

表 4 JQF 对家兔离体子宫收缩的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 4 Effect of JQF on *in vivo* uterine contraction of rabbit ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	$\rho / (g \cdot mL^{-1})$	给药前子宫收缩	给药后 40 min 子宫收缩曲线下面积 / ($mV \cdot s$)		
		曲线下面积 / ($mV \cdot s$)	重酒石酸去甲肾上腺素	甲磺酸倍他司汀	米非司酮
对照	—	0 1 491 $\pm$ 0 0 004	3 1 845 $\pm$ 0 8 088	2 7 522 $\pm$ 0 2 695	4 9 273 $\pm$ 0 8 213
JQF	0 50	0 1 473 $\pm$ 0 0 005	0 8 686 $\pm$ 0 0 845 ^{**}	0 3 287 $\pm$ 0 0 043 ^{**}	0 2 894 $\pm$ 0 0 016 ^{**}
	0 25	0 1 503 $\pm$ 0 0 005	0 2 073 $\pm$ 0 0 021 ^{**}	0 3 086 $\pm$ 0 0 048 ^{**}	0 4 873 $\pm$ 0 0 065 ^{**}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

别给药肾上腺素 α 受体激动剂去甲肾上腺素、组胺 H1 受体激动剂甲磺酸倍他司汀、孕酮受体竞争性拮抗剂米非司酮后,对子宫平滑肌均起到不同程度的兴奋作用,JQF 可抑制其兴奋,表明 JQF 可作用于受体,在受体水平调节子宫的收缩程度,以缓解子宫强烈收缩所致的痛经。为进一步阐明 JQF 治疗痛经的作用机制,本实验同时进行了炎症模型试验,结果显示 JQF 能明显对抗二甲苯所致小鼠耳廓肿胀,具有缓解炎症作用,从多角度阐述了 JQF 治疗痛经的作用机制。

现代医学认为原发性痛经的发生与前列腺素 (PGs) 有着密切关系^[5],前列腺素能促进子宫内螺旋小动脉收缩,加速内膜缺血、坏死及血管的断裂导致月经来潮。大量实验已经证实,痛经越严重的妇女,其经血中 $PGF_{2\alpha}$ 水平就越高,在月经开始的最初两天症状最严重时, $PGF_{2\alpha}$ 水平亦达到最高峰。高浓度的 $PGF_{2\alpha}$ 作用于螺旋小动脉上的 $PGF_{2\alpha}$ 受体,引起子宫平滑肌痉挛性收缩,表现为能使子宫肌张力增高、收缩幅度增加,导致子宫血流不足、子宫肌组织缺血,酸性代谢产物堆积于肌层,刺激子宫自主神经疼痛纤维而痛经^[6]。本实验考察 JQF 对大鼠痛经模型的 $PGF_{2\alpha}$ 水平的影响,JQF 高、低剂量组

与阿司匹林组均可调节 $PGF_{2\alpha}$ 的量,显著降低痛经大鼠 $PGF_{2\alpha}$ 水平,说明 JQF 可直接对抗 $PGF_{2\alpha}$ 所致的大鼠子宫痉挛,从而有效缓解痛经症状,达到标本兼治痛经的效果。在上述实验中均设置了 JQF 高、低剂量组,实验显示 JQF 存在剂量依赖性,但其并不成倍数关系,这可能是因为受体饱和,表现为痛经效果并不随着剂量的增加而增强。本实验从部分影响因素考察 JQF 治疗痛经的机制,JQF 治疗痛经的确切机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙海燕,曹永孝,刘静,等.小鼠痛经模型的建立[J].中国药理学通报,2002,18(2):233-236
- [2] 宋卓敏,屈彩芹,张远,等.益母草治疗痛经机制探索[J].中国医学科学院学报,2003,21(2):90-93
- [3] 沈建芬,肖军花,王嘉陵,等.当归 A_3 活性部位的抗炎作用及其对大鼠离体子宫环氧化酶 2 表达的影响[J].中草药,2006,37(9):1371-1374
- [4] Nazar H, Usmanghani M K. Clinical evaluation to assess the safety and efficacy of coded herbal medicine "Dysmoff" versus allopathic medicine "diclofenac sodium" for the treatment of primary dysmenorrhea [J]. *J Herb Pharmacoth*, 2006, 6(1): 21-39
- [5] Creatsas G, Deligeorgiou E, Zachari A. Prostaglandins: PGF_2 alpha, PGE_2 , $6\text{-ket}\alpha\text{-}PGF_1$ alpha and TXB_2 serum levels in dysmenorrheic adolescents before, during, and after treatment with oral contraceptives [J]. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*, 1990, 36(3): 292-298
- [6] 华永庆,洪敏,朱荃.原发性痛经进展[J].南京中医药大学学报,2003,19(1):62-64

黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内药动学研究

曾明飞,潘林梅*,朱华旭,张启春,郭立玮

(南京中医药大学 中药复方分离工程实验室,江苏 南京 210029)

摘要:目的 比较黄连解毒汤中栀子苷在正常和脑缺血大鼠体内的动力学过程。方法 正常大鼠及脑缺血大鼠 ig 黄连解毒汤后不同时间采血,用 HPLC 法测定栀子苷的血药浓度,3P87 软件拟合药动学参数。结果 脑缺血及正常大鼠栀子苷药动学符合一室模型。脑缺血及正常状态下大鼠 ig 黄连解毒汤后,栀子苷在脑缺血及正常状态下体内的 AUC 分别为 (15 819 $\pm$ 5 228)、(11 395 $\pm$ 3 111) $\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$, $t_{1/2ke}$ 分别为 (4 704 $\pm$ 1 850)、

①收稿日期:2009-08-10
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873450);江苏省教育厅自然科学基金项目(07KJB360087)
作者简介:曾明飞(1986—),男,江西抚州人,南京中医药大学 2007 级硕士研究生。
Tel: (025) 86798399 E-mail: xiaofei02@gmail.com
* 通讯作者 潘林梅 E-mail: linmeip@yahoo.com.cn

(3.695 ± 1.595) h, $C_{\max}$ 分别为 (2.135 ± 0.202)、(1.677 ± 0.621) $\mu\text{g/mL}$ 。结论 栀子苷在脑缺血状态下的血药浓度及吸收效果优于正常状态,在体内停留的时间较长,消除较慢,反映了黄连解毒汤临床对症治疗脑缺血疾病的合理性,体现了方证对应的思想。

关键词:黄连解毒汤;栀子苷;药动学

中图分类号:R286.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)04-0617-04

脑血管疾病在中医理论中属于“中风”,具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高等特点,是 21 世纪威胁人类健康的重大杀手之一,成为一种全球性疾病。据报道 80% 的脑中风的发生是由脑缺血造成的^[1]。相当多的学者认为热毒是中风病发病中的关键因素,清热解毒法治疗中风是值得深入探讨的治疗方法。黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成,为清热解毒代表方,栀子苷为黄连解毒汤中的有效成分之一。近年国内外对黄连解毒汤及栀子苷用于脑血管病的基础研究与临床报道较多,提示本方治疗缺血性脑血管病有良好前景^[2]。近年来对黄连解毒汤体内过程的报道日渐增多^[3,4],但都只是考察正常个体体内过程。本研究基于方证对应思想,比较复方黄连解毒汤中栀子苷在脑缺血模型及正常大鼠体内药动学,评价栀子苷在脑缺血病理状态是否会呈现出与正常状态不一样的动力学差异,及差异出现是否与“证”的存在有关等,将为揭示黄连解毒汤药动学,与指导临床脑缺血用药和探讨中药复方药动学有积极意义。

1 材料

1.1 药材与试剂:黄连解毒汤水提物(由本实验室制备,其中含栀子苷为 22.81 mg/g)。肝素钠购自 Sigma 公司。栀子苷对照品(批号 110749-200613,中国药品生物制品检定所)、芍药苷对照品(批号 110736-200629,中国药品生物制品检定所)。磷酸二氢钾(上海久亿化学试剂有限公司)。实验用甲醇、乙腈均为色谱级,水为娃哈哈纯净水。

1.2 实验动物:SD 大鼠,体质量 $280 \sim 300 \text{ g}$,雄性,购自南京中医药大学实验动物中心(由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供),清洁级,合格证号:SCXK 苏 2007-0005。

1.3 仪器:Waters 1525 系列高效液相色谱仪(1525 HPLC 泵,2487 Dual λ Absorbance Detector, Empower 工作站);TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器制造厂);氮吹仪(天津奥特赛恩斯有限责任公司);1411 治疗仪(上海医疗器械高技术公司);十万分之一电子分析天平;微型漩涡混合仪。

2 方法

2.1 黄连解毒汤水提物制备:黄连解毒汤由本实验室自制;精密称取黄连 60 g、黄芩 40 g、黄柏 40 g、栀子 60 g,加 10 倍量水煎煮 1 h,取煎液;药渣再加 8 倍量水煎煮 1 h,取煎液;二液合并后浓缩至干,研磨呈粉末,制得黄连解毒汤提取物约 50 g,经 HPLC 法测得其中含栀子苷 22.81 mg/g 。临用前用 0.5% CMG-Na 溶解配制成水提物 0.5 g/mL 的药液,相当于栀子苷 114.05 mg/mL 药液,备用。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Benetnack C₁₈ ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$),流动相为乙腈-水 (15:85),体积流量 1.0 mL/min ,检测波长 238 nm ,系统温度 30°C ,进样体积 $10 \mu\text{L}$,内标法峰面积定量。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取适量栀子苷对照品,置 25 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,配成栀子苷质量浓度为 0.229 mg/mL 溶液;芍药苷对照品同法制备,质量浓度为 0.204 mg/mL ,作为标准储备液, 4°C 保存。

2.4 血浆样品处理方法:取 $100 \mu\text{L}$ 血浆样品置于具塞离心管中,加入 $500 \mu\text{L}$ 无水甲醇沉淀蛋白, 5000 r/min 离心 10 min 。将上清液转移至尖底试管中,于 40°C 水浴 N_2 挥发至干。定量加入甲醇 $100 \mu\text{L}$ 溶解残渣,作为样品液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围及检测限:分别取 6 份空白血浆各 $100 \mu\text{L}$,置带塞试管中,加入不同浓度梯度的栀子苷对照品溶液各 $100 \mu\text{L}$ 配成质量浓度分别为 0.1 、 0.188 、 0.375 、 0.75 、 1.5 、 $3.0 \mu\text{g/mL}$ 的样品,按 2.4 项“血浆样品预处理”操作,以栀子苷峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 之比 (Y) 对栀子苷浓度 (X) 进行线性回归计算,得回归方程为: $Y = 0.0294X + 0.003$, $r = 0.9992$,线性范围为 $0.1 \sim 3 \mu\text{g/mL}$,最低检测量为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

2.5.2 提取回收率:分别取 15 份空白血浆各 $100 \mu\text{L}$,置具塞试管中,加入 3 种不同质量浓度的栀子苷对照品溶液使血浆中终质量浓度分别为 0.1 、 0.375 、 $1.5 \mu\text{g/mL}$,每个质量浓度样品 5 份,按 2.3 “血浆样品预处理”操作,依法测定,上述 3 种质量浓度的对照品溶液进样 $5 \mu\text{L}$,作为对照组。按血浆样

品的处理与测定项下方法进行测定,将栀子苷峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_i) 之比代入标准曲线方程计算出血浆中栀子苷质量浓度,以测得值与加入值之比计算回收率。结果可见,低、中、高 3 种质量浓度血浆样品的回收率分别为: $(83.33 \pm 5.02)\%$ 、 $(76.18 \pm 2.00)\%$ 、 $(83.62 \pm 3.87)\%$, 栀子苷平均萃取回收率为 $(81.04 \pm 4.22)\%$ 。

2.5.3 精密度: 以回收率试验的 3 种质量浓度的栀子苷血浆样品进行精密度实验,分别取 15 份空白血浆各 100 μL ,加入 3 种不同质量浓度的栀子苷对照品,使配成的血浆样品中含栀子苷分别为 0.1、0.375、1.5 $\mu\text{g/mL}$,每个质量浓度样品 5 份,按 2.4 项下操作。计算日内和日间精密度。数据结果表明,该分析方法的日内 $\text{RSD} < 6\%$ ($n=5$),日间 $\text{RSD} < 10\%$ ($n=5$),当血浆质量浓度较低时,日间差异大,但能满足生物样品测定的要求。该法可以用于测定血浆中栀子苷的质量浓度。

2.6 缺血性脑血管疾病模型制备: 雄性 SD 大鼠,体质量 280~300 g,参照文献方法^[5]对大鼠进行脑缺血手术。先将实验大鼠背部 sc 15% 酵母菌悬液 5 mL/kg,以 10% 水合氯醛麻醉 (350 mg/kg, ip),用电凝法制备大鼠脑缺血模型。大鼠侧卧位固定于手术台上,沿右外耳道与右眼外眦连线中点,垂直于连线切开皮肤约 2 cm,然后沿颞肌中线,依次切断颞肌和咬肌,暴露出颞弓。用咬骨钳除去颞弓,并沿露骨剪开筋膜,暴露出颞前窝。用小牵张器将颞

弓和下颌骨的距离撑大,暴露鳞状骨的大部分,在颞骨和鳞状骨前联合的前下方约 2 mm 处开一颅窗,暴露大脑中动脉 (MCA)。分离血管,使之游离。用电刀电凝烧灼嗅束内 1 mm 至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉。阻断大脑中动脉后用小块肌肉组织轻敷于颅窗上,然后逐层缝合伤口,术后回笼饲养。于术后 4 h 后测体温,并进行行为学评分,按 Bederson 等^[6]的方法,对动物进行神经症状评分。将体温升高 $\geq 0.8^\circ\text{C}$ 和行为学评分 ≥ 2 分的大鼠,作为复制成功的热证脑缺血模型。

2.7 血液样品采集: 大鼠给药前禁食不禁水 12 h,对照组 (正常大鼠) 及模型组大鼠术后 24 h 取空白血浆 0.5 mL 于肝素化试管。1 h 后分别 ig 给予黄连解毒汤水提物,剂量为 10 g/kg^[7~9],分别于给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、24 h 眼眶取血 0.5 mL 于肝素化试管中,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。置于 -20°C 条件下保存待测。

2.8 数据处理: 血药浓度数据采用中国药理学学会推荐的药动学计算程序 3P87,计算栀子苷的药动学参数。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 专属性考查: 在上述色谱条件下,栀子苷、芍药苷对照品保留时间分别为 8.086、13.448 min,血浆样品中栀子苷、芍药苷保留时间分别为 8.110、13.502 min,空白血浆在相同保留时间处无吸收峰,不干扰测定,见图 1。

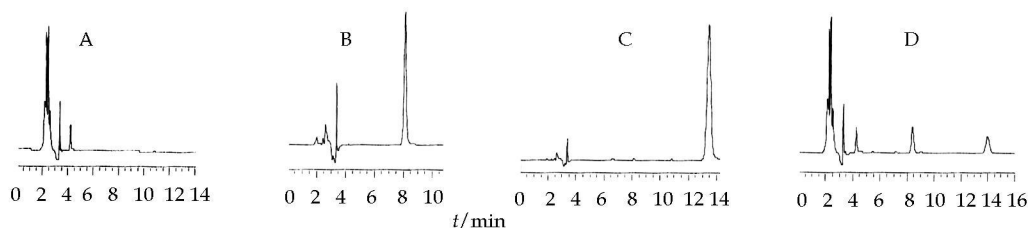


图 1 空白大鼠血浆 (A)、栀子苷对照品 (B)、芍药苷对照品 (C)、药后 1 h 血浆样品 (D) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank plasma of rats (A), geniposide reference substance (B), paeoniflorin reference substance (C), and plasma samples obtained 1 h after administration (D)

3.2 药动学参数: 根据峰面积按内标一点法计算血药浓度。在模型组药后 1 h 处,栀子苷的血药浓度达最高峰 $(2.406 \pm 0.713) \mu\text{g/mL}$,然后开始下降;在对照组给药后 0.75 h 处出现最高峰值, C_{max} 为 $(1.903 \pm 1.245) \mu\text{g/mL}$,栀子苷的吸收呈现起伏。脑缺血模型组大鼠对栀子苷的吸收效果要优于对照组正常大鼠的结果,黄连解毒汤中栀子苷药动学参数结果见图 2 及表 1。

4 讨论

4.1 本实验考察比较脑缺血和正常大鼠 ig 黄连解毒汤后栀子苷在体内的经时变化,评价药动学特征的差异,为临床用药提供参考。由于栀子苷为环烯醚萜苷,极性较大,选择蛋白沉淀法,比较了乙腈、醋酸乙酯、氯仿、甲醇等有机溶剂,通过综合比较提取回收率、杂质干扰等因素,最终发现甲醇基本能够符合实验的要求,故选用甲醇有机溶剂沉淀蛋白的方法。最终采用甲醇沉淀蛋白, N_2 吹干后甲醇复溶解的方法,提取回收率较高,获得较满意的效果。通过

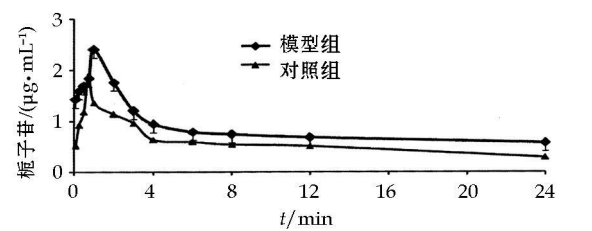


图 2 黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内的血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Concentration-time curves of geniposide in plasma of normal and cerebral ischemia rats by ig administered with Huanglian Jiedu Decoction

表 1 黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of geniposide in normal and cerebral ischemia rats by ig administered with Huanglian Jiedu Decoction ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

参数	单位	模型组 (脑缺血)	对照组 (正常)
C_{max}	$\mu g \cdot mL^{-1}$	2 135 $\pm$ 0 202	1 677 $\pm$ 0 621
t_{max}	h	0 910 $\pm$ 0 449	0 807 $\pm$ 0 178
AUC	$\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	15 819 $\pm$ 5 228 ^{**}	11 395 $\pm$ 3 111
$t_{1/2ka}$	h	0 244 $\pm$ 0 091	0 170 $\pm$ 0 087
$t_{1/2ke}$	h	4 704 $\pm$ 1 850	3 695 $\pm$ 1 595

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

对大鼠血浆中栀子苷的测定方法考察,建立了测定大鼠血浆中栀子苷定量的 HPLC 法,该方法灵敏度高,专属性强,数据可靠,适用于生物样品测定的要求,为研究黄连解毒汤体内的药动学提供了可靠的方法。

4.2 关于实验中脑缺血模型的选择,本实验采用的是开颅机械闭塞法以眶后入颅阻断大脑中动脉(MCA)法,该方法是脑缺血研究中较为常用、经典的脑缺血模型制备方法。实验动物的选择,研究发现,Wistar 大鼠 MCAO 平均脑梗死体积最小,梗死灶变异大;Fishcer-334 大鼠梗死灶最大,变异最小;而 SD 大鼠居二者之间,在动物体质量方面,现多数研究选用 280~350 g 的大鼠较为理想,故本研究选用 280~300 g 的 SD 大鼠为研究对象。

4.3 采用中国药理学学会数学药理委员会编制的 3P87 实用药动学软件,处理血药浓度数据,自动拟合药动学房室模型,计算药动学参数,根据 AIC 最小作为判断指标,大鼠在正常和脑缺血状态下 ig 黄连解毒汤后栀子苷在体内过程符合一室模型。由药动学参数可知,模型组与对照组比较,栀子苷在脑缺血模型大鼠体内的 AUC、 $t_{1/2ke}$ 及 C_{max} 要高于正常大鼠。结果表明脑缺血状态下栀子苷在体内的吸收

效果较正常状态要好,并且在病理状态下栀子苷在体内的驻留时间更长,消除较慢。

4.4 方证对应是一个动态对应,对证治疗时才能体现药物的治疗作用,不对证治疗或机体处于非证候状态时,则治疗作用不明显。近年来对黄连解毒汤、栀子苷对脑缺血“证”研究不断有新的拓展,黄连解毒汤有改善脑缺血、益智、对低氧性脑病的保护作用等^[10]。栀子苷是一种能够影响自由基代谢的抗氧化剂,其抑制缺血损伤大鼠的这些改变,有助于清除自由基,减少缺血性损伤引起的细胞功能的损伤和改善受损记忆功能。栀子苷能够透过血脑屏障^[11],为其治疗脑部疾病提供了保障。本实验同时研究栀子苷在脑缺血及正常状态下的药动学特征,研究结果显示在脑缺血模型体内栀子苷的吸收效果要明显优于正常大鼠,这种差异应该是与脑缺血“证”相联系的,表明临床应用黄连解毒汤治疗脑缺血疾病的合理性,栀子苷是复方发挥抗脑缺血证的药效物质基础的正确性,反映中医理论上的方证对应思想。中药复方的药动学研究极为复杂,结合相应的证确实地反映复方方证对应的体内药动学过程以及评价药动学差异,对于阐明复方的药效物质基础及机制,指导临床合理应用具有重要意义。

参考文献:

[1] Savit Z S I, Louis R M D, Caplan M D. Vertebrobasilar disease [J]. *New Engl J Med*, 2005, 352: 2618-2626

[2] 张吉军,汪丽娅,王忠,等.黄芩苷、栀子苷及其配伍治疗局灶性脑缺血大鼠药效评价及作用机制研究[J].*中国中药杂志*, 2006, 31(11): 907-910

[3] 邓远雄,杨昌华,牟玲丽.黄连解毒汤中黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠体内的药动学[J].*中草药*, 2008, 39(2): 227-231

[4] 宋珏,路通,谢林,等.以血清药理学方法研究黄连解毒汤对小鼠的药效动力学[J].*中草药*, 2005, 36(5): 709-713

[5] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1995, 26(9): 1037-1043

[6] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the mode and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476

[7] 朱晓磊,张娜,李澎涛,等.栀子苷阻抑脑缺血损伤级联反应的作用环节探讨[J].*中国中药杂志*, 2004, 29(11): 1065-1068

[8] 肖学风,乔晓莉,高岚,等.黄连解毒汤中三种成分在大鼠体内的药代动力学研究[J].*中国医药导报*, 2008, 5(30): 13-16

[9] 周威,石任兵,孙建宁,等.不同模型下清脑宣窍方有效组分药代动力学研究[J].*北京中医药大学学报*, 2008, 31(4): 265-268

[10] 刘磊,姜鹏,窦圣娜,等.黄连解毒汤的化学及药理学研究进展[J].*中草药*, 2008, 39(6): 935-938

[11] 高永红,王炎炎,肖盛元,等.清开灵有效组分透过体外模拟血脑屏障的研究[J].*北京中医药大学学报*, 2005, 28(2): 26-28