

## HPLC 法同时测定天麻首乌片中 12 种活性成分

刘梦媛<sup>1</sup>, 许曾平<sup>2</sup>

1. 天津医科大学第二医院 药学部, 天津 300211

2. 中国医学科学院 生物医学工程研究所, 天津 300192

**摘要:**目的 建立 HPLC 梯度洗脱法同时测定天麻首乌片(TSP)中 12 种活性成分芍药苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(二苯乙炔苷)、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的量。方法 采用 HPLC 法, Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 梯度洗脱; 进样量为 10  $\mu$ L。结果 12 种活性成分芍药苷、二苯乙炔苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素分别在 3.12~31.20  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ )、4.98~49.80  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 4$ )、1.05~10.50  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ )、0.99~9.90  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ )、1.11~11.10  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ )、3.24~32.40  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ )、3.63~36.30  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ )、1.13~11.30  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 3$ )、1.9~19.0  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ )、1.55~15.50  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ )、1.48~14.80  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ )、102.8~1028.0  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 9$ ) 质量浓度与峰面积具有较好的线性关系; 精密性、重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率和相应的 RSD 分别为 99.88%、1.55%, 101.25%、0.98%, 99.67%、1.29%, 102.04%、1.17%, 101.17%、1.67%, 98.27%、1.51%, 100.28%、1.20%, 99.11%、0.95%, 98.49%、1.67%, 101.57%、0.94%, 102.37%、0.58%, 97.89%、0.69%。12 批次供试品中 12 种指标成分质量分数分别为 1.241~1.261、2.116~2.133、0.540~0.558、0.077~0.099、0.089~0.110、1.111~1.134、0.158~0.183、1.375~1.399、0.342~0.372、0.542~0.571、0.648~0.672、45.05~45.93 mg/g。结论 建立的 HPLC 梯度洗脱法可同时测定 TSP 中 12 种活性成分, 该方法操作简便、快速、准确, 可作为 TSP 全面可靠的质量控制方法。

**关键词:** HPLC; 天麻首乌片; 芍药苷; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙炔-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 天麻素; 阿魏酸; 毛蕊花糖苷; 甘草苷; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 特女贞苷; 欧前胡素; 芦丁; 蟛蜞菊内酯; 大黄素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4682-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.014

## Determination of 12 kinds of components in Tianma Shouwu Pills by HPLC method

LIU Meng-yuan<sup>1</sup>, XU Zeng-ping<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

2. Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College-Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

**Abstract: Objective** To develop an HPLC combined with gradient elution method for the determination of the contents of paeoniflorin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucosid, gastrodin, ferulic acid, acteoside, liquiritin, tanshinone II<sub>A</sub>, specnuezhenide, imperatorin, rutin, wedelolactone, and emodin in Tianma Shouwu Pills (TSP) at the same time. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid solution (B) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min for gradient elution; sample quantity was 10  $\mu$ L. **Results** The linear relation between peak area and concentration of the twelve active components were good, which were 3.12—31.20  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ ) paeoniflorin, 4.98—49.80  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 4$ ) 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucosid, 1.05—10.50  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ ) gastrodin, 0.99—9.90  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ ) ferulic acid, 1.11—11.10  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ ) acteoside, 3.24—32.40  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ ) liquiritin, 3.63—36.30  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 2$ ) tanshinone II<sub>A</sub>, 1.13—11.30  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 3$ ) specnuezhenide, 1.9—19.0  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ ) imperatorin, 1.55—15.50  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ ) rutin, 1.48—14.80  $\mu$ g/mL ( $r=0.999\ 5$ ) wedelolactone, and 102.8—1028.0

收稿日期: 2017-06-30

作者简介: 刘梦媛 (1989—), 女, 本科。Tel: 13920704543 E-mail: liumy115@163.com

μg/mL ( $r = 0.9999$ ) emodin. The precision and repeatability were good, and RSD values were less than 2.0%. Moreover, the average recoveries and the corresponding RSD values were 99.88% (1.55%), 101.25% (0.98%), 99.67% (1.29%), 102.04% (1.17%), 101.17% (1.67%), 98.27% (1.51%), 100.28% (1.20%), 99.11% (0.95%), 98.49% (1.67%), 101.57% (0.94%), 102.37% (0.58%), and 97.89% (0.69%), respectively. The contents of 12 batches of the 12 active components were 1.241—1.261, 2.116—2.133, 0.540—0.558, 0.077—0.099, 0.089—0.110, 1.111—1.134, 0.158—0.183, 1.375—1.399, 0.342—0.372, 0.542—0.571, 0.648—0.672, and 45.05—45.93 mg/g. **Conclusion** An HPLC combined with gradient elution method has been successfully established for simultaneous determination of 12 components in TSP. The method is simple, quick, accurate, and helpful for the quality control of TSP.

**Key words:** HPLC; Tianma Shouwu Pills; paeoniflorin; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucosid; gastrodin; ferulic acid; acteoside; liquiritin; tanshinone II<sub>A</sub>; specnuezhenide; imperatorin; rutinum; wedelolactone; emodin

天麻首乌片 (Tianma Shouwu Pills, TSP) 的功效是滋阴补肾、养血息风。临床上用于肝肾阴虚所致的头晕目眩、头痛耳鸣、口苦咽干、腰膝酸软、脱发、白发; 脑动脉硬化、早期高血压、血管神经性头痛、脂溢性脱发等。TSP 为癌症辅助治疗药物, 可配合化疗使用, 有一定的减毒、增效作用<sup>[1]</sup>, 对于肺癌、结肠癌和胃癌等都具有治疗作用<sup>[1-5]</sup>。TSP 是由天麻、何首乌、白芷、熟地黄、丹参、川芎、女贞子、当归、炒蒺藜、墨旱莲、桑叶、白芍、甘草、黄精 14 味中药材加工而成的复方制剂, 收载于《中国药典》2015 年版一部<sup>[6]</sup>。《中国药典》中仅规定了 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (二苯乙烯苷) 的定量测定方法, 现文献报道该品种中定量测定还将大黄素作为指标成分进行测定<sup>[7-9]</sup>, 测定方法主要为 HPLC 法和薄层色谱法<sup>[10]</sup>。根据各成分的药理活性, 确定白芍中的芍药苷、何首乌中的二苯乙烯苷和大黄素、天麻中的天麻素、当归中的阿魏酸、熟地黄中的毛蕊花糖苷、甘草中的甘草苷、丹参中的丹参酮 II<sub>A</sub>、女贞子中的特女贞苷、白芷中的欧前胡素、桑叶中的芦丁、墨旱中的莲萆薢菊内酯为 TSP 的指标成分。多指标成分测定能更加客观地反映中成药质量<sup>[11-19]</sup>, 本实验采用 HPLC 梯度洗脱法, 首次建立了 HPLC 同时测定 TSP 中芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、萆薢菊内酯和大黄素 12 种活性成分的测定方法, 该方法简便、快速, 结果准确、重现性好, 为提高 TSP 质量标准提供有效依据。

## 1 仪器与材料

Agilent1260 高效液相色谱仪, 包括二极管阵列检测器, Chemstation 化学工作站等, Agilent 公司; XS521 型电子天平, 十万分之一, Mettler Toledo 公司; KQ-3500 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司。

对照品芍药苷 (批号 110736-201438, 质量分数 98.9%)、二苯乙烯苷 (批号 110844-200003, 质量分数 96.4%)、天麻素 (批号 110807-201306, 质量分数 99.2%)、阿魏酸 (批号 110773-201313, 质量分数 99.6%)、特女贞苷 (批号 111926-201605, 质量分数 97.3%)、毛蕊花糖苷 (批号 111530-201411, 质量分数 98.1%)、丹参酮 II<sub>A</sub> (批号 110766-201520, 质量分数 98.9%)、甘草苷 (批号 110323-201065, 质量分数 98.5%)、欧前胡素 (批号 110826-201415, 质量分数 99.7%)、芦丁 (批号 100080-201408, 质量分数 98.4%)、萆薢菊内酯 (批号 111885-201001, 质量分数 97.5%)、大黄素 (批号 110756-201512, 质量分数 98.7%) 均购于中国食品药品检定研究院。乙腈, 色谱纯; 磷酸, 分析纯; 水, 重蒸馏水。

天麻 *Gastrodiae Rhizoma*、何首乌 *Polygoni Multiflora Radix*、白芷 *Angelicae Dahuricae Radix*、熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata*、丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*、川芎 *Chuanxiong Rhizoma*、女贞子 *Ligustri Lucidi Fructus*、当归 *Angelicae Sinensis Radix*、炒蒺藜 *Fructus Tribuli*、墨旱莲 *Ecliptae Herba*、桑叶 *Mori Folium*、白芍 *Paeoniae Radix Alba*、甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*、黄精 *Polygonati Rhizoma* 经天津医科大学王金生副教授鉴定均为正品, 均购自天津医科大学第二医院药学部, 其基原植物天麻为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 何首乌为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 白芷为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根, 熟地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根的炮制品, 丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 川芎为伞形科藁

本属植物川芎 *Ligusticum chuamxiong* Hort. 的干燥根茎, 女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 炒蒺藜为蒺藜科蒺藜属植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实的炮制品, 墨旱莲为菊科鳢肠属植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分, 桑叶为桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 黄精为百合科黄精属植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥根茎。

TSP, 每片 0.25 g, 湖南国华制药有限公司生产, 批号分别为 160305、160411、160628、160826、161101、161102; 湖南德海制药有限公司生产, 批号分别为 151117、151118、160307、160619、160921、170105。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10.0 min, 10%~20%乙腈; 10.0~15.0 min, 20%~30%乙腈; 15.0~30.0 min, 30%乙腈; 30.0~40.0 min, 10%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 220 nm; 柱温 40 ℃; 进样量 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素适量, 50%甲醇溶解, 得含芍药苷 30 mg/L、二苯乙烯苷 50 mg/L、天麻素 10 mg/L、阿魏酸 10 mg/L、毛蕊花糖苷 10 mg/L、甘草苷 30 mg/L、丹参酮 II<sub>A</sub> 30 mg/L、特女贞苷 10 mg/L、欧前胡素 20 mg/L、芦丁 15 mg/L、蟛蜞菊内酯 15 mg/L 和大黄素 1 000 mg/L 的混合对照品溶液, 备用。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取 TSP 糖衣片 10 片, 去糖衣, 研成细粉, 取适量 (相当于本品 2 片), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得, 备用。

**2.2.3 阴性对照样品的制备** 按处方比例及制备工

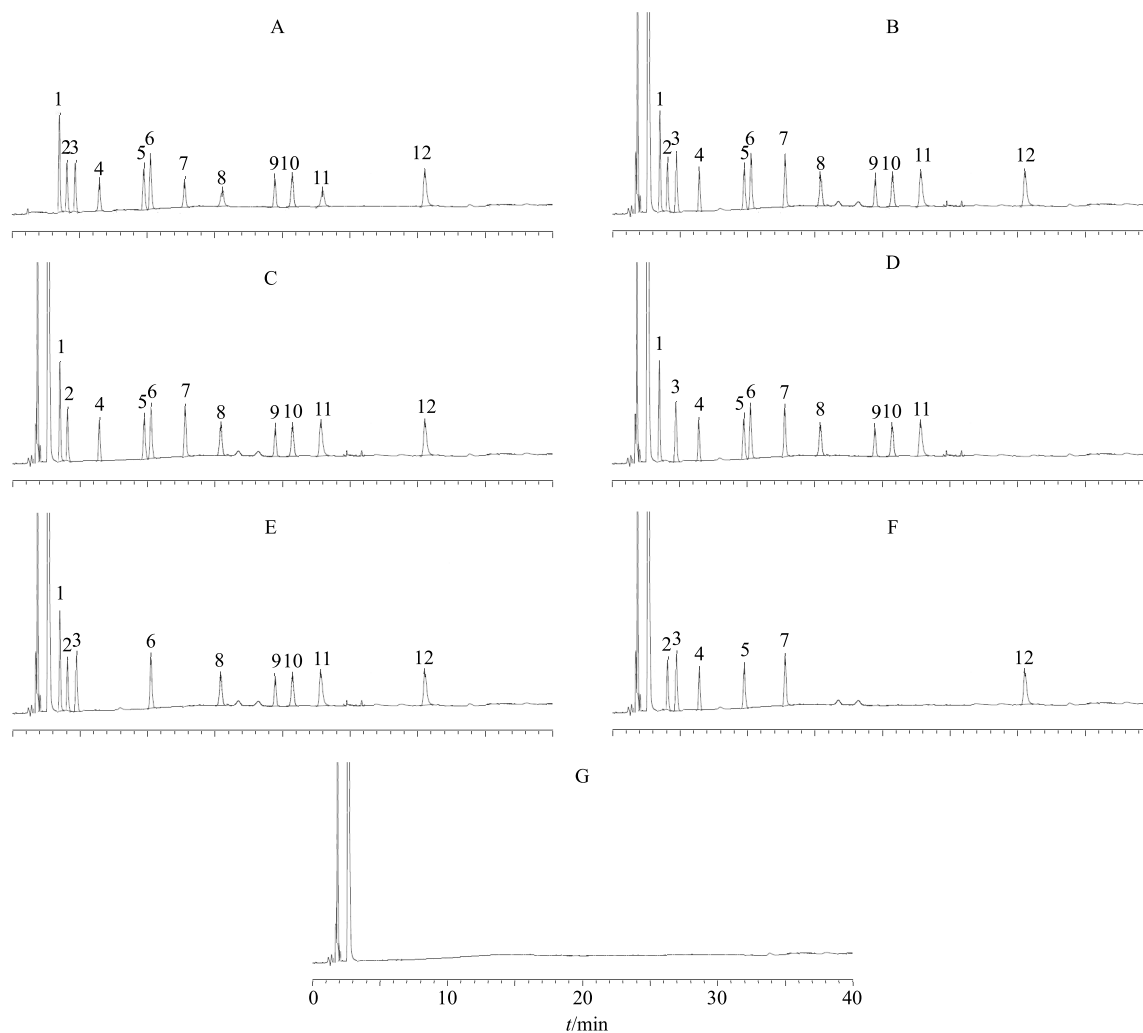
艺分别制备空白, 缺天麻, 缺何首乌, 缺熟地黄、丹参、川芎、当归及缺白芷、女贞子、炒蒺藜、墨旱莲、桑叶、白芍、甘草、黄精的阴性样品, 分别按“2.2.2”项下方法操作, 即得缺各味药材的各阴性对照溶液。

### 2.3 专属性考察

根据该色谱条件, 分别取“2.2.3”项下的 5 种阴性对照溶液、“2.2.1”项下的混合对照品溶液和“2.2.1”项下的供试品溶液, 在“2.1”项的色谱条件下依法进行测定。结果显示, 在与上述 12 种对照品色谱峰相应的保留时间处, 阴性对照溶液没有对应的色谱峰, 说明阴性无干扰, 色谱图见图 1。

### 2.4 线性关系考察、检测限、定量限

分别精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液各 1、2、2.5、5、10 mL, 将其置于 25 mL 量瓶中并用 50%甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得到 5 个质量浓度的混合对照品溶液, 按照上述测定方法进行测定, 以质量浓度作为横坐标 ( $X$ ), 测得的峰面积作为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 计算得线性回归方程、相关系数 ( $r$ )、线性范围、定量限及检测限, 结果分别为芍药苷  $Y=3\,521 X+11.27$ ,  $r=0.999\,5$ , 线性范围 3.12~31.2 μg/mL, 定量限 0.71 μg/mL, 检测限 0.22 μg/mL; 二苯乙烯苷  $Y=5.378 X+10.25$ ,  $r=0.999\,4$ , 线性范围 4.98~49.80 μg/mL, 定量限 0.54 μg/mL, 检测限 0.15 μg/mL; 天麻素  $Y=23.84 X+2.674$ ,  $r=0.999\,5$ , 线性范围 1.05~10.50 μg/mL, 定量限 0.42 μg/mL, 检测限 0.12 μg/mL; 阿魏酸  $Y=12.49 X+203.8$ ,  $r=0.999\,2$ , 线性范围 0.99~9.90 μg/mL, 定量限 0.39 μg/mL, 检测限 0.13 μg/mL; 毛蕊花糖苷  $Y=22.67 X-39.57$ ,  $r=0.999\,2$ , 线性范围 1.11~11.10 μg/mL, 定量限 0.72 μg/mL, 检测限 0.19 μg/mL; 甘草苷  $Y=11.23 X-4.526$ ,  $r=0.999\,1$ , 线性范围 3.24~32.40 μg/mL, 定量限 0.25 μg/mL, 检测限 0.09 μg/mL; 丹参酮 II<sub>A</sub>  $Y=1.339 X+2\,854$ ,  $r=0.999\,2$ , 线性范围 3.63~36.30 μg/mL, 定量限 1.11 μg/mL, 检测限 0.44 μg/mL; 特女贞苷  $Y=1\,284 X+287.4$ ,  $r=0.999\,3$ , 线性范围 1.13~11.30 μg/mL, 定量限 0.42 μg/mL, 检测限 0.17 μg/mL; 欧前胡素  $Y=5.671 X+4.342$ ,  $r=0.999\,5$ , 线性范围 1.9~19.0 μg/mL, 定量限 0.75 μg/mL, 检测限 0.22 μg/mL; 芦丁  $Y=55.41 X-74.61$ ,  $r=0.999\,8$ , 线性范围 1.55~15.5 μg/mL, 定量限 0.58 μg/mL, 检测限 0.21 μg/mL; 蟛蜞菊内酯  $Y=357.4 X+229.5$ ,  $r=0.999\,5$ , 线性范



1-芍药苷 2-二苯乙烯苷 3-天麻素 4-阿魏酸 5-毛蕊花糖苷 6-甘草苷 7-丹参酮 II<sub>A</sub> 8-特女贞苷 9-欧前胡素  
10-芦丁 11-蟛蜞菊内酯 12-大黄素  
1-paeoniflorin 2-tetrahydroxystilbene glucoside 3-gastrodin 4-ferulic acid 5-acteoside 6-liquiritin 7-tanshinone II<sub>A</sub>  
8-specnuezhenide 9-imperatorin 10-rutin 11-wedelolactone 12-emodin

图 1 混合对照品 (A), TSP 样品 (B), 缺天麻 (C), 缺何首乌 (D), 缺熟地黄、丹参、川芎、当归 (E), 缺白芷、女贞子、炒蒺藜、墨旱莲、桑叶、白芍、甘草、黄精 (F) 阴性样品及空白 (G) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), samples (B), blank sample without *Gastrjodiae Rhizoma* (C), blank sample without *Polygoni Multiflori Radix* (D), blank sample without *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae Sinensis Radix* (E), blank sample without *Angelicae Dahuricae Radix*, *Ligustri Lucidi Fructus*, *Fructus Tribuli*, *Ecliptae Herba*, *Mori Folium*, *Paeoniae Radix Alba*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Polygonati Rhizoma* (F), and blank (G)

围 1.48~14.80  $\mu\text{g/mL}$ , 定量限 0.52  $\mu\text{g/mL}$ , 检测限 0.13  $\mu\text{g/mL}$ ; 大黄素  $Y=4.387X+304.6$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围 102.8~1 028.0  $\mu\text{g/mL}$ , 定量限 1.56  $\mu\text{g/mL}$ , 检测限 0.64  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹

参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的峰面积, 分别计算这 12 个组分峰面积的 RSD 值, 结果这 12 个组分峰面积的 RSD 依次为 1.67%、0.61%、1.29%、1.33%、1.24%、0.93%、1.25%、1.44%、0.86%、1.71%、0.55%、0.68%, 结果显示仪器精密度良好。

## 2.6 重复性试验

取批号为 160305 的 TSP 适量, 按“2.2.2”项

方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项的色谱条件进行测定,分别计算 TSP 中的芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的量,并计算这 12 个组分质量分数的 RSD 依次为 0.86%、0.93%、0.77%、1.11%、1.27%、1.38%、1.39%、1.24%、1.36%、0.62%、1.01%、0.99%。结果表明本方法重复性良好。

## 2.7 稳定性试验

取批号为 160305 的 TSP 同一份供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h,按“2.1”项色谱条件测定芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的峰面积值,求得这 12 种组分的峰面积的 RSD 依次为 1.59%、1.22%、0.88%、0.79%、1.64%、1.59%、0.85%、1.62%、1.34%、0.91%、0.77%、1.06%,表明供试样品溶液在制备后 12 h 内稳定。

## 2.8 加样回收率试验

取批号为 160305 的 TSP 适量,称取 9 份,每份 1.0 g,置于圆底烧瓶中,3 份 1 组,分别精密加入芍药苷 30 mg/L、二苯乙烯苷 50 mg/L、天麻素 10 mg/L、阿魏酸 10 mg/L、毛蕊花糖苷 10 mg/L、甘草苷 30 mg/L、丹参酮 II<sub>A</sub> 30 mg/L、特女贞苷 10 mg/L、欧前胡素 20 mg/L、芦丁 15 mg/L、蟛蜞菊内酯 15 mg/L 和大黄素 100 mg/L 混合对照溶液 0.5、1.0、1.5 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,

定容至 25 mL,作为加样回收样品试液。按照“2.1”项色谱条件测定,计算这 12 个组分芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的回收率分别为 99.88%、101.25%、99.67%、102.04%、101.17%、98.27%、100.28%、99.11%、98.49%、101.57%、102.37%、97.89%,RSD 分别为 1.55%、0.98%、1.29%、1.17%、1.67%、1.51%、1.20%、0.95%、1.67%、0.94%、0.58%、0.69%。

## 2.9 耐用性考察

取批号为 160305 的 TSP 适量,照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法配制,按“2.1”项下色谱条件进行分析,记录色谱图。考察柱温(38、40、42 °C)、体积流量(0.9、1.0、1.1 mL/min)变化及不同批号色谱柱变化对测定的影响。结果显示,柱温、体积流量与流动相比比例的微小变化对样品的测定无明显影响,表明耐用性良好。

## 2.10 样品的测定

取 12 个批次的 TSP,按“2.2.2”项制备方法制备供试品溶液,按“2.1”项的色谱条件进样测定,结果见表 1。从所测得的实验结果可以看出,12 批 TSP 中芍药苷、二苯乙烯苷、天麻素、阿魏酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、丹参酮 II<sub>A</sub>、特女贞苷、欧前胡素、芦丁、蟛蜞菊内酯和大黄素的质量分数分别在 1.241~1.261、2.116~2.133、0.540~0.558、0.077~0.099、0.089~0.110、1.111~1.134、0.158~0.183、1.375~1.399、0.342~0.372、0.542~0.571、0.648~

表 1 12 批 TSP 定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of 12 batches of TSP

| 批号     | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |                     |       |       |       |       |
|--------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
|        | 芍药苷                        | 天麻素   | 二苯乙烯苷 | 阿魏酸   | 毛蕊花糖苷 | 甘草苷   | 蟛蜞菊内酯 | 丹参酮 II <sub>A</sub> | 特女贞苷  | 欧前胡素  | 芦丁    | 大黄素   |
| 160305 | 1.243                      | 0.548 | 2.121 | 0.086 | 0.099 | 1.122 | 0.164 | 1.384               | 0.355 | 0.549 | 0.652 | 45.22 |
| 160411 | 1.255                      | 0.543 | 2.116 | 0.090 | 0.110 | 1.131 | 0.174 | 1.387               | 0.357 | 0.542 | 0.656 | 45.87 |
| 160628 | 1.244                      | 0.542 | 2.133 | 0.094 | 0.093 | 1.127 | 0.161 | 1.396               | 0.353 | 0.545 | 0.658 | 45.93 |
| 160826 | 1.241                      | 0.546 | 2.126 | 0.084 | 0.091 | 1.129 | 0.160 | 1.399               | 0.344 | 0.547 | 0.650 | 45.13 |
| 161101 | 1.252                      | 0.550 | 2.119 | 0.088 | 0.089 | 1.112 | 0.165 | 1.378               | 0.342 | 0.551 | 0.672 | 45.05 |
| 161102 | 1.258                      | 0.558 | 2.127 | 0.099 | 0.105 | 1.126 | 0.171 | 1.385               | 0.367 | 0.555 | 0.662 | 45.63 |
| 151117 | 1.261                      | 0.549 | 2.129 | 0.077 | 0.101 | 1.115 | 0.183 | 1.388               | 0.348 | 0.562 | 0.668 | 45.35 |
| 151118 | 1.246                      | 0.547 | 2.122 | 0.083 | 0.093 | 1.134 | 0.159 | 1.375               | 0.366 | 0.547 | 0.659 | 45.53 |
| 160307 | 1.249                      | 0.542 | 2.131 | 0.085 | 0.107 | 1.130 | 0.158 | 1.377               | 0.371 | 0.556 | 0.648 | 45.68 |
| 160619 | 1.258                      | 0.540 | 2.118 | 0.079 | 0.094 | 1.111 | 0.162 | 1.382               | 0.372 | 0.564 | 0.651 | 45.48 |
| 160921 | 1.256                      | 0.541 | 2.124 | 0.075 | 0.098 | 1.125 | 0.166 | 1.380               | 0.351 | 0.566 | 0.664 | 45.28 |
| 170105 | 1.247                      | 0.551 | 2.128 | 0.082 | 0.096 | 1.121 | 0.168 | 1.393               | 0.362 | 0.571 | 0.660 | 45.72 |

0.672、45.05~45.93 mg/片。其中大黄素的量最高,阿魏酸、毛蕊花糖苷和蟛蜞菊内酯的量较低,各个批次的中成药之间各个成分的量差异小。

### 3 讨论

首次建立 HPLC 同时测定 TSP 中 12 种活性成分的方法,方法简便、结果可靠,可作为 TSP 多指标定量测定方法,对于该中成药的质量标准提升具有参考价值。

在参考药典方法的基础上,对色谱条件进行了优化,由于有多种成分,对于梯度洗脱程序和色谱柱重点进行了优化。同时对于样品的提取效率进行了考察,分别考察了过滤,超声提取和水浴回流提取对提取效率的影响,实验结果表明过滤的提取效率最低,水浴回流提取的效率最高;对于水浴回流提取方式的提取溶剂进行考察了,50%甲醇的提取效率最好;水浴回流提取时间分别选取 20、30、40、60 min 进行考察,确定了 30 min 的提取时间。

### 参考文献

- [1] 杨大雅, 欧阳天成. 天麻首乌片治疗恶性肿瘤化疗后脱发 60 例 [J]. 中华全科医师杂志, 2007, 6(11): 667.
- [2] 肖德华, 谭达全. 天麻首乌片治疗高血压病 120 例总结 [J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(6): 3-5.
- [3] 肖德华, 谭达全. 天麻首乌片治疗脑动脉硬化症 120 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(9): 41-43.
- [4] 李建国, 黄仁峰, 刘莲芳, 等. 天麻首乌片治疗偏头痛 60 例临床研究 [J]. 实用中西医结合临床, 2009, 9(1): 24-25.
- [5] 肖德华, 谭达全. 天麻首乌片治疗血管性头痛 60 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(12): 50-51.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 黄广菊. HPLC 法测定天麻首乌片中总黄酮含量的应用研究 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(2): 23-24.
- [8] 王淑红, 熊 英. 天麻首乌片中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙
- 烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量测定研究 [J]. 中国药品标准, 2006, 7(1): 56-58.
- [9] 陈新元, 王实强, 罗 琴. 天麻首乌片中总黄酮含量的测定研究 [J]. 湖南中医杂志, 2003, 19(2): 70.
- [10] 李瑞莲, 何芝义. 薄层扫描法测定天麻首乌片中总黄酮的含量 [J]. 中国药事, 2003, 17(2): 118-119.
- [11] 高 森, 白 雪, 文柳静, 等. HPLC-DAD 变波长法同时测定跌打止痛散中 6 种指标成分 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2863-2867.
- [12] 陈 帅, 王慧竹, 薛健飞, 等. HPLC 法同时测定四季三黄丸中 9 种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(8): 1727-1731.
- [13] 方 昱, 万丽丽, 朱金辉, 等. HPLC-MS/MS 测定同济 2 号颗粒剂中黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 394-397.
- [14] 瞿 燕, 李春雪, 曾 锐, 等. 双波长 RP-HPLC 同时测定龙砂颗粒中 7 种成分 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 221-225.
- [15] 胡 冰, 王鼎峰. HPLC 测定枳术宽中胶囊中 4 种有效成分 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(3): 335-339.
- [16] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [17] 郭晓民, 瞿晶田, 柴士伟. HPLC-DAD 法测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷和蒙花苷 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(3): 382-385.
- [18] Cui H R, Xu G H, Jang W Y, *et al.* Simultaneous determination of eight active components in Liuwei Wuling Tablet using HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 331-336.
- [19] 王春雷, 姜建伟, 侯桂兰. 急支糖浆 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4192-4197.