

膠囊錠狀食品中的人參皂苷之檢驗方法

Method of Test for Ginsenosides in Foods in Capsule and Tablet Form

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於膠囊錠狀食品中的人參皂苷Re、Rg1、Rb1、Rg2-S、Rg2-R、Rc、Rb2及Rd等8項人參皂苷(ginsenosides)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 μm ，內徑2.1 mm \times 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達5000 \times g以上者。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.5. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；人參皂苷Re、Rg1、Rb1、Rg2-S、Rg2-R、Rc、Rb2及Rd對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：2 mL、10 mL及50 mL。
 - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PVDF材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 50%乙腈溶液：
取乙腈與去離子水以1：1 (v/v)比例混勻。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：
取甲酸1 mL，加入去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.5.2. 移動相溶液B：
取甲酸1 mL，加入乙腈使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。
 - 2.6. 標準溶液之配製：

取人參皂苷對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別以甲醇溶解並定容至2 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時，取適量各標準原液混合，以50%乙腈溶液稀釋至人參皂苷Re、Rg1、Rb1、Rc、Rb2及Rd 0.01~0.8 µg/mL，人參皂苷Rg2-S及Rg2-R 0.02~0.8 µg/mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質混勻後，取約0.2 g，精確稱定，置於離心管中，加入50%乙腈溶液45 mL，旋渦混合，超音波振盪30分鐘，再以50%乙腈溶液定容至50 mL，以5000×g離心3分鐘，取上清液作為檢液原液。取檢液原液100 µL (a)，以50%乙腈溶液定容至10 mL (b)，混合均勻，經濾膜過濾後，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各2 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註1)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各人參皂苷之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中各人參皂苷之含量(mg/g)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000}$$

C：由標準曲線求得檢液中各人參皂苷之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數，由 b/a 求得

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註2)：

層析管：ACQUITY UPLC BEH C18，1.7 µm，內徑 2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：45°C。

樣品槽溫度：10°C。

移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	80 → 80	20 → 20
1.0 → 1.5	80 → 68	20 → 32
1.5 → 5.5	68 → 68	32 → 32
5.5 → 5.6	68 → 60	32 → 40
5.6 → 7.0	60 → 60	40 → 40

7.0 → 7.1	60 → 0	40 → 100
7.1 → 10.0	0 → 0	100 → 100
10.0 → 11.0	0 → 80	100 → 20
11.0 → 14.0	80 → 80	20 → 20

移動相流速：0.45 mL/min。

注入量：2 μ L。

毛細管電壓(Capillary voltage)：2.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：150°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：400°C。

進樣錐氣體流速(Cone gas flow rate)：150 L/hr。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：600 L/hr。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。離子化模式、偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)及碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子化模式	離子對	進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
Re	ESI ⁺	969.5 > 789.6*	65	45
		969.5 > 203		51
Rg1	ESI ⁺	823.5 > 643.5*	77	37
		823.5 > 203		45
Rb1	ESI ⁺	1131.6 > 365*	87	58
		1131.6 > 305		72
Rg2-S	ESI ⁻	783.5 > 475*	69	41
		783.5 > 205		31
Rg2-R	ESI ⁻	783.5 > 475*	59	37
		783.5 > 391		58
Rc	ESI ⁺	1101.6 > 335*	88	71
		1101.6 > 203		77
Rb2	ESI ⁺	1101.6 > 335*	91	61
		1101.6 > 789.5		51
Rd	ESI ⁺	969.5 > 789.6*	73	48
		969.5 > 365		61

*定量離子對

- 註：1. 上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。
2. 相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得($\leq 100\%$)，容許範圍如下：

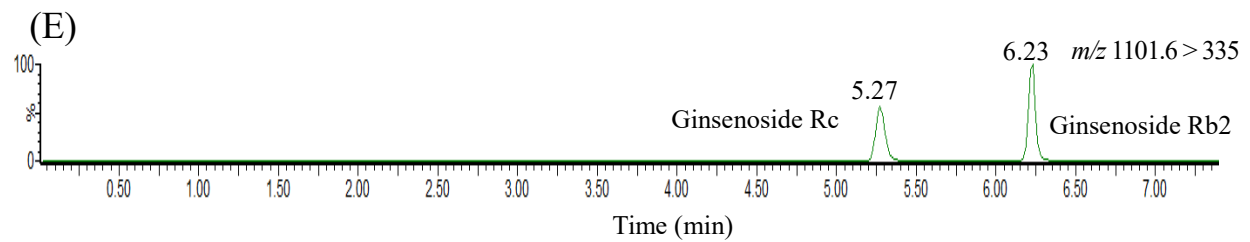
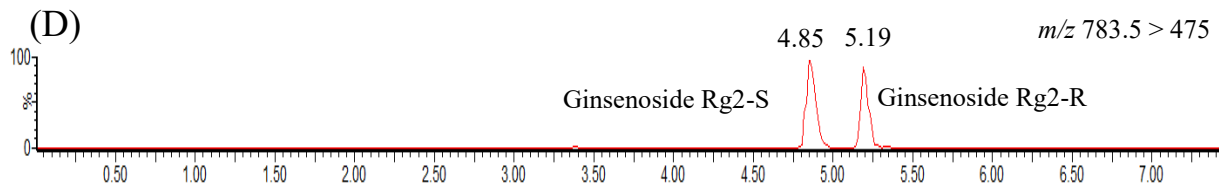
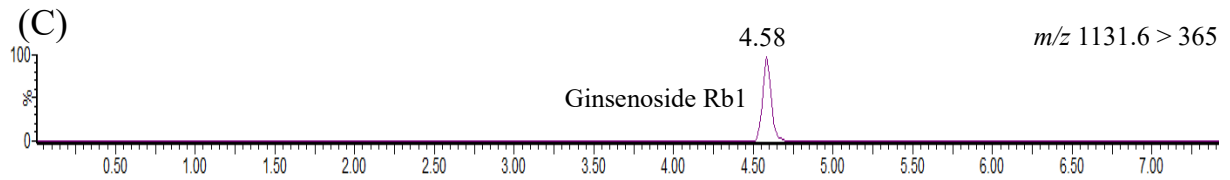
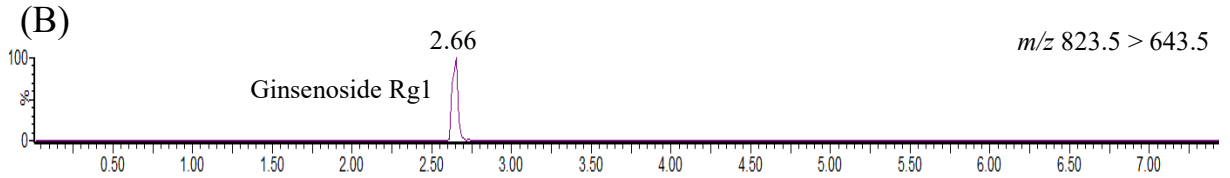
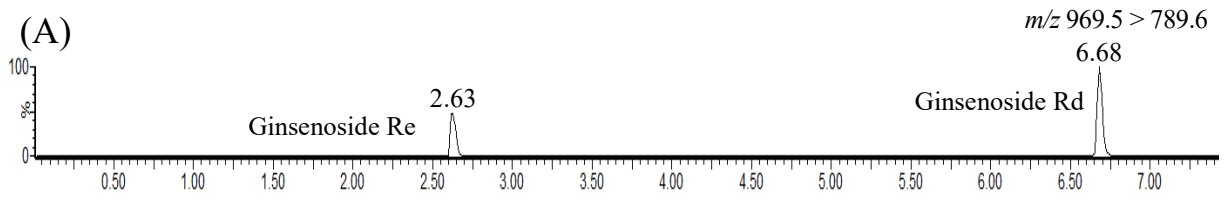
相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

- 附註：1. 本檢驗方法之定量極限，人參皂苷Re、Rg1、Rb1、Rc、Rb2及Rd均為0.25 mg/g，人參皂苷Rg2-S及Rg2-R均為0.5 mg/g。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻

1. Uhr, L., Chen, Y. Sit, D. and Li, P. C. H. 2014. Ginsenosides in commercial ginseng products analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 2014: 1-8.
2. Yang, D., Yang, X., Yan, H., Fan, B., Dai, J., Song, J., Lei, Y. and Guo, N. 2019. UPLC-MS/MS determination of twelve ginsenosides in Shenfu Tang and Dushen Tang. Anal. Chem. 2019: 1-7.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析人參皂苷Re、Rd (A)、Rg1 (B)、Rb1 (C)、Rg2-S、Rg2-R (D)、Rc及Rb2 (E)標準品之MRM圖譜