

离体心脏灌流法在丹参注射液生物活性检测中的应用

孙叶丹, 匡荣, 朱社敏, 王丹, 康桦, 张劲松, 李杨*
(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

[摘要] **目的:** 考察豚鼠离体心脏灌流法检测丹参注射液生物活性的可行性, 为进一步完善其质量控制标准提供参考。**方法:** 采用豚鼠离体心脏灌流法检测丹参注射液对冠状动脉流量的影响, 并以冠脉流量增量为指标考察其生物活性。分别进行量效关系考察和重复性研究, 对 4 个厂家 12 批丹参注射液样品的生物活性进行检测。**结果:** 丹参注射液在豚鼠离体心脏灌流模型中对冠脉流量有显著增加。在实验条件下, 在原液 0.1 ~ 0.6 mL 剂量范围内, 丹参注射液表现出一定的量效关系; 在 0.3 mL 剂量下, 在一定的时间内, 丹参注射液对同一心脏和不同心脏的生物活性重复性都较好。**结论:** 此模型用于丹参注射液生物活性质量控制指标具有一定的可行性, 通过进一步方法改进和探索有望成为丹参注射液的有效性质量控制方法。

[关键词] 丹参注射液; 生物活性; 心脏灌流; 冠脉流量; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0087-04

Application of Isolated Heart Perfusion Technique to Evaluate the Bioactivity of Danshen Injection

SUN Ye-dan, KUANG Rong, ZHU She-min, WANG Dan, KANG Hua, ZHANG Jing-song, LI Yang*
(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the application of isolated heart perfusion technique on evaluating the bioactivity of Danshen Injection, and lay the foundation for further improving the standards of quality control. **Method:** Isolated guinea pig heart perfusion was performed with Langendorff method to measure the Danshen Injection if it had any effects on coronary flow and then use the percentage increase in coronary flow as an index to investigate its biological activity. After inspection of dose-effect relationship and reproducibility studies, the biological activity would be tested from 12 batches of Danshen Injection from the four manufacturers. **Result:** Danshen Injection has a significant effect on increasing the coronary flow. Under a certain condition, Danshen Injection showed some dose-effect relationship in the range of 0.1 to 0.6 mL, and in the dose of 0.3 mL, repeatability of the activity was good both in the same or different isolated heart within a certain time. **Conclusion:** It may be of great possibility that Langendorff isolated heart perfusion technique will become a good method for evaluating the bioactivity of Danshen Injection after further improvement and exploration.

[Key words] Danshen Injection; biological activity; heart perfusion; coronary flow; quality control

生物活性测定法是以药物的生物效应为基础,

以生物统计为工具, 运用特定的实验设计, 测定药物有效性的一种方法, 从而达到控制药品质量的作用。中药的药材来源广泛、多变, 制备工艺复杂, 使得中药制剂的质量控制相对困难。此外, 中药含有多种活性成分和具有多种药理作用, 因此, 仅控制少数成分不能完全控制其质量和反映临床疗效。为了使中药的质量标准能更好地保证每批药品的临床使用安全有效, 有必要在现有含量测定的基础上增加生物活性测定, 以综合评价其质量^[1]。由不同药厂或同

[收稿日期] 20120201(008)

[第一作者] 孙叶丹, 学士, 实验室助理, 浙江省食品药品检验所, Tel: 0571-86457970, E-mail: danny19861213@sohu.com

[通讯作者] * 李杨, 学士, 主任药师, 浙江省食品药品检验所, Tel: 0571-86881430, E-mail: liyanghu2000@yahoo.com.cn

一药厂生产的不同规格和批号的灯盏花素注射液虽然“含量测定”均“符合规定”，但“生物活性”却存在着明显的差异，表明“生物活性测定”与理化分析控制质量的不同。因此，结合理化分析手段，“生物活性测定”能够通过综合和分析的结合，达到控制中药注射剂质量的目的^[2]。

离体心脏灌流法排除了神经和体液的控制，适用于观察药物对冠脉流量的影响和对心肌功能的直接作用，已广泛用于药物对心脏功能的研究和心血管药物的筛选^[3-6]，但作为中药注射剂生物活性的质量控制方法尚未见报道。丹参注射液主要成分为丹参，具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦、养血安神等功效。临床主要用于改善微循环和血液流变学，扩张冠状动脉，增加冠脉血流量，具有疗效显著、副作用少的特点^[7-9]。丹参注射液成分相对单一，疗效明确，因此，我们采用丹参注射液作为样品，探讨离体豚鼠心脏灌流法作为中药注射剂生物活性质量控制指标的可行性。

1 材料

1.1 仪器 离体心脏灌流装置由南京美易科技有限公司提供，主要由灌流瓶、恒压管、主动脉套管、心脏保温套管、超级恒温水浴、氧气瓶等组成，恒压管液面高度到心脏距离约为 70 ~ 75 cm，循环水浴保持(37.0 ± 0.5) °C，调节氧气流量为每分钟约 20 ~ 25 个。仪器的核心部分是恒温、循环和浴槽三部分组成灌流装置如图 1。

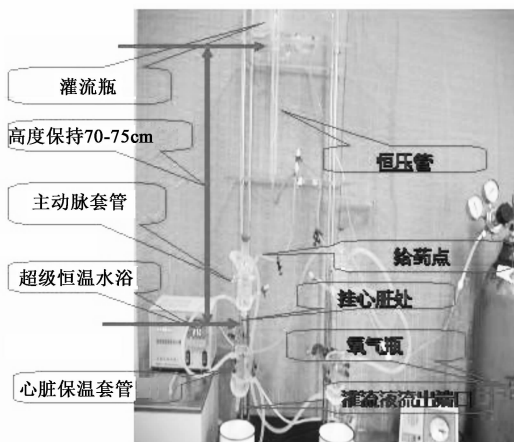


图 1 豚鼠离体心脏灌流装置

1.2 灌流液配置 氯化钠 34.480 g，氯化钾 1.752 g，磷酸二氢钾 0.815 g，硫酸镁 1.48 g，碳酸氢钠 10.5 g，葡萄糖 9.91 g，加水 4 000 mL 使溶解，加 1% 氯化钙 70.0 mL，再加水至 5 000 mL，混匀，临用新配。

1.3 样品 丹参注射液，批号分别为(A 厂) 101104, 101105, 101107; (B 厂) 101022, 10102, 101024; (C 厂) 1012201, 1012203, 1012303; (D 厂) 091103, 1007114, 090723。

1.4 动物 豚鼠品系: Hartley, 浙江省余姚市建飞实验兔养殖场, 生产许可证号 SCXK(浙) 2006-0026, 雌雄皆用, 体重 300 ~ 450 g。

2 方法与结果

2.1 标本制备 击昏豚鼠，摘取心脏，去除心包膜，修剪分离主动脉(主动脉保留 1 cm 左右)并置于离体灌流装置上。操作完毕稳定 20 min 后，测定连续 3 min 的每分钟冠脉流量。若 3 次数值相近，差值小于 0.5 mL，即已稳定，并将均值作为给药前流量。注射药物，测定药物进入心脏起 1 min 内的冠脉流量。计算给药前后冠脉流量的变化，按下式计算冠脉流量增加率。

$$\text{冠脉流量增加率} = (\text{给药后流量} - \text{给药前流量}) / \text{给药前流量} \times 100\%$$

2.2 检测方法量效关系的研究 采用批号 101105 的丹参注射液为样品，以样品原液按每次 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 进行量效关系考察。以两只豚鼠心脏重复实验，记录不同剂量的丹参注射液对豚鼠离体心脏冠脉流量增加率的影响，结果见表 1。

表 1 丹参注射液对离体心脏冠脉流量增加率的量效关系考察

给药剂量/mL	冠脉流量增加率/%					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
心脏 1	9.88	15.14	24.02	31.03	27.89	34.91
心脏 2	2.74	10.70	10.82	11.11	16.03	15.63
平均值	6.31	12.92	17.42	21.07	21.96	25.27

以两只豚鼠心脏重复实验的平均值进行趋势线拟合，得出线性图和对数图，结果见图 2。

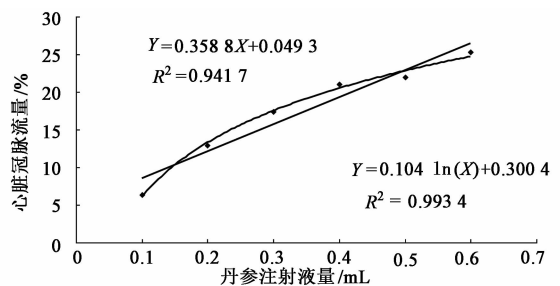


图 2 量效关系考察

结果表明丹参注射液各剂量均能明显增加豚鼠离体心脏的冠脉流量，并呈现出较好的量效关系。

对数图的相关系数达到 0.99 以上,线性相关系数也可达到 0.9 以上。在 0.2 ~ 0.4 mL,线性相关系数更可达到 0.996 以上。以 0.3 mL 作为限值剂量即可以产生生物效应又处于量效敏感期。

2.3 检测方法重复性的研究

2.3.1 对同一豚鼠心脏冠脉流量的重复性试验采用批号 101105 的丹参注射液为样品,给药剂量为 0.3 mL,在同一心脏上重复试验 5 次,共试验 5 个心脏,具体每个心脏给药前后心脏冠脉流量结果见表 2。

表 2 豚鼠离体心脏给药前后流量变化

No.	冠脉流量/mL·min ⁻¹														
	心脏 1			心脏 2			心脏 3			心脏 4			心脏 5		
	V ₀	V ₁	D	V ₀	V ₁	D	V ₀	V ₁	D	V ₀	V ₁	D	V ₀	V ₁	D
第 1 针	8.2	9.5	1.3	6.5	7.1	0.6	4.7	10.0	5.3	8.5	10.0	1.5	9.2	10.1	0.9
第 2 针	8.4	9.9	1.5	6.9	7.2	0.4	4.8	10.0	5.2	8.6	10.0	1.4	9.2	9.8	0.6
第 3 针	8.3	8.7	0.4	7.0	7.4	0.5	5.0	10.0	5.0	8.6	10.0	1.4	9.6	9.9	0.3
第 4 针	8.3	9.0	0.7	6.9	7.4	0.6	5.0	9.9	4.9	8.6	9.9	1.3	9.3	9.7	0.4
第 5 针	8.2	8.9	0.7	6.5	6.9	0.4	4.6	9.9	5.3	8.6	9.9	1.3	9.2	9.9	0.7
平均	8.3	9.2	0.9	6.8	7.2	0.5	4.8	10.0	5.1	8.6	10.0	1.4	9.3	9.9	0.6
SD/%	0.06	0.49	0.46	0.23	0.21	0.11	0.16	0.05	0.15	0.04	0.05	0.06	0.16	0.15	0.22

注:V₀:给药前均值;V₁:给药后极值;D:差值;SD:标准偏差。

总结表 2,5 个心脏未给药前的基础冠脉流量各不相同,说明个体差异较大。其原因可能是制作标本时的手法手段及对心脏造成的缺血和损伤程度不同。给药后稳定一段时间,测其冠脉流量基本维持

在各自给药前的基础冠脉流量值,有较好的稳定性。因此该模型在同一心脏上具有可重复性,该重复实验具有可行性。结合表 2,计算每个心脏的冠脉流量增加率并进行统计,结果见表 3。

表 3 丹参注射液对豚鼠离体心脏冠脉流量的增加率

No.	冠脉流量增加率/%						
	心脏 1	心脏 2	心脏 3	心脏 4	心脏 5	平均值	RSD
第 1 针	15.32	8.65	5.28	7.72	9.39	9.27	3.72
第 2 针	18.55	3.83	5.65	4.26	5.90	7.64	6.16
第 3 针	5.24	6.28	6.09	4.67	3.24	5.10	1.23
第 4 针	8.94	7.54	6.36	5.04	4.69	6.51	1.77
第 5 针	10.77	4.35	5.43	4.30	7.22	6.41	2.71
平均值	11.76	6.13	5.76	5.20	6.09	6.99	2.70
标准偏差	5.25	2.05	0.45	1.44	2.36	2.31	-

上表数据结果显示,在同一心脏上 5 次试验除了第一只心脏的标准偏差相对较大外,其余 4 只的标准偏差为 0.45% ~ 2.36%,说明在同一心脏上在一定的时间内重复性较好。

2.3.2 对不同豚鼠心脏冠脉流量的重复性试验采用批号 101105 的丹参注射液为样品,对 5 个不同心脏进行试验,给药剂量为 0.3 mL,由表 3 的数据显示,不同心脏 5 次试验结果的 RSD 为 2.70%,说明不同心脏上的重复性也较好。

综上,在 0.3 mL 给药剂量限值下,同一心脏和

不同心脏上的 RSD 都低于 6%,而冠脉流量增加百分比均能高于 5%。因此,此检测方法在一定时间内能够处于稳定状态,具有相对可重复性,经过改进可以作为丹参注射液的生物活性测定方法。

2.5 测定方法适用性考察 采用 4 个厂家各 3 批样品进行方法适用性研究。每批 2 只动物。结果见表 4。

结果显示,不同厂家的产品生物活性不同,相同厂家不同批次产品的生物活性也不一定相同。总体认为,D 厂生产的丹参注射液生物活性相对

表 4 不同厂家生产的丹参注射液对豚鼠离体心脏冠脉流量的影响

厂家	批号	冠脉流量增加率/%		
		心脏 1	心脏 2	平均值
A	101104	4.55	6.72	5.63
	101105	24.02	10.82	17.42
	101107	10.16	8.43	9.29
B	101022	13.27	13.85	13.56
	101023	8.81	18.60	13.71
	101024	9.52	26.53	18.03
C	1012201	5.33	12.63	8.98
	1012203	3.45	3.24	3.34
	1012303	14.71	12.93	13.82
D	090723	27.31	28.25	27.78
	091103	17.70	16.42	17.06
	1007114	22.43	22.89	22.66

较高。而 C 厂 1012203 批样品的冠脉流量增值仅为 3.34 %。若以 5 % 为增量限值,则可认为此批样品不符合规定。

3 讨论

离体心脏灌流法收录于《药理学实验指南——新药发现和药理学评价》和《药理学实验方法学》,是经典的药理学研究模型。近来也有许多关于离体心脏灌流模型的建立^[10]和稳定性研究^[11]等,使这一模型更有利于开展实验,向标准性方法靠近。丹参注射液的功能主治也很明确。因此,该法的原理符合《中国药典》2010 年版附录中“中药生物活性测定指导原则”的基本原则^[1]。按离体心脏灌流法测定,对于丹参注射液,质量标准可以描述为:取本品 0.3 mL,按《中国药典》一部附录(待定)检查,灌流量增加应不低于 5 %,如初试不符合规定,取一只豚鼠复试,应符合规定。

本法所用的载体为离体心脏,可以存活 2 ~ 3 h 或更长时间,一个理想的心脏可以检测数批产品,节省了动物,符合实验动物的“3R”要求^[12]。该灌流装置价廉,操作方便,试验在基层单位也能开展而且试验所用动物为豚鼠或大鼠,易得并能规范化养殖。

试验结果以给药前后的灌脉流量的变化为指标,可以准确量化。如果本法研究成熟,不仅可以用于该类中药注射剂的研究,也可以用于对该类药物其他剂型如复方丹参片,甚至于中药材的“生物活性”研究。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:附录 132.

[2] 芮菁,韩晶,唐元泰.不同来源灯盏花素注射液“生物活性”质量的比较研究[J].中国药品标准,2007,8(4):21.

[3] 孙燕,金红芳,魏红玲.巯基修饰剂对硫化氢的离体心脏灌流效应的影响[J].中国药理学通报,2009,25(4):469.

[4] 李冰冰,成希明,陈君.Langendorff 逆灌流制备特非那丁诱发尖端扭转室性心动过速模型[J].中国心血管杂志,2006,11(2):92.

[5] 匡荣,朱社敏,倪维芳,等.离体心脏灌流技术在抗心绞痛中药生物活性检测中的应用初探[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):66.

[6] 陈雯,郭丽丽,周婷婷,等.丹参总酚酸对离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):173.

[7] 余世春,琚小龙,段广勋.丹参的化学成分和药理活性研究概括[J].安徽卫生职业技术学院学报,2002,1(2):43.

[8] 杨志霞,林谦,马利.丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J].世界中西医结合杂志,2012,7(2):93.

[9] 段志学,殷宏飞.复方丹参注射液与小量异丙肾上腺素合用对离体豚鼠心脏的冠状动脉流量影响[J].中国医药指南,2010,8(31):31.

[10] 黄健,周云,杨绍军,等.成功制作离体心脏灌流模型要点和经验[J].实验动物科学,2011,28(4):60.

[11] 梁伟涛,Rusinkevich Vitali,臧旺福.离体心脏 Langendorff 灌流模型稳定性的探讨[J].国际心血管病杂志,2011,38(1):44.

[12] 孙靖.实验动物学基础[M].北京:北京科学技术出版社,2005:7.

[责任编辑 顾雪竹]