中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)16－0062－06
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.16.014

银星养脑方超高效液相色谱指纹图谱的建立及4种成分含量测定*

蒋翠平[1,2]，陶叶琴[1,2]，成紫嫣[3]，严建业[3]，熊　丹[1,2△]，谢宗明[1,2]

（1. 湖南省浏阳市中医医院，湖南 浏阳　410300；2. 湖南中医药大学附属第二中西医结合医院，湖南 浏阳　410300；3. 湖南中医药大学药学院，湖南 长沙　410208）

摘要：目的　建立银星养脑方超高效液相色谱（UPLC）指纹图谱，并测定指认出的4种成分的含量。**方法**　色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH C_{18}柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为0.1%磷酸水溶液－乙腈（梯度洗脱），流速为0.4 mL/min，检测波长为321 nm，柱温为30 ℃，进样量为1 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 A版）建立12批样品的UPLC指纹图谱，并进行相似度评价，确定共有峰并指认；采用聚类分析和主成分分析对样品进行分类和质量评价；采用UPLC法测定样品指认出的成分含量。**结果**　12批样品UPLC指纹图谱中有30个共有峰，可确定归属银杏叶、蜜远志、川芎，指认出其中4种成分，分别为阿魏酸、3,6′－二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮。样品相似度均大于0.990。样品共聚为4类；7个主成分累积方差贡献率达94.100%。4种成分质量浓度分别在3.36～67.20 μg/mL，5.10～102.00 μg/mL，5.00～100.00 μg/mL，2.50～50.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（$R^2 \geq 0.998\ 0$，$n=5$）；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于3.0%；平均加样回收率为99.01%～101.19%，*RSD*为0.22%～1.01%（$n=6$）。**结论**　该方法简单可行、专属性强、重复性好，可用于银星养脑方的质量评价；也为银星养脑片的质量控制和二次开发奠定了前期基础。

关键词：银星养脑方；超高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定；质量评价

Establishment of UPLC Fingerprint and Determination of Four Components in Yinxing Yangnao Formula

JIANG Cuiping[1,2], TAO Yeqin[1,2], CHENG Ziyan[3], YAN Jianye[3], XIONG Dan[1,2], XIE Zongming[1,2]

(1. Liuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuyang, Hunan, China 410300; 2. The Second Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Liuyang, Hunan, China 410300; 3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China 410208)

Abstract: Objective　To establish the ultra－high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Yinxing Yangnao Formula and determine the contents of four identified components. **Methods**　The chromatographic column was the ACQUITY UPLC® BEH C_{18} column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution－acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.4 mL/min, the detection wavelength was 321 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μL. The UPLC fingerprint of 12 batches of samples was established and the similarity evaluation was performed by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012 A), the common peaks were marked and identified. The samples were classified and the quality was evaluated by the cluster analysis and principal component analysis. The contents of identified components in the samples were determined by the UPLC method. **Results**　There were 30 common peaks in the UPLC fingerprint of 12 batches of samples, which from Ginkgo Folium, honey－baked Polygalae Radix and Chuanxiong Rhizoma; four components were identified, namely ferulic acid, 3,6′－disinapoyl sucrose, isoginkgetin and sciadopitysin. The similarity of the samples was greater than 0.990. The samples were classified into four groups. The cumulative variance contribution rate of the seven principal components was 94.100%. The linear ranges of ferulic acid, 3,6′－disinapoyl sucrose, isoginkgetin and sciadopitysin were 3.36－67.20 μg/mL, 5.10－102.00 μg/mL, 5.00－100.00 μg/mL, 2.50－50.00 μg/mL ($R^2 \geq 0.998\ 0$, $n=5$) respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rate of the above four components was in the range of 99.01%－101.19%, with the *RSD*s in the range of 0.22%－1.01% ($n=6$). **Conclusion**　This method is simple, feasible, specific and repeatable, which can be used for the quality evaluation of Yinxing Yangnao Formula, lay the foundation for the quality control and secondary development of Yinxing Yangnao Tablets.

Key words: Yinxing Yangnao Formula; UPLC; fingerprint; content determination; quality evaluation

*基金项目：湖南省自然科学基金[2021JJ80070]；湖南省科技创新计划项目[2021SK51501]；湖南省长沙市自然科学基金[kq2202497]；湖南省长沙市中医药科研课题重点项目[A202304]。

第一作者：蒋翠平，女，硕士，主管中药师，研究方向为医院制剂管理与质量控制，(电子信箱)86263293@qq.com。

△通信作者：熊丹，女，硕士，主管药师，研究方向为医院制剂研发，(电子信箱)631786752@qq.com。

银星养脑方为湖南省名老中医邹先智主任医师的临床经验方，疗效显著。该方由银杏叶、胆南星、川芎、蜜远志等9味药材组成[1]，方中银杏叶[2-3]活血化瘀、通络止痛，胆南星[4]清热化痰、熄风定痉，共为君药；川芎活血行气、扩张血管，蜜远志有保护神经元、安神益智、抗炎、祛痰开窍的作用，共为臣药[5]。全方共奏化瘀通络、熄风涤痰、开窍益智、益气养阴之功[6]。但目前对该方的研究主要集中在其片剂的药理作用与临床应用方面[1,5-11]，现行片剂质量控制项目仅有性状、薄层鉴别和一般检查项，尚无系统评价此方质量的研究。完善其质量标准对于本方的临床应用、推广和后续开发具有重要意义。本研究中选取了12批银星养脑方样品，建立其超高效液相色谱（UPLC）指纹图谱，并对复方中4种指标性成分进行含量测定，采用定性分析与定量分析相结合的模式，以期为该方全面质量评价提供试验数据，为其后期临床应用和二次开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-CLASS超高效液相色谱仪，包括Quaternary solvent Manager四元梯度泵，Sample Manager-FTN样品室及自动进样器，Empower数据处理软件（美国Waters公司）；XS205DU型电子分析天平（梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司，精度为0.01 mg）；SY-5000型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；Option R7 Ultra AN型超纯水系统（英国ELGA LabWater公司）。

1.2 试药

阿魏酸对照品（批号为110773-201915，含量≥99.4%），购自中国食品药品检定研究院；3,6′-二芥子酰基蔗糖对照品（批号为139891-98-8，含量≥98%）、异银杏素对照品（批号为548-19-6，含量≥98%）、金松双黄酮对照品（批号为521-34-6，含量≥98%），均购自维克奇生物科技有限公司；甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯，甲醇、无水乙醇、二甲基亚砜（DMSO）均为分析纯，水为超纯水（自制）。银杏叶（批号为220301）、川芎（批号为220901）、蜜远志（批号为210403）、熟地黄（批号为220801）、太子参（批号为220501）、法半夏（批号为220702）、醋香附（批号为220601）、天冬（批号为220902）、胆南星（批号为220906）9味对照药材，其中胆南星药材购自内江良辉药业有限公司，其余药材均购自安徽鑫泰药材药业有限公司，均经浏阳市中医医院制剂科谢宗明主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC® BEH C_{18}柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：0.1%磷酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~45 min时95%A→68%A，45~90 min时68%A→5%A，90~100 min时5%A→95%A）；流速：0.4 mL/min；检测波长：321 nm；柱温：30 ℃；进样量：1 μL。

2.2 溶液制备

样品制备：取银杏叶10.50 g、蜜远志2.10 g、川芎5.25 g，共17.85 g，加8倍量60%乙醇煎煮1 h，滤过，得醇提液。另按处方比例称取法半夏、胆南星、太子参、熟地黄、天冬、醋香附，共33.18 g，加入前述醇提滤渣，加8倍量水煎煮1 h，减压抽滤，得水提液。合并前述醇提滤液及水提液，旋转浓缩，置100 mL容量瓶中，加无水乙醇定容，即得。平行制备12批（编号S1-S12）。

混合对照品溶液：取阿魏酸、3,6′-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮对照品各适量，精密称定，金松双黄酮加入少量DMSO，其余对照品加入适量甲醇使溶解，置20 mL容量瓶中，加甲醇定容，得各成分质量浓度分别为67.20，102.01，100.00，50.02 μg/mL的溶液，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

供试品溶液：精密移取样品2 mL，加甲醇2 mL，摇匀，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

单味药材供试品溶液及阴性对照品溶液：取银星养脑方组方单味药材，以及按银星养脑方处方及工艺制备的缺相应药材的阴性样品，按供试品溶液制备方法，分别制成单味药材供试品溶液及阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验：取2.2项下供试品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，以9号峰（3,6′-二芥子酰基蔗糖峰）为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的*RSD*分别小于0.31%，1.90%（$n=6$），表明方法精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液适量，分别于室温放置0，2，4，8，12，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，以9号峰（3,6′-二芥子酰基蔗糖峰）为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的*RSD*分别小于0.52%，2.84%（$n=6$），表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验：取2.2项下供试品溶液适量，平行6份，按2.1项下色谱条件进样测定，以9号峰（3,6′-二芥子酰基蔗糖色谱峰）为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的*RSD*分别小于0.60%，2.63%（$n=6$），表明方法重复性良好。

2.4 UPLC指纹图谱建立及相似度评价

取12批样品（编号S1-S12）各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，将色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 A版），以S1为参照图谱，设定时间窗宽度0.1 min，采

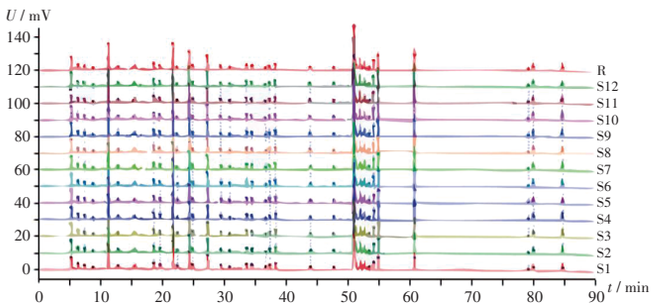


图1 12批银星养脑方样品超高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 UPLC superimposed fingerprint of 12 batches of Yinxing Yangnao Formula

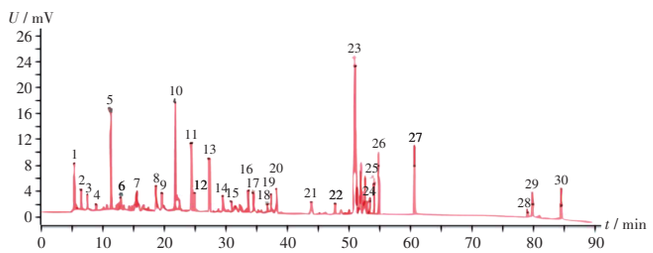
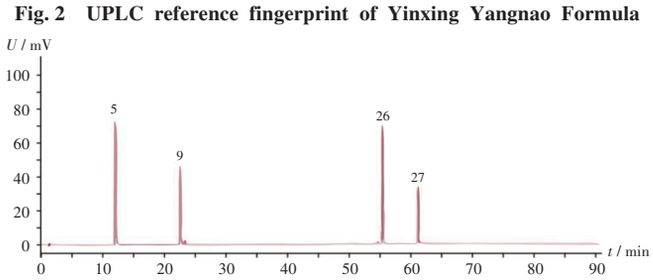


图2 银星养脑方超高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 UPLC reference fingerprint of Yinxing Yangnao Formula



5. 阿魏酸 9. 3,6′ - 二芥子酰基蔗糖 26. 异银杏素
27. 金松双黄酮

图3 混合对照品超高效液相色谱图

5. Ferulic acid 9. 3,6′ - Disinapoyl sucrose 26. Isoginkgetin
27. Sciadopitysin

Fig. 3 UPLC chromatograms of mixed reference substance

用多点校正和自动匹配，共标定30个共有峰，得到样品UPLC叠加指纹图谱（见图1），以平均数法生成对照指纹图谱（见图2），与混合对照品图谱（见图3）比对，指认出4种成分，其中峰5、峰9、峰26、峰27对应成分分别为阿魏酸、3,6′ - 二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮。样品相似度结果为0. 991 ~ 1. 000，详见表1。以9号峰（3,6′ - 二芥子酰基蔗糖）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积，结果的*RSD*分别为0. 01% ~ 0. 31%和0. 42% ~ 2. 89%。

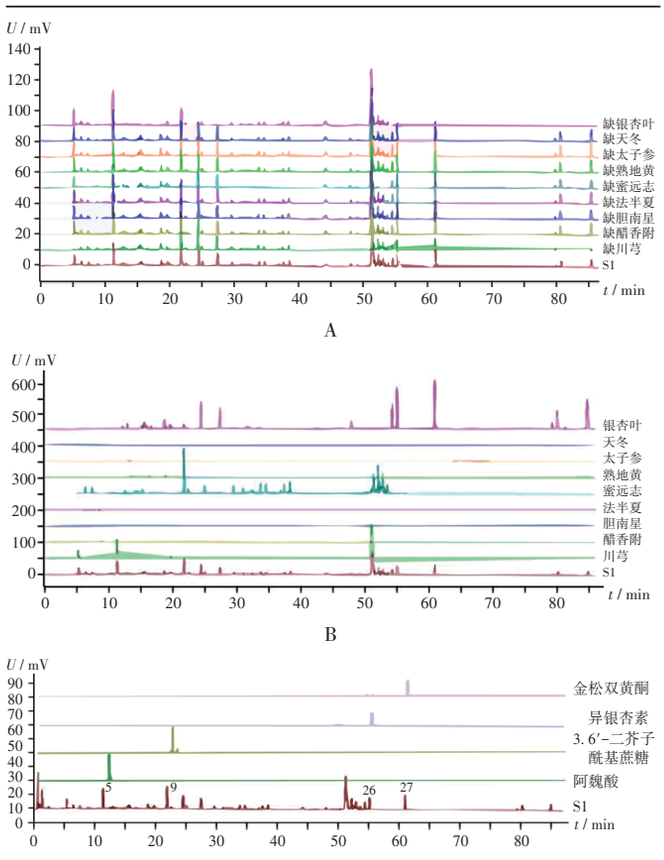
2. 5 共有峰的指认及归属

按2. 2项下方法平行制备供试品溶液（编号S1）、各单味药材供试品溶液及阴性对照品溶液，按2. 1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，以各峰保留时间为鉴定标准进行色谱峰指认。结果4,7,11,13,22,25 - 30号峰，1,5,8,21,23号峰，2 - 3,6,9 - 10,12,14 - 20,24号峰分别为银杏叶、川芎、蜜远志的特征峰，而胆南星、天冬、太子参、熟地黄、醋香附、法半夏对共有峰的贡献不明显。详见图4。

表1 12批样品相似度评价结果

Tab. 1 Results of similarity evaluation of 12 batches of samples

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1.000	0.998	0.999	0.998	0.999	0.995	0.995	0.992	0.993	0.991	0.992	0.992	0.996
S2	0.998	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	0.998	0.997	0.998	0.997	0.997	0.996	0.999
S3	0.999	0.999	1.000	0.999	0.998	0.995	0.995	0.991	0.993	0.992	0.992	0.991	0.996
S4	0.998	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	0.997	0.998	0.997	0.997	0.996	0.999
S5	0.999	0.999	0.998	0.999	1.000	0.998	0.998	0.997	0.997	0.995	0.997	0.997	0.999
S6	0.995	0.999	0.995	0.999	0.998	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000
S7	0.995	0.998	0.995	0.999	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	1.000
S8	0.992	0.997	0.991	0.997	0.997	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999
S9	0.993	0.998	0.993	0.998	0.997	0.999	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999
S10	0.991	0.997	0.992	0.997	0.995	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.999
S11	0.992	0.997	0.992	0.997	0.997	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S12	0.992	0.996	0.991	0.996	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999



A. 供试品溶液及阴性对照品溶液 B. 供试品溶液及单味药材供试品溶液 C. 银星养脑方主要色谱峰

图4 超高效液相色谱叠加图

A. Test solution and negative reference solution B. Test solution and single medicinal - herb test solution C. Main chromatographic peaks of Yinxing Yangnao Formula

Fig. 4 Superimposed UPLC chromatograms

2.6 聚类分析

以相对峰面积为变量进行聚类分析，结果见图5。可见，当平方欧式距离为10时，12批样品可聚为4类，第1类包括S3，第2类包括S11，第3类包括S2、S6、S9，第4类包括S1、S4－S5、S7－S8、S10、S12。

2.7 主成分分析

对12批样品的30个共有峰进行主成分分析，得到碎石图及7个主成分因子特征值，其累积方差贡献率为94.100%，详见图6、表2。对12批样品7个主成分因子进行评分，以方差贡献率为分配系数，计算各批样品的主成分因子得分及综合得分，并进行排序（见表3）。可见，样品质量高低依次为S6、S1、S3、S2、S12、S7、S4、S10、S5、S8、S11、S9。

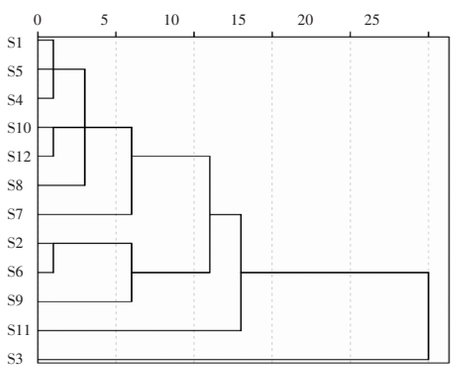


图5 12批样品聚类分析图

Fig. 5 Cluster analysis of 12 batches of samples

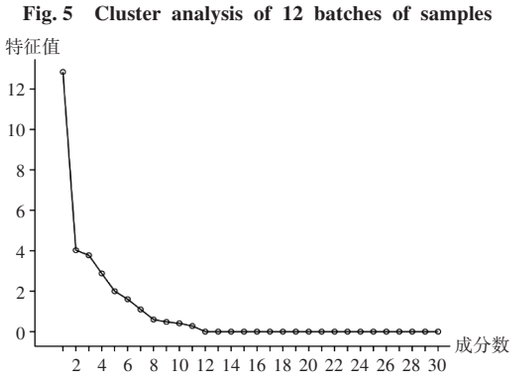


图6 主成分分析碎石图

Fig. 6 Scree plot of principal component analysis

2.8 4种成分含量测定

2.8.1 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验：精密量取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果各成分色谱峰分离度均符合要求，理论板数均大于5 000，且阴性对照无干扰。详见图7。

线性关系考察：精密量取混合对照品溶液0.5，1，2，6，10 mL，分别置10 mL容量瓶中，加甲醇定容，摇匀，

表2 主成分特征值及方差贡献率

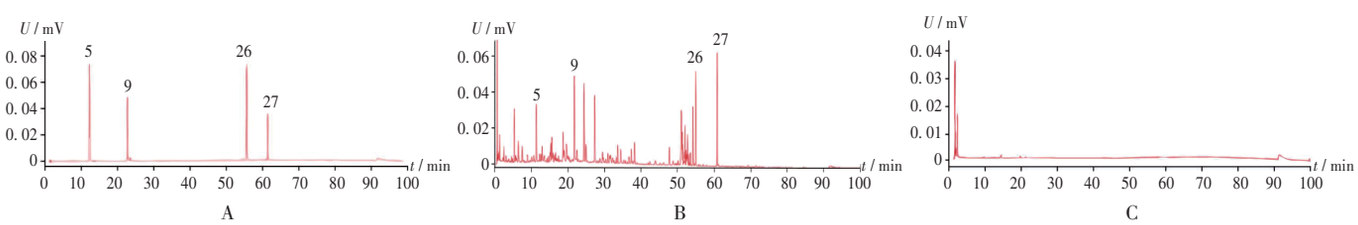
Tab. 2 Eigenvalue and variance contribution rate of principal components

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)	主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)
1	10.996	36.653	36.653	5	2.492	8.307	80.984
2	4.319	14.397	51.050	6	2.088	6.959	87.943
3	3.471	11.571	62.621	7	1.847	6.157	94.100
4	3.017	10.056	72.677				

表3 12批样品的主成分因子得分及排序

Tab. 3 Scoring and ranking of principal component factors for 12 batches of samples

编号	因子得分(分)							综合得分(分)	排序
	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	主成分5	主成分6	主成分7		
S1	1.59	0.57	-0.52	-0.68	-0.39	-0.47	1.14	0.54	2
S2	0.60	0.37	0.32	-0.91	0.90	-0.24	-1.56	0.18	4
S3	1.11	-0.85	-0.55	-0.44	1.82	1.41	0.65	0.47	3
S4	0.49	0.29	0.04	-0.69	-1.14	-0.25	-1.96	-0.08	7
S5	0.09	-0.41	-0.15	-0.99	-1.91	0.42	0.96	-0.21	9
S6	0.89	0.43	1.38	2.01	-0.02	0.71	-0.44	0.77	1
S7	0.41	-0.98	-0.85	1.87	-0.60	-1.07	0.28	-0.01	6
S8	-0.75	-0.13	0.64	-0.46	0.65	-1.65	0.54	-0.29	10
S9	-0.78	-0.35	1.64	-0.26	0.56	-0.86	0.66	-0.14	12
S10	-1.42	-1.10	0.57	-0.12	-0.57	1.70	-0.14	-0.56	8
S11	-1.04	2.62	-0.54	0.37	0.12	0.63	0.65	0.07	11
S12	-1.19	-0.45	-1.98	0.31	0.59	-0.32	-0.78	-0.72	5



5. 阿魏酸 9. 3，6′－二芥子酰基蔗糖 26. 异银杏素 27. 金松双黄酮

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图7 超高效液相色谱图

5. Ferulic acid 9. 3，6′－Disinapoyl sucrose 26. Isoginkgetin 27. Sciadopitysin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 7 UPLC chromatograms

制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以待测成分质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归。结果见表4。

表4 线性关系考察结果（$n=5$）

Tab. 4 Results of the linear relation test（$n=5$）

待测成分	回归方程	R^2	线性范围（μg/mL）
阿魏酸	$Y_1=14\,324X_1-2\,505.6$	1.000 0	3.36～67.20
3,6′-二芥子酰基蔗糖	$Y_2=5\,036.1X_2-2\,085$	0.999 9	5.10～102.00
异银杏素	$Y_3=7\,114.9X_3-3\,091.9$	1.000 0	5.00～100.00
金松双黄酮	$Y_4=4\,578.1X_4+15\,490$	0.998 2	2.50～50.00

精密度试验：取2.2项下混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果阿魏酸、3,6′-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮峰面积的*RSD*分别为0.62%，0.35%，0.34%，0.29%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液适量，分别于室温下放置0，2，4，6，8，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，阿魏酸、3,6′-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮含量分别为42.10，169.01，101.38，185.21 μg/mL，*RSD*分别为1.37%，2.66%，1.11%，1.39%（$n=6$），表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验：取2.2项下样品适量，再依法制备供试品溶液，平行6份，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算样品含量。结果阿魏酸、3,6′-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮平均含量分别为42.10，169.01，101.38，185.21 μg/mL，峰面积的*RSD*分别为1.16%，0.76%，1.26%，1.14%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取2.2项下已知含量的样品4 mL，精密称定，共6份，分别加入各对照品适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，计算记录峰面积及加样回收率。结果见表5。

表5 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 5 Results of the recovery test（$n=6$）

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
阿魏酸	0.170 8	0.171 2	0.342 8	100.47	100.55	1.01
	0.170 8	0.171 2	0.344 1	101.23		
	0.170 8	0.171 2	0.342 5	100.29		
	0.170 8	0.171 2	0.340 9	99.36		
	0.170 8	0.171 2	0.341 6	99.77		
	0.170 8	0.171 2	0.345 7	102.16		
3,6′-二芥子酰基蔗糖	0.676 0	0.676 0	1.351 1	99.87	99.92	0.22
	0.676 0	0.676 0	1.349 8	99.67		
	0.676 0	0.676 0	1.352 8	100.12		
	0.676 0	0.676 0	1.350 2	99.73		
	0.676 0	0.676 0	1.353 7	100.25		
	0.676 0	0.676 0	1.351 3	99.90		
异银杏素	0.405 6	0.405 5	0.813 4	100.57	101.19	0.53
	0.405 6	0.405 5	0.815 3	101.04		
	0.405 6	0.405 5	0.816 5	101.33		
	0.405 6	0.405 5	0.818 9	101.92		
	0.405 6	0.405 5	0.817 6	101.60		
	0.405 6	0.405 5	0.813 8	100.67		
金松双黄酮	0.740 8	0.741 3	1.474 3	98.95	99.01	0.41
	0.740 8	0.741 3	1.472 1	98.65		
	0.740 8	0.741 3	1.470 6	98.45		
	0.740 8	0.741 3	1.475 7	99.14		
	0.740 8	0.741 3	1.478 2	99.47		
	0.740 8	0.741 3	1.477 5	99.38		

表6 12批样品含量测定结果（μg/mL，$n=2$）

Tab. 6 Results of content determination of four components in 12 batches of samples（μg/mL，$n=2$）

编号	A	B	C	D	编号	A	B	C	D
S1	44.70	140.91	106.86	161.92	S8	43.71	141.07	103.09	170.04
S2	43.27	147.60	107.13	166.16	S9	45.86	138.85	103.68	168.37
S3	43.29	146.80	104.93	177.64	S10	45.55	137.51	103.26	161.00
S4	43.04	143.83	107.70	167.79	S11	43.38	139.38	106.58	172.07
S5	43.05	147.60	107.46	168.63	S12	43.77	140.20	101.97	170.32
S6	43.73	138.00	106.43	170.80	$\bar{X}$	44.01	142.36	105.44	169.08
S7	44.76	146.59	106.13	174.18	*RSD*(%)	2.21	2.74	1.86	2.77

注：A为阿魏酸，B为3,6′-二芥子酰基蔗糖，C为异银杏素，D为金松双黄酮。

Note: A refers to ferulic acid, B refers to 3,6′-disinapoyl sucrose, C refers to isoginkgetin, and D refers to sciadopitysin.

2.8.2 样品含量测定

按2.2项下方法制备12批样品及其供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算样品含量。结果见表6。

3 讨论

3.1 剂型改良背景

银星养脑方于1998年注册开发为浏阳市中医医院院内制剂银星养脑片。该制剂年产值达400万，二次开发价值较大。但限于当时的研究水平，该制剂工艺和质量研究相对简单。预试验中对银星养脑片（水提工艺）的质量研究发现，片剂在不同液相色谱条件下出峰均较少。课题组通过对比片剂、饮片水提、饮片醇提、单味饮片水提、单味饮片醇提多种条件下色谱峰差异较大，采用饮片水提相对片剂出峰明显增多。故最终选择对银星养脑方水提工艺进行质量控制研究。

3.2 指标成分的选择

银杏叶为银星养脑方君药，根据2020年版《中国药典（一部）》规定，需检测其中总黄酮醇苷和萜类内酯含量，但未规定双黄酮含量。双黄酮是一类具有保护神经及心血管、抗炎、抗氧化等多种活性的天然多酚类化合物，在银杏叶中的含量较高，甚至高于黄酮醇苷和萜类内酯的含量[12-14]，而金松双黄酮、异银杏素为双黄酮类的主要成分。川芎主要含阿魏酸，有保护神经、行气开郁作用[15-16]，并有抗氧化、祛风止痛、抗炎、保护心脑血管作用[17-18]。远志主要含寡糖酯类、皂苷、生物碱及叫酮类成分，其中3,6′-二芥子酰基蔗糖为寡糖酯类主要成分[19]，能有效保护神经、改善记忆力、抗痴呆等[20]。

前期研究中参照2020年版《中国药典（一部）》及相关文献，选择总黄酮醇苷类（槲皮素、山柰酚、异鼠李素），萜类内酯类（银杏内酯、白果内酯）及阿魏酸、远志山酮等指标成分，但供试品中黄酮醇苷类3个指标及远志山酮峰面积偏低，峰形及分离度欠佳，银杏内酯和白果内酯在蒸发光散射检测器和二极管阵列检测器下均未检测到色谱峰信号。故对醇提液进行了液相色谱-质谱联合分析，经质谱确认了分离度好、峰面积大的色谱峰归属，结合文献调研及银星养脑片疗效物质基础，最后选择了3,6′-二芥子酰基蔗糖、阿魏酸、金松双黄酮、异银杏素作为指标成分。

3.3 色谱条件的选择

预试验中分别考察了不同检测波长（280 nm、321 nm）、不同提取方法（加热回流提取，超声提取）、不同提取溶剂（60%乙醇、水、水+60%乙醇）、不同流动相（乙腈-甲酸，乙腈-0.1%磷酸水溶液）及梯度和洗脱时间的影响，结果发现在波长321nm、60%乙醇加热回流提取、0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相及现行梯度洗脱条件下，所得图谱基线平稳，色谱峰信息较丰富，峰形相对较好，各待测成分的峰高及峰面积较适宜，分离度较好。

3.4 方法评价

本研究中建立了银星养脑方的UPLC指纹图谱，并建立了测定样品中阿魏酸、3,6′-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮含量的UPLC法。该方法操作简便，精密度、稳定性及重复性良好，可用于银星养脑方的质量控制。本研究结果也为银星养脑片的质量控制和二次开发奠定了前期基础。如何完善方中总黄酮醇苷和萜类内酯含量测定方法，以及明确银星养脑片对比银星养脑方的质量转移过程，还有待进一步研究。

参考文献

[1] 肖 岚，李力松，彭 莎，等. 银星养脑片对血管性痴呆模型大鼠的记忆改善作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学，2022，39(19)：2465-2474.
[2] 陈 萍，薛佩芸，梁馨月，等. 银杏叶标准汤质量评价研究及高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 中国药业，2019，28(12)：17-20.
[3] 张 徽，王淑静，袁天宇，等. 银杏叶提取物对神经退行性疾病的作用机制及研究进展[J]. 药学研究，2020，39(1)：37-40.
[4] 唐照琦，李 彪，王秋红，等. 胆南星的化学成分、药理作用及相关复方临床应用的研究进展[J]. 中国药房，2020，31(12)：1523-1527.
[5] 李 丹，周兆祥，邱成元，等. 银星养脑片结合西药治疗脑外伤后认知障碍的疗效观察[J]. 湖南中医药大学学报，2013，33(11)：75-77.
[6] 肖 岚，刘 密，谢宗明，等. 基于UHPLC-QE-MS的银星养脑片治疗血管痴呆性大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中药药理与临床，2021，37(6)：111-119.
[7] 孔 娟. HPLC法测定银星养脑片中阿魏酸的含量[J]. 中国现代药物应用，2011，5(21)：68-69.
[8] 王芝平. 银星养脑片治疗风痰瘀阻型脑梗死的疗效观察[J]. 内蒙古中医药，2017，36(4)：40-41.
[9] 苏建斌，吴铁军，武华杰，等. 银星养脑片治疗脑动脉硬化症疗效观察[J]. 现代医药卫生，2014，30(15)：2262-2263.
[10] 王芝平，吴兵兵，潘俊安，等. 银星养脑片对蛛网膜下腔出血介入术后患者的影响[J]. 光明中医，2022，37(23)：4312-4315.
[11] 尹胡海，谢 聪，杨 年，等. 银星养脑片治疗弥漫性轴索损伤瘀阻脑络证的临床研究[J]. 中药药理与临床，2023，39(2)：71-75.
[12] 孔繁晟，严春艳，庞小雄，等. 从银杏叶中制备金松双黄酮对照品的研究[J]. 中成药，2010，32(5)：878-879.
[13] 李 玲，江美芳，王丹丹，等. 银杏叶双黄酮化学成分及药理学研究进展[J]. 上海中医药大学学报，2022，36(2)：101-108.
[14] 刘丽娜，李海亮，李耀磊，等. 银杏叶片中5种银杏双黄酮类成分同时测定方法的建立[J]. 中国药房，2022，33(10)：1220-1224.
[15] 李宏伟. 超声波法提取川芎中阿魏酸的工艺研究[J]. 科学技术创新，2023(5)：65-68.
[16] 徐倩倩，周梅林，赵苏敏，等. 川芎中促进视网膜血管内皮细胞增殖的化学成分[J]. 中药材，2022，45(11)：2643-2647.
[17] 蔚晶月，陶 琴，陈雪琴，等. 基于网络药理学和分子对接探究川芎治疗类风湿关节炎合并动脉粥样硬化的作用机制[J]. 广东化工，2023，50(5)：61-63.
[18] 徐廉松，黄富豪，张语涵，等. 川芎通过多成分、多靶点、多信号通路和多生物学功能发挥抗肺癌脑转移作用[J]. 南方医科大学学报，2021，41(9)：1319-1328.
[19] 李建丽，李 慧，李慧峰，等. 基于含量测定和指纹图谱的远志药效物质累积规律研究[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(9)：1472-1480.
[20] 史文华. 远志不同部位主要成分积累与关键酶活性及基因表达的相关性研究[D]. 西安：西北大学，2022.

（收稿日期：2023-10-11；修回日期：2024-03-16）