



GCMTI RD-3:2021

利用高效液相色谱二極管陣列檢測器和
高效液相色谱的柚皮苷和甘草苷含量

政府中藥檢測中心方法



利用高效液相色譜二極管陣列檢測器和高效液相色譜串聯質譜儀檢測枇杷膏的柚皮苷和甘草苷含量

安全預防措施：本檢測程式涉及致癌化學品、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. 枇杷膏是中國和香港常見的中成藥，用於緩解喉痛、咳嗽、聲音嘶啞和失聲的情況。由不同製造商製造的枇杷膏配方和生產程式各異，一般以川貝母、枇杷葉、化橘紅、桔梗、苦杏仁、甘草、薄荷等中藥材不斷煎煮，然後加入溶於乙醇的糖漿和蜂蜜。這些中藥材的常見化學指標如下：

中藥材名稱	常見化學指標名稱
川貝母	貝母辛
枇杷葉	齊墩果酸和熊果酸
化橘紅	柚皮苷
桔梗	桔梗皂苷 D
苦杏仁	苦杏仁苷
甘草	甘草苷和甘草酸
薄荷	薄荷醇

1.2. 本方法載列檢測枇杷膏樣本內的柚皮苷和甘草苷所涉的步驟。

1.3. 利用高效液相色譜二極管陣列檢測器和高效液相色譜串聯質譜儀就有關化學指標成分進行定性及／或定量測定。

2. 試劑

注：除非另有說明，否則所有使用的試劑均為分析純級別或同等級別的試劑。

2.1 配製高效液相色譜二極管陣列檢測器標準溶液

2.1.1. 個別標準儲備溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出柚皮苷和甘草苷各約 5 毫克，分別放進 2 個 5 毫升的容

量瓶，加入甲醇至刻度標記，溶解該等物質，則可配製個別標準儲備溶液。

2.1.2. 混合標準中間溶液(每毫升~100 微克)

把個別標準儲備溶液各 1 毫升轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間溶液。

2.1.3. 校準標準品 CS1 至 CS5

把適量混合標準中間溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑，則可配製每毫升~0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 微克的校準標準溶液。配製校準標準溶液所建議使用的校準標準溶液體積載於下表：

校準標準品	混合標準中間溶液體積(毫升)	CS5 體積(毫升)	最終體積(毫升)	柚皮苷和甘草苷濃度(微克/毫升)
CS1	/	0.2	10	0.1
CS2		1	10	0.5
CS3	0.1	/	10	1.0
CS4	0.25		10	2.5
CS5	0.5		10	5.0

2.1.4. 個別標準儲備 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出另一來源的柚皮苷和甘草苷各約 5 毫克，分別放進 2 個 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度標記，溶解該等物質，則可配製個別標準儲備 ICV 溶液。

2.1.5. 混合標準中間 ICV 溶液(每毫升~100 微克)

把個別標準儲備 ICV 溶液各 1 毫升轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間 ICV 溶液。

2.1.6. 標準工作 ICV 溶液(每毫升~2.5 微克)

把 250 微升混合標準中間 ICV 溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製標準工作 ICV 溶液。

2.1.7. 混合加標標準溶液(柚皮苷：每毫升~30 微克；甘草苷：每毫升~20 微克)

克)

把 300 微升柚皮苷標準儲備溶液和 200 微升甘草苷標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合加標標準溶液。

2.2. 配製高效液相色譜串聯質譜儀標準溶液

2.2.1. 個別標準儲備溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出柚皮苷和甘草苷各約 5 毫克，分別放進 2 個 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度標記，溶解該等物質，則可配製個別標準儲備溶液。

2.2.2. 混合標準中間溶液 I(每毫升~10 微克)

把個別標準儲備溶液各 100 微升轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間溶液 I。

2.2.3. 混合標準中間溶液 II(每毫升~250 奈克)

把 250 微升混合標準中間溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間溶液 II。

2.2.4. 校準標準品 CS1 至 CS5

把適量混合標準中間溶液 II 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑，則可配製每毫升~0.5、1.0、2.0、5.0、10 奈克的校準標準溶液。配製校準標準溶液所建議使用的校準標準溶液體積載於下表：

校準標準品	混合標準中間溶液 II 體積 (毫升)	CS5 體積 (毫升)	最終體積 (毫升)	柚皮苷和甘草苷濃度 (奈克/毫升)
CS1	/	0.5	10	0.5
CS2		1	10	1.0
CS3		2	10	2.0
CS4	0.2	/	10	5.0
CS5	0.4		10	10

2.2.5. 個別標準儲備 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出另一來源的柚皮苷和甘草苷各約 5 毫克，分別放進 2 個 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度標記，溶解該等物質，則可配製標準儲備 ICV 溶液。

2.2.6. 混合標準中間 ICV 溶液 I(每毫升~10 微克)

把個別標準儲備 ICV 溶液各 100 微升轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間 ICV 溶液 I。

2.2.7. 混合標準中間 ICV 溶液 II(每毫升~250 奈克)

把 250 微升混合標準中間 ICV 溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合標準中間 ICV 溶液 II。

2.2.8. 標準工作 ICV 溶液(每毫升~5 奈克)

把 200 微升混合標準中間 ICV 溶液 II 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製標準工作 ICV 溶液。

2.2.9. 混合加標標準溶液(柚皮苷：每毫升~30 微克；甘草苷：每毫升~20 微克)

把 300 微升柚皮苷標準儲備溶液和 200 微升甘草苷標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑至刻度標記，則可配製混合加標標準溶液。

2.3. 甲醇，色譜質譜純

2.4. 乙腈，色譜質譜純

2.5. 甲酸，分析純

2.6. Milli-Q 超純水

2.7. 稀釋溶劑

乙腈：0.02%甲酸(2:8)

3. 器具

所有玻璃量器用後均須儘快以丙酮沖洗，並以清潔劑清洗，隨即先後以丙酮及水沖洗，然後再以丙酮沖洗兩次。

- 3.1. 5 毫升和 10 毫升容量瓶
- 3.2. 300 微升、1000 微升、5000 微升和 10000 微升的自動移液器
- 3.3. 15 毫升的離心管
- 3.4. 分析天秤，感量為 0.1 毫克
- 3.5. 超聲波清洗器
- 3.6. 0.45 微米聚四氟乙烯過濾薄膜

4. 步驟

4.1. 高效液相色譜二極管陣列檢測法

4.1.1. 配製樣本

- 4.1.1.1. 準確地稱出約 0.2 克枇杷膏樣本，把樣本放進 15 毫升的離心管。
- 4.1.1.2. 把 10 毫升稀釋溶劑加進離心管，渦旋振蕩 1 分鐘混勻樣本。
- 4.1.1.3. 把混合樣本放在超聲波清洗器中進行 10 分鐘音波振動處理。
- 4.1.1.4. 上清液以 0.45 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾。
- 4.1.1.5. 混勻後使用高效液相色譜二極管陣列檢測器進行分析。

4.1.2. 高效液相色譜二極管陣列檢測法

- 4.1.2.1. 高效液相色譜二極管陣列檢測器系統應按使用手冊操作，樣本也應在下方建議的條件下進行分析。如要取得最佳輸出信號，實際操作條件或須修訂。

4.1.2.2. 建議的高效液相色譜條件：

高效液相色譜系統	： Waters Alliance e2695 高效液相色譜系統				
柱	： GL Science Intersil ODS-4， 4.6 x 250 毫米，5 微米				
柱溫度	： 25°C				
流速	： 1.0 毫升／分鐘				
進樣量	： 100 微升				
流動相	A：0.02%甲酸 B：乙腈				
梯度	：	時間 (分鐘)	A%	B%	流速 (毫升／分鐘)
		0.0	82	18	1.0
		10.0	82	18	1.0
		21.0	72	28	1.0
		21.1	5	95	1.0
		24.0	5	95	1.0
		24.1	82	18	1.0
		29.0	82	18	1.0

4.1.2.3. 建議的二極管陣列檢測器條件：

檢測器波長：278 奈米

4.2. 高效液相色譜質譜聯用法

4.2.1. 配製樣本

- 4.2.1.1. 準確地稱出約 0.2 克枇杷膏樣本，把樣本放進 15 毫升的離心管。
- 4.2.1.2. 把 10 毫升稀釋溶劑加進離心管，渦旋振蕩 1 分鐘混勻樣本。
- 4.2.1.3. 把混合樣本放在超聲波清洗器中進行 10 分鐘音波振動處理。
- 4.2.1.4. 使用高效液相色譜串聯質譜儀進行分析前，上清液先以 0.45 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾，再以適量稀釋溶劑稀釋。

4.2.1.5. 建議稀釋比為 500 倍。

4.2.2. 高效液相色譜質譜聯用法

4.2.2.1 高效液相色譜串聯質譜儀系統應按使用手冊操作，樣本也應在下方建議的條件下進行分析。如要取得最佳輸出信號，實際操作條件或須修訂。

4.2.2.2. 建議的高效液相色譜條件：

高效液相色譜系統	： Dionex UltiMate 3000 高效液相色譜系統			
柱	： GL Science Intersil ODS-4， 2.1 x 250 毫米，5 微米			
柱溫度	： 25°C			
流速	： 0.3 毫升／分鐘			
進樣量	： 5 微升			
流動相	： A：0.02%甲酸 B：乙腈			
梯度	： 時間 (分鐘)	A%	B%	流速 (毫升／分鐘)
	0.0	80	20	0.3
	4.0	80	20	0.3
	9.0	70	30	0.3
	14.0	50	50	0.3
	16.0	5	95	0.3
	18.0	5	95	0.3
	18.1	80	20	0.3
	22.0	80	20	0.3

4.2.3. 建議的串聯質譜儀條件：

串聯質譜儀系統	： AB SCIEX 6500+系統
離子化模式	： 電噴霧負離子電噴霧離子化模式
離子噴霧電壓	： -4500 伏特
離子源溫度	： 500°C
離子來源氣體 1	： 60
離子來源氣體 2	： 70
氣簾	： 20
碰撞氣體	： 9

掃描模式 : 多重反應監測對

4.2.4. 分析柚皮苷和甘草苷所建議的多重反應監測對條件：

分析物	多重反應監測對		停留時間 (毫秒)	DP	EP	CE	CXP
柚皮苷	579.2 → 271.1	定量多重 反應監測對	30-300	-160	-10	-45	-15
	579.2 → 459.1	定性多重 反應監測對	30-300	-160	-10	-35	-15
甘草苷	417.1 → 255.1	定量多重 反應監測對	30-300	-92	-10	-27	-15
	417.1 → 135.0	定性多重 反應監測對	30-300	-92	-10	-39	-15

5. 計算／結果分析

5.1. 鑒別要求

5.1.1 使用高效液相色譜二極管陣列檢測器和高效液相色譜串聯質譜儀進行分析時，應比較樣本與標準溶液的檢測峰保留時間，以鑒別樣本中的目標分析物成分。樣本的檢測峰保留時間不應與標準溶液的樣本的檢測峰保留時間相差多於 5%。

5.1.2. 計算下列離子的相對豐度(宜包括准分子離子)：

- (i) 液相色譜質譜聯用法／質譜分析：最少兩種多重反應監測離子對；或
- (ii) 能準確測量品質的儀器：最少一對特徵碎片離子。

5.1.3. 使用高效液相色譜串聯質譜儀進行分析時，多重反應監測對和特徵碎片離子的相對豐度(定性多重反應監測對／定量多重反應監測對)應符合鑒別分析物的偏差範圍(與標準溶液相對豐度或其平均數比較)：

與基峰的相對強度(%)	許可偏差%
> 50%	±20%
> 20 至 50%	±25%
> 10 至 20%	±30%

≤ 10%	±50%
-------	------

5.2. 校準曲線

5.2.1. 為每款標準溶液繪畫峰面積與濃度(高效液相色譜二極管陣列檢測器：微克／毫升；高效液相色譜串聯質譜儀：奈克／毫升)的圖表，從校準曲線得出斜率、截距與相關係數(r)。

5.2.2. 按下列方程式計算每一校準水平的偏差：

$$\text{校準水平的偏差 (\%)} = \frac{C - C_{theo}}{C_{theo}} \times 100\%$$

C = 從校準曲線得出的標準溶液濃度(高效液相色譜二極管陣列檢測器：微克／毫升；高效液相色譜串聯質譜儀：奈克／毫升)；以及

C_{theo} = 校準標準的理論濃度(高效液相色譜二極管陣列檢測器：微克／毫升；高效液相色譜串聯質譜儀：奈克／毫升)

C 值應按下列算式計算：

$$C(\text{微克或奈克／毫升}) = \frac{A - Y}{M}$$

A = 標準溶液的峰面積；

Y = 校準曲線截距；以及

M = 校準曲線斜率

5.3. 按下列方程式計算樣本中分析物成分：

$$\text{分析物成分 (微克／克)} = \frac{C \times V / 1000 \times D}{W}$$

C = 從校準曲線得出的分析物濃度(高效液相色譜二極管陣列檢測器：微克／毫升；高效液相色譜串聯質譜儀：奈克／毫升)；

V = 最終體積(毫升)；

D = 稀釋因子；以及

W = 樣本重量(克)

5.4. 按下列方程式計算一組重複樣本平均數的平均偏差：

$$\text{平均數平均偏差 (\%)} = \frac{D_1 - (D_1 + D_2) / 2}{(D_1 + D_2) / 2} \times 100\%$$

D1 = 樣本 1 的值；以及

D2 = 樣本 2 的值

6. 參考資料

- 6.1. 國家藥典委員會：《中華人民共和國藥典》2015 年版一部，中國醫藥科技出版社。
- 6.2. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Eurachem / CITAC Guide CG4, 3rd Edition, 2012.