



GCMTI RD-1:2021

利用高效液相色谱串联质谱仪检测枇杷膏的
桔梗皂苷D、苦杏仁苷和贝母辛含量

政府中药检测中心方法



利用高效液相色谱串联质谱仪检测枇杷膏的 桔梗皂苷 D、苦杏仁苷和贝母辛含量

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、甘草等中药材煎煮，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

1.2. 本方法载列检测枇杷膏样本内的桔梗皂苷 D、苦杏仁苷和贝母辛所涉的程序。

1.3. 样本以溶剂稀释，利用高效液相色谱质谱联用法进行定性及 / 或定量测定其有关化学指针成分。

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)

把桔梗皂苷 D、苦杏仁苷和贝母辛各 5 毫克分别放进 3 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. 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 微升转移至一个 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂 (第 2.15 段)至刻度标记，则可配制混合标准中间溶液 I。

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(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制混合标准中间溶液 II。

2.4. 混合标准工作溶液(校准标准品 CS1 至 CS5)

把适量混合标准中间溶液 II 或 CS5 标准溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.15 段)，则可配制每毫升~0.5、1、2、5、10 奈克的校准标准溶液。配制校准标准溶液所建议使用的标准溶液体积载于下表：

标准品	混合标准中间溶液 II 体积 (毫升)	CS5 (毫升)	最终体积 (毫升)
CS1	/	0.5	10
CS2		1	10
CS3		2	10
CS4	0.2	/	10
CS5	0.4		10

2.5. 标准储备 ICV 溶液(~每毫升 1000 微克)

把另一来源的桔梗皂苷 D、苦杏仁苷和贝母辛各 5 毫克分别放进 3 个 5 毫升的容量瓶，加入甲醇至刻度标记，并溶解该等物质，则可配制标准储备 ICV 溶液。

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(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制混合标准中间 ICV 溶液 I。

2.7. 混合标准中间 ICV 溶液 II(~每毫升 250 奈克)

把 250 微升混合标准中间溶液 I 转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制混合标准中间 ICV 溶液 II。

2.8. 混合标准 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(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制混合标准 ICV 溶液。

2.9. 加标标准中间溶液

把适量的个别标准储备溶液分别转移至合适的容量瓶(10 毫升或 5 毫升)，加入稀释溶剂(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制加标标准中间溶液。配制加标标准中间溶液所建议的标准溶液体积载于下表。

分析物	个别标准储备 溶液体积(毫升)	最终体积 (毫升)	浓度 (微克 / 毫升)
桔梗皂苷 D	0.1	10	10
苦杏仁苷	0.25	5	50
贝母辛	0.1	10	10

2.10. 加标标准溶液

把适量的加标标准中间溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.15 段)至刻度标记，则可配制加标标准溶液。配制加标标准溶液所建议的标准溶液体积载于下表。

分析物	加标标准中间 溶液体积(毫升)	最终体积 (毫升)	浓度 (奈克 / 毫升)
桔梗皂苷 D	0.25	10	250
苦杏仁苷	0.5		2500
贝母辛	0.2		200

2.11. 乙腈, 色谱质谱纯.

2.12. 甲醇, 色谱质谱纯.

2.13. Milli-Q 超纯水

2.14. 甲酸, 分析纯.

2.15. 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纯乙醇冲洗，并以清洁剂清洗，随即分别以丙酮及水冲洗，然后再以丙酮及二氯甲烷各冲洗一次。

3.1. 5 毫升和 10 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. 分析天秤, 感量为 0.01 毫克

- 3.4. 超声波清洗器.
- 3.5. 15 毫升的离心管
- 3.6. 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜

4. 程序

4.1. 配制样本

- 4.1.1. 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。
- 4.1.2. 用吸管把 10 毫升稀释溶剂(第 2.15 段)转移至离心管。
- 4.1.3. 把装有混合样本的离心管放在超声波清洗器中进行 10 分钟音波振动处理。
- 4.1.4. 在进行高效液相色谱串联质谱仪分析之前，样本溶液先以 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。
- 4.1.5. 分析桔梗皂苷 D 及贝母辛的建议稀释比为 5 倍。
- 4.1.6. 分析苦杏仁苷的建议稀释比为 50 倍。

4.2. 高效液相色谱串联质谱仪分析

- 4.2.1 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。如要取得最佳的分离结果和输出信号，实际操作条件或须修订。
- 4.2.2. 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			
自动进样器温度	: 20 °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 %	流量
	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. 建议质谱仪的条件:

串联质谱仪系统	AB SCIEX 6500+ 系统
离子化模式	: 电喷雾正离子和负离子电喷雾离子化模式
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
离子喷雾电压	-4500 伏特 (负离子模式)及 5500 伏特(正离子模式)

4.2.4. 分析桔梗皂苷 D、苦杏仁苷和贝母辛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
桔梗皂苷 D	1223.6 → 469.2	定量多重反应监测对	100	-265	-10	-74	-25
	1223.6 → 681.4	定性多重反应监测对	100	-265	-10	-79	-25
苦杏仁苷	456.2 → 323.1	定量多重反应监测对	100	-100	-10	-18	-11
	456.2 → 179.1	定性多重反应监测对	100	-100	-10	-22	-11
贝母辛	428.3 → 114.1	定量多重反应监测对	100	110	10	39	15
	428.3 → 410.3	定性多重反应监测对	100	110	10	39	15

5. 计算 / 结果分析

5.1. 鉴别要求

5.1.1. 比较样本与标准溶液的检测峰保留时间，可鉴别样本中的目标组分。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) 准确测量质量仪器: 最少一对特征碎片离子。

5.1.3. 多重反应监测对 / 特征碎片离子的相对丰度应符合正确鉴定指标的偏差范围(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 to 50%	±25%
> 10 to 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的图表，从校准曲线得出斜率、截距与相关系数的平方。

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(奈克 / 毫升)

C_{theo} = 校准标准的理论浓度(奈克 / 毫升)

C 值应按下列算式计算:

$$C(\text{奈克/毫升}) = \frac{A - Y}{M}$$

- A = 标准溶液的峰面积
 Y = 校准曲线截距
 M = 校准曲线斜率

5.3. 按下列方程式计算样本中指目标成分：

$$\text{指標成分(微克/克)} = \frac{C \times V / 1000 \times D}{W}$$

- C = 从校准曲线得出的指针浓度(奈克 / 毫升)
 V = 最后体积(毫升)
 D = 稀释因子
 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：

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

- D1 = 样本 1 的值
 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.