

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.05.015

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)05-0074-05



妇康片高效液相色谱指纹图谱建立及质量评价*

谢思敏^{1,2}, 陈俊妃^{1,2}, 黄浩宇³, 顾利红^{1,2}, 侯惠婵^{1,2}, 栗建明^{1,2Δ}

(1. 广州市药品检验所, 广东 广州 510160; 2. 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广东 广州 510160; 3. 广东药科大学, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立妇康片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并评价其质量。方法 样品用70%乙腈(含1%磷酸)提取,经氯化钠盐析液液分层萃取后,采用Waters CORTECS® T₃ C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm),以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相(梯度洗脱),切换波长(216, 260 nm)采集,流速为0.8 mL/min,柱温为35℃,进样量为5 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)及科迈恩 Chempattern 软件对6家生产企业的29批样品进行指纹图谱相似度评价、聚类分析(CA)及主成分分析(PCA)。结果 建立的妇康片 HPLC 指纹图谱中,29批样品的相似度为0.776~0.983,共识别了21个共有峰,并归属至处方药味,经与对照品比对,共鉴定出丁香酸、盐酸益母草碱、芍药内酯苷、芍药苷、洋川芎内酯A、脱氢紫堇碱、甘草酸铵、洋川芎内酯I、藁本内酯、白术内酯II 10个色谱峰。CA与PCA结果基本一致,29批样品聚为4类,样品S1-S8和样品S22-S25聚为1类,样品S9-S21和样品S26-S27聚为1类,样品S28聚为1类,样品S29聚为1类。结论 所建立的妇康片 HPLC 指纹图谱能较全面地表征并反映妇康片的整体质量,可为其质量控制和标准的完善提供参考,对提高妇康片产品质量可控性具有重要意义。不同生产企业、同一生产企业不同批次妇康片样品的成分存在一定差异。

关键词: 妇康片; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价; 聚类分析; 主成分分析; 质量评价

Establishment of HPLC Fingerprints and Quality Evaluation of Fukang Tablets

XIE Simin^{1,2}, CHEN Junfei^{1,2}, HUANG Haoyu³, GU Lihong^{1,2}, HOU Huichan^{1,2}, LI Jianming^{1,2}

(1. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510160; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510160; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Fukang Tablets, and to evaluate their quality. **Methods** The sample was extracted with 70% acetonitrile (containing 1% phosphoric acid), and then subjected to sodium chloride salt precipitation liquid-liquid layer extraction. The chromatographic column was Waters CORTECS® T₃ C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the switching wavelength (216, 260 nm) was adopted for collection, the flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 5 μL. The Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (Version 2012) and the Chempattern software were used to conduct fingerprint similarity evaluation, cluster analysis (CA), and principal component analysis (PCA) on 29 batches of samples from six manufacturers. **Results** In the established HPLC fingerprints of Fukang Tablets, the similarity of 29 batches of samples was in the range of 0.776-0.983, and 21 common peaks were calibrated and attributed to the Chinese medicine of the prescription. After comparison with the reference substance, 10 chromatographic peaks were identified, including syringic acid, hydrochloric leonurine, albiflorin, paeoniflorin, senkyunolide A, dehydrocorydaline, glycyrrhizic acid ammonium salt, senkyunolide I, ligustilide and atractylode II. The results of CA and PCA were basically consistent, with 29 batches of samples grouped into four categories, samples S1-S8 and samples S22-S25 grouped into one category, samples S9-S21 and samples S26-S27 grouped into one category, sample S28 grouped into one category, and sample S29 grouped into one category. **Conclusion** The established HPLC fingerprints of Fukang Tablets can comprehensively characterize and reflect the overall quality of Fukang Tablets, which can provide a reference for quality control and standard improvement, and it is of great significance for improving the controllability of the product quality of Fukang Tablets. There are certain differences in the components of Fukang Tablets samples from different manufacturers or different batches in the same manufacturers.

Key words: Fukang Tablets; HPLC; fingerprints; similarity evaluation; cluster analysis; principal component analysis; quality evaluation

妇康片由益母草、当归、白芍(酒制)、延胡索(醋制)、川芎、炙甘草、熟地黄、白术(炒)等11味中药材组

*基金项目: 2023年国家药品评价性抽验专项资助项目[027]。

第一作者: 谢思敏, 女, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药材及中成药质量标准, (电子信箱) 798447372@qq.com。

Δ通信作者: 栗建明, 男, 硕士, 主任中药师, 研究方向为中药质量标准及安全性, (电子信箱) longyangli2002@163.com。

方^[1],最早收载于1977年版《吉林省药品标准》,现收载于《中药成方制剂(第十二册)》(WS₃-B-2319-97),现有生产企业29家,批准文号29个,质量标准16个。各企业执行的现行质量标准的质控项目、指标及含量限度均存在一定差异,其质量控制方法主要有当归、川芎、白术的显微鉴别,延胡索、益母草、白术的薄层色谱鉴别,以及以芍药苷、阿魏酸、延胡索乙素为指标性成分的含量测定^[2-6]。但妇康片处方及制法工艺复杂,以单一成分或某几个成分的含量来控制 and 评价其质量存在一定局限性。指纹图谱技术能较全面地表征并反映中药及其制剂中所含化学成分信息,结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)等方法可对复杂的数据信息进行整合与分析,反映不同生产企业、同一生产企业不同批次样品的一致性 & 稳定性,对药品质量进行整体描述和评价^[7-8]。本研究中以2023年妇康片的国家药品评价性抽验样品为基础,建立了妇康片的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并评价其质量,为妇康片的质量控制和标准完善提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 II 型高效液相色谱仪[美国 Agilent 公司,配有 G7111A 型四元泵、G7129A 型自动进样器、G7117C 型二极管阵列检测器(DAD)];Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);XS204 型电子天平(精度为十万分之一),XS26 型电子天平(精度为百万分之一),均购自瑞士 Mettler Toledo 公司;P300H 型超声波清洗器(德国 Elma 公司,功率为 380 W,频率为 37 kHz);JULABO 型恒温水浴锅(德国 Julabo 公司);ST16R 型高速冷冻离心机(德国 Thermo 公司);Milli-Q 型超纯水处理系统(德国 Merck Millipore 公司)。

1.2 试药

丁香酸对照品(批号为 wkq22082204,纯度为 99.31%),芍药内酯苷对照品(批号为 wkq23011908,纯度为 98%),脱氢紫堇碱对照品(批号为 wkq1609024,纯度为 98%),藁本内酯对照品(批号为 wkq23011210,纯度为 98.38%),白术内酯 II 对照品(批号为 wkq22041507,纯度为 99.34%),均购自四川省维克奇生物科技有限公司;芍药苷对照品(批号为 110736-202145,纯度为 94.6%),盐酸益母草碱对照品(批号为 11823-202005,纯度为 95.7%),甘草酸铵对照品(批号为 110731-202122,纯度为 94.4%),均购自中国食品药品检定研究院;洋川芎内酯 A 对照品(批号为 5844,纯度为 99.8%),洋川芎内酯 I 对照品(批号为 13176,纯度为 98.4%),均购自上海诗丹德标准技术有限公司;乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);水为自制超纯

水;其余试剂均为分析纯(广州化学试剂厂);29 批妇康片样品均为市售,样品信息见表 1。

表 1 妇康片样品信息
Tab. 1 Information of Fukang Tablets

生产企业	批号	编号	生产企业	批号	编号	生产企业	批号	编号
A 企业	200901	S1		20210701	S11		20221102	S21
	210101	S2		20210702	S12	C 企业	210101	S22
	210301	S3		20210703	S13		210102	S23
	210601	S4		20210705	S14		210301	S24
	210801	S5		20220101	S15	D 企业	210302	S25
	211101	S6		20220102	S16		210501	S26
	220501	S7		20220103	S17		210801	S27
	221101	S8		20220104	S18	E 企业	019210301	S28
B 企业	20201101	S9		20220105	S19		210701	S29
	20201201	S10		20221101	S20			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters CORTECS® T₃ C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~25 min 时 3%A~30%A,25~50 min 时 30%A~65%A,50~51 min 时 65%A~100%A);流速:0.8 mL/min;检测波长:260 nm(0~11 min),216 nm(11~17 min),260 nm(17~38 min),216 nm(38~51 min);柱温:35 °C;进样量:5 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取对照品各适量,精密称定,用乙腈溶解,制成质量浓度为 2 mg/mL 的单一对照品贮备液;再精密量取各对照品贮备液适量,加乙腈配制成质量浓度为 4.679~408.316 μg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品 20 片,研细,取适量(约 5 片),精密称定,置回流瓶中,精密加入 70% 乙腈(含 1% 磷酸)15 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,加 70% 乙腈(含 1% 磷酸)补足减失的质量,离心(转速为 4 000 r/min)5 min,取上清液 5 mL,加氯化钠 1 g,振摇,离心(转速为 4 000 r/min)5 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

单味药材溶液:按处方工艺分别取益母草、当归、酒白芍、醋延胡索、川芎、炙甘草、熟地黄、炒白术粉末各适量,按制法工艺及供试品溶液制备方法制备,即得。

阴性对照品溶液:按处方工艺、制法工艺制备缺益母草、当归、酒白芍、醋延胡索、川芎、炙甘草、熟地黄、炒白术的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 方法学考察

精密度试验:取同一批供试品溶液(编号为 S1),按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图,

以5号峰(丁香酸)为参照峰,计算21个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 。结果 RSD 均小于2.53% ($n=6$),表明仪器精密度高。

稳定性试验:取同一批供试品溶液(编号为S1),分别于0,2,6,12,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以5号峰(丁香酸)为参照峰,计算21个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 。结果 RSD 均小于3.54% ($n=6$),表明供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取妇康片(编号为S1),按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以5号峰(丁香酸)为参照峰,计算21个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 。结果 RSD 均小于3.22% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.2 指纹图谱共有模式建立与相似度评价

取29批样品(编号为S1-S29)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,将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版),以妇康片(编号为S1)图谱作为参照图谱,采用中位数法,时间窗设为0.1 min,经多点校正后进行色谱峰匹配,生成29批样品的HPLC叠加指纹图谱(见图1)及指纹图谱共有模式(见图2)。共识别21个色谱峰,其中5号峰保留时间适中,且响应值较高,选为参照峰(S峰)。29批样品的指纹图谱的相似度为0.776~0.983,表明可能由于原药材质量或制备工艺等因素的影响,不同生产企业和同一生产企业不同批次产品的成分存在一定差异。详见表2。

2.3.3 色谱峰指认与归属

将指纹图谱中的色谱峰与混合对照品溶液HPLC图(见图3)进行比对,确认5号峰为丁香酸,6号峰为芍药内酯苷,8号峰为芍药苷,9号峰为盐酸益母草碱,11号峰为洋川芎内酯A,12号峰为脱氢紫堇碱,13号峰

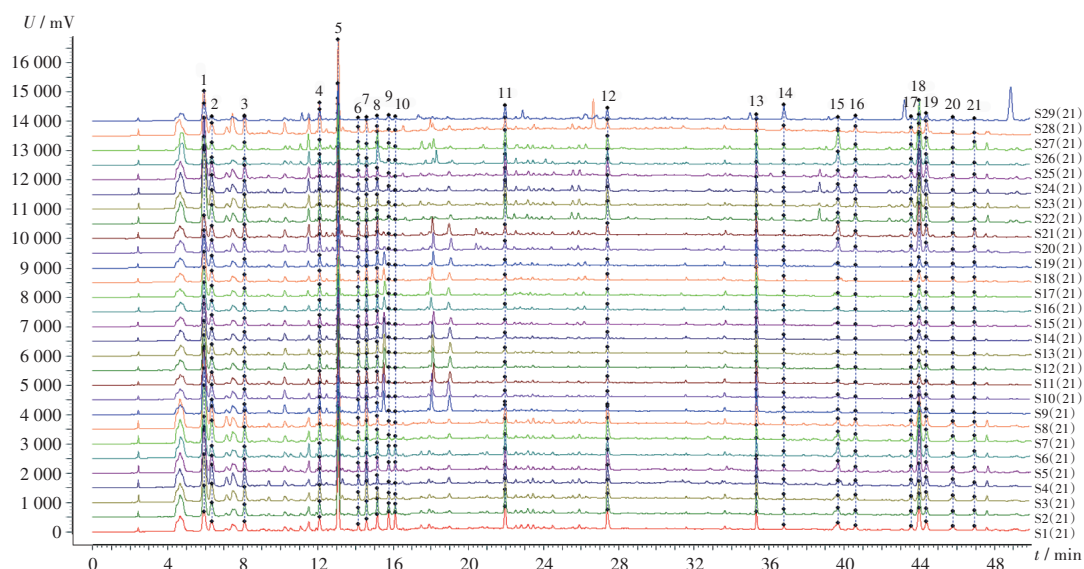


图1 29批妇康片样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig.1 HPLC superimposed fingerprints of 29 batches of Fukang Tablets

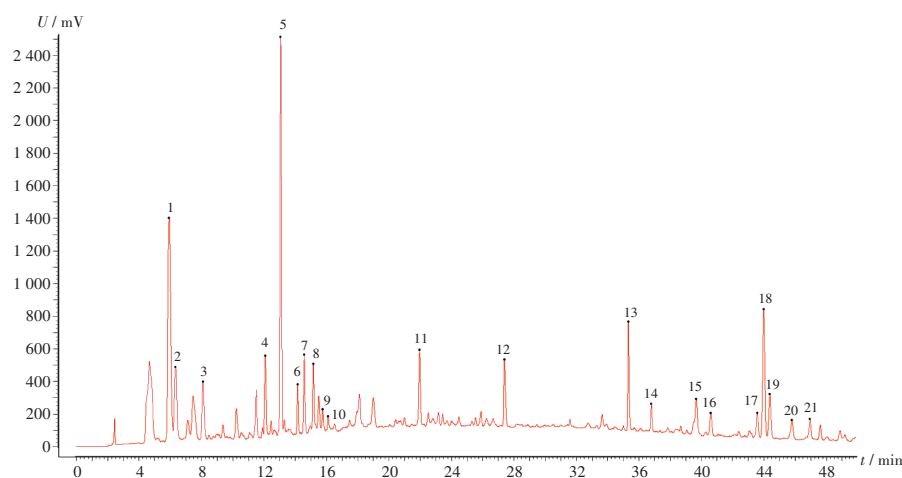


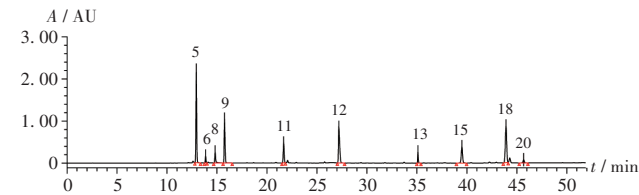
图2 妇康片样品高效液相色谱指纹图谱共有模式

Fig.2 Common patterns of HPLC fingerprints of Fukang Tablets

表 2 29 批妇康片样品相似度评价结果

Tab. 2 Results of similarity evaluation of 29 batches of Fukang Tablets

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.865	S9	0.971	S17	0.979	S25	0.980
S2	0.922	S10	0.969	S18	0.981	S26	0.844
S3	0.969	S11	0.979	S19	0.982	S27	0.776
S4	0.982	S12	0.980	S20	0.913	S28	0.932
S5	0.945	S13	0.979	S21	0.910	S29	0.906
S6	0.944	S14	0.980	S22	0.979		
S7	0.977	S15	0.980	S23	0.982		
S8	0.983	S16	0.980	S24	0.980		



5. 丁香酸 6. 芍药内酯苷 8. 芍药苷 9. 盐酸益母草碱
11. 洋川芎内酯 A 12. 脱氢紫堇碱 13. 甘草酸铵 15. 洋川芎
内酯 I 18. 藁本内酯 20. 白术内酯 II

图 3 混合对照品溶液高效液相色谱图

5. Syringic acid 6. Hydrochloric leonurine 8. Albiflorin 9. Paeoniflorin
11. Senkyunolide A 12. Dehydrocorydaline 13. Glycyrrhizic acid
ammonium salt 15. Senkyunolide I 18. Ligustilide 20. Atractylode II

Fig. 3 HPLC chromatogram of the mixed reference solution

为甘草酸铵,15 号峰为洋川芎内酯 I,18 号峰为藁本内酯,20 号峰为白术内酯 II。进一步与单味药材溶液及阴性对照品溶液的 HPLC 图比对,将 21 个共有峰进行归属,结果分别归属于处方中的益母草、当归、酒白芍、醋延胡索、川芎、炙甘草、熟地黄、炒白术 8 味中药材,基本表征妇康片产品的整体质量信息。详见表 3。

2.3.4 CA 与 PCA

以 29 批样品的 HPLC 指纹图谱中 21 个共有峰的峰面积作为变量,采用科迈恩 Chempattern 软件进行分析,数据经标准化处理后,分别进行 CA 与 PCA。

CA:以组间连接法结合平方欧式距离为测度,进行系统 CA。结果当欧氏距离为 5 时,可将样品聚为 4 类,其中样品 S29(F 企业)聚为 1 类,样品 S28(E 企业)聚为 1 类,样品 S1 - S8(A 企业)和样品 S22 - S25 聚为 1 类(C 企业),样品 S9 - S21(B 企业)和样品 S26 - S27(D 企业)聚为 1 类。详见图 4。可见,企业间的样品差异较大,不同生产企业的样品基本聚为不同的类,具有较明显的生产企业聚集性,同一生产企业不同批次的样品也存在一定差异。

PCA:PCA 法是一种无监督模式的分析方法,采用数据降维手段,将多个变量化为少数几个主成分,反映原始变量的绝大部分信息,克服人为确定指标权重的主观影响,结果更客观、公正^[9]。本研究中采用科迈恩

表 3 妇康片高效液相色谱指纹图谱共有峰处方药味归属

Tab. 3 Results of common peaks attributed to the Chinese medicine of prescription in Fukang Tablets

峰号	归属中药	峰号	归属中药
峰 1	熟地黄	峰 12(脱氢紫堇碱)	延胡索
峰 2	熟地黄	峰 13(甘草酸铵)	甘草
峰 3	熟地黄	峰 14	川芎
峰 4	当归、川芎	峰 15(洋川芎内酯 I)	当归、川芎
峰 5(丁香酸)	益母草	峰 16	当归、川芎
峰 6(芍药内酯苷)	白芍	峰 17	川芎
峰 7	熟地黄	峰 18(藁本内酯)	当归、川芎
峰 8(芍药苷)	白芍	峰 19	当归、川芎
峰 9(盐酸益母草碱)	益母草	峰 20(白术内酯 II)	白术
峰 10	益母草	峰 21	白术
峰 11(洋川芎内酯 A)	当归、川芎		

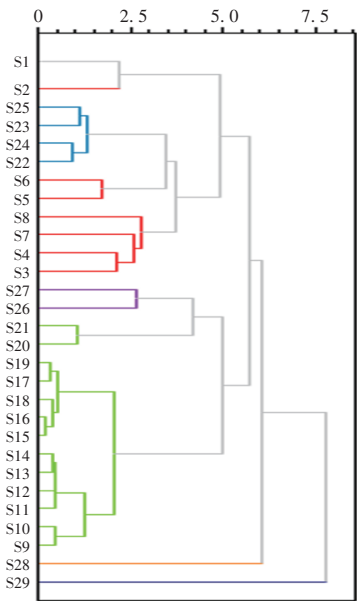


图 4 29 批妇康片样品聚类分析树状图

Chempattern 软件对妇康片 HPLC 指纹图谱中 21 个共有峰的峰面积进行 PCA,结果前 3 个主成分的累计方差贡献率达 76.68%,可较好地代表妇康片的成分信息和整体特征,可用于妇康片的质量评价。PCA 结果与 CA 结果基本一致,反映了妇康片产品间成分的差异。详见图 5。

3 讨论

3.1 流动相选择

通过比较不同流动相系统,考察乙腈 - 水、乙腈 - 0.2% 甲酸溶液、乙腈 - 0.2% 磷酸溶液及甲醇 - 0.2% 磷酸溶液对色谱峰分离度及响应值的影响,结果显示,流动相系统中加入酸,可有效降低化合物中酚羟基、羧基等的离子化,从而改善峰形,提高分离效果,但甲醇、甲酸存在末端吸收,对紫外吸收为末端的化合物

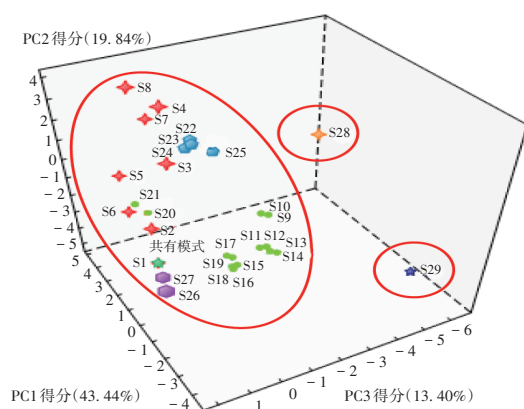


图5 29批妇康片样品主成分分析得分图

Fig. 5 PCA scores of 29 batches of Fukang Tablets

的响应产生明显抑制,而在乙腈-0.2%磷酸溶液系统的洗脱条件下,得到妇康片指纹图谱的色谱峰信息最丰富,分离效果最好,故选用该系统。

3.2 检测波长选择

采用DAD进行190~400 nm全波长扫描,并对图谱进行比较和分析。由于妇康片处方中含益母草、白芍、延胡索等11味中药材,成分较复杂,最终确定采用切换波长,分段在216 nm和260 nm波长下建立HPLC指纹图谱,并识别了其中的21个共有峰。

3.3 供试品溶液制备方法选择

妇康片处方中益母草、延胡索主要含生物碱类成分^[10-11],白芍、甘草、白术、川芎、当归主要含萜类、酚酸类、黄酮类、皂苷类、挥发油等成分^[12-16],且工艺制法中当归、川芎、白术(炒)为粉末入药,人参、延胡索(醋制)为渗漉提取,其余药味为水煎煮,各成分极性 & 类型差异大。本研究中考察了乙腈、甲醇、70%乙腈、70%甲醇、1%磷酸-乙腈、1%磷酸-甲醇、1%磷酸-70%乙腈、1%磷酸-70%甲醇作为提取溶剂对样品提取效果的影响,结果70%甲醇、70%乙腈的提取效果优于甲醇、乙腈,在提取溶液中加入1%磷酸可明显提高碱性化合物(如盐酸益母草碱、脱氢紫堇碱等)的提取率。但以1%磷酸-70%乙腈、1%磷酸-70%甲醇作为提取溶剂时,提取溶液所含杂质较1%磷酸-乙腈、1%磷酸-甲醇多,提取溶液的颜色较深,在1%磷酸-70%乙腈提取液中加入一定量的氯化钠进行盐析,可除去提取液中的蛋白质、糖等部分水溶性杂质,得到的色谱图基线噪音较小,色谱峰的分离度好、响应值高。进一步比较超声提取和加热回流提取2种提取方法,以及不同提取时间(30,40,60 min)的提取效果,结果加热回流提取优于超声提取,而提取时间对提取效果无显著影响。故确定了2.2项下供试品溶液制备方法。

3.4 方法评价

本研究建立的妇康片HPLC指纹图谱共识别了

21个共有峰,归属于处方中益母草、当归、酒白芍、醋延胡索、川芎、炙甘草、熟地黄、炒白术8味中药材,基本表征妇康片产品的整体质量信息。6家生产企业的29批样品的指纹图谱相似度评价、CA及PCA结果表明,可能由于原药材质量或制备工艺等因素的影响,不同生产企业及同一生产企业不同批次妇康片的整体质量存在一定差异。所建立的方法可为妇康片的质量控制和标准的完善提供参考,且对提高产品的质量可控性具有重要意义。

参考文献

- [1] WS₃-B-2319-97,中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂(第十二册)[S].
- [2] 王健,范文成,叶晓红,等. HPLC测定妇康片中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(8):15-16.
- [3] 夏军龙,张鹏,李巧如,等. HPLC法测定妇康片中延胡索乙素的含量[J]. 现代中医药,2006,26(4):48-50.
- [4] 李中娥,王春颖. HPLC同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):143-145.
- [5] 魏桂林,李泽玲,吴璐,等. RP-HPLC波长切换法同时测定妇康片中3种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):58-61.
- [6] 孟淑智,杨君. 妇康片中人参白芍当归的薄层色谱鉴别[J]. 辽宁中医学院学报,2005,7(2):163.
- [7] 梁军,刘彩凤,刘冬涵,等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J]. 中草药,2020,51(2):356-363.
- [8] 柯海姑,盛敏慧. 平消片HPLC指纹图谱研究及化学模式识别分析[J]. 中国药师,2020,23(11):2174-2179.
- [9] 肖炯昌,张文芳,胡梅,等. 白术药材UPLC特征图谱方法构建及模式识别研究[J]. 亚太传统医药,2023,19(2):31-37.
- [10] 孙晨,谢浙裕,吴永江. 益母草HPLC指纹图谱及多成分含量测定方法研究[J]. 药学学报,2019,54(11):2059-2063.
- [11] 李强,程艳芹,崔晓博,等. 延胡索HPLC指纹图谱评价及含量测定研究[J]. 药学研究,2023,42(1):18-22.
- [12] 钟文峰,张兰兰,胡懿,等. 甘草饮片、水煎液、配方颗粒的UPLC指纹图谱相关性研究[J]. 中南药学,2022,20(9):2123-2128.
- [13] 李鹏飞,岳倩侠,孙叶芬,等. 基于指纹图谱与化学计量学的白芍酒炙前后差异性标志物研究[J]. 中草药,2023,54(8):2398-2407.
- [14] 张明惠,朱田田,晋玲,等. 基于HPLC多指标成分测定及指纹图谱多模式识别的不同产地不同品种当归质量差异分析[J]. 中草药,2022,53(19):6187-6199.
- [15] 刘洁,冯梦晗,杨晓芹,等. 川芎化学成分研究[J]. 中药材,2022,45(4):848-852.
- [16] 高红宁,潘雨柔,殷奕,等. 高效液相色谱法测定不同产地麸炒白术中苍术酮、白术内酯I、白术内酯II和白术内酯III的含量[J]. 中国当代医药,2021,28(3):4-7.

(收稿日期:2024-01-12;修回日期:2024-08-25)