

• 药材与资源 •

基于化学计量学的酒萸肉特征性成分识别及定量测定

贾红梅¹, 庾延和^{2#}, 于 猛¹, 张宏武¹, 鞠成国³, 高 陆⁴, 邹忠梅^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 广西 南宁 530021

3. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

4. 修正药业集团股份有限公司, 吉林 长春 134001

摘 要: **目的** 识别酒萸肉特征性成分并检测其含量。**方法** 应用 UPLC-Q-TOF/MS 检测酒萸肉及其生品化学成分谱, 并基于化学计量学方法识别酒萸肉的特征成分。建立基于超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(UPLC-PDA)的酒萸肉特征成分含量测定方法, 对 12 批次酒萸肉及其生品的特征成分含量进行检测。**结果** 酒萸肉及其生品的化学成分谱不尽相同, 共获得 10 个可表征酒萸肉的特征成分, 包括 5-羟甲基糠醛、没食子酸、原儿茶酸、莫诺苷、马钱苷酸、獐芽菜苷、山茱萸苷、二氢槲皮素、马钱苷、山茱萸新苷。建立了基于 UPLC-PDA 的多成分含量测定方法, 方法学考察结果显示 10 个特征成分线性关系良好($r \geq 0.9997$)。与同批次生品比较, 酒萸肉中的 5-羟甲基糠醛、二氢槲皮素、没食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸苷和獐芽菜苷 7 个成分含量显著升高, 原儿茶酸、马钱苷酸和山茱萸新苷 3 个成分含量显著降低。**结论** 基于化学计量学筛选获得的特征成分可以区分酒萸肉及其生品, 建立的酒萸肉多成分含量测定方法, 线性关系良好、快速简便、稳定可靠, 可为酒萸肉质量控制提供参考。

关键词: 酒萸肉; 化学计量学; 特征成分; 5-羟甲基糠醛; 没食子酸; 原儿茶酸; 莫诺苷; 马钱苷酸; 獐芽菜苷; 山茱萸苷; 二氢槲皮素; 马钱苷; 山茱萸新苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1294-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.028

Qualitative and quantitative analysis of characteristic chemical constituents in wine-processed *Corni Fructus* by chemometric and UPLC-PDAJIA Hong-mei¹, YU Yan-he², YU Meng¹, ZHANG Hong-wu¹, JU Cheng-guo³, GAO Lu⁴, ZOU Zhong-mei¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China

3. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

4. Xiuzheng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Changchun 134000, China

Abstract: Objective To screen the differential ingredients between crude and wine-processed *Corni Fructus* and determine their content. **Methods** An integrated strategy using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) and the chemometric approach was applied to compare the global chemical profile of crude and wine-processed *Corni Fructus*. Then, the main differential ingredients were quantified by UPLC-PDA. **Results** The chemical profiling of wine-processed *Corni Fructus* was significantly different. Ten compounds could be considered as characteristic chemical markers for distinguishing crude and wine-processed *Corni Fructus*, including 5-hydroxymethyl furfuraldehyde (5-HMF), gallic acid, protocatechuic acid, morroniside, loganic acid, sweroside, cornin, dihydroquercetin, loganin and cornoside. A new UPLC-PDA quantitative method for analyzing simultaneously the above ten compounds in wine-processed *Corni Fructus* was established. The results of methodology investigation showed that the ten components were well linear within the investigation range

收稿日期: 2019-11-02

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JL-24)

作者简介: 贾红梅(1981—), 女, 副研究员, 研究方向为中药及复方药效物质基础和质量控制研究。Tel: (010) 57833302 E-mail: hmjia@implad.ac.cn

*通信作者: 邹忠梅(1964—), 女, 研究员, 研究方向为中药及复方药效物质基础和作用机制研究。

Tel: (010)57833290 E-mail: zmzou@implad.ac.cn

#并列第一作者 庾延和(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。E-mail: 1316143180@qq.com

($r \geq 0.999\ 7$). Compared with the crude *Corni Fructus*, the content of seven components were increased, including gallic acid, 5-HMF, loganin, morroniside, cornin, sweroside and dihydroquercetin, and the other three components in wine-processed *Corni Fructus* were decreased. **Conclusion** The differential ingredients obtained by chemometric-based approach can be used to distinguish crude and wine-processed *Corni Fructus*. The determination method of wine-processed *Corni Fructus* established is accurate and reliable, which can be used for the quality control of *Corni Fructus*.

Key words: wine-processed *Corni Fructus*; chemometric approach; characteristic chemical markers; 5-hydroxymethyl furfuraldehyde (5-HMF); gallic acid; protocatechuic acid; morroniside; loganic acid; sweroside; cornin; dihydroquercetin; loganin; cornoside.

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 记载于《神农本草经》和《中国植物志》。其性微温, 味酸、涩, 归肝、肾经, 有补益肝肾、涩精固脱之功效, 主治阳痿遗精、腰膝酸痛、内热消渴、大汗虚脱等症^[1]。山茱萸主要含有环烯醚萜类、五环三萜类、鞣质类、黄酮类、有机酸及其酯类和多糖类成分^[1-2], 具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等药理活性^[3-4]。酒萸肉是山茱萸药材按照《中国药典》(通则 0213) 酒炖法或酒蒸法, 炖或蒸至酒吸尽炮制而成^[5]。酒是中药炮制中的一种液体辅料, 其甘辛大热, 气味芳香, 能升能散、宣行药势、活血通络、祛风散寒、矫味矫臭。药物的多种有效成分, 如生物碱及其盐类、苷类、鞣质、有机酸等皆易溶于酒中, 经酒炮制后易于有效成分的释出, 以提高疗效。山茱萸药材酒蒸后可缓和其酸涩性, 使其味转厚, 增强其温补肝肾、活血通络的作用^[4,6]。酒萸肉作为常用中药, 临床应用广泛, 同时是“六味地黄丸”“金匱肾气丸”和“消渴康颗粒”等诸多经典名方的原料药, 其市场需求巨大。在《中国药典》2010 年版和 2015 年版中, 山茱萸药材及酒萸肉以莫诺苷和马钱苷作为评价指标, 规定山茱萸药材含莫诺苷和马钱苷的总量不得少于 1.20%, 酒萸肉含莫诺苷和马钱苷的总量不得少于 0.70%。两者质控指标相同, 限量标准相近, 不能达到区分和鉴别二者的目的。尤其在中成药制剂中无法追溯添加品为山茱萸或是酒萸肉, 易造成市场上生品、炮制品混用, 中成药药效降低的现象。因此, 明确酒萸肉及其生品山茱萸的化学成分差异, 建立可表征酒萸肉特征的质量控制方法是目前亟需解决的问题。

本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对同批次的山茱萸及其酒蒸得到的酒萸肉进行分析, 采用化学计量学方法寻找和识别酒萸肉的特征成分并开展定性鉴别分析。建立基于超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器 (UPLC-PDA) 的酒萸肉特征成分含量

测定方法, 并开展酒萸肉及其生品的含量检测, 为酒萸肉质量控制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

UPLC-Q-TOF-MS (美国沃特世公司, 型号 Synapt G2); H-Class UPLC System 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器厂); BT224S 型分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); Sorvall Strato 型高速离心机 (赛默飞科技有限公司); 数据处理软件: MarkerLynx 4.1 (美国沃特世公司), EmpowerTM 3 工作站 (美国沃特世公司), SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Umeå, 瑞典), SPSS 22.0 软件 (美国芝加哥)。

水 (Watsons 公司, 屈臣氏饮用水); 甲醇 (J. T. Baker 公司, 色谱纯); 甲酸、磷酸、乙腈 (Fisher 公司, 色谱纯); 亮氨酸脑啡肽 (Sigma Aldrich, 美国)。水 (Watsons, 屈臣氏饮用水); 甲醇 (北京化工厂, 分析纯); 对照品 5-羟甲基糠醛 (批号 BWB50736)、马钱苷 (批号 BWB50632)、莫诺苷 (批号 BWB50658)、马钱苷酸 (批号 BWB50633)、獐芽菜苷 (批号 BWB51574)、山茱萸苷 (批号 BWB50670) 均购于北纳创联生物技术研究院; 山茱萸新苷 (批号 131189-57-6) 购于上海一源生物科技有限公司; 没食子酸 (批号 P0000246)、原儿茶酸 (批号 P0000252)、二氢槲皮素 (批号 P0000120) 来自国家中药化合物库, 所有对照品质量分数均大于 98%。

1.2 药材

山茱萸药材 (S1~S6) 和酒萸肉 (J1~J6) 样品均由修正药业集团股份有限公司提供, 经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉。酒萸肉 (J1~J6) 是由山茱萸药材 (S1~S6) 按照《中国药典》(通则 0213) 酒炖法或酒蒸法, 炖或蒸至酒吸尽炮制而成, 样品信息见表 1。

表 1 同批次山茱萸及其酒蒸品样本信息

Table 1 Information list of same batch of crude and wine-processed *Corni Fructus*

编号	批号	编号	批号	产地
S1	20170501	J1	J20170501	河南
S2	20170505	J2	J20170505	河南
S3	20160501	J3	J20160501	河南
S4	20170415	J4	J20170415	河南
S5	20160307	J5	J20160307	浙江
S6	20140127	J6	J20140127	浙江

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称定酒茱萸肉粉末(过 3 号筛) 1.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取适量在 13 000 g/min, 高速离心 20 min, 取适量, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。山茱萸饮片粉末采用同样的方法制备供试品。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、马钱苷酸、莫诺苷、山茱萸苷、獐芽菜苷、马钱苷、二氢槲皮素、山茱萸新苷对照品适量, 加入甲醇溶液溶解, 配制成含没食子酸 251.94 $\mu\text{g/mL}$ 、5-羟甲基糠醛 998.82 $\mu\text{g/mL}$ 、原儿茶酸 98.44 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷酸 190.34 $\mu\text{g/mL}$ 、莫诺苷 1 198.30 $\mu\text{g/mL}$ 、山茱萸苷 49.20 $\mu\text{g/mL}$ 、獐芽菜苷 117.70 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 850.94 $\mu\text{g/mL}$ 、二氢槲皮素 1 000.85 $\mu\text{g/mL}$ 、山茱萸新苷 191.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 备用。

2.3 液相质谱联用(LC-MS)检测条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱采用 Waters ACQUITY[®] UPLC HSS T3 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 2%~9% B; 3~9 min, 9% B; 9~18 min, 9%~18% B; 18~25 min, 18%~32% B; 25~29 min, 32%~50% B; 检测波长为 245 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 4 μL ; 体积流量 0.3 mL/min。

2.3.2 质谱条件 UPLC-MS 系统使用 ESI 离子源, 以氮气作为雾化、锥孔气。数据采集模式: 正离子模式与负离子模式; 采集范围: m/z 100~1 200; 毛细管电压: 正离子模式为 3.0 kV, 负离子模式为 2.5 kV; 毛细管温度 275 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾电压 4.5 kV; 锥孔电压 30 V; 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气(N_2) 体积流量 50 L/h; 脱溶剂气(N_2) 体积流量 400 L/h; 脱溶剂室温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 数据采集形式为 centroid; 锁定质

量数: 正离子模式为 m/z 556.277 1, 负离子模式为 m/z 554.261 5; 校正溶液为亮氨酸脑啡肽。

2.4 UPLC-PDA 色谱条件

超高效液相色谱仪(美国沃特世公司, 型号 H-Class UPLC System); 色谱柱采用 Waters ACQUITY[®] UPLC HSS T3 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.2% 磷酸水(A)-乙腈(B)溶液; 梯度洗脱为 0~3 min, 2%~9% B; 3~9 min, 9% B; 9~18 min, 9%~18% B; 18~25 min, 18%~32% B; 检测波长为 245 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 4 μL ; 体积流量 0.3 mL/min。

2.5 数据处理

2.5.1 数据预处理 应用 MarkerLynx 4.1 软件, 对 LC-MS 数据进行归一化处理。数据预处理采用 MassLynx V4.1 软件包, 处理参数设置: 保留时间范围 0.5~25.0 min; 质量范围 100~1 200 amu; 质量偏差 0.01; 最小强度 1%; 质量窗 0.02; 保留时间窗口 0.20; 消除噪音水平为 6; 峰强度阈值 300, 生成包含样品名称、保留时间、精确质核比、峰面积的数据矩阵。

2.5.2 数据多元统计分析 将 LC-MS 采集数据预处理得到的数据矩阵导入多元统计分析软件(SIMCA-P V13.0), 经 Pareto 标度化处理。首先对酒茱萸肉和山茱萸样本分别进行主成分分析(PCA), 考察炮制对山茱萸化学成代谢轮廓的影响。在 PCA 的基础上, 利用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)对数据进行差异识别分析, 获得得分图(score plot)和载荷图(S-plot)。Score plot 反映各组数据的分组信息, S-plot 图反映出各个变量对样品分组的影响, 变量距离载荷矩阵图中心的距离越远, 表明其对分组的贡献越大, 即为显著差异变量, VIP>1.0 通常被认为是对分组具有贡献的变量。

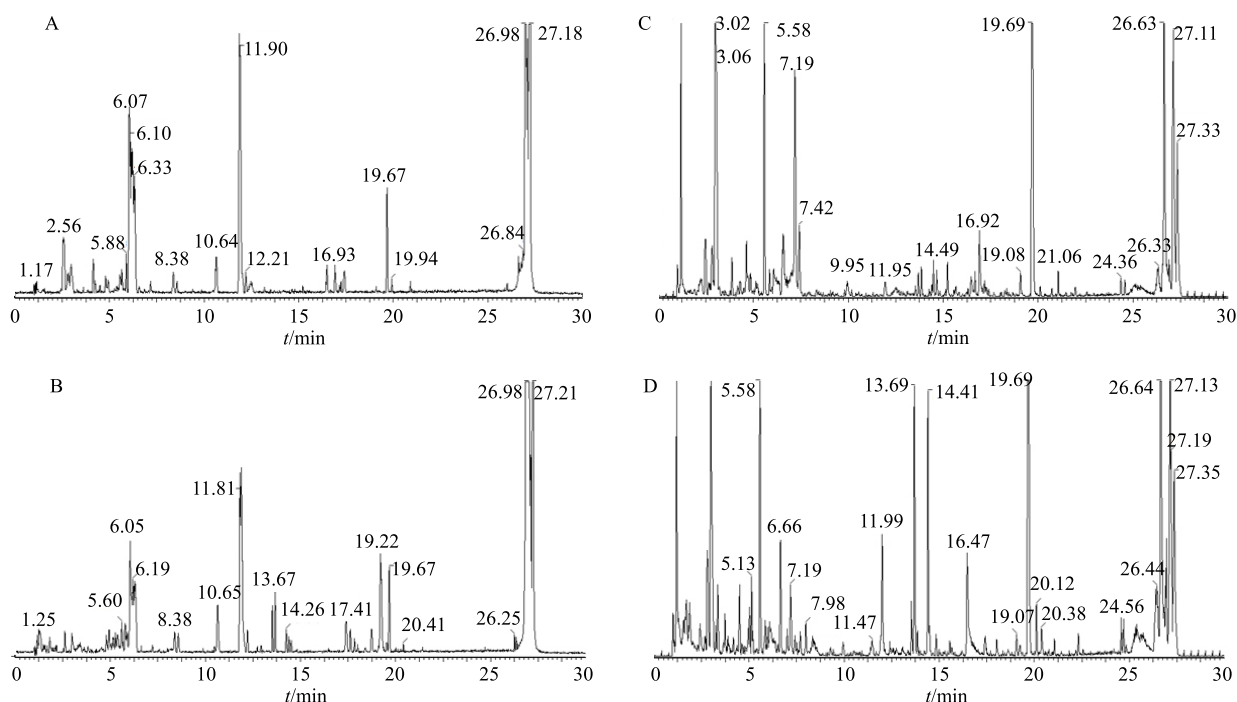
2.6 统计学处理方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 SPSS 20.0 数据处理软件进行统计分析。统计分析采用双侧 t 检验对差异变量进行显著性分析($P<0.05$ 具有统计学意义)。

3 结果与分析

3.1 山茱萸炮制前后化学成分的 LC-MS 分析

应用优化了的 LC-MS 方法分别对同批次的山茱萸及其酒蒸得到的酒茱萸肉进行分析。正、负离子检测模型条件下的山茱萸药材和酒茱萸肉 LC-MS 基峰图(BPI)见图 1。应用多元统计分析发现炮制前、后 2 种样本在 $t[1]$ 轴方向上显著分离(图 2-A), 表明两



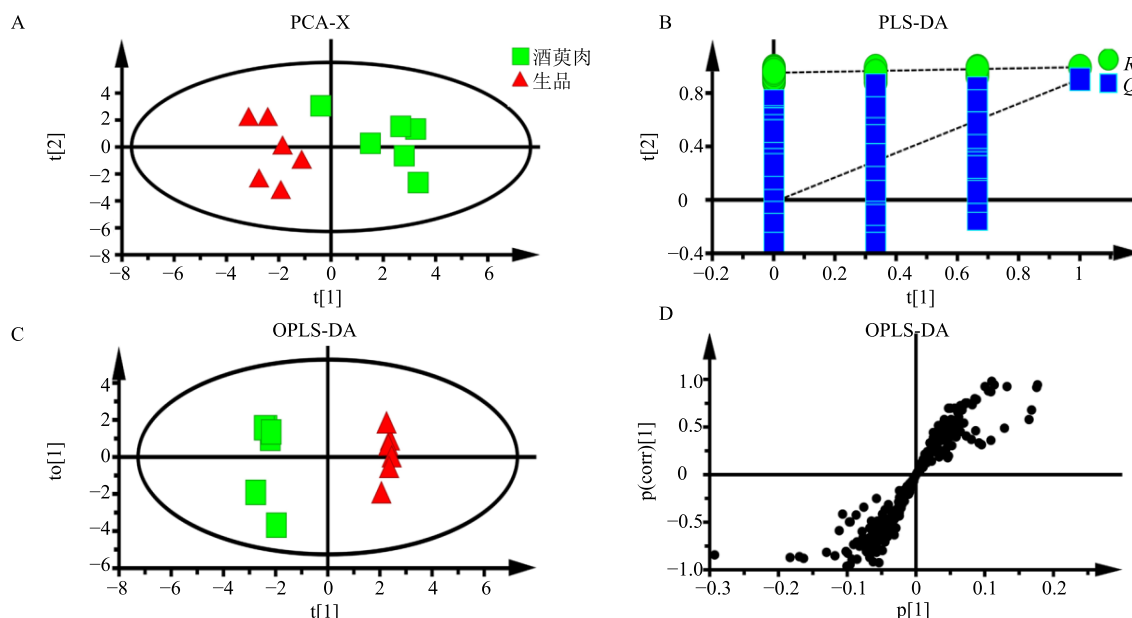
A、C-山茱萸药材的正、负离子模式基峰图 B、D-酒茱萸肉的正、负离子模式基峰图

A, C-base peak chromatogram of crude *Corni Fructus* detected in positive and negative ion mode

B, D-base peak chromatogram of wine-processed *Corni Fructus* detected in positive and negative ion mode

图 1 山茱萸药材和酒茱萸肉的 UPLC-Q-TOF/MS 基峰图

Fig. 1 Base peak chromatogram of crude and wine-processed *Corni Fructus* detected by UPLC-Q-TOF/MS



A-PCA 得分图 B-PLS-DA 模型验证 C-OPLS-DA 得分图 D-OPLS-DA 分析 S-plot 图

A-score plot of PCA B-verification of PLS-DA C-score plot of OPLS-DA D-S-plot of OPLS-DA

图 2 酒茱萸肉及其生品正离子检测模式质谱数据多元统计分析

Fig. 2 Multivariate statistical analysis of crude and wine-processed *Corni Fructus* detected by UPLC-Q-TOF/MS in positive mode

者化学成分组成或成分的含量具有差异,提示酒蒸炮制导致山茱萸药材的化学成分及其含量发生了改变。

3.2 酒茱萸肉特征成分的筛选与鉴定

为快速而准确地寻找 2 种样本间差异所在,在 PCA 的基础上,进一步利用 PLS-DA 和

OPLS-DA 对 LC-MS 数据进行深入分析, 获取得分图(score plot, 图 2-C 和图 3-C)、载荷图(S-plot, 图 2-D 和图 3-D)和变量重要性分析(VIP)值。实验模型排列验证结果如图 2-B、图 3-B 所示, 显示正、负离子模式检测数据的 CV-ANOVA 验证 P 值分别为 0.014 和 0.000 9, 表明建立的数据模型可靠、有效。以 S-plot 中变量远离原点 $P(\text{corr})$ [1] 0.8 或者 $P(\text{corr})$ [1] -0.8 , VIP 值 1.0, 且 t 检验 $P < 0.05$ 的差异变量为筛选标准, 共筛选出 17 个组间差异变量, 其中正离子模式 8 个, 负离子模式 9 个。通过精确质量数测定, MS/MS 分析, 与对照品保留行为及质谱数据进行比对, 或与文献报道相比较^[7-11], 一级质谱得到的精确质量和计算得到的理论值误差均在 5×10^{-6} 以内, 鉴定了 17 个差异变量的结构, 包括 8 个环烯醚萜类, 3 个有机酸类, 4 个黄酮类及 2 个鞣质类成分(表 2)。其中, 槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖苷、山茱萸新苷和马钱苷酸等 13 个化合物结构通过与对照品的保留时间和质谱数据进行了比对, 最

终得到确认。

炮制后含量显著改变的成分对酒茱萸肉的功效变化具有贡献, 可视为酒茱萸肉的特征成分。如表 2 所示, 槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖苷、二氢槲皮素和没食子酸等 10 个成分经炮制后含量显著升高, 而 7- O -没食子酰-D-景天庚酮糖、槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖醛酸苷和原儿茶酸等 7 个成分经炮制后含量显著降低。此外, 5-羟甲基糠醛是山茱萸酒蒸炮制后产生的新物质, 但并未经化学计量学筛选获得, 其原因是 5-羟甲基糠醛不易离子化, 故在筛选差异成分时未被提及, 亦可视为酒茱萸肉的特征成分。但由于槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖苷、7- O - β -D-葡萄糖-莫诺苷、山茱萸新苷 III/IV 3 个成分的紫外吸收弱, 不适于液相色谱紫外含量测定分析。因此, 本实验最终针对二氢槲皮素、没食子酸、山茱萸新苷、山茱萸苷、马钱苷酸、原儿茶酸、莫诺苷、獐牙菜苷、马钱苷和 5-羟甲基糠醛 10 个成分建立了基于 UPLC-PDA 的酒茱萸肉多成分含量测定方法。

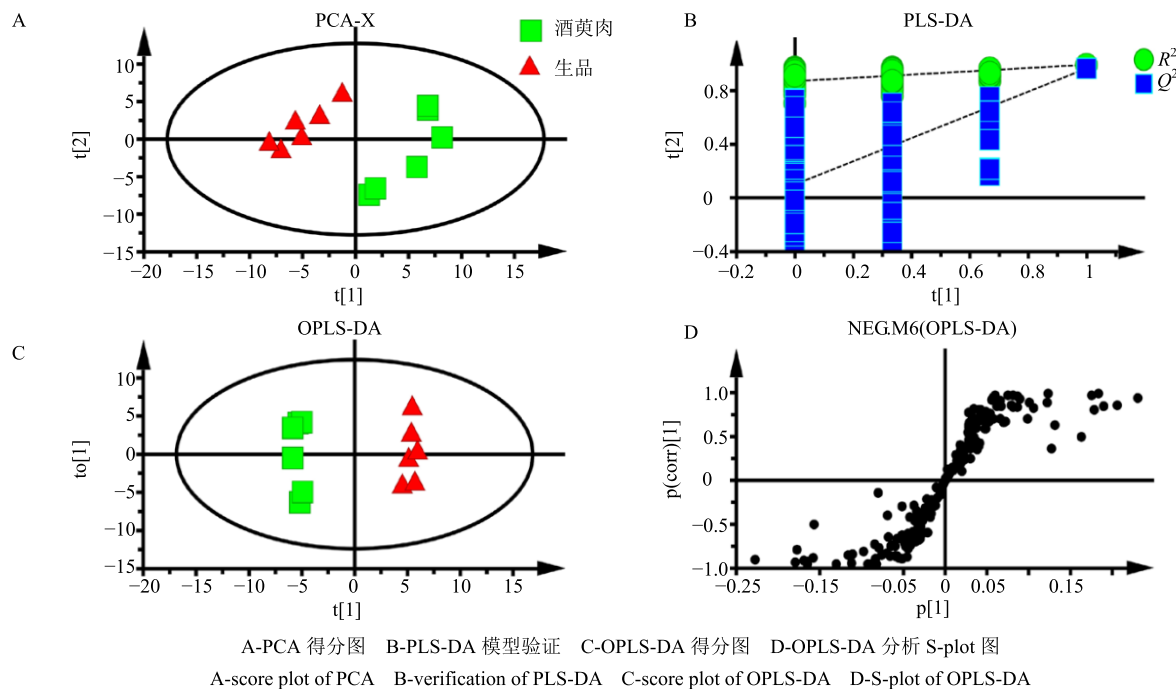


图 3 酒茱萸肉及其生品负离子检测模式质谱数据多元统计分析

Fig. 3 Multivariate statistical analysis of crude and wine-processed *Corni Fructus* detected by UPLC-Q-TOF/MS in negative mode

3.3 酒茱萸肉特征成分定量方法的建立及方法学考察

3.3.1 线性关系、定量限和检测限检测 将配制的混合对照品溶液按照“2.4 项”下方法进行检测, 分别以峰面积 (Y) 对对照品质量浓度 (X) 作图, 进

行加权回归计算, 得到各对照品的线性方程及相关系数 (r)。如表 3 所示, 10 个对照品线性回归方程的 $r \geq 0.999 7$, 表明对照品在考察范围内峰面积与进样量线性关系良好。

表 2 酒萸肉及其生品差异成分鉴定 (变化趋势)

Table 2 Identification of different components between crude and wine-processed *Corni Fructus* (change trend)

序号	保留时间/min	准分子离子 (<i>m/z</i>)	加合离子	化合物	含量变化趋势	VIP	离子检测模式
1*	20.72	487.211 6	[M+Na] ⁺	槲皮素-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	↑	5.12	正
2*	2.93	361.074 5	[M-H] ⁻	7- <i>O</i> -没食子酰- <i>D</i> -景天庚酮糖	↓	5.12	负
3*	15.20	569.434 6	[M+H] ⁺	7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖-莫诺苷	↑	3.53	负
4*	20.96	477.211 6	[M+H] ⁺	槲皮素-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	↓	3.19	正
5	20.39	487.211 5	[M+Na] ⁺	槲皮素-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -半乳糖苷	↓	3.11	正
6	10.17	513.088 6	[M-H] ⁻	1,7-二- <i>O</i> -没食子酰- <i>D</i> -景天庚酮糖	↓	2.93	负
7	17.71	565.155 8	[M+Na] ⁺	山茱萸新苷III/IV	↑	2.75	负
8	3.20	331.062 2	[M-H] ⁻	没食子酸-(4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖)	↓	2.75	负
9*	22.61	565.152 5	[M+Na] ⁺	山茱萸新苷	↑	2.39	正
10*	18.79	305.229 2	[M+H] ⁺	二氢槲皮素	↑	2.26	正
11*	3.71	169.102 5	[M-H] ⁺	没食子酸	↑	2.21	负
12*	14.01	387.371 1	[M-H] ⁺	山茱萸苷	↑	1.73	负
13*	7.32	375.128 7	[M-H] ⁺	马钱苷酸	↑	1.71	负
14*	7.02	153.124 5	[M-H] ⁺	原儿茶酸	↓	1.00	负
15*	11.81	435.143 2	[M+Na] ⁺	马钱苷	↑	1.14	正
16*	12.03	407.382 3	[M+H] ⁺	莫诺苷	↑	1.11	正
17*	10.65	403.115 6	[M+2Na] ⁺	獐芽菜苷	↑	1.05	正

*与对照品进行对照确认;“↑”酒萸肉与生品比较上调;“↓”酒萸肉与生品比较下调

*compared with the control product;“↑”the content of those compounds were increased in wine-processed *Coni Fructus* which compared with the raw product;“↓”the content of those compounds were decreased in wine-processed *Coni Fructus* compared with the raw product

表 3 酒萸肉中 10 个化学成分的线性回归方程、检测限、定量限

Table 3 Linear regression equation, detection limit and quantitative limit of 10 chemical components in wine-processed *Corni Fructus*

化合物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
没食子酸	$Y=8\ 976.2\ X-267.33$	0.999 7	3.94~251.94	0.256 3	0.748 9
5-羟甲基糠醛	$Y=10\ 830\ X+378.97$	0.999 7	15.61~998.82	0.020 8	0.062 4
原儿茶酸	$Y=22\ 063\ X+261.91$	0.999 7	1.54~98.44	0.035 6	0.076 9
马钱苷酸	$Y=10\ 403\ X-348.14$	0.999 8	2.97~190.34	0.049 6	0.147 8
莫诺苷	$Y=20\ 853\ X+171.83$	0.999 9	18.72~1 198.3	0.083 2	0.249 6
山茱萸苷	$Y=10\ 312\ X+360.51$	0.999 9	0.77~49.20	0.038 9	0.087 7
獐芽菜苷	$Y=13\ 064\ X-263.40$	0.999 9	1.84~117.70	0.061 3	0.183 9
马钱苷	$Y=18\ 743\ X+433.74$	0.999 8	13.30~850.94	0.017 7	0.053 2
二氢槲皮素	$Y=5\ 649.2\ X-50.59$	1.000 0	15.64~1 000.9	0.006 9	0.020 8
山茱萸新苷	$Y=16\ 779\ X-397.76$	1.000 0	3.00~191.40	0.001 0	0.029 9

将标准曲线上的最低浓度点逐级稀释,依次检测得到最低定量限(LOQ, $S/N=10$)和最低检测限(LOD, $S/N=3$)时的浓度,LOQ 为 0.020 8~0.748 9 μg/mL, LOD 为 0.001 0~0.256 3 μg/mL,表明该方法灵敏度较高。

3.3.2 精密度试验 (1) 日内精密度的测定:精密

吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液 4 μL,按照“2.4”项下的色谱条件连续进样 6 次,测定马钱苷、莫诺苷、没食子酸等 10 个化合物的峰面积,计算各成分峰面积 RSD 分别为 1.49%、0.51%、2.47%、1.23%、0.34%、1.43%、0.63%、0.42%、0.72%、0.47%。

(2) 日间精密度的测定:连续 3 d 测定上述混合对

照品溶液,各成分峰面积RSD分别为1.18%、0.48%、2.02%、1.27%、0.35%、1.78%、0.08%、0.10%、1.95%、0.70%。

3.3.3 重复性试验 精密称取 1.0 g 同一批 (S1) 次酒茱萸肉样品粉末 (过 3 号筛) 6 份,按“2.1”项下样品溶液制备方法制备得到 6 份供试液,按照“2.4”项下色谱条件测定 10 个化合物的峰面积,计算各化合物峰面积 RSD 分别为 0.97%、2.07%、1.98%、1.10%、1.58%、1.74%、1.49%、1.83%、0.87%、1.65%。

3.3.4 稳定性试验 精密称取 1.00 g 同一批次酒茱萸肉样品粉末 (过 3 号筛) 6 份,按照“2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后第 0、2、4、8、12 和 24 h 进样,按“2.4”项下的色谱条件测定各成分峰面积,并计算各化合物峰面积 RSD 分别为 1.79%、0.59%、1.81%、1.94%、1.55%、0.46%、0.86%、0.68%、0.60%、1.82%。

3.3.5 加样回收率试验 精密称取已测定的酒茱萸肉样品 (批号 J20160501) 粉末 (过 3 号筛) 9 份,约 0.50 g,分别按已知含量的 80.0%、100.0%、120.0% 的 3 个水平加入 5-羟甲基糠醛、没食子酸和马钱苷酸等 10 个对照品,测定并计算加样回收率及 RSD 值,10 个对照品的加样回收率在 98.0%~110.0%,RSD 在 0.88%~2.52%。

3.4 酒茱萸肉特征成分含量测定结果

应用建立的 UPLC-PDA 多成分定量分析方法,对山茱萸炮制前、后共 12 批次样本中的 10 个特征成分含量进行了检测。结果如图 4 和 5 所示,10 个化合物在炮制前、后含量变化差异显著,其中马钱苷酸、原儿茶酸、山茱萸新苷等 3 个成分经炮制后含量显著降低。而 5-羟甲基糠醛、没食子酸、二氢槲皮素、獐芽菜苷、马钱苷、莫诺苷和山茱萸苷等 7 个成分经炮制后含量显著升高。

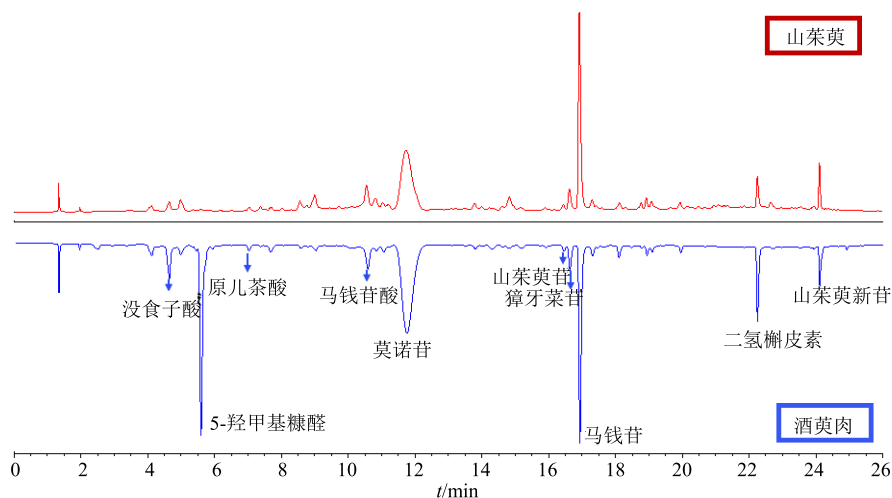


图 4 同批次山茱萸及其酒蒸品的 UPLC-PDA 色谱比较

Fig. 4 Chromatographic comparison of same batch of crude and its wine-processed *Corni Fructus* detected by UPLC-PDA

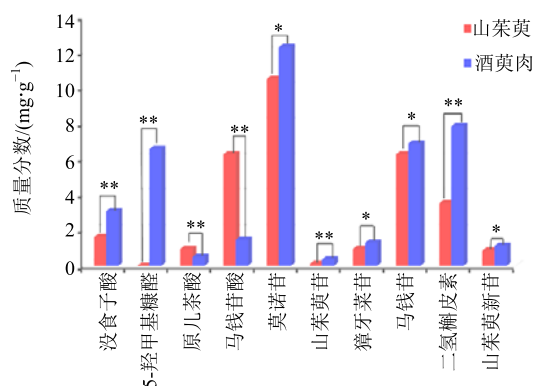


图 5 特征成分在同批次山茱萸及其酒蒸品样本的含量变化
Fig. 5 Content variation of 10 characteristic components in same batch crude and its wine-processed *Corni Fructus*

4 讨论

酒茱萸肉作为六味地黄丸、金匱肾气丸和消渴康颗粒等诸多经典名方的原料药,其市场需求巨大。但《中国药典》2010 年版和 2015 年版对山茱萸药材及酒茱萸肉的含量测定指标均是莫诺苷和马钱苷,山茱萸药材含莫诺苷和马钱苷的总量不得少于 1.2%,酒茱萸肉含莫诺苷和马钱苷的总量不得少于 0.70%。两者质控指标相同,限量标准相近,不能达到区分和鉴别二者的目的。尤其在中药制剂中无法追溯添加的原料是炮制品还是生品,易造成目前市场上生品、炮制品混用和中成药药效不一的现象。因此,明确酒茱萸肉与山茱萸药材的化学成分差异,建立可表征酒茱萸肉特征的质量控制方法是尚待解决

的问题。

炮制后含量显著改变的成分对酒萸肉的功效变化具有贡献, 可视为酒萸肉的特征成分。本实验采用化学计量学方法寻找和识别酒萸肉的特征成分, 槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、二氢槲皮素和没食子酸等 10 个成分经炮制后含量显著升高, 而 7-*O*-没食子酰-*D*-景天庚酮糖、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷和原儿茶酸等 7 个成分经炮制后含量显著降低。此外, 5-羟甲基糠醛是山茱萸酒蒸炮制后产生的新物质, 但并未经化学计量学筛选获得, 其原因是 5-羟甲基糠醛不易离子化, 故在筛选差异成分时未被提及, 虽然关于其活性作用评价不一^[12-13], 但鉴于其是酒萸肉炮制后产生的新成分, 5-羟甲基糠醛亦可视为酒萸肉的特征成分。鉴于质量控制方法的普适性, 液相色谱技术应用广泛, 但对化合物的紫外吸收强度有要求, 而槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、7-*O*- β -*D*-葡萄糖-莫诺苷、山茱萸新苷 III/IV 3 个成分的紫外吸收弱, 不适于液相色谱紫外含量测定分析。因此, 本实验最终对二氢槲皮素、没食子酸、山茱萸新苷、山茱萸苷、马钱苷酸、原儿茶酸、莫诺苷、獐牙菜苷、马钱苷和 5-羟甲基糠醛 10 个成分建立了基于 UPLC-PDA 的酒萸肉多成分含量测定方法。

应用建立的 UPLC-PDA 方法对同批次的山茱萸及其酒蒸得到的酒萸肉开展检测, 发现山茱萸经酒炮制后, 二氢槲皮素的含量变化最为显著, 鉴于其是山茱萸中除环烯醚萜类成分之外的另一类主要成分——黄酮类成分, 故建议将二氢槲皮素作为酒萸肉质控指标成分。同时, 《中国药典》2015 年版规定酒萸肉中马钱苷和莫诺苷的限量标准低于山茱萸药材, 而本研究显示炮制后马钱苷和莫诺苷含量高于生品, 故现有药典标准有待商榷, 有必要开展多产地、多批次山茱萸药材及酒萸肉样本开展大样本检测分析, 分析马钱苷和莫诺苷分别在山茱萸药材和酒萸肉中的含量变化范围, 确定其限量标准; 此外, 5-羟甲基糠醛虽为新生产物, 但鉴于其为药材酒制或醋制后的常见新生产物, 不具有特异

性, 并具有毒副作用, 故不建议做酒萸肉的质控指标成分。

参考文献

- [1] 温媛媛, 王 雷, 王 硕, 等. 山茱萸中活性成分的提取分离及其抗氧化活性研究综述 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(92): 44-48.
- [2] 杨明明, 袁晓旭, 赵桂琴, 等. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(5): 398-400.
- [3] 陈玉霞, 刘建华, 林 峰, 等. DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性 [J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(6): 11-14.
- [4] 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, 2016, 33(12): 1604-1608.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] 杜伟锋. 山茱萸炮制前后药效学研究及活性成分分析 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.
- [7] 王玉峰, 靳茂礼, 李 松. UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定马钱苷大鼠体内代谢产物 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(10): 77-80.
- [8] 王 静, 陈随清, 王延丽, 等. 山茱萸药材及其制剂的 LC-MS 鉴别 [J]. 中国药房, 2010, 21(11): 1004-1006.
- [9] 熊 山, 李敬来, 朱秀清, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中莫诺苷血药浓度 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3378-3381.
- [10] 王丽灵, 庞会明, 郑 啸, 等. 山萸肉炮制前后 11 种成分的变化 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 624-631.
- [11] Cai H, Cao G, Cai B C. Rapid simultaneous identification and determination of the multiple compounds in crude *Fructus Corni* and its processed products by HPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring mode [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(3): 273.
- [12] 顾 海. 山茱萸活性成分 5-羟甲基糠醛对 H₂O₂ 诱导损伤的大鼠海马神经元保护作用的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [13] 李恩灿, 贺玖明, 靳洪涛, 等. 4,5-羟甲基糠醛的药理和毒理研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4): 210-216.