

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710132670.9

[51] Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/758 (2006.01)

A61K 36/88 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 131/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 2 日

[11] 公开号 CN 101152202A

[22] 申请日 2007.9.29

[21] 申请号 200710132670.9

[71] 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

[72] 发明人 杨中林

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 栗仲平

权利要求书 3 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

治疗呼吸系统疾病的药物组合物及其制备方法

[57] 摘要

一种治疗呼吸系统感染的含橙皮苷提取物、黄芩苷提取物、葛根素提取物和射干苷提取物的药物组合物及其制备方法，该药物组合物具有解热、镇痛、消炎、抗菌和抗病毒的作用，尤其适宜防治上呼吸道感染。

1、一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷 1-4 份、黄芩苷 2-8 份、葛根素 1-4 份、射干苷 1-6 份。

2、权利要求 1 的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷 2-3 份、黄芩苷 3-4 份、葛根素 2-3 份、射干苷 2-3 份。

3、一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷提取物 1-4 份、黄芩苷提取物 2-8 份、葛根素提取物 1-4 份、射干苷提取物 1-6 份；橙皮苷提取物中橙皮苷含量 10-90%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 10-90%，葛根素提取物中葛根素含量 5-20%，射干苷提取物中射干苷含量 10-90%。

4、权利要求 3 的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷提取物 2-3 份、黄芩苷提取物 3-4 份、葛根素提取物 2-3 份、射干苷提取物 2-3 份；橙皮苷提取物中橙皮苷含量 50-65%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 50-85%，葛根素提取物中葛根素含量 10-15%，射干苷提取物中射干苷含量 50-70%。

5、一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：含橙皮苷的植物 1-4 份、黄芩 2-8 份、含葛根素的植物 1-4 份、含射干苷的植物 1-6 份；含橙皮苷的植物选自陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橼果实、柠檬果实、黎檬果皮、枸橼成熟果实、芦柑皮和芦柑皮渣中的一种或几种混合物；含葛根素的植物选自野葛和/或葛根，含射干苷的植物选自鸢尾和/或射干。

6、一种治疗呼吸系统感染的药物组合物的制备方法，包括如下步骤：

取药效原料芦柑皮或芦柑皮渣、鸢尾、黄芩、野葛；

用水和/或乙醇作溶剂，加热提取上述药效原料，得提取液；将提取液浓缩后，得浓缩物，向该浓缩物中加入水，滤取沉淀物。

7、权利要求 6 药物组合物的制备方法，其特征在于：

用 50-80%乙醇分别提取上述药效原料，得提取液；分别浓缩提取液后，得到相应浓缩

物,分别向这些浓缩物中加水,分别滤取沉淀物,干燥沉淀物,得到粗制的橙皮苷提取物、黄芩苷提取物、葛根素提取物和射干苷提取物;该橙皮苷提取物中橙皮苷含量不低于10%,黄芩苷提取物中黄芩苷含量不低于10%,葛根素提取物中葛根素含量不低于5%,射干苷提取物中射干苷含量不低于10%。

8、权利要求7药物组合物的制备方法,其特征在于用60-70%乙醇分别提取上述药效原料;所述粗制的橙皮苷提取物、黄芩苷提取物和射干苷提取物可用常规加碱溶解、加酸沉淀方法精制;橙皮苷提取物中橙皮苷含量20-90%,黄芩苷提取物中黄芩苷含量20-90%,葛根素提取物中葛根素含量10-20%,射干苷提取物中射干苷含量20-90%;按重量计称取橙皮苷提取物1-4份、黄芩苷提取物2-8份、葛根素提取物1-4份、射干苷提取物1-6份,与药学上可接受辅料或载体混合。

9、权利要求8药物组合物的制备方法,所述

橙皮苷提取物的精制方法是:取粗制的橙皮苷提取物加入含2%NaOH的50%乙醇溶解,过滤,将滤液加盐酸调PH至7左右,静置24h后,滤取沉淀,干燥;

黄芩苷提取物的精制方法是:取粗制的黄芩苷提取物加相当于药材3倍体积的水分散均匀,用40%NaOH调节PH7左右,用加入等体积的95%乙醇搅拌使溶解,静置12h,滤过,滤液用盐酸调节PH2左右,60℃保温60min,静置24h后,滤取沉淀,先用稀乙醇洗涤沉淀,再用水洗涤沉淀至中性,减压干燥;

射干苷提取物的精制方法是:将60-70%乙醇提取液浓缩后,加入水,用盐酸调PH到1~2,静置10小时后,滤取沉淀;于酸水液加入2%NaOH液调到PH至8~9,继续浓缩,浓缩到原体积的1/2,然后加盐酸调PH到1~2,静置10小时后,滤取沉淀;合并两次沉淀物,然后用抽滤漏斗将沉淀抽干,得射干苷的粗提物,向射干苷粗提物中加入无水乙醇(药材重量g:乙醇体积ml=7:10),搅拌均匀后,滤取沉淀物,干燥。

10、权利要求8药物组合物的制备方法,其中按重量计称取橙皮苷提取物2-3份、黄芩苷提取物3-4份、葛根素提取物2-3份、射干苷提取物2-3份;橙皮苷提取物中橙皮苷含量50-65%,黄芩苷提取物中黄芩苷含量50-85%,葛根素提取物中葛根素含量10-15%,射干苷提取物中射干苷含量50-70%,与口服制剂辅料混合,制成胶囊剂、分散片、普通片、颗

粒剂、口服液。

11、一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，其特征在于该药物组合物的药效原料按重量计为：含橙皮苷的原料 1-4 份、含黄芩苷的原料 2-8 份、含葛根素的原料 1-4 份、含射干苷的原料 1-6 份；含橙皮苷的原料中橙皮苷含量不低于 10%，含黄芩苷的原料中黄芩苷含量不低于 10%，含葛根素的原料中葛根素含量不低于 5%，含射干苷的原料中射干苷含量不低于 10%；

所述含橙皮苷的原料包括含橙皮苷的植物、橙皮苷提取物或橙皮苷；含橙皮苷的植物选自陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橘果实、柠檬果实、黎檬果皮、枸橼成熟果实、芦柑皮和芦柑皮渣中的一种或几种混合物；含黄芩苷的原料包括黄芩、黄芩提取物和黄芩苷；含葛根素的原料包括野葛或葛根、葛根素提取物和葛根素；含射干苷的原料包括鸢尾或射干、射干苷提取物和射干苷。

治疗呼吸系统疾病的药物组合物及其制备方法

技术领域

本发明属于治疗呼吸系统疾病的药物组合物及其制备方法，具体为主要源于植物药的具有治疗和预防呼吸系统感染作用的药物组合物及其可工业上应用的制备方法。

背景技术

呼吸系统病毒感染的临床表现主要为：发热，头痛、身痛，咽喉肿痛、咳喘、肺部感染等上、中、下呼吸道炎症，因而理想的治疗呼吸系统病毒感染的药物应该同时具有解热、抗炎、镇痛、抗菌和抗病毒的作用。已有抗呼吸道病毒作用的专利(申请)中：**CN 03100188.2** 没有抗炎、镇痛作用，其抗病毒谱较窄，只抗流感病毒甲、乙型；**CN 00100617.7** 没有具体的抗病毒药理实验依据，仅有几例临床治疗病例，而且这些病例缺少支持，所治病例没有病毒感染的诊断学依据，没有实验数据支持，所治病例，没有统计学处理；**CN 03118301.8** 中仅提出具有“抗病毒”作用，没有公开具体抗哪些病毒；**CN 02128077.0** 的说明书中仅有组方、制法，没有公开抗病毒药效学数据，“中药不传之秘在于量”，量的规律是组方的基本规律之一，在不同的量变规律指导下，几百味常用中药，可以演变出数千万首汤方，而该专利的申请说明中恰恰没有提到组方的计量问题；**CN 03113857.8** 专利说明书第4页记载其“对流感病毒感染的小鼠肺病变与肺指数没有表现出明显的作用，体外对呼吸系统10株致病菌作用不明显”；**CN 94115927.2** 主要用于风寒感冒，未提到抗病毒的药理作用；**CN 01129177.X** 仅具有解热、抗炎作用；**CN 96110520.8** 的说明书第3页仅提及“长于抗流感病毒”，但未见具体的实验数据支持。

橙皮苷(Hesperidin)，异名陈皮甙、桔皮甙。物化性质：白色或浅黄色粉末。几乎不溶于水，微溶于甲醇，易溶于稀碱液和吡啶；60℃时溶于甲酰胺和二甲基甲酰胺；微溶于甲醇、热冰乙酸。橙皮苷可源于陈皮、芸香科植物化州橘 *Citrus reticulate* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果实]、青皮[芸香科植物化州橘 *Citrus reticulate* Blanco 及其栽培

变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮]、枳实[芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果]、枳壳[芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥果皮]、化橘红[芸香科植物化州柚 *Citrus grandis* 'Tomentosa' 或柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的未成熟或近成熟的干燥外层果, 茜草科植物栗猪殃殃地上部分, 芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橘果实、柠檬果实、藜檬果皮、枸橼成熟果实等药材和植物中。橙皮苷是 3-羟基-3-甲基戊二酰基 CoA(HMG-CoA)还原酶抑制剂, 可以降低毛细血管的脆性及通透性, 用于高血压病及毛细血管出血性疾患的辅助治疗。射干苷(Tectoridin)源于鸢尾科鸢尾属植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 鸢尾科植物鸢尾的干燥茎根, 射干[为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 的干燥根茎]中也含有射干苷。功能是清热解毒、消痰利咽、消积, 用于咽喉肿痛、痰咳气喘等症。川射干中总异黄酮较药典其他射干品种高, 射干苷是其中的一个主要活性成分。黄芩苷(Baicalin)源于黄芩。黄芩是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。药理作用: 具有抗病原微生物, 增强机体免疫力、解热、镇静、降压、降血脂、保肝利胆及解痉、抗氧化等多种作用。用于湿温、暑湿胸闷呕恶、湿热痞满, 泻痢, 黄疸, 肺热咳嗽, 高热烦渴, 痈肿疮毒, 胎动不安。葛根素(puerarin)源于野葛。野葛为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。葛根[豆科植物葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 根]中也含有葛根素。葛根中含多种黄酮类成份, 主要活性成份为大豆素(daidzein)、大豆甙(daidzin)、葛根素(puerarin)、葛根素-7-木糖甙(puerarin-7-xyloside)等。葛根素有心血管作用(扩张血管)、受体阻断效应、抗心律失常、治疗高血压和心绞痛。

发明内容

本发明要解决的技术问题是筛选研究治疗和预防呼吸道病毒感染的药物组合物, 具体为同时具有确切的抗病毒、抗菌、解热、抗炎、镇痛作用的主要源于植物药的药物组合物。本发明还要研究该药物组合物适于工业化应用的制备工艺。

为解决上述问题, 本发明提供技术方案如下:

一种治疗呼吸系统感染的药物组合物, 该药物组合物的药效原料按重量计为: 橙皮苷

1-4 份、黄芩苷 2-8 份、葛根素 1-4 份、射干苷 1-6 份。优选该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷 2-3 份、黄芩苷 3-4 份、葛根素 2-3 份、射干苷 2-3 份。

一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷提取物 1-4 份、黄芩苷提取物 2-8 份、葛根素提取物 1-4 份、射干苷提取物 1-6 份；橙皮苷提取物中橙皮苷含量 10-90%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 10-90%，葛根素提取物中葛根素含量 5-20%，射干苷提取物中射干苷含量 10-90%。优选该药物组合物的药效原料按重量计为：橙皮苷提取物 2-3 份、黄芩苷提取物 3-4 份、葛根素提取物 2-3 份、射干苷提取物 2-3 份；橙皮苷提取物中橙皮苷含量 50-65%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 50-85%，葛根素提取物中葛根素含量 10-15%，射干苷提取物中射干苷含量 50-70%。

一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，该药物组合物的药效原料按重量计为：含橙皮苷的植物 1-4 份、黄芩 2-8 份、含葛根素的植物 1-4 份、含射干苷的植物 1-6 份；优选含橙皮苷的植物 2-3 份、黄芩 3-4 份、含葛根素的植物 2-3 份、含射干苷的植物 2-3 份；含橙皮苷的植物选自陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橼果实、柠檬果实、黎檬果皮、枸橼成熟果实、芦柑皮和芦柑皮渣中的一种或几种混合物；含葛根素的植物选自野葛和/或葛根，含射干苷的植物选自鸢尾和/或射干。

一种治疗呼吸系统感染的药物组合物的制备方法，包括如下步骤：

取药效原料芦柑皮或芦柑皮渣、鸢尾、黄芩、野葛；

用水和/或乙醇作溶剂，加热提取上述药效原料，得提取液；将提取液浓缩后，得浓缩物，向该浓缩物中加入水，滤取沉淀物。

所述药物组合物的制备方法，包括：用 50-80%乙醇分别提取上述药效原料，得提取液；分别浓缩提取液后，得到相应浓缩物，分别向这些浓缩物中加水，分别滤取沉淀物，干燥沉淀物，得到粗制的橙皮苷提取物、黄芩苷提取物、葛根素提取物和射干苷提取物；该橙皮苷提取物中橙皮苷含量不低于 10%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量不低于 10%，葛根素提取物中葛根素含量不低于 5%，射干苷提取物中射干苷含量不低于 10%。

所述药物组合物的制备方法，优选用 60-70%乙醇分别提取上述药效原料；所述粗制的橙皮苷提取物、黄芩苷提取物和射干苷提取物可用常规加碱溶解、加酸沉淀方法精制；橙

皮苷提取物中橙皮苷含量 20-90%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 20-90%，葛根素提取物中葛根素含量 10-20%，射干苷提取物中射干苷含量 20-90%；按重量计称取橙皮苷提取物 1-4 份、黄芩苷提取物 2-8 份、葛根素提取物 1-4 份、射干苷提取物 1-6 份，与药学上可接受辅料或载体混合。

所述药物组合物的制备方法中，橙皮苷提取物的精制方法是：取粗制的橙皮苷提取物加入含 2%NaOH 的 50%乙醇溶解，过滤，将滤液加盐酸调 PH 至 7 左右，静置 24 h 后，滤取沉淀，干燥；黄芩苷提取物的精制方法是：取粗制的黄芩苷提取物加相当于药材 3 倍体积的水分散均匀，用 40%NaOH 调节 PH7 左右，用加入等体积的 95%乙醇搅拌使溶解，静置 12h，滤过，滤液用盐酸调节 PH2 左右，60℃保温 60min，静置 24h 后，滤取沉淀，先用稀乙醇洗涤沉淀，再用水洗涤沉淀至中性，减压干燥；射干苷提取物的精制方法是：将 60-70%乙醇提取液浓缩后，加入水，用盐酸调 PH 到 1~2，静置 10 小时后，滤取沉淀；于酸水液加入 2%NaOH 液调到 PH 至 8~9，继续浓缩，浓缩到原体积的 1/2，然后加盐酸调 PH 到 1~2，静置 10 小时后，滤取沉淀；合并两次沉淀物，然后用抽滤漏斗将沉淀抽干，得射干苷的粗提物，向射干苷粗提物中加入无水乙醇（药材重量 g：乙醇体积 ml=7：10），搅拌均匀后，滤取沉淀物，干燥。

所述药物组合物的最优选制备方法，其中按重量计称取橙皮苷提取物 2-3 份、黄芩苷提取物 3-4 份、葛根素提取物 2-3 份、射干苷提取物 2-3 份；橙皮苷提取物中橙皮苷含量 50-65%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 50-85%，葛根素提取物中葛根素含量 10-15%，射干苷提取物中射干苷含量 50-70%，与口服制剂辅料混合，制成胶囊剂、分散片、普通片、颗粒剂、口服液。

一种治疗呼吸系统感染的药物组合物，该药物组合物的药效原料按重量计为：含橙皮苷的原料 1-4 份、含黄芩苷的原料 2-8 份、含葛根素的原料 1-4 份、含射干苷的原料 1-6 份；含橙皮苷的原料中橙皮苷含量不低于 10%，含黄芩苷的原料中黄芩苷含量不低于 10%，含葛根素的原料中葛根素含量不低于 5%，含射干苷的原料中射干苷含量不低于 10%。优选含橙皮苷的原料中橙皮苷含量 10-90%，含黄芩苷的原料中黄芩苷含量 10-90%，含葛根素的原料中葛根素含量 5-20%，含射干苷的原料中射干苷含量 10-90%。更优选该药物组合物的药

效原料按重量计为：含橙皮苷的原料 2-3 份、含黄芩苷的原料 3-4 份、含葛根素的原料 2-3 份、含射干苷的原料 2-3 份；含橙皮苷的原料中橙皮苷含量 50-65%，含黄芩苷的原料中黄芩苷含量 50-85%，含葛根素的原料中葛根素含量 10-15%，含射干苷的原料中射干苷含量 50-70%。所述原料选自：①含相应有效成分的植物，或者②有效成分（单体化合物），或者③含有效成分的提取物（植物的有效部位）。即：含橙皮苷的原料包括含橙皮苷的植物、橙皮苷提取物或橙皮苷；含橙皮苷的植物选自芦柑皮（包括芦柑皮渣）、陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橘果实、柠檬果实、黎檬果皮和枸橼成熟果实中的一种或几种混合物；含黄芩苷的原料包括黄芩、黄芩提取物和黄芩苷；含葛根素的原料包括野葛或葛根、葛根素提取物和葛根素；含射干苷的原料包括鸢尾或射干、射干苷提取物和射干苷。

本发明药物组合物包括：①橙皮苷、黄芩、葛根素和射干苷组成的混合物；②橙皮苷提取物、黄芩苷提取物、葛根素提取物和射干苷提取物组成的混合物（即四个提取物的混合物，简称“CYHG 药物”，“提取物”即“有效部位”或简称“部位”）；③含橙皮苷的植物、黄芩、含葛根素的植物和含射干苷的植物组成的混合物以及④本发明所述提取物与原料药粉末和/或有效成分组成的混合物，例如可用橙皮苷提取物与黄芩苷、射干苷及葛根粉末组成的药物组合物。所述含橙皮苷的植物有芦柑皮（包括芦柑皮渣）、陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橘果实、柠檬果实、黎檬果皮和枸橼成熟果实；含葛根素的植物是葛根和野葛；含射干苷的植物有鸢尾和射干；含黄芩苷的植物有黄芩。优选芦柑皮、黄芩、野葛和鸢尾组成的混合物。更优选芦柑皮中的橙皮苷提取物、黄芩中的黄芩苷提取物、野葛中葛根素提取物和鸢尾中射干苷提取物组成的药物组合物。

本发明药物组合物的抗病毒谱和药效作用强度优于目前市场具有抗病毒优势的的双黄连口服液。本发明包括研究该药物组合物组方中起到核心和关键作用的“CYHG 药物”。CYHG 药物是组方药材中相应的活性部位提取物的组合物，相对于目前的抗呼吸道感染药物有以下特点和优势：用量小、抗病毒谱广、药效作用强（强于阳性对照药双黄连口服液）、低毒等特点。含橙皮苷的中药传统用于理气化痰，现代研究表明对心脑血管疾病

有辅助治疗作用，而本发明发现用橙皮苷、含橙皮苷的部位以及含橙皮苷的植物（尤其是芦柑皮或芦柑皮渣）可有效地治疗病毒性感染的呼吸系统疾病。CYHG 药物中，优选芦柑皮、芦柑皮渣作为原料提取橙皮苷提取物。芦柑皮属于可循环再生资源（每年收获芦柑果实，必然可以回收到芦柑皮，不破坏资源、不耗费资源、该资源可以循环再生，以芦柑皮为原料开发的产品，有可持续发展性）。芦柑（全果，连皮）榨汁之后产生的芦柑皮渣，原本是农副产品生产过程中的废料。本发明用芦柑皮（可循环再生资源）、芦柑皮榨（废物利用）作为提取橙皮苷有效部位的原料，属于开发可循环再生资源和废物利用。本发明用芦柑皮、芦柑皮渣作原料开发出来的新药产品，显著降低了生产成本，有可持续发展性。本发明提取有效部位的全部工艺中，不用柱层析分离，不用正丁醇萃取，完全用水和/乙醇作溶剂提取，通过调节酸碱性，得到富集有效成分的有效部位。工艺简单，安全，成本较低，利于工业化生产。

具体实施方式

第一部分：

一：组方筛选研究实验

1.组方研究的因素水平的确定

我们选择橙皮苷部位、射干苷部位、葛根素部位、黄芩苷部位（是四个部位的混合物。橙皮苷部位、射干苷部位、黄芩苷部位、葛根素部位各分别按实施例一 1、2、3、4 制备。见实施例一·制法 1）。本发明进行了二轮组方筛选研究正交实验。第一轮初步确定较好组方范围，第二轮确定了最优组方。下面列出最优组方筛选实验的具体步骤与实验结果。

表 1：各组方筛选的因素水平表

水平	橙皮苷部位	射干苷部位	葛根素部位	黄芩苷部位
1	4	2	4	3
2	2	3	3	4
3	1	4	1	5

2.组方筛选研究的 1-9 组 L9（3⁴）正交工作安排表

表 2：组方筛选 1-9 组 L9（3⁴）正交工作安排表

实验组序号	橙皮苷部位	射干苷部位	葛根素部位	黄芩苷部位	光密度 (x±s)
1 组	4	2	4	3	0.60±0.103
2 组	4	3	2	4	0.545±0.122
3 组	4	4	1	5	0.626±0.099
4 组	2	2	2	5	0.495±0.118
5 组	2	3	1	3	0.489±0.132
6 组	2	4	4	4	0.499±0.126
7 组	1	2	1	4	0.580±0.101
8 组	1	3	4	5	0.598±0.128
9 组	1	4	2	3	0.644±0.121
10 组 (阳对)					0.501±0.106
11 组 (空白)					0.678±0.115
K ₁	0.591	0.559	0.566	0.578	A ₂ D ₂ B ₂ G ₂
K ₂	*0.494	*0.544	*0.561	*0.541	
K ₃	0.607	0.590	0.565	0.578	
R	0.113	0.015	0.050	0.037	

3.组方筛选研究的实验方法和结果

(1). 1-9 组的组方药物的制备

按表 2 的规定的量，称取由橙皮苷部位、射干苷部位、葛根素部位、黄芩苷部位 4 个部位组成的 1-9 组的组方药物；分别配制成浓度为 10mg/ml 的水溶液。

(2).小鼠腹腔毛细血管通透性抗炎实验

取 20~24g 健康雄性小鼠 110 只随机分为 11 组，分别给予 1-9 组的组方药物，给药的剂量均为 0.20 g/kg（每 20g 小鼠给药 0.4ml）；阳性对照组双黄连口服液 7.5ml/kg（相当于 11.25g 生药/kg）；空白对照组给予等容量生理盐水；连续给药 6d，ig 给药。在末次给药 1h 后，各鼠均静注 0.5%伊文思蓝生理盐水溶液 0.1ml/10g，随即腹腔注射 0.6%醋酸 0.20ml/只，20min 后颈椎脱位处死小鼠，用 6ml 生理盐水分三次洗涤腹腔，吸出洗涤液，合并后用入生理盐水定容至 10ml。定容液于 3000 转离心 15min，取上清液，于 590nm 处比色测定光密度，

结果填入表 1。

(3).实验结果

将各组实验结果的平均值代入表 2，进行极差分析。

二轮组方筛选研究表明：优选组方是按重量计橙皮苷部位 1-4 份、黄芩苷部位 2-8 份、葛根素部位 1-4 份、射干苷部位 1-6 份；最优组方是按重量计橙皮苷部位 2 份、射干苷部位 3 份、黄芩苷部位 4 份、葛根素部位 2 份。

二.最佳组方与药材组方、纯品组方、单一的橙皮苷部位、射干苷部位、葛根素部位、黄芩苷部位比较实验

1.实验样品药液的制备

最佳组合即为 CYHG 药物（见实施例一·制法制备 CYHG 药物，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为 CYHG 药物组样品液）；药材组方组[分别取芦柑皮 2 份、鸢尾 3 份、黄芩 4 份、野葛 2 份，加入药物重量 10 倍量、8 倍量、8 倍量的水（w/v），分别直火煎煮 1 小时、40 分钟、30 分钟，分别得到三次煎煮液，合并，减压浓缩至小体积，以水定容为 0.5g/ml 的水溶液，即为药材组方组样品液]；纯品组方组即为 CYHG 纯品-混合物（见实施例二制备 CYHG 纯品-混合物，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为 CYHG 纯品-混合物组样品液）；橙皮苷部位（实施例一 1 制备橙皮苷部位，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为橙皮苷部位组样品液）；射干苷部位（实施例一 2 制备射干苷部位，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为射干苷部位组样品液）；葛根素部位（实施例一 3 制备葛根素部位，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为葛根素部位组样品液）；黄芩苷部位（实施例一 4 制备黄芩苷部位，再制备成 10mg/ml 的水溶液，即为黄芩苷部位组样品液）。

2.小鼠腹腔毛细血管通透性抗炎实验

取 20~24g 健康雄性小鼠 90 只随机分为 9 组，分别给予 1-9 组的组方药物，给药的剂量均为 0.20 g/kg（每 20g 小鼠给药 0.4ml）；阳性对照组双黄连口服液 7.5ml/kg（相当于 11.25g 生药/kg）；空白对照组给予等容量生理盐水；连续给药 6d，ig 给药。具体方法见组方筛选研究实验的 3.2 项下。

3.小鼠腹腔毛细血管通透性抗炎实验结果

具体实验结果见表2。

表2.各组药物对腹腔注射醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的比较研究 (X±SD)

实验样品组	动物数 n	给药剂量 g/kg	给药方式	光密度
1 组 CYHG 药物	10	0.2	Ig	0.415±0.107**
2 组药材组方组	10	10g 生药	Ig	0.515±0.146*
3 组纯品组方组	10	0.2	Ig	0.481±0.143**
4 组橙皮苷部位	10	0.2	Ig	0.570±0.108*
5 组射干苷部位	10	0.2	Ig	0.549±0.132*
6 组黄芩苷部位	10	0.2	Ig	0.536±0.151*
7 组葛根素部位	10	0.2	Ig	0.627±0.130
8 组阳性对照组	10	11.25g 生药	Ig	0.496±0.156**
9 组空白对照组	10	--	ig	0.664±0.123

注：各用药组与空白对照组比较 *P<0.05 ** P<0.01

4.结论：CYHG 药物、药材组方组、纯品组方组、橙皮苷部位、射干苷部位、黄芩苷部位、阳性对照组与空白对照组比较均具有抗炎的显著作用 (*P<0.05 ** P<0.01)；其中 CYHG 药物作用最强，明显优于单独的各个部位。

第二部分：

药效学及毒性试验

实验材料

1.试药：

(1).CYHG 药物（是四个部位的混合物。橙皮苷部位、射干苷部位、黄芩苷部位、葛根素部位各分别按实施例一 1、2、3、4 制备。见实施例一·制法 1）。

(2).CYHG 胶囊（见实施例一·制法 2）。

(3). CYHG 纯品-混合物（分别称取橙皮苷 2g、射干苷 3g、黄芩苷 4g、葛根素 2g，混合均匀后，即为 CYHG 纯品-混合物。其中葛根素(含量 90%-95%，陕西天润植物化工有限公司提供)；射干苷（按本发明提取分离方法，反复精制纯化，用 HPLC 测定，用中国药品生物制品检定所的标准品对照，用归一划法计算纯度达 95%），黄芩苷（含量 90%，惠州东

方植物保健科技有限公司提供)；橙皮苷(购于南京青泽医药科技开发有限公司)。见实施例二。

(4). CYHG 纯品-胶囊 (见实施例三)。

2.阳性对照药:双黄连口服液: 来源: 河南太龙药业股份有限公司, 批号: 06051201 规格: 10ml×10 支/盒; 功能主治: 清热解毒,祛痰止咳。用于上呼吸道感染。用法用量: 口服, 一次 2 支, 一日 3 次。

3.实验试剂: (1) 冰醋酸: 来源: 南京市化工试剂厂 批号: 020821 规格: 500ml/瓶。

(2) 酵母: 来源: 湖北 安琪酵母股份有限公司, 批号: 0607042 规格: 100g/瓶。

4.实验动物: (1) 昆明种小鼠: 体重 18~26g, 雌雄兼用, SPF 级, 来源于南通大学实验动物中心,合格证号: SCXK(苏)2003-0002。(2) SD 雄性大鼠, 体重 200~240g, SPF 级, 来源于南通大学实验动物中心,合格证号: SCXK(苏)2003-0002。

5.仪器: 722 分光光度计, 离心机, 大鼠肛温计, 秒表, 精密电子天平。

(一) 抗炎试验: 小鼠腹腔毛细血管通透性实验

取 20~24g 健康雄性小鼠 50 只随机分为 5 组, 分别是: CYHG 药物高剂量组 0.25g/kg (相当于生药 3.7088g/kg), (此处 0.25g 是 CYHG 药物, 是四个部位混合物, 按实施例一项下制法 1 制备)。CYHG 药物中剂量组 0.20 g/kg (相当于生药 2.967g/kg), CYHG 药物低剂量组 0.15g/kg (相当于生药 2.225g/kg), 阳性对照组双黄连口服液 7.5ml/kg (相当于 11.25g 生药/kg), 空白对照组给予等容量生理盐水, 连续给药 6d, ig 给药。在末次给药 1h 后, 各鼠均静注 0.5%伊文思蓝生理盐水溶液 0.1ml/10g, 随即腹腔注射 0.6%醋酸 0.20ml/只, 20min 后颈椎脱位处死小鼠, 用 6ml 生理盐水分三次洗涤腹腔, 吸出洗涤液, 合并后用入生理盐水定容至 10ml。定容液于 3000 转离心 15min, 取上清液, 于 590nm 处比色测定光密度, 以平均光密度值做 t 检验。结果见表 4。

表 4.对腹腔注射醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	动物数(只)	光密度
高剂量组	10	0.429±0.107**
中剂量组	10	0.426±0.122**
低剂量组	10	0.468±0.143*

阳性对照组	10	$0.472 \pm 0.121^*$
空白对照组	10	0.591 ± 0.108

注：各用药组与空白对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

实验结果：CYHG 药物各剂量组及阳性对照组与空白对照组组间 t 检验，CYHG 药物各剂量组及阳性对照组与空白对照组组间差异有显著意义，检验结果分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

抗炎实验结论：与双黄连口服液对照组比较，CYHG 药物组给药剂量小、抗炎用强。

（二）止痛试验：小鼠醋酸扭体法

取 20~24g 健康雄性小鼠 50 只随机分为 5 组，分别是：CYHG 药物高剂量组 0.25g/kg（相当于生药 3.7088g/kg），（此处 0.25g 是 CYHG 药物，是四个部位混合物，按实施例一项下制法 1 制备）。CYHG 药物中剂量组 0.20 g/kg（相当于生药 2.967g/kg），CYHG 药物低剂量组 0.15g/kg（相当于生药 2.225g/kg），阳性对照组双黄连口服液 7.5ml/kg（相当于 11.25g 生药/kg，空白对照组给予等容量生理盐水，连续给药 6d，ig 给药。末次给药 0.5h 后腹腔注射 0.6%醋酸 0.2ml/只。观察 20min 内各鼠出现扭体反应次数，结果见表 5。

表 5.CYHG 药物、双黄连口服液对小鼠醋酸反应次数的影响 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	动物数 (只)	扭体反应次数 (次)
高剂量组	10	$15.6 \pm 2.28^{**}$
中剂量组	10	$16.4 \pm 4.01^{**}$
低剂量组	10	$16.1 \pm 5.32^*$
阳性对照组	10	$16.4 \pm 4.74^{**}$
空白对照组	10	27.4 ± 8.76

注：各用药组与空白对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

实验结果：CYHG 药物各剂量组及阳性对照组与空白对照组组间用 t 检验，CYHG 药物各剂量组及阳性对照组与空白对照组组间差异有显著意义，结果分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。

镇痛实验结论：与双黄连口服液对照组比较，CYHG 药物组给药剂量小、镇痛作用强。

（三）解热试验：酵母法

取体重 150~200g，雌雄各半大鼠，用体温计间隔 1h 测直肠体温两次，以平均值作为基础体温。选取体温变化不超过 0.3℃者 50 只，将其随机分为 5 组，每组 10 只。即 CYHG 药物高剂量组 0.20g/kg（相当于生药 2.967g/kg），CYHG 药物中剂量组 0.15g/kg（相当于生

药 2.2252g/kg), CYHG 药物低剂量组 0.1g/kg (相当于生药 1.4835g/kg), 阳性对照组双黄连口服液 12ml/kg, 空白对照组给予等容量生理盐水。采用灌胃给药, 连续 7d。末次给药 0.5h 后各小鼠于背部皮下注射 20%酵母混悬液 10ml/kg, 于第 0.5、1、2、4、6、8、10 及 12h 各测大鼠体温 1 次。结果见表 6。求出 $\Delta^{\circ}\text{C}$ 值, 并进行 T 检验。

表 6. CYHG 药物、双黄连口服液对酵母致大鼠发热的影响实验 ($\bar{X} \pm S$)

组别	数量	基础体温 ($^{\circ}\text{C}$)	造模后不同时间体温变化							
			0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12h
H 组	10	37.91 \pm 0.23	37.65 \pm 0.28	38.07 \pm 0.15*	38.13 \pm 0.23*	38.16 \pm 0.25**	38.28 \pm 0.34**	38.29 \pm 0.17**	38.31 \pm 0.39**	38.69 \pm 0.15*
		$\Delta^{\circ}\text{C}$	-0.26 \pm 0.28	0.16 \pm 0.15*	0.22 \pm 0.23*	0.25 \pm 0.25**	0.37 \pm 0.34**	0.38 \pm 0.17**	0.40 \pm 0.39**	0.78 \pm 0.15*
M 组	10	37.82 \pm 0.44	37.39 \pm 0.31	38.06 \pm 0.37*	38.08 \pm 0.36*	38.04 \pm 0.43**	38.30 \pm 0.60**	38.42 \pm 0.45**	38.77 \pm 0.45*	38.57 \pm 0.47*
		$\Delta^{\circ}\text{C}$	-0.43 \pm 0.31	0.24 \pm 0.37*	0.26 \pm 0.36*	0.22 \pm 0.43**	0.48 \pm 0.60**	0.6 \pm 0.45*	0.95 \pm 0.45*	0.75 \pm 0.47*
L 组	10	37.88 \pm 0.23	37.60 \pm 0.34	38.07 \pm 0.51*	38.13 \pm 0.37*	38.18 \pm 0.32*	38.69 \pm 0.37**	38.60 \pm 0.37**	38.84 \pm 0.36*	38.57 \pm 0.30*
		$\Delta^{\circ}\text{C}$	-0.28 \pm 0.34	0.19 \pm 0.51*	0.25 \pm 0.37*	0.3 \pm 0.32*	0.81 \pm 0.37**	0.72 \pm 0.36*	0.96 \pm 0.36*	0.69 \pm 0.30*
阳对	10	37.80 \pm 0.30	37.63 \pm 0.26	38.21 \pm 0.33	38.40 \pm 0.18	38.21 \pm 0.31*	38.54 \pm 0.36**	38.57 \pm 0.36**	38.97 \pm 0.37	38.91 \pm 0.39
		$\Delta^{\circ}\text{C}$	-0.17 \pm 0.26	0.41 \pm 0.33	0.6 \pm 0.18	0.41 \pm 0.31*	0.74 \pm 0.36**	0.77 \pm 0.36**	1.17 \pm 0.37	1.11 \pm 0.39
空白	10	37.93 \pm 0.20	37.79 \pm 0.24	38.38 \pm 0.22	38.49 \pm 0.43	38.68 \pm 0.25	39.25 \pm 0.34	39.32 \pm 0.29	39.18 \pm 0.29	38.96 \pm 0.22
		$\Delta^{\circ}\text{C}$	-0.149 \pm 0.24	0.45 \pm 0.22	0.56 \pm 0.43	0.75 \pm 0.25	1.32 \pm 0.34	1.39 \pm 0.29	1.25 \pm 0.29	1.03 \pm 0.22

注: 各用药组 $\Delta^{\circ}\text{C}$ 与空白对照组 $\Delta^{\circ}\text{C}$ 比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

实验结果: CYHG 药物各剂量组及阳性对照组与空白对照组组间 t 检验显示, CYHG 药物高、中剂量组与空白对照组比较从致热 1h 开始直到 12h 结束, 有显著的降温作用, $P < 0.05$, $P < 0.01$; 低剂量组与空白对照组比较从致热 1h 开始直到 8h 结束, 有显著的降温作用 $P <$

0.05, $P < 0.01$ 。阳性对照组从 4h 到 8h 都有降温作用, $P < 0.01$, $P < 0.05$ 。

解热实验结论：与双黄连口服液对照组比较，CYHG 药物组给药剂量小、起效快、持续药效时间长、解热作用强。

参考文献：《新药审批办法》 国家药品监督局 2002.12；《药理实验方法》人民卫生出版社，徐淑云 2002，《中药药理研究方法学》人民卫生出版社，陈奇 1994，《新药西药临床前指导原则》卫生部药监局 1993。

(四) 体外抑菌实验

1. 材料

(1) 药物：CYHG 药物（是四个部位混合物，按实施例一项下制法 1 制备）。

(2) 菌种：试验所采用的菌株均为临床分离株，由江苏省人民医院检验科和南京市第一医院检验科提供并鉴定。

(3) 培养基：MH 培养基由北京三药科技开发公司生产，肺炎链球菌采用血培养基，即在 MH 培养基中加入 5%脱纤维羊血制成。

2. 方法

(1) 药物配制：准确称取一定量的 CYHG 药物，加入到 20ml 灭菌生理盐水中，搅拌 20min 使其溶解，配制成终浓度为 10 mg/ml 的药物溶液。用灭菌生理盐水倍比稀释上述药物溶液，配制成下列浓度梯度，即 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 和 0.15625mg/ml。

(2) 含药物平板制备：吸取 1.5ml 稀释好的不同浓度的药物置无菌平皿中，分别于每个平皿中加入恒温于 45℃左右的灭菌 MH 培养基，混匀冷却制成一系列药物浓度梯度的药物平板，即 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625mg/ml 和 0（空白对照）mg/ml。

(3) 菌悬液制备：将冷冻保藏的菌株（甘油管）接种于新鲜琼脂斜面培养基，37℃恒温培养 24 小时，再分别接种于 1ml 肉汤中，37℃恒温培养 12 小时。肺炎链球菌的肉汤培养中含 5%脱纤维羊血清。上述细菌培养液浓度约为 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml，分别用灭菌生理盐水稀释至 10^7 CFU/ml 左右。

采用多点接种仪将上述稀释的菌悬液接种至不同浓度的药物平板，接种量约为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/点。试验菌于 37℃恒温倒置培养 16~18 小时，观察结果，并记录 MIC 值。

CYHG 药物对临床致病菌的 MIC 值如表 6 所示。试验结果表明，CYHG 药物对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、绿脓杆菌(ATCC27853)等具有一定的抑制作用。

表 7. CYHG 胶囊内容物对临床致病菌的 MIC 值

细菌	株数	MIC(mg/ml)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 范围
金黄色葡萄球菌	10	1.25	2.5	1.25~2.5
表皮葡萄球菌	10	2.5	5	2.5~5
肺炎链球菌	10	1.25	2.5	1.25~2.5
大肠埃希菌	10	2.5	5	2.5~5
绿脓杆菌	10	0.625	1.25	0.625~1.25
肺炎克雷伯菌	10	1.25	2.5	1.25~2.5
金黄色葡萄球菌(ATCC25923)	1	2.5	5	1.25~2.5
大肠埃希菌(ATCC25922)	1	1.25	2.5	1.25~2.5
绿脓杆菌(ATCC27853)	1	1.25	2.5	1.25~2.5

抗菌实验结论：CYHG 药物对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、绿脓杆菌(ATCC27853)等具有抑制作用。

(五) 体外抗病毒实验

药物 CYHG 药物（是四个部位混合物，按实施例一项下“制法 1”制备）。14.835g 生药/1g 制剂，以蒸馏水配制成 1g 生药/ml（67.4mg/ml），隔水煮沸 20 分钟灭菌，用于体外抗病毒和抑菌试验。

对照药 双黄连口服液，1.5g 生药/ml（河南太龙药业股份有限公司批号：06051201 ），以蒸馏水配制成 1g 生药/ml，隔水煮沸 20 分钟灭菌，用于体外抗病毒和抑菌试验。

病毒 流感病毒甲 3 型（A3）、副流感病毒 1 型（HVJ）、呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒 3 型（ADV3）、腺病毒 7 型（ADV7）、单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1），用于体外试验；流感病毒鼠肺适应株 FM1，用于体内试验。均购自中国预防医学科学院病毒学研究所，本实验室传代后保存于-60℃冰箱备用。

细胞 人喉癌传代细胞 Hep-2 株，购自国家药品生物制品检定所。

细胞培养液 含 10%小牛血清、0.29mg 谷氨酰胺/ml、100u/ml 青、链霉素的 Eagle’s MEM（日本日水制药株式会社出品）。

细胞维持液 除所含小牛血清为 2%外, 其他含量均同培养液。

细菌培养基 营养琼脂培养基, 批号 060114, 营养肉汤培养基, 批号 060112, 均由中国药品生物制品检定所监制。

仪器 CO₂ 培养箱, 日本 Yamato 科学株式会社生产。倒置显微镜, OLYMPUS 牌。

1、对 Hep-2 培养细胞的毒性试验

试验方法 按常规试验操作, 将瓶中 Hep-2 细胞消化下来, 接种于 96 孔细胞培养板中, 置 37℃5%CO₂ 培养箱中培养 2 天, 长成单层细胞后, 进行试验: 将培养板中的培养液倾去, 将试药以维持液连续 2 倍稀释 11 个浓度, 加入板中 200 μl/孔, 每稀释度加 4 孔, 第 12 列不加药液作正常细胞对照。将培养板置 37℃5%CO₂ 培养箱中培养 3 天, 每日用倒置显微镜观察药液对细胞的影响。若毒性为“1”及其以下“-”, 则视为阴性, 可认为此浓度药样对细胞无中毒现象, 其余的“2”及其以上各级, 均视为阳性, 即所试药样在此浓度对细胞有中毒作用。利用 Reed-Muench 法计算 50%毒性浓度 (TC₅₀)。

按上述方法取得试验结果利用 Reed-Muench 法计算 50%毒性浓度 (TC₅₀) 如下:

CYHG 药物的 TC₅₀=6.80mg 生药/ml, TC₀=1.74 生药 mg/ml, 双黄连口服液的 TC₅₀=5.24mg 生药/ml, TC₀ = 1.36mg 生药/ml。选择对细胞生长无影响的最大无毒浓度 TC₀ 及其以下浓度作抗病毒试验。

2、对病毒致细胞病变作用的影响

实验方法 取已长成单层细胞的培养板, 倒掉培养液, 接种 100 TCID₅₀ 的不同病毒液 100 μl 于细胞孔, 每一块细胞板接种二种病毒 (各加 6 列), 留第 8 行不接种病毒作正常细胞对照。置 37℃5%CO₂ 培养箱中吸附 2 小时, 倒掉病毒液, 用不含小牛血清的 Eagle's 维持液洗细胞面 1 次后, 加入从最大无毒浓度 TC₀ 起倍比稀释 5 个浓度的药液 (1~5 行) 200 μl/孔, 各浓度加 3 孔。第 6 行加 1/4TC₅₀(0.714/4=0.197mg/ml)Ribavirin, 第 7 行不加药液作病毒对照, 第 8 行为未感染未加药的正常细胞对照。置 37℃5%CO₂ 培养箱中培养 3 天, 每日在倒置显微镜下镜检 CPE 进展。根据以上细胞病变五级标准判断, 利用 Reed-Muench 法计算 50%有效浓度 (EC₅₀), 并求出治疗指数 (TI=TC₅₀/EC₅₀), TI 值越高, 表明药效作用越强。

表 8.CYHG 胶囊对常见呼吸系统感染有关病毒的作用

病毒	CYHG 胶囊				双黄连口服液			
	第 1 次		第 2 次		第 1 次		第 2 次	
	EC ₅₀	TI	EC ₅₀	TI	EC ₅₀	TI	EC ₅₀	TI
A ₃	0.80	6.9	0.44	6.9	1.68	4.4	1.44	4.2
HVJ	0.40	8.6	0.40	7.8	2.90	4.8	2.80	6.2
RSV	0.60	6.0	0.48	5.6	2.40	3.0	1.28	3.1
ADV3	0.80	4.8	0.9	4.2			-	

注：表中 EC50 单位为 mg 生药/ml； EC50 为 50%有效浓度； TI 为治疗指数 $TI=TC50/EC50$ 。第 1 次、第 2 次分别指第 1 次实验结果和第 2 次实验结果的意思。

实验结果 按上述方法通过两次试验结果表明，CYHG 药物对流感病毒甲 3 型（A3）、副流感病毒 1 型（HVJ）、呼吸道合胞病毒（RSV）、腺病毒 3 型（ADV3）均显示具有抑制作用，其中 CYHG 药物对副流感病毒抑制作用较强。

抗病毒实验结论：CYHG 药物与对照药双黄连口服液对流感病毒甲 3 型（A3）、副流感病毒 1 型（HVJ）、呼吸道合胞病毒（RSV）均显示具有抑制作用；与对照药双黄连口服液比较，CYHG 药物对上述三种病毒的抑制作用强，治疗指数（TI）；对照药双黄连口服液对腺病毒 3 型（ADV3）没有抑制作用，而 CYHG 药物对腺病毒 3 型（ADV3）具有较强的抑制作用。

抗病毒实验结论：CYHG 药物比对照药双黄连口服液的抗病毒谱宽、抑制病毒的治疗指数高；尤其是对呼吸道重要的致病病毒腺病毒 3 型（ADV3）CYHG 药物具有独特的药效。

总的药效实验结论：CYHG 胶囊具有抗呼吸系统流感病毒甲 3 型（A3）、副流感病毒 1 型（HVJ）、呼吸道合胞病毒（RSV）、腺病毒 3 型（ADV3）作用，具有抗菌、消炎、解热作用。其药理作用优于对照药双黄连口服液。

(六) CYHG 药物的急性毒性实验（最大耐受量实验）

以 CYHG 药物（按实施例一项下“制法 1”制备）30%浓度，一日内一次灌胃给药，每次 0.8ml/20g，剂量为 12g /kg，没有测出 LD₅₀。故进行最大耐受量实验：以 30%浓度的 CYHG 药物，一日内 2 次，灌胃给药，每次 0.8ml/20g，给药后，观察 7 日，记录结果。最大给药

量为 24gCYHG 药物/kg (相当于 356.04g 组方生药/kg),相当于临床人最高剂量 (0.05g/kg) 的 480 倍时,实验动物未出现毒性反应。目的:观察 CYHG 药物一日内 2 次灌胃给药,可能产生的毒性反应,为临床安全用药提供参考依据。

实验方法:取体重 19-21g 昆明种小鼠 20 只,雌雄各 10 只。饲养 2 日,实验前禁食 8 小时,不禁水,67%CYHG 药物,一日内两次灌胃给药,每次 0.8ml/20g,给予各鼠灌胃,药后正常给水喂养,观察 7 日内小鼠死亡数目及各鼠有无行为活动异常,皮毛、二便、饮食状态等不佳表现。

实验结果:以 CYHG 药物的最大体积 (0.8ml/20g)、最高浓度 (30%),一日内 2 次灌胃给药,给药后观察 7 日,20 只小鼠均状态良好,未出现任何不适现象,皮毛光亮、活动正常、摄食正常、无腹泻发生,测定结果,最大给药量为 24gCYHG 药物/kg (相当于 356.04g 组方生药/kg),相当于临床人最高剂量 (0.05g/kg) 的 480 倍 (计算公式如下)。实验表明本发明药物组合物即 CYHG 药物毒性低微。

$$\begin{aligned}\text{最大给药量倍数} &= (\text{每只小鼠给药量/小鼠平均体重}) \times (\text{成人平均体重/成人每日用量}) \\ &= (0.3 \times 0.8 \times 2/20) \times (60000/3) = 480(\text{倍})\end{aligned}$$

第三部分:

实施例一

处方:橙皮苷部位 86.58g、射干苷部位 129.87g、黄芩苷部位 173.16g、葛根素部位 86.58g。

制法 1:分别称取上述处方量药物部位 (药物部位的制备方法见本实施例下述 1、2、3、4.),混合均匀后,即为 CYHG 药物。

制法 2:分别称取上述处方量药物部位 (药物部位的制备方法见本实施例下述 1、2、3、4.)与淀粉适量,混合均匀后,常规湿法制粒,干燥,装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。制成 CYHG 胶囊。用法用量:口服,一次 1-2 粒,一日 3 次。规格:0.5g/粒。

1、橙皮苷部位 (即橙皮苷提取物,全文同) 提取工艺流程及质量标准:

橙皮苷部位提取工艺:取芦柑皮 (或芦柑皮渣) [芸香科柑橘属植物芦柑 *Crtrus chinensis* (L.) Osbeck 的成熟干燥外层果皮]适当粉碎,用 10 倍量 (70%的乙醇为水和乙醇 v/v 混合,全文同),先浸泡 1 h 后,于 85℃水浴条件下回流连续提取药材 4 次,每次 1

小时，滤过，合并滤液，减压回收乙醇至无醇味，并将提取物用适量蒸馏水（药材：总体积=1g：2ml）转移至烧杯中，静置过夜，抽滤，干燥（65℃、0.08Mpa），得粗提物（母液反复3次沉淀粗提物，每次沉淀时都要将体积浓缩为原体积的1/2）。取粗提物加入含2%NaOH的50%乙醇溶解[粗提物与2%NaOH的50%乙醇比例关系为1：10（w/v）]，过滤，将滤液加盐酸调PH至7，静置24h待析出沉淀后抽滤，得纯化物，65℃减压真空干燥48h。研磨成粉，得纯化物。

橙皮苷部位质量标准：参照中国药典2005版相关内容进行实验操作。HPLC色谱条件与系统适用性实验：填充剂：十八烷基硅烷键合硅胶；流动相：甲醇-醋酸-水（35：4：61）；检测波长283nm，柱温30℃。对照品溶液：精密称取橙皮苷对照品适量，加甲醇制成每1ml含0.2mg的溶液。供试品溶液：取纯化物精密称重3mg，置于10ml容量瓶中，以甲醇溶解并定容至刻度，得供试液样品测定方法：分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20ul，注入液相色谱仪，测定。纯化物中橙皮苷含量（w/w）为65%以上。橙皮苷部位的提取率：得到橙皮苷部位5.5g/100g药材。

可用陈皮、青皮、枳实、枳壳、化橘红、芸香科植物佛手果实、蕉柑果实、枸橼果实、柠檬果实、黎檬果皮或枸橼成熟果实作原料，参照本发明上述方法提取橙皮苷部位，亦可参见其它文献方法，如：“微波法提取陈皮中橙皮苷”，孙秀丽等；中药材，2007年06期；“正交试验优选枳实中橙皮苷提取工艺”，杨志学等；怀化医学学报2007年01期。

2、射干苷部位（即射干苷提取物，全文同）提取工艺流程及质量标准：

射干苷部位提取工艺：取鸢尾（鸢尾科鸢尾属植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的干燥茎根，）粗颗粒，加入70%醇提取了3次，每次2小时，每次分别加入10、8、8倍量乙醇，85℃水浴回流提取，提取液用8层纱布自然过滤，合并三次提取液，水浴减压浓缩至无醇味体（浓缩过程中可加入少量碱），并将提取物用适量蒸馏水（药材：总体积=1g：2ml）转移至烧杯中，用盐酸调PH到1~2，静置10小时，待沉淀完全后，分离得沉淀；于酸水液加入2%NaOH液调到PH=8~9，继续浓缩，浓缩到原体积的1/2，然后加盐酸调PH到1~2，静置10小时，待沉淀完全后，分离得沉淀；于酸水液加入2%NaOH液调至PH=8~9，继续浓缩至原体积的1/2，然后加盐酸调PH到1~2，静置10小时，待沉淀完全后，分离沉淀

物，合并 3 次沉淀物，然后用抽滤漏斗将沉淀抽干，得射干苷的粗提物。将射干苷粗提物置于容器中，加入无水乙醇（药材重量 g：乙醇体积 ml=7：10），搅拌均匀后抽滤，取沉淀物，干燥，即得射干苷部位。

射干苷部位质量标准：照高效液相色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VID）测定。色谱条件：色谱柱：KromasilC18 柱，150mm×4.6mm，5μm；流动相：流动相：水：甲醇=80：20（0min）-40：60（10min）-20：80（30min）；流速：1ml/min；柱温：30℃；检测波长：266nm；按射干苷色谱峰计算，理论塔板数不低于 2500。对照品溶液配制：精密称取射干苷标准品 1.124mg 至 10ml 容量瓶中，甲醇溶解后定容至刻度，为射干苷对照品溶液（0.1124mg/ml）。对照药材溶液制备（按药典）：取鸢尾粉末过 50 目筛 0.4992g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 25ml，密塞超声处理（50HZ）1 小时，过滤后不经过旋干直接定容到 100ml 容量瓶中，再从中用移液管转移出 2ml 到 10ml 容量瓶中（1：500），超声，待测。供试品溶液的制备：称取 0.75 倍量无水乙醇洗得到的沉淀物干燥后，称取 27.4mg 定容于 25ml 容量瓶中，超声 10 分钟，用移液管出 2 ml 定容于 10ml 容量瓶中，超声，微孔滤膜过滤后进 HPLC 测定含量。测定法：分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μl 注入液相色谱仪，测定，即得。射干苷提取物中射干苷的含量（w/w）为 70%。射干苷部位的提取率：得到射干苷部位 4g/100g 药材。

3、黄芩苷部位（即黄芩苷提取物，全文同）提取工艺流程及质量标准

黄芩苷部位提取工艺：取黄芩（唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根）分别加入 12 倍、10 倍、8 倍 60%乙醇提取 3 次，每次 1.5 小时。提取液减压浓缩至药材：体积=1g：5ml 后，盐酸调节 PH2，80℃保温 30min（可提高黄芩苷的含度），取出，放置 24h。抽滤，抽滤后所得沉淀，加相当于药材 3 倍体积的水分散均匀，用 40%NaOH 调节 PH=7，用加入等体积的 95%乙醇搅拌使溶解，静置 12h，滤过，滤液用盐酸调节 PH=2，60℃保温 60min（可提高黄芩苷的含度，黄芩苷可以在这个温度条件下析出沉淀，而杂质在此温度条件下保留在溶液中，而达到分离杂质的目的），静置 24h，抽滤，沉淀先用稀乙醇洗，再用水洗至中性，50℃减压干燥，即得。所得黄芩提取物的含量平均百分率为

87.81%，转移率为 72.77%。

黄芩苷部位质量标准：照高效液相色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VID）测定。色谱条件：色谱柱：KromasilC18 柱，150mm×4.6mm，5μm；流动相：甲醇：水（0.4%磷酸）=47：53；流速：1ml/min；柱温：33℃；检测波长：280nm；按黄芩苷色谱峰计算，理论塔板数不低于 2500。样品溶液制备，对照品及标准曲线制备：精密称取黄芩苷标准品 3.3mg 至 50ml 容量瓶中，甲醇溶解后定容至刻度，为黄芩苷对照品溶液（66μg/ml）。供试样品溶液制备：水煎煮：精密称取样品 9.3mg 至 25ml 容量瓶中，用甲醇溶解后，定容至刻度，再从中精密吸取 5ml 至 25ml 容量瓶中，甲醇定容，从中吸取 4ml 至 5ml 量瓶中，甲醇定容，摇匀，0.45μm 微孔滤膜过滤后待测。进样 20ul。乙醇提取：精密称取样品 9.3mg 至 25ml 量瓶中，甲醇溶解后，定容至刻度，再从中精密吸取 5ml 至 25ml 容量瓶中，甲醇定容，摇匀，0.45μm 微孔滤膜过滤后待测。进样 20ul。样品中黄芩苷的含量（w/w）为 85%。黄芩苷部位的提取率：得到黄芩苷部位 8g/100g 药材。

4、葛根素部位（即葛根素提取物，全文同）提取工艺流程及质量标准

葛根素部位提取工艺：将葛根（野葛，豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根）适当粉碎，分别用 8 倍量 70%乙醇回流提取 3 次，每次 1.5 小时。将乙醇提取液减压回收乙醇(60~70℃，-0.08Mpa)，将提取浓缩液置减压干燥器中，调节干燥温度为 60±5℃，真空度为-0.08MPa，干燥后，取出干燥物观察其性状，并粉碎成细粉，备用。

葛根素部位质量标准：采用 HPLC 法对葛根提取物中的葛根素进行含量测定。色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇—水（25：75）为流动相；检测波长 250nm；理论板数按葛根素峰计算不得低于 4000。供试品溶液的制备 称取葛根提取物约 30mg，精密称定，置 50ml 量瓶中，以 30%乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，过微孔滤膜，备用。对照品溶液的制备 称取葛根素对照品约 2mg，精密称定，置 25ml 量瓶中，以 30%乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀；再精密吸取 5ml 置 10ml 量瓶中，以 30%乙醇稀释至刻度，摇匀，备用。测定法 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 20ul 注入液相色谱仪，测定，即得。

含量限量 本品含葛根素（C₂₁H₂₀O₉）不得少于 10%（w/w）。葛根素部位的提取率：得到葛根素部位 4g/100g 药材。

实施例二 CYHG 纯品-混合物的制备

处方：橙皮苷 2g、射干苷 3g、黄芩苷 4g、葛根素 2g

所用原料均为市购，植物中提取的或化学合成的原料药均可使用，含量不低于 90%；如果需要可按常规方法纯化到 90%以上，比如 95%，

制法：分别称取上述处方量药物，混合均匀后，即为 CYHG 纯品-混合物。

实施例三 CYHG 纯品-胶囊的制备

处方：橙皮苷 86.58g、射干苷 129.87g、黄芩苷 173.16g、葛根素 86.58g。

制法：分别称取上述处方量药物（组方药物均系市场购买）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。制成 CYHG 纯品-胶囊。用法用量：口服，一次 1-2 粒，一日 3 次。规格：0.5g/粒。

实施例四

处方：橙皮苷部位 20g、射干苷部位 40g、黄芩苷部位 40g、葛根素部位 20g。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。

实施例五

处方：橙皮苷部位 30g、射干苷部位 30g、黄芩苷部位 40g、葛根素部位 30g。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。

实施例六

处方：橙皮苷部位 20g、射干苷部位 30g、黄芩苷部位 40g、葛根素部位 20g。

橙皮苷提取物中橙皮苷含量 70%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 90%，葛根素提取物中葛根素含量 20%，射干苷提取物中射干苷含量 50%。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。

实施例七

处方：橙皮苷部位 40g、射干苷部位 60g、黄芩苷部位 80g、葛根素部位 40g。

橙皮苷提取物中橙皮苷含量 65%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 85%，葛根素提取物中葛根素含量 10%，射干苷提取物中射干苷含量 70%。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。

实施例八

处方：橙皮苷部位 10g、射干苷部位 10g、黄芩苷部位 20g、葛根素部位 10g。

橙皮苷提取物中橙皮苷含量 50%，黄芩苷提取物中黄芩苷含量 50%，葛根素提取物中葛根素含量 10%，射干苷提取物中射干苷含量 70%。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）与淀粉适量，混合均匀后，常规湿法制粒，干燥，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。

实施例九

处方：橙皮苷部位 20g、射干苷部位 30g、黄芩苷 30g、野葛 30g。

橙皮苷提取物中橙皮苷含量 50%，黄芩苷含量测定为 90%，野葛（粉末）中葛根素含量 5%，射干苷提取物中射干苷含量 70%。

制法：分别称取上述处方量药物部位（药物部位的制备方法参见实施例一下述 1、2、3、4.）混合均匀后，装制成 1000 粒 0 号硬胶囊。