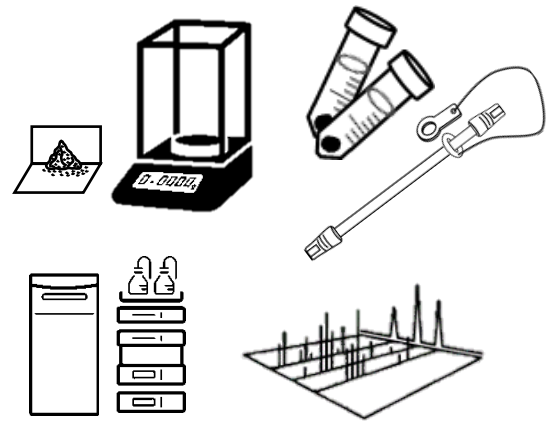




GCMTI RD-2: 2025

利用液相色谱串联质谱仪技术
检测中药复方颗粒中人参皂苷的含量

政府中药检测中心方法



-空白页-



利用液相色谱串联质谱仪技术 检测复方中药颗粒中人参皂苷的含量¹

安全预防措施：本文中涉及致癌化学品、腐蚀性化学品和可燃溶剂，处理有关化学品时请采取预防措施，如戴上护眼及护手用具，并在有需要时在抽气柜进行检测工作，以免吸入该等化学品气体。

1. 引言

- 1.1. 复方中药颗粒是香港其中一种中成药，并以不同处方销售。这些处方多数是根据古代中医药文献制定。一般而言，其生产过程是将一系列中药粉碎、煎煮、滤过和浓缩后，制成为水溶性粉末。
- 1.2. 本方法包含液相色谱串联质谱仪 (LC-MS/MS) 技术，可用于分析以人参为君、臣药或主要成分的十种处方。以下将详细列出处方列表。

项目	处方	古代中医药文献
1.	圣愈汤	医宗金鉴
2.	举元煎	景岳全书
3.	理中汤	伤寒论
4.	人参养荣汤	三因极一病证方论
5.	大建中汤	金匱要略
6.	六君子汤	医学正传
7.	附子理中汤	三因极一病证方论
8.	人参败毒散	太平惠民和剂局方
9.	麦门冬汤	金匱要略
10.	温经汤	金匱要略

- 1.3. 本方法已验证能以 LC-MS/MS 技术，对十种含人参的处方进行定性及定量的检测。四种分析物为人参皂苷Re (Re)、人参皂苷Rg1 (Rg1)、人参皂苷Rf (Rf) 和人参皂苷Rb1 (Rb1)。其验证的工作范围为溶液中的 1–50 µg/L，相当于原样本中的 50–2500 µg/g。



2. 试剂

注意： 除非另有说明，否则所有使用的试剂均属分析纯级别或同等级的试剂。

2.1. 超纯水，Milli Q。

2.2. 甲醇，LC-MS 级。

2.3. 乙醇，Absolute 级。

2.4. 乙腈，LC-MS 级。

2.5. 50 % 甲醇溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~500 mL 的甲醇和 ~500 mL 的超纯水。

2.6. 95 % 乙腈溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~950 mL 的乙腈和 ~50 mL 的超纯水。

2.7. 70 % 乙腈溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~700 mL 的乙腈和 ~300 mL 的超纯水。

2.8. Re, CAS. No.: 52286-59-6。

2.9. Rg1, CAS. No.: 22427-39-0。

2.10. Rf, CAS. No.: 52286-58-5。

2.11. Rb1, CAS. No.: 41753-43-9。

2.12. 标准溶液

2.12.1. 标准储备溶液 (~2000 µg/mL)

分别精密称取 ~20 mg 的人参皂苷 (Re、Rg1、Rf 和 Rb1) 于四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记，可配制成四瓶标准储备溶液。

2.12.2. 第一混合标准中间溶液 (~100 µg/mL)

从四瓶不同的标准储备溶液，转移 0.5 mL 至一个 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记，可配制成第一混合标准中间溶液。



2.12.3. 第二混合标准中间溶液 (~1 µg/mL)

把 0.1 mL 的第一混合标准中间溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记，可配制成第二混合标准中间溶液。

2.12.4. 第三混合标准中间溶液 (~100 µg/L)

把 2.5 mL 的第二混合标准中间溶液转移至 25 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成第三混合标准中间溶液。

2.13. 校准标准溶液

从第三混合标准中间溶液中，新鲜配制最少六瓶校准标准溶液。把适量的第三混合标准中间溶液分别转移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成一系列校准标准溶液。配制校准标准溶液所须的标准中间溶液建议分量表列如下：

校准标准溶液	第三混合标准中间溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	人参皂苷各自的最终浓度 (µg/L)
CS1	0.1	10.0	1
CS2	0.5	10.0	5
CS3	1.0	10.0	10
CS4	2.0	10.0	20
CS5	3.0	10.0	30
CS6	5.0	10.0	50

备注： 可使用其他合适浓度，或采用其他稀释顺序来达到所需的浓度。须在数据表中记录详细信息。

2.14. 初始校正验证标准溶液

2.14.1. 初始校正验证标准储备溶液 (~2000 µg/mL)

分别精密称取 ~20 mg 来源与校准标准品不同的人参皂苷 (Re、Rg1、Rf 和 Rb1) 于四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记，可配制成四瓶初始校正验证标准储备溶液。

2.14.2. 第一混合初始校正验证标准中间溶液 (~100 µg/mL)

从四瓶不同的初始校正验证标准储备溶液，转移 0.5 mL 至一个 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记，可配制成第一混合初始校正验证标准中间溶液。



2.14.3. 第二混合初始校正验证标准中间溶液 (~1 µg/mL)

把 0.1 mL 的第一混合初始校正验证标准中间溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记，可配制成第二混合初始校正验证标准中间溶液。

2.14.4. 第三混合初始校正验证标准中间溶液 (~100 µg/L)

把 1.0 mL 的第二混合初始校正验证标准中间溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成第三混合初始校正验证标准中间溶液。

2.14.5. 初始校正验证标准工作溶液 (~10 或 20 µg/L)

把 1.0 或 2.0 mL 的第三混合初始校正验证标准中间溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成初始校正验证标准工作溶液。

2.15. 校准检查标准品

校准检查标准品应为校准标准溶液中的 CS3 或 CS4，即 ~10 或 20 µg/L。

2.16. 方法空白

方法空白应依照第 4.1.3 段至第 4.3 段进行完整的样本制备步骤，并应含有与样本溶液等量的试剂。

3. 器具

注意： 所有玻璃量器使用后均须尽快以丙酮及清洁剂清洗。用清洁剂清洗后，玻璃量器随即以水冲洗，之后再以丙酮冲洗两次。

3.1. 研磨机或搅拌机。

3.2. 10 和 25 mL 的容量瓶。

3.3. 1 L 的量筒。

3.4. 分析天秤，感量为 0.01 mg。

3.5. 300, 1000 µL 和 10 mL 的自动移液器。



- 3.6. 15 mL 的聚丙烯离心管并配备扭盖。
- 3.7. 超声波清洗器。
- 3.8. 漩涡振荡器。
- 3.9. 离心机，能达到至少 4000 rpm 的转速。
- 3.10. 冷冻柜，可在 $\sim 20^{\circ}\text{C}$ 温度下运作。
- 3.11. 玻璃试管。
- 3.12. 离心式蒸发器或同等类型的系统。
- 3.13. NH_2 固相萃取柱，55- 至 105- μm ，6-mL，含 500 mg 的吸附物料或同等类型的消耗品。
- 3.14. 0.20 μm 的聚四氟乙烯过滤薄膜或同等类型的消耗品。
- 3.15. 液相色谱玻璃样本瓶。
- 3.16. 超高效液相色谱柱，InertSustain C_{18} 色谱柱 (2.1 \times 250 mm, 5 μm) 或同等类型的色谱柱。
- 3.17. 液相色谱串联质谱仪，Dionex Ultimate 3000 UPLC 配备 QTRAP 6500+ 系统或同等类型的系统。

4. 步骤

4.1. 配制样本

- 4.1.1. 如果需要，在进行分析前，使用研磨机或搅拌机把固体的样本进行研磨及均质化处理。
- 4.1.2. 精密称取 ~ 0.5 g 的样本放进 15 mL 扭盖的离心管。
- 4.1.3. 把 10 mL 的 50% 甲醇溶液注入离心管，然后将离心管涡旋振荡 ~ 1 min。
- 4.1.4. 把装有混合样本的离心管放入超声波清洗器中以室温进行 ~ 20 min 音波振动处理。
- 4.1.5. 以 ~ 4000 rpm 的转速对样本溶液进行 ~ 10 min 的离心处理并将上清液转移至 25 mL 的容量瓶中。



4.1.6. 以 4 mL 的 50 % 甲醇溶液进行两次第 4.1.3 段至第 4.1.5 段所述的步骤。

4.1.7. 以同一个 25 mL 的容量瓶收集所有上清液，然后加入 50 % 甲醇溶液稀释至刻度标记，得到样本溶液。

4.1.8. 将 2 mL 的样本溶液转移至新的 15 mL 离心管中。

4.1.9. 用自动移液器将 6 mL 的乙醇放入离心管中并涡旋振荡 ~30 s。

4.1.10. 把样本溶液 (第 4.1.9 段) 摆放在 $\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻柜中冷藏 ~10 min。

4.1.11. 以 ~4000 rpm 的转速对样本溶液进行 ~10 min 的离心处理，沉淀固体物或上浮物。

4.1.12. 用自动移液器将 4 mL 的上清液转移至玻璃试管中。

4.1.13. 用离心式蒸发器在 $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将上清液蒸发至干，然后用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。

4.1.14. 用自动移液器依序地将 0.5 mL 的乙醇和 8.5 mL 的乙腈转移至玻璃试管中。

4.1.15. 把样本溶液涡旋振荡 ~30 s。

4.2. 样本净化

4.2.1. 用 ~5 mL 的乙腈活化 NH_2 固相萃取柱，然后用 5 mL 的 95 % 乙腈溶液 洗脱。弃掉洗脱液。

4.2.2. 把样本溶液 (第 4.1.15 段) 完全转移至 NH_2 固相萃取柱。弃掉洗脱液。

4.2.3. 用 5 mL 的 95 % 乙腈溶液 冲洗玻璃试管，然后再完全转移至 NH_2 固相萃取柱中。弃掉洗脱液。

4.2.4. 进一步将 5 mL 的 70 % 乙腈溶液 加入 NH_2 固相萃取柱中，并将洗脱液收集在新的玻璃试管中。

4.2.5. 用离心式蒸发器在 $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将洗脱液蒸发至干，然后用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。



4.2.6. 以 0.20 μm 的聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液。将滤液收集在液相色谱玻璃样本瓶中。

4.2.7. 用 50 % 甲醇溶液将样本溶液进一步稀释 1000 倍。

备注： 如果分析物的浓度不在校准范围内，可用 50 % 甲醇溶液把样本溶液作进一步稀释。

4.3. 液相色谱串联质谱仪分析

4.3.1. 按照使用手册以操作液相色谱串联质谱仪的系统，并在下列的建议操作条件下进行分析。如要取得最佳的分离结果和输出信号，实际操作条件或须修订。实际的实验条件须记录在数据表上。

4.3.2. 建议的液相色谱仪之操作条件：

液相色谱仪	:	Dionex UltiMate 3000 HPLC 系统 或同等类型的系统		
液相色谱柱	:	InertSustain C ₁₈ 色谱柱 (2.1 × 250 mm, 5 μm) 或同等类型的色谱柱		
流动相 A	:	超纯水		
流动相 B	:	乙腈		
梯度	:	时间 (min)	A (%)	B (%)
		0.0	60	40
		2.0	60	40
		16.0	30	70
		23.0	30	70
		23.1	5	95
		25.0	5	95
		25.1	60	40
		28.0	60	40
流速	:	0.3 mL/min		
进样量	:	5 μL		
报告的保留时间	:	Re ~12.5 min Rg1 ~12.8 min Rf ~17.3 min Rb1 ~20.6 min		
柱温度	:	40 °C		



4.3.3. 建议的串联质谱仪之操作条件:

串联质谱仪	:	QTRAP 6500+ 系统 或同等类型的系统
离子源	:	电喷雾
离子源模式	:	负离子
离子喷雾电压	:	-4500
离子源温度	:	350 °C
雾化气 (GS1)	:	40
辅助加热气 (GS2)	:	40
气帘气 (CUR)	:	30
碰撞气 (CAD)	:	中度
扫描模式	:	多重反应监测 (MRM) 扫描模式

4.3.4. 建议的 MRM 之参数:

分析物	MRM 对	驻留时间 (msec)	DP	EP	CE	CXP
Re	945.6→637.4*	100	-240	-10	-54	-39
	945.6→475.4^	100	-240	-10	-70	-25
Rg1	799.6→637.4*	100	-205	-10	-34	-27
	799.6→475.4^	100	-205	-10	-50	-27
Rf	799.6→475.4*	100	-225	-10	-54	-29
	799.6→637.4^	100	-225	-10	-44	-39
Rb1	1107.6→945.5*	100	-255	-10	-60	-55
	1107.6→783.5^	100	-255	-10	-66	-45

备注: 定量及定性的 MRM 对分别以 * 和 ^ 符号标示。

5. 计算/结果分析

5.1. 鉴别要求

5.1.1. 比较样本检测峰保留时间和校准标准溶液的平均保留时间,以鉴别样本中的目标分析物。样本检测峰保留时间不应与校准标准溶液的平均保留时间相差多于 5% 以作阳性鉴别。



5.1.2. MRM 对的相对丰度应符合鉴别分析物的偏差范围 (与校准标准品的平均相对丰度比较):

与基峰比较的相对强度	许可偏差 %
> 50 %	± 20 %
> 20 % 至 50 %	± 25 %
> 10 % 至 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

5.2. 在线性校准模式下就分析物绘画峰面积与校准标准溶液浓度的图表,从而得出校准曲线。从校准曲线中取得斜率、y 截距和确定系数 (r^2)。

5.3. 按下列方程式计算样本中分析物的浓度 ($\mu\text{g/g}$):

$$\text{分析物浓度 } (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times (V/1000) \times D}{W}$$

C = 从校准曲线得出的分析物浓度 ($\mu\text{g/L}$)

V = 最终体积 (mL)

D = 稀释比

W = 样本重量 (g)

6. 参考数据

6.1. 中国医药科技出版社 (2020)。《中华人民共和国药典》(2020年版第一部)。国家药典委员会。

¹ 本方法旨在提供一种可靠的测试方法,在检测相关中成药中目标化学指针成分的含量时作质量控制之用。检测人员采用本方法时,有责任评估方法是否适用于拟测试的产品。

-空白页-