

## 微量量热法研究清开灵对金葡菌生长代谢的影响

金城<sup>1</sup>, 武彦舒<sup>2</sup>, 张倩<sup>3</sup>, 李兴丰<sup>4</sup>, 鄢丹<sup>1</sup>, 杜晓曦<sup>5\*</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

- (1. 解放军第三〇二医院全军中药研究所, 北京 100039; 2. 陕西省榆林市第二医院, 陕西 榆林 719000;  
3. 武警西藏总队医院, 西藏 拉萨 850003; 4. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208;  
5. 国家食品药品监督管理局药品评价中心, 北京 100038)

**摘要:** 通过研究清开灵注射液对金葡菌生长代谢的影响, 探索建立基于生物活性图谱的清开灵注射液的质量评价方法。本研究采用微量量热法, 考察药物作用于金葡菌的生物热效应; 对所测得的热输出曲线进行拟合, 获得系列热动力学参数, 对比分析各项热动力学参数及热输出曲线。结果显示, 在一定范围内 (0~5.00%), 随清开灵剂量增加, 金葡菌生长曲线呈“下降”趋势且指数生长期后延; 其热动力学参数  $T_1$ 、 $T_2$ 、 $k_1$ 、 $P_1$ 、 $P_2$ 、 $I$  均与清开灵剂量呈现线性关系。清开灵注射液对金葡菌的半数抑菌量为 3.26%, 最佳抑菌量为 5.47%; 各类不同的清开灵注射液样品作用下的金葡菌生长曲线存在不同程度差异。实验结果表明, 清开灵注射液对金葡菌生长具有较强的抑制作用, 通过微量量热法研究, 可对清开灵注射液的质量一致性进行初步评价。

**关键词:** 微量量热法; 清开灵注射液; 金葡菌; 热输出曲线

中图分类号: O642.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0193-05

## Microcalorimetric study on the metabolism of *Staphylococcus aureus* affected by Qingkailing injection

JIN Cheng<sup>1</sup>, WU Yan-shu<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>3</sup>, LI Xing-feng<sup>4</sup>, YAN Dan<sup>1</sup>, DU Xiao-xi<sup>5\*</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1\*</sup>

- (1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, Military 302 Hospital, Beijing 100039, China;  
2. Second Hospital of Yulin City, Yulin 719000, China; 3. Hospital of Tibet Armed Police, Lhasa 850003, China;  
4. Pharmacy College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;  
5. Center for Drug Reevaluation, SFDA, Beijing 100038, China)

**Abstract:** This paper is to report the investigation on the metabolic behavior of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) after given Qingkailing injection, and with the aim of seeking for a new quality control method based on biological assessment. The growth thermogenic curves of *S. aureus* were determined by microcalorimetry and analyzed by computer. The results showed that in the concentration range of (0–5.00%), the growth thermogenic curves of *S. aureus* were declined and removed back with increasing dosage of Qingkailing injection; the main parameters ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $k_1$ ,  $P_1$ ,  $P_2$  and  $I$ ) and the dosage of Qingkailing injection have good correlation. The 50% inhibiting dosage is 3.26%, and the optimal inhibiting dosage is 5.47%. Difference could be detected among the Qingkailing injection samples from different factories and different batches. It is proved that Qingkailing injection could inhibit the metabolic behavior of *S. aureus*, and microcalorimetry might be applied in the quality assessment of Qingkailing injection.

**Key words:** microcalorimetry; Qingkailing injection; *Staphylococcus aureus*; growth thermogenic curve

收稿日期: 2010-08-03.

基金项目: 国家“十一·五”科技支撑计划 (2008BAI55B04); 国家中医药管理局研究专项 (06-07ZP58).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, E-mail: pharmacy302@126.com

清开灵注射液是传统名方“安宫牛黄丸”的改良剂型,由胆酸、珍珠母(粉)、猪去氧胆酸、栀子、水牛角(粉)、板蓝根、黄芩苷、金银花 8 味中药组成<sup>[1]</sup>,成分复杂。清开灵主要用于热病、神昏、中风偏瘫、神志不清、急性肝炎、上呼吸道感染、肺炎、脑血栓形成、脑出血等。但是,随着清开灵注射液临床应用日益广泛,其引发的不良反应也时有报道<sup>[2]</sup>。尽管目前针对清开灵注射剂质量评价也发展了许多基于化学成分的方法,但由于未直接与生物活性相关联,目前尚无有效控制质量一致性与稳定性的方法进入实际应用<sup>[3]</sup>。

目前,在中药质量控制与评价研究中,生物评价已成为发展方向与热点之一<sup>[4]</sup>。国家食品药品监督管理局(SFDA)针对已上市的中药注射剂明确要求<sup>[5]</sup>:“建立生物活性检测方法,以弥补目前检验指标仅仅能控制已知成分的不足,从生物活性角度控制药品的质量。”在注射液质量评价体系中引入生物评价方法具有其研究前景。现代药理研究<sup>[6-8]</sup>表明,清开灵注射液主要有解热镇静、抗菌、治疗脑缺血、抗凝促溶、免疫调节等作用。临床上,清开灵注射液常用于热病、急性上呼吸道感染及肺炎等<sup>[9-12]</sup>,这与清开灵注射液具有良好的抗菌作用密不可分<sup>[13, 14]</sup>。微量热法,作为一种快速非侵入性的方法,近年来被广泛应用于对物质抗菌能力的考察<sup>[15, 16]</sup>。结合课题组前期研究工作<sup>[17-19]</sup>,本文采用微量热法考察清开灵注射液对金葡菌生长代谢行为的影响,并对其抗菌作用参数进行比较和评价。

## 材料与方

**仪器** LKB-2277 生物热活性检测系统, LKB-2132 蠕动泵(瑞典 Thermometric 公司)。有关仪器的结构原理见文献<sup>[20]</sup>。

**药品与试剂** 清开灵注射液样品共 6 批,由具代表性的两大生产厂家(BZY、SXTH)提供,各提供 3 批,样品批号分别为:811601、712604A、710510A 和 070930、071120、071219。

**实验材料** 金葡菌 *Staphylococcus aureus* (武汉大学中国典型培养物保藏中心, CCTCC AB910393)。

**培养基配制** LB 培养基:取蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 加蒸馏水至 1 L, 调节 pH 至 7.0~7.2, 分装后于 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min, 置 4 °C 备用。

**生长热功率输出曲线采集** 采用停流法检测。系

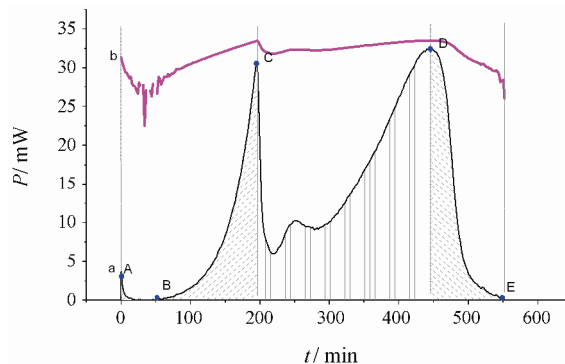
统温度设定为 37 °C, 测定前分别用适量 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠、0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸、75% 乙醇溶液和无菌水清洗管道和流通池, 待仪器获得稳定基线后, 用蠕动泵以 50 mL·h<sup>-1</sup> 的流速, 将菌液和清开灵注射液混合液泵入微量热仪中; 当样品充满流通池后停泵, 启动采集卡开始采集数据, 跟踪记录流通池内细菌生长的产热曲线 (*P-t* 曲线), 当产热曲线数据重新回到基线后, 实验结束。

**样品对金葡菌生长代谢影响测定** 根据实验设计, 将一定量的清开灵注射液加入到接种了金葡菌的培养液中, 使最终菌悬液浓度为 2×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 振荡混匀, 以备进样。整个过程为无菌操作。

## 结果

### 1 金葡菌的生长热功率输出曲线

图 1 是 37 °C 下, 停流法测定的金葡菌完整代谢曲线。曲线 a (*P-t* 曲线) 是所测定的细菌生长曲线, 可以分成 4 个阶段: I 停滞期、II 指数生长期、III 稳定期和 IV 衰亡期。分别对应于细菌对培养基中不同营养成分的利用情况及不同的代谢过程<sup>[21]</sup>, 与传统方法测定的细菌代谢曲线相似。曲线 b (ln *P-t* 曲线) 则显示了线性拟合后细菌代谢热功率输出随时间的变化特征。



**Figure 1** Metabolism curve of *Staphylococcus aureus*. A-B: Lag phase; B-C: Exponential phase; C-D: Stationary phase; D-E: Decline phase. a: The metabolism curve of *S. aureus* b: The logarithmic curve of *S. aureus* metabolism

根据微生物生长代谢的特征和化学动力学、热动力学原理, 建立了多种基于细菌细胞的热动力学模型, 其中以指数模型最为常用<sup>[22]</sup>。根据细菌生长指数模型, 在细菌生长过程中的指数生长期, 其产热功率  $P_t$  与生长速率常数  $k$  有如下关系:

$$P_t = P_0 \exp(kt) \text{ 或 } \ln P_t = \ln P_0 + kt \quad (1)$$

式 (1) 中的  $P_t$  就是产热曲线中指数生长期内  $t$  时刻的输出热功率, 将图谱的指数生长期  $P_t$ 、 $t$  值代入公式 (1) 中, 进行线性拟合可得金葡菌的生长速率常数  $k$  值。

## 2 重现性考察

采用微量热之停流法测定金葡菌生长热谱曲线, 在相同的实验条件下重复测定 3 次,  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $k_1$ 、 $\Delta T$  的 RSD 值分别为 3.468%、4.474%、2.416% 和 0.941%, 说明实验结果具有良好的重现性。

## 3 清开灵注射液不同剂量对金葡菌代谢的影响

采用同一来源与批号的样品 (SXTH, 071120), 分别设置了 0~6.67% (0~200  $\mu\text{L}$ ) 的 8 个浓度梯度进行考察。由图 2 可见, 在清开灵浓度范围 0.83%~5.00% 时, 清开灵的量与抗金葡菌作用具有良好的线性关系; 当清开灵在体系中浓度增加至 6.67% 时, 金葡菌生长曲线已严重变形, 不再适用于指数生长模型, 见图 2 曲线 h。

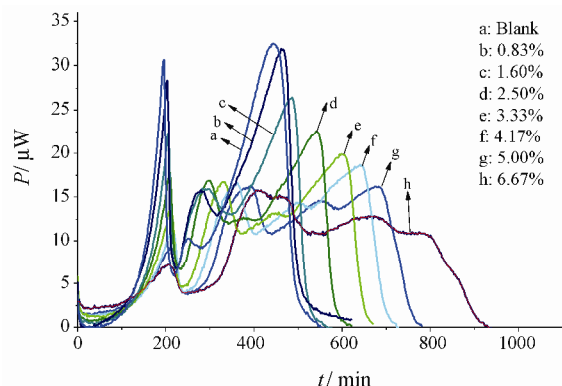


Figure 2 Growth curves of *Staphylococcus aureus* affected by different concentrations of Qingkailing injection

## 4 清开灵注射液对金葡菌生长代谢的抑制作用

药物对细菌的抑制率  $I = (k_0 - k_V) / k_0 \times 100\%$ , 式中  $k_0$  为未加药物时细菌生长代谢的速率常数,  $k_V$  为细菌受到剂量为  $V$  的药物抑制时的速率常数。由此计算出金葡菌在清开灵注射液不同浓度下的抑制率  $I$ , 作  $V-I$  (%) 图, 求得半数抑菌浓度为 3.26%。当  $k_1$  为 0 时, 细菌完全停止生长, 求得最佳抑菌量为 5.47%。细菌传代时间  $t_G = \ln(2)/k$ 。详细参数见表 1。

由清开灵作用下的金葡菌生长代谢图谱及参数分析可见, 在一定范围内 (0~5.00%), 随清开灵注射液剂量增加, 金葡菌生长曲线整体呈“下降、后延”趋势; 细菌指数生长期速率常数  $k_1$ 、最大热功率  $P_1$ 、稳定期最大热功率  $P_2$  均相应减小; 指数生长期达峰

时间  $T_1$ 、稳定期达峰时间  $T_2$ 、稳定期与指数生长期达峰时间差  $\Delta T$ 、药物对细菌抑制率  $I$  均相应增大, 且均与剂量呈较好的线性关系 ( $r$  分别为: 0.994、0.989、0.991、0.985、0.989、0.985 和 0.998); 细菌传代时间  $t_G$  也相应增加; 而细菌第一指数生长期发热量  $Q_1$  整体略呈下降趋势, 稳定期发热量  $Q_2$ 、总发热量  $Q_t$  整体略呈上升趋势, 但相关性略差 ( $r$  分别为 0.608、0.936 和 0.676)。

## 5 不同来源清开灵注射液样品热谱图初步分析

通过上述研究, 选择和空白相比参数变化较大, 但图谱不发生明显变形的浓度 (1.67%), 对不同来源清开灵注射液样品的抑菌效果进行了测试, 结果见图 3。

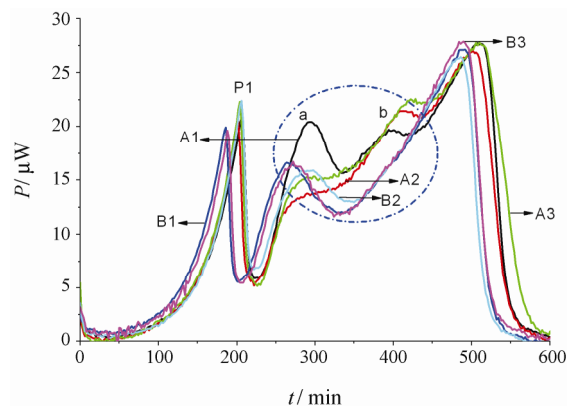


Figure 3 Effect of Qingkailing injection on the metabolism of *Staphylococcus aureus*

图 3 中 A1、A2 和 A3 为 BZY 清开灵注射液生长曲线图, B1、B2 和 B3 为 SXTH 清开灵注射液生长曲线图。由图可见, BZY、SXTH 两个厂家的样品对于金葡菌生长曲线的影响有较大差异, BZY 样品的稳定期较 SXTH 样品多一个峰, 如图所示峰 b, 且  $P_1$  也较 SXTH 样品大。

由图所示区域 (稳定期) 可见, BZY 批次为 811601 的样品 (A1) 生长曲线明显区别于其他样品 (峰 a 明显高于其他样品); SXTH 的 3 批次样品生长曲线差异较小。

可见, 不同厂家及同厂家不同批次的清开灵注射液, 其质量差异可通过微量热法初步表现出来。

## 讨论

本实验首次通过微量热法较系统地研究了清开灵注射液对金葡菌代谢的影响, 印证了文献报道的抑菌效应, 并求得清开灵注射液对金葡菌的半数

**Table 1** Effect of Qingkailing injection of different dosage on parameters.  $T_1, T_2$ : The appearance times of the maximum power output;  $\Delta T$ : The time from C to D;  $k_1$ : The growth rate constants;  $P_1$ : The maximum power output in the exponential phase;  $P_2$ : The maximum power output in the stationary phase;  $I$ : The inhibitory ratio;  $t_G$ : The generation time;  $Q_1$ : The heat output in the exponential phase;  $Q_2$ : The heat output in the stationary phase;  $Q_T$ : The heat output in the whole course

C (%)	$T_1$ /min	$P_1/\mu W$	$Q_1/mJ$	$k_1/min^{-1}$	$T_2$ /min	$P_2/\mu W$	$Q_2/mJ$	$Q_T/mJ$	$\Delta T$ /min	$t_G$ /min	$I/\%$
0	196	30.661	63.995	0.034 26	444	32.468	242.125	378.011	248	20.232	–
0.83	204	28.305	68.863	0.027 53	462	30.191	278.888	402.654	258	25.178	0.196
1.67	206	22.403	54.885	0.024 51	486	26.437	268.776	359.542	280	28.280	0.285
2.50	210	17.789	52.341	0.020 55	542	22.592	285.151	374.263	332	33.730	0.400
3.33	212	13.664	47.857	0.017 02	598	19.904	299.357	388.404	386	40.725	0.503
4.17	216	11.373	46.272	0.013 89	640	18.666	322.248	408.585	424	49.903	0.595
5.00	220	9.194	59.504	0.009 09	674	16.115	369.840	492.008	454	76.254	0.735
$r$	0.985	0.989	0.608	0.994	0.989	0.991	0.936	0.676	0.985	0.928	0.998

抑菌量 (3.26%) 和最佳抑菌量 (5.47%)。结果显示, 在特定条件下, 一定剂量药物作用于细菌的生长曲线是相对稳定的, 且与其活性相关, 因此称之为“生物热活性特征图谱” (bio-activity fingerprint)。在相同条件下, 清开灵注射液不同样品的生物热活性特征图谱存在不同程度的差异, 在一定程度上反映了其质量的差异性。清开灵注射液作用于金葡菌的生物热活性特征图谱提示, 微量热法在研究清开灵注射液质量一致性方面可为评价清开灵注射液的质量提供思路。

微量热检测技术具有普适性好、实时在线、客观灵敏、定性定量、经济高效等特点, 符合中药药效与质量评价的客观现实和发展方向, 有利于中药质量控制和药效评价等复杂性难题, 在理论上比现行的中药指标性成分定性定量分析具有较明显的优越性<sup>[4]</sup>。

本研究仅针对清开灵注射液的生物活性特征图谱的建立进行了初步探讨, 生物活性特征图谱的差异与哪些成分变化直接/间接相关, 在何种程度上影响药物内在质量, 将进行深入探究。

**致谢:** 武汉大学化学与分子科学学院刘义教授给予悉心指导和无私帮助。

**References**

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Part I. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010: 1110.

[2] Liu YP. Adverse reactions of traditional Chinese medicines in 111 cases [J]. Adv Drug React J (药物不良反应杂志), 2000, 2: 94–97.

[3] Yan SK, Xin WF, Wang YM, et al. Application of HPLC/ELSD fingerprint and constellation graphical clustering method applied to evaluate the quality of Qingkailing injection [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 842–845.

[4] Xiao XH, Jin C, Zhao ZZ, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 38: 1377–1381.

[5] State Food and Drug Administration. Notice about the enhancement on the registration management of traditional Chinese medicine injections (a draft for discussion) [EB/OL]. 2006[2010-08-03]. <http://www.sda.gov.cn/cmsweb/webportal/W4291/A64011687.html>.

[6] Fan YB. Advances on the clinical use and pharmacological action of Qinkailing injection [J]. Mod J Integr Chin Tradit West Med (现代中西医结合杂志), 2000, 9: 575–577.

[7] Li S. Clinical use and pharmacological action of Qingkailing injection [J]. Mod J Integr Chin Tradit West Med (现代中西医结合杂志), 2009, 18: 108–109.

[8] Yang JY, Chen HH. Advances on the clinic and pharmacology of Qingkailing injection [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2001, 21: 46–49.

[9] Hu M, Huang G. Injection in the treatment of 101 cases of acute upper respiratory tract infection [J]. Med World (医药世界), 2006, 8: 110.

[10] Li CS, Wang XS, Chen SM, et al. Clinical study on acute upper respiratory tract infection treated with Qingkailing injection [J]. Chin J Integr Chin Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 1999, 19: 21–23.

[11] Xian JP, Guan JL, Zhao HX. Clinical observation of 54 cases of high fever with acute upper respiratory tract infection treated by Qingkailing [J]. Guide Chin Med (中国医药指南), 2010, 8: 35–37.

- [12] Zeng GH. Clinical effect Qingkailing on 64 cases of high fever with acute upper respiratory tract infection [J]. *Chin J Mod Drug Appl* (现代药物应用), 2010, 4: 130–131.
- [13] Li D, Huang JH, Zhang SH et al. Study on the anti-bacterial activity *in vitro* of Qingkailing freeze-dried powder for injection [J]. *Sichuan J Physiol Sci* (四川生理科学杂志), 2008, 30: 164–166.
- [14] Li D, Huang JH, Zhang SH et al. Study on anti-bacterial activity of Qingkailing freeze-dried powder for injection *in vivo* [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2009, 23: 53–55.
- [15] Braissant O, Wirz D, Gopfert B, et al. “The heat is on”: rapid microcalorimetric detection of mycobacteria in culture [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, 90: 57–59.
- [16] Garedew A, Schmolz E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an *in vitro* approach [J]. *Thermochim Acta*, 2004, 422: 115–124.
- [17] Ren YS. Prediction on Drug Reaction in Traditional Chinese Medicinal Injection by Chem-bioassay (基于化学—生物特征图谱分析的中药注射剂不良反应早期预警方法的初步研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2008.
- [18] Zhang YM, Yan D, Zhang P, et al. Quality control of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection based on its HPLC-ELSD fingerprints and biological profiles [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45: 93–97.
- [19] Zhang XR, Wang JB, Xiao XH, et al. Antimicrobial activity and chemical differences between the two chemotypes of rhubarbs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45: 1144–1148.
- [20] Li X, Gao ZT, Yu HY, et al. Thermokinetic method study for kinetic parameters determination by LKB 2277 bioactivity monitor [J]. *J Wuhan Univ Technol* (武汉工业大学学报), 2000, 6: 17–19.
- [21] Liu Y, Xie WH, Xie CL, et al. Thermokinetic study on the limited growth of bacteria [J]. *Acta Phys Chim Sin* (物理化学学报), 1996, 12: 156–158.
- [22] Li X, Liu Y, Wu J, et al. Microcalorimetric study of *Staphylococcus aureus* growth affected by selenium compounds [J]. *Thermochim Acta*, 2002, 387: 57–61.