

热毒宁注射液抗病毒活性成分研究 (I)

李海波^{1,2,3}, 于洋³, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}, 姚新生^{3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

摘要: **目的** 对中药复方热毒宁注射液抗病毒活性成分进行研究。**方法** 采用流感病毒致应激负荷小鼠模型进行热毒宁注射液抗病毒活性部位的筛选, 综合应用各种现代色谱技术对活性部位进行分离和纯化, 根据化合物的光谱数据和理化性质进行结构鉴定。采用检测流感病毒神经氨酸酶活性的方法, 对分离得到的黄酮类化合物进行了体外抗甲型流感病毒(A/PR/8/34 H1N1)的活性测试。**结果** 热毒宁注射液经大孔吸附树脂 95%乙醇洗脱部位为抗病毒活性部位, 从中分离鉴定了 20 个化合物, 分别鉴定为丁香酸(1)、阿魏酸(2)、苯甲酸(3)、咖啡酸(4)、对羟基苯甲醛(5)、香草醛(6)、4-羟基-3-甲氧基苯丙酸(7)、反式对羟基桂皮酸(8)、反式邻羟基桂皮酸(9)、反式桂皮酸(10)、7-羟基-6-甲氧基-香豆素(11)、7-羟基-6, 8-二甲氧基-香豆素(12)、香豆素(13)、3-羟基-1, 2-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-丙酮(14)、异鼠李素(15)、槲皮素(16)、木犀草素(17)、芦丁(18)、金丝桃苷(19)、木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(20); 其中木犀草素对流感病毒的 EC₅₀ 值小于 50 μmol/L, 选择指数(SI)值大于 10, 具有较强的抗甲型流感病毒活性。**结论** 化合物 1~20 均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 木犀草素为热毒宁注射液抗病毒活性成分之一。

关键词: 热毒宁注射液; 丁香酸; 咖啡酸; 香草醛; 异鼠李素; 槲皮素; 木犀草素; 抗病毒活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)12-1682-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.005

Research on antiviral constituents in Re-Du-Ning Injection (I)

LI Hai-bo^{1,2,3}, YU Yang³, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, YAO Xin-sheng³

1. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To study the antiviral constituents from the active fraction of Re-Du-Ning (RDN) Injection. **Methods** In this study, the active fraction of RDN Injection was screened by the mice model loaded with restraint stress infected with influenza virus. The investigation on this fraction led to the isolation and identification of compounds through various chromatographic techniques and spectroscopic methods. In addition, the *in vitro* activity on influenza virus A (A/PR/8/34 H1N1) of the flavonoids was evaluated *in vitro* by the method for the detection of anti-influenza virus neuraminidase activity. **Results** Through the macroporous adsorption resin, 95% ethanol eluate of RDN Injection was proved to be the antivirus active fraction of RDN Injection. Twenty compounds were obtained and characterized as syringic acid (1), ferulic acid (2), benzoic acid (3), caffeic acid (4), *p*-hydroxy benzaldehyde (5), vanillin (6), 4-hydroxy-3-methoxy styrene acrylic acid (7), *trans-p*-hydroxy cinnamic acid (8), *trans-o*-hydroxy cinnamic acid (9), *trans*-cinnamic acid (10), 7-hydroxy-6-methoxy coumarin (11), 7-hydroxy-6, 8-dimethoxy coumarin (12), coumarin (13), 3-hydroxy-1, 2-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanone (14), isorhamnetin (15), quercetin (16), luteolin (17), rutin (18), hyperoside (19), and luteolin-7-O-β-D-glucoside (20). Among them, luteolin exhibited the antivirus activity against Flu A virus. **Conclusion** All the isolated compounds are reported from RDN Injection for the first time, and luteolin exhibits the most potential activity against H1N1.

Key words: Re-Du-Ning Injection; syringic acid; caffeic acid; vanillin; isorhamnetin; quercetin; luteolin; antivirus activity

收稿日期: 2014-03-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)新药研制过程化学机制: 中药制药过程控制技术模式和方式研究(2010CB735604)

作者简介: 李海波(1985—), 女, 福建省宁德市人, 博士, 研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: lihaibo1985124@sina.com

*通信作者 萧伟, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: xw_kanion@163.com

姚新生, 中国工程院院士, 博士生导师, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: (020)85225849 E-mail: tyaoxs@jnu.edu.cn

热毒宁注射液由金银花、栀子和青蒿 3 味常用中药组合而成, 主要用于外感风热所致流感、高热不退、咳嗽、上呼吸道感染等症, 临床上退热作用迅速、抗病毒效果显著^[1]。本课题组采用流感病毒致应激负荷小鼠模型^[2]对热毒宁注射液及其分离部位进行了活性评价, 确定大孔吸附树脂 95%乙醇洗脱部位为热毒宁注射液抗病毒活性部位。本研究在此基础上对活性部位进行了系统地化学成分研究, 从中分离得到了 20 个化合物, 分别鉴定为丁香酸 (syringic acid, **1**)、阿魏酸 (ferulic acid, **2**)、苯甲酸 (benzoic acid, **3**)、咖啡酸 (caffeic acid, **4**)、对羟基苯甲醛 (*p*-hydroxy benzaldehyde, **5**)、香草醛 (vanillin, **6**)、4-羟基-3-甲氧基苯丙酸 (4-hydroxy-3-methoxy styrene acrylic acid, **7**)、反式对羟基桂皮酸 (*trans-p*-hydroxy cinnamic acid, **8**)、反式邻羟基桂皮酸 (*trans-o*-hydroxy cinnamic acid, **9**)、反式桂皮酸 (*trans*-cinnamic acid, **10**)、7-羟基-6-甲氧基-香豆素 (7-hydroxy-6-methoxy coumarin, **11**)、7-羟基-6, 8-二甲氧基-香豆素 (7-hydroxy-6, 8-dimethoxy coumarin, **12**)、香豆素 (coumarin, **13**)、3-羟基-1, 2-双 (4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-丙酮 [3-hydroxy-1, 2-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanone, **14**]、异鼠李素 (isorhamnetin, **15**)、槲皮素 (quercetin, **16**)、木犀草素 (luteolin, **17**)、芦丁 (rutin, **18**)、金丝桃苷 (hyperoside, **19**)、木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (luteolin-7-*O*- β -D-glucoside, **20**)。所有化合物均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 对分离得到的黄酮类化合物进行体外抗甲型流感病毒 (A/PR/8/34 H1N1) 作用研究, 结果显示木犀草素对流感病毒的 EC₅₀ 值小于 50 μ mol/L, 选择指数 (SI) 值大于 10, 具有较强的体外抗甲型流感病毒的活性。

1 仪器与材料

Brucker AVANCE400 型核磁共振仪 (瑞士 Brucker 公司), Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Waters Snapt G2 mass spectrometer 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司), Shimadzu 分析高效液相色谱 (日本 Shimadzu 公司, Shimadzu LC-6AD 泵, 紫外检测器), Shimadzu 制备型高效液相色谱 (日本 Shimadzu 公司)。分析高效液相色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Nacalai Tesque Inc., 日本), 制备高效液相色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μ m, Nacalai Tesque Inc., 日本)。薄层硅胶 GF₂₅₄ 和柱色

谱硅胶 (青岛海洋化工厂), HP-20 大孔树脂 (Mitsubishi-Chemical, 日本), 反相 ODS 填料 (Merck 公司), Sephadex LH-20 填料 (Amersham Biosciences 公司), Toyo-pearl HW-40 填料 (Toyo Soda MFG)。热毒宁注射液 (江苏康缘药业股份有限公司生产, 批号 100906)。

2 提取与分离

热毒宁注射液成品浓缩液 840 g, 用适量水溶解后经 HP-20 大孔吸附柱色谱, 乙醇-水梯度洗脱, 得到水洗脱部位 RDN-1 (410 g), 30%乙醇洗脱部位 RDN-2 (318 g), 95%乙醇洗脱部位 RDN-3 (84 g)。取 95%乙醇洗脱部位 RDN-3 (65 g) 进行硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱得到 Fr. 1~9 共 9 个流分。Fr. 1 经过 ODS 中低压柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 70%甲醇-水洗脱部分经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 柱色谱分离, 再经过 HPLC 制备 (65%甲醇), 得到化合物 **3** (17.4 mg)、**5** (8.9 mg)、**6** (7.5 mg)、**10** (7.8 mg) 和 **14** (4.3 mg), 50%甲醇-水洗脱部分经 Sephadex LH-20 柱色谱分离 (氯仿-甲醇, 1:1) 再经过 HPLC 制备 (30%乙腈), 得到化合物 **1** (15.8 mg)、**2** (8.9 mg)、**7** (6.7 mg)、**11** (8.9 mg)、**12** (9.3 mg) 和 **13** (2.5 mg)。Fr. 2 经过 ODS 中低压柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 40%甲醇-水洗脱部分经 Sephadex LH-20 (甲醇-水 1:1) 柱色谱分离, HPLC 制备 (20%乙腈) 得到化合物 **8** (9.5 mg) 和 **9** (8.8 mg)。Fr. 4 经过 ODS 中低压柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 70%甲醇-水洗脱部分经 HPLC 制备 (45%甲醇水), 得到化合物 **15** (3.7 mg)、**16** (5.1 mg) 和 **17** (25.4 mg), 40%甲醇-水洗脱部位经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 50%甲醇水等度洗脱得到 3 个流分 Fr. a~c, Fr. a 重结晶得到化合物 **20** (70 mg), Fr. b 洗脱部分经 HPLC 制备 (45%甲醇-水), 得到化合物 **18** (4.7 mg) 和 **19** (5.3 mg)。Fr. 6 经过 ODS 中低压柱色谱, 甲醇-水梯度洗脱, 50%甲醇-水洗脱部分经 HPLC 制备 (45%甲醇-水), 得到化合物 **4** (10.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色针状结晶 (甲醇), ESI-MS *m/z*: 199 [M+H]⁺, 221 [M+Na]⁺, 197 [M-H]⁻, 相对分子质量为 198。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.32 (2H, s, H-2, 6), 3.87 (6H, s, H-3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.0 (COOH), 148.8 (C-3, 5), 141.7 (C-4), 121.9 (C-1), 108.3 (C-2, 6), 56.7 (C-3,

5-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **1** 为丁香酸。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 217 [M+Na]⁺, 193 [M-H]⁻, 相对分子质量为 194。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₀H₁₀O₄, 不饱和度为 6。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.58 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.16 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 7.08 (1H, dd, J = 1.9, 8.2 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.30 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (C-9-COOH), 146.8 (C-7), 150.5 (C-4), 149.4 (C-3), 127.8 (C-1), 124.0 (C-8), 116.5 (C-6), 116.1 (C-5), 111.7 (C-2), 56.4 (C-3-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为阿魏酸。

化合物 **3**: 无色针状结晶(甲醇), ESI-MS m/z : 121 [M-H]⁻, 相对分子质量为 122。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.00 (2H, m, H-3, 5), 7.57 (1H, tt, J = 1.4, 8.7 Hz, H-4), 7.48 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2, 6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.1 (-COOH), 132.0 (C-1), 134.0 (C-4), 130.7 (C-2, 6), 129.4 (C-3, 5)。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为苯甲酸。

化合物 **4**: 淡黄色结晶(甲醇), ESI-MS m/z : 203 [M+Na]⁺, 179 [M-H]⁻, 相对分子质量为 180。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₉H₈O₄, 不饱和度为 6。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.53 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, J = 1.8, 8.5 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.22 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (9-COOH), 146.9 (C-7), 149.4 (C-4), 146.8 (C-3), 127.8 (C-1), 122.8 (C-8), 116.5 (C-6), 115.7 (C-5), 115.1 (C-2)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **4** 为咖啡酸。

化合物 **5**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 123 [M+H]⁺, 145 [M+Na]⁺, 121 [M-H]⁻, 相对分子质量为 122。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₇H₆O₂, 不饱和度为 5。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.76 (1H, s, CHO), 7.77 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 192.8 (CHO), 164.6 (C-4), 133.4 (C-2, 6), 130.1 (C-1), 116.9 (C-3, 5)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **5** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **6**: 无色针晶(甲醇), ESI-MS m/z : 153

[M+H]⁺, 151 [M-H]⁻, 相对分子质量为 152。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₈H₈O₃, 不饱和度为 5。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.73 (1H, s, CHO), 7.43 (1H, dd, J = 8.5, 1.7 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2), 6.94 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 192.9 (CHO), 154.7 (C-4), 149.7 (C-3), 130.6 (C-1), 127.9 (C-6), 116.3 (C-5), 111.2 (C-2), 56.3 (C-3-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为香草醛。

化合物 **7**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 195 [M-H]⁻, 推出化合物相对分子质量为 196。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₁₀H₁₂O₄, 不饱和度为 5。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.82 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2), 6.69 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.66 (1H, dd, J = 1.5, 8.0 Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 2.84 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-7), 2.54 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.1 (9-COOH), 149.4 (C-3), 150.1 (C-4), 133.5 (C-1), 122.0 (C-6), 116.3 (C-5), 111.2 (C-2), 56.8 (3-OCH₃), 34.7 (C-8), 31.8 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **7** 为二氢异阿魏酸。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 163 [M-H]⁻, 相对分子质量为 164。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₉H₈O₃, 不饱和度为 6。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.59 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.42 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2, 6), 6.79 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3, 5), 6.27 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (9-COOH), 146.6 (C-7), 161.1 (C-4), 116.8 (C-3, 5), 127.2 (C-1), 115.6 (C-8), 131.1 (C-2, 6)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **8** 为反式对羟基桂皮酸。

化合物 **9**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 163 [M-H]⁻, 相对分子质量为 164。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据确定分子式为 C₉H₈O₃, 不饱和度为 6。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.95 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-7), 7.48 (1H, dd, J = 1.4, 8.0 Hz, H-6), 7.20 (1H, td, J = 1.7, 8.5 Hz, H-4), 6.84 (2H, m, H-3, 5), 6.55 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 171.1 (9-COOH), 142.2 (C-7), 132.5 (C-4), 120.8 (C-5), 122.8 (C-1), 130.0 (C-6), 119.3 (C-8), 158.2 (C-2), 117.0 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **9** 为反式邻羟基桂皮酸。

化合物 **10**: 无色针状结晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 147 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 148。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_9H_8O_2$, 不饱和度为 6。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.67 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.59 (2H, m, H-3, 5), 7.40 (3H, m, H-2, 4, 6), 6.49 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8)。其 TLC 行为与反式桂皮酸对照品一致, 以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **10** 为反式桂皮酸。

化合物 **11**: 黄绿色固体, ESI-MS m/z : 193 $[M+H]^+$, 191 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 192。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{10}H_8O_4$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.86 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-4), 6.21 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 7.11 (1H, s, H-8), 6.78 (1H, s, H-5), 3.92 (3H, s, $-OCH_3$); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 164.1 (C-2), 153.0 (C-7), 151.4 (C-6), 147.1 (C-10), 146.1 (C-4), 112.6 (C-3), 112.5 (C-9), 109.9 (C-5), 103.9 (C-8), 56.8 (6- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **11** 为 7-羟基-6-甲氧基-香豆素。

化合物 **12**: 黄绿色固体, ESI-MS m/z : 223 $[M+H]^+$, 221 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 222。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定化合物分子式为 $C_{11}H_{10}O_5$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.82 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-4), 6.21 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 6.88 (1H, s, H-5), 3.94 (3H, s, $-OCH_3$), 3.89 (3H, s, $-OCH_3$)。通过与化合物 **11** 进行比对, 发现化合物 **12** 仅多了 1 个甲氧基信号, 少了 1 个芳香质子信号, 并与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **12** 为 7-羟基-6, 8-二甲氧基-香豆素。

化合物 **13**: 白色针晶, ESI-MS m/z : 147 $[M+H]^+$, 145 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 146。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_9H_6O_2$, 不饱和度为 7。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.96 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 7.62 (2H, m, H-6, 7), 7.35 (2H, m, H-5, 8), 6.44 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **13** 为香豆素。

化合物 **14**: 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 319 $[M+H]^+$, 317 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 318, HR-ESI-Q-TOF-MS m/z : 341.100 4 $[M+Na]^+$ (计算值为 341.100 1), 确定分子式为 $C_{17}H_{18}O_6$, 不饱和度为 9。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, dd, J = 1.9, 8.5 Hz, H-6'), 7.55 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.79 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.75 (1H, dd, J = 2.0,

8.2 Hz, H-6), 6.88 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.71 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 3.85 (3H, s, $-OCH_3$), 3.81 (3H, s, $-OCH_3$); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 199.7 ($-CO$), 149.3 (C-3), 149.0 (C-3'), 155.4 (C-4'), 147.0 (C-4), 130.4 (C-1'), 116.4 (C-1), 65.5 (C- α), 56.4 (C-3'- OCH_3), 56.3 (C-3- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **14** 为 3-羟基-1, 2-双 (4-羟基-3-甲氧基苯基)-1-丙酮。

化合物 **15**: 黄色无定形粉末。ESI-MS m/z : 317 $[M+H]^+$, 315 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 316, 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{16}H_{12}O_7$, 不饱和度为 11。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.76 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.69 (1H, dd, J = 8.5, 2.1 Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5') 6.48 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 183.4 (C-4), 164.8 (C-7), 163.4 (C-2), 161.5 (C-5), 157.3 (C-9), 149.4 (C-4'), 146.9 (C-3'), 121.9 (C-1'), 121.6 (C-6'), 115.2 (C-5'), 113.2 (C-2'), 104.2 (C-3), 103.6 (C-10), 99.0 (C-6), 93.8 (C-8), 59.8 (4'- OCH_3)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **15** 为异鼠李素。

化合物 **16**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 325 $[M+Na]^+$, 301 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 302。结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$, 不饱和度为 11。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.66 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.53 (1H, dd, J = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 176.5 (C-4), 164.8 (C-7), 161.3 (C-9), 156.7 (C-5), 148.2 (C-2), 147.3 (C-4'), 145.7 (C-3'), 122.4 (C-1'), 120.5 (C-6'), 115.8 (C-5'), 116.1 (C-2'), 136.3 (C-3), 103.4 (C-10), 98.7 (C-6), 93.9 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **16** 为槲皮素。

化合物 **17**: 黄色无定形粉末。ESI-MS m/z : 287 $[M+H]^+$, 285 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 286, 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据确定分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$, 不饱和度为 11。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.37 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.43 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.53 (1H, s, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 183.9 (C-4), 166.4 (C-7), 166.0 (C-2), 163.2 (C-5), 159.4

(C-9), 150.9 (C-4'), 147.1 (C-3'), 123.7 (C-1'), 120.3 (C-6'), 116.8 (C-2'), 114.2 (C-5'), 105.3 (C-3), 100.1 (C-6), 95.0 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **17** 为木犀草素。

化合物 **18**: 黄色粉末, EI-MS m/z : 633 $[M+Na]^+$, 1 243 $[2M+Na]^+$, 609 $[M-H]^-$, 1 219 $[2M-H]^-$, 相对分子质量为 610。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.56 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, brd, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.83 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.34 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 5.07 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-1'''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) 结合 DEPT-135 图谱共显示 27 根谱线, 除去 2 个糖基的信号剩余 15 个碳信号 δ : 179.4 (C-4), 166.0 (C-7), 163.0 (C-5), 159.4 (C-2), 158.5 (C-9), 149.8 (C-4'), 145.8 (C-3'), 135.7 (C-3), 123.2 (C-1'), 105.7 (C-10), 123.6 (C-6'), 117.7 (C-5'), 116.1 (C-2'), 100.0 (C-6), 94.7 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **18** 为芦丁。

化合物 **19**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 487 $[M+Na]^+$, 951 $[2M+Na]^+$, 463 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 464。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 不饱和度为 12。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.67 (1H, dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 60.7 (C-6''), 67.8 (C-4''), 71.1 (C-2''), 73.1 (C-3''), 75.8 (C-5''), 93.4 (C-8), 98.6 (C-6), 101.7 (C-1''), 103.8 (C-10), 115.1 (C-5'), 115.9 (C-2'), 121.9 (C-6'), 121.0 (C-1'), 133.4 (C-3), 144.7 (C-4'), 148.4 (C-3'), 156.1 (C-2), 156.2 (C-9), 161.1 (C-5), 164.0 (C-7), 177.4 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **19** 为金丝桃苷。

化合物 **20**: 黄色无定形粉末。ESI-MS m/z : 951 $[2M+Na]^+$, 463 $[M-H]^-$, 相对分子质量为 464, 结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据推测分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 不饱和度为 12。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.45 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.42 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.74 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.9 (C-4), 164.4 (C-7), 162.9 (C-2),

161.1 (C-5), 156.9 (C-9), 149.9 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.3 (C-1'), 105.3 (C-10), 119.1 (C-6'), 115.9 (C-5'), 113.5 (C-2'), 103.1 (C-3), 99.5 (C-6), 94.7 (C-8)。由分子式推知, 剩余的信号应归属为 1 个六碳糖基。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **20** 为木犀草素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

4 黄酮类化合物体外抗甲型流感病毒的活性评价

4.1 黄酮类化合物的细胞毒性检测

实验采用 AlamarBlue[®] (Invitrogen) 试剂盒检测化合物对细胞的毒性作用。单体化合物的最高毒性测试浓度均为 500 μ mol/mL。

AlamarBlue[®] 是一种氧化还原指示剂, 能根据代谢活性产生吸光度变化和荧光信号。AlamarBlue[®] 易溶于水, 其氧化形式进入细胞后经线粒体酶还原产生可测量的荧光及颜色变化, 用于细胞活性和细胞增殖的定量分析以及体外细胞毒性研究。这种测定是基于具有代谢活性的细胞将试剂转换成荧光和比色指示剂的能力, 受损和无活性细胞具有较低天然代谢活性, 对应的信号较低。因此荧光信号强弱可以反映细胞活性的高低。

细胞活性 = (样品孔荧光值 - 空白对照孔荧光值) / (细胞对照孔荧光值 - 空白对照孔荧光值)

将 MDCK 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞贴壁后备用。用细胞维持液将单体化合物从 2 倍起始浓度连续 5 倍梯度稀释 6 个梯度, 每浓度梯度单孔检测。加化合物培养 72 h 后, 光镜下观察化合物引起的细胞病变效应, 加入 AlamarBlue[®], 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 荧光检测 AlamarBlue[®] 的还原情况, 激发光波长 570 nm, 发射光波长 595 nm。实验结果见表 1。

4.2 黄酮类化合物对甲型流感病毒的抑制试验

采用检测流感病毒神经氨酸酶活性来代表病毒的复制水平, 将 MDCK 细胞接种于 96 孔细胞培养板中备用。化合物从 2 倍最高测试浓度 (100 μ mol/mL) 起连续 5 倍梯度稀释 6 个梯度; 将孔板中培养基弃去, 同时加入化合物和病毒液于细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 1 h 后, 弃上清培养基, PBS 洗涤后, 再次加入梯度稀释药物。置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养 48 h, 辅以观察细胞病变 (CPE)。取培养液上清进行神经氨酸酶活力检测。实验设空白对照孔 (正常细胞)、酶活对照孔 (病毒感染后未加药物孔)、阳性药物对照孔 (感染后加利巴韦林)。神经氨酸酶活性检测实验操作步骤如下: 在 96 孔黑色微量板中加入 40 μ L 底物 (MUNANA), 吸取病

表1 黄酮类化合物体外抗流感病毒活性
Table 1 *In vitro* antiviral experiment results of flavonoids

化合物	CC ₅₀ / (μmol·mL ⁻¹)	EC ₅₀ / (μmol·mL ⁻¹)	SI
异鼠李素 (15)	—	ND	ND
槲皮素 (16)	—	91.284	>5.48
木犀草素 (17)	—	28.440	24.66
芦丁 (18)	—	ND	ND
金丝桃苷 (19)	—	ND	ND
木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (20)	—	ND	ND

CC₅₀: 使 50% 细胞发生病变时的药物浓度; EC₅₀: 指能够有效抑制 50% 细胞感染病毒的药物浓度; SI = CC₅₀ / EC₅₀; “—”: 未检测到明显细胞毒性, 其 CC₅₀ 值大于最大测试浓度; “ND”: 未检测到病毒抑制活性, 无 SI

CC₅₀: the median lethal dose of a substance, or the amount required to kill 50% of a given test population; EC₅₀: the molar concentration of an agonist, which produces 50% of the maximum possible response for that agonist; SI (selected index) = CC₅₀ / EC₅₀; “—”: No cytotoxicity and CC₅₀ > the maximum test concentration; “ND”: No inhibitory activity and no selected index

毒培养液 20 μL 上清加入孔板中, 避光置于 37 ℃ 孵育 60 min, 加入 100 μL/孔终止液终止反应, 多功能检测仪上测定荧光值。激发光波长 355 nm, 发射光波长 485 nm。计算各检测孔中神经氨酸酶抑制率, 结果见表 1。

抑制率 = 100 - (样品孔荧光值 - 空白对照孔荧光值) / (酶活对照孔荧光值 - 空白对照孔荧光值)

实验结果表明这些黄酮类化合物的细胞毒性较低, 所测 CC₅₀ 值大于被测试的最高浓度, 同时在光学显微镜下看不到明显的细胞病变, 其中木犀草素对流感病毒表现出较强抑制作用, EC₅₀ 值小于 50 μmol/L, SI 值大于 10, 且细胞毒性较低 (CC₅₀ 值较高), 值得进一步深入研究其抗病毒作用机制。

5 讨论

本研究采用现代化学-药理学相结合的方法对临床疗效确切, 应用广泛的热毒宁注射液进行抗病毒活性成分的研究。综合应用各种色谱分离手段从热毒宁注射液抗病毒活性部位 (热毒宁注射液经 HP-20 大孔吸附树脂 95% 乙醇洗脱部位) 中分离并鉴定了 20 个化合物, 所有化合物均为首次从热毒宁注射液中分离得到, 并采用检测流感病毒神经氨酸酶活性的方法, 对分离得到的黄酮类化合物进行了体外抗甲型流感病毒 (A/PR/8/34 H1N1) 作用研究,

结果显示木犀草素体外抑制流感病毒的活性较强, 可能是热毒宁注射液的抗病毒活性成分之一。这在一定程度上揭示了该产品发挥抗病毒作用的物质基础; 为探讨黄酮类成分对复方药效的贡献提供了依据。在后续研究中本课题组将继续追踪分离活性成分, 选择能反映复方整体药效活性的药理评价模型对热毒宁注射液中的多种成分进行多方面、多层次的研究, 以期能为全面揭示热毒宁注射液的科学内涵提供依据, 并最终建立与活性相关联的质量控制方法。同时本研究的思路与方法也为阐明中药复方药效物质基础提供了一种可能的研究思路与方法。

志谢: 暨南大学药学院中药及天然药物研究所栗原博教授课题组帮助完成热毒宁注射液抗病毒活性部位的筛选; 中国科学院武汉病毒所陈绪林教授课题组帮助完成单体化合物的体外活性评价工作; 暨南大学药学院中药及天然药物研究所帮助完成核磁和质谱的测试工作。

参考文献

- [1] 余 俭. 抗菌抗病毒新药——热毒宁注射液 [J]. 中南药学, 2010, 8(7): 548-550.
- [2] 王聪智. 应激负荷诱发小鼠抗流感病毒能力低下与营养型鸡精的改善作用 [D]. 广州: 暨南大学, 2011.
- [3] 张 雪, 高 昊, 姚新生, 等. 金钗石斛中的酚性成分 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 652-655.
- [4] 邢亚超, 汤迎湛, 潘 英, 等. 新疆阿魏树脂的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 11-13.
- [5] 叶 冠, 彭 华, 范明松, 等. 十齿花化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 808-810.
- [6] Yue J M, Lin Z W, Sun H D. A new caffeoyl conjugate from *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Chem Lett*, 1977, 8(3): 225-228.
- [7] 王素娟, 裴月湖. 白桦叶化学成分的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 256-257.
- [8] Lin T H, Chang S J, Chen C C. Constituents from the stems of *Dendrobium moniliforme* [J]. *Chin Pharm J*, 2000, 52(5): 251-259.
- [9] 王新峦, 王乃利, 姚新生, 等. 骨碎补中的苯丙素类成分及其对 UMR 106 细胞增殖作用的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(1): 24-28.
- [10] 周惠燕, 李士敏. 竹叶化学成分研究 [J]. 中国药杂志, 2006, 41(9): 662-663.
- [11] Gerothanassis I P, Exarchou V, Iagouri V, et al. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution

- two-dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two oregano species [J]. *Agric Food Chem*, 1998, 46(10): 4185-4192.
- [12] Yun X J, Shu H M, Chen G Y, *et al*. Chemical constituents from barks of *Lannea coromandelica* [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(1): 65-69.
- [13] 尹 锋, 楼凤昌. 佛手化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 20-21.
- [14] 王青虎, 王金辉, 额尔登巴格那, 等. 蒙药小白蒿化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1540-1543.
- [15] 周 硕, 霍海如, 郭建友, 等. 桂枝汤对体温整合调节作用的活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 865-867.
- [16] 黄火强, 朴香兰. 三角叶凤毛菊化学成分研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1569-1572.
- [17] 卢海啸, 倪 林, 李树华, 等. 三桠苦叶的化学成分研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 56-65.
- [18] 吴迎春, 张尊听, 甄宝勤, 等. 贯叶连翘化学成分分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(6): 99-106.
- [19] 张 伟, 李春梅, 吴春华, 等. 中药北刘寄奴中黄酮类成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(6): 434-437.
- [20] Yu X X, Xiao Y, Xu Z J, *et al*. A new diarylheptanoid from barks of *Mangifera indica* [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 320-322.
- [21] 唐 敏. 金银花黄酮活性成分分离纯化与生物学效应研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [22] Beck M A, Berlein H H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(2): 323-332.