

HPLC 法同时测定常山胡柚花中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的量

宋剑锋¹, 冯敬骞², 胡建华³, 傅厚道^{4*}

1. 衢州市食品药品检验所, 浙江 衢州 324000

2. 衢州职业技术学院, 浙江 衢州 324000

3. 衢州南孔中药有限公司, 浙江 衢州 324000

4. 浙江省宁波市第二医院, 浙江 宁波 315010

摘要: **目的** 建立同时测定常山胡柚花 *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang 中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的 RP-HPLC 方法。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸 (15:85); 检测波长为 284 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 40 ℃; 峰面积外标法定量。**结果** 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷分别在 28.45~284.5、18.09~180.93、85.86~858.55 ng 内呈良好的线性关系, 回归方程分别为 $Y=1\,725.2X+6.383\,3$, $r=0.999\,8$; $Y=1\,764.6X+0.416\,7$, $r=0.999\,8$; $Y=1\,914.7X+15.892$, $r=0.999\,6$ 。平均回收率分别为 98.83%、99.05%、98.83%; RSD 分别为 2.12%、2.30%、1.85%; 并按该方法建立的方法, 测得样品中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量。**结论** 本方法简便、快速、准确、可靠, 可为常山胡柚花的质量控制提供参考。

关键词: 常山胡柚花; HPLC 法; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0854-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.022

Simultaneous determination for contents of naringin, hesperidin, and neohesperidin in flower of *Citrus changshan-huyou* by RP-HPLC

SONG Jian-feng¹, FENG Jing-qian², HU Jian-hua³, FU Hou-dao⁴

1. Quzhou Institute for Drug Control, Quzhou 324000, China

2. Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China

3. Quzhou Nankong Chinese Medicine Co., Ltd., Quzhou 324000, China

4. Ningbo No. 2 Hospital, Ningbo 315010, China

Abstract: **Objective** To establish a method for the simultaneous determination for the contents of naringin, hesperidin, and neohesperidin in the flower of *Citrus changshan-huyou* by RP-HPLC. **Methods** The HPLC method was adopted with Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column; The mobile phase was acetonitrile-0.2% aqueous phosphoric acid (15:85) with the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 284 nm and column temperature was 40 ℃; The peak areas were quantified by external standard method. **Results** According to the method, naringin linear was within 28.45—284.5 ng, the regression equation was $Y=1\,725.2X+6.383\,3$ ($r=0.999\,8$), and the average recovery rate was 98.83%. Hesperidin linear was within 18.09—180.93 ng, $Y=1\,764.6X+0.416\,7$ ($r=0.999\,8$) with the average recovery rate of 99.05%. Neohesperidin linear was within 85.86—858.55 ng, $Y=1\,914.7X+15.892$ ($r=0.999\,6$), and the average recovery rate was 98.83%. According to the established method, the contents of sample, naringin, hesperidin, and neohesperidin were respectively determined. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, and reliable, which provides the reference for the quality control for the flower of *C. changshan-huyou*, and is suitable for the content determination.

Key words: flower of *Citrus changshan-huyou*; HPLC method; naringin; hesperidin; neohesperidin

常山胡柚 *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang 乡胡家村为常山胡柚的起源地, 资源丰富, 产量高, 主产于浙江衢州, 以常山为重点产区, 常山县青石花期 4 月下旬至 5 月上旬^[1-2]。常山胡柚花为常山胡

收稿日期: 2014-01-27

基金项目: 浙江省衢州市科技计划项目 (20061082)

作者简介: 宋剑锋 (1974—), 男, 浙江衢州人, 副主任中药师, 主要从事中药材 (饮片) 及中成药质量研究。

Tel: (0570)8587269 E-mail: sjfzq@163.com

*通信作者 傅厚道 (1973—), 男, 浙江宁波人, 副主任中药师。Tel: 13616883400 E-mail: 13616883400@163.com

柚的花蕾，在花期大多胡柚花蕾最后都会掉落或被疏枝整理，当地农户进行采集、烘制和晒干后，加工生产为花茶。赵雪梅等^[3-6]对常山胡柚皮中的挥发性成分、黄酮类成分、相关药效做了大量的研究工作，证实胡柚皮挥发油具有较好的抗菌活性，其中对真菌的抑制效果好于对细菌的抑制效果，胡柚皮中黄酮类成分主要为柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷，具有免疫调节等生物活性。

常山胡柚的花朵和花蕾目前主要作为花茶使用，其中主要为黄酮类成分，指标成分是柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷，至今仍未见有常山胡柚花的相关文献报道，本实验采用高效液相色谱法同时测定其中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的量，以期利用常山胡柚花的资源提供参考，建立常山胡柚花的质量控制方法。经方法学研究，证明本法结果准确，操作方便，可用于常山胡柚花的质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪，自动进样系统；日本岛津 UV—2450 紫外分光光度计；梅特勒 XP205 型电子天平；KQ—250B 型超声波清洗器（功率：250 W，频率：40 kHz，昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂

柚皮苷（110722-201111）、橙皮苷（110721-201014）、新橙皮苷（111857-201102）对照品均由中国食品药品生物制品检定研究院提供，均供测定用。乙腈为色谱纯；磷酸分析纯；水为纯化水；常山胡柚花（批号及采集地分别为 20130422 于常山县、20130429 于衢江区、20130502 于常山县、20130505 于柯城区），经衢州食品药品检验所宋剑锋副主任中药师鉴定为常山胡柚 *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang 的花蕾。

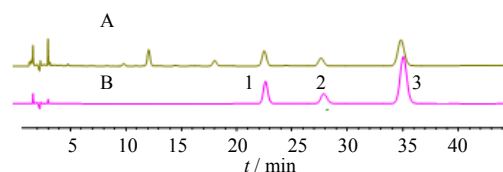
2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适应性试验

安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.2%磷酸溶液（15：85）；检测波长为 284 nm；体积流量 1.0 mL/min，柱温：40 ℃；进样量：5 μL；峰面积外标法定量。理论塔板数按柚皮苷峰计算不低于 4 000，分离度均大于 1.5，对称因子 0.95~1.05。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适



1-柚皮苷 2-橙皮苷 3-新橙皮苷

1-naringin 2-hesperidin 3-neohesperidin

图 1 样品 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of samples (A) and mixed reference substances (B)

量，用甲醇超声溶解并稀释至刻度，摇匀，即制得含柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷约分别为 30、20、80 μg/mL 的对照品混合溶液。

2.3 供试品溶液制备

取常山胡柚花适量，60 ℃烘干，粉碎，过三号筛，取约 0.2 g，精密称定，置索氏提取器中，加甲醇 150 mL，加热回流至提取液无色，放冷，滤过，滤液置 200 mL 量瓶中，用少量甲醇分数次洗涤容器，洗液滤入同一量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，用微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备

分别精密吸取对照品溶液 1.0、2.0、4.0、5.0、8.0、10 μL，注入高效液相色谱仪，按“2.1”项条件测定，记录峰面积，以峰面积为纵坐标（Y）、对照品溶液中成分的质量为横坐标（X）进行线性回归，得柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的回归方程，分别为 $Y=1\,725.2X+6.383\,3$ ， $r=0.999\,8$ ； $Y=1\,764.6X+0.416\,7$ ， $r=0.999\,8$ ； $Y=1\,914.7X+15.892$ ， $r=0.999\,6$ 。结果表明柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷分别在 28.45~284.5、18.09~180.93、85.86~858.55 ng 内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

按“2.1”项条件，取“2.2”项条件下的对照品溶液混合溶液，进样 5 μL，重复进样 6 次，结果柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的峰面积的 RSD 分别为 0.36%、0.23%、0.21%。

2.6 重复性试验

取同一批号样品 6 份（批号 20130502），按照“2.3”项下操作，测定结果柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷平均质量分数分别为 2.18%、1.41%、5.25%，RSD 分别为 1.24%、2.50%、1.26%。

2.7 稳定性试验

取同一批号（批号 20130502）供试溶液，在室

温下放置,分别按“2.1”项色谱条件在0、4、8、15、24、48 h时测定,共测定6次,结果柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.90%、1.54%、0.98%。

2.8 回收率试验

采用加样回收试验方法,取已测定的胡柚花样品(批号20130502)粉末6份,每份约0.1 g,精密称定,分别精密吸取10 mL对照品溶液(柚皮苷0.222 6 mg/mL、橙皮苷0.141 8 mg/mL、新橙皮苷0.628 5 mg/mL),加入到样品中,照“2.3”项下操作,分别按上述色谱条件测定,计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷加样回收率分别为98.83%、99.05%、98.83%,RSD分别为2.12%、2.30%、1.85%。

2.9 样品测定

取样品适量,按照“2.3”项下操作制备得样品溶液,按“2.1”项色谱条件进样5 μ L,记录柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的峰面积,按外标法计算,测得柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量,计算结果见表1。

表1 样品测定结果

Table 1 Determination of samples

批号	采集地	柚皮苷 / %	橙皮苷 / %	新橙皮苷 / %
20130422	常山	1.58	1.02	4.30
20130429	衢江	1.38	0.55	2.57
20130502	常山	2.18	1.41	5.25
20130505	柯城	1.55	1.23	4.84

由测定结果可见,在相近时间采集的常山胡柚花样品,采自常山的所含指标成分的量相对较高,常山的常山胡柚花样品的花蕾较小,质量分数与采自柯城的相近,但较采自衢江的样品高。由此,采自常山的胡柚花在其量上有一定的地缘优势。但由于受样品数限制,有待通过增加采集样品进一步确证。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液,用HPLC-DAD检测,在波长200~400 nm扫描,经DAD光谱分析,结果均在284 nm波长处有最大吸收,故以284 nm作为检测波长。

3.2 样品的提取

索氏提取法提取完全、容易控制,所以使用此法制备样品,以后可以考察甲醇超声提取法、甲醇

回流提取法与该法的综合效率比较,以期择优选用。

3.3 柱温的选择

柱温虽对组分的分离度影响较小,但对样品组分的保留时间影响较大,经反复实验,柱温在40 $^{\circ}$ C时既可加快分析速度,又可保持出峰时间的恒定,从而保证试验结果的重复性和准确性。

3.4 流动相的确定

比较了甲醇-水(25:75)、乙腈-4%醋酸(12:88)、乙腈-0.2%磷酸(15:85)3种流动相,结果以乙腈-0.2%磷酸(15:85)分离效果最好,故选用此作为流动相。

3.5 色谱柱的选择

考察了不同色谱柱,包括安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、岛津 VP-ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、依利特 Hypersil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),结果表明安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)能够获得较好的峰形和分离度。

常山胡柚花在空气中容易吸潮,不易粉碎,且对结果影响较大,考虑到其中还含有挥发油等挥发性成分,故样品采用60 $^{\circ}$ C烘干,粉碎,过3号筛等处理。取样及量计算均以此干燥品为准。另外,不同采集地、不同花期的常山胡柚花中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量是否有较大差别,常山胡柚的花、果皮及果汁中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的量是否有较大差别,还有待于进一步考察,这对常山胡柚的进一步开发都具有较大的现实意义。本方法简便、快速、准确、可靠,可为常山胡柚花的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 韦直,何业祺.浙江植物志[M].杭州:浙江科学技术出版社,1993.
- [2] 衢州市志编纂委员会编.衢州市志[M].杭州:浙江人民出版社,1994.
- [3] 赵雪梅,叶兴乾,朱大元,等.常山胡柚皮的化学成分分离鉴定[J].北京大学学报:医学版,2009,41(5):575-577.
- [4] 赵雪梅,叶兴乾,朱大元,等.常山胡柚皮中的一个新化合物[J].药学报,2008,43(12):1208-1210.
- [5] 赵雪梅,叶兴乾,朱大元,等.常山胡柚皮中挥发性成分分析[J].果树学报,2007,24(1):109-112.
- [6] 赵雪梅,叶兴乾,席岍芳,等.胡柚皮中黄酮类化合物提取及抗氧化性研究[J].果树学报,2003,20(4):261-265.