

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.033

铁丝威灵仙质量标准研究

杨宇慧,段超慧,王 皓,段 羚,张 婷,杨桂娥[△]

(内蒙古自治区包头市食品药品检验检测中心,内蒙古 包头 014060)

摘要:目的 完善铁丝威灵仙的质量标准。方法 对铁丝威灵仙进行性状和显微鉴别;建立鉴别薯蓣皂苷元成分的薄层色谱法;建立测定白藜芦醇含量的高效液相色谱法,按2015年版《中国药典(四部)》通则0832水分测定法中烘干法、2302灰分测定法对样品进行相关检查。结果 样品的性状和显微特征明显;薄层色谱显色清晰,与其他斑点分离良好,无干扰;样品中其他成分对白藜芦醇的测定无干扰;水分为2.42%~6.12%,总灰分为2.04%~8.66%,酸不溶性灰分为0.04%~6.34%,70%乙醇浸出物为5.51%~9.80%。结论 该方法操作方便、准确度高、重复性好,可用于铁丝威灵仙的质量控制。

关键词:铁丝威灵仙;质量标准;性状;显微;薄层色谱;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0109-05

Quality Standard of *Radix et Rhizoma Smilacis*

YANG Yuhui, DUAN Chaohui, WANG Hao, DUAN Ling, ZHANG Ting, YANG Gui'e

(Baotou Food and Drug Inspection & Testing Center, Baotou, Inner Mongolia, China 014060)

Abstract: **Objective** To improve the quality standards of *Radix et rhizoma smilacis*. **Methods** The traits and microscopic identification of the samples were carried out. The identification of diosgenin was established by thin layer Chromatography(TLC) identification method. The content of resveratrol was determined by liquid chromatography. Relevant inspections such as the 0832 moisture method drying method and the 2302 ash determination method in the 2015 edition of the *Chinese Pharmacopoeia* were conducted. **Results** The traits and microscopic characteristics of the samples were obvious. The TLC method could conveniently and efficiently extract the components of diosgenin, and the coloration was clear and obvious. The method of sample extraction was studied by methodological investigation, which showed that the method was simple, reproducible, and specific. The other components in the sample did not interfere with the determination of resveratrol. Water was 2.42% - 6.12%, the total ash was 2.04% - 8.66%, acid insoluble ash was 0.04% - 6.34%, 70% ethanol extract was 5.51% - 9.80%. **Conclusion** The method is easy to operate, has high accuracy and good repeatability, and can be used as the quality standard for *Radix et rhizoma smilacis*.

Key words: *Radix et rhizoma smilacis*; quality standard; traits; microscopic; thin layer chromatography; content determination

铁丝威灵仙为百合科植物短梗菝葜 *Smilax scobini-caulis* C. H. Wright、华东菝葜 *Smilax sieboldii* Miq 的干燥根及根茎。短梗菝葜主产于河北、山西、河南等地,华东菝葜主产于辽宁、山东、江苏等地^[1-5],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。该品种收载于1988年版《内蒙古中药材标准》,仅对其性状及显微特征进行了规定,而其薄层色谱鉴别^[6]、水分、杂质、总灰分、酸不溶性灰分的测定及含量测定未作规定。完善质量标准项目与药物的临床疗效、稳定性和安全性密切相关,本研究在铁丝威灵仙原有质量标准基础上,对薄层色谱鉴别、水分、灰分、含量测定等项目进行了较系统和全面的分析,为建立其质量标准体系提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Sartorius BP-211D 型电子天平(精度为0.01 mg)、Sartorius BS300S-WEI 型电子天平(精度为0.1 mg)均购自北京赛多利斯仪器系统有限公司;Mettler Toledo

ME104E 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为0.000 1 g);Leica DM3000B 型智能显微镜(德国莱卡仪器有限公司);Aglient 1260 型高效液相色谱仪(美国 Aglient 公司);KQ-700DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为4.0 kHz);HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市白塔金昌实验仪器厂)。

1.2 试药

短梗菝葜(编号为S1~S7),其中S6和S7号样品为本项目组自行采集,并经河南信阳师范学院植物学教研室朱鑫鑫讲师鉴定为百合科植物短梗菝葜正品,其他批次样品经本中心实验室通过性状、显微、薄层色谱、有效成分含量测定等方式比对,确定均为百合科植物短梗菝葜正品,于大连长山岛和大黑山采集华东菝葜2批(编号为S8~S9),样品信息见表1;薯蓣皂苷元对照品(批号为111539-200001),白藜芦醇对照品(批号为111535-201703,纯度为99.4%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(HPLC Grade, LOT 178509, Fisher

第一作者:杨宇慧,女,大学本科,助理工程师,研究方向为中蒙药标准化,(电子信箱)yyh406@qq.com。

[△]通信作者:杨桂娥,女,大学本科,高级工程师,研究方向为中蒙药标准化,(电子信箱)359798153@qq.com。

表1 样品基本信息

编号	来源	批号或采集时间	品种
S1	湖北	2018-04-29	短梗菝葜
S2	湖北	2018-05-03	短梗菝葜
S3	辽宁	2017-09	短梗菝葜
S4	陕西		短梗菝葜
S5	甘肃		短梗菝葜
S6	湖北广水	2018-09-22	短梗菝葜
S7	河南信阳	2018-09-22	短梗菝葜
S8	大连长山岛	2019-06	华东菝葜
S9	大连大黑山	2019-06	华东菝葜

Chemical);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

短梗菝葜:本品根茎呈不规则块状,略横向延长而弯曲,有针状小刺,下侧着生许多细长的根。根长20~100 cm,直径1~2 mm,表面灰褐色或灰棕色,平滑,带有细小钩状刺及少数须根。质韧,不易折断,富有弹性,断面外圈为浅棕色环(石细胞),内有一圈排列均匀的小孔(导管)。气无,味淡。详见图1 A。

华东菝葜:根茎及根外形同短梗菝葜极相似,稍有不同处在于根粗细均匀,刺相对较少。详见图1 B。

2.2 显微鉴别

采用2015年版《中国药典(四部)》通则2001项下显微鉴别法鉴别各批次样品横切面及粉末显微特征。

不定根的横切面(直径约1.5 mm):内皮层外侧的组织多已脱落,有时可见残存皮层细胞。内皮层有1列由棕色色素的石细胞组成,细胞内壁及侧壁三面显著增厚,胞腔小,有明显的层纹及孔沟,中柱具初生结构,约占根的1/2。中柱鞘为9~13层木化厚壁纤维,直径17~40 μm,韧皮部由薄壁细胞和筛管组成,与木质部相间排列,各15~25个,呈辐射状。木质部由导管和木纤维组成。详见图2。

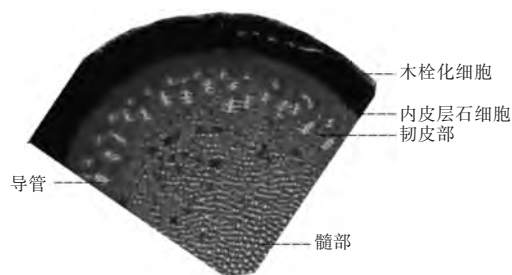
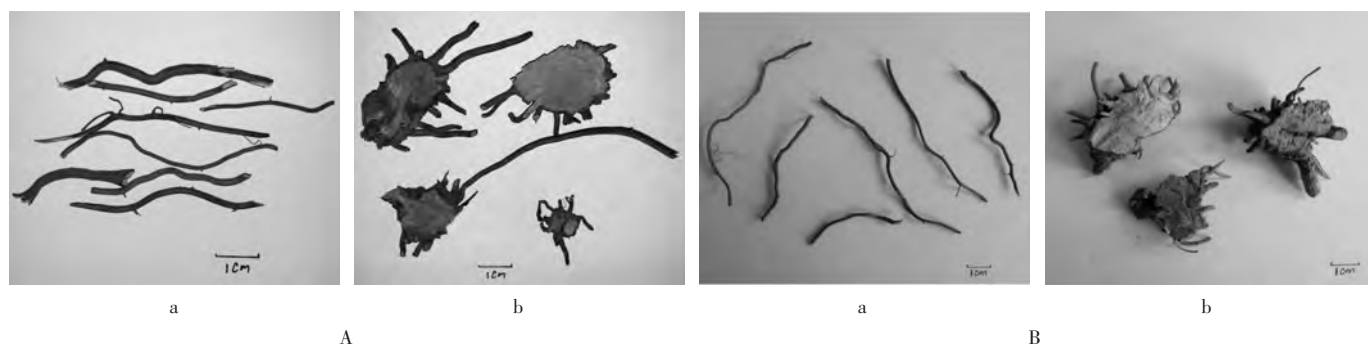


图2 不定根横切面(×100)

粉末显微特征:取一定量样品,粉碎,过4号筛,采用水合氯醛透化法观察粉末特征。本品粉末污黄色。髓细胞长方形,壁厚化,直径18~76 μm,多数细胞可见有圆形或长形细小单纹孔。中柱鞘纤维直径17~40 μm,壁较厚,木化。纤维单个散在,黄色或白色;一种黄棕色,次生壁极度增厚,纹孔沟分枝状汇合;另一种次生壁略微增厚,白色孔沟明显,胞腔较小。有梯纹和具缘纹孔导管,梯纹导管直径20~160 μm,具缘纹孔导管较少见。石细胞呈类圆形、类方形或长方形,直径约70 μm,胞腔狭细,两侧胞壁增厚,具显著孔沟。淀粉粒单粒或2~8个分粒组成的复粒,单粒呈圆形或卵圆形,脐点状,具层纹,但不明显。详见图3。

2.3 薄层色谱鉴别(薯蓣皂苷元)

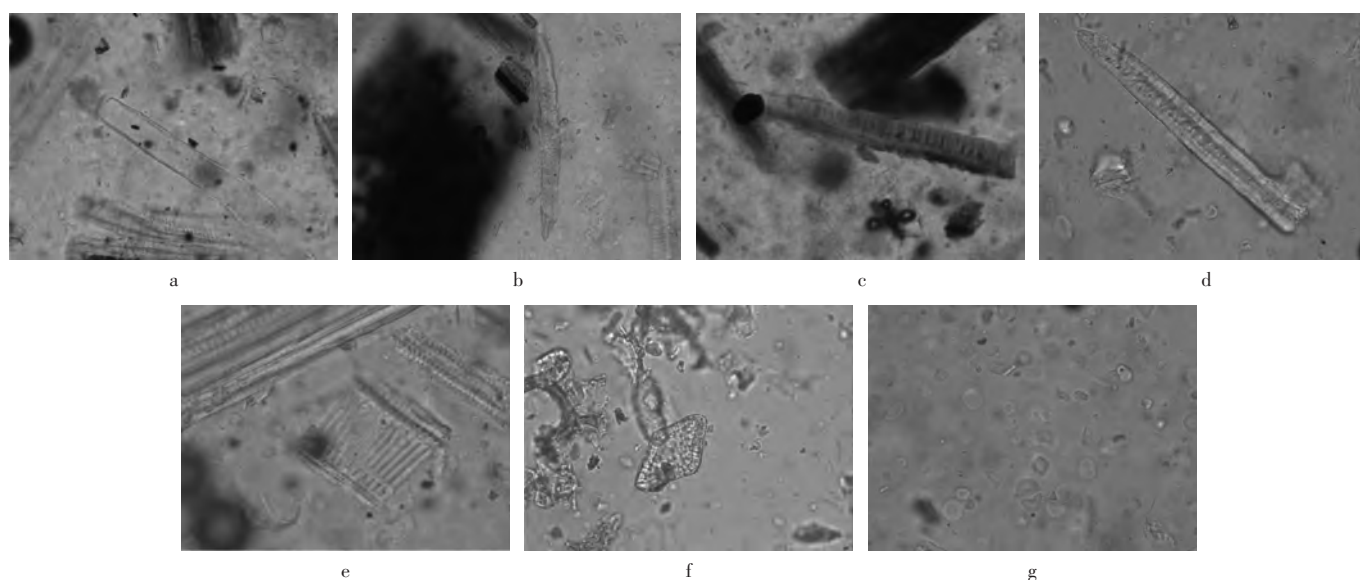
取9批样品粉末5 g,精密称定,加入无水乙醇50 mL,超声处理30 min,滤过,滤液加36.5%盐酸5 mL,加热回流2 h,放冷,用40%氢氧化钠溶液调至中性,挥干至无醇味,残渣加热水40 mL使溶解,用二氯甲烷振摇提取2次(40 mL,30 mL),合并提取液,挥干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取薯蓣皂苷元对照品,加甲醇制成质量浓度为0.5 mg/mL的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015年版《中国药典》通则0502)试验,分别吸取上述溶液各5 μL,点于同一硅胶G薄层板上。以环己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。供



a. 带有沟刺的细长不定根 b. 不规则块状根茎

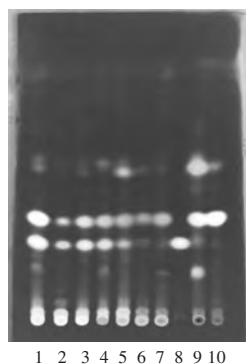
A. 短梗菝葜 B. 华东菝葜

图1 短梗菝葜根及根茎



a. 髓细胞 b. 中柱鞘纤维 c. 次生壁极度增厚纤维 d. 次生壁略微增厚纤维 e. 梯纹导管 f. 石细胞 g. 淀粉粒
图3 粉末显微特征($\times 400$)

试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图4。



1-7,9-10. 样品 S1~S7,S8-S9 8. 薯蓣皂苷元
图4 铁丝威灵仙中薯蓣皂苷元薄层色谱图

2.4 检查

按内蒙古自治区中蒙药材和炮制品标准修订工作手册的技术要求,对本品进行了水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物的考察。测定结果见表2。

2.5 白藜芦醇含量测定^[7-9]

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验

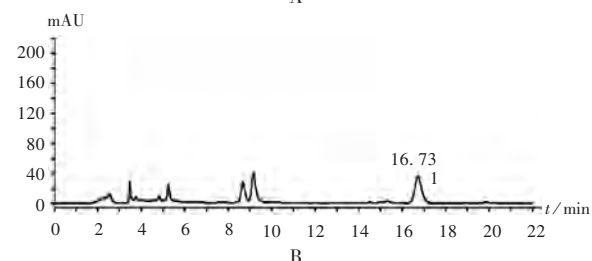
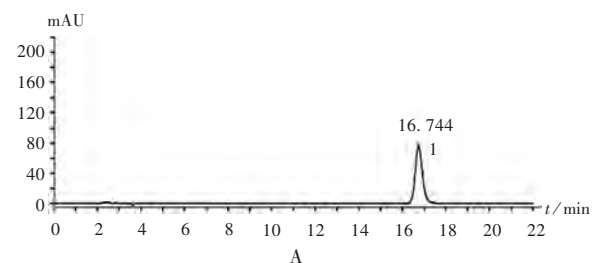
色谱柱:Agela Venusil MP C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); Agilent Zorbax Elipse XDB- C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(27:73, V/V);检测波长:308 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C。理论板数按白藜芦醇峰计应不低于8 000。色谱图见图5。

2.5.2 溶液制备

取白藜芦醇对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含27 μ g的溶液,即得对照品溶液。取本品粉末(过4号筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇15 mL,密塞,超声处理30 min,转移上清液,滤

表2 水分、灰分、酸不溶性灰分及浸出物测定结果(%)

样品	水分	总灰分	酸不溶性灰分	70%乙醇浸出物
S1	3.60	3.04	0.67	9.36
S2	3.98	6.54	3.78	9.56
S3	3.42	4.09	1.05	9.80
S4	3.66	8.66	6.34	6.00
S5	3.09	6.51	4.36	5.51
S6	3.34	2.47	0.05	9.77
S7	2.42	2.04	0.04	6.94
S8	5.92	5.24	1.89	8.92
S9	6.12	3.70	1.30	9.13
平均值	3.95	4.70	2.16	8.33
最小值	2.42	2.04	0.04	5.51
最大值	6.12	8.66	6.34	9.80
建议限量	≤ 6.0	≤ 6.0	≤ 2.0	≥ 6.7



1. 白藜芦醇

A. 白藜芦醇对照品 B. 铁丝威灵仙样品

图5 高效液相色谱图

过,残渣加 15 mL 甲醇超声提取 30 min,过滤残渣及二次提取液,并用甲醇洗涤残渣 3 次,每次 10 mL,合并所有滤液,水浴蒸至 10 mL 以下,冷却,用甲醇定容至 25 mL 容量瓶,摇匀,即得供试品溶液。取白藜芦醇对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液(实际配制质量浓度为 1.0800 mg/mL),作为对照品贮备液。

2.5.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取对照品贮备液,配制质量浓度为 5.4, 10.8, 27.0, 54.0, 64.8, 81.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 31.08962X + 5.41356$, $R^2 = 0.999$ ($n = 6$)。结果表明,白藜芦醇质量浓度在 5.4 ~ 81.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液(编号 S3),常温下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时按拟订色谱条件进样 5 μL 。结果白藜芦醇峰面积的 RSD 为 0.74 % ($n = 7$),表明供试品溶液在常温下 12 h 内稳定。

重复性试验:取同一供试品(编号 S3)6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,按外标法计算含量。结果的 RSD 为 1.24 % ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

精密度试验:精密吸取供试品溶液(编号 S2)5 μL ,按拟订色谱条件连续进样 6 次。结果白藜芦醇峰面积的 RSD 为 0.16 % ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取已知白藜芦醇含量(0.057%)的样品(编号 S2)粉末 3 份,精密称定,分别按已知量的 80%, 90%, 110% 加入白藜芦醇对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,按外标法计算含量。结果见表 3。

表 3 白藜芦醇加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5721	0.4536	1.0004	94.42		
0.5734	0.4536	0.9979	93.58		
0.5728	0.4536	1.0076	95.86		
0.5717	0.5040	1.0848	101.81		
0.5725	0.5040	1.0690	98.51	98.96	3.59
0.5732	0.5040	1.0804	100.63		
0.5709	0.6300	1.2030	100.33		
0.5716	0.6300	1.2209	103.06		
0.5733	0.6300	1.2184	102.40		

方法检测限(LOD)及定量限(LOQ)确定:依据逐级降低浓度进样法,测得白藜芦醇的仪器检出质量浓度为 0.3024 ng/mL,参考 GB/T27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》,采用添加标准物质的方法获得方法检测限为 0.26 $\mu\text{g/g}$ 。为增加数据可信性,采用

10 倍检出限来表示定量限,故定量限为 2.6 $\mu\text{g/g}$ 。

耐用性试验:采用不同厂家、不同型号色谱柱,取样品(编号 S4),精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,按外标计算含量。结果的 RSD 为 0。

2.5.4 样品含量测定

按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,测定含量,结果见表 4。可见,9 批样品白藜芦醇含量的平均值为 0.06%。考虑到药材质量差异,以 9 批中平均值下浮 20% 确定含量限度,即 $0.06\% \times (1 - 20\%) = 0.048\%$,故暂定本品含白藜芦醇($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$)不得少于 0.05%。

表 4 样品中白藜芦醇含量测定结果

样品	取样量(g)		样品含量(%,以干燥品计)		平均含量(%)	RSD (%)
	1	2	1	2		
S1	1.0034	1.0050	0.071	0.072	0.07	0.99
S2	1.0046	1.0057	0.065	0.064	0.06	1.10
S3	1.0021	1.0007	0.055	0.055	0.06	0
S4	1.0020	1.0099	0.089	0.087	0.09	1.61
S5	1.0029	1.0000	0.019	0.019	0.02	0
S6	1.0002	1.0000	0.036	0.035	0.04	2.00
S7	1.0001	1.0004	0.056	0.056	0.06	0
S8	1.0068	1.1654	0.102	0.102	0.10	0
S9	0.9899	1.0952	0.021	0.021	0.02	0

3 讨论

本研究中对铁丝威灵仙的质量进行了系统分析,总灰分及酸不溶性灰分数据相差较大,可能因为铁丝威灵仙为根及根茎入药,若采集后对其净制不规范则可能带入较多泥土杂质,而我中心自行采集并净制处理的样品灰分值较低。可见,除其生长环境因素外,规范的净制可有效降低样品中混入的泥沙等杂质。

薯蓣皂苷元薄层色谱鉴别中,充分考察提取条件、展开条件及点样量对斑点的影响。经验证,提取样品与薯蓣皂苷元对照品在相同位置显相同的荧光斑点,且主斑点清晰,其他斑点分离良好,无干扰,说明该提取条件与展开条件适用于薯蓣皂苷元的薄层鉴别。

白藜芦醇具有抗肿瘤、抗氧化、抗自由基、保护肝脏、保护心血管等功能,成为较受瞩目的绿色抗癌药物;此外,还具有调节免疫、抗病毒、抗菌、抗变态反应、辐射防护等药用价值^[10-14]。本研究中对铁丝威灵仙药材进行定性定量分析,发现样品中白藜芦醇含量差异较大,有必要对其质量进行控制,且 2015 年版《中国药典(四部)》中并无白藜芦醇的含量测定方法。因此,本研究中选择白藜芦醇作为定量测定成分,方法简单,准确可靠,样品的收集具有一定代表性,在此基础上可制订铁丝威灵仙药材的质量标准。

参考文献:

- [1] 杨贵元,丁永辉,宋平顺,等. 甘肃省威灵仙药用植物及商品