



GCMTI RD-4:2023

利用液相色谱串联质谱仪
检测白凤丸的地黄苷 D 含量

政府中藥檢測中心方法



利用液相色谱串联质谱仪检测白凤丸的地黄苷 D 含量¹

安全预防措施：本文中步骤涉及致癌化学品、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. 白凤丸是中国内地和香港普遍使用的中成药，常用于治疗血虚引起的各种疾病或妇科紊乱病。古代中药文献和《中华人民共和国药典》(《中国药典》)记录了白凤丸处方的主要成分。然而，香港市面上有不少白凤丸产品配方经修改，成分不尽相同。其中，人参、当归、川芎、香附、白芍、地黄、黄芪、丹参和甘草等中药材常见于不同品牌的白凤丸产品。对应的化学指标成分如下：

中药材	常见化学指标成分
人参(Ginseng Radix Et Rhizoma)	人参皂苷
当归(Angelicae Sinensis Radix)	Z-藁本内酯
川芎(Chuanxiong Rhizoma)	Z-藁本内酯
香附(Cyperus Rhizoma)	α -香附酮
白芍(Paeoniae Radix Alba)	芍药苷
地黄(Rehmanniae Radix)	地黄苷
黄芪(Astragali Radix)	黄芪皂苷 IV
丹参(Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma)	丹参酮和丹酚酸 B
甘草(Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma)	甘草苷

1.2. 本方法载列利用液相色谱串联质谱仪就白凤丸样本内的地黄苷 D 含量进行定性及 / 或定量检测时所涉及的步骤。

¹ 本方法旨在提供一种可靠的测试方法，在检测相关中成药中目标化学指标成分的含量时作质量控制之用。检测人员采用本方法时，有责任评估方法是否适用于拟测试的产品。

2. 试剂

注：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. 甲醇，LC-MS 级

2.2. Milli-Q 超纯水

2.3. 甲酸，LC-MS 级

2.4. 地黄苷 D，CAS 编号：81720-08-3

2.5. 0.1%甲酸缓冲溶液

把 1 毫升甲酸用 Milli-Q 超纯水(第 2.2.段)稀释至 1 升。

2.6. 提取溶剂

甲醇：水(1:1 v/v)

2.7. 标准溶液的配制

2.7.1. 标准储备溶液 (浓度约为每毫升 1000 微克)

精密称取 10 毫克地黄苷 D 置于 10 毫升的容量瓶，加入甲醇溶解并稀释至刻度标记，则可配制标准储备溶液。

2.7.2. 标准中间溶液 I (浓度约为每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制标准中间溶液 I。

2.7.3. 标准中间溶液 II (浓度约为每毫升 1000 奈克)

把 1 毫升标准中间溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制标准中间溶液 II。

2.7.4. 校准标准溶液 (校准标准品 CS1 至 CS5)

把适量标准中间溶液 II 分别转移至若干 10 毫升的容量瓶，加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制一系列校准标准溶液。配制校准标准溶液所须的标准溶液建议分量表列如下：

校准标准品	标准中间溶液 II 体积(毫升)	最终体积(毫升)	地黄苷 D 浓度(奈克/毫升)
CS1	0.25	10	25
CS2	0.50	10	50
CS3	1.00	10	100
CS4	1.50	10	150
CS5	2.00	10	200

2.7.5. 初始校正验证(ICV)标准储备溶液 (浓度约为每毫升 1000 微克)

精密称取 10 毫克来源与校准标准品不同的地黄苷 D 置于 10 毫升的容量瓶, 加入甲醇溶解并稀释至刻度标记, 则可配制 ICV 标准储备溶液。

2.7.6. ICV 标准中间溶液 I (浓度约为每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升 ICV 标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶, 加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记, 则可配 ICV 制标准中间溶液 I。

2.7.7. ICV 标准中间溶液 II (浓度约为每毫升 1000 奈克)

把 1 毫升 ICV 标准中间溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶, 加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记, 则可配制 ICV 标准中间溶液 II。

2.7.8. ICV 标准工作溶液 (浓度约为每毫升 100 奈克)

把 1 毫升 ICV 标准中间溶液 II 转移至 10 毫升的容量瓶, 加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记, 则可配制 ICV 标准工作溶液。

2.7.9. 加标标准溶液 (浓度约为每毫升 1000 微克)

参考标准储备溶液(第 2.7.1.段)。

3. 器具

注: 所有玻璃量器用后均须尽快以丙酮及清洁剂清洗。用清洁剂清洗后, 玻璃量器随即分别以丙酮及水冲洗, 之后再以丙酮冲洗两次。

3.1. 研磨机或搅拌机

3.2. 分析天秤, 感量为 0.01 毫克

- 3.3. 10 毫升和 25 毫升的容量瓶
- 3.4. 100 微升、300 微升和 1000 微升的自动移液器
- 3.5. 离心机，转速至少为 4000 转 / 分钟
- 3.6. 15 毫升的离心管
- 3.7. 漩涡振荡器
- 3.8. 超声波清洗器
- 3.9. 0.2 微米聚四氟乙烯过滤薄膜
- 3.10. 液相色谱玻璃样本瓶
- 3.11. 液相色谱柱：Inertsil C18，5 微米，2.1 毫米×250 毫米，生产商为 GL Sciences，或具同等规格
- 3.12. 液相色谱串联质谱仪系统

4. 步骤

- 4.1. 配制样本
 - 4.1.1. 分析前使用研磨机或搅拌机把固体样本进行研磨末及均质化处理。
 - 4.1.2. 精密称取 0.25 克白凤丸样本放进 15 毫升的离心管。
 - 4.1.3. 把 10 毫升提取溶剂(第 2.6.段)注入离心管，然后将离心管涡旋振荡 1 分钟。
 - 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 分钟音波振动处理。
 - 4.1.5. 以 4000 转 / 分钟的转速对样本溶液进行 10 分钟的离心处理并将上清液转移至 25 毫升容量瓶中。
 - 4.1.6. 以 5 毫升提取溶剂(第 2.6.段)进行两次第 4.1.3.段至第 4.1.5.段所述的步骤。以同一个 25 毫升的容量瓶收集所有上清液，然后加入提取溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记。用提取溶剂(第 2.6.段)稀释样本溶液 20 倍。
 - 4.1.7. 以 0.2 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤已稀释的样本溶液至液相色谱玻璃样本瓶中，便可用液相色谱串联质谱仪进行分析。

注：如果分析物的浓度不在校准范围内，请用提取溶剂(第 2.6.段)进一步稀释样本溶液。

4.2. 液相色谱串联质谱仪分析

4.2.1. 液相色谱串联质谱仪系统应按使用手册操作，并在下列的建议条件下进行分析。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报表上。

4.2.2. 建议的液相色谱条件：

液相色谱系统	: Thermo Scientific UltiMate 3000 液相色谱系统或具同等效能的系统		
液相色谱柱	: GL Sciences Inertsil C18, 5 微米, 2.1 毫米×250 毫米或具同等规格		
柱温度	: 30°C		
流速	: 0.3 毫升/分钟		
进样量	: 5 微升		
流动相	A: 0.1% 甲酸缓冲溶液(第 2.5.段) B: 甲醇		
梯度	: 时间(分钟)	A %	B %
	0.0	95	5
	5.0	95	5
	6.0	70	30
	10.0	70	30
	10.1	5	95
	15.0	5	95
	15.1	95	5
	20.0	95	5

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
离子源模式	: 电喷雾负离子模式
离子喷雾电压	: -4500 伏特
离子源温度	: 500°C
雾化气(GS1)	: 40
辅助加热气(GS2)	: 60
气帘气(CUR)	: 20
碰撞气	: 9
扫描模式	: 多重反应监测(MRM)扫描模式

4.2.4. 多重反应监测对建议条件：

分析物	多重反应监测对	停留时间(毫秒)	DP	EP	CE	CXP
地黄苷 D	685.2→263.1*	100	-130	-10	-28	-15
	685.2→179.0^	100	-130	-10	-34	-11

注：定量及定性的多重反应监测对分别以*和^为标记。

4.2.5. 使用至少 5 个校准标准品(第 2.7.4.段)校准液相色谱串联质谱仪系统。

4.2.6. 使用液相色谱串联质谱仪系统对空白对照样本、样本溶液、重复样本、加标样本和相关检查标准溶液进行分析。使用者可根据实验室既定的要求作质量控制。

5. 计算 / 结果分析

5.1. 鉴别要求

5.1.1. 进行液相色谱串联质谱仪分析时,应比较样本检测峰保留时间和校准标准品的平均保留时间,以鉴别样本中的目标分析物。样本检测峰保留时间不应与校准标准品的平均保留时间相差多于 5%。

5.1.2. 多重反应监测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. 在线性校准模式下就分析物绘画峰面积与浓度的图表,从而得出校准曲线。

5.3. 按下列方程式计算样本中分析物的浓度(微克 / 克):

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度 (奈克 / 毫升);

V = 最终体积(毫升);

D = 稀释比; 以及

W = 样本重量(克)

5.4. 如果发现加标回收率有显著偏差并怀疑受基质效应影响,为尽量减轻基质效应干扰,可(1)进一步稀释样本溶液或(2)使用标准添加法进行量化。

6. 参考资料

- 6.1. 国家药典委员会：《中华人民共和国药典》2020年版第一部，中国医药科技出版社。
- 6.2. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Eurachem / CITAC Guide CG4, 3rd Edition, 2012.
- 6.3. V. J. Barwick and S. L. R. Ellison, “VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for Uncertainty Evaluation from Validation data”, LGC/VAM/1998/088 Version 5.1, January 2000.