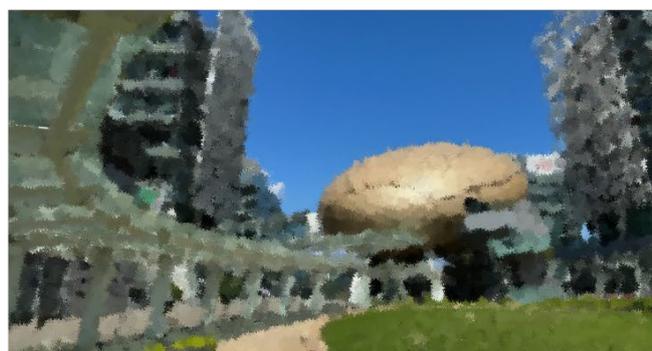


GCMTI RD-1:2024

利用高效液相色谱二极管阵列检测器
检测含补骨脂和人参的中成药中
人参皂苷 Re 的含量

政府中药检测中心方法



利用高效液相色谱二极管阵列检测器 检测含补骨脂和人参的中成药中人参皂苷Re的含量¹

安全预防措施：本文中涉及致癌化学品、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. 含补骨脂和人参的助阳补益类中成药在香港是十分常见。然而，检测这类中成药中补骨脂和人参的化学指标成分是一个巨大的挑战，因为当中的基质或其他化学成分容易对分析造成干扰。
- 1.2. 本方法载列利用高效液相色谱二极管阵列检测器为含补骨脂和人参的中成药的人参皂苷 Re 进行定性及定量检测的步骤。

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. 乙腈，LC-MS 级
- 2.2. 甲醇，LC-MS 级
- 2.3. 正丁醇
- 2.4. Milli-Q 超纯水
- 2.5. 氢氧化铵，28% (w/v)
- 2.6. 人参皂苷 Re (Ginsenoside Re)，CAS 编号: 52286-59-6
- 2.7. 提取溶剂
甲醇：水 (7:3 v/v)
- 2.8. 样本净化用试剂 (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) 摇匀混合，放置分层。

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。

2.8.1.1. 上层：正丁醇溶液（水饱和）

2.8.1.2. 下层：水溶液（正丁醇饱和）

2.8.2. 40%（v/v）氨试液

把 200 毫升氢氧化铵（第 2.5 段）和 300 毫升水（第 2.4 段）混合，再加入 500 毫升水饱和正丁醇溶液（第 2.8.1.1 段）混合摇匀，放置分层。取下层氨试液使用。

2.9. 样本净化用试剂（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）稀释至 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）稀释至 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）稀释至 100 毫升。

2.10. 标准溶液的配制

2.10.1. 标准储备溶液（浓度约为每毫升 1000 微克）

精密称取 10 毫克人参皂苷 Re（第 2.6 段）置于 10 毫升的容量瓶，加入甲醇（第 2.2 段）溶解并稀释至刻度标记，则可配制标准储备溶液。

2.10.2. 标准中间溶液（浓度约为每毫升 100 微克）

把 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 2.7 段）稀释至刻度标记，则可配制标准中间溶液。

2.10.3. 校准标准溶液（校准标准品 CS1 至 CS5）

把适量标准中间溶液分别转移至若干 10 毫升的容量瓶，加入提取溶剂（第 2.7 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	标准中间溶液容量 (毫升)	最终容量 (毫升)	人参皂苷 Re 浓度 (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人参皂苷 Re 置于 10 毫升的容量瓶, 加入甲醇 (第 2.2 段) 溶解并稀释至刻度标记, 则可配制个别 ICV 标准储备溶液。

2.10.5. ICV 标准中间溶液 (浓度约为每毫升 100 微克)

把 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 2.7 段) 稀释至刻度标记, 则可配制 ICV 标准中间溶液。

2.10.6. ICV 标准工作溶液 (浓度约为每毫升 30 微克)

把 3 毫升 ICV 标准中间溶液转移至 10 毫升的容量瓶, 加入提取溶剂 (第 2.7 段) 稀释至刻度标记, 则可配制 ICV 标准工作溶液。

2.10.7. 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 2.10.1 段)。

3. 器具

注: 所有玻璃量器使用后均须尽快以丙酮及清洁剂清洗。用清洁剂清洗后, 玻璃量器随即以水冲洗, 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 微升的自动移液器

3.6. 50 毫升的圆底烧瓶

- 3.7. 100 毫升的平底烧瓶
- 3.8. 离心机，转速至少为每分钟 4000 转
- 3.9. 15 毫升和 50 毫升的离心管
- 3.10. 漩涡振荡器
- 3.11. 超声波清洗器
- 3.12. 旋转蒸发器
- 3.13. 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜
- 3.14. 液相色谱玻璃样本瓶
- 3.15. 固相萃取（SPE）柱：反相聚合物吸附剂，33 微米，容量 6-毫升，吸附剂质量 100 毫克，生产商为 Phenomenex Strata-X，或具同等规格
- 3.16. 液相色谱柱：Inertsil NH₂ 5 微米，4.6 毫米×250 毫米，生产商为 GL Sciences，或具同等规格
- 3.17. 高效液相色谱二极管阵列检测器系统

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及均质化处理。
- 4.1.2. 精密称取 0.5 克样本放进 15 毫升的离心管。
- 4.1.3. 把 10 毫升提取溶剂（第 2.7 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. 以每分钟 4000 转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 100 毫升的平底烧瓶中。
- 4.1.6. 以 5 毫升提取溶剂（第 2.7 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 100 毫升的平底烧瓶收集所有上清液。

4.2. 样本净化

4.2.1. 正丁醇萃取法

4.2.1.1. 使用旋转蒸发器在 50℃ 下将收集得到的上清液（第 4.1.6 段）蒸发至近干。用 1 毫升提取溶剂（第 2.7 段）溶解残留物。

4.2.1.2. 将样本溶液（第 4.2.1.1 段）转移至 15 毫升的离心管中。用 5 毫升正丁醇溶液（水饱和）（第 2.8.1.1 段）冲洗烧瓶，并将冲洗溶液转移至同一个 15 毫升的离心管中。把 5 毫升水溶液（正丁醇饱和）（第 2.8.1.2 段）注入 15 毫升的离心管中。

4.2.1.3. 把装有样本溶液的离心管涡旋振荡 40 秒。然后以每分钟 4000 转的转速对样本溶液进行 2 分钟的离心处理。小心地将上层有机层（正丁醇萃取物）收集至 50 毫升的离心管中。

注：若上层在离心处理后仍显得混浊，可延长离心时间或提高转速重新离心处理。

4.2.1.4. 以 5 毫升正丁醇溶液（水饱和）（第 2.8.1.1 段）进行两次第 4.2.1.3 段所述的步骤。将所有上层有机层（正丁醇萃取物）（总共约 15 毫升）收集至同一个 50 毫升的离心管中。

4.2.1.5. 把 5 毫升 40% (v/v) 氨试液（第 2.8.2 段）注入正丁醇萃取物（第 4.2.1.4 段）。把装有样本溶液的离心管涡旋振荡 40 秒。然后以每分钟 4000 转的转速对样本溶液进行 2 分钟的离心处理。丢弃下层水层。

注：若上层在离心处理后仍显得混浊，可延长离心时间或提高转速重新离心处理。

4.2.1.6. 重复进行第 4.2.1.5 段所述的步骤。小心地将上层有机层（正丁醇萃取物）转移至 100 毫升的平底烧瓶。用 5 毫升提取溶剂（第 2.7 段）冲洗离心管，并将冲洗溶液转移至同一个 100 毫升的平底烧瓶中。

4.2.1.7. 使用旋转蒸发器在 55℃ 下将收集得到的溶液蒸发至近干。

注：若正丁醇无法蒸干，可在平底烧瓶加入约 1-2 毫升萃取溶液（第 2.7 条）以促进蒸发过程。

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 毫升提取溶剂 (第 2.7 段) 溶解残留物 (第 4.2.1.7 段), 然后加入 9 毫升水 (第 2.4 段) 稀释。

4.2.2.3. 将稀释后的样本溶液 (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) 冲洗烧瓶, 并将冲洗溶液转移至固相萃取柱。

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) 洗脱固相萃取柱, 收集洗脱液至 50 毫升的圆底烧瓶。

4.2.2.7. 使用旋转蒸发器在 50°C 下将收集得到的洗脱液蒸发至近干。精密地用定量移液管 (第 3.4 段) 转移 1 毫升提取溶剂 (第 2.7 段) 溶解残留物。

4.2.3. 以 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液至液相色谱玻璃样本瓶中, 便可用高效液相色谱二极管阵列检测器进行分析。

注: 如果分析物的浓度不在校准范围内, 可用提取溶剂 (第 2.7 段) 把样本溶液作进一步稀释。

4.3. 高效液相色谱二极管阵列检测法

4.3.1. 按照使用手册以操作高效液相色谱二极管阵列检测器系统, 并在下列的建议操作条件下进行分析。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。

4.3.2. 建议的高效液相色谱二极管阵列检测器操作条件:

液相色谱系统	: Waters Alliance e2695 高效液相色谱系统或同等效能的系统
液相色谱柱	: GL Sciences Inertsil NH ₂ , 5 微米, 4.6 毫米 × 250 毫米或同等规格
柱温度	: 35 °C
流速	: 每分钟 1 毫升
进样量	: 10 微升
流动相	: A:水 B:乙腈

梯度	: 时间 (分钟)	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
检测波长	: 203 奈米		

4.3.3. 使用至少 5 个校准标准品 (第 2.8.3 段) 校准高效液相色谱二极管阵列检测器系统。

4.3.4. 使用高效液相色谱二极管阵列检测器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

进行高效液相色谱二极管阵列检测时, 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% 以作正确鉴别。

5.2. 在线性校准模式下就分析物绘画峰面积与校准标准品浓度的图表, 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):

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度 (微克 / 毫升)

V = 最终体积 (毫升)

D = 稀释比

W = 样本重量 (克)

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.