



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103983711 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410215663.5

(22) 申请日 2014.05.21

(73) 专利权人 华侨大学

地址 362000 福建省泉州市丰泽区城东

(72) 发明人 刘青 刘珍伶

(74) 专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所

有限公司 35204

代理人 张松亭

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

(56) 对比文件

张锦文等. 高效液相色谱法测定金线莲中金线莲苷的含量. 《中国医院药学杂志》. 2011, 第31卷(第4期), 文章摘要、第1-2节.

Chang-Chai Ng 等. Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal Anoectochilus formosanus Hayata. 《Journal of Bioscience and Bioengineering》. 2010, 第111卷(第3

期), 289 - 293.

Jin-Bin Wu 等. The Hepatoprotective Activity of Kinsenoside from Anoectochilus formosanus. 《phytother res.》. 2007, 第21卷(第1期), 58-61.

审查员 王毅

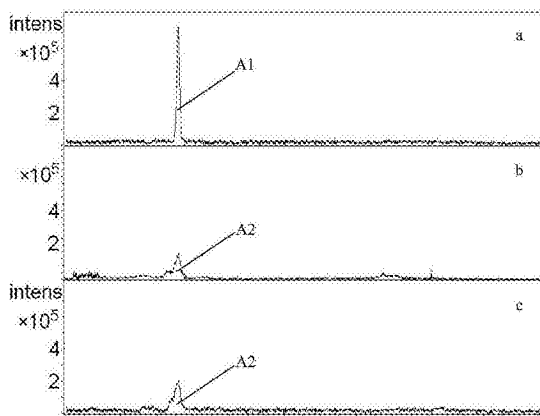
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种金线莲苷定量分析检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种金线莲苷定量分析检测方法, 本发明的方法运用 HPLC-ESI/MS 分析, 通过对比样品液和标准液的保留时间在 6.20 分钟、质量数为 265 的提取离子流色谱峰的积分面积, 计算得出待测样品中的金线莲苷的浓度, 该方法重复性好、准确率高。



1. 一种金线莲苷定量分析检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1)用金线莲苷纯品配制已知浓度的金线莲苷标准液;

(2)制备金线莲苷粗提物,将金线莲苷粗提物置于索氏提取器中,依次用石油醚、乙醚和氯仿分别进行回流提取2~3小时,残余物加水溶解过滤去除杂质,并经适当稀释,即得金线莲苷待测样品液,上述金线莲苷粗提物的制备方法为:以水、甲醇或乙醇萃取新鲜的金线莲植物或植物产品,再浓缩得到所述金线莲苷粗提物;

(3)将金线莲苷标准液进行HPLC-ESI/MS分析,再积分计算得到该标准液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即标准面积A1;

(4)将金线莲苷待测样品液进行同样条件的HPLC-ESI/MS分析,再积分计算得到该待测样品也保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即样品面积A2;

(5)将标准面积A1和样品面积A2进行比较,得出金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量,计算公式如下:金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量=金线莲苷标准液中金线莲苷的含量 $\times$ A2/A1;

(6)根据金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量计算得出待测的新鲜金线莲植物中的金线莲苷的含量。

2. 如权利要求1所述的一种金线莲苷定量分析检测方法,其特征在于:所述金线莲苷粗提物的制备方法为:以甲醇在40℃的温度下超声提取,再真空浓缩,即得所述金线莲苷粗提物。

3. 如权利要求1所述的一种金线莲苷定量分析检测方法,其特征在于:所述金线莲苷标准液和所述金线莲苷待测样品液均需经0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤。

4. 如权利要求1所述的一种金线莲苷定量分析检测方法,其特征在于:所述步骤(3)和步骤(4)中的HPLC-ESI/MS分析使用填料粒径小于等于5 $\mu$ m的ODS或BDS柱,柱温25℃,使用85%的甲醇做流动相,220nm紫外检测,ESI/MS分析使用离子源温度300℃,干燥气体流速为8L/min,雾化气体压力为25psi。

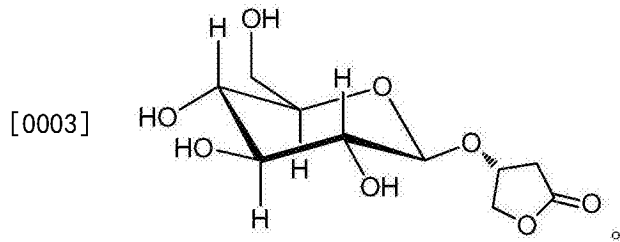
## 一种金线莲苷定量分析检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种金线莲苷定量分析检测方法。

### 背景技术

[0002] 金线莲苷(Kinsenoside)是兰科(Orchidaceae)开唇兰属植物金线莲 *Anoectochilus roxburghii*(Wall.)Lindl.中的高含量活性成分(J Nat Med,2008,62,132),其结构式如下:



[0004] 金线莲苷已被证明具有高水平的降血脂活性,降低甘油三酯水平、保肝、高血糖条件下的血管保护等作用(Biol.Pharm.Bull.,2001,24,65;Biol.Pharm.Bull.,2000,23,731;Fitoterapia,2013,86,163)。

[0005] 金线莲苷为亲水性强的化合物,复杂植物样品中的水溶性杂质与金线莲苷较难完全分离,现有的检测方法由于上述原因往往不能准确的对样品中的金线莲苷进行定性和定量分析。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术缺陷,提供一种金线莲苷定量分析检测方法。

[0007] 本发明的具体技术方案如下:

[0008] 一种金线莲苷定量分析检测方法,包括如下步骤:

[0009] (1)用金线莲苷纯品配制已知浓度的金线莲苷标准液;

[0010] (2)制备金线莲苷粗提物,将金线莲苷粗提物置于索氏提取器中,依次用石油醚、乙醚和氯仿分别进行回流提取2~3小时,残余物加水溶解过滤去除杂质,并经适当稀释,即得金线莲苷待测样品液;

[0011] (3)将金线莲苷标准液进行HPLC-ESI/MS分析,再积分计算得到该标准液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即标准面积A1;

[0012] (4)将金线莲苷待测样品液进行同样条件的HPLC-ESI/MS分析,再积分计算得到该待测样品也保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即样品面积A2;

[0013] (5)将标准面积A1和样品面积A2进行比较,得出金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量,计算公式如下:金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量=金线莲苷标准液中金线莲苷的含量×A2/A1;

[0014] (6)根据金线莲苷待测样品液中金线莲苷的含量计算得出待测的新鲜金线莲植物

中的金线莲苷的含量。

[0015] 在本发明的一个优选实施方案中,所述金线莲苷粗提物的制备方法为:以水、甲醇或乙醇萃取新鲜的金线莲植物或植物产品,再浓缩得到所述金线莲苷粗提物。

[0016] 进一步优选的,所述金线莲苷粗提物的制备方法为:以甲醇在40°C的温度下超声提取,再真空浓缩,即得所述金线莲苷粗提物。

[0017] 在本发明的一个优选实施方案中,所述金线莲苷标准液和所述金线莲苷待测样品液均需经0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤。

[0018] 在本发明的一个优选实施方案中,所述步骤(3)和步骤(4)中的HPLC-ESI/MS分析使用填料粒径小于等于5 $\mu$ m的ODS或BDS柱,柱温25°C,使用85%的甲醇做流动相,220nm紫外检测。ESI/MS分析使用离子源温度300°C,干燥气体流速为8L/min,雾化气体压力为25psi。

[0019] 本发明的有益效果是:本发明的方法运用HPLC-ESI/MS分析,通过对比样品液和标准液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,计算得出待测样品中的金线莲苷的浓度,该方法重复性好、准确率高。

## 附图说明

[0020] 图1为本发明的提取离子流色谱图,其中图1a中的A1为金线莲苷标准液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积;图1b中的A2为野生金线莲待测液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,;图1c中的A2为家生金线莲待测液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积。

## 具体实施方式

[0021] 以下通过具体实施方式结合附图对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

[0022] 下述实施例中A为出峰时间是6.20的化合物的提取离子流(质量数为265([M+1]<sup>+</sup>))色谱峰的峰面积,A1为金线莲苷标准液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即标准面积A1;A2为金线莲苷待测样品液的保留时间在6.20分钟、质量数为265的提取离子流色谱峰的积分面积,即样品面积A2。

[0023] 实施例1:

[0024] 新鲜野生金线莲植物晾干后称取15g粉碎,以甲醇40°超声提取三次,提取液真空浓缩得浸膏。浸膏置于索氏提取器中,分别用石油醚、乙醚和氯仿回流提取2小时,残余物加水100mL溶解后过滤,取滤液1mL加水定容至25mL。取1mL定容好的溶液过0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤后作为HPLC-ESI/MS的金线莲苷待测样品液。

[0025] 取金线莲苷的纯品配制浓度为10mg/mL的金线莲苷标准液。取1mL定容好的金线莲苷标准液过0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤后作为HPLC-ESI/MS的标准液。

[0026] 分析上述金线莲苷待测样品液和金线莲苷标准液中的金线莲苷浓度。HPLC分析柱为5 $\mu$ m的BDS柱,柱温25°C,流动相为85%的甲醇,220nm紫外检测。ESI/MS分析离子源温度300°C,干燥气体流速为8L/min,雾化气体压力为25psi。

[0027] 记录在HPLC-ESI/MS谱中的出峰时间是6.20的化合物的提取离子流(质量数为265([M+1]<sup>+</sup>))色谱峰的峰面积,其中A1如图1a所示,A2如图1b所示,用以下公式计算样品液中

的金线莲苷含量：

[0028] 金线莲苷待测样品液中的金线莲苷含量(mg/mL) = 10mg/mL × A2/A1

[0029] 植物样品中的金线莲苷含量(mg/g) = 金线莲苷待测样品液中的金线莲苷含量(mg/mL) × 2500mL/15g

[0030] 上述粗提物的前处理、样品液的配制、样品液和标样的含量测定过程重复三次，结果取平均值并计算平均偏差。

[0031] 回收实验：将5mg金线莲苷加入样品液，用同样的HPLC-ESI/MS条件测定金线莲苷含量。

[0032] 结果：表一列出了实验测定的金线莲苷中的金线莲苷的EIC谱出峰时间和峰面积。经计算得野生金线莲中的金线莲苷含量是每g植物样品中20mg。该方法的偏差是0.6。回收试验显示该方法准确率高。

[0033] 实施例2：

[0034] 新鲜家生金线莲植物晾干后称取15g粉碎，以与实施例1相同的步骤与方法处理并测量、计算得出结果，其中A1如图1a所示，A2如图1c所示，：

[0035] 金线莲苷待测样品液中的金线莲苷含量(mg/mL) = 10mg/mL × A2/A1

[0036] 植物样品中的金线莲苷含量(mg/g) = 金线莲苷待测样品液中的金线莲苷含量(mg/mL) × 2500mL/15g

[0037] 上述粗提物的前处理、样品液的配制、样品液和标样的含量测定过程重复三次，结果取平均值并计算平均偏差。

[0038] 结果：表二列出了实验测定的家生金线莲中的金线莲苷的EIC谱出峰时间和峰面积。经计算得家生金线莲中的金线莲苷含量是每g植物样品中22mg，略高于野生金线莲。该方法的偏差是0.89。回收试验显示该方法准确率高。

[0039] 表一 EIC 谱中金线莲苷的出峰时间、峰面积和金线莲苷含量

[0040]

	EIC 谱中的峰保留时间	EIC 谱中的峰的积分面积	含量 (mg/g)	平均偏差
金线莲苷标准液	6.194	4.3E+07	10	-
		4.12 E+07	10	
		4.41E+07	10	
野生金线莲金线莲苷	6.237	531468	20.6	0.60
		511836	20.7	
		511492	19.3	
实施例 1 的回收实验	6.202	669543	25.8	0.53
		657981	26.6	
		660505	25.0	

[0041] 表二EIC谱中金线莲苷的出峰时间、峰面积和金线莲苷含量

[0042]

	EIC 谱中的峰保留时间	EIC 谱中的峰的积分面积	含量 (mg/g)	平均偏差
金线莲苷标准液	<b>6.194</b>	<b>4.3E+07</b>	<b>10</b>	-
		<b>4.12 E+07</b>	<b>10</b>	
		<b>4.41E+07</b>	<b>10</b>	
家生金线莲金线莲苷	<b>6.253</b>	<b>568075</b>	<b>22.0</b>	<b>0.89</b>
		<b>579437</b>	<b>23.4</b>	
		<b>551298</b>	<b>20.8</b>	
实施例 2 的回收试验	<b>6.245</b>	<b>700654</b>	<b>27.2</b>	<b>0.40</b>
		<b>678641</b>	<b>27.4</b>	
		<b>699145</b>	<b>26.4</b>	

[0043] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,故不能依此限定本发明实施的范围,即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆应仍属本发明涵盖的范围内。

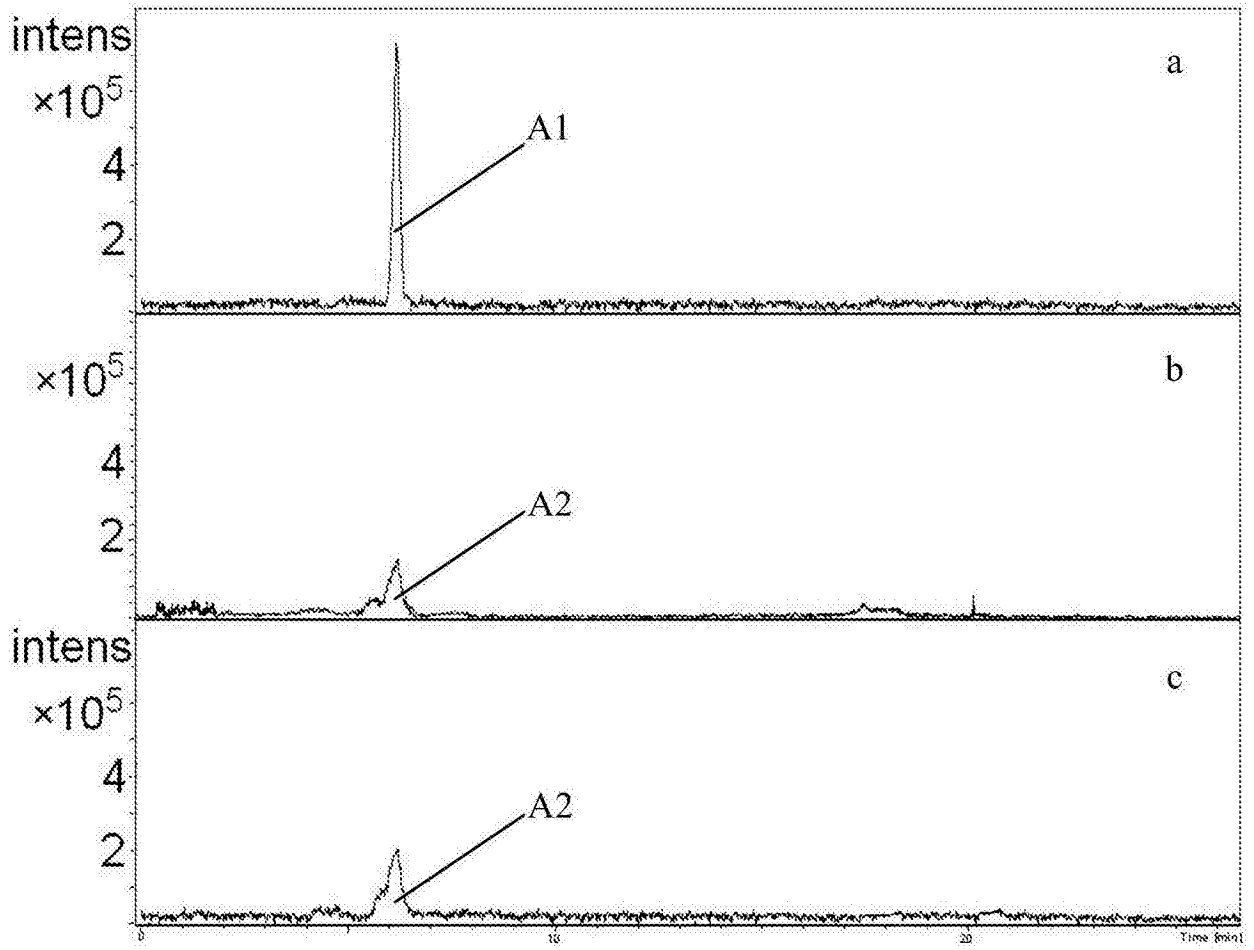


图1