

# 不同制备工艺对肺毒清体外抗病毒作用的影响

刘涛<sup>1</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 吴春梅<sup>1</sup>, 陆瑾<sup>3</sup>, 徐玉玲<sup>4\*</sup>

(1. 成都大学生物产业学院, 成都 610106; 2. 南京海陵中药制药工艺技术研究院有限公司, 南京 210049;  
3. 南京中医药大学中药复方分离工程重点实验室, 南京 210029;  
4. 成都大学实验技术中心, 成都 610106)

**[摘要]** 目的: 考察不同制备工艺对肺毒清处方药物体外抗病毒作用的影响。方法: 采用体外抗病毒法对比肺毒清的水提取物(A)、水醇提取物(D)、水提醇沉物(B)及水提醇沉物的正丁醇萃取物(C)的抗病毒作用。结果: 样品D在1 250 mg·L<sup>-1</sup>下能完全抑制甲1型和甲3型流感病毒, 250 mg·L<sup>-1</sup>样品A在60%细胞毒性下能完全抑制甲1型及甲3型流感病毒, 其他样品对其他呼吸道病毒均无抑制作用, 且样品D的体外抗病毒作用较样品A更好。结论: 相同处方不同制备工艺对复方的药效作用具有一定影响。

**[关键词]** 肺毒清; 体外抗病毒试验; 制备工艺; 甲1型及甲3型流感病毒

**[中图分类号]** R283.6; R943; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0042-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013180042

**[收稿日期]** 20130328(014)

**[基金项目]** 成都市科技局高校院所应用成果转化项目(12DXYB020JH-002)

**[第一作者]** 刘涛, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价研究, Tel: 028-61302236, E-mail: liutao0578@sina.com

**[通讯作者]** \* 徐玉玲, 高级工程师, 从事中成药质量研究及管理研究, Tel: 028-61302236, E-mail: xuyuling19750818@sina.com

释放缓慢, 具有明显的缓释作用, 且无明显突释效应。

## [参考文献]

[1] 李芸兰, 成志锋. 小檗碱的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(21): 4173.

[2] 廖霞, 李彩虹, 丁航. 黄连提取物盐酸小檗碱对三种肿瘤细胞株增殖的影响[J]. 东南大学学报: 医学版, 2011, 30(2): 344.

[3] 黄勤杰, 施超, 朱健. 小檗碱对人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 河北医药, 2012, 34(13): 1953.

[4] 洪怡, 何伟, 李丹, 等. 黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 29.

[5] 李祥, 杜俊, 向小四, 等. 脂质体在抗肿瘤药物中的应用研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(4): 290.

[6] 苏春梅, 杨红, 梁翠茵, 等. 盐酸小檗碱脂质体制备工艺研究[J]. 中国药业, 2009, 18(21): 41.

[7] 胡鹏翼, 郑琴, 刘彦君, 等. pH 梯度结合逆向蒸发法制备槐定碱纳米脂质体及体外释放度研究[J]. 中国

新药杂志, 2011, 20(14): 1275.

[8] 许伯慧, 李晓霞, 孟璐, 等. 齐墩果酸脂质体包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 86.

[9] 齐娜, 刘广, 廖迎, 等. 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 29.

[10] 赵志英, 谢俊, 刘文一, 等. 羟喜树碱脂质体的制备及其大鼠体内组织分布的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 450.

[11] 孙念, 刘相男, 王玉, 等. pH 梯度法结合逆向蒸发法制备硫酸多黏菌素 E 脂质体[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 784.

[12] 叶鹏, 宋金春, 郭成希. pH 梯度法结合逆向蒸发法制备氟尿嘧啶脂质体[J]. 中国药师, 2009, 12(3): 308.

[13] 张宏梅, 徐明, 崔佰吉, 等. pH 梯度法制备重酒石酸长春瑞滨脂质体[J]. 吉林医药学院学报, 2008, 29(6): 320.

[14] 苗彩云, 邓树海, 李艳辉. 主动载药法制备两亲性药物脂质体的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 433.

[责任编辑 全燕]

## Effects of Different Preparation Processes on *in vitro* Antiviral Activity of Feiduqing Prescription

LIU Tao<sup>1</sup>, LI Juan<sup>2</sup>, WU Chun-mei<sup>1</sup>, LU Jin<sup>3</sup>, XU Yu-lin<sup>4\*</sup>

(1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Nanjing Hailing Chinese Pharmaceutical Technology Research Co. Ltd, Nanjing 210049, China;

3. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound,  
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

4. Experimental Technology Center of Chengdu University, Chengdu 610106, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate effects of different preparation processes on *in vitro* antiviral activity of Feiduqing prescription. **Method:** Antiviral activities of water extract (A), water and alcohol extract (D), water extraction-ethanol precipitation substance (B) and its n-butanol extract (C) were investigated by *in vitro* antiviral method. **Result:** Sample D could completely inhibit A 1 and 3 type influenza viruses with the concentration of  $1\ 250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sample A with  $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  could completely inhibit A 1 and 3 type influenza A viruses under 60% cytotoxicity, other samples had no inhibitory effect on other respiratory viruses, and *in vitro* antiviral activity of sample D was better than sample A. **Conclusion:** Different preparation processes of the same prescription had a certain influence of pesticide effect.

**[ Key words ]** Feiduqing; *in vitro* antiviral test; preparation process; A 1 and 3 type influenza viruses

肺毒清颗粒来源于临床经验方,具有清热解毒、止咳化痰的功效,由苦参、栀子和木蝴蝶组成,临床用水煎煮服用<sup>[1]</sup>。随现代药剂学的发展,增加了乙醇提取、醇沉及萃取等技术,应用较为普遍,但这些技术对传统临床经验方的药效的影响程度尚不明确。本实验采用体外抗病毒法考察肺毒清的提取工艺及精制工艺,探讨溶媒及精制工艺对该方药效的影响,为该制剂的后续体内研究提供参考。

### 1 材料

BP211D型电子天平(梅特勒-托利多公司);苦参、栀子、木蝴蝶均购自成都市荷花池中药材市场,经成都大学生物产业学院刘涛研究员级高级工程师鉴定,分别为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的干燥成熟种子;阳性药病毒唑(广州肇庆星湖药业有限公司,批号 20100523)。

甲 1 型流感病毒 (FM1) 和甲 3 型流感病毒 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 于狗肾细胞 (MDCK) 传代,以细胞病变及鸡红血球凝集法来判断其滴度;呼吸道合胞病毒 long 株引自美国典型培养物收藏中心 (ATCC, VR-26),并于人肺癌细胞 (A549) 中传代扩增;腺病毒 3 型和

鼻病毒 R14 型引进自 ATCC (VR-284) 均于人肺二倍体细胞 (HEL) 上传代,滴定与检测;4 种病毒均在 35 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。MDCK, HEL, A549 等均由本室冻存。

### 2 方法与结果

**2.1 样品的制备** 称取栀子、苦参、木蝴蝶,加 12 倍量水提取 3 次,每次 1 h (下同),合并提取液,浓缩至相对密度 1.20 (25 ℃,下同),干燥,得样品 A。取栀子、苦参、木蝴蝶,加 12 倍量水提取 3 次,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20,加 95% 乙醇至含乙醇体积分数 85%,静置 > 24 h,取上清液,浓缩至相对密度约 1.20,干燥,得样品 B。取栀子、苦参、木蝴蝶,加 12 倍量水提取 3 次,浓缩至相对密度约 1.20,加 95% 乙醇至醇体积分数 80%,取上清液,浓缩至相对密度 1.10 且无醇味,以 1:1 (浓缩液与正丁醇体积比) 加正丁醇萃取 6 次,合并萃取液,浓缩,干燥,得样品 C。称取木蝴蝶、苦参,加 12 倍量 75% 乙醇提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20,干燥,得中间体 1;栀子加 12 倍量水提取 3 次,合并提取液,浓缩至相对密度约 1.20,加 95% 乙醇至含醇量 85%,取上清液,浓缩至相对密度 1.20,干燥,得中间体 2;合并 2 个中间体,混匀,

得样品 D。各样品情况见表 1。

表 1 肺毒清 4 种提取物得率

样品	提取工艺	提取物得率 /%	提取物 含生药量 /g·g <sup>-1</sup>
A	全方水煎煮	18.44	5.43
B	全方水煮醇沉	12.28	8.14
C	全方水煮醇沉 + 正丁醇萃取	7.50	13.33
D	栀子水煮醇沉,其余药乙醇提取	19.09	5.24

注:得率 = 提取物得量/称样量 × 100%。

**2.2 药物毒性试验** 在 96 孔培养板内,每孔均加入 HEL, MDCK, A549(接种密度  $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^3$  /mL),于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞长成单层后,分别加入 4 种样品。逐日观察细胞病变,培养 4 d 后终止试验,以细胞不出现病变的最小稀释度为该样品对细胞无毒界限。设阳性药对照和正常细胞对照,样品在表 2 中质量浓度时对细胞无毒性,大于该质量浓度则表现为细胞空泡,破碎等毒性特征。

表 2 肺毒清不同提取物在不同细胞上的最大无毒质量浓度 mg·L<sup>-1</sup>

样品	MDCK	A549	HEL
A	156.0	625.0	125.0
B	625.0	500.0	156.0
C	78.0	312.5	625.0
D	1 250.0	156.0	156.0

**2.3 体外抗病毒作用考察** 分别加入无毒质量浓度下的 4 种样品,每个样品配制 4 个质量浓度,每个质量浓度占 4 个孔,其中两孔作为药物对照,两孔用 100 半数组织培养感染剂量(TCID50)的病毒攻击量攻击,100 μL/孔,于 33 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养,每天在倒置显微镜下观察细胞病变(CPE)并记录。试验时设阳性药对照、正常细胞对照及病毒对照。当病毒对照出现“++”时终止试验。细胞出现病变的程度按以下标准记录:“-”表示细胞生长正常,无病变出现;“±”表示细胞病变少于整个单层细胞的 10%;“+”表示细胞病变约占整个单层细胞的 25%;“++”表示细胞病变约占整个单层细胞的 50%;“+++”表示细胞病变约占整个单层细胞的 75%;“++++”表示细胞病变约占整个单层细胞的 75% 以上。

结果阳性药病毒唑对 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, FM<sub>1</sub>, R14, 腺 3 型和呼吸道合胞病毒的最低抑制浓度分别为 125,

125, 25, 2 000, 1 000 mg·L<sup>-1</sup>;样品 D 在无毒质量浓度 1 250 mg·L<sup>-1</sup>下能完全抑制流感病毒 FM<sub>1</sub> 及 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 株,样品 A 在 60% 细胞毒性下(250 mg·L<sup>-1</sup>)能完全抑制 FM<sub>1</sub> 及 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>,其他样品对其他呼吸道病毒均无抑制作用。

### 3 讨论

MDCK, HEL, A549 是体外抗病毒试验常用的模型,甲 3 型流感病毒<sup>[2]</sup>、甲 1 型流感病毒<sup>[3]</sup>、鼻病毒 R14 型<sup>[4]</sup>、腺病毒 3 型<sup>[5]</sup>、呼吸道合胞病毒 long 株<sup>[6]</sup>是导致流感及其并发症的主要的致病因素,采用体外模型评价处方的优效,可大大节约后续开发的成本。不同提取方法对有效成分转移率具有一定影响<sup>[7-10]</sup>,含有不同化学成分的药材采用不同提取溶媒及纯化工艺,对方药效的发挥可能更具促进作用。

### [参考文献]

[1] 刘涛,李娟,徐玉玲,等.苦参提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):58.

[2] 于新芬,潘劲草,黄志成.甲 3 型流感病毒 M 基因披甲 RNA 的研制[J].中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(4):343.

[3] 林棉,张奉学,缪英年,等.羌银解热汤对甲<sub>1</sub>型流感病毒 FM<sub>1</sub> 株的抑制作用研究[J].中国中医急症,2007,16(9):1105.

[4] 王慧玲,许文波,孔晓慧.鼻病毒感染研究进展[J].医学综述,2010,16(13):2032.

[5] 滕峥,张曦,赵百慧,等.人 3 型腺病毒快速实验室检测方法的建立[J].上海预防医学杂志,2005,17(11):511.

[6] 杨洁,刘萍.双黄连颗粒体外抗呼吸道合胞病毒作用的实验研究[J].中国药业,2007,16(23):7.

[7] 仝燕,王锦玉,张锴镔,等.苦参总生物碱提取纯化工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):19.

[8] 刘涛,万德光,王永香,等.HPLC 法测定金银花药材中绿原酸的转移率[J].南京中医药大学学报,2008,24(5):350.

[9] 刘涛,李娟,徐玉玲,等.FDQ 颗粒提取工艺中药材有效成分含量测定及与其转移率研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):61.

[10] 国家食品药品监督管理局注册司.中药、天然药物提取纯化研究技术指导原则[S].[Z]GPH2-1,2005.

[责任编辑 仝燕]