·中药工业·

# 忘忧安神方标准煎液 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分含量测定△

汪莉，贾妙婷，孙天雄，冯慧敏，李玥，祝健鸿，何军刚，李波，强正泽，李成义*
甘肃中医药大学 药学院，甘肃　兰州　730000

［摘要］ **目的：**建立忘忧安神方标准煎液（WAPSD）高效液相色谱法（HPLC）指纹图谱及 4 种指标性成分栀子苷、甘草苷、槲皮苷、甘草酸含量测定方法，为忘忧安神方（WAP）的质量控制提供参考。**方法：**制备 10 批 WAPSD，采用高效液相色谱-二极管阵列检测器（HPLC-DAD）对 WAPSD 样品进行含量测定，建立 10 批 WAPSD 的 HPLC 指纹图谱，采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”软件对其进行相似度评价，对共有峰进行归属及指认。**结果：**栀子苷质量分数为 36.84～55.86 $mg \cdot g^{-1}$，甘草苷质量分数为 3.96～6.57 $mg \cdot g^{-1}$，槲皮苷质量分数为 4.59～13.76 $mg \cdot g^{-1}$，甘草酸质量分数为 16.48～21.40 $mg \cdot g^{-1}$，不同批次 4 种成分含量差异较大，说明不同批次的栀子、甘草、合欢花质量差异较大。建立了 WAP 的 HPLC 指纹图谱，10 批 WAPSD 指纹图谱与对照图谱相似度均大于 0.94；标定了36 个共有峰，多数峰来源于黄花菜、甘草、栀子；指认了 4 个共有峰，分别为 17 号峰栀子苷、24 号峰甘草苷、26 号峰槲皮苷、35 号峰甘草酸。**结论：**所建立 WAPSD 多指标成分测定及指纹图谱方法灵敏度高、准确性好、有较高稳定性，能体现 WAP 组分的整体特征，可为 WAP 后续开发及其成品制剂的质量控制提供参考。

［关键词］ 忘忧安神方；标准煎液；指纹图谱；含量测定
［中图分类号］ R289　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890（2021）03-0536-06
**doi**：10.13313/j.issn.1673-4890.20200902003

## Establishment of HPLC Fingerprint and Determination Method for Four Index Components of Wangyou Anshen Prescription Standard Decoction

WANG Li, JIA Miao-ting, SUN Tian-xiong, FENG Hui-min, LI Yue, ZHU Jian-hong, HE Jun-gang, LI Bo, QIANG Zheng-ze, LI Cheng-yi*
*College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou* 730000, *China*

［**Abstract**］ **Objective**: To establish HPLC fingerprint of Wangyou Anshen Prescription standard decoction (WAPSD) and determine contents of four index components: geniposide, liquiritin, quercitrin and glycyrrhizic acid, so as to provide basis for quality control of Wangyou Anshen Prescription (WAP). **Methods**: 10 Batches of WAPSD were prepared. The HPLC-DAD method was used for content determination and fingerprint of WAPSD, and the China Pharmacopoeia Committee "2012 edition of Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System" software was adopted for similarity evaluation, and the common peak assignment and identification. **Results**: The contents of 10 batches of WAPSD were determined, among which the content of geniposide was 36.84-55.86 $mg \cdot g^{-1}$; the content of liquiritin was 3.96-6.57 $mg \cdot g^{-1}$; the content of quercitrin was 4.59-13.76 $mg \cdot g^{-1}$, and the content of glycyrrhizic acid was 16.48-21.40 $mg \cdot g^{-1}$, respectively. The contents of 4 components in different batches were significantly different, which indicated that the quality of the original medicinal materials in different batches was quite different. HPLC fingerprint of WAP was established, and the similarity between 10 batches of WAPSD fingerprint and common mode was greater than 0.94. Thirty-six common peaks were demarcated, most of which were derived from Hemerocallis Flava, Gardeniae Fructus and Glycyrrhizeae Radix,

△［基金项目］ 甘肃省高等学校科技成果转化项目（2018D-17）
*［通信作者］ 李成义，教授，研究方向：中药品种与质量研究；Tel：（0931）8765390，E-mail：gslichengyi@163.com

and four common peaks were identified as geniposide (peak 17), liquiritin (peak 24), quercitrin (peak 26) and glycyrrhizic acid (peak 35). **Conclusion**: The established WAPSD multi-index component determination method and fingerprint method have high sensitivity, good accuracy and high stability, which can reflect the overall characteristics of WAP components, and can provide the basis for the subsequent development of WAP and the quality control of its finished preparations.

[**Keywords**]　Wangyou Anshen Prescription; standard decoction; fingerprints; determination of content

传统汤剂在中医临床应用中较为广泛且疗效显著，但其制备、携带不便，服用剂量大。在中药新剂型的研发和生产过程中，保证其成品与传统汤剂的化学和生物等效性是剂型变革的核心，用适宜的方法和标准评价现代制剂质量与传统汤剂的一致性，有助于保障中医临床用药更加安全有效[1]。标准汤剂、标准煎液、物质基准均是以中医理论为指导，保持原方疗效为目的，以传统制法为依据，经统一化、标准化工艺制备而成的制剂中间体[2-4]，在融合现代制备工艺的基础上极大限度保存了传统汤剂的完整性，其代表了制剂的整体内在质量，以这个中间体为基础，可实现对制剂原料药的追溯以及向成品制剂的延伸，是经典名方乃至所有中药及其复方制剂研发的基准[5]，可用于评价制剂的制备工艺、药效和质量标准，是现代中药研究的热点与发展趋势[6]。

甘麦大枣汤出自医圣张仲景的《金匮要略》，为安神剂，具有养心安神、和中缓急之功效，主治情志不舒、思虑过度、躁扰不宁的脏躁症[7]。现代研究表明[8]，甘麦大枣汤具有镇静、催眠、抗抑郁等药理作用。忘忧安神方是以经典名方甘麦大枣汤为基础方，由甘肃地产药材黄花菜及栀子等多味药食同源的中药组方而成。方中君药黄花菜，又名金针菜、忘忧草等，味甘而微凉。《本草纲目》记载其有利湿热、宽胸膈、安五脏、安寐解郁，治酒疸等作用[9]。该药与方中其他药合用，共奏滋阴降火、舒肝和胃、养心安神、平衡阴阳之功效。对目前社会环境因素影响及工作强度加大导致人群中出现的身体乏力、消化功能减弱、睡眠质量下降等亚健康问题具有较好的临床疗效。

本课题组前期已优化处方标准煎液提取工艺，方法稳定，拟开发为疗效持久、服用剂量小、质量稳定、携带方便、更易于被患者所接受的口服液制剂。为了保证忘忧安神方后续研发的口服液制剂能保持原方的疗效与特点，有必要建立原组方标准煎液的质量控制方法。本研究遵循经典名方遵古溯源的研究思路[10]，以复方标准煎液为切入点，采用高效液相色谱法(HPLC)建立忘忧安神方标准煎液指纹图谱，通过单味药及阴性样品指纹图谱对其中的色谱峰进行溯源研究，以获得专属的、整体的化学特征综合信息，并结合多指标成分测定[11]，建立忘忧安神方全面、有效而切实可行的质量评价体系，为后期成品口服液制剂的质量标准研究及饮片-标准煎液-成品制剂的量值传递相关性研究奠定基础，同时，可为基于中药标准煎液的中药临床验方研究及新药开发提供有益的研究经验和技术参考。

## 1　材料

### 1.1　仪器

Aglient 1260 型二极管阵列检测器(DAD)高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)；CAV214C 型电子分析天平(美国奥豪斯公司)；80-1 型电动离心机(金坛市恒丰仪器厂)；YRE-301 型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司)；98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)；Milli-Q Century 型超纯水机。

### 1.2　试药

对照品栀子苷(批号：Y25J9C53637)、甘草苷(批号：Z28M10X84164)、槲皮苷(批号：P19D10F106420)、甘草酸铵(批号：P13A9L67602)均购自上海源叶生物科技有限公司，纯度均≥98%；乙腈(批号：20200302)、磷酸(批号：20160307)均购自天津大茂化学试剂厂，均为色谱纯。

收集忘忧安神方处方饮片各 10 批，其中黄花菜购于各地药材市场，其在《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版中未记载，经甘肃中医药大学药学院李成义教授鉴定为百合科萱草属植物黄花菜 *Hemerocallis citrina* Baroni 的干燥花蕾；其余饮片采购于各大零售药店，经前期的鉴定及初步质量评价，均符合《中国药典》2015 年版规定。

## 2　方法与结果

### 2.1　全方含量测定方法建立

**2.1.1**　色谱条件　色谱柱为 Agilent HC-$C_{18}$(250 mm × 4.6 mm，5μm)；流动相：乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)，梯度洗脱(0 ~ 15 min，5% ~ 22% A；15 ~ 26 min，22% ~ 34% A；26 ~ 34 min，34% ~ 60% A；34 ~ 42 min，60% ~ 70% A；42 ~ 45 min，70% ~ 5% A)；记录时间为 45 min；流速：1 mL·min$^{-1}$；柱温：30 ℃；检测波长：237 nm(栀子苷、甘草苷)、254 nm(槲皮苷、甘草酸)；进样量：10 μL。

**2.1.2**　混合对照品制备　分别精密称取栀子苷 6.14 mg、甘草苷 0.92 mg、槲皮苷 1.95 mg、甘草酸铵 2.32 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，即得质量浓度分别为栀子苷 614 μg·mL$^{-1}$、甘草苷 92 μg·mL$^{-1}$、槲皮苷 195 μg·mL$^{-1}$、甘草酸铵 232 μg·mL$^{-1}$的混合对照品母液，备用。

**2.1.3**　供试品溶液制备　分别称取忘忧安神方处方饮片随机组方 T1 ~ T10，按课题组前期研究标准煎液最佳提取工艺，即加 10 倍量水，浸泡 1 h，武火煮沸后改用文火，煎煮 3 次，每次 1 h，滤过；合并滤液，浓缩并定容至 500 mL(生药量为 0.31 g·mL$^{-1}$)，得全方标准煎液，精密量取标准煎液2 mL，加 70% 甲醇 8 mL，称质量，超声 30 min，补足减失的质量，5000 r·min$^{-1}$离心 10 min(离心半径 8 cm)，上清液过 0.45 μm 滤膜，既得供试品溶液。

**2.1.4**　方法学考察

**2.1.4.1**　线性关系考察　分别精密量取混合对照品母液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 于 5 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，得到系列混合对照品溶液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，进样。以各对照品的质量浓度($X$，μg·mL$^{-1}$)为横坐标，峰面积值($Y$)为纵坐标，通过计算，得线性方程，结果表明，各对照品在相应浓度范围内线性关系良好，见表 1。

**表 1　忘忧安神方标准煎液中 4 种成分的线性关系**

| 对照品 | 回归方程 | $r$ | 线性范围/μg·mL$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| 栀子苷 | $Y = 13.412X + 8.835\ 6$ | 0.999 7 | 30.7 ~ 614.0 |
| 甘草苷 | $Y = 18.361X + 14.685$ | 0.999 7 | 4.6 ~ 92.0 |
| 槲皮苷 | $Y = 13.577X + 0.925\ 5$ | 0.999 8 | 9.75 ~ 195.0 |
| 甘草酸铵 | $Y = 6.588\ 4X - 50.288$ | 0.999 3 | 11.6 ~ 232.0 |

**2.1.4.2**　精密度试验　取 T1 供试品溶液，连续进样 6 次，按 **2.1.1** 项下色谱条件进样检测，得各指标性成分保留时间 RSD 均小于 1%，峰面积的 RSD 均小于 4%，表明仪器精密度良好。

**2.1.4.3**　稳定性试验　取 T1 供试品溶液，分别在 0、4、8、12、24、36 h，按 **2.1.1** 项下色谱条件进样检测，得各指标性成分保留时间 RSD 均小于 1%，含量 RSD 均小于 3%，表明各指标成分在 36 h 内稳定性良好。

**2.1.4.4**　重复性试验　取 T1 供试品溶液 6 份，按 **2.1.1** 项下色谱条件进样检测，得各指标性成分保留时间 RSD 均小于 1%，峰面积 RSD 均小于 3%，表明仪器重复性良好。

**2.1.4.5**　加样回收率试验　精密量取已知含量的 T1 标准煎液 2 mL，加入适量的各对照品溶液，按 **2.1.3** 项下方法制备，按 **2.1.1** 项下色谱条件进样检测，计算 4 种指标成分的平均加样回收率为 95% ~ 105%，RSD 均小于 3%，见表 2。

**表 2　忘忧安神方标准煎液中 4 种成分含量测定的加样回收率试验结果($n = 6$)**

| 成分 | 样品中含量/mg | 对照品加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 栀子苷 | 1.673 8 | 1.657 5 | 3.388 0 | 103.42 | 103.20 | 2.60 |
| | | | 3.382 2 | 103.07 | | |
| | | | 3.425 6 | 105.69 | | |
| | | | 3.428 0 | 105.83 | | |
| | | | 3.305 4 | 98.43 | | |
| | | | 3.377 2 | 102.77 | | |
| 甘草苷 | 0.202 2 | 0.204 0 | 0.398 2 | 96.11 | 96.11 | 1.01 |
| | | | 0.396 4 | 95.20 | | |
| | | | 0.397 0 | 95.50 | | |
| | | | 0.400 0 | 96.97 | | |
| | | | 0.396 6 | 95.31 | | |
| | | | 0.401 2 | 97.58 | | |
| 槲皮苷 | 0.450 4 | 0.449 6 | 0.885 5 | 96.77 | 98.23 | 1.13 |
| | | | 0.897 5 | 99.42 | | |
| | | | 0.898 5 | 99.65 | | |
| | | | 0.891 6 | 98.13 | | |
| | | | 0.888 8 | 97.51 | | |
| | | | 0.890 7 | 97.92 | | |
| 甘草酸 | 0.7336 | 0.729 | 1.493 2 | 104.19 | 104.93 | 0.80 |
| | | | 1.490 5 | 103.82 | | |
| | | | 1.500 2 | 105.15 | | |
| | | | 1.505 6 | 105.90 | | |
| | | | 1.504 7 | 105.77 | | |
| | | | 1.497 3 | 104.75 | | |

**2.2**　10 批标准煎液含量测定

取上述 10 批忘忧安神方标准煎液 T1 ~ T10，按照 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液，按照 **2.1.1** 项下色谱条件进行进样分析，记录色谱峰，分别代入回归方程，计算 10 批忘忧安神方标准煎液中栀子苷、甘草苷、槲皮苷、甘草酸含量，结果见表 3、图 1。结果表明，10 批忘忧安神方标准煎液中栀子苷质量分数为 36.84 ~ 55.86 $mg \cdot g^{-1}$、甘草苷质量分数为 3.96 ~ 6.57 $mg \cdot g^{-1}$、槲皮苷质量分数 4.59 ~ 13.76 $mg \cdot g^{-1}$、甘草酸质量分数为 16.64 ~ 21.14 $mg \cdot g^{-1}$，不同批次间 4 种成分含量差异较大，表明不同批次的原药材质量存在差异。

**表 3　10 批忘忧安神方标准煎液中 4 种成分的含量测定结果**（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

$mg \cdot g^{-1}$

| 批次 | 质量分数 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 栀子苷 | 甘草苷 | 槲皮苷 | 甘草酸 |
| T1 | 40.08 ± 0.06 | 5.20 ± 0.06 | 11.10 ± 0.20 | 18.98 ± 0.03 |
| T2 | 36.84 ± 0.21 | 5.50 ± 0.05 | 13.34 ± 0.13 | 17.91 ± 0.03 |
| T3 | 38.98 ± 0.29 | 4.02 ± 0.09 | 4.59 ± 0.09 | 18.83 ± 0.22 |
| T4 | 52.38 ± 0.84 | 6.57 ± 0.12 | 8.42 ± 0.22 | 19.25 ± 0.16 |
| T5 | 43.30 ± 0.21 | 5.75 ± 0.03 | 13.76 ± 0.23 | 19.73 ± 0.15 |
| T6 | 50.86 ± 0.87 | 4.21 ± 0.06 | 8.93 ± 0.17 | 16.48 ± 0.25 |
| T7 | 55.86 ± 0.33 | 5.31 ± 0.06 | 11.88 ± 0.26 | 18.99 ± 0.28 |
| T8 | 53.34 ± 0.77 | 3.96 ± 0.05 | 12.30 ± 0.02 | 17.51 ± 0.09 |
| T9 | 44.88 ± 0.28 | 5.84 ± 0.07 | 6.93 ± 0.03 | 21.04 ± 0.08 |
| T10 | 42.46 ± 0.49 | 5.21 ± 0.06 | 8.35 ± 0.14 | 21.40 ± 0.27 |

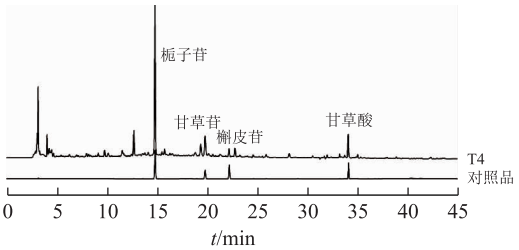



**图 1　混合对照品和忘忧安神方标准煎液供试品溶液的 HPLC 图**

**2.3**　全方标准煎液指纹图谱建立

**2.3.1**　色谱条件　色谱柱为 Agilent HC-$C_{18}$（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 16 min，3% ~ 10% A；16 ~ 34 min，10% ~ 19% A；34 ~ 38 min，19% ~ 20% A；38 ~ 54 min，20% ~ 28% A；54 ~ 60 min，28% ~ 34% A；60 ~ 65 min，34% ~ 46% A；65 ~ 80 min，46% ~ 58% A）；流速：0.8 $mL \cdot min^{-1}$；柱温：30 ℃；检测波长：260 nm；进样量：10 μL。

**2.3.2**　对照品制备　精密吸取 **2.1.2** 项下对照品母液 1 mL，加甲醇定容至 5 mL，制成质量浓度分别为栀子苷 122.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$、甘草苷 18.4 $\mu g \cdot mL^{-1}$、槲皮苷 39 $\mu g \cdot mL^{-1}$、甘草酸铵 46.4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的混合对照品溶液，既得。

**2.3.3**　供试品溶液制备

**2.3.3.1**　全方供试品制备　分别精密量取 **2.1.3** 项下标准煎液 T1 ~ T10 各 2 mL，加蒸馏水定容至 10 mL，5000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min（离心半径 8 cm），上清液过 0.45 μm 滤膜，既得全方指纹图谱供试品溶液。

**2.3.3.2**　单味饮片溶液制备　按照各单味药在全方中的配比，分别称取各单味药，按 **2.3.3.1** 项下方法制备单味饮片供试品溶液。

**2.3.3.3**　阴性样品溶液制备　分别称取除各单味药的其余药材，按 **2.3.3.1** 项下方法，制备缺各单味药的阴性对照溶液。

**2.3.4**　方法学考察

**2.3.4.1**　精密度试验　精密吸取同一供试品溶液（T1），按 **2.3.1** 项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以峰面积较大、出峰时间稳定的栀子苷为参照峰，计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD < 0.5%，相对峰面积的 RSD < 3%，相似度均大于 0.99，表明仪器精密度良好。

**2.3.4.2**　稳定性试验　精密吸取同一供试品溶液（T1），按 **2.3.1** 下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，记录色谱图。以栀子苷为参照峰，计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD < 0.5%，相对峰面积的 RSD < 3.0%，相似度均大于 0.99，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.4.3**　重复性试验　精密吸取 6 份 T1 的样品溶液，按 **2.3.3.1** 项下方法制备供试品溶液 6 份，再按 **2.3.1** 项下色谱条件进样，记录色谱图。以栀子苷为参照峰，计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD < 0.2%，相对峰面积的 RSD < 3.0%，相似度均大于 0.99，表明方法具有较好的重复性。

**2.4**　10 批标准煎液指纹图谱相似度评价及色谱峰归属和指认

**2.4.1**　指纹图谱相似度评价　按照 **2.3.1** 项下色谱条件，对 10 批标准煎液进行指纹图谱测定，记录图

谱。将 10 批标准煎液的指纹图谱测定结果以 AIA 格式依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版)，以 S1 为参照图谱，时间窗宽度为 0.2 s，通过多点校正后，采用平均数相关系数法进行图谱自动匹配，生成 10 批样品共有模式图谱，10 批标准煎液的 HPLC 指纹图谱及其共有模式图谱(R)见图 2。进行相似度计算，结果显示，10 批样品与对照指纹图谱相似度分别为 0.985、0.967、0.943、0.988、0.975、0.988、0.989、0.976、0.987、0.995。说明样品制备方法及所建立指纹图谱稳定可靠，能反映忘忧安神方标准煎液整体特征，可作为其质量控制的参照依据。

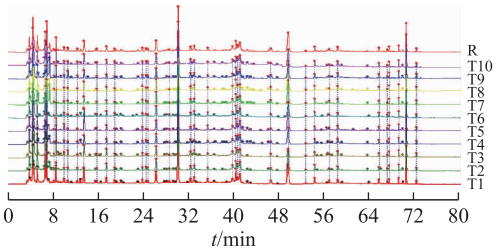
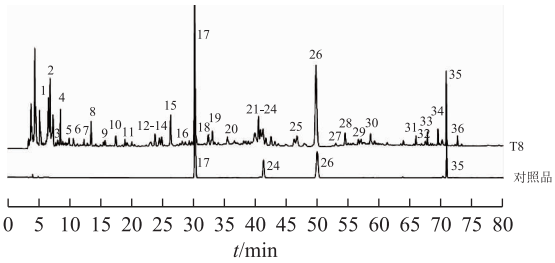



**图 2　10 批忘忧安神方标准煎液指纹图谱及其对照指纹图谱**

**2.4.2**　共有峰确立及指标成分标定　对 10 批次忘忧安神方标准煎液 HPLC 共有模式图谱进行分析后，确定了 36 个共有峰。通过与混合对照品图谱比对，确定 17 号峰对应栀子苷，24 号峰对应甘草苷，26 号峰为槲皮苷，35 号峰对应甘草酸，见图 3。




注：17. 栀子苷；24. 甘草苷；26. 槲皮苷；35. 甘草酸。

**图 3　忘忧安神方标准煎液指标成分指认**

**2.4.3**　色谱峰归属分析　取各单味药溶液、阴性供试品溶液、全方供试品溶液，按 **2.3.1** 项下色谱条件进行测定，记录各色谱图。将各单味药、阴性、全方共有模式色谱峰进行匹配，同时比对各共有峰保留时间及紫外光谱图，确定各共有峰归属。结果显示，各单味药对共有峰的贡献程度有所差异，君药黄花菜及栀子、甘草、合欢花 4 味药对共有峰贡献较大，其他各味药对共有峰贡献不大，但在指纹图谱中均有体现，表明所建立的指纹图谱可以反映忘忧安神方主要药效物质组成。

## 3　讨论

本研究建立了忘忧安神方中 4 种成分的 HPLC 含量测定方法及指纹图谱质量评价方法，考察确定了指标性成分的选择、提取溶剂、色谱条件。

### 3.1　指标成分选择

为了与传统汤剂保持一致，本研究标准煎液的提取以水为溶媒，并结合与忘忧安神方处方组成相似的复方制剂相关的研究及《中国药典》2015 年版中饮片含量测定指标[12-13]，确定性质稳定且水溶性较好、含量相对较高且具有解郁安神作用的栀子苷、甘草苷、槲皮苷、甘草酸 4 种成分作为含量测定成分[14-16]，同时，这 4 种成分具有较好的专属性，栀子苷为栀子的指标性成分，甘草苷、甘草酸为甘草的指标性成分，槲皮苷为合欢花的指标性成分，建立其含量测定的方法，可为后期忘忧安神方中栀子、甘草、合欢花饮片-标准煎液-成品制剂的转移率研究奠定基础。

### 3.2　提取溶剂

含量测定时分别考察了水、80% 甲醇、70% 甲醇、60% 甲醇、50% 甲醇作为提取溶剂，结果发现，70% 甲醇作为提取溶剂时 4 种成分的含量相对较高，故最终确定 70% 甲醇为含量测定提取溶剂。

### 3.3　色谱条件

在含量测定波长选择过程中，DAD 对栀子苷、甘草苷、槲皮苷、甘草酸铵对照品进行全波长扫描(190 ~ 400 nm)，结果栀子苷、甘草苷在 237 nm 左右有最大吸收，槲皮苷、甘草酸的最大吸收波长分别为 256、252 nm。综合分析将 237 nm 作为栀子苷、甘草苷含量测定波长，254 nm 作为槲皮苷、甘草酸含量测定波长。

由于大多数化学成分在 254 nm 均有紫外吸收，故在指纹图谱的前期研究过程中选择 254 nm 作为指纹图谱测定波长，结果栀子苷与其他色谱峰相应值差别较大，因此，选择 254 nm 附近的波长：250、252、256、258、260、265 nm，最终发现 260 nm 下各色谱峰响应值均较高，峰形较好且基线平稳，故确定指纹图谱测定波长为 260 nm。

流动相分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-0.1% 甲酸的洗脱效果。结果

乙腈-水的色谱峰的数量少且峰形不好，加入适量的酸后色谱峰变得丰富，而含 0.1% 甲酸流动相洗脱后色谱峰分离度略优于 0.1% 磷酸。增加甲酸含量至 0.2% 后，色谱峰峰形及分离度几乎没有变化，由于酸性过强容易对色谱柱造成损耗，最终确定选择乙腈-0.1% 甲酸作为指纹图谱流动相。

目前，很多学者致力于单味药材-饮片-标准汤剂-配方颗粒的研究[17-20]，也有少数学者对于经典名方标准汤剂（物质基准）进行研究[21-22]。中药用药讲求君臣佐使，即复方配伍的汤剂是中药用药的主要形式，本研究以复方标准煎液为模式标准，选择指纹图谱结合多指标成分定量分析的方法，建立忘忧安神方的质量控制技术及评价体系，在明确临床患者所用煎服汤剂的药学品质的基础上，进一步将这一标准用于后续的制剂研发和生产上，通过对饮片-标准煎液-成品制剂进行出膏率、指标成分转移率的快速测定及指纹图谱相似度分析，实现对单味饮片-中间体-成品制剂的量值传递相关性研究及制剂生产全过程质量控制，缩小成品制剂的批间差异，以保证制剂的有效物质群和质量基本稳定。另外，通过将各单味饮片中各成分信息与全方标准煎液的比较，能够更好地提升中药配伍、组方的科学性和规范性。

## 参考文献


[1] 陈士林，刘安，李琦，等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志，2016，41(8)：1367-1375.

[2] 邓哲，荆文光，王淑慧，等. 中药饮片标准汤剂研究进展与讨论[J]. 中国中药杂志，2019，44(2)：242-248.

[3] 张水寒，梁雪娟，刘浩，等. 中药标准煎液科学问题的探讨[J]. 中国中药杂志，2017，42(17)：3275-3281.

[4] 国家中医药管理局. 古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求公开征求意见[EB/OL]. (2019-03-29)[2020-09-02]. http://www.satcm.gov.cn/xinxifabu/shizhengyaowen/2019-03-29/9433.html.

[5] 代云桃，靳如娜，吴治丽，等. 基于标准汤剂（物质基准）的经典名方制备工艺和质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(2)：164-174.

[6] 杨立伟，王海南，耿莲，等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(8)：1-6.

[7] 晏仁义，陈衬心，李赫宇，等. 基于网络药理学研究甘麦大枣汤改善睡眠障碍的作用机制[J]. 中成药，2020，42(2)：343-350.

[8] 谢强敏，唐法娣，洪巨伦，等. 甘麦大枣汤的药理研究[J]. 中药药理与临床，1992，8(6)：6-10.

[9] 翟俊乐，田欢，李孟秋，等. 黄花菜抗抑郁作用有效成分的筛选[J]. 中国食品添加剂，2015(10)：93-97.

[10] 文旺，李莉，李德坤，等. 经典名方的“遵古”研发思路探讨：以泻白散为例[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(23)：196-201.

[11] 刘艳，章军，陈士林，等. 经典名方复方制剂研发策略[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(24)：166-172.

[12] 张华，刘俊萍，王菲菲，等. 五味沙棘颗粒特征图谱及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志，2017，37(9)：1627-1632.

[13] 王彦帅，丁浩强，郑鑫杰，等. 经典名方泻白散物质基准 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种指标成分含量测定[J]. 中草药，2020，51(11)：2946-2953.

[14] KANG T H，JEONG S J，KIM N Y，et al. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz[J]. J Ethnopharmacol，2000，71(1)：321-323.

[15] 郭超峰，夏猛，银胜高，等. 合欢花总黄酮的抗抑郁作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(13)：225-228.

[16] 曹志永. 基于抑郁症炎性机制的甘草酸临床疗效研究[D]. 北京：中国人民解放军海军军医大学，2019.

[17] 莫雨佳，王彦，齐琪，等. 经典名方散偏汤 HPLC 指纹图谱的建立及川芎的量值传递研究[J]. 中国中药杂志，2020，45(3)：572-578.

[18] 孙岚萍，顾志荣，马转霞，等. 黄芪饮片-标准汤剂-配方颗粒 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中草药，2020，51(10)：2781-2789.

[19] 冀艳花，高晗，常云凤，等. 白鲜皮饮片-标准汤剂-配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(18)：81-87.

[20] 陈玲，李晓，魏悦，等. 黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 天然产物研究与开发，2018，30(1)：56-60.

[21] 唐晓章，林美斯，周菲，等. 经典名方芍药甘草汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(14)：62-69.

[22] 刘冬涵，薛宇涛，罗菊元，等. 经典名方苓桂术甘汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志，2019，44(24)：5421-5428.


（收稿日期：2020-09-02　　编辑：王笑辉）