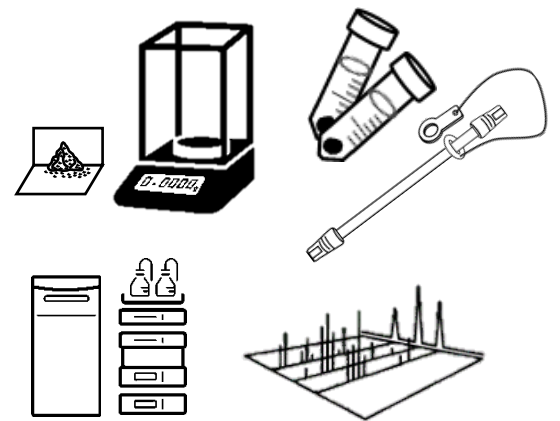




GCMTI RD-2: 2025

利用液相色譜串聯質譜儀技術
檢測中藥複方顆粒中的人參皂苷的含量

政府中藥檢測中心方法



-空白頁-



利用液相色譜串聯質譜儀技術 檢測複方中藥顆粒中的人參皂苷的含量¹

安全預防措施：本文中涉及致癌化學品、腐蝕性化學品和可燃溶劑，處理有關化學品時請採取預防措施，如戴上護眼及護手用具，並在有需要時在抽氣櫃進行檢測工作，以免吸入該等化學品氣體。

1. 引言

- 1.1. 複方中藥顆粒是香港其中一種中成藥，並以不同處方銷售。這些處方多數是根據古代中醫藥文獻制定。一般而言，其生產過程是將一系列中藥粉碎、煎煮、濾過和濃縮後，製成為水溶性粉末。
- 1.2. 本方法包含液相色譜串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 技術，可用於分析以人參為君、臣藥或主要成分的十種處方。以下將詳細列出處方列表。

項目	處方	古代中醫藥文獻
1.	聖愈湯	醫宗金鑒
2.	舉元煎	景嶽全書
3.	理中湯	傷寒論
4.	人參養榮湯	三因極一病證方論
5.	大建中湯	金匱要略
6.	六君子湯	醫學正傳
7.	附子理中湯	三因極一病證方論
8.	人參敗毒散	太平惠民和劑局方
9.	麥門冬湯	金匱要略
10.	溫經湯	金匱要略

- 1.3. 本方法已驗證能以 LC-MS/MS 技術，對十種含人參的處方進行定性及定量的檢測。四種分析物為人參皂苷Re (Re)、人參皂苷Rg1 (Rg1)、人參皂苷Rf (Rf) 和人參皂苷Rb1 (Rb1)。其驗證的工作範圍為溶液中的 1–50 µg/L，相當於原樣本中的 50–2500 µg/g。



2. 試劑

注意：除非另有說明，否則所有使用的試劑均屬分析純級別或同等級的試劑。

2.1. 超純水，Milli Q。

2.2. 甲醇，LC-MS 級。

2.3. 乙醇，Absolute 級。

2.4. 乙腈，LC-MS 級。

2.5. 50 % 甲醇溶液

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

2.6. 95 % 乙腈溶液

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

2.7. 70 % 乙腈溶液

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

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. 標準溶液

2.12.1. 標準儲備溶液 (~2000 µg/mL)

分別精密稱取 ~20 mg 的人參皂苷 (Re、Rg1、Rf 和 Rb1) 於四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，並稀釋至刻度標記，可配製成四瓶標準儲備溶液。

2.12.2. 第一混合標準中間溶液 (~100 µg/mL)

從四瓶不同的標準儲備溶液，轉移 0.5 mL 至一個 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，並稀釋至刻度標記，可配製成第一混合標準中間溶液。



2.12.3. 第二混合標準中間溶液 (~1 µg/mL)

把 0.1 mL 的第一混合標準中間溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，並稀釋至刻度標記，可配製成第二混合標準中間溶液。

2.12.4. 第三混合標準中間溶液 (~100 µg/L)

把 2.5 mL 的第二混合標準中間溶液轉移至 25 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成第三混合標準中間溶液。

2.13. 校準標準溶液

從第三混合標準中間溶液中，新鮮配製最少六瓶校準標準溶液。把適量的第三混合標準中間溶液分別轉移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成一系列校準標準溶液。配製校準標準溶液所須的標準中間溶液建議分量表列如下：

校準標準溶液	第三混合標準中間溶液容量 (mL)	最終容量 (mL)	人參皂苷各自的最終濃度 (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

備註： 可使用其他合適濃度，或採用其他稀釋順序來達到所需的濃度。須在數據表中記錄詳細資訊。

2.14. 初始校正驗證標準溶液

2.14.1. 初始校正驗證標準儲備溶液 (~2000 µg/mL)

分別精密稱取 ~20 mg 來源與校準標準品不同的人參皂苷 (Re、Rg1、Rf 和 Rb1) 於四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，並稀釋至刻度標記，可配製成四瓶初始校正驗證標準儲備溶液。

2.14.2. 第一混合初始校正驗證標準中間溶液 (~100 µg/mL)

從四瓶不同的初始校正驗證標準儲備溶液，轉移 0.5 mL 至一個 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，並稀釋至刻度標記，可配製成第一混合初始校正驗證標準中間溶液。



2.14.3. 第二混合初始校正驗證標準中間溶液 (~1 µg/mL)

把 0.1 mL 的第一混合初始校正驗證標準中間溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，並稀釋至刻度標記，可配製成第二混合初始校正驗證標準中間溶液。

2.14.4. 第三混合初始校正驗證標準中間溶液 (~100 µg/L)

把 1.0 mL 的第二混合初始校正驗證標準中間溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成第三混合初始校正驗證標準中間溶液。

2.14.5. 初始校正驗證標準工作溶液 (~10 或 20 µg/L)

把 1.0 或 2.0 mL 的第三混合初始校正驗證標準中間溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成初始校正驗證標準工作溶液。

2.15. 校準檢查標準品

校準檢查標準品應為校準標準溶液中的 CS3 或 CS4，即 ~10 或 20 µg/L。

2.16. 方法空白

方法空白應依照第 4.1.3 段至第 4.3 段進行完整的樣本製備步驟，並應含有與樣本溶液等量的試劑。

3. 器具

注意：所有玻璃量器使用後均須儘快以丙酮及清潔劑清洗。用清潔劑清洗後，玻璃量器隨即以水沖洗，之後再以丙酮沖洗兩次。

3.1. 研磨機或攪拌機。

3.2. 10 和 25 mL 的容量瓶。

3.3. 1 L 的量筒。

3.4. 分析天秤，感量為 0.01 mg。

3.5. 300, 1000 µL 和 10 mL 的自動移液器。



- 3.6. 15 mL 的聚丙烯離心管並配備扭蓋。
- 3.7. 超聲波清洗器。
- 3.8. 漩渦振蕩器。
- 3.9. 離心機，能達到至少 4000 rpm 的轉速。
- 3.10. 冷凍櫃，可在 $\sim 20^{\circ}\text{C}$ 溫度下運作。
- 3.11. 玻璃試管。
- 3.12. 離心式蒸發器或同等類型的系統。
- 3.13. NH_2 固相萃取柱，55- 至 105- μm ，6-mL，含 500 mg 的吸附物料或同等類型的消耗品。
- 3.14. 0.20 μm 的聚四氟乙烯過濾薄膜或同等類型的消耗品。
- 3.15. 液相色譜玻璃樣本瓶。
- 3.16. 超高效液相色譜柱，InertSustain C_{18} 色譜柱 (2.1 \times 250 mm，5 μm) 或同等類型的色譜柱。
- 3.17. 液相色譜串聯質譜儀，Dionex Ultimate 3000 UPLC 配備 QTRAP 6500+ 系統或同等類型的系統。

4. 步驟

4.1. 配製樣本

- 4.1.1. 如果需要，在進行分析前，使用研磨機或攪拌機把固體的樣本進行研磨及均質化處理。
- 4.1.2. 精密稱取 ~ 0.5 g 的樣本放進 15 mL 扭蓋的離心管。
- 4.1.3. 把 10 mL 的 50% 甲醇溶液注入離心管，然後將離心管渦旋振蕩 ~ 1 min。
- 4.1.4. 把裝有混合樣本的離心管放入超聲波清洗器中以室溫進行 ~ 20 min 音波振動處理。
- 4.1.5. 以 ~ 4000 rpm 的轉速對樣本溶液進行 ~ 10 min 的離心處理並將上清液轉移至 25 mL 的容量瓶中。



- 4.1.6. 以 4 mL 的 50 % 甲醇溶液進行兩次第 4.1.3 段至第 4.1.5 段所述的步驟。
- 4.1.7. 以同一個 25 mL 的容量瓶收集所有上清液，然後加入 50 % 甲醇溶液稀釋至刻度標記，得到樣本溶液。
- 4.1.8. 將 2 mL 的樣本溶液轉移至新的 15 mL 離心管中。
- 4.1.9. 用自動移液器將 6 mL 的乙醇放入離心管中並渦旋振蕩 ~30 s。
- 4.1.10. 把樣本溶液 (第 4.1.9 段) 擺放在 ~-20 °C 的冷凍櫃中冷藏 ~10 min。
- 4.1.11. 以 ~4000 rpm 的轉速對樣本溶液進行 ~10 min 的離心處理，沉澱固體物或上浮物。
- 4.1.12. 用自動移液器將 4 mL 的上清液轉移至玻璃試管中。
- 4.1.13. 用離心式蒸發器在 ~80 °C 下將上清液蒸發至乾，然後用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。
- 4.1.14. 用自動移液器依序地將 0.5 mL 的乙醇和 8.5 mL 的乙腈轉移至玻璃試管中。
- 4.1.15. 把樣本溶液渦旋振蕩 ~30 s。

4.2. 樣本淨化

- 4.2.1. 用 ~5 mL 的乙腈活化 NH₂ 固相萃取柱，然後用 5 mL 的 95 % 乙腈溶液洗脫。棄掉洗脫液。
- 4.2.2. 把樣本溶液 (第 4.1.15 段) 完全轉移至 NH₂ 固相萃取柱。棄掉洗脫液。
- 4.2.3. 用 5 mL 的 95 % 乙腈溶液沖洗玻璃試管，然後再完全轉移至 NH₂ 固相萃取柱中。棄掉洗脫液。
- 4.2.4. 進一步將 5 mL 的 70% 乙腈溶液加入 NH₂ 固相萃取柱中，並將洗脫液收集在新的玻璃試管中。
- 4.2.5. 用離心式蒸發器在 ~80 °C 下將洗脫液蒸發至乾，然後用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。



4.2.6. 以 0.20 μm 的聚四氟乙烯過濾薄膜過濾樣本溶液。將濾液收集在液相色譜玻璃樣本瓶中。

4.2.7. 用 50 % 甲醇溶液將樣本溶液進一步稀釋 1000 倍。

備註： 如果分析物的濃度不在校準範圍內，可用 50 % 甲醇溶液把樣本溶液作進一步稀釋。

4.3. 液相色譜串聯質譜儀分析

4.3.1. 按照使用手冊以操作液相色譜串聯質譜儀的系統，並在下列的建議操作條件下進行分析。如要取得最佳的分離結果和輸出信號，實際操作條件或須修訂。實際的實驗條件須記錄在數據表上。

4.3.2. 建議的液相色譜儀之操作條件：

液相色譜儀	:	Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統 或同等類型的系統		
液相色譜柱	:	InertSustain C ₁₈ 色譜柱 (2.1 × 250 mm, 5 μm) 或同等類型的色譜柱		
流動相 A	:	超純水		
流動相 B	:	乙腈		
梯度	:	時間 (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		
進樣量	:	5 μL		
報告的保留時間	:	Re ~12.5 min Rg1 ~12.8 min Rf ~17.3 min Rb1 ~20.6 min		
柱溫度	:	40 °C		



4.3.3. 建議的串聯質譜儀之操作條件：

串聯質譜儀	:	QTRAP 6500+ 系統 或同等類型的系統
離子源	:	電噴霧
離子源模式	:	負離子
離子噴霧電壓	:	-4500
離子源溫度	:	350°C
霧化氣 (GS1)	:	40
輔助加熱氣 (GS2)	:	40
氣簾氣 (CUR)	:	30
碰撞氣 (CAD)	:	中度
掃描模式	:	多重反應監測 (MRM) 掃描模式

4.3.4. 建議的 MRM 之參數：

分析物	MRM 對	駐留時間 (msec)	DP	EP	CE	CXP
Re	945.6→637.4*	100	-240	-10	-54	-39
	945.6→475.4^	100	-240	-10	-70	-25
Rgl	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
Rbl	1107.6→945.5*	100	-255	-10	-60	-55
	1107.6→783.5^	100	-255	-10	-66	-45

備註：定量及定性的 MRM 對分別以 * 和 ^ 符號標示。

5. 計算/結果分析

5.1. 鑒別要求

5.1.1. 比較樣本檢測峰保留時間和校準標準溶液的平均保留時間，以鑒別樣本中的目標分析物。樣本檢測峰保留時間不應與校準標準溶液的平均保留時間相差多於 5% 以作陽性鑒別。



5.1.2. MRM 對的相對豐度應符合鑒別分析物的偏差範圍（與校準標準品的平均相對豐度比較）：

與基峰比較的相對強度	許可偏差 %
> 50 %	± 20 %
> 20 % 至 50 %	± 25 %
> 10 % 至 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

5.2. 在線性校準模式下就分析物繪畫峰面積與校準標準溶液濃度的圖表，從而得出校準曲線。從校準曲線中取得斜率、y 截距和確定系數 (r^2)。

5.3. 按下列方程式計算樣本中分析物的濃度 ($\mu\text{g/g}$):

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

C = 從校準曲線得出的分析物濃度 ($\mu\text{g/L}$)

V = 最終體積 (mL)

D = 稀釋比

W = 樣本重量 (g)

6. 參考資料

6.1. 中國醫藥科技出版社 (2020)。《中華人民共和國藥典》(2020年版第一部)。國家藥典委員會。

¹ 本方法旨在提供一種可靠的測試方法，在檢測相關中成藥中目標化學指標成分的含量時作質量控制之用。檢測人員採用本方法時，有責任評估方法是否適用於擬測試的產品。

-空白頁-