

文章编号: 1008-9926(2009)03-0225-03 中图分类号: R931.6 文献标识码: A

双黄连粉针剂化学成分进一步研究

吕本强^①, 杨常成^②, 张贞良, 罗佳波^③

(^①解放军第 421 医院 药剂科 广东 广州 510310; ^②解放军第 163 医院 药剂科 湖南 长沙 410003; ^③南方医科大学中医药学院中药新药重点实验室 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究双黄连粉针剂药效物质基础, 为双黄连粉针剂更合理的应用和更广泛的开发提供依据。方法 应用各种色谱方法对其化学成分进行分离, 并利用色谱和光谱技术鉴定所分离得到的化学成分。结果 从双黄连粉针剂中分离得到 4 个化合物, 经鉴定分别为: 连翘环己醇 (rengyol, I)、齐墩果酸 (oleanolic acid, II)、熊果酸 (ursolic acid, III) 和 β -甾醇 (β -sterol, IV)。结论 经文献核实, 该 4 种化合物均系从该制剂中首次分得。

关键词: 双黄连粉针剂; 化学成分; 分离鉴定

Further Studies on Chemical Constituents of Shuanghuanglian Injection

LV Ben-Qiang^①, YANG Chang-Cheng^②, ZHANG Zhen-Liang, LUO Jia-Bo^③

(^①Medical Department of the Hospital 421, CPLA, Guangzhou 510310, Guangdong China)

(^②Medical Department of Hospital 163, CPLA, Changsha 410003, Hunan China)

(^③Key Lab of New Drug Research of TCM, TCM College, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong China)

ABSTRACT: **Aim** To study chemical constituents of Shuanghuanglian Injection. **Methods** Chromatography and spectral analysis were respectively used to isolate and identify the chemical constituents of Shuanghuanglian Injection. **Results** 4 compounds were isolated in Shuanghuanglian Injection, including rengyol (I), oleanolic acid (II), ursolic acid (III) and β -sterol (IV). **Conclusion** Four chemical constituents were isolated and identified in Shuanghuanglian Injection for the first time.

KEY WORDS: Shuanghuanglian Injection; chemical constituents; isolation and identification

双黄连粉针剂是由金银花、黄芩、连翘 3 味中药经提取精制而成的纯中药复方制剂, 该药具有清热解毒、增强肌体免疫功能的作用, 性质稳定, 疗效可靠, 已被国家中医药管理局指定为全国中医院急诊首批急诊必备中成药^[1]。本文在已发表文章基础上进一步报道对双黄连粉针剂化学成分的相关研究, 以期有助于对双黄连粉针剂更好的利用和更有效的开发。

1 仪器和材料

XT-4 型显微熔点测定仪 (上海济成分析仪器有限公司, 温度计未校正); Nicolet Impact-410 型红外光谱仪 (Thermo Nicolet 公司); JEOL JNM-GX400 型核磁共振仪 (JEOL 公司); Finnigan MATTSQ7000 质

谱仪 (Finnigan 公司); 柱层析硅胶 (青岛海洋化工厂产品); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板、制备薄层 (烟台化学工业研究所); 甲醇、乙醇、氯仿为分析纯。连翘来源于河南, 金银花来源于山东, 黄芩来源于河北 [南方医科大学中医药学院刘传明副教授鉴定符合 2005 年版《中国药典》规定, 为正品药材]。

2 制备与分离

按 2005 年版《中国药典》注射用双黄连项下制法, 取一定量金银花、连翘和黄芩。将黄芩水提, 然后采用酸沉碱溶法处理, 所得沉淀乙醇洗涤后干燥, 备用; 再将金银花和连翘混和水提, 然后采用水提醇沉法处理, 滤取上清液, 回收乙醇并浓缩得稠浸膏, 备用。将两部分原料混和, 溶解于水, 冷冻干燥, 即

① 作者简介: 吕本强 (1978 -), 男, 河南信阳人, 主管药师, 博士。研究方向: 中药新制剂、中药化学研究。Tel: (020) 83685495; E-mail: lbq421@163.com

通讯作者: 罗佳波, Tel: (020) 61648266; E-mail: ljb@fimmu.com

得注射用双黄连制剂。取自制注射用双黄连加水溶液,浓缩,依次用乙醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取,经聚酰胺(不同浓度的乙醇水溶液)、硅胶柱层析(氯仿-甲醇梯度洗脱)和制备液相、葡聚糖凝胶等分离得到化合物 I、II、III、IV。

3 鉴定

3.1 化合物 I 无色针状结晶(丙酮), mp 114°C~115°C。R (KBr) $\gamma_{\text{cm}^{-1}}$: 3297, 2938, 2847, 1721, 1629, 1453, 1407, 1374, 1328, 1289, 1245, 1221, 1195, 1159, 1065, 1019, 964, 942, 830。ES/MS (m/z): 183 [$M + Na$]⁺, 159 [$M - H$]⁻。¹H NMR (MeOD) δ_{ppm} : 3.73 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, 8-H), 3.52 (1H, m, 4-H), 1.68 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, 7-H), 1.62 (6H, m, 2, 3, 5, 6-H), 1.41 (2H, m, 2, 6-H)。¹³C NMR (MeOD) δ_{ppm} : 70.8 (C-1), 70.7 (C-4), 59.2 (C-8), 45.6 (C-7), 36.1 (C-2, 6), 31.3 (C-3, 5)。其 R (KBr)、¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与文献^[2]中的连翘环己醇数据一致,故鉴定该化合物为连翘环己醇[1-ethoxy-1,4-cyclohexanediol (Z), renyol]。

3.2 化合物 II 白色针状结晶(乙醇), mp 308°C~310°C。R (KBr) $\gamma_{\text{cm}^{-1}}$: 3437, 2943, 1464, 1387, 1693。¹H NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 5.28 (1H, br s, 12-H), 3.72 (1H, dd, $J = 7.0, 10.1$ Hz, 3-H), 3.22 (1H, dd, $J = 2.1, 10.6$ Hz, 18-H), 0.74 (3H, s, CH₃), 0.76 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.93 (3H, s, CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 1.12 (3H, s, CH₃)。¹³C NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 183.1 (C-28), 143.6 (C-13), 122.7 (C-12), 79.1 (C-3), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.5 (C-17), 45.9 (C-19), 41.6 (C-14), 41.0 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.4 (C-1), 37.1 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-29), 32.7 (C-7), 32.5 (C-22), 30.7 (C-20), 28.1 (C-23), 27.7 (C-15), 27.2 (C-2), 25.9 (C-27), 23.6 (C-30), 22.9 (C-16), 22.4 (C-11), 18.3 (C-6), 17.2 (C-26), 15.5 (C-24), 15.3 (C-25)。DEPT 谱显示有 8 个季碳、5 个叔碳、10 个仲碳和 7 个伯碳。其熔点、H 谱和 C 谱数据与文献^[3,4]报道齐墩果酸数据一致,并经薄层色谱对照鉴别,确定该化合物为齐墩果酸(oleanolic acid)。

3.3 化合物 III 白色针状结晶(乙醇), mp 277°C~279°C。¹H NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 5.26 (1H, br s, 12-H), 3.72 (1H, dd, $J = 7.0$ Hz, 3-H), 3.22 (1H, dd, $J = 6.3, 11.0$ Hz, 18-H), 0.78 (3H, s, CH₃), 0.80 (3H, s, CH₃), 0.85 (3H, s, CH₃), 0.93 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s,

CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 1.09 (3H, s, CH₃)。¹³C NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 182.4 (C-28), 138.0 (C-13), 125.9 (C-12), 79.1 (C-3), 55.3 (C-5), 52.8 (C-18), 47.9 (C-9), 47.6 (C-17), 42.1 (C-14), 39.1 (C-8), 38.9 (C-19), 38.8 (C-20), 38.7 (C-1), 38.7 (C-4), 36.7 (C-10), 33.0 (C-22), 33.0 (C-7), 30.6 (C-21), 28.2 (C-23), 27.3 (C-15), 24.2 (C-2), 23.6 (C-16), 23.6 (C-17), 23.3 (C-11), 21.1 (C-30), 18.3 (C-6), 17.1 (C-26), 17.1 (C-29), 15.6 (C-24), 15.5 (C-25)。DEPT 谱显示有 7 个季碳、6 个叔碳、10 个仲碳和 7 个伯碳。其 C 谱数据与文献^[5,6]报道熊果酸数据一致,并经薄层色谱对照鉴别,确定该化合物为熊果酸(ursolic acid)。

3.4 化合物 IV 白色片状结晶(醋酸乙酯), mp 137°C~139°C。¹H NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, 6-H), 3.52 (1H, m, 3-H), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 21-CH₃), 0.84 (3H, m, 29-CH₃), 0.82 (3H, m, 27-CH₃), 0.79 (3H, s, 26-CH₃), 0.68 (3H, s, 18-CH₃)。¹³C NMR (CDCl₃) δ_{ppm} : 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.9 (C-14), 56.1 (C-17), 50.2 (C-9), 45.9 (C-4), 42.3 (C-13), 39.8 (C-12), 37.3 (C-24), 36.5 (C-1), 36.2 (C-10), 34.0 (C-22), 31.9 (C-20), 31.9 (C-8), 31.7 (C-7), 29.2 (C-2), 28.9 (C-16), 28.3 (C-11), 26.2 (C-15), 24.3 (C-23), 23.1 (C-27), 21.0 (C-28), 19.8 (C-19), 19.4 (C-21), 19.1 (C-25), 18.8 (C-29), 12.0 (C-26), 11.9 (C-18)。其 H 谱和 C 谱数据与文献^[7,8]报道 β -谷甾醇数据一致,并经薄层色谱对照鉴别,故鉴定该化合物为 β -谷甾醇(β -sitosterol)。

双黄连粉针剂作为一个疗效可靠的现代中药制剂,具有抗菌、抗病毒、解热抗炎和调节免疫等多方面作用。从化学成分来源分析,Chiba M 等^[9]从连翘中分得熊果酸和齐墩果酸, β -谷甾醇又广泛地存在于这 3 味药材中^[10,11],连翘环己醇可能作为 C6-C2 天然醇分布于连翘中;从药理作用分析, β -谷甾醇有解热抗炎^[12]、抗氧化^[13]、抗肿瘤^[14]等作用,齐墩果酸有抗肿瘤^[15]、护肝解毒^[16]和免疫调节^[17]等作用,熊果酸有抗菌^[18]、抗炎^[19]、抗肿瘤^[20]和护肝^[21]等作用。双黄连粉针剂化学成分复杂,药理作用多样,其药理作用机理与各成分作用机理的相关性有待进一步研究,甚至其不良反应的发生与各成分之间的关系也有待进一步探讨,这样对优化双黄连粉针剂制剂工艺、提高其内在质量、增强其临床疗效、降低不良反应的发生都有很好的参考价值。

参考文献:

- [1] 宫涛,刘阳,张伯礼. 310例双黄连注射剂不良反应分析[J]. 天津中医学院学报, 2003, 22(1): 49
- [2] Bos R, Hendriks H, Bruins A. P., Koofteman J., et al. Isolation and identification of valerenane sesquiterpenoids from Valeriana officinalis[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 133
- [3] 张勉,张朝凤,王峰涛. 侧金盏花化学成分的研究[J]. 药学学报, 2005, 40(6): 529
- [4] 王焕弟,谭成玉,杜昱光,等. 藏药湿生扁蕾的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 40(14): 1059
- [5] 曾建伟,钱士辉,吴锦忠,等. 薄荷非挥发性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 400
- [6] 孙连娜,陈万生,陶朝阳,等. 泽兰化学成分的研究(II)[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(9): 109
- [7] 黄恩喜,徐卯力,杨吉贤,等. 长白瑞香化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 33
- [8] 田军,吴凤鸾,丘明华,等. 匙叶翼首花的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(1): 35
- [9] Chiba M, Hisada S. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus" (III) [J]. Shoyakugaku Zasshi, 1978, 32(3): 194
- [10] 李永梅,王天志,王志霄. 细毡毛忍冬花蕾化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(1): 45
- [11] 周成萍,何宝林,廖蔚珍,等. 连翘化学成分的分析[J]. 中国民族学院学报(自然科学版), 1998, 17(2): 22
- [12] 陈惠芳. β -谷甾醇的消炎解热作用[J]. 国外医药 植物药分册, 1980, (02): 13
- [13] 刘慧琼,郭书好,沈英森,等. 半夏中 β -谷甾醇的抗氧化作用

研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 281

- [14] 言岩. β -谷甾醇 蔬菜中的抗肿瘤成分[J]. 国外医学情报, 1982, 3(15): 262
- [15] Choi C Y, You H J, Jeong H G. Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by oleanolic acid via nuclear factor- κ B activation in macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(1): 49
- [16] 田丽婷,马龙,堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884
- [17] 孙燕. 齐墩果酸的促免疫作用[J]. 中国临床病理学杂志, 1988, (1): 26
- [18] Chattopadhyay D, Anunachalam G, Mandal A B, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore Mallotus peltatus leaf extract[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 82(2/3): 229
- [19] Tapondjou L A, Lontsi D, Sondengam B L, et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxy ursolic acid, from Cussonia bancoensis[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26(2): 143
- [20] Lee I, Lee J, Lee Y H, et al. Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O_2 consumption and tumor interstitial fluid pressure[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2827
- [21] Martin Aragon S, DelasHeras B, Sanchez Reus M I, et al. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes[J]. Exp Toxicol Pathol, 2001, 53(2/3): 199

(收稿日期: 2008-10-14;修回日期: 2009-02-04)

(本文编辑 魏 萍)

文章编号: 1008-9926(2009)03-0227-04 中图分类号: R927. 2; R963 文献标识码: A

以双氯酚酸为探针采用高效液相色谱法快速测定 CYP450 2C9的酶活性

李慎谦^①, 张少燕^②, 梁秉文^③

(青岛大学医学院附属医院 ^①泌尿外科 ^②检验科 山东 青岛 266003; ^③北京中研同仁堂医药研发有限公司 北京 100075)

摘要:目的 建立一种快速、高效的以双氯酚酸作为探针药物评价细胞色素 P450 2C9(CYP2C9)酶活性的高效液相色谱 紫外检测方法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(50mm×4.6mm I.D., 5 μ m);流动相为乙腈(含 0.01%七氟丁酸)水(含 0.01%七氟丁酸)(65:35, V/V),流速 2.0 mL/min;检测波长为 280nm。双氯酚酸与人 CYP2C9酶在 37℃温孵适当时间后,加入 100 μ L 乙腈 冰乙酸(94:6, V/V)终止反应,10 000g离心后取上清液进样分析测定。结果 4'-羟基双氯酚酸的保留时间为 1.35min,线性范围为 1.00~200 μ mol·L⁻¹($r=0.9999$),最低定量限为 1.00 μ mol·L⁻¹,回收率为 99.5%~100.8%;双氯酚酸的保留时间为 2.25min,线性范围为 1.00~200 μ mol·L⁻¹($r=0.9999$),最低定量限为 1.00 μ mol·L⁻¹,回收率为 99.3%~101.1%。两者的日内、日间 RSD 均 <15%,温孵体系中的其他内源性物质不干扰测定。结论 该方法快速、稳定、灵敏度高,适合体外双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的测定,可应用于体外 CYP2C9酶活性的评价及酶动力学研究。

关键词: RP-HPLC;双氯酚酸;4'-羟基双氯酚酸;细胞色素 P450 2C9

① 作者简介:李慎谦(1963-),男,山东莱西人,硕士,副主任医师,硕士研究生导师。研究方向:肾移植,泌尿系统临床用药监测、安全性和有效性研究。Tel: (0532)82911330