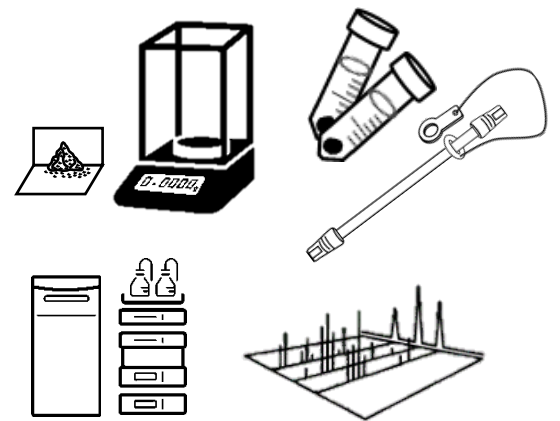




# GCMTI RD-3: 2025

利用高效液相色譜/超高效液相色譜  
二極管陣列技術  
檢測中藥複方顆粒中地黃苷D的含量

## 政府中藥檢測中心方法



-空白頁-



## 利用高效液相色譜/超高效液相色譜二極管陣列技術 檢測複方中藥顆粒中地黃苷D 的含量<sup>1</sup>

**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. 複方中藥顆粒是香港其中一種中成藥，並以不同處方銷售。這些處方多數是根據古代中醫藥文獻制定。一般而言，其生產過程是將一系列中藥粉碎、煎煮、濾過和濃縮後，製成為水溶性粉末。
- 1.2. 本方法包含高效液相色譜二極管陣列 (HPLC-DAD) 技術或超高效液相色譜二極管陣列 (UPLC-DAD) 技術，可用於分析以地黃為君、臣藥或主要成分的十一種處方。以下將詳細列出處方列表及所採用的技術。

項目	處方	古代中醫藥文獻	技術
1.	聖愈湯	醫宗金鑒	HPLC-DAD
2.	養陰清肺湯	重樓玉鑰	HPLC-DAD
3.	清胃散	脾胃論	HPLC-DAD
4.	小薊飲子	濟生方	HPLC-DAD
5.	當歸六黃湯	蘭室秘藏	HPLC-DAD
6.	左歸丸	景嶽全書	UPLC-DAD
7.	八味地黃丸	博青主女科·產後編	UPLC-DAD
8.	玉泉散	血證論卷八	HPLC-DAD
9.	大補陰丸	丹溪心法	HPLC-DAD
10.	芎歸膠艾湯	金匱要略	HPLC-DAD
11.	消風散	外科正宗	HPLC-DAD

- 1.3. 本方法已驗證能以 HPLC-DAD 或 UPLC-DAD 技術，對十一種含地黃苷 D 的處方進行定性及定量的檢測。第一校準曲線的工作範圍為溶液中的 2–80 µg/mL，相當於原樣本中的 50–2000 µg/g。而第二校準曲線的工作範圍為溶液中的 2–50 µg/mL，相當於原樣本中的 50–1250 µg/g。



## 2. 試劑

*注意：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. 超純水，Milli Q。

2.2. 乙腈，LC-MS 級。

2.3. 甲醇，LC-MS 級。

2.4. 乙醇，Absolute 級。

2.5. 氯仿，AR 級。

2.6. 1-丁醇，AR 級。

2.7. 1% 乙腈溶液

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

2.8. 50% 甲醇溶液

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

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. 地黃苷D，CAS. No.: 81720-08-3。

2.11. 標準溶液

2.11.1. 標準儲備溶液 (~5000 µg/mL)

精密稱取 ~50 mg 的地黃苷D 於 10 mL 的容量瓶，加入甲醇溶解，並稀釋至刻度標記，可配製成標準儲備溶液。

2.11.2. 標準中間溶液 (~100 µg/mL)

把 0.5 mL 的標準儲備溶液轉移至 25 mL 的容量瓶，加入 50% 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成標準中間溶液。



### 2.12. 第一校準曲線的校準標準溶液

從標準儲備溶液和標準中間溶液中，新鮮配製最少六瓶校準標準溶液。把適量的標準儲備溶液或標準中間溶液分別轉移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 1% 乙腈溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成一系列校準標準溶液。配製校準標準溶液所須的標準儲備溶液和標準中間溶液建議分量表列如下：

校準標準溶液	標準中間溶液 容量 (mL)	標準儲備溶液 容量 (mL)	最終容量 (mL)	最終濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
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

**備註：** 可使用其他合適濃度，或採用其他稀釋順序來達到所需的濃度。須在數據表中記錄詳細資訊。

### 2.13. 第二校準曲線的校準標準溶液

從標準中間溶液中，新鮮配製最少六瓶校準標準溶液。把適量的標準中間溶液分別轉移至六瓶 10 mL 的容量瓶，加入 1% 乙腈溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成一系列校準標準溶液。配製校準標準溶液所須的標準中間溶液建議分量表列如下：

校準標準溶液	標準中間溶液 容量 (mL)	最終容量 (mL)	最終濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
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

**備註：** 可使用其他合適濃度，或採用其他稀釋順序來達到所需的濃度。須在數據表中記錄詳細資訊。



## 2.14. 初始校正驗證標準溶液

### 2.14.1. 初始校正驗證標準儲備溶液 (~5000 µg/mL)

精密稱取 ~50 mg 來源與校準標準品不同的地黃苷D 置於 10 mL 的容量瓶，加入甲醇溶解，並稀釋至刻度標記，可配製成初始校正驗證標準儲備溶液。

### 2.14.2. 初始校正驗證標準中間溶液 (~100 µg/mL)

把 0.2 mL 的初始校正驗證標準儲備溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入 50 % 甲醇溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成初始校正驗證標準中間溶液。

### 2.14.3. 初始校正驗證標準工作溶液 (~10 or 20 µg/mL)

把 1.0 或 2.0 mL 的初始校正驗證標準中間溶液轉移至 10 mL 的容量瓶，加入 1 % 乙腈溶液，並稀釋至刻度標記，可配製成初始校正驗證標準工作溶液。

## 2.15. 校準檢查標準品

校準檢查標準品應為校準標準溶液中的 CS3 或 CS4，即 ~10 或 20 µg/mL。

## 2.16. 方法空白

方法空白應依照第 4.1.3 段至第 4.4 段進行完整的樣本製備步驟，並應含有與樣本溶液等量的試劑。

## 3. 器具

**注意：** 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. 10 和 25 mL 的容量瓶。

3.3. 1 L 的量筒。

3.4. 分析天秤，感量為 0.01 mg。

3.5. 300, 1000 µL 和 10 mL 的自動移液器。



- 3.6. 15 mL 的聚丙烯離心管並配備扭蓋。
- 3.7. 超聲波清洗器。
- 3.8. 漩渦振蕩器。
- 3.9. 離心機，能達到至少 4000 rpm 的轉速。
- 3.10. 一次性玻璃滴管。
- 3.11. 冷凍櫃，可在  $-20^{\circ}\text{C}$  溫度下運作。
- 3.12. 圓底燒瓶，50-mL。
- 3.13. 旋轉蒸發儀或同等類型的系統。
- 3.14. 0.20  $\mu\text{m}$  及 13 mm 的聚四氟乙烯過濾薄膜或同等類型的消耗品。
- 3.15. 液相色譜玻璃樣本瓶。
- 3.16. 高效液相色譜柱，Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色譜柱 (4.6 × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 或同等類型的色譜柱。
- 3.17. 超高效液相色譜柱，Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色譜柱 (2.1 × 150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 或同等類型的色譜柱。
- 3.18. 高效液相色譜儀配備二極管陣列檢測器的系統，Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統或同等類型的系統。
- 3.19. 超高效液相色譜儀配備二極管陣列檢測器的系統，Acquity H-Class UPLC 系統或同等類型的系統。

## 4. 步驟

### 4.1. 配製樣本

- 4.1.1. 如果需要，在進行分析前，使用研磨機或攪拌機把固體的樣本進行研磨及均質化處理。
- 4.1.2. 精密稱取  $\sim 0.5\text{ g}$  的樣本放進 15 mL 扭蓋的離心管。
- 4.1.3. 把 10 mL 的 50% 甲醇溶液注入離心管，然後將離心管渦旋振蕩  $\sim 1\text{ min}$ 。



- 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 min 音波振動處理。
- 4.1.5. 以 ~4000 rpm 的轉速對樣本溶液進行 ~10 min 的離心處理並將上清液轉移至 25 mL 的容量瓶中。
- 4.1.6. 以 4 mL 的 50 % 甲醇溶液進行兩次第 4.1.3 段至第 4.1.5 段所述的步驟。
- 4.1.7. 以同一個 25 mL 的容量瓶收集所有上清液，然後加入 50 % 甲醇溶液稀釋至刻度標記，得到樣本溶液。
- 4.2. 液相-液相提取法
- 4.2.1. 用自動移液器將 2.0 mL 樣本溶液 (第 4.1.7 段) 轉移入 15 mL 的離心管中。
- 4.2.2. 加入 ~5 mL 的氯仿和1-丁醇的混合溶液。
- 4.2.3. 將離心管中的樣本溶液渦旋振蕩 ~1 min。
- 4.2.4. 以 ~4000 rpm 的轉速對樣本溶液進行 ~10 min 的離心處理，達至兩相分離
- 4.2.5. 用一次性玻璃滴管將上清液完全轉移至新的離心管中。
- 4.3. 乙醇沉澱
- 4.3.1. 用自動移液器將 6 mL 的乙醇加入離心管中的樣本溶液。
- 4.3.2. 把樣本溶液擺放在 ~-20 °C 的冷凍櫃中過夜。
- 4.3.3. 以 ~4000 rpm 的轉速對樣本溶液進行 ~10 min 的離心處理，沉澱固體物或上浮物。
- 4.3.4. 將上清液完全轉移至 50 mL 的圓底燒瓶。
- 4.3.5. 用旋轉蒸發儀在 ~45 °C 下將上清液蒸發至乾，然後用 1 mL 的 1 % 乙腈溶液重新溶解。
- 4.3.6. 以 0.2  $\mu$ m 及 13 mm 的聚四氟乙烯過濾薄膜過濾樣本溶液。將濾液收集在液相色譜玻璃樣本瓶中。



備註：如果分析物的濃度不在校準範圍內，可用 1% 乙腈溶液把樣本溶液作進一步稀釋。

#### 4.4. 高效液相色譜/超高效液相色譜二極管陣列分析

4.4.1. 按照使用手冊以操作高效液相色譜/超高效液相色譜儀配備二極管陣列檢測器的系統，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數據表上。

4.4.2. 建議的高效液相色譜儀配備二極管陣列檢測器之操作條件：

高效液相色譜儀	:	Dionex UltiMate 3000 HPLC 系統 或同等類型的系統		
液相色譜柱	:	Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 色譜柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 或同等類型的色譜柱		
流動相 A	:	超純水		
流動相 B	:	乙腈		
梯度	:	時間 (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		
進樣量	:	10 μL		
報告的保留時間	:	地黃苷D ~36.4 min		
柱溫度	:	25 °C		
檢測波長	:	203 nm		



## 4.4.3. 建議的超高效液相色譜儀配備二極管陣列檢測器之操作條件：

超高效液相色譜儀	:	Acquity H-Class UPLC 系統 或同等類型的系統																																													
液相色譜柱	:	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> 色譜柱 (2.1 × 150 mm, 1.7 μm) 或同等類型的色譜柱																																													
流動相 A	:	超純水																																													
流動相 B	:	乙腈																																													
梯度	:	<table border="1"><thead><tr><th>時間 (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>	時間 (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
時間 (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																																													
進樣量	:	10 μL																																													
報告的保留時間	:	地黃苷D ~30.0 min																																													
柱溫度	:	25 °C																																													
檢測波長	:	203 nm																																													

## 5. 計算/結果分析

## 5.1. 鑒別要求

比較樣本檢測峰保留時間和校準標準溶液的平均保留時間，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溶液的平均保留時間相差多於 5% 以作陽性鑒別。

5.2. 在線性校準模式下就分析物繪畫峰面積與校準標準溶液濃度的圖表，從而得出校準曲線。從校準曲線中取得斜率、y 截距和確定系數 ( $r^2$ )。



5.3. 按下列方程式計算樣本中分析物的濃度 ( $\mu\text{g/g}$ ):

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

C = 從校準曲線得出的分析物濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V = 最終體積 (mL)

D = 稀釋比

W = 樣本重量 (g)

## 6. 參考資料

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

---

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。

-空白頁-