

知柏清凉颗粒成型工艺优化及其质量标准建立

余丽宁¹, 黄婷^{1*}, 孙怡婕², 杜若飞³, 陶逸安¹, 曾佳^{1*}

(1. 上海市生物医药技术研究院, 国家卫生健康委员会生育调节药械重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海 200032; 2. 复旦大学附属华东医院, 上海 200040; 3. 上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 优化知柏清凉颗粒成型工艺, 并建立其质量标准。方法 以药辅比、乙醇体积分数、乙醇用量为影响因素, 颗粒得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化成型工艺, 再进行中试试验。TLC 法定性鉴别知母、黄芪、白花蛇舌草, HPLC 法测定盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、异阿魏酸含量。结果 最佳条件为药辅比 1 : 1.1, 乙醇体积分数 65%, 乙醇用量 32.2%, 颗粒得率为 94.14%, 3 批中试样品成品率分别为 82.3%、83.6%、84.7%。TLC 斑点专属性强, 阴性无干扰。3 种成分在各自范围线性关系良好 ($r=1$), 平均加样回收率分别为 100.8%、97.0%、99.0%, RSD 分别为 1.21%、1.51%、2.28%, 3 批中试样品中其平均每袋含量分别为 3.40、12.99、3.86 mg。结论 该方法稳定可行, 可为知柏清凉颗粒后续开发与质量控制提供坚实基础。

关键词: 知柏清凉颗粒; 成型工艺; Box-Behnken 响应面法; 质量标准; 定性鉴别; 含量测定; TLC; HPLC

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)04-1115-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.04.007

Optimization of forming process for Zhibo Qingliang Granules and establishment of their quality standard

YU Li-ning¹, HUANG Ting^{1*}, SUN Yi-jie², DU Ruo-fei³, TAO Yi-an¹, ZENG Jia^{1*}

(1. Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, NHC Key Laboratory of Reproduction Regulation, Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drug and Devices, Shanghai 200032, China; 2. Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; 3. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the forming process for Zhibo Qingliang Granules, and to establish their quality standard. **METHODS** With drug-excipient ratio, ethanol concentration and ethanol consumption as influencing factors, granule yield as an evaluation index, the forming process was optimized by Box-Behnken response surface method, after which pilot test was performed. TLC was adopted in the qualitative identification of *Anemarrhenae Rhizoma*, *Astragali Radix* and *Hedyotis diffusa* Willd., HPLC was employed to determine the contents of phellodendrine hydrochloride, berberine hydrochloride and isoferulic acid. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 1 : 1.1 for drug-excipient ratio, 65% for ethanol concentration, and 32.2% for ethanol consumption, the granule yield was 94.14%, and the yield rates of three batches of pilot samples were 82.3%, 83.6%, 84.7%, respectively. The TLC spots were specific without negative interference. Three constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r=1$), whose average recoveries were 100.8%, 97.0%, 99.0% with the RSDs of 1.21%, 1.51%, 2.28%, whose average contents per bag in three batches of pilot samples were 3.40, 12.99, 3.86 mg, respectively. **CONCLUSION** This stable and feasible method can provide a solid foundation for the further development and quality control of Zhibo Qingliang Granules.

收稿日期: 2025-11-26

基金项目: 上海市科委“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项(23S21901100)

作者简介: 余丽宁(1974—), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为药物质量分析与评价。E-mail: yulining@sibpt.cn

* 通信作者: 黄婷(1983—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为中药新药开发。E-mail: huangting@sibpt.cn

曾佳(1983—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药制剂关键技术及其基础理论。E-mail: zengjia@sibpt.cn

KEY WORDS: Zhibo Qingliang Granules; forming process; Box-Benhnken response surface method; quality standard; qualitative identification; content determination; TLC; HPLC

慢性肾小球肾炎是由多种病因和不同病理类型构成、原发于肾小球的疾病^[1]，也是导致慢性肾功能不全的首要因素^[2]，包括膜性肾病、IgA 肾病等，近年来膜性肾病发病率增长最快，与全球代谢性疾病发生率上升有关^[3]。目前，我国慢性肾病发病率为 8.2%，尿蛋白检出率为 6.7%^[4]，两者发生发展、预后关系密切，故在疾病早期减少和控制尿蛋白是预防慢性肾病进展的关键。

知柏清凉颗粒中知母、黄柏清热燥湿，为君药；黄芪、山药、黑豆补益肺脾肾，为臣药，具有清热利湿、益气扶正功效，用于治疗湿热潴留、正气衰败所致的慢性肾小球肾炎（病理分型为膜性肾病）。研究表明，知母-黄柏药对通过调控炎症反应、氧化应激等通路来发挥肾脏保护作用^[5]，黄芪中黄芪甲苷IV、黄芪多糖通过激活自噬及保护线粒体功能来减轻肾损伤^[6-8]，山药中的熊果苷及黑豆中的大豆苷元、染料木苷通过抗细胞凋亡和抗炎来发挥肾脏保护作用^[9-11]。课题组前期针对 82 例慢性肾小球肾炎患者的临床观察显示^[12]，知柏清凉方联合氯沙坦钾可显著降低尿蛋白定量、Cys-C、血 sFlt-1 水平，改善肾功能。

基于中医药理论及临床经验，知柏清凉颗粒符合 1.1 类中药创新药研发路径^[13]。课题组前期确定知柏清凉颗粒提取、浓缩、干燥等工艺参数，本实验进一步优化该制剂成型工艺，并建立质量标准，以期为其后续稳定性、临床疗效研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器 HLSH2-6A 湿法混合制粒机（北京航空制造工程研究所）；YK-10 摇摆制粒机（上海美阳机械发展有限公司）；GRX6 鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；3 000 L 直筒提取罐、1 500 kg/h 单效外循环浓缩器、1 000 L 球形浓缩罐（上海瑞派机械有限公司）；FZG-15 过热水加热型真空干燥箱（温州市金榜轻工机械有限公司）；30B 万能粉碎机、CT-C-I 型热风循环烘箱、SYH 三维运动混合机（常州范群鼎力化工设备有限公司）；JHZ-400 高效湿法制粒机（温州市健牌药业机械制造有限公司）；YK-160 型摇摆颗粒机（江苏宇通干燥工程有限公司）；PCK-240-2 平封自动包装机（上海众和包装机械有限公司）；XSE205 电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；VOS-

601SD 真空干燥箱（日本 Rikakikai 公司）；R-100 旋转蒸发仪（瑞士 Buchi 公司）；Heraeus Fresco 21 冷冻微量台式离心机（美国赛默飞世尔科技公司）；BL10-300C 超声波清洗仪（功率 200 W，频率 40 kHz，上海比朗仪器有限公司）；Agilent 1260 Infinity II、Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）。

1.2 试剂与药材 黄芪甲苷、知母皂苷 B II、去乙酰车叶草酸甲酯、盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、异阿魏酸对照品（批号 110781-202219、111839-202107、111786-202303、111895-201805、110713-202316、111698-201904），知母、黄芪（蒙古黄芪）、白花蛇舌草对照药材（批号 121070-201806、120974-201813、121183-201605）均购自中国食品药品检定研究院。可溶性淀粉（批号 240506）购自安徽山河药用辅料股份有限公司；无水乙醇（批号 P2911877）购自上海泰坦科技股份有限公司；聚酯/铝/聚乙烯药用复合膜袋（批号 2109074）购自无锡市羊尖华强塑料彩印有限公司。知母、黄柏、车前草、白花蛇舌草（批号 231103、231007、230823、231127）均购自上海康桥药业有限公司；黄芪、山药、黑豆、六月雪、鹿衔草、玉米须、薏苡根、鸭跖草、黄连、积雪草、蚕茧壳、升麻（批号 231229、231107、231014、221007、231107、231110、230626、240118、231110、231007、230715、231115）均购自苏州市春晖堂药业有限公司，经专家鉴定为正品。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 成型工艺优化

2.1.1 提取物制备 按前期优化工艺，取处方药材适量，加水煎煮 2 次，第 1 次加 12 倍量水，第 2 次加 10 倍量水，每次 1 h，过滤，合并滤液，减压浓缩至相对密度为 1.10~1.20（60℃），减压干燥，粉碎，过 80 目筛，即得。

2.1.2 Box-Benhnken 响应面法 前期通过单因素试验确定以可溶性淀粉为辅料，乙醇为黏合剂。本实验在此基础上，以药辅比（A）、乙醇体积分数（B）、乙醇用量（C）为影响因素，颗粒得率（Y）为评价指标，设计三因素三水平^[14-15]优化成型工艺，因素水平见表 1。

表1 Box-Behnken 响应面法因素水平

Tab.1 Factors and levels for Box-Behnken response surface method

A 药辅比	B 乙醇体积分数/%	C 乙醇用量/%
1 : 1.0	60	25.0
1 : 1.4	65	29.2
1 : 1.8	70	33.3

表2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

Tab.2 Design and results for Box-Behnken response surface method

试验号	A 药辅比	B 乙醇体积分数/%	C 乙醇用量/%	制软材和制粒顺畅度	Y 颗粒得率/%
1	1 : 1.0	60	29.2	软材较黏,少量无法通过筛网,可以制粒	90.89
2	1 : 1.8	60	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	81.84
3	1 : 1.0	70	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	94.83
4	1 : 1.8	70	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	79.86
5	1 : 1.0	65	25.0	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	91.66
6	1 : 1.8	65	25.0	软材黏性不足,能完全通过筛网,易于制粒	71.38
7	1 : 1.0	65	33.3	软材稍黏,能完全通过筛网,易于制粒	97.88
8	1 : 1.8	65	33.3	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	82.58
9	1 : 1.4	60	25.0	软材黏性稍不足,能完全通过筛网,易于制粒	85.65
10	1 : 1.4	70	25.0	软材黏性不足,能完全通过筛网,易于制粒	82.08
11	1 : 1.4	60	33.3	软材稍黏,能完全通过筛网,易于制粒	95.21
12	1 : 1.4	70	33.3	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	90.33
13	1 : 1.4	65	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	95.60
14	1 : 1.4	65	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	91.21
15	1 : 1.4	65	29.2	软材黏度适中,能完全通过筛网,易于制粒	88.29

通过 Design Expert 13 软件对表 2 结果进行多元线性拟合分析,得多元二次回归方程为 $Y = 91.70 - 7.45A - 0.8113B + 4.40C - 1.48AB + 1.25AC - 0.3275BC - 3.64A^2 - 1.20B^2 - 2.18C^2$, 相关系数 R^2 为 0.9227, 表明模型能解释 92.27% 的响应值变化, 预测值与实际值具有较好的相关性, 方差分析见表 3。由此可知, 模型 $P < 0.05$, 具有高度显著性; 失拟项 $P > 0.05$, 表明未知因素对结果影响较小; 因素 A、C 具有显著影响 ($P < 0.05$), B、AB、AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 无显著影响 ($P > 0.05$); 各因素影响程度依次为 $A > C > B$ 。

通过 Design Expert 13 软件进行响应面分析, 结果见图 1, 可知药辅比曲面坡度最大, 乙醇用量次之, 乙醇体积分数最小, 表明药辅比对颗粒得率的影响最大, 乙醇用量、乙醇体积分数对其影响较小, 与方差分析一致。最终确定, 最优工艺为药辅比 1 : 1.03, 乙醇体积分数 65.65%, 乙醇用量 32.23%, 颗粒得率为 96.71%, 考虑到可操作性及临床给药剂量, 将其修正为药辅比 1 : 1.1, 乙醇体积分数 65%, 乙醇用量 32.2%。

按上述优化工艺进行 3 批验证试验, 结果见表 4。由此可知, 平均颗粒得率为 94.14%, 与预测

将各因素水平输入 Design-Expert 13 软件中, 得到 15 组试验, 按相应药辅比称取物料, 置于高剪切制粒机中, 加入 12.5% 无水乙醇润湿物料, 再加入相应体积分数乙醇制软材, 置于摇摆制粒机中挤出制粒, 在 60 °C 下干燥 45 min, 整粒, 考察制软材和制粒顺畅度, 计算颗粒得率, 结果见表 2。

表3 方差分析结果

Tab.3 Results for analysis of variance

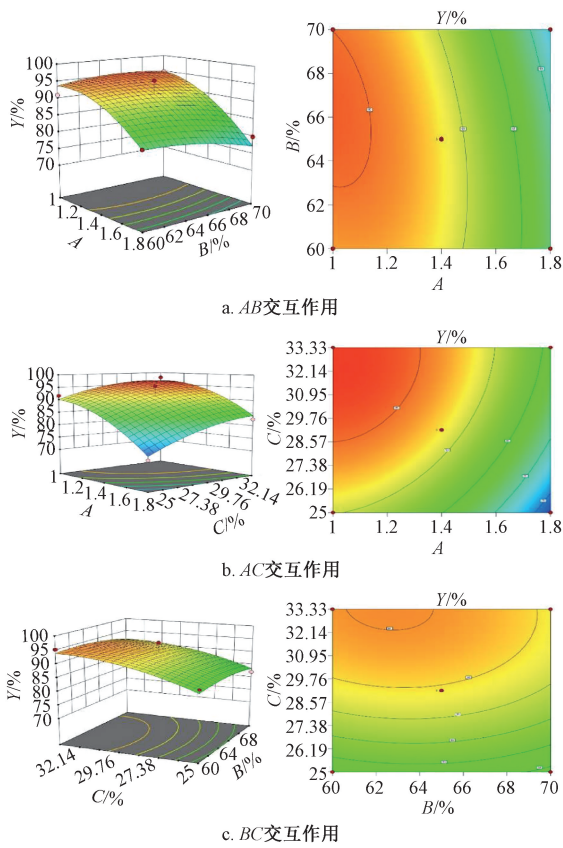
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	684.57	9	76.06	6.63	0.0254
A	444.02	1	444.02	38.71	0.0016
B	5.27	1	5.27	0.4590	0.5281
C	155.14	1	155.14	13.53	0.0143
AB	8.76	1	8.76	0.7639	0.4221
AC	6.20	1	6.20	0.5406	0.4952
BC	0.4290	1	0.4290	0.0374	0.8543
A^2	49.02	1	49.02	4.27	0.0935
B^2	5.33	1	5.33	0.4645	0.5258
C^2	17.57	1	17.57	1.53	0.2708
残差	57.35	5	11.47	—	—
失拟项	30.27	3	10.09	0.7452	0.6165
纯误差	27.08	2	13.54	—	—
总离差	741.91	14	—	—	—

值 96.71% 接近, 并且溶化时间、水分均符合相关质量要求, 表明该工艺稳定可行。

表4 验证试验结果 (n=3)

Tab.4 Results for verification tests (n=3)

试验号	颗粒得率/%	溶化时间/s	水分/%
1	97.18	70	6.46
2	91.53	71	5.81
3	93.71	74	5.25
平均值	94.14	72	5.84



注：A、B、C、Y分别为药辅比、乙醇体积分数、乙醇用量、颗粒得率。

图1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

2.2 中试试验 为了确认成型工艺的放大效果，进行3批中试试验，每批投料量20 kg，成品采用聚酯/铝/聚乙烯复合膜包装，每袋20 g，结果见表5。由此可知，该工艺具有良好的稳定性与可重复性，能满足规模化生产要求。

表5 中试试验结果 (n=3)

Tab. 5 Results for pilot tests (n=3)

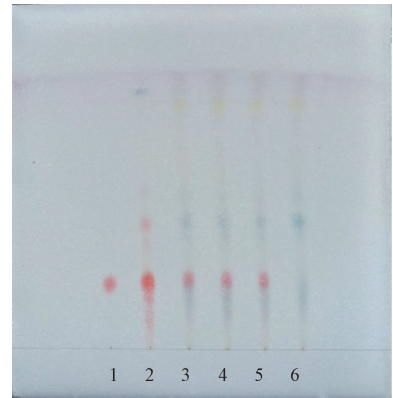
生产数据	批号		
	2409101	2409102	2409103
提取物用量/kg	8.08	8.57	9.20
可溶性淀粉用量/kg	11.92	11.43	10.80
无水乙醇用量/kg	1.98	1.98	1.98
65%乙醇用量/kg	5.42	5.43	5.41
颗粒得量/kg	17.01	17.23	17.44
收率/%	85.0	86.2	87.2
袋数/袋	823	836	847
成品率/%	82.3	83.6	84.7

2.3 质量标准建立

2.3.1 TLC定性鉴别

2.3.1.1 知母 取本品粉末3 g，加入10 mL甲醇超声处理15 min，过滤，滤液蒸干，加入2 mL甲

醇溶解，作为供试品溶液；除去知母，按处方制成阴性样品，同法制备阴性样品溶液；取知母对照药材0.5 g，同法制备对照药材溶液；取知母皂苷BII对照品适量，甲醇制成1 mg/mL对照品溶液。参照2025年版《中国药典》四部通则0502^[16]，吸取上述溶液各5 μL，点于同一硅胶G薄层板上，以氯仿-甲醇-甲酸-水(8:3:0.2:0.3)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以含5%对二甲氨基苯甲醛的10%硫酸溶液，90℃加热放置10 min至斑点显色清晰，在日光下检视，结果见图2。由此可知，3批中试样品在对照药材、对照品相应位置上显示相同的红色斑点，阴性无干扰。



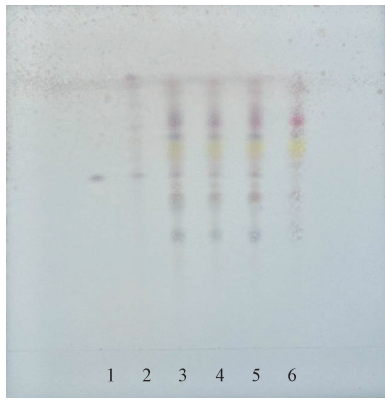
注：1~6分别为知母皂苷BII对照品、知母对照药材、供试品(批号2409101、2409102、2409103)、缺知母阴性样品。

图2 知母TLC色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Anemarrhena Rhizoma*

2.3.1.2 黄芪 取本品粉末6 g，加入20 mL甲醇超声提取30 min，过滤，滤液蒸干，残渣加入30 mL水溶解，水饱和正丁醇萃取2次，每次20 mL，合并正丁醇液，氨试液洗涤2次，每次20 mL，静置分层，正丁醇液蒸干，残渣加入1 mL甲醇溶解，作为供试品溶液；除去黄芪，按处方制成阴性样品，同法制备阴性样品溶液；取黄芪对照药材1 g，同法制备对照药材溶液；取黄芪甲苷对照品适量，甲醇制成1 mg/mL对照品溶液。参照2025年版《中国药典》四部通则0502^[16]，吸取对照品溶液5 μL，对照药材、供试品、阴性样品溶液各10 μL，点于同一硅胶G薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)下层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，105℃加热至斑点显色清晰^[17]，在日光下检视，结果见图3。由此可知，3批中试样品在对照药材、对照品相应位置上显示相同颜色的斑点，阴性无干扰。

2.3.1.3 白花蛇舌草 取本品粉末10 g，加入



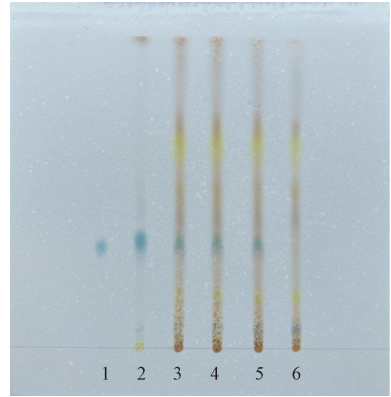
注：1~6 分别为黄芪甲苷对照品、黄芪对照药材、供试品（批号 2409101、2409102、2409103）、缺黄芪阴性样品。

图 3 黄芪薄层色谱图

Fig. 3 TLC chromatogram of *Astragali Radix*

20 mL 甲醇超声处理 30 min，过滤，滤液蒸干，残渣加入 10 mL 水溶解，水饱和正丁醇振摇提取 2 次，每次 10 mL，合并正丁醇液，蒸干，残渣加入 1 mL 甲醇溶解，作为供试品溶液；除去白花蛇舌草，按处方制成阴性样品，同法制备阴性样品溶液；取白花蛇舌草对照药材 2 g，同法制备对照药材溶液；取去乙酰车叶草酸甲酯对照品适量，乙醇制成 1 mg/mL 对照品溶液。参照 2025 年版《中国药典》四部通则 0502^[16]，吸取对照品、对照药材溶液各 5 μ L，供试品、阴性样品溶液各 25 μ L，点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-乙醇-浓氨试

液（7.5 : 7.5 : 1）为展开剂，置于氨蒸气预饱和 15 min 的展开缸中展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰^[18]，在日光下检视，结果见图 4。由此可知，3 批中试样品在对照药材、对照品相应位置上显示相同的蓝绿色斑点，阴性无干扰。



注：1~6 分别为去乙酰车叶草酸甲酯对照品、白花蛇舌草对照药材、供试品（批号 2409101、2409102、2409103）、缺白花蛇舌草阴性样品。

图 4 白花蛇舌草 TLC 色谱图

Fig. 4 TLC chromatogram of *Hedyotis diffusa* Willd.

2.3.2 质量检查 参照 2025 年版《中国药典》四部制剂通则 0104^[16]，对 3 批中试样品水分、粒度、溶化性、装量差异进行检查；参照 2025 年版《中国药典》四部通则 1105、1106^[16]，对其微生物限度进行检查，结果见表 6，可知均符合规定。

表 6 质量检查结果

Tab. 6 Results for quality inspection

批号	水分/%	粒度/%	溶化性	装量差异	需氧菌总数/(cfu·g ⁻¹)	霉菌和酵母菌总数/(cfu·g ⁻¹)	大肠埃希菌
2409101	2.32	8.96	符合规定	符合规定	10	20	未检出
2409102	3.33	5.61	符合规定	符合规定	15	<10	未检出
2409103	3.35	6.37	符合规定	符合规定	5	5	未检出

2.3.3 含量测定

2.3.3.1 盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱 采用 HPLC 法。

色谱条件：Shim-pack VP-ODS 色谱柱（250 mm，4.6 mm \times 5 μ m）；流动相 0.2% 醋酸（每 1 000 mL 含 1 g 十二烷基磺酸钠）（A）-乙腈（B），梯度洗脱，程序见表 7；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 $^{\circ}$ C；检测波长 284 nm；进样量 10 μ L。

对照品溶液制备：取盐酸黄柏碱对照品约 20 mg，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声溶解，放冷，甲醇稀释至刻度，摇匀，作为储备液 I；取盐酸小檗碱对照品约 25 mg，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声溶解，放冷，甲醇稀释至刻度，摇匀，作为储备液 II，分别精密吸

表 7 盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱梯度洗脱程序

Tab. 7 Gradient elution programs for phellodendrine chloride and berberine hydrochloride

时间/min	A 0.2% 醋酸(每 1 000 mL 含 1 g 十二烷基磺酸钠)/%	B 乙腈/%
0~5	85	15
5~40	85~50	15~50
40~50	50	50
50~51	50~85	50~15

取储备液 I 1 mL、储备液 II 3 mL，置于同一 50 mL 量瓶中，甲醇稀释成每 1 mL 分别含盐酸黄柏碱 7.27 μ g、盐酸小檗碱 29.89 μ g 的溶液，即得。

供试品溶液制备：取本品粉末约 2.0 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL

甲醇，称定质量，超声提取 45 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，离心，取上清液，即得。

阴性样品溶液制备：按处方分别制成缺黄柏、缺黄连、缺黄柏和黄连的阴性样品，同供试品溶液制备方法制备，即得。

专属性试验：取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在上述色谱条件下进样测定，结果见图 5。由此可知，盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱保留时间分别为 35.0、43.0 min，供试品、对照品溶液保留时间一致，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

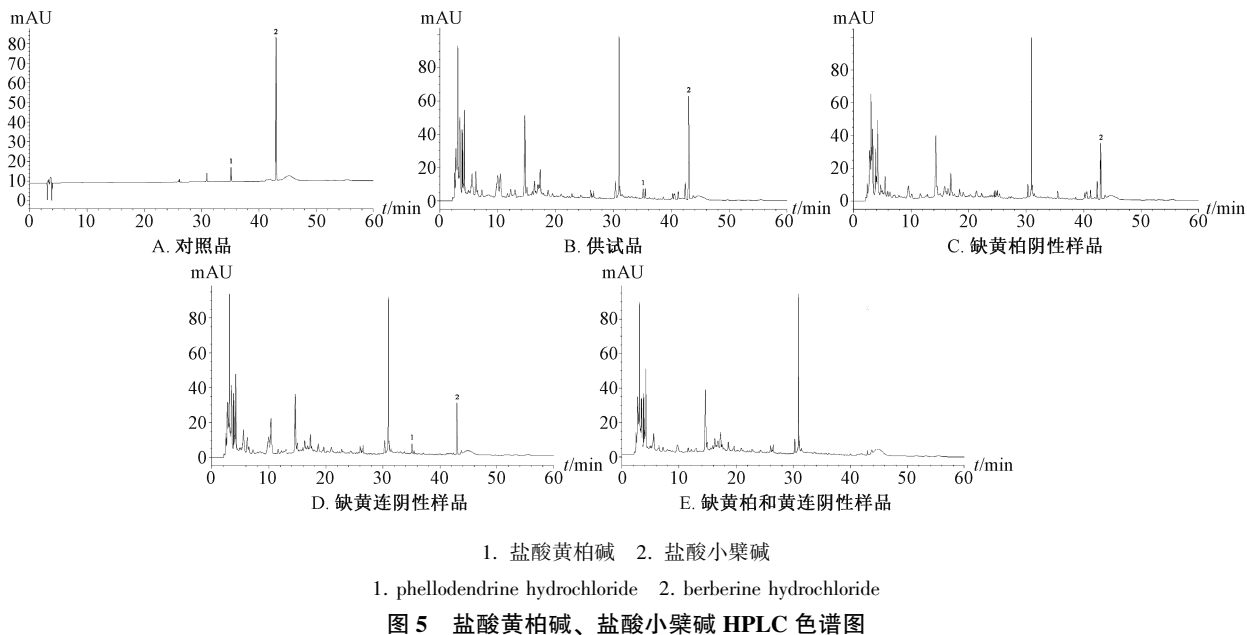


图 5 盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of phellodendrine hydrochloride and berberine hydrochloride

线性关系考察：精密吸取储备液 I ~ II 适量，甲醇稀释成盐酸黄柏碱质量浓度分别为 1.45、2.91、7.27、14.54、36.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，盐酸小檗碱质量浓度分别为 5.98、11.96、29.89、59.78、149.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液，在上述色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱回归方程分别为 $Y = 7.423 5X - 0.127 9$ ($r = 1$)、 $Y = 18.277X + 1.831 2$ ($r = 1$)，分别在 1.45~36.35、5.98~149.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

精密度试验：取供试品溶液适量，在上述色谱条件下进样测定，测得盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别为 0.17%、0.39%，表明仪器精密程度良好。

重复性试验：取本品粉末约 2.0 g，共 6 份，精密称定，制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，测得盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱含量 RSD 分别为 0.31%、0.35%，表明该方法重复性良好。

稳定性试验：取供试品溶液适量，于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 在上述色谱条件下进样测定，测得盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别为 0.96%、1.19%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

加样回收率试验：取各成分含量已知的本品粉末约 1.0 g，共 9 份，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，每 3 份分别精密加入 363.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸黄柏碱储备液 0.32、0.40、0.48 mL，以及 498.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸小檗碱储备液 1.2、1.5、1.8 mL，制备低、中、高水平供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，盐酸黄柏碱回收率分别为 100.8%、100.8%、100.7%，RSD 分别为 0.86%、1.98%、1.07%，平均加样回收率为 100.8%，RSD 为 1.21%；盐酸小檗碱加样回收率分别为 97.3%、96.8%、96.9%，RSD 分别为 1.39%、2.25%、1.36%，平均回收率为 97.0%，RSD 为 1.51%。

中试样品含量测定：取 3 批中试样品，制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 8。

2.3.3.2 异阿魏酸 采用 HPLC 法。

色谱条件：ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 (250 mm, 4.6 mm \times 5 μm)；流动相 0.05% 磷酸 (A) -乙腈 (B)，梯度洗脱，程序见表 9；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 320 nm；进样量 10 μL 。

表 8 盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱含量测定结果

Tab. 8 Results for content determination of phellodendrine hydrochloride and berberine hydrochloride

批号	盐酸黄柏碱		盐酸小檗碱	
	含量/ (mg·g ⁻¹)	含量/ (mg·袋 ⁻¹)	含量/ (mg·g ⁻¹)	含量/ (mg·袋 ⁻¹)
2409101	0.15	3.09	0.53	10.63
2409102	0.17	3.37	0.68	13.64
2409103	0.19	3.75	0.73	14.69
平均值	0.17	3.40	0.65	12.99

表 9 异阿魏酸梯度洗脱程序

Tab. 9 Gradient elution programs for isoferulic acid

时间/min	A 0.05% 磷酸/%	B 乙腈/%
0~20	86.3	13.7
20~30	86.3~80	13.7~20
30~31	80~20	20~80
31~37	20	80
37~38	20~86.3	80~13.7

对照品溶液制备：取异阿魏酸对照品约 10 mg，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声溶解，放冷，甲醇稀释至刻度，摇匀，作为储备液。精密吸取 2 mL，置于 25 mL 量瓶中，60% 甲醇稀释成每 1 mL 含 21.69 μg 异阿魏酸的溶液，即得。

供试品溶液制备：取本品粉末约 2.0 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 60% 甲醇，称定质量，超声提取 30 min，放冷，60% 甲醇补足减失的质量，摇匀，离心，取上清液，即得。

阴性样品溶液制备：按处方制备缺升麻的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备，即得。

专属性试验：取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在上述色谱条件下进样测定，结果见图 6。由此可知，异阿魏酸保留时间为 24.7 min，供试品、对照品溶液保留时间一致，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

线性关系考察：精密吸取储备液适量，60% 甲醇稀释成异阿魏酸质量浓度分别为 5.42、10.84、21.69、43.37、86.75 μg/mL 的溶液，在上述色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得异阿魏酸方程为 $Y = 50.337X + 2.5938$ ($r = 1$)，在 5.42 ~ 86.75 μg/mL 范围内线性关系良好。

精密度试验：取供试品溶液适量，在上述色谱条件下进样测定 6 次，测得异阿魏酸峰面积 RSD 为 1.87%，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取本品粉末约 2.0 g，精密称定，

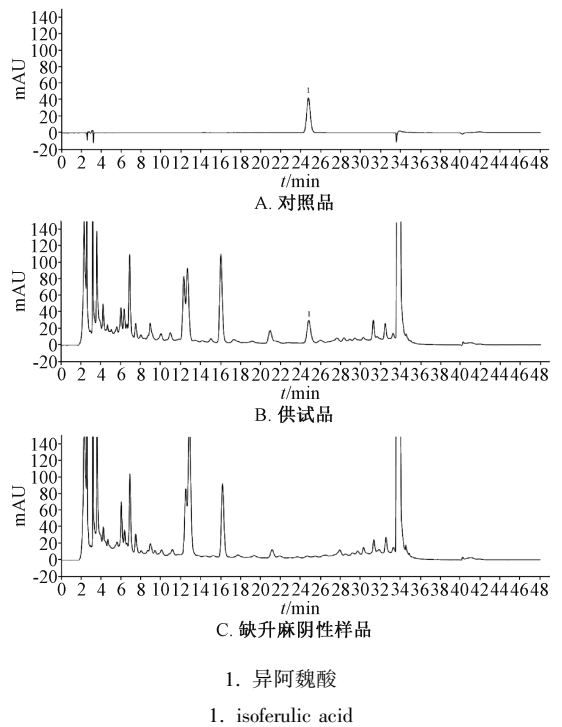


图 6 异阿魏酸 HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of isoferulic acid

共 6 份，制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，测得异阿魏酸含量 RSD 为 0.26%，表明该方法重复性良好。

稳定性试验：取供试品溶液适量，于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 在上述色谱条件下进样测定，测得异阿魏酸峰面积 RSD 为 0.59%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

加样回收率试验：取异阿魏酸含量已知的本品粉末约 1.0 g，精密称定，共 9 份，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，每 3 份分别精密加入 271.09 μg/mL 储备液 0.8、1.0、1.2 mL，制备低、中、高水平供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，异阿魏酸回收率分别为 100.9%、98.8%、97.3%，RSD 分别为 2.91%、0.86%、1.16%，平均加样回收率为 99.0%，RSD 为 2.28%。

中试样品含量测定：取 3 批中试样品，制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 10。

表 10 异阿魏酸含量测定结果

Tab. 10 Results for content determination of isoferulic acid

批号	含量/(mg·g ⁻¹)	含量/(mg·袋 ⁻¹)
2409101	0.17	3.45
2409102	0.19	3.89
2409103	0.21	4.23
平均值	0.19	3.86

3 讨论

3.1 成型工艺研究 预实验采用30%~95%乙醇作为粘合剂时,均出现物料迅速结块、明显粘壁的现象,说明仅调整乙醇体积分数无法顺利制粒,这与物料疏水表面及多孔结构有关,导致润湿不完全,形成三相界面缺陷^[19]。因此,本实验引入“预润湿”策略,即先采用无水乙醇降低物料表面张力,再以中等体积分数乙醇进行制粒,有效提高了制粒顺畅度与颗粒得率。

3.2 TLC鉴别 鉴别知母时,首先采用正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5)上层展开系统,发现存在阴性干扰;改用氯仿-甲醇-甲酸-水(8.5:3:0.2:0.3)后斑点清晰,阴性无干扰。鉴别黄芪时,首先将供试品溶液直接点样,发现存在阴性干扰,而经水饱和和正丁醇萃取、氨试液洗涤纯化后分离效果良好,专属性符合要求。鉴别白花蛇舌草时,分别考察了石油醚(30~60℃)-甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(20:40:14:1)、乙酸乙酯-甲醇-水(8:2:1)展开系统,最终确定为先用水饱和和正丁醇萃取样品,再以三氯甲烷-乙醇-浓氨(7.5:7.5:1)展开,此时斑点清晰,阴性无干扰。

3.3 含量测定分析 针对盐酸黄柏碱与盐酸小檗碱在常规反相色谱中保留弱、峰形拖尾的问题,本实验在流动相中加入离子对试剂十二烷基磺酸钠以增强保留,改善峰形。然后,分别考察了乙腈-0.1%磷酸(含0.1%十二烷基磺酸钠)、乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(含0.4%十二烷基磺酸钠,pH=4.0)、乙腈-0.2%醋酸(含0.1%十二烷基磺酸钠)流动相,最终确定为在梯度洗脱条件下采用乙腈-0.2%醋酸(含0.1%十二烷基磺酸钠),此时各成分色谱峰峰形对称,分离效果理想。

4 结论

知柏清凉颗粒最优成型工艺为药辅比1:1.1,乙醇体积分数65%,乙醇用量32.2%。中试试验显示,上述优化工艺稳定,可重复,能满足规模化生产要求。另外,知母、黄芪、白花蛇舌草TLC鉴别方法专属性强,重复性好,结果稳定可靠;盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、异阿魏酸含量测定方法专属性良好,方法学考察结果均符合相关要求,能有效监控该制剂质量。综上所述,本实验为知柏清凉颗粒质量评价提供了科学依据。

参考文献:

[1] Ellison B, Cader R, Willcocks L. Advances in primary glomerulonephritis[J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2024, 85(7): 1-11.
[2] 刘虹,彭佑铭,李娟,等. 3547例慢性肾脏病患者分期及相关因素分析[J]. *中南大学学报(医学版)* 2010, 35(5):

499-510.
[3] 谢志勇,李志莲,董伟,等. 慢性肾小球疾病谱演变和膜性肾病流行病学特点[J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(7): 471-476; 492.
[4] Wang L M, Xu X, Zhang M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: Results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance[J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183(4): 298-310.
[5] Guo X Y, Wu Y, Zhang C F, et al. Network pharmacology analysis of ZiShenWan for diabetic nephropathy and experimental verification of its anti-inflammatory mechanism[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2021, 15: 1577-1594.
[6] Tang J L, Xin M, Zhang L C. Protective effect of *Astragalus membranaceus* and astragaloside IV in sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(14): 5855-5877.
[7] Lu R R, Chen J Q, Liu B H, et al. Protective role of Astragaloside IV in chronic glomerulonephritis by activating autophagy through PI3K/AKT/AS160 pathway[J]. *Phyto Res*, 2020, 34(12): 3236-3248.
[8] Ma Q, Xu Y, Tang L M, et al. *Astragalus* polysaccharide attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing oxidative damage and mitochondrial dysfunction[J]. *Biomed Res Inter*, 2020, 2020: 1-12.
[9] Zhang B B, Zeng M N, Li B K, et al. Arbutin attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and apoptosis via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153466.
[10] 张贝贝,曾梦楠,贾菊芳,等. 山药中熊果苷通过ERβ抑制LPS诱导NRK-52e细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(3): 403-410.
[11] Widowati W, Prahastuti S, Hidayat M, et al. Detam 1 black soybean against cisplatin-induced acute renal failure on rat model via antioxidant, antiinflammatory and antiapoptosis potential[J]. *J Tradit Compl Med* 2022, 12(4): 426-435.
[12] 孙怡婕,肖婧,张栩. 知柏清凉方对老年慢性肾小球肾炎患者尿蛋白定量、CysC及血sFlt-1的影响[J]. *老年医学与保健*, 2019, 25(3): 306-310.
[13] 国家药品监督管理局. 中药注册分类及申报资料要求[S]. 2020.
[14] Kenekar V V, Ghugare S B, Patil-Shinde V. Multi-objective optimization of high-shear wet granulation process for better granule properties and fluidized bed drying characteristics[J]. *Powder Technol*, 2023, 420: 118373.
[15] Kim J Y, Chun M H, Choi D H. Control strategy for process development of high-shear wet granulation and roller compaction to prepare a combination drug using integrated quality by design[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(1): 80.
[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2025年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
[17] 陈平,米完完,应园园,等. 复方健肾颗粒的质量控制研究[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(36): 37-43; 169.
[18] 广东省药品监督管理局. 广东省中药配方颗粒质量标准[S]. 2021.
[19] Yonemoto Y, Tomimitsu I, Shimizu K, et al. Wettability model for water-ethanol binary mixture droplet on roughened low-surface-energy solids[J]. *Int J Multiphas Flow*, 2021, 137: 103569.