

铁丝威灵仙药材、饮片及其制剂心脑血管静片掺伪威灵仙的检测方法研究

高妍¹, 康帅¹, 何风艳¹, 宋平顺², 邹雪梅³, 戴忠^{1*}, 马双成^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 3. 内蒙古自治区药品检验研究院, 呼和浩特 750306)

摘要 目的: 建立铁丝威灵仙掺伪威灵仙的鉴别分析方法, 为铁丝威灵仙药材、饮片及其制剂心脑血管静片的质量监管提供技术支持。**方法:** 样品前处理方法为水提-酸水解法, 以威灵仙的专属性水解成分齐墩果酸作为鉴别指标, 采用高效液相色谱法, 选择Waters XbridgeTM C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 流速1 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 检测波长205 nm, 进样量10 μL。**结果:** 本研究建立的铁丝威灵仙药材、饮片及其制剂心脑血管静片掺伪鉴别方法, 经验证, 阴性无干扰, 齐墩果酸检测限为1.96 μg·mL⁻¹。共测定7批铁丝威灵仙饮片, 14批心脑血管静片制剂, 发现1批饮片掺伪, 心脑血管静片样品未发现掺伪现象。**结论:** 所建立的方法准确、快速、通用性强, 可有效鉴别铁丝威灵仙药材、饮片及其制剂心脑血管静片中掺伪威灵仙的问题, 并为含铁丝威灵仙的其他相关制剂掺伪鉴别方法的建立提供参考。

关键词: 铁丝威灵仙; 掺伪鉴别; 威灵仙; 齐墩果酸; 心脑血管静片; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2023)01-0059-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.01.007

Study on the Detection Method of Adulterant Clematidis Radix et Rhizoma in Smilacis Radix et Rhizoma Crude Drugs, Decoction Pieces and Preparation Xinnaojing Tablets

Gao Yan¹, Kang Shuai¹, He Fengyan¹, Song Pingshun², Zou Xuemei³, Dai Zhong^{1*}, Ma Shuangcheng^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China; 3. Inner Mongolia Institute for Drug Control, Huhehaote 750306, China)

Abstract Objective: To establish a method for the identification and analysis of Smilacis Radix et Rhizoma mixed with adulterant Clematidis Radix et Rhizoma, which could provide technical support for the quality control of its crude drugs, decoction pieces and preparation Xinnaojing tablets. **Methods:** Water extraction combined with acid hydrolysis was used as the sample pretreatment method. Oleanolic acid, which was identified as an exclusive hydrolyzed ingredient of Clematidis Radix et Rhizoma, was used as the identification index. HPLC (high performance liquid chromatography) was used gradiently eluted with acetonitrile(A)-water(B) as the mobile phase at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. Waters XbridgeTM C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was chosen as column,

作者简介: 高妍 Tel: (010) 67095995; E-mail: gaoyan@nifdc.org.cn

通信作者: 戴忠 Tel: (010) 67095268; E-mail: daizhong@nifdc.org.cn

马双成 Tel: (010) 53852076; E-mail: masc@nifdc.org.cn

and the column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 205 nm. The sample size was 10 µL.

Results: In this study, the established method for adulteration identification of *Smilacis Radix et Rhizoma* crude drugs, decoction pieces and preparation Xinnaojing tablets was validated. The negative control sample showed no interference. The detection limit of oleanolic acid was 1.96 µg·mL⁻¹. A total of 7 batches of *Smilacis Radix et Rhizoma* decoction pieces samples were tested, among which one batch was found mixed with adulterant. By testing 14 batches of Xinnaojing Tablets, no adulteration was found. **Conclusion:** The established method was accurate, fast and highly applicable on effectively identification of *Smilacis Radix et Rhizoma* mixed with adulterant *Clematidis Radix et Rhizoma* of its crude drugs, decoction pieces and preparation Xinnaojing tablets, which could also provide a reference for adulteration identification methods for other related preparations containing the *Smilacis Radix et Rhizoma*.

Keywords: *Smilacis Radix et Rhizoma*; adulteration detection; *Clematidis Radix et Rhizoma*; oleanolic acid; Xinnaojing tablets; high performance liquid chromatography

中药材、中药饮片、中成药是中医药传承发展的重要物质基础，保障其质量事关人民生命安全。中药质量研究，特别是掺伪检测研究一直是行业关切的重要问题^[1-3]。2021年国务院办公厅发布的《关于加快中医药特色发展的若干政策措施》中明确提出要“加强中药材质量安全风险评估与风险监测，促进快速检测装备研发和技术创新”。近年来，已报道了诸多中药品种的掺伪分析方法^[4-8]，为中药质量监管提供了强有力的技术支撑。但是，随着中药野生资源不断减少，在利益驱动下，部分中药材、中药饮片出现人为掺伪等问题。若使用有问题的中药材、饮片作为原材料投料，必将影响中成药的质量安全^[9-10]。因此，中药掺伪检测研究，特别是野生资源短缺的中药品种的掺伪检测研究工作依然备受关注。

《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2020年版四部^[11]“成方制剂中本版药典未收载的药材和饮片”中规定铁丝威灵仙为百合科植物短梗菝葜 *Smilax scobinicaulis* C. H. Wright、鞘柄菝葜 *Smilax stans* Maxim. 或华东菝葜 *Smilax siobold* Miq. 的干燥根及根茎。其具有祛风、除湿、散瘀、解毒等功效，主要用于治疗风湿腰腿痛、疮疖等症^[12]。部分地方标准中收载铁丝威灵仙的基原不尽相同^[13-16]，主要包括短梗菝葜和鞘柄菝葜。《陕西省药材标准》（2015年版）收载短梗菝葜和小叶菝葜 *Smilax microphylla* C. H. Wright 为正品铁丝威灵仙。一直以来，铁丝威灵仙药材主要为野生，存在采挖不易、产量较少等情况，因此，可能存在以性状相似、产量更高、价格更低的威灵仙进行掺伪使

用的问题。而铁丝威灵仙与威灵仙分属百合科和毛茛科植物^[17-18]，化学成分存在差异，掺伪将影响用药的安全性和有效性。采用传统的性状鉴定及显微鉴别方法难以高效区分铁丝威灵仙及威灵仙药材，更难以应用于切制后的饮片及经过提取后制成的成方制剂。因此，亟需基于化学成分差异建立适用于药材、饮片及相关制剂的准确、快速的铁丝威灵仙掺伪鉴别方法。

本研究通过收集铁丝威灵仙正品及伪品（威灵仙）样品，采用化学法和色谱法结合的形式寻找正品不含而伪品含有的专属性成分，进而建立基于化学成分差异的药材、饮片及其制剂心脑血管片中铁丝威灵仙的掺伪分析方法，为相关药品质量监管提供有力的技术支持。同时开展实际样品测定工作，考察市售饮片及制剂中铁丝威灵仙的掺伪情况。

1 仪器与试验材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪（ACQUITY 2695型，沃特世公司），超声波清洗器（KQ-500DE，昆山市超声仪器有限公司），低温冷却循环水器（MC1200，LAUDA 劳达贸易（上海）有限公司），超纯水系统（Milli-Q，默克集团），电热数显控温恒温水浴锅（DK-98-II，天津市泰斯特仪器有限公司），十万分之一、万分之一电子天平（XPE105、MS1003TS，梅特勒托利多集团）。

1.2 试验材料

药材、饮片及制剂：药材样品为自采，铁丝威灵仙及伪品样品经中国食品药品检定研究院康帅副研究员鉴定，样品信息及鉴定结果如表1、2

所示。7批铁丝威灵仙饮片样品购自安国、亳州药材市场，编号为T-YP-1~ T-YP-7。14批心脑血管片样品均来自国家药品评价性抽验抽样，编号为1~14。

试药：齐墩果酸对照品（批号110709-202109，含量95.8%，中国食品药品检定研究院）。

试剂：甲醇（色谱纯，批号 V44G1H）、乙腈（色谱纯，批号 V84A1H）来自Honeywell公司；乙酸乙酯（分析纯，批号 20200610）、盐酸（分析纯，批号 20190704）来自国药集团化学试剂有限公司；水为Milli-Q制超纯水。

表 1 铁丝威灵仙药材样品信息

编号	样品名称	种名	拉丁名	采集地
T-1	铁丝威灵仙	小叶菝葜	<i>Smilax microphylla</i>	安康宁陕县
T-2	铁丝威灵仙	小叶菝葜	<i>Smilax microphylla</i>	安康宁陕县
T-3	铁丝威灵仙	鞘柄菝葜	<i>Smilax stans</i> Maxim.	甘肃
T-4	铁丝威灵仙	鞘柄菝葜	<i>Smilax stans</i> Maxim.	陕西
T-5	铁丝威灵仙	华东菝葜	<i>Smilax sieboldii</i> Miq.	大连大黑山
T-6	铁丝威灵仙	短梗菝葜	<i>Smilax scobinicaulis</i> C. H. Wright	河南信阳

表 2 威灵仙样品信息

编号	样品名称	产地	编号	样品名称	产地
WY-1	威灵仙	辽宁	WY-5	威灵仙	吉林
WY-2	威灵仙	黑龙江	WY-6	威灵仙	吉林
WY-3	威灵仙	牡丹江	WY-7	威灵仙	东北
WY-4	威灵仙	辽宁	WY-8	威灵仙	东北

2 试验方法

2.1 色谱条件

采用Waters Xbridge™ C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；以乙腈为流动相A，水为流动相B，梯度洗脱（0~8 min，50%A→70%A；8~23 min，70%A→95%A；23~25 min，95%A）；流速1 mL·min⁻¹；检测波长 205 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取齐墩果酸对照品9.78 mg，置50 mL量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，即得。

2.2.2 药材、饮片供试品溶液

取药材或饮片（铁丝威灵仙、威灵仙）适

量，粉碎，称取2.0 g，加水100 mL，回流2 h，放冷，滤过，滤液置水浴上蒸干。残渣加2 mol·L⁻¹盐酸溶液30 mL使溶解，加热回流2 h，立即冷却，移入分液漏斗中，用水10 mL分次洗涤容器，洗液并入分液漏斗中，加乙酸乙酯振摇提取3次，每次20 mL，合并乙酸乙酯液，70 ℃以下浓缩至近干，加甲醇溶解，转移至25 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.3 心脑血管片供试品溶液

取14片心脑血管片，研细；称取4.0 g粉末（相当于10片），精密加浓度为2 mol·L⁻¹的盐酸溶液40 mL使溶解，加热回流1 h，立即冷却，移入分液漏斗中，用20 mL水分次洗净，再加乙酸乙酯振摇提取3次，每次20 mL，合并乙酸乙酯液，然后于

70 ℃以下浓缩至近干,加甲醇溶解,最后转移至10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm滤膜,即得。

2.2.4 阴性样品溶液

已知朱砂、冰片中不含齐墩果酸。依据心脑静片处方^[19],16味除去铁丝威灵仙、朱砂、冰片制备阴性样品。按处方比例,莲子心、珍珠母、槐米、黄柏、木香、人工牛黄分别研细,过筛;其余黄芩等7味加10倍量水煎煮2次,每次2 h,煎液滤过,滤液合并,浓缩成清膏,加入莲子心等粉末,混匀;再加入人工牛黄粉末,混匀,即得缺铁丝威灵仙的心脑静片阴性样品。

取上述阴性样品按“2.2.3”项下方法制得阴性

样品溶液。

2.3 方法验证

依据《中国药典》(2020年版)四部“9101 分析方法验证指导原则”^[11]及“0512 高效液相色谱法”^[11],开展专属性、检出限、系统适用性试验等方法验证工作。

2.3.1 铁丝威灵仙药材、饮片专属性试验

取样品按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,测定结果如图1、2所示,经过与齐墩果酸对照品比对,并结合DAD光谱,可知威灵仙样品溶液可检出齐墩果酸色谱峰,铁丝威灵仙样品中未检出,同时,在齐墩果酸色谱峰保留时间处不存在干扰峰。

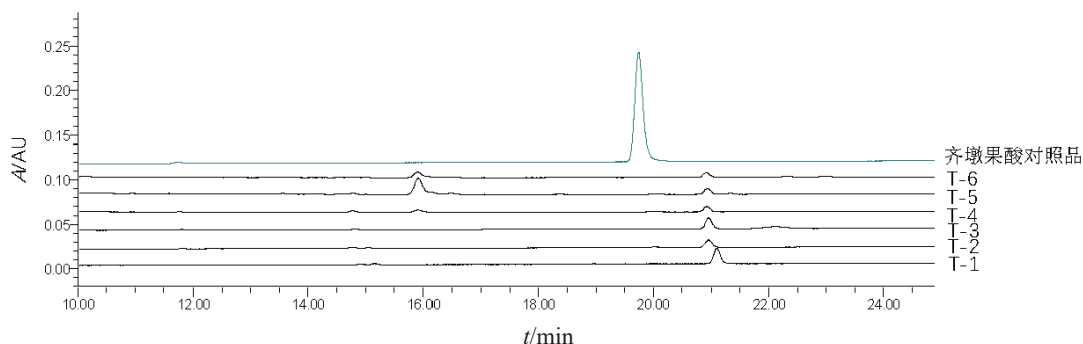


图1 铁丝威灵仙、齐墩果酸对照品的高效液相色谱图

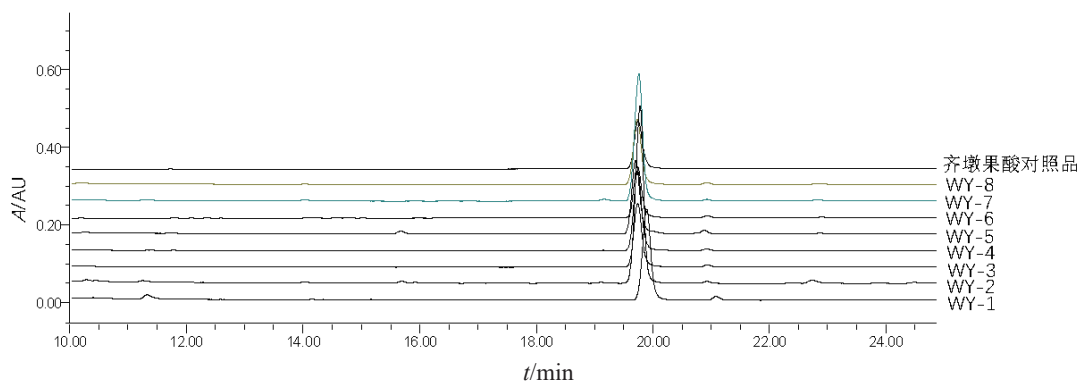
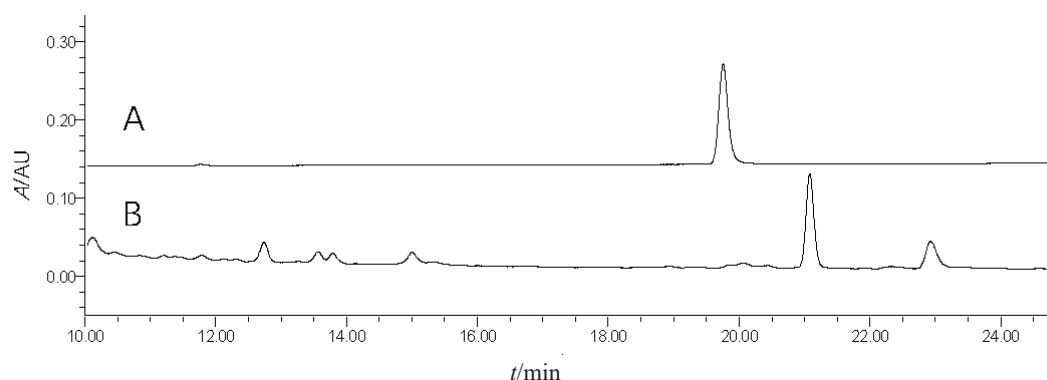


图2 威灵仙、齐墩果酸对照品的高效液相色谱图

2.3.2 心脑静片专属性试验

由于齐墩果酸在自然界中广泛分布,是诸多植物的药效成分,因此,需考察除铁丝威灵仙之外的心脑静片阴性样品溶液色谱图中是否存在干扰

峰。取“2.2.4”项下阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果如图3所示,可见心脑静片阴性样品无干扰。



A. 齐墩果酸对照品; B. 心脑静片阴性样品。

图 3 心脑静片阴性样品和齐墩果酸对照品的高效液相色谱图

2.3.3 检测限

将齐墩果酸对照品溶液稀释至 $3.92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 $S/N=3$ 时测得的浓度为检测限, 测得结果为 $1.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.4 系统适用性试验

如图2所示, 以威灵仙样品WY-1为例, 齐墩果酸的理论塔板数为93444, 与相近峰的分离度为5.0, 对称因子为0.99。取齐墩果酸对照品溶液(约 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.1”项下色谱条件进样5次, 计算峰面积的RSD为0.23%, 表明方法精密度良好。本方法系统适用性试验结果符合要求。

2.3.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(样品编号 T-YP-7), 分别在0、4、8、12、16、24 h进样, 齐墩果酸峰面积的RSD为1.5%, 结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.6 耐用性试验

取同一供试品溶液(样品编号 T-YP-7)及齐墩果酸对照品溶液, 再分别采用Agilent Eclipse XDB- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Agilent

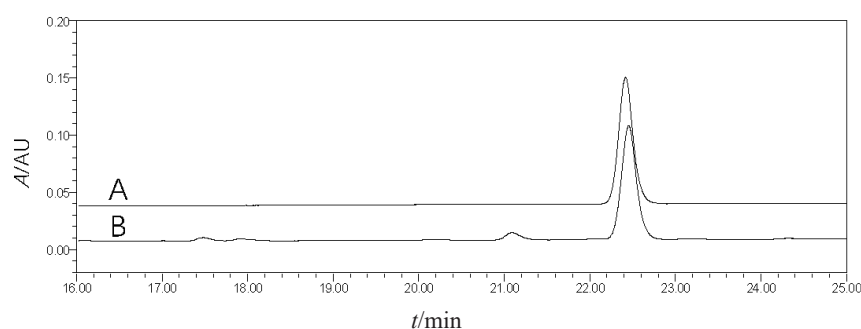
ZORBAX SB- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行测定, 测定结果如图4、5所示, 样品中齐墩果酸保留时间与其对照品保留时间比值的RSD为0.30%, 结果表明本方法耐用性良好。

3 样品测定结果

现行地方标准^[13-16]中, 铁丝威灵仙饮片的制法不尽相同, 主要方法: 除去杂质及残茎, 根茎切厚片, 根切段, 晒干。部分标准^[13,15-16]规定在切制前先水润。因此, 考虑铁丝威灵仙药材与饮片经粉碎后, 基质一致, 均可使用前期以铁丝威灵仙药材样品建立的掺伪分析方法开展掺伪检测研究。样品测定时, 铁丝威灵仙饮片按“2.2.2”项下方法进行前处理, 心脑静片样品溶液按“2.2.3”项下方法制备, 采用相同的色谱条件采集数据。

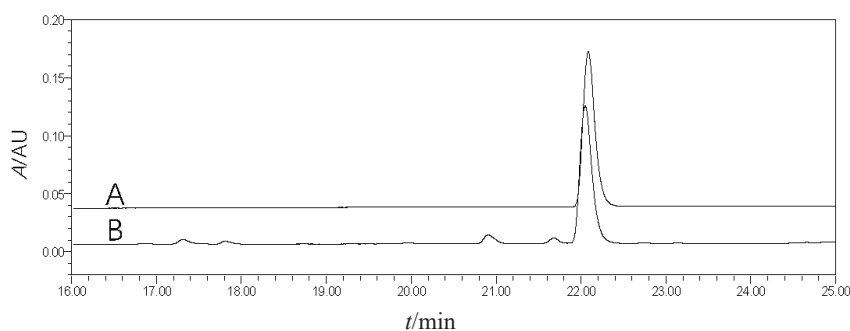
3.1 铁丝威灵仙饮片样品测定结果

采用本研究建立的方法对收集到的7批市售铁丝威灵仙饮片样品进行测定, 发现1批饮片样品(样品编号 T-YP-7)检出齐墩果酸, 提示该批样品掺伪威灵仙, 存在一定的质量风险, 其他批次未检出。测定结果如图6所示。



A. 齐墩果酸对照品; B. 供试品溶液(样品编号 T-YP-7)。

图 4 采用 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 色谱柱测定的高效液相色谱图



A. 齐墩果酸对照品; B. 供试品溶液 (样品编号 T-YP-7)。

图5 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱测定的高效液相色谱图

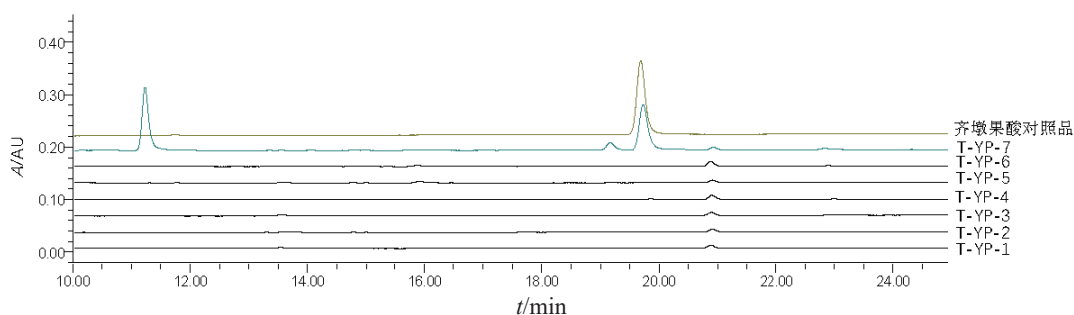


图6 7批铁丝威灵仙饮片样品的高效液相色谱图

3.2 心脑静片样品测定结果

按照本研究建立的铁丝威灵仙掺伪分析方法,共测定心脑静片样品14批,涉及2个企业。14批样品均未检出伪品威灵仙的专属水解成分齐墩果酸,未发现掺伪问题。

4 讨论

铁丝威灵仙与威灵仙药材性状相似,主要鉴别点^[20]:铁丝威灵仙的根状如铁丝不易折断,须根痕呈勾刺状;威灵仙的根质硬脆,易折断,鉴别方法相对简单。二者饮片相似度高,如有混用,单从性状上更加难以区分。我国部分地区以铁丝威灵仙代替威灵仙入药^[21]。但是,已有研究^[22]发现,分别给予威灵仙、铁丝威灵仙后,小鼠电刺激阈有差异,表明药理作用有差别,二者不应等同入药,更不可互相代替。前期调研发现,铁丝威灵仙价格高于威灵仙,考虑可能存在利益驱动下的人为掺伪问题。为了区分和打击市场上的掺伪行为,本研究采用专属性化学成分法区分铁丝威灵仙与威灵仙,基于高效液相色谱,通过比对铁丝威灵仙及威灵仙化学成分差异,发现了伪品威灵仙的专属水解成分齐墩果酸,可用于鉴别分析。这种方法的优点是可以

同时应用于药材、饮片及其相关制剂的掺伪鉴别。

4.1 优化制备方法

本方法的供试品溶液制备主要包括水提取皂苷和酸水解2个主要步骤。其中,酸水解的处理方法参考《中国药典》2020年版一部威灵仙项下齐墩果酸含量测定方法,故不再进行优化。本研究主要针对水提取皂苷步骤中的提取溶剂、提取溶剂加入量和提取时间开展方法优化。分别采用乙醇、水作为提取溶剂,发现乙醇提取制备的样品存在干扰峰,因此选择水作为提取溶剂。优化提取溶剂加入量时分别加入水50、100、200 mL;优化提取时间时,分别加入水提取1、2 h,根据峰面积/称样量结果,最终确定100 mL水提取2 h作为最优条件。

4.2 测定结果讨论

通过实际样品测定,发现市场上确实存在铁丝威灵仙饮片掺伪威灵仙的问题,必须打击这种掺伪行为,以保证人民用药安全、有效。基于本研究建立的心脑静片中铁丝威灵仙掺伪分析方法,14批心脑静片样品均未发现掺伪问题,表明心脑静片的相关生产企业有能力保证铁丝威灵仙原料的真实性,投料准确。

本研究成功建立了铁丝威灵仙药材、饮片掺伪威灵仙的分析方法,具有重要的实际应用价值,并且以心脑血管片为例,建立了铁丝威灵仙相关制剂的掺伪分析方法,可作为心脑血管片质量监管的技术储备,同时,为其他相关制剂掺伪研究提供参考。本研究建立的掺伪分析方法准确、快速、通用性强,可以为药品质量监管提供有力的技术保障。

参考文献:

- [1] 余坤子, 陆以云, 张南平, 等. 中药材掺伪染色鉴别技术研究进展[J]. 中国药事, 2017, 31 (11): 1311-1316.
- [2] 张萍, 郭晓晗, 荆文光, 等. 2020年全国中药材及中药饮片质量情况分析[J]. 中国现代中药, 2021, 23 (10): 1671-1678.
- [3] 马双成, 王翀, 朱炯, 等. 中成药的整体质量状况及有关问题分析[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54 (17): 1369-1373.
- [4] 高妍, 过立农, 马双成, 等. 快速测定肉苁蓉饮片中沙苁蓉掺伪比例的分析方法研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55 (19): 1629-1633.
- [5] 袁明昊, 周涛, 钟文潇, 等. 红外光谱结合化学计量学快速检测熊胆粉真伪及掺伪问题[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (5): 856-863.
- [6] 覃丽邴, 白桂昌, 张慧, 等. 银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查[J]. 中国药事, 2021, 35 (12): 1375-1382.
- [7] 郭晓晗, 张萍, 荆文光, 等. 从2020年国家药品抽检专项有关问题谈中药材及中药饮片监管[J]. 中国现代中药, 2021, 23 (10): 1679-1685.
- [8] 周健, 陈晓红, 金米聪. 基于真菌毒素污染差异的液相色谱-串联质谱法鉴别板栗粉中掺假小麦粉[J]. 色谱, 2022, 40 (4): 303-312.
- [9] 王菲菲, 任秀, 李静, 等. 关于中成药水蜜丸制剂掺伪米粉监管方法的研究[J]. 中国药事, 2021, 35 (12): 1364-1374.
- [10] 刘静, 朱嘉亮, 冯磊, 等. 2020年国家药品抽检中成药质量状况分析[J]. 中国现代中药, 2021, 23 (5): 755-759.
- [11] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 551, 480, 61.
- [12] 杨宇慧, 段超慧, 王皓, 等. 铁丝威灵仙质量标准研究[J]. 中国药业, 2020, 508 (9): 109-113.
- [13] 北京市中药材标准: 铁丝威灵仙[S]. 1998: 207.
- [14] 甘肃省中药材标准: 铁丝威灵仙[S]. 2009: 110.
- [15] 河南省中药材标准: 铁丝威灵仙[S]. 1991: 69.
- [16] 陕西省药材标准: 铁丝威灵仙[S]. 2012: 148.
- [17] 赵继荣, 杨文通, 陈文, 等. 威灵仙有效化学成分及镇痛机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (9): 9-12.
- [18] 鞠成国, 张强, 唐婷婷, 等. 不同来源威灵仙抗炎镇痛谱效关系研究[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35 (5): 28-31.
- [19] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 767.
- [20] 韦翡翡. 甘肃省铁丝威灵仙质量标准研究及其基原植物生态适宜性分析[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2020.
- [21] 陈艺邴, 吴小利, 聂飞, 等. 短梗菝葜药材的生药学鉴别研究[J]. 中药材, 2018, 41 (2): 313-316.
- [22] 李秀山. 铁丝灵仙与威灵仙的研究[J]. 陕西中医学院学报, 2001, 24 (3): 47-48.

(收稿日期 2022年7月1日 编辑 郑丽娥)