



GCMTI RD-5:2023

利用液相色譜串聯質譜儀
檢測白鳳丸的黃芪皂苷 IV 含量

政府中藥檢測中心方法



利用液相色譜串聯質譜儀檢測白鳳丸的黃芪皂苷 IV 含量¹

安全預防措施：本文中步驟涉及致癌化學品、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. 白鳳丸是中國內地和香港普遍使用的中成藥，常用於治療血虛引起的各種疾病或婦科紊亂病。古代中藥文獻和《中華人民共和國藥典》(《中國藥典》)記錄了白鳳丸處方的主要成分。然而，香港市面上有不少白鳳丸產品配方經修改，成分不盡相同。其中，人參、當歸、川芎、香附、白芍、地黃、黃芪、丹參和甘草等中藥材常見於不同品牌的白鳳丸產品。對應的化學指標成分如下：

中藥材	常見化學指標成分
人參(Ginseng Radix Et Rhizoma)	人參皂苷
當歸(Angelicae Sinensis Radix)	Z-藁本內酯
川芎(Chuanxiong Rhizoma)	Z-藁本內酯
香附(Cyperus Rhizoma)	α -香附酮
白芍(Paeoniae Radix Alba)	芍藥苷
地黃(Rehmanniae Radix)	地黃苷
黃芪(Astragali Radix)	黃芪皂苷 IV
丹參(Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma)	丹參酮和丹酚酸 B
甘草(Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma)	甘草苷

1.2. 本方法載列利用液相色譜串聯質譜儀就白鳳丸樣本內的黃芪皂苷 IV 含量進行定性及／或定量檢測時所涉及的步驟。

¹ 本方法旨在提供一種可靠的測試方法，在檢測相關中成藥中目標化學指標成分的含量時作質量控制之用。檢測人員採用本方法時，有責任評估方法是否適用於擬測試的產品。

2. 試劑

註：除非另有說明，否則所有使用的試劑均屬分析純級別或同等級的試劑。

2.1. 甲醇，LC-MS 級

2.2. 乙腈，LC-MS 級

2.3. Milli-Q 超純水

2.4. 氨水，28%

2.5. 甲酸，LC-MS 級

2.6. 甲酸銨

2.7. 黃芪皂苷 IV，CAS 編號：84687-43-4

2.8. 甲酸銨溶液，5M

把 63.1 克甲酸銨溶解在 200 毫升 Milli-Q 超純水(第 2.3.段)中。

2.9. 含 0.1%甲酸的甲酸銨緩衝溶液，10mM

把 2 毫升 5M 甲酸銨溶液(第 2.8.段)與 1 毫升甲酸(第 2.5.段)混合，用 Milli-Q 超純水(第 2.3.段)稀釋至 1 升。

2.10. 稀釋溶劑

甲醇：水(8:2 v/v)

2.11. 提取溶劑

把 40 毫升氨水(第 2.4.段)與 960 毫升稀釋溶液(第 2.10.段)混合來製備提取溶液。

2.12. 標準溶液的配製

2.12.1. 標準儲備溶液 (濃度約為每毫升 1000 微克)

精密稱取 10 毫克黃芪皂苷 IV 置於 10 毫升的容量瓶，加入甲醇(第 2.1.段)溶解並稀釋至刻度標記，則可配製標準儲備溶液。

2.12.2. 標準中間溶液 I (濃度約為每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製標準中間溶液 I。

2.12.3. 標準中間溶液 II (濃度約為每毫升 200 奈克)

把 0.2 毫升標準中間溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製標準中間溶液 II。

2.12.4. 校準標準溶液 (校準標準品 CS1 至 CS5)

把適量標準中間溶液 II 分別轉移至若干 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製一系列校準標準溶液。配製校準標準溶液所須的標準溶液建議分量表列如下：

校準標準品	標準中間溶液 II 體積(毫升)	最終體積(毫升)	黃芪皂苷 IV 濃度(奈克/毫升)
CS1	0.1	10	2
CS2	0.2	10	4
CS3	0.4	10	8
CS4	0.8	10	16
CS5	1.0	10	20

2.12.5. 初始校正驗證(ICV)標準儲備溶液 (濃度約為每毫升 1000 微克)

精密稱取 10 毫克來源與校準標準品不同的黃芪皂苷 IV 置於 10 毫升的容量瓶，加入甲醇(第 2.1.段)溶解並稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準儲備溶液。

2.12.6. ICV 標準中間溶液 I (濃度約為每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升 ICV 標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準中間溶液 I。

2.12.7. ICV 標準中間溶液 II (濃度約為每毫升 200 奈克)

把 0.2 毫升 ICV 標準中間溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準中間溶液 II。

2.12.8. ICV 標準工作溶液 (濃度約為每毫升 10 奈克)

把 0.5 毫升 ICV 標準中間溶液 II 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準工作溶液。

2.12.9. 加標標準溶液 (濃度約為每毫升 1000 微克)

參考標準儲備溶液(第 2.12.1.段)。

3. 器具

註: 所有玻璃量器用後均須儘快以丙酮及清潔劑清洗。用清潔劑清洗後，玻璃量器隨即分別以丙酮及水沖洗，之後再以丙酮沖洗兩次。

- 3.1. 研磨機或攪拌機
- 3.2. 分析天秤，感量為 0.01 毫克
- 3.3. 10 毫升的容量瓶
- 3.4. 100 微升、300 微升和 1000 微升的自動移液器
- 3.5. 50 毫升的平底燒瓶
- 3.6. 玻璃塞
- 3.7. 25 毫升的玻璃移液器
- 3.8. 加熱爐
- 3.9. 回流冷凝管
- 3.10. 冷水機，能夠維持水流低於 15°C
- 3.11. 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜
- 3.12. 液相色譜玻璃樣本瓶
- 3.13. 液相色譜柱：Acquity UPLC® BEH，C18，1.7 微米，2.1 毫米×100 毫米，生產商為 Waters，或具同等規格
- 3.14. 液相色譜串聯質譜儀系統

4. 步驟

- 4.1. 配製樣本
 - 4.1.1. 分析前使用研磨機或攪拌機把固體樣本進行研磨及均質化處理。
 - 4.1.2. 精密稱取 0.25 克白鳳丸樣本放進 50 毫升的平底燒瓶。
 - 4.1.3. 用玻璃移液器把 25 毫升提取溶劑(第 2.11.段)轉移至平底燒瓶並加入磁力攪拌子。蓋上玻璃塞以防溶劑揮發。稱量並記錄整個燒瓶裝置的重量。

- 4.1.4. 將回流冷凝管連接到冷水機並啟動水流，保持水溫在 15°C 以下。
- 4.1.5. 將燒瓶裝置連接到回流冷凝管，進行 60±5 分鐘加熱回流處理。
- 4.1.6. 待裝置冷卻至環境溫度後，將燒瓶裝置從冷凝管上拆下並蓋上玻璃塞。
- 4.1.7. 用提取溶液(第 2.11.段)為整個燒瓶裝置(第 4.1.6.段)補足減失的重量(如第 4.1.3.段中稱量所得)，精確到 0.01 克。
- 4.1.8. 以 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾樣本溶液，用稀釋溶劑(第 2.10.段)稀釋已稀釋的樣本溶液 20 倍。
- 4.1.9. 使用液相色譜串聯質譜儀對稀釋樣本溶液進行分析。

註：如果分析物的濃度不在校準範圍內，請用稀釋溶劑(第 2.10.段)進一步稀釋樣本溶液。

4.2. 液相色譜串聯質譜儀分析

- 4.2.1. 液相色譜串聯質譜儀系統應按使用手冊操作，並在下列的建議條件下進行分析。如要取得最佳的分離結果和輸出信號，實際操作條件或須修訂。實際的實驗條件須記錄在報表上。

4.2.2. 建議的液相色譜條件：

液相色譜系統 : Thermo Scientific UltiMate 3000 液相色譜系統或具同等效能的系統

液相色譜柱 : Acquity UPLC® BEH, C18 ,
1.7 微米，2.1 毫米×100 毫米或具同等規

柱溫度 : 30°C

流速 : 0.25 毫升/分鐘

進樣量 : 10 微升

流動相 : A: 甲酸銨緩衝溶液(第 2.9.段)
B: 乙腈

梯度	時間(分鐘)	A %	B %
	0.0	80	20
	2.0	80	20
	17.0	50	50
	18.0	5	95
	19.0	5	95
	19.5	80	20

21.0

80

20

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
離子源模式	電噴霧正離子模式
離子噴霧電壓	5500 伏特
離子源溫度	300°C
霧化氣(GS1)	30
輔助加熱氣(GS2)	30
氣簾氣(CUR)	20
碰撞氣	中度
掃描模式	多重反應監測(MRM)掃描模式

4.2.4. 多重反應監測對建議條件：

分析物	多重反應 監測對	駐留時間 (毫秒)	DP	EP	CE	CXP
黃芪皂苷 IV	785.4 → 143.1*	100	41	10	17	18
	785.4 → 455.3^	100	41	10	19	18

註：定量及定性的多重反應監測對分別以*和^為標記。

4.2.5. 使用至少 5 個校準標準品(第 2.12.4.段)校準液相色譜串聯質譜儀系統。

4.2.6. 使用液相色譜串聯質譜儀系統對空白對照樣本、樣本溶液、重複樣本、加標樣本和相關檢查標準溶液進行分析。使用者可根據實驗室既定的要求作質量控制。

5. 計算／結果分析

5.1. 鑒別要求

5.1.1. 進行液相色譜串聯質譜儀分析時，應比較樣本檢測峰保留時間和校準標準品的平均保留時間，以鑒別樣本中的目標分析物。樣本檢測峰保留時間不應與校準標準品的平均保留時間相差多於 5%。

5.1.2. 多重反應監測對的相對豐度應符合鑒別分析物的偏差範圍(與校準標準品的平均相對豐度比較)：

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

- 5.2. 在線性校準模式下就分析物繪畫峰面積與濃度的圖表，從而得出校準曲線。
- 5.3. 按下列方程式計算樣本中分析物的濃度(微克／克)：

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

- C = 從校準曲線得出的分析物濃度 (奈克／毫升)；
V = 最終體積(毫升)；
D = 稀釋比；以及
W = 樣本重量(克)

- 5.4. 如果發現加標回收率有顯著偏差並懷疑受基質效應影響，為盡量減輕基質效應干擾，可(1)進一步稀釋樣本溶液或(2)使用標準添加法進行量化。

6. 參考資料

- 6.1. 國家藥典委員會：《中華人民共和國藥典》2020年版第一部，中國醫藥科技出版社。
- 6.2. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Eurachem / CITAC Guide CG4, 3rd Edition, 2012.
- 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.