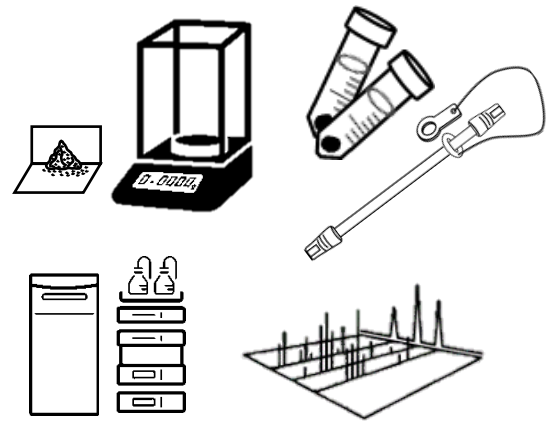




# GCMTI RD-3: 2025

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地黄苷D 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地黄苷D 的含量<sup>1</sup>

**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，可用于分析以地黄为君、臣药或主要成分的十一种处方。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.	圣愈汤	医宗金鉴	HPLC-DAD
2.	养阴清肺汤	重楼玉钥	HPLC-DAD
3.	清胃散	脾胃论	HPLC-DAD
4.	小蓟饮子	济生方	HPLC-DAD
5.	当归六黄汤	兰室秘藏	HPLC-DAD
6.	左归丸	景岳全书	UPLC-DAD
7.	八味地黄丸	博青主女科·产后编	UPLC-DAD
8.	玉泉散	血证论卷八	HPLC-DAD
9.	大补阴丸	丹溪心法	HPLC-DAD
10.	芎归胶艾汤	金匱要略	HPLC-DAD
11.	消风散	外科正宗	HPLC-DAD

- 1.3. 本方法已验证能以 HPLC-DAD 或 UPLC-DAD 技术,对十一种含地黄苷 D 的处方进行定性及定量的检测。第一校准曲线的工作范围为溶液中的 2–80  $\mu\text{g/mL}$ , 相当于原样本中的 50–2000  $\mu\text{g/g}$ 。而第二校准曲线的工作范围为溶液中的 2–50  $\mu\text{g/mL}$ , 相当于原样本中的 50–1250  $\mu\text{g/g}$ 。



## 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. 乙醇，Absolute 级。

2.5. 氯仿，AR 级。

2.6. 1-丁醇，AR 级。

2.7. 1% 乙腈溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~10 mL 的乙腈和 ~990 mL 的超纯水。

2.8. 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。

2.9. 氯仿和1-丁醇的混合溶液 (4:1, v/v)

在 100 mL 的量筒中混合 ~80 mL 的氯仿和 ~20 mL 的1-丁醇。

2.10. 地黄苷D，CAS.No.: 81720-08-3。

2.11. 标准溶液

2.11.1. 标准储备溶液 (~5000 µg/mL)

精密称取 ~50 mg 的地黄苷D 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。

2.11.2. 标准中间溶液 (~100 µg/mL)

把 0.5 mL 的标准储备溶液转移至 25 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。



### 2.12. 第一校准曲线的校准标准溶液

从标准储备溶液和标准中间溶液中，新鲜配制最少六瓶校准标准溶液。把适量的标准储备溶液或标准中间溶液分别转移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 1% 乙腈溶液，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储备溶液和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)	标准储备溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	最终浓度 (µg/mL)
CS1	0.2	---	10.0	2
CS2	0.5	---	10.0	5
CS3	1.0	---	10.0	10
CS4	2.0	---	10.0	20
CS5	5.0	---	10.0	50
CS6	---	0.16	10.0	80

**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。

### 2.13. 第二校准曲线的校准标准溶液

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 1% 乙腈溶液，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 (µg/mL)
CS1	0.2	10.0	2
CS2	0.5	10.0	5
CS3	1.0	10.0	10
CS4	2.0	10.0	20
CS5	3.0	10.0	30
CS6	5.0	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。



## 2.14. 初始校正验证标准溶液

### 2.14.1. 初始校正验证标准储备溶液 (~5000 µg/mL)

精密称取 ~50 mg 来源与校准标准品不同的地黄苷D 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。

### 2.14.2. 初始校正验证标准中间溶液 (~100 µg/mL)

把 0.2 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。

### 2.14.3. 初始校正验证标准工作溶液 (~10 or 20 µg/mL)

把 1.0 或 2.0 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 1 % 乙腈溶液，并稀释至刻度标记，可配制成初始校正验证标准工作溶液。

## 2.15. 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。

## 2.16. 方法空白

方法空白应依照第 4.1.3 段至第 4.4 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 µL 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. 一次性玻璃滴管。
- 3.11. 冷冻柜，可在  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  温度下运作。
- 3.12. 圆底烧瓶，50-mL。
- 3.13. 旋转蒸发仪或同等类型的系统。
- 3.14. 0.20  $\mu\text{m}$  及 13 mm 的聚四氟乙烯过滤薄膜或同等类型的消耗品。
- 3.15. 液相色谱玻璃样本瓶。
- 3.16. 高效液相色谱柱，Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 或同等类型的色谱柱。
- 3.17. 超高效液相色谱柱，Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 或同等类型的色谱柱。
- 3.18. 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。
- 3.19. 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  $\sim 0.5\text{ g}$  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  $\sim 1\text{ min}$ 。



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 ~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。

## 4.2. 液相-液相提取法

4.2.1. 用自动移液器将 2.0 mL 样本溶液 (第 4.1.7 段) 转移入 15 mL 的离心管中。

4.2.2. 加入 ~5 mL 的氯仿和1-丁醇的混合溶液。

4.2.3. 将离心管中的样本溶液涡旋振荡 ~1 min。

4.2.4. 以 ~4000 rpm 的转速对样本溶液进行 ~10 min 的离心处理，达至两相分离

4.2.5. 用一次性玻璃滴管将上清液完全转移至新的离心管中。

## 4.3. 乙醇沉淀

4.3.1. 用自动移液器将 6 mL 的乙醇加入离心管中的样本溶液。

4.3.2. 把样本溶液摆放在 ~-20 °C的冷冻柜中过夜。

4.3.3. 以 ~4000 rpm 的转速对样本溶液进行 ~10 min 的离心处理，沉淀固体物或上浮物。

4.3.4. 将上清液完全转移至 50 mL 的圆底烧瓶。

4.3.5. 用旋转蒸发器在 ~45 °C 下将上清液蒸发至干，然后用 1 mL 的 1 % 乙腈溶液重新溶解。

4.3.6. 以 0.2  $\mu\text{m}$  及 13 mm 的聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液。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 1% 乙腈溶液把样本溶液作进一步稀释。

#### 4.4. 高效液相色谱/超高效液相色谱二极管阵列分析

4.4.1. 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。

4.4.2. 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 <sub>18</sub> 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	99	1
		3.0	99	1
		15.0	97	3
		30.0	95	5
		40.0	95	5
		42.0	90	10
		45.0	50	50
		48.0	50	50
		49.0	5	95
		55.0	5	95
		56.0	70	30
		58.0	70	30
		59.0	99	1
		70.0	99	1
流速	:	0.5 mL/min		
进样量	:	10 μL		
报告的保留时间	:	地黄苷D ~36.4 min		
柱温度	:	25 °C		
检测波长	:	203 nm		



## 4.4.3. 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 BEH C <sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 1.7 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	:	<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>20.0</td><td>97</td><td>3</td></tr><tr><td>40.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>45.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>46.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>47.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>48.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>49.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>55.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>56.0</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>58.0</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>59.0</td><td>99</td><td>1</td></tr><tr><td>70.0</td><td>99</td><td>1</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	A (%)	B (%)	0.0	99	1	3.0	99	1	20.0	97	3	40.0	95	5	45.0	95	5	46.0	90	10	47.0	50	50	48.0	50	50	49.0	5	95	55.0	5	95	56.0	70	30	58.0	70	30	59.0	99	1	70.0	99	1
时间 (min)	A (%)	B (%)																																													
0.0	99	1																																													
3.0	99	1																																													
20.0	97	3																																													
40.0	95	5																																													
45.0	95	5																																													
46.0	90	10																																													
47.0	50	50																																													
48.0	50	50																																													
49.0	5	95																																													
55.0	5	95																																													
56.0	70	30																																													
58.0	70	30																																													
59.0	99	1																																													
70.0	99	1																																													
流速	:	0.2 mL/min																																													
进样量	:	10 μL																																													
报告的保留时间	:	地黄苷D ~30.0 min																																													
柱温度	:	25 °C																																													
检测波长	:	203 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-