

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 23/22

G01N 21/25 G01N 21/33

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01104005. X

[43] 公开日 2002 年 9 月 18 日

[11] 公开号 CN 1369704A

[22] 申请日 2001.2.16 [21] 申请号 01104005. X

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 159 号

[72] 发明人 刘淑莹 宋凤瑞 刘志强

郭明全 陈貌连 崔 勣

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 刺五加叶的质量检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种长白山地道药材刺五加叶的质量检测方法。利用乙醇提取、浓缩、过滤、除脂等样品前处理手段将刺五加叶处理后,通过电喷雾质谱得到总黄酮、总皂甙的指纹图谱,根据其指纹图谱确定刺五加叶中所含的黄酮、皂甙的种类;利用紫外-可见分光光度计测定总黄酮,总皂甙的含量。综合其指纹图谱及含量测定数据,可以对刺五加叶的质量进行评价。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种刺五加叶的质量检测方法，其特征在于选择 60%-90%的乙醇作为溶媒，称取已粉碎的刺五加叶 60-100g 于 2000ml 烧瓶中，加 360ml-1000ml 60%-90%乙醇，通过超声提取 2-3 次，20-40min/次，或热浸 2-3 次，1-3h/次；合并两次提取液并浓缩至约 60-100ml，再用石油醚萃取近无色，将下层蒸干成固体物，精确称取 50mg 于 50ml 容量瓶中，加乙醇定容后即为黄酮含量测定用样品 a；水定容后饱和正丁醇萃取 4 次，分别合并 4 次萃取的正丁醇层，减压蒸干，残渣以甲醇溶解，移入 50ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，作为总皂甙含量测定的样品 b；

样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到：取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释后，作电喷雾质谱分析，电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 3.5-5.5kV，流动注入泵进样；扫描范围 m/z 50-2000，利用负离子电喷雾质谱确认黄酮的种类，利用正离子电喷雾质谱确认皂甙的种类；

总皂甙含量测定的方法如下：精密称取约 15mg 的齐墩果酸置于 10ml 容量瓶中，加甲醇定容；香兰素配成 8%乙醇溶液；硫酸配成 72% (V/V) 溶液；

用微量注射器精密移取齐墩果酸标准品溶液 $0\mu\text{l}$ - $100\mu\text{l}$ 及 $50\mu\text{l}$ 样品溶液 b 分别置于六个小试管中，挥干溶剂，分别加入 8%香

兰素乙醇溶液 0.5ml, 72%(V/V)硫酸 5ml, 摇匀后于 60° C 恒温水浴加热 10min, 然后置冰水浴中冷却 15min, 反应物作为待测溶液;

首先测定标准溶液在 530-545nm 波长下的可见光吸收, 作标准工作曲线, 然后根据标准曲线测得样品中总皂甙的含量;

总黄酮含量测定方法如下: 精密称量约 10mg 的芦丁, 置于 10ml 容量瓶中, 加乙醇定容, 用微量注射器精密移取芦丁标准品溶液 0 μ l-50 μ l 及 25 μ l 样品溶液 a 分别置于 25ml 容量瓶中, 分别加入 5%亚硝酸钠 1.0ml, 摇匀, 静止 5min, 再加入 4%氢氧化钠溶液 5ml, 加 70%乙醇至刻度, 放置 15min, 在 490-510nm 波长下首先测定标准溶液的吸收, 作标准工作曲线, 然后根据标准曲线测得样品中总黄酮的含量。

说明书

刺五加叶的质量检测方法

本发明属于刺五加叶的质量检测方法。

刺五加是五加属五加科植物，为长白山地区特产中药材之一，通常用其干燥的根及根茎入药，商品名为五加参。刺五加已有悠久的药用历史。其根及根茎、茎的质量标准已列入药典 1996 年版，近年来的研究表明，刺五加叶中含有丰富的具有广泛药理活性的黄酮和皂甙类化合物，可以进一步开发利用。并且将叶子作为药材，具有保护药用资源，环境友好的特点。由于刺五加叶的质量标准未列入药典，建立一种能够准确可靠的质量检测手段，对于刺五加叶的开发利用是十分重要的。

本发明的目的是提供一种刺五加叶的质量检测方法。利用刺五加叶粗提物的电喷雾质谱作为指纹图谱，利用紫外-可见分光光度法确定刺五加叶中总黄酮、总皂甙的含量，保证了质量检测标准的准确性和先进性。

本发明利用软电离质谱技术对刺五加叶的粗提物进行检测，根据得到的刺五加叶粗提物的电喷雾指纹图谱中黄酮及皂甙的个数及分布，对刺五加叶的质量进行初步评价。该指纹图谱可以清晰反映出由于产地、采收季节所带来的黄酮和皂甙种类的不同。本发明考

考虑到刺五加叶中所含皂甙的甙元以齐墩果酸为主，基于齐墩果酸与香兰素-浓硫酸能发生显色反应这一原理，以齐墩果酸作为标准品，通过测定总皂甙水解产物中齐墩果酸的含量来测定刺五加叶总皂甙含量。而总黄酮的含量测定采用芦丁作为标准品，硝酸铝与黄酮类化合物形成配合物的显色原理进行测定。

本发明选择 60%-90%的乙醇作为溶媒，称取已粉碎的刺五加叶 60-100g 于 2000ml 烧瓶中，加 360ml-1000ml 60%-90%乙醇，通过超声提取 2-3 次，20-40min/次，或热浸 2-3 次，1-3h/次；合并两次提取液并浓缩至约 60-100ml，再用石油醚萃取近无色，将下层蒸干成固体物，精确称取 50mg 于 50ml 容量瓶中，加乙醇定容后即为本发明总黄酮含量测定用样品 a，水定容后饱和正丁醇萃取 4 次，分别合并 4 次萃取的正丁醇层，减压蒸干，残渣以甲醇溶解，移入 50ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，作为总皂甙含量测定的样品 b。

样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到：取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 3.5-5.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z 50-2000。利用负离子电喷雾质谱确认黄酮的种类，在 m/z 50-700 范围内，存在 m/z 301, m/z 447, m/z 463, m/z 609 等离子；利用正离子电喷雾质谱确认皂甙的种类，在 m/z 900-1500 范围内，存在 m/z 1065, m/z 1081, m/z 1097, m/z 1108, m/z 1123, m/z 1211, m/z 1227, m/z 1243, m/z 1253, m/z 1269, m/z 1285 等离子。

总皂甙含量测定的方法如下：精密称取约 15mg 的齐墩果酸置于 10ml 容量瓶中，加甲醇定容；香兰素配成 8%乙醇溶液；硫酸配成 72% (V/V) 溶液。

用微量注射器精密移取齐墩果酸标准品溶液 $0\ \mu\text{l}$ - $100\ \mu\text{l}$ 及 $50\ \mu\text{l}$ 样品溶液 b 分别置于六个小试管中，挥干溶剂，分别加入 8%香兰素乙醇溶液 0.5ml，72%(V/V)硫酸 5ml，摇匀后于 60°C 恒温水浴加热 10min，然后置冰水浴中冷却 15min，反应物作为待测溶液。

首先测定标准溶液在 530-545nm 波长下的可见光吸收，作标准工作曲线，然后根据标准曲线测得样品中总皂甙的含量。

总黄酮含量测定方法如下：精密称量约 10mg 的芦丁，置于 10ml 容量瓶中，加乙醇定容，用微量注射器精密移取芦丁标准品溶液 $0\ \mu\text{l}$ - $50\ \mu\text{l}$ 及 $25\ \mu\text{l}$ 样品溶液 a 分别置于 25ml 容量瓶中，分别加入 5%亚硝酸钠 1.0ml，摇匀，静止 5min，再加入 4%氢氧化钠溶液 5ml，加 70%乙醇至刻度，放置 15min，在 490-510nm 波长下首先测定标准溶液的吸收，作标准工作曲线，然后根据标准曲线测得样品中总黄酮的含量。

本方法的样品前处理过程较为简单，提取效率较高。利用刺五加叶提取物的电喷雾质谱作为指纹图谱，通过黄酮、皂甙的种类可以清晰地看出不同产地、不同季节采收的刺五加叶的质量差异，再结合紫外-可见分光光度计对刺五加叶提取物中总黄酮、总皂甙的含量测定结果，可以对刺五加叶的质量进行评价。

本发明提供的实施例如下：

实施例 1

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 60g 于 2000ml 烧瓶中，加 360ml 60% 乙醇，超声提取三次，每次 20 分钟；合并两次提取液并浓缩至约 100ml，再用石油醚萃取近无色，将下层蒸干成固体物，精确称取 50mg 于 50ml 容量瓶中，加乙醇定容后即为黄酮含量测定用样品 a。水定容后饱和正丁醇萃取 4 次，分别合并 4 次萃取的正丁醇层，减压蒸干，残渣以甲醇溶解，移入 50ml 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，作为总皂甙含量测定的样品 b。

(2) 样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释至一定浓度后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 4.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z 50-2000。利用负离子电喷雾质谱确认黄酮的种类， m/z 50-700 范围内，存在 m/z 301, m/z 447, m/z 463, m/z 609 离子；利用正离子电喷雾质谱确认皂甙的种类，在 m/z 900-1500 范围内，存在 m/z 1065, m/z 1081, m/z 1097, m/z 1108, m/z 1123, m/z 1211, m/z 1227, m/z 1243, m/z 1253, m/z 1269, m/z 1285 等离子。

(3) 总皂甙含量测定的方法：

精密称取约 15mg 的齐墩果酸置于 10ml 容量瓶中，加甲醇定容；

香兰素配成 8%乙醇溶液; 硫酸配成 72% (V/V) 溶液。

用微量注射器精密移取齐墩果酸标准品溶液 $0\ \mu\text{l}$ - $100\ \mu\text{l}$ 及 $50\ \mu\text{l}$ 样品溶液 b 分别置于六个小试管中, 挥干溶剂, 分别加入 8%香兰素乙醇溶液 0.5ml, 72%(V/V)硫酸 5ml, 摇匀后于 60°C 恒温水浴加热 10min, 然后置冰水浴中冷却 15min, 反应物作为待测溶液。

首先测定标准溶液在 530nm 波长下的可见光吸收, 作标准工作曲线, 然后根据标准曲线测得样品中总皂甙的含量。

(4) 总黄酮含量测定:

精密称量约 10mg 的芦丁, 置于 10ml 容量瓶中, 加乙醇定容, 用微量注射器精密移取芦丁标准品溶液 $0\ \mu\text{l}$ - $50\ \mu\text{l}$ 及 $25\ \mu\text{l}$ 样品溶液 a 分别置于六个 25ml 容量瓶中, 分别加入 5%亚硝酸钠 1.0ml, 摇匀, 静止 5min, 再加入 4%氢氧化钠溶液 5ml, 加 70%乙醇至刻度, 放置 15min, 在 490nm 波长下首先测定标准溶液的吸收, 作标准工作曲线, 然后根据标准曲线测得样品中总黄酮的含量。

实施例 2

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 80g 于 2000mL 烧瓶中, 加 640ml 80%乙醇, 超声提取二次, 每次 30 分钟; 按照实施例 1 的样品制备步骤得到黄酮含量测定用样品 a 和作为总皂甙含量测定的样品 b。

(2) 样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a, 用甲醇稀释至一定浓度后, 作电喷雾质

谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 4.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z 50-2000。按照实施例 1 的步骤（2）确认黄酮和皂甙的种类。

（3）总皂甙含量测定的方法：

利用实施例 1 中总皂甙含量测定的方法在 537.5nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总皂甙的含量。

（4）总黄酮含量测定：

利用实施例 1 中总黄酮含量测定的方法在 510nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总黄酮的含量。

实施例 3：

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 100g 于 2000mL 烧瓶中，加 1000ml 90% 乙醇，超声提取二次，每次 40 分钟；按照实施例 1 的样品制备步骤得到黄酮含量测定用样品 a 和作为总皂甙含量测定的样品 b。

（2）样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释至一定浓度后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 5.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z 50-2000。按照实施例 1 的步骤（2）确认黄酮和皂甙的种类。

（3）总皂甙含量测定的方法：

利用实施例 1 中总皂甙含量测定的方法在 545nm 波长下对标准

溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总皂甙的含量。

(4) 总黄酮含量测定：

利用实施例 1 中总黄酮含量测定的方法在 500nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总黄酮的含量。

实施例 4：

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 60g 于 2000mL 烧瓶中，加 360ml 60% 乙醇，60°C 热浸提取三次，每次 2 小时；按照实施例 1 的样品制备步骤得到黄酮含量测定用样品 a 和作为总皂甙含量测定的样品 b。

(2) 样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释至一定浓度后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 4.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z50-2000。按照实施例 1 的步骤（2）确认黄酮和皂甙的种类。

(3) 总皂甙含量测定的方法：

利用实施例 1 中总皂甙含量测定的方法在 545nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总皂甙的含量。

(4) 总黄酮含量测定：

利用实施例 1 中总黄酮含量测定的方法在 510nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总黄酮的含量。

实施例 5：

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 80g 于 2000mL 烧瓶中，加 640ml 80% 乙醇，60°C 热浸提取三次，每次 1 小时；按照实施例 1 的样品制备步骤得到黄酮含量测定用样品 a 和作为总皂甙含量测定的样品 b。

(2) 样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释至一定浓度后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 3.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z50-2000。按照实施例 1 的步骤（2）确认黄酮和皂甙的种类。

(3) 总皂甙含量测定的方法：

利用实施例 1 中总皂甙含量测定的方法在 537.5nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总皂甙的含量。

(4) 总黄酮含量测定：

利用实施例 1 中总黄酮含量测定的方法在 500nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总黄酮的含量。

实施例 6：

(1).样品制备

称取已粉碎的刺五加叶 100g 于 2000mL 烧瓶中，加 1000ml 90% 乙醇，60°C 热浸提取二次，每次 3 小时；按照实施例 1 的样品制备步骤得到黄酮含量测定用样品 a 和作为总皂甙含量测定的样品 b。

(2) 样品的电喷雾指纹图谱

取少量的样品溶液 a，用甲醇稀释至一定浓度后，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾源，正、负离子电离方式，喷雾电压 5.5kV。流动注入泵进样。扫描范围 m/z 50-2000。按照实施例 1 的步骤（2）确认黄酮和皂甙的种类。

（3）总皂甙含量测定的方法：

利用实施例 1 中总皂甙含量测定的方法在 530nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总皂甙的含量。

（4）总黄酮含量测定：

利用实施例 1 中总黄酮含量测定的方法在 490nm 波长下对标准溶液和样品溶液进行测定，确定样品中总黄酮的含量。