

酒萸肉鉴别检测方法研究

逯雯洁^{1,2*}, 刘亚蓉^{1,2}, 骆桂法^{1,2}, 海 平^{1,2}, 张春平^{1,2}, 李永鹏^{1,2}

(1. 青海省药品检验检测院, 西宁 810016; 2. 青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810016)

摘 要: **目的** 研究酒萸肉鉴别检测方法, 为规范饮片生产及加强监管力度提供依据。**方法** 以 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)为对照品, 薄层色谱法初筛, 对山萸肉、酒萸肉进行快速有效的区分; 采用 C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.005 mol/L 乙酸铵溶液-乙腈, 流速 0.2 mL/min 梯度洗脱, 波长 240 nm, 超高效液相色谱法检测, 并用液质联用验证。**结果** 在薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)、超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)和液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)佐证结果一致的情况下, 所建立的薄层色谱法、液相色谱方法能有效区别山萸肉、酒萸肉。**结论** 该方法快速、准确、专属性好, 可作为酒萸肉鉴别检测方法, 同时可为酒萸肉质量控制提供方法。

关键词: 酒萸肉; 5-羟甲基糠醛; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 液相色谱-质谱联用法

Research on identification methods of processed *Fructus corni*

LU Wen-Jie^{1,2*}, LIU Ya-Rong^{1,2}, LUO Gui-Fa^{1,2}, HAI Ping^{1,2}, ZHANG Chun-Ping^{1,2}, LI Yong-Peng^{1,2}

(1. Qinghai Provincial Institute of Drug Control, Xining 810016, China;

2. Key Laboratory for the study of the Modernization of Tibetan Medicine, Xining 810016, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the method for identification and detection of processed *Fructus corni*, and provide basis for standardizing the production and strengthening the supervision. **Methods** The thin layer chromatography (TLC) identification condition of crude and processed *Cornus officinalis* fruit was studied with 5-hydroxymethylfurfural as reference standard. A C₁₈ column (50 mm×2.1mm, 1.8 μm) was adopted for the determination, which was maintained at 30 °C throughout the analysis. The mobile phase was composed of 0.005 mol/L ammonium acetate and acetonitrile at a flow rate of 0.2 mL/min. The UV detector was set at 240 nm. The detection was performed by ultra performance liquid chromatography (UPLC) and validated by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Results** The results of TLC was consistent with those by UPLC and LC-MS. It could be used as an identification method of crude and processed *Fructus corni*. **Conclusion** The method is rapid, accurate and specific, which can be used as the identification and detection method of *Fructus corni* and provide a method for the quality control of *Fructus corni*.

KEY WORDS: *Fructus corni*; 5-hydroxymethylfurfural; thin layer chromatography; ultra performance liquid chromatography; liquid chromatography-mass spectrometry

基金项目: 2019 年国家药品抽检计划中药饮片专项、青海省科技厅科研基础条件平台项目(2017-ZJ-Y40)

Fund: Supported by the National Drug Sampling Plan in 2019, and the Basic Conditions Platform Project of Qinghai Science and Technology Department (2017-ZJ-Y40)

*通讯作者: 逯雯洁, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为中藏药品检验。E-mail: luwenjie608@hotmail.com

*Corresponding author: LU Wen-Jie, Master, Associate Chief Pharmacist, Qinghai Provincial Institute of Drug Control, Xining 810016, China. E-mail: luwenjie608@hotmail.com

1 引言

山茱萸是我国传统的名贵滋补中药材,有补益肝肾、涩精固脱之功效,主治眩晕耳鸣,腰膝酸痛,阳痿遗精,遗尿频,崩漏带下,大汗虚脱,内热消渴。主产区为河南、陕西、浙江等省份^[1]。主要成分为环烯醚萜苷^[2,3]、有机酸等^[4,5]。2015 版《中国药典》一部收载为山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉,秋末冬初果皮变红时采收果实,用火烘或置沸水中略烫后,及时除去果核,干燥;收载山萸肉、酒萸肉 2 个饮片炮制品种^[6]。从外观性状看,新鲜的山萸肉呈红色,酒萸肉呈黑色。山茱萸经除杂质和果核后统称为“山萸肉”,经酒炖法或酒蒸法炮制后称为“酒萸肉”,中医理论认为其生品敛阴止汗力胜而制品温补肝肾作用强^[7]。目前,中国药典标准中对山萸肉、酒萸肉的质量控制指标相同,且无系统区分山萸肉和酒萸肉的鉴别检测内容,单从饮片外观性状指标,不能达到真正有效区分和鉴别的目的;而山萸肉、酒萸肉中成分测定分析虽有报道^[8,9],但均缺乏可明确区分 2 种饮片特征成分的系统检测方法。常增荣等^[10]报道 5-羟甲基糠醛具有较好的特征性,可用于区分山萸肉和酒萸肉。因此本研究建立薄层色谱法初筛、超高效液相色谱法检测及液相色谱-质谱联用确认的方法,作为山萸肉、酒萸肉鉴别检测方法,能够有效区分山茱萸饮片生品及炮制品,以期规范饮片生产、山茱萸炮制工艺评价加强监管力度提供技术依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Sartorius BSA 224S-CW 电子天平(德国 Sartorius 公司); PB1502-S 电子天平(瑞士 Mettler 公司); ULTIMATE 3000 型高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司); AB SCIEX Triple Quad 5500 三重四极杆液质联用色谱仪(美国 AB 公司); KQ3200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TLC VISUALIZER 薄层数码成像仪(瑞士卡玛公司); 硅胶 G 板(青岛海洋化工有限公司)。

5-羟甲基糠醛对照品(含量以 99.4%计,批号 111626-201711,中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇(色谱纯,国药集团); 水为超纯水(美国 Milli-Q 公司); 其他试剂均为分析纯(国药集团)。

山萸肉样品(A 厂,批号 160102; B 厂,批号 160701; C 厂,批号 20170101; D 厂,批号 160201; E 厂,批号 160301;

酒萸肉样品(F 厂,批号 20160403; G 厂,批号 170329; H 厂,批号 151101; I 厂,批号 20170301; J 厂,批号 20150201)。

2.2 实验方法

2.2.1 薄层色谱法

取 5-羟甲基糠醛对照品,加甲醇制成每 1 mL 含

0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。分别取山萸肉、酒萸肉样品粉末各 0.5 g,加甲醇 10 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。吸取上述 2 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(3:1, V:V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光和紫外灯(365 nm)下分别检视。

2.2.2 超高效液相色谱法

色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(ACQUITY UPLC BEH C_{18} (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m); 以乙腈-0.005 mol/L 乙酸铵(10:90, V:V)为流动相;柱温为 30 $^{\circ}$ C,流速:0.2 mL/min。

对照品溶液:取 5-羟甲基糠醛对照品适量,精密称定,加 80%甲醇制成 10 μ g/mL 的对照品溶液,即得。

供试品溶液:取饮片粉末约 0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 20 mL,称定重量,超声处理(功率:500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用 80%甲醇补足减失的重量,滤过,即得。

2.2.3 液相-质谱法确认

液相部分色谱条件同“2.2.2”项。

质谱检测参数:电喷雾负离子模式(electron spray ionization, ESI-); 检测方式:一级质谱全扫描、多反应检测(multiple reaction monitoring, MRM)方式;去簇电压 70 V;入口电压 10 V;碰撞能量 12~21 V;源温度 450 $^{\circ}$ C;碰撞室出口电压 13 V。

3 结果与分析

3.1 薄层色谱法实验结果

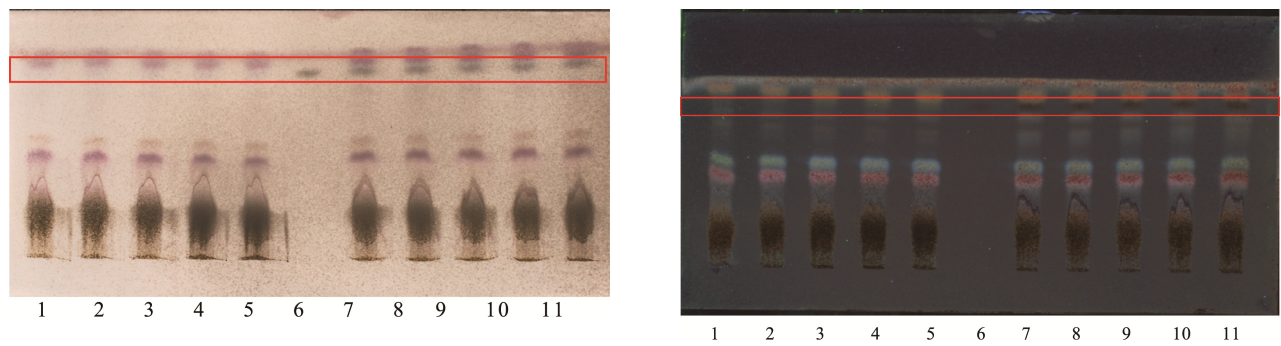
薄层色谱法鉴别结果显示(详见图 1、2),山萸肉饮片和酒萸肉饮片在与 5-羟甲基糠醛相应的位置上,色谱斑点具有明显的差异。5 批次酒萸肉饮片均显示 5-羟甲基糠醛相应的色谱斑点(日光下灰褐色;365 nm 下荧光淬灭),而山萸肉饮片在相同位置未显示斑点,因此本方法能快速有效鉴别山萸肉和酒萸肉样品。

3.2 超高效液相色谱检测结果

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 1 μ L,注入液相色谱仪。结果酒萸肉样品呈现与对照品保留时间相一致的色谱峰,山萸肉样品在同一保留时间无相应色谱峰出现,详见图 3。

3.3 液相-质谱法确认结果

5-羟甲基糠醛精确质量为 126.0317,在正离子模式形成 m/z 为 127 的分子离子峰。以 m/z 127 为母离子进行二级质谱分析,选取丰度较强、干扰较小的 2 对子离子,进行多反应监测(MRM)模式检测。在酒萸肉样品色谱中,相应的色谱峰具有与 5-羟甲基糠醛相同的质谱特征,见图 4、5。



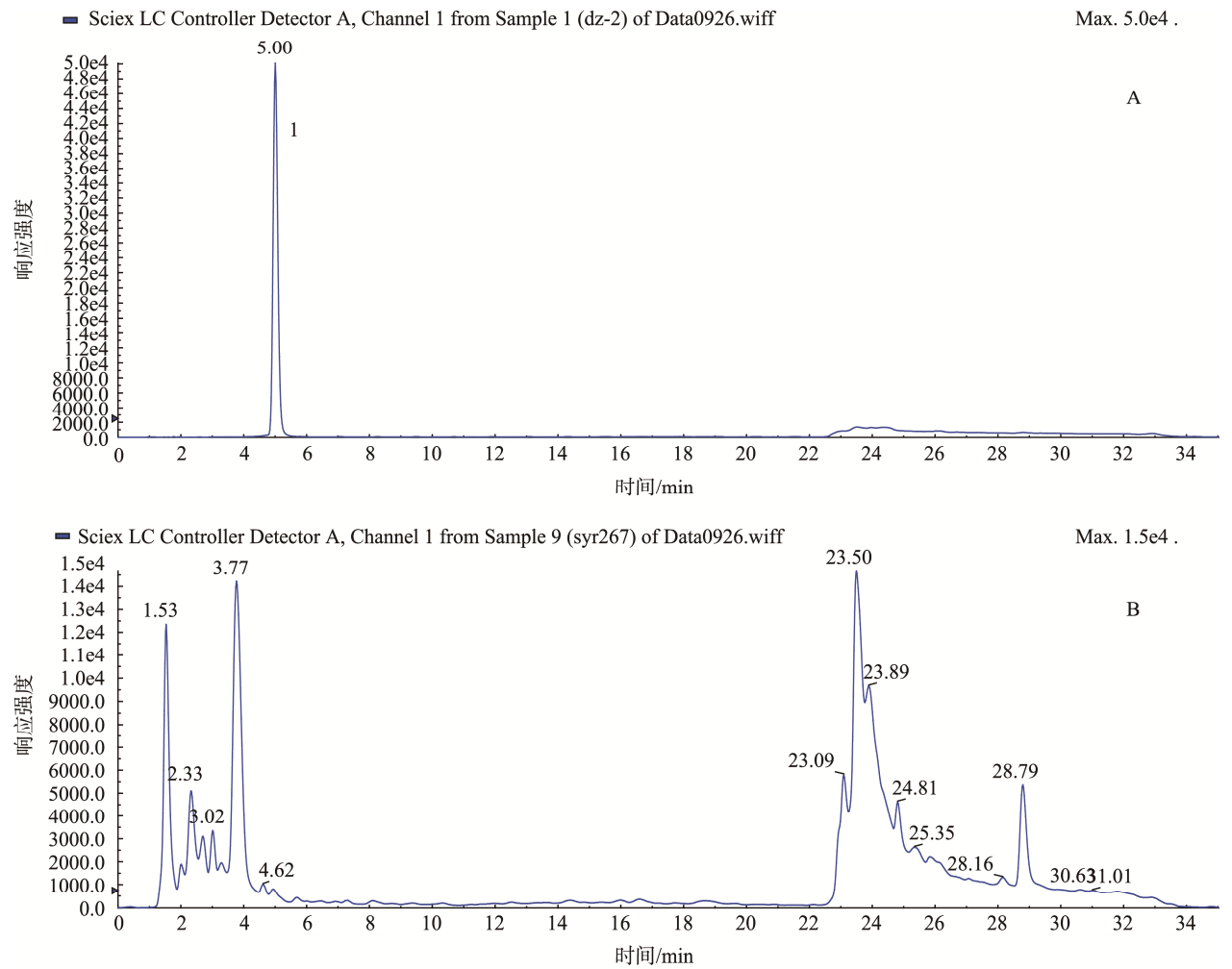
注: 1 ~ 5: 山茱肉样品; 6: 5-羟甲基糠醛对照品; 7 ~ 11: 酒茱肉样品。

图 1 薄层色谱图(日光)

图 2 薄层色谱图(365 nm)

Fig.1 Thin layer chromatogram (sunlight)

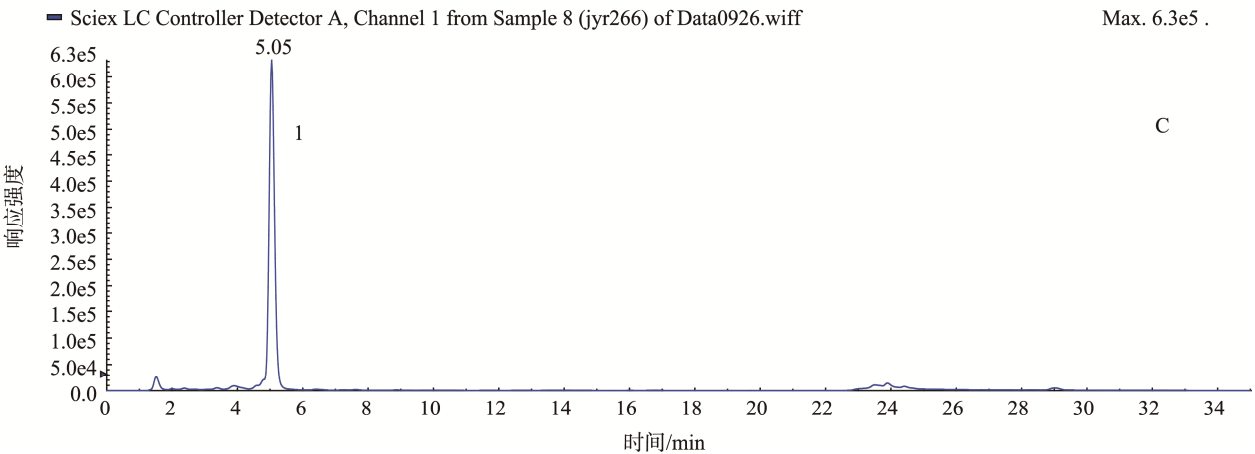
Fig.2 Thin layer chromatogram (365 nm)



注: A. 5-羟甲基糠醛对照品; B. 山茱肉样品。

图 3 超高效液相色谱图

Fig.3 Ultra performance liquid chromatography chromatogram



注: C. 酒茛肉样品(峰 1 代表 5-羟甲基糠醛)。

续图 3 超高效液相色谱图

Fig.3 Ultra performance liquid chromatography chromatogram

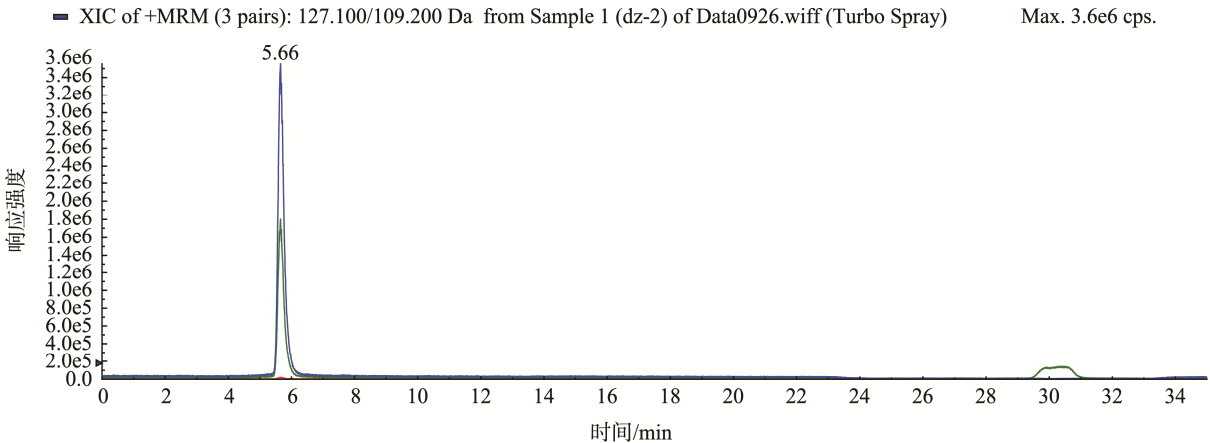


图 4 5-羟甲基糠醛对照品选择离子色谱图(m/z : 127.1/109.2; m/z : 127.1/81.0)

Fig.4 Selective ion chromatogram of 5-HMF (m/z : 127.1/109.2; m/z : 127.1/81.0)

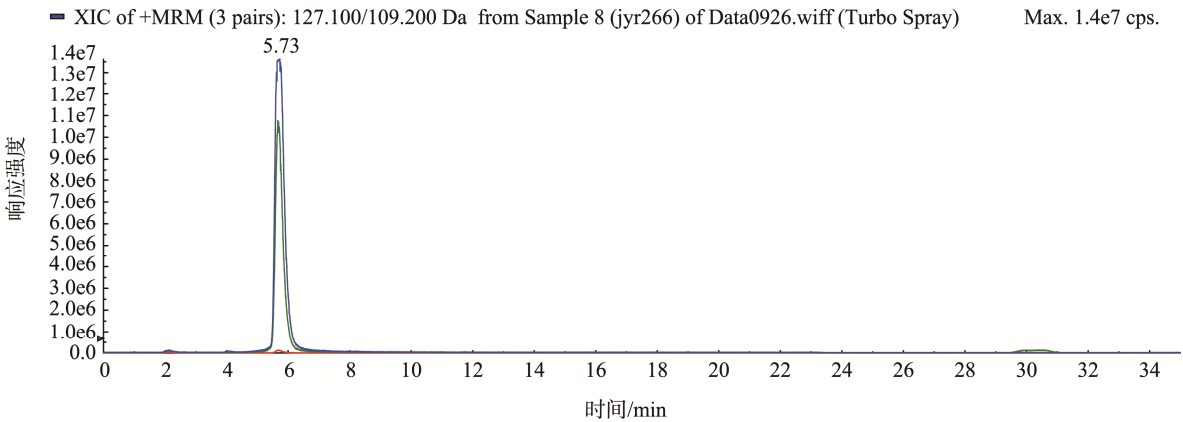


图 5 酒茛肉样品选择离子色谱图(m/z : 127.1/109.2; m/z : 127.1/81.0)

Fig.5 Selective ion chromatogram of processed *Fructus corni* (m/z : 127.1/109.2; m/z : 127.1/81.0)

3.4 精密度

精密吸取 5-羟甲基糠醛对照品溶液(浓度约为 10 $\mu\text{g/mL}$), 连续进样 5 次, 进样量 10 μL , 测得 5-羟甲基糠醛保留时间及峰面积, 保留时间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.50%, 峰面积 RSD 为 0.40%, 结果表明精密度良好。

3.5 稳定性

取同一供试品溶液, 室温下放置, 在 0、1、2、4、6、12、24 h 分别进样 10 μL 进行分析, 测定峰面积积分值, 5-羟甲基糠醛峰面积积分值的 RSD 为 1.17%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.6 检测限

取 5-羟甲基糠醛对照品一定量配制一定浓度的对照溶液, 按上述液相色谱条件, 进样测定, 以信噪比法($S/N=3$)测得 5-羟甲基糠醛的检出限为 0.0001 μg 。

3.7 样品测定

分别对上述 10 家企业 10 批山茱萸饮片样品进行了检测, 其中 5 个企业酒萸肉饮片样品(F 厂, 批号 20160403; G 厂, 批号 170329; H 厂, 批号 151101; I 厂, 批号 20170301; J 厂, 批号 20150201)薄层色谱法、液相色谱法均检出 5-羟甲基糠醛相应斑点或色谱峰, 山茱萸饮片样品未检出。且 5 批酒萸肉样品经液质联用验证均符合上述方法中视为 5-羟甲基糠醛阳性检出的规定。

4 结论与讨论

5-羟甲基糠醛具有较好的特征性, 可用于区分山茱萸肉和酒萸肉。由于酒萸肉经炮制后化学组分发生了改变^[11-14], 药典质量标准中针对酒萸肉只规定了莫诺苷和马钱苷的含量测定, 而莫诺苷和马钱苷的定量测定无法完整地反应该品种的化学组分特征并有效地控制其质量^[15-20]。通过探索性研究还发现, 酒萸肉饮片中 5-羟甲基糠醛含量受炮制因素影响较大, 应严格按照炮制规范进行炮制。因此, 本研究建立了酒萸肉中针对 5-羟甲基糠醛的鉴别检测方法, 为酒萸肉有效成分的测定以及质量控制提供了评价方法。

参考文献

- [1] 周京华, 李电东, 李春生, 等. 山茱萸有效化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808.
Zhou JH, Li DS, Li CS, et al. Progress in research of the active chemical components of *Cornus officinalis* [J]. Chin J New Drug, 2001, 10(11): 808.
- [2] Cao G, Zhang Y, Feng J, et al. A rapid sensitive assay for determining the main components in processed *Fructus corni* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chromatographia, 2011, 73(1): 135.
- [3] Cao G, Zhang CR, Cong XD, et al. Global detection and identification of

- components from crude and processed traditional Chinese medicine by liquid chromatography connected with hybrid ion trap and time-of-flight-mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2011, 34(15): 1845.
- [4] 张月娥, 刘鄂湖, 李会军, 等. 山茱萸的化学成分[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 365.
Zhang YE, Liu EH, Li HJ, et al. Chemical constituents from the fruit of *Cornus officinalis* [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7(5): 365.
 - [5] 李伟, 许惠琴, 陶玉茜, 等. RP-HPLC 法测定山茱萸环烯醚萜总苷中马钱苷和莫诺苷含量[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(1): 90.
Li W, Xu HQ, Tao YH, et al. Simultaneous determination of loganin of morroniside in total glucosides from *Cornus officinalis* by HPLC [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(1): 90.
 - [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the people's Republic of China [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Association, 2015.
 - [7] 杜伟锋, 张云, 丛晓东, 等. HPLC-ESI-MS 法分析山茱萸炮制前后的化学成分[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 62.
Du WF, Zhang Y, Cong XD, et al. HPLC-ESI-MS analysis of chemical components of *Cornus* before and after processing [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2012, 30(1): 62.
 - [8] 李清正, 张振凌, 闫梦真, 等. 酒萸肉饮片加工炮制一体化工艺[J]. 中国现代中药, 2019, 6(21): 817-822.
Li QZ, Zhang ZL, Yan MZ, et al. Study on processing technology of *Fructus corni* praeparatus cum vino Slices [J]. Mod Chin Med, 2019, 6(21): 817-822.
 - [9] 宋艺君, 王志彦, 李积秀, 等. 总评归一化法优选山茱萸酒蒸炮制工艺[J]. 中药材, 2018, 2(41): 325-329.
Song YJ, Wang ZY, Li JX, et al. Optimization of preparing procedure of wined *Cornus officinalis* fruit by overall desirability [J]. Chin Med Mat, 2018, 2(41): 325-329.
 - [10] 常增荣, 李姣, 郝博, 等. 中药山茱萸炮制前后特征化学成分的分析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 338-343.
Chang ZR, Li J, Hao B, et al. Analysis of characteristic chemical components in crude and processed *Fructus corni* [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(2): 338-343.
 - [11] 陈随清, 魏雅磊, 王静, 等. 多指标成分分析确定山茱萸最佳采收期[J]. 中国现代中药, 2011, 13(1): 29-43.
Chen SQ, Wei YL, Wang J, et al. Determination of the best harvest time of *Cornus officinalis* by multi index component analysis [J]. Mod Chin Med, 2011, 1(13): 29-43.
 - [12] 张嘉妮, 戴冰, 李玉星, 等. 酒制山茱萸炮制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2016, 12(33): 1604-1608.
Zhang JN, Dai B, Li YX, et al. Research progress in processing of *Fructus corni* with wine [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 12(33): 1604-1608.
 - [13] 郭仪, 王礼国, 杜春洁, 等. 多指标综合评价正交试验法优化酒萸肉加压蒸制工艺[J]. 化学工程师, 2018, 9: 16-19.
Guo Y, Wang LG, Du CJ, et al. Optimization of high pressure processing technology of wine-processed *Fructus corni* by multi-indexes comprehensive weighted method [J]. Chem Eng, 2018, 9: 16-19.
 - [14] 雷小小, 苏艳莹, 李美云, 等. 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫诺苷的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 1(52): 104-108.

- Lei XX, Su YY, Li MY, *et al.* Research progress of loganin and morroniside from cornel iridoid glycosides [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(1): 104–108.
- [15] 罗江燕, 朱雪梅, 吴敏, 等. 基于红外光谱结合二维相关光谱法的山茱萸蒸制前后化学变化分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3756–3758.
- Luo JY, Zhu XM, Wu M, *et al.* Analysis on the crude and processed *Fructus corni* by infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. Chin J Tradit Med, 2017, 32(8): 3756–3758.
- [16] 赫军, 续洁琨, 潘雪格, 等. 山茱萸中 1 个新苯丙素苷类化合物[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4264–4266.
- He J, Xu JK, Pan XG, *et al.* A new phenylpropanoid glycoside from fruit of *Cornus officinalis* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(21): 4264–4266.
- [17] 乔灏祯, 叶贤胜, 赫军, 等. 山茱萸中 1 个新的环烯醚萜苷类化合物[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(14): 1212–1216.
- Qiao YW, Ye XS, He J, *et al.* A new iridoid glucoside from the ripe fruits of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. [J]. Chin Pharm, 2017, 52(14): 1212–1216.
- [18] 孙玲, 樊晓兰, 戴晓丽, 等. HPLC-QAMS 法测定不同产地 19 批山茱萸中 5 种环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(15): 2063–2067.
- Sun L, Fan XL, Dai XL, *et al.* Content determination of 5 iridoid glycosides in 19 batches of *Fructus corni* from different origins by HPLC-QAMS method simultaneously [J]. J Chin Pharm, 2018, 29(15): 2063–2067.
- [19] 韩根利, 刘宏胜, 王树森, 等. RP-HPLC 法同时测定山茱萸萜类制剂中莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷、齐墩果酸及熊果酸[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5168–5173.
- Han HL, Liu HS, Wang SS, *et al.* Simultaneous determination of morroniside, loganin, cornuside, oleanolic acid, and ursolic in *Fructus corni* terpenoids medicinal preparation base on RP-HPLC [J]. China Tradit Herb Drug, 2017, 48(24): 5168–5173.
- [20] 王巍, 高陆, 姜文月, 等. 一测多评法测定山茱萸炮制前后 6 种成分的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(5): 38–41.
- Wang W, Gao L, Jiang WY, *et al.* Determination of six active ingredients in crude and processed *Fructus corni* by quantitative analysis multi-components with single-marker [J]. Chin Med J Res Prac, 2018, 32(5): 38–41.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



逯雯洁, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为中藏药品检验。

E-mail: luwenjie608@hotmail.com