

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710055978.8

[51] Int. Cl.
G01N 30/88 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月25日

[11] 公开号 CN 101373182A

[22] 申请日 2007.8.21

[21] 申请号 200710055978.8

[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 5625 号

[72] 发明人 刘淑莹 黄鑫 刘志强 宋凤瑞

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公
司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

一种中药北五味子的质量检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种中药北五味子的质量检测方法。利用粉碎、过筛、甲醇超声提取、定容、过滤处理手段将北五味子处理后，通过电喷雾质谱得到木脂素类成分及有机酸类成分的指纹图谱，根据其指纹图谱确定北五味子中所含的木脂素及有机酸的种类；利用高效液相色谱法测定木脂素类化合物的含量。综合其指纹图谱及含量测定数据，可以对北五味子的质量进行评价。该质量检测方法准确、快捷、方便、有效。

1、一种中药北五味子的质量检测方法，其特征在于：

(1) 供试样品溶液制备

本发明选择 50%-100%(V/V)的甲醇作为溶媒，将中药北五味子粉碎，过 40-60 目筛，称取已粉碎的北五味子 50-200 mg 于 50 ml 锥形瓶中，加 50%-100%(V/V)的甲醇 5-20 ml，通过超声提取 1-3 次，20-40 min/次，超声提取温度 20-60 °C；合并上述提取液并浓缩至 1-2 ml，甲醇定容至 10 ml 容量瓶中，摇匀，得到供试样品溶液；

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

供试样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到：取 5-10 μl 的供试样品溶液，用甲醇稀释至 100-500 μl ，作电喷雾质谱分析；

电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾电离源，正、负离子电离方式，喷雾电压 3.5-5.5 kV，毛细管温度 120-180 °C，流动注入泵进样流速 2-8 $\mu\text{l}/\text{min}$ ；扫描范围质荷比(m/z)50-2000，利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类，在 m/z 200-1000 范围内，存在 m/z 385，m/z 389，m/z 391，m/z 401，m/z 403，m/z 417，m/z 433，m/z 501，m/z 515，m/z 521，m/z 537，m/z 553 离子；利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类，在 m/z 50-500 范围内，存在 m/z 133，m/z 191，m/z 353 离子；

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 20-35 °C；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 50:50-100:0，洗脱时间 30-60 min；紫外检测器检测波长：190-400 nm；样品进样量 5-20 μl ；

木脂素含量测定方法如下：分别精密称量 2 mg 的标准对照品：五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素，加甲醇溶解，分别用甲醇定容至 2 ml 容量瓶中，配成标准对照品溶液；

高效液相色谱测定，各标准对照品分别以 2、4、6、8、10 μl 进样，测得各标准对照品的高效液相色谱峰面积；以所得各标准对照品峰面积为纵坐标，各对应标准对照品含量为横坐标绘制标准曲线，计算得线性回归方程；然后对供试样品溶液进行高效液相色谱测定，得到各标准对照品对应色谱峰的峰面积，根据标准曲线测得供试样品中各标准对照品的含量，经计算得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.2%-0.7%、五味子酯甲 0.1%-0.4%、五味子甲素 0.03%-0.2% 和五味子乙素 0.3%-0.9%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

一种中药北五味子的质量检测方法

技术领域

本发明属于中药技术领域，具体涉及中药北五味子的质量检测方法。

技术背景

中药五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实，习称“北五味子”。秋季果实成熟时采摘，晒干，除去果梗及杂质。因其果实五味具有故名。中药北五味子为敛肺止咳药，酸、甘、温，归肺、心、肾经。具有敛肺滋肾、生津敛汗、涩精止泻、宁心安神之功。临床主要用于久咳虚喘、津伤口渴、阴虚消渴、自汗、盗汗、遗精、滑精、久泻不止、心悸、失眠、多梦等，是我国中医应用最广泛的滋补中药之一。现代科学研究证明，中药北五味子中含有木脂素、有机酸、挥发油、维生素、三萜、倍半萜及多糖等多种化学成分。木脂素类化合物以联苯环辛二烯为母核，为中药北五味子中最主要的药效活性成分；有机酸类以柠檬酸和苹果酸为主，是北五味子发挥酸涩收敛作用的基础性成分。

现代研究证明，北五味子的药用价值高于其他种类的五味子（南五味子、红花五味子、绿叶五味子等），但因它们外形相似，并且在价格上，北五味子较其他种类的五味子高数倍。所以有厂家为降低成本用其他种类的五味子代替北五味子使用或将它们混用，特别是在中成药生产中易出现此类现象。因此为确保中药使用的安全有效，对中

药材进行准确可靠的质量检测显得十分必要。

发明内容

本发明的目的是提供一种中药北五味子的质量检测方法，该方法利用北五味子粗提物的电喷雾质谱作为指纹图谱，利用高效液相色谱法确定北五味子中木脂素类化合物的含量，保证了质量检测方法的准确性和质量检测标准的先进性。

本发明利用软电离质谱技术对北五味子的粗提物进行检测，根据得到的北五味子粗提物的电喷雾指纹图谱中木脂素及有机酸的个数及强度，对北五味子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、采收季节所带来的木脂素和有机酸种类的不同。本发明考虑到北五味子中最主要的药效活性成分是木脂素类化合物，并且以其中的五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素四种木脂素类化合物为主，因此本发明以这四种木脂素作为标准对照品，通过高效液相色谱测定，得到各标准对照品的标准曲线及线性回归方程，然后对供试样品溶液进行高效液相色谱测定，得到各标准对照品对应色谱峰的峰面积，根据标准曲线测得供试样品中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素的含量，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

实施本发明的技术方案如下：

(1) 供试样品溶液制备

本发明选择 50%-100%(V/V)的甲醇作为溶媒，将中药北五味子粉碎，过 40-60 目筛，称取已粉碎的北五味子 50-200 mg 于 50 ml 锥形

瓶中,加 50%-100%(V/V)的甲醇 5-20 ml,通过超声提取 1-3 次,20-40 min/次,超声提取温度 20-60 °C;合并上述提取液并浓缩至 1-2 ml,甲醇定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀,得到供试样品溶液;

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

供试样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到:取 5-10 μl 的供试样品溶液,用甲醇稀释至 100-500 μl ,作电喷雾质谱分析;

电喷雾质谱实验条件如下:电喷雾电离源,正、负离子电离方式,喷雾电压 3.5-5.5 kV,毛细管温度 120-180 °C,流动注入泵进样流速 2-8 $\mu\text{l}/\text{min}$;扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000,利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类,在 m/z 200-1000 范围内,存在 m/z 385, m/z 389, m/z 391, m/z 401, m/z 403, m/z 417, m/z 433, m/z 501, m/z 515, m/z 521, m/z 537, m/z 553 离子;利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类,在 m/z 50-500 范围内,存在 m/z 133, m/z 191, m/z 353 离子;

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下: C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);柱温 20-35 °C;流动相:甲醇和水,甲醇与水体积比 50:50-100:0,洗脱时间 30-60 min;紫外检测器检测波长:190-400 nm;样品进样量 5-20 μl ;

木脂素含量测定方法如下:分别精密称量 2 mg 的标准对照品:五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素,加甲醇溶解,分别用甲醇定容至 2 ml 容量瓶中,配成标准对照品溶液;

高效液相色谱测定，各标准对照品分别以 2、4、6、8、10 μl 进样，测得各标准对照品的高效液相色谱峰面积；以所得各标准对照品峰面积为纵坐标，各对应标准对照品含量为横坐标绘制标准曲线，计算得线性回归方程；然后对供试样品溶液进行高效液相色谱测定，得到各标准对照品对应色谱峰的峰面积，根据标准曲线测得供试样品中各标准对照品的含量，经计算得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.2%-0.7%、五味子酯甲 0.1%-0.4%、五味子甲素 0.03%-0.2% 和五味子乙素 0.3%-0.9%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

本方法的样品前处理过程简单，提取效率高。利用中药北五味子提取物的电喷雾质谱作为指纹图谱，通过木脂素、有机酸的种类可以清晰地看出不同产地、不同季节采收的五味子的质量差异，再结合高效液相色谱对中药北五味子提取物中木脂素类化合物的含量测定结果，可以对中药北五味子的质量进行评价。

具体实施方式

实施例 1:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎，过 40 目筛，称取已粉碎的北五味子 50 mg 于 50 ml 锥形瓶中，加 50%(V/V)的甲醇 5 ml，通过超声提取 1 次，20 min/次，超声提取温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ；合并上述提取液并浓缩至约 1 ml，甲醇定容至 10 ml 容量瓶中，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 5 μl 的供试样品溶液，用甲醇稀释至 100 μl ，作电喷雾质谱分

析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾电离源，正、负离子电离方式，喷雾电压 3.5 kV，毛细管温度 120 °C，流动注入泵进样流速 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ ；扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类，在 m/z 200-1000 范围内，存在 m/z 385， m/z 389， m/z 391， m/z 401， m/z 403， m/z 417， m/z 433， m/z 501， m/z 515， m/z 521， m/z 537， m/z 553 离子；利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类，在 m/z 50-500 范围内，存在 m/z 133， m/z 191， m/z 353 离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 20 °C；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 50:50，等度洗脱时间 30 min；紫外检测器检测波长：190 nm；样品进样量 5 μl 。

木脂素含量测定方法如下：分别精密称量约 2 mg 的标准对照品（五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素），加甲醇溶解，分别用甲醇定容至 2 ml 容量瓶中，配成标准对照品溶液。高效液相色谱测定，各标准对照品分别以 2、4、6、8、10 μl 进样，测得各标准对照品的高效液相色谱峰面积。以所得各标准对照品峰面积为纵坐标，各对应标准对照品含量为横坐标绘制标准曲线，计算得线性回归方程。然后对供试样品溶液进行高效液相色谱测定，得到各标准对照品对应色谱峰的峰面积，根据标准曲线测得供试样品中各标准对照品的含量，经计算得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.2%-0.4%、五味子酯甲 0.1%-0.2%、五味子甲素 0.03%-0.09%和五味子乙素 0.3%-0.5%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

实施例 2:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎,过 60 目筛,称取已粉碎的北五味子 200 mg 于 50 ml 锥形瓶中,加 100%的甲醇 20 ml,通过超声提取 3 次,40 min/次,超声提取温度 60 °C;合并上述提取液并浓缩至约 2 ml,甲醇定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀,即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 5 μ l 的供试样品溶液,用甲醇稀释至 500 μ l,作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下:电喷雾电离源,正、负离子电离方式,喷雾电压 5.5 kV,毛细管温度 180 °C,流动注入泵进样流速 8 μ l/min;扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类,在 m/z 200-1000 范围内,存在 m/z 385, m/z 389, m/z 391, m/z 401, m/z 403, m/z 417, m/z 433, m/z 501, m/z 515, m/z 521, m/z 537, m/z 553 等离子;利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类,在 m/z 50-500 范围内,存在 m/z 133, m/z 191, m/z 353 等离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下: C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 35 °C; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 100:0, 等度洗脱时间 60 min; 紫外检测器检测波长: 400 nm; 样品进样量 20 μ l。

木脂素含量测定方法同实施例 1, 得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.3%-0.5%、五味子酯甲 0.1%-0.3%、五味子甲素 0.04%-0.1%和五味子乙素 0.4%-0.7%, 完成一种中药北五味子的质量

检测方法。

实施例 3:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎,过 50 目筛,称取已粉碎的北五味子 150 mg 于 50 ml 锥形瓶中,加 75%(V/V)的甲醇 15 ml,通过超声提取 2 次,30 min/次,超声提取温度 40 °C;合并上述提取液并浓缩至约 1.5 ml,甲醇定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀,即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 10 μ l 的供试样品溶液,用甲醇稀释至 100 μ l,作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下:电喷雾电离源,正、负离子电离方式,喷雾电压 4.5 kV,毛细管温度 150 °C,流动注入泵进样流速 6 μ l/min;扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类,在 m/z 200-1000 范围内,存在 m/z 385, m/z 389, m/z 391, m/z 401, m/z 403, m/z 417, m/z 433, m/z 501, m/z 515, m/z 521, m/z 537, m/z 553 等离子;利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类,在 m/z 50-500 范围内,存在 m/z 133, m/z 191, m/z 353 等离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下: C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 °C; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 50:50-100:0, 梯度洗脱时间 45 min; 紫外检测器检测波长: 300 nm; 样品进样量 15 μ l。

木脂素含量测定方法同实施例 1，得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.4%-0.6%、五味子酯甲 0.2%-0.4%、五味子甲素 0.05%-0.15%和五味子乙素 0.4%-0.8%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

实施例 4:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎，过 40 目筛，称取已粉碎的北五味子 125 mg 于 50 ml 锥形瓶中，加 100%的甲醇 10 ml，通过超声提取 2 次，30 min/次，超声提取温度 25 ℃；合并上述提取液并浓缩至约 1 ml，甲醇定容至 10 ml 容量瓶中，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 8 μ l 的供试样品溶液，用甲醇稀释至 200 μ l，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾电离源，正、负离子电离方式，喷雾电压 4.0 kV，毛细管温度 140 ℃，流动注入泵进样流速 5 μ l/min；扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类，在 m/z 200-1000 范围内，存在 m/z 385， m/z 389， m/z 391， m/z 401， m/z 403， m/z 417， m/z 433， m/z 501， m/z 515， m/z 521， m/z 537， m/z 553 等离子；利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类，在 m/z 50-500 范围内，存在 m/z 133， m/z 191， m/z 353 等离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)；柱温 35 ℃；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 75:25-100:0，

梯度洗脱 60 min；紫外检测器检测波长：260 nm；样品进样量 10 μ l。

木脂素含量测定方法同实施例 1，得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.5%-0.7%、五味子酯甲 0.3%-0.4%、五味子甲素 0.06%-0.2%和五味子乙素 0.4%-0.9%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

实施例 5:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎，过 50 目筛，称取已粉碎的北五味子 100 mg 于 50 ml 锥形瓶中，加 50%(V/V)的甲醇 20 ml，通过超声提取 3 次，20 min/次，超声提取温度 50 $^{\circ}$ C；合并上述提取液并浓缩至约 2 ml，甲醇定容至 10 ml 容量瓶中，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 10 μ l 的供试样品溶液，用甲醇稀释至 500 μ l，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾电离源，正、负离子电离方式，喷雾电压 5.0 kV，毛细管温度 160 $^{\circ}$ C，流动注入泵进样流速 4 μ l/min；扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类，在 m/z 200-1000 范围内，存在 m/z 385，m/z 389，m/z 391，m/z 401，m/z 403，m/z 417，m/z 433，m/z 501，m/z 515，m/z 521，m/z 537，m/z 553 等离子；利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类，在 m/z 50-500 范围内，存在 m/z 133，m/z 191，m/z 353 等离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 50:50-75:25, 梯度洗脱 50 min; 紫外检测器检测波长：350 nm; 样品进样量 10 μl。

木脂素含量测定方法同实施例 1，得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.2%-0.6%、五味子酯甲 0.15%-0.25%、五味子甲素 0.03%-0.1%和五味子乙素 0.3%-0.5%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。

实施例 6:

(1) 供试样品溶液制备

将中药北五味子粉碎，过 60 目筛，称取已粉碎的北五味子 175 mg 于 50 ml 锥形瓶中，加 100%的甲醇 15 ml，通过超声提取 3 次，40 min/次，超声提取温度 30 °C；合并上述提取液并浓缩至约 1.5 ml，甲醇定容至 10 ml 容量瓶中，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取 7 μl 的供试样品溶液，用甲醇稀释至 300 μl，作电喷雾质谱分析。电喷雾质谱实验条件如下：电喷雾电离源，正、负离子电离方式，喷雾电压 4.0 kV，毛细管温度 160 °C，流动注入泵进样流速 7 μl/min; 扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000。利用正离子电喷雾质谱确认木脂素的种类，在 m/z 200-1000 范围内，存在 m/z 385, m/z 389, m/z 391, m/z 401, m/z 403, m/z 417, m/z 433, m/z 501, m/z 515, m/z 521, m/z 537, m/z 553 等离子; 利用负离子电喷雾质谱确认有机酸的种类，在 m/z 50-500 范围内，存在 m/z 133, m/z 191, m/z 353 等离子。

(3) 木脂素含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 ℃；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 75:25，等度洗脱时间 45 min；紫外检测器检测波长：280 nm；样品进样量 20 μl。

木脂素含量测定方法同实施例 1，得到各标准对照品的质量百分含量为五味子醇甲 0.3%-0.6%、五味子酯甲 0.1%-0.35%、五味子甲素 0.04%-0.15%和五味子乙素 0.4%-0.8%，完成一种中药北五味子的质量检测方法。