



GCMTI RD-5:2022

利用液相色譜串聯質譜儀

檢測白鳳丸的人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)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人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)含量¹

安全預防措施：本文中的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，如戴上護眼及護手裝備，如有需要可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，常用於治療因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(Cyper 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人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)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. 人參皂苷 Re，CAS 編號：52286-59-6

2.5. 人參皂苷 Rg1，CAS 編號：22427-39-0

2.6. 人參皂苷 Rf，CAS 編號：2005-06-24

2.7. 人參皂苷 Rb1，CAS 編號：41753-43-9

2.8. 提取溶劑

甲醇：水(1:1 v/v)

2.9. 配製標準溶液

2.9.1. 個別標準儲備溶液 (濃度約為每毫升 1000 微克)

精密稱取 10 毫克人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)分別置於個別的 10 毫升容量瓶，加入乙腈：水(1:1 v/v) 溶解並稀釋至刻度標記，則可配製個別標準儲備溶液。

2.9.2. 混合標準中間溶液 I (濃度約為每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升個別標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.段)稀釋至刻度標記，則可配製混合標準中間溶液 I。

2.9.3. 混合標準中間溶液 II (濃度約為每毫升 200 奈克)

把 0.2 毫升混合標準中間溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.段)稀釋至刻度標記，則可配製混合標準中間溶液 II。

2.9.4. 校準標準溶液 (校準標準品 CS1 至 CS6)

把適量混合標準中間溶液 II 分別轉移至若干 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.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：

註：校準曲線應包含至少 5 個校準標準品的數據。使用者可因應分析的工作範圍，選用濃度合適的校準標準品加以配合。

| 校準標準品 | 混合標準中間溶液 II 體積 (毫升) | 最終體積 (毫升) | 人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)濃度 (奈克/毫升) |
|-------|---------------------|-----------|---------------------------------|
| CS1 | 0.25 | 10 | 5 |
| CS2 | 0.50 | 10 | 10 |
| CS3 | 1.00 | 10 | 20 |
| CS4 | 1.50 | 10 | 30 |
| CS5 | 2.00 | 10 | 40 |
| CS6 | 2.50 | 10 | 50 |

- 2.9.5. 個別初始校正驗證(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人參皂苷(Re、Rg1、Rf 和 Rb1)分別置於個別的 10 毫升容量瓶，加入乙腈：水(1:1, v/v) 溶解並稀釋至刻度標記，則可配製個別 ICV 標準儲備溶液。

- 2.9.6. 混合 ICV 標準中間溶液 I (濃度約為每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升個別標準儲備 ICV 溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.段)稀釋至刻度標記，則可配製混合 ICV 標準中間溶液 I。

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

把 0.2 毫升混合標準中間 ICV 溶液 I 轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.段) 稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準中間溶液 II。

- 2.9.8. 混合 ICV 標準工作溶液 (濃度約為每毫升 30 奈克)

把 0.15 毫升混合標準中間 ICV 溶液 II 轉移至 1 毫升的容量瓶，加入提取溶劑(第 2.8.段)稀釋至刻度標記，則可配製混合 ICV 標準工作溶液。

2.9.9. 個別加標標準溶液 (濃度約為每毫升 1000 微克)

參考個別標準儲備溶液(第 2.9.1.段)。

3. 器具

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. 1 毫升、10 毫升和 25 毫升的容量瓶
- 3.4. 100 微升、300 微升和 1000 微升的自動移液器
- 3.5. 離心機，轉速至少為 4000 轉／分鐘
- 3.6. 15 毫升的離心管
- 3.7. 渦旋振蕩器
- 3.8. 超聲波清洗器
- 3.9. 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜
- 3.10. 液相色譜玻璃樣本瓶
- 3.11. 液相色譜柱：Acquity UPLC® BEH, C18 1.7 微米，2.1×100 毫米，生產商為 Waters，或具同等規格
- 3.12. 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對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 15 毫升的離心管。
 - 4.1.3. 把 10 毫升提取溶劑(第 2.8.段)注入離心管，然後將離心管渦旋振蕩 1 分鐘。
 - 4.1.4. 把裝有混合樣本的離心管放入超聲波清洗器中以室溫進行 20 分鐘音波振動處理。

- 4.1.5. 以 4000 轉／分鐘的轉速對樣本溶液進行 10 分鐘的離心處理並將上清液轉移至 25 毫升容量瓶中。
- 4.1.6. 以 5 毫升提取溶劑(第 2.8.段)重複進行兩次第 4.1.3.段至第 4.1.5.段所述的步驟。以同一個 25 毫升的容量瓶收集所有上清液，然後加入提取溶劑(第 2.8.段) 稀釋至刻度標記。用提取溶劑(第 2.8.段)稀釋樣本溶液 20 倍。
- 4.1.7. 以 0.2 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾已稀釋的樣本溶液至液相色譜儀玻璃樣本瓶中，便可用液相色譜串聯質譜儀分析。

註：如果分析物的濃度不在校準範圍內，請用提取溶劑(第 2.8.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 毫米或具同等規格 | | |
| 柱溫度 | ： 40 °C | | |
| 流速 | ： 0.3 毫升／分鐘 | | |
| 進樣量 | ： 5 微升 | | |
| 流動相 | A：水 B：乙腈 | | |
| 梯度 | ： 時間(分鐘) | A % | B % |
| | 0.0 | 90 | 10 |
| | 6.0 | 90 | 10 |
| | 13.0 | 40 | 60 |
| | 13.5 | 5 | 95 |
| | 15.5 | 5 | 95 |
| | 16.0 | 90 | 10 |
| | 20.0 | 90 | 10 |

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 | ： 電噴霧負離子模式 |
| 離子噴霧電壓 | ： -4500 伏特 |

| | |
|------------|-------------------|
| 離子源溫度 | : 350°C |
| 霧化氣(GS1) | : 40 |
| 輔助加熱氣(GS2) | : 40 |
| 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 |
|-------------|-----------------|--------------|------|-----|-----|-----|
| 人參皂苷 Re | 945.6 → 637.4* | 50 | -240 | -10 | -54 | -39 |
| | 945.6 → 475.4^ | 50 | -240 | -10 | -70 | -25 |
| 人參皂苷 Rg1 | 799.6 → 637.4* | 50 | -205 | -10 | -34 | -27 |
| | 799.6 → 475.4^ | 50 | -205 | -10 | -50 | -27 |
| 人參皂苷 Rf | 799.6 → 475.4* | 50 | -225 | -10 | -54 | -29 |
| | 799.6 → 637.4^ | 50 | -225 | -10 | -44 | -39 |
| 人參皂苷 Rb1 | 1107.6 → 945.5* | 50 | -255 | -10 | -60 | -55 |
| | 1107.6 → 783.5^ | 50 | -255 | -10 | -66 | -45 |

註：定量及定性的多重反應監測對分別以*和^符號標示。

4.2.5. 使用至少 5 個校準標準品(第 2.9.4.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和濃度的圖表，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(納克／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.