

基于指纹图谱、化学计量学和多指标定量测定的妇康宝口服液质量评价

曲佳¹, 韩国园¹, 郑新元¹, 王静¹, 牛辰瑾¹, 张茉¹, 赵晨¹, 陈卓^{2*}, 周军^{1*}

1. 天津市药品检验研究院, 天津 300070

2. 津药达仁堂集团股份有限公司健康科技产业发展分公司, 天津 300110

摘要: **目的** 建立妇康宝口服液(Fukangbao oral liquid, FOL)的 HPLC 指纹图谱、化学计量学和多指标成分定量测定相结合的质量评价方法。**方法** 采用菲罗门色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 237 nm, 芍药苷对照品为参照, 建立了 FOL HPLC 指纹图谱, 结合层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)对 5 家生产企业共 29 批 FOL 进行质量评价, 开发并验证了 3 种指标成分的定量测定分析方法。**结果** 指纹图谱及定量测定的方法学验证均良好, 29 批 FOL 样品指纹图谱相似度均大于 0.85, 共确定了 22 个共有峰, 并通过与对照品比较指认了其中 3 个色谱峰, 分别为甘草苷、甘草酸和芍药苷。HCA 与 PLS-DA 结果一致, 29 批 FOL 样品可按不同生产厂家、不同生产日期聚类, 并筛选出引起 FOL 质量差异的 9 个差异性成分, 分别为色谱峰 12、3、4、18、14、9、20、21、22。9 个差异性成分主要来自于药味白芍和甘草, 建立的芍药苷、甘草苷和甘草酸定量测定方法能够同时快速、准确测定 FOL 中关键差异性成分含量。结果显示, 不同厂家、不同批次 FOL 样品中芍药苷、甘草苷和甘草酸含量差异明显。**结论** 建立的 FOL HPLC 指纹图谱、化学计量学和多指标成分含量测定方法相结合的 FOL 质量评价方法, 快速、准确、高效、特征性强、重复性和稳定性较好, 可用于市售 FOL 产品的质量评价, 也可各生产企业完善 FOL 质量控制体系提供参考。

关键词: 妇康宝口服液; 指纹图谱; 化学计量学; 质量评价; 主成分分析; 层次聚类分析; 偏最小二乘法-判别分析; 甘草苷; 甘草酸; 芍药苷

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)14-5029-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.009

Quality evaluation of Fukangbao Oral Liquid based on combinative methods of fingerprint and quantitative analysis of multi-components

QU Jia¹, HAN Yuanyuan¹, ZHENG Xinyuan¹, WANG Jing¹, NIU Chenjin¹, ZHANG Mo¹, ZHAO Chen¹, CHEN Zhuo², ZHOU Jun¹

1. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Pharmaceutical Darentang Group Co., Ltd., Health Technology Industry Development Branch, Tianjin 300110, China

Abstract: Objective To establish a quality evaluation method for Fukangbao Oral Liquid (FOL, 妇康宝口服液) by combining HPLC fingerprint, multi-index content determination, and analyze the content determination results by chemometrics method. **Methods** The analysis was carried out on Phenomenex chromatographic column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase by gradient elution, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 35 °C, detection wavelength of 237 nm, and paeoniflorin reference substance. The determination results were comprehensively analyzed using hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to evaluate the quality of 29 batches of FOL from five production enterprises. The content determination and analysis methods of three indicator components were developed and validated. **Results** The methodological validation of fingerprint spectra and content determination was good, and the similarity of fingerprint spectra of 29 batches of FOL was greater than 0.85. A total of 22 common peaks were identified, and three chromatographic peaks were identified

收稿日期: 2025-02-01

基金项目: 国家药品监督管理局中国药品监管科学行动计划重点项目(NMPAJGKX-2023-079)

作者简介: 曲佳(1981—), 副主任药师, 研究方向为中药分析及质量控制。Tel: (022)23513806 E-mail: qj4599@sina.com

*通信作者: 陈卓, 工程师, 从事中药大健康发展及临床应用研究。Tel: 17622915212 E-mail: 403297501@qq.com

周军, 主任药师, 从事中药分析及质量控制研究。Tel: (022)23374076 E-mail: happy76dragon.com@aliyun.com

by comparison with the control substance, namely liquiritin, glycyrrhetic acid and paeoniflorin. The results of HCA and PLS-DA are consistent. 29 batches of FOL samples can be clustered according to different manufacturers and production dates. Nine differential components that cause differences in the quality of FOL can be screened, namely chromatographic peaks 12, 3, 4, 18, 14, 9, 20, 21, 22. The nine differential components mainly come from the medicinal flavors of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*, PRA) and Ganciao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, GRR). The established method for determining the content of paeoniflorin, liquiritin, and glycyrrhetic acid can simultaneously, quickly, and accurately determine the content of key differential components in FOL. The results showed significant differences in the content of paeoniflorin, liquiritin, and glycyrrhetic acid in FOL from different manufacturers and batches. **Conclusion** The established HPLC fingerprint, multi-index component content determination method, and chemometric combined quality evaluation method for FOL are fast, accurate, efficient, highly characteristic, have good repeatability and stability. The method can be used for the quality evaluation of commercially available FOL products, and can be used to improve the quality control system of FOL.

Key words: Fukangbao Oral Liquid; fingerprint spectrum; chemometrics; quality evaluation; principal component analysis; hierarchical cluster analysis; partial least squares-discriminant analysis; liquiritin; glycyrrhetic acid; paeoniflorin

妇康宝口服液 (Fukangbao Oral Liquid, FOL), 源自于《金匱要略》卷下的经典名方“芍归胶艾汤”, 由白芍、当归、熟地黄、川芎、阿胶、艾叶、甘草共 7 味中药组成, 具有补血调经止血之功, 用于治疗面色萎黄、头晕乏力、月经后错、量多色淡、经期延长^[1-4]。现行标准收载于《中国药典》2020 年版一部, 包括 5 项鉴别及 2 项含量测定, 但仅覆盖 4 味中药, 且阿魏酸的鉴别及含量测定不具备药味专属性^[1]。经国家食品药品监督管理总局网站数据库检索^[5], FOL 现有批准文号 23 个, 生产企业众多, 现有的质量标准很难满足实际生产质控, 从而导致不同企业或同一企业不同批次间的制剂存在质量参差不齐的现象。近年来, 随着国家越来越注重中药制剂的整体质量评价^[6-9], 中药指纹图谱作为从不同层面控制中药的内在成分、保障中药疗效的最有效方法之一^[6,10-11], 现已发展为评价中药优劣^[12-13]、鉴别中药真伪^[14-15]、区分中药品种^[16-18]和确保中药及其制剂一致性、稳定性最有效的方法^[19-21]。化学计量学^[22-23]是以计算机技术为基础的一门新兴交叉学科, 通过采用层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 等方法可对复杂的多维信息进行整合、降维、分类, 并将复杂的问题简单化, 有利于揭示中成药制剂复杂成分间隐藏的规律^[24-26]。因此, 本研究以 FOL 为研究对象^[27-29], 以对照品和对照药材为参照, 采用 HPLC 法建立其指纹图谱, 并结合化学计量学分析和多成分定量测定进行综合分析, 以期对 FOL 的质量控制与评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本

岛津制作所; XS205DU 型电子天平, 瑞士梅特勒-托利多集团; Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 广州菲罗门科技有限公司; Thermo Acclaim™ 120 Å C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 赛默飞世尔科技有限公司; Accchrom XAq C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 华谱科仪 (北京) 科技有限公司; Shiseido Capcell PAK-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 日本资生堂公司; Phenomenex Kinetex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 广州菲罗门科技有限公司; Thermo Acclaim™ 120 Å C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 材料

乙腈、甲醇, 色谱纯, Merck 公司; 磷酸, 分析纯, 天津市赢达稀贵化学试剂厂; 水为 Milli-Q 超纯水; 对照品甘草苷 (批号 111610-202209, 质量分数 95.2%)、甘草酸铵 (批号 110731-202122, 质量分数 94.4%)、芍药苷 (批号 110736-202246, 质量分数 96.7%); 对照药材熟地黄 (批号 121196-202208)、川芎 (批号 120918-201813)、白芍 (批号 120905-202011)、艾叶 (批号 121345-201804)、当归 (批号 120927-202118)、甘草 (批号 120904-202021); 以上对照品及药材均购自中国食品药品检定研究院。

FOL 样品: 来源于市售 5 家生产企业共 29 批, 其中, 批号 181012、181212、181210、180618、180227 来源于江西南昌桑海制药有限责任公司, 分别编号 S1~S5; 批号 180601、190102、181101、181201、190101、181001、190301、181002、190401、180901 来源于重庆芸峰药业有限公司, 分别编号 S6~S15; 批号 161101、190301、180101、170501 来源于重庆希尔安药业有限公司, 分别编号 S16~S19; 批号

180301、181101、180302、171101、181001、190201 来源于药圣堂（湖南）制药有限公司，分别编号 S20~S25；批号 180701、170602、17041101、181101 来源于四川双新制药有限公司，分别编号 S26~S29。

阴性样品：缺熟地黄、缺川芎、缺白芍、缺艾叶、缺当归、缺甘草阴性样品，均由天津市药品检验研究院中药室按 FOL 处方和工艺模拟制备。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 溶液的制备

(1) 供试品溶液的制备：精密称取样品 3 g，置于 10 mL 量瓶中，加入 80% 甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

(2) 混合对照品溶液的制备：取甘草苷、甘草酸铵和芍药苷对照品适量，精密称定，加 80% 甲醇制成各含甘草苷 15 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 80 $\mu\text{g/mL}$ （甘草酸质量 = 甘草酸铵质量/1.020 7）、芍药苷 200 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液，即得。

(3) 对照药材溶液的制备：分别取白芍、熟地黄、甘草、川芎、艾叶、当归 6 种对照药材，按照《中国药典》2020 年版一部“妇康宝口服液”制法工艺制备，再取适量按照“2.1.1 (1)”项下方法操作，作为对照药材溶液。

(4) 阴性样品溶液的制备：取各阴性样品，按照“2.1.1 (1)”项下方法制成阴性样品溶液。

2.1.2 色谱条件 选用 Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相，梯度洗脱：0~10 min, 5%~12% 乙腈；10~40 min, 12%~30% 乙腈；40~60 min, 30%~46% 乙腈；60~63 min, 46%~5% 乙腈；63~70 min, 63% 乙腈；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 237 nm；进样量 10 μL 。

2.1.3 精密度考察 取 FOL(S18)，按照“2.1.1(1)”项下方法制得供试品溶液，按照“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以 4 号色谱峰（芍药苷）的保留时间及峰面积为参照，计算供试品溶液中 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。供试品溶液指纹图谱中呈现 22 个共有峰，其中 4 号色谱峰与芍药苷参照物峰保留时间一致。同时，将色谱图以 AIA 格式输出，导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）”（以下简称“相似度计算软件”），与“2.1.6”项下建立的对照图谱比较，相

似度均大于 0.900。结果表明，该仪器和方法的精密度良好。

2.1.4 重复性考察 取 FOL(S18)，按照“2.1.1(1)”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1.2”项下色谱条件进样分析，并记录色谱图，以 4 号色谱峰（芍药苷）的保留时间及峰面积为参照，计算供试品溶液中 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。供试品溶液指纹图谱中呈现 22 个共有峰，其中 4 号峰与芍药苷参照物峰保留时间一致。同时，将色谱图导出为 AIA 格式，再导入相似度计算软件，与“2.1.6”项下建立的对照图谱比较，相似度均大于 0.900。结果表明该方法的重复性良好。

2.1.5 稳定性考察 取 FOL(S18)，按照“2.1.1(1)”项下方法制成供试品溶液，按照“2.1.2”项下色谱条件，分别在制备后 0、4、8、12、16、24 h 进行指纹图谱分析，并记录色谱图。以 4 号色谱峰（芍药苷）的保留时间及峰面积为参照，计算供试品溶液中 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。供试品溶液指纹图谱中呈现 22 个共有峰，其中 4 号峰与芍药苷参照物峰保留时间一致。同时，将色谱图以 AIA 格式输出，导入相似度计算软件，与“2.1.6”项下建立的对照图谱比较，相似度均大于 0.900。结果表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.1.6 对照指纹图谱的建立及特征峰指认 取 14 批 FOL (S4、S5、S7~S9、S17~S19、S23~S25、S27~S29)，按照“2.1.1 (1)”项下方法制成供试品溶液，按照“2.1.2”项下色谱条件进样分析，得到 14 批 FOL 样品的色谱图。将 14 批 FOL 样品的图谱导入相似度计算软件，得到 HPLC 叠加指纹图谱，经过多点校正及峰匹配，最终生成 FOL 的对照指纹图谱 (R)，并确定 22 个共有峰（图 1），其中最大峰为防腐剂，故不参与对照指纹图谱的建立。

取按照“2.1.1”项下混合对照品溶液、FOL 供试品溶液、对照药材溶液及缺熟地黄、缺川芎、缺白芍、缺艾叶、缺当归、缺甘草阴性样品溶液，按照“2.1.2”项下色谱条件进样分析，结果见图 2~6，通过比较各药味中对照药材色谱图、阴性样品色谱图和对照指纹色谱图对共有峰进行归属，结果显示，峰 4 为芍药苷，峰 7 为甘草苷，峰 21 为甘草酸（图 7）；其中，1、2、11、13、14 号峰来自于药味艾叶；3~5、18 号峰来自于药味白芍；6~9、15~17、19~21 号峰来自于药味甘草；12 号峰来自于药味熟地黄；10、22 号峰来自于药味当归和川芎。其

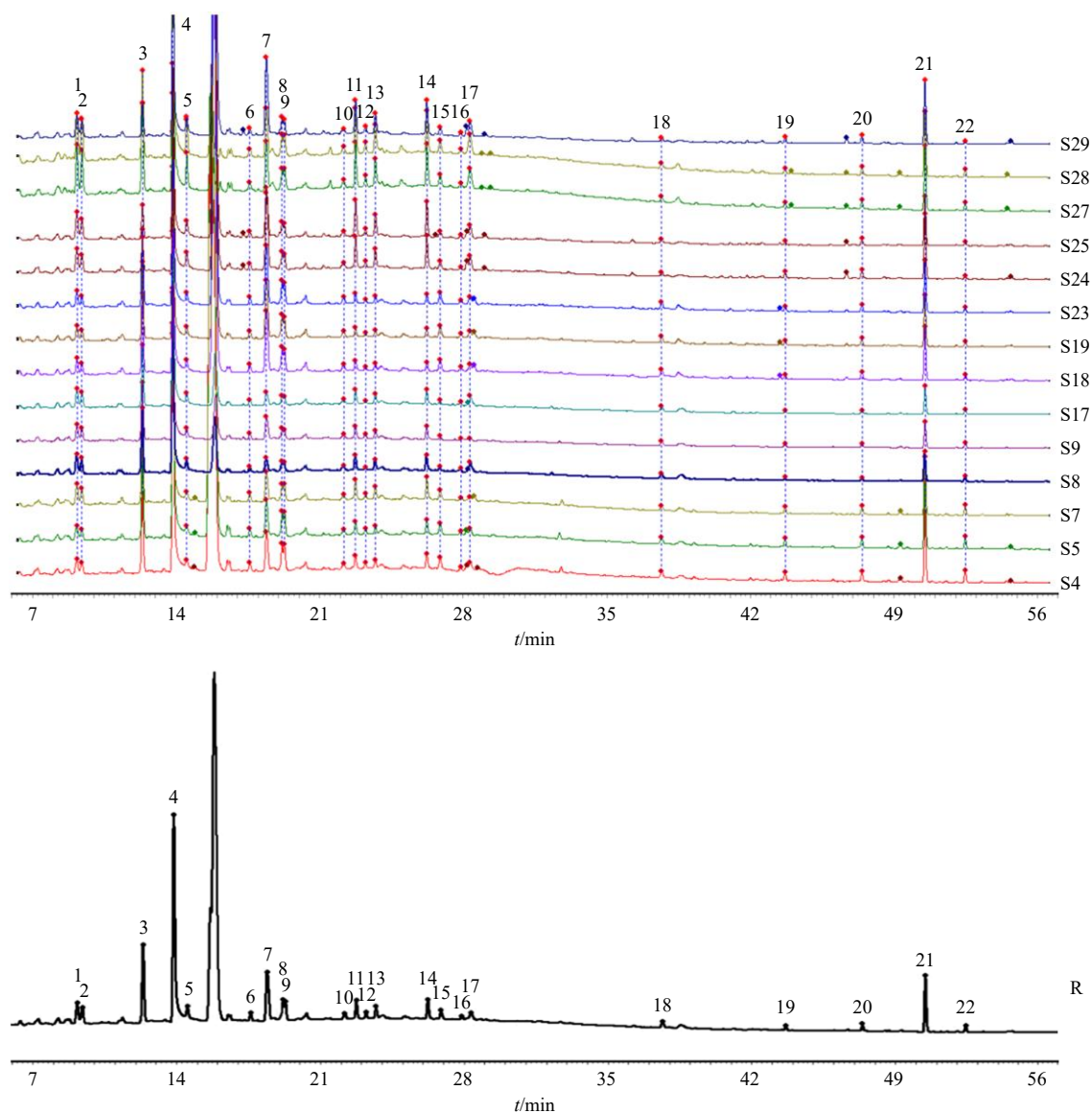


图 1 14 批 FOL 的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint overlay of 14 batches of FOL and its reference fingerprint (R)

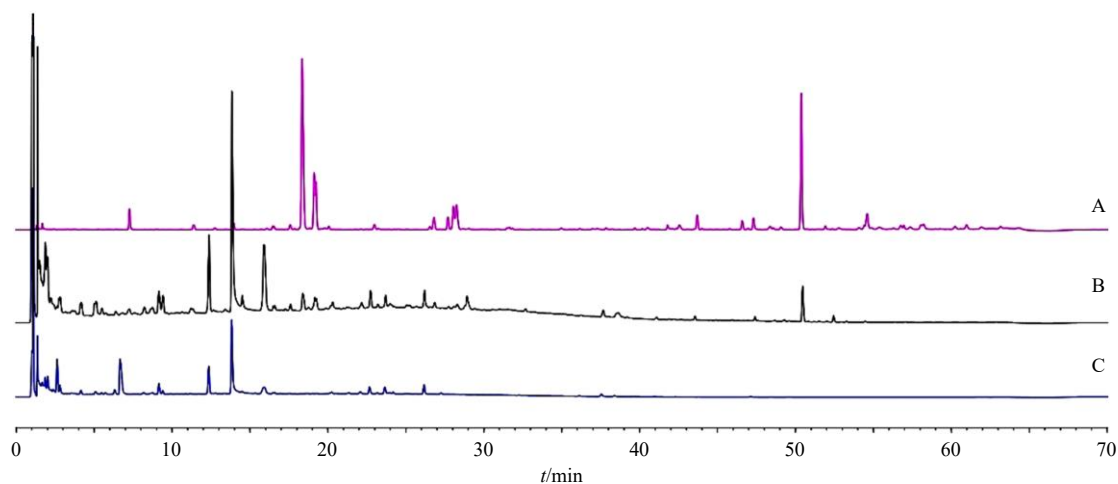


图 2 甘草对照药材溶液 (A)、FOL 供试品溶液 (B) 与缺甘草阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of GRR reference medicinal solution (A), FOL test solution (B) and negative sample without GRR solution (C)

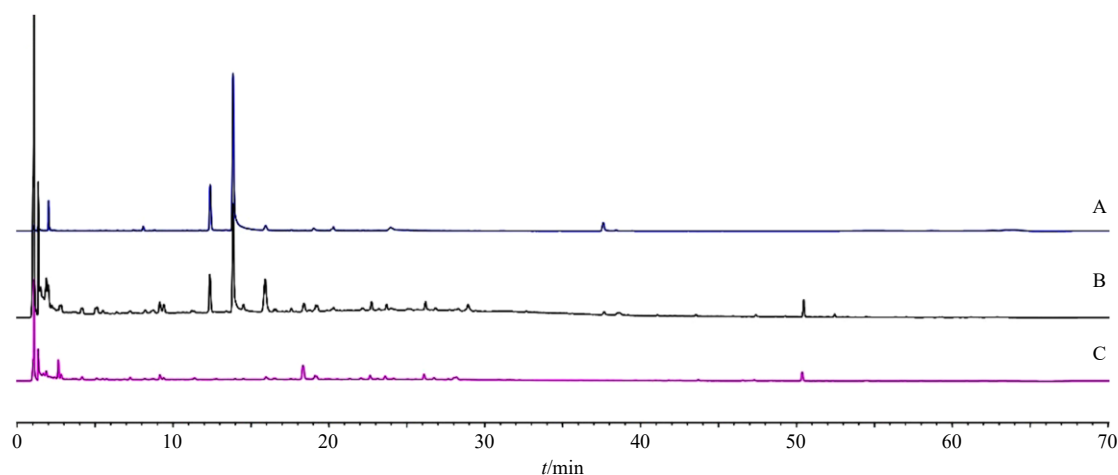


图 3 白芍对照药材溶液 (A)、FOL 供试品溶液 (B) 与缺白芍阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of PRA reference medicinal solution (A), FOL test solution (B) and negative sample without PRA solution (C)

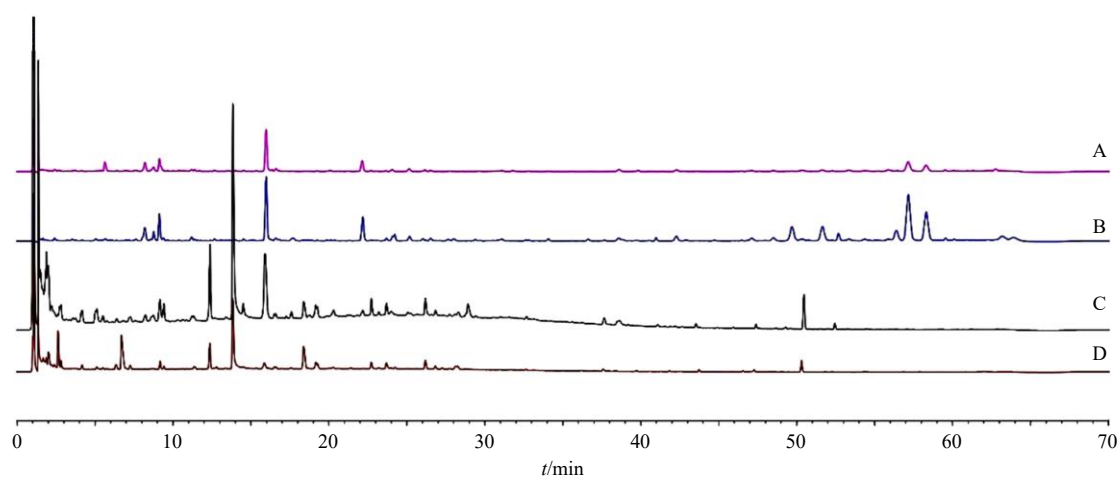


图 4 当归对照药材溶液 (A)、川芎对照药材溶液 (B)、FOL 供试品溶液 (C) 与缺当归、川芎阴性样品溶液 (D) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of *Angelicae Sinensis Radix* (ASR) reference medicinal solution (A), *Chuanxiong Rhizoma* (CR) reference medicinal solution (B), FOL test solution (C) and negative sample without ASR, CR solution (D)

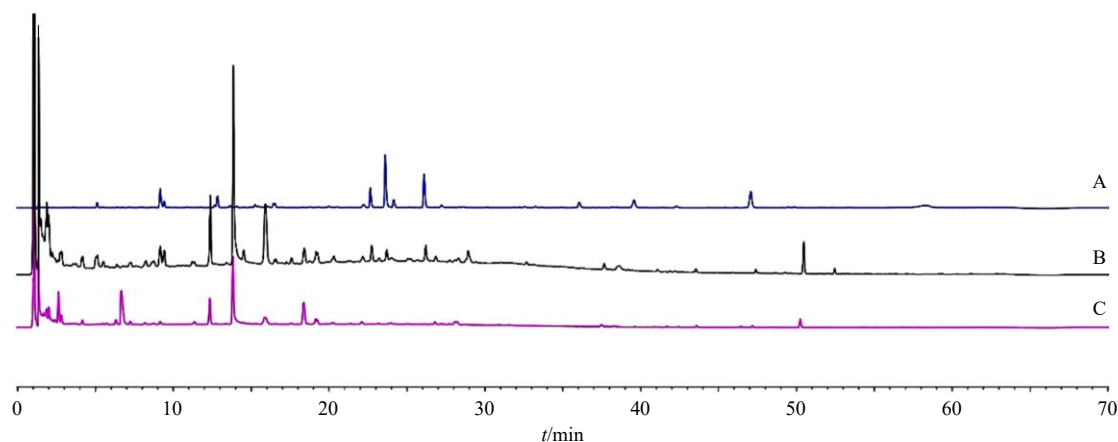


图 5 艾叶对照药材溶液 (A)、FOL 供试品溶液 (B) 与缺艾叶阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of *Artemisiae Argyi Folium* (AAF) reference medicinal solution (A), FOL test solution (B) and negative sample without AAF solution (C)

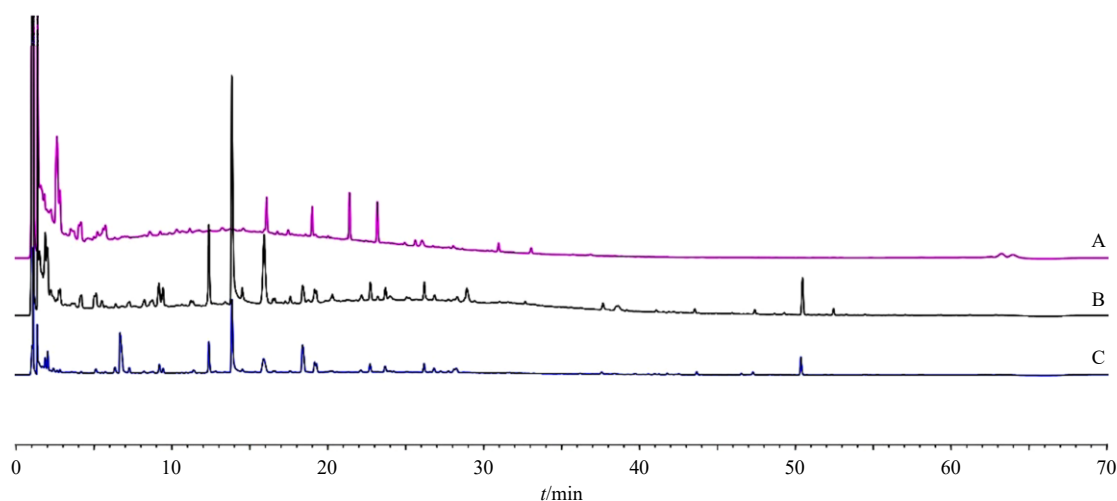
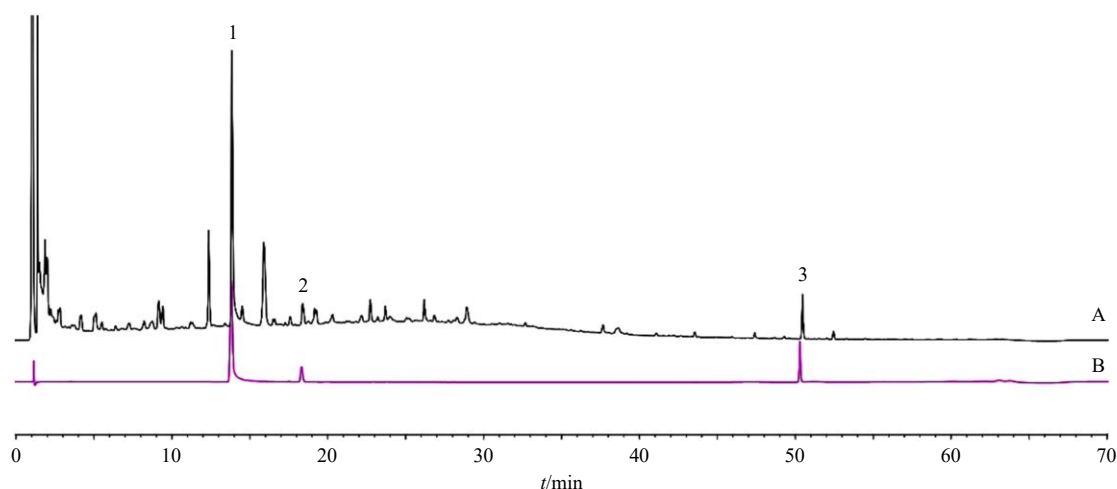


图 6 熟地黄对照药材溶液 (A)、FOL 供试品溶液 (B) 与缺熟地黄阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of *Rehmanniae Radix Praeparata* (RRP) reference medicinal solution (A), FOL test solution (B) and negative sample without RRP solution (C)



1-芍药苷; 2-甘草苷; 3-甘草酸。

1-paeoniflorin; 2-liquiritin; 3-glycyrrhizic acid.

图 7 FOL 供试品溶液 (A) 与混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of FOL test solution (A) and mixed reference solution (B)

中, 芍药苷为方中白芍的活性成分和指标性成分, 且所有检测的样品均检出芍药苷, 出峰时间稳定, 色谱分离良好, 无杂质峰干扰。以芍药苷为参照峰, 计算其他共有峰的相对保留时间, 并计算相应的 RSD, 结果发现, 22 个共有峰的相对保留时间的 RSD ($n=29$) 均小于 0.5%, 故选择芍药苷作为参照峰 (S)。

2.1.7 相似度分析 取全部 29 批次 FOL 样品, 按照“2.1.1 (1)”项下方法制成供试品溶液, 再按所建立的指纹图谱条件进行分析, 将色谱图导出为 AIA 格式, 再导入相似度计算软件, 与对照图谱比较, 29 批次 FOL 样品 (S1~S29) 的相似度值分别为 0.937、0.862、0.858、0.895、0.915、0.998、0.954、

0.985、0.988、0.969、0.997、0.963、0.996、0.978、0.993、0.991、0.991、0.984、0.989、0.986、0.993、0.988、0.978、0.986、0.994、0.985、0.993、0.993、0.984, 在 0.858~0.998。因不同生产厂家样品和同一厂家不同批次样品相似度存在差异, 继而采用化学计量学对 FOL 进一步分析。

2.1.8 基于化学计量学的 FOL 质量分析

(1) HCA: 使用 SPSS 26.0 软件, 对来源于 5 家生产企业的 29 批样品进行统计分析, 以生产企业对照图谱的 22 个共有峰的标准化峰面积为变量, 以平方欧式距离作为样品的测度, 得到 29 批 FOL 指纹图谱的 HCA 树状关系图, 结果见图 8。当平方欧式距离为 10 时, 29 批样品可聚为 4 类: S1~S5

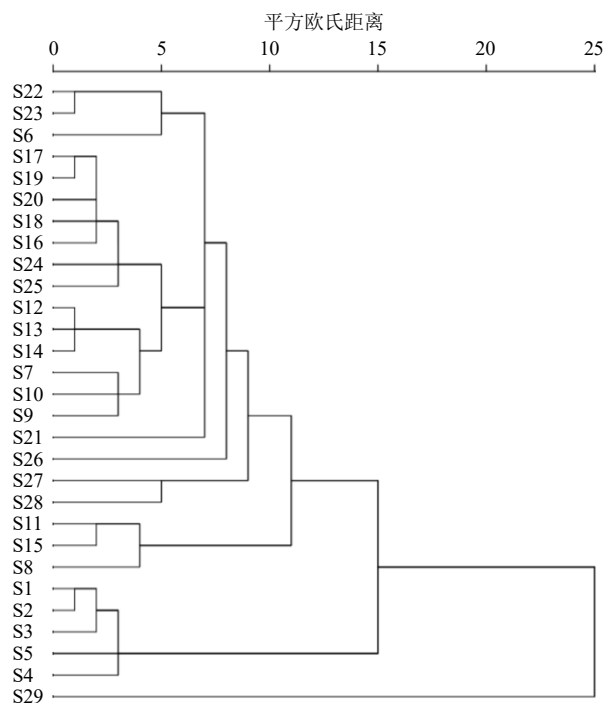


图 8 29 批 FOL 的 HCA 树状图

Fig. 8 HCA dendrogram of 29 batches of FOL

表 1 FOL 主成分因子特征值及方差贡献率

Table 1 Eigenvalue and variance contribution rate of principal component factors in FOL

主成分	初始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.474	43.065	43.065	9.474	43.065	43.065	7.225	32.840	32.840
2	4.506	20.482	63.548	4.506	20.482	63.548	4.106	18.662	51.502
3	2.042	9.281	72.828	2.042	9.281	72.828	3.485	15.840	67.342
4	1.591	7.231	80.060	1.591	7.231	80.060	2.602	11.828	79.170
5	1.253	5.697	85.756	1.253	5.697	85.756	1.449	6.586	85.756

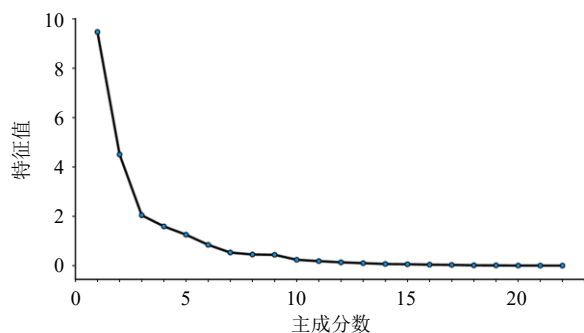


图 9 FOL 22 个因子特征值碎石图

Fig. 9 Principle component analysis scree plot of FOL

成分 5 主要反映峰 17 的贡献率。

(3) 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA): 为进一步分析引起 FOL 样品质量差异的原因, 筛选出对差异

为聚为 I 类; S8、S11、S15 聚为 II 类; S6、S7、S9、S10、S12~S14、S16~S28 聚为 III 类; S29 单独为 IV 类。结果表明, 除个别样品外, 29 批 FOL 不仅依据不同生产企业聚为一类, 还根据不同生产日期各自聚为一小类, 这可能不同批次 FOL 生产使用的组方药材的质量差异造成。

(2) PCA: 为进一步比较不同批次 FOL 间的质量差异, 将 5 家生产企业的指纹图谱中 22 个共有峰的峰面积数据导入 SPSS 26.0 软件, 进行 PCA, 计算相关系数特征值和方差贡献率, 以特征值 > 1 为提取标准, 得到前 5 个主成分, 累积方差贡献率达 85.756% (表 1)。碎石图 (图 9) 进一步表明前 5 个成分较陡, 其余成分之间趋于平缓, 表明前 5 个主成分可以代表 FOL 中 22 个特征峰 85% 以上的信息量, 具有良好的代表性。从主成分因子载荷表 (表 2) 可知, 主成分 1 主要反映峰 1、2、5、7、11~14、16 的贡献率; 主成分 2 可反映峰 8~10、19~21 的贡献率; 主成分 3 主要反映峰 6、15、22 的贡献率; 主成分 4 主要反映峰 3、4、18 的贡献率; 主

贡献较大的成分, 在 HCA、PCA 基础上采用 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 将 29 批次 FOL 各 22 个共有峰面积标准化数据导入自动拟合建立 PLS-DA、OPLS-DA 模型 (图 10)。结果显示, 5 家企业的 29 批样品按不同企业分类明显, 与 HCA 结果一致。

利用变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值进行预测分析, 以 VIP 值 > 1 为筛选标准 (图 11), 得到 9 个差异性化学成分, 分别为归属于熟地黄的峰 12, 属于白芍的峰 3、4、18, 属于艾叶的峰 14, 归属于甘草的峰 9、20、21; 归属于当归和川芎的峰 22。此 9 个成分对 FOL 样品分类具有显著影响, 是引起样品差异的主要标志

表 2 FOL 中主成分因子载荷矩阵
Table 2 Loading matrix of principal component factors in FOL

因子	载荷矩阵				
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
峰 1	0.810	0.374	0.102	-0.131	0.231
峰 2	0.761	0.406	0.072	-0.169	0.214
峰 3	-0.424	0.108	0.282	0.786	-0.031
峰 4	-0.238	-0.045	0.037	0.936	-0.042
峰 5	0.833	-0.008	0.150	-0.198	0.098
峰 6	0.154	0.231	0.791	0.207	0.038
峰 7	0.676	0.334	0.330	-0.204	-0.141
峰 8	0.221	0.873	0.278	-0.004	0.178
峰 9	0.202	0.855	0.335	0.162	0.097
峰 10	0.517	0.624	0.402	0.157	-0.028
峰 11	0.934	0.245	0.083	-0.147	0.048
峰 12	0.499	-0.152	-0.348	0.433	0.458
峰 13	0.960	0.140	0.050	-0.078	0.084
峰 14	0.956	0.059	-0.056	-0.029	0.050
峰 15	0.242	-0.048	0.834	0.084	-0.039
峰 16	0.773	0.108	0.108	-0.247	-0.016
峰 17	0.182	0.057	0.129	-0.165	0.872
峰 18	-0.220	0.101	0.519	0.748	-0.238
峰 19	0.032	0.907	-0.278	-0.097	-0.099
峰 20	0.511	0.565	0.399	0.021	-0.379
峰 21	0.515	0.641	0.431	-0.019	-0.251
峰 22	-0.040	0.230	0.854	0.082	0.134

物。由分析可知，不同企业 FOL 样品除生产工艺外，由于投料质量差异，企业间样品质量差异明显，提示企业应关注上述饮片质量。9 个成分差异成分中 3 个来自药味白芍、3 个来自药味甘草，进一步提示企业应重点关注组方中白芍、甘草的投料质量，从而保证产品均一稳定。

2.2 多指标含量测定

2.2.1 溶液的制备

- (1) 对照品溶液的制备：同“2.1.1 (2)”项（甘草酸质量＝甘草酸铵质量/1.020 7）。
- (2) 供试品溶液的制备：精密称取 FOL 样品 2 g，置于 10 mL 量瓶中，加入 80%甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。
- (3) 阴性样品溶液的制备：分别取缺白芍、缺甘草阴性样品，按照“2.2.1 (1)”项下方法制成各自阴性样品溶液。

2.2.2 色谱条件 选用 Thermo Acclaim™ 120 Å C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；柱温 40 ℃；

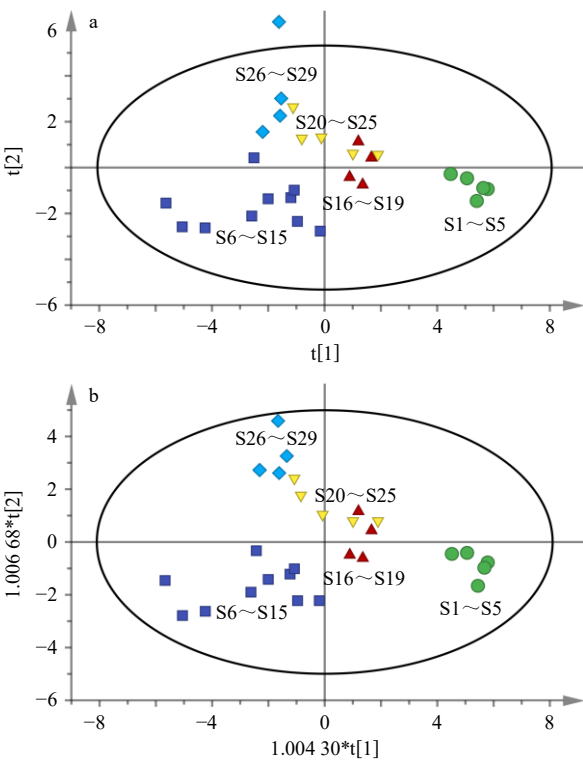


图 10 29 批 FOL 样品的 PLS-DA (a) 和 OPLS-DA (b) 得分图

Fig. 10 PLS-DA (a) and OPLS-DA (b) score plot of 29 batches of FOL

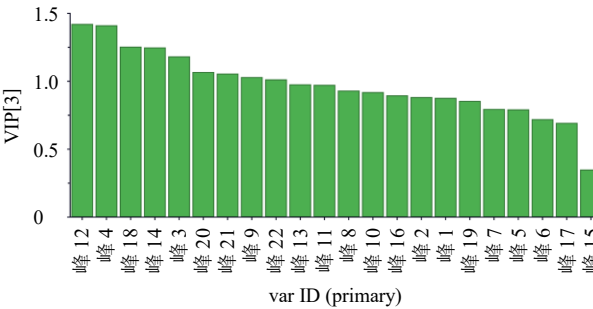


图 11 FOL 中 22 个共有峰的 VIP 值得分图

Fig. 11 VIP score plot of 22 components in FOL

体积流量 1.0 mL/min；检测波长 230 nm（芍药苷）和 237 nm（甘草苷、甘草酸）；进样量 10 μL；以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相，梯度洗脱：0～15 min，17%乙腈；15～30 min，17%～45%乙腈；30～32 min，45%～60%乙腈；32～50 min，60%乙腈。

2.2.3 专属性考察 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL，注入 HPLC 色谱仪，按照“2.2.2”项下色谱条件进样测定。结果表明供试品溶液在与对照品溶液保留时间相应位置上出现相同色谱峰，分离度良好，且阴性样品无干扰，结果见图 12。

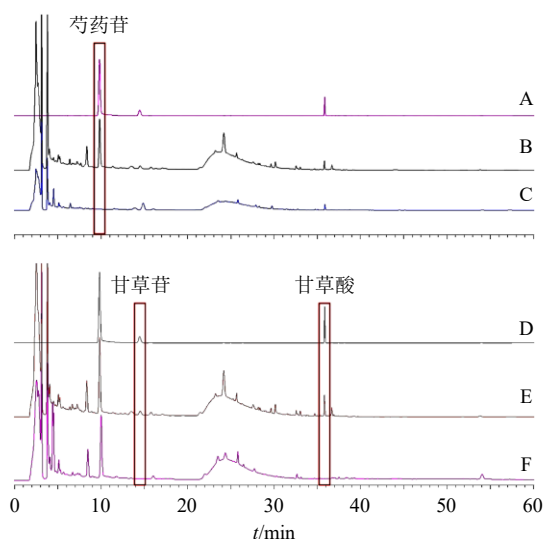


图 12 混合对照品溶液 (230 nm, A; 237 nm, D)、FOL 供试品溶液 (230 nm, B; 237 nm, E) 和缺芍药阴性样品溶液 (230 nm, C)、缺甘草阴性样品溶液 (237 nm, F) HPLC 图
Fig. 12 HPLC of mixed reference substances solution (230 nm, A; 237 nm, D), FOL test solution (230 nm, B; 237 nm, E) and negative sample without PRA solution (230 nm, C), negative sample without GRR solution (237 nm, F)

2.2.4 线性关系参考 各取芍药苷、甘草苷、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成含芍药苷 186.52 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 13.84 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 77.44 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。分别精密吸取上述溶液 2、5、10、15、20 μL , 注入液相色谱仪, 按照“2.2.2”项下色谱条件分析, 测定各自峰面积, 以对照品进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程分别为芍药苷 $Y=1\,371\,533.62X+16\,596.55$, $r=0.999\,9$; 甘草苷 $Y=2\,127\,835.01X+1\,308.66$, $r=0.999\,9$; 甘草酸 $Y=625\,272.69X+3\,279.49$, $r=0.999\,9$; 结果表明, 芍药苷在 0.373~3.730 μg , 甘草苷在 27.67~276.70 ng, 甘草酸在 0.154 9~1.549 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度考察 取 FOL (S18), 按照“2.2.1 (1)”项下制成供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录甘草苷、甘草酸和芍药苷峰面积, 结果显示样品中甘草苷、甘草酸和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.52%、0.64%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 FOL (S18), 按照“2.2.1 (1)”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件分别在 0、4、8、12、24 h 进样, 测定样品中

甘草苷、甘草酸和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.25%、0.51%、0.17%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内测定稳定。

2.2.7 重复性考察 取 FOL (S18), 按照“2.2.1 (1)”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件测定, 记录甘草苷、甘草酸和芍药苷峰面积, 结果显示甘草苷、甘草酸及芍药苷的平均质量分数分别为 0.066 88、0.382 6、0.904 3 mg/g, RSD 分别为 0.45%、1.16%、1.08%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 分别取 FOL (S18) 样品 1 g, 精密称定, 共 6 份, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入含有甘草苷、甘草酸、芍药苷质量浓度分别为 13.38、76.52、180.86 $\mu\text{g/mL}$ 的 80% 甲醇混合对照品溶液 5 mL, 再用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 制得供回收率用供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果甘草苷、甘草酸、芍药苷的平均加样回收率分别为 97.10%、99.72%、99.80%, RSD 分别为 0.69%、0.98%、0.70%, 表明该方法准确度良好。

2.2.9 样品含量测定结果 取来自 5 家生产企业的 29 批次 FOL 样品, 按照“2.2.1 (1)”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 计算样品中芍药苷、甘草苷和甘草酸含量, 结果见表 3。对 29 批 FOL 中 3 种成分含量进行比较, 结果表明, 不同生产企业的 FOL 产品中 3 种指标成分含量差异明显, 同一生产企业的不同批次 FOL 产品由于原料不同也存在不同程度含量差异, 与化学计量学分析结果一致。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

FOL 由多种药味组方而成, 处方成分复杂, 本研究经过多次探索不同品牌及型号的色谱柱 (Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱、Acchrom XAq C₁₈ 色谱柱、Shiseido Capcell PAK-C₁₈ 色谱柱、phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱、Thermo Acclaim™ 120Å C₁₈ 色谱柱), 确定了指纹图谱和含量测定色谱柱; 考察了不同种类及组成的流动相系统 (甲醇、乙腈、水、醋酸-水、甲酸-水、磷酸-水), 最终确定以乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相, 进行梯度洗脱。采用 DAD 检测器, 分别设置了 210、237、280、321、334 nm 5 个波长进行色谱分析, 在不同波长分析供试品溶液色谱图时发现 237 nm 检测波长下, FOL 色谱图可

表 3 29 批 FOL 中 3 种指标成分含量测定结果
Table 3 Content determination results of three
components of 29 batches of FOL

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	芍药苷	甘草苷	甘草酸		芍药苷	甘草苷	甘草酸
S1	1.97	0.08	0.09	S16	0.88	0.07	0.33
S2	1.82	0.05	0.06	S17	1.03	0.08	0.27
S3	1.83	0.05	0.06	S18	1.09	0.04	0.26
S4	1.40	0.04	0.11	S19	0.84	0.07	0.40
S5	1.31	0.03	0.21	S20	0.85	0.08	0.30
S6	1.18	0.15	0.51	S21	1.07	0.25	0.51
S7	0.53	0.19	0.42	S22	0.87	0.08	0.31
S8	0.95	0.14	0.43	S23	1.62	0.09	0.39
S9	0.79	0.12	0.37	S24	1.24	0.14	0.40
S10	0.88	0.27	0.51	S25	1.01	0.15	0.49
S11	1.06	0.15	0.44	S26	1.46	0.30	0.77
S12	1.07	0.33	0.68	S27	1.58	0.15	0.79
S13	0.93	0.13	0.44	S28	1.06	0.13	0.66
S14	1.07	0.21	0.55	S29	2.17	0.16	0.88
S15	1.02	0.12	0.47				

以稳定、全面地反映组方化合物信息，各色谱峰响应值良好，基线平稳，因此选择 237 nm 作为指纹图谱检测波长。参考《中国药典》2020 年版有关成分含测方法，进一步确定 230 nm（芍药苷）和 237 nm（甘草苷、甘草酸）双波长作为含量测定检测波长。

3.2 供试品溶液制备方法考察

FOL 为液体制剂，综合考虑不同极性成分的提取效率，考察水、20%甲醇、50%甲醇、80%甲醇及甲醇等不同提取溶剂的影响，以及不同稀释倍数对含量的影响程度，综合最优化结果最终确定以 80% 甲醇作为提取溶剂将样品稀释至 10 mL。研究还对比了直接稀释法和超声提取法对中各成分的提取效果，结果显示测定结果基本无差别，故选用直接稀释过滤法。

因 FOL 中含有阿胶、熟地黄等黏性较高的药材，且含糖量高达 0.40 g/mL，故其液体较为黏稠，研究中发现按体积取样且量少的情况下沾壁严重，含量测定及指纹图谱检测重复性较差，然而按质量取样可避免移液管沾壁带来的影响，但同时也可能带来 PCA 峰面积偏差，影响样品分组的显著性。课题组前期测定了各厂家 FOL 的比重，均在 1.19~1.20，偏差很小，故取样方式对结果分析影响不大。

3.3 研究的不足之处

本研究建立的指纹图谱未能包含 FOL 中阿胶

药味相关信息，后续应结合阿胶测定结果，建立更全面的 FOL 综合质量评价方法。由于专属性差、响应低等原因，本研究未能建立 FOL 中反映艾叶、熟地黄等原料质量的差异性成分含量测定方法，后续将进一步深入研究差异性成分确切化学结构，并建立合理的质量控制方法。

4 结论

本研究建立了一种能够同时反映除阿胶外其余 6 种药味的 FOL 指纹图谱，并结合 HCA、PCA 和 PLS-DA 等化学计量学方法，分析市售 FOL 样品之间的差异性和影响因素，挖掘出对 FOL 质量影响较大的差异性成分及关键药味。本研究还建立了 FOL 中关键差异性成分芍药苷、甘草苷和甘草酸的含量测定方法。研究建立的方法准确可靠、简单便捷，可用于 FOL 的质量控制与评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 966-967.

[2] 孙凤莉. 妇康宝口服液辅助治疗子宫内膜炎所致阴道流血的效果分析 [J]. 当代医药论丛, 2020, 18(11): 109-110.

[3] 曹俊红. 妇康宝口服液联合宫血宁胶囊治疗阴道流血的临床效果 [J]. 河南医学研究, 2019, 28(11): 2035-2036.

[4] 冯淑梅. 妇产科临床中阴道流血的病因及诊疗措施分析 [J]. 中国农村卫生, 2021, 13(12): 30-32.

[5] 国家药品监督管理局. 境内药品生产查询数据库 [EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/datasearch/search-result.html>.

[6] 马双成, 王莹. 我国中药质量控制模式及思路研究进展十年回顾 [J/OL]. 中国药学杂志, (2023-01-05) [2025-05-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2162.R.20230104.2122.001.html>.

[7] 顾杰, 汪祺, 赵宇新, 等. 基于中药监管科学的中药制剂质量标准研究策略与方法 [J]. 中国药学杂志, 2025, 60(2): 121-129.

[8] 顾杰, 周思源, 阳长明, 等. 保障功效稳定的中药制剂质量控制体系 [J]. 药学学报, 2025, 60(6): 1682-1691.

[9] 曾瑾, 陈平, 刘阳, 等. 中药复方制剂质量控制与评价的监管科学 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(2): 17-22.

[10] 吕昀, 程文倩, 牛可敬, 等. 基于多维整合策略的中药复方制剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7847-7856.

[11] 吴春兴, 杨杨, 孟梅, 等. 近十年中药指纹图谱领域的研究现状及趋势分析 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2024, 33(4): 63-73.

- [12] 钱森华, 张晓勇, 朱斐, 等. 中药饮片等级量化评价方法研究进展与趋势 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 667-679.
- [13] 郝培君, 张林祥, 靳婉君, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与指标性成分结合多元统计学对色选金银花等级的评价研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2694-2701.
- [14] 郑舒宁, 齐红, 林漫怡, 等. 香橼及其易混淆品 UPLC 指纹图谱建立及 6 个成分含量测定研究 [J/OL]. 天然产物研究与开发, (2025-03-28) [2025-05-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20250328.1151.002.html>.
- [15] 刘梓梵, 明凯利, 向阳, 等. 基于指纹图谱-化学模式识别的宽叶缬草及其混伪品鉴别研究 [J]. 中药材, 2025, 48(3): 674-680.
- [16] 吴秀平, 徐明珠, 孙宜春, 等. 基于 UPLC 多指标成分定量和指纹图谱结合化学模式识别法评价不同基原十大功劳木的质量 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2914-2924.
- [17] 吴新, 吴涛, 王冰清, 等. 不同产地甘草 UPLC 指纹图谱的建立及 6 种成分定量分析 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2518-2526.
- [18] 张玉珊, 袁欣月, 南红梅, 等. 基于多成分含量测定和化学计量学的不同基原甘草质量评价研究 [J]. 中药材, 2024, 47(5): 1208-1214.
- [19] 贺嫣然, 吉丽群, 吴子佳, 等. 基于 HPLC 指纹图谱特征的补中益气汤组方配伍规律研究 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7633-7643.
- [20] 李书晚, 廖扬振, 王龙飞, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法、HPLC 指纹图谱、含量测定评价覆盆子质量 [J]. 中成药, 2025, 47(4): 1077-1084.
- [21] 王少卿, 孙慧珠, 苏建, 等. 基于指纹图谱结合化学计量学分析枣仁安神液质量及主要成分含量测定研究 [J/OL]. 中国新药杂志, (2025-05-14) [2025-06-01]. <https://doi.org/10.20251/j.cnki.1003-3734.2025>.
- [22] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [23] 孙雪倩, 杨彬, 李遇伯. 多基原中药质量评价研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4214-4224.
- [24] 孙玉, 许丽丽, 高文燕, 等. 基于多波长切换 HPLC 指纹图谱结合化学计量学和多指标含量测定的脉络舒通丸质量评价研究 [J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(21): 2065-2074.
- [25] 张继红, 郑露盼, 胡美英, 等. 基于多指标成分定量结合化学计量学的复方板蓝根颗粒质量评价研究 [J]. 药品评价, 2025, 22(1): 6-11.
- [26] 梅佳华, 郝佳旭, 程欣, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的香果健消片质量评价 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 458-466.
- [27] 郑新元, 曲佳, 陈博知, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS/MS 技术对不同厂家妇康宝口服液的质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(6): 1100-1105.
- [28] 车爽, 周军, 曲佳. HPLC 法测定妇康宝口服液中阿魏酸的含量 [J]. 天津药学, 2021, 33(3): 16-18.
- [29] 张玉婷, 曲佳, 周军, 等. 超高效液相色谱-质谱法对妇康宝口服液中阿胶皮源成分的鉴别 [J]. 天津药学, 2022, 34(5): 14-17.

[责任编辑 郑礼胜]