

· 药学基础 ·

清肺排毒颗粒质量控制体系中苦杏仁苷含量测定方法的建立

张艳¹, 周严严¹, 王宏洁¹, 杨立新¹, 赵海誉¹, 边宝林¹, 吴骅楷², 韩凌³, 司南^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 漳州片仔癀药业股份有限公司, 福建漳州 363000;
3. 华润三九医药股份有限公司, 广东深圳 518110)

[摘要] 目的: 苦杏仁, 性味苦, 有小毒, 为保证处方安全, 该研究确定苦杏仁的炮制方法为“焯”法, 结合文献以及网络药理学手段, 选择特征监测指标, 以此为基础建立新药清肺排毒颗粒中苦杏仁苷的含量测定方法, 同时测定制剂过程中的转移率, 完善清肺排毒颗粒的质量控制体系。方法: 采用 YMC Triart C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 以甲醇-水为流动相系统进行洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 210 nm。结果: 测得苦杏仁苷在测定质量浓度范围内线性良好, 平均回收率为 97.74%, RSD 为 4.3%。以此方法考察苦杏仁苷在药材, 提取液, 浓缩液, 颗粒即制剂工艺过程中的转移率, 得苦杏仁苷药材制备颗粒平均转移率在 (60±3.91)%, 比较各过程转移率测定结果, 提示药材制备提取液过程可能是影响整个制剂工艺的关键环节。结论: 该研究检测指标选择合理, 所建方法简便、灵敏, 具有良好的重复性、稳定性以及准确度, 可用于清肺排毒颗粒的质量控制。同时, 也适用于清肺排毒颗粒制剂过程中转移率的测定, 进一步完善了清肺排毒颗粒中苦杏仁的质量控制标准, 为清肺排毒颗粒的临床应用提供了一定参考。

[关键词] 清肺排毒颗粒; 苦杏仁; 含量测定

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0127-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220818 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220516.0932.001.html>

[网络出版日期] 2022-05-16 14:15

Establishment of a Method for Determination of Amygdalin in Quality Control System of Qingfei Paidu Granules

ZHANG Yan¹, ZHOU Yanyan¹, WANG Hongjie¹, YANG Lixin¹, ZHAO Haiyu¹, BIAN Baolin¹,
WU Huakai², HAN Ling³, SI Nan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Zhangzhou PienTze Huang Pharmaceutical Co. Ltd., Zhangzhou 363000, China;
3. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China)

[Abstract] **Objective:** Almond, which is bitter in taste, contains traces of toxic substances. For the sake of the safety of prescriptions containing this medicinal material, the processing method of "soaking in boiling water" was selected. Moreover, through literature research and network pharmacology, the characteristic index of this medicinal material was determined. On this basis, a method was established for the determination of amygdalin in Qingfei Paidu Granules (QFPD) and the transfer rate of it in the processing of this prescription was monitored, aiming at improving the quality control system of QFPD. **Method:** The high performance liquid chromatography conditions are as follows: YMC Triart C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase of

[收稿日期] 2022-02-16

[基金项目] 国家中医药管理局青年岐黄学者项目; 中医药防治新型冠状病毒感染的肺炎应急研究专项(2020ZYLCYJ02-9); 杭州市钱江特聘专家项目(2020)

[第一作者] 张艳, 在读硕士, 从事中药分析研究, E-mail: 1784865127@qq.com

[通信作者] * 司南, 副研究员, 从事中药化学与分析研究, Tel: 010-84041249, E-mail: nsi@icmm.ac.cn

methanol-water with flow of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column temperature of $35 \text{ }^\circ\text{C}$, and detection wavelength of 210 nm . **Result:** The linear curve fitted well and the average recovery of amygdalin was 97.74% with RSD of 4.3% . The transfer rates of amygdalin from the medicinal material to the extract, from extract to concentrate, and from concentrate to granules were investigated with this method. The result showed that the average transfer rate from the medicinal material to the granules was $(60 \pm 3.91)\%$. The comparison of transfer rate between the processes suggesting that the extraction of the medicinal material might be the key part influencing the prescription preparation. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, reproducible, stable, and accurate, and the index is reasonable. Thus, the method can be used for the quality control of QFPD and determination of transfer rate of components in the preparation of QFPD. This study further improves the quality control standard of almond in QFPD, which can serve as a reference for the clinical application of QFPD.

[**Keywords**] Qingfei Paidu granules; almond; content determination

清肺排毒方是国家中医药管理局以临床急用、实用、效用为导向推出的新冠肺炎救治方剂,该方剂由《伤寒杂病论》所载麻杏石甘汤、五苓散、小柴胡汤,以及射干麻黄汤为基础化裁而成,涉及麻黄、苦杏仁、甘草、石膏、桂枝、泽泻、猪苓、白术、茯苓、柴胡、黄芩、半夏、生姜、紫菀、款冬花、射干、细辛、山药、枳实、陈皮、广藿香,共21味中药。该组方合理,性味平和,可宣肺平喘、解毒化湿,用于外感寒湿,内有郁热,脾胃失调所致寒湿闭肺扰脾证,可减轻新冠肺炎患者主要症状,对普通型、轻型和重型均有明显疗效^[1]。自新型冠状病毒肺炎疫情爆发以来临床应用最广、投放量最大,在抗疫临床发挥了重要作用,显示了中医药的抗疫优势,提升了中医药在疾病防治领域的地位,是经典方剂当代应用的代表^[2-5]。本处方组成庞大,煎煮困难,作为传统汤剂应用于抗疫临床具有煎煮费时、运输不便等弊端。基于上述背景,本团队临危受命、紧急攻关,将其开发成3.2类新药清肺排毒颗粒,克服了传统汤剂的不足,更好的发挥了清肺排毒汤的临床价值,造福广大人民群众。

方中臣药苦杏仁,性味苦、微温,入肺、大肠经,具有止咳平喘、润肠通便的功效,是治疗咳喘的要药,被广泛应用于“抗疫”方剂中,是治疗新冠处方中出现频次最高的药物之一。在清肺排毒方中,苦杏仁开泄肺气于上,肺气宣降,水道自调。苦杏仁因其苦降肺气,止咳平喘,既助麻黄宣降肺气、泻肺热,又助石膏沉降下行,在处方中发挥着重要作用,是处方不可或缺的重要组成。现代研究也表明,苦杏仁作为对内皮和凝血机制有调节作用的中药,对肺纤维化具有治疗作用^[6-7],这可能解释了清肺排毒方在新冠肺炎防治过程中的有效性。同时苦杏仁具有轻微的毒性,其毒性主要来源于其主要活性成

分苦杏仁苷,苦杏仁苷属芳香族氰苷,在植物界中分布广泛,本身无毒,被自身所含有的苦杏仁酶水解后,产生剧毒氢氰酸。因此严格把控苦杏仁的用量、炮制规格,以及建立苦杏仁的质量控制方法具有重要性^[8-20]。但至今,未有研究对清肺排毒汤中苦杏仁进行系统研究。

因此,本研究基于上述背景,通过文献查阅、毒性验证以及网络药理学关联探讨,确定了处方中苦杏仁的基原、炮制方法、检测指标,建立了苦杏仁关键成分苦杏仁苷的质量控制方法,并利用本方法对清肺排毒颗粒制剂过程各个环节的转移率进行了监测,完善了清肺排毒颗粒制剂的质量标准,为清肺排毒颗粒临床安全、合理用药提供依据和保障。

1 苦杏仁基原物种的选择及依据

2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)记载苦杏仁是蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* var. *ansu*、西伯利亚杏 *P. sibirica*、东北杏 *P. mandshurica* 或杏 *P. armeniaca* 的干燥成熟种子。

本草中关于苦杏仁基原物种的记载最早见于宋代苏颂《本草图经》:“其实亦数种,黄而圆者名金杏……种出济南郡之分流山,彼人谓之汉帝杏,今近都多种之,熟最早。其扁而青黄者名木杏,味酢,不及金杏。”《本草衍义》中记载:“核大而褊者为金杏,此等需接,其他皆不逮也。如山杏辈,只可收仁。又有白杏,至熟色青白或微黄,其味甘淡而不酸。”可见,至少自宋代开始,杏已经实现了大面积种植,且已经出现了品种分化,本草中提到的“金杏”“汉帝杏”“木杏”“白杏”可能为杏的栽培变种或者培育的品种,其中“金杏”应该是经过嫁接而来的新品种,但由于缺乏其他佐证,其基原不可考证。明代朱橚《救荒本草》中除了记载几个品种,还记载

了杏树的一些特征：“其树高丈余，叶颇圆，淡绿，颇带红色，叶似木葛叶而光嫩，微尖。开花色红，结实金黄色。”古时一丈约为现代3.3 m，“丈余”约为现代4~5 m，“叶颇圆……叶似木葛叶而光嫩，微尖。”与现代植物志中“叶片宽卵形或圆卵形……先端急尖至短渐尖，基部圆形至近心形，两面无毛……”的描述基本一致，“开花色红”与现代植物志中“(花)白色或带红色”的描述基本一致。许希周《药性粗评》中记载：“春初开白花，结实五月。”与植物志中“花期3~4月，果期6~7月”的描述基本一致。现代研究表明，不同基原苦杏仁中的苦杏仁苷具有较大差异，其中杏(*P. armeniaca*)中的苦杏仁苷质量分数为3.4%~4.38%；山杏(*P. armeniaca* var. *ansu*)中的苦杏仁苷质量分数为3.41%~5.2%；西伯利亚杏(*P. sibirica*)中的苦杏仁苷质量分数为4.17%~5.3%；东北杏(*P. mandshurica*)中的苦杏仁苷质量分数为4.33%~4.4%。其中，山杏和西伯利亚杏中的苦杏仁苷含量相对较高，并且质量相对稳定。综上所述，古代本草典籍关于苦杏仁药用基原的记载与现代植物志中杏、山杏、西伯利亚杏、东北杏的描述均一致，不排除古代苦杏仁药用基原混乱的情况。而根据现代研究，山杏(*P. armeniaca* var. *ansu*)的质量变异较小，便于生产管理和质量控制。本方中确定苦杏仁的药用基原为山杏 *P. armeniaca* var. *ansu*。

2 苦杏仁检测指标的确定

2.1 文献报道苦杏仁苷是苦杏仁质量监测标准的首选 研究表明，苦杏仁主要含有苷、脂肪酸、挥发性成分、氨基酸等化学成分，其中苦杏仁苷是其代表性和专属性的特征成分，常被作为含量测定指标^[21-22]。且在历来苦杏仁质量标准中，苦杏仁苷也多含有苦杏仁方质量监测标准的首选^[23-25]。2020年版《中国药典》一部苦杏仁项下明确将苦杏仁苷列为含量测定的指标成分。

2.2 网络药理学分析也证明了苦杏仁苷具有治疗新冠的作用 本研究利用 SwissTargetPrediction 数据库对苦杏仁苷的靶点进行预测，共搜集到42个相关靶点^[26]。以“新型冠状病毒肺炎(COVID-19)”为关键词，在 DisGeNET、GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、TTD、DrugBank 等数据库进行筛选，通过将多个数据库筛选结果合并，去除重复值，最终得到916个疾病靶点。筛选得到的靶点在 UniProt 网站进行 gene symbol 转换，结合新冠肺炎相关靶基因利用 Omicshare 平台，筛得二者交集靶基因作为苦杏仁治疗 COVID-19 的潜在靶基包括血

管内皮生长因子 A(VEGFA)、可溶性半乳糖苷结合凝集素 3(LGALS3)、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-12、MMP-8、 α -葡萄糖苷酶(GAA)。说明成分与疾病之间具有相关性，可能是通过交集基因发挥作用的。见增强出版附加材料。

同时，利用 Metascape 数据库^[20]对靶点进行通路富集，京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集，结果见增强出版附加材料，筛选出半乳糖代谢、缺氧诱导因子-1、氮代谢、蛋白激酶 a、磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B 等信号通路。GO 富集发现生物过程(BP)主要在免疫反应调节、肺发育、MAPK 通路调控等方面靶点富集较集中；而细胞组成(CC)方面靶点主要富集条目在线粒体外膜、溶酶体等；分子功能(MF)方面靶点主要在生长因子结合、葡萄糖苷酶活化等。说明苦杏仁苷可能是通过干预内分泌代谢，炎症、调节免疫代谢等途径来发挥消炎、抗病毒、增强免疫以及保护肺损伤功能，与清肺排毒汤机制一致。因此，选择苦杏仁苷作为苦杏仁在清肺排毒颗粒中检测指标具有科学性。见增强出版附加材料。

3 处方中苦杏仁炮制规格的确定

苦杏仁具有轻微的毒性，其毒性主要在于苦杏仁苷被自身含有的苦杏仁酶水解后，产生氢氰酸。研究发现口服氢氰酸 0.05 g 便可致成人死亡^[26]。由此可见，无论是考虑其功效抑或是毒性作用，苦杏仁苷均应作为检测指标加以控制。

苦杏仁常用的炮制方法为焯法^[28-29]。中药炮制“焯”法可使苦杏仁中苦杏仁酶经炮制后被杀灭，氢氰酸含量明显降低，因此焯苦杏仁的毒性低于苦杏仁。为达到保证药效的同时减毒的目的，研发前期课题组使用不同炮制规格苦杏仁饮片的清肺排毒汤颗粒进行了急性毒性评价研究，发现生苦杏仁半致死浓度(LD₅₀)为 22.49 g·kg⁻¹，焯苦杏仁的 LD₅₀ 为 31.89 g·kg⁻¹，在一定程度上表明，使用焯苦杏仁的清肺排毒颗粒处方，其安全性高于使用苦杏仁的处方。同时，笔者通过测定发现，炮制前后苦杏仁苷的含量基本不变，因此清肺排毒颗粒中使用苦杏仁规格为“焯苦杏仁”。

4 苦杏仁苷含量测定方法的建立

4.1 仪器、试剂 LC-20AT 型高效液相色谱仪(包括 SIL-20A 自动进样器、CTO-10AS 柱温箱、SPD-M20A 检测器，Labsolutions DB Multi LC-PDA 工作站，日本岛津公司)，KQ-250B 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；XA105，ML-104/02 型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；

YMC Triart C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)。

乙腈、甲醇色谱纯(Fisher Scientific),娃哈哈纯净水。苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110820-201808。纯度88.2%)。

清肺排毒颗粒由漳州片仔癀药业股份有限公司以及合肥华润神鹿药业有限公司提供[批号分别为2004007、2004008、2004009、2004010、2002001、2009001、2009002、2009003、20092502、20092503、20092504(片仔癀提供,其中20092502、20092503、20092504用于制剂过程中转移率测定);批号分别为2003903、2007901、2007902、2007903、2009902、2009903、2009904(合肥华润神鹿提供)]。

4.2 方法与结果

4.2.1 含量测定方法 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;流动相甲醇(A)-水(B);梯度洗脱(0~30 min, 14%A; 30~30.01 min, 100%A; 30.01~40 min, 100%A; 40~40.01 min, 14%A; 40.01~60 min, 14A);流速1.0 mL·min⁻¹;柱温35℃;进样体积10 μL;检测波长为210 nm。理论板数按苦杏仁苷计算不低于2 000。

对照品溶液的制备:取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含50 μg的溶液,即得。

供试品溶液的制备:取装量差异项下的本品适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

4.2.2 实验条件的选择 提取溶剂的选择:取清肺排毒颗粒1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入50%甲醇溶液、70%甲醇、100%甲醇溶液各25 mL,称定质量,超声提取30 min,按4.2.1项下方法依次制成供试品溶液,测定结果见表1。

表1 提取溶剂的选择

Table 1 Selection of extraction solvent

| 提取溶剂 | 苦杏仁苷含量/% | 理论塔板数 | 拖尾因子 |
|---------|----------|-------|-------|
| 50% 甲醇 | 0.221 | 6 696 | 0.994 |
| 70% 甲醇 | 0.221 | 6 265 | 0.993 |
| 100% 甲醇 | 0.215 | 4 684 | 1.076 |

结果表明,50%甲醇与70%甲醇提取的供试品中苦杏仁苷含量相近,结合理论塔板数和拖尾因子

数据,确定采用50%甲醇提取。

提取溶剂倍数的选择:分别取清肺排毒颗粒0.2、0.5、1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入50%甲醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,按正文方法依次制成供试品溶液,测定结果见表2。结果表明,各倍数提取率相近,确定采用50倍溶剂量进行提取。

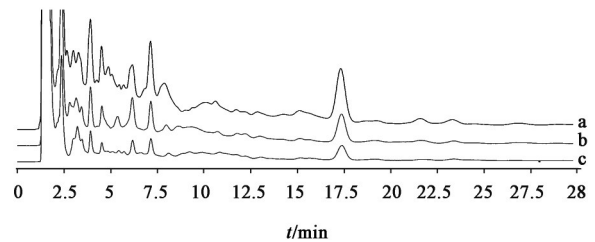
表2 提取溶剂倍数的选择

Table 2 Selection of extraction solvent multiple

| 称样量/g | 溶剂倍数 | 苦杏仁苷含量/% |
|---------|------|----------|
| 0.205 4 | 125 | 0.222 |
| 0.509 6 | 50 | 0.224 |
| 1.015 7 | 25 | 0.221 |

提取时间的选择:取本品0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入50%甲醇25 mL,称定质量,分别超声提取15、30、45 min;按正文方法制成供试品溶液,苦杏仁苷质量分数分别为0.214%、0.218%、0.218%。结果表明超声处理30 min已提取完全。

进样量的确定:选择正文记载方法,对供试品分别吸取5、10、20 μL注入液相色谱仪进行测定,观察测定的分离情况,结果从分离效果、基线情况,谱图情况综合分析,选择10 μL作为进样量见图1。



注:a. 20 μL;b. 10 μL;c. 5 μL

图1 不同进样量考察

Fig. 1 Investigation of different injection volume

4.2.3 系统适应性试验 高效液相色谱仪及色谱柱选择:取按照4.2.2项记载方法制成的同一供试品,分别使用不同品牌高效液相色谱仪(岛津LC-20AT、Agilent 1260),相同色谱柱(YMC Triart C₁₈, TA12S05-1546WT, 1152A60167);相同品牌相同型号不同序号、相同品牌不同型号以及不同品牌的多根色谱柱对同一样品进行测定,观察测定的分离情况,方法系统适应性良好,见表3。

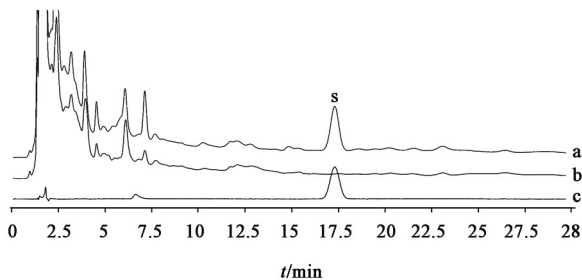
4.2.4 线性关系考察 精密称取苦杏仁苷对照品10.26 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇制成每1 mL含1.026 mg的溶液。加甲醇逐级稀释成质量浓度为256.50、102.60、51.30、25.65、10.26 μg·L⁻¹的一系列

表3 苦杏仁苷系统适应性合格的仪器及色谱柱数据
Table 3 Amygdalin system adaptability(eligible)

| 仪器 | 色谱柱 | | | 苦杏仁苷 | |
|--------------|---|---------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|
| | 型号 | 规格 | 编号 | 理论板数 | 拖尾因子(10%) |
| 岛津 LC-20AT | YMC Triart C ₁₈ TA12S05-1546WT | 4.6 mm×150 mm, 5 μm | 0415187081(W) | 5 428.0 | 1.037 5 |
| | | | 0415176358(W) | 5 755.5 | 1.014 5 |
| | | | 115ZA60167(FFX) | 6 662.0 | 0.986 0 |
| Agilent 1260 | YMC J'sphere ODS-H80 JH08S04-1546WT | 4.6 mm×150 mm, 5 μm | 0415172900(W) | 5 590.0 | 0.984 5 |
| | | | 1152A60167(FFX) | 6 333.7 | 1.015 0 |
| | | | SilGreen GH0515046C ₁₈ AR | GH1900042 | 4 312.2 |

对照品溶液, 摇匀。吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 每个浓度连续进样 2 次, 测定峰面积, 以对照品进样量为横坐标, 对照品峰面积为纵坐标进行回归处理, 绘制标准曲线, 结果表明, 苦杏仁苷在 0.102 6~2.565 0 μg 线性良好。其回归方程为 $Y=947\ 027X+7\ 322.8$, $R^2=1$ 。

4.2.5 阴性试验 阴性溶液的制备按处方中药味比例, 自配不含苦杏仁的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果阴性溶液在与苦杏仁苷对照品及清肺排毒颗粒供试品相同保留时间处未见色谱峰干扰, 见图 2。



注: a. 阴性; b. 清肺排毒颗粒; c. 对照品; s. 苦杏仁苷

图2 清肺排毒颗粒、苦杏仁阴性制剂及苦杏仁苷 HPLC

Fig. 2 HPLC diagram of QFPD, amygdalin negative formulations and amygdalin

4.2.6 精密度、重复性与稳定性考察结果 取同一批样品(批号 2004010, 片仔癀)按 4.2.1 方法制成供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录各化合物峰面积, 计算精密度 RSD。按 4.2.1 方法平行制备供试品溶液 6 份, 依次检测, 计算重复性 RSD。取适量供试品溶液, 分别在制备后 0、1、2、4、8、12、24、36 h 按 4.2.1 方法检测, 记录峰面积, 计算稳定性 RSD。结果表明, 供试品溶液在 36 h 内基本稳定, 重复性、精密度良好, 见表 4。

4.2.7 回收率试验 采用加样回收率测定法, 称取已知含量的同一批号的样品(批号 2004010, 片仔

表4 苦杏仁苷精密度、重复性与稳定性考察

Table 4 Precision, repeatability and stability test results

| No. | 重复性 | | 精密度 | | 稳定性 | | |
|-----|--------------------------|--------|---------|--------|-------|---------|--------|
| | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | RSD /% | 峰面积 | RSD /% | 时间 /h | 峰面积 | RSD /% |
| 1 | 0.24 | 0.6 | 447 004 | 0.9 | 0 | 447 004 | 1.1 |
| 2 | 0.24 | | 444 366 | | 4 | 437 666 | |
| 3 | 0.24 | | 439 165 | | 6 | 445 719 | |
| 4 | 0.24 | | 437 666 | | 9 | 451 554 | |
| 5 | 0.24 | | 439 189 | | 12 | 440 203 | |
| 6 | 0.24 | | 445 719 | | 19 | 441 537 | |
| 7 | | | | | 25 | 440 186 | |
| 8 | | | | | 36 | 437 477 | |

癀, 含量 0.274%) 0.25g, 通过 1:1 加入相应对照品含量, 共 9 份; 按 4.2.1 项下供试品溶液的制备方法制备成供试品溶液, 并按照该项下色谱条件, 测定, 按下式计算回收率, 经测定苦杏仁苷的平均回收率为 97.735%, RSD 为 4.3%。实验结果表明, 回收率符合含量测定的要求结果见表 5。

表5 苦杏仁苷加样回收率试验

Table 5 Recovery test of amygdalin

| 取样量 /mg | 样品中量/mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|---------|---------|---------|---------|---------|----------|--------|
| 256.1 | 0.618 | 0.684 | 1.331 | 104.260 | | |
| 251.7 | 0.607 | 0.684 | 1.316 | 103.597 | | |
| 253.8 | 0.613 | 0.684 | 1.308 | 101.686 | | |
| 255.1 | 0.616 | 0.472 | 1.061 | 94.337 | | |
| 250.5 | 0.605 | 0.472 | 1.057 | 95.820 | 97.74 | 4.3 |
| 253.2 | 0.611 | 0.472 | 1.067 | 96.697 | | |
| 256.0 | 0.618 | 0.232 | 0.838 | 95.201 | | |
| 252.8 | 0.610 | 0.232 | 0.829 | 94.364 | | |
| 253.7 | 0.612 | 0.232 | 0.829 | 93.654 | | |

4.2.8 15批次样品测定结果 按4.2.1项方法制备供试品溶液,测定15批清肺排毒颗粒中苦杏仁苷的含量,结果见表6。

表6 15批样品测定结果

Table 6 Determination results of 15 batches of samples

| 厂家 | 序号 | 批号 | 苦杏仁苷含量/mg/袋 |
|-------|----|---------|-------------|
| 片仔癀样品 | 1 | 2004010 | 36.20 |
| | 2 | 2002001 | 33.69 |
| | 3 | 2004007 | 33.20 |
| | 4 | 2004008 | 30.74 |
| | 5 | 2004009 | 38.30 |
| | 6 | 2009001 | 45.01 |
| | 7 | 2009002 | 43.16 |
| | 8 | 2009003 | 48.51 |
| 神鹿样品 | 9 | 2003903 | 27.53 |
| | 10 | 2007901 | 32.98 |
| | 11 | 2007902 | 36.27 |
| | 12 | 2007903 | 32.88 |
| | 13 | 2009902 | 40.42 |
| | 14 | 2009903 | 38.28 |
| | 15 | 2009904 | 41.01 |

2个企业提供的15批样品测定数据结果显示,苦杏仁苷含量在颗粒剂中最低测定值27.53 mg/袋,最高测定值48.51 mg/袋,平均值37.21 mg/袋。最高测定值与最低测定值相差不是很大。苦杏仁为果实的成熟果仁,考虑到苦杏仁药材含量的实际情况,制定颗粒剂上下限量的样品批数较少,因此,暂时按照最高测定值与最低测定值上下浮动20%计算颗粒剂中苦杏仁苷的限量。规定本品每袋含苦杏仁以苦杏仁苷($C_{20}H_{27}NO_{11}$)计,在22.0~58.2 mg。

5 清肺排毒颗粒制剂过程苦杏仁苷的监测

按照清肺排毒汤制剂工艺相关过程,测定了来自片仔癀有限公司3批样品不同状态(药材、提取液、浓缩液、颗粒)的含量,苦杏仁苷药材-颗粒平均转移率在60%左右。汤剂转变成颗粒剂的过程中,指标性成分的含量虽有所下降,但下降幅度较小。可知,苦杏仁苷在制剂过程中稳定。以药材60 g(3.30%)所含苦杏仁苷含量测定,测得数据见表7。

表7 3批生产各环节样品中苦杏仁苷转移率测定

Table 7 Determination of amygdalin transfer rate in samples from each link of 3 batches %

| 批次 | 药材-提取液 | 提取液-浓缩液 | 浓缩液-颗粒 | 药材-颗粒 |
|----------|--------|---------|--------|-------|
| 20092502 | 69.41 | 87.46 | 91.53 | 60.00 |
| 20092503 | 75.63 | 89.77 | 84.37 | 56.00 |
| 20092504 | 80.19 | 91.12 | 90.88 | 64.00 |

实验结果可见苦杏仁苷在清肺排毒颗粒制备过程转移率为中药材-提取液(75.08±5.41)%,提取液-浓缩液(89.45±1.85)%,浓缩液-颗粒(88.93±3.96)%,最终药材-颗粒(60±3.91)%。3批次工业化生产之间波动较小,由此可知,苦杏仁苷作为质控指标,在制剂过程中温度、浓缩与干燥工艺并不会对其造成显著影响,指标稳定,作为含量测定指标更符合专属性和科学性要求。药材-提取液转移率较低,由此可知,提取过程可能是整个制剂工艺过程的关键环节。但清肺排毒汤是含有21味药材的方剂,成分复杂,各成分之间可能会有一定的干扰,而且因为是大生产,会有仪器设备等的残留,这可能是导致苦杏仁苷转移率在60%左右的原因。

6 讨论

本研究基于新冠肺炎疫情中发挥巨大作用的经典化裁方剂开发而成的3.2类中药新药清肺排毒颗粒,对其中臣药苦杏仁进行全面的质量控制研究。通过历史沿革,确定本处方中使用的苦杏仁单一基原为山杏 *P. armeniaca* var. *ansu*。并通过文献报道及利用 SwissTargetPrediction 数据库 Metascape 平台进行网络药理学预测分析,解析了苦杏仁主要成分苦杏仁苷作用机制,证明其为清肺排毒方中重要的功效成分,选择该成分作为清肺排毒颗粒质量控制体系中苦杏仁的质量控制指标;通过文献报道、课题组前期急性毒性筛选以及炮制前后苦杏仁苷含量测定结果,确定焯法作为处方中苦杏仁饮片的炮制方法。

清肺排毒颗粒处由22味中药组合煎煮制剂而成,成分十分复杂。在众多成分中建立单一成分,尤其是苦杏仁苷这种末端吸收成分的测定方法较为困难。参照2020年版《中国药典》一部苦杏仁项下的含量测定条件以及相关文献报道,结合课题组前期桃红四物汤研究基础,进行了大量的实验研究。笔者通过对提取溶剂、溶剂倍数、提取时间的全面考察,从易于操作、结果准确、分离效果等多方面考量,确定供试品溶液制备方法为取装量差异项下的本品适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。同时,由于处方成分复杂且苦杏仁苷为末端吸收,经常出现分离状况不佳、基线不平稳等问题,为保证样本测定的准确性和合理性,笔者进行了全面的系统适应性

实验,从几十款色谱柱中最终筛选出4款能够良好的完成该成分的分离和测定。最终确定含量测定色谱条件为岛津LC-20AT高效液相色谱仪,DAD检测器;YMC Triart C₁₈色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相甲醇-水梯度洗脱;流速1.0 mL·min⁻¹;柱温35℃;检测波长为210 nm。在此流动相条件下,供试品苦杏仁苷出峰后,色谱在60 min范围内不能达到基线平稳,也就是说反复进样情况下可能会有杂质影响,测定时应设置柱平衡程序。

本研究运用HPLC技术建立了清肺排毒颗粒中苦杏仁苷的含量测定方法并通过方法学验证。方法简单,具有良好的重复性、稳定性以及准确度,是清肺排毒颗粒质量控制体系的重要组成部分。采用本方法对清肺排毒颗粒工业化生产过程中的转移率进行监测,对清肺排毒颗粒的工业化生产工艺起到了指导意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王饶琼,杨思进,谢春光,等.清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的临床疗效观察[J].中药药理与临床,2020,36(1):13-18.

[2] 赖寒,吴棕冰,林林.《伤寒论》经方翻译研究——以清肺排毒汤原方为例[J].广西中医药大学学报,2020,23(4):84-86.

[3] 薛伯寿,姚魁武,薛燕星.“清肺排毒汤”快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析[J].中医杂志,2020,61(6):461-462.

[4] 杜燕,张选国.清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎临床依据概述[J].陕西中医,2020,41(8):1016-1019.

[5] 田朝晖,向建军,葛舰,等.清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎理论分析与临床实践[J].世界中医药,2020,15(4):497-501.

[6] 张向群,张淑坤.苦杏仁苷抗器官纤维化作用及其机制研究进展[J].现代医学,2020,48(7):908-911.

[7] 赵鑫,吕文良,李娟梅,等.苦杏仁苷抗纤维化作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(10):109-112.

[8] 李科友,史清华,朱海兰,等.苦杏仁化学成分的研究[J].西北林学院学报,2004,19(2):124-126.

[9] 丁东宁,谭廷华,刘俊儒,等.镇原苦杏仁化学成分的研究[J].西北药学杂志,1990(3):21-23.

[10] 孙景琦,冯秀华,张学勤.山杏仁油脂脂肪酸成分及理化特性的研究[J].内蒙古农学院学报,1994,15(1):123-124.

[11] 时登龙,刘代缓,曹喆,等.苦杏仁药理作用及炮制工艺研究进展[J].亚太传统医药,2018,14(12):

106-109.

[12] 杨国辉,魏丽娟,王德功,等.中药苦杏仁的药理研究进展[J].中兽医学杂志,2017(4):75-76.

[13] 李露,戴婷,李小龙,等.苦杏仁苷药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2016,37(1):63-66.

[14] 郭君其,盛明雄,谭建明,等.苦杏仁甙抑制大鼠肾脏纤维化的实验研究[J].实用医学杂志,2007,23(17):2628-2630.

[15] 赖莹,夏薇,袁源,等.杏仁蛋白降血脂功能的研究[J].中国食物与营养,2011,17(4):66-68.

[16] 敖君求,张清安,邵凯,等.苦杏仁苷的生理功能提取及测定方法研究进展[J].农产品加工(上半月),2021(1):64-68.

[17] 唐乔.HPLC法测定百咳静颗粒中8个成分的含量[J].药物分析杂志,2021,41(1):147-153.

[18] 王丽萍,许红玮.HPLC法测定加味桂枝茯苓汤中苦杏仁苷的含量[J].中医学报,2014(6):776-777,778.

[19] 魏金婷,刘文奇.方药中苦杏仁苷的研究和应用进展[J].海南医学院学报,2007,13(6):589-591,596.

[20] GFELLER D, GROSIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (Web Server issue): W32-38.

[21] 李科友,史清华,朱海兰,等.苦杏仁化学成分的研究[J].西北林学院学报,2004,19(2):124-126.

[22] 孙景琦,冯秀华,张学勤.山杏仁油脂脂肪酸成分及理化特性的研究[J].内蒙古农学院学报,1994,15(1):123-124.

[23] 陈霞,李计萍.苦杏仁及其制剂的质量控制体系探讨[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(19):200-205.

[24] 孔小英,高超.HPLC同时测定厚朴-杏仁药对水煎液中厚朴酚、和厚朴酚、苦杏仁苷的含量[J].四川中医,2020,38(7):77-80.

[25] 许秀琼,刘建博,王硕辉,等.HPLC法测定苦杏仁苷两种差向异构体的含量[J].中药新药与临床药理,2019,30(1):94-98.

[26] 段海婧,龙晓宙,杜丽东,等.清肺排毒汤对三种冠状病毒感染的SARS、MERS和COVID-19的潜在共性作用及机制探讨[J].中药药理与临床,2020,36(04):29-35.

[27] 高鑫,何正有,罗璞,等.抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)中药复方中高频单味药的研究概述[J].国外医药:抗生素分册,2020,41(4):283-289.

[28] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:210.

[29] 刘艳,张国媛,陈莎,等.经典名方麻黄汤的处方考证及历史沿革分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(1):7-16.

[责任编辑 顾雪竹]