

团体标准《苦郎树枝叶》 (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起草的团体标准《苦郎树枝叶》（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 6 号）。

二、项目背景及目的意义

苦郎树 *Volkameria inermis* L. 为马鞭草科（Verbenaceae）苦郎树属（*Volkameria*）植物，生于海岸沙滩和潮汐能至的地方，分布于印度、东南亚至大洋洲北部。国内主要分布于广西、福建、台湾、广东。苦郎树具有广泛的药用价值，其根、树皮、叶均可入药，具有散瘀逐湿，通经祛痹，清热消肿，止痛，除湿杀虫截疟之功效。用于风湿骨痛，风湿性关节炎，腰腿痛，坐骨神经痛，胃痛，感冒发热，疟疾，肝炎，肝脾肿大，跌打损伤，血瘀肿痛，内伤吐血，外伤出血，疮癣疥癩，湿疹瘙痒。

苦郎树作为东南亚国家传统药用植物，有着广泛的使用历史。在越南民间医学中，苦郎树被用于治疗各种疾病，如肝炎、风湿、发烧、疟疾、胃痛等。在印度作为退热和抗疟药以及奎宁的替代品用于退烧和间歇性发热；其叶粉与樟脑、大蒜或辣椒一起用于水肿、肌肉疼痛、风湿疼痛，根可用于性病。在泰国传统医学中，苦郎树的新鲜叶子外用于治疗皮肤病。在我国广西京族使用苦

郎树枝叶捣汁饮用治疗肝炎。

京族药用植物具有独特的医药价值，在历史上对京族的生存与繁衍起到了至关重要的作用，但目前有关京族医药的挖掘和探索报道，不够充分、社会认知度较低，仍需进一步研究。因此“一带一路”背景下京族医药文化的传承和发展，显得更为必要和迫切。苦郎树为京医常用药物，其作为药用植物的渊源较长，且具有较广的药用范围和分布范围，可作为植物药、兽用药及人用药使用，其药用价值已经得到广泛认可。

国内外学者对苦郎树进行了一些研究，发现苦郎树含有黄酮类、萜类、酚酸类、苯乙醇苷类等化合物，具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种药理活性。然而目前国内外未见有关于药材苦郎树的质量标准研究相关报道，这给苦郎树的种植、采收、加工、贸易以及药物研究开发等方面带来了困难。为了更好的开发利用民族药材，保护我区特色药材资源，控制好药材质量，保障人民用药安全，使之符合国际标准，开发出新的药用途径，为资源的利用及提高应用价值打下科学基础，有必要建立一套科学、准确评价苦郎树枝叶药材的质量标准。

三、项目编制过程

（一）成立标准编制工作组

团体标准《苦郎树枝叶》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壮族自治区中医药研究院广西中药质量标准研究重点实验室相关人员配合。

苦郎树枝叶标准主要起草人员

研制人员	姓名	职务/职称	现从事专业	所在单位
------	----	-------	-------	------

项 目 负责人	柴玲	副研究员	药物分析	广西壮族自治区中医药研究院
主 要 参 加 人 员	刘布鸣	研究员	中药质量研究	广西中药质量标准研究重点实验室
	袁健童	助理研究员	中药质量研究	广西中药质量标准研究重点实验室
	陈明生	助理研究员	中药分析	广西中药质量标准研究重点实验室
	冯军	副主任药师	中药学	广西中药质量标准研究重点实验室
	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：

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 65(1).北京：北京科学出版社,1982: 154.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海科学技术出版社, 1999.

[3] Chi VV. Dictionary of Vietnamese medicinal plants [M].New ed. Hanoi: Medicine Publishing House,2012.

[4] Nadkarni Km N A, Chopra Rn. Indian Materia Medica[M].Mumbai: Popular Prakashan Ltd.,1996: 352.

[5] Kanchanapoom T, Kasai R, Chumsri P, et al.Megastigmane and iridoid glucosides from Clerodendrum inerme[J].Phytochemistry,2001, 58 (2): 333-336.

[6] 杜钦, 韦文猛, 米东清.京族药用红树林民族植物学知识及现状[J].广西植物,2016, 36 (04): 405-412.

[7] Hassan S K, EL-Sammad N M, Mousa A M, et al. Hypoglycemic and

antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, 5(6): 462-471.

[8] 张偲, 南海涵, 尹浩. 许树中苯乙醇苷类化合物的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(6): 1008-1011.

[9] 邓业成, 毕秀莲, 杨林林, 等. 红树植物苦郎树提取物及其活性成分对植物病原真菌的抑菌活性研究 [J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(10): 2010-2013.

[10] 南海涵, 吴军, 尹浩等. 许树中的萜类化合物 [J]. *中草药*, 2006, (04): 508-509.

[11] 吴军, 南海涵, 张偲等. 许树化学成分研究 [J]. *中草药*, 2005, 36(4): 492-494.

[12] Kanchanapoom T, Kasai R, Chumsri P, et al. Megastigmane and iridoid glucosides from *Clerodendrum inerme* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(2): 333-336.

[13] Pandey R, Verma R K, Gupta M M. Neo-clerodane diterpenoids from *Clerodendrum inerme* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(6): 643-648.

[14] Parveen M, Khanam Z, Ali M, et al. A novel lupene-type triterpenic glucoside from the leaves of *Clerodendrum inerme* [J]. *Natural Product Research*, 2010, 24(2): 167-176.

[15] Kar P, Mishra D K, Roy A, et al. Elucidation of phytomedicinal efficacies of *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. (Wild Jasmine) [J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 140: 356-364.

[16] Pereira J, Gurudutt K N. Growth inhibition of *Musca domestica* L. and *Culex quinquefasciatus* (say) by (-)-3-epicaryoptin isolated from leaves of *Clerodendron inerme* (Gaertn) (Verbenaceae) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, 16(7):

2297-2306.

[17] Rao M L S, Varma Y N R. Ethno-veterinary Medicinal Plants of the Catchments Area of the River Papagni in the Chittoor and Ananthapur Districts of Andhra Pradesh, India [J]. Ethnobotanical Leaflets, 2008, 2008: 26.

[18] Natesh J, Mondal P, Kaur B, et al. Promising phytochemicals of traditional Himalayan medicinal plants against putative replication and transmission targets of SARS-CoV-2 by computational investigation [J]. Comput Biol Med, 2021, 133: 104383.

[19] Swing K. Introduction to Biodiversity [M]//Furze J N, Swing K, Gupta A K, et al. Mathematical Advances Towards Sustainable Environmental Systems. Cham; Springer International Publishing. 2017: 89-107.

[20] Deka M K, Saikia G K. Antifeedant and Growth Regulatory Effects of *Clerodendron Inerme* (Linn.) Gaertn. and *Lantana Camara* L. Extracts on Tea Mosquito Bug, *Helopeltis Theivora* Waterhouse (Hemiptera: Miridae) [J]. Pesticide Research Journal, 2011, 23(1): 32-35.

[21] Kiruba S, Nithya J, Jeeva S, et al. Ecological inhibitory effect of certain tropical weeds on the oviposition and emergence of *Callosobruchus maculatus* [J]. Journal of Environmental Protection and Ecology, 2013, 14(3): 991-999.

[22] Kumar C M, Jayadevappa H P, Vasudev H H. Evaluation of *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. on Burkitt's Lymphoma Cancer [J]. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2018, 52(2): 241-247.

[23] Renju G L, Manoharan S, Balakrishnan S, et al. Chemopreventive and antilipidperoxidative potential of *Clerodendron inerme* (L) Gaertn in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice [J].

Pakistan journal of biological sciences : PJBS, 2007, 10(9): 1465-1470.

[24] Palani V, Senthilkumaran R K, Govindasamy S. Biochemical evaluation of antitumor effect of Muthu Marunthu (a herbal formulation) on experimental fibrosarcoma in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 65(3): 257-265.

[25] Prasad K N, Edwards-prasad J, Kentrotil S, et al. Ayurvedic (science of life) agents induce differentiation in murine neuroblastoma cells in culture [J]. Neuropharmacology, 1992, 31(6): 599-607.

[26] Fan P C, Huang W J, Chiou L C. Intractable Chronic Motor Tics Dramatically Respond to Clerodendrum inerme (L) Gaertn [J]. Journal of Child Neurology, 2009, 24(7): 887-890.

[27] Chaturvedi G N, Subramaniyam P R, Tiwari S K, et al. Experimental and clinical studies on diabetes mellitus evaluating the efficacy of an indigenous oral hypoglycaemic drug-arani (clerodendron phlomidis) [J]. Ancient science of life, 1984, 3(4): 216-224.

[28] Lin T-Y, Huang W-J, Wu C-C, et al. Acacetin Inhibits Glutamate Release and Prevents Kainic Acid-Induced Neurotoxicity in Rats [J]. PLOS ONE, 2014, 9(2): e88644.

（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，对苦郎树枝叶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苦郎树枝叶技术要求，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《苦郎树枝叶》（草案）。

2023 年 9 月至 10 月，深入区内苦郎树种植、加工及检验的有代表性的村镇、单位、企业针对苦郎树枝叶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《苦郎树枝叶》（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苦郎树枝叶的感官指标、理化指标进行分析测定，对苦郎树枝叶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。

毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量测定：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，深入广西北海、广西钦州、广西防城等地区开展资源调查、样品采集。

苦郎树枝叶采集于广西北海、钦州、防城、海南海口、三亚等地，总计 10 批，经广西壮族自治区中医药研究院胡仁传副研究员鉴定为马鞭草科植物苦郎树（*Volkameria inermis* L.）的枝叶，批号如表 1 所示。

表 1 不同产地苦郎树枝叶的样品来源信息

编号	产地	采收时间
S1	海南海口	2023.05
S2	海南三亚	2023.05
S3	广西合浦	2023.11
S4	广西钦州	2023.10
S5	广西合浦	2023.05
S6	广西合浦	2023.07
S7	广西钦州	2023.11
S8	广西北海	20221108
S9	广西北海	2023.11
S10	广西北海	2023.11
S11	广西防城	2023.09
S12	广西北海	2023.11
S13	福建省福州市	2023.11

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。样品粉末黄绿色。非腺毛细胞1~4个，有的细胞内含棕黄色物质，直径15~33 μm 。草酸钙方晶单个散在或存在于薄壁细胞中，直径10~21 μm 。纤维成束或单个分离，直径18~35 μm 。石细胞长方形或圆形，单个散在或数个相聚，壁厚，孔沟明显，直径25~55 μm 。叶表皮细胞垂周壁平直或稍弯曲，气孔不定式，副卫细胞3~5个。导管为螺纹导管或具缘纹孔导管，直径25~35 μm 。



图1 苦郎树枝叶的显微鉴别

2. 薄层色谱鉴别

2.1 仪器

ZF1-II 暗箱紫外分析仪。

2.2 试剂

环己烷、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、冰醋酸、甲酸均为分析纯，水为超纯水。

毛蕊花糖苷对照品（111530-201914，中国食品药品检定研究院），异毛蕊花糖苷对照品（CFS201701，Chem Faces）。

2.3 供试品溶液的制备方法

精密称取1 g苦郎树药材细粉，加入50 mL 80%甲醇，超声（频率40 KHz，功率400 W）30 min，收集滤液，蒸干后，残渣加取2 mL甲醇溶解后取上清液，0.45 μm滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备方法

取毛蕊花糖苷标准品与异毛蕊花糖苷标准品适量，精密称量，分别取甲醇制得每1 mL溶液含有毛蕊花糖苷1 mg、异毛蕊花糖苷1 mg的溶液，0.45 μm滤膜滤过，取滤液即得。

2.5 薄层色谱条件考察

2.5.1 不同展开体系考察

实验比较了3种展开体系，如表2所示，按照吸取供试品溶液3~5 μL、对照品溶液3 μL的点板方法，实验结果如图2所示。

表2 薄层展开条件

薄层板	展开剂	显色剂
预制硅胶G板	环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸 (20: 5: 8: 0.1)	10%硫酸乙醇溶液
高效预制硅胶GF254板	乙酸乙酯-甲醇-甲酸-水(18: 2: 1.5: 1)	0.5%香草醛硫酸溶液
预制聚酰胺薄层板	甲醇-乙酸-水 (5: 1: 4)	无

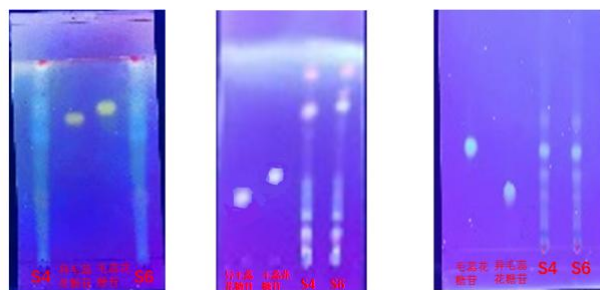


图2 不同展开体系的对比

对比上述三种展开体系点板结果，发现相较于其他薄层色谱体系，选用预制聚酰胺薄膜板，以甲醇-乙酸-水（5：1：4）作为展开剂时，在板上显出的斑点清晰，无干扰，对照品毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷所对应的斑点与周边的斑点能够分离开来，且Rf值适中，因此确定以预制聚酰胺薄层板作为固定相，以甲醇-乙酸-水（5：1：4）作为展开剂来作为苦郎树薄层鉴别的展开体系。

2.5.2 不同展开温度考察

按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下方法制备对照品溶液，使用预制聚酰胺薄膜板，以甲醇-乙酸-水（5：1：4）作为展开剂进行展开，比较15℃、25℃和35℃不同温度下的展开情况，如图3所示。

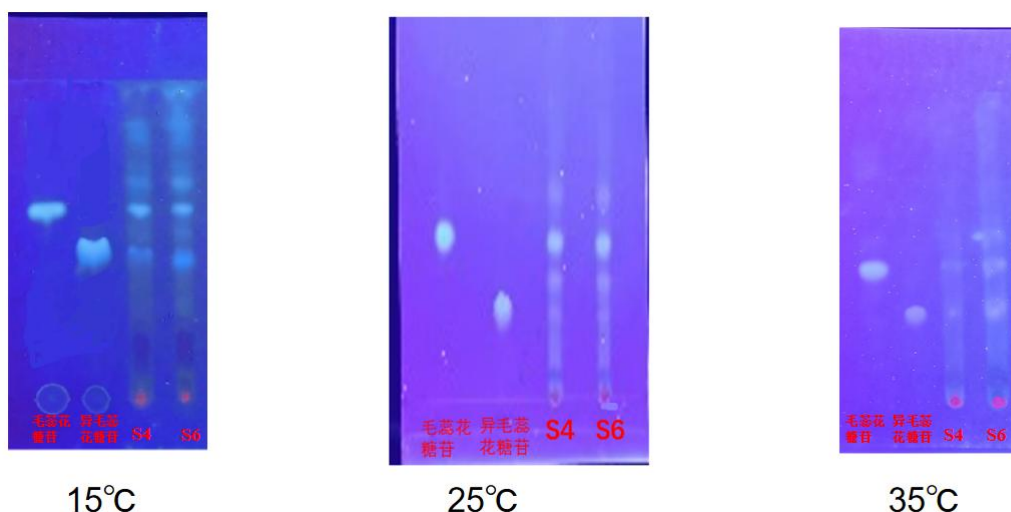


图3 不同温度下薄层色谱展开

结果表明，35℃环境温度，15℃与25℃相比，25℃环境温度下斑点显示更为清晰，因此选择在25℃环境温度下进行展开。

2.6 苦郎树枝叶样品的薄层鉴别

利用建立的薄层鉴别方法，对苦郎树枝叶样品进行鉴别。结果如图4所示。供试品溶液中，在与毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品相应的位置上，均显相同颜色的荧光斑点。

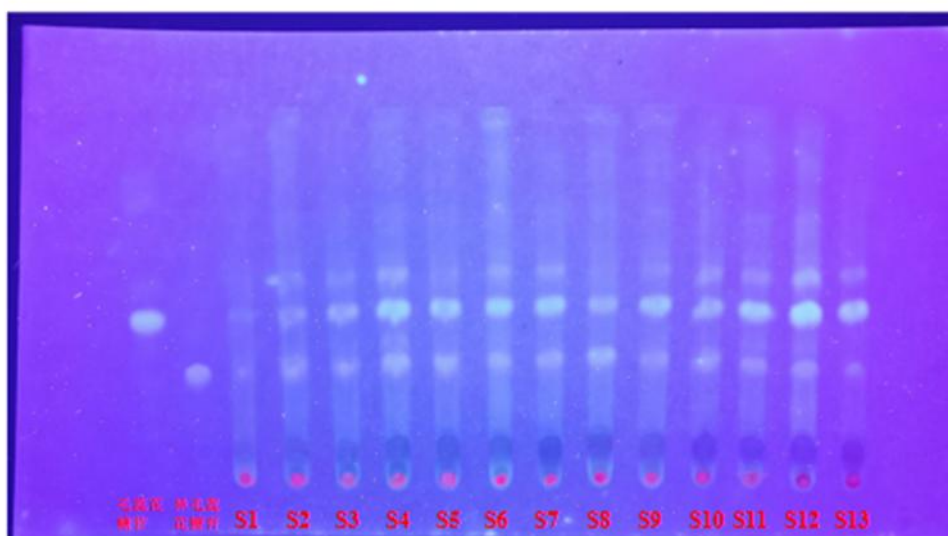


图4 13批苦郎树枝叶样品薄层鉴别结果
(聚酰胺薄膜板，100×200 mm) (25℃)

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3所示，13批样品的平均水分为8.40%，以平均值上浮20%作为水分限度，规定不得超过10.0%。

表 3 13 批苦郎树药材水分含量测定

批号	含水量 (%)
S1	5.8
S2	6.4
S3	6.1
S4	10.2
S5	8.3
S6	7.4
S7	7.5
S8	6.3
S9	7.2
S10	10.2
S11	10.4
S12	12.1
S13	11.3
平均值	8.4

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4所示。13批苦郎树枝叶样品的平均灰分为5.6%，以平均值上浮20%作为总灰分限度，规定不得过6.7%。

表 4 13 批苦郎树药材总灰分含量测定

批号	含水量 (%)
S1	4.2
S2	5.4
S3	6.4
S4	6.1
S5	6.5
S6	6.6
S7	6.2
S8	4.2
S9	6.3
S10	5.2
S11	4.5
S12	5.4
S13	4.7
平均值	5.6

5.浸出物的测定

5.1 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，用甲醇作为溶剂。13批样品的检测结果见表5，醇溶性浸出物平均值为25.4%，以平均值下浮20%作为限度，规定不得少于30.5%。

表5 苦郎树枝叶样品浸出物测定结果

批号	含水量 (%)
S1	18.3
S2	17.5
S3	25.3
S4	23.2
S5	26.5
S6	22.6
S7	24.2
S8	24.2
S9	21.3
S10	25.2
S11	28.5
S12	25.4
S13	27.7
平均值	23.8

6.毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量测定方法

6.1 材料

6.1.1仪器

万分之一电子分析天平（AR-224CN，奥豪斯仪器（常州）有限公司）；Waters 1525-2707-2489高效液相色谱仪（美国沃特世公司）；色谱柱：Dionex Acclaim 120 C 18（4.6×150mm，3μm），WelchXB-C 18（4.6×250mm，5μm）；数控超声波清洗器（KQ500DE，昆山市超声仪器有限公司）；移液管。

6.1.2 试药

毛蕊花糖苷对照品（111530-201914，中国食品药品检定研究院，纯度>98.0 %），异毛蕊花糖苷对照品（CFS201701，Chem Faces，纯度>98.0 %）。甲醇（广东光华科技股份有限公司，分析纯）；甲醇、乙腈（上海星可纯溶剂

有限公司，色谱纯）；磷酸、冰醋酸（广东光华科技股份有限公司，色谱纯），水为超纯水。

6.2 对照品溶液的制备

取毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷对照品适量，置于同一量瓶中，加甲醇制成每1 mL含毛蕊花糖苷920 μg 、异毛蕊花糖苷917 μg 的混合对照品溶液。

6.3 供试品溶液的制备

取本品粉末（过二号筛）约0.2 g，精密称定，精密加入80% 甲醇10 mL，称定重量，超声处理（功率400 W，频率40 KHz）30 min，放冷后，再次称定重量，使用80%甲醇补足减失的重量，摇匀后过滤，收集过滤液，即得供试品溶液。

6.4 含量测定条件考察

6.4.1 检测波长选择

取毛蕊花糖苷对照品的甲醇溶液及异毛蕊花糖苷的甲醇溶液测定紫外吸收光谱，毛蕊花糖苷对照品的最大吸收波长为 329 nm，异毛蕊花糖苷对照品的最大吸收波长为 326 nm，且在 330 nm 下其他干扰峰较小，依据国家计量检定规程对二极管阵列检测器波长示值最大允许误差为 ± 2 nm，因此选择 330 nm 为检测波长。通过比较各吸收波长下的图谱最终选择 330 nm 作为检测波长。

6.4.2 色谱柱选择

根据毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的结构特征，为苯乙醇苷类物质，具有多羟基结构，也因此选用 C18 柱作为分离柱较为合适。对比安捷伦 ZORBAX SB-C18 柱（250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ）、伊利特 C18 柱（250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ）、Sunfire C18 柱（250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ）这三种品牌的色谱柱，如图 5 所示。

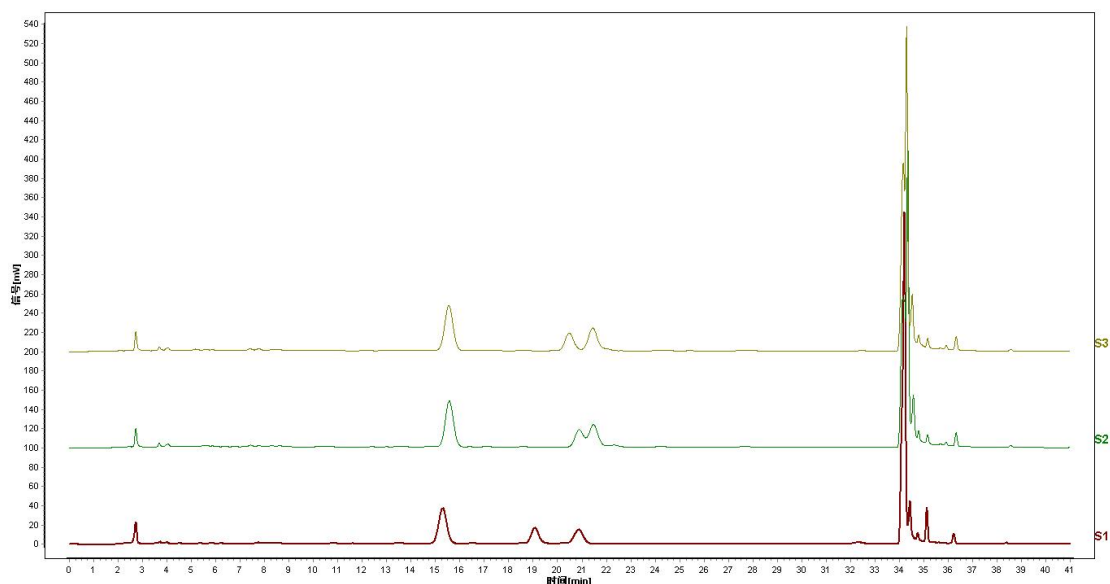


图 5 不同色谱柱测定的苦郎树药材 HPLC 色谱图

经比较，在使用 Waters SunFire C18 分析柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm）时分离效果最佳，峰型尖且窄，因此选用该柱作为含量测定所使用的分析柱。

6.4.3 不同梯度条件选择

按本章节“6.3”项下方法制备供试品溶液，使用如表 6 所示洗脱梯度，进样检测得到对应色谱图结果如图 6 所示。

表 6 不同洗脱梯度表

梯度 S1			梯度 S2		
时间 (分钟)	0.1% 磷酸 水溶液(%)	乙腈 (%)	时间 (分钟)	0.1% 磷酸 水溶液(%)	乙腈 (%)
0→10	90	100	0→5	90	10
10→20	90→80	10→20	5→10	90→81	10→19
20→35	80→80	20→20	10→30	81→81	19→19
35→36	80→30	20→70	30→31	81→30	19→70
36→48	30→30	70→70	31→41	30→30	70→70
48→49	30→90	70→10	41→42	30→90	70→10
49→55	90	100	42→45	90	10
梯度 S3			梯度 S4		
时间 (分钟)	0.1% 磷酸 水溶液(%)	乙腈 (%)	时间 (分钟)	0.1% 磷酸 水溶液(%)	乙腈 (%)
0→30	81→81	19→19	0→30	82→80	18→20
30→31	81→30	19→19	30→31	80→30	20→70
31→40	30→30	70→70	31→40	30→30	70→70
40→41	30→81	70→19	40→41	30→82	70→18
41→45	81→81	19→19	41→45	82→82	18→18

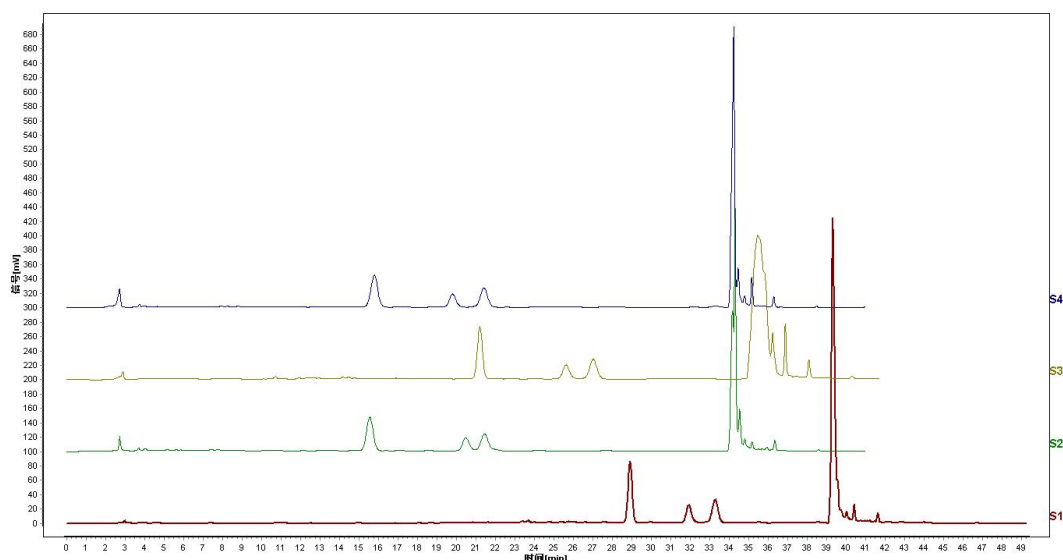


图 6 不同梯度洗脱考察结果

从结果对比中可以看出，使用梯度 S4 的方法进行洗脱时，峰型最好且分离度最佳，因此决定选用梯度 S4 作为洗脱流动相方法。

6.4.4 不同流动相考察

按照本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，按照本章“6.4.3”项下液相方法考察乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸、甲醇-水这四种流动相对峰分离度的影响。发现以甲醇作为有机相时，难以将供试品洗脱出来，相比于乙腈作为有机相洗脱效果较差，因此考虑使用乙腈作为流动相的有机相。

其中，以 0.1%磷酸的水-乙腈的流动相能够使得峰形尖窄并且保证较好的分离度，因此，选择以乙腈-0.1%磷酸水作为流动相进行洗脱。

6.4.5 不同流速考察

按照本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，按照本章“6.4.3”项下所述液相梯度洗脱条件，对比一下 3 种不同流速，为 0.8、1.0、1.2 mL/min，结果如图 7 所示。

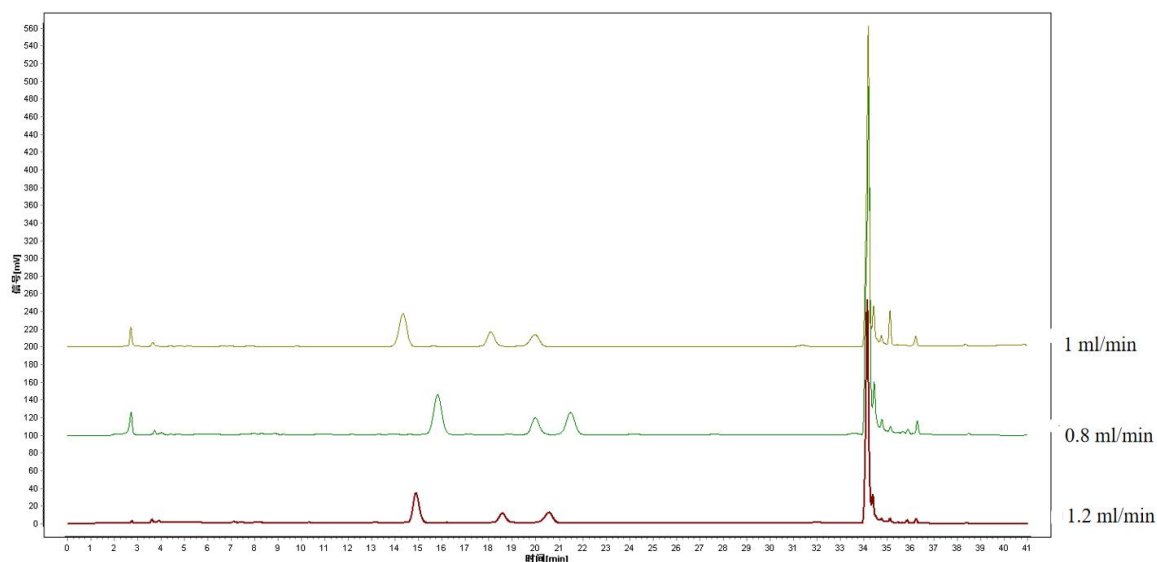


图 7 不同流速考察结果

根据结果显示，选用了不同流速仅是改变出峰时间，而对于分离效果并无明显影响，因此采用常用的 1 mL/min 的流速来作为液相洗脱流速。

6.4.6 不同柱温的考察

按照本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，“6.4.3”项下所述液相梯度洗脱条件，对比 25 °C、30 °C、35 °C 这 3 种不同温度下进样测试，在这三种柱温条件下分离效果如图所示。

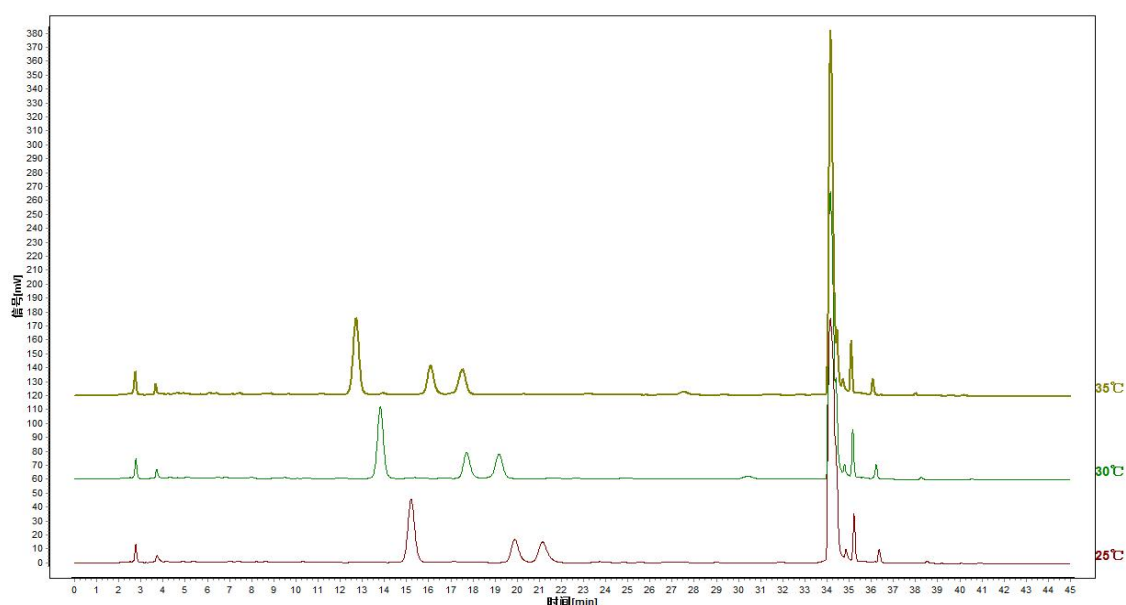


图 8 不同柱温条件下分离情况

随着柱温的升高，各峰出峰时间均略有提前，但对分离度及峰型并无较大影

响，因此选择 25 ℃作为分离时所采用的柱箱温度。

6.4.7 供试品提取条件考察

主要对比了不同提取溶剂、不同提取方法、不同提取时间以及料液比对实验结果的影响。使用的样品为 K4（20211008），按照本章“6.4.3”项下所述液相梯度洗脱条件进行方法学考察。实验结果如图 9 所示。

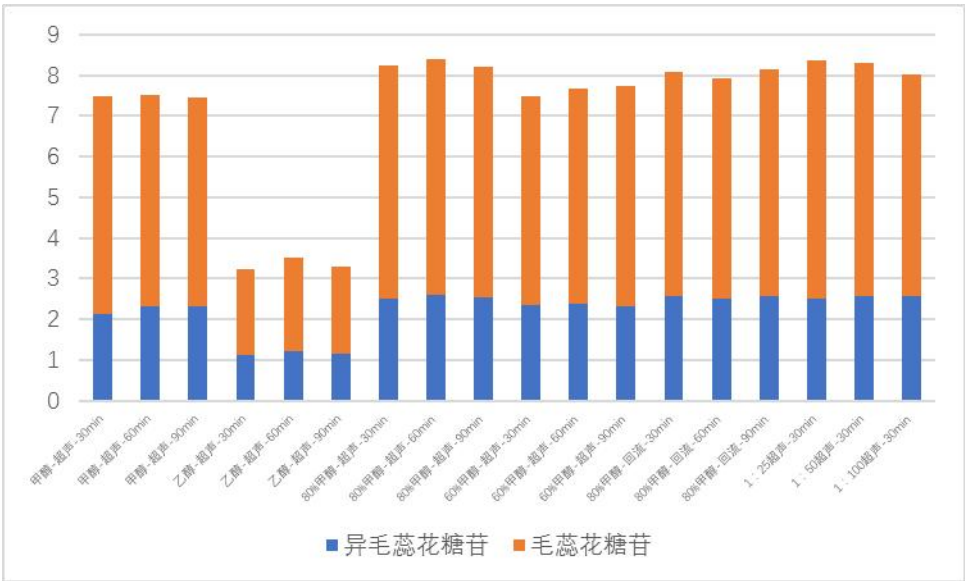


图 9 供试品提取条件考察

曾对比乙醇、甲醇、水、80%甲醇、60%甲醇分别作为提取溶剂时的效果，对比发现，当乙醇作为提取溶剂时，提取效果很差，而 80%甲醇作为提取溶剂时表现最佳，因此选择 80%甲醇作为提取溶剂。对比超声提取、加热回流提取和静置提取，使用超声提取和加热回流提取效果相差不大，而超声提取较为简单快捷，选择超声提取法。进行超声处理 30 min 和 60 min 时，差别不大，从效率上考虑，选择超声 30 min。对比 1: 25、1: 50 和 1: 100 这几种不同料液比，几乎无太大差别，但在进行含量测定时，使用的药材量较少，为保障溶液能完全浸没药材粉末，选择 1: 50 的料液比。最后确定供试品的提取条件为 80%甲醇超声（频率 40KHz，功率 400W）提取 30 min，料液比为 1: 50。

6.5 方法学验证

6.5.1 对照品溶液的制备

取毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷对照品适量，置于同意量瓶中，加甲醇制成每 1 mL 含毛蕊花糖苷 920 μg 、异毛蕊花糖苷 917 μg 的混合对照品溶液。

6.5.2 供试品溶液的制备

取本品粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，精密加入 80% 甲醇 10 mL，称定重量，超声处理（功率 400 W，频率 40 KHz）30 min，放冷后，再次称定重量，使用 80% 甲醇补足减失的重量，摇匀后过滤，收集过滤液，即得供试品溶液。

6.5.3 色谱条件

选用 Waters SunFire C18 柱、乙腈和 0.1% 磷酸水溶液为流动相，梯度洗脱，洗脱梯度见下表 7 所示，柱温 25℃，检测波长 330 nm。

表 7 洗脱梯度

时间（分钟）	0.1%磷酸水溶液（%）	乙腈（%）
0→30	82→80	18→20
30→31	80→30	20→70
31→40	30→30	70→70
40→41	30→82	70→18
41→45	82→82	18→18

6.5.4 线性关系

取毛蕊花糖苷对照品母液进行稀释，配置成为浓度分别为 4.6、18.6、46、92、138、230 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，采用自动进样器进样 20 μL ，最终毛蕊花糖苷的进样量分别为 0.092、0.368、0.92、1.84、2.76、4.6 μg ，在波长 330 nm 下进行检验测定。

以对照品峰面积积分值 A 作为纵坐标（Y），以对照品进样量 C 作为横坐标（X）进行线性回归分析，其回归方程为 $A=1.4688*106C+5.8934*104$ ，相关系数的平方值 $R^2=0.9998$ ；结果表明毛蕊花糖苷在 4.6~230 $\mu\text{g/mL}$ 范围之内，峰面

积积分值 A 与进样量 C (μg)呈现良好的线性关系。线性关系数据见表 8，标准曲线见图 10。

表 8 毛蕊花糖苷线性及线性范围

编号	毛蕊花糖苷对照 品浓度 (μg/ml)	毛蕊花糖苷对照 品进样量 (μg)	毛蕊花糖苷对照 品峰面积
1	4.6	0.092	141367
2	18.6	0.368	581347
3	46	0.92	1443676
4	92	1.84	2885536
5	138	2.76	4030327
6	230	4.6	6810832

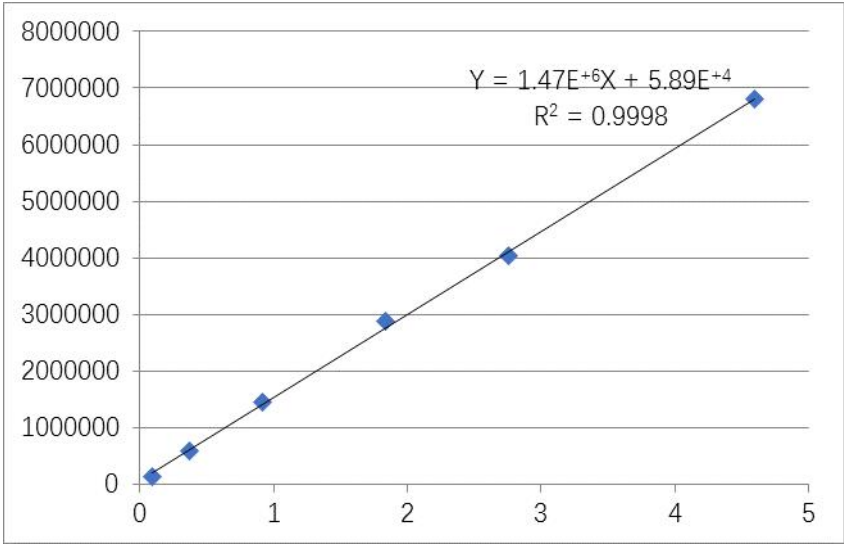


图 10 毛蕊花糖苷标准曲线

取异毛蕊花糖苷对照品母液进行稀释，配置成为浓度分别为 2.2925、9.17、18.34、36.68、55.02、91.7 μg/mL 的对照品溶液，采用自动进样器进样 20 μL，最后异毛蕊花糖苷进样量分别为 0.04585、0.1834、0.3668、0.7336、1.1004、1.834 μg，在波长为 330 nm 下进行检验测定。

以对照品峰面积积分值 A 作为纵坐标 (Y)，以对照品进样量 C 作为横坐标 (X) 进行线性回归分析，其回归方程为 $A=1.4686 \times 10^6 \times C - 3.1305 \times 10^4$ ，相关系数的平方值 $R^2=0.9994$ ；结果表明异毛蕊花糖苷在 2.29 μg/mL~91.7 μg/mL 范围之内，峰面积积分值 A 与进样量 C (μg)呈现良好的线性关系。线性关系数据见

表 9，标准曲线见图 11。

表 9 异毛蕊花糖苷线性及线性范围

编号	异毛蕊花糖苷对照品 浓度 (μg/ml)	异毛蕊花糖苷对照品 进样量 (μg)	异毛蕊花糖苷对照品 峰面积
1	2.2925	0.04585	50538
2	9.17	0.1834	232588
3	18.34	0.3668	487891
4	36.68	0.7336	1057402
5	55.02	1.1004	1583689
6	91.7	1.834	2662361

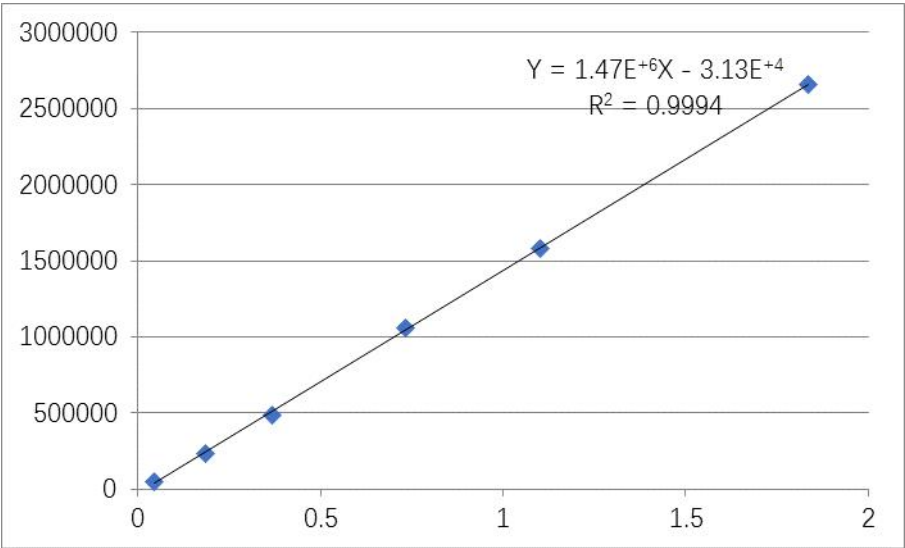


图 11 异毛蕊花糖苷标准曲线

6.5.5 精密度试验

按本章节“6.3”项下方法制备供试品溶液，按本章“6.5.3”项下方法于高效液相色谱仪连续上样 6 次，记录各自的峰面积及保留时间，并计算相应的 RSD 值，结果供试品中毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 值为 0.3777%，毛蕊花糖苷保留时间的 RSD 值为 0.0779%；供试品中异毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 值为 0.4068%，异毛蕊花糖苷保留时间的 RSD 值为 0.0371%，表明本方法精密度较为良好，具体数据如下表 10 所示。

表 10 苦郎树供试品精密度试验

进样次数	毛蕊花糖苷峰面积	毛蕊花糖苷相对保留时间 (min)	异毛蕊花糖苷峰面积	异毛蕊花糖苷相对保留时间 (min)
1	587350	15.047	259133	21.003
2	594754	15.053	256998	20.998
3	598001	15.049	253034	20.993
4	595767	15.034	259385	20.984
5	596510	15.032	256254	20.991
6	595815	15.023	253647	20.983
RSD (%)	0.3777	0.0779	0.4068	0.0371

6.5.6 稳定性试验

取同一批苦郎树供试品溶液（批号：20211008）按本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h。按照本章“6.5.3”项下方法所述液相色谱洗脱方法进行含量测定，分别计算毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的峰面积及对应的 RSD 值，得知供试品中毛蕊花糖苷的峰面积的 RSD 值为 0.1306%，对应的保留时间的 RSD 值为 0.0618%；异毛蕊花糖苷的峰面积的 RSD 值为 1.3983%，对应的保留时间的 RSD 值为 0.0702%。结果表明稳定性良好，具体测定结果数据如下表 11 所示。

表 11 苦郎树供试品稳定性试验

进样次数	毛蕊花糖苷峰面积	毛蕊花糖苷相对保留时间 (min)	异毛蕊花糖苷峰面积	异毛蕊花糖苷相对保留时间 (min)
1	563048	15.097	257593	21.015
2	562516	15.089	265593	21.029
3	563811	15.077	264522	21.038
4	563990	15.080	263431	21.023
5	563134	15.100	260700	21.058
6	562069	15.083	256882	21.033
RSD (%)	0.1306	0.0618	1.3983	0.0702

6.5.7 重复性试验

取同一批苦郎树供试品溶液（批号：20211008）按本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，按照本章“6.5.3”项下方法所述液相色谱洗脱方法进行含量

测定，分别计算毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的峰面积及对应的 RSD 值，得知供试品中毛蕊花糖苷的峰面积的 RSD 值为 1.2671%，对应的保留时间的 RSD 值为 0.2405%；异毛蕊花糖苷的峰面积的 RSD 值为 1.3232%，对应的保留时间的 RSD 值为 0.3647%。结果表明该方法重复性良好，具体测定结果数据如下表 12 所示。

表 12 样品重复性试验结果

进样次数	毛蕊花糖苷峰面积	毛蕊花糖苷保留时间 (min)	异毛蕊花糖苷峰面积	异毛蕊花糖苷保留时间 (min)
1	552033.5	15.765	295145	21.387
2	563383.5	15.782	292822	21.421
3	563477.5	15.873	294458.5	21.398
4	535466.5	15.798	286345.5	21.412
5	540799.5	15.821	281590	21.387
6	562276	15.792	297288	21.213
RSD (%)	1.2671	0.2405	1.3232	0.3647

6.5.8 加样回收率试验

精密称取同一批次的苦郎树药材（批号：20211008）粉末（过三号筛）0.1 g，共 6 份，按本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，再使用 100%的比例加入对照品，按照本章“6.5.3”项下方法所述液相色谱洗脱方法进行含量测定，计算加样回收率，得出毛蕊花糖苷的加样回收率在 95.78%~101.15%，平均加样回收率为 98.35%，其 RSD 值为 2.4013%；异毛蕊花糖苷的加样回收率在 96.39%~100.42%，平均加样回收率为 97.76%，其 RSD 值为 1.4378%。结果表明加样回收率合格。具体数据见下表 13 所示。

表 13 加样回收率测定结果

成分	取 样 量 (g)	样 品 中 含 量 (mg)	加 入 量 (mg)	测 得 量 (mg)	回 收 率 (%)	平 均 回 收 率 (%)	RSD (%)
毛蕊花 糖苷	0.1012	0.6261	0.6164	1.2183	95.97	98.35	2.4013
	0.1006	0.6224	0.6164	1.2205	97.04		
	0.1003	0.6205	0.6164	1.2363	99.89		
	0.1008	0.6236	0.6164	1.2140	95.78		
	0.1005	0.6218	0.6164	1.2398	100.15		
	0.1013	0.6267	0.6164	1.2502	101.15		
异毛蕊 花糖苷	0.1012	0.3234	0.3668	0.6813	97.51	97.76	1.4378
	0.1006	0.3214	0.3668	0.6766	96.83		
	0.1003	0.3205	0.3668	0.6786	97.64		
	0.1008	0.3221	0.3668	0.6904	100.42		
	0.1005	0.3211	0.3668	0.6747	96.39		
	0.1013	0.3237	0.3668	0.6823	97.76		

6.6 样品含量测定

取 13 批次苦郎树样品，按本章“6.3”项下方法制备供试品溶液，依据本章“6.5.3”项下色谱条件测定，平行测定两次，每个样品进样两次。计算结果如下表 14 所示。

表 14 苦郎树样品含量测定结果

编号	毛蕊花糖苷 (mg/g)	异毛蕊花糖苷 (mg/g)	两者总量 (mg/g)
K-1	0.328	0.286	0.614
K-2	1.553	0.879	2.432
K-3	2.974	0.923	3.897
K-4	6.826	2.290	9.116
K-5	7.280	1.456	8.736
K-6	4.082	1.347	5.429
K-7	6.901	3.251	10.152
K-8	3.905	2.109	6.014
K-9	4.709	1.013	5.722
K-10	5.554	2.083	7.637
K-11	8.494	4.490	12.984
K-12	13.863	4.558	18.421
K-13	9.842	4.142	13.984
平均值	5.870	2.217	8.087

13 批次苦郎树药材中毛蕊花糖苷含量为 0.328~13.863 mg/g，异毛蕊花糖苷含量为 0.286~4.558 mg/g。毛蕊花糖苷含量平均值为 5.870 mg/g，异毛蕊花糖苷含量平均值为 2.217 mg/g。比对数据可知，毛蕊花糖苷含量多数集中在 3 mg/g

以上，异毛蕊花糖苷含量多数集中在 1.5 mg/g 以上，部分值极低极高，根据比较平均值和众数值，确定毛蕊花糖苷含量应不得低于 0.3%，异毛蕊花糖苷含量应不得低于 0.15%。

不同批次的苦郎树药材中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷含量差异较大，且 13 批次中毛蕊花糖苷含量均大于异毛蕊花糖苷含量。

团体标准《苦郎树枝叶》

标准编制工作小组

2023 年 12 月 1 日