



GCMTI RD-3:2021

利用高效液相色谱二极管阵列检测器和
高效液相色谱串联质谱仪检测
枇杷膏的柚皮苷和甘草苷含量

政府中藥檢測中心方法



利用高效液相色谱二极管数组检测器和高效液相色谱串联质谱仪检测枇杷膏的柚皮苷和甘草苷含量

安全预防措施：本检测程序涉及致癌化学品、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. 枇杷膏是中国和香港常见的中成药，用于缓解喉痛、咳嗽、声音嘶哑和失声的情况。由不同制造商制造的枇杷膏配方和生产程序各异，一般以川贝母、枇杷叶、化橘红、桔梗、苦杏仁、甘草、薄荷等中药材不断煎煮，然后加入溶于乙醇的糖浆和蜂蜜。这些中药材的常见化学指针如下：

中药材名称	常见化学指针名称
川贝母	贝母辛
枇杷叶	齐墩果酸和熊果酸
化橘红	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. 本方法载列检测枇杷膏样本内的柚皮苷和甘草苷所涉的步骤。

1.3. 利用高效液相色谱二极管数组检测器和高效液相色谱串联质谱仪就有关化学指针成分进行定性及 / 或定量测定。

2. 试剂

注：除非另有说明，否则所有使用的试剂均为分析纯级别或同等级别的试剂。

2.1 配制高效液相色谱二极管数组检测器标准溶液

2.1.1. 个别标准储备溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出柚皮苷和甘草苷各约 5 毫克，分别放进 2 个 5 毫升的容

量瓶，加入甲醇至刻度标记，溶解该等物质，则可配制个别标准储备溶液。

2.1.2. 混合标准中间溶液(每毫升~100 微克)

把个别标准储备溶液各 1 毫升转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间溶液。

2.1.3. 校准标准品 CS1 至 CS5

把适量混合标准中间溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂，则可配制每毫升~0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 微克的校准标准溶液。配制校准标准溶液所建议使用的校准标准溶液体积载于下表：

校准标准品	混合标准中间溶液体积(毫升)	CS5 体积(毫升)	最终体积(毫升)	柚皮苷和甘草苷浓度(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. 个别标准储备 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出另一来源的柚皮苷和甘草苷各约 5 毫克，分别放进 2 个 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度标记，溶解该等物质，则可配制个别标准储备 ICV 溶液。

2.1.5. 混合标准中间 ICV 溶液(每毫升~100 微克)

把个别标准储备 ICV 溶液各 1 毫升转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间 ICV 溶液。

2.1.6. 标准工作 ICV 溶液(每毫升~2.5 微克)

把 250 微升混合标准中间 ICV 溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制标准工作 ICV 溶液。

2.1.7. 混合加标标准溶液(柚皮苷：每毫升~30 微克；甘草苷：每毫升~20 微克)

克)

把 300 微升柚皮苷标准储备溶液和 200 微升甘草苷标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合加标标准溶液。

2.2. 配制高效液相色谱串联质谱仪标准溶液

2.2.1. 个别标准储备溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出柚皮苷和甘草苷各约 5 毫克，分别放进 2 个 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度标记，溶解该等物质，则可配制个别标准储备溶液。

2.2.2. 混合标准中间溶液 I(每毫升~10 微克)

把个别标准储备溶液各 100 微升转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间溶液 I。

2.2.3. 混合标准中间溶液 II(每毫升~250 奈克)

把 250 微升混合标准中间溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间溶液 II。

2.2.4. 校准标准品 CS1 至 CS5

把适量混合标准中间溶液 II 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂，则可配制每毫升~0.5、1.0、2.0、5.0、10 奈克的校准标准溶液。配制校准标准溶液所建议使用的校准标准溶液体积载于下表：

校准标准品	混合标准中间溶液 II 体积 (毫升)	CS5 体积 (毫升)	最终体积 (毫升)	柚皮苷和甘草苷浓度 (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. 个别标准储备 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出另一来源的柚皮苷和甘草苷各约 5 毫克，分别放进 2 个 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度标记，溶解该等物质，则可配制标准储备 ICV 溶液。

2.2.6. 混合标准中间 ICV 溶液 I(每毫升~10 微克)

把个别标准储备 ICV 溶液各 100 微升转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间 ICV 溶液 I。

2.2.7. 混合标准中间 ICV 溶液 II(每毫升~250 奈克)

把 250 微升混合标准中间 ICV 溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合标准中间 ICV 溶液 II。

2.2.8. 标准工作 ICV 溶液(每毫升~5 奈克)

把 200 微升混合标准中间 ICV 溶液 II 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制标准工作 ICV 溶液。

2.2.9. 混合加标标准溶液(柚皮苷：每毫升~30 微克；甘草苷：每毫升~20 微克)

把 300 微升柚皮苷标准储备溶液和 200 微升甘草苷标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂至刻度标记，则可配制混合加标标准溶液。

2.3. 甲醇，色谱质谱纯

2.4. 乙腈，色谱质谱纯

2.5. 甲酸，分析纯

2.6. Milli-Q 超纯水

2.7. 稀释溶剂

乙腈：0.02%甲酸(2:8)

3. 器具

所有玻璃量器用后均须尽快以丙酮冲洗，并以清洁剂清洗，随即先后以丙酮及水冲洗，然后再以丙酮冲洗两次。

- 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 微升的自动移液器
- 3.3. 15 毫升的离心管
- 3.4. 分析天秤，感量为 0.1 毫克
- 3.5. 超声波清洗器
- 3.6. 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜

4. 步骤

4.1. 高效液相色谱二极管数组检测法

4.1.1. 配制样本

- 4.1.1.1. 准确地称出约 0.2 克枇杷膏样本，把样本放进 15 毫升的离心管。
- 4.1.1.2. 把 10 毫升稀释溶剂加进离心管，涡旋振荡 1 分钟混匀样本。
- 4.1.1.3. 把混合样本放在超声波清洗器中进行 10 分钟音波振动处理。
- 4.1.1.4. 上清液以 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤。
- 4.1.1.5. 混匀后使用高效液相色谱二极管数组检测器进行分析。

4.1.2. 高效液相色谱二极管数组检测法

- 4.1.2.1. 高效液相色谱二极管数组检测器系统应按使用手册操作，样本也应在下方建议的条件下进行分析。如要取得最佳输出信号，实际操作条件或须修订。

4.1.2.2. 建议的高效液相色谱条件：

高效液相色谱系统	： Waters Alliance e2695 高效液相色谱系统			
柱	： GL Science Intersil ODS-4, 4.6 x 250 毫米, 5 微米			
柱温度	： 25°C			
流速	： 1.0 毫升 / 分钟			
进样量	： 100 微升			
流动相	A: 0.02%甲酸 B: 乙腈			
梯度	： 时间	A%	B%	流速
	(分钟)			(毫升 / 分钟)
	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. 建议的二极管数组检测器条件：

检测器波长：278 奈米

4.2. 高效液相色谱质谱联用法

4.2.1. 配制样本

- 4.2.1.1. 准确地称出约 0.2 克枇杷膏样本，把样本放进 15 毫升的离心管。
- 4.2.1.2. 把 10 毫升稀释溶剂加进离心管，涡旋振荡 1 分钟混匀样本。
- 4.2.1.3. 把混合样本放在超声波清洗器中进行 10 分钟音波振动处理。
- 4.2.1.4. 使用高效液相色谱串联质谱仪进行分析前，上清液先以 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤，再以适量稀释溶剂稀释。

4.2.1.5. 建议稀释比为 500 倍。

4.2.2. 高效液相色谱质谱联用法

4.2.2.1 高效液相色谱串联质谱仪系统应按使用手册操作，样本也应在下方建议的条件下进行分析。如要取得最佳输出信号，实际操作条件或须修订。

4.2.2.2. 建议的高效液相色谱条件：

高效液相色谱系统 : Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱系统

柱 : GL Science Intersil ODS-4,
2.1 x 250 毫米, 5 微米

柱温度 : 25°C

流速 : 0.3 毫升 / 分钟

进样量 : 5 微升

流动相 : A: 0.02%甲酸
B: 乙腈

梯度	时间 (分钟)	A%	B%	流速 (毫升 / 分钟)
	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. 建议的串联质谱仪条件：

串联质谱仪系统 : AB SCIEX 6500+系统

离子化模式 : 电喷雾负离子电喷雾离子化模式

离子喷雾电压 : -4500 伏特

离子源温度 : 500°C

离子来源气体 1 : 60

离子来源气体 2 : 70

气帘 : 20

碰撞气体 : 9

扫描模式 : 多重反应监测对

4.2.4. 分析柚皮苷和甘草苷所建议的多重反应监测对条件:

分析物	多重反应监测对		停留时间 (毫秒)	DP	EP	CE	CXP
柚皮苷	579.2 → 271.1	定量多重 反应监测对	30-300	-160	-10	-45	-15
	579.2 → 459.1	定性多重 反应监测对	30-300	-160	-10	-35	-15
甘草苷	417.1 → 255.1	定量多重 反应监测对	30-300	-92	-10	-27	-15
	417.1 → 135.0	定性多重 反应监测对	30-300	-92	-10	-39	-15

5. 计算 / 结果分析

5.1. 鉴别要求

5.1.1 使用高效液相色谱二极管数组检测器和高效液相色谱串联质谱仪进行分析时, 应比较样本与标准溶液的检测峰保留时间, 以鉴别样本中的目标分析物成分。样本的检测峰保留时间不应与标准溶液的样本的检测峰保留时间相差多于 5%。

5.1.2. 计算下列离子的相对丰度(宜包括准分子离子):

(i) 液相色谱质谱联用法 / 质谱分析: 最少两种多重反应监测离子对; 或

(ii) 能准确测量质量的仪器: 最少一对特征碎片离子。

5.1.3. 使用高效液相色谱串联质谱仪进行分析时, 多重反应监测对和特征碎片离子的相对丰度(定性多重反应监测对 / 定量多重反应监测对)应符合鉴别分析物的偏差范围(与标准溶液相对丰度或其平均数比较):

与基峰的相对强度(%)	许可偏差%
> 50%	±20%
> 20 至 50%	±25%
> 10 至 20%	±30%

≤ 10%	±50%
-------	------

5.2. 校准曲线

5.2.1. 为每款标准溶液绘画峰面积与浓度(高效液相色谱二极管数组检测器：微克 / 毫升；高效液相色谱串联质谱仪：奈克 / 毫升)的图表，从校准曲线得出斜率、截距与相关系数(r)。

5.2.2. 按下列方程式计算每一校准水平的偏差：

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

C = 从校准曲线得出的标准溶液浓度(高效液相色谱二极管数组检测器：微克 / 毫升；高效液相色谱串联质谱仪：奈克 / 毫升)；以及

C_{theo} = 校准标准的理论浓度(高效液相色谱二极管数组检测器：微克 / 毫升；高效液相色谱串联质谱仪：奈克 / 毫升)

C 值应按下列算式计算：

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

A = 标准溶液的峰面积；

Y = 校准曲线截距；以及

M = 校准曲线斜率

5.3. 按下列方程式计算样本中分析物成分：

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度(高效液相色谱二极管数组检测器：微克 / 毫升；高效液相色谱串联质谱仪：奈克 / 毫升)；

V = 最终体积(毫升)；

D = 稀释因子；以及

W = 样本重量(克)

5.4. 按下列方程式计算一组重复样本平均数的平均偏差：

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

D1 = 样本 1 的值；以及

D2 = 样本 2 的值

6. 参考数据

- 6.1. 国家药典委员会：《中华人民共和国药典》2015 年版一部，中国医药科技出版社。
- 6.2. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Eurachem / CITAC Guide CG4, 3rd Edition, 2012.