



GCMTI RD-2:2022

利用高效液相色谱二极管阵列检测器
检测白凤丸的 α -香附酮含量

政府中藥檢測中心方法



利用高效液相色谱二极管阵列检测器检测白凤丸的 α -香附酮含量¹

安全预防措施：本文中的步骤涉及致癌化学品、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，如戴上护眼及护手装备，如有需要可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. 白凤丸是中国内地和香港普遍使用的中成药，常用于治疗血虚引起的各种疾病或妇科紊乱病。古代中药文献和《中华人民共和国药典》(《中国药典》)记录了白凤丸处方的主要成分。然而，香港市面上有不少白凤丸产品配方经修改，成分不尽相同。其中，人参、当归、川芎、香附、白芍、地黄、黄芪、丹参和甘草等中药材常见于不同品牌的白凤丸产品。对应的化学指标成分如下：

中药材	常见化学指标成分
人参 (Ginseng Radix Et Rhizoma)	人参皂苷
当归 (Angelicae Sinensis Radix)	Z-藁本内酯
川芎 (Chuanxiong Rhizoma)	Z-藁本内酯
香附 (Cyperi Rhizoma)	α -香附酮
白芍 (Paeoniae Radix Alba)	芍药苷
地黄 (Rehmanniae Radix)	地黄苷
黄芪 (Astragali Radix)	黄芪皂苷 IV
丹参 (Salviae Miltiorrhizae Radix Et Rhizoma)	丹参酮和丹酚酸 B
甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma)	甘草苷

1.2. 本方法载列利用高效液相色谱二极管阵列检测器就白凤丸样本内的 α -香附酮含量进行定性及 / 或定量检测时所涉及的步骤。

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标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。

2. 试剂

注：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. 甲醇，色谱纯

2.2. 乙腈，色谱纯

2.3. Milli-Q 超纯水

2.4. α -香附酮，CAS 编号：473-08-5

2.5. 提取溶剂

甲醇：水(1:1 v/v)

2.6. 稀释溶剂

乙腈：水(1:1 v/v)

2.7. 配制标准溶液

2.7.1. 标准储备溶液（浓度约为每毫升 1000 微克）

精密称取 10 毫克 α -香附酮置于 10 毫升的容量瓶，加入甲醇溶解并稀释至刻度标记，则可配制标准储备溶液。

2.7.2. 标准中间溶液（浓度约为每毫升 10 微克）

把 0.1 毫升标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制标准中间溶液。

2.7.3. 校准标准溶液（校准标准品 CS1 至 CS5）

把适量标准中间溶液分别转移至若干 5 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制一系列校准标准溶液。配制校准标准溶液所须的标准溶液建议分量表列如下：

校准标准品	标准中间溶液体积(毫升)	最终体积(毫升)	α -香附酮浓度(微克 / 毫升)
CS1	0.05	5	0.1
CS2	0.50	5	1
CS3	2.50	5	5
CS4	3.75	5	7.5
CS5	5.00	5	10

- 2.7.4. 初始校正验证(ICV)标准储备溶液 (浓度约为每毫升 1000 微克)

精密称取 10 毫克来源与校准标准品不同的 α -香附酮置于 10 毫升的容量瓶，加入甲醇溶解并稀释至刻度标记，则可配制 ICV 标准储备溶液。

- 2.7.5. ICV 标准中间溶液 (浓度约为每毫升 10 微克)

把 0.1 毫升 ICV 标准储备溶液转移至 10 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制 ICV 标准中间溶液。

- 2.7.6. ICV 标准工作溶液 (浓度约为每毫升 5 微克)

把 0.5 毫升 ICV 标准中间溶液转移至 1 毫升的容量瓶，加入稀释溶剂(第 2.6.段)稀释至刻度标记，则可配制 ICV 标准工作溶液。

- 2.7.7. 加标标准溶液 (浓度约为每毫升 1000 微克)

参考标准储备溶液(第 2.7.1.段)。

3. 器具

所有玻璃量器用后均须尽快以丙酮及清洁剂清洗。用清洁剂清洗后，玻璃量器随即分别以丙酮及水冲洗，之后再以丙酮冲洗两次。

- 3.1. 研磨机或搅拌机

- 3.2. 分析天秤，感量为 0.1 毫克

- 3.3. 1 毫升、10 毫升和 25 毫升的容量瓶

- 3.4. 100 微升、300 微升和 1000 微升的自动移液器

- 3.5. 离心机，转速至少为 4000 转 / 分钟
- 3.6. 15 毫升的离心管
- 3.7. 涡旋振荡器
- 3.8. 超声波清洗器
- 3.9. 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜
- 3.10. 液相色谱玻璃样本瓶
- 3.11. 液相色谱柱：Inertsil ODS-4，5 微米，2.1 毫米×250 毫米，生产商为 GL Sciences，或具同等规格
- 3.12. 高效液相色谱二极管阵列检测器系统

4. 步骤

4.1. 配制样本

- 4.1.1. 分析前使用研磨机或搅拌机对固体样本进行研磨及均质化处理。
- 4.1.2. 精密称取 0.5 克白凤丸样本放进 15 毫升的离心管。
- 4.1.3. 把 10 毫升提取溶剂(第 2.5.段)注入离心管，然后将离心管涡旋振荡 1 分钟。
- 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 分钟音波振动处理。
- 4.1.5. 以 4000 转 / 分钟的转速对样本溶液进行 10 分钟的离心处理并将上清液转移至 25 毫升的容量瓶中。
- 4.1.6. 以 5 毫升提取溶剂(第 2.5.段)重复进行两次第 4.1.3.段至第 4.1.5.段所述的步骤。以同一个 25 毫升的容量瓶收集所有上清液，然后加入提取溶剂(第 2.5.段)稀释至刻度标记，则可得到样本溶液。
- 4.1.7. 以 0.45 微米聚四氟乙烯过滤薄膜过滤样本溶液至液相色谱玻璃样本瓶中，便可用高效液相色谱二极管阵列检测。

注：如果分析物的浓度不在校准范围内，请用稀释溶剂(第 2.6.段)进一步稀释样本溶液。

4.2. 高效液相色谱二极管阵列检测法

4.2.1. 高效液相色谱二极管阵列检测器系统应按使用手册操作，并在下列的建议条件下进行分析。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报表上。

4.2.2. 建议的高效液相色谱二极管阵列检测器操作条件：

液相色谱系统：Waters Alliance e2695 高效液相色谱系统
或具同等效能的系统

液相色谱柱：GL Sciences Inertsil ODS-4,
5 微米, 2.1 毫米 x 250 毫米或具同等规格

柱温度：25 °C

流速：0.2 毫升 / 分钟

进样量：10 微升

流动相
A: 水
B: 乙腈

梯度	时间(分钟)	A %	B %
	0.0	80	20
	10.0	20	80
	25.0	20	80
	25.5	80	20
	35.0	80	20

检测波长：253 奈纳

4.2.3. 使用至少 5 个校准标准品(第 2.7.3. 段)校准高效液相色谱二极管阵列检测器系统。

4.2.4. 使用高效液相色谱二极管阵列检测器系统对空白对照样本、样本溶液、重复样本、加标样本和相关检查标准溶液进行分析。使用者可根据实验室既定的要求作质量控制。

5. 计算 / 结果分析

5.1. 鉴别要求

进行高效液相色谱二极管阵列检测时，应比较样本检测峰保留时间和校准标准品的平均保留时间，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品的平均保留时间相差多于 5%。

5.2. 在线性校准模式下就分析物绘画峰面积与浓度的图表，从而得出校准曲线。

5.3. 按下列方程式计算样本中分析物的浓度(微克 / 克):

$$\text{分析物浓度(微克/克)} = \frac{C \times V \times D}{W}$$

C = 从校准曲线得出的分析物浓度(微克 / 毫升);

V = 最终体积(毫升);

D = 稀释比; 以及

W = 样本重量(克)

6. 参考资料

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

6.2. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Eurachem / CITAC Guide CG4, 3rd Edition, 2012.

6.3. V. J. Barwick and S. L. R. Ellison, “VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for Uncertainty Evaluation from Validation data”, LGC/VAM/1998/088 Version 5.1, January 2000.