



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116087392 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 09

(21) 申请号 202211703700.8

(22) 申请日 2022.12.29

(71) 申请人 江苏弘典中药产业研究院有限公司

地址 210042 江苏省南京市玄武区徐庄路6号4幢

申请人 南京中山制药有限公司

(72) 发明人 王海丽 李诗琪 赵开军 彭云

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

专利代理师 竞存

(51) Int. Cl.

G01N 30/86 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

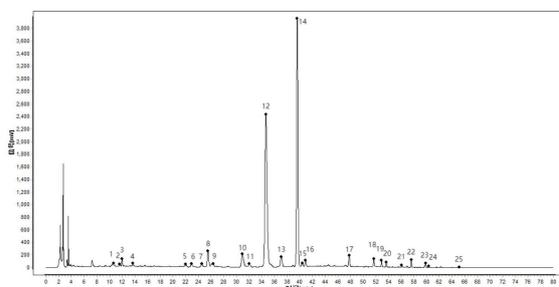
权利要求书3页 说明书18页 附图3页

(54) 发明名称

枳术颗粒指纹图谱及含量测定的检测方法

(57) 摘要

本申请提供了枳术颗粒指纹图谱建立方法及其成分含量测定方法,采用高效液相色谱法,通过合理选择色谱条件,实现枳术颗粒指纹图谱的建立,且所述方法具有简便、灵敏度高、分析速度快、专属性强等优势,从而可用于枳术颗粒的质量控制,也为进一步研究枳术颗粒的化学成分和质量标准提供依据。本申请实现枳术颗粒中7种化学成分含量的测定,首次将多波长的方法引入测定枳术颗粒,实现了对枳术颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的同时含量测定,方法操作简便、快速、专属性强,具有优异的稳定性、重现性和准确度等特点,有利于本发明枳术颗粒的含量测定及质量控制,同步实现三味组方药在制剂中的质量监测。



1. 一种枳术颗粒指纹图谱的建立方法,其特征在于,所述方法包括:

(1) 枳术颗粒供试品溶液制备:取质量为M1的枳术颗粒,以体积为V1的体积分数为50-100%的甲醇为溶剂进行提取,得到供试品溶液;其中, $M1:V1=1g:(10-50)mL$;

(2) 混合对照品溶液的制备:精密称取芸香柚皮苷、荷叶碱、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ对照品,置于容量瓶中,用50-100%的甲醇定容至刻度,摇匀,制成对照品溶液;

(3) 采用高效液相色谱检测所述供试品溶液,得到枳术颗粒的色谱图;

色谱条件包括:

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

流动相:A相为体积分数为0.05-0.15%的磷酸水溶液,B相为乙腈;

洗脱程序:采用体积分数25-90%A相,10-75%B相,梯度洗脱;

流速:0.8-1.2mL/min;

柱温:30-40°C;

进样体积:10-20 μ L;

检测波长:220 \pm 5nm;

(4) 将步骤(3)得到的枳术颗粒的色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析,得到枳术颗粒的指纹图谱。

2. 根据权利要求1所述的建立方法,其特征在于,步骤(1)中,所述提取为超声提取,提取时间为20-60min,提取功率为150-200W,提取频率为30-50kHz。

3. 根据权利要求1所述的建立方法,其特征在于,步骤(2)混合对照品溶液的制备:精密称取芸香柚皮苷、荷叶碱、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ对照品,加100%的甲醇制成含芸香柚皮苷50 \pm 5 μ g/mL、荷叶碱50 \pm 5 μ g/mL、柚皮苷100 \pm 5 μ g/mL、橙皮苷50 \pm 5 μ g/mL、新橙皮苷100 \pm 5 μ g/mL、柚皮素50 \pm 5 μ g/mL、橙皮素50 \pm 5 μ g/mL、川陈皮素50 \pm 5 μ g/mL、桔皮素50 \pm 5 μ g/mL、白术内酯Ⅲ50 \pm 5 μ g/mL、白术内酯Ⅱ50 \pm 5 μ g/mL的对照品溶液,优选的,制成含芸香柚皮苷50 μ g/mL、荷叶碱50 μ g/mL、柚皮苷100 μ g/mL、橙皮苷50 μ g/mL、新橙皮苷100 μ g/mL、柚皮素50 μ g/mL、橙皮素50 μ g/mL、川陈皮素50 μ g/mL、桔皮素50 μ g/mL、白术内酯

Ⅲ50 μ g/mL、白术内酯Ⅱ50 μ g/mL的对照品溶液。

4. 根据权利要求1或2所述的建立方法,其特征在于,步骤(3)所述洗脱程序为:

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10

7	85	15
20	82	18
30	81	19
45	65	35
55	40	60
65	25	75
70	90	10
80	90	10

5. 一种枳术颗粒对照指纹图谱建立方法,其特征在于,所述方法包括:

取批次数量为R的枳术颗粒,按照权利要求1-4中任一项所述枳术颗粒指纹图谱的建立方法,分别得到各批枳术颗粒的指纹图谱;将R批枳术颗粒的指纹图谱采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析,得到枳术颗粒对照指纹图谱;所述 $R \geq 15$ 。

6. 采用权利要求5所述的建立方法得到的枳术颗粒对照指纹图谱。

7. 根据权利要求6所述的枳术颗粒对照指纹图谱,其特征在于,所述枳术颗粒对照指纹图谱包括25个共有峰,指认11个色谱峰,其中10号峰为芸香柚皮苷,保留时间为31.796min,11号峰为荷叶碱,保留时间为32.878min,12号峰为柚皮苷,保留时间为35.722min,13号峰为橙皮苷,保留时间为37.937min,14号峰为新橙皮苷,保留时间为40.877min,18号峰为柚皮素,保留时间为51.926min,19号峰为橙皮素,保留时间为53.147min,22号峰为川陈皮素,保留时间为57.817min,23号峰为桔皮素,保留时间为60.025min,24号峰为白术内酯Ⅲ,保留时间为60.482min,25号峰为白术内酯Ⅱ,保留时间为65.342min。

8. 一种枳术颗粒质量控制方法,其特征在于,所述方法包括:

a. 取待测枳术颗粒,根据权利要求1-4中任一项所述的建立方法,得到待测枳术颗粒的色谱图;

b. 将步骤a得到的色谱图,与权利要求6所述的枳术颗粒对照指纹图谱进行相似度评价,若相似度 ≥ 0.90 ,判定待测枳术颗粒的质量合格。

9. 一种枳术颗粒中化学成分含量测定方法,其特征在于,采用高效液相色谱测定枳术颗粒中化学成分的含量,所述化学成分包括:芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ;

所述方法包括:

Z1. 建立各化学成分的标准曲线:

以体积分数为50-100%的甲醇为溶剂,在浓度范围内分别配制5-12个浓度梯度的各化学成分的混合对照品溶液;

在相同的色谱条件下,将各浓度梯度的混合对照品溶液分别注入高效液相色谱仪中,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分色谱峰,并获得各化学成分色谱峰面积;

所述色谱条件包括:

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

流动相:A相为体积分数为0.05-0.15%的磷酸水溶液,B相为乙腈;

洗脱程序:采用体积分数25-90%A相,10-75%B相,梯度洗脱;

流速:0.8-1.2mL/min;

柱温:30-40℃;

进样体积:10-20 μ L;检测波长:190-900nm全波长扫描,其中220 \pm 5nm波长下检测白术内酯Ⅲ、280nm \pm 5nm波长下检测芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、332nm \pm 5nm波长下检测川陈皮素;

以各化学成分色谱峰的峰面积为纵坐标,以各化学成分的浓度为横坐标,分别建立各化学成分的标准曲线;

Z2.获得待测枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积:

取质量为M1的待测枳术颗粒,以体积为V1的体积分数为50-100%的甲醇为溶剂进行提取,得到供试品溶液;其中,M1:V1=1g:(10-50)mL;

在与步骤Z1相同的色谱条件下,将所述供试品溶液注入高效液相色谱仪中,得到待测枳术颗粒的色谱图,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分的色谱峰,并获得各化学成分的色谱峰面积;

Z3.确定待测枳术颗粒中各化学成分的含量:

根据Z1建立的标准曲线,由Z2待测枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积,分别获得各化学成分的浓度C1,按照公式 $C=C1 \times V1/M1$ 分别计算出待测枳术颗粒中各化学成分的含量。

10.根据权利要求9所述的测定方法,其特征在于,Z1所述混合对照品溶液中,芸香柚皮苷浓度范围为0.0240-0.3993mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.1807-3.0123mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0121-0.2011mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.1502-2.5032mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0020-0.0325mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0027-0.0442mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0019-0.0313mg/ml。

11.根据权利要求9所述的建立方法,其特征在于,Z1所述洗脱程序具体为:

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
7	85	15
20	82	18
30	81	19
45	65	35
55	40	60
65	25	75
70	90	10
80	90	10

12.根据权利要求9所述的测定方法,其特征在于,步骤Z2中,所述提取为超声提取,提取时间为20-60min,提取功率为150-200W,提取频率为30-50kHz。

枳术颗粒指纹图谱及含量测定的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及中药分析技术领域,具体涉及中成药枳术颗粒指纹图谱及含量测定的检测方法。

背景技术

[0002] 中药及其制剂均为多组分复杂体系,因此评价其质量应采用与之相适应的,能提供丰富鉴别信息的检测方法,建立中药指纹图谱及其特征成分含量检测将能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量,进而对药品质量进行整体描述和评价。

[0003] 枳术颗粒制剂进行严格的质量控制,对于保证制剂的安全性、有效性及稳定性具有重要意义。枳术颗粒由麸炒枳实、麸炒白术、荷叶三味药组成,本法建立了在开展指纹图谱研究同时进行含量测定,同步实现三味组方药在制剂中的质量监测,完善了制剂质量控制方法。

[0004] 枳术颗粒为南京中山制药有限公司的独家产品,由麸炒枳实、麸炒白术、荷叶三味药组成,具有健脾消食,行气化湿的功效,临床上对脾胃虚弱,食少不化,脘腹胀满等病症有较好的疗效。枳术颗粒系利用现代提取方法由枳术丸改剂型来的国家四类中药创新药,具有疗效明确、方便服用等特点。

[0005] 现有技术中,关于枳术颗粒的研究报道很少,未有指纹图谱及含量测定同步进行,全面检测三味组方药质量的报道,采用现有方法进行检测,均无法实现多组分的有效分离和准确定量。本发明在现有技术的基础上,本研究主要针对其主要成分的指纹图谱及含量测定进行研究,可以更好的控制产品质量。

发明内容

[0006] 本申请的目的在于提供一种枳术颗粒指纹图谱建立方法及其成分含量测定方法,能够得到枳术颗粒的指纹图谱,能够分离25个共有峰,指认其中11个色谱峰,并能够同时测定枳术颗粒中至少7种化学成分的含量,可用于枳术颗粒的质量控制。具体技术方案如下:

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种枳术颗粒指纹图谱的建立方法,所述方法包括:

[0008] (1) 枳术颗粒供试品溶液制备:取质量为M1的枳术颗粒,以体积为V1的体积分数为50-100%的甲醇为溶剂进行提取,得到供试品溶液;其中, $M1:V1=1g:(10-50)mL$;当采用本申请供试品溶液的制备方法,结合本申请的高效液相色谱法的色谱条件,有利于在较短的分析时间内获得较多的特征峰,能够全面地从化学成分的角度建立枳术颗粒的指纹图谱,从而能够快速、准确、全面、可信地建立枳术颗粒的指纹图谱,可用于枳术颗粒的质量控制。

[0009] (2) 混合对照品溶液的制备:精密称取芸香柚皮苷、荷叶碱、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ对照品,置于容量瓶中,用50-100%的甲醇定容至刻度,摇匀,制成对照品溶液;本申请中,所述体积分数为50-100%的甲醇是指体积分数为50-100%的甲醇水溶液。

[0010] (3) 采用高效液相色谱检测所述供试品溶液,得到枳术颗粒的色谱图;

[0011] 色谱条件包括:

[0012] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

[0013] 流动相:A相为体积分数为0.05-0.15%的磷酸水溶液,B相为乙腈;

[0014] 洗脱程序:采用体积分数25-90%A相,10-75%B相,梯度洗脱;

[0015] 流速:0.8-1.2mL/min;

[0016] 柱温:30-40℃;

[0017] 进样体积:10-20μL;

[0018] 检测波长:220±5nm;

[0019] 采用本申请的色谱条件,能够使枳术颗粒中各化学成分获得更好的分离效果。

[0020] (4)将步骤(3)得到的枳术颗粒的色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析,得到枳术颗粒的指纹图谱。

[0021] 进一步的,步骤(1)中,所述提取为超声提取,提取时间为20-60min,提取功率为150-200W,提取频率为30-50kHz。

[0022] 进一步的,步骤(2)混合对照品溶液的制备:精密称取芸香柚皮苷、荷叶碱、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ对照品,加100%的甲醇制成含芸香柚皮苷 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、荷叶碱 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、柚皮苷 $100 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、新橙皮苷 $100 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、柚皮素 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、橙皮素 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、川陈皮素 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、桔皮素 $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、白术内酯Ⅲ $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 、白术内酯Ⅱ $50 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液;

[0023] 优选的,制成含芸香柚皮苷 $50 \mu\text{g/mL}$ 、荷叶碱 $50 \mu\text{g/mL}$ 、柚皮苷 $100 \mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 $50 \mu\text{g/mL}$ 、新橙皮苷 $100 \mu\text{g/mL}$ 、柚皮素 $50 \mu\text{g/mL}$ 、橙皮素 $50 \mu\text{g/mL}$ 、川陈皮素 $50 \mu\text{g/mL}$ 、桔皮素 $50 \mu\text{g/mL}$ 、白术内酯Ⅲ $50 \mu\text{g/mL}$ 、白术内酯Ⅱ $50 \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

[0024] 进一步的,步骤(3)所述洗脱程序为:

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
7	85	15
20	82	18
30	81	19
[0025] 45	65	35
55	40	60
65	25	75
70	90	10
80	90	10

[0026] 本发明的第二个目的是提供一种枳术颗粒对照指纹图谱建立方法,所述方法包括:

[0027] 取批次数量为R的枳术颗粒,按照前述枳术颗粒指纹图谱的建立方法,分别得到各

批枳术颗粒的指纹图谱;将R批枳术颗粒的指纹图谱采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析,得到枳术颗粒对照指纹图谱;所述 $R \geq 15$ 。

[0028] 本申请对所述中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析时的参数设置不做限定,只要能够实现本申请的目的即可。将所述R批枳术颗粒的指纹图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件分析,可按照均值法或者中位数法得到枳术颗粒的对照指纹图谱。

[0029] 本发明的第三个目的是提供采用前述的建立方法得到的枳术颗粒对照指纹图谱。

[0030] 进一步的,所述枳术颗粒对照指纹图谱包括25个共有峰,指认11个色谱峰,其中10号峰为芸香柚皮苷,保留时间为31.796min,11号峰为荷叶碱,保留时间为32.878min,12号峰为柚皮苷,保留时间为35.722min,13号峰为橙皮苷,保留时间为37.937min,14号峰为新橙皮苷,保留时间为40.877min,18号峰为柚皮素,保留时间为51.926min,19号峰为橙皮素,保留时间为53.147min,22号峰为川陈皮素,保留时间为57.817min,23号峰为桔皮素,保留时间为60.025min,24号峰为白术内酯Ⅲ,保留时间为60.482min,25号峰为白术内酯Ⅱ,保留时间为65.342min。

[0031] 本申请中,所述“共有峰”,是指R批枳术颗粒的色谱图中均存在的保留时间相同、分离度良好的色谱峰,即各枳术颗粒的色谱图中所具有的共有峰。

[0032] 本发明的第四个目的时提供一种枳术颗粒质量控制方法,,所述方法包括:

[0033] a. 取待测枳术颗粒,根据前述的建立方法,得到待测枳术颗粒的色谱图;

[0034] b. 将步骤a得到的色谱图,与前述的枳术颗粒对照指纹图谱进行相似度评价,若相似度 ≥ 0.90 ,判定待测枳术颗粒的质量合格。

[0035] 具体的,本申请可以通过以下方法进行质量控制,采用本申请的方法获得枳术颗粒的指纹图谱或对照指纹图谱,对未知质量的枳术颗粒,按本申请的方法制备其供试品溶液,并按本申请的色谱条件检测供试品溶液,得到未知质量的枳术颗粒的色谱图,将未知质量枳术颗粒的色谱图,与枳术颗粒的指纹图谱或枳术颗粒的对照指纹图谱进行相似度评价,得到相似度 ≥ 0.90 ,从而判定枳术颗粒的质量合格。

[0036] 本发明的第五个目的是提供一种枳术颗粒中化学成分含量测定方法,,采用高效液相色谱测定枳术颗粒中化学成分的含量,所述化学成分包括:芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ;

[0037] 所述方法包括:

[0038] Z1. 建立各化学成分的标准曲线:

[0039] 以体积分数为50-100%的甲醇为溶剂,在浓度范围内分别配制5-12个浓度梯度的各化学成分的混合对照品溶液;

[0040] 在相同的色谱条件下,将各浓度梯度的混合对照品溶液分别注入高效液相色谱仪中,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分的色谱峰,并获得各化学成分的色谱峰面积;

[0041] 所述色谱条件包括:

[0042] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

[0043] 流动相:A相为体积分数为0.05-0.15%的磷酸水溶液,B相为乙腈;

[0044] 洗脱程序:采用体积分数25-90%A相,10-75%B相,梯度洗脱;

[0045] 流速:0.8-1.2mL/min;

[0046] 柱温:30-40℃;

[0047] 进样体积:10-20 μ L;检测波长:190-900nm全波长扫描,其中220 \pm 5nm波长下检测白术内酯Ⅲ、280nm \pm 5nm波长下检测芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、332nm \pm 5nm波长下检测川陈皮素;

[0048] 以各化学成分色谱峰的峰面积为纵坐标,以各化学成分的浓度为横坐标,分别建立各化学成分的标准曲线;

[0049] Z2. 获得待测枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积:

[0050] 取质量为M1的待测枳术颗粒,以体积为V1的体积分数为50-100%的甲醇为溶剂进行提取,得到供试品溶液;其中,M1:V1=1g:(10-50)mL;

[0051] 在与步骤Z1相同的色谱条件下,将所述供试品溶液注入高效液相色谱仪中,得到待测枳术颗粒的色谱图,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分的色谱峰,并获得各化学成分的色谱峰面积;

[0052] Z3. 确定待测枳术颗粒中各化学成分的含量:

[0053] 根据Z1建立的各化学成分的标准曲线,由Z2待测枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积,分别获得各化学成分的浓度C1,按照公式 $C=C1 \times V1/M1$ 分别计算出待测枳术颗粒中各化学成分的含量。

[0054] 进一步的,Z1所述混合对照品溶液中,芸香柚皮苷浓度范围为0.0240-0.3993mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.1807-3.0123mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0121-0.2011mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.1502-2.5032mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0020-0.0325mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0027-0.0442mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0019-0.0313mg/ml;

[0055] 进一步的,Z1所述洗脱程序具体为:

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
7	85	15
20	82	18
30	81	19
[0056] 45	65	35
55	40	60
65	25	75
70	90	10
80	90	10

[0057] 进一步的,步骤Z2中,所述提取为超声提取,提取时间为20-60min,提取功率为150-200W,提取频率为30-50kHz。

[0058] 本申请对混合对照品溶液的配制方式没有特别的限定,只要能够实现本申请的目的即可,例如可以先配制混合对照品储备液,其中各成分的浓度大于等于所述混合对照品溶液中各化学成分的浓度,然后通过稀释获得所述混合对照品溶液。

[0059] 本申请中,所用于建立标准曲线的混合对照品溶液可包括所述混合对照品储备液;本申请对所述混合对照品储备液的配制没有特别的限定,只要能够实现本申请的目的即可,示例性地,可通过优先单独配制各化学成分的储备液,再分别取各化学成分的储备液,配制所述混合对照品储备液。

[0060] 通过采用本申请供试品溶液的制备方法,实现获得包括7种化学成分的供试品溶液,使得枳术颗粒中化学成分含量的检测结果更加全面、准确、可信。

[0061] 本发明技术方案的有益效果在于:

[0062] 本申请提供的一种枳术颗粒指纹图谱建立方法,采用高效液相色谱法(HPLC),通过合理选择色谱条件,实现枳术颗粒指纹图谱的建立,且所述方法具有简便、灵敏度高、分析速度快、专属性强等优势,从而可用于枳术颗粒的质量控制,也为进一步研究枳术颗粒的化学成分和质量标准提供依据。

[0063] 本申请还提供一种枳术颗粒对照指纹图谱建立方法、枳术颗粒对照指纹图谱,及其在质量控制中的用途。通过对多批次枳术颗粒的指纹图谱进行分析,能够更准确地建立枳术颗粒的对照指纹图谱,从而能够更准确、可信地对枳术颗粒的质量进行评价。通过将待测枳术颗粒与建立的枳术颗粒对照指纹图谱进行相似度对比,即可准确、高效、简便的判定待测枳术颗粒的质量是否合格。

[0064] 本申请进一步提供一种枳术颗粒中化学成分含量测定方法,采用与所述枳术颗粒指纹图谱建立方法中相同的色谱条件,实现枳术颗粒中至少7种化学成分含量的测定。本发明首次将多波长的方法引入测定枳术颗粒,首次实现了对枳术颗粒中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的同时测定,该方法操作简便、快速、专属性强,具有优异的稳定性、重现性和准确度等特点。有利于本发明枳术颗粒的含量测定及质量控制,同步实现三味组方药在制剂中的质量监测。

附图说明

[0065] 图1为实施例1中的混合对照品的色谱图,其中各序号对应的化学成分为:10号峰为芸香柚皮苷,11号峰为荷叶碱,12号峰为柚皮苷,13号峰为橙皮苷,14号峰为新橙皮苷,18号峰为柚皮素,19号峰为橙皮素,22号峰为川陈皮素,23号峰为桔皮素,24号峰为白术内酯Ⅲ,25号峰为白术内酯Ⅱ。

[0066] 图2为实施例1-24中编号S1-S24的枳术颗粒的指纹图谱和实施例25中枳术颗粒的对照指纹图谱R的叠加谱图;

[0067] 图3为实施例25中枳术颗粒的对照指纹图谱R;其中各序号对应的化学成分中,已知的化学成分为:10号峰为芸香柚皮苷,11号峰为荷叶碱,12号峰为柚皮苷,13号峰为橙皮苷,14号峰为新橙皮苷,18号峰为柚皮素,19号峰为橙皮素,22号峰为川陈皮素,23号峰为桔皮素,24号峰为白术内酯Ⅲ,25号峰为白术内酯Ⅱ。

[0068] 图4为实施例26中混合对照品溶液的色谱图;其中,各序号对应的化学成分为:10号峰为芸香柚皮苷、12号峰为柚皮苷、13号峰为橙皮苷、14号峰为新橙皮苷、18号峰为柚皮素、22号峰为川陈皮素、24号峰为白术内酯Ⅲ。

[0069] 图5为实施例26中编号S1的枳术颗粒的供试品溶液的色谱图。

具体实施方式

[0070] 下面对本申请所用的仪器、试剂和材料进行说明。

[0071] 仪器:岛津LC-40D液相色谱仪;RODI-220A1纯水机(锐思捷水纯化技术有限公司);ML104/02万分之一电子天平、百万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KH-500E型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版):国家药典委员会。

[0072] 试剂:乙腈色谱级(批号:22075301;厂家:安徽天地高纯溶剂有限公司);磷酸色谱级(批号:C14276009;厂家:上海麦克林生化科技有限公司);甲醇分析级(批号:20220624;厂家:国药集团化学试剂有限公司);试验用水为RODI-220A1超纯水。

[0073] 试药:对照品芸香柚皮苷(纯度以99.27%计,成都迈斯克医药科技有限公司)、荷叶碱(纯度以99.8%计,中国食品药品检定所)、柚皮苷(纯度以93.4%计,中国食品药品检定所)、橙皮苷(纯度以95.3%计,中国食品药品检定所)、新橙皮苷(纯度以99.4%计,中国食品药品检定所)、柚皮素(纯度以98%计,上海融禾医药科技有限公司)、橙皮素(纯度以98%计,德斯特生物)、川陈皮素(纯度以100%计,中国食品药品检定所)、桔皮素(纯度以98%计,上海融禾医药科技有限公司)、白术内酯Ⅲ(纯度以99.9%计,中国食品药品检定所)、白术内酯Ⅱ(纯度以99.9%计,中国食品药品检定所)。24批枳术颗粒样品来源于南京中山制药有限公司,均已检验合格,样品信息详见表1。

[0074] 表1枳术颗粒样品信息

样品编号	批号	样品编号	批号	样品编号	批号
S1	190201	S9	201103	S17	220101
S2	200301	S10	201104	S18	220201
S3	200401	S11	210101	S29	220301
[0075] S4	200501	S12	210201	S20	220401
S5	200601	S13	210301	S21	220501
S6	201001	S14	210302	S22	220502
S7	201101	S15	210303	S23	220601
S8	201102	S16	210304	S24	220602

[0076] 实施例1

[0077] 取编号S1的枳术颗粒内容物研细,精密称取质量M1为1g,精密加入100%甲醇溶液10mL,密塞,称定重量,超声30min,提取功率为180W,提取频率为40kHz;放冷,再称定重量,甲醇溶液补足减失的量,摇匀,0.22μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

[0078] 精密称取芸香柚皮苷、荷叶碱、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素、白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅱ对照品,加100%甲醇制49.54μg/mL、51.35μg/mL、102.07μg/mL、50.45μg/mL、102.76μg/mL、49.92μg/mL、50.50μg/mL、51.52μg/mL、51.98μg/mL、51.52μg/mL、50.02μg/mL的混合对照品溶液。

[0079] 采用高效液相色谱检测所述混合对照品溶液及供试品溶液,得到混合对照品色谱图(图1)及编号S1的枳术颗粒的色谱图(图2);其中,色谱条件包括:

[0080] 色谱柱:Waters Symmetry C18(4.6*250mm,5 μ m);

[0081] 流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),

[0082] 洗脱梯度:0-7min,90%-85%A;7-20min,85%-82%A;20-30min,82%-81%A;30-45min,81%-65%A;45-55min,65%-40%A;55-65min,40%-25%A;65-70min,25%-90%A;70-80min,90%A;

[0083] 流速1.0mL/min;

[0084] 柱温30 $^{\circ}$ C;

[0085] 检测波长指纹图谱为220nm,

[0086] 进样量10 μ L。

[0087] 将编号S1的枳术颗粒的色谱图,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,建立编号S1的枳术颗粒的指纹图谱,如图2中的S1所示。

[0088] 实施例2-24

[0089] 除了分别取编号S2-S24的枳术颗粒替换实施例1中编号S1的枳术颗粒外,其余与实施例1相同,分别得到编号S2-S24的枳术颗粒的指纹图谱;其中,编号S2-S24的枳术颗粒的指纹图谱分别如图2中的S2-S24所示。

[0090] 实施例25

[0091] (1)取实施例1-24得到的编号S1-S24的枳术颗粒的指纹图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行分析,设定编号S20的枳术颗粒的指纹图谱为参照图谱,时间窗宽度设定为0.1min,采用平均数法,进行多点校正和对色谱峰进行自动匹配,得到枳术颗粒的对照指纹图谱,并计算相似度;所得枳术颗粒的对照指纹图谱如图2和图3中的R所示。

[0092] 经分析,识别25个共有峰,即枳术颗粒包括25个共有色谱峰,依次编号,其中采用对照品比对,指认11个色谱峰,其中10号峰为芸香柚皮苷,保留时间为31.796min,11号峰为荷叶碱,保留时间为32.878min,12号峰为柚皮苷,保留时间为35.722min,13号峰为橙皮苷,保留时间为37.937min,14号峰为新橙皮苷,保留时间为40.877min,18号峰为柚皮素,保留时间为51.926min,19号峰为橙皮素,保留时间为53.147min,22号峰为川陈皮素,保留时间为57.817min,23号峰为桔皮素,保留时间为60.025min,24号峰为白术内酯III,保留时间为60.482min,25号峰为白术内酯II,保留时间为65.342min;相似度评价结果见表2,可见相似度均在0.90以上,表明所建立的枳术颗粒指纹图谱物质基准的稳定性较好,可以反映其指纹特征,各批次枳术颗粒的指纹图谱具有较高的一致性。

[0093] 表2相似度结果

[0094]

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18	S 19	S 20	S 21	S 22	S 23	S 24	S 25	对 照 指 纹 图 谱
S 1	1	0. 9 3 6	0. 9 2 5	0. 9 2 4	0. 9 1 6	0. 9 3 4	0. 9 3 4	0. 9 3 3	0. 9 9 3	0. 9 9 3	0. 9 4 2	0. 9 3 5	0. 9 3 4	0. 9 3 6	0. 9 3 5	0. 9 5 2	0. 9 5 2	0. 9 4 8	0. 9 5 3	0. 9 5 8	0. 9 7 1	0. 9 7 9	0. 9 6 5	0. 9 6 9	0. 9 5 9	0. 9 4 9
S 2	3	1	0. 9 8	0. 9 7	0. 9 6	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 7	0. 9 2	0. 9 3	0. 9 4	0. 9 9	0. 9 9
S 3	2	9	1	1	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 7	0. 9 5	0. 9 5	0. 9 7	0. 9 7	0. 9 5	0. 9 5	0. 9 6	0. 9 5	0. 9 3	0. 9 7	0. 9 8	0. 9 8	0. 9 9	0. 9 9	0. 9 6
S 4	9	9	1	1	0. 9 9																					

[0095]

	2	9			9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	9		
		7			7	8	6	7	7	6	5	4	3	6	6	6	4	3	4	3	1	4	6	8	4	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.		0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.		
5	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
4	9	9	9	9	9			9	9		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.		
6	9	9	9	9	9	1		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
1	9	9	9	9	9			9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
6	6	6	8	8	7			8	8	8	8	6	5	5	7	8	8	4	4	5	4	2	4	6	8	5
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
7	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
3	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
4	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
8	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
3	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
4	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
9	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
3	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
9	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
0	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
3	9	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
1	4	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
1	2	9	7	5	6			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
2	3	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
5	8	5	4	8	5			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
3	3	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
4	8	5	3	8	5			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	
3	3	9	9	9	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
4	6	9	7	6	9			9	9					9	9				9	9	9	9	9	9	9	
S	0.	0.	0.	0.	0.			0.	0.					0.	0.				0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	
1	9	9	9	9	9	1	1	9	9	1	1	1	1	9	9	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	

[0099] 取编号S6的枳术颗粒,按实施例1的方法制备供试品溶液,按实施例1的色谱条件连续进样6次,记录HPLC色谱图;将得到的各色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,测得相似度均为1.000,表明仪器精密度良好。

[0100] (2-2)稳定性试验

[0101] 取编号S6的枳术颗粒,按实施例1的方法制备供试品溶液,按实施例1的色谱条件,分别于0、2、4、6、8、10、12、24h进样检测,记录HPLC色谱图;将得到的各色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,测得相似度均1.000,表明供试品溶液在24h内稳定。

[0102] (2-3)重复性试验

[0103] 取编号S6的枳术颗粒,按实施例1的方法平行制备供试品溶液6份,分别按实施例1的色谱条件进样检测,记录HPLC色谱图;将得到的各色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,测得相似度均为1.000,表明该方法重复性良好。

[0104] 实施例26

[0105] Z1.检测波长

[0106] 190-900nm全波长扫描,其中220nm波长下检测白术内酯Ⅲ;280nm波长下检测芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素;332nm波长下检测川陈皮素;

[0107] Z2.建立各化学成分的标准曲线

[0108] 分别精密称取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品4、30、2、25mg至10ml容量瓶1中;精密称取柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ1.5、2、1.5mg至10ml容量瓶2中,用甲醇定容;取容量瓶2中2ml溶液至容量瓶1中,用甲醇定容,得混合对照品储备液。取混合对照品储备液0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5,甲醇定容至5ml容量瓶中,得到包含混合对照品储备液在内的7个含有不同已知浓度的各化学成分的混合对照品溶液作为标准曲线溶液。

[0109] 标准曲线溶液1中芸香柚皮苷浓度范围为0.0240mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.1807mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0121mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.1502mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0020mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0027mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0019mg/ml;

[0110] 标准曲线溶液2中芸香柚皮苷浓度范围为0.0399mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.3012mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0201mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.2503mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0033mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0044mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0031mg/ml;

[0111] 标准曲线溶液3中芸香柚皮苷浓度范围为0.0799mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.6025mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0402mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.5006mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0065mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0088mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0063mg/ml;

[0112] 标准曲线溶液4中芸香柚皮苷浓度范围为0.1198mg/ml,柚皮苷浓度范围为0.9037mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0603mg/ml,新橙皮苷浓度范围为0.7510mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0098mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0133mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0094mg/ml;

[0113] 标准曲线溶液5中芸香柚皮苷浓度范围为0.1597mg/ml,柚皮苷浓度范围为1.2049mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.0804mg/ml,新橙皮苷浓度范围为1.0013mg/ml,柚皮素

浓度范围为0.0130mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0177mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0125mg/ml;

[0114] 标准曲线溶液6中芸香柚皮苷浓度范围为0.1997mg/ml,柚皮苷浓度范围为1.5062mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.1006mg/ml,新橙皮苷浓度范围为1.2516mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0163mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0221mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0157mg/ml;

[0115] 标准曲线溶液7(即混合对照品储备液)中芸香柚皮苷浓度范围为0.3993mg/ml,柚皮苷浓度范围为3.0123mg/ml,橙皮苷浓度范围为0.2011mg/ml,新橙皮苷浓度范围为2.5032mg/ml,柚皮素浓度范围为0.0325mg/ml,川陈皮素浓度范围为0.0442mg/ml,白术内酯Ⅲ浓度范围为0.0313mg/ml;

[0116] 在相同的色谱条件下,将各混合对照品溶液分别注入高效液相色谱仪中,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分的色谱峰,并获得各化学成分的色谱峰面积;

[0117] 其中,所述色谱条件包括:

[0118] 色谱柱:Waters Symmetry C18(4.6*250mm,5 μ m);

[0119] 流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),

[0120] 洗脱梯度:0-7min,90%-85%A;7-20min,85%-82%A;20-30min,82%-81%A;30-45min,81%-65%A;45-55min,65%-40%A;55-65min,40%-25%A;65-70min,25%-90%A;70-80min,90%A;

[0121] 流速1.0mL/min;

[0122] 柱温30 $^{\circ}$ C;

[0123] 检测波长指纹图谱为220nm、280nm、332nm,

[0124] 进样量10 μ L。

[0125] 以各化学成分色谱峰的峰面积(Y)为纵坐标,以各化学成分的浓度(X)为横坐标,进行回归分析,分别建立各化学成分的标准曲线,得到各化学成分的线性回归方程及相关系数r,7种化学成分的标准曲线结果见表3,结果显示7种化学成分在各自线性范围内的相关系数 $r \geq 0.999$,表明7种化学成分在其线性范围内的线性关系良好。

[0126] 表3 7种化学成分的标准曲线

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/(mg·mL ⁻¹)
芸香柚皮苷(Narirutin)	$Y=2 \times 10^7 X - 12414$	0.999	0.0240-0.3993
柚皮苷(Naringin)	$Y=2 \times 10^7 X + 34495$	0.999	0.1807-3.0123
[0127] 橙皮苷(Hesperidin)	$Y=2 \times 10^7 X - 7834.8$	0.999	0.0121-0.2011
新橙皮苷(Neohesperidin)	$Y=2 \times 10^7 X + 253276$	0.999	0.1502-2.5032
柚皮素(Naringenin)	$Y=3 \times 10^7 X - 400.28$	0.999	0.0020-0.0325
川陈皮素(Nobiletin)	$Y=4 \times 10^7 X - 3402.6$	0.999	0.0027-0.0442
白术内酯Ⅲ(AtractylenolideⅢ)	$Y=3 \times 10^7 X - 4195.2$	0.999	0.0019-0.0313

[0128] Z3. 获得待测枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积:

[0129] 取编号S1的枳术颗粒内容物研细,精密称取质量M1为1g,精密加入甲醇溶液10mL,密塞,称定重量,超声30min,提取功率为180W,提取频率为40kHz;放冷,再称定重量,甲醇溶液补足减失的量,摇匀,0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。重复制备3份编号S1的枳术颗粒的供试品溶液。

[0130] 在与步骤Z2相同的色谱条件下,将供试品溶液注入高效液相色谱仪中,得到枳术颗粒的色谱图,根据各化学成分的保留时间确定各化学成分的色谱峰,并获得编号S1的枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积;

[0131] Z4. 确定待测枳术颗粒中各化学成分的含量:

[0132] 根据Z2已建立的各化学成分的标准曲线,由编号S1的枳术颗粒中各化学成分的色谱峰面积,分别获得各化学成分的浓度C1,按照公式 $C=C1 \times V1/M1=C1 \times 10\text{mL}/1\text{g}$ 分别计算出编号S1的枳术颗粒中各化学成分的含量C,结果如表4所示,将枳术颗粒中各化学成分含量的单位以mg/g表示。

[0133] 实施例27-49

[0134] 除了分别取编号S2-S24的枳术颗粒替换实施例26中编号S1的枳术颗粒外,其余与实施例26相同,分别得到编号S2-S24的枳术颗粒中各化学成分的含量,结果见表4。

[0135] 表4编号S1-S24的枳术颗粒中各化学成分的含量(mg/g)

编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮素	川陈皮素	白术内酯 III
(No.)	(Narirutin)	(Naringin)	(Hesperidin)	(Neohesperidin)	(Naringenin)	(Nobiletin)	(AtractylenolideIII)
S1	0.63	6.99	1.07	14.28	0.07	0.08	0.06
S2	0.51	7.17	0.32	6.88	0.04	0.07	0.06
S3	0.52	5.30	0.52	4.68	0.02	0.10	0.08
S4	0.53	5.16	0.57	4.52	0.03	0.11	0.09
S5	0.60	6.69	0.49	6.53	0.06	0.09	0.06
S6	0.91	7.73	0.46	6.50	0.08	0.10	0.08
S7	1.14	14.32	0.75	13.67	0.18	0.14	0.10
S8	1.17	14.68	0.77	13.99	0.19	0.15	0.10
S9	1.33	16.62	0.84	15.31	0.21	0.15	0.10
S10	1.36	17.49	0.89	16.18	0.22	0.15	0.10
[0136] S11	1.15	14.95	0.81	14.76	0.18	0.14	0.12
S12	0.48	11.04	0.35	10.64	0.31	0.10	0.10
S13	0.40	10.36	0.29	9.96	0.34	0.10	0.10
S14	1.32	17.58	0.94	17.15	0.25	0.15	0.13
S15	1.35	17.98	0.95	17.52	0.26	0.16	0.13
S16	1.33	17.72	0.94	17.24	0.25	0.15	0.13
S17	1.04	13.80	0.81	14.75	0.15	0.16	0.14
S18	1.00	13.67	0.79	14.56	0.15	0.16	0.13
S19	0.98	13.10	0.76	13.70	0.14	0.15	0.13
S20	1.11	13.62	0.83	15.01	0.14	0.18	0.07
S21	1.01	12.58	0.78	14.24	0.14	0.16	0.07
S22	1.08	14.70	1.00	18.49	0.20	0.19	0.07
S23	1.20	16.34	1.11	20.55	0.23	0.21	0.08
S24	1.27	17.39	1.18	22.20	0.22	0.20	0.06

[0137] 实施例50枳术颗粒中化学成分含量测定方法的方法学考察

[0138] (1) 专属性考察

[0139] 取实施例26中的第4个混合对照品溶液(即标准曲线溶液4),经检测得到其色谱图如图4所示;取实施例26中编号S1的枳术颗粒的供试品溶液,经检测得到其色谱图如图5所示;根据图4和图5可以看出,在芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯III的对照品的相应位置上,供试品溶液中具有相同保留时间的色谱峰出现,同时各化学成分的分度度良好,表明该方法具有良好的专属性。

[0140] (2) 精密度试验

[0141] 取实施例26中的第4个混合对照品溶液(即标准曲线溶液4),按实施例26中的色谱条件连续进样测定6次,记录HPLC色谱图,经计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的保留时间RSD值分别为0.05%、0.05%、0.03%、0.02%、0.01%、0.01%、0.01%,峰面积RSD值分别为0.24%、0.24%、0.33%、0.25%、0.24%、0.24%、0.11%,结果表明仪器精密度良好。

[0142] (3) 稳定性试验

[0143] 取编号S6的枳术颗粒,按实施例26的方法制备供试品溶液,按实施例26的色谱条件,分别于0、2、4、6、8、10、12、24h进样检测,记录HPLC色谱图,经计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的保留时间RSD值分别为0.03%、0.04%、0.02%、0.02%、0.01%、0.01%、0.01%,峰面积RSD值分别为4.70%、1.04%、1.10%、1.10%、0.94%、0.91%、0.80%,表明供试品溶液在24h内稳定。

[0144] (4) 重复性

[0145] 取编号S6的枳术颗粒,按实施例26的方法平行制备供试品溶液6份,分别按实施例26的色谱条件进样测定,记录HPLC色谱图,经计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的含量RSD值分别为2.38%、2.42%、2.38%、2.48%、2.55%、2.18%、2.10%,结果表明该方法重复性良好。

[0146] (5) 加样回收率

[0147] 精密称取已知7种化学成分含量的编号S6的枳术颗粒9份,分别精密加入含有7种化学成分含量80%、100%、120%水平的混合对照品或混合对照品溶液,按实施例26中的方法平行(n=3)制备加标供试品溶液,按实施例26中的色谱条件进样测定,计算各化学成分的含量;其中,各化学成分的原有量、加入量及测得量结果分别如表5所示。按公式:加样回收率(%)=(测得量-原有量)/加入量×100%,计算得到各化学成分的加样回收率,并计算平均回收率及RSD值,结果如表5所示,测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、川陈皮素、白术内酯Ⅲ的平均回收率为87.6%-114.3%,RSD值为0.66%-3.21%,结果表明该方法准确度良好。

[0148] 表5

成分 (component)	样品含量 (content) / mg	加入量 (added) / mg	测得量 (measured)) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery)%	RSD/%
	0.457	0.366	0.782	88.8		
	0.459	0.366	0.790	90.4	88.7	1.75
芸香柚皮	0.457	0.366	0.775	87.0		
苷	0.459	0.458	0.865	88.7		
(Narirutin)	0.457	0.458	0.848	85.6	87.6	1.94
n)	0.459	0.458	0.865	88.6		
	0.457	0.549	0.932	86.5		
	0.457	0.549	0.941	88.1	87.6	1.67
	0.459	0.549	0.947	88.9		
[0149]	3.883	3.111	6.907	97.2		
	3.901	3.136	7.026	99.7	97.1	2.39
	3.885	3.122	6.836	94.5		
柚皮苷	3.902	3.894	7.709	97.7		
(Naringin)	3.880	3.873	7.635	96.9	97.2	1.01
n)	3.903	3.910	7.692	96.9		
	3.885	4.707	8.327	94.4		
	3.888	4.691	8.423	96.7	96.0	1.50
	3.901	4.679	8.438	97.0		
橙皮苷	0.230	0.185	0.417	100.7		
(Hesperidin)	0.231	0.185	0.421	102.5	100.7	1.70
din)	0.230	0.185	0.413	98.8		

	0.231	0.231	0.464	100.5		
	0.230	0.231	0.456	97.8	99.6	1.53
	0.231	0.231	0.464	100.4		
	0.230	0.278	0.503	98.1		
	0.231	0.278	0.510	100.6	99.8	1.48
	0.231	0.278	0.511	100.7		
	3.264	2.615	5.870	99.6		
	3.279	2.620	6.044	105.5	101.8	2.87
	3.266	2.636	5.907	100.2		
新橙皮苷	3.281	3.266	6.659	103.4		
(Neohes	3.262	3.263	6.432	97.1	101.2	3.21
peridin)	3.281	3.279	6.662	103.1		
	3.266	3.921	7.117	98.2		
	3.269	3.920	7.215	100.7	99.9	1.49
[0150]	3.279	3.917	7.228	100.8		
	0.042	0.034	0.081	114.0		
	0.043	0.034	0.082	116.3	114.3	1.58
	0.042	0.034	0.081	112.5		
柚皮素	0.043	0.042	0.091	114.5		
(Naring	0.042	0.042	0.089	110.2	112.9	2.08
enin)	0.043	0.042	0.091	114.1		
	0.042	0.051	0.100	113.0		
	0.042	0.051	0.100	113.3	113.3	0.66
	0.043	0.051	0.100	113.5		
	0.050	0.040	0.092	106.0		
川陈皮素	0.050	0.040	0.093	109.1	106.5	2.09
(Nobilet	0.050	0.040	0.091	104.3		
in)	0.050	0.049	0.103	106.8		
	0.050	0.049	0.100	103.0	105.5	1.96

		0.050	0.049	0.103	106.7		
		0.050	0.059	0.111	104.1		
		0.050	0.059	0.113	106.2	105.5	1.21
		0.050	0.059	0.113	106.2		
		0.039	0.031	0.071	103.1		
		0.039	0.031	0.071	104.3	102.9	1.36
[0151]	白术内酯	0.039	0.031	0.070	101.3		
	III	0.039	0.039	0.079	102.5		
	(Atracty	0.039	0.039	0.077	98.4	101.0	1.37
	lenolide	0.039	0.039	0.079	102.1		
	III)	0.039	0.047	0.085	99.5		
		0.039	0.047	0.086	101.4	100.8	1.23
		0.039	0.047	0.086	101.4		

[0152] 综上,本申请提供的枳术颗粒指纹图谱建立方法及其成分含量测定方法,采用相同的色谱条件,实现枳术颗粒指纹图谱的建立,并能够测定枳术颗粒中至少7种化学成分的含量,方法准确,重复性及专属性良好,具有简便高效、灵敏度高、分析速度快、专属性强等优势,能够全面、准确、可信地对枳术颗粒的质量进行评价,为枳术颗粒药效物质基础及全面质量控制提供了较好的参考依据。

[0153] 以上所述仅为本申请的较佳实施例,并非用于限定本申请的保护范围。凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均包含在本申请的保护范围内。

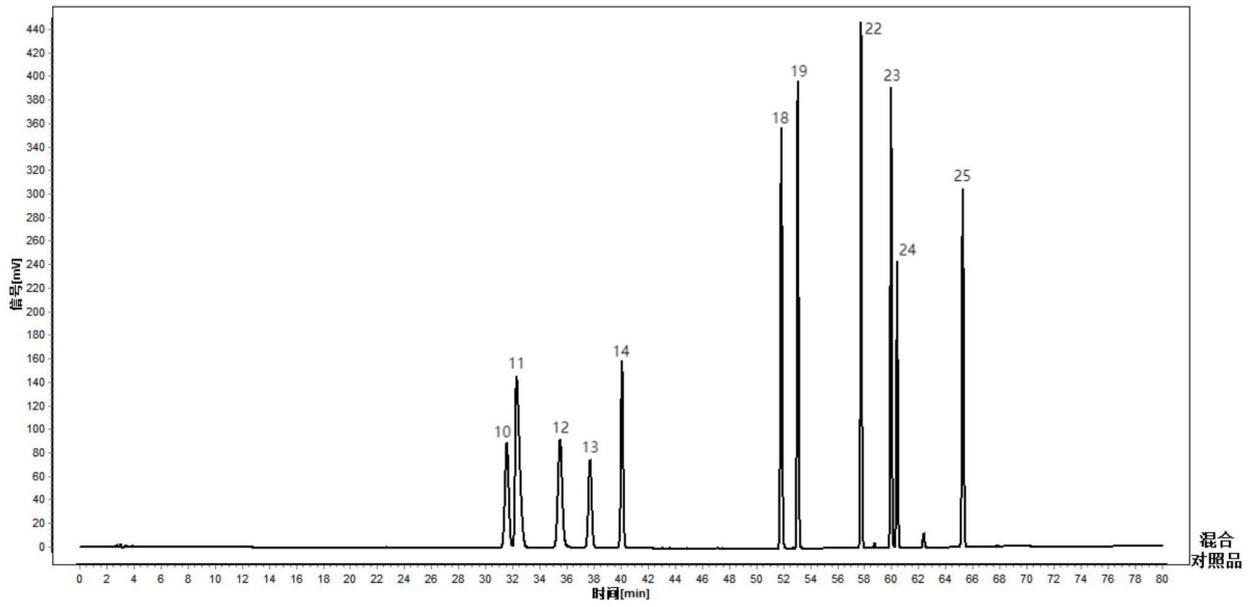


图1

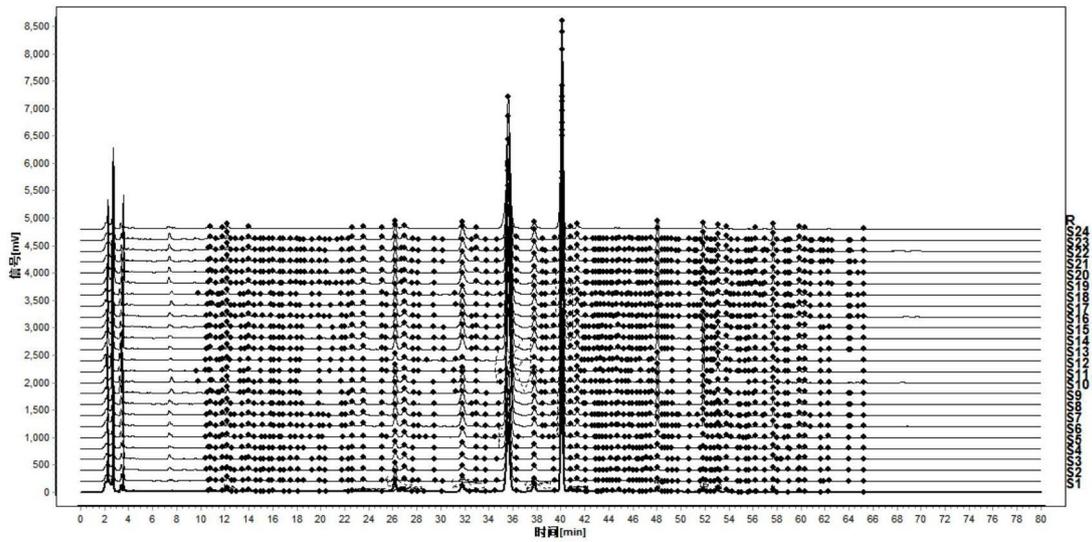


图2

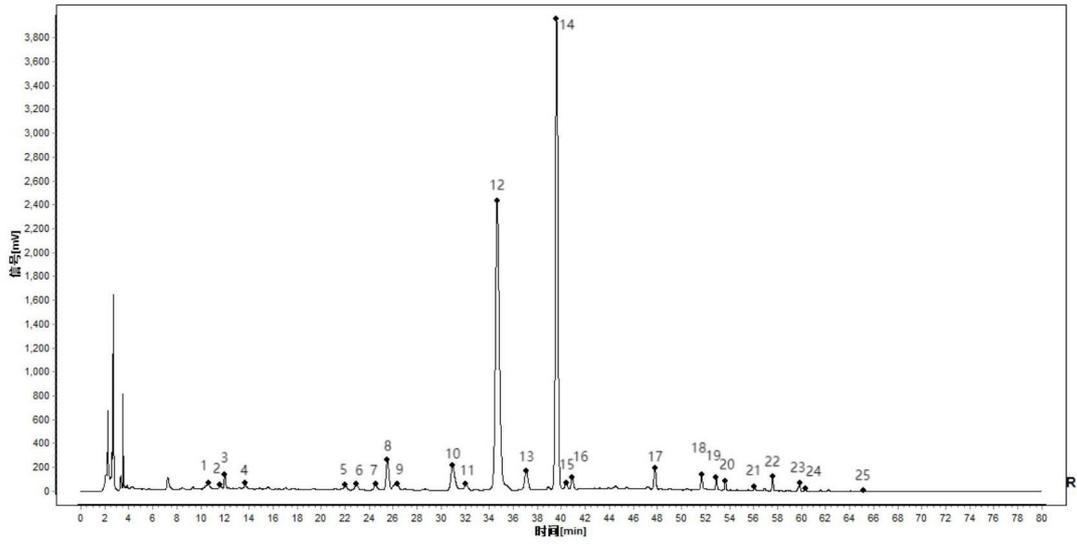


图3

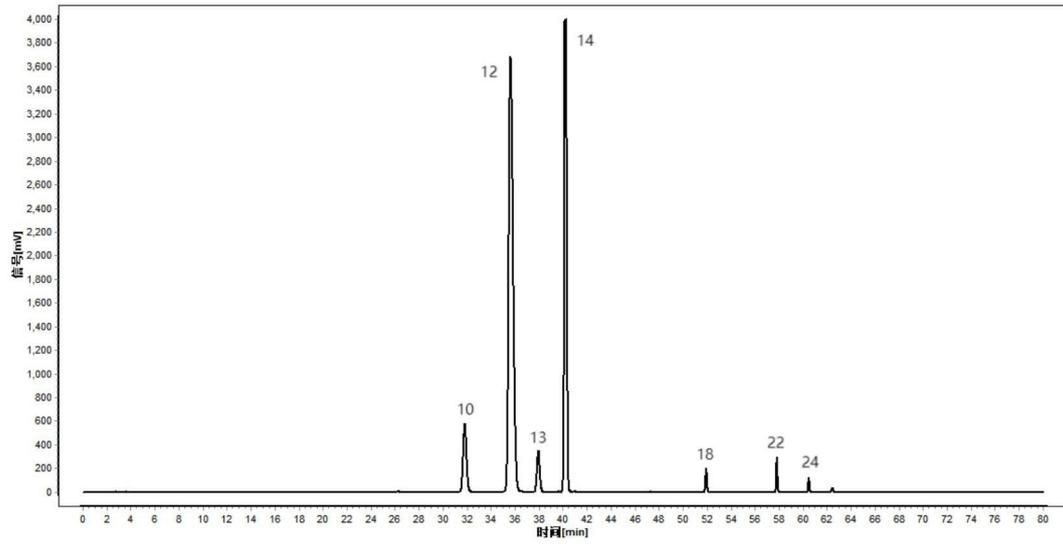


图4

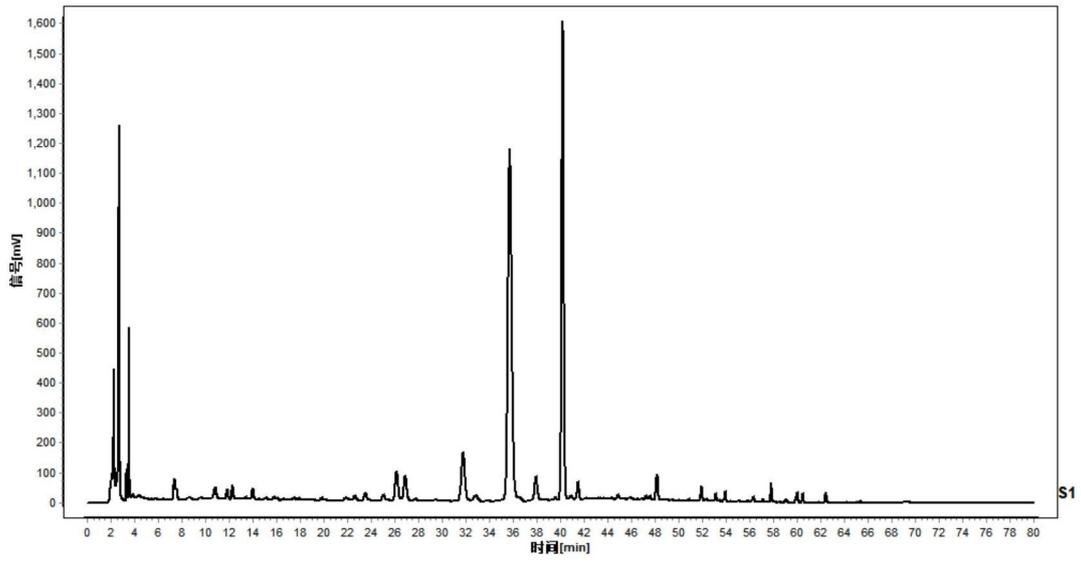


图5