

清开灵注射液中钙元素分析

杨维, 吴思场, 王芦笛, 康琛, 李鹰飞*
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**通过对清开灵注射液组方药材、清开灵注射液和大鼠给药清开灵注射液后体内钙元素含量进行分析,明确清开灵注射液中钙元素的含量、主要来源和不同批次间的差异,推测钙元素是否是清开灵注射液的药效物质基础。**方法:**采用微波消解法对清开灵注射液、相关药材和大鼠给药清开灵注射液后的血浆样品进行处理,用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法检测其中的钙元素,并结合相关信息学研究对结果进行分析。**结果:**明确了珍珠母和板蓝根是清开灵注射液组方药材钙元素的主要提供者,且进入到清开灵注射液中的钙元素不足组方药材钙元素质量分数的0.1%。不同批次清开灵注射液中钙元素差异相对差异>40%。大鼠尾静脉给予清开灵注射液后,血浆中的钙元素未有统计学意义上的变化。**结论:**清开灵注射液的制备工艺导致钙元素大量损失,且清开灵注射液中的钙元素未能引起大鼠血浆中钙元素浓度增加,因此钙元素是否是清开灵注射液的药效物质基础有待进一步研究。

[关键词] 清开灵注射液; 钙元素; 体外; 体内

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0075-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1437.006.html>

[网络出版时间] 2016-10-27 14:37

Analysis of Calcium Element in Qingkailing Injection

YANG Wei, WU Si-yang, WANG Lu-di, KANG Chen, LI Ying-fei*

(China Academy of Chinese Medical Sciences, Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** The calcium element in Qingkailing injection and its crude medicine were analyzed to clarify the calcium content, main source, differences between ten batches and whether calcium element is the pharmacodynamics material basis in Qingkailing injection. **Method:** The Qingkailing injection and crude medicine were prepared by microwave resolution method; the calcium element was detected by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Meanwhile the data was analyzed by relevant informatics research. **Result:** Concha margaritifera and Radix isatis were the major providers of calcium element in Qingkailing injection. The RSD of different batches Qingkailing injection was more than 40%. The concentration of plasma calcium element had no statistically significant differences after rat receiving intravenously Qingkailing injection compared to that of rats of control group. **Conclusion:** The modern preparing technology of Qingkailing injection lead to the loss of calcium, and the concentration of plasma calcium element was not increased by the calcium element of Qingkailing injection. Therefore, further research would be needed to understand whether the calcium element was the pharmacodynamics material basis of Qingkailing injection.

[Key words] Qingkailing injection; calcium element; *in vitro*; *in vivo*

[收稿日期] 20160329(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09201022-005);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2014034)

[第一作者] 杨维,博士,助理研究员,从事中药药代动力学研究,Tel:010-56288129,E-mail:wyang@icmm.ac.cn

[通讯作者] *李鹰飞,博士,副研究员,从事中药药代动力学研究,Tel:010-56288129,E-mail:yfli@icmm.ac.cn

清开灵注射液是在传统名方“安宫牛黄丸”基础上加减、运用现代科技研制生产的纯中药速效制剂,是我国目前生产和使用量较大的中药注射剂品种之一,在临床上已经有 30 多年的应用历史。该注射液具有清热解毒、化痰通络和醒神开窍的功效,对上呼吸道感染以及脑卒中、脑血栓形成、脑出血等临床病症疗效确切^[1-3]。清开灵注射液物质基础复杂,由 8 味药组成,分别是动物药水牛角,矿物药珍珠母,植物药板蓝根、梔子和金银花,以及 3 个提取物胆酸、猪去氧胆酸和黄芩苷。目前已有对清开灵注射液的药效物质基础的报道,但对无机元素的研究较少,因此研究清开灵注射液中的无机元素对于明确其药效物质基础具有一定意义^[4-5]。

珍珠母中碳酸钙的含量在 90% 以上,同时板蓝根、梔子和金银花以及水牛角中也含有钙离子^[6-10]。钙离子是机体各项生理活动不可缺少的离子,对于维持细胞膜两侧的生物电位和正常的神经传导功能具有重要的作用,具有维持骨骼强健和心律正常、缓解失眠、帮助体内铁的代谢、强化神经系统的功效^[11]。清开灵注射液改变了传统的制备工艺,因此按药材-制剂-体内的方法研究清开灵注射液中钙离子的来源、组方药材中的钙元素进入清开灵注射液的情况,以及该浓度水平的钙元素是否会引体内血钙浓度的增加,对于明晰钙元素是否是清开灵注射液中的药效物质基础具有重要意义。

目前已有对清开灵注射液和珍珠母水解液中钙离子测定的研究,指出珍珠母是清开灵中钙的主要来源^[6],但其尚未明确其他 7 味药对钙离子的贡献程度,以及给药清开灵注射液后体内钙元素增加情况。本研究拟通过 ICP-MS 法对清开灵注射液组成的 8 味药、市售清开灵注射液和大鼠给药清开灵注射液后血浆中的钙元素进行测定,旨在明确清开灵注射液中钙元素的含量、主要来源和体内增加情况。通过对不同批次的市售清开灵注射液中钙元素含量进行测定,考察清开灵注射液不同批次间的差异。结合相关信息学研究探讨钙元素是否是清开灵注射液的药效物质基础。本研究为阐明清开灵注射液整体功效及其作用奠定了基础,同时为清开灵注射液的安全使用和质量控制提供了指导。

1 材料

7700x 型电感耦合等离子体质谱(ICP-MS, 美国安捷伦公司), MARS6 型微波消解系统(美国 CEM 公司), XP56 型分析天平(瑞士梅特勒托利多公司), Milli-Q 超纯水处理装置(美国 Millipore 公司)。

对照药材板蓝根(批号 121177-201407), 金银花(批号 121060-201107), 梔子(批号 120986-201309)购自中国食品药品检定研究院;水牛角(粉)(批号 150501), 珍珠母(粉)(批号 150502), 黄芩苷提取物(批号 140627), 猪去氧胆酸提取物(批号 140626)和胆酸提取物(批号 140626), 以及清开灵注射液由吉林省集安益盛药业股份有限公司提供。

钙标准溶液($1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 购自国家标准物质研究中心), HNO_3 , 30% H_2O_2 (优级纯, 购自北京化工厂)。

SD 大鼠 10 只, 体重(250 ± 10)g 左右, 雄性, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)2012-0001, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 工作条件 射频功率 1 500 W, 采样深度 6.5 mm, 等离子气流量 $15.0\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气流量 $1.0\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 载气流量 $1.0\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 采样锥孔径 1.0 mm, 截取锥孔径 0.6 mm, 雾化室温度 $2\ ^\circ\text{C}$, 实验室用气纯度 $\geq 99.999\%$ 。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取一定量样品, 约 100 mg, 置于聚氯氟乙烯消解罐中, 加入 HNO_3 4 mL 和 H_2O_2 1 mL。为防止消解过程产生过多气体, 致使罐内压力过大而损失样品, 本实验采用先进行预消解 15 min, 再按设定程序进行微波消解。温度程序为 $120\ ^\circ\text{C}$ (0~5 min), $150\ ^\circ\text{C}$ (5~10 min), $180\ ^\circ\text{C}$ (10~25 min); 功率 1 200 W, 压力 $2.41 \times 10^6\ \text{Pa}$ 。消解程序结束后, 冷却至常温后, 打开密闭消解罐, 将消解后溶液转移至 50 mL 量瓶中用超纯水稀释至刻度。液体样品消解后溶液转移至 10 mL 量瓶混匀, 定容后的样品再稀释不同倍数得供试品溶液。同时作试剂空白。

2.3 标准曲线的绘制 精密吸取质量浓度为 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙元素标准溶液, 用 5% HNO_3 , 逐级稀释, 配制成质量浓度为 0, 10, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准工作溶液。用 ICP-MS 测定, 获取样品相应浓度的系列测定值。以测定值为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准工作曲线, 由此求得元素的线性方程 $Y = 0.090X + 0.019$ ($r = 0.999\ 5$)。

2.4 检测限 在上述工作参数条件下, 用 5% HNO_3 , 空白溶液连续测定 11 次, 测定结果的 3 倍标准偏差对应的浓度值即为钙元素的检出限 $4\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 清开灵注射液及其组方药材分析 采用 ICP-

MS 法对清开灵注射液中的 8 味药要进行分析,钙元素的质量分数分别为水牛角 $1\ 413.0\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,珍珠母 $382.2\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,板蓝根 $9.156\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,栀子 $2.967\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和金银花 $5.320\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,胆酸 $111.5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,猪去氧胆酸 $109.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和黄芩苷 $93.0\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,钙元素含量排序见图 1。珍珠母 > 板蓝根 > 金银花 > 栀子 > 水牛角 > 胆酸提取物 > 猪去氧胆酸提取物 > 黄芩苷提取物。

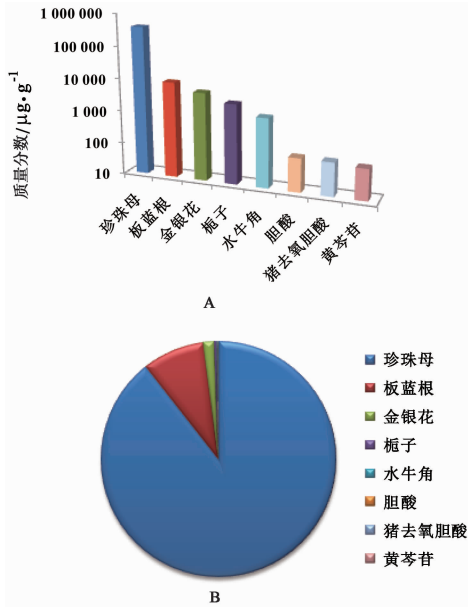


图 1 清开灵注射液组方八味药中钙元素的质量分数 (A) 和每味药的最大贡献度比 (B)

Fig. 1 Content levels of calcium element in eight component medicine of Qingkailing injection (A) and percentage doses of calcium element of eight component medicine in total dose of calcium element (B)

根据清开灵注射液组方中单位药的剂量,得到 1 L 清开灵注射液中每味药材提供钙元素的最大量为水牛角 $35.3\ \text{mg}$,珍珠母 $19\ 110.0\ \text{mg}$,板蓝根 $1\ 831.2\ \text{mg}$,栀子 $74.2\ \text{mg}$,金银花 $319.2\ \text{mg}$,胆酸 $0.4\ \text{mg}$,猪去氧胆酸 $0.4\ \text{mg}$,黄芩苷 $0.5\ \text{mg}$,最大贡献度比见图 1。其中珍珠母占 89.4%,板蓝根占 8.6%,剩下 6 味药材占 2.0%,提示清开灵注射液中钙元素主要来自于珍珠母和板蓝根。1 L 清开灵注射液中 8 味药材提供的钙元素量最大为 $21\ 371.1\ \text{mg}$ 。

10 批清开灵注射液中钙元素质量分数分别为 10.6, 15.0, 10.0, 10.2, 8.10, 7.40, 17.1, 16.6, 29.8, $16.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,均值为 $14.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD 为 46.8%。8 味组方药材中的钙元素只有 0.07% 进入了清开灵注射液中。清开灵注射液是在传统名方“安宫牛黄丸”基础上加減、采用现代科学技术和

方法制成的供注入人体的无菌制剂,改变了传统的制备工艺^[12]。该研究结果提示清开灵注射液采用目前的制备工艺使绝大部分的钙元素在制备过程中损失。

2.6 给药清开灵注射液后大鼠血浆中钙元素分析

由于大鼠体内存在稳定量的血钙,为了考察清开灵注射液中的钙元素是否在体内有明显的增加,将 SD 大鼠随机分为 2 组(生理盐水组和清开灵注射液组),每组 5 只,按 $4\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量(人用清开灵注射液剂量折算),尾静脉注射生理盐水或清开灵注射液。由于静脉注射给药,药物在体内无吸收相,药物成分随时间增加而降低^[13],选取血浆中钙离子浓度最可能增加的代表性时间 5 min 和给药后的 30 min 两个时间点进行研究。于 5 min 和 30 min 后眼内眦静脉丛取血 1 mL,置于肝素化离心管中,以 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分取上层大鼠血浆用于钙离子检测。

生理盐水组和清开灵注射液组大鼠在尾静脉分别注射后 5 min 和 30 min 的血钙含量见图 2。分别对 5 min 和 30 min 两组大鼠的血钙进行 *t* 检验,*P* 值均 > 0.05 ,没有统计学意义,表明静脉给药后,外来的清开灵注射液中的钙元素未能引起大鼠血浆中的钙元素水平发生变化。

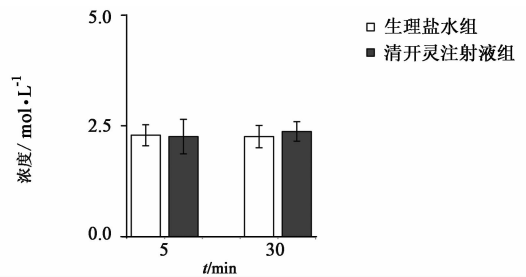


图 2 生理盐水组和清开灵注射液组大鼠在 5 min 和 30 min 的血钙浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Content levels of calcium element in experimental group and control group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

清开灵注射液是在传统名方“安宫牛黄丸”基础上加減、采用现代科学技术和方法制成的供注入人体的无菌制剂,改变了传统的制备工艺。本研究通过对清开灵注射液及其组方药材中钙元素含量进行分析,明确了珍珠母和板蓝根是清开灵注射液钙元素的主要提供者,现代工艺导致钙元素大量损,只有不足 0.1% 的钙元素进入了清开灵注射液中。珍珠母具有平肝潜阳、安神定惊、明目退翳的功效,其碳酸钙的含量在 90% 以上,是珍珠母的物质

基础。钙对中枢神经、内脏神经及躯体神经均有镇静及抑制作用,同时具有抗痉挛的作用^[14-15]。传统安宫牛黄丸具有清热解毒、镇惊开窍的功效,而清开灵注射液的功效为清热解毒,醒神开窍。根据该研究推测制备过程中钙元素的大量损失,可能是清开灵注射液与安宫牛黄丸功效差异的原因之一。

通过比较尾静脉注射生理盐水和清开灵注射液的大鼠血浆中的钙元素,显示清开灵注射液中的钙离子未能引起大鼠血浆中的钙元素发生变化。清开灵注射液说明书标注“重症患者静脉滴注,1日2~4支(20~40 mL)”,计算得到清开灵注射液中钙元素的人日给药剂量约7.05~14.10 μmol。根据人体内血浆中钙的含量约为2 420.0 μmol·L⁻¹^[16],其远大于清开灵注射液提供的钙元素含量,提示清开灵注射液中的钙元素在人体内可能不会有明显的增加^[17]。钙元素是否是清开灵注射液的药效物质基础有待进一步研究。

[参考文献]

[1] CHENG F, WANG X, LU Y, et al. Chinese medicine injection Qingkailing for treatment of acute ischemia stroke: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012; 213172.

[2] WU J, ZHANG X, ZHANG B. Qingkailing injection for the treatment of acute stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(2): 131-139.

[3] 杨建华. 清开灵注射液的临床应用[J]. *中成药*, 1994, 16(12): 20-21.

[4] ZHANG H Y, HU P, LUO G A, et al. Screening and identification of multi-component in Qingkailing injection using combination of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 577(2): 190-200.

[5] 何雪莲,秦付林,任华忠. 中药复方药效物质基础研究方法探析[J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(3): 3-4.

[6] 徐燕,程伟,徐艳华,等. 清开灵注射液和珍珠母水溶液中钙的测定及形态初探[J]. *中成药*, 2003, 25(2): 106-109.

[7] 徐哈,方建国,刘云海. 板蓝根最新研究进展[J]. *中草药*, 2003, 34(4): 10-11.

[8] 傅静芝,刘小芬. 金银花中钙镁离子含量测定方法的探讨[J]. *中成药*, 2009, 31(9): 1460-1462.

[9] 洪筱坤,范广平,王智华,等. 广角、水牛角和黄牛角中无机元素的比较研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(2): 76-77.

[10] 刘明地,祁正兴,叶丹. 不同产地栀子中微量元素的主成分分析[J]. *四川理工学院学报*, 2014, 27(2): 15-18.

[11] Peacock M. Calcium metabolism in health and disease [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5 (S1): 23-30.

[12] 梁爱华,李连达. 中药注射剂的现状和问题[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(11): 1119-1120.

[13] JIA W, DU F, LIU X, et al. Renal tubular secretion of tanshinol: molecular mechanisms, impact on its systemic exposure, and propensity for dose-related nephrotoxicity and for renal herb-drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(5): 669-678.

[14] Brini M, Ottolini D, Cali T, et al. Calcium in health and disease [J]. *Met Ions Life Sci*, 2013 (13): 81-137.

[15] 徐桂霞,金会华. 钙与人体健康及其临床应用[J]. *黑龙江医药*, 1992(8): 33.

[16] Lentner C, West Cadwell N J. *Geigy scientific tables [M]*. 8th Rev Edition. Basel Switzerland; Medical Education Div, Ciba-Geigy Corp, 1992: 82-85.

[17] LI M, WANG F, HUANG Y, et al. Systemic exposure to and disposition of catechols derived from *Salvia miltiorrhiza* roots (Danshen) after intravenous dosing Danhong injection in human subjects, rats, and dogs [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(5): 679-690.

[责任编辑 顾雪竹]