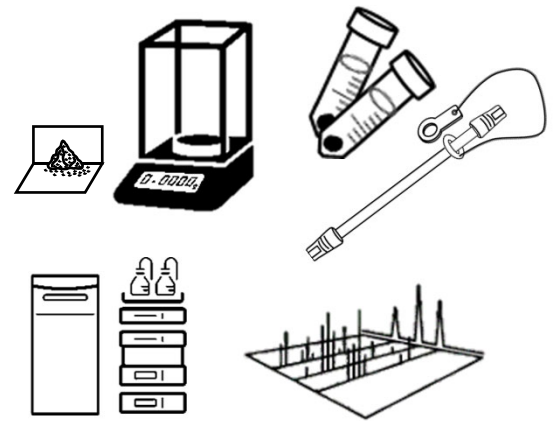




GCMTI RD-1: 2025

利用高效液相色谱/超高效液相色谱
二极管阵列技术
检测中药复方颗粒中芍药苷的含量

政府中药检测中心方法



-空白页-



利用高效液相色谱/超高效液相色谱二极管阵列技术 检测复方中药颗粒中芍药苷的含量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. 复方中药颗粒是香港其中一种中成药，并以不同处方销售。这些处方多数是根据古代中医药文献制定。一般而言，其生产过程是将一系列中药粉碎、煎煮、滤过和浓缩后，制成为水溶性粉末。
- 1.2. 本方法包含高效液相色谱二极管阵列 (HPLC-DAD) 技术或超高效液相色谱二极管阵列 (UPLC-DAD) 技术，可用于分析以白芍为君、臣药或主要成分的十二种处方。以下将详细列出处方列表及所采用的技术。

项目	处方	古代中医药文献	技术
1.	真武汤	伤寒论	HPLC-DAD
2.	麻子仁丸	伤寒论	HPLC-DAD
3.	固经丸	丹溪心法	HPLC-DAD
4.	桂枝加龙骨牡蛎汤	金匱要略	HPLC-DAD
5.	痛泻药方	丹溪心法	UPLC-DAD
6.	独活寄生汤	备急千金要方	UPLC-DAD
7.	十全大补汤	太平惠民和剂局方	HPLC-DAD
8.	荆芥连翘汤	沈氏尊生方	UPLC-DAD
9.	人参养荣汤	三因极一病证方论	HPLC-DAD
10.	当归芍药散	金匱要略	HPLC-DAD
11.	黄芪建中汤	金匱要略	HPLC-DAD
12.	圣愈汤	医宗金鉴	HPLC-DAD

- 1.3. 本方法已验证能以 HPLC-DAD 或 UPLC-DAD 技术，对十二种含芍药苷的处方进行定性及定量的检测。其验证的工作范围均为溶液中的 2–50 µg/mL，相当于原样本中的 200–5000 µg/g。



2. 试剂

注意： 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. 超纯水，Milli Q。

2.2. 乙腈，LC-MS 级。

2.3. 甲醇，LC-MS 级。

2.4. 50 % 甲醇溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~500 mL 的甲醇和 ~500 mL 的超纯水。

2.5. 芍药苷，CAS. No.: 23180-57-6。

2.6. 标准溶液

2.6.1. 标准储备溶液 (~1000 $\mu\text{g/mL}$)

精密称取 ~10 mg 的芍药苷于 10 mL 的容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记，可配制成标准储备溶液。

2.6.2. 标准中间溶液 (~200 $\mu\text{g/mL}$)

把 2.0 mL 的标准储备溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成标准中间溶液。

2.7. 校准标准溶液

从标准中间溶液中，新鲜配制最少六瓶校准标准溶液。把适量的标准中间溶液分别转移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成一系列校准标准溶液。配制校准标准溶液所须的标准中间溶液建议分量表列如下：

校准标准溶液	标准中间溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	最终浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
CS1	0.1	10.0	2
CS2	0.25	10.0	5
CS3	0.5	10.0	10
CS4	1.0	10.0	20
CS5	1.5	10.0	30
CS6	2.5	10.0	50



备注： 可使用其他合适浓度，或采用其他稀释顺序来达到所需的浓度。须在数据表中记录详细信息。

2.8. 初始校正验证标准溶液

2.8.1. 初始校正验证标准储备溶液 (~1000 µg/mL)

精密称取 ~10 mg 来源与校准标准品不同的芍药苷置于 10 mL 的容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记，可配制成初始校正验证标准储备溶液。

2.8.2. 初始校正验证标准中间溶液 (~200 µg/mL)

把 2.0 mL 的初始校正验证标准储备溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成初始校正验证标准中间溶液。

2.8.3. 初始校正验证标准工作溶液 (~10 或 20 µg/mL)

把 0.5 或 1.0 mL 的初始校正验证标准中间溶液转移至 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，并稀释至刻度标记，可配制成初始校正验证标准工作溶液。

2.9. 校准检查标准品

校准检查标准品应为校准标准溶液中的 CS3 或 CS4，即 ~10 或 20 µg/mL。

2.10. 方法空白

方法空白应依照第 4.1.3 段至第 4.2 段进行完整的样本制备步骤，并应含有与样本溶液等量的试剂。

3. 器具

注意： 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. 10 和 25 mL 的容量瓶。

3.3. 1 L 的量筒。



- 3.4. 分析天秤，感量为 0.01 mg。
- 3.5. 300, 1000 μ L 和 10 mL 的自动移液器。
- 3.6. 15 mL 的聚丙烯离心管并配备扭盖。
- 3.7. 超声波清洗器。
- 3.8. 漩涡振荡器。
- 3.9. 离心机，能达到至少 4000 rpm 的转速。
- 3.10. 0.20 和 0.45 μ m 的聚四氟乙烯过滤薄膜或同等类型的消耗品。
- 3.11. 液相色谱玻璃样本瓶。
- 3.12. 高效液相色谱柱，Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m) 或同等类型的色谱柱。
- 3.13. 超高效液相色谱柱，Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m) 或同等类型的色谱柱。
- 3.14. 高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器的系统，Dionex UltiMate 3000 HPLC 系统或同等类型的系统。
- 3.15. 超高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器的系统，Acquity H-Class UPLC 系统或同等类型的系统。

4. 步骤

4.1. 配制样本

- 4.1.1. 如果需要，在进行分析前，使用研磨机或搅拌机把固体的样本进行研磨及均质化处理。
- 4.1.2. 精密称取 \sim 0.25 g 的样本放进 15 mL 扭盖的离心管。
- 4.1.3. 把 10 mL 的 50% 甲醇溶液注入离心管，然后将离心管涡旋振荡 \sim 1 min。
- 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 \sim 20 min 音波振动处理。



4.1.5. 以 ~4000 rpm 的转速对样本溶液进行 ~10 min 的离心处理并将上清液转移至 25 mL 的容量瓶中。

4.1.6. 以 4 mL 的 50 % 甲醇溶液进行两次第 4.1.3 段至第 4.1.5 段所述的步骤。

4.1.7. 以同一个 25 mL 的容量瓶收集所有上清液，然后加入 50 % 甲醇溶液稀释至刻度标记，得到样本溶液。

4.1.8. 以 0.45 μm 的聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液，然后再用 0.20 μm 的聚四氟乙烯过滤薄膜过滤。将滤液收集在液相色谱玻璃样本瓶中。

备注： 如果分析物的浓度不在校准范围内，可用 50 % 甲醇溶液把样本溶液作进一步稀释。

4.2. 高效液相色谱/超高效液相色谱二极管阵列分析

4.2.1. 按照使用手册以操作高效液相色谱/超高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器的系统，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数据表上。

4.2.2. 建议的高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器之操作条件：

高效液相色谱仪	:	Dionex UltiMate 3000 HPLC 系统 或同等类型的系统		
液相色谱柱	:	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 或同等类型的色谱柱		
流动相 A	:	超纯水		
流动相 B	:	乙腈		
梯度	:	时间 (min)	A (%)	B (%)
		0.0	95	5
		3.0	95	5
		5.0	90	10
		10.0	85	15
		30.0	85	15
		35.0	80	20
		37.0	70	30
		40.0	5	95
		45.0	5	95
		46.0	95	5
		52.0	95	5



流速	:	0.5 mL/min
进样量	:	10 μ L
报告的保留时间	:	芍药苷 ~30.2 min
柱温度	:	25 $^{\circ}$ C
检测波长	:	230 nm

4.2.3. 建议的超高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器之操作条件:

超高效液相色谱仪	:	Acquity H-Class UPLC 系统 或同等类型的系统																																	
液相色谱柱	:	Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m) 或同等类型的色谱柱																																	
流动相 A	:	超纯水																																	
流动相 B	:	乙腈																																	
梯度	:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>99</td><td>1</td></tr><tr><td>3.0</td><td>99</td><td>1</td></tr><tr><td>5.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>7.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10.0</td><td>88</td><td>12</td></tr><tr><td>33.0</td><td>88</td><td>12</td></tr><tr><td>35.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>42.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>43.0</td><td>99</td><td>1</td></tr><tr><td>55.0</td><td>99</td><td>1</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	A (%)	B (%)	0.0	99	1	3.0	99	1	5.0	90	10	7.0	90	10	10.0	88	12	33.0	88	12	35.0	5	95	42.0	5	95	43.0	99	1	55.0	99	1
时间 (min)	A (%)	B (%)																																	
0.0	99	1																																	
3.0	99	1																																	
5.0	90	10																																	
7.0	90	10																																	
10.0	88	12																																	
33.0	88	12																																	
35.0	5	95																																	
42.0	5	95																																	
43.0	99	1																																	
55.0	99	1																																	
流速	:	0.2 mL/min																																	
进样量	:	10 μ L																																	
报告的保留时间	:	芍药苷 ~29.4 min																																	
柱温度	:	25 $^{\circ}$ C																																	
检测波长	:	230 nm																																	

5. 计算/结果分析

5.1. 鉴别要求

比较样本检测峰保留时间和校准标准溶液的平均保留时间,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溶液的平均保留时间相差多于 5% 以作阳性鉴别。

5.2. 在线性校准模式下就分析物绘画峰面积与校准标准溶液浓度的图表,从而得出校准曲线。从校准曲线中取得斜率、y 截距和确定系数 (r^2)。



5.3. 按下列方程式计算样本中分析物的浓度 ($\mu\text{g/g}$):

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

V = 最终体积 (mL)

D = 稀释比

W = 样本重量 (g)

6. 参考数据

6.1. 中国医药科技出版社 (2020)。《中华人民共和国药典》(2020年版第一部)。国家药典委员会。

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针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。

-空白页-