

黄芪注射液中对心脏正性肌力作用的成分分离与鉴定*

刘星阶 喻正坤 郑基蒙¹ 龚志铭¹

张静华¹ 沈筱同 戴瑞鸿¹

(上海医科大学药学院,¹华山医院,上海 200032)

摘要 用豚鼠离体乳头肌的收缩力相对增强百分率为正性肌力作用的指标,研究了黄芪注射液及其各分离部分的活性,证明中性部分为有效部位;其正性肌力作用呈浓度依赖关系。并用放射配基-受体结合分析法,证明其作用不是通过 β -肾上腺素受体,也不依赖于儿茶酚胺的释放。活性部分的成分,通过柱层析分离出单体,并经波谱数据分析和标准样品直接对照,证明该单体为黄芪甙IV。

关键词 黄芪;黄芪甙IV;正性肌力作用

Activity-guided isolation and identification of Huangqi injection constituents with positive inotropic activity Liu Xing-Jie, Yu Zheng-Kun, Zheng Ji-Meng¹, Gong Zhi-Ming¹, Zhang Jing-Hua¹, Shen Xiao-Tong and Dai Rui-Hong¹ (School of Pharmacy, Shanghai Medical University, ¹Huashan Hospital, Shanghai 200032) *J. Plant Resour. & Environ.* 1992, 1(2): 4~9

Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. (Leguminosae) is widely used in Chinese traditional medicine as an antiperspirant, a diuretic or a tonic. By bioactivity-guided fractionating, a positive inotropic constituent has been characterized from the neutral portion of Huangqi injection, using modified Robert's method as a guide. Its activity quantitatively correlated well with the dosage of neutral portion and the result of radio-complement-receptor combination analysis suggests that the positive inotropic effect of Huangqi injection neither mediated through β -adrenaline receptor nor depended on the releasing of catechoamine. The constituents of Huangqi injection neutral portion have been isolated and identified by analysis of their spectra data and confirmed by direct comparison with authentic samples. It may be concluded that astragaloside IV from Huangqi injection neutral portion is the active constituent with positive inotropic activity.

Key words *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.; astragaloside IV; positive inotropic activity

我国传统中药黄芪为豆科紫云英属膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)或内蒙黄芪(*A. mongolicus* Bge.)的根,具有益卫、补中益气等功效^[1],中医临床上常用于治疗气衰血虚病人^[2]。

收稿日期 1991-11-01

* 国家自然科学基金资助课题(黄芪有效成份研究IV)

朱伯卿等^[3,4]应用黄芪注射剂治疗气虚血瘀型心力衰竭患者, 结果表明其能显著增加心排量, 改善血液流变学指标, 发现它对心脏有正性肌力作用, 并证实了黄芪注射剂是一非洋地黄类的正性肌力药物。

沈筱同等^[5]应用彻底去钙后的黄芪注射剂进行大鼠右心室乳头肌收缩力试验, 显示其对心肌的正性肌力作用, 且呈浓度依赖关系。作者用大鼠离体乳头肌的收缩力相对增强百分率为活性指标, 进行黄芪注射液各分离部分的活性筛选, 证明其中性部分为有效部位(表1)。并用放射配基-受体结合分析法证实黄芪注射液的强心作用不是通过 β 受体, 也不依赖于儿茶酚胺的释放(表2)。

表1 离体大鼠右心室乳头肌收缩力相对增强百分率

Tab 1 Relative increment percentage of contraction force by papilla muscle isolated from white rats right venicle.

样品 Sample	剂量(mg/ml) Dose	相对收缩力增强% Relative increment percentage of contraction force
黄芪注射液 Huangqi injection	0.02	10.7±8.6% (p<0.05, n=6)
	0.2	13.7±9.0% (p<0.05, n=6)
	2	18.5±10.8% (p<0.01, n=6)
中性成分 neutral portion	0.02	22.2±13.7% (p<0.05, n=6)
	0.2	46.5±24.3% (p<0.05, n=6)
	2	73.5±48.7% (p<0.05, n=6)

表2 黄芪注射液(去钙)放射配基-受体结合分析

Tab 2 The radio-complement-receptor combination analysis of Huangqi injection (without Ca^{2+})

剂量(mg/ml) Dose	β -受体抑制率(%) β -adrenaline receptor inhibition (%)
0.2	14.8
0.02	11.3

作者将黄芪注射液的强心有效部分加以分离分析, 证明其中含有葡萄糖、蔗糖及黄芪甙IV (astragaloside IV)。

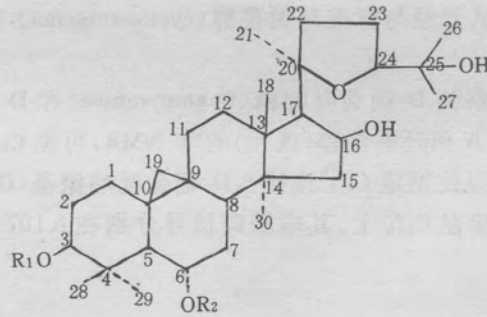
黄芪甙IV的鉴定, 为白色细针晶, m. p. 299°C, $C_{41}H_{68}O_{14} \cdot 2H_2O$, $[\alpha]_D^{25} + 24.5^\circ$ (0.4% 甲醇)。红外光谱示有羟基(3380 cm^{-1})、环丙烷

(3020 cm^{-1})吸收峰存在, 1H 核磁共振谱上示特征的环丙烷信号(δ 0.27, 0.59, 各 1H 均为d, J=3.5Hz), 酸水解后所得甙元经与标准环黄芪醇(cycloastragenol)直接对照IR谱一致。FAB-MS测得分子量为784。

^{13}C NMR谱上可观察到D-葡萄糖吡喃糖(D-glucopyranose)和D-木吡喃糖(D-xylopyranose)的部分(表3), 比较黄芪甙IV和环黄芪醇(甙元)的 ^{13}C NMR, 可见 C_3 和 C_6 分别产生了10.3 ppm和10.7 ppm的甙化位移, 因此推定 C_6 上连接 β -D-葡萄糖吡喃糖基(D-glucopyranosyl), 而木吡喃糖基(xylopyranosyl)则应接在 C_3 位上。其端基碳信号分别在 δ_c 107 ppm处和105 ppm处^[6](见表3)。

表3 黄芪甙IV和环黄芪醇¹³C NMR谱比较(δ, ppm 吡啶-d₅)Tab 3 Comparison of ¹³C NMR data for astragaloside IV and cycloastragenol (δ, ppm, pyridin-d₅)

碳序号 No.	黄芪甙 IV Astragaloside IV	环黄芪醇 Cycloastragenol	碳序号 No.	黄芪甙 IV Astragaloside IV	环黄芪醇 Cycloastragenol
1	32.4(t)	35.1(t)	22	35.0(t)	31.3(t)
2	30.1(t)	32.9(t)	23	25.9(t)	26.6(t)
3	88.7(d)	78.4(d)	24	82.0(d)	81.8(d)
4	42.6(s)	42.5(s)	25	71.5(s)	71.4(s)
5	54.2(d)	54.0(d)	26	23.0(q)	28.3(q)
6	79.2(d)	68.5(d)	27	25.6(q)	28.7(q)
7	38.4(t)	39.0(t)	28	20.0(q)	29.3(q)
8	46.7(d)	47.5(d)	29	16.6(q)	16.3(q)
9	23.0(s)	21.1(s)	30	18.6(q)	20.4(q)
10	29.3(s)	30.1(s)	1'	107.1(d)	
11	26.2(t)	26.5(t)	2'	75.2(d)	
12	33.4(t)	33.6(t)	3'	77.7(d)	
13	46.0(s)	45.2(s)	4'	71.3(d)	
14	45.1(s)	46.3(s)	5'	66.6(t)	
15	46.3(t)	46.9(t)	1''	105.0(d)	
16	73.5(d)	73.6(d)	2''	75.6(d)	
17	58.7(d)	58.5(d)	3''	79.0(d)	
18	21.4(q)	21.8(q)	4''	72.9(d)	
19	30.4(t)	31.5(t)	5''	77.9(d)	
20	87.3(s)	87.4(s)	6''	63.4(t)	
21	27.8(q)	27.3(q)			

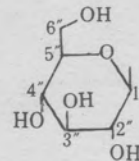
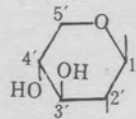


环黄芪醇 Cycloastragenol

R₁
H

R₂
H

黄芪甙 IV Astragaloside IV



实 验

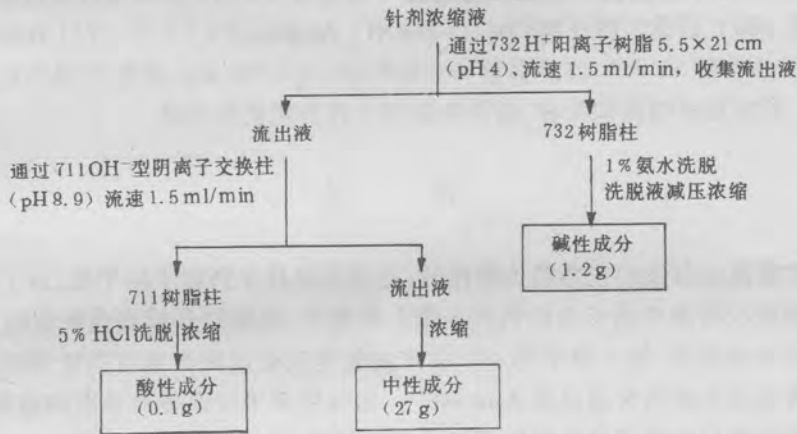
Kofler 显微熔点测定仪(温度未校正); Perkin-Elmer 783型红外光谱仪(KBr 压片); 岛津紫外240型分析仪; FX-90Q 型核磁共振仪(TMS 为内标)。薄层层析用硅胶 GF-254预制板, 110℃活化10 min, 展开剂 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}(7:3:1)$ 下层; 纸层析新华 I 号层析滤纸, 展开剂为正丁醇:醋酸:水(4.5:1:5), 显色剂为邻苯二甲酸苯胺, 柱层析用 Bondapak C_{18} 反相硅胶; 离子交换树脂(732型, 711型)由上海树脂厂生产。

正性肌力作用: 用改良的 Robert's 方法, 以离体大鼠乳头肌收缩力相对增强百分率为指标。雄大鼠(250~300 g 体重)离体乳头肌于 10 ml Krebs-Henseleit 溶液中, 30℃ 通入 95% O_2 和 5% CO_2 , 400 mg 张力, 自动记录收缩力(1 Hz 电刺激)^[8]。

黄芪注射液: (1) 华山医院制备; (2) 中药一厂生产。使用前均经离子交换树脂去钙离子。

薄层层析用微晶纤维素(Avicel); 加 1% CMC 液调制涂板(PTLC)。

1. 黄芪注射液有效部位的分离 取针剂(2 g 生药/ml) 2 l 减压浓缩至 200 ml, 按下列流程分离:



2. 中性部分的成分分离 取上述中性部分 2.7 g 上反相硅胶 Bondapak C_{18} (150 g) 柱, 先用水洗脱至流出液检查无糖反应为止。收集水洗脱液, 浓缩至干, 经纸层析检查其中含 $R_f 0.14$ 和 0.18 的两个糖类, 再经纤维素粉 PTLC 分离, 得 $R_f 0.14$ 的糖: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 计算值(%): C 42.1, H 6.48, 实验值(%): C 42.21, H 6.51, m. p. 160~186℃ 分解。 $R_f 0.18$ 的糖: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 计算值(%): C 40.0, H 6.72, 实验值(%): C 40.25, H 6.83, m. p. 83℃ (稀乙醇重结晶)。

分别与标准的蔗糖和葡萄糖样品进行纸层析鉴定和红外光谱对照, 证明上述分离出 $R_f 0.14$ 的糖为蔗糖, $R_f 0.18$ 的糖为葡萄糖。

反相硅胶柱再用 50% 乙醇洗脱, TLC 控制, 收集硫酸铯试剂显色部分, 合并, 减压浓缩, 得固体 150 mg, 经二次甲醇重结晶, 得无色细针晶 100 mg。

3. 黄芪甙 IV 的鉴定 上述针晶 m. p. 299℃ (甲醇重结晶), $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 计算值(%): C 59.98, H 8.84, 实验值(%): C 59.95, H 8.75, $[\alpha]_D^{18} + 24.5^\circ (0.4\%, \text{MeOH})$, FAB-MS $\text{M}^+ \cdot 784$, EB-MS (m/z, %), 143(100), 125(16), ^{13}C NMR (见表 3 中的全部信号的归属) IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3380, 2930, 1040, 3020 (环丙烷基)。 ^1H NMR (吡啶 d_5, δ): 0.23, 0.52 (各 1H, d 3.5 Hz C_{19}), 0.98 (3H),

1. 29(12H), 1. 53(3H), 1. 82(3H)(全为 S, CH₃×7), TLC R_f0. 36, CHCl₃:MeOH:H₂O (7:3:1 下层)。

水解反应: 甙 100 mg, EtOH 10 ml, 10% HCl 5 ml, 苯 20 ml, 回流加热 24 hr, 反应液倾入冰水中, 水层用醋酸乙酯萃取 3 次, 乙酯层用饱和碳酸氢钠溶液洗一次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液减压蒸馏, 硅胶板制备薄层分离, 展开剂: CHCl₃:MeOH(10:1), 得甙元 C₃₀H₅₀O₅(30 mg), m. p. 243~244°C, $[\alpha]_D^{20} + 48^\circ$ (0.4%, MeOH), 计算值(%): C 73. 43, H 10. 27, 实验值(%): C 73. 38, H 10. 37, ¹H NMR (吡啶 d₅, 90 MHz, δ): 0. 31, 0. 59(各 1H, d, J=3. 5 Hz), 1. 10(3H), 1. 31(12H), 1. 41, 1. 53(各 3H)(全为 S, CH₃×7), 2. 53(1H d, J=7. 7 Hz, 17-H), 3. 76(1H, dd J=6. 9 Hz, 24-H), ¹³C NMR 见表 3, 按(6)指定信号归属。MS(m/z, %) 490(M⁺, <1%), 143(100), 125(27)。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3 400, 2 930, 1 090, 3 030(γ_{CH} 环丙基)。甙元的红外光谱经与标准的环黄茱醇的红外光谱对照完全一致。

从黄芪注射剂中分离得到的甙并与标准的黄芪甙 IV 样品进行直接对照, 二者在 R_f0. 36, 红外光谱均完全一致。

4. 黄芪注射液中黄芪甙 IV 薄层扫描定量 用岛津 CS-910 型薄层扫描仪测定; 硅胶 H 加 1% CMC 涂板, 105°C 活化。展开剂 CHCl₃: MeOH: Acetone(2: 1: 2), 10% H₂SO₄-EtOH 100°C 5 min 显色。线性参数 SX=3, 仪器参数 $\lambda_S=578$ nm, $\lambda_R=700$ nm, 反射法锯齿扫描, 狭缝 1. 25 × 1. 25 mm。测定斑点峰面积积分, 由标准曲线计算黄芪甙 IV 含量。

讨 论

1. 在研究黄芪注射液的正性肌力活性时, 必须排除其中钙离子的干扰, 由于该注射液在制备过程中或多或少将原生药所含的钙离子带入制剂中, 据我们分析有些制剂的含钙量足以影响正性肌力活性的观察, 如上海中药一厂生产的黄芪注射液钙含量可高达 980 μg/ml, 而华山医院制备的黄芪注射液钙含量仅有 5 μg/ml^[7]。因为钙离子对离体乳头肌的收缩有影响, 易造成假阳性。因而我们用离子交换树脂层析处理注射液, 保证钙离子的去除。

2. 黄芪注射液各分离部分, 经离体乳头肌的收缩增强(%)的筛选, 证明其酸性、碱性部分均无明显的正性肌力作用, 中性部分作用明显, 可能为有效成分存在的部分, 我们利用反相硅胶 Bondapak C₁₈ 柱层析分离, 分析其中成分, 证明含有葡萄糖、蔗糖及黄芪甙 IV, 黄芪甙 IV 经初步药理试验证明确有正性肌力作用。我们也用黄芪甙 IV 的标准样品为对照进行薄层扫描分析, 结果发现黄芪甙 IV 在黄芪注射液中的含量为 90~890 μg/ml(华山医院生产的不同批号的黄芪注射液 2 g 生药/ml)。

3. 黄芪注射剂的强心作用机制的探讨

(1) 用放射配基-受体结合分析法, 测定黄芪注射剂对 β-受体的影响(表 2), β-受体抑制率均小于 50%, 表明无明显抑制作用, 说明它的强心作用不是通过 β-受体而发挥作用的。

(2) 用利血平处理动物后的乳头肌依然显示出正性肌力作用, 故说明黄芪注射剂的强心作用不是通过促进儿茶酚胺释放而引起的。

(3) 黄芪注射液与毒毛旋花子甙 K 联合作用于乳头肌, 呈非常显著的增强心肌收缩力的作用, 说明与毒毛旋花子甙 K 的强心机制是不相同的, 因而我们认为黄芪的有效成分可能为

非毛地黄强心甙一类的强心药^[5]。

致谢 本工作曾得到上海市科委部分资助,药学院仪器分析中心的陈御石、吴伟良、王建忠等同志帮助测定 IR、UV、NMR 及 MS。上海中医学院植化室何侃同志提供黄芪甙 IV 及环黄芪醇等标准品,分析室代测比旋光度,并支援反相硅胶 Bondapak C₁₈。特此致谢。

参 考 文 献

- 1 全国中草药汇编编写组. 1976: 全国中草药汇编(上册), 人民卫生出版社, 北京. 761 页.
- 2 江苏新医学院. 1986: 中药大辞典(下册), 上海科技出版社, 上海. 2038 页.
- 3 朱伯卿, 戴瑞鸿, 龚志铭等. 1986: 中西医结合杂志 6(2):75.
- 4 戴瑞鸿, 朱伯卿, 徐雅民等. 1984: 上海医科大学学报 14(2):201.
- 5 沈筱同, 刘星阶, 戴瑞鸿等. 1990: 全国中西医结合第二届心血管疾病学术交流会论文集汇编, 5 页.
- 6 刘星阶, 郑基蒙, 龚志铭等. 1990: 华东地区第九次天然药物化学学术讨论会论文集. 74~76 页.
- 7 榊原仁作, 植田泰诚, 大崎勉等. 1985: 药学杂志 105(8):731
- 8 Kitagawa I, H K Wang, M Saito *et al.* 1983: *Chem. Pharm. Bull.* 31(2): 698~715.

第十一届国际植物园协会大会将在无锡召开

“第十一届国际植物园协会大会”将紧接在“第十五届国际植物学大会”(1993年8月下旬至9月3日, 日本 横滨)之后于1993年9月在中国江苏无锡召开。会议由江苏省对外科技交流中心、中国环境科学学会植物园保护分会、国际植物园协会亚洲分会、南京中山植物园、江苏省无锡科委等单位筹办。会议的主题是“植物园与国家发展”, 内容包括: 植物物种保护、植物资源开发和持续利用、植物繁殖(组培及细胞培养)、植物育种、植物环境等方面。这个主题是在1991年5月国际植物园协会亚洲分会成立大会上由国际植物园界著名专家商定的, 对发展中国家尤为重要。

会议将邀请知名植物学家、植物园学家, P. Ashton, V. H. Heywood, K. Iwatsuki, K. Larsen, L. Andreev, H. Ern, M. A. Rifai, 以及我国的知名学者作大会报告。大会秘书处设在南京中山植物园内, 秘书长盛宁同志, 通讯地址: 210014 南京中山门外 南京中山植物园; Tel.: 432128; Telex: 34025 ISSAS CN; FAX: (025)432074。

国际植物园协会大会每6年召开一次, 按规定会址一次在欧洲国家, 一次在非欧洲国家。因此对一个争取筹办会议的国家来说12年才有一次机会。江苏省对外科技交流中心是1986年发出筹办本次会议的邀请的。