

双黄连二次开发的示范研究*

□阮克锋** 刘志远 林志宏 沈平壤**

(国家中药制药工程技术研究中心 上海 201203)

摘要:中成药双黄连是我国基本药物品种,有着 30 多年的临床应用历史,对急性上呼吸道感染疾病疗效确切。伴随现代科技发展,应用中药制药高新技术革新传统工艺,全面提高质量标准,加强临床疗效,二次开发双黄连传统片剂,具有重要意义。本文系统介绍了超临界萃取技术、分散片制剂技术与指纹图谱质控技术在双黄连传统片剂二次开发中的创新应用,对我国中药现代化、产业化与国际化发展,具有良好的示范作用。

关键词:双黄连 急性上呼吸道感染 超临界萃取 分散片 指纹图谱

一、双黄连制剂的背景介绍

1. 急性上呼吸道感染及其药物治疗现状

急性上呼吸道感染约有 70%~80% 由病毒引起。主要有流感病毒(甲、乙、丙)、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、鼻病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒、麻疹病毒、风疹病毒。细菌感染可直接或继病毒感染之后发生,以溶血性链球菌为多见,其次为流感嗜血杆菌、肺炎球菌和葡萄球菌等。其感染的主要表现为鼻炎、咽喉炎或扁桃腺炎。

目前,在急性上呼吸道病毒感染治疗领域尚缺乏特效药物,临床药物种类极少。吗啉胍(ABOB)对流感病毒和呼吸道病毒有一定的疗效。阿糖腺苷对腺病毒有一定效果。利福平能选择性抑制病毒 RNA 聚合酶,对流感病毒和腺病毒有一定疗效。近年发现

一种人工合成的、强有力的干扰素诱导剂——聚肌胞(简称 polyI:C)可使人体产生干扰素,能抑制病毒的繁殖。

中医药学与生物医学在防治感染病方面有共同之处,但也有明显区别。中医药讲究辨证,重视人的整体及人与自然界的相互联系,重视调整内在的抗病能力及邪正双方在体内的消长变化,进而对疾病发展过程中的不同特点进行跟踪治疗。传统中医学认为,感染性疾患是机体正气虚损、热毒内侵所致,可扶正祛邪,清热解毒,相比于西医单纯抗病毒疗法有不同特色。伴随现代科技发展,中医药学与时俱进,不断吸收融合先进科技,在防治感染病方面进一步彰显出优势特色。

近几年内,“非典”和“禽流感”这两个变异病毒的接踵而至,使人类付出了惨痛的代价。前不久世界卫生组织发出警告,禽流感已在多个国家爆发,一旦

收稿日期:2007-12-06

修回日期:2008-01-12

* 国家科技部重点科技攻关计划项目“中药现代化研究与产业化开发”(99-929-02-03):双黄连片现代化、国际化示范研究,负责人:沈平壤,阮克锋;上海市现代生物与新药发展基金项目(004319229):双黄连制剂的质量标准研究,负责人:沈平壤,阮克锋;上海市科委新药开发项目(04DZ19816):双黄连制剂的二次开发,负责人:沈平壤,阮克锋。

** 联系人:阮克锋,高级工程师,主要研究方向:中药制药工程技术, Tel:021-50800237, E-mail: rkf@nercmcm.com; 沈平壤,本刊编委,教授,主要研究方向:中药制剂和制药工程研究。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 17

出现能在人类之间传播的 H5N1 病毒变种,可能意味着流感的全球大流行。从中草药中开发治疗病毒感染的新药成为一个研发热点,临床上正热切期盼能有效抵御病毒感染、标本兼治的创新药物。

2. 抗感染中药双黄连制剂的优势与特色

双黄连由金银花、黄芩、连翘组成,含有多种抗病毒成分,具辛凉解表,清热解毒功效,临床可应用于急性上呼吸道感染的预防和 30 三十多年的临床应用历史。

药理学研究证明,双黄连能抑制病毒在人体细胞内的复制,对甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒(i-iv 型)、多种流感病毒变株(b 型)、呼吸道合胞病毒等 10 种病毒有较强的杀灭作用,对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎双球菌、百日咳杆菌、脑膜炎球菌等有明显的抑制作用,具有广谱的杀菌作用,并能降低毛细血管的通透性、减少渗出,具有抗炎、抗过敏作用,可增强机体产生 α -干扰素能力,显著增强细胞免疫和体液免疫,较强抑制多种病毒,并能中和细菌内毒素,具有抗感染及免疫调节双重作用。

多年临床实践表明,双黄连已成为防治流行性感冒最常用的中药方剂,对于各种感冒病毒引起的发热、咳嗽、咽痛,都有良好疗效。临床主要用于细菌和病毒感染引起的感冒、流感以及肺炎、气管炎、扁桃体炎等症。作为一种验方制剂,双黄连安全、疗效确切,尤其适用于对某些抗生素治疗无效以及对青霉素类抗生素过敏者,是一种很有前途的抗感染中药制剂。

农业部动物流感重点开发实验室暨国家禽流感参考实验室对双黄连制剂抗禽流感病毒的作用进行了实验研究,结果表明双黄连制剂对 H₅N₁ 亚型禽流感病毒的杀灭率达到 94.37%,可见该制剂对禽流感有良好的防治潜力。2007 年 8 月双黄连制剂(口服液)被列为其卫生部发布的《人禽流感诊疗方案》。

目前,双黄连制剂有口服液、片剂等口服剂型与注射剂等多种剂型,占抗感染中草药用药销售的 24%市场份额(据六大城市医院用药数据分析)。其中上海地区口服制剂用药占 93%,其它地区也均以口服制剂用药为主。随着临床适应症的增加及高效、低

毒、使用方便的口服新剂型产品的上市,口服制剂的市场将呈上升趋势。

3. 双黄连制剂的研究进展

双黄连制剂为中国药典和部颁标准所收录,有 20 多种剂型。其主要工艺流程均为以水煎酒沉等经典工艺。在分离、纯化技术方面,则有采用絮凝技术(是本研究中心的研究报道成果)和超滤技术的报道。在质量标准方面主要是绿原酸和黄芩苷的 TLC 法测定,其他方面研究较少。

传统双黄连制剂技术上局限,缺少严格可控的质量标准,这严重阻碍其临床应用与市场推广,更无法进入国际医药市场。目前主要存在的问题有:

(1)未明确处方有效物质基础,导致不同工艺路线制成的制剂疗效差别较大,临床用药选择困难,影响市场开拓。

(2)传统工艺仅采用水提取技术,未能有效富集处方中脂溶性活性成分(研究已证明具有很强的抗病毒作用),未充分利用药材。

(3)原产品制剂工艺落后,导致服用量大,生物药剂学性能低下,起效缓慢。

(4)缺乏对原料、中间体及成品的全面质量评判标准,难以稳定控制成品质量,更无法与国际接轨。

(5)市场上销售的制剂种类繁多,但均属于普通仿制或改变剂型,缺乏全面的毒理学、药效学、作用机理等基础研究工作,难以为临床应用提供科学依据。

4. 对双黄连制剂深入研究的意义

我中心采用现代先进技术,在制剂、工艺、质控方面进行独特的改进和创新,研制出一种剂型新颖,有效成分含量相对稳定、质量可控、服用剂量及有效剂量稳定、安全有效、临床效果显著,可与国际医药要求接轨的中成药。该药的研究对提供中药研究现代化和国际化具有良好的示范作用。

二、研究开发总体设想及其验证

通过对传统双黄连制剂存在问题的详细分析,我们提出以下设想,对双黄连制剂进行科学、系统的研究,目标是开发出更符合市场需求的,并能走向国际的有技术含量的双黄连新产品。

1. 超临界萃取技术的创新应用

超临界萃取技术适宜于挥发油等脂溶性成分的提取分离,如引入到双黄连提取工艺中可充分提取处方中脂溶性成分;同时,对超临界后的药材采用水提取,这样有可能既保证该处方主成分的不变,又增加了脂溶性有效成分,进一步提高双黄连制剂的药效作用。

体内外抗病毒试验筛选显示,双黄连超临界提取物对 A3(流感)、HVJ(副流感 I 型)、RSV(呼吸道合胞病毒)、HSV-I、II(单纯疱疹病毒 I、II)均有一定的抑制活性,水提取物仅对 A3(流感)有抑制作用,双黄连新工艺将超临界提取与亚沸态提取联用,扩大了产品的抗病毒谱。通过新老工艺提取物对病毒致细胞病变作用及对流感病毒性肺炎(肺指数)的影响比较,可以看出,双黄连新工艺对 5 种病毒均有一定抑制作用,抗病毒谱较广,体内抗病毒作用有强于老工艺作用趋势(表 1~表 3)。

根据以上两个方面的研究,我们最终选择了超临界提取与亚沸态动态水提取工艺相结合的工艺路线获取双黄连处方中有效物质和部位,并结合化学指标确定了超临界提取和水提取的最佳工艺参数。

2. 分散片制剂技术的创新应用

改变双黄连传统的制剂方法,采用较为新颖的分散片作为本次研究的双黄连制剂类型。分散片具有服用简单、起效快、生物利用度高等特点,制成双黄连分散片正适合于其治疗病毒性感冒等病症需要起效快、疗效好等特点。

按照 SFDA 对中药新药临床研究指导原则设计试验方案,遵循《药品临床研究管理规范》,上海中医药大学附属龙华医院、上海中医药大学附属曙光医院、上海中医药大学附属岳阳医院、浙江中医学院附属医院进行了以双黄连片对照评价双黄连分散片治疗感冒(风热证)有效性、安全性的随机、双盲、多中心、平行对照临床研究。

临床试验数据分析显示双黄连分散片治疗风热感冒综合疗效、中医症候疗效有效率均为 97.32%,体温疗效有效率为 89.29%,安全性评价 1 级为 (98.29%)。与双黄连片对照组比较,两组中医症状、

体征的各项指标治疗后较治疗前有明显改善,治疗前后组内比较,差异有统计学意义。临床研究结果显示,双黄连分散片治疗风热型感冒疗效确切,且不亚于阳性对照药物双黄连片。

双黄连分散片对体温下降起效时间和退热时间较原剂型的片剂组有更快的趋势。分散片制备工艺是采用超临界流体提取技术结合水提取工艺,与原制剂相比,富集了处方中脂溶性有效成分,制成分散片提高了片剂的崩解时间,提高了溶出速度,使有效成分的吸收更好。

3. 指纹图谱质控技术的全面应用

表 1 两提取部位体外抗流感病毒试验

病毒	病毒唑 (125mg/ml)	双黄连 50%有效浓度(EC50, mg/ml)	
		超临界提取物	水提物
A3	+	83.93(6.7)	236.6 (9.4)
HVJ	+	167.5(3.4)	—
RSV	+	115.36(3.8)	—
HSV-I	+	561.2(4.0)	—
HSV-II	+	472.1(4.7)	—

表 2 新老工艺提取物对病毒致细胞病变作用的影响

病毒	50%有效浓度(EC50, mg/ml)(IT)	
	水提物	水提物+超临界提取物
A3	706(2.0)	316 (3.5)
HVJ	—	561 (2.0)
RSV	—	280 (4.0)
HSV-I	706(2.0)	561 (2.0)
HSV-II	706(2.0)	561 (2.0)

表 3 新老工艺提取物对流感病毒性肺炎(肺指数)的影响比较

($\bar{X} \pm SD$, n=8-10)

病毒	剂量 (g/kg)	肺指数值	抑制率 (%)
正常对照		0.98±0.04	
感染对照		1.54±0.25 ^{###}	
病毒唑	0.77	1.15±0.10 ^{**}	25.32
水提物	50.0	1.29±0.20 [*]	16.23
水提物+超临界提取物	50.0	1.25±0.18 ^{**}	18.83

注:###p<0.01 与正常对照组比较; *p<0.01, **p<0.01 与感染对照组比较

对双黄连药材进行标准化研究,并制定指纹图谱,确定产地,可保证原药材的质量;对中间体采用GC、HPLC等手段制定检测指标,可保证产品质量的稳定;对成品质量标准进行更系统的研究,在原有标准上进一步完善,并制定成品的指纹图谱,对双黄连产品的内在成分进行总体控制,将更符合国际上对中药质量控制的要求。指纹图谱质控技术的创新应用可全面提高双黄连药材、中间体、成品的质量控制水平。

采用色谱-指纹谱技术,本课题组初步建立了双黄连药材及其制剂的HPLC指纹谱,提供了稳定可控的质量标准体系,并确定了用以鉴定制剂中各药材的特征峰群。目前课题将继续积累数据,完善双黄连的指纹图谱标准,制订符合我国SFDA与美国FDA要求的中药新药质量控制体系。

以下是双黄连药材、中间体和成品的液相色谱图(图1~图7)。

总体上,双黄连分散片应用了多项现代技术,对工艺技术及标准提高进行了深化研究,既革新了生产工艺,降低了生产成本,又取得了更好的临床疗效,性价比大幅提高,并形成自主知识产权,是一种很有前途的抗

感染中药制剂(见表4)。

三、研究开发进度及成果

1. 完成了临床前研究工作,获得临床研究批件

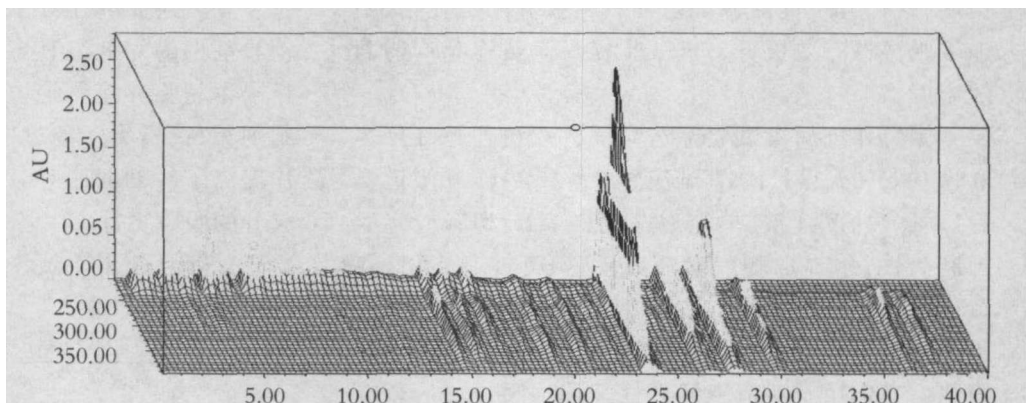


图1 黄芩药材 3D 图谱

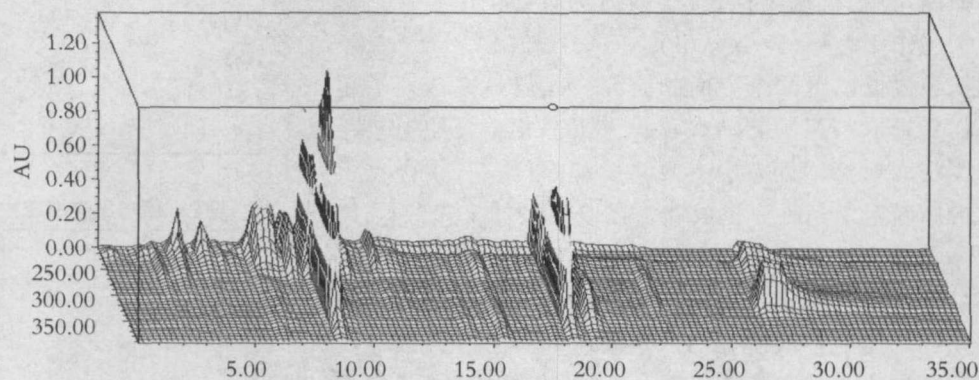


图2 金银花药材 3D 图谱

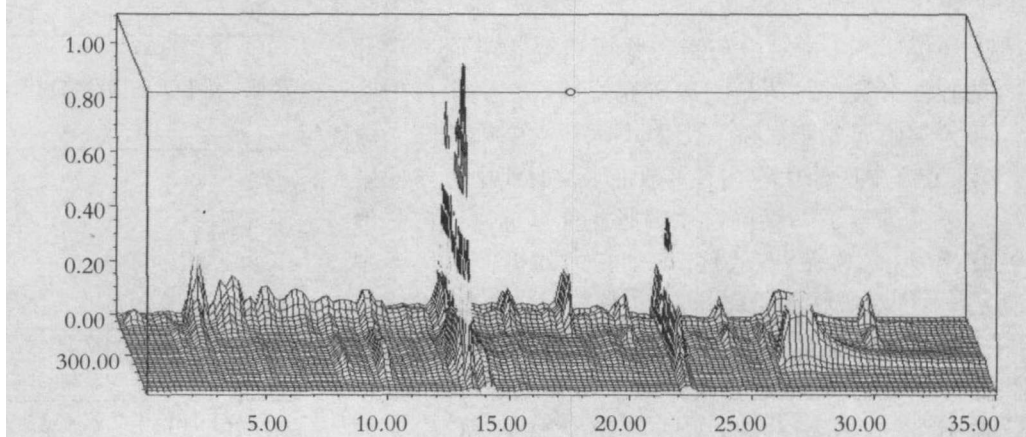


图3 连翘药材 3D 图谱

按照国家 SFDA 新药临床前研究指南的要求,全面完成了双黄连分散片的提取工艺研究、制剂工艺的研究、质量标准研究、制剂稳定性研究和主要药效和毒理学研究等一系列的研究工作,于 2003 年向国家 SFDA 申报临床研究,获得临床研究批件,批件号:2004L04337。

2. 完成了临床研究工作,并进了生产批件的申请

作为一种新型双黄连制剂,双黄连分散片借鉴传统双黄连制剂的临床研究经验,强化提高不足,严格按照 SFDA 药品注册要求,开展双黄连分散片抗 AURTF 的规范化临床研究,以评价其安全性与有效性,为申报生产提供可靠依据。

课题已经完成新药注册工作,按照 SFDA 新药注册要求,国家局已受理双黄连分散片的生产批文申请,受理号: CXZS0503563 沪。

3. 发明专利申请

课题已申请一项美国发明专利和一项中国发明分别获得授权,具体如下:

(1)Composition comprising extracts of flos Inoicerae, frustus forsythiae and radix scutellariae, uses and preparation thereof (专利号: US 6,787,165 B2)。

(2)复方双黄连制剂及制备方法(专利号: CN1401334A)。

(3)双黄连分散片及其制备方法(申请号: 200610026579.4)。

4. 发表论文

(1)王新宏,等. 双黄连片的多组分质量分析. 药学学报 2001,36 (12):917~920.

(2)王新宏,等. 数字化色谱指纹谱技术在双黄连制剂质量及药材鉴定中的应用. 中草药 2002,33(2):115~118.

(3)邬洪波,等. 双黄连分散片抗病毒作

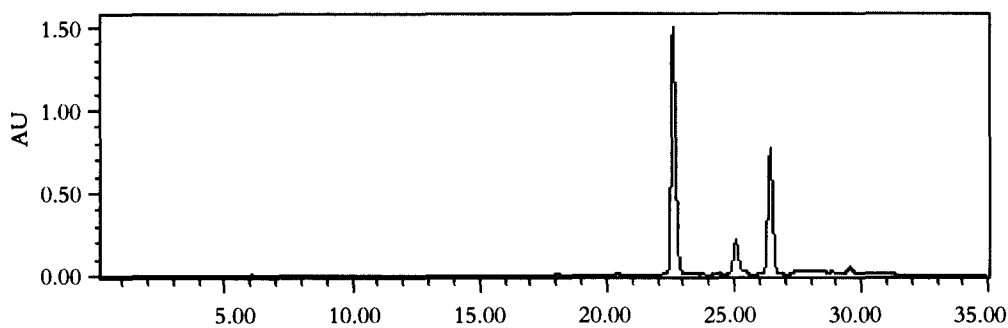


图4 黄芩提取物色谱图

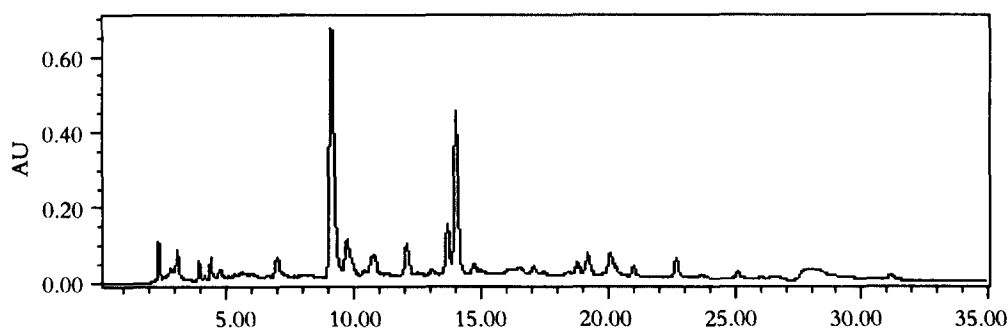


图5 金银花、连翘提取物色谱图

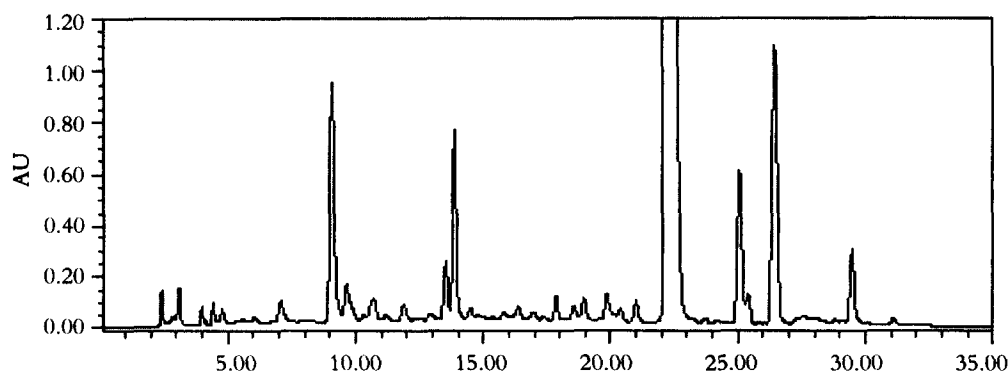


图6 双黄连成品的色谱图

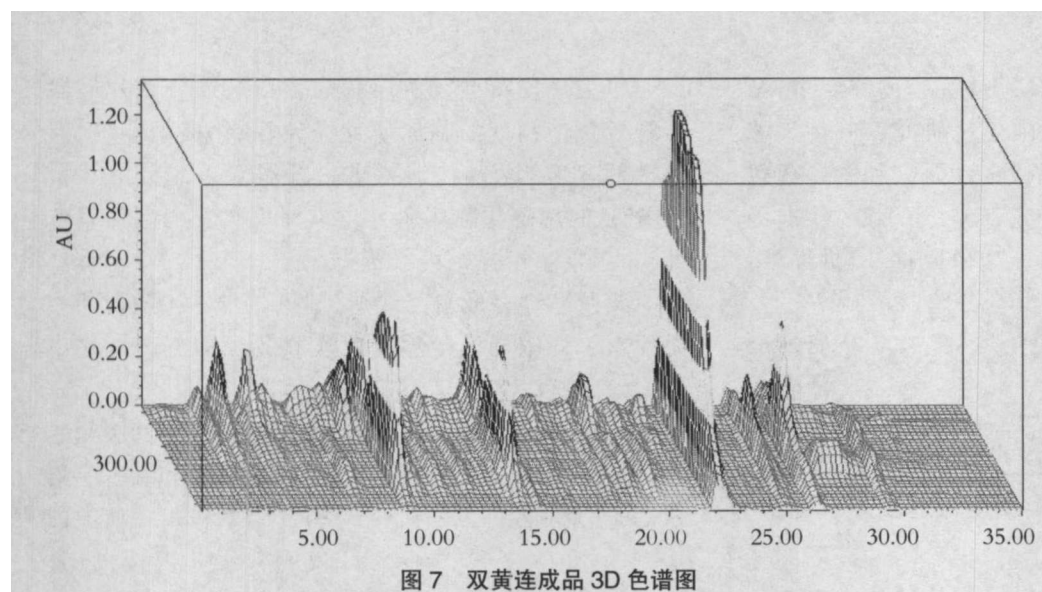


图7 双黄连成品3D色谱图

用实验研究. 中国实验方剂学杂志 2004,10(3): 48~50.

四、展 望

流感病毒感染引起的呼吸道疾病,仍是严重危害人类生命和健康的一种病毒性传染病。该类疾病发病率高、发病人群广,早已引起人们的高度重视。近年来不断出现的流感病毒变异

引起感染疾病--非典与禽流感,令世界医学界措手不及,并令现有疫苗与抗病毒化学药物失去目标,不能及时满足社会医疗与保健需求,严重阻碍了社会和谐发展,并造成巨大的经济负担。

以具有巨大临床需求及市场需求的抗病毒感染为立题导向,对祖国药理学经典方剂双黄连进行深层次的“二次开发”,形成“三小、三效、五方便”的抗感染创新中药制剂,进军国际市场,以满足临床需求,提高人类健康水平,抵御病毒入侵,无疑具有良好的社会意义。此外,本产品以高科技含量为切入点,通过临床研究进一步证明了疗效可靠,更能适合目前社会的消费需求;而且,本中心联合了具有丰富市场经验的上药集团抗生素事业部作为该产品的产销合作单位,充分运用上药集团现有的市场网络,将形成紧密型的产销合作模式;一旦投产进入市场,前景广阔;并具有自主知识产权,必将受到患者的欢迎和市场的认可。

双黄连分散片的研究不仅使我们完成一个新药的开发,更为我们积累了在中药制剂二次开发研究方面的大量经验,为现代化中药的研制提供了一种研究思路。

(Continued on Page 16)

表4 双黄连分散片与双黄连片的比较

比较项目	双黄连分散片	双黄连片
工艺筛选	全面	部分
超临界部位	有	无
水提部位	有	有
抗病毒活性	抗病毒谱广	抗病毒谱窄
提取工艺	先进、高效	传统、低效
超临界	富集挥发性成分	-
亚沸态提取	保留热敏成分	-
有效物质转移率	高	低
黄芩苷	>70%	40%左右
绿原酸(热敏物质)	>50%	20%左右
制剂工艺	分散片	普通片剂
崩解时限	<3min	45min
黄芩苷溶出度	5min 内容出 100%	45min 内容出 70%
质量控制	药材、中间体、成品三级控制	成品控制
指纹图谱	初步制订	-
绿原酸含量	13mg/片	5.5mg/片
黄芩苷含量	90mg/片	50mg/片
药理作用		
抗病毒	强	弱
解热	强	弱
镇痛	相似	相似
抑菌	强	弱
抗炎	强	弱
免疫调节	相似	相似
临床疗效		
体温下降	快	慢
退热时间	快	慢

中药现代研究打下坚实的理论和实践基础, 改变中药研究西药化的不良趋势, 明确中医药现代化的研究方向, 切实提升中医药学学术水平和国际地位。

参考文献

- 1 商庆新. 中药四性理论现代研究是中药现代化的前提和关键. 山东中医药大学学报, 2006, 30(2): 111~113.
- 2 王普霞, 周春祥. 基于“证-药效-药性”观念及“药性本质多元”假说探讨中药药性本质. 南京中医药大学学报 2006, 22(6): 345~347.
- 3 王耘, 史新元, 张燕玲, 等. 系统生物学意义下的中药研发与药性理论. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(1): 39~43.
- 4 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotic*, 1999, 29: 1181~1189.
- 5 谢跃生, 潘桂湘, 高秀梅, 等. 高效液相色谱技术在代谢组学研究中的应用. 分析化学, 2006, 34(11): 1644~1648.
- 6 胡爱萍. 关于中药药性理论现代化研究的思考. 光明中医, 2006, 21(10): 20~22.

Technical Lines and Methods: Studying Scientific Connotations of Traditional Chinese Medicines Using Systems Biology

Liu Shumin, Lu Fang

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang, Harbin 150040)

In this article, authors analyzed the existing issues concerning the study of TCM property theory in modern times. They proposed to study TCM property theory using systems biology, or metabolomics, in particular, making organic biomarkers and associated variations as the main line, and tracking down the anticipated outcome. Authors believe that it is important to establish a technical platform for studying the essence of the property, the flavor of traditional Chinese medicines, and property-effect correlation.

Keywords: systems biology; metabolomics; property theory of traditional Chinese medicine; biomarkers

(责任编辑: 王 瑀, 责任译审: 邹春申)

(Continued from Page 22)

Innovative Redevelopment of Shuanghuanglian

Ruan Kefeng, Liu Zhiyuan, Lin Zhihong, Shen pingniang

(National Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201210)

Shuanghuanglian (SHL), an essential Chinese patent medicine (CPM), has been used clinically to treat acute upper respiratory infection (AURI) in China for more than 30 years. Along with the advancement of industrial pharmaceuticals, it needs to upgrade the traditional SHL producing techniques, in an attempt to raise its therapeutic effects. This review discusses a range of improvements involving the redevelopment of the drug, including, superficial fluid extraction, dispersible tablet preparation, fingerprint chromatography, and turning traditional SHL tablets into dispersible SHL tablets. Redevelopment of SHL dispersible tablets adds a promise for the modernization, industrialization and internationalization of CPM.

Keywords: Shuanghuanglian; Acute upper respiratory infection; Superficial fluid extraction

(责任编辑: 张述庆, 责任译审: 邹春申)