

# 大鼠血中生姜泻心汤黄芩苷含量与胃运动关系研究

刘晓霓<sup>1\*</sup>, 牛欣<sup>2</sup>, 司银楚<sup>2</sup>, 金秀东<sup>1</sup>

(1 牡丹江医学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 探讨大鼠血中生姜泻心汤黄芩苷含量与胃运动关系。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)测定大鼠血中生姜泻心汤黄芩苷的含量; 通过测定大鼠胃内标记物葡聚糖蓝的胃内残留率, 观察生姜泻心汤对大鼠胃排空作用的影响, 分析二者之间的相关性; 体外实验观察黄芩苷对大鼠胃窦平滑肌细胞舒缩功能的影响。结果: 生姜泻心汤对大鼠的胃排空有明显的抑制作用( $P < 0.05$ ); 相关分析结果表明, 大鼠血中生姜泻心汤黄芩苷含量与生姜泻心汤的抑制胃排空作用之间存在着正相关( $r = 0.58, P < 0.05$ ); 黄芩苷有促进大鼠胃窦平滑肌细胞舒张的作用。结论: 黄芩苷可能是生姜泻心汤抑制胃运动的物质基础之一。

**[关键词]** 胃排空; 高效液相色谱法; 黄芩苷; 生姜泻心汤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0032-03

生姜泻心汤是《伤寒论》治疗心下痞满、呕而肠鸣证的著名经方, 为历代医家公认的治疗脾胃病的良方之一。我们在实验中发现该方对胃运动有调节作用, 本实验通过观测该方对正常大鼠胃排空作用的影响和大鼠血中黄芩苷的含量, 分析二者之间的关系; 观察黄芩苷对大鼠胃窦平滑肌细胞舒缩功能的影响, 进而探讨该方调节胃运动的物质基础。

## 1 生姜泻心汤对大鼠胃排空作用的影响

**1.1 动物与分组** 动物: SD 大鼠, 雌雄兼用, 200~220g, 由北京维通利华实验动物中心提供(合格证号: SCXK-2002-0003)。分组: 20 只大鼠随机分为正常对照组和生姜泻心汤组。

**1.2 药物制备与给药方法** 中药: 生姜 12g, 炙甘草 9g, 党参 9g, 干姜 3g, 黄芩 9g, 法半夏 10.7g, 黄连 3g, 大枣 8g) 各药均购自同仁堂, 经中药教研室鉴定, 制成水煎剂, 1mL 含生药 1g。给药方法: 大鼠连续灌胃 7d, 剂量为人用量 7 倍(7.4g/kg), 对照组给常水。

**1.3 胃排空实验方法** 实验前, 大鼠禁食不禁水 24h, 末次灌药后 1h, 灌入 2% 葡聚糖蓝-2000 0.5mL, 经 20min 后, 开腹取出胃, 沿胃大弯剪开, 将胃内色

素残留物充分洗于 4mL 去离子水中, 4000r/min 离心 15min, 取上清液, 用 WFZ 800-D2 型紫外可见分光光度计在 620nm 波长测吸光度即为胃内色素残留量吸光度, 求出各样本吸光度与对照组吸光度均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留率。

**1.4 结果** 见表 1。

表 1 生姜泻心汤对大鼠胃内色素相对残留率的影响( $\bar{x} \pm s\%$ ,  $n = 10$ )

组别	胃内色素相对残留率
正常对照组	99.87 ± 32.23
生姜泻心汤组	141.78 ± 21.07 <sup>1)</sup>

注: 与正常对照组相比, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

结果表明, 与正常对照组相比, 生姜泻心汤组大鼠胃内色素相对残留率增加( $P < 0.05$ ), 提示该方有显著抑制胃排空的作用。

## 2 生姜泻心汤中黄芩苷在大鼠血中的含量测定

**2.1 仪器** MODEL510 高效液相色谱仪(WATERS 公司); 486 检测器(WATERS 公司); C18 色谱柱(HYPERSIL 填料, ODS2, 150mm × 4.6mm, 5μm, 大连依利特科学仪器有限公司)。

**2.2 试剂** 黄芩苷购自 DELTA 天然有机化合物信息中心; 甲醇(色谱纯)、磷酸二氢钠和磷酸(化学纯)购自北京化学试剂公司。

**2.3 方法** 色谱条件<sup>[1]</sup> 流动相为甲醇: 0.2mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50v: 50v), 用磷酸调至 pH 为 2.7, 使用前用超声脱气 20min; 流速: 1mL/min; 压力: 65kgf/cm<sup>2</sup>; 温度: 室温; 检测波长: 275nm; 灵敏度: 0.01; 进样量:

**[收稿日期]** 2005-02-06

**[基金项目]** 国家中西医结合基础重点学科 211 工程资助项目 (No. 2001-004)

**[通讯作者]** 刘晓霓, Tel: 13836379061; E-mail: liuxiani888@yahoo.com.cn

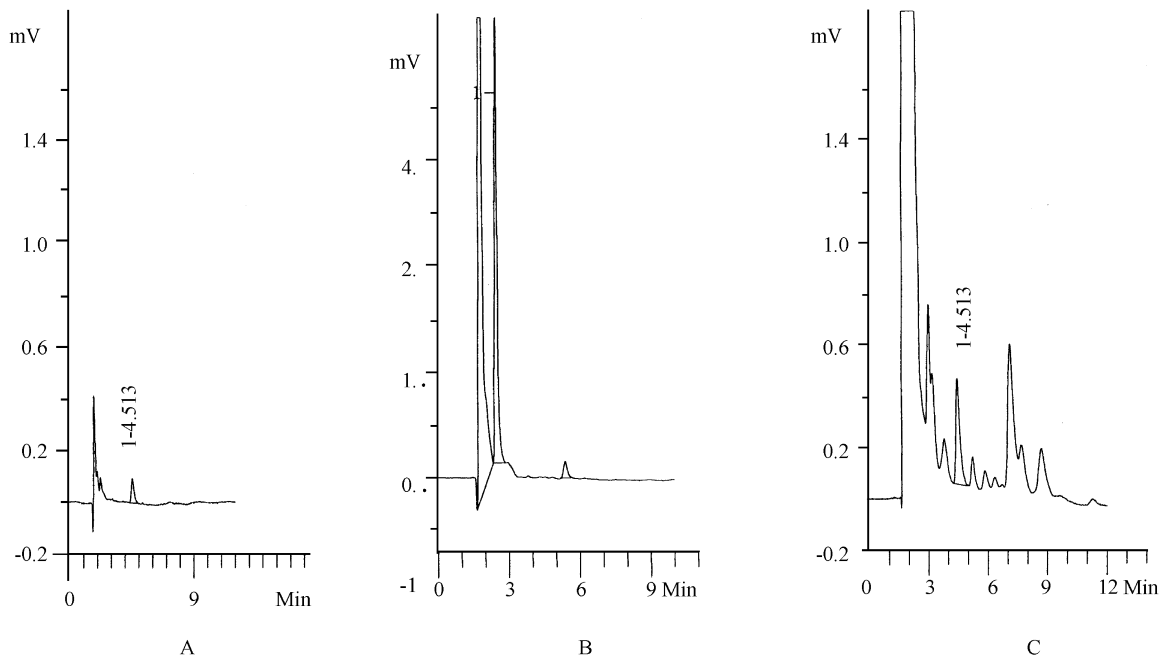


图 1 黄芩苷(A) 空白血浆(B) 加药血浆(C)的 HPLC 色谱图

20 $\mu$ L。血样处理: 将上述大鼠开腹前断头后的血液收集于预先用肝素抗凝的离心管中, 静置 1h, 4000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10min, 取血浆 0.5mL, 加入 0.5mL 甲醇, 超声震荡 1min, 7000 $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15min, 取上清进样。

## 2.4 方法学考证

**2.4.1 方法可行性考察** 精密称取黄芩苷标准品 1mg, 置于 10mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 作为母液。从中吸取 100 $\mu$ L, 置于 5mL 容量瓶中, 用甲醇定容。即得黄芩苷标准溶液, 浓度为 2 $\mu$ g/mL。

取空白血浆、加药空白血浆 0.5mL, 加入 0.5mL 甲醇, 超声震荡 30min, 7000 $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15min, 取上清液, 即得空白对照液和模拟试样液。取标准液、空白对照液和模拟试样液, 分别进样 5, 20, 20 $\mu$ L, 按上述高效液相色谱条件测绘色谱图, 空白对照液不干扰黄芩苷的分离测定。(见图 1)。

**2.4.2 线性关系及最低检出量** 精取母液 20 $\mu$ L, 置于 5mL 容量瓶中, 加入空白血浆 0.1mL, 用甲醇定容, 超声震荡 30min, 7000 $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15min, 取上清液 1, 2, 4, 8, 16 $\mu$ L 分别进样, 以峰面积对进样量 (ng) 进行直线回归。得直线回归方程:  $y = 8902.145x - 8849$  ( $r = 0.9993$ ), 结果表明黄芩苷在 2~32ng 范围内线性关系良好。最低检出量为 0.4ng (以信噪比 = 3 计)。

**2.4.3 加样回收试验** 取 0.2mL 空白血浆 18 份, 分别加入黄芩苷标准液 100, 400, 800 $\mu$ L, 分别用甲醇

定容至 2mL, 按样品处理方法处理后, 取上清 20 $\mu$ L 进样, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 黄芩苷加样回收率试验 ( $n = 6$ )

加入量 (ng)	测出量 (ng)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2	1.97 $\pm$ 0.66	97.99 $\pm$ 2.63		
8	7.81 $\pm$ 0.30	97.69 $\pm$ 3.90	98.93 $\pm$ 1.89	1.91
16	16.18 $\pm$ 0.53	101.10 $\pm$ 3.32		

**2.4.4 日内和日间精密度** 取 0.2mL 空白血浆 3 份, 分别加入黄芩苷标准液 100, 400, 800 $\mu$ L, 分别用甲醇定容至 2mL, 配成 0.10, 0.40, 0.80 $\mu$ g/mL 三个浓度, 按样品处理方法处理后, 同一日内, 每隔 1h 测一次样品, 连续测 6h, 每个样品测两次, 取平均值, 计算日内变异系数, 即日内精密度。不同日内测量样品, 每个样品测两次, 取平均值, 连续测量 6d 计算日间变异系数, 结果见表 3。

表 3 黄芩苷日内精密度和日间精密度 ( $n = 6$ )

浓度 ( $\mu$ g/mL)	RSD% (日内)	RSD% (日间)
0.10	2.68	0.55
0.40	4.00	0.55
0.80	3.28	1.56

**2.5 黄芩苷在大鼠血浆中含量** 结果见表 4。

表 4 大鼠血中生姜泻心汤黄芩苷含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	浓度 ( $\mu$ g/mL)
生姜泻心汤	1.1374 $\pm$ 0.6162

**3 黄芩苷在大鼠血中含量与大鼠胃内色素相对残**

## 留率相关分析研究

采用 SPSS10.0 统计软件对生姜泻心汤组大鼠血中黄芩苷含量与其胃内色素相对残留率进行相关分析,结果表明,二者呈正相关( $r = 0.58, P < 0.05$ )。

### 4 黄芩苷对大鼠胃窦平滑肌细胞舒缩功能的影响

**4.1 动物** SD 大鼠,雌雄兼有,10 周龄,体重  $180 \pm 20\text{g}$ ,维通利华动物实验中心提供。合格证号:SCXK-2002-0003。

**4.2 主要试剂** 黄芩苷(DELTA 天然有机化合物信息中心);吐温-80 HEPES、胶原酶(II)、大豆胰蛋白酶抑制剂、牛血清白蛋白、台盼蓝、丙酮酸钠、L-谷氨酸(Sigma 公司);L-谷氨酸钠(北京奥博星生物技术责任有限公司)延胡索酸(北京金龙化学试剂公司)。

**4.3 仪器** XS2-02 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂);SHZ-82 型水浴恒温振荡器(江苏省太仓医疗器械厂);KQ 3200 超声波清洗机(昆山市超声波仪器厂);MP120-1 电子天平(上海第二天平仪器厂)。

**4.4 游离胃窦平滑肌细胞的制备** 采用 bitar 法<sup>[2]</sup>

**4.5 胃平滑肌细胞舒缩反应的测量和计算** 每一个反应体系取  $0.20\text{mL}$  约  $2 \times 10^5$  个细胞悬液,将黄芩苷加入细胞悬液中,使其终浓度达  $0.5, 1.0, 2.0\text{g/L}$ ,对照组加入 2%吐温-80 PBS 缓冲液,各管混匀,  $30^\circ\text{C}$  反应 5min 后,立即用  $100\mu\text{L}$  的 2.5% 戊二醛终止反应。在倒置显微镜下,用测微尺随机测定遇到的 50 个细胞,计算其平均长度。

**4.6 结果** 对照组和终浓度  $0.5, 1.0, 2.0\text{g/L}$  黄芩苷组的细胞长度分别为  $102 \pm 21\mu\text{m}, 103 \pm 17\mu\text{m}, 106 \pm 26\mu\text{m}, 110 \pm 23\mu\text{m}$ 。与对照组相比,各剂量组细胞长度伸长率分别为  $0.98\%, 3.92\%, 7.84\%$ 。 $2.0\text{g/L}$  剂量组使平滑肌细胞舒张明显( $P < 0.05$ ),可见黄芩苷有使平滑肌细胞舒张的作用,并呈剂量依赖性(见图 2)。

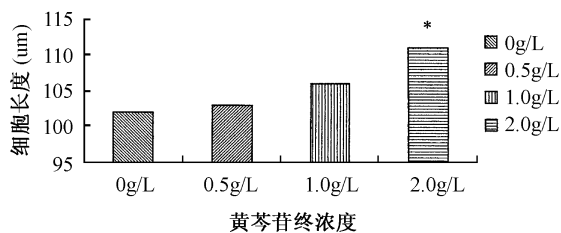


图 2 黄芩苷对大鼠胃窦平滑肌细胞收缩功能的影响

## 5 讨论

现代临床研究表明,生姜泻心汤有治疗幽门不全梗阻、腹泻、结肠炎、肠道激惹征的报道,提示此方有调节胃肠运动的作用<sup>[3~5]</sup>。本实验结果表明,生姜泻心汤有抑制胃排空的作用。但生姜泻心汤由生姜、半夏、黄芩、黄连、干姜、大枣、党参和甘草组成,成分复杂,究竟那些成分与生姜泻心汤抑制胃排空的作用有关,未见报道。黄芩是方中主要药味之一,而黄芩苷是黄芩的主要成分之一,有关黄芩苷对胃肠运动影响的报道较少,但有实验证实黄芩苷有缓解豚鼠气管收缩及整体动物的哮喘的作用;而且黄芩苷可以竞争性拮抗肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺收缩主动脉和肺动脉条的作用,提示黄芩苷对平滑肌的舒缩功能具有直接或间接的作用<sup>[6]</sup>。本研究体外实验表明,黄芩苷有促进大鼠胃窦平滑肌细胞舒张的作用。同时本研究建立了一种可靠的生姜泻心汤中黄芩苷血药浓度的检测方法,生姜泻心汤组大鼠血中黄芩苷含量与大鼠胃内色素相对残留率相关分析结果表明二者呈正相关,相关系数( $r = 0.58, P < 0.05$ );这些结果提示黄芩苷可能与生姜泻心汤抑制胃运动的作用有关,黄芩苷可能是生姜泻心汤抑制胃排空的物质基础之一。

### [参考文献]

- [1] 张志荣,胡晓颖,蒋大义,等. 银黄冲剂中黄芩苷在家兔体内的代谢动力学研究[J]. 中成药, 1996, 18(6): 1-3.
- [2] 刘晓霓,司银楚,高艳青,等. 小檗碱对大鼠胃窦平滑肌细胞收缩作用的影响[J]. 中成药, 2004, 26(10): 822-824.
- [3] 孙大兴. 生姜泻心汤加减治疗幽门不全性梗阻 48 例[J]. 江苏中医, 1997, 18(6): 16.
- [4] 周红三. 生姜泻心汤加味治疗小儿腹泻 56 例. 四川中医[J]. 2002, 20(2): 52.
- [5] 徐秀全,高秀云. 生姜泻心汤治疗慢性结肠炎 30 例. 国医论坛[J]. 1995, 3: 15.
- [6] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 哈尔滨:黑龙江科技出版社, 1995. 60-63.