

[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 200910066875.0

[51] Int. Cl.
A61K 36/515 (2006.01)
G01N 27/68 (2006.01)
G01N 30/36 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101530463A

[22] 申请日 2009.4.27

[21] 申请号 200910066875.0

[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 宋凤瑞 齐静静 邢俊鹏 刘志强
刘淑莹

[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 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

一种中药龙胆的质量检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种中药龙胆的质量检测方法。利用粉碎、过筛、甲醇超声提取、定容、过滤的样品前处理手段将龙胆处理后，通过电喷雾质谱得到裂环烯醚萜苷类成分的指纹图谱，根据其指纹图谱确定龙胆所含的裂环烯醚萜苷类成分的种类；利用高效液相色谱法测定裂环烯醚萜苷类化合物的含量。综合其指纹图谱及含量测定数据，可以对龙胆的质量进行评价。该质量检测方法准确、快捷、方便、有效。

1. 一种中药龙胆的质量检测方法, 其特正在于, 步骤和条件如下:
将中药龙胆粉碎过 60-80 目筛, 称取已粉碎的龙胆 50-200 mg 置 50 ml 锥形瓶中, 以体积百分比浓度为 50%-100%的甲醇作为溶媒, 加入甲醇 5-20 ml, 超声提取 1-3 次, 20-40 min/次, 超声提取温度 20-50℃, 过滤, 合并上述提取液并浓缩至 1-2 ml, 甲醇定容至 10 ml, 摇匀, 即为供试样品溶液;

样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到: 取 50-100 μ L 供试样品溶液, 用甲醇稀释 10 倍后, 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, 喷雾电压 3.5-5.5 kV, 毛细管温度 180-220℃, 流动注入泵进样流速 2-8 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裂环烯醚萜苷的种类, 正离子条件下, 在 m/z 100-1000 范围内, 存在 m/z 379, m/z 381, m/z 395, m/z 735, m/z 805, m/z 821 离子;

高效液相色谱技术条件如下: C18 色谱柱条件为 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 柱温 20-35℃; 流动相为甲醇和水, 甲醇与水体积比 80:20-30:70, 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 μ l;

裂环烯醚萜苷含量测定方法如下: 分别精密称量 1 mg 的标准对照品为龙胆苦苷、当药苷和当药苦苷, 分别加甲醇溶解并定容至 2 ml 容量瓶中, 配成标准对照品溶液;

高效液相色谱测定条件如下: C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5

μm); 柱温 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 80:20, 等度洗脱时间 30 min; 紫外检测器检测波长: 190 nm; 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;

然后按照标准品的高效液相色谱实验条件对供试样品溶液进行测定, 样品进样量为 5 μl , 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龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷的含量。

一种中药龙胆的质量检测方法

技术领域

本发明属于中药技术领域，具体涉及中药龙胆的质量检测方法。

技术背景

中药龙胆是龙胆科植物条叶龙胆 (*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆 (*Gentiana scabra* Bge.)、三花龙胆 (*Gentiana triflora* Pall.) 或坚龙胆 (*Gentiana rigescens* Franch.) 的干燥根及根茎，前三种习称“龙胆”，后一种习称“坚龙胆”。其中条叶龙胆又称东北龙胆，龙胆又称为粗糙龙胆。龙胆性寒，味苦，归肝胆经，具清热燥湿，泻肝胆火之功效，属清热燥湿药。用于湿热黄疸，阴肿阴痒，带下，湿疹瘙痒，目赤耳聋，惊风抽搐等症。龙胆为常用中药，中医取其苦寒之性，泻肝胆实火，除下焦湿热。研究发现，龙胆的根及根茎含有环烯醚萜，裂环环烯醚萜及其苷类，生物碱，黄酮，甾体，香豆素，内酯，糖及其苷类，酚性成分，微量元素，鞣质，有机酸，挥发油等挥发成分。裂环环烯醚萜及其苷类为中药龙胆最主要的药效活性成分，以龙胆苦苷为主，是保肝利胆、健胃、抗炎等药理作用的基础性成分。在临床上，龙胆是龙胆泻肝汤、泻青丸、当归龙荟丸等方剂的主药，具泻肝胆实火、清下焦

湿热之功。近年来用于健胃、抗肿瘤。龙胆在国际上龙胆亦为天然药，被收载为苦味健胃剂。现在市场上中药龙胆品种众多，而各品种之间的化学成分及含量均有差异，若化学成分和含量不能达到质量要求，势必会影响临床应用的安全性以及有效性。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是十分必要。（参考文献：Yang Shaoyun (杨绍云), Wang Weiwei (王薇薇), Li Zhiping (李志平). *Chinese Traditional Herb Drugs*. (中草药), 1981, 12(6): 7.)

发明内容

本发明的目的是提供一种中药龙胆的质量检测方法。该方法利用龙胆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龙胆中裂环烯醚萜苷类化合物的含量，保证了质量检测方法的准确性和质量检测标准的先进性。

实施本发明的技术方案如下：

将中药龙胆粉碎过 60-80 目筛，称取已粉碎的龙胆 50-200 mg 置 50 ml 锥形瓶中，以体积百分比浓度为 50%-100%的甲醇作为溶媒，加入甲醇 5-20 ml，超声提取 1-3 次，20-40 min/次，超声提取温度 20-50℃，过滤，合并上述提取液并浓缩至 1-2 ml，甲醇定容至 10 ml，摇匀，即为供试样品溶液；

样品的电喷雾指纹图谱通过如下步骤得到：取 50-100 μ L 供试样品溶液，用甲醇稀释 10 倍后，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，喷雾电压 3.5-5.5 kV，毛细管温度 180-220℃，流动注入泵进样流速 2-8 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裂环烯醚萜苷的种类，正离子条件下，在

m/z 100-1000 范围内, 存在 m/z 379, m/z 381, m/z 395, m/z 735, m/z 805, m/z 821 离子;

高效液相色谱技术条件如下: C18 色谱柱条件为 150 mm×4.6 mm, 5 μm, 柱温 20-35 °C; 流动相为甲醇和水, 甲醇与水体积比 80:20-30:70, 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;

裂环烯醚萜苷含量测定方法如下: 分别精密称量 1 mg 的标准对照品为龙胆苦苷、当药苷和当药苦苷, 分别加甲醇溶解并定容至 2 ml 容量瓶中, 配成标准对照品溶液;

高效液相色谱测定条件如下: C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 20 °C; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 80:20, 等度洗脱时间 30 min; 紫外检测器检测波长: 190 nm。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;

然后按照标准品的高效液相色谱实验条件对供试样品溶液进行测定, 样品进样量为 5 μl, 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龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷的含量。

有益效果: 本发明利用软电离质谱技术对龙胆的粗提物进行检测, 根据得到的龙胆粗提物的电喷雾指纹图谱中裂环烯醚萜苷的个数及强度, 对龙胆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、采收季节所带来的裂环烯醚萜苷种类的不同。本发明考虑到

龙胆中最主要的药效活性成分是裂环烯醚萜苷类化合物,并且以其中的龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷三种裂环烯醚萜苷类化合物为主,因此本发明以这三种裂环烯醚萜苷作为标准对照品,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龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷的含量。

本发明给出的方法的样品前处理过程简单,提取效率高。利用中药龙胆提取物的电喷雾质谱作为指纹图谱,通过裂环烯醚萜苷种类可以清晰地看出不同产地、不同季节采收的龙胆质量差异,再结合高效液相色谱对中药龙胆提取物中木脂素类化合物的含量测定结果,可以对中药龙胆的质量进行评价。

具体实施方式

实施例 1:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎,过 60 目筛,称取已粉碎的龙胆 50 mg 置 50 ml 锥形瓶中,加入体积百分比浓度为 50%的甲醇 5 ml,超声提取 1 次,20 min/次,超声提取温度 20℃。过滤,合并上述提取液并浓缩至 1 ml,甲醇定容至 10 ml,摇匀,即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液,用甲醇稀释 10 倍后,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,喷雾电压 3.5 kV,毛细管温

度 180℃，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裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下，在 m/z 100-1000 范围内，存在 m/z 379， m/z 381， m/z 395， m/z 735， m/z 805， m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 20 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 80:20，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 。

裂环烯醚萜苷含量测定方法如下：分别精密称量 1 mg 的标准对照品龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷，分别置于 2 ml 容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，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。然后按照标准品的高效液相色谱实验条件对供试样品溶液进行测定，样品进样量为 5 μl ，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龙胆苦苷、当药苷、当药苦苷的含量。

实施例 2:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎，过 80 目筛，称取已粉碎的龙胆 200 mg 置 50 ml 锥形瓶中，加入体积百分比浓度为 100% 甲醇 20 ml，超声提取 3 次，40 min/次，超声提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 。过滤，合并上述提取液并浓缩

至 2 ml，甲醇定容至 10 ml，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液，用甲醇稀释 10 倍后，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，喷雾电压 5.5 kV，毛细管温度 220℃，流动注入泵进样流速 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裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下，在 m/z 100-1000 范围内，存在 m/z 379， m/z 381， m/z 395， m/z 735， m/z 805， m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 35℃；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 30:70，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 μl 。

裂环烯醚萜苷含量测定方法同实施例 1

实施例 3:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎，过 70 目筛，称取已粉碎的龙胆 150 mg 置 50 ml 锥形瓶中，加入体积百分比浓度为 75%甲醇 15 ml，超声提取 2 次，30 min/次，超声提取温度 35℃。过滤，合并上述提取液并浓缩至 1.5 ml，甲醇定容至 10 ml，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液，用甲醇稀释 10 倍后，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，喷雾电压 4.5 kV，毛细管温

度 200℃，流动注入泵进样流速 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ ；扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000，利用正离子电喷雾质谱确认裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下，在 m/z 100-1000 范围内，存在 m/z 379， m/z 381， m/z 395， m/z 735， m/z 805， m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 80:20-30:70，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 μl 。

裂环烯醚萜苷含量测定方法同实施例 1

实施例 4:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎，过 60 目筛，称取已粉碎的龙胆 125 mg 置 50 ml 锥形瓶中，加入体积百分比浓度为 100% 甲醇 10 ml，超声提取 2 次，30 min/次，超声提取温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。过滤，合并上述提取液并浓缩至 1 ml，甲醇定容至 10 ml，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液，用甲醇稀释 10 倍后，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，喷雾电压 4.0 kV，毛细管温度 190 $^{\circ}\text{C}$ ，流动注入泵进样流速 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ；扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000，利用正离子电喷雾质谱确认裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下，在 m/z 100-1000 范围内，存在 m/z 379， m/z 381， m/z 395，

m/z 735, m/z 805, m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 °C；流动相：甲醇和水，甲醇与水体积比 55:45-30:70，梯度洗脱时间 60 min；紫外检测器检测波长：260 nm；样品进样量 10 μl。

裂环烯醚萜苷含量测定方法同实施例 1

实施例 5:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎，过 70 目筛，称取已粉碎的龙胆 100 mg 置 50 ml 锥形瓶中，加入体积百分比浓度为 50%甲醇 20 ml，超声提取 3 次，20 min/次，超声提取温度 40 °C。过滤，合并上述提取液并浓缩至 2 ml，甲醇定容至 10 ml，摇匀，即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液，用甲醇稀释 10 倍后，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，喷雾电压 5.0 kV，毛细管温度 210 °C，流动注入泵进样流速 4 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裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下，在 m/z 100-1000 范围内，存在 m/z 379, m/z 381, m/z 395, m/z 735, m/z 805, m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下：C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5

μm); 柱温 25 °C; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 80:20-55:45, 梯度洗脱时间 50 min; 紫外检测器检测波长: 350 nm; 样品进样量 10 μl 。

裂环烯醚萜苷含量测定方法同实施例 1

实施例 6:

(1) 供试样品溶液制备

将中药龙胆粉碎, 过 80 目筛, 称取已粉碎的龙胆 175 mg 置 50 ml 锥形瓶中, 加入体积百分比浓度为 100% 甲醇 15 ml, 超声提取 3 次, 20 min/次, 超声提取温度 40 °C。过滤, 合并上述提取液并浓缩至 1.5 ml, 甲醇定容至 10 ml, 摇匀, 即为供试样品溶液。

(2) 供试样品的电喷雾指纹图谱

取供试样品溶液, 用甲醇稀释 10 倍后, 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, 喷雾电压 4.0 kV, 毛细管温度 160 °C, 流动注入泵进样流速 7 $\mu\text{l}/\text{min}$; 扫描范围质荷比 (m/z) 50-2000, 利用正离子电喷雾质谱确认裂环烯醚萜苷的种类。正离子条件下, 在 m/z 100-1000 范围内, 存在 m/z 379, m/z 381, m/z 395, m/z 735, m/z 805, m/z 821 离子。

(3) 裂环烯醚萜苷含量测定

高效液相色谱实验条件如下: C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 流动相: 甲醇和水, 甲醇与水体积比 55:45, 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 。

裂环烯醚萜苷含量测定方法同实施例 1。