



· 药代动力学 ·

MD-HPLC 联用研究中药苏合香对西药舒必利脑药和血药浓度的影响

刘萍^{1*}, 于绍帅², 何新荣³

(1. 解放军总医院海南分院药剂科, 海南 三亚 572013;

2. 安徽蚌埠医学院药学系, 安徽 蚌埠 233000;

3. 解放军总医院药品保障中心中药房, 北京 100853)

[摘要] 目的:为了观察中药苏合香对联用药西药舒必利血药与药脑浓度的影响,探讨苏合香开窍作用与增加胃肠屏障与血脑屏障透过性的关系,并研究苏合香与舒必利联用的相互作用。方法:大鼠连续口服用药1周后,进行脑部与颈部安装探针手术,平衡1h后,利用血微透析法与脑微透析法分别在(30,60,90,120,150,180 min)各时间段采集大鼠右心房内血液中与海马组织中的透析液,利用反相高效液相色谱系统检测样品中舒必利的含量,利用统计学方法比较2组给药后脑中及血液中的舒必利含量。结果:舒必利合用苏合香组的大鼠脑中和血中舒必利浓度明显高于单用舒必利组,单用舒必利组大鼠血中和脑中舒必利的浓度比值为1:0.2,舒必利与苏合香合用组血脑比增加为1:0.3,与单用舒必利组相比,舒必利与苏合香合用组的舒必利脑浓度上升39%,血浓度上升69%。结论:苏合香能够明显增加舒必利在大鼠脑中和血中的浓度,说明苏合香能够促进舒必利透过胃肠屏障与血脑屏障,该研究从药理学角度揭示了苏合香“开窍”的机制是促进了胃肠屏障及血脑屏障通透性增加。

[关键词] 苏合香;舒必利;微透析;胃肠屏障;血脑屏障;高效液相色谱

“芳香开窍”药包括苏合香、麝香、石菖蒲、薄荷脑、冰片等,是一类具有通关开窍、苏醒神志作用的中药。开窍药之一的苏合香是金缕梅科植物苏合香树 *Liquidamar orientalis* Mill. 所分泌的树脂,归心脾经。其功效为开窍醒神,辟秽止痛,《本草纲目》认为苏合香:“气香窜,能通诸窍脏腑,故其功能辟一切不正之气。”按照中医理论,将人的精神活动主要归结为心,认为心藏神、主神明,心窍开通则神明有主、神志清醒、思维敏捷。若心窍被阻、清窍被蒙,则神明内闭、神识昏迷、不省人事,尤属闭证者治疗则须用辛香开通心窍之品。开窍药在西药系统中难以找到对应的分类,其作用机制也一直不清楚。以往的研究中发现该类药物能帮助同用的其他药物入脑^[1],开窍药的作用可能与促进血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的通透性增加相关^[2]。

虽然有报道^[2-4]冰片,石菖蒲,麝香影响BBB发挥其治疗作用,而苏合香尚未见类似报道。而且开

窍药促进其他药物浓度增加的血脑比值也尚未见报道,有必要进行深入的探讨。舒必利是临床常用的效果-价格比值较好的抗精神分裂症阴性症状的老药,属第一代抗精神分裂症药,还具有较好的镇吐作用^[5],但有一定的副作用,比如锥体外系反应、心血管反应等^[6],患者对舒必利的依从性差^[7]。它对中脑边缘系统中多巴胺受体D₂亲和力较高,对纹状体多巴胺受体D₂亲和力低,由于其通过血脑较少,需要大剂量长期服用,病人的依从性较差。本实验利用微透析技术(microdialysis, MD)联合高效液相色谱法(HPLC)探究联合应用苏合香后是否可以增加舒必利的血药与脑药浓度,减少舒必利服药量,提高疗效,增强病人的依从性,减少不良反应发生率,为临床更好用此药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

微透析系统:WDT-II型脑立体定位仪(中国西北光学仪器厂);微透析脑探针(瑞典, MAB),微透析血管探针(瑞典, MAB),CMA-400型微量注射泵(瑞士, CMA公司);牙科钻(日本, Saeshin);PHS-2C计(上海虹益仪器仪表有限公司);KQ2200DB型数

[稿件编号] 20120215005

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173572)

[通信作者] *刘萍,研究方向为中药临床药理学, Tel: 13601203271, E-mail: liuping0707@yahoo. com. cn



控超声波清洗器(昆山超声仪器厂);MDF-U4086S 超低温冰箱(日本)。

HPLC 系统:Agilent 1200 型,G1329A 自动进样器, Chemstation on line 处理系统,G1315D 荧光检测器(FLD),Alltima C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱。

1.2 药品

舒必利对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100203-200503),舒必利片(上海医药集团有限公司信谊制药总厂,批号 B090401);苏合香(药用,由解放军总医院中药房提供,经刘萍主任药师鉴定为金缕梅科植物苏合香树 *L. orientalis* Mill. 的树干渗出的香树脂);甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司)均为色谱纯;其他所用试剂均为分析纯。

2 方法^[8]

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠 24 只,(260±20) g,雄性,分为 4 组,每组 6 只,即阴性对照组(I)给香油 1 mL;苏合香组(II)按剂量 400 mg·kg⁻¹(用香油 1 mL 溶解)给予苏合香;舒必利组(III)按剂量 400 mg·kg⁻¹(用水 1 mL 溶解)给予舒必利;合用组(IV)6 只,给予舒必利 400 mg·kg⁻¹+苏合香 400 mg·kg⁻¹体重(相当人剂量 4.5 倍)。均每日 1 次,连续饲喂 7 d。

2.2 手术

2.2.1 颈静脉手术 将大鼠用 10% 的水合氯醛按 3.45 mL·kg⁻¹的剂量腹腔注射麻醉,躺姿固定于操作台,去毛后在颈部正中位置切口,分离出颈静脉,结扎远心端;在颈静脉上剪一“V”形小口,将血管探针小心插入到右心房前,用细线固定好探针防止滑脱或移位,缝合颈部伤口。

2.2.2 脑海马区手术 继上步操作后,将大鼠卧姿置于脑立体定位仪上,上耳棒、牙托,下垫温毯,切开头皮,暴露头骨,根据坐标位置在颅骨上钻孔,小心操作尽量不损伤硬脑膜。参照《大鼠脑立体定位图谱》^[9],旋转脑立体定位仪垂直臂将微透析探针插入海马区。

2.3 试液配制

2.3.1 人工脑脊液(aCSF)配制 分别取 NaCl 7.363 g, CaCl₂ 0.122 g, NaHCO₃ 2.31 g, MgCl₂ 0.172 8 g, KCl 0.179 g, Na₂SO₄ 0.071 g, KH₂PO₄ 0.068 g 加入 1 L 蒸馏水,溶解后调 pH 7.38,孔径 0.2 μm 水系微孔滤膜抽滤,冰箱内冷藏备用。

2.3.2 人工血液(aB)配制^[10] 称取柠檬酸,柠檬

酸钠,葡萄糖溶于灭菌注射用水,使其含柠檬酸 3.5 mol·mL⁻¹,柠檬酸钠 7.5 mol·mL⁻¹,葡萄糖 13.6 mol·mL⁻¹,备用。

2.3.3 对照溶液配制 精密称取舒必利钠对照品 10.0 mg,以注射用水定容在 100 mL 量瓶中,配成 0.10 g·L⁻¹的溶液作为对照储备液,0~4 °C 冰箱保存,1 周内使用完毕。精密量取舒必利钠对照储备液 1 mL,以空白 aB 定容于 10 mL 量瓶中,振荡混匀,得 0.01 g·L⁻¹溶液,然后取该溶液 1 mL 用空白 aB 稀释于 10 mL 容量瓶中,制成质量浓度分别为 0.01,0.1,0.5,1,5 mg·L⁻¹的舒必利钠系列对照溶液。

2.4 微透析取样

开启微透析灌流系统,以人工血液和人工脑脊液分别进行脑和血液灌流,调节微量注射泵控制灌流液流速恒定为 2.0 μL·min⁻¹。待脑内稳定平衡 60 min 后,每 30 min 收集一管透析液,共收集 6 管。收集好的透析液即刻转入 -80 °C 冰箱保存。透析结束后,脊椎脱臼处死大鼠,断头取脑,观察透析探针取样位置,若探针错位则实验结果不计。

2.5 探针回收率的测定

每次微透析取样前,配制含舒必利 0.01 g·L⁻¹的溶液,保持温度在 37 °C 左右,将探针前端浸在溶液中,灌流液以微透析取样时相同的速度(2.0 μg·min⁻¹)灌注,待探针稳定平衡 40 min 后,连续收集流出液 30 min。并按前述的 HPLC 条件进行检测,计算得出每次探针的体外回收率,用以折算大鼠血液中舒必利的真实浓度。经测定血液探针的平均回收率为 42.21%,脑探针的平均回收率为 27.18%。

2.6 色谱测定

2.6.1 色谱条件 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄-乙腈 92:8;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 25 °C;进样量 30 μL;荧光发射波长 238 nm,吸收波长 345 nm,见图 1。

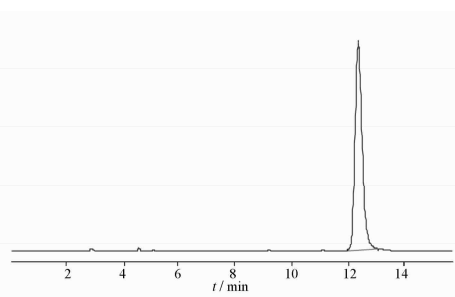


图 1 舒必利的标准色谱图

Fig. 1 The typical chromatogram of sulphiride

2.6.2 标准曲线的绘制 分别吸取不同浓度舒必利对照溶液各 30 μL 直接进样测定,记录色谱图及峰面积,以舒必利浓度为横坐标,所测得的峰面积为纵坐标,作图。得回归方程为 $Y = 370.16X - 0.46915$,线性相关系数 $r = 0.9996$ 。结果表明舒必利在 0.01 ~ 10 mg · L⁻¹ 与峰面积之间具有良好的线性关系。

2.6.3 加样回收率和精密度测定 在标准曲线的线性范围内分别配制 0.100, 1.000, 10.00 mg · L⁻¹ 3 个不同质量浓度的样品溶液,取各浓度溶液在同 1 d 的不同时间段平行测定 5 次,计算出日内精密度;取各浓度溶液 5 份,间隔 2 ~ 3 d,于 2 周内测定,计算得日间精密度;同时根据标准曲线计算出各溶液中舒必利的浓度,求得测定浓度与加入量的比值,即为舒必利的加样回收率,见表 1。

表 1 舒必利加样回收率和精密度测定 (n = 5)

Table 1 Sulpiride recoveries and precision of the determination results (n = 5)

质量浓度 /mg · L ⁻¹	测定值 /mg · L ⁻¹	平均回收率 /%	精密度 RSD/%	
			日内	日间
10	10.030	100.3	0.12	0.62
1	0.983	98.30	1.5	2.0
0.1	0.102	102.4	2.1	2.2

2.6.4 样品含量测定及统计学分析 根据上述建立的高效液相色谱分析方法,分别对大鼠各组的样品进行分析,测定不同的采样时间段脑脊液和右心房前区血液微透析液中舒必利的含量。分析各组舒必利含量的变化,并绘出平均药时曲线,见图 2 ~ 3。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理方法

表 2 舒必利单用组和合用苏合香组血液中舒必利浓度变化 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

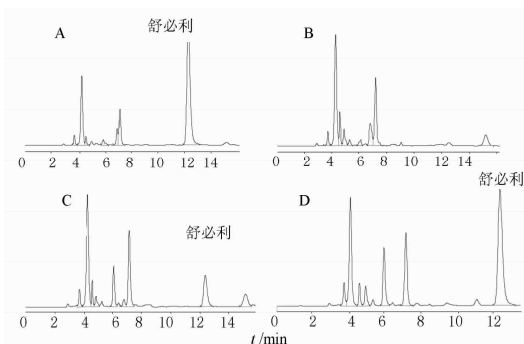
Table 2 The concentration changes of sulpiride in blood of sulpiride group and combination with styrax group ($\bar{x} \pm s, n = 4$) mg · L⁻¹

组别	平衡后取样时间/min					
	30	60	90	120	150	180
I	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-
III	0.492 ± 0.065	0.578 ± 0.099	0.658 ± 0.091	0.698 ± 0.100	0.698 ± 0.140	0.777 ± 0.211
IV	0.643 ± 0.139	0.776 ± 0.142 ²⁾	0.907 ± 0.104 ²⁾	0.970 ± 0.035 ²⁾	1.042 ± 0.067 ²⁾	1.079 ± 0.131 ¹⁾

注:与舒必利单用组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 海马区舒必利浓度变化

舒必利在大鼠海马区的浓度 IV 组明显高于 III



A. 空白血液 + 舒必利对照品; B. 对照组; C. 舒必利单用组; D. 舒必利与苏合香合用组 (图 3 同)。

图 2 大鼠各组血液样品中舒必利的色谱图

Fig. 2 The chromatograms of sulpiride

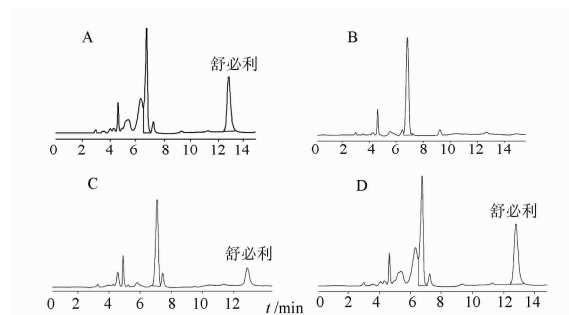


图 3 各组脑脊液海马区微透析舒必利样品色谱图

Fig. 3 The chromatograms of sulpiride in the hippocampus cerebrospinal fluid of rat models

采用组间 t 检验。

3 结果

3.1 血液中舒必利浓度变化

与 III 组相比,给药后大鼠 IV 组的血中明显浓度升高,平均上升了 69% ($P < 0.01$),见表 2,图 4。

组,上升幅度为 39%,见表 3,图 5。

3.3 舒必利脑透析液与血透析液的浓度

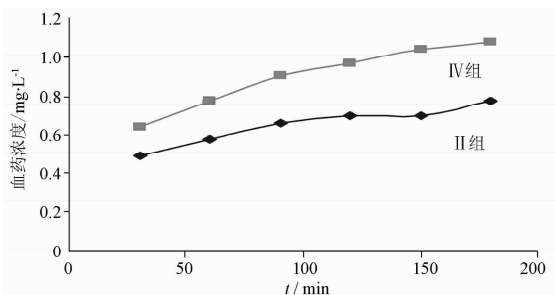


图 4 舒必利单用组和舒必利合用苏合香组血药浓度的比较

Fig. 4 The comparison of serum sulpiride concentration of sulpiride group and sulpiride + storax group

表 3 舒必利单用组和合用苏合香组的脑内舒必利浓度变化 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

mg · L⁻¹

组别	平衡后取样时间/min					
	30	60	90	120	150	180
III	0.192 ± 0.043	0.135 ± 0.058	0.098 ± 0.074	0.065 ± 0.008	0.064 ± 0.014	0.063 ± 0.012
IV	0.354 ± 0.044 ¹⁾	0.236 ± 0.014 ¹⁾	0.127 ± 0.010	0.123 ± 0.033	0.117 ± 0.037	0.110 ± 0.016

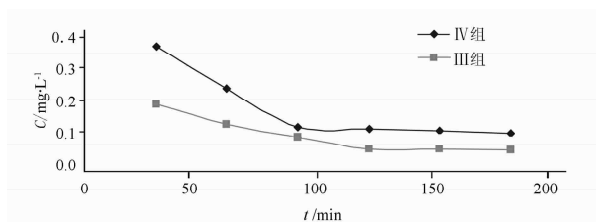


图 5 舒必利单用与舒必利与苏合香合用对大鼠海马区舒必利浓度的影响

Fig. 5 The effects of sulpiride combination with storax on sulpiride concentration in hippocampus of rats

污染,这都大大影响了血液中舒必利含量的测定,而血液微透析技术则很好地解决了这些问题。舒必利属于苯甲酰胺类化合物,分子量较小,微透析透过率较高,不受探针的限制,血中检测容易。但因分子极性较大,与血液透析液中极性大的杂质不易分离,按照文献报道方法摸索,使用 HPLC 流动相盐的比例几经增加,峰形分离开来;实验中还特别出现拖尾现象,加扫尾剂效果也不佳,最后去掉预柱,解决了问题。由于舒必利不易透过 BBB,脑中的浓度检测相对困难。

对中药开窍药的深入研究目前很少,本实验选取苏合香帮助西药透过 GB 与 BBB 作为研究对象,有较大创新意义。结果表明,苏合香能够促进 GB

III 组大鼠血中和脑中舒必利的浓度比值(血脑比)为 1:0.2,IV 组的血脑比为 1:0.3,说明舒必利与苏合香合用比单用舒必利大鼠脑海马内舒必利浓度有明显增加。

4 讨论

微透析技术在药理学方面的应用主要在于其药动学的研究^[11],而将微透析技术用于直接测定外源性药物在脑脊液中浓度方面的研究较少^[12-13]。在测定血液中舒必利浓度时,通常采用传统方法取血,去蛋白处理后进行含量测定^[14],大鼠血内含大量的杂质,对检测结果干扰很大;且在采集血样时,极易

的通透性增加,使舒必利在胃肠道的吸收增加,促进舒必利更多地透过 GB,帮助舒必利更多地进入血液与脑脊液,与单用舒必利组相比,舒必利与苏合香合用组的舒必利脑浓度上升 39%,血药浓度上升 69%。单用舒必利组大鼠血中和脑中舒必利的浓度比值为 1:0.2,舒必利与苏合香合用组血脑比增加为 1:0.3 的结果说明,舒必利脑中分布增加,在海马区浓度也提高,这是苏合香促进了大鼠 BBB 的通透性增加的结果。笔者推断苏合香帮助其他药物透过体内屏障的作用可能就是传统医学中所述“开窍”功能。今后拟开展实验,观察开窍药联合用药后,能否增加生物体血、脑、眼、睾丸、皮肤等屏障部位所用药物的浓度,验证开窍药可提高人体屏障通透性的假说。本实验也对中西药的良性联合应用,研究中西药相互作用及临床合理用药提供了依据。希望本实验有助于从中西药相互作用方面减少舒必利的治疗用量,从而减少其不良反应。

[参考文献]

- [1] 魏宁宇,刘萍,何新荣,等. 微透析法研究中成药冰片对西药头孢曲松在大鼠脑纹状体中含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2010,35(19):2338.
- [2] 刘岩,姚洪武,杨伟峰,等. 开窍药对血脑屏障影响的实验性研究[J]. 辽宁中医药杂志,2009,36(4):659.
- [3] 胡园,袁默,刘屏,等. 石菖蒲对血脑屏障超微结构及通透性的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(3):349.

- [4] 陈文垠, 黄玉芳, 王海东. 麝香“归经入脑”的实验研究[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(4): 288.
- [5] 库宝善. 神经精神药理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 222.
- [6] 温国明, 徐月娥, 刘治卿, 等. 舒必利与氯丙嗪治疗精神分裂症的疗效及副反应对照研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1996, 22(4): 245.
- [7] 李永红. 喹硫平与舒必利治疗以阴性症状为主的精神分裂症对照研究[J]. 中国民族民间医药, 2011(1): 31.
- [8] 刘萍, 何新荣, 周文斌, 等. 大鼠脑中脑边缘微透析法研究天王补心方剂中桔梗的应用与抑制性神经递质变化的相关性[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2428.
- [9] George Paxinos, Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 6th ed. New York: Academic Press, 2007.
- [10] Yu Tse Wu, Tong Rong Tsai, Lie Chwen Lin. Liquid chromatographic method with amperometric detection to determine acetoside in rat blood and brain microdialysates and its application to pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B, 2007(853): 281.
- [11] 李范珠, 冯健. 脑微透析技术及其在脑内药理学中的应用[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(6): 405.
- [12] Witten L, Sager T, Thirstrup K, et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition augments dopamine release in the rat brain *in vivo*[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(7): 1686.
- [13] Bagger M A, Bechgaard E. A microdialysis model to examine nasal drug delivery and olfactory absorption in rats using lidocaine hydrochloride as a model drug [J]. Int J Pharm, 2004, 269(2): 311.
- [14] 袁洞君, 阳利龙, 祝文兵, 等. HPLC法测定人血浆中舒必利浓度及其人体药理学和相对生物利用度研究[J]. 儿科学杂志, 2006, 12(3): 4.

Effect of storax on concentration of sulphiride in brain and blood by MD-HPLC

LIU Ping^{1*}, YU Shao-shuai², HE Xin-rong³

(1. Hainan Branch of Pharmacy, PLA General Hospital, Sanya 572013, China;

2. Department of pharmacology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

3. Drug Guarantee Center of Traditional Chinese Medicine Pharmacy, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of traditional Chinese medicine storax on the concentration of combined western medicine sulphiride in brain and blood, discuss the effect of storax in inducing resuscitation and increasing the permeability of the gastrointestinal barrier (GB) and the blood-brain-barrier (BBB), and explore the interaction between storax and sulphiride. **Method:** Rats were orally administered with the drugs for one week, probes were implanted in their brains and necks by surgery. After balance for 60 min, brain microdialysis and blood microdialysis were adopted for collect dislyates from blood in right atrum and cerebral hippocampus at time periods of 30, 60, 90, 120, 150, 180 min. The concentration of sulphiride in the samples was detected by RP-HPLC. Statistical approaches were adopted to compare the contents of sulphiride in brain and blood of the two groups. **Result:** The sulphiride combined with storax group showed a significant higher concentration of sulphiride than the pure sulphiride group. The pure sulphiride group showed a concentration ratio between sulphiride in brain and blood of 1:0.2; while the sulphiride combined with storax group increased the concentration ratio between sulphiride in brain and blood to 1:0.3. Compared with the pure sulphiride group, the sulphiride combined with storax group showed an increase of concentration by 39% in brain and 69% in blood. **Conclusion:** Storax can notably increase the concentration of sulphiride in rat brain and blood, indicating that it can increase the permeation of sulphiride through gastrointestinal barrier and BBB. This study reveals the mechanism of storax in inducing resuscitation by promoting the permeation through gastrointestinal barrier and BBB.

[Key words] storax; sulphiride; microdialysis; gastrointestinal barrier; blood-brain barrier; HPLC

doi:10.4268/cjmm20122131

[责任编辑 陈玲]