

# 肝肾颗粒的制备、质量标准及指纹图谱研究<sup>△</sup>

程杰\*, 张屏, 包保全, 梁雨娜, 唐雨晨, 刘德旺<sup>#</sup>(内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R944.2;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2913-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.08

**摘要** 目的:制备肝肾颗粒,并初步拟定其质量标准,建立其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:以送料速度、压辊速度、压辊压力、压辊间隙为考察因素,颗粒成型率为评价指标,采用单因素试验及正交试验优化肝肾颗粒干法制粒工艺。根据2015年版《中国药典》(四部)(以下简称“药典”)对其水分、粒度、溶化性进行测定;采用薄层色谱定性鉴别肝肾颗粒中的枸杞子、黄芪、党参;采用HPLC法定量测定肝肾颗粒中甜菜碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、党参炔苷的含量,并绘制10批肝肾颗粒的指纹图谱。结果:肝肾颗粒干法制粒的最优工艺为送料速度25 r/min、压辊转速8 r/min、压辊压力7 MPa、压辊间隙1.1 mm,所制颗粒成型率为85.53%。肝肾颗粒的水分、粒度、溶化性均符合药典标准;枸杞子、黄芪、党参供试品薄层色谱在对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点;甜菜碱的进样量线性范围为4.32~8.64 μg,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、党参炔苷的检测质量浓度线性范围分别为5~30、10~60 μg/mL,精密性、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD均<2.0%(n=5),平均回收率分别为97.02%、99.25%、101.04%(RSD均<1.7%,n=6或9),含量分别为4.298、0.054、0.025 mg/g;10批肝肾颗粒样品HPLC指纹图谱与对照指纹图谱相似度均>0.95。结论:优化后的肝肾颗粒制粒工艺稳定、可行,所建立的质量标准及HPLC指纹图谱可为肝肾颗粒的质量控制提供依据。

**关键词** 肝肾颗粒;干法制粒;制备;正交试验;含量测定;质量标准;指纹图谱

## Study on Preparation, Quality Standard and Fingerprint of Ganshen Granules

CHENG Jie, ZHANG Ping, BAO Baoquan, LIANG Yuna, TANG Yuchen, LIU Dewang (College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Ganshen granules, formulate its quality standards primarily and establish its HPLC fingerprint. METHODS: Using feeding speed, roller speed, roller pressure and roller clearance as factor, grain forming rate as index, single factor test and orthogonal test were used to optimize the granulation technology of Ganshen granules. According to 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV) (shorted for pharmacopoeia), moisture, granulation and dissolution were determined. TLC was used for the qualitative identification of *Lycium barbarum*, *Astragalus membranaceus*, *Codonopsis pilosula* in the Ganshen granules. HPLC method was used to determine the contents of betaine, calycosin-7-glucoside and lobetyolin in Ganshen granules. Fingerprints of 10 batches of Ganshen granules were drawn. RESULTS: The optimal dry granulation technology of Ganshen granules included that 25 r/min feeding speed, 8 r/min roller speed, 7 MPa roller pressure and 1.1 mm roller clearance, The grain forming rate is 85.83%. The moisture, granulation and solubility of Ganshen granule were all in line with pharmacopoeia standard. TLC of *L. barbarum*, *A. membranaceus* and *C. pilosula* showed the same color spots on the corresponding positions of the reference chromatogram. The linear range of sample mass of betaine is 4.32-8.64 μg, and the linear range of mass concentration of calycosin-7-glucoside and lobetyolin were 5-30 and 10-60 μg/mL, respectively. RSDs of precision, reproducibility and stability tests (24 h) were all lower than 2.0% (n=5). Average recoveries were 97.02%, 99.25% and 101.04% (all RSD<1.7%, n=6 or n=9). The contents of them were 4.298, 0.054, 0.025 mg/g, respectively. The similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of Ganshen granules to control fingerprint was higher than 0.95. CONCLUSIONS: The optimal granulation technology of Ganshen granule is stable and feasible, and established quality standard and HPLC fingerprint can provide reference for quality control of Ganshen granule.

**KEYWORDS** Ganshen granules; Dry granulation; Preparation; Orthogonal test; Content determination; Quality standard; Fingerprint

肝肾颗粒(国药准字Z20080369)由枸杞子、黄芪、党

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460651);中国留学基金(No.201808155053);内蒙古自治区人民政府蒙医药标准化项目基金(No.2019-(MB020))

\* 硕士研究生。研究方向:蒙药药效物质基础研究。E-mail: 809035954@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,博士。研究方向:中蒙药资源开发与利用。E-mail: 1627051605@qq.com

参、麦冬、阿胶五味药加水煎煮,煎液浓缩至清膏,加入辅料,制粒、干燥、整粒制成。方中枸杞子为君药,党参和阿胶为臣药,黄芪为佐药,麦冬为使药。本品具有益肝明目、滋阴补肾的疗效,用于肾阴不足、气血两亏、目眩昏暗、心烦失眠、肢倦乏力、腰腿酸软等。甜菜碱是枸杞子中主要有效成分,具有调节体内渗透压、促进脂肪代谢和蛋白质合成等作用<sup>[1-2]</sup>。党参炔苷是党参的主要

有效成分<sup>[3-4]</sup>。黄芪具有显著的免疫增强作用,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷作为黄芪提升免疫的主要活性成分<sup>[5-6]</sup>,是控制黄芪质量的重要指标。

受新药研发时期制药工艺技术和生产设备水平的限制,肝肾颗粒旧工艺是在清膏中加入辅料糊精直接湿法制粒,在烘箱中干燥后,整粒,制得颗粒,制粒过程中易黏结成块,颗粒成型率低,产品生产存在效率低、成本高和成品质量稳定性差等缺陷,为此,针对上述问题需提出工艺变更和质量标准提升的解决方法。

本研究在保持提取工艺和辅料不变的前提下,采用喷雾干燥技术得到原料粉末,并用干法制粒工艺直接制粒。以送料速度、压辊速度、压辊压力、压辊间隙为考察因素,颗粒成型率为评价指标,采用单因素试验及正交试验优化肝肾颗粒干法制粒工艺。原质量标准采用薄层色谱扫描法对枸杞子中甜菜碱进行了含量测定,薄层色谱法对黄芪进行了定性鉴别<sup>[7]</sup>,为保证工艺变更以后的产品质量稳定可靠,笔者对原质量标准进行了提升。根据2015年版《中国药典》(四部)(以下简称“药典”)对所制肝肾颗粒的水分、粒度、溶化性进行测定;采用薄层色谱定性鉴别肝肾颗粒中的枸杞子、黄芪、党参;采用HPLC法定量测定肝肾颗粒中甜菜碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、党参炔苷的含量,并绘制10批肝肾颗粒的指纹图谱,以为肝肾颗粒的质量控制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Nexera液相色谱仪,包括LC-20AD-XR四元梯度泵、SIL-20A自动进样器、CTO-10AS柱温箱、SPD-M20A紫外检测器、ELSD-LT II蒸发光检测器(ELSD)、RID-20A示差检测器(日本Shimadzu公司);AB135-S分析天平(德国Sartorius公司);GL-25干法制粒机(江苏张家港市开创机械制造有限公司);DHG-9123A电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);B-290喷雾干燥仪(瑞士Buchi公司)。

### 1.2 药品与试剂

甜菜碱对照品(批号:110894-201604,纯度:98%)、枸杞子对照药材(批号:121072-201611)、党参炔苷对照品(批号:111732-201607,纯度:98%)、黄芪甲苷对照品(批号:110781-201616,纯度:98%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201606,纯度:98%)均购自中国食品药品检定研究院;肝肾颗粒提取物浓缩液、肝肾颗粒旧工艺样品(批号:201801、201802)、肝肾颗粒缺枸杞子阴性样品、肝肾颗粒缺党参阴性样品、肝肾颗粒缺黄芪阴性样品均由内蒙古大唐药业公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 肝肾颗粒的制粒与质量评价方法

2.1.1 肝肾颗粒的制粒 取肝肾颗粒提取物浓缩液,减压浓缩至相对密度为1.10(60℃时测)的清膏,加入3%糊精,均匀搅拌后,喷雾干燥制成原料粉(进风温度:190~200℃,出风温度:70~80℃),调节好干法制粒机压辊压力、压辊转速、送料速度和压辊间隙参数后,将原料粉加入到干法制粒机中制粒,再用1号筛整粒,即得。

2.1.2 颗粒成型率的测定 取所制颗粒15g,称定质量,依次通过1号筛和5号筛。收集通过1号筛但不能通过5号筛的颗粒,称定质量,颗粒成型率(%)=通过1号筛但不能通过5号筛的颗粒的质量/颗粒总质量×100%。

### 2.2 肝肾颗粒制粒单因素考察

参考相关文献研究<sup>[8-14]</sup>,干法制粒工艺中压辊压力、压辊转速、送料速度和压辊间隙等工艺条件对颗粒成型率影响较大,因此针对上述影响条件进行单因素考察。

2.2.1 压辊压力 称取肝肾颗粒原料粉适量,固定压辊转速8 r/min、送料速度15 r/min和压辊间隙1.2 mm,分别考察压辊压力4、5、6、7、8和9 MPa对颗粒成型率的影响。结果,不同压辊压力所制颗粒的颗粒成型率分别为45.6%、55.8%、65.3%、75.1%、76.9%和78.3%,试验过程中发现,当压辊压力增加到8~9 MPa时,颗粒成型率增加速度趋于平缓,且在9 MPa时轧轮间的固体条出现不均的现象,导致制出的颗粒产生色差,综上,选择压辊压力8 MPa进一步优化。

2.2.2 压辊转速 称取肝肾颗粒原料粉适量,固定压辊间隙1.2 mm和送料速度15 r/min,设定压辊压力8 MPa,分别考察压辊转速3、5、8、12、14和16 r/min对颗粒成型率的影响。结果,不同压辊转速所制颗粒的颗粒成型率分别为55.3%、69.6%、72.3%、75.6%、68.3%和60.5%,因此,选择压辊转速12 r/min进一步优化。

2.2.3 送料速度 称取肝肾颗粒原料粉适量,固定压辊间隙12 mm,压辊压力8 MPa,压辊转速12 r/min,分别考察送料速度10、15、25、35、45和55 r/min对颗粒成型率的影响。结果,不同送料速度所制颗粒的颗粒成型率分别为63.9%、70.9%、78.8%、80.6%、73.9%、65.8%,因此,选择送料速度35 r/min进一步优化。

2.2.4 压辊间隙 称取肝肾颗粒原料粉适量,固定压辊压力8 MPa,压辊转速12 r/min,送料速度35 r/min,考察压辊间隙0.8、0.9、1.0、1.1、1.2和1.3 mm对颗粒成型率的影响。结果,不同压辊间隙所制颗粒的颗粒成型率分别为70.3%、75.3%、78.8%、80.6%、72.9%和59.3%。因此,选择压辊间隙1.1 mm进一步优化。

### 2.3 正交试验优化肝肾颗粒制粒工艺

2.3.1 正交试验 按“2.1.1”项下方法,制备肝肾颗粒原料粉90 kg,平均分成9份,进行干法制粒工艺正交试验。根据单因素考察结果,确定影响干法制粒颗粒质量的主要因素为以下4个因素:送料速度(A)、压辊转速

(B)、压辊压力(C)、压辊间隙(D)。每个因素设3个水平,采用正交设计表 $L_9(3^4)$ 进行试验,以颗粒成型率作为评价指标进行正交试验。因素与水平见表1,正交试验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, r/min	B, r/min	C, MPa	D, mm
1	15	5	7	0.9
2	25	8	8	1.0
3	35	12	9	1.1

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Design and results of orthogonal tests

编号	A	B	C	D	颗粒成型率, %
1	1	1	1	1	63.37
2	1	2	2	2	68.91
3	1	3	3	3	64.98
4	2	1	2	3	75.51
5	2	2	3	1	76.52
6	2	3	1	2	85.65
7	3	1	3	2	63.23
8	3	2	1	3	81.34
9	3	3	2	1	75.83
$K_1$	197.26	202.11	230.36	215.72	
$K_2$	237.68	226.77	220.25	217.79	
$K_3$	220.40	226.46	204.73	221.83	
R	40.42	24.66	25.63	6.11	

表3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F值	P
A	556.42	2	278.21	567.85	<0.01
B	270.09	2	135.05	275.64	<0.01
C	177.96	2	88.98	181.62	<0.01
D	14.24	2	7.12	14.53	<0.05
误差	4.40	9	0.49		

注:  $F_{0.05}(2, 18) = 99.44$ ;  $F_{0.01}(2, 18) = 19.44$

Note:  $F_{0.05}(2, 18) = 99.44$ ;  $F_{0.01}(2, 18) = 19.44$

2.3.2 结果分析 由表2可知,以颗粒成型率作为指标,其影响效果大小依次为  $A > C > B > D$ ,即送料速度 > 压辊压力 > 压辊转速 > 压辊间隙;由表3方差分析结果可知,因素A、B、C具有极显著性影响,因素D具有显著性影响。因此,最优制粒工艺条件为  $A_2B_2C_1D_3$ ,即送料速度 25 r/min,压辊转速为 8 r/min,压辊压力为 7 MPa,压辊间隙为 1.1 mm。

2.3.3 验证试验 按“2.1.1”项下方法,制备肝肾颗粒原料粉 300 kg,再按“2.4.2”项下最优制粒工艺制粒3批(批号为 201803、201804、201805),每批投原料粉 100 kg,测定颗粒成型率。结果,3批肝肾颗粒的平均颗粒成型率为 85.53%,RSD 为 1.24% ( $n=3$ ),表明该工艺稳定、可靠。

## 2.4 肝肾颗粒的检查

2.4.1 水分测定 称取所制肝肾颗粒3份(批号:

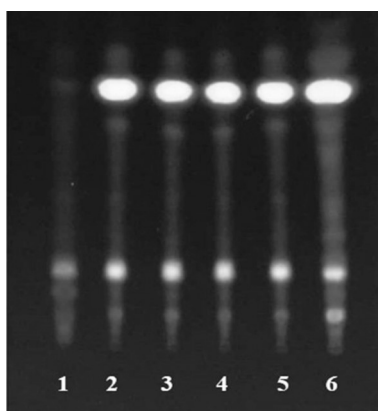
201803),每份 10 g,参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0832 中水分测定法的第一法<sup>[7]</sup>进行测定。结果,肝肾颗粒的水分含量分别为 4.86%、4.90%、4.52%,符合 2015 年版《中国药典》(四部)“颗粒剂”项下水分  $\leq 8.0\%$  的要求。

2.4.2 粒度测定 称取所制肝肾颗粒(批号:201803)3份,每份 10 g,参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0982 中双筛分法测定<sup>[7]</sup>。结果,肝肾颗粒的粒度分别为 9.52%、9.66%、9.85%,符合 2015 年版《中国药典》(四部)“颗粒剂”项下粒度  $\leq 15\%$  的要求。

2.4.3 溶化性测定 称取所制肝肾颗粒(批号:201803)3份,每份 10 g,放入 3 个相同烧杯中加热水 200 mL,玻璃棒同时搅拌,观察颗粒溶化情况并测定其完全溶化所用时间。结果,肝肾颗粒在 25 s 内全部溶化,符合 2015 年版《中国药典》(四部)“颗粒剂”项下溶化性要求<sup>[7]</sup>。

## 2.5 肝肾颗粒的定性鉴别

2.5.1 枸杞子的薄层鉴别 取肝肾颗粒新工艺样品3批(批号:201805、201806、201807),每批分别取 1 g,加水 35 mL,煮沸 15 min,放冷,滤过,滤液用 15 mL 乙酸乙酯振摇提取,取乙酸乙酯部分浓缩至 1 mL,得供试品溶液。同法制备缺枸杞子的阴性样品溶液、肝肾颗粒旧工艺样品(批号:201801)溶液。另取枸杞子对照药材 0.5 g,同法制成枸杞子对照药材溶液。参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0502 进行薄层色谱试验<sup>[7]</sup>,吸取上述溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸(3:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置于紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品和旧工艺样品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。枸杞子的薄层色谱见图 1。



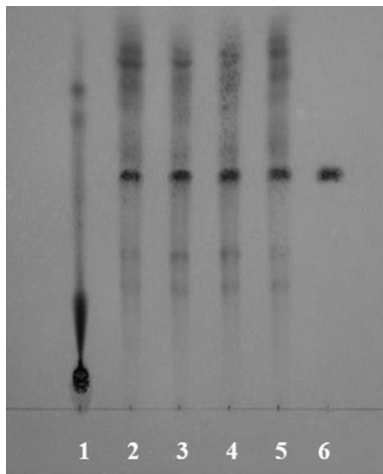
注:1.阴性样品;2.旧工艺样品(批号:201801);3~5.新工艺样品(批号分别为:201805、201806、201807);6.枸杞子对照药材

Note: 1. negative sample; 2. sample of old process (batch number is 201801); 3-5. samples of new process (batch numbers are 201805, 201806, 201807, respectively); 6. *L. barbarum* control medicinal material

图1 枸杞子的薄层色谱图

Fig 1 TLC of *L. barbarum*

2.5.2 黄芪的薄层色谱鉴别 取肝肾颗粒新工艺样品3批(批号:201805、201806、201807),每批分取10 g,加甲醇80 mL,超声(频率:40 KHz,功率:400 W,下同)提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加氨试液15 mL溶解,再用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次15 mL,合并正丁醇溶液,蒸干,残渣加水5 mL溶解,过D101型大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为12 cm),先用50 mL水洗脱,弃去水液,再用30 mL 40%乙醇洗脱,弃去洗脱液,最后用80 mL 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加0.5 mL甲醇溶解,得供试品溶液。同法制备缺黄芪的阴性样品溶液、肝肾颗粒旧工艺样品(批号:201801)溶液。另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。参照2015年版《中国药典》(四部)通则0502进行薄层色谱试验<sup>[7]</sup>,吸取供试品溶液10  $\mu$ L、对照品溶液2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,于日光下检视。结果,供试品和旧工艺样品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的棕褐色斑点。黄芪的薄层色谱图见图2。



注:1.阴性样品;2.旧工艺样品(批号:201801);3~5.新工艺样品(批号分别为:201805、201806、201807);6.黄芪甲苷对照品

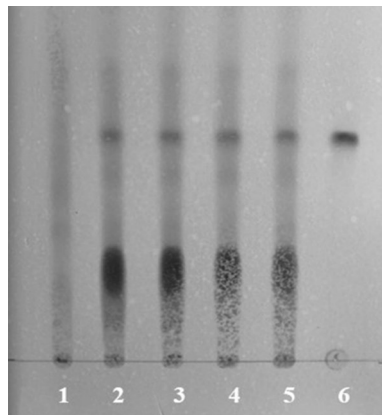
Note: 1. negative sample; 2. samples of old process (batch number is 201801); 3-5. samples of new process (batch numbers are 201805, 201806, 201807, respectively); 6. astragaloside reference substance

图2 黄芪的薄层色谱图

Fig 2 TLC of *A. membranaceus*

2.5.3 党参的薄层色谱鉴别 取肝肾颗粒新工艺样品3批(批号:201805、201806、201807),每批分取10 g,加甲醇80 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加氨试液15 mL溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次15 mL,合并正丁醇溶液,蒸干,残渣加水15 mL溶解,通过D101型大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为10 cm),先用50 mL水洗脱,弃去水液,再用50 mL 50%乙

醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇1 mL溶解,得供试品溶液。同法制备缺党参的阴性样品溶液、肝肾颗粒旧工艺样品(批号:201801)溶液。另取党参炔苷对照品,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。参照2015年版《中国药典》(四部)通则0502进行薄层色谱试验<sup>[7]</sup>,吸取供试品溶液10  $\mu$ L、对照品溶液2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水(7:1:0.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干。喷以10%硫酸乙醇溶液,在105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,于日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。党参的薄层色谱图见图3。



注:1.阴性样品;2.旧工艺样品(批号:201801);3~5.新工艺样品(批号分别为:201805、201806、201807);6.党参炔苷对照品

Note: 1. negative sample; 2. samples of old process (batch number is 201801); 3-5. samples of new process (batch numbers are 201805, 201806, 201807, respectively); 6. lobetyolin reference substance

图3 党参的薄层色谱图

Fig 3 TLC of *C. pilosula*

## 2.6 甜菜碱的含量测定

2.6.1 色谱条件 色谱柱: Sepax-HP-Amino (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈-水 (35:65, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35  $^{\circ}$ C; 检测器: ELSD; 漂移管温度: 40  $^{\circ}$ C; 进样量: 12  $\mu$ L。

2.6.2 甜菜碱对照品溶液的制备 取甜菜碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成对照品贮备液。精密量取对照品贮备液0.18 mL,置于2 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得甜菜碱质量浓度为0.540 mg/mL的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 取肝肾颗粒新工艺样品(批号:201806)0.6 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇30 mL,摇匀,超声处理30 min,放置室温,滤过,用甲醇适量洗涤滤渣及容器,合并滤液,蒸干,残渣加甲醇适量溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.22  $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.6.4 阴性对照溶液的制备 同“2.6.3”项下方法制备

缺枸杞子阴性对照溶液。

2.6.5 系统适用性考察 取“2.6.2”项下甜菜碱对照品溶液和“2.6.3”项下供试品溶液,分别按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,甜菜碱与相邻峰间分离度均大于1.5,以甜菜碱峰计理论板数 $>4\ 000$ ,阴性对照在与对照品色谱保留时间相同的位置上无色谱峰出现,表明本方法专属性良好。甜菜碱的高效液相色谱图见图4。

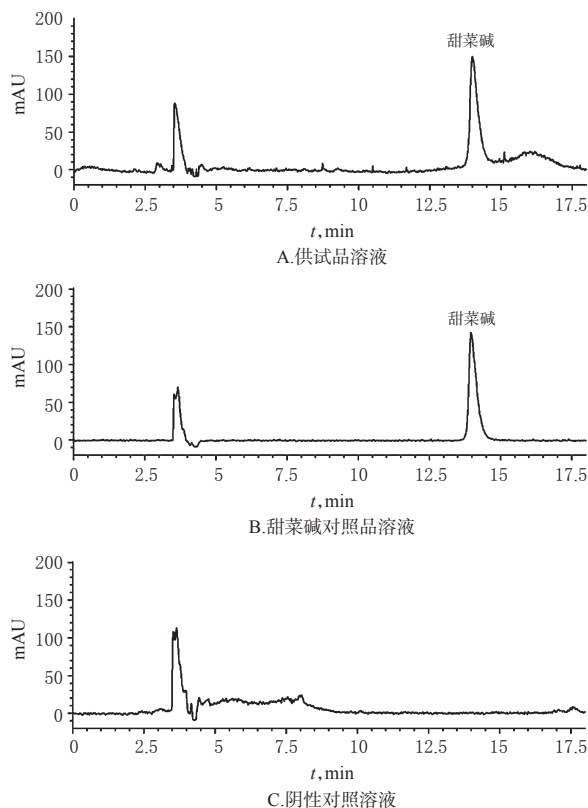


图4 甜菜碱含量测定的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms for the determination of betaine content

2.6.6 线性关系考察 分别精密吸取甜菜碱对照品溶液8、10、12、14和16  $\mu\text{L}$ 注入色谱仪,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对对照品进样量对数为横坐标(x)、峰面积对数为纵坐标(y)进行回归分析,得甜菜碱的回归方程为 $y=1.050x+5.603$  ( $r=0.999\ 1$ ),表明甜菜碱进样量在4.32~8.64  $\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.6.7 精密度试验 精密吸取“2.6.2”项下甜菜碱对照品溶液12  $\mu\text{L}$ ,按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果,甜菜碱峰面积的RSD为0.05% ( $n=5$ ),表明仪器的精密度良好。

2.6.8 重复性试验 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液共5份,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甜菜碱峰面积的RSD为1.33% ( $n=5$ ),表明本方法重复性良好。

2.6.9 稳定性试验 取“2.6.2”项下供试品溶液,室温下

放置2、4、6、8、12、24 h后分别按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甜菜碱峰面积的RSD为0.07% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定性良好。

2.6.10 加样回收试验 称取已知含量的肝肾颗粒新工艺样品(批号:201806)共9份,每份约0.3 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,分别按样品中甜菜碱含量的80%、100%、120%加入对照品,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算平均回收率。结果,甜菜碱平均回收率为97.02% (RSD=0.79%,  $n=9$ )。

2.6.11 样品含量测定 分别称取10批肝肾颗粒样品(批号:201801、201802、201803、201804、201805、201806、201807、201808、201809和201810),每份约0.6 g,精密称定,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,结果10批肝肾颗粒样品中甜菜碱平均含量为4.298 mg/g。

## 2.7 党参炔苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

2.7.1 色谱条件 色谱柱: Apollo C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm, 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱条件见表4。

表4 梯度洗脱条件

Tab 4 Gradient elution conditions

时间, min	流动相A	流动相B
0.01~30	5%~15%	95%~85%
30~60	15%~35%	85%~65%
60~100	35%~35%	65%~65%
100~120	35%~55%	65%~55%

2.7.2 混合对照品溶液的制备 取党参炔苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含党参炔苷0.2 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.1 mg的溶液,即得。

2.7.3 供试品溶液的制备 称取肝肾颗粒新工艺样品(批号:201806)3 g,精密称定,置于锥形瓶中,加入甲醇50 mL,超声处理30 min,取续滤液,蒸干,残渣加氨试液25 mL溶解,水饱和正丁醇萃取4次,每次25 mL,合并正丁醇层,蒸干,残渣加水5 mL溶解,放冷,通过D101型大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为10 cm),以水50 mL洗脱,弃去洗脱液,再以50 mL 30%乙醇洗脱,弃去洗脱液,最后以80 mL 80%乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,并于5 mL量瓶中定容摇匀,即得。

2.7.4 系统适用性试验 取“2.7.2”项下混合对照品溶液和“2.7.3”项下供试品溶液,分别按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷与相邻峰间分离度均大于1.5,以党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计理论板数均 $>4\ 000$ ,党参

炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱图谱见图5。

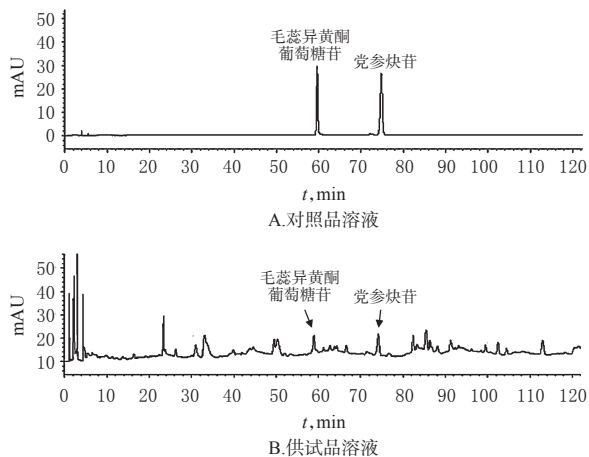


图5 党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱图谱

Fig 5 HPLC chromatograms of lobetyolin and calycosin-7-glucoside

2.7.5 线性关系考察 分别精密量取“2.7.2”项下混合对照品溶液 1.5、1.25、1.0、0.5、0.25 mL，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得混合对照品系列溶液。再取系列溶液按“2.7.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以对照品溶液的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析，得党参炔苷回归方程为 $y=12\ 479x+6\ 279.18(r=0.999\ 4)$ ；毛蕊异黄酮葡萄糖苷的回归方程为 $y=11\ 606x-3\ 023.32(r=0.999\ 1)$ 。结果表明，党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的检测质量浓度分别在 10~60、5~30  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好。

2.7.6 精密度试验 取“2.7.3”项下供试品溶液适量，按“2.7.1”项下色谱条件连续进样测定 5 次，记录党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积。结果，党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<1.96\%$  ( $n=5$ )，表明本方法精密度良好。

2.7.7 稳定性试验 取“2.7.3”项下供试品溶液，分别于室温下放置 0、4、8、12 和 24 h 后，按“2.7.1”项下色谱条件进样测定，记录党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积。结果，党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<2.15\%$  ( $n=5$ )，表明供试品溶液室温下放置 24 h 内稳定。

2.7.8 重复性试验 按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液，共 5 份，再按“2.7.1”项下色谱条件连续进样测定，记录党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积。结果，党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<2.01\%$  ( $n=5$ )，表明本方法重复性良好。

2.7.9 加样回收试验 称取肝肾颗粒(批号:201806)共

6 份，每份约 1.5 g (已知含党参炔苷 0.053 mg/g、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.026 mg/g)，精密称定，分别置于具塞锥形瓶中，加入 0.4 mL “2.7.2”项下混合对照品溶液(含党参炔苷 0.08 mg，毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.04 mg)，按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.7.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算回收率。结果，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、党参炔苷平均回收率分别为 99.25%、101.04%，RSD 分别为 1.62%、1.26% ( $n=6$ )，表明方法准确度良好。

2.7.10 样品含量测定 分别称取 10 批肝肾颗粒样品(批号:201801、201802、201803、201804、201805、201806、201807、201808、201809 和 201810)，每份约 3 g，精密称定，按“2.8.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.7.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，10 批肝肾颗粒样品中党参炔苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均含量分别为 0.054、0.025 mg/g，RSD 分别为 2.70%、2.46% ( $n=10$ )。

## 2.8 肝肾颗粒的指纹图谱

由于检测甜菜碱需要使用 ELSD，但经过前期预试验发现，ELSD 不适于肝肾颗粒指纹图谱研究，经综合考虑，选用了在紫外条件下有特征吸收，并且以含量稳定的党参炔苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为后续肝肾颗粒指纹图谱研究指标。

2.8.1 HPLC 指纹图谱的生成 取 10 批(编号 S1~S10，其中 S1~S2 为旧工艺样品，S3~S10 为新工艺样品)肝肾颗粒各适量，按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.7.1”项下色谱条件进样测定，采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)对 10 批肝肾颗粒样品的 HPLC 图谱进行分析，得其 HPLC 指纹图谱，设计时间窗宽度为 0.20 min，以中位数法生成对照指纹图谱。结果，肝肾颗粒 HPLC 叠加指纹图谱见图 6，HPLC 对照指纹图谱见图 7。

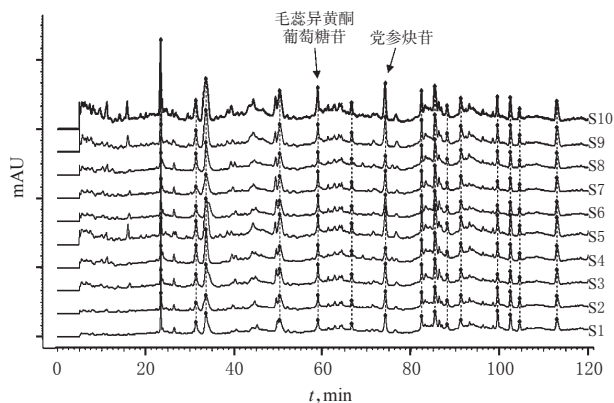


图6 10批肝肾颗粒HPLC叠加指纹图谱  
Fig 6 HPLC superposed fingerprint of 10 batches of Ganshen granules

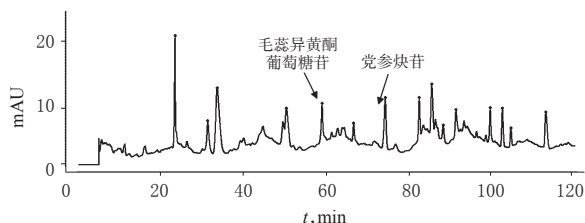


图7 肝肾颗粒HPLC对照指纹图谱

Fig 7 HPLC control fingerprint of Ganshen granules

2.8.2 相似度分析 采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012A版),以肝肾颗粒样品HPLC对照指纹图谱为参考,进行相似度评价。结果,S1~S10样品与对照图谱相比相似度均大于0.95,符合指纹图谱要求。相似度测定结果见表5。

表5 相似度测定结果

Tab 5 Results of similarity tests

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.998	0.984	0.983	0.976	0.968	0.975	0.969	0.984	0.982	0.992
S2	0.998	1.000	0.980	0.976	0.981	0.959	0.968	0.959	0.981	0.985	0.989
S3	0.984	0.980	1.000	0.985	0.978	0.974	0.991	0.977	0.989	0.982	0.995
S4	0.983	0.976	0.985	1.000	0.960	0.963	0.976	0.992	0.984	0.974	0.990
S5	0.976	0.981	0.978	0.960	1.000	0.929	0.971	0.940	0.981	0.992	0.984
S6	0.968	0.959	0.974	0.963	0.929	1.000	0.977	0.972	0.967	0.957	0.973
S7	0.975	0.968	0.991	0.976	0.971	0.977	1.000	0.980	0.993	0.970	0.991
S8	0.969	0.959	0.977	0.992	0.940	0.972	0.980	1.000	0.983	0.957	0.983
S9	0.984	0.981	0.989	0.984	0.981	0.967	0.993	0.983	1.000	0.987	0.997
S10	0.982	0.985	0.982	0.974	0.992	0.957	0.970	0.957	0.987	1.000	0.990
对照	0.992	0.989	0.995	0.990	0.984	0.973	0.991	0.983	0.997	0.990	1.000

### 3 讨论

本试验对肝肾颗粒的成型工艺进行了优化,优化后的工艺所制备的颗粒成型率为85.53%,且该工艺具有较好的稳定性,可用于工业化生产。采用薄层色谱法对肝肾颗粒中枸杞子、黄芪、党参进行定性鉴别,结果表明,枸杞子、黄芪、党参色谱分离效果良好,斑点显色清晰。之后笔者对肝肾颗粒的粒度、水分、溶化性等进行测定,也符合2015年版《中国药典》(四部)的相关质量要求。

在前期甜菜碱的含量测定中,参考相关研究<sup>[15-16]</sup>对不同类型色谱柱、流动相、检测器进行了考察,选择Welch XB-C<sub>8</sub>色谱柱、Sepax BR-C<sub>18</sub>色谱柱、Sepax-HP-Amino色谱柱对样品进行色谱分析,发现使用Sepax-HP-Amino色谱柱对样品的分离效果好;考察甲醇-水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水溶液等流动相的色谱分离效果,发现乙腈-水溶液的分离效果较好。考察了二极管阵列(PDA)检测器、示差折光检测器、ELSD检测器的灵敏度,发现采用ELSD检测器灵敏度高,峰形分离较好,满足含量测定要求。另外,笔者以党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为质控成分,建立肝肾颗粒HPLC指纹图谱,结果,10批肝肾颗粒指纹图谱的相似度均大于0.95。

综上所述,本试验考察了肝肾颗粒的质量相关项目,初步拟定了肝肾颗粒中标志性成分甜菜碱的含量测定方法和党参、枸杞子、黄芪的薄层鉴别方法,建立了肝肾颗粒的HPLC指纹图谱,可为肝肾颗粒的质量控制提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 高雁,李春,姜恺.甜菜碱的制备及其应用研究进展[J].新疆农业科学,2007,44(2):48-52.
- [2] 党宏万,王欣瑜,杨小英.枸杞中甜菜碱、牛磺酸、枸杞多糖对β-胡萝卜素在比格犬体内药动学的影响[J].中国药理学杂志,2013,48(23):2034-2038.
- [3] 苏锦松,秦付营,张艺,等.党参的化学成分研究[J].中药材,2018,41(4):863-867.
- [4] 邹利,邱炳勋,刘珂,等.党参米炒前后党参多糖与5-羟甲基糠醛的变化及其对胃肠平滑肌运动的影响[J].中草药,2017,48(1):149-154.
- [5] 余素姣,谭慧.黄芪甲苷通过炎症小体活化影响软骨细胞炎症因子的表达[J].中国组织工程研究,2019,23(11):1652-1656.
- [6] 张聪,杨强,樊丽博. HPLC-ELSD法测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量[J].中国兽药杂志,2017,51(8):62-66.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:7,103,132,249,302.
- [8] 李更青,吴飞,胡佳亮,等.基于制剂原料物理性质的抗甲方颗粒干法制粒工艺研究[J].中草药,2018,49(3):575-581.
- [9] 周恩丽,康小东,付娟,等.基于制剂原料物理特性的哮喘颗粒干法制粒工艺优选[J].中草药,2017,48(4):681-685.
- [10] 田守生,孙四海,张淹,等.阿胶颗粒干法制粒工艺研究[J].中草药,2014,45(12):1714-1717.
- [11] 余琰,范凌云,高建德. Box-Behnken设计-响应面法优选党参干法制粒工艺研究[J].中药材,2017,40(6):1393-1396.
- [12] 孙臻,陈明聪,汪杰,等.参芪妇康颗粒成型工艺研究[J].中草药,2018,49(16):3849-3853.
- [13] 霍小琰,王振宇,刘宝俊,等.奶片基料粉干法制粒工艺研究与优化设计[J].中国乳品工业,2018,46(4):17-21.
- [14] 刘永岭,邵杰,王永香,等.正交试验优化银翘败毒片的干法制粒工艺[J].中国药房,2017,28(25):3553-3556.
- [15] 明鹤,杨太新,杜艳华.不同采收时间枸杞子中枸杞多糖和甜菜碱含量的分析[J].时珍国医国药,2014,25(4):945-946.
- [16] 杨宗学,林楠,蔺海明,等.基于HPLC对不同产地枸杞子中甜菜碱含量的研究[J].中国现代中药,2013,15(7):552-555.

(收稿日期:2019-06-17 修回日期:2019-08-02)

(编辑:唐晓莲)