



GCMTI RD-4:2021

# 利用高效液相色谱串联质谱仪鉴别 枇杷膏的熊果酸

政府中藥檢測中心方法



## 利用高效液相色谱串联质谱仪鉴别枇杷膏的熊果酸

**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. 本方法载列鉴别枇杷膏样本内的熊果酸所涉的步骤。

1.3. 利用高效液相色谱串联质谱仪就有关化学指针成分进行定性测定。

### 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. 个别标准储备溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出约 2 毫克熊果酸，放进 2 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. 标准中间溶液 I (每毫升~10 微克)

把 100 微升个别标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度标记，则可配制标准中间溶液 I。

## 2.3 标准中间溶液 II (每毫升~50 奈克)

把 50 微升标准中间溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度标记，则可配制标准中间溶液 II。

## 2.4. 标准工作溶液(每毫升~1 奈克)

把 200 微升标准中间溶液 II 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂，则可配制每毫升~1 奈克的标准工作溶液。

## 2.5. 个别标准储备 ICV 溶液(每毫升~1000 微克)

准确地称出约 2 毫克另一来源的熊果酸，放进 2 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。

## 2.6. 标准中间 ICV 溶液 I (每毫升~10 微克)

把 100 微升个别标准储备 ICV 溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度标记，则可配制标准中间 ICV 溶液 I。

## 2.7. 标准中间 ICV 溶液 II (每毫升~50 奈克)

把 50 微升标准中间 ICV 溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入乙醇至刻度标记，则可配制标准中间 ICV 溶液 II。

## 2.8. 标准工作 ICV 溶液(每毫升~1 奈克)

把 200 微升标准中间 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。

## 2.9. 加标标准溶液(每毫升~50 奈克)

使用标准中间 ICV 溶液 II 作为加标标准溶液。

2.10. 检测限校准标准溶液：

每毫升 1 奈克或每克 10 奈克

2.11. 甲醇，色谱质谱纯

2.12. 乙醇，纯乙醇

2.13. 乙酸铵，分析纯

2.14. 缓冲溶液，乙酸铵(~10 毫摩尔)

准确地称出约 770.8 毫克乙酸铵，放进 1 升的容量瓶，加入 Milli-Q 超纯水至刻度标记。

2.15. Milli-Q 超纯水

2.16. 稀释溶剂

乙醇：缓冲溶液(1:1)

2.17. 提取溶剂

乙醇：甲醇(1:1)

### 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. 2 毫升、10 毫升和 1000 毫升容量瓶

3.2. 300 微升、1000 微升和 5000 微升的自动移液器

3.3. 15 毫升的离心管

3.4. 水浴锅，60°C 热水

3.5. 涡旋振荡器

3.6. 分析天秤，感量为 0.1 毫克

3.7. 超声波清洗器

3.8. 0.2 微米聚四氟乙烯过滤薄膜

## 4. 步骤

### 4.1. 配制样本

4.1.1. 准确地称出约 1.0 克枇杷膏样本，把样本放进 15 毫升的离心管。

4.1.2. 把 1 毫升提取溶剂加进离心管，置样本于 60°C 热水浴中 1 分钟。

4.1.3. 涡旋振荡离心管 5 分钟混匀样本。

4.1.4. 把 4 毫升乙醇加进离心管，并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，再存放在 -20°C 冰箱中 10 分钟。

4.1.5. 样本以每分钟 4000 转的转速离心 15 分钟，所得的上清液以 0.2 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤。

4.1.6. 把样本溶液和缓冲溶液各 500 微升转移至 2 毫升样本瓶，混匀后使用高效液相色谱串联质谱仪进行分析。如有需要，可适当稀释。

### 4.2. 配制方法空白样本

按第 4.1 段载列的步骤配制方法空白样本，其间不加入枇杷膏样本。

### 4.3. 配制加标样本

4.3.1. 按第 4.1.1 至 4.1.3 段载列的步骤配制加标样本。

4.3.2. 把 200 微升加标标准溶液和 3.8 毫升乙醇加进离心管(如认为适当，可加入任何分量的标准品)，并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，再存放在 -20°C 冰箱中

10 分钟。

4.3.3. 按第 4.1.5 至 4.1.6 段载列的步骤继续配制加标样本。

#### 4.4. 高效液相色谱质谱联用法

4.4.1. 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。

4.4.2. 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：Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>，  
2.1 x 100 毫米，1.7 微米

保护柱：Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>，  
2.1 x 5 毫米，1.7 微米

柱温度：25°C

流速：0.4 毫升 / 分钟

进样量：40 微升

流动相：A: 10 毫摩尔乙酸铵  
B: 乙腈

等度	时间(分钟)	A %	B %	流速
	0.0	40	60	0.4
	15.0	40	60	0.4

4.4.3. 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

CEM：2000

## 4.4.4. 分析熊果酸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
熊果酸	455.4 → 407.4	定量 多重反应 监测对	1000	-200	-10	-55	-10
	455.4 → 391.4	定性 多重反应 监测对	1000	-200	-10	-59	-21

4.4.5. 重复注入检测限校准标准溶液(~1 奈克 / 毫升)3 次, 记录检测峰保留时间和信号反应。

4.4.6. 按第 5.2.1 段载列的方程式计算分析物的检测峰平均保留时间和信号反应。

4.4.7. 分别注入方法空白样本、标准工作 ICV 溶液、样本溶液、重复样本和加标样本。

4.4.8. 记录检测峰的保留时间和信号反应。

4.4.9. 比较样本检测峰的信号反应与检测限校准标准溶液所含分析物的平均信号反应。

## 5. 计算 / 结果分析

### 5.1. 鉴别要求

5.1.1. 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. 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. 计算检测峰的平均保留时间和信号反应

- 5.2.1. 按下列方程式计算检测限校准标准溶液所含分析物的选定离子或离子对的基峰平均保留时间和信号反应:

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

$\ln j_1, \ln j_2, \ln j_3$  = 第一、二、三次注入检测限校准标准溶液后相应选定离子或离子对的基峰保留时间或信号反应

- 5.2.2. 按下列方程式计算检测峰保留时间和信号反应的相对标准偏差%:

$$\text{相对标准偏差\%} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

$s$  = 3 次注入检测限校准标准溶液的检测峰保留时间或信号反应的标准偏差

$\bar{x}$  = 3 次注入检测限校准标准溶液的检测峰平均保留时间或信号反应

## 5.3. 结果分析

- 5.3.1. 如样本所含分析物的信号反应等于或超过检测限校准标准溶液所含分析物的平均信号反应的 70%，即显示样本对该分析物呈“阳性反应”。

## 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。