

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4722—2025

桂花中苯乙醇苷类化合物的测定
高效液相色谱法

Determination of phenylethanoid glycosides in *Osmanthus Fragrans* Lour.
flowers by high performance liquid chromatography

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专家委员会归口。

本文件起草单位：浙江大学、中国计量大学、湖南农业大学、浙江中医药大学、江苏省农业科学院、黄山华绿园生物科技有限公司、杭州花凝香生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陆柏益、朱宇航、黄伟素、周菲、李脉泉、夏道宗、焦琳舒、陈克、张大勇。



桂花中苯乙醇苷类化合物的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了桂花中苯乙醇苷类化合物的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于桂花中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、红景天苷和连翘酯苷 A 含量的测定。

毛蕊花糖苷的标准曲线线性范围为 $1.0\ \mu\text{g/mL}$ ~ $200\ \mu\text{g/mL}$, 异毛蕊花糖苷、红景天苷和连翘酯苷 A 的标准曲线线性范围为 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ ~ $200\ \mu\text{g/mL}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

桂花中的苯乙醇苷类化合物, 经 80% 乙醇水溶液超声提取, 用高效液相色谱仪经紫外检测器或二极管阵列检测器在 285 nm 波长下检测, 以色谱峰的保留时间定性, 外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH)。

5.1.2 乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)。

5.1.3 乙酸(CH_3COOH)。

5.1.4 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1% 乙酸水溶液: 准确吸取 1.0 mL 乙酸(5.1.3), 加水定容至 1 000 mL, 混匀。

5.2.2 50% 甲醇水溶液: 准确吸取 50 mL 甲醇(5.1.1), 加水定容至 100 mL, 混匀。

5.2.3 80% 乙醇水溶液: 准确吸取 80 mL 乙醇(5.1.2), 加水定容至 100 mL, 混匀。

5.3 标准品

5.3.1 毛蕊花糖苷(Acteoside, $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$, CAS 号: 61276-17-3): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 异毛蕊花糖苷(Isoacteoside, $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$, CAS 号: 61303-13-7): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 红景天苷(Salidroside, $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_7$, CAS 号: 10338-51-9): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.4 连翘酯苷 A (Forsythoside A, $C_{29}H_{36}O_{15}$, CAS 号: 79916-77-1): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液 (10 mg/mL): 分别准确称取苯乙醇苷标准品 50 mg (精确至 0.1 mg), 用 50% 甲醇水溶液 (5.2.2) 溶解并定容至 5 mL 棕色容量瓶中, 配制成浓度为 10 mg/mL 标准储备溶液, 于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 2 个月。

5.4.2 标准中间溶液 (1 mg/mL): 分别移取 1 mL 标准储备溶液 (5.4.1) 于 4 个 10 mL 棕色容量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液 (5.2.2) 定容至刻度, 配制成浓度为 1 mg/mL 标准中间溶液, 现用现配。

5.4.3 混合标准工作溶液: 分别移取 0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL 的标准中间溶液 (5.4.2) 混合于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液 (5.2.2) 定容至刻度, 配制成浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合标准工作溶液, 现用现配。

5.5 材料

微孔滤膜: 0.22 μm 水系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.000 1 g。

6.3 分析研磨机。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 离心机: 离心力不小于 3 120 g, 带有 15 mL 转子。

6.6 超声波清洗器: 功率大于或等于 900 W。

7 试样制备与保存

取 10 g 新鲜桂花或干桂花样品, 液氮冷冻, 用研磨机粉碎 30 s 至颗粒均匀, 过 100 目筛, 放入分装容器中, 立即检测或用封口膜密封处理, 放于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用, 有效期 2 个月。

8 测定步骤

8.1 提取

称取 0.1 g 试样 (精确到 0.000 1 g) 于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 80% 乙醇水溶液 (5.2.3), 涡旋振荡 10 s, 室温下超声提取 30 min, 3 120 g 离心力或以上离心 10 min, 取上清液; 往残渣中再次加入 10 mL 80% 乙醇水溶液 (5.2.3), 涡旋振荡 10 s, 按上述条件离心, 合并两次提取液于 25 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀, 取适量清液经 0.22 μm 微孔滤膜 (5.5) 过滤后待检测。

8.2 测定

8.2.1 色谱参考条件

液相色谱参考条件:

- 色谱柱: C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 反向色谱柱或性能相当者;
- 检测波长: 285 nm;
- 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样量: 10 μL ;
- 流速: 1.0 mL/min;
- 流动相: A 为 0.1% 乙酸水溶液 (5.2.1), B 为乙腈 (5.1.4), 流动相梯度条件见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱参考条件

时间 min	A %	B %
0	90	10
10	80	20
15	80	20
30	75	25
31	20	80
32	20	80
33	90	10
35	90	10

8.2.2 校准曲线制作

取适量 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 的毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、红景天苷和连翘酯苷 A 的系列混合标准工作溶液(5.4.3),用高效液相色谱仪测定,以待测物质色谱峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,相关系数 R^2 应不低于 0.999 0。

8.2.3 定性

用高效液相色谱仪测定样品溶液和标准溶液。在相同实验条件下,苯乙醇苷类化合物在样品中的保留时间与在标准工作溶液中的保留时间一致,相对偏差在±2.5%以内。

8.2.4 定量测定

在相同的高效液相色谱条件下,对样品溶液和标准工作溶液进行测定,以标准工作溶液浓度为横坐标,苯乙醇苷类化合物峰面积为纵坐标进行外标法定量。试样溶液中苯乙醇苷类化合物的响应值应在仪器测定的线性范围内。4 种苯乙醇苷类化合物标准工作溶液的液相色谱图见附录 A 的图 A.1。

9 结果计算与表述

试样中苯乙醇苷类化合物含量以质量分数 ω_i 表示,按公式(1)进行计算。

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω_i —— 苯乙醇苷类化合物在样品中质量分数的数值,单位为微克每克(μg/g);
- ρ_i —— 由标准曲线求得试样溶液中苯乙醇苷类化合物浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V —— 样品溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g);
- f —— 稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

10 精密度

10.1 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立的测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10.2 再现性

在再现性条件下获得的 2 次独立的测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

11 检出限与定量限

当样品取样量为 0.1 g、定容体积为 25 mL 时,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 A 的检出限均

为 $0.3\ \mu\text{g/g}$,红景天苷的检出限为 $3.0\ \mu\text{g/g}$ 。

当样品取样量为 $0.1\ \text{g}$ 、定容体积为 $25\ \text{mL}$ 时,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 A 的定量限均为 $1.5\ \mu\text{g/g}$,红景天苷的定量限为 $12\ \mu\text{g/g}$ 。

附 录 A
(资料性)

4 种苯乙醇苷类化合物标准工作溶液的液相色谱图

4 种苯乙醇苷类化合物标准工作溶液的液相色谱图见图 A. 1。

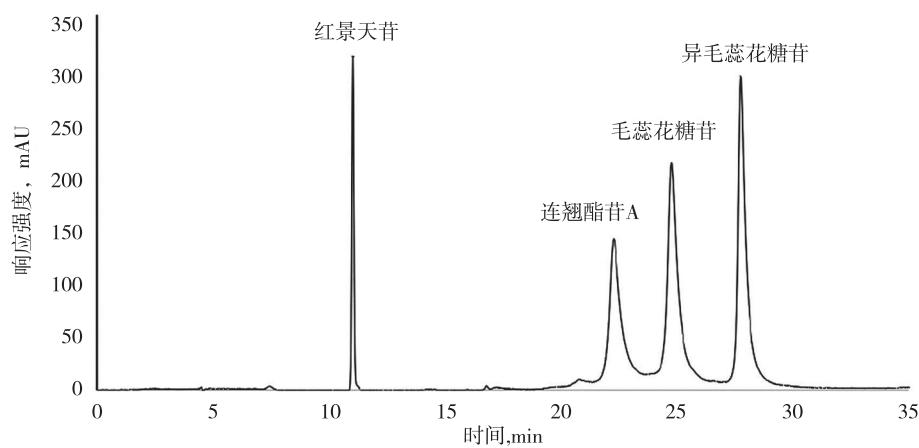


图 A. 1 4 种苯乙醇苷类化合物标准工作溶液 (200 µg/mL) 的液相色谱图