

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

**A61K 31/353**

A61K 31/7048

A61K 35/78

A61P 31/12

A61P 37/04



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03123879.3

[43] 公开日 2005 年 4 月 13 日

[11] 公开号 CN 1605335A

[22] 申请日 2003.5.30 [21] 申请号 03123879.3

[71] 申请人 任启生

地址 100050 北京市北纬路禄长街头条四号

共同申请人 宋新荣

[72] 发明人 任启生 宋新荣

权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物  
用于抗病毒等药物

[57] 摘要

本发明公开了含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物在制备广谱抗病毒药物和制备提高免疫力药物中的用途，其中所述含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物中二氢杨梅素含量是 20% 至 98% 重量比，杨梅素含量是 2% 至 80% 重量比，所述药物组合物所抗病毒是乙肝病毒、流感病毒和/或冠状病毒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物在制备广谱抗病毒药物组合物和/或提高免疫力药物组合物中的用途。
2. 权利要求1的用途，特征在于其中所述含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物中含有20%至98%重量比的二氢杨梅素和2%至80%重量比的杨梅素。
3. 权利要求1或2的用途，特征在于其中所述组合物还含有一种或几种选自下面的成分：杨梅甙，没食子酸和/或茶多酚。
4. 权利要求3的用途，特征在于其中杨梅甙的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的0-50wt%，没食子酸的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的0-50wt%，茶多酚的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的0-50wt%。
5. 权利要求1-4任一项的用途，特征在于其中所述组合物是从蛇葡萄属植物中提取的。
6. 权利要求5的用途，特征在于其中所述蛇葡萄属植物包括粤蛇葡萄，栋叶玉葡萄，显齿蛇葡萄，大叶蛇葡萄，白藜，东北蛇葡萄或山葡萄。
7. 权利要求1-4任一项的用途，特征在于其中所述组合物是所述单体按照所述比例混合得到的。
8. 权利要求1至7之一的用途，其中所制备的药物所抗病毒是乙肝病毒、流感病毒和/或冠状病毒。
9. 一种广谱抗病毒药物组合物，特征在于其含有抗病毒有效量的

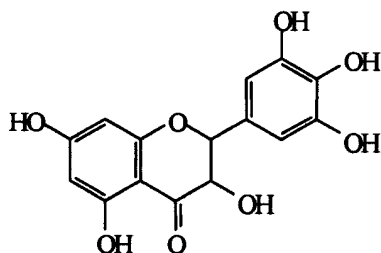
含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物。

10. 权利要求 9 的组合物, 特征在于其中所述含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物中含有 20% 至 98% 重量比的二氢杨梅素和 2% 至 80% 重量比的杨梅素。
11. 权利要求 9 或 10 的组合物, 特征在于其中所述组合物还含有一种或几种选自下面的成分: 杨梅甙, 没食子酸和/或茶多酚。
12. 权利要求 11 的组合物, 特征在于其中杨梅甙的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%, 没食子酸的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%, 茶多酚的含量是二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%。
13. 权利要求 9 至 12 之一的组合物, 其中所述抗病毒是抗乙肝病毒、流感病毒和/或冠状病毒。

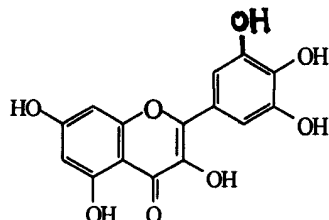
## 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物用于抗病毒等药物

本发明属于药物领域。

文献 Walter Karrerr, Birkhauser Verlag, Bassel und stuttgart (1958), P. 652, NO:1640 公开了二氢杨梅素的结构式,



但是没有对二氢杨梅素的活性进行研究。杨梅素是一种已知的化合物，其结构式是：



迄今为止没有人公开过含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物及其用途。

本发明的目的是提供一种新的组合物，其含有二氢杨梅素和杨梅素，其中二氢杨梅素含量是 20% 至 98% 重量比，杨梅素含量是 2% 至 80% 重量比。本发明组合物中还可以含有一种或几种选自下面的成分：杨梅甙，没食子酸和/或茶多酚。杨梅甙的含量优选占二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%，没食子酸的含量优选是占二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%，茶多酚的含量优选是占二氢杨梅素和杨梅素总重量的 0-50wt%。

本申请人令人惊奇地发现含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物在制药领域和保健品领域具有广泛的用途。

本发明的含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物具有广谱抗病毒作用，特别是抗乙肝病毒、流感病毒和/或冠状病毒。含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物可以直接用作抗病毒药物，还可以与药学可接受载体或赋形剂混合制

成广谱抗病毒药物组合物，药物组合物中含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物的量可以是2-98%重量比。

本发明的含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物具有降血糖和降血脂作用，可以制备成降血糖药和降血脂药。

本发明的另一个目的是提供制备本发明含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物的方法。本发明的组合物可以通过将所述组分单体按比例混合制备，也可以从蛇葡萄属植物中提取。所述蛇葡萄属植物包括粤蛇葡萄，栋叶玉葡萄，显齿蛇葡萄，大叶蛇葡萄，白藜，东北蛇葡萄和山葡萄。所述提取方法可以是：通过各种溶剂(水和/或有机溶剂)煎煮葡萄科植物，煎煮一次或多次，煎煮液经浓缩冷却，静置过夜，检测沉淀与上清的药效成分，取具有活性的沉淀和/或经进一步硅胶吸附后得到本发明组合物。煎煮所用的溶剂优选水，醇类，酯类，酮类，醚类和强极性有机溶剂，更优选低级链烷醇，低级脂肪酸酯，具有3-12个碳原子的酮和醚和/或水，最优选甲醇，乙醇，丙醇，异丙醇，正丁醇，异丁醇，仲丁醇，叔丁醇，乙酸乙酯，乙酸甲酯，甲酸乙酯，丙酮，甲基乙基酮，乙醚，甲基乙基醚，甲基叔丁基醚，二氯甲烷，氯仿，四氯化碳，二甲亚砜，N,N-二甲基甲酰胺和/或水等等。分离使用的吸附剂可以是硅胶。

本发明的原理是通过建立药理筛选模型追踪含有二氢杨梅素和杨梅素组合物药效活性，找到其药用用途。体外抑菌试验和抗病毒试验表明本发明组合物具有抗菌消炎和广谱抗病毒作用，特别是抗乙肝病毒、流感病毒和/或冠状病毒。试验还证明本发明的含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物具有降血糖和降血脂作用，具有预防和/或恢复酒精性肝损伤的功能，具有保肝护肝，增强免疫系统免疫力的功能。

本发明的含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物可以通过药物领域常规配制技术和载体，配制成药物组合物，药物组合物中含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物的量可以是2-98%重量比。本发明组合物可以制备成片剂，颗粒剂，胶囊，外用药。但是本领域技术人员也可以根据需要用本领域公知的技术和载体配制成其它剂型。优选活性成分对人施用的剂量是0.01-5克/千克体重/天，但是也可以根据具体情况而定，不局限于此范围。

通过下面的实施例详细说明本发明。但是应该理解这些实施例只是说明本发明,而不是在任何方面限制本发明的范围。

实施例 1: 从二氢杨梅素和杨梅素晶体制备本发明组合物

取二氢杨梅素 80g, 杨梅素 20 g, 上述组分在混合机中混合后得混合物。或者取二氢杨梅素 98g, 杨梅素 2 g, 上述组分在混合机中混合后得混合物。或者取二氢杨梅素 20g, 杨梅素 80 g, 上述组分在混合机中混合后得混合物。

实施例 2: 从二氢杨梅素和杨梅素晶体制备本发明组合物

取二氢杨梅素 20g, 杨梅素 80g, 杨梅甙 2.5g, 没食子酸 2.5g, 茶多酚 2.5g, 上述组分在混合机中混合得混合物。或者取二氢杨梅素 98g, 杨梅素 2g, 杨梅甙 2.5g, 没食子酸 2.5g, 茶多酚 2.5g, 上述组分在混合机中混合得混合物。或者取二氢杨梅素 85g, 杨梅素 15g, 杨梅甙 25g, 没食子酸 2g, 上述组分在混合机中混合得混合物。或者取二氢杨梅素 50g, 杨梅素 50g, 杨梅甙 25g, 茶多酚 2.5g, 上述组分在混合机中混合得混合物。或者取二氢杨梅素 70g, 杨梅素 30g, 杨梅甙 5g, 上述组分在混合机中混合得混合物。

实施例 3: 从二氢杨梅素和杨梅素晶体制备本发明组合物

分别取实施例 1 的第一种组合物(或实施例 2 的第三种组合物)30 g, 乳糖 53g, 羧甲基纤维素钠 1.5g, 硬脂酸镁 0.5g, 50%乙醇 5ml, 上述组分在混合机中混合后压制成片。

实施例 4: 从二氢杨梅素和杨梅素晶体制备本发明组合物

取二氢杨梅素 115g, 杨梅素 15g, 糖粉 345g, 糊精 145g, 乙醇 5ml, 上述组分混合后干燥, 得到冲剂。

实施例 5: 从显齿蛇葡萄植物制备本发明组合物

取显齿蛇葡萄干燥嫩茎叶 2kg, 用 95%乙醇(医用乙醇)回流提取两次, 每次 2 小时, 过滤, 合并滤液, 蒸发至干, 加入 1200 毫升 85℃热水, 使浸膏充分溶解, 滤去黑色不溶物, 滤液中加入硅胶(100 目)200g, 将滤液加热至 60℃, 乘热过滤, 将滤液冷却至室温, 沉淀, 静置过夜, 得到黄色沉淀, 产率: 11.2%。其中二氢杨梅素含量 74.8%重量比, 杨梅素含量 21.1%重量比, 杨梅甙的含量是 2.8%重量比, 没食子酸的含量是 1.3%重量比。薄层色谱分析用聚酰胺薄层层析, 规格 8×8cm, 展开剂: 甲醇, 显色剂: 4%三氯化铁-乙醇溶液,  $R_f$  没食子酸=0.72,  $R_f$  杨梅甙=0.54,  $R_f$  二氢杨梅素=0.50,  $R_f$  杨梅素=0.21。

或者取显齿蛇葡萄干燥嫩茎叶 2kg, 用 95%乙醇(医用乙醇)回流提取两次, 每次 2 小时, 过滤, 合并滤液, 蒸发至干, 加入 1200 毫升 85℃热水, 使浸膏充分溶解, 滤去黑色不溶物, 滤液用等体积乙酸乙酯萃取两次, 合并乙酸乙酯溶液, 蒸发至干, 得到黄色沉淀, 产率: 10.25%。其中二氢杨梅素含量 76%重量比, 杨梅素含量 18%重量比, 杨梅甙的含量是 3.0%重量比, 没食子酸的含量是 2%重量比, 其余为显齿蛇葡萄植物中  $R_{f5}$ =0.41 的成分。薄层色谱分析用聚酰胺薄层层析, 规格 8×8cm, 展开剂: 甲醇, 显色剂: 4%三氯化铁-乙醇溶液,  $R_{f \text{ 没食子酸}}$ =0.72,  $R_{f \text{ 杨梅甙}}$ =0.54,  $R_{f \text{ 二氢杨梅素}}$ =0.50,  $R_{f \text{ 杨梅素}}$ =0.21,  $R_{f5}$ =0.41。

#### 实施例 6: 从东北蛇葡萄植物制备本发明组合物

室温下, 将收集来的东北蛇葡萄 1000 克洗去尘土, 加入 4000 毫升水, 超声提取 0.5 小时, 过滤, 残渣再加入 1000 毫升丙醇, 再超声提取 0.5 小时, 再过滤, 滤液合并, 浓缩至 2 毫升, 加入 500 毫升 100℃热水, 冷却到 60℃, 静置, 过滤, 滤液用硅胶(100 目)100g 吸附, 将滤液加热至 70℃, 乘热过滤, 将滤液冷却至室温, 沉淀, 静置过夜, 得到黄色沉淀, 产率: 10.3%。其中二氢杨梅素含量 58%重量比, 杨梅素含量 14%重量比, 杨梅甙的含量是 1.4%重量比, 没食子酸的含量是 1.7%重量比, 其余为东北蛇葡萄植物中  $R_{f5}$ =0.43 的成分。薄层色谱分析用聚酰胺薄层层析, 规格 8×8cm, 展开剂: 甲醇, 显色剂: 4%三氯化铁-乙醇溶液,  $R_f$  没食子酸=0.76,  $R_f$  杨梅甙=0.55,  $R_f$  二氢杨梅素=0.54,  $R_f$  杨梅素=0.22,  $R_{f5}$ =0.43。

实施例 7：含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物体外抗乙肝病毒的药效试验

选择乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 转染的 2215 细胞株，以其培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的滴度作为评价抗 HBV 效果的指标，研究本发明实施例 5 的第一种组合物的抗 HBV 作用。本试验还采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色分析法检测药物对细胞的毒性，选用阿昔洛韦作为阳性对照物。

## 1. 材料与方法

### 1. 1 活性成分

#### 1. 1. 1 本发明实施例 6 得到的组合物

1. 1. 2 阳性药物 甘泰或注射用阿昔洛韦 (Acyclovir for Injection)，批号：20000409 2，湖北潜江制药股份有限公司生产，鄂卫药准字 (1991) 第 000354 号。

### 1. 2 细胞与试剂

2215 细胞由本实验室保存，培养液为 DMEM (Gibco 公司)，培养液中含 10% 胎牛血清，38ug/ml G418 (Geneticin, Gibco 公司)，0.03% L-谷氨酰胺 (华美进口分装)，青、链霉素各式各 1000iu/ml。

MTT (瑞士 Fluka 公司)、二甲基亚砷 (DMSO) (Serva 公司)

HBsAg、HBeAg 试剂盒由上海实业华生科技有限公司提供。批号：08-2000-03，06-2000-02

### 1. 3 细胞培养与实验分组

2215 细胞按常规方法以  $10^3$ - $10^4$  个/孔的浓度接种 96 孔培养板，每孔 0.1ml，5%CO<sub>2</sub>、37℃ 培养 24h 后移去培养液，按成含药物的培养液，其中实施例 5 的第一种组合物设 6 个浓度：95ug/ml，195ug/ml，385ug/ml，750ug/ml，1500ug/ml，3100ug/ml，阿昔洛韦设 6 个浓度，即 62.5ug/ml、125ug/ml、250ug/ml、500ug/ml、1mg/ml、2mg/ml，每个浓度设 5 个平行孔，同时设不加药物孔为对照组，培养 5 天后收获上清液。

### 1. 4 药物的细胞毒性测定

用药 5 天后，吸净各孔上清液，培养孔重新加入含 MTT 的培养液，使 MTT 最终浓度为 0.5mg/ml、37℃ 培养 4h，弃去培养液，每孔加入 100ul DMSO，振荡



10min,酶标仪上490nm测定OD值,与相应对照孔的吸光度值(存活细胞为100%)比较,计算存活细胞百分比,确定药物对细胞的最大无毒剂量浓度。

### 1.5 检测

根据药物对细胞的最大无毒剂量浓度向前推出4—5个剂量级,收获各级上清液用于HBsAg和HBeAg的检测,检测按操作说明书进行。

### 1.6 药物抗HBV的评价方法

用药物对HBsAg或HBeAg的抑制率进行评价

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孔 HBsAg (HBeAg) OD 值} - \text{药物孔 HBsAg (HBeAg) OD 值}}{\text{对照孔 HBsAg (HBeAg) OD 值}} \times 100\%$$

## 2. 结果

### 2.1 药物对细胞的毒性

结果发现随着用药浓度的提高,其对细胞的毒性增加,对细胞的最大无毒浓度(存活细胞在90%以上的药物浓度)为750ug/ml,阳性药阿昔洛韦为500ug/ml(表1)。

### 2.2 药物抗HBV效果

本发明实施例6的第一种组合物及阳性药对2215细胞分泌HBsAg、HBeAg的抑制结果见表2,从表中可以看出,在本试验所用的浓度下:本发明实施例6的第一种组合物对HBsAg、HBeAg的抑制率分别在 $15.68 \pm 3.723\%$ — $54.65 \pm 9.067\%$ 和 $25.84 \pm 1.705\%$ — $45.38 \pm 8.705\%$ 之间,随着药物浓度的增加其抑制率逐渐增大,当药物浓度达750ug/ml时,对HBsAg的抑制率大于50%。

阳性药物阿昔洛韦对HBsAg、HBeAg的分泌抑制率分别为 $19.48 \pm 9.86\%$ — $51.86 \pm 7.14\%$ 和 $20.42 \pm 1.52\%$ — $28.44 \pm 5.15\%$ 之间,当药物浓度为500ug/ml时,对HBsAg的抑制率大于50%。

表1 本发明实施例6的第一种组合物对细胞的毒性

药物名称	浓度(ug/ml)	存活细胞 (%M±S)
本发明 实施例 5 得到的 组合物	3100	52.38±1.20
	1500	88.40±2.11
	750	92.60±1.82
	385	93.31±5.45
	195	95.68±4.78
	95	99.70±1.28
阿 昔 洛 韦	2000	76.64±4.96
	1000	87.40±1.51
	500	92.54±1.76
	250	92.76±8.84
	125	92.06±4.87
	62.5	96.48±4.04

表2 本发明实施例6得到的组合物的体外抗HBV 试验结果

药物名称	浓度(ug/ml)	HbsAg 抑制率 (%M±S)	HBeAg 抑制率 (%M±S)
本发明 实施例 5 得到的 组合物	95	15.68±3.723	25.84±1.705
	195	23.68±2.213	28.39±7.087
	385	35.48±8.705	31.49±4.689
	750	54.65±9.067	45.38±8.705
阿 昔 洛 韦	62.5	19.48±9.86	20.42±1.52
	125	25.88±11.09	20.94±10.55
	250	44.44±5.94	21.62±19.95
	500	51.86±7.14	28.44±5.15

以上结果表明本发明实施例6的组合物在体外具有一定的抗乙肝病毒活性。用本发明实施例5的组合物、实施例1的第一种组合物或实施例2的第三种组合物进行试验,也得到了基本相同的结果,这些组合物在体外都具有抗乙

肝病毒活性。

实施例 8：含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗效果

在鸭乙型肝炎病毒感染鸭体内进行治疗试验，观察本发明实施例 1，2，5 和 6 得到的组合物是否抑制鸭乙型肝炎病毒。

实验采用一日龄北京鸭静脉注射鸭乙型肝炎病毒，7 天后开始给鸭口服本发明实施例 1，2，5 得到的组合物 3 个剂量组 1.25，2.5 和 5.0g/kg，1 天 2 次，给药 10 天 (Bid×10)，观察药物对鸭的毒性和鸭血清鸭乙型肝炎病毒 DNA (DHBV-DNA) 的影响，并与拉米夫定比较。

实验表明，本发明实施例 1，2，5 得到的组合物大剂量组 5.0g/kg 口服，1 天 2 次 10 天，无毒性，第一批实验，按配对统计，5.0g/kg 组，给药后第 5，10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降，( $P<0.01$ )。按成组统计与各自对照组比较，给药后第 5 天，第 10 天和停药后 3 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降，( $P<0.01$ )。2.5g/kg 组，给药后第 5，10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著和非常显著下降，( $P<0.05-0.01$ )。按成组统计与各自对照组比较，给药后第 10 天和停药后 3 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降，( $P<0.05$ )。1.25g/kg 组，给药后第 5 天，按配对统计，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降，( $P<0.01$ )。按成组统计，给药后第 5 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著下降，( $P<0.05$ )。第二批实验 5.0g/kg 组，按配对统计，给药后第 5 天，第 10 天和停药后 3 天治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著和显著下降，( $P<0.01-0.05$ )。按成组统计与各自对照组比较，给药后第 5 天，第 10 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著和显著下降，( $P<0.01-0.05$ )。2.5g/kg 组，按成组统计与各自对照组比较，给药后第 10 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著下降，( $P<0.05$ )。1.25g/kg 组，无抑制作用。第三批实验 5.0g/kg，配对统计，给药后第 5、10 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著和显著效果。( $P<0.01-0.05$ )。按成组统计与各自对照组比较，给药后第 5 天，治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有非常显著下降，( $P<0.01$ )。2.5g/kg 组，按配对统计，给药后第 5、10 天和停药后 3 天，治疗组鸭血清

DHBV-DNA 有显著和非常显著下降, ( $P<0.05, 0.01, 0.05$ )。成组统计, 给药后第 5 天, 第 10 天, 治疗组鸭血清 DHBV-DNA 有显著和非常显著下降, ( $P<0.05-0.01$ )。1.25g/kg 组, 无抑制作用。拉米夫定对照组, 有非常显著效果, 说明实验可信。提示: 本发明实施例 1, 2, 或 5 得到的组合物在 3.4-10.0g/kg 组对鸭乙型肝炎病毒感染有效。

## 材料和方法

### (一) 药物

本发明实施例 5 得到的组合物, 用生理盐水配制。

阳性药物拉米夫定由葛兰素威康制药公司产品, 用生理盐水配制。

### (二) 病毒

鸭乙型肝炎病毒 鸭乙型肝炎病毒 DNA (DHBV-DNA) 强阳性血清, 采自上海麻鸭,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

### (三) 动物

1. 日龄北京鸭, 购自北京前进种鸭场动物饲养场。

### (四) 试剂

$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP 购自北京福瑞生物工程公司。缺口翻译药盒购自普洛麦格公司 (Promega Co.); Sephadex G-50, Ficoll PVP 购自瑞典 Pharmacia 公司; SDS 西德 Merck 公司产品; 鱼精 DNA、牛血清白蛋白为中国科学院生物物理所产品; 硝酸纤维素膜 0.45um Amersham 公司产品。

### (五) 实验方法

1. 鸭乙型肝炎病毒感染:

1 日龄北京鸭, 经腿胫静脉注射上海麻鸭 DHBV-DNA 阳性鸭血清, 每只 0.2ml, 在感染后 7 天取血, 分离血清,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存待检。

2. 药物治疗试验:

DHBV 感染雏鸭 7 天后随机分组进行药物治疗试验, 每组 6 只, 给药组分 3 个剂量组, 分别为 1.25, 2.5, 5.0g/kg 组, 口服, 1 天 2 次, 10 天。设病毒对照组 (DHBV), 以生理盐水代替药物。阳性药用拉米夫定, 口服给药 50mg/kg, 1 天 2 次, 10 天。在感染后第 7 天即用药前 (T0), 用药第 5 天 (T5), 用药第 10 天 (T10) 和停药后第 3 天 (P3), 自鸭腿胫静脉取血, 分离血清,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存待检。

### 3. 检测方法：

取上述待检鸭血清，每批同时点膜，测定鸭血清中 DHBV-DNA 水平的动态，按缺口翻译试剂盒说明书方法，用  $^{32}\text{P}$  标记 DHBV-DNA 探针，并作鸭血清斑点杂交，放射自显影膜片斑点，在酶标检测仪测定 OD 值（滤光片为 490nm），计算血清 DHBV-DNA 密度，以杂交斑点 OD 值作为标本 DHBV-DNA 水平值。

### （六）药效计算

1. 计算每组鸭不同时间血清 DNA OD 值的平均值 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )，并将每组鸭用药后不同时间 (T5、T10) 和停药后第 3 天 (P3) 血清 DHBV-DNA 水平与同组给药前 (T0) OD 值比较，采用配对 t 检验，计算 t1、P1 值。分析差异的显著性，判断药物对病毒感染的抑制效果。

2. 计算每组鸭用药后不同时间 (T5、T10) 和停药第 3 天 (P3) 血清 DHBV-DNA 的抑制%，并作图，比较各组鸭血清 DHBV-DNA 抑制率的动态。

$$\text{DNA 抑制}\% = \frac{\text{给药前 (T0) OD 值} - \text{给药后 (T5, T10, P3) OD 值}}{\text{给药前 (T0) OD 值}} \times 100\%$$

## 结 果

### （一）1 日龄北京鸭感染 DHBV 后，血清 DHBV-DNA 动态

DHBV-DNA 感染鸭口服生理盐水后 DHBV-DNA 斑点杂交结果见表 3。三批实验感染 78 只血清 DHBV-DNA 全部阳性。病毒对照组 18 只雏鸭感染后第 7 天血清 DHBV-DNA 全部阳性，三批实验全程 21 天内血清 DHBV-DNA 水平感染后基本平稳。

### （二）阳性药拉米夫定对 DHBV 感染鸭血清 DHBV-DNA 的影响

DHBV 感染鸭口服阳性药拉米夫定 50mg/kg，1 天 2 次，10 天。结果见表 3、表 4。配对分析，给药第 10 天 (T10) 与给药前 (T0) 的 OD 值比较，下降有非常显著性 ( $P < 0.01$ )，给药后对血清 DHBV-DNA 抑制率与病毒对照组，成组分析给药第 10 天 (T10) 有非常显著性差异，( $P < 0.01$ )。停药后 3 天 (P3) 无统计学意义。有反跳现象。

### （三）本发明实施例 5 的第一种组合物在 DHBV 感染鸭体内对鸭血清 DHBV-DNA 的影响

三批实验结果表明：

1. 第一批实验选用3个剂量组,见表3,图1。分别为1.25,2.5和5.0g/kg组,在给药前(T0)与给药后第5天(T5)、10天(T10)及停药后3天(P3),取鸭血,分离血清,检测DHBV-DNA OD值,作自身比较。结果表明:5.0g/kg组在给药第5天(T5)、第10天(T10),和停药后第3天(P3),鸭血清DHBV-DNA OD值与给药前(T0)比较,配对分析,有非常显著的抑制作用。 $(P<0.01)$ 。成组分析,给药第5天,10天(T10),和停药后第3天(P3),给药组与对照组比较,有非常显著的抑制作用。 $(P<0.01)$ 。2.5g/kg组,在给药第5天(T5)、第10天(T10),和停药后第3天(P3),鸭血清DHBV-DNA OD值与给药前(T0)比较,配对分析,有显著和非常显著的抑制作用。 $(P<0.05-0.01)$ 。成组分析,给药第10天(T10),和停药后第3天(P3),给药组与对照组比较,有显著的抑制作用。 $(P<0.05)$ 。1.25g/kg组,鸭血清DHBV-DNA OD值与给药前(T0)比较,配对分析,在给药第5天(T5),有显著的抑制作用。 $(P<0.05)$ 。成组分析,给药第5天(T5),给药组与对照组比较,有显著的抑制作用。 $(P<0.05)$ 。

2. 第二批实验结果表明:见表3,4,图2。5.0g/kg组在给药后不同时间,鸭血清DHBV-DNA OD值与给药前(T0)比较,给药后第5天(T5)、10天(T10),和停药后第3天(P3),有非常显著和显著抑制作用, $(P<0.01-0.05)$ ,成组分析,与对照组抑制%作对比分析,给药第5天(T5)、第10天(T10),有非常显著和显著抑制作用, $(P<0.01-0.05)$ 。2.5g/kg组,配对分析,给药后第10天(T10),有非常显著抑制作用, $(P<0.01)$ ,成组分析,与对照组抑制%作对比分析,给药第10天(T10),有显著抑制作用, $(P<0.05)$ 。1.25g/kg组,抑制作用不明显。

3. 第三批重复实验结果表明:见表3,4,图3。5.0g/kg组给药后第5,10天,DHBV-DNA与给药前比较,配对分析,有非常显著和显著抑制作用, $(P<0.01-0.05)$ ,成组分析,与对照组抑制%作对比分析,给药第5天(T5),有非常显著抑制作用, $(P<0.01)$ 。2.5g/kg组,配对分析,与给药前比较,给药第5天(T5)、第10天(T10)和停药后第3天(P3),有非常显著和显著抑制作用, $(P<0.05, 0.01, 0.05)$ 。成组分析,与对照组抑制%作对比分析,给药第5天(T5)、第10天(T10),有显著和非常显著抑制作用, $(P<0.05-0.01)$ 。1.25g,抑制作用不明显。

表3 本发明实施例5的第一种组合物在鸭乙型肝炎病毒感染鸭体内治疗组与病毒感染对照组鸭血清DHBV-DNA OD值比较

实验 批次	组别	剂量 g/kg	鸭数(只) bid×10	鸭血清 DHBV-DNA OD490 值(X±SD)			P3
				T0	T5	T10	
I	生理盐水		6	0.958±0.06	0.926±0.07	0.930±0.07	0.910±0.07
	本发明实施	1.25	6	0.938±0.09	0.738±0.10**	0.836±0.13	0.783±0.19
	例 5 的第一	2.5	6	0.918±0.06	0.775±0.09*	0.675±0.08**	0.698±0.05**
	种组合物	5.0	6	1.291±0.21	0.985±0.23**	0.916±0.16**	0.943±0.09**
II	生理盐水		6	0.549±0.05	0.528±0.04	0.514±0.03	0.515±0.03
	本发明实施	1.25	6	0.638±0.15	0.529±0.09	0.526±0.08	0.546±0.09
	例 5 的第一	2.5	6	0.731±0.05	0.665±0.09	0.576±0.04**	0.656±0.06
	种组合物	5.0	6	1.251±0.38	0.675±0.26**	0.758±0.28**	0.810±0.24*
III	生理盐水		6	0.802±0.05	0.795±0.06	0.755±0.02	0.776±0.08
	本发明实施	1.25	6	0.989±0.05	0.985±0.20	0.955±0.21	0.896±0.09
	例 5 的第一	2.5	6	1.383±0.23	1.005±0.10*	0.985±0.09**	0.995±0.13*
	种组合物	5.0	6	1.385±0.09	0.679±0.32**	0.915±0.39*	1.230±0.29
	3TC	0.05	6	1.554±0.17	1.195±0.62	0.657±0.20**	1.742±0.14

统计处理：t1, P1: 给药组不同时间 (T5、T10、P3) 鸭血清 DHBV-DNA OD 值与感染前 (T0) OD 值比较 (配对 t 检验)。\*p1<0.05, \*\*p1<0.01。

表 4. 在鸭乙型肝炎病毒感染鸭体内口服本发明实施例 5 的第一种组合物治疗组与病毒感染对照组

鸭血清 DHBV-DNA 水平抑制率的比较

实验 批次	药物	剂量 g/kg bid×10	鸭数 (只)	抑制率 (%)		P3
				T5	T10	
I	病毒对照		6	3.32	2.91	4.90
	本发明实施例 5 的	1.25	6	21.25*	10.25	16.18
	第一种组合物	2.5	6	15.25*	25.97	23.78*
		5.0	6	23.13**	29.15**	26.35**
II	病毒对照		6	3.51	5.86	5.62
	本发明实施例 5 的	1.25	6	16.96*	17.58	14.25
	第一种组合物	2.5	6	9.12	21.50*	10.26
		5.0	6	46.09**	38.80*	35.27*
III	病毒对照		6	0.88	5.65	2.99
	本发明实施例 5 的	1.25	6	0.41	3.18	9.25
	第一种组合物	2.5	6	27.21*	28.69**	27.86
		5.0	6	50.98**	33.98	11.56
	3TC	50mg/kg	6	23.88	56.67**	-13.16
I	病毒对照		6	3.32	2.91	4.90
	本发明实施例 5 的	1.25	6	19.57*	8.31	14.80
	第一种组合物	2.5	6	13.52	23.68	22.03*
		5.0	6	19.39**	26.76**	23.96**
II	病毒对照		6	3.51	5.86	5.62

III	本发明实施例 5 的 第一种组合物	1.25	6	10.50	6.68	7.06
		2.5	6	6.86	17.02*	6.16
		5.0	6	36.35**	26.80*	20.01
	病毒对照		6	0.88	5.65	2.99
	本发明实施例 5 的 第一种组合物	1.25	6	-5.34	0.23	5.94
		2.5	6	19.93*	26.39**	23.56
		5.0	6	50.82**	32.87	9.53
	3TC	50mg/kg	6	23.88	56.67**	-13.16

统计处理: t2, P2: 给药组不同时间 (T5、T10, P3) 鸭血清 DHBV-DNA 水平与感染前 (T0) 比较的抑制%与病毒对照组抑制%比较 (成组 t 检验)。

\*p2<0.05, \*\*p2<0.01, \*\*\*p2<0.001。

## 总 结

本发明实施例 5 的第一种组合物在鸭乙型肝炎病毒感染鸭体内治疗实验, 三批实验结果表明: 鸭乙型肝炎病毒感染鸭在感染后第 7 天口服本发明实施例 5 的第一种组合物治疗, 5.0g/kg 一天 2 次 10 天对感染鸭血清 DHBV-DNA 水平的抑制效果有非常显著性作用, ( $P<0.01$ ), 无毒性反应; 2.5g/kg 组在实验中给药第 5, 10 天, 具有一定的抑制作用。有显著和非常显著性作用, ( $P<0.05$ ,  $0.01$ )。实验中 1.25g/kg 组, 无明显抑制作用。阳性药拉米夫定口服对 DHBV-DNA 的抑制作用, 有非常显著的抑制作用。与以往多次实验结果一致。以上实验结果表明: 本发明实施例 5 的第一种组合物治疗鸭乙型肝炎病毒感染鸭有效, 有效剂量为 2.5-5.0g/kg, 一天 2 次 10 天。

用实施例 1 的组合物、实施例 2 组合物和实施例 6 的组合物进行上述试验, 也得到了基本相同的结果, 说明这些组合物治疗鸭乙型肝炎病毒感染鸭有效。

实施例 9: 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物的抗流感病毒实验:

### 流感病毒的分离和鉴定

目前常用鸡胚进行分离进行流感病毒, 接种途径为鸡胚的尿囊腔, 3 天后出现后鸡胚死亡的病变特征和出现血凝素, 对此, 我们采用此方法进行对本发明实施例 1, 2 或 5 得到的组合物的鉴定。我们采用一定浓度的提取液和 4 个血凝单位的流感病毒 1:1 混合, 让二者于室温作用 20 分钟后



再注射鸡胚，注射量为每胚 0.2ml。实验采用 9 至 11 日龄的鸡胚，进行尿囊腔接种，培养 48 小时后，于 4℃ 放置过液，然后无菌取其尿液，经 1000rpm 离心 10 分钟后取上清，分装，-20℃ 存放，备检测之用，尿液的检测分血凝和血抑两种，使用的红细胞是来亨公鸡，方法为常规法。

抗病毒实验：用不同浓度的本发明实施例 5, 6, 1 或 2 得到的组合物在鸡胚中进行抗病毒实验

表 5 流感病毒血凝抑制试验

血清稀释度	原液	10×	20×	40×	80×	160×	320×	640×	1280×
样品浓度									
原液 1	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++		
原液 2	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++		
原液 3	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++	
原液 4	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++	
10 <sup>-5</sup> a	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++++	++
10 <sup>-5</sup> b	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++++	++
10 <sup>-5</sup> c	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++	++++	
10 <sup>-5</sup> d	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++	
10 <sup>-6</sup> a	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++	++++	
10 <sup>-6</sup> b	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++	++++	
10 <sup>-6</sup> c	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++	
10 <sup>-6</sup> d	++++	++++	+++ +	++++	++++	++++	++++	++	

备注：1、原液指初始浓度的二氢杨梅素 4mg/ml

2、10<sup>-5</sup>与 10<sup>-6</sup>指从本发明实施例 5 的第一种组合物原液进行药的稀释度

3、判定结果时按血凝强度分别以++++、+++、++、-表示以 50% 红细胞出现凝集++的血凝稀释度为其血凝下降

红细胞呈细沙粒样无效主孔（管）底者为+++，即 100% 凝集；红细胞均匀铺于孔（管）底，但边缘不整而稍向孔（管）底集中者为+++，即 75% 凝集；红细胞于孔（管）底形成一个环状，四周有小凝集块者为++，即 50% 凝集；红细胞于孔（管）底形成圆团，但边缘不够光滑，四周

稍有凝集块者为+，即25%凝集；红细胞于孔（管）底形成圆团，边缘光滑整齐者为一，即无凝集。

上述实验数据证明含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物具有抗流感病毒作用。

实施例10：本发明的含有含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物增强免疫系统免疫力的功能的试验

#### 1. 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

##### 1.1 实验目的

观察含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物对小鼠吞噬功能的影响。

##### 1.2 受试药物

名称：含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物

溶剂：热双蒸水

用量：0.5ml/20g 小鼠

##### 1.3 对照样品

联苯双酯；上海天平制药厂，沪卫药准字（1995）第3765号-011

##### 1.4 动物

小鼠，昆明种，雄性，19~21g。

鸡红细胞：5%浓度

##### 1.5 方法

昆明种小鼠，随机分为5组，即对照组、含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物75、150、300mg/kg、联苯双酯150 mg/kg，对照组给予生理盐水，给药组均口服给药，每日1次，共6次，末次给药同时腹腔注射0.5%水解乳蛋白1.5ml/只，24小时后腹腔注射5%鸡红细胞0.1 ml，30分钟后断头放血，用生理盐水冲洗腹腔，收集腹腔巨噬细胞37℃孵育半小时，离心，沉淀物涂片，染色，油镜下计数细胞，以下列公式计算，并与对照组比较。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个巨噬细胞}} \times 100$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞}}{100 \text{ 个巨噬细胞}}$$

## 1.6 结果

结果见表6，含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物低、中、高剂量均能促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞及增加吞噬指数，联苯双酯 150 mg/kg 剂量组也能促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能。

表6. 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物  
对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 (±SD)

组别	剂量 mg/kg	途径	动物数 (只)	吞噬百分率 %	吞噬指数
本发明实施 例5的第一 种组合物	75	po×6	8	32.5±3.5 <sup>**</sup>	0.67±0.08 <sup>**</sup>
	150	po×6	8	43.7±3.9 <sup>**</sup>	0.90±0.03 <sup>**</sup>
	300	po×6	8	43.7±5.2 <sup>**</sup>	0.84±0.08 <sup>**</sup>
联苯双酯	150	po×6	8	40.1±4.5 <sup>**</sup>	0.88±0.03 <sup>**</sup>
对照组	相应溶剂		8	23.0±5.3	0.39±0.12

<sup>\*\*</sup> P < 0.01 与模型对照组比较

## 2. 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

### 2.1 实验目的

观察含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。

### 2.2 受试药物

名称：含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物

溶剂：热双蒸水

用量：0.5ml/20g 小鼠

### 2.3 对照样品

联苯双酯；上海天平制药厂，沪卫药准字（1995）第3765号-011

### 2.4 动物

小鼠，C<sub>57</sub>BL/6，♂，19~21g。

### 2.5 其他材料

刀豆球蛋白 (ConA)：Sigma 产品，50 μg/ml 浓度

<sup>3</sup>H-TdR：上海原子核研究所，放射性浓度 1mCi/ml

培养基：RPMI-1640，内含 15% 小牛血清、巯基乙醇、Hepes 等

## 2.6 方法

C<sub>57</sub>BL/6 小鼠，随机分为 5 组，即正常对照组、含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物 75、150、300mg/kg、联苯双酯 150 mg/kg，每天口服给药 1 次，连续 7 天，给药结束后，处死动物无菌条件下取脾，计数脾细胞，并调整细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ，在 96 孔细胞培养板上每孔加细胞悬液  $100 \mu\text{l}$ ，ConA  $50 \mu\text{l}$ ，和培养液，各组均设三复管， $37^\circ\text{C}$ ，5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 小时，加入  $^3\text{H}$ -TdR  $0.5 \mu\text{ci}/\text{孔}$ ，继续培养 18 小时，用多头细胞收集器收集细胞，在液闪仪上测 CPM 值，并与对照组比较，结果见表 7。

## 2.7 结果

表 7. 含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物  
对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

组别	剂量 mg/kg	途径	动物数 (只)	CPM 值 ( ±SD)
本发明实施 例 5 的第一 种组合物	75	po×7	4	$11956 \pm 2178^{**}$
	150	po×7	4	$7869 \pm 1401^*$
	300	po×7	4	$7947 \pm 1321^*$
联苯双酯	150	po×7	4	$7188 \pm 1010^{**}$
对照组	N.S.		4	$5448 \pm 917$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

结果表明，含有二氢杨梅素和杨梅素的组合物有明显的促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用，并以低剂量作用较其它两组强。

用实施例 1、实施例 2 和实施例 6 的组合物进行试验，得到了大致相同的试验结果，说明这些组合物都有增强免疫力的功能。