



GCMTI RD-4:2021

# 利用高效液相色譜串聯質譜儀鑒別 枇杷膏的熊果酸

政府中藥檢測中心方法



## 利用高效液相色譜串聯質譜儀鑒別枇杷膏的熊果酸

**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. 本方法載列鑒別枇杷膏樣本內的熊果酸所涉的步驟。

1.3. 利用高效液相色譜串聯質譜儀就有關化學指標成分進行定性測定。

### 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. 個別標準儲備溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出約 2 毫克熊果酸，放進 2 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. 標準中間溶液 I (每毫升~10 微克)

把 100 微升個別標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度標記，則可配製標準中間溶液 I。

## 2.3 標準中間溶液 II (每毫升~50 奈克)

把 50 微升標準中間溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度標記，則可配製標準中間溶液 II。

## 2.4. 標準工作溶液(每毫升~1 奈克)

把 200 微升標準中間溶液 II 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑，則可配製每毫升~1 奈克的標準工作溶液。

## 2.5. 個別標準儲備 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

準確地稱出約 2 毫克另一來源的熊果酸，放進 2 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。

## 2.6. 標準中間 ICV 溶液 I (每毫升~10 微克)

把 100 微升個別標準儲備 ICV 溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度標記，則可配製標準中間 ICV 溶液 I。

## 2.7. 標準中間 ICV 溶液 II (每毫升~50 奈克)

把 50 微升標準中間 ICV 溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度標記，則可配製標準中間 ICV 溶液 II。

## 2.8. 標準工作 ICV 溶液(每毫升~1 奈克)

把 200 微升標準中間 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。

## 2.9. 加標標準溶液(每毫升~50 奈克)

使用標準中間 ICV 溶液 II 作為加標標準溶液。

2.10. 檢測限校準標準溶液：

每毫升 1 奈克或每克 10 奈克

2.11. 甲醇，色譜質譜純

2.12. 乙醇，純乙醇

2.13. 乙酸銨，分析純

2.14. 緩衝溶液，乙酸銨(~10 毫摩爾)

準確地稱出約 770.8 毫克乙酸銨，放進 1 升的容量瓶，加入 Milli-Q 超純水至刻度標記。

2.15. Milli-Q 超純水

2.16. 稀釋溶劑

乙醇：緩衝溶液(1:1)

2.17. 提取溶劑

乙醇：甲醇(1:1)

### 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. 2 毫升、10 毫升和 1000 毫升容量瓶

3.2. 300 微升、1000 微升和 5000 微升的自動移液器

3.3. 15 毫升的離心管

3.4. 水浴鍋，60°C 熱水

3.5. 渦旋振蕩器

- 3.6. 分析天秤，感量為 0.1 毫克
- 3.7. 超聲波清洗器
- 3.8. 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜

## 4. 步驟

### 4.1. 配製樣本

- 4.1.1. 準確地稱出約 1.0 克枇杷膏樣本，把樣本放進 15 毫升的離心管。
- 4.1.2. 把 1 毫升提取溶劑加進離心管，置樣本於 60°C 熱水浴中 1 分鐘。
- 4.1.3. 渦旋振蕩離心管 5 分鐘混勻樣本。
- 4.1.4. 把 4 毫升乙醇加進離心管，並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，再存放在 -20°C 冰箱中 10 分鐘。
- 4.1.5. 樣本以每分鐘 4000 轉的轉速離心 15 分鐘，所得的上清液以 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾。
- 4.1.6. 把樣本溶液和緩衝溶液各 500 微升轉移至 2 毫升樣本瓶，混勻後使用高效液相色譜串聯質譜儀進行分析。如有需要，可適當稀釋。

### 4.2. 配製方法空白樣本

按第 4.1 段載列的步驟配製方法空白樣本，其間不加入枇杷膏樣本。

### 4.3. 配製加標樣本

- 4.3.1. 按第 4.1.1 至 4.1.3 段載列的步驟配製加標樣本。
- 4.3.2. 把 200 微升加標標準溶液和 3.8 毫升乙醇加進離心管(如認為適當，可加入任何分量的標準品)，並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，再存放在 -20°C 冰箱中

10 分鐘。

4.3.3. 按第 4.1.5 至 4.1.6 段載列的步驟繼續配製加標樣本。

#### 4.4. 高效液相色譜質譜聯用法

4.4.1. 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。

4.4.2. 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	： Waters Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> ， 2.1 x 100 毫米，1.7 微米			
保護柱	： Waters Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> ， 2.1 x 5 毫米，1.7 微米			
柱溫度	： 25°C			
流速	： 0.4 毫升／分鐘			
進樣量	： 40 微升			
流動相	： A：10 毫摩爾乙酸銨 B：乙腈			
等度	： 時間(分鐘)	A %	B %	流速
	0.0	40	60	0.4
	15.0	40	60	0.4

4.4.3. 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
CEM	： 2000

## 4.4.4. 分析熊果酸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
熊果酸	455.4 → 407.4	定量 多重反應 監測對	1000	-200	-10	-55	-10
	455.4 → 391.4	定性 多重反應 監測對	1000	-200	-10	-59	-21

4.4.5. 重複注入檢測限校準標準溶液(~1 奈克/毫升)3 次，記錄檢測峰保留時間和信號反應。

4.4.6. 按第 5.2.1 段載列的方程式計算分析物的檢測峰平均保留時間和信號反應。

4.4.7. 分別注入方法空白樣本、標準工作 ICV 溶液、樣本溶液、重複樣本和加標樣本。

4.4.8. 記錄檢測峰的保留時間和信號反應。

4.4.9. 比較樣本檢測峰的信號反應與檢測限校準標準溶液所含分析物的平均信號反應。

## 5. 計算/結果分析

### 5.1. 鑒別要求

5.1.1. 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. 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. 計算檢測峰的平均保留時間和信號反應

- 5.2.1. 按下列方程式計算檢測限校準標準溶液所含分析物的選定離子或離子對的基峰平均保留時間和信號反應：

$$\text{平均保留時間或信號反應} = \frac{\ln j_1 + \ln j_2 + \ln j_3}{3}$$

$\ln j_1, \ln j_2, \ln j_3$  = 第一、二、三次注入檢測限校準標準溶液後相應選定離子或離子對的基峰保留時間或信號反應

- 5.2.2. 按下列方程式計算檢測峰保留時間和信號反應的相對標準偏差%：

$$\text{相對標準偏差\%} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

$s$  = 3 次注入檢測限校準標準溶液的檢測峰保留時間或信號反應的標準偏差

$\bar{x}$  = 3 次注入檢測限校準標準溶液的檢測峰平均保留時間或信號反應

## 5.3. 結果分析

- 5.3.1. 如樣本所含分析物的信號反應等於或超過檢測限校準標準溶液所含分析物的平均信號反應的 70%，即顯示樣本對該分析物呈“陽性反應”。

## 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。