

HPLC法测定肝肾颗粒中甜菜碱含量方法研究

赵粉荣^{1,2}, 王宇^{3*}, 宋宏春², 李永刚¹, 刘斌¹

1. 内蒙古大唐药业股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010000

2. 内蒙古盛唐国际蒙医药研究院(有限公司), 内蒙古 呼和浩特 010000

3. 内蒙古自治区药品检查中心, 内蒙古 呼和浩特 010000

DOI:10.61369/MRP.2025120028

摘要: 目的: 肝肾滋改剂型产品肝肾颗粒中甜菜碱的测定方法, 以保证剂改后药品质量依然可控。方法: 采用 HPLC 法测定产品中甜菜碱的含量, 高效液相色谱仪(蒸发光散射检测器 ELSD6000, 雾化器温度 77°C, 气体流速 2.0 mL/min)。流动相为乙腈-水(85:15)。结果: 甜菜碱进样量在 0.0983~1.9678 mg 范围内呈良好的线性关系($R=0.997$, $n=6$); 平均加样回收率为 102.7%。对 5 批样品中甜菜碱的含量进行测定, 结果为 5.35mg/g 以上。结论: 该测定方法简单、高效、准确、快速, 可用于该产品的质量标准提升。

关键词: 肝肾颗粒; 甜菜碱; 含量测定

Methodological Study on the Determination of Betaine Content in Ganshen Granules by HPLC

Zhao Fenrong^{1,2}, Wang Yu^{3*}, Song Hongchun², Li Yonggang¹, Liu Bin¹

1. Inner Mongolia Datang Pharmaceutical Co., LTD., Hohhot, Inner Mongolia 010000

2. Inner Mongolia Shengtang International Mongolian Medicine Research Institute (Co., LTD.), Hohhot, Inner Mongolia 010000

3. Inner Mongolia Autonomous Region Drug Inspection Center, Hohhot, Inner Mongolia 010000

Abstract: Objective: To establish a content determination method for Ganshen granules to improve the quality standard of the preparation. Methods: HPLC was used to determine the content of Betaine in the preparation. The chromatographic was SPD-M40, The nebulizer temperature of the evapor light scattering detector was 77°C, and the gas flow rate was 2.0 mL/min. The mobile phase was Ethanol-water (85:15). Results: The content of Betaine was determined to be 0.0983~1.9678 mg. The linear relationship between the concentration range of 0.03~1.00 mg/mL and the peak area was good ($r=0.9997$, $n=6$); the average recovery rate was 102.7%. The content of Betaine in 5 batches of samples was determined to be 5.35mg/g. Conclusion: This method is simple to operate, the results are stable and reliable, and the specificity and repeatability are good. It can be used to improve the quality standard of Ganshen granules.

Keywords: ganshen granules; betaine; content determination

肝肾颗粒是一种专门针对肝肾滋补的药物, 具有养肝明目、滋阴补肾的效果, 适用于肾阴不足、气血不足、视力模糊、心烦失眠、四肢无力及腰酸腿软等症状。其配方由枸杞子、黄芪、党参、麦冬和阿胶五种药材组成。枸杞为肝肾颗粒处方中的主药, 其中甜菜碱是枸杞子中主要指标成分, 在人体内的功能主要是提供活性甲基, 并具有加快脂肪代谢、降血压^[1]、防止肝损伤^[2]和抗肿瘤^[3]等作用。甜菜碱含量测定项研究, 对其投料量及投料原料药质量进行控制具有重要意义^[4]。

一、仪器与试剂

(一) 仪器

日本岛津 SPD-M40 型高效液相色谱仪(蒸发光散射检测

器 ELSD6000); Sartorius D09-09-015 MSX(SA EA) 电子天平; Sartorius MSE6.6S-000-DM 电子天平; XSR2050DU 电子天平。旋转蒸发仪(型号: RE-52AA), FW400A 型万能粉碎机(设备编号: DT2006024), 电热鼓风干燥箱(设备编号:

基金资助: 国家科技部项目(项目编号: 2022YFC3500301)。

作者简介: 赵粉荣(1980—), 女, 汉族, 内蒙古乌兰察布人, 硕士研究生, 研究方向为中蒙药二次开发。

通讯作者: 王宇(1981—), 男, 蒙古族, 内蒙古阿鲁科尔沁旗人, 本科学历, 研究方向为药品工艺、质量标准检查。

DT2006010)

(二) 试剂与试药

甜菜碱对照品；色谱纯乙腈，超纯水。肝肾颗粒样品来源于内蒙古大唐药业股份有限公司。

二、方法与结果

(一) 色谱条件

色谱柱：Waters XBridge™ HILIC柱（250×4.6mm 5μm）；流动相：乙腈-水（85:15）；蒸发光检测器雾化器温度77℃；气体流速2.0 mL/min；进样体积10μL。理论板数按甜菜碱峰计应不低于3000。

(二) 正交试验优选提取工艺

根据预实验的结果，选定对提取工艺产生影响的因素，包括小柱品牌（A）、除杂体积（B）、洗脱体积（C）以及超声时间（D），并以甜菜碱的含量作为提取工艺的评价标准。优化提取工艺正交试验因素与水平见表1，实验结果见表2。

表1 因素水平表

水平	因素			
	A 小柱品牌	B 除杂体积 (mL)	C 洗脱体积 (mL)	D 超声时间 (min)
1	Pribolab	5	5	10
2	Agela	10	10	30
3	Supelco	15	15	60

表2 正交实验结果

序号	因素				甜菜碱量 (mg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.196
2	1	2	2	2	0.233
3	1	3	3	3	0.221
4	2	1	2	1	0.239
5	2	2	3	3	0.237
6	2	3	1	2	0.183
7	3	1	3	2	0.201
8	3	2	1	3	0.157
9	3	3	2	1	0.204

正交实验结果直观分析表明，最佳处理条件为超声处理10min，Agela品牌固相萃取小柱处理样品（小柱提前活化：10mL纯化水分5次洗柱子，15mL甲醇分5次洗柱子，最后保留1mL溶液于柱内），5mL甲醇除杂，10mL水洗脱。按最佳工艺提取条件A₂B₁C₂D₁重复提取进行条件验证，结果表明该工艺提取效果良好，工艺条件稳定可行。

(三) 溶液制备

1. 对照品溶液的制备

精密称定甜菜碱对照品，用超纯水溶解并定容，配制浓度为100ug/mL的对照溶液。

2. 供试品溶液的制备

取经过干燥恒重、研细、混匀的样品约1g，精密称定，置100mL具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25ml，密塞，称定重量，

超声处理10分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，充分摇匀后，置离心管中5000转离心，精密吸取上清液2ml，转移于活化后的Florisil固相萃取柱（规格为1000mg/6ml，活化方法：先用水10ml、再用甲醇15ml分次缓慢洗脱）上，随后用5ml甲醇淋洗并弃去流出液，排干残留甲醇后，再以10ml水洗脱，收集洗脱液至10ml量瓶，定容后滤过，取续滤液，即得。

3. 阴性样品溶液的制备

根据处方的比例称取除枸杞子以外的其它药材，依照产品工艺制作阴性样品，并根据供试品溶液的制备方法制备阴性对照样品溶液。

(四) 方法学考察

1. 系统适用性与专属性考察

准确量取2.3项下的三种溶液各10μL进行液相色谱分析。结果显示，肝肾颗粒供试品溶液色谱峰中出的特征峰与甜菜碱对照品色谱峰保留时间吻合；而阴性对照溶液未出现该特征峰，结果表明，处方中其他成分对甜菜碱的检测无显著干扰。结果见图1-3所示。

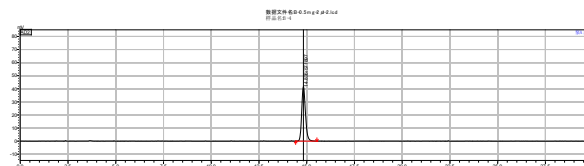


图1 甜菜碱对照品色谱峰图

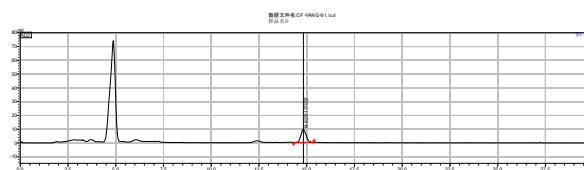


图2 样品中甜菜碱色谱峰图

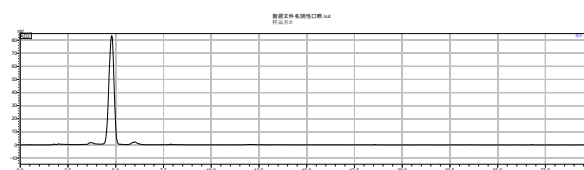


图3 阴性样品色谱峰图

2. 线性关系考察

称取甜菜碱9.989 mg（纯度为98.5%）加水使溶解，配置成系列溶液，各取2μL进样分析，以峰面积（Y）对进样量的对数（X）进行线性拟合，得到回归方程为： $Y = 1.3173x - 14.2547$ （ $R^2 = 0.995$, $n=6$ ），结果表明，甜菜碱在0.0983-1.9678 mg范围呈现良好的线性关系。

3. 精密度试验

对甜菜碱对照品溶液进行6次平行测定，测得峰面积的相对标准偏差（RSD）=0.81%（ $n=6$ ），表明所使用的高效液相色谱仪器精度良好。

4. 重复性试验

采用相同批号样品，按照2.3.2方法平行制备6份并进行色谱分析。结果显示，6份测定结果的相对标准偏差（RSD）为0.96%

(n=6), 表明该方法具有良好的重复性。

5. 稳定性试验

取供试品溶液于不同时间点0、2、4、8、12、18、24小时进行色谱分析。结果表明, 肝肾颗粒样品中的甜菜碱在24h内保持稳定。

6. 加样回收试验

精密称取9份同批次供试品, 按取样量计算本底含量后, 分别定量添加甜菜碱对照品, 依照2.3.2方法制备样品溶液并测定。结果见表3。

表3 甜菜碱加样回收试验

序号	取样量 (g)	加入量 (mg)	总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	0.512	0.987	3.937	118.1	
2	0.521	0.987	3.937	113.6	
3	0.504	0.987	3.875	116.4	
4	0.506	2.962	5.601	96.7	
5	0.506	2.962	5.602	96.7	102.7
6	0.505	2.962	5.775	102.7	
7	0.495	4.937	7.025	88.0	
8	0.504	4.937	7.462	95.9	
9	0.504	4.937	7.475	96.2	

7. 耐用性试验

为验证方法耐用性, 本研究考察了不同品牌/型号色谱柱对测定结果的影响。如表4所示, 四种色谱柱分析同一供试品溶液, 表明色谱柱的更换对测定结果无显著影响 ($p > 0.05$)。

表4 不同色谱柱的耐用性试验

序号	仪器型号	柱型号	测得平均含量 (mg/g)
1		Waters XBridge™ HILIC 250 × 4.6mm5 μm	5.39
2	岛津 SPD-M40 型高效液相色谱仪 (蒸发光 散射检测器 ELSD6000)	Supelco Ascentis Express 90A HILIC 250 × 4.6mm5 μm	5.85
3		YMC-Triart Diol-HILIC 250 × 4.6mm5 μm	5.94
4		SHIMADZU Shim-pack GIS HILIC250 × 4.6mm5 μm	5.83

8. 样品含量测定

依法取5批样品进行含量测定, 测定结果见表5。

表5 甜菜碱含量测定结果

序号	取样量 (g)	含量 (mg/g)
1	1.0043	5.38
2	1.0013	5.39
3	1.0021	5.41
4	1.0012	5.35
5	1.0002	5.40

三、讨论

肝肾颗粒为内蒙古大唐药业股份有限公司独家产品, 在滋补肝肾方面临床效果显著, 但其质量标准中甜菜碱检测方法存在一些问题如水平较低、方法相对落后等问题。因此, 对其进行质量标准研究是必要的。甜菜碱的含量是衡量枸杞质量优劣的重要指标, 为提升产品质量, 公司考察不同地区枸杞中甜菜碱的含量, 并选择最优药材投入用药。甜菜碱常用测定方法均具有各自的优缺点。本实验通过选择高效液相色谱法测定甜菜碱含量替代原质量标准中薄层色谱法测定甜菜碱含量方法, 可以显著提高肝肾颗粒的质量控制水平, 确保其临床用药的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 周芹, 吴玉梅. 亲水性液相色谱串联质谱法测定红甜菜中甜菜碱含量 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(7): 134-138.
- [2] DAY C R, KEMPSON S A. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2016, 1860 (6): 1098-1106.
- [3] HONG Z F, LIN M G, ZHANG Y M, et al. Role of betaine in inhibiting the induction of RNA Pol gene transcription and cell growth caused by alcohol [J]. Chemico-Biological Interactions, 2020(325): 109-129.
- [4] 国家药典委员会. 《中国药典》2020年版 [M]. 一部, 中国医药科技出版社, 260.