利用高效液相色谱二极管阵列技术
检测中药复方颗粒中人参皂苷的含量[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. 中药复方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. 本方法采用高效液相色谱二极管阵列 (HPLC-DAD) 技术，分析以人参为君、臣药或主要成分的十种处方。以下将详细列出处方列表。

项目	处方	古代中医药文献	已验证的分析物			
			Re	Rg1	Rf	Rb1
1.	圣愈汤	医宗金鉴	✓	✓	✓	✓
2.	举元煎	景岳全书	✓	✓	✓	✓
3.	理中汤	伤寒论	✓	✓	✓	✓
4.	人参养荣汤	三因极一病证方论	✓	✓	---	✓
5.	大建中汤	金匮要略	✓	✓	✓	✓
6.	六君子汤	医学正传	✓	✓	✓	✓
7.	附子理中汤	三因极一病证方论	✓	---	---	---
8.	人参败毒散	太平惠民和剂局方	✓	✓	✓	✓
9.	麦门冬汤	金匮要略	✓	✓	✓	✓
10.	温经汤	金匮要略	✓	---	---	✓

1.3. 本方法已验证能以高效液相层析法（HPLC），定性或定量测定中药复方颗粒中的四种分析物，即人参皂苷Re（Re）、人参皂苷Rg1（Rg1）、人参皂苷Rf（Rf）和人参皂苷Rb1（Rb1）。 其验证的工作范围为溶液中的1–50 μg/mL，相当于原样本中的 50–2500 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. 甲醇(MeOH)，LC-MS 级。

2.3. 乙醇(EtOH)，Absolute 级。

2.4. 乙腈(ACN)，LC-MS 级。

2.5. 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。

2.6. 95 % 乙腈溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~950 mL 的乙腈和 ~50 mL 的超纯水。

2.7. 70 % 乙腈溶液

在 1 L 的量筒中混合 ~700 mL 的乙腈和 ~300 mL 的超纯水。

2.8. Re，CAS. No.: 52286-59-6。

2.9. Rg1，CAS. No.: 22427-39-0。

2.10. Rf，CAS. No.: 52286-58-5。

2.11. Rb1，CAS. No.: 41753-43-9。

2.12. 标准溶液

2.12.1. 个别标准储备溶液（~2000 μg/mL）

分别精密称取 ~20 mg 的人参皂苷（Re、Rg1、Rf 和 Rb1）于四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记。

2.12.2. 混合标准中间溶液(INT,~100 μg/mL)

从四瓶不同的个别标准储备溶液，转移 0.5 mL 至一个 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记。

2.13. 校准标准溶液

从混合标准中间溶液中，新鲜配制最少六瓶校准标准溶液。把适量的混合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。校准标准溶液的建议浓度表列如下：

校准标准溶液	混合标准中间溶液容量 (mL)	最终容量 (mL)	人参皂苷 (Re、Rg1、Rf 和 Rb1) 最终浓度 (μg/mL)
CS1	0.1	10.0	1
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资讯。*

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（~2000 μg/mL）

依照第2.12.1.段，分别精密称取 ~20 mg 来源与校准标准品不同的人参皂苷（Re、Rg1、Rf 和 Rb1）于四瓶不同的 10 mL 容量瓶，加入甲醇溶解，并稀释至刻度标记。

2.14.2. 混合初始校正验证标准中间溶液（ICV，~100 μg/mL）

从四瓶不同的初始校正验证标准储备溶液，转移 0.5 mL 至一个 10 mL 的容量瓶，加入甲醇，并稀释至刻度标记。

2.14.3. 初始校正验证标准工作溶液（~10 或 20 μg/mL）

把 1.0 或 2.0 mL 的混合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。

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 4.3 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. 冷冻柜，可在 ~–20 °C 温度下运作。

3.11. 玻璃试管。

3.12. 离心式蒸发器或同等类型的系统。

3.13. 氨丙基(NH2) 固相萃取吸附剂，55- 至 105-µm，6-mL 固相萃取管柱，含 500 mg 吸附剂或同等类型的消耗品。

3.14. 0.20 μm 的聚四氟乙烯(PTFE)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，Symmetry C_{18}色谱柱（4.6 × 250 mm，5 μm）或同等类型的色谱柱。

3.17. HPLC Alliance 系统或性能相当的系统。

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 ~0.5 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 ~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 ~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 至 5 mL 的 50 % 甲醇溶液进行**两次**第 4.1.3.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. 将 2 mL 的样本溶液转移至新的 15 mL 离心管中。

4.1.9. 用自动移液器将 6 mL 的乙醇放入离心管中并涡旋振荡 ~30 s。

4.1.10. 把样本溶液（第 4.1.9. 段）摆放在 ~–20 °C 的冷冻柜中冷藏 ~10 min。

4.1.11. 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。

4.1.12. 用自动移液器将 4 mL 的上清液转移至玻璃试管中。

4.1.13. 用离心式蒸发器在 ~80 °C 下将上清液蒸发至干，然后用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。

4.1.14. 用自动移液器依序地将 0.5 mL 的乙醇和 8.5 mL 的乙腈转移至玻璃试管中。

4.1.15. 把样本溶液涡旋振荡 ~30 s。

4.2. 样本净化

4.2.1. 用 ~5 mL 的乙腈活化 NH_2 固相萃取柱，然后用 5 mL 的 **95 % 乙腈溶液**洗脱。弃掉洗脱液。

4.2.2. 把样本溶液（第4.1.15.段）完全转移至 NH_2 固相萃取柱。弃掉洗脱液。

4.2.3. 用 5 mL 的 **95 % 乙腈溶液**冲洗玻璃试管，然后再完全转移至 NH_2 固相萃取柱中。弃掉洗脱液。

4.2.4. 进一步将 5 mL 的 **70% 乙腈溶液**加入 NH_2 固相萃取柱中，并将洗脱液收集在新的玻璃试管中。

4.2.5. 用离心式蒸发器在 ~80 °C 下将洗脱液蒸发至干，然后用 1 mL 的 50 % 甲醇溶液重新溶解。

4.2.6. 以 0.20 µm 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 50 % 甲醇溶液把样本溶液作进一步稀释。*

4.3. 高效液相色谱二极管阵列分析

4.3.1. 按照使用手册以操作高效液相色谱二极管阵列系统，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。

4.3.2. 建议的高效液相色谱二极管阵列之操作条件：

高效液相色谱仪	:	Alliance 系统或同等类型的系统
液相色谱柱	:	Symmetry C18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 8.0 / 95 / 5 15.0 / 85 / 15 25.0 / 80 / 20 40.0 / 80 / 20 70.0 / 78 / 22 95.0 / 65 / 35 100.0 / 15 / 85 101.0 / 2 / 98 116.0 / 2 / 98 116.5 / 95 / 5 125.0 / 95 / 5
流速	:	0.8 mL/min
进样量	:	10 μL
报告的保留时间	:	Re ~55.0 min Rg1 ~53.0 min Rf ~91.5 min Rb1 ~95.5 min
柱温度	:	25 ℃
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（μg/g）:

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

C = 从校准曲线得出的分析物浓度（μg/mL）
V = 最终容量（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。2025年版**《中华人民共和国药典》**。国家药典委员会。

---

[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。

-空白页-