

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 2 月 11 日 (11.02.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/019684 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01) *A61P 31/22* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/094710
- (22) 国际申请日: 2014 年 12 月 23 日 (23.12.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410389232.0 2014 年 8 月 7 日 (07.08.2014) CN
- (72) 发明人; 及
- (71) 申请人: 富力 (FU, Li) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。
- (72) 发明人: 鲁明明 (LU, Mingming); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。付强 (FU, Qiang); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。王凯乾 (WANG, Kaiqian); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。惠敏 (HUI, Min); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。刘正贤 (LIU, Zhengxian); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。柳洋 (LIU, Yang); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。王硕 (WANG, Shuo); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。曲洪颖 (QU, Hongying); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。于晓静 (YU, Xiaojing); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山

中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。王海玲 (WANG, Hailing); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。盖鑫 (GAI, Xin); 中国辽宁省大连市经济技术开发区铁山中路 5 号, Liaoning 116600 (CN)。

(74) 代理人: 北京元本知识产权代理事务所 (BEIJING YUANBEN INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE); 中国北京市海淀区花园路 12 号时代玉成 403, Beijing 100088 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: APPLICATIONS OF PHILLYRIN/PHILLYGENIN COMPOSITION IN PREPARING DRUGS OR HEALTH CARE PRODUCTS FOR RELIEVING AND/OR TREATING VIRAL DISEASES

(54) 发明名称: 连翘苷/连翘脂素组合物在制备缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用

(57) Abstract: Applications of a phillyrin and phillygenin composition in preparing drugs or health care products for relieving and/or treating viral diseases.

(57) 摘要: 一种连翘苷与连翘脂素的组合物在制备缓解或/和治疗病毒性疾病药物或保健品中的应用。



WO 2016/019684 A1

连翘苷/连翘脂素组合物在制备缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用

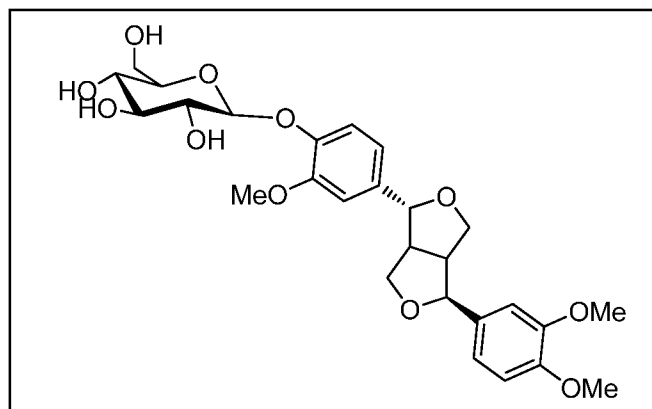
技术领域

本发明属于药物化学领域，具体而言，本发明涉及连翘苷/连翘脂素组合物或混合物及其在制备用于缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用。

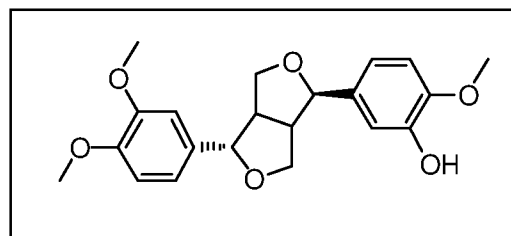
背景技术

流行性感冒是严重危害人类健康的急性、病毒性呼吸道传染病。二十一世纪以来，SARS、H5N1 病毒和甲型 H1N1 流感病毒的流行，给人类带来极大的危害。目前世界上尚无有效治疗病毒性流感及肺炎的天然药物。

连翘为木犀科(Oleaceae)连翘属(Forsythia)植物连翘(*Forsythia suspensa*(Thunb.)Vahl)的干燥果实，主要分布于我国河南、山西、陕西、山东等地，此外，湖北、河北、四川、甘肃亦有分布。常用于治疗急性风热感冒、痈肿疮毒、淋巴结结核、尿路感染等症[1]。连翘的主要成分为连翘苷(phillyrin)和连翘苷元，连翘苷元又称连翘脂素((+)-phillygenin)，两种成分的结构式如下。



连翘苷(phillyrin)



连翘脂素((+)-phillygenin)

连翘主要成分为连翘苷，具有抗病毒、抗菌、抗氧化、清除自由基等药理作用。连翘脂素，亦为连翘的主要活性成分之一，具有抗氧化、降低血脂、清除自由基、抑菌、抗肿瘤、抗炎等作用。已发表文献中，主要对未明确成分和已明确几种成分的连翘提取物、连翘苷单一成分抗病毒药理作用进行了研究，而未见有人对连翘脂素和连翘苷的组合物、连翘脂素单一成分进行抗病毒药理作用研究。

发明内容

本发明的目的是针对现有在治疗、预防或缓解病毒性疾病的过程中存在的技术缺陷，提供一种连翘苷/连翘脂素组合物在制备用于缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用。本发明的连翘脂素/连翘苷组合物缓解或/和治疗病毒性疾病的性能和功效强，为研制用于缓解或/和治疗病毒性疾病的新药提供了

新的途径，即在治疗、调理和缓解病毒性疾病的药物或保健食品中的新应用提供了新的思路。

为实现上述目的，本发明一方面提供一种连翘苷/连翘脂素组合物在制备缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用。

其中，所述病毒性疾病为流感病毒、副流感病毒、柯萨奇病毒 CoxA16、呼吸道合胞病毒 RSV、单纯带状疱疹病毒 HSV-I、单纯带状疱疹病毒 HSV-II、单纯带状疱疹病毒 CVB3、腺病毒 ADV 或肠道病毒 EV71 所致病毒性疾病，尤其是由流感病毒、副流感病毒、柯萨奇病毒 CoxA16、呼吸道合胞病毒 RSV 所致的病毒性感冒、肺炎呼吸道传染病。

在筛选具有缓解或/和治疗病毒性流感及肺炎呼吸道传染病作用的天然活性成分的过程中，发明人发现连翘苷/连翘脂素组合物具有强烈的抑制病毒性流感及肺炎的作用，其疗效显著优于连翘苷或连翘脂素单独使用的效果。

其中，所述连翘苷/连翘脂素组合物中连翘苷与连翘脂素的重量份配比为 80-98：2-20，优选为 90-98：2-10，进一步优选为 98：2。

特别是，所述连翘苷/连翘脂素组合物还包括药学上可接受的载体。

药学上可接受的载体通常被保健专家认可用于这一目的且作为药剂的非活性成分。有关药学上可接受的载体的汇编可以在《药物赋形剂手册》(Handbook of Pharmaceutical excipients, 第 2 版, 由 A. Wade 和 P. J. Weller 编辑; American Pharmaceutical Association 出版, Washington and The Pharmaceutical Press, London, 1994)等工具书中找到。

尤其是，所述的载体包括赋形剂，如淀粉、水等；润滑剂，如硬脂酸镁等；崩解剂，如微晶纤维素等；填充剂，如乳糖等；粘结剂，如预胶化淀粉、糊精等；甜味剂；抗氧化剂；防腐剂、矫味剂、香料等。

特别是，所述药物以片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、巴布剂、橡胶贴膏剂或贴膏剂形式存在。

其中，所述连翘苷/连翘脂素组合物中连翘苷与连翘脂素的总重量与药学上可接受的载体的重量之比为 1:1~1:100，优选为 1:10，进一步优选为 1:5，更进一步优选为 1:2，再更进一步优选为 1:1。

特别是，所述的连翘苷/连翘脂素组合物含量 $\geq 80\%$ ，优选为 $\geq 85\%$ ，进一步优选为 $\geq 88\%$ ，更进一步优选为 $\geq 90\%$ ，再更进一步优选为 $\geq 99\%$ 。

特别是，所述的连翘苷/连翘脂素组合物中两种成分的重量比为：2~98：98~2；优选为 80:20 或 20:80，进一步优选为 90:10 或 10:90，更进一步优选为 98:2 或 2:98。

其中，所述连翘苷/连翘脂素组合物以连翘苷和连翘脂素以单体组成、或采用溶剂加热提取方法制备而成的连翘脂素-连翘苷提取组合物，或连翘脂素和连翘苷与环糊精或环糊精的衍生物组合而成连翘脂素-连翘苷-环糊精组合物。

特别是，所述连翘脂素-连翘苷-环糊精组合物选择连翘脂素和连翘苷与 α -、 β -或 γ -环糊精或其衍生物相混合而成的混合物，或连翘脂素和连翘苷与 α -、 β -或 γ -环糊精或其衍生物经物理、化学方法处理形成的复合物。

其中，所述连翘脂素-连翘苷-环糊精组合物中连翘苷和连翘脂素重量与环糊精或环糊精的衍生物的重量之比为 1：1-50。

特别是,所述环糊精为 α -或 β -、 γ -环糊精;所述环糊精衍生物为羟乙基 β -环糊精、2,6-二甲基 β -环糊精、2,3,6-三甲基 β -环糊精、2,6-二乙基 β -环糊精、2,3,6-三乙基 β -环糊精、麦芽糖基 β -环糊精或磺丁醚 β -环糊精、对甲基苯磺酰氯(p-TsCl)取代的 β -环糊精、6-位取代的 β -CD对甲基苯磺酸酯(β -环糊精-6-OTs)、2-氧羟丙基- β -环糊精、2-位单取代的对甲基苯磺酸酯(β -环糊精-2-OTs)、 β -环糊精对甲基苯磺酸酯(Tosyl- β -CD)、 β -环糊精的星形大分子 PCL-(Tos)7- β -CD。

其中,所述连翘脂素-连翘苷提取组合物按照如下方法提取制备而成:

- 1) 采用溶剂对连翘叶或连翘果实进行加热回流提取 2~3 次,每次 2~4 小时;
- 2) 提取液浓缩后静置,析出沉淀,获得连翘脂素和连翘苷混合物粗品;
- 3) 将连翘脂素和连翘苷混合物粗品采用溶剂溶解后,静置,析出结晶,获得连翘脂素和连翘苷混合物;
- 4) 用溶剂对连翘脂素和连翘苷混合物进行重结晶处理,得到连翘脂素-连翘苷提取物。

特别是,步骤 1)、3)、4) 中所述溶剂为甲醇、乙醇、丙酮、含水甲醇或含水乙醇。

尤其是,所述含水甲醇的质量百分比浓度为 70-95%;所述含水乙醇的质量百分比浓度为 70-95%。

其中,步骤 2) 中静置的温度为室温,优选为 10-35℃,进一步优选为 20-25℃;静置时间为 1-48h;步骤 2) 中提取液浓缩后的体积与原提取液的体积之比为 0.1-0.5: 1。

特别是,步骤 4) 中所述重结晶处理的温度为室温,优选为 10-35℃,进一步优选为 20-25℃。

本发明另一方面提供一种缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品,含有连翘苷和连翘脂素。

其中,所述连翘苷与连翘脂素的重量份配比为 80-98: 2-20,优选为 90-98: 2-10,进一步优选为 98: 2。

特别是,所述药物或保健品由连翘苷/连翘脂素组合物和药学上可接受的载体组成。

其中,所述连翘苷/连翘脂素组合物中连翘苷与连翘脂素的总重量与药学上可接受的载体的重量之比为 1:1~1:100,优选为 1: 10,进一步优选为 1: 5,更进一步优选为 1:2,再更进一步优选为 1:1。

特别是,所述连翘脂素/连翘苷组合物的重量与所述药物或保健品的总重量之比为 0.01~10: 100,优选为 0.1~10: 100,进一步优选为 1~10: 100。

特别是,所述药物以片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、巴布剂、橡胶贴膏剂或贴膏剂形式存在。

特别是,所述药物或保健品中还包括蒲公英提取物、板蓝根提取物、金银花提取物、知母提取物、玄参提取物、夏枯草提取物、芦根提取物、淡竹叶提取物、栀子提取物、川贝提取物、苦丁茶提取物、鱼腥草提取物中的一种或多种。

所述药物可以采用本领域公知的方法制成各种剂型,如片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、巴布剂、橡胶贴膏剂或贴膏剂等。

本发明还提供了一种治疗病毒性流感及肺炎疾病的方法,包括向受试者给予治疗有效量的连翘脂素和连翘苷的组合物的药物组合物,其治疗有效量为 0.1~50mg/kg.d,优选为 0.3~30mg/kg.d,进一步优选为 0.5~10mg/kg.d。

除非另外说明,本文所用的术语“治疗有效量”为需要产生有效作用的药物的用量;“治疗有效量”是可

以调整和变化的, 最终由医务人员确定, 其所考虑的因素包括给药途径和制剂的性质、接受者的体重、年龄等一般情况以及所治疗疾病的性质和严重程度。

与现有技术相比, 本发明具有如下的明显优点:

本发明连翘苷/连翘脂素组合物的制备方法简便、适于工业化生产, 组合物具有明显的抗流感、肺炎等多种病毒的疗效, 且抗病毒效果显著优于单独使用连翘苷、连翘脂素的疗效, 也明显优于目前临床最新抗病毒药——磷酸奥司他韦(达菲); 此外, 还发掘了连翘苷/连翘脂素组合物具有抗其他病毒的疗效, 能显著抑制柯萨奇病毒 CoxA16 及呼吸道合胞病毒 RSV、单纯带状疱疹病毒 HSV-I 和 HSV-II 及 CVB3、腺病毒 ADV、肠道病毒 EV71, 可用于治疗上述病毒所致流感及肺炎、带状疱疹、心肌炎、手足口病、上呼吸道感染、毛细支气管炎、皮疹、脑膜炎等疾病, 故本发明可制备成用于缓解或/和治疗病毒性流感及肺炎、带状疱疹、心肌炎、手足口病、上呼吸道感染、毛细支气管炎、皮疹、脑膜炎等疾病的高效天然药物或保健食品, 为连翘药材的应用开拓了一个新的领域。

1、本发明的连翘苷/连翘脂素组合物具有抗流感及肺炎病毒的疗效, 其疗效显著优于连翘苷、连翘脂素单独用药的疗效, 连翘苷与连翘脂素按照特定比例组合使用, 具有协同增效的作用;

2、本发明的连翘苷/连翘脂素组合物具有抑制柯萨奇病毒 CoxA16 及呼吸道合胞病毒 RSV、单纯带状疱疹病毒 HSV-I 和 HSV-II 及 CVB3、腺病毒 ADV、肠道病毒 EV71 等多种病毒的作用, 连翘苷/连翘脂素组合物治疗上述病毒所致流感及肺炎、带状疱疹、心肌炎、手足口病、上呼吸道感染、毛细支气管炎、皮疹、脑膜炎等疾病;

3、本发明的连翘苷/连翘脂素组合物具有显著抑制病毒所致炎症及增强患者的免疫力的功效; 连翘苷/连翘脂素组合物抑制病毒性流感及肺炎的药理作用强, 用于缓解、调理和治疗病毒性流感及肺炎的功效显著, 见效快、毒副作用小、安全性好, 能够长期服用, 具有良好的药用前景;

4、本发明的产品原料来源丰富、价廉、临床使用安全, 制备工艺简单, 可制成各种剂型, 且服量小, 使用方便, 因此易于推广;

5、本发明的连翘苷/连翘脂素组合物既可采用单体成分定量配制而成, 也可通过提取制备成连翘苷/连翘脂素组合物, 或上述连翘苷/连翘脂素组合物与一种 α -或 β -、 γ -环糊精或环糊精的衍生物组合而成配方成组合物, 还可采用连翘苷/连翘脂素组合物与其他活性成分(例如与蒲公英提取物、板蓝根提取物、金银花提取物、知母提取物、玄参提取物、夏枯草提取物、芦根提取物、淡竹叶提取物、栀子提取物、川贝提取物、苦丁茶提取物、鱼腥草提取物中的一种或多种)共同组方, 制备治疗病毒性流感、肺炎及其他病毒性疾病的复方药物。

具体实施方式

下面通过具体实施方式来进一步描述本发明所述配方的有益效果。这些实施例仅是范例性的, 并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是, 在不偏离本发明的配方思路、用途范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换, 但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

实施例 1-4 连翘苷/连翘脂素组合物的制备

分别取连翘苷和连翘脂素的两种单体成分粉末,两者可以按表 1 的重量比混合制备成连翘苷/连翘脂素组合物,连翘苷单体由大连富生天然药物开发有限公司生产,经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定,其纯度为 99.5%,并用中国药品生物制品含量测定用连翘苷对照品标定和确认其含量为 99.5%;连翘脂素由大连富生天然药物开发有限公司生产,经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定,其纯度为 99.1%。

表 1 实施例 1-4 的连翘苷/连翘脂素组合物的原料配比表

实施例编号	重量比	
	连翘苷	连翘脂素
实施例 1	98	2
实施例 2	80	20
实施例 3	90	10
实施例 4	95	5

实施例 5-24 连翘苷/连翘脂素组合物的制备

取实施例 1-4 制备的连翘苷/连翘脂素组合物,以表 2 所述重量比、按以下方法制备组合物:(1)直接加入到环糊精溶液中,或(2)直接加入到环糊精溶液中并充分搅拌 1-24h、(3)直接加入到环糊精溶液中并加热 10-120 分钟、(4)直接加入到环糊精溶液中并超声 10-120 分钟、(5)直接与环糊精粉末研磨 10-120 分钟、(6)使连翘苷/连翘脂素组合物与所述环糊精粉末混合均匀、过筛;(7)直接加入环糊精衍生物溶液中,或(8)直接加入到环糊精衍生物溶液中并充分搅拌 1-24h、(9)直接加入到环糊精衍生物溶液中并加热 10-120 分钟、(10)直接加入到环糊精衍生物溶液中并超声 10-120 分钟、(11)直接与环糊精衍生物粉末研磨 10-120 分钟、(12)与环糊精衍生物粉末混合均匀、过筛。

表 2 实施例 5-24 的原料配比和制备方法

实施例编号	连翘苷/连翘脂素组合物克数	环糊精或环糊精衍生物克数	制备方法
实施例 5	100(98:2)	100	(1) 直接加入
实施例 6	100(80:20)	10000	(2) 搅拌 1h
实施例 7	100(90:10)	500	(5) 加热 10min
实施例 8	100(95:5)	1000	(4) 超声 10min
实施例 9	100(98:2)	2000	(5) 研磨 10min
实施例 10	100(98:2)	3000	(6) 混匀过筛 10min
实施例 11	100(98:2)	4000	(1) 直接加入
实施例 12	100(98:2)	3500	(2) 搅拌 12h
实施例 13	100(98:2)	4500	(3) 加热 120min
实施例 14	100(98:2)	1500	(4) 超声 120min
实施例 15	100(98:2)	100	(7) 直接加入
实施例 16	100(80:20)	10000	(8) 搅拌 1h
实施例 17	100(90:10)	500	(9) 加热 10min
实施例 18	100(95:5)	1000	(10) 超声 10min
实施例 19	100(98:2)	2000	(11) 研磨 10min
实施例 20	100(98:2)	3000	(12) 混匀过筛 10min
实施例 21	100(98:2)	4000	(1) 直接加入
实施例 22	100(98:2)	3500	(2) 搅拌 12h
实施例 23	100(98:2)	4500	(5) 加热 120min
实施例 24	100(98:2)	1500	(6) 超声 120min

实施例 5-24 中的辅料以选用 β -环糊精为例进行举例说明,其他环糊精、环糊精衍生物均适用于本发明,例如 1) β -羟丙基环糊精、2) 羟乙基 β -环糊精、3) 2,6-二甲基 β -环糊精、4) 2,3,6-三甲基 β -环糊精、5) 2,6-二乙基 β -环糊精、6) 2,3,6-三乙基 β -环糊精、7) 麦芽糖基 β -环糊精、8) 磺丁醚 β -环糊精、9) 对甲基苯磺氯(p-TsCl)取代的 β -环糊精、10) 6-位取代的 β -CD 对甲基苯磺酸酯(β -环糊精-6-OTs)、11) 2-氧羟丙基- β -环糊精、12) 2-位单取代的对甲基苯磺酸酯(β -环糊精-2-OTs)、13) β -环糊精对甲基苯磺酸酯(Tosyl- β -CD)_j, 以及 15) β -环糊精的星形大分子 PCL-(Tos)7- β -CD。

实施例 25 连翘苷和连翘脂素组合物的制备

干燥的连翘叶 1kg, 加入 95% (m/m) 乙醇 10kg, 加热回流提取 2 次, 每次 2 小时, 过滤, 滤液减压浓缩至原体积的 1/2, 于 25℃放置 1h, 析出沉淀; 再用甲醇溶解, 进行重结晶, 析出沉淀; 重复上述方法用甲醇重结晶, 得连翘苷/连翘脂素组合物无定形粉末, 采用 HPLC 测定连翘苷、连翘脂素的含量, 分别为 98%、2%。

实施例 26 连翘苷和连翘脂素组合物的制备

干燥的连翘果实 1kg, 加入甲醇 10kg, 加热回流提取 3 次, 每次 4 小时, 过滤, 滤液减压浓缩至原体积的 1/10, 于 20℃放置 48h, 析出沉淀; 再用乙醇溶解, 进行重结晶, 析出沉淀; 重复上述方法用乙醇重结晶, 得连翘苷/连翘脂素组合物无定形粉末, 其所含连翘苷、连翘脂素的含量分别为 95%、4%。

实施例 27 连翘苷和连翘脂素组合物的制备

干燥的连翘叶 1kg, 加入 70% (m/m) 甲醇 10kg, 加热回流提取 3 次, 每次 3 小时, 过滤, 滤液减压浓缩至原体积的 1/3, 于室温放置 2h, 析出沉淀; 再用 90%甲醇溶解之, 进行重结晶, 析出沉淀; 重复上述方法用甲醇重结晶, 得连翘苷/连翘脂素组合物无定形粉末, 其所含连翘苷、连翘脂素的含量分别为 88%、2%。

实施例 28 连翘苷和连翘脂素组合物的制备

干燥的连翘果实 1kg, 加入无水乙醇 10kg, 加热回流提取 2 次, 每次 4 小时, 过滤, 滤液减压浓缩至原体积的 1/4, 于室温放置 24h, 析出沉淀; 再用丙酮溶解之, 进行重结晶, 析出沉淀; 重复上述方法用丙酮重结晶, 得连翘苷/连翘脂素组合物无定形粉末, 其所含连翘苷、连翘脂素的含量分别为 90%、6%。

实施例 29 连翘苷和连翘脂素组合物的制备

干燥的连翘叶子 1kg, 加入丙酮 10kg, 加热回流提取 3 次, 每次 3 小时, 过滤, 滤液减压浓缩至原体积的 1/5, 于室温放置 10h, 析出沉淀; 再用 70%乙醇溶解之, 进行重结晶, 析出沉淀; 重复上述方法用 70%乙醇重结晶, 得连翘苷/连翘脂素组合物无定形粉末, 其所含连翘苷、连翘脂素的含量分别为 80%、5%。

实施例 30 连翘苷和连翘脂素组合物片剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的片剂:

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 98:2)	500g
淀粉	480g
滑石粉	1%(10g)
硬脂酸镁	1%(10g)

按上述配比, 取实施例 1 中制备的连翘苷/连翘脂素组合物与淀粉混合均匀后, 制成颗粒, 加入滑石粉

和硬脂酸镁混合均匀后压制成 10000 片。

实施例 31 连翘苷/连翘脂素组合物颗粒剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的颗粒剂：

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 98:2)	100g
微晶纤维素	10000g

按上述配比，取实施例 1 中制备的连翘苷/连翘脂素组合物与微晶纤维素混合均匀后，制成颗粒装袋，制成 10000 袋。

实施例 32 连翘苷/连翘脂素组合物胶囊剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的胶囊剂：

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 98:2)	250g
淀粉	2500g

按上述配比，取实施例 1 中制备的连翘苷/连翘脂素组合物与淀粉混合均匀后装胶囊，制成 10000 粒。

实施例 33-36 连翘苷/连翘脂素组合物胶囊剂制备

实施例 33-36 中，连翘苷/连翘脂素组合物分别按表 3 的重量比与淀粉混合均匀后装胶囊，各制成 10000 粒胶囊。

表 3

实施例编号	原料 (连翘脂素和连翘苷的组合物, g)	辅料 (淀粉, g)	原料与辅料 重量比
实施例 33	500(98:2)	500	1: 1
实施例 34	50 (80:20)	5000	1: 100
实施例 35	250(90:10)	2500	1: 10
实施例 36	250(95:5)	5000	1: 20

表中原料，可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合物。

实施例:37-40 连翘苷/连翘脂素组合物颗粒剂制备

实施例 37-40 中，连翘苷/连翘脂素组合物分别按表 4 的重量比与微晶纤维素混合均匀后，制成颗粒装袋，制成 10000 袋。

表 4

实施例编号	原料 (连翘脂素和连翘苷的组合物, g)	辅料 (微晶纤维素, g)	原料与辅料 重量比
实施例 37	1000(98:2)	1000	1: 1
实施例 38	250 (80:20)	25000	1: 100
实施例 39	2500(90:10)	25000	1: 10
实施例 30	2500(95:5)	50000	1: 20

表中原料，可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合物。

实施例 41 连翘苷/连翘脂素组合物片剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的片剂：

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 98:2)	500g
淀粉	380g
蒲公英提取物	100g

滑石粉	1%(10g)
硬脂酸镁	1%(10g)

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合与上述提取物粉末混合均匀,再与淀粉混合均匀后制成颗粒,加入滑石粉和硬脂酸镁混合均匀后压制成 10000 片。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合。

实施例 42 连翘苷/连翘脂素组合颗粒剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的颗粒剂:

连翘苷/连翘脂素组合(两者重量比为 98:2)	250g
板蓝根提取物	250g
金银花提取物	250g
微晶纤维素	24500g

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合与上述提取物粉末混合均匀,再与微晶纤维素混合均匀后制成颗粒装袋,制成 10000 袋。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合。

实施例 43 连翘苷/连翘脂素组合胶囊剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的胶囊剂:

连翘苷/连翘脂素组合(两者重量比为 98:2)	250g
栀子提取物	250g
川贝提取物	250g
苦丁茶提取物	250g
淀粉	1000g

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合与上述提取物粉末混合均匀,再与淀粉混合均匀后装胶囊,制成 10000 粒。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合。

实施例 52 连翘苷/连翘脂素组合片剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的片剂:

连翘苷/连翘脂素组合(两者重量比为 80:20)	500g
淀粉	480g
知母提取物	500g
滑石粉	1%(10g)
硬脂酸镁	1%(10g)

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合与上述提取物粉末混合均匀,再与淀粉混合均匀后制成颗粒,加入滑石粉和硬脂酸镁混合均匀后压,制成 10000 片。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合。

实施例 53 连翘苷/连翘脂素组合颗粒剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的颗粒剂:

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 90:10)	1000g
玄参提取物	500g
淡竹叶提取物	500g
微晶纤维素	10000g

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合物与上述提取物粉末混合均匀,再与微晶纤维素混合均匀后制成颗粒装袋,制成 10000 袋。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合物可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合物。

实施例 54 连翘苷/连翘脂素组合物胶囊剂制备

按照如下配比制备连翘苷/连翘脂素组合物的胶囊剂:

连翘苷/连翘脂素组合物(两者重量比为 94:6)	2000g
夏枯草提取物	250g
鱼腥草提取物	500g
芦根提取物	250g
淀粉	1000g

按上述配比,连翘苷/连翘脂素组合物与上述提取物粉末混合均匀,再与淀粉混合均匀后装胶囊,制成 10000 粒。其中,本实施例中的连翘苷/连翘脂素组合物可替换为实施例 5-29 制备的连翘脂素和连翘苷的组合物。

试验例 1 连翘苷/连翘脂素组合物抗病毒试验

1 体外抗病毒试验

1.1 试验材料

(1) 药物

①连翘苷,白色粉末,大连富生天然药物开发有限公司生产,经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定,其纯度为 99.5%,并用中国药品生物制品含量测定用连翘苷对照品标定和确认其含量为 99.5%。

②连翘脂素,白色粉末,大连富生天然药物开发有限公司生产,经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定,其纯度为 99.1%;

③连翘苷/连翘脂素组合物:连翘苷/连翘脂素组合物 1:白色粉末,大连富生天然药物开发有限公司生产,由连翘苷和连翘脂素两种单体配比而成,用 99.5%连翘苷和 99.1%连翘脂素作为对照品进行标定,连翘苷/连翘脂素组合物中两种单体成分含量均为 98%,其中连翘苷/连翘脂素组合物 1 中连翘苷与连翘脂素的重量比 98:2;连翘苷/连翘脂素组合物 2 中连翘苷与连翘脂素的重量比为 80:20。

④ 利巴韦林注射液,无色透明液体,由河南润弘股份有限公司生产,产品批号:1206261,国药准字:H19993553,100mg/ml,作为本次试验阳性对照药物。

⑤ 磷酸奥司他韦,中国药品生物制品检定所。产品批号:101096-200901,100mg/支作为本次试验阳

性对照药物。

上述药品均用纯净水溶解，滤过，除菌分装，4℃备用，为本次试验待测药物。

(2) 细胞株：Vero(非洲绿猴肾细胞细胞)由吉林大学基础医学院保存细胞株。

(3) 病毒株：① 流感病毒株、副流感病毒株、呼吸道合胞病毒(RSV)株：购于中国预防医学科学院病毒研究所；②柯萨奇病毒 B₃(CVB₃)株：来源于美国, 为本教研室保存；③柯萨奇病毒 A16 (CoxA16)株、肠道病毒 EV71 株：由日本仙台国立医院馈赠，于本教研室保存；④腺病毒(AdV) 来源于白求恩医科大学一院儿科研究室；⑤单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1) 购于卫生部药品生物制品检定所。

(4) 主要设备与试剂：

生物安全柜：BHC-1300 II A/B3, AIRTECH; CO₂ 培养箱：MCO-18AIC, SANYO; 倒置显微镜：CKX41, OLYMPUS; 电子分析天平：AR1140/C, DHAUS; 培养基：DMEM, HyClone; 胎牛血清：HyClone; 胰蛋白酶：Gibco; MTT: Sigma; DMSO: 天津市北联精细化学品开发有限公司。

1.2 试验方法

(1) 细胞准备

Vero 细胞传代培养 1-2d, 使之成片, 界线清晰, 立体感及折光度强时, 用胰酶消化, 待细胞面出现针尖样小孔, 吸尽消化液, 取数毫升培养液吹散细胞, 计数, 用培养液(含 10%胎牛血清的 DMEM)稀释至约 5×10^7 个/L 后, 接种于 96 孔培养板内, 待细胞长成单层。

(2) 药物毒性测定

细胞毒性试验：将药物按表 1-1 所示浓度进行稀释，用于细胞毒性测定。

表 1-1 药物稀释参照表(单位：g/L)

浓度梯度 药物	梯度 1	梯度 2	梯度 3	梯度 4	梯度 5	梯度 6	梯度 7	梯度 8
连翘苷	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.078125
连翘脂素	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.078125
连翘苷/连翘脂素 组合物 1	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.078125
连翘苷/连翘脂素 组合物 2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.078125
利巴韦林	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.039063
酸奥司他韦	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625

将上述用维持液(含 2%胎牛血清的 DMEM)稀释好的不同浓度的药品滴加于 Vero 单层细胞上, 每孔 0.2ml, 每个浓度 6 个复孔, 另设 6 孔正常对照(不加药物的正常对照组)和 6 孔空白对照(培养液), 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每日置倒置显微镜观察 CPE 并记录。72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL (5 mg · mL⁻¹), 继续孵育 4 h, 吸弃各孔培养液, 每孔加入 100 μL DMSO, 振荡 5 min, 492 nm 测定 OD 值, 计算细胞存活率。在 SPSS 18.0 统计软件中, 将细胞存活率进行 Probit 回归分析, 计算药物对 Vero 细胞的最大无毒浓度(TC₀)和半数毒性浓度(TC₅₀)。

(3) 各种病毒 TCID₅₀ 的测定

将各种病毒进行 10 倍递减稀释为 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ 不同稀释度, 按序接种于单层的 Vero

细胞 96 孔培养板上, 每孔 100 μ L, 每个稀释度 6 孔, 同时设正常细胞对照组。置 37℃, 5%CO₂ 中孵育 2h, 弃病毒液, 随即每孔加细胞维持液 100 μ L, 置 37℃, 5%CO₂ 中培养。第 3 天开始在显微镜下观察细胞病变结果, 第 7-8 天判定结果并做好记录, 以能使 50%细胞孔发生阳性病变的最高稀释度作为终点, 用 karber 法计算病毒滴度。

公式 $\text{LogTCID}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100}$ (TCID₅₀: 50%组织细胞感染量; XM: 病毒最高浓度稀释度的对数; d:

稀释度系数(倍数)的对数; $\sum p_i$: 每个稀释度病变百分数的总和。)

(4) 药物对病毒致细胞病变作用的影响

取已长满单层细胞的培养板, 吸弃培养液, 以 100TCID₅₀ 对应的病毒攻击量接种细胞, 37℃, 5% CO₂ 培养箱吸附 2 h, 加入特定浓度(最大无毒浓度左右)的各药液, 每浓度 6 个复孔培养, 200 μ L/孔。设利巴韦林注射液和磷酸奥司他韦为阳性药物对照组, 同时设正常对照组(不加病毒不加药)和病毒对照组(加病毒但不加药物的对照组), 观察药物对病毒致 CPE 的影响。72h 后, 用 MTT 比色法, 在 492nm 波长下测定 OD 值, 计算药物抗病毒有效率(ER%)。在 SPSS 18.0 统计软件中用 ANOVA 法比较各药物抗病毒有效率之间的显著性差异。

$\text{ER}\% = (\text{药物处理组平均 OD 值} - \text{病毒对照组平均 OD 值}) / (\text{细胞对照组平均 OD 值} - \text{病毒对照组平均 OD 值}) \times 100\%$

1.3 试验结果

(1) 各种病毒的 TCID₅₀

$$\text{副流感病毒: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

$$\text{流感病毒: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

$$\text{CVB}_3: \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{HSV-1: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 30}{100} = -4.8$$

$$\text{AdV: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 50}{100} = -4$$

$$\text{RSV: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{CoxA16: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

$$\text{EV71: } \text{LogTCID}_{50} = -2 + 0.5 - \frac{100 + 100 + 100 + 50}{100} = -5$$

(2) 药物毒性测定

1) 药物对细胞毒性的测定

各药物对 Vero 细胞的最大无毒浓度 (TC₀)、半数毒性浓度 (TC₅₀) 及药物抗病毒实验用浓度见表 1-2。

表 1-2 药物细胞毒性实验结果(单位: g/L)

药物 病毒	连翘苷	连翘脂素	连翘苷/连翘 脂素组合物 1	连翘苷/连翘 脂素组合物 2	利巴韦林	磷酸奥司他韦
最大无毒浓 度	0.0066	0.011	0.010	0.0066	0.065	0.28
半数毒性浓 度	0.55	0.297	0.60	0.55	1.392	0.832
0.30	0.01	0.02	0.01	0.01	0.70	0.30

2) 药物对病毒致细胞病变保护作用结果

药物抗各种病毒的有效率及 ANOVA 法单因素方差分析结果, 详见表 1-3。

表 1-3 药物抗病毒有效率(ER%)统计表

药物 病毒	连翘苷	连翘脂素	连翘苷/连翘脂素 组合物 1	连翘苷/连翘脂素 组合物 2	利巴韦林	磷酸奥 司他韦
流感病毒	75.38**	75.35**	100.00***##▲▲▲●	97.60***##▲▲▲●	57.49**	81.76**
副流感病毒	84.96**	80.72**	100.00***#▲	99.51***#▲	91.56**	94.52**
CoxA16	75.08**	50.04	98.20***##▲▲▲▲●●●	97.63***##▲▲▲▲●●●	0.70	2.95
RSV	80.40**	80.88**	96.22***#▲▲▲●●●	95.88***#▲▲▲●●●	50.08*	37.60
HSV-I	85.00**	84.30**	100.00***#▲▲▲●●	99.24.00***#▲▲▲●●	62.92**	66.56**
ADV	75.14**	50.61	100.00***##▲▲▲▲●●● ●	96.10***##▲▲▲▲●●●	0.43	10.31
EV71	84.85**	75.86**	100.00***#▲▲▲▲●●●	98.01***#▲▲▲▲●●●	4.25	51.86
CVB ₃	75.27**	50.89	92.67***##▲▲▲▲●●●	90.49***##▲▲▲▲●●●	13.44	1.64

注: 与病毒对照组相比, *P<0.05, **P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷相比, #P<0.05, ##P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素相比, ▲P<0.05, ▲▲P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合物与利巴韦林相比, △P<0.05, △△P<0.01, △△△P<0.001; 连翘苷/连翘脂素组合物与磷酸奥司他韦相比, ●P<0.05, ●●P<0.01, ●●●P<0.001。

表 1-3 结果显示, 连翘苷/连翘脂素组合物对 8 种病毒均有明显抑制作用 (P<0.01 或 P<0.001), 对流感病毒、副流感病毒、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、肠道病毒 EV71 及腺病毒 (ADV) 抗病毒的有效率均达到 100%, 且疗效明显优于连翘苷、连翘脂素, 表明连翘苷/连翘脂素组合物具有协同增效作用。此外, 连翘苷/连翘脂素组合物抑制流感、柯萨奇病毒 A16 (CoxA16)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、腺病毒 (ADV)、肠道病毒 EV71 及柯萨奇病毒 B₃(CVB₃)的疗效明显优于阳性药利巴韦林 (P<0.01 或 P<0.001), 抑制流感、柯萨奇病毒 A16 (CoxA16)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、腺病毒 (ADV)、肠道病毒 EV71 及柯萨奇病毒 B₃(CVB₃)的疗效上明显优于磷酸奥司他韦 (P<0.05, 或 P<0.01、P<0.001)。

2. 体内抗病毒试验

2.1 实验材料

(1)实验动物

昆明种小鼠由吉林大学白求恩医学部实验动物中心提供，医动字第 10-5219 号。

(2) 检测仪器、试剂

仪器名称	型号	生产厂家
定量 PCR 仪	7300	ABI
PCR 仪	ES-60J	沈阳龙腾电子称量仪器有限公司
电子分析天平	FA1004	沈阳龙腾有限公司
CO ₂ 孵育箱	HG303-5	南京实验仪器厂
超净工作台	SW-CJ-IF	苏州安泰技术有限公司
倒置显微镜	CKX41	Olympus Instrument
-80℃超低温冰箱	TECON-5082	澳大利亚
水浴振荡器	HZS-H	哈尔滨市东联有限公司
酶标仪	TECAN A-5082	澳大利亚
分光光度计	7550 型	日本

2.2 实验方法

(1) 流感病毒和副流感病毒对小鼠半数致死量的测定

将流感病毒和副流感病毒(细胞裂解液)10 倍递比稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度的病毒液。取昆明种小鼠 120 只，流感病毒和副流感病毒组各 60 只，分别随机分成 6 组，乙醚轻度麻醉小鼠，滴鼻感染不同稀释度病毒液 0.03mL/只。同时设空白对照，用生理盐水代替病毒悬液。以死亡和生存为观察指标，每天观察，直至感染后的 14 天。感染 24h 内死亡的为非特异死亡，不予统计，Karber 法计算病毒液 LD₅₀。

计算公式： $\text{LogLD}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2}d - d \frac{\sum P_i}{100}$ [其中：LD₅₀：半数致死量；XM：病毒最高浓度稀释度的对数；d：稀释度系数(倍数)的对数； $\sum p_i$ ：每个稀释度病变百分数的总和]。

(2) 连翘苷/连翘脂素组合物抗流感病毒和副流感病毒感染所致肺炎的研究

1) 试验动物及分组

取四周龄的昆明小鼠 540 只，进行 2 项试验。

先取小鼠 270 只，随机分成 27 组，每组 10 只，用于连翘苷/连翘脂素组合物对流感病毒和副流感病毒感染小鼠肺指数和肺指数抑制率的测定试验；每次试验取小鼠 90 只，3 次重复试验。另取小鼠 270 只，随机分成 27 组，每组 10 只，用于连翘脂素和连翘苷的组合物对肺悬液病毒血凝滴度的测定试验；每次试验取小鼠 90 只，3 次重复试验。

2) 感染方法

在 200~300mL 大小的烧杯内放入一团脱脂棉，然后倒入适量的乙醚(使脱脂棉变湿即可)，把装有脱脂棉的烧杯倒扣过来，把小鼠放入进行麻醉，见小鼠极度兴奋，明显呈无力样时，将小鼠仰卧，滴鼻感染 15LD₅₀ 流感病毒和副流感病毒 0.03mL/鼻孔，正常对照组用生理盐水代替病毒悬液。

3) 给药方法及给药剂量

连翘苷/连翘脂素组合物 1 组、连翘苷/连翘脂素组合物 2 组、连翘脂素组、连翘苷组、利巴韦林和磷酸奥司他韦对照组，分别于感染前一天开始常规灌胃给药，连翘苷/连翘脂素组合物 1、2 分别分为高、中、低剂量组，给药剂量分别为 13.0、6.5、3.25mg/kg，连翘苷组给药剂量为 13mg/kg、连翘脂素组给药剂量

为 13mg/kg、利巴韦林阳性药给药剂量为 58.5mg/kg、磷酸奥司他韦给药剂量为 19.5mg/kg，每天一次，连续给药 5d，正常对照组、病毒对照组灌服相同体积的生理盐水。

4) 观察指标

① 肺指数测定

小鼠用药后第 5 天，先禁食水 8 小时，称体重后摘眼球放血处死动物，打开胸腔摘出全肺，以生理盐水洗涤两次，用滤纸吸干表面水份，电子天平称肺重，按下列公式计算肺指数和肺指数抑制率：

$$\text{肺指数} = (\text{小鼠肺重} / \text{小鼠体重}) \times 100\%$$

$$\text{肺指数抑制率} = (\text{感染模型组平均肺指数} - \text{实验组平均肺指数}) / \text{感染模型组平均肺指数} \times 100\%$$

② 肺悬液病毒血凝滴度测定

分别取治疗后第 5 天的各组小鼠肺，低温下置匀浆器研磨成匀浆，生理盐水稀释为 10% 的肺组织悬液，离心取上清，倍比稀释，按 0.2ml/孔滴于滴定板上，每孔加入 0.2ml 1% 鸡红细胞悬液，混匀，置室温 30min，观察记录血凝滴度。以红细胞凝集(++)时为终点，以悬液稀释倍数表示其滴度。

2.3 试验结果及分析

(1) 流感病毒和副流感病毒对小鼠半数致死量的测定结果

试验组昆明种小鼠分别被滴鼻感染不同浓度流感病毒、副流感病毒液 30 μ L，感染第 3 天前 3 组(病毒浓度为 10^{-1} 组、 10^{-2} 组、 10^{-3} 组)小鼠均出现不同程度的发病症状：耸毛、发抖、饮食减少等；第 5 天小鼠出现走路摇摆不定；第 6 天最高病毒浓度组小鼠开始出现死亡，其余各组于感染后第 7 天陆续出现死亡现象。观察 14 天结束后，统计各组小鼠死亡数目，结果见下表 1-4、1-5。计算该流感病毒的 LD₅₀ 为稀释度 $10^{-2.9}$ ，副流感病毒的 LD₅₀ 为稀释度 $10^{-2.5}$ 。

表 1-4 流感病毒半数致死量试验结果统计

流感病毒组	死亡累计	存活累计	死亡累计率
10-1 组	9	1	90%
10-2 组	7	3	70%
10-3 组	4	6	40%
10-4 组	3	7	30%
10-5 组	1	9	10%
空白组	0	10	0%

Karber 法计算病毒的 LD₅₀。流感病毒的 LogLD₅₀ 如下：

$$\text{LogLD}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2} d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0.5 - (80\% + 60\% + 40\% + 20\% + 0\% + 0\%) = -2.9$$

表 1-5 副流感病毒半数致死量试验结果统计

副流感病毒组	死亡累计	存活累计	死亡累计率
10-1 组	8	2	80%
10-2 组	6	4	60%
10-3 组	4	6	40%
10-4 组	2	8	20%
10-5 组	0	10	0%
空白组	0	10	0%

Karber 法计算病毒的 LD₅₀。副流感病毒的 LogLD₅₀ 如下：

$$\text{LogLD}_{50} = \text{XM} + \frac{1}{2}d - d \frac{\sum P_i}{100} = -1 + 0.5 - (90\% + 70\% + 40\% + 30\% + 10\% + 0\%) = -2.5$$

(2)连翘苷/连翘脂素组合物抗流感病毒和副流感病毒感染所致肺炎的作用结果

① 肺指数测定

流感病毒和副流感病毒感染小鼠后，平均肺指数结果显示：与感染模型组比较，正常对照组、连翘苷组13.0mg/kg/d、连翘脂素组16.0mg/kg/d、连翘苷/连翘脂素组合物1和2的3个剂量组（低剂量组3.25mg/kg/d、中剂量组6.5mg/kg/d、高剂量组13.0mg/kg /d）、利巴韦林组及磷酸奥司他韦组的肺指数明显降低(P<0.05或P<0.01)；其中，连翘苷/连翘脂素组合物在3.25~13.0mg/kg/d浓度范围内有明显保护作用，肺指数均明显降低、对肺组织病变指数的抑制率，其疗效明显优于优于与连翘苷组、连翘脂素组(P<0.01或P<0.05)，结果见表1-6、1-7。

表 1-6 连翘苷/连翘脂素组合物对流感病毒感染小鼠肺指数的抑制率(n=3)

组 别		药物剂量 (mg/kg/d)	肺指数 ($\bar{X} \pm S$)	肺指数 抑制率(%)	P 值	P 值
正常对照组		0	1.274±0.102	——		
病毒对照组		0	1.488±0.084	——		
利巴韦林组		58.5	1.281±0.061	13.90	*<0.05	
磷酸奥司他韦组		19.5	1.178±0.066	19.84	**<0.01	
连翘苷组		13.0	1.280±0.040	14.00	*<0.05	
连翘脂素组		13.0	1.302±0.046	12.51	*<0.05	
连翘苷/连 翘脂素组 合物 1	高剂量组	13.0	1.049±0.056	29.52	**<0.01	##▲▲<0.01
	中剂量组	6.5	1.129±0.041	24.15	**<0.01	▲#<0.05
	低剂量组	3.25	1.184±0.039	20.40	**<0.01	▲#<0.05
连翘苷/连 翘脂素组 合物 2	高剂量组	13.0	1.070±0.056	28.10	**<0.01	##▲▲<0.01
	中剂量组	6.5	1.131±0.041	24.00	**<0.01	▲#<0.05
	低剂量组	3.25	1.197±0.039	19.56	**<0.01	▲#<0.05

各试验组病毒对照组比较，*P<0.05，**P<0.01；连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷比较，[#]P<0.05，^{##}P<0.01；连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素比较，[▲]P<0.05，^{▲▲}P<0.01。

表 1-7 连翘苷/连翘脂素组合物对副流感病毒感染小鼠肺指数的抑制率(n=3)

组 别		药物剂量 (mg/kg/d)	肺指数 ($\bar{X} \pm S$)	肺指数 抑制率(%)	P 值	P 值
正常对照组		0	1.305±0.031	——		
病毒对照组		0	1.591±0.062	——		
利巴韦林组		58.5	1.340±0.065	15.76	*<0.05	
磷酸奥司他韦组		19.5	1.243±0.054	21.85	*<0.01	
连翘苷组		13.0	1.335±0.062	16.10	*<0.01	
连翘脂素组		13.0	1.357±0.050	14.69	*<0.01	
连翘苷/连 翘脂素组 合物 1	高剂量组	13.0	1.068±0.058	32.87	*<0.01	##▲▲<0.01
	中剂量组	6.5	1.143±0.065	28.13	*<0.01	▲▲<0.05
	低剂量组	3.25	1.177±0.044	26.01	*<0.01	▲#<0.05
连翘苷/连	高剂量组	13.0	1.101±0.058	30.79	*<0.01	##▲▲<0.01

翘脂素组合 物 2	中剂量组	6.5	1.158±0.065	27.22	*<0.01	#▲▲<0.05
	低剂量组	3.25	1.188±0.044	25.30	*<0.01	#▲<0.05

各试验组病毒对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合与连翘苷比较, #P<0.05, ##P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合与连翘脂素比较, ▲P<0.05。

② 肺悬液病毒血凝滴度测定

流感病毒和副流感病毒感染小鼠后, 感染模型组肺组织病毒血凝滴度(InX)分别为32.40和33.11, 不同浓度连翘脂素/连翘苷组合1和2用药治疗5天后, 肺组织病毒血凝滴度均有所下降, 与感染模型组比较, 差异有显著性(P<0.01), 且它们的不同剂量组对流感、副流感病毒血凝滴度均明显低于连翘苷组、连翘脂素组(P<0.05~P<0.001), 表明组合物具有协同增效作用, 其对病毒繁殖的抑制率均明显高于连翘苷组、连翘脂素组(P<0.05~P<0.001) 其中, 连翘苷/连翘脂素组合1和2的高、中、低剂量组对流感病毒感染小鼠肺悬液血凝滴度的抑制率均显著高于连翘苷组、连翘脂素组(P<0.01~P<0.001)。上述试验结果详见表1-8、1-9。

表 1-8 连翘苷/连翘脂素组合物对流感病毒感染小鼠肺悬液血凝滴度的影响(n=3)

组 别	药物剂量 (mg/kg/d)	血凝滴度 (InX)	抑制率 (%)	P 值	P 值	
正常对照组	0	0				
病毒对照组	0	32.40±1.105				
利巴韦林组	58.5	21.91±1.050	32.39	* <0.01		
磷酸奥司他韦组	19.5	20.50±1.123	36.73	* <0.01		
连翘苷组	13.0	22.06±1.120	31.90	* <0.01		
连翘脂素组	13.0	22.61±1.059	30.22	* <0.01		
连翘苷/连翘脂素组合物 1	高剂量组	13.0	17.70±0.618	45.36	* <0.01	###▲▲▲ <0.001
	中剂量组	6.5	19.21±0.450	40.72	* <0.01	##▲▲ <0.01
	低剂量组	3.25	20.71±1.439	36.08	* <0.01	#▲ <0.05
连翘苷/连翘脂素组合物 2	高剂量组	13.0	17.70±0.618	45.36	* <0.01	###▲▲▲ <0.001
	中剂量组	6.5	19.21±0.450	40.72	* <0.01	##▲▲ <0.01
	低剂量组	3.25	20.71±1.439	36.08	* <0.01	#▲ <0.05

表 1-9 连翘苷/连翘脂素组合物对副流感病毒感染小鼠肺悬液血凝滴度的影响(n=3)

组 别	药物剂量 (mg/kg/d)	血凝滴度 (InX)	抑制率 (%)	P 值	P 值	
正常对照组	0	0				
病毒对照组	0	33.11±1.210				
利巴韦林组	58.5	23.22±1.091	29.86	* <0.05		
磷酸奥司他韦组	19.5	22.05±1.055	33.40	* <0.01	# <0.05	
连翘苷组	13.0	23.17±1.059	30.01	* <0.01	# <0.05	
连翘脂素组	13.0	23.79±1.072	28.15	* <0.01	# >0.05	
连翘苷/连翘脂素组合物 1	高剂量组	13.0	17.38±0.955	47.50	* <0.01	###▲▲▲ <0.001
	中剂量组	6.5	19.04±0.501	42.49	* <0.01	##▲▲▲ <0.01
	低剂量组	3.25	20.36±0.824	38.52	* <0.01	##▲▲ <0.01
连翘苷/连翘脂素组合物 2	高剂量组	13.0	17.97±0.955	45.73	* <0.01	###▲▲▲ <0.001
	中剂量组	6.5	19.69±0.501	40.52	* <0.01	##▲▲▲ <0.01
	低剂量组	3.25	20.81±0.824	37.15	* <0.01	##▲▲ <0.01

表 1-8 和 1-9 中, 各试验组病毒对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷比

较, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01, ^{###}P<0.001; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素比较, [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01, ^{▲▲▲}P<0.001。

试验例 2 连翘苷/和连翘脂素组合物解热、抗炎试验

1.1 试验材料

(1) **试验动物** Wistar 大鼠, 体重 120~250g, 雌雄兼用, 合格证号: 医动字第 13-1225; 日本大耳白兔, 雄性, 体重 1.5~2.0kg。合格证号: 医动字第 10-5115, 均由长春高新医学动物实验中心供给, 动物饲料由吉林大学实验动物部供给。

(2) 试验药品

① 连翘苷, 白色粉末, 大连富生天然药物开发有限公司生产, 经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定, 其纯度为 99.5%, 并用中国药品生物制品含量测定用连翘苷对照品标定和确认其含量为 99.5%;

② 连翘脂素, 白色粉末, 大连富生天然药物开发有限公司生产, 经高效液相色谱两种检测器紫外检测器和蒸发光散射检测器面积归一化法测定, 其纯度为 99.1%;

③ 连翘苷/连翘脂素组合物: 白色粉末, 大连富生天然药物开发有限公司生产。由连翘苷与连翘脂素两种单体配比而成, 用 99.5%连翘苷和 99.1%连翘脂素作为对照品进行标定, 连翘苷/连翘脂素组合物中两种单体成分含量均为 98%, 其中连翘苷/连翘脂素组合物 1 中连翘苷与连翘脂素的重量比 98: 2, 连翘苷/连翘脂素组合物 1 中连翘苷与连翘脂素的重量比 80: 20。

1.2 主要仪器与试剂

YLS-7A 大鼠足趾肿胀测量仪: 山东省医学科学院设备站; 722 可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司生产; 便携式数字测温仪: 型号 WSC-411P, 上海浦东三厂; 毛果芸香碱: 天津市人民制药厂, 批号: 20130112; 组胺: 上海生化所, 批号: 20130115; 5-羟色胺: 上海生化所, 批号: 20130623; 伊文思蓝: 上海化学试剂采购供应站, 批号: 20130217; 扑尔敏片: 长春经济开发区药业有限公司, 批号: 20130801; 角叉菜胶: 吉林省药物研究所, 批号: 20130502; 扑热息痛片: 辽源市百康药业有限责任公司, 批号: 20130512; 阿司匹林片: 白城万达药业有限公司, 批号: 20130305; 啤酒酵母: 北京奥博星生物技术责任有限公司, 批号: 2013020; 伤寒、副伤寒疫苗: 长春生物制品研究所, 批号: 20130216。

1.3 统计处理

统计分析采用两样本比较的秩和检验、 χ^2 检验及 t 检验。

2.1 连翘苷/连翘脂素组合物对大鼠足跖部汗液分泌影响试验(着色法)

(1) 材料与方法

本试验根据大鼠足跖部肉垫上有汗腺分布, 其汗液分泌的多少可利用碘与淀粉遇汗液即可产生紫色反应的机理, 观测汗液分泌的变化。

试验取 Wistar 大鼠 500 只, 雌雄各半, 体重 120~150g。按体重、性别随机分为 50 组, 即: 对照(0.5%羧甲基纤维素)组, 连翘苷组、连翘脂素组、连翘苷/连翘脂素组合物组 1 和 2 的低、中、高剂量组(分别为 2.5、5、10mg/kg)及阳性药毛果芸香碱(35mg/kg)组, 每组 10 只, 每次试验 10 组, 共 5 个时间段的试验

(1、5、10、15、20min)。将大鼠置入自制的大鼠固定袋内，暴露双后肢。用棉签蘸取无水乙醇将其右足跖部污物轻轻擦洗干净。除毛果芸香碱溶液皮下注射外，其余各组均采用灌胃方式给药。给药后 1h(毛果芸香碱组于给药后 30min)，先将各组大鼠右足跖原有的和由于挣扎时所造成的汗液用干棉签轻轻拭干，涂上和田-高垣氏试剂 A 液(取碘 2g 溶于 100ml 无水乙醇)，待充分干燥后，再薄薄涂上和田-高垣氏试剂 B 液(取可溶性淀粉 50g、蓖麻油 100ml 均匀混合)。分别于涂 B 液后 1、5、10、15 及 20min 用放大镜仔细观察深紫色着色点(即汗点)出现的颜色和数量。试验结束后，按两样本比较的秩和检验进行统计学处理，比较各组间的差异。

(2)结果

与对照组比较，连翘苷/连翘脂素组合物的中、高剂量组（5、10mg/kg）于涂 B 液后 10、15 及 20min 对大鼠足跖部汗液分泌均有明显促进作用($p<0.05$)，连翘苷/连翘脂素组合物的 2.5mg/kg 组于涂 B 液后 15 及 20min 对大鼠足跖部汗液分泌均有明显促进作用($p<0.05$)，它们的发汗作用与阳性药毛果芸香碱相当，且具有缓缓促进大鼠足跖部汗液分泌的作用特点。连翘苷/连翘脂素组合物高剂量组于涂 B 液后 10、15、20min 后对大鼠足跖部汗液分泌的促进作用明显优于连翘苷和连翘脂素($p<0.05$)，连翘苷/连翘脂素组合物中剂量组于涂 B 液后 10、15min 后对大鼠足跖部汗液分泌的促进作用明显优于连翘苷和连翘脂素($p<0.05$)，连翘苷/连翘脂素组合物低剂量组于涂 B 液后 15min 后对大鼠足跖部汗液分泌的促进作用明显优于连翘苷和连翘脂素($p<0.05$)。上述试验结果，表明连翘苷/连翘脂素组合物促进大鼠足跖部汗液分泌的作用明显优于连翘苷和连翘脂素，详见 2-1、2-2、2-3、2-4、2-5。

表 2-1 连翘苷/连翘脂素组合物对正常大鼠足跖部汗液分泌的影响(着色法)

组 别	动物数 (只)	涂 B 液后 1 分各等级汗点动物数(只)					P 值
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	2	2	3	2	1	
连翘苷	10	0	2	2	2	4	>0.05
连翘脂素	10	0	1	3	3	3	>0.05
毛果芸香碱 35.0mg/kg	10	0	1	3	1	5	>0.05
连翘苷/连翘 脂素组合物 1							
2.5mg/kg	10	0	2	2	1	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	2	2	1	5	>0.05
10.0mg/kg	10	0	2	2	1	5	>0.05
连翘苷/连翘 脂素组合物 2							
2.5mg/kg	10	0	3	2	0	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	3	1	1	5	>0.05
10.0mg/kg	10	0	3	1	1	5	>0.05

表 2-2 连翘苷/连翘脂素组合物对正常大鼠足跖部汗液分泌的影响(着色法)

组 别	动物数 (只)	涂 B 液后 5 分各等级汗点动物数(只)					P 值
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	0	4	1	4	1	
连翘苷	10	0	1	2	2	5	>0.05
连翘脂素	10	0	1	3	2	4	>0.05
毛果芸香碱 35.0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0.05*
连翘苷/连翘脂素组合 1							
2.5mg/kg	10	0	0	1	4	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	1	1	3	5	>0.05
10.0mg/kg	10	0	1	3	2	5	>0.05
连翘苷/连翘脂素组合 2							
2.5mg/kg	10	0	2	2	1	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	1	2	2	5	>0.05
10.0mg/kg	10	0	1	3	2	5	>0.05

表 2-3 连翘苷/连翘脂素组合对正常大鼠足跖部汗液分泌的影响(着色法)

组 别	动物数 (只)	涂 B 液后 10 分各等级汗点动物数(只)					P 值
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	0	3	2	4	1	
连翘苷	10	0	1	1	3	5	>0.05
连翘脂素	10	0	1	3	1	5	>0.05
毛果芸香碱 35.0mg/kg	9	0	0	2	1	6	<0.05*
连翘苷/连翘脂素组合 1							
2.5mg/kg	10	0	0	1	4	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	2	1	1	6	<0.05* ^{#▲}
10.0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0.05* ^{#▲}
连翘苷/连翘脂素组合 2							
2.5mg/kg	10	0	0	2	3	5	>0.05
5.0mg/kg	10	0	3	0	1	6	<0.05* ^{#▲}
10.0mg/kg	10	0	1	1	1	6	<0.05* ^{#▲}

表 2-4 连翘苷/连翘脂素组合对正常大鼠足跖部汗液分泌的影响(着色法)

组 别	动物数 (只)	涂 B 液后 15 分各等级汗点动物数(只)					P 值
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	0	3	2	4	1	
连翘苷	10	0	1	2	4	5	<0.05*
连翘脂素	10	0	1	1	3	5	>0.05
毛果芸香碱 35.0mg/kg	9	0	0	2	1	6	<0.05*
连翘苷/连翘脂素组合 1							

2. 5mg/kg	10	0	2	1	1	6	<0. 05*▲
5. 0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0. 05*▲
10. 0mg/kg	10	0	0	3	1	6	<0. 05*#▲
连翘苷/连翘脂素组合物 2							
2. 5mg/kg	10	0	3	0	1	6	<0. 05*▲
5. 0mg/kg	10	0	2	1	1	6	<0. 05*▲
10. 0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0. 05*#▲

表 2-5 连翘苷/连翘脂素组合物对正常大鼠足跖部汗液分泌的影响(着色法)

组 别	动物数 (只)	涂 B 液后 20 分各等级汗点动物数(只)					P 值
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	0	3	2	4	1	
连翘苷	10	0	0	4	0	6	<0. 05*
连翘脂素	10	0	0	1	4	5	<0. 05*
毛果芸香碱							
35. 0mg/kg	9	0	0	2	1	6	<0. 05*
连翘苷/连翘脂素组合物 1							
2. 5mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0. 05*
5. 0mg/kg	10	0	0	3	1	6	<0. 05*
10. 0mg/kg	10	0	0	2	2	6	<0. 05*#▲
连翘苷/连翘脂素组合物 2							
2. 5mg/kg	10	0	2	1	1	6	<0. 05*
5. 0mg/kg	10	0	1	2	1	6	<0. 05*
10. 0mg/kg	10	0	0	2	2	6	<0. 05*#▲

汗点等级评定标准:

“-” 大鼠足跖肉垫表面无汗点;“+” 大鼠足跖肉垫表面偶见汗点,汗点面积约占足跖表面的 10%以下;“++” 大鼠足跖肉垫表面散在分布汗点,汗点面积约占足跖表面的 11-40%;“+++” 大鼠足跖肉垫表面多处分布汗点,汗点面积约占足跖表面的 41-70%;“++++” 大鼠足跖肉垫表面均匀分布汗点,汗点面积约占足跖表面的 71%以上。

各试验组病毒对照组比较, *P<0. 05; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷比较, #P<0. 05; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素比较, ▲P<0. 05。

2. 2 连翘苷/连翘脂素组合物对大鼠足跖部汗液分泌的影响(组织形态观察法)

(1)材料与方法

本试验根据大鼠汗腺兴奋时,除汗液分泌增加外,汗腺上皮细胞内的形态也随之改变。光学显微镜下可见汗腺上皮细胞空胞数目增多、扩大。这种扩大的空泡在电子显微镜下则是汗腺上皮细胞内线粒体肿胀、破裂,融合和分泌小泡扩大,通过对大鼠足跖部汗腺上皮组织形态学观察,即可了解汗腺的分泌活动。

试验取 Wistar 大鼠 300 只,雌雄各半,体重 120~160g。按体重、性别随机分为 30 组,即:对照组(0. 5%羧甲基纤维素) 连翘脂素、连翘苷、连翘苷/连翘脂素组合物 1 和 2 分别分为低、中、高(2. 5、5、10mg/kg) 剂量组及阳性药毛果芸香碱(35mg/kg)组,每组 10 只,每组试验 3 次。除毛果芸香碱溶液皮下注射给药外,其余各组均采用灌胃方式给药。对照组给予 0. 5%羧甲基纤维素 1h 后、阳性药组给予毛果芸香碱 30min 后,以及连翘苷、连翘脂素、连翘苷/连翘脂素组合物均给药后 1h,于齐踝关节处瞬时截断右

后肢，随即取下右足跖部肉垫，置 10% 甲醛溶液中，按常规方法固定、脱水、包埋、切片、HE 染色，光学显微镜下观察各组大鼠足跖部汗腺上皮细胞内变化，主要观察空泡发生率，并通过 χ^2 检验进行统计学处理，比较各组间的差异。上述试验重复 3 次。

空泡发生百分率 = 空泡汗腺数/观察汗腺数×100%

(2) 结果

与对照组比较，连翘苷/连翘脂素组合物 1 和 2 的 2.5、5、10mg/kg 组对大鼠足跖部汗液分泌均有极显著的促进作用 ($p<0.001$)；其中，它们的低、中、高剂量组 (2.5、5、10mg/kg) 的疗效显著优于连翘苷及连翘脂素 ($p<0.001$ 或 $p<0.01$)，表明连翘苷/连翘脂素组合物具有协同增效作用。试验结果详见表 2-6；

表 2-6 连翘苷/连翘脂素组合物对大鼠足跖部 汗液分泌的影响 (组织形态观察法，n=3)

组 别	动物数 (只)	观察汗腺数 (个)	空泡汗腺数 (个)	空泡率 (%)
对照组	10	242	14	5.78
连翘苷	10	209	86	22.15**
连翘脂素	10	212	79	20.26**
毛果芸香碱 35.0mg/kg	10	208	57	27.40***
连翘苷和连翘脂素的组合物 1				
2.5mg/kg	10	221	25	30.31****▲▲
5.0mg/kg	10	213	73	34.27****▲▲▲
10.0mg/kg	10	207	85	41.63****▲▲▲
连翘苷和连翘脂素的组合物 2				
2.5mg/kg	10	225	66	29.30****▲▲
5.0mg/kg	10	219	69	31.51****▲▲▲
10.0mg/kg	10	208	85	40.86****▲▲▲

与对照组比较，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ；连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷比较，## $p<0.01$ ，### $p<0.001$ ；连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素比较，▲▲ $p<0.01$ ，▲▲▲ $p<0.001$ ；

2.3 连翘苷/连翘脂素组合物对啤酒酵母致大鼠发热的影响

(1) 材料与方法

雄性 Wistar 大鼠，体重 180~200g。试验前分别用 WSC-411P 型便携式数字测温仪测量正常肛温 2 次 (每次间隔一定时间)，取两次测量的平均值作为大鼠的正常体温。然后选体温在 36.5~38℃ 的大鼠 300 只，按体重随机分为 30 组：模型组 (0.5% 羧甲基纤维素)，连翘苷/连翘脂素组合物 1、2 组分别分为低、中、高 (2.5、5、10mg/kg) 剂量组、连翘苷组 (13mg/kg)、连翘脂素组 (13mg/kg) 及阳性药扑热息痛 (100mg/kg) 组，每组 10 只，每组重复试验 3 次。各组大鼠均背部皮下注射 10% 鲜啤酒酵母混悬液 10ml/kg 致热。给 10% 鲜啤酒酵母混悬液 6.0h 后，连翘脂素和连翘苷的组合物及扑热息痛均灌胃给药，模型组灌胃等体积 0.5% 羧甲基纤维素。分别于给药后 1、2、3 及 4h 测量肛温。观察体温变化情况，并通过解热百分率进行组间 t 检验处理，比较各组间的差异。上述试验共重复 3 次。

$$\text{解热百分率} = \frac{\text{药后某时刻体温} - \text{致热后 6h 体温}}{\text{致热后 6h 体温}} \times 100\%$$

(2) 结果

各组大鼠皮下注射 10% 鲜啤酒酵母混悬液 6h 后, 体温升高均在 1.5℃ 左右, 与致热前比较差异显著 ($p < 0.001$), 表明啤酒酵母致大鼠发热模型建立成功。与模型组比较, 连翘苷/连翘脂素组合物 1 和 2 的中、高剂量组于药后 1、2、3 及 4h, 以及低剂量组于药后 2、3 及 4h 对啤酒酵母混悬液所致大鼠发热均有明显的降温作用 ($p < 0.05 \sim p < 0.001$); 同时, 连翘苷/连翘脂素组合物 1 和 2 的不同剂量组的降温疗效极显著优于连翘苷组、连翘脂素组 ($p < 0.001$ 或 $p < 0.01$), 表明它们具有明显协同增效作用。上述试验结果见表 2-7。

2.4 连翘苷/连翘脂素组合物对伤寒、副伤寒疫苗致家兔发热的影响

(1) 材料与方法

雄性日本大耳白兔, 体重 1.5~2.0kg。试验前分别用 WSC-411P 型便携式数字测温仪测量正常肛温 2 次, 取均值作为正常体温。然后选体温在 38~39.6℃ 的日本大耳白兔 198 只, 按体重随机分为 33 组, 即: 空白对照(生理盐水)组, 模型对照(0.5% 羧甲基纤维素)组, 连翘苷/连翘脂素组合物 1、2 组分为低、中、高 (1.25、2.5、5mg/kg) 剂量组、连翘苷组、连翘脂素组及阳性药扑热息痛(50mg/kg)组。每组 6 只大白兔, 各试验均重复 3 次。将兔置固定器内固定。空白对照组由耳缘静脉注射生理盐水 1ml/kg; 模型对照组和各药物组耳缘静脉注射伤寒、副伤寒疫苗 0.8ml/kg。待兔体温升高超过 1℃ 时(约需 1~1.5h, 本实验限定在 1h), 空白对照组和模型组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素 1ml/kg, 给药组灌胃连翘脂素和连翘苷的组合物和扑热息痛。于药后 30、60、90、120、180 及 240min 测量肛温, 观察体温变化情况, 并通过解热百分率进行组间 t 检验处理, 比较各组间的差异。

$$\text{解热百分率} = \frac{\text{药后某时刻体温} - \text{致热后 1h 体温}}{\text{致热后 1h 体温}} \times 100\%$$

(2) 结果

家兔耳缘静脉注射伤寒、副伤寒疫苗 1h 后, 体温升高在 1℃ 左右, 表明伤寒、副伤寒疫苗可制备家兔发热模型。与空白对照组比较, 模型组的体温在 300min 观察期内持续升高 ($p < 0.05 \sim p < 0.001$), 与模型组比较, 连翘苷/连翘脂素组合物的高、中、低剂量组于药后 30~240min、60~240min、90~240min 对伤寒、副伤寒疫苗所致家兔发热有明显的解热作用 ($p < 0.05 \sim p < 0.001$), 且它们的疗效也明显优于连翘苷组、连翘脂素组 ($p < 0.01$), 表明连翘苷/连翘脂素组合物具有明显的协同增效作用。上述试验结果见表 2-8。

2-5 连翘苷/连翘脂素组合物对角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀影响

(1) 材料与方法

取体重 120~150g 的雄性 Wistar 大鼠 70 只, 按体重随机分为 7 组, 即: 空白对照(0.5% 羧甲基纤维素钠)组, 连翘苷/连翘脂素组合物 1 组分为低、中、高 (2.5、5 及 10mg/kg) 剂量组、连翘苷组、连翘脂素组及阳性药阿司匹林(200mg/kg)组, 每组 10 只。实验各组均采用舌下静脉注射方式给药。实验前用毛细管放大测量法测定各组大鼠右后足的正常体积。为避免误差, 应固定测量位置, 给药前后均由 1 人操作。取两次测量的平均值作为给药前大鼠右后足的正常体积。给药后立即在大鼠右后肢足跖皮下注射 1% 角叉菜胶 0.1ml 致炎。

测定致炎后 15、30、60、120、180、240、300 及 360min 的右后足跖体积。并通过大鼠致炎前后足跖体积的差值百分率(肿胀率)进行组间 t 检验处理, 比较各组间的差异。

$$\text{肿胀率}(\%) = \frac{\text{致炎后右后足跖体积} - \text{给药前右后足跖体积}}{\text{给药前右后足跖体积}} \times 100\%$$

结果

与空白对照组比较, 连翘苷/连翘脂素组合物的低剂量组(10mg/kg)给药后于 15min 至 360min 内、连翘苷/连翘脂素组合物的中剂量组(5mg/kg)、低剂量组(2.5mg/kg)均于给药后 30min 至 360min 内均对角叉菜胶所致大鼠足跖肿胀均有明显的抑制作用($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 其疗效明显优于连翘苷 10mg/kg 组及连翘脂素 10mg/kg 组($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 且上述组合物的各剂量组在给药后 60min、240min 的疗效皆极显著优于连翘脂素组($p < 0.01$)。以上试验结果表明, 连翘苷/连翘脂素组合中连翘苷与连翘脂素组合使用具有明显的协同增效作用, 详见表 2-9。

表 2-7 连翘苷/连翘脂素组合物对家兔伤寒、副伤寒菌苗发热体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	正常	致热后 6h	体温 (°C)			
			1	2	3	4
模型对照组	37.72±0.90	39.30±0.54	39.44±0.58	39.42±0.47	38.88±0.46	38.57±0.49
扑热息痛		4.22±2.11 ^{###}	0.37±1.66	0.31±1.77	-1.07±1.54	-1.86±1.20
100mg/kg	37.55±0.70	39.48±0.62	38.66±0.59	38.19±0.59	37.98±0.19	37.84±0.32
连翘苷		5.14±1.42 ^{###}	-2.07±0.54 ^{**}	-3.27±0.77 ^{***}	-3.80±1.43 ^{***}	-4.15±1.59 ^{***}
10mg/kg	37.58±0.59	39.53±0.63	39.13±0.52	38.77±0.42	38.63±0.40	38.46±0.31
连翘脂素		5.18±1.52 ^{###}	-0.60±0.39	-0.92±0.93 ^{**}	-1.29±1.18 [*]	-1.70±1.23 [*]
10mg/kg	37.50±0.59	39.44±0.47	39.31±0.48	39.04±0.45	38.91±0.40	38.70±0.31
连翘苷/连翘脂素组合物 1		5.17±1.37 ^{###}	-0.33±0.41	-0.69±0.93 [*]	-1.03±1.18 [*]	-1.55±1.23 [*]
2.5mg/kg	37.33±0.51	39.23±0.63	38.86±0.47	38.20±0.44	37.85±0.52	38.52±0.59
5.0mg/kg	37.41±0.55	39.37±0.41	-0.95±1.02 [▲]	-1.70±1.11 [▲]	-2.61±1.65 ^{**△▲}	-3.45±1.88 ^{**△▲}
10.0mg/kg	37.53±0.59	39.54±0.62	38.61±0.52	38.46±0.55	38.22±0.32	37.84±0.41
连翘苷/连翘脂素组合物 2		5.25±1.25 ^{###}	-1.92±0.42 ^{**△▲}	-2.31±0.57 ^{**△▲}	-2.93±0.36 ^{**△▲}	-3.93±0.50 ^{***△▲▲}
2.5mg/kg	37.64±0.42	39.60±0.63	38.69±0.57	37.72±0.40	37.27±0.42	37.08±0.35
5.0mg/kg	37.47±0.63	39.47±0.43	-2.16±0.51 ^{**△▲▲}	-2.85±0.93 ^{**△▲▲}	-3.66±1.18 ^{**△▲▲}	-4.16±1.23 ^{**△▲▲}
10.0mg/kg	37.55±0.76	39.48±0.67	39.26±0.47	38.97±0.41	38.59±0.35	38.30±0.50
		5.13±1.50 ^{###}	-0.87±1.12 [▲]	-1.59±1.18 [▲]	-2.54±1.32 ^{**△▲}	-3.29±1.81 ^{**△▲}
			38.76±0.56	38.57±0.52	38.35±0.40	37.95±0.38
			-1.80±0.50 ^{**△▲}	-2.27±0.50 ^{**△▲}	-2.84±0.31 ^{**△▲}	-3.85±0.44 ^{***△▲▲}
			38.71±0.49	38.39±0.48	38.24±0.37	37.90±0.31
			-1.95±0.58 ^{**△▲▲}	-2.76±0.85 ^{**△▲▲}	-3.15±1.10 ^{**△▲▲}	-4.00±1.12 ^{**△▲▲}

与模型对照组比较 *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001;

与正常(致热前)比较^{###}p<0.001。连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷解热百分率比较, [△]p<0.05; ^{△△}p<0.01; ^{△△△}p<0.001; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素解热百分率比较, [▲]p<0.05; ^{▲▲}p<0.01; ^{▲▲▲}p<0.001。

表 2-8 连翘苷/连翘脂素组合物对家兔伤寒、副伤寒菌苗发热体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	正 常	致热后 1h	体 温 (°C)					
			30	60	90	120	180	240
空白对照组	39.47±0.25	39.50±0.21	39.56±0.24	39.45±0.20	39.54±0.22	39.49±0.23	39.56±0.27	39.59±0.26
(%)		0.15±0.25	0.15±0.25	-0.13±0.15	0.11±0.14	-0.02±0.10	0.15±0.24	0.23±0.08
模型对照组	39.68±0.54	41.10±0.51 ^{###}	41.23±0.52	41.27±0.52 ^{##}	41.22±0.52 [#]	41.21±0.51 [#]	40.95±0.48 ^{##}	40.49±0.57 ^{###}
(%)		3.60±1.03	0.32±0.28	0.41±0.19	0.28±0.15	0.26±0.29	-0.36±0.22	-1.48±0.25
扑热息痛								
50mg/kg	39.53±0.49	40.09±0.41 ^{###}	40.53±0.65 ^{***}	40.10±0.49 ^{***}	39.83±0.58 ^{***}	39.72±0.56 ^{***}	39.61±0.41 ^{***}	39.53±0.47 ^{***}
(%)		3.71±0.27	-1.14±0.56	-2.18±0.17	-2.83±0.15	-3.11±0.20	-3.38±0.22	-3.58±0.38
连翘苷								
5.2mg/kg	39.59±0.30	40.98±0.23 ^{###}	40.83±0.26	40.58±0.21	40.43±0.22	40.37±0.27	40.16±0.23	39.92±0.25
(%)		3.52±0.41	-0.37±0.15	-0.61±0.12	-0.97±0.27	-1.13±0.14 ^{**}	-1.65±0.12 ^{**}	-2.22±0.11 ^{***}
连翘脂素								
5.2mg/kg	39.63±0.30	41.10±0.24 ^{###}	41.06±0.26	40.86±0.21	40.74±0.22	40.65±0.27	40.49±0.23	40.30±0.25
(%)		3.71±0.41	-0.10±0.11	-0.49±0.10	-0.77±0.22	-1.00±0.18 ^{**}	-1.39±0.17 ^{**}	-1.85±0.15 ^{**}
连翘苷/连翘脂素组合物 1								
1.3mg/kg	39.56±0.21	41.13±0.47 ^{###}	41.94±0.49	41.52±0.42	41.36±0.33	41.13±0.46	40.94±0.33	40.61±0.31
(%)		3.99±0.52	-0.46±0.18	-0.90±0.12	-1.29±0.27 ^{**}	-1.83±0.34 ^{**}	-2.30±0.46 ^{***}	-3.08±0.25 ^{***}
2.6mg/kg	39.72±0.29	41.23±0.35 ^{###}	40.88±0.32	40.43±0.38	40.21±0.23	39.94±0.25	39.73±0.26	39.35±0.22
(%)		3.79±0.46	-0.85±0.02	-1.09±0.03 ^{**}	-1.65±0.19 ^{***}	-2.30±0.44 ^{***}	-2.82±0.22 ^{***}	-3.75±0.31 ^{***}
5.2mg/kg	39.77±0.30	41.17±0.23 ^{###}	40.75±0.26	40.03±0.21	39.85±0.22	39.58±0.27	39.32±0.23	38.99±0.25
(%)		3.51±0.41	-1.02±0.15 ^{**}	-1.77±0.12 ^{**}	-2.21±0.27 ^{***}	-2.93±0.14 ^{***}	-3.50±0.12 ^{***}	-4.33±0.11 ^{***}
连翘苷/连翘脂素组合物 2								
1.3mg/kg	39.56±0.32	41.15±0.39 ^{###}	39.44±0.46	39.85±0.36	39.94±0.35	38.95±0.49	38.76±0.29	39.25±0.20
(%)		4.02±0.44	-0.29±0.10	-0.73±0.20	-0.95±0.29 ^{**}	-1.53±0.30 ^{**}	-2.02±0.30 ^{***}	-0.78±0.41 ^{***}
2.6mg/kg	39.72±0.25	41.24±0.40 ^{###}	39.50±0.38	39.40±0.31	39.20±0.32	38.92±0.29	38.71±0.12	38.48±0.32
(%)		3.83±0.41	-0.55±0.17	-0.81±0.09 ^{**}	-1.30±0.20 ^{**}	-2.01±0.44 ^{***}	-2.54±0.37 ^{***}	-3.11±0.24 ^{***}
5.2mg/kg	39.77±0.33	41.16±0.21 ^{###}	39.40±0.19	39.16±0.34	38.97±0.24	38.75±0.25	38.54±0.26	38.19±0.11
(%)		3.51±0.32	-0.94±0.23 ^{**}	-1.52±0.20 ^{**}	-2.00±0.21 ^{***}	-2.56±0.20 ^{***}	-3.10±0.18 ^{***}	-3.97±0.09 ^{***}

与模型对照组比较 *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; 与正常(致热前)比较^{###} p<0.001。

连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷解热百分率比较, [△]p<0.05; ^{△△}p<0.01。连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素解热百分率比较, [▲]p<0.05; ^{▲▲}p<0.01。

表 2-9 连翘苷/连翘脂素组合物对角叉采胶所致大鼠足肿胀的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	肿胀率(%)							
	15min	30min	60min	120min	180min	240min	300min	360min
对照组	18.7±12.6	28.9±14.6	33.8±10.5	46.5±18.2	46.7±15.3	48.8±21.9	49.1±14.6	47.4±15.5
阿司匹林								
100mg/kg	8.90±6.70*	15.6±12.2*	20.3±10.9*	21.6±12.1**	26.1±21.1**	26.1±16.3**	34.9±14.6*	31.9±12.2*
连翘苷								
10.0mg/kg	12.9 ±8.41	19.9±9.55	21.8±11.8*	28.9±14.0*	30.8±15.4*	29.9±11.1*	33.5±10.0*	32.2±11.9*
连翘脂素								
10.0mg/kg	14.9 ±6.13	21.9±9.72	27.1±13.5	30.7±10.2*	33.8±12.1*	31.0±11.3*	35.8±13.5*	36.4±10.2
连翘苷/和连翘脂素的组合物 1								
2.5mg/kg	13.6 ±8.40	24.2±16.3	20.1±14.8**	22.0±16.0**△	26.8±16.1**△	26.8±23.3**△	29.5±16.1**△	32.4±23.4**
5.0mg/kg	11.4 ±8.90	15.2±6.20*△	18.0±9.00*	19.7±12.1**△	22.0±14.9**△	24.2±12.0**△	27.8±13.1**△	30.0±16.0**△
10.0mg/kg	9.0 ±7.90*△	13.2±9.50*△	15.8±11.6**△	17.9±14.3**△	19.7±15.2**△	22.5±11.8**△	25.4±10.6**△	28.7±11.4**△
连翘苷/和连翘脂素的组合物 2								
2.5mg/kg	13.5 ±8.52	24.9±16.0	21.1±14.1**	23.1±16.5**△	27.4±15.6**△	27.7±23.7**△	30.4±16.9**△	33.1±22.8**
5.0mg/kg	12.4 ±8.71	16.0±6.15*△	19.5±9.55*	20.2±11.6**△	23.2±15.2**△	25.6±11.6**△	28.89±12.7**△	31.6±15.5**△
10.0mg/kg	9.9 ±7.80*△	13.9±9.61*△	16.9±12.2**△	18.2±14.8**△	20.5±15.9**△	23.8±12.0**△	26.1±11.3**△	29.8±11.9**△

与对照组相比 *p<0.05; **p<0.01;

连翘苷/连翘脂素组合物与连翘苷解热百分率比较, [△]p<0.05; ^{△△}p<0.01; 连翘苷/连翘脂素组合物与连翘脂素解热百分率比较, [△]p<0.05; ^{△△}p<0.01。

权利要求书

- 1、一种连翘苷/连翘脂素组合物在制备用于缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品中的应用。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其特征是所述病毒性疾病为流感病毒、副流感病毒、柯萨奇病毒 CoxA16、呼吸道合胞病毒 RSV、单纯带状疱疹病毒 HSV-I、单纯带状疱疹病毒 HSV-II、单纯带状疱疹病毒 CVB3、腺病毒 ADV 或肠道病毒 EV71 所致病毒性疾病。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征是所述连翘苷/连翘脂素组合物中连翘苷与连翘脂素的重量份配比为 80~98：2~20。
- 4、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征是所述连翘苷/连翘脂素组合物还包括药学上可接受的载体。
- 5、如权利要求 4 所述的应用，其特征是所述连翘苷/连翘脂素组合物中连翘苷与连翘脂素的总重量与药学上可接受的载体的重量之比为 1:1~1:100。
- 6、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征是所述连翘苷/连翘脂素组合物以连翘苷和连翘脂素以单体组成、或采用溶剂加热提取方法制备而成的连翘脂素-连翘苷提取组合物，或连翘脂素和连翘苷与环糊精或环糊精的衍生物组合而成连翘脂素-连翘苷-环糊精组合物。
- 7、如权利要求 4 所述的的应用，其特征是所述连翘脂素-连翘苷-环糊精组合物选择连翘脂素和连翘苷与 α -、 β -或 γ -环糊精或其衍生物相混合而成的混合物，或连翘脂素和连翘苷与 α -、 β -或 γ -环糊精或其衍生物经物理、化学方法处理形成的复合物。
- 8、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征是所述药物以片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、凝胶剂、霜剂、巴布剂、橡胶贴膏剂或贴膏剂形式存在。
- 9、一种缓解或/和治疗病毒性疾病的药物或保健品，其特征是含有连翘苷和连翘脂素。
- 10、如权利要求 9 所述的药物或保健品，其特征是所述连翘苷与连翘脂素的重量份配比为 80~98：2~20。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/094710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7048 (2006.01) i; A61K 31/34 (2006.01) i; A61P 31/16 (2006.01) i; A61P 31/22 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASE: WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA, EMBASE

KEY WORDS: Fructus Forsythiae, forsythin, forsythigenin, Forsythia Suspensa, virus, influenza virus, paramyxovirus, coxsackie virus, Respiratory Syncytial Viruses, Herpes zoster Virus, adenovirus, enterovirus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1748776 A (JIANXIN MEDICINE IND RES CO LTD) 22 March 2006 (22.03.2006) the whole document	1-10
X	CN 102210837 A (XIAO J) 12 October 2011 (12.10.2011) the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 March 2015	Date of mailing of the international search report 22 September 2015
--	---

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Zhicong Telephone No. (86-10) 62411129
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/094710

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1748776 A	22 March 2006	None	
CN 102210837 A	12 October 2011	None	

A. 主题的分类 A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 31/34(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; A61P 31/22(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类											
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: WPI, EPDOC, CNPAT, CNKI, CA, EMBASE 检索词: 连翘, 连翘苷, 连翘脂素, 病毒, 流感病毒, 副流感病毒, 柯萨奇病毒, 呼吸道合胞病毒, 单纯带状疱疹病毒, 单纯带状疱疹病毒, 单纯带状疱疹病毒, 腺病毒, 肠道病毒, Forsythia Suspensa, forsythin, phillygenin, virus											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 1748776 A (成都市健欣医药工业研究有限公司) 2006年 3月 22日 (2006 - 03 - 22) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102210837 A (肖嘉惠) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 1748776 A (成都市健欣医药工业研究有限公司) 2006年 3月 22日 (2006 - 03 - 22) 全文	1-10	A	CN 102210837 A (肖嘉惠) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
A	CN 1748776 A (成都市健欣医药工业研究有限公司) 2006年 3月 22日 (2006 - 03 - 22) 全文	1-10									
A	CN 102210837 A (肖嘉惠) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 全文	1-10									
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。 * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件											
国际检索实际完成的日期 2015年 3月 3日		国际检索报告邮寄日期 2015年 9月 22日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张志聪 电话号码 (86-10)62411129									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/094710

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	1748776	A	2006年 3月 22日	无	
CN	102210837	A	2011年 10月 12日	无	