

一种中药提取物、药物及其检测方法

技术领域

本发明涉及中药技术领域，特别涉及一种中药提取物、药物及其检测方法。

背景技术

病毒性肺炎是由上呼吸道病毒感染、向下蔓延引发肺部炎症，导致肺换气功能障碍的疾病。该病一年四季均可发生，但大多见于冬、春季节，可暴发流行、亦可散在发生。临床主要表现为发热、头痛、全身酸痛、干咳及肺部浸润等。以流感病毒引发的肺炎最常见，其他病原体包括呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒也引起了广泛关注。

病毒感染主要表现为肺间质病变。最初累及纤毛柱状上皮细胞，然后侵及其他呼吸道细胞，包括肺泡细胞、黏液腺细胞及巨噬细胞。病毒在细胞内复制，然后释放出感染性病毒感染相邻细胞。被感染的纤毛细胞可出现退行性变包括颗粒变性，空泡形成，细胞肿胀和核固缩，继而坏死和崩解。细胞碎片聚集在气道内和阻塞小气道，并出现呼吸道肿胀。肺泡间隔有明显的炎症反应，伴淋巴细胞、巨噬细胞浸润，偶有浆细胞和中性粒细胞浸润和水肿。肺泡毛细血管内可出现坏死和出血的纤维蛋白血栓，肺泡可见嗜酸性透明膜。重症感染者可出现肺水肿、实变、出血，肺实质坏死，肺不张。

流感病毒和呼吸道合胞病毒是引起上呼吸道感染最常见的病毒。流感病毒属于正黏病毒科，是 RNA 病毒，按照病毒核蛋白和基质蛋白的抗原性不同，分为甲、乙、丙 3 型。其中甲型流感病毒变异快、毒力强。H1N1/FM1 属于流感病毒亚甲型鼠肺适应株，模拟甲型流感病毒制备肺感染损伤。甲型流感病毒通过血凝素结合呼吸道上皮细胞含有唾液酸受体的细胞表面启动感染，进入细胞后，病毒基因组开始转录和复制。复制出的大量子代病毒颗粒通过呼吸道黏膜扩散开始感染其他细胞，从而诱发细胞因子风暴，导致全身炎症反应，进而出现急性呼吸窘迫综合征、休克及多脏器功能衰竭。呼吸道合胞病毒属副粘病毒科，是 RNA 病毒。发病机制包括病毒与宿主受累细胞损伤、炎症、体液和局部免疫反应及高反应性之间的相互作用。

目前据各种资料及临床使用证实，中药抗病毒疗效显著，抗病毒谱广，毒副作用小的特点。而且，其在抗病毒同时，许多药物兼有解热、抗炎等作用，对病毒引起的感染具有多重作用，如缩短发热的时间、控制炎症的扩散、促进炎症的吸收等，即多途径、多方位起作用；正是由于这种治疗过程中中药有效成分的多元化，病毒难以对其产生抗药性，使得中药在治疗病毒感染性疾病方面具有明显的优势，临床使用前景广阔。

发明内容

本发明的目的在于弥补现有技术的不足，提供一种具有抗病毒作用的中药提取物，其特征在于，以重量比计，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：

厚朴 1~100 份、焦槟榔 1~100 份、煨草果 1~100 份、麻黄 1~100 份、苦杏仁 1~100 份、羌活 1~100 份、生姜 1~100 份、广藿香 1~100 份、佩兰 1~100 份、苍术 1~100 份、茯苓 1~100 份、白术 1~100 份、石膏 1~100 份、焦山楂 1~100 份、焦六神曲 1~100 份、焦麦芽 1~100 份、地龙 1~100 份、徐长卿 1~100 份、绵马贯众 1~100 份、葶苈子 1~100 份。

进一步地，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 1~80 份、焦槟榔 1~80 份、煨草果 1~80 份、麻黄 1~60 份、苦杏仁 1~60 份、羌活 1~80 份、生姜 1~60 份、广藿香 1~80 份、佩兰 1~60 份、苍术 1~80 份、茯苓 1~160 份、白术 1~120 份、石膏 1~80 份、焦山楂 1~50 份、焦六神曲 1~80 份、焦麦芽 1~60 份、地龙 1~80 份、徐长卿 1~80 份、绵马贯众 1~60 份、葶苈子 1~80 份。

进一步地，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 30~50 份、焦槟榔 20~30 份、煨草果 30~50 份、麻黄 20~30 份、苦杏仁 20~30 份、羌活 30~50 份、生姜 30~50 份、广藿香 30~50 份、佩兰 20~30 份、苍术 30~50 份、茯苓 120~150 份、白术 80~100 份、石膏 30~50 份、焦山楂 20~30 份、焦六神曲 30~50 份、焦麦芽 20~30 份、地龙 30~50 份、徐长卿 30~50 份、绵马贯众 20~30 份、葶苈子 30~50 份。

进一步地，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 50 份、麻黄 30 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 50 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

进一步地，前述提取物的麻黄碱含量为 0.5-1.5mg/g，固含物转移率为 18-25%。

进一步地，前述提取物的紫花前胡苷含量为 2-8mg/g。

进一步地，所述中药提取物的制备包括：

称取厚朴、焦槟榔、煨草果、麻黄、苦杏仁、羌活、生姜、广藿香、佩兰、苍术、茯苓、白术、石膏、焦山楂、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、绵马贯众、葶苈子，分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液干燥；其中，所述提取物的麻黄碱含量为 1.20-1.50mg/g，固含物转移率为 19-22%，紫花前胡苷含量为 6-8mg/g。

进一步地，所述中药提取物的制备包括：称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈子 15g；分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心

滤过，滤液干燥。

进一步地，所述厚朴的指纹图谱和对照指纹图谱相比，相似度不得低于 0.90。其中，对照指纹图谱包含共有峰和厚朴酚、厚朴酚。所述对照指纹图谱例如可以是图 1。

进一步地，所述焦槟榔的指纹图谱和对照指纹图谱相比，相似度不得低于 0.90。其中，对照指纹图谱包含共有峰槟榔次碱、槟榔碱。所述对照指纹图谱例如可以是图 2。

进一步地，所述煨草果的指纹图谱和对照指纹图谱相比，相似度不得低于 0.90。其中，对照指纹图谱包含共有峰原儿茶酸。所述对照指纹图谱例如可以是图 3。

一种中药提取物的制备方法，其特征在于：称取厚朴、焦槟榔、煨草果、麻黄、苦杏仁、羌活、生姜、广藿香、佩兰、苍术、茯苓、白术、石膏、焦山楂、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、绵马贯众、葶苈子，分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液干燥；其中，所述提取物的麻黄碱含量为 1.20-1.50mg/g，固含物转移率为 19-22%，紫花前胡苷含量为 6-8mg/g。其中，所述厚朴、焦槟榔或煨草果的指纹图谱如前所定义。本发明还提出了如前任一所述的中药提取物在制备治疗抗流感病毒 H1N1 或 FM1，或呼吸道合胞病毒药物中的应用。

进一步地，前述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 30 份、麻黄 20 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 30 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

本发明还提出了一种药物，该药物由如前任一所述的中药提取物与药学上可接受的辅料或添加剂制得。

具体地，该药物选自汤剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂、口服液、丸剂、软胶囊、滴丸、酏剂、糖浆剂、栓剂、凝胶剂、喷雾剂、注射剂。

进一步地，所述药物为颗粒剂，所述辅料或添加剂优选为糊精和三氯蔗糖。

进一步地，所述药物还可以包括用于上呼吸道感染的抗病毒药物，例如可以是利巴韦林和/或磷酸奥司他韦。

本发明还提出了检测如前任一所述的中药提取物或药物的指纹图谱的方法，其特征在于，取供试品溶液进行 HPLC 检测，HPLC 检测的色谱条件包括：采用 C18 色谱柱，以甲醇为流动相 A，含有 0.1%浓度的磷酸水溶液为流动相 B，所述 HPLC 检测的色谱条件中的洗脱为梯度洗脱，该梯度洗脱程序为：0~5min，0% A；5~25 min，0%~15% A；25~60 min，15%~55% A；60~75 min，55%~100% A；75~80 min，100% A。

所述供试品溶液为由中药提取物或药物所制得的用于检测的溶液，制备方法例如可以是，取颗粒剂 1g，置具塞锥形瓶中，加水 25ml，超声处理 30 分钟，即

得。

进一步地，所述色谱条件包括：所述流速为 1.0 mL/min，所述柱温为 30℃，检测波长 250 nm。

进一步地，所述指纹图谱如图 14 所示。

具体地，所述指纹图谱中，供试品特征图谱中应呈现10个特征峰，与参照物峰相应的峰为S峰，计算各特征峰与S峰的相对保留时间，应在规定值的 $\pm 10\%$ 优选5%之内，相对保留时间规定值为：0.11（峰1）、0.27（峰2）、0.36（峰3）、0.38（峰4）、0.41（峰5）、0.84（峰6）、0.92（峰7）、1.00[峰8（S）]、1.19（峰9）、1.29（峰10）。

本发明制备了新的中药组合物，提升了组合物的质量标准，而且通过采用流感病毒 H1N1/FM1 株感染模型、呼吸道合胞病毒感染模型，评价组合物颗粒治疗病毒性上呼吸道感染的有效性，表明组合物可以降低肺组织中病毒载量及炎性细胞因子，表明对该类常见的特定病毒感染有增强治疗的作用，为进一步临床研究提供依据。

附图说明

图 1 为厚朴药材对照指纹图谱；峰 6：和厚朴酚 峰 7（S）：厚朴酚；

图 2 为槟榔药材对照指纹图谱；峰 1：槟榔次碱 峰 3（S）：槟榔碱；

图 3 为煨草果药材对照指纹图谱；峰 1：原儿茶酸；

图 4 为供试品溶液全波长扫描 3D 图；

图 5 为供试品溶液波长考察色谱图；

图 6 为流动相比例考察色谱图；

图 7 为供试品制备方法考察色谱图；

图 8 为耐用性考察色谱图；

图 9 为精密度考察色谱图；

图 10 重复性考察色谱图；

图 11 稳定性考察色谱图；

图 12 20 批制剂特征图谱叠加图；

图 13 对照特征图谱；

图 14 对照特征图谱及各特征峰指认结果；其中，1-腺嘌呤；2-尿苷；3-鸟苷；4-肌苷；5-5-羟甲基糠醛；6-厚朴苷 A；7-佛手酚葡萄糖苷；8-紫花前胡苷；9-6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷；10-茴香酸对羟基苯乙酯。

具体实施方式

奥司他韦是流感病毒的神经氨酸酶的抑制药，临床上主要用来治疗甲型、乙型流感。利巴韦林为广谱抗病毒药，临床上可以用来治疗呼吸道合胞病毒、甲型和乙型流感，但 FDA 不太推荐。本发明则旨在提供一种中药组合物及其制备方法和应用。以下将以常用的流感病毒或呼吸道合胞病毒药物为例，结合实验内容进行具体描述。

特别需要指出的是，针对本发明所做出的类似的替换和改动对本领域技术人

员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。

本发明如未注明具体条件者，均按照常规条件或制造商建议的条件进行，所用原料药或辅料，以及所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实验例 1 制备工艺考查

1.提取溶剂考察

称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈子 15g 为 1 份，加水煎煮两次，第一次提取 1.5h，第二次提取 1.0h。合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液真空干燥，喷雾干燥粉碎，得中间体组合物。不同提取溶剂体积的麻黄碱转移率和固含物转移率检测结果如下：

溶媒倍量	盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总转移率（%）	固含物转移率（%）
4,3	48.17	15.43
6,4	61.17	19.71
8,6	61.96	21.05
10,8	55.81	22.52

计算公式：

麻黄碱转移率(%) = $\frac{\text{提取液中麻黄碱总量}}{\text{麻黄药材中麻黄碱总量}} \times 100\%$

固含物转移率(%) = $\frac{\text{提取液中干膏总量}}{\text{药材投料量}} \times 100\%$

其中，总转移率是指提取物中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总量与药材中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的比值。

实验结果表明，盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率及固含物转移率随着加水量的增加，呈递增趋势。当溶媒倍量由 4，3 倍增加到 6，4 倍时，各指标转移率增加较为明显，当加水量继续增加，各指标增长趋势较为平缓，但溶剂过高时反而有所下降。综合考虑能效及指标成分转移率，确定加水量为第一次加 6 倍量，第二次加 4 倍量。

2.浸泡时间考察

另称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈

子 15g 为 1 份，共 3 份，加水煎煮两次，第一次加 6 倍量水、提取 1.5h，第二次加 4 倍量水、提取 1.0h，3 份浸泡时间分别为 0、30 和 60min。合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液真空干燥，喷雾干燥粉碎，得中间体组合物。

考察浸泡时间对盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率及固含物转移率的影响。实验结果如下：

浸泡时间 (min)	盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率 (%)	固含物转移率 (%)
0	58.76	18.47
30	61.67	19.84
60	59.47	19.68

计算公式：

麻黄碱转移率(%) = $\frac{\text{提取液中麻黄碱总量}}{\text{麻黄药材中麻黄碱总量}} \times 100\%$

固含物转移率(%) = $\frac{\text{提取液中干膏总量}}{\text{药材投料量}} \times 100\%$

实验结果表明，浸泡时间对盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总转移率及固含物转移率影响较小。因此，确定提取工艺选择不浸泡，直接进行提取。

3.提取时间考察

另称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈子 15g 为一份，共 5 份，分别加水提取 2 次，第一次加 6 倍量水，第二次加 4 倍量水，第一次提取时间分别为 60min、75min、90min、105min、120min，第二次提取时间分别为 30min、45min、60min、75min、90min，考察提取时间对盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率及固含物转移率的影响，实验结果如下：

提取时间 (min)	盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率 (%)	固含物转移率 (%)
60,30	61.41	16.49
75,45	62.04	17.73
90,60	61.61	19.46
105,75	64.32	19.61
120,90	58.63	19.97

计算公式：

麻黄碱转移率(%) = $\frac{\text{提取液中麻黄碱总量}}{\text{麻黄药材中麻黄碱总量}} \times 100\%$

固含物转移率(%)

=

提取液中干膏总量

药材投料量

× 100%

实验结果表明，盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率及固含物转移率随着提取时间的增加，呈递增趋势。当提取时间自 60，30min 增加到 90，60min 时，各指标增长趋势较为明显，提取时间继续增加各指标增长趋势逐渐平缓。因此，提取时间选择第一次提取 90min，第二次提取 60min。

4.提取工艺验证

为验证优选的提取工艺，按单因素实验优选结果进行放大验证试验。在前期实验中，提取物的几个主要成分波动较大，导致疗效受到了影响，因此通过加强从原料到制备工艺的控制，以期实现提取物的有效、可控。称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈子 15g 为 1 份，共称取 12 份（一些重要的药物厚朴、槟榔和煨草果均建立了特有的药材及饮片指纹图谱控制标准，处方药材均符合最新药典标准的规定），分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h。每 4 份合并作为 1 组，共 3 组。测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱转移率、固含物转移率以及其它重要指标，考察工艺的稳定性 and 可行性，实验结果如下：

组别	盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱总转移率（%）	固含物转移率（%）	麻黄碱（mg/g）	紫花前胡苷（mg/g）
1	62.42	19.11	1.29	6.02
2	59.67	20.95	1.33	6.44
3	60.03	20.61	1.42	7.77

验证结果显示，优选的工艺稳定、可行，重现性良好，因此确定的最佳提取工艺为加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h；第二次加 4 倍量水，提取 1.0h。

5、厚朴、槟榔和煨草果药材及饮片指纹图谱控制标准

5.1 厚朴药材及饮片指纹图谱控制标准

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（Waters CORTECTS C₁₈ 色谱柱，150mm×4.6mm，2.7μm）；以乙腈为流动相 A，以 0.1%乙酸溶液为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；柱温为 35℃；流速为 0.8ml/min；检测波长为 230nm。理论板数按厚朴酚峰计算应不低于 4000。

时间（分钟）	乙腈 A（%）	0.1%乙酸 B（%）
--------	---------	-------------

0~13	10→15	90→85
13~38	15→75	85→25
38~40	75→95	25→5
40~45	95	5

参照物溶液的制备 取厚朴酚、和厚朴酚对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 各含 200μg 的混合溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过三号筛）1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇溶液 25ml，摇匀，密塞，浸渍 24 小时，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定。

供试品指纹图谱中应呈现与参照物色谱峰图 1 保留时间相同的色谱峰。按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不得低于 0.90。

5.2 槟榔药材及饮片指纹图谱控制标准

色谱条件与系统适用性试验 以强阳离子交换键合硅胶为填充剂（Thermo BioBasic SCX 色谱柱，柱长为 25cm，内径为 4.6 mm，粒径为 5μm）；以乙腈-0.2%磷酸溶液（用氨水调节 pH 至 3.8）（65:35）为流动相；柱温为 35℃；流速为 1.2 ml/min；检测波长为 210nm。理论板数按槟榔碱计算应不低于 10000。

参照物溶液的制备 取氢溴酸槟榔碱对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 50μg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过二号筛）0.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇溶液 50ml，超声处理 30 分钟，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定，记录色谱图，即得。

供试品指纹图谱中应呈现与参照物色谱峰图 2 保留时间相同的色谱峰。按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不得低于 0.90。

5.3 煨草果药材及饮片指纹图谱控制标准

色谱条件与系统适用性 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Waters CORTECTS T3 色谱柱，柱长为 15cm，内径为 4.6 mm，粒径为 2.7μm）；以乙腈为流动相 A，以 0.1% 甲酸溶液为流动相 B，按下表的规定进行梯度洗脱；柱温为 30℃；流速为 0.8 ml/min；检测波长为 254nm。理论板数按原儿茶酸峰计算应不低于 10000。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0~25	0→25	100→75
25~35	25→50	75→50
35~40	50→95	50→5

40~45

95

5

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 200 μ g 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过二号筛）1g，精密称定，精密加入 50%甲醇溶液 25ml，超声处理 30 分钟，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取参照物溶液 5~10 μ l 和供试品溶液 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，记录色谱图，即得。

供试品指纹图谱中应呈现与参照物色谱峰图 3 保留时间相同的色谱峰。按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算，相似度不得低于 0.90。

实验例 2 制剂的制备

制备例 1 中药复方颗粒

组方：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 30 份、麻黄 20 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 30 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

该中药组合物颗粒剂的制备方法：

取上述药材，加入水回流提取 2 次，第一次加入 6 倍水，提取 1.5h，第二次加入 4 倍水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液真空干燥，喷雾干燥粉碎，得中间体组合物，加入三氯蔗糖和糊精，混匀，得颗粒剂。

制备例 2 中药复方胶囊

组方：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 30 份、麻黄 20 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 30 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

该中药组合物胶囊的制备方法：

取药材加入水回流提取 2 次，第一次加入 6 倍水，提取 1.5h，第二次加入 4 倍水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液真空干燥，喷雾干燥，制粒，制成胶囊。

制备例 3 中药复方片剂

组方：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 30 份、麻黄 20 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 30 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

该中药组合物片剂的制备方法：

取药材加入水回流提取 2 次，第一次加入 6 倍水，提取 1.5h，第二次加入 4 倍水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液真空干燥，喷雾干燥，得浸膏粉加入微晶纤维素等辅料，制成片剂。

实验例 3 本发明组合物颗粒对流感病毒 H1N1/FM1 株感染的治疗作用

1 试验材料

1.1 受试药物 制备例 1 的颗粒，江苏康缘药业股份有限公司提供。

1.2 阳性对照药

1.2.1 磷酸奥司他韦颗粒（可威）：宜昌东阳光长江药业股份有限公司生产，成分：每袋颗粒内含 15 毫克磷酸奥司他韦。

1.2.2 利巴韦林颗粒：四川百利药业有限责任公司生产，成分：本品主要成分为利巴韦林。规格：50mg。

1.3 试剂

试剂名称	批号	生产厂家	试剂用途
异氟烷	S200106	上海玉研科学仪器有限公司	小鼠麻醉
二甲苯	20170705	国药集团化学试剂有限公司	肺组织病理
苏木素染色液	DH0001/0 405A17	北京博瑞捷科技有限公司	肺组织病理
伊红(曙红)	20150915	北京化工厂	肺组织病理
甲醛	F2018082 5	国药集团化学试剂有限公司	肺组织病理
95%乙醇	20180208	北京化工厂	肺组织病理
无水乙醇	20180208	北京化工厂	肺组织病理
中性树胶	20170815	上海标本模型厂	肺组织病理

1.4 仪器

仪器名称	型号	生产厂家	仪器用途
A2 型生物安全柜	MSC-Advantage 1.8	美国 Thermo 公司	动物感染、解剖
电子天平	YP1002 MAX100g	上海越平科学仪器有限公司	称量小鼠体重
电子分析天平	AR1140 MAX110g	美国 Ohaus 公司	称量药物、试剂
电子天平	AL204 MAX210g	梅特勒-托利多仪器公司	称量组织重量
IVC 小鼠饲养笼	ZJ-4	苏州冯氏股份有限公司	饲养小鼠
低温高速离心机	Eppendorf-5810R	德国 eppendorf 公司	离心肺组织
组织匀浆仪	FastPre-24TM	美国 MP 公司	处理组织样本
自动脱水机	TP 1020	德国 Leica	肺组织病理
石蜡包埋机	EG 1140H	德国 Leica	肺组织病理
全自动轮转式切片机	HM 355S	德国 Microm	肺组织病理
自动染色机	XL 5010	德国 Autostainer	肺组织病理

显微数字照像生物显微镜	DM 2500	德国 Leica	肺组织病理
自动光学照相生物显微镜	DMLB-HC	德国 Leica	肺组织病理

1.5 试验动物

种类	级别	体重	数量	性别	合格证号	动物许可证
ICR 小鼠	SPF 级	13-15 g	70	雌雄 各半	110011211111036298 2 110011211111036284 1	SCXK(京)2021-0006
来源：北京维通利华试验动物技术有限公司提供。						
饲养条件：ABSL-2 实验室，-20Pa，温度 22±1℃，湿度 40~50%						

1.6 病毒株

甲型 H1N1 流感病毒 FM1 毒株购自美国标准生物品收藏中心（ATCC）。由本所 ABSL-2 试验室常规传代，-80℃ 保存备用。

2 剂量设计及药物配制

2.1 制备例 1：

药液配制：试验前取颗粒定容加入蒸馏水，定容，用量为 26.4g 生药/kg /d，按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.2 磷酸奥司他韦：试验时小鼠用量为 27.5 mg/kg/d，相当于人临床等倍剂量，给药时按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.3 利巴韦林：试验时小鼠用量为 82.5 mg/kg/d，给药时按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.4 组合物组 1：制备例 1 13.2g 生药/kg /d+磷酸奥司他韦 13.7 mg/kg/d，给药方式同上。

2.5 组合物组 2：即制备例 1 13.2g 生药/kg /d+利巴韦林 41.2 mg/kg/d，给药方式同上。

3 试验方法

取 ICR 小鼠 70 只，体重 14±1 g，雌雄各半，按体重等级随机分为 7 组，分别为正常对照组、模型对照组、磷酸奥司他韦组、利巴韦林、组合物组、磷酸奥司他韦组+组合物组、利巴韦林+组合物组。除正常对照组外，将小鼠用异氟烷轻度麻醉，以 15 个 LD₅₀ 流感病毒液（H1N1/FM1 株）滴鼻感染，每只 35 μL。感染当天开始给药，每次按 0.2 mL/10 g 灌胃，每天 1 次，连续 4 天，正常对照组和模型对照组在同等条件下以蒸馏水灌胃。第 5 天各组小鼠称体重；解剖称肺重，取肺组织进行 HE 病理检测，计算肺指数及肺指数抑制率。

肺指数（%）=肺湿重(g) / 体重（g）×100

肺指数抑制率（%）=

模型对照组肺重(g)-给药组肺重(g)

模型对照组肺重(g)-正常对照组肺重(g)

×100

镜下标准：

“—”：小鼠肺间质未见有渗出，未见有瘀血，组织间质细胞未见有增大，肺内细支气管周围未见有炎症，组织结构正常。

“+”：小鼠肺组织、肺泡间质未见有明显渗出性炎症，未见有大面积瘀血，肺内细支气管周围有少量局限性炎症，以淋巴为主。

“++”：小鼠肺组织肺泡间质未见有大面积炎性及粘液渗出，有局限性小片状粘液渗出，肺细支气管周围有局限性炎症，以淋巴为主，腔内膜细胞有局限性增多（节段性）。

“+++”：小鼠肺组织肺泡间质内有大面积炎性及粘液渗出，渗出炎症以淋巴细胞为主，有少量分叶核及嗜酸细胞，细胞大小不均匀，成团状聚集，并有多量粉色粘液。血管周围炎症明显，肺内细支气管周围炎症局限性，腔内膜细胞增生，血管周围炎症较重。

统计方法：结果采用组间比较 t 检验进行统计学处理。

4 本发明组合物颗粒对肺指数及肺指数抑制率的影响

研究结果（表 1）显示：采用甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株病毒感染小鼠后，模型对照组小鼠肺指数明显增高，与正常对照组比较有显著差异（ $P<0.01$ ）；感染当天开始给予组合物颗粒治疗 4 天，磷酸奥司他韦组、组合物组、磷酸奥司他韦组+组合物组、利巴韦林+组合物组的肺指数显著降低，与模型对照组比较有明显差异，表明组合物对用于上呼吸道感染的抗病毒药物在抗流感病毒上有明显的增效作用。

表 1 组合物颗粒对流感病毒 H1N1/FM1 株感染小鼠肺指数的影响

组别	剂量	动物数 (只)	肺指数 (%)	抑制率 (%)
正常对照组	-	10	0.75 ± 0.03	
模型对照组	-	10	$1.01\pm0.03^{##}$	
磷酸奥司他韦组	27.5 mg/kg/d	10	$0.88\pm0.06^{**}$	0.74
利巴韦林组	82.5 mg/kg/d	10	0.96 ± 0.08	0.41
组合物组	26.4 生药/kg /d	10	$0.95\pm0.07^{*}$	0.46
磷酸奥司他韦组+组合物组	13.7	10	$0.87\pm0.06^{**}$	0.82
	mg/kg/d+13.2g 生药/kg /d			
利巴韦林+组合物组	41.2	10	$0.89\pm0.07^{**}$	0.75
	mg/kg/d+13.2g 生药/kg /d			

注：与正常对照组比较^{##} $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^{*} $P<0.01$ ，^{*} $P<0.05$ 。

实验例 4 本发明组合物颗粒对呼吸道合胞病毒感染的治疗作用

1 试验材料

1.1 受试药物 制备例 1 颗粒，江苏康缘药业股份有限公司提供。

1.2 阳性对照药

- 1.2.1 磷酸奥司他韦颗粒（可威）：宜昌东阳光长江药业股份有限公司生产，成分：每袋颗粒内含 15 毫克磷酸奥司他韦。
- 1.2.2 利巴韦林颗粒：四川百利药业有限责任公司生产，成分：本品主要成分为利巴韦林。规格：50mg。
- 1.3 试剂

试剂名称	批号	生产厂家	试剂用途
异氟烷	S200106	上海玉研科学仪器有限公司	小鼠麻醉
IL-4	239645-001	Thermo Fisher	肺组织因子检测
IL-33	230852-006	Thermo Fisher	肺组织因子检测

1.4 仪器

仪器名称	型号	生产厂家	仪器用途
A2 型生物安全柜	MSC-Advantage 1.8	美国 Thermo 公司	动物感染、解剖
电子天平	YP1002 MAX100g	上海越平科学仪器有限公司	称量小鼠体重
电子分析天平	AR1140 MAX110g	美国 Ohaus 公司	称量药物、试剂
电子天平	AL204 MAX210g	梅特勒-托利多仪器公司	称量组织重量
IVC 小鼠饲养笼	ZJ-4	苏州冯氏股份有限公司	饲养小鼠
低温高速离心机	Eppendorf-5810R	德国 eppendorf 公司	离心肺组织
组织匀浆仪	FastPre-24TM	美国 MP 公司	处理组织样本

1.5 试验动物

种类	级别	体重	数量	性别	合格证号	动物许可证
BALB/C 小鼠	SPF 级	13-15 g	70	雌雄 各半	110011211111036318 5 110011211111036306 8	SCXK(京)2021-0006
来源：北京维通利华试验动物技术有限公司提供。						
饲养条件：ABSL-2 实验室，-20Pa，温度 22±1℃，湿度 40~50%						

1.6 病毒株

呼吸道合胞病毒(RSV)毒株购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。由本所 ABSL-2 试验室常规传代，-80℃ 保存备用。

2 剂量设计及药物配制

2.1 制备例 1：

药液配制：取颗粒，加入蒸馏水，定容至 40 mL，用量为 26.4g 生药/kg/d，给药时按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.2 磷酸奥司他韦颗粒：试验时小鼠用量为 27.5 mg/kg/d，相当于人临床等倍剂量，给药时按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.3 利巴韦林颗粒：试验时小鼠用量为 82.5 mg/kg/d，给药时按 0.2 mL/10 g 体重/次灌胃给药，1 次/日，连续 4 天。

2.4 组合物组 1：即制备例 1 颗粒 13.2g 生药/kg/d+磷酸奥司他韦 13.7 mg/kg/d，给药方式同上。

2.5 组合物组 2：即制备例 1 颗粒 13.2g 生药/kg/d+利巴韦林 41.2 mg/kg/d，给药方式同上。

3 试验方法

取 BALB/C 小鼠 70 只，体重 14±1g，雌雄各半，按体重等级随机分为 7 组，分别为正常对照组、模型对照组、磷酸奥司他韦组、利巴韦林、组合物组、磷酸奥司他韦组+组合物组、利巴韦林+组合物组，每组 10 只。除正常对照组外，将小鼠用异氟烷轻度麻醉，以 100TCID₅₀ RSV 病毒液滴鼻感染，每只 45 μL。感染当天开始给药，每次按 0.2mL/10g 灌胃，每天 1 次，连续 4 天，正常对照组和模型对照组在同等条件下以蒸馏水灌胃。第 5 天各组小鼠称体重；解剖称肺重，取肺组织进行炎性因子检测，计算肺指数及肺指数抑制率。

$$\text{肺指数}(\%) = \frac{\text{肺湿重(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100$$
$$\text{肺指数抑制率}(\%) = \frac{\text{模型对照组肺重(g)} - \text{给药组肺重(g)}}{\text{模型对照组肺重(g)} - \text{正常对照组肺重(g)}} \times 100$$

4 实验结果

4.1 组合物颗粒对肺指数及肺指数抑制率的影响

研究结果（表 2）显示：采用呼吸道合胞病毒（RSV）滴鼻感染小鼠后，模型组小鼠肺指数明显增高，与正常对照组比较有显著差异（P<0.01）；感染当天开始给予组合物颗粒治疗 4 天，磷酸奥司他韦组、组合物组、磷酸奥司他韦组+组合物组、利巴韦林+组合物组的肺指数显著降低，与模型对照组比较有明显差异，表明组合物对用于上呼吸道感染的抗病毒药物在抗呼吸道合胞病毒上有一定的增效作用。

表 2 组合物颗粒对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺指数的影响

组别	剂量	动物数 (只)	肺指数 (%)	抑制率 (%)
正常对照组	-	10	0.65±0.04	
模型对照组	-	10	0.88±0.05 ^{##}	
利巴韦林组	82.5 mg/kg/d	10	0.76±0.03 ^{**}	0.41
磷酸奥司他韦组	27.5 mg/kg/d	10	0.84±0.06	0.11
组合物组	26.4 生药/kg /d	10	0.83±0.05 [*]	0.13
	13.7			
磷酸奥司他韦组+组合物组	mg/kg/d+13.2 g 生药/kg /d	10	0.76±0.04 ^{**}	0.45
	41.2			
利巴韦林+组合物组	mg/kg/d+13.2 g 生药/kg /d	10	0.76±0.03 ^{**}	0.43

注：与正常对照组比较^{##}P<0.01；与模型对照组比较，^{*}P<0.05。

4.2 对肺组织中细胞因子 IL-33 的影响

将肺组织从-80℃低温冰箱中取出，用高效蛋白裂解液（已加入 PMSF 及蛋白酶抑制剂）处理肺组织后离心，取蛋白上清。将蛋白样品放置于冰盒中交予莱兹生物技术有

限公司进行高通量液相蛋白芯片检测小鼠肺组织中各个细胞因子情况，具体检测步骤详见附件。

采用呼吸道合胞病毒（RSV）滴鼻感染小鼠后，模型组小鼠肺组织细胞因子 IL-33 含量明显增高，与正常对照组比较有显著差异（ $P<0.01$ ）；感染当天开始给予组合物颗粒治疗 4 天，磷酸奥司他韦组、组合物组、磷酸奥司他韦组+组合物组、利巴韦林+组合物组的 IL-33 含量明显降低，与模型组比较有显著差异（ $P<0.01$ ， $P<0.05$ ）。见表 3。

表 3 组合物颗粒对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺组织细胞因子的影响

组别	剂量 (g 生药/kg/d)	动物数 (只)	肺组织中细胞因子含量 (pg/mL)
			IL-33
正常对照组	-	10	1567.11±68.24
模型对照组	-	10	1802.2±59.65 ^{##}
利巴韦林组	82.5 mg/kg/d	10	1495.20±351.62 [*]
磷酸奥司他韦组	27.5 mg/kg/d	10	1667.23±275.1
组合物组	26.4 生药/kg /d	10	1432.25±312.4 ^{**}
利巴韦林+组合物组	13.7	10	1324.65±246.32 ^{**}
	mg/kg/d+13.2g 生药/kg /d		
磷酸奥司他韦组+组合物组	41.2	10	1402.26±258.64 ^{**}
	mg/kg/d+13.2g 生药/kg /d		

注：与正常对照组比较^{##} $P<0.01$ ，^{*} $P<0.05$ ；与寒湿疫毒肺炎模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

本研究中，将组合物颗粒 26.4 g 生药/kg/d（1/2 倍）小鼠灌胃给药，1 次/日，连续 3~4 天，采用流感病毒 H1N1/FM1 株感染模型、呼吸道合胞病毒感染模型，评价组合物颗粒治疗病毒性上呼吸道感染的有效性，结果显示：组合物联合抗病毒药物可以降低肺组织中病毒载量及炎性细胞因子，表明对该类常见的特定病毒感染有治疗作用，利用了中药本身的优势来进一步促进和巩固其它药物的抗病毒的效果，为进一步临床研究提供依据。

实验例 5 本发明组合物指纹图谱研究

仪器与试药

仪器：Agilent 1260 高效液相色谱仪，DAD 紫外检测器；Agilent 1260 高效液相色谱仪，VWD 紫外检测器；Agilent 1290 超高压液相色谱仪，DAD 紫外检测器，Agilent 6538 Q-TOF-MS 质谱检测器，电喷雾（ESI）离子源，美国安捷伦公司；Thermo Fisher Ultimate3000 高效液相色谱仪；

Mettler Toledo XP6 电子分析天平，梅特勒公司；Mettler Toledo AL204 型电子分

析天平，梅特勒公司；KQ500DB 数控超声波清洗机，昆山超声仪器有限公司；HH 数显恒温水浴锅，常州国宇仪器制造有限公司；Milli-Q 超纯水仪，美国密理博公司；

对照品：腺嘌呤，99.4%，批号 B0002908，北京曼哈格生物科技有限公司；尿苷，99.4%，批号 B0008580，北京曼哈格生物科技有限公司；鸟苷，96.1%，批号 B0006767，北京曼哈格生物科技有限公司；肌苷，99.2%，批号 140669-202007，中国食品药品检定研究院；5-羟甲基糠醛，95.0%，批号 8610，上海诗丹德标准技术有限公司；厚朴苷 A，99.1%，批号 7611，上海诗丹德标准技术有限公司；佛手酚葡萄糖苷，98%，批号 CFS202002，武汉天植生物技术有限公司；紫花前胡苷，99.6%，批号 111821-201604，中国食品药品检定研究院；6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷，98%，批号 CFS202002，武汉天植生物技术有限公司；茴香酸对羟基苯乙酯，99.6%，批号 A05GB156933，上海源叶生物科技有限公司；

试剂：甲醇（默克股份有限公司、美国迈瑞达公司，色谱纯）；乙酸（L07203503，默克飞世尔科技有限公司），其他试剂均为分析纯。

样品：制备例 1 方法制备的颗粒，批号为：200201、200202、200203、200204、200205、200206、200207、200208、200209、200210、200211、200212、200213、200214、200601、200602、200603，其中 200602 批为方法学研究批次，均由江苏康缘药业股份有限公司中药研发部提供。

1 色谱条件选择

取本品适量，研细，取约 2g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入水 50ml，超声处理 30 分钟，摇匀，离心，取上清液，即得供试品溶液。

1.1 检测波长的选择

取供试品溶液，采用 DAD 进行全波长扫描，结果可见 250nm 条件下色谱峰信息较丰富，响应较均匀，基线较平稳，因此选取 250nm 作为特征图谱的检测波长。见附图 4、图 5。

1.2 流动相的选择

基于本品水提工艺特点，采用对水溶性成分具有较好分离效果的 Waters Atlantis T₃（4.6×250mm，5μm）C₁₈ 色谱柱，采用甲醇-0.1%磷酸作为流动相系统，250nm 作为检测波长，考察不同流动相梯度的分离效果，结果梯度程序Ⅳ各峰分离度较好，保留时间合适，基线较为平稳，因此，优选梯度程序Ⅳ作为流动相洗脱程序。梯度洗脱程序如下，结果见附图 6。

	时间（min）	甲醇（%）	0.1%磷酸（%）
梯度程序 I	0	0	100
	5	0	100
	60	60	40
	80	100	0
梯度程序 II	0	0	100
	10	0	100
	30	15	85
	50	40	60
	80	100	0

梯度程序III	0	0	100
	5	0	100
	25	15	85
	60	50	50
	80	100	0
梯度程序IV	0	0	100
	5	0	100
	25	15	85
	60	55	45
	75	100	0
	80	100	0

综上考察，拟定色谱条件为：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Waters Atlantis T3，柱长为 25cm，内径为 4.6mm，粒径为 5 μ m）；以甲醇为流动相 A，以 0.1%磷酸为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；柱温为 30℃；检测波长为 250nm。理论板数按紫花前胡苷峰计应不低于 10000。

时间（分钟）	流动相 A(%)	流动相 B (%)
0	0	100
5	0	100
25	15	85
60	55	45
75	100	0
80	100	0

2 供试品制备方法选择

为优选合理、简便的供试品溶液制备方法，对提取溶剂、提取方式考察。

供试品溶液制备：取本品适量，研细，取约 1g，共 4 份，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入水、50%甲醇 25ml，分别超声处理 30 分钟、回流 30 分钟，摇匀，离心，取上清液，即得 4 份供试品溶液。

结果：取各供试品溶液，按上述色谱条件进行测定，结果显示采用水为提取溶剂所得的色谱图 25min 之前的极性较大的色谱峰响应较高，整体色谱峰较为丰富，响应较均匀，结合产品的水提工艺特点，优选水作为提取溶剂。回流与超声两种方式得到的色谱图色谱峰的丰富程度与响应无明显差异，考虑操作的方便性，优选超声提取方式。见附图 7。

综上考察，拟定供试品处理方法为：取本品适量，研细，取约 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入水 25ml，超声处理（功率 500W，频率 40kHz）30 分钟，摇匀，离心，取上清液，即得。

3 耐用性考察

考察不同的波长（245nm、250nm、255nm）、流速（0.8ml/min、0.9 ml/min、1.0 ml/min、1.1 ml/min、1.2 ml/min）、柱温（25℃、28℃、30℃、32℃、35℃）、色谱柱不同批号{柱 1: Waters Atlantis T₃（4.6×250mm，5 μ m），序列号 01813017014031；柱 2: Waters Atlantis T₃（4.6×250mm，5 μ m），序列号 01813017014008}、仪器（仪器 1: Agilent 1260、仪器 2: Ultimate3000）对选定的 10 个特征峰分离效果的影响。

结果显示，在波长 250 $\pm$ 5nm、流速 0.8ml/min~1.2 ml/min、柱温 25℃~35℃范围

内，以及使用不同批号的色谱柱、不同品牌的仪器，选定的特征峰均可得到较好的分离效果，说明方法耐用性良好。见附图 8。

4 方法学验证

精密度考察：按上述方法制备供试品溶液，精密吸取同一供试品溶液 10μl，连续进样 6 次，测定，以紫花前胡苷（峰 8）为参照峰，对标定的 10 个特征峰的相对保留时间进行计算。结果显示，10 个特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.5%，表明仪器的精密度良好。见表 4、附图 9。

重复性考察：按上述方法平行制备 6 份供试品溶液，测定。以紫花前胡苷（峰 8）为参照峰，对标定的 10 个特征峰的相对保留时间进行计算。结果显示，10 个特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.5%，表明该方法重复性良好。见表 5，附图 10。

稳定性考察：取同一供试品溶液，分别于第 0 h、3h、6 h、9h、12h、18h、24h、30h、36h 进样，每次进样 10 μl，测定，以紫花前胡苷（峰 8）为参照峰，对标定的 10 个特征峰的相对保留时间进行计算。结果显示，10 个特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.5%，表明供试品溶液 36 小时内稳定性较好。见表 6，附图 11。

表 4 特征图谱精密度考察计算结果

峰号	相对保留时间(min)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	
峰 1	0.104	0.104	0.104	0.104	0.104	0.103	0.04
峰 2	0.251	0.251	0.251	0.251	0.252	0.252	0.10
峰 3	0.337	0.338	0.338	0.338	0.338	0.338	0.06
峰 4	0.355	0.355	0.355	0.355	0.356	0.355	0.06
峰 5	0.397	0.397	0.397	0.397	0.398	0.397	0.04
峰 6	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.01
峰 7	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.01
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	0.01
峰 10	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	0.02

表 5 重复性考察计算结果

峰号	相对保留时间(min)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	
峰 1	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.33
峰 2	0.252	0.251	0.251	0.251	0.250	0.251	0.15
峰 3	0.338	0.337	0.337	0.337	0.336	0.337	0.14
峰 4	0.355	0.355	0.355	0.355	0.354	0.355	0.11
峰 5	0.397	0.397	0.397	0.397	0.396	0.397	0.08
峰 6	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.01
峰 7	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.01
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	0.01
峰 10	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	0.01

表 6 稳定性考察计算结果

峰号	相对保留时间(min)									RSD (%)
	0h	3h	6h	9h	12h	18h	24h	30h	36h	
峰 1	0.104	0.104	0.104	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.40
峰 2	0.251	0.251	0.252	0.251	0.250	0.251	0.251	0.251	0.251	0.16
峰 3	0.337	0.338	0.338	0.337	0.336	0.337	0.338	0.337	0.337	0.16
峰 4	0.355	0.355	0.356	0.355	0.354	0.355	0.355	0.354	0.355	0.13
峰 5	0.397	0.397	0.398	0.397	0.396	0.397	0.397	0.397	0.397	0.09
峰 6	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840	0.01
峰 7	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	0.01
峰 8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
峰 9	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	1.188	0.01
峰 10	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285	0.02

5 多批次测定及对照特征图谱生成

依据上述方法进行 14 批临床实践用样品、3 批中试样品及 3 批工艺验证样品的测定，选定 10 个峰为特征峰，以 20 批制剂生成对照指纹图谱，以紫花前胡苷参照物峰相应的峰为 S 峰，计算各特征峰的相对保留时间，各峰应在规定值的±10%以内，规定值为：0.11（峰 1）、0.27（峰 2）、0.36（峰 3）、0.38（峰 4）、0.41（峰 5）、0.84（峰 6）、0.92（峰 7）、1.00（峰 8）、1.19（峰 9）、1.29（峰 10）。多批次结果见附图 12、表 7，对照特征图谱见附图 13。

表 7 20 批制剂相对保留时间结果

批号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
200201	0.114	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200202	0.114	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200203	0.113	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200204	0.113	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200205	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200206	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200207	0.113	0.269	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200208	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200209	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200210	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200211	0.113	0.269	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285

200212	0.113	0.270	0.355	0.372	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200213	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200214	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.284
200601	0.113	0.269	0.354	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200602	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
200603	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
210401	0.117	0.268	0.352	0.369	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300
210402	0.117	0.268	0.352	0.369	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300
210403	0.117	0.269	0.352	0.37	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300

6 特征图谱质量标准

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（Waters Atlantis T3，柱长为 25cm，内径为 4.6mm，粒径为 5 μ m）；以甲醇为流动相 A，以 0.1%磷酸为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；柱温为 30℃；检测波长为 250nm。理论板数按紫花前胡苷峰计应不低于 10000。

时间（分钟）	流动相 A(%)	流动相 B (%)
0	0	100
5	0	100
25	15	85
60	55	45
75	100	0
80	100	0

参照物溶液的制备 取紫花前胡苷对照品适量，精密称定，加 50%甲醇制成每 1ml 含 0.15mg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品适量，研细，取约 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入水 25ml，超声处理（功率 500W，频率 40kHz）30 分钟，摇匀，离心，取上清液，即得。

测定法 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定，记录色谱图，即得。

供试品特征图谱中应呈现 10 个特征峰，与参照物峰相应的峰为 S 峰，计算各特征峰的相对保留时间，应在规定值的 $\pm$ 10%之内，相对保留时间规定值为：0.11（峰 1）、0.27（峰 2）、0.36（峰 3）、0.38（峰 4）、0.41（峰 5）、0.84（峰 6）、0.92（峰 7）、1.00[峰 8（S）]、1.19（峰 9）、1.29（峰 10）。对照特征图谱见附图 14。

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

1、一种中药提取物，其特征在于，以重量比计，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 1~100 份、焦槟榔 1~100 份、煨草果 1~100 份、麻黄 1~100 份、苦杏仁 1~100 份、羌活 1~100 份、生姜 1~100 份、广藿香 1~100 份、佩兰 1~100 份、苍术 1~100 份、茯苓 1~100 份、白术 1~100 份、石膏 1~100 份、焦山楂 1~100 份、焦六神曲 1~100 份、焦麦芽 1~100 份、地龙 1~100 份、徐长卿 1~100 份、绵马贯众 1~100 份、葶苈子 1~100 份；其中，所述提取物的麻黄碱含量为 0.5-1.5mg/g，固含物转移率为 18-25%。

2、根据权利要求 1 所述的中药提取物，其特征在于，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 1~80 份、焦槟榔 1~80 份、煨草果 1~80 份、麻黄 1~60 份、苦杏仁 1~60 份、羌活 1~80 份、生姜 1~60 份、广藿香 1~80 份、佩兰 1~60 份、苍术 1~80 份、茯苓 1~160 份、白术 1~120 份、石膏 1~80 份、焦山楂 1~50 份、焦六神曲 1~80 份、焦麦芽 1~60 份、地龙 1~80 份、徐长卿 1~80 份、绵马贯众 1~60 份、葶苈子 1~80 份；其中，所述提取物的紫花前胡苷含量为 2-8mg/g。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的中药提取物，其特征在于，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 30~50 份、焦槟榔 20~30 份、煨草果 30~50 份、麻黄 20~30 份、苦杏仁 20~30 份、羌活 30~50 份、生姜 30~50 份、广藿香 30~50 份、佩兰 20~30 份、苍术 30~50 份、茯苓 120~150 份、白术 80~100 份、石膏 30~50 份、焦山楂 20~30 份、焦六神曲 30~50 份、焦麦芽 20~30 份、地龙 30~50 份、徐长卿 30~50 份、绵马贯众 20~30 份、葶苈子 30~50 份。

4、根据权利要求 3 所述的中药提取物，其特征在于，所述中药提取物由包括以下原料的中药制成：厚朴 50 份、焦槟榔 30 份、煨草果 30 份、麻黄 20 份、苦杏仁 30 份、羌活 50 份、生姜 50 份、广藿香 50 份、佩兰 30 份、苍术 50 份、茯苓 150 份、白术 100 份、石膏 50 份、焦山楂 30 份、焦六神曲 30 份、焦麦芽 30 份、地龙 50 份、徐长卿 50 份、绵马贯众 30 份、葶苈子 50 份。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的中药提取物，其特征在于，所述中药提取物的制备包括：

称取厚朴、焦槟榔、煨草果、麻黄、苦杏仁、羌活、生姜、广藿香、佩兰、苍术、

茯苓、白术、石膏、焦山楂、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、绵马贯众、葶苈子，分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液干燥；其中，所述提取物的麻黄碱含量为 1.20-1.50mg/g，固含物转移率为 19-22%，紫花前胡苷含量为 6-8mg/g。

6、根据权利要求 5 所述的中药提取物，其特征在于，所述中药提取物的制备包括：

称取厚朴 15g、焦槟榔 9g、煨草果 9g、麻黄 6g、苦杏仁 9g、羌活 15g、生姜 15g、广藿香 15g、佩兰 9g、苍术 15g、茯苓 45g、白术 30g、石膏 15g、焦山楂 9g、焦六神曲 9g、焦麦芽 9g、地龙 15g、徐长卿 15g、绵马贯众 9g、葶苈子 15g；分别加水提取两次，第一次加 6 倍量水，提取 1.5h，第二次加 4 倍量水，提取 1.0h，合并提取液，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.10~1.15，离心滤过，滤液干燥。

7、权利要求 1-6 任一项所述的中药提取物在制备治疗抗流感病毒 H1N1 或 FM1，或呼吸道合胞病毒药物中的应用。

8、一种药物，其特征在于，该药物由 1-6 任一项所述的中药提取物与药学上可接受的辅料或添加剂制得。

9、根据权利要求 6 所述的药物，其特征在于，所述药物为颗粒剂，所述辅料或添加剂优选为糊精和三氯蔗糖。

10、检测权利要求 1-6 任一所述的中药提取物或权利要求 6 所述的药物的指纹图谱的方法，其特征在于，取供试品溶液进行 HPLC 检测，HPLC 检测的色谱条件包括：采用 C18 色谱柱，以甲醇为流动相 A，含有 0.1%浓度的磷酸水溶液为流动相 B，所述 HPLC 检测的色谱条件中的洗脱为梯度洗脱，该梯度洗脱程序为：0~5min，0% A；5~25 min，0%~15% A；25~60 min，15%~55% A；60~75 min，55%~100% A；75~80 min，100% A。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述色谱条件包括：所述流速为 1.0 mL/min，所述柱温为 30℃，检测波长 250 nm。

12、根据权利要求 10 或 11 所述的方法，其特征在于，所述指纹图谱中，供试品特征图谱中应呈现 10 个特征峰，与参照物峰相应的峰为 S 峰，计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，应在规定值的 $\pm 10\%$ 之内，相对保留时间规定值为：0.11（峰 1）、0.27

(峰 2)、0.36 (峰 3)、0.38 (峰 4)、0.41 (峰 5)、0.84 (峰 6)、0.92 (峰 7)、1.00[峰 8 (S)]、1.19 (峰 9)、1.29 (峰 10)。