

团体标准《广西橘红珠》 (征求意见稿) 编制说明

一、项目来源

根据《广西中药材产业协会关于印发 2023 年《广西中药材产业团体标准立项项目申报指南》的通知》（桂中协〔2023〕009 号）文件精神，由广西壮族自治区中医药研究院提出，广西中药质量标准研究重点实验室，中山大学-广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心共同起草的团体标准《广西橘红珠》（项目编号：广西中药材产业协会 2023 年第一批团体标准制定项目 7 号）。

二、项目背景及目的意义

化橘红是中国特有的国际性珍稀名贵药材，有“南方人参”美誉，其药材标准收载于《中国药典》2020 年版，为芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* Tomentosa 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果皮，味辛、苦，性温，具有理气宽中，燥湿化痰功效，用于咳嗽痰多，食积伤酒，呕恶痞闷。

化州柚是柚而不是橘，是借助了宋、明以来橘红的声誉。相关的文字记载，始见于 1675 年《广东通志》，在高州府药之属类别下有如下描述：“粤中虽称沃壤，然风土浅薄赋质柔脆，人物同之，至于灵奇珍异，物亦独擅其美者，若…化州之橘红，增城之荔枝，琼南之香犀、象贝”。《广东省化州志》（1827 年）卷十一引《橘红辨》：“化州所产橘红，医家以之利气化痰，功峻于他药。（果实）有红白瓢两种，明明柚也，无毫发异，而混呼之曰橘，且饰其色曰红。夫果有利于用，即存其名以著其实可也。奚必橘之贵而柚之贱哉。或曰柚诚柚也，何以他产不利于用，予曰此正所谓道地也。”清光绪十五年（1890 年）《广

东省高州府志》记载：“若夫化州之橘非橘也，柚也，天下之人皆橘之，吾亦不得不橘之。”

橘红珠由化州柚 *Citrus grandis* Tomentosa 的干燥幼果加工制成，曾收载于《广西中药志》（1963 年）第二册，用于“止渴，助消化，除胸中气滞。治食积，症瘕”；后亦收载于《中药大辞典》、《中华本草》。化州柚早期作为药用时，其炮制方法也效仿橘红“去白取皮”，使用外果皮入药，即化橘红药材。而由于化州柚皮厚肉酸，不中食，在实际使用中，逐渐演变为使用未成熟幼果入药即橘红珠。橘红珠中大部分都是中果皮，其中柚皮苷、野漆树苷等活性成分含量很高，同样也有祛痰止咳的药理作用；将其除去反而不利于资源的合理利用。研究发现橘红珠有效成分含量更高，药效更好，经过近 50 年的市场流通，已成为化州柚的主流加工产品，近年来围绕橘红珠的药、食、茶等产品日益增多。建立科学、准确的广西橘红珠质量控制标准，对于保障广西橘红产品的品质，规范广西橘红的种植、采收、加工，促进广西柚产业健康可持续发展，打造广西中药材、大健康产业强省名片，有着重要的意义。

近年来自治区政府的对种植化橘红的支持力度不断增强，调动了农户的积极性，广西的化州柚的种植规模不断扩大，按优质高产品种亩产 2000~2500 公斤，近年市场价格 20~30 元/公斤计算，橘红平均亩产值高达 4 万元以上，经济效益相当可观，产品供不应求，因此广西橘红产业迅速发展，目前初步统计种植面积已达 4.3 万亩。有学者从广东化州、广西南宁、玉林、百色等地的产区环境调查着手，在对各产区的水分、光照、温度、土壤条件分析的基础上，研究分析了广西化橘红产区种植发展的现状，发现广西化州柚种植发展过程中面临着种植适应区划分不明确，盲目引种扩种；受气候条件影响较大，且基础设施落后；各产区土壤环境差异明显，产品质量参差不齐；品种良莠不齐，橘红珠品质得不到保证；其原因归结为专业型人才缺乏，种植规模小，土地集约化程

度低；缺乏有效质量控制体系政策落实不到位，产品得不到保障等问题。随着橘红珠及其系列产品的多元化开发及其独特功效的日益凸显，为保证人民群众的用药安全，促进广西化橘红产业的健康发展，有必要建立一套科学、准确评价橘红珠产品的质量标准。

三、项目编制过程

（一）成立标准编制工作组

团体标准《广西橘红珠》项目任务下达后，成立了标准编制工作组，制定了标准编写方案，明确任务职责，确定工作技术路线，开展标准研制工作，具体标准编制工作由广西中药质量标准研究重点实验室，中山大学-广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心相关人员配合。

广西橘红珠标准主要起草人员

研 制 人 员	姓 名	职务/职 称	现从事 专 业	所在单位
项 目 负责人	袁健童	助理研 究院	中药民族药质 量标准研究	广西中药质量标准 研究重点实验室
主 要 参 加 人 员	邱宏聪	主任药 师	药物分析	广西壮族自治区中 医药研究院
	刘布鸣	研究员	中药质量标准 研究	广西中药质量标准 研究重点实验室
	苏薇薇	二级教 授	药学	中山大学广东省中 药上市后质量与药 效再评价工程技术

				中心
	彭维	主任药师	药物分析	中山大学广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术中心
	柴玲	副研究员	中药学	广西中药质量标准研究重点实验室
	陈明生	助理研究员	药物分析	广西中药质量标准研究重点实验室
	李泮霖	讲师	药学	中山大学广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术中心
	谢诗婷	实验员	药学	中山大学广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术中心
	黄艳	副研究员	中药化学	广西中药质量标准研究重点实验室

（二）收集整理文献资料

标准编制工作组收集了相关文献资料。主要有：

化橘红胎（化橘红珠），《广东省中药材标准单页标准》

中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].科学出版社,2004,43
(2):189.

国家药典委员会. 中华人民共和国药典（2020 版, 一部） [M]. 北京：中
国医药科技出版社, 2015: 76-77.

清•金光祖.广东通志（30 卷）.康熙十四年（1675 年）

清•黄锡宝.化州志（11 卷首 1 卷）.道光十四年（1827 年）

清•杨霁. 高州府志（54 卷）.光绪十五年（1890 年）

李沛波, 苏畅, 毕福均, 王永刚, 彭维, 苏薇薇. 化州柚提取物止咳作用及
其

机制的研究[J]. 中草药, 2008, 39（2）:247-250.

Zhang Li-jian, Cai Chun, Wang Xiu-ji, Comparison of volatile oil components in
tomentose pummel fruit, red tangerine peel and pummel peel. Journal of
Guangdong medical college, 2006, 24（4）: 344-345.

Sen Gao, Pei-Bo Li, Hong-Liang Yang, Si-Qi Fang, Wei-Wei Su, Antitussive
effect of naringin on experimentally induced cough in Guinea pigs, Planta Med.
2011,

77（1）, 16-21.

Bao-Qin Lin, Pei-Bo Li, Yong-Gang Wang, Wei Peng, Zhong Wu, Wei-Wei Su,

Hui Ji, The expectorant activity of naringenin, Pulm. Pharmacol.Ther. 2008, 21

(2) ,

259-263.

Yi-Chu Nie, Hao Wu, Pei-Bo Li, Li-Ming Xie, Yu-Long Luo, Jian-Gang Shen,

Wei-Wei Su, Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells

by

suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and

IKKs-IkappaB-NF-kappaB signaling pathways, Eur. J. Pharmacol., 690 (1-3) ,

207-213, 2012.

Syu-ichi Kanno, Ai Shouji, Keiko Asou, et al. Effects of Naringin on Hydrogen

Peroxide-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in P388 Cells. Journal of

Pharmacological Sciences, 2003,92: 166 – 170.

Omayma Eldahshan, Samar Azab. Anti-inflammatory Effect of

Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin-Induced Rat Oedema

Model. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (08) ; 2012: 74-79.

Nabila Zaabat, Anne-Emmanuelle Hay, Serge Michalet,et al. Antioxidant and

antigenotoxic properties of compounds isolated from Marrubium deserti de

Noé. Food

and Chemical Toxicology 49 (2011) 3328 – 3335.

Rosa Martha Perez Gutierrez, Irasema Anaya sosa, Carlos Hoyo Vadillo, and

Teresa Cruz Victoria. Effect of flavonoids from Prosthechea michuacana on carbon

tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. Pharmaceutical Biology, 2011, 49

(11):1121-1127.

李泮霖, 李锋, 余剑军, 等. 化州柚幼果生长过程中柚皮苷含量的动态变化研究[J]. 中药材, 2012, 35(4):538-539.

(三) 研讨确定标准主体内容

标准编制工作组在对收集的资料进行整理研究之后, 2023 年 5 月到 6 月, 标准编制工作组召开了标准编制会议, 对标准的整体框架结构进行了研究, 并对标准的关键性内容进行了初步探讨。经过研究, 标准的主体内容确定为范围、规范性引用文件、术语和定义、要求、检验方法、检验规则、标志、包装、运输和贮存。

(四) 调研、形成文本草案、征求意见稿

2023 年 6 月至 7 月, 标准起草工作小组进行了广泛实地调研工作, 查阅了大量的国内外文献资料, 对广西橘红珠的前人研究成果进行系统总结, 形成了标准的基本构架, 对主要内容进行了讨论并对项目的工作进行了部署和安排。

2023 年 7 月至 9 月, 在前期工作的基础之上, 通过理清逻辑脉络, 整合已有的参考资料中有关广西橘红珠技术要求, 并结合检验实际要求的基础上, 按照简化、统一等原则编制完成团体标准《广西橘红珠》(草案)。

2023 年 9 月至 10 月, 深入区内橘红珠种植、加工及检验的有代表性的村镇、单位、企业针对广西橘红珠技术情况进行分组实地调研学习。通过实地调研,

掌握各地方产品的具体要求。并实际征求意见，通过收集反馈了大量意见，标准编制工作组多次召开会议，对标准草案进行了反复修改和研究讨论。最终形成了团体标准《广西橘红珠》（征求意见稿）和（征求意见稿）编制说明。

四、标准主要章节内容及确定依据

（一）标准涉及的技术原理及依据

采用现代分析技术对广西橘红珠的感官指标、理化指标进行分析测定，对广西橘红珠进行质量控制是本标准制定的出发点。

薄层色谱鉴别：按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0502 的规定测定。

水分的测定：按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0832 中第二法的规定测定。

总灰分的测定：按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 2302 的规定测定。

浸出物的测定：按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 2201 项水溶性浸出物测定法中的热浸法规定测定，以水作溶剂。

柚皮苷的含量测定：按照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0512 的规定测定。

（二）标准涉及技术的具体实施方案

按照广西壮族自治区市场监督管理局关于标准编制工作的要求，标准起草小组成员于项目实施期间，深入广西陆川、广西南宁、广西百色、广东化州等地区开展资源调查、样品采集。

橘红珠采集于广西陆川及广东化州等地，总计 10 批，经广西中医药研究院饶伟源主任药师鉴定为芸香科植物化州柚（*Citrus grandis* ‘Tomentosa’）未成

熟干燥幼果，批号如表 1 所示。

表 1 不同产地橘红珠的样品来源信息

编号	产地	采收时间
IP-1	广西陆川	2023/02
IP-2	广西陆川	2023/02
IP-3	广西陆川	2023/04
IP-4	广西陆川	2023/04
IP-5	广西陆川	2023/07
IP-6	广西南宁	2023/04
IP-7	广西南宁	2023/07/
IP-8	广东百色	2023/02
IP-9	广西百色	202306
IP-10	广东化州	2023/06
IP-11	广东化州	2023/08

1.显微鉴别

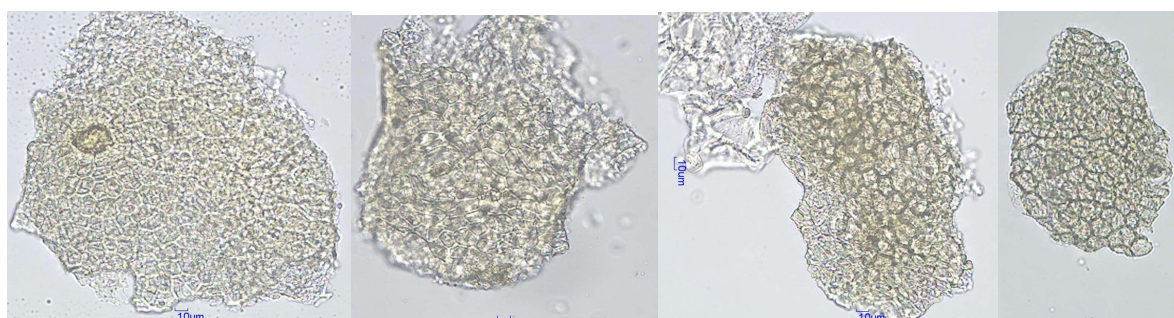
参照中国药典方法。

供试品粉碎，过二号筛，混合均匀。取适量于载玻片上，滴数滴水合氯醛溶液将粉末浸润后，酒精灯加热，再滴加适量稀甘油溶液，充分混合，盖上盖玻片，置于显微镜下观察。代表性显微特征见图 1。样品粉末黄棕色至棕褐色，中果皮薄壁细胞形状不规则，壁不均匀增厚，有的作连珠状或在角隅处特厚。果皮表皮细胞表面观多角形、类方形或长方形，垂周壁增厚，气孔类圆形，直径 18~31 μm ，副卫细胞 5~7 个。可见碎断的非腺毛，碎段细胞多至十数个，最宽处直径约 33 μm ，胞腔内含淡黄色或棕色颗粒状物。草酸钙方晶成片或成行存在于中果皮薄壁细胞中，呈多面形、菱形、棱柱形、长方形或形状不规

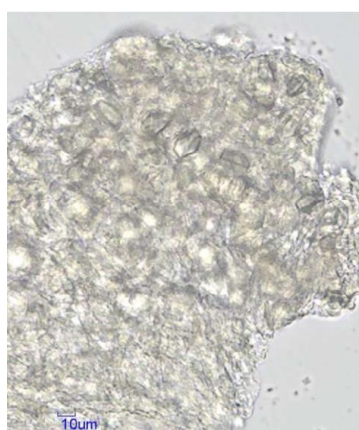
则，直径 $1\sim 32\mu\text{m}$ ，长 $5\sim 40\mu\text{m}$ 。导管为螺纹导管和网纹导管。偶见石细胞及纤维。



1 导管



2 表皮细胞



3 薄壁细胞和草酸钙方晶



4 非腺毛

图1 广西橘红珠的显微鉴别

2. 薄层色谱鉴别

2.1 仪器

卡玛薄层色谱自动点样仪 (ATS 4)、自动展开仪 (ADC 2)、紫外成像系统 (CAMAG, Muttenz, Switzerland)。

2.2 试剂

乙酸乙酯, 丙酮, 冰醋酸, 甲醇, 乙醇, 均为分析纯。

柚皮苷对照品 (110722-200610, 中国食品药品检定研究院), 橙皮内酯水合物对照品 (BBP00486, 云南西力生物技术股份有限公司)。

2.3 供试品制备方法考察

(1) 提取溶剂的考察

配制含柚皮苷对照品 0.98 mg/mL, 橙皮内酯水合物对照品 0.19 mg/mL 的混合溶液。

对不同提取溶剂进行考察: 甲醇、甲醇水溶液 (7: 3, v/v)、乙醇、乙醇水溶液 (7: 3, v/v)。供试品制备步骤如下:

取第 5 批样品, 粉碎过二号筛, 取 0.5 g 粉末于锥形瓶中, 分别加入 5 mL 上述不同提取溶剂, 超声 15 分钟, 离心, 取上清液作为供试品溶液。各取 2 μ L 供试品溶液, 点样于高效薄层硅胶 G 板。展开剂根据 2015 版中国药典化橘红项, 选择乙酸乙酯, 丙酮, 乙酸和水 (8:4:0.3:1), 点好样的薄层板于饱和展开缸中展开至 8cm。取出薄层板, 干燥, 喷适量 5% 三氯化铝乙醇溶液显色剂后, 于 105° C 加热一分钟, 并在 365nm 紫外波长下观察。结果见图 3。

结果表明，提取溶剂对供试品溶液薄层展开效果并无明显影响，最终选用甲醇作为提取溶剂。

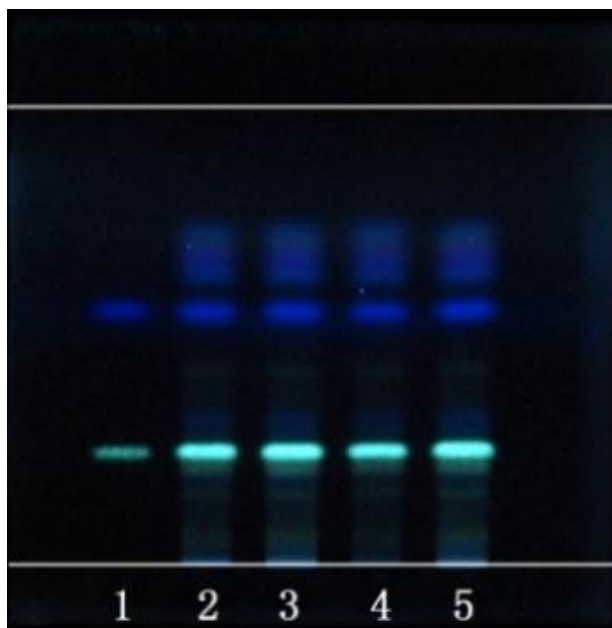


图 2 提取溶剂的考察

1-对照品, 2-甲醇, 3- 70%甲醇, 4- 乙醇, 5-70%乙醇

(HPTLC Silica G (Merc k) 10×10 cm) (21° C, 45%)

(柚皮苷 R F = 0.24, 橙皮内酯水合物 R F = 0.55)

(2) 提取溶剂体积的考察

取 0.5 g 样品粉末于锥形瓶中，分别加入 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL 甲醇，超声 15 分钟，离心，取上清液作为供试品溶液。各取 2 μL 供试品溶液点样，同11法展开、显色。结果见图 3。

结果表明，随着提取体积的降低，柚皮苷及橙皮内酯水合物条带清晰度增加。因此选用 5 mL 提取体积进行后续实验。

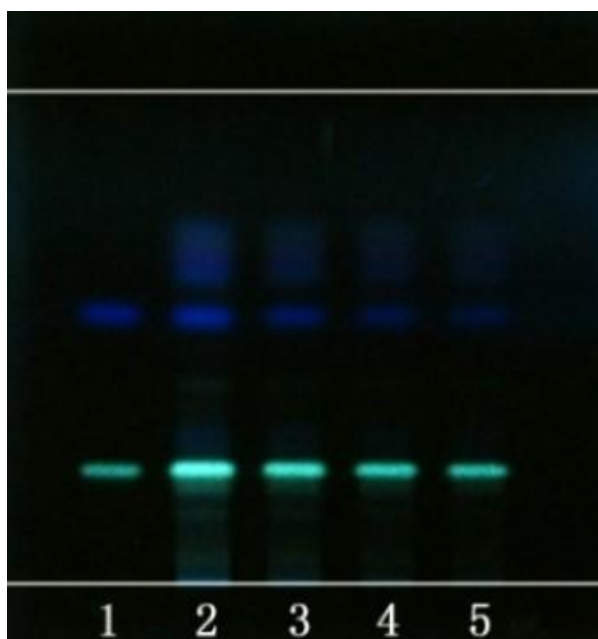


图 3 提取溶剂体积的考察

1-对照品, 2- 5 mL, 3- 10 mL, 4-15 mL, 5-20 mL

(HPTLC Silica G (Merck) 10×10 cm) (22° C, 45%)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.54, 柚皮苷 R F = 0.22)

(3) 提取时间的考察

取 0.5 g 样品粉末于锥形瓶中，加入 5 mL 甲醇，分别超声 5min、15 min、25 min 和 35 min，离心，取上清液作为供试品溶液。各取 2 μL 供试品溶液点样，同法展开、显色。结果见图4。

结果表明，超声时间对提取效果无明显影响。选择 15 分钟作为提取时间。

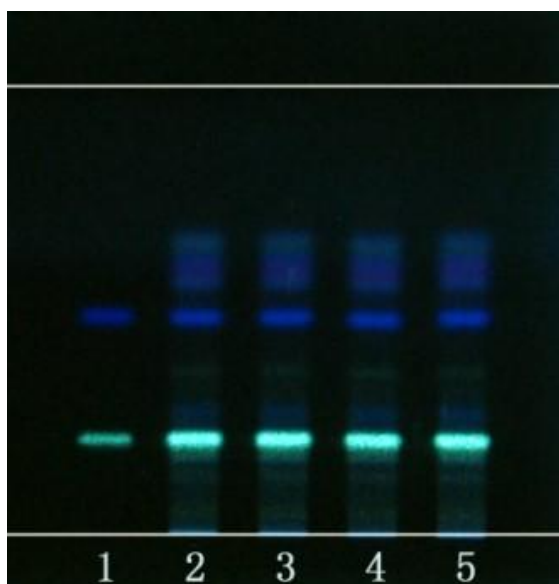


图 4 提取时间的考察

(1-对照品 , 2- 5 min, 3- 15 min, 4- 25 min, 5-35 min)

(HPTLC Silica G (Merck) 10×10 cm) (21° C, 46%)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.49, 柚皮苷 R F = 0.21)

2.4 点样方法的考察

(1) 点样体积的考察

分别取0.5 μL, 1 μL, 2 μL, 5 μL, 8 μL供试品溶液点于高效薄层板展开, 干燥, 喷显色剂, 于 105° 加热 1 分钟后, 置于 365nm 紫外波长下观察。结果见图 5。

结果表明, 随着点样体积增加, 柚皮苷及橙皮内酯水合物条带清晰度增加。但当点样体积为 8 μL 时, 柚皮苷条带与下方条带分离较差。因此最终选用 2 μL作为点样体积。

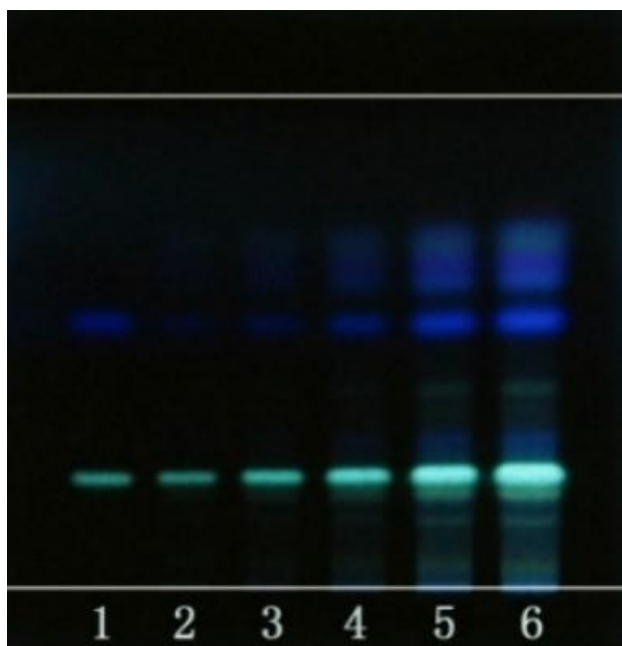


图 5 点样体积的考察

1-对照品, 2- 0.5 μL , 3- 1 μL , 4- 2 μL , 5- 5 μL , 6-8 μL

(HPTLC Silica G (Merck) $10 \times 10 \text{ cm}$) (22° C, 45%)

(2) 条带宽度的考察

取 2 μL 供试品溶液点在高效薄层板上, 条带宽度分别为 2 mm, 4 mm, 6 mm, 8 mm and 10 mm, 于饱和展开缸中展开, 干燥, 喷适量显色剂后于 105° 干燥 1 分钟, 并在 365nm 紫外波长下观察。结果见图 6。

结果表明, 条带随着点样宽度的增加显得更加狭细, 分离度更好。因此选用 8 mm 的条带宽度进行后续试验。

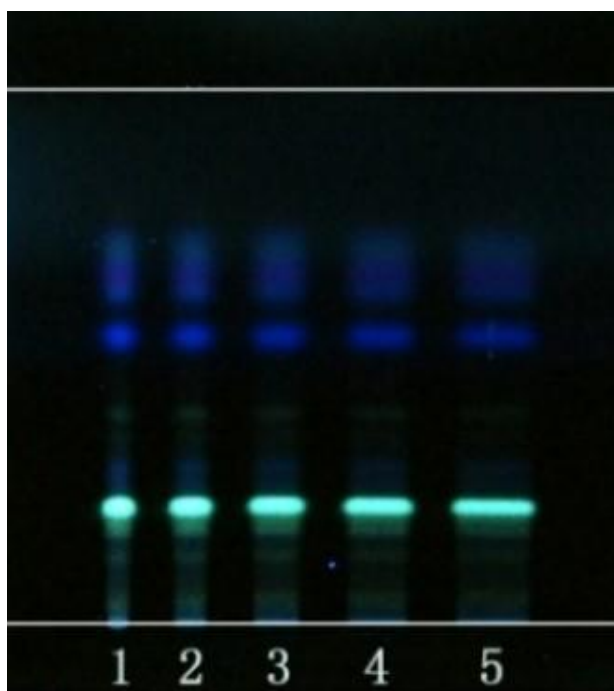


图 6 条带宽度的考察

1-2 mm ,2- 4 mm, 3- 6 mm, 4-8 mm, 5-10 mm

(HPTLC Silica G (Merck) 10×10 cm) (20° C, 44%)

2.5 方法学考察

(1) 稳定性

供试品溶液于室温放置不同时间(0, 1, 2, 3 天)后, 点样、展开、显色, 置于 365nm 波长紫外光下观察。结果见图 7。

结果表明, 供试品溶液在 3 天内稳定性良好。

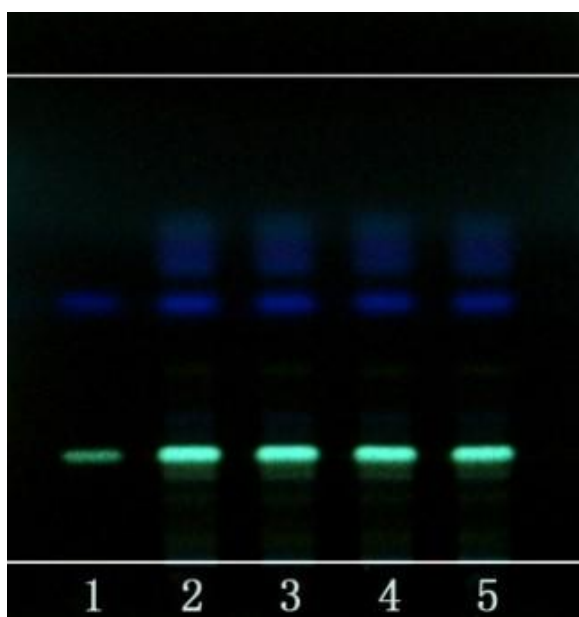


图 7 稳定性

1-对照品 , 2- 0 d, 3- 1 d, 4- 2 d, 5- 3 d

(HPTLC Silica G Merck 10×10 cm) (25° C, 35%)

(2) 耐用性

不同粒径硅胶薄层板

样品分别点于不同粒径薄层板上 (TLC 和 HPTLC 板)。展开、显色，置 365nm 波长紫外光下观察。结果见图 8。

结果表明，高效薄层板条带更为清晰，但普通薄层板也可达到鉴别要求。

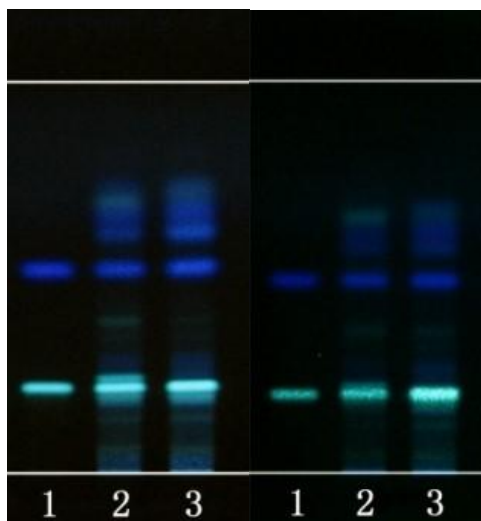


图 8 HPTLC（左）和 TLC（右）薄层板的比较

1-对照品, 2-化橘红, 3-广西橘红珠

（HPTLC Silica G Merck）（21° C, 46%）

（TLC Silica G Merck）（19° C, 44%）

不同品牌薄层板

样品分别点于不同品牌薄层板上，展开、显色，置 365nm 波长紫外光下观察。结果见图 9。

结果表明，不同品牌薄层板对供试品溶液条带无明显影响。

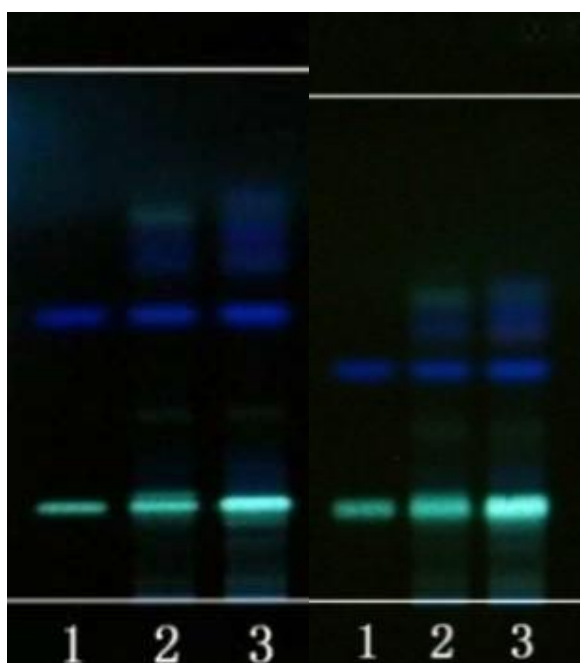


图 9

MN（左）和 Merck（右）HPTLC 薄层板的比较

1-对照品, 2-化橘红, 3-橘红珠

（HPTLC Silica MN）（21° C, 46%）

（HPTLC Silica G Merck）（21° C, 46%）

展开湿度的影响

点样后，分别在不同湿度（46%、65%、75%、84%）条件下展开，显色后，置于 365nm 波长紫外光下观察。结果见图 10。

结果表明，不同湿度下，条带清晰度无明显区别。

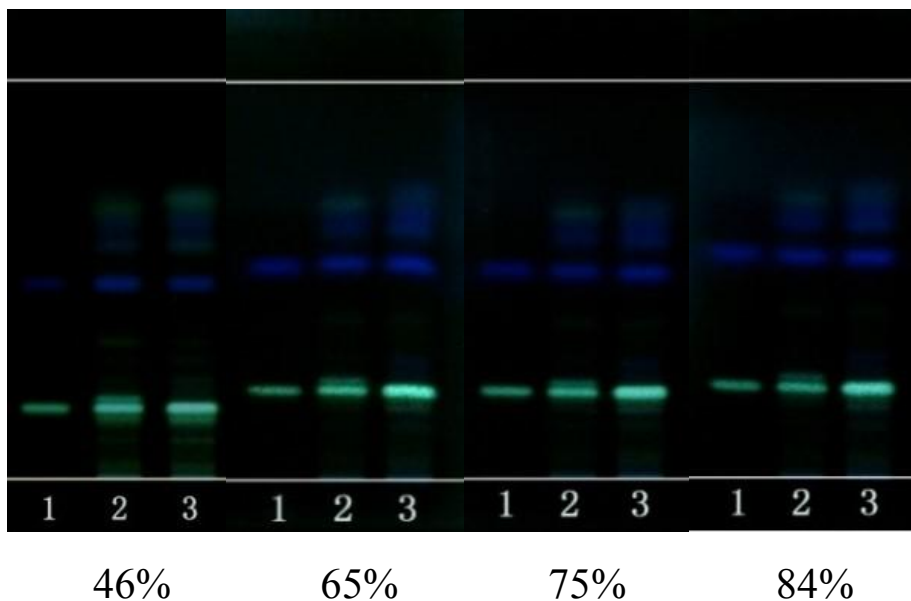


图10 湿度的影响

1-对照品, 2-化橘红, 3-橘红珠

(HPTLC Silica G, Merc k)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.49, 柚皮苷 R F = 0.18) (21° C, 46%)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.54, 柚皮苷 R F = 0.22) (18° C, 65%)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.52, 柚皮苷 R F = 0.22) (17° C, 75%)

(橙皮内酯水合物 R F = 0.56, 柚皮苷 R F = 0.23) (16° C, 84%)

耐用性考察结果表明，不同粒径（高效薄层板或普通薄层板），不同品牌对样品及对照品溶液薄层展开结果无明显影响。不同湿度对橙皮内酯水合物斑点有一定影响，湿度过低斑点不清晰。最终确定以柚皮苷对照品作为对照。

2.6 广西橘红珠样品的薄层鉴别

利用建立的薄层鉴别方法，对橘红珠样品进行鉴别。结果如图 11 所示。供试品溶液中，在与柚皮苷对照品相应的位置上，均显相同的绿色荧光斑点，R F 约为 0.28。

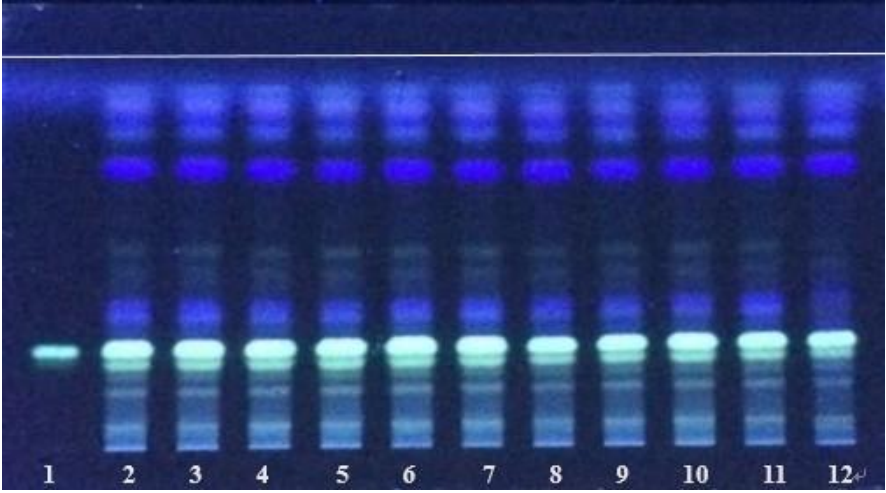


图 11 1~11 批橘红珠样品薄层鉴别结果

1-柚皮苷，2-第 1 批，3-第 2 批，4-第 3 批，5-第 4 批，6-第 5 批，7-第 6 批，8-第 7 批，9-第 8 批，10-第 9 批，11-第 10 批，12-第 11 批（HPTLC 硅胶 G 板，100×200mm）（21℃，60%）（R F =0.28）

3.水分

水分检查采用药典通则 0832 第二法进行测定。样品的水分结果如表 2 所示，11 批样品的平均水分为 9.70%，以平均值上浮 20%作为水分限度，规定不得过 12.0%。

表 2 橘红珠样品水分测定结果

编号	产地	水分%
1	广西陆川	10.46
2	广西陆川	10.14
3	广西陆川	8.49

4	广西陆川	9.9
5	广西陆川	8.45
6	广西南宁	7.82
7	广西南宁	7
8	广东百色	11.69
9	广西百色	10.18
10	广东化州	11.29
11	广东化州	11.28
	平均值	9.70

4.总灰分的测定

总灰分检查采用药典通则 2302 进行测定。结果如表 3 所示。11 批橘红珠样品的平均灰分为 3.50%，以平均值上浮 20%作为总灰分限度，规定不得过 4.5%。

表 3 橘红珠样品总灰分测定结果

编号	产地	总灰分%
1	广西陆川	3.79
2	广西陆川	3.74
3	广西陆川	3.47
4	广西陆川	3.56
5	广西陆川	3.6
6	广西南宁	3.29
7	广西南宁	3.44
8	广东百色	3.5

9	广西百色	3.49
10	广东化州	3.39
11	广东化州	3.2
	平均值	3.5

5.浸出物的测定

6 浸出物

6.1 醇溶性浸出物

照醇溶性浸出物测定法（通则 2201）项下的热浸法测定，用乙醇作为溶剂。11 批样品的检测结果见表 4，醇溶性浸出物平均值为 26.89%，以平均值下浮 20%作为限度，规定不得少于 20.0%。

6.2 水溶性浸出物

照水溶性浸出物测定法（通则 2201）项下的冷浸法测定，用水作溶剂。11批样品检测结果见表 4，水溶性浸出物平均值为 48.45%，以平均值下浮 20%作为限度，规定不得少于 40.0%。

表 4 橘红珠样品浸出物测定结果

编号	醇溶性浸出物（%）	水溶性浸出物（%）
1	25.66	50.58
2	25.51	51.3
3	29.02	51.41
4	26.28	48.23
5	28.61	47.36
6	25.09	48.62
7	26.11	49.05

8	26.48	46.49
9	29.44	49.36
10	23.09	42.7
11	30.56	47.86
平均值	26.89	48.45

7.柚皮苷含量测定方法

7.1 材料

7.1.1仪器

万分之一电子分析天平（ME204，瑞士 Mettler toledo 公司）；Ultimate 3000高效液相色谱仪（美国 Dionex 公司，DGP-3600SD 双三元泵、SRD-3600 脱气机、UPS-3000SL 自动进样器、TCC3000-RS 柱温箱、DAD 检测器、Chromeleon 7.2数据处理软件）；色谱柱：Dionex Acclaim 120 C 18（4.6×150mm，3μm），WelchXB-C 18（4.6×250mm，5 μ m）；数控超声波清洗器（KQ500DE，昆山市超声仪器31有限公司）；超纯水器（Simplicity 185 personal，美国 Millipore 公司）；移液管。

7.1.2 试药

柚皮苷对照品（中国药品生物制品检定所，批号：110722-201111，纯度：93.2%）。甲醇（天津市大茂化学试剂厂，分析纯）；甲醇（Honeywell，批号：R11G4H，色谱纯）；冰醋酸（aladdin，批号：E1519047，色谱纯）。

7.1.3 样品

条件摸索及方法学考察所用样品为第 8 批样品。

7.2 供试品制备方法的考察

7.2.1 色谱条件

色谱柱：Dionex Acclaim 120 C 18（4.6×150mm，3μm）；流动相：甲醇（A）-0.3%醋酸溶液（B）=35：65；流速：1.0ml/min；检测波长：320nm；进样量：10μl；柱温：35℃。

7.2.2 对照品溶液的制备

精密称取适量柚皮苷对照品，加甲醇制成每1ml含柚皮苷496.5 μg的溶液。

7.2.3 供试品溶液的制备

使用水浴回流及超声两种方法对样品进行提取，其中超声时间分别考察 20分钟、30 分钟，比较以上三种方法的柚皮苷提取效果。

供试品溶液A（水浴回流）：取供试品粉末（过二号筛）0.5g，精密称定，置150mL 圆底烧瓶中，精密加入甲醇 50mL，称定重量，水浴回流提取 60 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，取 25mL 续滤液，加甲醇定量转移至 5mL 量瓶中，并加甲醇至刻度，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，取续滤液即得。

供试品溶液 B（超声 20min）：取供试品粉末（过二号筛）0.5g，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50mL，称定重量，超声 20 分钟（150W，40kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，取续滤液即得。

供试品溶液 C（超声 30min）：取供试品粉末（过二号筛）0.5 g，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50mL，称定重量，超声 30 分钟（150W,40 kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，取续滤液即得。

分别进样以上 3 种供试品溶液 10 μ L，记录所需成分的峰面积。结果表明（表5），超声 30 分钟与水浴回流 60 分钟的提取效果相近，且两种成分的峰面积均略高于水浴回流，说明此法提取效果较好，且更加省时、便利。

故选择超声 30分钟作为样品的提取方法。

表 5 不同提取方法的比较

编号	提取方法	称样量 (g)	柚皮苷峰面 积
供试品溶液 A	水浴回流 60 分 钟	0.5123	17507.12
供试品溶液 B	超声 20 分钟	0.5208	15072.77
供试品溶液 C	超声 30 分钟	0.4721	17926.50

最终确定的供试品溶液制备方法为：取样品粉末（过二号筛）约 0.5g，精密称定，置 100ml 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50ml，称定重量，超声处理 30 分钟（150W，40kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 5ml，置 10ml 容量瓶中，加 50%甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

为节约溶剂，本标准草案中将供试品制备方法调整为：取本品粉末（过二号筛）约 50mg，精密称定，置 10ml 容量瓶中，精密加入

甲醇 5ml，超声处理 30分钟（150W，40kHz），放冷，加 50%甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

7.3 色谱系统考察

7.3.1 溶液的制备

（1）对照品溶液的制备

精密称取适量柚皮苷对照品、野漆树苷对照品，加甲醇制成每 1ml 分别含柚皮苷 420.2 μg 。

（2）供试品溶液的制备

取供试品粉末（过二号筛）约 0.5g，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，

精密加入甲醇 50mL，称定重量，超声处理 30min（150W，40 kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 5ml，置 10 ml容量瓶中，加 50%甲醇至刻度，摇匀。过 0.45 μm 滤膜，取续滤液，即得。

7.3.2 色谱条件

流动相及比例依据药典化橘红标准中柚皮苷含量测定条件，选择甲醇-0.3%醋酸溶液（35:65）等度洗脱。

7.3.3 检测波长的选择

根据柚皮苷对照品溶液的紫外波长扫描结果（图 12），确定最大吸收波长 λ_{max} 。选择 283nm作为柚皮苷的检测波长。

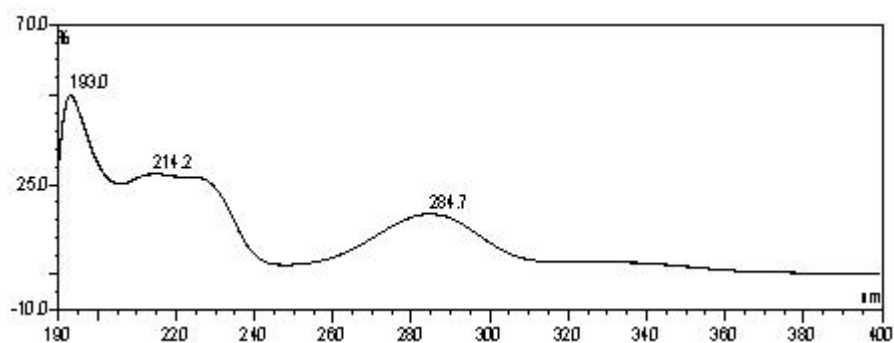


图 12 柚皮苷紫外扫描图

7.3.4 色谱柱的选择

(1) 不同品牌色谱柱的考察

共考察三种不同品牌色谱柱：Dionex Acclaim C 18（5 μm，4.6 × 250mm），Agilenteclipse plus C 18（5 μm，2.1 × 250mm），Welch XB C 18（5 μm，4.6 × 250mm）。使用同一对照品溶液，比较柚皮苷的保留时间、理论塔板数和拖尾因子。结果表明（表 6），对于以上三种品牌色谱柱，柚皮苷均能获得较好的分离效果。

表 6 色谱柱的选择

色谱柱	保留时间 (min)	塔板数	拖尾因子
戴安 acclaim 120 C 18			
5	19.513	5532	1.16
μm, 4.6 × 250 mm			
安捷伦 ZORBAX			
SB-C18, 5 μm, 4.6 ×	21.057	7777	1.02
250 mm			
Ultimate XB C 18, 5	19.91	6127	0.93

7.3.5 流动相的选择

(1) 流动相比例

使用同一供试品溶液，考察流动相中不同甲醇比例（30%、33%、35%、37%、40%）对分离的影响。结果表明（表 7），不同比例甲醇对两种待测成分的保留时间有显著影响。甲醇比例越高，保留时间越短。考虑到分离度及缩短分析时间，最终选择甲醇比例为 35%。

表 7 流动相甲醇比例的选择

甲醇（%）	保留时间（min）	塔板数	拖尾因子
30	25.87	5267	1.12
33	16.397	3825	1.14
35	13.09	4362	1.15
37	10.343	3512	1.16
40	7.537	3807	1.2

(2) 流速

使用同一供试品溶液，考察不同流速（0.8、1.0、1.2ml/min）对分离效果的影响。结果表明（表 8），除保留时间外，流速对各参数无明显影响。最终选用 1.0ml/min 进行后续实验。

表 8 流速的选择

流速	保留时间（min）	塔板数	拖尾因子
0.8ml/min	15.557	4448	1.05
1.0ml/min	12.697	4414	1.06
1.2mL/min	10.813	4482	1.08

7.3.6 柱温的选择

使用同一供试品溶液，考察不同柱温（25、30、35、40° C）对分离效果的影响。结果表明（表 19，图 29），随着柱温上升，柚皮苷的分离度减小。考虑到二者之间合适的分离度，最终选用 35° C 进行后续实验。

表 9 柱温的选择

柱温	保留时间（min）	塔板数	拖尾因子
25° C	17.637	4485	1.25
30° C	15.507	4431	1.18
35° C	12.697	4414	1.06
40° C	10.98	3492	1.12

7.3.7 小结

最后确定的色谱条件为：色谱柱：Dionex Acclaim 120 C 18（4.6×150mm，3μm）；流动相：甲醇（A）-0.3%醋酸溶液（B）=35：65；流速：1.0ml/min；检测波长：柚皮苷 283nm；进样量：10μl；柱温：35℃。

7.4 方法学考察

通过混合对照品溶液以及供试品溶液，使用外标法计算柚皮苷在样品中的含量。其公式如下：

$$(r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u 为在供试品溶液中，柚皮苷在 283nm 波长下的峰面积； r_s 为在混合标准品溶液中，柚皮苷在 283nm 波长下的峰面积。 C_u 为供试品溶液的浓度，单位为 mg/ml； C_s 为柚皮苷在混合标准品溶液中的浓度，单位 mg/ml。

7.4.1 线性范围

对照品母液的制备：精密称取 42.02mg 柚皮苷对照品于 10ml 容量瓶中，用甲醇定容，即得柚皮苷浓度为 4.202mg/ml 对照品母液。

线性对照品溶液的制备：分别定量移取不同体积 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml 对照品母液于 10ml 容量瓶中，加 50%甲醇定容，混匀。

分别进样各浓度的线性对照品溶液，记录 283nm 波长下柚皮苷峰面积，根据各浓度下测得的峰面积，获得以下校正曲线（表 10，图 13），结果表明，柚皮苷具有良好的线性。

表 10 柚皮苷的标准曲线

线性方程	R ²	线性范围（μg/ml）
y=0.2035x+0.0930	R ² =1.0000	42.02~1050.50

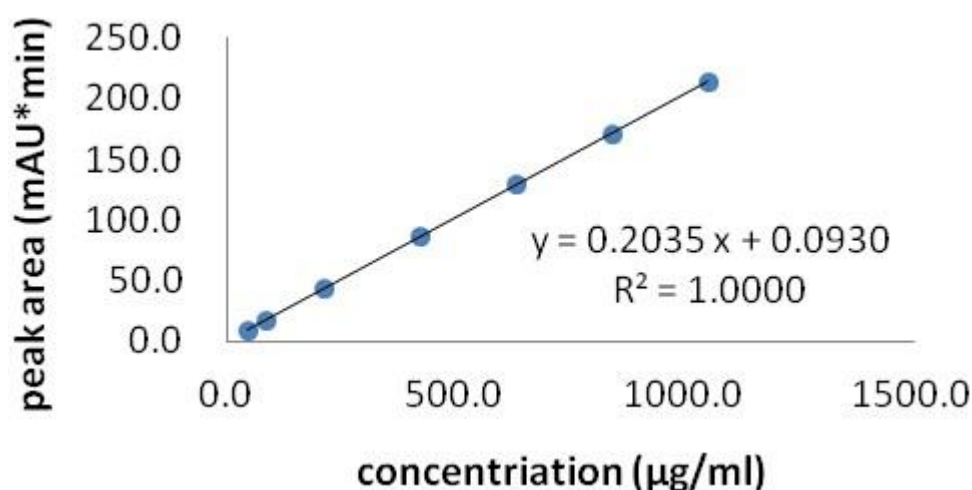


图 13 柚皮苷的标准曲线

7.4.2 重复性试验

取同一批样品，平行制备六份供试品溶液，进样测定。结果表明（表 23），两种待测成分含量的 RSD 均小于 2%。

表 11 重复性实验结果

编号	称样量 (g)	柚皮苷峰面积	柚皮苷 (%)
1	0.50071	87.4226	9.787
2	0.5009	87.1934	9.758
3	0.50062	88.0177	9.856
4	0.50069	88.7009	9.931
5	0.50049	88.7588	9.941
6	0.50079	88.5216	9.909
平均值 (%)			9.864
RSD (%)			0.78

7.4.3 中间精密度试验

不同日期：取同一批样品，在 3 个不同日期制备供试品溶液，每次平行 3 份，进样测定，RSD 小于 2%。不同分析人员：取同一批样品，由三名分析人员分别平行制备 3 份供试品溶液，进样检测，RSD 小于 2%。结果见表 12。

表 12 中间精密度实验结果-不同日期、不同实验人员

不同日期	柚皮苷含量 (%)	不同人员	柚皮苷含量 (%)
日期 1	9.506	分析人员 1	9.491

	9.515		9.726
	9.524		9.484
	9.304		9.426
日期 3	9.323	分析人员 2	9.433
	9.353		9.423
	9.573		9.446
日期 3	9.66	分析人员 3	9.531
	9.313		9.189
RSD (%)	1.39		1.65

7.4.4 准确性试验

通过检测已知加入量的两种待测成分的回收率来判断方法的准确性。分别制备低、中、高三个浓度的供试品溶液，每个浓度平行制备三份，方法如下：低浓度：取样品粉末 250mg，精密称定，取 9 份，分别置 100ml 具塞锥形瓶中，分成低、中、高三个浓度组，每组三份，向低浓度组各加入 10mg 柚皮苷对照品，中等浓度各加入 20mg 柚皮苷对照品，高浓度各加入 30mg 对照品，向每份样品中精密加入甲醇 50ml，称定重量，超声处理 30min（150W，40kHz），放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 5ml，置 10ml 量瓶中，加 50%甲醇至刻度，摇匀。取续滤液即得。

根据样品的测得量、原有量及加入量，计算其回收率。结果表明（表 13），回收率范围在 95%-105%之间，且 RSD<3%。

表 13 回收率试验结果

浓度	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
----	-------------	-------------	-------------	---------	------------	------------

	21.69	10.57	32.68	103.97		
低	21.54	10.98	32.85	103.01	102.77	1.31
	21.69	10.61	32.44	101.32		
	21.69	21.02	42.66	99.76		
中	21.67	21.42	43	99.58	99.81	0.26
	22.53	21.38	43.93	100.09		
	21.64	31.58	53.5	100.89		
高	21.67	31.6	54.39	103.54	102.44	1.35
	21.68	31.39	53.98	102.9		
平均值 (%)				101.67		
RSD (%)				1.68		

7.4.5 稳定性试验

使用同一供试品溶液，在室温存放不同时间后进样检测，比较待测成分的峰面积，并计算 RSD。结果显示（表 14），供试品溶液柚皮苷在 24 小时内稳定性良好。

表 14 供试品溶液稳定性试验结果

时间（小时）	峰面积
0	87.4226
2	87.5079
4	87.663
6	87.5962
8	87.7168

12	87.7799
24	88.0927
平均值	87.6827
RSD (%)	0.25

7.4.6 耐用性试验

使用两种长度的色谱柱（150mm，250mm），检测柚皮苷含量，通过相对平均偏差（RAD）评估两种柱长的含量测定误差。结果表明（表 15），柚皮苷含量计算结果的 RAD 均小于 3%，说明色谱柱长对检测结果的影响小。

表 15 耐用性试验结果——色谱柱长度

柱长（mm）	柚皮苷含量（%）
250	9.854
150	9.8
RAD (%)	0.38

*色谱柱品牌均为 Dionex acclaim

7.5 样品检测及含量限度的规定

根据已建立的方法，对 11 批橘红珠样品进行柚皮苷含量测定，结果如表 16 所示。根据含量测定结果，11 批橘红珠样品柚皮苷含量平均值为 10.67%，以柚皮苷平均值下浮约 30%作为限度，规定橘红珠中柚皮苷含量不得少于 7.5%。

表 16 橘红珠样品含量测定结果

编号	产地	柚皮苷（%）
1	广西陆川	13.24
2	广西陆川	12.89

3	广西陆川	10.9
4	广西陆川	13.41
5	广西陆川	11.16
6	广西南宁	10.04
7	广西南宁	12.3
8	广东百色	7.92
9	广西百色	8.28
10	广东化州	9.81
11	广东化州	7.46
平均值		10.67

7.6 柚皮苷对照品色谱图和广西橘红珠样品色谱图

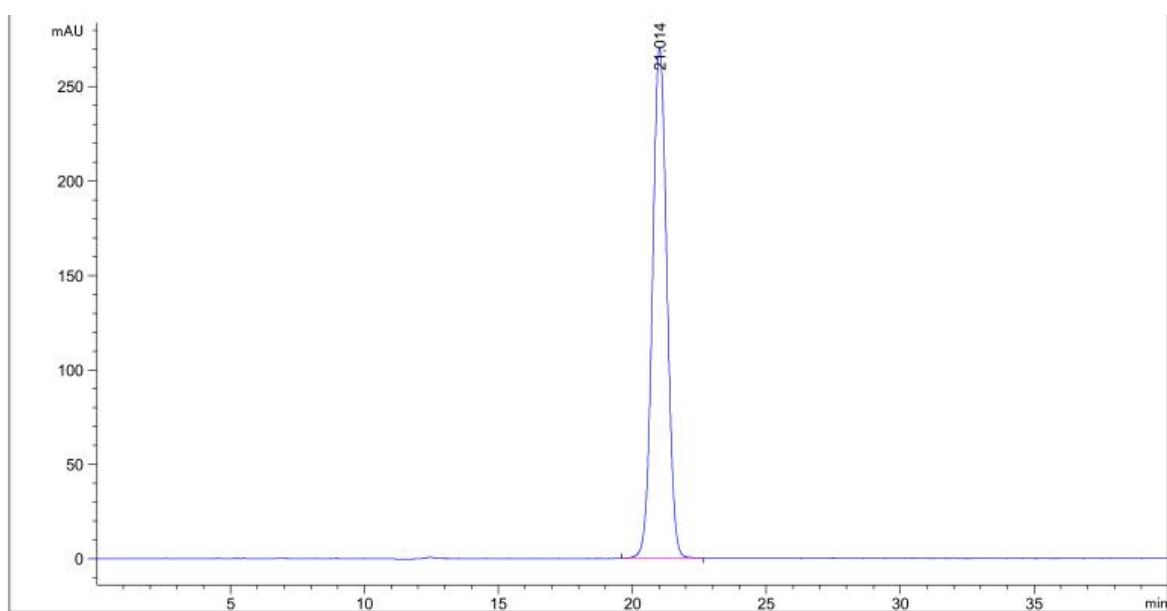


图 14 柚皮苷对照色谱图

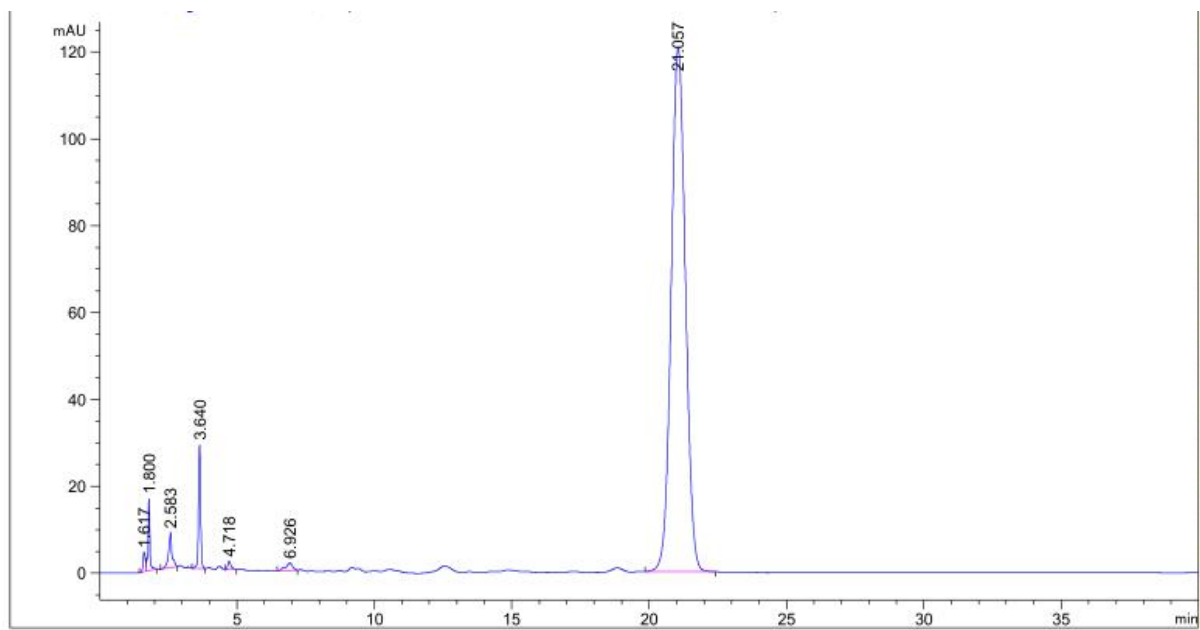


图 15 广西橘红珠样品色谱图

团体标准《广西橘红珠》
标准编制工作小

组

2023 年 12 月 1

日