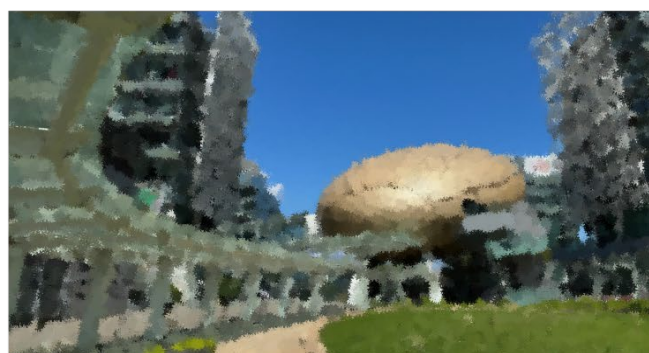




GCMTI RD-1:2024

利用高效液相色譜二極管陣列檢測器
檢測含補骨脂和人參的中成藥中
人參皂苷 Re 的含量

政府中藥檢測中心方法



利用高效液相色譜二極管陣列檢測器 檢測含補骨脂和人參的中成藥中人參皂苷Re的含量¹

安全預防措施：本文中涉及致癌化學品、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. 含補骨脂和人參的助陽補益類中成藥在香港是十分常見。然而，檢測這類中成藥中補骨脂和人參的化學指標成分是一個巨大的挑戰，因為當中的基質或其他化學成分容易對分析造成干擾。
- 1.2. 本方法載列利用高效液相色譜二極管陣列檢測器為含補骨脂和人參的中成藥的人參皂苷 Re 進行定性及定量檢測的步驟。

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. 乙腈，LC-MS 級
- 2.2. 甲醇，LC-MS 級
- 2.3. 正丁醇
- 2.4. Milli-Q 超純水
- 2.5. 氫氧化銨，28% (w/v)
- 2.6. 人參皂苷 Re (Ginsenoside Re)，CAS 編號: 52286-59-6
- 2.7. 提取溶劑
 甲醇：水 (7:3 v/v)
- 2.8. 樣本淨化用試劑 (正丁醇萃取法)
 - 2.8.1. 把 500 毫升正丁醇 (第 2.3 段) 和 500 毫升水 (第 2.4 段) 搖勻混合，放置分層。

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。

2.8.1.1. 上層：正丁醇溶液（水飽和）

2.8.1.2. 下層：水溶液（正丁醇飽和）

2.8.2. 40%（v/v）氨試液

把 200 毫升氫氧化銨（第 2.5 段）和 300 毫升水（第 2.4 段）混合，再加入 500 毫升水飽和正丁醇溶液（第 2.8.1.1 段）混合搖勻，放置分層。取下層氨試液使用。

2.9. 樣本淨化用試劑（固相萃取（SPE）法）

2.9.1. 10%（v/v）甲醇

把 10 毫升甲醇（第 2.2 段）用水（第 2.4 段）稀釋至 100 毫升。

2.9.2. 30%（v/v）甲醇

把 30 毫升甲醇（第 2.2 段）用水（第 2.4 段）稀釋至 100 毫升。

2.9.3. 20%（v/v）乙腈

把 20 毫升乙腈（第 2.1 段）用水（第 2.4 段）稀釋至 100 毫升。

2.10. 標準溶液的配製

2.10.1. 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（第 2.6 段）置於 10 毫升的容量瓶，加入甲醇（第 2.2 段）溶解並稀釋至刻度標記，則可配製標準儲備溶液。

2.10.2. 標準中間溶液（濃度約為每毫升 100 微克）

把 1 毫升標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑（第 2.7 段）稀釋至刻度標記，則可配製標準中間溶液。

2.10.3. 校準標準溶液（校準標準品 CS1 至 CS5）

把適量標準中間溶液分別轉移至若干 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑（第 2.7 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	標準中間溶液容量 (毫升)	最終容量 (毫升)	人參皂苷 Re 濃度 (微克/毫升)
CS1	1.00	10	10
CS2	2.00	10	20
CS3	3.00	10	30
CS4	4.00	10	40
CS5	5.00	10	50

2.10.4. 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 置於 10 毫升的容量瓶，加入甲醇 (第 2.2 段) 溶解並稀釋至刻度標記，則可配製個別 ICV 標準儲備溶液。

2.10.5. ICV 標準中間溶液 (濃度約為每毫升 100 微克)

把 1 毫升 ICV 標準儲備溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑 (第 2.7 段) 稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準中間溶液。

2.10.6. ICV 標準工作溶液 (濃度約為每毫升 30 微克)

把 3 毫升 ICV 標準中間溶液轉移至 10 毫升的容量瓶，加入提取溶劑 (第 2.7 段) 稀釋至刻度標記，則可配製 ICV 標準工作溶液。

2.10.7. 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 2.10.1 段)。

3. 器具

註：所有玻璃量器使用後均須儘快以丙酮及清潔劑清洗。用清潔劑清洗後，玻璃量器隨即以水沖洗，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. 1 毫升的定量移液管

3.5. 100 微升、300 微升和 1000 微升的自動移液器

3.6. 50 毫升的圓底燒瓶

- 3.7. 100 毫升的平底燒瓶
- 3.8. 離心機，轉速至少為每分鐘 4000 轉
- 3.9. 15 毫升和 50 毫升的離心管
- 3.10. 漩渦振蕩器
- 3.11. 超聲波清洗器
- 3.12. 旋轉蒸發器
- 3.13. 0.45 微米聚四氟乙烯過濾薄膜
- 3.14. 液相色譜玻璃樣本瓶
- 3.15. 固相萃取 (SPE) 柱：反相聚合物吸附劑，33 微米，容量 6-毫升，吸附劑質量 100 毫克，生產商為 Phenomenex Strata-X，或具同等規格
- 3.16. 液相色譜柱：Inertsil NH₂ 5 微米，4.6 毫米×250 毫米，生產商為 GL Sciences，或具同等規格
- 3.17. 高效液相色譜二極管陣列檢測器系統

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 0.5 克樣本放進 15 毫升的離心管。
- 4.1.3. 把 10 毫升提取溶劑（第 2.7 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. 以每分鐘 4000 轉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 100 毫升的平底燒瓶中。
- 4.1.6. 以 5 毫升提取溶劑（第 2.7 段）進行兩次第 4.1.3 段至第 4.1.5 段所述的步驟。以同一個 100 毫升的平底燒瓶收集所有上清液。

4.2. 樣本淨化

4.2.1. 正丁醇萃取法

4.2.1.1. 使用旋轉蒸發器在 50°C 下將收集得到的上清液（第 4.1.6 段）蒸發至近乾。用 1 毫升提取溶劑（第 2.7 段）溶解殘留物。

4.2.1.2. 將樣本溶液（第 4.2.1.1 段）轉移至 15 毫升的離心管中。用 5 毫升正丁醇溶液（水飽和）（第 2.8.1.1 段）沖洗燒瓶，並將沖洗溶液轉移至同一個 15 毫升的離心管中。把 5 毫升水溶液（正丁醇飽和）（第 2.8.1.2 段）注入 15 毫升的離心管中。

4.2.1.3. 把裝有樣本溶液的離心管渦旋振蕩 40 秒。然後以每分鐘 4000 轉的轉速對樣本溶液進行 2 分鐘的離心處理。小心地將上層有機層（正丁醇萃取物）收集至 50 毫升的離心管中。

註：若上層在離心處理後仍顯得混濁，可延長離心時間或提高轉速重新離心處理。

4.2.1.4. 以 5 毫升正丁醇溶液（水飽和）（第 2.8.1.1 段）進行兩次第 4.2.1.3 段所述的步驟。將所有上層有機層（正丁醇萃取物）（總共約 15 毫升）收集至同一個 50 毫升的離心管中。

4.2.1.5. 把 5 毫升 40% (v/v) 氨試液（第 2.8.2 段）注入正丁醇萃取物（第 4.2.1.4 段）。把裝有樣本溶液的離心管渦旋振蕩 40 秒。然後以每分鐘 4000 轉的轉速對樣本溶液進行 2 分鐘的離心處理。丟棄下層水層。

註：若上層在離心處理後仍顯得混濁，可延長離心時間或提高轉速重新離心處理。

4.2.1.6. 重複進行第 4.2.1.5 段所述的步驟。小心地將上層有機層（正丁醇萃取物）轉移至 100 毫升的平底燒瓶。用 5 毫升提取溶劑（第 2.7 段）沖洗離心管，並將沖洗溶液轉移至同一個 100 毫升的平底燒瓶中。

4.2.1.7. 使用旋轉蒸發器在 55°C 下將收集得到的溶液蒸發至近乾。

註：若正丁醇無法蒸乾，可在平底燒瓶加入約 1-2 毫升萃取溶液（第 2.7 段）以促進蒸發過程。

4.2.2. 固相萃取法

4.2.2.1. 依次用 5 毫升甲醇（第 2.2 段）和 5 毫升水

(第 2.4 段) 活化固相萃取柱 (第 3.15 段)。

4.2.2.2. 用 1 毫升提取溶劑 (第 2.7 段) 溶解殘留物 (第 4.2.1.7 段)，然後加入 9 毫升水 (第 2.4 段) 稀釋。

4.2.2.3. 將稀釋後的樣本溶液 (第 4.2.2.2 段) 加入固相萃取柱。

4.2.2.4. 用 5 毫升 10% (v/v) 甲醇 (第 2.9.1 段) 沖洗燒瓶，並將沖洗溶液轉移至固相萃取柱。

4.2.2.5. 用 10 毫升 30% (v/v) 甲醇 (第 2.9.2 段) 淋洗固相萃取柱。

4.2.2.6. 用 10 毫升 20% (v/v) 乙腈 (第 2.9.3 段) 洗脫固相萃取柱，收集洗脫液至 50 毫升的圓底燒瓶。

4.2.2.7. 使用旋轉蒸發器在 50°C 下將收集得到的洗脫液蒸發至近乾。精密地用定量移液管 (第 3.4 段) 轉移 1 毫升提取溶劑 (第 2.7 段) 溶解殘留物。

4.2.3. 以 0.45 微米聚四氟乙烯過濾薄膜過濾樣本溶液至液相色譜玻璃樣本瓶中，便可用高效液相色譜二極管陣列檢測器進行分析。

註：如果分析物的濃度不在校準範圍內，可用提取溶劑 (第 2.7 段) 把樣本溶液作進一步稀釋。

4.3. 高效液相色譜二極管陣列檢測法

4.3.1. 按照使用手冊以操作高效液相色譜二極管陣列檢測器系統，並在下列的建議操作條件下進行分析。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。

4.3.2. 建議的高效液相色譜二極管陣列檢測器操作條件：

液相色譜系統：Waters Alliance e2695 高效液相色譜系統或同等效能的系統

液相色譜柱：GL Sciences Inertsil NH₂, 5 微米, 4.6 毫米 × 250 毫米或同等規格

柱溫度：35 °C

流速：每分鐘 1 毫升

進樣量：10 微升

流動相：A: 水

B: 乙腈

梯度	: 時間 (分鐘)	A%	B%
	0.0	5	95
	5.0	5	95
	15.0	12	88
	25.0	13	87
	65.0	13	87
	65.5	25	75
	70.0	25	75
	71.0	5	95
	80.0	5	95
檢測波長	: 203 奈米		

4.3.3. 使用至少 5 個校準標準品 (第 2.8.3 段) 校準高效液相色譜二極管陣列檢測器系統。

4.3.4. 使用高效液相色譜二極管陣列檢測器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

進行高效液相色譜二極管陣列檢測時，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% 以作正確鑒別。

5.2. 在線性校準模式下就分析物繪畫峰面積與校準標準品濃度的圖表，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)：

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

C = 從校準曲線得出的分析物濃度 (微克／毫升)

V = 最終體積 (毫升)

D = 稀釋比

W = 樣本重量 (克)

6. 參考資料

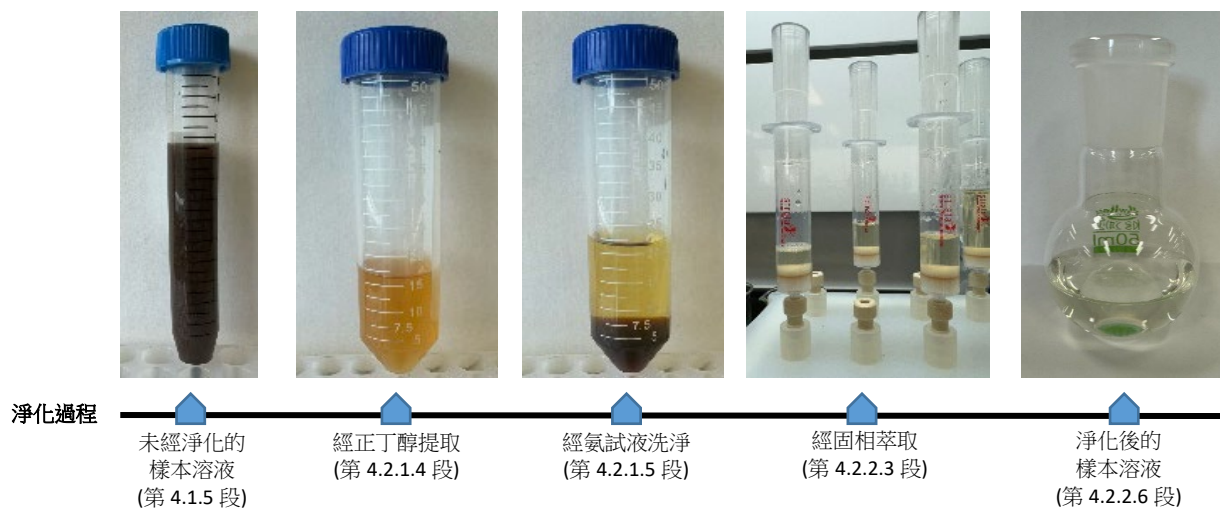
6.1. 國家藥典委員會：《中華人民共和國藥典》2020 年版第一部，中國醫藥科技出版社。

- 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.

附錄 A
(資訊性)

淨化程序的額外信息

A1. 下圖闡明淨化程序中不同階段所獲得的樣本溶液。



A2. 淨化程序中不同階段所獲得的樣本溶液的疊加層析圖。

