

胆木叶药材的质量标准研究[△]

张小强^{1,2*}, 吴云^{1,2}, 杨一帆^{1,2}, 王振中^{1,2}, 丁岗^{1,2#} (1.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2.中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2097-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.23

摘要 目的:建立胆木叶药材的质量标准。方法:采用显微鉴别法和薄层色谱法(TLC)对药材进行定性鉴别;测定药材水分、灰分;采用高效液相色谱法测定药材中异长春花苷内酰胺含量;色谱柱为Lichrospher C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为226 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:胆木叶的显微鉴别特征性强,TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。异长春花苷内酰胺检测质量浓度线性范围为0.010 5~0.21 mg/mL($r=0.999\ 5$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为96.25%~101.82%(RSD=1.86%, $n=9$)。测得药材样品总灰分为5.27%~6.44%,酸不溶性灰分为0.23%~0.36%,水分为9.48%~11.46%,异长春花苷内酰胺含量为0.124%~1.003%。结论:该研究所建标准可用于胆木叶药材的质量控制。

关键词 胆木叶;质量标准;显微鉴别法;薄层色谱法;含量测定;高效液相色谱法

Study on Quality Standard for the Leaves of *Nauclea officinalis*

ZHANG Xiaoqiang^{1,2}, WU Yun^{1,2}, YANG Yifan^{1,2}, WANG Zhenzhong^{1,2}, DING Gang^{1,2} (1.Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Lianyungang 222001, China; 2.State Key Lab of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Lianyungang 222001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for the leaves of *Nauclea officinalis*. METHODS: Microscopic identification and TLC methods were used for qualitative identification of *N. officinalis*. The moisture and ash of medicinal materials were determined. HPLC method was adopted to determine the content of strictosamide in medicinal materials. The determination was performed on Lichrospher C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min, injection volume was 10 μL. The detection wavelength was set at 226 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: Microscopic identification of the leaves of *N. officinalis* had strong characteristics, and TLC spots were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of strictosamide were 0.010 5-0.21 mg/mL($r=0.999\ 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. Average recoveries were 96.25-101.82% (RSD=1.86%, $n=9$). Total ash of medicinal materials was 5.27%-6.44%, acid insoluble ash was 0.23%-0.36%, water content was 9.48%-11.46%, strictosamide was 0.124%-1.003%. CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality evaluation of *N. officinalis*.

KEYWORDS Leaves of *Nauclea officinalis*; Quality standard; Microscopic identification; TLC; Content determination; HPLC

胆木为茜草科乌檀属乌檀 *Nauclea officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. et Chun的干燥茎、枝、树皮和根,在我国主要分布于海南、广西、广东等地。其味苦、性寒,具清热解毒、消肿止痛之功效^[1],在南方民间常用于治疗感冒发烧、肺炎、肠炎、痢疾、湿疹、皮疹等,现代临床用于治疗急性咽喉炎、急性结膜炎及上呼吸道感染^[2]。

胆木叶为茜草科植物胆木的干燥叶。本课题组从胆木叶中分离鉴定出多个生物碱和黄酮类成分,如异长春花苷内酰胺、短小蛇根草苷等;并通过比较胆木叶与胆木心的指纹图谱,发现二者具有同样的特征性指标成分吲哚类生物碱^[3-4]。

据报道,乌檀属植物富含吲哚类生物碱并具有抗增

殖、抗疟、抗菌、抗肿瘤等多种生物活性^[5]。相关药理研究发现,胆木叶醇提取物具有抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性^[6]及抗氧化^[7]、抗炎和镇痛作用^[8]。本课题组前期研究发现,胆木叶醇提取部位(ELN)能明显减少模型大鼠角叉菜胶性炎症渗出液中前列腺素 E₂(PGE₂) 含量^[9-10]。以上均说明胆木叶具有潜在的药用价值。

目前,关于胆木叶质量标准研究未见报道。本课题组首次建立了该药材的质量控制方法,包括基源鉴定,性状鉴别,水分、总灰分、酸不溶性灰分检查,显微鉴别,薄层色谱(TLC)鉴别和异长春花苷内酰胺含量测定^[11-13],并根据10批不同产地药材样品的相关检测结果,初步制定了检测限度,旨在为保障其质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪,包括四元泵、DAD检测器(美国Agilent公司);XS205型电子分析天平、AL204型

△ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2013ZX09402203)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药、天然药物新药研发。

E-mail: zhangxq15@163.com

通信作者:高级工程师,博士。研究方向:中药新药研发。电

话:025-87181862。E-mail: dingg2000@126.com

电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KH2200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);DESA 型全自动紫外摄像仪(德国 Desaga 公司);DEM-11 型数码显微镜(北京清大德人科技有限公司);DHG-9023A 型电热鼓风干燥箱(上海精宏实验仪器有限公司)。

1.2 试剂

异长春花苷内酰胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111778-201102,纯度:95.3%);硅胶 GF₂₅₄ 预制板(青岛海洋化工厂分厂,批号:20150408);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

胆木叶药材采自广西、海南各地(见表1),由中药制药工程新技术国家重点实验室丁岗高级工程师鉴定为真品。

表 1 胆木叶药材来源
Tab 1 Source of the leaves of *N. officinalis*

编号	批号	产地
1	15040801	广西玉林
2	15041602	海南保亭
3	15050403	海南琼中
4	15050904	广西梧州
5	15071005	海南万宁
6	15071506	广西玉林
7	15090807	海南五指山
8	15091008	广西梧州
9	15110609	广西梧州
10	15111310	海南琼中

2 方法与结果

2.1 性状

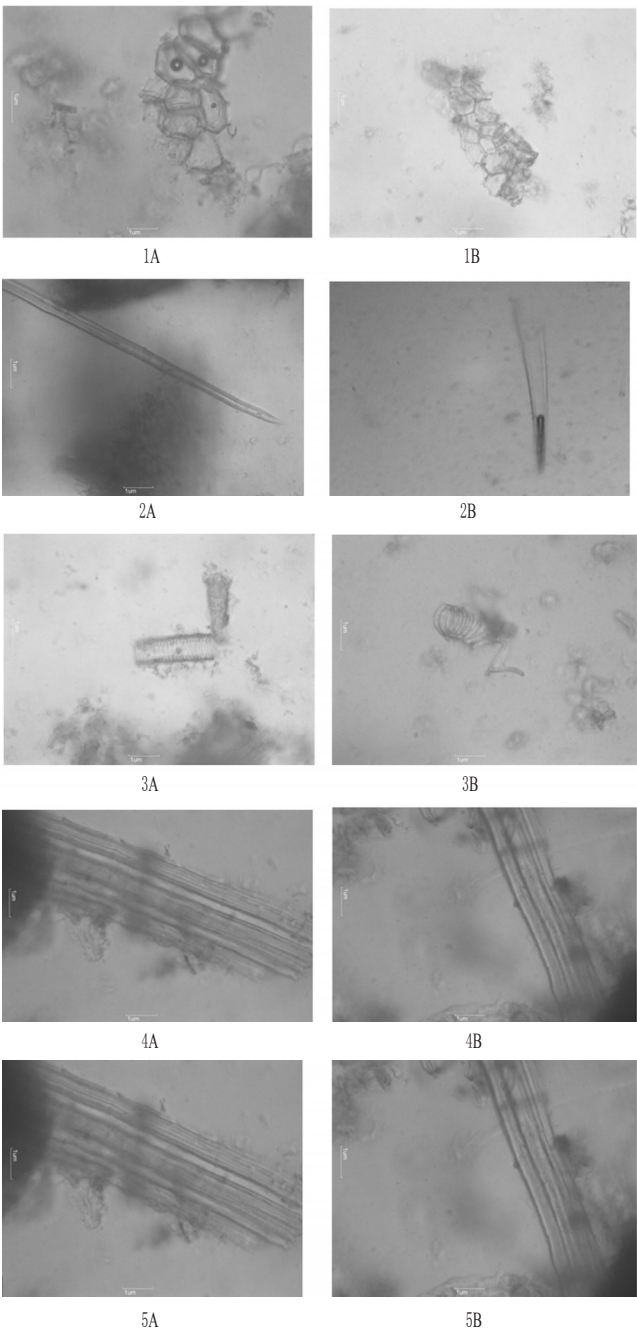
胆木叶多皱缩卷曲,有的破碎。完整叶片展开后呈长椭圆形至长圆状倒披针形,长 5~14 cm,宽 3~7 cm,顶端渐尖而略钝,基部呈楔形;上表面呈墨绿色,背面褐色,叶脉呈网状,侧叶脉明显,纤细,向上斜伸,近边缘处连结,在叶片两边略凸起。叶柄长 0.5~3 cm,棕褐色。气微,味苦、涩。

2.2 显微特征

药材样品粉末为黄棕色。导管众多,大小不一,多为螺旋导管。纤维多成束,壁较厚。非腺毛较粗大,顶端细胞尖锐。薄壁细胞类圆形。厚角组织较多,黄棕色,详见图 1。

2.3 TLC 鉴别

取药材样品粉末 1 g,加 70%乙醇溶液 25 mL,超声处理 30 min,冷却,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取对照品适量,精密称定,加 70%乙醇溶液制成异长春花苷内酰胺质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。以 70%乙醇溶液作为阴性对照溶液。按 TLC 法[2015 年版《中国药典》(四部)]^[14]试验,量取上述供试品溶液 5 μL、对照品溶液和空白对照溶液各 3 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(15:22:



1A、1B. 薄壁细胞;2A、2B. 非腺毛;3A、3B. 螺旋导管;4A、4B. 纤维;5A、5B. 厚角组织
1A, 1B. parenchyma cell; 2A, 2B. nonglandular hair; 3A, 3B. spiral vessels; 4A, 4B. fibre; 5A, 5B. collenchyma

图 1 显微特征

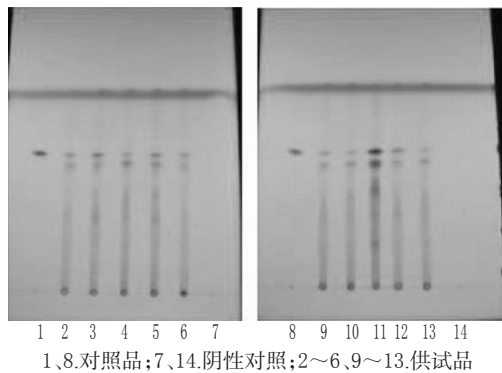
Fig 1 Microscopic characteristics

40:10, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,空白对照无干扰,详见图 2。

2.4 水分测定

取各批药材样品粉末约 3 g,精密称定,按 2015 年版《中国药典》(四部)“通则 0832 第一法”^[14]测定,每批平行测定 2 次,详见表 2。结果表明,药材样品水分在

9.48%~11.46%之间,平均水分为10.34%。故初步拟定胆木叶药材水分不得过12.0%。



1, 8. substance control; 7, 14. negative control; 2-6, 9-13. test samples

图2 薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatograms

表2 药材样品水分、灰分测定结果(n=2)

Tab 2 Results of moisture and ash determination (n=2)

样品批号	水分,%	总灰分,%	酸不溶性灰分,%
15040801	11.46	5.98	0.24
15041602	9.48	5.67	0.25
15050403	9.88	5.51	0.23
15050904	10.16	5.67	0.26
15071005	10.38	6.44	0.30
15071506	10.42	5.98	0.27
15090807	10.75	6.12	0.36
15091008	9.68	5.27	0.35
15110609	9.96	5.49	0.28
15111310	11.25	5.48	0.30
平均值	10.34	5.76	0.28

2.5 总灰分、酸不溶性灰分的测定

取各批药材样品粉末约2 g,精密称定,按2015年版《中国药典》(四部)“通则2302总灰分、酸不溶性灰分测定法”^[14]测定。每批平行测定2次,详见表2。结果表明,药材样品总灰分在5.27%~6.44%之间,平均总灰分为5.76%;酸不溶性灰分在0.23%~0.36%之间,平均酸不溶性灰分为0.28%。故初步拟定胆木叶药材总灰分不得过6.5%,酸不溶性灰分不得过0.50%。

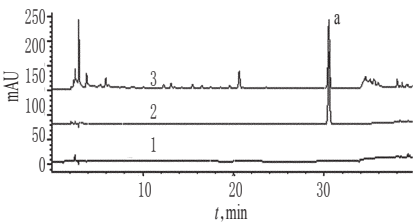
2.6 异长春花苷内酰胺含量测定

2.6.1 色谱条件和系统适用性试验 色谱柱:Lichrospher C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~30 min, 15%→32% A; 30~35 min, 32%→95% A)^[11];流速:1 mL/min;检测波长:226 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以异长春花苷内酰胺峰计不少于3 000^[12];基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

2.6.2 对照品溶液的制备 取对照品适量,精密称定,加75%乙醇溶液制成异长春花苷内酰胺质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 取样品粉末(过3号筛)1 g,精密称定,置于250 mL圆底烧瓶中,加75%乙醇溶液

100 mL,称定质量,加热回流2 h,放冷,再次称定质量,加75%乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。



1.空白对照;2.对照品;3.供试品;a.异长春花苷内酰胺

1. blank control; 2. substance control; 3. test samples; a. strictosamide

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

2.6.4 空白对照溶液的制备 以75%乙醇溶液作为空白对照溶液。

2.6.5 线性关系考察 分别精密量取“2.6.2”项下对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加75%乙醇溶液定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以异长春花苷内酰胺质量浓度(x, mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y = 4\,056.3x - 5.949\,2$ ($r = 0.999\,5$)。结果表明,异长春花苷内酰胺检测质量浓度线性范围为0.010 5~0.21 mg/mL。

2.6.6 精密度试验 取“2.6.2”项下对照品溶液适量,按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,异长春花苷内酰胺峰面积的RSD=0.72% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.6.7 稳定性试验 取“2.6.3”项下供试品溶液(批号:15090807)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,异长春花苷内酰胺峰面积的RSD=0.21% (n=7),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

2.6.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:15090807)适量,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,异长春花苷内酰胺平均含量为0.423%,RSD=1.18% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.6.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:15090807)0.5 g,共6份,分别加入低、中、高质量的异长春花苷内酰胺对照品各适量,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.6.10 药材样品含量测定 取10批样品各适量,分别按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

由表4可知,10批胆木叶药材中异长春花苷内酰胺含量在0.124%~1.003%之间,平均含量为0.433%。考

虑到不同产地、不同采收期采集的胆木叶药材的含量差异,暂定胆木叶药材按干燥品计算,含异长春花苷内酰胺(C₂₆H₃₀N₂O₈)不得少于0.30%。

表3 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.509 2	2.14	1.10	3.23	99.09		
0.503 1	2.12	1.10	3.24	101.82		
0.501 3	2.11	1.10	3.21	98.18		
0.505 0	2.12	2.10	4.15	96.67		
0.502 4	2.11	2.10	4.18	98.57	98.45	1.86
0.504 9	2.12	2.10	4.17	97.62		
0.501 0	2.13	3.20	5.35	100.63		
0.500 2	2.11	3.20	5.19	96.25		
0.503 6	2.12	3.20	5.23	97.19		

表4 药材样品含量测定结果(n=3,%)
Tab 4 Results of content determination of samples(n=3,%)

样品批号	异长春花苷内酰胺
15040801	0.348
15041602	0.124
15050403	0.140
15050904	0.446
15071005	0.358
15071506	0.542
15090807	0.431
15091008	0.572
15110609	0.364
15111310	1.003
平均含量	0.433

3 讨论

关于胆木的基源,1977年版《中国药典》(一部)^[15]记载为茜草科植物乌檀*N. officinalis* Pierre ex Pitard的干燥茎及根。2004年版《广东省中药材标准》(第一册)^[1]记载为茜草科植物胆木*N. officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. ex Chun的干燥木材。经对照二者基源相同,均为茜草科乌檀属植物乌檀(又称胆木),但入药部位稍有不同(前者为干燥茎及根,后者为干燥木材)。从1999年版《中国植物志》^[16]来看,1940年乌檀(又称胆木)的拉丁名已明确为*N. officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. et Chun,因未查阅到1977年版《中国药典》起草说明,其中收录的乌檀(又称胆木)将拉丁名定为*N. officinalis* Pierre ex Pitard的原因不明。2004年版《广东省中药材标准》(第一册)^[1]中,将胆木的拉丁名定为*N. officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. ex Chun,这与1999年版《中国植物志》中的拉丁名存在细微差异,相关起草说明也未给予解释。鉴于以上情况,考虑到胆木药材基源考证的历史变革及药材名称的普及性,将胆木叶的基源确定为茜草科乌檀属植物胆木*N. officinalis* (Pierre ex Pitard) Merr. et Chun的干燥叶。目前,胆木叶尚未被国家或地方标准收录,有

必要建立胆木叶药材标准,便于其新用药部位的开发利用。

根据10批胆木叶药材的各项检测结果,建议胆木叶药材按干燥品计算,含异长春花苷内酰胺(C₂₆H₃₀N₂O₈)不得少于0.30%,水分不得过12.0%,总灰分不得过6.5%,酸不溶性灰分不得过0.50%。

综上所述,本研究建立的胆木叶药材定性、定量检测方法具有简便、准确、灵敏度高、重复性好等特点,可为胆木叶药材质量标准的制定提供科学依据,并为胆木新药部位的开发奠定基础。

参考文献

[1] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药材标准:第一册[M].广州:广东科技出版社,2004:154-155.

[2] 范龙.胆木叶的化学成分研究[D].广州:暨南大学,2010.

[3] 谢达温,李永辉,赵丽,等.胆木叶化学成分研究[J].中国中药杂志,2011,36(8):1037-1039.

[4] 廉源沛,谢达温,原少伟,等.胆木叶和胆木的相似性研究[J].中国中药杂志,2015,40(22):4433-4441.

[5] 宣伟东,卞俊,陈海生.胆木生物碱成分研究[J].中草药,2007,38(2):170-173.

[6] 苏奎,龚敏,邓世明,等.胆木叶和茎挥发性成分对比分析及其抗MRS活性的研究[J].时珍国医国药,2010,21(2):299-301.

[7] 张伟敏,肖健雄,符致坚,等.胆木叶提取物的抗氧化活性研究[J].林产化学与工业,2009,37(4):82-86.

[8] 唐菲,王豪,骆辉,等.胆木叶的抗炎镇痛作用研究[J].中国医药导刊,2009,11(7):1191-1192.

[9] 曹亮,李娜,丁岗,等.胆木叶提取部位群的抗炎镇痛作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):125-128.

[10] 章晨峰,曹亮,衡晴晴,等.胆木叶片抗大鼠急性咽炎作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(23):97-100.

[11] Xie DW, Li YH, Zhao L, et al. Simultaneous quantification of five compounds from Nauclea officinalis leaves by high performance liquid chromatography[J]. J Food Drug Anal,2012,20(2):259-264.

[12] 张亚平.胆木注射液的质量研究[D].武汉:华中科技大学,2008.

[13] 王静静,蒋俊,王粉霞,等.HPLC法同时测定胆木及其制剂中酚酸和生物碱类成分[J].中成药,2012,34(12):2326-2330.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57、103、204.

[15] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].1977年版.北京:人民卫生出版社,1977:424.

[16] 中国科学院植物志编辑委员会.中国植物志:第71卷:1[M].北京:科学出版社,1999:260.

(收稿日期:2016-09-14 修回日期:2016-10-14)

(编辑:张 静)