

复方清开灵注射液的效应物质探索

肖兰^{1,2*}, 王峰², 赵绪元²

(1. 长沙卫生职业学院, 长沙 410100; 2. 中南大学湘雅二医院临床药理学室, 长沙 410011)

[摘要] 目的:以黄芩归经为指导,探索清开灵注射液(QKL)的效应物质。方法:取大鼠,给药后于不同时间点处死,取脑、肺、肝。另取大鼠,分为正常组和缺血再灌注组,各组大鼠按采样点随机分为5组,每组5只。正常组大鼠经尾静脉给予800 mg·kg⁻¹QKL。脑缺血再灌注组采用改良的腔内线栓法通过阻闭大脑中动脉120 min后再灌注120 min复制局灶性脑缺血-再灌注病理模型,并于恢复再灌注120 min时给予800 mg·kg⁻¹QKL。给药后于不同时间点处死,取脑、肺、肝。HPLC-MS法测定黄芩苷浓度。结果:正常大鼠注射清开灵后,大量黄芩苷很快分布至肺、肝中,脑中分布较少。脑缺血-再灌注大鼠脑中黄芩苷量较正常组明显升高。结论:黄芩苷为清开灵治疗肝、肺、脑缺血疾病的效应物质之一;以中药归经为指导,进行复方效应物质探索具有可行性。

[关键词] 清开灵注射液; 归经; 效应物质; 黄芩苷

[中图分类号] R285;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0139-04

Study on Effector Substance of Qingkailing Injection Directed by Meridian Distribution

XIAO Lan^{1,2*}, WANG Feng², ZHAO Xu-yuan²

(1. Changsha Health Vocational College, Changsha 410100, China;
2. Clinical Pharmacy Laboratory, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[Abstract] **Objective:** Directed by meridian distribution of Radix Scutellariae, studying effector substance of Qingkailing injection. **Method:** Qingkailing injection was given to experimental rats, the brain, liver and lung were collected in various time. Then Qingkailing was injected to both normal and cerebral isehemia-reperfusion rats, the brain, liver and lung were collected at various time. The concentration of baicalin from samples was determined by HPLC-MS. **Result:** After iv Qingkailing injection, considerable baicalin was distributed quickly to target tissue of normal rats, ie liver and lung; the content of baicalin in the brain was minimum. In cerebral ischemia-reperfusion rats, the concentration of baicalin in the brain was higher than that of normal rats. **Conclusion:** Baicalin is one of effector substance of Qingkailing injection curing lung, liver and cerebral ischemia disease. It is feasibility to search for effector substance of complex prescription, directed by meridian distribution of traditional Chinese medicine.

[Key words] Qingkailing injection; meridian distribution; effector substance; baicalin

中药归经是中药作用于机体的疗效定位概念,是指中药具有对某脏腑及(或)相应的经络、形体官

窍具有显著的选择性治疗作用。归经理论是中医通过长期临床实践总结出来的用药重要规律,是中药药性理论的重要内容之一,在现代医学中如何应用这一理论,已经成为中药现代化研究的热点问题。中药复方是中医用药的特色,研究中药复方的效应物质对阐明复方的作用机制、组方原理,指导临床用药,规范中药的质量标准,开发新中药等具有非常重

[收稿日期] 20120209(004)

[通讯作者] *肖兰, 硕士, 高级讲师, 执业药师, 从事中药现代化研究和药学职业教育, Tel: 0731-84015936, E-mail: xl73110@yahoo.com.cn.

要的意义。随着近年来国内学者对该领域的探索性研究不断深入,对复方效应物质的认识,经过最初的“全成分论”、中期的“吸收入血的成分”探讨,目前已逐渐趋于一致,即:中药复方的效应物质绝大多数是服用复方后在体内检测到的,对某一病症有效的成分,它来源于复方所含的成分以及药物与机体作用所产生的新成分^[1]。现代药理研究表明药物选择性作用的主要原因包括药物在机体分布不同、机体组织细胞结构和生化功能不同两个方面。中药活性成分是其发挥疗效的物质基础,也是归经的物质基础,故活性成分在体内靶器官的分布情况是归经的重要前提。陆光伟、郭顺根、施怀生等的研究也证明中药归经与其活性成分在所属脏腑的高浓度分布密切相关^[2]。因此笔者设想能以归经为指导,检测中药活性成分在效应器官的分布进行复方效应物质的探索。

清开灵注射液(Qingkailing, QKL)是由黄芩、栀子、牛黄、金银花等 7 味药组成的中药复方注射液,具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍、镇静安神等作用,临床用于肝炎、呼吸道感染、流行性脑脊髓膜炎等有高热不退、咳嗽、痰盛、黄疸等指征者,因疗效显著,名列国家首批公布的中医急症必备中成药之一。20 世纪 90 年代以来,清开灵的应用扩大到治疗急性缺血性与出血性中风、颅脑损伤等,尤其在中风偏瘫等脑血管疾病中具有良好疗效。黄芩性味苦寒,入心、肺、肝、胆、胃、大肠经,有清热燥湿、泻火解毒之功效,用于肺热咳嗽、高热烦渴、黄疸等。黄芩苷(baicalin, BC)是黄芩的主要活性成分,实验证明其具有抗炎、利胆、保肝、解热、镇静、保护脑组织、抗氧化^[3]等作用。据此,笔者认为黄芩苷很可能是清开灵注射液治疗肺炎、肝炎、中风偏瘫、高热、神志不清等病症的物质基础之一。本课题以黄芩的传统归经为指导,研究黄芩苷在正常大鼠体内效应器官(脑、肝、肺)的分布,并比较生理及病理状态下黄芩苷在大鼠效应器官分布的不同,为探索清开灵注射液的效应物质提供依据。

1 仪器与材料

1.1 动物 (200 ± 20)g 健康 SD 大白鼠 60 只,雌雄各半,中南大学湘雅二医院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(湘)2003-0003。(250 ± 25)g 雄性健康 SD 大白鼠 50 只,中南大学湘雅二医院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(湘)2003-0003。

1.2 仪器 美国 Waters 公司 2690 型高效液相色谱系统, Waters ZQ 质谱检测器, Masslynx3.5 工作

站,旋涡振荡仪(上海第一医学院仪器厂),瑞士 METTLER TOLEDO AG285 型 1/10 万电子分析天平, DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科技股份有限公司), GL 20A 型低温高速离心机(长沙市湘仪制造厂), KQ-600 型超声清洗器。

1.3 试药与试剂 QKL 粉针剂(贵州益佰制药股份有限公司,批号 20050207)规格:每支 200 mg(含 BC 25 mg)。BC 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 715-20011,含量 > 99.9%),内标芬氟拉明(中国药品生物制品检定所,批号 0073-9501,含量 > 99.9%),甲醇、甲酸、三氟乙酸均为色谱纯(质谱专用),水为本院自制二次重蒸馏水。

2 方法

2.1 给药及采样方法 取 60 只健康 SD 大鼠,雌雄各半,随机分成两组:空白组 10 只和实验组 50 只,实验组又随机分成 5 个小组。禁食 12 h 后,实验组大鼠按 800 mg·kg⁻¹ 剂量尾静脉注射 QKL 粉针剂(相当于 BC 100 mg·kg⁻¹),空白组大鼠给予同样体积的溶媒。分别于给药后 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480 min 处死大鼠,摘取大脑、肺及肝脏组织,用 50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲盐溶液(pH 6.5)洗去表面浮血,用滤纸吸干水分、精密称重后,立即放入 -80 °C 低温冰箱速冻。

另取雄性 SD 大鼠 50 只,随机分为正常组和缺血再灌注两组。各组大鼠按采样点随机分为 5 组,每组 5 只。正常组大鼠经尾静脉给予 800 mg·kg⁻¹ QKL。脑缺血再灌注组采用改良的腔内线栓法通过阻闭大脑中动脉 120 min 后再灌注 120 min 复制局灶性脑缺血-再灌注病理模型,并于恢复再灌注 120 min 时给予 800 mg·kg⁻¹ QKL。两组大鼠分别于给药前及给药后 30, 45, 60, 120 min 处死,摘取大脑、肺及肝脏组织。

2.2 生物样本测定方法 HPLC-MS 法测定大鼠脑、肝、肺组织中黄芩苷的浓度。采用 Thermo C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 40 °C,流动相由 A, B 两相组成, A 为 0.5% 甲酸水溶液(含 0.01% 三氟乙酸), B 为甲醇;采用梯度洗脱程序调节流动相比比例,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 25 μL。采用电喷雾电离源正离子模式(ESI⁺),选择性离子监测进行定量分析:BC 选用碎片离子,质荷比(*m/z*)为 271.4,芬氟拉明选用准分子离子,*m/z* 为 232.5^[4]。

样品处理:脑组织样品用甲醇-pH 6.5 的磷酸二氢钠缓冲溶液(4:1)冰浴匀浆后,离心取上清,低温真空挥干,残渣用甲醇定容,内标法定量。肝、肺

组织样品用甲醇(含0.05%甲酸)冰浴匀浆后,离心取上清,内标法定量。

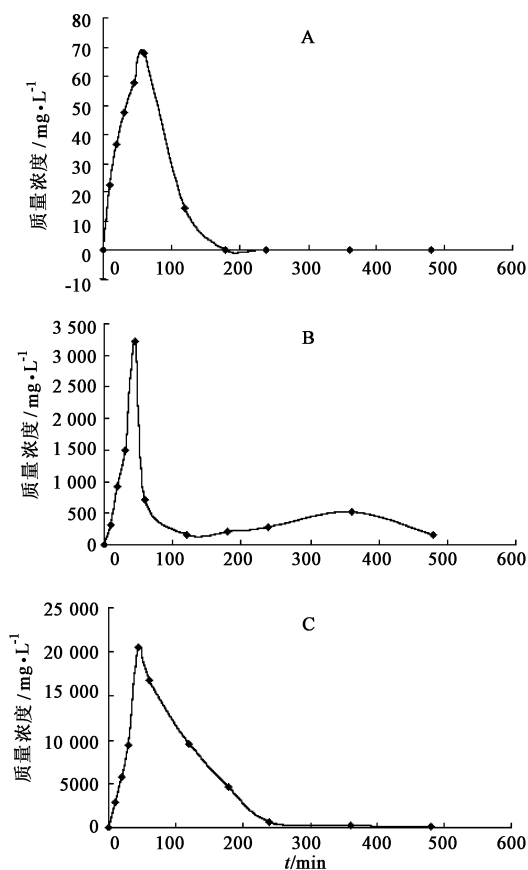


图1 脑(A)、肝(B)、肺(C)组织中黄芩苷的时间-浓度曲线

3 结果与结论

3.1 生物样本测定 脑、肝、肺组织中的BC分别在10.8~540.0, 56.8~5680.0, 56.8~22750.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好($r\geq 0.9994$)。萃取回收率稳定,方法回收率均在90%~110%,日内与日间RSD均<15%。

3.2 黄芩苷在正常大鼠脑、肝、肺中的分布 正常大鼠静脉注射QKL后,BC在其效应器官脑、肝、肺中均有分布,肺中含量最高,肝中其次,脑中最低。BC在肝中浓度上升迅速,45 min达峰,然后被快速消除,120 min后又开始缓慢回升,呈现双峰现象。黄芩苷在肺中分布也迅速,但其消除速度较肝脏明显减慢。脑中BC分布较慢,60 min才到达峰值,消除较快,180 min在脑部已检测不到BC,见图1。

3.4 黄芩苷在脑缺血再灌注大鼠脑、肝、肺中的分布 与正常组比较,BC在脑缺血-再灌注大鼠脑中的含量明显升高,肝中BC分布也显著增加,但肺中BC含量明显降低;BC在脑、肝中分布速度呈加快趋势,而肺中分布速度无明显变化。

4 讨论

现代研究认为归经与中药活性成分在体内的分布、受体学说、中药药理等均有密切关系^[2],检测中药活性成分在体内效应器官的分布是目前归经实验研究中被采用较多的一种方法,该法定位明确,对于既在局部有高浓度分布,又能在局部发挥明显药效

表1 正常和脑缺血再灌注大鼠尾静脉注射清开灵800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后不同时间的脑、肝、肺组织中黄芩苷含量($\bar{x}\pm s, n=5$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

时间	对照	30 min	45 min	60 min	120 min
脑	正常	47.86 ± 6.22	54.47 ± 14.73	62.87 ± 8.09	13.87 ± 0.41
	病理	271.76 ± 29.86 ¹⁾	357.33 ± 80.71 ¹⁾	242.12 ± 62.02 ¹⁾	76.79 ± 8.09 ¹⁾
肝	正常	1490.41 ± 143.74	3251.28 ± 270.68	691.94 ± 84.69	161.39 ± 25.58
	病理	3679.62 ± 98.46 ¹⁾	2973.96 ± 364.18 ²⁾	300.23 ± 135.31 ¹⁾	1375.05 ± 106.90 ¹⁾
肺	正常	10344.56 ± 1146.99 ²⁾	21409.46 ± 551.31 ²⁾	19599.70 ± 734.16 ²⁾	9178.23 ± 134.16 ²⁾
	病理	5709.79 ± 361.54 ¹⁾	6539.59 ± 196.89 ¹⁾	2258.82 ± 213.55 ¹⁾	1076.05 ± 207.51 ¹⁾

注:与同部位正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与正常大鼠肝、脑中黄芩苷浓度相比²⁾ $P<0.01$ 。

效的药物,能在一定程度上说明归经的意义。黄芩为苦寒泻火燥湿要药,归肺、胆经,长于泻肺经之湿热火邪,《本草纲目》中记黄芩“治风热、湿热、头疼,奔豚热痛,火咳肺痿,喉腥诸失血”。本实验通过现代分析手段证明静注QKL后,大量的黄芩苷很快分布至靶器官肺、肝中,与临床适应症相符;也与黄芩传统的归肺、胆经理论相符;确证了黄芩苷为QKL注射液的肝肺效应物质基础之一。黄芩苷在肺组织

中浓度高于肝组织中浓度,也与中医强调的黄芩“长于泻肺经之湿热火邪”相符。药理研究显示:黄芩苷的体内代谢物黄芩素有较强的药理活性,而黄芩苷在肝组织中迅速代谢,并排泄至胆汁中,且通过胆汁呈现肝肠循环现象;这些现象与中医历代强调“黄芩归胆经”有密切的联系。本实验结果一方面验证了传统归经理论的科学性;另一方面提示以中药的归经为指导,采用中药活性成分在效应器官分布

观察法进行复方的效应物质探索具有可行性。

血脑屏障在阻止血液中非亲脂性化合物进入脑组织中起着重要作用,BC属黄酮苷类化合物,极性较强,脂溶性较差,从理化性质分析其难以穿透血脑屏障。实验结果表明BC透过正常大鼠的血脑屏障较少,但在脑缺血再灌注状态下,其穿透血脑屏障明显增加。动物实验发现脑缺血状态可导致血脑屏障通透性增加^[5],缺血再灌注后血脑屏障也存在开放现象,这些病理变化一方面导致脑水肿,加重脑损伤,另一方面有利于一些外源性的治疗药物快速穿透血脑屏障进入脑内,故BC在脑缺血-再灌注大鼠脑组织中不仅分布量明显增加,分布速度也得到了提高。中药归经中未见有归经入脑之说,这与中医强调五脏的功能有关。传统中医将脑列为奇恒之腑,认为脑与精神活动有关,同时又将脑的主要功能统归于心而分属于五脏,强调心主神明,认为心是人精神意识思维活动的主宰,因此将对脑有治疗作用的药物的归经归属到五脏特别是心的范畴。心主神明,是受历史条件局限形成的观念,以心代脑不利于临床对脑疾病的治疗,现代学者提出中药归经入脑的论点,并以药物的主要有效成分能透过血脑屏障在脑中有一定浓度的分布,同时又对脑有明显的药效作用来予以证明^[6]。中医认为黄芩治在上焦,入心、肝、胆、小肠经。心主神明,结合黄芩的现代药理研究,我们推测黄芩苷“归经入脑”。现代中药“归经入脑”观点认为凡临床实践、实验结果证明药物对脑有选择性药效作用,则可初步确定其归经属脑,而中药成分透过血脑屏障进入脑中发挥药效作用,是中药归经入脑的基础。本实验结果发现黄芩苷能

迅速通过脑缺血再灌注大鼠的血脑屏障进入脑组织,且在脑组织中维持较高浓度达一定时间,为黄芩的“归经入脑”提供了实验依据;同时印证了“以中药的归经为指导,采用活性成分在效应器官分布观察法进行复方效应物质探索”思路的可行性。

与正常大鼠不同,脑缺血再灌注大鼠肝中BC浓度增加、达峰时间提前,说明受病理状态的改变的影响,药物在体内的分布出现了新的调整,这种调整的意义与机制尚有待进一步研究。BC在脑缺血再灌注大鼠肺中的分布较正常大鼠明显减少,QKL治疗肺炎时,BC在肺部的分布是否也会出现一定的改变,尚需进一步的实验研究确证。

[参考文献]

- [1] 马春涛,雷燕. 中药复方效应物质基础的研究进展及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(3):46.
- [2] 贲长恩,郭顺根. 中药归经理论研究述评[J]. 北京中医药大学学报,1999,22(2):2.
- [3] 张喜平,田华,程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报,2003,19(11):1212.
- [4] 肖兰,张晓杰,王峰,等. 正常及脑缺血-再灌注静脉注射清开灵后黄芩苷在脑、肝、肺中的分布[J]. 中南药学,2006,4(3):166.
- [5] 徐凯,黄海东,沈天真,等. 大鼠急性脑缺血再灌注后血脑屏障的变化[J]. 中国医学影像技术,2005,21(4):519.
- [6] 宋秋英,郑国庆. 中药归经入脑理论及方法的研究[J]. 中华中医药杂志,2008,23(6):546.

[责任编辑 邹晓翠]