

# 纸喷雾离子化技术对山茱萸药材的质量控制研究

谭鹏程<sup>1</sup> 张静<sup>2</sup> 张斌贝<sup>1</sup> 夏雪梅<sup>1</sup> 唐雅廷<sup>1</sup> 曾星星<sup>1</sup>

长沙医学院 湖南长沙 410219;  
长沙市北雅中学 湖南长沙 410000

**【摘要】**目的: 探讨纸喷雾电离技术在中药材品质控制中的可行性, 以期能迅速找到山萸肉与酒萸肉的特征性化学成分, 为进一步规范山萸肉的炮制标准, 以及对山萸肉品质的评价奠定基础。方法 1. 对纸喷射电离技术的试验条件进行优化。2. 采用 PS-MS, 对炮制后的山茱萸的主要化学成分进行归属。3. 用 HPLC 对马钱苷和莫诺苷进行了准确的定量分析。结果: 1. 在+3.5 kV, 10℃直径范围内的三角形喷雾纸, 以 80% 甲醇作提取溶剂下, 样品的检测信号最强, 且检测信号十分稳定。2. 用质谱技术对不同产地的山茱萸的化学成分进行分析, 得到 7 种山茱萸的药效物质。3. 应用 HPLC 色谱技术, 对 26 批次的山茱萸进行了精确的定量分析, 并从中找出了一批不合格的山茱萸。结论: 1. 纸喷雾电离技术可用于中药的超速质控, 并可迅速鉴定出山茱萸、酒萸萸的特征组分。2. 用 HPLC 色谱法精确定量分析马钱苷、莫诺苷, 发现批号为 FM160413, 其含量未达到药典要求, 可有效地控制主要成分含量, 对山茱萸的栽培有一定的指导作用。

**【关键词】** 山茱萸、质量控制、PS-MS、HPLC

## 1. 仪器与试剂

质谱仪 ZQ2000 (waters); Thermo Finnigan-LCQ 离子阱质谱; LCQ-tune 工作站 (菲尼根, 美国); 三级电喷雾纸 (沃特曼公司); Prominence Plus 系列高效液相色谱仪 (SHIMADZU 岛津中国); 粉碎机 (FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司); 超声波清洗器 (KQ-3200DB 超声波清洗器 广州市予华仪器有限公司); 玻璃仪器气流烘于器 (邦西仪器科技 (上海) 有限公司); 电子天平 (EX125ZH 奥豪仪器 (常州) 有限责任公司); 低压溶剂过滤器 (AP-01P); 砂芯过滤装置 (2000ml 津腾); 马钱苷标准品 (Lot: BL 210342 诶法生物); 莫诺苷标准品 (Lot: AFBG1851 诶法生物); 乙腈 (色谱纯, 天津大茂化学试剂厂); 甲醇 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲酸 (分析纯, 天津化学有限公司); 山茱萸生品及山茱萸酒蒸品 (由市场上购买 26 批);

表 1-1 市场上购买的不同批次的山茱萸来源, 批号, 产地及规格

Table 1-1 Source, batch number, origin, and specifications of different batches of dogwood purchased in the market

序号	来源	批号	产地	规格
S1	九芝堂股份有限公司	160502	湖南	生品
S2	九芝堂股份有限公司	151119	湖南	生品
S3	九芝堂股份有限公司	160401	湖南	生品
S4	九芝堂股份有限公司	160603	湖南	生品
S5	九芝堂股份有限公司	160804	湖南	生品
S6	九芝堂股份有限公司	160502	湖南	酒制
S7	九芝堂股份有限公司	151119	湖南	酒制
S8	九芝堂股份有限公司	160401	湖南	酒制
S9	九芝堂股份有限公司	160603	湖南	酒制
S10	九芝堂股份有限公司	160804	湖南	酒制

表 1-2 市场上购买的不同批次的山茱萸来源, 批号, 产地及规格

Table 1-2 Source, batch number, origin, and specifications of different batches of dogwood purchased in the market

序号	来源	批号	产地	规格
S11	湖南自然堂中药饮片	20151101	湖南	酒制
S12	河北顺金隆药业	2015030102	河北	生品
S13	湖南振兴中药饮片	15071929	湖南	生品
S14	亳州市宏宇中药饮片	150828	亳州	生品
S15	湖南君昊中药饮片	150101	湖南	生品
S16	湖南千金药材	20150701	湖南	制品

S17	湖南振兴中药饮片	15120803	湖南	制品
S18	湖南养天和大药房	15120803	浙江	制品
S19	老百姓大药房	150716	山东	制品
S20	六谷大药房	150501	浙江	制品
S21	九芝堂大药房	141101	河南	制品
S22	千金大药房	20160201	河南	制品
S23	九芝堂制药	FM160414	湖南	生品
S24	九芝堂制药	FM160414	湖南	制品
S25	九芝堂制药	FM160413	湖南	制品
S26	九芝堂制药	FM160413	河北	生品

## 2. 方法

### 2.1 溶液配置

#### 2.1.1 实验条件

PS-MS 的试验条件: 正离子方式、喷射电压+3.5 kV、250℃的毛细管温度、锥形电压 60 V。样品进样量为 15  $\mu$  L, 质量控制范围为  $m/z=100\sim 1000$ , 萃取电压为 3V, 去溶剂温度为 20℃, 源温度为 105℃。

PS-MS 的进样方法是: 将静电喷射纸板夹住, 使其与质谱进样口相距 5-10 nm, 然后将 15 微升的溶液滴入三角喷射纸上, 用高压使其形成一个小的喷射液滴。

#### 2.1.2 标准溶液的配置

精密称取莫诺苷标准品白色粉末 28mg, 马钱苷标准品白色粉末 30 mg, 加 50 mL 80% 的甲醇水, 定容, 得到混合标准品溶液, 其中, 莫诺苷标准品浓度为 56  $\mu$  g/mL, 马钱苷标准品浓度为 60  $\mu$  g/mL, 将其置于-40℃冰箱中备用。

混合标准品溶液的配制: 配制不同浓度的莫诺苷与马钱苷混合标准品溶液, 莫诺苷的浓度分别为 5.6  $\mu$  g/mL, 11.2  $\mu$  g/mL, 28  $\mu$  g/mL, 56  $\mu$  g/mL, 112  $\mu$  g/mL; 马钱苷的浓度分别为 6  $\mu$  g/mL, 12  $\mu$  g/mL, 30  $\mu$  g/mL, 60  $\mu$  g/mL, 120  $\mu$  g/mL。2.1.3 供试品的配置

精密称取山茱萸药材粉末 (过三号筛) 约 0.5 g, 放置于具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 的甲醇溶液 25ml, 称定重量, 热回流提取 30 分钟, 放冷, 再次称定其重量, 用 80% 甲醇溶液补足减轻的重量, 摇匀, 过滤, 取滤液, 续滤液继续用 0.45  $\mu$  m 微孔滤膜过滤, 既得。

### 2.2 纸喷雾实验条件的优化

#### 2.2.1 喷雾溶剂的优化

在纸电离子质谱分析中, 喷雾溶剂的选择是一个重要的影响因素。该方法是待测物质在高压条件下电离, 形成静电喷射液滴, 然后送入质谱仪, 由于溶剂的极性不同, 其电离效率也不相同, 因此, 不同的喷雾

溶剂不仅会对电喷雾的洗脱效果产生重要影响，而且所获得的质谱响应信号也会有很大差别。

通常采用的是甲醇与水的混合物。本文以山茶萸对照品药材的提取液为模型化合物，研究了 80% 甲醇水、甲醇、氯仿、丙酮、环己烷、乙腈、乙醚、二氯甲烷八种溶剂对分析结果的影响，通过对比可以看出，当 80% 甲醇水作为提取溶剂时，目标物的离子峰度最高，为最好的提取溶剂。

### 2.2.2 喷雾电压的优化

在纸喷雾试验中，选用适当的电压是很重要的一个环节，它对纸张的毛细作用有很大的影响。随着电压的升高，被测物的毛细效应和雾化水滴的生成更加显著，质谱信号更强，更稳定，但电压不能太高，否则其他杂质的信号会增强。

在此基础上，本课题拟选取四种不同的电压，即+0.3, +3.5, +3.8, +4.0 kv，并对其进行优选。从图 2-1 中可以看出，在电压小于 3.0 kV 的情况下，质谱响应信号相对较弱，在电压大于 3.5 kV 的情况下，信号骤然减弱，出现放电现象，导致响应信号不稳定。而在+3.5 kV 的电压下，则是一个很强、很稳定的信号。所以喷射电压的选取是+3.5kV。

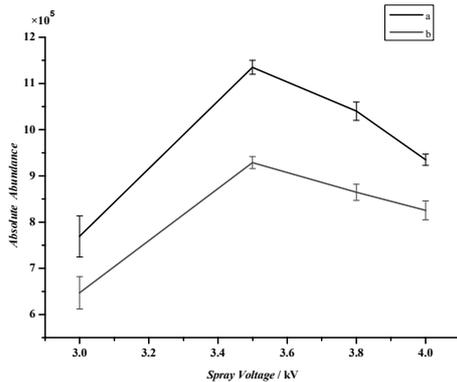


图 2-1 喷雾电压优化图

Figure 2-1 Optimization Diagram of spray Voltage

### 2.2.3 锥孔电压的考察

锥孔电压主要影响离子进入质谱的速度，本实验选择了 6 个不同的电压进行优化，实验结果如图 2-2 所示，在其它实验条件不变的情况下，在 10V-60V 时，随着锥孔电压的升高，质谱响应信号增强，当大于 60V 时，响应增加不明显，还稍有所下降，碎片离子会随着电压的增大而增多，导致杂质离子峰增加，因而选择 60V 为本实验锥孔电压。

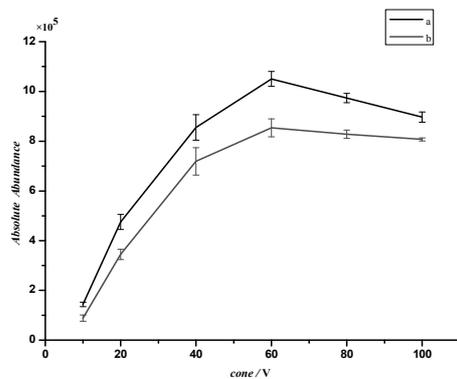


图 2-2 锥孔电压优化图

Figure 2-2 Cone hole voltage optimization diagram

### 2.2.4 三角形纸基的角度优化

喷头的夹角也是影响纸浆电离效果的重要因素之一。据文献报道，将喷雾器纸条切割为圆形时，没有反应，而将喷雾器纸条切割为三角形时，则能得到稳定的质谱信号。为此，我们在 10℃, 20℃, 30℃ 三个温度范围内分别进行了纸面喷雾试验，并以马钱苷，莫诺苷作为对照药物。实验表明，温度为 10℃ 时，三张三角纸的喷射效果较好，其喷射效果也较好。

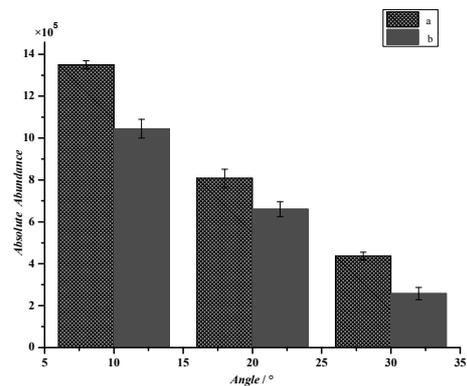
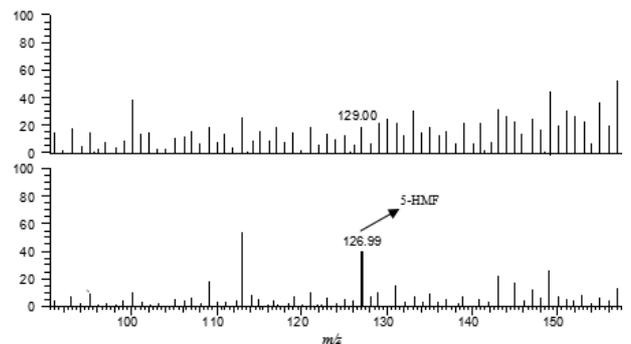


图 2-3 纸三角形角度的优化

Figure 2-3 Optimization of Paper Triangle Angle

### 2.3 PS-MS 对炮制山茶萸药材中部分化学成分的归属

利用纸喷射离子质谱法，分别在正负离子模式下，直接检测山茶萸与酒蒸品提取液，PS-MS 谱图如图 2-4，并对山茶萸化学成分进行了归属。结果表明：以负离子模型计算，其反应信号较弱，不能归因于其有效组分。在正离子模式下，对山茶萸中的 7 个活性化学成分进行了分类，其中  $m/z=266.10$  为脱水莫诺苷的分子离子峰， $m/z=342.12$  为没食子酸的分子离子峰， $m/z=429.05$  为马钱苷的分子离子峰， $m/z=445.04$  为莫诺苷的分子离子峰， $m/z=381.09$  为狼芽裂苷的分子离子峰， $m/z=607.10$  为山茶萸裂苷的分子离子峰， $m/z=126.99$  为 5-羟甲基糠醛的分子离子峰，其中 5-羟甲基糠醛是酒蒸品相对生品新增的化合物，可作为鉴别山萸肉和酒萸肉的依据之一。



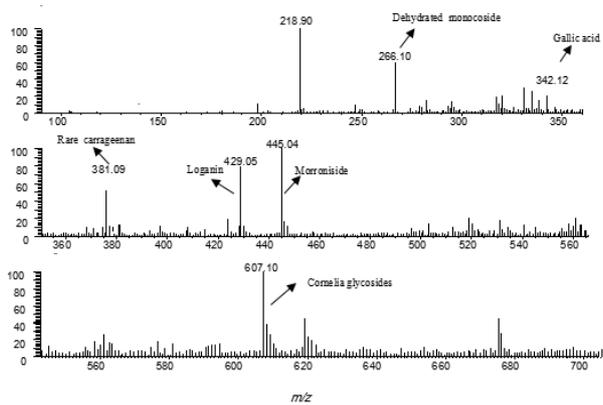


图 2-4 PS-MS 正离子模式下山茱萸酒蒸品图

Figure 2-4: Photos of *Cornus officinalis* wine steamed in PS-MS positive ion mode

#### 2.4 HPLC 对马钱苷和莫诺苷的准确定量

为确保检测结果的可靠与质量，我们参照 2020 年《中国药典》中的“干品中，马钱素、莫诺糖素的总量不能少于 1.2%”，同一样品中，马钱素、莫诺糖素的总量不能少于 0.7%”。

方法：用十八烷基硅作粘剂；在 0 至 20 分钟条件下，以乙腈作为流动性 A，0.3% 的磷酸水作为流动性 B；在 20-50 分钟时 A 为 20%，在 0-20 分钟时 B 为 93%；在 80% 流动相 B) 中，在 20-50 分钟内对其进行梯度洗脱；色谱柱温度 35℃，探测波长 240 nm。根据马钱苷峰的推算，理论塔板的数量应该在 10000 以上。

绘制标准曲线：根据 2.1.1 配制的马钱苷和莫诺苷的不同浓度的混合标准品，将标准品 1, 2, 5, 10, 20 ml 放入 10 ml 的容量瓶，以 80% 甲醇进行定容，过滤后进行 HPLC 分析，获得色谱峰，并记录马钱苷和莫诺苷峰面积，得出了莫诺苷的线性关系式： $Y=19289X-19089$ ,  $R^2=0.9995$ ；马钱苷线性方程为： $R^2=0.9998$ ,  $Y=19222X-19856$ 。

马钱苷、莫诺苷的含量测定：以标准物质为标准物质，以标准物质作为标准物质，制备相应的标准物质，并将其注入本装置，进行色谱分析。测定了两组样品中的马钱子甙和莫诺甙的峰面积。

表 2-1 26 个批次中山茱萸生品及酒蒸品的质量控制

Table 2-1 Quality Control of 26 Batches of Zhongshan *Cornus* Raw and Liquor Steamed Products

序号	总量 (%)	合格/不合格	序号	总量 (%)	合格/不合格
S1	1.58	是	S14	1.28	是
S2	1.24	是	S15	1.21	是
S3	1.60	是	S16	1.34	是
S4	1.25	是	S17	0.93	是
S5	1.74	是	S18	1.51	是
S6	1.30	是	S19	1.19	是
S7	1.22	是	S20	1.00	是
S8	0.95	是	S21	1.11	是
S9	1.85	是	S22	1.34	是
S10	1.30	是	S23	1.29	是
S11	1.05	是	S24	1.06	是
S12	1.13	是	S25	1.30	是
S13	0.99	否	S26	1.21	是

### 3. 结论

山茱萸是一种集药、食、用于一体的名贵药材。是山茱萸属植物山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 的干果和成熟果实。性温和，有酸涩的味道。具有补肝肾，收涩固脱的功效<sup>[1]</sup>。主治头晕耳鸣，腰膝酸软，阳痿遗精，遗尿频数，崩漏带下，虚汗乏力，内热消渴<sup>[2]</sup>。山茱萸中的化学成分主要有：环烯醚萜<sup>[3]</sup>，有机酸<sup>[4]</sup>，单宁<sup>[5]</sup>，黄酮<sup>[6]</sup>。其主要活性成分是莫诺苷和马钱素<sup>[7]</sup>。马钱苷、莫诺苷是山茱萸中最重要、最主要的药效物质，也是其品质评价指标的重点。马钱苷，又名马前子苷、马前素、番木鳖苷，是一类以糖苷形态为主的生物碱<sup>[8]</sup>。在分子式中，由于含有极性功能基团，如羟基、羧基等，在水、甲醇中容易溶解；莫诺苷是一类重要的中药成分，由于其良好的神经保护作用，其在临床上的应用越来越受到人们的重视<sup>[9]</sup>。另外，莫诺苷还具有明显的降糖作用，并能减轻糖尿病病所致的肾脏损害。可以有效的减少糖尿病导致的血管疾病的发生。莫诺苷可明显提高脑缺血后的神经保护作用<sup>[10]</sup>。

本实验通过优化 PS-MS 实验条件，确定了采用纸喷雾质谱的实验条件：80% 甲醇水为提取溶剂，以 +3.5kV 为喷雾电压，采用 10° 大小的三角形喷雾纸及 60V 的锥孔电压。并且用 PS-MS 归属了炮制山茱萸中的七个主要化学活性成分，分别为脱水莫诺苷、没食子酸、马钱苷、莫诺苷、狼芽裂苷、山茱萸裂苷及 5-羟甲基糠醛。这可以作为山茱萸品种的鉴别依据。新增的 5-HMF 和 7- $\alpha$ -乙氧基莫诺苷可以作为鉴别生茱萸肉和酒茱萸肉的依据。采用 HPLC 对 26 批山茱萸药材进行了准确定量，筛选出了批号为 FM160413 的含量不符合药典含量规定，这能对主成分的含量测定进行质量控制并且能够起到规范山茱萸种植的效果。

#### 参考文献：

- [1] 梁兆松, 姜明辉. 补益肝肾山茱萸[J]. 家庭医学, 2020 (08): 52-53.
- [2] 胡献国. 收敛固脱山茱萸[J]. 家庭医学, 2020 (10): 52.
- [3] 安淑静, 牛豆, 王婷, 等. 不同产地山茱萸总皂苷及总环烯醚萜苷的地理变异分析[J]. 中医药学报, 2021, 49 (09): 50-55.
- [4] 杨晖, 和素娜, 李杰, 等. HPLC 法测定山茱萸果核中 5 种有机酸的含量[J]. 河南科技大学学报 (医学版), 2015, 33 (03): 161-163.
- [5] 卢莹莹, 白璐, 刘晓谦, 等. 近十年来中药鞣质的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (24): 6353-6365.
- [6] 李杰, 马艳莉, 刘尚军, 等. 超声波辅助溶剂法提取山茱萸黄酮工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33 (12): 81-88.
- [7] 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.
- [8] 崔永霞, 王利丽, 孙孝亚, 等. 山茱萸环烯醚萜苷类成分的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (05): 2869-2874.
- [9] 范倩, 陈雪冰, 荣莉, 等. 山茱萸化学成分、生物活性、复方应用及质量控制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32 (07): 1244-1258.
- [10] 李子洁. 莫诺苷对 EphB4 基因敲除的 9 月龄小鼠脑缺血损伤后神经发生的影响[D]. 遵义医科大学, 2021.

项目基金：2023 年湖南省大学生创新创业项目，湘教通[2023]237 号——一般项目 (4015)

2022 年湖南省大学生创新创业项目，湘教通[2022]174 号——一般项目 (4609)

作者简介：谭鹏程 (2002-) 男，汉，湖南娄底人，长沙医学院本科生在读，主要研究方向：药物分析。

曾星星 (1989-) 女，汉，湖南长沙人，硕士研究生，长沙医学院药学院讲师，主要研究方向：中药成分分析及质量控制研究。