

二值三谱法评价复方甘草片质量一致性并与AI合成3D谱评价对比研究

蔡鸣¹, 张江镭¹, 闫慧^{1*}, 兰丽丽^{1*}, 孙万阳^{1,2*}, 孙国祥^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 暨南大学 药学院, 广东 广州 510632)

摘要: 基于75批复方甘草片的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)色谱数据, 该研究提出并验证了一种3D指纹图谱构建方法: 将200~348 nm范围内的38个波长通过AI全谱积分融合, 同时结合二值三谱法计算宏定性相似度(S_m)与宏定量相似度(P_m), 以开展质量一致性评价。同时用标准曲线法和比率指纹法对9个药效物质进行了定量测定与差异比较。结果显示, 与单波长220 nm指纹图谱相比, 3D指纹图谱在保持宏观定性一致性的同时显著提高了 P_m 的区分能力, 主成分分析(PCA)与雷达图表明, 其对批次与厂家的判别更敏感。同时, 比率指纹法与标准曲线法在9个目标成分定量上高度一致($r>0.99$), 验证了定量策略的可靠性。3D指纹图谱融合38个波长检测信息, 能较为全面和灵敏地表征复方甘草片的化学组成与质量差异, 显著增强批次与厂家的判别能力。该方法与二值三谱法结合, 为中药质量一致性评价与标准化控制提供了基于大数据的植物药质量一致性监控方法, 为基于人工智能与大规模色谱数据的质量监测研究提供了实证支撑和可推广的技术路径。

关键词: 复方甘草片; 二值三谱法; 3D指纹图谱; 质量一致性评价; 多组分含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: O657.7; R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)06-0001-13

Evaluation of Quality Consistency in Compound Liquorice Tablets Using Binary Triple Fingerprint Method and Comparison with AI-synthesized 3D Fingerprint

CAI Ming¹, ZHANG Jiang-lei¹, YAN Hui^{1*}, LAN Li-li^{1*}, SUN Wan-yang^{1,2*}, SUN Guo-xiang^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Based on high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) chromatographic data from 75 batches of compound liquorice tablets, this study proposed and validated a 3D fingerprint constructed by AI-integrated fusion across 38 wavelengths in the 200–348 nm range. Combined with a binary triple fingerprint method to calculate S_m and P_m , this approach enabled quality consistency evaluation. Simultaneously, nine pharmacologically active substances were quantitatively determined using standard curve method and ratio fingerprint method, with comparative analysis conducted. Results demonstrated that compared to the single-wavelength fingerprint at 220 nm, the 3D fingerprint maintained macro-qualitative consistency while significantly enhancing the discrimination power for P_m . Principal component analysis (PCA) and radar charts indicated its superior sensitivity in distinguishing batches and manufacturers. Furthermore, the ratio fingerprint method and standard curve method showed high consistency ($r>0.99$) in quantifying the nine target components, validating the reliability of the quantitative strategy. The 3D fingerprint integrates detection information from 38 wavelengths, enabling a comprehensive and sensitive characterization of the chemical composition and quality variations in compound liquorice tablets. This significantly enhances the ability to distinguish between batches and manufacturers. Combined with the binary triple

收稿日期: 2026-01-24; 修回日期: 2026-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(81573586, 82274403, 81703696)

* 通讯作者: 闫慧, 博士, 研究方向: 中药纳米技术与中药质量控制研究, E-mail: yancy226@163.com

兰丽丽, 讲师, 研究方向: 中药指纹图谱研究, E-mail: lanlily_spu@163.com

孙万阳, 教授, 研究方向: 神经-免疫药理学、中药药理学, E-mail: wanyangsun@jun.edu.cn

孙国祥, 教授, 研究方向: 中药指纹学和中药一致性评价学研究, E-mail: gxswmwys@163.com

fingerprint method, this approach provides a big data-driven consistency monitoring method for herbal medicine quality in traditional Chinese medicine consistency evaluation and standardized control. It offers empirical support and a scalable technical pathway for quality monitoring research based on artificial intelligence and large-scale chromatographic data.

Key words: compound liquorice tablets; binary triple fingerprint method; 3D fingerprint; quality consistency evaluation; multicomponent content determination; HPLC

复方甘草片(Compound liquorice tablets)是一种广泛应用于呼吸系统疾病的中药复方制剂^[1],其配方源自美国药典布朗制剂(剔除酒石酸锑钾,1962年由青海制药厂申请进入中国药典),具有镇咳祛痰的药理作用^[2]。现代制剂主要为片剂,每一片由112.5 mg甘草浸膏粉、4 mg阿片粉(罂粟果提取物粉)、2 mg樟脑和八角茴香油,以及2 mg防腐剂苯甲酸钠,约10~100 mg辅料制成^[3]。该制剂的主要药效物质包括甘草酸、甘草苷、芹糖甘草苷和甘草素等三萜皂苷类和黄酮类成分,以及吗啡和主要镇咳成分磷酸可待因,通过多组分协同发挥显著的镇咳、祛痰、平喘及呼吸道黏膜保护作用^[4]。研究表明,复方甘草片能有效抑制咳嗽中枢,降低气道高反应性,并促进支气管腺体分泌以稀释痰液,便于咳出^[5-6]。临床数据显示,其对急慢性支气管炎、感冒等引起的咳嗽症状的缓解效率较高,并能改善咽部不适^[7]。在呼吸疾病治疗领域,复方甘草片常用作基础性镇咳祛痰药物,年产200亿片、年销售20亿元人民币(居镇咳药第二),尤其适用于痰少而咳嗽剧烈的患者,其疗效明确且成瘾风险在规范使用下可控^[8]。该制剂化学成分复杂,多组分协同发挥作用,其质量一致性直接影响临床疗效与用药安全。当前,复方甘草片的研究已从化学成分整体控制深入到生物效应关联评价。研究重点集中于:采用多维指纹图谱(如液相色谱、毛细管电泳、光谱融合等)进行质量一致性系统评价;积极探寻化学指纹与抗氧化等活性的关联;并逐步开展多成分药代动力学研究,以揭示其体内过程,推动质量控制标准从成分一致向效能一致的科学跨越^[9-17]。

近年来,人工智能(AI)与大数据技术在中药质量控制领域得到快速发展,并已在若干应用场景中展示出潜力。主要进展可概括为以下几类:一是化学计量学与机器学习方法,如主成分分析、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)、支持向量机和随机森林等被广泛用于指纹数据的降维、批次分类及关键特征筛选^[18-19];二是深度学习模型,如自编码器、卷积神经网络等在复杂光谱或色谱信号的特征提取、噪声抑制与谱图融合方面展现优势,能够自动学习高维数据中的判别性特征^[20-21];三是多源数据融合策略使得来自高效液相色谱(HPLC)、近红外光谱(NIR)、质谱或代谢组学的数据可在同一框架内联合分析,以增强信息覆盖与判别力^[22-23]。

二值三谱法作为一种新兴的中药质量数字化评价的代表方法,通过宏定性相似度与宏定量相似度两个核心指标,实现了综合质量评价,已显示出在复杂体系评价中的优势。本文以不同厂家的75批复方甘草片为研究对象,提出并评估一种基于多波长光谱信号融合的3D指纹图谱构建策略,并将其与传统220 nm单波长指纹图谱进行系统比较。通过数据融合方法整合200~348 nm范围内的色谱响应形成信息更全面的二维指纹图谱,结合二值三谱法及主成分分析等化学计量学工具,对不同厂家、批次样品的指纹信息覆盖度、批次判别力与厂家溯源能力进行评估。旨在验证多波长融合3D指纹图谱在增强信息表达与提升质量判别稳健性方面的优势,并评估二值三谱法在多维指纹数据上的适用性。通过方法学验证与实例应用,期望为复杂中药制剂的多变量质量控制提供一种在可定量核心成分基础上,结合全峰指纹与多波长融合数据实现整体化学信息表征的技术路径,并为将AI与大规模色谱数据用于中药质量评价提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪(Agilent公司,美国),配备二极管阵列检测器(DAD)、四元低压梯度泵、脱气装置和自动进样器。在线处理工作站为OpenLAB CDS ChemStation(Agilent公司,美国)。Sartorius-BS110S分析天平(赛多利斯天平有限公司,北京),JP-040超声波清洗机(洁盟清洗设备有限公司,广东)。

甲醇和乙腈均为色谱纯(Tedia有限公司, 美国), 磷酸(色谱纯, 成都市科龙化工试剂厂), 庚烷磺酸钠(山东省禹城市中美色谱产品厂), 娃哈哈纯净水(沈阳娃哈哈启力食品有限公司)。吗啡(MP, 99.1%)、磷酸可待因(CP, 97.3%)、苯甲酸钠(SB, 99.7%)购自中国食品药品检定研究院。芹糖甘草苷(LA, 98%)、甘草苷(LQ, 98%)、甘草素(LG, 98%)、异甘草素(ILG, 98%)和甘草酸(GA, 98%)购自成都埃法生物科技有限公司。芹糖异甘草苷(ILA, 98%)购自成都乐美天医药科技有限公司。75批复方甘草片由4个厂家提供(S1~S8: 厂家A; S9~S23: 厂家B; S24~S35: 厂家C; S36~S75: 厂家D)。

1.2 色谱条件

0.2%磷酸-水溶液(含5 mmol/L庚烷磺酸钠)为流动相A, 乙腈-甲醇(9:1)溶液为流动相B, 色谱柱为COSMOSIL 5C₁₈-MS-II柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。柱温为35 °C, 样品进样量为10 μL, 流速为1.0 mL/min。梯度洗脱: 0~10 min, 4%~21% B; 10~20 min, 21%~35% B; 20~32 min, 35%~53% B; 32~45 min, 53%~82% B; 45~50 min, 82%~85% B; 50~55 min, 85%~4% B。检测波长范围为190~400 nm。

1.3 溶液制备

精密称定20片复方甘草片, 研细后称取约4片量, 加入50 mL 80%甲醇溶液(含0.5%磷酸), 45 °C超声处理10 min。静置至室温后摇匀, 过0.45 μm滤膜, 取续滤液作为样品溶液待检测。

分别取吗啡、芹糖甘草苷、甘草苷、磷酸可待因、苯甲酸钠、芹糖异甘草苷、甘草素、异甘草素和甘草酸对照品适量, 精密称定, 加80%甲醇溶液(含0.5%磷酸)制成一系列浓度的混合对照品溶液。

2 理 论

2.1 二值三谱法

二值三谱法以2个核心指标(宏定性相似度: S_m ; 宏定量相似度: P_m)联合三类指纹谱(标准指纹图谱、样品指纹图谱、比率指纹图谱)来刻画中药整体质量特征。 S_m (见式1)用于评估指纹峰总数及其含量分布比例的特征匹配程度, 反映宏观定性的一致性, 解决是与不是的鉴别问题。 P_m (见式2)则对多个指纹成分进行整体综合定量分析, 以解决药效物质总量控制的评价问题。根据 S_m 与 P_m 的结果, 可将中药划分为8个质量等级(见表1)。三谱体系中, 标准指纹图谱(式3)作为中药质量评价的基准, 完整表征了在理想状态(对应于标准制剂模式)下各关键药效成分的含量比例分布特征。样品指纹图谱(式4)记录了待测样品中各特征药效成分的指纹含量信息。比率指纹图谱(式5)通过计算样品中每个指纹峰面积(x_i)与其在标准图谱中对应峰面积(y_i)的比值($r_i=x_i/y_i$, 式6), 并以保留时间为横轴作图生成。比值 r_i 实质上代表了第*i*个组分的百分含量, 因此比率指纹图谱即是中药百分含量指纹谱。二值三谱法的核心在于建立一个具有计量学智能匹配和零误差的标准指纹图谱体系: 通过样品指纹与标准指纹的全息自适应智能匹配比对, 既能实现中药质量的整体量化评价, 又能对任一指纹成分进行单独的定量测定。数据评价采用沈阳药科大学孙国祥教授开发的中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统6.0。

$$S_m = \frac{1}{2}(S_F + S'_F) = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}} + \frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{y_i}}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n (\frac{x_i}{y_i})^2}} \right) \quad (1)$$

$$P_m = \frac{1}{2}(C + P) \frac{m_{RFP}}{m_i} = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n y_i^2} + \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{\sum_{i=1}^n y_i} S_F \right) \frac{m_{RFP}}{m_i} \times 100\% \quad (2)$$

$$\vec{Y} = (y_1, y_2, y_3, \dots, y_n) \quad (3)$$

$$\vec{X} = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (4)$$

$$\vec{R} = \left(\frac{x_1}{y_1}, \frac{x_2}{y_2}, \frac{x_3}{y_3}, \dots, \frac{x_n}{y_n} \right) \quad (5)$$

$$r_i = \frac{x_i}{y_i} (x_i < y_i); r_i = 2 - \frac{y_i}{x_i} (x_i > y_i) \quad (6)$$

式中, S_F 为定性相似度, S'_F 为比率定性相似度, x_i 和 y_i 为各指纹峰面积, C 为投影含量相似度, P 为定

量相似度, m_i 为样品 i 质量, m_{RFP} 为标准指纹对应的质量, \vec{Y} 为标准指纹向量, \vec{X} 为样品指纹向量, \vec{R} 为比率指纹向量, r_i 为第 i 个组分的百分含量(以比值表示)。

表 1 S_m 、 P_m 划分中药质量等级标准

Table 1 Classification criteria of TCM quality grades by S_m and P_m

Grade	$S_m \geq$	$P_m / \%$	Quality
G1	0.95	95~105	最好
G2	0.90	90~110	很好
G3	0.85	85~115	好
G4	0.80	80~120	良好
G5	0.70	70~130	一般
G6	0.60	60~140	中等
G7	0.50	50~150	次品
G8	<0.50	0~∞	劣质

2.2 3D 指纹图谱

单一检测波长在信息覆盖上存在固有局限, 不同化学类别在紫外区的响应峰值各异, 单波长难以同时捕获全部有意义信号。为此, 本研究提出 3D 指纹图谱, 在一定波长范围内获取多组色谱响应, 通过规范化的数据与融合方法实现对复杂中药制剂质量信息的挖掘与利用, 突破传统单波长指纹图谱在化学信息覆盖面上的局限性。具体而言, 需要对色谱原始数据进行基线校正、峰对齐与归一化; 其次以原始横向采样点(*.csv 曲线)为基础进行融合, 即全谱积分相加, 构成一个以指纹峰 \times 波长为维度的高维表征矩阵。在完成基线校正和保留时间校准等预处理后, 采用数据级谱融合策略, 通过对同一保留时间点在多个检测波长处的吸光度值进行逐点求和来构建样品的聚合色谱曲线。该聚合谱方法基于光谱信息互补性, 能够在不改变峰形特征的前提下将不同最大吸收波长的组分响应叠加, 从而提高总体信噪比并扩大化学信息覆盖面。形成了基于大数据的中药质量的一致性监测方法, 再通过二值(S_m 、 P_m)对其进行质量评价, 最终实现从高维色谱数据采集到数据预处理-融合-模型构建-评价的工作流程。每个样品在单一波长关注的信息点很低, 但该方法体现了基于多波长 3D 全数据点合成相加的全信息协同的整体质量监控与评价的控制策略。

3 结果与讨论

3.1 方法学验证

3.1.1 仪器精密度实验 将样品溶液(S1)按照“1.2”色谱条件连续进样 6 次并记录色谱图。以甘草酸的峰面积和保留时间为参照, 确定 30 个共有指纹峰。各共有指纹峰的相对峰面积(RPA)和相对保留时间(RRT)的相对标准偏差(RSD)分别小于 3.0% 和 1.0%, 表明仪器精密度良好。

3.1.2 方法重复性实验 根据“1.3”方法平行制备 6 份样品溶液(S1), 按照“1.2”色谱条件进样并记录色谱图。以甘草酸的峰面积和保留时间为参照, 确定 30 个共有指纹峰。各共有指纹峰 RPA 和 RRT 的 RSD 分别小于 3.0% 和 1.0%, 表明方法重复性良好。

3.1.3 溶液稳定性实验 将“1.3”方法制备的样品溶液(S1)室温放置, 24 h 内在不同时间点按照“1.2”色谱条件分别进样 6 次, 并记录色谱图。不同进样时间下各共有指纹峰 RPA 和 RRT 的 RSD 分别小于 4.0% 和 1.0%, 表明室温条件下复方甘草片样品溶液在 24 h 内稳定。

3.1.4 准确性实验 为评价方法的准确性, 采用 100% 水平标准加入法进行回收率实验。在已知含量的样品中加入等量对照品, 平行制备 6 份, 按“1.2”色谱条件测定, 并以回收率(测得增加量/理论加入量 $\times 100\%$)表示结果。9 个化合物的平均回收率为 94.9%~103%(如表 2), 表明该方法准确可靠, 符合定量分析方法学要求。

3.1.5 标准曲线建立 以各标准物质的系列浓度为 x , 峰面积为 y , 在指纹图谱色谱条件下测定了 MP、LA、LQ、CP、SB、ILA、LG、ILG 和 GA 的线性方程、线性范围、检出限(LOD)与定量下限(LOQ)(如表 2)。上述 9 个化合物的线性关系良好($r > 0.998$), LOD 和 LOQ 分别为 0.14~13.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.43~40.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

表2 9种化合物的线性关系、检出限、定量下限和回收率

Table 2 Linear relations, limits of detection(LOD), limits of quantification(LOQ) and recoveries for the 9 compounds

Compound	Linear equation	<i>r</i>	Linear range/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recovery/%
MP	$y=31.79x+3.96$	0.999 5	3.94~78.8	0.30	0.90	101
LA	$y=24.07x+5.42$	0.999 7	10.64~212.8	1.04	3.16	103
LQ	$y=35.50x-0.80$	0.998 9	4.52~90.4	0.37	1.12	102
CP	$y=27.09x+2.54$	0.999 5	2.68~53.6	0.19	0.57	100
SB	$y=26.97x+42.8$	0.999 4	16.38~327.6	3.18	9.64	100
ILA	$y=11.76x-0.27$	0.999 8	4.92~98.4	0.62	1.88	103
LG	$y=52.84x+13.8$	1.000 0	2.64~26.4	0.14	0.43	94.9
ILG	$y=21.96x-0.40$	0.999 7	1.16~23.2	0.25	0.77	102
GA	$y=1.438x-5.76$	0.999 5	110.56~2 211.2	13.5	40.9	97.2

3.2 复方甘草片HPLC指纹图谱建立

3.2.1 峰指认和共有指纹峰标定 将样品溶液和对照品溶液按照相同的色谱条件进行检测。样品和对照品在220 nm的色谱图如图1A所示,可知10号峰为MP,13号峰为LA,14号峰为LQ,15号峰为CP,16号峰为SB,17号峰为ILA,21号峰为LG,25号峰为ILG,27号峰为GA,指认的9个化合物的结构如图1B所示。其余指纹峰在45 min内全部出峰。甘草酸在色谱图中保留时间适中,分离度较好,且是样品的主要物质,因此以其作为参照物峰,确定了30个共有指纹峰。

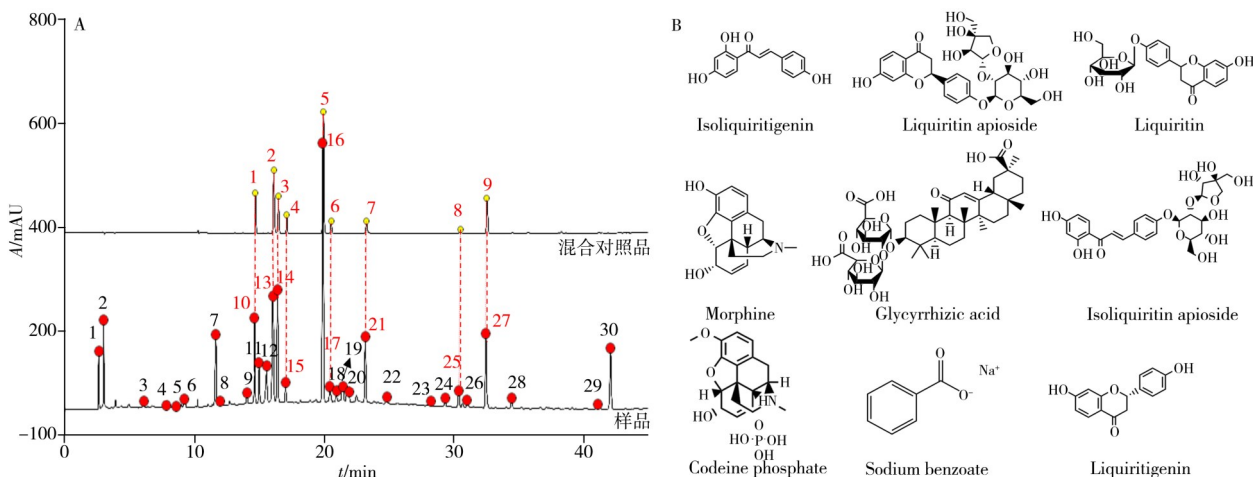


图1 样品和混合对照品的色谱图(A)以及9种化合物结构(B)

Fig. 1 Chromatograms of samples and mixed reference standards(A), and structures of 9 compounds(B)

A: 10. morphine, 13. liquiritin apioside, 14. liquiritin, 15. codeine phosphate, 16. sodium benzoate, 17. isoliquiritin apioside, 21. liquiritigenin, 25. isoliquiritigenin, 27. glycyrrhizic acid(A: 10. 吗啡, 13. 芹糖甘草苷, 14. 甘草苷, 15. 磷酸可待因, 16. 苯甲酸钠, 17. 芹糖异甘草苷, 21. 甘草素, 25. 异甘草素, 27. 甘草酸)

3.2.2 二值三谱法评价HPLC指纹图谱 75批样品在220 nm的指纹图谱如图2A~D所示,以平均值法建立对照指纹图谱(RFP,图2E),每批样品积分30个共有峰。采用二值法计算 S_m 与 P_m 。结果如表3所示, S_m 平均值为0.968,表明各批次的色谱指纹峰形与峰位高度一致,宏观定性特征稳定。 P_m 的平均值为99.5%,但RSD为7.7%,表明尽管指纹图谱形态一致,但样品间的含量存在较显著的定量差异。按二值法评价34批样品为质量1级,32批样品为2级,4批样品为3级,2批样品为4级,仅3批样品为5级(S1、S6、S7)。值得注意的是,传统的药典余弦相似度在75批样品中普遍较高,大多数样品超过0.95,这使得难以区分定量偏差。而二值法通过 S_m 与 P_m 的耦合能同时反映指纹一致性与含量偏离两类信息,从而在质量分级上具有更强的判别力。例如S1、S6、S7等批次的 S_m 和药典相似度均较高,但 P_m 仅约75%~79%,获得了较低的质量等级,提示生产批间的原料、制备生产工艺可能导致有效成分总量偏低。此外,4个不同厂家的样品在 S_m 上总体保持高度一致性,但在 P_m 一致性上存在显著差异。厂家A的样本呈较大批间波动,存在多批 P_m 明显低于RFP,提示可能为原料含量偏低。厂家B为中等波动,个别批次出现定量偏离。厂家C样本总体趋于稳定但存在少数略高或略低的偏移。厂家D则多数批次 P_m 接近或高于RFP,质量等级也以极好或很好为主,显示出更好的定量一致性与工艺稳定性。基于上述结果,二值三谱法既可作为指纹鉴别的定性补充,也可作为宏观定量一致性的快速筛查工具。

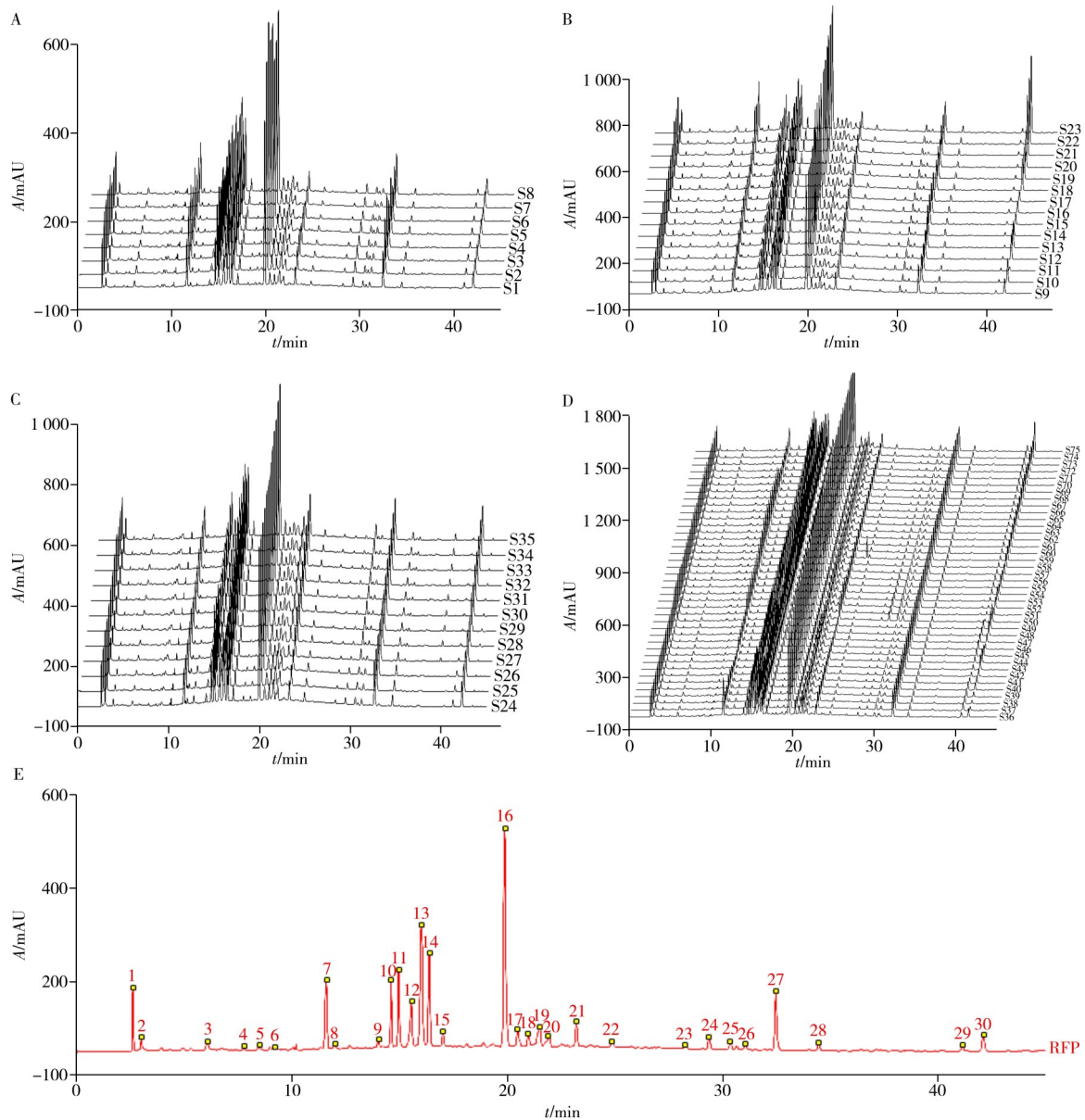


图 2 75 批复方甘草片在 220 nm 的 HPLC 指纹图谱(A~D)及其对照指纹图谱(E)

Fig. 2 The 220 nm HPLC fingerprints(A~D) of 75 batches of compound licorice tablets and the reference fingerprint(E)
A: S1~S8, manufacturer A; B: S9~S23, manufacturer B; C: S24~S35, manufacturer C; D: S36~S75, manufacturer D(A: S1~S8, 厂家
A; B: S9~S23, 厂家B; C: S24~S35, 厂家C; D: S36~S75, 厂家D)

表 3 75 批复方甘草片的评价结果

Table 3 Evaluation results of 75 batches of compound licorice tablets

Batch	Pharmacopoeial similarity	220 nm fingerprint				3D fingerprint			
		S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality	S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality
S1	0.996	0.973	76.2	5	中等	0.952	67.2	6	一般
S2	0.996	0.972	95.3	1	极好	0.977	95.5	1	极好
S3	0.996	0.972	103.6	1	极好	0.977	101.6	1	极好
S4	0.995	0.972	89.6	3	好	0.976	87.0	3	好
S5	0.995	0.971	95.4	1	极好	0.978	93.3	2	很好
S6	0.995	0.970	75.3	5	中等	0.973	74.2	5	中等
S7	0.996	0.974	78.9	5	中等	0.979	78.7	5	中等
S8	0.996	0.974	82.3	4	良好	0.977	80.8	4	良好
S9	0.991	0.952	91.2	2	很好	0.950	93.4	2	很好
S10	0.991	0.956	87.8	3	好	0.954	90.9	2	很好
S11	0.982	0.961	83.7	4	良好	0.943	82.4	4	良好
S12	0.987	0.967	89.6	3	好	0.961	93.2	2	很好
S13	0.987	0.968	92.9	2	很好	0.965	97.1	1	极好

(续表3)

Batch	Pharmacopoeial similarity	220 nm fingerprint				3D fingerprint			
		S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality	S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality
S14	0.986	0.964	92.9	2	很好	0.953	91.2	2	很好
S15	0.987	0.963	91.0	2	很好	0.952	89.2	3	好
S16	0.989	0.966	91.1	2	很好	0.954	89.7	3	好
S17	0.986	0.959	88.1	3	好	0.951	87.1	3	好
S18	0.984	0.962	92.2	2	很好	0.958	98.2	1	极好
S19	0.986	0.965	95.4	1	极好	0.961	102.0	1	极好
S20	0.981	0.962	92.4	2	很好	0.950	97.7	1	极好
S21	0.959	0.928	97.7	2	很好	0.918	104.2	2	很好
S22	0.953	0.925	97.9	2	很好	0.915	105.2	2	很好
S23	0.943	0.912	101.2	2	很好	0.895	109.8	3	好
S24	0.980	0.969	108.9	2	很好	0.962	115.8	4	良好
S25	0.982	0.971	107.7	2	很好	0.965	113.7	3	好
S26	0.984	0.972	106.5	2	很好	0.968	112.4	3	好
S27	0.992	0.969	102.6	1	极好	0.978	108.4	2	很好
S28	0.989	0.968	102.9	1	极好	0.971	109.0	2	很好
S29	0.982	0.958	98.8	1	极好	0.959	105.2	2	很好
S30	0.984	0.960	99.3	1	极好	0.961	104.4	1	极好
S31	0.982	0.958	98.4	1	极好	0.956	103.5	1	极好
S32	0.983	0.959	102.8	1	极好	0.960	108.0	2	很好
S33	0.978	0.953	97.2	1	极好	0.958	102.4	1	极好
S34	0.979	0.952	98.3	1	极好	0.952	106.8	2	很好
S35	0.979	0.953	97.4	1	极好	0.951	102.6	1	极好
S36	0.985	0.969	108.8	2	很好	0.856	89.7	3	好
S37	0.984	0.961	103.8	1	极好	0.958	103.8	1	极好
S38	0.984	0.960	101.1	1	极好	0.960	100.9	1	极好
S39	0.985	0.960	105.2	2	很好	0.957	99.3	1	极好
S40	0.987	0.970	105.3	2	很好	0.965	100.5	1	极好
S41	0.991	0.978	101.3	2	很好	0.966	97.4	2	很好
S42	0.989	0.976	99.8	2	很好	0.970	96.5	2	很好
S43	0.992	0.979	100.0	2	很好	0.976	97.2	2	很好
S44	0.992	0.978	101.0	1	极好	0.976	99.4	2	很好
S45	0.993	0.975	101.2	1	极好	0.968	97.9	1	极好
S46	0.985	0.963	105.6	2	很好	0.948	100.1	2	很好
S47	0.985	0.963	108.3	2	很好	0.947	103.8	2	很好
S48	0.988	0.966	106.7	2	很好	0.952	105.0	2	很好
S49	0.989	0.966	107.6	2	很好	0.952	105.9	2	很好
S50	0.993	0.964	99.9	1	极好	0.951	97.6	1	极好
S51	0.991	0.964	99.4	1	极好	0.956	92.5	2	很好
S52	0.986	0.950	96.9	2	很好	0.925	93.0	2	很好
S53	0.996	0.972	100.9	1	极好	0.953	97.5	1	极好
S54	0.996	0.980	103.9	1	极好	0.972	98.9	1	极好
S55	0.997	0.981	105.9	2	很好	0.980	101.3	1	极好
S56	0.996	0.980	106.1	2	很好	0.979	100.8	1	极好
S57	0.995	0.983	104.4	1	极好	0.986	100.0	1	极好
S58	0.997	0.985	104.9	1	极好	0.988	101.6	1	极好
S59	0.997	0.986	103.7	1	极好	0.987	101.5	1	极好
S60	0.993	0.982	107.0	2	很好	0.979	104.3	1	极好
S61	0.993	0.982	107.5	2	很好	0.984	104.4	1	极好
S62	0.993	0.981	105.7	2	很好	0.983	103.2	1	极好
S63	0.994	0.980	102.3	1	极好	0.982	99.4	1	极好
S64	0.994	0.980	104.6	1	极好	0.982	101.9	1	极好
S65	0.996	0.982	105.4	2	很好	0.982	102.9	1	极好
S66	0.996	0.984	103.4	1	极好	0.984	100.7	1	极好
S67	0.996	0.983	103.5	1	极好	0.986	100.9	1	极好
S68	0.996	0.983	103.3	1	极好	0.984	101.3	1	极好
S69	0.996	0.982	103.3	1	极好	0.971	101.1	1	极好
S70	0.990	0.973	104.9	1	极好	0.967	103.7	1	极好
S71	0.990	0.973	103.7	1	极好	0.963	104.0	1	极好
S72	0.990	0.973	105.6	2	很好	0.965	99.9	1	极好

(续表 3)

Batch	Pharmacopoeial similarity	220 nm fingerprint				3D fingerprint			
		S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality	S_m	$P_m/\%$	Grade	Quality
S73	0.989	0.971	106.3	2	很好	0.960	104.1	1	极好
S74	0.987	0.970	103.5	1	极好	0.961	101.7	1	极好
S75	0.990	0.973	105.0	1	极好	0.965	105.7	2	很好
Mean	0.988	0.968	99.5			0.962	99.0		
RSD/%	0.94	1.36	7.7			2.19	8.52		
RFP	1.000	1.000	100.0			1.000	100.0		

3.2.3 基于比率指纹图谱的批次间分析 基于“2.1”方法构建了比率指纹图谱。如图 3A 所示,以 RFP 为标准得到了样品的 30 个峰的面积比值。图 3B 为 75 批样品 30 个峰的面积比值百分图,可以直观评估不同批次样品化学组成的整体一致性及波动情况。图中数据显示,大多数批次在 30 个共有指纹峰上的比值集中于 100% 附近,表明多数样品与标准图谱在相应成分的相对含量上具有较高吻合度,整体质量一致性较好。然而,部分指纹峰在不同批次间仍呈现一定程度的离散分布,提示某些成分的含量存在可观察的批次间变异。该比率图谱形象地反映出样品群体在多个化学成分上的协调性与稳定性,进一步验证了采用比率指纹谱进行整体定量比较的可行性与灵敏性。通过比率指纹图谱分析,可捕捉到化学成分含量分布的细微差异,为批次间质量均一性评价提供了更为精细的数字化依据。

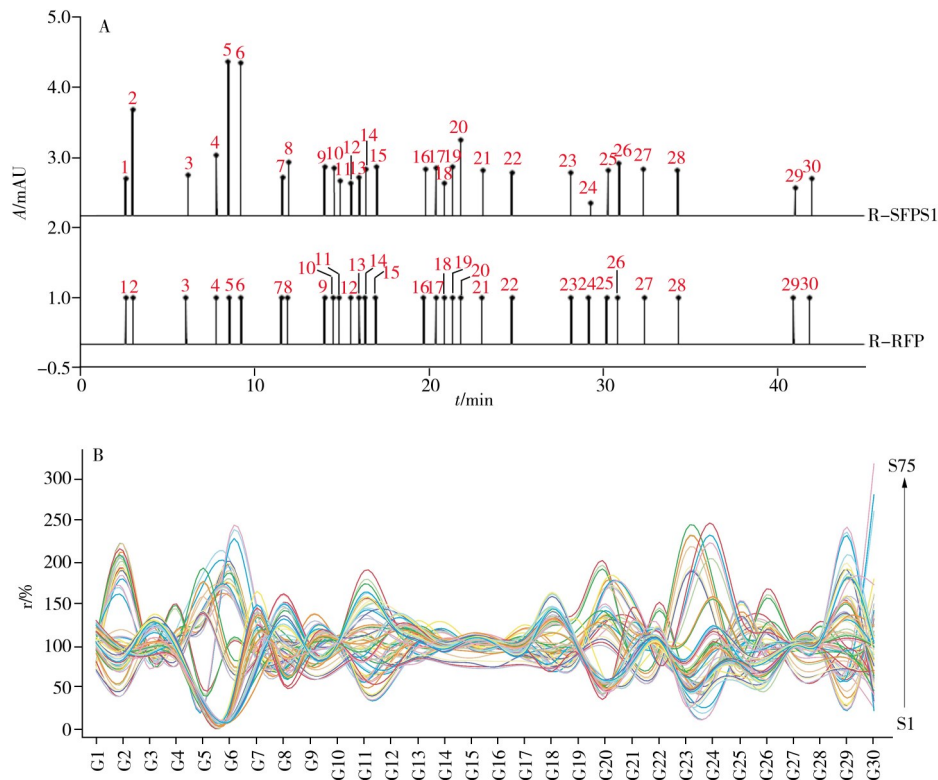


图 3 标准比率指纹谱(R-RFP)和样品比率指纹谱(R-SFP)表征的 r 含量谱对比图(A), 75 批复方甘草片与标准指纹图谱峰面积比值计算的 30 个指纹峰百分比图(B)

Fig. 3 Comparison of r -content fingerprint characterized by reference ratio fingerprint(R-RFP) and sample ratio fingerprint(R-SFP)(A), and percentage plots of 30 fingerprint peaks calculated from peak area ratios against the reference fingerprint for 75 batches of compound licorice tablets(B)

3.3 含量测定

3.3.1 标准曲线法测定 使用标准曲线法计算复方甘草片样品中 9 种化合物的含量。上述 9 种化合物一方面涵盖了本方的主要药效与安全相关成分,包括生物碱类的吗啡与磷酸可待因、甘草的三萜皂苷与黄酮类代表以及常用的防腐剂苯甲酸钠,能在药理学和安全监控上提供直接参考数据。另一方面,这些组分在 30 个共有峰中表现为共有,色谱响应良好,且可获得参比标准品,便于实施准确重复的定量测定。结果显示(表 4),各批次样品中目标化合物的含量存在波动,其中甘草酸含量普遍较高,范围为 8.82~14.46 mg/片。从整体含量分布来看,定量的总活性成分含量为 12.92~20.50 mg/片,反映出

不同批次间化学组成具有不均一性。不同厂家产品之间活性成分总量及组成均存在一定差异。厂家A样品的含量整体处于较低水平。厂家B的总含量明显提高,为17.12~19.35 mg/片,且批次间波动较小,表明其生产工艺与原料来源相对稳定。厂家C的总含量为19.29~20.50 mg/片,其中甘草酸与部分黄酮类成分的含量普遍较高。厂家D的样品数量最多,整体一致性较好。这些差异提示,不同生产厂家可能由于原料药材产地、采收加工、制剂工艺或质量控制标准的不同,导致最终样品的化学组成有所区别。对复方甘草片多组分含量的测定也为基于化学成分的中药一致性评价提供了有益的数据支撑。

表4 75批样品中9种化合物的含量测定结果(mg/片)

Table 4 Content determination results for 9 compounds in 75 batches of samples (mg/tablet)

Batch	Standard curve method										Ratio fingerprint method									
	MP	LA	LQ	CP	SB	ILA	LG	ILG	GA	Total	MP	LA	LQ	CP	SB	ILA	LG	ILG	GA	Total
S1	0.28	1.14	0.45	0.13	1.46	0.45	0.14	0.12	9.02	13.19	0.29	1.14	0.45	0.13	1.46	0.45	0.14	0.12	8.81	12.99
S2	0.37	1.42	0.55	0.17	1.81	0.57	0.17	0.15	11.74	16.94	0.37	1.42	0.55	0.17	1.81	0.57	0.17	0.15	11.49	16.70
S3	0.38	1.52	0.59	0.17	2.00	0.62	0.18	0.15	13.20	18.82	0.39	1.53	0.59	0.17	2.01	0.62	0.18	0.16	12.96	18.60
S4	0.34	1.32	0.52	0.15	1.78	0.53	0.16	0.14	10.49	15.41	0.34	1.32	0.52	0.15	1.78	0.53	0.16	0.14	10.26	15.19
S5	0.36	1.42	0.55	0.16	1.79	0.57	0.17	0.14	11.92	17.08	0.36	1.42	0.55	0.16	1.79	0.57	0.17	0.14	11.67	16.84
S6	0.28	1.13	0.44	0.13	1.42	0.45	0.14	0.11	8.82	12.92	0.28	1.13	0.44	0.13	1.43	0.45	0.14	0.11	8.62	12.72
S7	0.30	1.18	0.46	0.14	1.46	0.51	0.15	0.12	9.61	13.93	0.30	1.17	0.46	0.14	1.46	0.51	0.15	0.12	9.38	13.70
S8	0.31	1.21	0.47	0.14	1.59	0.48	0.16	0.13	9.58	14.06	0.31	1.20	0.47	0.14	1.59	0.48	0.16	0.13	9.36	13.84
S9	0.40	1.20	0.58	0.18	1.97	0.59	0.20	0.18	13.25	18.57	0.40	1.20	0.58	0.18	1.97	0.59	0.20	0.18	12.98	18.29
S10	0.38	1.18	0.56	0.17	1.90	0.55	0.21	0.19	12.31	17.45	0.38	1.19	0.56	0.17	1.90	0.55	0.21	0.19	12.10	17.26
S11	0.37	1.08	0.55	0.17	1.88	0.50	0.27	0.24	12.07	17.12	0.37	1.08	0.55	0.17	1.88	0.49	0.26	0.24	11.80	16.85
S12	0.39	1.14	0.58	0.18	1.87	0.52	0.28	0.26	12.83	18.05	0.40	1.15	0.59	0.18	1.89	0.52	0.28	0.26	12.67	17.93
S13	0.40	1.15	0.60	0.18	2.00	0.54	0.27	0.24	13.31	18.68	0.40	1.15	0.61	0.18	2.00	0.54	0.27	0.24	13.08	18.47
S14	0.40	1.11	0.61	0.18	2.11	0.50	0.23	0.21	13.65	19.01	0.40	1.11	0.61	0.18	2.11	0.50	0.23	0.21	13.37	18.72
S15	0.40	1.11	0.60	0.18	2.04	0.50	0.23	0.21	13.53	18.79	0.40	1.11	0.60	0.18	2.03	0.50	0.23	0.21	13.24	18.49
S16	0.40	1.16	0.59	0.18	1.97	0.51	0.25	0.22	13.45	18.74	0.41	1.16	0.59	0.18	1.98	0.51	0.25	0.22	13.18	18.47
S17	0.40	1.11	0.56	0.18	1.99	0.49	0.24	0.21	12.98	18.15	0.40	1.11	0.56	0.18	1.99	0.49	0.23	0.21	12.69	17.85
S18	0.41	1.13	0.57	0.18	2.01	0.54	0.25	0.23	13.17	18.48	0.41	1.14	0.57	0.18	2.01	0.54	0.25	0.23	12.92	18.24
S19	0.42	1.20	0.61	0.18	1.96	0.56	0.25	0.23	13.81	19.23	0.42	1.20	0.61	0.19	1.97	0.56	0.25	0.23	13.57	18.99
S20	0.38	1.15	0.56	0.17	2.00	0.56	0.21	0.19	12.55	17.77	0.38	1.15	0.56	0.17	2.00	0.56	0.21	0.19	12.30	17.53
S21	0.38	1.22	0.56	0.19	2.00	0.56	0.20	0.19	13.59	18.89	0.38	1.22	0.56	0.19	1.99	0.56	0.20	0.19	13.28	18.57
S22	0.41	1.22	0.56	0.19	1.99	0.54	0.22	0.20	13.57	18.89	0.41	1.22	0.56	0.19	1.99	0.53	0.22	0.20	13.28	18.60
S23	0.42	1.25	0.57	0.19	2.12	0.57	0.21	0.19	13.84	19.35	0.42	1.25	0.57	0.19	2.12	0.57	0.21	0.19	13.55	19.06
S24	0.41	1.38	0.57	0.18	1.99	0.59	0.17	0.16	14.42	19.87	0.41	1.38	0.57	0.18	1.99	0.59	0.17	0.16	14.11	19.55
S25	0.41	1.35	0.56	0.18	1.96	0.58	0.18	0.16	14.09	19.46	0.41	1.34	0.56	0.18	1.95	0.57	0.18	0.16	13.77	19.12
S26	0.42	1.34	0.56	0.18	1.93	0.57	0.18	0.16	13.96	19.29	0.42	1.33	0.56	0.18	1.93	0.57	0.18	0.16	13.65	18.98
S27	0.42	1.53	0.66	0.17	1.95	0.70	0.25	0.23	13.90	19.82	0.42	1.53	0.66	0.17	1.95	0.70	0.25	0.23	13.59	19.50
S28	0.41	1.53	0.67	0.17	1.97	0.71	0.30	0.28	14.46	20.50	0.41	1.53	0.67	0.17	1.97	0.71	0.30	0.28	14.18	20.22
S29	0.41	1.43	0.67	0.17	1.92	0.64	0.29	0.27	13.75	19.55	0.41	1.43	0.67	0.17	1.92	0.64	0.29	0.27	13.47	19.26
S30	0.41	1.43	0.67	0.17	1.95	0.64	0.29	0.27	13.86	19.69	0.41	1.43	0.67	0.17	1.95	0.64	0.29	0.27	13.58	19.41
S31	0.42	1.44	0.68	0.17	1.96	0.64	0.30	0.27	13.92	19.80	0.42	1.44	0.68	0.17	1.95	0.64	0.30	0.27	13.63	19.50
S32	0.43	1.53	0.73	0.18	1.96	0.67	0.32	0.30	13.49	19.60	0.43	1.53	0.73	0.18	1.96	0.68	0.32	0.30	13.23	19.36
S33	0.42	1.35	0.66	0.17	1.91	0.60	0.33	0.30	13.81	19.54	0.41	1.35	0.66	0.17	1.91	0.60	0.33	0.30	13.52	19.26
S34	0.43	1.38	0.68	0.17	1.96	0.61	0.33	0.30	14.01	19.87	0.43	1.39	0.68	0.17	1.97	0.61	0.33	0.30	13.77	19.64
S35	0.41	1.34	0.65	0.17	1.98	0.60	0.34	0.31	13.76	19.56	0.42	1.35	0.66	0.17	1.98	0.60	0.34	0.31	13.51	19.32
S36	0.40	1.77	0.60	0.17	1.99	0.73	0.13	0.13	13.98	19.92	0.40	1.77	0.60	0.17	1.99	0.73	0.13	0.13	13.98	19.92
S37	0.41	1.63	0.54	0.20	1.98	0.58	0.21	0.19	13.45	19.19	0.41	1.63	0.54	0.20	1.98	0.58	0.21	0.19	13.44	19.18
S38	0.40	1.58	0.52	0.19	1.96	0.57	0.20	0.18	13.16	18.78	0.40	1.58	0.52	0.19	1.96	0.57	0.20	0.18	13.16	18.77
S39	0.40	1.53	0.56	0.19	1.97	0.57	0.17	0.16	13.29	18.84	0.40	1.53	0.56	0.19	1.97	0.57	0.17	0.16	13.28	18.82
S40	0.41	1.54	0.56	0.19	2.01	0.57	0.18	0.16	13.37	18.98	0.41	1.53	0.56	0.19	2.00	0.57	0.18	0.16	13.36	18.96
S41	0.40	1.61	0.58	0.18	2.00	0.63	0.17	0.17	13.54	19.29	0.41	1.65	0.60	0.18	2.05	0.65	0.18	0.17	13.89	19.78
S42	0.40	1.68	0.58	0.17	2.00	0.65	0.17	0.17	13.43	19.26	0.40	1.68	0.58	0.17	2.00	0.65	0.17	0.17	13.42	19.24
S43	0.39	1.62	0.57	0.17	1.98	0.62	0.17	0.16	13.30	18.98	0.39	1.61	0.57	0.17	1.97	0.62	0.17	0.16	13.27	18.94
S44	0.39	1.58	0.56	0.18	1.99	0.61	0.17	0.16	13.40	19.02	0.39	1.58	0.56	0.18	1.98	0.60	0.17	0.16	13.38	19.00
S45	0.40	1.40	0.56	0.19	1.99	0.55	0.16	0.16	13.07	18.49	0.40	1.40	0.56	0.19	1.99	0.55	0.16	0.16	13.05	18.46
S46	0.41	1.65	0.56	0.19	2.02	0.60	0.13	0.12	13.57	19.25	0.41	1.64	0.56	0.19	2.02	0.60	0.13	0.12	13.55	19.23
S47	0.42	1.68	0.59	0.19	2.03	0.62	0.13	0.12	13.68	19.45	0.42	1.68	0.59	0.19	2.02	0.62	0.13	0.12	13.67	19.44
S48	0.41	1.63	0.57	0.18	1.93	0.60	0.12	0.11	13.41	18.97	0.41	1.64	0.57	0.18	1.94	0.60	0.12	0.11	13.44	19.02
S49	0.41	1.62	0.57	0.19	2.00	0.60	0.12	0.11	13.44	19.06	0.41	1.62	0.57	0.18	1.99	0.60	0.13	0.11	13.42	19.03
S50	0.42	1.40	0.58	0.18	2.09	0.56	0.27	0.25	13.32	19.08	0.42	1.40	0.58	0.18	2.09	0.56	0.27	0.25	13.32	19.07

(续表 4)

Batch	Standard curve method										Ratio fingerprint method									
	MP	LA	LQ	CP	SB	ILA	LG	ILG	GA	Total	MP	LA	LQ	CP	SB	ILA	LG	ILG	GA	Total
S51	0.44	1.51	0.58	0.20	2.16	0.58	0.28	0.24	12.95	18.92	0.44	1.51	0.58	0.20	2.16	0.58	0.27	0.24	12.94	18.91
S52	0.44	1.43	0.58	0.19	2.10	0.57	0.31	0.27	13.28	19.16	0.44	1.43	0.57	0.19	2.09	0.57	0.31	0.27	13.26	19.13
S53	0.44	1.53	0.59	0.19	2.11	0.58	0.27	0.24	13.15	19.10	0.44	1.52	0.59	0.19	2.10	0.58	0.27	0.24	13.13	19.06
S54	0.43	1.62	0.60	0.19	2.06	0.59	0.22	0.20	13.05	18.97	0.43	1.62	0.60	0.19	2.06	0.59	0.22	0.20	13.06	18.97
S55	0.44	1.65	0.61	0.20	2.11	0.60	0.23	0.20	13.24	19.27	0.43	1.65	0.61	0.20	2.11	0.59	0.22	0.20	13.22	19.23
S56	0.44	1.67	0.61	0.20	2.10	0.60	0.22	0.20	13.24	19.29	0.44	1.67	0.62	0.20	2.10	0.60	0.22	0.20	13.28	19.33
S57	0.44	1.62	0.60	0.20	2.08	0.63	0.20	0.19	13.60	19.55	0.44	1.62	0.59	0.20	2.08	0.62	0.20	0.19	13.59	19.53
S58	0.44	1.61	0.59	0.19	2.09	0.63	0.21	0.19	13.62	19.57	0.44	1.61	0.59	0.19	2.08	0.63	0.21	0.19	13.59	19.53
S59	0.43	1.60	0.59	0.19	2.06	0.62	0.20	0.19	13.35	19.22	0.43	1.60	0.59	0.19	2.05	0.62	0.20	0.19	13.34	19.20
S60	0.44	1.70	0.58	0.19	2.07	0.66	0.19	0.17	13.50	19.50	0.44	1.69	0.58	0.19	2.07	0.66	0.19	0.17	13.48	19.47
S61	0.44	1.72	0.58	0.19	2.07	0.67	0.19	0.17	13.50	19.53	0.44	1.71	0.58	0.19	2.07	0.67	0.19	0.17	13.49	19.52
S62	0.42	1.65	0.56	0.18	2.02	0.64	0.19	0.17	13.03	18.85	0.42	1.65	0.56	0.18	2.01	0.64	0.19	0.17	13.03	18.85
S63	0.42	1.61	0.55	0.18	2.00	0.62	0.17	0.15	12.77	18.46	0.42	1.61	0.55	0.18	2.00	0.61	0.17	0.15	12.76	18.44
S64	0.43	1.65	0.56	0.18	2.02	0.63	0.18	0.15	13.09	18.89	0.43	1.65	0.56	0.18	2.02	0.63	0.18	0.15	13.08	18.88
S65	0.43	1.60	0.57	0.19	2.03	0.62	0.17	0.15	13.33	19.10	0.43	1.60	0.57	0.19	2.03	0.62	0.17	0.15	13.33	19.09
S66	0.42	1.57	0.55	0.18	2.03	0.60	0.17	0.15	13.01	18.68	0.42	1.57	0.55	0.18	2.02	0.60	0.17	0.15	12.99	18.65
S67	0.43	1.55	0.55	0.18	2.02	0.59	0.17	0.15	12.97	18.62	0.43	1.55	0.55	0.18	2.02	0.59	0.17	0.15	12.95	18.59
S68	0.43	1.56	0.56	0.18	2.01	0.60	0.17	0.15	13.15	18.80	0.43	1.56	0.56	0.18	2.01	0.60	0.17	0.15	13.13	18.78
S69	0.42	1.50	0.54	0.18	1.97	0.57	0.17	0.16	13.05	18.55	0.42	1.49	0.54	0.18	1.96	0.56	0.17	0.16	13.03	18.52
S70	0.41	1.46	0.53	0.19	1.95	0.54	0.18	0.16	13.12	18.54	0.41	1.46	0.53	0.19	1.95	0.54	0.18	0.16	13.12	18.54
S71	0.40	1.50	0.55	0.19	1.95	0.55	0.16	0.14	12.84	18.29	0.40	1.50	0.55	0.19	1.95	0.55	0.16	0.14	12.82	18.26
S72	0.41	1.52	0.56	0.19	2.00	0.56	0.16	0.15	13.04	18.57	0.41	1.52	0.56	0.19	2.00	0.56	0.16	0.15	13.05	18.59
S73	0.40	1.49	0.56	0.19	1.97	0.56	0.16	0.15	12.96	18.44	0.40	1.49	0.56	0.19	1.97	0.56	0.16	0.15	12.94	18.42
S74	0.41	1.44	0.55	0.19	1.94	0.54	0.17	0.16	12.93	18.31	0.41	1.44	0.55	0.19	1.94	0.54	0.17	0.15	12.91	18.29
S75	0.41	1.34	0.62	0.18	1.95	0.58	0.18	0.18	12.66	18.10	0.41	1.34	0.62	0.18	1.95	0.58	0.18	0.18	12.66	18.10
Mean	0.40	1.44	0.58	0.18	1.96	0.58	0.21	0.19	13.06	18.60	0.40	1.44	0.58	0.18	1.96	0.58	0.21	0.19	12.94	18.48
RSD/ %	8.19	13.25	8.51	8.11	6.92	9.46	26.66	27.06	8.31		8.16	13.23	8.57	8.04	6.86	9.50	26.29	27.15	8.53	

对 75 批复方甘草片样本中 9 个化合物的总含量与二值法中 P_m 进行线性回归分析。如图 4A 所示,二者之间存在显著的正相关关系(Pearson's $r=0.777$, $p<0.001$), 决定系数(R^2)=0.603 表明总含量的差异可以解释约 60.3% 的 P_m 值变异。该结果印证了 P_m 值不仅能够评价指纹图谱的整体相似性, 同时也对样品的整体物质基础总量具有敏感的反应。 P_m 值是一个宏观的综合定量指标, 它基于样品的整体色谱指纹信息, 评估样品与 RFP 的整体接近程度。分析显示, P_m 值较高的批次, 其对应的多个指标成分(如甘草酸、甘草素等)的含量往往处于相对稳定且适中的区间, 且各成分之间的比例关系更为协调。这表明 P_m 值不仅反映了总物质含量, 更意味着样品内部主要活性成分群的构成比例。例如, 在前期分析中总含量较高且波动较小的厂家 C 和部分厂家 D 的产品, P_m 值普遍较高, 且质量等级多集中于极好与很好。因此, P_m 值可以视为对多个单体成分含量测定结果的一种综合评价, 它将离散的含量数据转化为一个反映整体相似性的指标, 从宏观定量角度印证了样品的质量差异。

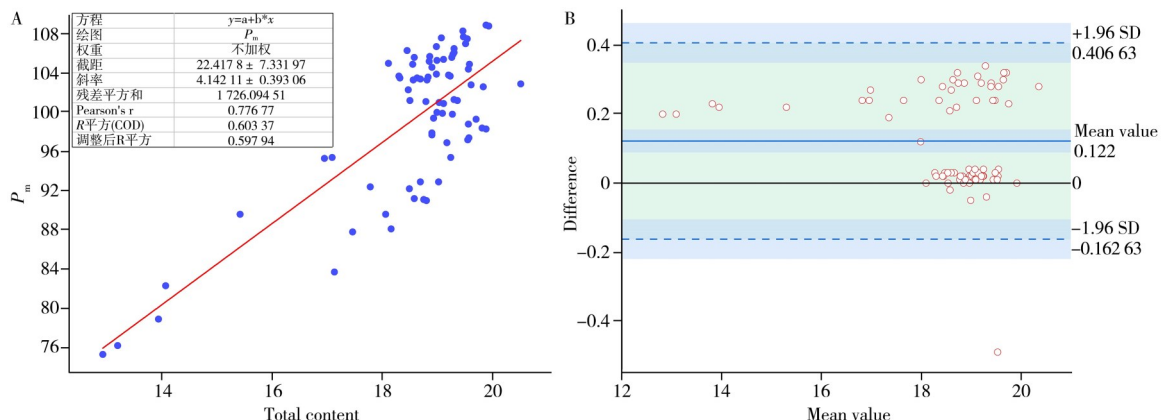


图 4 9 种化合物总含量与 P_m 的线性拟合(A), 标准曲线法与比率指纹图谱法计算的总含量结果的 Bland-Altman 分析(B)
Fig. 4 Linear fitting of the total content of 9 compounds with P_m (A), Bland-Altman analysis of the total content results calculated by standard curve method and ratio fingerprint method (B)

3.3.2 比率指纹图谱法测定 通过各样品色谱峰面积与对照指纹图谱(RFP)对应峰面积的比值($r_i=x_i/y_i$), 结合RFP中9种化合物的含量, 计算了75批样品中该9种化合物的含量(表4)。与采用标准曲线直接定量相比, 两种方法所得各化合物含量数据高度吻合。经统计分析, 各成分在75批样品中两种方法测定结果间的相关系数(r)均大于0.99, 表明二者具有极显著的正相关关系。基于对两种方法总含量测定结果的Bland-Altman分析(图4B), 标准曲线法与比率指纹图谱法在总体上具有良好的一致性。两种方法测定结果的平均偏差为+0.122, 表明比率指纹图谱法测得的含量值在整体上略低于标准曲线法。95%一致性界限为[-0.163, 0.407], 表明绝大多数样品中两种方法的差异落在此区间内, 且区间范围相对较窄, 证实了两种方法整体上具有可接受的定量可比性。值得注意的是, 图中数据显示差分在均值较大的区域内分布相对集中且接近平均偏差线, 而在均值含量较低(12~14 mg/片)的区域内, 差值系统性偏向正值。这提示在低含量样品中, 比率指纹图谱法的计算结果可能存在相对较大的波动。结合 P_m 评价, 发现总体含量偏低的样本同时伴随较低的 P_m 值, 且在Bland-Altman图上呈现更明显的正偏差, 这表明方法间的差异在一定程度上与样品总量水平相关。这一结果验证了比率指纹图谱作为一种相对定量方法的可靠性, 它本质上是以RFP为内标化的基准, 将峰面积比值转化为绝对含量, 其准确性的前提是RFP中各成分含量已知且测定准确。相较于独立的标准曲线法, 比率指纹图谱法无需使用系列标准品, 而是将定量过程整合到指纹图谱的整体相似性评价框架中, 实现了从图谱相似性到成分含量的快速推算。两种方法结果的一致性表明, 基于比率指纹图谱的定量策略不仅可用于宏观质量控制, 也能在已知RFP成分含量的基础上, 实现对多组分指标成分的定量。

3.4 3D指纹图谱评价结果

复方甘草片在190~400 nm的3D HPLC色谱光谱图如图5A所示, 根据样品波长的基线平直要求, 选择提取波长范围为200~348 nm。如图5B所示, 每批样品每隔4 nm提取1个波长下的*.csv文件, 得到38个波长指纹图谱信号的*.csv文件, 对每个样品的38个*.csv文件进行全部数据点对应相加, 则每个样品得到一张二维平面指纹图谱的*.csv文件(包含38个波长信息)。依次对75批复方甘草片的3D指纹融合图谱进行积分得到30个共有峰, 峰匹配后按照均值法生成RFP, 并采用二值法进行质量评价。评价结果见表3, 不同生产厂家的产品在 S_m 与 P_m 上呈现出一定的分布规律, 厂家A的 P_m 值普遍较低, 且部分批次(S1、S6、S7)的 P_m 低于80%, 对应较低质量等级(5~6级), 提示这些产品在主要化学成分总量控制上存在不足。厂家B与厂家C的 P_m 值多集中于90%~115%区间, 整体质量处于中等至良好水平。厂家D(S36~S75)的产品表现最为优异, S_m 值普遍高于0.95, P_m 值稳定在95%~105%之间, 绝大多数样品被评为1级, 显示在生产工艺一致性及全过程质量控制方面具有显著优势。本研究证实, 基于多波长融合的3D指纹图谱结合二值法, 显著提升了色谱信息的丰度与代表性, 不仅能实现从单波长平面分析到多波长立体评价的跃升, 更能灵敏、综合地鉴别不同生产来源产品的质量差异, 为复方甘草片及其他中药制剂的整体质量控制与标准化研究提供了方法学参考。

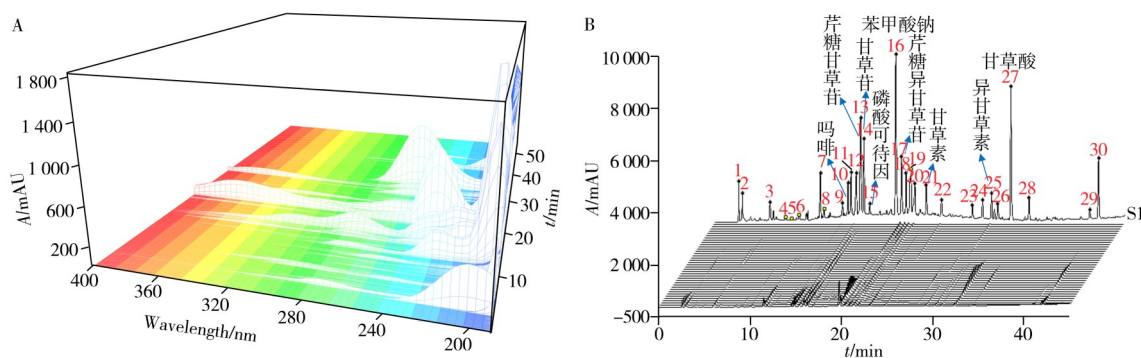


图5 复方甘草片的3D色谱光谱图(A), 每批样品38个波长积分融合得到3D指纹融合二维图谱的过程(B)

Fig. 5 The three-dimensional chromatographic and spectra-diagram of compound licorice tablet (A), and the process of fusing 38 wavelengths of each batch of samples to obtain a 3D fingerprint (B)

3.5 化学计量学分析

为探究220 nm单一波长与融合3D指纹图谱在表征复方甘草片化学组成及质量差异上的效能差异,

进一步对两种方法所得的评价结果(S_m 与 P_m)分别进行主成分分析(PCA),以75批样品的30个共有峰面积构建了一个包含75个观测值和2个变量(75×2)的二维矩阵,并绘制Biplot图进行对比。如图6A所示,在220 nm图谱的PCA模型中,PC1的方差贡献率高达61.0%,而PC2为39.0%,表明样品间的主要变异高度集中于PC1,这可能反映了在该特定波长下占主导的某类或某几类成分的含量差异。相比之下,3D指纹图谱的PCA模型呈现出更为均衡的信息分布结构,PC1贡献率为52.9%,PC2贡献率显著提升至47.1%。这说明通过融合200~348 nm范围内多个波长的化学信号,3D方法成功地提取并增强原本可能被掩盖的、独立于主要变异趋势的化学信息,体现在了PC2方向上。Biplot图中样品点分布显示,不同厂家群组间的分离度可能更为明显。综上,3D指纹图谱的PCA模型凭借其更均衡的主成分贡献率证实了多波长信息融合能更全面地捕捉体系的整体化学差异特征。

基于对75批复方甘草片样品二值三谱法评价结果的雷达图分析(图6B),发现220 nm单一波长与融合3D指纹图谱在 S_m 与 P_m 上呈现出一致性与差异性并存的整体差异特征。在 S_m 雷达图中,所有样品主要分布在0.88~0.96范围内,两种方法所得 S_m 的变化趋势高度同步,表明不同波长选择对指纹图谱的宏观定性一致性评价影响有限,宏观化学模式具有较强的稳定性。然而,部分批次(如S71~S75)在3D方法下 S_m 值略低于220 nm方法,提示多波长融合可能对部分微量成分或特定官能团的响应更为敏感,从而在定性层面引入了更细微的化学特征区分。在 P_m 雷达图中,两种方法的分布呈现更明显的离散性,且3D方法下多数样品的 P_m 更集中于100%,尤其在厂家C和厂家D的批次中,该趋势与PCA分析中观察到的厂家间差异相互印证。整体而言,雷达图直观揭示出3D指纹图谱通过整合多波长光谱信息,在保持定性评价稳定性的同时,进一步放大了不同批次在宏观总量控制上的差异,增强了方法对生产工艺及原料来源细微变化的辨识能力。

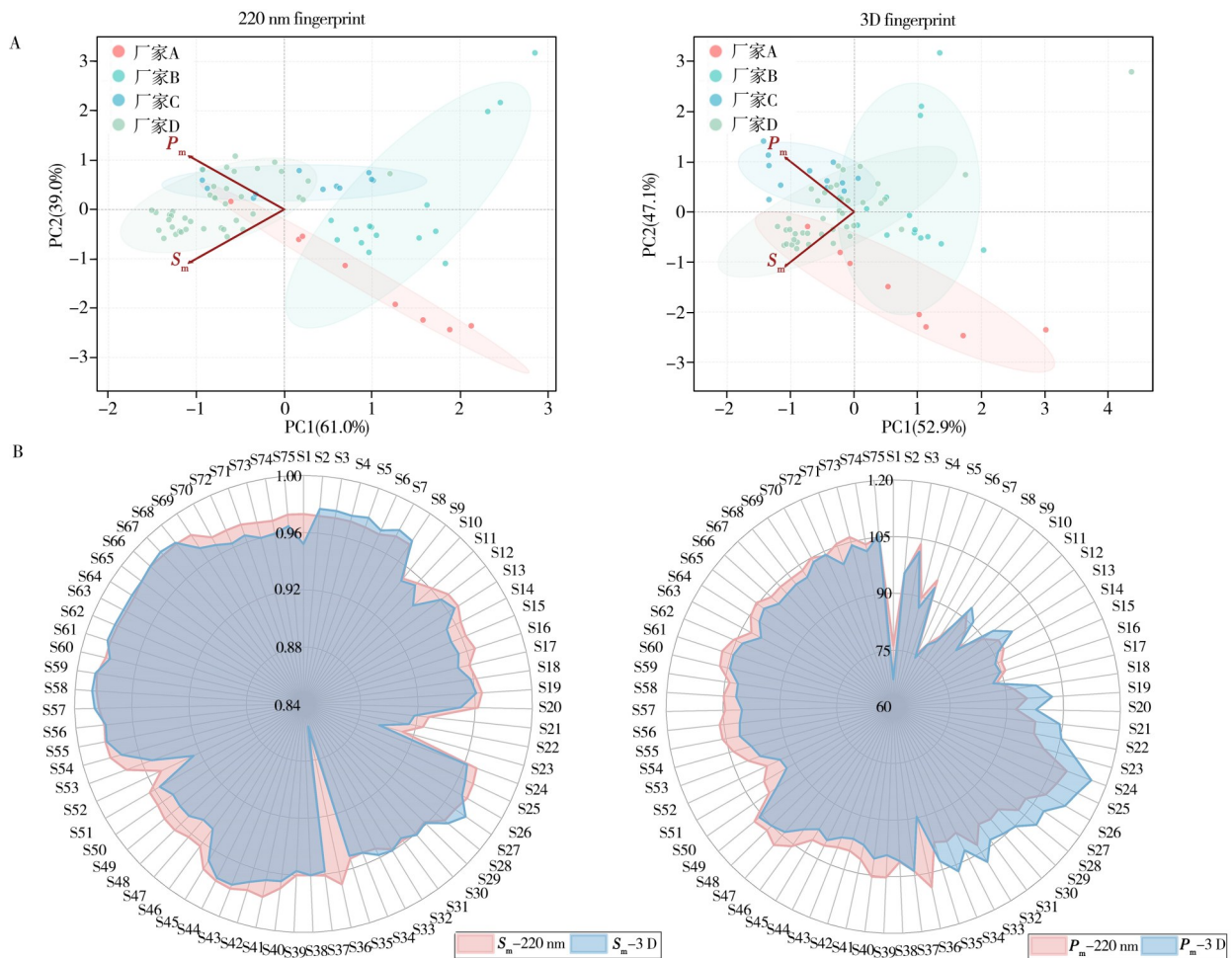


图6 220 nm单一波长指纹图谱和3D融合指纹图谱评价结果的PCA(A)以及两种评价结果的雷达图(B)
Fig. 6 PCA for the evaluation results of 220 nm single wavelength fingerprint and 3D fusion fingerprint(A), and radar images for the two evaluation results(B)

4 结 论

本研究将多波长(200~348 nm)色谱信息经融合构建的3D指纹图谱,与220 nm单波长指纹图谱以及二值三谱法结合用于75批复方甘草片的一致性评价。结果表明,多波长融合能在保持宏观定性一致性的同时显著增强 P_m 对批次与厂家的区分能力,且比率指纹法的定量结果与标准曲线法高度一致。但鉴于当前共有峰中仍有若干峰未完成结构确证,后续工作将结合高分辨质谱技术与文献或标准品比对,系统解析其余共有峰的化学归属,以进一步完善复方制剂的指纹特征。本研究将多波长色谱数据视为可训练的大数据资源,构建了从数据采集到评价的分析流程,为将人工智能与大规模色谱数据用于复杂中药制剂的质量控制提供了可行的技术路径。

参考文献:

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume II*. Beijing: China Medical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部. 北京: 中国医药科技出版社), **2025**; 1008.
- [2] Wang J P, He L. *The Historical Evolution and Clinical Application of Compound Liquorice Tablets*. Beijing: China Press of Chinese Medicine (王金鹏, 和龙. 复方甘草片的历史沿革与临床应用. 北京: 中国中医药出版社), **2021**; 4.
- [3] Zhao H P, Qi Y C, Qi L X, Yang L R, Chen Y, Xu Y W. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (赵海鹏, 齐衍超, 祁立新, 杨丽蓉, 陈燕, 徐玉文. 中国现代应用药学), **2022**, 39(13): 1743-1747.
- [4] Gong D D, Zheng Z J, Chen J Y, Pang Y, Sun G X. *New J. Chem.*, **2021**, 45(5): 2563-2572.
- [5] Yan H, Sun G X, Chi H X, Zhang J, Sun W Y, Hou Z F, Li X L, Pu D J, Chen Z H. *Chin. J. Chromatogr.* (闫慧, 孙国祥, 迟哈笑, 张晶, 孙万阳, 侯志飞, 李显林, 蒲道俊, 陈振鸿. 色谱), **2019**, 37(11): 1200-1208.
- [6] Bo S Q, Jing M, Zhu Y B, Li Z M, Wang J. *J. Pharm. Res.* (薄双琴, 景明, 朱英布, 李宗明, 王静. 药学研究), **2021**, 40(10): 638-640, 659.
- [7] Wang J P, Li X L, Wang L, Tian W X. *Clin. Med. J.* (王金鹏, 李显林, 王玲, 田卫星. 临床药物治疗杂志), **2018**, 16(5): 37-42, 46.
- [8] Tang M Q. *Chin. J. Conval. Med.* (汤明启. 中国疗养医学), **2015**, 24(7): 695-697.
- [9] Cai M, Zhang Q, Lan L L, Sun W Y, Zhang H, Sun G X. *Talanta*, **2023**, 264: 124774.
- [10] Gong D D, Chen J Y, Sun Y, Liu X T, Sun G X. *Microchem. J.*, **2021**, 160: 105671.
- [11] Hou Z F, Sun G X. *Phytochem. Anal.*, **2021**, 32(6): 1118-1130.
- [12] Gong D D, Chen J Y, Li X, Sun G X, Sun W Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 202: 114172.
- [13] Gong D D, Zhai M H Y, Yang F L, Sun G X, Zhang H. *Microchem. J.*, **2021**, 170: 106649.
- [14] Lan L L, Zhang Y J, Zhang M T, Sun G X. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 175: 112715.
- [15] Zhang Y J, Wang C, Yang F L, Yang Z, Wang F R, Sun G X. *RSC Adv.*, **2018**, 8(49): 27661-27673.
- [16] Zhang Y J, Yang F L, Zhang J, Sun G X, Wang C, Guo Y, Wen R, Sun W Y. *Phytomedicine*, **2019**, 59: 152790.
- [17] Zhou X L, Zeng Y L, Yin L H, Chen H. *Chin. J. Pharm. Anal.* (周晓力, 曾月林, 尹利辉, 陈华. 药物分析杂志), **2023**, 43(2): 280-288.
- [18] Huang L, Luo L, Li Z, Yi Z, Chen B L. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (黄岚, 罗镭, 李正, 依泽, 陈碧莲. 中国现代应用药学), **2025**, 42(9): 1501-1509.
- [19] Ma Z C, Zhao X R, Zhao R M, Qing H X, Yin Y, Lv M J, Zhu Y Y, Sun L L, Chen M L, Ren X L. *J. Food Compos. Anal.*, **2026**, 149: 108715.
- [20] Huang T Y, Yang H H, Li L Q. *Spectrosc. Spectral Anal.* (黄天宇, 杨辉华, 李灵巧. 光谱学与光谱分析), **2025**, 45(8): 2218-2227.
- [21] Yang Z H, Wu J, Li R D, Hao X W, Lü X F, Tian Y N, Zhang Z C, Wu L T, Li Z Y, Xia C Y, Zhang K, Xu M Y, Bi Y M, Xia Z L. *J. Instrum. Anal.* (杨泽会, 吴箭, 李瑞东, 郝贤伟, 吕小芳, 田雨农, 张志成, 吴灵通, 李正莹, 夏春艳, 张恺, 徐梦瑶, 毕一鸣, 夏自麟. 分析测试学报), **2025**, 44(3): 471-478.
- [22] Huang R, Ma S C, Dai S Y, Zheng J. *Sensors*, **2023**, 24(1): 106.
- [23] Gu Z R, Mao X W, Qi M, Guo Y, Ge B. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* (顾志荣, 毛小文, 祁梅, 郭燕, 葛斌. 中草药), **2023**, 54(18): 6159-6171.

(责任编辑: 丁 岩)