

发明名称: 一种贯众与贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的特征图谱构建方法

[0001] 本申请要求于2023年09月7日提交中国专利局、申请号为202311154624.4、发明名称为“一种贯众与贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的标准汤剂特征图谱方法及鉴别”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及分析检测技术领域，尤其是涉及一种贯众与贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的标准汤剂特征图谱方法及鉴别。

背景技术

[0003] 贯众为乌毛蕨科植物单牙狗脊*Woodwardiaunigemmata*(Makino.)Nakai.的干燥根状茎，习称“狗脊贯众”，春秋两季采挖，削去叶柄，除去须根及泥土，洗净，晒干；或趁鲜切片，晒干。具有清热解毒，止血，敛疮生肌的功效。贯众标准汤剂是由药材经炮制后按固定的制备工艺而成的冻干粉；贯众配方颗粒是贯众药材经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。贯众为较常用中药，入药始载于《神农本草经》，具有清热解毒、驱虫等功效。历代本草所记载的贯众形态、生境、产地表明，贯众原植物品种甚多。文献记载我国曾用作贯众的原植物多达11科18属58种。艾铁民等调查结果表明，80年代有27种植物被用作贯众的药源植物。《中药大辞典》中记载贯众的原植物有7种，杨纯瑜等通过调查整理出贯众原植物达到38种，其中18种广泛作为贯众收购入药。甚至《中国药典》对贯众原植物的规定也有过多次变动，1977年版收载绵马贯众和紫萁贯众2种，1995年版后仅收录绵马贯众一种，2010年版开始又增加紫萁贯众。可见，贯众类药材极为复杂。

[0004] 贯众炭为贯众药材照清炒法(通则0213)炒至外表面黑色，内部褐色；增强止血功效。贯众炭标准汤剂是由药材经炮制后按固定的制备工艺而成的冻干粉；贯

炭众配方颗粒是贯众药材经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。为了确保贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒质量的均一、稳定。

[0005] 因此建立一种新的特征图谱方法对贯众炭质量进行控制；并能将贯众炭与贯众及其制剂进行明显的鉴别。

[0006] 发明内容

[0007] 有鉴于此，本发明要解决的技术问题在于提供一种贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱构建方法，本发明构建的贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱方法稳定，可靠，可以对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的质量进行控制。

[0008] 一种贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱构建方法，包括：

[0009] A)将贯众炭原料采用溶剂溶解，得到待测液；

[0010] B)将待测液采用高效液相色谱法测定，得到贯众炭原料的UPLC特征图谱；

[0011] 所述高效液相色谱法色谱条件为：色谱柱为C18柱；流动相A为乙腈，流动相B为0.1%甲酸，梯度洗脱。

[0012] 本发明提供的一种贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱构建方法首先取贯众炭原料，溶剂溶解，得到待测液。所述溶剂优选为70%甲醇。

[0013] 本发明采用上述提取溶剂色谱峰信息量大，效果好。

[0014] 具体为将贯众炭原料采用水煮沸后，过滤，滤渣再加入溶剂溶解，超声提取，摇匀，滤过，即得。

[0015] 本发明所述提取方法为水煮后超声提取或直接超声提取；

[0016] 其中水煮后超声具体参数为：所述贯众炭水的质量比优选为1:50；所述水煮的时间优选为20~30min；所述超声功率优选为600W，频率优选为40kHz；所述提取时间优选为15~45min；更优选为15~30min；

[0017] 直接超声提取参数具体为：采用70%甲醇超声10~15min。

[0018] 药材、饮片、对照药材使用水煮后超声提取的方式，标准汤剂和配方颗粒采用直接超声的方式。

[0019] 其中，所述贯众炭原料的质量g和溶剂的体积mL的比优选为(0.1~1)：(10~50)；更优选为0.2：25。

- [0020] 所述贯众炭原料为贯众药材、贯众饮片、标准汤剂、配方颗粒。本发明对其不进行限定，上述原料皆可通过本发明的方法进行质量控制和定性检测。
- [0021] 本发明还包括制备参照物溶液：分别取原儿茶酸和5-羟甲基糠醛，加水煮沸后，过滤，滤渣采用70%甲醇溶解，得到参照物溶液；本发明所述提取方法为水煮后超声提取或直接超声提取；所述贯众药材和水的质量比优选为1:50；所述水煮的时间优选为20~30min；所述超声功率优选为600W，频率优选为40kHz；所述提取时间优选为15~45min；更优选为15~30min。其中，所述贯众炭对照药材的质量g和溶剂的体积mL的比优选为(0.1~1):(10~50)；更优选为0.2:25。
- [0022] 将所述参照物溶液采用高效液相色谱法测定，得到参照物的色谱图；并根据参照物的色谱图对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱的成分进行定性测定。
- [0023] 流动相A为乙腈，流动相B为0.1%甲酸，梯度洗脱。
- [0024] 本发明所述梯度洗脱优选具体为：
- [0025] 0~8min，A相：1%、B相：99%；
- [0026] 8~18min，A相：1%~15%、B相：99%~85%；
- [0027] 18~35min，A相：15%~25%、B相：85%~75%；
- [0028] 35~50min，A相：25%~26%、B相：75%~74%。
- [0029] 本发明在上述洗脱梯度下基线分离好，各个峰分离度好，基线平稳。
- [0030] 1.6 μ m，2.1 $\times$ 150mm；柱温35 $^{\circ}$ C。
- [0031] 本发明色谱柱在上述35 $^{\circ}$ C条件下色谱峰对称、分离度好。
- [0032] 流动相流速优选为0.3ml/min。
- [0033] 本发明发现流速0.3ml/min下各色谱峰分离较好，峰形较对称，作为最优选方案。
- [0034] 本发明检测波长优选为250nm。
- [0035] 本发明人发现，在上述波长下色谱信息丰富，各成分均有较好吸收，响应值适中，各峰分离度较好，基线平稳。
- [0036] 本发明进样量为1 μ L。

- [0037] 本发明的有益效果是，一个液相色谱条件下，以指纹图谱控制贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的物质群，以原儿茶酸对指纹图谱进行定位；能够大大降低检测的成本，实现定性检测。
- [0038] 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱的相似度进行评价，得到由13个特征峰构成的贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC标准特征图谱，其中峰1为羟甲基糠醛，峰3为原儿茶酸。
- [0039] 在所述贯众炭标准汤剂特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.51(峰4)、2.75(峰5)、2.81(峰6)、3.34(峰7)、3.43(峰8)、3.50(峰9)、3.67(峰10)、4.57(峰11)、4.72(峰12)、4.77(峰13)；
- [0040] 在所述贯众炭饮片特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.86(峰2)、1.48(峰4)、2.67(峰5)、2.72(峰6)、3.24(峰7)、3.32(峰8)、3.39(峰9)、3.55(峰10)、4.44(峰11)、4.57(峰12)、4.61(峰13)；
- [0041] 在所述贯众炭配方颗粒特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.50(峰4)、2.72(峰5)、2.77(峰6)、3.30(峰7)、3.39(峰8)、3.46(峰9)、3.62(峰10)、4.53(峰11)、4.65(峰12)、4.70(峰13)。
- [0042] 本发明经过检测，贯众及其制剂仅11个峰，比贯众炭少了峰1、峰2，能对贯众及贯众炭进行明显的鉴别。
- [0043] 质量判断标准：取贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒样品，按上述同法操作，得到贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒特征图谱，采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012版对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒标准特征图谱和样品特征图谱进行分析，相似度大于0.90。
- [0044] 采用本发明所提供的方法能有效的监控不同批次贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的质量，使其质量稳定，方法具有精密度高、重现性好等特点，有利于全面监控产品的质量。

- [0045] 本发明建立的贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒特征图谱以原儿茶酸和5-羟甲基糠醛为参照物，注重各个特征峰的顺序和与药材及中间产品的相关性，能全面评价产品的整体质量面貌特征，方法科学可靠。
- [0046] 本发明新建的特征图谱方法，可以检测贯众及其标准汤剂中极性较大的成分。且供试品制备方法简单容易操作，指认特征峰相对较多。可对贯众及其制剂进行准确、可靠的特征图谱检测。对贯众及其制剂的真实性和质量的一致性以及稳定性均可有效地加以检测和控制。为有效控制和较全面评价贯众标准汤剂的质量提供依据。确保贯众及其标准汤剂质量的均一、稳定。
- [0047] 本发明提供了一种贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱构建方法，包括：A)将贯众炭原料采用溶剂溶解，得到待测液；B)将待测液采用高效液相色谱法测定，得到贯众炭原料的UPLC特征图谱；所述高效液相色谱法色谱条件为：色谱柱为C18柱；流动相A为乙腈，流动相B为0.1%甲酸，梯度洗脱。本发明采用高效液相色谱法，选用乙腈-0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱，以原儿茶酸为参照物，建立了贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱，重复性、精密度好，方法稳定，可靠，可以对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的质量进行控制。

附图说明

- [0048] 图1-1为本发明实施例1公开的贯众炭饮片的对照特征图谱；
- [0049] 图1-2为同等测定条件下贯众药材的对照特征图谱；
- [0050] 图2为贯众炭饮片提取方式考察结果图；
- [0051] 图3为贯众炭饮片不同溶剂提取色谱图；
- [0052] 图4为贯众炭饮片不同提取时间色谱图；
- [0053] 图5为不同提取溶剂量色谱图；
- [0054] 图6为色谱峰指认结果图；
- [0055] 图7为不同仪器考察结果图；
- [0056] 图8为不同色谱柱考察结果图；
- [0057] 图9-1为贯众炭饮片特征图谱；
- [0058] 图9-2为贯众炭饮片特征图谱；

- [0059] 图9-3为贯众药材特征图谱；
- [0060] 图9-4为贯众药材特征图谱；
- [0061] 图9-5为贯众药材对照特征图谱；
- [0062] 图10为贯众炭汤剂提取方式考察；
- [0063] 图11为贯众炭汤剂提取溶剂考察；
- [0064] 图12不同提取时间色谱图；
- [0065] 图13不同提取溶剂量色谱图；
- [0066] 图14色谱峰指认；
- [0067] 图15不同仪器考察；
- [0068] 图16不同色谱柱考察；
- [0069] 图17贯众炭标准汤剂特征图谱；
- [0070] 图18为贯众炭标准汤剂特征图谱；
- [0071] 图19为贯众标准汤剂对照特征图谱；
- [0072] 图20流动相种类考察；
- [0073] 图21柱温考察色谱图；
- [0074] 图22流速考察；
- [0075] 图23延迟性考察；
- [0076] 图24不同提取方式色谱图；
- [0077] 图25不同溶剂提取色谱图；
- [0078] 图26不同提取时间色谱图；
- [0079] 图27不同提取溶剂量色谱图；
- [0080] 图28色谱峰指认；
- [0081] 图29不同仪器考察；
- [0082] 图30不同色谱柱考察；
- [0083] 图31为3批贯众配方颗粒特征图谱验证图；
- [0084] 图32为贯众炭配方颗粒对照特征图谱；
- [0085] 图33为贯众药材的特征图谱；
- [0086] 图34为贯众药材的特征图谱；

- [0087] 图35为贯众药材对照特征图谱；
[0088] 图36为贯众标准汤剂的特征图谱；
[0089] 图37为贯众标准汤剂的特征图谱；
[0090] 图38为贯众标准汤剂对照特征图谱；
[0091] 图39为贯众配方颗粒的特征图谱；
[0092] 图40为贯众配方颗粒对照特征图谱；
[0093] 图41为对比比例4不同梯度条件结果图。

具体实施方式

- [0094] 为了进一步说明本发明，以下结合实施例对本发明提供的一种贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱构建方法进行详细描述。
- [0095] 高效液相色谱仪：安捷伦1290；岛津LC-40B X3；赛默飞Vanquish Flex；
- [0096] 电子天平：ME204E/02、MS205DU、XP26(梅特勒-托利多仪器有限公司)；
- [0097] 超纯水机：细胞型1810A(上海摩勒科学仪器有限公司)；
- [0098] 超声波清洗器：KQ600DB型(600W，40KHz；昆山市超声仪器有限公司)；
- [0099] 色谱柱：CORTECS®UPLC®T3 2.1 × 150mm, 1.6 μm；Phenomenex Luna®Omega PS C18 100A 2.1 × 150mm, 1.6 μm；ACQUITY UPLC®BEH Shield RP18 2.1 × 150mm, 1.7 μm
- [0100] 甲醇、乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯；
- [0101] 原儿茶酸对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110809-201906)，
- [0102] 5-羟甲基糠醛对照品(中国食品药品检定研究院，批号：111626-202215)
- [0103] 贯众对照药材(四川省药品检验研究院，批号：NO.SCZD003-201905)；
- [0104] 贯众炭饮片批号(YP-01、YP-02、YP-03、YP-04、YP-05、YP-06、YP-07、YP-08、YP-09、YP-10、YP-11、YP-12、YP-13、YP-14、YP-15、YP-16、YP-17、YP-18、YP-19、YP-20)；
- [0105] 贯众炭标准汤剂冻干粉(四川新绿色药业科技发展有限公司制备，批号：BT-01、BT-02、BT-03、BT-04、BT-05、BT-06、BT-07、BT-08、BT-09、BT-10、BT-11、BT-12、BT-13、BT-14、BT-15、BT-16、BT-17、BT-18、BT-19、BT-20)。

- [0106] 贯众炭配方颗粒(批号：KL-01、KL-001、KL-002、KL-003)。
- [0107] 实施例1贯众炭药材、饮片色谱条件筛选
- [0108] 色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为150mm，内径为2.1mm，粒径为1.6 μ m)；以乙腈为流动相A；以0.1%甲酸溶液为流动相B，按下表中的规定进行梯度洗脱；柱温为35℃；流速为0.3ml/min；检测波长为250nm。理论板数按原儿茶酸峰计算应不低于5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~8	1	99
8~18	1→15	99→85
18~35	15→25	85→75
35~50	25→26	75→74

- [0109] 参照物溶液的制备：取贯众对照药材1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取原儿茶酸对照品适量，精密称定，精密加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μ g的溶液，作为对照品参照物溶液。
- [0110] 取本品粉末(过三号筛)约1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，即得。
- [0111] 测定法精密吸取供试品溶液和参照物溶液各1 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。
- [0112] 供试品色谱中应呈现13个特征峰，除峰1、峰2外，均应与对照药材参照物色谱中的11个特征峰保留时间相对应，与原儿茶酸对照品参照物峰相对应的峰为S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内。规定值为：0.77(峰1)、0.86(峰2)、1.48(峰4)、2.67(峰5)、2.72(峰6)、3.24(峰7)、3.32(峰8)、3.39(峰9)、3.55(峰10)、4.44(峰11)、4.57(峰12)、4.61(峰13)。结果如图1所示，图1-1为本发明实施例1公开的贯众炭饮片的

对照特征图谱，图1-2为同等测定条件下贯众药材的对照特征图谱。通过本发明的方法可以很好地区别贯众炭和贯众药材。

[0113] 实施例2提取方式考察

[0114] 比较了水煎煮后超声、回流提取与超声提取，水煎煮后超声提取的色谱峰信息与贯众炭标准汤剂一致，最终选择水煎煮后超声进行提取。见图2，图2为贯众炭饮片提取方式考察结果图。

[0115] 实施例3提取溶剂考察：

[0116] 考察了甲醇、水、50%甲醇、70%甲醇作为提取溶媒，结果表明，用70%甲醇作为提取溶剂所得的色谱峰信息量大，分离度好，故选用70%甲醇作为提取溶剂。见图3，图3为贯众炭饮片不同溶剂提取色谱图。

[0117] 实施例4提取时间考察

[0118] 比较了超声提取15分钟、30分钟、60分钟，色谱图基本一致。故提取时间确定为15分钟。见图4，图4为贯众炭饮片不同提取时间色谱图。

[0119] 实施例5提取溶剂量考察

[0120] 比较了提取溶剂加入量25ml、50ml、100ml，在提取溶剂量为25ml时，色谱峰大小较为适宜，故提取溶剂量确定为25ml。见图5，图5为不同提取溶剂量色谱图。

[0121] 实施例6方法学考察

[0122] 6.1 色谱峰指认

[0123] 供试品溶液的制备：按最终确定供试品制备方法，制备贯众药材供试品溶液。即为：取本品粉末(过三号筛)约1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

[0124] 对照品参照物溶液的制备：取原儿茶酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μ g的对照品溶液，即得。

[0125] 对照药材溶液的制备：取贯众对照药材1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。

[0126] 阴性对照溶液的制备：按以上拟定的实验条件，制备缺贯众药材阴性对照溶液。对贯众药材特征图谱峰进行定位。见图6，图6为色谱峰指认结果图。

[0127] 6.2精密度试验

[0128] 取贯众炭饮片(批号：YP-01)供试品溶液，按拟定实验方法连续进样6次，每次1 μl，计算各特征峰的保留时间及峰面积。见表1-1。

[0129] 表1-1精密度考察-保留时间

序号	特征峰												
	峰1	峰2	峰3 (S)	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13
1	7.138	8.003	9.339	13.799	24.832	25.248	30.172	30.906	31.502	32.989	41.241	42.429	42.867
2	7.144	8.007	9.352	13.807	24.828	25.238	30.175	30.902	31.496	32.983	41.236	42.432	42.869
3	7.159	8.019	9.371	13.819	24.843	25.247	30.186	30.908	31.500	32.984	41.218	42.423	42.859
4	7.16	8.022	9.384	13.824	24.842	25.248	30.181	30.901	31.493	32.980	41.223	42.420	42.857
5	7.142	8.007	9.355	13.811	24.834	25.244	30.182	30.91	31.504	32.995	41.221	42.418	42.856
6	7.151	8.014	9.369	13.817	24.833	25.238	30.168	30.888	31.479	32.965	41.184	42.384	42.821
RSD(%)	0.13	0.10	0.18	0.07	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05

[0130] 表1-2精密度考察-峰面积

序号	特征峰												
	峰1	峰2	峰3 (S)	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13
1	72.377	81.088	80.886	35.327	4.952	15.617	5.157	15.077	8.945	15.286	9.091	5.743	3.496
2	72.851	81.653	81.269	35.529	4.974	15.751	5.153	15.137	9.031	15.426	9.050	5.808	3.472
3	72.165	80.981	81.278	35.553	4.712	15.688	5.148	15.047	8.954	15.307	4.345	5.786	3.550
4	72.902	81.665	82.136	35.900	4.779	15.816	5.184	15.146	9.064	15.450	4.536	5.887	3.615
5	73.185	82.039	81.803	35.823	4.950	15.826	5.206	15.352	9.059	15.484	4.583	5.855	3.636
6	72.557	81.580	81.595	35.683	4.893	15.721	5.123	15.140	9.023	15.385	4.328	5.833	3.884
RSD(%)	0.13	0.10	0.18	0.07	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05

[0131] 结果表明，精密度各特征峰保留时间RSD为0.02%–0.18%，峰面积RSD为0.02%–0.18%。该仪器精密度良好。

[0132] 6.3重复性考察

[0133] 取贯众炭饮片(批号：YP-01)6份，按拟定实验方法进行制备及测定。见表2-1和2-2。

[0134] 表2-1重复性考察-相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
2	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.55	4.60
3	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.23	3.31	3.38	3.54	4.42	4.55	4.60
4	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.23	3.31	3.38	3.54	4.42	4.55	4.60
5	0.76	0.86	1.00	1.48	2.66	2.70	3.23	3.31	3.37	3.53	4.41	4.54	4.59
6	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.55	4.60
RSD(%)	0.54	0.00	0.00	0.00	0.16	0.24	0.26	0.25	0.30	0.28	0.31	0.22	0.22

[0135] 表2-2重复性考察-相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
2	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
3	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.12	0.07	0.04
4	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
5	0.90	1.00	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
6	0.91	1.02	1.00	0.44	0.06	0.20	0.06	0.19	0.11	0.20	0.09	0.07	0.04
RSD(%)	0.46	0.63	0.00	0.00	0.00	2.13	0.00	0.00	0.00	2.13	9.08	0.00	0.00

[0136] 结果表明，重复性各特征峰相对保留时间RSD为0.00%–0.54%，相对峰面积RSD为0.00%–9.08%。该方法重复性良好。

[0137] 6.4中间精密度考察

[0138] 6.4.1不同人员不同时间

[0139] 在以上拟定的实验条件基础上，取贯众炭饮片(批号：YP-01)，不同人员和不同时间制备供试品溶液，进行测定。见表3-1和3-2。

[0140] 表3-1中间精密度-相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
人员 B	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
时间 2	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
RSD(%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.17	0.13	0.00	0.00

[0141] 表3-2中间精密度-相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
人员 B	0.91	1.02	1.00	0.44	0.06	0.20	0.06	0.19	0.11	0.19	0.08	0.07	0.04
时间 2	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
RSD(%)	0.64	0.57	0.00	0.00	0.00	2.99	0.00	0.00	0.00	0.00	17.33	0.00	0.00

[0142] 结果表明，由不同的人员在不同的时间对同一个样品进行测定，方法精密度较好。

[0143] 6.5不同仪器

[0144] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对仪器1；仪器2；仪器3进行考察。见图7，图7为不同仪器考察结果图，表4-1和4-2。

[0145] 表4-1不同仪器考察-相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰1	峰2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
仪器 2	0.69	0.86	1.00	1.82	3.38	3.41	4.02	4.04	4.16	4.35	5.33	5.47	5.51
仪器 3	0.83	0.87	1.00	1.46	2.45	2.50	2.95	3.03	3.08	3.22	4.13	4.26	4.31
RSD(%)	9.21	0.67	0.00	12.76	17.16	16.51	16.21	14.97	15.65	15.63	13.41	13.19	12.95

[0146] 表4-2不同仪器考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
仪器 2	0.89	1.07	1.00	0.45	0.06	0.20	0.06	0.19	0.10	0.19	0.06	0.07	0.05
仪器 3	0.90	1.13	1.00	0.43	0.06	0.21	0.06	0.20	0.11	0.19	0.05	0.07	0.06
RSD(%)	0.65	5.61	0.00	2.28	0.00	5.00	0.00	2.99	5.42	0.00	43.84	0.00	20.00

[0147] 结果表明，用上述三种仪器检测时，各特征峰相对保留时间的RSD在0.67%~17.16%；各特征峰相对峰面积的RSD在0.00%~43.84%，不同仪器耐用性较差。

[0148] 6.6色谱柱耐用性考察

[0149] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对色谱柱1；色谱柱2；色谱柱3进行考察。见图8，图8为不同色谱柱考察结果图，表5-1和5-2。

[0150] 表5-1色谱柱耐用性考察-相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
色谱柱 2	0.67	0.97	1.00	1.33	2.41	2.42	2.88	2.92	2.98	3.10	4.01	4.10	4.16
色谱柱 3	0.43	0.60	1.00	1.61	2.66	2.69	3.34	3.30	3.34	3.48	4.44	4.53	4.59
RSD(%)	28.04	23.46	0.00	9.52	5.71	6.34	7.73	7.18	7.02	7.28	5.85	5.93	5.78

[0151] 表5-2色谱柱耐用性考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	0.90	1.01	1.00	0.44	0.06	0.19	0.06	0.19	0.11	0.19	0.11	0.07	0.04
色谱柱 2	0.63	0.45	1.00	0.33	0.08	0.85	0.09	0.58	0.30	0.60	0.13	0.21	0.12
色谱柱 3	0.56	0.60	1.00	0.33	0.14	0.71	0.03	0.52	0.27	0.52	0.18	0.04	0.08
RSD(%)	25.78	42.22	0.00	17.33	44.61	59.62	50.00	48.84	45.07	49.78	25.76	85.07	50.00

[0152] 由图8可知，CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6μm(色谱柱1)的色谱图分离较好，因此推荐使用色谱柱CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6μm。

[0153] 6.7稳定性考察

[0154] 在以上拟定的实验条件基础上，取同一供试品溶液，分别于0h，3h，6h，9h，12h，18h，24h时测定。见表6-1和6-2。

[0155] 表6-1稳定性考察-保留时间

时间 (h)	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
0	7.114	7.984	9.275	13.764	24.797	25.232	30.145	30.901	31.503	32.990	41.249	42.423	42.869
3	7.121	7.990	9.290	13.775	24.817	25.246	30.168	30.914	31.512	32.995	41.269	42.451	42.895
6	7.148	8.014	9.340	13.804	24.830	25.242	30.172	30.908	31.503	32.988	41.255	42.441	42.882
9	7.126	7.995	9.305	13.782	24.817	25.241	30.164	30.907	31.504	32.990	41.260	42.441	42.885
12	7.132	7.999	9.315	13.786	24.818	25.241	30.161	30.901	31.500	32.988	41.256	42.432	42.874
18	7.143	8.009	9.344	13.806	24.828	25.242	30.165	30.898	31.495	32.984	41.242	42.429	42.870
24	7.112	7.979	9.279	13.764	24.797	25.234	30.143	30.892	31.492	32.979	41.247	42.420	42.865
RSD(%)	0.19	0.16	0.30	0.13	0.06	0.02	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03

[0156] 表6-2稳定性考察-峰面积

时间 (h)	特征峰												
	峰1	峰2	峰3 (S)	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13
0	69.382	77.664	76.773	34.109	4.642	14.957	4.881	14.443	8.723	14.725	8.510	5.567	3.363
3	69.797	78.294	77.359	34.087	4.635	15.078	4.915	14.494	8.739	14.840	8.829	5.575	2.904
6	69.843	77.869	77.567	33.848	4.716	15.039	4.910	14.432	8.688	14.762	8.992	5.553	3.192
9	71.506	80.316	79.876	34.818	4.913	15.558	5.070	15.097	9.017	15.211	8.946	5.699	3.200
12	73.837	83.432	83.007	36.044	5.083	16.149	5.240	15.658	9.311	15.838	9.570	5.974	3.540
18	70.709	79.318	78.942	34.474	4.682	15.358	5.031	14.714	8.838	15.077	8.801	5.643	3.389
24	71.042	79.751	78.856	34.743	4.771	15.320	5.059	14.982	8.863	15.081	8.687	5.687	3.457
RSD(%)	2.14	2.50	2.67	2.13	3.46	2.67	2.51	3.04	2.47	2.54	3.76	2.58	6.48

[0157] 结果表明，其相对应的特征峰保留时间的RSD在0.02% ~ 0.19%，峰面积RSD为2.13%–6.48%。样品溶液在24小时内较稳定。综上所述，各特征峰相对保留时间的RSD在以上各项考察中均符合要求，该方法良好。将上述13个特征峰纳入后续考察。

[0158] 6.8贯众炭饮片特征图谱验证

[0159] 采用此方法，在20批贯众炭饮片样品进行特征图谱分析，计算相对保留时间和相对峰面积比值，结果见图9-1和9-2，表7-1和7-2。

[0160] 其中图9-1为贯众炭饮片特征图谱，从下到上批号依次为：YP-01、YP-02、YP-03、YP-04、YP-05、YP-06、YP-07、YP-08、YP-09、YP-10；

[0161] 图9-2为贯众炭饮片特征图谱，从下到上批号依次为：YP-11、YP-12、YP-13、YP-14、YP-15、YP-16、YP-17、YP-18、YP-19、YP-20。

[0162] 表7-1 20批贯众炭饮片特征图谱相对保留时间

批号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
YP-01	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.55	4.60
YP-02	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.71	3.24	3.32	3.39	3.55	4.44	4.57	4.61
YP-03	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
YP-04	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.45	4.57	4.62

YP-05	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
YP-06	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.58	4.62
YP-07	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
YP-08	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
YP-09	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
YP-10	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.45	4.57	4.62
YP-11	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
YP-12	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.45	4.57	4.62
YP-13	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.61
YP-14	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.23	3.31	3.38	3.54	4.42	4.55	4.60
YP-15	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.56	4.60
YP-16	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.23	3.31	3.38	3.54	4.42	4.55	4.60
YP-17	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.31	3.38	3.54	4.42	4.55	4.60
YP-18	0.77	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.56	4.60
YP-19	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.71	3.24	3.32	3.39	3.55	4.43	4.56	4.61
YP-20	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
RSD(%)	0.00	0.00	0.00	0.16	0.21	0.19	0.22	0.23	0.23	0.22	0.26	0.21	0.22
平均值	0.77	0.86	-	1.48	2.67	2.72	3.24	3.32	3.39	3.55	4.44	4.57	4.61
90%	0.69	0.77	-	1.33	2.40	2.45	2.92	2.99	3.05	3.20	4.00	4.11	4.15
110%	0.85	0.95	-	1.63	2.94	2.99	3.56	3.65	3.73	3.90	4.88	5.03	5.07

[0163] 表7-2贯众炭饮片特征图谱相对峰面积

批号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
YP-01	0.90	1.07	1.00	0.46	0.06	0.18	0.05	0.16	0.10	0.17	0.09	0.06	0.04
YP-02	0.88	1.07	1.00	0.45	0.06	0.17	0.05	0.15	0.10	0.16	0.09	0.06	0.04
YP-03	0.88	1.10	1.00	0.45	0.05	0.16	0.05	0.14	0.09	0.15	0.08	0.05	0.04
YP-04	0.87	1.10	1.00	0.45	0.05	0.15	0.05	0.14	0.09	0.15	0.08	0.05	0.03
YP-05	0.89	1.08	1.00	0.44	0.06	0.17	0.05	0.15	0.10	0.16	0.06	0.06	0.04
YP-06	0.88	1.08	1.00	0.45	0.06	0.17	0.05	0.15	0.09	0.16	0.08	0.06	0.04
YP-07	0.88	1.06	1.00	0.45	0.06	0.17	0.05	0.15	0.10	0.16	0.09	0.06	0.04
YP-08	0.87	1.08	1.00	0.45	0.06	0.16	0.05	0.14	0.09	0.15	0.08	0.05	0.04
YP-09	0.92	1.04	1.00	0.44	0.06	0.18	0.06	0.16	0.10	0.17	0.09	0.06	0.04
YP-10	0.92	1.04	1.00	0.45	0.05	0.17	0.05	0.15	0.10	0.16	0.09	0.06	0.04
YP-11	0.92	1.05	1.00	0.45	0.05	0.16	0.05	0.14	0.09	0.15	0.09	0.06	0.04
YP-12	0.92	1.05	1.00	0.45	0.05	0.16	0.05	0.14	0.09	0.15	0.09	0.06	0.04
YP-13	0.89	1.10	1.00	0.45	0.05	0.14	0.04	0.12	0.08	0.13	0.07	0.05	0.03
YP-14	0.92	1.10	1.00	0.45	0.05	0.14	0.04	0.12	0.08	0.13	0.07	0.05	0.03
YP-15	0.91	1.10	1.00	0.45	0.05	0.14	0.04	0.12	0.08	0.13	0.07	0.05	0.03
YP-16	0.95	1.07	1.00	0.46	0.05	0.13	0.04	0.11	0.07	0.12	0.07	0.04	0.03
YP-17	0.95	1.08	1.00	0.46	0.05	0.13	0.04	0.11	0.07	0.12	0.06	0.04	0.03
YP-18	1.11	1.08	1.00	0.46	0.07	0.19	0.07	0.18	0.11	0.19	0.08	0.07	0.05
YP-19	0.66	0.54	1.00	0.24	0.15	0.64	0.08	0.44	0.26	0.47	0.12	0.15	0.10
YP-20	0.69	0.55	1.00	0.25	0.15	0.64	0.07	0.44	0.25	0.46	0.10	0.14	0.09
RSD (%)	10.14	16.08	0.00	14.80	46.24	71.74	21.16	55.04	48.34	54.06	17.09	44.89	43.41

[0164] 根据相对保留时间稳定及各批次样品均能检出且峰相对较高的原则，共选择了13个重复性较好的峰作为特征峰。结果表明，当峰3作为S峰时，20批次贯众炭饮

片特征峰相对保留时间RSD在0.00% ~ 0.26%，20批次贯众炭饮片13个特征峰相对保留时间RSD均小于10%。

- [0165] 最终规定：供试品色谱中应呈现13个特征峰，除峰1、峰2外，均应与对照药材参照物色谱中的11个特征峰保留时间相对应，与原儿茶酸对照品参照物峰相对应的峰为S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围之内。规定值为：0.77(峰1)、0.86(峰2)、1.48(峰4)、2.67(峰5)、2.72(峰6)、3.24(峰7)、3.32(峰8)、3.39(峰9)、3.55(峰10)、4.44(峰11)、4.57(峰12)、4.61(峰13)。
- [0166] 6.9贯众药材特征图谱结果：
- [0167] 20批贯众药材特征图谱如图9-3和图9-4所示，其中图9-3为贯众药材特征图谱(从下到上批号依次为：XLS202107277、XLS202107278、XLS202107279、XLS202107280、XLS202107281、XLS202107282、XLS202107283、XLS202107284、XLS202107285、XLS202107286)；图9-4为贯众药材特征图谱(从下到上批号依次为：XLS202107287、XLS202107288、XLS202107289、XLS202107290、XLS202107291、XLS202107292、XLS202107293、XLS202107294、XLS202107295、010176-2012001))；
- [0168] 图9-5为贯众药材对照特征图谱；峰1(S)：原儿茶酸；注：色谱柱：CORTECS®UPLC®T3 2.1 × 150mm，1.6 μm。
- [0169] 实施例7贯众炭标准汤剂色谱条件的选择
- [0170] 贯众标准汤剂特征图谱色谱条件与系统适应性试验确定为：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为150mm，内径为2.1mm，粒度为1.6 μm)；以乙腈为流动相A，以0.1%甲酸溶液为流动相B，按下表中的规定进行梯度洗脱；柱温为35℃；流速为每分钟0.3ml，检测波长为250nm，理论板数按原儿茶酸峰计算应不低于5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0 ~ 8	1	99
8~18	1→15	99→85
18~35	15→25	85→75
35~50	25→26	75→74

- [0171] 参照物溶液的制备
- [0172] 取贯众对照药材1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70% 甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)30分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取原儿茶酸对照品适量，精密称定，精密加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μg 的溶液，作为对照品参照物溶液。
- [0173] 供试品溶液的制备
- [0174] 取贯众炭标准汤剂，0.2g，置具塞锥形瓶中，加入70% 甲醇50ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)30分钟，取出，放冷，取续滤液，即得。
- [0175] 测定法
- [0176] 精密吸取供试品溶液和参照物溶液各1 μl，注入液相色谱仪，测定，即得。
- [0177] 波长、柱温、流速选择：标汤与成品颗粒的物质成分基础一致，特征色谱条件与系统适应性和颗粒的特征图谱方法保持一致。
- [0178] 7.1提取方式考察
- [0179] 比较了回流提取与超声提取，色谱峰信息大致相同，最终选择操作简便的超声进行提取。见图10。图10为贯众炭汤剂提取方式考察。
- [0180] 7.2提取溶剂考察
- [0181] 考察了甲醇、水、50% 甲醇、70% 甲醇作为提取溶媒，结果表明，用70% 甲醇作为提取溶剂所得的色谱峰信息量大，分离度好，故选用70% 甲醇作为提取溶剂。见图11。图11为贯众炭汤剂提取溶剂考察。
- [0182] 7.3提取时间考察
- [0183] 比较了超声提取15分钟、30分钟、60分钟，色谱图基本一致，故提取时间确定为15分钟，见图12。图12不同提取时间色谱图。
- [0184] 7.4提取溶剂量考察

- [0185] 比较了提取溶剂加入量25ml、50ml、100ml，在提取溶剂量为25ml时，色谱峰大小较为适宜，故提取溶剂量确定为25ml。见图13。图13不同提取溶剂量色谱图。
- [0186] 7.5最终确定供试品制备方法
- [0187] 取约0.2g，置具塞锥形瓶中，加入70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，即得。
- [0188] 实施例8贯众标准汤剂方法学考察
- [0189] 8.1色谱峰指认
- [0190] 供试品溶液的制备：按最终确定供试品制备方法，制备贯众炭标准汤剂供试品溶液。
- [0191] 参照物溶液的制备：另取原儿茶酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μ g的对照品溶液，即得。
- [0192] 对照药材溶液的制备：取贯众对照药材1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)15分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。
- [0193] 阴性对照溶液的制备：按以上拟定的实验条件，制备缺贯众标准汤剂阴性对照溶液。对贯众标准汤剂特征图谱峰进行定位。见图14。图14色谱峰指认。
- [0194] 8.2精密度试验
- [0195] 取贯众炭标准汤剂(批号：BT-01)供试品溶液，按拟定实验方法连续进样6次，每次1 μ l，计算各特征峰的保留时间及峰面积。见表8和9。
- [0196] 表8精密度考察-保留时间

序号	特征峰												
	峰1	峰2	峰3 (S)	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13
1	7.159	8.003	9.388	13.826	24.817	25.217	30.154	30.871	31.461	32.948	41.351	42.356	42.794
2	7.135	8.007	9.352	13.805	24.804	25.212	30.143	30.868	31.462	32.952	41.323	42.360	42.799
3	7.122	8.019	9.325	13.788	24.792	25.213	30.135	30.868	31.465	32.945	41.294	42.354	42.796

4	7.099	8.022	9.292	13.770	24.783	25.210	30.128	30.865	31.463	32.949	41.278	42.337	42.781
5	7.099	8.007	9.290	13.770	24.789	25.222	30.135	30.872	31.469	32.954	41.274	42.346	42.791
6	7.08	8.014	9.265	13.756	24.764	25.205	30.11	30.853	31.453	32.941	41.236	42.343	42.788
RSD(%)	0.41	0.10	0.49	0.19	0.08	0.03	0.05	0.03	0.02	0.02	0.10	0.03	0.02

[0197] 表9精密度考察-峰面积

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	86.389	81.088	70.658	39.372	4.535	10.075	4.994	11.022	5.082	11.861	23.819	4.340	2.741
2	87.208	81.653	71.402	39.970	4.537	10.189	5.029	11.104	5.146	11.533	24.160	4.422	2.822
3	86.960	80.981	71.572	40.510	4.431	10.220	5.070	11.262	5.175	11.461	24.156	4.353	2.739
4	86.964	81.665	71.645	40.886	4.525	10.246	5.107	11.147	5.205	11.538	24.022	4.216	2.699
5	86.009	82.039	71.157	40.719	4.466	10.115	5.077	11.282	5.114	11.728	24.059	4.231	2.703
6	85.690	81.580	70.085	40.287	4.534	10.136	5.059	11.261	5.160	11.484	23.768	4.186	2.654
RSD(%)	0.70	0.49	0.86	1.38	1.01	0.65	0.79	0.95	0.86	1.37	0.70	2.18	2.08

[0198] 结果表明，精密度各特征峰保留时间RSD为0.02%–0.41%，峰面积RSD为0.49%–2.18%。该仪器精密度良好。

[0199] 8.3重复性考察

[0200] 精密称取贯众炭标准汤剂(批号：BT-01)6份，按拟定实验方法进行制备及测定。见表10-1和10-2。

[0201] 表10-1重复性考察~相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.40	3.57	4.46	4.59	4.64
2	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.71	3.24	3.32	3.39	3.55	4.44	4.56	4.61
3	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.24	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.61
4	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.24	3.32	3.39	3.55	4.44	4.57	4.61
5	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.41	3.57	4.47	4.59	4.64
6	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.40	3.56	4.46	4.58	4.63
RSD(%)	0.00	0.00	0.00	0.37	0.21	0.30	0.34	0.30	0.25	0.28	0.30	0.27	0.33

[0202] 表10-2重复性考察~相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	1.26	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.34	0.06	0.03
2	1.23	1.43	1.00	0.56	0.06	0.14	0.07	0.16	0.07	0.16	0.33	0.06	0.04
3	1.23	1.42	1.00	0.56	0.06	0.14	0.07	0.16	0.07	0.16	0.34	0.06	0.03
4	1.23	1.42	1.00	0.56	0.06	0.14	0.07	0.16	0.07	0.16	0.33	0.06	0.03
5	1.27	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.34	0.06	0.04
6	1.27	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.27	0.06	0.04
RSD(%)	1.64	1.42	0.00	1.93	8.43	3.78	0.00	0.00	7.31	3.32	8.43	0.00	15.65

[0203] 结果表明，重复性各特征峰相对保留时间RSD为0.00%–0.37%，相对峰面积RSD为0.00%–15.65%。该方法重复性良好。

[0204] 8.4中间精密度考察

[0205] 8.4.1不同人员和不同时间考察

[0206] 在以上拟定的实验条件基础上，分别精密称取贯众标准汤剂(批号：BT-01)，不同人员和不同时间制备供试品溶液，进行测定。见表11-1和11-2。

[0207] 表11-1中间精密度–相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.40	3.57	4.46	4.59	4.64
人员 B	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.24	3.33	3.39	3.55	4.45	4.56	4.61
时间 2	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.71	3.24	3.32	3.39	3.55	4.44	4.56	4.61
RSD(%)	0.00	0.00	0.00	0.39	0.22	0.37	0.36	0.31	0.18	0.33	0.23	0.38	0.38

[0208] 表11-2中间精密度–相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	1.26	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.34	0.06	0.03
人员 B	1.23	1.42	1.00	0.56	0.06	0.14	0.07	0.16	0.07	0.16	0.33	0.06	0.04
时间 2	1.23	1.42	1.00	0.55	0.06	0.14	0.07	0.16	0.07	0.16	0.34	0.06	0.03
RSD(%)	1.40	1.62	0.00	2.72	9.12	4.03	0.00	0.00	7.89	3.54	1.72	0.00	17.33

[0209] 结果表明，由不同的人员在不同的时间对同一个样品进行测定，方法精密度较好。

[0210] 8.4.2不同仪器考察

[0211] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对仪器1；仪器2；仪器3进行考察。见图15，表12-1和12-2。图15不同仪器考察。

[0212] 表12-1不同仪器考察–相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.40	3.57	4.46	4.59	4.64
仪器 2	0.69	0.86	1.00	1.82	3.37	3.41	4.01	4.09	4.16	4.34	5.32	5.46	5.51
仪器 3	0.83	0.87	1.00	1.46	2.46	2.51	2.97	3.04	3.10	3.23	4.08	4.29	4.34
RSD (%)	9.21	0.67	0.00	12.57	16.74	16.28	15.73	15.50	15.38	15.32	13.76	12.72	12.59

[0213] 表12-2不同仪器考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	1.26	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.34	0.06	0.03
仪器 2	1.21	1.53	1.00	0.56	0.06	0.15	0.07	0.15	0.08	0.15	0.05	0.06	0.04
仪器 3	1.13	1.57	1.00	0.53	0.07	0.15	0.08	0.18	0.07	0.15	0.27	0.06	0.06
RSD(%)	5.47	3.67	0.00	4.53	8.67	0.00	7.88	9.36	7.54	7.38	68.79	0.00	35.26

[0214] 结果表明，用上述三种仪器检测时，各特征峰相对保留时间的RSD在9.21%~16.74%；各特征峰相对峰面积的RSD在0.00%~68.79%，不同仪器耐用性较差。

[0215] 8.5耐用性考察

[0216] 8.5.1色谱柱耐用性考察

[0217] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对色谱柱1；色谱柱2；色谱柱3；进行考察。见图16，表13-1和13-2。图16不同色谱柱考察。

[0218] 表13-1色谱柱耐用性考察-相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.73	3.26	3.34	3.40	3.57	4.46	4.59	4.64
色谱柱 2	0.67	0.97	1.00	1.33	2.41	2.43	2.89	2.92	2.99	3.10	4.01	4.09	4.16
色谱柱 3	0.43	0.61	1.00	1.62	2.68	2.72	3.27	3.33	3.38	3.52	4.48	4.57	4.64
RSD(%)	28.04	22.69	0.00	9.82	6.02	6.49	6.90	7.50	7.10	7.60	6.16	6.41	6.19

[0219] 表13-2色谱柱耐用性考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	1.26	1.46	1.00	0.58	0.07	0.15	0.07	0.16	0.08	0.17	0.34	0.06	0.03
色谱柱 2	1.08	1.25	1.00	0.67	0.05	0.19	0.07	0.17	0.08	0.18	0.05	0.34	0.04
色谱柱 3	1.05	1.53	1.00	0.25	0.07	0.17	0.01	0.17	0.07	0.17	0.12	0.09	0.02
RSD(%)	10.06	10.32	0.00	44.23	18.24	11.77	69.29	3.47	7.54	3.34	89.02	94.13	33.34

[0220] 由图16可知，CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6 μm(色谱柱1)的色谱图分离较好，因此推荐使用色谱柱 CORTECS®UPLC®T32.1×150mm,1.6 μm。

[0221] 8.5.2稳定性考察

[0222] 在以上拟定的实验条件基础上，取同一供试品溶液，分别于0h，3h，6h，9h，12h，18h，24h时测定。见表14-1和14-2。

[0223] 表14-1稳定性考察～保留时间

时间 (h)	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
0	7.098	7.970	9.252	13.753	24.792	25.232	30.140	30.898	31.501	32.989	41.286	42.451	42.898
3	7.134	8.003	9.319	13.791	24.822	25.242	30.169	30.909	31.506	32.995	41.352	42.446	42.889
6	7.132	8.002	9.322	13.792	24.826	25.248	30.167	30.906	31.502	32.990	41.339	42.437	42.882
9	7.125	7.994	9.306	13.783	24.821	25.245	30.165	30.909	31.505	32.994	41.337	42.444	42.888
12	7.129	7.998	9.316	13.790	24.821	25.242	30.162	30.902	31.498	32.989	41.348	42.447	42.890
18	7.134	8.001	9.325	13.794	24.682	25.247	30.173	30.913	31.510	32.994	41.360	42.442	42.883
24	7.107	7.974	9.269	13.759	24.802	25.236	30.150	30.902	31.500	32.986	41.287	42.425	42.868
RSD(%)	0.21	0.18	0.32	0.13	0.21	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.08	0.03	0.03

[0224] 表14-2稳定性考察-峰面积

时间 (h)	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
0	86.882	100.985	69.221	40.075	4.596	10.140	5.036	11.262	5.263	12.024	23.779	4.231	2.094
3	86.505	100.089	70.518	39.216	4.513	10.062	4.951	11.134	5.220	11.536	23.682	4.177	2.243
6	87.092	100.736	70.965	39.375	4.558	10.102	4.969	11.213	5.220	11.505	23.882	4.246	2.370
9	86.706	100.356	70.673	39.385	4.536	10.063	4.985	11.185	5.224	11.446	23.705	4.194	2.259
12	87.092	100.864	71.015	39.394	4.555	10.133	5.022	11.185	5.255	11.502	23.799	4.166	2.243
18	87.008	100.876	71.083	39.435	4.560	10.147	5.027	11.213	5.235	11.507	23.997	4.253	2.343
24	86.661	100.695	70.555	39.582	4.578	10.123	5.047	11.292	5.258	11.502	23.647	4.215	2.488
RSD(%)	0.27	0.32	0.91	0.71	0.60	0.36	0.74	0.47	0.37	1.73	0.52	0.81	5.41

[0225] 结果表明，其相对应的特征峰保留时间的RSD在0.02%～0.21%，峰面积RSD为0.27%～5.41%。样品溶液在24小时内较稳定。

[0226] 综上所述，各特征峰相对保留时间的RSD在以上各项考察中均符合要求，该方法良好。将上述13个特征峰纳入后续考察。

[0227] 实施例9特征峰的确定及对照图谱的建立

[0228] 9.1 20批贯众炭标准汤剂验证结果采用此方法，在20批标准汤剂样品进行特征图谱分析，计算相对保留时间和相对峰面积比值。见图17-18，表15-1和15-2。图17贯众炭标准汤剂特征图谱(从下到上批号依次为：BT-01、BT-02、BT-03、BT-04、BT-05、BT-06、BT-07、BT-08、BT-09、BT-10)；图18为贯众炭标准汤剂特征图谱(从下到上批号依次为：BT-11、BT-12、BT-13、BT-14、BT-15、BT-16、BT-17、BT-18、BT-19、BT-20)。

[0229] 表15-1 20批贯众炭标准汤剂相对保留时间

批号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
BT-01	0.77	0.87	1.00	1.53	2.79	2.85	3.39	3.48	3.55	3.72	4.63	4.79	4.84
BT-02	0.77	0.87	1.00	1.53	2.78	2.84	3.38	3.48	3.55	3.71	4.62	4.78	4.83
BT-03	0.77	0.87	1.00	1.52	2.77	2.83	3.37	3.47	3.54	3.70	4.60	4.76	4.81
BT-04	0.77	0.87	1.00	1.52	2.78	2.84	3.38	3.47	3.54	3.71	4.61	4.77	4.82
BT-05	0.77	0.87	1.00	1.52	2.76	2.81	3.35	3.44	3.51	3.68	4.58	4.73	4.78
BT-06	0.77	0.89	1.00	1.52	2.76	2.82	3.36	3.45	3.52	3.68	4.58	4.74	4.79
BT-07	0.77	0.87	1.00	1.52	2.77	2.83	3.37	3.46	3.53	3.69	4.60	4.75	4.80
BT-08	0.77	0.87	1.00	1.51	2.75	2.80	3.34	3.43	3.50	3.67	4.56	4.71	4.76
BT-09	0.77	0.87	1.00	1.51	2.73	2.79	3.32	3.41	3.48	3.64	4.54	4.69	4.74
BT-10	0.77	0.86	1.00	1.51	2.75	2.80	3.34	3.43	3.50	3.66	4.57	4.71	4.76
BT-11	0.77	0.86	1.00	1.51	2.74	2.79	3.33	3.42	3.48	3.65	4.55	4.69	4.74
BT-12	0.77	0.86	1.00	1.50	2.72	2.77	3.31	3.39	3.46	3.62	4.52	4.66	4.71
BT-13	0.77	0.86	1.00	1.50	2.72	2.77	3.30	3.39	3.46	3.62	4.52	4.66	4.71
BT-14	0.77	0.87	1.00	1.50	2.73	2.79	3.32	3.41	3.47	3.64	4.54	4.68	4.73
BT-15	0.76	0.86	1.00	1.51	2.74	2.79	3.33	3.41	3.48	3.64	4.55	4.69	4.74
BT-16	0.77	0.86	1.00	1.50	2.72	2.77	3.31	3.39	3.46	3.62	4.52	4.66	4.71
BT-17	0.76	0.86	1.00	1.51	2.74	2.80	3.33	3.42	3.49	3.66	4.56	4.70	4.75
BT-18	0.77	0.86	1.00	1.51	2.74	2.80	3.34	3.43	3.49	3.66	4.56	4.71	4.76
BT-19	0.77	0.87	1.00	1.51	2.75	2.81	3.35	3.44	3.50	3.67	4.57	4.72	4.77
BT-20	0.77	0.87	1.00	1.52	2.76	2.82	3.36	3.46	3.52	3.69	4.59	4.75	4.80
RSD(%)	0.40	0.85	0.00	0.62	0.77	0.86	0.78	0.86	0.86	0.85	0.72	0.85	0.85
平均值	0.77	0.87	0.00	1.51	2.75	2.81	3.34	3.43	3.50	3.67	4.57	4.72	4.77
90%	0.69	0.78	0.00	1.36	2.48	2.53	3.01	3.09	3.15	3.30	4.11	4.25	4.29
110%	0.85	0.96	0.00	1.66	3.03	3.09	3.67	3.77	3.85	4.04	5.03	5.19	5.25

[0230] 表15-2 20批贯众炭标准汤剂相对峰面积

批号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
BT-01	1.30	1.47	1.00	0.57	0.07	0.16	0.07	0.15	0.09	0.14	0.28	0.06	0.05
BT-02	1.29	1.45	1.00	0.57	0.06	0.16	0.07	0.16	0.08	0.15	0.34	0.05	0.04
BT-03	1.29	1.43	1.00	0.57	0.06	0.17	0.06	0.14	0.08	0.14	0.34	0.03	0.02
BT-04	1.28	1.45	1.00	0.56	0.07	0.16	0.06	0.16	0.08	0.15	0.33	0.05	0.05
BT-05	1.31	1.39	1.00	0.58	0.06	0.16	0.07	0.16	0.08	0.15	0.33	0.05	0.05
BT-06	1.29	1.39	1.00	0.58	0.06	0.15	0.06	0.15	0.09	0.14	0.34	0.05	0.05
BT-07	1.29	1.44	1.00	0.58	0.07	0.15	0.06	0.16	0.09	0.15	0.32	0.05	0.04
BT-08	1.34	1.41	1.00	0.58	0.06	0.16	0.06	0.16	0.08	0.16	0.33	0.04	0.02
BT-09	1.43	1.49	1.00	0.62	0.07	0.16	0.06	0.17	0.10	0.17	0.36	0.05	0.04
BT-10	1.35	1.44	1.00	0.58	0.07	0.16	0.05	0.17	0.09	0.15	0.34	0.03	0.01
BT-11	1.44	1.50	1.00	0.62	0.07	0.16	0.04	0.17	0.09	0.15	0.38	0.04	0.04
BT-12	1.66	1.73	1.00	0.72	0.09	0.19	0.04	0.21	0.11	0.18	0.44	0.07	0.06
BT-13	1.65	1.71	1.00	0.71	0.08	0.19	0.05	0.19	0.10	0.18	0.42	0.04	0.02
BT-14	1.50	1.56	1.00	0.64	0.07	0.16	0.05	0.19	0.09	0.17	0.39	0.06	0.04
BT-15	1.45	1.52	1.00	0.62	0.07	0.16	0.04	0.19	0.09	0.16	0.36	0.06	0.05
BT-16	1.63	1.70	1.00	0.70	0.08	0.19	0.05	0.20	0.10	0.17	0.41	0.06	0.06
BT-17	1.32	1.44	1.00	0.59	0.07	0.15	0.04	0.16	0.08	0.14	0.35	0.03	0.03

BT-18	1.34	1.41	1.00	0.58	0.07	0.15	0.05	0.16	0.08	0.14	0.34	0.05	0.04
BT-19	1.30	1.38	1.00	0.56	0.07	0.15	0.05	0.16	0.08	0.12	0.28	0.03	0.02
BT-20	1.25	1.40	1.00	0.56	0.06	0.15	0.05	0.15	0.07	0.13	0.06	0.04	0.03
RSD (%)	9.42	7.30	0.00	8.40	11.43	8.16	18.43	11.03	11.05	10.59	22.83	24.99	37.80

- [0231] 根据相对保留时间稳定及各批次样品均能检出且峰相对较高的原则，共选择了13个重复性较好的峰作为特征峰。结果表明，当峰3作为S峰时，20批次贯众炭标准汤剂特征峰相对保留时间RSD在0.40%~0.86%，20批次贯众炭标准汤剂13个特征峰相对保留时间RSD均小于10%。
- [0232] 最终规定：供试品色谱中应呈现13个特征峰，除峰1、峰2外，均应与对照药材参照物色谱中的11个特征峰保留时间相对应，与原儿茶酸对照品参照物峰相对应的峰为S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的±10%范围之内。规定值为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.51(峰4)、2.75(峰5)、2.81(峰6)、3.34(峰7)、3.43(峰8)、3.50(峰9)、3.67(峰10)、4.57(峰11)、4.72(峰12)、4.77(峰13)。图19为贯众标准汤剂对照特征图谱，峰1：5-羟甲基糠醛；峰3(S)：原儿茶酸；注：色谱柱：CORTECS®UPLC®T32.1×150mm,1.6μ。
- [0233] 实施例10贯众炭配方颗粒色谱条件

[0234] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为150 mm，内径为2.1mm，粒度为1.6 μ m)；以乙腈为流动相A，以0.1%甲酸溶液为流动相B，按下表中的规定进行梯度洗脱；柱温为35℃；流速为0.3ml/min，检测波长为250nm，理论板数按原儿茶酸峰计算应不低于5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0 ~ 8	1	99
8~18	1→15	99→85
18~35	15→25	85→75
35~50	25→26	75→74

- [0235] 10.1参照物溶液的制备
- [0236] 取贯众对照药材1g，置具塞锥形瓶中，加水50ml，煮沸30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加70%甲醇25ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)30分钟，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。另取原儿茶酸对照品适量，精密称定，精密加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μ g的溶液，作为对照品参照物溶液。
- [0237] 10.2供试品溶液的制备
- [0238] 取贯众炭配方颗粒，研细，取约0.2g，置具塞锥形瓶中，加入70%甲醇50ml，超声处理(功率600W，频率40kHz)30分钟，取出，放冷，取续滤液，即得。
- [0239] 10.3测定法
- [0240] 分别精密吸取参照物溶液与供试品溶液各1 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。
- [0241] 10.4波长选择
- [0242] 波长选择250nm。
- [0243] 10.5流动相种类考察
- [0244] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对流动相乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.1%磷酸进行考察，见图20。图20流动相种类考察。结果表明。流动相为乙腈-0.1%甲酸时，色谱峰分离度好，故流动相为乙腈-0.1%甲酸。
- [0245] 10.6柱温考察

[0246] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对柱温为25℃、30℃、35℃时进行考察。
见图21。图21柱温考察色谱图。

[0247] 结果表明，柱温在35℃时，色谱峰分离度好，柱温暂定为35℃。

[0248] 10.7流速考察

[0249] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对流速为0.25ml/min、0.3ml/min、0.35ml/min时进行了考察。见图22。图22流速考察。

[0250] 结果表明，流速分别为0.25ml/min、0.3ml/min、0.35ml/min时，各特征峰色谱图峰的信息量基本一致。在流速为0.3ml/min时，色谱峰分离度较好，故流速确定为0.30ml/min。

[0251] 10.8延迟性考察

[0252] 在以上拟定的实验条件基础上，将色谱图采集时间设为2倍。结果见图23。图23延迟性考察。结果表明，在色谱图在50分钟后，无色谱峰出现。

[0253] 综上所述，贯众配方颗粒特征图谱色谱条件与系统适应性试验确定为：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为150mm，内径为2.1mm，粒径为1.6 μ m)；以乙腈为流动相A，以0.1%甲酸溶液为流动相B，按下表中的规定进行梯度洗脱；柱温为35℃；流速为0.3ml/min，检测波长为250nm。理论板数按原儿茶酸峰计算应不低于5000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~8	6	94
8~18	6→15	94→85
18~35	15→25	85→75
35~50	25→26	75→74

[0254] 实施例11贯众炭配方颗粒前处理方法的优选

[0255] 11.1提取方式考察

[0256] 比较了回流提取与超声提取，色谱峰信息大致相同，最终选择操作简便的超声进行提取。见图24。图24不同提取方式色谱图。

[0257] 11.2提取溶剂考察

- [0258] 考察了甲醇、水、50%甲醇、70%甲醇作为提取溶媒,结果表明,用70%甲醇作为提取溶剂所得的色谱峰信息量大,分离度好,故选用70%甲醇作为提取溶剂。见图25。图25不同溶剂提取色谱图。
- [0259] 11.3提取时间考察
- [0260] 比较了超声提取15分钟、30分钟、60分钟,色谱图基本一致。故提取时间确定为15分钟,见图26。图26不同提取时间色谱图。
- [0261] 11.4提取溶剂量考察
- [0262] 比较了提取溶剂加入量25ml、50ml、100ml,在提取溶剂量为25ml时,色谱峰大小较为适宜,故提取溶剂量确定为25ml,见图27。图27不同提取溶剂量色谱图。
- [0263] 11.5最终确定供试品制备方法
- [0264] 取本品适量,研细,取约0.2g,置具塞锥形瓶中,加入70%甲醇25ml,超声处理(功率600W,频率40kHz)15分钟,摇匀,滤过,取续滤液,即得。
- [0265] 实施例12贯众炭配方颗粒方法学考察
- [0266] 12.1色谱峰指认
- [0267] 供试品溶液的制备:按最终确定供试品制备方法,制备贯众炭配方颗粒供试品溶液。
- [0268] 参照物溶液的制备:取原儿茶酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1ml含原儿茶酸20 μ g的对照品溶液,即得。另取5-羟甲基糠醛对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1ml含5-羟甲基糠醛50 μ g的对照品溶液,即得。
- [0269] 取贯众对照药材1g,置具塞锥形瓶中,加水50ml,煮沸30分钟,滤过,滤液蒸干,残渣加70%甲醇25ml,超声处理(功率600W,频率40kHz)15分钟,摇匀,滤过,取续滤液,作为对照药材参照物溶液。
- [0270] 阴性对照溶液的制备:按以上拟定的实验条件,制备缺贯众配方颗粒阴性对照溶液。
- [0271] 对贯众配方颗粒特征图谱峰进行定位,见图28。图28色谱峰指认。
- [0272] 12.2精密度试验

[0273] 取贯众配方颗粒(批号：KL-01)供试品溶液，按拟定实验方法连续进样6次，每次1 μ l，计算各特征峰的保留时间及峰面积。见表16-1和16-2。

[0274] 表16-1精密度考察-保留时间

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	7.075	7.920	9.251	13.746	24.772	25.219	30.122	30.867	31.467	32.950	41.191	42.351	42.795
2	7.078	7.922	9.257	13.752	24.774	25.215	30.116	30.860	31.458	32.942	41.166	42.326	42.770
3	7.079	7.924	9.261	13.753	24.771	25.211	30.125	30.866	31.464	32.947	41.172	42.331	42.777
4	7.078	7.923	9.261	13.756	24.768	25.209	30.118	30.862	31.463	32.947	41.169	42.328	42.771
5	7.069	7.915	9.243	13.741	24.757	25.206	30.110	30.861	31.463	32.949	41.177	42.336	42.780
6	7.071	7.915	9.239	13.738	24.752	25.202	30.1	30.852	31.454	32.937	41.172	42.335	42.779
RSD(%)	0.06	0.06	0.11	0.06	0.04	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03

[0275] 表16-2精密度考察-峰面积

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	52.748	69.318	81.030	29.835	3.863	33.085	6.450	27.417	15.340	25.390	16.640	9.416	6.444
2	52.390	69.786	81.643	29.805	3.848	32.638	6.370	27.031	15.128	24.889	15.878	9.343	6.347
3	52.761	70.352	82.433	29.972	3.904	32.869	6.457	27.299	15.181	25.098	16.351	9.302	6.408
4	52.724	70.473	82.620	29.955	3.858	32.787	6.429	27.222	15.197	25.055	16.046	9.357	6.388
5	52.735	67.782	81.980	29.902	3.864	32.793	6.362	27.202	15.119	25.088	15.675	9.323	6.344
6	52.740	68.011	78.651	29.845	3.915	32.762	6.184	27.240	15.128	24.987	15.619	9.346	6.330
RSD(%)	0.28	1.67	1.8	0.23	0.71	0.46	1.6	0.47	0.56	0.68	2.49	0.42	0.7

[0276] 结果表明，精密度各特征峰保留时间RSD为0.02%–0.11%，峰面积RSD为0.23%–2.49%。该仪器精密度良好。

[0277] 12.3重复性考察

[0278] 精密称取贯众炭配方颗粒(批号：KL-01)6份，按拟定实验方法进行制备及测定。见表17-1和17-2。

[0279] 表17-1重复性考察-相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.72	3.25	3.34	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
2	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
3	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
4	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.58	4.62
5	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.40	3.56	4.45	4.57	4.62
6	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.72	3.25	3.33	3.39	3.55	4.44	4.57	4.62
RSD(%)	0.00	0.00	0.00	0.28	0.16	0.00	0.00	0.13	0.13	0.12	0.10	0.12	0.12

[0280] 表17-2重复性考察-相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	0.65	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.33	0.19	0.30	0.19	0.11	0.06
2	0.64	0.87	1.00	0.35	0.05	0.40	0.08	0.33	0.18	0.30	0.15	0.11	0.07
3	0.65	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.32	0.19	0.30	0.18	0.11	0.07
4	0.64	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.32	0.18	0.30	0.19	0.11	0.07
5	0.60	0.83	1.00	0.34	0.05	0.42	0.08	0.35	0.20	0.32	0.20	0.12	0.07
6	0.64	0.86	1.00	0.34	0.05	0.39	0.08	0.32	0.18	0.30	0.18	0.11	0.07
RSD(%)	2.93	1.86	0.00	1.49	0.00	3.06	0.00	3.57	4.38	2.70	9.49	3.66	5.98

[0281] 结果表明，重复性各特征峰相对保留时间RSD为0.00%–0.28%，相对峰面积RSD为0.00%–9.49%。该方法重复性良好。

[0282] 12.4中间精密度

[0283] 12.4.1不同人员不同时间

[0284] 在以上拟定的实验条件基础上，分别精密称取贯众颗粒，不同人员和不同时间制备供试品溶液，进行测定。见表18-1和18-2。

[0285] 表18-1中间精密度-相对保留时间比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.72	3.25	3.34	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
人员 B	0.77	0.86	1.00	1.48	2.67	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.56	4.61
时间 2	0.76	0.86	1.00	1.48	2.66	2.71	3.24	3.32	3.38	3.54	4.43	4.55	4.60
RSD(%)	0.76	0.00	0.00	0.39	0.38	0.22	0.18	0.35	0.35	0.33	0.27	0.34	0.33

[0286] 表18-2中间精密度-相对峰面积比值

序号	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
人员 A	0.65	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.33	0.19	0.30	0.19	0.11	0.06
人员 B	0.63	0.85	1.00	0.34	0.05	0.39	0.08	0.32	0.18	0.30	0.19	0.11	0.07
时间 2	0.64	0.87	1.00	0.34	0.05	0.39	0.08	0.32	0.18	0.30	0.19	0.11	0.07
RSD(%)	1.57	1.34	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00	1.79	3.15	0.00	0.00	0.00	8.67

[0287] 结果表明，由不同的人员在不同的时间对同一个样品进行测定，方法精密度较好。

[0288] 12.4.2仪器耐用性考察

[0289] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对仪器1；仪器2；仪器3进行考察。见图29，表19-1和19-2。图29不同仪器考察。

[0290] 表19-1色谱柱耐用性考察-相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.72	3.25	3.34	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
仪器 2	0.69	0.86	1.00	1.82	3.38	3.41	4.02	4.10	4.17	4.35	5.33	5.47	5.52
仪器 3	0.83	0.87	1.00	1.46	2.45	2.50	2.95	3.03	3.09	3.22	4.06	4.27	4.31
RSD(%)	9.21	0.67	0.00	12.57	17.08	16.51	16.21	15.78	15.65	15.63	14.11	13.06	13.01

[0291] 表19-2色谱柱耐用性考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
仪器 1	0.65	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.33	0.19	0.30	0.19	0.11	0.06
仪器 2	0.63	0.92	1.00	0.35	0.04	0.39	0.08	0.32	0.17	0.29	0.09	0.11	0.08
仪器 3	0.60	0.93	1.00	0.38	0.05	0.40	0.08	0.35	0.18	0.30	0.10	0.11	0.07
RSD(%)	4.02	3.55	0.00	4.82	12.38	1.47	0.00	4.59	5.56	1.95	43.49	0.00	14.29

[0292] 结果表明，用上述三种仪器检测时，各特征峰相对保留时间的RSD在0.67% ~ 17.08%；各特征峰相对峰面积的RSD在0.00% ~ 43.49%，不同仪器耐用性较差。

[0293] 12.5耐用性考察

[0294] 12.5.1色谱柱耐用性考察

[0295] 在以上拟定的实验条件基础上，分别对色谱柱1；色谱柱2；色谱柱3进行考察。见图30，表20-1和20-2。图30不同色谱柱考察。

[0296] 表20-1色谱柱耐用性考察-相对保留时间

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	0.77	0.86	1.00	1.49	2.68	2.72	3.25	3.34	3.40	3.56	4.45	4.58	4.63
色谱柱 2	0.67	0.96	1.00	1.33	2.41	2.43	2.89	2.93	2.99	3.11	4.02	4.12	4.17
色谱柱 3	0.43	0.61	1.00	1.62	2.69	2.74	3.28	3.34	3.53	3.39	4.50	4.59	4.66
RSD(%)	28.04	22.26	0.00	9.82	6.13	6.60	6.92	7.39	8.53	6.78	6.11	6.07	6.13

[0297] 表20-2色谱柱耐用性考察-相对峰面积

仪器	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
色谱柱 1	0.65	0.87	1.00	0.35	0.05	0.39	0.08	0.33	0.19	0.30	0.19	0.11	0.06
色谱柱 2	0.55	0.86	1.00	0.49	0.08	0.53	0.10	0.42	0.21	0.38	0.11	0.26	0.09
色谱柱 3	0.50	0.98	1.00	0.24	0.04	0.46	0.01	0.38	0.19	0.34	0.14	0.06	0.06
RSD(%)	13.48	7.38	0.00	34.81	36.74	15.22	74.62	11.98	5.88	11.77	27.56	72.62	24.75

[0298] 由图30可知，CORTECS®UPLC®T32.1×150mm,1.6μm(色谱柱1)的色谱图分离较好，因此推荐使用色谱柱CORTECS®UPLC®T32.1×150mm,1.6μm。

[0299] 12.6稳定性考察

[0300] 在以上拟定的实验条件基础上，取同一供试品溶液，分别于0h，3h，6h，9h，12h，18h，24h时测定。见表21-1和21-2。

[0301] 表21-1稳定性考察~保留时间

时间 (h)	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
0	7.109	7.979	9.266	13.761	24.806	25.243	30.153	30.905	31.508	32.996	41.278	42.455	42.901
3	7.132	8.000	9.316	13.790	24.826	25.245	30.175	30.915	31.511	32.999	41.264	42.444	42.886
6	7.129	7.996	9.308	13.784	24.809	25.234	30.158	30.900	31.498	32.986	41.266	42.443	42.887
9	7.129	7.996	9.309	13.784	24.821	25.247	30.166	30.906	31.504	32.992	41.262	42.440	42.884
12	7.133	8.000	9.318	13.792	24.820	25.243	30.172	30.912	31.507	32.992	41.264	42.443	42.887
18	7.135	7.999	9.320	13.791	24.821	25.242	30.167	30.905	31.502	32.988	41.254	42.433	42.874
24	7.106	7.973	9.274	13.764	24.803	25.238	30.151	30.899	31.498	32.986	41.233	42.406	42.851
RSD(%)	0.17	0.14	0.24	0.10	0.04	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04

[0302] 表21-2稳定性考察-峰面积

时间 (h)	特征峰												
	峰 1	峰 2	峰 3 (S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
0	53.000	71.509	81.807	28.944	3.911	32.230	6.268	26.703	15.367	24.752	15.662	9.241	4.751
3	53.322	72.234	83.928	28.837	3.834	32.906	6.369	27.081	15.647	25.217	16.491	9.434	5.347
6	53.085	71.789	83.315	28.634	3.873	32.551	6.329	26.848	15.423	24.963	16.242	9.321	5.326
9	53.268	72.013	83.607	28.639	3.861	32.613	6.326	26.897	15.460	24.919	16.320	9.285	5.395

12	52.908	71.598	83.131	28.500	3.828	32.223	6.301	26.607	15.300	24.629	16.083	9.196	5.284
18	53.445	72.398	83.875	28.882	3.910	32.593	6.339	26.932	15.367	24.889	16.159	9.322	5.651
24	53.426	72.342	83.276	28.902	3.879	32.683	6.396	26.924	15.345	24.950	15.732	9.381	6.056
RSD (%)	0.40	0.50	0.86	0.59	0.86	0.76	0.67	0.59	0.75	0.74	1.89	0.87	7.32

- [0303] 结果表明，其相对应的特征峰保留时间的RSD在0.02% ~ 0.24%，峰面积RSD为0.40%–7.32%。样品溶液在24小时内较稳定。
- [0304] 综上所述，各特征峰相对保留时间的RSD在以上各项考察中均符合要求，该方法良好。将上述13个特征峰纳入后续考察。
- [0305] 实施例13特征峰的确定及对照图谱的建立
- [0306] 13.1批贯众配方颗粒验证结果
- [0307] 采用拟定的方法对本品3批样品进行特征图谱的测定，计算相对保留时间、相对峰面积。见图31，表22–1和22–2。图313批贯众配方颗粒特征图谱验证图。
- [0308] 表22–1 3批贯众炭配方颗粒–相对保留时间

序号	批号	特征峰												
		峰 1	峰 2	峰 3(S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	验证 1	0.77	0.87	1.00	1.50	2.71	2.76	3.30	3.38	3.45	3.61	4.51	4.64	4.69
2	验证 2	0.77	0.87	1.00	1.50	2.72	2.77	3.30	3.39	3.46	3.62	4.52	4.65	4.70
3	验证 3	0.77	0.87	1.00	1.50	2.72	2.78	3.32	3.40	3.47	3.63	4.54	4.67	4.72
	RSD%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.37	0.35	0.30	0.29	0.28	0.34	0.33	0.33
	平均值	0.77	0.87	-	1.50	2.72	2.77	3.30	3.39	3.46	3.62	4.53	4.65	4.70
	90%	0.69	0.78	-	1.35	2.45	2.49	2.97	3.05	3.11	3.26	4.08	4.19	4.23
	110%	0.85	0.96	-	1.65	2.99	3.05	3.63	3.73	3.81	3.98	4.98	5.12	5.17

- [0309] 表22–2 3批贯众炭配方颗粒–相对峰面积

序号	批号	特征峰												
		峰 1	峰 2	峰 3(S)	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13
1	验证 1	0.49	0.74	1.00	0.31	0.03	0.43	0.08	0.31	0.19	0.30	0.15	0.11	0.08
2	验证 2	0.49	0.74	1.00	0.31	0.03	0.44	0.08	0.31	0.19	0.30	0.17	0.11	0.08
3	验证 3	0.49	0.74	1.00	0.31	0.03	0.44	0.08	0.31	0.19	0.30	0.15	0.11	0.08
	RSD%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33	0.00	0.00	0.00	0.00	7.38	0.00	0.00

- [0310] 根据相对保留时间稳定及各批次样品均能检出且峰相对较高的原则，共选择了13个重复性较好的峰作为特征峰。结果表明，当峰3作为S峰时，3批次贯众炭配方颗粒特征峰相对保留时间RSD在0.00%~0.37%，3批次贯众炭配方颗粒13个特征峰相对保留时间RSD均小于10%。
- [0311] 最终规定：供试品色谱中应呈现13个特征峰，除峰1、峰2外，均应与对照药材参照物色谱中的11个特征峰保留时间相对应，与原儿茶酸对照品参照物峰相对应的峰为S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的±10%范围之内。规定值为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.50(峰4)、2.72(峰5)、2.77(峰6)、3.30(峰7)、3.39(峰8)、3.46(峰9)、3.62(峰10)、4.53(峰11)、4.65(峰12)、4.70(峰13)。
- [0312] 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)对3批贯众炭配方颗粒进行合成，建立了贯众炭配方颗粒特征图谱的对照图谱。见图32，图32为贯众炭配方颗粒对照特征图谱。峰1：5-羟甲基糠醛；峰3(S)：原儿茶酸；色谱柱：CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6 μm。
- [0313] 对比例1
- [0314] 采用与实施例1相同的条件测定贯众药材，结果如图33~图35所述，其中图33为贯众药材的特征图谱，图34为贯众药材的特征图谱，图35为贯众药材对照特征图谱；峰1(S)：原儿茶酸；注：色谱柱：CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6 μm。由上述可以看出，通过本发明的方法，可以很好地将贯众药材饮片与贯众炭药材饮片进行鉴别。
- [0315] 对比例2
- [0316] 采用与实施例1相同的条件测定贯众标准汤剂，结果如图36~图38所述，其中图36为贯众标准汤剂的特征图谱(从下到上批号依次为：BT-01、BT-

02、BT-03、BT-04、BT-05、BT-06、BT-07、BT-08、BT-09、BT-10)，图37为贯众标准汤剂的特征图谱(从下到上批号依次为：BT-11、BT-12、BT-13、BT-14、BT-15、BT-16、BT-17、BT-18、BT-19、BT-20)，图38为贯众标准汤剂对照特征图谱；峰1(S)：原儿茶酸；注：色谱柱：CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6μm。由上述可以看出，通过本发明的方法，可以很好地将贯众标准汤剂与贯众炭标准汤剂进行鉴别。

- [0317] 对比例3
- [0318] 采用与实施例1相同的条件测定贯众配方颗粒，结果如图39～图40所述，其中图39为贯众配方颗粒的特征图谱(从下到上依次为：KL-001；KL-002；KL-003，图40为贯众配方颗粒对照特征图谱；峰1(S)：原儿茶酸；注：色谱柱：CORTECS®UPLC®T32.1×150mm，1.6μm。由上述可以看出，通过本发明的方法，可以很好地将贯众贯众配方颗粒与贯众炭贯众配方颗粒进行鉴别。
- [0319] 贯众及其制剂仅11个峰，比贯众炭少了峰1、峰2，能对贯众及贯众炭进行明显的鉴别。
- [0320] 对比例4
- [0321] 本对比例为采用不同梯度条件，其余与实施例1相同的结果：
- [0322] 流动相梯度：
- [0323] 梯度1：

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~10	1→15	99→85
10~35	15→25	85→75
35~50	25	75

- [0324] 结果如图41所示，由图可以看出，峰1.2缺失；峰5分开，峰12、13分离度差。
- [0325] 梯度2：

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0 ~ 10	1→5	99→95
10 ~ 18	5→15	95→85
18~35	15→25	85→75
35~50	25	75

[0326] 结果如图41所示，由图可以看出，峰2、3未分开，峰12、13分离度差。

[0327] 梯度3:

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0 ~ 5	1→5	99→95
5 ~ 20	5→20	95→80
20~35	20→25	80→75
35~50	25	75

[0328] 结果如图41所示，由图可以看出，峰11、12、13缺失。

[0329] 由上述可以看出，只有本发明的梯度条件，才能达到峰分离度良好的效果。

[0330] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种贯众与贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒的标准汤剂特征图谱构建方法，包括：
- A)将贯众炭原料采用溶剂溶解，得到待测液；
- B)将待测液采用高效液相色谱法测定，得到贯众炭原料的UPLC特征图谱；
- 所述高效液相色谱法色谱条件为：色谱柱为C18柱；流动相A为乙腈，流动相B为0.1%甲酸，梯度洗脱。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，还包括制备参照物溶液：分别取原儿茶酸和5-羟甲基糠醛，加水煮沸后，过滤，滤渣采用70%甲醇溶解，得到参照物溶液；所述参照物溶液的浓度为20 μ g/mL；
- 将所述参照物溶液采用高效液相色谱法测定，得到参照物的色谱图；并根据参照物的色谱图对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱的成分进行定性测定。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述梯度洗脱具体为：
- 0~8min，A相：1%、B相：99%；
- 8~18min，A相：1%~15%、B相：99%~85%；
- 18~35min，A相：15%~25%、B相：85%~75%；
- 35~50min，A相：25%~26%、B相：75%~74%。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述色谱柱为C18柱，规格为1.6 μ m，2.1×150mm；柱温35℃。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的方法，其特征在于，所述流动相流速为0.3mL/min；检测波长为250nm；进样量为1 μ L。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒UPLC特征图谱的相似度进行评价，得到由13个特征峰构成的贯众炭饮片、标准

汤剂、配方颗粒UPLC标准特征图谱，其中峰1为羟甲基糠醛，峰3为原儿茶酸。

[权利要求 7]

根据权利要求6所述的方法，其特征在于，在所述贯众炭标准汤剂特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.51(峰4)、2.75(峰5)、2.81(峰6)、3.34(峰7)、3.43(峰8)、3.50(峰9)、3.67(峰10)、4.57(峰11)、4.72(峰12)、4.77(峰13)；

在所述贯众炭饮片特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.86(峰2)、1.48(峰4)、2.67(峰5)、2.72(峰6)、3.24(峰7)、3.32(峰8)、3.39(峰9)、3.55(峰10)、4.44(峰11)、4.57(峰12)、4.61(峰13)；

在所述贯众炭配方颗粒特征图谱中，以原儿茶酸为参照峰S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，所述相对保留时间在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，所述规定值分别为：0.77(峰1)、0.87(峰2)、1.50(峰4)、2.72(峰5)、2.77(峰6)、3.30(峰7)、3.39(峰8)、3.46(峰9)、3.62(峰10)、4.53(峰11)、4.65(峰12)、4.70(峰13)。

[权利要求 8]

根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤A)所述溶剂为70%甲醇；所述提取方法为水煮后超声提取；所述超声功率为600W，频率为40kHz；所述提取时间为15~45min。

[权利要求 9]

根据权利要求8所述的方法，其特征在于，步骤A)所述贯众炭原料的质量g和溶剂的体积mL的比为(0.1~1):(10~50)。

[权利要求 10]

根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤A)所述贯众炭原料为贯众炭饮片、标准汤剂、配方颗粒。