



利用液相色谱串联质谱仪技术检测中药复方颗粒中 芍药苷、Z-藁本内酯、阿魏酸和/或地黄苷 D 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. 中药复方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. 本方法采用液相层析串联质谱联用技术（LC-MS/MS）分析28种含有白芍、当归和/或地黄的中药复方制剂。这些中药复方制剂的主要成分包括君、臣药和主要成分。以下将详细列出处方列表。
- 1.3. 以白芍为主要核心成分，本方法已验证了12种配方。所分析的化学标记为芍药苷（Pae）

项目	处方	古代中医药文献
1.	真武汤	伤寒论
2.	麻子仁丸	伤寒论
3.	固经丸	丹溪心法
4.	桂枝加龙骨牡蛎汤	金匱要略
5.	痛泻药方	丹溪心法
6.	独活寄生汤	备急千金要方
7.	十全大补汤	太平惠民和剂局方
8.	荆芥连翘汤	沈氏尊生方
9.	人参养荣汤	三因极一病证方论
10.	当归芍药散	金匱要略
11.	黄芪建中汤	金匱要略
12.	圣愈汤	医宗金鉴

- 1.4. 以当归为主要核心成分，本方法已验证了 10 种配方。所分析的化学标记物为 Z-藁本内酯（Li）和阿魏酸（FA）

项目	处方	古代中医药文献
1.	圣愈汤	医宗金鉴
2.	当归四逆汤	伤寒论
3.	济川煎	景岳全书
4.	补阳还五汤	医林改错
5.	蠲痹汤	济生方



项目	处方	古代中医药文献
6.	当归芍药散	金匱要略
7.	调经丸	证治准绳
8.	消风散	外科正宗
9.	温经汤	金匱要略
10.	人参养荣汤	三因极一病证方论

- 1.5. 以地黄为主要成分，本方法已验证了 12 种制剂。所分析的化学标记为地黄苷 D（Reh D）

项目	处方	古代中医药文献
1.	圣愈汤	医宗金鉴
2.	养阴清肺汤	重楼玉钥
3.	清胃散	脾胃论
4.	小蓟饮子	济生方
5.	当归六黄汤	兰室秘藏
6.	左归丸	景岳全书
7.	八味地黄丸	博青主女科·产后编
8.	玉泉散	血证论卷八
9.	大补阴丸	丹溪心法
10.	调经丸	证治准绳
11.	芎归胶艾汤	金匱要略
12.	消风散	外科正宗

- 1.6. 本方法已通过液相层析串联质谱法（LC-MS/MS）验证，可用于定性或定量测定中药复方颗粒中的四种分析物，即芍药苷、Z-藁本内酯、阿魏酸和地黄苷 D。分析中以氢化可的松作为内标。各分析物的有效工作范围如下表所示。

分析物	浓度范围	
	溶液浓度(μg/L)	固体浓度(μg/g)
Pae	20–500	100–2500
Li	0.2–5	1–25
FA	2–50	50–1250
Reh D	2–50	50–1250



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. 乙腈，LC-MS 级。

2.4. 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。

2.5. 5 % 乙腈溶液

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

2.6. 甲酸，LC-MS 级。

2.7. 0.1% 甲酸溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~999mL 的超纯水和 ~1 mL 的甲酸。

2.8. 氢化可的松, CAS. No.: 50-23-7.

2.9. Pae, CAS. No.: 23180-57-6.

2.10. Li, CAS. No.: 81944-09-4.

2.11. FA, CAS. No.: 537-98-4.

2.12. Reh D, CAS. No.: 81720-08-3.

2.13. 内标溶液

2.13.1. 储备内标溶液 (~2000 µg/mL)

精密称取 ~20 mg 的氢化可的松于10 mL容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记。

2.13.2. 第一中间内标溶液 (IS1, ~10 µg/mL)

把 0.05 mL 的储备内标溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入乙腈，并稀释至刻度标记。



2.13.3. 第二中间内标溶液 (IS2, ~100 µg/L)

把 0.1 mL 的第一中间内标溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入5 % 乙腈溶液，并稀释至刻度标记。

2.13.4. 第三中间内标溶液 (IS3, ~5 µg/L)

把 0.025 mL 的第一中间内标溶液转移至 50 mL 的容量瓶，加入5 % 乙腈溶液，并稀释至刻度标记。

2.14. 标准溶液

2.14.1. 个别标准储备溶液

分别准确称取建议量的校准标准品于不同的 10 mL 容量瓶中。用甲醇溶解并定容至刻度标记。配制个别标准储备溶液所建议的浓度如下所示。

个别标准储备溶液	校准标准品重量 (mg)	最终容量 (mL)	浓度 (µg/mL)
Pae	~50	10	~5000
Li	~10	10	~1000
FA	~20	10	~2000
Reh D	~20	10	~2000

2.14.2. 混合标准中间溶液 1 (INT1)

取适量的个别标准储备溶液（第 2.14.1段）至10 mL容量瓶中。以乙腈溶液定容至刻度标记。配制混合标准中间溶液1的建议浓度如下所示。

INT1	储备标准溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	浓度 (µg/mL)
Pae	2.0	10	~1000
Li	0.1		~10
FA	0.5		~100
Reh D	0.5		~100

2.14.3. 混合标准中间溶液 2 (INT2)

把0.1 mL混合标准中间溶液 1 移至 10 mL 容量瓶中。以 5% 乙腈溶液定容至刻度标记。 配制混合标准中间溶液2的建议浓度如下所示。



INT2	储备标准溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	浓度 ($\mu\text{g/L}$)
Pae	0.1	10	~10000
Li			~100
FA			~1000
Reh D			~1000

2.15. 校准标准溶液

由标准中间溶液(INT2和/或CS6)，新鲜配制最少六瓶校准标准溶液。把适量的标准中间溶液分别转移至六瓶 10 mL 的容量瓶，以5%乙腈稀释至刻度标记。配制校准标准溶液所须的标准中间溶液建议浓度表列如下：

校准标准溶液	INT2 容量 (mL)	最终浓度 ($\mu\text{g/L}$)				IS2 容量 (mL)	最终浓度 ($\mu\text{g/L}$)	最终 容量 (mL)
		Pae	Li	FA	Reh D		内标	
CS3	0.1	100	1	10	10	0.5	5	10
CS4	0.2	200	2	20	20	0.5	5	10
CS5	0.3	300	3	30	30	0.5	5	10
CS6	0.5	500	5	50	50	0.5	5	10

校准标准溶液	CS6 容量 (mL)	最终浓度 ($\mu\text{g/L}$)				IS3 容量 (mL)	最终浓度 ($\mu\text{g/L}$)	最终 容量 (mL)
		Pae	Li	FA	Reh D		I.S.	
CS1	0.4	20	0.2	2	2	9.6	5	10
CS2	1.0	50	0.5	5	5	9.0	5	10

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。校准标准溶液中内标浓度应配制成约 $5 \mu\text{g/L}$ 。须在数据表中记录详细资讯。

2.16. 初始校正验证标准溶液

2.16.1. 初始校正验证标准储备溶液

依照第 2.14.1. 段，使用独立的标准品（如适用，可使用其他品牌或同一品牌的其他批次标准品）来制备储备 ICV 标准溶液。

2.16.2. 混合初始校正验证标准中间溶液 I (ICV I)

使用初始校正验证标准储备溶液，依照第 2.14.2 段建议的容量配制混合初始校正验证标准中间溶液 I。以 ACN 溶液加至刻度标记。



2.16.3. 混合初始校正验证标准中间溶液II (ICV II)

依照第2.14.3. 段, 使用 ICV I 配制ICV II。以 5% ACN 溶液加至刻度标记。

2.16.4. 初始校正验证标准工作溶液

依照第 2.15. 段中的 CS3 或 CS4, 使用 ICV II 取代 INT2 配制 ICV 工作标准溶液。以 5% ACN 溶液加至刻度标记。

2.17. 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。

2.18. 方法空白

方法空白应依照第 4.1. 段至第 4.2. 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, 25 和 50 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. 100, 300, 1000 μ L 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. 转速可调的高速离心机, 能达到至少 4000 rpm 的转速。

3.10. 0.20 μ m 的聚四氟乙烯过滤薄膜或同等类型的消耗品。



- 3.11. 液相色谱玻璃样本瓶。
- 3.12. 超高效液相色谱柱，Acquity HSS T3 Column 色谱柱 (2.1×150 mm, $1.8 \mu\text{m}$) 或同等类型的色谱柱。
- 3.13. 液相色谱串联质谱仪，Dionex Ultimate 3000 UPLC 配备 Triple Quad 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. 以 $0.20 \mu\text{m}$ 的聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液。
- 4.1.9. 取 0.01 mL 样品溶液(第 4.1.8. 段)与 0.05 mL IS2 (内标浓度约 $100 \mu\text{g/L}$) 移入液相层析玻璃进样瓶中，使样品溶液稀释100倍。然后再以 5% 乙腈溶液定容至 1.0 mL。所得稀释样品溶液即可用于 Pae 和 Li 的分析。
- 4.1.10. 取 0.2 mL 样品溶液(见第 4.1.9. 段)与 0.8 mL IS3 (约 $5 \mu\text{g/L}$ 内标) 移入液相层析玻璃小瓶中，使样品溶液进一步稀释 5 倍。所得稀释样品溶液即可用于 FA 和 Reh D 的分析。



备注：如果分析物浓度不在校正范围内，则需以IS3（约5 µg/L）进一步稀释样品溶液。样品溶液中内标物的浓度应保持在约5 µg/L。

4.2. 液相色谱串联质谱仪分析

4.2.1. 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。

4.2.2. 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	:	Acquity HSS T3 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 1.8 µm) 或同等类型的色谱柱		
流动相 A	:	0.1% 甲酸溶液		
流动相 B	:	乙腈		
梯度	:	Time (min)	A (%)	B (%)
		0.0	99	1
		1.0	99	1
		2.0	95	5
		3.0	95	5
		8.0	90	10
		9.0	80	20
		17.0	80	20
		19.0	35	65
		25.0	35	65
		27.0	5	95
		32.0	5	95
		33.0	99	1
		40.0	99	1
流速	:	0.2 mL/min		
进样量	:	10 µL		
报告的保留时间	:	Reh D ~7.5 min Pae ~14.0 min FA ~17.5 min Li ~25.9 min I.S.~21.0 min		
柱温度	:	30 °C		



4.2.3. 建议的串联质谱仪之操作条件:

串联质谱仪	:	Triple Quad 6500+ 系统 或同等类型的系统
离子源	:	电喷雾
离子源模式	:	正和负离子
离子喷雾电压	:	4500 和-4500
离子源温度	:	500°C
雾化气 (GS1)	:	50
辅助加热气 (GS2)	:	50
气帘气 (CUR)	:	30
碰撞气 (CAD)	:	9
扫描模式	:	多重反应监测 (MRM) 扫描模式

4.2.4. 建议的 MRM 之参数:

分析物	MRM对	极性	驻留 时间 (msec)	DP	EP	CE	CXP
Pae	479.1→120.8 [*]	-ve	50	-35	-10	-32	-10
	479.1→77.0 [^]		50	-35	-10	-70	-4
Li	191.0→173.0 [*]	+ve	50	+100	+10	+22	+22
	191.0→145.0 [^]		50	+100	+10	+23	+18
FA	193.0→133.9 [*]	-ve	50	-30	-10	-24	-15
	193.0→177.9 [^]		50	-30	-10	-18	-15
Reh D	685.2→263.1 [*]	-ve	50	-130	-10	-28	-15
	685.2→179.0 [^]		50	-130	-10	-34	-11
I.S.	363.0→120.9 [*]	+ve	50	+70	+10	+30	+18
	361.0→331.3 [*]	-ve	50	-90	-10	-17	-24

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. 目标分析物的鉴定是透过比较样本检测峰的相对保留时间 (RRT_{sample}) 与校准标准溶液的平均相对保留时间 (RRT) 进行。样本检测峰的相对保留时间 (RRT_{sample}) 与校准标准溶液的平均相对保留时间 (RRT) 之差异不得超过 2.5%，方可作为阳性鉴别。



- 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, 分析每种分析物相对面积比 (分析物峰面积/内标峰面积) 与校准标准溶液浓度的图表。从校准曲线中获得斜率、y轴截距和决定系数 (r^2)。
- 5.3. 按下列方程式计算样本中分析物的浓度 ($\mu\text{g/g}$):

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度 ($\mu\text{g/L}$)

V = 最终容量 (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 (2025)。《中华人民共和国药典》(2025年版)。国家药典委员会。

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。

-空白页-