



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第19卷 第9期(总第188期) 2021年9月20日出版

目 次

顾问

周宏灏 饶健

主编 / 社长

李焕德

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民中路 139 号中南
大学湘雅二医院内

出版: 中南药 学杂志社

发行: 湖南省报刊发行局

印刷: 长沙建华印务有限公司

订阅: 全国各地邮局

定价: 每期 20.00 元, 全年 240.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证: 4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2021 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

本刊声明:

本刊已入编中国知网等数据库, 其收录论 文作者著作 权使用 费与本 刊稿酬 一并支 付。凡 不同意 编入数 据库的 稿件, 请 在来稿 时声明。

除非特 别声明, 本 刊刊出 的所有 文章不 代表本 刊编委 会的观 点。

基于 SGLTs 靶点的新型降血糖药物研究专题

(1757) 钠 - 葡萄糖协同转运蛋白功能与作用研究进展

..... 洪庆霞, 梅文柳, 刘文雅, 等

(1766) 选择性 SGLT2 抑制剂的研究进展

..... 郭家钰, 巫振坤, 贺岩, 等

(1776) SGLT1/2 双靶点抑制剂的研究进展... 杨中兴, 贺岩, 杨龙, 等

研究论文

(1786) 盐酸小檗碱多晶型的制备、表征及其对自制片剂溶出行为的影响
..... 闫富龙, 祝宇龙, 彭灿

(1792) 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的新贛片化学成分分析
..... 高旭华, 冯欣, 毕玥琳, 等

(1800) 飞龙掌血根的化学成分研究..... 朱勤凤, 聂莉, 陈倩, 等

(1806) UPLC-Q-TOF-MS 分析畚药地 荜的化学成分
..... 曹丹, 赵崇军, 王海燕, 等

(1811) LC-MS/MS 法同时测定肾移植患者血浆中霉酚酸及两种代谢物
浓度 蒋振伟, 杨旭萍, 蒋艳, 等

(1816) 双螺杆挤出技术制备双氯芬酸钠肠溶制剂的研究
..... 王艳, 袁梦, 夏毓龙, 等

(1822) 基于环磷酰胺致小鼠损伤保护作用研究正源方前处理工艺
..... 程晓妮, 倪健, 潘亚磊, 等

(1828) 生物素标记多杀菌素衍生物合成及抗肿瘤活性研究
..... 许娜, 彭婷, 罗志勇, 等

(1833) 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管炎症的影响及其
机制探讨 刘子源, 谭泽明, 谭佳琪, 等

(1841) 益根调理口服液质量标准及其免疫调节研究
..... 蒋林, 陈海燕, 随家宁, 等

(1848) 基于 Box-Behnken 响应面设计法结合熵权法优选脑络欣通方提
取工艺 赵国栋, 洪璐, 王倪, 等

(1854) 肉苁蓉复方颗粒对大鼠骨质疏松症的治疗作用... 徐双华, 吴清

(1859) UPLC-MS/MS 测定人血浆中诺氟沙星的含量及其应用
..... 刘海姣, 廖音娟, 唐智

《中南药学》杂志第四届编委会

主编

李焕德

副主编

王玉 尹桃 向大雄 刘世坤
刘芳群 孙国祥 孙铁民 苏薇薇
余自成 张毕奎 张相林 赵志刚
潘卫三

编委 (按姓氏笔画排列)

丁劲松 马恩龙 王玉 王珊
王立辉 王永军 王淑梅 文晓柯
方平飞 尹桃 甘勇 左笑丛
卢海儒 冯星 吕永宁 朱运贵
朱荣华 向大雄 刘浏 刘韶
刘世坤 刘芳群 刘茂柏 刘建平
刘高峰 刘塔斯 刘雁鸣 汤海峰
孙进 孙国祥 孙树森 孙铁民
劳海燕 苏薇薇 李昕 李玲
李文莉 李向平 李运曼 李顺祥
李晓宇 李健和 李焕德 杨星钢
杨献文 肖贵南 何江江 余自成
谷福根 张弋 张俐 张峻
张毕奎 张庆华 张相林 张洪文
陆晓彤 陈力 陈琦 陈卫东
陈西敬 陈孝治 陈勇川 武新安
范国荣 林厚文 金鹏飞 周权
屈建 孟宪生 赵立波 赵志刚
姜玲 姜翠敏 姜德建 娄月芬
祝德秋 秦红岩 袁成 袁易
夏道宗 原永芳 徐珽 徐萍
徐必学 郭怀忠 唐芳 曹玲
常福厚 巢志茂 彭文兴 董亚琳
董得时 蒋云生 蒋孟良 傅强
温金华 睢大赏 裴月湖 谭桂山
肇丽梅 翟青 潘卫三 魏高文

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁骁 于海洋 王刚 王亮
孔维军 边原 刘宏 刘剑敏
刘梦扬 孙平华 孙晓慧 苏丹
杜恩明 李娟 李文龙 李语玲
李新刚 杨志平 肖雪 肖朝江
邱玉玲 张凭 张纯刚 张程亮
陈富超 罗聪 金锐 周志旭
赵亮 赵娣 贺敏 胡楠
徐硕 徐文峰 高利臣 郭韧
郭海彪 郭源源 梅升辉 龚力民
梁光平 寇龙发 蒋德旗 韩晓芳
程汝滨 舒畅 谢诚 谢奕丹
蒙光义 廖德华

编辑: 邹志娟 彭金飞 李科
陆窃窃

综述

- (1865) 细胞外基质在糖尿病足溃疡防治研究中的应用进展 王轩宇, 阙华发
- (1871) 大环内酯类抗菌药物致长 QT 综合征的研究进展 于正阳, 唐赛康, 韩鑫, 等

中药资源开发与利用

- (1877) 茯苓采后的加工生产现状调研和优化建议 徐博, 吴翠, 李卓俊, 等

药物分析与检验

- (1883) 基于聚类分析和主成分分析的广西小叶金花草高效液相色谱指纹图谱研究 陈锋, 张颖, 李嘉
- (1887) 不同厂家清热解毒口服液的质量分析与评价 朱伟堃, 周欣, 王劲, 等
- (1893) 五味消毒饮标准煎液指纹图谱的建立 郑艳萍, 张晓琳, 彭云, 等
- (1898) 黄芩 UPLC-DAD 指纹图谱的建立及其黄芩苷和汉黄芩苷的含量研究 郑如文, 刘港辉, 江志强, 等
- (1904) 瑶药材串连珠质量标准研究 莫单丹, 唐炳兰, 龚小妹, 等
- (1908) 注射用长春西汀中两种磺酸酯类基因毒性杂质的测定 焦洁, 王涛, 妙苗
- (1911) 高效液相色谱法同时测定红旱莲中 5 个黄酮类成分的含量 王慧, 辛爱玲, 冯璐杰, 等
- (1915) 氨甲苯酸注射液日晒降解产物的研究 张耀文, 于明, 岳青阳, 等
- (1919) 高效液相色谱法测定利巴韦林滴眼液中有关物质的含量 冯文, 刘峰, 谢华
- (1925) 甘草饮片质量分析与评价 段超慧
- (1930) 紫外分光光度法测定血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔的 4 种定量分析方法比较 陈晓文, 朱浩, 吴飞华, 等
- (1934) 离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质 陈霞, 张洁, 董瑞
- (1938) 不同辅料硝酸咪康唑乳膏微生物限度检查方法适用性研究 琚滢莹, 李亚东, 朱小磊

医院药学

- (1942) 某院 PD-1 免疫检查点抑制剂致不良反应的发生情况及分析 李哲, 孙一琦, 何超然, 等
- (1947) 基于 WHO 基本药物标准清单 (21 版) 分析本院抗菌药物品种配备合理性 周艳琴, 王静宇, 郑春茂, 等

- (1952) 儿童感染肠球菌的临床特征与耐药性分析
..... 张旭, 孙良, 赵永, 等

临床药师在临床

- (1957) 临床药师参与 1 例骨肉瘤化疗患儿严重恶心呕吐的药学实践
..... 司霞, 黄琳, 于芝颖, 等
- (1960) 1 例经皮下输注装置鞘内联合给药治疗晚期重度癌痛的药学监护
..... 赵宁, 李培红, 刘津, 等
- (1964) 南通市医院临床药师顺利开展药学服务的影响因素研究
..... 周盈莹, 蔡亮亮, 朱永红, 等

药物与临床

- (1969) 阿帕替尼联合替吉奥治疗进展期胃癌有效性和安全性的系统评价
..... 王凯, 张学琴, 刘秀菊, 等
- (1976) 胰岛素联合低分子肝素治疗高脂血症性急性胰腺炎有效性和安全性的 meta 分析 吴发建, 刘静, 陈道荣

药事管理

- (1983) 欧美细胞治疗产品上市后研究的经验及对我国的启示
..... 田文森, 梁毅
- (1988) “两票制” 实施对某三甲医院药品供应和价格的影响分析
..... 刘永谦, 朱文思, 陈砾, 等

药品不良反应

- (1993) 卡瑞利珠单抗致急性间质性肾炎的病例报道及文献分析
..... 章斌, 焦秀秀, 沈波, 等
- (1996) 吉非替尼致药物性肝损伤 1 例 贾东丽, 张阳, 韩欢欢

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 19, Number 9 September 20 2021

Consultant

ZHOU Hong-hao, RAO Jian

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Office

LI Huan-de

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Food and Drug Administration of
Hunan Province

Edited by

Editorial Board of Central South
Pharmacy (139 Middle Renmin
Road, Changsha, China)

Tel

(0731) 822584871/84895602

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

<http://znyx.cbpt.cnki.net>

E-mail

znyxzz2003@vip.163.com

Published by

Central South Pharmacy
Publishing House

Advertisement Publishing Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (1758) Research progress in hypoglycemic mechanism of sodium-glucose co-transporter inhibitors
..... HONG Qing-xia, MEI Wen-liu, LIU Wen-ya, et al
- (1766) Research progress in SGLT2 inhibitors
..... GUO Jia-yu, WU Zhen-kun, HE Yan, et al
- (1776) Research progress in SGLT1/2 dual-target inhibitors
..... YANG Zhong-xing, HE Yan, YANG Long, et al
- (1786) Preparation and characteristics of polymorphs of berberine hydrochloride and its effect on the dissolution behaviors of self-made tablets
..... YAN Fu-long, ZHU Yu-long, PENG Can
- (1792) Chemical constituents of Xinhuang tablets by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS GAO Xu-hua, FENG Xin, BI Yue-lin, et al
- (1800) Chemical constituents from the roots of *Toddalia asiatica* (L.) Lam.
..... ZHU Qin-feng, NIE Li, CHEN Qian, et al
- (1806) Chemical constituents in She medicine *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-Q-TOF-MS
..... CAO Dan, ZHAO Chong-jun, WANG Hai-yan, et al
- (1811) Simultaneously determination of mycophenolic acid and two metabolites in the plasma of renal transplant patients by LC-MS/MS
..... JIANG Zhen-wei, YANG Xu-ping, JIANG Yan, et al
- (1816) Preparation of diclofenac sodium enteric by twin-screw extrusion technology WANG Yan, YUAN Meng, XIA Yu-long, et al
- (1823) Pretreatment process of Zhengyuan prescription based on its protective effect in mice with cyclophosphamide-induced injury
..... CHENG Xiao-ni, NI Jian, PAN Ya-lei, et al
- (1828) Synthesis of biotin-labeled spinosyn and its anti-tumor activity
..... XU Na, PENG Ting, LUO Zhi-yong, et al
- (1833) Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the vascular inflammation and related mechanism in type 2 diabetic rats
..... LIU Zi-yuan, TAN Ze-ming, TAN Jia-qi, et al
- (1841) Quality standard of Yigen conditioning oral liquid and its immunomodulation JIANG Lin, CHEN Hai-yan, SUI Jia-ning, et al

Postal code

42-290

Printed byChangsha city Kaifu district
Shanjun printing Factory**Publish**Editorial Office of Central South
Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for
subscription please contact the
Publishing House of our journal**Price**¥ 20.00 an issue
¥ 240.00 a year**CSSN**

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2021 by the
Central South Pharmacy**

All articles published represent the
opinions of the authors, do not reflect
the official policy of the Editorial
Board, unless this is clearly specified.

- (1848) Optimization of Naoluo Xintong decoction extraction based on Box-Behnken response surface methodology and entropy weight method
..... ZHAO Guo-dong, HONG Lu, WANG Ni, et al
- (1854) Therapeutic effect of cistanche compound granules on osteoporosis in rats
..... XU Shuang-hua, WU Qing
- (1859) UPLC-MS/MS determination of norfloxacin content in human plasma and its application LIU Hai-jiao, LIAO Yin-juan, TANG Zhi
- (1865) Extracellular matrix in the prevention and treatment of diabetic foot ulcer
..... WANG Xuan-Yu, QUE Hua-Fa
- (1871) Research progress in long QT syndrome caused by macrolides
..... YU Zheng-yang, TANG Sai-kang, HAN Xin, et al
- (1877) Current situation and optimization of the processing of post-harvest *Poria cocos* XU Bo, WU Cui, LI Zhuo-jun, et al
- (1883) HPLC fingerprint of *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. from Guangxi based on cluster analysis and principal component analysis
..... CHEN Feng, ZHANG Ying, LI Jia
- (1887) Quality evaluation of Qingre Jiedu oral liquid from different manufactures
..... ZHU Wei-kun, ZHOU Xin, WANG Jin, et al
- (1893) Establishment of fingerprints of Wuwei Xiaoduyin standard decoction
..... ZHENG Yan-ping, ZHANG Xiao-lin, PENG Yun, et al
- (1898) UPLC-DAD fingerprint of *Scutellaria baicalensis* Georgi and its contents of baicalin and wogonoside
..... ZHENG Ru-wen, LIU Gang-hui, JIANG Zhi-qiang, et al
- (1904) Quality standard for Yao medicine *Damnacanthus giganteus*
..... MO Dan-dan, TANG Bing-lan, GONG Xiao-mei, et al
- (1908) Determination of genotoxic impurities of sulfonate esters in vinpocetine for injection JIAO Jie, WANG Tao, MIAO Miao
- (1911) Determination of 5 flavonoids in *Hypericum ascyron* L. by HPLC
..... WANG Hui, XIN Ai-ling, FENG Lu-jie, et al
- (1915) Photodegradation products of aminomethylbenzoic acid injection
..... ZHANG Yao-wen, YU Ming, YUE Qing-yang, et al
- (1919) Determination of related compounds in ribavirin eye drops by HPLC
..... FENG Wen, LIU Feng, XIE Hua
- (1925) Quality of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces
..... DUAN Chao-hui
- (1930) Content determination of timolol maleate in hemangioma cream by 4 quantitative methods with UV spectrophotometer
..... CHEN Xiao-wen, ZHU Hao, WU Fei-hua, et al

- (1934) Determination of related substances in ibandronate sodium raw materials by ion suppression chromatography
..... *CHEN Xia, ZHANG Jie, DONG Rui*
- (1938) Applicability of microbial limit test for miconazole nitrate cream with different excipients *JU Ying-ying, LI Ya-dong, ZHU Xiao-lei*
- (1942) Occurrence of adverse reactions caused by PD-1 immune checkpoint inhibitors *LI Zhe, SUN Yi-qi, HE Chao-ran, et al*
- (1947) Rationality of antibacterial stock based on the WHO list of essential medicines (21st Edition)
..... *ZHOU Yan-qin, WANG Jing-yu, ZHENG Chun-mao, et al*
- (1964) Influential factors for providing pharmaceutical care in the hospital of Nantong
..... *ZHOU Ying-ying, CAI Liang-liang, ZHU Yong-hong, et al*
- (1969) Systematic evaluation of the efficacy and safety of apatinib combined with tegafur for advanced gastric cancer
..... *WANG Kai, ZHANG Xue-qin, LIU Xiu-ju, et al*
- (1976) Efficacy and safety of insulin combined with low molecular weight heparin for hyperlipidemic acute pancreatitis: A meta-analysis
..... *WU Fa-jian, LIU Jing, CHEN Dao-rong*
- (1983) Post-market research of cell therapy products in Europe and America and their implications for China *TIAN Wen-miao, LIANG Yi*
- (1988) Effect of “Two-invoice System” on drug supply and price in a major comprehensive hospital
..... *LIU Yong-qian, ZHU Wen-si, CHENG Luo, et al*

基于 SGLTs 靶点的新型降血糖药物研究专题

【编者按】

尽管目前降血糖药物种类繁多,但大多数糖尿病患者的血糖水平仍然得不到有效控制,因此寻找药物作用机制不同、更加安全和有效的降血糖药物迫在眉睫。钠-依赖型葡萄糖协同转运体(SGLTs)抑制剂的研究开启了糖尿病治疗的新时代。SGLT2 和 SGLT1 是 SGLTs 家族中与肾脏重吸收葡萄糖最相关的两个蛋白,SGLT2 是一种低亲和力、高转运能力的转运体,负责了约 90% 的肾脏葡萄糖重吸收量;SGLT1 是一种高亲和力、低转运能力的转运体,负责其余 10% 的肾脏葡萄糖重吸收量。SGLTs 抑制剂通过抑制肾脏葡萄糖的重吸收显示出较好的降血糖作用。因此,本专栏对 SGLTs 的作用机制、选择性 SGLT2 抑制剂及 SGLT1/2 双靶点抑制剂的研究进展方面进行综述,以期对新型降血糖药物的开发提供参考。

【特邀专家简介】



孙铁民,男,沈阳药科大学药物化学专业教授(二级),博士研究生导师。曾获辽宁省教学名师,辽宁省普通高等学校专业带头人(制药工程专业)等荣誉;获国家教学成果二等奖、辽宁省教学成果二等奖;为国家级实验教学示范中心药学实验教学中心负责人、国家级精品课程《药物化学》负责人,国家双语教学示范课程《药物化学》及国家级精品课程《药学概论》《化学制药工艺学》主要完成人;国家高等学校特色专业制药工程专业负责人,辽宁省本科示范专业,制药工程专业负责人;主编和参编国家级规划教材 20 余部。《中国药物化学》《中南药学》等杂志编委。近 10 年发表研究文章 100 余篇,其中 SCI 50 余篇;曾主持“十五”重大专项、国家自然科学基金面上项目等 5 项;申请专利 10 项。



吴成军,男,现就职于沈阳药科大学药物化学教研室,入选辽宁省“百千万人才工程”万人层次,沈阳市高层次人才。《药学概论》《药物化学》等杂志编委;主要从事基于靶点的小分子创新药物研究及基于工业化生产的药物合成工艺研究。主持及参与国家自然科学基金、辽宁省科技厅基金及辽宁省教育厅基金项目 3 项;荣获沈阳市自然科学学术成果奖 1 项,第 17 届沈阳科学学术年会论文一等奖 1 项;完成校企合作项目左乙拉西坦、埃索美拉唑钠、盐酸西那卡塞、盐酸头孢卡品匹酯等药物合成工艺研究 13 项;目前已发表学术论文 30 余篇。

钠 - 葡萄糖协同转运蛋白功能与作用研究进展

洪庆霞¹,梅文柳¹,刘文雅¹,贺岩²,吴成军^{1*},孙铁民^{1*}(沈阳药科大学基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室制药工程学院,沈阳 110016;2.北部战区总医院药剂科,沈阳 110840)

摘要:长期高血糖会使全身各个组织器官发生病变,导致急慢性并发症的发生,如肾功能受损、神经病变、眼底病变、心脑血管疾病、糖尿病足等。在生理状态下,肾脏对葡萄糖的重吸收对维持血糖平稳发挥着重要作用。但是,在患有 2 型糖尿病的患者中,钠-葡萄糖协同转运蛋白的表达上调,肾脏对葡萄糖的重吸收会随着血糖浓度的升高而增加,导致糖尿病的发生与发展。因此钠-葡萄糖共转运体抑制剂被开发并应用于 2 型糖尿病的治疗,本文总结了其结构功能、作用机制、在各种疾病中发挥的作用以及不良反应。

关键词:糖尿病;钠-葡萄糖共转运体抑制剂;降糖机制;降血糖药物

中图分类号:R96, R587.2 文献标识码:A 文章编号:1672-2981(2021)09-1757-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.001

基金项目:辽宁省自然科学基金(No.2020LJC06)。

作者简介:洪庆霞,女,硕士研究生,主要从事药物合成工艺研究,E-mail:1605399505@qq.com *通信作者:吴成军,男,讲师,主要从事基于靶点的新型小分子药物研究,E-mail:chengjun871@163.com;孙铁民,男,教授,博士研究生导师,主要从事天然产物合成和半合成、手性药物合成以及抗病毒药物的合成研究,E-mail:suntiemini@126.com

Research progress in hypoglycemic mechanism of sodium-glucose co-transporter inhibitors

HONG Qing-xia¹, MEI Wen-liu¹, LIU Wen-ya¹, HE Yan², WU Cheng-jun^{1*}, SUN Tie-min^{1*} (1. Innovation Laboratory of Drug Research and Design, Shenyang Pharmaceutical University, Ministry of Education, Shenyang 110016; 2. Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840)

Abstract: Long-term hyperglycemia may cause pathological changes in various tissues and organs in the body, leading to the occurrence of acute and chronic complications, such as impaired renal function, neuropathy, fundus diseases, cardiovascular and cerebrovascular diseases, diabetic feet and so on. Under physiological conditions, the reabsorption of glucose by the kidney is the mechanism of the body to retain sugar, which plays an important role in maintaining the stability of blood sugar. However, in patients with type 2 diabetes, the expression of sodium-glucose cotransporter is up-regulated, and the reabsorption of glucose by the kidneys may increase the blood glucose level. This mechanism promotes the occurrence and development of diabetes. Therefore, sodium-glucose cotransporter inhibitors have been developed and used for type 2 diabetes. This article summarized the structure, function, mechanism, and role in various diseases and adverse reactions.

Key words: diabetes; sodium-glucose cotransporter inhibitor; hypoglycemic mechanism; hypoglycemic drug

糖尿病是一种常见的内分泌紊乱的代谢性疾病^[1], 目前已成为威胁人类健康的三大慢性非传染性疾病之一。据估计, 到 2035 年, 全球发病率可达 10.1%, 而中国患病人群已超过 9240 万, 约占全球糖尿病患者的 1/4^[2]。糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病, 长期存在的高血糖状态, 导致各种组织 (特别是眼、肾、心脏、血管、神经) 出现慢性损害以及功能障碍^[3]。

糖尿病主要分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病 (见图 1), 1 型糖尿病是一种因胰岛 β 细胞被破坏而导致胰岛素缺乏, 具有酮症倾向的糖尿病。目前认为病因是在遗传易感性的基础上, 外界环境因素 (可能包括病毒感染) 引发机体自身免疫功能紊乱, 导致胰岛 β 细胞损伤和破坏, 胰岛素分泌不足, 从而引发 1 型糖尿病。自身免疫系统缺陷、遗传因素、病毒感染等可能是诱因。与 1 型糖尿病一样, 2 型糖尿病有较为明显的家族史。2 型糖尿病患者体内产生胰岛素的能力并非完全丧失, 有的患者体内胰岛素甚至产生过多, 但胰岛素的作用效果较差, 因此胰岛素是一种相对缺乏的状态。流行病学研究表明, 肥胖、高热量饮食、体力活动不足以及年龄增长是引发 2 型糖尿病最主要的因素, 高血压、血脂异常等因素也会增加患病风险^[4-5]。

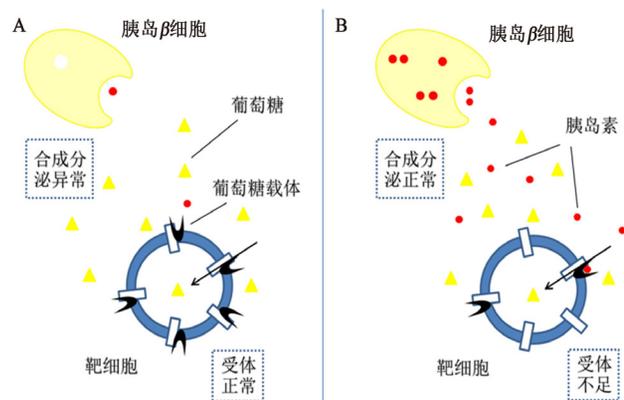


图 1 1 型糖尿病 (A) 和 2 型糖尿病 (B) 的特征

Fig 1 Characteristics of type I diabetes (A) and type II diabetes (B)

糖尿病的病因是多方面的 (见图 2), 治疗药物品种繁多, 针对不同靶点发挥作用, 如双胍类、磺脲类或胰岛素主要降低空腹血糖, 其他药物如 α -葡萄糖苷酶抑制剂、格列奈类主要是降低餐后血糖水平, 但其余抗糖尿病药物如噻唑烷二酮类、二肽基肽酶 -4 抑制剂可以同时发挥这两种功能^[6-9]。目前, 钠-葡萄糖共转运体 (SGLT) 抑制剂已被确定为治疗糖尿病的新型药物, 可通过尿液促进葡萄糖的排泄, 从而减少肾元内葡萄糖的再吸收。SGLT 抑制剂的作用机制不涉及胰岛素, 因此可以用于任何阶段糖尿病的治疗。SGLT 抑制剂也被发现在胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍

中发挥重要疗效，为糖尿病治疗提供了一种特殊的选择方向^[10]。

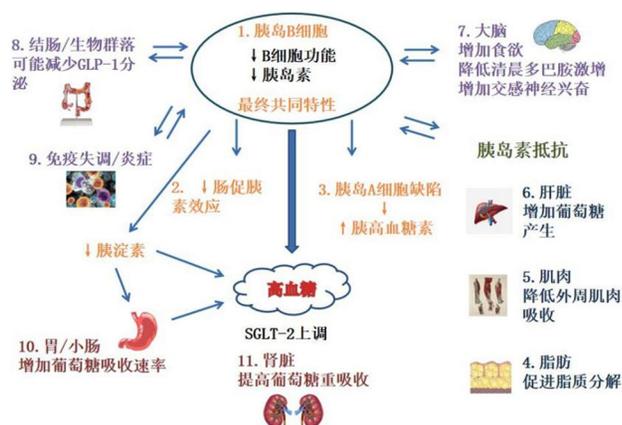


图 2 引发高血糖的原因
Fig 2 Causes of hyperglycemia

1 钠-葡萄糖协同转运蛋白的结构与功能

钠-葡萄糖协同转运蛋白 (SGLTs) 属于膜蛋白家族，它可以促进葡萄糖、氨基酸、维生素等化合物以及各种离子通过近曲小管和肠上皮转运。高血糖情况下，SGLTs 呈饱和状态，大量葡萄糖随尿液排出^[11]。SGLT 蛋白家族已扩展到 12 个：SGLT1 ~ SGLT6 以及 6 个 SLC5A 蛋白。其中，SGLT1 和 SGLT2 在糖尿病治疗中起主导作用 (见表 1)^[12]。

在整个进化过程中，SGLT1 高度保守，已经在细菌、酵母、无脊椎动物和脊椎动物中发现了超过 55 个 SGLT1 成员^[13]。SGLT1 转运蛋白由 *SLC5A1* 基因编码，是高亲和力、低转运力的转运蛋白，主要分布于小肠、心肌细胞、肾近端

表 1 SGLT1 和 SGLT2 转运蛋白的解剖定位和生化特征

Tab 1 Anatomical location and biochemical characteristics of the SGLT1 and SGLT2 transporters

项目	SGLT1	SGLT2
在肾脏中的分布	肾近端小管远端 S2 和 S3 段	肾近端小管 S1 段
在其他器官中的分布	肠道、心脏	大脑、肝脏
对糖的选择性	对葡萄糖和半乳糖亲和力相似	对葡萄糖的亲和力大于半乳糖
钠/葡萄糖运输比	2 : 1	1 : 1
对葡萄糖的亲和力	高亲和力 (0.4 mmol · L ⁻¹)	低亲和力 (2 mmol · L ⁻¹)
对葡萄糖的运输能力	低运输能力 [2 nmol/ (mg · min)]	高运输能力 [10 nmol/ (mg · min)]
突变引起的临床综合征	腹泻和脱水	家族性肾性糖尿

小管远端 S2 和 S3 段，以相似的亲和力转运葡萄糖和半乳糖，以 2 : 1 的比例运输钠和葡萄糖。SGLT1 基因缺陷可引起葡萄糖-半乳糖吸收障碍综合征，导致可能危及生命的腹泻和脱水，这类患者很少或没有尿糖排出^[14]。

SGLT2 基因位于人第 13 号染色体 p11.2 区，由 *SLC5A2* 基因编码，主要表达于肾皮质，在大脑和肝脏中也有低水平表达。SGLT2 是肾近端小管中主要的葡萄糖转运体，对葡萄糖的选择性高于半乳糖，以 1 : 1 的比例运输钠和葡萄糖^[15]。SGLT2 基因突变会引发家族性肾性糖尿，这类患者每日从尿中排出的葡萄糖常大于 100 g，有的高达 160 g，此类人群大多数除了尿液中葡萄糖排泄量增加外没有其他异常 (见表 1)^[16-17]。

SGLT3 由 *SLC5A4* 基因编码，该蛋白质主要存在于骨骼肌、小肠、肾脏和胆碱能神经元中。人 SGLT3 是一种基本的葡萄糖门控离子通道，它不具有葡萄糖转运活性，一般不作为钠-葡萄糖的转运体，可能在肠神经系统中发挥葡萄糖传感器的作用^[18]。相比于葡萄糖，SGLT4 对甘露糖表现出更高的亲和力，并可能发挥甘露糖转运体作

用^[19]。SGLT5 在肾皮质中高表达，相比于葡萄糖，对甘露糖具有更高的亲和力^[20]。SGLT6，也被称为 SMIT2，运输肌醇而不运输葡萄糖^[21]。

2 肾脏对葡萄糖的处理

肾脏每日过滤约 180 L 的血浆，在正常糖耐量个体中，每日的平均血糖浓度为 100 mg · dL⁻¹，约 180 g 的葡萄糖被过滤^[12]。葡萄糖在肾小管里的重吸收由葡萄糖转运蛋白 (GLUTs) 和 SGLTs 完成。GLUTs 以易化扩散的方式转运葡萄糖，而 SGLTs 则以主动运输的方式转运葡萄糖 (见图 3)。在正常的葡萄糖耐受性受试者中，几乎所有的葡萄糖都在近端小管中被重新吸收，最终没有葡萄糖通过尿液排出^[22]。

SGLT2 位于肾近端小管 S1 段，负责 80% ~ 90% 的过滤后葡萄糖的重吸收。SGLT1 位于近端小管 (S2/S3 段) 的更远端，负责重新吸收剩余的 10% ~ 20% 的过滤后葡萄糖 (见图 4)^[12, 23]。SGLT1 结合 1 mol 的葡萄糖，2 mol 的 Na⁺，形成 Na⁺-载体-葡萄糖复合物，顺 Na⁺ 的浓度梯度进入细胞后，SGLT1 的构象还原到原始状态，重新暴露其表面结合位点，以便再次与葡萄糖结

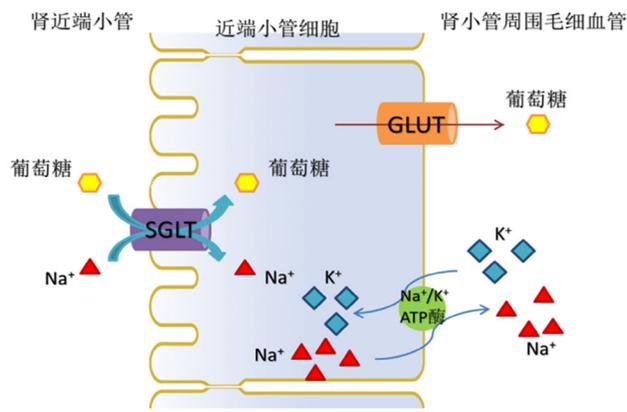


图 3 肾脏对葡萄糖的重吸收
Fig 3 Glucose reabsorption by the kidney

合。Na⁺不断被细胞侧基底膜的 Na⁺/K⁺-ATP 泵出，维持细胞内 Na⁺浓度与胞外浓度的差值，这种电位差产生的能量使葡萄糖逆浓度被转运到细胞内。细胞内的葡萄糖由位于侧基底膜的载体 GLUT1，经易化扩散进入到组织间隙液。SGLT2 则是结合 1 mol 的葡萄糖，1 mol 的 Na⁺，形成 Na⁺-载体-葡萄糖复合物，进入到细胞中^[24]。

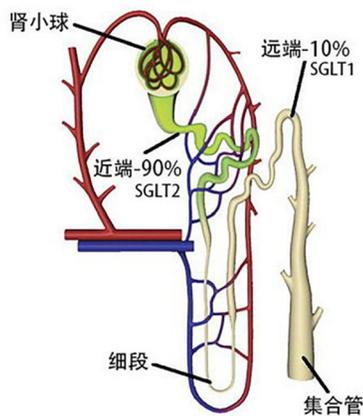


图 4 肾脏的解剖结构
Fig 4 Anatomical structure of the kidney

近端小管的最大葡萄糖运输能力 (T_m) 在个体之间存在差异，平均值约为 $375 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在非糖尿病受试者中，过滤后的葡萄糖负荷小于 $375 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$ ，所有过滤后的葡萄糖都被重新吸收并返回循环。在 2 型糖尿病受试者中，过滤后的葡萄糖负荷可能超过 T_m ，所有超过 T_m 的葡萄糖都被从尿中排泄出来^[24]。

有研究显示，高血糖动物和人类的肾近端小管细胞中，SGLT2 的基因与蛋白表达增加，并显示出葡萄糖运输量的增加^[25-26]。Farber 等^[27]的研究结果显示，纠正高血糖导致了葡萄糖的 T_m 降低和尿糖的出现，提示慢性高血糖症会导致肾脏中葡萄糖的 T_m 升高。

正常葡萄糖耐受性受试者对葡萄糖的 T_m 远远高于过滤后的葡萄糖负荷，这有利于为大脑保存关键的能量来源。然而，在糖尿病患者中，这种适应机制产生了负面影响，肾脏对葡萄糖的 T_m 升高，从而减少了尿糖，加剧了高血糖^[28]。基于这些病理生理学的考虑，发展肾脏 SGLT 转运蛋白抑制剂为糖尿病患者的治疗提供了一种合理且新颖的方法。但是要注意避免抑制 SGLT1 转运蛋白（它存在于肠道和肾脏中），否则会导致葡萄糖吸收不良和腹泻^[29]。

3 治疗糖尿病

3.1 抑制肾小管重吸收，降低糖化血红蛋白

糖化血红蛋白是血液中的葡萄糖与红细胞内的血红蛋白非酶糖基化产物，是代表过去 2 ~ 3 个月平均血糖水平的指标，其受贫血、血红蛋白疾病以及平均血糖水平的影响^[30]，正常值是 4% ~ 6%，当糖化血红蛋白大于 6.5% 时就可能诊断为糖尿病，通过增高的糖化血红蛋白，可以大概估算平均血糖水平^[31]。英国有前瞻性糖尿病控制以及并发症试验表明，糖化血红蛋白每降低 1%，微血管并发症的风险就降低 37%^[32-33]。SGLT 抑制剂作用于肾近曲小管，抑制 SGLT 转运蛋白，可减少肾脏对葡萄糖的重吸收，增加尿糖排泄（见图 5），从而降低患者的血糖水平，显著降低糖尿病患者的糖化血红蛋白，且葡萄糖在肠黏膜的转运主要是通过 SGLT1 来完成的，所以即使是对伴有肾脏病变的患者仍然有明显的降糖作用，但可能导致葡萄糖吸收不良和腹泻等肠道不良反应的发生^[34]。

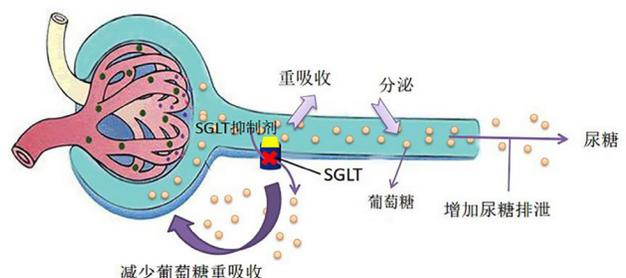


图 5 钠-葡萄糖共转运抑制剂作用机制
Fig 5 Mechanism of sodium-glucose cotransport inhibitor

3.2 改善胰岛素抵抗，提高胰岛素敏感性

慢性高血糖可引起胰岛素抵抗，抑制胰岛素分泌，即糖毒性^[35]。营养过度导致肌肉以及肝脏脂肪组织肥大、增生和三酰甘油异位沉积，这是胰岛素抵抗的关键特征。在切除部分胰腺（90%）的糖尿病大鼠模型中，慢性高血糖导致骨骼肌和肝脏出现严重的胰岛素抵抗，可抑制 GLUT4 易

位和内在活性。采用 SGLT 抑制剂根皮苷治疗的大鼠骨骼肌中, GLUT4 含量增加, 胰岛素诱导的 GLUT4 转位到质膜得到纠正^[36-37]。在肝脏中, SGLT 抑制剂治疗增加了胰岛素受体、胰岛素受体底物 -1 和胰岛素受体底物 -2 酪氨酸磷酸化, 增强了磷脂酰肌醇 -3 激酶活性, 改善了胰岛素抵抗^[38]。胰岛素敏感性的提高与降低葡萄糖氧化和增加脂质氧化有关。由于增加的肌肉脂肪在骨骼肌胰岛素抵抗中起主要作用, 研究人员推测, 抑制 SGLT 后增加的脂肪氧化降低了肌肉脂肪含量, 有助于提高胰岛素敏感性^[39]。提示 SGLT 抑制剂可以通过纠正高血糖改善肌肉和肝脏胰岛素抵抗来提高胰岛素敏感性。

3.3 恢复胰岛 β 细胞功能

研究发现, 糖毒性在胰岛 β 细胞功能障碍的发展中有着重要影响, 使用 SGLT 抑制剂能降低血糖浓度, 同时也能改善糖尿病患者的 β 细胞功能^[40]。糖尿病患者较高的血糖水平会抑制胰岛 β 细胞分泌胰岛素并降低外周组织对胰岛素的敏感性, 从而加重胰岛素抵抗。为使血糖水平恢复正常, 胰岛 β 细胞需超负荷分泌更多胰岛素, 这无疑进一步加速了胰岛 β 细胞功能的衰竭。SGLT 抑制剂通过降低血糖水平可打断胰岛 β 细胞功能衰竭的恶性循环, 从而在一定程度上恢复胰岛 β 细胞功能^[41-42]。

3.4 降低糖异生

糖尿病患者的血浆游离脂肪酸水平升高, 刺激肝脏产生葡萄糖并引起肝脏胰岛素抵抗, 即糖异生^[43]。慢性高血糖也可通过刺激葡萄糖 -6- 磷酸酶, 或者增强肌肉对葡萄糖的摄取, 来增强糖异生。糖尿病患者葡萄糖氧化和糖原合成明显受损, 增强了葡萄糖酵解, 释放大量的乳酸回到肝脏刺激肝脏产生葡萄糖。SGLT 抑制剂可降低血糖和游离脂肪酸浓度, 降低葡萄糖 -6- 磷酸酶含量, 减少肌肉和脂肪细胞中乳酸的产生, 减少肝脏中用于糖异生的乳酸, 抑制糖异生, 从而纠正高血糖^[44-46]。

3.5 促进胰高血糖素样肽 -1 分泌

SGLT1 负责吸收摄入的葡萄糖, 抑制肠道内 SGLT1 可改善餐后血糖浓度升高。抑制肠道葡萄糖重吸收将导致更多的葡萄糖到达 L 细胞所在的远端肠, 刺激胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 的分泌^[47-48]。GLP-1 具有保护 β 细胞的作用, 其可促进胰岛素基因的转录、胰岛素的合成和分泌, 并可刺激胰岛 β 细胞的增殖和分化, 抑制胰岛 β 细胞凋亡。除此之外, GLP-1 还可作用于胰岛 α 细

胞, 抑制胰高血糖素的释放, 并作用于胰岛 δ 细胞, 促进生长抑素的分泌, 生长抑素又可作为旁分泌激素参与抑制胰高血糖素的分泌。然而, 由于 SGLT1 是 L 细胞中分泌 GLP-1 的传感器, 因此 SGLT1 抑制剂可能会抑制 GLP-1 分泌。但有研究表明, 葡萄糖发酵产物, 即短链脂肪酸, 是 L 细胞分泌 GLP-1 的有效刺激因子, 可克服 SGLT1 抑制剂对 GLP-1 分泌的影响。有研究结果显示, SGLT1/SGLT2 双抑制剂 LX4211 可使小鼠血浆 GLP-1 浓度小幅升高^[49]。

4 保护心血管

4.1 改善心室负荷

SGLT 抑制剂可以增加尿钠排泄, 发挥渗透性利尿作用, 减少水钠潴留, 减轻心脏前后负荷^[50]。利钠反应也刺激肾小管 - 肾小球反馈, 导致传入小动脉血管收缩, 从而降低肾小球高血压^[51]。SGLT 抑制剂可改善内皮功能和动脉硬化指数, 并可能通过激活电压门控钾通道和蛋白激酶 G 来诱导血管舒张^[52]。

4.2 影响 Na^+/H^+ 交换

糖尿病患者的心肌细胞钠氢交换蛋白 (NHE) 表达增加, 可能导致细胞质钠、钙水平升高, 进一步导致心力衰竭。有研究证明, SGLT2 抑制剂恩格列净能抑制心肌细胞 NHE, 并降低细胞质钠、钙水平, 同时增加线粒体钙水平。由于心脏中不表达 SGLT2 受体, 作用于心肌细胞 NHE 的机制尚不清楚^[53]。有假设认为 SGLT2 抑制剂还可以通过下调近端小管 NHE3 的活性来促进利钠化, 恢复全身钠稳态, 减轻心力衰竭^[54-55]。因此, 抑制 NHE1 和 NHE3 可能是 SGLT 抑制剂预防和治疗心力衰竭的一种心 - 肾机制。

4.3 抗心肌纤维化

心肌梗死大鼠实验模型研究数据表明, 达格列净可通过促进 M2 巨噬细胞的激活和抑制肌成纤维细胞分化来抑制胶原合成, 显示出明显的抗心肌纤维化作用^[56]。恩格列净能显著减弱转化生长因子 β_1 蛋白 (TGF- β_1) 诱导的成纤维细胞激活, 并减少细胞介导的细胞外基质重塑, 抑制关键的促纤维化标志物的表达, 包括 I 型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、结缔组织生长因子和基质金属蛋白酶 2, 发挥抗纤维化作用^[57]。

4.4 改善心脏代谢

SGLT 抑制剂可以轻微增加酮体 β - 羟基丁酸的含量, 可能为糖尿病患者提供一种替代的心脏燃料来源。酮水平的升高被认为是提高胰高血糖

素水平和肾脏减少酮体排泄引起的^[58-59]。研究表明,恩格列净增加了心肌酮的消耗,并降低了心脏葡萄糖的消耗和乳酸的产生^[60]。酮体 β -羟基丁酸水平升高也可能抑制组蛋白去乙酰化酶,阻止促肥大转录通路,减少乙酰辅酶 A,从而降低有害的线粒体酶的高乙酰化,提高线粒体的能量生产。SGLT 抑制剂这一作用使心脏收缩增强,心力衰竭风险降低,从而发挥心血管保护作用^[61]。

5 保护肾脏

SGLT 抑制剂降血糖作用可以减轻高血糖对肾脏足细胞的损伤,抑制钠和葡萄糖在近端小管中的重吸收,影响肾内血流动力学,增加钠向肾小球旁器的运输,引起入球小动脉收缩,肾小球内压力降低,降低肾小球超滤和相关的损伤^[62]。同时 SGLT 抑制剂还可以减少白蛋白尿,阻断尿酸的再吸收,导致尿酸排泄增加,使血清尿酸浓度降低,发挥肾脏保护作用^[63]。

6 在肿瘤治疗中的作用

因肿瘤细胞生存和生长所需的能量由葡萄糖提供,所以与健康细胞相比,肿瘤细胞对葡萄糖的摄取和利用都增加了^[64]。研究发现在多种癌症中发现了 SGLT 过表达,如胰腺腺癌、前列腺腺癌、肺腺癌、肝癌和淋巴结癌^[65]。由于细胞的能量需求,肿瘤微环境往往表现为低血糖和缺氧。在低血糖状态下,由于主动转运和被动转运的差异,SGLT 相对于 GLUT 的连续摄取能力较高,SGLT 被认为是肿瘤细胞葡萄糖的主要来源^[66]。有报道称,过表达表皮生长因子受体(EGFR)可增加口腔鳞癌中 SGLT1 的表达^[67]。此外,电离辐射激活钾通道,可通过 SGLT 增加葡萄糖摄取。辐射刺激和 EGFR 激活增加 SGLT 介导的人 A549 肺腺癌细胞摄取葡萄糖,促进了肿瘤细胞的生存。研究发现 EGFR 存在于多种癌症中,因此在这些癌症中,抑制 SGLT 可能是一种新的治疗方法^[68]。

7 在脑缺血和肠道缺血中的作用

钠离子与葡萄糖一起通过 SGLT 运输,诱导内向电流,导致膜去极化,过量的钠离子通过脑 SGLT 的流入加剧了缺血性神经元损伤。此外,钠通过 SGLT 流入还可增加细胞内钙浓度,在脑缺血的情况下,钙超载诱导兴奋性毒性和神经元细胞死亡;细胞内钠离子和钙离子的稳态破坏,也可引起缺血性神经元损伤。虽然脑 SGLT 诱导的钠内流加重了脑缺血神经元的损伤,但葡萄糖通过脑 SGLT 的内流保护了脑缺血应激。因此需要进一步的研究来阐明通过脑 SGLT 的葡萄糖内流在脑缺血中的

作用^[69]。肠道缺血可引起黏膜屏障损伤和细菌移位,导致脓毒症和全身炎症。有研究显示,大鼠小肠缺血/再灌注可引起上皮细胞凋亡、黏膜屏障损伤和黏膜炎症反应,而肠道中细胞通过 SGLT1 灌注葡萄糖可减轻这种损伤,因此,上皮细胞中的 SGLT1 可减轻肠缺血相关的上皮屏障损伤^[70]。

8 不良反应

8.1 低血压

SGLT 抑制剂具有利尿作用,导致血管内容量收缩。患者使用 SGLT 抑制剂治疗后可观察到红细胞压积和血浆尿素氮与肌酐比值的小幅上升,有发生低血压的风险。特别是肾功能受损的患者,更易发生症状性低血压。因此在治疗时应密切监测患者,并根据患者的自身因素(年龄较大、收缩压低)和临床治疗反应及时对治疗方案进行调整^[71]。

8.2 糖尿病酮症酸中毒

酮症酸中毒是 SGLT 抑制剂的一个重要不良反应,症状与脱水和代谢性酸中毒一致,包括恶心、呕吐、腹痛、全身不适和呼吸短促。这可能是 SGLT 抑制剂降低了肾脏对酮体的清除率导致的^[72-73]。

8.3 尿路感染

慢性高血糖会抑制白细胞的吞噬活性,且 SGLT 抑制剂会促进糖尿,额外的糖尿可能促进细菌生长,所以 SGLT 抑制剂有造成尿路感染的风险。这些感染大多涉及下尿路,如由典型尿路病原体引起的膀胱炎^[74]。

8.4 肾功能损伤

SGLT 抑制剂增加血清肌酐含量,降低肾小球滤过率,引起血管内容量收缩,一些低血容量、慢性肾功能不全、心力衰竭以及同时使用利尿剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体阻滞剂或非甾体抗炎药物的患者可能发展为急性肾损伤,需要住院和透析^[75]。

9 总结

SGLT 抑制剂是一种有效且新颖的治疗糖尿病的药物,抑制 SGLT 转运蛋白,可以减少肾脏对葡萄糖的重吸收,增加尿糖排泄,从而降低患者的血糖水平,显著降低糖尿病患者的糖化血红蛋白,且其是独立于胰岛素发挥作用的。此外,SGLT 抑制剂还具有其他的益处,比如改善胰岛素抵抗,提高胰岛素敏感性,恢复胰岛 β 细胞功能,降低糖异生,促进胰高血糖素样肽-1 分泌,保护心血管及肾脏等。尽管 SGLT 抑制剂有着良好的应用前景,

但也应该注意在治疗过程中可能出现的低血压、糖尿病酮症酸中毒、尿路感染、肾功能损伤等不良反应。虽然目前对 SGLT 抑制剂的相关研究还存在不足,但相信未来 SGLT 抑制剂必将在糖尿病以及其他疾病领域发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] Skyler JS. Diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment strategies [J]. *J Med Chem*, 2010, 47 (17): 4113-4117.
- [2] Leung MY, Mallory. Life years lost and lifetime health care expenditures associated with diabetes in the U.S., National Health Interview Survey, 1997—2000 [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38 (3): 460-468.
- [3] Esteghamati A, Meysamie A, Khalilzadeh O, et al. Third national surveillance of risk factors of non-communicable diseases (SuRFNCD-2007) in Iran: Methods and results on prevalence of diabetes, hypertension, obesity, central obesity, and dyslipidemia [J]. *Bmc Public Health*, 2009, 9 (1): 1-10.
- [4] Wilding JPH. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: Clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors [J]. *Metabolism*, 2014, 63 (10): 1228-1237.
- [5] Shanthi M. WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014 [J]. *Women*, 2015, 47 (26): 2562-2563.
- [6] Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: New understandings, new uses [J]. *Drugs*, 2003, 63 (18): 1879-1894.
- [7] Lebovitz HE. Alpha-glucosidase inhibitors [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997, 26 (3): 539-551.
- [8] Lebovitz HE. Adjunct therapy for type 1 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010, 6 (6): 326-334.
- [9] Hanefeld M. Cardiovascular benefits and safety profile of acarbose therapy in prediabetes and established type 2 diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2007, 6 (1): 1-10.
- [10] Tat V, Forest CP. The role of SGLT2 inhibitors in managing type 2 diabetes [J]. *J Am Acad Phys*, 2018, 31 (6): 35-40.
- [11] Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease [J]. *J Intern Med*, 2010, 261 (1): 32-43.
- [12] Ernest M, Wright. Biology of human sodium glucose transporters [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91 (2): 733-794.
- [13] Wright EM. Glucose galactose malabsorption [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275 (1): G879-G882.
- [14] Kasahara M, Maeda M, Hayashi S, et al. A missense mutation in the Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1 in a patient with congenital glucose-galactose malabsorption: Normal trafficking but inactivation of the mutant protein [J]. *Bba-Mol Basis Dis*, 2001, 1536 (3): 141-147.
- [15] Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, et al. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter [J]. *Am J Physiol*, 1992, 263 (2): 459-465.
- [16] Kanai Y, Lee WS, You G, et al. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93 (1): 397-404.
- [17] Abdul-Ghani MA, Luke N, Defronzo RA. Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Endocr Rev*, 2011, 32 (4): 515-531.
- [18] Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, et al. A glucose sensor hiding in a family of transporters [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (20): 11753-11758.
- [19] Tazawa S, Yamato T, Fujikura H, et al. SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1, 5-anhydro-D-glucitol, and fructose [J]. *Life Sci*, 2005, 76 (9): 1039-1050.
- [20] Grempler R, Augustin R, Froehner S, et al. Functional characterisation of human SGLT-5 as a novel kidney-specific sodium-dependent sugar transporter [J]. *Febs Lett*, 2012, 586 (3): 248-253.
- [21] Lin X, Ma L, Fitzgerald RL, et al. Human sodium/inositol cotransporter 2 (SMIT2) transports inositols but not glucose in L6 cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 481 (2): 197-201.
- [22] Dasilva P, Daconceicao R, Docoutomaia R, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitors: A new antidiabetic drug class [J]. *Med Chem Comm*, 2018, 9 (8): 1273-1281.
- [23] Turk E, Martín MG, Wright EM. Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1 [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (21): 15204-15209.
- [24] Fleischmann LE. Renal function: Mechanisms preserving fluid and solute balance in health [J]. *Arch Surg*, 1973, 109 (3): 462.
- [25] Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes [J]. *Diabetes*, 2005, 54 (12): 3427-3434.
- [26] Kamran M, Peterson RG, Dominguez JH. Overexpression of GLUT2 gene in renal proximal tubules of diabetic Zucker rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8 (6): 943-948.
- [27] Farber SJ, Berger EY, Earle DP. Effect of diabetes and insulin of the maximum capacity of the renal tubules to reabsorb glucose [J]. *J Clin Invest*, 1951, 30 (2): 125-129.
- [28] Gribble FM, Williams L, Simpson AK, et al. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line [J]. *Diabetes*, 2003, 52 (5): 1147-1154.
- [29] Neumiller JJ, White JR, Campbell RK. Sodium-glucose co-transport inhibitors [J]. *Drugs*, 2010, 70: 377-385.
- [30] Qaseem A, Vijan S, Snow V, et al. Glycemic control and type 2 diabetes mellitus: The optimal hemoglobin A1c targets. A Guidance Statement from the American College of Physicians [J]. *Ann Intern Med*, 2007, 147 (6): 417-422.

- [31] Rodbard H, Blonde L, Braithwaite S, et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Management of Diabetes Mellitus [J]. *Endocr Pract*, 2007, 13 (1): 1-68.
- [32] Turner RC, Holman RR, Cull CA, et al. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. *Lancet*, 1998, 352 (9131): 837-853.
- [33] Group CCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group [J]. *New Engl J Med*, 1993, 329 (14): 977-986.
- [34] Dardi I, Kouvatso T, Jabbour SA. SGLT2 inhibitors [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101: 27-39.
- [35] Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity [J]. *Diabetes Care*, 1990, 13 (6): 610-630.
- [36] Kahn BB, Shulman GI, DeFronzo RA, et al. Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transport in adipose cells without restoring glucose transporter gene expression [J]. *J Clin Invest*, 1991, 87 (2): 561-570.
- [37] Rossetti L, Smith D, Shulman GI, et al. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats [J]. *J Clin Invest*, 1987, 79 (5): 1510-1515.
- [38] Tomoichiro A, Takehide O, Hideki K, et al. Glucose transporter and Na⁺/glucose cotransporter as molecular targets of anti-diabetic drugs [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11 (20): 2717-2724.
- [39] Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (2): 499-508.
- [40] Merovci A, Mari A, Solis-Herrera C, et al. Dapagliflozin lowers plasma glucose concentration and improves β -cell function [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2015, 100 (5): 1927-1932.
- [41] Garvey WT, Olefsky JM, Griffin JM, et al. The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type II diabetes mellitus [J]. *Diabetes*, 1985, 34 (3): 222-234.
- [42] Leahy JL, Bonner WS, Weir GC. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy [J]. *J Clin Invest*, 1988, 81 (5): 1407-1414.
- [43] Oku A, Ueta K, Nawano M, et al. Antidiabetic effect of T-1095, an inhibitor of Na⁺-glucose cotransporter, in neonatally streptozotocin-treated rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 391 (1): 183-192.
- [44] Mevorach M, Giacca A, Aharon Y, et al. Regulation of endogenous glucose production by glucose per se is impaired in type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102 (4): 744-753.
- [45] Prato SD, Bonadonna RC, Bonora E, et al. Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91 (2): 484-494.
- [46] DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: Metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes [J]. *Diabetes Rev*, 1997, 5 (3): 177-269.
- [47] Vrhovac I, Erer DB, Klessen D, et al. Localizations of Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart [J]. *Pflugers Arch*, 2015, 467 (9): 1881-1898.
- [48] Powell DR, Smith M, Greer J, et al. LX4211 increases serum glucagon-like peptide 1 and peptide YY levels by reducing sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT1)-mediated absorption of intestinal glucose [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345 (2): 250-259.
- [49] Zambrowicz B, Ding ZM, Ogbaa I, et al. Effects of LX4211, a Dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, plus sitagliptin on postprandial active glp-1 and glycemic control in type 2 diabetes [J]. *Clin Ther*, 2013, 35 (3): 273-285.
- [50] Verma S, McMurray JJV, Cherney DZI. The metabolodiuretic promise of sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibition: The search for the sweet spot in heart failure [J]. *Jama Cardiol*, 2017, 2 (9): 939-940.
- [51] Sattar N, McLaren J, Kristensen SL, et al. SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: Why did EMPA-REG outcomes surprise and what were the likely mechanisms? [J]. *Diabetologia*, 2016, 59 (7): 1333-1339.
- [52] Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17 (12): 1180-1193.
- [53] Verma S, McMurray JJV. SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: A state-of-the-art review [J]. *Diabetologia*, 2018, 61 (10): 2108-2117.
- [54] Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RCI, et al. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits [J]. *Diabetologia*, 2017, 60 (3): 568-573.
- [55] Gallo LA, Wright EM, Vallon V, et al. Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: Basic physiology and consequences [J]. *Diabetes Vasc Dis Re*, 2015, 12 (2): 78-89.
- [56] Packer M, Anker SD, Butler J, et al. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for the treatment of patients with heart failure: Proposal of a novel mechanism of action [J]. *Jama Cardiol*, 2017, 2 (9): 1025-1029.
- [57] Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted

- rat hearts [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 298-310.
- [58] Kang S, Verma S, Teng G, et al. Direct effects of empagliflozin on extracellular matrix remodeling in human cardiac fibroblasts: Novel translational clues to empagliflozin outcome [J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33 (10): S169.
- [59] Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME trial: A “thrifty substrate” hypothesis [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39 (7): 1108-1114.
- [60] Mizuno Y, Harada E, Nakagawa H, et al. The diabetic heart utilizes ketone bodies as an energy source [J]. *Metabolism*, 2017, 77: 65-72.
- [61] Santos-Gallego CG, Ibanez JAR, Antonio RS, et al. Empagliflozin induces a myocardial metabolic shift from glucose consumption to ketone metabolism that mitigates adverse cardiac remodeling and improves myocardial contractility [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71 (11): A674.
- [62] Lopaschuk GD, Verma S. Empagliflozin’s fuel hypothesis: Not so soon [J]. *Cell Metab*, 2016, 24 (2): 200-202.
- [63] Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, et al. Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetic Renal Disease Study Group [J]. *N Engl J Med*, 1996, 335 (22): 1636-1642.
- [64] Arakawa K, Ishihara T, Oku A, et al. Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095 [J]. *Brit J Pharmacol*, 2001, 132 (2): 578-586.
- [65] Huber SM, Misovic M, Mayer C, et al. EGFR-mediated stimulation of sodium/glucose cotransport promotes survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells [J]. *Radiother Oncol*, 2012, 103 (3): 373-379.
- [66] Scafoglio C, Hirayama BA, Kepe V, et al. Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (30): 4111-4119.
- [67] Palazón A, Aragonés J, Morales-Kastresana A, et al. Molecular pathways: Hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (5): 1207-1213.
- [68] Wu P, He P, Zhao SQ, et al. Effects of ursolic acid derivatives on caco-2 cells and their alleviating role in streptozocin-induced type 2 diabetic rats [J]. *Molecules*, 2014, 19 (8): 12559-12576.
- [69] Fumagalli A, Drost J, Suijkerbuijk SJE, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (12): E2357-E2364.
- [70] Gribble FM, Williams L, Simpson AK, et al. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line [J]. *Diabetes*, 2003, 52 (5): 1147-1154.
- [71] Huang CY, Hsiao JK, Lu YZ, et al. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia [J]. *Lab Invest*, 2011, 91 (2): 294-309.
- [72] Wilding John PH, Norwood P, T’Joens C, et al. A study of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes receiving high doses of insulin plus insulin sensitizers: Applicability of a novel insulin-independent treatment [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32 (9): 1656-1662.
- [73] Kerridge R, Whyte I, Prior F, et al. The good, the bad, and the ugly: Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors (gliflozins) and perioperative diabetes [J]. *Anaesth Intens Care*, 2018, 46 (2): 155-158.
- [74] Lin YH. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors induced eu-glycemic diabetic ketoacidosis: The first report in a type 2 diabetic (T2D) Taiwanese and literature review of possible pathophysiology and contributing factors [J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 92 (9): 664-673.
- [75] Hussey EK, Clark RV, Amin DM, et al. Early clinical studies to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single doses of sergliflozin, a novel inhibitor of renal glucose reabsorption, in healthy volunteers and subjects with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes*, 2007, 56 (1): 189.

(收稿日期: 2021-06-02; 修回日期: 2021-06-28)

选择性 SGLT2 抑制剂的研究进展

郭家钰¹, 巫振坤¹, 贺岩², 吴成军^{1*}, 孙铁民^{1*} (1. 沈阳药科大学基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室 制药工程学院, 沈阳 110016; 2. 北部战区总医院药剂科, 沈阳 110840)

摘要: 钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (SGLT2) 主要分布在肾近曲小管 S1 部位, 负责肾脏中约 90% 葡萄糖的重吸收, 抑制 SGLT2 可以促进糖尿病患者尿糖的排出, 因此 SGLT2 抑制剂是一种新型的具有独特作用机制的抗糖尿病药物。本文主要介绍了 SGLT2 的作用机制以及相比于其他降糖药物的优势, 并对已经上市的 SGLT2 抑制剂进行详细综述, 同时对在研阶段的 SGLT2 抑制剂进行分类总结, 为新型选择性 SGLT2 抑制剂的研发提供参考。

关键词: 钠-葡萄糖共转运蛋白; 糖尿病; SGLT2 抑制剂; 降血糖药物

中图分类号: R977.1, R587.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1766-11
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.002

Research progress in SGLT2 inhibitors

GUO Jia-yu¹, WU Zhen-kun¹, HE Yan², WU Cheng-jun^{1*}, SUN Tie-min^{1*} (1. *Innovation Laboratory of Drug Research and Design, Shenyang Pharmaceutical University, Ministry of Education, Shenyang 110016*; 2. *Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840*)

Abstract: Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) is distributed in the proximal convoluted tubule S1 of the kidney and is responsible for the reabsorption of about 90% of the glucose in the kidney. Inhibition of SGLT2 can promote the excretion of urine sugar in diabetic patients, so SGLT2 inhibitors are considered to be a new type of anti-diabetic drug with a unique mechanism of action. This article mainly introduces the mechanism of action of SGLT2 and its advantages as compared with other hypoglycemic drugs, and gives an overview of the marketed SGLT2 inhibitors. This article may provide reference for the development and research of new selective SGLT2 inhibitors.

Key words: sodium-glucose cotransporter; diabetes; SGLT2 inhibitor; hypoglycemic drug

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种与代谢功能障碍相关的常见疾病, 通常发生在胰腺无法产生足够的胰岛素或胰岛素因抵抗而无法发挥降血糖作用的患者中^[1]。截止至 2020 年, 全球糖尿病患者约 4.25 亿, 预计到 2030 年, 糖尿病患者数量将增加到约 5.52 亿。糖尿病患病人数的增长与人们生活条件的改变息息相关。糖尿病的发生通常伴随着肥胖、高血压、心血管疾病或动脉粥样硬化等各种其他慢性疾病和病症, 从而导致患者生活质量下降^[2-4]。

美国糖尿病协会 (ADA) 和世界卫生组织将

糖尿病分为 4 个类别: 1 型糖尿病 (T1DM)、2 型糖尿病 (T2DM)、妊娠糖尿病以及其他特定类型的糖尿病。T1DM 是由 T 细胞介导的胰岛 β 细胞自身免疫破坏引起的胰岛素缺乏所导致的, 多发于青少年。根据 ADA 的相关统计, T1DM 仅占糖尿病患者的 5% ~ 10%。T2DM 是由胰岛素分泌的减退、胰岛素抵抗 (IR) 或两种情况同时发生导致的碳水化合物、脂质和蛋白质代谢失调所引起的。在所有糖尿病患者中, T2DM 占比超过 90%^[5]。尽管 T2DM 的发病机制尚不明确, 但遗传因素、生活环境、肥胖、高血压在一定程度上

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No. 2020LJC06)。

作者简介: 郭家钰, 男, 硕士研究生, 主要从事药物合成研究, E-mail: 1102603779@qq.com *通信作者: 吴成军, 男, 讲师, 主要从事基于靶点的新型小分子药物研究, E-mail: chengjun871@163.com; 孙铁民, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物合成和半合成、手性药物合成以及抗病毒药物的合成研究, E-mail: suntiemin@126.com

上与 T2DM 的发生相关^[6]。

研究表明,通过改变生活方式和控制饮食的方法可以辅助调控患者的血糖,但是这种方式对血糖水平的调控是有限的。并且,随着糖尿病的发展,仅仅依靠传统药物治疗并不能取得理想的效果。在 1950 到 1990 年代中期,接近 40 年的

时间里,只有胰岛素、磺脲类药物和双胍类药物用于糖尿病治疗。在 1995 年之后,一些新型的糖尿病药物才逐步被开发并应用于临床^[7-9](见图 1),本文将对 SGLT2 及其作用机制进行综述,并与其他降糖药物进行比较,为新型选择性 SGLT2 抑制剂的研发提供参考。

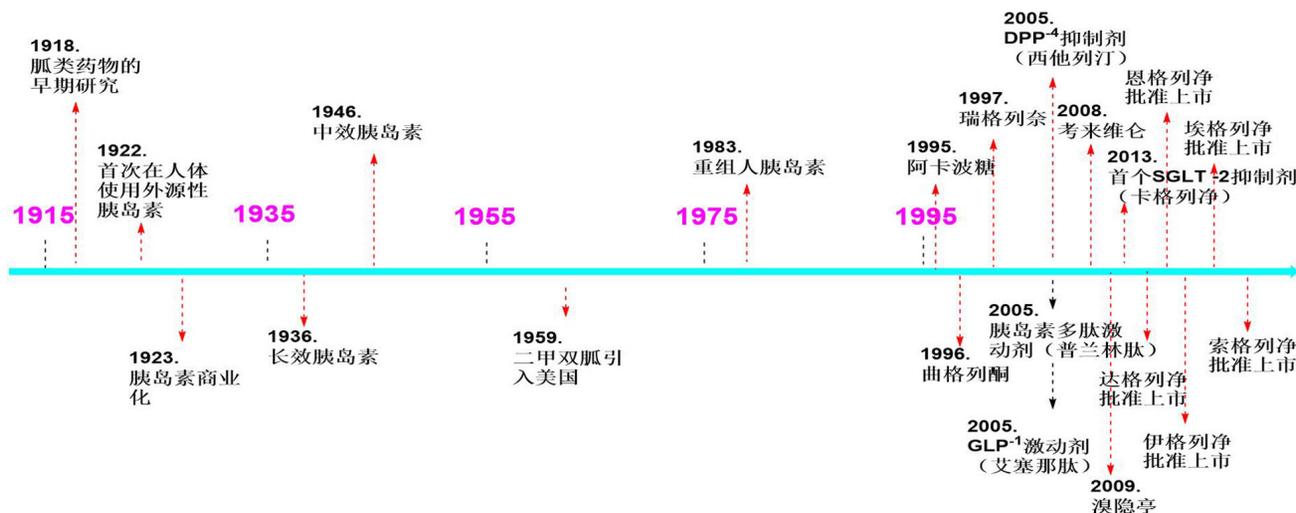


图 1 近年来降血糖药物的发展^[9]

Fig 1 Development of hypoglycemic drugs in recent years^[9]

1 传统降血糖药物

1.1 促进胰岛素合成、分泌类药物

1.1.1 磺酰脲类药物 临床采用此种药物治疗 T2DM 已经近半个世纪。磺酰脲类药物主要通过刺激胰岛 β 细胞,促进其释放胰岛素,但不会影响患者自身胰岛素的合成。长期服用此药,会引起一定的低血糖反应,且此类药物仅局限于胰岛 β 细胞功能尚存的患者,对胰岛 β 细胞功能受损的患者没有疗效^[10]。

1.1.2 胰高血糖素样肽 1 (GLP1) 受体激动剂 与葡萄糖依赖性促胰岛素多肽类似,可促进肠促胰岛素激素释放,促进胰岛素的分泌从而降低血糖。其对胰岛 β 细胞功能受损的患者同样无法产生疗效^[11]。

1.2 胰岛素增敏剂

1.2.1 双胍类药物 此类药物通过减少肝糖分解,降低糖异生,增加患者体内胰岛素的敏感性来发挥作用,并且不会造成胰岛功能减退。同时,双胍类药物还能有效降低胰岛素抵抗作用,并显著减轻 T2DM 患者的体重^[12]。

1.2.2 噻唑烷二酮类药物 此类药物能够有效作用于患者肝脏系统,激活胰岛素抵抗、脂肪组织,进一步增加胰岛素自身的敏感性,降低患者

血糖水平。临床研究表明,噻唑烷二酮类药物具有降低胰岛素抵抗的作用。但是,在部分患者中发现,噻唑烷二酮类药物会引起液体潴留,继而发展为充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF)^[13]。

1.3 α -葡萄糖苷酶抑制剂

α -葡萄糖苷酶抑制剂可通过竞争性抑制位于小肠中的 α -葡萄糖苷酶,延缓碳水化合物的吸收。 α -葡萄糖苷酶抑制剂仅改变餐后葡萄糖水平,不改变空腹血浆葡萄糖水平,所以导致该药物调控糖化血红蛋白 (HbA1c) 的能力下降。此类药物的已知不良反应包括胃部不适,例如腹泻、腹胀和腹部绞痛等^[14]。

1.4 钠/葡萄糖共转运蛋白 (SGLT) 抑制剂

SGLT 属于膜蛋白家族(见表 1),可促进葡萄糖、氨基酸和维生素等物质的转运,促进各种离子在近曲小管和肠上皮的吸收。SGLTs 转运的葡萄糖中有大约 90% 会在肾脏中被重新吸收,因此通过抑制这些转运蛋白可以阻止葡萄糖的重吸收,从而导致糖尿增加,血糖降低,由于在这一过程中不涉及胰岛素,所以该抑制剂可以在 T2DM 的任何阶段使用。该机制是改善糖尿病患者血糖控制最有前途的治疗方法之一^[15]。

表 1 SGLTs 蛋白在体内分布

编码基因	蛋白	底物	分布
SLC5A1	SGLT1	葡萄糖和半乳糖	小肠, 肾脏, 心脏
SLC5A2	SGLT2	葡萄糖	肾脏
SLC5A4	SGLT3	Na ⁺ (H ⁺)	小肠, 骨骼肌, 肾脏, 子宫, 睾丸
SLC5A8	SGLT4	—	小肠, 肝脏, 肾脏, 肺, 脑
SLC5A9	SGLT5	—	肾脏
SLC5A10	SGLT6	手性肌醇, 肌肉肌醇, 葡萄糖, 木糖	小肠, 肾脏, 肝脏, 心脏, 肺, 脑

SGLT2 主要分布在肾脏近曲小管 S1 部位, 负责肾脏中约 90% 葡萄糖的重吸收, 抑制 SGLT2 可以促进糖尿病患者尿糖的排出, 因此 SGLT2 抑制剂被认为是一种新型的具有独特作用机制的抗糖尿病药物。SGLT2 抑制剂也被发现在胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞细胞功能障碍病例中具有很好的疗效, 为糖尿病治疗提供了一种全新的治疗选择^[16]。

2 SGLT2 抑制剂研究进展

2.1 SGLT2 天然活性产物

根皮苷 (phlorizin) 是由法国的研究人员于 19 世纪 50 年代在苹果树皮中得到的一种查尔酮类天然产物, 并一度被认为是 SGLT1 和 SGLT2 的非特异性抑制剂。根皮苷能够减少尿液中葡萄糖的重吸收并且增加肾脏对葡萄糖的清除, 从而降低了高血糖和糖中毒的风险。但是, 根皮苷会非选择

性地抑制 SGLT1, 且由于其不良反应和口服生物利用度的问题, 所以它并没有被开发成抗糖尿病药物^[17-19]。此外, 研究发现根皮苷的水解代谢产物根皮素可以阻断葡萄糖转运通道 1 (glucose transporter 1, GLUT1), 严重干扰了葡萄糖在其他组织器官中的摄取和利用, 从而影响患者的生理健康^[20]。

在 20 世纪中叶之前, 根皮苷被一度认为是造成肾脏和小肠中红细胞停止吸收葡萄糖的罪魁祸首。但是, 在 20 世纪末期, 随着对 SGLT2 研究的深入, 阐明了根皮苷对于糖尿和肾脏的作用机制^[16, 21], 于 1990 年在根皮苷的基础上发现了 T-1095, T-1095 在体内代谢成活性成分 T-1095A 发挥作用。在活性测试中发现 T-1095A 的抑制活性 (SGLT1: IC₅₀ = 0.20 μmol · L⁻¹, SGLT2: IC₅₀ = 0.05 μmol · L⁻¹) 与根皮苷的抑制活性 (SGLT1: IC₅₀ = 0.16 μmol · L⁻¹, SGLT2: IC₅₀ = 0.16 μmol · L⁻¹) 接近, 但是仍然没有克服 O-葡萄糖苷类似物药代动力学不稳定的问题, 故止步于此^[22] (见图 2)。

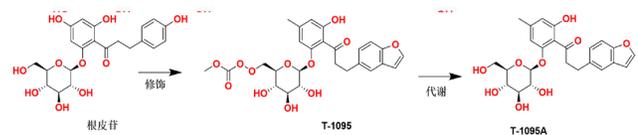


图 2 天然产物根皮苷及 T-1025 的化学结构

Fig 2 Chemical structure of natural product phlorizin and T-1025

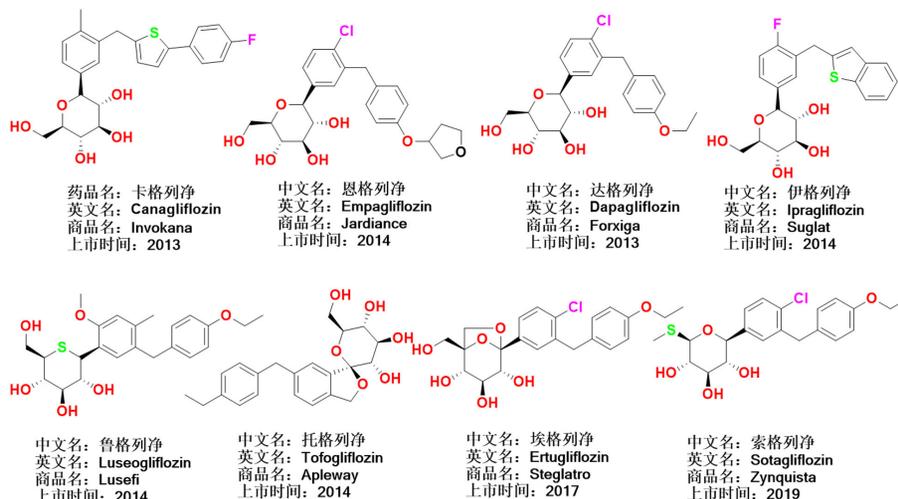


图 3 上市 SGLT2 抑制剂的化学结构

Fig 3 Chemical structure of commercially available SGLT2 inhibitors

2.2 已上市的 SGLT2 抑制剂 (见图 3)

2.2.1 卡格列净 (canagliflozin) 第一个经 FDA 批准上市的 SGLT2 抑制剂, 其与二甲双胍的复方制剂 (商品名: Invokamet) 在 2015 年即实现了 13.08 亿元的巨额销售; 卡格列净通过抑制肾近曲小管的葡萄糖重吸收使血糖降低^[23]。研究显示, 与安

慰剂组相比, 每日分别给予 100 和 300 mg 的卡格列净能明显降低 HbA1c 水平; 当卡格列净单独使用时, HbA1c 水平分别下降了 0.91% 和 1.16%; 在与磺酰脲类、二甲双胍、二甲双胍加吡格列酮、二甲双胍加磺酰脲类和胰岛素联合使用时, HbA1c 下降了 0.62% ~ 0.925% (排除特殊人群, 例如老

年人和肾功能不全者)^[24]。与对照组比较,大量给予 100 和 300 mg 卡格列净治疗的患者体重减轻了 0.4%~3.3%,收缩压(SBP)降低 0.1~7.9 mmHg,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平升高。

在口服卡格列净或其他 SGLT2 抑制剂时会产生一些不良反应,如口渴,尿量增加,低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平升高以及高血压和泌尿生殖道感染的发生率增加等。因此,在患有肾功能不全,肾小球滤过率(GFR)降低的人群中禁用卡格列净^[25]。

FDA 在 2015 年 5 月发出警告,卡格列净和某些 SGLT2 抑制剂可能会引起酮症酸中毒。2015 年 9 月,FDA 声明卡格列净存在着使骨密度降低从而导致骨折的风险^[26]。

2.2.2 恩格列净(empagliflozin) 是由勃林格殷格翰和礼来公司共同开发的一种 SGLT2 抑制剂,该药物于 2014 年被 FDA 批准上市。恩格列净具有与根皮苷相似的 C-葡萄糖苷结构,对 SGLT2 有更高的选择性(是 SGLT1 的 2500 多倍)^[27]。

相比于安慰剂对照组,恩格列净组患者的 SBP 和体重都明显下降。相比于单一使用恩格列净,联合使用 25 mg 的恩格列净和二甲双胍时体重和 SBP 明显降低。后续的临床研究表明,恩格列净可以降低中风、心肌梗死和心血管死亡的风险,这使恩格列净成为第一个 FDA 批准的用于降低心血管死亡风险的 SGLT2 抑制剂^[28]。

2.2.3 达格列净(dapagliflozin) 是由百时美施贵宝和阿斯利康公司共同研发的 C-芳基糖苷类 SGLT-2 抑制剂,在 2014 年 1 月 8 日,FDA 批准了达格列净与饮食和运动一起用于控制糖尿病患者的血糖的治疗方案。2014 年 10 月,FDA 又批准了达格列净与盐酸二甲双胍联合治疗的方案。

达格列净的常见不良反应包括重度糖尿病、疲倦且体重减轻伴随着脱水以及糖尿病酮症酸中毒(DKA)的风险增加。除此之外,达格列净还会因为增加尿液中的含糖量而加剧糖尿病所引起的感染^[29]。2017 年 3 月 10 日,达格列净在中国上市,成为首个在国内上市的 SGLT2 抑制剂。

2.2.4 伊格列净(ibrigliflozin) 是 2014 年 1 月在日本获得批准上市的口服 SGLT2 抑制剂。伊格列净既可单独用于 T2DM 的治疗,也可与其他降血糖药物(例如二甲双胍、磺酰脲类或 α -葡萄糖苷酶抑制剂和吡格列酮)联合使用。FDA 批准上市了 25 和 50 mg 两种规格的伊格列净片,如果 50 mg 的伊格列净疗效不足,则伊格列净剂量

可以增加至每日 100 mg^[30]。2018 年 12 月,安斯泰来制药公司和日本 Kotobuki 制药公司在日本获得了伊格列净 L-脯氨酸用于治疗 T1DM 的批准。体外药理研究发现,伊格列净可以竞争性地抑制 SGLT2,并且对 SGLT2 的选择性比 SGLT1 的选择性高 254 倍^[31]。

2.2.5 托格列净(tofogliflozin) 是由日本中外制药开发的一种用于治疗 T2DM 的口服 SGLT2 抑制剂^[32],其既可以作为降糖药物单独使用也可以与其他药物联合使用治疗糖尿病^[33]。现已批准 20 mg 剂量的托格列净用于治疗 T2DM^[34]。

2.2.6 鲁格列净(luseogliflozin) 是由日本开发的选择性 SGLT2 抑制剂。鲁格列净的批准剂量有 2.5 和 5 mg 两种,一般建议每日起始剂量为 2.5 mg,如果效果不佳,则增加剂量到每日 5 mg。在长期治疗中,无论是作为单一疗法还是与其他口服抗高血糖药物联合使用,鲁格列净均表现出较好的治疗效果^[35]。

2.2.7 埃格列净(ertugliflozin) 是默克公司和辉瑞公司联合开发的新型口服 SGLT2 抑制剂。使用 5 mg 和 15 mg 剂量的埃格列净治疗后,HbA1C 分别降低了 0.69% 和 0.76% (相比于安慰剂对照组)。研究还发现,相比于单独使用埃格列净或西他列汀,二者联合使用可使 HbA1C 降至 7.0% 以下。2017 年,埃格列净(商品名 Steglatro)被 FDA 批准上市^[36-37]。

2.2.8 索格列净 2016 年 Lexicon 制药公司在 III 期临床实验中发现,索格列净可显著降低 T1DM 患者 HbA1C 的水平,治疗 24 周后,每日 200、400 mg 剂量的索格列净可使 HbA1C 相比于基线分别降低 0.43%、0.49%。而安慰剂只能使 HbA1C 降低 0.08%。索格列净是同类产品中第一个同时抑制 SGLT1 和 SGLT2 的双靶点抑制剂^[38-39]。2019 年 4 月 26 日,索格列净获得欧洲药物管理局批准上市,成为第一个获批上市的 SGLT1/SGLT2 双靶点抑制剂。

近年研究发现,现有的 SGLT2 抑制剂除了能降血糖,还能降低心力衰竭的发生风险,减轻体重和保护肾脏^[40],这使得 SGLT2 抑制剂成为了具有开发潜力的降血糖药物,在糖尿病药物市场中占据了越来越大的份额。

2.3 处于研发阶段的 SGLT2 抑制剂

2.3.1 三唑类(见图 4) 1, 2, 3-取代和 1, 2, 4-取代的三唑类化合物是很多药物(例如抗病毒剂、抗过敏剂、抗 HIV 和抗菌剂)的核心结构。

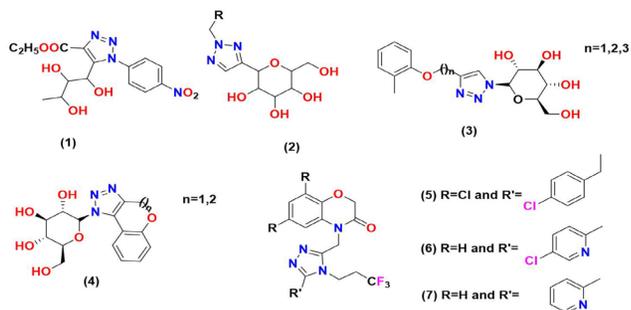


图 4 三唑类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 4 Chemical structure of triazole SGLT2 inhibitors

Putapatri 等^[41]设计并合成了葡萄糖苷类衍生物, 将 *L*-鼠李糖的 C-核苷与 1, 2, 3-三唑核偶联。使用葡萄糖摄取测定法(评估 SGLT1 和 SGLT2 抑制效果)对这些衍生物进行降血糖活性筛选, 结果发现对硝基苯基衍生物 **1** 对 SGLT2 具有抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $125.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Li 等^[42]使用“点击化学”的策略, 设计并合成一系列三唑类葡萄糖苷衍生物并评估了其对抗糖尿病的影响, 发现了含有三唑糖苷配基核心的 C-葡萄糖苷的化合物 **2** 具有良好的 SGLT2 抑制活性, 且几乎所有合成的三唑 C-葡萄糖苷均会增加尿葡萄糖排泄 (urinary glucose excretion, UGE), 但是尿量的增加都小于达格列净对照组。

Bai 等^[43]首次合成了一种新型的三唑 *N*-糖苷衍生物, 并测试了其对抗葡萄糖转运的抑制作用(以达格列净作对照)。实验结果表明, 将三唑部分与 *N*-葡萄糖苷或 *N*-半乳糖苷 **3** 和 **4** 相连的化合物显示出了很强的抑制活性。

Du 等^[44]合成了一种新的非根皮苷类的 SGLT2 抑制剂, 并进行了 SGLT 的相关活性测试。在对人的 SGLT2 进行筛选时, 发现化合物 **5** 是最有效的抑制剂 ($IC_{50} = 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。化合物 **5** 还对 SGLT1 表现出很好的选择性 ($IC_{50} = 9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 当在大鼠体内进行实验时, 观察到了较低的微粒体稳定性和较高的清除率。

该系列的 SAR 分析表明, 含有苯并恶嗪酮的化合物与芳环相连的结构显示 SGLT2 抑制剂有效; 通过在苯并恶嗪酮的 C-8 位上连接一些极性基团(如氰基或吡啶基团)合成的化合物 **6** ($IC_{50} = 3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶解度 = $1.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和化合物 **7** ($IC_{50} = 12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶解度 = $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与先导化合物 **5** 相比, 均表现出更好的抑制活性^[44]。

2.3.2 吲哚类(见图 5) 使用葡萄糖取代 *D*-木糖, 并在第三位引入吲哚基团, 得到的 *N*-吲哚

木糖苷类化合物, 表现出了很强的 SGLT2 抑制剂活性。此外, C-吲哚葡萄糖苷衍生物也被发现是良好的 SGLT2 抑制剂^[45]。

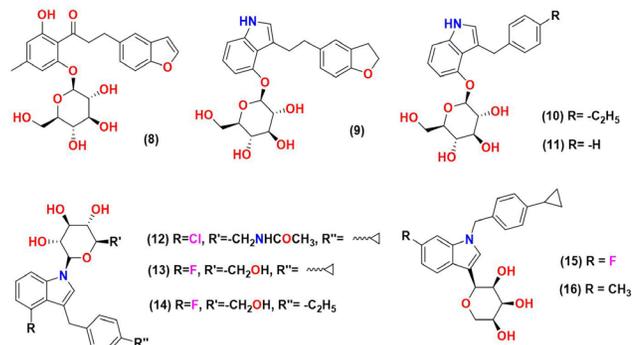


图 5 吲哚类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 5 Chemical structure of indole SGLT2 inhibitors

Zhang 等^[45]通过修饰先前报道的降血糖混合物 **8** 合成了一系列吲哚 *O*-和 *C*-葡萄糖苷化合物。通过对新化合物进行体外 SGLT1 和 SGLT2 的抑制活性测试, 筛选出了化合物 **9** 和 **10**, 分别是有效的 SGLT2 抑制剂和 SGLT1/SGLT2 双靶点抑制剂, 其具有促进 UGE 的功效。进一步测试了这两种化合物在 ZDF 雄性大鼠中的疗效, 发现这两种新抑制剂的药代动力学参数与化合物 **8** 相似, 但药效却显著降低。SAR 分析表明, 将化合物 **9** 中与 2, 3-二氢苯并呋喃部分的连接部分缩短得到的化合物 **11** 对 SGLT2 抑制活性减弱, 甚至消失; 而当 2, 3-二氢苯并呋喃部分被另一个芳香基团修饰后, 得到的化合物展现出较强的 SGLT2 抑制活性。该研究还表明, 异头氧(糖苷氧)的存在对于 SGLT 的抑制活性至关重要, 将其取代所得到的 C-葡萄糖苷类化合物的活性显著降低。

Chu 等^[46]合成了一系列 *N*-吲哚基葡萄糖苷化合物, 在以根皮苷为阳性对照的实验中测试了 SGLT2 的体外抑制活性。SAR 分析表明, 通过修饰 C₆-葡萄糖得到的化合物抗糖尿病活性明显升高。在筛选中发现 C₆ 位被酰胺修饰的化合物 **12** 具有优良的 SGLT2 (化合物 **12**, $EC_{50} = 42 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 根皮苷 $EC_{50} = 123 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制活性, 但对 SGLT1 (化合物 **12**, $EC_{50} = 1412 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 根皮苷, $EC_{50} = 153 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的选择性较差。

Li 等^[47]使用全新的方法合成了 *N*-糖苷吲哚类衍生物 **13**。在化合物 **13** 的基础上使用 F-C 反应进一步修饰得到了化合物 **14**。经测试, 这两个化合物均表现出了优良的 SGLT2 抑制活性。

Yao 等^[48]设计并合成了一系列吡啶基木糖苷衍生物。在实验中观察到含有 C-糖苷键的化合物不能被胃肠道葡萄糖苷酶水解,从而避免了胃肠道 (gastrointestinal tract, GIT) 对这一类化合物的清除,保持着较好的抑制活性。在研发新的 SGLT 抑制剂时,采用 D-木糖取代 C-葡萄糖苷中的葡萄糖合成了一系列的吡啶木糖衍生物,结果发现化合物 **15** 是最有效的 SGLT2 抑制剂 [SGLT2: $EC_{50} = (47 \pm 3) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT1: $EC_{50} = (282 \pm 11) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$]; 化合物 **16** 是最有效的 SGLT1 抑制剂 [SGLT2: $EC_{50} = (50 \pm 11) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT1: $EC_{50} = (55 \pm 5) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

SAR 研究表明,在环丙基苯基的对位连着吡啶的 N 时,对吡啶基团的 7 位进行修饰得到的化合物 **15** 和 **16** 表现出最好的抑制活性。体内研究表明,化合物 **15** 代谢稳定,清除率低,具有良好的降血糖活性 (与对照药物相比,化合物 **15** 使糖尿病大鼠血糖水平降低 35% 以上)^[48]。

2.3.3 噻吩类 (见图 6) Lee 等^[49]设计并合成了两种不同类型的含噻吩环的 C-芳基葡萄糖苷衍生物,并对其作为 SGLT2 抑制剂进行了活性评价。在这些衍生物中,发现化合物 **17** 是最有效的抑制剂,其 IC_{50} 值为 $4.47 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这一结果表明,当苄基第 4 位与烷基链相连时 (具有适当数量的碳原子) 得到的化合物表现出良好的体外 SGLT2 抑制活性。

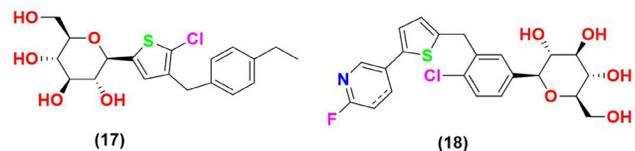


图 6 噻吩类 SGLT2 抑制剂化学结构
Fig 6 Chemical structure of thiophene SGLT2 inhibitors

Koga 等^[50]通过将卡格列净中的苯环替换为不同的部分,例如吡啶、噻吩和五元噻吩偶联杂芳烃,得到了一系列衍生物。在实验中发现化合物 **18** 活性最好,其对 SGLT2 ($IC_{50} = 2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 表现出很强的抑制活性 (卡格列净 $IC_{50} = 2.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.3.4 哒嗪类 (见图 7) Min 等^[51]设计并合成了具有哒嗪环的葡萄糖苷芳香族衍生物。在活性测试中发现化合物 **19** 和 **20** 具有明显的 SGLT2 抑制活性, IC_{50} 值分别为 11.4 和 $13.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,含有甲硫基的化合物 **20** 在正常 SD 大鼠体内表现出显著的 SGLT2 抑制活性。

2.3.5 噻唑和噻二唑类 (见图 8) Lee 等^[52]合成了一种含有呋喃基团的噻唑类化合物,该系列

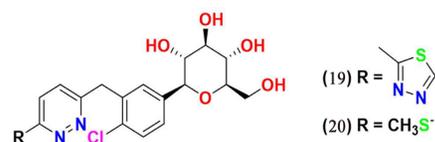


图 7 哒嗪类 SGLT2 抑制剂化学结构
Fig 7 Chemical structure of pyridazine SGLT2 inhibitors

化合物在体外的活性测试中表现出了纳摩尔级别的 SGLT2 抑制活性。筛选发现化合物 **21** 和 **22** 是最有效的 SGLT2 抑制剂, IC_{50} 值分别为 $0.934 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.797 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

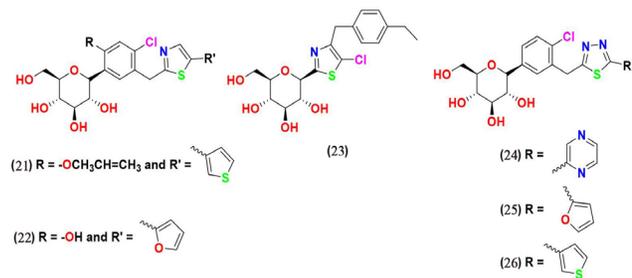


图 8 噻唑和噻二唑类 SGLT2 抑制剂化学结构
Fig 8 Chemical structure of thiazole and thiazadiazole SGLT2 inhibitors

Kang 等^[53]合成了一系列将噻唑环与 C-葡萄糖苷相连的噻唑类化合物,并且对噻唑的 C-4 或 C-5 位进行了卤素修饰。体外 SGLT2 抑制实验发现,苄基噻唑衍生物 **23** 具有显著的 SGLT2 抑制剂活性 (IC_{50} 值为 $121 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

除此之外,研究人员还设计并合成了一系列 1, 3, 4-噻二唑偶联的 C-芳基葡萄糖苷类化合物,并对其进行了 SGLT2 活性测试。其中化合物 **24** ~ **26** 对 SGLT2 的体外抑制活性较好, IC_{50} 值分别为 4.06、7.03 和 $3.51 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[54]。

SAR 分析表明,用 1, 3, 4-噻二唑取代达格列净末端的苯环得到的化合物降血糖活性消失,而 1, 3, 4-噻二唑环取代则增加了抗糖尿病活性。此外,噻二唑环上的线性脂肪链的取代使抗糖尿病活性下降,采用更大的基团取代时则导致抗糖尿病活性完全丧失。如果在苯环的 C-4' 位置引入类似卤素的亲脂性小取代基,则会使抗糖尿病活性提高。经过筛选得到的活性较好的化合物 (如含有吡嗪环的化合物 **24**、含有呋喃环的化合物 **25** 和含有噻吩环的化合物 **26**) 的共有结构是杂环,提示这种杂环对 SGLT2 的抑制活性很重要^[54]。

2.3.6 螺环类 (见图 9) Lv 等^[55]在 C-芳基葡萄糖苷的基础上,在邻位引入螺环合成了一系列新的化合物,并对该系列化合物进行了体外 SGLT1 和 SGLT2 活性测试。化合物 **27** 和 **28** 表现出了显著的体外活性,对 SGLT2 的 IC_{50} 值分别为 0.3 和

3.8 nmol·L⁻¹, 对 SGLT1 的 IC₅₀ 值分别为 3.1 和 0.7 nmol·L⁻¹, 化合物 27 对 SGLT2 选择性更高, 而化合物 28 对 SGLT1 表现出更好的选择性。测试结果显示, 当 B 环的 C-4 位置被氯取代的螺环修饰时表现出更好的抗糖尿病活性。

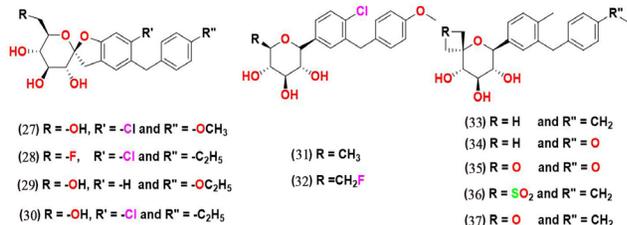


图 9 螺环类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 9 Chemical structure of spirocyclic SGLT2 inhibitors

Xu 等^[56]合成了一系列的 *O*-螺环-*C*-芳基葡萄糖苷化合物, 其中螺环基团连接到 *C*-芳基葡萄糖苷的 2' 和 6' 位置。以 1 μmol·L⁻¹ 为单一剂量测试了体外对 SGLT1 和 SGLT2 活性, 6'-*O*-螺环取代的 *C*-芳基糖苷衍生物对 SGLT2 抑制活性更好; 2'-*O*-螺环衍生物对此靶标没有显示出明显活性。两种 6'-*O*-螺环衍生物化合物 29 和 30 被筛选为有效的 SGLT2 抑制剂, IC₅₀ 值分别为 71 和 6.6 nmol·L⁻¹。SAR 表明, 苯环上 4' 位的取代基对 SGLT2 抑制活性至关重要, 4' 位没有取代的化合物 29 相比于 4' 位氯取代的化合物 30 表现出 10 倍以上的活性丧失。

Robinson 等^[57]制备了一系列 C-5 螺环衍生物, 通过评估其体外 SGLT2 抑制活性, 筛选出化合物 31 ~ 35, 其中化合物 33 和 35 在大鼠体内显示出良好的功效。

Mascitti 等^[58]合成了在吡喃糖环第 5 位被螺环修饰的 *C*-糖苷衍生物。通过评估这些衍生物对 SGLT1 和 SGLT2 的抑制活性和选择性, 得到了 SGLT2 抑制活性较好的化合物 36 ~ 37, IC₅₀ 值分别为 (6.6±2.5)、14 和 (3.4±0.8) nmol·L⁻¹。

2.3.7 苯基类 (见图 10) Xu 等^[59]合成了一系列在第二个碳原子上具有取代基的 *C*-芳基葡萄糖苷衍生物, 这些衍生物在体外细胞测试中展现出对 SGLT1 和 SGLT2 较好抑制活性。其中化合物 38 和 39 活性较好, 对 SGLT1 的 IC₅₀ 分别为 0.9、1.2 nmol·L⁻¹, 对 SGLT2 的 IC₅₀ 分别为 2、4.2 nmol·L⁻¹。化合物 38 在体外实验中表现出 7 倍于达格列净的 SGLT2 的抑制活性和 11 倍选择性。

SAR 表明, 与糖苷键相邻的苯环的第 2 个碳原子 (邻位) 上引入取代基不仅会增加 SGLT2 的抑制活性, 而且还会提高化合物对 SGLT2 的选择性^[59]。

Min 等^[60]设计并且合成了一类引入了大环结构的 *C*-芳基葡萄糖苷类 SGLT2 抑制剂。化合物 40、41 在体外实验中对 SGLT2 的抑制 IC₅₀ 值为 0.778 nmol·L⁻¹ 和 0.899 nmol·L⁻¹ [达格列净 IC₅₀ = (1.35±0.15) nmol·L⁻¹], 但在 SD 大鼠体内中仅表现出中等活性。

Li 课题组^[61]合成了一系列具有二氧杂双环的 *C*-芳基葡萄糖苷衍生物, 在体外测试了其对于 SGLT2 的抑制活性并筛选出了化合物 42, IC₅₀ 值为 700 nmol·L⁻¹。

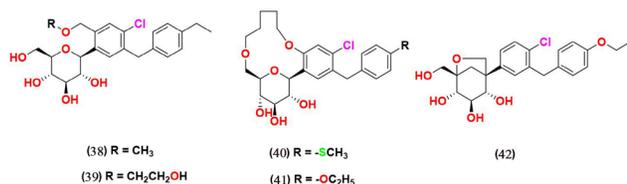


图 10 苯基类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 10 Chemical structure of phenyl SGLT2 inhibitors

2.3.8 萘类 (见图 11) Ikegai 等^[62]设计并合成了一系列将萘环连接到与糖部分直接相连的苯环上的化合物并且在体外评估其抗 SGLT1 和 SGLT2 活性。其中化合物 43 和 44 表现出对 SGLT2 良好的选择性和抑制活性 (IC₅₀ = 22 nmol·L⁻¹ 和 8.9 nmol·L⁻¹), 化合物 44 还在糖尿病大鼠和小鼠的体内测试中表现出较好的活性。SAR 分析表明, 邻位的羟基取代化合物 (化合物 44) 展现出对于 SGLT2 的更好的抑制活性。化合物 44 的单胆碱化合物 45 正在进行进一步的临床开发。

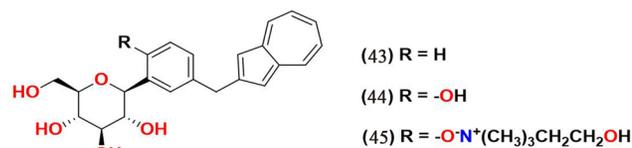


图 11 萘类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 11 Chemical structure of azulene SGLT2 inhibitors

2.3.9 异喹啉类 (见图 12) Pan 等^[63]合成了一系列将四氢异喹啉环引入到 *C*-芳基葡萄糖苷的化合物, 并在体外测试了其对于 SGLT2 的抑制活性。经筛选发现化合物 46 是最有效的 SGLT2 抑制剂, 可使 SGLT2 活性降低 81.7%, 具有与达格列净 (85.4%) 相近的抑制作用。

2.3.10 葡萄糖衍生物类 (见图 13) Chen 等^[64]报道了在 C-4 位具有双氟取代的达格列净衍生物的设计和合成, 与参考化合物达格列净 (IC₅₀ = 1.98 nmol·L⁻¹) 相比, 这一系列化合物在体外的 SGLT2 抑制活性评估中表现出很强的抑制活性

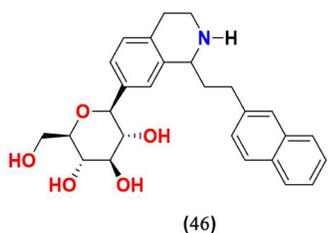


图 12 异喹啉类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 12 Chemical structure of isoquinoline SGLT2 inhibitors

($IC_{50} < 0.60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。其中化合物 47 是最有效的 SGLT2 抑制剂, IC_{50} 值为 $0.35 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SAR 分析表明吸电子基团(例如三氟甲基)的取代导致活性降低, 而达格列净的 C-4 位的双氟取代基则会明显提高 SGLT2 抑制活性。

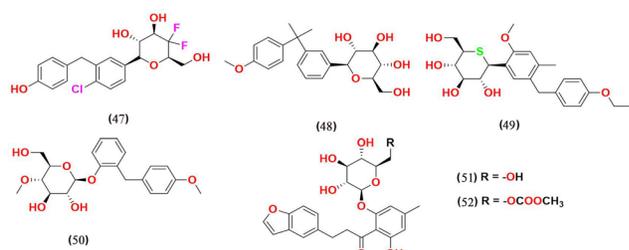


图 13 葡萄糖衍生物类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 13 Chemical structure of SGLT2 inhibitors of glucose derivatives

Wen 等^[65]报道了二甲基取代的 C-葡萄糖苷的合成, 并对其 SGLT2 抑制活性评估后得到了化合物 48, 在鼠中显示出良好的降血糖功效, 但其效力不如对照药物达格列净。

Kakinuma 等^[66]报道了一系列将芳环或吡喃环连接到硫原子取代的 D-葡萄糖的衍生物, 并在体外测试了其 SGLT1 和 SGLT2 的抑制活性, 筛选出化合物 49 为最有效的 SGLT2 抑制剂, IC_{50} 值为 $2.26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 选择性比 SGLT1 强 1650 倍。化合物 49 在接下来的体内测试中表现出较好的效果, 目前已经进入临床 II 期研究。

Cao 等^[67]报道了一系列全新的葡萄糖苷化合物。通过优化, 发现化合物 50 具有良好的药代动力学稳定性和良好的药效学效力。

Tsujihara 等^[68]设计并合成了一系列在 B 环上取代的 4'-脱羟基根皮苷的衍生物。研究发现, 在 4' 位上有一个小的烷基取代基可以提高这些衍生物的生物活性。测试中化合物 51 展现出了最优秀的抑制活性。对化合物 51 的前药化合物 52 在鼠中进行测试时观测到鼠高血糖症的缓解和血糖水平的降低。

2.3.11 非糖类(见图 14) Li 等^[69]通过高通量筛选, 得到了目标化合物 53, 使用中国仓鼠卵巢细胞

实验进行体外测试时, 发现其对 SGLT2 的 IC_{50} 值为 $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过对化合物 53 修饰合成了一系列含有苯并噻嗪酮和苯并恶嗪酮结构的化合物, 其中化合物 54 和 55 表现出较好的抑制活性。化合物 54 对 SGLT2 和 SGLT1 的 IC_{50} 值分别为 $0.009 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $9.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 化合物 55 的 IC_{50} 值分别为 $0.010 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

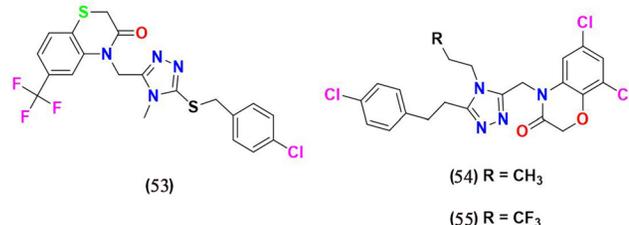


图 14 非糖类 SGLT2 抑制剂化学结构

Fig 14 Chemical structure of non-glucose SGLT2 inhibitors

3 结论

糖尿病及其并发症的危害较大, 只有通过有效的方法控制血糖, 才能减缓糖尿病的病情、减少并发症的出现。传统的降血糖药物只能在短期内控制患者的血糖, 不能达到长期治疗的目的。SGLT2 抑制剂以其独特的作用机制区别于其他传统的降血糖药物, 具有更好的治疗效果和更广阔的治疗范围。根皮苷是第一个被发现的具有 SGLT 抑制活性的天然产物, 但其选择性较差, 因此, 对其结构进行了大量的优化及改造, 得到了许多选择性高、活性好、不良反应少的 SGLT2 抑制剂。

随着对糖尿病深入的研究和探索, 国内外越来越多的 SGLT2 抑制剂进入临床研究中, 如葛兰素史克公司的 Remogliflozin^[70]、Theracos 的 Bexagliflozin^[71] 以及恒瑞公司的 Henegliflozin^[72]。与此同时, SGLT2 晶体结构的发现对新型选择性 SGLT2 抑制剂的研究具有重要意义。

参考文献

- [1] Boussageon R, Roustit M, Gueyffier F, et al. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2018, 391 (10127): 1261-1262.
- [2] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.
- [3] Scully T, Ettela A, Leroith D, et al. Obesity, type 2 diabetes, and cancer risk [J]. Front Oncol, 2021, 10: 615375.
- [4] Wong ND, Hsu A, Rozanski A, et al. Sex differences in coronary artery calcium and mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in adults

- with diabetes: The coronary calcium consortium [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43 (10): 2597-2606.
- [5] Aguillon AR, Mascarello A, Segretti ND, et al. Synthetic Strategies toward SGLT2 Inhibitors [J]. *Org Process Res Dev*, 2018, 22: 467-488.
- [6] Hill NE, Oliver NS. Evolving type 1 diabetes in distinguishing between type 1 and type 2 diabetes [J]. *BMJ*, 2020, 370: m3772.
- [7] Tian S, Wu J, Liu JS, et al. Type 2 diabetes [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172 (10): 704-705.
- [8] 李慧芳. 糖尿病患者药物治疗的研究进展 [J]. *医疗装备*, 2019, 32 (18): 194-195.
- [9] Kshirsagar RP, Kulkarni AA, Chouthe RS, et al. SGLT inhibitors as antidiabetic agents: A comprehensive review [J]. *RSC Advances*, 2020, 10 (3): 1733-1756.
- [10] Seino S. Cell signalling in insulin secretion: The molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea [J]. *Diabetologia*, 2012, 55 (8): 2096-2108.
- [11] Madsbad S. Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-1 receptor agonists [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18 (4): 317-332.
- [12] Flory J, Lipska K. Metformin in 2019 [J]. *JAMA*, 2019, 321 (19): 1926-1927.
- [13] Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 549627.
- [14] Usman B, Sharma N, Satija S, et al. Recent developments in alpha-glucosidase inhibitors for management of type-2 diabetes: An Update [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25 (23): 2510-2525.
- [15] Neumiller JJ, White JR, Campbell RK. Sodium-glucose co-transport inhibitors progress and therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2010, 70 (4): 377-385.
- [16] Idris I, Donnelly R. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: an emerging new class of oral antidiabetic drug [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11 (2): 79-88.
- [17] Petersen C. Analyse des phloridzins [J]. *Eur J Org Chem*, 2006, 15 (2): 178.
- [18] Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, et al. Phlorizin: A review [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005, 21 (1): 31-38.
- [19] Dardi I, Kouvatso T, Jabbour SA. SGLT2 inhibitors [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101: 27-39.
- [20] Takeno A, Kanazawa I, Tanaka KI, et al. Phloretin suppresses bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastogenesis and mineralization via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinases/akt pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10): 2481.
- [21] Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (2): 499-508.
- [22] Oku A, Ueta K, Arakawa K, et al. T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes [J]. *Diabetes*, 1999, 48 (9): 1794-1800.
- [23] Nomura S, Sakamaki S, Hongu M, et al. Discovery of canagliflozin, a novel C-glucoside with thiophene ring, as sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Med Chem*, 2010, 53 (17): 6355-6360.
- [24] Fujita Y, Inagaki N. Renal sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a novel therapeutic approach to treatment of type 2 diabetes: Clinical data and mechanism of action [J]. *J Diabetes Investig*, 2014, 5 (3): 265-275.
- [25] Wilding J, Charpentier G, Hollander P, et al. Efficacy and safety of canagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with metformin and sulphonylurea: A randomised trial [J]. *Int J Clin Pract*, 2013, 67 (12): 1267-1282.
- [26] Taylor SI, Blau JE, Rother KI. SGLT2 Inhibitors may predispose to ketoacidosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100 (8): 2849-2852.
- [27] Thomas L, Grempler R, Eckhardt M, et al. Long-term treatment with empagliflozin, a novel, potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control and features of metabolic syndrome in diabetic rats [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2012, 14 (1): 94-96.
- [28] Rosenstock J, Jelaska A, Zeller C, et al. Impact of empagliflozin added on to basal insulin in type 2 diabetes inadequately controlled on basal insulin: A 78-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17 (10): 936-948.
- [29] Ferrannini E, Ramos SJ, Salsali A, et al. Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 (10): 2217-2224.
- [30] Takasu T, Yokono M, Tahara A, et al. In vitro pharmacological profile of ipragliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42 (3): 507-511.
- [31] Poole RM, Dungo RT. Ipragliflozin: First global approval [J]. *Drugs*, 2014, 74 (5): 611-617.
- [32] Poole RM, Prossler JE. Tofogliflozin: First global approval [J]. *Drugs*, 2014, 74 (8): 939-944.
- [33] Aharon-Hananel G, Raz I. An evaluation of the efficacy and safety of Tofogliflozin for the treatment of type II diabetes [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20 (7): 781-790.
- [34] Suzuki M, Honda K, Fukazawa M, et al. Tofogliflozin, a potent and highly specific sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor, improves glycemic control in diabetic rats and mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341 (3):

- 692-701.
- [35] Yabe D, Hamamoto Y, Seino Y, et al. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitor luseogliflozin in the management of type 2 diabetes: A drug safety evaluation [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16 (10): 1211-1218.
- [36] Markham A. Ertugliflozin: First global approval [J]. *Drugs*, 2018, 78 (4): 513-519.
- [37] Amin NB, Wang X, Jain SM, et al. Dose-ranging efficacy and safety study of ertugliflozin, a sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, in patients with type 2 diabetes on a background of metformin [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17 (6): 591-598.
- [38] Sands AT, Zambrowicz BP, Rosenstock J, et al. Sotagliflozin, a dual SGLT-1 and SGLT-2 inhibitor, as adjunct therapy to insulin in type 1 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38 (7): 1181-1188.
- [39] Markham A, Keam SJ. Sotagliflozin: First global approval [J]. *Drugs*, 2019, 79 (9): 1023-1029.
- [40] Georgianos PI, Vaios V, Dounousi E, et al. Mechanisms for cardiorenal protection of SGLT-2 inhibitors [J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27 (8): 1043-1050.
- [41] Putapatri SR, Kanwal A, Sridhar B, et al. Correction: Synthesis of l-rhamnose derived chiral bicyclic triazoles as novel sodium-glucose transporter (SGLT) inhibitors [J]. *Org Biomol Chem*, 2017, 15 (28): 6057.
- [42] Li LT, Zhou LF, Li YJ, et al. Facile synthesis of 1, 2, 3-triazole analogs of SGLT-2 inhibitors by 'click chemistry' [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22 (1): 642-644.
- [43] Bai ST, Xiong DC, Niu YH, et al. Synthesis of novel *N*-glycoside derivatives via CuSCN-catalyzed reactions and their SGLT2 inhibition activities [J]. *Tetrahedron*, 2015, 71 (30): 4909-4919.
- [44] Du X, Lizarzaburu M, Turcotte S, et al. Optimization of triazoles as novel and potent nonphlorizin SGLT-2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21 (12): 3774-3779.
- [45] Zhang X, Urbanski M, Patel M, et al. Indole-glucosides as novel sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors. Part 2 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16 (6): 1696-1701.
- [46] Chu KF, Yao CH, Song JS, et al. *N*-Indolyglycosides bearing modifications at the glucose C6-position as sodium-dependent glucose co-transporter 2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24 (10): 2242-2250.
- [47] Li X, Wells KM, Branum S, et al. An Efficient synthesis of 3-substituted *N*-glycoside indoles useful as sodium-dependent glucose transporter inhibitors [J]. *Org. Process Res Dev*, 2012, 16 (11): 1727-1732.
- [48] Yao CH, Song JS, Chen CT, et al. Synthesis and biological evaluation of novel *C*-indolyxylosides as sodium-dependent glucose co-transporter 2 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 55: 32-38.
- [49] Lee SH, Song KS, Kim JY, et al. Novel thiophenyl *C*-aryl glucoside SGLT2 inhibitors as potential antidiabetic agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19 (19): 5813-5832.
- [50] Koga Y, Sakamaki S, Hongu M, et al. *C*-Glucosides with heteroaryl thiophene as novel sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21 (17): 5561-5572.
- [51] Min JK, Lee J, Kang SY, et al. Novel *C*-aryl glucoside SGLT-2 inhibitors as potential antidiabetic agents: Pyridazinylmethylphenyl glucoside congeners [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20 (11): 3420-3425.
- [52] Lee SH, Min JK, Lee SH, et al. Thiazolylmethyl ortho-substituted phenyl glucoside library as novel *C*-aryl glucoside SGLT2 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46 (7): 2662-2675.
- [53] Kang SY, Song KS, Lee J, et al. Synthesis of pyridazine and thiazole analogs as SGLT2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18 (16): 6069-6079.
- [54] Lee J, Lee SH, Seo HJ, et al. Novel *C*-aryl glucoside SGLT2 inhibitors as potential antidiabetic agents: 1, 3, 4-Thiadiazolylmethylphenyl glucoside congeners-ScienceDirect [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18 (6): 2178-2194.
- [55] Lv B, Xu B, Feng Y, et al. Exploration of *O*-spiroketal *C*-arylglucosides as novel and selective renal sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19 (24): 6877-6881.
- [56] Xu B, Lv B, Yan F, et al. *O*-Spiro *C*-aryl glucosides as novel sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19 (19): 5632-5635.
- [57] Robinson RP, Mascitti V, Boustany-Kari CM, et al. *C*-aryl glycoside inhibitors of SGLT2: Exploration of sugar modifications including *C*-5 spirocyclization [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20 (5): 1569-1572.
- [58] Mascitti V, Robinson RP, Prévile C, et al. Syntheses of *C*-5-spirocyclic *C*-glycoside SGLT2 inhibitors [J]. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51 (14): 1880-1883.
- [59] Xu B, Feng Y, Lv B, et al. Ortho-Substituted *C*-aryl glucosides as highly potent and selective renal sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18 (12): 4422-4432.
- [60] Min JK, Lee SH, Park SO, et al. Novel macrocyclic *C*-aryl glucoside SGLT-2 inhibitors as potential antidiabetic agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19 (18): 5468-5479.
- [61] Yan Q, Ding N, Li Y. Synthesis and biological evaluation of novel dioxo-bicycle *C*-aryl glucosides as SGLT2 inhibitors [J]. *Carbohydr Res*, 2016, 421: 1-8.
- [62] Ikegai K, Imamura M, Suzuki T, et al. Synthesis and biological evaluation of *C*-glucosides with azulene rings as selective SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Discovery of YM543 [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21 (13): 3934-3948.

- [63] Pan X, Huan Y, Shen Z, et al. Synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroisoquinoline-C-aryl glucosides as SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 114: 89-100.
- [64] Chen ZH, Wang RW, Qing FL, et al. Synthesis and biological evaluation of SGLT-2 inhibitors: Gem-difluoromethylenated dapagliflozin analogs [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53 (17): 2171-2176.
- [65] Wen JZ, Yong HS, Gui LZ, et al. Design, synthesis and in vivo anti-hyperglycemic activity of gem-dimethyl-bearing C-glucosides as SGLT2 inhibitors [J]. *Chin Chem Lett*, 2011, 10: 1215-1218.
- [66] Kakinuma H, Oi T, Hashimoto-tsuchiya Y, et al. (1S)-1, 5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methyl phenyl]-1-thio-D-glucitol (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitor for type 2 diabetes treatment [J]. *J Med Chem*, 2010, 53 (8): 3247-3261.
- [67] Cao X, Zhang W, Yan X, et al. Modification on the O-glucoside of sergliflozin-A: A new strategy for SGLT2 inhibitor design [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26 (9): 2170-2173.
- [68] Tsujihara K, Hongu M, Saito K, et al. Na⁺-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxy-phlorizin derivatives substituted on the B ring [J]. *J Med Chem*, 1999, 42 (26): 5311-5324.
- [69] Li AR, Jian Z, Greenberg J, et al. Discovery of non-glucoside SGLT2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21 (8): 2472-2475.
- [70] Markham A. Remogliflozin etabonate: First global approval [J]. *Drugs*, 2019, 79 (10): 1157-1161.
- [71] Azzam O, Carnagarin R, Lugo-Gavidia LM, et al. Bexagliflozin for type 2 diabetes: An overview of the data [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1959915>.
- [72] Weng J, Zeng L, Zhang Y, et al. Henagliflozin as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin: A multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2021, 23 (8): 1754-1764. (收稿日期: 2021-07-06; 修回日期: 2021-08-18)

SGLT1/2 双靶点抑制剂的研究进展

杨中兴¹, 贺岩², 杨龙¹, 陈建超^{1*}, 孙铁民^{1*} (1. 沈阳药科大学基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室制药工程学院, 沈阳 110016; 2. 北部战区总医院药剂科, 沈阳 110840)

摘要: 糖尿病是因胰腺产生不了足够的胰岛素或者人体无法有效地利用所产生的胰岛素时, 而产生的慢性疾病。钠-葡萄糖协同转运蛋白 (SGLTs) 是跨细胞膜吸收葡萄糖的重要转运蛋白, 其亚型 SGLT1 和 SGLT2 分别对胃肠道和肾脏吸收葡萄糖起着关键作用, SGLTs 抑制剂是一类新型降糖药物。SGLT1/2 双靶点抑制剂, 通过对 SGLT1 与 SGLT2 的抑制, 能减少肠道中的葡萄糖吸收, 增加肾脏的尿葡萄糖排泄, 从而有效控制血糖。近几年针对 SGLT1/2 双靶点抑制剂的研究日益增多, 本文拟对其研究进展进行综述。

关键词: 糖尿病; SGLT1; SGLT2; SGLT1/2 双靶点; 抑制剂

中图分类号: R977.1, R587.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1776-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.003

Research progress in SGLT1/2 dual-target inhibitors

YANG Zhong-xing¹, HE Yan², YANG Long¹, CHEN Jian-chao^{1*}, SUN Tie-min^{1*} (1. *Innovation Laboratory of Drug Research and Design, Shenyang Pharmaceutical University, Ministry of Education, Shenyang 110016*; 2. *Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840*)

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No. 2020LJC06)。

作者简介: 杨中兴, 男, 硕士研究生, 主要从事药物合成研究, E-mail: 2411072555@qq.com *通信作者: 陈建超, 男, 博士, 主要从事药物合成研究, E-mail: chenjianchaosyphu@163.com; 孙铁民, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物合成和半合成、手性药物合成以及抗病毒药物的合成研究, E-mail: suntiemini@126.com

Abstract: Diabetes is a chronic disease that occurs either when the pancreas does not produce enough insulin or when the body cannot effectively use the insulin it produces. Sodium-glucose cotransporters (SGLTs) are important transporters for the absorption of glucose across the cell membranes. Subtypes SGLT1 and SGLT2 play a key role in the absorption of glucose in the kidney and gastrointestinal tract. SGLTs inhibitors are a new type of hypoglycemic drugs. SGLT1/2 dual-target inhibitors can effectively control the blood glucose by inhibiting the SGLT1 and SGLT2 targets, reducing glucose absorption in the intestine and increasing urinary glucose excretion in the kidney. In recent years, the research on SGLT1/2 dual-target inhibitors has been increasing rapidly. This article mainly reviewed the research progress in SGLT1/2 dual-target inhibitors.

Key words: diabetes; SGLT1; SGLT2; SGLT1/2 dual-target; inhibitor

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,特征为患者的血糖长期高于标准值。当胰腺产生不了足够的胰岛素或者人体无法有效地利用所产生的胰岛素时,就会出现糖尿病。糖尿病主要分为 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 和 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM), T1DM 好发于青少年,主要是因为胰岛 β 细胞产生胰岛素不足导致的,有明显的临床症状,例如多饮、多尿、多食等^[1]。T2DM 主要发生在中老年人中,比 T1DM 更加常见,约占糖尿病的 90%~95%,主要是由于胰岛素抵抗(胰岛素调控葡萄糖代谢能力)或胰岛素分泌不足导致,一般无明显的临床症状^[2]。随着时间的延长,糖尿病会严重损害人体的心脏、血管、神经等健康系统。根据国际糖尿病协会预测,至 2030 年全球成人糖尿病数量将增加至 5.52 亿,每年花费将近 8250 亿美元,已成为全球威胁人类健康的三大慢性非传染性疾病之一^[3-5]。

目前,已有众多药物可以用于糖尿病治疗,如胰岛素类似物、双胍类、磺酰脲类、格列奈类^[6]。然而,传统降糖药物存在一些不良反应,如胰岛素类、磺酰脲类、格列奈类药物使用不当会引起低血压,双胍类药物易引起乳酸性酸中毒等^[7]。这些不良反应均会影响糖尿病的治疗,因此迫切需要开发新型降糖药物来满足患者的需要。

钠-葡萄糖协同转运蛋白(sodium-glucose cotransporters, SGLTs)是一类在小肠和肾脏中表达的葡萄糖转运蛋白,其主要功能是介导葡萄糖的跨膜运输,已被美国食品和药品监督管理局批准为一类新型降糖药物,受到了各界广泛关注^[8]。目前,人体已发现 6 种 SGLT 亚型,分别为 SGLT1、SGLT2、SGLT3、SGLT4、SGLT5、SGLT6^[9]。其中,对 SGLT1 与 SGLT2 两种亚型研究较深(见图 1)。SGLT1 主要表达于小肠刷状缘和肾近曲小管的 S2、S3 节段中,负责在肠腔中转运葡萄糖,重吸收肾近曲小管未被 SGLT2 重吸收的 10% 葡

糖^[10]。SGLT2 主要分布在肾近曲小管 S1 部位,完成约 90% 葡萄糖的重吸收^[11]。SGLT1 和 SGLT2 的共同作用使尿液中的葡萄糖含量较少,若抑制 SGLT1 和 SGLT2 靶点,则可以减少小肠、肾脏对葡萄糖的重吸收,使过量的葡萄糖可以通过尿液排出体外,从而达到降低葡萄糖阈值效果。

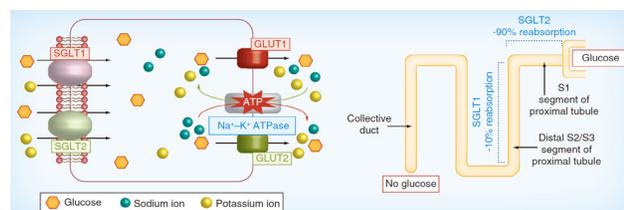


图 1 SGLT1 和 SGLT2 在肾单位中的位置和分布及其重吸收能力

Fig 1 Location and distribution of SGLT1 and SGLT2 in the nephron and its reabsorption capacity

SGLTs 的研究发现,通过抑制肠道和/或肾脏葡萄糖重吸收来降低高血糖是一种有吸引力的治疗策略。若对 SGLT1/2 多靶点进行双重抑制,既能够抑制 SGLT1 而延缓肠道葡萄糖吸收,又可以抑制 SGLT2 而增加葡萄糖的排出,从而有效地降低血糖水平。本文拟对该类新型抗糖尿病药物的研究进展进行综述。

1 SGLT1 与 SGLT2 转运机制

葡萄糖在人体肾脏中的吸收和重吸收转运体主要分为两类,即葡萄糖转运蛋白(glucose transporters, GLUTs)和 SGLTs。GLUTs 以易化扩散的方式转运葡萄糖, SGLTs 则以主动运输的方式转运葡萄糖^[12]。

1.1 SGLT1 在肠道介导的葡萄糖吸收

SGLT1 在小肠刷状缘的上皮细胞膜中表达,主要功能为将肠道中的葡萄糖与半乳糖从内腔向上皮细胞转运,之后由 GLUT2 介导的葡萄糖经基底外侧膜转运进入血液,从而进入体循环^[13]。对 SGLT1 基因敲除小鼠的临床研究发现,餐后胃肠道会释放胰高血糖素样肽(GLP-1)和抑胃肽

(GIP), 刺激胰岛 β 细胞增加胰岛素的释放, 进一步促进降糖作用^[14]。SGLT1 抑制剂可以通过抑制肠道中的 SGLT1 减少肠道中葡萄糖的重吸收, 以及诱导胰岛素分泌刺激因子的释放, 促进葡萄糖向远端位置的输送, 从而维持葡萄糖的稳态。

1.2 SGLT1 与 SGLT2 在肾脏介导的葡萄糖吸收

在肾脏中, 葡萄糖则是由 SGLT1 与 SGLT2 共同作用, 其主要区别为 SGLT2 为低亲和力、高转运的转运蛋白, 在肾近曲小管的近端 (S1、S2 片段) 中表达, 可以对约 90% 的葡萄糖进行重吸收^[15-16]。而 SGLT1 则是高亲和力、低转运的转运蛋白, 也可以在肾近曲小管的远端 (S2、S3 片段) 中表达, 吸收剩余 10% 的葡萄糖^[17]。其机制主要为细胞外高浓度的 Na^+ 与 SGLT1 负电荷位点结合, 再与葡萄糖结合, 形成 Na^+ -载体-葡萄糖复合物, 顺 Na^+ 的浓度梯度进入细胞后, 在细胞内, SGLT1 与葡萄糖和 Na^+ 分离, 使 SGLT1 还原到原始构象状态, 重新暴露其表面结合位点, 以便再次与葡萄糖结合。 Na^+ 不断被细胞侧基底膜的 Na^+/K^+ -ATP 泵泵出, 维持细胞内 Na^+ 浓度与胞外浓度差值, 这种电位差产生的能量使葡萄糖逆浓度被转运到细胞内。细胞内的葡萄糖则由位于侧基底膜的载体 GLUT2, 经易化扩散转运进入到组织间隙液。SGLT2 则是结合一分子的葡萄糖, 一分子的 Na^+ , 形成 Na^+ -载体-葡萄糖复合物, 进入到细胞中 (见图 2)。

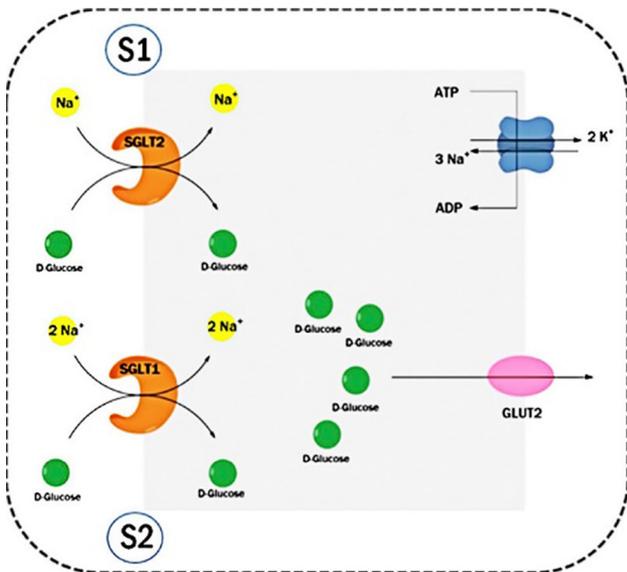


图 2 SGLT1 和 SGLT2 转运葡萄糖机制

Fig 2 SGLT1 and SGLT2 transport glucose mechanism

1.3 SGLT 抑制剂的开发

近年来已开发了多种 SGLT 选择性抑制剂, 从第一个 SGLT2 选择性抑制剂——达格列净上

市以来, 随后多个 SGLT2 选择性抑制剂相继上市 (见表 1)^[18]。它们对 SGLT2 选择性较高, 对 SGLT1 选择性较差。关于选择性抑制剂 SGLT1, Mizagliflozin 是目前最具选择性的一种, 对 SGLT1 的选择性是 SGLT2 的 300 倍^[19]。并且 Mizagliflozin 被认为是不可吸收的肠道 SGLT1 特异性抑制剂, 显示出极低的生物利用度 ($F = 0.02\%$), 而在组织中没有任何明显的积累。由于 Mizagliflozin 能增加腔内葡萄糖和水含量的能力, 目前的临床试验正在研究使用其作为改善功能性便秘的候选药物。此外, 新开发的化合物 TP043883625, 也是不可吸收的 SGLT1 抑制剂, 在啮齿动物的口服葡萄糖耐量试验中, 显著降低了血糖波动^[20]。

SGLT1 选择性抑制剂通过对 SGLT1 的抑制有助于降低心力衰竭的发生, 对左心室肥厚和纤维化也起着重要作用^[21]。但因具有过强的降血糖作用, 不仅对肾脏远端、肾近端小管有抑制作用, 也抑制了肠中葡萄糖的吸收和促进了尿葡萄糖的排泄, 从而引起低血糖症等一些不良反应。

SGLT2 抑制剂可增强尿糖排泄来控制患者血糖水平, 改善心力衰竭或慢性肾病的效果^[22-23]。还有降低血压、调血脂、减重等疗效, 并且不会发生低血糖的风险, 但是 SGLT2 抑制剂却有一些常见的不良反应, 如泌尿生殖道感染、酮症酸中毒等^[24-26]。因此研究人员正在探索减少 SGLTs 抑制剂不良反应的新方法。

从代谢角度来看, 在正常情况下, 单独抑制 SGLT1 的尿糖排泄效果较低。然而, 当葡萄糖含量增加, 或者肾小管前端 SGLT2 被抑制, 大量的葡萄糖则会向远端运输, SGLT1 对葡萄糖的重吸收比例则会增加到 40% ~ 50%, 起到补偿作用的效果^[27-28]。而对 SGLT1/2 双靶点进行抑制, 则可将更多的葡萄糖通过尿液排出体外, 从而达到更好的降糖效果。故此, 对 SGLT1/2 双靶点抑制剂的研究开发具有较好的应用前景。

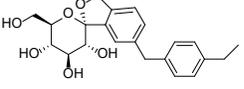
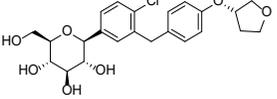
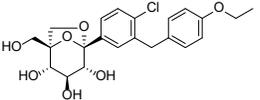
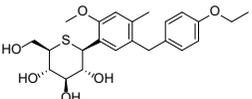
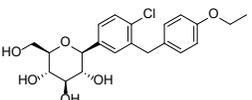
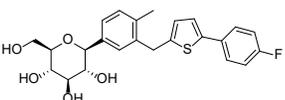
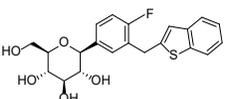
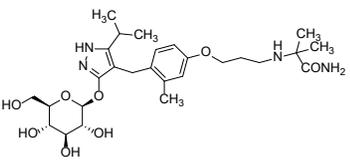
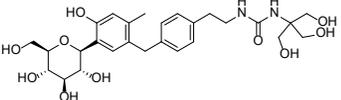
2 SGLT1/2 双重抑制剂研究进展

2.1 O-葡萄糖苷类

根皮苷 (phlorizin, 结构式见图 3) 是从苹果树的根皮中分离出来的第一个 SGLTs 抑制剂, 随后发现其是 SGLT1 和 SGLT2 的非选择性抑制剂^[29]。研究表明服用 1.0 g 以上的根皮苷会导致尿葡萄糖排泄 (urinary glucose excretion, UGE), 使空腹和进食的血浆葡萄糖水平趋于正常^[30]。但因为根皮苷在肠道吸收差、生物利用度低以及被体内的 β -葡萄糖苷酶降解为根皮素 (phloretin, 结

表 1 SGLT2 上市药物及其 SGLT1 抑制剂的研发

Tab 1 SGLT2 listed drugs and development of SGLT1 inhibitors

化合物	化学结构	SGLT1 IC_{50} / (nmol · L ⁻¹)	SGLT2 IC_{50} / (nmol · L ⁻¹)	选择性 (SGLT2 vs SGLT1)
Tofogliflozin		~ 8400	~ 2.9	2900
Empagliflozin		~ 8300	~ 3.1	2700
Ertugliflozin		~ 1960	~ 0.9	2200
Luseogliflozin		~ 4071	~ 2.3	1770
Dapagliflozin		~ 1400	~ 1.2	1200
Canagliflozin		~ 710	~ 2.7	260
Ipragliflozin		~ 1875	~ 7.5	250
Mizagliflozin		~ 27	~ 8170	0.003
TP043883625		~ 7	~ 28	0.25

构式见图 3), 阻碍了药物吸收到各组织中, 故尚未进一步发展为抗糖尿病治疗药物。需要寻找发现更多的根皮苷衍生物, 改善生物利用度差、容易被降解代谢失活等缺点。

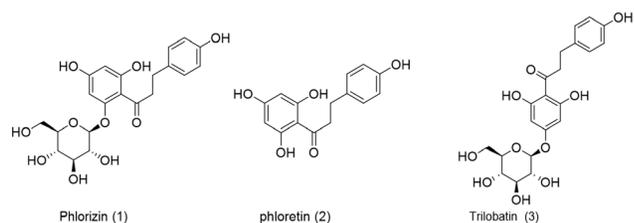


图 3 根皮苷、根皮素和三叶苷的化学结构

Fig 3 Structure of phlorizin, phloretin and trilobatin

Wang 等^[31]发现了根皮苷的异构体三叶苷 (Trilobatin) 也是一种 O-葡萄糖苷类 SGLT1/2 双靶点抑制剂, 可明显地减少体内葡萄糖的吸收 (结构式见图 3)。为了研究三叶苷对 SGLT1/2 的选择性,

课题组将三叶苷以相同的方式与 SGLT1 和 SGLT2 进行了分子对接 (见图 4)。结果发现, 三叶苷与 SGLT1 的相互作用和与 SGLT2 的相互作用相似, 结合位点处有许多相似的氨基酸残基, 表明三叶苷对 SGLT1 和 SGLT2 没有选择性。此外国内外的一些研究表明, SGLTs 抑制剂可减少肿瘤细胞中葡萄糖的摄取, 从而发挥抗肿瘤细胞增殖活性, 根皮苷也显示出对大鼠肿瘤细胞显著的抗增殖特性^[32-33]。根据根皮苷抗增殖特性, 课题组对三叶苷的抗肿瘤作用进行了研究。实验观察到使用高浓度 (超过 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的三叶苷促进了人肝母细胞瘤细胞 (HepG2) 的增殖, 细胞的数量增加了 35%, 选择性地诱导了人肝母细胞瘤细胞的增殖, 表明了三叶苷对 HepG2 并没有抗增殖的特性。提示并非所有的 SGLTs 抑制剂都能抑制肿瘤细胞的增殖, 需要进一步研究, 评估新型降糖药物的抗肿瘤潜力。

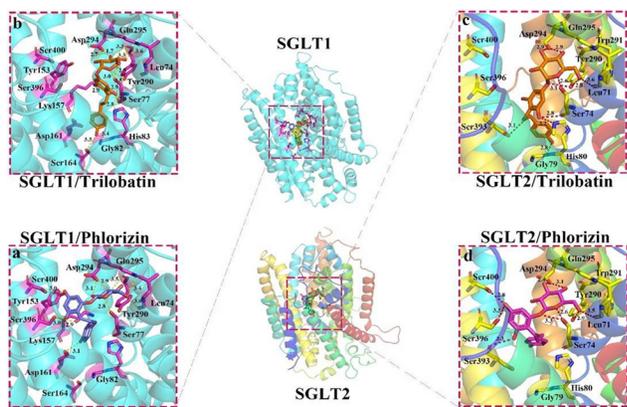


图 4 三叶苷和根皮苷与 SGLT1 和 SGLT2 的相互作用

Fig 4 Interaction of trilobatin and phlorizin with SGLT1 and SGLT2

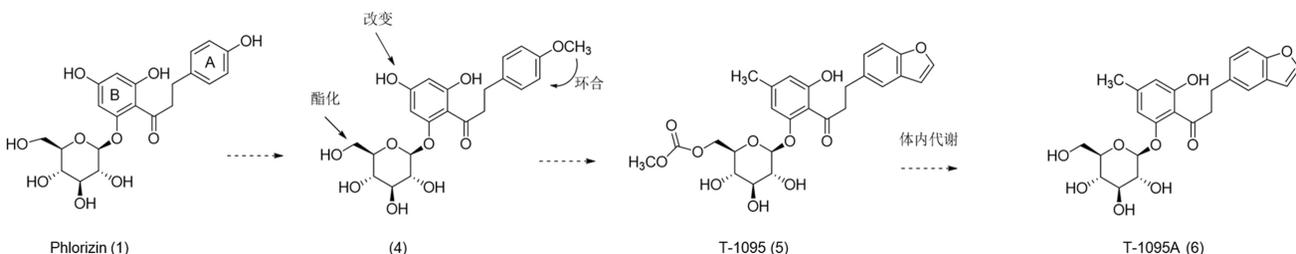


图 5 以根皮苷为先导化合物的结构改造

Fig 5 Structural modification with phlorizin as the leading compound

Oku 等^[36]对 T-1095 进行了代谢方面的研究, T-1095 通过口服吸收进入循环系统, 被代谢为活性形式 T-1095A, 抑制肾脏中 SGLTs 的活性, 增加糖尿病动物的尿葡萄糖排泄, 从而降低血糖水平。研究发现 T-1095A 的抑制活性 (SGLT1: $IC_{50} = 0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT2: $IC_{50} = 0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与根皮苷的抑制活性 (SGLT1: $IC_{50} = 0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT2: $IC_{50} = 0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相当, 但 T-1095A 的活性却是 T-1095 (SGLT1: $IC_{50} = 22.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT2: $IC_{50} = 2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 6 ~ 120 倍。尽管化合物 T-1095A 活性较好, 但是仍然没有克服 O-葡萄糖苷类似物药代动力学不稳定的缺陷, 无法成药。

Frick 等^[37-38]在专利中报道了一类新的杂环氟糖苷衍生物 SGLT1/2 抑制剂 (7) (结构式见图 6), 并对此结构进行了改造。在研究中发现, 在六元糖环的 C5 位有氟原子的取代效果较优, 并对中心的杂环选取了噻吩、呋喃、吡咯、吡啶等进行了研究, 发现吡啶环对其活性较好。之后对取代基 R_1 和 R_2 改造, R_1 选取了羟基、三氟甲基、甲基、氢原子等, R_2 选取了甲氧基、卤素、乙基、甲基等, 发现当 R_1 为三氟甲基, R_2 为甲氧基时活性较好, 最终合成了化合物 SAR-7226, 对人的 SGLT1/2 的 IC_{50} 分别为 0.029 、 $0.088 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[39]。

2.2 C-葡萄糖苷类

Tsujihara 等^[34]以根皮苷为先导化合物, 进行结构改造, 六元糖环和两个苯环之间的连接基团是必须的, 把 A 环酚羟基甲基化得到化合物 4 (见图 5), 对 SGLTs 仍有一定活性。之后用苯并呋喃环代替了 A 环, B 环引入甲基发现活性较好。为了克服消化道中 β -葡萄糖苷酶对化合物的水解, 将六元糖环上的羟甲基酯化, 进一步改善药物在体内的活性并且增加对 β -葡萄糖苷酶的稳定性, 基于此设计想法, 得到了 SGLT1/2 双靶点抑制的前药衍生物 (T-1095), 其在体内可代谢为 T-1095A^[35] (见图 5)。



图 6 杂环氟糖苷衍生物的结构改造

Fig 6 Structural modification of heterocyclic fluoroglycoside derivatives

除了常见的氧-糖苷, 碳-糖苷结构在生物活性方面也具有较多的优点, 比如氧-糖苷具有更高的稳定性, 在体内不易被水解酶降解等, 因此碳-糖苷成为结构优化的有效策略。

Lexicon 制药公司以碳-糖苷为结构基础, 研发出了化合物 LP-925219 (结构式见图 7), 此化合物是小鼠 SGLT1/2 的有效抑制剂, 其 IC_{50} 值分别为 22.6 、 $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[40]。通过分别给野生型 (WT) 小鼠, SGLT1 基因敲除、SGLT2 基因敲除和 SGLT1/2 基因双敲除的小鼠饲喂 LP-925219 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 并检测其 24 h 的尿糖排泄。结果发现, SGLT1/2 基因双敲除的小鼠 UGE 是最大的, SGLT2 基因敲除、SGLT1 基因敲除和 WT 小鼠分别是 SGLT1/2 基因双敲除小鼠 UGE 的 30%、2% 和 0.2%。每日两次以 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给药可以使 SGLT1 基因敲除、SGLT2 基因敲除和 WT 小鼠的 UGE 升高至 SGLT1/2 基因双敲除小鼠的 UGE

水平。结果表明,口服 LP-925219 抑制剂可以使哺乳动物的 UGE 在 24 h 内达到最大,与选择性 SGLT2 抑制剂相比,化合物 LP-925219 能更好地控制糖尿病患者的血糖。

Lexicon 制药公司随后以 LP-925219 为基础,用乙氧基代替甲氧基,得到了活性较好的索格列净 (sotagliflozin, 见图 7), 对 SGLT1 和 SGLT2 的 IC_{50} 值分别为 0.0018、0.036 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 2019 年 4 月 26 日获欧洲药物管理局 (European Medicines Agency, EMA) 批准上市,且为唯一上市的 SGLT1/2 双靶点抑制剂的药物,在中国处于 I 期临床试验状态^[41]。

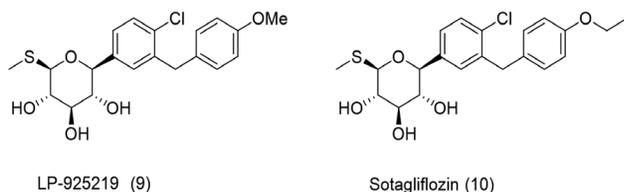


图 7 LP-925219、sotagliflozin 的化学结构

Fig 7 Structure of LP-925219 and sotagliflozin

Sands 等^[42]评估了索格列净与胰岛素联合使用治疗 T1DM 的有效性。选取 33 例患者,其中 17 名患者使用索格列净联合胰岛素治疗,16 名患者使用安慰剂联合胰岛素进行治疗。在索格列净治疗组中,注射胰岛素的剂量,与安慰剂组治疗相比剂量降低 32.1% ($P = 0.007$),同时测得平均每日血糖较低,为 148.8 $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平降低 0.55%。而安慰剂组胰岛素的使用剂量比基线减少了 6.4%,平均每日葡萄糖为 170.3 $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,HbA1c 水平下降 0.06%。作为胰岛素的辅助药物,索格列净可改善血糖控制,减少胰岛素剂量,并且不会增加 T1DM 患者血糖。

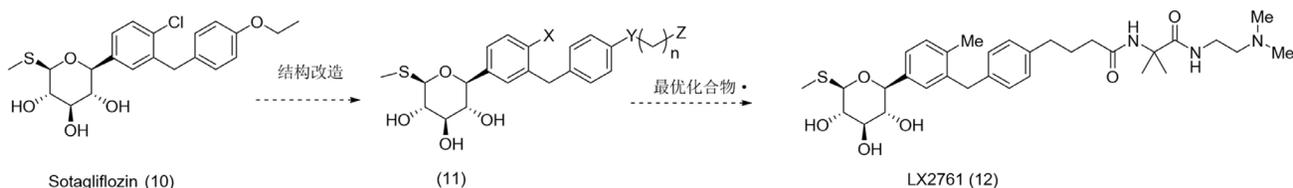


图 8 LX2761 的设计策略

Fig 8 Design strategy of LX2761

Kakinuma 等^[45]合成了化合物 13,并对其进行了改造(结构式见图 9)。当 A 环上取代基 R_1 被 2-OH, R_2 被 4- CH_3 取代时,其效能得到了增强。在 B 环上讨论了不同的芳基取代基的影响,当 B 环为苯并环丁烷, A 环为 2-羟基-4-甲基苯基时,得到了化合物 14,显示出非常高的抑制活性,对

Zambrowicz 等^[43]则研究了索格列净对 T2DM 患者的血糖控制。选取了 36 例 T2DM 患者,随机平均分配服用安慰剂组和分别服用 150 mg、300 mg 的索格列净治疗组,持续 28 d。相对于安慰剂组 (18% 的患者 $\text{HbA1c} \leq 7.0\%$),两个治疗组的平均 HbA1c 显著降低,有 50% 的患者 $\text{HbA1c} \leq 7.0\%$,150 mg、300 mg 索格列净治疗组的 T2DM 尿糖排泄分别增加至 37 和 48 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。在一项针对 12 例 T2DM 患者的后续单剂量研究中,索格列净 (300 mg) 显著增加了 GLP-1 和 PYY 的水平,促进胰岛素 β 细胞再生,从而降低血糖。两项研究表明,索格列净显著改善了患者血糖指标,同时伴有 GLP-1 和 PYY 循环水平的提高。

在肾功能不全的患者中,SGLT2 选择性抑制剂疗效不佳,故此 Goodwin 等^[44]以索格列净为先导化合物进行了结构改造,设计出了一种由于口服生物利用度差而停留在胃肠道内的 SGLT1/2 抑制剂化合物 LX2761,在胃肠道内局部抑制 SGLT1 而不影响肾脏中 SGLT1/2 (结构式见图 8)。保持木糖结构,对双芳基苄元部分进行改造:① 在近端芳环上取代卤素原子 X;② 改变远端芳环的连接原子 Y 和链长度 n;③ 改变链末端的基团 Z。发现用甲基取代卤素 X 基团,对 SGLT1 活性更好。连接原子 Y 用亚甲基取代氧原子,对 SGLT1 或 SGLT2 抑制活性相似。链末端的基团 Z 的改变对活性影响较大,官能团不同其口服吸收也不同。当以碱性胺为取代基团时,口服吸收减少,由此设计了一系列具有酰胺和胺类化合物,其中化合物 LX2761 对 SGLT1 和 SGLT2 均有较好的活性,抑制活性 IC_{50} 分别为 2.2、2.7 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,并在胃肠道表现出特定的 SGLT1 抑制作用。

SGLT1 和 SGLT2 的 IC_{50} 值分别为 4 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。尽管化合物 14 在 SGLT1/2 上均表现出优异的体外效能,但酚类分子可能通过葡萄糖醛酸化产生 II 期代谢问题^[46]。研究发现当去除 R_1 位的羟基, R_2 位用 Cl 原子取代,得到的化合物 15 也能保持较高的活性,对 SGLT1 和 SGLT2

的抑制 IC_{50} 分别为 45、1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [47]。化合物 **15** 在小鼠、大鼠、狗和猴子中表现出较好的口服生物利用度，分别为 99%、78%、107%、88%。

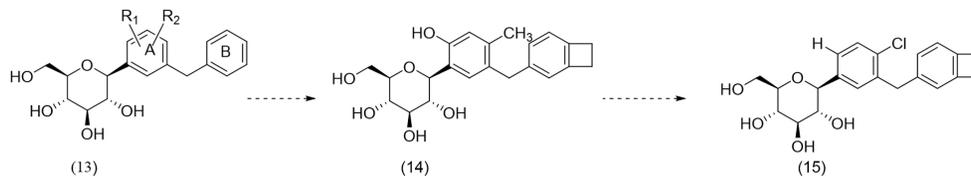


图 9 结构式 **13** 的构造优化

Fig 9 Structural optimization of structural **13**

Jensen 制药在 2014 年发布的专利 US90124-12B2 中发现了一类化合物 **16**，作为 SGLT1/2 抑制剂用于糖尿病的治疗，并对其进行了结构改造 [48] (见图 10)。选取 R_1 为 OH、烷氧基、芳杂环或卤素， R_2 为氢原子、甲基， R_3 为甲基、烷氧基、卤素进行研究，发现当 R_1 为羟基， R_2 为氢原子， R_3 为甲基时，活性较优，对 SGLT1 和 SGLT2

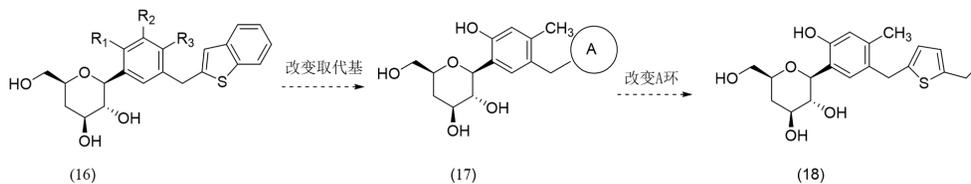


图 10 化合物 **18** 的设计策略

Fig 10 Design strategy of compound **18**

针对 C-葡萄糖苷类的降糖药，诺华公司发现了 licogliflozin (见图 11)，现处于 II 期临床试验阶段，对 SGLT1 和 SGLT2 的抑制 IC_{50} 值分别为 20.6、0.58 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [49]。针对化合物 licogliflozin，He 等 [50] 研究了其对 T2DM 和肥胖患者的体重、代谢参数与肠降血糖素激素的影响。共纳入 130 名患者，随机接受 licogliflozin 或安慰剂治疗。第一项肥胖患者研究共纳入 88 位患者，用 150 mg qd 的 licogliflozin 治疗肥胖症患者，12 周后，较安慰剂组体重降低了 5.7% ($P < 0.001$)，并改善了代谢参数，餐后葡萄糖的波动幅度降低了 21% ($P < 0.001$)，胰岛素水平降低了 80% ($P < 0.001$)，胰高血糖素升高了 59% ($P < 0.001$)。第二项研究纳入 42 位 T2DM 患者，用 licogliflozin 15 mg qd 治疗连续 14 d，与安慰剂组相比，T2DM 患者的 24 h 平均血糖水平降低了 26% ($P < 0.001$)，总 GLP-1 提高了 54% ($P < 0.001$)，PYY 提高了 67% ($P < 0.05$)，而 GIP 水平降低了 53% ($P < 0.001$)。licogliflozin 治疗可明显减轻体重，各种代谢参数和肠降血糖激素发生了有利的变化。

Lee 等 [51] 报道了化合物 HM41322 (见图 11)，并与达格列净进行对比。HM41322 在体外对人的

在 SD 大鼠中，化合物 **15** 以剂量依赖性方式显著降低了血糖水平，在 ZDF 大鼠中，化合物 **15** 降血糖作用时长可长达 24 h。

的抑制 IC_{50} 分别为 117、16 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。后又对其 A 环进行了优化，选取了苯并咪唑环、苯并噻唑环、2-乙基噻吩环、2-(4-氟苯基)噻吩环进行研究，发现 A 环为 2-乙基噻吩环时活性较好，得到化合物 **18**，对人体肾脏和肠道中的 SGLT1 与 SGLT2 的抑制 IC_{50} 分别为 97、4 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

SGLT2 ($IC_{50} = 5.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的选择性是 SGLT1 ($IC_{50} = 54.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 10 倍，其中对 SGLT2 抑制作用与达格列净 ($IC_{50} = 2.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 类似，但是却有着比达格列净更好的 SGLT1 抑制性 ($IC_{50} = 920.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在小鼠的药代动力学研究中发现，在单次口服剂量为 1 或 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，HM41322 的最大血浆浓度分别为 439 和 1830 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量时作用与达格列净 ($C_{\text{max}} = 457 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 类似，并且可以在 30 min 内快速吸收。化合物 HM41322 还可通过抑制肾脏中的 SGLT1 和 SGLT2 来达到尿糖排泄最大化，在 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量下，24 h 内正常血糖小鼠的最大尿糖排泄为 $(19.32 \pm 1.16) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，比达格列净 $(10.70 \pm 1.16) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 更加有效。

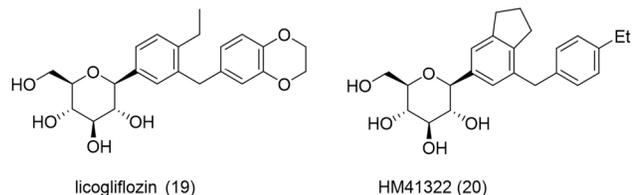


图 11 licogliflozin、HM41322 的化学结构

Fig 11 Structure of licogliflozin and HM41322

有报道指出 C-F 键的长度 (1.39 Å) 与 C-O

键的长度 (1.43Å) 非常接近, 氟可以充当羟基的等排体^[40]。此外, 早期的 SAR 研究表明, C-芳基葡萄糖苷的 C5 位可进行结构修饰^[52]。因此, Xu 等^[53]对 C-葡萄糖苷改造, 用氟原子取代 C5-羟基, 以构建 C5-氟己糖糖苷的 SGLT 抑制剂, 如化合物 **22** (见图 12, 其中 Ar 代表通用的苷元部分)。基于此设计合成了化合物 **23**, 其对 SGLT1 ($IC_{50} = 43 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 SGLT2 ($IC_{50} = 9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 有着较好的抑制效力。在 SD 大鼠的口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 中对血糖波动有着强烈的抑制作用, 当以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的口服剂量在 db/db 小鼠和高脂饮食喂养的 ZDF 大鼠中表现出明显的降血糖作用。

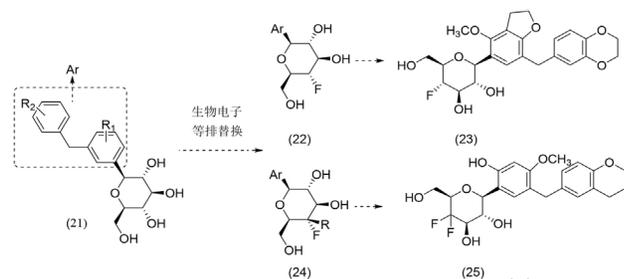


图 12 新型 SGLT1/2 双靶点抑制剂的设计

Fig 12 Design of a new dual inhibitor of SGLT1/2

此课题组又基于原先的策略, 对糖环以及苷元部分进一步修饰, 糖环 C5 位处的氢都被氟原子取代, 合成了化合物 **25**^[54]。化合物 **25** 具有双重抑制活性 (SGLT1: $IC_{50} = 96 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SGLT2: $IC_{50} = 1.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在口服 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 SD 大鼠的 OGTT 中, 对葡萄糖显示出强烈的抑制作用, 当口服剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 能较好地控制 db/db 小鼠餐后的血糖。

之后此课题组对于单氟取代的 C-芳基葡萄糖苷进行了改造优化^[55] (见图 13)。当固定 R_2 为羟基, R_3 为 H 时, R_4 为甲基时, 对 R_1 进行了优化。发现当 R_1 为羟甲基时, SGLT1 和 SGLT2 的抑制率分别为 $IC_{50} = 0.014 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $IC_{50} = 0.004 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 效果较好。选取 R_1 为其羟甲基, R_3 和 R_4 不变, R_2 选取了甲基、甲氧基、卤素等基团进行改造, 发现并没有羟基取代时效果好。故此, 保持 R_2 为羟基。之后用甲基取代了 R_3 的 H, 其对 SGLT1 和 SGLT2 的抑制 IC_{50} 分别为 0.015、0.007 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 效果较优。最后对 R_4 进行取代, 发现当其为甲氧基时, 效果最好, 得到化合物 **27**, 对 SGLT1 的 IC_{50} 值为 $0.009 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 SGLT2 的 IC_{50} 值为 $0.008 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

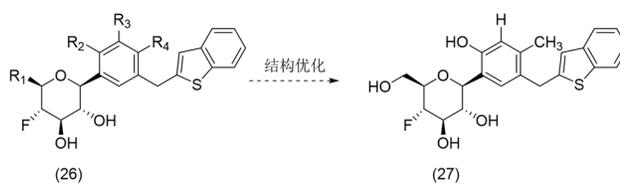


图 13 单氟取代的 C-芳基葡萄糖苷的优化

Fig 13 Optimization of monofluoro substituted C-aryl glucoside

2.3 其他类

Park 等^[56]发现了一种有效的新型合成小分子 JP-2266 (此结构尚未公开), 是高度选择性的 SGLT1/2 抑制剂, 对 SGLT1 和 SGLT2 体外抑制 IC_{50} 值分别为 $10.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 优于索格列净 ($36 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。此外, 给大鼠口服 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 JP-2266 后, 显示出与大剂量胰岛素治疗组 ($1.8 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相同的 $AUC_{0 \sim 4 \text{ h}}$ 的降低效果。当分别以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 JP-2266 和索格列净口服重复给药 28 d 后, 血糖分别降低 49.4% 和 39.1%。另外, JP-2266 治疗组的 HbA1c 下降到 6.4%, 优于索格列净治疗组 (7.2%), 表现出较优的降血糖效果。

3 总结

控制血糖可以减缓糖尿病患者的病情, 并降低其并发症。SGLTs 抑制剂通过抑制葡萄糖的重吸收, 从而降低血液中葡萄糖的含量。但因其 SGLT 选择性抑制剂有着不良反应的产生, 限制了进一步的开发。SGLT1/2 双靶点抑制剂相比于选择性 SGLT 抑制剂来说, 有着较新的抑制机制, 其降糖效果较好, 能更好地控制餐后血糖水平, 并可以减少不良反应的发生。

根皮苷为第一个 SGLT1 和 SGLT2 的非选择性抑制剂, 但其生物利用度低、稳定性差, 故此研究合成了一些根皮苷衍生物, 以便改善其缺点。以根皮苷为其设计思路, 合成了 O-葡萄糖苷类衍生物, 但仍然有药代动力学及稳定性差和对 SGLT2 的选择性不足等缺点, 之后用 C-糖苷代替了 O-葡萄糖苷, 研究发现了一系列活性, 稳定性较好的 SGLT1 和 SGLT2 双靶点抑制剂。不仅可以有效控制血糖, 还有其他的临床发现, 如减重, 抗肿瘤细胞增殖等疗效。因此, 新型降糖药物 SGLT1/2 双靶点抑制剂有着较好的开发前景。

参考文献

- [1] Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes [J]. Lancet, 2014, 383 (9911): 69-82.
- [2] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes [J].

- Lancet, 2017, 389 (10085): 2239-2251.
- [3] Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94 (3): 311-321.
- [4] Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387 (10027): 1513-1530.
- [5] 廖涌. 中国糖尿病的流行病学现状及展望 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015 (7): 1042-1045.
- [6] Dominguez Rieg JA, Rieg T. What does sodium-glucose co-transporter 1 inhibition add: Prospects for dual inhibition [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, Suppl 2 (Suppl 2): 43-52.
- [7] 康庆伟, 阎姝. 新型抗糖尿病药物钠-葡萄糖协同转运蛋白抑制剂研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24 (3): 370-373.
- [8] Rieg T, Vallon V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors [J]. *Diabetologia*, 2018, 61 (10): 2079-2086.
- [9] 丁钊, 郭立新. 钠-葡萄糖共转运蛋白及其相关药物的作用机制 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2016 (5): 319-320.
- [10] Koepsell H. The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 170: 148-165.
- [11] Rosenwasser RF, Sultan S, Sutton D, et al. SGLT-2 inhibitors and their potential in the treatment of diabetes [J]. *Diabet Metab Syndr Ob*, 2013, 6: 453-467.
- [12] Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters [J]. *Protein Sci*, 2016, 25 (3): 546-558.
- [13] Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, et al. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (2): e89977.
- [14] Gribble FM. The gut endocrine system as a coordinator of postprandial nutrient homeostasis [J]. *Proc Nutr Soc*, 2012, 71 (4): 456-462.
- [15] 胡秀卓, 吕莉. 钠-葡萄糖共转运体 2 抑制剂在治疗 2 型糖尿病中的应用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20 (3): 338-343.
- [16] Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, et al. Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion [J]. *Diabetes*, 2012, 61 (1): 187-196.
- [17] Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na⁺/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells [J]. *Kidney Int*, 2007 (106): S27-S35.
- [18] Chao EC, Henry RR. SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9 (7): 551-559.
- [19] Inoue T, Takemura M, Fushimi N, et al. Mizagliflozin, a novel selective SGLT1 inhibitor, exhibits potential in the amelioration of chronic constipation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806: 25-31.
- [20] Kuroda S, Kobashi Y, Oi T, et al. Discovery of a potent, low-absorbable sodium-dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1) inhibitor (TP0438836) for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28 (22): 3534-3539.
- [21] Seidelmann SB, Feofanova E, Yu B, et al. Genetic variants in SGLT1, glucose tolerance, and cardiometabolic risk [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72 (15): 1763-1773.
- [22] McGuire DK, Shih WJ, Cosentino F, et al. Association of SGLT2 inhibitors with cardiovascular and kidney outcomes in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis [J]. *JAMA cardiology*, 2021, 6 (2): 148-158.
- [23] Powell DR, DaCosta CM, Smith M, et al. Effect of LX4211 on glucose homeostasis and body composition in preclinical models [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 350 (2): 232-242.
- [24] 谷庆炜, 李倩. 钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2018, 24 (17): 125-129.
- [25] Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2015, 75 (1): 33-59.
- [26] Danne T, Biester T, Kordonouri O. Combined SGLT1 and SGLT2 inhibitors and their role in diabetes care [J]. *Diabetes Technol Ther*, 2018, 20 (S2): S2-69-S2-77.
- [27] Rieg T, Masuda T, Gerasimova M, et al. Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia [J]. *Am J Physiol*, 2014, 306 (2): F188-F193.
- [28] Heise T, Seewaldt-Becker E, Macha S, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics following 4 weeks' treatment with empagliflozin once daily in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15 (7): 613-621.
- [29] Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Ronald Kahn C, et al. Phlorizin: A review [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005, 21 (1): 31-38.
- [30] Blaschek W. Natural products as lead compounds for sodium glucose cotransporter (SGLT) inhibitors [J]. *Planta Med*, 2017, 83 (12/13): 985-993.
- [31] Wang L, Liu M, Yin F, et al. Trilobatin, a novel SGLT1/2 inhibitor, selectively induces the proliferation of human hepatoblastoma cells [J]. *Molecules*, 2019, 24 (18): 3390.
- [32] Teicher BA, Linehan WM, Helman LJ. Targeting cancer metabolism [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (20): 5537-5545.
- [33] Scafoglio C, Hirayama BA, Kepe V, et al. Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112 (30): E4111-E4119.
- [34] Tsujihara K, Hongu M, Saito K, et al. Na⁺-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. Part 4. Synthesis and pharmacological properties of 4-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring [J]. *J Med Chem*, 1999, 42 (26): 5311-5324.
- [35] 郭宗儒. 由根皮苷到坎格列净的上市 [J]. *药学学报*,

- 2015, 50 (5): 633-634.
- [36] Oku A, Ueta K, Arakawa K, et al. T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes [J]. *Diabetes*, 1999, 48 (9): 1794-1800.
- [37] Frick W, Glombik H, Theis S, et al. Novel aromatic fluoroglycoside derivatives, pharmaceuticals comprising said compounds and the use thereof: U. S. Patent Application 12/851, 944 [P]. 2011-03-10.
- [38] Frick W, Glombik H, Kramer W, et al. Novel fluoroglycoside heterocyclic derivatives, pharmaceutical products containing said compounds and the use thereof: NZ, NZ540695 [P]. 2003-11-28.
- [39] Lima LM, Barreiro EJ. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12 (1): 23-49.
- [40] Powell DR, Smith MG, Doree DD, et al. LP-925219 maximizes urinary glucose excretion in mice by inhibiting both renal SGLT 1 and SGLT 2 [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, 3 (2): e00129.
- [41] Cefalo CMA, Cinti F, Moffa S, et al. Sotagliflozin, the first dual SGLT inhibitor: Current outlook and perspectives [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18 (1): 1-14.
- [42] Sands AT, Zambrowicz BP, Rosenstock J, et al. Sotagliflozin, a dual SGLT1 and SGLT2 inhibitor, as adjunct therapy to insulin in type 1 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38 (7): 1181-1188.
- [43] Zambrowicz B, Freiman J, Brown PM, et al. LX4211, a dual SGLT1/2 inhibitor, improved glycemic control in patients with type 2 diabetes in a randomized, placebo-controlled trial [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92 (2): 158-169.
- [44] Goodwin NC, Ding ZM, Harrison BA, et al. Discovery of LX2761, a sodium-dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1) inhibitor restricted to the intestinal lumen, for the treatment of diabetes [J]. *J Med Chem*, 2017, 60 (2): 710-721.
- [45] Kakinuma H, Kobashi Y, Hashimoto Y, et al. C-phenyl glycol compound: U. S. Patent 7 973 012 [P]. 2011-07-05.
- [46] Zamek-Gliszczyński MJ, Hoffmaster KA, Nezasa K, et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27 (5): 447-486.
- [47] Kuo GH, Gaul MD, Liang Y, et al. Synthesis and biological evaluation of benzocyclobutane-C-glycosides as potent and orally active SGLT1/2 dual inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28 (7): 1182-1187.
- [48] Gaul M, Kuo G, Xu G, et al. Dual SGLT1/SGLT2 inhibitors: U. S. Patent 9 012 412 [P]. 2015-04-21.
- [49] Wang-Lakshman L, Mendonza AE, Huber R, et al. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of licogliflozin, a dual inhibitor of SGLT1/2, in rats, dogs, and Humans [J]. *Xenobiotica*, 2020, 51 (4): 413-426.
- [50] He YL, Haynes W, Meyers CD, et al. The effects of licogliflozin, a dual SGLT1/2 inhibitor, on body weight in obese patients with or without diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21 (6): 1311-1321.
- [51] Lee KH, Lee SD, Kim N, et al. Pharmacological evaluation of HM41322, a novel SGLT1/2 dual inhibitor, in vitro and in vivo [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2019, 23 (1): 55-62.
- [52] Robinson RP, Mascitti V, Boustany-Kari CM, et al. C-Aryl glycoside inhibitors of SGLT2: Exploration of sugar modifications including C-5 spirocyclization [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20 (5): 1569-1572.
- [53] Xu G, Gaul MD, Kuo GH, et al. Design, synthesis and biological evaluation of (2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*, 6*R*)-5-fluoro-6-(hydroxymethyl)-2-aryltetrahydro-2H-pyran-3, 4-diols as potent and orally active SGLT dual inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28 (21): 3446-3453.
- [54] Xu G, Du F, Kuo GH, et al. 5, 5-Difluoro-and 5-Fluoro-5-methyl-hexose-based C-Glucosides as potent and orally bioavailable SGLT1 and SGLT2 dual inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30 (17): 127387.
- [55] Xu G, Kuo G, Gaul M. 5-fluoro-C-(aryl or heterocycl) -glycoside derivatives useful as dual SGLT1/ SGLT2 modulators: U. S. Patent 10 696 662 [P]. 2020-06-30.
- [56] Park Y. Antidiabetic effect of JP-2266, a novel SGLT1/2 dual Inhibitor, for the treatment of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2018, 67: 1454.

(收稿日期: 2021-06-03; 修回日期: 2021-07-06)

研究论文

盐酸小檗碱多晶型的制备、表征及其对自制片剂溶出行为的影响

闫富龙¹, 祝宇龙¹, 彭灿^{1, 2, 3, 4*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 合肥 230012; 3. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 4. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 合肥 230012)

摘要: **目的** 探究盐酸小檗碱多晶型及其对片剂溶出行为的影响。**方法** 采用单一溶剂重结晶法制备多晶型盐酸小檗碱粉末, 应用电子显微镜法、热分析法、红外光谱法和 X-衍射法对多晶型盐酸小檗碱粉末进行表征; 将不同晶型盐酸小檗碱粉末湿法制粒压片制成片剂, 应用 HPLC 法测定自制片剂在不同溶出介质中的溶出行为, 考察晶型对盐酸小檗碱片溶出行为的影响。**结果** 通过单一溶剂重结晶法制备了 5 种盐酸小檗碱晶型 (B、C、D、E、F), 5 种晶型在 SEM、PXRD 和红外等方法的检测结果上存在明显差异; 不同晶型制备成的盐酸小檗碱自制片在纯水、醋酸缓冲液和磷酸缓冲液中溶出行为存在明显差异, 狭长针形晶型自制片能较快溶出, 柱形晶型自制片在各溶出介质中溶出较慢。**结论** 盐酸小檗碱 5 种晶型自制片溶出行为有明显的差异, 晶型比表面积越小在不同介质中溶出越快, 可为盐酸小檗碱进一步晶型研究提供参考。

关键词: 盐酸小檗碱; 晶型; 溶出; 表征

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1786-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.004

Preparation and characteristics of polymorphs of berberine hydrochloride and its effect on the dissolution behaviors of self-made tablets

YAN Fu-long¹, ZHU Yu-long¹, PENG Can^{1, 2, 3, 4*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei 230012; 3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012; 4. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of the polymorphism of berberine hydrochloride on the dissolution behaviors of self-made tablets. **Methods** The polymorphic berberine hydrochloride powder was prepared by a single solvent recrystallization method, and was characterized by electron microscopy, thermal analysis, infrared spectroscopy and X-diffractometry. Then different crystal forms of berberine hydrochloride tablets were established by wet granulation method. The dissolution behaviors of self-made tablets in different dissolution media were determined by HPLC method to determine the effect of different crystal forms on the dissolution behaviors of berberine hydrochloride tablets. **Results** Five type crystal forms of berberine hydrochloride (B, C, D, E, and F) were prepared by a single solvent recrystallization method. The crystal form characterization showed a significant difference in the SEM, PXRD and infrared methods. The dissolution behaviors of self-made berberine hydrochloride tablets prepared with different crystal forms in pure water, acetate buffer and phosphate buffer were obviously different. The long and narrow needle-shaped crystal form tablets dissolved faster, while the columnar crystal tablets dissolved slowly in all dissolution media. **Conclusion** Five self-made tablets of different crystal forms show different dissolution. The smaller the crystal surface

基金项目: 国家科技重大专项 - 重大新药创制 (No.2017ZX09101001)。

作者简介: 闫富龙, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物制剂与药物分析研究工作, E-mail: 2856576815@qq.com *通信作者: 彭灿, 男, 副教授, 主要从事药剂学及药物分析研究, E-mail: pengcankang@hotmail.com

areas of berberine hydrochloride, the faster the dissolution in different media, which can provide a basis for further crystal form research of berberine hydrochloride.

Key words: berberine hydrochloride; crystal form; dissolution; characterization

近年来,随着对药物研究的深入,研究者发现在药物的药物成分、手性、结构、纯度等因素固定时,药物在质量和疗效上仍然存在着不稳定现象。经大量实验后发现了多晶型这一重要影响因素^[1]。多晶型现象是指固体药物在结晶过程中因为条件的差异,分子在晶胞中对称规律的不同,使得药物分子之间、药物分子与溶剂分子之间相互作用力或结合方式以及空间结构等发生变化,从而使药物晶体出现两种或两种以上的空间群和晶胞参数^[2-4]。不同的晶型具有不同的机械学、热力学、物理学和化学特性,尤其是对难溶性药物来说,不同晶型的转变会影响其在体内的溶解和吸收,进而影响药物的生物利用度、疗效,甚至产生不良反应,影响用药安全^[5-7]。我国是一个仿制药大国,并且仿制企业繁多,同一品种可能被多家企业仿制,而药物的多晶型会直接影响药品的有效性、安全性和质量^[8]。因此,固体药物多晶型的研究对药物的开发上市至关重要。

盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)是一种天然异喹啉类生物碱,又称为黄连素,主要来源于黄连、黄柏、三颗针等小檗科等 4 科 10 属药用植物^[9-11]。目前盐酸小檗碱可以由植物提取和人工合成两种途径获得^[12],在临床上常用于治疗细菌性疟疾、肠胃炎等疾病^[13-14],效果显著。现代药理学研究证明,其还有降血脂^[15]、降血糖^[16]、抗肿瘤^[17-19]和抗心律失常^[20]等药理作用,具有广泛的应用前景。

目前国内外对于盐酸小檗碱片剂的研究,大部分集中于质检分析、含量测定以及辅料对盐酸小檗碱溶出度的影响等方面,而对其晶型的研究很少^[21-23]。罗小飞等^[24]发现不同溶剂中析出的盐酸小檗碱溶解度不同,经 X 衍射分析发现盐酸小檗碱也存在多种晶型现象。晶型研究对于盐酸小檗碱药效发挥尤为重要,本文应用单一溶剂重结晶法制备盐酸小檗碱不同晶型,比较不同晶型自制片在不同溶出介质中的溶出行为,为改善盐酸小檗碱溶出与药物临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 试药

盐酸小檗碱对照品(含量:86.8%,批号:160901,中国食品药品检定研究院);甲醇(北京百灵威科技有限公司);冰醋酸、盐酸(国药集团

化学试剂有限公司);磷酸盐(天津市福晨试剂公司);三乙胺(批号:20191130,上海润捷化学试剂有限公司);蒸馏水。淀粉(批号:S116028)、羧甲基淀粉钠(CMS-Na,批号:C105666,阿拉丁有限公司);聚维酮 K30(PVP K30,批号:190506,安徽山河药用辅料股份有限公司);聚山梨酯 80(萨恩化学技术有限公司),硬脂酸镁(辽宁奥达制药有限公司)。所有辅料均为药用级辅料。

1.2 仪器

SmartLab3KW X-射线衍射仪(日本理学公司);S-3700N 扫描电子显微镜(日本岛津公司);Spectrum 400 红外光谱仪(英国 PE 公司);Mettler TGA/DSC1 热分析仪(瑞士梅特勒公司);高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司);超声波清洗机(YL060S,济南巴克超声波科技有限公司);超纯水机(milli-Q Synt hesis, millipore);十万分之一电子天平(BT25S,墨多利斯科学仪器有限公司);循环水式真空泵;溶出试验仪(ZRS-8L,天津天大天发科技有限公司);ZP29 旋转式压片机(上海天峰);YD-1 片剂硬度测试仪(天津市国铭医药设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 晶型样品制备

本研究采用单一溶剂重结晶法制备盐酸小檗碱晶型样品,盐酸小檗碱原料药晶型设为晶 A 型,其他新制备得到的晶型依次命名为晶 B 型至晶 F 型。取盐酸小檗碱原料药 300 mg 于洁净容器中,少量多次加入总量为 40 mL 的醋酸溶液、或 100 mL 的乙酸乙酯溶液、或总量为 25 mL 的二氯甲烷溶液、或总量为 80 mL 的乙腈溶液、或总量为 100 mL 的丙酮溶液,加热,体系温度均为 20 ~ 100 °C,磁力搅拌(速度控制在 500 ~ 1200 r · min⁻¹),反应 1 ~ 5 h,使其完全溶解,得到黄色澄清溶液。溶液趁热过滤,滤液置于 40 ~ 60 °C 真空干燥环境下挥发结晶,获得淡黄色粉末分别为盐酸小檗碱晶 B 型、盐酸小檗碱晶 C 型、盐酸小檗碱晶 D 型、盐酸小檗碱晶 E 型、盐酸小檗碱晶 F 型。

2.2 盐酸小檗碱不同晶型表征分析

2.2.1 晶体粉末扫描电子显微镜法 使用碳双面胶带将样品固定在黄铜桩上。然后设置电压为 15 kV,电流为 119 μA,拍摄不同晶型粉末微观照片。

如图 1 所示, 5 种不同晶型的盐酸小檗碱粉末呈现不同的微观形状。晶 B 型和晶 F 型呈现两端渐变锋利趋势的针状, 晶 F 型呈现相比于普通针状更加狭长纤细的狭长针状; 晶 E 型为不规则块状晶型, 晶体两端边缘无明显渐变锋利趋势,

比较光滑; 晶 C 型为较为明显的柱状晶型, 比表面积较大; 晶 D 型呈现为片状晶体, 与晶 C 型柱状晶型较为相似, 但侧面可以看出特别薄, 其比表面积比柱状小。



图 1 盐酸小檗碱晶 5 种晶型的扫描电子显微镜图

Fig 1 SEM image of 5 crystal forms of berberine hydrochloride

A. 晶 B 型 (B crystal form)(100×5); B. 晶 C 型 (C crystal form)(100×25); C. 晶 D 型 (D crystal form)(100×1.2); D. 晶 E 型 (E crystal form)(100×12); E. 晶 F 型 (F crystal form)(100×12)

2.2.2 差示扫描量热法 (DSC) 精密称取不同晶型盐酸小檗碱粉末样品 5 ~ 10 mg, 置于 40 μL 标准 Al₂O₃ 坩埚中, 铺匀后压盖, 放入差示扫描量热仪中, 以 40 μL 标准 Al₂O₃ 空坩埚为参比, 在温度范围 0 ~ 240 °C, 升温速率 10 °C · min⁻¹ 的条件下进行分析, 记录 DSC 曲线。

与相关文献记载的 190 °C 相符。除熔点吸收峰外, 晶 B 型和晶 C 型 DSC 图谱中只存在 100 °C 左右的吸收峰, 说明该晶型盐酸小檗碱粉末中只存在游离水; 晶 B 型和晶 C 型 DSC 图谱中只存在 150 °C 左右的吸收峰, 说明该晶型盐酸小檗碱粉末中只存在结合水; 晶 F 型在图谱上存在 100 °C 左右和 150 °C 左右两个特征吸收峰, 说明多晶型盐酸小檗碱粉末中存在游离水和结晶水。由于制备的盐酸小檗碱粉末在实验前已干燥 5 h, 说明该晶型粉末具有较强的吸湿性。

如图 2 所示, 样品在二次升温过程中无特征吸收峰, 经观察样品升温到 240 °C 和 300 °C 时均已完全碳化, 所以 185 °C 左右为盐酸小檗碱粉末的熔点温度,

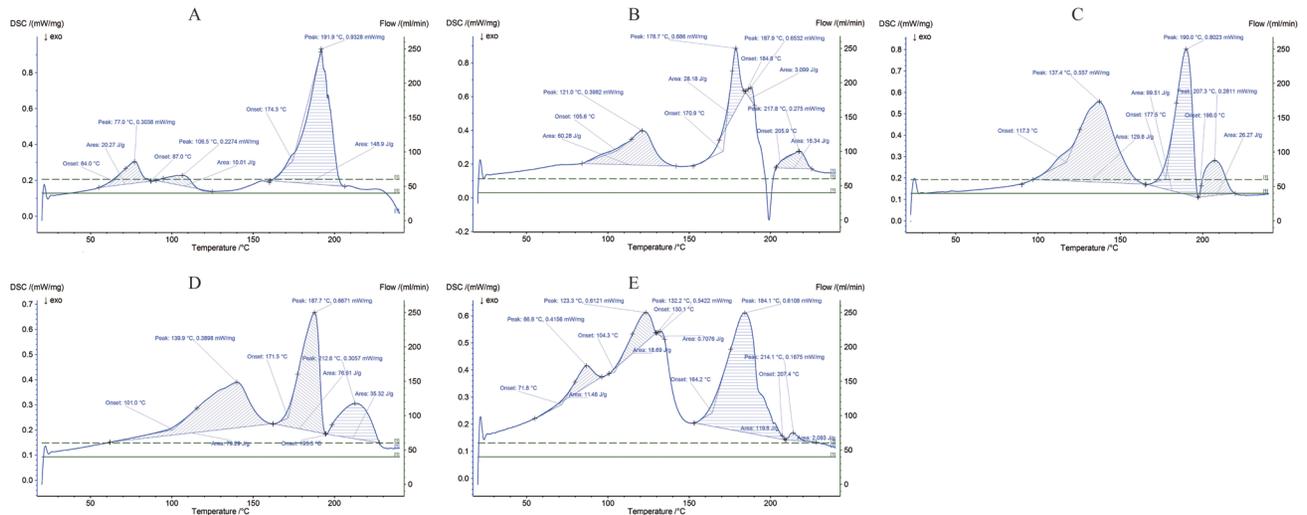


图 2 盐酸小檗碱 5 种晶型的 DSC 图谱

Fig 2 DSC spectrum of 5 crystal forms of berberine hydrochloride

A. 晶 B 型 (B crystal form); B. 晶 C 型 (C crystal form); C. 晶 D 型 (D crystal form); D. 晶 E 型 (E crystal form); E. 晶 F 型 (F crystal form)

2.2.3 傅里叶变换红外光谱法 压力作用因素可能会导致药物晶型发生改变, 本实验采用衰减全反射法 (ATR) 红外光谱法, 药物粉末直接进样。光谱范围: 6000 ~ 650 cm⁻¹, 分辨率: 4.00 cm⁻¹, 扫描次数: 16 次。

在 3649、3324、3047、2162、1505、1140、1109、1066、1018 cm⁻¹ 等处均具有红外光谱特征峰, 其中红外光谱特征峰的允许偏差为 ±2 cm⁻¹。比较盐酸小檗碱不同晶型样品红外吸收峰发现, 晶 C 型、晶 D 型、晶 E 型和晶 F 型在 3549 cm⁻¹ 处无明显吸收峰, 表明可能发生了开环反应; 晶 B 型和晶 C 型在 1705 cm⁻¹ 处存在吸收峰, 表明存在

采用红外光谱法对 5 种晶型盐酸小檗碱样品进行表征, 其红外吸收光谱如图 3 所示。5 种晶型

羧基,可能来源于醋酸的羧基或乙酸乙酯的酯基。

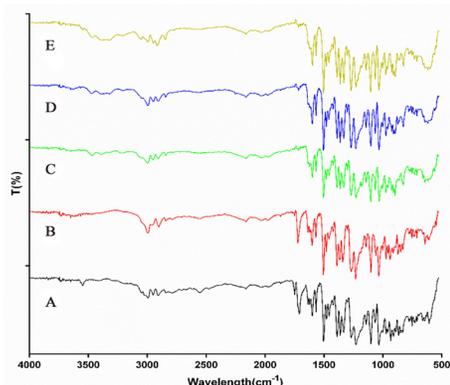


图3 盐酸小檗碱5种晶型的红外图谱

Fig 3 Infrared spectrum of 5 crystal forms of berberine hydrochloride

A. 晶B型 (B crystal form); B. 晶C型 (C crystal form); C. 晶D型 (D crystal form); D. 晶E型 (E crystal form); E. 晶F型 (F crystal form)

2.2.4 X射线粉末衍射法 称取一定量的5种晶型样品,进行粉末X射线衍射检测。检测条件:使用CuK α 辐射在40 mA和40 kV下运行,并在衍射束上配备石墨单色仪,以收集X射线衍射图案;在 $3^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$ 的范围内以步长 0.01° 记录XRD图案,每步至少采集1000个计数。平均晶体尺寸通过Scherrer方程估算,其中积分宽度已针对仪器加宽进行了校正。仪器轮廓加宽源自对标准样品获得的XRD数据的拟合。

结果如图4所示,盐酸小檗碱5种晶型在X射线粉末衍射图谱上均有一定的差异。晶B型盐酸小檗碱在 $2\theta = 8.92$ 处出现了强衍射峰,且强度较高,并在 $2\theta = 47.3$ 处出现了为其他晶型所不具有的散射峰。晶C型盐酸小檗碱在 2θ 在 $8 \sim 10$ 范围内出现了双强峰,晶D型盐酸小檗碱粉末在 2θ 为25.4、26.3时无明显散射峰,而在 2θ 为16.9、17.7时处存在散射峰,表明晶D型可能发生了键位变化或晶型变化。晶E型盐酸小檗碱在 2θ 为10.1、11.3、11.8处存在散射,说明晶E型与其他晶型晶相不同,而晶F型盐酸小檗碱 $13.0 \sim 15.0$ 内没有出现衍射峰这与其他晶型不相同。X射线衍射结果说明5种盐酸小檗碱晶型各不相同。粉末X射线衍射分析法可用于不用晶型物质鉴别,是盐酸小檗碱晶型鉴定的有效分析方法。

2.3 盐酸小檗碱片剂制备

本实验采用湿法制粒法,先将5 g不同晶型盐酸小檗碱粉末过100目筛,置于研钵中,分别加入2.2 g淀粉和3.55 g含有聚山梨酯80的80%乙醇溶液,充分搅拌均匀之后,制软材,过80目筛,放置托盘中, 105°C 下干燥2 h,最后加入70 mg羧甲基淀粉钠和50 mg硬脂酸镁,混匀,随之压片(盐酸小檗碱自制片规格为0.1 g/片)。

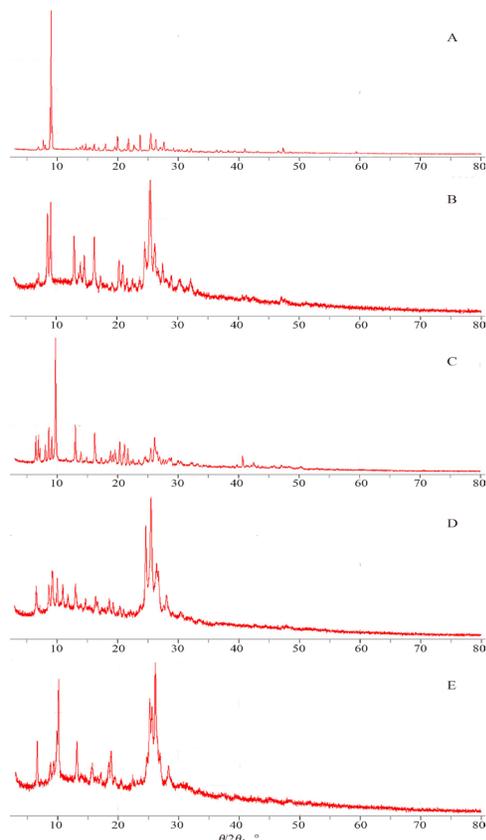


图4 盐酸小檗碱5种晶型的PXRD图谱

Fig 4 X-ray powder diffraction pattern of 5 crystal forms of berberine hydrochloride

A. 晶B型 (B crystal form); B. 晶C型 (C crystal form); C. 晶D型 (D crystal form); D. 晶E型 (E crystal form); E. 晶F型 (F crystal form)

然后对盐酸小檗碱自制片进行了片剂质量检查,包括片剂外观、片重差异和片剂硬度等检查。

从5种晶型盐酸小檗碱自制片中各随机选择6片进行观察,外观检查结果如表1所示。片剂表面略有黑点出现,经过分析,确定黑点是由辅料颜色加深造成的,这对片剂质量没有影响。由于晶E型粉末在压缩时容易折断,难以制成片剂,可能与晶E型的不规则块状有关。所以后续研究中,晶E型将不再纳入研究范围。从4种晶型盐酸小檗碱自制片中各随机选择20片进行准确称重,计算差异。盐酸小檗碱粉末自制片片重差异见表2,差异范围在90%~120%,符合药典标准。从4种晶型盐酸小檗碱自制片中各随机选择6片,用片剂硬度计测定片剂硬度,结果如表3所示,各片剂平均硬度在30~60 N,符合片剂标准。综合所上,晶E型盐酸小檗碱粉末不符合压片要求,其他4种晶型粉末所制片剂均符合标准。

2.4 高效液相法测定溶出度

采用HPLC系统,色谱柱为Unitary C₁₈柱

表 1 5 种晶型盐酸小檗碱自制片剂外观检查 (n = 6)

Tab 1 Appearance of 5 crystal forms of berberine hydrochloride tablets (n = 6)

批次	特征
晶 B 型片	片剂完整, 表面有黑点
晶 C 型片	片剂完整, 表面无黑点
晶 D 型片	片剂完整, 表面有黑点
晶 E 型片	压片时损坏
晶 F 型片	片剂完整, 表面无黑点

表 2 4 种晶型盐酸小檗碱自制片片重差异 (n = 6)

Tab 2 Weight of 4 crystal forms of berberine hydrochloride tablets (n = 6)

批次	平均片重 /g	重量差异 /%
晶 B 型片	0.2099	93.3 ~ 101.7
晶 C 型片	0.2204	95.0 ~ 107.1
晶 D 型片	0.2286	98.3 ~ 108.5
晶 F 型片	0.2144	93.9 ~ 104.8

表 3 4 种晶型盐酸小檗碱自制片硬度测试 (n = 6)

Tab 3 Hardness test of 4 crystal forms of berberine hydrochloride tablets (n = 6)

批次	平均硬度 /N
晶 B 型片	33
晶 C 型片	39
晶 D 型片	42
晶 F 型片	38

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 36 °C。流动相为 0.2% 三乙胺的 0.02 mol · L⁻¹ 磷酸溶液 - 乙腈 (65 : 35, V/V), 以 1.0 mL · min⁻¹ 的流速进行洗脱。检测波长为 346 nm, 进样量为 10 μL。

取盐酸小檗碱对照品用甲醇溶液稀释至 1 mg · mL⁻¹ 作为对照品储备液在 4 °C 下保存。取对照品储备液逐级稀释 (5 ~ 100 μg · mL⁻¹) 后测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 建立标准曲线, Y = 44.03X + 9.982, R² = 0.999。

同时, 基于课题组前期的研究^[25], 考察所建立

HPLC 方法的方法学, 包括特异性、线性、精密度、准确度、重复性和加样回收率, 结果均符合要求。

2.5 药物溶出度实验

分别取盐酸小檗碱自制片各 6 片, 以超纯水, pH 4.5 醋酸缓冲液, pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质, 参照 2015 年版《中国药典》盐酸小檗碱片溶出度测定法 (篮法) 进行考察。溶出介质为 1000 mL, 转速为 120 r · min⁻¹, 温度设置为 (37 ± 2) °C, 分别在第 5、10、15、20、30、45、60、120 min 取样, 用微孔滤膜过滤后, 进样。依据 CFDA 颁布的《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》, 连续两点溶出量均达 85% 以上, 且差值在 5% 以内, 可作为考察截止时间点选择的依据。从图 5a 中可以看出, 在纯水溶出介质中, 晶 F 型盐酸小檗碱自制片较快溶解, 能有良好的溶出行为; 晶 D 型自制片在 90 min 内累计溶出量达到 85%, 晶 B 型和晶 C 型自制片在此溶出介质中溶出较慢。4 种自制片剂在醋酸缓冲液溶出介质的溶出曲线如图 5b 所示, 晶 B 型、晶 D 型和晶 F 型自制片能在较短时间内达到 85% 溶出量, 表现出良好的溶出行为, 而晶 C 型自制片溶出较慢。如图 5c 所示, 晶 D 型和晶 F 型在磷酸缓冲液溶出较快, 具有良好的溶出行为; 晶 B 型和晶 C 型自制片在此溶出介质中溶出较慢; 此外, 晶 D 型自制片溶出曲线在 20 ~ 60 min 有一定的下降趋势, 可能是晶 D 型盐酸小檗碱发生了一定程度的降解行为。综合考虑 4 种不同晶型自制片在 3 种溶出介质中的溶出行为, 晶 F 型自制片在所有介质中都有较快的溶出行为, 而晶 C 型自制片都表现出较慢的溶出, 晶 B 型和晶 D 型自制片在 3 种溶出介质中表现出不一致的溶出行为。

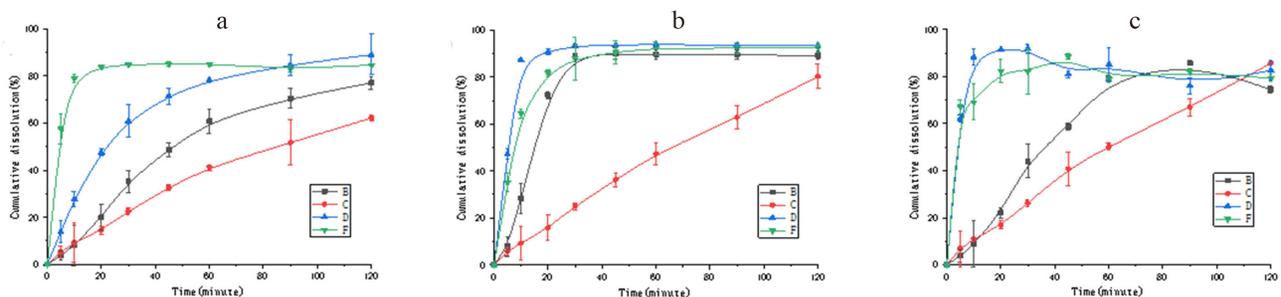


图 5 4 种晶型盐酸小檗碱片在超纯水 (a)、醋酸盐缓冲液 (b)、磷酸盐缓冲液 (c) 的溶出曲线

Fig 5 Dissolution curve of 4 crystal forms of berberine hydrochloride tablets in ultrapure water (a), acetate buffer (b) and phosphate buffer (c)

3 讨论

药物多晶型现象对于药物的研发具有极其重要的意义, 约 70% 临床使用的药物为固体口服制剂, 而且 50% 以上固体药物存在多晶型现象。不同晶型药物对药物的吸湿性、稳定性、生物利用

度、药效以及安全性等产生较大的影响^[26]。由此固体药物选择一种合适的存在形式对于药物应用显得尤为重要。盐酸小檗碱在临床上以盐酸小檗碱片为主要用药剂型, 本研究中采用单一溶剂重结晶法制备了盐酸小檗碱 5 种晶型, 从晶型微观、

红外光谱、热分析以及物质结构分析等多个方面对盐酸小檗碱多晶型进行表征,可以直观且准确地描绘出盐酸小檗碱多晶型在各个方面的差异,为盐酸小檗碱多晶型后续研究提供数据参考。

本实验在前期优化片剂制备工艺的基础上,均采用最佳工艺条件进行制片,设置原料药晶型为实验设计单一变量,考察原料药晶型因素对于片剂溶出度的影响。并依据《普通口服固体制剂溶出曲线测定与指导原则》,根据药物的理化性质,充分考虑体内环境因素的影响,应选择不同 pH 的溶出介质进行溶出度的考察。实验中为模拟体内胃肠道环境,纯水、pH 1.2 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液被选择为 4 种不同 pH 的溶出介质。因在 pH 1.2 的盐酸溶液介质中,盐酸小檗碱的稳定性不好,且在 $5 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系不符合要求,故后续研究中剔除了 pH 1.2 的盐酸溶液的溶出介质。基于多晶型盐酸小檗碱的溶出行为结果,表明晶 F 型自制片在所有介质中都有较快的溶出行为,而比表面积较大的晶 C 型自制片在各介质中都表现出较慢的溶出。溶出速度从快到慢依次为针状、片状和柱状,狭长针状的溶出速度快于针状。

综上所述,本文从药物晶型表征以及研究其对片剂溶出度的影响,发现晶型单晶比表面积对药物溶出行为产生显著的影响。后续研究可关注药物晶型、粒径、形貌等属性对溶出行为的影响,以更加精准地控制原料药质量,并根据临床对药物释放速度的需求,选择不同晶型的原料药制备所需制剂。

参考文献

- 王允雨, 杨玉军, 刘苗苗, 等. 固体药物的多晶型现象及研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50 (3): 79-80.
- Yadav A, Dabke A, Shete A. Crystal engineering to improve physicochemical properties of mefloquine hydrochloride[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36 (9): 1036-1045.
- 李淑娴, 刘登, 刘婷. 多晶型药物研发及制剂最新研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41 (4): 6-28.
- 王哲清. 药物多晶型与有效性[J]. 中国医药工业杂志, 2005 (7): 442-446.
- 陈琳, 陈玲, 张亚珊, 等. 我国药物多晶型研究的现状[J]. 海峡药学, 2020, 32 (12): 1-4.
- Box K, Comer J, Taylor R, et al. Small-scale assays for studying dissolution of pharmaceutical cocrystals for oral administration[J]. AAPS PharmSciTech, 2016, 17 (2): 245-251.
- 吕扬, 张丽, 杨世颖, 等. 多晶型药品的质量控制技术与方法应用要求[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (7): 759-763.
- 杨世颖, 周健, 张丽, 等. 我国化学药物晶型研究现状与进展[J]. 医药导报, 2019, 38 (2): 177-182.
- Mayock S, Saim S, Fleming A. In vitro drug release after crushing: Evaluation of xtampza ER and other ER opioid formulations[J]. Clin Dug Invest, 2017, 37 (12): 1117-1124.
- 王佳, 余世荣, 石金敏, 等. 小檗碱抗炎的分子机制研究[J]. 中医药导报, 2020, 26 (14): 9-12.
- 赵西子, 李文芳, 邢彦超, 等. 小檗碱体内药代动力学及药理活性研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22 (10): 86-90.
- 杨红艳, 许建丽. 星点设计-效应面法优化酶法提取黄连中盐酸小檗碱工艺[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26 (7): 89-93.
- 李彩兰. 小檗碱肠道氧化代谢物抗炎及抗溃疡性结肠炎的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- 陆永彬. 盐酸小檗碱治疗幽门螺旋杆菌感染性胃溃疡临床应用分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5 (A0): 41-42.
- Yang W, She L, Yu K, et al. Jatrorrhizine hydrochloride attenuates hyperlipidemia in a high-fat diet-induced obesity mouse model[J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (4): 3277-3284.
- Pérez-Rubio K, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, et al. Effect of berberine administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion[J]. Metab Syndr Relat D, 2013, 11 (5): 366-369.
- Li H, Wu H, Zhang B, et al. MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion in vitro and in vivo[J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (2): 1430-1438.
- Li J, Liu F, Jiang S, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways[J]. Oncol Lett, 2018, 15 (5): 7409-7414.
- Li X, Zhao S, Shi H, Et al. Berberine hydrochloride IL-8 dependently inhibits invasion and IL-8-independently promotes cell apoptosis in MDA-MB-231 cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32 (6): 2777-2788.
- 刘丹, 曹广尚, 席席, 等. 黄连中生物碱类成分抗心律失常研究概述[J]. 山东中医杂志, 2017, 36 (2): 164-166, 171.
- 曹俊涵, 施颖, 张亿, 等. 90 批盐酸小檗碱片溶出度的测定和评价[J]. 中国药物评价, 2018, 35 (2): 91-93.
- 史云, 王咏梅. 不同溶解方法对盐酸小檗碱片含量测定结果的影响[J]. 山西医药杂志, 2012, 41 (2): 192-193.
- 王莹, 刘继华, 罗璐, 等. 离子色谱法测定盐酸小檗碱片的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29 (3): 62-64.
- 罗小飞, 宋丹青, 苏显英, 等. 提高盐酸小檗碱溶解度的研究[J]. 化学世界, 2016, 57 (7): 393-395.
- 余飞, 周文莉, 阚家义, 等. 11 种盐酸小檗碱片剂在不同溶出度介质中溶出度曲线特征的比较(英文)[J]. J Chin Pharm Sci, 2020, 29 (2): 102-112.
- 陈建. 药物多晶型转变因素的研究进展[J]. 天津药学, 2018, 30 (6): 44-48.

(收稿日期: 2021-03-06; 修回日期: 2021-04-21)

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的新癩片化学成分分析

高旭华, 冯欣, 毕玥琳, 倪诗婷, 杨天歌, 陶欧* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-四极杆-静电轨道场离子阱质谱 (UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 技术对新癩片中的化学成分进行鉴定分析。方法 对新癩片粉末进行加热回流提取, 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm), 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40℃, 进样量 5 μL; 采用 ESI 源在正、负离子模式下分别采集数据。根据化合物精确质荷比及二级碎片离子信息, 结合参考文献数据, 鉴定新癩片水提液中的主要化学成分。结果 从新癩片水提液中鉴定出 54 个化学成分, 包括皂苷、胆酸、酚酸、香豆素等各类化合物。结论 本研究首次采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术研究新癩片中的化学成分, 为新癩片成分及机制层面的研究奠定基础。

关键词: 新癩片; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; 皂苷类; 胆酸类; 酚酸类

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1792-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.005

Chemical constituents of Xinhuang tablets by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

GAO Xu-hua, FENG Xin, BI Yue-lin, NI Shi-ting, YANG Tian-ge, TAO Ou* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the chemical compositions of Xinhuang tablets by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** The powder of Xinhuang tablets was extracted via heating and refluxing. The analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm) column. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid water solution and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The column temperature was 40℃ and the injection volume was 5 μL. The mass spectrometry was acquired with an ESI ion source in both positive and negative ion modes. The components were identified by the precise mass-to-charge ratio, secondary fragmentation and other information with literature data. **Results** Totally 54 compounds were identified, including saponins, bile acids, phenolic acids, and coumarins, etc. **Conclusion** The chemical components of Xinhuang tablets are studied by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS for the first time, providing scientific foundation for the study of the compositions and mechanism of Xinhuang tablets.

Key words: Xinhuang tablet; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; saponin; bile acid; phenolic acid

新癩片主要由肿节风、三七、人工牛黄、猪胆粉、肖梵天花等 8 味中药与西药成分吡罗美辛组成, 有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛的功效。常用于治疗热毒瘀血所致的咽喉肿痛、牙痛、痹痛、胁痛、黄疸及无名肿毒等。

迄今为止, 有关新癩片的研究大多集中于其临床药效观察, 研究表明新癩片对于痛风性关节炎、软组织损伤、骨性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿关节炎等骨伤科疾病均有较好的抗炎镇痛

作用^[1]。此外, 新癩片用于轻症亚急性甲状腺炎、带状疱疹等皮肤疾病、口腔种植牙术后疼痛或口腔正畸疼痛均有较好的治疗作用^[2-5]。目前关于新癩片具体中药成分的研究仅有针对其中某个或某几个特征成分进行含量测定的研究^[6-9], 近期也有学者建立了新癩片的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 并通过比对指认了其中 9 个色谱峰的化学成分^[10]。到目前为止, 尚未见对新癩片化学成分进行全面分析的研究。

作者简介: 高旭华, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药分析学方面的研究, E-mail: gxhgaohua@163.com *通信作者: 陶欧, 女, 副教授, 主要从事中药信息技术在中药质量控制中的应用研究, E-mail: 602213@bucm.edu.cn

Orbitrap 高分辨质谱法具有高分离性能、高灵敏度及高检测能力, 可以进行高精度的定量和定性分析, 已广泛用于中药成分分析、药物动力学等领域^[11]。故本研究首次采用超高效液相色谱-四极杆-静电轨道场离子阱质谱 (UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 技术对新黄片水提液进行检测, 并结合相关文献和化合物质荷比及碎片离子信息, 快速分析鉴定新黄片中的化学成分, 并对其进行药材归属, 为明确新黄片物质基础, 阐明其体内药理作用机制等提供研究基础。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive、Xcalibur、Vanquish Duo UHPLC 系统、Pico 17 高速离心机 (Thermo Scientific); Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm, USA); CPA225D 电子天平 (SARTORIUS); HH-S4A 电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 试剂

质谱级乙腈 (美国赛默飞世尔科技有限公司); 质谱级甲酸 (美国 ROE 公司); 新黄片 (厦门中药厂有限公司, 批号: 200102); 水为纯净水。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

新黄片样品粉碎, 精密称取 2.50 g, 加水 50 mL, 80 °C 水浴加热回流提取 1 h, 取上清液 1 mL, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL, 用水稀释 50 倍, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm), 柱温: 40 °C, 进样量: 5 μL, 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 3 min, 5%B; 3 ~ 16 min, 5% ~ 95%B。

2.3 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源 (ESI), 正负离子交替扫描; 扫描模式为: 全扫描/数据依赖的二级扫描 (Full scan/ddMS²), 扫描范围为 100 ~ 1300 Da, 毛细管温度为 350 °C, 负模式下的喷雾电压为 3800 V, 正模式下的喷雾电压为 3200 V, 鞘气为 35 arb, 辅助气为 15 arb, MS² 采用低、中、高 3 种碰撞能。正离子模式为 20 V、40 V、60 V, 负离子模式为 30 V、50 V、70 V。一级质谱分辨率 Full Scan 70000 FWHM (Full Width at Half Maximum), 二级质谱分辨率: MS/MS 17500 FWHM。

2.4 数据处理分析

通过文献及 PubChem 在线数据库检索, 收集新黄片组方中 8 味中药所含成分的分子式, 英文名称, 准分子离子及特征碎片离子等信息, 建成 Excel 格式质谱数据库。采用 Xcalibur 3.0 数据软件根据分子式计算出精确质量数及可能的准分子离子质荷比, 并以此对采集的质谱数据进行峰提取, 与自建数据库中的准分子离子质荷比、特征碎片离子质荷比以及文献中的裂解规律进行比对分析, 对样品中的化合物进行快速鉴定。

3 结果与分析

考虑到中药组分化学成分复杂, 故采用正、负两种电离模式对新黄片水提液中的成分进行全扫描, 以期鉴定出尽可能多的化学成分。基峰离子谱图 (BPI) 见图 1。

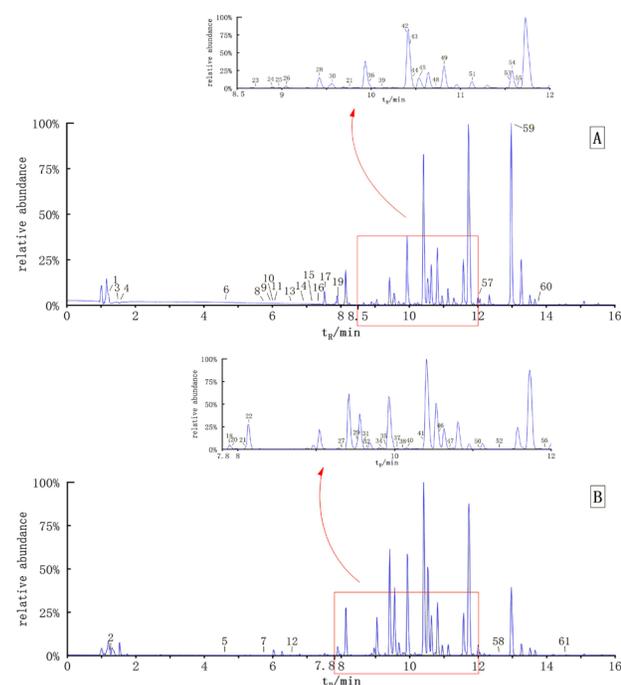


图 1 ESI⁺模式 (A) 和 ESI⁻模式 (B) 下新黄片水提液的 BPI 图
Fig 1 Base peak ion flow diagram of Xinhuang tablets water extract under positive ion (A) and negative ion (B) modes by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

3.1 新黄片化学成分分析

按照“2.4”项下的数据处理方法, 共鉴定出新黄片水提液中化学成分 54 个^[12-34], 结果见表 1, 其中有 2 个成分因存在多个同分异构体, 且可供参考的资料有限, 未能确定其准确保留时间。

3.2 新黄片中主要化学成分的质谱裂解规律

3.2.1 皂苷类化合物 峰 29 保留时间为 9.53 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 1107.5921 [M - H]⁻, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 945.5421、783.4887、621.4365、459.3836, 根据负离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[8, 34]可判断该化合物为 ginsenoside Rb₁。

碎片离子 m/z 945 是 C-3 位连接最外侧的葡萄糖丢失形成, 再进一步丢失一分子葡萄糖形成离子 m/z 783。碎片离子 m/z 783 在 C-17 位支链最外侧丢失一分子葡萄糖形成 m/z 621, 进一步丢失葡萄糖形成离子 m/z 459。其裂解规律如图 2 所示。

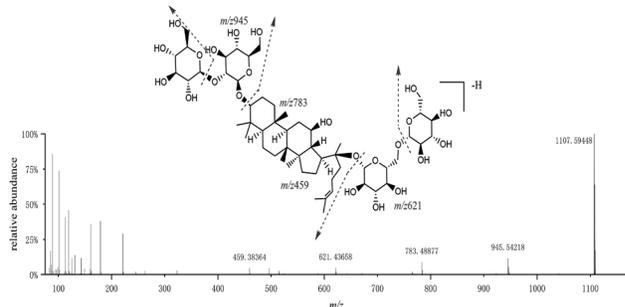


图 2 Ginsenoside Rb₁ 可能的裂解途径
Fig 2 Proposed fragmentation pathways of ginsenoside Rb₁

峰 32 保留时间为 9.63 min, 准分子离子峰 m/z 799.4838 [M-H]⁻, 峰 22 保留时间为 8.14 min, 准分子离子峰 m/z 799.4843 [M-H]⁻, 两者为同分异构体, 均可观察到主要碎片离子 m/z 637、475、391。而在峰 32 的碎片离子中观察到了两个葡萄糖相连形成的 m/z 221.0653 离子, 且峰 22 的 m/z 637 离子丰度高于峰 32 的 m/z 637 离子, 与文献^[14-34]相符, 则可判断峰 32 对应化合物 ginsenoside Rf, 峰 22 对应化合物 ginsenoside Rg₁。两者的裂解规律如图 3 所示。

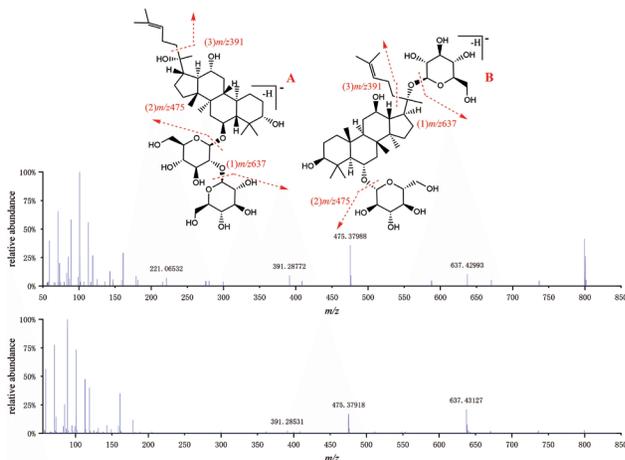


图 3 Ginsenoside Rf (A) 和 ginsenoside Rg₁ (B) 可能的裂解途径
Fig 3 Proposed fragmentation pathways of ginsenoside Rf (A) and ginsenoside Rg₁ (B)

峰 18 保留时间为 7.89 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 931.5243 [M-H]⁻, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 799.4845、637.4315、475.3786、391.2843, 根据负离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[34]可判断该化合物为 notoginsenoside R₁。其裂解规律如图 4。

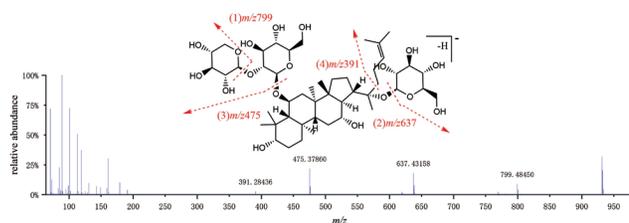


图 4 Notoginsenoside R₁ 可能的裂解途径
Fig 4 Proposed fragmentation pathways of notoginsenoside R₁

3.2.2 胆酸类化合物 峰 54 保留时间为 11.58 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 431.2752 [M+Na]⁺, 同时可观察到一系列脱水离子 m/z 373.2726、355.2623、337.2522, 以及较小丰度的碎片离子 m/z 159.1164、147.1156, 根据正离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[33]可判断该化合物为 hyocholic acid。其裂解规律如图 5。

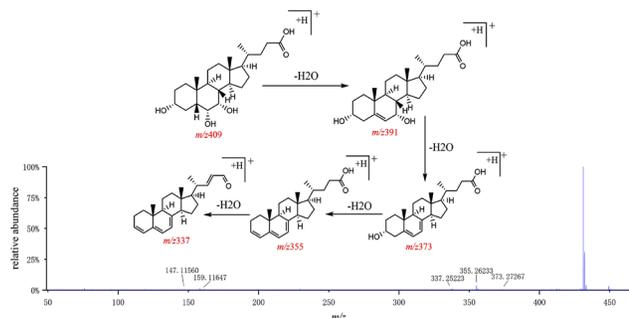


图 5 Hyocholic acid 可能的裂解途径
Fig 5 Proposed fragmentation pathways of hyocholic acid

峰 57 保留时间为 12.01 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 450.3198 [M+H]⁺, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 432.3117、414.2998、339.2683、76.0398、376.2171、158.0811, 根据正离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[33]可判断该化合物为 glycochenodeoxycholic acid。其裂解规律如图 6。

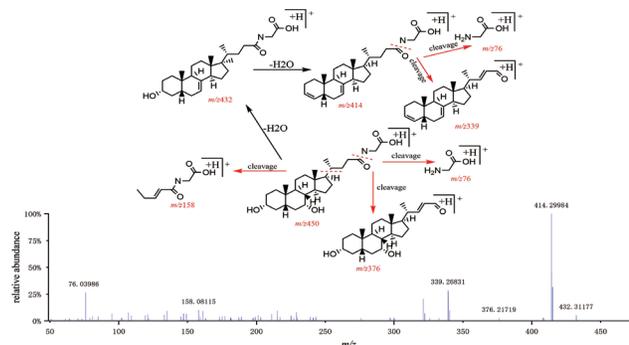


图 6 Glycochenodeoxycholic acid 可能的裂解途径
Fig 6 Proposed fragmentation pathways of glycochenodeoxycholic acid

峰 49 保留时间为 10.82 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 500.3022 [M+H]⁺, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 482.2923、464.2821、339.2675、

表 1 新癪片中化学成分的 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 鉴定结果
 Tab 1 Identified chemical constituents of Xinhuang tablets by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

峰号	保留时间 /min	理论值 / (m/z)	测定值 / (m/z)	误差 /ppm	离子形式	分子式	碎片离子 / (m/z)	化合物鉴定结果	归属
1	1.21	139.0389	139.0387	1.44	[M + H] ⁺	C ₇ H ₆ O ₃	116.9661, 139.9819, 80.9454, 95.0493, 93.0336, 121.0284, 65.0390	salicylic acid	肖梵天花
2	1.25	163.0231	163.0237	- 3.37	[M + COOH] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄	101.0230, 145.0130, 163.0236, 73.0280, 99.0074, 117.0544, 55.0175	succinic acid	肿节风
3	1.51	137.0457	137.0456	0.73	[M + H]	C ₅ H ₄ N ₄ O	137.0456, 114.9710, 138.9857, 110.0351, 119.0353, 94.0403	hypoxanthine	水牛角 / 猪胆粉
4	1.53	268.1040	268.1036	1.57	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0616, 268.1033, 137.0660, 269.1080, 252.1448, 133.0497	adenosine	水牛角 / 猪胆粉
5	4.60	353.0878	353.0872	1.47	[M - H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0551, 179.0340, 135.0438, 353.0873, 173.0442	chlorogenic acid	肿节风
6	4.63	127.0389	127.0388	0.71	[M + H] ⁺	C ₆ H ₆ O ₃	127.0389, 146.9611, 128.9507, 55.9351, 109.0285, 81.0338	5-hydroxymethylfurfural	肿节风
7	5.74	353.0878	353.0873	1.30	[M - H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	173.0444, 179.0339, 191.0550, 135.0439, 353.0874, 355.0939	cryptochlorogenic acid	肿节风
8	5.79	193.0495	193.0492	1.61	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0491, 167.9767, 194.1171, 178.0255, 133.0282, 137.0594	scopoletin	肿节风
9	5.98	179.0338	179.0334	2.23	[M + H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₄	139.9816, 179.0335, 116.9657, 133.0281, 123.0439, 151.0390	esculetin	肿节风
10	6.04	223.0600	223.0605	- 2.06	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	225.0423, 223.0625, 165.0542, 207.0320, 208.0347, 178.1222	isofraxidin	肿节风
11	6.05	181.0495	181.0490	2.38	[M + H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	139.9815, 163.0385, 116.9655, 145.0280, 135.0439, 121.1007	caffeic acid/iso-caffeic acid	肿节风
12	6.55	197.0455	197.0446	4.62	[M - H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	142.9453, 153.0545, 98.9553, 153.0545, 121.0282, 197.0445, 182.0210, 138.0309	syringic acid	肿节风
13	6.56	181.0495	181.0490	2.43	[M + H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	139.9814, 116.9654, 181.0491, 163.0384, 107.0851, 135.0439	caffeic acid/iso-caffeic acid	肿节风
14	6.93	249.1485	249.1479	2.29	[M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	249.1480, 231.1374, 203.1425, 185.1321, 213.1266, 157.1008	atractylenolide III /iso-atractylenolide III	肿节风
15	7.17	181.0495	181.0491	2.21	[M + H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	139.9810, 163.0386, 116.9721, 135.0440, 145.0282, 107.0856	caffeic acid/iso-caffeic acid	肿节风
16	7.33	447.0921	447.0914	1.61	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	271.0594, 272.0629, 91.0576, 447.0924, 167.0549, 273.0658	baicalin	肖梵天花
17	7.53	223.0600	223.0594	2.73	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223.0598, 225.0423, 224.1274, 208.0359, 190.0254, 163.0387	fraxidin	肿节风
18	7.89	931.5271	931.5243	3.04	[M - H] ⁻	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	89.0230, 101.0230, 113.0230, 931.5269, 475.3786, 637.4315, 799.4845, 391.2843	notoginsenoside R ₁	三七
19	7.91	181.0495	181.0489	3.48	[M + H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	163.0386, 139.9819, 116.9719, 145.0281, 135.0438, 107.0857	caffeic acid/iso-caffeic acid	肿节风
20	7.92	359.0772	359.0764	2.28	[M - H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	161.0233, 197.0446, 179.0339, 72.9917, 135.0439, 359.0777	rosmarinic acid	肿节风
21	8.10	945.5428	945.5396	3.34	[M - H] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	89.0230, 101.0230, 113.0230, 945.5423, 161.0444, 475.3790, 637.4307, 783.4897	ginsenoside Re	三七
22	8.14	799.4849	799.4843	0.68	[M - H] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	89.0230, 101.0230, 113.0231, 161.0444, 637.4312, 475.3791, 179.0553, 391.2853	ginsenoside Rg ₁	三七

续表 1

峰号	保留时间/min	理论值/ (<i>m/z</i>)	测定值/ (<i>m/z</i>)	误差 /ppm	离子形式	分子式	碎片离子/(<i>m/z</i>)	化合物鉴定结果	归属
23	8.70	595.1446	595.1430	2.59	[M + H] ⁺	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	147.0437, 287.0542, 148.0472, 165.0543, 119.0491, 291.0860	tilioside	肖梵天花
24	8.90	249.1485	249.1477	3.25	[M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	231.1375, 249.1479, 137.0594, 185.1321, 213.1269, 203.1426	atractylenolide III/iso-atractylenolide III	肿节风
25	8.97	500.3040	500.3029	2.16	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	464.2823, 126.0220, 500.3447, 339.2680, 208.0638, 465.2868	taurodeoxycholic acid/taurohyodeoxycholic acid	人工牛黄/ 猪胆粉
26	9.05	516.2989	516.2974	2.94	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	126.0218, 480.2768, 462.2661, 355.2622, 337.2516, 319.2411	taurocholic acid/taurallocholic acid	人工牛黄
27	9.32	1091.6007	1091.5987	1.82	[M - H] ⁻	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₂	1091.5990, 101.0230, 113.0231, 161.0443, 929.5431, 605.4465, 767.4970	notoginsenoside I	三七
28	9.42	500.3040	500.3022	3.56	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	126.0219, 464.2822, 339.2674, 465.2852, 161.1321, 208.0631, 201.1636	taurodeoxycholic acid/taurohyodeoxycholic acid	人工牛黄/ 猪胆粉
29	9.53	1107.5957	1107.5921	3.16	[M - H] ⁻	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107.5944, 89.0230, 101.0230, 179.0549, 945.5421, 783.4887, 621.4365, 459.3836	ginsenoside Rb ₁	三七
30	9.57	516.2989	516.2971	3.53	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	462.2661, 337.2517, 126.0218, 319.2412, 209.1319, 227.1425	taurocholic acid/taurallocholic acid	人工牛黄
31	9.59	1193.5961	1193.5935	2.13	[M - H] ⁻	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	101.0230, 1107.5943, 1149.6048, 1089.5835, 179.0550, 945.5423, 783.4917	malonyl-ginsenoside Rb ₁	三七
32	9.63	799.4849	799.4838	1.36	[M - H] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	101.0231, 71.0125, 113.0231, 799.4831, 475.3798, 637.4299, 391.2877, 221.0653	ginsenoside Rf	三七
33	9.76	249.1485	249.1479	2.49	[M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	249.1475, 225.0424, 185.1321, 231.1377, 157.1008, 203.1423	atractylenolide III/iso-atractylenolide III	肿节风
34	9.84	769.4743	769.4726	2.29	[M - H] ⁻	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	101.0230, 475.3787, 113.0231, 161.0444, 769.4732, 637.4309, 391.2854	notoginsenoside R ₂	三七
35	9.90	1123.5889	1123.5886	0.27	[M + COOH] ⁻	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₂	1077.5824, 89.0230, 101.0230, 149.0442, 464.3005, 621.4434, 945.5377	ginsenoside Rb ₃	三七
36	9.97	488.2982	488.2963	3.87	[M + Na] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	488.2971, 396.2891, 339.2675, 412.2648, 213.1633, 319.2407	glycocholic acid/glycoursocholic acid	人工牛黄/ 猪胆粉
37	10.03	829.4938	829.4946	-1.02	[M + COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	101.0230, 783.4893, 71.0124, 475.3786, 637.4319, 391.2852	ginsenoside Rg ₂	三七
38	10.10	1077.5851	1077.5833	1.60	[M - H] ⁻	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5849, 945.5384, 101.0231, 783.4851, 621.4360, 149.0440	ginsenoside Rb ₂	三七
39	10.12	271.0964	271.0957	2.66	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	167.0336, 271.0959, 105.0337, 272.0998, 131.0488, 168.0366	pinostrobin chalcone	肖梵天花/ 肿节风
40	10.16	683.4359	683.4364	-0.69	[M + COOH] ⁻	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	101.0230, 161.0443, 637.4314, 475.3781, 683.4364, 113.0229	ginsenoside Rh ₁	三七
41	10.38	945.5428	945.5397	3.28	[M - H] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	101.0230, 945.5412, 113.0230, 783.4877, 459.3840, 621.4352, 221.0668	ginsenoside Rd	三七
42	10.41	472.3033	472.3014	3.94	[M + Na] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₃	472.3025, 76.0397, 432.3100, 414.2995, 339.2675, 321.2571	glycodeoxycholic acid	人工牛黄
43	10.43	466.3163	466.3145	3.86	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	412.2839, 337.2518, 319.2414, 76.0398, 209.1321, 158.0809, 199.1477	glycocholic acid/glycoursocholic acid	人工牛黄/ 猪胆粉

续表 1

峰号	保留时间 /min	理论值 / (m/z)	测定值 / (m/z)	误差 /ppm	离子形式	分子式	碎片离子 / (m/z)	化合物鉴定结果	归属
44	10.45	249.1485	249.1475	3.89	$[M + H]^+$	$C_{15}H_{20}O_3$	249.1477, 231.1375, 177.0907, 185.1322, 203.1427, 213.1270	atractylenolide III/iso-atractylenolide III	肿节风
45	10.53	522.2859	522.2847	2.39	$[M + Na]^+$	$C_{26}H_{45}NO_6S$	148.0036, 486.2640, 504.2742, 522.1985, 464.2824, 361.2480	taurochenodeoxycholic acid	人工牛黄
46	10.56	683.4359	683.4364	-0.69	$[M + COOH]^-$	$C_{36}H_{62}O_9$	89.0230, 161.0444, 71.0124, 475.3786, 391.2861	ginsenoside F ₁	三七
47	10.70	945.5428	945.5410	1.91	$[M - H]^-$	$C_{48}H_{82}O_{18}$	89.0230, 101.0230, 179.0551, 221.0661, 945.5412, 323.0969, 621.4344	notoginsenoside K	三七
48	10.72	249.1485	249.1477	3.09	$[M + H]^+$	$C_{15}H_{20}O_3$	249.1475, 225.0426, 231.1374, 185.1321, 213.1265, 203.9378	atractylenolide III/iso-atractylenolide III	肿节风
49	10.82	500.3040	500.3022	3.62	$[M + H]^+$	$C_{26}H_{45}NO_6S$	464.2821, 126.0219, 339.2675, 465.2854, 321.2564, 201.1635, 482.2923	tauroursodeoxycholic acid	人工牛黄
50	11.09	769.4743	769.4740	0.47	$[M - H]^-$	$C_{41}H_{70}O_{13}$	89.0230, 161.0444, 101.0230, 637.4310, 475.3787, 619.4190	ginsenoside F ₃	三七
51	11.13	409.2948	409.2935	3.25	$[M + H]^+$	$C_{24}H_{40}O_5$	355.2626, 373.2732, 356.2659, 337.2521, 374.2781	cholic acid	人工牛黄
52	11.34	249.0768	249.0762	2.33	$[M - H]^-$	$C_{13}H_{14}O_5$	177.0909, 205.0862, 249.1487, 231.0052, 161.0962	citrinin	红曲
53	11.56	583.2551	583.2529	3.74	$[M + H]^+$	$C_{33}H_{34}O_6N_4$	297.1227, 583.2533, 310.1793, 299.1375, 253.1330	biliverdin	人工牛黄
54	11.58	431.2767	431.2752	3.52	$[M + Na]^+$	$C_{24}H_{40}O_5$	431.2760, 432.2795, 355.2623, 337.2522, 356.2662, 373.2726, 159.1164, 147.1156	hyocholic acid	猪胆粉
55	11.63	472.3033	472.3020	2.77	$[M + Na]^+$	$C_{26}H_{43}NO_5$	76.0398, 414.2996, 472.3026, 339.2675, 432.3102, 321.2568	glycohyodeoxycholic acid	猪胆粉
56	11.92	829.4938	829.4949	-1.31	$[M + COOH]^-$	$C_{42}H_{72}O_{13}$	89.0230, 101.0230, 161.0444, 621.4350, 783.4921, 829.4996, 459.3838	ginsenoside F ₂	三七
57	12.01	450.3213	450.3198	3.33	$[M + H]^+$	$C_{26}H_{43}NO_5$	414.2998, 339.2683, 415.3024, 76.0398, 158.0811, 432.3117, 376.2171	glycochenodeoxycholic acid	人工牛黄 / 猪胆粉
58	12.61	829.4938	829.4951	-1.62	$[M + COOH]^-$	$C_{42}H_{72}O_{13}$	89.0229, 101.0229, 179.0551, 783.4859, 221.0659, 459.3842	ginsenoside Rg ₃	三七
59	12.98	358.0840	358.0822	4.97	$[M + H]^+$	$C_{19}H_{16}ClNO_4$	138.9943, 174.0910, 140.9912, 139.9976, 358.0834, 129.0098	indomethacin	吲哚美辛
60	13.75	385.3464	385.3456	2.13	$[M + H]^+$	$C_{27}H_{44}O$	385.3457, 95.0857, 81.0702, 215.1795, 257.2266, 161.1325	vitamin D ₃	人工牛黄
61	14.54	811.4832	811.4845	-1.52	$[M + COOH]^-$	$C_{42}H_{70}O_{12}$	101.0230, 71.0124, 765.4793, 113.0231, 161.0444, 603.4263	ginsenoside Rk ₁	三七

126.0219, 根据正离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[13-33]可判断该化合物为 tauroursodeoxycholic acid, 其裂解规律如图 7。

3.2.3 酚酸类化合物 峰 5 保留时间为 4.60 min, 准分子离子峰 m/z 353.0872 $[M - H]^-$, 峰 7 保留时间为 5.74 min, 准分子离子峰 m/z 353.0873 $[M - H]^-$, 两者为同分异构体, 均可观察到主要碎片离子 m/z 191、179、173、135, 根

据两者色谱保留时间, 结合相关文献^[32]可判断峰 5 对应化合物 chlorogenic acid, 峰 7 对应化合物 cryptochlorogenic acid, 其中 chlorogenic acid 的裂解规律如图 8。

峰 12 保留时间为 6.55 min, 准分子离子峰 m/z 197.0446 $[M - H]^-$, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 182.0210、153.0545、138.0309、121.0282, 根据负离子模式下的精确分子质量以及特征碎片

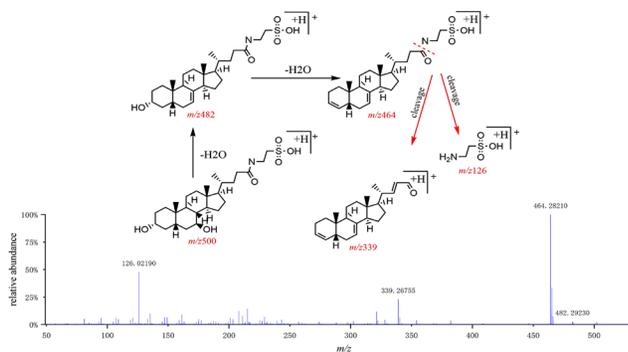


图 7 Tauroursodeoxycholic acid 可能的裂解途径
Fig 7 Proposed fragmentation pathways of tauroursodeoxycholic acid

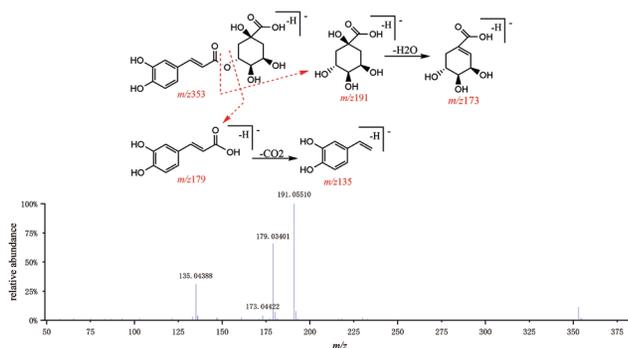


图 8 Chlorogenic acid 可能的裂解途径
Fig 8 Proposed fragmentation pathways of chlorogenic acid

的质量, 结合相关文献^[16, 31]可判断该化合物为 syringic acid, 其裂解规律如图 9。

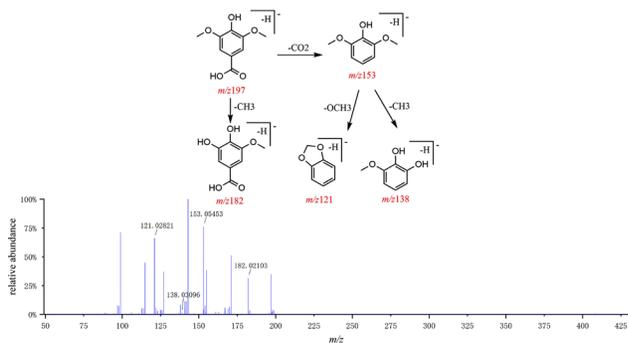


图 9 Syringic acid 可能的裂解途径
Fig 9 Proposed fragmentation pathways of syringic acid

峰 20 保留时间为 7.92 min, 准分子离子峰 m/z 359.0764 $[M - H]^-$, 同时可观察到主要碎片离子 m/z 197.0446、179.0339、161.0233、135.0439, 根据负离子模式下的精确分子质量以及特征碎片的质量, 结合相关文献^[30]可判断该化合物为 rosmarinic acid, 其裂解规律如图 10。

4 讨论

本研究首次采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对新癩片水提液中化学成分进行系统分析, 并对其中 10 种主要成分可能的裂解规律进行具体描述, 以期各成分及其代谢过程的研究

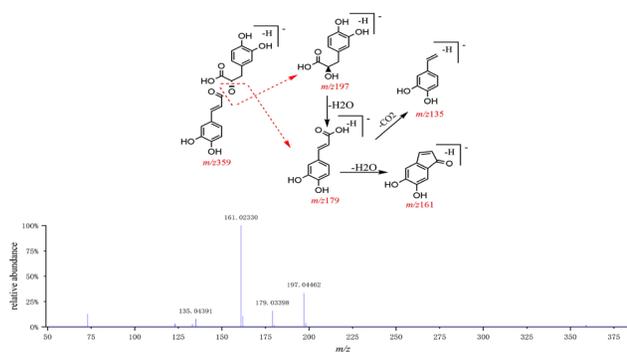


图 10 Rosmarinic acid 可能的裂解途径
Fig 10 Proposed fragmentation pathways of rosmarinic acid

提供依据。

本次研究鉴定出的化合物中, 皂苷类、胆酸类和酚酸类成分中均有镇痛作用的相关报道。谢暎^[35]研究发现 ginsenoside Rg₁ 可显著抑制醋酸致小鼠扭体反应和福尔马林致大鼠疼痛反应, 显示出良好的镇痛活性, 抑制 TRPV1 阳离子通道的激活, 可能是其发挥抗炎和镇痛作用的共同机制。郝文利^[36]研究发现 taurocholic acid 对热刺激、化学刺激和机械刺激对小鼠引起的疼痛均有显著的镇痛作用, 其作用机制与其阻断 DA 受体, 与 5-HT₂ 受体结合, 并降低小鼠脑中 PGE₂ 的含量有关。周怡梅等^[37]的实验研究结果显示, 腹腔处理中高剂量的 chlorogenic acid 能减轻紫杉醇对小鼠引起的机械痛敏, 对外周神经痛有镇痛作用, 其镇痛机制仍有待研究。李继珩等^[38]通过热板试验法发现, tauroursodeoxycholic acid 具有镇痛作用, 且发挥作用的时间比对照药品熊去氧胆酸快。现有研究表明, glycocholic acid 和 taurochenodeoxycholic acid 均可通过抑制 NO、LTB₄、PGE₂ 等炎症介质的产生发挥抗炎作用^[39-40], 此外 taurochenodeoxycholic acid 还能通过提高 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的产生间接发挥抗炎作用。王新亭等^[41]的研究发现, tauroursodeoxycholic acid 对慢性乙型病毒性肝炎残留黄疸的疗效比对照组丁二磺酸腺苷蛋氨酸肠溶片的疗效更佳, 且可能会改善患者的远期预后。这些化合物的药理作用与新癩片消肿止痛、治疗黄疸的功效一致, 且在谱图中有较为明显的峰形, 有可能是新癩片主要的药效物质基础。

此外, 鉴定得到的人参二醇型 -A 型类成分均未发现 m/z 375 的碎片离子, 与赵静等^[14, 34] m/z 459 的碎片离子 C-17 位侧链断裂形成 m/z 375 特征碎片离子的描述不符, 推测可能是质谱条件的设置导致 m/z 459 碎片离子未能进一步断裂导致的。

参考文献

- [1] 陈少东. 新癬片在骨伤科疾病临床应用的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(7): 666-668.
- [2] 岑锴, 李航, 杨祥, 等. 新癬片用于口腔种植术后肿胀疼痛中的治疗效果观察[J]. 世界中医药, 2020, 15(17): 2589-2592.
- [3] 宋群先. 新癬片在皮肤科的临床应用体会[J]. 光明中医, 2018, 33(6): 873-874.
- [4] 魏小平, 潘在兴, 陈小华. 新癬片缓解口腔正畸疼痛的临床疗效观察[J]. 福建医药杂志, 2018, 40(3): 56-58.
- [5] 许言, 许贵勤, 胡少锋. 新癬片治疗轻症亚急性甲状腺炎的疗效观察[J]. 中国社区医师, 2019, 35(8): 116, 118.
- [6] 黄旭东, 刘伟, 徐新元. HPLC法同时测定新癬片中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 1852-1856.
- [7] 罗珍珠. HPLC法测定新癬片中人参皂苷 Rg₁ 含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(9): 64-65.
- [8] 徐新元, 严婷. HPLC测定新癬片中吡罗美辛的含量[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1103-1104.
- [9] 郑丽纯. HPLC法测定新癬片中异嗪皮啶的含量[J]. 海峡药学, 2002, 14(4): 55-56.
- [10] 关斌. 新癬片的高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)指纹图谱建立[J]. 海峡药学, 2020, 32(9): 72-75.
- [11] 张恒斌, 王亮. UPLC-Q-Orbitrap 高分辨质谱定量分析风寒感冒颗粒中的11个成分[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10): 1828-1835.
- [12] 程栋, 申兰慧, 金坚, 等. UPLC-Q/TOF-MS/MS法同时测定丹参川芎嗪注射液中5种酚酸[J]. 中成药, 2019, 41(1): 34-38.
- [13] 霍金海, 孙国东, 魏文峰, 等. UPLC-Q-TOF/MS法分析牛黄清感胶囊成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2340-2348.
- [14] 姜亦南. 基于NIRS以及UHPLC-LTQ Orbitrap MS研究不同产地三七差异[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [15] 焦传新, 王和宇, 李慧, 等. 人参总皂苷定性定量分析及其体内代谢研究[J]. 中药材, 2019, 42(1): 131-135.
- [16] 黎雄, 张玉峰, 杨柳, 等. 关节风酚酸类化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 295-298.
- [17] 李丽, 刘春明, 吴巍, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱联用法测定人参和西洋参的皂苷类成分[J]. 分析化学, 2005, 33(8): 1087-1090.
- [18] 李晓凤, 张少强, 刘金彪, 等. 基于UPLC/Q-TOF MS/MS的稳心颗粒主要成分分析及鉴定[J]. 天津中医药, 2020, 37(8): 943-948.
- [19] 李娅琦, 王梓轩, 肖治均, 等. 猪胆粉主要胆酸类成分的定性定量分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1842-1849.
- [20] 励炯, 朱健, 沈国芳, 等. UPLC-MS/MS测定抗风湿中成药中非法添加布洛芬、双氯芬酸钠和吡罗美辛[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(10): 1234-1238.
- [21] 刘睿, 段金彪, 吴皓, 等. 水牛角中水溶性物质化学组成分析与鉴定[J]. 药学学报, 2015, 50(5): 594-598.
- [22] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS-n分析当归芍药散中化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [23] 孙学, 文红梅, 崔小兵, 等. HPLC-PDA指纹图谱结合UFLC-Q-TOF/MS定性鉴别评价不同产地白术药材质量[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3494-3501.
- [24] 王若柳, 王海强, 范晓辉, 等. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS分析参麦注射液中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 555-564.
- [25] 张晶, 温泉, 徐旭, 等. 基于UHPLC-QTOF-MS/MS技术的铁筷子中3个香豆素在大鼠体内代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4330-4338.
- [26] 张琰, 李方形, 韩铭鑫, 等. 通过RRLC-Q-TOF MS和UPLC-QQQ MS分析原人参三醇型皂苷在人肠道菌群中的代谢产物[J]. 质谱学报, 2020, 41(1): 66-75.
- [27] 周珮珮, 周霖, 孙志, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的丹参川芎嗪注射液主要化学成分识别及含量测定研究[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(4): 327-333.
- [28] Jing Z, Quan W, Ying ZM, et al. Simultaneous determination of three coumarins in rat plasma by HPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of chimonanthi radix extract[J]. J Chromatogr Sci, 2020, 58(10): 922-928.
- [29] Viljoen AM, Zhao J, Sandasi M, et al. Phytochemical distinction between *Pelargonium sidoides* ("Umckaloabo") and *P. reniforme* through 1H-NMR and UHPLC-MS metabolomic profiling[J]. Metabolomics, 2015, 11(3): 594-602.
- [30] 屠亚茹, 欧阳慧子, 孙梦杰, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS方法鉴定血必净注射液中20种化学成分[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(3): 209-213.
- [31] 门磊, 侯梦阳, 胡文忠. 基于LC-LTQ-Orbitrap/MS的复方木鸡颗粒成分分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(6): 1048-1057.
- [32] 赵晓梅, 程宇欣, 梁彩霞, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的吴茱萸化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 113-126.
- [33] 单国顺, 赵启苗, 潘多, 等. 基于UHPLC-Q-TOF MS/MS的胆南星中胆汁酸类成分的质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2020, 41(4): 340-350.
- [34] 赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.
- [35] 谢谦. 人参皂苷 Rg₁ 抗炎、镇痛作用及其作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1592-1597.
- [36] 郝文利. 牛磺胆酸的解热镇痛作用及其作用机理的研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2006.
- [37] 周怡梅, 金莹, 吴磊, 等. 绿原酸对紫杉醇致小鼠外周神经痛的影响[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2019, 33(3): 188-191, 277.
- [38] 李继珩, 刘士忠, 姚文庄. 牛磺熊去氧胆酸镇静与镇痛作用的动物实验[J]. 医药导报, 2002, 21(1): 11-12.
- [39] 李慧峰. 甘氨酸胆酸的抗炎作用及其作用机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [40] 何秀玲. TCDCA 抗炎免疫药理学及药代动力学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [41] 王新亭, 陈欣菊, 张传雷, 等. 牛磺熊去氧胆酸治疗慢性乙型病毒性肝炎残留黄疸的疗效观察[J]. 保健医学研究与实践, 2019, 16(2): 51-53.

(收稿日期: 2021-03-22; 修回日期: 2021-05-13)

飞龙掌血根的化学成分研究

朱勤凤, 聂莉, 陈倩, 雷丹丹, 廖尚高, 徐国波* (贵州医科大学药学院, 贵州 贵安新区 550025)

摘要: 目的 研究飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam. 根的化学成分。方法 运用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶色谱、制备高效液相色谱等方法分离飞龙掌血根乙醇提物的化学成分, 利用理化性质及 NMR, HR-ESI-MS 等波谱数据鉴定化合物结构。结果 从该植物根中分离得到 13 个化合物, 分别鉴定为 6-methoxy-7-demethylcoumurrayin (1)、茵芋内酯 (2)、异茵芋内酯 (3)、珊瑚菜内酯 (4)、走马芹内酯 (5)、布拉易林 (6)、九里香内酯 (7)、别欧前胡素 (8)、飞龙掌血香豆醌 (9)、茵芋碱 (10)、大叶桉亭 (11)、白藜碱 (12) 以及 4 α -ethoxy-10 α -hydroxyguai-6-ene (13), 抑菌活性测试结果表明化合物 11 对白假丝酵母菌有一定的抑制作用。结论 化合物 1 为新化合物, 化合物 13 为首次从芸香科中分离得到。化合物 11 对白假丝酵母菌有一定的抑制作用, MIC 值为 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 飞龙掌血; 香豆素; 生物碱; 化学成分; 6-methoxy-7-demethylcoumurrayin

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1800-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.006

Chemical constituents from the roots of *Toddalia asiatica* (L.) Lam.

ZHU Qin-feng, NIE Li, CHEN Qian, LEI Dan-dan, LIAO Shang-gao, XU Guo-bo* (School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Gui'an New District Guizhou 550025)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from the roots of *Toddalia asiatica* (L.) Lam.. **Methods** The chemical constituents of ethanol extracts from the roots of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. were separated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography. The structures of the isolates were identified by physicochemical properties and spectral analysis. **Results** Totally 13 compounds were isolated and identified as 6-methoxy-7-demethylcoumurrayin (1), pimpinellin (2), isopimpinellin (3), phellopterin (4), moellendorfflin (5), braylin (6), coumurrayin (7), alloimperatorin (8), toddacoumaquinone (9), skimmianine (10), robustine (11), dictamnine (12) and 4 α -ethoxy-10 α -hydroxyguai-6-ene (13). The antimicrobial activity against *Candida albicans* of all the compounds were evaluated. Compound 11 exhibited inhibitory effect on *Candida albicans*. **Conclusion** Compound 1 is a new coumarin derivative, compound 13 is isolated from this genus for the first time, and compound 11 has inhibitory effect on *Candida albicans* with a MIC value of 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words: *Toddalia asiatica*; coumarin; alkaloid; chemical constituent; 6-methoxy-7-demethylcoumurrayin

飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam. 是芸香科飞龙掌血属植物, 又名三百棒、大救驾、三文藤、牛麻筋, 产自秦岭南坡以南各地, 全株用作草药, 多用其根^[1]。《贵州省中药材民族药材质量

标准》记载其具有祛风止痛、散瘀止血、消肿解毒等功效, 主要用于治疗风湿痹痛、胃痛、跌扑损伤等症^[2]。文献报道该植物的化合物结构类型包括香豆素类、生物碱类以及三萜类等^[3], 具有

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2021]一般 554); 贵州省教育厅项目 (黔教合 KY 字 2021156); 贵州医科大学青苗项目 (No.19NSP077); 贵州医科大学博士启动基金项目 (校博合 J 字 2020005 号)。

作者简介: 朱勤凤, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药化学研究, E-mail: zhuqinfengmu@163.com *通信作者: 徐国波, 男, 博士, 副教授, 主要从事微生物次生代谢产物研究, E-mail: xguobo@163.com

抗炎镇痛、抗氧化、止血、抗心血管疾病等药理活性^[4]。为促进飞龙掌血植物资源的综合开发与利用,本实验对采自贵州贵阳的飞龙掌血根开展深入的化学成分研究。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Shimadzu UV-2401A 紫外可见分光光度仪 (Shimadzu 公司, 日本); Bruker Tensor-27 傅里叶变换红外光谱仪、Bruker AV-600 型超导核磁共振仪 (Bruker 公司, 德国); LC3000 制备型高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技); WB-2000 旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); 薄层色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 柱色谱凝胶 (Pharmacia 公司, 瑞典); 沙氏葡萄糖液体培养基 (SDB, 杭州百思生物技术有限公司); 白假丝酵母菌 (ATCC 5314, 广东省微生物保藏中心); 两性霉素 B ($> 750 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$, 批号: J0602A, 大连美仑生物技术有限公司); 所用试剂均为分析纯或色谱纯。

1.2 药材

飞龙掌血药材于 2020 年 6 月采集于贵阳市南明区,经贵州医科大学中药民族药标本馆龙庆德副教授鉴定为芸香科飞龙掌血属植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica*, 留样标本 (No.2020062301) 保存于贵州医科大学药学院天然药物化学教研室。

2 方法

2.1 化合物提取与分离

飞龙掌血干燥根 4.0 kg 粉碎后经 95% 乙醇 (20 L \times 3) 冷浸提取,提取液减压浓缩得流浸膏 580 g。流浸膏上样于 D101 大孔树脂层析柱,40%~95% 乙醇水梯度洗脱,洗脱液经过 TLC 薄层色谱检测,合并相似部分,得到 7 个组分,分别为 Fr.A~Fr.G。

Fr.D (72.0 g) 放置后析出淡黄色针状结晶,即得化合物 2 (17.3 g),其余部分用硅胶柱色谱分离,以石油醚-丙酮 (9:1, *V/V*) 洗脱,得到 16 个组分 Fr.D1~Fr.D16。其中 Fr.D12、Fr.D15 在乙酸乙酯-甲醇溶液中析出淡黄色结晶,用乙酸乙酯-甲醇 (1:1, *V/V*) 反复洗涤,分别得到化合物 10 (30.9 mg) 和化合物 3 (1.2 g)。剩余部分通过薄层色谱 (TLC) 分析后合并相似馏分,得到 12 个组分 (Fr.D1a~Fr.D12a)。Fr.D2a (0.110 g) 经硅胶柱层析、Sephadex LH-20 分离纯化得到化合物 8 (3.2 mg) 和化合物 13 (1.8 mg)。Fr.D3a (1.2 g) 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶色谱分离得到化合物

11 (13.2 mg)。Fr.D4a 段经 Prep-HPLC 液相色谱制备得到化合物 5 [4.9 mg, 甲醇-水 = 54:46 (*V/V*), $t_{\text{R}} = 32.5 \text{ min}$, 流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$] 以及化合物 1 [4.0 mg, 甲醇-水 = 70:30 (*V/V*), $t_{\text{R}} = 19.0 \text{ min}$, 流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$]。

Fr.E (14.602 g) 经硅胶柱层析石油醚-乙酸乙酯 (5:2, *V/V*) 洗脱得到 3 个组分 Fr.E1~Fr.E3。Fr.E1 (62.1 mg) 经硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱纯化得到化合物 6 (6.2 mg) 和化合物 4 (2.0 mg)。Fr.E3 经 Sephadex LH-20 分离得到化合物 7 (3.1 mg) 和化合物 9 (2.3 mg)。Fr.E2 经硅胶柱色谱用不同比例溶剂体系洗脱,得到 5 个组分 (Fr.E2-1~Fr.E2-5), Fr.E2-3 (50.4 mg) 经 Prep-HPLC 液相色谱制备 [甲醇-水 = 54:46 (*V/V*), $t_{\text{R}} = 32.0 \text{ min}$, 流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$] 分离得到化合物 12 (8.6 mg) (各化合物结构见图 1)。

2.2 抗菌活性筛选

将受试菌于一 80 °C 冰箱取出,用接种环挑取一环接种在沙氏葡萄糖液体培养基 (SDB) 里,28 °C 培养 24 h,麦氏比浊法后用无菌蒸馏水稀释至最终浓度为 $(5 \sim 10) \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。采用 96 孔板二倍稀释法检测单体化合物的最低抑菌浓度 (MIC) 值^[5-6],各单体化合物用 0.02% DMSO 无菌水溶液分别配制成 $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,用无菌蒸馏水稀释进行二倍稀释,最终得到质量浓度分别为 256、128、64、32、16、8、4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。在 96 孔板中分别加入 100 μL 不同浓度的样品溶液和 100 μL 受试菌液,设置两性霉素 B 为阳性对照,0.02% DMSO 无菌水溶液为阴性对照和空白对照 (无菌对照组),将接种好的菌株放在 28 °C 培养箱中培养 24 h 后记录 MIC 值。在空白组无细菌生产的情况下,实验孔内完全抑制细菌生长的最低样品浓度为该样品对受试细菌的 MIC 值,各样品每次实验重复 3 次。

3 结果

3.1 化合物结构鉴定

化合物 1: 无色针状晶体 (甲醇)。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 331, 258, 204 nm; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1729, 1602, 1428, 1171, 1055 cm^{-1} 。HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 289.1085[M-H]⁻ (计算值为 289.1081), 确定其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$, 不饱和度为 8。化合物 1 的 ¹H-NMR (CD_3OD , 600 MHz) 谱数据 (见表 1) 显示其有 2 个甲氧基信号, δ_{H} 4.07 (3H, s, -OCH₃), δ_{H} 3.80 (3H, s, -OCH₃), 2 个甲基信号 δ_{H} 1.70 (3H, s, 4'-CH₃), δ_{H} 1.79 (3H, s, 5'-CH₃), 1 对烯炔质子信号 δ_{H} 7.88

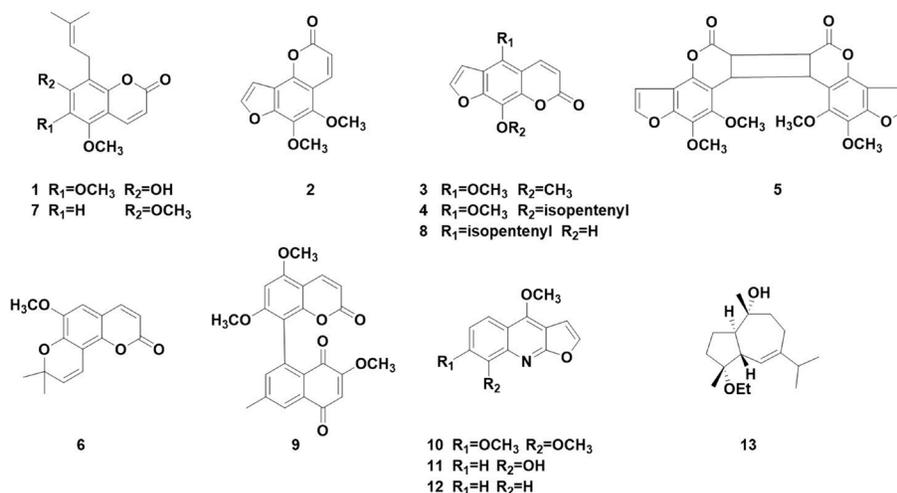


图 1 化合物 1 ~ 13 的化学结构

Fig 1 Structure of compound 1 ~ 13

(1H, d, $J = 9.7$ Hz) 和 δ_H 6.21 (1H, d, $J = 9.7$ Hz); 1 个活泼羟基信号 δ_H 6.33 (1H, s); 1 个烯烃信号 δ_H 5.21 (1H, m) 和 1 个亚甲基信号 δ_H 3.39 (2H, d, $J = 6.9$ Hz)。同时 $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz) 结合 HSQC 谱表明该化合物含有 16 个碳, 分别为 1 个酯基 (δ_C 160.5), 3 个烯碳 (δ_C : 139.7, 121.8, 112.1), 2 个甲氧基 (δ_C : 63.6, 62.0), 2 个甲基 (δ_C : 25.9, 18.0), 1 个亚甲基 (δ_C : 23.2), 7 个季碳 (δ_C : 151.2, 151.1, 145.5, 132.8, 130.5, 118.5, 107.2)(见图 2)。

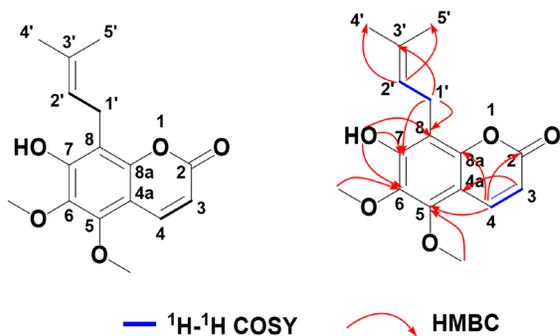


图 2 化合物 1 的化学结构及主要 $^1H-^1H$ COSY、HMBC 相关信号

Fig 2 Structure, $^1H-^1H$ COSY, and key HMBC of compound 1

在 HMBC 谱中, δ_H 1.70 (4'-CH₃) 和 1.79 (5'-CH₃) 分别与 δ_C 132.8 (C-3') 和 121.8 (C-2') 有相关关系, 结合 $^1H-^1H$ COSY 谱中观察到的 δ_H 5.21 (H-2') \leftrightarrow 3.39 (2H-1') 质子自旋偶合体系, 表明分子结构存在异戊烯基片段; δ_H 6.33 (7-OH) 与 δ_C 130.5 (C-6)、151.2 (C-7)、118.5 (C-8) 有相关, δ_H 3.39 (2H-1') 与 δ_C 151.2 (C-7)、118.5 (C-8) 有相关, 确定 1 个羟基和异戊烯基分别位于 C-7 和 C-8 上。 δ_H 3.80 (5-OCH₃) 和 δ_C 151.1 (C-5) 有相关, δ_H 4.07 (6-OCH₃) 和 δ_C 130.5 (C-6) 有相关, 表明 C-5 和 C-6 位发生甲氧基取代。 δ_H 7.88 (H-4) 与 δ_C 160.5 (C-2) 和 145.5 (C-8a) 相关, δ_H 6.21 (H-3) 与 δ_C 160.5 (C-2) 和 δ_C 107.3 (C-4a) 相关以及 δ_H 6.21 (H-3) \leftrightarrow 7.88 (H-4) 偶合体系的存在, 推测分子中存在不饱和和内酯环。该化合物的 NMR 数据与文献报道的化合物 6-methoxycoumurrayin^[7] 具有较高的相似度, 不同之处在于该化合物少了 7 位的甲氧基信号。根据 ^1H-NMR 和 $^{13}C-NMR$ 谱信号结合 $^1H-^1H$ COSY, HSQC 和 HMBC 谱信息, 对化合物碳氢信号进行归属 (见表 1)。

表 1 化合物 1 的 ^1H-NMR 和 $^{13}C-NMR$ 数据 (CD_3OD , 600 MHz/150 MHz)
Tab 1 ^1H-NMR and $^{13}C-NMR$ data of compound 1 (CD_3OD , 600 MHz/150 MHz)

位置	δ_H	δ_C	位置	δ_H	δ_C
2		160.5	8		118.5
3	6.21 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H)	112.1	8a		145.5
4	7.88 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H)	139.7	1'	3.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H)	23.2
4a		107.3	2'	5.21 (m, 1H)	121.8
5		151.1	3'		132.8
6		130.1	4'	1.70 (s, 3H)	25.9
7		151.2	5'	1.79 (s, 3H)	18.0
5-OCH ₃	3.80 (s, 3H)	63.6	7-OH	6.33 (s, 1H)	
6-OCH ₃	4.07 (s, 3H)	62.0			

根据以上数据推断, 确定化合物 **1** 的结构鉴定为 6-methoxy-7-demethylcoumurrayin, 是一个新的香豆素类化合物。

化合物 **2**: 淡黄色针状结晶 (甲醇), HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 247.0606 $[M + H]^+$ (计算值为 247.0601), 分子式: $C_{13}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6.37 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, H-3), 8.10 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, 4-H), 7.66 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-2'), 7.08 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-3'), 4.03 (3H, s, 5-OCH₃), 4.14 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 161.0 (C-2), 114.2 (C-3), 140.0 (C-4), 109.5 (C-4a), 144.5 (C-5), 135.2 (C-6), 143.3 (C-7), 113.8 (C-8), 149.9 (C-8a), 145.5 (C-2'), 104.4 (C-3'), 62.5 (6-OCH₃), 61.3 (5-OCH₃)。以上数据与文献^[8]报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为茴芹内酯。

化合物 **3**: 淡黄色针状结晶 (甲醇), HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 247.0605 $[M + H]^+$ (计算值为 247.0604), 分子式: $C_{13}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6.21 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 8.05 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.56 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.00 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 4.09 (3H, s, 5-OCH₃), 4.10 (3H, s, 8-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 160.5 (C-2), 112.8 (C-3), 139.4 (C-4), 107.6 (C-4a), 144.3 (C-5), 114.8 (C-6), 150.0 (C-7), 128.2 (C-8), 143.6 (C-8a), 145.1 (C-2'), 105.1 (C-3'), 60.8 (5-OCH₃), 61.7 (8-OCH₃)。以上数据与文献^[9]报道的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为异茴芹内酯。

化合物 **4**: 淡黄色粉末, HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 301.1076 $[M + H]^+$ (计算值为 301.1071), 分子式: $C_{17}H_{16}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6.21 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 8.51 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.55 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.92 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 4.77 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 5.53 (1H, m, H-2''), 1.67 (3H, s, 4'-CH₃), 1.63 (3H, s, 5'-CH₃), 4.11 (3H, s, 5-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 160.5 (C-2), 112.8 (C-3), 139.4 (C-4), 107.5 (C-4a), 144.3 (C-5), 114.5 (C-6), 150.8 (C-7), 126.9 (C-8), 144.3 (C-8a), 145.1 (C-2'),

105.0 (C-3'), 70.4 (C-1''), 119.8 (C-2''), 139.7 (C-3''), 25.8 (C-4''), 18.0 (C-5''), 60.7 (5-OCH₃)。以上数据与文献报道^[10]基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为珊瑚菜内酯。

化合物 **5**: 浅黄色粉末, HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 493.1131 $[M + H]^+$ (计算值为 493.1129), 分子式: $C_{26}H_{20}O_{10}$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 4.04 (2H, m, H-3, H-3''), 4.39 (1H, m, H-4, H-4''), 7.45 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-2', H-2''), 6.73 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-3', H-3'''), 3.83 (3H, s, 5-OCH₃, 5''-OCH₃), 3.67 (3H, s, 6-OCH₃, 6''-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 164.7 (C-2, C-2''), 39.7 (C-3, C-3''), 38.2 (C-4, C-4''), 106.4 (C-4a, C-4a''), 139.4 (C-5, C-5''), 134.5 (C-6, C-6''), 148.1 (C-7, C-7''), 113.7 (C-8, C-8''), 147.5 (C-8a, C-8a''), 60.7 (5-OCH₃, 6-OCH₃, 5''-OCH₃, 6''-OCH₃), 144.5 (C-2', C-2'''), 103.9 (C-3', C-3''')。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为走马芹内酯。

化合物 **6**: 白色针状结晶 (甲醇)。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6.26 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-3), 7.58 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-4), 6.77 (1H, s, H-5), 5.75 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H-3'), 6.88 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H-4'), 3.89 (3H, s, 6-OCH₃), 1.53 (6H, s, -CH₃×2); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 161.4 (C-2), 113.4 (C-3), 144.4 (C-4), 111.6 (C-4a), 108.7 (C-5), 145.7 (C-6), 146.0 (C-7), 110.4 (C-8), 144.7 (C-8a), 78.2 (C-2'), 131.0 (C-3'), 115.4 (C-4'), 56.7 (6-OCH₃), 28.1 (-CH₃×2)。以上数据与文献报道^[12]基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为布拉易林。

化合物 **7**: 白色粉末, HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 275.1281 $[M + H]^+$ (计算值为 275.1278), 分子式: $C_{16}H_{18}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 6.14 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 7.98 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 6.31 (1H, s, H-6), 3.43 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 5.19 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2'), 1.65 (3H, s, 4'-CH₃), 1.82 (3H, s, 5'-CH₃), 3.91 (3H, s, 5-OCH₃), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 162.1 (C-2), 110.4 (C-3), 139.18 (C-4), 104.1 (C-4a), 155.5 (C-5), 90.6

(C-6), 161.2 (C-7), 111.1 (C-8), 153.8 (C-8a), 21.7 (C-1'), 122.1 (C-2'), 132.5 (C-3'), 18.3 (C-4'), 26.2 (C-5'), 56.3 (5-OCH₃), 56.2 (7-OCH₃)。以上数据与文献报道^[13]基本一致,故鉴定化合物 7 为九里香内酯。

化合物 8: 淡黄色针状结晶(甲醇), HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 271.0968 [M + H]⁺ (计算值为 271.0965), 分子式: C₁₆H₁₄O₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-3), 8.09 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-4), 7.73 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 3.75 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1''), 5.06 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, H-2''), 1.69 (3H, s, 4''-CH₃), 1.86 (3H, s, 5''-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 162.9 (C-2), 113.9 (C-3), 143.8 (C-4), 115.1 (C-4a), 123.7 (C-5), 126.8 (C-6), 146.7 (C-7), 130.0 (C-8), 142.0 (C-8a), 147.7 (C-2'), 106.8 (C-3'), 28.5 (C-1''), 124.0 (C-2''), 133.3 (C-3''), 18.2 (C-4''), 25.8 (C-5'')。以上数据与文献报道^[14]基本一致,故化合物 8 鉴定为别欧前胡素。

化合物 9: 橙色粉末, HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 407.1134 [M + H]⁺ (计算值为 407.1125), 分子式: C₂₃H₁₈O₇。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 6.05 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-3), 7.97 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4), 6.34 (1H, s, H-6), 3.93 (3H, s, 5-OCH₃), 3.74 (3H, s, 7-OCH₃), 6.05 (1H, s, H-3'), 7.93 (1H, s, H-5'), 7.23 (1H, s, H-7'), 3.70 (3H, s, 2'-OCH₃), 2.43 (3H, s, 6'-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 161.5 (C-2), 111.1 (C-3), 139.0 (C-4), 104.0 (C-4a), 156.8 (C-5), 90.5 (C-6), 160.5 (C-7), 110.4 (C-8), 152.9 (C-8a), 56.2 (5-OMe), 56.3 (6-OMe), 185.4 (C-1'), 160.7 (C-2'), 108.7 (C-3'), 179.9 (C-4'), 133.6 (C-4a'), 127.5 (C-5'), 144.9 (C-6'), 138.8 (C-7'), 133.3 (C-8'), 127.2 (C-8'a), 56.5 (2'-OCH₃), 22.0 (6'-CH₃)。以上数据与文献报道^[15]基本一致,故化合物 9 鉴定为飞龙掌血香豆醌。

化合物 10: 淡黄色棱晶(甲醇), HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 260.0921 [M + H]⁺ (计算值为 260.0917), 分子式: C₁₄H₁₃NO₄。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7.91 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-5), 7.15 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-6),

7.50 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-2'), 6.93 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-3'), 4.32 (3H, s, 4-OCH₃), 3.94 (3H, s, 7-OCH₃), 4.03 (3H, s, 8-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 163.3 (C-2), 101.0 (C-3), 156.2 (C-4), 113.8 (C-4a), 117.2 (C-5), 110.9 (C-6), 140.3 (C-7), 151.1 (C-8), 140.8 (C-8a), 141.9 (C-2'), 103.6 (C-3'), 60.0 (4-OCH₃), 55.7 (7-OCH₃), 60.6 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16],故鉴定该化合物为茵芋碱。

化合物 11: 无色粉末, HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 216.0655 [M + H]⁺ (计算值为 216.0655), 分子式: C₁₂H₉NO₃。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7.47 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-2), 6.91 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-3), 7.58 (1H, m, H-5), 7.21 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.07 (1H, m, H-7), 4.28 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 162.5 (C-2), 103.8 (C-3), 157.5 (C-4), 118.7 (C-4a), 110.3 (C-5), 124.2 (C-6), 113.0 (C-7), 151.0 (C-8), 135.7 (C-8a), 143.3 (C-2'), 105.0 (C-3'), 59.0 (4-OCH₃)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定该化合物为大叶桉亭。

化合物 12: 无色针状结晶(氯仿), HR-ESIMS 给出其准分子离子峰 m/z 200.0710 [M + H]⁺ (计算值为 200.0706), 分子式: C₁₂H₉NO₂。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7.43 ~ 8.26 (4H, m, Ar-H), 7.06 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-10), 7.61 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-11), 4.43 (3H, s, 4-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 163.9 (C-2), 103.5 (C-3), 156.9 (C-4), 118.8 (C-4a), 122.5 (C-5), 123.8 (C-6), 129.7 (C-7), 127.9 (C-8), 145.7 (C-8a), 143.6 (C-2'), 104.9 (C-3'), 59.1 (4-OCH₃)。以上数据与文献报道数据一致^[18],故鉴定该化合物为白藜碱。

化合物 13: 无色油状物。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.43 (1H, s, H-6), 2.2 (1H, m, H-11), 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 12-CH₃), 0.92 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 13-CH₃), 1.91 (3H, s, 14-CH₃), 1.20 (3H, s, 15-CH₃), 3.37 (5H, q, $J = 8.0$ Hz, -OCH₂CH₃), 1.10 (5H, t, $J = 8.0$ Hz, -OCH₂CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 49.9 (C-1), 37.2 (C-2), 40.5 (C-3), 80.2 (C-4), 48.1 (C-5), 121.1 (C-6), 149.6 (C-7), 22.4 (C-8), 24.6 (C-9), 79.0

(C-10), 36.2 (C-11), 21.6 (C-12), 21.5 (C-13), 18.5 (C-14), 21.2 (C-15), 55.8 (OCH₂), 16.3 (OCH₂CH₃)。以上数据与文献^[19-20]报道基本一致,故鉴定该化合物为 4 α -ethoxy-10 α -hydroxyguai-6-ene。

3.2 抗菌活性筛选

考察了单体化合物对白假丝酵母菌 ATCC 5314 的抑制作用。结果显示化合物 **11** 对白假丝酵母菌 ATCC 5314 有一定抑制作用, MIC 值为 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (阳性对照两性霉素 B MIC 值 < 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。剩余化合物在浓度为 128 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对白假丝酵母菌未显示明显抑制作用。

4 讨论

本文对飞龙掌血根的 95% 乙醇提取液进行化学成分研究,从中分离鉴定化合物 **13** 个,包括 9 个香豆素类化合物 (**1** ~ **9**)、3 个喹啉生物碱类化合物 (**10** ~ **12**) 以及 1 个愈创木烷型倍半萜类化合物 (**13**)。其中化合物 **1** 为新化合物,化合物 **13** 为首次从芸香科中分离得到。前期对飞龙掌血的化学成分研究主要集中在香豆素和生物碱类成分,笔者从中分离到了新的香豆素类化合物及倍半萜类成分,丰富了飞龙掌血的化学信息。文献报道飞龙掌血根的乙醇提取物有明显的抑菌效果^[21-22];白假丝酵母菌的抑制活性测试结果表明,仅有化合物 **11** 具有一定的白假丝酵母菌抑制活性,提示可能是其他结构类型的化合物发挥抗菌作用,需要进一步研究阐明。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
 [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材民族药材质量标准 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
 [3] 房士明, 方刚, 刘睿, 等. 飞龙掌血化学成分的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43 (2): 239-248.
 [4] 楚冬海. 中药材飞龙掌血研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (34): 19374-19375.
 [5] Marta CTD, Glyn MF, Adilson S, et al. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 97 (2): 305-311.
 [6] Andreas R, Ervival AMZ, Johana R, et al. Screening of in vitro antimicrobial activity of plants used in traditional indonesian medicine [J]. Pharm Biol, 2018, 56 (1):

287-293.

- [7] Lv HN, Wang S, Zeng KW, et al. Anti-inflammatory coumarin and benzocoumarin derivatives from *Murraya alata* [J]. J Nat Prod, 2015, 78 (2): 279-285.
 [8] Yang SY, Liu MC, Liang N, et al. Discovery and antitumor activities of constituents from *Cyrtomium fortunei* (j.) smith rhizomes [J]. Chem Cent J, 2013, 7 (1): 1-10.
 [9] 杨长水, 韩苏乔, 周童, 等. 黄花三宝木中香豆素类成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (24): 5751-5755.
 [10] 夏少立, 曹悦, 李庆林, 等. 新疆一枝蒿的化学成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51 (13): 3393-3398.
 [11] 吴寿金, 李德玉, 张丽. 走马芹中香豆素成分的研究 [J]. 药学学报, 1986, 21 (8): 599-604.
 [12] 张艳军, 聂辉, 何瑞杰, 等. 桂野桐中香豆素类化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52 (21): 1889-1892.
 [13] Hisashi I, Junichi K, Munekazu I, et al. Studies on the chemical constituents of rutaceae++ plants. LXVI. The chemical constituents of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. (*T. aculeata* Pers.). (1). Chemical constituents of the root bark [J]. Yakugaku zasshi, 1991, 111 (7): 365-375.
 [14] 卢嘉, 金丽, 金永生, 等. 中药杭白芷化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28 (3): 294-298.
 [15] Hisashi I, Junichi K, Hiroko S, et al. Toddacoumaquinone, a unique coumarin-naphthoquinone dimer from *Toddalia asiatica* (L.) Lam. (*T. aculeata* Pers.) [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40 (5): 1358-1359.
 [16] 张军锋, 张名楠, 梁远学, 等. 三丫苦的化学成分研究 (ii) [J]. 海南大学学报 (自然科学版), 2011, 29 (1): 39-41.
 [17] 郭丽娜, 王芮, 裴月湖, 等. 白鲜皮化学成分的研究 [J]. 中成药, 2016, 38 (11): 2409-2413.
 [18] 吴蓉蓉, 田书璿, 陈勇, 等. 青花椒生物碱类化学成分及生物活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (6): 1305-1309.
 [19] Anjaneyulu ASR, Gowri PM. Two new guaiane sesquiterpenoids from the soft coral sarcophytonbuitendijki of the andaman and nicobar island of the Indian ocean [J]. Indian J Chem, 2000, 39B (10): 773-778.
 [20] 梅雪伟. 两种鄂西药用植物的化学成分研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
 [21] 丁文, 文赤夫, 陈建华, 等. 飞龙掌血提取物抑菌作用初步研究 [J]. 生物质化学工程, 2007, 41 (5): 33-35.
 [22] 侯幼红, 王正文. 七种中草药对白念珠菌体外粘附作用的影响及电镜观察 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 1990, 4 (3): 136-138.

(收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-05-03)

UPLC-Q-TOF-MS 分析畲药地苣的化学成分

曹丹^{1,2}, 赵崇军², 王海燕¹, 卫博文¹, 蒋杨雨¹, 林瑞超^{2*}, 李健^{1*} (1. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102488)

摘要: **目的** 应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 对畲药地苣的化学成分进行分析鉴定。**方法** 采用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱, 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱; 选择电喷雾离子源, 正负离子模式下采集数据, 通过各色谱峰的质谱数据与 Waters UNIFI 天然产物数据库匹配, 并结合二级碎片的裂解规律和文献报道进行解析。**结果** 15 min 内可快速筛选出地苣中 28 种化学成分, 包括 15 个黄酮类, 6 个鞣质, 4 个酚酸, 2 个三萜, 1 个寡糖, 其中 16 种成分为首次在地苣中发现。**结论** 该方法能准确、高效、快速地鉴定地苣中的化学成分, 为深入评价地苣药材质量奠定了基础。

关键词: 地苣; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱; 化学成分; 裂解途径

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1806-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.007

Chemical constituents in She medicine *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-Q-TOF-MS

CAO Dan^{1,2}, ZHAO Chong-jun², WANG Hai-yan¹, WEI Bo-wen¹, JIANG Yang-yu¹, LIN Rui-chao^{2*}, LI Jian^{1*} (1. *School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488*; 2. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488*)

Abstract: Objective To identify and analyze chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-Q-TOF-MS. **Methods** The separation was performed on Acquity UPLC HSS T3 column. The mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% formic acid water (B) for gradient elution. Electron spray ionization (ESI) source was adopted with both positive and negative ion modes. The mass spectrum of each peak was indentified by matching with the Waters UNIFI natural products database, and was analyzed with cracking rules of second-level fragments and related literatures. **Results** Totally 28 components were quickly identified in 15 min, including 15 flavones, 6 tannins, 4 phenolic acids, 2 triterpenoids and 1 oligosaccharide, 16 of which were detected in *Melastoma dodecandrum* Lour. for the first time. **Conclusion** This method is rapid, efficient and accurate to identify the chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour., which can lay a foundation for further quality evaluation of *Melastoma dodecandrum* Lour.

Key words: *Melastoma dodecandrum* Lour.; UPLC-Q-TOF-MS; chemical constituent; fragmentation pathway

地苣别称地苣、地茄子、地葡萄、铺地锦等, 为野牡丹科野牡丹属植物地苣 (*Melastoma dodecandrum* Lour.) 的干燥全草。民间使用广泛, 为畲族常用药材, 畲民多称嘎狗噜或粪桶板^[1]。

地苣具有清热化湿、祛瘀止痛、收敛止血之功效。现代药理研究表明, 地苣提取物有镇痛消炎、降血糖、调血脂、止血、抗氧化、抗肝炎等作用^[2-4]。地苣含有多种化学成分, 主要有黄酮类、甾体类、

作者简介: 曹丹, 女, 在读博士研究生, 主要从事中医药防治肝病研究, E-mail: 602532834@qq.com *通信作者: 李健, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中医药防治肝病研究, E-mail: lijian@bucm.edu.cn; 林瑞超, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制与品质评价研究, E-mail: linrch307@sina.com

萜类、鞣质、多糖类、有机酸等化合物^[5]。然而,目前关于地菘有效成分的深入研究相对较少,因此,针对地菘建立快速的分析方法,对于地菘药理活性物质的深入研究及开发利用具有重要参考价值。

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)具有高分辨率、高灵敏度和高分离度等优点,可在缺少对照品的情况下对复杂中药成分进行定性分析,近年来已迅速成为中药材成分分析领域的重要研究方法^[6]。本文采用UPLC-Q-TOF-MS技术结合UNIFI天然产物数据库,对地菘提取物中小分子成分进行快速、全面的分析,为进一步提升地菘药材的质量控制和阐明药效物质基础提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Acquity UPLC I-Class 超高效液相色谱仪、Q-TOF MS 串联飞行时间四级杆质谱仪(Waters 公司), BT224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器)。

1.2 试药

地菘(采自福建,批号:20140421,经北京中医药大学中药鉴定教研室刘春生教授鉴定野牡丹科植物 *Melastoma dodecandrum* Lour. 的干燥全草)。乙腈(色谱纯, Fisher), 甲酸(分析纯, 北京化工厂), 亮氨酸-脑啡肽(对照品, Sigma 公司), 水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相: 乙腈(A)~0.1%甲酸水(B), 梯度洗脱(0~1 min, 2%A; 1~10 min, 2%~30%A; 10~12 min, 30%~100%A; 12~13 min, 100%A; 13~13.5 min, 2%A; 13.5~15 min, 2%A), 柱温: 40℃; 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI); 毛细管电压: 正离子模式 3.0 kV, 负离子模式 2.5 kV; 锥孔电压: 40 V; 离子源温度: 110℃; 脱溶剂气温度: 450℃; 锥孔气: 150 L·h⁻¹; 脱溶剂气: 800 L·h⁻¹; 实时校正标准物: 亮氨酸脑啡肽([M+H]⁺=556.2771, [M-H]⁻=554.2615)。

2.3 供试品溶液的制备

取地菘粉末(过60目筛)4.0 g, 精密称定, 置250 mL圆底烧瓶中, 精密加入80%甲醇50

mL, 密塞, 称定质量, 加热回流提取3 h, 放冷至室温, 再称定质量, 用提取溶剂补足减失的质量, 摇匀, 取5 mL置10 mL量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 13 000 r·min⁻¹离心5 min, 上清液即为供试品溶液。

2.4 数据处理及谱库检索方法

采用UNIFI软件对正、负离子模式下地菘提取液LC-MS/MS的Raw data(MSe采集模式, 含全部一级、二级质谱峰信息)进行分析, 结合已报道的化学成分建立地菘成分数据库, 检索Waters UNIFI软件中天然产物数据库, UNIFI软件通过母离子的精确质量数、同位素峰度模型、子离子精确质量数等参数自动匹配中药数据库里已有化合物, 误差小于5 ppm, 至少匹配上1个子离子, 且一级质谱响应值大于10 000 筛选鉴定结果, 软件自动产生提取离子流图、一级质谱匹配结果和二级碎片匹配结果。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF/MS 分析地菘提取液总离子流图

采用UPLC-Q-TOF/MS对地菘提取液的化学成分进行定性分析, 得到地菘提取液(+)ESI-MS和(-)ESI-MS的质谱总离子流图(见图1)。

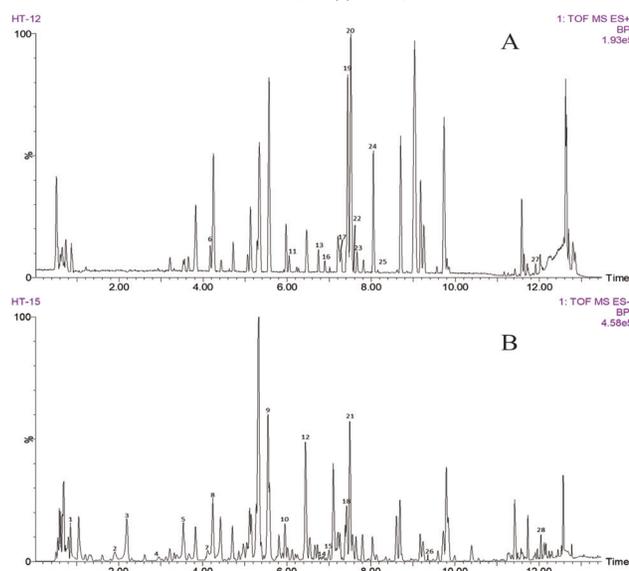


图1 正(A)、负(B)离子模式下地菘提取液总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of *Melastoma dodecandrum* Lour. extraction in positive (A) and negative (B) ion mode

3.2 地菘化学成分的结构鉴定

通过查阅文献^[7-25]、使用UNIFI软件对正、负离子模式下地菘提取液LC-MS/MS的Raw data(MSe采集模式)进行分析, 检索Waters UNIFI软件中天然产物数据库, 结合文献资料、Chemspider等数据库以及质谱裂解规律等, 推断可能的化学成

分及其裂解过程, 对地菘的化学成分结构进行分类, 并对主要碎片离子信息进行归属, 结果见表 1。

表 1 地菘化学成分鉴定结果

Tab 1 Identification of chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour.

峰号	t_R /min	测量值 / (m/z)	理论值 / (m/z)	误差 /ppm	离子模式	分子式	推测化合物	二级碎片
1	0.83	665.2199	666.2219	2.8	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	水苏糖 ^[26]	647.2039, 485.1512, 179.0558
2	1.90	331.0671	332.0739	1.2	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	单没食子酰葡萄糖 ^[10]	211.0250, 169.0142
3	2.19	169.0134	170.0215	1.0	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 ^[10]	125.0235, 124.0164
4	2.90	783.0686	784.0766	0.8	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	英国椴鞣花酸 ^[17]	765.0578, 481.0631, 169.0140
5	3.54	783.0688	784.0754	0.7	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	二逆没食子酰基葡萄糖 ^[18]	603.0636, 481.0621, 300.9989
6	4.13	611.1594	610.1534	2.1	[M + H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	nelumboside A ^[8]	287.0543, 105.0331
7	4.27	593.1293	594.1303	0.2	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	表没食子儿茶素(4, 8)-没食子儿茶素 ^[15]	305.0661, 287.0543, 153.0188
8	4.39	355.0304	356.0307	0.9	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	诃子次酸 ^[22]	169.0141
9	5.39	933.0716	934.0737	1.6	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	栗木鞣花素 ^[19]	915.0691, 783.0684, 631.0738
10	6.02	457.0772	458.0846	0.7	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯 ^[16]	302.0019, 169.0141
11	6.08	595.1277	594.1584	3.6	[M + H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3-O-鼠李糖葡萄糖苷 ^[9]	287.0543, 153.0178
12	6.45	935.0798	936.0869	0	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	casuarinin ^[10]	917.0691, 633.0734, 153.0179
13	6.74	449.1071	448.1005	1.7	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 ^[7]	329.0655, 287.0541, 153.0183
14	6.79	937.0924	938.1025	0.9	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	tellimagrandin II ^[20]	785.0745, 633.0728, 300.9987
15	6.88	447.0923	448.1002	0.8	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 ^[11]	327.0507, 285.0403
16	6.90	449.1071	448.1005	0.4	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 ^[7]	329.0655, 287.0541, 153.0183
17	7.28	617.1133	616.1064	0.6	[M + H] ⁺	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	desmanthin-1 ^[12]	303.0493, 153.0181
18	7.39	609.1445	610.1534	0.1	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁 ^[7]	301.0320, 151.0037
19	7.41	465.1036	464.0963	0.9	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 ^[13]	303.0498, 153.0184, 109.0283
20	7.44	433.1133	432.1056	0	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	牡荆素 ^[7]	313.0703, 283.0603, 153.0182
21	7.45	951.0896	952.0818	0.6	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	老鹤草素 ^[21]	933.0637, 300.9992, 169.0142
22	7.52	433.1135	432.1056	0.1	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	异牡荆素 ^[7]	313.0703, 283.0603, 153.0182
23	7.66	465.1021	464.0963	0.7	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 ^[13]	303.0498, 153.0184, 109.0283
24	8.10	595.1657	594.1657	0	[M + H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3-O-刺槐二糖苷 ^[14]	449.1080, 287.0545, 153.0184
25	8.37	287.0549	286.0477	0.9	[M + H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚 ^[7]	153.0185
26	9.42	717.1457	718.1234	1.3	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	丹酚酸 B ^[23]	519.0924, 321.0403, 161.0246
27	11.91	453.3353	452.3291	2.3	[M + H] ⁺	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	灵芝酸 S ^[24]	261.1840, 219.1744
28	12.18	517.3173	518.3235	1.6	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	2-羟基高陆酸 ^[25]	485.3381, 471.3114, 171.1023

3.2.1 黄酮类成分裂解规律分析 黄酮类化合物在 MS/MS 正离子模式下, 易得到 [M + H]⁺ 的分子离子峰。黄酮苷会失去糖基产生 [M + H-glc]⁺ 的特征性苷元碎片离子, 游离的黄酮苷元主要有两种裂解方式, 方式 I: 苷元 C 环的逆-狄尔斯-阿尔德反应 (RDA) 裂解产生 m/z 153 和 m/z 134 的碎片离子; 方式 II: 苷元还可以裂解产生 m/z 137 和 m/z 109 质谱碎片信息。以木犀草素-7-O-葡萄糖苷为例, 对黄酮类化合物质谱裂解规律进行探讨, 木犀草素-7-O-葡萄糖苷可能的裂解途径如图 2 所示, 与文献^[7]木犀草素-7-O-葡萄糖苷对照品碎片一致, 推测峰 13 为木犀草素-7-O-葡萄糖苷。

峰 6、11、15~20、22~25 为黄酮或黄酮醇类化合物, 正/负离子模式下, 分子离子峰 m/z 依次是 611.1594 [M + H]⁺, 595.1277 [M + H]⁺, 447.0923 [M + H]⁺, 449.1071 [M + H]⁺, 617.1133 [M + H]⁺, 609.1445[M-H]⁻, 465.1036[M +

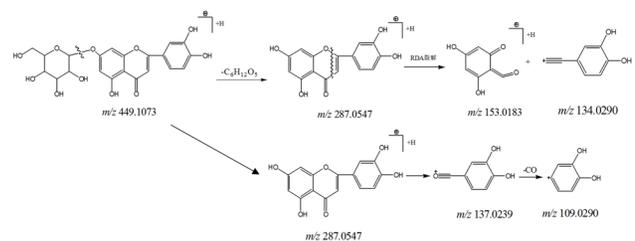


图 2 木犀草素-7-O-葡萄糖苷裂解途径

Fig 2 Fragmentation pathway of luteolin-7-O-glucoside

H]⁺, 433.1133 [M + H]⁺, 433.1135 [M + H]⁺, 465.1021 [M + H]⁺, 595.1657 [M + H]⁺, 287.0549 [M + H]⁺, 黄酮苷失去糖基后, 形成的黄酮苷元易产生正离子模式 m/z 153, 负离子模式 m/z 151 及 m/z 109 的特征碎片, 结合文献^[7-14], 推测峰 6、11、15~20、22~25 依次为 nelumboside A、山柰酚-3-O-鼠李糖葡萄糖苷、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷(峰 13 的同分异构体)、desmanthin-1、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、牡荆素、异牡荆素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(峰 19 的同分异构

体)、山柰酚-3-*O*-刺槐二糖苷和山柰酚。

峰 7 的分子离子峰为 m/z 593.1293 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 m/z 305.0661 $[M-H-C_{15}H_{13}O_6]^-$ ， m/z 287.0543 $[M-H-C_{23}H_{21}O_8]^-$ ， m/z 153.0188 $[C_7H_5O_4]^-$ 等特征峰，查阅文献^[15]，推测其为表没食子儿茶素(4,8)-没食子儿茶素。峰 10 的分子离子峰为 m/z 457.0772 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 m/z 169.0141 $[C_7H_5O_5]^-$ 的特征峰，查阅文献^[16]，推测其为表没食子儿茶素-3-*O*-没食子酸酯。

3.2.2 鞣质类成分裂解规律分析 鞣质是由没食子酸葡萄糖(多元醇)酯或其衍生物聚合物组成的多元酚。其 MS/MS 易失去 H_2O 、 CO_2 、 CO 和 glc 等碎片峰，通过失去六羟基联苯二甲酰基(HHDP, m/z 301)，没食子酰基(-galloyl, m/z 152)而发生裂解，HHDP 和没食子酸(m/z 169)也是鞣质的特征碎片。以 casuarinin 为例，推测鞣质类化合物可能的裂解途径(见图 3)，峰 12 在负离子模式下，其分子离子峰为 m/z 935.0798 $[M-H]^-$ ，失去一分子 H_2O 产生碎片离子 917.0691 $[M-H-H_2O]^-$ ，失去一分子 HHDP 产生 633.0734 $[M-H-HHDP]^-$ 的碎片离子，失去一分子没食子酰基产生 153.0179 $[-galloyl]^-$ 的碎片，查阅文献^[10]，推测其为 casuarinin。

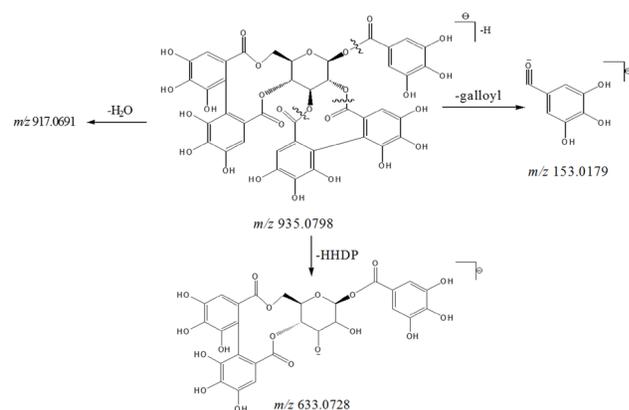


图 3 Casuarinin 的裂解途径

Fig 3 Fragmentation pathway of casuarinin

峰 4 的分子离子峰为 m/z 783.0686 $[M-H]^-$ ，失去一分子 H_2O 产生碎片离子 765.0578 $[M-H-H_2O]^-$ ，二级扫描产生 481.0631 $[M-H-HHDP]^-$ 和没食子酸 169.0140 $[C_7H_5O_5]^-$ 的碎片离子，查阅文献^[17]，推测其为英国栎鞣花酸。峰 5 的分子离子峰为 m/z 783.0688 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 603.0636 $[M-H-C_8H_5O_5]^-$ ，481.0621 $[M-H-HHDP]^-$ ，300.9989 $[HHDP]^-$ 的碎片离子，查阅文献^[18]，推测其为二逆没食子酰基葡萄糖。峰 9 的分子离子峰为 m/z 933.0716 $[M-H]^-$ ，二级扫

描产生 915.0691 $[M-H-H_2O]^-$ ，783.0684 $[M-H-galloyl]^-$ ，631.0738 $[M-H-HHDP]^-$ 的碎片离子，查阅文献^[19]，推测其为栗木鞣花素。峰 14 的分子离子峰为 m/z 937.0924 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 785.0745 $[M-H-galloyl]^-$ ，300.9987 $[HHDP]^-$ 查阅文献^[20]，推测其为 tellimagrandin II。峰 21 的分子离子峰为 m/z 951.0896 $[M-H]^-$ ，失去 1 分子 H_2O 产生 933.0637 $[M-H-H_2O]^-$ ，结合 300.9992 $[HHDP]^-$ 和 169.0142 $[C_7H_5O_5]^-$ 的特征碎片，查阅文献^[21]，推测其为老鹳草素。

3.2.3 有机酸和其他成分裂解途径推测 峰 2 的分子离子峰为 m/z 331.0671 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 211.0250 $[M-H-C_4H_9O_4]^-$ ，169.0142 $[M-H-glc]^-$ 等特征峰(见图 4)，查阅文献^[10]，推测其为单没食子酰葡萄糖。

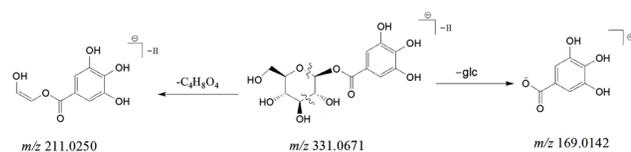


图 4 单没食子酰葡萄糖的裂解途径

Fig 4 Fragmentation pathway of galloylglucose

峰 3 的分子离子峰为 m/z 169.0134 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 125.0235 $[M-CO_2]^-$ 特征峰，查阅文献^[10]，推测其为没食子酸。峰 8 的分子离子峰为 m/z 355.0304 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 169.0141 $[M-H-C_7H_6O_6]^-$ 特征峰，查阅文献^[22]，推测其为诃子次酸。峰 26 的分子离子峰为 m/z 717.1457 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 519.0924 $[M-H-C_9H_{11}O_5]^-$ ，321.0403 $[M-H-C_{18}H_{21}O_{10}]^-$ ，161.0246 $[M-H-C_{27}H_{25}O_{13}]^-$ 等特征峰，查阅文献^[23]，推测其为丹酚酸 B。

峰 27 的分子离子峰为 m/z 453.3353 $[M+H]^+$ ，二级扫描产生 261.1840 $[M+H-C_{13}H_{19}O]^+$ ，219.1744 $[M+H-C_{15}H_{21}O_2]^+$ 等碎片离子，查阅文献^[24]，推测其为灵芝酸 S。峰 28 的分子离子峰为 m/z 517.3173 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 485.3381 $[M-H-OH-CH_3]^-$ ，471.3114 $[M-H-COOH]^-$ ，171.1023 $[C_6H_5O_3]^-$ 等特征峰，查阅文献^[25]，推测其为 2-羟基商陆酸。

峰 1 的分子离子峰为 m/z 665.2199 $[M-H]^-$ ，二级扫描产生 647.2039 $[M-H-H_2O]^-$ ，485.1512 $[M-H-rha]^-$ ，179.0558 $[C_6H_{11}O_6]^-$ 等特征峰，查阅文献^[26]，推测其为水苏糖。

4 讨论

目前，关于地蕊的化学成分研究较少，查阅已报道的文献^[5]，仅分离纯化得到 78 个化合物。

为进一步分析地苳中的化学成分,本课题组前期已分析鉴定出地苳中 109 种物质^[10],通过比对发现本次试验中有 6 个成分(没食子酸、单没食子酰葡萄糖、牡荆素、芦丁、casuarinin 和山柰酚)与文献^[10]报道一致。本文采用了与之不同的提取方式,提取的化合物多以极性成分(鞣质、黄酮苷、酚酸等)为主,既对已分离得到的地苳中化合物进行了验证,又补充和丰富了地苳中的化学成分,为完善地苳药材质量标准提供了参考。

比较正、负离子模式下的地苳提取液总离子流图发现,黄酮类化合物的一级质谱中正离子模式下的响应优于负离子,且正离子模式下其 MS/MS 碎片更为稳定、更具有特征性,因此,选择正离子模式下对黄酮类进行分析;鞣质和酚酸类物质在一级质谱中负离子模式下的响应优于正离子,在负离子模式下碎片较为丰富,特征碎片强度较高,因此,选择在负离子模式下对鞣质和酚酸类进行分析,故本文同时选择正、负离子模式对地苳的化学成分进行数据采集。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,通过检索 Waters UNIFI 软件中天然产物数据库、Chemspider 数据库等,结合文献资料以及质谱裂解规律,初步鉴定出 28 个化学成分,包括 15 个黄酮、6 个鞣质、4 个酚酸、2 个三萜和 1 个寡糖,其中 16 种成分为首次在地苳中发现。由于天然产物数据库质谱信息有限和质谱无法鉴定同分异构体,本研究尚有含量较高成分未指认,需进一步分离鉴定,增加对照品进行验证,也为未来继续研究地苳中新成分提供了方向。

参考文献

- [1] 陈志英,李水福.浅谈畚药地苳的研究概况[J].中草药,2007,38(7):1117-1118.
- [2] 梁丽清.地苳多糖降血糖作用及其机制研究[D].南宁:广西中医药大学,2020.
- [3] 李丽,罗泽萍,周焕第,等.地苳提取物降血脂作用的试验研究[J].时珍国医国药,2012,23(11):2783-2784.
- [4] 岑祚洁.地苳水提物和醇提物抗鸭乙型肝炎病毒及护肝作用的实验研究[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [5] 王金凤,张评沛,王雨彤,等.民族药地苳研究进展[J].中草药,2018,49(5):1211-1219.
- [6] 罗媛,王昌权,巩仔鹏,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析苗药云实皮的化学成分[J].中国药房,2020,31(20):2481-2486.
- [7] 张霞.基于液质联用技术的中药黄酮类成分的体内外代谢研究以及鸭跖草化学成分的定性定量分析[D].石家庄:河北医科大学,2018.
- [8] 郑凌云,周秋菊,王玲玲.UPLC-Q-ToF/MS 非靶向快速筛查野樱莓冻干粉中的多酚类化合物[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2020,33(2):276-280.
- [9] 秦振娟,张瑜,齐梦蝶,等.中国沙棘和西藏沙棘叶中化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析[J].中国中药杂志,2016,41(8):1461-1468.
- [10] Wang JF, Jia ZY, Zhang ZH, et al. Analysis of chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS [J]. *Molecules*, 2017, 22(3):476-495.
- [11] 李金,陈莲英,金恩惠,等.不同茶树品种的茶树花黄酮苷研究[J].浙江大学学报,2019,45(6):707-714.
- [12] 王腾蛟.绿芫菁成分定性分析、斑蝥素含量测定及斑蝥素与其衍生物抗肿瘤活性研究[D].桂林:广西师范学院,2018.
- [13] 王方方,康莹,张权,等.北京妙峰山玫瑰花渣中黄酮类成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J].中国现代中药,2017,19(11):1550-1554.
- [14] 代吉瑞,魏文峰,霍金海,等.不同采收期刺五加叶黄酮类成分动态变化分析[J].中国农学通报,2019,35(12):151-156.
- [15] Xin ZQ, Ma SS, Ren DB, et al. UPLC-Orbitrap-MS/MS combined with chemometrics establishes variations in chemical components in green tea from Yunnan and Hunan origins [J]. *Food Chem*, 2018, 266(11):534-564.
- [16] 林小珊,黄丽,夏宁,等.六堡茶酚类物质的分析鉴定及指纹图谱研究[J].轻工科技,2019,35(6):8-11,18.
- [17] 田静丽.具有免疫保护作用的核桃多酚活性成分研究[D].北京:北京林业大学,2018.
- [18] 陈晨.胡桃楸水提取物在体内的代谢与分布及没食子和丁香酸的药代动力学研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [19] Abdel-Hameed SE-S, Bazaid AS, Shohayeb MM. RP-HPLC-UV-ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. [J]. *Chem Pap*, 2014, 68(10):1358-1367.
- [20] 李师.藏药毛诃子化学成分及体外抗癌活性的研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [21] 周坤,简平,梁文仪,等.基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析藏药诃子与毛诃子化学成分[J].质谱学报,2020,41(3):254-267.
- [22] 吴尤娇,陈汀波,姬云青,等.UHPLC-QTOF-MSMS 比较两种不同基原火炭母的化学成分[J].天然产物研究与开发,2019,31(4):638-642,626.
- [23] 王红蕾,齐崑,吴小东,等.丹参水溶性多酚酸的多级串联电喷雾离子阱质谱断裂机理解析[J].质谱学报,2008,29(3):129-136.
- [24] 高越.基于组学和网络药理学的养心氏片抗心衰作用机理研究[D].上海:第二军医大学,2016.
- [25] 孙雨,刘润花,向延柳,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析消痞和胃胶囊的化学成分[J].国际药学研究杂志,2020,47(6):463-470.
- [26] 苏娜.糖类 HPLC-MS 分析方法及其质谱裂解规律的研究[D].长沙:湖南师范大学,2010.

(收稿日期:2021-01-29;修回日期:2021-03-04)

LC-MS/MS 法同时测定肾移植患者血浆中霉酚酸及两种代谢物浓度

蒋振伟, 杨旭萍, 蒋艳, 凌静, 董露露, 邹素兰, 陈荣, 胡楠* (常州市第一人民医院药学部, 江苏 常州 213003)

摘要: **目的** 建立 LC-MS/MS 法同时测定肾移植患者血浆中霉酚酸 (MPA) 及其代谢物 MPAG 和 AcMPAG 的浓度。**方法** 以稳定同位素 (MPA-d3) 为内标、甲醇-乙腈溶液 (9:1, V/V) 沉淀蛋白, 采用色谱柱 Kinetex C₁₈ (3 mm×100 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA), 流动相为水 (0.1% 甲酸, 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)-甲醇 (0.1% 甲酸) 溶液, 梯度洗脱, 流速 0.55 mL·min⁻¹。质谱选用 ESI 离子源, 正离子多反应监测扫描检测, 测定肾移植患者服药前及服药后血浆 MPA 及代谢物 MPAG 和 AcMPAG 的浓度。**结果** MPA 在 0.2~50 μg·mL⁻¹, MPAG 在 1~250 μg·mL⁻¹, AcMPAG 在 0.08~20 μg·mL⁻¹ 与测定值线性关系良好, 定量限分别为 0.2、1 和 0.08 μg·mL⁻¹。MPA 及其代谢物日内与日间精密度、准确度、提取回收率、基质效应、稳定性均符合方法学要求。**结论** 本法快速、灵敏、准确, 可用于检测肾移植患者血浆中 MPA 及代谢物 MPAG 和 AcMPAG 的浓度。

关键词: LC-MS/MS; 霉酚酸; 代谢物; 肾移植; 血药浓度

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1811-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.008

Simultaneously determination of mycophenolic acid and two metabolites in the plasma of renal transplant patients by LC-MS/MS

JIANG Zhen-wei, YANG Xu-ping, JIANG Yan, LING Jing, DONG Lu-lu, ZOU Su-lan, CHEN Rong, HU Nan* (Department of Pharmacy, Changzhou First People's Hospital, Changzhou Jiangsu 213003)

Abstract: Objective To determine mycophenolic acid (MPA) and its metabolites MPAG and AcMPAG in the plasma of renal transplant patients by LC-MS/MS. **Methods** The protein was precipitated in a methanol-acetonitrile solution (9:1, V/V) with a stable isotope (MPA-d3) as the internal standard. The gradient elution was performed on a Kinetex C₁₈ column (3 mm×100 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.55 mL·min⁻¹ with the mobile phase water (0.1% formic acid, 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate)-methanol (0.1% formic acid) solution. ESI ion source was used for the mass spectrometry and positive ion multiple reaction monitoring (MRM) scanning detection. The concentrations of plasma MPA and metabolites MPAG and ACMPAG were determined before and after the administration. **Results** The linearity was at 0.2~50 μg·mL⁻¹ for MPA, 1~250 μg·mL⁻¹ for MPAG and 0.08~20 μg·mL⁻¹ for AcMPAG. The limits of quantitation were 0.2, 1 and 0.08 μg·mL⁻¹, respectively. The intra-day and inter-day precision, accuracy, extraction recovery rate, matrix effect, and stability of MPA and its metabolites all met the methodological requirements. **Conclusion** This method is rapid, sensitive and accurate, which is suitable to detect the concentrations of MPA and two metabolites in the plasma of renal transplant patients.

Key words: LC-MS/MS; mycophenolic acid; metabolite; kidney transplantation; blood drug concentration

基金项目: 常州市科技计划 (应用基础研究指导性) 项目 (No. CJ20199010, No. CJ20189008); 江苏省卫健委高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才科研项目 (No. LGY2020033)。

作者简介: 蒋振伟, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, E-mail: triumphjzw@163.com * **通信作者:** 胡楠, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事药代动力学方面的研究, E-mail: hn_324@163.com

霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA) 是由青霉菌发酵生成的有机弱酸, 在体内通过抑制次黄嘌呤核苷酸脱氢酶的活性, 阻断嘌呤核苷酸的合成, 抑制 T、B 淋巴细胞的增殖, 从而发挥免疫抑制效应^[1]。MPA 在体内主要通过尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphate glucuronyl-transferase, UGT) 代谢为葡萄糖醛酸化物 (MPA-glucuronide, MPAG) 和酰基化的葡萄糖醛酸化物 (acyl-MPA-glucuronide, AcMPAG)^[2], 各化合物结构见图 1。MPA 的药动学个体间差异较大, 且浓度与疗效和不良反应有关^[2], 治疗药物监测具有重要意义。MPAG、AcMPAG 与 MPA 游离药物浓度、肝肠循环及二次峰浓度等有密切关联^[3-4], 因此测定上述三者血药浓度于 MPA 血药浓度监测、指导临床合理用药有实际意义。现有的关于 MPA 及其代谢物血药浓度测定的方法基本是测定其中的单一化合物。同时测定 MPA、MPAG、AcMPAG 有助于提高测定效率和药物检测时效。本研究建立了同时测定血浆中三者浓度的 LC-MS/MS 法。

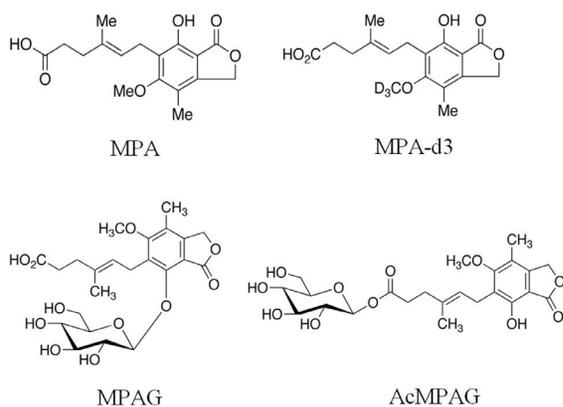


图 1 MPA、MPAG、AcMPAG 及 MPA-d3 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of MPA, MPAG, AcMPAG and MPA-d3

1 材料

1.1 仪器

Jasper HPLC 液相色谱仪, Triple Quad 4500MD 三重四极杆串联质谱仪 (AB SCIEX, 美国), Vortex-Genie 2 涡旋混合器 (Scientific industries, 美国), 5417R 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国), Direct-Q 纯水仪 (Millipore, 美国), BT25S 电子分析天平 (Sartorius, 德国)。

1.2 试剂

MPA (纯度: 98%, 批号: 3-BKG-19-1)、MPAG (纯度: 96%, 批号: 2-FAI-5-1)、AcMPAG (纯度: 95%, 批号: 6-PQY-99-1) (Toronto Research Chemicals 公司), 内标 MPA-d3 (纯度: 98%, 批号: 3-ACA-246-4, Cmass 公司)。甲醇 (色谱纯, Merck

公司); 甲酸和乙酸铵 (分析纯, Sigma-Aldrich 公司); 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kinetex C₁₈ (3 mm×100 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA), 流动相 A: 水 (0.1% 甲酸, 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵), 流动相 B: 甲醇 (0.1% 甲酸), 梯度洗脱: 0~0.8 min, 60%A; 0.8~3.8 min, 0%A; 3.8~4 min, 60%A; 4~5 min, 60%。流速: 0.55 mL·min⁻¹, 柱温: 40℃。

2.2 质谱条件

ESI 正离子检测模式, 多反应监测 (MRM) 扫描。各成分选用的离子对和 DP、CE 电压如下:

MPA: *m/z* 321.0 → 303.2, 75 V 和 15 V; MPAG: *m/z* 514.0 → 303.3, 30 V 和 18 V; AcMPAG: *m/z* 514.0 → 207.0, 30 V 和 50 V; 内标 MPA-d3: *m/z* 324.1 → 306.0, 110 V 和 15 V。

2.3 对照品储备液的配制

取 MPA 5 mg、MPAG 2.5 mg、AcMPAG 0.5 mg, 加入适量甲醇溶解, 配制成 MPA、MPAG 及 AcMPAG 质量浓度分别为 5、5、0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。分别取对照品储备液适量, 混合配制成 MPA、MPAG 及 AcMPAG 质量浓度分别为 0.5、2、0.4 mg·mL⁻¹ 混合对照品储备液。

2.4 血浆样品处理

取血浆 50 μL, 加入 5 μL 内标 MPA-d3 (10 μg·mL⁻¹), 再加入 200 μL 甲醇-乙腈溶液 (9:1), 涡旋震荡 3 min, 16 400 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL, 加入 50% 甲醇溶液 180 μL, 涡旋 30 s, 16 400 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 100 μL 进样。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 取 6 份不同来源的人空白血浆、加入对照品储备液的人血浆样品、用药后的血浆样品按照“2.4”项下方法处理分析。结果 MPA、MPAG、AcMPAG 和内标 (MPA-d3) 的保留时间分别为 2.8、2.39、2.58 和 2.79 min, 血浆中内源性物质在待测物保留时间内无干扰, 结果见图 2。

2.5.2 标准曲线和定量限 精密量取混合对照品储备液适量, 加甲醇稀释成含 MPA (2、4、10、25、50、100、250、500 μg·mL⁻¹), MPAG (10、20、50、125、250、500、1250、2500 μg·mL⁻¹), AcMPAG (0.8、1.6、4、10、20、40、100、200 μg·mL⁻¹) 的混合工作溶液。取混合工作液 5 μL, 加入空白血浆 45 μL, 制备标准

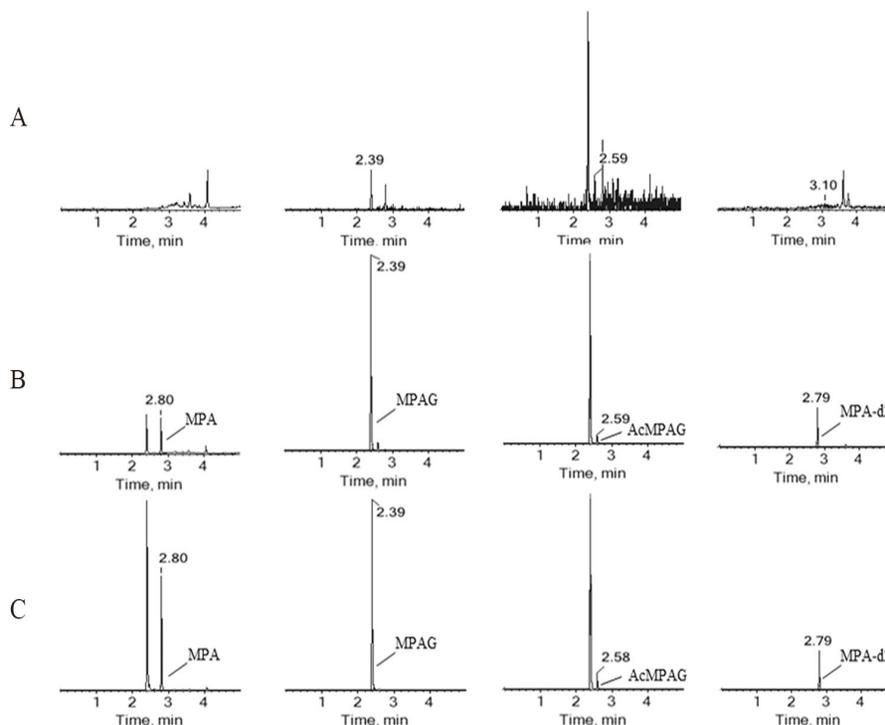


图 2 血浆中 MPA、MPAG、AcMPAG 和内标 MPA-d3 的 LC-MS/MS 色谱图

Fig 2 LC-MS/MS chromatogram of MPA, MPAG, AcMPAG and MPA-d3 in the plasma

A. 空白血浆 (blank plasma sample); B. 空白血浆加混合对照品 (blank plasma sample spiked with mixed standard solution); C. 患者服药后的血浆样品 (plasma sample)

系列溶液。按“2.4”项下方法处理。以待测物与内标物峰面积比 Y 为纵坐标，待测物质量浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，以加权 ($W = 1/\chi^2$) 最小二乘法进行线性回归运算，结果 MPA 标准曲线为： $Y = 3.754X + 0.3733$ ($r = 0.9926$)；MPAG 标准曲线为： $Y = 0.4653X + 0.1271$ ($r = 0.9941$)；AcMPAG 标准曲线为： $Y = 0.2891X + 4.441 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9942$)；MPA、MPAG、AcMPAG 的定量限分别为 0.2、1、0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 精密度与准确度 取混合对照品储备液，配制成含 MPA (5、80、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、MPAG (25、400、2000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 AcMPAG (2、32、160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的低、中、高浓度的质控工作液。取混合质控工作液 5 μL ，加入空白血浆 45 μL ，按“2.4”项下方法处理，每个浓度取 6 份，在 2 周内测定 3 次。根据当日的标准曲线计算日内和日间精密度、准确度，结果见表 1。

表 1 MPA、MPAG、AcMPAG 的准确度及精密度 ($n = 6$)

Tab 1 Accuracy and precision of MPA, MPAG and AcMPAG ($n = 6$)

化合物	浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内			日间		
		测定值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 / %	精密度 / %	测定值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 / %	精密度 / %
MPA	0.5	0.5 ± 4.7	103.0 ± 4.7	6.7	0.5 ± 0.0	94.4 ± 5.9	6.3
	8	7.3 ± 0.5	91.6 ± 5.8	6.4	8.5 ± 0.5	106.2 ± 6.1	5.8
	40	38.1 ± 1.4	95.2 ± 3.6	3.8	38.8 ± 1.4	97.0 ± 6.1	3.5
MPAG	2.5	2.4 ± 0.3	95.8 ± 9.7	10.3	2.2 ± 0.2	86.4 ± 4.8	10.1
	40	36.4 ± 1.3	90.7 ± 3.2	10.9	38.4 ± 2.5	96.0 ± 6.2	6.6
	200	200.7 ± 20.9	100.4 ± 10.5	10.5	208.1 ± 20.5	104.0 ± 11.6	10.8
AcMPAG	0.2	0.2 ± 0.0	100.8 ± 5.3	6.2	0.2 ± 0.0	96.5 ± 6.8	7.6
	3.2	3.4 ± 0.5	107.4 ± 14.4	13.5	3.2 ± 0.3	100.4 ± 10.0	9.9
	16	16.6 ± 0.7	103.6 ± 4.2	4.1	16.2 ± 0.9	101.4 ± 5.3	6.9

2.5.4 提取回收率和基质效应 取“2.5.3”项下 3 个浓度的质控 QC 工作液，进样测得待测物峰面积比值 A_1 。取空白血浆进行预处理后的上清液，

加入低、中、高浓度的混合质控样品 (包括内标)，每个浓度 6 份，测得待测物峰面积比值 A_2 。峰面积比 A_1/A_2 可求得 3 种浓度待测物的提取回收率。

取不同人空白血浆 6 份, 加入低, 中, 高浓度质控样品溶液, 每个浓度 6 个待测样品, 按“2.4”项下方法处理, 测得待测物峰面积比值 A_3 , 基质效应为 A_2/A_3 , 结果 MPA、MPAG 和 AcMPAG 的提取回收率及基质效应 RSD 均符合方法学要求。

2.5.5 稳定性 考察了室温稳定性, 4℃稳定性, 冻融稳定性及进样器稳定性。取“2.5.3”项下 3 个浓度的质控工作液各 5 μL, 每个浓度 6 份, 加入人空白血浆, 分别在室温下放置 6 h; 在 4℃下放置 24 h; 在 -80℃, 反复冻融 3 次, 按“2.4”项下方法处理后进样测定, 结果 MPA、MPAG 和 AcMPAG 质量浓度的 RSD 均在 ±15% 范围内, 表明 MPA 及其代谢物在本实验条件下稳定。

2.6 药动学研究

7 例肾移植患者, 术后免疫抑制剂方案均采用他克莫司 (FK506) + 霉酚酸酯 (MMF) + 糖皮质激素三联用药。MMF 在肾移植术前 12 h 内开始口服 1000 mg bid; 术中及术后 1 d 静脉滴注甲基强的松龙 500 mg · d⁻¹, 术后第 2 日或者第 3 日减为 250 mg · d⁻¹, 后口服泼尼松片 40 mg/(kg · d), 逐渐减量至 10 ~ 20 mg/(kg · d), 他克莫司剂量为 0.07 ~ 0.15 mg/(kg · d) bid。于本方案治疗 1 周后, 于末次给药后 0、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12 h 采集血浆样本测定 MPA、MPAG 和 AcMPAG 浓度。用 WinNonlin 软件的非房室模型进行拟合求算 C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC 及平均驻留时间 (MRT) 等药动学参数。实验数据以 mean ± SD 表示, 结果见表 2 及图 3。

表 2 7 例肾移植患者服用霉酚酸酯后 MPA 和代谢物的药动学参数

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of MPA and metabolites after the oral administration of MMP in 7 renal transplant patients

参数	$C_{max}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	t_{max}/h	$t_{1/2}/\text{h}$	$AUC_{0 \sim 12}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	MRT/h
MPA	12.13 ± 5.02	1.93 ± 2.70	6.63 ± 3.43	59.11 ± 18.82	4.91 ± 0.86
MPAG	109.33 ± 23.51	5.29 ± 4.56	9.33 ± 5.99	956.46 ± 204.58	5.67 ± 0.47
AcMPAG	2.24 ± 0.73	3.50 ± 3.821	5.02 ± 4.40	19.47 ± 8.66	5.55 ± 0.58

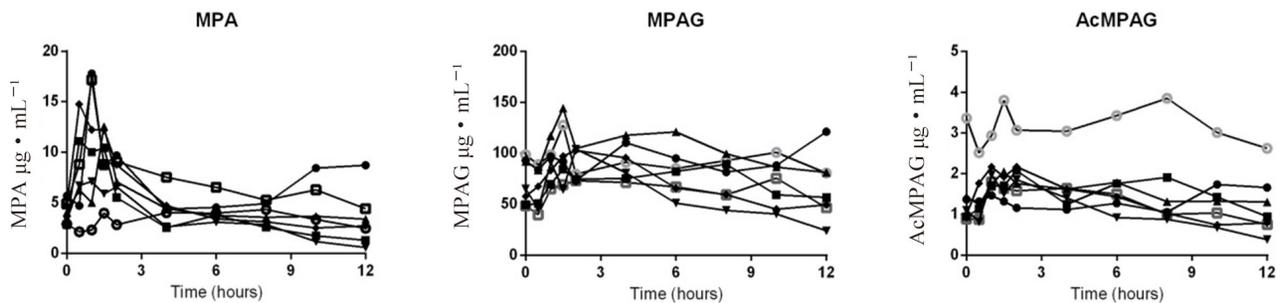


图 3 肾移植患者口服霉酚酸酯后 MPA、MPAG、AcMPAG 的血药浓度 - 时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentrations-time curve of MPA, MPAG and AcMPAG in renal transplantation patients after the oral administration of MMP

3 讨论

目前临床上应用的 MPA 类药物主要有霉酚酸酯 (MMF) 肠溶片和霉酚酸钠肠溶片 (EC-MPS) [5], MMF 是无活性的前体药物, 口服后经胃肠道吸收, 水解生成活性代谢产物 MPA。霉酚酸类药物具有非线性药动学特征, 在不同患者体内药动学差异较大, 需要通过血药浓度监测调整给药剂量。MPA 的血药浓度 - 时间曲线下面积 (AUC) 的理想范围在 30 ~ 60 μg · h · mL⁻¹, 大于 60 μg · h · mL⁻¹ 时易发生胃肠道、骨髓抑制等相关不良反应, 而小于 30 μg · h · mL⁻¹ 时发生急性排斥反应的风险增加 [6]。研究表明代谢物 MPAG 会影响 MPA 的药动学特征, AcMPAG 可能与 MPA 的毒副作用有关 [7-8]。MPAG 会与 MPA 竞争蛋白结合影响 MPA 的游离浓度。AcMPAG 可能通过抑制次黄嘌呤核苷酸脱氢酶、

白细胞的增殖和诱导细胞因子的释放表现出生物活性, 服用 MMF 后引起的白细胞减少和胃肠道功能紊乱可能与 AcMPAG 相关 [9]。因此对 MPA 及其代谢物的检测具有一定的临床意义。

目前国内外测定 MPA 及其代谢物的方法主要有 HPLC 法、LC-UV 法以及酶放大免疫法 (EMIT) [10]。免疫法方便快捷, 但是特异性不强, 测定 MPA 及其代谢物时, 会与 AcMPAG 发生交叉反应使 MPA 浓度偏高。HPLC 法具有较高的灵敏度和特异性, 是测定 MPA 及其代谢物的一种标准方法, 但检测过程耗时较长。本实验选择 LC-MS/MS 测定 MPA 及其代谢物浓度, 相较于 HPLC 和 EMIT 法, LC-MS/MS 法不需要使用昂贵的抗体, 可以缩短测定时间, 样本处理方法简单, 同时具有更好的特异性和灵敏度。

在方法优化过程中尝试了多种流动相, 包括水 - 甲醇、水 - 乙腈、水 (0.01% 甲酸, 10

mmol · L⁻¹ 乙酸铵) - 甲醇 (0.01% 甲酸)、水 (0.1% 甲酸, 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵) - 甲醇 (0.1% 甲酸), 最终选择流动相 A: 水 (0.1% 甲酸, 10 mmol · L⁻¹ 乙酸铵), 流动相 B: 甲醇 (0.1% 甲酸), 通过加入甲酸和乙酸铵使得 MPA 及其代谢物的色谱峰形和响应值得到改善。对于洗脱方式, 尝试了等度洗脱与梯度洗脱, 相对等度洗脱, 梯度洗脱有更好的峰形以及分离度。通过调整初始有机相比例得到了较为合适的保留时间, 避免与杂质共同洗脱从而减少了基质效应的干扰。笔者查阅相关文献, 发现大部分研究对于 MPA、MPAG 和 AcMPAG 母离子的选择都是 [M-H]⁻ 离子^[11-14], 而在质谱条件摸索时发现 MPA 的 [M + H]⁺ 离子, MPAG 和 AcMPAG 的 [M + NH₄]⁺ 离子也有很好的响应, 能够满足 MPA 血药浓度测定的需要。MPAG 和 AcMPAG 都是霉酚酸的葡萄糖醛酸化代谢物, 互为同分异构体具有相同的分子量, 刘晓雪等^[11] 建立的肝移植患者血浆 MPA 及其代谢物的 LC-MS/MS 检测方法中 MPAG 和 AcMPAG 共用同一个离子对, 笔者在实验中发现了两种代谢物的不同的离子对, 每个代谢物在各自的离子对下都具有较高的响应, 可以更好地对 MPAG 和 AcMPAG 进行定性和定量。对于内标的选择, 本实验选择稳定同位素内标 MPA-d₃, 相对于吡啶美辛内标^[11], MPA-d₃ 的理化性质与待测物最相近, 表现为相似的回收率、离子化效率和色谱保留行为, 并且无内源性干扰, 受到基质效应的干扰更小。

参考文献

- [1] 王华彬, 满江位, 胡伟, 等. 霉酚酸血药浓度监测在肾移植受者中的应用进展 [J]. 医学综述, 2020, 26 (4): 652-657.
- [2] 王琴, 杨春兰, 冯丽娟, 等. 基因多态性与器官移植受者霉酚酸个体化治疗研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53 (1): 161-166.
- [3] Klotzman M, Sathyan G, Anderson WH, et al. Mycophenolic acid in patients with immune-mediated inflammatory diseases. From humans to dogs [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2019, 42 (2): 127-138.
- [4] Ling J, Shi J, Jiang Q, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and its main glucuronide metabolite. a comparison between healthy Chinese and Caucasian subjects receiving mycophenolate mofetil [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2015, 71 (1): 95-106.
- [5] Strathie PSJ, Tait CP. Mycophenolic acid in dermatology a century after its discovery [J]. Australas J Dermatol, 2015, 56 (1): 77-83.
- [6] Kuypers DR, Le MY, Cantarovich M, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 5 (2): 341-358.
- [7] Jonge HD, Naesens M, Kuypers DRJ. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid. possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation [J]. Ther Drug Monit, 2009, 31 (4): 416-435.
- [8] Dasgupta A. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid [J]. Adv Clin Chem, 2016, 76: 165-184.
- [9] Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil [J]. Clin Biochem, 1999, 45 (3): 419-422.
- [10] Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients [J]. Clin Biochem, 2007, 40 (11): 752-764.
- [11] 刘晓雪, 黄菁菁, 夏琴, 等. 液-质联用法同时测定人血浆中霉酚酸及其代谢物浓度及其在肝移植患者药动学研究中的应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35 (23): 2096-2101.
- [12] 赵晓亚, 王艺茸, 周红, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中霉酚酸浓度及其在心脏移植患者药动学研究中的应用 [J]. 医药导报, 2019, 38 (10): 1326-1330.
- [13] 闫冬, 钟丽丽, 盛开, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中霉酚酸浓度 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20 (14): 1318-1320.
- [14] 冯晓杰, 杜丽英, 冯章英, 等. LC-MS/MS 法测定人血药浓度的基质效应研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (13): 1488-1492, 1497.

(收稿日期: 2021-01-15; 修回日期: 2021-02-20)

双螺杆挤出技术制备双氯芬酸钠肠溶制剂的研究

王艳, 袁梦, 夏毓龙, 曹杰, 柯学* (中国药科大学药学院药剂系江苏省纳米药物制备与生物学评价公共服务中心, 南京 210009)

摘要: **目的** 制备一种不含肠溶包衣的双氯芬酸钠肠溶片。**方法** 以双氯芬酸钠(DS)为模型药物, 以Eudragit L100-55为肠溶性材料, 通过双螺杆挤出技术, 制备双氯芬酸钠肠溶颗粒, 随之压制成片; 并以市售双氯芬酸钠肠溶片为参比制剂, 考察自研制剂的溶出行为及体内药动学行为。**结果** 溶出结果显示自研制剂在胃内不溶, 肠内以溶蚀型方式释放。家兔药动学实验结果显示, 自研制剂的平均滞留时间和达峰时间长于参比制剂, 血药浓度峰值略低于参比制剂, 结合溶出结果可知, 自制制剂在体内具有一定的缓释效果。**结论** 采用双螺杆挤出技术制备肠溶制剂, 工艺简单、操作易行、可实现颗粒连续式生产, 为肠溶制剂的制备提供了新思路。

关键词: 双螺杆挤出技术; 双氯芬酸钠; 肠溶制剂; 溶出度; 药动学

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1816-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.009

Preparation of diclofenac sodium enteric by twin-screw extrusion technology

WANG Yan, YUAN Meng, XIA Yu-long, CAO Jie, KE Xue* (School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Jiangsu Public Technical Service Center for Nanometer Drug Preparation and Biological Evaluation, Nanjing 210009)

Abstract: Objective To prepare diclofenac sodium enteric tablets without enteric coating. **Methods** Diclofenac sodium was used as a model drug and Eudragit L100-55 as enteric material to prepare a diclofenac sodium enteric-coated tablets by twin-screw extrusion technology. Commercial diclofenac sodium enteric-coated tablets were used as the reference preparation to determine the dissolution behaviors and pharmacokinetic behaviors of the self-made tablets. **Results** The self-made tablets were insoluble in the stomach and the intestinal dissolution type was gradually released. The pharmacokinetic results of rabbits showed that the average retention time and the peak time of the self-made tablets were longer than that of the reference preparation, while the peak blood concentration was lower than that of the reference preparation. The self-made tablets had a certain sustained-release effect in vivo. **Conclusion** The preparation of enteric-coated preparation by twin-screw extrusion technology is simple and easy with continuous grain production, providing a new research idea for enteric-coated preparations.

Key words: twin-screw extrusion technology; diclofenac sodium; enteric preparation; dissolution; pharmacokinetics

双螺杆挤出制粒(TSG)是在外加黏合剂或者润湿剂的条件下, 利用双螺杆挤出机对粉体进行湿法制粒的工艺^[1]。双螺杆挤出机利用不同形状的模块元件进行组装, 形成不同区域, 可以实现物料的输送、挤压、捏合与剪切, 从而制备出

颗粒。TSG的一般过程如图1所示。首先, 物料通过喂料口进入输送区, 绕两根螺杆呈螺旋“∞”形沿轴向向前输送, 蠕动泵向C1区泵入黏合剂/润湿剂, 在此处形成结构松散、粒径较大的润湿团块^[2]; 团块被推进到C2区, 此处的捏合块对润

作者简介: 王艳, 女, 硕士研究生, 主要从事药物制剂新技术与新剂型的研究, E-mail: 286690900@qq.com *通信作者: 柯学, 女, 教授, 主要从事药物新剂型、新制剂、新型给药系统研究, E-mail: kexue1973@vip.sina.com

湿团块进行剪切、压缩和反复捏合，形成粒径较小、密度和硬度较大的颗粒^[3-4]；随后进入 C3 区，由于颗粒表面被黏合剂/润湿剂润湿^[5]，故可以黏结少量细粉，颗粒粒径增大。进入 C4 区域后，颗粒再次受到捏合块的剪切、压缩和捏合作用，颗粒粒径变小、密度和硬度进一步增大，最终经过 C5 区域的在线烘干后离开腔体。不同挤出机的模块区域有所不同，一般过程大致如此。

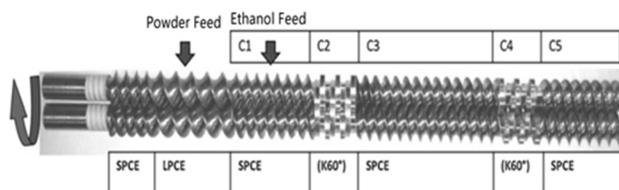


图 1 挤出螺杆不同部件配置^[2]

Fig 1 Configuration of extrusion screws with different compartments^[2]

与传统的湿法制粒技术相比，该工艺具有可连续式生产、药品质量可控、提高处方灵活性、减少原料药损耗以及利于产品放大生产等诸多优点^[3]。因此近年来愈发受到制药企业的关注。

双氯芬酸钠是非甾体抗炎药的典型代表药物，常用于各类轻中度急慢性疼痛的治疗^[6]。其主要不良反应发生在胃肠道，表现为恶心、腹泻、腹痛、便秘、胃不适等，其中少数患者可出现胃溃疡、十二指肠溃疡、胃黏膜出血、穿孔等^[7]。目前口服市售产品主要为肠溶片、肠溶胶囊、缓释片、缓释胶囊。其中肠溶制剂多数是通过片芯或微丸包肠衣的方式来降低药物的不良反应^[8-10]，工艺复杂、成本较高。故本文以双氯芬酸钠为模型药物，以 Eudragit 肠溶性材料^[11]为主要辅料，考察 TSG 技术制备双氯芬酸钠颗粒的可行性，而后压制成片，通过溶出和体内药效学分析自制制剂是否能在胃内不溶、肠内释放的效果，以期在不进行肠溶包衣的情况下实现药物肠溶。

1 材料

1.1 试药

双氯芬酸钠原料药（纯度 ≥ 99%，河南明哲生物科技有限公司）；双氯芬酸钠肠溶片（商品名：扶他林，规格：25 mg，批号：X1195，北京诺华制药有限公司）；吡罗美辛（纯度 ≥ 99.8%，大连美仑生物科技有限公司）；Eudragit L100-55、Eudragit L100（赢创德固赛中国投资有限公司）；乳糖（Granulac 200，德国美剂乐公司）；无水乙醇（上海泰坦科技股份有限公司）；微晶纤维素（VIVAPUR 101，德国 JRS 公司）；磷酸二氢钾（上海凌峰化学试剂有限公司）；氢氧化钠（西陇科学股份有限公司）；甲醇、乙腈（美国 TEDIA 公司）；

其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

BSM-2200.2 电子天平（百分之一，上海卓精电子科技有限公司）；BSA124S-CW 电子天平（万分之一，北京赛多利斯科学仪器有限公司）；HBD-30 料斗混合机（创志机电科技发展股份有限公司）；热熔挤出机（南京科尔克挤出装备有限公司）；HL-2S 恒流泵（上海沪西分析仪器厂有限公司）；DHG 9240A 电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；UV1800 紫外可见分光光度计、全自动溶出仪（SNTR-8400A 溶出度仪、SSAS-6000 自动取样器）、高效液相色谱仪（LC-20AT 高压泵、SPD-20A 紫外检测器，日本岛津公司）；pB-10 型 pH 计（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；XW-80A 涡旋混合器（上海医大仪器有限公司）。

1.3 实验动物

新西兰白兔 6 只（约 1.5 kg/只），雄性，普通级 [南京市江宁区青龙区动物繁殖场，许可证号：SCXK（苏）2017-0011，所有动物实验均符合动物伦理委员会标准]。

2 方法与结果^[12-15]

2.1 双螺杆挤出制备肠溶颗粒的工艺筛选

将双氯芬酸钠、肠溶材料和填充剂分别过 60 目筛，按照一定的质量比混合均匀。将上述混合物加入饲料粉料斗中，设定饲料粉螺杆转速和挤出螺杆转速后，开始挤出操作。待物料从出料口流出后，开启蠕动泵，以一定速率将润湿剂乙醇泵入粉体中，开始制粒。弃去前 3 min 的挤出物，开始收集，并过 20 目筛湿整粒，湿颗粒放入烘箱 60 °C 干燥。待颗粒烘干后，用 20 目筛干整粒，即得双氯芬酸钠肠溶颗粒。

以颗粒外观、粉体流动性（休止角、堆密度和振实密度、Carr's 指数和 Hausner 比）、粒径分布（将大于 100 目筛的粉体定义为颗粒，小于 100 目筛的粉体定义为粉末）为评价指标。

2.1.1 润湿剂加入速度筛选 固定挤出螺杆转速为 100 r·min⁻¹，饲料粉螺杆转速为 2 r·min⁻¹，考察润湿剂加入速度（15、20、25、30、35 r·min⁻¹）。

粒径分布结果见图 2A，结果显示随着润湿剂乙醇加入速度逐渐提高，颗粒量逐渐增加、细粉量逐渐减少，但片状颗粒会增加；当转速为 15 和 20 r·min⁻¹ 时，部分粉末未被充分润湿，导致细粉量增多，即使粉末被润湿，外观也较为疏松；当转速为 25 r·min⁻¹ 时，颗粒大都为类圆形，大小适中且分布较为均匀；当转速增加至 35 r·min⁻¹ 时出现过度润湿，几乎均为片状颗粒，

且硬度大难以过筛整粒。

同时,随着润湿剂加入速度不断提高,颗粒的各项流动性逐渐改善。当润湿剂加入速度提高到 $25 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, Carr's 指数小于 16%, Hausner 比小于 1.2, 且休止角小于 40° , 表明粉体流动性良好。综合各指标评价结果, $25 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 是较为适宜的润湿剂加入速度。

2.1.2 挤出螺杆转速 按照“2.1”项下工艺进行操作,固定润湿剂加入速度为 $25 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 饲料螺杆转速为 $2 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 考察挤出螺杆转速 (25 、 50 、 100 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。

粒径分布结果见图 2B, 当螺杆转速为 $25 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 物料输送速度很慢, 且捏合块对粉体的捏合、压缩、剪切作用很弱, 乙醇不能充分与粉体结合, 出现部分粉体过度润湿、部分粉体仍为细粉的不均匀情况。当转速提高到 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 粒径分布不均的现象有所改善, 但仍明显观察到大颗粒与小颗粒。在转速达到 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 捏合块的剪切捏合作用明显加强, 基本实现了乙醇与粉体间的充分混合, 所制得的颗粒粒度较为适宜。但当转速进一步提高到 150

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 捏合块的捏合挤压作用过于强烈, 被乙醇润湿后诱发了黏性的粉体在捏合区域内被反复剪切、压缩、捏合, 发生过度制粒, 形成大粒径、高硬度的颗粒团块。综合考虑, 较优的挤出螺杆转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.1.3 饲料螺杆转速 按照“2.1”项下工艺进行操作, 固定润湿剂加入速度为 $25 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 挤出螺杆转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 考察饲料螺杆转速 (1 、 2 、 3 和 $4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。

粒径分布结果见图 2C, 当转速为 $1 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 饲料速度很慢, 生产效率低, 同时粉末被乙醇充分润湿, 颗粒粒径大, 并有颗粒及片状颗粒产生; 当转速为 2 和 $3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 粉体与乙醇混匀混合, 颗粒粒径减小, 细粉量少, 粒径分布基本相似; 饲料螺杆转速提高为 $4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 单位体积内粉末量较大, 部分粉末未被润湿直接流出, 导致细粉过多, 并在出料口处出现静电吸附现象。即转速在 2 、 $3 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 可生产出较为适宜的颗粒。这两组转速下颗粒的 Carr's 指数均小于 16%、Hausner 比值均不超过 1.2、休止角均小于 40° , 综合考虑, 确定饲料螺杆的最优转速为 $2 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

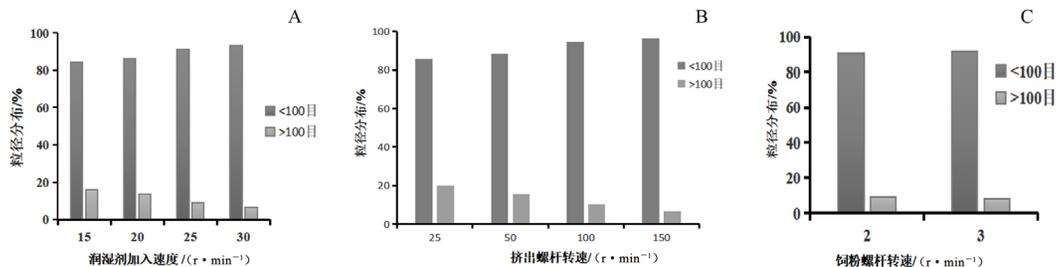


图 2 不同因素对肠溶颗粒粒径分布的影响

Fig 2 Effect of different factors on particle size of enteric coated granules

2.2 肠溶制剂处方筛选

2.2.1 溶出度检测方法 参考《中国药典》2015 年版四部双氯芬酸钠肠溶制剂溶出度测定方法^[12] 并改进, 建立溶出度检测方法如下:

取本品 (相当于双氯芬酸钠 25 mg), 照溶出度与释放度测定法 (通则 0931 第一法), 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 750 mL 为溶出介质, 转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 依法操作, 分别于 10 、 20 、 30 、 45 、 60 、 90 和 120 min 时, 取溶液 10 mL , 并向杯内补充等量同温的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液。取出的液体经 $0.45 \mu\text{m}$ 水系滤膜滤过, 取续滤液作为各供试品溶液。酸中溶出 2 h 后, 立即加入预热至 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠溶液 250 mL , 混匀 (必要时用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液或 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调节 pH 值至 6.8), 转速不变, 分别于继

续溶出后的 5 、 10 、 15 、 20 、 30 、 45 、 60 min 时, 取溶液 10 mL , 经 $0.45 \mu\text{m}$ 水系滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 同时向溶出杯内补充等量同温的 pH 6.8 缓冲溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠溶液, 按 $3:1$ 混合均匀, 必要时用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液或 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调节 pH 值至 6.8)。

另配制双氯芬酸钠在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液和 pH 6.8 PBS 缓冲溶液中的对照品溶液, 质量浓度均为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取各供试品溶液和对照品溶液适量, 照紫外-可见分光光度法 (通则 0401), 在 276 nm 波长处测量各溶液的吸光度, 并计算各时间点的累积溶出度。

2.2.2 处方组成 固定肠溶颗粒中双氯芬酸钠的含药量为 25% , 对主药与肠溶材料的比例、肠溶材料的型号、填充剂的类型与比例进行考察。

肠溶颗粒的处方组成见表 1。其中肠溶材料分别选择丙烯酸树脂 Eudragit L100-55 和 Eudragit L100, 填充剂分别选择乳糖 (Lac)、微晶纤维素 (MCC) 及其混合物, 采用“2.1”项下方法制备双氯芬酸钠肠溶颗粒。

表 1 双氯芬酸钠肠溶颗粒处方组成 (%)

处方	DS	L100-55	L100	Lac	MCC
R1	25	8.3	/	66.7	/
R2	25	12.5	/	62.5	/
R3	25	25	/	50	/
R4	25	/	12.5	62.5	/
R5	25	12.5	/	/	62.5
R6	25	12.5	/	31.25	31.25

将各处方所得到的肠溶颗粒与片剂常用辅料 (如填充剂、崩解剂、润滑剂和助流剂等, 不含肠溶性材料) 混合均匀, 采用 8 mm 冲头压片, 片重 220 mg, 得到规格为 25 mg 的双氯芬酸钠片。采用“2.2.1”项下方法考察片剂的溶出行为, 结果见图 3。

2.2.3 主药与肠溶材料的比例 调整主药与肠溶材料 Eudragit L100-55 的质量比分别为 3:1、2:1 和 1:1 (即处方 R1、R2 和 R3), 所制备片剂的溶出度测定结果见图 3A, 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 120 min 内, 观察到 3 种片剂体积膨胀但不崩解, 片剂表层的部分颗粒漂浮在介质中几乎不溶解, 溶出度均未超过 2%。而在 pH 6.8 PBS 溶液中, 漂浮的颗粒首先溶解, 片剂逐渐溶蚀。其中 R1 溶出最快, 30 min 时累积溶出度接近 100%; R2 在 45 min 溶出超过 85%, 60 min 时药物基本完全溶出; R3 溶出最慢, 60 min 时累积溶出度仅为 80%, 说明随 Eudragit L100-55 用量增加, 双氯芬酸钠的释放速度明显降低。

2.2.4 肠溶材料的型号 肠溶材料分别选择 Eudragit L100-55 和 Eudragit L100 (即处方 R2 和 R4), 所制备片剂的溶出度测定结果见图 3B。在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 120 min 内, 2 种片剂的溶出度均未超过 2%; 而在 pH 6.8 PBS 溶液中, R2 片剂的释放略高于 R4。由于 Eudragit L100-55 在 pH 5.5 以上溶解; Eudragit L100 则在 pH 6.0 以上溶解, 因此在 pH 6.8 PBS 溶液中 Eudragit L100-55 更快溶解, 出现微小差异。

2.2.5 填充剂筛选 分别选择乳糖、微晶纤维素及两者 1:1 的混合物 (即处方中 R2、R5 和 R6) 制备肠溶颗粒, 所得片剂的溶出度测定结果见图 3C。3 种片剂在酸性介质中 120 min 的溶出度

均未超过 2%; 但在 pH 6.8 PBS 介质中的溶出度差异较为明显, R2 的溶出度明显高于 R5 和 R6, 45 min 时累积溶出度接近 100%, 而 R6 仅为 55% 左右, R5 不超过 25%, 说明疏水性微晶纤维素会阻碍双氯芬酸钠肠溶颗粒的溶出。

这可能是由于随着肠溶材料 Eudragit L100-55 的溶解, 颗粒中的药物向外释放, 此时, 水溶性乳糖比疏水性微晶纤维素更快溶解^[13-14], 在颗粒中产生较多孔隙, 加快了水分的渗入, 因此药物的溶出速度明显加快, 溶出程度随之增强; 而疏水性微晶纤维素则更可能在颗粒中膨胀, 有可能阻碍 Eudragit L100-55 的溶解, 导致溶出速度和溶出程度的下降。

2.2.6 硬度筛选 基于前述已经确定的处方, 对压片硬度进行考察, 分别选择 30~50 N、50~70 N 和 70~90 N 3 种硬度进行压片, 考察各组片剂的片重差异、脆碎度和溶出情况。

表 2 不同硬度自制片片重差异及脆碎度

硬度 /N	片重差异	脆碎度 /%
30~50	合格	0.85
50~70	合格	0.69
70~90	合格	0.63

根据表 2 可知, 在 3 种硬度条件下, 片重差异限度均符合药典规定; 且脆碎度均未超过 1%, 亦无断裂、龟裂及粉碎的片剂, 表明在筛选的片剂硬度范围内, 硬度对双氯芬酸钠肠溶片的片重差异和脆碎度不产生影响。

由图 3D 可知, 在酸性介质中, 硬度越低, 药物的释放量逐渐升高, 但即使如此, 3 种片剂 120 min 时溶出仍未超过 10%; 在 pH 6.8 中, 低硬度组 (30~50 N) 5 min 时累积溶出度高达 65%, 25 min 药物即完全释放; 中硬度组 (50~70 N) 呈现缓慢释药的趋势, 45 min 时累积溶出度超过 90%, 60 min 时药物基本释放完全; 而高硬度组 (70~90 N) 溶出速度最慢, 45 min 时溶出尚未达到 75%。由此可见, 硬度对片剂溶出结果影响较为显著, 低硬度条件下, 在酸性介质中, 片剂崩解后有较多颗粒漂浮在介质表面, 增加了颗粒与介质之间的接触面积, 从而提高了酸中药物的累积溶出度, 同时当溶出介质向碱性条件过渡时, 有大量药物被溶解; 而高硬度条件下, 片剂崩解慢, 溶出结果偏低。为避免酸中溶出偏高, 并防止药物在碱中释放不全, 综合考虑, 选择 50~70 N 作为双氯芬酸钠肠溶片的硬度。

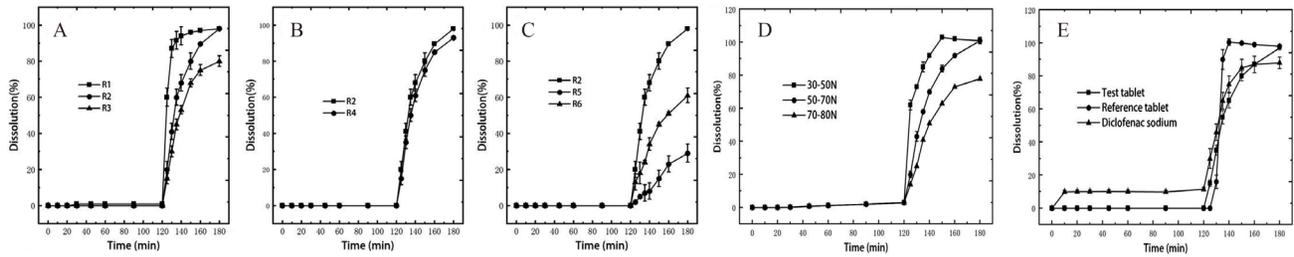


图3 不同因素对双氯芬酸钠肠溶制剂溶出行为的影响

Fig 3 Effect of different factors on dissolution behaviors of diclofenac sodium enteric-coated preparation

A. 主药与肠溶材料的比例 (ratio of drugs to enteric-coated materials); B. 肠溶材料型号 (type of enteric-coated materials); C. 填充剂筛选 (filler screening); D. 硬度筛选 (hardness); E. 溶出度对比 (dissolution)

2.2.7 溶出度对比 综上, 确定自制双氯芬酸钠肠溶颗粒的处方为: 双氯芬酸钠、Eudragit L100-55 和乳糖质量比为 25:12.5:62.5。三者分别过 60 目筛, 混合均匀, 以乙醇为润湿剂, 先在最优工艺下制备肠溶颗粒, 再添加适宜的片剂辅料进行混合, 采用 8 mm 冲头压片, 控制硬度范围在 50~70 N, 即得双氯芬酸钠肠溶片剂。并以市售双氯芬酸钠肠溶片和双氯芬酸钠原料作为对比, 探讨自研制剂的溶出行为, 结果见图 3E。

在酸性介质中, 双氯芬酸钠原料药 5 min 时约 10% 的药物开始溶解, 在随后的 120 min 内累积溶出度几乎无变化; 进入 pH 6.8 PBS 介质后, 药物开始时溶解较为迅速, 然后逐渐减慢, 60 min 时累积溶出度约为 90%。参比制剂在酸性介质中几乎无药物释放; 进入 pH 6.8 PBS 溶液后, 初始 5 min 仍然无药物释放, 但到 15 min 时累积溶出度已接近 90%, 20 min 时完全溶出。自研制剂在酸性介质中几乎无药物释放; 进入 pH 6.8 PBS 溶液后, 45 min 时溶出达到 90%, 60 min 时药物完全释放。

与参比制剂相比, 自研制剂也表现出明显的肠溶特征, 但两者在肠道的释放情况有所不同。参比制剂表现为迅速崩解, 并在较短的时间内释放出大量的药物; 而自研片剂则表现为溶蚀型溶出的特征, 药物逐渐释放, 但在 45 min 时也达到 90% 的溶出。这可能与制备原理密切相关, 参比制剂采用常规的湿法制粒、压片、包肠溶衣, 在进入肠道环境后, 衣膜迅速溶解剥落, 其后片芯快速释放药物。而自研制剂中的肠溶颗粒则是利用乙醇诱发出肠溶材料的黏性进行湿法制粒, 从而表现出溶蚀释药的特性。

2.3 体内药动学评价

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Sepax GP-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液-甲醇 (36:64, V/V); 柱温: 40℃; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 检测波长: 263 nm^[15]。

2.3.2 血浆处理方法 取冻存的兔血浆, 室温放置至完全融化。精密移取解冻血浆 200 μL 置于离心管内, 加入 10 μg·mL⁻¹ 的吲哚美辛甲醇溶液 200 μL 作为内标溶液, 加入乙腈 600 μL 作为蛋白沉淀剂, 涡旋混合振荡 3 min, 随后 3500 r·min⁻¹ 离心 10 min。精密移取全部上清液至另一个离心管中, 待有机溶剂挥干后, 加入 200 μL 流动相复溶, 涡旋混合振荡 3 min, 3500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 检测血浆中的药物含量。

2.3.3 给药及取样 取新西兰白兔 6 只, 随机分为 A、B 两组, 每组 3 只, 分别给予参比制剂和自制双氯芬酸钠肠溶片, 并于给药前禁食 12 h, 自由饮水。实验过程中, 将兔固定于兔盒中, 将片剂完整塞入兔的会咽部, 使其自动吞咽, 同时灌入适量清水, 以防药片黏附在食道膜壁上, 整个过程要避免兔将药片嚼碎。分别于给药前和给药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 和 24 h 耳缘静脉采血 1 mL, 置于预先浸润肝素钠的离心管中, 3500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层血浆, 放置于 -20℃ 冰箱中冷冻保存。按照“2.3.1”项下方法进样测定。

2.3.4 药动学参数 测定各时间点的血药浓度, 并采用 PK Solver 药动学软件分析, 绘制药-时曲线, 结果见图 4, 对主要的药动学参数进行分析和统计学检验, 结果见表 3。

由图 4、表 3 可知, 从药时曲线下面积来看, 与参比制剂相比, 自制制剂在家兔体内的平均滞留时间 (MRT) 和达峰时间 (C_{max}) 均有所延长, 但达峰浓度比参比制剂的低; 自制制剂的 AUC_{0~t}、AUC_{0~∞} 略低, 说明其生物利用度比参比制剂略低; 但其达峰时间与参比制剂相似。从药动学研究结果可知, 以 Eudragit L100-55 作为肠溶材料后进行 TSG, 随后压片得到的自制制剂在兔体内可以实现药物肠溶; 虽然自制制剂与参比制剂的处方及工艺不同, 但自制制剂简化了包

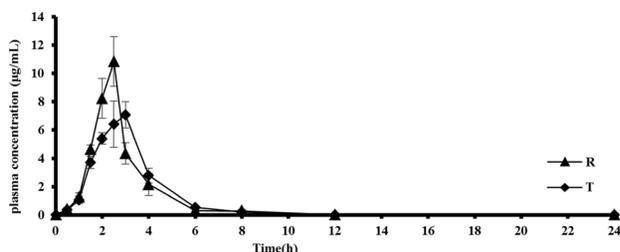


图4 兔子口服给药双氯芬酸钠后平均血药浓度-时间变化曲线

Fig 4 Mean plasma concentration-time profiles of diclofenac sodium in rabbits after the oral administration

表3 各制剂在家兔体内的药动学参数 (Mean±SD, n=3)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of each preparation in rabbits (Mean±SD, n=3)

参数	参比制剂	自制制剂
$MRT_{0-\infty}/h$	2.94±0.03	3.13±0.05**
$t_{1/2}/h$	2.00±0.02	2.18±0.07*
t_{max}/h	2.50±0.00	2.83±0.29
$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	10.83±1.75	7.74±0.44*
$AUC_{0-\infty}/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	20.83±2.18	19.65±0.54
$AUC_{0-\infty}/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	20.84±2.18	19.68±0.54
$AUMC_{0-\infty}/(\mu g \cdot h^2 \cdot mL^{-1})$	61.25±6.24	61.57±2.32

注: 与参比制剂比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the reference preparation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

肠溶衣膜的工艺;同时,自制制剂在兔体内表现出了一定的缓释效果,降低了参比制剂中由于药物在肠道中快速释放产生的局部药物浓度过高而可能引起的肠道不良反应的风险。

3 讨论

虽然原料药的溶出曲线与肠溶颗粒的溶出曲线相似,将原料药直接灌装肠溶胶囊可以达到同样的目的,但将原料药直接灌装肠溶胶囊存在以下缺点:

① 从溶出曲线可知原料药在酸中2h约有10%的溶出,而肠溶颗粒仅有2%左右的溶出,直接罐装胶囊可能会因为局部浓度过高而对胃造成一定的刺激,产生相应的不良反应。

② 双氯芬酸钠的溶解度随pH的升高而逐渐提高,会因为碱中迅速崩解,并在较短的时间内释放出大量的药物,造成局部浓度过高而对肠道黏膜造成强烈的刺激,从而引起肠道的不良反应。

③ 双氯芬酸钠原料药为白色或类白色粉末,易吸潮,直接罐装因为粉末的流动性差,分散性、附着性、团聚性等现象比较明显,易存在装量差异较大、吸潮等问题;且如果不加其他辅料,不能确保用药的安全性。因此不建议原料药直接罐装肠溶胶囊。而通过TSG技术将其制备成肠溶颗粒后流动性增加,上述分散性、附着性等现象

明显减少,可以使颗粒具有一定的防潮性、缓释性和肠溶性等,而且肠溶颗粒可作为中间体,将其制备成片剂、胶囊剂等其他剂型,从而保证用药的安全性,降低对胃肠道的刺激。

本文首先通过双螺杆湿法制粒技术制备双氯芬酸钠肠溶颗粒,而后压制成片,与参比制剂相比,在pH 6.8 PBS溶液表现出溶蚀型的释放特征,可能是由于双螺杆挤出捏合块的作用较强,明显强于通常的湿法制粒,形成的小颗粒比较致密,孔隙率低,随着表层致密的Eudragit L100-55的逐渐溶解以及内部乳糖的溶蚀,药物才逐渐释放出来。且在制粒过程中形成无数个类似的表面被Eudragit L100-55溶液润湿的小颗粒;已溶解的Eudragit L100-55溶液作为黏合剂被均匀分散在整个颗粒内部,但实际上本制备方式下的Eudragit L100-55溶液黏度很高,均匀分散需要一定的时间,而此时由于挤压受热且加入量很少,部分乙醇可能已经挥发,溶解的Eudragit L100-55重新在表面析出,形成较为致密的一层。在颗粒表面的这一层Eudragit L100-55可能就是阻止颗粒在胃液中溶解的主要原因。

与参比制剂相比,从溶出结果和药效学结果来看,自制的双氯芬酸钠肠溶片剂可以实现在酸中不溶、碱中释放的肠溶特性,且在家兔体内的释放略慢,达峰浓度下降,有利于减少不良反应的发生。与传统的湿法制粒(如流化制粒^[16]、高剪切制粒^[17])相比,TSG技术具有工艺简单、操作易行、可实现颗粒连续式生产等诸多优点,在连续制造生产模式中显示出巨大的优势和潜力。本研究将其用于制备肠溶型制剂是一个新的尝试,所得到的肠溶颗粒可进一步制成片剂和胶囊,有望成为一种新的肠溶制剂生产方式。

参考文献

- [1] Khorsheed B, Gabbott I, Reynolds GK, et al. Twin-screw granulation: Understanding the mechanical properties from powder to tablets [J]. Powder Technol, 2019, 341: 104-115.
- [2] Dhenge RM, Cartwright JJ, Hounslow MJ, et al. Twin screw granulation: Steps in granule growth [J]. Int J Pharm, 2012, 438 (1-2): 20-32.
- [3] Keleb EI, Vermeire A, Vervaeke C, et al. Twin screw granulation as a simple and efficient tool for continuous wet granulation [J]. Int J Pharm, 2004, 273 (1): 183-194.
- [4] Thompson MR, Sun J. Wet granulation in a twin-screw extruder: Implications of screw design [J]. J Pharm Sci, 2010, 99 (4): 2090-2103.
- [5] Iveson SM, Lister JD. Growth regime map for liq-

- uid-bound granules [J]. AICHE J, 1998, 44 (7): 1510-1518.
- [6] 黄红深. 用高效液相色谱法测定双氯芬酸钠的杂质[J]. 北方药学, 2011, 8 (1): 3-4.
- [7] 陆小松, 吴天兴, 曹杰, 等. 双氯芬酸钠的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016 (5): 81-84.
- [8] Altman R, Bosch B, Brune K, et al. Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology [J]. Drugs, 2015, 75 (8): 859-877.
- [9] Singh C, Kumar R, Agarwal K, et al. Development and evaluation of enteric coated tablet containing diclofenac sodium [J]. Int J Pharm Sci Nanotechnol, 2009, 2 (1): 443-449.
- [10] 焦慧超, 李峰, 苏玉欣. 双氯芬酸钠肠溶薄膜衣片的制备及质量控制[J]. 中国医药导报, 2009, 6 (26): 52-54.
- [11] 李扬, 李金, 陶涛. 尤特奇在口服固体制剂中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47 (5): 629-636.
- [12] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 121.
- [13] Chitu TM, Oulahna D, Hemati M. Rheology, granule growth and granule strength: Application to the wet granulation of lactose—MCC mixtures [J]. Powder Technol, 2011, 208 (2): 441-453.
- [14] Nakagami H, Nada M. The use of micronized cellulose disintegrants as insoluble swellable matrices for sustained-release tablets [J]. Drug Des Deliv, 1991, 7 (4): 321-332.
- [15] 李存金, 郭飞宇. HPLC 检测抗风湿类中成药中非法添加非甾体类化学物质[J]. 中成药, 2010, 32 (12): 2191-2194.
- [16] Gao JZH, Jain A, Motheram R, et al. Fluid bed granulation of a poorly water soluble, low density, micronized drug: Comparison with high shear granulation [J]. Int J Pharm, 2002, 237 (1-2): 1-14.
- [17] Faure A, Grimsey IM, Rowe RC, et al. Applicability of a scale-up methodology for wet granulation processes in collette gral high shear mixer-granulators [J]. Eur J Pharm Sci, 1999, 8 (2): 85-93.

(收稿日期: 2021-04-19; 修回日期: 2021-05-20)

基于环磷酰胺致小鼠损伤保护作用研究正源方前处理工艺

程晓妮¹, 倪健², 潘亚磊^{1*}, 唐志书^{1*}, 周瑞¹, 苏洁¹, 张海潮¹, 宋忠兴¹ (1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 以环磷酰胺 (CTX) 致小鼠损伤模型的保护作用为主导, 研究正源方适宜的前处理工艺。**方法** 针对正源方采用不同的前处理工艺技术, 制备制剂前体药物。工艺 I: 正源方全方各味药材采用水煎提取; 工艺 II: 正源方采用部分药材超微粉碎+水醇双提。将小鼠分为空白组, 模型组, 地榆升白片组, 工艺 I 组, 工艺 II 低、中、高剂量组。空白组和模型组灌胃给予蒸馏水, 其余各组灌胃给予相应剂量药液, 连续给药 14 d。除空白组外, 其余各组小鼠于第 4 日腹腔注射 CTX 进行造模, 连续 4 d, 观察小鼠的一般状态及体质量变化, 实验结束后测定小鼠外周血常规, 检测小鼠血清中的超氧化物歧化酶和丙二醛含量的变化, 计算小鼠的脏器指数, 在显微镜下观察 HE 染色的小鼠肝脏和股骨切片的病理变化。**结果** 与模型组相比, 两种工艺获得的制剂前体药物, 均可以有效缓解小鼠体质量降低, 降低小鼠脾脏指数, 保护肝脏和骨组织, 并抑制小鼠血清的氧化应激反应, 工艺 II 组能提高小鼠的白细胞数, 工艺 I 组无显著性差异。**结论** 两种工艺获得的制剂前体药物均对 CTX 小鼠损伤模型有一定的保护作用。

关键词: 正源方; 制备工艺; 环磷酰胺损伤小鼠; 病理变化

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1822-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.010

基金项目: 国家重大科技专项“十三五”重大新药创制项目 (No.2019ZX09301-133); 国家自然科学基金项目 (No.81703777); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目 (No.CARS-21)。

作者简介: 程晓妮, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂工艺质量评价体系研究, E-mail: xiaoxiaoxiao_1369@163.com

***通信作者:** 潘亚磊, 男, 博士, 讲师, 主要从事中药抗炎免疫及骨质疏松药理研究, E-mail: panyalei588@163.com; 唐志书, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药制剂技术与质量分析研究, E-mail: tzs6565@163.com

Pretreatment process of Zhengyuan prescription based on its protective effect in mice with cyclophosphamide-induced injury

CHENG Xiao-ni¹, NI Jian², PAN Ya-lei^{1*}, TANG Zhi-shu^{1*}, ZHOU Rui¹, SU Jie¹, ZHANG Hai-chao¹, SONG Zhong-xing¹ (1. Shaanxi University of Chinese Medicine/ Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry/ State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation)/ Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang Shaanxi 712083; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To study the appropriate pretreatment process of Zhengyuan prescription based on its protective effect in mice with cyclophosphamide (CTX)-induced injury. **Methods** Process I: all kinds of medicinal materials in Zhengyuan prescription were extracted by water decoction; Process II: some medicinal materials in Zhengyuan prescription were processed with superfine grinding, and some other medicinal materials with ethanol extraction and water reextraction. The mice were divided into a blank group, a model group, a Diyu Shengbai tablet group, a process I group, and process II low-dose, medium-dose and high-dose groups. The mice in the blank group and the model group were given distilled water by gavage for while other groups were given corresponding doses of liquid medicine by gavage, consecutively 14 days. Except for the normal group, the mice in other groups were modeled by intraperitoneal injection of CTX on the fourth day for consecutively 4 days. The body mass and peripheral blood of the mice were observed, the content of superoxide dismutase and malondialdehyde in the serum of the mice were detected, and the organ index of the mice was calculated. The pathological changes of the liver and femur sections stained by HE were observed under the microscope. **Results** Compared with the model group, both process I and process II pretreatment drugs effectively relieved the body mass loss, reduced the spleen index, protected the live and bone tissues, and inhibited oxidative stress reaction in mice with CTX-induced injury. The white blood cell count of mice was increased in process II group, but there was no significant difference in process I group. **Conclusion** Both of the process pretreatment drugs have certain protective effect on mice with cyclophosphamide-induced injury.

Key words: Zhengyuan prescription; preparation process; mice with cyclophosphamide-induced injury; pathological change

正源方是由西洋参、当归、南沙参、仙鹤草等组成的临床经验方，由参脉散^[1]和当归补血汤^[2]两个经典方剂加减化裁而成，具有扶正解表、生血止血之功效，以汤剂在临床运用于治疗恶性肿瘤化疗引起的气血亏虚证中具有良好疗效，可有效缓解患者化疗引起的毛发脱落，皮肤红疹、斑疹、紫癜等不良反应，并且能有效改善血虚患者白细胞、血小板总数，从而改善机体状态^[3]。本研究采用环磷酰胺 (CTX) 所致小鼠损伤模型，通过观察正源方不同工艺对小鼠的一般状态、体质量变化、外周血常规、血清超氧化物歧化酶 (SOD)、血清丙二醛 (MDA)、小鼠脏器指数及肝脏和股骨切片的病理变化，评价正源方两种工艺获得的制剂

前体药物对 CTX 损伤小鼠的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级昆明小鼠 49 只，雄性，体质量 (25±5) g [成都达硕实验动物有限公司，生产许可证号: SCXK (川) 2020-030]; 动物颗粒饲料 (成都达硕实验动物有限公司); 动物饲养于陕西中医药大学陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 SPF 级动物饲养室 [SYXK (陕) 2017-004]。

1.2 试药

正源方由西洋参、当归、南沙参、仙鹤草、重楼组成 (以上饮片由西安盛兴中药饮片有限责任公司提供)。地榆升白片 (成都地奥集团天府

药业股份有限公司); 环磷酰胺 (Sigma 公司); SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司)。

1.3 仪器

全自动血液细胞分析 (深圳迈瑞生物医疗电子有限公司); 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); 5910R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); HH-S4A 水浴锅 (北京科伟永兴仪器公司); TS100-F 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 正源方前处理工艺

2.1.1 工艺 I 制法 称取西洋参 250 g、仙鹤草 250 g、当归 80 g、南沙参 125 g 和重楼 100 g, 共 805 g, 加 16 倍量的水煎煮 2 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液后浓缩至 2 L, 经喷雾干燥装置制成工艺 I 粉末 185 g, 备用。经计算工艺 I 所制备的粉末每 g 含生药量为 4.35 g。

2.1.2 工艺 II 制法 取仙鹤草 250 g 和当归 80 g, 共 330 g, 用 14 倍量的 50% 乙醇回流提取, 提取 3 次, 每次 1 h, 浓缩成 450 mL 稠膏; 药渣与南沙参 125 g, 用 16 倍量的水提取, 提取 2 次, 每次 2 h, 浓缩成 600 mL 稠膏; 西洋参 250 g (超微粉碎 30 min) 和重楼 100 g (超微粉碎 40 min) 与上述稠膏混合, 65 °C 烘干粉碎制成工艺 II 粉末 455 g, 备用。经计算工艺 II 所制备的粉末每 g 含生药量为 1.77 g。

2.2 动物分组及造模

将所有小鼠按照体质量随机分为空白组, 模型组, 地榆升白片组, 工艺 I 组, 工艺 II 低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 7 只小鼠。工艺 I 组给药剂量计算方法: 以正源处方成人每日临床常用剂量 97 g, 除以成人体质量 60 kg, 乘以小鼠和人换算系数 9.1, 再除以工艺 I 制备粉末所含的生药量 4.35, 计算得工艺 I 组给药剂量为 3.38 g/(kg·d)。同法计算地榆升白片组给药剂量为 0.18 g/(kg·d), 工艺 II 高、中、低剂量组给药剂量分别为 8.30、4.15、2.08 g/(kg·d)。

小鼠每日灌胃所需药液现用现配, 根据小鼠体质量, 称量每组小鼠每日灌胃所需药物粉末, 按照每 10 g 小鼠灌胃体积 0.1 mL, 加入适量蒸馏水, 超声制备成溶液或混悬均匀的溶液后灌胃。正常组和模型组灌胃给予蒸馏水, 其余各组灌胃给予相应剂量药液, 连续给药 14 d。除空白组外, 其余各组小鼠于第 4、5、6、7 日连续 4 d 腹腔注射 CTX [0.07 g/(kg·d)] 进行造模。14 d 后, 腹腔注射水合氯

醛麻醉处死小鼠, 取材测定相应指标。

2.3 观测小鼠生存情况和体质量变化

每日观察小鼠的毛色、饮食及活动等状态, 并于第 1、3、7、10、14 日称量小鼠体质量, 并作记录。

2.4 动物外周血常规测定

小鼠末次给药 2 h 后进行眼眶取血, 使用全自动血液细胞分析仪测定外周血常规白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC) 以及血小板 (PLT) 水平。

2.5 检测 SOD 和 MDA 水平

采用试剂盒检测正源方制剂对模型小鼠血清 SOD 和 MDA 的影响。

2.6 脏器指数测定

解剖获取各组小鼠的心、肝、脾、肺、肾和胸腺, 使用生理盐水将脏器清洗干净, 再用滤纸沾干生理盐水, 称重后计算脏器指数。

2.7 HE 染色

解剖获取各组小鼠的肝脏和股骨, 用 10% 甲醛固定, 股骨进行脱钙处理。肝脏和股骨远端石蜡包埋切片 (5 μm), 常规方法脱蜡, 进行 HE 染色, 显微镜下观察组织病理改变。

2.8 统计分析

分析采用 SPSS 19.0 统计软件 (SPSS, Chicago, IL, USA) 和 GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software, CA, USA)。全部数值用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。多组间采用单因素方差分析进行检验统计, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同工艺对 CTX 损伤小鼠生存情况的影响

观察结果显示, 造模前各组小鼠精神状态较好, 毛色光泽, 饮水量较多; 造模后, 模型组小鼠从实验第 10 日开始逐渐出现精神萎靡, 皮毛粗糙并存在头部显著脱毛等现象。与模型组比较, 给药组小鼠精神状态较好, 毛皮脱落较模型组轻。

3.2 不同工艺对 CTX 损伤小鼠体质量变化的影响

各组动物体质量变化见表 1 所示, 在第 14 日, 模型组小鼠的体质量较空白组降低 ($P < 0.001$), 表明 CTX 会影响小鼠的正常发育; 工艺 I 组以及工艺 II 中、高剂量组小鼠相比模型组的体质量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 不同工艺对 CTX 损伤小鼠外周血常规的保护作用

小鼠外周血常规变化见表 2。与空白组比较, 模型组 WBC 含量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地榆升白片组、工艺 II 低剂量组和中剂

表 1 小鼠 14 d 体质量变化
Tab 1 Body mass change in mice in 14 days

组别	给药剂量 / [g/(kg·d)]	不同喂养时间小鼠体质量/g				
		1 d	4 d	7 d	10 d	14 d
空白组	0	28.34±2.90	32.23±4.70	36.10±9.42	38.69±9.43	41.38±9.55
模型组	0	27.88±4.61	30.92±4.54	31.40±9.89 ^{###}	31.00±3.79 ^{###}	30.12±5.15 ^{###}
地榆升白片组	0.18	28.06±3.49	30.86±4.28	32.18±4.76	32.17±3.79	33.79±2.11 [*]
工艺 I 组	3.38	28.08±3.66	31.17±3.93	32.41±6.31	33.71±5.32	34.93±6.58 [*]
工艺 II 低剂量组	2.08	27.87±5.00	32.21±4.70	32.57±5.11	32.08±3.99	33.03±4.54
工艺 II 中剂量组	4.15	27.33±3.60	30.79±4.54	32.64±8.65	34.61±5.44 [*]	36.95±7.48 ^{**}
工艺 II 高剂量组	8.30	27.72±3.60	31.02±4.28	32.55±2.67	33.40±6.78	35.75±7.16 ^{**}

注：与空白组比较，^{###} $P < 0.01$ ，^{####} $P < 0.001$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, ^{###} $P < 0.01$, ^{####} $P < 0.001$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

量组可提高 CTX 损伤小鼠的 WBC 含量 ($P < 0.05$ 度范围内保护因 CTX 导致的小鼠体内的 WBC 降或 $P < 0.01$)，表明正源方工艺 II 组可以在一定浓度范围内保护因 CTX 导致的小鼠体内的 WBC 降低。各组 RBC 和 PLT 无显著差异。

表 2 不同工艺对 CTX 损伤小鼠外周血常规的保护作用

Tab 2 Protective effect of different processes on the peripheral blood in mice with cyclophosphamide-induced injury

组别	给药剂量/[g/(kg·d)]	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	RBC/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
空白组	0	7.12±0.94	7.95±0.94	1305±319
模型组	0	4.25±2.66 ^{###}	7.30±1.58	1651±581
地榆升白片组	0.18	6.79±1.63 [*]	8.18±1.73	1680±256
工艺 I 组	3.38	5.10±1.2	7.49±1.46	1662±639
工艺 II 低剂量组	2.08	6.49±1.85 [*]	7.48±1.55	1604±401
工艺 II 中剂量组	4.15	7.06±3.06 ^{**}	7.56±1.11	1532±309
工艺 II 高剂量组	8.30	6.36±2.22	7.65±1.14	1535±257

注：与空白组比较，^{###} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, ^{###} $P < 0.01$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.4 不同工艺对 CTX 损伤小鼠脏器的影响

各组小鼠脏器指数见表 3，结果显示，与空白组比较，模型组小鼠脾脏肿大，这可能是注射 CTX 引起机体的免疫应激，促进其脾脏的亢进，引起脾脏肿大。工艺 I 组和工艺 II 低、中剂量组可以显著降低模型组小鼠脾脏指数 ($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$)。各组间心、肝、肺、肾和胸腺的脏器指数无显著性差异。说明地榆升白片组和正源方各组对 CTX 损伤小鼠的脾脏有显著保护作用。工艺 II 高剂量组小鼠胃肠道药物粉末蓄积现象严重，表现为小鼠胃肠内容物显著增多。

表 3 不同工艺对 CTX 损伤小鼠脏器指数的影响

Tab 3 Effect of different processes on the organ index of mice with cyclophosphamide-induced injury

组别	给药剂量/[g/(kg·d)]	脏器指数/%					
		心	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏	胸腺
空白组	0	0.66±0.15	4.94±1.31	0.38±0.13	1.43±1.25	1.15±0.25	0.19±0.07
模型组	0	0.59±0.09	5.55±1.52	1.31±0.21 ^{###}	1.29±0.98	1.29±0.30	0.17±0.05
地榆升白片组	0.18	0.61±0.10	5.16±2.96	0.95±0.4 [*]	1.56±0.84	1.26±0.42	0.20±0.07
工艺 I 组	3.38	0.62±0.12	5.17±1.43	0.99±0.48 [*]	1.35±1.52	1.09±0.19	0.21±0.15
工艺 II 低剂量组	2.08	0.58±0.18	5.27±0.33	0.91±0.41 [*]	1.31±0.83	1.14±0.43	0.16±0.10
工艺 II 中剂量组	4.15	0.63±0.15	5.1±1.22	0.86±0.19 ^{**}	1.27±1.32	1.21±0.35	0.25±0.08
工艺 II 高剂量组	8.30	0.60±0.12	5.33±1.03	1.03±0.33	1.33±1.37	1.18±0.32	0.22±0.04

注：与空白组比较，^{###} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, ^{###} $P < 0.01$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.5 不同工艺对 CTX 损伤小鼠的肝组织病理形态的影响

如图 1 所示：与空白组相比，模型组可见组

织中有较多肝细胞轻度水肿，胞质疏松淡染（绿箭头），有髓外造血灶（红箭头），胞质中可见较小的圆形空泡（蓝箭头），偶见肝细胞点状坏死，

核溶解(黑箭头);地榆升白片组、工艺 I 组和工艺 II 各剂量组均能在一定程度上减轻上述肝组织

病理学损伤,肝细胞结构完整,排列整齐。提示正源方可明显改善 CTX 损伤引起的肝组织损伤。

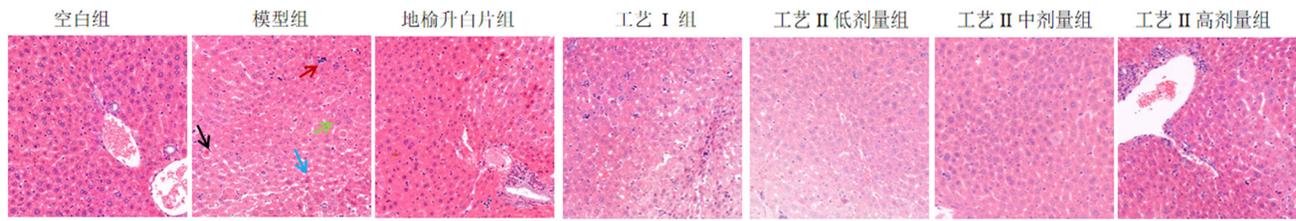


图 1 肝脏 HE 染色

Fig 1 HE staining of liver

3.6 不同工艺对 CTX 损伤小鼠的股骨组织病理形态的影响

如图 2 所示:模型组小鼠股骨的骨小梁数目减少,骨组织连接度降低,骨组织比例下降。工

艺 I 组和工艺 II 各剂量组小鼠骨小梁的数目、骨组织连接度、骨组织比例都有明显的提高。提示正源方对 CTX 损伤模型引起的股骨骨小梁丢失具有一定的保护作用。地榆升白片组作用不显著。

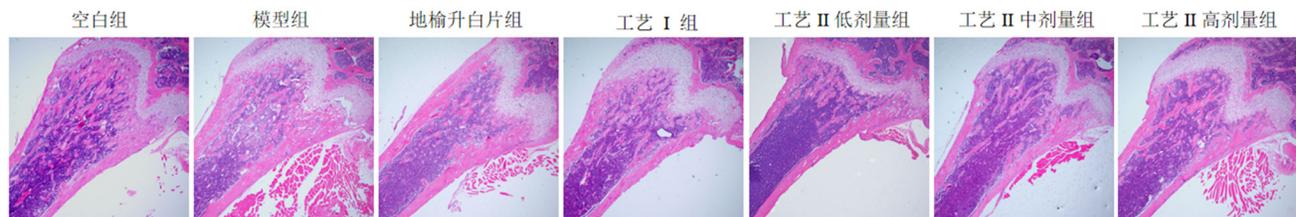


图 2 股骨 HE 染色

Fig 2 HE staining of femur

3.7 不同工艺对 CTX 损伤小鼠血清的 SOD 和 MDA 影响

各组小鼠血清的 SOD 和 MDA 含量见表 4,结果显示,与空白组比较,模型组 SOD 水平降低,MDA 水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,工艺 I 组和工艺 II 各剂量组的 SOD 水平上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),工艺 I 组和工艺 II 低、中剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。初步表明正源方可以提高 CTX 损伤小鼠血清的抗氧化作用。

表 4 不同工艺对 CTX 损伤小鼠血清的 SOD 和 MDA 影响
Tab 4 Effect of different processes on serum SOD and MDA in CTX-injured mice

组别	给药剂量 / [g / (kg · d)]	SOD/ (U · mL ⁻¹)	MDA/ (nmol · mL ⁻¹)
空白组	0	87.44 ± 5.70	7.33 ± 0.75
模型组	0	77.55 ± 1.68 ^{##}	11.75 ± 1.00 ^{##}
地榆升白片组	0.18	78.84 ± 10.39	8.13 ± 2.75 [*]
工艺 I 组	3.38	85.87 ± 5.70 [*]	8.5 ± 2.5 [*]
工艺 II 低剂量组	2.08	87.44 ± 3.35 ^{**}	9.92 ± 1.5 ^{**}
工艺 II 中剂量组	4.15	88.52 ± 3.02 ^{***}	6.63 ± 0.75 ^{**}
工艺 II 高剂量组	8.30	86.65 ± 2.68 ^{**}	7.67 ± 3.00

注:与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

4 讨论

CTX 化学损伤法是免疫抑制制造模方法之一^[4]。CTX 是一种烷化剂,是临床上常用的免疫抑制药物,可杀伤淋巴细胞,抑制 B 细胞的特异性抗体反应,同时可损伤机体的免疫器官,抑制骨髓造血功能,从而影响免疫应答的各个阶段,导致机体免疫功能低下^[4-5]。因此,研究能减少或拮抗 CTX 毒副作用的药物,具有十分重要的意义。

药西洋参、重楼药物“全成分”充分利用,结合制剂需要,拟考虑将其部分粉碎,亦可发挥“药辅同源”之用途。本研究对比了传统水提干燥制备的工艺 I 和采用新技术制备的工艺 II 获得的制剂前体药物对 CTX 损伤小鼠保护作用。工艺 II 处理技术是根据文献资料所报道的方中各味中药有效成分、有效部位的理化特性以及正源方的功效作用,结合在前期化学成分研究和药理学活性研究的基础上^[7-8],对正源方采用部分药材超微

正源方原汤剂每日一剂的临床应用生药量为 97 g,由西洋参、仙鹤草、当归、南沙参等组成,日服用剂量较大,加之方剂化学成分复杂,不同的制备工艺对药物的临床疗效有很大影响^[6],为了保障其与汤剂应用一致性;同时,为保证贵细

粉碎+水醇双提方法进行工艺制备。超微粉碎技术可以改变药材的均匀性,提高有效成分的溶出量、药理作用,达到提高制剂品质。刘颖等^[8]发现超微七白散比普通粉末对抗黄体酮造成豚鼠皮肤损伤、氧化应激等得到更好的保护作用。

本文采用 CTX 化学损伤法建立动物模型,研究了两种工艺获得的制剂前体药物对 CTX 损伤小鼠的一般状态、外周血常规、组织脏器及血清中 SOD 和 MDA 含量变化的影响。结果显示,两种工艺获得的前体药物均可保护 CTX 损伤小鼠的一般状态,但工艺 II 中剂量组可增加外周血 WBC 含量,工艺 I 组无显著性差异;正源方各组能够有效保护 CTX 损伤小鼠的脾脏、肝脏和骨组织。脾脏是体内重要的免疫器官,当感染或损伤时脾脏随之发生明显的变化,脾脏指数通常可以作为反映免疫功能变化的指标,与模型组相比,两组工艺获得制剂前体药物均能够降低因外界刺激导致机体免疫应激而引起的脾脏指数的增大,降低 CTX 对脏器的损伤,与前期研究结果基本一致^[7]。CTX 会造成红细胞缓慢性的氧化损伤^[9],通过检测小鼠血清中的 SOD 和 MDA 水平,两组工艺获得制剂前体药物均能够升高 SOD 水平,降低 MDA 水平,初步表明正源方可以保护机体免受氧化应激损伤。正源方工艺 II 中剂量组较工艺 I 组提高 WBC 作用更优,其余观测指标两组效果相当,表明工艺 II 中剂量组与工艺 I 组在治疗 CTX 损伤时药效相当。实验发现,工艺 II 中剂量组总体优于工艺 II 高剂量组,一方面可能是因为超微粉碎使药物的有效成分较好地分散、溶解在胃液中,且与胃黏膜的接触面积变大,提高药理作用^[10-11];另一方面可能是由于药材进行超微粉碎后有毒有害的成分暴露出来,或药液中水不溶性粉末过多,影响胃肠道的蠕动、黏膜吸收以及激素的分泌^[12],从而导致高剂量组药材的毒理作用增加^[11-12]。

综上所述,正源方两组工艺获得制剂前体药物对 CTX 小鼠损伤具有一定的保护作用,工艺

II 中剂量组比工艺 I 的药理作用较为显著,但实验发现,工艺 II 组药物吸收后可能影响胃肠道的蠕动、黏膜吸收以及激素的分泌药物,出现了部分的毒副作用,相关的药理作用和毒性副作用等均需要临床实践的检验和进一步的研究。

参考文献

- [1] 隆献, 万亮瑜. 生脉注射液和参麦注射液异同之探讨 [J]. 中医药通报, 2004, 3 (4): 42-43.
- [2] 杨飞霞, 王玉, 夏鹏飞, 等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (11): 2677-2685.
- [3] 年婧, 唐俊琪, 唐志书, 等. RP-HPLC 法测定正源方指标成分的梯度洗脱条件优选 [J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35 (2): 72-75.
- [4] 宋博翠, 蒋萌萌, 韩宇, 等. 大黄酚对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫保护作用 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31 (6): 66-71.
- [5] 于洪升, 朱静娟, 尚庆军, 等. 低剂量辐射对环磷酰胺所致 DNA 损伤的影响 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2007, 27 (1): 57-59.
- [6] 倪博然, 林龙飞, 张慧, 等. 不同工艺白金胶囊对慢性不可预知应激所致小鼠抑郁症的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23 (1): 65-68.
- [7] 曲永红, 王鹏远, 王晓娟, 等. 正源方对环磷酰胺所致豚鼠骨髓抑制的保护作用研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29 (2): 148-152.
- [8] 刘颖, 潘德高, 廖志航, 等. 七白散、七白微粉经皮给药的药效学对比研究 [J]. 四川中医, 2006, 24 (12): 13-15.
- [9] 张莉. 基于益气养血法的芪归补血颗粒对环磷酰胺所致小鼠脾脏氧化应激损伤的保护机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [10] 曲永红, 王鹏远, 王晓娟, 等. 正源方对⁶⁰Co- γ 射线致小鼠损伤的保护作用研究 [J]. 中成药, 2014, 36 (3): 468-473.
- [11] 孙源源, 杜光. 超微粉碎技术在中药中的应用进展 [J]. 医药导报, 2014, 33 (1): 69-71.
- [12] 钱珊珊, 桂双英, 杨满琴, 等. 中药超微粉碎技术的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2019, 42 (3): 136-140.

(收稿日期: 2021-02-03; 修回日期: 2021-03-04)

生物素标记多杀菌素衍生物合成及其抗肿瘤活性研究

许娜¹, 彭婷², 罗志勇², 邹自征², 马大友¹, 刘苏友¹, 刘丽君^{2*} (1. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 2. 中南大学生命科学学院, 长沙 410013)

摘要: **目标** 合成生物素标记的多杀菌素探针分子。**方法** 以多杀菌素 A 为原料, 经去甲基反应、亲核取代反应、酯化等反应, 合成生物素标记的多杀菌素衍生物, 并经过 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HRMS 进行结构表征。以人乳腺癌细胞 MCF-7 为模型研究该类化合物的体外抗肿瘤活性。**结果** 生物素标记多杀菌素衍生物 2、5、6 表现出较好的抗肿瘤细胞增殖活性, 其中化合物 6 的活性最好。**结论** 化合物 6 可作为生物素标记探针进行多杀菌素衍生物的抗肿瘤作用机制研究。

关键词: 多杀菌素; 合成; 探针; 生物素标记; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916, R914.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1828-05
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.011

Synthesis of biotin-labeled spinosyn and its anti-tumor activity

XU Na¹, PENG Ting², LUO Zhi-yong², ZOU Zi-zheng², MA Da-you¹, LIU Su-you¹, LIU Li-jun^{2*} (1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 2. School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013)

Abstract: Objective To synthesize biotin-labeled spinosyn probes. **Methods** Biotin-spinosyn probes were synthesized from spinosyn A via demethylation, nucleophilic substitution and esterification. All the synthesized compounds were characterized and confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HRMS. The in vitro anti-tumor activity against MCF-7 was evaluated. **Results** Biotin-labeled spinosyn probes 2, 5 and 6 showed good anti-tumor activity, among which 6 was the best. **Conclusion** Compound 6 may be used as a probe to investigate the anti-tumor mechanism of spinosyns.

Key words: spinosyn; synthesis; probe; biotin labeling; anti-tumor activity

天然产物及其衍生物是发现新药的重要来源^[1], 很多天然产物具有良好的抗肿瘤活性, 可以直接作为抗肿瘤药物或先导化合物。多杀菌素 (spinosyn) 是刺糖多胞菌 *Saccharopolysporaspinososa* 发酵液中提取的大环内酯类化合物。它是一种新型的生物源广谱绿色低毒杀虫剂, 于 20 世纪 90 年代初期开发并推向市场^[2]。研究显示, 多杀菌素还能够抑制细菌和病毒感染, 促进伤口愈合, 同时对多种肿瘤细胞有抑制活性^[3]。多杀菌素 A (spinosyn A, 见图 1) 是其主要成分, 它不仅生物活性高, 而且对非靶标生物的毒性很低^[4]。多杀菌素在抗肿瘤药物研究领域结构新颖, 但是其抗肿瘤作用机制仍不明确, 值得进一步研究。

小分子探针是确定活性化合物生物靶点的重要工具, 其中生物素标记探针是发现活性天然产物靶点蛋白的有效手段^[5-8]。生物素标记探针主要

由三部分组成, 分别是生物素、连接基团和活性基团^[9]。连接基团是将活性基团和生物素连接起来的长链或短链结构, 它的结构会影响到探针的生物活性和稳定性^[10]。连接基团的主要功能是调节生物素和活性基团的空间距离, 避免生物素和活性基团的空间干扰。常用的连接基团有长链脂肪烷烃^[11]、多肽片段^[12]或乙二醇^[13]等。

为了研究多杀菌素衍生物的抗肿瘤作用机制, 本试验设计并合成带有生物素标记的多杀菌素衍生物, 来研究其体外抗肿瘤活性。

1 材料

D-生物素 (上海瑞永生物科技有限公司, 纯度 ≥ 99%); 氯乙酰氯、1, 3-二溴丙烷、1, 6-二溴己烷 (萨恩化学技术有限公司, 纯度均为 98%); 其他试剂均为市售分析纯或化学纯。Bruker DRX 型核磁共振仪 (400 MHz, 500 MHz); X-4 型数

作者简介: 许娜, 女, 硕士研究生, 主要从事药物合成研究, E-mail: 627650134@qq.com *通信作者: 刘丽君, 女, 实验师, 主要从事药物合成和活性研究, E-mail: lijunliu@csu.edu.cn

字显微熔点仪; 安捷伦 6200/6500 series Q-TOF MS (HR-ESI-MS) 型质谱仪。多杀菌素 A 按文献方法由多杀菌素甲醇重结晶得到, 纯度大于 95%^[14]。

2 方法与结果

本研究在多杀菌素 A 的福乐糖胺氮原子上引

入含有不同连接基团的生物素, 合成生物素标记的多杀菌素衍生物 (见图 1), 并测试它们的体外抗肿瘤活性, 研究不同连接基团对生物素标记多杀菌素衍生物抗肿瘤活性的影响。

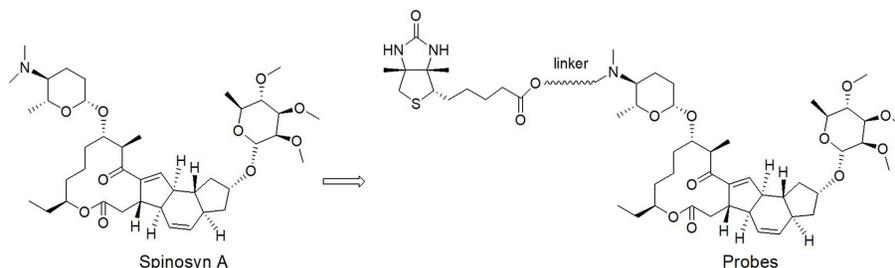


图 1 生物素标记多杀菌素衍生物的设计

Fig 1 Design of biotin-labeled spinosyn compounds

2.1 生物素标记多杀菌素衍生物的合成

化合物 2 的合成路线如图 2 所示^[15], 多杀菌素 A 福乐糖胺氮原子发生脱甲基反应得到多杀菌

素 B。多杀菌素 B 在弱碱条件下和氯乙酰氯发生乙酰化反应得到中间体 1, 最后中间体 1 和生物素通过亲核反应得到生物素标记的化合物 2。

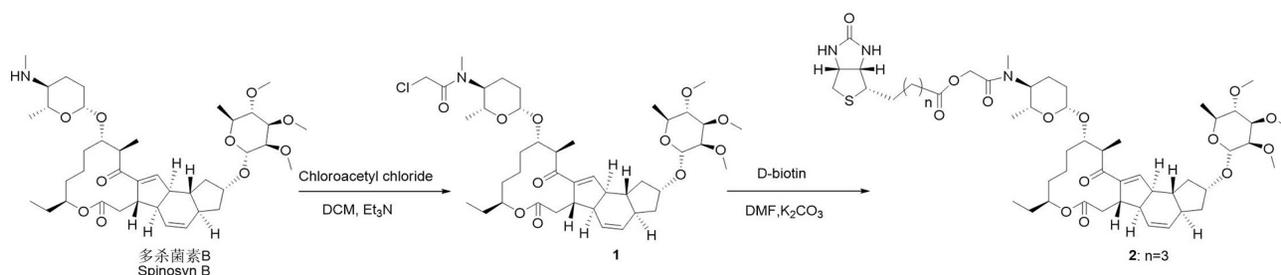


图 2 化合物 2 的合成路线

Fig 2 Synthetic route for compound 2

化合物 5、6 和 7 的合成路线如图 3 所示, 多杀菌素 B 在弱碱条件下, 与 1, 3-二溴丙烷或 1, 6-二溴己烷发生亲核取代反应, 分别得到中间体 3 或 4。3 或 4 以二甲基酰胺 (DMF) 为溶剂,

在弱碱条件下与生物素发生酯化反应得到生物素标记的化合物 5 或 6。在乙腈溶剂中, 化合物 6 和碘甲烷发生 N-甲基化反应, 得到生物素标记的季铵盐化合物 7。

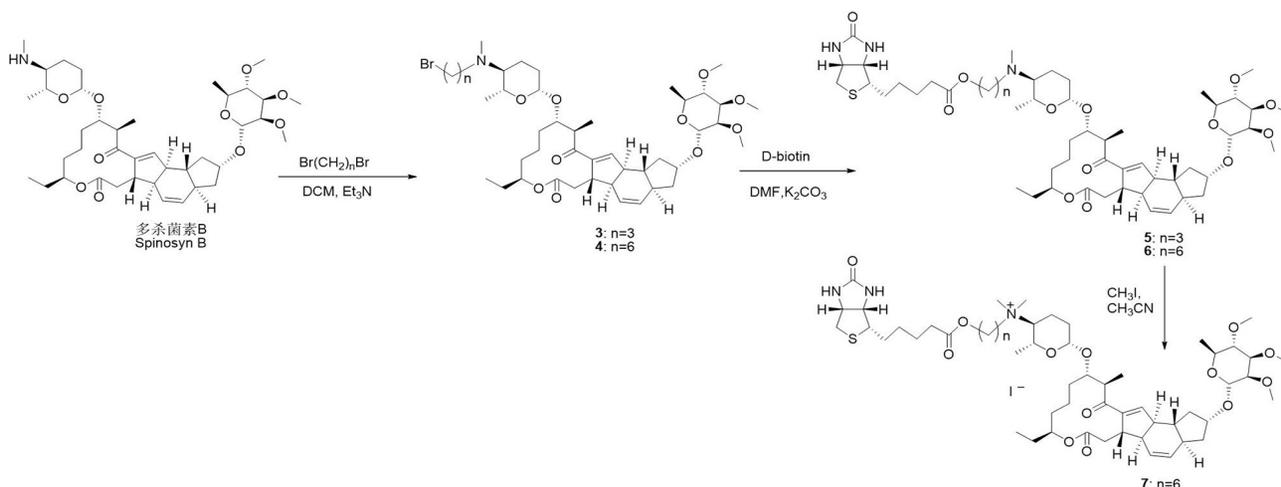


图 3 化合物 5、6 和 7 的合成路线

Fig 3 Synthetic route for compound 5, 6 and 7

2.2 结构鉴定

2.2.1 N-(3-氯乙酰基)多杀菌素 (1) 的合成

向 50 mL 单口圆底烧瓶中, 加入多杀菌素 B 300 mg (0.42 mmol)、二氯甲烷 20 mL 和三乙

胺 59 μL (0.42 mmol), 最后加入氯乙酰氯 94 μL (1.26 mmol), 回流搅拌 2 h, 抽滤, 用二氯甲烷 ($3 \times 20 \text{ mL}$) 和水 15 mL 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥。除去溶剂后, 经硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 4:1] 纯化, 得淡黄色固体 173 mg, 产率 52%。mp. 103 ~ 106 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.77 (s, 1H), 5.90 ~ 5.85 (m, 1H), 5.82 ~ 5.77 (m, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.70 ~ 4.63 (m, 1H), 4.53 ~ 4.46 (m, 1H), 4.34 ~ 4.28 (m, 1H), 4.17 ~ 4.13 (m, 1H), 4.10 ~ 4.03 (m, 2H), 3.71 ~ 3.61 (m, 2H), 3.57 ~ 3.53 (m, 4H), 3.52 ~ 3.43 (m, 8H), 3.43 ~ 3.37 (m, 1H), 3.33 ~ 3.26 (m, 1H), 3.14 ~ 3.08 (m, 2H), 3.04 ~ 2.98 (m, 1H), 2.95 (s, 1H), 2.90 ~ 2.83 (m, 1H), 2.81 ~ 2.77 (m, 1H), 2.43 ~ 2.37 (m, 1H), 2.29 ~ 2.22 (m, 1H), 2.20 ~ 2.12 (m, 1H), 2.06 ~ 2.01 (m, 1H), 1.97 ~ 1.89 (m, 2H), 1.80 ~ 1.71 (m, 2H), 1.59 ~ 1.41 (m, 7H), 1.38 ~ 1.30 (m, 2H), 1.29 ~ 1.25 (m, 3H), 1.22 ~ 1.12 (m, 7H), 0.95 ~ 0.84 (m, 2H), 0.84 ~ 0.78 (m, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.6, 172.3, 167.0, 147.6, 144.0, 129.3, 128.7, 103.1, 95.4, 82.2, 81.0, 80.5, 76.7, 76.5, 76.0, 71.8, 67.8, 60.8, 59.2, 58.9, 57.6, 49.4, 47.5, 46.0, 41.7, 41.4, 41.1, 37.3, 36.2, 34.1, 30.7, 30.0, 28.3, 28.0, 26.1, 21.5, 18.1, 17.7, 16.0, 9.3; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{ClNO}_{11}[\text{M} + \text{H}]^+$): 816.4065, 实测值: 816.4083。

2.2.2 多杀菌素-乙酰基-生物素 (2) 的合成
向 50 mL 单口圆底烧瓶中加入 DMF 1.5 mL、化合物 **1** 100 mg (0.13 mmol) 和 *D*-生物素 31 mg (0.13 mmol), 最后加入碳酸钾 18 mg (0.13 mmol), 室温搅拌 12 h。向反应液中加入冰水 15 mL, 有大量白色沉淀析出。静置, 抽滤, 得白色固体。用 V (正己烷): V (异丙醇) = 6:1 重结晶得白色粉末 77 mg, 产率 61%。mp. 144 ~ 148 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.79 (s, 1H), 5.90 (d, $J = 9.9 \text{ Hz}$, 1H), 5.81 (m, 1H), 4.88 (d, $J = 12.9 \text{ Hz}$, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.71 ~ 4.63 (m, 2H), 4.56 ~ 4.48 (m, 2H), 4.39 ~ 4.31 (m, 2H), 3.71 ~ 3.63 (m, 1H), 3.58 ~ 3.56 (m, 4H), 3.52 ~ 3.47 (m, 10H), 3.33 ~ 3.29 (m, 1H), 3.18 ~ 3.15 (m, 3H), 3.04 ~ 3.02 (m, 1H), 2.96 ~ 2.91 (m, 1H), 2.90 ~ 2.84 (m, 4H),

2.76 (t, $J = 11.7 \text{ Hz}$, 1H), 2.57 ~ 2.49 (m, 1H), 2.48 ~ 2.40 (m, 2H), 2.31 ~ 2.25 (m, 1H), 2.22 ~ 2.16 (m, 1H), 1.97 ~ 1.15 (m, 31H), 0.93 ~ 0.87 (m, 1H), 0.85 ~ 0.82 (m, 3H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.7, 173.4, 172.5, 166.8, 147.7, 144.1, 129.37, 128.8, 103.1, 95.5, 82.3, 81.1, 77.7, 76.1, 71.9, 68.0, 61.7, 61.3, 61.1, 60.9, 60.2, 59.0, 57.7, 55.6, 49.5, 47.6, 46.0, 41.5, 41.2, 40.5, 37.4, 36.3, 34.3, 34.2, 33.5, 33.4, 31.6, 30.8, 30.1, 28.4, 28.1, 28.0, 26.1, 25.3, 24.8, 22.6, 21.6, 18.2, 17.8, 16.2, 14.1, 9.3; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{52}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}[\text{M} + \text{H}]^+$): 1002.5361, 实测值: 1002.5408。

2.2.3 *N*-(3-溴丙烷基)多杀菌素 (3) 的合成
向 50 mL 单口圆底烧瓶中加入多杀菌素 **B** 1 g (1.39 mmol)、乙腈 20 mL 和 385 mg 碳酸钾, 最后加入 1, 3-二溴丙烷 1.42 mL (13.90 mmol), 45 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 48 h。除去溶剂, 加入 50 mL 水, 用乙醇 ($3 \times 60 \text{ mL}$) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥。除去溶剂后经硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 4:1] 纯化, 得白色固体 584 mg, 产率 42%。mp. 105 ~ 108 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.78 (s, 1H), 5.87 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 5.80 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.58 ~ 3.52 (m, 4H), 3.52 ~ 3.44 (m, 11H), 3.35 ~ 3.24 (m, 1H), 3.20 ~ 3.00 (m, 3H), 2.85 (m, 1H), 2.64 ~ 2.48 (m, 2H), 2.40 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 2.34 ~ 2.20 (m, 2H), 2.16 (s, 4H), 2.00 ~ 1.90 (m, 4H), 1.88 ~ 1.72 (m, 2H), 1.70 (s, 1H), 1.60 ~ 1.40 (m, 8H), 1.40 ~ 1.22 (m, 9H), 1.16 (d, $J = 10 \text{ Hz}$, 3H), 0.90 (m, 1H), 0.80 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.9, 172.6, 147.6, 144.1, 129.3, 128.7, 103.4, 95.3, 95.2, 82.2, 80.9, 80.5, 77.6, 75.9, 73.4, 67.9, 64.6, 60.9, 60.8, 59.0, 58.9, 57.7, 51.9, 49.4, 47.6, 47.5, 46.0, 41.5, 41.1, 37.3, 36.9, 36.2, 34.3, 34.1, 31.0, 30.0, 28.4, 21.6, 19.6, 19.0, 17.8, 16.1, 9.4; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{BrNO}_{10}[\text{M} + \text{H}]^+$): 837.4026, 实测值: 837.4046。

2.2.4 *N*-(3-溴己烷基)多杀菌素 (4) 的合成
产率 73%, mp. 95 ~ 98 $^{\circ}\text{C}$; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{BrNO}_{10}[\text{M} + \text{H}]^+$): 880.4574, 实测值: 880.4602。

多杀菌素-丙烷基-生物素(5)的合成: 向 50 mL 单口圆底烧瓶中加入 DMF 1.5 mL、化合物 3 100 mg (0.12 mmol) 和 *D*-生物素 32 mg (0.13 mmol), 最后加入碳酸钾 17 mg (0.12 mmol), 室温搅拌 12 h。向反应液中加入 15 mL 水, 用乙酸乙酯 (3×25 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥。除去溶剂后经硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (甲醇) = 20:1] 纯化, 再用 V (正己烷): V (异丙醇) = 6:1 重结晶得白色粉末 94 mg, 产率 79%。mp. 146 ~ 150 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.78 (s, 1H), 5.90 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.82 (m, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.71 ~ 4.67 (m, 1H), 4.55 ~ 4.52 (m, 1H), 4.44 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.35 ~ 4.31 (m, 2H), 4.16 ~ 4.12 (m, 2H), 3.66 ~ 3.62 (m, 1H), 3.59 ~ 3.56 (m, 4H), 3.53 ~ 3.46 (m, 10H), 3.33 ~ 3.27 (m, 1H), 3.21 ~ 3.17 (m, 1H), 3.13 ~ 3.11 (m, 2H), 3.04 ~ 3.02 (m, 1H), 2.99 ~ 2.93 (m, 1H), 2.90 ~ 2.86 (m, 1H), 2.76 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.53 ~ 2.45 (m, 2H), 2.45 ~ 2.40 (m, 1H), 2.37 ~ 2.33 (m, 2H), 2.30 ~ 2.12 (m, 6H), 1.99 ~ 1.92 (m, 2H), 1.82 ~ 1.18 (m, 30H), 0.96 ~ 0.88 (m, 1H), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.9, 173.8, 172.6, 147.6, 144.1, 129.3, 128.8, 103.5, 95.4, 82.2, 81.0, 80.6, 77.7, 76.1, 73.5, 67.9, 64.4, 62.5, 62.0, 60.9, 60.1, 59.0, 57.7, 55.5, 50.5, 49.4, 47.7, 47.6, 46.0, 41.5, 41.2, 40.5, 37.4, 36.9, 36.3, 34.3, 34.2, 33.9, 31.1, 30.1, 28.4, 28.2, 27.2, 24.8, 21.6, 19.4, 19.0, 17.8, 16.2, 9.4; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{S} [\text{M} + \text{H}]^+$): 1002.5725, 实测值: 1002.5772。

2.2.5 多杀菌素-己烷基-生物素(6)的合成^[15]

向 50 mL 单口圆底烧瓶中加入 DMF 1.5 mL、化合物 4 100 mg (0.11 mmol) 和 *D*-生物素 32 mg (0.13 mmol), 最后加入碳酸钾 17 mg (0.12 mmol), 室温搅拌 12 h。向反应液中加入 15 mL 水, 用乙酸乙酯 (3×25 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥。除去溶剂后经硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (甲醇) = 20:1] 纯化, 再用 V (正己烷): V (异丙醇) = 6:1 重结晶得白色粉末 68 mg, 产率 57%。mp. 124 ~ 129 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.78 (s, 1H), 5.90 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 5.82 (m, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.87 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.73 ~ 4.64 (m, 1H), 4.57 ~ 4.50

(m, 1H), 4.44 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.38 ~ 4.28 (m, 2H), 4.08 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.68 ~ 3.61 (m, 1H), 3.59 ~ 3.56 (m, 4H), 3.54 ~ 3.46 (m, 10H), 3.33 ~ 3.27 (m, 1H), 3.20 ~ 3.11 (m, 3H), 3.06 ~ 2.99 (m, 1H), 2.96 ~ 2.92 (m, 1H), 2.91 ~ 2.86 (m, 1H), 2.77 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.43 ~ 2.33 (m, 5H), 2.30 ~ 2.25 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.99 ~ 1.92 (m, 2H), 1.74 ~ 1.61 (m, 10H), 1.59 ~ 1.53 (m, 4H), 1.52 ~ 1.45 (m, 6H), 1.39 ~ 1.32 (m, 6H), 1.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 4H), 1.26 ~ 1.25 (m, 3H), 1.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 0.95 ~ 0.88 (m, 1H), 0.84 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.9, 173.8, 172.5, 147.5, 144.1, 129.3, 128.8, 103.5, 95.5, 82.3, 81.1, 80.7, 77.7, 76.1, 73.7, 68.0, 64.5, 64.1, 61.9, 60.9, 60., 59.0, 57.7, 55.4, 54.0, 49.4, 47.7, 47.6, 46.1, 41.5, 41.2, 40.5, 37.4, 37.2, 36.3, 34.4, 34.2, 33.9, 31.1, 30.2, 28.7, 28.4, 28.4, 28.3, 26.8, 25.9, 24.8, 21.6, 19.4, 19.0, 17.8, 16.2, 9.2; 高分辨率质谱计算值 ($\text{C}_{56}\text{H}_{89}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{S} [\text{M} + \text{H}]^+$): 1044.6194, 实测值: 1044.6234。

2.2.6 *N*-甲基季铵盐多杀菌素-己烷基-生物素(7)的合成 向 25 mL 单口圆底烧瓶中加入化合物 6 102 mg (0.10 mmol)、乙腈 15 mL 和碘甲烷 18 μL (0.29 mmol), 85 °C 搅拌 48 h。除去溶剂, V (正己烷): V (异丙醇) = 6:1 重结晶得经淡黄色固体 56 mg, 收率 48%。mp. 134 ~ 141 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.79 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.89 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.93 ~ 4.92 (m, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.72 ~ 4.60 (m, 2H), 4.43 (s, 1H), 4.37 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.16 ~ 4.06 (m, 2H), 3.82 (s, 1H), 3.72 ~ 3.70 (m, 1H), 3.59 ~ 3.55 (m, 4H), 3.50 ~ 3.47 (m, 10H), 3.30 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 3.26 ~ 3.24 (m, 1H), 3.14 ~ 3.12 (m, 1H), 3.10 ~ 3.06 (m, 2H), 3.03 ~ 3.02 (m, 1H), 2.97 ~ 3.95 (m, 1H), 2.92 ~ 2.87 (m, 2H), 2.44 ~ 1.15 (m, 44H), 0.94 ~ 0.89 (m, 1H), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.7, 174.0, 172.4, 147.6, 143.6, 129.4, 128.9, 101.0, 95.5, 82.2, 82.1, 81.0, 77.7, 76.2, 76.2, 73.5, 67.9, 67.5, 64.1, 61.9, 60.9, 60.2, 59.0, 57.7, 55.8,

49.5, 49.1, 48.8, 47.6, 47.0, 46.2, 41.5, 41.1, 40.7, 37.4, 36.3, 34.5, 34.0, 31.5, 30.7, 28.4, 28.0, 26.0, 25.7, 25.6, 24.9, 24.8, 22.7, 22.6, 20.3, 19.4, 17.8, 17.2, 9.4; 高分辨率质谱计算值 ($C_{57}H_{92}N_3O_{13}S [M + H]^+$), 1058.6351, 实测值 1058.6361。

2.3 抗肿瘤活性的研究

选用人乳腺癌 MCF-7 细胞株 (中国科学院昆明动物研究所), 应用 MTT 法^[16] 测试多杀菌素 A 和生物素标记多杀菌素衍生物分别在 10、20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对肿瘤细胞的抗增殖活性, 结果见图 4。可见引入不同的连接基团对生物素标记多杀菌素衍生物的抗肿瘤增殖活性影响较大。在浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 多杀菌素 A 和 4 个生物素标记多杀菌素衍生物的抗肿瘤增殖活性均较差。在浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 多杀菌素 A、化合物 2、5、6、7 对 MCF-7 细胞株的抑制率分别为 70%、28%、2%、90% 和 9%, 化合物 6 的抑制活性最好。在浓度为 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 多杀菌素 A、化合物 2、5、6、7 对 MCF-7 细胞株抑制率分别为 100%、94%、89%、100% 和 23%, 化合物 2、5、6 有很强的抑制活性, 化合物 7 对 MCF-7 细胞株抑制率低, 表明季铵盐形式会抑制其抗肿瘤增殖活性。化合物 6 对 MCF-7 细胞株的抑制率高于其他生物素标记的衍生物 2、5 和 7, 与母体多杀菌素 A 的活性相当, 因此, 化合物 6 可作为小分子探针进一步研究多杀菌素衍生物的抗肿瘤作用机制^[17]。

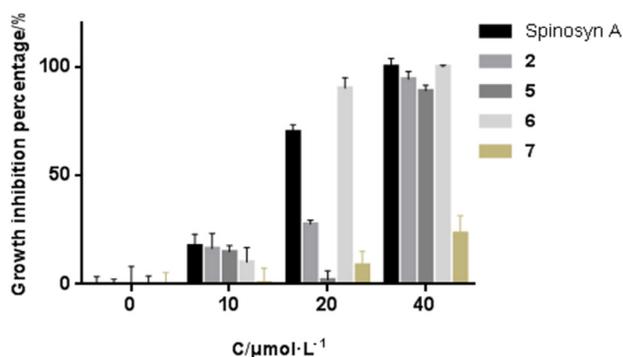


图 4 化合物对 MCF-7 的生长抑制活性

Fig 4 Growth inhibition of compounds to MCF-7

3 结论

本文合成了 4 个全新的生物素标记多杀菌素衍生物, 所有中间体和目标化合物均经过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HRMS 进行了结构表征。体外抗肿瘤活性研究显示生物素标记多杀菌素衍生物 6 具有较好的抗肿瘤增殖活性, 可作为生物素标记探针研究多杀菌素衍生物的抗肿瘤作用机制。

参考文献

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75 (3): 311-335.
- [2] Salgado VL. Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, 60 (2): 91-102.
- [3] Kritikou, Christine. Use of spinosyns and spinosyn compositions against disease caused by protozoans, viral infections and cancer: US 8697661 [P]. 2010-12-29.
- [4] Sparks TC, Crouse GD, Durst G. Natural products as insecticides: The biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids [J]. *Pest Manag Sci*, 2001, 57 (10): 896-905.
- [5] Bottcher T, Pitscheider M, Sieber SA. Natural products and their biological targets: Proteomic and metabolomic labeling strategies [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49 (15): 2680-2698.
- [6] Li C, Dong T, Li Q, et al. Probing the anticancer mechanism of (-)-ainsliatrimmer A through diverted total synthesis and bioorthogonal ligation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53 (45): 12111-12115.
- [7] Hiller Y, Gershoni JM, Bayer EA, et al. Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association [J]. *Biochem J*, 1987, 248 (1): 167-171.
- [8] Kong LM, Deng X, Zuo ZL, et al. Identification and validation of p53 as the cellular target of eriocalyxin B [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (22): 11354-11364.
- [9] Ziegler S, Pries V, Hedberg C, et al. Target identification for small bioactive molecules: Finding the needle in the haystack [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52 (10): 2744-2792.
- [10] Yuan L, Lin W, Zheng K, et al. FRET-based small-molecule fluorescent probes: Rational design and bioimaging applications [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46 (7): 1462-1473.
- [11] Duckert H, Pries V, Khedkar V, et al. Natural product-inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 8 (2): 179-184.
- [12] Weerapana E, Speers AE, Cravatt BF. Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP) - a general method for mapping sites of probe modification in proteomes [J]. *Nature protocols*, 2007, 2 (6): 1414.
- [13] Knoth T, Warburg K, Katzka C, et al. The ras pathway modulator melophlin A targets dynamins [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48 (39): 7240-7245.
- [14] 梅刚, 刘苏友, 马大友, 等. 多杀菌素 A 的纯化方法研究 [J]. *精细化工中间体*, 2013, 43 (4): 14-16.
- [15] 赖青, 欧晓明, 裴晖, 等. 多杀菌素 B 的半合成制备方法 [J]. *农药学报*, 2016, 18 (3): 299-303.
- [16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65 (1-2): 55-63.
- [17] Zou Z, Hu X, Luo T, et al. Naturally-occurring spinosyn A and its derivatives function as argininosuccinate synthase activator and tumor inhibitor [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 2263.

(收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2021-06-03)

有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管炎症的影响及其机制探讨

刘子源¹, 谭泽明¹, 谭佳琪², 薛宏坤^{3*} (1. 河北省廊坊市体育运动学校, 河北 廊坊 065000; 2. 北京大学前沿交叉研究院, 北京 100084; 3. 清华大学工程物理系, 北京 100084)

摘要: **目的** 探讨有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管炎症的影响及机制。**方法** 对 2 型糖尿病大鼠分别进行 8 周有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚联合干预, 检测干预后 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、主动脉形态、血管炎症标志物、氧化应激和 NF- κ B 信号通路相关指标。**结果** 糖尿病对照组血清中白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 水平均显著高于正常对照组, 白介素-10 (IL-10) 水平显著低于正常对照组。荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚联合干预能显著降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 VCAM-1 水平, 增加 IL-10 水平, 同时显著提高血管内超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性, 降低丙二醛 (MDA) 含量和活性氧 (ROS) 水平, 并显著下调 NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达, 上调 I κ B α mRNA 和蛋白表达。**结论** 有氧运动联合荔枝多酚可能通过改善 2 型糖尿病大鼠血糖代谢、降低血管氧化应激、抑制 NF- κ B 信号来缓解 2 型糖尿病大鼠的血管炎症。

关键词: 2 型糖尿病; 有氧运动; 荔枝多酚; 炎症; 机制

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1833-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.012

Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the vascular inflammation and related mechanism in type 2 diabetic rats

LIU Zi-yuan¹, TAN Ze-ming¹, TAN Jia-qi², XUE Hong-kun^{3*} (1. Langfang Sports School, Langfang Hebei 065000; 2. Institute of Frontier Research, Peking University, Beijing 100084; 3. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: Objective To determine the effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the vascular inflammation in type 2 diabetic rats. **Methods** After 8 weeks of aerobic exercises alone, litchi polyphenol alone and aerobic exercises + litchi polyphenol combination intervention, the glycolipid metabolism, aortic morphology, markers of vascular inflammation, oxidative stress and related indexes of NF- κ B signaling pathway in type 2 diabetic rats were measured. **Results** The serum levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 and VCAM-1 in the diabetic control group were significantly higher than those in the normal control group, while the level of IL-10 was lower than that of the normal control group. Both litchi polyphenols and aerobic exercises + litchi polyphenols combination significantly reduced the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 and VCAM-1, increased the level of IL-10, the activities of SOD, GSH-Px and CAT, reduced the content of MDA and the level of reactive oxygen species (ROS), memorably down-regulated the expression levels of NF- κ Bp65 mRNA and protein, and up-regulated the expression levels of I κ B α mRNA and protein. **Conclusion** Combination of aerobic exercises and litchi polyphenols can alleviate the vascular inflammation in

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助 (No. 2020M670357)。

作者简介: 刘子源, 男, 讲师, 主要从事运动科学与营养研究, E-mail: 3058660743@qq.com * **通信作者:** 薛宏坤, 男, 助理研究员, 博士, 主要从事功能性食品研究, E-mail: xuehk0906@163.com

type 2 diabetic rats by improving the blood glucose metabolism, reducing the vascular oxidative stress and inhibiting the NF- κ B signal.

Key words: type 2 diabetes mellitus; aerobic exercise; litchi polyphenol; inflammation; mechanism

随着生活水平的提高和饮食方式的改变, 糖尿病的发病率逐年增加, 其中 2 型糖尿病占糖尿病患者的 90% 以上。2 型糖尿病属于低度慢性炎症性疾病, 而通过糖尿病诱发的血管病变是导致糖尿病患者致残、致死的主要原因之一^[1]。已有研究证实 2 型糖尿病及因糖尿病引起的血管并发症与炎症密切相关^[2]。脂质代谢紊乱、高血糖、氧化应激和胰岛素抵抗等因素均会导致糖尿病发生, 进而诱导血管炎症的发生^[3]。其中氧化应激和高血糖均可以直接激活经典的炎症信号通路, 诱发级联反应, 进而激活下游的炎症相关基因。因此, 有效降低血管氧化应激程度, 抑制炎症相关的信号对缓解糖尿病血管并发症具有重要意义。目前, 临床上还没有比较完善的治疗糖尿病的方法, 主要以控制患者血糖为主, 2 型糖尿病患者常服用双胍类药物来达到控制血糖的目的。糖尿病本身并不可怕, 其并发症是最致命的, 其并发症不仅与血糖水平有关, 还与年龄、遗传和糖尿病病程等因素有关。除临床干预外, 科学合理的运动也能有效预防和治疗 2 型糖尿病, 同时科学规律的有氧运动能有效降低机体慢性炎症, 使心血管免受损伤^[4], 但其作用机制尚不清楚。

荔枝中富含多种活性成分, 其中荔枝多酚是最重要的活性成分之一, 其特殊的邻二酚结构, 使得荔枝多酚具有多种生理功效, 如抗氧化^[5]、抗炎等作用^[6], 并能较好地改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗 (IR)^[7] 及糖尿病引起的血管炎症^[8], 但荔枝多酚的抗炎作用机制尚不清晰。目前还尚未见将有氧运动和荔枝多酚联合起来作为一种手段治疗 2 型糖尿病血管炎症的相关报道。因此, 本研究通过对 2 型糖尿病大鼠进行 8 周有氧运动和荔枝多酚干预, 评价有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚联合治疗对 2 型糖尿病大鼠血管炎症的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

ZE5 流式细胞分析仪 (美国 BIO-RAD 公司); SW-CJ-2FB 超净工作台 (上海仙象仪器仪表有限公司); HBS-1096C 酶标分析仪 (南京德铁实验设备有限公司); FT-PCR 仪 (山东风途物联网科技有限公司); DYY-7C 电泳仪 (北京六一

生物科技有限公司)。

1.2 试剂

荔枝多酚 (批号: 84650-60-2, 上海源叶生物科技有限公司, 纯度 > 98.5%); 活性氧 (ROS) 试剂盒 (批号: E-BC-K138-F, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 磷酸盐缓冲液 (批号: 20190725, 广州济恒医药科技有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: 201020101, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (批号: 20131328)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: 20160816) (上海碧云天生物技术有限公司); 过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒 (批号: 20190721, 武汉谷歌生物有限公司); 总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒 (批号: 20119124, 深圳子科生物科技有限公司); 白介素 -1 β (IL-1 β) 试剂盒 (批号: 20190118, 上海酶联生物科技有限公司); 白介素 -6 (IL-6) 试剂盒 (批号: 20180518, 武汉艾迪抗生物科技股份有限公司); 白介素 -10 (IL-10) 试剂盒 (批号: 20200103, 武汉菲恩生物科技有限公司); 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 试剂盒 (批号: 20180462, 上海哈灵生物科技有限公司); NF- κ Bp65 一抗 (批号: 20191225, 武汉赛维尔生物科技股份有限公司); I κ B α 一抗 (批号: 20170513, 美国 BD 公司)。

1.3 动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 平均体质量 (220.8 \pm 11.65) g [北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证为: SCXK (京) 20160011]。大鼠的基础饲料和蒸馏水均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

2 方法

2.1 造模

选取 SD 大鼠 60 只, 实验室内温度和相对湿度分别在 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C 和 55% ~ 75%, 接受自然光照, 分笼饲养, 自由进食饮水。适应喂养 1 周后, 随机选取 8 只作为正常组 (control group, CG), 普通饲料喂养。其余 52 只作为糖尿病造模组, 采用高脂饲料 (66.5% 大鼠维持饲料 + 10% 猪油 +

20% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 1% 胆酸钠) 喂养, 喂养 4 周后, 对大鼠禁食 12 h, 高脂饮食大鼠腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 链脲佐菌素 (STZ), CG 大鼠腹腔注射相同体积的柠檬酸缓冲液, 期间观察各组大鼠的摄食、饮水和排尿变化。在每组大鼠注射 STZ 后的第 3、7 和 14 日分别测定其血糖值, 当大鼠空腹血糖值高于 $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 说明 2 型糖尿病大鼠模型造模成功。

2.2 分组

CG 大鼠 8 只。将造模成功的 2 型糖尿病大鼠随机分为 4 组: 糖尿病对照组 (DCG), 糖尿病 + 运动干预组 (DEG), 糖尿病 + 荔枝多酚干预组 (DLPG), 糖尿病 + 荔枝多酚 + 运动干预组 (DLPEG), 每组 10 只, 干预时间设定为 8 周。

2.3 给药方式

每日上午 9:00 给予 DLPG 和 DLPEG 的大鼠灌胃 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 荔枝多酚, 其他组灌胃等体积的蒸馏水, 每周 7 d, 直到实验结束, 每日监测各组大鼠的饮水量。

2.4 运动方案

DEG 和 DLPEG 的大鼠在训练前, 先进行每日 10 min 的适应性游泳, 共计 5 d, 适应训练结束后, DEG 和 DLPEG 的大鼠进行正式有氧干预实验, 设定为 $1 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 每周 5 d, 共 8 周, 前 4 周无负重游泳, 后 4 周为 1% 体质量负荷。游泳池为圆形塑料桶 (60 cm 直径 × 75 cm 高), 水深、水温分别控制在 45 ~ 50 cm 和 32 ~ 35 °C, 每桶可同时容纳 3 只大鼠游泳。在整个游泳过程中, 监控大鼠游泳状况, 防止大鼠溺水淹死。

2.5 样本制备

当大鼠经有氧运动干预 8 周后, 过夜禁食, 然后采用水合氯醛麻醉大鼠, 腹动脉取血, 血液样本在 4 °C、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 置于 -20 °C 的冰箱中保存备用。迅速剥离主动脉置于冷冻管中, -80 °C 的冰箱中保存备用。

2.6 指标测定

2.6.1 血糖测定 采用尾部采血方式, 利用血糖仪和血糖试纸测定各组大鼠禁食 12 h 后血糖浓度。

2.6.2 血清样本检测 采用 ELISA 检测法测定低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、总胆固醇 (TC)、空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS) 和胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 及血管细胞黏附分子 -1 (VCAM-1), 以上指标测定均严格按照试剂盒说明执行。

2.6.3 大鼠血管 SOD、GSH-Px、CAT 活性、MDA 浓度和 ROS 水平检测 实验前从 -80 °C 的冰箱中取出主动脉, 按照 1:9 比例加入生理盐水、充分研磨, 制备成 10% 组织匀浆液, 采用 BCA 试剂盒测定匀浆液中的蛋白浓度, 然后按照 SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 试剂盒测定 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 浓度; 利用流式细胞分析仪测定 ROS 水平。

2.6.4 RT-PCR 法检测 NF- κ Bp65 和 I κ B α mRNA 的相对表达水平 利用 TRIZOL 试剂提取大鼠主动脉总 RNA。采用紫外 - 分光光度测定其 $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ 的比值在 1.8 ~ 2.0, 按照反转录试剂盒说明进行反转录, 再以其 cDNA 产物进行 RT-PCR。通过该方法测定 NF- κ Bp65 和 I κ B α mRNA 转录水平表达。选取 GAPDH 作为内参, 以 NF- κ Bp65 和 I κ B α mRNA 与 GAPDH 的 mRNA 表达含量比值作为该因子相对表达水平。反转录程序如下: 95 °C 保持 5 min; 94 °C 保持 15 s; 55 °C 保持 20 s; 72 °C 保持 20 s, 40 个循环; 设定收集荧光, 每个处理重复 3 次。依据公式 (1) 计算待测基因的相对水平。

$$\Delta \Delta \text{CT} = (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}} \quad (1)$$

2.6.5 Western blot 法检测 NF- κ Bp65 和 I κ B α mRNA 的蛋白相对表达水平 采用 RIPA 裂解液裂解大鼠主动脉, 利用 BCA 试剂盒测定总蛋白含量。蛋白测定后, 取 20 μL 蛋白样品上样于 5% ~ 10% SDS-PAGE 凝胶, 电泳分离, 冰浴下将其转移至 PVDF 膜上, 采用 5% 脱脂奶粉 25 °C 摇床封闭 1 h, 加入对应的一抗 4 °C 孵育过夜。次日换为 HRP 标记的二抗孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光显影, 通过凝胶成像检测 NF- κ Bp65、I κ B α 和 GAPDH 的蛋白表达水平。结果利用 Image Lab 软件对相应蛋白表达水平进行定量分析。

2.7 数据处理

本研究所有实验结果用平均值 \pm 标准差表示; 采用 Statistix 8.0 软件对每组实验数据进行方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 代表组间差异有统计学意义; 采用 SAS 8.0 软件分析结果, Origin 9.0 进行绘图。

3 结果

3.1 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠糖代谢的影响

DCG、DEG、DLPG 和 DLPEG 大鼠中 TC 和 LDL-C 水平均显著高于 CG 大鼠 ($P < 0.05$), 而 HDL-C 显著低于 CG 大鼠 ($P < 0.05$), DCG、DEG、DLPG 和 DLPEG 大鼠中 TC、LDH-C 和 HDL-C 水平无显著差异 ($P > 0.05$), 说明有氧运

动和荔枝多酚干预不会影响 2 型糖尿病大鼠中 TC、LDH-C 和 HDL-C 水平。与 CG 相比, DCG、DEG、DLPG 和 DLPEG 大鼠中 FBG 和 HOMA-IR 水平均显著增加 ($P < 0.05$); 与 CG 相比, DCG 和 DEG 大鼠中 FINS 水平显著增加 ($P < 0.05$), 而 DLPG 和 DLPEG 大鼠中 FINS 水平无显著差异 ($P > 0.05$)。与 DCG 相比, DEG、DLPG 和 DLPEG 大鼠中 FBG 和 HOMA-IR 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 说明单

独采用有氧运动、荔枝多酚干预及两者联合干预均能改善 FBG 和 HOMA-IR 水平。DCG 大鼠 FINS 水平显著高于其他组 ($P < 0.05$), DEG 大鼠 FINS 水平显著高于 CG、DLPG 和 DLPEG ($P < 0.05$)。CG、DLPG 和 DLPEG 大鼠中 FINS 水平无显著差异 ($P > 0.05$)(见表 1)。综上说明 3 种干预措施均能改善大鼠 FBG 和 HOMA-IR 水平, 且有氧运动和荔枝多酚联合效果更好。

表 1 大鼠糖脂代谢指标

Tab 1 Indicators of glucose and lipid metabolism in rats

组别	TC/(mmol·L ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mIU·L ⁻¹)	HOMA-IR	LDH-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
CG	1.75±0.18 ^b	4.92±0.13 ^c	14.15±0.35 ^c	4.72±0.18 ^c	0.61±0.08 ^b	1.45±0.06 ^a
DCG	2.53±0.15 ^a	16.20±0.39 ^a	23.26±0.41 ^a	24.95±0.82 ^a	0.76±0.82 ^a	0.86±0.03 ^b
DEG	2.49±0.11 ^a	11.76±0.27 ^c	17.38±0.41 ^b	17.81±0.57 ^b	0.74±0.07 ^a	0.93±0.04 ^b
DLPG	2.45±0.21 ^a	14.09±0.33 ^b	15.17±0.29 ^c	13.24±0.51 ^c	0.69±0.05 ^a	0.89±0.03 ^b
DLPEG	2.39±0.17 ^a	9.04±0.24 ^d	13.83±0.24 ^c	8.12±0.18 ^d	0.70±0.03 ^a	0.92±0.05 ^b

注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3.2 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血清炎症标志物的影响

采用有氧运动和荔枝多酚对大鼠进行干预 8 周后, 与 CG 相比, DCG 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平以及单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 和血管细胞黏附分子 -1 (VCAM-1) 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 结果表明糖尿病能促进炎症的形成。单独采用有氧运动干预 2 型糖尿病大鼠, 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 MCP-1 水平与 DCG 相比无显著差异 ($P > 0.05$), 而 VCAM-1 和 TNF- α 水平显著低于 DCG 大鼠 ($P < 0.05$)。采用有氧

运动+荔枝多酚干预 2 型糖尿病大鼠, 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 VCAM-1 水平均显著低于 DCG 和其他干预组, 然而 IL-10 水平与上述 5 个指标变化有相反的趋势, 具体结果见图 1。结果表明有氧运动、荔枝多酚、有氧运动+荔枝多酚干预 2 型糖尿病大鼠均能有效降低大鼠血清促炎症因子的水平及 MCP-1 和 VCAM-1 水平, 增加抑制炎症因子的产生, 同时有氧运动和荔枝多酚具有协同效应, 共同抑制 2 型糖尿病大鼠血清炎症因子的释放, 促进促炎症因子的释放, 从而达到治疗血管炎症的目的。

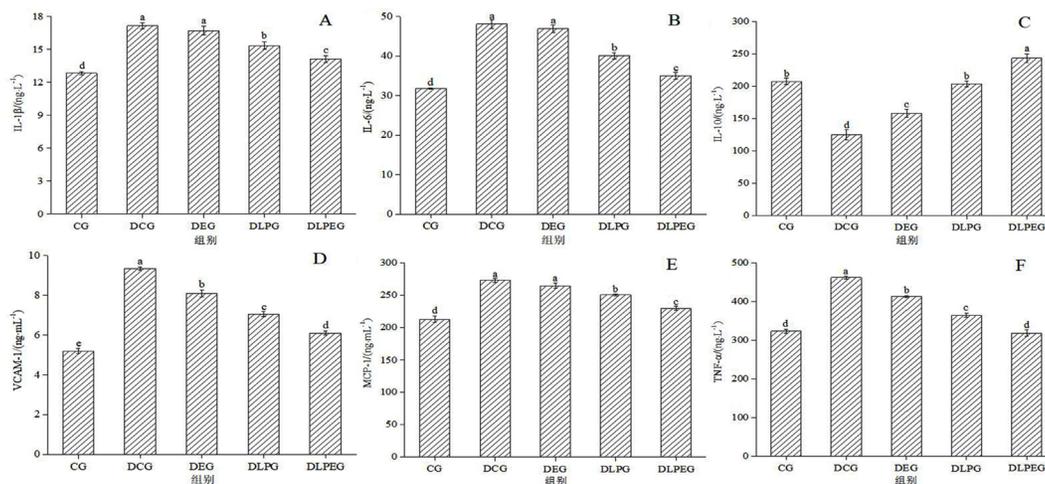


图 1 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血清炎症标志物的影响

Fig 1 Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the serum inflammation markers in type 2 diabetic rats

注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

3.3 有氧运动联合荔枝多酚对大鼠血管抗氧化酶活性及 MDA 浓度的影响

DCG 大鼠血管中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著低于 CG ($P < 0.05$), 而 MDA 浓度显著

高于 CG ($P < 0.05$), 具体见图 2, 表明 2 型糖尿病大鼠血管内抗氧化酶活性降低和脂质过氧化反应增加, 易受外界刺激而造成机体应激性损伤。采用有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚分别干预 2 型糖尿病大鼠, 血管内 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著高于 DCG ($P < 0.05$), 而 MDA 浓度显著低于 DCG ($P < 0.05$), 且干预

效果为有氧运动+荔枝多酚>荔枝多酚>有氧运动, 具体见图 2。结果表明有氧运动和荔枝多酚均能提高 2 型糖尿病大鼠血管内抗氧化酶活性, 降低脂质发生过氧化反应来降低血管氧化应激的发生, 从而抑制炎症相关通路的激活, 达到治疗血管炎症的目的。

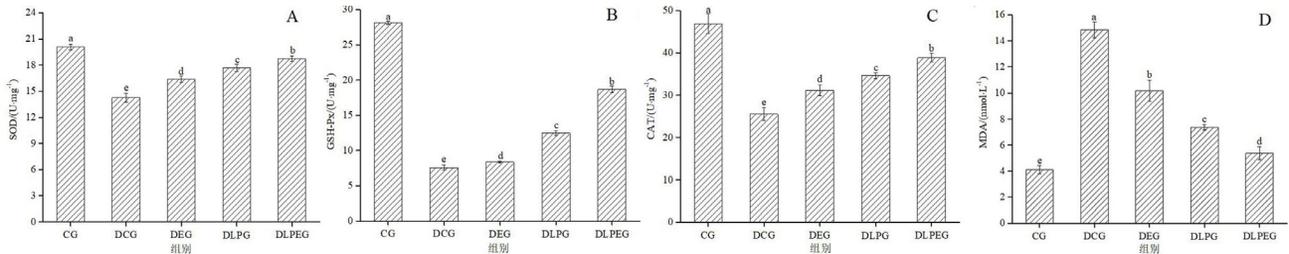


图 2 有氧运动联合荔枝多酚对大鼠血管抗氧化酶活性及 MDA 浓度的影响

Fig 2 Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the antioxidant enzyme activity and MDA concentration in rats

注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

3.4 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 ROS 水平的影响

机体在正常生理状态下, ROS 的产生和清除处于动态平衡过程, 适量的 ROS 能提高巨噬细胞吞噬能力和机体免疫力^[9]。但当机体受到外界氧化应激原刺激时, 引起血管内产生大量的 ROS, 而过量的 ROS 对细胞膜、脂质、蛋白质和 DNA 造成氧化损伤^[10]。本研究以 DCFH-DA 作为荧光探针, 在流式细胞分析仪上检测有氧运动和荔枝多酚对大鼠血管

内 ROS 水平的影响, 其平均荧光强度大小直观反映血管内 ROS 水平。DCG 大鼠血管内 ROS 水平显著高于 CG ($P < 0.05$), 结果见图 3, 说明糖尿病大鼠体内产生过量的 ROS, 易造成机体应激性损伤。与 DCG 相比, DEG、DLPG 和 DLPEG 中大鼠血管内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$), 结果表明有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚干预均能显著降低大鼠血管内 ROS 水平, 来抵御外界氧化应激损伤, 进而抑制氧化应激诱导的血管炎症。

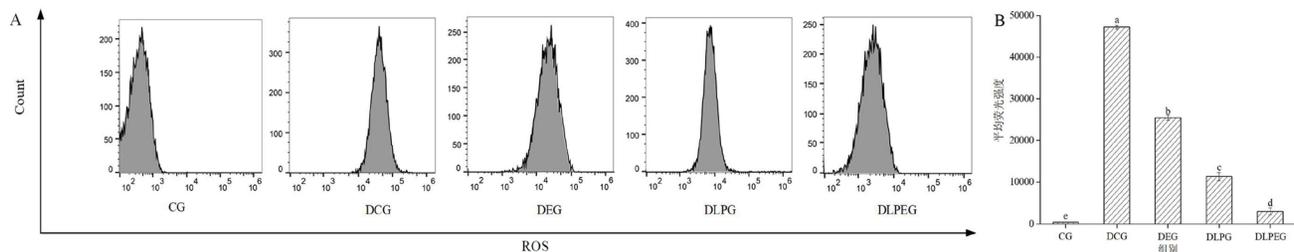


图 3 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 ROS 水平的影响

Fig 3 Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the level of ROS in blood vessels of type 2 diabetic rats

注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

3.5 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 NF-κBp65 和 IκBα mRNA 表达水平的影响

在正常生理条件下, 抑制剂 IκB 与 NF-κBp65 以失活状态结合在细胞质中, 当机体受到外界应激刺激时, IκB 被降解, 使抑制剂 IκB 与 NF-κBp65 分离, 随之转移至细胞核中, 激活细胞内的炎症相关基因^[11]。本研究通过 RT-PCR 测定 NF-κBp65 和 IκBα mRNA 表达水平来判断 NF-κB 信号的激活状态。DCG 大鼠血管内 NF-κBp65 mRNA 相对表达

水平显著高于 CG ($P < 0.05$), 而 IκBα mRNA 表达水平显著低于 CG ($P < 0.05$), 说明 2 型糖尿病大鼠使 IκB 与 NF-κBp65 解体, 进而激活炎症相关的基因 (见图 4)。采用有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚干预均能显著降低 2 型糖尿病大鼠血管内 NF-κBp65 mRNA 相对表达, 而增加 IκBα mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 进而抑制炎症相关基因的表达, 且有氧运动+荔枝多酚干预效果明显优于单纯的有氧运动和荔枝多酚干预。

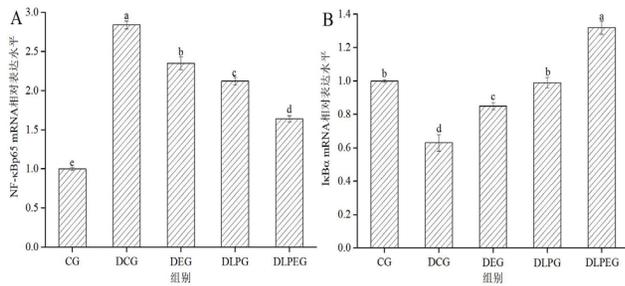


图 4 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 NF-κBp65 和 IκBα mRNA 表达水平的影响

Fig 4 Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the expression of NF-κBp65 and IκBα mRNA in type 2 diabetic rats

注：不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

3.6 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 NF-κBp65 和 IκBα 蛋白表达水平的影响

与 CG 相比, DCG 大鼠血管内 NF-κBp65 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.05$), 而 IκBα 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 具体见图 5。DEG、DLPG 和 DLPEG 中 NF-κBp65 蛋白表达水平较 DCG 大鼠显著降低 ($P < 0.05$), IκBα 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚干预均可以抑制 NF-κB 信号的激活, 从而达到抑制炎症的发生, 且有氧运动+荔枝多酚干预效果明显优于单纯的有氧运动和荔枝多酚干预。

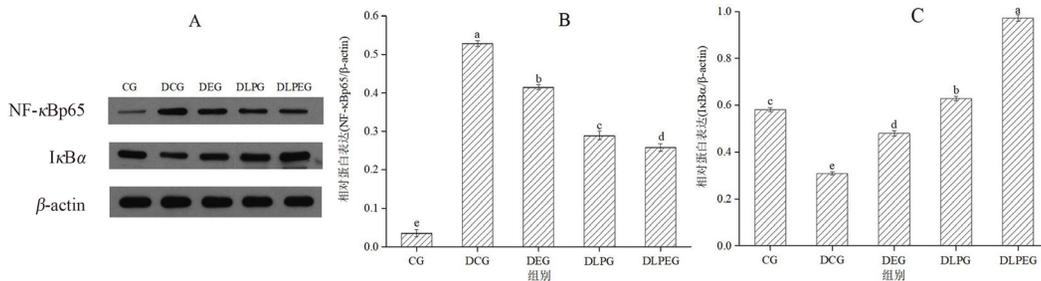


图 5 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内 NF-κBp65 和 IκBα 蛋白表达水平的影响

Fig 5 Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the expression of NF-κBp65 and IκBα protein in the blood vessels of type 2 diabetic rats

注：不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

4 讨论

4.1 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血脂代谢的影响

胰岛素抵抗、高血糖、脂质代谢紊乱等多种因素均可诱导血管炎症的发生。本研究表明有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚联合治疗均能改善 2 型糖尿病大鼠血糖, 有氧运动+荔枝多酚联合治疗在胰岛素抵抗指数方面优于有氧运动和荔枝多酚。其原因是荔枝多酚通过降低肝脏糖异生作用, 抑制肠系膜细胞吸收, 维持血糖平衡^[12]。此外, 运动可以通过促进骨骼肌对血糖的吸收和利用, 从而达到降糖作用^[13]。进一步分析数据发现有氧运动+荔枝多酚联合治疗在改善 2 型糖尿病大鼠血糖方面要优于有氧运动和荔枝多酚, 表明荔枝多酚和有氧运动在改善 2 型糖尿病大鼠血糖方面具有协同作用。运动能够通过影响胰岛素信号转导通路逆转胰岛素抵抗的发生, 改善胰岛素敏感性, 荔枝多酚可通过激活骨骼肌 AMPK 信号来增加外周胰岛素敏感性, 抑制炎症相关基因和蛋白的表达^[14]。综上, 有氧运动和荔枝多酚可能部分通过降低血糖和胰岛素抵抗改善糖尿病大鼠血管炎症。

4.2 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管炎症相关因子的影响

随着人们生活水平的提高, 高脂饮食越来越常见, 长期的高脂饮食会诱导氧化应激损伤血管内皮细胞, 进而激活炎症相关的通路, 导致血管发生炎症反应, 最终导致机体发病^[15]。大量研究证实血液中炎症因子浓度高低可反应血管的炎症状态^[16]。本研究选取了促炎因子、抗炎因子、细胞黏附分子和趋化因子 4 种类型细胞因子以及主动脉细胞黏附分子基因和蛋白表达反映血管炎症。TNF-α 是一种多功能的细胞因子, 在炎症的发生与发展过程中起着至关重要的作用, 其可激活中性粒细胞和淋巴细胞, 促进其他炎症细胞因子的合成与释放^[17]。IL-6 由多种免疫细胞产生, 参与绝大多数由炎症引起的急性期蛋白的调节^[18]; IL-1β 在炎症初期大量产生, 在各种炎症疾病患者体内大量存在^[19]; IL-10 属于抗炎因子, 由免疫和非免疫细胞分泌而来, 主要抑制炎症因子的产生和释放^[20]。内皮细胞、脂肪细胞和单核巨噬细胞分泌所产生的 MCP-1 可诱导炎症细胞向血管炎症部位迁移, 导致炎症发生^[21]。VCAM-1 能特性表达于血管组织, 能有效促进白细胞和血

管上皮细胞的黏附,在血管炎症反应中发挥至关重要的作用^[22]。近年来研究表明多酚具有显著的降糖活性和抗炎活性^[23-24]。本研究结果表明荔枝多酚能显著降低 2 型糖尿病大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 VCAM-1 水平,同时显著增加抗炎因子 IL-10 水平,说明荔枝多酚具有降低 2 型糖尿病大鼠炎症的作用;采用有氧运动干预 2 型糖尿病大鼠也有类似的结果,表明有氧运动可在一定程度上抑制 2 型糖尿病大鼠炎症的发生;采用荔枝多酚+有氧运动联合干预 2 型糖尿病大鼠,抗炎效果明显优于单纯的有氧运动和荔枝多酚干预。

4.3 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管氧化应激的影响

在糖尿病状态下,机体糖脂代谢发生紊乱,氧化应激信号通路被激活,使得细胞内产生大量的 ROS,同时降低细胞内的抗氧化酶活性,最终诱导血管内皮细胞损伤^[25]。此外,还可以通过激活 NF- κ B 炎症信号,诱导炎症相关基因的表达。氧化应激能诱发糖尿病的发病,同时也能导致糖尿病并发症的发生。因此,有效抑制机体氧化应激的发生,可以减轻因其导致的血管内皮损伤,同时一定程度上抑制炎症的发生。机体防御氧化应激损伤体系中总抗氧化能力的主要作用是维持机体内环境的 ROS 动态平衡。GSH-Px、SOD 和 CAT 是细胞内抗氧化酶的重要组成部分。在抵御外界氧化应激刺激时,细胞内的 SOD 和 CAT 首先发挥抗氧化功能^[26]。GSH-Px 在机体内作为一种重要的过氧化物分解酶,催化过氧化物和 GSH 还原成无毒的羟基化合物和谷胱甘肽,从而有效抑制过氧化物的损伤^[27]。因此,机体抗氧化酶系在发挥机体抗氧化和调节氧化应激动态平衡中起到至关重要的作用,抗氧化酶活力的高低直接反映出机体对外界氧化应激造成损伤的调控能力。本研究结果发现,各单独干预组 2 型糖尿病大鼠血管内 GSH-Px、SOD 和 CAT 的活性均显著提高,而 ROS 水平显著降低,且有氧运动+荔枝多酚联合治疗效果优于单独治疗,推测可能是通过降低氧化应激缓解糖尿病大鼠血管炎症。

4.4 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠主动脉 NF- κ B 信号通路的影响

NF- κ B 介导的信号传导是炎症发生和发展中最为重要的信号通路。NF- κ B 信号通路参与细胞炎症反应,促进促炎基因的表达。在生理状态下,抑制剂 I κ B 与 NF- κ B 亚基 p65 以失活状态紧密结合,并存于细胞质中,当细胞受到外界氧化应激

刺激时,细胞内 IKK 信号被激活,使 I κ B 发生磷酸化,并被蛋白酶降解,细胞质内 NF- κ B 亚基 p65 脱离 I κ B,并转移到细胞核,进而激活下游的靶基因 (TNF- α 、VCAM-1、MCP-1 和 IL-1 β) 等的表达^[28]。高糖和脂质代谢紊乱均能激活血管内皮 NF- κ B 信号通路,并增加局部炎症反应,损伤内皮细胞功能,促进内皮细胞发生凋亡^[29]。本研究结果表明 2 型糖尿病大鼠主动脉 NF- κ Bp65 基因表达水平和蛋白表达水平均显著高于正常对照组,但仅仅通过 NF- κ Bp65 基因表达水平和蛋白表达水平还不能判断该炎症信号通路被激活。因此,本研究又对抑制剂 I κ B α 进行基因和蛋白的测定,发现 DCG 大鼠主动脉中的 I κ B α 基因和蛋白表达水平均显著低于 CG,表明 2 型糖尿病大鼠主动脉中抑制剂 I κ B 与 NF- κ B 亚基 p65 基因已经分离,并转移到细胞核。同时 2 型糖尿病大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 VCAM-1 水平均显著高于 CG,而 IL-10 显著低于 CG,上述这些相关基因又受到 NF- κ B 信号通路的调控,推测糖尿病可能通过激活 NF- κ B 信号通路促进下游炎症因子的表达,而 IL-1 β 和 TNF- α 的增加,可进一步激活 NF- κ B 信号通路,上述过程不断循环,导致炎症反应加剧。各干预措施均能显著下调 NF- κ Bp65 基因和蛋白表达水平,并显著上调 I κ B α 基因和蛋白表达,有氧运动+荔枝多酚干预效果明显优于单纯有氧运动和荔枝多酚,且大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 和 VCAM-1 水平显著低于 DCG。结果表明有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚干预均可能通过抑制 NF- κ B 信号来减轻血管炎症。

5 结论

有氧运动、荔枝多酚和有氧运动+荔枝多酚干预均能降低 2 型糖尿病大鼠血管炎症,其中联合干预措施大鼠 FBG、HOMA-IR、IL-1 β 、IL-6、VCAM-1、MCP-1、TNF- α 、MDA、ROS 和 NF- κ Bp65 基因/蛋白表达水平均显著低于单纯的有氧运动和荔枝多酚干预,而 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性均显著高于单纯的有氧运动和荔枝多酚干预。有氧运动联合荔枝多酚可能通过改善 2 型糖尿病大鼠血糖代谢、降低血管氧化应激、抑制 NF- κ B 信号来缓解 2 型糖尿病大鼠的血管炎症。

参考文献

- [1] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11 (2): 98-107.
- [2] 于伟华,陈丽,侯新国.亚临床炎症与 2 型糖尿病及其

- 血管并发症关系的研究[J]. 山东医药, 2003, 43 (13): 12-13.
- [3] 张宝岩. 探讨糖尿病对心血管病的影响与其他危险因素的控制意义[J]. 中国健康月刊, 2011, 30 (3): 221-221.
- [4] golbidi S, laher I. Exercise and the aging endothelium [J]. J Diabetes Res, 2013, 9 (22): 1-12.
- [5] 周秋艳, 唐方华, 饶日昌, 等. 荔枝及荔枝多酚物质的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45 (29): 77-79.
- [6] Araujo M, Libério SA, Guerra R, et al. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: A brief review [J]. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2012, 22 (1): 208-219.
- [7] Hokayem M, Blond E, Vidal H, et al. Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients [J]. Diabetes Care, 2013, 36 (6): 1454-1461.
- [8] Pan MH, Li MY, Tsai ML, et al. A mixture of citrus polymethoxyflavones, green tea polyphenols and lychee extracts attenuates adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and obesity-induced adipose inflammation in mice [J]. Food Funct, 2019, 10 (12): 7667-7677.
- [9] Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells [J]. Life Sci, 2011, 88 (1-2): 82-88.
- [10] Beckman JA, goldfine AB, leopold JA, et al. Ebselen does not improve oxidative stress and vascular function in patients with diabetes: A randomized, cross-over trial [J]. Am Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311 (6): 1431-1436.
- [11] Peng L, Pan X, Yin G. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- κ B pathway [J]. Bio Med Res Int, 2015, 28 (12): 1-7.
- [12] Phielix E, Szendroedi J, Roden M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact [J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32 (10): 607-616.
- [13] Hansen M, Palsoemk, Jorn W, et al. The effect of metformin on glucose homeostasis during moderate exercise [J]. Diabetes Care, 2015, 38 (2): 293-301.
- [14] 李侃, 李港澳, 马一闻, 等. 香椿子多酚通过 JNK 通路抑制 6-羟多巴胺诱导 PC12 细胞炎症损伤[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (10): 151-155.
- [15] 云鹏, 邓德明, 孙爱萍. 高脂饮食诱导大鼠肾损伤及其氧化应激水平的研究[J]. 长江大学学报(自科版), 2007, 4 (2): 118-120.
- [16] 陈乐琴, 严华瑾, 张墨华. 体力活动水平与血脂及心血管炎症因子的相关性分析 - 基于不同体力活动水平女性血脂及心血管炎症因子指标数据[J]. 体育研究与教育, 2016, 31 (6): 95-99.
- [17] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance [J]. Ence, 1996, 271 (5249): 665-668.
- [18] 臧琳, 郭景茹, 郭爽, 等. H₂O₂ 诱导 BRL-3A 细胞模拟大鼠肝脏氧化应激损伤的研究[J]. 中国兽医学报, 2013, 33 (3): 445-449.
- [19] Maedler K, Sergeev P, Ehse JA, et al. Leptin modulates β cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 β in human islets [J]. P Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (21): 8138-8143.
- [20] Mcgeachy MJ, Bakjensen KS, Chen Y, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T (H) -17 cell-mediated pathology [J]. Nat Immunol, 2007, 8 (12): 1390-1397.
- [21] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity [J]. J Cent South Univ Technol, 2010, 17 (3): 472-479.
- [22] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 2001, 107 (10): 1255-1262.
- [23] 王利宏, 张文彪, 习利军, 等. 2 型糖尿病对大鼠牙周组织及 TNF- α , IL-6 和 PAI-1 水平影响的研究[J]. 口腔医学, 2017, 37 (10): 889-893.
- [24] 张友仁, 唐涛, 黄昀, 等. 辣椒叶多酚抗氧化及抗炎活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34 (8): 346-349.
- [25] 叶希韵, 王耀发. 山楂叶总黄酮对血管内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2002, 32 (4): 265-268.
- [26] Podkopaeva DA, Miu G, Dubinina GA. Oxidative stress and antioxidant cell protection systems in the microaerophilic bacterium *Spirillum winogradskii* [J]. Microbiology, 2003, 72 (5): 600-608.
- [27] 刘静, 吴建平, 寇耀, 等. SOD、GSH-Px、MDA 在胃癌患者血清中的表达及与临床分期的关系[J]. 癌症进展, 2019, 17 (13): 1576-1578.
- [28] 刘倩, 吕颜露. 咽喉反流通过 NF- κ B 信号通路介导炎症反应对声带黏膜的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48 (1): 32-37.
- [29] 游琼, 吴铿, 涂焰明, 等. 柚皮苷调控心肌核因子 NF- κ B 炎症信号通路对糖尿病心脏病大鼠防治作用[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29 (2): 121-124.

(收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-05-10)

益根调理口服液质量标准及其免疫调节研究

蒋林^{1, 2, 3}, 陈海燕¹, 随家宁¹, 郭勇秀¹, 谢孟姣¹, 赖信宏¹, 李芳婵^{1, 2, 3*} (1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200; 3. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立保健食品益根调理口服液的质量标准, 并对其免疫调节作用进行初步研究。**方法** 采用薄层色谱法 (TLC) 对益根调理口服液中沙棘、益智仁、五指毛桃、桑椹 4 味药材进行鉴别研究; 采用高效液相色谱法 (HPLC) 同时测定补骨脂素、鞣花酸成分的含量; 通过测定小鼠巨噬细胞吞噬指数及脾脏淋巴细胞活性评价益根调理口服液的免疫调节作用。**结果** 沙棘、益智仁、五指毛桃及桑椹薄层鉴别特征斑点清晰、分离度较好, 且阴性样品无干扰。补骨脂素在 18.24 ~ 48.64 μg ($r = 0.9999$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 100.77%, RSD 为 2.1%; 鞣花酸在 16.72 ~ 100.32 μg ($r = 0.9993$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.09%, RSD 为 2.0%。与阴性对照组相比, 给药组小鼠淋巴细胞增殖能力明显增强及吞噬指数明显增加。**结论** 所建立的益根调理口服液质量标准科学合理、安全有效、操作简便, 且准确性、重现性较好, 可用于益根调理口服液的质量控制; 益根调理口服液具有增强环磷酰胺所致的小鼠淋巴细胞增殖和吞噬功能的作用, 从而增强机体免疫力。

关键词: 益根调理口服液; 质量标准; 免疫调节

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1841-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.013

Quality standard of Yigen conditioning oral liquid and its immunomodulation

JIANG Lin^{1, 2, 3}, CHEN Hai-yan¹, SUI Jia-ning¹, GUO Yong-xiu¹, XIE Meng-jiao¹, LAI Xin-hong¹, LI Fang-chan^{1, 2, 3*} (1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Guangxi Zhuang and Yao Medicine Engineering Technology Research Center, Nanning 530200; 3. Guangxi University Key Laboratory of Common Technology Research & Development of Chinese Medicine Preparation, Nanning 530200)

Abstract: Objective To determine the quality standard of Yigen conditioning oral liquid and its immunomodulatory effects. **Methods** Thin layer chromatography was used to identify *Hippophae rhamnoides* L., *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, *Radix FiciHirtae* and *Mulberry* in Yigen conditioning oral liquid. The content of psoralen and ellagic acid was determined by high performance liquid chromatography. The immunomodulatory effect of Yigen conditioning oral liquid was evaluated by measuring macrophage phagocytosis index and splenic lymphocyte activity in mice. **Results** The thin layer identification of *Hippophae rhamnoides* L., *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, *Radix FiciHirtae* and *Mulberry* showed clear spots and good separation without interference. The linearity of psoralen was 18.24 — 48.64 μg ($r = 0.9999$), the average recovery was 100.77%, and RSD was 2.1%. The linearity of ellagic acid was 16.72 — 100.32 μg ($r = 0.9993$), the average recovery was 98.09%, and RSD was 2.0%. Compared with the negative control group, lymphocyte proliferation ability and phagocytic index of the administered mice were significantly enhanced. **Conclusion** The established quality standard is safe scientific, reasonable, and effective, easy to operate, accurate and reproducible, and can be used

基金项目: 广西创新驱动发展专项基金项目 (No. 桂科 AA17204073); 南宁市良庆区科学研究与技术开发计划项目 (No. 201910); 广西一流学科建设开放课题自然科学研究项目 (No. 2019XK118)。

作者简介: 蒋林, 男, 教授级高级工程师, 主要从事中药、保健食品研究与开发方面的研究, E-mail: 1009100482@qq.com *通信作者: 李芳婵, 女, 主要从事中药、食品研究与开发方面的研究, E-mail: 1936490308@qq.com

for the quality control of Yigen conditioning oral liquid. Yigen conditioning oral liquid can enhance the proliferation and phagocytosis of mouse lymphocytes induced by cyclophosphamide, improving the immune function.

Key words: Yigen conditioning oral liquid; quality standard; immunomodulation

益根调理口服液是在中医药理论基础上, 采用药食两用的药材所开发的中药复方保健食品口服液, 由黄精、桑椹、灵芝、沙棘、益智仁、五指毛桃及覆盆子 7 味药组成, 具有良好的增强免疫力、抗氧化、辅助改善记忆、缓解体力疲劳等保健功效, 用于年老体弱、形体消瘦、贫血、再生障碍性贫血、气虚质等人群日常养生。方中君药黄精功善补中益气、养阴益精可达气阴双补^[1], 臣药桑椹、灵芝分别助黄精滋阴、补气之功^[2-3], 佐药覆盆子及益智仁均具有益肾固精缩尿之功效^[4-5]; 沙棘健脾消食、五指毛桃健脾补肺, 全方以此两味为反佐药可“以泻助补”。益根调理口服液目前为止还未制订相关的质量标准, 本实验采用薄层色谱法对该口服液的 4 味药材进行初步的药材鉴别, 采用高效液相色谱法同时测定补骨脂素、鞣花酸成分含量研究, 为建立益根调理口服液质量标准提供科学依据; 同时对其免疫调节作用进行药效学研究, 为该口服液进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2020C 3D plus 高效液相色谱仪(日本岛津), 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 分析天平(十万分之一, 赛多利斯科学仪器有限公司), 漩涡混合器(常州越新仪器制造有限公司), 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司), 超纯水制备机(中国密理博有限公司), 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司), 硅胶 GF254 薄层板、双槽展开缸、SpectraMax i3x 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司], SW-CJ-2FD 型单人单面垂直净化工作台(苏州净化设备有限公司), TD5A 型台式多管架离心机(长沙英泰仪器有限公司)。

1.2 试药

益根调理口服液的处方中黄精、桑椹、灵芝、沙棘、益智仁、覆盆子和五指毛桃药材均购买自华泰中药饮片责任有限公司, 由广西中医药大学中药鉴定教研室田慧教授分别鉴定为黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.) 的干燥根茎、桑椹(*Morus alba* L.) 的干燥果穗、灵芝(*Ganoderma*

sinense Zhao, Xu et Zhang) 的干燥子实体、沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.) 的干燥成熟果实、益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.) 的干燥成熟果实、华东覆盆子(*Rubus chingii* Hu) 的干燥果实、桑科植物粗叶榕(*Ficus hirta* Vahl) 的干燥根。鞣花酸对照品(成都麦德生科技有限公司, 批号: RP190721, 含量: 99.58%)、补骨脂素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110739-201918, 含量: 99.6%) 以及益根调理口服液(批号分别为: 20191029、20200512-1、20200512-2、20200512-3、20200512-4、20200512-5、20200512-6, 由广西中医药大学广西壮瑶药工程中心实验室自制, 每瓶 45 mL); RPMI 1640 完全培养液(批号: AD23107271, 美国 Gibco 公司), ConA(批号: 1012J033)、台盼蓝(批号: 620C055)(北京索莱宝科技有限公司), MTT(批号: M2128, 美国 Amresco 公司), 印度墨汁(批号: 0919A17, 北京雷根生物技术有限公司)等。乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 益根调理口服液质量标准研究

2.1 益根调理口服液制备

取黄精、桑椹、灵芝、沙棘、益智仁、五指毛桃及覆盆子 7 味药材处方量, 回流提取 2 次, 提取液混合, 热滤浓缩, 混匀过滤, 添加适量蔗糖, 分装, 即得每瓶 45 mL 益根调理口服液(1 mL 相当于 1.28 g 生药量)。

2.2 薄层鉴别

2.2.1 沙棘薄层鉴别 取益根调理口服液 2 mL 置于分液漏斗中, 加水至 10 mL, 乙酸乙酯连续萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并乙酸乙酯液, 待滤液蒸干后, 残渣添加甲醇 1 mL 溶解, 即得供试品溶液。依据处方比例称取除了沙棘外的其他 6 味药材, 按“2.1”项下方法制得阴性样品; 取缺沙棘的阴性样品 1 mL, 以供试品溶液处理方法得到沙棘阴性样品溶液。另取沙棘对照药材 1 g, 加入乙酸乙酯 30 mL 超声(功率 200 W, 频率 40 kHz)提取 30 min, 滤液蒸干后, 残渣加入甲醇 1 mL 溶解, 即得沙棘对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502) 试验,

吸取供试品溶液、沙棘对照药材溶液、阴性样品溶液各 5、13、10 μL ，分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以石油醚（60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ ）- 氯仿 - 乙酸乙酯（3 : 8 : 5）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以三氯化铝溶液进行显色。在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰，放冷至室温后在 365 nm 紫外灯下观察。沙棘薄层色谱图中，供试品色谱与对照品色谱在相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点，且阴性样品无干扰（见图 1）。

2.2.2 益智仁薄层鉴别 按“2.2.1”项下方法制得供试品溶液。依据处方比例称取除了益智仁外的其他 6 味药材，按“2.1”项下方法制得缺益智仁的阴性样品，再取缺益智仁的阴性样品 1 mL，以供试品溶液处理方法得到益智仁阴性样品溶液。另取益智仁对照药材 1 g，加入乙酸乙酯 30 mL 超声（功率 200 W，频率 40 kHz）提取 30 min，过滤，滤液蒸干，残渣加入甲醇 1 mL 进行溶解，作为益智仁对照药材溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2015 年版四部通则 0502）试验，吸取供试品溶液、益智仁对照药材溶液、阴性样品溶液各 5、13、10 μL ，分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以石油醚（60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ ）- 氯仿 - 乙酸乙酯（3 : 8 : 5）为展开剂，展开，取出，晾干。喷以 5% 香草醛硫酸溶液进行显色，在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰，置紫外光灯（365 nm）下检视。在益智仁薄层色谱图中，供试品溶液色谱与益智仁对照药材色谱在相应的位置上，显相同颜色的斑点，且斑点清晰，无拖尾现象；且阴性样品色谱中无相同的斑点（见图 2）。

2.2.3 五指毛桃薄层鉴别 取益根调理口服液 5 mL 按“2.2.1”项下方法制得供试品溶液。依据处方比例称取除了五指毛桃外的其他 6 味药材，按“2.1”项下方法制得缺五指毛桃的阴性样品；再取缺五指毛桃的阴性样品 5 mL，按照供试品溶液方法制备得到五指毛桃阴性样品溶液。另取补骨脂对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 补骨脂素的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2015 年版四部通则 0502）试验，吸取上述溶液各 10 μL ，分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以环己烷 - 乙酸乙酯（2 : 1）为展开剂，展开，取出，晾干；喷以氢氧化钾甲醇溶液进行显色，晾干后在 365 nm 紫外灯下观察。五指毛桃薄层色谱图中，供试品溶液色谱与五指毛桃对照药材色谱在相应位置上显相同颜色的斑点，斑点清晰，并且阴性样品无干扰（见图 3）。

2.2.4 桑椹薄层鉴别 取益根调理口服液 1 mL 按“2.2.1”项下方法制得供试品溶液。依据处方比例称取除了桑椹外的其他 6 味药材，按“2.1”项下方法制得缺桑椹的阴性样品；再取缺桑椹的阴性样品 1 mL，按供试品溶液处理方法制备桑椹阴性样品溶液。另取桑椹对照药材 1 g，加乙酸乙酯 30 mL 超声（功率 200 W，频率 40 kHz）提取 30 min，滤液蒸干，残渣添加甲醇 1 mL 进行溶解，制成桑椹对照药材溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2015 年版四部通则 0502）试验，吸取上述溶液各 10 μL ，分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上，以石油醚（60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ ）- 氯仿 - 乙酸乙酯（3 : 8 : 5）为展开剂，展开，取出，晾干。在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰，取出放冷至室温，在 365 nm 紫外灯和日光灯下进行观察。在桑椹薄层色谱图中，供试品溶液色谱在与桑椹对照药材色谱对应位置上，显相同颜色的清晰斑点，而阴性样品溶液色谱在相应位置无斑点（见图 4）。

2.3 补骨脂素、鞣花酸含量测定研究

2.3.1 色谱条件 色谱柱：phenomenex- C_{18} 柱（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）；检测波长：254 nm；流动相：0.1% 甲酸（A）- 乙腈（B）；梯度洗脱为 0 ~ 16 min 时 5% \rightarrow 28%B，16 ~ 30 min 时 28% \rightarrow 55%B，30 ~ 45 min 时 55% \rightarrow 85%B，45 ~ 50 min 时 85% \rightarrow 100%B；柱温：25 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1.0 mL \cdot min $^{-1}$ ；进样量：20 μL 。

2.3.2 供试品溶液制备 精密量取 5.0 mL 益根调理口服液，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25.0 mL 甲醇，精密称重；超声（功率 200 W，频率 40 kHz）处理 30 min 后，放冷至室温，再次精密称重，补足重量并摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液制备 精密称取鞣花酸对照品、补骨脂素对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇稀释定容，摇匀后制得每 1 mL 含补骨脂素 0.0304 mg、鞣花酸 0.1672 mg 的混合对照品溶液。

2.3.4 阴性样品溶液制备 依据处方比例称取除了五指毛桃外的其他 6 味药材，按口服液制剂的制备工艺制得缺五指毛桃阴性样品，同法制得缺覆盆子阴性样品。分别精密量取五指毛桃阴性样品、覆盆子阴性样品 5.0 mL，按“2.3.2”项下方法进行处理，分别得到缺五指毛桃阴性样品溶液、缺覆盆子阴性样品溶液。

2.3.5 系统适用性考察 分别精密吸取上述供试品溶液、混合对照品溶液、缺五指毛桃阴性样品溶液、缺覆盆子阴性样品溶液各 20 μL ，按“2.3.1”项下色

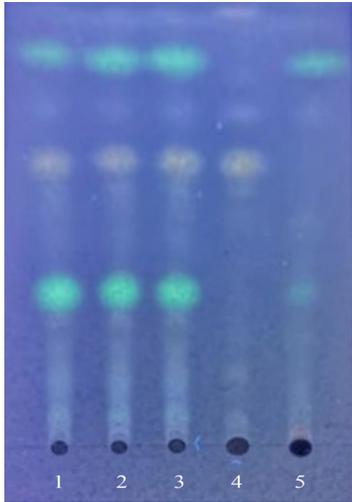


图 1 沙棘薄层色谱图

Fig 1 TLC of *Hippophae rhamnoides* L.

1~3. 供试品 (sample); 4. 沙棘对照药材 (reference herb of *Hippophae rhamnoides* L.); 5. 阴性样品 (negative sample)

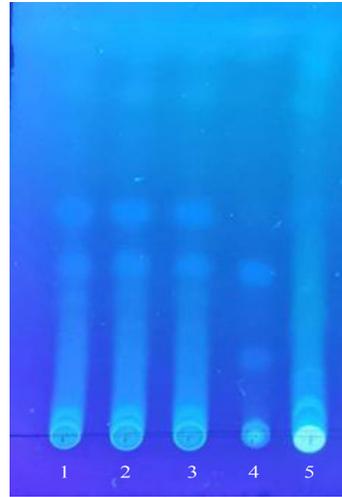


图 4 桑椹薄层色谱图

Fig 4 TLC of Mulberry

1~3. 供试品 (sample); 4. 桑椹对照药材 (reference herb of Mulberry); 5. 阴性样品 (negative sample)

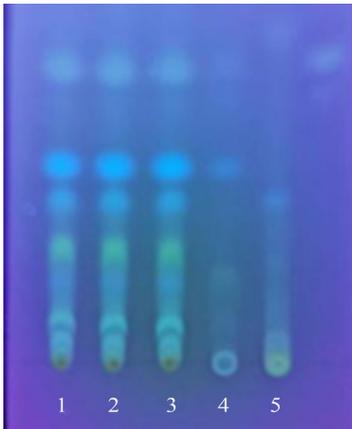


图 2 益智仁薄层色谱图

Fig 2 TLC of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

1~3. 供试品 (sample); 4. 益智对照药材 (reference herb of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*); 5. 阴性样品 (negative sample)

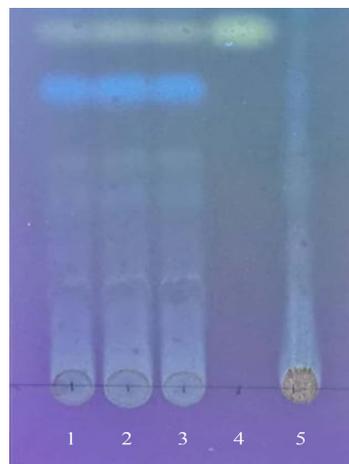


图 3 五指毛桃薄层色谱图

Fig 3 TLC of *Radix FiciHirtae*

1~3. 供试品 (sample); 4. 补骨脂素 (psoralen); 5. 阴性样品 (negative sample)

谱条件进样分析, 记录色谱图, 见图 5; 结果补骨脂素、鞣花酸成分与相邻色谱峰的分度大于 1.5, 理论塔板数均大于 20 000, 阴性对照样品对补骨脂素、鞣花酸成分无干扰, 方法专属性好。

2.3.6 线性关系考察 精密吸取“2.3.3”项下混合对照品溶液适量, 配制成具有 6 个浓度梯度的混合对照品溶液, 并分别精密吸取 20 μL , 注入高效液相色谱仪测定, 分别记录峰面积。以进样量 (μg) 为横坐标 (X)、对应峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。结果鞣花酸成分的回归方程为 $Y = 7.83 \times 10^9 X - 3.96 \times 10^5$ ($r = 0.9993$), 在 16.72 ~ 100.32 μg 内线性关系良好; 补骨脂素成分的回归方程为 $Y = 3.53 \times 10^9 X + 1.63 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 在 18.24 ~ 48.64 μg 内线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 精密吸取“2.3.3”项下的混合对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 结果补骨脂素、鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.5% ($n = 6$), 表明仪器的精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 精密吸取“2.3.2”项下一份供试品溶液 (批次: 20191029) 20 μL , 依据“2.3.1”项下色谱条件分别在第 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果补骨脂素峰面积的 RSD 为 1.9%, 鞣花酸峰面积的 RSD 为 1.8%, 表明在 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 平行量取同一批次口服液 (批次: 20191029) 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果口服液样品中的补骨脂素、鞣花酸成分的含量分别为 0.2583 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.3871 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 值分别为

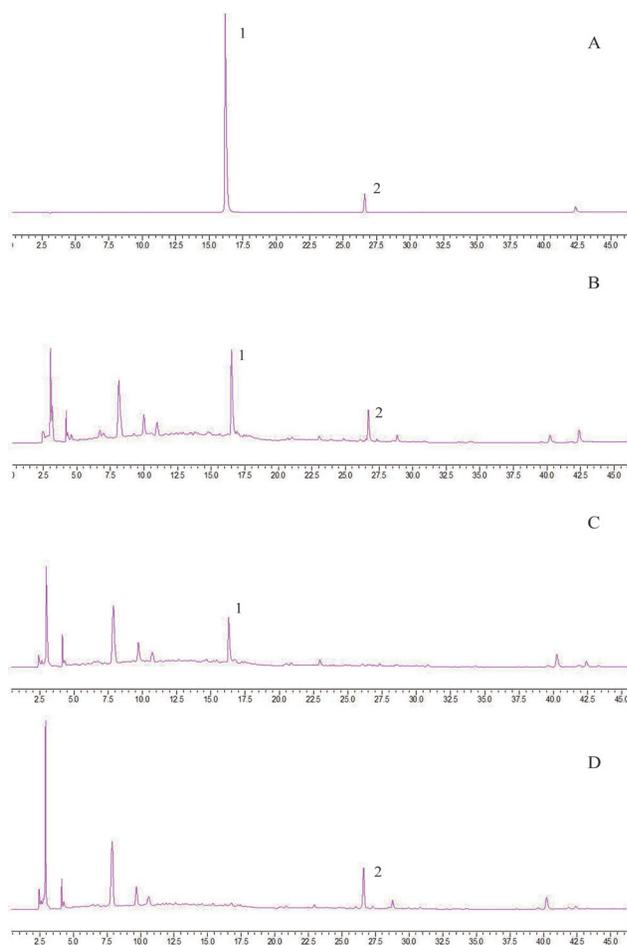


图 5 补骨脂素、鞣花酸的 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC of psoralen and ellagic acid

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 供试品 (sample); C. 缺五指毛桃阴性样品 (negative sample without *Radix FiciHirtae*); D. 缺覆盆子阴性样品 (negative sample without *Rubus Idaeus L.*); 1. 鞣花酸 (ellagic acid); 2. 补骨脂素 (psoralen)

0.6%、2.0% ($n = 6$), 说明该方法的重复性良好。

2.3.10 加样回收试验 精密量取同一批次口服液 (批次: 20191029) 2.5 mL, 平行量取 6 份, 加入鞣花酸 ($0.949 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及补骨脂素 ($0.624 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混合对照品溶液 1.0 mL, 置于具塞锥形瓶中, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。结果补骨脂素平均回收率为 100.77%, RSD 为 2.1%; 鞣花酸平均回收率为 98.09%, RSD 分别为 2.0%。

2.3.11 样品含量测定 分别取 6 批益根调理口服液样品, 平行制备 2 份, 按“2.3.2”项下方法处理, 进样测定, 计算益根调理口服液中补骨脂素、鞣花酸的含量。结果见表 1。

3 益根调理口服液对小鼠免疫功能调节作用

3.1 受试动物

雄性 ICR 小鼠 80 只 (SPF 级), 体质量为

表 1 鞣花酸及补骨脂素含量测定结果

Tab 1 Content of ellagic acid and psoralen

成分	批次	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均含量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
补骨脂素	20200512-1	0.2100	0.2191
	20200512-2	0.2112	
	20200512-3	0.2410	
	20200512-4	0.2093	
	20200512-5	0.2118	
	20200512-6	0.2317	
鞣花酸	20200512-1	0.3078	0.3193
	20200512-2	0.2604	
	20200512-3	0.3748	
	20200512-4	0.3121	
	20200512-5	0.3249	
	20200512-6	0.3357	

(22 ± 3) g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 使用许可证号: SYXK (湘) 2015-0016]。小鼠于实验室适应性喂养 1 周, 室温 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 明暗 12 h 交替, 自由饮食、摄水。

3.2 动物分组及给药

将雄性 ICR 小鼠随机分为实验 I 组、II 组, 每实验组各 40 只: 实验 I 组用于脾脏淋巴细胞活性测定, 实验 II 组用于巨噬细胞吞噬指数测定; 同时将各实验组均分为 4 小组, 即益根调理口服液低、中、高剂量组及阴性对照组。其中益根调理口服液低、中、高剂量组分别按 $9.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $19.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $29.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 阴性对照组给予相应剂量的 0.5% CMC-Na, 每日灌胃 1 次, 连续 30 d。实验期间, 温度恒定、通风, 所有小鼠自由饮食、饮水。

3.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行统计分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以率 (%) 表示, 组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3.4 脾脏淋巴细胞活性测定

实验前将第 I 组小鼠进行称重并记录, 末次给予受试样品 1 h 后, 无菌条件下取脾, 并且制成单个细胞悬液。脾淋巴细胞活性应用 ConA 刺激脾淋巴细胞分化增殖, 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测定; 细胞增殖率 (%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / 实验组 OD 值 $\times 100\%$ 。

与阴性对照组相比, 各给药组动物平均体质量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 6)。与阴性对照组相比, 益根调理口服液高剂量组小鼠淋巴细胞增殖能力明显增加 ($P < 0.05$, 见图 7)。

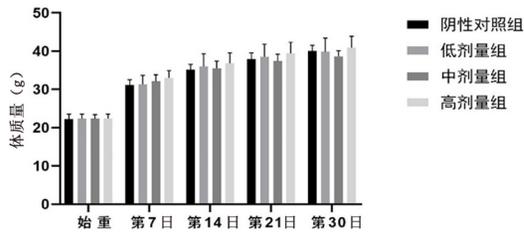


图 6 益根调理口服液对 ICR 小鼠 (第 I 组) 体质量的影响

Fig 6 Effect of Yigen conditioning oral liquid on body mass of ICR mice (group I)

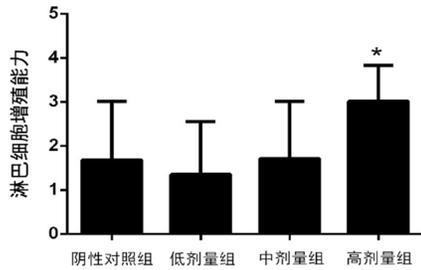


图 7 益根调理口服液对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖能力的影响

Fig 7 Effect of Yigen conditioning oral liquid on conA-induced lymphocyte proliferation in mice

注 (Note): 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$ (Compared with the negative control group, * $P < 0.05$).

3.5 巨噬细胞碳廓清吞噬指数测定

实验前将第 II 组小鼠进行称重并记录, 末次给予受试样品 1 h 后, 按体质量从小鼠尾静脉注入 20% 印度墨汁 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分别于墨汁注入后 2、10 min 从内眦静脉丛取血, 并立即加入 0.1% Na_2CO_3 溶液, 充分混匀, 用酶标仪在 600 nm 波长处测光密度值 (OD)。采血后将小鼠处死, 取肝脏和脾脏, 分别称重, 以吞噬指数表示小鼠碳廓清能力。吞噬指数 $a = \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量}) \times \sqrt[3]{K}$, $K = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1)$, OD_1 为 2 min 吸光度值, OD_2 为 10 min 吸光度值; t 为时间 (min)。

与阴性对照组相比, 各给药组体质量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 8), 益根调理口服液中剂量组小鼠碳廓清吞噬指数明显增加 ($P < 0.05$), 低剂量及高剂量组小鼠吞噬指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 9)。

4 讨论

本研究建立了益根调理口服液的薄层鉴别, 在沙棘、桑椹、益智仁薄层鉴别的过程中, 分别考察了湿度、温度、不同展开剂以及不同薄层板对样品展开的影响, 发现石油醚 ($60 \sim 90^\circ\text{C}$) - 氯仿 - 乙酸乙酯 (3 : 8 : 5) 作为沙棘、桑椹、益智仁鉴别的展开剂, 斑点均明亮清晰, 分离效果均较好, 且无拖尾现象。

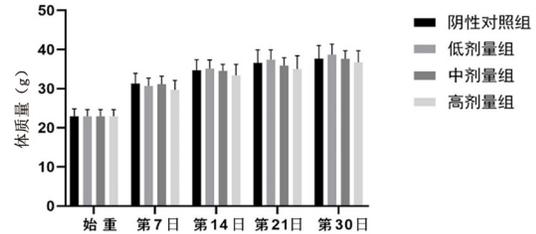


图 8 益根调理口服液对 ICR 小鼠 (第 II 组) 体质量的影响

Fig 8 Effect of Yigen conditioning oral liquid on the body mass of ICR mice (group II)

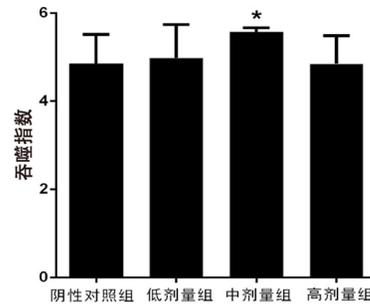


图 9 益根调理口服液对 ICR 小鼠吞噬指数的影响

Fig 9 Effect of Yigen conditioning oral liquid on the phagocytic index of ICR mice

注 (Note): 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$ (Compared with the negative control group, * $P < 0.05$).

遵循中药质量标志物理论, 对益根调理口服液质量标志物进行预测分析。该处方中黄精多糖是君药黄精的主要功效成分之一, 其具有抗氧化、抗疲劳、调节免疫力、降血脂、护肝等药理作用^[6-7]; 灵芝多糖、桑椹多糖分别为臣药灵芝、桑椹的主要有效成分, 均具有调节免疫、抗氧化、降血糖、降脂、抗衰老、护肝等药理作用^[8-9], 多糖类成分较复杂, 常用紫外分光光度法进行测定, 而在测定过程中发现口服液中蔗糖甜味剂影响其总多糖的含量测定, 因此不考虑黄精多糖、灵芝多糖、桑椹多糖作为该口服液功效成分的含量测定。五指毛桃为桑科榕属植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的根。本品性平, 味甜辛, 归肺、脾、胃、大肠、肝经, 有益气健脾、祛痰化湿、舒筋活络之功^[10]。处方中五指毛桃的特征性成分为补骨脂素成分, 具有良好的抗氧化、抗衰老的药理作用以及具有调节免疫力的功能^[11-12]。刘春玲等^[13]通过实验研究发现五指毛桃能提高免疫功能低下小鼠的细胞免疫和体液免疫功能, 对免疫功能具有调节作用。覆盆子为蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实, 始载于《神农本草经》, 具有益肾固精缩尿、养肝明目的功效^[14]。覆盆子中含量较高的有效成分为鞣花酸, 具有良好的抗氧化以及调节免疫力的作用^[15-16]。姜成哲

等^[17]通过观察鞣花酸对脾淋巴细胞增殖、自然杀伤细胞活性和 Th1/Th2 细胞因子的影响,发现鞣花酸主要通过影响 NK 细胞活性而引起一定的免疫调节作用。因此选择补骨脂素与鞣花酸作为益根调理口服液含量测定的特征成分。

现代药理研究表明,处方中的黄精多糖^[18]、桑椹多糖^[19]、灵芝多糖^[20]、沙棘多糖^[21]、补骨脂素^[12]、鞣花酸^[16]等成分均具有免疫调节作用。增强免疫力功能检验方法有很多,本课题组选择 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验及巨噬细胞吞噬指数实验对益根调理口服液增强免疫力的作用进行研究。细胞免疫主要是由 T 淋巴细胞介导的一种特异性免疫反应,淋巴细胞转化率降低表示细胞免疫水平低下^[22]。Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验,其转化率常被用来衡量机体细胞免疫水平;T 淋巴细胞转化率低,意味着在外来因子的刺激下淋巴细胞的增殖反应降低,机体的免疫力下降^[23]。非特异性免疫是机体免疫系统的重要组成部分,巨噬细胞吞噬功能是反映非特异性免疫功能的常用指标之一。巨噬细胞为一类重要的免疫调节细胞,可通过吞噬病原体、细胞碎片、递呈抗原、分泌 IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子诱导并调节特异性免疫应答^[24]。有研究表明提高 NK 细胞的杀伤活性与巨噬细胞的吞噬活性为增强免疫力的作用机制之一^[25]。评价单核巨噬细胞的吞噬功能常采用碳廓清实验,当碳颗粒进入血液后,血液中的吞噬细胞便开始吞噬异物颗粒^[26]。

本实验所建立的益根调理口服液质量标准科学合理、操作简便,且准确性、重现性较好,可用于益根调理口服液的质量控制;药效学初步研究表明益根调理口服液可能通过增强小鼠淋巴细胞增殖和吞噬功能的作用,从而增强机体免疫力,为进一步研究其免疫调节机制奠定基础。

参考文献

[1] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 33-326.
 [2] (唐)孟诜. 食疗本草[M]. 郑金生, 张同君, 译注. 上海: 上海古籍出版社, 2007.
 [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
 [4] 张希, 廖宇娇, 杨卓, 等. 覆盆子盐制前后化学成分及药效学变化研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (1):

82-84.
 [5] 随家宁, 李芳婵, 郭勇秀, 等. 益智仁化学成分、药理作用及质量标志物研究进展[J]. 药物评价研究, 2020, 43 (10): 2120-2126.
 [6] 张丽萍, 赵祺, 崔友, 等. 黄精多糖生物活性及功能性食品开发[J]. 热带农业工程, 2019, 43 (5): 207-210.
 [7] 董治程, 谢昭明, 黄丹, 等. 黄精资源、化学成分及药理作用研究概况[J]. 中南药学, 2012, 10 (6): 450-453.
 [8] 李颖, 李庆典. 桑椹多糖抗氧化作用的研究[J]. 中国酿造, 2010 (4): 59-61.
 [9] 程丽佳, 谢欣蓉, 杨明, 等. 灵芝提取物对提高小鼠机体免疫力作用研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36 (4): 361-363, 368.
 [10] 何凌云, 陈燕燕. 五指毛桃高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2015, 13 (7): 681-684.
 [11] 叶童, 石瑞娟, 等. 五指毛桃的化学成分和药理活性研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35 (4): 591-596.
 [12] 魏刚, 刘春玲, 何建雄, 等. 五指毛桃 GC-MS 特征指标成分群探讨[J]. 中医药学刊, 2005, 23 (7): 1249-1251.
 [13] 刘春玲, 徐鸿华, 吴清, 等. 五指毛桃对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中药材, 2004, 27 (5): 367-368.
 [14] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 382.
 [15] 郭增军, 谭林等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22 (3): 519-524, 540.
 [16] 程丹, 李洁, 周斌, 等. 覆盆子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2012, 35 (11): 1873-1876.
 [17] 姜成哲, 张乾坤, 金庆日, 等. 鞣花酸对脾淋巴细胞增殖、自然杀伤细胞活性和 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中草药, 2010, 41 (2): 275-277.
 [18] 傅圣斌, 钱建鸿, 陈乐意, 等. 黄精多糖的提取及其对小鼠免疫活性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13 (1): 68-72.
 [19] 骆新, 王忠, 朱虎虎, 等. 桑椹多糖对环磷酰胺诱导小鼠免疫功能低下的调节作用[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41 (1): 75-78.
 [20] 程丽佳, 谢欣蓉, 杨明, 等. 灵芝提取物对提高小鼠机体免疫力作用研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36 (4): 361-363, 368.
 [21] 王蓉, 李胜男, 陈春, 等. 沙棘多糖对巨噬细胞和免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究[J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 384-388.
 [22] 张自广. 中药复方多糖的优化提取及其对小鼠免疫功能的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
 [23] 任国庆, 邹晓峰, 韩亚男, 等. 人参全草免疫调节作用研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21 (1): 54-61.
 [24] 陶萍, 林江. 中药对巨噬细胞的免疫调控作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28 (27): 3071-3074.
 [25] 马得莹, 单安山. 中草药对动物生长、内分泌和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31 (1): 16-19.

(收稿日期: 2021-02-08; 修回日期: 2021-04-03)

基于 Box-Behnken 响应面设计法结合熵权法 优选脑络欣通方提取工艺

赵国栋¹, 洪璐¹, 王倪¹, 何玲², 张善堂^{3*}, 陈卫东^{1*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038; 3. 安徽省立医院, 合肥 230001)

摘要: 目的 利用 Box-Behnken 响应面设计法结合熵权法优选脑络欣通方最佳提取工艺。方法 以浸泡时间、提取时间、提取次数作为考察因素, 复方水提液中 3 种成分(羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸)的含量及复方出膏率作为考察指标; 基于单因素设计方法及 Box-Behnken 响应面设计法构建三因素三水平试验设计方案, 并采用熵权法对 4 种指标进行赋权, 以综合评分结果作为提取工艺的评价指标优选最佳工艺条件, 并进行工艺验证。结果 脑络欣通方的最佳工艺条件为提取 74 min, 浸泡 60 min, 提取 2 次。结论 利用 Box-Behnken 响应面设计法优化脑络欣通方提取工艺方法稳定, 预测性较好, 对脑络欣通方提取工艺研究具有重大的指导意义。

关键词: 脑络欣通; 提取工艺; Box-Behnken 响应面设计法; 熵权法

中图分类号: R283.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1848-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.014

Optimization of Naoluo Xintong decoction extraction based on Box-Behnken response surface methodology and entropy weight method

ZHAO Guo-dong¹, HONG Lu¹, WANG Ni¹, HE Ling², ZHANG Shan-tang^{3*}, CHEN Wei-dong^{1*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Xin'an Key Laboratory of Education Commission, Hefei 230038; 3. Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract: Objective To optimize the extraction of Naoluo Xintong decoction by Box-Behnken response surface methodology and entropy weight method. **Methods** The soaking time, extraction time and the number of extraction were taken as the investigation factors. The paste rate and the content of hydroxysafflor yellow A, calycosin-7-glucoside and ferulic acid in the water extraction were used as the indexes. The single factor design method and Box-Behnken response surface methodology were used to construct three-factor three-level experimental design scheme, and then the entropy weigh method were used to weight the four indexes. Finally, the comprehensive scoring results were taken as the evaluation index of the extraction process to obtain the optimal for conditions and there were process verification. **Results** The optimal process conditions of Naoluo Xintong decoction were extraction for 74 min, soaking for 60 min, and extracting twice. **Conclusion** Box-Behnken can optimize the extraction process of Naoluo Xintong decoction, which is stable and predictable, and of great guidance in the research of Naoluo Xintong decoction extraction.

Key words: Naoluo Xintong decoction; extraction process; Box-Behnken response surface methodology; entropy weight method

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (No.KJ2019A0452)。

作者简介: 赵国栋, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药剂学研究, E-mail: 2365370096@qq.com *通信作者: 陈卫东, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药学、药动学与药剂学研究, E-mail: anzhongdong@126.com; 张善堂, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事治疗药物监测及临床药动学研究, E-mail: zhangshantang@163.com

脑络欣通方 (Naoluo Xintong decoction, NLX-TD) 是新安医学用于中风治疗的临床验方, 由黄芪、川芎、三七等七味中药按照君臣佐使理论配伍而成。全方活血寓于补气之中, 气贯经脉以助血行, 营血流畅经脉得养, 临床疗效显著。现代药理学研究表明脑络欣通方治疗缺血性中风疗效显著, 在促进神经功能恢复, 减小脑梗死体积, 改善脑缺血再灌注损伤伴有的局部过度炎症反应等方面体现出显著的治疗优势^[1-3]。长期以来, 脑络欣通方应用于临床多以汤剂的形式, 其疗效确切、易吸收、起效迅速^[4]。但汤剂存在剂量不准确, 药效不稳定, 服用量大, 携带和运输不便, 不易保存等缺点, 限制了其临床应用和发展, 故需要改进剂型。

响应面法 (RSM) 是一种综合试验设计和数学建模, 通过对具有代表性的局部各点进行试验, 回归拟合全局范围内因素与结果间的函数关系, 取得各因素最优水平值的优化方法; 具有试验次数少、精密度高、模型预测性能好、可用于研究几种因素间交互作用等优点^[5]。熵权法 (EWM) 则是经过对试验获得的数据进行整理, 计算和分析, 进而得出各项试验指标的权重系数^[6]。采用两者结合的方式优化中药提取工艺, 既可以系统地影响中药提取工艺的各因素及因素间相互作用进行研究, 又有利于降低人为主观因素造成的试验结果偏差, 使试验结果更具有科学性和合理性。

基于此, 为更好地进行脑络欣通方的新药开发工作, 本研究依据中药新药研发的相关要求, 结合生产实际, 采用 Box-Behnken 响应面设计法, 选择脑络欣通方提取液中 3 种成分 (羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸) 的含量及复方出膏率作为考察指标, 运用熵权法对试验结果进行综合评价, 旨在优选出脑络欣通方提取工艺的最佳工艺参数, 为其剂型改进提供试验依据, 并为该方进一步的研究与开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20ADXR 液相色谱仪 (日本岛津仪器有限公司); 电子天平 (型号: PA1004B, 上海越平科学仪器有限公司); 数显恒温水浴锅 (型号: WB-2000, 郑州长城科工贸有限公司); 数控超声波清洗器 (型号: KQ2200, 江苏省昆山市超声仪器有限公司); CP2250 分析天平 (精度: 0.01 mg, 奥豪斯国际贸易有限公司)。

1.2 试药

羟基红花黄色素 A (批号: R25A9F 59977)、

毛蕊异黄酮苷 (批号: Y27F9H 54731)(对照品, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 阿魏酸对照品 (批号: 110773-201614, 质量分数 $\geq 98\%$, 中国食品药品检验研究院); 液相用乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他化学试剂均为分析纯。黄芪 (批号: 200601)、红花 (批号: 200601)、三七 (批号: 200601)、川芎 (批号: 200601)、天麻 (批号: 200601)、当归 (批号: 200601)(安徽友信药业有限公司), 蜈蚣 (批号: 160801, 安徽亳州广印堂中药有限责任公司), 均经安徽中医药大学俞年军教授鉴定其为正品。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备^[7]

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称定羟基红花黄色素 A 2.38 mg、毛蕊异黄酮苷 1.00 mg、阿魏酸 1.00 mg 对照品置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 制成含羟基红花黄色素 A $476.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、毛蕊异黄酮苷 $200.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、阿魏酸 $200.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 按照脑络欣通方药材比例称取药材 40 g (黄芪:川芎:三七:天麻:当归:红花:蜈蚣 = 15:5:3:5:5:5:2), 精密称定, 将除蜈蚣以外的其余药材全部置于圆底烧瓶中, 精密加入 8 倍量超纯水浸泡 30 min, 回流提取 1 h, 趁热用纱布过滤, 得到药渣与煎出液, 重复一次, 合并提取液; 将蜈蚣研磨成粉状物加入提取液中, 将混匀的提取液低速离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清液经布氏漏斗抽滤得滤液, 弃去滤渣, 再用旋转蒸发器浓缩至 1 mL 含生药 0.5 g; 精密量取 4 mL 浓缩液加入 6 mL 无水乙醇, 静置沉淀 24 h, 取上清液 1 mL 用 5% 的乙腈稀释 2 倍, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜, 即得供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按处方配比, 分别称取除红花以外、除黄芪以外以及除川芎、当归以外的其他药材, 按制备工艺制成复方水提液, 再按“2.1.2”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Unitary C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 230 nm; 流动相: 乙腈 (A) -0.05% 的磷酸水 (B); 梯度洗脱程序: 0 ~ 18 min, 5% ~ 17%A; 18 ~ 28 min, 17% ~ 20%A; 28 ~ 40 min, 20% ~ 25%A; 40 ~ 45 min, 25% ~ 90%A; 45 ~ 55 min, 90%A; 55 ~ 60 min, 90% ~ 5%A。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性及系统适应性考察 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液 20 μL , 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 结果表明, 羟基

红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷及阿魏酸均能与其他组分达到基线分离, 各吸收峰的理论塔板数均不低于 5000, 且阴性样品溶液无干扰 (见图 1)。

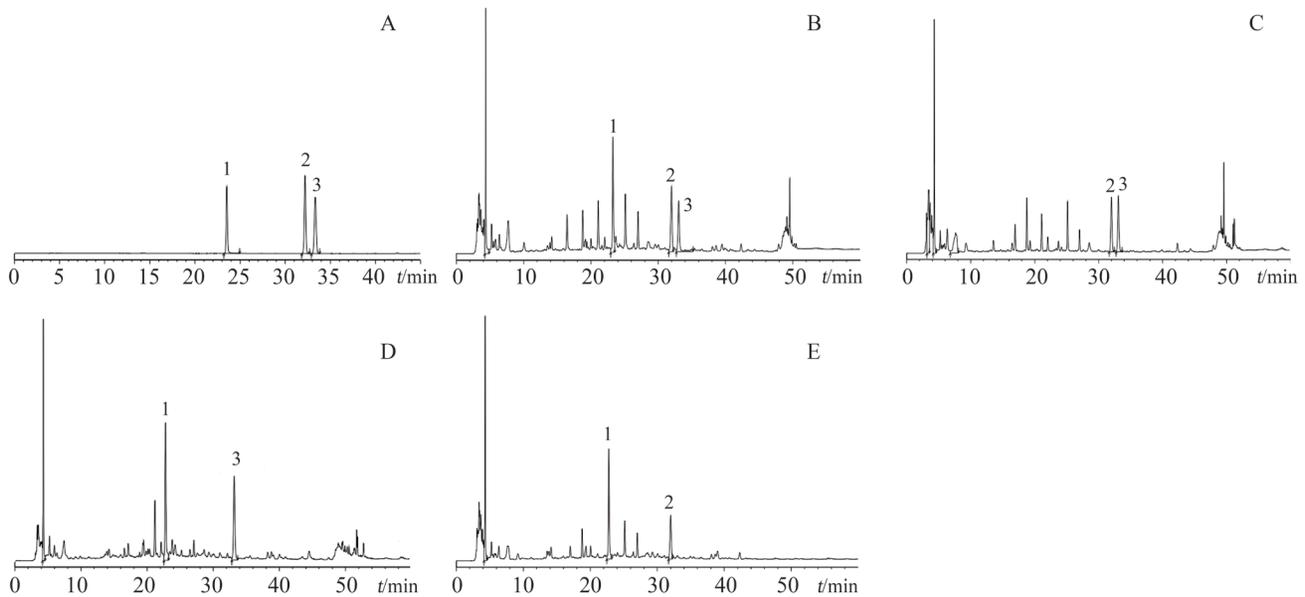


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B)、缺红花阴性样品 (C)、缺黄芪阴性样品 (D) 及缺川芎、当归阴性样品 (E) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC of mixed reference substance (A), sample (B), negative sample without Carthami Flos (C), negative sample without Astragal Radix (D), and negative sample without ChuanXiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix (E)

1. 羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A); 2. 毛蕊异黄酮苷 (calycosin-7-glucoside); 3. 阿魏酸 (ferulic acid)

2.3.2 线性关系考察 以“2.1.1”项下混合对照品溶液作为母液, 进行倍比稀释, 制成一系列质量浓度的混合对照品溶液。按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 测定峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 相应的峰面积积分为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程。羟基红花黄色素 A: $Y = 1.28 \times 10^4 X + 1.84 \times 10^5$, $r = 0.9998$; 毛蕊异黄酮苷: $Y = 3.84 \times 10^4 X - 1.10 \times 10^5$, $r = 0.9999$; 阿魏酸 $Y = 3.79 \times 10^4 X - 2.59 \times 10^5$, $r = 0.9999$; 羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸在 46.648 ~ 466.480 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、19.600 ~ 196.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、19.600 ~ 196.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.3 精密度考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 计算羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积 RSD 分别为 0.67%、0.08%、0.06%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 6 份, 分别放置 0、2、4、6、8、12 h 进样。计算羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积 RSD 分别为 1.2%、1.4%、2.0%, 结果表明

供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 选取同一批药材, 按脑络欣通方药材比例称取药材 40 g, 精密称取 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 记录羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸的色谱峰面积, RSD 值分别为 1.5%、1.8%、1.9%, 表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 取已测定的同一批药材, 按脑络欣通方中药材的比例精密称取药材 40 g, 共 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备提取液, 分别精密加入一定量的混合对照品溶液, 制得供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样测定, 羟基红花黄色素 A 平均回收率为 99.4%, RSD 为 1.3%; 毛蕊异黄酮苷的平均回收率为 100.1%, RSD 为 1.5%; 阿魏酸的平均回收率为 100.3%, RSD 为 1.3%, 说明该方法回收率良好。

2.4 出膏率测定

精密量取供试品溶液 40 mL, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于真空干燥箱中烘干至恒重, 取出, 移置干燥器中, 冷却, 迅速称重, 计算出膏率。

2.5 单因素试验

按照脑络欣通方药材比例称取药材 40 g, 加入 10 倍量的超纯水, 考察不同浸泡时间 (20、30、40、50、60 min), 提取时间 (30、60、90、120 min), 提取次数 (1、2、3、4 次), 对脑络欣通方中羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸的含量及浸膏得率的影响。结果表明: 各项指标的高低受浸泡时间、提取时间及提取次数影响显著, 直观分析确定浸泡时间最优值在 40 ~ 60 min 内, 最优提取时间在 60 ~ 120 min 内, 最优提取次数在 2 ~ 4 次内, 故选三因素三水平进行

响应面优化设计。

2.6 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺

2.6.1 Box-Behnken 响应面法试验设计及试验结果

选择水为提取溶剂, 以提取时间 (x_1)、提取次数 (x_2)、浸泡时间 (x_3) 为考察因素, 羟基红花黄色素 A 含量 (y_1)、毛蕊异黄酮苷含量 (y_2)、阿魏酸含量 (y_3) 及出膏率 (y_4) 为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。试验设计及结果见表 1。

表 1 响应面试验设计方案及结果

Tab 1 Response surface test design

组别	提取时间 /min	提取次数 /次	浸泡时间 /min	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			出膏率 /%	综合评分
				羟基红花黄色素 A	毛蕊异黄酮苷	阿魏酸		
1	120	2	50	1278.63	289.70	282.42	34.74	0.37
2	90	3	50	1235.95	239.68	295.85	32.63	0.27
3	90	2	40	942.73	229.44	256.04	40.53	0.20
4	90	3	50	1117.65	324.61	319.70	33.16	0.42
5	120	4	50	1423.81	353.21	320.73	29.47	0.51
6	60	4	50	1018.13	243.73	368.14	32.11	0.36
7	90	3	50	1094.57	328.75	256.87	32.63	0.28
8	60	2	50	1354.56	279.11	406.23	37.37	0.69
9	120	3	60	1066.86	298.56	250.39	32.11	0.20
10	90	4	40	1147.20	341.12	300.94	33.68	0.43
11	90	4	60	1017.76	221.62	346.45	30.53	0.25
12	60	3	40	1287.22	244.08	269.17	32.63	0.24
13	60	3	60	1616.09	339.47	340.71	36.32	0.70
14	90	3	50	1209.12	268.11	325.55	33.16	0.38
15	120	3	40	1154.71	376.67	268.78	34.21	0.42
16	90	3	50	1138.00	344.51	251.18	32.63	0.30
17	90	2	60	1524.12	303.01	419.34	35.26	0.78

2.6.2 信息熵法对数据的分析^[8] 信息熵是系统不确定性和无序程度的度量, 除了度量数据包含的信息量, 还可在多指标评价系统中用于确定各指标权重。该法是将每个评价指标作为一个随机变量, 计算该指标的熵权系数, 其取值变异程度越大, 越无序, 提供的信息量越多, 该指标就越重要; 反之该指标就越不重要。用熵权法确定权重的计算步骤如下:

① 指标归一化处理: 设 m 个评价指标 n 个评价对象的原始数据矩阵为 $X = (a_{ij})_{mn}$, 对其归一化后得到 $X' = (x_{ij})_{mn}$, 对正向指标而言, 按照以下公式进行归一化。

$X'_{ij} = (a_{ij} - \min_j \{a_{ij}\}) / (\max_j \{a_{ij}\} - \min_j \{a_{ij}\})$, X'_{ij} 表示第 i 次试验时第 j 个评价指标的取值, $i = 1, 2, 3, \dots, m; j = 1, 2, 3, \dots, n$ 。

② 将原始数据阵 $(a_{ij})_{mn}$ 转换为概率矩阵

$(P_{ij})_{mn}$; 在信息熵公式中 P_i 为某个信息的概率, 满足 $0 \leq P_i \leq 1$, 因此必须先对矩阵 $(a_{ij})_{mn}$ 进行归一化处理, 经处理后的矩阵可视为评价指标的概率矩阵。其中 P_{ij} 表示第 j 次试验在第 i 个评价指标下的概率。

$$P_{ij} = x_{ij} / \sum_{j=1}^n x_{ij}$$

③ 计算指标的熵值, 确定第 i 个评价指标的信息熵 (H_i)。

$$H_i = -k \sum_{j=1}^n p_{ij} \ln p_{ij}, k = 1/\ln n$$

④ 计算指标的熵权系数 (W_j)。

$$W_j = 1 - H_i / \sum_{i=1}^m (1 - H_i), \sum_{j=1}^m W_j = 1, 0 \leq W_j \leq 1$$

1, 通过计算, 结果见表 2。

运用 Design-Expert 10 软件对表 2 中的数据进行一次多元回归拟合分析, 得到提取时间 (x_1)、提取次数 (x_2)、浸泡时间 (x_3) 与综合评分 (Y) 之间的二次多元回归模型方程:

$$Y = 0.33 - 0.061x_1 - 0.061x_2 + 0.08x_3 + 0.12x_1x_2 - 0.17x_1x_3 - 0.19x_2x_3 + 0.064x_1^2 + 0.089x_2^2 - 3.750 \times 10^{-3}x_3^2$$

表 2 各指标熵值及权重系数

Tab 2 Entropy value and weight coefficient of each index

指标	H_i	W_j
羟基红花黄色素 A 含量	0.9196	0.2167
毛蕊异黄酮苷含量	0.9133	0.2336
阿魏酸含量	0.8613	0.3739
浸膏得率	0.9348	0.1758

对综合评分值模型进行方差分析, 结果方程决定系数 $r^2 = 0.9502$, 表明该回归模型的拟合情况良好。由二次回归模型方差分析结果 (见表 3) 可知, 该模型具有高度显著性, 可信度高, 失拟项不显著, 说明该模型拟合度较好, 可以对不同条件下的目标指标进行预测。

表 3 方差分析结果

Tab 3 Variance analysis

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.479	9	0.053	14.84	0.0009
x_1	0.030	1	0.030	8.36	0.0233
x_2	0.030	1	0.030	8.36	0.0233
x_3	0.051	1	0.051	14.26	0.0069
x_1x_2	0.055	1	0.055	15.39	0.0057
x_1x_3	0.116	1	0.120	32.21	0.0008
x_2x_3	0.144	1	0.140	40.23	0.0004
x_1^2	0.017	1	0.017	4.77	0.0653
x_2^2	0.033	1	0.033	9.24	0.0189
x_3^2	5.921×10^{-5}	1	5.921×10^{-5}	0.016	0.9014
残差	0.025	7	3.589×10^{-3}		
失拟项	7.525×10^{-3}	3	2.508×10^{-3}	0.570	0.6639
纯误差	0.018	4	4.400×10^{-3}		
总误差	0.505	16			

2.6.3 响应面优化提取工艺 根据拟合的二次回归模型, 采用 Design-Expert 10 软件绘制综合评分值随因素变化的三维曲面图和等高线图, 如图 2 所示。图 2A 显示浸泡时间为 50 min 的条件下, 提取时间和提取次数对综合评分值的影响, 提取时间的最优区域是 60 ~ 120 min, 提取次数的最优区域是 2 ~ 4 次。图 2B 显示提取时间为 90 min 的条件下, 浸泡时间和提取次数对综合评分的影响, 浸泡时间的最优区域是 40 ~ 60 min, 提取次

数的最优区域是 2 ~ 4 次。图 2C 显示提取次数为 3 次的条件下, 浸泡时间和提取时间对综合评分值的影响, 浸泡时间的最优区域是 30 ~ 50 min, 提取时间的最优区域是 60 ~ 120 min。

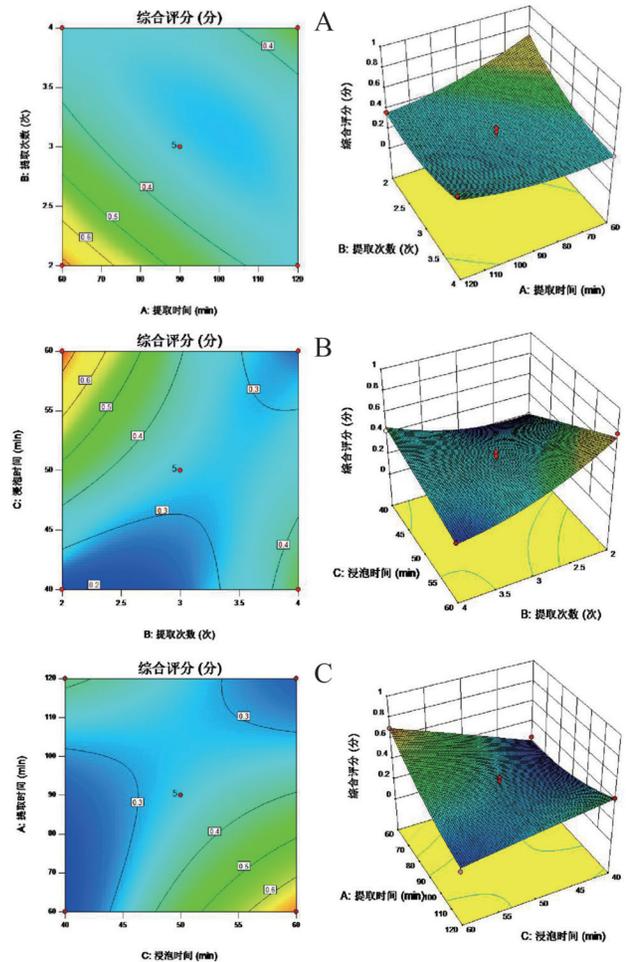


图 2 不同因素对综合评分值影响的等高线图与响应面图

Fig 2 Contour map and response surface map of influence of different factors on the comprehensive scores

2.6.4 验证试验 结合二次回归方程, 求解得到最佳工艺条件为提取 74.53 min, 浸泡 59.94 min, 提取 2.20 次 (综合评分预测值 0.850)。考虑到实际工艺生产, 求得的最佳工艺条件均取整数, 即提取 74 min, 浸泡 60 min, 提取 2 次。在该工艺下平行试验 3 次, 测定指标成分含量和出膏率。实测综合评分值分别是 0.824、0.870、0.815, 与预测值之间的 RSD 均小于 3%, 证明该工艺稳定可靠。

3 讨论

以往的复方提取工艺研究, 较多是对料液比、提取时间及提取次数进行考察。在预试验中选择 8 倍、10 倍、12 倍的料液比在其他因素相同的条件下分别提取。结果显示, 3 组所得样品的指标成分含量及出膏率并没有体现出显著差异。考虑

到脑络欣通方中有效成分大多为亲水性成分,如羟基红花黄色素 A,相较于料液比,浸泡时间产生的影响往往更大。因此,本试验选择浸泡时间、提取时间及提取次数作为考察因素。

在考察指标的选择中,考虑到毛蕊异黄酮苷是黄芪改善缺血性脑卒中的重要活性成分^[9-10],具有促进血管新生,增加缺血再灌注大鼠脑细胞中膜的流动性等作用。阿魏酸为当归和川芎的指标成分^[11],具有抗血小板聚集、解除血管平滑肌痉挛、抗氧化和清除氧自由基、提高膜稳定性等药理作用^[12]。羟基红花黄色素 A 是红花中的主要活性成分,具有活血、化瘀、通脉的功效,能够有效治疗缺血性脑卒中^[13]。此外,在高效液相色谱图中也能直观发现羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷及阿魏酸具有相对较高的峰面积,色谱峰易于辨识。浸膏作为中药药效的物质基础,出膏率的变化往往影响有效成分的含量变化,从而影响中药复方的药效。综上,本试验选取羟基红花黄色素 A、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸 3 个活性成分含量以及出膏率作为考察指标。

除考察指标的选择外,各项指标的权重系数同样影响着试验结果的可靠性。依据个人经验主观赋权往往会导致试验结果出现偏差,缺乏科学性与合理性。本试验基于熵权法计算各项指标的综合权重,结果更具有稳定性和可靠性,能够为脑络欣通方提取工艺研究提供参考。

参考文献

- [1] 王丽娜,曹健,朱国旗,等.脑络欣通降低局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮质 TLR4 及 TRAF6 和 TNF- α 蛋白的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2018,34(8):702-707.
- [2] 何玲,石晓倩,徐伟,等.脑络欣通对神经干细胞增殖分化及 β -tubulin III/GFAP 的影响[J].南方医科大学学报,2019,39(8):964-971.
- [3] 何浩,孙林娟,杨文明,等.脑络欣通对血管性痴呆大鼠学习记忆功能及海马神经元内钙离子浓度的影响[J].中成药,2018,40(5):1031-1035.
- [4] 杨文明,李祥,王键,等.脑络欣通治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的临床研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2013,12(12):1424-1426.
- [5] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版),2005,14(3):236-240.
- [6] 王智群,于亚田,冯建安,等.G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化黄虎胶囊的醇提工艺[J].时珍国医国药,2020,31(5):1110-1113.
- [7] He L, Shi XQ, Seto SW, et al. Using 3D-UPLC-DAD and a new method-verification by adding mixture standard compounds to determine the fingerprint and eight active components of Naoluoxintong decoction [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 169: 60-69.
- [8] 曾海蓉,李婷娜,冉倩,等.基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J].中草药,2020,51(1):84-90.
- [9] 马历历,李浩,孙立明,等.黄芪总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激、炎症、凋亡的影响[J].中成药,2019,41(8):1811-1815.
- [10] 张瑜,张富赓,张博凯,等.芪苈强心胶囊中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素在大鼠体内药动学研究[J].中草药,2019,50(16):3891-3896.
- [11] 中国药典 2015 年版.一部[S].2015:40,133.
- [12] 林志坚,董姣璇,程欣,等.阿魏酸钠对局灶性脑缺血大鼠神经功能及脑梗死面积的影响[J].医学研究杂志,2019,48(4):75-77.
- [13] 马嘉翼,褚松龄.羟基红花黄色素 A 改善缺血性脑卒中机制的研究进展[J].中国现代应用药学,2019,36(8):1012-1017.

(收稿日期:2021-01-10;修回日期:2021-03-05)

肉苁蓉复方颗粒对大鼠骨质疏松症的治疗作用

徐双华^{1,2}, 吴清^{1*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.北京中京丰创科技有限公司, 北京 100070)

摘要: **目的** 研究肉苁蓉复方颗粒对大鼠骨质疏松症的治疗作用, 为治疗骨质疏松提供药效依据。**方法** 将肉苁蓉、菊粉与硫酸软骨素组成复方制剂, 作用于去卵巢所致骨质疏松大鼠。**结果** 通过肉苁蓉复方颗粒进行治疗后, 可使大鼠体重增长缓慢, 显著提高股骨干质量、骨密度, 降低血清中碱性磷酸酶、骨钙素、组织蛋白酶 K 和脱氧吡啶啉含量, 抑制白细胞介素 -6 和肿瘤坏死因子 - α 的表达, 促进骨形态发生蛋白 -2 的表达。**结论** 肉苁蓉复方颗粒可以显著改善去卵巢大鼠骨质疏松的状态, 抑制骨量的继续丢失。

关键词: 肉苁蓉; 骨质疏松; 骨量; 白细胞介素 -6; 骨形态发生蛋白 -2

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1854-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.015

Therapeutic effect of cistanche compound granules on osteoporosis in rats

XU Shuang-hua^{1,2}, WU Qing^{1*} (1.School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Beijing Zhongjing Fengchuang Technology Co., Ltd, Beijing 100070)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of cistanche compound granules on osteoporosis in rats, and provide reference for the treatment of osteoporosis. **Methods** The compound of cistanche, inulin and chondroitin sulfate, was the preparation to act on rats with osteoporosis caused by ovariectomized. **Results** After the treatment with cistanche compound granules, the weight of rats increased slowly, while the bone density of rats increased significantly. The levels of alkaline phosphatase, bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein, cathepsin K and deoxypyridinoline decreased on rats, and the cistanche compound granules inhibited the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , and promoted the bone morphogenetic proteins-2 expression. **Conclusion** Cistanche compound granules significantly improve osteoporosis in ovariectomized rats and inhibit the continual loss of bone mass.

Key words: cistanche; osteoporosis; bone mass; IL-6; BMP-2

骨质疏松症是一种内分泌、营养、免疫、遗传多种复合因素引起的代谢性疾病, 大部分患者属于原发性骨质疏松, 主要是因年龄增加所致, 在老年人、绝经后妇女和恶性肿瘤患者中发生率较高。因此, 研究防治骨质疏松的药物极为重要。

研究表明, 肉苁蓉能提高性激素水平^[1-2]、促进骨形成^[3-5]、抑制骨吸收^[6]; 菊粉可以增加钙结合蛋白的表达与磷的生物利用度、提高钙吸收与全身骨骼矿物质参数^[7-8]; 硫酸软骨素能促进成骨细胞增生和新骨形成^[9]。本研究将肉苁蓉、菊粉与硫酸软骨素组成复方制剂, 研究以去卵巢所致骨质疏松大鼠为对象, 观察由上述复方制剂增加

动物骨密度及相关蛋白表达的效果, 为治疗和预防骨质疏松的作用提供依据。

1 材料

肉苁蓉(经北京中医药大学鉴定为肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C.Ma), 菊粉(比利时 BENEORAFIT), 硫酸软骨素钠片(四川省尚善堂制药有限公司), 注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司), 戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司广州分公司), 骨钙素(BGP)试剂盒(上海联硕生物科技有限公司), 碱性磷酸酶(ALP)ELISA试剂盒(上海联硕生物科技有限公司), BMP-2抗体(北京四正柏生物科技有限公司,

作者简介: 徐双华, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂研究, E-mail: 851025714@qq.com *通信作者: 吴清, 女, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: qwu@vip.sina.com

4AK201716F), 组织蛋白酶 K (CK) 试剂盒 (上海远慕生物科技有限公司), 脱氧吡啶啉 (DPD) ELISA 检测试剂盒 (上海研域仪器设备有限公司), 白细胞介素 -6 (IL-6) 检测试剂盒、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), 戊巴比妥钠 (德国默克公司, 批号: 20160411), 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) (上海颖心实验室, 批号: TX20149)。NORLAND-Stratec 周围型双能 X 线骨密度仪 (北京迈尔思瀛海威医疗技术有限公司); 离心机 (北京京立离心机有限公司); 电子天平 (梅特勒 - 托利多仪器有限公司)。

Wistar 大鼠 [北京维通利华动物技术有限公司提供, SPF 级健康雌性大鼠, 实验单位使用许可证号: SYXK (京) 2010-0025], 体质量 (300 \pm 20) g。所有动物均放置于恒温、清洁的环境中。温度 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (65 \pm 5) $^{\circ}$ C, 光照 12 h, 黑暗 12 h, 动物自由摄食、摄水。

2 方法

2.1 肉苁蓉复方颗粒的制备

肉苁蓉 200 g, 粉碎, 按照料液比 1 : 20 加入提取液 (70% 乙醇), 在 50 $^{\circ}$ C 条件下, 提取时间为 50 min, 重复提取两次, 提取液回收溶剂并浓缩, 烘干得到肉苁蓉浸膏, 与 300 g 菊粉、硫酸软骨素 25 g 混合均匀后, 通过传统的湿法制粒制成颗粒。

2.1 大鼠骨质疏松模型的建立

将大鼠按体质量随机分为 6 个组, 每组 10 只, 分别为假手术组 (0.5%CMC-Na, 10 mL \cdot kg $^{-1}$), 去卵巢模型组 (0.5%CMC-Na, 10 mL \cdot kg $^{-1}$), 戊酸雌二醇阳性对照组 (1 mg \cdot kg $^{-1}$), 肉苁蓉复方颗粒高、中、低剂量组 1100、550、275 mg \cdot kg $^{-1}$ (给药剂量分别为处方剂量的 2 倍、1 倍、0.5 倍)。

手术前称重, 按照 30 mg \cdot kg $^{-1}$ 剂量, 经腹腔注射戊巴比妥钠溶液实施麻醉, 待大鼠麻醉起效后, 腹位固定后于腹中线距阴道口 3 ~ 4 cm 除去毛, 分别用碘酒和酒精消毒, 待稍干后切开皮肤和腹肌约 2 ~ 3 cm, 切口视野可见白色脂肪, 拨开脂肪层找到子宫后, 轻轻将一侧子宫角拉出, 在其末端可见被脂肪团包裹的卵巢, 然后将卵巢下端输卵管用丝线结扎, 切除双侧卵巢, 顺势将子宫角送回腹腔中, 同法剪除另侧卵巢。其中假手术组仅仅切除卵巢附近的部分脂肪组织, 不结扎输卵管、不切除卵巢, 缝合切口, 再次消毒, 术后腹腔注射青霉素钠, 1 次 \cdot d $^{-1}$, 连续 3 d, 防止术后感染。术后大鼠的活动正常。术后观察

7 d, 然后开始每日下午灌胃给予对应药物, 每周称重一次, 12 周后大鼠灌胃结束。

2.2 检测指标

2.2.1 体质量 每周测定大鼠体质量一次, 据此调整灌胃量。

2.2.2 股骨干质量测定 大鼠喂养 12 周后处死, 剥离出左、右股骨。取左侧股骨于 105 $^{\circ}$ C 烤箱中烤至恒重, 称定股骨干质量。

2.2.3 骨密度测定 用美国 NORLAND-Stratec 周围型双能 X 线骨密度仪 (PDEXA) 测定右侧股骨重点及股骨远心端的 BMD 值 (g \cdot cm $^{-2}$)。

2.2.4 大鼠血清中 ALP、BGP、CK、DPD、IL-6 和 TNF- α 的测定 给药 12 周后, 麻醉大鼠, 腹部下部开口, 暴露腹主动脉, 使用一次性采血针与配套的采血管, 与腹主动脉下部 Y 字岔口处进针取血, 每只大鼠约取 5 mL 全血。室温静置 4 h, 使血液完全凝固, 3500 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 取血清。按照试剂盒说明, 测定血清中 ALP、BGP、CK、DPD、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.2.5 BMP-2 表达的测定 留取完整的右股骨段, 并迅速投入液氮中, 后转移至 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于提取蛋白; 用裂解液超声提取总蛋白后, Western blot 法测定 BMP-2 表达。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料采用方差分析方法, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠体质量及骨参数变化

如表 1 所示, 相比较于模型组, 肉苁蓉复方颗粒高剂量组、中剂量组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) 大鼠体质量增加量显著降低, 表明肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组对雌激素缺失导致骨髓间质细胞转化为脂肪细胞, 具有良好的抑制作用, 其中肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组股骨干质量、BMD 显著高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组具有提高大鼠 BMD 及股骨干质量的作用。

3.2 大鼠血清指标变化

3.2.1 血清中 ALP、BGP 水平 如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠由于雌激素的缺失会代偿性增加 ALP 和 BGP 的分泌, 其在血清中含量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组大鼠血清 ALP 和 BGP 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明高、中

表 1 肉苁蓉复方颗粒对骨参数的影响

Tab 1 Effect of cistanche compound granules on the bone parameters

组别	体质量增加量 /g	股骨干质量 /g	BMD/(g·cm ⁻²)
假手术组	19.40±2.24	0.64±0.02	7.36±0.11
模型组	84.34±4.71 ^{###}	0.51±0.01 [#]	3.37±0.19 ^{###}
阳性对照组	25.16±1.87 [*]	0.62±0.02 ^{**}	7.24±0.09 [*]
高剂量组	71.11±2.85 ^{**}	0.62±0.01 ^{**}	5.63±0.15 ^{**}
中剂量组	68.76±5.97 [*]	0.60±0.01 [*]	5.32±0.20 ^{**}
低剂量组	81.73±2.95	0.52±0.01	3.50±0.09

注：与假手术组比较，[#]*P* < 0.05；^{###}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the sham operated group, [#]*P* < 0.05, ^{###}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

剂量肉苁蓉给药组能够有效地逆转 ALP 和 BGP 升高的趋势，起到治疗骨质疏松的作用。阳性对照组大鼠的 ALP (*P* < 0.05) 和 BGP 显著降低 (*P* < 0.01)。

表 2 肉苁蓉复方颗粒对血清 ALP、BGP 的影响

Tab 2 Effect of cistanche compound granules on serum ALP and BGP

组别	ALP/(U·L ⁻¹)	BGP/(U·L ⁻¹)
假手术组	2.837±0.051	21.689±0.627
模型组	3.523±0.032 ^{###}	36.127±2.621 ^{###}
阳性对照组	3.278±0.041 [*]	23.765±3.131 ^{**}
高剂量组	3.361±0.022 ^{**}	29.627±5.021 [*]
中剂量组	3.296±0.013 ^{**}	30.516±3.522 [*]
低剂量组	3.510±0.029	34.627±2.953

注：与假手术组比较，^{###}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the sham operated group, ^{###}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

3.2.2 血清中 CK 和 DPD 含量变化 如图 1 所示，与模型组比较，阳性对照组、肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组的 CK 和 DPD 酶活力水平显著性降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)，肉苁蓉复方颗粒通过抑制 CK 和 DPD 酶的活力，从而抑制骨吸收。

3.2.3 血清中 IL-6 和 TNF-α 含量变化 如图 2 所示，与模型组比较，肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组的 IL-6、TNF-α 水平减少 (*P* < 0.01)，抑制水平接近阳性对照组，表明肉苁蓉复方颗粒通过调节 IL-6、TNF-α 的表达，降低破骨细胞增殖，抑制骨吸收。

3.3 大鼠 BMP-2 蛋白表达

如图 3 所示，骨组织中可检测到 BMP-2 蛋白表达，模型组的蛋白条明显低于假手术组，说明去势大鼠的 BMP-2 表达减少，肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组 BMP-2 蛋白表达高于模型组，接近

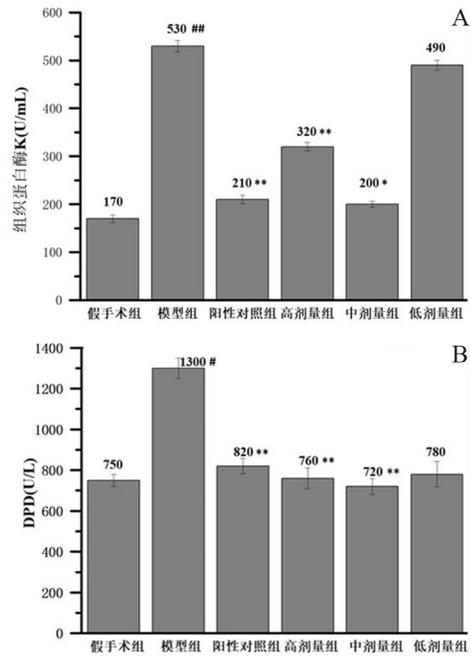


图 1 肉苁蓉复方颗粒对组织蛋白酶 (A) 和 DPD (B) 的影响

Fig 1 Effect of cistanche compound granules on serum CK (A) and DPD (B)

注：与假手术组比较，[#]*P* < 0.05；^{##}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the sham operated group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

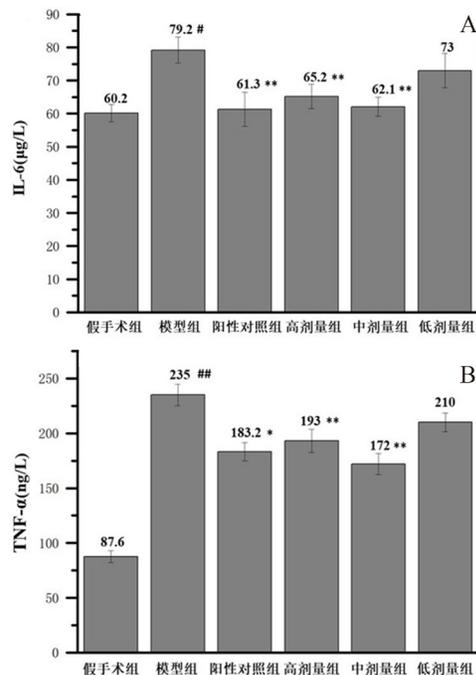


图 2 肉苁蓉复方颗粒对 IL-6 (A) 及 TNF-α (B) 的影响

Fig 2 Effect of cistanche compound granules on serum IL-6 (A) and TNF-α (B)

注：与假手术组比较，[#]*P* < 0.05；^{##}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the sham operated group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

阳性对照组,说明肉苁蓉复方颗粒可增强 BMP-2 蛋白表达,其中中剂量组的效果最好。

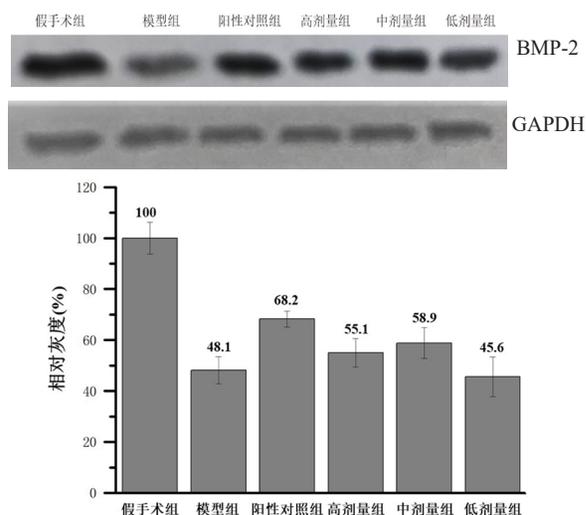


图3 各组大鼠骨组织中 BMP-2 蛋白表达图

Fig 3 Expression of BMP-2 protein in the bone tissues of rats in different groups

4 讨论

去势大鼠骨质疏松模型是研究动物骨质疏松采用的一种模型,去卵巢大鼠是研究绝经后妇女骨质疏松的一个常用动物模型,具有手术简单,重复性、稳定性好等优点^[10]。因此,采用此模型能比较客观地评价肉苁蓉复方颗粒对骨质疏松症的治疗作用。

在肉苁蓉复方颗粒对骨参数的影响实验中,模型组大鼠骨密度明显下降,破骨细胞和成骨细胞无法保持平衡,骨量快速丢失。通过肉苁蓉复方颗粒进行治疗后,可显著提高骨密度、股骨干质量,改善去卵巢大鼠骨质疏松的状态,抑制骨量的继续丢失。

ALP 作为成骨细胞分泌物,其与血液中的钙离子相互作用,促进骨质的合成,可反映成骨细胞的活性^[1, 11],ALP 促进有机磷酸化合物分解为无机磷酸离子,使磷酸离子与钙离子结合沉淀于骨内,BGP 也是由成骨细胞分泌,是骨形成和骨重建的反映指标之一^[12-13],两者均可反映成骨细胞的活性^[14-15],ALP 和 BGP 水平越高,说明体内越缺钙^[16]。本研究中,通过手术去卵巢处理,构建骨质疏松大鼠模型,发现模型组大鼠 ALP 和 BGP 含量升高,而肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组可显著降低其含量,说明肉苁蓉复方颗粒高、中剂量可以有效调节骨代谢平衡,抑制骨吸收,治疗骨质疏松。

BMP2/Smad 信号通路可以调控成骨细胞的全部过程,其功能障碍会引起骨量降低和骨形成减少,导致骨质疏松症发生^[17]。BMP2 是经

典 BMPs/Smad 通路的重要配体^[18-20],BMP2 是 BMPs 家族中非常重要的一个亚型,其可以刺激间充质干细胞分化为成骨细胞,促进成骨细胞转化为骨细胞,是促进骨形成和诱导成骨细胞分化的重要的信号分子之一^[21-23]。本研究中,发现模型组大鼠的 BMP-2 蛋白表达明显降低,说明 BMP2/Smad 通路的信号传递减弱,影响成骨细胞分化,进而影响骨密度水平,肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组可以上调 BMP-2 蛋白水平,蛋白表达水平接近阳性对照组,进而调节 BMP2/Smad 通路的信号传递,促进成骨细胞分化,起到治疗骨质疏松的作用。

CK 是组织蛋白酶溶酶体蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶成员。它被认为可降解骨基质蛋白,骨桥蛋白和骨粘连蛋白^[24],血清中的 CK 是骨吸收的典型标志物^[25],其过度表达会增加松质骨转换,阻止 CK 表达可抑制骨吸收,有利于骨基质的稳定性^[26]。DPD 也是典型的骨吸收标志物^[27-28],当骨吸收作用增强,成熟的 I 型骨胶原分解,DPD 作为降解产物被释放到血液中,DPD 具有组织特异性,不受饮食影响,其只在骨吸收及骨溶解时才被释放入血。因此,血清 DPD 水平升高,说明骨吸收增强^[29],本研究发现,发现模型组大鼠的 CK 和 DPD 含量升高,说明骨吸收增强,肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组可以显著降低 CK 和 DPD 含量,接近阳性对照组,抑制骨吸收,从而有效对抗骨质疏松的发生。

细胞因子 IL-6、TNF- α 是调节骨吸收的关键因素^[30],IL-6 作为一种生物活性因子,可通过多种方式参与到成骨细胞和破骨细胞的功能调控,是促进破骨细胞增殖分化的重要因子^[31],IL-6 可以通过 SHP2/P13K/Akt2 和 SHP2/MEK/ERK 通路抑制成骨细胞分化,TNF- α 是促进骨吸收的细胞因子^[32],可作用于前体破骨细胞,使其分化为破骨细胞,促进破骨细胞生成,增强骨吸收。TNF- α 还可通过影响 OPG/RANKL/RANK 信号系统,以旁分泌的方式调节破骨细胞活化,刺激骨吸收^[16]。本研究发现,模型组大鼠的 IL-6、TNF- α 水平显著升高,说明模型组大鼠骨吸收增强,骨质遭到破坏,而肉苁蓉复方颗粒高、中剂量组可显著降低的 IL-6、TNF- α 水平,接近阳性对照组水平,说明肉苁蓉复方颗粒高、中剂量可以抑制大鼠体内 IL-6、TNF- α 的表达,通过影响 SHP2/MEK/ERK、SHP2/P13K/Akt2 和 OPG/RANKL/RANK 通路,降低破骨细胞增殖,抑制骨吸收,有效治疗骨质疏松。

近年来,许多研究证明补肾类中药在治疗老年性骨质疏松症的研究中取得了较满意的结果,本方针对中老年人全身性骨量减少,骨密度损失及骨组织的微观结构退化所致的骨脆性增加、骨密度降低、骨折危险性增加的特点,选用具有补肾壮阳、补精益髓功效的肉苁蓉,辅以具有促进钙和矿质吸收,降低骨代谢过程作用的菊粉及促进成骨细胞增生和新骨形成的硫酸软骨素,有效改善了去卵巢大鼠骨质疏松的状态,为治疗和预防骨质疏松的作用提供依据。

参考文献

- [1] 朱刚,孙海斌,徐刚.肉苁蓉醇提物对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2018,44(1):68-72.
- [2] 李媛,宋媛媛,张洪泉.肉苁蓉的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(1):7-11.
- [3] 张跃全,郑丹红,许建峰,等.荒漠肉苁蓉对快速老化骨质疏松小鼠 BMP-2 蛋白表达的影响[J].宁夏医学杂志,2014,36(12):1114-1116.
- [4] 赖青海,王琳琳,丁辉,等.肉苁蓉治疗骨质疏松症研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(3):102-104.
- [5] Li F, Yang Y, Zhu P, et al. Echinacoside promotes bone regeneration by increasing OPG/RANKL ratio in MC3T3-E1 cells[J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1443-1450.
- [6] Yang XL, Li F, Yang YN, et al. Efficacy and safety of echinacoside in a rat osteopenia model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 926-928.
- [7] 刘小杰,赵允,童纪峰.菊粉与骨健康的研究[J].中国食品添加剂,2008(21):151-153.
- [8] 林金莺,周勇强,赖子尼.菊粉的功能与应用[J].广州化工,1999,27(4):8-10.
- [9] Nishimoto S, Takagi M, Wakitani S, et al. Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on gene expression in a three-dimensional culture of chondrocytes[J]. J Biosci Bioeng, 2005, 100(1): 123-126.
- [10] 张雅蓉,唐舸,刘杉,等.5种常用大鼠骨质疏松动物模型的特点[J].国际口腔医学杂志,2013,40(5):629-633.
- [11] 陈宇,薛志远,师志强,等.红芪活性组分抗骨质疏松作用的谱效关系研究[J].中草药,2018,49(1):160-166.
- [12] 刘江,陆加寿,马凌川,等.定量CT与血清骨钙素水平联合诊断老年女性骨质疏松的临床价值分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(12):1520-1523.
- [13] 侯娜,孙晓娟.枸杞提取物对骨质疏松症大鼠的改善作用[J].现代食品科技,2019,35(11):37-44,108.
- [14] 李然,黄瀚,刘立萍,等.左归丸对去卵巢大鼠骨组织降钙素受体蛋白表达的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(12):2993-2995.
- [15] 孙英莲,王英军.壮骨胶囊含药血清对小鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶、骨钙素合成的影响[J].吉林中医药,2019,39(6):797-800.
- [16] 刘跃辉,张波,李伟,等.杜仲叶醇提取物对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标、骨密度、IL-6及TNF- α 的影响[J].中医学报,2018,33(3):445-448.
- [17] 林晓芳,方芳,彭志强,等.Wnt/ β -catenin与BMP-2/Smads信号通路及其相互作用对骨质疏松疾病的影响[J].浙江中医药大学学报,2019,43(7):711-717.
- [18] 柴爽,王吉利,黄佳纯,等.补肾健脾活血方对去卵巢大鼠 BMP2/Smad 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):129-133.
- [19] 郑红,唐薇,角建林,等.槲皮素通过促进成骨分化治疗去势骨质疏松症大鼠的分子机制[J].中药药理与临床,2017,33(5):16-20.
- [20] 招文华,沈耿杨,任辉,等.骨碎补活性单体成分调控骨质疏松症相关信号通路的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(1):122-129,140.
- [21] 龚伟,郑洪新,杨鹤祥,等.鹿茸不同组分对去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织的作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(20):36-42.
- [22] 李威,姚新苗,李晓亚,等.益骨汤对骨质疏松大鼠骨密度及 BMP-2 信号通路的影响[J].云南中医学院学报,2016,39(6):5-9.
- [23] 徐陆晨,李运峰.骨质疏松性骨折药物治疗的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(7):947-953.
- [24] 梁维萍.靶向组织蛋白酶 K 抑制小鼠前列腺癌骨转移和骨破坏的研究[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [25] 马如风,莫芳芳,牛建昭,等.姜黄素通过调节组织蛋白酶 K 改善高脂诱导 C57BL/6J 小鼠骨结构和骨质量的实验研究[J].中国药理学通报,2017,33(10):1446-1451.
- [26] 朱媛媛,郭海英,孙振双,等.温肾固疏方对去势大鼠骨组织中 I 型胶原及组织蛋白酶 K 表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(4):533-538,545.
- [27] 刘明,宣振华,张永萍,等.新仙灵葆胶对去卵巢骨质疏松大鼠的影响[J].中药新药与临床药理,2018,29(4):399-403.
- [28] 马晓龙,刘强,吴斗,等.骨转换标志物在骨质疏松诊治中的分析评价及临床应用前景[J].中华老年骨科与康复电子杂志,2018,4(1):52-56.
- [29] 唐三元,谭文成,杨辉,等.多种骨代谢生化指标联合预测老年骨质疏松性髋部骨折风险的意义[J].中国矫形外科杂志,2015,23(18):1653-1656.
- [30] 邱奕雁,朱峰,蓝涛,等.IL-6,IL-1 β 及TNF- α 与大鼠骨质疏松形成的关系[J].现代生物医学进展,2016,16(18):3448-3451.
- [31] 范名月,李彦.阿托伐他汀联合阿仑膦酸钠治疗老年性骨质疏松症的效果及对患者肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素6的影响[J].中国综合临床,2017,33(4):345-349.
- [32] 陈鹏,李杨,胡伟文,等.绝经后骨质疏松症 TNF- α 通过激活 NF- κ B 促进 RANKL 诱导的破骨细胞形成[J].基因组学与应用生物学,2019,38(2):960-965.

(收稿日期:2021-01-05;修回日期:2021-03-04)

UPLC-MS/MS 测定人血浆中诺氟沙星的含量及其应用

刘海蛟¹, 廖音娟¹, 唐智^{2*} (1. 长沙市第四医院, 长沙 410006; 2. 长沙都正生物科技有限责任公司, 长沙 410000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定人血浆样品中诺氟沙星浓度并研究其生物等效性。**方法** 血浆样品经过蛋白沉淀法处理, 采用诺氟沙星-d8 作为内标。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.2% 甲酸水-乙腈 (85:15), 流速 0.4 mL·min⁻¹。电喷雾离子源 (ESI), 正离子多反应监测模式进行检测。诺氟沙星与内标诺氟沙星-d8 的离子对分别为 m/z 320.11 → m/z 276.13 和 m/z 328.17 → m/z 284.20。对健康受试者口服相同剂量的诺氟沙星片 (100 mg) 受试制剂或参比制剂后的血药浓度进行定量分析。**结果** 血浆中内源性物质不干扰待测物的测定, 人血浆中诺氟沙星的定量范围分别为 10 ~ 800 ng·mL⁻¹ ($r^2 = 0.9995$), 提取回收率为 82.7% ~ 86.0%; 无明显基质效应, 批内、批间精密度和准确度均满足要求。**结论** 该方法准确可靠, 且样品前处理和进样过程简单、快速, 充分满足诺氟沙星人体生物等效性研究的定量分析需求。

关键词: 诺氟沙星; 生物等效性; 超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1859-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.016

UPLC-MS/MS determination of norfloxacin content in human plasma and its application

LIU Hai-jiao¹, LIAO Yin-juan¹, TANG Zhi^{2*} (1. *The Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006*; 2. *Changsha Duzheng Biotechnology Co., Ltd, Changsha 410000*)

Abstract: Objective To determine the concentration of norfloxacin in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method and its human bioequivalence. **Methods** Plasma samples were processed by protein precipitation method, and with norfloxacin-d8 as the internal standard. The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 0.2% formylic acid in water-acetonitrile with a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Electrospray ion source was detected by the positive ion multiple reaction monitoring mode. The ion pairs of norfloxacin and the internal standard norfloxacin-d8 were m/z 320.11 → m/z 276.13 and m/z 328.17 → m/z 284.20, respectively. The plasma concentration of norfloxacin tablets (100 mg) as the test or reference preparation in healthy volunteers after the oral administration with the same dose were analyzed quantitatively. **Results** The determination of the substances to be measured was not interfered by the endogenous substances in the plasma, and the quantitative range of norfloxacin in human plasma was 10 ~ 800 ng·mL⁻¹ with good linearity ($r^2 = 0.9995$). The recovery of norfloxacin was 82.7% ~ 86.0%, without obvious matrix effect. The intra- and inter-batch accuracy and precision all met requirement. **Conclusion** The method is accurate and reliable. The sample pretreatment and injection is simple and fast, meeting the quantitative analysis of human bioequivalence study of norfloxacin.

Key words: norfloxacin; bioequivalence; UPLC-MS/MS

基金项目: 复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室 (No.2017TP1037); 药物临床评价关键技术创新及应用示范 (No.2019SK2241); 长沙市科技计划项目 (No. kq1907011)。

作者简介: 刘海蛟, 女, 硕士, 主要从事体内药物分析及药理研究, E-mail: 442763510@qq.com * **通信作者:** 唐智, 男, 药师, 主要从事体内药物分析, E-mail: zhi.tang@duxact.com

诺氟沙星是一种广谱抗菌剂,已在多个国家使用,可有效治疗人类和动物的感染,用于治疗尿路感染、呼吸道感染、胃肠道感染、伤口感染等^[1-5]。目前,有研究报道了海水、生物体液、食物以及人血浆中诺氟沙星的测定方法^[4, 6-8],常用的技术有紫外或荧光检测的高效液相色谱法、毛细管电泳法、分光光度法、薄层色谱法、微生物法等^[9]。Maia等^[10]使用基于HLB柱的固相萃取(SPE)进行液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)定量污水中7种不同的氟喹诺酮类抗菌药物,Ziarrusta等^[11]使用液相色谱串联质谱法测定鱼组织、生物体液和环境水中的氟喹诺酮类药物。Helmy等^[12]用高效液相测定血浆中诺氟沙星的含量,Amjadi等^[13]使用硅掺杂碳点、铁(II)和K₂S₂O₈组成的化学发光系统测定人血浆中的诺氟沙星,有研究采用LC-MS/MS法并使用环丙沙星作为内标定量测定人血浆中诺氟沙星的浓度^[14],也有报道采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定血浆中诺氟沙星的浓度^[15],但所需分析时间普遍较长(4 min以上),未完善对方法学的考察,如未进行样品溶血基质效应、高血脂基质效应及全血稳定性的考察,这些因素均可影响到样本测试结果的准确性和可靠性。因此建立一种准确、可靠的检测人血浆样品中诺氟沙星浓度的分析方法至关重要。

本试验采用UPLC-MS/MS法,以同位素为内标测定人血浆样品中诺氟沙星的浓度,检测过程更加简单、快速,极大地缩减了分析时间和项目实施成本,可以更好地应用于诺氟沙星人体生物等效性研究。

1 材料

1.1 仪器

UPLC I-Class、Xevo TQD质谱仪,配有电喷雾离子源,UNIFI数据处理软件(美国Waters公司);MSA6.6S-CE电子天平(Sartorius公司);MilliQ Direct 8超纯水仪(Merck Millipore公司);ST16R离心机(Thermo Fisher Thermo公司);Pipetman NEO和Pipet-Lite XLS⁺移液器(Gilson和RAININ公司);XW-80A涡旋混合器(宁波新芝);Talboys数显多管式涡旋振荡器(Troemner公司);DTA-27超声波清洗器(鼎泰恒盛);GZX-9140MBE电热鼓风干燥箱(上海博迅);MLTS1368医用低温冰箱(Thermo公司)。

1.2 试药

诺氟沙星(中国食品药品检定研究院,批号:

13450-201206,纯度:99.5%);内标诺氟沙星-d8(批号:12-ZCA-49-4,纯度:97%,TRC)。甲醇、乙腈(色谱纯,Merck公司);甲酸(FA,色谱纯,ACS);水为试验室超纯水仪自制水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);流动相:0.2%甲酸水-乙腈=85:15(V/V);流速:0.4 mL·min⁻¹;运行时间:1.5 min;进样量:10 μL;柱温:40℃;自动进样器温度:20℃。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式,MRM监测,离子源温度为150℃,毛细管电压为0.5 kV,脱溶剂气流为1000 L·h⁻¹,温度为500℃,诺氟沙星与内标诺氟沙星-d8的离子对分别为m/z 320.11→m/z 276.13和m/z 328.17→m/z 284.20。其中诺氟沙星的锥孔电压为40 V,碰撞能为14 eV,驻留时间为0.08 s;诺氟沙星-d8锥孔电压为40 V,碰撞能为16 eV,驻留时间为0.08 s。

2.3 标准工作液及质控工作液的配制

精密称取诺氟沙星对照品和诺氟沙星-d8对照品适量(经折算),分别用50%甲醇水(含0.1%FA)溶解并定容至25 mL,摇匀,即得诺氟沙星储备液和诺氟沙星-d8储备液。取诺氟沙星储备液适量,用50%甲醇水(0.1%FA)稀释,得含诺氟沙星质量浓度分别为16 000、8000、4000、2000、1000、800、400、200 ng·mL⁻¹的系列浓度标准曲线工作液,12 800、6000、1600、600 ng·mL⁻¹的系列浓度质控工作液及质量浓度为200 ng·mL⁻¹的定量下限工作液。取内标诺氟沙星-d8对照品储备液,用50%甲醇水(含0.1%FA)稀释,得质量浓度为10 μg·mL⁻¹的内标溶液,取适量内标溶液用甲醇稀释(内标溶液:甲醇=3:1000),得诺氟沙星-d8质量浓度为30 ng·mL⁻¹的内标工作液,同时也是蛋白沉淀剂。

2.4 标准曲线样品及质控样品配制

精密吸取人空白血浆190 μL,加入系列质量浓度工作液(16 000、8000、4000、2000、1000、800、400、200 ng·mL⁻¹)或质控工作液(12 800、6000、1600、600 ng·mL⁻¹)10 μL,涡旋混匀,得到线性范围浓度为10~800 ng·mL⁻¹的标准曲线样品以及浓度为30(LQC)、80(MQC)、300(HMQC)、640(HQC) ng·mL⁻¹的质控样品。

2.5 生物样品处理方法

2.5.1 空白血浆样品 精密吸取血浆样品 200 μL , 加入甲醇 400 μL , 振荡 30 s, 离心 (18 400 $\times g$, 8 min), 取上清液 100 μL , 加稀释剂 (0.2%FA 水) 400 μL , 振荡 30 s 即得。

2.5.2 零浓度血浆样品 精密吸取空白血浆 200 μL , 加入 400 μL 内标工作液, 振荡 30 s, 其余操作同“2.5.1”项下。

2.5.3 标准血浆样品 精密吸取标准血浆样品 200

μL , 加入 400 μL 内标工作液, 振荡 30 s, 其余操作同“2.5.1”项下。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 取空白血浆样品、定量下限 (LLOQ) 浓度水平的样品、只含内标的样品以及只含待测物的定量上限 (ULOQ) 浓度水平的样品。考察内源性物质及内标是否存在干扰。空白血浆中的内源性物质不对待测物与内标产生干扰; 待测物与内标之间互相不产生干扰。结果见图 1。

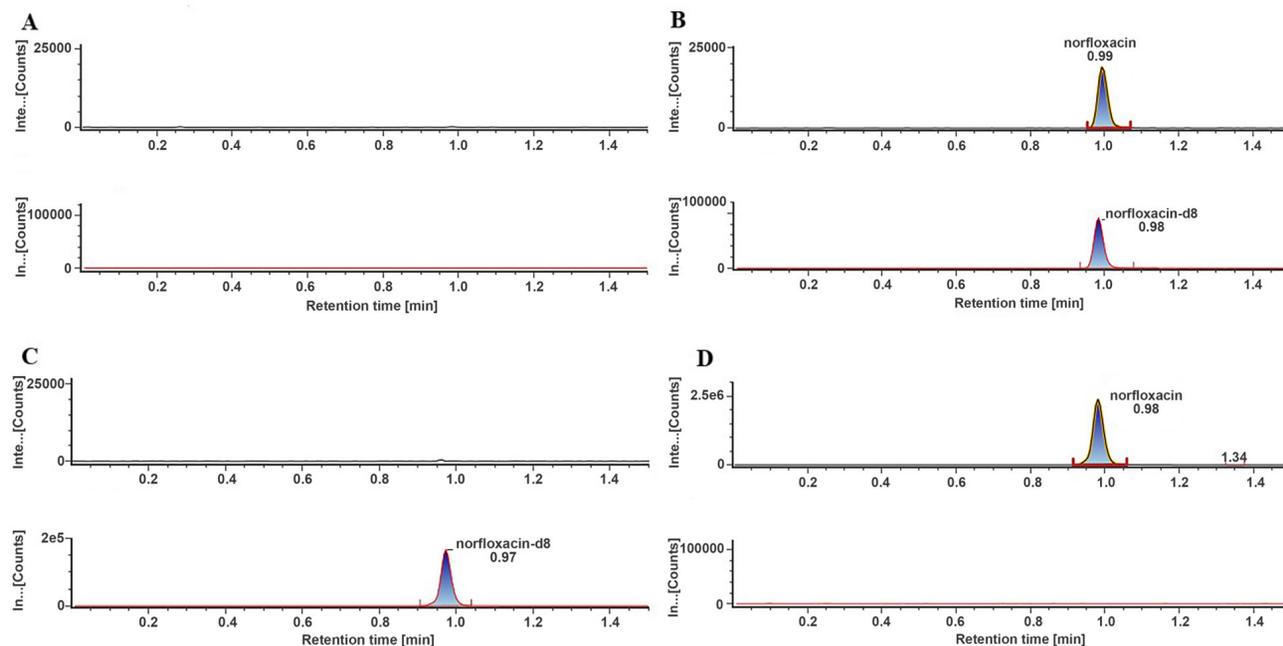


图 1 人血浆中诺氟沙星和诺氟沙星-d8 的典型色谱图

Fig 1 Typical chromatogram of norfloxacin and norfloxacin-d8 in human plasma

A. 空白血浆 (blank human plasma); B. 空白血浆+诺氟沙星 (定量下限: $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + 内标 ($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank human plasma spiked with norfloxacin (lower limit of quantitation: $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IS ($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); C. 空白血浆+内标 ($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank human plasma spiked with the IS ($30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); D. 空白血浆+诺氟沙星 (定量上限: $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank human plasma spiked with norfloxacin (upper limit of quantitation: $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)]

2.6.2 残留考察 按定量上限样品、空白样品、定量下限样品的顺序进样, 记录待测物与内标的色谱峰面积值, 考察残留情况。待测物进样残留小于 20% 且内标的进样残留小于 5%。表明以本方法测试高浓度诺氟沙星人血浆样品后, 在系统中的残留对于后续低浓度样品的测试无影响。

2.6.3 线性范围与定量下限考察 配制标准曲线血浆系列浓度样品, 按“2.5”项下方法处理, 进样分析, 记录待测物与内标的色谱峰峰面积值, 以诺氟沙星与内标的色谱峰峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 以系列标准血浆样品质量浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得到回归方程及相关系数。

结果诺氟沙星在 $10 \sim 800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与测定值线性关系良好, 定量下限为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 回归

方程为 $y = 0.0227x - 0.0037$, $r^2 = 0.9995$ 。

2.6.4 精密度与准确度 配制质量浓度为 10、30、80、300、640 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控标准血浆样品各 6 份, 按“2.5”项下方法处理后进样测定, 计算各样品浓度, 计算批内和批间的精密度, 结果见表 1。

2.6.5 提取回收率 取 6 份不同来源的空白血浆 190 μL , 每个来源平行 2 份, 加入甲醇 400 μL , 振荡 30 s, 离心 (18 400 $\times g$, 8 min), 得到 6 份基质上清液, 用 0.2%FA 水配制含诺氟沙星低、中、高质量浓度溶液 2.5、6.667、53.333 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、和内标 ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。振荡 30 s, 混匀, 进样 10 μL , 记录待测物诺氟沙星与内标诺氟沙星-d8 的色谱峰峰面积值。

表 1 人血浆样本中诺氟沙星的批内、批间精密度的 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 1 Intra- and inter-batch precision of norfloxacin in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

项目	样品浓度 / (ng · mL ⁻¹)	测得浓度 / (ng · mL ⁻¹)	RE/%	CV/%
批内	LLOQ (10.00)	10.66 ± 0.15	6.58	1.41
	LQC (30.00)	32.83 ± 1.05	9.43	3.20
	MQC (80.00)	84.17 ± 0.93	5.21	1.10
	HMQC (300.00)	308.46 ± 1.45	2.82	0.47
	HQC (640.00)	687.85 ± 16.47	7.48	2.39
批间	LLOQ (10.00)	10.98 ± 0.33	9.75	3.01
	LQC (30.00)	32.16 ± 1.08	7.20	3.36
	MQC (80.00)	83.75 ± 2.74	4.69	3.27
	HMQC (300.00)	299.76 ± 7.62	-0.08	2.54
	HQC (640.00)	684.32 ± 27.12	6.93	3.96

诺氟沙星质控样品低、中、高浓度的回收率分别为 82.7%, 86.0%、82.7%, 总体变异系数

(CV) 为 2.30%。内标平均回收率为 81.6%。

2.6.6 基质效应 取 6 份不同来源的空白血浆 190 μL, 加入 10 μL 50% 甲醇水 (0.1%FA) 溶液, 再加入甲醇 400 μL, 振荡 30 s, 离心 (18 400 × g, 8 min), 得 6 份不同来源空白基质上清液备用。按空白血浆方式同样处理可得溶血基质上清、高脂基质上清。

移取空白基质上清 100 μL, 加入诺氟沙星低、中、高浓度溶液 400 μL, 振荡 30 s, 混匀, 即得基质效应考察样本。按照空白血浆方式同样处理可得溶血血浆、高脂血浆基质效应考察样本。

取 67% 甲醇水溶液 100 μL, 加入诺氟沙星低、中、高浓度溶液 400 μL, 振荡 30 s, 混匀, 即得基质效应参比样本。

人空白血浆、溶血血浆、高脂血浆均无明显基质效应。结果见表 2。

表 2 人血浆中诺氟沙星基质效应 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 2 Matrix effect of norfloxacin in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

诺氟沙星浓度 / (ng · mL ⁻¹)	空白血浆		空白溶血血浆		高脂血浆	
	内标归一化基质因子	CV/%	内标归一化基质因子	CV/%	内标归一化基质因子	CV/%
30.00	1.07 ± 0.02	1.87	0.99 ± 0.05	5.05	1.00 ± 0.06	6.00
80.00	1.04 ± 0.03	2.88	0.97 ± 0.02	2.06	0.98 ± 0.03	3.06
640.00	1.11 ± 0.03	2.70	0.98 ± 0.03	3.06	1.01 ± 0.02	1.98

2.6.7 稳定性 对样品采集、样品储存及分析过程中所涉及到的稳定性条件进行考察, 结果见表 3。

表 3 诺氟沙星不同条件下的稳定性
Tab 3 Stability test of norfloxacin under different conditons

样品	诺氟沙星	诺氟沙星 -d8
储备液	室温, 26 h, 稳定	室温, 26 h, 稳定
	4 °C 下, 54 d, 稳定	4 °C, 59 d, 稳定
工作液	室温, 26 h, 稳定	室温, 26 h, 稳定
	4 °C 下, 10 d, 稳定	4 °C, 10 d, 稳定
血浆样品	室温, 24 h, 稳定	/
	- 20 °C, 19 d, 稳定	/
	- 70 °C, 61 d, 稳定	/
	- 70 °C, 4 次冻融, 稳定	/
全血样品	室温, 2 h, 稳定	/
处理液	进样条件下, 26 h, 稳定	/
	再进样条件下, 21 h, 稳定	/

2.6.8 稀释方法学验证 配制质量浓度为 1600 ng · mL⁻¹ 的诺氟沙星血浆样品, 用空白血浆稀释 10 倍, 平行处理 6 份, 考察血浆样品的稀释可靠性。结果平均准确度偏差为 - 4.95%, 精密度为 2.1%。

2.6.9 分析批容量考察 配制标准曲线样品及低、中、高浓度质控样品, 按照“2.5”项下血浆样品处理方法处理后进样分析, 分析批进样数量作为分析批容量考察结果。结果表明, 分析批中

可以连续进样至少 180 个未知样本。

2.7 测定方法在生物等效性 (BE) 研究中的应用
2.7.1 给药方案与血样采集 本研究经湖南省脑科医院医学伦理委员会的批准 (编号为 2017010)。在一项单中心、随机、开放、2 × 2 交叉设计的诺氟沙星 BE 研究, 入组 8 例受试者且所有受试者均完成两周期研究, 洗脱期为 7 d。受试者在早餐后单次口服受试制剂 100 mg (1 片) 或参比制剂 100 mg (1 片), 240 mL 常温水送服。在给药前 (0 h) 以及给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12、24 h 进行血样采集。血样采集后置于已编号的肝素钠抗凝负压管内, 轻柔颠倒混匀, 4 °C 离心 10 min (3500 r · min⁻¹) 后分离得血浆样品, - 80 °C 冰箱保存待测。

取受试者血浆样本按“2.5.3”项下方法处理后进行测定, 记录待测物质和内标的峰面积, 代入回归方程, 计算血药浓度。

2.7.2 数据分析 血药浓度数据采用 Phoenix WinNonlin 软件 (Pharsight Corporation) 进行非房室模型药代动力学参数的估算分析, 计算主要药代动力学参数, 以全面反映药物在人体内吸收、分布、代谢和排泄的特点。

2.7.3 健康受试者的药代动力学研究 8 名受试者单剂量口服诺氟沙星受试制剂及参比制剂后血浆中诺氟沙星平均药浓度-时间曲线见图 2；主要药代动力学参数见表 4。 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 指标均提示受试制剂与参比制剂生物等效。 C_{max} 指标结果提示尚不能拒绝生物不等效，因本试验设计密集采血点为 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 h，实际结果受试制剂 t_{max} 中位值为 2.25 h，Q1 ~ Q3 为 1.5 ~ 3 h；参比制剂 t_{max} 中位值为 3 h，Q1 ~ Q3 为 2 ~ 3.5 h，密集采血时间早于受试制剂和参比制剂 t_{max} 、 C_{max} 相关数据可能非真实值。本次为预试验，样本量较小，因此 C_{max} 相关数据需要进一步验证。

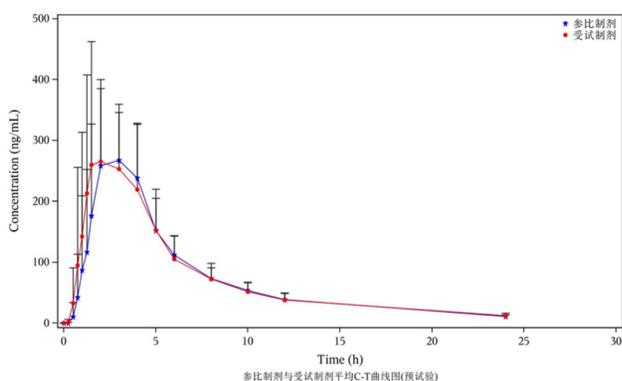


图 2 受试者口服受试制剂和参比制剂后血浆诺氟沙星平均血药浓度-时间曲线 ($n = 8$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of norfloxacin in the test and reference preparations after the oral administration ($n = 8$)

3 讨论

3.1 配制溶液及色谱柱的选择

本方法的关键点是根据诺氟沙星的结构特点对其色谱、质谱条件进行优化。诺氟沙星在水中溶解度较小^[16]，《中国药典》中也对其溶解性进行了阐述，根据这些信息，本方法选择 50% 甲醇水 (含 0.1%FA) 溶液配制诺氟沙星溶液。此外，诺氟沙星属于喹啉羧酸类化合物，同时含有羧基和氨基，其 $\log P$ 为 0.82，表明该化合物极性较大，在常规的 C_{18} 柱中保留较差^[17]，所以在液相条件摸索过程中，选择 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μ m)，该色谱柱完全耐受 100% 水相且对含有羧酸基团的化合物有较好的保留。

3.2 流动相的选择

本试验过程中对流动相进行了优化，水相考察了不同比例甲酸水及缓冲盐体系，通过对比，确定使用水相中含 0.2%FA 最为适合。有机相分

表 4 8 名受试者单剂量口服诺氟沙星的主要药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s$)

药代动力学参数	受试制剂	参比制剂
$t_{1/2}/h$	7.019±0.842	6.193±0.441
$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	389.788±118.274	344.961±76.439
t_{max}/h	2.25	3.00
$AUC_{0\sim t}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	1787.667±505.662	1743.070±402.543
$AUC_{0\sim\infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	1912.737±542.128	1841.944±429.238

别用甲醇和乙腈进行洗脱，经过对比发现使用乙腈作为有机相时，色谱峰峰宽更窄，且响应更好。另外乙腈的洗脱能力比甲醇强，很好地避免了诺氟沙星在色谱柱中残留。

3.3 质谱条件的考察

本试验采用正离子模式，在流动相中加入适量甲酸，有助于提高离子化效率，提高响应，同时也能获得较好的色谱峰，而负离子模式则响应较低，与峰形不能同时兼顾，且文献也多采用正离子模式^[14-15, 18]。

3.4 内标的选择

本试验采用同位素内标，其被广泛用于化学和临床分析中的定量分析^[19-20]，同位素内标具有与分析物几乎相同的物理化学性质，在分析物信号波动和量的损失上的矫正作用更强，可以有效校正甚至消除基质效应的影响。为保证待测物和内标之间不存在明显干扰，本试验对同位素内标和待测物之间的通道干扰进行了考察，最终选定 m/z 320.11 \rightarrow m/z 276.13 和 m/z 328.17 \rightarrow m/z 284.20 分别作为诺氟沙星和内标的检测离子对。

3.5 分析效率的优化

本方法通过对色谱柱、流动相体系、前处理过程中稀释剂的优化，避免了残留。得益于样品前处理过程的优化，使得本方法通过简单的等度洗脱就可以实现很好的检测结果，与采用梯度洗脱的方式相比，基线更平稳，样品保留时间更稳定，也不容易出现残留，而且对仪器的要求降低，即使单液相泵也可以正常运行该方法，另外样品之间不需要设置平衡时间来让系统恢复到所需的流动相比比例，可以极大地缩短进样时间，这对于样品测定来说，相同时间内可以检测更多的样品，明显提升测定效率，显著降低仪器占用成本和人工成本。本方法将分析时间缩短为 1.5 min，极大地提高了分析效率，非常适合于大批量样品的分析。

3.6 小结

本次方法学验证严格按照国内外法规要求进

行, 验证内容完整且各项验证内容均符合验证接受标准。尤其是近年来备受关注的溶血基质效应、高脂基质效应和全血稳定性内容, 本方法均进行了完整的考察, 使得方法更加完善、可靠, 且已用于诺氟沙星片人体 BE 研究, 样品测试完成后还开展了试验样品再分析 (ISR) 测试, ISR 合格率为 100%, 表明该方法可以稳定、可靠、可准确地检测人血浆样品中诺氟沙星的浓度, 为诺氟沙星 BE 研究提供真实、可靠的血药浓度数据。

参考文献

- [1] Sharma PC, Saneja A, Jain S. Norfloxacin: A therapeutic review [J]. *Int J Chem Sci*, 2008, 6 (4): 1702-1713.
- [2] Liu W, He T, Wang Y, et al. Synergistic adsorption-photocatalytic degradation effect and norfloxacin mechanism of ZnO/ZnS@BC under UV-light irradiation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 11903.
- [3] Bhattacharya B, Mondal A, Soni SR, et al. Multidrug salt forms of norfloxacin with non-steroidal anti-inflammatory drugs: Solubility and membrane permeability studies [J]. *Cryst Eng Comm*, 2018, 20 (41): 6420-6429.
- [4] Maia MS, Martins IL, Nascimento D, et al. Validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the bioequivalence study of norfloxacin in plasma samples [J]. *Ther Drug Monit*, 2008, 30 (3): 341-346.
- [5] García-Villén F, Faccendini A, Aguzzi C, et al. Montmorillonite-norfloxacin nanocomposite intended for healing of infected wounds [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5051-5060.
- [6] Shi T, Fu H, Tan L, et al. CdTe quantum dots coated with a molecularly imprinted polymer for fluorometric determination of norfloxacin in seawater [J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186 (6): 362.
- [7] Vakh C, Alaboud M, Lebedinets S, et al. An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1001: 59-69.
- [8] Kaur B, Kumar R, Chand S, et al. Determination of norfloxacin in urine and pharmaceutical samples using terbium doped zinc sulphide nanomaterials-sensitized fluorescence method [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 214: 261-268.
- [9] Chierentin L, Salgado HR. Review of properties and analytical methods for the determination of norfloxacin [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2016, 46 (1): 22-39.
- [10] Maia AS, Paíga P, Delerue-Matos C, et al. Quantification of fluoroquinolones in waste waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113927.
- [11] Ziarrusta H, Val N, Dominguez H, et al. Determination of fluoroquinolones in fish tissues, biological fluids, and environmental waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409 (27): 6359-6370.
- [12] Helmy SA. Simultaneous quantification of linezolid, tinidazole, norfloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and gatifloxacin in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies in human volunteers [J]. *Ther Drug Monit*, 2013, 35 (6): 770-777.
- [13] Amjadi M, Manzoor JL, Hallaj T, et al. Application of the chemiluminescence system composed of silicon-doped carbon dots, iron (II) and $K_2S_2O_8$ to the determination of norfloxacin [J]. *Microchim Acta*, 2017, 184 (6): 1587-1593.
- [14] 刘珊珊, 耿雅杰, 夏媛媛, 等. LC-MS/MS 法定量测定人血浆中诺氟沙星浓度的分析方法研究及其在应用 [J]. *药学报*, 2019, 54 (4): 695-700.
- [15] 蔡娟, 徐新颖, 文琪, 等. UPLC-MS/MS 法测定人血浆中的诺氟沙星 [J]. *华西药学杂志*, 2020, 35 (5): 549-552.
- [16] Loh G, Tan Y, Peh KK. Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with β -cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11 (4): 536-546.
- [17] 李俊, 杨玉琴, 王英璞. 中国药典 2015 年版中诺氟沙星胶囊有关物质测定方法的改进研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (6): 74-77.
- [18] 杨丹丹, 陈金亮, 吴金莲, 等. 诺氟沙星片在中国健康受试者空腹和餐后状态下生物等效性研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25 (12): 1357-1362.
- [19] Pagliano E, Meija J. A tool to evaluate nonlinearity in calibration curves involving isotopic internal standards in mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2021, 464 (1): 116557.
- [20] Loos G, Schepdael AV, Cabooter D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2016, 374 (2079): 20150366.

(收稿日期: 2021-04-08; 修回日期: 2021-06-15)

综述

细胞外基质在糖尿病足溃疡防治研究中的应用进展

王轩宇^{1, 2}, 阙华发^{2*} (1. 上海中医药大学, 上海 200032; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: 细胞外基质 (ECM) 是一个复杂的大分子网络, 为细胞提供了细胞外支架, 决定了组织的物理和机械特性, 并通过与细胞表面受体之间的时空分布和双向调控等多种相互作用, 直接或间接地影响细胞的形状、迁移、增殖、凋亡和代谢等行为, 介导多种疾病的进展。现有研究表明, 糖尿病足溃疡 (DFU) 中 ECM 成分、结构、硬度及丰度的失调会导致多种病理状况, 如伤口血管新生与纤维化、氧化应激及炎症反应等, 即 ECM 稳态变化对溃疡生成及创面结构与功能恢复至关重要。本文总结了 ECM 稳态在 DFU 中的作用与机制, 并针对研究中存在的问题进行分析与展望, 为开发以 ECM 为靶点的 DFU 新型药物提供参考与借鉴。

关键词: 细胞外基质; 糖尿病足溃疡; 创面愈合; 作用机制

中图分类号: R602, 96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1865-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.017

Extracellular matrix in the prevention and treatment of diabetic foot ulcer

WANG Xuan-yu^{1, 2}, QUE Hua-fa^{2*} (1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Abstract: Extracellular matrix (ECM) is a complex network of macromolecules that provides extracellular scaffolds for cells, determines the physical and mechanical properties of tissues, and interacts with cell surface receptors through temporal and spatial distribution and bidirectional regulation. It directly or indirectly affects the behavior and fate of cells such as the cell shape, migration, proliferation, apoptosis and metabolism, and mediates the progression of many diseases. Existing studies have shown that the imbalance of ECM composition, structure, hardness and abundance in diabetic foot ulcers (DFU) may lead to a variety of pathological conditions, such as wound angiogenesis and fibrosis, oxidative stress and inflammation, etc. ECM homeostasis changes are critical to the formation of ulcers and the restoration of wound structure and function. This article summarizes the role and mechanism of ECM homeostasis in DFU, predicts possible problems in the research, and provides reference for the development of new DFU drugs targeting ECM components.

Key words: extracellular matrix; diabetic foot ulcer; wound healing; function mechanism

据报道, 全世界约有 4.15 亿人患有糖尿病, 另约有 1.93 亿潜在糖尿病患者未被诊断^[1]。我国成人糖尿病患者人数已超过 1.14 亿^[2]。糖尿病足溃疡 (diabetic foot ulcer, DFU) 是一种严重的糖尿病并发症, 糖尿病患者终生患脚溃疡的风险高达

25%^[3]。DFU 患者截肢率和死亡率高, 死亡率约为未患有 DFU 的糖尿病患者的两倍^[4]。DFU 复发率高, 3 年后复发率大于 50%^[5]。糖尿病患者因局部缺血、神经病变、感染等因素协同作用而导致足溃疡发生。此外, 年龄、性别、吸烟史、足部温

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81774317); 上海市中西医临床协作试点建设项目 (No. ZY (2018-2020) -FWTX-1103); 上海市临床重点专科建设项目 (No.shslczdk03801); 上海中医药大学附属龙华医院科技创新项目 (No.CX202034)。

作者简介: 王轩宇, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中医防治血管病及促创面修复研究, E-mail: 1149241961@qq.com

***通信作者:** 阙华发, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中医外科学研究, E-mail: huafaque@126.com

度等因素也影响 DFU 的发生发展^[6-8]。目前, DFU 的外治主要以局部清创和新型敷料为主, 但由于其发病机制尚不明确, 临床治疗缺乏靶向性, 因此 DFU 仍然是慢性难愈性溃疡领域的重大挑战。

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是由胶原蛋白、蛋白聚糖/糖胺聚糖、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白和其他糖蛋白组成的非细胞三维高分子网络^[9]。既往的研究中, 人们常注重探究细胞内环境和成分的改变对疾病的影响, 而 ECM 对疾病的影响不够重视。随着细胞分离技术和分子生物学的进步, 人们逐渐认识到 ECM 不仅是支持细胞的框架, 还提供重要的生物化学与生物物理学信息, 对细胞形态、生长、分裂、分化和凋亡起重要的调控作用。当前, ECM 已证实与免疫、炎症、创面愈合、血管生成、恶性转化等密切相关^[10]。近年来, 国内外研究发现 ECM 在 DFU 的发生、发展及转归中起到了重要作用。本文对一些主要 ECM 组分及其相关酶类与抑制剂在 DFU 的发生与修复中的作用与可能机制进行重点综述。

1 ECM 稳态在 DFU 创面愈合中的作用

ECM 是一种高度动态的结构网络, 其蛋白组分与相关酶类以及酶类相关抑制剂的组成、含量、形态结构以及生物活性共同构成 ECM 稳态, 是细胞微环境的重要组成部分。维持 ECM 稳态无论是在组织发育还是在组织的疾病与再生中都至关重要, 因而越来越受到重视。DFU 创面愈合既涉及细胞迁移、增殖与分化, 也涉及 ECM 沉积和重塑等生物学过程。在 DFU 微环境中, 深入探究 ECM 稳态重塑在 DFU 伤口愈合的作用与机制可为以 ECM 为分子靶标的 DFU 治疗策略提供新的研究方向。

DFU 进展特征区别于普通创面愈合过程, 表现为炎症期延长, 增殖期有限, 重塑不规则等^[11-13]。ECM 作为结构支撑和细胞相互作用的重要媒介, 是创面愈合的关键促进者。在伤口愈合过程中, 断裂的原纤维被 ECM 酶降解, 如基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs), 包括胶原酶和明胶酶等, 新的 ECM 原纤维也被合成和修饰来实现肌肉等组织再生^[14-15]。即 ECM 重构涉及 ECM 退化、产生和成熟之间的平衡, 以及 MMPs 和金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 的平衡。而在 DFU 伤口愈合过程中, 涉及的炎症因子、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等过度分泌以及 ECM 调控基因、ECM 相关酶类异常表达, 平衡倾向于产生更多降解的、不可溶性的

原纤维, 导致 ECM 稳态紊乱。DFU 中主要 ECM 及其相关酶类的变化情况见表 1 及表 2。

表 1 DFU 进程中主要 ECM 分子的变化情况

Tab 1 Change of major ECM components in the DFU process

分子名称	在 DFU 中的变化	病理学效应	参考文献
胶原蛋白	沉积	皮肤厚度和完整性降低	[16]
透明质酸	表达减少	延迟伤口愈合	[17]
弹性蛋白	表达减少	组织硬度增加和间隔壁厚度增加	[18]
骨桥蛋白	表达增加	组织炎症加剧	[19]

表 2 DFU 进程中 ECM 相关酶类及其抑制剂的变化情况

Tab 2 Change of ECM related enzymes and their inhibitors in the DFU process

分子名称	在 DFU 中的变化	病理学效应	参考文献
基质金属蛋白酶 -1	表达增加	胶原与蛋白多糖等 ECM 大量降解	[20]
基质金属蛋白酶 -8	表达增加	胶原等 ECM 大量降解	[21]
基质金属蛋白酶 -9	表达增加	明胶、层粘连蛋白等 ECM 大量降解	[21-22]
MMP-1 组织抑制剂	表达减少	明胶酶活性不受抑制, 明胶等 ECM 降解	[23-24]
MMP-2 组织抑制剂	表达减少	细胞扩散和黏附, 以及肌生成受限	[24-26]

在糖尿病中, 高糖环境和其他变化引起炎症因子过度释放及氧化应激性损伤, MMPs 的产生增加, 高表达的 MMPs 进一步加重炎症, 同时 MMPs/TIMPs 比值增加, 导致 ECM 稳态改变, ECM 片段过度累积^[27-28]。此外, 高糖导致糖基化引起晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 的蓄积也会改变 ECM 的结构和功能, 糖基化导致分子间交联的形成, 这显著改变了 ECM 的生物力学特性, 并导致真皮成纤维细胞的细胞周期停滞和凋亡^[29-31]。而 ECM 的病理状态, 进一步影响细胞黏附与增殖及细胞正常生物功能, 导致 DFU 创面经久难愈。ECM 稳态在 DFU 中的作用模式见图 1。

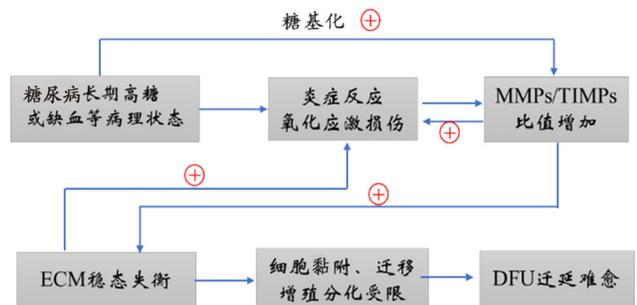


图 1 ECM 稳态在 DFU 进程中的作用模式示意图

Fig 1 Mode of ECM steady state in the DFU process

2 ECM 及其酶类在 DFU 治疗中的作用

2.1 ECM 在 DFU 治疗中的作用

透明质酸 (hyaluronan, HA) 是皮肤 ECM 的主要成分, 以酯化的形式存在于许多真皮基质中。HA 在创面愈合的增殖阶段影响细胞的迁移、增殖、炎症反应和血管生成等多种过程, 在伤口愈合和组织修复过程中处于关键地位^[32]。Lee 等^[33] 为了确认 HA 在 DFU 治疗中的唯一有效性, 使用不含其他物质的 HA 敷料进行了一项前瞻性研究, 将 34 位患者随机分为 HA 敷料组和常规敷料组两组, 发现 HA 敷料组的完全治愈率显著高于常规敷料组, 溃疡愈合速度更快。这些研究显示, HA 作为 ECM 的主要成分, 纯外源性 HA 敷料治疗 DFU 有效。

胶原蛋白 (collagen) 是一种主要 ECM 组分, 也是皮肤的重要组成部分, 可促进成肌纤维细胞分化与纤维化, 从而保留天然 ECM 结构并促进愈合^[34]。Colak 等^[35] 将 64 例 Wagner 2 级或以上 DFU 患者分为胶原组 (34 例) 和生理血清组 (30 例), 治疗 12 周后, 生理血清组 17 例患者 (56.6%) 完全愈合, 胶原组 25 例完全愈合 (73.5%)。与生理血清组相比, 胶原蛋白组平均愈合时间更短、创面愈合率明显更高, 提示在 DFU 的治疗中使用胶原蛋白敷料可以有效缩短愈合时间。

2.2 以 ECM 酶类为靶点的 DFU 防治

MMP-9 等酶高表达及 MMPs/TIMPs 比例失衡是导致 DFU 创面难愈的主要原因, 以 MMPs 为靶标设计抑制剂有望成为 DFU 防治新策略。ND-336 能选择性抑制 MMP-9, 同时不影响 MMP-8 活性, 可通过降低炎症, 增强血管生成和使伤口重新上皮化来加速糖尿病伤口的愈合, 从而逆转病理状态, 有效促进 DFU 创面愈合^[36]。ND-336 和活性重组 MMP-8 复合物的局部应用进一步增强了愈合效果, 这一策略在 DFU 的愈合中具有很大的前景^[37]。

高选择性 MMP 抑制剂已被证实在 DFU 的治疗中具有巨大潜力。然而, MMPs 之间结构的相似性使得选择性 MMPs 抑制剂的药物设计极具挑战。随着多组学及生物信息学技术进步, 应用于靶标和药物间关联网络药理学的构建, 结合分子对接技术进行高精度预测, 可为寻找高特异性的 MMPs 抑制剂提供解决方案。

3 ECM 稳态在 DFU 创面愈合中可能的机制

ECM 通过连接特定的跨膜受体, 激活或改变细胞形态和细胞骨架动力学特性, 影响细胞内信

号传导, 从而调节细胞的生长、迁移和细胞命运, 介导多种生理和病理过程。伤口愈合是一个复杂的生物学过程, 涉及复杂的 ECM 分子和细胞间的相互作用。目前, 缺乏 DFU 的发病机制制约了人们对 ECM 在 DFU 创伤愈合中的理解, 现有研究主要集中在 ECM 组分及其酶类变化导致 DFU 创面难愈, 以及 ECM 相关成分防治 DFU 有效性与安全性的评价, 而关于 ECM 分子在 DFU 的作用机制缺乏深入研究, 本文综合当前的研究结果, 将 ECM 稳态在 DFU 中可能的机制进行以下探讨。

3.1 新生血管生成

血管生成在伤口愈合中起核心作用, 新生血管生成机制受损是 DFU 伤口难以愈合的主要因素。ECM 包括基质蛋白及其降解性金属蛋白酶, 是微环境的主要组成部分, 在血管重塑过程中表现出复杂的动态变化^[38]。基底膜 (BM) 是 ECM 中的细腻、纳米级和柔软的薄片, 它直接影响皮肤完整性和神经肌肉结构, 从而影响皮肤脂肪形成和纤维化^[39]。BM 是支撑毛细血管形态结构和维持血管动态平衡所必需的物质。通过去除包含生长因子的细胞成分和脂质残留物纯化获得的无细胞脂肪提取物 (cell-free fat extract, Ceffe), 能显著促进体外培养的真皮成纤维细胞的增殖。在小鼠皮肤中, Ceffe 显著增加了真皮的厚度、增殖细胞的数量和毛细血管的密度^[40]。骨 ECM- 仿生纳米纤维系统显著改善了内皮细胞的附着和增殖, 并上调血管生成标记 (CD31) 的表达, 其在体内还通过上调低氧诱导因子 -1 α (Hif-1 α), 血管内皮生长因子 (VEGF), 胶原蛋白 1 (Col1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 和蛋白表达, 显著促进了血管生成、肉芽组织形成以及胶原基质重塑和表皮分化, 从而有效促进糖尿病伤口的愈合^[41]。可见, DFU 组织内 ECM 合成与降解的失衡影响血管生成和毛细血管完整性可能是导致创面难愈的主要原因, 外源性 ECM 对 DFU 新生血管形成有积极意义。

3.2 氧化应激水平

氧化还原信号通过影响 ECM 的结构与功能调节伤口愈合。糖尿病中正常的氧化还原信号被破坏, 导致自由基 (如 ROS) 生成和清除之间关系失衡。研究发现 DFU 患者的病灶周围皮肤组织处于严重的氧化应激状态, 皮肤核因子 -E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, NRF2) 介导的抗氧化反应活性降低, 氧化性 DNA 损伤增加^[42]。临床标本检测结果表明, 与对照组相比, DFU 组组

组织中过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性降低, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和一氧化氮 (NO) 含量增加, 高糖水平可能通过激活 PKC β -p66shc 途径诱导细胞和组织氧化应激损伤^[43]。

3.3 细胞行为与功能

骨髓来源的内皮祖细胞 (EPCs) 募集减少, 成纤维细胞和角质形成细胞的增殖和迁移降低是 DFU 愈合不良的主要特征。ECM 对这些细胞的功能与行为产生重要影响。ECM 连接特定的跨膜受体, 激活改变细胞形状和细胞骨架动力学的细胞内信号传导, 从而调节细胞的生长和活力、细胞迁移, 对塑造发育和协调组织行为至关重要。体外研究表明纤连蛋白能保持 EPCs 干细胞特征并扩增, 而明胶和胶原蛋白则将 EPCs 导向成熟的内皮表型, 这些 ECM 可通过调节 EPC 为骨髓重建和新血管生成提供条件^[44]。外源性胶原蛋白膜能促进成纤维细胞迁移^[45]。HA 由成纤维细胞与角质形成细胞动态产生, 细胞外 HA 与细胞表面受体 CD44 的相互作用在这些细胞生理中起重要调节作用^[46]。可见, DFU 环境下的 ECM 组成和结构的紊乱损害了细胞行为与功能, 引起损伤局部组织稳态失衡, 最终造成愈合困难。

3.4 炎性细胞因子水平

糖尿病患者体内长期高血糖发挥累积作用, 导致感染后炎症细胞因子水平升高, 细胞毒性介质分泌增加, 从而导致持续的炎症状态和伤口上皮功能异常^[47]。DFU 创面组织 MMPs 分泌增加, 其水解产物 ECM 片段增多。而大量 ECM 片段及其受体与体内炎症发生显著有关^[48]。此外, 在炎症过程中 ECM 片段表达上也可以激活免疫细胞, 从而使炎症反应持续发生^[49]。这种异常表达的 ECM 与炎症反应之间相互影响、相互促进作用模式导致 DFU 创面长期在较高的炎症水平, 以致迁延难愈。

3.5 生长因子水平

生长因子是一类生物活性多肽, 包括血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 等, 影响多种细胞的增殖和迁移, 成纤维细胞和炎症细胞的血管生成

和趋化, 在加速和促进伤口愈合过程中起着重要作用, 生长因子也有助于防止细胞凋亡, 并影响 ECM 的产生和重塑^[50]。糖尿病患者 VEGF-A 和胎盘生长因子 (PlGF) 等生长因子表达水平与 DFU 的发生成负相关^[51]。ECM 有利于维持生长因子活性, DFU 创面组织 ECM 稳态遭到破坏, 导致生长因子受体的调节降低和生长因子的快速退化, 从而影响患者伤口愈合。

4 问题与展望

长期以来, 人们普遍倾向于将 ECM 简单视为一种结构组分, 将机体重要病理生理改变解释归于单纯的细胞功能与活动的变化。随着对 ECM 的机械性能与生物力学研究的逐渐深入, 以及对整联蛋白、CD44、盘状蛋白结构域受体等细胞表面受体的广泛研究, 人们对其与细胞之间的复杂相互作用逐渐有了清晰认识, 明确了 ECM 组分调节信号级联与细胞骨架构型等功能在细胞形态发生和稳态维持等方面的重要性, 强调了其在急性慢性创面愈合中的关键作用。靶向 ECM 组件 (例如蛋白聚糖和糖胺聚糖, MMPs 和 TIMPs 等) 有望成为慢性难愈性创面修复创新防治的新策略。

目前, DFU 的治疗主要有伤口清创, 减压, 重塑血管和防治感染等方法。除这些传统疗法外, 新的治疗方法如重组生长因子, 皮肤替代品, 细胞因子刺激物或抑制剂, MMPs 抑制剂, 神经肽, 血管生成刺激物等^[52], 以及未来的治疗策略包括干细胞的疗法, 基因疗法, 应用血管紧张素受体类似物等已成为 DFU 防治研究的热点。这些新型 DFU 的治疗方法中, 通过干预生长因子、炎症因子、MMPs、血管生成以及干细胞等疗法需要通过调节 ECM 组件或 ECM 功能支持来实现。提示, ECM 组件在 DFU 的传统或新型疗法中都起着举足轻重的作用, 以 ECM 为靶点的 DFU 防治研究具有重要学术意义与应用价值。

然而, 目前掌握的有关蛋白酶和生物活性 ECM 片段数据是有限, 另外蛋白酶和 ECM 片段通常存在时间短, 且局部浓度低, 因此, 尚缺乏对 ECM 完整的生物学信息的了解^[53-54]。此外, ECM 的特定受体、ECM-受体间相互作用机制研究均不够充分, ECM 稳态失衡引起细胞外微环境的改变是如何调控细胞的生长, 代谢, 迁移, 增殖和分化等生命活动, 以及调节组织或器官的功能机制尚未阐明。因此, 缺乏对 ECM 完整的生物学信息的了解, 局限了 ECM 对 DFU 作用及其机制的诠释。随着先进检测与分析技术的快速进

步, 如基于定量蛋白质组学、转录组学、表观遗传学等方法, 通过组织质谱、双光子显微镜和低温电子显微镜, 以及基于衍射和 X 射线的光谱技术, 能准确而有效地分析低丰度物质的时空分布, 有助于系统地诠释 ECM 功能与活动, 以及细胞-ECM 间复杂的生物学作用。这些方法可以应用于 ECM 在 DFU 中作用与机制研究, 为开发更有效的 DFU 防治策略提供新的思路与方向。

参考文献

- [1] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10085): 2239-2251.
- [2] Zhou X, Ni Y, Xie G, et al. Analysis of the health information needs of diabetics in China [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2019, 264: 487-491.
- [3] Peter-Riesch B. The diabetic foot: The never-ending challenge [J]. *Endocr Dev*, 2016, 31: 108-134.
- [4] Andrews KL, Houdek MT, Kiemele LJ. Wound management of chronic diabetic foot ulcers: From the basics to regenerative medicine [J]. *Prosthet Orthot Int*, 2015, 39 (1): 29-39.
- [5] Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, et al. The global burden of diabetic foot disease [J]. *Lancet*, 2005, 366 (9498): 1719-1724.
- [6] Sayiner ZA, Can FI, Akarsu E. Patients' clinical characteristics and predictors for diabetic foot amputation [J]. *Prim Care Diabetes*, 2019, 13 (3): 247-251.
- [7] Xia N, Morteza A, Yang F, et al. Review of the role of cigarette smoking in diabetic foot [J]. *J Diabetes Invest*, 2019, 10 (2): 202-215.
- [8] Yavuz M, Ersen A, Hartos J, et al. Temperature as a causative factor in diabetic foot ulcers: A call to revisit ulceration pathomechanics [J]. *Am Podiatr Med Assoc*, 2019, 109 (5): 345-350.
- [9] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4-27.
- [10] Toole BP. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4 (7): 528-539.
- [11] Davis FM, Kimball A, Boniakowski A, et al. Dysfunctional wound healing in diabetic foot ulcers: New crossroads [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18 (1): 2.
- [12] Al-Mulla F, Leibovich SJ, Francis IM, et al. Impaired TGF- β signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7 (11): 3006-3020.
- [13] Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and wound angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (7): 1419.
- [14] Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44-46: 1-6.
- [15] Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2014, 62 (2): 91-95.
- [16] Blair MJ, Jones JD, Woessner AE, et al. Skin structure-function relationships and the wound healing response to intrinsic aging [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2020, 9 (3): 127-143.
- [17] Weindl G, Schaller M, Schäfer-Korting M, et al. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: Molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2004, 17 (5): 207-213.
- [18] Ledoux WR, Pai S, Shofer JB, et al. The association between mechanical and biochemical/histological characteristics in diabetic and non-diabetic plantar soft tissue [J]. *J Biomech*, 2016, 49 (14): 3328-3333.
- [19] Feldbrin Z, Omelchenko E, Lipkin A, et al. Osteopontin levels in plasma, muscles, and bone in patient with non-healing diabetic foot ulcers: A new player in wound healing process? [J]. *J Diabetes Complications*, 2018, 32 (8): 795-798.
- [20] Macarie RD, Vadana M, Ciortan L, et al. The expression of MMP-1 and MMP-9 is up-regulated by smooth muscle cells after their cross-talk with macrophages in high glucose conditions [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (9): 4366-4376.
- [21] Burrow JW, Koch JA, Chuang HH, et al. Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and-9 by human diabetic skin fibroblasts [J]. *J Surg Res*, 2007, 140 (1): 90-98.
- [22] Jones JI, Nguyen TT, Peng Z, et al. Targeting MMP-9 in diabetic foot ulcers [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12 (2): 79.
- [23] Trøstrup H, Holstein P, Karlsmark T, et al. Uncontrolled gelatin degradation in non-healing chronic wounds [J]. *J Wound Care*, 2018, 27 (11): 724-734.
- [24] Guillemin Y, Le Broc D, Ségalen C, et al. Efficacy of a collagen-based dressing in an animal model of delayed wound healing [J]. *J Wound Care*, 2016, 25 (7): 406-413.
- [25] Chang H, Lee J, Poo H, et al. TIMP-2 promotes cell spreading and adhesion via upregulation of Rap1 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345 (3): 1201-1206.
- [26] Lluri G, Langlois GD, Soloway PD, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates myogenesis and beta1 integrin expression in vitro [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314 (1): 11-24.
- [27] Halim M, Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes) [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13 (2): 1165-1172.

- [28] Luanraksa S, Jindatanmanusan P, Boonsiri T, et al. An MMP/TIMP ratio scoring system as a potential predictive marker of diabetic foot ulcer healing [J]. *J Wound Care*, 2018, 27 (12): 849-855.
- [29] 牛轶雯, 缪明远, 董炜, 等. 晚期糖基化终末产物与其受体对糖尿病创面氧化应激反应的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2012, 28 (1): 32-35.
- [30] Gautieri A, Passini FS, Silván U, et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue [J]. *Matrix Biol*, 2017, 59: 95-108.
- [31] Niu Y, Xie T, Ge K, et al. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products [J]. *Am J Dermatopathol*, 2008, 30 (4): 344-351.
- [32] King IC, Sorooshian P. Hyaluronan in skin wound healing: Therapeutic applications [J]. *J Wound Care*, 2020, 29 (12): 782-787.
- [33] Lee M, Han SH, Choi WJ, et al. Hyaluronic acid dressing (Healoderm) in the treatment of diabetic foot ulcer: A prospective, randomized, placebo-controlled, single-center study [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24 (3): 581-588.
- [34] Seo BR, Chen X, Ling L, et al. Collagen microarchitecture mechanically controls myofibroblast differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (21): 11387-11398.
- [35] Colak B, Yormaz S, Ece I, et al. Comparison of collagen granule dressing versus conventional dressing in patients with diabetic foot ulcer [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2020, 1534734620938988.
- [36] Chang M. Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: A perspective [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 243-248.
- [37] Gao M, Nguyen TT, Suckow MA, et al. Acceleration of diabetic wound healing using a novel protease-anti-protease combination therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (49): 15226-15231.
- [38] Ma Z, Mao C, Jia Y, et al. Extracellular matrix dynamics in vascular remodeling [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319 (3): C481-C499.
- [39] Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes [J]. *Matrix Biol*, 2017, 57-58: 1-11.
- [40] Xu Y, Deng M, Cai Y, et al. Cell-free fat extract increases dermal thickness by enhancing angiogenesis and extracellular matrix production in nude mice [J]. *Aesthet Surg J*, 2020, 40 (8): 904-913.
- [41] Gao W, Jin W, Li Y, et al. A highly bioactive bone extracellular matrix-biomimetic nanofibrous system with rapid angiogenesis promotes diabetic wound healing [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5 (35): 7285-7296.
- [42] Long M, Rojo de la Vega M, Wen Q, et al. An essential role of NRF2 in diabetic wound healing [J]. *Diabetes*, 2016, 65 (3): 780-793.
- [43] Liu Z, Hu L, Zhang T, et al. PKC β increases ROS levels leading to vascular endothelial injury in diabetic foot ulcers [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12 (10): 6409-6421.
- [44] Siavashi V, Nassiri SM, Rahbarghazi R, et al. ECM-dependence of endothelial progenitor cell features [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117 (8): 1934-1946.
- [45] Sadeghi R, Mahdavi P, Lee WS, et al. A novel, cell-permeable, collagen-based membrane promotes fibroblast migration [J]. *J Periodontol Res*, 2018, 53 (5): 727-735.
- [46] Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler [J]. *Glycobiology*, 2016, 26 (6): 553-559.
- [47] Moura J, Madureira P, Leal EC, et al. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing [J]. *Clin Immunol*, 2019, 200: 43-54.
- [48] Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40 (6-7): 1101-1110.
- [49] Wight TN, Kang I, Evanko SP, et al. Versican-A critical extracellular matrix regulator of immunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 512.
- [50] Zubair M, Ahmad J. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20 (2): 207-217.
- [51] Chen Z, Fu S, Wu Z, et al. Relationship between plasma angiogenic growth factors and diabetic foot ulcers [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 482: 95-100.
- [52] Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation [J]. *J Wound Care*, 2016, 25 (1): 46-55.
- [53] Taha IN, Naba A. Exploring the extracellular matrix in health and disease using proteomics [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63 (3): 417-432.
- [54] Naba A, Pearce OMT, Del Rosario A, et al. Characterization of the extracellular matrix of normal and diseased tissues using proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16 (8): 3083-3091.

(收稿日期: 2021-02-24; 修回日期: 2021-04-21)

大环内酯类抗菌药物致长 QT 综合征的研究进展

于正阳², 唐赛康², 韩鑫², 张昊川², 金景玉^{1*} (1. 青岛大学青岛医学院-药学院药理学系, 山东 青岛 266073; 2. 青岛大学医学部, 山东 青岛 266071)

摘要: 大环内酯类抗菌药物引发的长 QT 综合征是一种严重的药物不良反应, 能引发致命的心律失常和猝死。之前的研究认为, 延迟整流钾电流是导致此类药物不良反应发生的基础。随着近年来研究的深入, 晚钠电流、诸多胞内信号通路和多种临床因素亦被发现在长 QT 综合征的发生发展中发挥了复杂作用。本文对大环内酯类抗菌药物致长 QT 综合征的发生机制和影响其发生的相关临床因素进行了简要归纳, 为新药的安全性筛查提供了相关理论基础, 并为临床安全应用此类药物提供了重要参考。

关键词: 长 QT 综合征; 尖端扭转型室性心动过速; 大环内酯类

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-0-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.018

Research progress in long QT syndrome caused by macrolides

YU Zheng-yang², TANG Sai-kang², HAN Xin², ZHANG Hao-chuan², JIN Jing-yu^{1*} (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong 266073; 2. Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong 266071)

Abstract: Long QT syndrome caused by macrolides is a severe adverse reaction, which can induce mortal arrhythmia and sudden cardiac death. Previous studies suggest that delayed rectifier potassium current is the fundamental mechanism of this adverse reaction. With the in-depth research in recent years, late sodium current, multiple cell signaling pathways and several clinical factors have also been found to play complex roles in the occurrence and development of long QT syndrome. In this article, the mechanism and relative clinical factors of the long QT syndrome caused by macrolides are summarized to provide theoretical basis for the safe screening of new drugs and for the safe clinical use of macrolides.

Key words: long QT syndrome; torsade de pointe; macrolide

长 QT 综合征 (long QT syndrome, LQTS) 多由心肌复极耗时过长而造成, 发生时可在体表心电图上记录到 QT 间期的相对延长, 起病较隐匿, 其继发的尖端扭转型室性心动过速 (torsades de pointes, TdP) 可使病情旋即恶化, 进一步引发心室颤动使 LQTS 患者发生突然的昏厥及猝死^[1]。药物等后天环境所导致的 LQTS 称为获得性 LQTS, 抗菌药物是临床工作中导致获得性 LQTS 发生的常见原因, 其中以大环内酯类抗菌药物致 LQTS 作用最为突出^[2]。大环内酯类抗菌药物因含 14 ~ 16 元的大环内酯环而得名, 其通过特异结合至病原核糖体上而发挥抑制蛋白合

成的作用实现抗菌, 抗菌谱广且对非典型病原体感染疗效优异, 常见药物包括红霉素、阿奇霉素和克拉霉素等。筛查新药的潜在致 LQTS 作用及临床合理用药是减少获得性 LQTS 发生的有效手段。近年来, 大环内酯类抗菌药物引发获得性 LQTS 的机制得到了深入研究, 其与细胞内复极期诸多离子通道及信号通路的复杂相关性得到了深层次的揭示, 提示既往筛查新药潜在致 LQTS 作用的手段存在不足。众多临床因素在获得性 LQTS 发生中起到的作用及降低获得性 LQTS 发生风险的手段也需要被临床医师加以重视。本文从 LQTS 发生及恶化为 TdP 的基本机制、大环内

作者简介: 于正阳, 男, 主要从事临床药理心血管系统不良反应研究, E-mail: YuQD00@163.com * 通信作者: 金景玉, 女, 博士, 副教授, 主要从事临床药理心血管系统不良反应研究, E-mail: jingyujin@qdu.edu.cn

酯类抗菌药物引发 LQTS 的机制和发生风险及相关影响因素几方面予以综述。

1 LQTS 的发生及恶化为 TdP 的基本机制

1.1 心肌细胞复极化耗时增加造成 LQTS 的发生

心肌细胞的复极进程分 3 期（即为平台期及其两侧的初期和末期），而复极耗时的延长主要归咎于平台期耗时增加。内向电流和外向电流在此期对抗式强化，使得膜电位维持在一“平台”的状态，与获得性 LQTS 相关的外向电流主要由延迟整流钾电流（delayed rectifier potassium current, I_k ）主导， I_k 又可被进一步分为 I_{kr} 和 I_{ks} 等亚型，此种钾电流易受大环内酯类药物的影响而造成外向电流削弱，相关内向电流主要是晚钠电流（late sodium current, I_{Na-p} ），其于平台期由长时程、弱开放的钠通道介导，此外尚有与 TdP 恶化相关的 L 型钙电流（L-type calcium current, I_{Ca-L} ），无论是内向电流增强还是外向电流减弱均能使心肌复极化能力异常^[3-4]。

心肌细胞的复极能力具有一定储备，在面对大环内酯类抗菌药物等令复极时间过长的因素时可以通过调节膜电流，即增加平台期外向电流，反之亦可减弱内向电流，使心肌复极化耗时维持在正常范围之内。实际上，临床工作中 LQTS 最可能的出现环境是患者先天具有更少的复极储备或某些临床因素的存在削弱了心肌细胞的复极储备，在此基础上应用大环内酯类抗菌药物等影响心肌复极化的药物，就造成了复极时间延长，在此种多重作用下获得性 LQTS 得以发生^[5-6]。

1.2 早后除极的发生造成 LQTS 向 TdP 恶化

LQTS 尚保留心脏的窦性节律，但一旦恶化为 TdP，即出现快速且在心电图上沿基线扭转不定的异位心律，心肌细胞中早后除极化（early after depolarization, EAD）的发生则是 LQTS 向 TdP 恶化的基本机制^[7]。

早后除极指的是复极耗时延长而致的在细胞完全复极之前发生的除极化，主要由 I_{Ca-L} 介导^[1, 8]。对于获得性 LQTS 而言，EAD 的发生机制主要是：随复极耗时延长，胞浆内的钙离子被逐渐回纳至内质网内，胞浆中钙离子水平降低，因而部分 I_{Ca-L} 重新获得了开放的能力，此时的膜电位如在其阈电位之上，则能使 I_{Ca-L} 重新开放，介导一股内向电流的产生，此内向电流如果足够强，那么就会导致除极化的出现^[8]。EAD 在获得性 LQTS 中所发挥作用的细节尚有待明确之处，但基本共识认为浦肯野纤维能够产生快速重复发

放的 EAD，在 LQTS 的基础上于心室壁内造成一个甚至多个异位节律点，产生快速型主动性异位心律^[7]，且另有研究指出，EAD 的出现导致了心肌细胞复极耗时延长，进而令心肌细胞的动作电位时程延长，为异位心律在心室壁内不断折返提供了条件^[8]。EAD 使得 LQTS 中原有的窦性节律被快速型异位心律所取代，其因在心室壁内不断折返而在体表心电图上呈现出形态不定且方向多变的特点，如此，TdP 得以发生。

1.3 心肌跨壁内离散度增加的影响

心室壁不同层次的细胞的电生理活动不完全相同，即细胞间具有相当程度的电位离散程度。相较邻近心内膜和心外膜的心肌细胞，位于室壁中层的心肌细胞，即 M 细胞，拥有和浦肯野细胞类似的长动作电位时程，以及弱的复极期钾离子外向电流，即更少的复极储备，也更容易发生 EAD^[9]。M 细胞的存在对药物引起的复极耗时延长起到放大作用，室壁多细胞对药物反应的离散性为折返的发生提供了结构性基础，对 LQTS 的维持和恶化起重要作用^[7]。

2 大环内酯类抗菌药物引发 LQTS 的机制

2.1 对钾通道的阻滞作用

复极期众电流中， I_{kr} 中的快速激活成分最容易受到致 LQTS 药物的影响，其主要由 *KCNH2* 基因编码，也可以称之为 hERG^[1]。对该型电流的阻滞是大环内酯类抗菌药物增加心肌细胞复极耗时而引发 LQTS 的关键机制^[10-11]。一项以表达 hERG 的人重组肾 -239 胚胎细胞为材料的研究观察了几种大环内酯类抗菌药物对 I_{kr} 的阻滞效果，其抑制细胞中 50% 的 I_{kr} 所需剂量分别为：克拉霉素 $3.29 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、罗红霉素 $3.65 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、红霉素 $7.22 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，虽然这些剂量均远大于安全用药剂量，但是由于对 I_{kr} 轻微的阻滞效果也能导致复极耗时延长，加上临床相关高危因素影响，故治疗剂量的大环内酯类药物仍能致 LQTS 的发生^[12]。

鉴于 I_{kr} 阻滞在大环内酯类抗菌药物致 LQTS 中的核心地位，根据药物对离体细胞上的 I_{kr} 的阻滞作用来筛查新药潜在致 LQTS 作用已经成为新药研发的常规步骤之一^[13]。随着近年 LQTS 背后分子层次研究的不断深入，获得性 LQTS 发生的更多机制也被揭示。

2.2 晚钠电流增强

虽然和 0 期去极化时的钠电流相比， I_{Na-p} 的幅度较为微弱，但是由于其拥有相当长的持续时

间,其介导的内流钠离子的量仍然是十分可观的,也就是说其增强也能造成比较明显的复极延缓^[4]。近年来 I_{Na-p} 在获得性 LQTS 中起到的独特作用被逐渐阐明。

在那些既往被认为是通过 hERG 阻滞而致 LQTS 的抗菌药物中,致使 I_{Na-p} 增强的作用也开始被逐渐发现,如阿奇霉素的长时间暴露可以增强 I_{Na-p} ^[14]。在最近的研究中,红霉素也被发现有增强 I_{Na-p} 的作用^[15]。 I_{Na-p} 的增强对于 LQTS 的作用主要包括两个方面:① I_{Na-p} 属于心肌复极化期间的一种内向电流,其增强可以直接削弱心肌细胞的复极储备,从而令机体倾向于产生 LQTS;② I_{Na-p} 的增强使得心肌细胞在平台期接受过多的钠离子内流,能导致细胞内 Na^+ 超载^[16],而 Na^+ 超载又会通过细胞膜上的钠-钙交换体将过多 Ca^{2+} 在平台期换入细胞,即造成钙超载,进一步造成迟后除极等一系列更严重的细胞生理活动紊乱。

细胞内对于 I_{Na-p} 的生理性调控机制及主要意义包括:① 蛋白激酶 C;② 依赖 Ca^{2+} -钙调蛋白的蛋白激酶,其与钙超载致 I_{Na-p} 增强有关;③ 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 信号通路,其转导过程易受大环内酯类药物干扰,是目前在抗菌药物引起的 LQTS 中关联最大且研究最深的信号通路^[4]。PI3K 信号通路在细胞的众多生理活动中有广泛的调节作用。对于获得性 LQTS,以 I 类 PI3K 信号通路中的 PI3K α 与相关离子通道的调控关系最为密切。经多级磷酸化,活化的 PI3K α 终使胞内的 Akt 蛋白活化,Akt 蛋白起到抑制 I_{Na-p} ,增强 I_{Ks} 、 I_{Kr} 和 I_{Ca-L} 的作用^[17]。PI3K 信号通路的抑制剂对 I_{Na-p} 的增强作用和对动作电位时程的延长作用已经被多项实验所证实^[15, 18]。虽然这些能够增强 I_{Na-p} 的抗菌药物在机体内对 PI3K 信号通路具体造成了何种干扰尚无明确的研究结果,但是已有研究显示红霉素是通过干扰 PI3K 信号通路的有效传导实现了增强 I_{Na-p} 的作用^[15]。

根据目前研究来看, I_{Kr} 阻滞仍然被认为是现有大环内酯类抗菌药物诱发获得性 LQTS 的主要机制,而对于 I_{Na-p} 的增强能否独立诱发获得性 LQTS 仍无统一结论,但是针对 I_{Na-p} 的研究对于新研发抗菌药物的潜在致 LQTS 作用核对有重大的提示意义,反映了既往单一的对 hERG 阻滞性筛查的检测方法的不足。

此外,由于 I_{Na-p} 相较于 I_{Kr} 更广泛地受细胞

内外环境调控,其增强常作为糖尿病和心力衰竭等疾病促进 LQTS 发生的机制存在,在获得性 LQTS 发生发展中具有重要地位^[16-17]。

2.3 对膜蛋白转运的干扰作用

心肌复极相关离子通道蛋白从肽链开始,需经多次折叠转运才能形成构型正确且功能完整的膜蛋白^[19]。有研究认为致 LQTS 药物可能通过干涉膜蛋白转运从而使到达膜表面的有恰当活性的离子通道数量异常,造成细胞电生理活动的改变,从而诱发获得性 LQTS^[20]。而大环内酯类抗菌药物具体如何影响肽链的加工尚待进一步明确。

3 LQTS 发生风险及相关因素分析

3.1 不同种类大环内酯类抗菌药物致获得性 LQTS 的发生风险

在 2015—2017 年美国食品与药品管理局 (FDA) 收集到的 3960 例药源性 LQTS 报告中,由大环内酯类抗菌药物引发的占 108 例,在所有抗菌药物中占比最高,其中红霉素 6 例、阿奇霉素 56 例、克拉霉素 46 例,有研究通过计算报告优势比 (reporting odds ratios, ROR) 排除了各类药物应用基数不同造成的差异并衡量了各种大环内酯类药物引发 LQTS 相对于引发其他不良反应的常见程度:红霉素 ROR 为 15.86,阿奇霉素 ROR 为 22.14,克拉霉素 ROR 为 9.63^[2]。鉴于获得性 LQTS 相对罕见且发生隐匿、难以统计,目前尚缺乏准确大样本统计学研究,特别是具体到各个类型大环内酯类药物的致获得性 LQTS 发生率的研究,仅有 meta 分析显示使用大环内酯类抗菌药物将心源性猝死或室性心动过速的发生风险提高了大约 152%,其中,红霉素提高了 261%,居首位;阿奇霉素提高 240%;而克拉霉素则提高了 116%^[21]。但值得注意的是该统计学结论只关注了心源性猝死或室性心动过速等 LQTS 的恶性结局事件,而隐匿发生的无症状获得性 LQTS 未能被报告和统计,即使是 FDA 统计到的报告数量也很可能明显低于实际,故大环内酯类药物实际致 LQTS 的风险可能远高于上述结果。

虽然 LQTS 发生的概率可以被认为是比较低的,但其发生隐匿且后果往往是迅速且致命的,据统计学分析因大环内酯类抗菌药物引发的 LQTS 而死亡的风险明显高于因应用青霉素引发过敏而死亡的风险^[10]。

3.2 不同给药方式的影响

大环内酯类药物对 I_{Kr} 的阻滞效应具有明显的浓度依赖性^[12, 22]。而不同给药途径下药物在体

内的血药浓度变化不同,故同一种大环内酯类药物在不同给药途径下致获得性 LQTS 的发生风险也不尽相同,限于样本数量过少等原因,目前尚无可靠统计学研究阐述不同给药方式对大环内酯类药物致获得性 LQTS 的影响。但总体来看,虽然红霉素相对克拉霉素阻滞 I_{Kr} 的能力更弱,但统计学结果显示红霉素致获得性 LQTS 的危险度最高,其可能原因是红霉素具有短的抗菌药物后效应,需要通过每日多次给药维持于高血药浓度,而高血药浓度很可能导致 LQTS 发生。阿奇霉素和克拉霉素因具有长的抗菌药物后效应而不存在此类问题^[11, 21, 23]。

如此可推测,应用阿奇霉素、克拉霉素具有长抗菌药物后效应的药物,特别是缓释口服制剂,可以通过降低其峰值血药浓度以有效降低获得性 LQTS 的发生风险,相反,应用红霉素,特别是每日多次静脉大剂量应用,获得性 LQTS 的发生风险相对更高。

3.3 先天易感性差异的影响

一项针对 188 名获得性 LQTS 确诊患者的回顾性研究发现,这些患者在未接触致 LQTS 因素时心电图上的基础 QTc 平均水平为 453 ms,显著高出非致病基因携带者的平均水平约 50 ms,具有更弱的复极储备,即对获得性 LQTS 具有更高的先天易感性^[24]。

遗传因素及性别是造成心肌细胞对大环内酯类抗菌药物反应性不同而导致获得性 LQTS 在人群中存在易感性差异的重要原因。在 1/3 获得性 LQTS 背后,可以明确发现存在相关的基因突变,包括编码离子通道的基因在内的多达 61 种基因的突变,其中以 KCNH2 突变最为常见, KCNQ1 次之^[2, 24-25]。性别对于获得性 LQTS 易感性的影响很可能是由激素水平差异造成的,在对发生于前列腺癌患者的获得性 LQTS 的分析中,雄激素剥夺治疗与获得性 LQTS 的发生率被发现具有正相关性^[26]。雄激素可能具有加快心肌复极而防止 LQTS 发生的作用,在雄激素环境下的离体心肌细胞的电位记录实验中,雄激素的这种通过增加复极储备从而降低 LQTS 发生率的作用已经被初步证实^[27]。从另一个角度分析,伴有雄激素水平低下或者雄激素在靶组织遭受抵抗的内分泌疾病可能使男性和女性具有相同水平的获得性 LQTS 易感性。

诚然,通过基因检测来分析个体的获得性 LQTS 先天易感性是可能的,但是限于基因检测

的成本,在实际临床工作中开展这一类针对药物少见并发症的详细评估的可行性仍有待讨论。相比之下,检测患者的 QTc 基础水平是经济且相对可靠的预防手段,特别是对于快速静脉大剂量使用红霉素的患者来说,有必要通过提前检测 QTc 水平以排除获得性 LQTS 高易感性人群甚至是既往未能被发现的先天性 LQTS 患者。目前来说,高 QTc 水平尚未被列为大环内酯类药物应用的绝对禁忌,如临床工作确须对高 QTc 水平患者应用大环内酯类药物甚至是静脉大剂量使用红霉素,应提前告知其危险性,并行持续心电监护以及时发现 LQTS 的发生。如前所述,LQTS 的发生发展是多步骤多阶段的,且单纯的 LQTS 未伴 TdP 发生并不会危及生命甚至毫无症状,故行持续性心电监护并提高医护对 LQTS 的认识可以在单纯的 QT 间期延长阶段及时发现大环内酯类药物所致获得性 LQTS 的发生,以阻止获得性 LQTS 导致的恶劣后果。

3.4 其他削弱心肌复极储备的临床因素的影响

① 低钾血症是引发 LQTS 的强有力的因素,可以增加复极耗时,削弱细胞的复极储备^[28-29];还能够引发胞内钠、钙超载,激活 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 型,导致 I_{Na-p} 的增强,削弱复极储备^[29-30]。② 糖尿病患者被发现具有比较高的获得性 LQTS 发生率,目前认为,这可能是由 PI3K 信号通路缺乏胰岛素的有效激活使 I_{Na-p} 增强而造成的^[31]。③ 包括 LQTS 在内的多种心律失常均为慢性心力衰竭的常见结局,心力衰竭发展过程中的 LQTS 相关的心肌细胞电生理重构是其背后的主要原因,包括 I_{Na-p} 的增强和 I_{Kr} 的削弱^[32-34]。以上因素可通过直接改变心肌细胞的复极储备从而增加获得性 LQTS 的风险。

这些临床因素将明显增加应用大环内酯类抗菌药物时发生获得性 LQTS 的风险,基于此点认识,临床应用大环内酯类抗菌药物时,在条件允许的情况下,首先应尽可能对其进行纠正:① 补钾以纠正低钾血症;② 对糖尿病患者进行适量的胰岛素应用以充分激活 PI3K 信号通路:经胰岛素受体将胰岛素受体底物磷酸化继而激活细胞内的 PI3K 信号通路是胰岛素调节细胞糖代谢的主要途径,其下游激活的 Akt 蛋白对葡萄糖转运体的表达及糖原合成等糖代谢重要环节具有关键性的调控作用^[35-36]。胰岛素缺乏或抵抗造成的 PI3K 信号通路及 Akt 蛋白的激活不足是糖尿病重要的病理生理环节,在通过足量应用胰岛素而将

糖尿病患者的血糖水平降至正常的过程中,有理由认为 PI3K 信号通路及 Akt 蛋白得到了足量的激活^[31]。且目前认为,心肌细胞平台期的 I_{Na-p} 增强也是 Akt 蛋白激活不足造成的^[17]。故此可以推测,通过足量胰岛素应用以控制糖尿病患者的强 I_{Na-p} 从而降低糖尿病患者获得性 LQTS 的发生风险是可能的,但目前尚待可靠临床研究以证实胰岛素对糖尿病患者 QT 间期的确切影响及其在预防 LQTS 发生中的作用。

如短时间内无法纠正或存在心力衰竭等无法客观消除的因素,应该尽可能避免静脉大剂量应用红霉素这类 I_{Kr} 阻滞效应强的治疗手段,并告知其危险性,行持续性心电监护。另外,主动补充钾剂使血钾维持在较高水平是预防先天性 LQTS 发作的可行手段^[37],但这对于获得性 LQTS 预防是否具有可行性仍待进一步实验以评估利弊。

3.5 慢性肝脏功能不全及低蛋白血症的影响

大环内酯类药物在体内部分与血浆蛋白结合,由未结合的部分发挥药理作用,最终主要经肝清除^[23]。低蛋白血症可减少大环内酯类药物的结合部分以提高未结合药物的浓度,而慢性肝功能不全能通过减缓其代谢排泄而增加大环内酯类药物的血药浓度,两者均能增加大环内酯类药物致获得性 LQTS 的风险,且慢性肝功能不全常合并低蛋白血症同时存在。

目前的专家共识认为,对于慢性肝功能不全的患者,在严密检测肝功能的情况下,可以正常应用大环内酯类药物,但必要时应减量^[23]。为预防获得性 LQTS 的发生,可以优先选用主要经肾脏排泄的克拉霉素,定期监测其血药浓度以防蓄积,并行心电监护。因红霉素的蛋白结合率 (protein binding, PB) 高,故对存在低蛋白血症的患者应避免应用,而优先选用中等水平 PB 的克拉霉素和阿奇霉素^[23]。

综上所述,大环内酯类抗菌药物对 I_{Kr} 的阻滞作用是其延长心肌细胞复极时间、造成获得性 LQTS 发生的基本机制,在此基础上,早后除极化可导致 LQTS 向 TdP 恶化,造成难以挽回的后果。大环内酯类抗菌药物和诸多临床因素可经多重信号通路调节 I_{Na-p} 使其增强,其与 I_{Kr} 阻滞相协调共同削弱心肌细胞复极储备,上述机制很可能是获得性 LQTS 发生的重要触发环节,针对 I_{Na-p} 增强及其背后复杂通路的更深一步研究对于更新新一代大环内酯类药物致 LQTS 风险的筛查手段

以及临床工作中避免 LQTS 发生有重大意义。各类大环内酯类抗菌药物中,克拉霉素 (特别是其口服缓释制剂) 相较红霉素可能拥有更低的致 LQTS 风险,但目前尚需可靠的统计学研究及相关指南或共识意见予以明确指导。针对 LQTS 发生风险的各影响因素,筛查高易感人群、消除相关危险因素,同时合理选用不同种类大环内酯类药物、施行心电监护是避免获得性 LQTS 发生并恶化的重要手段,是实现大环内酯类抗菌药物临床安全应用的重要环节。

参考文献

- [1] Roden DM. Clinical practice. Long-QT syndrome [J]. N Engl J Med, 2008, 358 (2): 169-176.
- [2] Teng C, Walter EA, Gaspar DKS, et al. Torsades de pointes and QT prolongation associations with antibiotics: A pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system [J]. Int J Med Sci, 2019, 16 (7): 1018-1022.
- [3] Roden DM. Predicting drug-induced QT prolongation and torsades de pointes [J]. J Physiol, 2016, 594 (9): 2459-2468.
- [4] Makielski JC. Late sodium current: A mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia [J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26 (2): 115-122.
- [5] Vandael E, Vandenberg B, Vandenberghe J, et al. Risk factors for QTc-prolongation: Systematic review of the evidence [J]. Int J Clin Pharm, 2017, 39 (1): 16-25.
- [6] 曲云鹏, 刘洋, 张春鹏, 等. 尖端扭转型室性心动过速的机制及危险因素的研究进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11 (1): 124-125, 128.
- [7] Roden DM. A current understanding of drug-induced QT prolongation and its implications for anticancer therapy [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115 (5): 895-903.
- [8] Wit AL. Afterdepolarizations and triggered activity as a mechanism for clinical arrhythmias [J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2018, 41 (8): 883-896.
- [9] Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, et al. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells [J]. Circ Res, 1991, 69 (6): 1427-1449.
- [10] Viskin S, Havakuk O, Schwaber MJ. Pro-arrhythmic effects of noncardiac medications: Lessons from macrolide antibiotics [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66 (20): 2185-2188.
- [11] 庄晓峰, 高丽芳. 抗菌药物导致相关性心律失常的研究进展 [J]. 国外医药 (抗菌药物分册), 2019, 40 (1): 25-31.
- [12] Volberg WA, Koci BJ, Su W, et al. Blockade of human cardiac potassium channel human ether-a-go-go-related gene (HERG) by macrolide antibiotics [J]. J Pharmacol

- Exp Ther, 2002, 302 (1): 320-327.
- [13] Gintant G, Sager PT, Stockbridge N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15 (7): 457-471.
- [14] Yang Z, Prinsen JK, Bersell KR, et al. Azithromycin causes a novel proarrhythmic syndrome [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2017, 10 (4): e3560.
- [15] Yang T, Chun YW, Stroud DM, et al. Screening for acute IKr block is insufficient to detect torsades de pointes liability: Role of late sodium current [J]. Circulation, 2014, 130 (3): 224-234.
- [16] Rivaud MR, Baartscheer A, Verkerk AO, et al. Enhanced late sodium current underlies pro-arrhythmic intracellular sodium and calcium dysregulation in murine sodium channelopathy [J]. Int J Cardiol, 2018, 263: 54-62.
- [17] Cohen IS, Lin RZ, Ballou LM. Acquired long QT syndrome and phosphoinositide 3-kinase [J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27 (7): 451-459.
- [18] Yang T, Meoli DF, Moslehi J, et al. Inhibition of the α -subunit of phosphoinositide 3-kinase in heart increases late sodium current and is arrhythmogenic [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2018, 365 (3): 460-466.
- [19] Botelho HM, Uliyakina I, Awatade NT, et al. Protein traffic disorders: An effective high-throughput fluorescence microscopy pipeline for drug discovery [J]. Sci Rep, 2015, 5 (1): 1141-1149.
- [20] Foo B, Williamson B, Young JC, et al. hERG quality control and the long QT syndrome [J]. J Physiol, 2016, 594 (9): 2469-2481.
- [21] Cheng YJ, Nie XY, Chen XM, et al. The role of macrolide antibiotics in increasing cardiovascular risk [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66 (20): 2173-2184.
- [22] 王冠, 白融, 王金丽, 等. 克拉霉素致室性心律失常的观察及部分机制探讨 [J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2017, 31 (3): 247-250.
- [23] 张菁, 吕媛, 于凯江, 等. 抗菌药物药代动力学/药效学理论临床应用专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41 (6): 409-446.
- [24] Itoh H, Crotti L, Aiba T, et al. The genetics underlying acquired long QT syndrome: Impact for genetic screening [J]. Eur Heart J, 2016, 37 (18): 1456-1464.
- [25] Strauss DG, Vicente J, Johannesen L, et al. Common genetic variant risk score is associated with drug-induced QT prolongation and torsade de pointes risk: A pilot study [J]. Circulation, 2017, 135 (14): 1300-1310.
- [26] Gagliano-Jucá T, Trivison TG, Kantoff PW, et al. Androgen deprivation therapy is associated with prolongation of QTc interval in men with prostate cancer [J]. J Endocr Soc, 2018, 2 (5): 485-496.
- [27] Salem JE, Yang T, Moslehi JJ, et al. Androgenic effects on ventricular repolarization: A translational study from the international pharmacovigilance database to iP-SC-cardiomyocytes [J]. Circulation, 2019, 140 (13): 1070-1080.
- [28] Marill KA, Miller ES. Hypokalemia in women and methadone therapy are the strongest non-cardiologic factors associated with QT prolongation in an emergency department setting [J]. J Electrocardiol, 2017, 50 (4): 416-423.
- [29] Pezhouman A, Singh N, Song Z, et al. Molecular basis of hypokalemia-induced ventricular fibrillation [J]. Circulation, 2015, 132 (16): 1528-1537.
- [30] Aronsen JM, Skogestad J, Lewalle A, et al. Hypokalaemia induces Ca^{2+} overload and Ca^{2+} waves in ventricular myocytes by reducing Na^{+} , K^{+} -ATPase α activity [J]. J Physiol, 2015, 593 (6): 1509-1521.
- [31] Maffei A, Lembo G, Carnevale D. PI3Kinases in diabetes mellitus and its related complications [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (12): 4098.
- [32] Ramírez J, Orini M, Mincholé A, et al. Sudden cardiac death and pump failure death prediction in chronic heart failure by combining ECG and clinical markers in an integrated risk model [J]. PLoS One, 2017, 12 (10): e0186152.
- [33] Long VP 3rd, Bonilla IM, Vargas-Pinto P, et al. Heart failure duration progressively modulates the arrhythmia substrate through structural and electrical remodeling [J]. Life Sci, 2015, 123: 61-71.
- [34] Cho JH, Zhang R, Kilfoil PJ, et al. Delayed repolarization underlies ventricular arrhythmias in rats with heart failure and preserved ejection fraction [J]. Circulation, 2017, 136 (21): 2037-2050.
- [35] Asano T, Fujishiro M, Kushiyama A, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30 (9): 1610-1616.
- [36] Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2002, 13 (10): 444-451.
- [37] 周蕾, 刘玉环, 黄菲菲, 等. 1 例妊娠合并先天性长 QT 综合征伴低钾血症患者的药学实践 [J]. 中南药学, 2020, 18 (8): 1425-1427.

(收稿日期: 2021-02-08; 修回日期: 2021-03-04)

中药资源开发与利用

茯苓采后的加工生产现状调研和优化建议

徐博^{1,2}, 吴翠^{1,2}, 李卓俊^{1,2}, 宋平平^{1,2}, 巢志茂^{1,2*} (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 国家中药材产业技术体系贮藏与包装岗位, 北京 100700)

摘要: **目的** 调查茯苓采收、初加工、贮藏、包装等环节的生产加工现状, 以促进各环节的规范化和标准化。**方法** 通过实地调研茯苓采后的生产现状, 探究影响其质量的因素, 结合专业知识及文献资料提出改进意见。**结果** 茯苓在采收时应准确判断成熟度, 适时采收。初加工方式有发汗、蒸制和趁鲜切制 3 种方式。现多采用自然晾晒和烘干的方法进行干燥。贮藏过程中易发生受潮、霉变、虫蛀等变质现象。大批量的茯苓以单层或双层塑料编织袋包装最为常见; 零售的包装形式有袋装、瓶装等。茯苓在生产过程中存在着采收提前, 加工不规范, 硫磺、磷化铝过度熏蒸, 缺少贮藏与包装的标准操作规范等问题。**结论** 应从各环节、多角度加强对茯苓生产全过程的质量控制, 制订标准操作规程, 从而保证茯苓药材的质量。

关键词: 茯苓; 采后; 初加工; 贮藏; 包装; 调研

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1877-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.019

Current situation and optimization of the processing of post-harvest *Poria cocos*

XU Bo^{1,2}, WU Cui^{1,2}, LI Zhuo-jun^{1,2}, SONG Ping-ping^{1,2}, CHAO Zhi-mao^{1,2*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Storage & Packaging Section, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System, Beijing 100700)

Abstract: Objective To investigate the current status of *Poria cocos* in harvesting, primary processing, storage, and packaging to promote the standardization of these steps. **Methods** The current situation of harvesting, primary processing, storage, and packaging of *Poria cocos* was investigated. Quality-related problems were exposed. Improvements were proposed based on professional knowledge and literature. **Results** The maturity of *Poria cocos* should be judged and harvested timely. The primary processing included sweating, steaming, and cutting fresh. Nowadays, sun drying and hot air drying were always used to dry *Poria cocos*. During storage, it is easily damaged by damp, mildew, and insects. Commonly *Poria cocos* was packed in single-layer or double-layer plastic woven bags, and the retail packaging included bags and bottles. However, problems like immature harvesting, nonstandard processing, excessive fumigation of sulfur or aluminum phosphide, and lack of standardized storage and packaging still existed. **Conclusion** It is important to establish the standard quality control of *Poria cocos* production.

Key words: *Poria cocos*; post-harvest; primary processing; storage; packaging; investigation

茯苓是多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) 肾经, 具有利水渗湿、健脾、宁心的功效, 临床上 Wolf 的干燥菌核, 性甘、淡, 平, 归心、肺、脾、 常用于治疗水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (No.CARS-21)。

作者简介: 徐博, 女, 博士研究生, 主要从事中药材贮藏与包装研究, E-mail: xubo_345@163.com * 通信作者: 巢志茂, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药材贮藏与包装研究, E-mail: chaozhimao@163.com

泄泻、心神不安、惊悸失眠等症^[1]。作为传统的药食同源品种，茯苓最早记载于《神农本草经》，列为上品，享有“药膳白银”的美誉。现代研究表明，茯苓的主要化学成分为多糖、三萜类、甾醇、氨基酸、脂肪酸等，具有抗肿瘤^[2]、调节免疫^[3]、抗炎^[4]、抗氧化、镇静催眠、提高记忆力等药理活性^[5-6]。

在中医临床上，茯苓的应用广泛，素有“十方九苓”之称。2018 年由国家中医药管理局发布的《古代经典名方（第一批）》中包含茯苓的经典名方比例高达 24%。茯苓与桂枝、牡丹皮等配伍组成桂枝茯苓汤，用于治疗痛经、盆腔炎、子宫肌瘤等妇科疾病^[7]；与人参、白术等组成四君子汤，用于治疗胃炎、糖尿病等疾病^[8-9]。此外，茯苓在保健品、食品、化妆品、兽药等领域也有广泛的应用^[10]。

随着茯苓研发品种的增多，市场对茯苓的需求也与日俱增。20 世纪 50 年代，茯苓的野生资源较为丰富，主要集中在云南、安徽等地。近年来，由于过度采挖，导致野生茯苓大量减少，甚至濒临灭绝，目前市场上已较少见到野生茯苓，大多由人工栽培而得。目前茯苓的栽培主产区有湖南、安徽、云南、湖北、贵州等^[11]。其中，湖南靖州县的茯苓产量居全国之首，被评为“中国茯苓之乡”，靖州茯苓大市场是全国最大的茯苓交易市场，每年集散茯苓近 8 万吨，占全国的 70%，已成为最大的茯苓集散地、加工及出口基地，是茯苓产业链最为完整的区域。靖州的茯苓加工主要是作坊式的分散加工，可根据市场需求加工成多种规格，但存在加工不规范的问题^[12]。在安徽大别山区，大多数茯苓由个体散户进行种植、采收和加工。加工时，由于规模小、方法落后、设备简陋，无法规模化、规范化，导致茯苓的质量存在差异^[13]。在湖北产区，一些农户为提前获得经济收益，在茯苓菌核尚未完全成熟时便进行采收，不但降低了茯苓产量，品质也难以得到保障^[14]。目前关于茯苓生产标准的研究主要集中在菌种培育、种植技术、病虫害防治等方面^[15]，而对采后加工、贮藏和包装的研究较少。故本调研通过实地走访结合文献检索，调查茯苓采后加工贮藏包装的现状，指出存在的问题并提出优化建议，以期控制茯苓药材的质量提供参考。

1 采收

1.1 采收时间

茯苓的采收时间随产地、接种时间及培养材料等不同而存在差异，通常在春、秋两季接

种^[16]。春季接种时间为 4 月下旬至 5 月中旬，采收时间为 10 月下旬至 12 月上旬；秋季接种时间为 8 月下旬至 9 月上旬，采收时间为翌年 4 月下旬至 5 月中下旬。茯苓成熟的标志是苓场中出现裂纹，且裂纹不随时间增大，菌核表皮呈黄褐色，无白色裂纹。成熟的茯苓应及时采挖。若菌核表皮呈黄白色，则表明尚未成熟，需覆盖培养土让其继续生长；若呈黑褐色，表明已成熟过度，应立即采挖并及时处理，以防腐烂。采收的新鲜茯苓，常称为“潮苓”。

1.2 采收方式

当前茯苓主要依靠人工在天气晴朗时采收。若在阴雨天采收，干燥后茯苓表皮颜色变黑，且在阴雨潮湿的环境中，易滋生霉菌，发生霉变。进入采收期后，应根据茯苓的成熟度分批采收，成熟一批采收一批，不可盲目、一次性全部采挖。由于成熟后的茯苓质软肉嫩，使用锄头采挖时，易对其造成损伤，故采挖时应注意保护完整性。成熟的茯苓采收后，应及时填覆培养土，使未成熟的茯苓继续生长。采挖后需除去附着的泥沙并及时进行初加工^[17]。若加工不及时，表皮易快速失水使内部发生龟裂。裂隙处既易滋生霉菌发生霉变，又不利于后期的初加工。

2 初加工

新鲜茯苓的含水量高达 40%~50%，采收后不可直接暴晒或高温烘干，以防因茯苓体积较大，内外失水不均而发生爆裂^[18]。2020 年版《中国药典》一部规定茯苓的初加工方法为：除去泥沙，堆置发汗，摊开晾晒至表面干燥后，再次发汗，反复数次至出现皱纹，阴干，得“茯苓个”。将“茯苓个”润后稍蒸，切制成块或片，晒干即得。或者将新鲜采收的茯苓剥下外皮后，切制成片或立方块，阴干，得茯苓片或茯苓块。

当前，在主产区的主要加工模式有发汗切制、趁鲜切制和蒸制切制 3 种。其中，发汗切制是茯苓的传统加工方法，但耗时较长且需大量人工；趁鲜切制成本低，但加工的成品外观品质欠佳，成品率低^[19]；蒸制切制方法的成品率高，现已逐渐成为主流的加工方法。

2.1 发汗

发汗是茯苓的早期加工方法。其原理为将茯苓进行堆置，堆置时茯苓通过呼吸作用产生热量，使内部水分均匀地向外迁移至表面，然后蒸发，形似人体的“发汗”过程。发汗既有利于保证茯苓内外干燥的均匀性，又可加快干燥速度。

采收后, 由于切断了外界养料的供应, 茯苓内部的组织细胞便通过水解、酶促反应分解多糖以维持生命。研究报道, 发汗后的茯苓中茯苓多糖的质量分数是鲜切的 1.5 倍; 发汗还可改善茯苓的外观性状, 使其色泽变白^[20]。

在安徽的茯苓主产区, 发汗的操作方法为: 根据茯苓数量的多少, 选择合适的、密闭性良好的容器或房间, 在容器底层或房间地面预先均匀铺放稻草, 依次将茯苓和稻草分层码放, 在最上层覆盖稻草或厚麻袋, 待其发汗。当潮苓表面出现菌丝(即白色绒毛)时, 将其取出, 置于阴凉通风处。待表面干燥后, 刷去菌丝, 翻转茯苓再次放入房间或容器内, 再次发汗, 反复操作 3~4 次, 至茯苓表皮皱缩, 颜色变为褐色或黑色, 表皮翘起, 表面有鸡皮状裂纹时即可, 此时已成“茯苓个”。

在云南及周边的茯苓加工时, 有些农户提前将稻草加热, 再将茯苓与稻草相间铺放, 由于稻草经过提前加热, 可加快发汗速度, 称为“火发汗”。在发汗前, 可在多处用针刺破茯苓, 以防发汗时出现空泡或裂隙。天气寒冷时, 应采取防冻措施。秋冬季节发汗时, 应选择保湿、保温的环境, 7 d 后第一次翻动, 之后每隔 2~3 d 翻动一次。翻动时, 每次转动半边即可, 不可上下对翻, 以防茯苓因发汗不均而出现裂隙。春季应选择选择在阴湿处发汗, 2~3 d 翻动一次。若环境过于干燥应均匀喷洒少量的水。

2.2 蒸制

蒸制茯苓的操作方法为将茯苓置于蒸屉上, 武火加热, 隔水蒸至圆汽后, 改用中火。目前关于蒸制时长的说法不一。有研究发现蒸制时间可影响茯苓中浸出物、水溶性多糖、总三萜的含量, 建议蒸制时间不超过 180 min^[21]。在实际蒸制时, 应根据茯苓体积的大小合理把握蒸制时长。蒸制后, 待其稍凉后取出, 除去外皮。外皮干燥后, 得茯苓皮, 可作为药材用于治疗水肿、小便不利等症。蒸制后的茯苓在切制时, 切面光滑、平整且不易碎裂, 但也有研究发现由于茯苓多糖、茯苓酸不耐高温、高压, 蒸制后其含量明显降低^[22-23]。

2.3 切制

切制是将潮苓或茯苓个剥皮后切为薄片或立方块的过程。根据加工模式的不同, 常采用人工和机械两种方式。采用人工切制时, 应遵循“先破后整, 先小后大”的原则, 切片厚度控制在 0.8~2.0 cm。切制时应用力均匀, 保证切面光滑、

平整, 同时应注意保持茯苓片厚度的一致和立方块大小的均匀。现在散户及加工商也有采用茯苓切片切丁一体化的机械设备进行切制, 预先调试切片的厚度, 设置切制参数, 便可实现机械化切片或切丁^[24]。与人工切制相比, 机械切制省时省力, 且成品率高, 在产区应用较为广泛。趁鲜切制由于含水量较大, 易产生碎屑, 成品率低。

2.4 干燥

2.4.1 自然晾晒 天气晴朗时, 将切制后的茯苓丁(片)置于空旷、通风的地方平摊晾晒。当切面出现细小裂纹时, 收回, 置于阴凉处回潮; 待切面回润、复平后再次晾晒, 反复多次, 直至干燥。在晾晒和回潮过程中, 若发现霉变, 应予以剔除, 避免污染其他茯苓。

自然晾晒这种开放式的室外晾晒方法易受气候、天气的制约及风沙、虫鸟等的影响, 占地面积大, 干燥过程缓慢且无法精准控制。茯苓丁(片)若直接置于强光下暴晒, 常会由于内外水分分布不均而出现裂纹或破碎, 且自然晾晒难以彻底杀灭活虫或虫卵。研究表明, 自然晾晒得到的茯苓丁放置一年, 容易发生虫蛀现象^[25]。但由于该法简单易行、投资少、污染小, 是目前茯苓常用的干燥方法。

2.4.2 烘干法 将茯苓丁(片)置于烘箱中, 设置温度 50~80℃, 定时翻动, 保证均匀干燥。干燥时间根据茯苓丁的体积或茯苓片的厚度而定, 以水分含量不超过 18% 为度^[1]。若干燥温度过高, 易使茯苓丁内外脱水不一致, 导致茯苓丁破碎, 故应保持适宜、恒定的干燥温度。相比于自然晾晒法, 烘干法可缩短干燥时间, 且破碎率较低, 可控性强, 现在应用较为广泛。

2.4.3 真空干燥 真空干燥是近年来逐渐用于中药材生产的一种干燥方法。其原理为将中药材置于密闭的低压干燥箱中加热, 使药材内部的水分通过压力差和浓度梯度扩散到表面, 受热后蒸发排出^[26]。采用真空干燥时, 受压力变化的影响, 茯苓表面光滑但平整度较差。

2.4.4 其他干燥方法 自然晾晒及烘干法是茯苓的主要干燥方法。有学者考察了其他干燥技术用于茯苓的可行性, 如远红外热风干燥、气体射流冲击干燥、真空脉动干燥、微波真空干燥, 但这些干燥方法目前仅限于实验室研究, 尚未用于大规模生产, 且由于采用这些干燥技术所需设备昂贵, 成本投入高, 难以实现大批量生产, 因此仍需要继续探索和完善。

3 贮藏

茯苓在产地干燥后,或运输至贮藏库中进行储藏,或运输至中药材交易市场进行销售。在河北安国中药材专业市场,茯苓的经销商或散户从安徽、云南等主产区购进大批量茯苓后,选取 1~2 袋作为样品放于店铺中供采购者参考选购,对不能及时出售的茯苓,放入贮藏库中保存。

温度是影响茯苓多糖含量的关键因素,低温条件可减缓其降解速度^[27],也可减少变质现象,所以大多数商户采用低温的方式贮藏茯苓,温度通常控制在 5~15℃。贮藏库大多由商户自家房间改造,墙壁内配有保温层,采用空调、制冷机等制冷设备降温,除湿机控湿。若贮藏时间较长,则在天气晴朗时取出平摊于室外晾晒。有商户采用磷化铝对贮藏库进行熏蒸,以防虫害。

4 包装

在主产区将茯苓加工后,需进行包装。目前常见的包装材料是塑料编织袋。在调研中发现,大部分编织袋内附有一层内衬塑料薄膜。塑料薄膜的防水、防潮性能较好,还可避免由于外层编织袋划破导致茯苓散落的现象,但也有一部分盛装在单层编织袋中。单层编织袋缝隙较大,防水、防潮效果差,若在运输或贮藏过程中遇到阴雨天气或空气潮湿时,容易受潮,甚至会引发变质现象。采用编织袋盛装的茯苓重量一般在 25~50 kg/袋。对于零售的茯苓,则常采用普通塑料袋(瓶)、玻璃瓶包装,规格为 50~500 g/袋(瓶)。对于粉碎后的茯苓粉,则常采用塑料瓶或玻璃瓶盛装出售。

5 变质现象

5.1 受潮

据文献报道,茯苓中茯苓多糖的含量高,长期暴露在潮湿环境中容易吸湿受潮^[28]。茯苓块在吸潮后不仅容易变形,还易发生变色、霉变、虫蛀等变质现象。因此,在贮藏过程中应严格控制贮藏环境的湿度,定期开窗通风或排湿,定期检测茯苓的水分含量。天气潮湿时密切关注茯苓的状态,若已受潮,及时采取干燥措施,如置于室外晾晒,或通过烘干设备干燥等,以保证茯苓的水分控制在规定范围内。

5.2 霉变

茯苓在贮藏过程中,霉变是常见的变质现象。湿度是霉菌繁殖的关键因素,当贮藏环境的相对湿度低于 70% 时,霉菌的孢子不能出芽,故可通过控制湿度,保持相对湿度在 70% 以下以

抑制霉变。现多采用通风、除湿机或空调排湿等方法除湿^[29]。温度也是影响霉菌生长的因素,在 20~35℃ 时,霉菌最容易生长繁殖。当温度在 10℃ 以下时,可有效抑制霉菌等微生物的滋生,故茯苓的贮藏温度以 5~10℃ 为宜。茯苓本身的含水量高也是引发霉变的因素。当茯苓的水分含量超过 18% 时,霉菌的新陈代谢旺盛,易发生霉变。故在贮藏过程中应密切观察茯苓的水分情况,定期抽检^[30]。

5.3 虫蛀

茯苓丁(片)在贮藏过程中容易发生虫蛀,轻者可将茯苓蛀蚀出现空洞,重者则为粉末,故在贮藏过程应密切关注虫蛀现象,采取科学、规范的措施进行预防。由于害虫喜欢温暖、潮湿的环境,故控制温度、湿度是预防虫蛀的重要措施,也是控制虫蛀的关键。当温度在 22~32℃ 时,害虫开始生长发育;当达到 30~35℃ 时,害虫的生长繁殖最为活跃;当降至 5~15℃ 时,可抑制害虫的生长。在梅雨季节时,空气湿度大,茯苓易受潮出现虫蛀现象,故应严格控制贮藏库的湿度。研究发现,当相对湿度控制在 45%~70% 时,中药材成分稳定,较少发生虫蛀现象,因此建议茯苓的贮藏库相对湿度控制在 45%~70%^[31]。采用干冰对茯苓进行封装和贮藏,可在两年内不发生虫蛀等变质现象^[32]。

6 问题与对策

6.1 缺少规模化的初加工基地

调研发现,在安徽大别山、云南等主产区,个体散户从事茯苓的种植、采收和初加工的现象普遍。由于这些散户的经济实力有限,加工规模小、技术落后^[12],无法进行大规模的集中初加工。部分种植户为提前收益,常在茯苓尚未完全成熟时便进行采挖。茯苓传统的生长周期为 8~12 个月,现多数产区已缩短到 6 个月,甚至在 4~5 个月时便开始采挖,这种采收时间人为提前的做法使得茯苓的生长期变短,产量和质量都无法得到保障。因此,建议相关部门联合当地的种植、加工企业建立规模化的加工基地,对种植散户进行有效整合和规范统一的管理,制订科学合理的采收、加工等操作规范,从而保障茯苓的质量。

6.2 贮藏、包装过程缺少标准操作规程

《中国药典》规定茯苓的贮藏方法为“置于干燥处,防潮”,然而目前关于茯苓的贮藏与包装尚无明确、具体的操作规范和参数标准。贮藏库主要由农户或经销商自行建造或改造而成,缺少标

准的管理规章制度,甚至不具备防鼠、防虫、消防、养护等基本功能,低温、干燥的贮藏环境也无法得到保证。在包装方面,包装的材料和规格尚无明确标准,散户所使用的包装材料各不相同,尤其是无内衬薄膜的包装材料防潮防湿性能差,极易造成茯苓的受潮,并引发进一步的变质现象。同时,在贮藏与包装方面亟需制订一套完整的标准操作规程,规范贮藏和包装的操作和参数。

6.3 加工方法及工艺参数有待优化

在加工方法方面,当前茯苓在各主产区所采用的加工方法并不一致,发汗次数、蒸制时间等工艺参数也不相同,主要依靠农户的经验积累,缺少科学、规范的参数标准。因此,应深入研究发汗次数、蒸制时间等对茯苓质量的影响,从可操作性、投入成本的角度出发,优选出合理的工艺参数,从而将加工过程规范化、标准化。

当前在中药材市场上,茯苓以茯苓丁或茯苓片的形式较为常见,茯苓丁的完整性与其市场价格密切相关。然而在茯苓的加工过程中,如何有效降低破碎率是一个亟待解决的问题。破碎通常是由于茯苓丁在干燥过程中,内外水分、温度分布、体积收缩不均导致的,因此应加大对茯苓干燥技术及工艺的深入研究,降低茯苓丁的破碎率。

6.4 存在硫磺、磷化铝熏蒸现象

为了提高茯苓在初加工时的干燥速度和外观品质,防止贮藏和包装环节中出现变质现象,在初加工时常会对茯苓进行一定程度的硫磺熏蒸。但硫磺属于低毒危化品,可对人体的眼睛、皮肤和呼吸道等多个系统产生强烈的刺激,熏蒸后残留的二氧化硫也会对人体造成一定的伤害,且硫磺及二氧化硫可能会与茯苓中的化学成分发生反应,影响茯苓的安全性。

茯苓在贮藏过程中容易发生虫蛀,尤其是在阴雨、潮湿的季节。在贮藏库中使用磷化铝进行熏蒸是一种常见的现象。但是,磷化铝遇到水或酸会生成毒性极大的磷化氢气体,严重威胁人体的生命安全,尤其是易对贮藏库保管员造成伤害。《中国药典》并未规定对磷化铝的残留进行测定,目前也尚无法明确规定不得使用磷化铝熏蒸,但是,贮藏库管理人员应该充分认识到磷化铝的危害,不用或者尽量少用,使用时应加强防范,熏蒸后要及时充分通风。

7 结论

调研结果表明,茯苓在采收、初加工、贮藏与包装等环节均存在影响质量的因素。准确判断

成熟情况、在合适的时间内采收,是保证茯苓质量的首要因素。采收时,应根据成熟度分批采收。采收后的茯苓应保持通风,防止发生霉变、腐烂等变质现象,及时进行初加工。初加工过程应注意保证茯苓的完整性,降低破碎率。目前常见的加工方式有发汗切制、趁鲜切制和蒸制切制 3 种。发汗是茯苓的传统加工方法;趁鲜切制由于新鲜茯苓的含水量高,在切制过程中容易产生碎屑,且在干燥过程中容易破碎,成品率较低,但相对省时省力;蒸制切制应注意控制蒸制时长。茯苓的常用干燥方法有自然晾晒法及烘干法。自然晾晒法操作简单、投资小、不产生污染,但所需干燥时间较长且无法精准控制;烘干法所需干燥时间短,可控性强但应注意控制干燥温度和速率。在贮藏与包装方面,目前尚无标准的操作规程及参数标准,常会因为贮藏、包装的不规范引发茯苓的受潮、霉变、虫蛀等变质现象。因此,应从各环节、多角度加强对茯苓采后加工的全过程进行质量控制,制订标准操作规程,从而保证茯苓药材和饮片的质量。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 251.
- [2] 魏科,陈勇超,周家豪,等.茯苓多糖辅助抗肿瘤及免疫调节作用研究[J].中华中医药杂志,2020,35(10): 4937-4940.
- [3] Tian H, Liu ZJ, Pu YW, et al. Immunomodulatory effects exerted by *Poria cocos* polysaccharides via TLR4/TRAF6/NF- κ B signaling in vitro and in vivo [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108709.
- [4] Huang YJ, Hsu NY, Lu KH, et al. *Poria cocos* water extract ameliorates the behavioral deficits induced by unpredictable chronic mild stress in rats by down-regulating inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 258: 112566.
- [5] 张年,李兆星,李娟,等.茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(2): 220-233.
- [6] Yang PF, Hua T, Wang D, et al. Phytochemical and chemotaxonomic study of *Poria cocos* (Schw.) Wolf [J]. Biochem Syst Ecol, 2019, 83: 54-56.
- [7] 张崴,宋殿荣,蔺凯丽,等.桂枝茯苓方临床应用文献研究与现状分析[J].中国中药杂志,2020,45(23): 5789-5796.
- [8] 张莉丹,刘培,王伊楠,等.基于网络药理学的四君子汤治疗胃炎的作用机制研究[J].药物评价研究,2020,43(4): 688-694.
- [9] 刘培,孙芮芮,张莉丹,等.基于网络药理学的四君子汤治疗 2 型糖尿病的作用机制研究[J].中草药,2020,51(6): 1548-1558.

- [10] 金剑, 钟灿, 谢景, 等. 我国茯苓炮制加工和产品研发现状与展望[J]. 中国现代中药, 2020, 22(9): 1441-1446.
- [11] 於小波, 咎俊峰, 王金波, 等. 我国茯苓药材主要产区资源调查[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 714-716.
- [12] 欧阳叙回. 湖南靖州发展茯苓产业的启示[J]. 中国林业产业, 2011(5): 72-73.
- [13] 彭慧, 王妍妍, 张越, 等. 安徽大别山区茯苓产业发展的现状与前景[J]. 中南药学, 2018, 16(3): 369-372.
- [14] 王克勤, 尹旭仁, 黄鹤, 等. 湖北茯苓生产现状及产业化发展对策[J]. 中国现代中药, 2012, 14(12): 24-27.
- [15] 程磊, 侯俊玲, 王文全, 等. 我国茯苓生产技术现状调查分析[J]. 中国现代中药, 2015, 17(3): 195-199.
- [16] 田玉桥, 尹火青, 陈三春, 等. 不同生长期采收的茯苓品质比较研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 12-16.
- [17] 唐文锐. “菌核诱引”对茯苓新菌核产量和品质影响的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [18] 贺海花, 杨云, 孙维英, 等. 茯苓趁鲜加工工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(2): 360-361.
- [19] 田玉桥, 尹火青, 陈三春, 等. 茯苓不同初加工方法比较研究[J]. 中药材, 2019, 42(5): 1038-1040.
- [20] 张平, 郑志安, 江庆伍. 茯苓采后不同预处理方式对其品质及干燥特性的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(20): 294-304.
- [21] 邱小燕, 田玉桥, 肖深根, 等. 不同蒸制时间对茯苓和茯苓皮品质的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(6): 858-862.
- [22] 李习平, 张琴, 周逸群, 等. 不同加工方法对白茯苓及茯苓皮中多糖含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(12): 2902-2903.
- [23] 李习平, 庞雪, 周逸群, 等. 不同加工方法对茯苓及茯苓皮中茯苓酸含量的影响[J]. 中国药师, 2015, 18(9): 1453-1455.
- [24] 张平, 郑志安, 张卫鹏, 等. 茯苓采后不同加工工艺模式评价[J]. 农业工程学报, 2016, 32(19): 287-295.
- [25] 张卫鹏. 茯苓干燥技术适应性及真空脉动干燥特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [26] 罗传伟. 花椒真空干燥动力学模型及干燥工艺研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [27] 徐雷, 刘常丽, 刘合刚, 等. 不同温度贮藏条件下茯苓品质变化研究[J]. 北方园艺, 2014, 44(22): 170-173.
- [28] 王坤凤. 茯苓化学成分及质量控制方法研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [29] 于莉, 吴晓毅, 廖永红, 等. 贮藏过程中影响中药材质量的相关因素分析[J]. 中南药学, 2015, 13(5): 547-550.
- [30] 陈俊. 谈中药霉变的原因及预防措施[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(7): 431-432.
- [31] 庞玉扬, 彭志婷, 于军平. 中药饮片虫蛀的原因及预防措施[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(11): 123-126.
- [32] 巢志茂, 王建红, 吴晓毅, 等. 干冰贮存中药材的方法: 中国, CN200910093138. X [P]. 2009-09-30.

(收稿日期: 2021-02-07; 修回日期: 2021-03-07)

2022 年“综述”栏目征稿

《中南药学》杂志是中国科技核心期刊、《世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2020科技版)》期刊,被国内外多个数据库收录。综述,在某种意义上对学科的发展具有重要的指导作用。为了促进学科交流,本刊拟扩大“综述”栏目版面,向全国征集综述文章,投稿后编辑部将快速处理、按时出版。

来稿要求:

1. 药学相关;
2. 带省级以上基金项目;
3. 必须是该领域的新发现,新进展或研究新方向;
4. 作者对该领域有一定的研究和了解;
5. 来稿必须是未经发表的文章,均按照《中南药学》杂志 2021 年 1 期投稿须知要求投稿,请保证文章版权的独立性,严禁抄袭,文责自负,勿一稿多投;
6. 优秀稿件的出版周期将大大缩短;
7. 投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>。

如有任何疑问可联系我们:

Tel: 0731-82258487, 0731-84895602

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

中南药学编辑部

2021.09.06

药物分析与检验

基于聚类分析和主成分分析的广西小叶金花草 高效液相色谱指纹图谱研究

陈锋^{1,2}, 张颖^{1,2}, 李嘉^{1,2*} (1. 广西壮族自治区中医药研究院化学所, 南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

摘要: **目的** 建立小叶金花草的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 综合评价其质量。 **方法** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”建立广西产小叶金花草的 HPLC 指纹图谱, 色谱柱为 Agilent XBD-C₁₈, 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液 (梯度洗脱), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 260 nm, 柱温为 25 °C, 用对照品定性部分共有峰, 并采用 SPSS 软件进行聚类分析和主成分分析。 **结果** 共确定了 11 个共有峰, 指认了其中 4 个共有成分 (1、4、5、8 号共有峰分别为原儿茶酸、香草酸、咖啡酸和菊苣酸); 13 批药材可聚为三类; 提取出 3 个主成分, 累积方差贡献率达到 84.643%。 **结论** 该方法简便、快捷, 结合聚类分析和主成分分析可为药材的质量评价提供参考。

关键词: 小叶金花草; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1883-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.020

HPLC fingerprint of *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. from Guangxi based on cluster analysis and principal component analysis

CHEN Feng^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, LI Jia^{1,2*} (1. Department of Chemistry, Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022; 2. Guangxi Key Laboratory of the Quality Standard of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. to evaluate its quality comprehensively. **Methods** HPLC fingerprints of *Onychium japonicum* from Guangxi were established by Similarity Evaluation System Chromatographic Fingerprint of TCM software, and detected by Agilent XDB-C₁₈ column with mobile phase consisting of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 260 nm, and the column temperature was 25 °C. Some common peaks were identified by reference substances. Cluster analysis and principal component analysis were performed by SPSS software. **Results** Totally 11 common peaks were determined, 4 common peaks (peak 1, 4, 5, 8) were identified as protocatechuic acid, vanillic acid, caffeic acid and cichoric acid; 13 batches of medicinal materials clustered into 3 groups; 3 principal components were extracted and the cumulative contribution rate was 84.643%. **Conclusion** This method is simple and rapid, which can provide reference for the quality evaluation of *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. from Guangxi combining the cluster analysis and principal component analysis.

Key words: *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze.; HPLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

基金项目: 桂澳中药质量研究联合实验室建设 (桂科 AD17195002); 广西食品药品监督管理局项目 (No. MZY2017002-8)。

作者简介: 陈锋, 男, 副主任药师, 主要从事植物化学和药物分析方面的研究, E-mail: 120765361@qq.com *通信作者: 李嘉, 女, 主任药师, 主要从事植物化学、中药新药开发方面的研究, E-mail: 810040681@qq.com

小叶金花草来源于中国蕨科植物野雉尾金粉蕨 *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. 的全草, 别名金花蕨、小野鸡尾、日本乌蕨等, 为广西壮族和瑶族地区民间常用中药, 其味苦, 具有清热解毒、利湿、止血的功效, 用于治疗风热感冒、肺热咳嗽、急性肠胃炎、黄疸、便血等^[1]。小叶金花草在全区范围广泛分布, 多野生于林下、河边、山坡灌丛阴处或石山上, 主要含有黄酮、萜类、香豆素、酚酸和糖苷等化学成分。药理研究表明小叶金花草其提取物具有抗炎镇痛、解痉和解毒等作用^[2-5]。目前未见小叶金花草在质量评价方面的相关报道, 药材中的化学成分直接关系着药效, 而中药化学成分复杂, 单个或少数指标成分很难全面反映药材的质量。中药指纹图谱是研究中药质量标准的手段之一, 它能反映中药的整体化学特征, 可以在一定程度上区分中药的真伪与优劣, 达到对质量的评价和控制^[6-7]。主成分分析方法结合 HPLC 指纹图谱既能降低原始数据处理的量级, 又能保留大部分主要信息, 解决中药质量在多元评价当中遇到的很多问题^[8]。该模式能将化学成分群与药物药理进行分类, 这有助于药效基础的研究和新药的开发^[9]。本研究建立了广西 13 批不同产地小叶金花草药材的 HPLC 指纹图谱, 并用对照品定性了其中部分共有峰, 运用中药色谱指纹相似度评价系统软件及 SPSS 统计软件进行聚类分析和主成分分析, 旨在为其质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 系列四元梯度泵高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); XS205 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KS-500DE 型超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司); KDM 型调温电热套 (山东鄞城华鲁电热仪器有限公司)。

1.2 试药

原儿茶酸 (批号: 110809-201205, 纯度: 99.9%)、香草酸 (批号: 110776-201503, 纯度: 99.8%) (对照品, 中国食品药品检定研究院); 咖啡酸 (批号: MUST-18032003, 纯度: 99.48%); 菊苣酸 (批号: MUST-18031720, 纯度: 99.33%) (对照品, 成都曼思特生物科技有限公司); 乙腈 (美国 Fisher 公司, 色谱纯), 磷酸为分析纯, 水为超纯水。药材经广西中医药大学韦松基教授鉴定为中国蕨科植物野雉尾金粉蕨 *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze. 的全草, 具体信息见表 1。

2 方法

表 1 小叶金花草基原信息

Tab 1 Material source information of *Onychium japonicum* (Thunb.) Kze.

编号	部位	采集地点	采集时间
S1	全草	桂林市恭城县栗木镇	2017 年 11 月
S2	全草	桂林市恭城县三江乡	2017 年 10 月
S3	全草	桂林市恭城县嘉会镇	2017 年 11 月
S4	全草	河池市都安县澄江镇	2018 年 12 月
S5	全草	河池市都安县菁盛乡	2018 年 12 月
S6	全草	河池市宜州区德胜镇	2019 年 1 月
S7	全草	河池市宜州区石别镇	2019 年 1 月
S8	全草	来宾市兴宾区凤凰镇	2018 年 5 月
S9	全草	南宁市马山县金钗乡	2018 年 12 月
S10	全草	桂林市灵川县海洋乡	2018 年 6 月
S11	全草	玉林市博白县径口镇	2019 年 12 月
S12	全草	柳州市鹿寨县江口乡	2019 年 12 月
S13	全草	桂林市荔浦县蒲芦乡	2019 年 12 月

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.4% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10%A; 10 ~ 60 min, 10% → 30%A; 60 ~ 105 min, 30%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 260 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 称取小叶金花草粉末 1.0 g, 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 30 mL, 称重, 加热回流 1.5 h, 放冷, 再次称重后补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液 分别取原儿茶酸、香草酸、咖啡酸、菊苣酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制得含上述 4 种成分质量浓度分别为 5.07、8.26、6.53、32.46 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 过滤, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取供试品 (S7) 适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果表明, 以 8 号菊苣酸色谱峰为参照峰时, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.00% ~ 0.41% 和 0.27% ~ 0.61%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取供试品 (S7) 溶液, 分别于制备 0、2、4、8、12、24 h 后, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 记录色谱图。结果表明, 以 8 号菊苣酸色谱峰为参照峰时, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.96% ~ 2.3% 和 0.37% ~ 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 分别称取同一批供试品

(S7) 6 份, 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。结果以 8 号菊苣酸色谱峰为参照峰时, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别为 0.24% ~ 0.77% 和 1.3% ~ 3.6%, 表明该方法重复性良好。

3 结果与分析

3.1 HPLC 指纹图谱的生成及相关分析

取 13 批药材样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。将色谱图导入“中药色谱指纹相似度评价系统(2012 版)”软件进行分析, 以 S7 号色谱图为参照图谱, 采用多点校正法进行色谱峰匹配, 选择中位数法生成对照图谱 R。13 批药材样品相似度在 0.848 ~ 0.992, 结果见表 2, 其中 10 批药材样品相似度大于 0.9, 表明不同批次药材样品间差异不大。共确定了 11 个共有峰, 其中 1、4、5、8 号峰分别为原儿茶酸、香草酸、咖啡酸和菊苣酸, 混合对照品溶液色谱图见图 1, 13 批药材样品叠加指纹图谱见图 2。其中 8 号峰峰面积较大, 且分离度和对称因子均符合要求, 故设为参照峰。

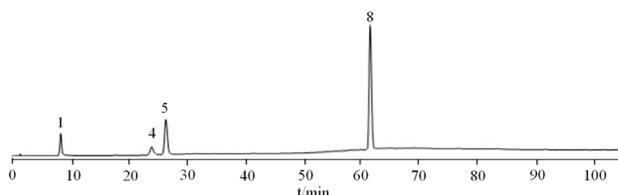


图 1 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed control

1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 4. 香草酸 (vanillic acid); 5. 咖啡酸 (caffeic acid); 8. 菊苣酸 (cichoric acid)

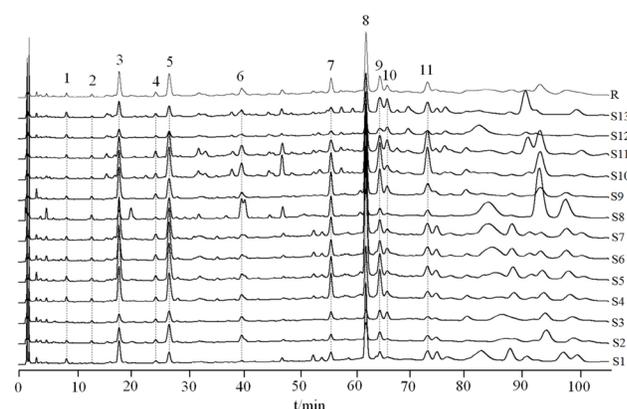


图 2 13 批样品的 HPLC 叠加指纹图谱

Fig 2 HPLC superimposed fingerprint of 13 batches of samples

3.2 聚类分析

以 11 个共有峰的相对峰面积为原始数据, 导入 SPSS 25.0 软件, 用平方欧式距离法测量, 用组间数联接法对 13 批小叶金花草进行聚类分析, 结果见图 3。13 批药材样品可聚类为三类: S2、

表 2 13 批样品 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度

Tab 2 HPLC fingerprint similarity of 13 batches samples to the reference fingerprint

批号	相似度
1	0.951
2	0.904
3	0.878
4	0.965
5	0.973
6	0.982
7	0.973
8	0.848
9	0.992
10	0.963
11	0.963
12	0.894
13	0.932

S3、S8、S12、S13 聚为一类, 这一类相似度结果均小于 0.94; S1、S4、S6、S9、S10、S11 聚为一类; S5、S7 聚为一类。

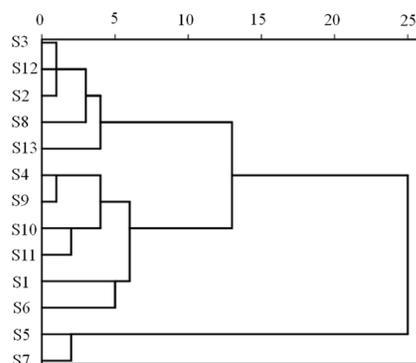


图 3 13 批药材样品聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis of 13 batches of samples

3.3 主成分分析

经 SPSS 25.0 软件对各共有峰峰面积进行标准化处理后, 对 13 批小叶金花草药材指纹图谱的 11 个共有峰进行主成分分析, 得出相关矩阵的特征性及其方差, 部分结果见表 3。前三个因子累积方差贡献率达到 84.643%, 且特征根均大于 1, 可代表共有峰的大部分信息, 故选择该 3 个主成分因子。主成分载荷矩阵见表 4, 它反映了各变量对主成分的贡献程度, 由表 4 可知, 主成分 1 主要反映了香草酸、咖啡酸、菊苣酸和 2、3、7、9、11 号峰的信息; 主成分 2 主要反映了原儿茶酸的信息; 主成分 3 主要反映了 6、10 号峰的信息。通过成分得分系数矩阵计算综合得分可以评价药材的整体质量^[10-11], 结果见表 5。

4 讨论

4.1 提取条件和流动相优化

表 3 主成分特征值及方差

Tab 3 Analysis of principal components and variance

主成分	特征根值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	4.994	45.397	45.397
2	2.341	21.279	66.676
3	1.976	17.967	84.643
4	0.647	5.884	90.527

表 4 主成分载荷矩阵

Tab 4 Principal components loading matrix

峰号	载荷		
	1	2	3
1	0.388	0.728	-0.085
2	0.440	-0.802	0.018
3	0.867	0.166	-0.419
4	0.860	0.101	0.017
5	0.897	-0.297	-0.126
6	0.121	-0.698	0.656
7	0.865	-0.321	0.085
8	0.842	0.206	-0.388
9	0.702	0.284	0.471
10	-0.053	0.537	0.780
11	0.622	0.201	0.598

表 5 13 批小叶金花草主成分得分、综合得分及排名

Tab 5 Factor score, comprehensive score and ranking of principal components in 13 batches of samples

编号	主成分得分			综合得分	排名
	1	2	3		
S1	-0.711	1.085	-0.820	-0.283	10
S2	-0.937	-0.824	-0.440	-0.803	12
S3	-0.147	-0.379	-0.055	-0.186	9
S4	0.673	-0.066	-0.084	0.327	5
S5	1.396	0.340	-1.352	0.547	3
S6	0.616	-0.104	-1.110	0.069	8
S7	0.888	-0.210	-0.890	0.235	7
S8	-0.522	-2.585	0.455	-0.833	13
S9	0.618	0.107	0.030	0.364	4
S10	0.968	0.038	1.899	0.932	1
S11	0.674	0.242	1.574	0.756	2
S12	-1.640	0.793	-0.183	-0.719	11
S13	-0.649	1.563	0.975	0.252	6

在供试品溶液的制备过程中，考察了提取方式（超声提取、加热回流），提取溶剂（水、甲醇、乙醇），溶剂用量（20、30、40 mL）及提取时间（0.5、1、1.5、2 h）等因素对供试品制备的影响，以 HPLC 色谱图共有峰的个数和各峰面积作为评价指标，最终确定了本研究中的制备方法。还考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.4% 磷酸溶液体系作为流动相对化合物分离效果的影响，结果以乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时，各共有峰有较好的对称性和分离度。

4.2 分析方法评价

本文对 13 批小叶金花草药材的指纹图谱进行分析，其中 10 批药材相似度大于 0.9，说明大部分

样品具有较好的相似性。主成分分析显示，前 3 个成分因子的累积方差贡献率达到 84.643%，其中，经对照品比对出 4、5、8 号共有峰分别为香草酸、咖啡酸和菊苣酸，推断主成分 1 主要反映了其中酚酸类成分的信息，其方差贡献率达到 45.397%，是影响质量的主要因素，这些酚酸类成分都是药材发挥功能主治的基础^[12-15]，提示以菊苣酸为代表的酚酸类成分对小叶金花草药材的质量控制有重要意义。13 批样品可聚类为三类，小叶金花草中主要有效成分含量存在批间差异，可能与不同生长阶段、不同的生长环境有关，其原因有待进一步探究^[16]。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准第二册[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 32-34.
- [2] 葛越, 蒋金和, 陈业高, 等. 金粉蕨属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 39(4): 753-756.
- [3] 邓晰朝. 野雉尾金粉蕨配子体发育及其系统学研究[J]. 广西植物, 2016, 36(1): 96-100.
- [4] 李明潺, 唐生安, 段宏泉. 野雉尾金粉蕨化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 685-688.
- [5] 方玉, 程佩佩, 夏叶, 等. 野鸡尾研究进展[J]. 医药导报, 2016, 35(11): 1226-1229.
- [6] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [7] 张萍, 罗敏, 胡克特, 等. 西南鬼灯檠 UPLC-ECD 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J]. 中南药学, 2021, 19(1): 62-66.
- [8] 孔浩, 郭庆梅, 王慧慧, 等. 主成分分析法在中药质量评价中的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 890-892.
- [9] Leszek B, Marcin K, Urszula JP, et al. Pharmacological classification of drugs by principal component analysis applying molecular modeling descriptors and HPLC retention data[J]. J Chromatogr Sci, 2011, 49(10): 758-763.
- [10] 杨中荣, 毛广运, 臧桐华, 等. 用 SAS 和 SPSS 软件进行主成分分析[J]. 中国卫生统计, 2009, 26(2): 212-213.
- [11] 傅静, 张莹, 李宇辉, 等. 基于聚类分析和主成分分析的壮瑶药三妹木 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2019, 30(17): 2355-2359.
- [12] Mirza AC, Panchal SS. Safety assessment of vanillic acid subacute oral toxicity studies in wistar rats[J]. Turk J Pharm Sci, 2020, 17(4): 432-439.
- [13] Khan AK, Rashid R, Fatima N, et al. Pharmacological activities of protocathechuic acid[J]. Acta Pol Pharm, 2015, 72(4): 643-650.
- [14] 包伊凡, 沈新春, 汪芳. 咖啡酸及其主要衍生物的研究进展及开发前景[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(10): 1825-1833.
- [15] 王玉真, 高爽, 李凌军, 等. 菊苣酸生物活性及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(15): 1729-1733.
- [16] 李雁群, 吴鸿. 药用植物生长发育与有效成分积累关系研究进展[J]. 植物学报, 2018, 53(3): 293-304.

(收稿日期: 2021-01-05; 修回日期: 2021-03-05)

不同厂家清热解毒口服液的质量分析与评价

朱伟堃, 周欣, 王劲, 曲智雅, 赵丹彤, 王素香 (菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东 菏泽 274000)

摘要: **目的** 分析不同厂家清热解毒口服液的整体质量及存在的问题。**方法** 对 16 个厂家 42 批次样品采用法定标准检验, 并对山银花违规投料、多成分含量测定、抑菌剂、山麦冬违规投料等进行探索性研究, 对检验结果进行统计分析和评价。**结果** 按法定标准检验, 样品合格率 100%, 但探索性研究合格率有所下降, 厂家间样品质量差异较大。**结论** 部分厂家清热解毒口服液的内在质量有待进一步提高, 法定标准可控性一般, 应增加有关补充检验方法, 以提高标准的可控性, 保证药品的安全性和有效性。

关键词: 清热解毒口服液; 不同厂家; 质量分析; 探索性研究

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1887-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.021

Quality evaluation of Qingre Jiedu oral liquid from different manufactures

ZHU Wei-kun, ZHOU Xin, WANG Jin, QU Zhi-ya, ZHAO Dan-tong, WANG Su-xiang (Heze Institute for Food and Drug Control, Heze Shandong 274000)

Abstract: Objective To determine the overall quality and problem of Qingre Jiedu oral liquid from different manufactures. **Methods** Stipulated standard methods were used to test 42 batches of Qingre Jiedu oral liquid from 16 manufactures. The illegally added *Lonicerae flos* and *Liriope Radix*, multicomponents and antibacterial agents, etc. were determined and the quality was evaluated. **Results** According to legal standards, the pass rate of samples reached 100%, but the qualification rate of exploratory research decreased. The exploratory research results showed significant differences in the quality among manufactures. **Conclusion** The quality of Qingre Jiedu oral liquid from some manufactures needs improvement. To improve the controllability of the standard and ensure the safety and effectiveness of drugs, supplementary tests should be added.

Key words: Qingre Jiedu oral liquid; different manufactures; quality analysis; exploratory research

清热解毒口服液属清热解毒类中成药, 收载于《中国药典》2020 年版一部^[1]。清热解毒口服液由石膏、金银花、玄参、地黄、黄芩、栀子、连翘等 12 味中药组成, 具有清热解毒之功效, 用于热毒壅盛所致的发热面赤、烦躁口渴、咽喉肿痛; 流感、上呼吸道感染见上述证候者。该药使用量较大, 生产厂家众多, 据统计, 目前全国有 211 家生产企业。本研究采用《中国药典》方法对 2020 年山东省市场上流通的 16 个厂家共 42 批次清热解毒口服液的相关质量指标进行测定, 分析不同厂家各项检验指标存在的差异, 并开展了有关探索性研究, 以评价现有质量标准对药品质量控制的合理性和有效性, 为生产企业提升药品质量提

供思路, 为监管部门日常监管提供有力依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 infinity II 高效液相色谱仪连接二极管阵列检测器和蒸发光散射检测器 (美国 Agilent 公司), 岛津 20AD 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司), API4000 电喷雾三重四极杆质谱仪 (美国 Sciex 公司), XS105 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), Seven Excellence 多参数测试仪 (瑞士 Mettler Toledo 公司), 超纯水仪 (美国 Merck Millipore 公司)。

1.2 试药

绿原酸 (批号: 110753-202018, 含量以 96.1% 计)、栀子苷 (批号: 110749-201919, 含量以 97.1%

基金项目: 2020 年山东省药品质量风险监测资助项目。

作者简介: 朱伟堃, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 主要从事中药质量控制研究, E-mail: 450836450@qq.com

计)、连翘苷(批号: 110821-201816, 含量以 95.1% 计)、黄芩苷(批号: 110715-201821, 含量以 95.4% 计)、灰毡毛忍冬皂苷乙(批号: 111814-201604, 含量以 94.4% 计)、短葶山麦冬皂苷 C(批号: 111908-201102)、山麦冬皂苷 B(批号: 111907-201804)、苯甲酸(批号: 100419-201703, 含量以 99.9% 计)、山梨酸(批号: 190126-201501, 含量以 99.6% 计)、4-羟基苯甲酸甲酯(批号: 100278-201906, 含量以 99.9% 计)、4-羟基苯甲酸丁酯(批号: 110792-200503, 含量以 100.0% 计)对照品及麦冬对照药材(批号: 121013-201711)(中国食品药品检定研究院)。

麦冬皂苷 D(批号: PS200310-09, 含量以 99.58% 计)、4-羟基苯甲酸丙酯(批号: AP161229-08, 含量以 99.34% 计)、4-羟基苯甲酸乙酯(批号: AP170618-09, 含量以 99.82% 计)、4-羟基苯甲酸异丁酯(批号: CN170213-21, 含量以 99.53% 计)、4-羟基苯甲酸异丙酯(批号: CN180113-06, 含量以 99.60%)(对照品, 斯坦福分析化学公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司), 磷酸(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

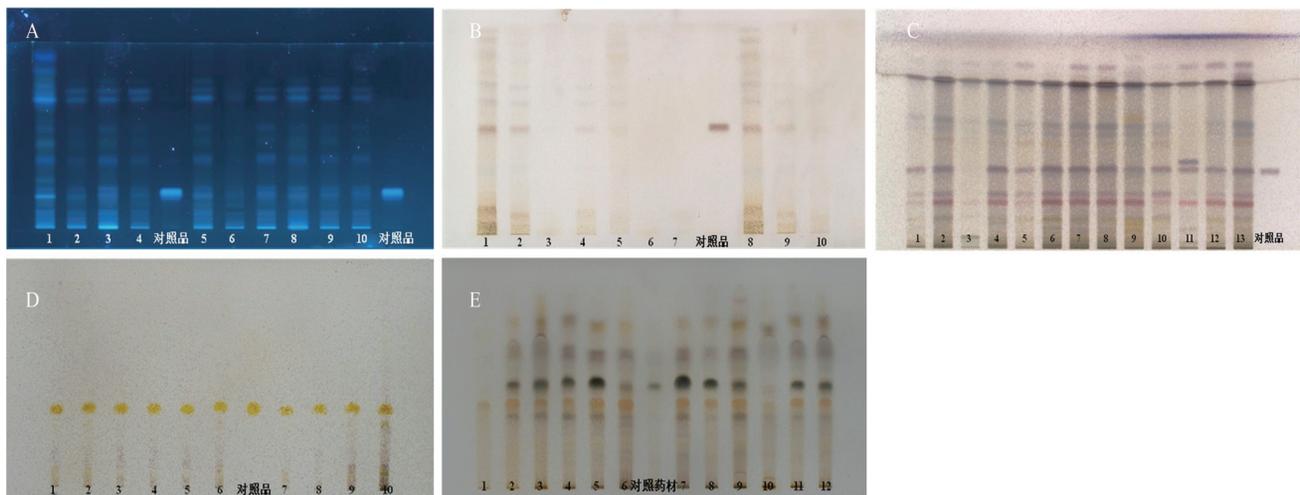


图 2 清热解毒口服液薄层色谱图

Fig 2 Thin layer chromatogram of Qingre Jiedu oral liquid

A. 绿原酸(chlorogenic acid); B. 栀子苷(geniposide); C. 连翘苷(forsythoside); D. 菝葜皂苷元(smilogenin); E. 麦冬(ophiopogonis radix)

2.1.3 pH 值 标准规定: 应为 4.5 ~ 6.5。依法检验, 结果 42 批次清热解毒口服液的 pH 值介于 5.0 ~ 5.8, 均符合规定(见图 3A)。各批次样品 pH 值分布较为集中, 说明各厂家对于样品 pH 值控制得较好。

2.1.4 含量测定 标准规定: 本品每 1 mL 含黄芩以黄芩苷($C_{21}H_{18}O_{11}$)计, 不得少于 1.0 mg。照《中国药典》2020 年版四部通则 0512 外标法测定^[2]。42 批次样品中黄芩苷含量在 1.1 ~ 3.7 mg · mL⁻¹,

所用饮片均购自亳州市中药材市场, 并经菏泽市食品药品检验检测研究院马海春副主任中药师鉴定为正品。清热解毒口服液样品来自 2020 年山东省内市场流通抽样, 共 16 个厂家的 42 批次样品。

2 方法与结果

2.1 法定标准检验

2.1.1 性状 标准规定: 本品为棕红色的液体; 味甜、微苦。依法检验, 部分样品性状见图 1。结果 42 批次样品均符合规定, 但厂家间样品性状差异较大, 说明各厂家生产工艺有所差异。



图 1 部分样品性状图

Fig 1 Characters of some samples

2.1.2 薄层色谱 按《中国药典》2020 年版一部【鉴别】项下薄层色谱法进行检验, 42 批次样品均符合有关规定。部分批次薄层图谱见图 2。部分厂家绿原酸、栀子苷、连翘苷和麦冬的斑点颜色较浅, 说明各厂家原料投料质量及工艺差异较大。

均符合规定(见图 3B)。各批次样品中黄芩苷含量分布较为离散, 进一步说明各厂家黄芩投料质量和生产工艺差异较大。

2.2 探索性研究

基于法定标准检验中发现的问题, 薄层色谱中各批次样品绿原酸、栀子苷、连翘苷斑点深浅不一的情况, 并结合合剂项下的有关规定, 本文开展了山银花违规投料的筛查, 绿原酸、栀子苷、连翘苷的含量测定, 抑菌剂的使用规范性和山麦

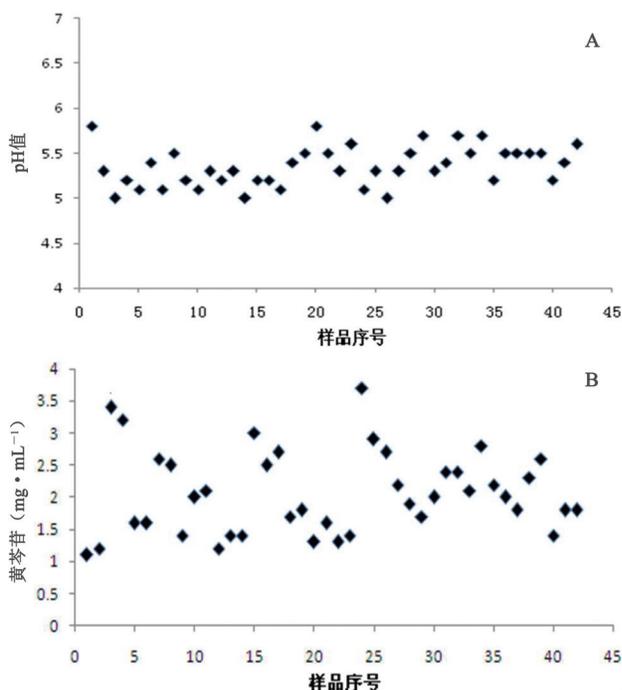


图3 42 批次样品 pH 值和黄芩苷含量测定结果
Fig 3 pH and baicalin content of 42 batches samples

冬违规投料的筛查等有关探索性研究。

2.2.1 山银花违规投料的筛查 清热解毒口服液处方中金银花用量较大，与其同科植物山银花，两者长期混用^[3-4]。《中国药典》2005 年版一部按照“一物一名”的原则已将金银花和山银花明确区分为两个品种^[5]。因此，在药品生产时应严格按照处方工艺进行生产。两者在药材时相对较好区分，但制成制剂后现有标准无法将两者区分。

本文以山银花特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙为指标^[6-7]，建立了清热解毒口服液中山银花违规投料的筛查方法，方法学验证均符合要求。主要测定条件：Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱，以乙腈为流动相 A，水为流动相 B，梯度洗脱，流速为 1.0 mL · min⁻¹。蒸发光散射检测器检测，漂移管温度为 60 °C，气体流速为 1.6 L · min⁻¹，典型图谱见图 4。研究发现，有 2 家企业的 4 批次样品检出山银花特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙，检出率 9.5% (见表 1)。由此可知，尽管山银花和金银花已经明确区分为两个品种，但仍有部分企业主观或客观地将两者混用。因此，清热解毒口服液中增加山银花筛查项目尤为必要。

2.2.2 绿原酸、栀子苷和连翘苷的含量测定 本文建立了绿原酸、栀子苷、连翘苷和黄芩苷同时测定的方法^[8-10]，且方法学验证均符合有关要求。主要测定条件：Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱，以甲醇为流动相

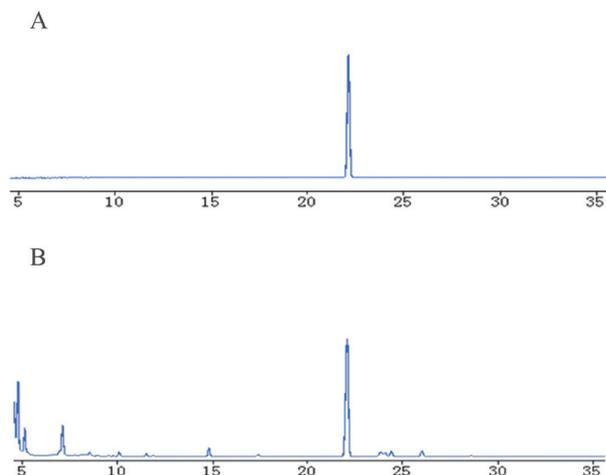


图4 清热解毒口服液中山银花筛查典型 HPLC 图谱
Fig 4 HPLC chromatogram of *Lonicerae flos* in Qingre Jiedu oral liquid
A. 灰毡毛忍冬皂苷乙 (lonicera saponins B); B. 阳性样品 (positive sample)

表 1 清热解毒口服液中山银花违规投料筛查结果

Tab 1 <i>Lonicerae flos</i> illegal added in Qingre Jiedu oral liquid		
厂家	序号	灰毡毛忍冬皂苷乙含量 / (mg · mL ⁻¹)
A	1	0.854
	2	0.740
O	35	0.076
	36	0.063

A, 0.1% 磷酸为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 326 nm (0 ~ 25 min, 测定绿原酸)、238 nm (25 ~ 35 min, 测定栀子苷)、230 nm (35 ~ 45 min, 测定连翘苷)、276 nm (45 ~ 70 min, 测定黄芩苷)。典型图谱见图 5。

将新建的方法和《中国药典》方法测得的黄芩苷含量，用 SPSS statistics 19.0 进行了差异显著性分析，结果 $P = 0.379 > 0.05$ ，说明两种方法的测定结果无显著性差异，进一步说明建立的方法准确、可行。此外，结合自制的模拟样品，制订了相关限度，规定清热解毒口服液中绿原酸不得低于 0.25 mg · mL⁻¹，栀子苷不得低于 0.20 mg · mL⁻¹，连翘苷不得低于 0.02 mg · mL⁻¹。结果 42 批次样品中，有 8 家企业的 21 批次样品中绿原酸含量低于拟订限度，2 家企业的 3 批次样品中栀子苷含量低于拟订限度，1 家企业的 2 批次样品连翘苷含量低于拟订限度，不合格率达 50%，频率分布直方图见图 6。统计发现，企业内批次间 4 种成分含量差异较小，但企业间 4 种成分含量差异较大。

鉴于上述结果，本研究对企业间 4 种成分的含量进行了统计 (多于 1 批次样品的生产企业采用多批次样品含量均值)，见图 7。发现各企业 4 种成分含量高低有一定的相关性，对 4 种成分含量进行

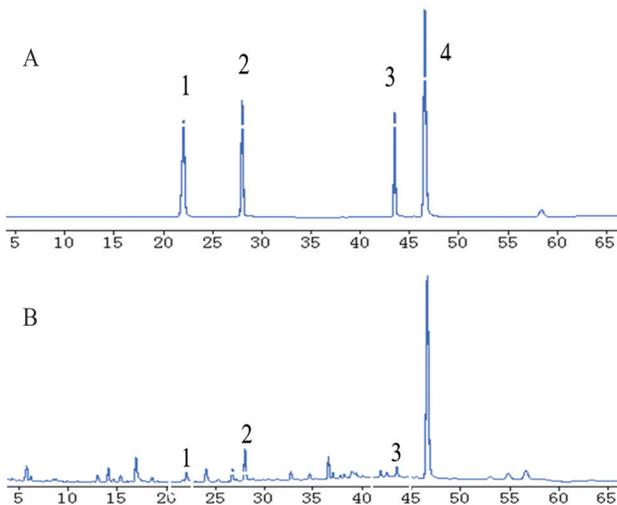


图 5 清热解渴口服液中多含量测定 HPLC 图谱
Fig 5 HPLC chromatogram of multicomponent in Qingre Jiedu oral liquid
1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 栀子苷 (geniposide); 3. 连翘苷 (forsythin); 4. 黄芩苷 (baicalin); A. 对照品 (reference substance); B. 样品 (sample)

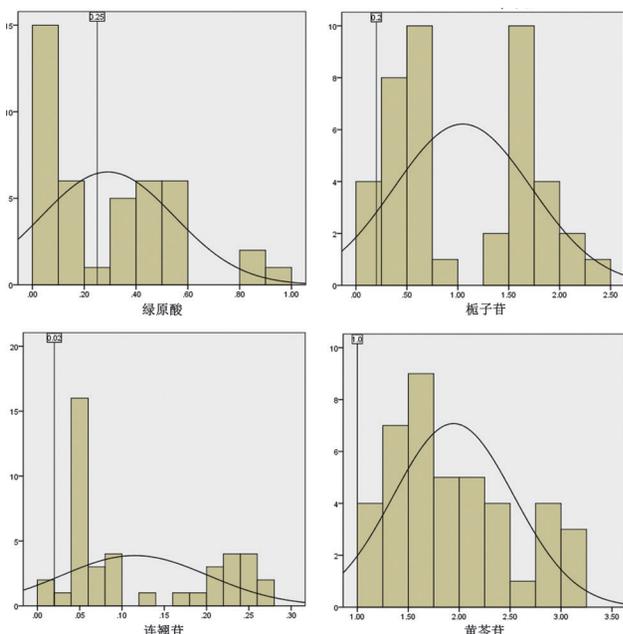


图 6 42 批次样品 4 种成分含量分布直方图
Fig 6 Histogram of 4 components in 42 batches samples

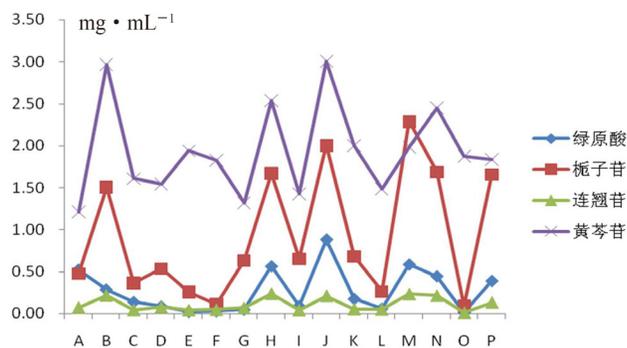


图 7 厂家间样品含量结果比较
Fig 7 Sample content from different manufactures

了相关性分析, 结果表明各成分间存在显著正相关 (见表 2), 说明样品的优劣是整体性的, 而非个别指标的优劣。因此, 厂家应从投料、工艺等各方面进行整体改进, 才能够真正提高样品的质量。

表 2 相关性分析结果 (n = 42)
Tab 2 Correlation analysis (n = 42)

成分	绿原酸	栀子苷	连翘苷	黄芩苷
绿原酸	1	0.828**	0.737**	0.614**
栀子苷		1	0.814**	0.655**
连翘苷			1	0.692**
黄芩苷				1

注 (Note): **P < 0.01。

2.2.3 抑菌剂的检查 《中国药典》2020 年版四部合剂项下规定, 山梨酸和苯甲酸的用量不得超过 0.3%, 羟苯酯类的用量不得超过 0.05%。参考有关文献^[11-13], 以山梨酸、苯甲酸、4-羟基苯甲酸甲酯、4-羟基苯甲酸乙酯、4-羟基苯甲酸丙酯、4-羟基苯甲酸丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、4-羟基苯甲酸异丙酯为指标, 建立清热解渴口服液中测定 8 种抑菌剂的液相-质谱联用方法, 方法学验证符合有关要求。主要测定条件, 色谱: RESTEK Allure PFPP (2.1 mm × 100 mm, 5 μm) 色谱柱; 以 0.01 mol · L⁻¹ 醋酸铵为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL · min⁻¹。质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子扫描, 多反应监测模式 (MRM)。典型图谱见图 8。

研究发现, 42 批次样品中, 山梨酸和羟苯酯类抑菌剂均未检出, 苯甲酸有 22 批次样品检出, 但均符合规定, 苯甲酸检出结果详见图 9, 说明各厂家在抑菌剂的使用方面较为规范。

2.2.4 山麦冬违规投料的筛查 麦冬和山麦冬性状较为相近, 但《中国药典》2020 年版一部规定两者为不同的药味, 故在药品生产过程中应严格按照配方投料, 不可混用。但近年来山麦冬产量较大, 有部分厂家会使用山麦冬代替或混入麦冬进行投料。参考有关文献^[14-16], 选取了山麦冬特征成分山麦冬皂苷 B (湖北麦冬) 和短葶山麦冬皂苷 C (短葶山麦冬), 麦冬特征成分麦冬皂苷 D, 以此为指标建立清热解渴口服液中山麦冬筛查的液相-质谱联用方法, 方法学验证均符合有关规定。色谱条件: Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 甲酸 (75:25) 为流动相, 流速为 0.3 mL · min⁻¹。质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子扫描, 多反应监测模式 (MRM)。典型图谱见图 10。

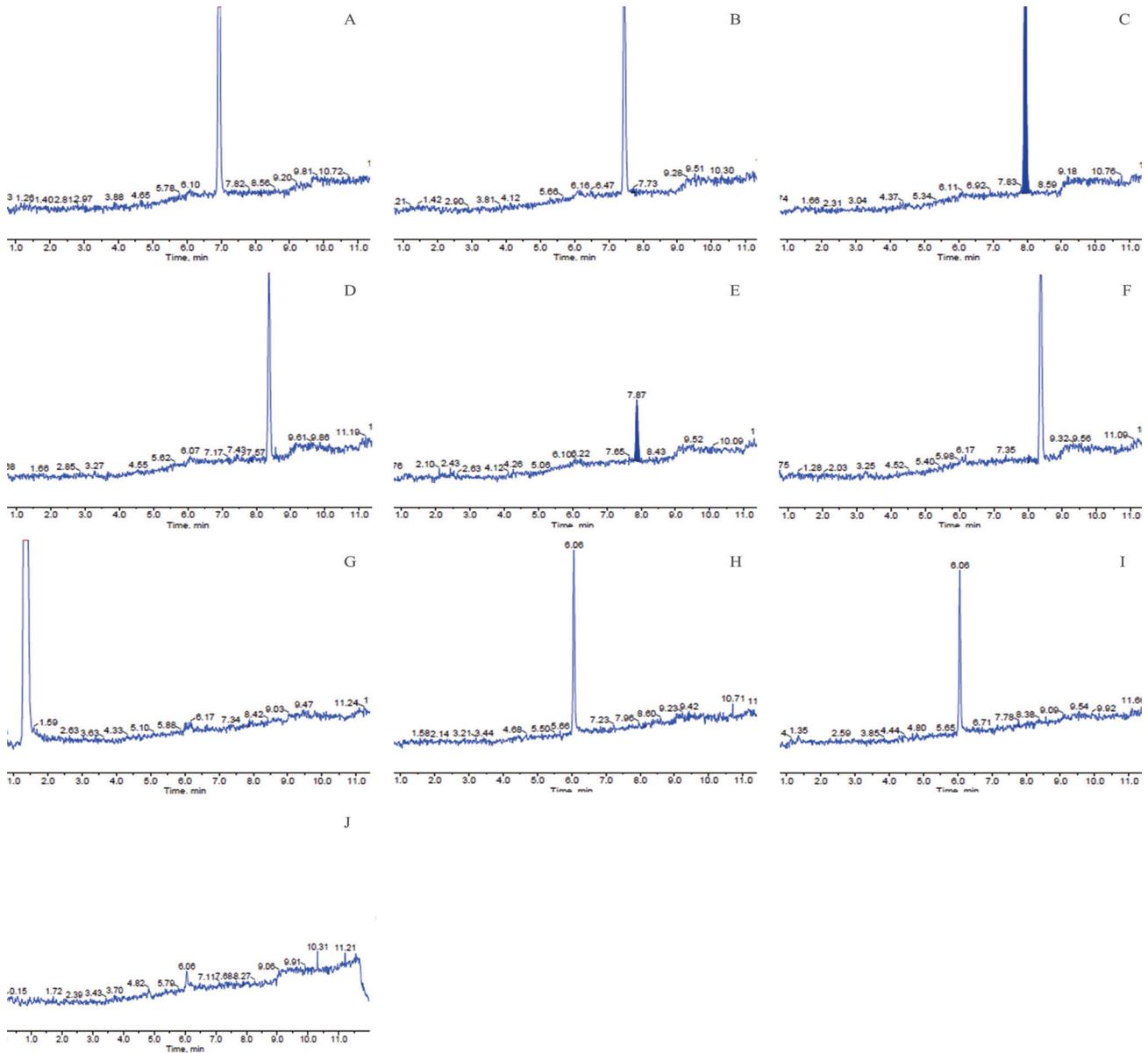


图 8 清热解暑口服液中抑菌剂检查典型图谱

Fig 8 HPLC-MS/MS chromatogram of antibacterial agent determination in Qingre Jiedu oral liquid

A. 4-羟基苯甲酸甲酯 (methyl 4-hydroxybenzoate); B. 4-羟基苯甲酸乙酯 (ethyl 4-hydroxybenzoate); C. 4-羟基苯甲酸丙酯 (propyl 4-hydroxybenzoate); D. 4-羟基苯甲酸丁酯 (butyl 4-hydroxybenzoate); E. 4-羟基苯甲酸异丙酯 (isopropyl 4-hydroxybenzoate); F. 4-羟基苯甲酸异丁酯 (isobutyl 4-hydroxybenzoate); G. 山梨酸 (sorbic acid); H. 苯甲酸 (benzoic acid); I. 苯甲酸检出样品 (sample with benzoic acid); J. 空白 (blank sample)

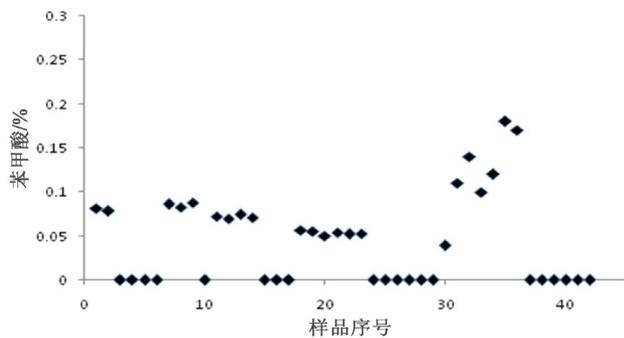


图 9 清热解暑口服液中苯甲酸测定结果

Fig 9 Benzoic acid in Qingre Jiedu oral liquid

研究发现, 42 批次样品中, 有 2 家企业的 7 批次样品 (D 企业 1 批, I 企业 6 批) 检出山麦冬皂苷 B 和麦冬皂苷 D, 1 家企业的 2 批次样品 (K 企业) 检出短葶山麦冬皂苷 C 和麦冬皂苷 D, 说明有 3 家企业的 9 批次样品涉嫌以山麦冬掺混麦冬进行投料, 检出率 21.4%。因此有必要增加清热解暑口服液中山麦冬的筛查项目。

3 讨论

按照《中国药典》2020 年版一部的质量标准检验, 16 个厂家共 42 批次清热解暑口服液均

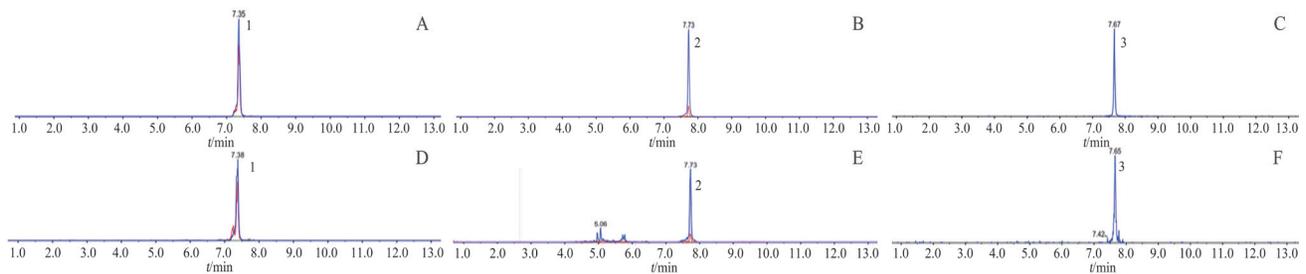


图 10 清热解毒口服液中山麦冬筛查典型图谱

Fig 10 HPLC-MS/MS chromatograms of *Liriope Radix* in Qingre Jiedu oral liquid

A ~ C. 对照品 (reference substance); D ~ F. 阳性样品 (positive sample); 1. 短葶山麦冬皂苷 C (liriope muscari baily saponins C); 2. 山麦冬皂苷 B (liriope saponins B); 3. 麦冬皂苷 D (ophiopogonin D)

符合规定, 合格率 100%。但经探索性研究后发现, 合格率有所下降, 山银花筛查项目合格率为 90.5%, 绿原酸、栀子苷和连翘苷含量测定项合格率仅 50%, 山麦冬筛查项目合格率为 78.6%, 提示清热解毒口服液的内在质量有待进一步提高, 目前其质量标准的可控性一般。

近年来, 山银花、山麦冬产量大价格低, 而金银花、麦冬产量低价格高^[17-18], 可能会导致部分生产企业为降低成本而不按处方进行投料。结合本次的探索性研究可知, 增加清热解毒口服液中山银花、山麦冬的筛查十分必要。

绿原酸、栀子苷和连翘苷分别为处方中金银花、栀子和连翘的有效成分, 探索性研究发现各厂家 3 种成分的含量差异较大。前期市场调研发现, 不同产地中药材和饮片质量差异较大, 伪劣药材仍偶有出现。有研究表明, 金银花物候期、干燥方法等对绿原酸含量影响较大^[19]; 栀子果实过度成熟会导致栀子苷的降解^[20]; 连翘炮制过程的不规范会导致连翘饮片有效成分含量的降低^[21]。因此, 制剂生产企业在采购原料药材时应加强从业人员的培训并注重原料、中间体、成品等环节性检验以确保制剂生产过程的可控。此外, 清热解毒口服液提取工艺较为复杂, 关键工艺参数如水提时间、浓缩温度, 醇沉醇浓度等对有效成分含量的影响也不容忽视。建议部分厂家严格把控原料质量并考察工艺参数, 以提高药品质量。

以上研究发现, 同一企业多批次样品间的质量一致性较为稳定, 说明生产企业内部工艺控制相对较好。但企业间样品质量差异较大, 说明部分企业生产过程可控性较差, 产品质量风险较高, 提示生产企业应从原料、生产管理等方面进行原因分析, 以提高产品质量; 提示监管部门应对风险较高的企业加大监督力度, 从各方面督促药企完善药品生产质量保障体系, 避免合格劣药的出现。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1683-1684.
- [2] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 61-65.
- [3] 杨翠玲. 易混品金银花与山银花的鉴别 [J]. 山西中医学院学报, 2006, 7(4): 48.
- [4] 张晓红, 靳士英, 刘莹. 岭南道地药材山银花亟待正名与发展 [J]. 中国药业, 2019, 28(11): 4-8.
- [5] 王赵, 李耀磊, 李静, 等. 金银花配方颗粒评价性抽验结果分析与建议 [J]. 中国药事, 2019, 33(5): 528-533.
- [6] 李瑞娥. 金银花与山银花的性状鉴别和药理作用的差别研究 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(15): 118-119.
- [7] 邱连建, 索彩仙, 潘礼业, 等. 基于多元统计分析的金银花、山银花及川银花质量评价研究 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(5): 620-626.
- [8] 张振巍, 张娜娜, 白丹丹, 等. 一测多评法测定清热解毒口服液中 4 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24(28): 2676-2678.
- [9] 宁科贤, 黄燕萍. HPLC 法同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷的含量 [J]. 中国药房, 2014, 25(40): 3819-3821.
- [10] 周兰, 罗曼, 熊慧林. HPLC 法测定清热解毒口服液中栀子苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2168-2170.
- [11] 马传江. 高效液相色谱-串联质谱法测定中药口服液中 23 种防腐剂 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1651-1659.
- [12] 孙蒙, 闫小玉, 毕开顺, 等. HPLC 测定 11 种中药口服液中 6 种防腐剂的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 76-79.
- [13] 张府君, 冯贞, 王海花, 等. HPLC 法测定 31 批次消栓口服液中 6 种防腐剂的含量 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(4): 528-531.
- [14] 王峰, 何轶, 于建东, 等. 牛黄清胃丸中麦冬掺伪情况研究 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(16): 1332-1335.
- [15] 张炜, 宋文静, 武嘉庚, 等. UPLC-MS/MS 法检测妇康宁片中掺加的山麦冬 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 867-869.
- [16] 张府君, 冯贞, 王海花, 等. HPLC 法测定 31 批次消栓口服液中 6 种防腐剂的含量 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(4): 528-531.
- [17] 王浩兵. 金银花、山银花的质量分析与提取物的制备研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [18] 王霞. 山麦冬中主要有效成分分析研究 [D]. 汉中: 陕西理工大学, 2018.

- [19] 王玲娜, 张金, 刘红燕, 等. 金银花质量影响因素分析[J]. 中国医药导报, 2014, 11 (25): 159-164.
- [20] 刘春雷, 刘燕琴, 陈艾萌, 等. 不同栀子品系果实中活性成分累积规律探究[J]. 中成药, 2021, 43 (2): 436-440.
- [21] 王雪, 唐波, 赵鲁元, 等. 不同产地连翘的质量分析[J]. 北方园艺, 2019 (24): 124-129.

(收稿日期: 2021-02-09; 修回日期: 2021-04-23)

五味消毒饮标准煎液指纹图谱的建立

郑艳萍¹, 张晓琳², 彭云¹, 赵开军³, 贵书琪^{3, 4}, 刁和芳^{1*} (1. 江苏弘典中药产业研究院有限公司 南京市工程技术研究中心, 南京 210042; 2. 苏州思源天然产物研发有限公司, 江苏 苏州 215163; 3. 南京中山制药有限公司 江苏省中药经典方工程技术研究中心, 南京 210046; 4. 中国药科大学中药学院, 南京 211198)

摘要: 目的 建立五味消毒饮标准煎液的指纹图谱, 并对其特征峰进行药材归属。方法 制备 16 批次五味消毒饮标准煎液和单味药标准煎液, 采用高效液相色谱法对其进行测定。色谱柱为 YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 330 nm, 进样量 20 μL。结果 共确定了 13 个共有峰, 对每个共有峰归属到单味药材。16 批五味消毒饮标准煎液 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0.99。结论 该方法准确可靠, 重复性和稳定性较好, 可为五味消毒饮标准煎液的质量控制提供参考。

关键词: 五味消毒饮; 标准煎液; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R927, R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1893-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.022

Establishment of fingerprints of Wuwei Xiaoduyin standard decoction

ZHENG Yan-ping¹, ZHANG Xiao-lin², PENG Yun¹, ZHAO Kai-jun³, GUI Shu-qi^{3, 4}, DIAO He-fang^{1*} (1. Jiangsu Hongdian Research Institute of Traditional Chinese Medicine Industry Co., Ltd., Nanjing Engineering Technology Research Center, Nanjing 210042; 2. Suzhou Sylvan Natural Product R&D Co., Ltd., Suzhou Jiangsu 215163; 3. Nanjing Zhongshan Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Classical Prescriptions Engineering Research Center, Nanjing 210046; 4. China Pharmaceutical University, School of Traditionnal Chinese Pharmacy, Nanjing 211198)

Abstract: Objective To establish the fingerprints of Wuwei Xiaoduyin standard decoction (WXSD) and to match medicinal materials with their characteristic peaks. **Methods** Sixteen batches of WXSD and single medicinal material standard decoction were prepared and determined by HPLC. The HPLC method was performed on YMC-Pack ODS-A column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 330 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** There were 13 common peaks in the HPLC fingerprints of 16 batches of WXSD. Each common peak matched a single medicinal material. The similarity of the HPLC fingerprint of 16 batches of WXSD was greater than 0.99. **Conclusion** The method is accurate, reliable, stable and reproducible, which can provide reference for the quality control of WXSD.

Key words: Wuwei Xiaoduyin; standard decoction; fingerprint; HPLC; quality control

基金项目: 江苏省科技成果转化专项 (No. BA2020005); 南京市知识产权战略专项基金。

作者简介: 郑艳萍, 女, 副研究员, 主要从事中药分析与质量标准研究, E-mail: zyp611@163.com *通信作者: 刁和芳, 女, 工程师, 主要从事中药研发及项目管理工作, E-mail: wuxicathy2002@163.com

五味消毒饮出自《医宗金鉴》，由金银花、蒲公英、天葵子、野菊花、紫花地丁 5 味药组成，具有清热解毒、消散疔疮等功效，常用于疔毒等症。现代研究表明，本方主要含有绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、蒙花苷等成分^[1-5]，具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、增强机体免疫功能等作用^[6-7]，临床上广泛用于五官科、内科、外科、妇科等火毒湿热所致的感染性疾患^[8-10]。目前，五味消毒饮临床应用以传统汤剂为主^[11]，然而，其质量一致性易受煎煮方式及原药材品质的影响。因此，为了确保五味消毒饮后续研发的剂型能保持原方的药效，有必要建立标准煎液的质量控制方法。

中药复方制剂成分复杂，部分指标性成分检测并不能充分体现整体质量与药效。中药指纹图谱能全面、系统地反映复方制剂的整体特征，已成为中药质量控制的有效手段^[12-13]。本研究采用 HPLC 法建立五味消毒饮标准煎液的指纹图谱，为五味消毒饮标准煎液的质量评价提供方法及依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); EL104 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药

金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 产地来源为山东和河南，野菊花 *Chrysanthemum indicum* L. 产地来源为安徽和湖北，蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 产地来源为河南、山西、内蒙古，紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 产地来源为河南、山东、陕西，天葵子 *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) Makino 产地来源为安徽、湖北、湖南，各 10 个批次 (均购于安徽汇中州中药饮片有限公司和安徽金芙蓉中药饮片有限公司，经南京中山制药有限公司李辉执业中药师鉴定)。经检验，以上药材水分、灰分、含量、浸出物等均符合 2015 年版《中国药典》一部相关规定。

绿原酸 (批号: 110753-201716, 纯度 $\geq 99\%$) 和咖啡酸 (批号: 110885-201703, 纯度 $\geq 99\%$) (对照品, 中国食品药品检定研究院), 木犀草苷 (批号: 17030405, 纯度 $\geq 99\%$) 和蒙花苷 (批号: 15101207, 纯度 $\geq 99\%$) (对照品, 北京北纳创联生物技术研究院)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, 安徽天地高纯溶剂有限公司), 磷酸 (分析纯, 南京化学试剂股份有限

公司), 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、蒙花苷对照品适量, 加 80% 甲醇配制成质量浓度分别为 32、19.68、10.7、17.28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取金银花 150 g、野菊花 60 g、蒲公英 60 g、紫花地丁 60 g、天葵子 60 g, 加 4.5 L 水, 浸泡 20 min, 加热至沸, 沸腾 20 min 后过滤, 药渣加 4 L 水, 加热至沸, 沸腾 20 min 后过滤, 合并药液, 减压浓缩至含生药 1.0 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。量取浓缩液 1 mL, 加入 1 mL 水, 混匀, 用 80% 甲醇定容至 50 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。按照表 1 对应的产地及批号的药材制备 16 批五味消毒饮标准煎液。

2.1.3 单味药供试液 分别取金银花 150 g, 野菊花 60 g, 蒲公英 60 g, 紫花地丁 60 g, 天葵子 60 g, 按照“2.1.2”项下方法制备, 即得各单味药的供试液。

2.2 色谱条件

色谱柱: YMC-Pack ODS-A 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 洗脱梯度 (0 ~ 20 min, 90% ~ 80%B; 20 ~ 40 min, 80% ~ 75%B; 40 ~ 52 min, 75% ~ 70%B; 52 ~ 52.01 min, 70% ~ 90%B; 52.01 ~ 60 min, 90%B); 流速: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 330 nm; 进样量: 20 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密称取绿原酸对照品 10.3 mg 和蒙花苷对照品 1.1 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得到各对照品储备液。绿原酸对照品储备液用甲醇稀释至 264、132、66、33、16.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 蒙花苷对照品储备液用甲醇稀释至 35.2、17.6、8.8、4.4、2.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 进样测定, 以对照品溶液的质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 计算回归方程: 绿原酸 $Y = 6.11 \times 10^4 X - 2.23 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 线性范围: 16.5 ~ 264 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 蒙花苷 $Y = 5.03 \times 10^4 X + 4.25 \times 10^3$ ($r = 0.9999$), 线性范围: 2.2 ~ 35.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 结果显示相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性

表 1 16 批五味消毒饮标准煎液药材样品产地及批号

Tab 1 Origin places and batch numbers of herbs in 16 batches of Wuwei Xiaoduyin standard decoction

样品批次	金银花		野菊花		蒲公英		紫花地丁		天葵子	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	山东	170801	湖北	170803	内蒙	170801	山东	170801	湖北	170801
S2	山东	170501	湖北	170601	内蒙	170401	山东	170401	湖北	170501
S3	山东	170101	湖北	170101	内蒙	170101	山东	170101	湖北	170101
S4	河南	170802	安徽	170802	内蒙	170801	陕西	170802	湖南	170802
S5	河南	170401	安徽	170401	内蒙	170401	陕西	170501	湖南	170502
S6	河南	170201	安徽	170201	内蒙	170101	陕西	170201	湖南	170201
S7	河南	170802	湖北	170803	河南	170803	河南	170803	安徽	170803
S8	河南	170401	湖北	170601	河南	170601	河南	170701	安徽	170401
S9	河南	170201	湖北	170101	河南	170301	河南	170301	安徽	170301
S10	山东	170801	安徽	170802	山西	170804	河南	170803	湖北	170801
S11	山东	170501	安徽	170401	山西	170602	河南	170701	湖南	170502
S12	山东	170101	安徽	170201	山西	170501	河南	170301	安徽	170301
S13	山东	170901	湖北	170702	河南	170601	山东	170401	湖北	170501
S14	山东	170902	湖北	170901	河南	170803	山东	170801	湖北	170801
S15	河南	170701	安徽	170302	山西	170602	河南	170701	安徽	170401
S16	山东	160801	湖北	161001	河南	160901	山东	160901	湖北	160801

良好。

2.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液，连续进样 5 次，按“2.2”项下色谱条件进行测定，结果显示相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 均小于 3%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 参照“2.1.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，结果显示相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收试验

① 绿原酸加样回收试验：按“2.1.2”项下方法制备 9 份标准煎液浓缩液，每 3 份一组，取 0.25 mL 置 25 mL 量瓶中，加入 0.25 mL 水，摇匀，分别加入 165 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 绿原酸对照品溶液 10、13、15 mL，加 80% 的甲醇定容，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液为供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，结果低、中、高回收率均在 101.0% ~ 102.8%，*RSD* 均小于 1.0%。

② 蒙花苷加样回收试验：按“2.1.2”项下方法制备 9 份标准煎液浓缩液，每 3 份一组，取 0.30 mL 置 50 mL 量瓶中，加入 0.70 mL 水，摇匀，分别加入 44 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蒙花苷对照品溶液 4、5、6 mL，加 80% 的甲醇定容，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液为供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，结果低、中、高回收率均在 97.0% ~ 99.2%，*RSD* 均小于 1.0%。

2.4 五味消毒饮标准煎液含量测定

取“2.1.2”项下供试品溶液，按“2.2”项下色谱

条件检测，计算绿原酸及蒙花苷含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 2 Sample content determination ($n = 3, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批次	绿原酸	蒙花苷	批次	绿原酸	蒙花苷
S1	6.65	0.456	S9	6.33	0.585
S2	5.22	0.496	S10	5.96	0.542
S3	5.66	0.518	S11	6.19	0.526
S4	6.10	0.504	S12	5.78	0.508
S5	4.97	0.482	S13	5.78	0.514
S6	5.96	0.533	S14	6.52	0.597
S7	6.58	0.492	S15	5.55	0.551
S8	6.20	0.578	S16	5.86	0.546

2.5 五味消毒饮标准煎液指纹图谱的建立

将 16 批供试品溶液按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录 1 h 内的色谱图。将其导入“中药指纹图谱相似度评价系统 2012 版”，生成五味消毒饮标准煎液特征指纹图谱，见图 1，结果确定了 13 个共有峰。取混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，见图 2，通过比对各峰与混合对照品色谱峰保留时间，确认 3、6、9、13 号峰分别为绿原酸、咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷。

在 16 批五味消毒饮标准煎液指纹图谱中，3 号峰（绿原酸）峰面积最大且分离度好，故选用 3 号峰作为参照峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

采用“中药指纹图谱相似度评价系统 2012 版”，对 16 批标准煎液的指纹图谱进行相似度分析，结果分别为 0.998、0.999、0.999、0.999、0.998、

0.998、0.998、0.999、0.999、0.998、0.999、0.999、0.998、0.999、0.996、0.998，均大于 0.99，说明样品制备方法及所建立的指纹图谱稳定可靠，能作为五味消毒饮标准煎液质量控制的参考依据。

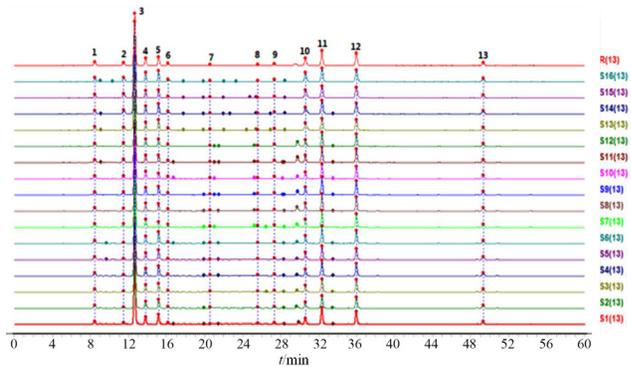


图 1 16 批五味消毒饮标准煎液 HPLC 指纹图谱
Fig 1 HPLC fingerprint of 16 batches of Wuwei Xiaoduyin standard decoction

3. 绿原酸 (chlorogenic acid) ; 6. 咖啡酸 (caffeic acid) ; 9. 木犀草苷 (luteoloside) ; 13. 蒙花苷 (linarin)

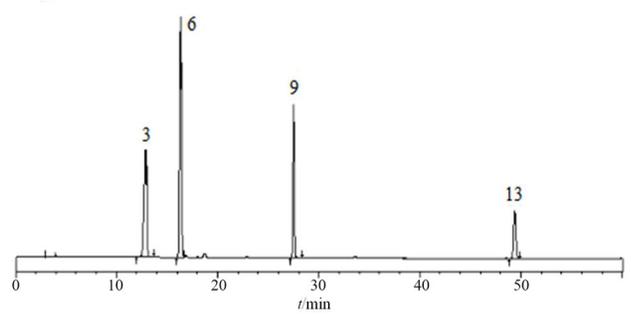


图 2 混合对照品 HPLC 指纹图谱
Fig 2 HPLC fingerprint of mixed reference substances

2.6 指纹图谱特征峰的归属分析

将单味药供试液按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。通过与标准煎液及其对照指纹图谱进行比较，确定各特征峰归属，结果见图 3。指纹图谱特征峰主要由金银花、野菊花、蒲公英、紫花地丁 4 味药材所贡献。其中，1 号峰、3 号峰、4 号峰、9 号峰、10 号峰、11 号峰、12 号峰主要来源于金银花，次要来源于野菊花；2 号峰单独来源于蒲公英；5 号峰和 7 号峰单独来源于紫花地丁；6 号峰来源于蒲公英和金银花；8 号峰来源于紫花地丁和金银花；13 号峰单独来源于野菊花。五味消毒饮标准煎液共有峰归属见表 3。

3 讨论

在对五味消毒饮标准煎液指纹图谱特征峰进行归属分析时，发现天葵子没有对应特征峰，可能是因为天葵子的主要成分为内酯类和氰苷类化合物^[14]，其中内酯类化合物微溶于水^[5]，按照五

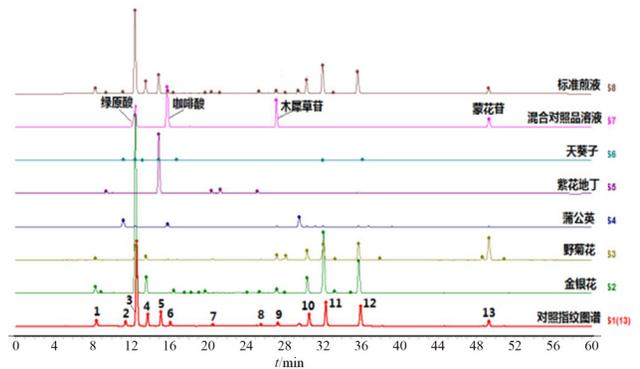


图 3 单味药标准煎液 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱
Fig 3 HPLC fingerprint of single medicinal material standard decoction and reference substance

表 3 五味消毒饮标准煎液共有峰归属

Tab 3 Common peaks attribution in Wuwei Xiaoduyin standard decoction

峰号	归属药材	对照品归属
1	金银花 (主要来源)、野菊花	
2	蒲公英	
3	金银花 (主要来源)、野菊花	绿原酸
4	金银花 (主要来源)、野菊花	
5	紫花地丁	
6	蒲公英 (主要来源)、金银花	咖啡酸
7	紫花地丁	
8	紫花地丁、金银花	
9	金银花 (主要来源)、野菊花	木犀草苷
10	金银花 (主要来源)、野菊花	
11	金银花 (主要来源)、野菊花	
12	金银花 (主要来源)、野菊花	
13	野菊花	蒙花苷

味消毒饮经典名方的传统工艺，药材加水制备标准煎液后，其溶于标准煎液中的含量很低，难以检测。

为了对五味消毒饮进行质量控制，张宇等^[7]采用 HPLC 法测定了其口服液中绿原酸和咖啡酸的含量，杨宏静等^[6]利用 HPLC 法测定了五味消毒饮中绿原酸、咖啡酸、蒙花苷和秦皮乙素的含量。然而，利用已知的少量活性成分的含量来控制中药的质量不充分，指纹图谱能更全面地反映其整体特征^[15]。杨晓琴等^[11]建立了五味消毒饮口服液的 HPLC 指纹图谱，并对其特征峰进行了对照品归属，但并未归属到药材。本研究建立了五味消毒饮标准煎液的 HPLC 特征指纹图谱，对共有峰进行了中药材归属和化学成分指认，较全面地反映了五味消毒饮标准煎液的整体化学特征，该方法稳定可靠、重复性好，可为五味消毒饮标准煎液的质量控制提供依据。

此外,本课题组前期对供试品的制备方法进行了优化,发现减压浓缩后,直接用 80% 甲醇稀释会产生大量浅棕色大片絮状沉淀,沉淀会包裹药液成分,影响测定结果,加水后再稀释,这种情况得到较大改善。对 60% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇稀释溶剂进行比较,发现 80% 甲醇为稀释溶剂时,各成分的峰面积都较高,故选择浓缩液加水稀释后用 80% 甲醇稀释定容。比较了色谱柱 Comasil ODS AR- II、Nucleosil C₁₈、YMC-Pack ODS-A 洗脱效果,结果表明, YMC-Pack ODS-A 对应图谱的色谱峰分离最佳,峰形最好,因此选用 YMC-Pack ODS-A 色谱柱。对流动相甲醇-0.3% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.4% 磷酸水溶液进行考察,发现以甲醇-0.3% 磷酸水溶液洗脱时,色谱峰拖尾;以乙腈-0.4% 磷酸水溶液洗脱时,色谱峰分离度较差;以乙腈-0.1% 磷酸水溶液洗脱时,色谱峰分离度较好,保留时间适中,故流动相确定为乙腈-0.1% 磷酸水溶液。对供试液进行全波长扫描,结果在检测波长为 330 nm 时,图谱信息最为丰富,响应值普遍较高,且分离效果较好,因此选择 330 nm 为检测波长。

参考文献

- [1] 王亚丹,杨建波,戴忠,等.中药金银花的研究进展[J].药物分析杂志,2014,34(11):1928-1935.
- [2] 刘丹丹,苗明三.野菊花现代研究及作用特点分析[J].中医学报,2014,29(4):551-553.
- [3] 谢沈阳,杨晓源,丁章贵,等.蒲公英的化学成份及其药理作用[J].天然产物研究与开发,2012,24(S1):141-151.
- [4] 李永生,何希瑞,杨燕,等.紫花地丁化学成分与药理活性研究新进展[J].环球中医药,2013,6(4):313-318.
- [5] 牛锋.天葵子的化学成分及质量标准研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2006.
- [6] 杨宏静,陈瑛,方应权.HPLC法同时测定五味消毒饮中4种成分[J].中成药,2015,37(4):778-781.
- [7] 张宇,金玲宇,韩飞,等.RP-HPLC法同时测定五味消毒饮口服液中绿原酸和咖啡酸的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(11):904-906,928.
- [8] 黄水仙,田道法.五味消毒饮临床应用研究进展[J].湖南中医药导报,2002,8(9):523-525,529.
- [9] 程晶玲.五味消毒饮皮肤科应用研究[J].江西中医学院学报,2012,24(2):36-38.
- [10] 丁明勇.五味消毒饮临床应用研究[J].中国医疗前沿,2012,7(17):66-67.
- [11] 杨晓琴,吴亿晗,白俊毅,等.五味消毒饮口服液 HPLC 指纹图谱的建立及 6 种指标性成分定量测定[J].中草药,2017,48(24):5151-5157.
- [12] 赵娟,谢世静,赵兴华,等.中药指纹图谱质控方法研究进展[J].云南中医中药杂志,2020,41(1):82-86.
- [13] 熊鑫,黄传奇,程璐.清血解毒合剂的高效液相色谱指纹图谱研究[J].医药导报,2020,39(10):1394-1399.
- [14] 孙志强,王笑.基于特征图谱和多指标成分含量测定的不同产地天葵子质量分析[J].山东科学,2020,33(1):16-23.
- [15] 涂兴明,吴涵,吴康郁.中药指纹图谱的研究与应用[J].海峡药学,2016,28(5):1-3.

(收稿日期:2021-01-27;修回日期:2021-03-17)

黄芩 UPLC-DAD 指纹图谱的建立及其黄芩苷和汉黄芩苷的含量研究

郑如文¹, 刘港辉², 江志强¹, 董玉君², 张俊华¹, 程国华^{2*} (1. 广州白云山光华制药股份有限公司, 广州 510282; 2. 暨南大学药学院, 广州 510632)

摘要: 目的 分析不同产地和不同生长年限的黄芩中黄芩苷与汉黄芩苷含量的变化规律, 建立 UPLC-DAD 指纹图谱, 为黄芩药材质量标准建立提供依据。方法 采用 BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 流速 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 40℃, 进样量 2 μL。以 5 个产地不同生长年限共 26 批黄芩药材建立野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的 UPLC-DAD 指纹图谱, 并检测黄芩苷和汉黄芩苷的含量变化。结果 不同产地黄芩样品的黄芩苷和汉黄芩苷含量有显著差别, 山东秋季二年生黄芩的黄芩苷含量最高 (17.02%), 甘肃秋季二年生黄芩的汉黄芩苷含量最高 (3.63%)。黄芩苷和汉黄芩苷含量总体呈二年生 > 一年生 > 三年生 > 野生的规律。26 批黄芩样品指纹图谱重现性与相似度好, 质量较稳定。结论 该方法快速、简便、准确, 符合指纹图谱技术要求, 可为黄芩药材的质量评价提供参考。

关键词: 黄芩; 超高效液相色谱; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1898-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.023

UPLC-DAD fingerprint of *Scutellaria baicalensis* Georgi and its contents of baicalin and wogonoside

ZHENG Ru-wen¹, LIU Gang-hui², JIANG Zhi-qiang¹, DONG Yu-jun², ZHANG Jun-hua¹, CHENG Guo-hua^{2*} (1. Guangzhou Baiyunshan Guanghua Pharmacy Co., Ltd, Guangzhou 510282; 2. School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Objective To analyze baicalin and wogonoside in *Scutellaria baicalensis* Georgi of different origins and different growth years, and to establish the UPLC-DAD fingerprint to provide a basis for the establishment of quality standards for *Scutellaria baicalensis*. **Methods** BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) chromatographic column was used, with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B). The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 2 μL. UPLC-DAD fingerprints of scutellarin, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A in 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi from 5 origins and different growth years were established, and changes of baicalin and wogonoside in *Scutellaria baicalensis* were detected. **Results** There were significant differences in the contents of baicalin and wogonoside in 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi samples. The content of baicalin in biennial *Scutellaria baicalensis* Georgi in autumn in Shandong was the highest (17.02%), and the content of wogonoside in biennial *Scutellaria baicalensis* Georgi in autumn in Gansu was the highest (3.63%). The content of baicalin and wogonoside followed biennial > annual > three-year > wild. The fingerprints of 26 batches of *Scutellaria baicalensis* samples had good reproducibility and similarity, and the quality was relatively stable and consistent. **Conclusion** The method is fast, simple and accurate, and meets the technical requirements of fingerprints, which

作者简介: 郑如文, 男, 制药工程师, 主要从事药品研发与质量管理方面的研究, E-mail: js@bysgh.com *通信作者: 程国华, 男, 教授, 主要从事药物临床试验管理方面的研究, E-mail: ghcheng661203@126.com

can also provide reference for the quality evaluation of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

Key words: *Scutellaria baicalensis*; UPLC; baicalin; wogonoside; fingerprint; cluster analysis

黄芩是唇形科黄芩属多年生草本植物，干燥根为药用部位，具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]，可用于肺热咳嗽、胎动不安等症。黄芩中活性成分以黄酮类化合物为主，包括野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 等，其中黄芩苷是评价黄芩药材质量的主要依据^[2-3]。《中国药典》2020 年版一部中记载了 HPLC 法测定黄芩苷成分的含量标准^[4]，但未见其他黄酮类成分及指纹图谱的检测标准。中药指纹图谱作为鉴定和评价中药质量的重要技术，已经成为国内外中药材和天然药物质量控制的常用方法^[5-7]。

超高效液相色谱技术 (UPLC) 能够快速地对分析和鉴定药材中的化学成分，具有高分辨率的特点^[8-9]。本研究采用 UPLC 和优化的超声提取方法^[10-12]，同时测定黄芩苷和汉黄芩苷成分的含量并建立相应的指纹图谱，为黄芩药材的质量评价方法提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂

UPLC-DAD (Agilent Infinity 1290 II); KQ-500VDB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XPE26 型百万分之一天平、ML204T 型万分之一天平 (美国梅特勒公司); BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, Waters); 黄芩苷 (批号: 110715-201821, 纯度: 95.4%)、汉黄芩苷 (批号: 112002-201702, 纯度: 98.5%)、野黄芩苷 (批号: 110842-201709, 供含量测定用)、黄芩素 (批号: 111595-201808, 供含量测定用)、汉黄芩素 (批号: 111514-201706, 供含量测定用) 对照品 (中国食品药品检定研究院), 千层纸素 A 对照品 (批号: Y31M9H62597, 供含量测定用, 源叶生物); 甲酸 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙腈 (色谱纯, 德国默克公司); 甲醇 (分析纯, 广州化学试剂厂)。

1.2 样品

共采集 5 个产地不同生长年限的 26 批黄芩干燥根, 经暨南大学药学院中药教研室张英副教授鉴定均为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)。来源见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件

表 1 不同产地黄芩干燥根的来源

Tab 1 Sources of dried roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi from different origins

产地	季节	生长年限	样品名称	编号		
山西运城夏县	春季	二年生	01S109	S1		
		三年生	01S107	S2		
	秋季	一年生	01S301	S3		
		二年生	01S302	S4		
		三年生	01S303	S5		
陕西渭南澄城县	春季	一年生	02S110	S6		
		二年生	02S109	S7		
		三年生	02S106	S8		
	秋季	一年生	02S301	S9		
		二年生	02S302	S10		
		三年生	02S303	S11		
		二年生	02S302	S14		
	山东临沂沂水县	春季	二年生	03S110	S12	
		秋季	一年生	03S301	S13	
			二年生	03S302	S14	
	甘肃定西陇西县	春季	一年生	04S110	S15	
二年生			04S109	S16		
三年生			04S108	S17		
秋季		一年生	04S301	S18		
		二年生	04S302	S19		
		三年生	04S303	S20		
		河北承德县头沟镇	春季	约一年生	05S101	S21
				约二年生	05S102	S22
约三年生	05S103			S23		
河北承德县高寺台镇	春季	野生 1	06S101	S24		
		野生 2	06S102	S25		
河北承德县双桥区	春季	野生	07S101	S26		

色谱柱: BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 14 min (见表 2), 后运行 5 min; 检测波长 280 nm; 流速 0.4 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL。

2.2 指纹图谱共有峰的确定

将样品的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 系统生成黄芩药材的对照指纹图谱 (见图 1)。通过对照品明确黄芩药材的 6 个特征峰 (见图 2), 分别为野黄芩苷 (1)、黄芩苷 (2)、汉黄芩苷 (3)、黄芩素 (4)、汉黄芩素 (5) 和千层纸素 A (6), 保留时间分别约为 2.5、5.3、8.5、10.5、12.2、12.4 min, 选黄芩苷 (B) 作为参照峰 (S), 计算 6 个特征峰的相对保留时间、相对峰面积。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备

精密称取黄芩苷

表 2 梯度洗脱程序
Tab 2 Gradient elution

时间 /min	A. 0.1% 甲酸水溶液 /%	B. 乙腈 /%
0 ~ 0.5	85	15
0.5 ~ 2	80 ~ 85	15 ~ 20
2 ~ 6	77 ~ 80	20 ~ 23
6 ~ 10	70 ~ 77	23 ~ 30
10 ~ 12	40 ~ 70	30 ~ 60
12 ~ 14	40	60

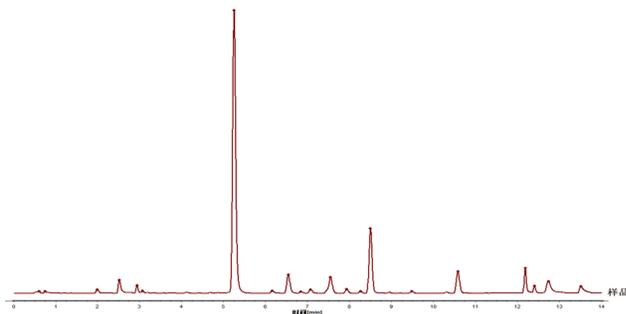


图 1 黄芩样品的 UPLC 对照指纹图谱

Fig 1 UPLC spectra of *Scutellaria baicalensis* samples

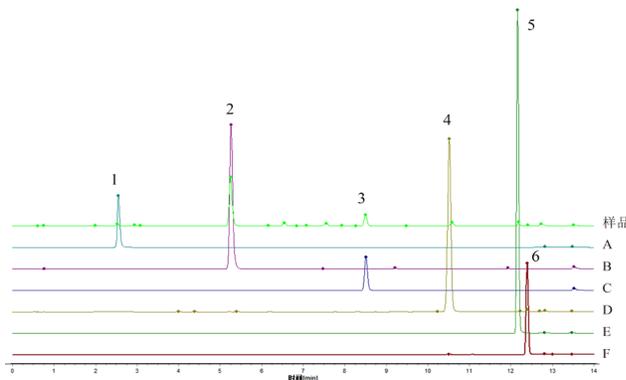


图 2 黄芩样品与黄芩对照品的指纹图谱

Fig 2 Fingerprints of *Scutellaria baicalensis* sample and standards

A. 野黄芩苷 (scutellarin); B. 黄芩苷 (baicalin); C. 汉黄芩苷 (wogonoside); D. 黄芩素 (baicalein); E. 汉黄芩素 (wogonin); F. 千层纸素 A (oroxylin A)

29 mg、汉黄芩苷 6 mg 于同一 50 mL 量瓶中 (均经折算), 加甲醇定容, 摇匀。配成黄芩苷质量浓度为 $0.58 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、汉黄芩苷质量浓度为 $0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 称取黄芩粉末 (过 65 目筛) 约 0.3 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密移取 50 mL 70% 甲醇于锥形瓶中, 称重, 超声 50 min, 冷却至室温后补足失重, 摇匀过滤, 取 1 mL 续滤液, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液, 待测。

2.4 含量测定方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密移取混合对照品

溶液适量制得黄芩苷质量浓度分别为 0.5473 、 0.2736 、 0.1368 、 0.0684 、 0.0342 、 0.0171 、 $0.0086 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和汉黄芩苷质量浓度分别为 0.1108 、 0.0554 、 0.0277 、 0.0139 、 0.0069 、 0.0035 、 $0.0017 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。吸取各混合对照品溶液 $2 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行分析。以对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 制备标准曲线, 得到回归方程见表 3。

表 3 黄芩苷与汉黄芩苷回归方程

Tab 3 Regression equation of baicalin and wogonin

成分	回归方程	r^2	线性范围 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
黄芩苷	$Y = 1.39 \times 10^4 X + 82.24$	0.9997	0.0086 ~ 0.5473
汉黄芩苷	$Y = 1.59 \times 10^4 X + 14.34$	0.9998	0.0017 ~ 0.1108

2.4.2 重复性试验 精密称取同一份黄芩药材粉末 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积, 计算黄芩苷、汉黄芩苷平均含量的 RSD 值分别为 1.4% 和 1.3%, 表明方法重复性好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一份黄芩供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 每次进样量 $2 \mu\text{L}$ 。记录黄芩苷、汉黄芩苷的峰面积积分值, 结果两者含量的 RSD 分别为 0.25% 和 0.36%, 表明分析方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一黄芩供试品溶液 ($n = 6$), 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录黄芩苷、汉黄芩苷的峰面积, 结果两者含量的 RSD 分别为 0.42% 和 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收试验 取已知含量的黄芩药材 0.1 g, 各平行操作 6 份, 分别精密加入黄芩苷对照品 (约 13 mg) 和汉黄芩苷对照品 (约 3 mg), 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进行检测, 结果黄芩苷、汉黄芩苷的平均回收率为 98.0% 和 99.2%, $RSD < 5\%$, 表明方法回收率良好。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 以黄芩苷 (B) 为参照峰 (S), 计算其余 5 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行评价, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.12% ~ 0.19%, 相对峰面积的 RSD 在 0.11% ~ 0.54%, 表明仪器精密度良好 (见图 3)。

2.5.2 重复性试验 以黄芩苷 (B) 为参照峰 (S), 计算其余 5 个共有峰的相对保留时间与相

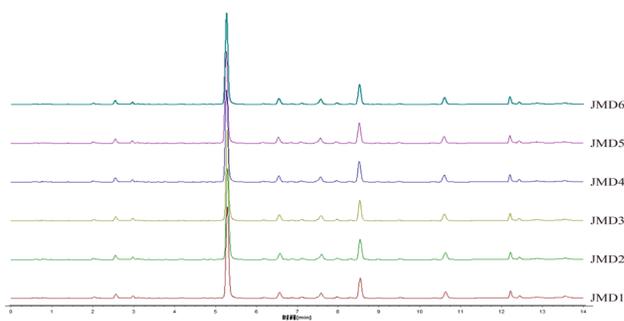


图3 精密度指纹图谱
Fig 3 Fingerprint of precision

对峰面积, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”进行评价, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.10% ~ 0.15%, 相对峰面积的 RSD 在 0.26% ~ 3.8%, 表明方法重复性良好(见图4)。

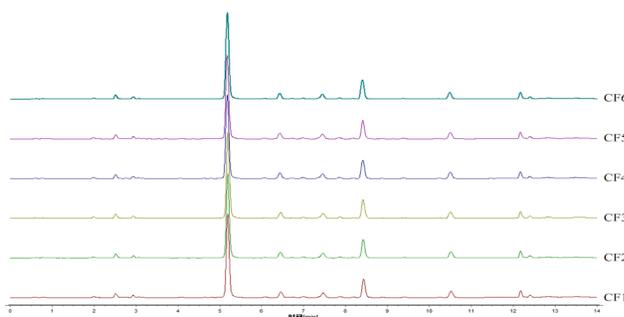


图4 重复性指纹图谱
Fig 4 Fingerprint of repetitive

2.5.3 稳定性试验 以黄芩苷(B)为参照峰(S), 计算其余5个共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”进行评价, 结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 在 0.10% ~ 0.23%, 相对峰面积的 RSD 在 0.38% ~ 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定(见图5)。

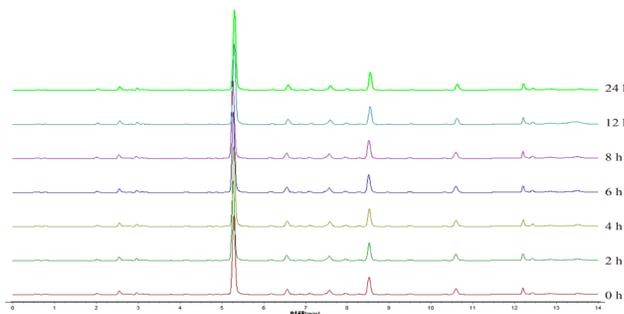


图5 稳定性指纹图谱
Fig 5 Fingerprint of stability

3 结果

3.1 样品含量测定

取 26 批次黄芩样品粉末(过 65 目筛)各约

0.3 g, 每个样品平行称取 2 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进行分析, 测量黄芩苷和汉黄芩苷的峰面积, 计算样品中黄芩苷和汉黄芩苷的百分含量, 结果见表 4。

表 4 26 批黄芩样品中黄芩苷与汉黄芩苷的含量

Tab 4 Contents of baicalin and wogonin in 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi

编号	产地年限	黄芩苷 /%		汉黄芩苷 /%	
		百分含量	产地平均含量	百分含量	产地平均含量
S1	山西春二年生	12.45	12.81	2.45	2.57
S2	山西春三年生	14.71		2.93	
S3	山西秋一年生	13.76		2.76	
S4	山西秋二年生	11.53		2.27	
S5	山西秋三年生	11.58		2.46	
S6	陕西春一年生	12.94	14.41	3.20	2.90
S7	陕西春二年生	16.84		3.32	
S8	陕西春三年生	13.78		2.91	
S9	陕西秋一年生	14.40		2.68	
S10	陕西秋二年生	14.52		2.85	
S11	陕西秋三年生	13.99		2.43	
S12	山东春二年生	12.84	14.17	3.25	3.11
S13	山东秋一年生	12.66		2.64	
S14	山东秋二年生	17.02		3.44	
S15	甘肃春一年生	12.95	13.59	2.81	2.93
S16	甘肃春二年生	14.93		3.55	
S17	甘肃春三年生	12.29		2.33	
S18	甘肃秋一年生	12.58		2.74	
S19	甘肃秋二年生	16.49		3.63	
S20	甘肃秋三年生	12.31		2.51	
S21	河北承德头沟镇春约一年生	13.30	9.48	2.51	1.98
S22	河北承德头沟镇春约二年生	12.05		2.38	
S23	河北承德头沟镇春约三年生	11.55		2.21	
S24	河北承德高台寺镇春野生 1	6.65		1.53	
S25	河北承德高台寺镇春野生 2	4.42		1.13	
S26	河北承德双桥区春野生	8.90		2.10	

3.2 指纹图谱建立

分别称取 26 批黄芩粉末按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 注入超高压液相色谱仪, 得到样品图谱, 将 26 批样品的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”, 得到叠加指纹图谱(见图6), 选择黄芩苷(B)作为参照峰, 计算 6 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积, 结果相对保留时间的 RSD 均小于 0.70%(见表 5 和表 6), 表明各批次之间的相对保留时间重现性和分离度好, 特征峰明显。

3.3 相似度分析

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”中位数法计算 26 批黄芩药材相似度,

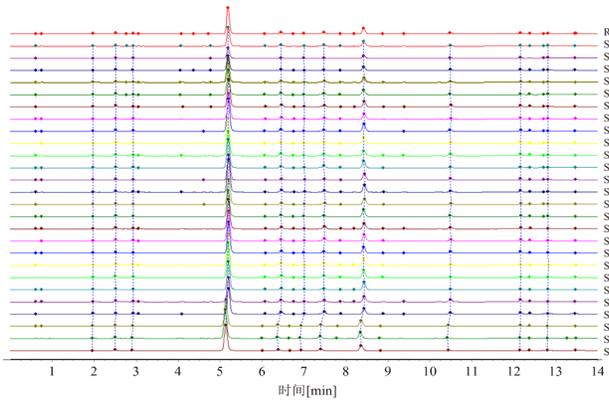


图 6 26 批黄芩样品的 UPLC 叠加指纹图谱

Fig 6 UPLC overlay fingerprints of 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi

表 5 26 批黄芩样品的共有峰相对保留时间

Tab 5 Relative retention time of common peaks of 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi

编号	A	B (S)	C	D	E	F
S1	0.485	1.000	1.629	2.034	2.366	2.410
S2	0.486	1.000	1.628	2.033	2.370	2.414
S3	0.486	1.000	1.628	2.033	2.366	2.409
S4	0.483	1.000	1.622	2.017	2.338	2.381
S5	0.484	1.000	1.624	2.019	2.341	2.384
S6	0.482	1.000	1.623	2.020	2.341	2.382
S7	0.483	1.000	1.623	2.021	2.343	2.385
S8	0.485	1.000	1.624	2.023	2.346	2.389
S9	0.483	1.000	1.620	2.018	2.338	2.381
S10	0.483	1.000	1.623	2.019	2.340	2.383
S11	0.483	1.000	1.622	2.018	2.339	2.383
S12	0.484	1.000	1.623	2.020	2.343	2.386
S13	0.483	1.000	1.623	2.020	2.339	2.381
S14	0.483	1.000	1.623	2.019	2.339	2.382
S15	0.483	1.000	1.622	2.017	2.337	2.380
S16	0.484	1.000	1.622	2.020	2.341	2.384
S17	0.484	1.000	1.622	2.019	2.341	2.385
S18	0.485	1.000	1.625	2.023	2.346	2.389
S19	0.482	1.000	1.622	2.018	2.341	2.383
S20	0.482	1.000	1.620	2.017	2.336	2.379
S21	0.483	1.000	1.621	2.018	2.337	2.379
S22	0.483	1.000	1.622	2.019	2.342	2.384
S23	0.484	1.000	1.624	2.021	2.343	2.385
S24	0.484	1.000	1.623	2.020	2.343	2.386
S25	0.483	1.000	1.623	2.018	2.341	2.448
S26	0.484	1.000	1.622	2.018	2.341	2.384
RSD/%	0.234	0.000	0.135	0.237	0.383	0.634

结果显示 S1 ~ S26 的相似度均大于 0.99，表明不同产地、不同季节及不同生长年限的黄芩药材之间质量稳定，一致性好，无异常样品。

3.4 聚类分析

以 26 批样品的 6 个共有峰相对于黄芩苷 (B) 的相对峰面积为变量，使用 SPSS 22.0 软件，采用组间连接和平方 Euclidean 距离法进行系统聚

表 6 26 批黄芩样品的共有峰相对峰面积

Fig 6 UPLC overlay fingerprints of 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi

编号	A	B (S)	C	D	E	F
S1	0.033	1.000	0.213	0.018	0.012	0.009
S2	0.034	1.000	0.224	0.029	0.020	0.011
S3	0.036	1.000	0.224	0.044	0.031	0.018
S4	0.044	1.000	0.219	0.068	0.053	0.027
S5	0.041	1.000	0.236	0.108	0.075	0.025
S6	0.031	1.000	0.275	0.031	0.020	0.009
S7	0.033	1.000	0.224	0.023	0.012	0.006
S8	0.055	1.000	0.234	0.031	0.021	0.011
S9	0.041	1.000	0.211	0.051	0.038	0.016
S10	0.039	1.000	0.222	0.056	0.042	0.021
S11	0.039	1.000	0.195	0.061	0.044	0.021
S12	0.040	1.000	0.283	0.052	0.034	0.011
S13	0.032	1.000	0.233	0.049	0.024	0.018
S14	0.037	1.000	0.226	0.056	0.041	0.014
S15	0.033	1.000	0.245	0.073	0.037	0.016
S16	0.037	1.000	0.264	0.037	0.031	0.015
S17	0.049	1.000	0.211	0.084	0.054	0.033
S18	0.032	1.000	0.244	0.060	0.049	0.018
S19	0.034	1.000	0.246	0.051	0.032	0.015
S20	0.033	1.000	0.228	0.040	0.037	0.012
S21	0.048	1.000	0.211	0.078	0.042	0.028
S22	0.048	1.000	0.222	0.052	0.036	0.019
S23	0.049	1.000	0.214	0.053	0.039	0.021
S24	0.078	1.000	0.250	0.078	0.054	0.023
S25	0.068	1.000	0.269	0.049	0.054	0.023
S26	0.050	1.000	0.260	0.047	0.039	0.015
RSD/%	27.362	0.000	9.496	38.106	38.507	37.704

类分析。结果显示，当欧式距离为 10 时，26 批样品共分为 5 类，相似度和聚类分析的结果基本一致，且与样品的地域性关系不明显（见图 7）。

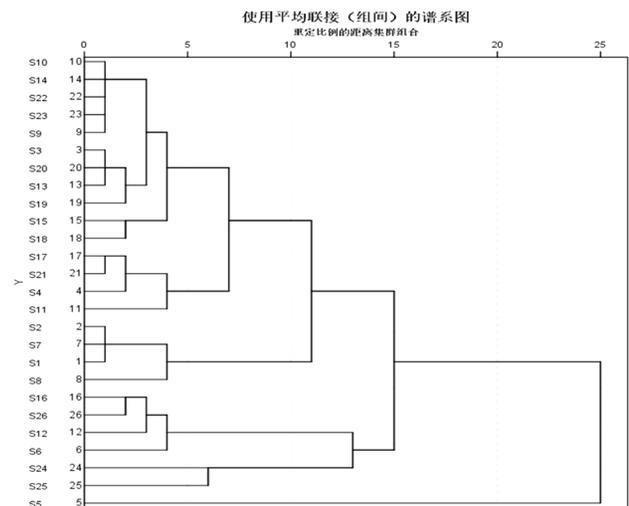


图 7 26 批黄芩样品聚类分析图

Fig 7 Cluster analysis chart of 26 batches of *Scutellaria baicalensis* Georgi

4 讨论

4.1 提取条件的优化

以黄芩苷得率为主要考察指标,考察不同溶剂(体积分数 50%~70% 甲醇,间隔 10%)、不同目筛(50、65、80 目)和不同超声时间(50、60、70 min)对提取效率的影响,结果表明,在 70% 甲醇,过 65 目筛,超声 50 min 时,黄芩苷得率最高,可达 17.34%,而按《中国药典》2020 年版的回流提取方法黄芩苷得率仅约 12%。

4.2 黄芩苷与汉黄芩苷的含量分析

采集不同产地的 26 批样品中,除河北地区野生的 3 个批次(S24、S25、S26)外,黄芩苷的百分含量均在 9% 以上,符合《中国药典》2020 年版要求。26 批黄芩药材的黄芩苷和汉黄芩苷平均含量分别为 12.75%、2.66%。山西产黄芩苷和汉黄芩苷含量最高的为春季三年生黄芩,陕西产黄芩苷和汉黄芩苷含量最高的为春季二年生黄芩,山东产黄芩苷和汉黄芩苷含量最高的为秋季二年生黄芩,甘肃产黄芩苷和汉黄芩苷含量最高的为秋季二年生黄芩,河北产黄芩苷和汉黄芩苷含量最高的为承德头沟镇春约一年生黄芩。5 个产地综合比较,山东秋季二年生黄芩的黄芩苷含量最高,甘肃秋季二年生黄芩的汉黄芩苷含量最高。河北承德高台寺镇春野生 2 中黄芩苷和汉黄芩苷含量均最低,河北野生黄芩中黄芩苷和汉黄芩苷的含量明显比栽培黄芩低,这可能与其枯心和粗皮性状以及表面泥土较多有关。

不同生长年限中的黄芩苷和汉黄芩苷含量差异较大,但可以发现黄芩苷和汉黄芩苷含量总体呈二年生>一年生>三年生>野生的规律,二年生含量达到最高值。不同产地的黄芩苷平均含量:陕西>山东>甘肃>山西>河北,其中陕西、山东和甘肃产地的黄芩苷平均含量较一致,均在 14% 左右,河北产地黄芩苷含量最低,约 9%;不同产地的汉黄芩苷平均含量:山东>甘肃>陕西>山西>河北,除河北地区较低外(约 2%),其余 4 个主产地的汉黄芩苷含量均在 3% 左右。

4.3 小结

本试验在超高效液相色谱仪的基础上,结合

超声优化提取方法,采用 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)的流动相,梯度洗脱 14 min,测定黄芩中的黄芩苷和汉黄芩苷的含量,并建立 6 种黄酮类成分的指纹图谱。各批次之间的相对保留时间重现性和分离度好,准确可靠,可为完善黄芩的质量控制与评价提供参考。

参考文献

- [1] Zhao T, Tang H, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71 (9): 1353-1369.
- [2] Fang YM, Cui MY, Liu J, et al. Study advance in biosynthesis of flavone from *Scutellaria* [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2020, 45 (20): 4819-4826.
- [3] 姚雪, 吴国真, 赵宏伟, 等. 黄芩中化学成分及药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47 (7): 215-220.
- [4] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 314-315.
- [5] 王常麟, 高鹏, 姜晶晶, 等. 中药黄芩指纹图谱研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22 (4): 82-86.
- [6] 武晓媛, 翟雪蓓, 刘沙, 等. 高效液相色谱指纹图谱在中药制药过程中的效果分析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19 (69): 122.
- [7] Liu X, Jiang W, Su M, et al. Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43 (1): 6-17.
- [8] Zhang FX, Li M, Qiao LD, et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59-80.
- [9] 于红红, 高晓燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MS^E 快速分析绵茵陈中化学成分 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (5): 656-661.
- [10] 赵明明, 王艺文, 李婧楠, 等. 黄芩中黄芩苷提取方法研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2020 (8): 233-234, 236.
- [11] 王仁广, 贾艾玲, 邱智东, 等. 响应面法优化黄芩中黄芩苷的电磁裂解提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (21): 106-111.
- [12] 刘昊, 常仁旭, 陈博, 等. 正交试验优化黄芩中黄芩苷超声提取工艺 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017 (11 下): 162-164.

(收稿日期: 2021-01-19; 修回日期: 2021-02-08)

瑶药材串连珠质量标准研究

莫单丹^{1,2}, 唐炳兰^{1,2}, 龚小妹^{1,2}, 欧春丽^{1,2}, 王硕^{1,2}, 周小雷^{1,2}, 赵以民^{1,2*} (1. 广西药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023; 2. 广西药用植物园, 广西壮族自治区中药资源智慧创制工程研究中心, 南宁 530023)

摘要: **目的** 制订瑶药串连珠的质量标准, 为其质量控制及合理开发利用提供参考。**方法** 参照药典方法对 10 个不同产地的串连珠样品进行性状、显微、薄层鉴别及水分、灰分和浸出物测定。**结果** 各项鉴别方法专属性强, 10 个不同产地串连珠色谱与对照药材色谱在相同位置上显相同颜色的斑点; 水分含量为 7.91% ~ 12.85%, 总灰分含量为 3.33% ~ 5.58%, 酸不溶性灰分含量为 0.16% ~ 0.76%; 70% 乙醇浸出物含量(冷浸法)为 5.77% ~ 11.08%。**结论** 拟订水分含量不得过 13.0%, 总灰分不得过 6.0%, 酸不溶性灰分不得过 1.0%, 70% 乙醇冷浸法浸出物不得少于 5.0%。

关键词: 串连珠; 质量标准; 显微鉴别; 薄层色谱

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1904-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.024

Quality standard for Yao medicine *Damnacanthus giganteus*

MO Dan-dan^{1,2}, TANG Bing-lan^{1,2}, GONG Xiao-mei^{1,2}, OU Chun-li^{1,2}, WANG Shuo^{1,2}, ZHOU Xiao-lei^{1,2}, ZHAO Yi-min^{1,2*} (1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023; 2. Guangxi Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Resource Intelligent Creation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023)

Abstract: Objective To establish the quality standards for Yao medicine *Damnacanthus giganteus*.

Methods The macroscopic and microscopic characteristics of 10 *Damnacanthus giganteus* samples from different habitats were determined. The reference medicinal materials were used to identify the water, ash and extract content with thin layer chromatography. **Results** The identification methods were highly specific. Totally 10 samples from different habitats showed the same colors for the same spots with the control chromatogram at the corresponding positions. The content of moisture was 7.91% - 12.85%, total ash 3.33% - 5.58%, acid insoluble ash 0.16% - 0.76%, and ethanol soluble extract 5.77% - 11.08%. **Conclusion** The quality standard for the water content should be below 13.0%, the average content of ash less than 6.0%, acid insoluble ash under 1.0%, and ethanol soluble extract above 5.0%.

Key words: *Damnacanthus giganteus*; quality standard; microscopic identification; TLC

串连珠为茜草科植物短刺虎刺 *Damnacanthus giganteus* (Mak.) Nakai 的干燥根, 别名岩石羊(灌阳)、半球莲(恭城)、树莲藕(临桂)、大黄沙^[1-5]。短刺虎刺生于山地疏林或密林下和灌木丛中, 主要分布于安徽、浙江、江西、福建、湖南、

广东、广西、贵州、云南等省区^[6-7], 在广西主要分布在恭城、阳朔、灌阳、罗城、环江、桂林、临桂、龙胜、那坡等地^[2, 8]。串连珠为瑶族民间习用药材, 具有补气收敛止血、舒筋活血、补养气血、祛风除湿、安神止咳的功效, 主要用于肾

基金项目:《广西壮族自治区瑶药材质量标准(第二卷)》质量评价与标准研究项目(No.MZY2017003); 广西科技重大专项(桂科 AA18242040)。

作者简介: 莫单丹, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药(民族药)质量标准研究工作, E-mail: 280870928@qq.com *通信作者:

赵以民, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药品质评价与鉴定工作, E-mail: zh_ym2009@126.com

虚腰疼、遗精、贫血萎黄、瘰疬、骨结核、咳嗽、肝脾肿大、体弱血虚、月经不调、崩漏、白带、小儿疳积、风湿痹痛、黄疸、肠风下血、肝炎、肿瘤、神经衰弱、跌打损伤等症^[2-7]。目前研究表明,串连珠主要化学成分是茜根定-1-甲醚、短刺虎刺素、8-羟基短刺虎刺素、5-羟基虎刺素- ω -乙基醚、8-羟基虎刺素- ω -乙基醚(1-甲氧基-2-乙氧甲基-3,8-二羟基蒽醌)^[3,9]。现代药理研究表明串连珠具有抗肿瘤作用^[3]。桂林灌阳县当地民间用串连珠治疗颈淋巴结核,对鼻咽癌、颈转移淋巴结有一定的疗效,且具有镇静、镇痛、抗炎、镇咳的作用^[10]。串连珠为瑶族民间习用药材,但国家和地方标准均未收载,《广西壮族自治区瑶药材质量标准(第二卷)》拟收载该品种。因此,本研究通过对串连珠性状、显微及薄层色谱(TLC)进行鉴别,并对水分、总灰分、浸出物含量测定等项目进行研究,为该药材的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

石蜡切片机(德国 Leica RM2255); HH-6 数显恒温水浴锅[邦西仪器科技(上海)有限公司]; FA2004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 电子分析天平(CP2250D, Sartorius); 超纯水仪(美国 Millipore Milli-Q Academic); DZTW 调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司); LEICA 生物显微(DM2000 LEICA/Germany)。

1.2 试药

硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工有限公司), 甲醇、石油醚(60~90℃)、三氯甲烷等均为分析纯。串连珠 10 个样品分别采于广西桂林市恭城瑶族自治县、灌阳县等地,经韦松基教授和黄云峰副研究员鉴定为茜草科植物短刺虎刺 *Damnacanthus giganteus* (Mak.) Nakai, 10 批样品的详细信息见表 1。以 CLZ-3 样品作为串连株的对照药材与其他样品进行对比;将样品干燥、粉碎处理,过 40 目筛,备用。

2 方法与结果^[11-13]

2.1 药材性状与显微特征

2.1.1 方法 药材性状通过对药材的形状、大小、颜色、断面、气、味等进行观察并描述分析。显微特征分别取药材根按石蜡切片法制作切片,取药材粉末按粉末制片法制作粉末片,在显微镜下观察拍照并描述。

表 1 串连株样品信息

Tab 1 Sample source information of *Damnacanthus giganteus*

编号	采集时间	采集地点
CLZ-1	2018.04.15	广西桂林市恭城瑶族自治县西岭乡
CLZ-2	2018.04.18	广西桂林市灌阳县洞井乡
CLZ-3	2018.04.16	广西桂林市恭城瑶族自治县栗木镇
CLZ-4	2018.08.10	广西柳州市融水县白云山
CLZ-5	2018.06.25	广西桂林市灌阳县西山乡
CLZ-6	2018.08.28	广西富川县
CLZ-7	2018.10.10	广西鹿寨县
CLZ-8	2018.09.22	广西贵港市
CLZ-9	2018.09.20	广西临桂县
CLZ-10	2018.09.27	广西龙胜县

2.1.2 药材性状 本品呈圆柱形,略弯曲,自然缢缩而呈念珠状,缢缩处常有表皮包被而不露出木部,直径 4~9 mm。表面棕褐色,有不规则纵皱纹,横裂纹明显。质坚韧,易折断,断面皮部淡紫色或黄白色,木部黄白色。气微臭,味微甘,嚼之稍发黏(见图 1)。

2.1.3 根横切面 木栓层为数列木栓细胞;皮层宽广,内外两侧均有石细胞单个或多个成群散在,直径 30~80 μm ,薄壁细胞可见草酸钙针晶束,长达 150 μm ;韧皮部窄,有的细胞含细小草酸钙针晶束,长 30~50 μm ;形成层呈环状;木质部导管呈放射状排列。(见图 2)。

2.1.4 粉末特征 本品粉末灰棕褐色。草酸钙针晶束散在或存在于薄壁细胞中,针晶长 30~150 μm ;石细胞棕黄色,类长方形、类椭圆形、或不规则形,长 50~200 μm ,宽 15~50 μm ,壁较厚,纹孔及孔沟明显;木纤维单个散离或成束,比较薄,可见点状纹孔;多见孔纹导管。木薄壁细胞类长方形、类椭圆形,木化,长 47~200 μm ,宽 29~34 μm ,见图 3。

2.2 薄层色谱鉴别

2.2.1 溶液的制备 取本品粉末 2 g,加乙醇 50 mL,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz) 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,用三氯甲烷萃取两次,每次 10 mL,合并三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取串连株对照药材 2 g,同法制成对照药材溶液。

2.2.2 薄层色谱条件及结果 照薄层色谱法[《中国药典》2015 年版四部通则 0502] 试验,吸取上述两种溶液各 2~5 μL ,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以石油醚(60~90℃)-三氯甲烷-甲醇-水(8:17:2:1)为展开剂,展开,



图 1 串连株药材

Fig 1 Crude drug of *Damnacanthus giganteus*

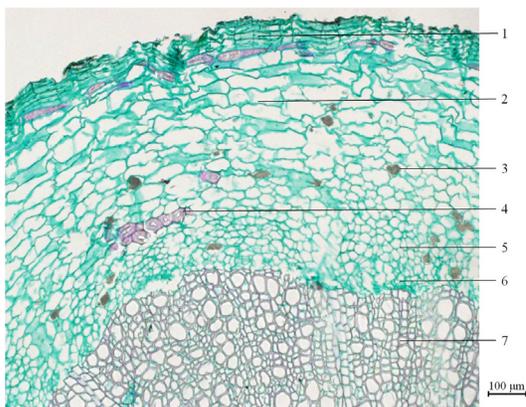


图 2 串连珠根横切面显微图

Fig 2 Cross section of *Damnacanthus giganteus* root

1. 木栓层 (phellem layer); 2. 皮层 (cortex); 3. 草酸钙针晶束 (acicular crystal); 4. 石细胞 (stone cell); 5. 韧皮部 (phloem); 6. 形成层 (cambium); 7. 木质部 (xylem)



图 3 串连株粉末显微图

Fig 3 Powder of *Damnacanthus giganteus*

1. 木薄壁细胞 (xylem parenchyma); 2. 石细胞 (stone cell); 3. 孔纹导管 (pitted vessel); 4. 草酸钙针晶 (acicular crystal); 5. 纤维束 (fiber bundle)

取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品, 在与对照药材相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点 (见图 4)。

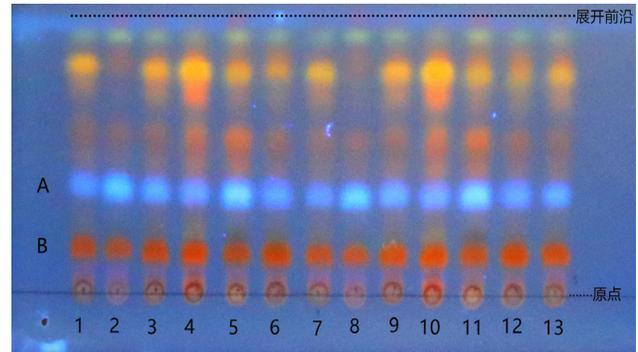


图 4 串连株样品 TLC 图

Fig 4 TLC chromatogram of *Damnacanthus giganteus*

注 (Note): 1, 6, 9, 13. 对照药材 (control drug); 2 ~ 5, 7 ~ 9, 10 ~ 12. 样品 (sample)。

2.3 水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物的测定

2.3.1 测定方法 水分测定参照《中国药典》2015 年版四部通则 0832 水分测定法测定; 总灰分、酸不溶性灰分测定参照《中国药典》2015 年版四部通则 2302 灰分测定法测定; 浸出物参照《中国药典》2015 年版四部通则 2201 项下的冷浸法进行测定。

2.3.2 测定结果 10 批样品的水分、总灰分、酸不溶性灰分和浸出物的测定结果见表 2。10 批样品水分含量在 7.91% ~ 12.85%, 总灰分含量在 3.33% ~ 5.58%, 酸不溶性灰分含量在 0.16% ~ 0.76%, 70% 乙醇浸出物 (冷浸法) 含量在 5.77% ~ 11.08%。

表 2 串连珠样品水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物测定结果 (n = 3, %)

Tab 2 Determination of moisture, ash, acid insoluble ash and extract of *Damnacanthus giganteus* (n = 3, %)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物
CLZ-1	8.25	4.23	0.25	8.45
CLZ-2	8.57	3.33	0.29	8.22
CLZ-3	8.59	4.25	0.27	11.08
CLZ-4	9.56	4.53	0.16	6.17
CLZ-5	7.91	5.14	0.22	7.34
CLZ-6	8.51	3.87	0.47	6.66
CLZ-7	10.33	5.58	0.71	9.46
CLZ-8	12.85	5.13	0.72	10.52
CLZ-9	11.31	4.91	0.76	5.77
CLZ-10	12.26	4.15	0.64	7.81

3 讨论

目前, 关于串连珠的化学成分、药理作用研究较少, 其主要化学成分为蒽醌类, 有抗肿瘤、镇

静、镇痛、抗炎、镇咳的作用。串连珠为瑶族民间习用药材，其物质基础及作用机制研究还未见报道。经查阅文献和预试验，本研究未找到合适的指标成分用于薄层鉴别和含量测定，因此采用经专家鉴定的串连珠作为对照药材用于薄层鉴别。

薄层色谱鉴别比较了三氯甲烷-石油醚-甲醇-水(10:5:2:1)、三氯甲烷-石油醚-甲醇-水(10:5:1:1)、三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(20:2:1:1)、三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(7:2:1:1)等展开系统，经过反复试验确定以石油醚(60~90℃)-三氯甲烷-甲醇-水(8:17:2:1)为展开剂，得到的薄层色谱斑点分离度较好。同时考察了不同厂家、不同类型预制板，不同展开温度和湿度，结果均表明本法的耐用性良好。

根据测定结果，考虑到串连珠药材为南方所产，而南方气候较为湿润，因此拟订水分不得过13.0%，总灰分不得过6.0%，酸不溶性灰分不得过1.0%；采用冷浸法和热浸法来进行试验，结果两者提取率相当，浸出溶剂的选择方面，采用不同浓度的乙醇和水作为溶剂来提取，结果不同浓度其浸出物含量不同，水溶性大于醇溶性浸出物含量，低浓度的乙醇浸出物含量较大，为了降低药材无效成分的溶出度，重点富集瑶药串连株蒽醌类和部分水溶性成分等主要活性成分，因此浸出物测定采用以70%乙醇作为溶剂的冷浸法，含量不得少于5.0%。本研究所建立的方法准确可靠，

可为瑶药串连珠的质量评估、监管等提供参考。

参考文献

- [1] 方鼎, 沙文兰, 陈秀香, 等. 广西药用植物名录 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1986: 385.
- [2] 广西中药资源普查办公室. 广西中药资源名录 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 1993: 201.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 《中华本草》第六册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 415.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编-2版(下册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 322.
- [5] 姚振生, 熊耀康. 浙江药用植物资源志要 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 304.
- [6] 姚淦, 邓懋彬. 我国东部地区虎刺属新植物 [J]. 植物研究, 1990, 10(4): 1-4.
- [7] 江纪武. 药用植物词典 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2014: 245.
- [8] 覃海宁, 刘演. 广西植物名录 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 325.
- [9] 利国威, 赵志远, 徐任生, 等. 短刺虎刺化学成分的研究——I. 短刺虎刺素与8-羟基短刺虎刺素的分离和结构鉴定 [J]. 药学学报, 1981, 16(8): 576-581.
- [10] 潘启超, 利国威, 刘宗潮, 等. 短刺虎刺(岩石羊)抗癌研究初步报告 [J]. 中山医学院学报, 1980, 1(1): 59-63.
- [11] 陈华林, 徐俊, 蔡小洋, 等. 藏药奥色折布的质量标准研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(21): 2609-2613.
- [12] 陈乾平, 谷筱玉, 龙海荣, 等. 壮药五指那藤的质量标准研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(2): 182-186.
- [13] 赵超, 徐文芬, 孙庆文, 等. 人字果质量标准的研究 [J]. 中成药, 2020, 42(10): 2579-2583.

(收稿日期: 2020-12-24; 修回日期: 2021-03-05)

注射用长春西汀中两种磺酸酯类基因毒性杂质的测定

焦洁, 王涛, 妙苗 (陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定注射用长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的含量。**方法** 采用 Waters ODS2 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (39:61); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 225 nm。**结果** 对甲苯磺酸甲酯在 0.15~0.60 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率 98.9%, RSD = 1.2%。对甲苯磺酸乙酯在 0.11~0.45 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率 99.5%, RSD = 1.6%。**结论** 本方法简便、准确, 可用于长春西汀注射液中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的定性和定量分析。

关键词: 高效液相色谱法; 注射用长春西汀; 对甲苯磺酸甲酯; 对甲苯磺酸乙酯

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1908-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.025

Determination of genotoxic impurities of sulfonate esters in vinpocetine for injection

JIAO Jie, WANG Tao, MIAO Miao (*Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065*)

Abstract: Objective To determine the genotoxic impurities methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate in vinpocetine for injection by HPLC. **Methods** The chromatographic conditions adopted were ODS2 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (39:61) was used as the mobile phase in gradient elution mode at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 225 nm. **Results** The methyl *p*-toluene sulfonate showed good linearity at 0.15~0.60 μg·mL⁻¹, whose average recovery was 98.9% with RSD = 1.2%. The ethyl *p*-toluene sulfonate showed a good linearity at 0.11~0.45 μg·mL⁻¹, whose average recovery was 99.5% with RSD = 1.6%. **Conclusion** This method is simple, accurate, which can be used for the qualitative and quantitative analysis of methyl *p*-toluene sulfonate and ethyl *p*-toluene sulfonate in vinpocetine for injection.

Key words: HPLC; vinpocetine for injection; methyl *p*-toluene sulfonate; ethyl *p*-toluene sulfonate

注射用长春西汀是由主药长春西汀和辅料甘露醇、山梨醇等制成的无菌粉针剂, 临床主要用于改善脑梗死后遗症、脑出血后遗症、脑动脉硬化症等诱发的各种症状^[1]。其主要成分长春西汀是以长春胺为起始原料, 经脱水消除反应、水解反应和酯化反应制得。在长春西汀中间体制备过程中使用了对甲苯磺酸作为催化剂, 虽然在后续处理过程中进行了充分的洗涤, 但仍然可能残留对甲苯磺酸, 在后续的酯化反应中会继续反应生成对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯。对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯为基因毒性杂质, 因此

需要在成品质量中严格控制其含量。

目前, 对甲苯磺酸酯类的检测方法主要有高效液相色谱法^[2-7]、液质联用法^[8-11]、气质联用法^[12-13]等。高效液相色谱法具有低成本、分离效率高、灵敏度高优点。注射用长春西汀中这两种基因毒性杂质的测定还未见有报道。本研究建立了 HPLC 法测定注射用长春西汀中对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸乙酯的含量, 为该药中潜在有害杂质的检测提供参考。

1 材料

1.1 仪器

基金项目: 陕西省创新能力支撑计划科技资源开放共享平台 (No.2020PT-041); 陕西省重点研发计划 (No.2019SF-075)。

作者简介: 焦洁, 女, 主管药师, 主要从事药物分析及质量控制研究, E-mail: 674272301@qq.com

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), XPE-105 型电子分析天平 (瑞士梅特勒公司)。

1.2 试药

对甲苯磺酸甲酯 (批号: F1012054; 纯度: 98.0%)、对甲苯磺酸乙酯 (批号: E1012037; 纯度: 98.0%) (对照品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 注射用长春西汀 (15 个厂家, 共计 92 批样品, 包括 5 mg、10 mg、20 mg、30 mg 4 种规格); 磷酸 (西安试剂厂, 分析纯), 乙腈 (美国天地公司, 色谱纯), 水为高纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ODS2 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (39:61); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 225 nm; 柱温: 35 °C, 进样体积: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯各适量, 用流动相溶解并稀释成含对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯各约 0.25 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取供试品 1 支, 精密加入流动相适量, 振摇使溶解并稀释制成每 1 mL 含长春西汀约为 5 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.2.3 辅料空白溶液制备 根据各生产企业提供的注射用长春西汀处方, 取甘露醇、枸橼酸、山梨醇、焦亚硫酸钠、维生素 C、酒石酸、活性炭、柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠、亚硫酸氢钠、依地酸二钠等辅料适量, 配制辅料空白, 称取适量, 用流动相溶解并过滤, 作为注射用长春西汀辅料空白溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

取流动相 (空白溶液)、对照品溶液、加标供试品溶液 (按“2.5”项下方法配制) 和辅料空白溶液, 照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (见图 1)。结果显示, 对照品溶液出峰顺序依次为对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯, 分离度为 9.2, 理论塔板数分别为 13 359 和 13 880, 空白溶液和辅料对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密称取对甲苯磺酸甲酯 12.24 mg 和对甲苯磺酸乙酯 9.27 mg 同置 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释到刻度, 摇匀。精密量取 2.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释到刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 1、1.5、2、3 和 4 mL, 分别置 20 mL 量瓶中, 用流动

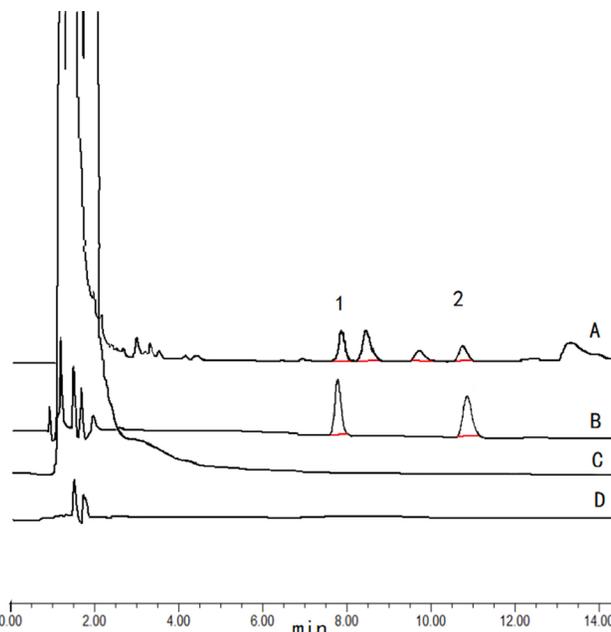


图 1 专属性色谱图

Fig 1 Specific chromatogram

A. 加标供试品溶液 (spiked sample solution); B. 对照品溶液 (reference solution); C. 辅料空白溶液 (negative solution); D. 空白溶液 (blank solution); 1. 对甲苯磺酸甲酯 (methyl *p*-toluene sulfonate); 2. 对甲苯磺酸乙酯 (ethyl *p*-toluene sulfonate)

相溶解并稀释到刻度, 摇匀即得线性对照品溶液。

精密量取线性对照品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测试, 分别获得相应线性方程。对甲苯磺酸甲酯: $Y = 6.36 \times 10^4 X - 3.09 \times 10^2$, $r = 1.000$; 对甲苯磺酸乙酯: $Y = 6.12 \times 10^4 X - 3.17 \times 10^2$, $r = 1.000$; 对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯分别在 0.15 ~ 0.60 μg·mL⁻¹, 0.11 ~ 0.45 μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 回收试验

考虑到各企业之间工艺和处方的差别, 选择注射用长春西汀使用辅料最多的 A 公司样品进行加样回收试验。取 A 公司生产的批号为 DB190101 的样品 6 支 (规格 10 mg, 对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯均未检出), 精密加入线性对照品溶液适量, 摇匀。

精密量取对照品溶液和上述溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进样, 按外标法计算回收率。对甲苯磺酸甲酯平均加样回收率为 98.9%, $RSD = 1.2\%$; 对甲苯磺酸乙酯平均加样回收率为 99.5%, $RSD = 1.6\%$ 。结果表明方法准确度符合要求。

2.6 重复性试验

回收率试验 6 份加标样品中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯含量均值分别为 0.0059%、0.0045%,

RSD均小于1.6%，表明方法的重复性符合要求。

2.7 定量限和检测限

取线性对照品溶液逐级稀释，按“2.1”项下色谱条件进样分析，得对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的定量限($S/N \approx 10$)分别为 $0.037 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.045 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，检测限($S/N \approx 3$)分别为 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.023 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.8 精密度试验

精密量取甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯对照品溶液 $20 \mu\text{L}$ (质量浓度分别为 0.3 、 $0.23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，如前配制)连续进样6次，测得两者峰面积的RSD分别为0.91%和2.0%。表明仪器的精密度良好。

2.9 稳定性试验

取对照品溶液于室温放置0、1、2、3、4、5、6 h，分别进样分析，记录色谱图，结果发现对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯峰面积有变小的趋势，但在6 h内峰面积变化 $RSD < 2.0\%$ ，建议供试品溶液在配制后6 h内测定。

2.10 样品含量测定

取92批注射用长春西汀样品，分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。按外标法计算，结果均未检出甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯。

3 讨论

3.1 流动相的优化

试验中先后考察了①乙腈-0.1%磷酸溶液(39:61)，检测波长为225 nm；②乙腈-水(40:60)，检测波长为220 nm；③乙腈-0.2 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(50:50)，检测波长为260 nm 3种体系。结果发现，3种流动相均可满足系统适应性要求，但③的检出限是①和②的10倍，且②的系统耐用性较差，故采用流动相①。

3.2 色谱柱的选择

试验中先后考查了①Waters ODS2 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)柱、②Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)柱、③ACE Excel C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)柱。结果发现，在采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相条件下，3种色谱柱均可满足系统适应性要求，但在使用②和③色谱柱时2种待测物均在长春西汀主成分之后出峰，由于供试品溶液浓度较大，有一定程度的拖尾，导致2种待测物的灵敏度低，达不到限度要求。采用色谱柱①，待测物在长春西汀主峰前流出，

可以杜绝高浓度样品拖尾对待测组分的干扰，降低基线噪音，提高检测的灵敏度。

3.3 待测物的确认

试验过程中发现，部分厂家供试品溶液色谱图中，在待测物甲苯磺酸甲酯保留时间附近还有其他色谱峰，为排除因保留时间漂移引起的漏检，对上述样品均进行加标回收验证，结果表明，该色谱峰不是待测物，为长春西汀原料引入的杂质。

3.4 限度的确定

根据ICH规定，基因毒性杂质的最大摄取量为 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ，长春西汀每日最大用量为30 mg，按此计算，确定本品中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的限度为50 ppm，即不得过0.005%。

参考文献

- [1] 陈雪江, 郭丽蓉, 沈红娅, 等. 长春西汀注射液中的基因毒性杂质研究与含量测定[J]. 中国药物经济学, 2018, 5: 42-44.
- [2] 朱小华, 吕列超, 赵金亮, 等. HPLC法测定原料药AL58805中基因毒杂质[J]. 化工时刊, 2020, 34(2): 17-20.
- [3] 李明显, 郑枫, 丁黎. HPLC-UV法测定卡培他滨中的对甲苯磺酸酯[J]. 广州化工, 2019, 47(10): 92-94.
- [4] 谢卫峰, 高玉珍. HPLC法检测托吡司特中的基因毒性杂质对甲苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸仲丁酯、对甲苯磺酸乙酯[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1788-1793.
- [5] 江凡, 张炎, 林晓燕, 等. 高效液相色谱法测定布林佐胺中对甲苯磺酸异丙酯[J]. 医药导报, 2018, 37(7): 882-885.
- [6] 樊高娜, 郑枫, 孙宏张. 高效液相色谱法测定缙沙坦中两种基因毒性杂质[J]. 海峡药学, 2020, 32(4): 75-77.
- [7] 冯向东, 王戈, 刘直臻, 等. 高效液相色谱法同时测定元胡止痛片中6种活性成分的含量[J]. 中南药学, 2019, 17(2): 243-246.
- [8] 张薇, 陈夷花, 郑枫. 长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的LC-MS/MS法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(12): 1334-1336.
- [9] 梁键谋, 傅聪, 陈悦. LC-MS/MS测定草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的含量[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(11): 1436-1440.
- [10] 舒诗会, 姚君亮, 尹大全. LC-MS/MS法检测拉科酰胺原料中的对甲苯磺酸甲酯[J]. 上海医药, 2019, 40(15): 116-119.
- [11] 芦飞, 邢珊珊, 王咏. LC-MS测定醋酸甲羟孕酮中对甲苯磺酸甲酯及对甲苯磺酸乙酯的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 657-659.
- [12] 侯金凤, 李珉, 齐麟, 等. 气相色谱质谱联用法用于甲磺酸左氧氟沙星片中甲磺酸乙酯的含量测定[J]. 中国医药导报, 2018, 15(3): 126-129.
- [13] 刘雪薇, 厉程, 韩海云, 等. 药物中磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J]. 色谱, 2018, 36(10): 952-961.

(收稿日期: 2021-01-05; 修回日期: 2021-04-07)

高效液相色谱法同时测定红旱莲中 5 个黄酮类成分的含量

王慧, 辛爱玲, 冯璐杰, 任小凡, 李元伟, 董俊青 (洛阳市食品药品检验所, 河南 洛阳 471023)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定红旱莲中芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷的含量并研究其变化。方法 采用高效液相色谱法在 360 nm 下, 对 28 批不同产地的红旱莲进行测定, 并对 5 批河南南阳产红旱莲的根、茎、叶、花、果实、地上部分中 5 个黄酮类成分进行含量测定。结果 芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷质量浓度分别在 26.9 ~ 403.5、21.37 ~ 320.55、32.72 ~ 490.8、26.73 ~ 400.95、17.7 ~ 265.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系 (r 均 > 0.9998); 5 个黄酮类成分的平均加样回收率均在 98.27% ~ 103.72%, RSD 在 0.43% ~ 0.75%。结论 不同产地红旱莲中黄酮类成分含量差异较大, 其中槲皮素含量最高; 8 月份左右果成熟后采收总黄酮含量最高; 不同部位总黄酮含量比较如下: 果 $>$ 茎 $>$ 地上部分 $>$ 花 $>$ 叶 $>$ 根。该方法简便、准确, 结果稳定, 可用于红旱莲中黄酮类成分的含量测定和质量评价。

关键词: 高效液相色谱法; 红旱莲; 黄酮

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1911-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.026

Determination of 5 flavonoids in *Hypericum ascyron* L. by HPLC

WANG Hui, XIN Ai-ling, FENG Lu-jie, REN Xiao-fan, LI Yuan-wei, DONG Jun-qing (Institute for Food and Drug Control, Luoyang Henan 471023)

Abstract: Objective To simultaneously determine rutin, hyperoside, quercetin, isoquercetin and kaempferol in *Hypericum ascyron* L. by HPLC, and study the content changes. **Methods** The content of 28 batches of *Hypericum ascyron* L. from different areas and the content of 5 flavonoids in the roots, stems, leaves, flowers, fruits and parts above the ground of 5 batches of *Hypericum ascyron* L. from Nanyang, Henan were determined at 360 nm by HPLC. **Results** The detection concentrations of rutin, hyperin, quercetin, isoquercetin and kaempferol were at 26.9 ~ 403.5, 21.37 ~ 320.55, 32.72 ~ 490.8, 26.73 ~ 400.95 and 17.7 ~ 265.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, with a good linearity in the peak area (all $r > 0.9998$). The average recovery was 98.27% ~ 103.72%, and RSD was 0.43% ~ 0.75%. **Conclusion** The content of *Hypericum ascyron* L. in different areas is quite different, but the content of quercetin is the highest. The total content of fruits harvested in August is the highest. The total content in different parts follows: fruits $>$ stems $>$ parts above the ground $>$ flowers $>$ leaves $>$ roots. The method is simple, accurate and stable, which can be used for the content determination and quality evaluation of flavonoids in *Hypericum ascyron* L.

Key words: HPLC; *Hypericum ascyron* L.; flavonoid

红旱莲又名湖南连翘、黄海棠等, 为藤黄科金丝桃属多年生草本植物黄海棠 (*Hypericum ascyron* L.) 的干燥地上部分^[1], 具有凉血止血、活血调经、平肝消肿、清热解毒之功效^[2]。在我国分布较广, 除新疆、青海外, 我国东北地区及黄河、长

江、珠江流域均有分布。民间多用于止痛、抗菌消炎、治疗创伤等^[3]。据研究报道, 红旱莲含有丰富的黄酮类生物活性物质, 其提取物具有降血脂、抗氧化、抗抑郁、抗病毒、抑制组胺释放等药理活性^[4-8]。目前文献中对红旱莲总黄酮的研究比较多,

基金项目: 河南省药品监督管理局科技计划项目 (No.2020DB013)。

作者简介: 王慧, 女, 主管药师, 主要从事药物分析、检验及中药质量标准研究, E-mail: wang.hui83@163.com

但对其各部位黄酮类化合物分布的研究较少,且对于红旱莲的采收期、药用部位等虽有文献记载,但标准并不统一,如药用部位有全草入药和地上部分入药^[8-10]。本研究以芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷 5 个黄酮类成分作为指标成分,对不同产地、不同采收期、不同药用部位的红旱莲进行多组分含量分析及比较,为确立红旱莲适宜采收期和药用部位,完善红旱莲的质量标准及红旱莲资源的合理利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪、Agilent ChemStation 色谱工作站(美国 Agilent Technologies 公司);MSA225S-000-DU 电子天平(德国 Sartorius 公司);BSA224S-CW 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-400DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材

28 批红旱莲样品,经洛阳市食品药品检验所辛爱玲副主任中药师鉴定均为藤黄科植物黄海棠(*Hypericum ascyron* L.)的干燥地上部分,具体信息见表 1。

表 1 样品来源

Tab 1 Source of samples

编号	产地	采集时间
S1	湖北	2020-09-06
S2	湖南	2020-09-17
S3	河南信阳	2020-10-14
S4	河南信阳	2020-08-29
S5	河南南阳	2020-08-13
S6	湖北	2020-08-24
S7	河南南阳	2020-09-05
S8	广西	2020-09-23
S9	河南南阳	2020-11-13
S10	安徽	2020-10-08
S11	浙江	2020-10-27
S12	上海	2020-09-30
S13 ~ 16	河南南阳桐柏	2020 年 7 ~ 10 月
S17 ~ 20	河南南阳西峡	2020 年 7 ~ 10 月
S21 ~ 24	河南洛阳宜阳	2020 年 7 ~ 10 月
S25 ~ 28	河南洛阳栾川	2020 年 7 ~ 10 月

1.3 试药

对照品芦丁(批号:100080-200707,纯度:90.5%)、金丝桃苷(批号:111521-201507,纯度:94.3%)、槲皮素(批号:100081-201610,纯度:99.1%)、异槲皮苷(批号:111809-201804,纯度:97.2%)、山柰苷(批号:110861-202013,纯度:

93.2%)(中国食品药品检定研究院);乙腈、磷酸为色谱纯(DiKMA 公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 25 min, 15%B; 25 ~ 45 min, 15% ~ 55%B; 45 ~ 50 min, 55% ~ 15%B);流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 360 nm;柱温为 35 °C;进样量为 10 μL。在此条件下,5 个成分与相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5,理论塔板数均高于 6000,对称性良好,空白溶剂对测定结果无干扰(见图 1)。

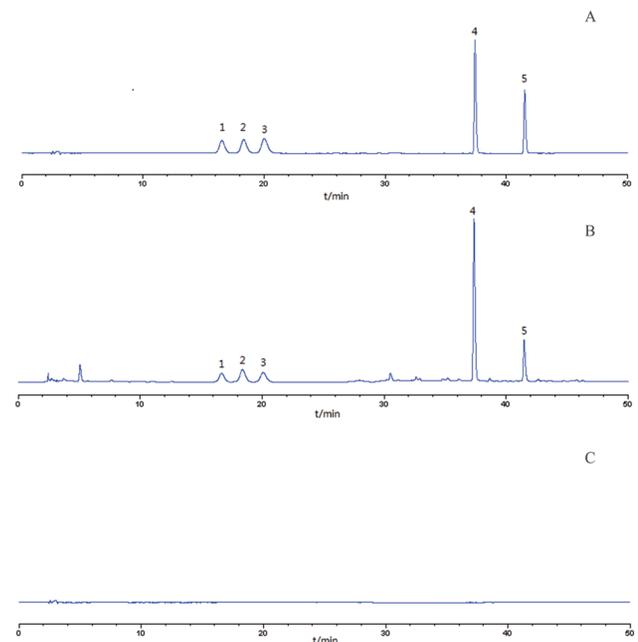


图 1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)及空白溶剂(C) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference substance (A), sample solution (B) and blank solvent (C)

1. 芦丁(rutin); 2. 金丝桃苷(hyperoside); 3. 异槲皮苷(isoquercetin); 4. 槲皮素(queracetin); 5. 山柰苷(kaempferol)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷适量,加甲醇超声溶解并定容,制成每 1 mL 分别含芦丁 0.026 90 mg、金丝桃苷 0.021 37 mg、槲皮素 0.032 72 mg、异槲皮苷 0.026 73 mg、山柰苷 0.017 70 mg 的混合对照品溶液,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取过 2 号筛的红旱莲粉末约 1 g,精密称定,

置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 30 min (功率 400 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液适量, 配制系列质量浓度对照品溶液, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定。以各成分峰面积 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回归, 其回归方程和线性范围见表 2。

表 2 各种成分的线性关系

Tab 2 Linearity of various constituents

化合物	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
芦丁	$Y = 47.94X + 27.56$	0.9998	26.90 ~ 403.5
金丝桃苷	$Y = 42.40X + 62.66$	0.9999	21.37 ~ 320.55
异槲皮苷	$Y = 49.80X + 60.66$	0.9998	26.73 ~ 400.95
槲皮素	$Y = 133.8X + 10.33$	0.9999	32.72 ~ 490.80
山柰素	$Y = 75.80X + 8.666$	0.9999	17.70 ~ 265.50

2.4.2 精密度试验 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录色谱图并计算 5 个化学成分峰面积的 RSD 。结果各组分色谱峰保留时间波动均小于 0.2 min, 芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷峰面积 RSD 分别为 0.72%、0.81%、0.67%、0.23%、0.42%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批供试品 (S9) 溶液, 室温下放置, 分别于 0、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 测得芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷峰面积 RSD 分别为 0.59%、0.47%、0.81%、0.42%、0.71%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批供试品 (S9) 约 1 g, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 按外标法计算各成分含量及其 RSD 。结果芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷平均质量浓度分别为 0.1562、0.3058、0.3233、0.5951、0.1840 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.82%、0.96%、0.78%、0.43%、0.61%, 表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 称取已知含量供试品 (S9) 9 份, 每份约 1 g, 分成 3 组, 精密称定, 分别加入含芦丁 0.0629 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、金丝桃苷 0.1226

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、槲皮素 0.2381 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、异槲皮苷 0.1293 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、山柰苷 0.0741 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的混合对照品溶液 2.0、2.5、3.0 mL, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算 5 个成分加样回收率均在 98.27% ~ 103.72%, RSD 均在 0.43% ~ 0.75%。

2.4.6 样品含量测定 精密称取 16 批不同产地的供试品 (地上部分, 见表 3)、5 批产自或采自河南南阳的供试品 (不同部位, 见图 2) 及河南 4 个产地不同采集时间的供试品 (地上部分, 见图 3), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件下平行进样 2 次, 记录色谱图, 按外标法计算各组分含量。

表 3 样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 3 Content determination ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

编号	芦丁	金丝桃苷	槲皮素	异槲皮苷	山柰苷	总含量
S1	0.1771	0.6114	1.1147	0.6016	0.2887	2.7935
S2	0.0613	0.2564	0.2570	0.2461	0.2513	1.0721
S3	0.0893	0.0649	0.2628	0.0865	0.0792	0.5827
S4	0.0693	0.1685	0.1818	0.1191	0.0655	0.6042
S5	0.1397	0.4678	0.7852	0.4524	0.2068	2.0519
S6	0.2650	0.1319	0.2470	0.0971	0.0881	0.8291
S7	0.1472	0.4478	0.7477	0.3875	0.2529	1.9831
S8	0.1229	0.5499	1.4068	0.4905	0.3579	2.9280
S9	0.1021	0.3258	0.3228	0.6594	0.1247	1.5348
S10	0.1904	0.1880	0.3434	0.2829	0.1192	1.1239
S11	0.1843	0.0974	0.2955	0.3347	0.2411	1.1530
S12	0.1030	0.1782	0.3550	0.5346	0.1915	1.3623
S13	0.1103	0.4782	1.3550	0.5346	0.2915	2.7696
S18	0.0946	0.3795	0.9477	0.4562	0.2466	2.1205
S22	0.1349	0.3846	0.4455	0.5697	0.2011	1.7358
S26	0.1217	0.4166	0.4722	0.4285	0.2653	1.7043

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

比较不同品牌色谱柱 [COSMOSIL Packed 5 C_{18} -MS-II (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Aglient ZORBAX SB- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Agela venusil XBD C_{18} (L) (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)] 对试验结果的影响, 结果各成分色谱峰分离度均达到满意效果, 证明该方法耐用性良好。

3.2 方法学条件的优化与选择

采用 DAD 检测器在 200 ~ 400 nm 波长对各考察成分进行光谱扫描, 发现各成分均在 360 nm 波长处有较大吸收; 对流动相、柱温、流速、提取溶剂、提取方式均进行了考察, 在保证含量稳定、分离度、信号强度较好的前提下, 以提取完全及节约时间成本为尺度综合考虑, 最终确定了

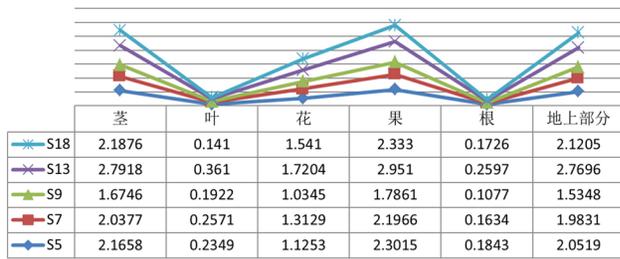


图 2 红旱莲不同部位 5 个黄酮类成分总含量分布 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Fig 2 Total content of 5 flavonoids in different parts of *Hypericum ascyron* L. ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

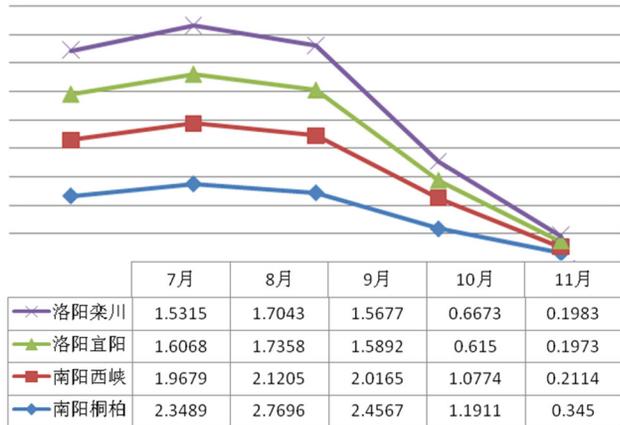


图 3 红旱莲不同采收期 5 个黄酮类成分总含量比较 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 16$)
Fig 3 Total content of 5 flavonoids in different harvest periods of *Hypericum ascyron* L. ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 16$)

本研究所需的色谱条件。

3.3 含量测定结果分析

所有批次的红旱莲均检测出芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、山柰苷这 5 个黄酮类成分。各产地之间 5 个黄酮类成分总含量差异较大，其中南阳产的含量偏高；单个成分的含量槲皮素最高，依次是异槲皮苷、金丝桃苷、山柰苷、芦丁。5 批南阳产红旱莲不同部位的 5 个黄酮类成分总含量也存在显著差异，依次为果实 > 茎 > 地上部分 > 花 > 叶 > 根。这种差异可能与植物自身遗传因素、植物生长发育进程、所处生长环境有关，也可能与植物器官所承担的功能有关^[11-12]。根据河南不同产地的

红旱莲连续 4 个月的考察结果可知，7~9 月份 5 个黄酮类成分总含量相对较高，8 月份达到最高，为红旱莲最佳采收时间提供了数据支持。

3.4 小结

本研究建立了高效液相色谱法同时测定红旱莲中 5 个黄酮类成分含量的方法，并用此方法对红旱莲进行多组分、多角度的测定分析，为指导红旱莲的最佳采收时间和资源合理利用方面提供了科学依据。

参考文献

- [1] 河南省卫生厅：河南省中药材标准[M]. 河南：中原农民出版社，1993.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999.
- [3] 丁宝章，王遂义，高增义. 河南植物志（第三册）[M]. 河南：河南人民出版社，1981.
- [4] Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J, et al. Antidepressant-like effects of apigenin and 2, 4, 5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26 (4): 474-480.
- [5] 方一杰，徐岩成，安毛毛，等. 黄酮类化合物的药理学和药理作用研究进展 [J]. 药学服务与研究，2015, 15 (1): 6-9.
- [6] 李纳，刘吉爽，张雅蓉，等. 红旱莲不同部位金丝桃苷含量测定 [J]. 药学研究，2018, 37 (7): 391-393.
- [7] 王兆全，王先荣. 红旱莲有效成分的研究 [J]. 药学学报，1980, 15 (6): 365-371.
- [8] 甘盛，施晓光，韩婷，等. 高效液相色谱法同时测定葡萄籽中芦丁、槲皮素与异槲皮素的含量 [J]. 中南药学，2011, 9 (12): 894-897.
- [9] 南京中医药大学. 中药大辞典（上册）[M]. 2 版. 上海：上海科学技术出版社，2006.
- [10] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范 [M]. 河南：河南人民出版社，2005.
- [11] 程水源，顾曼如，束怀瑞. 银杏叶黄酮研究进展 [J]. 林业科学，2000, 36 (6): 110-115.
- [12] 诸姮，胡宏友，卢昌义，等. 植物体内的黄酮类化合物代谢及其调控研究进展 [J]. 厦门大学学报（自然科学版），2007, 46 (S1): 136-143.

(收稿日期：2021-04-11；修回日期：2021-05-15)

氨甲苯酸注射液日晒降解产物的研究

张耀文^{1,2}, 于明^{1,2}, 岳青阳^{1,2}, 刘美辰^{1,2}, 徐万魁^{1,2*} (1. 辽宁省检验检测认证中心, 沈阳 110036; 2. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036)

摘要: **目的** 对氨甲苯酸注射液日晒降解产物进行研究。**方法** 考察日晒对氨甲苯酸注射液有关物质和 pH 值的影响, 建立 UHPLC-Q Exactive Focus MS 法对样品中产生的杂质进行结构鉴定并进行毒性预测。**结果** 日照 10 d 的氨甲苯酸注射液颜色变黄, 采用 UHPLC-Q Exactive Focus MS 推测该杂质的结构为 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸, 当样品中该杂质含量超过 0.1% 时溶液颜色变黄, 对杂质的毒性预测显示, 该杂质属遗传毒性 5 级。**结论** 氨甲苯酸注射液在光和热同时作用下产生杂质 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸, 同时 4-甲酰基苯甲酸含量和其他杂质总量明显增加, 提示氨甲苯酸注射液应采用棕色安瓿包装为宜, 避免阳光直射。

关键词: 氨甲苯酸注射液; UHPLC-Q Exactive Focus MS 法; 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸; 毒性预测
中图分类号: R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1915-05
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.027

Photodegradation products of aminomethylbenzoic acid injection

ZHANG Yao-wen^{1,2}, YU Ming^{1,2}, YUE Qing-yang^{1,2}, LIU Mei-chen^{1,2}, XU Wan-kui^{1,2*} (1. Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Shenyang 110036; 2. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036)

Abstract: Objective To determine the photodegradation products of aminomethylbenzoic acid injection. **Methods** The effect of light on the related substances and pH of aminomethylbenzoic acid injection was investigated, and the structure of impurities generated in the sample influence factor test was identified by UHPLC-Q Exactive Focus MS. **Results** In the influence factor test, the color of aminomethylbenzoic acid injection turned yellow after 10 days of sunshine. The structure of the impurity was inferred as 3-hydroxy-4-hydroxymethyl benzoic acid by UHPLC-Q Exactive Focus MS. When the impurity content in the sample exceeded 0.1%, the color of the solution turned yellow. Toxicity prediction showed that the genetic toxicity of 3-hydroxy-4-hydroxymethyl benzoic acid was level 5. **Conclusion** Under the simultaneous action of light and heat, the 3-hydroxy-4-hydroxymethyl benzoic acid was produced, the content of 4-formylbenzoic acid and other impurities may increase significantly. Therefore, aminomethylbenzoic acid injection should be protected from direct sunlight.

Key words: aminomethylbenzoic acid injection; UHPLC-Q Exactive Focus MS; 3-hydroxy-4-hydroxymethyl benzoic acid; toxicity prediction

氨甲苯酸 (aminomethylbenzoic acid) 是一种抗纤溶止血药, 临床上主要用于因原发性纤维蛋白过度溶解所引起的出血, 包括急性和慢性、局限性或全身性的高纤溶出血^[1-3]。氨甲苯酸注射液产品描述为无色的澄明液体。2020 年辽宁省药品检验检测院承担的氨甲苯酸注射液的国家计划抽

验任务共涉及 9 个生产企业, 均为透明玻璃安瓿包装。其中 2 个企业的产品有效期为 36 个月, 其余 7 个企业的产品有效期为 24 个月。氨甲苯酸注射液中有关物质含量较低, 各企业提供的长期稳定性考察资料表明, 本品在有效期内质量稳定。

目前, 国内文献针对氨甲苯酸的报道多为临

基金项目: 国家药品监督管理局 2020 年国家药品抽验任务 (编号: 73)。

作者简介: 张耀文, 女, 主管药师, 主要从事化学药品质量标准的研究, E-mail: zhangyw716@126.com * **通信作者:** 徐万魁, 男, 主任药师, 主要从事药物分析及药品标准研究, E-mail: xuwanke@163.com

床应用方面^[4-6], 针对氨甲苯酸注射液的降解产物尚未见报道。在药物生产贮存过程中, 保证药物的稳定性是非常重要的, 药物的稳定性与药品作用的发挥密切相关, 外界环境因素对药物稳定性的影响是不可避免的, 环境中的氧气、温度、湿度及光照等因素都会对药物的稳定性产生影响^[7-9]。而国家药品计划抽检探索性研究中的稳定性试验目的是了解不同生产企业杂质情况及影响因素。本次试验样品是抽样不同生产企业的氨甲苯酸注射液, 来自于不同省市, 运输及贮藏条件存在差异, 因而在常规的高温、光照等破坏的同时增加了日晒破坏, 结果发现有部分企业样品出现变色。因此本试验重点考察日晒对氨甲苯酸注射液有关物质和 pH 值的影响, 对氨甲苯酸注射液日晒的降解产物进行研究。采用 UHPLC-Q Exactive Focus MS 方法对影响因素试验产生的杂质进行结构鉴定, 并对其毒性与遗传毒性进行评价, 对本品的安全性进行全面控制。

1 仪器与试药

Waters e2695 液相色谱仪、2998 UVD 检测器(美国 Waters 公司); Vanquish 超高效液相色谱仪、Q Exactive Focus MS (美国 Thermo 公司); XP205 型电子分析天平、S400 Seven excellent 型 pH 计(瑞士 Mettler-Toledo 公司); 恒温恒湿箱(KBF115 德国 BINDER); 结构解析软件 Mass Frontier、小分子未知物定性软件 Compound Discoverer (美国 Thermo 公司); Derek Nexus 6.1.0 和 Sarah Nexus 3.1.0 遗传毒性预测软件(英国 Lhasa 有限公司); YB-2 型澄明度检测仪(天大天发科技有限公司)。

9 个生产企业 A ~ I 的氨甲苯酸注射液各 2 批(规格均为 100 mg/10 mL)。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液(磷酸氢二钠 11.0 g, 辛烷磺酸钠 1.0 g, 加水 800 mL 使溶解, 用磷酸调节 pH 值至 2.5, 加水至 900 mL) - 乙腈(88:12, V/V); 柱温: 40 °C; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 230 nm。

2.2 UHPLC MS 条件

色谱柱: Thermo Acclaim 120 C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相: 20 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 4.0) - 甲醇(80:20, V/V); 柱温: 40 °C; 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 进

样体积: 2 μL; 样品盘温度: 8 °C, UV: 230 nm。

喷雾电压: 3500 V, 雾化温度: 400 °C, 鞘气压力: 40 arb, 辅助气压力: 10 arb, 离子传输管温度: 300 °C, 扫描模式: Full Scan-ddms² 正负离子切换, 扫描范围: *m/z* 50 ~ 930, 分辨率: 70 000。

2.3 溶液配制

2.3.1 有关物质供试品溶液配制 精取氨甲苯酸注射液样品 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3.2 有关物质对照溶液配制 精取供试品溶液 100 μL 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.3.3 杂质鉴别样品配制 取户外光照 10 d 的 H 企业样品, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液直接进样。

2.4 稳定性试验

2.4.1 高温试验 将待测样品打开外包纸盒, 保留完整安瓿, 置于恒温恒湿培养箱中, 在 70 °C 条件下放置 30 d, 于第 5、10 和 30 日取样进行检测, 同时考察样品的性状。

2.4.2 强光照射试验 将待测样品打开外包纸盒, 保留完整安瓿, 于照度 4500 Lx 的光源下照射, 于第 5、10 日取样进行检测, 同时考察样品的性状。

2.4.3 日晒试验 将待测样品打开外包纸盒, 保留完整安瓿, 置于户外, 放置 10 d, 于第 5、10 日取样进行检测, 同时考察样品的性状和 pH 值。

2.4.4 安瓿瓶的影响 将各企业样品分别灌装于洗净的西林瓶中, 密塞, 放置 10 d, 取样检测, 同时考察样品的性状和 pH 值。

3 结果

3.1 氨甲苯酸注射液高温试验结果

在 70 °C 放置 30 d, 9 个生产企业样品的性状无明显变化, 有关物质色谱中各峰无明显变化, 相对保留时间约为 1.83 的已知杂质 4-甲酰基苯甲酸的含量无明显变化。表明氨甲苯酸注射液对温度相对稳定, 典型图谱见图 1 和 2。

3.2 氨甲苯酸注射液强光照射试验结果

9 个生产企业样品的性状无明显变化, 有关物质色谱中各峰无明显变化, 4-甲酰基苯甲酸的含量无明显变化。表明氨甲苯酸注射液对强光照相对稳定, 典型图谱见图 3。

3.3 氨甲苯酸注射液日晒试验结果

样品放置 5 d 时注射液样品颜色无明显变化, 放置 10 d 时部分企业样品颜色变黄。日晒时温度

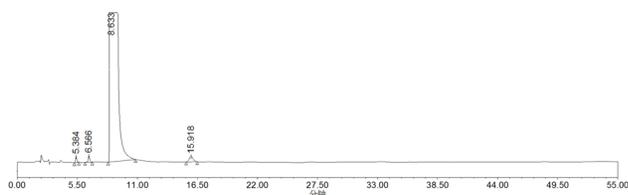


图 1 I 企业氨基苯甲酸注射液

Fig 1 Chromatogram of aminomethylbenzoic acid injection from I company

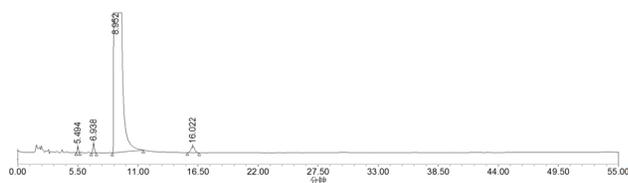


图 2 I 企业氨基苯甲酸注射液于 70 °C 放置 30 d

Fig 2 Chromatogram of aminomethylbenzoic acid injection from I company placed at 70 °C for 30 days

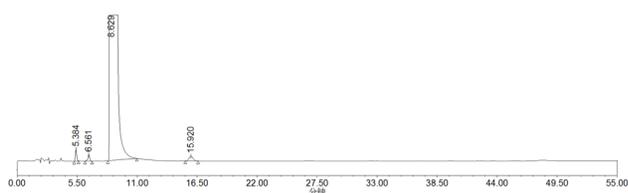


图 3 I 企业氨基苯甲酸注射液于 4500 Lx 照射 10 d

Fig 3 Chromatogram of aminomethylbenzoic acid injection from I company placed at 4500 Lx for 10 days

与光照同时作用于样品,使氨基苯甲酸注射液中杂质含量明显增加,特别是 6.8 min 的未知杂质峰,日晒照射后未变色样品中该杂质含量较低,变色样品中该杂质含量增大,见图 4 [实际杂质峰(6.881 min)与前后峰分离度均大于 1.5,分离度较好]。有关物质检查主要考察 6.8 min 未知杂质、15.9 min 的 4-甲酰基苯甲酸和除已知杂质其他杂质之和。日晒试验中样品变化情况见表 1。

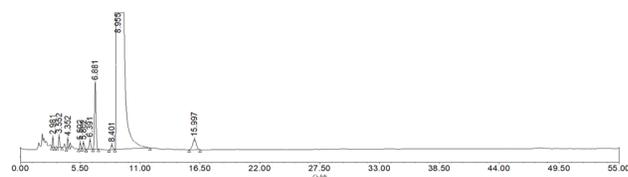


图 4 I 企业氨基苯甲酸注射液日晒 10 d

Fig 4 Aminomethylbenzoic acid injection from I company after sunshine for 10 days

由表 1 可见,当样品中保留时间为 6.8 min 的杂质达到一定量时,溶液颜色变黄;其含量为 0.1% 左右时,溶液为微黄色至淡黄色;含量为 0.2% 左右时,溶液为黄色。日照 10 d 的样品中,4-甲酰基苯甲酸的含量略有增加,总杂质含量增加,但均与样品颜色变化无相关性。样品 pH 值无明显变化(溶液颜色与 2020 年版《中国药典》

标准比色液中的黄色标准液比较,微黄色至淡黄色当相于 Y2 ~ Y6,黄色相当于 Y7 ~ Y8)。

3.4 对安瓿瓶影响的考察

将各企业样品密封于安瓿瓶放置 5 d 时注射液样品颜色无明显变化,放置 10 d 时部分企业样品颜色变黄,且变黄样品对应的企业及该企业样品的变色程度与样品在原包装日晒破坏时结果相同,结果表明安瓿瓶对样品变色无影响,且日晒条件具有可重复性。

3.5 对 6.8 min 未知杂质的研究

利用 UHPLC-Q Exactive Focus MS 对 6.8 min 杂质进行定性研究,对杂质的一、二级质谱图进行分析,确定化合物及二级碎片裂解规律。

一级质谱图给出 [M-H]⁻ 分子离子峰 *m/z* 167.035 11,二级质谱可见丢失 CO₂ 所得特征碎片 *m/z* 123.0452,进一步碎裂 CH₂O 所得 *m/z* 93.0345。运用 Mass Frontier 软件辅助 Compound Discoverer 软件,对该化合物的碎片结构进行归属,推测该杂质为 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸。杂质结构见图 5,质谱定性见图 6。

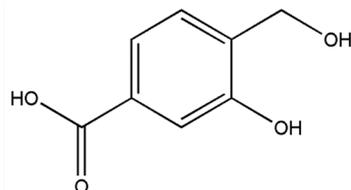


图 5 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸结构

Fig 5 Structure of 3-hydroxy-4-hydroxymethyl benzoic acid

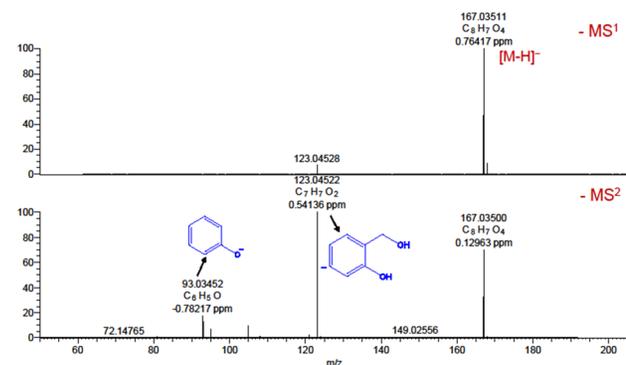


图 6 目标杂质的质谱图

Fig 6 Mass spectrum of target impurity

3.6 杂质毒性预测

采用 Derek Nexus 6.1.0 (基于知识规则的)和 Sarah Nexus 3.1.0 (基于统计学的)对杂质 3-羟基-4-羟甲基苯甲酸进行遗传毒性预测,并根据 ICH M7 指导原则对其毒性分级,结果见表 2。3-羟基-4-羟甲基苯甲酸属遗传毒性 5 级,没有警示结构。

表 1 日晒试验中样品变化情况
Tab 1 Sample changes in the solar test

生产企业	批号	测定物	有关物质含量 /%			pH 值		性状变化	
			0 d	5 d	10 d	0 d	10 d	5 d	10 d
A	11909200	6.8 min 杂质	0.00	0.01	0.01	3.7	3.8	无色	无色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.00	0.00	0.00				
		其他杂质之和	0.02	0.02	0.03				
B	319112901	6.8 min 杂质	0.00	0.01	0.02	4.2	4.2	无色	无色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.00	0.00	0.03				
		其他杂质之和	0.05	0.05	0.07				
C	190618214	6.8 min 杂质	0.00	0.01	0.04	4.0	4.1	无色	无色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.29	0.29	0.32				
		其他杂质之和	0.07	0.07	0.10				
D	A190504	6.8 min 杂质	0.00	0.01	0.01	3.9	3.9	无色	无色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.00	0.00	0.00				
		其他杂质之和	0.00	0.01	0.01				
E	1907141	6.8 min 杂质	0.00	0.04	0.14	4.0	4.0	无色	淡黄色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.00	0.03	0.09				
		其他杂质之和	0.03	0.06	0.25				
F	1912251 C2	6.8 min 杂质	0.01	0.03	0.09	4.2	4.2	无色	淡黄色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.09	0.12	0.17				
		其他杂质之和	0.32	0.40	0.54				
G	20181111	6.8 min 杂质	0.00	0.03	0.11	4.0	4.1	无色	淡黄色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.00	0.03	0.09				
		其他杂质之和	0.04	0.05	0.25				
H	2010109	6.8 min 杂质	0.02	0.04	0.19	3.7	3.8	无色	黄色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.26	0.26	0.35				
		其他杂质之和	0.05	0.08	0.43				
I	1906032	6.8 min 杂质	0.00	0.02	0.06	4.1	4.2	无色	微黄色
		4- 甲酰基苯甲酸	0.03	0.03	0.09				
		其他杂质之和	0.04	0.05	0.16				

表 2 杂质毒性预测
Tab 2 Toxicity prediction of impurity

杂质	Derek 预测	Sarah 预测	ICH M7 等级
3- 羟基 -4- 羟 甲基苯甲酸			Class 5

4 讨论

日照 10 d, 9 个生产企业氨甲苯酸注射液的颜色和有关物质明显不同。9 个生产企业氨甲苯酸注射液涉及 5 个原料药生产企业的氨甲苯酸, 加氯化钠和不加氯化钠 2 种处方, 7 个企业的低硼硅玻璃安瓿。本试验通过明确样品中产生 6.8 min 杂质的内因, 推测其来源。结果表明, 安瓿对氨甲苯酸注射液变色无影响, 在变色样品中, 有含氯化钠及不含氯化钠 2 种处方, 因此, 处方是否含氯化钠对氨甲苯酸注射液变色无影响。同时发现, 所有变色样品均使用国内同一企业的原料药, 推测变色可能与原料药有关。

氨甲苯酸注射液中有关物质含量较低。在 70 °C 条件放置 30 d, 性状基本上没有变化, 有关色谱图无明显变化, 可知氨甲苯酸注射液对温度

相对稳定。于照度 4500 Lx 的光源下照射 10 d, 性状基本上没有变化, 有关色谱图无明显变化, 可知氨甲苯酸注射液对强光照射相对稳定。将样品暴露于日光中, 5 d 时注射液样品颜色无明显变化, 放置 10 d 时部分企业样品颜色变黄, 氨甲苯酸注射液中杂质含量明显增加, 特别是 6.8 min 的未知杂质峰, 同时其他杂质总量虽也明显增加, 但杂质数目及各杂质增量并无规律性。由表 1 中可见 B 企业 4- 甲酰基苯甲酸含量明显增加, 但样品仍为无色, C 企业 4- 甲酰基苯甲酸含量明显高于样品显淡黄色的 E、F 和 G 企业, 但 C 企业样品无色, 说明样品变色与 4- 甲酰基苯甲酸无关, 综上推测样品变色与 6.8 min 杂质有关。通过 UHPLC-Q Exactive Focus MS 推测出该杂质的结构为 3- 羟基 -4- 羟甲基苯甲酸, 且当其含量为 0.1% 左右时, 溶液为微黄色至淡黄色; 当含量为 0.2% 左右时, 溶液为黄色。采用 Derek Nexus 6.1.0 和 Sarah Nexus 3.1.0 对 3- 羟基 -4- 羟甲基苯甲酸进行毒性预测, 预测结果表明该杂质属遗传毒性 5 级,

没有警示结构。综上,提示氨甲苯酸注射液采用棕色安瓿包装宜,应避免阳光直射。

参考文献

- [1] 张莉,刘光辉,高永丽,等.氨甲苯酸的配伍禁忌文献概述[J].中国药物滥用防治杂志,2016,22(3):168-169.
- [2] 任晓彤.最安全的抗纤维蛋白溶解药——氨甲苯酸[J].首都食品与医药,2017,24(23):67.
- [3] 朱迎军,兰文,王伟娇.高效液相色谱法测定氨甲苯酸注射液的含量及有关物质[J].中南药学,2012,10(4):263-265.
- [4] 吕竟夷,杜洁珊,梁丽玲.氨甲苯酸注射液与临床常用注射剂的配伍稳定性研究[J].中国药物滥用防治杂志,2017,23(5):278-281.
- [5] 张萍,王鸣.泼尼松龙联合氨甲苯酸对过敏性紫癜患者疗效及对炎症因子和凝血功能的影响观察[J].中国药师,2017,20(5):845-847.
- [6] 刘延芹,石磊,李浩,等.氨甲苯酸联合乌司他丁对小儿VSD修补术的临床效果[J].实用药物与临床,2016,19(7):851-854.
- [7] 刑玉秀,尹文华,王瑞萍,等.药包材料的组分及结构对药物稳定性的影响[J].合成材料老化与应用,2020,49(2):12-16.
- [8] 荆小芳.影响药物制剂稳定性的因素[J].化学工程与装备,2020,10:235-236.
- [9] 余艳,杨丹.影响药物制剂稳定性因素及其解决方法[J].科技资讯,2020,18(17):207-208.

(收稿日期:2021-01-24;修回日期:2021-04-12)

高效液相色谱法测定利巴韦林滴眼液中有关物质的含量

冯文,刘峰,谢华^{*}(四川省药品检验研究院,成都 611731)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定利巴韦林滴眼液中有关物质的含量。方法 采用 Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 硫酸钠水溶液 (pH = 2.8) 为流动相 A, 以乙腈-流动相 A (5 : 95) 为流动相 B, 以 20% 乙腈为流动相 C, 以乙腈为流动相 D, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 220 nm。结果 杂质 A 回收率在 94.6% ~ 100.3% (n = 3), 校正因子为 2.0; 未知杂质鉴定为 2-磺基苯甲酸。结论 该法专属性强、简便可靠, 适用于利巴韦林滴眼液有关物质检查, 可为其质量控制提供参考。

关键词: 利巴韦林滴眼液; 有关物质; 高效液相色谱法; 2-磺基苯甲酸

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1919-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.028

Determination of related compounds in ribavirin eye drops by HPLC

FENG Wen, LIU Feng, XIE Hua^{*} (Sichuan Institute for Drug Control, Chengdu 611731)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of related compounds in ribavirin eye drops. **Methods** Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. With 0.1% sodium sulfate aqueous solution (pH 2.8) as mobile phase A, acetonitrile-mobile phase A (5 : 95) as mobile phase B, 20% acetonitrile as mobile phase C, acetonitrile as mobile phase D, and gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C, and the UV detection wavelength was 220 nm. **Results** The linear correlation coefficient of impurity A was 0.9997, and the average recovery was 94.6% — 100.3% (n = 3), and the correction factor of impurity A was 2.0. The unknown impurity was identified as 2-sulfobenzonic acid. **Conclusion** The method is highly specific, simple and reliable, and suitable for the determination of related substances in ribavirin eye drops.

Key words: ribavirin eye drop; related substance; HPLC; 2-sulfobenzonic acid

作者简介: 冯文, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药品质量评价与控制工作, E-mail: 273344933@qq.com ^{*}通信作者: 谢华, 女, 硕士, 主任药师, 主要从事药品质量评价与控制工作, E-mail: 1293376773@qq.com

利巴韦林 (ribavirin) 又名病毒唑、三氮唑核苷等, 化学名为 1- β -D-呋喃核糖基-1H-1, 2, 4-三唑-3-羧酰胺 (结构式见图 1), 是广谱强效的抗逆转录病毒药物^[1-2], 属合成核苷类药, 对多种 DNA 和 RNA 病毒有抑制作用, 具有作用位点多、不易产生耐药性、疗效高、毒性低和不良反应少等特点, 现已用于多种病毒的治疗。

有关物质的考察贯穿于整个药品研究, 直接关系到制剂质量的可控性与安全性。利巴韦林滴眼液的有关物质测定方法未见报道, 国内外药典虽收载其原料药的有关物质检测方法^[3-6], 但由于滴眼液中抑菌剂等特殊辅料^[7] (如羟苯乙酯) 与利巴韦林极性差异较大, 利巴韦林原料药的有关物质测定方法无法及时将其洗脱, 连续进样多针后残留物将干扰后续样品的测定。因此, 本文建立了一种测定利巴韦林滴眼液中主要降解杂质 A (结构式见图 1) 及其他有关物质的方法, 以消除滴眼液中特殊辅料的干扰, 为其质量提供了可靠的检测依据, 也为本品研发、生产和质量提升提供分析方法。

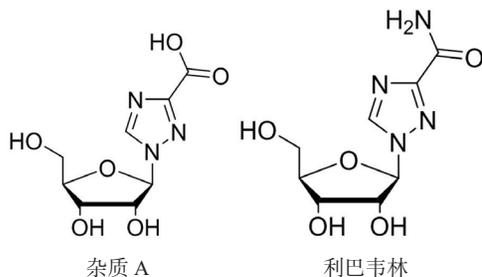


图 1 利巴韦林杂质 A 与利巴韦林化学结构式
Fig 1 Chemical structure formula of impurity A and ribavirin

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Agilent 1100 (安捷伦科技有限公司); 高效液相色谱仪岛津 LC20A (岛津实验器材有限公司); 电子天平 (赛多利斯 Sartorius CPA255D, 十万分之一)。

利巴韦林滴眼液 [A 企业 3 批次; B 企业 15 批次; C 企业 2 批次; D 企业 2 批次; E 企业 6 批次; F 企业 15 批次; G 企业 14 批次; H 企业 5 批次; I 企业 3 批次; J 企业 14 批次; K 企业 17 批次 (其中批号为 20010401 样品用于方法学验证)]。利巴韦林对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 140629-201703, 含量: 99.60%), 利巴韦林杂质 A (TLC, 批号: 3793-019A1, 含量: 100%), 空白辅料由各企业提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品适量, 用水稀释制成每 1 mL 中约含利巴韦林 0.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照品储备液的制备 分别精密称取利巴韦林对照品与杂质 A 对照品各约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得利巴韦林对照品储备液与杂质 A 对照品储备液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密量取利巴韦林对照品储备液与杂质 A 对照品储备液各 2.5 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.1.4 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.1.5 系统适用性溶液 取供试品溶液 5 mL, 加入 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 5 mL, 静置 30 min, 用 5 mL 1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液中和, 以产生杂质 A 溶液作为系统适用性溶液。

2.1.6 空白辅料溶液配制 由于各企业处方不同, 空白辅料溶液是 11 家企业所用所有辅料的混合溶液。即精密称取氯化钠 0.9 g、硼酸 0.95 g、硼砂 50 mg、羟苯乙酯 40 mg、苯扎溴铵 10 mg、甘油 1.0 g 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件与系统适用性

以十八烷基硅烷键合硅胶为填料的色谱柱 Waters Atlantis T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.1% 硫酸钠水溶液 (取无水硫酸钠 1.0 g, 加水 950 mL 溶解, 加 2 mL 5% 磷酸, 用 5% 磷酸调节 pH 至 2.8, 用水稀释至 1000 mL, 即得) 为流动相 A, 以乙腈-流动相 A (5:95) 为流动相 B, 以 20% 乙腈为流动相 C, 以乙腈为流动相 D; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 按表 1 进行梯度洗脱; 柱温为 30℃; 检测波长为 220 nm; 进样体积为 20 μL。系统适用性溶液中, 杂质 A (相对保留时间约 0.78) 与利巴韦林分离度应不低于 4.0。

2.3 专属性考察

精密量取空白辅料溶液、系统适用性溶液及供试品溶液各 20 μL 进样, 记录色谱图 (见图 2)。空白辅料对本品有关物质的测定无干扰, 各杂质与主成分分离良好, 方法专属性良好。

2.4 强制降解试验

为考察在所选择的色谱条件下能否检出利巴韦林滴眼液中可能产生的降解产物, 分别用高

表 1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%	流动相 D/%
0	100	0	0	0
15	100	0	0	0
25	0	100	0	0
35	0	100	0	0
36	0	0	100	0
41	0	0	100	0
41.1	0	0	0	100
60	0	0	0	100
60.1	0	0	100	0
65	0	0	100	0
66	100	0	0	0
75	100	0	0	0

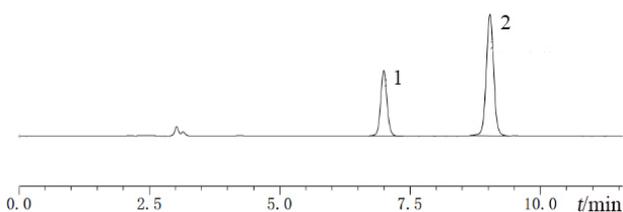


图 2 系统适用性溶液图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of system suitability solution
1. 杂质 A (impurity A); 2. 利巴韦林 (ribavirin)

温、酸、碱、氧化和光照等剧烈条件对本品进行破坏，试验如下：

① 未破坏溶液：精密量取本品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。

② 酸破坏：精密量取本品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加 1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL，静置 120 min，用等浓度氢氧化钠溶液中和，加水稀释至刻度作为酸破坏溶液；同法配制酸空白溶液及酸破坏辅料溶液。

③ 碱破坏：精密量取本品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL，静置 60 min，用等浓度盐酸溶液中和，加水稀释至刻度作为碱破坏溶液；同法配制碱空白溶液及辅料溶液。

④ 高温破坏：精密量取本品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，密封，于 105 °C 加热 8 h 作为高温破坏溶液；同法配制高温辅料溶液。

⑤ 光照破坏：取本品适量，5000 Lx 光照射 5 d，取破坏后样品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀；同法配制光照辅料溶液。

⑥ 氧化破坏：精密量取本品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加入 30% 过氧化氢溶液 2.0 mL，静置 60 min，用水稀释至刻度，摇匀，作为氧化破坏溶液；同法配制氧化空白溶液及辅料溶液。

取上述溶液各 20 μL，分别注入高效液相色谱仪，结果见图 3。由强制降解试验结果可知，本品在光照条件下相对比较稳定；在酸、碱和高温条件下主要破坏产生杂质 A，其中在碱性条件下破坏产生的杂质 A 最多；在氧化条件下破坏出杂质峰个数最多，保留时间约为 5.5 min 和 17 min 的杂质有明显增加。破坏试验中各杂质峰与利巴韦林峰分离良好，无其他杂质峰干扰已知杂质的测定，能有效检出杂质，表明该色谱方法专属性良好。

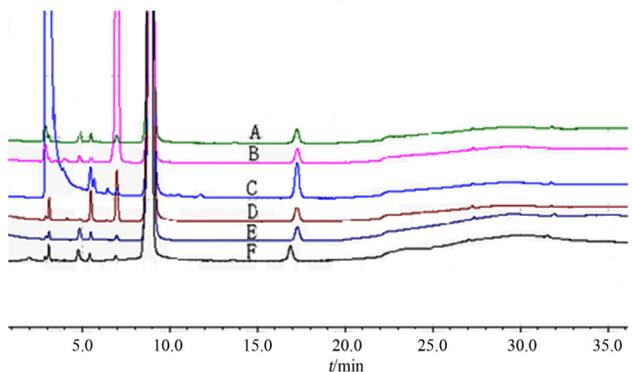


图 3 强制降解试验色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of forced degradation test
A. 酸破坏 (destroyed by acid); B. 碱破坏 (destroyed by alkali); C. 氧化破坏 (destroyed by oxidation); D. 高温破坏 (destroyed by high temperature); E. 光照破坏 (destroyed by light); F. 未破坏 (not destroyed)

2.5 线性试验

精密量取“2.1.2”项下对照品储备液适量，用水稀释制成含利巴韦林和杂质 A 的质量浓度分别约为 0.25、0.5、2.5、5.0、10.0、15.0 μg · mL⁻¹ 的系列浓度的对照品溶液。精密量取系列浓度的对照品溶液各 20 μL，分别注入高效液相色谱仪，记录色谱图。以质量浓度作为横坐标，峰面积作为纵坐标，绘制标准曲线，见表 2。

表 2 利巴韦林和杂质 A 的回归方程、范围、检测限和定量限
Tab 2 Linearity, regression equation, LOQ and LOD of ribavirin and impurity A

组分	回归方程	r	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)	定量限		检测限	
				浓度 / (μg · mL ⁻¹)	相当于样品 中检出量 /%	浓度 / (μg · mL ⁻¹)	相当于样品 中检出量 /%
利巴韦林	y = 4.936 × 10 ³ x - 596.0	0.9997	0.26 ~ 15.34	0.13	0.026	0.05	0.01
杂质 A	y = 2.408 × 10 ³ x - 294.5	0.9997	0.24 ~ 14.28	0.20	0.040	0.07	0.014

2.6 检测限、定量限

将线性溶液 ($15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 逐步稀释后进样测定, 以色谱图中信噪比 (S/N) 为 3:1 确定检测限, S/N 为 10:1 确定定量限, 结果见表 2。

2.7 进样精密度

精密吸取对照品溶液与对照溶液各 $20 \mu\text{L}$, 按“2.2”项下色谱条件测定 6 次, 记录色谱图, 考察进样精密度, 结果利巴韦林与杂质 A 连续 6 针峰面积 RSD 分别为 0.3% 和 0.4%, 表明本法进样精密度良好。

2.8 稳定性

精密吸取对照品溶液、对照溶液与供试品溶液各 $20 \mu\text{L}$, 按“2.2”项下色谱条件分别在常温下于 0、2、4、6、10、24 h 进样, 记录色谱图, 结果主成分及杂质 A 峰面积 RSD 均小于 2%, 也无其他杂质产生, 表明各溶液在 24 h 内稳定。

2.9 准确度

按照各企业提供的处方及辅料对试药进行混合, 得到多组分多厂家共用空白辅料, 添加相应的利巴韦林对照品 (杂质均未检出), 作为阴性样品, 称取阴性样品适量 (约相当于利巴韦林 5 mg), 共 9 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 再分别精密加入对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL, 各 3 份, 加流动相适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为准确度试验 80%、100%、120% 的供试品溶液, 按照拟订的色谱条件检测。结果杂质 A 的回收率在 94.6% ~ 100.3%, RSD 均 < 2.0%, 表明该方法准确度较高。

2.10 重复性

精密量取本品适量, 用水定量稀释制成每 1 mL 中约含利巴韦林 0.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.2”项下方法测定, 已知杂质 A 按外标法以峰面积计算含量, 未知杂质按自身对照法以峰面积计算含量, 结果显示, 杂质 A 的 RSD 为 4.1%, 最大未知单杂 RSD 为 3.3%, 总杂 RSD 为 4.1%, 表明方法重复性良好。

2.11 杂质校正因子

在两台液相色谱仪 (Agilent 1100 高效液相色谱仪和岛津 LC20A 高效液相色谱仪) 上, 考察 3 根色谱柱 [型号分别为: Waters Atlantis T3 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)、Waters Symmetry Shield C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)、YMC-Triart C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$)], 分别进样“2.5”项下线性溶液, 以各成分进样量对峰面积进行回归, 用利巴韦林斜率除以杂质 A 斜率测得杂质 A 相对校

正因子的平均值为 2.0, 为杂质 A 的准确定量提供了经济便捷的计算方式。

2.12 耐用性

为考察本方法对条件发生微小变化的耐受程度, 进行耐用性试验, 改变因素包括流动相比例 $\pm 2\%$ 、流速变化 $\pm 10\%$ 、柱温变化 $\pm 10\%$ 。以含有 3 种已知杂质 A 的样品 (D 企业, 批号 20010401) 为耐用性试验溶液, 考察条件改变对测定结果的影响。经测定, 在上述各条件下杂质 A 与主成分之间分离度良好, 测得杂质 A 的 RSD 分别为 3.4%, 最大未知单杂 RSD 为 4.5%, 总杂 RSD 为 3.3%, 表明方法耐用性良好。

2.13 样品测定

按“2.3”项下方法测定 11 个不同生产企业共 96 批利巴韦林滴眼液中的有关物质, 结果见表 3。

表 3 利巴韦林滴眼液有关物质检查结果

Tab 3 Determination of related compounds in ribavirin eyes drops					
生产 企业	样品数 量 / 批	杂质 A / %	其他最大 单杂 / %	杂质总 和 / %	杂质 个数 / 个
A	3	0.19 ~ 0.21	0.02 ~ 0.03	0.23 ~ 0.28	3 ~ 6
B	15	0.04 ~ 0.08	0.03 ~ 0.06	0.09 ~ 0.20	3 ~ 7
C	2	0.32 ~ 0.34	0.02 ~ 0.05	0.36 ~ 0.43	4 ~ 5
D	2	2.94 ~ 2.98	0.02 ~ 0.03	2.98 ~ 3.02	4
E	6	0.08 ~ 0.10	0.03 ~ 0.04	0.15 ~ 0.18	4 ~ 6
F	15	0.47 ~ 0.73	0.02 ~ 0.04	0.52 ~ 0.77	4 ~ 5
G	14	0.09 ~ 0.11	0.05 ~ 0.06	0.18 ~ 0.24	4 ~ 6
H	5	0.23 ~ 0.49	0.02 ~ 0.04	0.30 ~ 0.56	5 ~ 6
I	3	0.10 ~ 0.15	0.05 ~ 0.06	0.20 ~ 0.25	5 ~ 6
J	14	0.24 ~ 0.38	0.02 ~ 0.34	0.32 ~ 1.08	3 ~ 8
K	17	0.07 ~ 0.12	0.31 ~ 0.44	0.68 ~ 0.92	5 ~ 10

2.14 限度

参照《中国药典》2020 年版利巴韦林原料及其注射液的限度, 同时考虑本品的临床使用情况, 拟定有关物质限度为: 供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 除辅料峰外, 杂质 A 按校正后的峰面积计算 (乘以校正因子 2.0) 不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍 (0.5%); 其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍; 各杂质校正后峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积 (1.0%)。

2.15 未知杂质的定性研究

K 企业 17 批样品均合格, 其中最大未知单杂均为相对保留时间约 1.9 的杂质, 检出量为利巴韦林标示量的 0.32% ~ 0.44%, 其他 10 家生产企业样品中未检出该杂质。采用 2D-HPLC-DAD-ESI-Q-TOF 技术 [一维液相条件同本文建立的色谱条件; 二维液相条件为: 采用中心切割, 色

谱柱为 Agilent EclipsePlus C₁₈ (3.0 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相为以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 梯度洗脱 (0~17.6 min, 95%A; 17.6~23 min, 95%→5%A; 23~35 min, 5%A), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长为 220 nm; 质谱条件为: 采用 ESI 源, 质谱扫描范围为 100~1000 m/z, 负离子模式, Gas Temp: 325 °C, Drying Gas: 8 L·min⁻¹, VCap: 3500 V, Expt: 1000 V。推测降解反应机制, 将 K 企业样品 (批号: 20010401) 105 °C 加热 8 h 进行分析, 结果见图 4。

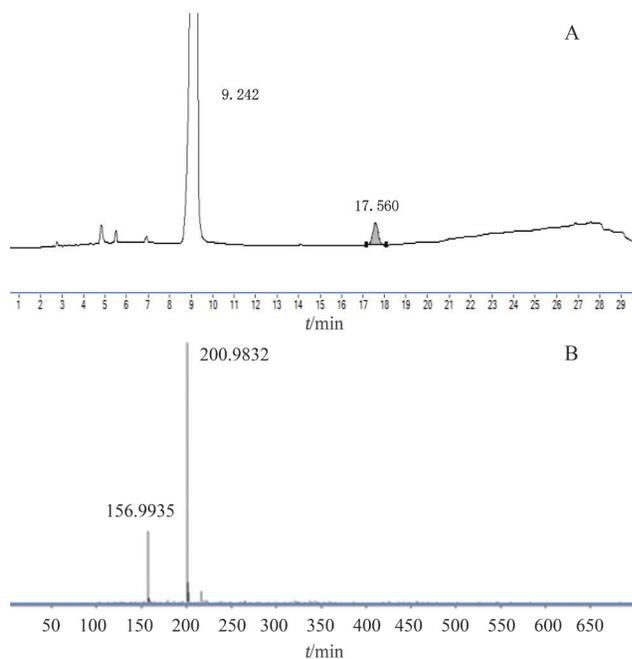


图 4 未知杂质 (相对保留时间约 1.9) 的一维液相色谱图 (A) 和质谱图 (B)

Fig 4 One-dimensional liquid chromatogram (A) and MS1 (B) of unknown impurity (relative retention time about 1.9)

根据质谱结果, 相对保留时间约为 1.9 的杂质 *m/z* 为 200.9832[M-H]⁻, 推测其为硫柳汞钠与氯化钠配伍所产生^[8-10], 反应机制为: 硫柳汞钠在氯化钠存在的条件下, 可分解为硫代水杨酸和氯化乙基汞, 硫代水杨酸不能稳定存在, 经氧化生成较为稳定的 2, 2'-二硫代二苯甲酸。2, 2'-二硫代二苯甲酸在乙基汞的作用下, 部分分解转化为硫柳汞钠, 部分经三步氧化, 最终转化为 2-磺基苯甲酸 (见图 5)。

3 讨论

3.1 色谱条件筛选

采用利巴韦林的碱破坏溶液, 分别参照 ChP2020、BP2020 中利巴韦林有关物质检查法进行试验。ChP2020 采用氢型阳离子交换柱, 在

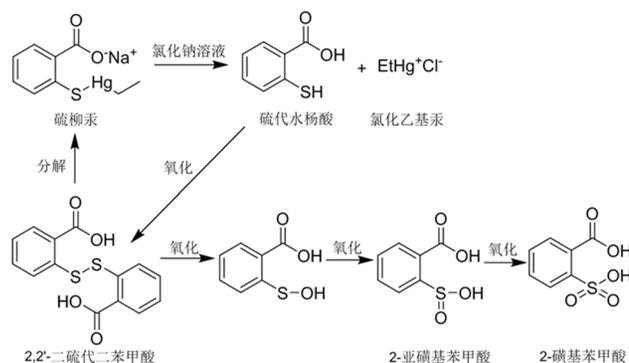


图 5 2-磺基苯甲酸生成机制图

Fig 5 Formation mechanism of 2-sulfobenzic acid

该色谱条件下主峰出峰较快, 峰形较差, 与相邻杂质峰分离度不佳, 且由于该类色谱柱与有机溶剂不能耐受, 无法洗脱滴眼液中抑菌剂等特殊辅料 (如羟苯乙酯), 连续进样多针后对后续样品测定造成干扰。故选择在条件相对较优的 BP2020 基础上对色谱柱和洗脱程序等进一步优化。分别考察以下色谱柱 (1) Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); (2) J & K C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); (3) Waters Atlantis T3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。发现采用色谱柱 (1) 和 (2) 时, 利巴韦林由于其极性较强, 保留时间较短, 与碱破坏产生的杂质 A 分离度不能达到 4.0。采用色谱柱 (3) 时, 利巴韦林峰保留时间约为 9 min, 杂质 A 与主成分峰间分离度约为 8.2, 各杂质间分离度均良好。在此基础上调节梯度洗脱程序, 由于利巴韦林与滴眼液中特殊辅料如羟苯乙酯极性差异较大, 因此本法增加乙腈梯度洗脱的程序。

3.2 不合格样品原因分析

以拟订限度判断, 本次抽取的 96 批样品有关物质合格率为 81.2%, 其中, D 企业 2 批样品均不合格, 均为杂质 A 超出限度, 其检出量为 2.94%~2.98%; F 企业 15 批样品中 14 批不合格, 均为杂质 A 超出限度, 其检出量为 0.53%~0.73%; J 企业 14 批样品中 2 批不合格, 均为总杂超出限度, 其检出量为 1.06%~1.08%。

不合格样品主要由杂质 A 含量超出限度 (0.5%) 导致, 通过强制降解试验及影响因素试验可知, 杂质 A 为利巴韦林的主要降解杂质, 高温、氧化、碱性条件均会导致其大量产生。分析企业处方和工艺流程, 如 D 企业处方中含有氢氧化钠 (约 3.75 μg·mL⁻¹), 生产工艺中采用沸水溶解原辅料, 可能出现高温条件下局部碱性过强, 导致利巴韦林降解产生杂质 A。因此, 建议

企业在生产工艺过程中关注原辅料的溶解温度,避免用煮沸的方式使其溶解。同时,在使用氢氧化钠等碱性 pH 调节剂时注意其加入方式,避免局部碱性过浓造成利巴韦林的降解。

3.3 J 企业样品生产时间与杂质质量相关性分析

J 企业的 14 批样品测定结果显示相对保留时间约为 0.62 的杂质的检出量为 0.02% ~ 0.34%, 查阅其批号, 发现含量为 0.02% 的样品批号为 200301 (生产日期为 2020 年 3 月), 含量为 0.34% 的样品批号为 190703 (生产日期为 2019 年 7 月), 同时期生产的样品有关物质含量相当 (见图 6), 提示该企业杂质含量随贮存时间延长增长趋势较为明显, 存在质量隐患。

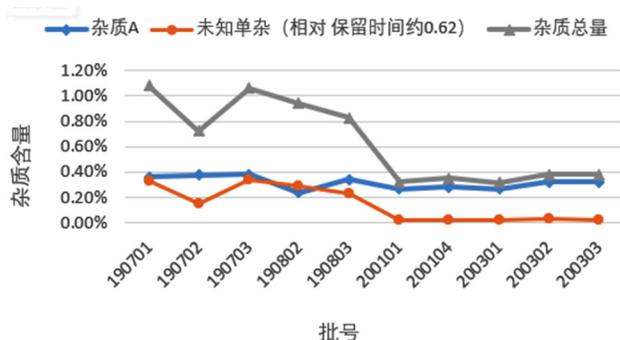


图 6 J 企业杂质随批号变化趋势图

Fig 6 Impurity change trend with batch number of J company

3.4 抑菌剂使用合理性分析

采用有关物质检查方法, K 企业的 17 批样品中, 2-磺基苯甲酸检出量为利巴韦林标示量的 0.32% ~ 0.44%。按硫柳汞钠标示量计算, 则约为 16% ~ 22%, 硫柳汞钠大量降解, 可能样品中存在一定量的硫柳汞钠分解产生的氯化乙基汞, 氯化乙基汞为剧毒物质^[11], 其中人经口吸收, 最小致死剂量为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可致人 Hela 细胞突变, 同时还具有一定的生殖毒性。氯

化乙基汞可经口、呼吸道、皮肤和黏膜吸收, 大剂量接触可造成急性中毒, 低剂量长期接触可造成慢性中毒^[12], 对人的神经、心脏、皮肤等系统造成严重损害, 存在较大安全隐患。因此建议硫柳汞钠从处方中去除, 且处方中不应与氯化钠配伍使用。

参考文献

- [1] 吴紫阳, 杜欣, 陈慧, 等. 利巴韦林治疗严重急性呼吸综合征和中东呼吸综合征的有效性与安全性的系统综述[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(10): 90-93.
- [2] 李全斌, 乔明艳, 钱宏波. 利巴韦林及其制剂定量分析方法概述[J]. 东南国防医药, 2007, 9(3): 195.
- [3] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 488.
- [4] The Japanese Pharmacopoeia 17 edition [S]. 2017: 1511-1512.
- [5] British Pharmacopoeia 2020 main edition [S]. 2020: 2109.
- [6] U. S. Pharmacopoeia 42 [S]. 2018: 3830-3831.
- [7] 李立理, 徐可, 张菁, 等. HPLC 法测定利巴韦林滴眼液中抑菌剂的含量[J]. 中国药品标准, 2020, 21(5): 424-425.
- [8] 王强, 李香荷, 高燕霞, 等. 国产盐酸林可霉素滴眼液的质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(3): 359.
- [9] 曲静伍, 江淦达. 硫柳汞为什么不能与氯化钠配伍[J]. 中国医院药学杂志, 1986, 6(6): 41.
- [10] 朱志忠. 眼用防腐剂硫柳汞对兔和人眼角膜内皮的作用[J]. 国外医学参考资料(眼科学分册), 1978, 5(3): 44.
- [11] 阴永光, 傅建捷, 周群芳, 等. 氯化乙基汞对稀有鮟鮑的急慢性暴露: 积累、消除与组织形态学变化[A]// 第七次全国分析毒理学大会暨第四届分析毒理专业委员会第二次会议论文集[C]. 杭州: 第七次全国分析毒理学大会暨第四届分析毒理专业委员会第二次会议, 2012.
- [12] 孟元华, 龚艳, 徐志飞, 等. 全自动固相萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定太湖三白中氯化乙基汞[J]. 化学试剂, 2020, 42(5): 538-541.

(收稿日期: 2021-02-03; 修回日期: 2021-05-10)

甘草饮片质量分析与评价

段超慧 (包头市食品药品检验检测中心, 内蒙古 包头 014060)

摘要: **目的** 分析与评价市售甘草饮片的质量, 为甘草饮片的质量提高和有效监管提供参考。**方法** 依照《中国药典》2015 年版一部的的方法对全国 43 家企业生产的 47 批次甘草饮片进行检验, 并通过文献挖掘及化学计量学等方法对检验结果进行分析。**结果** 共 39 批次样品符合规定, 合格率为 82.98%, 其中 1 批次样品重金属及有害元素不符合规定, 7 批次样品甘草苷与甘草酸含量低于标准限量。化学计量学分析结果显示, 甘草饮片中砷、铅、镉、铜这几种重金属元素之间具有一定的协同作用, 甘草苷及甘草酸含量存在显著性正相关 ($r = 0.620$), 并且这两种指标性成分的含量均与砷元素的含量成正相关; 可能与砷离子生成配合物有关。通过聚类分析可知, 样品中甘草苷含量差异较大, 道地产区 (内蒙古、甘肃) 药材有效成分含量明显高于其他地区药材, 相同厂家生产的不同批号样品含量较均匀。**结论** 现行质量标准能基本满足甘草饮片质量控制需要, 市售甘草饮片整体质量较好, 但仍存在一定问题, 建议从有效成分的含量方面加强监管。

关键词: 甘草饮片; 法定检验; 质量标准; 质量评价; 药品监管

中图分类号: R927, R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1925-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.029

Quality of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces

DUAN Chao-hui (Baotou Food and Drug Inspection and Testing Center, Baotou Inner Mongolia 014060)

Abstract: Objective To evaluate and analyze the quality of commercially available *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces, and provide reference for the quality control of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces and effective supervision. **Methods** According to the 2015 Edition of the Chinese Pharmacopoeia, 47 batches of samples produced by 43 companies were tested, and references and stoichiometry methods were used to analyze the results. **Results** Totally 39 batches (82.98%) met the regulation requirements. Heavy metals and harmful elements in one batch did not meet the requirements, and the content of liquiritin and glycyrrhizic acid in 7 batches was below the standard limit. The stoichiometry analysis showed that As, Pb, Cd and Cu in the *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces had certain synergistic effect. Meanwhile the content of liquiritin and glycyrrhizic acid was positively correlated ($r = 0.620$), and the content of these two index components was positively correlated to the content of As which might be related to the complex of arsenic ions. The cluster analysis showed the content of liquiritin in the samples was quite different, and the content of effective ingredients of medicinal materials in Inner Mongolian and Gansu was significantly higher than that of other regions. The content of samples in different batches produced by the same manufacturer was more uniform. **Conclusion** The current quality standards can basically meet the quality control needs. The overall quality of commercially available *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. is good with some minor problems. We should strengthen the supervision of the content of active ingredients.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction piece; statutory inspection; quality standard; quality evaluation; drug administration

甘草是常用的也是重要的中药材,能调和诸药,解百毒,其应用范围十分广泛。甘草在我国使用由来已久,最早记录载于《神农本草经》,称“美草”“国老”,被列为上品^[1]。我国是世界上甘草主产国之一,生产历史久,产量大,野生的甘草资源主要分布在我国黄河流域及黄河以北地区的内蒙古、新疆、甘肃、宁夏等地区,甘草的种类全世界约有 24 种,我国种植的甘草有 11 种^[2]。《中国药典》2015 年版一部规定其来源为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎;春、秋二季采挖,除去须根,晒干;其味甘、性平;归心、肺、脾、胃经;具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药之功效^[3]。现代药理学研究表明,甘草具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、增强记忆力、保护神经、降糖、降胆固醇等多方面的药理活性^[4-5]。本研究通过对全国 12 个地区流通与使用环节中的 43 家生产企业生产的 47 批次甘草饮片进行质量评价,以全面了解目前市售甘草饮片的质量现状,并分析存在的问题,为甘草饮片的质量提高和有效监管提供参考依据。

1 试药与仪器

1.1 试药

100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标 (Bi、Ge、In、Li、Lu、Rh、Sc、Tb, 批号: 5188-6525, 美国 Agilent 公司), 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 汞单元素标准溶液、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混标 (Al、B、Ba、Cu、Fe、Mn、Ti、Zn)、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混标 (Ag、As、Cd、Cr、Mo、Ni、Pb、Se、Sn、V)(国家有色金属及电子材料分析测试中心), 甘草对照药材 (批号: 120904-201620)、甘草苷对照品 (批号: 111610-201106, 纯度: 93.7%)、甘草酸铵对照品 (批号: 110731-201317, 纯度: 92.6%)(中国食品药品检定研究院), 色谱级乙腈 (德国 Merck 公司), 光谱级硝酸 (德国 CNW 公司), 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

SLD-I 型薄层色谱摄影仪 (天津思利达色谱技术开发公司); 硅胶 G 薄层板 (青岛海洋化工有限公司); CEM MARS 6 微波消解仪 (美国 CEM 公司); Agilent 7900 电感耦合等离子体质谱仪 (美国 Agilent 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); BP 211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司);

AB 104 型万分之一分析天平 (美国 METTLER TOLEDO 公司)。

2 资料与方法

2.1 基本信息

本研究抽验的 47 批甘草饮片覆盖全国 12 个省、直辖市、自治区的 43 家生产企业,被抽样单位包括医疗单位 26 家,经营单位 21 家。所有批次甘草饮片产地集中在内蒙古、宁夏、甘肃、东北、河北及山西等省、自治区,具体分布见图 1。

2.2 检验标准

《中国药典》2015 年版一部对甘草饮片做了性状、粉末显微鉴别、薄层鉴别 (甘草对照药材、甘草酸单铵盐对照品)、检查 (水分、总灰分、重金属及有害元素)、含量测定 (甘草苷、甘草酸) 等方面的检验要求。未有企业自己的注册标准,不存在标准差异的影响。

3 结果与分析

3.1 抽验结果

3.1.1 抽验总体结果 共检验甘草饮片 47 批次,合格样品 39 批次,合格率为 82.98%,不合格样品 8 批次,不合格率 17.02%,其中 1 批次重金属及有害元素不符合规定,7 批次含量测定低于标准要求。

3.1.2 性状 47 批次样品的性状特征均符合《中国药典》2015 年版一部的要求。

3.1.3 鉴别

① 粉末显微鉴别: 标准中对甘草饮片规定只做粉末显微鉴别,观察晶纤维、草酸钙方晶、具缘纹孔导管、木栓化细胞等特征。47 批样品结果均符合规定,部分典型粉末特征见图 2。

② 薄层色谱鉴别: 47 批次样品结果均符合规定,合格率为 100%。薄层色谱中各斑点分离度好,显色清晰,典型图谱见图 3。

3.1.4 检查

① 水分: 按《中国药典》2015 年版四部通则 0832 第二法对 47 批样品进行检验,水分全部低于标准规定的 12.0%; 其中有 31 批次水分在 6.1% ~ 8.0%, 占总数的 65% 以上。

② 总灰分: 是指生药本身经过灰化后遗留的不挥发性无机成分以及生药表面附着的不挥发性无机成分总和,是衡量中药材质量的重要指标,反映中药材中掺假及其受污染的情况^[6]。甘草饮片标准规定总灰分不得过 5.0%。按《中国药典》2015 年版四部通则 2302 检验的 47 批样品总灰分均符合规定。有 32 批次总灰分在 4.1% ~ 5.0%,

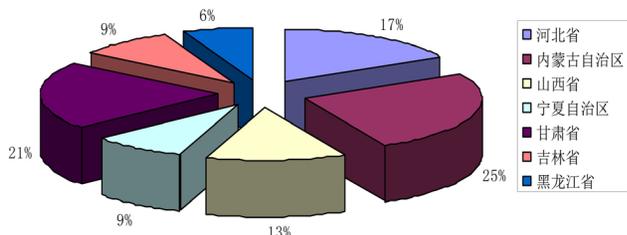


图 1 甘草饮片产地分布图

Fig 1 Origin of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces

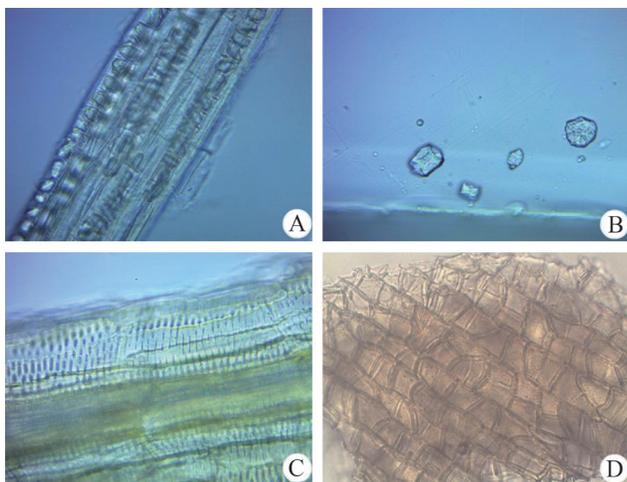


图 2 甘草饮片典型粉末显微特征

Fig 2 Typical powder microscopic characteristics of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces

A. 晶纤维 (crystal fiber); B. 草酸钙方晶 (calcium oxalate square crystal); C. 具缘纹孔导管 (edged puncture duct); D. 木栓化细胞 (embolus)

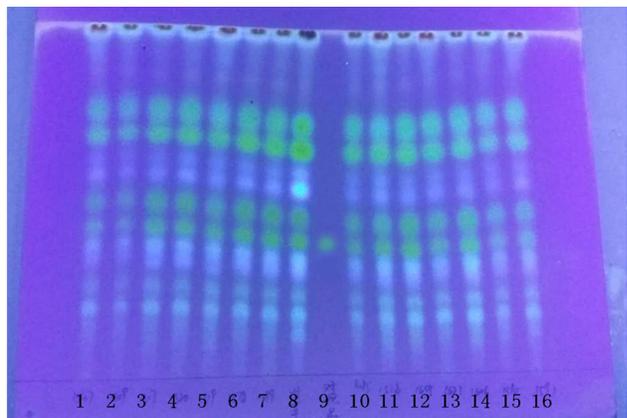


图 3 甘草饮片薄层色谱图

Fig 3 TLC of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces

8. 甘草对照药材 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.); 9. 甘草酸铵对照品 (ammonium glycyrrhizinate); 1~7, 10~16. 供试品 (sample)

占总数的 65% 以上。

③ 重金属及有害元素: 标准规定对甘草饮片以原子吸收分光光度法或电感耦合等离子体质谱法测定铅、镉、砷、汞、铜 5 种元素的含量, 其中铅不得过 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 镉不得过 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 砷不得过 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 汞不得过 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;

铜不得过 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本次评价采用电感耦合等离子体质谱法对 47 批次样品中 5 种重金属元素进行测定, 甘草饮片中砷含量在 $0.05 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均值为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 铅含量在 $0.07 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均值为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 镉含量在 $0 \sim 0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (检出限为 $0.0023 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 平均值为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 铜含量在 $2 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均值为 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 汞含量在 $0 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (检出限为 $0.00019 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 平均值为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各批次甘草饮片中重金属元素含量规律为铜 > 铅 > 砷 > 镉 > 汞。除 1 批次样品中汞元素超过标准限量外, 其余所有批次样品的 5 种元素虽有不同程度的检出, 但是含量较低, 均符合标准规定。

3.1.5 含量测定 标准规定采用高效液相色谱法对甘草饮片中的甘草苷、甘草酸的含量进行测定。按干燥品计, 甘草饮片含甘草苷 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$) 不得少于 0.45%, 甘草酸 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$) 不得少于 1.8%。

参照《中国药典》2015 年版四部通则 0512 的方法对 47 批次甘草饮片中的甘草苷及甘草酸含量进行测定, 各色谱峰峰形良好, 保留时间稳定, 分离度及理论板数均符合药典要求, 说明该方法专属性强, 重现性好 (见图 4)。结果显示, 40 批次样品符合标准规定, 甘草苷含量在 0.46% ~ 2.06%, 平均值为 0.77%; 甘草酸含量在 2.0% ~ 4.5%, 平均值为 2.4%。7 批次样品不符合规定, 包括 2 批次甘草苷含量不合格, 2 批次甘草酸含量不合格, 3 批次甘草苷及甘草酸含量均不合格。

3.2 综合分析

3.2.1 相关性分析 有研究表明, 药材中金属元素之间、金属元素与成分之间会形成各种形态或配位化合物, 它们可通过协同或拮抗作用改变药物的生理活性^[7-8], 还有学者指出将中药材的指标性成分与金属元素两者有机地结合起来, 可进一步揭示中药材在治疗疾病和降低毒性方面的作用机制^[9]。因此本研究首先采用 SPSS 22.0 统计学软件对 47 批次甘草饮片中各重金属元素含量之间的相关性进行分析 (双变量), 结果表明, 砷与铅含量之间存在显著正相关 ($r = 0.596$), 砷与镉含量之间成正相关 ($r = 0.315$), 镉与铜含量之间成正相关 ($r = 0.342$), 说明在甘草药材中, 砷、铅、镉、铜元素之间具有一定的协同作用^[10] (见表 1)。

之后对 47 批次甘草饮片中甘草苷及甘草酸含量进行相关性分析, 两者存在显著性正相关 ($r =$

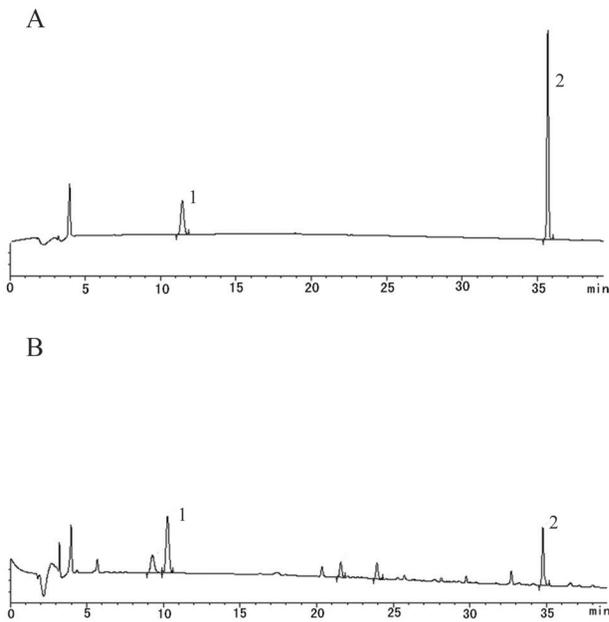


图 4 甘草饮片高效液相色谱图
 Fig 4 HPL chromatogram of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces
 A. 对照品溶液 (reference solution); B. 供试品溶液 (sample solution);
 1. 甘草苷 (liquiritin); 2. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

0.620)。本研究还分别对甘草苷和甘草酸含量与 5 种重金属元素的含量做了双变量相关性分析, 结果表明, 甘草苷及甘草酸含量均与砷元素的含量成正相关 ($r_{\text{甘草苷}} = 0.446$, $\text{Sig}_{\text{甘草苷}} = 0.002$; $r_{\text{甘草酸}} = 0.376$, $\text{Sig}_{\text{甘草酸}} = 0.008$)。推测这可能与砷离子生成配合物有关, 具体的金属配合物发挥作用的机制还需要进一步深入研究。

表 1 甘草饮片中各重金属元素含量之间的相关系数

Tab 1 Correlation coefficient of the content of heavy metal elements in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction pieces

元素	As	Pb	Cd	Cu	Hg
As	—				
Pb	0.596**	—			
Cd	0.315*	0.265	—		
Cu	0.242	0.269	0.342*	—	
Hg	0.007	-0.080	0.007	-0.071	—

注: **表示在 0.01 水平 (双侧) 上相关; *表示在 0.05 水平 (双侧) 上相关。

Note: ** indicates correlation at the 0.01 level (bilateral); * indicates correlation at the 0.05 level (bilateral).

3.2.2 系统聚类分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件, 以系统聚类分析法^[11]对 47 批次甘草样品中甘草苷、甘草酸的含量测定结果进行分析, 以评价不同产地及同厂家不同批次样品间的质量差异。由图 5A 可见, 甘草苷整体含量差异较大, 35 (产地甘肃)、36 (产地内蒙古)、37 (产地内蒙

古) 被聚为 I 类, 其余样品被聚为 II 类, 每类样品又可聚为其他亚类, I 类样品甘草苷含量明显高于其余批次样品; 由图 5B 可见, 甘草酸含量差异较小, 37 (产地内蒙古) 被聚为 I 类, 其余样品被聚为 II 类, I 类样品甘草酸含量明显高于其余批次样品。I 类样品的产地均为甘草的道地产区 (内蒙古、甘肃), 也充分说明道地产区的药材质量要明显优于其他地区。对于相同厂家生产的不同批号的样品: 11、12、28 (河北), 14、15 (内蒙古), 21、30 (山东), 23、38 (陕西), 18、44 (安徽), 除山东的 2 批次甘草苷稍有差异, 被聚为不同亚类外, 其余各相同生产厂家生产的不同批号样品的甘草苷及甘草酸含量均被聚为一类, 说明相同厂家生产的样品质量较均匀。

4 讨论

甘草是常用大宗药材, 在中药材中产量和销量均居于大宗药材的首位, 同时也是食品加工、轻工业的重要原料。通过本次评价发现市售甘草饮片的质量总体较好, 抽样合格率为 82.98%, 不合格样品 8 批次, 涉及抽样单位: 经营企业 2 家, 医疗单位 6 家, 不合格样品的产地分布在河北省 (5 批含量不合格)、内蒙古自治区 (1 批含量不合格)、山西省 (1 批含量不合格) 及甘肃省 (1 批重金属及有害元素不合格)。可见, 甘草饮片最大的质量问题为有效成分的含量, 占总不合格率的 87.50%。这可能是由于甘草市场需求量逐年增大, 野生资源过度采挖^[12]。目前药用主要为栽培甘草, 而人工栽培甘草主要成分含量与产区^[13]、基源^[14]、药用部位^[15]、生长年限^[16-17]及采挖时期^[15]有关。聚类分析结果显示出道产区如内蒙古及甘肃出产的甘草质量要明显优于其他地区的甘草, 也充分说明了产地对于药材质量的重要性。

重金属中砷、铅、汞、镉、铜等具有明显的生物毒性作用, 在本次评价工作中, 47 批次样品只有 1 批样品的汞元素超出限量标准。药材中重金属元素含量的高低主要取决于两方面^[18-20]: 一是土壤的性质、土壤中重金属元素含量及各重金属存在形态; 二是药材本身对不同重金属元素的选择和积累能力。土壤为中药材的生长提供有机和无机营养物质, 一般来说, 土壤中重金属含量的多少将直接影响到中药材中重金属含量是否超标。如茅向军等^[21]对贵州不同地区栽培的杜仲药材中铅、砷、汞的含量进行了测定, 结果发现种植土壤与药材间砷、汞含量基本成正相关, 说明药材中的砷、汞含量与种植环境关系密切。因此,

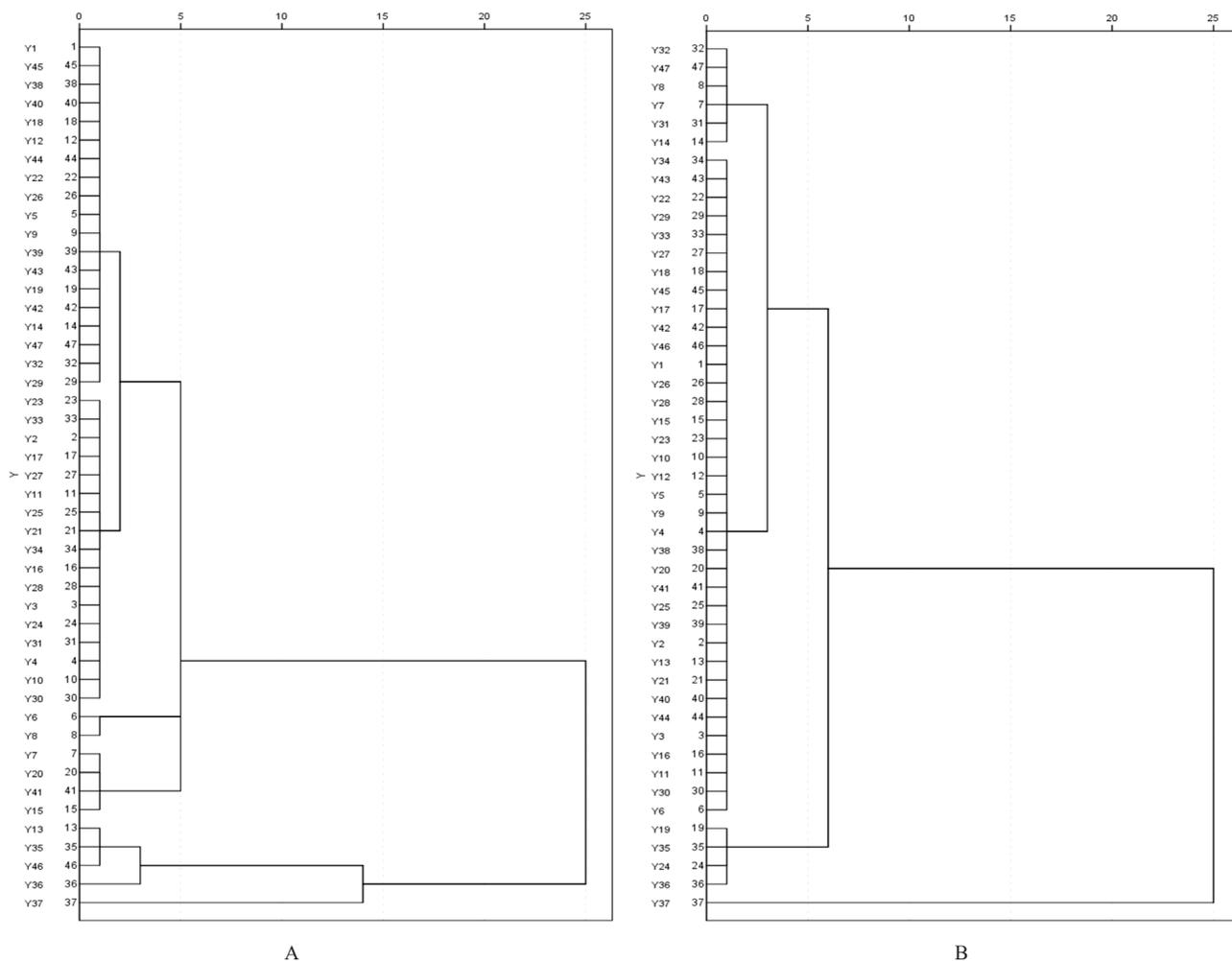


图 5 47 批次甘草饮片样品聚类分析图
 Fig 5 Cluster analysis of 47 batches of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. decoction piece
 A. 甘草苷 (liquiritin); B. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

对于汞超出限量标准的 1 批样品，最可能原因是种植环境受到污染。

甘草的次生代谢受到多种因素如光照、温度、湿度、矿质元素等的影响，其中矿质元素更是直接参与甘草的次生代谢过程。因此本研究采用 SPSS 22.0 软件对 5 种重金属元素含量及有效成分与金属元素含量之间的相关性进行分析。

5 检验和监管建议

① 建立开展药材专项抽样的长效机制，加强对甘草生产、加工、流通、使用多环节的监管。

② 建立合理机制，将评价抽验中发现的质量问题及时反馈给各生产企业。

③ 通过检验发现，不合格样品的经营单位主要集中在医疗单位，占总不合格数的 75.00%，因此，建议加强医疗单位饮片质量的监管。

④ 检验的 47 批次样品中，不合格样品产地主要为河北省，占总不合格数的 62.50%。而通过聚类分析发现，甘草道地产区如内蒙古、甘肃所产的

甘草含量均较高，说明道地产区的药材品质较好，因此，建议各经营单位在进货时可优先选择内蒙古等道地产区的供应商，间接保证甘草药材质量。

⑤ 对于甘草饮片中各金属元素之间、有效成分与砷元素之间的协同作用及其作用机制可以开展进一步的探索性研究。

参考文献

- [1] 张继, 姚健, 丁兰, 等. 甘草的利用研究进展 [J]. 草原与草坪, 2000, 89 (2): 12-17.
- [2] 李海华, 青梅, 于娟, 等. 甘草的研究进展 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37 (2): 199-204.
- [3] 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 86.
- [4] 张耀峰. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. 中医临床研究, 2019, 11 (9): 141-142.
- [5] 李想, 李冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药, 2019, 51 (5): 81-86.
- [6] 谢晓婷, 李霞, 陈卫东, 等. 新疆、甘肃地区甘草质量评价研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38 (2): 85-88.
- [7] 刘威, 王振中, 胡军华, 等. 不同产地牡丹皮中微量元

- 素与多指标成分灰色关联度评价及相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (1): 34-41.
- [8] 钟建宾, 陈亮, 张立伟, 等. 丹参酮 II A 与稀土离子形成配合物配位过程的研究[J]. 波谱学杂志, 2001, 18 (1): 67-71.
- [9] Korkina LG, Ostrachovich EA, Ibragimova GA, et al. Complexes of flavonoids with iron and copper as a new way of decreasing the oxidative damage induced by transition metal supplementation [M]. New York: Springer, doi: 10.1007/0-306-47466-2_23.
- [10] 秦双双, 黄静雯, 袁媛, 等. 中药材重金属元素及其与指标性成分相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (6): 66-70.
- [11] 毕天琛, 赵丹彤, 周欣, 等. 市售薏苡仁饮片质量分析与评价[J]. 中国药业, 2019, 28 (19): 32-35.
- [12] 李珍珍. 甘草新品种“国甘 1 号”的质量评价研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [13] 黄明进, 魏胜利, 王文全. 气候和土壤因素对甘草药材质量影响的初步分析[A]. 2010 年中国药学会暨第十届中国药师周论文集[C]. 中国药学会, 2010: 289-293.
- [14] 周香珍, 王文全. 甘草质量差异研究概况[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (10): 1394-1396.
- [15] 刘关杰. 影响甘草质量的因子分析[J]. 内蒙古农业科技, 2012 (6): 42.
- [16] 詹晓平. 宁夏栽培甘草质量分析的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2009, 31 (11): 1008-1009.
- [17] 闫永红. 不同来源甘草的质量特征及评价研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- [18] 贾薇. 中药材中重金属的分析方法及其吸收系数特征研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2009.
- [19] 张丹. 贵州主要药材基地土壤及中药中污染状况调查研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2006.
- [20] 彭锐, 谭均, 孙年喜, 等. 重庆市中药材重金属富集特性研究[J]. 重庆中草药研究, 2017, 40 (6): 1290-1294.
- [21] 茅向军, 杨永东, 熊慧林, 等. 贵州杜仲中铅、砷、汞含量的研究[J]. 药物分析杂志, 2000, 20 (3): 172-174.
- (收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-06-02)

紫外分光光度法测定血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔含量的 4 种定量分析方法比较

陈晓文, 朱浩, 吴飞华, 原永芳* (上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011)

摘要: **目的** 比较紫外分光光度法测定血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔含量的 4 种定量分析方法。**方法** 采用标准曲线法 (298 nm)、吸收系数法 (298 nm)、双波长法 (测定波长 298 nm、参比波长 330 nm)、一阶导数法 (316 nm) 对紫外扫描光谱数据进行定量分析, 并对 4 种方法进行方法学考察。**结果** 标准曲线法 (298 nm)、吸收系数法 (298 nm)、双波长法 (测定波长 298 nm、参比波长 330 nm)、一阶导数法 (316 nm) 中马来酸噻吗洛尔含量线性范围为 $10 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r \geq 0.9994$), 平均回收率为 94.6% ~ 97.1%, 日内精密度 RSD 分别为 1.6%、1.6%、1.6%、0.0%; 日间精密度 RSD 分别为 2.2%、2.6%、1.3%、0.0%。**结论** 4 种分析方法都可用于血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔的含量定量分析, 其中双波长法和一阶导数法更为简便。

关键词: 血管瘤乳膏; 马来酸噻吗洛尔; 紫外分光光度法; 标准曲线法; 吸收系数法; 双波长法; 一阶导数法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1930-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.030

Content determination of timolol maleate in hemangioma cream by 4 quantitative methods with UV spectrophotometer

CHEN Xiao-wen, ZHU Hao, WU Fei-hua, YUAN Yong-fang* (Department of Pharmacy, Ninth People's Hospital Affiliated to Medical School, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011)

作者简介: 陈晓文, 女, 主管药师, 主要从事医院制剂分析, E-mail: ch-xw@139.com *通信作者: 原永芳, 女, 博士, 主任药师, 主要从事医院药学和临床药学研究, E-mail: nmxyyf@126.com

Abstract: Objective To compare 4 quantitative methods in the determination of timolol maleate in hemangioma cream with UV spectrophotometer. **Methods** UV scanning spectrum was analyzed quantitatively by standard curve method (298 nm), absorption coefficient (298 nm), dual-wavelength spectrophotometry (detection wavelength of 298 nm, reference wavelength of 330 nm) and first-derivative spectrophotometry (316 nm). Methodology of 4 methods were compared. **Results** The linearity of timolol maleate was $10 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r \geq 0.9994$) by standard curve method (298 nm), absorption coefficient (298 nm), dual-wavelength spectrophotometry (detection wavelength of 298 nm, reference wavelength of 330 nm) and first-derivative spectrophotometry (316 nm) with average recoveries of 94.6% \sim 97.1%, RSDs were 1.6%, 1.6%, 1.6%, and 0.0% for intra-day precision, and 2.2%, 2.6%, 1.3%, and 0.0% for inter-day precision. **Conclusion** All the 4 methods can be used for the determination of timolol maleate in hemangioma cream. The dual-wavelength spectrophotometry and first-derivative spectrophotometry are simpler and more convenient.

Key words: hemangioma cream; timolol maleate; UV spectrophotometry; standard curve method; UV absorption coefficient method; dual-wavelength spectrophotometry; first-derivative spectrophotometry

婴幼儿血管瘤是儿童最常见的良性肿瘤，目前公认的一线治疗药物是口服非选择性 β 受体阻滞剂普萘洛尔，但其存在全身不良反应，包括心动过缓、低血压、支气管痉挛等，且口服普萘洛尔肝脏首过效应强，个体差异大^[1]，继而有研究外用普萘洛尔用于面积小、位置表浅的血管瘤患儿^[2]。噻吗洛尔与普萘洛尔同属非选择性 β 受体阻滞剂，其作用强度为普萘洛尔的8倍，无内源性拟交感活性，无直接抑制心脏作用。2010年有报道局部外用马来酸噻吗洛尔眼药水治疗眼睑血管瘤有效，可以使治疗药物噻吗洛尔富集于病灶部位发挥作用并且明显减少药物对全身的影响，更为安全，尤其适合于面部和眼周区域的浅表型病灶^[3-4]。但目前国内尚无商品化的噻吗洛尔凝胶制剂^[5]，市售马来酸噻吗洛尔滴眼剂使用不方便，且存在敷药后易蒸发，剂量不容易掌握，长期使用会致皮肤干燥、脱皮等缺陷，不利于临床使用^[6]。为此，本院自行研制了血管瘤乳膏，含0.5%马来酸噻吗洛尔，适用于婴幼儿血管瘤。为更好地对该制剂进行质量控制，参考《中国药典》2020年版采用紫外分光光度法作为马来酸噻吗洛尔制剂中噻吗洛尔含量的测定方法^[7]，并选取紫外分光光度法中的标准曲线法(298 nm)、吸收系数法(298 nm)、双波长法(测定波长298 nm、参比波长330 nm)、一阶导数法(316 nm)对血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔的含量定量分析进行了方法学考察。

1 材料

1.1 仪器

紫外分光光度计(日本岛津公司); 电子分

析天平(德国 Sartorius 公司, $d = 0.1 \text{ mg}$); 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 试药

马来酸噻吗洛尔(天津市中央药业有限公司, 批号: 180301, 纯度: 99.9%), 血管瘤乳膏(规格: 20 g/0.1 g, 批号: 190410、190430、190507)及不含噻吗洛尔的空白乳膏均为院内自制。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称定经 105°C 干燥至恒重的马来酸噻吗洛尔, 加乙醇振摇溶解后, 定量配制成质量浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 即得。

2.2 样品溶液的配制

精密称取血管瘤乳膏 1 g, 加适量乙醇水浴振摇溶解, 置冰箱中冷却 30 min。过滤, 滤液用乙醇定容至 50 mL 量瓶。再精密量取 10 mL 至 50 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 即得。

2.3 乳膏基质溶液的配制

按照血管瘤乳膏处方及工艺配制不含马来酸噻吗洛尔的空白乳膏。精密称取空白乳膏 1 g, 按“2.2”项下方法处理, 即得。

2.4 测定波长的选择

以乙醇为空白, 在 $250 \sim 350 \text{ nm}$ 波长内对上述 3 种溶液进行紫外扫描, 结果见图 1, 可见马来酸噻吗洛尔在 298 nm 波长处有最大吸收, 而乳膏基质在此处无吸收, 不干扰主分的测定。

2.5 稳定性试验

将对照品溶液避光放置于冰箱, 分别于 0、1、2、3、5、24 h 时测定吸收度, RSD 为 0.30% ($n =$

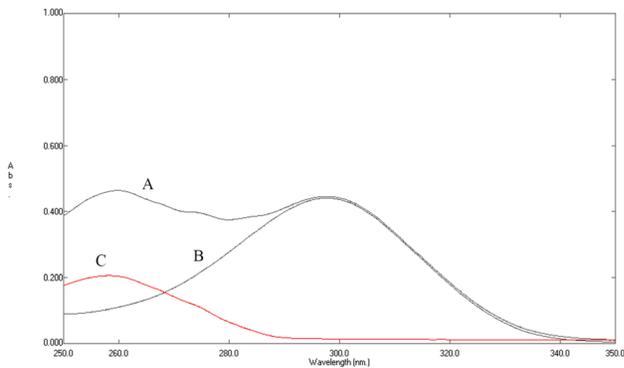


图 1 3 种溶液的紫外吸收光谱图

Fig 1 Absorption spectra of 3 dilutions

A. 样品溶液 (sample solution); B. 对照品溶液 (control solution); C. 乳膏基质溶液 (blank solution)

6), 说明马来酸噻吗洛尔乙醇溶液在 24 h 内稳定。

2.6 方法的选择^[8]

精密称定经 105 °C 干燥至恒重的马来酸噻吗洛尔 20 mg, 置 200 mL 量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1.0、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀。

2.6.1 标准曲线法 以乳膏基质溶液为空白, 照分光光度法在 298 nm 波长测定吸收度, 绘制吸收度 - 浓度标准曲线, 得回归方程: $A = 0.0215C + 1.714 \times 10^{-3}$, $r = 0.9999$, 线性范围为 $10 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见表 1。

2.6.2 吸收系数法 根据朗伯 - 比尔定律, 由公式 $A = ECL$ 得出马来酸噻吗洛尔的紫外吸收系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 取平均吸收系数 215, RSD 为 0.98%, 见表 1。

表 1 马来酸噻吗洛尔的紫外吸收系数

Tab 1 Absorption coefficient of timolol maleate

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A_{298}	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
9.94	0.217	218
19.88	0.423	212
24.85	0.537	216
29.82	0.638	214
34.79	0.746	214
39.76	0.859	216

2.6.3 双波长法^[9] 由于马来酸噻吗洛尔在 298 nm 波长处有最大吸收, 乳膏基质溶液在 298、330 nm 波长处有相同吸收度, 且马来酸噻吗洛尔两波长处的吸光度差值足够大, 所以 298、330 nm 可作为双波长法的测定波长和参比波长。以乙醇为空白, 在 298、330 nm 波长处测定吸收度, 绘制吸收度差值 - 浓度标准曲线, 得回归方程: $A_{(298 \sim 330)} = 0.0191C + 3.629 \times 10^{-3}$, $r = 0.9999$, 浓度线性范围为 $10 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见表 2。

2.6.4 一阶导数法 对图 1 进行一阶导数转换, 可见在一阶导数图谱中 316 nm 波长处, 乳膏基质溶液的振幅 Z 为 0, 对照品溶液与样品溶液在此波长处振幅最大且相似, 此波长处乳膏基质对测定无干扰, 见图 2。故以 316 nm 作为一阶导数测定波长, 以此波长处的振幅 Z 值作为定量依据。以乙醇为空白, 以 316 nm 为一阶导数测定波长, 绘制振幅值 - 浓度标准曲线, 得回归方程: $Z_{316} = -8.422C + 6.571 \times 10^{-4}$, $r = 0.9994$, 线性范围为 $10 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见表 2。

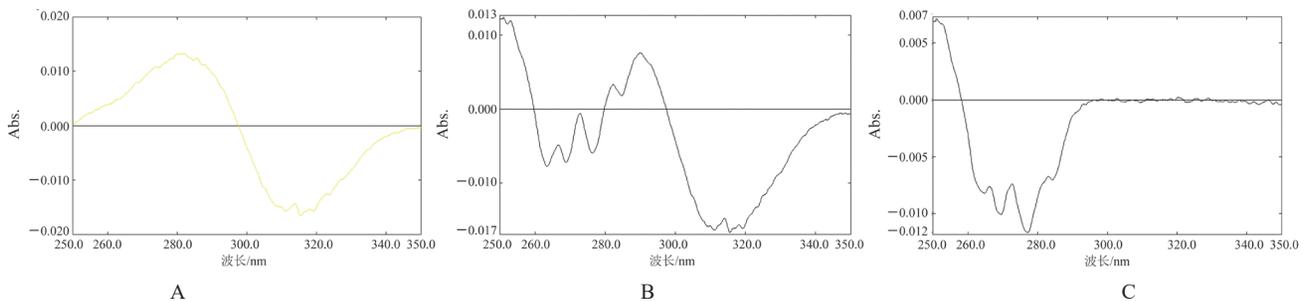


图 2 3 种稀释液的一阶导数光谱图

Fig 2 First derivative spectra of three dilutions

A. 对照品溶液 (control solution); B. 样品溶液 (sample solution); C. 乳膏基质溶液 (blank)

表 2 马来酸噻吗洛尔的紫外光谱数据

Tab 2 UV spectrum data of timolol maleate

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A_{298}	A_{330}	Z_{316}
9.94	0.225	0.029	-0.008
19.88	0.433	0.055	-0.016
24.85	0.547	0.068	-0.020
29.82	0.652	0.082	-0.024
34.79	0.766	0.098	-0.029
39.76	0.876	0.113	-0.033

2.7 方法学验证

2.7.1 回收试验 精密称取 105 °C 干燥至恒重的马来酸噻吗洛尔, 按处方量分别配制相当于标示量为 80%、100%、120% 的样品溶液, 各 3 份, 按“2.6”项下方法进行紫外分光光度法测定, 结果标准曲线法平均回收率为 96.8%, RSD 为 2.0%; 吸收系数法平均回收率为 97.1%, RSD

为 2.1%；双波长法平均回收率为 96.1%，*RSD* 为 2.3%；一阶导数法平均回收率为 94.6%，*RSD* 为 4.3%。4 种方法均符合药物质量控制分析方法的要求。

2.7.2 精密度试验 将“2.7.1”项下配制的 100% 样品溶液，于同一日内每批测定 5 次，计算日内精密度；连续测定 5 d，计算日间精密度。结果标准曲线法、吸收系数法、双波长法、一阶导数法日内精密度 *RSD* 分别为 1.6%、1.6%、1.6%、0.0%；日间精密度 *RSD* 分别为 2.2%、2.6%、1.3%、0.0%。

2.8 样品含量的测定

按照“2.6”项下方法，分别测定 3 个批次样品中马来酸噻吗洛尔含量，结果见表 3。4 种方法均可对血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔进行定量测定。

表 3 4 种方法测定 3 批样品含量结果比较

Tab 3 Content determination of 3 batches of samples by 4 methods

批号	标准曲线	吸收系数	双波长	一阶导数	<i>RSD</i> /%
	法 /%	法 /%	法 /%	法 /%	
190410	100.2	100.2	98.50	98.86	0.89
190430	96.48	96.54	94.40	96.94	1.19
190507	94.64	94.68	92.12	92.94	1.36

3 讨论

血管瘤乳膏为本院自制制剂，用于婴幼儿血管瘤的治疗，弥补了无市售噻吗洛尔凝胶或乳膏制剂的不足。血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔含量对治疗效果影响很大，故建立血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔的含量测定方法尤为重要。

马来酸噻吗洛尔在乙醇中略溶，且测定波长选择在 298 nm、316 nm 及 330 nm，均大于乙醇截止使用波长，符合紫外-可见分光光度法对溶剂的要求。

紫外分光光度法根据样品的吸光度对波长的变化规律来进行定性和定量分析，应用紫外分光光度法对共存组分进行不分离定量测定时，通常采用的方法有双波长法、三波长法、导数光谱法等，笔者选择使用标准曲线法、吸收系数法、双

波长法、一阶导数法分别对其进行含量测定。结果，4 种测定方法回收率、精密度都在可控范围内，符合药物含量测定要求，均可用于血管瘤乳膏中马来酸噻吗洛尔的含量测定。

由于受乳膏基质吸收的影响，在进行含量测定时，标准曲线法及吸收系数法要扣除空白乳膏基质的吸收才能进行计算，每次需另行配制空白乳膏并制备乳膏基质溶液，操作繁琐。双波长法利用测定波长和参比波长的差值绘制标准曲线，可以同时测定互有干扰的两个组分，消除空白辅料的干扰，方便简洁。一阶导数法采用微分求导，可以在谱图上显示出微小的变化，不仅具有双波长法测定的上述优点，而且可以提高光谱图的分辨率，具有灵敏度高、专属性强、操作方便、结果准确等优点，具有较大的优越性。

参考文献

- [1] 何世英, 张杰, 丁劲松. 普萘洛尔治疗血管瘤的作用机制及其应用研究进展[J]. 中南药学, 2011, 9(4): 274-278.
- [2] 张志华, 何周康, 何世英, 等. 盐酸普萘洛尔凝胶的制备及质量评价[J]. 中南药学, 2012, 10(5): 345-349.
- [3] 王霞, 胡焰, 王琼, 等. 局部外用噻吗洛尔治疗婴幼儿血管瘤的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(44): 4212-4216.
- [4] 邹筠, 袁华, 付荣华, 等. 外用 0.5% 马来酸噻吗洛尔治疗婴幼儿血管瘤的临床分析[J]. 中国医疗美容, 2019, 9(9): 57-60.
- [5] 张丽华, 宋洪涛. 婴幼儿血管瘤治疗药物研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(1): 50-53.
- [6] 郑家伟, 王绪凯, 江成鸿, 等. 外用马来酸噻吗洛尔治疗婴幼儿血管瘤中国专家共识[J]. 上海口腔医学, 2016, 25(6): 744-747.
- [7] 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 74.
- [8] 景霞, 徐进, 初立梅, 等. 紫外分光光度计测定小儿速效感冒口服溶液中对乙酰氨基酚含量的 4 种定量分析方法比较[J]. 中国药房, 2013, 24(21): 1996-1998.
- [9] 杨泉生, 聂基兰. 双波长分光光度法的原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1992: 7.

(收稿日期: 2021-01-02; 修回日期: 2021-03-02)

离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质

陈霞, 张洁*, 董瑞 (成都市食品药品检验研究院, 成都 610045)

摘要: **目的** 建立伊班膦酸钠中有关物质的离子抑制色谱检测方法。**方法** 采用阴离子交换色谱柱 Dionexionpac AS11-HC (4 mm×250 mm, 9 μm), 保护柱为 AG11-HC (4 mm×50 mm), 以 100 mmol·L⁻¹ NaOH 为流动相 A、水为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测器为电导检测器, 柱温 30℃, 进样量 20 μL。**结果** 各已知杂质及杂质与主成分之间分离度均大于 1.5, 主成分与强制破坏产生的降解产物分离度良好; 各杂质在检测质量浓度范围内与峰面积线性关系良好; 平均回收率在 93.48%~100.30%; 定量限和检测限均符合要求。**结论** 本方法准确度高, 重复性良好, 灵敏度高, 适用于伊班膦酸钠原料药中有关物质的检查。

关键词: 离子抑制色谱法; 伊班膦酸钠; 有关物质; *N*-甲基-*N*-戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐; 亚磷酸; *N*-去甲基杂质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1934-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.031

Determination of related substances in ibandronate sodium raw materials by ion suppression chromatography

CHEN Xia, ZHANG Jie*, DONG Rui (Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045)

Abstract: Objective To determine the related substances in ibandronate sodium raw materials by ion suppression chromatography. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Dionexionpac AS11-HC (4 mm×250 mm, 9 μm) column and analyzed by conductivity detector, with 100 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide as the mobile phase A and water as the mobile phase B by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃ and the injection volume was 20 μL. **Results** The separation between the impurity and main components was greater than 1.5, and the main components and degradation products by forced destruction well separated. The linearity was good within the concentration range. The average recovery was 93.48%—100.30%. The quantitative limit and detection limit met the requirements. **Conclusion** This method is accurate, reproducible and sensitive for the determination of related substances in ibandronate sodium raw materials.

Key words: ion suppression chromatography; ibandronate sodium; related substance; *N*-methyl-*N*-amyl-β-aminopropionic acid hydrochloride; phosphite; *N*-demethyl impurity

伊班膦酸钠, 化学名称为 1-羟基-3-(*N*-甲基-戊胺基)-亚丙基二膦酸-钠盐-水合物, 临床上用于治疗绝经后骨质疏松症、恶性肿瘤溶骨性骨转移以及伴有或不伴有骨转移的恶性肿瘤引起的高钙血症, 目前的剂型为注射液^[1-4]。该药物的最后一步合成中, 通常会

产生诸如亚磷酸根、磷酸根、1-羟基-3-戊胺基-亚丙基二膦酸、1-羟基-3-甲胺基-亚丙基二膦酸等杂质^[5-6]。伊班膦酸钠和这些杂质的结构皆没有发色基团, 也不具备电化学活性, 故不能用常规的紫外、荧光或电化学分析方法检测。目前报道伊班膦酸钠及伊班膦酸钠注射液中有

基金项目: 四川省科技计划项目 (No.2020YFS0570)。

作者简介: 陈霞, 女, 主管药师, 主要从事食品药品检验工作, E-mail: 281804706@qq.com *通信作者: 张洁, 女, 主管药师, 主要从事食品药品检验工作, E-mail: 48848101@qq.com

少,且未见同时检测 *N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基丙酸盐、亚磷酸、杂质 B、杂质 D、磷酸、杂质 G、*N*-去甲基杂质,并能排除氯离子、碳酸根、硫酸根干扰的报道^[7-15]。本文建立了离子色谱抑制法同时测定伊班膦酸钠原料药中 7 个有关物质的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

离子色谱仪 Thermo IC5000,包括自再生抑制器(Dionex AERS 500),电导检测器,进样器(Dionex AS-DV);十万分之一天平(MS205DU METTER TOLEDO),超纯水仪(Milli-Q)。

1.2 试剂

对照品伊班膦酸(USP,批号:R013F0,纯度:99.9%);*N*-去甲基杂质(批号:20161002-D,纯度:100%)、杂质 G(批号:20181004-D,纯度:100%)、杂质 D(批号:D-181101,纯度:100%)(A 制药股份有限公司);杂质 B(TLC,批号:2641-091A3,纯度:99.4%);*N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基丙酸盐(成都叮当时代科技有限公司,批号:DTYQ0605-13-D,纯度:100%);亚磷酸、磷酸(中国食品药品检定研究院)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Dionexionpac AS11-HC 色谱柱(4 mm×250 mm, 9 μ m);AG11-HC 保护柱(4 mm×50 mm);以 100 mmol·L⁻¹ NaOH 为流动相 A、水为流动相 B,梯度洗脱(见表 1);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测器:抑制性电导检测器;检测器温度:35℃;抑制器:Dionex AERS 500 4 mm;抑制器电流:110 mA;柱温:30℃;进样量:20 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	16	84
5	16	84
7	25	75
17	25	75
20	45	55
23	45	55
23.1	25	75
28	25	75
28.1	16	84
39	16	84

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液 取伊班膦酸钠原料药,精密称

定,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含伊班膦酸钠 5 mg 的溶液,作为供试品溶液。

2.2.2 系统适用性溶液 取伊班膦酸钠对照品和磷酸对照品各适量,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 约含伊班膦酸 5 mg、磷酸 5 μ g 的混合溶液,作为系统适用性溶液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密称取伊班膦酸钠对照品和 *N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基丙酸盐、伊班膦酸 *N*-去甲基、亚磷酸、磷酸对照品各适量,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 约含伊班膦酸 5 μ g、*N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基丙酸盐 5 μ g、伊班膦酸 *N*-去甲基 5 μ g、亚磷酸 10 μ g、磷酸 15 μ g 的溶液,作为混合对照品溶液。

2.3 专属性考察

精密量取空白溶剂(超纯水)、伊班膦酸钠杂质 B、*N*-去甲基杂质、杂质 G、杂质 D、*N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基丙酸盐、磷酸和亚磷酸适量,加超纯水溶解作为对应的定位溶液;取上述各溶液适量混合后作为混合定位溶液;另取样品溶液加入混合定位溶液进样 20 μ L,记录色谱图。见图 1,结果表明:溶剂不干扰已知杂质和主成分的检出;各已知杂质之间、已知杂质与主成分之间的分离度均符合要求。

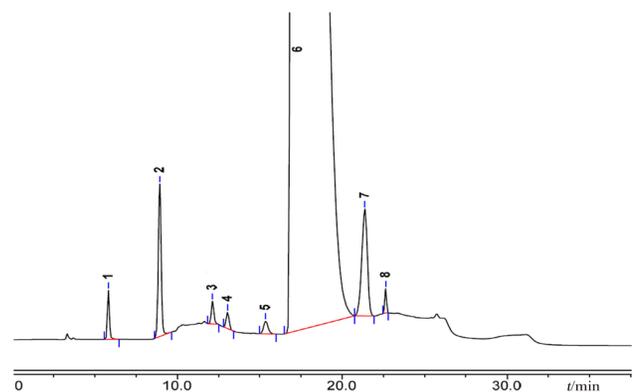


图 1 专属性考察图谱

Fig 1 Ion suppression chromatogram of specificity

1. *N*-甲基-*N*-戊基- β -氨基 (*N*-methyl-*N*-amyl- β -amin); 2. 亚磷酸(phosphiteh); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 D (impurity D); 5. *N*-去甲基杂质 (*N*-demethylation impurity); 6. 伊班膦酸 (ibandronate); 7. 磷酸 (phosphoric acid); 8. 杂质 G (impurity G)

2.4 强制降解试验

为考察本品可能的降解途径及拟订色谱条件对降解产物的检测能力,确定强制降解产物是否为已知杂质,本研究对原料进行了强制降解试验,样品制备方法见表 2。取上述各供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图,强制破坏试验结果见表 3 及图 2。

表 2 强制降解条件

Tab 2 Forced degradation condition

破坏方式	试验条件
未破坏	取本品 50 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加超纯水溶解并稀释至刻度
酸破坏	取本品 50 mg, 精密称定, 加入 1 mol · L ⁻¹ 的盐酸溶液 1 mL, 置于 80 °C 水浴 30 min, 加入 1 mol · L ⁻¹ 的氢氧化钠溶液终止反应后, 加超纯水溶解并稀释至 10 mL。(由于酸破坏样品引入大量 Cl 离子干扰杂质测定, 故未统计结果)
碱破坏	取本品 50 mg, 精密称定, 加入 1 mol · L ⁻¹ 的氢氧化钠溶液 1 mL, 置于 80 °C 水浴 30 min, 加超纯水溶解并稀释至 10 mL
氧化破坏	取本品 50 mg, 精密称定, 加入 3% 的过氧化氢溶液 1 mL, 置于 80 °C 水浴 30 min, 加超纯水溶解并稀释至 10 mL
高温破坏	取本品适量, 置于 105 °C 下 2 h, 取出放冷, 取 50 mg, 精密称定, 加超纯水溶解并稀释至 10 mL
光照破坏	取本品适量, 置于 5000 Lx 下 48 h, 取出, 取 50 mg, 精密称定, 加超纯水溶解并稀释至 10 mL

结果显示, 本品在酸、碱、氧、高温和光照条件下均未产生较大未知杂质, 且破坏条件足够强烈, 远远超过本品储存条件, 故未继续加剧破坏条件。且各破坏条件下, 杂质与主成分峰之间的分离度均大于 1.5, 表明拟订的色谱条件能够满足各已知杂质及降解产物的有效检出及分离。

2.5 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

精密量取“2.2”项下对照品混合液适量, 逐级稀释, 以信噪比 (S/N) 约为 3 时的进样浓度为其检测限 (LOD), 以信噪比 (S/N) 约为 10 时的进样浓度为其定量限 (LOQ), 并平行配制 6 份进行检测。

以拟订供试品浓度 5 mg · mL⁻¹, 进样体积为 20 μL 时, 各杂质的检出能力均低于绝对进样量的 0.02% (限度的 20%), 各杂质的定量限均小于报告限 (本品的最大日剂量小于 2 g, 根据 ICH 的要求, 原料有关物质的报告限为 0.05%)。

表 3 强制破坏试验结果

Tab 3 Forced degradation

破坏方式	主成分与相邻杂质分离度	杂质个数	N-甲基-N-戊基-β-氨基丙酸盐	亚磷酸	杂质 B	杂质 D	N-去甲基杂质	磷酸	杂质 G	最大未知杂质	总杂质 /%
未破坏	2.4	5	未检出	0	0.01	未检出	0.01	0.11	未检出	0.03	0.16
碱破坏	2.2	7	/	0	0	未检出	0.01	0.11	未检出	0.03	0.18
氧化破坏	2.3	7	/	0	0	未检出	0.01	0.09	未检出	0.04	0.2
高温破坏	2.3	8	0.02	0	0.01	未检出	0.01	0.11	未检出	0.05	0.22
光照破坏	2.2	8	0.01	0	0.01	未检出	0.01	0.11	未检出	0.03	0.2

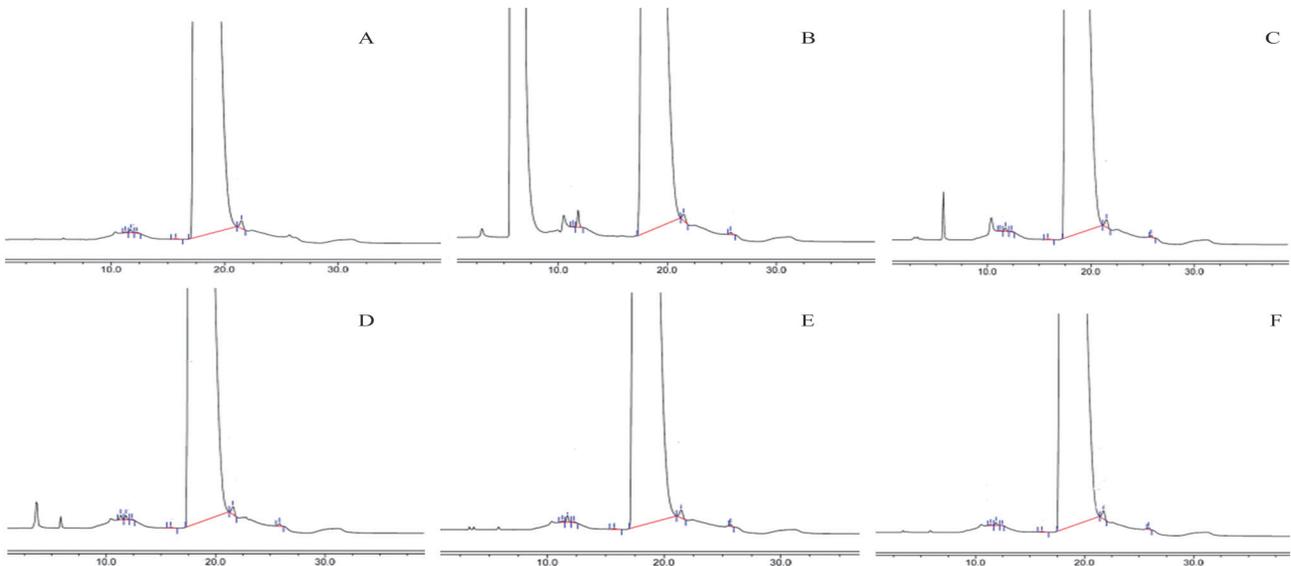


图 2 伊班膦酸强制破坏试验

Fig 2 Forced degradation of ibandronate sodium

A. 未破坏 (sample undamaged); B. 酸破坏 (destroyed by acid); C. 碱破坏 (destroyed by alkali); D. 氧化破坏 (destroyed by oxidant); E. 高温破坏 (destroyed by high temperature); F. 光照破坏样品 (destroyed by light)

2.6 线性关系考察

按“2.2.3”项下方法配制每 1 mL 约含伊班膦酸

N-去甲基杂质、杂质 B、杂质 D、杂质 G、N-甲基-N-戊基-β-氨基丙酸各 50 μg、磷酸 150 μg 和

亚磷酸 100 μg 的混合溶液，作为线性储备液；精密量取线性储备液逐级稀释，制成系列杂质线性溶液。精密量取上述各线性溶液 20 μL，注入液相色谱

仪，记录峰面积，以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归，结果见表 4。

表 4 标准曲线、线性范围、检测下限和定量下限
Tab 4 Regression equation, linearity, LODs and LOQs

杂质	回归方程	相关系数 (<i>r</i>)	线性范围/ (μg · mL ⁻¹)	检测下限 (LOD)/ (μg · mL ⁻¹)	定量下限 (LOQ)/ (μg · mL ⁻¹)
<i>N</i> -甲基- <i>N</i> -戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐	$Y = 0.0431X + 0.0004$	0.9996	0.000 85 ~ 10.20	0.002 04	0.008 48
<i>N</i> -去甲基杂质	$Y = 0.0226X - 0.0036$	0.9999	0.415 ~ 10.37	0.207	0.415
杂质 B	$Y = 0.0224X - 0.0046$	0.9995	0.209 ~ 10.450	0.104	0.209
杂质 D	$Y = 0.0213X - 0.0005$	0.9997	0.211 ~ 10.55	0.106	0.211
杂质 G	$Y = 0.0170X + 0.0011$	0.9992	0.412 ~ 10.29	0.137	0.412
磷酸	$Y = 0.0838X - 0.0289$	0.9998	0.080 ~ 30.0	0.0100	0.080
亚磷酸	$Y = 0.0984X - 0.0357$	0.9996	0.040 ~ 20.0	0.0200	0.040

2.7 精密度考察

量取对照品溶液按“2.1”项下方法测定，连续进样 6 针，记录色谱图，考察进样精密度，结果 *N*-甲基-*N*-戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐、亚磷酸、杂质 B、杂质 D、磷酸、杂质 G、*N*-去甲基杂质色谱峰面积的 *RSD* 分别为 0.34%、0.21%、3.0%、0.23%、0.17%、1.2%、0.40%，表明方法精密度良好。

2.8 重复性考察

按“2.10”项下方法配制 100% 的加标供试品溶液，平行配制 6 份。照“2.1”项下色谱条件进行测定，计算每份样品中已知杂质的含量。结果 *N*-甲基-*N*-戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐含量 *RSD* 为 2.6%；亚磷酸的含量 *RSD* 为 1.1%；杂质 B 的含量 *RSD* 为 1.9%；杂质 D 的含量 *RSD* 为 1.81%；*N*-去甲基杂质的含量 *RSD* 为 1.3%；磷酸的含量 *RSD* 为 1.8%；杂质 G 的含量 *RSD* 为 0.72%，说明拟定的检测方法重复性符合要求。

2.9 稳定性考察

参照“2.10”项下方法配制对照品溶液与加标供试品溶液，在室温下放置不同的时间，进样测定，考察各溶液的稳定性。结果表明室温条件下，对照品溶液放置 12 h，各杂质峰面积 *RSD* 小于 3.0%，稳定性良好；供试品溶液放置 12 h，各杂质峰面积 *RSD* 小于 3.0%，稳定性良好。

2.10 回收试验

取伊班膦酸钠原料约 50 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，分别精密加入“2.4”项下线性储备溶液适量，制成含限度浓度 50%、100%、150% 的加标供试品溶液，每个浓度平行制备 3 份，照“2.1”项下色谱条件进行检测，结果 *N*-甲基-*N*-戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐、亚磷酸、杂质 B、杂质 D、磷酸、杂质 G、*N*-去甲基杂质的平均回收率均在 93.48% ~ 100.30%，*RSD* 在 1.2% ~ 5.5%。

2.11 样品测定

取伊班膦酸钠原料按照拟订的检测方法进行测定，结果见表 5。

表 5 伊班膦酸钠中有关物质检测结果

Tab 5 Detection of related substances in ibandronate sodium

批号	<i>N</i> -甲基- <i>N</i> -戊基-β-氨基丙酸盐盐酸盐 /%	亚磷酸 /%	杂质 B /%	杂质 D /%	<i>N</i> -去甲基杂质 /%	磷酸 /%	杂质 G /%	杂质个数 / 个	最大未知单杂 /%	总杂质 /%
1	0.0286	0.0008	0.0073	未检出	0.0092	0.0266	未检出	8	0.0256	0.1294
2	0.0103	0.0009	0.0086	未检出	0.0102	0.0231	未检出	8	0.0244	0.1016
3	0.0112	0.0008	0.0077	未检出	0.0101	0.0224	未检出	8	0.0348	0.1097
4	0.0142	0.0009	0.0101	未检出	0.0104	0.0227	未检出	8	0.0388	0.1127
5	0.0134	0.0008	0.0067	未检出	0.0102	0.0246	未检出	8	0.0186	0.0999
6	0.0084	0.0008	0.0106	未检出	0.0103	0.0220	未检出	8	0.0189	0.0820

3 讨论

伊班膦酸钠原料药中存在较多的阴离子，故采用梯度洗脱的方式，即改变流动相中氢氧化钠溶液的浓度，使各杂质之间、杂质与主成分之间分离度均能达到要求；且在预试验中发现，采用 100

mmol · L⁻¹ NaOH-水 (22 : 78) 等度洗脱，除杂质 G 外，其余各峰峰形和分离度良好；杂质 G 峰形一般且响应较低；杂质 D 峰拖尾；故用梯度优化杂质 G 的峰形。氢氧化钠溶液的浓度梯度由初始的 16 mmol · L⁻¹ 增加至 45 mmol · L⁻¹ 时，各杂质与主

峰间能够达到分离要求,各阴离子峰之间均无干扰。

本文采用阴离子交换-抑制电导方式进行检测,不仅可以得到很低的背景电导,提高检测灵敏度,而且样品前处理简单,只需溶解稀释即可进样分析。

参考文献

- [1] 关素梅,张勇. 负荷量伊班膦酸钠治疗肺癌骨转移的临床观察[J]. 中国药房, 2011, 22(4): 338-339.
- [2] 包丽华,林华,李永军,等. 伊班膦酸钠和阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松的干预研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(3): 232-235.
- [3] 徐春江,卢海波,谢梅,等. 伊班膦酸钠的药理作用及临床应用进展[J]. 中国药业, 2009, 18(15): 87-88.
- [4] 李继红. 伊班膦酸钠的药理作用和临床用药分析[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(22): 3500-3501.
- [5] 李谢,易超,徐琳,等. 伊班膦酸钠合成工艺的改进[J]. 安徽医药, 2012, 16(8): 1074-1075.
- [6] 郑美林,孟歌. 伊班膦酸钠合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2): 151-153.
- [7] 黄进宝,葛高飞,吴涛. 离子色谱法测定伊班膦酸钠注射液主成分的方法探讨[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(4): 744-748.
- [8] 王雷,焦霞,朱岩. 离子色谱法测定伊班膦酸钠及其杂质含量[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 419.
- [9] 胡晓敏,宋周虎,张培敏,等. 离子色谱-抑制电导法检测同时测定伊班膦酸和有关物质磷酸根离子[J]. 卫生职业教育, 2007, 25(16): 113-114.
- [10] 牟世芬,刘克纳,丁晓静. 离子色谱方法及应用[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 158-201.
- [11] 莫庆奎,卢军,袁静. 亚磷酸的含量测定方法探析[J]. 化工技术与开发, 2009, 38(3): 33-34.
- [12] 李欣,陈红,张亿. 离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质[J]. 中国药房, 2017, 28(30): 4288-4291.
- [13] 安静,张俊贞,卢彦芳,等. 伊班膦酸钠注射液的流动注射化学发光法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(2): 123-125.
- [14] 马邦,唐玮,董建峰,等. 离子色谱法测定伊班膦酸钠注射液中的亚磷酸根和磷酸根的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 446-449.
- [15] 张锦梅,田海峰,张习志. 离子色谱法测定伊班膦酸钠中的亚磷酸和磷酸根离子[J]. 化学分析计量, 2014, 23(Z1): 35-37.

(收稿日期: 2021-01-05; 修回日期: 2021-03-08)

不同辅料硝酸咪康唑乳膏微生物限度检查方法适用性研究

琚滢莹, 李亚东, 朱小磊 (南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473001)

摘要: 目的 根据不同厂家硝酸咪康唑乳膏所用的辅料不同, 建立对应的硝酸咪康唑乳膏的微生物限度检查法。**方法** 根据不同厂家的硝酸咪康唑乳膏的辅料特性, 选择破胶、萃取、静置等前处理方式, 采用薄膜过滤法进行硝酸咪康唑乳膏的微生物计数检查, 采用常规法进行硝酸咪康唑软膏的控制菌检查。**结果** 针对不同辅料, 采用合适的供试品前处理方法, 可以很好地去去除硝酸咪康唑软膏的抑菌性, 并且解决样品难以过滤的问题, 从而建立可靠的微生物限度检查方法。**结论** 不同厂家硝酸咪康唑乳膏采用不同的辅料, 可以灵活选用适宜的前处理方法, 顺利解决样品的抑菌性和难以过滤的问题。

关键词: 硝酸咪康唑; 微生物限度检查; 方法适用性研究; 前处理

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2021)09-1938-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.032

Applicability of microbial limit test for miconazole nitrate cream with different excipients

JU Ying-ying, LI Ya-dong, ZHU Xiao-lei (Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang Henan 473001)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test for miconazole nitrate cream with different excipients from different manufacturers. **Methods** According to the excipients characteristics

作者简介: 琚滢莹, 女, 主管药师, 主要从事抗生素药品检验及药品微生物检验的研究, E-mail: design3wo@126.com

of miconazole nitrate cream from different manufacturers, pretreatment methods, such as gel breaking, extraction and static treatment were selected. Membrane filtration method was used for the microbiological count of miconazole nitrate cream, and the specified micro-organisms of miconazole nitrate cream was determined by conventional method. **Results** The bacteriostatic properties of miconazole nitrate cream were well removed with appropriate pretreatments for different excipients, and the filter problem of the sample was solved to establish a reliable microbial limit test method.

Conclusion For different manufacturers of miconazole nitrate cream with different excipients, we can select appropriate pretreatment, and solve the problem of antibacterial properties of the samples.

Key words: miconazole nitrate; microbial limit inspection; method applicability; pretreatment

硝酸咪康唑乳膏是一种常见的用于治疗皮肤科及妇科疾病类非处方药, 主要用于治疗由真菌、酵母菌及其他真菌引起的皮肤、指(趾)甲感染, 以及由酵母菌(如假丝酵母等)和革兰氏阳性菌引起的阴道感染和继发感染^[1]。由于药品具有较强的抑菌作用, 且其基质较为复杂, 在进行微生物限度检查方法适用性研究的时候, 如果没有采用合适的前处理方法, 会发生试验菌回收率不符合要求, 或者出现薄膜过滤法的过滤效率低、堵膜的情况^[2]。辅料研究发现, 过滤时发生堵膜是由于硝酸咪康唑乳膏中含有卡波姆/聚丙烯酸^[3], 利用氯化钙和乳膏中的卡波姆/聚丙烯酸生成钙盐沉淀, 避开沉淀物, 取溶液过滤, 即可顺利地通过滤膜。本文参照 2020 年版《中国药典》四部要求, 根据不同厂家生产的硝酸咪康唑乳膏的辅料的特点, 采用溶解、破胶、萃取、沉淀、静置相结合的方法, 对供试品做适当前处理, 解决薄膜过滤法效率差及堵膜的难题, 建立适用于硝酸咪康唑乳膏的微生物限度检查方法。

1 材料

1.1 仪器

LDZH-100L 立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂), BGZ-1146 电热鼓风干燥箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司), BCS-1300 II A2 生物安全柜(苏静集团苏州安泰空气技术有限公司), HY-4 调速多用振荡器(江苏金坛市中大仪器厂), PYX-DHS-40x50 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂), SPX-150 型生化培养箱(上海金慧科电子有限公司), HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), JJ500 天平(常熟市双杰测试仪器厂), JT-C 匀质器(漯河市金田试验设备研究所), Htysteritest601 集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司), 75 单罐薄膜过滤器(北京牛牛基因技术有限公司)。

1.2 试药

氯化钙(批号: 20190907)、氯化钠(批号: MB6B206)(天津市恒兴化学试剂制造有限公司), 十四烷酸异丙酯(上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C11291582)。硝酸咪康唑乳膏(西安杨森制药有限公司, 规格: 20 g/支, 批号: KCJ3SKL, KAJ0FD9, KBJ1GFV; 福建太平洋制药有限公司, 规格: 10 g/支, 批号: 190601, 180303, 200301)。胰酪大豆胨琼脂培养基(批号: 20181020)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号: 20180806)、胰酪大豆胨液体培养基(批号: 20190726)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号: 20200220)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号: 20200225)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号: 20200314)(青岛海博生物技术有限公司)。

1.3 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC (B) 10104]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]、白假丝酵母菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003], 上述菌株均来自于中国食品药品检定研究院, 工作菌株为第 3 代。

2 方法

2.1 菌液的制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中, 置 35 °C 培养 24 h。将白假丝酵母菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基中, 置 25 °C 培养 3 d。分别取上述培养物用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的菌悬液。将黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上, 置 25 °C 培养 7 d, 加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨

缓冲液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

2.2 供试品的制备

2.2.1 不含卡波姆/聚丙烯酸乳膏 称取硝酸咪康唑乳膏 10 g (批号: 190601), 加入无菌十四烷酸异丙酯和 0.9% 无菌氯化钠溶液各 100 mL, 充分震荡萃取, 静置 15 min 后取下层水相的上层溶液作为 1:10 的供试液。取 1:10 的供试液适量, 用 0.9% 无菌氯化钠稀释成 1:20 和 1:50 的供试液。

2.2.2 含卡波姆/聚丙烯酸乳膏 称取硝酸咪康唑乳膏 10 g (批号: KCJ3SKL), 加入无菌十四烷酸异丙酯 100 mL, 10% 无菌氯化钙溶液 10 mL, 再加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 90 mL, 充分震荡萃取, 静置 15 min 后取下层水相的上层溶液作为 1:10 的供试液。取 1:10 的供试液适量, 用 0.9% 无菌氯化钠稀释成 1:20 和 1:50 的供试液。

2.3 供试品计数方法适用性试验

2.3.1 平皿法

① 试验组: 取“2.2”项下制备好的 1:10、1:20 和 1:50 的供试液各 9.9 mL, 分别加入不大于 1×10^4 CFU · mL⁻¹ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母菌和黑曲霉试验菌液 0.1 mL, 混匀。取 1 mL 注入无菌培养皿中, 加入温度不超过 45 °C 融化的胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖培养基 20 mL, 摇匀, 待凝固后分别在 35 °C 和 25 °C 倒置培养、计数。

② 供试品对照组: 分别取 1:10、1:20 和 1:50 的供试液 1 mL, 不加试验菌, 方法同“试验组”。

③ 菌液对照组: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 1 mL, 代替供试液, 方法同“试验组”。

④ 阴性组: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 1 mL, 代替供试液, 不加试验菌, 方法同“试验组”。

2.3.2 薄膜过滤法

① 试验组: 取“2.2”项下制备好的 1:10 供试液 9.9 mL, 分别加入不大于 1×10^4 CFU · mL⁻¹ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母菌和黑曲霉试验菌液 0.1 mL, 混匀。取 1 mL 加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 100 mL 冲洗液中, 薄膜过滤, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗滤膜, 每次 100 mL, 共冲洗 3 次。在最后一次冲洗液中分别加入不大于 1×10^4 CFU · mL⁻¹ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母菌和黑曲霉试验菌液 1 mL。

② 供试品对照组: 取 1:10 供试液 1 mL,

不加试验菌, 方法同“试验组”。

③ 菌液对照组: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 1 mL, 代替供试液, 方法同“试验组”。

④ 阴性组: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 1 mL, 代替供试液, 不加试验菌, 方法同“试验组”。

取过滤后的滤膜, 菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基上, 分别在 35 °C 和 25 °C 倒置培养、计数。

2.4 回收率

计算各试验菌的回收率, 若回收率在 0.5 ~ 2.0 范围内, 则该方法可行。回收率 = (试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数) / 菌液对照组菌落数。

2.5 控制菌的检查

硝酸咪康唑乳膏为皮肤用药和阴道用药, 需要控制金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌及白假丝酵母菌。采用直接接种法, 取“2.2”项下 1:10 供试液各 10 mL 分别接种至 100、200、400 mL 胰酪大豆胨液体培养基, 沙氏葡萄糖液体培养基中, 再加入含菌量不大于 100 CFU · mL⁻¹ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白假丝酵母菌悬液 1 mL, 混匀, 分别置 35 °C、25 °C 培养 24 h, 3 d 后分别划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板或沙氏葡萄糖琼脂平板上。

3 结果

3.1 菌落计数方法适用性结果

硝酸咪康唑乳膏需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数微生物计数方法适用性结果分别见表 1、2。从表格中可以看出, 平皿法计数方法的回收率不符合要求, 薄膜过滤法计数方法的回收率均在 0.5 ~ 2 内, 符合《中国药典》要求^[4], 故可采用薄膜过滤法进行需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数。

3.2 控制菌检查法适用性结果

硝酸咪康唑乳膏采用 1:10 供试液分别接种至胰酪大豆胨液体培养基、沙氏葡萄糖液体培养基各 100、200、400 mL 的方法, 结果发现, 由于硝酸咪康唑的抑菌性, 当培养基体积为 100 mL 时, 未检出试验菌。当培养基体积增加到 200、400 mL 可检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白假丝酵母菌, 故采用 200 mL 培养基稀释接种法对其进行控制菌检查, 结果见表 3。

4 讨论

硝酸咪康唑是一种广谱、高效的抗真菌类药物, 且对葡萄球菌等革兰氏阳性菌也有抑制作用, 当微生物限度检查采用普通的平皿法无法满

表 1 微生物计数平皿法回收率

Tab 1 Recovery of plate-count method of microbial count

试验菌株	试验次数	供试品稀释浓度		
		1:10	1:20	1:50
铜绿假单胞菌	1	0.77	1.12	0.89
	2	1.10	0.68	0.99
	3	0.89	0.90	0.91
金黄色葡萄球菌	1	0.06	0.28	0.70
	2	0.07	0.40	0.89
	3	0.04	0.36	0.74
枯草芽孢杆菌	1	0.66	0.69	0.75
	2	0.82	0.80	0.90
	3	0.80	0.83	0.83
白假丝酵母菌	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00
黑曲霉	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00
白假丝酵母菌*	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00
黑曲霉*	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00

注：“*”表示霉菌和酵母菌总数检查方法适用性试验数据。

Note: “*” indicates the test data of applicability of total number of molds and yeasts.

表 2 微生物计数薄膜过滤法回收率

Tab 2 Recovery of membrane filtration method of microbial count

试验菌株	试验次数		
	1	2	3
铜绿假单胞菌	0.85	0.81	0.79
金黄色葡萄球菌	0.92	0.93	0.89
枯草芽孢杆菌	0.82	0.78	0.83
白假丝酵母菌	0.77	0.79	0.72
黑曲霉	0.71	0.73	0.68
白假丝酵母菌*	0.80	0.76	0.73
黑曲霉*	0.77	0.75	0.72

注：“*”表示霉菌和酵母菌总数检查方法适用性试验数据。

Note: “*” indicates the test data of applicability of total number of molds and yeasts.

表 3 控制菌检查法适用性结果

Tab 3 Applicability of the specified micro-organisms test methods

试验菌	培养基体积 /mL		
	100	200	400
金黄色葡萄球菌	未检出	检出	检出
铜绿假单胞菌	未检出	检出	检出
白假丝酵母菌	未检出	检出	检出

足试验菌的回收率要求，而改用薄膜过滤法，可以很好地去除其抑菌性。但由于硝酸咪康唑乳膏

是黏稠的半固体制剂，需要用合适的方法进行前处理样品才能顺利地通过滤膜。在最初试验过程中，采用称取样品 10 g，加入无菌十四烷酸异丙酯和 0.9% 氯化钠各 100 mL 的方法处理样品^[5]，发现有一些产品无法顺利通过滤膜，堵塞很严重。又尝试添加聚山梨酯 80，提高冲洗液温度至 45℃^[6]，供试液仍然不能快速通过滤膜。

对比不同厂家硝酸咪康唑乳膏的成分表发现，难以通过滤膜的样品均含有聚丙烯酸或卡波姆（丙烯酸交链共聚物），均为高分子聚合物，是常用的增稠剂，易溶于水，增加水相的黏稠度，使得供试液难以通过滤膜。利用氯化钙与聚丙烯酸/卡波姆形成钙盐沉淀，从而达到破胶的目的，吸取水相上清液，避开沉淀物，即可顺利地通过滤膜^[2]。因此建议药品检验人员在面对不同厂家的同一品种药品时，应该根据辅料的理化特性，依照药典规定，灵活选用适宜的前处理方法，顺利解决样品的抑菌性、难以过滤等问题。

另外，在对比各个企业的硝酸咪康唑乳膏微生物限度检查方法适用性试验报告时，发现一些厂家忽略了硝酸咪康唑治疗阴道炎的用法，而忽略了阴道给药制剂应不得检出白假丝酵母菌的规定^[4]。暴露了一些企业在进行微生物限度检查方法适用性时不够严谨、规范，无法很好地保证药品质量。药品微生物控制也是药品质量保证的重要组成部分，药品污染微生物不仅直接影响药品的有效性，更有可能危及用药患者的生命安全。因此建议厂家一定要严格按照药典要求的微生物限度标准进行微生物限度检查方法适用性研究。

参考文献

- [1] 张秉华, 宋莉, 杜珊, 等. HPLC 法测定硝酸咪康唑原料有关物质的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(4): 638-641.
- [2] 钱桂英, 季大伟. 克林霉素磷酸酯凝胶微生物限度检查方法验证[J]. 海峡药学, 2012, 24(12): 75-77.
- [3] 郭红叶, 伊博文, 闫小平, 等. 新型辅料卡波姆在凝胶剂中应用现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 371-374.
- [4] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 160-170.
- [5] 李辉, 杨晓莉, 梁泽梅, 等. 不同剂型硝酸咪康唑微生物限度检查方法适用性研究与评[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 80-84.
- [6] 倪玉佳, 朱文静, 戈煜, 等. 复方硝酸咪康唑软膏微生物限度检查的方法学验证[J]. 药学服务与研究, 2019, 19(6): 409-412.

(收稿日期: 2021-01-10; 修回日期: 2021-03-20)

某院 PD-1 免疫检查点抑制剂致不良反应的发生情况及分析

李哲, 孙一琦, 何超然, 李新刚* (首都医科大学附属北京友谊医院西药剂科, 北京 100050)

摘要: **目的** 分析本院 PD-1 免疫检查点抑制剂在临床应用中引起的不良反应情况。**方法** 回顾性调查 2015 年 1 月 1 日至 2021 年 3 月 31 日在本院接受 PD-1 免疫检查点抑制剂治疗各类恶性肿瘤的患者病历, 记录患者接受治疗期间发生的所有不良反应信息, 并进行严重程度分级、相关性评价和影响因素分析。**结果** 共记录 212 例患者共 574 次入院记录, 99 例患者发生共 193 次不良反应, 主要有发热 (11.3%)、白细胞降低 (10.4%)、全身乏力 (7.5%)、转氨酶升高 (6.6%)、血小板降低 (6.6%)、肺炎 (6.6%)、恶心 (6.6%)、皮疹 (6.1%)、腹泻 (6.1%) 等。其中 1~2 级不良反应共 141 次 (73.1%), 相关性为肯定和很可能共 28 次 (14.5%)。72 例患者在不良反应发生后再次接受治疗, 有 15 例出现了新的不良反应, 23 例再次出现了相同的不良反应。经分析, 是否联合其他抗肿瘤药物对不良反应的发生率有显著影响。**结论** PD-1 免疫检查点抑制剂引起的不良反应严重程度较轻, 具有一定安全性, 但不良反应较为多样化, 需要及时发现。

关键词: PD-1; 不良反应; 免疫治疗; 相关性评价

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1942-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.033

Occurrence of adverse reactions caused by PD-1 immune checkpoint inhibitors

LI Zhe, SUN Yi-qi, HE Chao-ran, LI Xin-gang* (*Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050*)

Abstract: Objective To analyze the adverse reactions caused by PD-1 immune checkpoint inhibitors. **Methods** We retrospectively analyzed the medical records of patients who received PD-1 immune checkpoint inhibitors for various malignant tumors in our hospital from January 1st, 2015 to March 31st, 2021, and recorded all adverse reactions that occurred during the treatment. Severity grading, correlation and influencing factors were measured. **Results** A total of 212 patients and 574 records were collected. Totally 99 patients had 193 adverse reactions, including fever (11.3%), leukopenia (10.4%), malaise (7.5%), and elevated transaminase (6.6%), thrombocytopenia (6.6%), pneumonia (6.6%), nausea (6.6%), rash (6.1%), and diarrhea (6.1%). Among them, there were 141 times (73.1%) of grade 1~2 adverse reactions, with likely affirmative correlation 28 times (14.5%). Totally 72 patients received second treatment after the adverse reaction, 15 patients developed new adverse reactions, and 23 experienced the same adverse reactions again. There was a significant difference in the incidence of adverse reactions in combination with other anti-tumor drugs. **Conclusion** Adverse reactions caused by PD-1 immune checkpoint inhibitors are generally mild and safe, but the adverse reactions are diverse and need caution.

Key words: PD-1; adverse reaction; immunotherapy; correlation evaluation

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (No.7192060)。

作者简介: 李哲, 男, 药师, 主要从事临床药学工作, E-mail: lizhe19900701@163.com * 通信作者: 李新刚, 男, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药事管理及群体药代动力学研究, E-mail: lxxg198320022003@163.com

免疫治疗是当前肿瘤治疗领域中最具前景的研究方向之一,研究表明,当肿瘤细胞表面过表达的程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)与主要表达于活化T细胞的程序性细胞死亡受体-1(PD-1)结合后,T细胞受体信号传导通路失活,导致T细胞的增殖和活化受抑制,从而使肿瘤细胞逃避机体正常的免疫监视^[1-2]。而近年来陆续上市的PD-1免疫检查点抑制剂可以阻断PD-1与PD-L1结合,增强免疫应答。该类药品在多种肿瘤中疗效显著,客观缓解率通常在10%~40%^[3]。但是,随着PD-1免疫检查点抑制剂的广泛应用,临床发现这种治疗方法可能会导致诸多不良反应的发生,对患者的生活质量产生较大负面影响,从而中断肿瘤治疗^[4]。虽然PD-1免疫检查点抑制剂总不良反应发生率较高,但严重不良反应发生率约为10%~13%,低于传统化疗的35%~54%^[5-6],故部分患者会选择在不良反应缓解的情况下再次接受PD-1免疫检查点抑制剂治疗。本文就PD-1免疫检查点抑制剂治疗恶性肿瘤期间出现的不良反应,以及不良反应缓解后的再应用情况进行分析。

1 研究对象

共收集到2015年1月1日至2021年3月31日在本院接受PD-1免疫检查点抑制剂治疗各类恶性肿瘤的患者212例,共接受574次治疗。本研究涉及患者的基本信息和医疗信息,已通过医院伦理委员会审批同意,批件号:2021-P2-162-01。

2 方法

2.1 主要治疗药物及用法用量

信迪利单抗注射液(200 mg, q3w)、纳武利

尤单抗注射液(3 mg·kg⁻¹或240 mg, q2w)、帕博利珠单抗注射液(2 mg·kg⁻¹, q3w)、注射用卡瑞利珠单抗(3 mg·kg⁻¹或200 mg, q3w; 200 mg, q2w)、特瑞普利单抗注射液(3 mg·kg⁻¹, q2w)、替雷利珠单抗注射液(200 mg q3w),部分18周岁以下患者酌情减少剂量。

2.2 研究方法

通过回顾性查阅患者病历记录、体温单、实验室检查结果以及影像学检查结果等,记录患者接受PD-1免疫检查点抑制剂治疗期间发生的所有不良反应信息,以不良事件评价标准(CTCAE)5.0版为依据进行评价,包括不良反应的类别和分级,并根据用药与不良反应/事件的出现有无合理的时间关系;反应是否符合该药已知的不良反应类型;停药或减量后,反应是否消失或减轻;再次使用可疑药品是否再次出现同样的反应/事件;反应/事件是否可用合并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来解释五条标准进行相关性评价。评价结果分为肯定、很可能、可能、可能无关,其中可能无关以上等级的不良反应判定为有关。

2.3 分析方法

应用统计软件SPSS 22.0对相关数据进行统计分析,计数信息的比较采用卡方检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般资料

212例患者共接受574次治疗。其中男性136人(64.2%),女性76人(35.8%),年龄范围在4~81岁,其他详见表1。

表1 212例患者一般情况

Tab 1 General conditions of 212 patients

类别	分类	例数/n(%)	类别	分类	例数/n(%)
性别	男	136人(64.2)	入院科室	血液内科	299次(52.1)
	女	76人(35.8)		肿瘤内科	188次(32.8)
年龄/岁	<18	34人(16.0)		介入科	26次(4.5)
	18~65	129人(60.9)		泌尿外科	23次(4.0)
	>65	49人(23.1)		普外科	13次(2.3)
入院年份	2015—2018	38次(6.6)		胸外科	10次(1.7)
	2019—2021	536次(93.4)		其他	15次(2.6)
是否超适应症用药	是	188人(88.7)	是否一线	是	73人(34.4)
	否	24人(11.3)	否	139人(65.6)	
接受过放疗	是	29人(13.7)	接受过靶向治疗	是	98人(46.2)
	否	183人(86.3)	否	114人(53.8)	
合并症≥3个系统	是	152人(71.7)	是否联合化疗	是	198人(93.4)
	否	60人(28.3)	否	14人(6.6)	

3.2 不良反应

3.2.1 不良反应数据

212例患者中,99例发生

不同程度的不良反应,其中35例患者发生一种不良反应,37例患者发生两种不良反应,24例患者

发生三种不良反应, 3 例患者发生四种不良反应, 最终共记录 193 次不良反应, 平均 1.95 次/例, 不良反应发生例数、严重程度分级及相关性评价见表 2。

表 2 不良反应例数、严重程度分级及相关性评价

Tab 2 Number of adverse reactions, severity classification and correlation evaluation

不良反应	例数 / n (%)	严重程度分级		相关性评价			
		1~2 级	3~5 级	肯定	很可能	可能	可能 无关
发热	24 (11.3)	21	3	1	3	7	13
白细胞降低	22 (10.4)	13	9			9	13
全身乏力	16 (7.5)	13	3		5	9	2
转氨酶升高	14 (6.6)	11	3			7	7
血小板降低	14 (6.6)	6	8			6	8
肺炎	14 (6.6)	2	12		3	7	4
恶心	14 (6.6)	10	3		1	11	2
皮疹	13 (6.1)	9	5	2	2	8	1
腹泻	13 (6.1)	12	1		1	10	2
食欲减退	10 (4.7)	8	2		3	3	4
咳嗽	9 (4.2)	9	0	1	1	3	4
血肌酐升高	7 (3.3)	7	0			3	4
咳嗽	6 (2.8)	5	1		2	3	1
呕吐	5 (2.4)	5	0			4	1
失眠	4 (1.9)	3	1			2	2
贫血	4 (1.9)	3	1			1	3
甲状腺异常	3 (1.3)	3	0		3		
体重降低	1 (0.5)	1	0			1	
总计	193 (91.0)	141	52	4	24	94	71

本研究共涉及 6 种已上市的 PD-1 免疫检查点抑制剂, 使用分布及各自不良反应发生例数见表 3。

3.2.2 不良反应分析 采用卡方检验, 对患者的性别、年龄、是否是一线使用、是否联合其他抗肿瘤药物进行不良反应发生率的分析, 结果见表 4。

3.2.3 不良反应再激发 99 例发生不良反应的患者中, 有 72 例在不良反应缓解或不影响后续治疗的情况下 (33 例痊愈、24 例好转、15 例未好转), 再次接受 PD-1 免疫检查点抑制剂治疗, 这些患者中, 有 15 例出现了新的不良反应, 而有 23 例再次出现了与先前相同的不良反应, 再次出现的不良反应详情见表 5。

4 讨论

PD-1 免疫检查点抑制剂治疗恶性肿瘤在诸多临床试验中已经被证实为一类安全、有效、广谱的治疗方法^[3], 但最早上市的纳武利尤单抗也是在 2014 年才在美国用于黑色素瘤, 虽然近些年新药和相关研究不断, 但仍是一类应用时间较短的治疗药物, 且存在超说明书用药的情况, 所以需要对其进行安全性的用药监护。

在本研究中, 较为常见的不良反应有发热 (11.3%)、白细胞降低 (10.4%)、全身乏力 (7.5%)、转氨酶升高 (6.6%)、血小板降低 (6.6%)、肺炎 (6.6%)、恶心 (6.6%)、皮疹 (6.1%)、腹泻

表 3 PD-1 免疫检查点抑制剂使用分布及不良反应发生例数

Tab 3 Distribution of PD-1 immune checkpoint inhibitors and number of adverse reactions

药物	例数	发生的不良反应及其例数
信迪利单抗注射液	106	发热 (18)、白细胞降低 (16)、血小板计数降低 (11)、转氨酶升高 (9)、恶心 (7)、食欲减退 (7)、全身乏力 (6)、血肌酐升高 (6)、肺炎 (5)、腹泻 (5)、呕吐 (5)、皮疹 (4)、咳嗽 (4)、咳嗽 (4)、贫血 (4)、失眠 (3)、甲状腺功能异常 (2)
注射用卡瑞利珠单抗	58	皮疹 (5)、发热 (4)、全身乏力 (4)、肺炎 (4)、腹泻 (4)、恶心 (3)、食欲减退 (3)、白细胞降低 (2)、转氨酶升高 (2)、血小板计数降低 (2)、咳嗽 (2)、咳嗽 (2)、甲状腺功能异常 (1)、体重降低 (1)、血肌酐升高 (1)
特瑞普利单抗注射液	25	全身乏力 (4)、恶心 (4)、白细胞降低 (3)、肺炎 (3)、皮疹 (3)、腹泻 (3)、发热 (2)、转氨酶升高 (1)、血小板计数降低 (1)、咳嗽 (1)、失眠 (1)
替雷利珠单抗注射液	15	全身乏力 (2)、转氨酶升高 (2)、肺炎 (1)、腹泻 (1)、咳嗽 (1)
帕博利珠单抗注射液	5	肺炎 (1)、皮疹 (1)、咳嗽 (1)
纳武利尤单抗注射液	3	白细胞降低 (1)

(6.1%)、食欲减退 (4.7%)、咳嗽 (4.2%) 等。该不良反应数据与使用率最高的信迪利单抗注射液说明书中不良反应谱较为相似, 信迪利单抗注射液发生率 $\geq 10\%$ 的不良反应包括发热、贫血、天门冬氨酸氨基转移酶升高、丙氨酸氨基转移酶升高、乏力、白细胞计数降低。其中, 除贫血在本研究中的发生率较低 (1.9%) 外, 其他常见不良反应在本研究的发生率均较高, 但总体发生率与说明书相比较低, 分析原因可能是回顾性研究与 II 期、III 期临床试验的方法差异所致, 临床试验对

受试者的用药安全性更加重视, 记录也更为详实。与国外有关 PD-1 免疫检查点抑制剂的临床试验相比, 本研究中不良反应种类也较为相似, 但个别不良反应的发生率有较大不同。如 Weber 等^[7-13]针对纳武利尤单抗的研究显示发生率最高的不良反应为疲乏, 发生率在 14% ~ 24.8%。本研究全身乏力不良反应的发生率仅为 7.5%, 可能的原因一方面是上述国外研究大多是前瞻性研究, 对不良反应的观察更为敏锐; 另一方面是国内医师和患者普遍对乏力的重视程度不足, 导致记录和报

表 4 不同因素对不良反应率的影响

Tab 4 Influence of different factors on the adverse reaction rate

因素	不良反应数		χ^2 值	P 值	
	发生	未发生			
性别	男	62	74	0.188	0.665
	女	37	39		
年龄 / 岁	< 18	15	19	3.353	0.187
	18 ~ 65	56	73		
	> 65	28	21		
是否一线	是	28	45	3.113	0.078
	否	71	68		
是否超适应证用药	是	90	98	0.920	0.337
	否	9	15		
既往接受过放疗	是	17	12	1.919	0.166
	否	82	101		
既往接受过靶向治疗	是	51	47	2.090	0.148
	否	48	66		
合并症 \geq 3 个系统	是	77	75	3.383	0.066
	否	22	38		
联合其他抗肿瘤药物	是	97	101	6.327	0.012
	否	2	12		

表 5 不良反应再激发情况

Tab 5 Re-stimulation of adverse reactions

不良反应	例数	先前分级		先前相关性		
		1 ~ 2 级	3 ~ 5 级	很可能	可能	可能无关
发热	10	9	1	1	3	6
白细胞降低	3	1	2		1	2
全身乏力	2	2		1	1	
转氨酶升高	2	2			2	
血小板降低	2	1	1		1	1
皮疹	2	2		2		
恶心	1	1			1	
咳嗽	1	1		1		

告数较低,如周静文等^[14]报道中,PD-1 免疫检查点抑制剂引起疲乏的不良反应发生率也仅为 8.8%,与本文相似。但其不良反应发热和白细胞降低的发生率与本文相比较低,原因可能是本文纳入的病例多为血液内科患者(52.1%),而血液内科患者粒细胞缺乏伴发热的发生率较高,该现象也同样出现在其他研究中,如针对霍奇金淋巴瘤的研究中,PD-1 免疫检查点抑制剂引起发热的不良反应分别为 14% 和 24.3%^[15-16]。本研究共涉及 6 种已上市的 PD-1 免疫检查点抑制剂,从表 3 可知,由于各 PD-1 免疫检查点抑制剂的使用数量参差不齐,可及性差导致观察到的不良反应发生情况也有较大差异。

本研究共记录了 193 次不良反应,按照 CTCAE 5.0 的标准对其进行分类,其中 141 次的严重程度为 1 ~ 2 级,52 次的严重程度为 3 ~ 5 级,总体而言,多数不良反应程度较轻,且在停药或对症处理后很快得到缓解,这与国内外相关

研究较为类似^[7-16]。本研究对每一项不良反应进行相关性评价,相关性为肯定的共 4 例,很可能共 24 例,可能的共 94 例,可能无关的共 71 例。肯定和很可能与 PD-1 相关的不良反应仅占 14.5%,这与多数患者的疾病情况和合并用药有关,由表 4 可知,是否联用其他抗肿瘤药物对不良反应的发生率有显著性影响。而 212 例患者中,有 198 例(93.4%)接受了 PD-1 联合其他抗肿瘤药物的治疗方法,所以许多不良反应与 PD-1 免疫检查点抑制剂的相关性并不强,这也正是临床会在不良反应缓解或不影响治疗的前提下,再次使用 PD-1 免疫检查点抑制剂的原因。

在再次使用 PD-1 免疫检查点抑制剂治疗的患者中,共有 23 例(31.9%)再次出现了与之前相同的不良反应,大多为发热这类发生率高且较易控制的不良反应。而其中 4 例(2 例皮疹、1 例咳嗽、1 例发热)不良反应也因为此次再激发试验阳性而将相关性评价为肯定。此外,有 15 例患者出现了新的不良反应,所以在 72 例再次接受 PD-1 免疫检查点抑制剂治疗的患者中,再次出现不良反应的发生率为 52.8%,与总发生率 46.7% (99/212) 相似,未明显升高的不良反应发生率也是临床考虑再次采用 PD-1 治疗的原因之一。

此外,本研究探讨了不同因素对不良反应发生率的影响,除“联合其他抗肿瘤药物”对不良反应发生率有显著性影响外,患者性别、年龄、是否一线使用、是否超适应证用药、既往是否接受过放疗、既往是否接受过靶向治疗、合并疾病是否 \geq 3 个系统没有发现显著影响。但不能因此而放弃 PD-1 免疫检查点抑制剂联合其他抗肿瘤药物的治疗方案,因为根据目前的相关研究,PD-1 免疫检查点抑制剂联合其他抗肿瘤药物,尤其是分子靶向药物,往往能够产生协同抗肿瘤作用,且在一定程度上可减少用药剂量,避免耐药的产生^[17-19]。所以联合用药具有较大意义,但需要进行安全性监测。

目前许多研究考察 PD-1 免疫检查点抑制剂引起的特殊炎症不良反应,即免疫相关不良反应(irAEs),主要影响皮肤、消化道、内分泌腺体、肝脏和肺等重要脏器^[20-22],但有专家认为,经 PD-1 免疫检查点抑制剂治疗后发生的不良反应均可视为 irAEs^[23]。所以,本研究未针对 irAEs,而是对发生的所有不良反应进行调查和分析,以提供全面且详实的临床数据。

5 小结

PD-1 免疫检查点抑制剂具有广而强的抗肿

瘤活性, 为许多晚期恶性肿瘤患者带来了新的希望, 但在临床应用中, 应该重视其引起的不良反应尤其是严重不良反应, 临床医师以及药师在患者用药后进行积极的监测, 对不良反应做到早发现、早对症, 在使用前沿治疗手段提高有效性的同时, 兼顾患者用药的安全性^[24]。

参考文献

- [1] Chamoto K, Hatae R, Honjo T. Current issues and perspectives in PD-1 blockade cancer immunotherapy [J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25 (5): 790-800.
- [2] Wakabayashi G, Lee YC, Luh F, et al. Development and clinical applications of cancer immunotherapy against PD-1 signaling pathway [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26 (1): 96.
- [3] Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. *Nature*, 2017, 541 (7637): 321-330.
- [4] Byun DJ, Wolchok JD, Rosenberg LM, et al. Cancer immunotherapy-immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13 (4): 195-207.
- [5] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *New Engl J Med*, 2015, 373 (17): 1627-1639.
- [6] Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 387 (10027): 1540-1550.
- [7] Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, et al. Safety profile of nivolumab monotherapy: A pooled analysis of patients with advanced melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (7): 785-792.
- [8] Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): A multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 (3): 312-322.
- [9] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer [J]. *New Engl J Med*, 2015, 373 (2): 123-135.
- [10] Fuchs CS, Doi T, Jang RW, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: Phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (5): e180013.
- [11] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): An open-label, multicentre, phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 (9): 1182-1191.
- [12] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *New Engl J Med*, 2016, 375 (19): 1856-1867.
- [13] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2015, 373 (19): 1803-1813.
- [14] 周静文, 何明基, 练辉, 等. 免疫检查点抑制剂 PD-1 免疫相关不良反应的临床分析 [J]. *介入放射学杂志*, 2021, 30 (1): 29-33.
- [15] Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: A multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17 (9): 1283-1294.
- [16] Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, et al. Phase II study of the efficacy and safety of pembrolizumab for relapsed/refractory classic hodgkin lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (19): 2125-2132.
- [17] Hughes PE, Caenepeel S, Wu LC. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy combinations for the treatment of cancer [J]. *Trends Immunol*, 2016, 37 (7): 462-476.
- [18] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin-Tie system [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10 (3): 165-177.
- [19] Yasuda S, Sho M, Yamato I, et al. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172 (3): 500-506.
- [20] Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the immune-related adverse effects of immune checkpoint inhibitors: A review [J]. *Jama Oncol*, 2016, 2 (10): 1346-1353.
- [21] Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33 (17): 1974-1982.
- [22] Weber JS, Postow M, Lao CD, et al. Management of adverse events following treatment with anti-programmed death-1 agents [J]. *Oncologist*, 2016, 21 (10): 1230-1240.
- [23] Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 54: 139-148.
- [24] 李草, 赵志刚. 程序性死亡受体 1 抑制剂的神经系统不良反应及药学监护 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (3): 548-552.

(收稿日期: 2021-05-12; 修回日期: 2021-06-23)

基于 WHO 基本药物标准清单 (21 版) 分析 本院抗菌药物品种配备合理性

周艳琴^{1, 2}, 王静宇¹, 郑春茂¹, 黄晓亮¹, 陈碧^{1, 2*} (1. 郴州市第一人民医院, 湖南 郴州 423000; 2. 南华大学医院管理研究所, 湖南 郴州 423000)

摘要: **目的** 比较 WHO 基本药物标准清单 (21 版) [以下简称 WHO-EML (21 版)] 与本院药品供应目录中抗菌药物的差异, 分析本院药品供应目录中抗菌药物品种配备合理性。**方法** 对两个目录中抗菌药物的药品分类、种类、剂型、品规及药品分级进行比较, 探讨本院抗菌药物目录的合理性。**结果** 除多黏菌素类外, 本院药品供应目录配备了 WHO-EML (21 版) 目录中所有的抗菌药物类别, 还配备了其没有的头霉素类以及单环 β -内酰胺类。本院抗菌药物共 54 个品种, WHO-EML (21 版) 共 46 个品种, 共有品种 30 个 (65.22%)。WHO-EML (21 版) 有 10 种剂型, 以口服药为主; 本院目录有 9 种剂型, 以注射剂为主。WHO-EML (21 版) 将其目录内抗菌药物分为 access (可用)、watch (慎用) 和 reserve (备用) 三级。本院抗菌药物则按照“非限制使用级”“限制使用级”和“特殊使用级”3 级分级管理。两目录共有的品种, 分级一致的仅为 14 种。**结论** 本院抗菌药物品种配备较为合理, 但是剂型尚需要进一步优化。

关键词: 基本药物标准清单; 抗菌药物; 品种配备

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1947-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.034

Rationality of antibacterial stock based on the WHO list of essential medicines (21st Edition)

ZHOU Yan-qin^{1, 2}, WANG Jing-yu¹, ZHENG Chun-mao¹, HUANG Xiao-liang¹, CHEN Bi^{1, 2*} (1. Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou Hunan 423000; 2. Institute of Hospital Management, University of South China, Chenzhou Hunan 423000)

Abstract: Objective To analyze the rationality of antibacterial stock in our hospital by referring to WHO list of essential medicines (21st Edition) [WHO-EML (21st Edition)]. **Methods** The drug classification, types, dosage forms, product specifications and clinical application of two catalogues were compared to determine the rationality of the antibacterial stock in our hospital. **Results** Except for polymyxin, the drug supply catalogue in our hospital was equipped with all the listed antibacterials in the WHO-EML (21st Edition) and the cephalosporin and monocyclic β -lactams which were not in the WHO-EML (21st Edition). There were 54 antibiotics in our hospital. WHO-EML (21st Edition) included 46 antibiotics, 30 (65.22%) of which were common in the two drug catalogues. WHO-EML (21st Edition) had 10 dosage forms, mainly oral drugs, and our hospital catalogue had 9 dosage forms, mainly injections. According to WHO-EML (21st Edition), antimicrobial agents were divided into three groups: access, watch and reserve. Antibacterial stock in our hospital was managed according to three levels: non restrictive, restrictive and special. Only 14 in the two catalogues shared the same classification. **Conclusion** The antibacterial stock in our hospital is fairly reasonable, but the dosage forms need optimization.

Key words: list of essential medicine; antibacterial; stock

基金项目: 南华大学医院管理研究所项目 (No.2019YYGL21); 2020 年郴州市级重点研发及技术创新引导专项项目 (No.ZDYF2020129)。

作者简介: 周艳琴, 女, 硕士研究生, 主要从事抗感染、肠外肠内营养临床药学研究, E-mail: zyqloveyx@163.com *通信作者: 陈碧, 女, 主任药师, 主要从事临床药学、药事管理研究, E-mail: chenbi2001@163.com

我国医疗机构所用抗菌药物品种是抗菌药物临床应用管理评价的指标之一^[1]。《抗菌药物临床应用指导原则》2015 年版要求医疗机构按照《抗菌药物临床应用管理办法》的要求,严格控制抗菌药物供应目录的品种、品规数量。抗菌药物购用品种遴选应以“优化结构、确保临床合理需要”为目标,保证抗菌药物类别多元化,在同类产品中优选抗菌活性强、药动学特性好、不良反应少、性价比优、循证医学证据多和权威指南推荐的品种^[2]。基本药物是指能满足人们基本的健康需要,根据公共卫生的现状、有效性和安全性,并通过成本-效果比较的证据所遴选的药品^[3]。世界卫生组织自 1977 年颁布了第 1 版《世界卫生组织基本药物标准清单》(WHO Model List of Essential Medicines, WHO-EML)以来,每隔两年都会根据全球疾病种类、分布,以及药品安全性与有效性等方面的资料对该清单进行更新^[4]。截至 2019 年,WHO 基本药物清单已更新至第 21 版即 WHO-EML (21 版)^[5]。本文就 WHO-EML (21 版)与本院药品供应目录中抗菌药物对比与分析,探讨本院抗菌药物目录结构合理性,为本院抗菌药物目录的修订与完善提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料

WHO 官方网站发布的《世界卫生组织基本药物标准清单(WHO-EML)(21 版)》^[5]与本院药品供应目录中抗菌药物目录清单。本研究所指的抗菌药物是指治疗细菌、支原体、衣原体、立克次氏体、螺旋体、真菌等病原微生物所致感染性疾病病原的药物,不包括治疗结核病、寄生虫病和各种病毒所致感染性疾病的药物以及具有抗菌作用的中药制剂^[6]。

1.2 方法

对两个目录中抗菌药物的药品分类、种类、剂型、规格及药品分级进行汇总分析,比较两者的异同。通过文献调研,探讨本院抗菌药物目录的合理性。

2 结果

2.1 两个目录收录抗菌药物的类别与品种比较

2.1.1 类别比较 WHO-EML (21 版)与本院药品供应目录共有的抗菌药物类别有 16 类,WHO-EML (21 版)独有的药品类别为多黏菌素类,本院药品供应目录独有的药品类别为头霉素类以及单环 β -内酰胺类,具体见表 1。

2.1.2 品种比较 WHO-EML (21 版)共收录抗菌药物 46 个品种,本院 2020 年药品供应目录常规收录了 54 种抗菌药物(复方磺胺甲噁唑、味

喃妥因、青霉素 G、苄星青霉素可不计在品种数内)^[1],其中两个目录共有品种 30 个,本院药品目录收录了 WHO-EML (21 版) 65.22% 的品种,具体见表 1。

2.2 两个目录共同收录抗菌药物的剂型品规比较

WHO-EML (21 版)共收录抗菌药物 10 种剂型共 87 个品规,本院目录收录 9 种剂型共 51 品规,具体见表 2。

2.3 两目录共同收录抗菌药物品种分级对比分析

2.3.1 抗菌药物品种分级标准对比 WHO-EML (21 版)参照 AWaRe 分级目录,将其目录内抗菌药物分为 access (可用)、watch (慎用)和 reserve (备用) 3 个级别^[7]。本院药品目录根据《抗菌药物临床应用管理办法》将其目录内抗菌药物按照“非限制使用级”“限制使用级”和“特殊使用级” 3 级分级管理^[6],具体见表 3。

2.3.2 共同收录抗菌药物不同分级对比分析 两个目录共有的 30 个品种,分级一致的仅为 14 种,有 16 种分级发生变化。其中 WHO-EML (21 版)中的抗真菌药物都无具体的分级,有 4 个抗细菌药物品种在本院目录中发生了升级,有 7 个抗细菌药物品种在本院目录中发生了降级,具体见表 4。

3 讨论

3.1 两个目录收录抗菌药物的类别比较分析

WHO-EML (21 版)与本院药品供应目录共有的抗菌药物类别基本相同,不过,本院没有常规配备 WHO-EML (21 版)目录内的多黏菌素,但常规配备了 WHO-EML (21 版)没有的头霉素类以及单环 β -内酰胺类。近 10 年,我国在抗菌药物管理方面已取得一定成效,但是多重耐药尤其是泛耐药革兰氏阴性菌的流行给临床抗感染治疗带来的挑战依然存在。国际指南委员会推荐多黏菌素与对病原体表现出敏感最低抑菌浓度(MIC)的另外一种或多种药物联合用于耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌引起的侵袭性感染的治疗^[8]。广泛耐药革兰氏阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制:中国专家共识推荐治疗各种广泛耐药革兰氏阴性杆菌(XDRGNB)感染的联合用药推荐方案中就包括以多黏菌素为基础的联合治疗方案^[9]。但是多黏菌素的肾毒性及神经毒性在临床的安全性仍需关注。本院虽未常规配备多黏菌素,但是对于因特殊感染患者治疗需求,医院可启动临时采购程序采购多黏菌素。头霉素类其抗菌谱和抗菌作用与第二代头孢菌素相仿,且对脆弱拟杆菌等厌氧菌抗菌作用较头孢菌素类强,可用于胃肠道手术、经阴道子宫切除、经腹腔镜子宫切除或剖宫

表 1 本院药品目录与 WHO-EML(21 版) 收录抗菌药物类别与品种比较

Tab 1 Type and variety of antibiotics in the drug catalogues in our hospital and WHO-EML (21st Edition)

药品类别	共有药品	WHO-EML (21 版) 独有药品	本院目录独有药品
青霉素类	阿莫西林、苄星青霉素、青霉素、	氨苄西林、氯唑西林、苯氧甲基青霉素、普鲁卡因苄基青霉素	苯唑西林钠针、哌拉西林钠针、氟氯西林钠针
β -内酰胺 β -内酰胺类酶抑制剂复合制剂	阿莫西林+克拉维酸、哌拉西林+他唑巴坦	头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-法硼巴坦	氨苄西林钠舒巴坦钠、头孢哌酮钠-舒巴坦钠
头孢菌素	头孢唑啉、头孢曲松、头孢呋辛、头孢他啶、头孢克肟、头孢噻肟	头孢氨苄	头孢拉定、头孢替安、头孢地尼、头孢他美酯、头孢匹胺、头孢吡肟
头霉素类	/	/	头孢西丁钠
碳青霉烯	美罗培南	/	亚胺培南西司他丁钠
单环 β -内酰胺类	/	/	氨曲南
氨基糖苷类	阿米卡星、庆大霉素	大观霉素、拉唑米星	/
大环内酯类	阿奇霉素、克拉霉素	/	红霉素、罗红霉素
喹诺酮类	环丙沙星	/	诺氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星
林可酰胺类	克林霉素	/	/
硝基咪唑类	甲硝唑	/	奥硝唑
磺胺类	复方磺胺甲噁唑片	/	/
硝基呋喃类	呋喃妥因	/	/
磷霉素	磷霉素	/	/
四环素	/	多西环素	替加环素
酰胺醇类	氯霉素	/	/
糖肽类	万古霉素	/	去甲万古霉素替考拉宁
噁唑烷酮类	利奈唑胺	/	/
多黏菌素类	/	多黏菌素 B、黏菌素 E	/
抗真菌药	两性霉素 B、氟康唑、伊曲康唑、制霉菌素、伏立康唑	克霉唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素、碘化钾	卡泊芬净

表 2 WHO-EML (21 版) 与本院目录共同收录抗菌药物的剂型品规
Tab 2 Formation of antibiotics in the drug catalogues in our hospital and WHO-EML (21st Edition)

给药途径	剂型	WHO-EML (21 版)	本院目录
口服	口服粉末剂(颗粒剂)	2	2
	片剂	15	12
	胶囊	10	3
	固体口服剂	3	0
	口服液	13	0
	口服液粉剂	5	0
	干混悬剂	0	2
	缓释片	0	1
	分散片	0	2
	注射	注射剂	8
静脉输液		3	5
注射无菌粉末		27	19
注射用油性悬浮液		1	0

产等手术前的预防用药^[2]，且对于产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的肠杆菌有效，可作为产 ESBLs 菌株的降阶梯治疗^[10]。单环 β -内酰胺类抗菌谱窄，仅对肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌等需氧革兰氏阴性菌有效，但其具有肾毒性低、免疫原性弱以及与青霉素类、头孢菌素类交叉过敏少等特点，对于头孢菌素过敏者，围手术期如果针对预防革兰氏阴性杆菌感染可用氨曲南替代头孢菌素^[2]。基于以上原因，本院药品供应目录将头霉素类以及单环 β -内

酰胺类两类药品收录其中。总的来说，本院配备的抗菌药物的类别比较完善。

3.2 两个目录收录抗菌药物的品种比较

本院药品目录收录了 WHO-EML (21 版) 65.22% 的品种，品种重合率较高。WHO-EML (21 版) 收录而本院未收入的品种有氨苄西林、氯唑西林、苯氧甲基青霉素、普鲁卡因苄基青霉素、头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-法硼巴坦、头孢氨苄、大观霉素、拉唑米星、多西环素、克霉唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素、碘化钾。虽然本院无氯唑西林与头孢氨苄，但本院有与氯唑西林抗菌谱相似的苯唑西林，与头孢氨苄抗菌谱相似的头孢拉定。苯氧甲基青霉素、普鲁卡因苄基青霉素与大观霉素临床使用较少，克霉唑、灰黄霉素、碘化钾作为外用抗菌药物，因此未纳入抗菌药物目录内。美罗培南-法硼巴坦与拉唑米星分别于 2017 年 8 月、2018 年 6 月获得 FDA 批准用于治疗复杂尿路感染 (cUTIs)，暂未在我国上市。头孢他啶-阿维巴坦于 2019 年 5 月 21 日获得国家药品监督管理局 (NMPA) 批准，用于治疗复杂性腹腔内感染 (cIAI)、医院获得性肺炎 (HAP) 和呼吸机相关性肺炎 (VAP)，在治疗方案选择有限的成人患者中治疗由下列对本品敏感的革兰氏阴性菌引起的感染：肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、奇异变形杆菌和铜绿假单

表 3 两目录内抗菌药物品种分级标准对比

Tab 3 Classification standards of antibiotics in both catalogues

WHO-EML (21 版)		本院目录	
项目	标准	项目	标准
可用级	① 首选或第二选择抗菌药物；② 提供最好的治疗价值，同时尽量减少耐药性的潜力	非限制使用级	① 经长期临床应用证明安全、有效；② 对细菌耐药性影响较小；③ 价格相对较低的抗菌药物
慎用级	① 首选或第二选择抗菌药物；② 仅针对特定的、数量有限的感染综合征；③ 更容易耐药，因此优先被列为管理项目和监测的目标	限制使用级	① 经长期临床应用证明安全、有效；② 对病原菌耐药性影响较大；③ 或者价格相对较高的抗菌药物
备用级	① 是其他替代治疗方案治疗无效时的最后治疗选择；② 严格挑选的患者（由于多种耐药细菌而危及生命的感染）；③ 密切监控，并优先作为管理项目的目标，以确保其持续有效	特殊使用级	① 具有明显或者严重不良反应，不宜随意使用的抗菌药物；② 需要严格控制使用，避免细菌过快产生耐药的抗菌药物；③ 疗效、安全性方面的临床资料较少的抗菌药物；④ 价格昂贵的抗菌药物

表 4 WHO-EML(21 版)与本院目录共同收载抗菌药物分级对比

Tab 4 Different grades of antibiotics in both catalogues in our hospital and WHO-EML (21st Edition)

药品名称	剂型	分级	
		WHO-EML (21 版)	本院目录
阿莫西林+克拉维酸	注射用无菌粉末	可用级	限制使用级
头孢曲松	注射用无菌粉末	慎用级	非限制使用级
头孢吡辛	注射用无菌粉末	慎用级	非限制使用级
头孢噻肟*	注射用无菌粉末	慎用级	非限制使用级
美罗培南	注射用无菌粉末	慎用级	特殊使用级
阿奇霉素	口服剂型	慎用级	非限制使用级
克拉霉素	口服剂型	慎用级	非限制使用级
环丙沙星	输液	慎用级	非限制使用级
磷霉素	注射用无菌粉末	备用级	非限制使用级
氯霉素	注射液	可用级	限制使用级
万古霉素	注射用无菌粉末	慎用级	特殊使用级
两性霉素 B	注射用无菌粉末	未分	特殊使用级
氟康唑	口服剂型	未分	非限制使用级
	输液	未分	限制使用级
伊曲康唑	胶囊	未分	非限制使用级
制霉菌素	片剂	未分	非限制使用级
伏立康唑	片剂	未分	限制使用级
	注射用无菌粉末	未分	特殊使用级

胞菌。一项关于头孢他啶-阿维巴坦治疗的多重耐药革兰氏阴性菌（MDR-GNB）感染的回顾性研究结果显示：14 d 的临床治愈率为 45%，14 d 和 30 d 死亡率分别为 25% 和 55%^[11]，其有效性还需更多临床数据验证，暂不适合纳入目录。氨苄西林为肠球菌、李斯特菌感染的首选用药。李斯特菌属于环境致病菌，其感染多发生于孕妇、新生儿及老年人等免疫力低下人群，可引起流产、死胎、败血症、脑炎等严重疾病。在一些发达国家，李斯特菌感染是引起新生儿脑膜炎常见的病原菌^[12]。我国新生儿李斯特菌败血症发病率较低，主要以散发病例为主^[13]。虽然新生儿李斯特菌检出率不高，但是致死率及并发症发生率高，2019 版《新生儿败血症诊断及治疗专家共识》推荐在培养结果出来之前，应该经验性使用氨苄西林（青霉素）+第三代头孢作为一线治疗覆盖革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌^[14]，

本院拥有儿童医院独立院区，应该考虑将氨苄西林纳入目录。多西环素作为四环素类药物，具有广谱抗菌活性，是多种感染性疾病首选治疗药物。比如痤疮的系统药物治疗，抗菌药物首选多西环素、米诺环素等四环素类药物^[15]，多西环素作为首选联合药物之一用于无合并症的非复杂性人布鲁菌病感染（成人以及 8 岁以上儿童）者^[16]，可以考虑纳入本院目录内。

3.3 共同收载抗菌药物的剂型品规比较

两个目录共有的 30 个抗菌药物品种中，“WHO-EML（21 版）共收录抗菌药物 10 种剂型共 87 个品规，包括口服剂型 48 个与注射剂型 39 个；本院药品目录收录 9 种剂型共 51 个品规，包括口服剂型 22 个与注射剂型 29 个。两者比较 WHO-EML（21 版）配备的剂型与品规更多。WHO-EML（21 版）目录主要以口服剂型为主，占全部品规的 55.17%，除片剂与胶囊外，口服液与口服液体剂型占比也较高，对于特殊人群，特别是儿童、老年人、吞咽困难、需要管饲等患者，液体口服剂型方便患者治疗，有利于提高患者用药的依从性。相比之下，本院的抗菌药物目录以注射剂为主，占 56.86%，不符合“能口服不肌注、能肌注不输液”的用药原则^[17]，此外本院目录的口服剂型主要以片剂为主，无口服液体剂型，适宜于特殊人群的剂型较少。可见本院目录在剂型配备上尚有不合理之处。

3.4 收载抗菌药物品种分级对比分析

3.4.1 抗菌药物品种分级定义对比分析

AWaRe 分级目录是 WHO 推荐的抗菌药物品种分级目录，目的在于更好地加强各地区、国家和全球的抗菌药物管理，遏制或降低细菌耐药性发展^[18]。2019 年的 WHO-EML（21 版）使用 AWARe 分级对 46 种抗菌药物进行分级^[5]，该分级标准主要基于细菌的耐药性。为了促进临床合理应用抗菌药物，控制细菌耐药，保障医疗质量和医疗安全，我国医疗机构抗菌药物目录根据安全性、疗效、

细菌耐药性、价格等因素,将抗菌药物分为三级:非限制使用级、限制使用级与特殊使用级^[6]。AWaRe 分级与我国抗菌药物分级既有相同之处,又有不同之处。两者都强调了细菌耐药性和疗效,AWaRe 的可用级与我国的非限制使用级都强调了价格较低。其不同之处在于:① AWARe 的可用级强调了可及性及质量保障,我国的非限制使用级未提及;② 我国的限制使用级及特殊使用级都强调了安全性与药品价格,而 AWARe 分级并未提及价格与安全性;③ AWARe 分级未包括抗真菌药物。

3.4.2 共同收载抗菌药物不同分级对比分析 我国的抗菌药物分级目录为各省级卫生行政部门制定本行政区域抗菌药物分级管理目录^[6]。本院抗菌药物目录根据湖南省菌药物分级管理目录进行分级管理。除 5 个抗真菌药物外,两个目录共有的药品有 11 个品种分级有差别,如:① 我省将磷霉素列为非限制使用级,而在 AWARe 分级目录中,磷霉素归属备用级;② 我省将头孢曲松、头孢呋辛、头孢噻肟注射用无菌粉末、阿奇霉素、克拉霉素口服剂型、环丙沙星注射液列为非限制使用级,而在 AWARe 分级目录中,上述 6 个品种归属为慎用级;③ 我省将注射用阿莫西林+克拉维酸、氯霉素注射液列为限制使用级,而在 AWARe 分级目录中,上述 2 个品种归属为可用级;④ 我省将注射液用美罗培南、万古霉素列为特殊使用级抗菌药物,而在 AWARe 分级目录中,上述 2 个品种归属为慎用级抗菌药物。

4 小结

医院抗菌药物合理应用是体现整个医院合理用药水平重要指标之一。为了促进抗菌药物的临床合理使用,要求医院合理配备抗菌药物。目前国内上市的抗菌药物品种众多,医院需根据每种抗菌药物抗菌谱及安全性和有效性,结合本院的感染性疾病种类、服务人群特点等因素进行遴选。总体来说,本院抗菌药物目录结构较为合理,但部分品种比如氨苄西林、多西环素,应该考虑纳入。此外本院抗菌药物的剂型配置尚需改进,注射剂剂型偏多,缺少口服剂型,给临床使用带来不便,有进一步优化的空间。

参考文献

[1] 国家卫生计生委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于进一步加强抗菌药物临床应用管理工作的通知[EB/OL].(2015-08-27)[2021-03-27].<http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s3593/201508/f0fd1f52df14b87aa97bc53819f1036.shtml>.

[2] 国家卫生和计划生育委员会办公厅,国家中医药管理局办公室,解放军总后勤部卫生部药品器材局.抗菌药物临床应用指导原则(2015年版)[EB/OL].(2015-08-27)[2021-03-27].<http://www.nhc.gov.cn/>

xinwei/2015-08/27/content__2920799.html.

[3] 肖爱丽.WHO《基本药物示范目录》的更新与启示[J].中国药事,2016,30(1):65-68.

[4] 周瑞瑞,谢晓慧,陈哲,等.第5版和第6版《WHO儿童基本药物标准清单》及其与《国家基本药物目录》(2012年版)的对比分析及启示[J].中国新药杂志,2018,27(19):2222-2226.

[5] World Health Organization. World Health Organization Model List of Essential Medicines 21st List 2019[EB/OL]. [2021-03-27]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325771>.

[6] 中华人民共和国卫生健康委员会.抗菌药物临床应用管理办法(卫生部令第84号)[EB/OL].(2012-04-24)[2021-03-27].<http://www.nhc.gov.cn/wjw/bmgz/201205/347e8d20a6d442ddb626312378311b4.shtml>.

[7] World Health Organization. WHO releases the 2019 AWARe Classification Antibiotics [EB/OL]. (2019-10-01) [2021-03-27]. <https://www.who.int/news/item/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics>.

[8] Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins [J]. Pharmacother: J Hum Pharmacol Drug Ther, 2019, 39(1): 10-39.

[9] Chinese XDR Consensus Working Group. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacilli: A Chinese consensus statement [J]. Clin Microbiol Infect (CMI), 2016, 22 (Suppl 1): s15-s25.

[10] 周华,李光辉,陈佰,等.中国产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科细菌感染应对策略专家共识[J].中华医学杂志,2014,94(24):1847-1856.

[11] Kuang H, Zhong CJ, Wang YF, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections treated with ceftazidime/avibactam [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 23: 404-407.

[12] Pucci L, Massacesi M, Liuzzi G. Clinical management of women with listeriosis risk during pregnancy: A review of national guidelines [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2018, 16(1): 13-21.

[13] 白瑞苗,曾军安,杨云帆.17例新生儿李斯特菌败血症的临床特征及结局分析[J].中国妇幼健康研究,2021,32(3):453-458.

[14] 中华医学会儿科学分会新生儿学组.新生儿败血症诊断及治疗专家共识(2019年版)[J].中华儿科杂志,2019,57(4):252-257.

[15] 中国痤疮治疗指南专家组.中国痤疮治疗指南(2019修订版)[J].临床皮肤科杂志,2019,48(9):583-588.

[16] 《中华传染病杂志》编辑委员会.布鲁菌病诊疗专家共识[J].中华传染病杂志,2017,35(12):705-710.

[17] 张瑾.合理用药十大核心信息[J].《医药前沿》,2014,3:70-71.

[18] 陈志东,颜青,杨小强.使用世界卫生组织抗菌药物AWaRe分级目录分析我国157家三级综合医院所用抗菌药物品种情况[J].上海医药,2020,41(15):71-75.

(收稿日期:2021-04-13;修回日期:2021-06-01)

儿童感染肠球菌的临床特征与耐药性分析

张旭¹, 孙良², 赵永¹, 张雷¹, 李桂涛¹, 毛国顺¹ (1. 阜阳市人民医院, 安徽 阜阳 236000 2. 阜阳市疾病预防控制中心, 安徽 阜阳 236000)

摘要: **目的** 了解本院儿童肠球菌感染状况、耐药性及多重耐药菌株出现的危险因素。**方法** 回顾性分析 2018 年 1 月至 2020 年 8 月在本院检出肠球菌的患儿, 对标本来源、科室病区分布、药敏结果、患者临床因素等进行统计分析, 依据肠球菌是否为多重耐药株分为多重耐药组 ($n = 84$) 和非多重耐药组 ($n = 17$)。**结果** 肠球菌主要来源于尿液 (68.32%, 69/101), 分离的肠球菌中屎肠球菌和粪肠球菌比例最高, 分别达到 61.39% 和 30.69%; 粪肠球菌和屎肠球菌主要检出科室/病区均为普通儿科病区 (51.61% 和 46.77%); 粪肠球菌对奎奴普丁-达福普丁和四环素的耐药率在 70% 以上, 而对环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因、青霉素、高单位的链霉素、氨苄西林、替加环素、利奈唑胺和万古霉素较为敏感, 耐药率在 10% 以下。屎肠球菌对氨苄西林、青霉素、红霉素和高单位的庆大霉素表现出高耐药率, 均在 70% 以上, 而对呋喃妥因、奎奴普丁-达福普丁表现出高度敏感。粪肠球菌和屎肠球菌均未发现替加环素、利奈唑胺和万古霉素的耐药株。粪肠球菌中多重耐药株共 16 株 (51.61%), 屎肠球菌中多重耐药株有 59 株 (95.16%), 5 株 鸫鸡肠球菌均为多重耐药株; 屎肠球菌以氨苄西林、红霉素、高单位的庆大霉素、青霉素耐药谱型最为常见, 共 19 株 (32.20%), 粪肠球菌中红霉素、高单位的庆大霉素、奎奴普丁-达福普丁、四环素耐药谱型最多 (7 株); 性别 ($P = 0.026$)、年龄 ($P = 0.037$)、氧疗 ($P < 0.001$)、发热 ($P = 0.037$) 和泌尿道感染 ($P = 0.001$) 在多重耐药组和非多重耐药组中存在显著性差异, 二元 Logistics 回归分析发现泌尿道感染是多重耐药肠球菌感染的独立危险因素, 氧疗是其保护因素。**结论** 屎肠球菌和粪肠球菌在本院肠球菌感染中占主要地位, 屎肠球菌多重耐药率大于粪肠球菌; 泌尿道感染患者需考虑多重耐药肠球菌感染的情况, 并结合药敏结果谨慎使用抗菌药物。

关键词: 肠球菌; 屎肠球菌; 粪肠球菌; 儿童; 多重耐药

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1952-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.035

肠球菌为革兰氏阳性球菌, 常寄生于人、动物肠道和女性生殖道, 其中屎肠球菌和粪肠球菌为肠球菌的代表菌。随着广谱抗菌药物的滥用及介入性诊疗手段的应用, 肠球菌感染已经成为儿童医院感染的主要病原菌, 其异位感染可引起尿路感染、呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎、败血症等疾病^[1]。肠球菌对多种抗菌药物具有天然耐药, 并且近年来耐万古霉素肠球菌以及耐利奈唑胺菌株等多重耐药菌株的出现给临床治疗带来了巨大的挑战。为了解阜阳市人民医院儿科感染患者中肠球菌属感染和耐药性情况, 并有针对性地选择用药, 现收集 101 例住院患儿临床分离的 101 株肠球菌, 进行标本来源、科室病区分布、药敏结果、患者临床因素等分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及相关定义

采用回顾性调查法, 对 2018 年 1 月至 2020 年 8 月本院 101 例住院患儿不同临床标本所分离的肠球菌属细菌、患者住院期间住院号、年龄、性别、科室病区、出入院诊断等临床信息进行统计。严格按照《全国临床检验操作规程》的要求进行标本转种、分离和纯化。收集经 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪鉴定为肠球菌并排除了同一患儿同一部位体外培养两次及以上的重复杂株, 且体外药敏相同的样本。抗菌药物的选择定义于临床医师根据体外药敏结果对最佳抗菌药物所进行的选择。多重耐药细菌定义于对 3 类及以上抗菌药物同时出现耐药的细菌。

1.2 菌株分离与鉴定

遵循《全国临床检验操作规程》对临床标本进

基金项目: 安徽省卫生厅第二批科研计划项目 (No.13FR013); 阜阳市卫生健康委科研立项课题 (No.FY2019-050)。

作者简介: 张旭, 女, 主要从事儿科临床工作, E-mail: yimiyang6@163.com

行分离、培养。质控菌株为肠球菌 ATCC29212。

1.3 药敏试验

采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪和 VITEK-MS 质谱鉴定仪进行细菌鉴定和药敏试验。抗菌药物纸片为氨苄西林 (AMP)、环丙沙星 (CIP)、红霉素 (ERY)、高单位的庆大霉素 (GEH)、利奈唑胺 (LNZ)、左氧氟沙星 (LVX)、呋喃妥因 (NIT)、青霉素 (PEN)、奎奴普丁-达福普丁 (QDA)、高单位的链霉素 (STH)、四环素 (TCY)、替加环素 (TGC) 和万古霉素 (VAN)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 采用 WHONET 5.6 进行耐药分析, 计量资料符合正态分布使用 t 检验, 组间比较采用 χ^2 检验, 理论数小于 5 时使用 Fisher 精确检验, 多重耐药菌感染的危险因素采用 Logistics 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠球菌属菌株构成分布

2018 年 1 月至 2020 年 8 月期间收集的 101 例患儿共分离出 101 株肠球菌属, 6 种肠球菌, 其中屎肠球菌和粪肠球菌比例最高, 分别为 62 株 (61.39%) 和 31 株 (30.69%), 鹌鸡肠球菌 5 株 (4.95%), 鸟肠球菌、海氏肠球菌和棉子糖肠球菌各 1 株 (0.99%)。

2.2 肠球菌样本来源

肠球菌主要来源于尿液, 共 69 株 (68.32%), 其中屎肠球菌和粪肠球菌分别有 49 株 (48.51%) 和 15 株 (14.85%), 除了尿液外, 送检的样本中, 血液检出率也占有一定比例, 具体见表 1。

表 1 肠球菌来源及构成比

样品类型	粪肠球菌 / [n (%)]	屎肠球菌 / [n (%)]	鹌鸡肠球菌 / [n (%)]	其他 / [n (%)]	合计
尿液	15 (14.85)	49 (48.51)	4 (3.96)	1 (0.99)	69
血液	14 (13.86)	10 (9.90)	0 (0.00)	0 (0.00)	24
分泌物	1 (0.99)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.99)	2
腹腔引流液	0 (0.00)	1 (0.99)	0 (0.00)	1 (0.99)	2
腹水	0 (0.00)	1 (0.99)	0 (0.00)	0 (0.00)	1
导管	1 (0.99)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1
脑脊液	0 (0.00)	1 (0.99)	1 (0.99)	0 (0.00)	2

2.3 临床分离肠球菌科室分布

从表 2 可知, 粪肠球菌和屎肠球菌检出科室主要来源于儿科, 分别为 31 例 (30.69%) 和 62 例 (61.39%), 少量来源于风湿科和康复医学科, 其中普通儿科病区占比较高, 分别为 51.61%

和 46.77%, 而屎肠球菌在新生儿和 PICU 病区的检出比例高于粪肠球菌, 鹌鸡肠球菌主要分布在 PICU 病区, 占比 60%。

表 2 肠球菌科室 / 病区分布及构成比 [n (%)]

科室 / 病区	粪肠球菌	屎肠球菌	鹌鸡肠球菌
普通儿科	16 (51.61)	29 (46.77)	1 (20.00)
新生儿	8 (25.80)	20 (32.26)	1 (20.00)
PICU	5 (16.13)	13 (20.97)	3 (60.00)
风湿科	1 (3.23)	0 (0.00)	0 (0.00)
康复医学科	1 (3.23)	0 (0.00)	0 (0.00)
总计	31 (100.00)	62 (100.00)	5 (100.00)

2.4 肠球菌耐药性分析

粪肠球菌对奎奴普丁-达福普丁和四环素的耐药率在 70% 以上, 而对环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因、青霉素、高单位的链霉素、氨苄西林较为敏感, 耐药率在 10% 以下。屎肠球菌对氨苄西林、青霉素、红霉素和高单位的庆大霉素表现出高耐药率, 均在 70% 以上, 而对呋喃妥因和奎奴普丁-达福普丁表现出高度敏感, 粪肠球菌和屎肠球菌均未发现替加环素、利奈唑胺和万古霉素的耐药株。5 株鹌鸡肠球菌中发现 1 株对万古霉素耐药的耐药株。粪肠球菌和屎肠球菌的耐药情况见表 3, 粪肠球菌和屎肠球菌在对氨苄西林、环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素和奎奴普丁-达福普丁的耐药率差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 多重耐药肠球菌菌株的耐药谱型分析

分离出的 31 株粪肠球菌中多重耐药的粪肠球菌共 16 株, 占比 51.61%, 62 株屎肠球菌中多重耐药株有 59 株, 占比 95.16%, 5 株鹌鸡肠球菌均为多重耐药株。屎肠球菌和鹌鸡肠球菌多重耐药率明显高于粪肠球菌。粪肠球菌表现出 6 种耐药谱型, 其中红霉素、高单位的庆大霉素、奎奴普丁-达福普丁、四环素和红霉素、奎奴普丁-达福普丁、四环素最为常见, 分别占比 43.75% 和 31.25%; 屎肠球菌有 21 种不同的耐药谱型, 其中氨苄西林、红霉素、高单位的庆大霉素、青霉素最为常见, 共 19 株 (32.20%), 具体见表 4。

2.6 临床因素与多重耐药菌相关性分析

将 101 株肠球菌按是否为多重耐药菌分为多重耐药菌组 ($n = 84$) 和非多重耐药菌组 ($n = 17$), 与非多重耐药菌组相比, 多重耐药菌组在性别、年龄、氧疗、发热、泌尿道感染的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 而早产、剖宫产、3 个月内住院史、3 个月内有创操作史、1 个月内抗

表 3 粪肠球菌与屎肠球菌药敏结果

抗菌药物	粪肠球菌 (n = 31)		屎肠球菌 (n = 62)		χ^2 值	P 值
	耐药株数	耐药率 /%	耐药株数	耐药率 /%		
氨苄西林	0	0.00	59	95.16	—	< 0.001
环丙沙星	3	9.68	34	54.84	17.60	< 0.001
红霉素	15	48.39	54	87.10	16.17	< 0.001
高单位的庆大霉素	11	35.48	46	74.19	13.05	< 0.001
左氧氟沙星	3	9.68	33	53.23	16.52	< 0.001
呋喃妥因	1	3.23	2	3.23	—	1.000
青霉素	1	3.23	58	93.55	75.39	< 0.001
奎奴普丁 - 达福普丁	30	96.77	1	1.61	—	< 0.001
高单位的链霉素	3	9.68	15	24.19	2.79	0.095
四环素	22	70.97	33	53.23	2.69	0.101
替加环素	0	0.00	0	0.00	—	—
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	—	—
万古霉素	0	0.00	0	0.00	—	—

表 4 粪肠球菌和屎肠球菌多重耐药谱型

耐药谱型	粪肠球菌 (n = 16) / [n (%)]	耐药谱型	屎肠球菌 (n = 59) / [n (%)]
红霉素、高单位的庆大霉素、奎奴普丁 - 达福普丁、四环素	7 (43.75)	氨苄西林、红霉素、高单位的庆大霉素、青霉素	19 (32.20)
红霉素、奎奴普丁 - 达福普丁、四环素	5 (31.25)	氨苄西林、环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素、四环素	7 (11.86)
环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、呋喃妥因、青霉素	1 (6.25)	氨苄西林、环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素、高单位的链霉素、四环素	6 (10.17)
环丙沙星、红霉素、左氧氟沙星、奎奴普丁 - 达福普丁、高单位的链霉素、四环素	1 (6.25)	氨苄西林、环丙沙星、红霉素、左氧氟沙星、青霉素、四环素	5 (8.47)
环丙沙星、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、奎奴普丁 - 达福普丁、高单位的链霉素、四环素	1 (6.25)	氨苄西林、环丙沙星、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素	3 (5.00)
红霉素、高单位的庆大霉素、奎奴普丁 - 达福普丁	1 (6.25)	氨苄西林、环丙沙星、左氧氟沙星、青霉素、四环素	3 (5.08)
		氨苄西林、环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、青霉素、四环素	2 (3.39)
		其他	14 (23.63)

菌药物使用史、咳嗽、病区分布、住院时间、呼吸道感染、新生儿败血症、脓毒血症的差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 5。将性别、年龄、氧疗、发热、泌尿道感染 5 种差异有统计学意义的项目进行二元 Logistics 回归分析, 泌尿道感染是多重耐药肠球菌感染的独立危险因素, 氧疗是其保护因素, 见表 6。

3 讨论

肠球菌是人类肠道的固有菌群, 肠球菌因本身的特性, 如细胞壁厚, 对许多抗菌药物天然耐药。根据近年来的临床数据, 肠球菌感染呈逐年增加趋势, 已成为临床常见的感染类型。因此肠球菌已被美国医院感染监视系统列为医院感染的主要病原菌^[2]。

3.1 肠球菌菌种及来源

本研究共收集了 101 株肠球菌, 主要来自于儿科的不同病区, 少量来自于其他科室的儿童患者。在不同的样本来源中, 如尿液、血液、分泌物、脑脊液等均发现了肠球菌的存在。其中分离自尿液中的最多, 达到 68.32%; 其次为分离自血液, 占比 23.76%。由此可知, 肠球菌感染在尿路感染中最为常见^[3]。另外, 肠球菌感染也经常发生在脓毒血症和新生儿败血症中。肠球菌中屎肠球菌和粪肠球菌的分离率最高, 分别达到 61.93% 和 30.69%, 而本院成人肠球菌感染粪肠球菌分离率最高, 达到 53.64%^[4], 体现出了儿童与成人间的差异性。本研究共发现 5 株鹌鸡肠球菌感染, 3 株在 PICU 中分离出来, 鹌鸡肠球菌多为院内感染, 可能与 PICU 病区住院时间长、侵入性治疗和长时间使用抗菌药物有关^[5]。

表 5 临床资料与多重耐药感染相关性分析

临床资料	多重耐药 (n = 84)	非多重耐药 (n = 17)	χ^2 值	P 值
性别 (男)	30	11	4.93	0.026
年龄 (> 28 d)	48	5	4.36	0.037
早产	6	2	0.41	0.520
剖宫产	31	7	0.11	0.740
氧疗	5	8	21.30	< 0.001
3 个月内住院史	24	2	2.09	0.225
3 个月内有创操作史	48	6	2.71	0.100
1 个月内抗菌药物使用史	32	4	1.31	0.253
发热	48	5	4.36	0.037
咳嗽	22	2	1.62	0.203
PICU	18	3	0.12	0.726
新生儿	23	6	0.43	0.511
普通儿科	41	7	0.44	0.508
住院时间 (> 7 d)	50	9	0.25	0.616
泌尿道感染	43	1	11.81	0.001
呼吸道感染	19	1	2.49	0.114
新生儿败血症	26	6	0.12	0.726
脓毒血症	16	0	2.55	0.110

表 6 多重耐药肠球菌感染影响因素多因素分析

影响因素	B	SE	Wald	d _f	P	OR	95%CI
性别	-1.080	0.692	2.434	1	0.119	0.34	(0.088, 1.319)
年龄 (> 28 d)	-0.957	0.796	1.444	1	0.229	0.384	(0.081, 1.829)
氧疗	-2.764	0.811	11.607	1	0.001	0.063	(0.013, 0.309)
发热	0.706	0.752	0.880	1	0.348	2.026	(0.464, 8.848)
泌尿道感染	1.866	0.861	4.702	1	0.030	6.464	(1.197, 34.915)

3.2 多重耐药肠球菌耐药谱型分析

与其他革兰氏阳性菌相比, 肠球菌不仅具有天然的耐药性, 更易于接受外来 DNA 片段 (转座子、质粒、噬菌体等) 而导致获得性耐药, 因此肠球菌出现多重耐药的情况更为严重^[6]。粪肠球菌和屎肠球菌对红霉素 (48.39% 和 87.10%) 和四环素 (70.97% 和 53.23%) 均表现出了很高的耐药率, 这两种药在临床上不再适用于治疗肠球菌的感染。粪肠球菌对 β -内酰胺类如氨苄西林、青霉素高度敏感, 分别为 0.00% 和 3.23%, 而屎肠球菌对其则有极高的耐药率, 分别达到了 95.16% 和 93.55%, 两者差异显著 ($P < 0.001$), 这就要求临床医师需要根据细菌药敏结果针对性地给药。对于喹诺酮类药物, 粪肠球菌对其高度敏感, 而屎肠球菌的耐药率则大于 50%。由于喹诺酮类药物潜在的诱发小儿关节损伤的风险, 推荐在药敏实验只对其敏感且适用其他药物治疗无效时使用。粪肠球菌和屎肠球菌则均对呋喃妥因高度敏感。这两类药物在泌尿生殖道中浓度高, 为

尿路感染的首选药物^[7], 在治疗肠球菌感染引起的泌尿系统感染时, 应优先考虑呋喃妥因。然而新生儿酶系尚未发育完全, 使用呋喃妥因易诱发溶血性贫血, 故需特别注意。在考虑使用高单位的氨基糖苷类药物时, 从数据上看, 粪肠球菌和屎肠球菌对于高单位的庆大霉素的耐药率明显高于高单位的链霉素, 建议用药时优先使用高单位的链霉素。氨基糖苷类药物的肾毒性和耳毒性对儿科患者危害甚大, 一般来说, 小于 6 岁的儿童尽量不要使用此类药物。本研究未发现对替加环素、利奈唑胺和万古霉素耐药的粪肠球菌和屎肠球菌, 与张书婉等的报告一致^[8]。综合来看, 粪肠球菌除了对红霉素、四环素、奎奴普丁-达福普丁表现出了极高的耐药率外, 对于其余药物都具有敏感性。反观屎肠球菌, 对氨苄西林、环丙沙星、红霉素、高单位的庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素、四环素多种药物均有极高的耐药率。与粪肠球菌相比, 屎肠球菌表现出更高的耐药率和更复杂的耐药谱型。粪肠球菌的多重耐药率达到了 51.61%, 屎肠球菌达到了 95.16%, 与文献报道相仿^[9]。值得注意的是, 鹌鹑肠球菌均为多重耐药菌, 并且出现耐万古霉素的菌株。作为医院感染重要的病原菌之一, 耐万古霉素肠球菌的出现通常会影响到接受多疗程抗生素治疗的重症住院患者, 需要引起本院临床工作人员的高度重视^[10]。肠球菌对利奈唑胺耐药率低, 且儿童使用利奈唑胺耐受性好, 半衰期短^[11], 目前已成为治疗耐万古霉素肠球菌感染的主要手段^[12]。

3.3 多重耐药肠球菌危险因素分析

为了更好地防范和治疗多种耐药肠球菌的感染, 本研究对肠球菌感染的患者的临床因素进行了相关性分析, 结果显示, 多重耐药组和非多重耐药组在性别、年龄 (> 28 d)、氧疗、发热和泌尿道感染比较存在显著差异。使用二元 Logistic 回归方程进行多因素分析, 泌尿道感染为多重耐药肠球菌感染的危险因素。在出现反复发热, 并诊断为泌尿道感染时, 需要格外警惕多重耐药性肠球菌的感染。这与尿液中发现大比例的屎肠球菌也有相关性。泌尿道与肠道生理位置接近, 当患泌尿生殖系统疾病进行尿路器械操作, 留置导管或存在病理性的尿路结构异常, 也为多重耐药肠球菌的异位感染提供了机会^[13-14]。

综上所述, 本院儿科多重耐药肠球菌感染已经非常普遍, 不同种属间耐药性还存在较大差异, 给临床治疗带来了很大的挑战。由于儿童处

于生长发育阶段, 机体器官尚未发育成熟, 临床用药具有特殊性, 在治疗多重耐药肠球菌感染时必须结合细菌药敏结果与儿科应用抗菌药物的一般原则, 进行精准的针对性用药。本研究样本量不够丰富, 尤其是鹌鸡肠球菌等菌株, 统计结果会存在一定的偏差, 但也能为临床的治疗提供一定的数据支持。

参考文献

- [1] Julian TR, Pickering AJ, Leckie JO, et al. Enterococcus spp on fomites and hands indicate increased risk of respiratory illness in child care centers [J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41 (8): 728-733.
- [2] 赵莎, 张春鑫, 苏洁, 等. 北极新奥尔松地区粪土中大肠杆菌和肠球菌的分布及耐药性分析 [J]. *海洋环境科学*, 2017, 36 (2): 261-265.
- [3] 叶小翠, 姚建凤与黄荣富, 两种肠球菌致重症患者尿路感染的耐药性比较 [J]. *中国微生物学杂志*, 2016, 28 (2): 205-209.
- [4] 汪晓娟, 武东. 肠球菌多重耐药株出现的危险因素和用药探究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39 (20): 2063-2068.
- [5] Choi SH, Lee SO, Kim TH, et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 cases [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38 (1): 53-61.
- [6] 姜锋, 姜凯, 邢志广, 等. 肠球菌所致泌尿系统感染的耐药性分析 [J]. *现代预防医学*, 2012, 39 (19): 5101-5102.
- [7] Kang CI, Kim J, Park DW, et al. Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections [J]. *Infect Chemother*, 2018, 50 (1): 67-100.
- [8] 张书婉, 黄军华. 儿童多重耐药肠球菌感染流行病学及耐药基因筛选 [J]. *海南医学*, 2015, 26 (17): 2554-2557.
- [9] 吕萍, 徐桦巍, 宋文琪, 等. 儿童患者中肠球菌属临床分离株耐药特征分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2008, 8 (1): 34-37.
- [10] 胡伟明, 谭建, 李静, 等. 重症监护病房耐万古霉素肠球菌耐药性与耐万古霉素基因及毒力因子研究 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2015, 8 (1): 42-46.
- [11] 佟若菲, 金玉洁. 利奈唑胺在儿科应用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28 (1): 66-68.
- [12] 楼亚玲, 喻玮, 武喆, 等. 肠球菌对利奈唑胺耐药机制的研究进展 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2018, 11 (1): 66-70.
- [13] Schmidt B, Copp HL. Work-up of pediatric urinary tract infection [J]. *Urol Clin North Am*, 2015, 42 (4): 519-526.
- [14] 张晓红, 周云, 陶云珍, 等. 留置尿管相关性尿路感染的病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中华全科医学*, 2012, 10 (7): 1024-1026.

(收稿日期: 2020-11-26; 修回日期: 2021-04-19)

《中南药学》2022 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学术交流, 本刊现在开始启动 2022 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药学硕、博毕业研究生的研究论文、综述, 一经录用, 即可在我刊 2022 年 1—6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊, 被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录, 被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体要求及处理如下:

1. 与药学相关的研究论文或综述;
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”;
3. 全日制硕士、博士毕业研究生;
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版;
5. 投稿时间: 即日起至 2022 年 2 月底;
6. 出刊时间: 2022 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日, 共 6 期, 请至少提前 3 个月投稿, 带基金项目文章优先刊登;
7. 投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>, 请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们:

Tel: 0731-82258487, 0731-84895602

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

临床药师参与 1 例骨肉瘤化疗患儿严重恶心呕吐的药学实践

司霞, 黄琳, 于芝颖, 封宇飞* (北京大学人民医院, 北京 100044)

摘要: 针对 1 例骨肉瘤患儿化疗所致严重恶心呕吐, 临床药师查阅相关资料和文献, 参与临床诊治, 同时监测药物治疗方案的疗效和不良反应。最终患儿恶心呕吐得到有效控制, 提高了治疗的依从性, 保证了化疗的顺利进行。此病例提示临床药师参与药物治疗实践有助于儿童化疗所致严重恶心呕吐的防治。

关键词: 临床药师; 恶心呕吐; 骨肉瘤; 儿童

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1957-03

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.036

骨肉瘤是骨科肿瘤中发病率最高的原发于骨组织恶性肿瘤, 好发于儿童, 大剂量联合化疗使骨肉瘤的 5 年总生存率从 15% ~ 20% 提高到 55% ~ 80%, 但不良反应也随之增多, 其中化疗所致恶心呕吐 (chemotherapy induced nausea and vomiting, CINV) 是骨肉瘤患儿化疗过程中常见的不良反应, 严重 CINV 不但可导致患儿脱水、电解质紊乱、营养不良, 还会对肿瘤患儿的心理造成负面影响, 降低生活质量, 降低患儿治疗的依从性, 影响化疗的顺利进行甚至中断化疗。国际上已有少数止吐指南^[1-2]为儿童 CINV 的防治提供参考依据, 但目前我国尚未发布关于儿童 CINV 的相关指南。儿童是特殊群体, 不是成人的缩影, 因此, 在临床实践中, 临床药师协助医师, 运用循证医学, 促进儿童 CINV 止吐方案的合理使用具有重要意义。

1 病例资料

患儿, 男, 13 岁, 身高 160 cm, 体质量 39.5 kg, 体表面积 1.33 m²。主因“右股骨远端骨肉瘤术后 2 月余”于 2018 年 10 月 12 日入院。患儿术前行 APMIAP 方案新辅助化疗, 具体为洛铂 70 mg + 多柔比星脂质体 70 mg、甲氨蝶呤 12 g + 长春地辛 3 mg、异环磷酰胺 15 g。于 2018 年 8 月 1 日全麻下行右股骨下段肿瘤切除术 + 人工膝关节置换术, 术后病理提示骨肉瘤。于 2018 年 8 月 22 日行顺铂 130 mg + 多柔比星脂质体 60 mg 化疗。于 2018 年 9 月 16 日行甲氨蝶呤 16 g +

长春地辛 3 mg 化疗, 此次化疗期间患儿出现严重 CINV, 给予甲氧氯普胺 5 mg po tid 解救治疗, 呕吐症状缓解。为求进一步诊治收入本院。

入院完善相关检查, 血常规示: 白细胞计数 (WBC) $3.76 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞百分比 (NE) 50.0%, 血红蛋白浓度 $110 g \cdot L^{-1}$, 血小板计数 $177 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。血生化示: 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) $37 U \cdot L^{-1}$, 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) $29 U \cdot L^{-1}$, 乳酸脱氢酶 (LDH) $142 U \cdot L^{-1}$, 碱性磷酸酶 (ALP) $246 U \cdot L^{-1}$ 。入院查体, 体温 $36.5 ^\circ C$, 脉搏 $76 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $18 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $120/80 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。神志清楚, ADL 评级 1 级, 全身浅表淋巴结无肿大, 双肺呼吸音清, 未闻及啰音, 心脏听诊 (一), 腹平软, 无压痛及反跳痛。右膝可见长约 15 cm 手术瘢痕, 愈合良好。入院诊断: 股骨远端骨肉瘤、恶性肿瘤术后化疗。

2 主要治疗经过

入院后完善相关检查, 无明显化疗禁忌, 于次日开始化疗, 方案为异环磷酰胺 3 g qd d1 ~ d5, 同时予以昂丹司琼注射液 16 mg qd、地塞米松磷酸钠注射液 5 mg qd 进行预防性止吐治疗。化疗开始后 5 min 左右, 患儿出现恶心、呕吐, 医师给予甲氧氯普胺 10 mg 肌内注射进行解救性治疗。10 min 后患儿出现双手僵硬、无力, 大汗, 面部肌肉抽搐、舌根发硬, 考虑为甲氧氯普胺所致锥体外系反应, 予停用甲氧氯普胺, 立即静脉

作者简介: 司霞, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, E-mail: sixia2012@126.com

*通信作者: 封宇飞, 男, 主任药师, 主要

从事药品循证评价、药物经济学及医疗大数据利用研究, E-mail: fengyufei@126.com

补液, 并静脉推注地西洋注射液 10 mg, 5 min 后患儿上述症状消失, 化疗顺利完成。临床药师评估止吐方案偏弱, 建议加用阿瑞匹坦加强止吐, 医师采纳建议。化疗第 2 日, 患儿恶心、呕吐无明显缓解, 呕吐 5~6 次·d⁻¹, 日呕吐量约 1500 mL, 影响进食并拒绝继续化疗。医师欲肌内注射异丙嗪进行解救, 临床药师建议选用奥氮平进行解救性治疗, 同时建议患儿清淡饮食, 少食多餐, 可看电视或听音乐转移注意力。后患儿未诉明显恶心、呕吐, 除嗜睡外未发生其他不良反应, 化疗过程顺利。考虑患儿存在预期性恶心呕吐, 需加强对患儿的心理支持和信息支持。

3 讨论

3.1 严重 CINV 的原因

患儿此次输注的大剂量异环磷酰胺具有高致吐风险, 对于接受高度催吐风险化疗方案的患儿, 癌症支持疗法多国学会 (MASCC) / 欧洲肿瘤内科学会 (ESMO) (2016 版) 指南^[1] 和安大略湖指南 (2017 版)^[2] 推荐应用 5-HT₃ 受体拮抗剂、地塞米松和阿瑞匹坦三联止吐方案。本例患儿采用的是昂丹司琼联合地塞米松的二联止吐方案, 止吐方案强度不足可能是导致严重 CINV 的主要原因。此外, 患儿既往 CINV 控制不佳, 此次化疗开始数分钟后即出现恶心、呕吐, 判断其还伴有预期性恶心呕吐。预期性恶心呕吐是在给予化疗药物之前发生的恶心和呕吐, 目前普遍认为它是一种经典的条件反射模型, 受环境影响。文献报道, 大约 25%~30% 的患者在进行第 4 个疗程的化疗前会发生预期性恶心呕吐, 如果患者使用的是高催吐性药物, 预期性恶心呕吐的发生率高达 60%~70%, 严重降低患者的生活质量, 甚至有 25%~30% 的患者不得不终止化疗^[3]。

3.2 加强性止吐药物的加入

阿瑞匹坦是阻断 P 物质致吐效果的 NK₁ 受体拮抗剂^[4], 我国药品说明书中注明“有关儿童使用本品的安全性和有效性尚未确定”, 因此, 国内医师很少会超说明书将阿瑞匹坦用于治疗儿童 CINV。目前, 已有多项研究对儿童使用阿瑞匹坦联合 5-HT₃ 受体拮抗剂的方案进行探索^[5-6], 结果表明, 联合阿瑞匹坦方案组可以显著提高 CINV 的急性和迟发性阶段的完全缓解率, 未见严重不良反应, 为指南中儿童单日或多日高催吐风险 CINV 预防方案 (阿瑞匹坦+5-HT₃ 受体拮抗剂+地塞米松) 的推荐提供了强证据。2015 年 9 月 2 日, FDA 批准阿瑞匹坦胶囊用于 12~17

岁和年龄 < 12 岁且体质量 > 30 kg 的儿童。2015 年 12 月 21 日, FDA 批准阿瑞匹坦口服混悬剂用于 ≥ 6 个月的儿童。但是, 阿瑞匹坦在儿童中使用需要结合其年龄和体质量个体化给药, 对于 12~17 岁儿童, 第 1 日口服 125 mg, 第 2~3 日口服 80 mg; 对于 6 个月~12 岁儿童, 第 1 日按 3 mg·kg⁻¹ 给药, 第 2~3 日按 2 mg·kg⁻¹ 给药。在相互作用方面, 阿瑞匹坦是一种剂量依赖性 CYP3A4 的抑制剂, 而地塞米松是 CYP3A4 的底物, 因此与阿瑞匹坦合用时, 地塞米松每日剂量需要减少 50%^[7]。

3.3 解救性止吐药物的选择

爆发性呕吐是指即使进行预防处理但仍出现的呕吐, 需要进行“解救性治疗”。原则上增加不同类型的止吐药物, 可以增强止吐疗效。安大略湖指南^[8] 推荐奥氮平联合 5-HT₃ 受体拮抗剂+地塞米松+阿瑞匹坦预防急性 CINV。对于不能接受奥氮平的患儿, > 1 岁的患儿可考虑应用甲氧氯普胺。

本例患儿在化疗第 1 日即出现爆发性 CINV, 医师应用甲氧氯普胺进行解救性止吐治疗时发生了锥体外系不良反应。甲氧氯普胺是中枢性止吐药, 主要通过阻滞多巴胺受体而抑制延髓催吐化学感受器和脑干网状结构产生止吐效应。儿童黑质致密带内的多角形细胞色素含量少, 功能不成熟, 多巴胺产量相对较少, 与成人相比更易发生锥体外系反应。因此在临床中要注意加强对患儿用药史的询问, 结合患儿的临床表现做出快速准确的判断, 掌握好药物的不良反应及处理原则, 对于治疗至关重要, 也可以有效消除患儿及家属的恐慌情绪。

患儿增加阿瑞匹坦后仍有爆发性呕吐, 医师欲使用异丙嗪进行解救治疗。异丙嗪是吩噻嗪类抗组胺药, 常规剂量也可能导致锥体外系反应^[9], 原因为异丙嗪可使黑质损害, 通路神经纤维变性, 导致纹状体失去抑制作用, 乙酰胆碱的兴奋作用相对增强, 胆碱能神经占优势, 因而发生锥体外系反应。奥氮平是一种非典型苯二氮草类抗精神病药, 可与脑内 5-HT、多巴胺 D_{1~4} 受体、毒蕈碱 M_{1~5}、肾上腺素 α₁ 和组胺 H₁ 受体结合后发挥拮抗作用, 与止吐作用机制重叠, 为治疗 CINV 提供依据^[10]。一项多中心回顾性研究^[11] 表明, 儿童患者接受奥氮平 (平均初始剂量 0.1 mg·kg⁻¹) 预防急性或治疗 CINV 的完全缓解率为 65%, 其常见不良反应为短期镇静和体重增

加,呈剂量相关性。严重 CINV 导致患儿心理负担较大,会对化疗产生恐惧,而奥氮平有助于改善患者的情绪、睡眠、食欲和整体生活质量,提高患者治疗的依从性^[12]。临床药师建议采用奥氮平 4 mg po qd 进行解救治疗,医师采纳建议,后患儿恶心呕吐明显缓解,顺利完成化疗。

3.4 提高依从性

调查显示^[13-14],临床实践和止吐指南之间的依从性差是目前 CINV 治疗中存在的突出问题,其中医师对指南不熟悉是依从性较差的原因之一。因此,临床药师需要与医师保持良好的沟通。此外,患者对止吐方案治疗依从性差,止吐治疗达不到效果,也让医师无法掌握 CINV 的治疗情况。由于儿童与成人的认知不同,因此临床药师不但要对患儿进行教育,还需要重视照顾者的心理健康,向照顾者提供心理支持。日常生活中,建议患儿多读休闲娱乐类书籍,多听舒缓的音乐,转移注意力。饮食上,建议患儿少食多餐,进食清淡、易消化、营养丰富的食物。同时指导患者正确使用止吐等药物,如阿瑞匹坦胶囊应在化疗前 1 h 服用,第 1 日服用 125 mg,第 2~3 日早晨服用 80 mg。奥氮平是一种新型非典型抗精神病药物,为了消除患儿及其家属的用药疑虑,向患儿及其家属解释奥氮平对多种神经递质受体具有亲和力,可以有效防治 CINV,不良反应少且轻微,最常见不良反应是嗜睡,为了防止发生过度嗜睡,应从小剂量开始服用。该患儿在应用甲氧氯普胺解救时发生了锥体外系反应,患儿及其家属比较恐慌,告知其与成人相比,儿童由于肝肾功能、血脑屏障及神经系统发育不完善,更容易发生锥体外系反应,但通常可逆,停药后对症治疗,预后良好。

本次治疗过程中,临床药师参与到治疗团队中,通过循证医学对骨肉瘤化疗患儿 CINV 预防用药、CINV 控制情况进行综合分析,开展药学监护,保证化疗顺利进行,进一步促进了合理用药。

参考文献

- [1] Dupuis LL, Sung L, Molassiotis A, et al. 2016 updated MASCC/ESMO consensus recommendations: Prevention of acute chemotherapy-induced nausea and vomiting in children [J]. Support Care Cancer, 2017, 25 (1): 323-331.
- [2] Patel P, Robinson PD, Thackray J, et al. Guideline for the prevention of acute chemotherapy-induced nausea and vomiting in pediatric cancer patients: A focused update [J]. Pediatr Blood Cancer, 2017, 64: e26542.
- [3] Aapro M, Molassiotis A, Dicato M, et al. The effect of guideline-consistent antiemetic therapy on chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV): The pan european emesis registry (peer) [J]. Ann Oncol, 2012, 23 (8): 1986-1992.
- [4] Navari RM, Aapro M. Antiemetic Prophylaxis for chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. N Engl J Med, 2016, 374 (14): 1356-1367.
- [5] Bakhshi S, Batra A, Biswas B, et al. Aprepitant as an add-on therapy in children receiving highly emetogenic chemotherapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Support Care Cancer, 2015, 23 (11): 3229-3237.
- [6] Kang HJ, Loftus S, Taylor A, et al. Aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in children: A randomised, double-blind, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2015, 16 (4): 385-394.
- [7] Dupuis LL, Boodhan S, Holdsworth M, et al. Guideline for the prevention of acute nausea and vomiting due to anti-neoplastic medication in pediatric cancer patients [J]. Pediatr Blood Cancer, 2013, 60 (7): 1073-1082.
- [8] Flank J, Robinson PD, Holdsworth M, et al. Guideline for the treatment of breakthrough and the prevention of refractory chemotherapy-induced nausea and vomiting in children with cancer [J]. Pediatr Blood Cancer, 2016, 63 (7): 1144-1151.
- [9] Onifer DJ, Butler FK, Gross KR, et al. Replacement of promethazine with ondansetron for treatment of opioid-and trauma-related nausea and vomiting in tactical combat casualty care [J]. J Spec Oper Med, 2015, 15 (2): 17-24.
- [10] Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, et al. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine [J]. Neuropsychopharmacol, 1996, 14 (2): 87-96.
- [11] Flank J, Thackray J, Nielson D, et al. Olanzapine for treatment and prevention of acute chemotherapy-induced vomiting in children: A retrospective, multi-center review [J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62 (3): 496-501.
- [12] Tan L, Liu J, Liu X, et al. Clinical research of olanzapine for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 131.
- [13] Gilmore JW, Peacock NW, Gu A, et al. Antiemetic guideline consistency and incidence of chemotherapy-induced nausea and vomiting in US community oncology practice: Inspire study [J]. J Oncol Pract, 2014, 10 (1): 68-74.
- [14] Grunberg SM. Obstacles to the implementation of antiemetic guidelines [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2009, 7 (5): 601-605.

(收稿日期: 2021-01-08; 修回日期: 2021-03-16)

1 例经皮下输注装置鞘内联合给药治疗晚期 重度癌痛的药学监护

赵宁^{1,2}, 李培红¹, 刘津¹, 王文青^{1*} (1. 中国中医科学院西苑医院药学部, 北京 100091; 2. 中日友好医院药学部, 北京 100029)

摘要: 1 例 41 岁男性肺腺癌患者, 疼痛 1 年半, 因疼痛控制不佳入院。曾服用多种镇痛药物出现皮疹不良反应, 现口服硫酸吗啡缓释片 480 mg q12 h, 盐酸吗啡片 75 mg 控制爆发痛, 爆发痛每日 4~5 次, 便秘严重。疼痛控制不佳, 入院后调整镇痛方案, 行经皮下输注装置鞘内联合使用吗啡和布比卡因镇痛治疗。患者疼痛控制较满意, 带泵出院。临床药师通过对患者进行动态的疼痛评估、镇痛方案调整及不良反应监测, 为癌痛患者鞘内镇痛用药提出建议, 探索对鞘内镇痛患者的药学监护点及重要性。

关键词: 癌痛; 鞘内; 联合镇痛; 临床药师

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1960-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.037

疼痛是癌症患者最常见的伴随症状之一, 尤其是晚期癌症患者可出现剧烈的疼痛, 常需要大量的镇痛药物治疗, 约 10%~20% 难治性癌痛常常需要通过微创介入手段才能获得满意的镇痛效果^[1]。鞘内镇痛 (intrathecal analgesia) 是指将镇痛药物注入蛛网膜下腔, 经脑脊液循环直接作用于脊髓、脑产生镇痛作用的技术, 具有起效快、镇痛效果确切、药物用量小、药物不良反应少等优点, 是对常规治疗无效的重度顽固性癌痛治疗的重要手段^[2]。现就 1 例经皮下输注装置鞘内联合给药治疗晚期重度癌痛患者的药学监护进行报道, 为治疗方案的制订和调整提出合理建议。

1 病史摘要

患者, 男, 41 岁, 2019 年 5 月无明显诱因出现右侧胸痛, 为持续性钝痛, CT 引导下肺穿刺病理提示: 低分化癌, 肺腺癌。后行化疗和镇痛治疗, 化疗方案为顺铂+培美曲塞二钠, 镇痛方案为盐酸吗啡片 20 mg·d⁻¹, 后逐渐增加剂量。服用盐酸羟考酮缓释片、度洛西汀、阿米替林、加巴喷丁等镇痛药物均出现上肢和胸部水疱, 瘙痒伴疼痛, 停药并给予抗过敏、对症处理后好转。目前患者右侧胸背部持续性疼痛, NRS 8 分, 间断出现爆发痛, 严重影响睡眠及情绪, 口服硫酸吗啡缓释片 480 mg q12 h, 每日出现爆发痛 4~5 次, 口服 75 mg 盐酸吗啡片控制爆发痛, 自觉疼痛效果控制不佳, 便秘严重。为进一步镇痛治疗,

于 2020 年 12 月 22 日以“癌性疼痛”收治入院。入院诊断: 癌性疼痛; 肺恶性肿瘤; 骨继发恶性肿瘤; 淋巴结继发恶性肿瘤; 胸膜继发恶性肿瘤。患者一般情况可, 精神状态正常, 情绪抑郁伴焦虑, 食欲尚可, 睡眠质量差, 每日睡眠约 2 h, 有夜间痛醒, 便秘严重, 需每 2~3 日给予一次番泻叶通便, 体质量下降约 20 kg。对花粉、紫外线、刺激性气味过敏。家族史和个人史无特殊。

2 治疗经过

入院后患者完善血常规、尿常规、肝肾功能、凝血功能等检查, 排除手术禁忌后, 在 2020 年 12 月 26 日于全麻下行“微创神经介入镇痛+皮下 port 植入术”, 手术过程顺利, 术后吗啡泵持续泵入, 吗啡浓度为 0.3 mg·mL⁻¹, 泵入速度为 0.23 mL·h⁻¹, Bolus 0.5 mL, 锁定时间 1 h, 停用口服镇痛药物。住院期间, 临床药师对患者进行全程、动态疼痛评估, 每日 9:00 和 16:00 两个固定时间进行全面的疼痛评估, 药学查房或特殊情况下 (如药物剂量调整、出现爆发痛及处理后等) 评估疼痛情况, 疼痛动态评估 3~6 次·d⁻¹, 记录“疼痛日记”, 监测不良反应, 参与镇痛方案调整等。

临床药师对患者手术前进行疼痛评估, 结果患者右侧胸肋部疼痛, 针刺样、抽搦样、刀割样痛, 持续发作, 阵发加重, 每日爆发痛 4~5 次; 夜间疼痛较白天明显加重 (20:00—次日 3:00); 静息状态疼痛减轻, 活动时疼痛加重; 目

作者简介: 赵宁, 女, 主管药师, 主要从事临床药学、中药学研究, E-mail: zhaoning0606@126.com * 通信作者: 王文青, 女, 副主任药师, 主要从事医院药学工作, E-mail: Lilywang_mm@163.com

前服用硫酸吗啡缓释片 480 mg q12 h 控制疼痛, 每日出现爆发痛 4~5 次, 每次口服 75 mg 吗啡片控制爆发痛, 服药后疼痛可控制约 1 h; 无法入睡, 每晚睡眠小于 2 h, 有夜间痛醒; 情绪抑郁伴焦虑, 影响日常生活和社交; 便秘严重, 每 2~3 日给予一次番泻叶通便。患者为重度神经病理性疼痛, 镇痛药物换算成口服吗啡为 1335 mg·d⁻¹, NRS 4~5 分。

患者手术后, 第一、二日鞘内吗啡用量呈上升趋势, 爆发痛减少至 2 次·d⁻¹, 无明显不良反应。第三日考虑患者有神经病理性疼痛, 为进一步优化鞘内给药方案, 提高镇痛效果, 并减少吗啡使用量, 药师建议泵内配方加用小剂量布比卡因, 起始浓度为 0.80 mg·mL⁻¹, 同时降低吗啡浓度为 0.27 mg·mL⁻¹。第四日调整布比卡因浓度为 1.02 mg·mL⁻¹, 同时泵入速度提升至 0.5 mL·h⁻¹, Bolus 至 1 mL; 第五日逐步提升泵入速度和 Bolus 量, 但患者仍多次出现爆发痛, 并自诉 Bolus 无效; 于第六日调整泵入速度为 0.66 mL·h⁻¹, Bolus 1.45 mL, 镇痛效果较稳定; 第八日调整为吗啡 0.3 mg·mL⁻¹ 和布比卡因 1.50 mg·mL⁻¹, 疼痛 NRS 2 分, 爆发痛 2 次·d⁻¹, 达到镇痛目标; 第九日患者出院, 调整为吗啡 1.07

mg·mL⁻¹ 和布比卡因 1.50 mg·mL⁻¹, 降低泵入速度为 0.21 mL·h⁻¹, Bolus 0.5 mL。

患者住院期间, 药师进行用药宣教, 并记录“疼痛日记”。用药宣教内容: ① 镇痛泵可有效控制疼痛, 阿片类药物用量较口服相比, 明显减少, 不良反应概率相应减少, 但仍需密切监测是否发生便秘、恶心呕吐、尿潴留、呼吸抑制、瘙痒等不良反应。② 不可随意调整泵入速度等设置, 出现爆发痛可自行控制“Bolus”, 如 Bolus 30 min 后镇痛效果不佳, 可补服盐酸吗啡片 75 mg。③ 生活指导: 调整饮食, 增加纤维性食物的摄入, 预防便秘; 适量活动, 增强体力; 调节情绪, 保证睡眠。④ 介绍“疼痛日记”的内容及意义, 提高患者依从性, 便于用药调整。“疼痛日记”内容包括: 鞘内输注药物方案调整、泵入速度、Bolus 调整、疼痛评估、爆发痛及处理、用药量换算及不良反应等, 其中患者术后出现爆发痛时间和次数不定, 多与自主活动(如起身, 运动等)相关, 白天及睡前多发, “疼痛日记”详见表 1。

患者经治疗后, 疼痛得到改善, NRS 2 分, 爆发痛 2 次·d⁻¹, 无便秘、皮疹等不良反应, 顺利完成了由口服到鞘内镇痛的改变, 于 2021 年 1 月 4 日带泵出院。

表 1 患者鞘内输注后“疼痛日记”

日期 (术后)	药物 / (mg·mL ⁻¹) 吗啡 布比卡因		速度 / (mL·h ⁻¹)	Bolus/ mL	日均疼痛评分 / 爆发时疼痛评分	爆发痛次数 (时间)	爆发痛处理	换算每日 口服吗啡 总量 /mg	不良 反应
第一日	0.30	—	0.23	0.50	4/9	2 (5: 00, 7: 00)	Bolus	586.80	无
第二日	0.30	—	0.26	0.60	3/9	2 (19: 00, 21: 00)	Bolus + 75 mg 吗啡口服	669.60	无
第三日	0.27	0.80	0.36	0.80	4/9	3 (19: 00, 20: 00, 21: 00)	Bolus + 75 mg 吗啡口服	893.40	无
第四日	0.27	1.02	0.50	1.20	3~4/10	5 (15: 00, 16: 00, 17: 33, 18: 38, 20: 50)	Bolus + 75 mg 吗啡口服	1458.00	无
第五日	0.27	1.02	0.55	1.32	3/10	10 (19: 00, 23: 30, 01: 10, 02: 00, 03: 25, 04: 05, 05: 00, 06: 15, 07: 40, 08: 20)	Bolus	2138.00	无
第六日	0.27	1.02	0.66	1.45	3/10	2 (9: 00, 10: 30)	Bolus	1517.70	无
第七日	0.27	1.02	0.73	1.63	2/10	2 (18: 00, 19: 40)	Bolus	1683.00	无
第八日	0.30	1.50	0.73	1.63	2/10	2 (20: 00, 23: 00)	Bolus	1870.00	无
第九日	1.07	1.50	0.21	0.50	—	—	—	1617.80	无

3 讨论

3.1 患者疼痛评估

随着癌痛规范化管理体系日渐完善, 临床药师参与癌痛治疗的定位及意义逐渐清晰, 如参与癌痛多学科诊疗^[3]、干预癌痛治疗不合理用药^[4]等, 主要进行疼痛及药物治疗评估, 并针对患者药物治疗相关问题提出优化建议, 以提高癌痛患者的用药依从性及生存质量, 减少阿片类药物消化系统不良反应发生率^[5-6], 保证患者镇痛用药的有效性和安全性。

本例癌痛患者治疗过程中, 临床药师综合评估治疗药物, 开展全程、动态疼痛评估, 并记录“疼痛日记”, 有助于患者镇痛方案及药物剂量调整, 以取得较好的镇痛效果。患者系肺癌及多部位转移致疼痛, 疼痛部位以胸背部为主, 且主要表现为神经病理性疼痛, 长期服用镇痛药物出现耐受, 剂量不断增加, 入院时口服硫酸吗啡缓释片 480 mg q12 h 控制疼痛, 盐酸吗啡片 75 mg 控制爆发痛 (4~5 次·d⁻¹)。换算后吗啡日用量约为 1335 mg, 疼痛评分 NRS 4~5 分, 为中度

疼痛,便秘不良反应严重,睡眠差。对花粉、紫外线、刺激性气味及盐酸羟考酮缓释片、度洛西汀、阿米替林、加巴喷丁等药物过敏。综合分析,患者为难治性癌痛、神经病理性疼痛,经鞘内镇痛泵治疗后,出院 NRS 2 分,为轻度疼痛,爆发痛 2 次·d⁻¹,疼痛控制可,无便秘等不良反应,睡眠改善,患者满意。

3.2 患者行鞘内输注方法镇痛的评价

鞘内镇痛用于临床始于 20 世纪 70 年代,鞘内使用药物能够直接作用于脊髓及大脑中的多种离子通道及受体,避免了口服的首过效应及血脑屏障,用量远远低于全身给药量,同时可减少药物全身不良反应。目前常用来治疗中重度顽固性疼痛,效果确切。一般适用于常规应用吗啡类药物治疗疼痛没有明显减轻,出现难以忍耐的副作用,测试成功、无植入禁忌证、预期寿命大于 3 个月,排除椎管内转移的疼痛患者^[7]。入院前患者口服吗啡约 1335 mg,用量大,每日仍出现爆发痛 4~5 次,疼痛控制不佳,并伴有严重便秘,可以考虑使用鞘内输注镇痛药物治疗。

使用鞘内药物输注系统联合自控镇痛法(PCA)进行镇痛治疗^[8],可自行追加给药,防控爆发痛。定量、定时、定速输注镇痛药物,血药浓度时刻保持稳定,可有效减少个体间药代动力学和药效波动,同时根据患者需求随时调整,可操作性强,长期使用经济合算,能实现个体化镇痛治疗。

患者经鞘内吗啡测试后,镇痛效果佳,且无明显不良反应,无感染、菌血症、败血症、静脉血栓病史、肝素诱发血小板缺乏症、植入材料过敏等鞘内药物输注的禁忌证。可考虑使用鞘内输注吗啡镇痛。

3.3 患者鞘内给予镇痛药物方案分析

目前应用于鞘内的阿片与非阿片类药物主要为吗啡、氢吗啡酮、芬太尼、舒芬太尼、布比卡因、罗哌卡因、齐考诺肽、可乐定等^[9]。该患者癌症治疗预后差,曲马多、羟考酮及加巴喷丁等镇痛药物过敏,入院前口服大剂量吗啡,疼痛控制不佳,伴有严重的便秘,口服镇痛方案出现瓶颈现象,有使用吗啡鞘内输注给药的适应证。

一般口服吗啡和鞘内吗啡的剂量换算为 300:1,该例手术导管前端在胸椎 T₂ 节段,更利于吗啡向头侧扩散,故给予患者起始剂量较小,为 0.3 mg·mL⁻¹,速度为 0.23 mL·h⁻¹,Bolus 0.5 mL,锁定时间 1 h,该剂量下日消耗吗啡为 1.66 mg,约为口服剂量的 1/800,第二日后根据患者疼痛情况,逐步缓慢增加。

患者为混合性癌痛,为减少鞘内吗啡用量,

并针对神经病理性疼痛治疗,参考 2018 年 PACC 共识关于神经病理性疼痛鞘内治疗的一线推荐方案,建议临床调整为吗啡与布比卡因联合镇痛^[10]。吗啡注入脑脊液可直接作用于脑和脊髓阿片受体,而小剂量的布比卡因选择性阻滞该节段神经传导,安全性较高,并基本覆盖疼痛部位^[11-12]。患者术后鞘内吗啡及布比卡因的用量均持续缓慢地上升,可能与药物的耐受和疾病的进展有关,在及时调整药物剂量后依然能维持确切的镇痛效果,且未出现明显的不良反应,表明该方案对患者镇痛安全有效。

3.4 不良反应监护

相关研究提示^[13-14],鞘内持续输注吗啡治疗癌痛的安全且有效的剂量范围一般为 1~20 mg·d⁻¹,鞘内持续输注布比卡因治疗癌痛无明显运动阻滞且安全有效的剂量范围一般为 3~40 mg·d⁻¹。为保证癌痛患者口服转换为鞘内镇痛的用药安全,鞘内输注镇痛药物从小剂量开始,缓慢增加,计算每日用量,做好疼痛评估,监测不良反应,为及时调整镇痛方案提供依据。

临床药师注意监测患者实施鞘内镇痛后可能出现的不良反应或并发症,包括恶心、呕吐、便秘、戒断症状、低颅压性头痛、尿潴留、呼吸抑制、嗜睡和颅内感染、外周水肿、激素改变、导管尖端炎性肉芽肿、痛觉过敏等。可通过适当的调整阿片类药物减量的幅度、补液及口服非甾体抗炎药、导尿并使用盐酸坦索罗辛缓释胶囊等方法处理相应症状。而对于鞘内注射阿片出现痛觉倒错和肌阵挛,应立即停止阿片药物,改用 γ-氨基丁酸(GABA)激动剂等;导管尖端形成肉芽肿时镇痛作用可能会突然消失或产生新的、逐渐加重的神经症状,可选用氢吗啡酮代替吗啡,其镇痛强度是吗啡的 5 倍^[15]。该患者一直有便秘,使用鞘内输注镇痛药物后,阿片类镇痛药用量减少,便秘症状明显改善,如需要时可使用番泻叶泡水或麻仁润肠丸、乳果糖口服液等通便治疗^[16]。

3.5 出院教育

患者出院带药:镇痛泵;盐酸吗啡片 75 mg po prn;乳果糖口服溶液 15 mL po bid。药师针对出院带药进行用药教育:

① 患者带泵出院,泵内药物可持续使用一个月。嘱患者妥善保管并合理使用镇痛泵,医务人员已调整好滴速,患者可按需使用,切忌随意调整滴速,以免剂量过大出现呼吸抑制等严重不良反应。出院后记录“疼痛日记”,包括疼痛评分、药品用量、不良反应、饮食及睡眠情况等内容,全面疼痛评估^[17]。一个月后按时随诊,期间如出

现疼痛明显控制不佳、不能耐受、严重不良反应等情况,需住院调整镇痛方案。

② 盐酸吗啡片可用于缓解爆发痛。主要不良反应为中枢作用及便秘,可有倦怠、嗜睡、头晕等,应注意监测。

③ 乳果糖口服溶液用于缓解便秘。服用方法为每次 1 袋,每日 2 次,一般服用 1~2 d 可取得临床效果,如 2 d 后仍未有明显效果,可考虑加量,亦可视便秘改善程度调整剂量。治疗初始几天可能会有腹胀,通常继续治疗即可消失,当剂量高于推荐治疗剂量时,可能会出现腹痛和腹泻,此时应减少使用剂量。如果长期大剂量服用,可能会因腹泻出现电解质紊乱,应监测电解质。

④ 为缓解便秘,可以多吃富含膳食纤维的食物(如谷物、豆类、橘子),同时多喝水(建议每日喝水 1.5~2 L)。

⑤ 放松情志,适当运动。疼痛与情绪有关,疼痛发作时可接受心理疏导、转移注意力、听舒缓音乐、培养兴趣爱好等,以减少镇痛药物的使用。

4 小结

本次药学监护对象为 1 例中年晚期混合性癌痛患者,对多种镇痛药物过敏,大剂量口服吗啡(换算成口服吗啡为 $1335 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)并伴有严重便秘,自觉疼痛控制不佳。入院后给予患者经皮下输注装置鞘内输注吗啡,初始计量为 1.66 mg,为口服吗啡的 1/800,后调整为联合布比卡因镇痛,每日增加剂量平均速度是 10%。按照 NCCN 癌痛指南推荐的滴定通则,疼痛评分未变或增加的情况下,口服或静脉用量应该增加 50%~100%,若鞘内给药途径按此幅度调整,风险过大。经过逐步剂量调整,患者于术后第七日镇痛效果较稳定,相比阿片滴定要求(应该在 5 日内、最好 3 日内完成),其调整周期过长。鞘内吗啡滴定剂量调整风险与获益有待进一步讨论。

患者术后疼痛整体状况得到改善后带泵出院,减少了阿片类药物的使用剂量,减轻了患者经济负担^[18]。药师在患者住院期间,利用药学专业知识,采用记录“疼痛日记”的方式,对患者的疼痛治疗需求、用药获益与风险进行评估,与医护共同参与患者的癌痛诊疗过程^[19-20],在患者治疗过程中对患者的疼痛情况进行了全面的评估,提供剂量调整建议,监测不良反应,保证用药安全;对患者进行用药依从性教育,保证了其用药的安全及有效,体现了药师的价值。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 癌痛诊疗规范(2018年版)[Z]. 国卫办医函[2018]734号,

2018-09-18.

- [2] 孙小英, 蒋峻, 石巧娣, 等. 鞘内镇痛在顽固性癌痛患者的应用[J]. 江苏医药, 2016, 42(5): 567-569.
- [3] 梁蔚婷, 王剑, 马宇翔, 等. 临床药师在难治性癌痛多学科诊疗团队中的实践与体会[J]. 中国临床药学杂志, 2020, 29(5): 389-392.
- [4] 姜琳. 临床药师对癌痛治疗不合理用药的干预效果[J]. 中国医药指南, 2019, 17(28): 89-90.
- [5] 庄瑞春, 李光灿, 向安玲, 等. 国内临床药师干预对癌痛控制效果的系统评价[J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1409-1413.
- [6] 宋佳伟, 李春贤, 施朕善, 等. 基于加权 TOPSIS 法评价与药学干预对癌痛治疗效果的分析[J]. 中南药学, 2019, 17(2): 281-285.
- [7] 冯智英. 鞘内药物输注镇痛治疗和管理—多学科专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(10): 577-579.
- [8] 陈明坤, 范敏, 黄颖. 静脉自控镇痛在晚期癌痛病人中的应用[J]. 兵团医学, 2017, 51(1): 38-40.
- [9] 章沿锋, 杨旖欣, 冯智英. 鞘内药物输注系统植入术适应证和药物选择的进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(10): 723-728.
- [10] 谢文强, 李伟彦, 刘健, 等. 持续鞘内吗啡联合布比卡因用于中重度晚期癌痛患者的疗效和安全性[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(6): 585-587.
- [11] Liu Y, Cui X, Sun YE, et al. Intrathecal injection of the peptide Myr-NR2B9c attenuates bone cancer pain via perturbing *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-PSD-95 protein interactions in mice[J]. Anesth Analg, 2014, 118(6): 1345-1354.
- [12] Yin Q, Cheng W, Cheng MY, et al. Intrathecal injection of anti-CX3CR1 neutralizing antibody delayed and attenuated pain facilitation in rat tibial bone cancer pain model[J]. Behav Pharmacol, 2010, 21(7): 595-601.
- [13] Cohen SP, Dragovich A. Intrathecal analgesia[J]. Anesthesiol Clin, 2007, 25(4): 863-882.
- [14] Gogia V, Chaudhary P, Ahmed A, et al. Intrathecal morphine pump for neuropathic cancer pain: A case report[J]. Am J Hosp Palliat Care, 2011, 46(7): 223-225.
- [15] 杨冯睿. 鞘内给药治疗疼痛进展[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(3): 232-234.
- [16] 徐象威, 朱佩祯, 吕向群, 等. 临床药师参与大剂量阿片类药物癌痛会诊对患者疼痛及不良反应的分析[J]. 浙江医学, 2017, 39(3): 208-211.
- [17] 张露, 程模, 何霖, 等. 临床药师参与 1 例癌痛患者经 PCIA 镇痛的临床实践[J]. 中药与临床, 2019, 10(5): 36-39.
- [18] 胡吕萍, 廖志军, 徐彬, 等. 临床药师参与癌痛规范化治疗的实践效果评价[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(6): 34-37.
- [19] 谷铁波, 康敏, 袁微, 等. 规范化药学服务模式在癌痛全程化管理中的应用研究[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 752-755.
- [20] 李佳霖, 彭艺飞. 临床药师参与 1 例阿片类药物不良反应敏感癌痛患者的药学实践[J]. 中南药学, 2020, 18(7): 1230-1232.

(收稿日期: 2021-01-02; 修回日期: 2021-03-05)

南通市医院临床药师顺利开展药学服务的影响因素研究

周盈莹¹, 蔡亮亮¹, 朱永红¹, 马玲^{2, 3*} (1. 南通大学附属医院药剂科, 江苏 南通 226001; 2. 云南省第一人民医院临床药学科, 昆明 650032; 3. 昆明理工大学附属医院临床药学科, 昆明 650032)

摘要: 目的 为推进临床药学服务发展提供参考。方法 设计调查问卷, 对南通市二级和三级医院临床药师进行调查, 并采用因子分析和二元 Logistic 回归分析方法, 分析临床药师顺利开展药学服务的影响因素。结果 因子分析结果显示, 制度建设、专业素质、他人态度、药品供应对药学服务工作能否顺利开展均有影响。二元 Logistic 回归分析结果显示, 医院建设的临床药师相关制度 [$OR = 2.501, 95\%CI = 1.094 \sim 5.722, P = 0.030$] 越完善, 其临床药师越能顺利开展各项临床药学服务。结论 分析临床药师顺利开展药学服务的影响因素, 建议国家层面尽快推进《药师法》的建立, 医院管理层和药学部应结合本部门实际情况, 不断完善临床药师制建设方案、工作制度和考核激励制度等多项制度, 提高药师顺利开展药学服务的能力。

关键词: 临床药师; 药学服务; 影响因素; 问卷调查

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1964-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.038

Influential factors for providing pharmaceutical care in the hospital of Nantong

ZHOU Ying-ying¹, CAI Liang-liang¹, ZHU Yong-hong¹, MA Ling^{2, 3*} (1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong Jiangsu 226001; 2. Department of Clinical Pharmacy, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032; 3. Department of Clinical Pharmacy, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032)

Abstract: Objective To promote the development of clinical pharmaceutical service. **Methods** Questionnaires were designed and distributed among clinical pharmacists in second and third tier hospitals in Nantong. Factor analysis and binary Logistic analysis were used to analyze the influential factors for the service of clinical pharmacists. **Results** The factor analysis showed the institutional improvement, professional quality, others' attitude and drug supply all had an impact on pharmaceutical care. The binary Logistic analysis showed that the better the system [$OR = 2.501, 95\%CI = 1.094 \sim 5.722, P = 0.030$] in the hospital construction, the more smoothly the clinical pharmacists might carry out clinical pharmaceutical services. **Conclusion** The Law of the People's Republic of China on Pharmaceutical Practitioners is urgently needed. The working system, assessment, incentive and other systems related to the hospital Pharmacy Department should also be improved.

Key words: clinical pharmacist; pharmaceutical service; influential factor; questionnaire survey

临床药学服务的内涵为临床药师优化药物使用, 并改善患者健康结局^[1]。随着“医药分开”政策的推进, 医院临床药学发展进程逐渐加快, 在临床工作中已占据重要地位^[2]。

2002 年, 我国发布的《医疗机构药事管理暂行规定》开始明确建立临床药师制的要求。此后, 临床药师队伍逐渐壮大, 临床药师服务工作也逐渐步入正轨。2011 年《医疗机构药事管理规定》

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81900528); 江苏省博士后科研资助计划项目 (No.2020Z435); 南通市卫生健康委员会科研课题专项 (No.YAOZ201913); 南通市药学会 - 常州四药医院药学科研基金项目 (No.ntyx2019); 南通市市级科技计划 (指导性) 项目 (No.JCZ20160)。

作者简介: 周盈莹, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学、医院药学方面的工作, E-mail: 702010253@qq.com * **通信作者:** 马玲, 女, 硕士, 主要从事临床药学、医院药学方面的工作, E-mail: ml_cpu@163.com

明确规定了二级及三级医院临床药师的底线人数和全职临床药师的工作性质。南通市各大医疗机构也在加紧扩充临床药师数量。但该市临床药师工作还存在一定问题,如各大医院顺利开展临床药学服务的水平差异较大^[3]。而现在的研究多偏向于探索临床药学服务能力的影响因素^[4-5]。但实际上,临床药学服务能力强和顺利开展临床药学服务是两个不同的概念,后者是前者的基础。故基于此,本课题以二级及三级医院的临床药师(取得岗位培训证)为研究对象,通过对医院药学服务现状进行问卷调查,运用因子分析和二元 Logistic 回归分析来评价其顺利开展临床药学服务的影响因素,以期为提高临床药师药学服务质量提供参考。

1 对象与方法

1.1 调查对象

南通市所有的二级及三级医院的临床药师(取得岗位培训证),共计 78 名。

1.2 调查方法

参考国内外相关文献^[4-8],并结合相关领域专家的意见,设计该调查问卷。其主要内容包括:① 基本信息(包括个人情况和医院情况);② 参与药学服务项目情况;③ 临床药师的工作负担与薪资水平;④ 药学服务工作开展影响因素及能否较好地开展临床药学工作。采用 5 点 Likert 量表^[9]就受访临床药师的所有定量数据相关的回答进行正向评分,分别赋予 1~5 分。

1.3 质量控制

本次调查问卷经过前期预调查以保证问卷的质量。调查人员均经过统一培训,培训内容包括:① 对本次问卷的调查目的和填写要求进行说明;② 对问卷的每一条题目进行一致解释;③ 问卷调查的质量控制:问卷整理采用双人录入和逻辑纠错,以确保问卷录入无误。调查对象均采用不记名方式,若问卷有缺项则判断为无效问卷。

1.4 统计分析

采用 Epidata 3.1 软件建立数据库,由专人录入数据;采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。定类数据采用 χ^2 检验;定量数据采用 t 检验;影响因素分析采用因子分析和二元 Logistic 回归分析。检验标准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 调查基本信息

共发放问卷 78 份,回收 70 份,均为有效问卷,有效回收率为 89.74%(其中 4 份来自 3 家二级医院,其余 66 份来自 10 家三级医院)。经过信效度分析可得:克朗巴哈 α 值(Cronbach's α)

为 0.832,说明问卷内的定量数据可靠。本次调查的样本是南通市二级及二级以上医院的专职临床药师,其中女性较多,占 77.14%;年龄集中在 30~39 岁,占 74.29%;专业为临床药学的占 44.29%;高学历者居多,其中硕士占 57.14%,博士占 1.43%;主管药师比例最高,占 61.43%;从事临床药学工作 2~3 年的占比最多,为 25.71%;经国家级基地培训的专科临床药师占 75.71%;所在医院大部分为综合性医院,占 75.71%;工作科室分布在大内科(60.00%)、大外科(24.29%)、儿科(4.29%)、妇产科(5.71%)等各科室。

2.2 临床药师参与的药学工作项目情况

本次调查发现,临床药师参与的传统的临床药学服务项目如药学查房、书写药历的比例最高(为 88.57%),而需要一定资历或学历才能完成的硕士带教、博士带教的比例最低(为 0)。虽然受访临床药师均参与临床药物治疗相关工作,但其参与时间比例大于 85%的只占 34.29%,且只有 35.71%的临床药师能达到每日一次以上的药学查房频率。50% 以上的临床药师仍脱离不了调剂工作,其中 44.29% 参与白班药品调剂工作,51.43% 参与夜班药品调剂工作。由此可知,临床药师真正服务于临床的时间有限。

2.3 临床药师的工作负担与薪资水平

有 31.43% 的受访临床药师所在医院药学人员总数能达到专业技术人员总数的 8%;仅有 14.29% 的受访临床药师所在医院能达到 100 张床配一名临床药师的标准。本次调查发现,50% 以上的临床药师认为自己承担了过多的非临床药学相关工作。除此之外,只有 5.71% 的受访临床药师认为自己的薪资较高。而这些均与所处药学部负责人乃至医院领导对临床药学工作的重视程度有关。

2.4 临床药师顺利开展药学服务因子分析

药学服务工作是否能顺利开展受到多种因素影响^[10-12],本次调查主要针对实际工作中的客观因素及主观因素。对临床药师顺利开展药学服务影响因素进行因子分析,发现 KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) 值 = 0.713, Bartlett 的近似 $\chi^2 = 538.258$, $P < 0.01$ (Sig = 0.000), 表明适合进行因子分析; Cronbach's $\alpha = 0.838$, 说明研究数据信度质量高。特征根值 > 1 的有 4 个因子,旋转后方差解释率(累计贡献率)达到 69.786%。因子分析结果见表 1。

表 1 列出了经 SPSS 因子分析法提取后的 4 个因子,每个因子对应一个方差解释率,表示可以提取的信息占比。第 1 个因子命名为“制度建设”,解释了总偏差的 20.194%,这 3 个题项要求医院药

表 1 临床药师顺利开展药学服务影响因素得分的因子分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Factor analysis of influencing factors for smooth conducting pharmaceutical service ($\bar{x} \pm s$)

提取后的因子	题项	因子载荷	得分
1. 制度建设	医院临床药师制建设方案的完善程度	0.875	2.657±0.961
	医院临床药师工作制度完善程度	0.863	2.886±1.084
	医院临床药师绩效考核制度完善程度	0.797	2.357±1.192
2. 专业素质	在进行医嘱或处方审核时, 能及时发现临床用药安全性问题的频率	0.403	3.614±0.728
	上报不良反应的频率	0.660	4.129±1.191
	及时并准确回答医师提出的用药问题的频率	0.757	3.600±0.689
	对药品知识信息更新的关注度	0.691	3.486±0.974
3. 他人态度	患者对临床药师的信任度	0.807	3.043±0.824
	护士对临床药师的信任度	0.900	3.129±0.741
	医师对临床药师的信任度	0.874	3.000±0.742
	医师对临床药师提供的用药建议采纳程度	0.532	2.729±0.779
4. 药品供应	药品供应对临床需求的满足程度	0.694	3.743±0.736
	药品供应的及时程度	0.858	3.786±0.720
	药品供应渠道的便利、顺畅程度	0.842	3.743±0.716
	临床药师对药房药品供应信息的掌握程度	0.664	3.671±0.812

学部完善临床药师相关的各项规章制度, 分清临床药师的“权”“责”和“利”, 保障其临床工作顺利开展; 第 2 个因子命名为“专业素质”, 解释了总偏差的 17.797%, 这 4 个题项要求临床药师加强自身专业技能和工作积极性; 第 3 个因子命名为“他人态度”, 解释了总偏差的 16.467%, 这 4 个题项要求医护患大力支持临床药师工作; 第 4 个因子命名为“药品供应”, 解释了总偏差的 15.328%, 这 4 个题项要求药学部门应尽量满足临床上的药品需求。对提取后的 4 个因子进行描述性统计, 其分析结果见表 2。由表 2 可知, 受访临床药师对“药品供应”的得分最高, 达到了 (3.736±0.593); 而对“制度建设”的得分最低, 为 (2.633±0.926)。

表 2 提取后 4 个因子的描述性统计分析结果

Tab 2 Descriptive statistics of 4 factors after selection

提取后的因子	题项数	Cronbach's α	得分
1. 制度建设	3	0.815	2.633±0.926
2. 专业素质	4	0.700	3.707±0.666
3. 他人态度	4	0.865	2.975±0.651
4. 药品供应	4	0.804	3.736±0.593

对 4 个因子进行配对 t 检验, 结果见表 3。由表 3 可见, 受访临床药师对“专业素质”和“药品供应”的得分差异无统计学意义, 而其他因子间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 3 对提取后的 4 个因子进行配对 t 检验结果

Tab 3 t -test of 4 factors after selection

组别	因子配对	Cohen's d	t	P
配对 1	因子 1 对因子 2	1.089	-9.108	< 0.001
配对 2	因子 1 对因子 3	0.332	-2.779	0.007
配对 3	因子 1 对因子 4	1.119	-9.364	< 0.001
配对 4	因子 2 对因子 3	1.083	9.060	< 0.001
配对 5	因子 2 对因子 4	0.042	-0.355	0.724
配对 6	因子 3 对因子 4	1.062	-8.882	< 0.001

2.5 临床药师顺利开展药学服务影响因素的二元 Logistic 回归分析

经问卷调查得, 70.0% 的受访临床药师认为自己能较好地开展临床药学服务, 与 2015 年上海市临床药师自身职业认识调查结果一致^[13]。将受访临床药师的基本情况 (包括个人情况和医院情况) 与临床药学服务是否顺利开展情况 (顺利为 1, 不顺利为 0) 进行卡方检验, 发现不同性别、年龄、专业、学历、职称、工作年限、医院等级等 9 个方面基本情况对临床药学服务开展顺利与否均无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 4。故笔者排除基本情况, 以 4 个因子“制度建设”“专业素质”“他人态度”和“药品供应”为自变量, 引入模型进行二元 Logistic 回归分析, 第一步得出的模型似然比检验结果 $P = 0.047$, 说明该模型有效。逐步回归分析结果见表 5。结果显示, 制度建设 ($OR = 2.501, 95\%CI = 1.094 \sim 5.722, P = 0.030$) 是临床药师顺利开展临床药学服务的独立影响因素。

3 讨论

3.1 南通市调查对象的基本情况

受访的 70 名临床药师中, 职称为中级及以上的占 82.86%, 学历全部为本科及以上, 这可能是因为临床药师属于技术型人才, 工作内容不同于药学部其他下属科室; 44.29% 的临床药师所学专业为临床药学, 其余均为药学相关的其他专业, 这可能与早年我国高校培养方向相关; 同时, 有 74.29% 的临床药师年龄分布在 30 ~ 39 岁, 但大于 5 年临床药学工作年限的人数只有 34.29%, 这可能是因为南通市尚属于发展中二线城市, 临床药学工作开展相对滞后。故建议南通

表 4 临床药师基本情况与临床药学服务开展情况的卡方检验结果

Tab 4 Chi-square test of clinical pharmacists' general situation and evaluation of pharmaceutical care

因素	χ^2	<i>P</i>
性别	0.247	0.619
年龄	0.864	0.834
专业	5.169	0.639
学历	0.825	0.662
职称	5.283	0.259
工作年限	2.079	0.721
临床药学工作年限	7.792	0.100
医院性质	1.632	0.201
医院等级	3.738	0.443

市医院相关部门应设定好临床药师入职时的学历和专业门槛，并及时进行人才培养进修计划以确保临床药师的专业素养。

3.2 南通市药学服务现状

受访临床药师所在医院药学人员总数占比及临床药师配比达标率低，说明南通受访医院药学人员配备严重不足，临床药师缺口很大。这是我国各大医院普遍存在的问题^[14]。严重缺少编制导致 54.29% 的临床药师认为自己承担过多非临床药学工作，如药品调剂、药品供应和药物制剂。繁重的工作制约临床药师进驻临床的时间及参与更多培训

表 5 临床药师顺利开展药学服务影响因素的二元逐步 Logistic 回归分析结果

Tab 5 Binary Logistic analysis of influencing factors for conducting pharmaceutical service

步骤	变量	β	β 标准误	Wald	<i>P</i>	OR	OR 的 95% 置信区间	
							下限	上限
步骤 1	制度建设	0.750	0.488	1.536	0.125	2.117	0.813	5.512
	专业素质	0.151	0.591	0.256	0.798	1.163	0.366	3.701
	他人态度	0.658	0.528	1.247	0.213	1.931	0.686	5.434
	药品供应	0.391	0.533	0.733	0.463	1.478	0.520	4.201
	截距	- 4.908	2.288	- 2.145	0.032	0.007	0.000	0.655
步骤 2	制度建设	0.794	0.458	1.734	0.083	2.213	0.902	5.429
	他人态度	0.696	0.506	1.374	0.170	2.005	0.743	5.409
	药品供应	0.423	0.516	0.820	0.412	1.527	0.556	4.195
	截距	- 4.728	2.158	- 2.191	0.028	0.009	0.000	0.608
步骤 3	制度建设	0.864	0.451	1.917	0.055	2.372	0.981	5.737
	他人态度	0.837	0.474	1.765	0.078	2.309	0.912	5.846
	截距	- 3.775	1.758	- 2.147	0.032	0.023	0.001	0.719
步骤 4	制度建设	0.917	0.422	2.172	0.030	2.501	1.094	5.722
	截距	- 1.479	1.064	- 1.391	0.164	0.228	0.028	1.832

和继续教育的机会。建议南通市医院重新认识临床药师制建设^[15]，首先保证药师及临床药师的数量，重视药师队伍建设，此为基础；并严格规定临床药师的工作内容，确保临床药师适量的工作负担；另外，药品调剂、制剂和供应科室可以引入自动化、信息化技术手段，以减少人力需求。

3.3 临床药师顺利开展药学服务的影响因素分析

首先进行因子分析^[16]。结果表明，主客观因素可以归纳为 4 个主要因素：制度建设、专业素质、他人态度、药品供应。表 3 显示制度建设项目的得分显著低于其他三类 ($P < 0.01$)。这一结果反映南通各大医院缺乏统一、科学、合理的临床药师相关制度体系。

之后进行二元 Logistic 回归分析^[17]。结果表明，制度建设是临床药师服务顺利开展的独立影响因素。该影响因素的回归系数为 $0.917 > 0$, $P = 0.030$, 说明医院建设的临床药师相关制度越完善，其临床药师越能顺利开展各项临床药学服务。这一研究结果与姚伟等^[18]和刘慧^[19]的调查结果一致。

3.4 基于临床药师相关制度的几点建议

2017 年,《国务院办公厅关于建立现代医院管理制度的指导意见》中明确提出健全人力资源管理制度、健全绩效考核制度,对不同岗位、不同职级的医务人员实行分类考核。进一步加强临床药师制建设、完善临床药师工作制度和构建行之有效的临床药师绩效激励制度,不仅是落实国家医改方针政策的切实举措,更是新医改和医院药学转型的双重需要^[20]。

3.4.1 推进《药师法》尽快出台 我国陆续发布《执业医师法》和《护士条例》，但药师相关法律却一直处于空白。所幸的是，2017 年《中华人民共和国药师法（草案征求意见稿）》在多方努力下终于发布出来。本调查结果显示，仅 31.43% 的受访临床药师所在医院药学人员总数能达标，是因为规范性文件不能起到和法律一样的行政处罚作用。故建议国家层面在借鉴英、美、日等国药师法律的基础上尽快出台我国的第一部《药师法》，将药学人员比例、临床药师专业门槛、工作内容和药事服务费等大框架内容明确下来；各省级卫生行政部门再结合实际情况分别制定各省、市级及地区涉及的具体细则问题。

3.4.2 加强临床药师体系建设 临床药师制建设是指以临床为基础,以“病人为中心”的临床药师工作模式和管理制度建设,包括临床药师的职业定位,参加临床药物治疗工作的形式、职责任务、沟通技巧、药学服务技能等建设^[21]。本调查结果显示,临床药师顺利开展药学服务影响因素中,医院临床药师制建设方案的完善程度得分偏低,说明医院临床药师制的建设是医院顺利开展药学服务的核心要素之一。故建议卫生行政部门加强对医院临床药师制的监督和检查,将强化临床药师制的相关指标落实到医院各项检查和评级评审中,以进一步推进临床药师制的建设;医院管理层及药学部负责人应转变观念,重视临床药学工作,深入实施临床药师制,并努力消除阻碍临床药学工作顺利进行的各种不利因素。

3.4.3 完善临床药师工作制度 临床药师的工作就是直接参与临床药物治疗,只有参加临床用药实践,才能了解患者的用药情况和真实需求,才能发挥临床药师的作用,并不断提升个人执业能力与水平。但是经调查,51.43%和44.29%的临床药师分别承担夜班和白班调剂工作。这不仅会混淆临床药师的个人定位,还会阻碍临床药学的学科发展。故建议医疗机构应建立完善的临床药师工作制度,明确工作范围,以保证临床工作的顺利开展;药学部门在制度书面化、用药实践标准化的同时,还应制订一系列工作表,一方面指导和约束临床药师的日常工作行为,实现临床药师管理的规范化,另一方面纸质档案可供总结或检查。

3.4.4 深化临床药师绩效考核制度 我国医院药学部门奖金主要体现在药品供应和调剂方面,很难体现临床药师的价值,也难以推进临床药学工作。经调查,只有5.71%的受访临床药师认为自己的薪资较高;且临床药师顺利开展药学服务影响因素分析结果中,医院临床药师绩效考核制度的完善程度得分最低,说明技术要求较调剂药师更高的临床药师薪资未必高,在一定程度上影响临床药学工作的顺利开展。故建议药学部门负责人应与医院管理层重新协商药学部门整体奖金核算方式,以体现临床药学工作的重要性;药学部门应制订二次绩效方案,给予临床药师待遇倾斜和机会倾斜;临床药学科应制订三次绩效方案,对临床药师个体进行更加客观公正、切实可行的绩效考核,最终建立健全兼具科室内公平性和个人间竞争性的有效激励机制。

参考文献

[1] Allemann SS, van Mil JW, Botermann L, et al. Pharmaceutical care: The PCNE definition 2013 [J]. *Int J Clin*

Pharm, 2014, 36(3): 544-555.

- [2] Zhao SJ, Zhao HW, Du S, et al. The impact of clinical pharmacist support on patients receiving multi-drug therapy for coronary heart disease in China [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2015, 77(3): 306-311.
- [3] 周盈莹, 陈伯华, 杨燕, 等. 江苏南通市 9 家医院临床药学发展现状调查 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(22): 2832-2838.
- [4] 杜成凤, 钱妍, 邓丹. 医院临床药师药学服务能力及影响因素研究 [J]. *中国药房*, 2017, 28(17): 2436-2440.
- [5] 孙艳, 黄翠丽, 张明华, 等. 医院临床药学服务能力的制约因素及对策探讨 [J]. *药学服务与研究*, 2016, 16(5): 369-374.
- [6] 吴汀溪, 王斌, 王亚东. 北京市 5 家“三甲”医院医师对临床药学服务的评价调查 [J]. *中国药房*, 2016, 27(36): 5066-5068.
- [7] Yao D, Xi X, Huang Y, et al. A national survey of clinical pharmacy services in country hospitals in China [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188354.
- [8] Wang Y, Dai Y, Yang J, et al. A survey about the contents and features of oncology clinical pharmacy services and self-evaluations of the oncology pharmacists in China [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2020, 455(5): e13191.
- [9] Nunnally JC. *Psychometric Theory* [M]. 3rd Edition. New York: Mc-Graw-Hill, 1994.
- [10] 魏俊婷, 邹美南, 李中东. 深圳市中医院门诊病人合理用药现状及其影响因素 [J]. *药学服务与研究*, 2014, 14(5): 340-343.
- [11] 刘东, 费晋秀, 杨世民, 等. 药师进行处方审核的影响因素分析 [J]. *药学服务与研究*, 2011, 11(1): 27-29.
- [12] 张莎, 王婧, 祝德秋. 社区老年慢性病患者药物相关问题评估及影响因素分析 [J]. *中南药学*, 2020, 18(6): 1046-1051.
- [13] 黄文杰, 蔡卫民, 马国. 上海市医疗卫生机构临床药师对临床药学工作及自身职业的认知情况调查 [J]. *中国药房*, 2015, 26(36): 5048-5051.
- [14] 杨志海, 张幸国, 马葵芬, 等. 我国临床药学科发展现状调研分析及思考 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(17): 1553-1557.
- [15] 席晓宇, 姚东宁, 黄元楷, 等. 我国三级医院临床药学服务现状及问题研究(二): 临床药师团队建设现状分析 [J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(6): 472-476.
- [16] 薛薇. *SPSS 统计分析方法及应用* [M]. 2 版. 北京: 电子工业出版社, 2009.
- [17] 武松. *SPSS 实战与统计思维* [M]. 北京: 清华大学出版社, 2019.
- [18] 姚伟, 王天琳, 李晶. 临床药师服务能力建设探讨 [J]. *中国医院*, 2018, 22(3): 60-62.
- [19] 刘慧. 医院实施药学服务的影响因素与对策 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2014, 35(12): 1760-1761.
- [20] 方罗, 郑小卫, 许高奇, 等. 临床药师绩效考核制度的构建 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(6): 745-748.
- [21] 吴永佩, 颜青. 临床药学科建设的内涵、范畴和发展趋势 [J]. *中国临床药学杂志*, 2014, 23(3): 133-159.

(收稿日期: 2021-01-20; 修回日期: 2021-03-04)

药物与临床

阿帕替尼联合替吉奥治疗进展期胃癌有效性和安全性的系统评价

王凯^{1,2}, 张学琴^{1,2}, 刘秀菊¹, 王好雨¹, 杨珍珍¹, 王淑梅^{1*} (1. 河北医科大学第二医院药学部, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学, 石家庄 050000)

摘要: **目的** 系统评价阿帕替尼联合替吉奥对比替吉奥单药治疗二线及二线以上进展期胃癌的有效性和安全性, 以期为临床合理用药提供依据。**方法** 系统检索 Embase、Cochrane Library、PubMed/Medline、中国知网、万方数据库、维普中文科技期刊全文数据库, 收集阿帕替尼联合替吉奥(试验组)和替吉奥(对照组)治疗晚期胃癌的随机对照试验(RCT), 筛选文献、提取数据并采用 Cochrane 系统评价员手册 5.1.0 提供的偏倚风险评估工具对纳入研究的质量进行评价, 采用 RevMan 5.3 软件进行 meta 分析。**结果** 共纳入 15 项 RCT, 合计 1121 例患者。Meta 分析结果显示, 与对照组比较, 试验组总体缓解率和疾病控制率显著高于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 0.33, 95\%CI (0.25, 0.44), P < 0.000 01$; $OR = 0.37, 95\%CI (0.28, 0.50), P < 0.000 01$]。安全性方面, 试验组手足综合征、高血压和蛋白尿的发生率显著高于对照组 [$OR = 2.11, 95\%CI (1.09, 4.08), P = 0.03$; $OR = 0.13, 95\%CI (0.06, 0.28), P < 0.000 01$; $OR = 0.26, 95\%CI (0.13, 0.51), P < 0.000 01$], 两组恶心呕吐、腹泻、乏力和血小板减少等其他不良反应发生率的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 替吉奥联合阿帕替尼提高了晚期胃癌患者的总体缓解率和疾病控制率, 但要警惕手足综合征、高血压和蛋白尿等不良反应的发生。

关键词: 胃癌; 阿帕替尼; 替吉奥(S-1); 疗效; 安全性; 系统评价

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2021)09-1969-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.039

Systematic evaluation of the efficacy and safety of apatinib combined with tegafur for advanced gastric cancer

WANG Kai^{1,2}, ZHANG Xue-qin^{1,2}, LIU Xiu-ju¹, WANG Hao-yu¹, YANG Zhen-zhen¹, WANG Shu-mei^{1*} (1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy and safety of apatinib combined with tegafur (S-1) for advanced gastric cancer in the second line and beyond to provide evidence for the rational use of drugs in clinical practice. **Methods** Embase, the Cochrane Library, PubMed/Medline, China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang Database and VIP Database were searched. Randomized controlled trials (RCT) on apatinib combined with S-1 (the experimental group) and S-1 (the control group) for advanced gastric cancer were collected. The data and the quality of the included RCTs were evaluated with the bias risk assessment tool provided by the Cochrane system evaluator manual 5.1.0. The meta analysis was carried out with RevMan 5.3 software. **Results** Totally 1121 patients were included in 15 RCTs. Meta-analysis showed that the objective remission rate and disease control rate in the experimental group were significantly higher than those in the control group [$OR =$

基金项目: 2019 年度河北省医学科学研究课题计划 (No.20190499)。

作者简介: 王凯, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, E-mail: 503300374@qq.com * **通信作者:** 王淑梅, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学、体内药物分析和药物相互作用研究, E-mail: shumei-wang@163.com

0.33, 95% CI (0.25, 0.44), $P < 0.000\ 01$; $OR = 0.37$, 95%CI (0.28, 0.50), $P < 0.000\ 01$]. In terms of safety, hand-foot syndrome the incidence of hypertension and albuminuria in the experimental group were significantly higher than those in the control group [$OR = 2.11$, 95%CI (1.09, 4.08), $P = 0.03$; $OR = 0.13$, 95% CI (0.06, 0.28), $P < 0.000\ 01$; $OR = 0.26$, 95%CI (0.13, 0.51), $P < 0.000\ 01$]. There was no significant difference in the incidence of other adverse reactions such as nausea and vomiting, diarrhea, fatigue and thrombocytopenia between the two groups. **Conclusion** Apatinib combined with S-1 can improve the objective remission rate and effective control rate of patients with advanced gastric cancer, but precaution is needed against the occurrence of adverse reactions such as hand-foot syndrome, hypertension and albuminuria, and other adverse reactions.

Key words: gastric cancer; apatinib; tegafur (S-1); efficacy; safety; systematic assessment

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 2018 年全球胃癌新发病例数为 103.4 万, 占全部恶性肿瘤发病的 5.7%, 位于恶性肿瘤发病第六位, 中国是全球胃癌的高发区, 发病数占世界的 44.1%^[1]。有研究显示我国胃癌发病率呈下降趋势, 且平均发病年龄出现后移趋势^[2]。我国早期胃癌占比很低, 仅约 20%, 大多数发现时已是进展期, 总体 5 年生存率不足 50%, 针对晚期胃癌患者的临床治疗大多数是以放化疗方法为主。替吉奥广泛应用于各种癌症的治疗, 包括晚期胃癌, 且替吉奥单药或替吉奥联合化疗药在疾病控制率和临床缓解率方面显示出优越性^[3]。阿帕替尼是一种新型的小分子抗血管生成剂, 高度选择性地抑制血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR-2) 酪氨酸激酶的活性, 阻断 VEGF 与其受体结合的信号传导, 从而强效抑制肿瘤血管生成, 发挥抗肿瘤作用^[4]。阿帕替尼为我国 I 类新药, 于 2014 年上市并于 2017 年进入基本医疗保险目录, 主要用于进展期胃癌或食管结合部腺癌的二线以上治疗^[5]。为探究阿帕替尼联合替吉奥是否比单用替吉奥有更好的疗效和安全性, 本研究采用系统评价的方法比较阿帕替尼联合替吉奥对比单用替吉奥针对晚期胃癌的疗效和安全性, 以期为晚期胃癌的临床用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 研究类型 国内外公开发表的随机对照试验 (randomized controlled trial, RCT); 语种限定为中文或英文。

1.1.2 研究对象 ① 符合《胃癌诊疗规范 (2011 年版)》中关于晚期胃癌的诊断标准, 并经病理组织学检查和影像学检查证实为晚期胃癌^[6]; ② 年龄 18 ~ 80 岁, 性别不限; ③ 具有可以测量的肿

瘤病灶; ④ 预期生存时间 ≥ 3 个月; ⑤ 所有患者均无化疗药物使用禁忌证; ⑥ 所有患者均签署知情同意书, 研究经过医院伦理委员会批准。

1.1.3 干预措施 对照组为替吉奥胶囊, 剂量 40 ~ 60 mg, 每日 2 次; 试验组在对照组的基础上加用阿帕替尼, 阿帕替尼的剂量为 250 ~ 850 mg, 每日 1 次。

1.1.4 结局指标 疗效相关指标: A. 总体缓解率 (objective response rate, ORR) 和 B. 疾病控制率 (disease control rate, DCR)。安全性相关指标: C. 手足综合征、D. 高血压、E. 蛋白尿、F. 恶心呕吐、G. 腹泻、H. 乏力以及 I. 血小板减少。依据美国癌症研究所制定的肿瘤疗效评价标准进行评价, 分为完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、疾病稳定 (stable disease, SD)、疾病进展 (progressive disease, PD)。 $ORR = (CR + PR) / \text{样本总量}$, $DCR = (CR + PR + SD) / \text{样本总量}$ 。采用实体瘤近期疗效评定标准 (RECIST) 进行评价: CR (病灶完全消失, 持续 4 周), PR (肿瘤最大径之和较之前最少降低 30%, 持续 4 周), SD (肿瘤最大径之和较之前降低 $< 30\%$, 或升高 20%), PD (肿瘤最大径之和较之前升高 $> 20\%$ 或有新的病灶发现)。

1.1.5 排除标准 ① 排除试验设计有明显错误、缺陷或经相关查询提供资料不详的文献; ② 排除未进行组间均衡性比较, 基线资料不可比的文献; ③ 排除总样本量低于 20 的研究; ④ 文中无明确排除标准或排除标准不全面的文献。

1.2 文献检索策略

计算机系统检索 Cochrane Library、PubMed/Medline、Embase、中国知网 (CNKI)、万方数据库、维普数据库, 检索时间均为建库至 2020 年 6

月 28 日。英文检索关键词为“Apatinib”“Apatinib mesylate”“S-1”“Tegafur”“Gimeracil”“Oteracil Potassium Capsules”“Stomach Neoplasm”“Gastric Neoplasms”“Cancer of Stomach”“Stomach Cancers”“Gastric Cancer”;中文检索关键词为“阿帕替尼”“替吉奥”“甲磺酸阿帕替尼”“艾恒”“胃癌”和“胃肿瘤”。

1.3 文献资料的提取和质量评价

由两名研究人员相互独立地按照纳排标准, 阅读导出的文献的篇名、摘要进行文献初筛, 排除不符合标准的文献, 并记录排除原因; 通过阅读全文对初筛符合纳排标准的文献进行复筛, 排除不符合标准的文献, 并记录排除原因; 最后对筛选出的文献进行交叉核对, 意见不一致时通过讨论或征求第三位研究人员的意见协商解决。对符合纳排标准的文献, 使用提前设计好的资料提取表提取文献中的关键信息, 包括作者、发表时间、研究对象、干预措施、结局指标等内容。质量评价的标准根据 Cochrane 系统评价员手册 5.1.0 提供的评价标准^[7], 共包括 5 个方面: 随机序列生成、随机分配方案是否隐藏、患者及干预措施者盲法、不完整性结局报告、选择性报告^[5]。质量评价“low risk”表示低偏倚; “unclear”表示偏倚不清楚; “high risk”表示高偏倚。采用 Egger 检验评估发表偏倚以评价结果的可靠性。

1.4 统计学分析

采用 RevMan 5.3 软件对纳入研究效应量进行合并分析。使用点估计与区间估计为效应量指标, 对于二分类变量采用比值比 OR 值 (odds ratio) 及 95%CI (confidence interval) 表示其效应量大小, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水平。采用 I^2 检验对纳入的研究进行异质性评价, 各研究间无异质性 ($P > 0.10, I^2 \leq 50\%$), 采用固定效应模型分析; 反之, 采用随机效应模型分析。采用单因素和亚组分析进行敏感性分析以验证结果的稳健性。

2 结果

2.1 文献检索结果及纳入研究基本信息

检索各个数据库, 共检索到 342 篇文献, 剔除个案报告、重复文献、综述、回顾性研究、非随机研究或不符合纳入标准的研究, 最终纳入 15 项研究, 合计 1121 例患者, 阿帕替尼联合替吉奥组 561 例, 替吉奥组 560 例, 文献筛选流程图 1, 纳入研究基本信息见表 1。

2.2 纳入文献质量评价结果

纳入的 15 篇文献, 均报告采用随机数字表法进

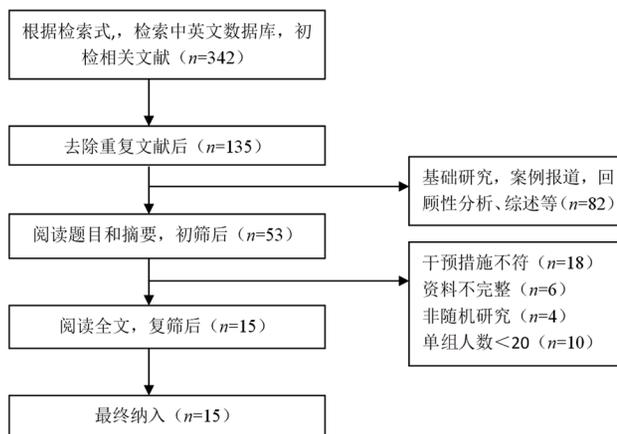


图 1 文献筛选流程

Fig 1 Flow chart of literature screening

行分组, 研究中试验组与对照组基线可比。所有研究均未提及分配隐藏和盲法使用情况, 试验期间均未报告脱落情况, 没有选择性报告。根据文献的风险偏倚评价结果, 文献的总体质量偏低, 详见图 2。

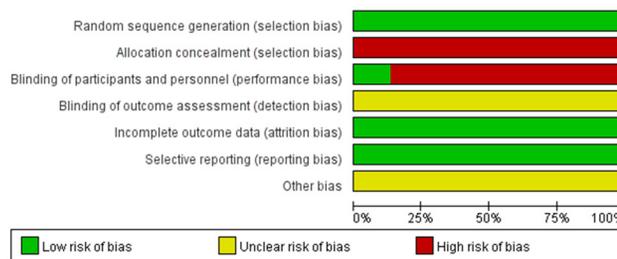


图 2 偏倚风险图

Fig 2 Graph of bias risk

2.3 Meta 分析结果

2.3.1 ORR 15 项研究^[8-22]全部报道了 ORR。各研究间无统计学异质性 ($P = 0.97, I^2 = 0$), 采用固定效应模型进行 meta 分析, 详见图 3。Meta 分析结果显示, 试验组的 ORR 显著高于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 0.33, 95\%CI (0.25, 0.44), P < 0.00001$]。

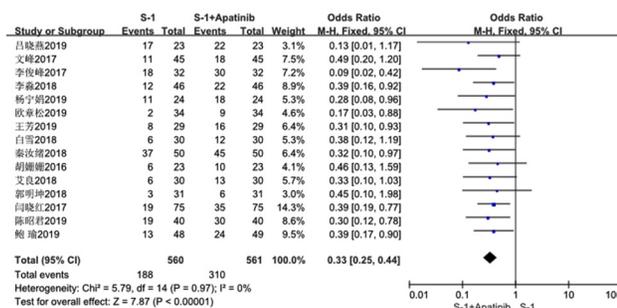


图 3 两组患者 ORR 的 meta 分析结果

Fig 3 Meta analysis of ORR in the two groups of patients

2.3.2 DCR 15 项研究^[8-22]全部报道了 DCR。各研究间无统计学异质性 ($P = 0.67, I^2 = 0$), 采用固定效应模型进行 meta 分析, 详见图 4。

表 1 纳入研究基本信息

Tab 1 General information of included studies

第一作者及 发表年份	例数 /n		年龄 / 岁		干预措施		疗程	结局指标
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组		
杨宁娟 2019 ^[8]	24	24	73.1±6.9	72.0±6.9	阿帕替尼 (500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②③⑥
王芳 2019 ^[9]	29	29	72.2±5.8	71.9±5.7	阿帕替尼 (850 或 500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②③④⑤ ⑥⑦⑧⑨
吕晓燕 2019 ^[10]	23	23	57.8±1.1	58.1±1.2	阿帕替尼 (250-500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②④⑤ ⑥⑦⑧
陈昭君 2019 ^[11]	40	40	56.5±5.5	57.6±6.4	阿帕替尼 (500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②⑤⑥
艾良 2018 ^[12]	30	30	64±4.6	65±4.1	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②⑥⑦⑨
鲍瑜 2019 ^[13]	49	48	52.64±2.9	52.57±2.9	阿帕替尼 (500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (35~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②③⑥
文峰 2017 ^[14]	45	45	< 80	< 80	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (35~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	12 周	①②③ ⑥⑦⑨
闫晓红 2017 ^[15]	75	75	54±6	56±6	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②④ ⑤⑦⑧
李俊峰 2017 ^[16]	32	32	47.5±1.5	46.9±1.6	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	9 周	①②⑥ ⑦⑨
李森 2018 ^[17]	46	46	< 80	< 80	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	12 周	①②③④⑤ ⑥⑦⑧⑨
秦汝绪 2018 ^[18]	50	50	60.6±6.6	59.3±6.4	阿帕替尼 (500~850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②⑥⑦⑨
欧章松 2019 ^[19]	34	34	58.6±5.2	58.6±5.7	阿帕替尼 (500 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	12 周	①②④⑤ ⑥⑦⑧
郭明坤 2018 ^[20]	31	31	63.8±9.0	62.6±6.8	阿帕替尼 (850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②
白雪 2018 ^[21]	30	30	24~71	25~73	阿帕替尼 (250 mg, qd) + 替吉奥 (40 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40 mg·m ⁻² , bid)	12 周	①②③ ④⑤
胡姗姗 2016 ^[22]	23	23	57.8±1.1	58.1±1.2	阿帕替尼 (800~850 mg, qd) + 替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	替吉奥 (40~60 mg·m ⁻² , bid)	8 周	①②⑥⑦

注 (Note): ① 总体缓解率 (ORR, objective response rate); ② 疾病控制率 (DCR, disease control rate); ③ 手足综合征 (hand-foot syndrome); ④ 高血压 (hypertension); ⑤ 蛋白尿 (proteinuria); ⑥ 恶心呕吐 (nausea and vomiting); ⑦ 腹泻 (diarrhea); ⑧ 乏力 (fatigue); ⑨ 血小板减少 (thrombocytopenia)。

Meta 分析结果显示, 试验组的 DCR 显著高于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 0.37, 95\%CI (0.28, 0.50), P < 0.0001$]。

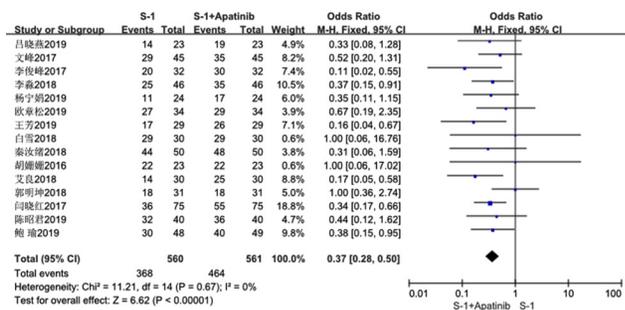


图 4 两组患者 DCR 的 meta 分析森林图

Fig 4 Meta analysis of DCR in the two groups of patients

2.3.3 手足综合征 6 项研究^[8-9, 13-14, 17, 21] ($n = 445$) 报道了患者治疗后手足综合征的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.23, I^2 = 27\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的手足综合征发生率显著高于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 2.11, 95\%CI (1.09, 4.08), P = 0.03$], 见表 2。

2.3.4 高血压 6 项研究^[9-10, 15, 17, 19, 21] ($n = 474$) 报道了患者治疗后高血压的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.23, I^2 = 28\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的高血压发生率显著高于对照组,

差异有统计学意义 [$OR = 0.13, 95\%CI (0.06, 0.28), P < 0.01$], 见表 2。

2.3.5 蛋白尿 7 项研究^[9-11, 15, 17, 19, 21] ($n = 554$) 报道了患者治疗后蛋白尿的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.08, I^2 = 46\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的蛋白尿发生率显著高于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 0.26, 95\%CI (0.13, 0.51), P < 0.01$], 见表 2。

2.3.6 恶心呕吐 14 项研究^[8-15, 17-19, 21-22] ($n = 999$) 报道了患者治疗后恶心呕吐的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.04, I^2 = 45\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的恶心呕吐发生率与对照组相比, 差异无统计学意义 [$OR = 1.03, 95\%CI (0.76, 1.40), P = 0.86$], 见表 2。

2.3.7 腹泻 12 项研究^[8-15, 16-19, 21] ($n = 774$) 报道了患者治疗后腹泻的发生情况, 各研究间无统

计学异质性 ($P = 0.64, I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的腹泻发生率与对照组相比, 差异无统计学意义 [$OR = 0.90, 95\%CI (0.60, 1.35), P = 0.60$], 见表 2。

2.3.8 乏力 4 项研究^[9, 11, 22, 19] ($n = 218$) 报道了患者治疗后乏力的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.16, I^2 = 41\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组的乏力发生率与对照组相比, 差异无统计学意义 [$OR = 0.67, 95\%CI (0.36, 1.30), P = 0.24$], 见表 2。

2.3.9 血小板降低 6 项研究^[9, 12, 14, 16-18] ($n = 464$) 报道了患者治疗后血小板减少的发生情况, 各研究间无统计学异质性 ($P = 0.80, I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型进行 meta 分析。Meta 分析结果显示, 试验组血小板减少发生率与对照组相比, 差异无统计学意义 [$OR = 1.24, 95\%CI (0.73, 2.11), P = 0.42$], 见表 2。

表 2 试验组与对照组有效性和安全性的 meta 分析结果

Tab 2 Meta analysis of effectiveness and safety between the test group and the control group

参数	样本量		分析方法	异质性检验		meta 分析结果		
	对照组	试验组		I^2	P	OR	$95\%CI$	P
ORR	560	561	Fixed	0%	0.97	0.33	0.25 ~ 0.44	< 0.01
DCR	560	561	Fixed	0%	0.67	0.37	0.28 ~ 0.50	< 0.01
手足综合征	222	223	Fixed	27%	0.23	2.11	1.09 ~ 4.08	0.03
高血压	237	237	Fixed	28%	0.23	0.13	0.06 ~ 0.28	< 0.01
蛋白尿	277	277	Fixed	46%	0.08	0.26	0.13 ~ 0.51	< 0.01
恶心呕吐	499	500	Fixed	45%	0.04	1.03	0.76 ~ 1.40	0.86
腹泻	387	387	Fixed	0%	0.64	0.90	0.60 ~ 1.35	0.60
乏力	109	109	Fixed	41%	0.16	0.67	0.36 ~ 1.30	0.24
血小板降低	232	232	Fixed	0%	0.80	1.24	0.73 ~ 2.11	0.42

2.4 敏感性分析

纳入的 15 篇文献中, 1 篇文献阿帕替尼的用量为 250 mg^[14]; 5 篇文献的用量为 500 mg^[8, 10, 11, 13, 19]; 2 篇文献的用量为 500 ~ 850 mg^[9, 18]; 7 篇文献的用量为 850 mg^[12, 14-17, 20, 22]。疗程: 10 篇文献为 8 周^[8-11, 13, 15, 18, 20, 22]; 1 篇文献为 9 周^[16]; 4 篇文献为 12 周^[14, 17, 19, 21]; 1 篇文献为 18 周^[21], 分别对阿帕替尼的剂量和治疗周期做了亚组分析, 亚组分析显示 (见表 3、4), 研究结果的方向未发生改变, 进一步验证了结果的稳健性。

2.5 发表偏倚分析

由图 5 可知, ORR、DCR 和恶心呕吐等结果指标各研究散点都在倒漏斗图范围内, 倒漏斗图分布的对称性良好, Egger 检验 (ORR) $P =$

0.18, (DCR) $P = 0.24$, (恶心呕吐) $P = 0.26$, 无明显发表偏倚; 以腹泻为结果指标的研究绘制各研究在到漏斗图分布不均匀, 对称性较差, Egger 检验 $P = 0.014$, 提示该结果指标可能存在发表偏倚。

3 讨论

尽管对胃癌进行了许多研究且取得了相应进展, 但是总体上胃癌的治疗效果仍未取得实质性突破^[23]。随着目前靶向治疗的兴起, 联合靶向治疗药物不仅能够获得更好的近期治疗效果, 且远期疗效也较好。作为一种新型靶向治疗药物, 阿帕替尼能有效抑制小分子 VEGF 的形成, 抑制肿瘤的生长, 具有靶向性、安全性较高、耐受性良好等特点, 在治疗晚期胃癌的临床应用中有较好的效果^[24]。同时阿帕替尼作为一种新药, 仍缺乏

表 3 ORR 阿帕替尼剂量与疗程的亚组 meta 分析结果

Tab 3 Subgroup meta analysis of ORR apatinib doses and courses of treatment

亚组	样本量		分析方法	异质性检验		meta 分析结果		
	对照组	试验组		I^2	P	OR	95%CI	P
阿帕替尼剂量								
250 mg	53	53	Fixed	0%	0.4	3.54	1.30 ~ 9.64	0.01
500 mg	146	147	Fixed	81%	0.001	1.66	1.00 ~ 2.74	0.05
500 ~ 850 mg	102	102	Fixed	0%	0.88	2.87	1.48 ~ 5.56	0.12
850 mg	259	259	Fixed	0%	0.59	2.84	1.91 ~ 4.22	< 0.01
总计	560	561	Fixed	39%	0.06	2.48	1.89 ~ 3.25	< 0.01
疗程								
8 周	344	343	Fixed	0%	0.99	2.9	2.05 ~ 4.11	< 0.01
9 周	32	32	Fixed			11.67	2.37 ~ 57.36	< 0.01
12 周	155	155	Fixed	0%	0.76	2.67	1.59 ~ 4.49	< 0.01
18 周	30	30	Fixed			3.06	0.97 ~ 9.66	0.06
总计	561	560	Fixed	0%	0.97	3.01	0.97 ~ 9.66	< 0.01

表 4 DCR 阿帕替尼剂量与疗程的亚组 meta 分析结果

Tab 4 Subgroup meta analysis of DCR apatinib doses and courses of treatment

亚组	样本量		分析方法	异质性检验		meta 分析结果		
	对照组	试验组		I^2	P	OR	95%CI	P
阿帕替尼剂量								
250 mg	53	53	Fixed	0%	0.48	2.47	0.73 ~ 8.30	0.14
500 mg	146	147	Fixed	0%	0.88	2.33	1.32 ~ 4.12	< 0.01
500 ~ 850 mg	102	102	Fixed	0%	0.52	3.90	1.47 ~ 10.40	0.02
850 mg	259	259	Fixed	37%	0.16	2.69	1.84 ~ 3.93	< 0.01
总计	561	560	Fixed	0%	0.67	2.67	2.00 ~ 3.57	< 0.01
疗程								
8 周	344	343	Fixed	0%	0.87	3.37	2.35 ~ 4.82	< 0.01
9 周	32	32	Fixed			9.00	1.82 ~ 44.59	0.01
12 周	155	155	Fixed	0%	0.45	2.46	1.43 ~ 4.23	< 0.01
18 周	30	30	Fixed	0%	0.82	5.71	1.72 ~ 18.94	< 0.01
总计	561	560	Fixed	36%	0.67	2.67	2.00 ~ 3.57	< 0.01

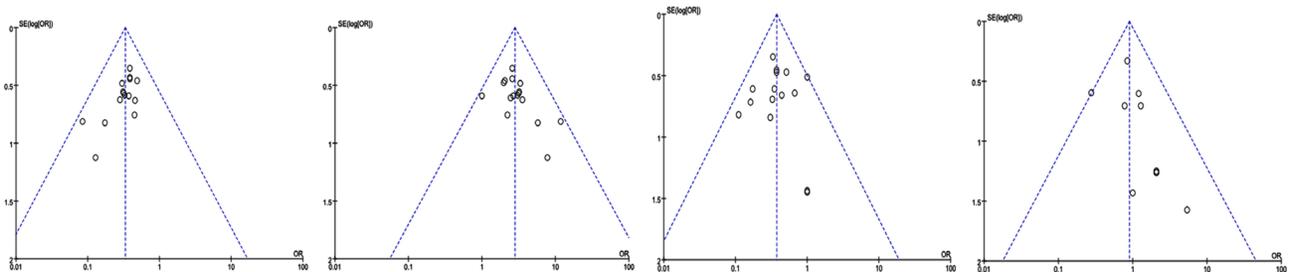


图 5 Meta 分析发表偏倚漏斗图

Fig 5 Meta analysis publication bias funnel diagram

A. ORR; B.DCR; C. 恶心呕吐 (nausea and vomiting); D. 腹泻 (diarrhea)

其功效和不良反应的高质量证据,通常将其作为一线和二线化疗失败的三线药物用于胃癌患者,但是,根据临床经验,许多医师和学者还发现它具有作为二线或一线治疗药物的潜力^[25-26]。

本研究结果显示,阿帕替尼联合替吉奥用于晚期胃癌的治疗,疗效较单用替吉奥组显著提高,ORR 和 DCR 差异有统计学意义。安全性方

面,联合治疗组手足综合征、高血压、蛋白尿的发生率较单用替吉奥高,恶心呕吐、腹泻、乏力和血小板降低发生率的差异无统计学意义。发生不良反应时,可对症治疗,调整剂量或停药。阿帕替尼常见高血压、蛋白尿、手足综合征等不良反应,可参考中国临床肿瘤学会抗肿瘤药物安全管理专家委员会的防治策略进行处理^[27]。

在敏感性分析中,分别对主要结局指标 ORR 和 DCR 结果的稳健性进行了验证,在亚组分析中分别探讨了阿帕替尼不同剂量和不同疗程对结果的影响,其中在阿帕替尼小剂量 250 mg 时,结果方向发生改变,其他剂量及疗程均未对结果产生影响,进一步说明 meta 分析结果较为稳健,同时提示在临床使用过程中,警惕小剂量阿帕替尼对晚期胃癌的治疗。

本研究严格按照 Cochrane 评价体系对文献进行整合分析,但仍存在以下不足:纳入的部分文献在分配隐藏和病例退出/失访等方面未予描述,可能存在实施偏倚;漏斗图提示本研究结果可能存在发表偏倚;本研究未能比较两药生存获益方面的差异纳入的研究;部分文献纳入的样本量较少,可靠性较低。因此,本研究所得结论仍需高质量、大样本的双盲随机对照试验加以验证。

综上所述,与单用替吉奥相比,阿帕替尼联合替吉奥能显著提高晚期胃癌患者的 ORR 和 DCR,但要警惕手足综合征、高血压和蛋白尿等不良反应的发生,其他不良反应相当。因此,阿帕替尼联合替吉奥在治疗晚期胃癌方面有较好的疗效和安全性。

参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estiMetas of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- 周家琛, 郑荣寿, 庄贵华, 等. 2000—2015 年中国肿瘤登记地区胃癌发病趋势及年龄变化 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2020, 34 (1): 1-5.
- Matt P, van Zwieten-Boot B, Rojas GC, et al. The European medicines agency review of Tegafur/Gimeracil/Oteracil (Teysuno™) for the treatment of advanced gastric Cancer when given in combination with Cisplatin: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for medicinal products for human use (CHMP) [J]. *Oncologist*, 2011, 16 (10): 1451-1457.
- 朱丹, 赵宏伟, 赵健琦, 等. 肿瘤分子靶向药物阿帕替尼的临床研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37 (2): 194-198.
- 冯久桓, 秦叔逵, 王琳. 甲磺酸阿帕替尼的研究现状与进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22 (4): 345-356.
- 中华人民共和国卫生部医政司. 胃癌诊疗规范 (2011 年版) [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2012, 4 (5): 62-71.
- Higgins JP, Green S. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions (Version 5.1.0)* [EB/OL]. [2012-01-05]. <http://www.cochrane-handbook.org>.
- 杨宁娟, 殷常春, 潘守杰, 等. 阿帕替尼联合替吉奥对老年晚期胃癌的疗效 [J]. *中国临床研究*, 2019, 32 (2): 162-165.
- 王芳. 阿帕替尼联合替吉奥治疗老年晚期胃癌的临床观察 [J]. *黑龙江医药*, 2019, 32 (1): 61-63.
- 吕晓燕. 阿帕替尼联合替吉奥治疗老年晚期胃癌的临床效果及安全性分析 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6 (34): 25-26.
- 陈昭君. 阿帕替尼联合替吉奥治疗晚期胃癌的应用价值体会 [J]. *临床研究*, 2019, 27 (6): 83-84.
- 艾良, 张麒. 阿帕替尼联合替吉奥二线治疗胃癌患者对 CA19-9、CEA、TSGF 水平的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2018, 33 (4): 541-543.
- 鲍瑜, 钱江, 宋文灿, 等. 阿帕替尼联合替吉奥一线治疗晚期胃癌临床研究 [J]. *中国药业*, 2019, 28 (11): 74-77.
- 文峰, 向燕, 王雷. 阿帕替尼片治疗晚期胃癌的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33 (7): 589-591.
- 闫晓红, 赵亚宁, 汪华, 等. 阿帕替尼联合奥沙利铂+替吉奥治疗晚期胃癌效果观察 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2017, 29 (11): 761-764.
- 李俊峰. 阿帕替尼治疗晚期胃癌的临床疗效及预后 [J]. *世界中医药*, 2017, 12 (2): 140.
- 李森, 晋国权, 陈蓉, 等. 甲磺酸阿帕替尼联合 SOX 方案二线治疗晚期胃癌的近期疗效及安全性 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26 (9): 736-741.
- 秦汝绪. 甲磺酸阿帕替尼与替吉奥治疗晚期胃癌的疗效和安全性比较分析 [J]. *医药界*, 2018, 1 (21): 44.
- 欧章松, 余锡贺, 张力苹, 等. 替吉奥联合阿帕替尼治疗晚期胃癌的效果及对患者肿瘤标志物的影响 [J]. *中国实用医刊*, 2019, 46 (6): 98-100.
- 郭明坤. 甲磺酸阿帕替尼联合化疗在治疗中晚期胃癌中的疗效观察 [J]. *中国保健营养*, 2018, 28 (28): 107.
- 白雪. 替吉奥联合阿帕替尼一线治疗晚期胃癌的临床效果观察 [J]. *母婴世界*, 2018 (13): 114.
- 胡姗姗, 向梅, 卢萍, 等. 阿帕替尼联合替吉奥治疗老年一线晚期胃癌患者的临床效果分析 [J]. *养生保健指南*, 2016 (36): 33.
- Marrelli D, Pedrazzani C, Roviello F. Gastric cancer prognosis: Strong correlation between incidence and survival [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17 (1): 340-341.
- Geng R, Li J. Apatinib for the treatment of gastric cancer [J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2015, 16 (1): 117-122.
- Roviello G, Ravelli A, Polom K, et al. Apatinib: A novel receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2016, 372 (2): 187-191.
- Zhang Y, Gou M, Han C, et al. Efficacy and safety of apatinib as second-line therapy for advanced gastric cancer: A single-center observational study [J]. *Anti-Cancer Drug*, 2017, 29 (2): 1.
- 秦叔逵, 李进. 阿帕替尼治疗胃癌的临床应用专家共识 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015 (9): 841-847.

(收稿日期: 2021-01-08; 修回日期: 2021-03-15)

胰岛素联合低分子肝素治疗高脂血症性急性胰腺炎有效性和安全性的 meta 分析

吴发建, 刘静, 陈道荣* (重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

摘要: **目的** 系统评价胰岛素联合低分子肝素治疗高脂血症性急性胰腺炎的有效性和安全性。**方法** 检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science、CNKI、万方、维普、CBM 数据库自建库至 2020 年 11 月, 由两名评审员筛选文献、提取资料并评估质量, 采用 RevMan 5.3 软件进行统计分析。**结果** 共纳入 9 项随机对照试验 (RCT) 研究, 共计 727 名患者。联合组与低分子肝素治疗组比较, 显效率、总有效率、胃肠功能恢复时间、三酰甘油 (TG) 水平、C 反应蛋白 (CRP) 水平、白介素-6 (IL-6) 水平、 α 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与胰岛素组比较, 胃肠功能恢复时间、住院时间、三酰甘油及 CRP 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-6 水平差异无统计学意义; 与常规治疗组比较, 胃肠功能恢复时间、TG 及 CRP 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组药物不良反应发生率均较低 ($P > 0.05$)。**结论** 与常规内科治疗或单药治疗相比, 胰岛素联合低分子肝素对高脂血症性急性胰腺炎具有显著的疗效和较好的安全性, 可考虑作为一线治疗方案。

关键词: 胰岛素; 低分子肝素; 随机对照试验; 高脂血症; 胰腺炎; meta 分析

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1976-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.040

Efficacy and safety of insulin combined with low molecular weight heparin for hyperlipidemic acute pancreatitis: A meta-analysis

WU Fa-jian, LIU Jing, CHEN Dao-rong* (Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract: Objective To review the efficacy and safety of insulin combined with low molecular weight heparin (LMWH) hyperlipidemic acute pancreatitis systematically. **Methods** PubMed, Cochrane Library, Embase, Web of Science, CNKI, Wanfang Data, VIP and CBM were searched for related articles up to November 2020. Two reviewers independently screened the articles, extracted data, and assessed the quality. The meta-analysis was conducted with RevMan 5.3. **Results** Nine randomized controlled trials were included, with 727 patients in total. Compared with the combined treatment group, statistical differences was found ($P < 0.05$) in efficiency rate, total effective rate, gastrointestinal function recovery time, triglyceride level, CRP level, IL-6 level and TNF- α level in LMWH group. Significant differences was found in gastrointestinal function recovery time, hospital stay, triglyceride level and CRP level ($P < 0.05$), but not in IL-6 level as compared with the insulin group ($P < 0.05$). Significant differences was found in gastrointestinal function recovery time, triglyceride level and CRP level in the conventional treatment group. The incidence of adverse drug reactions was low in all groups without significant difference. **Conclusion** Compared with conventional therapy or monotherapy, insulin combined with LMWH has better efficacy and safety for hyperlipidemic acute pancreatitis, and may be considered as a first-line treatment.

Key words: insulin; low molecular weight heparin; randomized controlled trial; hyperlipidemia; pancreatitis; meta-analysis

作者简介: 吴发建, 男, 硕士研究生, 主要从事消化系统疾病研究, E-mail: 1173921237@qq.com *通信作者: 陈道荣, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病研究, E-mail: chendrcdr@qq.com

随着我国人群生活水平的提高和饮食结构的改变,高脂血症性急性胰腺炎(hyperlipidemic acute pancreatitis, HLAP),尤其是高三酰甘油血症(HTG)所致急性胰腺炎(AP)的发病率愈来愈高,且具有年轻化、重症化的特点,有超越酒精性胰腺炎成为第二大病因的趋势^[1-3],需引起足够重视。其机制可能与三酰甘油(TG)分解的游离脂肪酸对胰腺本身的毒性作用及其引起的胰腺微循环障碍等有关^[4-6]。当血清TG ≥ 11.3 mmol·L⁻¹时,极易发生AP;当TG < 5.65 mmol·L⁻¹时,发生AP的危险性减少^[2]。目前治疗HLAP的关键是迅速降低TG水平,主要手段包括胰岛素联合肝素(insulin and heparin therapy, IHT)、血浆置换(plasma exchange, PE)等。近年来,有大量研究表明低分子肝素(low molecular weight heparin, LMWH)治疗HLAP效果明显,而胰岛素联合LMWH的疗效显著,在许多方面不亚于PE^[7],但其确切疗效和安全性尚缺乏循证医学数据支持。本研究旨在运用循证医学方法对胰岛素联合LMWH治疗HLAP的有效性和安全性进行评价。

1 资料与方法

1.1 检索策略

计算机检索PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science等英文数据库,CNKI、万方、维普、CBM等中文数据库,搜集所有胰岛素联合LMWH治疗HLAP的相关研究,检索时间为建库至2020年11月。英文检索词为“insulin”“heparin”“lipid-lowering agent”“acute pancreatitis”,中文检索词为“胰岛素”“肝素”“降脂药物”“急性胰腺炎”等,按如下检索式进行检索:

#1 insulin (胰岛素) [Title/Abstract]

#2 heparin (肝素) [Title/Abstract]

#3 lipid-lowering agent (降脂药物) [Title/Abstract]

#4 acute pancreatitis (急性胰腺炎) [Title/Abstract]

#1 AND (#2 OR #3) AND #4

1.2 纳入标准及排除标准

1.2.1 纳入标准

(1) 纳入类型:前瞻性、随机对照试验(RCT)。

(2) 研究对象:① AP诊断均符合相应时期中华医学会胰腺病学组制定的《中国急性胰腺炎诊治指南》标准;② 血清TG水平 > 11.3 mmol·L⁻¹,

或血清TG值介于5.6~11.3 mmol·L⁻¹,但呈乳糜状者;③ 除外其他病因引起的AP。

(3) 干预措施:联合组[胰岛素+LMWH+常规] vs 对照组[胰岛素/LMWH+常规或单用常规];常规治疗:禁食水、持续胃肠减压、静脉营养支持、维持电解质平衡、抗炎及抑酸、补液、镇痛、解痉等对症治疗。

(4) 结局指标主要有:① 显效率=显效例数/总例数 $\times 100\%$;② 总有效率=(显效+有效)例数/总例数 $\times 100\%$;③ 胃肠功能恢复时间;④ 住院时间;⑤ TG水平;⑥ CRP;⑦ IL-6;⑧ TNF- α ;⑨ 不良反应。临床疗效的判定,显效:患者临床症状,各项检查指标及体征恢复正常或明显好转;有效:患者临床症状,各项检查指标及体征有所好转。

1.2.2 排除标准 ① 动物研究;② 病例报告、系统评价、综述及重复发表的文献;③ 资料不全、数据无法利用及未能获取全文的文献。

1.3 文献筛选与资料提取

由两名研究人员相互独立通过上述检索方式获取文献,并阅读题目或摘要对纳入文献进行初次筛选,去除明显不符合纳入标准的文献,再通过阅读全文的方式确定满足上述纳入标准的文献,并依照排除标准对文献进行相应排除。若对纳入或排除的文献产生分歧,则由第三位研究员协商解决。数据提取内容包括作者、发表时间、样本量、干预内容、研究对象疾病疗效判定的方法、结局指标等。

1.4 文献质量及偏移评估

采用Cochrane系统评价员手册5.1.0偏倚风险评价工具进行评价,由两位评价者独立进行方法学质量评价,如有分歧根据第三方意见达成一致。此外,为明确评价纳入研究的质量,本研究同时采用改良Jadad评分对纳入的研究进行评价。改良Jadad评分量表满分7分,评分4分及以上为较高质量研究,反之为低质量研究。

1.5 统计学分析

使用RevMan 5.3软件进行统计学分析。异质性检验使用 I^2 检验, I^2 取值范围为[0%, 100%]。当 $I^2 \leq 50\%$, $P \geq 0.1$ 时,提示纳入分析的各研究结果间异质性小,使用固定效应模型计算合并效应量;当 $I^2 > 50\%$, $P < 0.1$ 时,提示纳入分析的研究间存在异质性,通过分析其可能的异质性来源对文献进行评估,必要时可进行亚组分析。分类资料采用相对危险度(RR)及其95%置信区间(95%CI)作为分析统计量;计量资料采用均数差(MD)及其95%置信区间(95%CI)

作为分析统计量。使用 Stata 16.0 进行发表偏倚检验，对其中连续型变量采用 Egger's 检验，当 $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入研究基本特征及方法学质量评价

本研究共检出相关文献 2478 篇，通过剔除、阅读文题、摘要及全文，根据纳入和排除标准剔除文献 2469 篇，最终纳入 9 篇^[8-16] RCT，包括中文 8 篇，英文 1 篇。详细筛选过程如图 1。纳入研究基本信息见表 1。9 项临床研究共纳入了 727 名患者，其中联合组 287 名患者，对照组试验分三类，其中 LMWH 组 192 名，胰岛素组 171 名，常规组 77 名。9 项研究均为 RCT，其中 6 项^[9-12, 14-15] 研究采用随机数字表法进行分组，其他研究未说明分组方法；均未描述是否分配隐藏及使用盲法。5 项研究^[10-12, 14-15] 的质量较高（Jadad 评分 ≥ 4 分），所有试验均报道了两组基线资料具有可比性。基线可比性及改良 Jadad 评分见表 1。方法学质量评价结果见图 2。

2.2 Meta 分析

2.2.1 显效率 共纳入 4 项研究^[8, 10-11, 14] 进行 meta 分析，各研究间无异质性 ($I^2 = 24\%$, $P = 0.27$)，故采用固定效应模型进行合并效应量。联合治疗组显效率 70.00%，对照组显效率 40.00% ($RR = 1.75$, $95\%CI: 1.40 \sim 2.19$, $P < 0.000 01$)，见图 3。

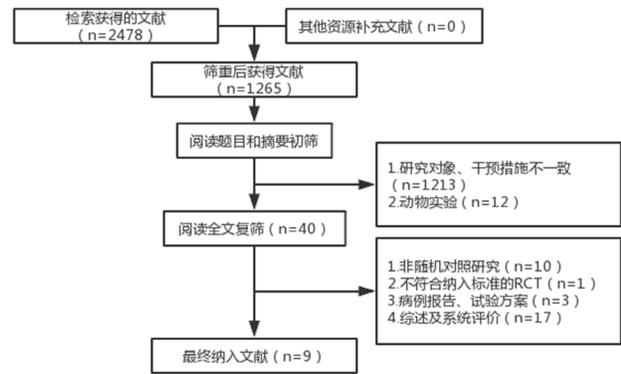


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flow diagram of literature filtration

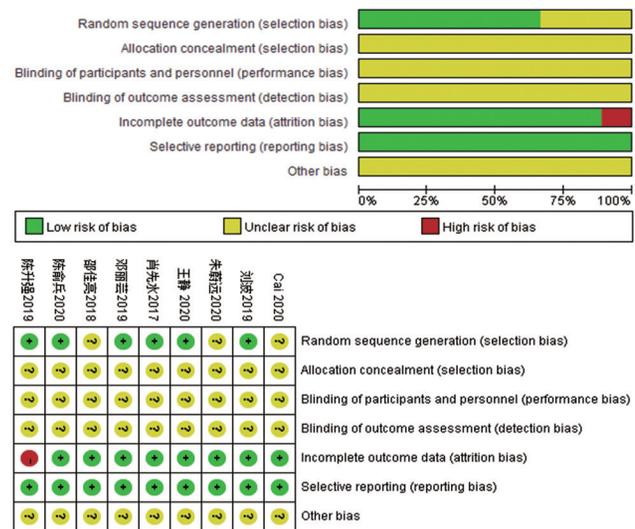


图 2 纳入 RCT 的风险偏倚评估

Fig 2 Assessment of risk bias in RCTs

表 1 纳入文献的基本特征

Tab 1 Characteristics of included studies

研究	联合组 / 对照组		干预措施	疗程 / d	结局指标	改良 Jadad 评分
	年龄 / 岁	样本量				
刘波 2019 ^[12]	NR	33/31	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 常规	14	③④⑥⑦	4
	NR	33/32	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	14	③④⑥⑦	4
	NR	33/32	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	14	③④⑥⑦	4
朱蔚远 2020 ^[16]	39.9 ± 13.21 / 39.8 ± 13.18	28/28	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	7	③④⑤⑥⑨	3
肖先水 2017 ^[15]	39.97 ± 8.12 / 40.96 ± 7.61	20/20	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 常规	5	③⑤⑥⑨	4
	39.97 ± 8.12 / 42.66 ± 5.41	20/20	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	5	③⑤⑥⑨	4
	39.97 ± 8.12 / 41.15 ± 4.92	20/20	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	5	③⑤⑥⑨	4
邓丽芸 2019 ^[11]	41.05 ± 11.04 / 39.82 ± 10.73	44/44	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	5	①②⑤⑥⑦⑧⑨	4
邵佳亮 2018 ^[13]	41.0 ± 12.6	27/26	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	7	③④⑤⑥⑨	3
陈俞兵 2020 ^[10]	40.7 ± 2.1 / 40.5 ± 2.1	26/26	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 常规	9	①②⑤⑥	4
	40.7 ± 2.1 / 41.1 ± 1.9	26/26	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	9	①②⑤⑥	4
	40.7 ± 2.1 / 40.8 ± 2.0	26/26	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	9	①②⑤⑥	4
陈升强 2019 ^[9]	40.95 ± 12.46 / 39.10 ± 10.41	39/39	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 胰岛素 + 常规	14	③⑤⑦⑧	3
Cai 2020 ^[8]	42.9 ± 14.1 / 43.4 ± 14.2	40/40	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	5	①②⑥⑦⑧⑨	3
王静 2020 ^[14]	44.65 ± 2.78 / 44.18 ± 2.94	30/30	胰岛素 + 低分子肝素 + 常规 / 低分子肝素 + 常规	12	①②⑤⑥⑦⑧	4

注 (Note): ① 显效率; ② 总有效率; ③ 胃肠功能恢复时间; ④ 住院时间; ⑤ TG 水平; ⑥ CRP 水平; ⑦ IL-6 水平; ⑧ TNF- α 水平; ⑨ 不良反应; NR: 未提及 (① significant efficiency rate; ② total effective rate; ③ gastrointestinal function recovery time; ④ hospitalization time; ⑤ TG level; ⑥ CRP level; ⑦ IL-6 level; ⑧ TNF- α level; ⑨ adverse drug reactions; NR: it is not reported)。

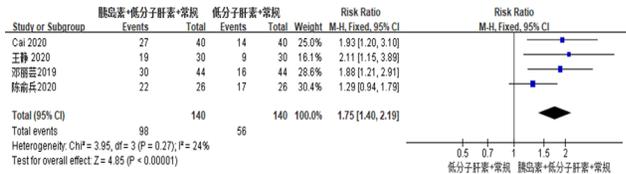


图3 两组患者治疗前后显著效率的 meta 分析森林图
Fig 3 Forest plot of meta-analysis of significant efficacy rate in both groups

2.2.2 总有效率 共纳入 4 项研究^[8, 10-11, 14], 各研究间无异质性 ($I^2 = 0\%$, $P = 0.65$), 故采用固定效应模型进行合并效应量。联合治疗组总有效率 93.57%, 对照组总有效率 77.14% ($RR = 1.21$, $95\%CI: 1.10 \sim 1.34$, $P = 0.0002$), 见图 4。

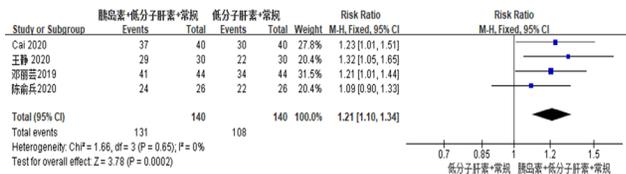


图4 两组患者治疗前后总有效率的 meta 分析森林图
Fig 4 Forest plot of meta-analysis of total effective rate in both groups

2.2.3 胃肠功能恢复时间 共纳入 5 项研究^[9, 12-13, 15-16], 异质性检验结果显示各研究间有异质性, 进一步行亚组分析, 显示各组仍有异质性, 故采用随机效应模型进行合并效应量。联合组与单用低分子肝素相比, 胃肠功能恢复时间缩短 ($MD = -1.42$, $95\%CI: -2.71 \sim -0.13$, $P = 0.03$); 与单用胰岛素相比, 胃肠功能恢复时间缩短 ($MD = -1.67$, $95\%CI: -2.59 \sim -0.75$, $P = 0.0004$); 与常规相比, 胃肠功能恢复时间缩短 ($MD = -3.54$, $95\%CI: -4.89 \sim -2.19$, $P < 0.00001$), 见图 5。

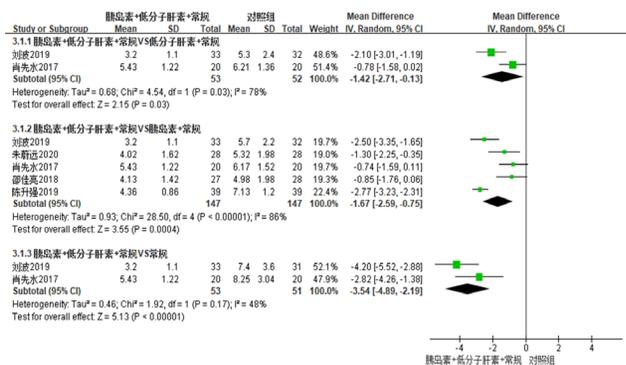


图5 两组患者治疗前后胃肠功能恢复时间的 meta 分析森林图
Fig 5 Forest plot of meta-analysis of gastrointestinal function recovery in both groups

2.2.4 住院时间 共纳入 3 项研究^[12-13, 16], 各研究间无异质性 ($I^2 = 21\%$, $P = 0.28$), 故采用固定效应模型进行合并效应量。住院时间缩

短 ($MD = -2.80$, $95\%CI: -3.72 \sim -1.87$, $P < 0.00001$), 见图 6。

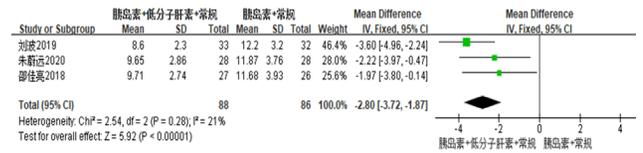


图6 两组患者治疗前后住院时间的 meta 分析森林图
Fig 6 Forest plot of meta-analysis of hospitalization in both groups

2.2.5 TG 水平 共纳入 7 项研究^[9-11, 13-16] 进行分析, 异质性检验结果显示各研究间有异质性, 进一步行亚组分析, 显示除常规对照组外均有异质性, 故采用随机效应模型进行合并效应量。联合组与单用低分子肝素相比, TG 水平降低 ($MD = -1.25$, $95\%CI: -2.32 \sim -0.18$, $P = 0.02$); 与单用胰岛素相比, TG 水平降低 ($MD = -0.99$, $95\%CI: -1.89 \sim -0.09$, $P = 0.03$); 与常规相比, TG 水平降低 ($MD = -1.85$, $95\%CI: -2.27 \sim -1.42$, $P < 0.00001$), 见图 7。

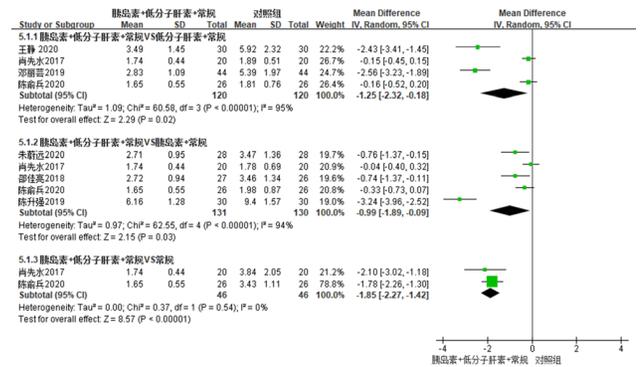


图7 两组患者治疗前后三酰甘油水平的 meta 分析森林图
Fig 7 Forest plot of meta-analysis of TG level in both groups

2.2.6 CRP 水平 共纳入 8 项研究^[8, 10-16], 异质性检验结果显示各研究间有异质性, 进一步行亚组分析, 显示各组仍有异质性, 故采用随机效应模型进行合并效应量。联合组与单用低分子肝素相比, CRP 水平降低 ($MD = -5.21$, $95\%CI: -7.01 \sim -3.41$, $P < 0.00001$); 与单用胰岛素相比, CRP 水平降低 ($MD = -5.80$, $95\%CI: -8.04 \sim -3.56$, $P < 0.00001$); 与常规相比, CRP 水平降低 ($MD = -14.09$, $95\%CI: -19.21 \sim -8.96$, $P < 0.00001$), 见图 8。

2.2.7 IL-6 水平 共纳入 5 项研究^[8-9, 11-12, 14], 异质性检验结果显示各研究间有异质性, 进一步行亚组分析, 显示各组仍有异质性, 故采用随机效应模型进行合并效应量。联合组与单用低分子肝素相比, IL-6 水平降低 ($MD = -10.01$, $95\%CI: -15.29 \sim -4.73$, $P = 0.0002$); 与单用胰岛素相比, IL-6 水平降低

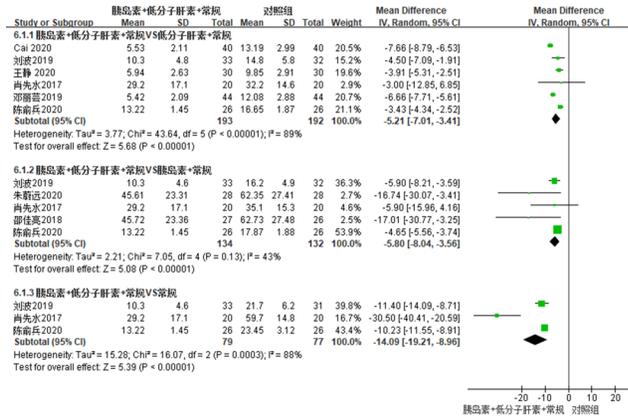


图 8 两组患者治疗前后 CRP 水平的 meta 分析森林图
Fig 8 Forest plot of meta-analysis of CRP level in both groups

($MD = -15.65$, $95\%CI: -32.10 \sim 0.81$, $P = 0.06$), 见图 9。

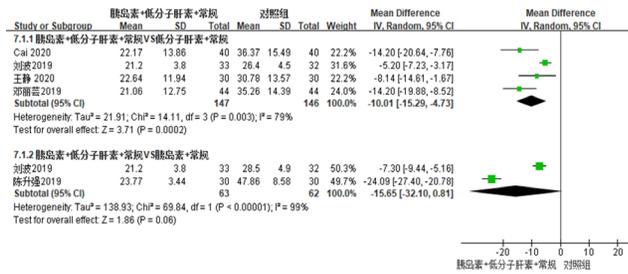


图 9 两组患者治疗前后 IL-6 水平的 meta 分析森林图
Fig 9 Forest plot of meta-analysis of IL-6 level in both groups

2.2.8 TNF- α 水平 共纳入 4 项研究^[8-9, 11, 14], 各研究间有异质性 ($I^2 = 99\%$, $P < 0.0001$), 故采用随机效应模型进行合并效应量。联合组与单用低分子肝素相比, TNF- α 水平降低 ($MD = -90.68$, $95\%CI: -126.43 \sim -54.92$, $P < 0.0001$), 见图 10。

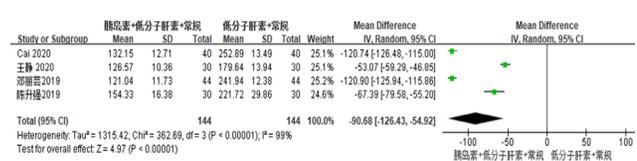


图 10 两组患者治疗前后 TNF- α 水平的 meta 分析森林图
Fig 10 Forest plot of meta-analysis of TNF- α level in both groups

2.3 安全性评价 (不良反应)

胰岛素使用时会根据血糖监测情况适时调整, 安全性好; LMWH 的主要不良反应 (ADR) 为皮疹和出血, 9 篇研究中共有 5 篇报道了 ADR 的发生情况, 其中两篇报道了凝血指标, 结果无明显差异^[13, 16], 两篇报道了 ADR 发生率, 两组均低, 结果显示无明显差异^[11]或联合组更低^[8], 1 篇报道无 ADR 发生^[15]。均未见异常出血、低血糖等严重 ADR 发生。

2.4 敏感性分析

对剔除 ADR 后的各项结局指标分别用固定和随机两种效应模型进行分析, 具体结果见表 2, 提示 IL-6 水平在胰岛素亚组的两种模型分析结果发生了本质改变 [随机效应模型: $MD = -15.65$, $95\%CI: -32.10 \sim 0.81$, $P = 0.06$, 固定效应模型: $MD = -12.24$, $95\%CI: -14.04 \sim -10.45$, $P < 0.0001$], 仍需更多大样本、高质量的研究进行论证; 其他结局指标的 RR 或 MD 值及其 95%CI 均相差不大, 且结果无本质改变, 证明本 meta 分析的合并结果基本可靠。对各组 meta 分析逐个剔除入选的文章重新进行分析计算, 结果与未剔除前比较, 结果未发生有统计学意义的改变, 证实该 meta 分析结果稳定可靠。

表 2 两种不同效应模型的分析结果

Tab 2 Analysis of two effect models

指标	固定效应模型	随机效应模型
显效率	$RR = 1.75$, $95\%CI: 1.40 \sim 2.19$, $P < 0.0001$	$RR = 1.67$, $95\%CI: 1.29 \sim 2.15$, $P < 0.0001$
总有效率	$RR = 1.21$, $95\%CI: 1.10 \sim 1.34$, $P = 0.0002$	$RR = 1.20$, $95\%CI: 1.09 \sim 1.33$, $P = 0.0003$
胃肠恢复	肝素组 $MD = -1.35$, $95\%CI: -1.96 \sim -0.75$, $P < 0.0001$	$MD = -1.42$, $95\%CI: -2.71 \sim -0.13$, $P = 0.03$
时间	胰岛素组 $MD = -2.04$, $95\%CI: -2.36 \sim -1.72$, $P < 0.0001$	$MD = -1.67$, $95\%CI: -2.59 \sim -0.75$, $P = 0.0004$
	常规组 $MD = -3.57$, $95\%CI: -4.54 \sim -2.59$, $P < 0.0001$	$MD = -3.54$, $95\%CI: -4.89 \sim -2.19$, $P < 0.0001$
住院时间	$MD = -2.80$, $95\%CI: -3.72 \sim -1.87$, $P < 0.0001$	$MD = -2.75$, $95\%CI: -3.80 \sim -1.69$, $P < 0.0001$
TG 水平	肝素组 $MD = -0.50$, $95\%CI: -0.71 \sim -0.29$, $P < 0.0001$	$MD = -1.25$, $95\%CI: -2.32 \sim -0.18$, $P = 0.02$
	胰岛素组 $MD = -0.59$, $95\%CI: -0.80 \sim -0.37$, $P < 0.0001$	$MD = -0.99$, $95\%CI: -1.89 \sim -0.09$, $P = 0.03$
	常规组 $MD = -1.85$, $95\%CI: -2.27 \sim -1.42$, $P < 0.0001$	$MD = -1.85$, $95\%CI: -2.27 \sim -1.42$, $P < 0.0001$
CRP 水平	肝素组 $MD = -5.29$, $95\%CI: -5.82 \sim -4.76$, $P < 0.0001$	$MD = -5.21$, $95\%CI: -7.01 \sim -3.41$, $P < 0.0001$
	胰岛素组 $MD = -4.92$, $95\%CI: -5.76 \sim -4.08$, $P < 0.0001$	$MD = -5.80$, $95\%CI: -8.04 \sim -3.56$, $P < 0.0001$
	常规组 $MD = -10.74$, $95\%CI: -11.92 \sim -9.56$, $P < 0.0001$	$MD = -14.09$, $95\%CI: -19.21 \sim -8.96$, $P < 0.0001$
IL-6 水平	肝素组 $MD = -6.96$, $95\%CI: -8.72 \sim -5.20$, $P < 0.0001$	$MD = -10.01$, $95\%CI: -15.29 \sim -4.73$, $P = 0.0002$
	胰岛素组 $MD = -12.24$, $95\%CI: -14.04 \sim -10.45$, $P < 0.0001$	$MD = -15.65$, $95\%CI: -32.10 \sim 0.81$, $P = 0.06$
TNF- α 水平	$MD = -100.17$, $95\%CI: -103.29 \sim -97.04$, $P < 0.0001$	$MD = -90.68$, $95\%CI: -126.43 \sim -54.92$, $P < 0.0001$

2.5 发表偏倚分析

用 Egger's 检验法分别对纳入研究的 TG 水平和 CRP 水平指标进行分析, 结果提示均无明显发表偏倚 ($P > 0.05$), 具体结果见表 3。

表 3 各组 Egger's 检验 P 值结果
Tab 3 P value of the Egger's test of groups

组别	Egger's 检验 P 值	
	TG 水平	CRP 水平
肝素组	0.260	0.467
胰岛素组	0.340	0.203
常规组	—	0.356

注 (Note): “—” 无法求值 (“—” means unable to evaluate)。

3 讨论

近年来, 随着 HLAP 的发病率升高, 关于 HLAP 的研究也愈来愈多, 但其具体发病机制尚不明确。目前较为认可的有以下几种可能: 游离脂肪酸过多, 微循环障碍, 钙超载, 基因多态性, 氧化应激等^[4-6, 17-18]。对于 HLAP 的治疗当前也缺乏明确的指南或共识进行指导^[19]。

脂蛋白脂酶 (LPL) 是调节脂质代谢的关键酶, 其由脂肪细胞、骨骼肌细胞、乳腺细胞等实质细胞的内皮细胞合成和分泌, 释放后将 TG 水解成甘油和游离脂肪酸, 从而降解乳糜微粒。肝素可以刺激内皮细胞释放 LPL 入血, 加快 TG 降解; 同时有研究表明 LMWH 具有抗炎作用, 能防止微血栓形成, 改善微循环障碍, 其可使毛细血管扩张和增强通透性, 并抑制血小板聚集, 发挥抗凝血作用^[20-24]。此外, LMWH 清除氧自由基, 直接抑制胰腺组织和胰腺蛋白酶进入血浆, 诱导胰腺腺泡凋亡^[25]。但需要指出的是, 在严重的高脂血症引起的胰腺炎中, 长期应用肝素可继发 LPL 耗竭导致 TG 水平升高^[26]。而胰岛素可以提高 LPL 的活性, 促进脂肪细胞的 LPL 表达^[27], 以降低 TG, 因此对于伴或不伴糖代谢异常患者均有较好的疗效^[28]。Kuchay 等^[29] 研究显示, 胰岛素与肝素联合治疗安全有效, 且无并发症及 LPL 减少。多项研究指出, 这种联用可协同增强疗效, 迅速降低 TG 水平, 以降低肝素引起 LPL 耗竭的风险。

本研究结果表明, 联合组患者的总有效率明显高于对照组, 对于降低 TG 和炎性指标 (CRP、IL-6 和 TNF- α), 缩短胃肠功能恢复时间和住院时间也有明确的效果。胰岛素联合 LMWH 可明显提高 HLAP 治疗的总有效率; 对比试验组与对照组患者胃肠功能恢复时间和住院时间的缩短、治疗前后

的血脂水平和各炎性指标的降低, 结果均显示治疗组疗效更佳。在安全性方面, 试验组和对照组均有较好的安全性, 差异无统计学意义。

目前对于 HLAP 的治疗, 包括 PE、血液滤过等在内的血液净化成为早期降脂治疗的一线方案已基本达成共识^[30]。而戴伟等^[31] 以及 Jin 等^[7] 的研究显示, IHT 与血液净化在 TG、淀粉酶、CT 严重指数评分、腹痛缓解时间、淀粉酶转阴时间、住院时间及病死率方面无明显差异。不仅如此, 与血浆置换相比, IHT 的治疗费用更低, 无治疗相关不良反应发生^[7]。由此可见, 胰岛素联合 LMWH 治疗 HLAP 安全有效, 可考虑作为一线治疗方案。

本研究的局限性包括: ① 纳入文献的数量较少、样本量较小; ② 部分纳入分析的研究未描述随机方法, 未实施盲法或未阐述分配隐藏方法等, 文献质量不高; ③ 纳入的英文文献较少, 均为国内研究, 缺乏多中心研究; ④ 缺乏比较认可的疗效评价指标, 部分症状相关的判断标准不统一; ⑤ 缺乏对病情严重程度的亚组分析; ⑥ 研究对象病程各异, 对疗效可能产生影响。

参考文献

- [1] 朱亮, 祝荫, 何文华, 等. 江西省 2625 例急性胰腺炎临床特征分析 [J]. 中华消化杂志, 2014, 34 (8): 531-534.
- [2] 杜奕奇, 陈其奎, 李宏宇, 等. 中国急性胰腺炎诊治指南 (2019 年, 沈阳) [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35 (12): 2706-2711.
- [3] Li X, Ke L, Dong J, et al. Significantly different clinical features between hypertriglyceridemia and biliary acute pancreatitis: A retrospective study of 730 patients from a tertiary center [J]. BMC Gastroenterol, 2018, 18: 89.
- [4] Garg R, Rustagi T. Management of hypertriglyceridemia induced acute pancreatitis [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018 (12): 1-12.
- [5] Kimura W, Mossner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats [J]. Int J Pancreatol, 1996, 20 (3): 177-184.
- [6] Yang F, Wang Y, Sternfeld L, et al. The role of free fatty acids, pancreatic lipase and Ca⁺ signalling in injury of isolated acinar cells and pancreatitis model in lipoprotein lipase-deficient mice [J]. Acta Physiol (Oxf), 2009, 195 (1): 13-28.
- [7] Jin M, Peng JM, Zhu HD, et al. Continuous intravenous infusion of insulin and heparin vs plasma exchange in hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis [J]. J Dig Dis, 2018, 19 (12): 766-772.
- [8] Cai X, Wang K, Wang J, et al. Effects of low molecular weight heparin calcium combined with insulin on immune

- function, inflammatory response, haemorrhage and coagulation in patients with high triglyceride acute pancreatitis [J]. *Acta Medica Mediterr*, 2020, 36 (3): 1557-1561.
- [9] 陈升强. 低分子肝素和胰岛素降脂治疗对高脂血症急性重症胰腺炎患者预后的影响 [J]. *吉林医学*, 2019, 40 (10): 2213-2215.
- [10] 陈俞兵, 周宇, 申屠刚. 胰岛素联合低分子肝素治疗高脂血症急性胰腺炎的临床效果及安全性分析 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28 (5): 370-373.
- [11] 邓丽芸, 肖涌, 刘劫, 等. 低分子肝素钙联合胰岛素治疗重症高脂血症急性胰腺炎的疗效及对血清氧化应激和炎症因子的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36 (2): 209-213.
- [12] 刘波, 罗强, 张毅, 等. 低分子肝素联合强化胰岛素在基层医院治疗高脂血症急性胰腺炎的临床观察 [J]. *医学理论与实践*, 2019, 32 (3): 322-324.
- [13] 邵佳亮, 周小娟, 黎顺松. 低分子量肝素钙联合胰岛素治疗高脂血症急性胰腺炎的临床研究 [J]. *南通大学学报 (医学版)*, 2018, 38 (2): 154-155.
- [14] 王静. 胰岛素联合低分子肝素钙对重症高脂血症性 AP 患者生化指标和炎症因子的影响 [J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2020, 4 (17): 44-45.
- [15] 肖先水, 苏晋簇, 蒋佑成. 低分子肝素、胰岛素联合治疗高脂血症急性胰腺炎的疗效观察 [J]. *中华胰腺病杂志*, 2017, 17 (4): 265-267.
- [16] 朱蔚远. 低分子量肝素钙联合胰岛素治疗高脂血症急性胰腺炎的临床研究 [J]. *中国社区医师*, 2020, 36 (16): 29-30.
- [17] Chang YT, Chang MC, Su TC, et al. Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation/variant/haplotype and tumor necrosis factor (TNF) promoter polymorphism in hyperlipidemic pancreatitis [J]. *Clin Chem*, 2008, 54 (1): 131-138.
- [18] Yan MX, Li YQ, Meng M, et al. Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347 (1): 192-199.
- [19] Alfred A, Emmanouil P, Martin C, et al. A systematic review of the epidemiology, pathophysiology and current management of hyperlipidaemic pancreatitis [J]. *Clinical Nutrition*, 2018, 37 (6): 1810-1822.
- [20] Qiu F, Lv XS, Huang YK. Effect of low molecular weight heparin on pancreatic microcirculation in severe acute pancreatitis in a rodent model [J]. *Chinese Medical Journal*, 2007, 120 (24): 2260-2263.
- [21] 范钦桥, 陈书伟, 胡秀红, 等. 低分子量肝素治疗重症急性胰腺炎的机制研究 [J]. *现代医药卫生*, 2008, 24 (14): 2065-2066.
- [22] 刘立涛, 滑志娟, 程树杰, 等. 小剂量低分子肝素对重症急性胰腺炎大鼠胰腺微循环的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2007, 36 (10): 1289-1291.
- [23] 潘小季, 吕新生, 段炼, 等. 甘遂和低分子量肝素联合应用治疗重症急性胰腺炎的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (11): 831-835.
- [24] 吴同飞, 朱功兵, 张杨, 等. 低分子肝素治疗重症急性胰腺炎的临床效果分析及机制研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2016, 19 (10): 777-779.
- [25] 范钦桥, 陈书伟, 杨根辉, 等. 低分子量肝素诱导重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国医师杂志*, 2009, 11 (3): 342-344.
- [26] Wayne TJ. Concerns about heparin therapy for hypertriglyceridemia [J]. *Arch Intern Med*, 2010, 170 (1): 108-109.
- [27] Ong JM, Kirchgessner TG, Schotz MC, et al. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263 (26): 12933-12938.
- [28] Park SY, Chung JO, Cho DK, et al. Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis treated with insulin in a nondiabetic patient [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2010, 55 (6): 399-403.
- [29] Kuchay MS, Farooqui KJ, Bano T, et al. Heparin and insulin in the management of hypertriglyceridemia-associated pancreatitis: Case series and literature review [J]. *Arch Endo-crinol Metab*, 2017, 61 (2): 198-201.
- [30] 浙江省医学会重症医学分会. 浙江省重症急性胰腺炎诊治专家共识 [J]. *浙江医学*, 2017, 39 (14): 1131-1150, 1161.
- [31] 戴伟, 周瑞祥, 严骏, 等. 低分子量肝素钙联合胰岛素治疗高脂血症性重症胰腺炎的临床观察 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2020, 49 (4): 500-503.

(收稿日期: 2021-01-11; 修回日期: 2021-03-15)

欧美细胞治疗产品上市后研究的经验及对我国的启示

田文淼, 梁毅 (中国药科大学国际医药商学院, 南京 210009)

摘要: 细胞治疗产品作为一种活细胞药物, 不仅制备技术复杂, 在体内的作用具有一定不可控性, 而且某些作用机制尚未研究透彻, 所以在疗效显著的同时也存在很大的风险, 因此上市后研究十分重要。本文就美国和欧盟对细胞治疗产品上市后研究的一般性要求和特殊性要求进行介绍, 并以一款嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 细胞治疗产品为例, 分析其上市后研究的实施情况, 再结合我国现状, 总结出欧美先进管理经验对我国的启示。建议在完善药品上市后研究的一般性管理框架的基础之上, 注重细胞治疗产品的特殊性, 增加具有针对性的要求, 并贯彻风险管理的要求, 实行分级分类管理, 加强细胞治疗产品上市后的持续管理。

关键词: 细胞治疗产品; 上市后研究; 嵌合抗原受体 T 细胞

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1983-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.041

Post-market research of cell therapy products in Europe and America and their implications for China

TIAN Wen-miao, LIANG Yi (*School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009*)

Abstract: As a living cell medicine, cell therapy products have not only complicated preparation technology, but also some uncontrollable effect in the body, whose mechanism of action remains unclear. Despite its outstanding curative effect, possible risks exist. Therefore, post-market research is very important. This article introduced both the general requirements and specific requirements for the post-market research of cell therapy products in the United States and the European Union, and used a chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) product as an example to analyze the implementation of its post-market research. Referring to the current situation in China, we summed up management experience of Europe and America. Besides improving the general management framework for post-market research of drugs, we should pay attention to the particularity of cell therapy products and targeted requirements. Hierarchical and classified risk management is needed to strengthen the post-market research of cell therapy products.

Key words: cell therapy product; post-market research; chimeric antigen receptor T cell

近年来, 细胞治疗成为医药领域的研究热点, 为肿瘤等重大和难治性疾病提供了新的治疗手段。细胞治疗的种类繁多, 根据细胞来源分为干细胞治疗和免疫细胞治疗等, 根据供体来源分为自体细胞、同种异体细胞和异种细胞等。其中, 嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 是近年来研究最热门的细胞治疗产品之一, 属于自体来源的免疫细胞治疗产品。它

是通过基因工程改造过的 T 细胞, 可以特异性地识别肿瘤相关抗原, 并增强 T 细胞的靶向性、杀伤性和持久性, 从而有效杀伤肿瘤细胞, 并形成抗肿瘤长效机制。因此 CAR-T 在肿瘤治疗领域具有巨大的应用价值, 尤其是在血液肿瘤领域疗效明显。CAR-T 产品在我国产业化进程也不断加快, 目前国内已有 CAR-T 产品进入上市申请阶段, 相信不久就会有产品上市。

作者简介: 田文淼, 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量管理与国内外药品注册研究, 1057161300@qq.com

药品上市后研究是药品全生命周期管理的重要组成部分,是针对上市后药品开展的安全性、有效性和质量可控性的持续研究,包括临床试验、调查(如观察性流行病学研究)、动物研究以及实验室研究等^[1]。由于药品上市前的临床试验数据有限,且无法真实反映药品在普通或特殊人群中使用的获益与风险等原因,有必要进行药品上市后研究。对于细胞治疗这类新型产品,其技术更复杂、操作要求更高,且某些治疗机制尚未研究透彻,在疗效更优的同时也存在很大的风险。而且这类产品往往由于具有突破性,可能在尚未获得完整研究数据的情况下就通过特殊审评途径加速上市许可,因此其上市后研究的重要性则更为凸显。

本文探讨了在细胞治疗领域较为领先的美国和欧盟国家的细胞治疗产品上市后研究的政策和经验,并以一款 CAR-T 细胞产品为例,介绍其在美国和欧盟的上市后的研究情况,再对比我国管理现状,有针对性地借鉴欧美先进管理经验。

1 欧美对细胞治疗产品上市后研究的制度要求

1.1 美国

1.1.1 一般性要求 美国《联邦食品、药品和化妆品法案》第 505(o) 和《美国食品药品监督管理局 2007 修正案(FDAAA)》对药品上市后研究的目的、要求和管理程序都进行了规定^[1]。美国对药品上市后研究进行分类管理,按照是否具有法律强制性分为上市后要求(post-marketing requirement, PMR)和上市后承诺(post-marketing commitment, PMC)。PMR 是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)强制要求开展的研究,包括上市后研究(此处是狭义的上市后研究,主要指调查、动物研究和实验室研究)和临床试验,属于法定义务;PMC 是 FDA 与上市许可持有人协商一致同意开展的研究,属于协议任务。FDA 对此区分的主要考虑是基于药品本身的风险因素。FDA 在要求开展一项 PMR 之前,必须明确药物相关的不良反应/事件报告,并确认现有药物警戒系统不能达到以下目的:① 评估上市药品有关的已知严重风险;② 评估上市药品有关的严重风险信号;③ 识别已知数据所提示的潜在严重风险^[2]。对于 PMR,申请人必须定期提交阶段性研究报告或者临床试验的执行情况;对于 PMC,申请人则只需提交年度报告即可^[3]。二者的主要区别见表 1。

1.1.2 细胞治疗产品的特殊性要求 FDA 在药品

表 1 PMR 与 PMC 的主要区别

Tab 1 Main difference between PMR and PMC			
类别	法律强制性	适用对象	监管要求
PMR	具有	已经发现风险或有严重风险信号的药品 ^[2]	定期提交阶段性研究报告或者临床试验的执行情况
PMC	不具有	潜在风险较大的药品	只提交年度报告

分类中设置了细胞和基因治疗产品(cell and gene therapy products, CGTPs),由组织和先进疗法办公室(Office of Tissue and Advanced Therapies, OTAT)进行专门管理。FDA 将 CAR-T 这种需要通过人工方法改变细胞遗传学特性的细胞疗法归于基因治疗的范畴^[4]。

由于基因治疗产品是通过对人体长期或永久性的作用来达到治疗效果,患者出现延迟性不良事件和不可预测结果的风险增加,为了减轻这种风险,需要进行长期监测。2020 年 1 月, FDA 颁布了《人类基因治疗产品给药后的长期随访指导原则(Long Term Follow-up After Administration of Human Gene Therapy Products; Guidance for Industry)》,对基因治疗产品的临床及上市后安全性研究提供了详细的指导。

该指导原则中列举了不同基因治疗产品发生延迟性不良事件的潜在风险,并给出了评估基因治疗产品发生延迟性不良事件风险的指导原则。对于使用了基因编辑技术、载体序列融合或人类基因组改变等风险高的产品,要求其临床试验中包括长期随访观察。长期随访的持续时间应根据产品特性、给药途径及在体内的存留时间等因素来确定。指导原则还就不同产品类型给出了建议,例如使用整合载体(如慢病毒、逆转录病毒和转座子)的产品观察时间为 15 年,基因组编辑产品最长 15 年。考虑到产品上市之前的临床研究通常不会超过 15 年,产生的安全性数据可能无法显示所有延迟性不良事件,因此建议在产品上市后要持续进行长期随访观察。对此,指导原则建议在 BLA(Biologic License Application, 生物制品许可申请)中提交上市后研究方案、统计分析计划和预期研究时间表,以及药物警戒计划(pharmacovigilance plan, PVP)。在 BLA 审查期间还将评估是否需要实施风险评估和缓解策略(risk evaluation and mitigation strategy, REMS),以确保产品的收益大于风险。

相关的指导原则还有《在生产和随访过程中,基于逆转录病毒载体的人类基因治疗产品的逆转录病毒复制能力检测(Testing of Retroviral Vec-

tor-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up)》, 该指导原则考虑到逆转录病毒载体的潜在复制风险, 专门针对使用该病毒载体的基因治疗产品在随访过程中进行逆转录病毒复制能力检测提出了具体建议。

1.2 欧盟

1.2.1 一般性要求

欧盟的药品上市后研究包括上市后安全性研究和上市后有效性研究, 但重点还是在于上市后安全性研究。欧盟在《2001/20/EC 法案》中对药品上市后研究进行了规定, 并发布了相应的指导原则, 即《药物警戒管理规范指南 (GVP) 模块 VIII——上市后安全性研究》。

类似于美国对 PMR 和 PMC 的区分, 欧盟的药品上市后安全性研究既有应监管部门强制要求而开展的研究, 也有持有人自愿开展的研究。上市后安全性研究包括临床试验和非干预性研究^[5]。当出现以下情况时, 监管部门会强制要求持有人开展上市后安全性研究: ① 具有全新化学构成或者治疗机制的药品; ② 动物实验出现毒性反应, 需进行临床验证的; ③ 安全性不明确, 有待临床进一步确定的; ④ 上市后发现安全性问题, 需加以验证的; ⑤ 需研究药品临床应用中有问题的; ⑥ 需评价其风险最小化措施有效性的^[6]。

1.2.2 细胞治疗产品的特殊性要求

欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 将细胞治疗产品纳入先进治疗药物范畴, CAR-T 也属于该范畴。先进治疗药物由先进疗法委员会 (Committee for Advanced Therapies, CAT) 进行专门管理。EMA 专门针对此类药物制定了上市后研究的指导原则《先进治疗药物的安全性和有效性随访和风险管理指导原则 (Guideline on Safety and Efficacy Follow-up-risk Management of Advanced Therapy Medicinal Products)》。该指导原则就先进治疗药物上市后药物警戒、风险管理计划 (risk management plan, RMP)、安全性和有效性随访等内容进行了详细规定。

安全性方面, 指导原则指出在为某个具体的先进治疗药物制定风险管理计划时, 应综合考虑已确定重大风险、潜在重大风险及缺失信息等问题, 并列出了先进治疗药物在制造、应用和随访等各环节的风险, 包括活体捐赠者的风险、与产品质量特征相关的患者风险、产品储存和分发的患者风险、与给药程序相关的患者风险、产品在患者体内持续存在的风险等。有效性方面, 考虑

到先进治疗药物在上市前临床数据有限, 全面的有效性评估需要几年的随访, 因此产品上市后仍需在实际应用中进行评估。对于安全性和有效性随访方案, 指导原则指出了方案的设计要点, 包括随访的样本量、疾病进展及产品疗效、密切接触者及后代的安全性跟踪等。

针对先进治疗药物的特殊性, 指导原则还提出了一些额外要求。风险管理体系方面, 风险管理计划中需要增加针对先进治疗药物特有风险的讨论和有效性随访必要性的讨论等; 药物警戒方面, 除了常规药物警戒外, 还可引入额外药物警戒措施。

2 欧美 CAR-T 产品上市后研究的实施情况

2.1 美国

2017 年, 美国 FDA 率先批准了两款 CAR-T 产品, 分别是诺华 (Novartis) 的 Kymriah 和凯特制药 (Kite Pharma) 的 Yescarta, 分别用于治疗 B 细胞白血病和淋巴瘤。Kymriah 作为全球第一款 CAR-T 产品, FDA 将其认定为突破性疗法并予以优先审评^[7]。

本文以 Kymriah 为例, 根据 FDA 网站所公布的信息, 介绍它在美国上市后, 产品的上市后研究情况。由于药物警戒系统不足以评估与产品使用相关的继发恶性肿瘤的严重风险, 因此 FDA 确定了一项 PMR, 即一项前瞻性、多中心、观察性的上市后安全性研究, 以评估 Kymriah 的长期安全性及其治疗后发生继发恶性肿瘤的风险, 该研究要求对至少 1000 名接受 Kymriah 治疗的患者进行为期 15 年的随访^[8]。持有人要定期向 FDA 报告上市后研究及临床试验状态, 并在规定时间节点提交最终报告。对于 PMC, 包含一项关于某载体的分析方法验证研究, 持有人要每年报告 PMC 的状态更新, 并在完成研究后提交最终报告^[7]。此外, FDA 还要求提交一份 REMS, REMS 由确保安全使用的要素、实施系统和提交 REMS 评估的时间表组成, 以对上市后的产品进行风险管理。

2.2 欧盟

欧盟通过集中审批程序在 2018 年先后批准上市了 Kymriah 和 Yescarta 两款 CAR-T 产品。在审批中将两款产品认定为孤儿药, 且需要额外监测。额外监测是指该药物相比于其他药物, 会受到监管机构更为密切的监测, 以加强对临床证据欠完善的药物进行不良反应报告。额外监测的药品在产品信息中标有黑色倒三角形 (▼) 以作提示^[9]。

根据 EMA 网站所公布的信息, Kymriah 在欧盟上市后, 产品的上市后研究情况如下。安全性方面, 风险管理计划中列出了 Kymriah 产品的安全性考虑 (见表 2), 对识别的每一项风险都提出了风险最小化措施, 并要求对风险最小化措施的有效性进行评估。药物警戒计划中除了常规药物警戒外, 还引入了两项额外药物警戒措施: 一是非介入性研究, 对来自两个注册机构的数据进行二次使用, 以评估接受 CAR-T 细胞疗法治的恶性肿瘤患者的长期安全性; 二是对接受基于

慢病毒的 CAR-T 细胞治疗的患者进行长期随访, 以描述与 CAR-T 细胞疗法有关的延迟性不良事件, 并监测外周血中 CAR 转基因的持久性, 监测慢病毒的表达, 评估 CAR-T 的长期疗效^[9]。监管部门要求这两项额外药物警戒活动提交年度安全性报告和 5 年中期报告。有效性方面, 持有人与监管机构达成一致, 承诺开展一项上市后有效性研究, 收集 Kymriah 在真实临床中治疗 3 岁以下患者的数据, 进一步评估产品在 3 岁以下患者中的疗效和安全性, 以支持收益 - 风险评估。

表 2 Kymriah 安全性问题汇总
Tab 2 Summary of Kymriah security issues

风险类别	具体风险
已确定重大风险	细胞因子释放综合征; 感染; 严重的神经系统不良反应; 肿瘤溶解综合征; 正常 B 细胞 / 血球蛋白血症的长期耗竭; 第 28 日仍未解决造血细胞减少症
潜在重大风险	脑水肿; 具有复制能力的慢病毒的产生; 继发性恶性肿瘤 (包括载体插入位点的寡核苷酸 / 单克隆抗体); 自身免疫性疾病的新发生或加剧; 血液系统疾病 (包括再生障碍性贫血和骨髓衰竭); 移植物抗宿主病的恶化; 传染媒介的传播; 由于产品处理不当而导致细胞活力下降
缺失信息	在怀孕和哺乳期使用; 用于乙型肝炎病毒 (HBV) / 丙型肝炎病毒 (HCV) / 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 患者; 用于因恶性肿瘤而积极参与中枢神经系统治疗的患者; 长期安全; 免疫原性

3 我国细胞治疗产品的上市后研究现状

3.1 一般性要求

我国药品上市后的研究也可大致分为两类: 一种类似于 PMR, 包括法规规定的 IV 期临床试验和生产批件中要求的研究; 另一种为申请人或研究者自愿发起的研究^[1]。但对二者的划分依据并没有作出具体说明。我国对药品上市后研究的要求主要体现在《药品管理法》《药品注册管理办法》《药品不良反应报告和监测管理办法》等法律法规中。其中《药品管理法》明确提出持有人应制定药品上市后风险管理计划, 主动开展药品上市后研究, 以进一步确证药品的安全性、有效性和质量可控性, 加强对已上市药品的持续管理^[10]。但是对于上市后研究的监管并没有作出详细规定。在持有人的实际操作方面, 对于如何开展药品上市后研究也缺乏具体的技术指导。

3.2 细胞治疗产品的特殊性要求

我国目前还没有出台针对细胞治疗产品上市后研究的相关政策, 也没有针对细胞治疗产品设置专门的管理机构。这可能也与我国细胞治疗产品的产业现状有关, 我国大部分细胞治疗产品处于临床前或临床研究阶段, 产业化和临床应用较为落后。已上市的细胞治疗产品不多, 上市后研究的问题还不凸显。但随着国家对细胞治疗、基因治疗等生物产业的大力扶持, 其产业化发展速

度在不断加快, 及时建立完善政策和监管体系才能引导细胞治疗产品上市后健康、有序的发展, 更好地惠及临床患者。

4 启示与建议

4.1 完善我国药品上市后研究的制度体系, 明确监管和实施要求

相比于美国和欧盟, 我国药品上市后研究的制度体系还比较薄弱, 并没有形成从法律、法规到指导原则层面的完整制度体系, 尤其是在指导原则层面较为欠缺。我国虽然在法律法规层面都提出了要开展药品上市后研究的相关要求, 但在指导原则层面还缺乏更为具体的监管要求和技术指导。因此建议: 一方面要明确对药品上市后研究的监管要求, 例如对 IV 期临床试验如何进行监管, 对上市后研究如何进行评价等; 另一方面要出台能够具体指导企业如何开展上市后研究的技术指导原则。

4.2 关注细胞治疗产品上市后研究的特殊性, 出台针对性要求

细胞治疗产品在其上市后研究中应体现其特殊性。它作为一种活细胞治疗药物, 在人体内发挥作用时具有一定的不可控性, 如微生物载体潜在的可复制性和致突变性, 且个体差异大, 导致不可预测的安全性风险增加; 此外, 细胞治疗产品因对人体长期或永久性的改变作用, 延迟性不良反应的风险也增大, 在长期治疗过程中, 疗效

也可能发生改变,因此需要有针对性的上市后研究方案和对安全性、有效性的长期随访计划。美国和欧盟都注意到了细胞治疗产品的这种特殊性,一方面出台了有针对性的上市后研究指导原则,另一方面也设置了专门的管理机构对细胞治疗产品进行全生命周期监管。美国的指导原则中体现了对细胞治疗产品长期随访和对病毒载体安全性的重视。欧盟的指导原则更为系统,在提出药物警戒、风险管理及安全性和有效性随访的要求后,还对这三方面分别提出了一些额外要求,值得我们学习和借鉴。因此建议:一方面需要关注细胞治疗产品上市后研究的特殊性,出台有针对性的指导原则等要求;另一方面建议设置专门针对细胞治疗产品这类特殊药品的管理机构,加强细胞治疗产品上市前和上市后监管的衔接,以实现细胞治疗产品全生命周期的有效监管。

4.3 基于风险明确划分依据,实施分级分类管理

风险管理的要求在上市后研究中应该是贯穿始终的。美国和欧盟对药品的上市后研究都区分出强制和非强制要求,我国虽也做出了类似区分,但划分依据并不清晰,企业无法进行准确预判。因此建议我国监管机构可以基于风险信息明确划分依据,在划分依据中也可以与药物警戒系统相结合,合理确定药品上市后研究中强制要求的情形。

无论美国还是欧盟,对药品上市后研究的侧重点都在安全性研究方面,细胞治疗产品亦是如此。而且上市后安全性研究需要与药物警戒系统互相配合和补充,监管范围与有效性研究有所不同。因此建议将上市后安全性研究和有效性研究进行区分,实施分类管理;并根据细胞来源、类型、功能、载体特性、制备工艺、体内作用过程等对细胞治疗产品的上市后风险进行分级,实施

分级管理,并制定区分风险等级的相应标准。

参考文献

- [1] 赵建中,谢松梅,杨进波,等.不同国家药品上市后研究管理现状比较[J].中国新药杂志,2014,23(22):2589-2592.
- [2] 赵婷婷,王海学,赵建中.浅谈美国食品和药品监督管理局对上市后研究的背景与内容及其启示[J].中国临床药理学杂志,2020,36(13):1908-1912.
- [3] 罗雪燕,赖寒,陈绍成,等.美国药品上市后研究的监管制度及其对我国的启示[J].中国药房,2017,28(31):4330-4334.
- [4] U. S. Food and Drug Administration. What is Gene Therapy? [EB/OL].(2018-07-25)[2021-02-23].<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>.
- [5] European Medicines Agency. Post-authorisation safety studies (PASS) [EB/OL]. [2021-02-25].<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/pharmacovigilance/post-authorisation-safety-studies-pass-0>.
- [6] 张琪,颜建周,姚雯,等.欧盟药品上市后安全性研究制度及对我国的启示[J].中国新药杂志,2020,29(1):9-14.
- [7] U. S. Food and Drug Administration. FDA approval brings first gene therapy to the United States[EB/OL].(2018-03-26)[2021-02-23].<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>.
- [8] U. S. Food and Drug Administration. KYMRIAH (tisagenlecleucel) [EB/OL].(2019-03-28)[2021-02-23].<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>.
- [9] European Medicines Agency. Kymriah [EB/OL].(2018-09-19)[2021-02-26].<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>.
- [10] 国家药品监督管理局.《中华人民共和国药品管理法》[EB/OL].(2019-08-27)[2021-02-26].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/flxzhfg/20190827083801685.html>.
(收稿日期:2021-02-03;修回日期:2021-04-05)

“两票制”实施对某三甲医院药品供应和价格的影响分析

刘永谦¹, 朱文思¹, 陈烁¹, 刘付伟清², 阳巧凤^{1*} (1. 广东省妇幼保健院药学部, 广州 511442; 2. 广东省妇幼保健院妇科, 广州 511442)

摘要: 目的 探讨“两票制”政策在本院的实施效果, 为“两票制”政策在医疗机构的实践推行和完善提供参考。方法 收集“两票制”政策实施前后本院药库药品的采购供应和价格调整等相关数据。结果 本院药库的缺货率、药品替换率和药品配送延迟率在“两票制”政策实施的当月, 即 2018 年 6 月达到最高, 分别为 15.33%、5.03% 和 4.07%, 随后逐渐降低。平均配送延迟时间由“两票制”政策实施前的 3~4 d 逐渐下降为 1~2 d。药品供应逐渐趋向于稳定和充足状态。2018 年 6—11 月, 本院共有 136 种药品涨价, 多数药品的涨价幅度在 20% 以内, 占 52.21%, 而涨价幅度 $\geq 50\%$ 的药品占 33.08%。涨价原因主要为非平台采购的药品, 缺乏监管。本院共有 131 种药品降价, 多数药品的降价幅度在 10% 以内, 占 58.78%, 而降价幅度 $\geq 50\%$ 的药品占 3.82%。降价原因主要为新中标价、供应价调整和政府限价等。结论 从目前本院实施“两票制”政策后的效果来看, 实施初期药品供应不稳定、部分药品供货周期延长。药品价格因新中标价和供应价调整导致反复变化, 波动较大。整体药价得到有效控制或降低的同时, 部分药品价格也发生了一定幅度的上涨。建议药品管理部门根据实际情况完善相关制度管理, 使“两票制”在医疗机构的实施更加顺利。

关键词: 两票制; 药品供应; 药品价格

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2021)09-1988-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.042

Effect of “Two-invoice System” on drug supply and price in a major comprehensive hospital

LIU Yong-qian¹, ZHU Wen-si¹, CHENG Luo¹, LIU Fu-wei-qing², YANG Qiao-feng^{1*} (1. Department of Pharmacy, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou 511442; 2. Department of Gynecology, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou 511442)

Abstract: Objective To determine the effect of “Two-invoice System” in our hospital and to provide reference for further implementation and improvement of “Two-invoice System” in medical institutions. **Methods** The data of drug supply and price adjustment were collected. **Results** The drug shortage rate, replacement rate and delivery delay rate was 15.33%, 5.03% and 4.07% respectively, reaching the highest in June 2018, the very month when the “Two-invoice System” was implemented formally, and then the rates decreased gradually. After its implementation, the average delivery delay time was shortened from 3 — 4 days to 1 — 2 days, the supply of drugs gradually tended to stabilize and be adequate. From June to November 2018, the price of 136 drugs rose in our hospital, 52.21% of which rose by 20%, while 33.08% rose by more than 50%. The price rise mostly occurred in the non-platform procurement of drugs due to the lack of regulation. Meanwhile, 131 drugs had price recuction, 58.78% of which reduced by 10%, and 3.82% reduced by more than 50%. The main reasons for the price reduction included new bidding price, supply price adjustment and government-controlled price. **Conclusion** At the early implementation stage, unstable medicine supply and prolonged delivery cycle are observed. Drug prices frequently flucuated due to new bidding price and

作者简介: 刘永谦, 男, 主管药师, 主要从事医院药学研究, E-mail: 544312754@qq.com * 通信作者: 阳巧凤, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药事管理、卫生管理与政策等方面的研究, E-mail: 258041704@qq.com

supply price adjustment. The overall drug prices had been controlled or reduced effectively, while some drug prices had also increased to a certain extent.

Key words: Two-invoice System; drug supply; drug price

长期以来, 公立医院药品采购方式、医药生产的流通秩序存在着环节过多、多层代理等问题。药品在购销过程所需要的成本和利润是导致药品价格虚高的主要原因之一。2017 年 1 月 9 日, 国务院医改办、国家卫生计生委等 8 部委联合发布了《关于在公立医疗机构药品采购中推行“两票制”的实施意见(试行)》, 将“两票制”定义为: 药品从药厂卖到一级经销商开的发票为“第一票”, 从一级经销商卖到医疗机构所开的发票为“第二票”^[1]。在公立医院药品采购中推行“两票制”, 是现阶段治理药品市场乱象的一项重要改革举措, 其目的是整顿和重塑医药生产流通秩序, 压缩过多和无序的药品购销环节, 节省药品流通资金, 从源头上治理医药行业中药品价格虚高这一系列体制下产生的问题, 减轻群众用药负担^[2]。

广东省自 2017 年 12 月 2 日起启动实施“两票制”, 有效期为 3 年, 过渡期 6 个月, 2018 年 6 月起, 全省所有公立医疗机构正式全面实施“两票制”^[3]。目前, 关于“两票制”的研究报道还停留在理论分析层面的探讨, 尚缺乏可供决策参考的实证研究证据。本文通过分析本院“两票制”实施前后的药品供应情况和实行“两票制”后药品价格变化情况, 反映“两票制”政策的实施效果, 旨在为卫生主管部门对“两票制”政策在医疗机构的进一步推行和完善提供参考。

1 资料与方法

利用医院 His 系统, 收集本院实施“两票制”政策前 6 个月(2017 年 12 月~2018 年 5 月)和后 6 个月(2018 年 6~11 月)药库药品的采购供应情况、价格调整情况。统计短缺药品的种类、替换药品的种类、延迟配送药品的种类、药品延迟配送时间、药品价格等信息, 计算缺货率、药品替换率、延迟配送率、价格变化幅度等。

2 结果

2.1 “两票制”执行前后本院药库药品供应情况概况

本院药品配送企业总共为 22 家, 均属于“两票”配送企业, 其中主要配送企业有 7 家, 药品目录品规数为 835 种。本院于 2018 年 6 月 1 日起, 正式实施“两票制”政策。实施“两票制”前后各 6 个月, 本院药库药品的供应情况见表 1。

表 1 本院药库实行“两票制”前后药品供应概况

Tab 1 Drug supply before and after the implementation of “Two-invoice System” in our hospital

时间	缺货率 /%	药品替换率 /%	药品配送延迟率 /%	平均配送延迟时间 /d
2017 年 12 月	14.01	2.75	3.59	3.07
2018 年 1 月	8.74	2.99	1.44	3.25
2018 年 2 月	1.80	2.40	0.36	4.33
2018 年 3 月	5.15	1.08	0.48	3.25
2018 年 4 月	5.63	1.68	1.44	4.08
2018 年 5 月	10.66	3.11	2.99	2.68
2018 年 6 月	15.33	5.03	4.07	3.24
2018 年 7 月	1.68	3.83	0.48	2.50
2018 年 8 月	7.07	3.11	2.87	1.46
2018 年 9 月	8.62	2.87	1.92	1.88
2018 年 10 月	6.71	2.04	1.80	2.00
2018 年 11 月	7.78	3.83	1.08	1.00

综合来看, 连续 12 个月的统计数据显示, 实施“两票制”政策前, 本院药品供应较为平稳, 均在合理变化范围内。其中 2018 年 2 月的缺货率和药品配送延迟率均为最低, 是由于该月为春节期间, 医院患者量减少, 药品的总需求量降低, 采购入库的药品数量也相应减少。而 2018 年 4 月和 5 月, 即实施两票制的前 2 个月, 缺货率、药品替换率和药品配送延迟率明显增加, 于“两票制”政策正式实施的当月, 即 2018 年 6 月达到最高, 分别为 15.33%、5.03% 和 4.07%, 2018 年 7 月均有所降低。实施“两票制”政策之前, 本院药库药品平均配送延迟时间为 3~4 d。“两票制”政策正式实施的当月, 即 2018 年 6 月, 平均配送延迟时间为 3.24 d。随后, 配送延迟平均时间明显下降, 为 1~2 d。随着时间的推移, 药品供应逐渐趋向于稳定和充足状态。

研究表明, 本院药品在实行“两票制”初期对药品供应情况存在一定程度上的影响, 这可能与部分生产企业和配送企业对新政策的实施没有做好充分准备, 需要一定的适应期有关。

2.2 本院药库药品价格增长情况

本院药品目录品规数为 835 种。“两票制”政策实施后 6 个月内, 即 2018 年 6~11 月, 本院共有 136 种药品发生涨价, 由于非平台采购和不同供应商供货价不同, 其中 9 种药品发生 2 次涨价, 2 种药品发生 3 次涨价。以抗微生物类、血

液系统用药、电解质和酸碱平衡调节药涨价品种数最多，累计占 28.68%。其次是消化系统药物、心血管系统药物等，见表 2。

表 2 “两票制”政策后本院药库发生价格变化的药品种类

Tab 2 Drugs types with price change after the implementation

分类	涨价药品		降价药品	
	种数	构成比/%	种数	构成比/%
抗微生物类	13	9.56	14	10.69
血液系统用药	13	9.56	10	7.63
电解质和酸碱平衡调节药	13	9.56	11	8.40
消化系统药物	12	8.82	10	7.63
心血管系统药物	10	7.35	13	9.92
神经系统用药	9	6.62	7	5.34
专科用药	9	6.62	15	11.45
中成药	9	6.62	5	3.82
解热镇痛抗炎及抗风湿药物	8	5.88	7	5.34
抗肿瘤药	7	5.15	13	9.92
麻醉药及其辅助药物	7	5.15	3	2.29
生殖系统用药	6	4.41	5	3.82
内分泌系统用药	5	3.68	4	3.05
维生素与微量元素药物	5	3.68	0	0.00
呼吸系统药物	2	1.47	3	2.29
其他类药物	8	5.88	11	8.40
合计	136	100	131	100

实施“两票制”政策后，发生涨价的药品中，多数药品的涨价幅度在 20% 以内，占 52.21%。

而涨价幅度 $\geq 50\%$ 的药品占 33.08%，给患者造成一定的经济负担，见表 3。

表 3 “两票制”政策后本院药库药品价格变化幅度

Tab 3 Fluctuation of drug prices after the implementation

价格变化幅度/%	涨价药品		降价药品	
	种数	构成比/%	种数	构成比/%
≤ 1	13	9.56	18	13.74
1 ~ 10	38	27.94	59	45.04
10 ~ 20	20	14.71	28	21.37
20 ~ 30	13	9.56	11	8.40
30 ~ 40	4	2.94	5	3.82
40 ~ 50	3	2.21	5	3.82
50 ~ 100	16	11.76	5	3.82
≥ 100	29	21.32	0	0.00
合计	136	100	131	100

发生涨价的药品中，差价前 10 名的药品价格增长均大于 18 元。其中差价大于 50 元的药品有促皮质素冻干粉针、长春新碱冻干粉针、右旋糖酐 40 葡萄糖注射液。价格变化较大的依次为苯巴比妥钠注射液（广东邦民制药）增长 1809.55%、苯巴比妥钠注射液（天津金耀药业）增长 1185.09%、右旋糖酐 40 葡萄糖注射液增长 1476.47% 等。调价原因主要为非平台采购，供应价调整（见表 4）。

表 4 价格增长差价前 10 的药品汇总

Tab 4 Top 10 drugs with increased prices in our hospital

药品名	规格	生产厂家	原价格/元	新价格/元	差价/元	增幅/%	调价原因
促皮质素冻干粉针	25 u	上海上药第一生化药业有限公司	216.00	398.00	182.00	84.26	非平台采购，供应价调整
长春新碱冻干粉针	1 mg	深圳万乐药业有限公司	35.00	195.00	160.00	457.14	非平台采购，供应价调整
右旋糖酐 40 葡萄糖注射液	500 mL	四川科伦药业股份有限公司	4.56	58.60	54.04	1185.09	非平台采购，供应价调整
长春新碱冻干粉针	1 mg	广东岭南制药有限公司	5.34	50.80	45.46	851.31	平台价格不供应，非平台采购
放线菌素 D 粉针	200 μ g	海正辉瑞制药有限公司	58.95	103.76	44.81	76.01	平台价格不供应，非平台采购
苯巴比妥钠注射液	0.1 g	广东邦民制药厂有限公司	1.99	38.00	36.01	1809.55	非平台采购，供应价调整
苯巴比妥钠注射液	0.1 g	天津金耀药业有限公司	1.70	26.80	25.10	1476.47	非平台采购，供应价调整
氢溴酸东莨菪碱注射液	0.3 mg	遂成药业股份有限公司	2.64	24.50	21.86	828.03	非平台采购，供应价调整
糜蛋白酶冻干粉针	4000 u	上海第一生化药业有限公司	5.70	25.90	20.20	354.39	非平台采购，供应价调整
依沙吖啶注射液	50 mg	广西河丰药业有限责任公司	79.60	98.00	18.40	23.12	非平台采购，供应价调整

2.3 本院药库药品价格降低情况

“两票制”政策实施 6 个月内，即 2018 年 6 ~ 11 月，本院共有 131 种药品发生降价，其中 7 种药品发生 2 次降价，3 种发生 3 次降价。以专科用药、抗微生物类、抗肿瘤药降价品种数最多，累计占 32.06%。其次是心血管系统药物、消化系统药物等，见表 2。

实施“两票制”政策后，发生降价的药品中，多数药品的降价幅度在 10% 以内，占 58.78%。

而降价幅度 $\geq 50\%$ 的药品占 3.82%，见表 3。

发生降价的药品中，差价前 10 名的药品价格降低均大于 22 元。其中差价大于 300 元的药品有多柔比星脂质体注射液和曲妥珠单抗冻干粉针，两者均为抗肿瘤药。价格变化较大的依次为长春新碱冻干粉针降低 88.13%、0.06% 雌二醇凝胶降低 48.75%、胸腺五肽冻干粉针降低 42.41% 等。调价原因主要为新中标价、供应价调整和政府限价等，见表 5。

表 5 价格降低差价前 10 的药品汇总
 Tab 5 Top10 of drugs with decreased prices in our hospital

药品名	规格	生产厂家	原价格 / 元	新价格 / 元	差价 / 元	降幅 / %	调价原因
多柔比星脂质体注射液	20 mg	石药集团欧意药业有限公司	4925.42	4580.64	- 344.78	7.00	新中标价
曲妥珠单抗冻干粉针	0.44 g	美国 Genentech Inc.	7600.00	7270.16	- 329.84	4.34	新中标价
氟维司群注射液	0.25 g	德国 Vetter Pharma	2400.00	2306.00	- 94.00	3.92	政府限价
重组人血小板生成素注射液	15000 u	沈阳三生制药股份有限公司	1063.82	1008.00	- 55.82	5.25	供应价调整
重组人促卵泡激素注射液	450 iu	意大利默克雪兰诺公司制药厂	1557.91	1511.17	- 46.74	3.00	新中标价
0.06% 雌二醇凝胶	30 g	比利时 Besins Manuf.	90.91	46.59	- 44.32	48.75	新中标价
胸腺五肽冻干粉针	10 mg	深圳翰宇药业股份有限公司	93.77	54.00	- 39.77	42.41	新中标价
长春新碱冻干粉针	1 mg	广东岭南制药有限公司	45.00	5.34	- 39.66	88.13	新中标价
沙美特罗替卡松粉吸入	300 ug	英国葛兰素威康	221.74	195.57	- 26.17	11.80	新中标价
氟比洛芬酯注射液	50 mg	北京泰德制药股份有限公司	62.12	39.27	- 22.85	36.78	新中标价

3 讨论

3.1 本院实施“两票制”政策后药品供应存在的问题

3.1.1 药品供应不稳定、部分药品供货周期延长

药品“两票制”政策依靠省级药品采购的集中，着手限制药品流通环节与票据监察，对流通渠道上的每一个利益相关方有着不同的影响^[4]。从生产企业到配送企业，从配送企业到医疗机构，这一整条供应链存在的各种情况都会影响药品的供应，导致药品短缺、品种替换、配送延迟等情况出现^[5]。实施“两票制”政策后，药品流通环节减少，药品供应多元化、多层次现象消失，药品配送企业之间调拨药品的次数受限。当其无法组织到符合“两票制”的货源，备货不足，药品采购不及时，或药品的出库单不符合“两票制”验收要求时，就会导致公立医疗机构药品的短缺，配送时间延迟，部分药品供应不稳定等^[6]。为保障临床用药，公立医疗机构会采取购用可以替换原品种的药品或重新选择配送企业，导致药品替换率明显增加。

3.1.2 药品价格波动大、部分药品价格居高不下

我国在公立医院药品采购中推行“两票制”，其目的是简化医药流通环节，降低药品价格虚高。但从目前本院实施“两票制”政策后的效果来看，实施初期药品价格因新中标价和供应价调整导致反复变化，波动较大。整体药价得到有效控制或降低的同时，部分药品价格也发生了一定幅度的上涨。价格上涨的药品主要是非药品集中采购平台的品种（本院价格增长差价前 10 均为非平台采购），或者厂家在集中采购平台中标药品因价格低厂家不供应，医疗机构为了保证临床用药只能通过非平台采购高价格的药品。以抗肿瘤药长春新碱冻干粉针（1 mg）为例，本院共有深圳万乐药业

和广东岭南制药两个生产厂家的品规。2018 年 7 月新中标后，长春新碱冻干粉针（广东岭南制药）价格由 45.00 元降低为 5.34 元，而 2018 年 9 月供应价格上调为 50.80 元（非平台采购）。2018 年 10 月长春新碱冻干粉针（深圳万乐药业）供应价由 35.00 元调整为 195.00 元（非平台采购）。这可能与药品省级集中采购政策有关。部分药品在前期企业投标过程中，相互竞争压价，过分追求“最低中标价格”，而中标后厂家会以中标价低不供应，迫使医疗机构通过非平台采购高价格的药品。此外，生产药品的原辅料涨价、生产企业的生产经营成本上升、配送企业或生产厂家药品供应不足等原因都会导致药品涨价^[7]。

3.2 对策建议

从政府层面上，“两票制”政策压缩了药品流通环节，规范了药品生产流通秩序，使得药品的监管和追溯更加透明化，遏制了药品流通环节中多层加价问题。“两票制”对于集中采购平台药品整体药价得到有效控制，但对于非集中采购平台药品无法管控，药品上涨情况仍然存在，对于实施“两票制”后药品价格仍然上涨有以下三点建议：① 所有药品进入采购平台，价格接受平台的监控，厂家和供应商必须按照平台价格供货，杜绝中标后厂家以中标价低不供应，迫使医疗机构通过非平台采购高价格的药品；② 政府部门制定法规对于中标后以中标价低不供应的厂家和供应商进行处罚；③ 制定价格机制，药品的价格涨幅有限制，例如涨幅不能超过 50%，药品价格由药品出厂价格追溯制度和药品集中采购制度决定，只有从源头上限定药品出厂价格结合药品“两票制”才能避免药品价格虚高问题^[8]。

从医院层面上，积极采取有效措施应对“两票制”实施初期药品供应不稳定、药品价格波动

大等问题。对供应不足的药品,药库管理人员做好采购周期和计划的管理,加强与配送企业的沟通联系,或通过重新选择配送企业、更换同品规的生产企业、替换原品种的药品等,保障临床用药;药库加快信息化建设,完善信息管理系统,实现计划、下单、验收、入库等环节的信息化管理,为“两票制”政策在医疗机构的顺利实施创造条件^[9]。

综上所述,“两票制”政策的实施初期,一定程度上影响了本院药库的药品供应,经过一系列措施,药品供应不稳定、不及时等问题得到改善,药品供应逐渐趋向平稳。在整体药价得到有效控制或降低的同时,价格波动幅度大,部分药品价格上涨等问题仍普遍存在。期望药品管理部门根据实际情况完善相关制度管理,使“两票制”在医疗机构的实施更加顺利。

参考文献

[1] 中华人民共和国国务院医改办,国家卫生计生委,食品药品监管局,等.印发关于在公立医疗机构药品采购中

推行“两票制”的实施意见(试行)的通知[EB/OL].北京:国务院医改办,2016.

- [2] 黄河,孙静,刘远立.“两票制”药品流通领域改革探讨[J].中国药房,2017,28(18):2456-2459.
- [3] 广东省人力资源和社会保障厅等八部门关于印发医疗机构药品交易“两票制”的实施方案(试行)的通知[EB/OL].广东省人力资源和社会保障厅,2017-11-06.
- [4] 崔兆涵,吕兰婷.我国药品流通领域“两票制”的实施效果、风险预测及政策建议[J].中国药房,2018,29(8):1009-1014.
- [5] 刘晓慧,彭六保,邓楠,等.湖南省21家三级医院常用药品与急救药品短缺现象分析[J].中南药学,2015,13(8):880-883.
- [6] 张帆,王帆,侯艳红.“两票制”下药品供应链的重塑和发展[J].卫生经济研究,2017(4):11-15.
- [7] 许日祥,解雪峰,沐婷玉,等.基本药物价格上涨的现状调查及因素分析-基于合肥某三级综合医院的调查[J].中国药事,2018,32(10):1382-1388.
- [8] 张琼英.“两票制”在某大型三甲医院的实践探讨[J].中国药物经济学,2018,13(10):105-108.
- [9] 郑玉晶.“两票制”实施初期对某院药品供应的影响浅析[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(44):208-209.

(收稿日期:2021-01-02;修回日期:2021-03-05)

欢迎订阅 2022 年《中南药学》杂志

《中南药学》杂志是由湖南省食品药品监督管理局主管,湖南省药学会主办,中南大学湘雅二医院及长沙市中心医院承办的国内外公开发行的药学综合性学术期刊。国际刊号:ISSN 1672-2981;国内刊号:CN43-1408/R。《中南药学》是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊,被美国 CA、波兰 IC、中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库、解放军医学图书馆数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)和中国生物医学期刊引文数据库(CMCI)等收录。

本刊内容涵盖药剂、药理、药分、药化、生化药物、中药及天然药物、药事管理、医院药学等研究领域。主要栏目有研究论文、综述、中药定量指纹图谱与中药标准制剂专题、药物分析与检验、新药之窗、药物与临床、药事管理、药品不良反应、临床药师在临床、医院药学等。本刊面向全国高、中及基层医药工作者,欢迎广大医药工作者投稿和订阅。

本刊为月刊,大16开本,160页码,印刷装帧精美,每月20日出版,定价25.00元/本。如需订阅,可到当地邮局(邮发代号为42-290)或直接汇款至杂志社订购(开户行:中国银行长沙市分行杏林支行;开户名:中南药学杂志社;账号:600257351940),全年订价300元。本刊通讯地址:湖南省长沙市人民中路139号中南大学湘雅二医院内《中南药学》杂志社,邮编:410011;电话:(0731)82258487/84895602;传真:(0731)82258487。

药品不良反应

卡瑞利珠单抗致急性间质性肾炎的病例报道及文献分析

章斌¹, 焦秀秀¹, 沈波², 李艳^{2*} (1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院肾内科, 上海 200011)

关键词: 程序性细胞死亡受体-1; 急性间质性肾炎; 卡瑞利珠单抗; 恶性肿瘤; 不良反应

中图分类号: R969.3 文献标识码: B 文章编号: 1672-2981(2021)09-1993-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.043

肿瘤治疗进入了免疫治疗新时代, 目前已有多种程序性细胞死亡受体-1 (PD-1) 免疫检查点抑制剂被批准用于恶性肿瘤的治疗。接受免疫疗法的患者中超过 60% 最终会产生免疫相关不良事件 (irAEs) [1-2], 最常见的是皮肤和胃肠道, 其次是肺、内分泌系统、肌肉骨骼、肾、神经、血液和心血管。既往认为肾脏不良反应虽相对罕见, 但仍可能存在严重的伤害 [3]。本文通过 1 例 PD-1 抗体所致的急性间质性肾炎的案例进行分析, 以期临床安全合理用药提供参考。

1 病例资料

患者, 男, 62 岁, 体质量 80 kg, 2019 年 12 月 25 日全麻下行右颈部淋巴结活检术, 诊断为上皮性恶性肿瘤, 2020 年 3 月起行放疗化疗, 化疗药物为注射用卡瑞利珠单抗 (艾瑞卡) 200 mg/次, 静脉输注, 每 2 周 1 次, 已行 8 次化疗。患者化疗前及化疗后肌酐均在 $65 \sim 78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 但在化疗 8 次后随访发现, 肌酐升高至 $187 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$; eGFR (EPI) $32 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2) \downarrow$; 同时查尿常规示: 尿蛋白 (++) ; 尿红细胞 (+++)。患

者病程中无明显泡沫尿, 无明显双下肢、眼睑浮肿, 无明显尿量减少, 无畏寒乏力, 无咳嗽咳痰, 无恶心呕吐, 无尿路刺激征, 无发热、光过敏、口腔溃疡、关节酸痛等不适, 为进一步治疗, 于 2020 年 7 月 8 日收入本院肾内科。入院当日查血清肌酐 $274 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, eGFR (EPI) $26 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2) \downarrow$; 尿微量白蛋白与肌酐比值 (UACR) $316.8 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \uparrow$, 抗核抗体 (ANA) +, 临床诊断为急性间质性肾炎, 考虑为 PD-1 单抗所致的急性肾损伤。给予甲基强的松龙 $40 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 3 d; 后减量至甲强龙 $20 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 3 d。7 月 22 日, 复查肾功能恢复正常, 血清肌酐 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, eGFR (EPI) $102 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$; UACR $58.6 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。住院期间 7 月 9 日查尿微量蛋白, 结果显示尿微量白蛋白 $186 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿 β_2 微球蛋白 $0.274 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿转铁蛋白 $8.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 均高于正常值, 其他的主要检查指标见表 1。之后改为口服醋酸泼尼松片 (强的松) $25 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 维持治疗, 出院后逐渐减量至停药。2 个月后复查肾功能正常, 血清肌酐 $61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 主要检查指标

日期	尿白细胞酯酶	尿蛋白	白细胞 / $\cdot \mu\text{L}^{-1}$	红细胞 / $\cdot \mu\text{L}^{-1}$	eGFR (EPI) / [$\text{mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$]	血清尿素氮 a/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血清尿酸 b/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血清肌酐 c/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
2020-07-08					26 ↓	28.8 ↑	498 ↑	274 ↑
2020-07-09	++	+	118.5 ↑	2017.1 ↑				
2020-07-14	+++	++	323.7 ↑	36188 ↑				
2020-07-20					79	6.8 ↑	272	90
2020-07-22					102	5.5	217	60

2 分析与探讨

2.1 不良反应相关性判断

免疫检查点抑制剂 (ICIs) 所致免疫相关性

肾损伤的治疗较为特殊, 不同于常规的药物性肾损伤, 所以确诊时需谨慎, 应排除其他可能造成肾损伤的原因。当监测出现血肌酐异常时, 应开

作者简介: 章斌, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学工作, E-mail: zhb.1211@126.com *通信作者: 李艳, 女, 博士, 主治医师, 主要从事原发或继发的急性慢性肾炎研究, E-mail: lisa51@139.com

始肾功能异常的鉴别诊断,以区分肾前性、肾性及肾后性因素。详细询问病史,包括液体出入量、有无腹泻及感染、其他药物使用史如非甾体抗炎药(NSAIDs)、质子泵抑制剂(PPIs)及氨基糖苷类抗菌药物等。完善尿常规及沉渣、肾功能及尿蛋白定量、尿相差显微镜、影像学等辅助检查。筛查尿常规如提示白细胞或红细胞升高,伴蛋白尿,且尿培养阴性,患者亦无尿频尿急尿痛等尿路刺激征的表现,提示为急性间质性肾炎(AIN)所致的急性肾损伤。确诊 AIN 需行肾活检,但在明确患者是在使用某种致病药物后出现的急性肾损伤(AKI)时,一般认为没有必要行肾活检。

根据国家药品不良反应评价中心制订的不良反应关联性评价标准,该患者符合:

① 化疗 8 次后出现肾功能不全症状,免疫性肾损伤与卡瑞利珠单抗的使用存在合理的时间关系。② 说明书中有介绍该药致免疫性肾损伤的不良反应,中重度肾功能不全患者不推荐使用;轻度肾功能不全患者应在医师指导下慎用,如确需使用,无需调整剂量。③ 化疗 8 次后出现肌酐升高等肾功能不全症状,给予激素治疗后,肾功能恢复正常,病情稳定。④ 未再次使用卡瑞利珠单抗。⑤ 完善各项检查后,临床诊断为 AIN,考虑是药物引起的 AKI,无其他药物用药史。因此,判断患者免疫相关性肾损伤的原因很可能是卡瑞利珠单抗所致。

2.2 免疫相关性肾损伤的发生机制

免疫相关性肾损伤的发生机制还未明确,主要为免疫系统非特异性激活(TCR-MHC 作用),非特异性刺激 T 细胞持续活化,活化的 T 细胞不能区分肿瘤组织与正常组织,导致对自身组织包括肾脏的损伤;T 细胞多样化(PD-1 被 ICI 阻断的 T 细胞)。免疫治疗相关的 AIN 可能是由于 PD-1 信号通路的阻断改变了 T 细胞对肾脏固有抗原(自身免疫相关)或伴随药物(药物诱导的)的免疫耐受^[4]。PD-1 信号在维持外周 T 细胞免疫耐受中起重要作用。在肾小管细胞上表达 L1 保护这些细胞免受 T 细胞介导的自身免疫。也有研究表明,体内存在一些自身反应性 T 细胞,它们通常通过几种机制保持休眠,以防止自身免疫^[5]。

2.3 病理表现和临床特点

肾脏疾病的发生发展与免疫系统关系密切,PD-1 抗体亦有导致肾脏损伤发生的风险。免疫相关性肾损伤的发生率约为 2.2%^[6]。AKI 是 ICI 免疫治疗的罕见并发症。有病例系列研究显示,最

常见的是 AIN,但也有免疫复合物性肾小球肾炎和血栓性微血管病。但目前尚无卡瑞利珠单抗致免疫相关性肾损伤的个案报道。随着肿瘤免疫治疗的不断推广,PD-1 抗体导致的肾损伤将不断攀升,成为药物性肾损伤的重要组成部分。

PD-1 抗体致免疫相关性肾损伤一般在开始治疗后 3~10 个月出现^[7],中位时间大约 4.5 个月^[8],在停止免疫治疗后仍有可能发生。该患者不良反应出现在用药后 4 个月,与既往研究数据相符。最新的统计研究显示,PD-1 抗体致免疫相关性肾损伤的中位发生时间为 48 d,个别发生在首次给药后^[9]。因此,应严密监测肾功能,尤其是在 ICI 给药后的前几个月内。

2.4 危险因素及注意事项

免疫相关性肾损伤的危险因素包括基线 eGFR、联用 PPIs、联合免疫治疗(PD-1 抑制剂/PD-L1 抑制剂与 CTLA-4 抑制剂联用)^[5,10]。再次接受免疫治疗是否会激发免疫相关性肾毒性仍存在争议。出现免疫相关性肾损伤的患者在病情缓解后,建议继续每周监测血清肌酐水平至少 1~3 个月。

2.5 分级和治疗

目前血清肌酐虽不够敏感,但仍是最为经济有效的筛查方式。如出现病情明显变化或影响重要药物使用的决策,肾活检是确诊肾脏损伤的金标准。建议在使用 ICI 之前进行基线尿液分析,并定量蛋白尿或微量白蛋白尿,从而更好地了解患者的基线肾脏特征,便于医师在治疗过程中进行数据比较。此外,可以关注 C 反应蛋白(CRP)。最新研究发现,在 irAEs 的发展过程中,CRP 通常会在临床症状出现之前升高。因此,CRP 可能是使用 ICI 患者发生 irAEs 的预测指标,可作为肾脏 irAEs 的诊断和后续免疫应答治疗反应的辅助生物标志物^[11]。irAEs 管理主要参考美国食品药品监督管理局、中国临床肿瘤学会、美国临床肿瘤学会、欧洲肿瘤内科学会等管理指南,汇总如下(见表 2)^[10]。该患者 Scr > 3 ULN,根据肾损伤分级标准为 3 级,停用卡瑞利珠单抗,给予激素治疗后肾功能恢复正常。

2.6 预后

糖皮质激素对于 ICI 所致 AIN 有较好的效果。大多数诊断明确的患者如及时干预,肾功能多数可部分甚至完全恢复,同时病情复发的情况少见^[3]。如肾脏病理提示明确的肉芽肿病变形,可能提示对激素的反应及肾功能恢复均不佳。此外,其他特殊类型的肾小球疾病十分罕见,预后

表 2 免疫相关性肾损伤的管理

分级	分级标准	治疗和随访
1 级	无症状或轻度症状 Scr > 1.5 ~ 2 ULN 或 Scr > 0.3 mg · dL ⁻¹	继续 ICIs 治疗, 无需干预; 监测肌酐和尿蛋白
2 级	中度症状 Scr > 2 ~ 3 ULN	暂停 ICIs 治疗; 对症治疗; 0.5 ~ 1 mg/(kg · d) 泼尼松口服或等效静脉给药; 每 3 ~ 7 日监测肌酐和尿蛋白; 如改善至 1 级激素减量维持至少 1 个月, 逐渐恢复 ICIs 治疗; 如无改善或加重继续激素治疗
3 级	重度症状 Scr > 3 ULN 或 Scr > 4 mg · dL ⁻¹	永久停用 ICIs 治疗; 1 ~ 2 mg/(kg · d) 甲泼尼龙静脉给药; 如恢复到 2 级则改为 1 ~ 2 mg/(kg · d) 泼尼松口服维持; 如未改善、加重或反弹加用吗替麦考酚酯或环孢素或环磷酰胺或硫唑嘌呤等免疫抑制剂
4 级	危及生命 Scr > 6 ULN	永久停用 ICIs 治疗; 处理同终末期肾病需要维持性血液透析

方面仍需进一步统计。该患者经过激素积极治疗后, 肾功能逐渐恢复正常, 病情稳定未再复发。该患者在最后一次化疗方案后发生的 AIN, 故不存在再次接受同一治疗方案再次发生 AKI 的风险。若还要继续化疗, 应警惕 PD-1 抗体导致 AKI 的不良预后和复发风险, 重在预防。在 ICIs 治疗前, 评估肾功能, 停用其他肾毒性药物; 治疗中, 减少 PPIs、NSAIDs 等联合用药, 降低药物肾损伤的叠加风险; 对于已经发生的 AKI, 可暂停相关药物, 待肾功能恢复后, 在条件允许下可更换抗体种类, 并严格监测尿量与肾功能, 警惕 AKI 复发^[12]。

3 总结

免疫相关性肾损伤等 irAEs 可对全身各器官和组织造成损害, 并具有独特的作用机制, 随着 ICIs 在肿瘤治疗的应用愈来愈广泛, T 细胞过度活化带来的免疫不良事件须引起警惕。应根据 irAEs 发生的器官系统和组织部位的不同特点进行针对性的处理, 治疗药物以糖皮质激素和免疫抑制剂为基础; 应对 irAEs 进行全程化管理, 包括预防、评估、检查、治疗、监测等闭环式管理, 根据具体情况制订个体化诊疗方案, 往往需要肿瘤、肾脏内科甚至泌尿外科等多学科合作, 以有效保障患者的用药安全。

参考文献

- [1] Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, et al. Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 57: 36-49.
- [2] Haanen JBAG, Carbone F, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO clinical

practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29 (Suppl 4): iv264-iv266.

- [3] Murakami N, Borges TJ, Yamashita M, et al. Severe acute interstitial nephritis after combination immune-checkpoint inhibitor therapy for metastatic melanoma [J]. *Clin Kidney J*, 2016, 9 (3): 411-417.
- [4] Koda R, Watanabe H, Truchida M, et al. Immune checkpoint inhibitor (nivolumab)-associated kidney injury and the importance of recognizing concomitant medications known to cause acute tubulointerstitial nephritis: A case report [J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19 (1): 48.
- [5] Luca P, Vittorio S, Lorenzo DL, et al. Nephrotoxicity associated with novel anticancer agents (aflibercept, dasatinib, nivolumab): Case series and nephrological considerations [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (14): 4878.
- [6] Cortazar FB, Marrone KA, Troxell ML, et al. Clinicopathological features of acute kidney injury associated with immune checkpoint inhibitors [J]. *Kidney Int*, 2016, 90 (3): 638-647.
- [7] 中国临床肿瘤学会 (CSCO). 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 (2019) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- [8] 广东省药学会. 免疫检查点抑制剂全程化药学服务指引 (2019 年版) [J]. *今日药学*, 2020, 30 (5): 289-306.
- [9] Chen G, Qin Y, Fan Q, et al. Renal adverse effects following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens: A real-world pharmacoepidemiology study of post-marketing surveillance data [J]. *Cancer Med*, 2020, 9 (18): 6576-6585.
- [10] Hassan I, Christine M, Boutros C, et al. Renal effects of immune checkpoint inhibitors [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32 (6): 936-942.
- [11] Meraz-Muñoz A, Amir E, Ng P, et al. Acute kidney injury associated with immune checkpoint inhibitor therapy: Incidence, risk factors and outcomes [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (1): 1-9.
- [12] 刘章锁, 刘东伟, 潘少康. 肿瘤免疫治疗与急性肾损伤 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 6 (27): 551-552.

(收稿日期: 2021-01-26; 修回日期: 2021-04-05)

吉非替尼致药物性肝损伤 1 例

贾东丽¹, 张阳², 韩欢欢¹ (1. 邯郸市第一医院药学部, 河北 邯郸 056002; 2. 邯郸市第一医院胸外科, 河北 邯郸 056002)

关键词: 吉非替尼; 肺癌; 药物性肝损伤; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2021)09-1996-03

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2021.09.044

肺癌是目前全世界发病率和病死率最高的恶性肿瘤, 其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 约占肺癌总发病率的 80% ~ 85%^[1], 在 NSCLC 患者的致癌驱动基因中, 表皮生长因子受体 (EGFR) 基因的突变比例最高, 约为 50.2%^[2], 针对该基因突变的表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 现已被广泛应用于临床。与传统化疗相比, EGFR-TKI 具有较少的不良反应和较高的安全性及有效性^[3], 避免了传统细胞毒类化疗药物常见的恶心、呕吐、脱发和骨髓抑制等不良反应, 但 EGFR-TKI 有其特有的不良反应。吉非替尼是第一个用于治疗 NSCLC 的 EGFR-TKI, 其不良反应主要包括皮疹、腹泻、甲沟炎、肝损伤、间质性肺疾病等, 这些不良反应的发生会导致靶向治疗药物减量或中断, 从而影响抗肿瘤治疗。本文对 1 例应用吉非替尼后出现急性药物性肝损伤 (DILI) 的案例进行分析, 以期为临床安全用药提供参考。

1 病史资料

患者, 女, 54 岁, 身高 160 cm, 体质量 50 kg。2018 年 4 月因体检行胸部 CT 检查示: 左肺下叶占位性病变, 行气管镜检查刷片示: 有腺癌细胞。4 月 22 日行胸腔镜左肺下叶切除术+纵隔淋巴结清扫术, 术后诊断: 左肺下叶浸润性腺癌 (T2N2M0 IIIA 期)(腺泡型, 乳头型, 微乳头型)。既往无特殊病史, 无食物及药物过敏史。

2018 年 5—8 月行培美曲塞 800 mg d1 + 卡铂 500 mg d2 方案化疗 3 个周期, 6 月 13 日行基因检测示 *E19* 缺失, 6 月 16 日开始应用吉非替尼靶向治疗。8 月 15 日 (第 4 周期化疗前) 复查提示肝功能异常 [谷丙转氨酶 (ALT) 997 U · L⁻¹ ↑, 谷草转氨酶 (AST) 1029 U · L⁻¹ ↑, 碱性磷酸酶 (ALP) 209 U · L⁻¹ ↑, γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GGT) 271 U · L⁻¹ ↑, 总胆红素 (TBil) 25.3

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑], 医师考虑可能为化疗药物所致肝损伤, 暂停化疗及靶向治疗, 并给予保肝治疗 (还原型谷胱甘肽+异甘草酸镁)。9 月 26 日复查肝功能各项指标较前明显好转 (ALT 49 U · L⁻¹ ↑, AST 67 U · L⁻¹ ↑, ALP 102 U · L⁻¹, γ -GGT 81 U · L⁻¹ ↑, TBil 11.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 后逐渐停用保肝治疗药物。医师及患者考虑到疾病治疗的重要性, 2018 年 12 月 13 日开始继续应用吉非替尼单药治疗, 2019 年 1 月 1 日复查肝功能再次出现异常 (ALT 1144 U · L⁻¹ ↑, AST 1177 U · L⁻¹ ↑, ALP 263 U · L⁻¹ ↑, γ -GGT 483 U · L⁻¹ ↑, TBil 69.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑), 行腹部增强 CT 示肝胆胰脾无异常, 医师、药师均考虑为急性 DILI, 立即停用吉非替尼, 给予保肝治疗 (还原型谷胱甘肽+异甘草酸镁+熊去氧胆酸), 定期复查。2019 年 2 月 21 日检查示肝功能各项指标明显下降, 但之后出现一过性升高, 2019 年 9 月 3 日肝功能恢复正常。保肝治疗期间医师建议患者更换为埃克替尼继续靶向治疗, 患者担心药物不良反应, 坚持暂停抗肿瘤治疗。

2019 年 12 月 18 日复查示疾病进展 (颅脑多发转移、双肺多发转移), 2019 年 12 月—2020 年 1 月给予培美曲塞+卡铂+重组人血管内皮抑制素+奥希替尼治疗 2 个周期, 2020 年 2 月 13 日给予培美曲塞+重组人血管内皮抑制素+奥希替尼治疗 1 个周期, 后因血小板 II 度减少 ($63 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$) 一直应用重组人血管内皮抑制素联合奥希替尼方案维持。2020 年 2 月 10 日疗效评价为部分缓解, 之后定期复查疗效评价为稳定, 患者一直应用奥希替尼 (80 mg qd) 治疗, 用药期间定期复查肝功能均未见异常。

2 分析讨论

2.1 不良反应关联性评价

根据国家药品不良反应监测的关联性评价原

作者简介: 贾东丽, 女, 主要从事抗肿瘤药物研究, E-mail: 1067188577@qq.com

则：① 患者用药前肝功能正常，应用吉非替尼约 2 个月后发现肝功能异常；② 吉非替尼说明书及文献资料^[4]指出其可致转氨酶、总胆红素升高，且极为常见；③ 患者停用吉非替尼并保肝治疗 1 个月后，肝功能各项指标好转；④ 为控制肿瘤，患者再次应用吉非替尼后肝功能再次出现明显异常，停药并保肝治疗后好转，后更换为奥希替尼治疗期间肝功能未再出现异常；⑤ 患者左肺下叶浸润性腺癌术后，无肝炎病史，复查腹部 CT 排除肝转移及其他肝脏疾病，故可以排除疾病本身所致肝功能异常。因此，该患者使用吉非替尼与肝损伤因果关系评价为肯定。

2.2 发生不良反应原因分析

2.2.1 食物药物相互作用

吉非替尼与抑酸剂、CYP3A 抑制剂、CYP3A4 诱导剂或 CYP2D6 抑制剂同时应用时肝毒性发生率可能增加^[5-6]。食物如西柚和葡萄柚（汁）具有强效 CYP3A4 酶抑制作用，与吉非替尼同时应用可致吉非替尼血药浓度增加，导致不良反应发生。另外，饮酒亦可加重肝损伤。该患者应用吉非替尼期间未合并使用其他药物，服药期间亦未饮酒或食用西柚和葡萄柚（汁），故可排除食物药物相互作用的影响。

2.2.2 患者自身因素

首先，有研究显示基因突变类型、肿瘤分期、rs1065852 位点基因型不同均是肝损害的独立因素：肿瘤 IV 期肝损害发生风险率为 I 期的 4.729 倍^[7]；EGFR 21 L858R 突变的肝损伤发生风险率为 EGFR 19del 缺失的 0.492 倍（即负相关），肝毒性的严重程度与丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）1 rs13515 的遗传突变相关^[8]；单核苷酸基因多态性（SNP）：AA 和 GA 型的肝损伤发生风险率分别为 GG 型的 2.276 倍和 2.797 倍。该患者为肿瘤 IV 期及第 19 位外显子缺失，这可能是其肝损伤的主要原因之一；其次，吉非替尼在体内主要经肝脏 CYP450 酶系中的 CYP3A4/5、CYP1A1 和 CYP2D6 代谢，其肝毒性与 CYP2D6 的基因多态性有关，但该患者 CYP2D6 的基因多态性未检测。

2.3 药物性肝损伤时的治疗药物调整

参考《药物性肝损伤诊治指南》^[9]，该患者诊断为 DILI，肝细胞损伤型，急性，RUCAM 10 分（极可能），严重程度 2 级。参考美国 FDA 制订药物临床试验中出现 DILI 的停药原则，该患者 ALT 及 AST 均 > 8 ULN，应立即停药，并给予保肝治疗。参考《肿瘤药物相关性肝损伤防治专家共识》^[10]，急性期建议使用 1 ~ 2 种解毒护肝

药 + 抗炎护肝药治疗，待血清生化指标稳定或好转，可改为抗炎护肝药 + 必需磷脂类药物。医师急性期立即停药，并应用异甘草酸镁 + 还原型谷胱甘肽保肝治疗合理。

患者两次应用吉非替尼后均出现肝损伤，停药近 1 年复查疾病进展（颅脑多发转移、双肺多发转移）。查阅文献资料有以下几种方案：

① 吉非替尼减量使用：有研究显示减量使用仍可抑制肿瘤生长，但也可能面临疾病较快进展的风险^[11-12]。

② 换用其他 EGFR-TKI 如厄洛替尼、埃克替尼、奥希替尼等。有研究报道，对于吉非替尼所致肝毒性的患者，换用厄洛替尼，同时加强肝功能监测，可能是不错的替代方案，但也可能再次出现肝损伤。

③ 换用化疗：不能耐受靶向药物治疗的患者可换用培美曲塞、紫杉醇、多西他赛或吉西他滨和铂类药物联合的方案^[13]。

患者再次行基因检测（血液标本）提示 *E19* 突变，参考 2020 年中国临床肿瘤学会（CSCO）《非小细胞肺癌诊疗指南》^[14]，EGFR 突变阳性 IV 期非小细胞肺癌应给予 EGFR-TKI 类药物如一代吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼，二代阿法替尼、达克替尼，三代奥希替尼治疗，故医师建议患者继续应用 EGFR-TKI 类靶向治疗，下一步 EGFR-TKI 品种如何选择值得深思。研究显示^[15-17]阿法替尼、达克替尼、奥希替尼疗效优于一代 EGFR-TKI；二代 EGFR-TKI 较一代 EGFR-TKI 具有更优的疗效，但不良反应也显著增加，近 2/3 的患者因不良反应需要进行剂量调整；三代 EGFR-TKI 奥希替尼较一代 EGFR-TKI 显著延长无进展生存期（PFS），且具有更好的颅内病灶控制效果。故医师药师共同分析建议患者选用颅内转移癌疗效好且不良反应相对小的奥希替尼^[18-20]，并监测肝功能，患者接受此治疗方案。另外，对于 IV 期驱动基因阳性非小细胞肺癌的联合治疗模式，EGFR-TKI 联合化疗或抗血管生成治疗也为一线选择，但该患者奥希替尼 + 培美曲塞 + 卡铂 + 重组人血管内皮抑制素的四药联合方案是否合理还需要进一步循证证据支持。

3 小结

EGFR-TKI 能改善晚期 NSCLC 患者的临床结局，目前成为 NSCLC 治疗的重要部分，EGFR-TKI 有其特有的不良反应，但多数不良反应是可防、可控的。本文阐述了 1 例应用吉非替尼后出

现急性 DILI 的案例, 对其原因进行分析, 并对患者用药过程进行监护教育, 保障了患者用药安全。该病例提示, 临床医师与药师均应密切关注 EGFR-TKI 药物不良反应, 做好患者宣教、及早识别和积极采取有效干预措施, 使 EGFR-TKI 所致不良反应最小化, 避免不必要的减量或过早停药而中断有效治疗, 保障患者用药安全、有效。

参考文献

- [1] Lu S, Yu Y, Yang Y. Retrospect and prospect for lung cancer in China: Clinical advances of immune checkpoint inhibitors [J]. *Oncologist*, 2019, 24 (Suppl 1): S21-S30.
- [2] Shiau CJ, Babwan JP, Cunha Santos GD, et al. Sample features associated with success rates in population based EGFR mutation testing [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9 (7): 947-956.
- [3] 靳贺, 杨黎, 李春刚. 非小细胞肺癌靶向治疗研究进展 [J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32 (7): 105-110.
- [4] 戴冰, 杨洋, 杨甜, 等. 基于美国不良事件报告系统数据库的吉非替尼不良反应信号挖掘 [J]. *中国药业*, 2020, 29 (11): 92-95.
- [5] Cho S, Yee J, Kim JY, et al. Effects of concomitant medication use on gefitinib-induced hepatotoxicity [J]. *J Clin Pharmacol*, 2018, 58 (2): 263-268.
- [6] 刘素侠, 王义坤. 探析代谢活化在酪氨酸激酶抑制剂所致肝毒性的作用及防治对策 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (4): 589-594.
- [7] 陈丽鹃, 俞婷婷, 单莉, 等. NSCLC 患者 CYP2D6 基因多态性与吉非替尼不良反应相关性研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29 (2): 248-252.
- [8] 冯薇, 陈曦, 管少兴, 等. MAPK1 基因多态性与 EGFR 敏感型非小细胞肺癌患者吉非替尼肝毒性的相关性 [J]. *药理学学报*, 2018, 53 (5): 760-764.
- [9] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南 [J]. *实用肝病杂志*, 2017, 20 (2): 257-274.
- [10] 于世英, 姚阳. 肿瘤药物相关性肝损伤防治专家共识 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2014.
- [11] 许绍兰, 孟慧, 原源, 等. 吉非替尼导致肝毒性的用药调整及药学服务 [J]. *药学服务与研究*, 2019, 19 (6): 458-460.
- [12] Sugiura Y, Nemoto E, Kawai O, et al. Gefinitib frequently induces liver damage in patients with lung adenocarcinoma previously treated by chemotherapy [J]. *Lung Cancer (Auckl)*, 2013, 4: 9-14.
- [13] 王江峰. 吉非替尼诱发肝损伤 1 例分析 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10 (7): 96-98.
- [14] 赫捷, 李进, 马军, 等. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 常见恶性肿瘤诊疗指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 91-129.
- [15] Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): A randomised, openlabel, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 (11): 1454-1466.
- [16] Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (1): 41-50.
- [17] Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al. CNS response to osimertinib versus standard epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36 (33): 3290-3297.
- [18] 王华玉, 杜芑, 刘乐, 等. 甲磺酸奥希替尼不良反应文献分析 [J]. *中国药房*, 2019, 30 (3): 391-396.
- [19] 中国抗癌协会肺癌专业委员会. EGFR-TKI 不良反应管理专家共识 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22 (2): 57-77.
- [20] 饶晓明, 李海燕, 李凯. 抗非小细胞肺癌药物奥希替尼研究进展 [J]. *安徽医药*, 2019, 23 (3): 611-614.

(收稿日期: 2021-01-12; 修回日期: 2021-04-13)