

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)17-0068-03  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.17.016



# 高效液相色谱法测定玳玳花中柚皮苷和新橙皮苷含量

王启砚, 刘冬梅<sup>△</sup>, 宋 军

(湖北省荆门市食品药品质量检验所, 湖北 荆门 448000)

**摘要:**目的 建立测定玳玳花中柚皮苷和新橙皮苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Akasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 283 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 柚皮苷和新橙皮苷进样量分别在 0.110 4~1.766 4 μg、0.118 1~1.890 0 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好( $r=1.000 0$ ,  $n=5$ ); 平均加样回收率分别为 97.85% 和 98.43%, RSD 分别为 2.95% 和 2.22% ( $n=6$ )。13 批样品中柚皮苷和新橙皮苷含量分别为 2.85%~4.18% 和 8.05%~9.36% ( $n=3$ )。结论 所建立的方法操作简便、结果准确, 可用于玳玳花的质量控制。

**关键词:** 高效液相色谱法; 玳玳花; 柚皮苷; 新橙皮苷; 含量测定

## Content Determination of Naringin and Neohesperidin in Citri Aurantii Flos by HPLC

WANG Qiyuan, LIU Dongmei, SONG Jun

(Jingmen Institute for Food and Drug Control, Jingmen, Hubei, China 448000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatographic method for the content determination of naringin and neohesperidin in Citri Aurantii Flos. **Methods** The chromatographic column was Akasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (20:80, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of naringenin and neohesperidin were 0.110 4-1.766 4 μg and 0.118 1-1.890 0 μg ( $r=1.000 0$ ,  $n=5$ ), respectively. The average recoveries of naringenin and neohesperidin were 97.85% and 98.43% with RSDs of 2.95% and 2.22% ( $n=6$ ), respectively. The contents of naringin and neohesperidin in the 13 batches of samples were in the ranges of 2.85%-4.18% and 8.05%-9.36% ( $n=3$ ), respectively. **Conclusion** The established method is simple, reliable and accurate, which can be used for quality control of Citri Aurantii Flos.

**Key words:** HPLC; Citri Aurantii Flos; naringin; neohesperidin; content determination

玳玳花为芸香科植物玳玳花 *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. 的干燥花蕾, 主要分布于我国南部各地, 在浙江、江苏、广东等地均有栽培, 其具有理气宽胸、开胃止呕的功效, 主要用于胸膈胀闷、恶心呕吐、食欲不振等症<sup>[1]</sup>。玳玳花主要含有黄酮类、酚酸类、香豆

素、木脂素类、脂肪酸、萜类等成分<sup>[2-4]</sup>, 但质量标准中仅有挥发油<sup>[5-6]</sup>的总量测定方法, 文献<sup>[7-8]</sup>对玳玳花果实(枳实和枳壳)的质量研究较多。本研究中建立了测定玳玳花中柚皮苷和新橙皮苷含量的高效液相色谱(HPLC)法, 旨在为玳玳花的质量控制提供参考。现报

第一作者: 王启砚, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)984326560@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 刘冬梅, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品标准, (电子信箱)2751249315@qq.com。

[7] 孙晨瑜, 谢国勇, 秦民坚. 芒果苷在植物界的分布及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(4): 39-45.  
[8] 任晓光, 李东伟, 何彩梅, 等. 芒果苷药理活性研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(5): 860-863.  
[9] 李宏亮, 白敏, 宋秋艳, 等. 天然活性成分獐芽菜苦苷的研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(4): 66-70.  
[10] 张召华, 曾擎屹, 林鹏程, 等. RP-HPLC 法同时测定藏药肋柱花中三种成分的含量[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(3): 687-689.  
[11] 包同力嘎. HPLC 法测定不同产地肋柱花中獐芽菜苦苷的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(12): 2558-2559.  
[12] 王秀梅, 巴根那, 白明纲. HPLC 法测定肋柱花中木犀草素

的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2009, 15(1): 38-39.  
[13] 王振旺, 龙平, 张春红, 等. HPLC 测定肋柱花中獐芽菜苦苷和当药黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 106-108.  
[14] 李晨, 姜子涛, 李荣. 高效液相色谱-串联质谱联用技术鉴定樱桃叶中的黄酮成分[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 226-230.  
[15] 段超慧, 李洋, 杨桂娥, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术同时测定蒙药材叉分蓼中多种活性成分[J]. 中药材, 2018, 41(10): 2381-2385.

(收稿日期: 2022-07-16; 修回日期: 2023-04-06)

道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Dionex UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.01 mg / 0.1 mg);AS10200A 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz);TTL-10B 型纯水机(北京同泰联科技发展有限公司)。

### 1.2 试药

13 批玳玳花药材样品均购自 A 公司,批号分别为 210410-210412, 210506-210507, 210619-210620, 220622-210624, 20210616, 20210701, 20210621), 经湖北省荆门市食品药品质量检验所宋军副主任中药师鉴定均为正品;柚皮苷对照品(批号为 110722-201312, 含量为 100%), 新橙皮苷对照品(批号为 111857-201102, 含量为 99.6%), 均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验<sup>[9-12]</sup>

色谱柱: Akasil-C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液(20:80, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。理论板数按柚皮苷峰计应不低于 4 000。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

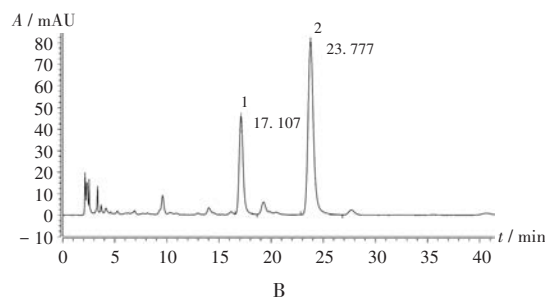
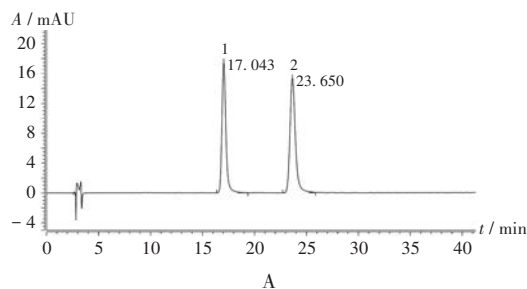
### 2.2 溶液制备

取玳玳花药材细粉 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

分别取柚皮苷和新橙皮苷对照品 11.04, 11.86 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得质量浓度分别为 220.8, 236.3 μg/mL 的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液各 2 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

线性关系考察: 精密量取 2.2 项下对照品贮备液 0.5, 1, 2, 4, 8 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以柚皮苷和新橙皮苷的进样量为横坐标( $X, \mu\text{g}$ )、峰面积积分为纵坐标( $Y$ )进行线性回归, 得回归方程  $Y_{\text{柚}} = 28.788X_{\text{柚}} + 0.0303$ 、 $Y_{\text{新}} = 32.452X_{\text{新}} + 0.0200$  ( $r = 1.0000, n = 5$ )。结果表明, 柚皮苷和新橙皮苷进样量分别在 0.1104~



1. 柚皮苷 2. 新橙皮苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Naringin 2. Neohesperidin

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

1.7664 μg、0.1181~1.8900 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验: 取 2.2 项下混合对照品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果柚皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.78% 和 1.02% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

中间精密度试验: 取样品 0.20 g, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别在 Dionex UltiMate 3000 型、SpectraSYSTEM P2000 型、Waters e2695 Separations Module 型高效液相色谱仪上测定, 记录峰面积。结果柚皮苷和新橙皮苷含量的 RSD 分别为 1.48% 和 1.52% ( $n = 3$ ), 表明不同仪器对精密度影响较小。

稳定性试验: 取同一供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果柚皮苷和新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.65% 和 0.30% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 210410)样品, 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果柚皮苷和新橙皮苷平均含量分别为 3.84% 和 8.29%, RSD 分别为 1.75% 和 2.00% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号为

表1 加样回收试验结果( $n=6$ )

Tab.1 Results of the recovery test ( $n=6$ )

取样量(g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷
0.1049	4.0313	8.6994	3.95	8.12	8.0260	16.8625	101.13	100.53				
0.0976	3.7508	8.0940	4.01	8.06	7.6852	16.0520	98.11	98.73				
0.1012	3.8891	8.3925	3.95	8.26	7.6542	16.2310	95.32	94.90	97.85	98.43	2.95	2.22
0.0956	3.6739	7.9281	4.14	8.15	7.8720	16.1243	101.40	100.57				
0.1019	3.9160	8.4506	3.82	8.06	7.5360	16.4208	94.76	98.89				
0.1072	4.1197	8.8901	3.98	8.21	7.9560	16.8521	96.39	96.98				

210410)0.10 g,精密称定,共6份,分别精密加入柚皮苷和新橙皮苷对照品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

耐用性试验:取同一供试品溶液适量,分别用 Akasil C<sub>18</sub>柱、AE. Licrum C<sub>18</sub>柱、Dionex C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果柚皮苷和新橙皮苷含量的RSD分别为1.60%和0.98%( $n=3$ ),表明柚皮苷和新橙皮苷在不同色谱柱上的测定结果无明显差异。

#### 2.4 样品含量测定

取13批玳玳花药材样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量,结果见表2。

表2 样品中柚皮苷和新橙皮苷含量测定结果(%, $n=3$ )

Tab.2 Results of the content determination of naringin and neohesperidin in samples (%, $n=3$ )

批号	柚皮苷	新橙皮苷	批号	柚皮苷	新橙皮苷
210410	3.84	8.29	210622	3.77	8.24
210411	3.93	8.83	210623	2.85	8.16
210412	4.18	9.18	210624	3.73	8.05
210506	3.33	8.30	20210616	3.73	8.84
210507	3.60	8.14	20210701	3.77	8.72
210619	3.00	8.10	20210621	3.79	8.76
210620	3.81	9.36			

### 3 讨论

柚皮苷和新橙皮苷均为黄酮类化合物,新橙皮苷可作用于胃肠道平滑肌<sup>[11]</sup>,两者含量作为HPLC法<sup>[9-12]</sup>检测玳玳花质量的指标具有一定意义。以甲醇<sup>[9,12]</sup>为提取溶剂,曾采用30,60,90,120 min的超声波提取和水浴回流提取,结果水浴回流提取90 min时指标成分的得率较高;柚皮苷和新橙皮苷紫外最大吸收波长为分别为283,284 nm,故检测波长选择283 nm;以乙腈-0.1%磷酸水溶液(20:80, V/V)<sup>[8]</sup>为流动相,能

很好地将柚皮苷和新橙皮苷同其他组分分离,与最邻近峰的分度度约为1.7(>1.5),符合2020年版《中国药典(四部)》通则0512的要求。故最终确定2.1项下色谱条件。

本研究中建立的HPLC法操作简便、结果准确,可用于玳玳花的质量控制。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药材:第一册[M]. 北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1992:30.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1492.
- [3] 饶颖,黄文平,冯育林,等. 基于UHPLC-QTOF-MS/MS法分析玳玳花化学成分[J]. 中成药,2019,41(6):1455-1462.
- [4] 严欢,左月明,张忠立. 基于UHPLC-Q-TOF-MS技术分析代代花中的化学成分[J]. 中药材,2018,41(10):2343-2348.
- [5] 陈丹,刘永静,曾绍炼,等. 代代叶、花与果挥发油中化学成分 GC-MS 分析[J]. 中国现代应用药学,2008,25(2):117-119.
- [6] 刘廷礼,邱琴,赵怡. 代代花挥发油化学成分的 GC-MS 研究[J]. 中国药物化学杂志,2000,10(4):270-272.
- [7] 连赞芳,陈丹,蔡伟炜,等. 一测多评法同时测定玳玳果黄酮滴丸中4个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(6):974-978.
- [8] 曾令军,陈丹,郑利,等. 玳玳黄酮提取物的质量标准研究[J]. 中国药品标准,2013,14(5):337-341.
- [9] 汪秀月. 高效液相色谱法测定骨刺片中柚皮苷含量[J]. 中国药业,2016,25(4):77-78.
- [10] 魏晓锐,徐金玲,刘艳霞. 高效液相色谱法同时测定胆胃平颗粒中柚皮苷和新橙皮苷含量[J]. 中国药业,2017,26(11):28-30.
- [11] 徐海燕,金艺,张红霞,等. HPLC同时测定胃力片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中成药,2010,32(8):1355-1357.
- [12] 杨武亮,杨世林,黄加龙,等. 高效液相色谱法测定不同产品枳壳中柚皮苷和新橙皮苷[J]. 中草药,2006,37(12):1888-1889.

(收稿日期:2022-08-03;修回日期:2023-02-28)