中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)19－0076－07
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.19.016

# 加味乳核颗粒工艺优选和质量标准研究*

高　昱[1]，黄　莉[1]，许　龙[1]，唐　林[1]，高洁莹[2△]

（1. 湖南中医药大学第一附属医院，湖南 长沙　410012；　2. 湖南省长沙市食品药品检验所，湖南 长沙　410036）

**摘要：目的**　优选加味乳核颗粒的提取工艺与成型工艺，并对其进行质量控制。**方法**　选取加水量、浸泡时间、煎煮时间为提取工艺关键参数，以加热能耗、时间成本为辅助考察因素，以浸膏得率为评价指标，采用$L_9(3^4)$正交试验优选提取工艺；以粒度、溶化性、制粒情况为成型工艺关键参数，采用单因素考察法优选辅料润湿剂和稀释剂。采用薄层色谱法对加味乳核颗粒中的柴胡、青皮、延胡索、赤芍、玄参进行定性鉴别；采用高效液相色谱法测定制剂中芍药苷、丹酚酸B的含量，色谱柱为Waters XBridge $C_{18}$柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈－0.1%磷酸水溶液（梯度洗脱），流速为1.0 mL/min，检测波长分别为230 nm（芍药苷）和286 nm（丹酚酸B），柱温为30 ℃，进样量为10 μL。**结果**　优选工艺为取药材浸泡1.0 h，第1次加10倍量水、煎煮1.5 h，第2次加8倍量水、煎煮1.0 h，稠膏与糊精的质量比为5∶(8～9)，以95%乙醇为润湿剂，用量为糊精含量的20%。薄层色谱鉴别中，柴胡、青皮、延胡索、赤芍、玄参的特征斑点均显色清晰，且阴性对照无干扰。芍药苷、丹酚酸B的质量浓度分别在1.05～26.35 μg/mL、1.04～25.96 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（$r$=0.999 8，0.999 9，$n$=5）；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%；平均加样回收率分别为98.68%和99.41%，*RSD*分别为0.81%和1.17%（$n$=6）。3批样品中芍药苷的含量为1.52～1.58 mg/g，丹酚酸B的含量为1.17～1.23 mg/g。**结论**　优选的工艺合理简单、方法稳定可靠，建立的质量标准操作简便、结果准确，可用于加味乳核颗粒的质量控制。

**关键词：**加味乳核颗粒；工艺优选；$L_9(3^4)$正交试验；芍药苷；丹酚酸B；高效液相色谱法；薄层色谱法

## Preparation Process Optimization and Quality Standard of Jiaweiruhe Granules

*GAO Yu[1], HUANG Li[1], XU Long[1], TANG Lin[1], GAO Jieying[2]*

*(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China　410012;　2. Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha, Hunan, China　410036)*

**Abstract: Objective**　To optimize the extraction and molding processes of Jiaweiruhe Granules, and to control their quality. **Methods**　With the water addition amount, soaking time, and decoction time as key parameters for the extraction process, with the heating energy consumption and time cost as auxiliary factors for investigation, and with the extract yield as the evaluation index, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize the extraction process. With particle size, dissolubility, and granulation state as key parameters of the molding process, the appropriate excipients wetting agents and diluents were optimized by the single factor test method. Qualitative identification of Bupleuri Radix, Citri Reticulatae Pericarpium Viride, Corydalis Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, and Scrophulariae Radix in Jiaweiruhe Granules was performed by the thin－layer chromatography (TLC) method. The content of paeoniflorin and salvianolic acid B in the preparation was determined by the high－performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Waters XBridge $C_{18}$ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 230 nm for paeoniflorin and 286 nm for salvianolic acid, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The optimal process was as follows: soaking the Chinese medicinal herbs for 1.0 h, adding 10 times the amount of water and boiling for 1.5 h for the first time, adding 8 times the amount of water and boiling for 1.0 h for the second time, the mass ratio of thick paste to dextrin was 5∶(8－9), taking 95% ethanol as a wetting agent with a dosage of 20% of the dextrin content. In the TLC identification, the characteristic spots of Bupleuri Radix, Citri Reticulatae Pericarpium Viride, Corydalis Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, and Scrophulariae Radix were all clearly colored, and the negative control had no interference. The linear ranges of paeoniflorin and salvianolic acid B were 1.05－26.35 μg/mL and 1.04－25.96 μg/mL ($r$=0.999 8, 0.999 9, $n$=5), respectively. The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recoveries of paeoniflorin and salvianolic acid B were 98.68% and 99.41%, with *RSD*s of 0.81% and 1.17% ($n$=6), respectively. The contents of paeoniflorin and salvianolic acid B in the three batches of samples were in the ranges of 1.52－1.58 mg/g, and 1.17－1.23 mg/g, respectively. **Conclusion**　The optimal process was reasonable, simple, stable and reliable, and the established quality standard is easy to operate and accurate in results, which can be used for quality control of Jiaweiruhe Granules.

**Key words:** Jiaweiruhe Cranules; process optimization; $L_9(3^4)$ orthogonal test; paeoniflorin; salvianolic acid B; HPLC; TLC

*基金项目：湖南省自然科学基金[2022JJ80023]；湖南省教育厅科学研究项目[22B0375]。

第一作者：高昱，男，满族，硕士研究生，主管中药师，研究方向为中药制剂，(电子信箱)471287265@qq.com。

△通信作者：高洁莹，女，硕士研究生，主管中药师，研究方向为中药分析检验，(电子信箱)738000385@qq.com。

加味乳核颗粒是由柴胡、青皮、延胡索、赤芍、玄参等16味中药材组方的中药复方颗粒，有疏肝理气、活血化瘀、软坚散结等功效，临床用于治疗肝郁血瘀型乳腺增生及乳房肿块、乳房瘀痛、乳头流水或出血等症[1-2]。该方源于湖南中医药大学第一附属医院自制乳核袋泡茶[3]，在原方基础上增加玄参、麦冬2味中药，以治疗其阴虚火旺、苦寒伤胃的不良反应，并将原茶剂改为服用更方便、起效更快的颗粒剂。为使该制剂的质量稳定、均一，通过质量源于设计（QbD）理念，在水提取、制粒等关键工序中对直接影响制剂质量的工艺关键参数进行优化，并结合中药质量标志物（Q-Marker）理念，以芍药苷和丹酚酸B为质量标志物，验证优选结果[4-8]。参照原乳核袋泡茶的质量标准及相关文献，建立了鉴别加味乳核颗粒中柴胡、青皮、延胡索、赤芍、玄参的薄层色谱（TLC）法，采用高效液相色谱（HPLC）法测定了制剂中芍药苷和丹酚酸B的含量，为其质量标准的建立提供依据。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC-20AD型高效液相色谱仪（日本岛津株式会社），配有二极管阵列检测器（PDA）；XSE205DU型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司，精度为十万分之一）；SB-800DTD型数控超声波清洗器（宁波新星生物科技公司，功率为840 W，频率为40 kHz）；ZF-2型三用紫外分析仪（上海安亭电子仪器厂）；Milli-Q Direct 8型超纯水处理系统（德国Merck Millipore公司）；YK160型摇摆制粒机、CT-C-IV型热风干燥箱（南京腾涌干热设备有限公司）。

### 1.2 试药

柴胡对照药材（批号为120992-201509），延胡索对照药材（批号为120928-201609），橙皮苷对照品（批号为110721-202019），延胡索乙素对照品（批号为110726-202020），芍药苷对照品（批号为110736-202145，纯度为94.6%），哈巴俄苷对照品（批号为111730-202110），丹酚酸B对照品（批号为111562-201917，纯度为96.6%），均购自中国食品药品检定研究院；硅胶G薄层板（德国Merck公司）；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 工艺优选

#### 2.1.1 水提取工艺优选

因素与水平：以加水量（因素A）、浸泡时间（因素B）、煎煮时间（因素C）为工艺关键参数，以加热能耗、时间成本为辅助考察因素，以浸膏得率为评价指标，采用$L_9(3^4)$正交试验优选水提取工艺。因素与水平及加热能耗与时间成本评级见表1。

**表1 因素与水平及加热能耗与时间成本评级**

**Tab. 1 Heating energy consumption and time costs rating for factors and their levels**

| 水平 | 因素A | | 因素B | | 因素C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 参数(倍) | 加热能耗评级 | 参数(h) | 时间成本评级 | 参数(h) | 加热能耗/时间成本评级 |
| 1 | 8,6 | - | 0 | - | 1.0,0.5 | -/- |
| 2 | 10,8 | + | 0.5 | + | 1.5,1.0 | +/+ |
| 3 | 12,10 | ++ | 1.0 | ++ | 2.0,1.5 | ++/++ |

注：“-”“+”“++”“+++”“+++++”表示加热能耗、时间成本递增。表4同。

Note: "-" "+" "++" "+++" "+++++" indicates an increase in heating energy consumption and time costs (for Tab. 1 and Tab. 4).

试验设计与结果：采用煎煮法提取，采用$L_9(3^4)$正交试验优选水提取工艺。按处方工艺取饮片195 g，平行9份，加水煎煮2次，滤过，收集并合并滤液，浓缩并定容至1 000 mL，精密吸取提取液50 mL，水浴蒸干，105 ℃干燥5 h，置干燥器中冷却0.5 h，迅速称定质量，计算浸膏得率。试验设计与结果见表2。

**表2 $L_9(3^4)$正交试验设计与结果**

**Tab. 2 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test**

| 序号 | 因素A | 因素B | 因素C | 因素D(误差) | 浸膏得率(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 19.85 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 22.31 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 23.05 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 23.50 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 24.87 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 24.69 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 23.87 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 23.64 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 25.84 |
| $K_1$ | 65.210 | 67.220 | 68.180 | 70.560 | |
| $K_2$ | 73.060 | 70.820 | 71.650 | 70.870 | |
| $K_3$ | 73.350 | 73.580 | 71.790 | 70.190 | |
| $R$ | 8.140 | 6.360 | 3.610 | 0.680 | |

方差分析与工艺验证：方差分析结果见表3。可见，因素A、因素B、因素C有显著差异。结合表2中$K$值进一步分析，$A_1 < A_2 \approx A_3$，表明加水量对浸膏得率有显著影响；$B_1 < B_2 < B_3$，以$B_3$为优；$C_1 < C_2 \approx C_3$，表明已提取完全，延长提取时间对浸膏得率无正反馈。综合药效、加热能耗、时间成本考虑，以芍药苷、丹酚酸B的转移率为考察指标验证工艺，进一步优选工艺$A_2B_3C_2$，$A_3B_3C_2$，$A_2B_3C_3$，$A_3B_3C_3$，结果见表4。可见，因素A中，加水量多则滤液量增多，加重了浓缩工序的负载，延长了药效成分在高温中的处置时间，综合药效与加热能耗考虑，以$A_2$为优；因素C中，综合考虑时间成本与加热能耗，以

$C_2$为优。故优选水提取工艺为$A_2B_3C_2$，即取药材浸泡1.0 h，第1次加10倍量水、煎煮1.5 h，第2次加8倍量水、煎煮1.0 h。

**表3 浸膏得率方差分析结果**

**Tab. 3 Results of the ANOVA of the extract yield**

| 方差来源 | 因素A | 因素B | 因素C | 因素D（误差） |
|---|---|---|---|---|
| 离差平方和 | 14.22 | 6.78 | 2.79 | 0.08 |
| 自由度 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| 均方差 | 7.11 | 3.39 | 1.40 | 0.04 |
| *F*值 | 184.02 | 87.76 | 36.08 | |
| *P* | < 0.01 | < 0.05 | < 0.05 | |

注：$F_{0.01}(2,2) = 99$，$F_{0.05}(2,2) = 19$。

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99$, $F_{0.05}(2,2) = 19$.

**表4 转移率验证试验结果**

**Tab. 4 Results of the verification test of the transfer rate**

| 工艺 | 加热能耗 | 时间成本 | 转移率（%） | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 芍药苷 | 丹酚酸B |
| $A_2B_3C_2$ | ++ | + | 86.32 | 60.13 |
| $A_3B_3C_2$ | +++ | + | 85.56 | 58.15 |
| $A_2B_3C_3$ | +++ | ++ | 85.18 | 59.24 |
| $A_3B_3C_3$ | ++++ | ++ | 84.74 | 59.27 |

验证试验：按优选工艺进行3次验证试验，浸膏得率分别为25.06%，26.36%，25.10%，平均为25.51%，*RSD*为2.90%（$n = 3$），表明优选工艺稳定、可行。分别将验证试验中按$A_2B_3C_2$工艺制备的3份药渣继续进行第3次提取，加8倍量水，煎煮1.0 h，滤过，滤液减压浓缩至1 000 mL。结果浸膏得率分别为6.42%，5.48%，6.87%，平均为6.26%，表明煎煮2次已基本提取完全，优选工艺合理、可行。

2.1.2 成型工艺优选

稀释剂种类：浓缩后的稠膏（相对密度为1.28～1.30，60 ℃）和辅料以质量比5∶8混匀，制粒，以制粒情况、溶化性为评价指标，优选稀释剂。由表5可知，糊精制粒后细粉少，有更好的水溶性，有利于考察粒度和溶化性。故稀释剂选择糊精。

**表5 稀释剂种类考察结果**

**Tab. 5 Results of the investigation on the types of diluents**

| 稀释剂 | 制粒情况 | 溶化性 |
|---|---|---|
| 可溶性淀粉 | 不黏手，不堵筛网，细粉偏多 | 全部溶化 |
| 糊精 | 不黏手，不堵筛网，易整粒 | 全部溶化 |
| 糖粉 | 黏手，堵筛网，颗粒偏硬 | 全部溶化 |

稠膏与糊精比例：取稠膏和糊精，按质量比5∶(6～10)进行制粒，记录制粒情况。结果稠膏和糊精的质量比为5∶(6～7)时，软材黏手成团，堵筛网，颗粒硬，成粒、整粒困难；质量比为5∶10时，出现较多细粉；质量比为5∶(8～9)时，软材不黏手，不成团，不堵筛网，易整粒。故稠膏与糊精的质量比选择5∶(8～9)。

润湿剂体积分数：选择75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇为润湿剂制备软材，相同条件下干燥至含水量合格，以制粒情况为评价指标。结果润湿剂选择75%乙醇时，无法成粒；选择85%乙醇时，制得软材黏手，偶成团，制粒时稍结块，颗粒干燥较快；选择95%乙醇时，制得软材不黏手，不成团，制粒时不结块，颗粒干燥快。故润湿剂选择95%乙醇。

润湿剂用量：按工艺取糊精及稠膏，以95%乙醇为润湿剂，以不同润湿剂用量（15%，20%，25%）制粒，相同条件下干燥至含水量合格，以制软材情况、制粒和整粒情况、粒度为评价指标。结果见表6，表明以95%乙醇为润湿剂，用量约为糊精含量的20%时的制粒效果最佳。故润湿剂选择95%乙醇，用量为糊精含量的20%。

**表6 润湿剂（95%乙醇）用量考察结果**

**Tab. 6 Results of the investigation on the dosage of wetting agent (95% ethanol)**

| 评价指标 | 15% | 20% | 25% |
|---|---|---|---|
| 制软材 | 难成型 | 不黏手，不成团 | 不黏手，不成团，软材较湿 |
| 制粒、整粒 | 粉末较多 | 不黏筛，易整粒 | 不黏筛，颗粒有结块 |
| 粒度（%） | 5.51 | 6.07 | 10.42 |

2.1.3 样品制备

按2.1.1项下优选的水提取工艺和2.1.2项下优选的成型工艺，按处方工艺取药材饮片，浸泡1.0 h，第1次加10倍量水、煎煮1.5 h，第2次加8倍量水、煎煮1.0 h，得稠膏，稠膏与糊精按质量比5∶(8～9)加入糊精，加入20%糊精含量的95%乙醇，分别制备3批样品（批号分别为20230215，20221208，20221009，规格为每袋12 g），备用。

## 2.2 TLC鉴别

柴胡：取样品20 g，研匀，加甲醇80 mL，超声处理45 min，滤过，滤液蒸干，残渣加30 mL水使溶解，用乙醚振摇提取2次，每次20 mL，弃乙醚液，用水饱和的正丁醇振摇提取3次，每次30 mL，合并正丁醇液，用氨试液洗涤3次，每次20 mL，弃氨液层，再用正丁醇饱和的水洗涤2次，每次20 mL，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇1 mL使溶解，作为供试品溶液。另取柴胡对照药材0.5 g，加水100 mL，煎煮1 h，滤过，滤液浓缩至30 mL，自“用乙醚振摇提取2次”起，同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按处方工艺制备缺柴胡的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取上述3种溶液各10 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以乙酸乙酯－乙醇－水（8∶2∶1，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷2%对二甲氨基苯甲醛的40%硫酸溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，置紫外光灯（365 nm）下检

视。结果供试品溶液色谱中，在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光主斑点，且阴性对照无干扰（图1 A）。

青皮[9]：取样品20 g，研匀，加甲醇50 mL，加热回流30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加水20 mL使溶解，加乙醚振摇提取2次，每次20 mL，弃乙醚液，用乙酸乙酯振摇提取2次，每次20 mL，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加甲醇1 mL使溶解，作为供试品溶液。另取橙皮苷对照品，制成甲醇饱和溶液，作为对照品溶液。按处方工艺制备缺青皮的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取上述3种溶液各2 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以乙酸乙酯－甲醇－水（100∶17∶13，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷5%三氯化铝试液，置紫外光灯（365 nm）下检视。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点，且阴性对照无干扰（图1 B）。

延胡索[3,10]：取样品10 g，研匀，加甲醇50 mL，超声处理30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加水10 mL使溶解，用氨水调pH至碱性，用乙醚振摇提取3次，每次20 mL，合并乙醚液，蒸干，残渣加甲醇1 mL使溶解，作为供试品溶液。另取延胡索对照药材0.5 g，自“加甲醇50 mL”起，同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取延胡索乙素对照品适量，加甲醇制成每1 mL含0.3 mg的溶液，作为对照品溶液。按处方工艺制备缺延胡索的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取上述4种溶液各5 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷－二氯甲烷－甲醇（10∶6∶2，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，置碘蒸气中熏至斑点显色清晰，取出，通风放置10 min后，置紫外光灯（365 nm）下检视。结果供试品溶液色谱中，在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点，且阴性对照无干扰（图1 C）。

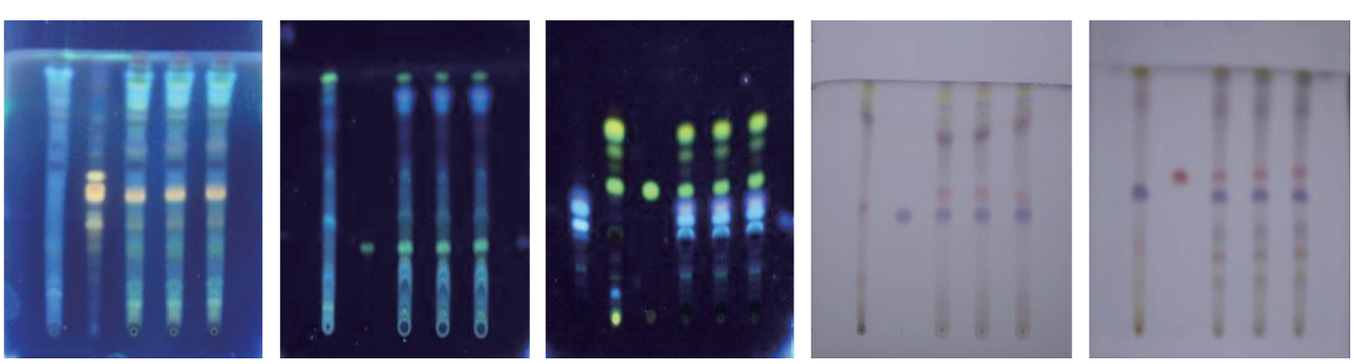
赤芍[3,11]：取“柴胡”项下供试品溶液2 mL，作为供试品溶液。另取芍药苷对照品适量，加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液，作为对照品溶液。按处方工艺制备缺赤芍的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取上述3种溶液各5 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以二氯甲烷－乙酸乙酯－甲醇（40∶5∶10，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷5%香草醛硫酸溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，置日光下检视。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰（图1 D）。

玄参[3,12]：取“柴胡”项下供试品溶液2 mL，作为供试品溶液。另取哈巴俄苷对照品适量，加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液，作为对照品溶液。按处方工艺制备缺玄参的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取上述3种溶液各5 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以二氯甲烷－甲醇－水（5∶1∶0.1，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷5%香草醛硫酸溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，置日光下检视。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰（图1 E）。

### 2.3 含量测定[13]

#### 2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Waters XBridge $C_{18}$柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.1%磷酸水溶液（B），梯度




1. 阴性对照品溶液（分别缺柴胡、青皮、延胡索、赤芍、玄参） 2. 对照药材溶液 3. 对照品溶液 4－6. 供试品溶液

A. 柴胡（365 nm） B. 青皮（365 nm） C. 延胡索（365 nm） D. 赤芍（日光） E. 玄参（日光）

**图1 薄层色谱图**

1. Negative reference solution (lacking Bupleuri Radix, Citri Reticulatae Pericarpium Viride, Corydalis Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, and Scrophulariae Radix, respectively) 2. Reference medicinal herbs solution 3. Reference solution 4－6. Test solution

A. Bupleuri Radix (365 nm) B. Citri Reticulatae Pericarpium Viride (365 nm) C. Corydalis Rhizoma (365 nm) D. Paeoniae Radix Rubra (sunlight) E. Scrophulariae Radix (sunlight)

**Fig. 1 TLC chromatograms**

洗脱（0～15 min时 12%A，15～20 min时 12%A → 20%A，20～45 min时20%A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：230 nm（芍药苷）和286 nm（丹酚酸B）；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。在此色谱条件下，芍药苷和丹酚酸B均达到基线分离，理论板数均大于2 000。

2.3.2 溶液制备

取芍药苷与丹酚酸B对照品各适量，精密称定，加甲醇溶解并定容，制成每1 mL含芍药苷105.41 μg、丹酚酸B 103.84 μg的混合对照品溶液。取样品适量，混匀，研细，取0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入50%甲醇50 mL，密塞，称定质量，超声处理30 min，放冷，再称定质量，用50%甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按加味乳核颗粒处方及工艺分别制备缺赤芍、丹参的阴性样品，并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验：分别取2.3.2项下3种溶液各适量，按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液色谱中，芍药苷、丹酚酸B的色谱峰与混合对照品溶液色谱峰的保留时间相同，且阴性对照无干扰，表明方法专属性良好。详见图2。

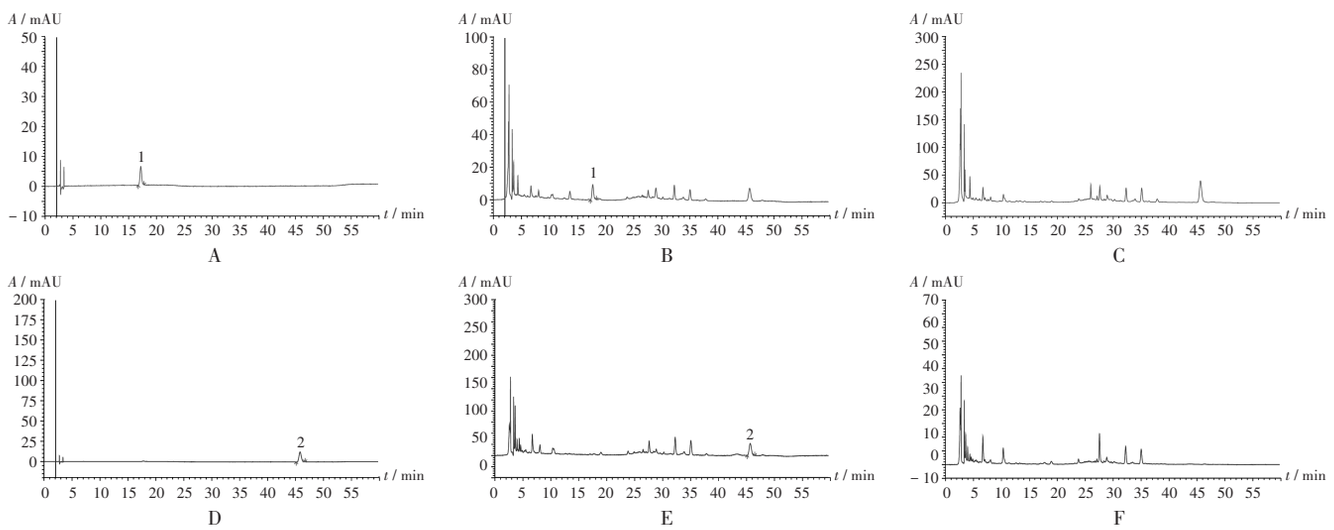
线性关系考察和检测限与定量限确定：分别精密量取2.3.2项下混合对照品溶液0.1，0.5，1.0，1.5，2.5 mL，分别置10 mL容量瓶中，加甲醇定容，摇匀，按2.3.1项下色谱条件分别进样测定，记录峰面积。分别以待测成分质量浓度（$X$，μg/mL）为横坐标、峰面积（$Y$）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y_{芍}$ = 13 641 $X_{芍}$ + 963.02（$r$ = 0.999 8，$n$ = 5），$Y_{丹}$ = 14 104 $X_{丹}$ − 6 580.2（$r$ = 0.999 9，$n$ = 5）。结果表明，芍药苷、丹酚酸B的质量浓度分别在1.05～26.35 μg/mL和1.04～25.96 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。分别以各待测成分信噪比（$S/N$）为10∶1和3∶1时的质量浓度为定量限和检测限。结果芍药苷的检测限为5.88 ng/mL，定量限为19.41 ng/mL；丹酚酸B的检测限为2.70 ng/mL，定量限为8.92 ng/mL。

精密度试验：精密量取2.3.2项下混合对照品溶液适量，按2.3.1项下色谱条件进样测定6次，记录峰面积。结果芍药苷和丹酚酸B峰面积的*RSD*分别为0.40%和0.63%（$n$ = 6），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取样品（批号为20230215）适量，按2.3.2项下方法制备供试品溶液，在常温下放置0，2，4，6，8，12，24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果芍药苷和丹酚酸B峰面积的*RSD*分别为0.60%和0.34%（$n$ = 7），表明供试品溶液室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验：取样品（批号为20230215）适量，共6份，按2.3.2项下方法制备供试品溶液，按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果芍药苷和丹酚酸B的平均含量分别为1.52，1.17 mg/g，*RSD*分别为0.57%和0.36%（$n$ = 6），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品（批号为20230215）适量，共6份，分别加入一定质量的对照品，




1. 芍药苷 2. 丹酚酸B

A，D. 混合对照品溶液（230，286 nm） B，E. 供试品溶液（230，286 nm） C，F. 阴性对照品溶液（分别缺赤芍、丹参）

**图2 高效液相色谱图**

1. Paeoniflorin 2. Salvianolic acid B

A，D. Mixed reference solution（230，286 nm） B，E. Test solution（230，286 nm） C，F. Negative reference solution（lacking Paeoniae Radix Rubra and Scrophulariae Radix，respectively）

**Fig. 2 HPLC chromatograms**

按 2. 3. 2 项下方法制备供试品溶液，按 2. 3. 1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表 7。

**表 7　加样回收试验结果（$n = 6$）**

**Tab. 7　Results of the recovery test（$n = 6$）**

| 成分 | 取样量（g） | 样品含量（mg） | 加入量（mg） | 测得量（mg） | 回收率（%） | $\bar{X}$（%） | *RSD*（%） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 芍药苷 | 0. 250 9 | 0. 381 3 | 0. 316 2 | 0. 693 4 | 98. 70 | 98. 68 | 0. 81 |
| | 0. 251 4 | 0. 382 1 | 0. 316 2 | 0. 691 2 | 97. 75 | | |
| | 0. 250 3 | 0. 380 4 | 0. 316 2 | 0. 693 6 | 99. 05 | | |
| | 0. 251 8 | 0. 382 7 | 0. 316 2 | 0. 691 6 | 97. 69 | | |
| | 0. 251 1 | 0. 381 6 | 0. 316 2 | 0. 696 8 | 99. 68 | | |
| | 0. 250 2 | 0. 380 3 | 0. 316 2 | 0. 693 9 | 99. 18 | | |
| 丹酚酸 B | 0. 521 0 | 0. 293 6 | 0. 311 5 | 0. 600 6 | 95. 56 | 99. 41 | 1. 17 |
| | 0. 250 3 | 0. 292 8 | 0. 311 5 | 0. 607 0 | 100. 87 | | |
| | 0. 251 2 | 0. 293 9 | 0. 311 5 | 0. 605 7 | 100. 10 | | |
| | 0. 251 6 | 0. 294 3 | 0. 311 5 | 0. 606 7 | 100. 29 | | |
| | 0. 250 3 | 0. 292 8 | 0. 311 5 | 0. 600 3 | 98. 72 | | |
| | 0. 250 9 | 0. 293 5 | 0. 311 5 | 0. 598 5 | 97. 91 | | |

2. 3. 4　样品含量测定

取 3 批样品（批号分别为 20230215，20221208，20221009）各适量，按 2. 3. 2 项下方法制备供试品溶液，按 2. 3. 1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算含量。结果样品中芍药苷的含量分别为 1. 52，1. 58，1. 53 mg / g，丹酚酸 B 的含量分别为 1. 17，1. 18，1. 23 mg / g。

## 3　讨论

### 3. 1　优选工艺考察

以加水量、浸泡时间、煎煮时间为工艺关键参数，以浸膏得率为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选水提取工艺。药材浸泡 1. 0 h 后，第 1 次加 10 倍量水、煎煮 1. 5 h，第 2 次加 8 倍量水、煎煮 1. 0 h。以不同加水量及煎煮时间分组测定样品中芍药苷、丹酚酸 B 的含量，并计算转移率。结果芍药苷、丹酚酸 B 的转移率最高为 86. 32% 和 60. 13%，与工艺优化结果相当，表明优选工艺合理、可行。

### 3. 2　TLC 鉴别

曾考察香附、丹参、当归[14-15]的 TLC 鉴别，但均存在一定阴性干扰，结果不理想，故暂未列入。曾考察不同温度（10，35 ℃），相对湿度（40%，80%），硅胶 G 薄层板（青岛海洋化工有限公司，德国 Merck 公司，规格均为 100 mm × 200 mm）等对待测成分分离度的影响，结果各待测成分均分离良好，无拖尾现象。故最终确定 2. 2 项下 TLC 考察条件。

### 3. 3　含量测定

指标性成分选择：根据加味乳核颗粒的处方组成，针对临床效用，拟设置具有疏肝理气功效的柴胡、青皮及具有活血化瘀功效的丹参、赤芍作为质量标志物。青皮标志物橙皮苷无明显活血化瘀功效及对乳腺的作用[16]，柴胡在 HPLC 中分离度不佳，两者的质量标志物均有待进一步研究。丹参 - 赤芍是临床治疗乳腺疾病的常见药对，且临床疗效确切[17]。丹酚酸 B 具有促进乳腺癌模型小鼠肿瘤血管正常化的作用[18]，芍药苷具有改善小鼠乳腺炎性反应[19]及抑制对人乳腺癌 MCF - 7 细胞的增殖、迁移、侵袭作用[20]，故选择芍药苷和丹酚酸 B 作为含量测定的指标性成分。

提取方法选择：参考文献[21 - 22]，分别考察了不同提取方法（超声提取、加热回流提取），提取溶剂（甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇），提取时间（15，30，60 min）对提取效果的影响。结果综合考虑提取效果与效能，最终确定最优提取方法，提取溶剂为 50% 甲醇 50 mL，超声处理 30 min。

色谱条件选择：曾考察不同柱温（25，30，40 ℃）和流速（0. 8，1. 0 mL / min）条件下芍药苷和丹酚酸 B 的色谱分离效果。结果柱温为 30 ℃，流速为 1. 0 mL / min 时基线平稳，分离效果较好。故确定 2. 3. 1 项下色谱条件。

### 3. 4　方法评价

本研究中优选工艺合理简单、方法稳定可靠，建立的质量标准操作简便、结果准确，可用于加味乳核颗粒的质量控制。

## 参考文献

[1] 中成药治疗乳腺增生症临床应用指南》课题组. 中成药治疗乳腺增生症临床应用指南（2021 年版）[J]. 中国中西医结合外科杂志，2022，28（2）：149 - 157.

[2] 张立双，金鑫瑶，杨丰文，等. 软坚散结中成药治疗乳腺增生症的网状 Meta 分析[J]. 中国中药杂志，2018，43（17）：3562 - 3572.

[3] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省医疗机构制剂规范[M]. 长沙：湖南科学技术出版社，2016：328 - 329.

[4] 伊博文，李梦薇，郑　蕊，等. 辣黄白通便复方颗粒剂处方与生产工艺研究[J]. 中成药，2022，44（9）：2948 - 2953.

[5] 徐　男，王　平，王淑玲，等. 基于 UPLC 特征图谱和 Q - Marker 量值传递评价经典名方半夏白术天麻汤颗粒剂的关键生产工艺[J]. 中草药，2021，52（24）：7455 - 7463.

[6] 吴志生，石涵芬，王　琦，等. QbD 理念的名医名方创研：脱敏定喘颗粒工艺优化研究[J]. 中国中药杂志，2019，44（30）：4322 - 4328.

[7] 吴安超，林咏梅，施娅妮，等. 四黄栓制备工艺和质量标准研究[J]. 中国药业，2022，31（7）：42 - 47.

[8] 严文利，周德勇，龚　韬，等. 儿舒平颗粒制备工艺优选[J]. 中国药业，2022，31（17）：50 - 53.

[9] 亓淑芬，夏红旻，张乐青. 健脾通便合剂质量标准的研究[J]. 食品与药品，2021，23（6）：539 - 542.