

# 红背桂药材的质量标准研究<sup>Δ</sup>

王 硕<sup>1\*</sup>, 周小雷<sup>1</sup>, 袁经权<sup>1,2</sup>, 樊溪源<sup>1</sup>, 陈振鹏<sup>1</sup>, 陈乾平<sup>1,3</sup>, 缪剑华<sup>1</sup>, 谷筱玉<sup>1#</sup> (1. 广西药用植物研究所, 南宁 530023; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广州 510632; 3. 广西中医学院, 南宁 530001)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2542-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.17

**摘要** 目的: 制订红背桂药材的质量标准, 为其开发利用提供科学依据。方法: 分别对红背桂药材的性状、显微特征进行观察鉴别; 按照《中国药典》方法对10个不同产地药材中浸出物、灰分和水分进行测定; 以没食子酸为对照品, 采用薄层色谱(TLC)法对其进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定药材中没食子酸的含量; 色谱柱为迪马 C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水 (10:90, V/V), 检测波长为 273 nm。结果: 对红背桂药材的性状、显微特征进行了描述。暂定红背桂药材中总灰分不得过 11%, 不溶性灰分不得过 3%, 水浸出物不得少于 12%, 醇浸出物不得少于 14%, 水分不得过 12%。TLC 中主斑点清晰、分离度好。没食子酸的进样量在 0.009 5~1.900 0 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系 ( $r=0.999\ 9$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 2%; 平均加样回收率为 101.93%, RSD=1.67% ( $n=6$ )。结论: 所建标准可用于红背桂药材的质量控制。

**关键词** 红背桂; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 性状; 没食子酸

## Study on Quality Standard of *Excoecaria cochinchinensis*

WANG Shuo<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-lei<sup>1</sup>, YUAN Jing-quan<sup>1,2</sup>, FAN Xi-yuan<sup>1</sup>, CHEN Zhen-peng<sup>1</sup>, CHEN Qian-ping<sup>1,3</sup>, MIAO Jian-hua<sup>1</sup>, GU Xiao-yu<sup>1</sup> (1. Guangxi Institute of Medicinal Plant, Nanning 530023, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Guangxi College of TCM, Nanning 530001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide scientific basis for the utilization and development of *Excoecaria cochinchinensis* by setting up the quality standard of *E. cochinchinensis*. METHODS: The property and microscopic characteristics of *E. cochinchinensis* were determined respectively. Extract, moisture and ash of medicinal material from 10 producing areas were determined according to *Chinese Pharmacopoeia*; *E. cochinchinensis* was qualitatively determined by TLC using gallic acid as control; the content of gallic acid was determined by HPLC: the determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (10:90, V/V). The detection wavelength was set at 273 nm. RESULTS: The property and microscopic characteristics of *E. cochinchinensis* were described. The contents of total ash, acid-insoluble ash, aqueous extract, ethanol extract and moisture were no more than 11%, 3%, 12%, 14% and 12%. TLC spots were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of gallic acid were 0.009 5-1.900 0 μg ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recovery rates were 101.93% (RSD=1.67%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of *E. cochinchinensis*.

**KEY WORDS** *Excoecaria cochinchinensis*; Quality standard; TLC; HPLC; Property; Gallic acid

红背桂是一种民间常用药材, 为大戟科植物红背桂 *Excoecaria cochinchinensis* Lour. 的全株, 又名金锁玉、叶背红、红叶桂花、东洋桂花等。它始载于《云南药用植物名录》<sup>[1]</sup>, 全株入药, 具有通经活络、消肿止痛的功效, 民间用于治疗麻疹、腮腺炎、扁桃体炎、心绞痛、肾绞痛、腰肌劳损<sup>[2-5]</sup>。红背桂主要含没食子酸等多种成分<sup>[6-7]</sup>。没食子酸作为一种有机酸类, 易被消化道所吸收; 它对肝脏、肾脏、心血管有较强的亲和力, 生物学效应比较广泛, 突出的功效为抗肿瘤, 对多种致癌、促癌物有抵抗作用<sup>[8-9]</sup>。目前, 尚未见到有关红背桂药材质量控制

方面的研究报道。笔者结合《中国药典》规定方法, 对10个不同产地红背桂样品的药材性状、显微特征进行了观察鉴定, 对其浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分进行了测定, 并采用薄层色谱(TLC)与高效液相色谱(HPLC)法对其进行定性、定量研究, 以期科学有效地控制药材质量, 保证临床疗效。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪 (美国 Agilent 公司); KQ-5200 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); CP2250D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); LEICA 型生物显微镜 (德国 Leica 公司); SX2-4JOA 型箱式电阻炉 (上海比尔得仪器实业有限公司); 101-1 型电热鼓风干燥箱 (上海沪南科学仪器联营厂); W201 型恒温浴锅 (上海申生科技有限公司); 高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); Milli-Q Academic 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

<sup>Δ</sup> 基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (No.10100024-4)

\* 助理研究员, 博士。研究方向: 新药研发。电话: 0771-2443136。E-mail: ws428@163.com

# 通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 药物检测分析与新药研发。电话: 0771-5610390。E-mail: guxiaoyu1977@hotmail.com

## 1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(美国Fisher公司);甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯为分析纯(成都市科龙化工试剂厂);水为超纯水;没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-200803);硅胶GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂分厂)。

## 1.3 药材

红背桂药材产自广西10个不同产地,经广西药用植物研究所马小军研究员鉴定其来源为大戟科植物红背桂 *E. cochinchinensis* Lour.。

## 2 方法与结果

### 2.1 药材性状

本品全株长30~100 cm,根和茎较粗大,具侧根。主根圆锥形,棕褐色,通直或弯曲,木栓层易脱落,可见棕褐色皮层,断面有髓,质地脆,易折断。茎圆柱形,多分枝,直径0.5~2 cm,表面暗褐色,有密集短纵纹,节不明显,质坚硬,易折断,断面有髓。叶对生,稀兼有互生或3片近轮生,多皱缩,完整叶展平后呈狭椭圆形或长圆形,长6~14 cm,宽1.2~4 cm,顶端渐尖,基部楔形,有时两侧边缘可见2~3腺体,边缘有不明细钝齿,两面无毛,上表面暗棕色,下表面暗红色,叶柄长3~10 mm。气微,味淡。

### 2.2 鉴别

2.2.1 红背桂叶 上表皮细胞长方形,下表皮细胞稍小,具气孔。叶异面型,叶内栅栏组织含1~2层细胞,海绵组织含7~12层细胞,排列疏松;叶肉细胞内常含草酸钙簇晶,尤以栅栏组织的细胞中多见。主脉维管束外韧型,木质部导管常2~7个排列成行,薄壁细胞中有时可见草酸钙簇晶。红背桂叶的横切面图见图1。

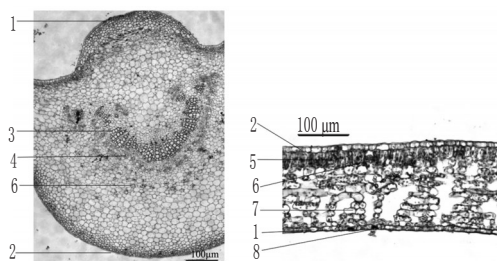


图1 红背桂叶的横切面图

1.上表皮;2.下表皮;3.木质部;4.韧皮部;5.栅栏组织;6.草酸钙簇晶;7.海绵组织;8.气孔

Fig 1 Transverse section of the leaves of *E. cochinchinensis*

1. upper epidermis; 2. lower epidermis; 3. xylem; 4. phloem; 5. palisade tissue; 6. calcium oxalate crystals; 7. spongy tissue; 8. stoma

2.2.2 红背桂茎 呈圆形或椭圆形。表皮为1层长方形细胞,外被角质层,表皮下常排列有2~3层厚角细胞。皮层薄壁细胞数列,排列较紧密,细胞中常含有方晶;内皮层不明显。韧皮部狭窄,形成层成环,木质部发达,木纤维多角形,射线宽窄不一。髓薄壁细胞大。红背桂茎的横切面图见图2。

2.2.3 红背桂根 木栓层为3~5层木栓细胞;皮层较宽;木质部发达;髓部不明显,有时可见细胞里含有晶体。红背桂根的横切面图见图3。

2.2.4 红背桂药材粉末显微特征 本品粉末棕色。可清晰地看到石细胞的纹孔,纹孔沟和壁上的成纹。草酸钙结晶甚多,以方晶和簇晶为主,针晶束次之;方晶类方形、类长方形或不规则多边形,多成群密集分布,直径8~16 μm不等;簇晶分布

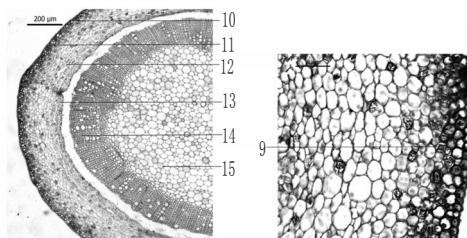


图2 红背桂茎的横切面图

9.方晶;10.表皮细胞;11.厚角组织;12.皮层;13.韧皮部;14.木质部;15.髓

Fig 2 Transverse section of the stem of *E. cochinchinensis*

9. prismatic crystal; 10. epidermic cells; 11. collenchyma; 12. cortex; 13. phloem; 14. xylem; 15. pith

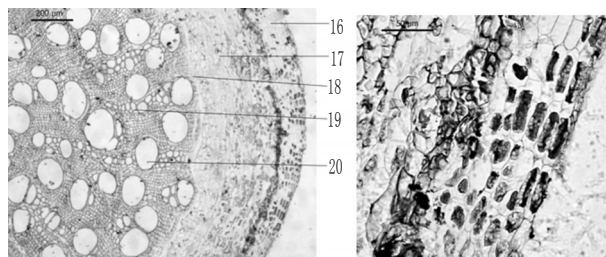


图3 红背桂根的横切面图

16.木栓层;17.皮层;18.韧皮部;19.木射线;20.木质部

Fig 3 Transverse section of the root of *E. cochinchinensis*

16. phellem layer; 17. cortex; 18. phloem; 19. xylem rays; 20. xylem 较分散,晶瓣较钝,晶瓣直径6~9 μm;针晶散在分布,长110~166 μm,少见密集成束。导管以螺纹为主,直径15~23 μm,可见少量纹孔导管。红背桂药材的粉末特征图见图4。

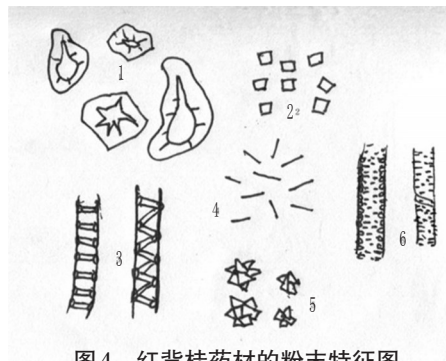


图4 红背桂药材的粉末特征图

1.石细胞;2.草酸钙结晶;3.螺旋导管;4.草酸钙针晶;5.草酸钙簇晶;6.纹孔导管

Fig 4 Power characteristics graph of *E. cochinchinensis*

1. lithocyte; 2. calcium oxalate crystal; 3. spiral vessels; 4. calcium oxalate needle crystal; 5. calcium oxalate clustered crystal; 6. pitted vessel

2.2.5 TLC鉴别 取本品粉末5 g,加入30%甲醇75 ml,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)提取1 h,滤过,用乙酸乙酯萃取2次(体积比1:1),合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶

解,作为供试品溶液。再取没食子酸对照品,加甲醇制成每1 ml 含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法<sup>[10]</sup>试验,吸取对照品溶液5  $\mu$ l与供试品溶液10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶GF<sub>254</sub>薄层板上,以氯仿-丙酮-乙酸-甲酸(4.5:1:0.5:0.5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%磷钼酸溶液,于105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。不同产地红背桂药材的TLC图见图5。

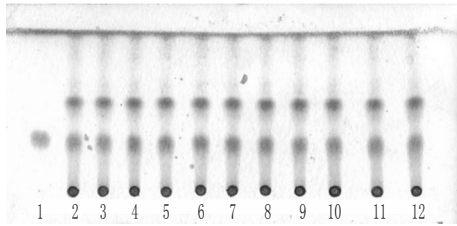


图5 不同产地红背桂药材的TLC图

1. 没食子酸对照品; 2. 没食子酸对照品+广西南宁样品; 3. 广西南宁样品; 4. 广西桂林样品; 5. 广西宁明样品; 6. 广西天等样品; 7. 广西雁山样品; 8. 广西北流样品; 9. 广西梧州样品; 10. 广西玉林样品; 11. 广西贺州样品; 12. 广西荔浦样品

Fig 5 TLC of *E. cochinchinensis* from different producing areas

1. gallic acid control; 2. gallic acid control+sample from Guangxi Nanning; 3. sample from Guangxi Nanning; 4. sample from Guangxi Guilin; 5. sample from Guangxi Ningming; 6. sample from Guangxi Tiandeng; 7. sample from Guangxi Yanshan; 8. sample from Guangxi Beiliu; 9. sample from Guangxi Wuzhou; 10. sample from Guangxi Yulin; 11. sample from Guangxi Hezhou; 12. sample from Guangxi Lipu

### 2.3 浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分的测定

2.3.1 测定方法 浸出物测定参照2010年版《中国药典》(一部)附录X A 浸出物测定法<sup>[10]</sup>,采用冷浸法测定醇溶性浸出物,乙醇体积分数为95%;总灰分、酸不溶性灰分测定参照2010年版《中国药典》(一部)附录IX K 灰分测定法<sup>[10]</sup>操作;水分测定参照2010年版《中国药典》(一部)附录IX H 水分测定法(烘干法)<sup>[10]</sup>操作。

2.3.2 测定结果 10个不同产地样品总灰分在8.2%~10.6%之间,酸不溶性灰分在1.3%~2.7%之间;水浸出物在13.5%~32.3%之间,醇浸出物在12.4%~29.1%之间;水分在8.1%~10.9%之间。鉴于本品来自于野生资源,产地和采收情况比较复杂,灰分限量按照目前检查结果适当上浮。综上,暂定本品含总灰分不得过11%,酸不溶性灰分不得过3%,水浸出物不得少于12%,醇浸出物不得少于12%,水分不得过12%。不同产地红背桂药材的水分、灰分与浸出物测定结果见表1。

### 2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:迪马C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-0.1%磷酸水(10:90, V/V);检测波长:273 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C;流速:1.0 ml/min。在上述色谱条件下,供试品中没食子酸峰与其他组分峰能够达到基线分离,且与相邻色谱峰的分度 $>$ 1.5。理论板数按没食子酸峰计算应不小于5 000。色谱见图6。

2.4.2 供试品溶液的制备 取红背桂药材粉末(过四号筛)0.5 g,精密称定质量,置于具塞锥形瓶中,精密加入25 ml 50%甲醇,回流提取1 h,放冷,再称质量,用50%甲醇补足失质量,

表1 不同产地红背桂药材的水分、灰分与浸出物测定结果  
Tab 1 Content determination of moisture, ash and extract in *E. cochinchinensis* from different producing areas

来源	水分, %	总灰分, %	酸不溶性灰分, %	水浸出物, %	95%乙醇浸出物, %
广西南宁	8.8	8.2	1.5	21.0	15.5
广西桂林	9.2	10.0	2.1	13.5	12.4
广西宁明	8.1	10.5	2.7	21.6	19.0
广西天等	10.8	10.6	2.1	15.7	19.2
广西雁山	10.8	9.5	1.5	25.2	15.1
广西北流	10.9	9.3	1.3	32.3	21.2
广西梧州	9.4	9.6	1.9	22.3	29.1
广西玉林	9.4	10.3	1.7	28.4	17.6
广西贺州	9.6	10.4	2.1	22.7	24.4
广西荔浦	8.6	10.4	1.6	21.5	22.1

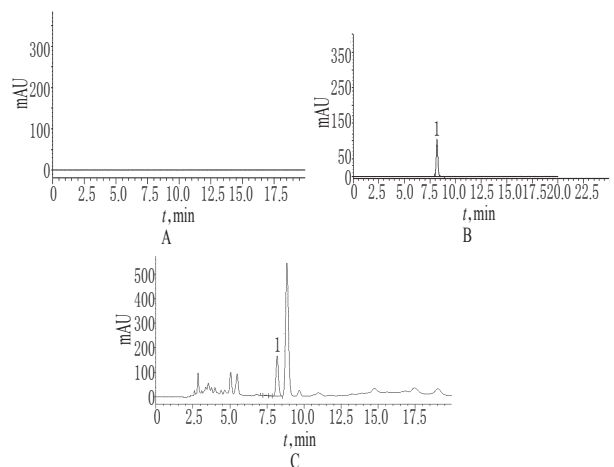


图6 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 没食子酸对照品; C. 供试品; 1. 没食子酸

Fig 6 HPLC chromatograms

A. negative control; B. gallic acid control; C. test sample; 1. gallic acid 滤过,精密量取续滤液10 ml,蒸干,用流动相溶解并定容至5 ml量瓶中,以0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,即得。

2.4.3 对照品贮备液的制备 精密称取没食子酸对照品0.038 g,置100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.38 mg/ml的对照品贮备液。

2.4.4 线性关系考察 取没食子酸对照品贮备液(0.38 mg/ml)适量,加甲醇依次稀释使梯度质量浓度分别为0.95、1.9、3.8、9.5、19.0、38.0、95.0、190.0  $\mu$ g/ml,以0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,分别进样10  $\mu$ l,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对进样量(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=30\ 078x-16.445$ ( $r=0.999\ 9, n=8$ )。结果表明,没食子酸进样量在0.009 5~1.900 0  $\mu$ g范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4.5 精密度试验 精密称取没食子酸对照品适量,加流动相溶解并稀释,制成每1 ml含20  $\mu$ g的对照品溶液。照上述色谱条件取10  $\mu$ l,连续进样6次测定,记录峰面积。结果, RSD=1.1%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批样品(产地:广西玉林)粉末0.5 g(过四号筛),精密称定,共6份,分别按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液。照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中没食子酸的平均质量分数为0.06%, RSD=1.2%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.4.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(产地:广西玉林)适量,分别于0、2、4、6、8、12、16、24 h进样10 μl,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果,RSD=0.7%(n=8),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.8 加样回收率试验 取已测定含量(没食子酸的质量分数为0.03%)的同一批样品粉末(过四号筛)6份,各0.25 g,精密称定,精密加入197 μl没食子酸对照品贮备液(0.38 mg/ml),按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,微孔滤膜滤过后进样10 μl,照上述色谱条件测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)  
Tab 2 Results of recovery test(n=6)

编号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	$\bar{x}$ , %	RSD, %
1	0.150 5	0.149 7	0.298 6	98.93		
2	0.150 1	0.149 7	0.305 7	103.94		
3	0.150 0	0.149 7	0.303 2	102.34	101.93	1.67
4	0.150 4	0.149 7	0.304 5	102.97		
5	0.150 5	0.149 7	0.302 4	101.47		
6	0.150 0	0.149 7	0.302 6	101.93		

2.4.9 样品含量测定 取10批不同产地的样品,分别按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品含量。结果表明,10批样品中没食子酸的质量分数范围为0.02%~0.07%。考虑到本品来自于野生资源,产地和采收情况比较复杂,贮藏过程也会影响质量,故拟定药材中没食子酸的质量分数不得低于0.015%。样品含量测定结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3)  
Tab 3 Content determination of samples(n=3)

样品编号	产地	没食子酸的质量分数, %	样品编号	产地	没食子酸的质量分数, %
1	广西南宁	0.03	6	广西北流	0.04
2	广西桂林	0.02	7	广西梧州	0.06
3	广西南宁	0.06	8	广西玉林	0.06
4	广西天等	0.06	9	广西贺州	0.05
5	广西桂林	0.03	10	广西荔浦	0.07

### 3 讨论

#### 3.1 样品提取溶剂的选择

在供试品溶液制备方法的考察中,曾比较采用石油醚、氯仿、丙酮、甲醇、乙醇作为提取溶剂的提取效果。结果表明,以甲醇为提取溶剂,没食子酸的提取率较高,因此选择甲醇作为提取溶剂。

#### 3.2 TLC试验中展开系统的选择

笔者曾以氯仿-丙酮-乙酸(5:2:1, V/V/V)、氯仿-丙酮-甲酸(5:2:1, V/V/V)、氯仿-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)、氯仿-乙

酸乙酯-乙酸(5:2:1, V/V/V)、石油醚-丙酮-甲酸(3:2:1, V/V/V)、石油醚-丙酮-乙酸(3:2:1, V/V/V)、氯仿-丙酮-乙酸-甲酸(4.5:1:0.5:0.5, V/V/V/V)为展开系统进行比较试验。结果发现,以氯仿-丙酮-乙酸-甲酸(4.5:1:0.5:0.5, V/V/V/V)为展开剂所分离出的斑点清晰、不拖尾,分离效果好,因此选择其作为展开溶剂。

#### 3.3 HPLC试验中流动相的选择

笔者曾比较甲醇-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水、乙腈-水-磷酸系统作为流动相的结果,发现以甲醇-水-磷酸作流动相,峰形较好,且没食子酸峰与其他组分峰能达到基线分离,故选择甲醇-0.1%磷酸水(10:90, V/V)作为流动相。

综上,所建标准可用于红背桂药材的质量控制。

### 参考文献

- [1] 云南省药物研究所.云南药用植物名录[M].昆明:云南省药物研究所,1975:127.
- [2] Flora of China editorial committee. *Flora of China*[M]. Beijing: Missouri Botanical Garden Press,2008:280.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:3 603-4 816.
- [4] 方鼎.广西中药资源名录[M].南宁:广西民族出版社,1993:102.
- [5] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编:下册[M].2版.北京:人民卫生出版社,1996:759.
- [6] Giang PM, Son PT, Matsunami K, et al. New megastigmane glucosides from *Excoecaria cochinchinensis* Lour. var. *cochinchinensis*[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*,2005,53(12):1 600.
- [7] 汪云松,黄荣,张洪彬,等.红背桂花化学成分研究[J].热带亚热带植物学报,2009,17(2):156.
- [8] Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, et al. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4,5-trihydroystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats[J]. *Int J Tissue React*,1996,18(2/3):67.
- [9] Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,1995,35(4):341.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34、附录62、附录53、附录52.

(收稿日期:2012-07-09 修回日期:2013-05-03)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅