

浙贝乙素胆汁酸盐的制备及其镇咳、祛痰和平喘活性的筛选

徐仿周, 张勇慧, 阮汉利, 皮慧芳, 陈昶, 吴继洲*

(华中科技大学 同济药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 为了寻找具有优良镇咳、祛痰和平喘活性且毒性较低的药物, 将贝母中的主要药效成分之一浙贝乙素和蛇胆中各主要药效成分进行酸碱反应, 得到一系列浙贝乙素胆汁酸盐并对所得的盐进行镇咳、祛痰和平喘活性的筛选。活性筛选结果显示, 浙贝乙素胆汁酸盐和浙贝乙素鹅去氧胆酸盐的镇咳、祛痰和平喘活性较强, 尤其是二者显示出比磷酸可待因还强的镇咳活性值得关注。借鉴药物化学中的结构拼合思路有望在中药复方的研究开发中开辟出一条新的途径。

关键词: 浙贝乙素胆汁酸盐; 浙贝乙素胆酸盐; 浙贝乙素鹅去氧胆酸盐; 镇咳; 祛痰; 平喘

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0274 - 05

Preparation and antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of verticinone-bile acids salts

XU Fang-zhou, ZHANG Yong-hui, RUAN Han-li, PI Hui-fang, CHEN Chang, WU Ji-zhou*

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: To search for potential drugs with potent antitussive, expectorant, antiasthmatic activities and low toxicity, a series of verticinone-bile acids salts were prepared based on the clearly elucidated antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of verticinone in bulbs of *Fritillaria* and different bile acids in Snake Bile. The antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of these verticinone-bile acid salts were then screened with different animal models. Ver-CA (verticinone-cholic acid salt) and Ver-CDCA (verticinone-chenodeoxycholic acid salt) showed much more potent activities than other compounds. The bioactivities of Ver-CA and Ver-CDCA are worthy to be intensively studied, and it is also deserved to pay much attention to their much more potent antitussive effects than codeine phosphate. In order to elucidate whether they have synergistic effect and attenuated toxicity, their activities will be continuously compared with single verticinone, cholic acid and chenodeoxycholic acid at the same doses on different animal models. The application of "combination principles" in traditional Chinese medicinal formulations may be a novel way in traditional Chinese medicine research and discovery.

Key words: verticinone-bile acids salts; verticinone-cholic acid salt; antitussive; verticinone-chenocholic acid salt; expectorant; antiasthmatic

中药复方的研究是中药现代化的关键, 但复方中复杂多样的化学成分又大大加剧了中药复方研究开发的难度。因此该领域中大多数研究还仅仅局限在单味药的研究上, 但若摒弃复方中各味药的配伍

应用而仅以其中的某一味药或某一味药中的某类成分来代替复方, 又往往难以发挥出复方的疗效, 因为不少研究已经证明, 中药复方的配伍应用往往能产生增效减毒的功效, 有些甚至可产生新的药用成分^[1]。所以在中药复方的研究开发中要大胆借鉴多学科交叉的新思路, 利用新方法和新技术, 才有可能开辟出中药复方研究的新途径。如在充分认识各单味药药效成分的基础上, 以各药中的主要有效成

收稿日期: 2006-08-13.

基金项目: 2006年高等学校科技创新工程重大项目培养基金.

* 通讯作者 Tel: 86 - 27 - 83692739,

E-mail: ywjz@mails.tjmu.edu.cn

分再组方或借助药物合成中结构拼合的思路^[2],利用这些药效成分的理化特性或结构上的特殊基团进行结构拼合,有可能得到一些新的化合物,这也意味着可能发现具有协同作用且易被国际所接受的新药。

蛇胆川贝散在临床应用历史悠久,治疗效果良好且毒副作用小,组成该复方的两味药材分别为川贝和蛇胆。现代药理研究已经阐明这两味药的主要药效成分分别为各种胆汁酸和异甾生物碱^[3-6],由此作者设想,是否可将异甾生物碱和胆汁酸进行结构拼合而得到能发挥出复方功效并可增效减毒的新物质呢?在进行结构拼合的研究中,作者使用了生物碱单体中具有良好镇咳、祛痰和平喘作用的浙贝乙素^[7]和蛇胆中五种含量较高的胆汁酸,利用浙贝乙素和胆汁酸分别具酸和碱的特性制备了一系列具有水溶性的盐,并对这些盐作了镇咳、祛痰和平喘活性的筛选,期望能从中发现更具优良活性和开发前景的药物。

材料与方法

试剂及药品

原料药 五种胆汁酸(胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸和猪去氧胆酸)均购自深圳亚嘉特实业有限公司,纯度在98%以上;浙贝乙素由本教研室吴继洲教授提供,其纯度经HPLC-ELSD分析达99%以上。

阳性对照药 磷酸可待因(青海制药厂,20050338);愈创甘油醚(山西远景康业制药有限公司,050104);氨茶碱(山西临汾云鹏药业有限公司,20050102)。

其他试剂及药品 0.9%氯化钠注射液(武汉

滨湖双鹤药业有限公司,050815);苯酚红(天津市科密欧化学试剂开发中心,200408023);氯化乙酰胆碱(上海三爱思试剂有限公司,050209);磷酸组胺(上海丽珠东风生物技术有限公司,040506);氨水及其他试剂均为国产分析纯。

仪器 UV-756PC紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);熔点用X-5型显微熔点仪测定,温度未校正;IR光谱用Shimadzu IR 2460红外光谱仪测定(KBr压片);FAB-MS用VG Auto Spec-3000质谱仪测定;NMR以重水为溶剂用Bruker 2-400测定。

动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20±2)g;昆明种小鼠,雄性,体重(22±2)g;豚鼠,雌雄兼用,体重(170±20)g,以上动物均由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

浙贝乙素胆汁酸盐的制备 将浙贝乙素和胆酸等摩尔溶解于惰性有机溶剂中,在室温下搅拌过夜,回收溶剂并真空干燥,所得产物用蒸馏水纯化后得到目标化合物浙贝乙素胆汁酸盐(以下简称Ver-CA,结构见图1),产率90%。白色粉末,可溶于水,熔点:137.3~139.2℃(未分解);IR(KBr) ν : 3 422(OH, alcohol), 2 939(C-H), 2 868(C-H), 2 379(NH⁺), 1 705(C=O), 1 704(C=O); Anal. Calcd. For C₅₁H₈₃NO₈: C 73.12, H 9.92, N 1.67; Found: C 72.95, H 9.89, N 1.66; FAB-MS m/z 838[$M+H$]⁺; ¹H NMR(D₂O, 500 MHz) δ : 0.55(3H, s, H-19), 0.58(3H, s, H-18'), 0.75(3H, s, H-19'), 0.82(3H, d, $J=6.1$ Hz, H-21'), 0.94(3H, d, $J=6$ Hz, H-27), 1.06(3H, s, H-21), 3.35(1H, m, $W_{1/2}=22$ Hz, H-3'), 3.50(1H, m, $W_{1/2}=24$ Hz, H-3), 3.75(1H, s, H-7'), 3.92

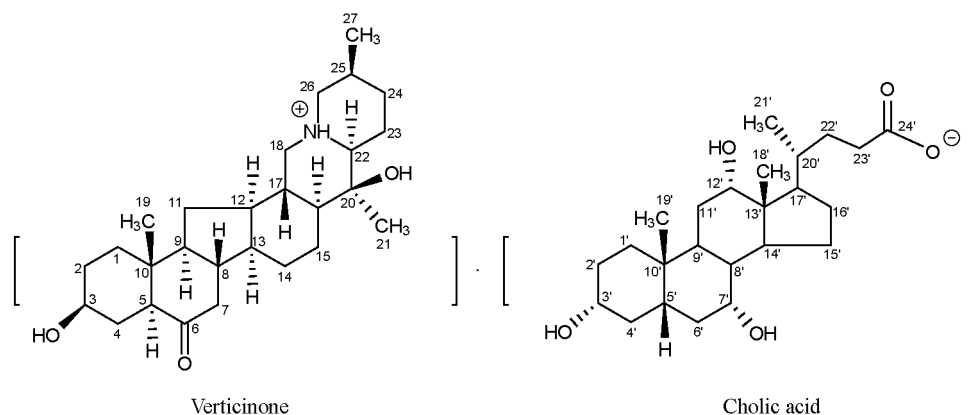


Figure 1 Structure of verticinone-cholic acid

Table 1 Physical properties of Ver-CA and the admixture of verticinone and cholic acid

Composition	mp/°C	Solubility	IR ν/cm^{-1}
Ver-CA	137.3 ~ 139.2	Soluble in water	3 422, 2 939, 2 868, 2 379, 1 705, 1 704
Admixture (verticinone : cholic acid = 1 : 1)	134.1 ~ 193.2	Insoluble in water	2 756 (caused by lone-pair electron of N atom of verticinone); others are equal to overlap of the two IR spectra

The 2 756 cm^{-1} of IR spectrum of Ver-CA does not appear because the lone-pair electron of atom N is transferred to H^+

(1H, s, H-12'); ^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ : 11.7 (C-19), 12.0 (C-18'), 15.4 (C-27), 16.7 (C-21'), 20.7 (C-21), 22.0 (C-19'), 35.0 (C-10'), 38.4 (C-10), 46.0 (C-13'), 59.2 (C-26), 60.0 (C-18), 68.2 (C-7'), 70.1 (C-22), 70.3 (C-3), 71.1 (C-20), 71.4 (C-3'), 73.1 (C-12'), 185.5 (C-24'), 217.5 (C-6)。

其他浙贝乙素胆汁酸盐的制备及理化分析 上述波谱数据及表 1 中理化性质的比较可以确定浙贝乙素结构中 N 原子上的孤对电子和胆酸中羧基上的质子进行了电子转移即发生了广义的酸碱反应,从而生成了可溶于水的 Ver-CA。按照该反应及纯化路线,作者制备了其他几个浙贝乙素胆汁酸盐,即浙贝乙素去氧胆酸盐(简称 Ver-DCA),熔点:123.3 ~ 126.3 °C;浙贝乙素鹅去氧胆酸盐(简称 Ver-CDCA),熔点:132.0 ~ 134.5 °C;浙贝乙素熊去氧胆酸盐(简称 Ver-UDCA),熔点:127.0 ~ 131.0 °C;浙贝乙素猪去氧胆酸盐(简称 Ver-HDCA),熔点:130.0 ~ 133.3 °C。各盐在水中均有一定程度的溶解。

浙贝乙素胆汁酸盐镇咳、祛痰和平喘作用的筛选^[8-10]

镇咳活性的筛选 取体重(20 ± 2) g 小鼠,雌雄各半,随机分组(Ver-CA组、Ver-DCA组、Ver-CDCA组、Ver-UDCA组、Ver-HDCA组、阴性组、阳性组,共 7 组),每组 10 只。实验前小鼠禁食不进水 12 h,各浙贝乙素胆汁酸盐、阴性和磷酸可待因均灌胃给药,给药 1 h 后,将小鼠置于倒置的 500 mL 烧杯中,用 1 mL 的注射器吸取 25% 氨水 0.15 mL 注入烧杯内的棉球中,观察咳嗽潜伏期和 3 min 之内咳嗽的次数。

祛痰活性的筛选 酚红标准曲线的测定:精密称取酚红粉末 0.001 30 g,置于 25 mL 量瓶中,用生理盐水溶解并定容,配制成 52 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,再分别精密吸取 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 和 0.60 mL 该溶液于 10 mL 量瓶中并再次用生理盐水定容,分别加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 1.00 mL,以 558 nm 波长测定其吸收度(A),以 A 对溶液中酚红

的浓度(C)作回归得 $A = 0.1077C - 0.1052$, $r = 0.9995$ 。

取体重(22 ± 2) g 雄性昆明种小鼠,实验前禁食不禁水过夜。随机分组,每组 10 只。各组小鼠灌胃给药 30 min 后,再腹腔注射 5% 酚红溶液 0.01 mL · g⁻¹, 30 min 后处死小鼠,尽量不损伤气管,将其仰位固定于手术板上,剪开颈正中皮肤,分离气管,小心地剔除气管周围组织,然后剪取自甲状软骨至气管分叉处的气管段,取出气管后,放入盛有生理盐水 2.00 mL 的试管中,振摇 30 min 后,加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 0.20 mL,以 4 000 r · min⁻¹ 离心 30 min,吸取离心液于 558 nm 处测定各洗出液的吸收度。

平喘活性的筛选 取(170 ± 20) g 豚鼠,雌雄不拘,逐一测定引喘潜伏期,挑选合格者。将豚鼠放入 402A 型超声雾化仪中,以恒速喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.1% 磷酸组胺的等量混合液 15 s,密切注意豚鼠的反应。观察 6 min 内豚鼠出现喘息性抽搐的潜伏期即引喘潜伏期与发生抽搐的动物数,如见豚鼠跌倒应立即将其取出,以免死亡。并记录引喘潜伏期,若引喘潜伏期大于 120 s 则认为不合格而不予选用。

次日将合格豚鼠随机分组,每组 8 只。分别灌胃给予 5 个浙贝乙素胆汁酸盐及阳性对照和阴性对照样品,给药 60 min 后,以同样条件引喘并测定引喘潜伏期。计算给药前后豚鼠引喘潜伏期的差值。

结果

由表 2 的结果可以看出,在同等剂量灌胃给药时,除 Ver-DCA 外,其他盐对小鼠氨水引咳均有一定程度的镇咳作用(与阴性比较均具显著性差异, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),镇咳活性前三位的排序为: Ver-CDCA > Ver-CA > Ver-UDCA,其中 Ver-CA 和 Ver-CDCA 在不到磷酸可待因 1/15 的剂量下,显示出和磷酸可待因相似的镇咳活性。

表 3 所示的祛痰作用结果中,同等剂量下,5 个浙贝乙素胆汁酸盐均显示出一定的祛痰活性,各组

给药小鼠气管酚红排泌量与阴性比较均具显著性差异 ($P < 0.05$)。其中以 Ver-CA 的祛痰活性最强。

在表 4 所示的平喘活性的结果中,同等剂量下,5 个胆汁酸盐均显示出良好的平喘活性,其平喘活性前三位的顺序为 Ver-CA > Ver-CDCA > Ver-DCA, Ver-CA 的平喘活性最强。

Table 2 Antitussive activity of the verticinone-bile acids complexes ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	Latent period of cough/s	Number of coughs in 3 min
Saline	0	48.46 ± 8.87	50.72 ± 9.07
Codeine phosphate	25	98.04 ± 24.17***	25.00 ± 6.57***
Ver-CA	1.5	68.91 ± 18.95**	28.21 ± 5.42***
Ver-CDCA	1.5	72.73 ± 19.40**	22.39 ± 7.50***
Ver-DCA	1.5	53.61 ± 19.64	41.50 ± 10.71
Ver-HDCA	1.5	52.36 ± 15.73	36.52 ± 8.83**
Ver-UDCA	1.5	56.08 ± 20.57	34.65 ± 8.64***

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs saline

Table 3 Expectorant activity of the verticinone-bile acids complexes ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	A	C/μg• mL ⁻¹
Saline	0	0.057 49 ± 0.027 17	0.252 2 ± 0.119 2
Guaifenesin	200	0.092 27 ± 0.020 33	0.404 9 ± 0.089 2**
Ver-CA	2.5	0.105 98 ± 0.029 07	0.465 1 ± 0.127 5**
Ver-CDCA	2.5	0.102 15 ± 0.043 87	0.448 3 ± 0.192 5*
Ver-DCA	2.5	0.082 94 ± 0.027 11	0.363 9 ± 0.118 9*
Ver-HDCA	2.5	0.096 13 ± 0.037 55	0.421 8 ± 0.164 7*
Ver-UDCA	2.5	0.086 07 ± 0.032 41	0.377 7 ± 0.142 2*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs saline

Table 4 Antiasthmatic activity of the the verticinone-bile acids complexes ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	Latency of asthma before drug adm in+ stration/s	Latency of asthma after drug adm in+ stration/s	Prolonged period of asthma/s
Saline	0	79.3 ± 7.2	91.1 ± 10.5	21.5 ± 6.1
Am inophylline	25	83.0 ± 9.9	171.1 ± 10.2	88.1 ± 18.3***
Ver-DCA	4	80.5 ± 14.3	128.0 ± 16.8	47.5 ± 19.5**
Ver-CA	4	84.4 ± 13.8	168.6 ± 20.5	84.5 ± 19.3***
Ver-CDCA	4	96.6 ± 10.0	149.4 ± 21.5	52.8 ± 19.5***
Ver-HDCA	4	79.8 ± 13.2	102.6 ± 23.6	30.6 ± 10.2*
Ver-UDCA	4	80.0 ± 11.2	117.6 ± 13.9	37.8 ± 15.9*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs saline

综上所述,5 种新生成的生物碱盐均显示出一

定程度镇咳、祛痰和平喘的活性,但从综合效果来看以 Ver-CA 和 Ver-CDCA 较为理想。

讨论

经典古方蛇胆川贝散在临床上主要用于治疗肺热咳嗽、痰多等疾病,由于其疗效显著,毒副作用小而被历版《中华人民共和国药典》所收载。组成该复方的两味中药川贝 (*Fritillaria cirrhosae*) 和蛇胆 (Snake Bile) 品种较多且均为贵重药材,尤其是蛇胆,还涉及到动物保护等问题,所以药源十分紧缺,以假充真、以劣充优现象非常严重,直接影响了其疗效和质量稳定性,因此深入研究该复方以期能发掘出可替代复方疗效且药效成分清晰的物质则显得尤为重要。

药物化学中结构拼合思路的应用产生了很多具有优良疗效的药物,如英国葛兰素公司研发的雷尼替丁枸橼酸铋 (ranitidine bismuth citrate, RBC),这种新化合物为雷尼替丁 (ranitidine) 与枸橼酸铋 (bismuth citrate) 反应所形成的盐,其在治疗胃溃疡时可利用两种原料药的机制发挥出协同增效的作用。中药复方中各味药的配伍具有深刻的科学依据,很多研究已经阐明复方中的众多药效成分在治疗疾病时往往能产生增效减毒的作用,所以单味药中的某一药效成分很难发挥出复方的疗效。但若把各药中的有效成分重新组方或进行结构拼合则很有可能得到具协同作用的新药。

本文作者基于上述思路制备了 5 个浙贝乙素胆汁酸盐并对其进行了镇咳、祛痰和平喘活性筛选,得到了综合效果良好的 Ver-CA 和 Ver-CDCA。但这两个盐相对于各自的制备原料来说是否具有预期的协同增效及减毒作用,尚需进一步研究。作者曾用猫喉上神经镇咳模型证明了贝母生物碱的镇咳部位在中枢,那么形成浙贝乙素胆汁酸盐及鹅去氧胆酸盐后镇咳部位是否是中枢和外周兼备从而表现出比磷酸可待因还强的镇咳活性,同样值得进一步探讨。下一步作者拟采用多个药理模型在整体动物、离体器官和分子水平上对这两个盐进行深入研究。

References

- [1] Jia W, Gao WY, Yan YQ, et al. The rediscovery of ancient Chinese herbal formulas [J]. *Phytother Res*, 2004, 18: 681 - 686.
- [2] Liu FL, Zhang XS, Wang YC, et al. Application combination principles in drug discovery [J]. *Northwest Chin Pharm (西北药学杂志)*, 2005, 20: 92 - 94.

- [3] Yeh YH, Wang DY, Liao MY, et al. Bile acid composition in snake bile juice and toxicity of snake bile acids to rats [J]. Comp Biochem Phys C, 2003, 136: 277 - 284.
- [4] Li PF, Guan H, Zhao HX, et al. Studies on mechanism of antiasthmatic and anti-inflammatory actions of CDCA [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29: 349 - 352.
- [5] Li SL, Li P, Lin G, et al. Existence of 5- α cevenine isosteroidal alkaloids in bulbs of fritillaria [J]. Acta Pham Sin (药 学 学 报), 1999, 34: 842 - 847.
- [6] Lin G, Li P, Li SL, et al. Chromatographic analysis of *Fritillaria isosteroidal* alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb [J]. J Chromatogr A, 2001, 935: 321 - 338.
- [7] Qian BC, Xu HJ. Studies on the antitussive and sedative activities of peimine and peiminine [J]. Acta Pham Sin (药 学 学 报), 1985, 20: 306 - 308.
- [8] Xu SY. Methodology in Phamacological Experiments (药 理 实 验 方 法 学) [M]. 3rd ed. Beijing: People' s Medical Publishing House, 2002: 1362 - 1363, 1380.
- [9] Li YK. Methodology in Phamacological Experiments on Chinese Medicinal Medica (中 药 药 理 实 验 方 法 学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1991: 423 - 424.
- [10] Bureau of Drug Administration Policy, Ministry of Health of the People' s Republic of China. Compilation of the Guidelines of the Preclinical Study of the New Medicine (Western Medicine) (新 药 (西 药) 临 床 前 研 究 指 导 原 则 汇 编) [G]. Beijing: People' s Medical Publishing House, 1993: 76, 80, 86.