中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 19 卷　第 12 期（总第 191 期）　2021 年 12 月 20 日出版

顾问
周宏灏

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。

目　次

研究论文

（2483）褪黑素对人神经胶质瘤 U118 细胞的抗增殖作用及机制研究 …… 李鑫，吕子阳，刘佳佳，等

（2489）阿魏酸通过抑制 MAPK 和 NF-κB/IκBα 信号通路减轻大鼠肝纤维化的机制研究 …… 王媛媛，朱浩，史玉欢，等

（2496）基于转运体 MRP2 和 P-gp 研究甘草酸对雷公藤多苷所致肝损伤的保护作用及机制 …… 鞠爱霞，胡勇，单万亭，等

（2502）石杉碱甲衍生物预防梭曼中毒的研究 …… 崔雅岚，张瑞华，靳倩，等

（2507）歪头菜黄酮类化学成分研究 …… 罗礼，张伟，楚建杰，等

（2511）伏九贴敷药物通过调控 RORγt、Foxp3 mRNA 表达重塑 Th17/Treg 免疫平衡的抗哮喘机制初探 …… 付昆，杨艳，陆一菱，等

（2517）呋塞米杂质 B 的潜在毒性预测研究 …… 姜宏宇，王翰洵，王健

（2520）LC-MS/MS 自身内标法测定人血浆中达比加群浓度 …… 王峰，何昕，钱懿轶

（2525）注射用曲札芪苷类过敏反应检测体系的应用 …… 杨炳治，杨旭娟，黄茜，等

（2530）基于多指标 - 响应曲面法优选“建昌帮”姜天麻提取工艺 …… 周莉莉，张霞，彭巧珍，等

（2536）藤石松乙酸乙酯部位的化学成分研究 …… 姚晓长，蒋梅香，刘阳，等

（2540）柏子仁抗焦虑作用评价及机制探究 …… 蒋征奎，宁二娟，王学方，等

（2545）基于星点设计 - 响应面法的红景天提取物冻干口崩片制备工艺研究 …… 李红鑫，吴菲，吴婧楠，等

（2549）阿胶强骨口服液对大鼠缺铁性贫血的改善及其对铁代谢的调节作用机制初探 …… 恰木斯亚·吐尔逊哈里，美拉依·吉恩斯，武嘉林

（2555）复方磺胺甲噁唑片人体生物等效性研究 …… 吴蔚，肖珍，张顺芝，等

《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 睢大筵 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： 邬志娟 彭金飞 李 科
陆窈窈

（2559）荧光光谱法研究萘普生和壳聚糖之间的相互作用 …… 孙杰，张冰卫，徐光富，等

（2564）LC-MS-MS 法测定人血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的浓度 …… 易志恒，李筱旻，申秋莹，等

（2569）中药千金黄连丸的抗动脉粥样硬化作用 …… 李静，陈泫锦，佘成烨，等

药品不良反应信号监测专题

（2576）基于 FAERS 数据库的 3 种碳青霉烯类药物不良反应信号挖掘研究 …… 唐春梅，杨思芸，詹阳洋，等

（2582）基于美国 FAERS 数据库的新型降脂药前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂药物不良信号的数据挖掘与分析 …… 张莎，祝德秋

综述

（2588）高原低氧环境下机体药动学参数变化对临床用药的启示 …… 周杨，朱俊博，李向阳

（2597）劳拉替尼在 ALK 阳性非小细胞肺癌中的应用 …… 侯举，孙吉，欧阳丽辉，等

（2603）胆汁淤积症的生物机制研究进展…… 卢颖，秦琳，谭道鹏，等

（2609）SIRT1 在心血管疾病中的研究进展 …… 武丹，祝德秋

药物分析与检验

（2616）色选分级技术在通渭金银花质量等级划分上的应用研究 …… 郭然，代熙，黄厚钰，等

（2622）两广地区地龙中 22 种无机元素量变规律研究 …… 陈林明，林晓坤，王智民，等

（2628）高效液相色谱法测定头孢拉定胶囊有关物质及方法学验证 …… 杜玮炜

（2633）芪苓益肾颗粒高效液相色谱指纹图谱物质基准研究及 7 种成分含量测定 …… 王隆隆，杨忠杰，张海风，等

（2639）D- 甘露醇标准样品的研制 …… 晋文慧，陈伟珠，张怡评，等

（2645）高效液相色谱法测定克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量 …… 郭丹峰，雷建刚，章泽恒

（2648）基于 QuEChERS-GC-MS/MS 法同时测定湘产黄精中的 74 种农药残留 …… 马杰，丁野，孙辉，等

（2655）盐酸倍他司汀中基因毒性杂质甲醛的测定 …… 李沫，张耀文，孙苓苓，等

（2658）苦参碱及其氯化钠注射液有关物质检查方法研究 …… 严菲，顾小燕，陈民辉，等

（2662）筋骨宁膏中黄曲霉毒素的测定…… 倪倩，南文萍，张俐

医院药学

（2666）某地区新生儿痰标本金黄色葡萄球菌分离株耐药情况及分子特征
…… 黄金华，傅锦坚，梁婧，等
（2671）沙格雷酯片合理使用评价标准的建立及应用
…… 司福国，崔佳，曹迪，等
（2675）新冠疫情后湖南省居民用药行为风险 KAP 调查
…… 何丹，梁群，张超，等

临床药师在临床

（2680）基于加速康复外科关节置换术临床药学服务模式实践与探讨
…… 余江丽，李平，吴韧，等
（2685）基于治疗药物监测干预丙戊酸和利福平药物相互作用的案例分析
…… 史群志，吴戈，刘芳群，等
（2688）围术期血小板减少患者的药学监护
…… 丁英龙，秦琼，谢诚，等
（2692）临床药师参与妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁中毒的药学实践与思考 …… 张俊杰，张韶辉，郭珩，等

药物与临床

（2695）如意金黄散联合抗菌药物治疗皮肤软组织感染的临床研究
…… 邢竹兰，王敏
（2699）重症患者应用万古霉素联合不同 β- 内酰胺类抗菌药物治疗的急性肾损伤风险比较 …… 续茜桥，杨春静，时正媛

药品不良反应

（2704）托伐普坦相关不良反应文献分析…… 刘艳，刘慧，王娟，等
（2710）蒲地蓝消炎制剂致肝损伤 8 例并文献复习
…… 刘金春，张帆，陈重，等
（2716）特利加压素致自主神经功能紊乱 1 例
…… 曹铭晨，胡晓燕，唐宁，等
（2721）帕博利珠单抗致免疫相关性重症肌无力 1 例
…… 徐小婷，马芳，刘文辉，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*238*zh*P*20.0*47*2021-12
本期责任编辑：邬志娟，陆窈窈，彭金飞，李科
英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 19, Number 12 December 20 2021

Consultant
ZHOU Hong-hao

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

(2483) Anti-proliferation effect of melatonin on human glioma U118 cells and its mechanism ····· *LI Xin, LYU Zi-yang, LIU Jia-jia, et al*

(2488) Ferulic acid reduces liver fibrosis by inhibiting MAPK and NF-κB/IκBα signaling pathways in rats ····· *WANG Yuan-yuan, ZHU Hao, SHI Yu-huan, et al*

(2496) Protective effect and mechanism of glycyrrhizic acid on Tripterygium wilfordii multiglycoside-induced hepatic injury based on transporter MRP2 and P-gp ····· *JU Ai-xia, HU Yong, SHAN Wan-ting, et al*

(2502) Protective effect of Huperzine A derivatives against soman intoxication ····· *CUI Ya-lan, ZHANG Rui-hua, JIN Qian, et al*

(2507) Flavoids from the whole plant of *Vicia unijuga* A. Br. ····· *LUO Li, ZHANG Wei, CHU Jian-jie, et al*

(2511) Anti-asthmatic mechanism of Fujiu patching medicine in restoring Th17/Treg immune balance via regulating RORγt and Foxp3 mRNA expressions ····· *FU Kun, YANG Yan, LU Yi-ling, et al*

(2517) Potential toxicity of impurity B in furosemide preparation ····· *JIANG Hong-yu, WANG Han-xun, WANG Jian*

(2521) Determination of dabigatran concentration in human plasma by LC-MS/MS method with self-internal standard ····· *WANG Feng, HE Xin, QIAN Yi-yi*

(2525) Allergic reaction evaluation system of piceatannol-3'-*O*-β-*D*-glucopyranoside for injection ····· *YANG Bing-zhi, YANG Xu-juan, HUANG Xi, et al*

(2530) Extraction of *Gastrodia elata* processed with ginger juice from Jianchangbang by multi-index-response surface methodology ····· *ZHOU Li-li, ZHANG Xia, PENG Qiao-zhen, et al*

(2536) Chemical constituents of ethyl acetate extract from *Lycopodiastrum casuarinoides* ····· *YAO Xiao-chang, JIANG Mei-xiang, LIU Yang, et al*

(2540) Anti-anxiety effect of *Platycladi semen* and related mechanism ····· *JIANG Zheng-kui, NING Er-juan, WANG Xue-fang, et al*

Postal code
42-290

Printed by
Changsha city Kaifu district Shanjun printing Factory

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

Subscribe
Post office nationwide for subcription 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.

(2545) Preparation of oral disintegrating tablets of rhodiola extract based on central composite design and response surface methodology ····· *LI Hong-xin, WU Fei, WU Jing-nan, et al*

(2549) Ejiao Qianggu oral liquid improves iron deficiency anemia in rats and mechanism of iron metabolism regulation ····· *Qiamusiya • Tuerxunhali, Meilayi • Jiensi, WU Jia-lin*

(2555) Bioequivalence of compound sulfamethoxazole tablets ····· *WU Wei, XIAO Zhen, ZHANG Shun-zhi, et al*

(2559) Interaction between naproxen and chitosan by fluorescence spectroscopy ····· *SUN Jie, ZHANG Bing-wei, XU Guang-fu, et al*

(2564) LC-MS-MS determination of atorvastatin，ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma ····· *YI Zhi-heng, LI Xiao-min, SHEN Qiu-ying, et al*

(2569) Anti-atherogenic effect of Chinese polyherbal Qianjin Huanglian Wan ····· *LI Jing, CHEN Xuan-jin, SHE Cheng-ye, et al*

(2576) Adverse drug reaction signals of 3 carbapenems based on the FAERS database ····· *TANG Chun-mei, YANG Si-yun, ZHAN Yang-yang, et al*

(2582) Adverse drug events signals of PCSK9 inhibitors based on the FAERS database ····· *ZHANG Sha, ZHU De-qiu*

(2588) Effect of changes in pharmacokinetic parameters on clinical medication under hypoxic environment at high altitude ····· *ZHOU Yang, ZHU Jun-bo, LI Xiang-yang*

(2597) Application of lorlatinib in ALK-positive non-small cell lung cancer ····· *HOU Ju, SUN Ji, OU YANG Li-hui, et al*

(2603) Research progress in the biological mechanism of cholestasis ····· *LU Ying, QIN Lin, TAN Dao-peng, et al*

(2609) Role of SIRT1 in cardiovascular diseases ····· *WU Dan, ZHU De-qiu*

(2616) Color grading technology in the quality classification of *Lonicera japonica* Flos in Tongwei ····· *GUO Ran, DAI Xi, HUANG Hou-yu, et al*

(2622) Quantitative variation of 22 inorganic elements in pheretima from Guangdong and Guangxi ····· *CHEN Lin-ming, LIN Xiao-kun, WANG Zhi-min, et al*

(2628) HPLC determination of related substances in cefradine capsules and validation of methodology ····· *DU Wei-wei*

(2633) HPLC fingerprint of Qiling Yishen granules and the determination of 7 components ····· *WANG Long-long, YANG Zhong-jie, ZHANG Hai-feng, et al*

(2639) Development of D-mannitol certified reference material ····· *JIN Wen-hui, CHEN Wei-zhu, ZHANG Yi-ping, et al*

(2645) HPLC determination of disodium edetate in clindamycin phosphate injection ····· *GUO Dan-feng, LEI Jian-gang, ZHANG Ze-heng*

(2648) Simultaneous determination of 74 pesticide residues in Polygonati Rhizoma from Hunan by QuEChERS-GC-MS/MS ····· *MA Jie, DING Ye, SUN Hui, et al*

(2655) Determination of genotoxic impurity formaldehyde in betahistine hydrochloride ····· *LI Mo, ZHANG Yao-wen, SUN Ling-ling, et al*

(2658) Determination method of related impurities of matrine or its sodium chloride injection ····· *YAN Fei, GU Xiao-yan, CHEN Min-hui, et al*

(2662) Determination of aflatoxin in Jinguning ointment ····· *NI Qian, NAN Wen-ping, ZHANG Li*

(2666) Antibiotic resistance and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from sputum samples in neonatology ····· *HUANG Jin-hua, FU Jin-jian, LIANG Jing, et al*

(2671) Evaluation criteria for rational use of sarpogrelate tablets ····· *SI Fu-guo, CUI Jia, CAO Di, et al*

(2675) KAP survey on drug usage behavior risk of residents in Hunan province after the COVID-19 outbreak ····· *HE Dan, LIANG Qun, ZHANG Chao, et al*

(2680) Clinical pharmacy service model based on enhanced recovery after surgery joint arthroplasty ····· *YU Jiang-li, LI Ping, WU Ren, et al*

(2695) Clinical efficacy of Ruyi Jinhuang powder combined with antibiotics for skin and soft tissue infection ····· *XING Zhu-lan, WANG Min*

(2699) Acute kidney injury risks in critically ill patients receiving vancomycin and concomitant beta-lactam antibiotics ····· *XU Xi-qiao, YANG Chun-jing, SHI Zheng-yuan*

(2710) 8 cases of liver injury caused by Pudilan anti-inflammatory preparations and literature review ····· *LIU Jin-chun, ZHANG Fan, CHEN Zhong, et al*

研究论文

褪黑素对人神经胶质瘤 U118 细胞的抗增殖作用及机制研究

李鑫，吕子阳，刘佳佳*，王珊*（中南大学化学化工学院制药工程系，长沙　410083）

摘要：目的　研究褪黑素（MT）对人神经胶质瘤 U118 细胞增殖能力及膜联蛋白 A2（ANXA2）和促癌蛋白 c-Myc 表达的影响。**方法**　用不同浓度的 MT（1 nmol • L^{-1}，100 nmol • L^{-1}，10 μmol • L^{-1}，1 mmol • L^{-1}）处理 U118 细胞后，CCK-8 法检测各组细胞活性。用 1 mmol • L^{-1} MT 处理 U118 细胞后，EDU 染色法检测各组细胞 DNA 合成情况，克隆形成法检测各组细胞克隆数，Western blot 检测增殖标记物 Ki67 和 PCNA 的表达情况及 ANXA2 和 c-Myc 的蛋白表达情况，RT-qPCR 检测 ANXA2 的 mRNA 的表达情况。**结果**　MT 可以抑制 U118 细胞增殖，并且可以明显降低 U118 细胞中 ANXA2 和 c-Myc 的表达水平。**结论**　MT 可能通过降低 ANXA2 及下游通路 c-Myc 的表达从而抑制 U118 细胞的增殖。

关键词：褪黑素；胶质瘤；增殖；膜联蛋白 A2
中图分类号：R739.41，R975　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2483-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.001

Anti-proliferation effect of melatonin on human glioma U118 cells and its mechanism

LI Xin, LYU Zi-yang, LIU Jia-jia*, WANG Shan* (*Department of Pharmaceutical Engineering*, *School of Chemistry and Chemical Engineering*, *Central South University*, *Changsha* 410083)

Abstract: Objective　To determine the effect of melatonin (MT) on the proliferation of human glioma U118 cells and the expression of Annexin A2 (ANXA2) and oncoprotein c-Myc. **Methods**　After the U118 cells were treated with different concentrations of MT (1 nmol • L^{-1}, 100 nmol • L^{-1}, 10 μmol • L^{-1}, and 1 mmol • L^{-1}), the cell viability of each group was detected by CCK-8. The DNA synthesis of the cells in each group was detected by EDU staining, and the colony number of cells in each group was detected by colony formation, the expressions of proliferation markers Ki67 and PCNA, and the protein expressions of ANXA2 and c-Myc were detected by Western blot, and the mRNA expression of ANXA2 was detected by RT-qPCR, after treated with 1 mmol • L^{-1} MT. **Results**　MT inhibited the proliferation of U118 cells and significantly decreased the expression level of ANXA2 and c-Myc in U118 cells. **Conclusion**　MT may inhibit the proliferation of U118 cells by decreasing the expression of ANXA2 and the downstream pathway c-Myc.

Key words: melatonin; glioma; proliferation; Annexin A2

神经胶质瘤是一种最常见的颅内肿瘤，恶性程度高、预后差[1-2]。目前临床上主要采取手术切除肿瘤，术后辅助放化疗的综合治疗方法[3]。但胶质瘤细胞呈浸润性生长，且其与正常脑组织无明显的界限，导致手术切除的难度极大。胶质瘤细胞的快速增殖是导致术后复发、恶性程度升高的重要原因[4-5]。此外，神经胶质瘤对放疗不敏感，而化疗药物难以进入血脑屏障，导致化疗药物对胶质瘤

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81872919）。

作者简介：李鑫，男，在读博士研究生，主要从事胶质瘤的发病机制及治疗研究，E-mail：tengyunxin2010@163.com　*通信作者：王珊，女，教授，主要从事胶质瘤的发病机制及治疗研究，E-mail：wangshancsu0717@163.com；刘佳佳，男，教授，主要从事天然产物及微生物研究，E-mail：liujj0903@163.net

疗效不佳，对非中枢神经系统毒副作用较大[4]。因此，寻找既容易通过血脑屏障又可以有效地抑制胶质瘤增殖的新的治疗药物，具有重要意义。

褪黑素（melatonin，MT）是一种由松果体产生的天然胺类神经内源性激素，其水溶性和脂溶性均较好，易透过血脑屏障[6-7]。此外，MT 的半衰期较短，在体内不易蓄积，毒性很小[8]，并具有神经保护作用[9-10]。笔者前期综述发现 MT 对不同来源的胶质瘤细胞株增殖能力的影响并不完全一致：MT 能明显抑制大鼠神经胶质瘤 C6 细胞及人神经胶质瘤 U87 细胞的增殖[6，11-14]；MT 能明显抑制人神经胶质瘤 T98G 和 U251 细胞的迁移和侵袭能力，却不影响它们的增殖能力[7]。目前，MT 对人神经胶质瘤 U118 细胞增殖能力的影响及可能涉及的机制尚未见相关报道。进一步探索 MT 对不同种属、不同来源的胶质瘤细胞的影响，对全面评估 MT 对胶质瘤细胞增殖能力的影响具有一定的研究意义。

膜联蛋白 A2（Annexin A2，ANXA2）是一种钙依赖性磷酸脂质结合蛋白[15]，在胶质瘤中高表达，并与胶质瘤恶性程度成正相关[16-17]。研究发现，敲除 ANXA2 可以显著抑制人神经胶质瘤 U118、U251、U87 和 GP1 细胞的增殖[18-20]。并且，前期研究已证实 ANXA2 可以通过下游通路促癌蛋白 c-Myc 调控 U118 细胞的增殖[18]。上述研究提示，ANXA2 可通过调控下游通路 c-Myc 蛋白介导胶质瘤细胞的增殖。但 MT 是否会影响人神经胶质瘤 U118 细胞 ANXA2 及下游通路 c-Myc 蛋白的表达，亦未见相关报道。

综上所述，本实验拟研究 MT 对人神经胶质瘤 U118 细胞的抗增殖作用，并探讨其可能的作用机制，为确立 MT 作为抗胶质瘤生长的候选药物提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

酶标仪（N12639-01，美国 Thermo）；Q5 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems）；梯度 PCR 仪（T100，美国 Bio-Rad）；电泳仪（Power Pac Basic，美国 Bio-Rad）；化学发光仪（LAS 500，瑞士）；高内涵成像系统（High Content Analysis System Operetta CLSTM，PerkinElmer）。

1.2 试药

DMEM 培养基（C11995500BT）、胎牛血清（A3160801）、胰蛋白酶（25200-072）、双抗（15140122）（Gibco）；CCK-8 试剂盒（美仑生物，MA0218）；kFluor647-EDU 检测试剂盒（凯基生物，KGA335-100）；2.5% 结晶紫染色液（索莱宝生物，G1061）；Trizol（Invitrogen，15596026）；逆转录试剂盒（Genecopoeia，QP056）；SYBR-Green 荧光定量 PCR 试剂盒（Genecopoeia，QP001）；褪黑素（APEXBIO，纯度≥ 98%，A2842）；RIPA 裂解液（P0013B）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（P0009）、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（P0015L）、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒（P0012A）、快速封闭液（P0252A）（碧云天生物）；转膜液（WB4600）、抗体稀释液（WB500D）、蛋白酶抑制剂混合液（P001）（新赛美生物）；20×TBST（索莱宝生物，T1082）；PVDF 膜（Millipore，IPVH00010）；预染彩色蛋白 Marker（Thermo，26616）；甲醇（国药集团，40064260）；乙醇（恒兴试剂，ZB1F003）；PBS 缓冲液（凯基生物，KGB5001）；ECL 发光液（Santa Cruz，sc-2048）；Anti-Ki67（ab16667）、Anti-PCNA（ab92552）、Anti-c-Myc（ab32072）（Abcam）；Anti-β-actin（Proteintech Group，20536-1-AP）；Anti-Annexin A2（Cell Signaling Technology，8235S）。

1.3 细胞系

神经胶质瘤细胞 U118 细胞购自中科院上海细胞库。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞活性

收集对数增长期的 U118 细胞，以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板，待细胞贴壁 24 h 后吸去培养基，对照组换上含有对应溶媒浓度的新鲜无血清培养基，实验组以 1 nmol·L^{-1}，100 nmol·L^{-1}，10 μmol·L^{-1}，1 mmol·L^{-1} 的 MT 加入到新鲜无血清 DMEM 培养基中，每组设 5 个复孔。37 ℃，5% CO_2 恒温培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8，37 ℃继续培养 2 h，取出 96 孔板，于 450 nm 处测吸光度。计算细胞存活率，细胞存活率＝（实验组 OD_{450} －空白组 OD_{450}）/（对照组 OD_{450} －空白组 OD_{450}）×100%。选择合适的浓度后，再设 24、48、72、96 h 4 个时间梯度。重复上述步骤。

2.2 EDU 法检测细胞 DNA 合成

收集对数增长期的 U118 细胞，以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板，待细胞贴壁 24 h 后吸去培养基，对照组换上含有对应溶媒浓度的新鲜无血清培养基，实验组以 1 mmol·L^{-1} 的 MT 加入到新鲜无血清 DMEM 培养基中，每组设 3 个复孔。37 ℃，5% CO_2 恒温培养 24 h。吸弃培

养基，按照 kFluor647-EDU 检测试剂盒说明书进行 EDU 检测，并在高内涵下完成荧光成像，随机选取 3 个视野完成 EDU 阳性率统计。

2.3　结晶紫染色法检测细胞克隆形成

收集对数增长期的 U118 细胞，以每孔 5×10^2 个细胞接种于 6 孔板，待细胞贴壁 24 h 后吸弃培养基，对照组换上含有对应溶媒浓度的新鲜无血清培养基，实验组以 1 mmol • L^{-1} 的 MT 加入到新鲜无血清 DMEM 培养基中，每组设 3 个复孔。37 ℃，5% CO_2 恒温培养 24 h。每 3 d 换一次液，培养 14 d 后吸弃培养基，用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后再用 0.5% 结晶紫染色液孵育 20 min，PBS 洗涤细胞数次，晾干，数码相机拍照，计数并统计。

2.4　逆转录和实时定量 PCR（Real Time qPCR）

将 U118 细胞以 2×10^5 个每孔接种于 6 孔培养板中，培养过夜。新鲜无血清 DMEM 处理 24 h 后分为对照组和 1 mmol • L^{-1} MT 组。37 ℃，5% CO_2 恒温培养 24 h，每组 U118 细胞加入适当体积的 Trizol 裂解液，提取总 RNA 并用逆转录试剂盒按照说明书逆转录为 cDNA，然后以 cDNA 为模板进时定量 PCR 检测，以 *β*-actin 为内参。实验的目的基因和内参引物均由上海生工生物合成，*ANXA2*，上游引物：5'-GATCAGAATCATGGTCT-CCCG-3'，下游引物：5'-GCCCTTAGTGTCTTGCTGGAT-3'；*β-actin*，上游引物：5'-TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'，下游引物：5'-TCACCTTCACC-GTTAGTTT-3'。每个样品设 3 个复孔，反应总体系 10 μL。PCR 反应条件：95 ℃ 15 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，40 个循环。然后进行数据分析，各目的基因表达水平用 RQ 值（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）来表示。

2.5　蛋白免疫印记检测

取对数增长期的 U118 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板，培养过夜。新鲜无血清培养基处理 24 h 后分为对照组和 1 mmol • L^{-1} MT 组。干预 24 h 后，用预冷的 PBS 洗 3 次，每次 10 min，吸干净剩余的 PBS 后，加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上孵育 30 min，收集被裂解的 U118 细胞，12 000 g 转速离心 30 min 后吸弃上清液。按照 1∶4 加入一定量的 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液并用振荡器进行混匀，100 ℃蛋白变性 10 min。采用 4% SDS-PAGE 浓缩胶和 10% SDS-PAGE 分离胶，垂直电泳恒定电压分离蛋白。恒定电流 400 mA 转膜 40 min，结束后取出 PVDF 膜后用快速封闭液孵育 20 min，之后分别用兔抗 Ki67 的多克隆抗体（1∶1000）；兔抗 PCNA 的多克隆抗体（1∶1000）、兔抗 ANXA2 的多克隆抗体（1∶1000）、兔抗 c-Myc 的多克隆抗体（1∶1000）、兔抗 *β*-actin 的多克隆抗体（1∶1000），4 ℃过夜孵育；用 1×TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，之后加入山羊抗兔的二抗（1∶10 000），在圆周摇床上室温孵育 2 h，结束后继续用 1×TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，最后用 ECL 发光液在化学发光仪上进行成像并使用 Image J 进行图像灰度值分析。

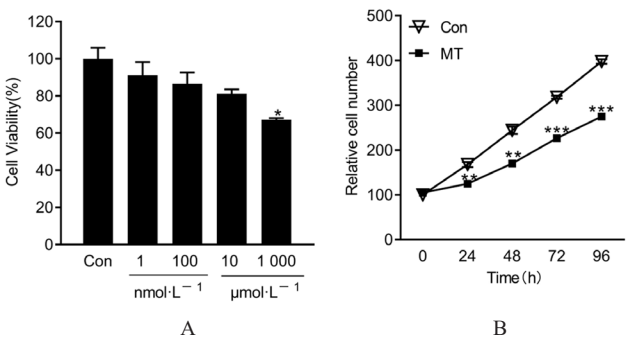
2.6　统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件完成实验数据的统计处理，结果以均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。两组数据差异比较采用 student's *t* 检验，多组数据差异比较采用单因素 ANOVA 方差分析方法，$P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

3　结果

3.1　MT 抑制 U118 细胞的活性和生长速度

如图 1A 所示，与对照组相比，MT（1 mmol • L^{-1}）处理组的细胞活性明显受到抑制（$P<0.05$），而其余 MT 浓度处理组的细胞活性均未受到显著影响，表明 MT 处理细胞 24 h 后能抑制细胞活性的合适剂量为 1 mmol • L^{-1}，因此，选择该浓度进行后续研究。如图 1B 所示，与对照组相比，随着时间的延长，MT（1 mmol • L^{-1}）处理组的细胞数目均显著下降（$P<0.01$，$P<0.001$），表明 1 mmol • L^{-1} MT 能时间依赖性地抑制 U118 细胞的生长速度。



A　　B

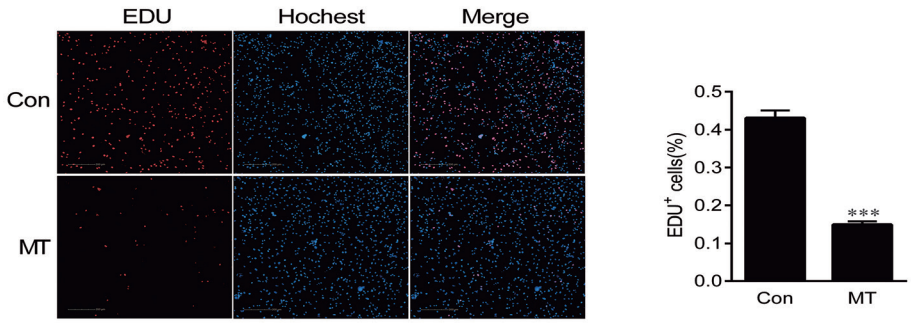
图 1　MT 对 U118 细胞活性和生长速度的影响

Fig 1　Effect of MT on U118 cell viability and growth rate

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$（Compared with the control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）。

3.2　MT 抑制 U118 细胞的 DNA 合成

与对照组相比，MT 处理组 EDU 阳性率（红色荧光染色细胞数占蓝色荧光染色细胞数的比率）显著下降（$P<0.001$，见图 2），说明 MT 能抑制 U118 细胞的 DNA 合成。

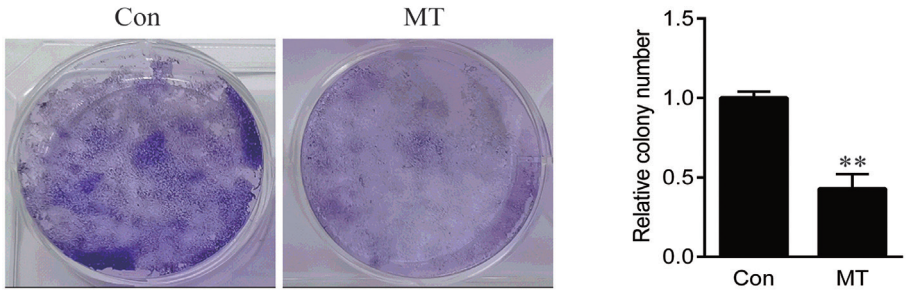


A B

图 2 MT 对 U118 细胞 DNA 合成的影响

Fig 2 Effect of MT on DNA synthesis in U118 cells

注（Note）：与对照组相比，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{***}P < 0.001$）。



A B

图 3 MT 对 U118 细胞克隆形成的影响

Fig 3 Effect of MT on the clone formation of U118 cells

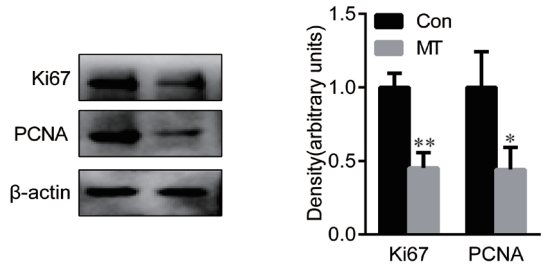
注（Note）：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$）。

3.3 MT 抑制 U118 细胞的克隆形成

与对照组相比，MT 处理组细胞克隆形成数目下降（$P < 0.01$，见图 3），说明 MT 能抑制 U118 细胞的克隆形成。

3.4 MT 抑制 U118 细胞增殖标记物 Ki67 和 PCNA 的蛋白表达

由图 4 可见，与对照组相比，MT 处理组 Ki67 和 PCNA 蛋白表达量均显著下降（$P < 0.01$，$P < 0.05$），表明 MT 能抑制 U118 细胞的 Ki67 和 PCNA 的蛋白表达。



A B

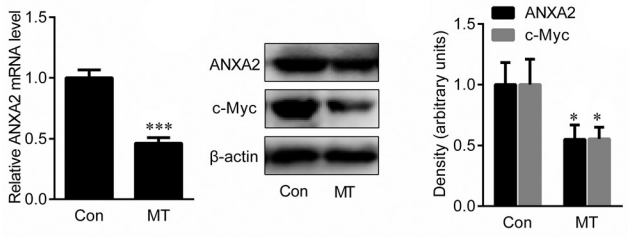
图 4 MT 对 U118 细胞增殖标记物 PCNA 和 Ki67 的蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of MT on the protein expression of proliferation markers PCNA and Ki67 in U118 cells

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.5 MT 抑制 U118 细胞 ANXA2 及 c-Myc 蛋白的表达

如图 5 所示，与对照组相比，MT 处理组 ANXA2 的 mRNA 和蛋白表达量均下降，c-Myc 的蛋白表达下降（$P < 0.001$，$P < 0.05$），提示 MT 能抑制 U118 细胞 ANXA2 的 mRNA 和蛋白以及 c-Myc 蛋白的表达水平，可能通过下调 U118 细胞的 ANXA2 及下游相关通路 c-Myc 蛋白的表达来抑制细胞增殖。



A B C

图 5 MT 对 U118 细胞 ANXA2 mRNA（A）和 ANXA2、c-Myc 蛋白（B，C）的表达的影响

Fig 5 Effect of MT on the expression of ANXA2（A）mRNA, ANXA2 and c-Myc（B，C）protein in U118 cells

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）。

4 讨论

神经胶质瘤占人类中枢神经系统肿瘤的70%[21-22]。胶质瘤细胞的快速增殖是导致胶质瘤患者复发率高和死亡率高的重要原因之一[4-5, 23-24]。大量研究表明，有效抑制神经胶质瘤细胞的增殖可以改善神经胶质瘤患者的预后[4, 25]。因此，寻找可以高效抑制胶质瘤细胞增殖的药物，具有一定的研究意义。据报道，1 mmol • L^{-1} MT 处理 T98G 和 U251 细胞 24 h 后，能下调基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 的表达从而明显抑制它们的迁移和侵袭能力，但不影响它们的增殖活性，而 1 nmol • L^{-1} MT 处理 T98G 和 U251 细胞 24 h 后，它们的增殖、迁移和侵袭均未改变[7]。本实验发现 1 mmol • L^{-1} MT 可以显著抑制 U118 细胞增殖、细胞活性、DNA 合成、克隆形成以及增殖标记物 PCNA 和 Ki67 的表达。MT 对其他胶质瘤细胞如鼠神经胶质瘤细胞 C6 及人神经胶质瘤细胞 U87 增殖的抑制作用支持本文的研究结果[6, 11-14]。综上，MT 对不同来源的胶质瘤细胞增殖的抑制作用不同，可能源于不同种属、不同来源胶质瘤细胞对 MT 的敏感性不同，并且，MT 对胶质瘤细胞的抑制作用与 MT 的浓度及处理时间均有一定关系，后续值得进行深入研究，以便寻找最合适的 MT 处理浓度及时间。

早前有研究证实，ANXA2 可以激活纤溶酶原，促进血管生成[26-27]，表明 ANXA2 可以通过调控肿瘤微环境促进肿瘤的发生与发展。之后又有大量研究证实，ANXA2 在各种肿瘤细胞中高度表达，并可以直接调控肿瘤细胞的增殖，包括乳腺癌细胞[28-29]、非小细胞肺癌[30-31]和胶质瘤细胞[18-20]等。在具体调控机制方面，已有文献报道，ANXA2 可通过调控下游通路促癌蛋白 c-Myc 的表达来控制肿瘤细胞的增殖[18, 28-29]。此外，ANXA2 与胶质瘤恶性程度成正相关[16, 17]，可以作为判断胶质瘤预后的标记物[32]。另有研究表明，ANXA2 在肿瘤中的重要作用还体现在 ANXA2 与化疗药物的高耐药性成正相关[33-34]，提示抑制 ANXA2 的表达除了可以直接抑制胶质瘤细胞增殖之外，还可以显著提高胶质瘤细胞对其余化疗药物的敏感性。总之，寻找下调胶质瘤 ANXA2 的表达的药物，既可以通过直接抑制胶质瘤细胞增殖发挥治疗作用，也可以辅助提升其他化疗药物的治疗效果，为胶质瘤的治疗提供了一个可能的新思路。已有研究报道，MT 可以抑制 U87 细胞和 C6 细胞的增殖[6, 11-14]。并且，MT 对 T98G 和 U251 细胞的迁移和侵袭有显著抑制作用[7]。亦有研究证实，MT 可以增强化疗药物的作用并克服胶质瘤细胞的多重耐药性[35]。因此，MT 是否下调 ANXA2 及下游通路 c-Myc 的表达值得进一步研究。

本实验发现，ANXA2 在 U118 细胞中高表达，与对照组比较，在 1 mmol • L^{-1} MT 作用 24 h 后，ANXA2 mRNA 表达下调，ANXA2 和 c-Myc 蛋白的表达降低，提示 MT 可能通过抑制 ANXA2 及下游通路 c-Myc 蛋白的表达从而抑制 U118 细胞的增殖。

综上所述，MT 在神经胶质瘤的治疗方面有良好的潜在应用价值，但是 MT 的这些治疗作用是否都与 ANXA2 及下游通路 c-Myc 蛋白的表达有关，值得进一步深入研究探讨。

参考文献

[1] Zhang M，Song T，Yang L，et al. Nestin and CD133：Valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients [J]. J Exp Clin Cancer Res，2008，27（1）：85.

[2] Ordys BB，Launay S，Deighton RF，et al. The role of mitochondria in glioma pathophysiology [J]. Mol Neurobiol，2010，42（1）：64-75.

[3] Chu L，Yu L，Liu J，et al. Long intergenic non-coding LINC00657 regulates tumorigenesis of glioblastoma by acting as a molecular sponge of miR-190a-3p [J]. Aging（Albany NY），2019，11（5）：1456-1470.

[4] Wion D. Therapeutic dormancy to delay postsurgical glioma recurrence：The past，present and promise of focal hypothermia [J]. J Neurooncol，2017，133（3）：447-454.

[5] Xu T，Yu W，Li Q，et al. MicroRNA-524 inhibits the progress of glioma via the direct targeting of NCF2 [J]. Am J Transl Res，2019，11（3）：1605-1615.

[6] Martin V，Herrera F，Carrera GP，et al. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin [J]. Cancer Res，2006，66（2）：1081-1088.

[7] Wang J，Hao H，Yao L，et al. Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cells [J]. Pineal Res，2012，53（2）：180-187.

[8] Carrillo VA，Guerrero JM，Lardone PJ，et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system [J]. Endocrine，2005，27（2）：189-200.

[9] Radogna F，Nuccitelli S，Mengoni F，et al. Neuroprotection by melatonin on astrocytoma cell death [J]. Ann N Y Acad Sci，2009，1171：509-513.

[10] Esposito E，Iacono A，Muia C，et al. Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells [J]. J Pineal Res，2008，44（1）：78-87.

[11] Gonzalez A，Martinez CC，Mediavilla MD，et al. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells [J]. Br J Cancer，

2007，97（6）：755-760.
[12] Qu J，Rizak JD，Li X，et al. Melatonin treatment increases the transcription of cell proliferation-related genes prior to inducing cell death in C6 glioma cells in vitro [J]. Oncol Lett，2013，6（2）：347-352.
[13] Gu J，Lu Z，Ji C，et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells [J]. Biomed Pharmacother，2017，93：969-975.
[14] Franco DG，Moretti IF，Marie SKN. Mitochondria transcription factor A：A putative target for the effect of melatonin on U87MG malignant glioma cell line [J]. Molecules，2018，23（5）：1129.
[15] Luo S，Xie C，Wu P，et al. Annexin A2 is an independent prognostic biomarker for evaluating the malignant progression of laryngeal cancer [J]. Exp Ther Med，2017，14（6）：6113-6118.
[16] Gao H，Yu B，Yan Y，et al. Correlation of expression levels of ANXA2，PGAM1，and CALR with glioma grade and prognosis [J]. J Neurosurg，2013，118（4）：846-853.
[17] Reeves SA，Chavez KC，Davis R，et al. Developmental regulation of annexin Ⅱ（Lipocortin 2）in human brain and expression in high grade glioma [J]. Cancer Res，1992，52（24）：6871-6876.
[18] Li X，Nie S，Lv Z，et al. Overexpression of Annexin A2 promotes proliferation by forming a Glypican 1/c-Myc positive feedback loop：Prognostic significance in human glioma [J]. Cell Death Dis，2021，12（3）：261.
[19] Chen L，Lin L，Xian N，et al. Annexin A2 regulates glioma cell proliferation through the STAT3cyclin D1 pathway [J]. Oncol Rep，2019，42（1）：399-413.
[20] Wu W，Yu T，Wu Y，et al. The miR155HG/miR-185/ANXA2 loop contributes to glioblastoma growth and progression [J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：133.
[21] Huo JF，Chen XB. P2X4R silence suppresses glioma cell growth through BDNF/TrkB/ATF4 signaling pathway [J]. J Cell Biochem，2019，120（4）：6322-6329.
[22] Xu CS，Wang ZF，Huang XD，et al. Involvement of ROS-alpha v beta 3 integrin-FAK/Pyk2 in the inhibitory effect of melatonin on U251 glioma cell migration and invasion under hypoxia [J]. J Transl Med，2015，13：95.
[23] Dolecek TA，Propp JM，Stroup NE，et al. CBTRUS statistical report：Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005 — 2009 [J]. Neuro Oncol，2012，14（Suppl 5）：v1-49.
[24] Stupp R，Mason WP，Bent MJ，et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. N Engl J Med，2005，352（10）：987-996.
[25] Zhang X，Zhang W，Mao XG，et al. Malignant intracranial high grade glioma and current treatment strategy [J]. Curr Cancer Drug Targets，2019，19（2）：101-108.
[26] Lokman NA，Ween MP，Oehler MK，et al. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression [J]. Cancer Microenviron，2011，4（2）：199-208.
[27] Hajjar KA，Acharya SS. Annexin Ⅱ and regulation of cell surface fibrinolysis [J]. Ann N Y Acad Sci，2000，902：265-271.
[28] Wu B，Zhang F，Yu M，et al. Up-regulation of Anxa2 gene promotes proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells [J]. Cell Prolif，2012，45（3）：189-198.
[29] Zhang J，Guo B，Zhang Y，et al. Silencing of the annexin II gene down-regulates the levels of S100A10，c-Myc，and plasmin and inhibits breast cancer cell proliferation and invasion [J]. Saudi Med J，2010，31（4）：374-381.
[30] Wu M，Sun Y，Xu F，et al. Annexin A2 silencing inhibits proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition through p53-dependent pathway in NSCLCs [J]. J Cancer，2019，10（5）：1077-1085.
[31] Wang CY，Chen CL，Tseng YL，et al. Annexin A2 silencing induces G2 arrest of non-small cell lung cancer cells through p53-dependent and-independent mechanisms [J]. J Biol Chem，2012，287（39）：32512-32524.
[32] Li S，Zou H，Shao YY，et al. Pseudogenes of annexin A2，novel prognosis biomarkers for diffuse gliomas [J]. Oncotarget，2017，8（63）：106962-106975.
[33] Fan Y，Si W，Ji W，et al. Rack1 mediates tyrosine phosphorylation of ANXA2 by Src and promotes invasion and metastasis in drug-resistant breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res，2019，21（1）：66.
[34] Sharma MC. Annexin A2（ANX A2）：An emerging biomarker and potential therapeutic target for aggressive cancers [J]. Int J Cancer，2019，144（9）：2074-2081.
[35] Martin V，Sanchez AM，Herrera F，et al. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells [J]. Br J Cancer，2013，108（10）：2005-2012.

（收稿日期：2021-05-27；修回日期：2021-07-03）

阿魏酸通过抑制 MAPK 和 NF-κB/IκBα 信号通路减轻大鼠肝纤维化的机制研究

王媛媛，朱浩，史玉欢，王蓉*，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　探讨阿魏酸抗肝纤维化作用的潜在机制。**方法**　检测阿魏酸对肝纤维化和肝功能指标以及抗氧化应激酶活性的影响。结合炎症相关因子和肝星状细胞（HSC）激活标志物水平检测结果，发现阿魏酸能有效抑制 HSC 的激活、氧化应激和炎症反应。免疫组织化学分析和蛋白质免疫印迹实验探索阿魏酸抗大鼠肝纤维化机制。**结果**　阿魏酸能够抑制丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号途径，同时能够抑制核因子（NF）-κB/IκBα 途径。**结论**　阿魏酸在 CCl_4 诱导的肝纤维化中能够抑制 MAPK 和 NF-κB/IκBα 信号通路，是一种潜在的抗肝纤维化药物。

关键词：肝纤维化；阿魏酸；氧化应激；炎症反应；MAPK；NF-κB/IκBα
中图分类号：R575.2，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2489-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.002

Ferulic acid reduces liver fibrosis by inhibiting MAPK and NF-κB/IκBα signaling pathways in rats

WANG Yuan-yuan, ZHU Hao, SHI Yu-huan, WANG Rong*, YUAN Yong-fang (*Department of Pharmacy*, *Shanghai* 9*th People's Hospital*, *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai* 200011)

Abstract: Objective　To determine the potential mechanism of ferulic acid (FA) against liver fibrosis. **Methods**　The effects of FA on the liver fibrosis and liver function indexes as well as the activitives of antioxidative stress kinase were detected. The inflammation-related factors and hepatic stellate cell (HSC) activation marker levels indicated that FA effectively inhibited HSC activation, oxidative stress and inflammation. At the same time, immunohistochemical analysis and Western blot were carried out to further explore the mechanism of FA against liver fibrosis in rats. **Results**　FA inhibited both the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway and the nuclear factor (NF)-κB/IκBα pathway. **Conclusion**　FA can inhibit the MAPK and NF-κB/IκBα signaling pathways in CCl_4-induced liver fibrosis, which may serve as a potential anti-liver fibrosis drug.

Key words: liver fibrosis; ferulic acid; oxidative stress; inflammatory response; MAPK; NF-κB/IκBα

肝纤维化的主要特征为肝星状细胞（HSC）活化和细胞外基质（ECM）沉积，分子机制涉及到炎症因子、生长因子、趋化因子和氧化应激相关分子等[1]。四氯化碳（CCl_4）在诱导肝纤维化过程中，能够产生自由基并促进炎症反应，这些共同参与 HSC 激活和 ECM 产生[2-3]。

丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路包括 p38MAPK（p38MAPK）、c-Jun N 端激酶（JNK）和细胞外信号调节蛋白激酶 1/2（ERK1/2）用于调节人类许多疾病，包括癌症、阿尔茨海默病和肝纤维化等[4-5]。近年来研究发现氧化应激和炎症相关因子是激活 MAPK 信号通路的主要刺激因子[6]。目前，MAPK 信号通路被研究得最多的是 p38MAPK、JNK 和 ERK1/2 三条主要信号通路，它们与核因子 κB（NF-κB）信号通路共同参与炎症细胞因子和活性氧（ROS）的调节，这是抗氧化应激和炎症反应的关键环节[7]。NF-κB 是细胞内重要的核转录因子，家族主要成员包括 RelA（p65）、

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803815）。
作者简介：王媛媛，女，主要从事中药抗肝纤维化的分子机制研究，E-mail：wyyuan1@163.com　*通信作者：王蓉，女，副主任药师，主要从事中药抗肝纤维化的分子机制研究，E-mail：wangrong198521@126.com

RelB、c-Rel、p50 和 p52，其中 NF-κB 的 p65 亚基的激活主要通过 NF-κB/IκBα 信号通路参与炎症反应的调节。NF-κB 与 IκB 在细胞质中结合成非活化的二聚体。在 IκB 激酶（IKK）激活后，诱导 IκB 的磷酸化和泛素降解，NF-κB 被激活，发生核转移，促进目的基因转录 [8]，可调节 HSCs 的活化和凋亡 [9]。

阿魏酸（ferulic acid，FA）是阿魏、当归和川芎等中药的重要活性成分，其结构如图 1 所示。近年来，FA 因其抗炎、抗氧化等药理作用而备受关注 [10]。如 Mir 等 [11] 用 FA 处理急性肾损伤的小鼠，发现 FA 能够通过抑制 TLR-4 介导 NF-κB 活化，具有良好的抗炎作用。而且临床研究也发现，补充 FA 能够改善高脂血症患者的血脂、氧化应激和炎症状态 [12]。由此，假设 FA 可能具有抗肝纤维化作用，其作用可能与 MAPK 和 NF-κB/IκBα 通路相关。本课题旨在探讨 FA 对肝纤维化的抑制作用及其对 MAPK 和 NF-κB/IκBα 的信号通路的影响，以探讨 FA 对肝脏的保护作用。

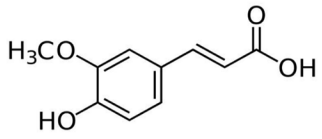


图 1 阿魏酸的结构式

Fig 1 Chemical structure of ferulic acid

1 材料

FA（Nature Standard Biological Technology Co.，Ltd.，纯度：98%，CAS 1135-24-6）。NE-PER 细胞核、细胞质提取试剂 [Thermo Fisher Scientific]。p38 MAPK、NF-κBp65、α 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、胶原Ⅰ型（ColaⅠ）、组蛋白 H3（histone H3）和 β- 微管蛋白（β-tubulin）单克隆抗体 [Cell signaling Technology]。辣根过氧化物酶标记甘油醛 3- 磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体 [Bioworld Technology]，羊抗兔免疫球蛋白 G（IgG）二抗（Signalway）。转化生长因子 β1[TGF-β1，R&D Systems]。SYBR Ex Taq Ⅱ（Tli RNaseH Plus）试剂、PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）试剂 [TaKaRa Co.，Ltd.]。免疫组化试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）。肝功能标志物丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、总胆红素（TBIL）试剂盒、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）活性测定试剂盒（南京建成生物工程研究所），肝纤维化检测系列试剂盒（郑州安图生物工程股份有限公司）。所有其他主要试剂均购自碧云天生物技术公司（上海）。蛋白酶抑制剂（德国默克）和磷酸酶抑制剂（美国罗氏）。全自动生化分析仪（美国 Beckman LX-2），增强化学发光系统（德国 Fusion FX7），Nanodrop 2000 分光光度计（Thermo Fisher Scientific），LightCycler 480 仪器（Hoffman-La Roche）。

2 方法

2.1 大鼠分组

SPF 级雄性 SD 大鼠，共 48 只（6 周，180 ～ 220 g，上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司），饲养条件为标准动物实验室：温度 25 ℃，湿度（55±10）%，12 h/12 h 明暗循环，给予标准的食物和水。饲养 2 周后，将大鼠随机分为正常组、模型组、高剂量组和低剂量组。除正常组外，其余大鼠均灌胃给予 CCl_4- 花生油（1∶1，*v/v*）1 mL • kg^{-1} 建立大鼠肝纤维化模型，每周 2 次，共 6 周。同时，低剂量组和高剂量组大鼠腹腔注射 FA，每日 1 次，连续给药 6 周，剂量分别为 15 mg • kg^{-1} 和 30 mg • kg^{-1}；正常组大鼠连续 6 周注射相同剂量的生理盐水。在第 6 周结束时称量大鼠体质量（空腹）并用 3% 戊巴比妥钠麻醉。然后，从腹主动脉快速获取新鲜血液样本。3000 r • min^{-1}，4 ℃，离心 10 min，并在－ 80 ℃下储存。所有肝脏样本获取后迅速称重，一半用 10% 福尔马林固定，进行组织病理学和免疫组化检测。剩余的肝脏样本在－ 80 ℃下冷冻保存。

2.2 肝脏指数计算及肝功能、肝纤维血清学检查

根据公式：肝脏指数（%）＝［肝脏质量（g）/ 体质量（g）］×100% 计算肝脏指数。用肝功能系列活性检测试剂盒测定肝功能标志物 ALT、AST 和 TBIL。按照肝纤维化检测系列试剂盒说明测定血清Ⅲ型前胶原氨基末端前肽（PⅢNP）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）、透明质酸（HA）和层粘连蛋白（LN）的水平。

2.3 氧化应激相关指标检测

肝脏样品用生理盐水均质，制备匀浆。将匀浆在 4 ℃、3500 r•min^{-1} 离心 10 min，离心两次，取上清液，分别按照说明测定各酶活力，按试剂盒说明检测 MDA 水平。

2.4 肝脏组织病理学观察和免疫组化检测

将固定好的肝脏标本，经脱水、石蜡包埋后，切成 5 μm 厚的组织切片，再经脱蜡冲洗，按照说明书中的标准步骤，用苏木精伊红（H&E）染色和 Masson 三色染色方法进行组织学评估，用抗 P-p38MAPK、P-JNK、P-ERK 1/2 和 NF-κBp65 的抗体进行免疫组化染色。在光学显微镜下观察肝脏病理情况和胶原沉积的变化，由同一位肝脏病理学家评估。肝纤维化严重程度按 0 到 4 分进行分级 [13]，评分体系如下：0. 正常；1. 存在纤

维化（胶原纤维呈从门静脉三联或中央静脉延伸至周围区域）；2. 轻度纤维化（轻度胶原纤维呈伸展但无隔形成）；3. 中度纤维化（中度胶原纤维）；4. 严重纤维化（多为胶原纤维，部分间隔增厚，假小叶形成较多）。免疫组化染色后，黄色或棕褐色染色显示阳性信号。根据阳性染色的程度和位置进行评估：0. 阳性染色（0 ～ 5%）；1. 弱阳性染色（6% ～ 35%）；2. 中度阳性染色（36% ～ 55%）；3. 强阳性染色（56% ～ 100%）。

2.5　Western blot 检测肝脏相关蛋白的表达

将肝组织通过高通量研磨仪（TL-2020，北京）2 min，1000 r • min $^{-1}$ 粉碎匀浆并提取蛋白，利用细胞核和细胞质提取试剂盒收集细胞核和细胞质蛋白。然后，用蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂处理的蛋白样品，使用恒温加热器加热。通过十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离蛋白质，转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，然后用 P-p38 MAPK、P-JNK、P-ERK1/2、NF-κBp65、IκBα、α-SMA 或 Colla Ⅰ抗体孵育靶蛋白，再用二抗孵育。以 β-tubulin、Histone H3 和 GAPDH 抗体作内参检测条带。

2.6　Real-time PCR 检测相关基因转录水平

肝脏样品用 TRIzol 试剂均质离心提取 mRNA，Nanodrop 2000 分光光度计测定浓度。在 Light-Cycler 480 仪器上进行逆转录和扩增。引物由上海生工生物工程有限公司上海合成，见表 1。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行进一步定量分析。

2.7　统计分析

表 1　mRNA 扩增的基因引物序列

Tab 1　Geneprimers sequences of mRNA amplification

基因名称	正向	反向	产物长度 /bp
TNF-α	*AAGGGAATTGTGGCTCTGGG*	ACTCAGGCATCGACATTCCG	179
IL-6	*AGAGACTTCCAGCCAGTTGC*	ACAGTGCATCATCGCTGTTC	232
IL-1β	*GCCAACAAGTGGTATTCTCCA*	CCGTCTTTCATCACACAGGA	118
Cox-2	*GTTGCTGGGGGAAGGAATGT*	AGAAGCGTTTGCGGTACTCA	112
TGF-β	*AGGGCTACCATGCCAACTTC*	CCACGTAGTAGACGATGGGC	168
α-SMA	*ACCATCGGGAATGAACGCTT*	TTGCGTTCTGGAGGAGCAAT	263
Colla1	*GCAATGCTGAATCGTCCCAC*	CAGCACAGGCCCTCAAAAAC	176
Colla2	*TAAAGAAGGCCCTGTGGGTC*	ATGGCCTTTCTCACCAGGTTT	148
TIMP-1	*ACGCTAGAGCAGATACCACG*	CCAGGTCCGAGTTGCAGAAA	141
MMP-1	*AACAGCAGAAGATTTCCCTGG*	TTCGGAGGCTAAATCTGCGT	110
Desmin	*CCGATCCAGACCTTCTCTGC*	TCTCCATCCCGGGTCTCAAT	116
GAPDH	*CAGGGCTGCCTTCTCTTGTG*	GGTGGTGAAGACGCCAGTAG	256

使用 SPSS v21.0 对数据进行分析，统计分析方法采用单因素方差分析、SNK 检验和秩和检验。数据以平均值 ± 标准差表示，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　FA 减轻 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化

如表 2 结果所示，正常组大鼠没有死亡，模型组、低剂量组均死亡 2 只，高剂量组死亡 1 只。与正常组相比，模型组体质量明显下降，肝脏质量和肝脏指数明显升高（$P < 0.05$）。与模型组相比，低、高剂量组体质量均增加，肝脏质量和肝脏指数均降低（$P < 0.05$）。与低剂量组比较，高剂量组肝脏质量、肝脏指数降低更明显（$P < 0.05$），体质量差异无统计学意义。

肝功能指标 TBIL、ALT 和 AST 如表 3 所示。与正常组相比，模型组肝功能下降（$P < 0.05$）。与模型组相比，低剂量组 AST 水平显著降低（$P < 0.05$）；高剂量组肝功能恢复明显，提示 FA 治疗有助于肝功能恢复。肝纤维化指标 PⅢNP、Ⅳ-C、LN 和 HA 的水平见表 4。模型组 4 项指标明显高于正常组（$P < 0.05$）。与模型组比较，低、高剂量组各含量均下降（$P < 0.05$）。与低剂量组比较，高剂量组 4 项指标差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

表 2　FA 对大鼠体质量、肝脏质量及肝脏指数的影响

Tab 2　Effect of FA on the body mass，liver mass and liver index of rats

组别	*n*	体质量 /g	肝脏质量 /g	肝脏指数
正常组	12	434.5±11.2	13.1±0.7	0.030±0.002
模型组	10	325.7±20.5^{a}	14.4±1.2^{a}	0.044±0.003^{a}
低剂量组	10	361.2±23.1^{b}	13.9±1.9^{b}	0.039±0.005^{b}
高剂量组	11	388.1±23.9^{b}	13.4±1.3^{bc}	0.034±0.002^{bc}

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

3.2　组织病理学变化

采用 HE 染色观察肝组织病理变化，采用 Masson 染色观察胶原沉积的结果，结果见图 2。正常组肝组织呈正常状态，肝细胞在中心静脉周围排列整齐，肝小叶结构完整。模型组肝细胞周

表 3　FA 对血清 TBIL、ALT 及 AST 的影响

Tab 3　Effect of FA on the serum concentration of TBIL，ALT and AST

组别	n	TBIL/（μmol•L^{-1}）	ALT/（U•L^{-1}）	AST/（U•L^{-1}）
正常组	12	2.2±0.6	45.40±5.8	178.1±17.1
模型组	10	30.6±2.8^{a}	398.7±33.1^{a}	446.0±29.8^{a}
低剂量组	10	23.7±3.4	335.2±28.7	359.2±22.5^{b}
高剂量组	11	12.1±2.3^{bc}	206.3±29.2^{bc}	261.3±19.4^{bc}

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

围紊乱，可见炎性细胞浸润，斑点或完全坏死，脂肪变性及脂肪空泡可见。结缔组织增生，纤维结节周围胶原明显沉积，形成纤维间隔和假小叶。FA 治疗能明显改善组织损伤，降低肝纤维化程度，尤其在高剂量组，脂肪变性、肝脏病变和炎性细胞浸润明显减少，也未观察到明显的胶原堆积。但与高剂量组相比，低剂量组 FA 对组织损伤的改善作用不明显。各组肝纤维化程度评分结果与染色结果一致（见表 5）。结果表明，FA 对肝纤维化有一定程度的改善作用。

表 4　FA 对血清 HA、LN、Ⅳ-C 和 PⅢNP 水平的影响

Tab 4　Effect of FA on the serum concentration of HA，LN，Ⅳ-C and PⅢNP

组别	n	HA/（U•L^{-1}）	LN/（ng•mL^{-1}）	Ⅳ-C/（ng•mL^{-1}）	PⅢNP/（ng•mL^{-1}）
正常组	12	35.8±12.3	17.4±3.1	22.6±4.8	1.41±0.22
模型组	10	202.3±26.5^{a}	125.6±20.2^{a}	154.3±20.6^{a}	3.68±0.83^{a}
低剂量组	10	131.6±33.1^{b}	75.6±27.5^{b}	110.7±22.5^{b}	2.96±0.35^{b}
高剂量组	11	72.6±23.4^{bc}	30.1±12.4^{bc}	58.2±11.3^{bc}	1.73±0.38^{bc}

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

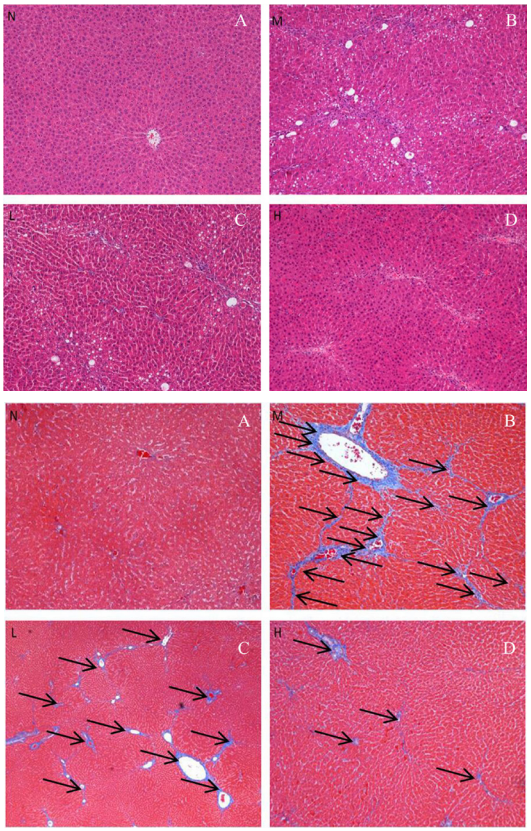


图 2　HE（上）及 Masson（下）染色结果（100×）

Fig 2　HE（up）and Masson（down）staining（100×）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 低剂量组（low dose group）；D. 高剂量组（high dose group）

3.3　FA 减轻 CCl_4 对大鼠氧化应激损伤的作用

抗氧化酶（SOD、CAT 和 GSH-PX）的活性

表 5　各组大鼠肝纤维化程度

Tab 5　Degree of liver fibrosis in each group of rats

组别	数量	评分 / 分					
		0	1	2	3	4	平均值
正常组	12	12	0	0	0	0	0
模型组	10	0	0	2	4	4	3.2±0.89^{a}
低剂量组	10	0	1	3	3	3	2.8±0.63^{b}
高剂量组	11	0	4	5	2	0	1.8±0.87^{bc}

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

和 MDA 水平如图 3 所示。与正常组比较，模型组 SOD、GSH-PX、CAT 活性降低，MDA 含量升高（$P < 0.05$）。与模型组比较，FA 高、低剂量组抗氧化酶活性升高，MDA 水平降低（$P < 0.05$）。高剂量 FA 抗氧化酶活性的增强和 MDA 的减少明显高于低剂量组（$P < 0.05$）。这些结果显示 FA 在肝纤维化治疗中具有抗氧化能力。

3.4　FA 通过调控 MAPK 和 NF-κB/IκBα 途径发挥氧化应激和炎症的拮抗作用

Western blot 和免疫组化结果见图 4 ～ 6。与正常组比较，模型组 P-JNK/JNK、P-p38MAPK/p38MAPK 及核内 NF-κBp65 水平明显上调；与模型组比较，高、低剂量组均呈现出下调趋势（$P < 0.05$）。与正常组比较，模型组胞浆 NF-κBp65 和 IκBα 的表达水平明显下降（$P < 0.05$），而 FA 治疗组与模型组比较，则呈上升趋势（$P < 0.05$）。通过比较 β-tubulin 和组蛋白 H3 的表

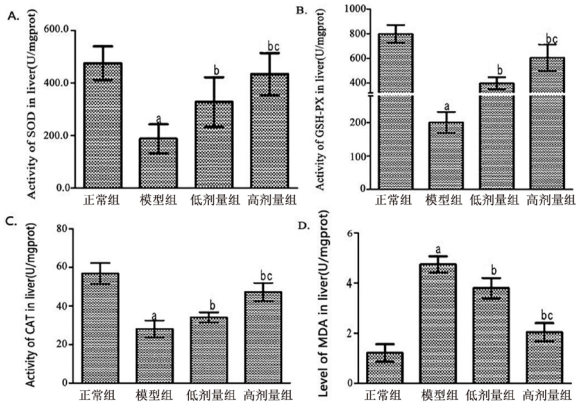


图 3　FA 对氧化应激指标的影响

Fig 3　Effect of FA on the index of oxidative stress damage

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

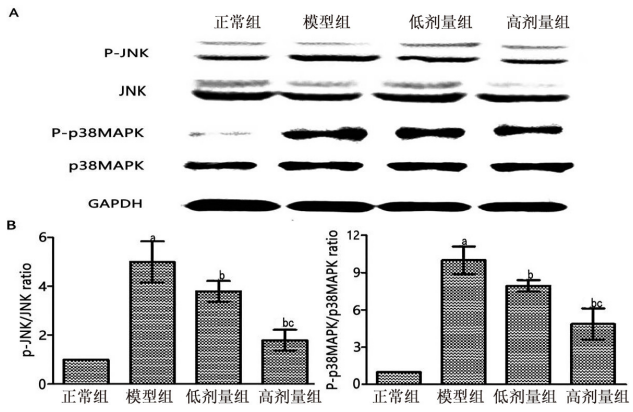


图 4　FA 对 MAPKs 信号通路的影响

Fig 4　Effects of FA on MAPKs pathway signals

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

达水平，确定细胞质和核酸蛋白的分离纯度。

与正常组比较，模型组 JNK 和 p38MAPK 的磷酸化水平以及 NF-κBp65 水平增加。与模型组比较，FA 给药组的阳性染色分数呈降低趋势。这些结果表明，FA 可能主要通过调节 MAPK 和 NF-κB/IκBα 途径，从而发挥抗肝纤维化的作用。

3.5　FA 减少炎症因子和 HSC 活化标志物

通过 Real-time PCR 评估 FA 对炎症因子（Cox-2）、白细胞介素（IL）-1β、IL-6、肿瘤坏死因子（TNF）-α 和 TGF-β 及 HSC 活化标记物（Colla1、Colla2、MMP-1、TIMP-1、α-SMA 和 Desmin）的影响，结果如图 7 所示。与正常组比较，模型组除 MMP-1 降低外，炎症因子和 HSC 活化标志物

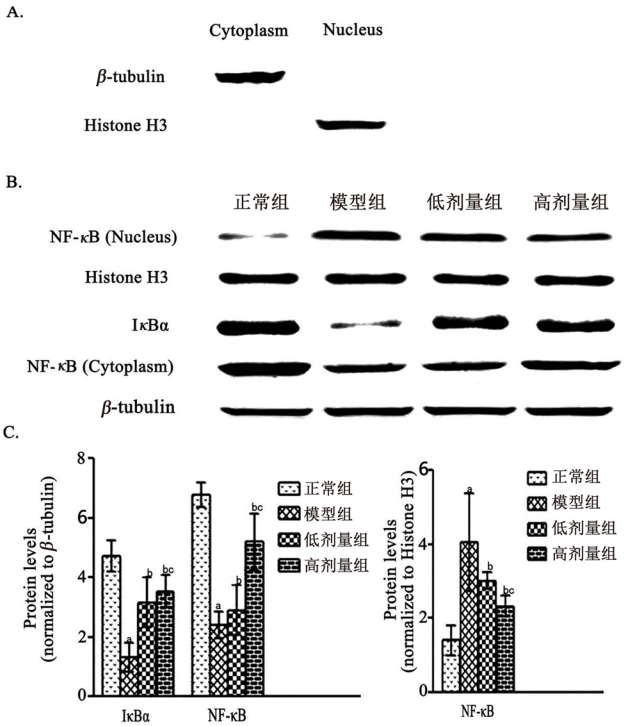


图 5　FA 对 NF-κB/IκBα 通路信号的影响

Fig 5　Effect of FA on NF-κB/IκBα pathway signals

A. 细胞浆和细胞核内 β-微管蛋白以及组蛋白 H3 的表达（expression of β-tubulin and Histone H3 in the cytoplasmic or nuclear compartments）；B. 细胞核内 NF-κB、细胞浆内 IκBα、NF-κB 的表达（expression of nuclear NF-κB and cytoplasmic IκBα，NF-κB）；C. 统计分析结果（statistical analysis）

注：与正常组比较，$^{a}P < 0.05$；与模型组比较，$^{b}P < 0.05$；与低剂量组比较，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{a}P < 0.05$；compared with the model group，$^{b}P < 0.05$；compared with the low dose group，$^{c}P < 0.05$.

均升高（$P < 0.05$）。与模型组比较，低剂量组和高剂量组除 MMP-1 升高外，其余水平均呈下降趋势（$P < 0.05$）。这些结果表明，FA 可能在一定程度上减轻炎症和抑制 HSC 的活化。

4　讨论

肝纤维化的发生和发展涉及到一系列复杂的过程，了解其相关的作用机制将有助于发掘新的治疗靶点，找到可能的治疗药物。氧化应激和炎症反应与肝纤维化的发生和逆转密切相关[14]。CCl_4 因能够诱导产生自由基并促进炎症反应而用于构建大鼠肝纤维化模型。研究表明，FA 具有抗炎和抗氧化作用，能够减轻 CCl_4 诱导的肝纤维化。FA 是一种酚酸类化学物质，尽管对其研究很多，但 FA 对肝纤维化的具体作用机制尚不完全清楚。本研究旨在揭示 FA 对大鼠肝纤维化的潜在作用机制。肝功能指标 TBIL、AST、ALT，肝纤维化指标 PⅢNP、Ⅳ-C、HA、LN 水平以及进

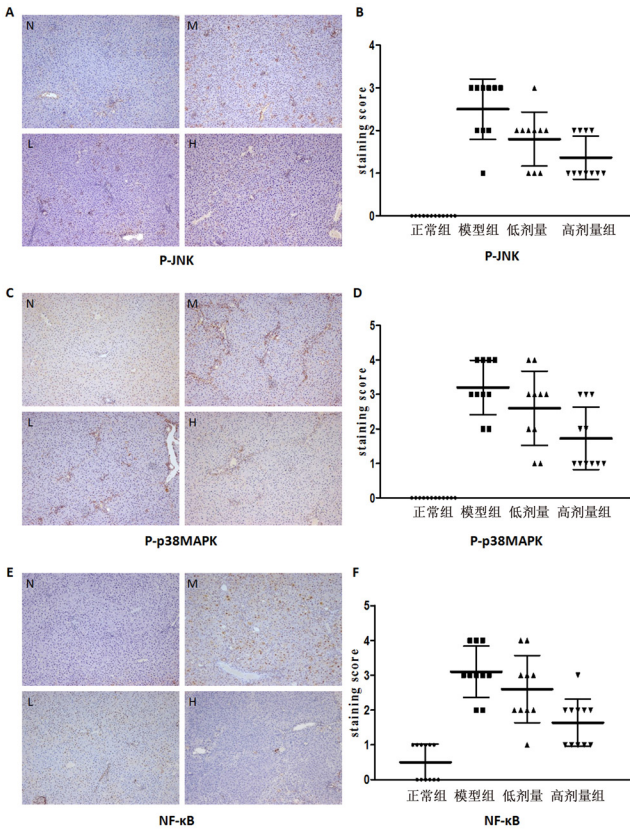


图 6 肝细胞中 P-JNK（A）、P-p38MAPK（B）和 NF-κB（C）表达的免疫组化评估和评分（100×）

Fig 6 Immunohistochemical evaluation and scores for P-JNK（A）, P-p38MAPK（B）, and NF-κB（C）expression in hepatocytes（100×）

一步组织病理学变化提示组织病理得到改善。基于以上结果，笔者推测 FA 能改善大鼠肝纤维化。

HSCs 的激活与肝纤维化的发生、发展密切相关。活化的 HSCs 或应激肝细胞能够产生 ROS，从而引起抗氧化防御形成氧化应激反应，这将进一步激活 HSCs，直接或间接促进炎症反应，加速纤维化的发生和发展 [15]。SOD、GSH-PX、CAT 等抗氧化酶以及 MDA 是抗氧化防御系统的重要组成部分，能够反映出机体的抗氧化能力。Srinivasan 等 [16] 发现 FA 能降低 ROS 和抑制脂质过氧化反应，具有较强的抗氧化活性。本研究显示，FA 治疗后 SOD、GSH-PX、CAT 升高，MDA 水平降低，结果提示 FA 能够降低肝纤维化组织的氧化应激水平。

MAPK 和 NF-κB/IκBα 通路是调节氧化应激、炎症和纤维化的关键信号通路。MAPKs 在调节 HSC 活化和胶原合成中起着重要作用。例如，抑制 p38MAPK 活化可有效抑制激活的 HSCs 产生胶原 [17]，而抑制 JNK 可阻止 TGF-β 诱导的 HSCs 活化并显著降低 CCl_4 诱导的纤维化 [18]。MAPKs 在调节氧化应激方面也发挥重要作用。氧化应激是肝纤维化的关键诱导因素，选择性 MAPK 抑制

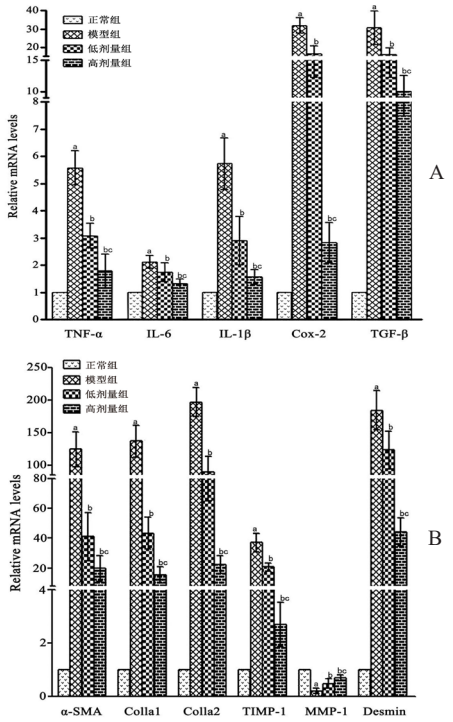


图 7 FA 对炎症相关因子（A）及 HSC 激活标记 mRNA 水平（B）的影响

Fig 7 Effect of FA on the mRNA levels of inflammation-related factors（A）and HSC activation markers（B）by real-time PCR analysis

注：与正常组比较，$^aP < 0.05$；与模型组比较，$^bP < 0.05$；与低剂量组比较，$^cP < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^aP < 0.05$；compared with the model group，$^bP < 0.05$；compared with the low dose group，$^cP < 0.05$.

剂能够改变氧化还原状态，这也在可可酚提取物通过靶向 MAPKs 介导氧化还原平衡中得到了证实 [19]。总之，MAPKs 是抗纤维化治疗的一个潜在靶点。为了探讨 FA 抗肝纤维化作用的可能机制，笔者主要检测了 MAPK 通路相关蛋白的变化，发现 p38MAPK 和 JNK 的磷酸化水平降低，提示 FA 抗肝纤维化的机制可能是通过调节 MAPK 信号通路来减轻氧化应激损伤。研究表明 MAPK 通路激活在 LPS 诱导的 NF-κB/IκBα 信号通路激活中起着重要作用 [20]，它能够通过影响 IκBα 磷酸化调节 NF-κB 的活化。NF-κB/IκBα 信号通路在炎症调节中发挥关键作用，能够阻止 NF-κB 信号抑制血管平滑肌细胞的炎症反应。抑制 NF-κB 信号能够抑制 HSCs 的活化，激活 NF-κB 信号能够抑制活化 HSCs 的凋亡 [21]。因此，本研究探讨了 FA 对肝纤维化的抗炎作用与 NF-κB/IκBα 信号通路相关性。在本研究中，模型组核内 NF-κBp65 水平明显高于正常组，胞浆 NF-κBp65 和 IκBα 的水平明显低于正常组，NF-κBp65 蛋白大量进入细胞核，而 IκBα 水平也显著降低，NF-κB 信号通路处于高

激活状态，FA 给药后，能一定程度上逆转蛋白表达水平的差异，抑制 NF-κB 信号通路的高激活状态，说明 FA 可能通过调节 NF-κB/IκBα 途径发挥抗肝纤维化的作用。总的来说，本文实验研究结果表明，FA 能够通过抑制 MAPK 和 NF-κB/IκBα 通路的激活从而发挥抗氧化应激和抗肝纤维化的炎症反应。

由于肝纤维化易受促炎症因子和 HSCs 激活的影响，HSC 激活受 MAPK 和 NF-κB/IκBα 通路的密切调控，炎症相关因子可由 NF-κB[22] 调节引起炎症反应，所以探讨 FA 对炎症因子（Cox-2、IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β）和 HSC 激活标记物（Colla1、Colla2、MMP-1、TIMP-1、α-SMA）的影响具有重要意义。通过相关指标的检测发现，FA 可抑制炎症和 HSCs 的激活，这些结果为 FA 对肝纤维化的抑制作用提供了进一步的证明。

5 总结

本研究证实了 FA 能够抑制 CCl_4 诱导的肝纤维化，对氧化应激和炎症反应具有明显影响。此外，本研究结果显示 FA 能够抑制 MAPK 和 NF-κB/IκBα 信号通路，这也为其抗氧化和抗炎作用机制提供了依据。然而，FA 作为抗肝纤维化治疗药物在临床应用中还有待进一步研究，后续将对 FA 的抗肝纤维化作用机制进行进一步挖掘。

参考文献

[1] Parola M，Pinzani M. Liver fibrosis：Pathophysiology，pathogenetic targets and clinical issues [J]. Mol Aspects Med，2019，65：37-55.

[2] Theerut L，Su S，Henricus AM，et al. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis [J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol，2018，175：71-102.

[3] Koyama Y，David AB. Liver inflammation and fibrosis [J]. J Clin Invest，2017，127（1）：55-64.

[4] Kim EK，Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. Biochimica Et Biophysica Acta，2010，1802（4）：396-405.

[5] Li ZL，Shi Y，Le G，et al. 24-Week exposure to oxidized tyrosine induces hepatic fibrosis involving activation of the MAPK/TGF-β_1 signaling pathway in Sprague-Dawley rats model [J]. Oxid Med Cell Longev，2016，2016：3123294.

[6] Lee IT，Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases [J]. Biochemical Pharmacology，2012，84（5）：581-590.

[7] Morgan MJ，Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling [J]. Cell Research，2011，21（1）：103-115.

[8] Telma PP，Francisco AA，José DS，et al. Differential behavior of NF-κB，IκBα and EGFR during the renal carcinogenic process in an experimental model in vivo [J]. Oncol Lett，2020，19（4）：3153-3164.

[9] Raquel EP，David T. The NF-κB family：Key players during embryonic development and HSC emergence [J]. Exp Hematol，2016，44（7）：519-527.

[10] Zduńska K，Dana A，Kolodziejczak A，et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application [J]. Skin Pharmacol Physiol，2018，31（6）：332-336.

[11] Mir SM，Ravuri HG，Pradhan RK，et al. Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice [J]. Biomed Pharmacother，2018，100：304-315.

[12] Akkarach B，Supathra L，Siriporn T，et al. Ferulic acid supplementation improves lipid profiles，oxidative stress，and inflammatory status in hyperlipidemic subjects：A randomized，double-blind，placebo-controlled clinical trial [J]. Nutrients，2018，10（6）：713.

[13] Wang Y，Wang R，Wang Y，et al. Ginkgo bilobaextract mitigates liver fibrosis and apoptosis by regulating p38 MAPK，NF-κB/IκBα，and Bcl-2/Bax signaling [J]. Drug Des Devel Ther，2015，9：6303-6317.

[14] Montano-Loza AJ，Thandassery RB，Czaja AJ. Targeting hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis [J]. Dig Dis Sci，2016，61（11）：3118-3139.

[15] Cui W，Matsuno K，Iwata K，et al. NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，reduced form（NADPH）oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation [J]. Hepatology，2011，54（3）：949-958.

[16] Srinivasan M，Rukkumani R，Sudheer AR，et al. Ferulic acid，a natural protector against carbon tetrachloride - induced toxicity [J]. Fundam Clin Pharmacol，2005，19（4）：491-496.

[17] Li X，Wang X，Han C，et al. Astragaloside Ⅳ suppresses collagen production of activated hepatic stellate cells via oxidative stress-mediated p38 MAPK pathway [J]. Free Radic Biol Med，2013，60：168-176.

[18] Kluwe J，Pradere JP，Gwak GY，et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition [J]. Gastroenterology，2010，138（1）：347-359.

[19] Isabel CH，María AM，Luis G，et al. Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress：Relevance of MAPKs [J]. Mol Nutr Food Res，2015，59（4）：597-609.

[20] Carter AB，Knudtson KL，Monick MM，et al. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein（TBP）[J]. J Biol Chem，1999，274（43）：30858-30863.

[21] Wang F，Liu S，Du T，et al. NF-κB inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cells [J]. Exp Ther Med，2014，8（1）：95-99.

[22] Shirasaki T，Honda M，Shimakami T，et al. Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway [J]. Hepatology，2014，60（5）：1519-1530.

（收稿日期：2021-02-05；修回日期：2021-04-06）

基于转运体 MRP2 和 P-gp 研究甘草酸对雷公藤多苷所致肝损伤的保护作用及机制

鞠爱霞，胡勇，单万亭，赵娇，肖洪彬，李秋红*（黑龙江中医药大学，哈尔滨 150040）

摘要：目的 基于药物转运体多药耐药相关蛋白 2（MRP2）、P- 糖蛋白（P-gp）探讨甘草酸对雷公藤多苷所致肝损伤的保护作用及机制。**方法** 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组，即空白组、雷公藤多苷组、甘草酸组以及联合组（雷公藤多苷＋甘草酸）。采用 ELISA 法测定大鼠血清及胆汁中谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、总胆红素（TBIL）和总胆汁酸（TBA）的水平，通过 HE 染色判断大鼠肝脏病理情况。运用 qRT-PCR 法和 Western blot 法检测 MRP2、P-gp 基因和蛋白的表达情况。**结果** 与空白组比较，雷公藤多苷组大鼠血清中 AST、ALT、TBA、TBIL 显著上升（$P < 0.01$），胆汁中 TBA、TBIL 含量显著降低（$P < 0.01$）。与雷公藤多苷组比较，联合组大鼠血清中 AST、ALT、TBA、TBIL 显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$），胆汁中 TBA、TBIL 含量升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。肝脏病理结果显示，雷公藤多苷组肝细胞排列紊乱，部分区域可见坏死灶；联合组中甘草酸能有效改变雷公藤多苷对肝细胞的损伤作用；空白组以及甘草酸组未见异常变化。与空白组比较，雷公藤多苷组大鼠肝脏 Mdr1a、Mdr1b、MDR2 mRNA 表达量以及 P-gp 蛋白表达均明显降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$），同时 MRP2 mRNA 表达量和蛋白表达也显著下降（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。联合组 Mdr1a、Mdr1b、MDR2 mRNA 以及 P-gp 蛋白表达显著上调（$P < 0.05$，$P < 0.01$），MRP2 mRNA 表达量和蛋白表达也不同程度被上调（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论** 雷公藤多苷所致肝损伤可能是抑制了肝脏 MRP2 和 P-gp 转运体，导致毒性物质外排减少，而甘草酸可以上调 MRP2 和 P-gp 基因和蛋白的表达，逆转雷公藤多苷对转运体的抑制作用，加快毒素排出，降低雷公藤多苷对肝脏的损伤。

关键词：雷公藤多苷；肝损伤；甘草酸；多药耐药相关蛋白 2；P- 糖蛋白
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2496-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.003

Protective effect and mechanism of glycyrrhizic acid on Tripterygium wilfordii multiglycoside-induced hepatic injury based on transporter MRP2 and P-gp

JU Ai-xia, HU Yong, SHAN Wan-ting, ZHAO Jiao, XIAO Hong-bin, LI Qiu-hong* (*Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040)

Abstract: Objective To determine the protective effect of glycyrrhizic acid on the liver injury induced by Tripterygium wilfordii multiglycoside based on drug transporter MRP2 and P-gp and related mechanism. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups: a blank group, a Tripterygium wilfordii multiglycoside group, a glycyrrhizic acid group and a combination group (Tripterygium wilfordii multiglycoside ＋ glycyrrhizic acid). Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) and total bile acid (TBA) in the serum and the bile were determined by ELISA. The pathological condition of the rat liver was judged by HE staining. The gene and protein expressions of MRP2 and P-gp were detected by qRT- PCR and Western blot. **Results** Compared with those of the blank group, the levels of AST, ALT, TBA and TBIL in the serum were significantly increased, while the content of TBA and TBIL in the bile was significantly decreased in the Tripterygium wilfordii multiglycoside

基金项目：黑龙江省自然科学基金联合引导项目（No.LH2019H107）。
作者简介：鞠爱霞，女，硕士，主要从事中药学相关研究，E-mail：juaixialuck@126.com *通信作者：李秋红，女，教授，硕士研究生导师，主要从事临床药学和药物动力学研究，E-mail：liqiuhong64@163.com

group ($P < 0.01$). Compared with the Tripterygium wilfordii multiglycoside group, the AST, ALT, TBA and TBIL values in the serum of the combination group were significantly lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the TBA and TBIL content in the bile of the combination group was significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Pathological results of the liver showed that hepatocytes in the Tripterygium wilfordii multiglycoside group were disordered and necrotic foci were seen in some areas, while glycyrrhizic acid effectively changed the damaging effect of tripterygium wilfordii multiglycoside on hepatocytes in the combination group. No abnormal changes were found in both the blank group and the glycyrrhizic acid group. Compared with the blank group, the mRNA expressions of Mdr1a, Mdr1b, MDR2 and P-gp protein expressions in the liver of rats in the Tripterygium wilfordii multiglycoside group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the gene and protein expressions of MRP2 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After combining with glycyrrhizic acid, the mRNA expression of Mdr1a, Mdr1b, MDR2 and P-gp protein were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expressions of MRP2 mRNA and protein were up-regulated to different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The hepatic injury induced by Tripterygium wilfordii multiglycoside may be due to the inhibition of MRP2 and P-gp transporters in the liver, resulting in the reduction of toxic substance efflux. Glycyrrhizic acid can up-regulate the expression of MRP2 and P-gp genes and proteins, reverse the inhibitory effect of Tripterygium wilfordii multiglycoside on transporters, accelerate toxin excretion and reduce the liver damage caused by Tripterygium wilfordii multiglycoside.

Key words: Tripterygium wilfordii multiglycoside; hepatic injury; glycyrrhizic acid; MRP2; P-gp

雷公藤多苷是从植物雷公藤去皮根部提取的总苷，包含雷公藤甲素、雷公藤红素和对醌 B 等成分，临床上常用于关节肿痛、糖尿病[1-2]、肾病和系统性红斑狼疮等疾病的治疗，但易产生肝损伤等毒副作用[3-4]。转运体是一种位于细胞膜上具有转运功能的蛋白，近年越来越多的研究证明，转运体变化不仅影响药物在体内的转运过程，而且在药物引起肝毒性的过程中也扮演着重要角色[5-6]。研究发现，雷公藤多苷主要毒性成分雷公藤甲素对多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance associated protein 2，MRP2）、P- 糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）有抑制作用[7-8]，导致胆红素、胆汁酸等有毒成分转运受阻，在肝中蓄积造成胆汁淤积性肝损伤。甘草有“解百药毒”之称，研究证实，雷公藤在配伍甘草后能够减轻对肝脏的损伤，同时又能维持临床疗效，但产生这种效应的分子机制尚不明确[9-10]。本研究欲从转运体 MRP2、P-gp 基因转录和蛋白翻译水平，探讨甘草酸对雷公藤多苷致肝毒性保护作用及分子机制，为减毒机制研究提供一定参考。

1　材料

1.1　实验动物

40 只 SPF 级 SD 雄性大鼠，年龄 6 ～ 8 周，体质量 180 ～ 200 g [青岛派特福德白鼠养殖公司，许可证号：SCKK（鲁）2014-004]。饲养环境：温度为 20 ～ 26 ℃，湿度为 40% ～ 70%。本研究的受试动物通过了黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会的批准。

1.2　试药

雷公藤多苷片（湖南千金协力药业，批号：20180603，规格：10 mg/ 片）；甘草酸（上海源叶生物科技有限公司，批号：X12A9C58435，纯度＞ 95%）；总胆红素（TBIL）检测试剂盒（批号：20180514）、总胆汁酸（TBA）检测试剂盒（批号：20180514）、谷草转氨酶（AST）试剂盒（批号：20180511）、谷丙转氨酶（ALT）试剂盒（批号：20180511）（南京建成生物科技有限公司）；动物总 RNA 快速抽提试剂盒（生工生物工程股份有限公司，批号：EA12KA9784）；Fastking cDNA 第一链合成试剂盒（天根生物科技有限公司，批号：R6720）；Fast Start Un.iversal SYBR Green Master Master（ROX）（罗氏诊断产品有限公司，批号：34226600）；BCA 蛋白浓度试剂盒（碧云天生物技术，批号：P0012S）；超敏 ECL 化学发光检测试剂盒（上海爱必信生物科技有限公司，批号：EL0419004）。

1.3　仪器

SynergyMX 酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；TGL16M 高速冷冻离心机（长沙英泰仪器有限公司）；实时荧光定量聚合酶链式反应仪，Smart Spec

plus 核酸蛋白分析仪，Mini PROT.EN Te.tra Cell 电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）；Alpha Ease FC4.0 紫外凝胶成像系统（美国）；Direct De.tect 红外微定量分析仪（美国）。

2 方法

2.1 实验分组及给药

40 只 SD 大鼠随机分为 4 组，即空白组、雷公藤多苷组、甘草酸组以及联合组（雷公藤多苷＋甘草酸），每组 10 只。给药量为雷公藤多苷 200 mg • kg^{-1}，甘草酸 80 mg • kg^{-1}，空白组给予生理盐水，每日灌胃给药 1 次，连续 14 d [大鼠雷公藤多苷给药剂量依据文献肝损伤模型确定其等效剂量为 20×（临床总给药剂量 ×0.018/0.2）[11]，甘草酸给药剂量依照文献查阅及预实验不同配比确定 80 mg • kg^{-1} 保肝效果最佳 [12]]。

2.2 生物样本采集

大鼠连续给药 14 d，禁食不禁水 12 h，第 15 日眼眶取血，约 1 mL，静置 1 h，于 3500 r • min^{-1} 离心 10 min，用移液枪吸取上清液于离心管中为血清样本；大鼠 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，胆总管插管，收集 0 ～ 2 h 胆汁分装于离心管中为胆汁样本；待收取胆汁结束后取其肝脏，用生理盐水冲洗表面并用滤纸吸干多余的水分，称量各组大鼠肝脏重量，分装于离心管中为肝脏样本；血清和胆汁样本－ 20 ℃保存，肝脏样本－ 80 ℃保存。

2.3 肝功能生化指标测定

血清中 AST、ALT、TBA 和 TBIL 指标分别按照各检测试剂盒说明书进行测定。胆汁中 TBA、TBIL 参照血清中的相关方法进行检测。

2.4 组织病理观察

选取各组中较为完整的肝组织样本置于 4% 多聚甲醛中固定不少于 24 h，用蒸馏水和乙醇清洗数次，进行梯度脱水至无水乙醇状态，用二甲苯进行透明，并用石蜡包埋，切片，随后用二甲苯代替物进行脱蜡，梯度水化至 75% 乙醇溶液，蒸馏水冲洗后用苏木精染细胞核，蒸馏水冲洗，除去多余的染料；用盐酸乙醇分化，蒸馏水冲洗，后于弱碱性水溶液中返蓝，再冲洗；将水化后的切片用 1% 伊红染色液染细胞质，蒸馏水冲洗，将切片脱水至无水乙醇状态后使用中性树胶封片，置于显微镜下观察。

2.5 qRT-PCR 法检测肝组织中 Mdr1a、Mdr1b、MDR2、MRP2 mRNA

Buffer Rlysis-A 法分别提取各组肝组织总 RNA，用核酸蛋白分析仪检测总 RNA 的浓度及纯度，并逆转录合成 cDNA 第一链，反应条件为 42 ℃ 孵育 15 min；95 ℃ 3 min。采用 SYBR Green Master 预混液于荧光定量 PCR 仪上进行测定，反应条件为 95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，46 个循环；55 ℃ 15 s，81 个循环；55 ℃ 15 s。引物由生工生物工程有限公司（上海）合成，见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence of PCR

引物	序列
Mdr1a	F：TTTCAAAGGTTGTAGGGG
	R：CAATGTATCGGAGTCGC
Mdr1b	F：GGTTCCGTGCCTACTTGGTG
	R：GATGTGGGATGCTGAGACTTTG
MDR2	F：CACGGGCGCATCAAAATAGG
	R：GTCCCCACCACAAAGTAGGG
MRP2	F：GAGCACCAGCAGCGATTTC
	R：AAGACGACCAAGTTTCCAACCA
β-actin	F：CTGGCCCGACCTGACAGA
	R：GCGGCAGTAGCCATCTC

2.6 Western blot 检测肝组织中 P-gp、MRP2 蛋白表达

提取大鼠肝脏总蛋白；BCA 法测定蛋白浓度后用 5×SDS-PAGE 上样缓冲液（蛋白体积:上样缓冲液＝ 4∶1）进行煮样；配制 8% 分离胶及 5% 浓缩胶；灌胶后于电压 60 V 浓缩胶中跑胶约 30 min 直至溴酚蓝进入浓缩胶与分离胶交界处，改为电压 80 V 继续电泳，约 1.5 h 时溴酚蓝接近分离胶底端，电泳结束；恒压 15 V，转膜 30 ～ 35 min；5% 脱脂奶粉封闭 2 h；一抗 4 ℃孵育过夜，稀释比例为 MRP2（1∶750）、P-gp（1∶750）、*β*-actin（1∶1000）；二抗孵育 1 h，稀释比例为 MRP2（1∶10 000）、P-gp（1∶10 000）、*β*-actin（1∶25 000）；超敏 ECL 化学发光显影液显影；利用 Image J 软件测定各实验组蛋白条带的光密度值并分析各组灰度值。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行分析，多组数据采用单因素方差分析，两组数据分析比较采用 *t* 检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义，各组实验结果均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。

3 结果

3.1 大鼠血清 AST、ALT、TBA 和 TBIL 变化情况

与空白组比较，雷公藤多苷组大鼠血清 AST、ALT、TBA 和 TBIL 的水平明显升高（$P < 0.01$），说明 200 mg • kg^{-1} 雷公藤多苷造成了大鼠肝损

伤；与雷公藤多苷组比较，甘草酸组与联合组血清 AST、ALT、TBA、TBIL 水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），说明服用雷公藤多苷的同时给予甘草酸可以减轻雷公藤多苷造成的影响（见表 2）。

表 2　大鼠血清 ASL、ALT、TBA 及 TBIL 的水平（$n=10$）

Tab 2　Serum levels of ALT，AST，TBA and TBIL in rats（$n=10$）

组别	AST/（U·L^{-1}）	ALT/（U·L^{-1}）	TBA/（μmol·L^{-1}）	TBIL/（μmol·L^{-1}）
空白组	66.82±3.83	51.10±3.15	2.49±0.23	13.21±2.03
雷公藤多苷组	118.84±2.44**	97.59±6.96**	5.29±0.28**	31.36±2.31**
甘草酸组	65.61±6.04$^{\#\#}$	47.03±5.24$^{\#\#}$	2.31±0.13$^{\#\#}$	11.72±1.46$^{\#\#}$
联合组	75.02±8.66$^{\#}$	62.51±6.54$^{\#}$	3.79±0.10$^{\#}$	20.06±1.67$^{\#\#}$

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与雷公藤多苷组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

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

3.2　大鼠胆汁 TBA 和 TBIL 含量变化情况

与空白组比较，雷公藤多苷组胆汁 TBA、TBIL 水平降低（$P<0.01$），说明排入胆汁中的 TBA 和 TBIL 减少，在肝脏中蓄积；与雷公藤多苷组比较，甘草酸组与联合组胆汁 TBA、TBIL 水平升高（$P<0.05$，$P<0.01$），表明联合组中甘草酸加速肝脏中 TBA 和 TBIL 外排，减轻了雷公藤多苷对肝细胞的损伤（见表 3）。

3.3　组织病理观察

表 3　大鼠胆汁 TBA、TBIL 的水平（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

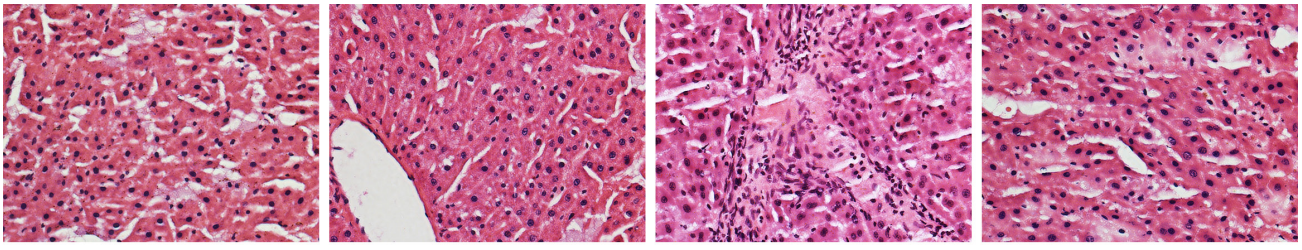
Tab 3　Bile levels of TBA and TBIL in rats（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TBA/（μmol·L^{-1}）	TBIL/（μmol·L^{-1}）
空白组	22.86±1.90	93.97±8.81
雷公藤多苷组	17.18±1.35**	72.69±5.99**
甘草酸组	24.12±2.09$^{\#}$	102.93±8.24$^{\#\#}$
联合组	21.31±1.72$^{\#}$	89.98±4.44$^{\#\#}$

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与雷公藤多苷组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

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

空白组中肝脏组织中细胞排列整齐，肝小叶清晰可见，细胞形态、结构均正常，未见肝纤维化及炎症细胞浸润现象。甘草酸组中肝小叶结构正常，肝细胞以中央静脉为中心呈放射状，肝索排列正常，未发现病理改变，肝小叶内未见炎症细胞浸润。雷公藤多苷组中肝索结构紊乱，肝细胞肿胀，细胞核增大伴有少量水肿，部分区域可见片状坏死以及炎症细胞浸润现象。联合组中肝细胞较雷公藤多苷组排列整齐但不及甘草酸组与空白组，图中可见肝细胞的分化以及肝血窦，也能发现少许的点状坏死现象及少许细胞体积增大较雷公藤多苷组均有所改善（见图 1）。表明联合组中甘草酸能减轻雷公藤多苷造成的组织细胞坏死及炎症细胞浸润，对肝组织具有一定的保护作用。



A　　B　　C　　D

图 1　大鼠肝组织病理形态的苏木精 - 伊红染色图（400×）

Fig 1　HE staining micrograms of the pathological changes of liver tissue in rats（400×）

A. 空白组（blank group）；B. 甘草酸组（glycyrrhizic acid group）；C. 雷公藤多苷组（Tripterygium wilfordii multiglycoside group）；D. 联合组（combination group）

3.4　雷公藤多苷配伍甘草酸对转运体相关基因表达的影响

与空白组比较，雷公藤多苷组大鼠肝脏 Mdr1a、Mdr1b、MDR2、MRP2 mRNA 表达量下降（$P<0.05$，$P<0.01$）；与雷公藤多苷组比较，甘草酸组与联合组大鼠肝脏 Mdr1a、Mdr1b、MDR2、MRP2 mRNA 表达量上升（$P<0.05$，$P<0.01$）。结果见图 2。

3.5　雷公藤多苷配伍甘草酸对转运体 MRP2 和 P-gp 蛋白表达的影响

与空白组比较，雷公藤多苷组 P-gp、MRP2 蛋白表达下降（$P<0.05$，$P<0.01$）；与雷公藤多苷组比较，甘草酸组与联合组 P-gp、MRP2 蛋白表达上升（$P<0.05$，$P<0.01$）。结果见表 4 和图 3。

4　讨论

雷公藤多苷临床上常用于风湿、类风湿关节炎，系统性红斑狼疮等疾病的治疗，但雷公藤多苷的毒性也困扰着其使用，临床上因雷公藤剂量不当或长期服用造成的不良反应受到了人们的广泛关注[13-14]，肝脏为其最主要和损伤最严重的靶

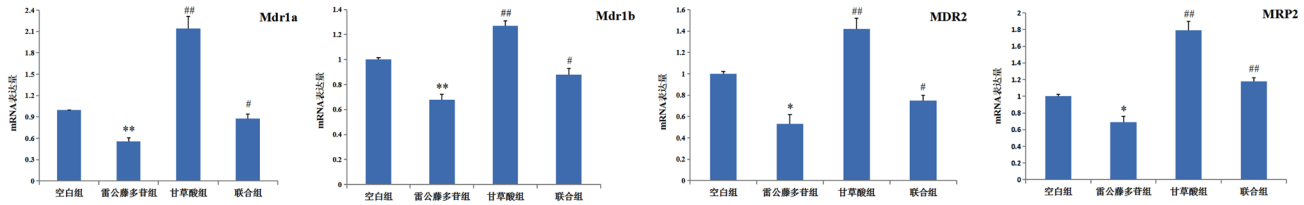


图 2 大鼠肝组织中 Mdr1a、Mdr1b、MDR2、MRP2 的基因表达水平

Fig 2 Expression of Mdr1a, Mdr1b, MDR2 and MRP2 mRNA in liver tissues of rats

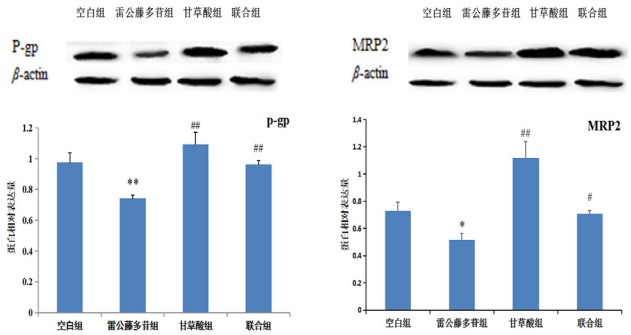


图 3 大鼠肝组织 MRP2 和 P-gp 蛋白表达水平

Fig 3 Expression of MRP2 and P-gp proteins in liver tissues of rats

表 4 大鼠肝组织中的 P-gp 及 MRP2 蛋白表达水平 (n = 10)

Tab 4 Expression of P-gp and MRP2 protein in liver tissue of rats (n = 10)

组别	P-gp	MRP2
空白组	0.97±0.06	0.73±0.06
雷公藤多苷组	0.74±0.02**	0.52±0.04*
甘草酸组	1.09±0.08##	1.11±0.12##
联合组	0.96±0.02##	0.71±0.02#

注：与空白组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与雷公藤多苷组比较，#P < 0.05，##P < 0.01。

Note：Compared with the blank group, *P < 0.05, **P < 0.01; compared with the Tripterygium wilfordii multiglycoside group, #P < 0.05, ##P < 0.01.

器官之一，为降低其毒副作用，古今医家在药性理论基础上采用配伍用药对其毒性进行制约或减轻，可有效地保证用药安全性[15]。甘草被认为“解百药毒”，甘草或其有效成分常与雷公藤或雷公藤制剂应用于湿疹、风湿等的治疗，可以缓解对肝脏的损伤[16]。研究表明甘草酸可通过诱导 CYP3A 酶活性，增强肝细胞抗氧化能力及抑制细胞凋亡等达到对雷公藤致肝毒性的减毒作用[17]。

现代研究证实雷公藤造成的肝损伤与其干扰肝细胞表面的转运体活性有关[18]。雷公藤下调外排转运体 MRP2 和 P-gp 表达，抑制了外排转运体 P-gp 和 MRP2 转运能力，致使肝脏内胆汁酸、胆红素或其他有害物质的外排过程受阻从而毒害肝细胞，对肝脏造成毒害后果；而甘草配伍雷公藤后能逆转 MRP2 和 P-gp 下调作用，从而对肝细胞有保护作用，加速有害物质的转运。甘草具有保肝解毒之功效，其中主要有效成分甘草酸在临床常用于治疗慢性肝炎，因此，本研究从转运体角度探究了雷公藤多苷致肝毒性及甘草酸对其保护的作用机制，为临床两药联用提供了实验数据支持。

本实验对各组大鼠血清生化指标 AST、ALT、TBA 和 TBIL 及胆汁中 TBA 和 TBIL 含量进行了检测，结果显示，雷公藤多苷造成的肝损伤可能是干扰正常机体胆汁中 TBA 和 TBIL 等物质的转运。上述物质由肝脏排入胆管减少，在肝脏蓄积，而浓度过高的胆汁酸、胆红素等有毒物质诱导细胞线粒体功能紊乱促进炎性介质产生，导致肝细胞损伤、坏死及凋亡，在临床上也常出现乏力、黄疸、胆汁淤积等现象[19-21]。而雷公藤多苷配伍甘草酸后，加快肝脏中 TBA、TBIL 外排入胆汁，降低肝脏中 TBA 和 TBIL 蓄积，减轻对肝细胞的损伤。肝组织切片 HE 染色结果进一步证实甘草酸能有效缓解雷公藤多苷造成的肝细胞损伤。为了进一步明确雷公藤多苷所致的肝损伤及甘草酸对其保护机制是否与转运体有关，本实验对转运胆汁酸、胆红素等有毒物质的转运体 P-gp 和 MRP2 进行了检测。采用 qRT-PCR 对编码转运体 P-gp 的编码基因 Mdr1a/b 和 MDR2 的 mRNA 及 MRP2 的 mRNA 表达量进行检测，采用 Western blot 技术对 P-gp 和 MRP2 蛋白表达量进行检测。结果表明，雷公藤多苷对编码外排转运体 P-gp 及 MRP2 基因和蛋白的作用具有一致性，均有不同程度抑制作用，说明雷公藤对转运体功能的影响可能是通过对基因的抑制传递到对蛋白表达的抑制，转运体 P-gp 和 MRP2 外排能力的降低在一定程度上限制了两者对一些毒性物质如游离型胆汁酸、胆红素等的转运，使这些毒性物质在肝脏滞留，导致肝功能异常；而雷公藤多苷配伍甘草酸后，有效逆转雷公藤多苷对外排转运体 P-gp 和 MRP2 基因和蛋白的下调作用[22]，使肝细胞功能恢复正常，胆红素、胆汁酸及其他有毒代谢产物能及时分泌到胆汁中，减少有毒物质胆汁酸在肝中蓄积导致的肝损伤。综上，雷公藤多苷抑制了 MRP2、P-gp 基因及蛋白表达，使转运体功能异

常，造成胆汁酸和胆红素等物质在体内蓄积造成肝毒性，配伍甘草酸后逆转 MRP2、P-gp 基因及蛋白表达进而达到保肝作用。

本研究也存在一定的局限性：首先，仅从动物水平研究甘草酸对雷公藤多苷所致肝损伤的保护机制，未从细胞水平深入探索其是如何影响转运体；其次，仅从外排转运体研究造成胆汁淤积性肝损伤及甘草酸对其保护作用的分子机制，不够全面。本课题组后续将从涉及胆汁合成、代谢及相关调节因子进行全面深入研究。但本实验在一定程度上证明了雷公藤多苷造成的肝损伤与转运体有一定联系，而甘草酸对肝的保护作用也与外排转运体有关，其能逆转雷公藤多苷对转运体的影响达到减毒作用。

参考文献

[1] 傅瑶，张剑萍，简桂花，等 . 雷公藤多苷治疗糖尿病肾病临床疗效文献分析 [J]. 世界临床药物，2019，40（7）：514-520.

[2] 樊磊，张倩茹，赵琳妍 . 雷公藤多苷对红斑狼疮患者的临床治疗效果及抗氧化能力的影响 [J]. 中国药物与临床，2019，19（3）：432-434.

[3] 张鑫 . 雷公藤制剂毒副作用及减毒方法研究进展 [J]. 中国药学杂志，2013，48（22）：1897-1901.

[4] 杨冬梅，刘俊 . 雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（20）：2185-2190.

[5] 李红品，朱虹宇，高兴，等 . 基于特异质大鼠胆红素相关转运体功能抑制探讨首乌藤肝损伤机制 [J]. 中国中药杂志，2017，42（18）：3591-3595.

[6] 苏慧宗，李玥，张志荣，等 . 茵陈蒿水煎液对 ANIT 所致肝内胆汁淤积模型小鼠肝损伤影响及其机制初步探讨 [J]. 上海中医药杂志，2017，51（S1）：172-176.

[7] 周利婷，曲晓宇，陶娌娜，等 . 雷公藤甲素致小鼠肝损伤对转运体 Mrp2 和 Oatp2 的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（21）：1844-1847.

[8] Kong LL，Zhuang XM，Yang HY，et al. Inhibition of P-glycoprotein gene expression and function enhances triptolide-induced hepatotoxicity in mice [J]. Sci Rep，2015，5：11747.

[9] 马致洁，章从恩，唐进法，等 . 雷公藤配伍甘草降低肝毒性的代谢通路探讨 [J]. 药学学报，2017，52（7）：1077-1084.

[10] 赵小梅，宫嫚，董捷鸣，等 . 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（1）：119-124.

[11] 禄保平，苗明三，杨晓娜 . 应用雷公藤多苷灌胃建立小鼠急性肝损伤模型的研究 [J]. 中药药理与临床，2007，23（2）：75-77.

[12] 李慧珍，刘斌，舒海洋，等 . 雷公藤配伍甘草减毒作用动物实验的系统评价 [J]. 中国中药杂志，2019，44（16）：3512-3519.

[13] 李金全，运乃茹，温学红 . 雷公藤多苷在常见自身免疫性疾病中的临床应用及安全性 [J]. 医学综述，2016，22（19）：3850-3854.

[14] 冯群，孙蓉 . 雷公藤多苷片抗炎作用及伴随肝毒性研究 [J]. 中药新药与临床药理，2014，25（6）：713-716.

[15] 陶玲，管咏梅，陈丽华，等 . 雷公藤配伍减毒研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（4）：229-234.

[16] 朱胜楠，张靖，谭亲友，等 . 甘草水提物对雷公藤甲素致大鼠急性肝损伤的改善作用及对其体内 IL-10、TNF-α 水平的影响 [J]. 中国药房，2019，30（2）：216-220.

[17] 曹玲娟，颜苗，李焕德，等 . 雷公藤致肝损伤及与甘草配伍减毒机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（13）：2537-2541.

[18] 周利婷，曲晓宇，陶娌娜，等 . 雷公藤甲素致小鼠肝损伤对转运体 Mrp2 和 Oatp2 的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（21）：1844-1847.

[19] 吴文晓，王婷，耿兴超，等 . 药物性胆汁淤积型肝损伤的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2020，29（2）：143-151.

[20] 王安红，刘路，周昆 . 胆汁淤积与胆汁酸转运蛋白关系的研究进展 [J]. 医学综述，2013，19（1）：16-18.

[21] Tan QY，Hu Q，Zhu SN，et al. Licorice root extract and magnesium isoglycyrrhizinate protect against triptolide-induced hepatotoxicity via up-regulation of the Nrf2 pathway [J]. Drug Deliv，2018，25（1）：1213-1223.

[22] 徐叶 . 雷公藤甲素及其衍生物雷腾舒药物代谢研究 [D]. 上海：中国科学院大学（中国科学院上海药物研究所），2019.

（收稿日期：2021-05-25；修回日期：2021-07-14）

石杉碱甲衍生物预防梭曼中毒的研究

崔雅岚，张瑞华，靳倩，石童，王陈，陈学军*，李丽琴*（国民核生化灾害防护国家重点实验室，北京 102205）

摘要：目的 研究石杉碱甲（Hup A）衍生物石杉碱甲 - 水杨醛（Hup A-SA）和石杉碱甲 - 反式肉桂醛（Hup A-TCA）对神经性毒剂梭曼（GD）的体外、体内预防效应及安全性。**方法** 采用改良 Ellman 法体外测定 Hup A 及其衍生物 Hup A-SA 和 Hup A-TCA 对乙酰胆碱酯酶（AChE）的抑制效应及对 GD 的体外预防效应。小鼠灌胃给予 Hup A（2 mg • kg^{-1}）、Hup A-SA（2.86 mg • kg^{-1}）和 Hup A-TCA（2.94 mg • kg^{-1}），分别于给药后 12、24 h 肌内注射 1×LD_{95} 剂量的 GD，观察并记录各组小鼠的中毒症状及死亡情况。小鼠灌胃给予 Hup A（4 ～ 10 mg • kg^{-1}）、Hup A-SA（15 ～ 55 mg • kg^{-1}）和 Hup A-TCA（5 ～ 40 mg • kg^{-1}），记录小鼠的中毒症状及 14 d 内的死亡情况，使用 Bliss 法计算半数致死剂量（LD_{50}）。**结果** Hup A、Hup A-SA、Hup A-TCA 均浓度依赖性地抑制 AChE 活性，其半数抑制浓度（IC_{50}）分别为（0.36±0.05）、（1.36±0.03）和（0.62±0.03）μmol • L^{-1}。3 种药物与 AChE 预孵育，均可显著提高 GD 的 IC_{50} 值；体内预防给药 12 h 后以 GD 攻击，3 种药物小鼠存活率均提高，分别为 66.67%、75% 和 100%；预防给药 24 h 后以 GD 攻击，2 个衍生物组仍有部分动物存活，而 Hup A 组动物全部死亡，2 种衍生物体内预防 GD 的时效性较 Hup A 更长。急性毒性研究显示，3 种药物小鼠灌胃的 LD_{50} 值分别为 7.20、45.75 和 16.42 mg • kg^{-1}，衍生物安全性提高。**结论** Hup A-SA 和 Hup A-TCA 均通过可逆地抑制 AChE 活性发挥 GD 中毒预防作用，预防时间较 Hup A 长，且安全性更高。

关键词：石杉碱甲；衍生物；神经性毒剂；梭曼；预防作用
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2502-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.004

Protective effect of Huperzine A derivatives against soman intoxication

CUI Ya-lan, ZHANG Rui-hua, JIN Qian, SHI Tong, WANG Chen, CHEN Xue-jun*, LI Li-qin* (*State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing* 102205)

Abstract: Objective To determine the in vitro and in vivo intoxication and safety of Hup A derivatives (Hup A-SA and Hup A-TCA) against soman (GD). **Methods** Modified Ellman method was applied in vitro to determine the inhibiting effect of Hup A and its derivatives on AChE and their preventive effect against soman intoxication. The mice were pretreated with Hup A (2 mg • kg^{-1}), Hup A-SA (2.86 mg • kg^{-1}), and Hup A-TCA (2.94 mg • kg^{-1}) orally. The poisoning symptoms and death rates of each group were observed and recorded 12 h or 24 h after challenged with 1×LD_{95} dose of GD (im). In the acute toxicity study, the mice were given Hup A, Hup A-SA or Hup A-TCA orally. Their poisoning symptoms and death rates within 14 d were recorded, and the median lethal doses (LD_{50}) were calculated by Bliss method. **Results** Hup A, Hup A-SA and Hup A-TCA all inhibited the activity of AChE in a concentration-dependent manner with IC_{50} values at (0.36±0.05) μmol • L^{-1}, (1.36±0.03) μmol • L^{-1} and (0.62±0.03) μmol • L^{-1}, respectively. The IC_{50} values of GD inhibiting AChE pretreated with Hup A, Hup A-SA or Hup A-TCA were increased significantly as compared with those of the non-pretreated groups. The mice were pretreated with prophylactic drugs of Hup A, Hup A-SA or Hup A-TCA 12 hours in advance improved the survival rates of mice challenged with GD, and the survival rates of mice were 66.67%, 75%, and 100%, respectively. If given 24 hours in

作者简介：崔雅岚，女，硕士研究生，主要从事分子药理学研究，E-mail：1044168379@qq.com *通信作者：李丽琴，女，研究员，博士研究生导师，主要从事分子药理学研究，E-mail：llq969696@163.com；陈学军，男，博士，主要从事神经毒理学研究，E-mail：chenxuejun86@sina.com

advance, some mice in the two derivative groups survived, while all mice died in the Hup A group. The effective time of preventing soman in the two derivatives groups was longer than that of Hup A group. The LD_{50} values of the mice given Hup A, Hup A-SA and Hup A-TCA orally were 7.20 mg • kg^{-1}, 45.75 mg • kg^{-1} and 16.42 mg • kg^{-1}, respectively, and the safeties of the derivatives were enhanced. **Conclusion** The Hup A-SA and Hup A-TCA can prevent GD poisoning by reversibly inhibiting the activity of AChE, with longer prevention time and safer effect than those of Hup A.
Key words: huperzine A; derivative; nerve agent; soman; prophylaxis

近年来，国际恐怖活动日益猖獗，有机磷神经性毒剂（organophosphorus nerve agents，OPNA）频繁在化学恐怖袭击中使用，是危害公共安全的极大隐患[1-3]。

OPNA 通过不可逆地抑制乙酰胆碱酯酶（AChE）使其无法水解神经递质乙酰胆碱（ACh），造成大量 ACh 在神经系统、突触间隙和肌神经接头处积蓄，导致胆碱能危象，产生毒蕈碱样、烟碱样和中枢神经系统症状，严重者可导致死亡[4]。针对 OPNA 的常规治疗包含肟类重活化剂、抗惊厥药以及抗胆碱药阿托品的联合使用[5]。然而，对于梭曼（soman，代号 GD）这种与 AChE 结合速度十分迅速的 OPNA，其与 AChE 的“老化”速度快，重活化剂很难恢复被梭曼所抑制的 AChE 活性[5-6]。

除了传统治疗外，预防性应用 AChE 可逆性抑制剂是预防 OPNA 中毒的重要手段。AChE 可逆性抑制剂通过暂时占据 AChE 的催化位点，从而阻止 OPNA 与酶结合，使酶保留部分活性，达到预防中毒的目的。如英美等国军队装备的溴吡啶斯的明就曾作为海湾战争中 OPNA 的预防药物。虽然每 8 h 口服 30 mg 剂量的溴吡啶斯的明可以作为潜在 OPNA 暴露的预防措施，但较大给药剂量以及较短的预防时间增加了不良反应的发生，如一类以情绪认知障碍、慢性疲劳、呼吸困难、头痛等为症状的“海湾战争综合征”就可能与服用溴吡啶斯的明有关，同样，预防时效过短也不利于士兵在战场环境下使用[7-8]；而且，溴吡啶斯的明难以透过血脑屏障，对 OPNA 造成的中枢神经损伤无预防效应。

石杉碱甲（huperzine A，Hup A）是一种从蛇足石杉中提取的可逆性 AChE 抑制剂，临床上用于阿尔茨海默病的治疗。由于 Hup A 具有中枢保护、对 AChE 选择性高等优势，在预防 OPNA 中毒方面显示出一定的应用前景[9]。然而，Hup A 在临床使用中暴露出毒性相对较大、药效时间短等问题，为了进一步延长 Hup A 预防 OPNA 的作用时间，降低其毒性，本研究设计合成了 2 种 Hup A 衍生物，即石杉碱甲 - 水杨醛（huperzine A-salicylaldehyde，Hup A-SA）和石杉碱甲 - 反式肉桂醛（huperzine A-trans-cinnamaldehyde，Hup A-TCA）（结构式见图 1），通过开展体内外对梭曼的预防研究和急性毒性评价，为开发神经性毒剂的长效预防药物提供依据。

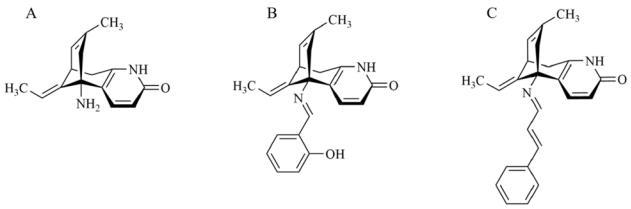


图 1　Hup A（A）、Hup A-SA（B）和 Hup A-TCA（C）的结构

Fig 1　Chemical structures of Hup A（A），Hup A-SA（B），and Hup A-TCA（C）

1　材料

1.1　试药和仪器

羧甲基纤维素钠 [阿拉丁试剂（上海）有限公司]；异丙醇（美国 Amresco 公司）；二甲基亚砜（上海麦克林科技有限公司）；AChE（C1682-0.1MG）、乙酰硫代胆碱（ATCh）、5，5'- 二硫代双（2- 硝基苯甲酸）（DTNB）、谷胱甘肽、明胶（美国 Sigma 公司）；氯化钠注射液（批号：F10122510，河北天成药业股份有限公司）；0.1 mol • L^{-1} pH 7.4 磷酸缓冲液（PB，北京 COOLABER 公司）；Hup A（批号：AB505H，天津一方科技有限公司）；Hup A-SA、Hup A-TCA 均由本单位合成，纯度≥ 99%。

MillQ-10A 超纯水净化系统（美国 Millipore 公司）；Spark 20M 多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；Genie Vortex-2 型涡旋振荡器（美国 Scientific Industries 公司）。

1.2　实验动物

SPF 级 ICR 小鼠，雌雄各半，体质量 20 ～ 22 g [北京华阜康生物科技股份有限责任公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010]。动物饲养于室温（22±2）℃，湿度 50% ～ 60%，照明与黑暗交替进行，周期为 12 h，可自由饮水与进食。实验前饲养 3 d 以适应环境。

2 方法

2.1 Hup A 衍生物对 AChE 的抑制作用研究

采用改良 Ellman 法测定 Hup A 及衍生物对 AChE 酶抑制的动力学[4, 10]。反应体系总体积 250 μL：将 50 μL 的显色剂 DTNB（终浓度 0.3 mmol • L^{-1}）与 135 μL PB 预先混合，再加入 10 μL 的 AChE（终质量浓度 16 ng • mL^{-1}）和 0.03 ～ 4 μmol • L^{-1} 的 Hup A 或 0.52 ～ 5.60 μmol • L^{-1} 的 Hup A-SA 或 0.19 ～ 4 μmol • L^{-1} 的 Hup A-TCA 5 μL，最后加入 50 μL 的 ATCh（终浓度 0.45 mmol • L^{-1}），在 37 ℃条件下 412 nm 处测定 AChE 活性，连续测定 30 min，每次测定间隔 30 s。空白组以 5 μL 的 PB 代替 Hup A，同等条件下检测。按照以下公式计算 Hup A 及其衍生物对 AChE 的抑制率。以药物浓度的对数为横坐标，抑制率为纵坐标，绘制浓度 - 抑制效应曲线，并计算 Hup A 及衍生物的半数抑制浓度（IC_{50}）。

抑制率（100%）＝（空白组 A_{412} －测试组 A_{412}）/ 空白组 A_{412} × 100%

2.2 Hup A 衍生物对梭曼的体外预防效应研究

将 10 μL 的 AChE、5 μL 的 Hup A（终浓度 0.2 μmol • L^{-1}）或衍生物（终浓度 0.2 μmol • L^{-1}）、50 μL 的 DTNB 及 135 μL 的 PB 混合，37 ℃条件下预先孵育 30 min，然后加入 5 μL 不同浓度的梭曼稀释液以及 50 μL ATCh 启动反应，酶标仪于 37 ℃条件下在 412 nm 处连续测定 160 min，每次测定间隔 1 min。同时设置梭曼对照组，连续测定不同浓度梭曼对 AChE 活性的抑制作用。计算 90 min 时各药物不同浓度的抑制效率，绘制浓度 - 抑制效应曲线，计算各组 IC_{50} 值。

2.3 Hup A 衍生物体内预防梭曼中毒研究

分别精密称取适量 Hup A、Hup A-SA 和 Hup A-TCA，采用注射用水配制的 5% 羧甲基纤维素钠溶液分别制成 0.2、0.286 及 0.294 mg • mL^{-1} 的混悬液备用。96 只雌雄各半的 ICR 小鼠随机分为对照组、Hup A 预防组、Hup A-SA 预防组、Hup A-TCA 预防组。各预防给药组灌胃剂量分别为 Hup A（2 mg • kg^{-1}）、Hup A-SA（2.86 mg • kg^{-1}）、Hup A-TCA（2.94 mg • kg^{-1}），灌胃体积均为 0.1 mL/10 g；对照组小鼠灌胃等剂量生理盐水。各组小鼠在灌胃给药 12 h、24 h 后分别以 1×LD_{95} 的梭曼（250 μg • kg^{-1}）进行肌内注射染毒，观察并记录各组小鼠中毒症状及死亡情况，判定预防效果。

2.4 Hup A 衍生物的急性毒性研究

ICR 小鼠 180 只，雌雄各半，随机分为 3 个药物组。根据预实验结果获得各药物的 100% 致死剂量和无死亡剂量，并按照相邻高低剂量大约 0.5 ～ 0.8 倍的间距设置剂量组。Hup A 剂量为 4、5、6、8 和 10 mg • kg^{-1}；Hup A-SA 剂量为 15、20、30、40 和 55 mg • kg^{-1}；Hup A-TCA 剂量为 5、10、20、30 和 40 mg • kg^{-1}，均以采用注射用水配制的 5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成相应质量浓度（Hup A 0.4 ～ 1 mg • mL^{-1}；Hup A-SA 1.5 ～ 5.5 mg • mL^{-1}；Hup A-TCA 0.5 ～ 4 mg • mL^{-1}），按照 0.1 mL/10 g 给药。观察小鼠中毒症状和体征，并记录 14 d 内死亡数量及时间。采用 Bliss 法计算各药物的半数致死剂量（LD_{50}）。

2.5 统计分析

定量数据用均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，IC_{50} 使用 GraphPad Prime 8.0 软件通过非线性回归分析计算，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Hup A 衍生物对 AChE 的抑制作用

不同浓度的 Hup A 及衍生物对 AChE 抑制的时效关系如图 2 所示，Hup A 及衍生物均对 AChE 具有明显的抑制作用，随衍生物浓度增大，抑制作用逐渐增强。各药物抑制 AChE 的浓度 - 效应曲线如图 3 所示，30 min 时 Hup A、Hup A-SA 和 Hup A-TCA 的 IC_{50} 值分别为（0.36±0.05）、（1.36±0.03）、（0.62±0.03）μmol • L^{-1}，Hup A-SA 和 Hup A-TCA 的 IC_{50} 值均大于 Hup A（$P < 0.05$）。

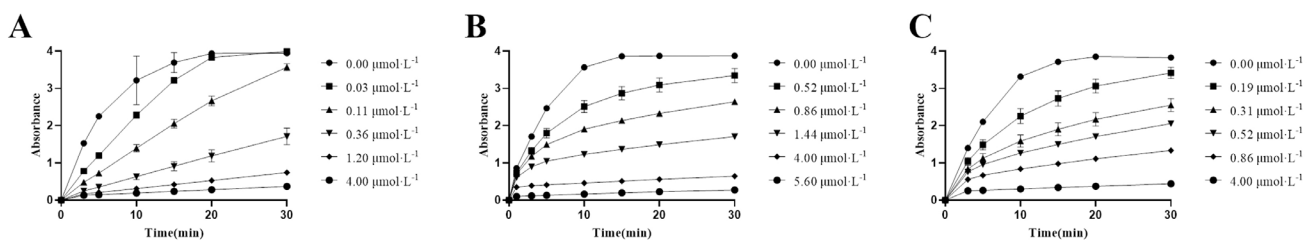


图 2 Hup A（A）、Hup A-SA（B）及 Hup A-TCA（C）在体外对 AChE 活性的影响（$n = 3$）

Fig 2 Effect of Hup A（A），Hup A-SA（B），and Hup A-TCA（C）on the activity of AChE in vitro（$n = 3$）

3.2 Hup A 及其衍生物对梭曼的体外预防效应研究

预实验结果表明，反应 90 min 左右梭曼对 AChE 的抑制达到峰值，此后随反应时间延长，抑制率有所下降，因此选择 90 min 进行药物对梭

曼体外预防作用进行研究。

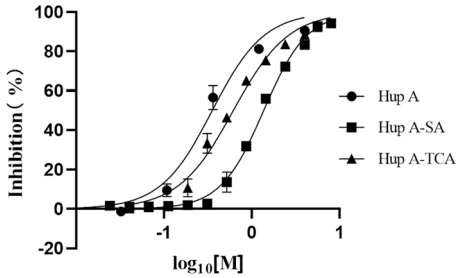


图 3　Hup A 及其衍生物抑制 AChE 的浓度 - 效应曲线

Fig 3　Concentration-effect curves of inhibition of AChE by Hup A and its derivatives

梭曼显著抑制 AChE 的活性，其 90 min时对 AChE 的抑制率为（94.99±0.04）%，0.2 μmol • L^{-1} Hup A 或衍生物预先孵育的 AChE，保留有部分酶活性，反应体系吸光度值随反应时间增长而增加（见图 4），计算各组 90 min 时的抑制率并以相应梭曼浓度的对数作浓度 - 抑制效应曲线，结果如图 5 所示。梭曼抑制 AChE 的 IC_{50} 值为（15.88±0.02）nmol • L^{-1}，Hup A、Hup A-SA、Hup A-TCA 预先孵育的 AChE 组，浓度 - 抑制效应曲线均右移，其 IC_{50} 值分别为（60.38±1.74）、（52.21±0.30）和（45.74±0.82）nmol • L^{-1}，3 种化合物均能有效预防梭曼对 AChE 的抑制作用。

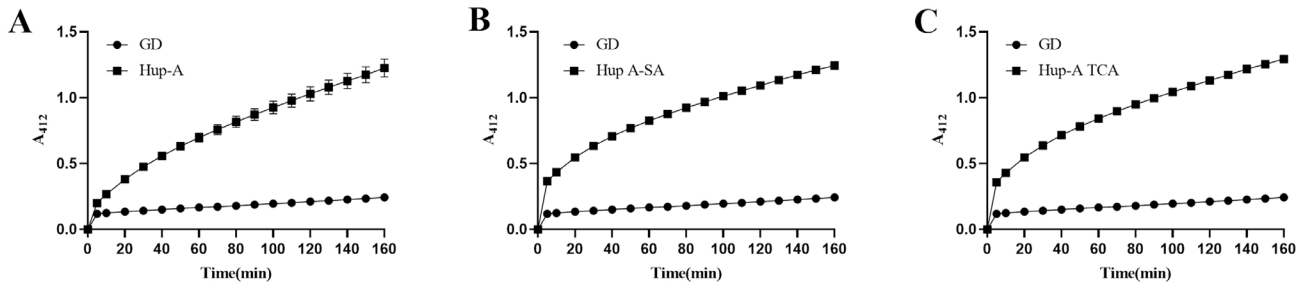


图 4　Hup A（A）、Hup A-SA（B）及 Hup A-TCA（C）预孵育对梭曼抑制效应的影响

Fig 4　Effect of the pretreatment of AChE with Hup A（A），Hup A-SA（B），and Hup A-TCA（C）on the inhibiting effect of soman

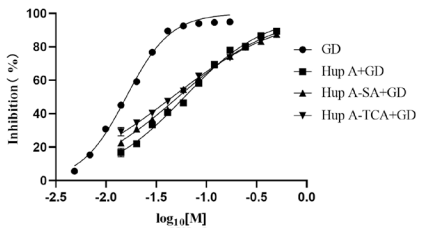


图 5　Hup A 及其衍生物对梭曼抑制 AChE 量效曲线的影响

Fig 5　Effect of Hup A and its derivatives on the concentration-effect curves of soman inhibiting AChE

3.3　Hup A 及衍生物体内预防梭曼中毒研究

生理盐水灌胃的小鼠，以梭曼攻击后 2 ～ 3 min 内出现震颤、癫痫等典型有机磷中毒症状，10 min 内全部死亡。各给药组预防给药 12 h 后予以梭曼染毒，Hup A、Hup A-SA、Hup A-TCA 预防组小鼠存活率分别为 66.67%、75%、100%；给药 24 h 后予以梭曼染毒，Hup A 预防组小鼠全部死亡，Hup A-SA、Hup A-TCA 预防组小鼠存活率分别为 25%、33.33%。如图 6 所示，Hup A-SA、Hup A-TCA 预防给药 12 h 时对小鼠的保护效果优于 Hup A，预防时间延长，给药 24 h 后仍具有部分保护效应。

3.4　Hup A 及衍生物的急性毒性

不同剂量 Hup A 灌胃给药后，小鼠均出现了不同程度的多汗、流涎、流泪、震颤、抽搐等症状。2 种衍生物灌胃给药，10 mg • kg^{-1} 以下剂量无明显盗汗、震颤，10 mg • kg^{-1} 以上剂量，均出现与 Hup A 相似的盗汗症状，随着剂量增加，死亡率增高。采用 Bliss 法计算得到 Hup A 对小鼠的 LD_{50} 为 7.20 mg • kg^{-1}，95% 置信区间（*CI*）为 6.60 ～ 7.85 mg • kg^{-1}；Hup A-SA 和 Hup A-TCA 对小鼠的 LD_{50} 分别为 45.75 mg • kg^{-1}（95% *CI* 41.25 ～ 50.75）、16.42 mg • kg^{-1}（95% *CI* 11.95 ～ 22.54），Hup A-SA 和 Hup A-TCA 的 LD_{50} 分别为 Hup A 的 6.35 倍和 2.28 倍，表明 2 种衍生物的急性毒性低于 Hup A，安全性明显提高。

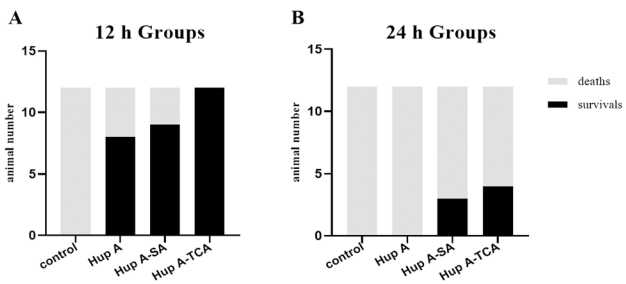


图 6　Hup A 衍生物预防给药 12 h（A）、24 h（B）后梭曼中毒小鼠的生存情况

Fig 6　Survival of mice with soman poisoning after the preventive administration of Hup A derivatives at 12 h（A）and 24 h（B）

4　讨论

OPNA 通过抑制 AChE 使 ACh 在神经突触不断积蓄，产生持续刺激导致抽搐、癫痫、震颤、呼吸困难等一系列胆碱能症状，严重者死亡，具有毒性大、难治疗、预后差等特点，对人类健康

和社会稳定造成极大威胁。因此，OPNA 的预防药物开发显得尤为重要。预防 OPNA 中毒可以采用特定底物掩蔽 AChE 活性位点，避免酶暴露于 OPNA，从而达到保护目的；但只有足够数量的 AChE 被暂时抑制，且在中毒期间保持抑制状态时，预防才能见效。这种抑制必须适度，能够保证足够数量的 AChE 在中毒前维持正常生理功能活性，因此在剂量把握上十分具有挑战性。现有的 OPNA 预防药物不良反应较多，保护时间较短。

Hup A 是一种天然的、高效的、可穿过血脑屏障的可逆性 AChE 抑制剂。Hup A 与其他化学类预防药物相比，其对生物清除剂丁酰胆碱酯酶的抑制作用较弱，从而使丁酰胆碱酯酶充分发挥生物清除作用，进一步提高对梭曼等神经性毒剂的预防效果 [11]。豚鼠预先注射 Hup A 较预先注射溴吡啶斯的明能够更好地阻止梭曼引起的癫痫发作，前者可使梭曼中毒动物全部存活，而后者只有 1/6 的动物存活，且出现广泛的神经病理学变化 [12]。

然而，Hup A 存在毒性相对较大、半衰期短等问题，Hup A 尾静脉给药小鼠的 LD_{50} 为 1.42 mg·kg^{-1}，腹腔注射大鼠的 LD_{50} 为 2.47 mg·kg^{-1}[13-14]。本研究以灌胃给药的方式研究了 Hup A 的急性毒性，其对小鼠 LD_{50} 值为 7.20 mg·kg^{-1}，而 2 种衍生物的 LD_{50} 值分别为 Hup A 的 6.35 倍和 2.28 倍，急性毒性大大降低。作为 AChE 的可逆性抑制剂，Hup A-SA 和 Hup A-TCA 均有 AChE 抑制活性，但抑制活性均弱于 Hup A。2 种衍生物分别与 AChE 预先孵育，梭曼的浓度 - 抑制效应曲线右移，表明 2 种衍生物均能有效预防梭曼对 AChE 的抑制作用。

Grunwald 等 [15] 报道，Hup A 给药 5.5 ～ 6.0 h 后皮下注射梭曼，其保护指数 2.18，而等剂量的溴吡啶斯的明的保护指数为 1.07，表明 Hup A 的预防效果优于溴吡啶斯的明。张瑞华等 [13] 报道，尾静脉注射 0.3 mg•kg^{-1} 和 0.5 mg•kg^{-1} 的 Hup A，其对梭曼的有效预防时间均为 4 h。本研究中，Hup A 经灌胃给药后 12 h 以 1×LD_{95} 剂量的梭曼肌内注射染毒，小鼠存活率为 66.67%，24 h 后染毒小鼠全部死亡，表明 Hup A 的药效维持低于 24 h。而等摩尔剂量的 Hup A-SA 和 Hup A-TCA 给药 12 h 后小鼠存活率分别为 75% 和 100%；24 h 后染毒，其存活率分别为 25% 和 33.33%，表明 2 种衍生物对梭曼的预防时间长于 Hup A。分析其发挥长效预防的可能机制，除了衍生物本身对 AChE 有可逆性结合而阻止梭曼等有机磷类化合物与 AChE 结合起到保护作用外，这些衍生物在体内发生解离可能持续释放 Hup A，使 Hup A 继续发挥保护效应，进而延长了对梭曼的预防时间。此外，Hup A-SA 和 Hup A-TCA 较 Hup A 具有更低的毒性，用药安全性明显改善。

本研究对 2 种 Hup A 衍生物的体外 AChE 抑制活性、体外和体内预防梭曼作用及急性毒性进行评估，结果表明，2 种衍生物均可延长预防时间，降低毒性，以 Hup A-TCA 的长效预防作用最佳，其药代动力学、不同种属动物药效学及安全性等还有待进一步考察。本研究为神经性毒剂的长效预防药物开发奠定了基础。

参考文献

[1] Sakurada K，Ohta H. No promising antidote 25 years after the Tokyo subway sarin attack：A review [J]. Leg Med（Tokyo），2020，47：101761.

[2] Makishima A. Chapter Sixteen-Detoxification of Toxic Gases of VX and Sarin [A]//Makishima A. Biochemistry for Materials Science [M]. Elsevier，2019：197-202.

[3] Hulse EJ，Haslam JD，Emmett SR，et al. Organophosphorus nerve agent poisoning：Managing the poisoned patient [J]. Br J Anaesth，2019，123（4）：457-463.

[4] Horn G，de Koning MC，van Grol M，et al. Interactions between acetylcholinesterase，toxic organophosphorus compounds and a short series of structurally related non-oxime reactivators：Analysis of reactivation and inhibition kinetics in vitro [J]. Toxicol Lett，2018，299：218-225.

[5] Chambers JE，Dail MB，Meek EC. Oxime-mediated reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase with emphasis on centrally-active oximes [J]. Neuropharmacology，2020，175：108201.

[6] Chandar NB，Ganguly B. A first principles investigation of aging processes in soman conjugated AChE [J]. Chem Biol Interact，2013，204（3）：185-190.

[7] Ribeiro ACR，Deshpande LS. A review of pre-clinical models for Gulf War Illness [J]. Pharmacol Ther，2021，228：107936.

[8] Wu X，Shetty AK，Reddy DS. Long-term changes in neuroimaging markers，cognitive function and psychiatric symptoms in an experimental model of Gulf War Illness [J]. Life Sci，2021，285：119971.

[9] Haigh JR，Johnston SR，Peppernay A，et al. Protection of red blood cell acetylcholinesterase by oral huperzine A against ex vivo soman exposure：Next generation prophylaxis and sequestering of acetylcholinesterase over butyrylcholinesterase [J]. Chem Biol Interact，2008，175（1）：380-386.

[10] Ellman GL，Courtney KD，Andres V，et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol，1961，7（2）：88-95.

[11] 杨跃新，田海林，王强，等 . 石杉碱甲与吡啶斯的明预防有机磷神经毒剂效果的比较 [J]. 工业卫生与职业病，

2008，34（1）：32-35.
[12] Lallement G，Veyret J，Masqueliez C，et al. Efficacy of huperzine in preventing soman-induced seizures，neuropathological changes and lethality [J]. Fundam Clin Pharmacol，1997，11（5）：387-394.
[13] 张瑞华，石童，陈学军，等 . 不同粒径石杉碱甲纳米制剂对小鼠急性毒性的研究 [A]// 中国毒理学会第九次全国毒理学大会论文集 [C]. 太原：中国毒理学会第九次全国毒理学大会，2019.
[14] Wang Y，Wei Y，Oguntayo S，et al. A combination of [＋] and [－]-Huperzine A improves protection against soman toxicity compared to [＋]-Huperzine A in guinea pigs [J]. Chem Biol Interact，2013，203（1）：120-124.
[15] Grunwald J，Raveh L，Doctor BP，et al. Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity [J]. Life Sci，1994，54（14）：991-997.

（收稿日期：2021-09-12；修回日期：2021-10-29）

歪头菜黄酮类化学成分研究

罗礼[1]，张伟[2]，楚建杰[2]，李韦韦[2]，王明明[2*]（1. 空军军医大学第二附属医院药剂科，西安　710038；2. 空军军医大学第一附属医院药剂科，西安　710032）

摘要：目的　研究歪头菜全草中的黄酮类化学成分。**方法**　采用硅胶柱色谱，葡聚糖凝胶柱色谱以及半制备 HPLC 等方法分离纯化，根据 MS 和 NMR 数据鉴定化合物的结构。**结果**　从歪头菜中分离得到 8 个化合物，分别鉴定为山柰酚（**1**），槲皮素（**2**），异鼠李素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**3**），槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**4**），槲皮素 -7-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**5**），萹蓄苷（**6**），杨梅苷（**7**），金丝桃苷（**8**）。**结论**　化合物 **1** ～ **7** 为首次从该植物中分离得到。

关键词：歪头菜；化学成分；黄酮类化合物；槲皮素
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2507-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.005

Flavoids from the whole plant of *Vicia unijuga* A. Br.

LUO Li[1], ZHANG Wei[2], CHU Jian-jie[2], LI Wei-wei[2], WANG Ming-ming[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University*, *Xi'an* 710038; 2. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University*, *Xi'an* 710032)

Abstract: Objective To determine the flavoids components in *Vicia unijuga* A. Br.. **Methods** The chemical constituents were separated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and semi-preparative HPLC while the structures were identified by MS and NMR spectra data analysis. **Results** Eight compounds were isolated from *Vicia unijuga* A. Br.: kaempferol (**1**), quercetin (**2**), isorhamnetin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnoside (**3**), quercetin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnoside (**4**), quercetin-7-*O*-*α*-*L*-rhamnoside (**5**), quercetin-3-*O*-*α*-*L*-arabinofuraside (**6**), myricoside (**7**) and hypericin (**8**). **Conclusion** Compounds **1** ～ **7** have been isolated from this plant for the first time.

Key words: *Vicia unijuga* A. Br.; chemical constituent; flavoid; quercetin

歪头菜（*Vicia unijuga* A. Br.）为豆科（Leguminosae sp.）野豌豆属（*Vicia Linn*）植物歪头菜的带根全草，又名野豌豆、草豆、三铃子等，主要分布于我国西南、西北、华东等地区[1]。其性

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803749）。
作者简介：罗礼，女，主要从事中药药效物质基础研究，E-mail：luoli1312620291@126.com　*通信作者：王明明，女，主管药师，主要从事中药药效物质及药理作用研究，E-mail：wangmm130@163.com

平、味甘，具有解痉止痛、止咳平喘等功效[1-2]。临床主要用于治疗胃、十二指肠溃疡、急慢性支气管炎等[2-4]。近年来研究发现歪头菜中主要为黄酮类化学成分，包括大波斯菊苷、木犀草素 -7-*O*-*β*-*D* 吡喃葡萄糖苷、金丝桃苷等[1]，但缺乏系统性的文献报道[5-7]。本研究对歪头菜中黄酮类化学成分进行了系统的分离和鉴定，从其全草的 80% 乙醇提取物中共分离鉴定了 8 个黄酮类化合物（结构见图 1），分别为山柰酚（**1**），槲皮素（**2**），异鼠李素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**3**），槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**4**），槲皮素 -7-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**5**），萹蓄苷（**6**），杨梅苷（**7**），金丝桃苷（**8**），除金丝桃苷（化合物 **8**）外，其余均为首次从歪头菜中分离得到。

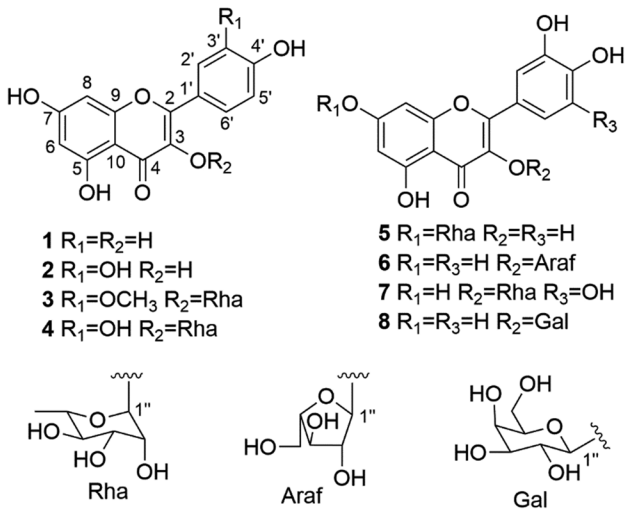


图 1　化合物 **1** ～ **8** 的化学结构

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **8**

1　材料

Avance-400 核磁共振波谱仪（德国 Burker 公司）；LC-6AD 型半制备液相色谱仪（日本岛津公司）；Thermo DFS 型质谱仪（美国 Thermo 公司）；YMC-Pack Pro C_{18} 半制备色谱柱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20（GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司）；柱色谱硅胶（100 ～ 200 目和 200 ～ 300 目，青岛海洋化工厂）；薄层硅胶板（烟台江友硅胶开发有限公司）；色谱甲醇和色谱乙腈（科密欧化学试剂有限公司）；甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇（分析纯，天津市天力化学试剂有限公司）；水为纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

歪头菜 2017 年 5 月购于陕西省太白县，经空军军医大学第一附属医院王明明主管药师鉴定为豆科（Leguminosae sp.）野豌豆属（*Vicia Linn*）歪头菜 *Vicia unijuga* A. Br. 的带根全草，标本（No. 201705VL）保存于空军军医大学第一附属医院药剂科。

2　提取分离

干燥的歪头菜药材 4.0 kg，粉碎后经 80% 的乙醇回流提取 3 次（分别为 2、2、1 h）。回收乙醇，分别用石油醚，乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取 3 次，得石油醚部位 19.3 g，乙酸乙酯部位 98.5 g，正丁醇部位 37.7 g。

取乙酸乙酯部位 95 g，经硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷 - 甲醇（100∶1、80∶1、50∶1、20∶1、10∶1、5∶1 和 3∶1，*V/V*）梯度洗脱，合并相同流分，得到 A ～ H 共 8 个组分。B 组分（3.6 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，二氯甲烷 - 甲醇（1∶1，*V/V*）洗脱，得到化合物 **1**（25.9 mg）；C 组分（5.1 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，甲醇洗脱，得到化合物 **2**（28.2 mg）；D 组分（10.5 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，甲醇洗脱，合并相同流分，得到 D-1 ～ D-5 组分，D-3（0.2 g）经半制备液相色谱，乙腈 - 水（38∶62，*V/V*）洗脱，得到化合物 **3**（10.8 mg，t_R ＝ 21.4 min），D-4（0.1 g）经半制备液相色谱，乙腈 - 水（35∶65，*V/V*）洗脱，得到化合物 **4**（15.1 mg，t_R ＝ 28.2 min）；E 组分（21.0 g）经 ODS C_{18} 柱色谱，甲醇 - 水（20∶80 ～ 80∶20，*V/V*）洗脱，得到 E-1 ～ E-4 组分，E-2（0.3 g）经半制备液相色谱，甲醇 - 水（30∶70，*V/V*）洗脱，得到化合物 **5**（19.0 mg，t_R ＝ 33.0 min）和 **6**（27.5 mg，t_R ＝ 28.8 min）。F 组分（18.0 g）经 ODS C_{18} 柱色谱，甲醇 - 水（20∶80 ～ 80∶20，*V/V*）洗脱，得到 F-1 ～ F-6 组分，F-3（2.3 g）经 ODS C_{18} 柱色谱，甲醇 - 水（30∶70 ～ 80∶20，*V/V*）洗脱，得到 F-3-1 ～ F-3-4 组分，F-3-1（0.1 g）经半制备液相色谱，乙腈 - 水（20∶80，*V/V*）洗脱得到化合物 **7**（8.8 mg），F-3-2（0.1 g）经半制备液相色谱，乙腈 - 水（22∶78，*V/V*）洗脱得到化合物 **8**（22.5 mg）。

3　结构鉴定

化合物 **1**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 287（$[M + H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.47（1H，br s，5-OH），6.19（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-6），6.44（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-8），8.04（2H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-2'，6'），6.93（2H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-3'，5'）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：146.9（C-2），135.7（C-3），175.9（C-4），160.8（C-5），98.3（C-6），163.9（C-7），

93.5（C-8），159.2（C-9），103.1（C-10），121.7（C-1'），129.6（C-2'，6'），115.5（C-3'，5'），156.2（C-4'）。以上数据与文献[8-9]基本一致，化合物 **1** 鉴定为山柰酚。

化合物 **2**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 303（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.48（1H，br s，5-OH），6.18（1H，d，J = 2.1 Hz，H-6），6.38（1H，d，J = 2.1 Hz，H-8），7.67（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），6.89（1H，d，J = 8.5 Hz，H-5'），7.53（1H，dd，J = 8.5，2.0 Hz，H-6'）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：147.7（C-2），135.8（C-3），175.9（C-4），160.7（C-5），98.2（C-6），163.9（C-7），93.4（C-8），156.2（C-9），103.0（C-10），122.0（C-1'），115.1（C-2'），146.8（C-3'），145.1（C-4'），115.6（C-5'），120.0（C-6'）。以上数据与文献[10]基本一致，化合物 **2** 鉴定为槲皮素。

化合物 **3**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 463（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.64（1H，br s，5-OH），6.38（1H，d，J = 2.3 Hz，H-6），6.38（1H，d，J = 2.3 Hz，H-8），7.34（1H，d，J = 2.2 Hz，H-2'），6.87（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5'），7.28（1H，dd，J = 8.3，2.2 Hz，H-6'），5.28（1H，s，H-1"），3.86（3H，s，OCH3），3.13 ～ 3.99（4H，m，H2" ～ H5"），0.78（d，3H，J = 6.0 Hz，H-6"）。

^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：157.6（C-2），134.4（C-3），177.9（C-4），161.0（C-5），97.9（C-6），165.1（C-7），92.2（C-8），156.4（C-9），103.9（C-10），56.1（OCH_3），120.6（C-1'），115.4（C-2'），147.5（C-3'），148.5（C-4'），115.7（C-5'），121.1（C-6'），101.8（C-1"），70.3（C-2"），70.0（C-3"），70.6（C-4"），71.2（C-5"），17.5（C-6"）。以上数据与文献[11]基本一致，化合物 **3** 鉴定为异鼠李素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷。

化合物 **4**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 447（$[M-H]^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.64（1H，br s，5-OH），6.21（1H，d，J = 1.9 Hz，H-6），6.40（1H，d，J = 1.9 Hz，H-8），7.31（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），6.87（1H，d，J = 8.3 Hz，H-5'），7.25（1H，dd，J = 8.3，2.0 Hz，H-6'），5.26（1H，s，H1"），0.83（3H，d，J = 6.2 Hz，H6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：156.4（C-2），134.2（C-3），177.8（C-4），161.3（C-5），98.7（C-6），164.2（C-7），93.6（C-8），157.3（C-9），104.1（C-10），120.7（C-1'），115.5（C-2'），148.4（C-3'），145.2（C-4'），115.7（C-5'），121.1（C-6'），101.8（C-1"），71.2（C-2"），70.1（C-3"），70.4（C-4"），70.6（C-5"），17.5（C-6"）。以上数据与文献[11]基本一致，化合物 **4** 鉴定为槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷。

化合物 **5**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 447（$[M-H]^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.21（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），6.42（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），7.76（1H，d，J = 2.1 Hz，H-2'），6.52（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5'），7.52（dd，1H，J = 8.4，2.1 Hz，H-6'），4.98（1H，s，H-1"），3.18 ～ 3.95（4H，m，H-2" ～ H-5"），0.78（3H，d，J = 6.4 Hz，H-6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：156.5（C-2），133.9（C-3），176.8（C-4），160.9（C-5），98.3（C-6），164.5（C-7），93.2（C-8），156.3（C-9），103.8（C-10），121.1（C-1'），131.0（C-2'，6'），115.2（C-3'，5'），160.0（C-4'），101.3（C-1"），70.3（C-2"），70.5（C-3"），72.0（C-4"），68.3（C-5"），17.5（C-6"）。以上数据与文献[11]基本一致，化合物 **5** 鉴定为槲皮素 -7-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷。

化合物 **6**：黄色针状结晶（甲醇），ESI-MS *m/z* 435（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.65（1H，br s，5-OH），6.20（1H，d，J = 1.9 Hz，H-6），6.38（1H，d，J = 1.9 Hz，H-8），7.47（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），6.85（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5'），7.58（1H，dd，J = 8.4，2.0 Hz，H-6'），5.58（1H，s，H-1"），4.15（1H，dd，J = 0.8，3.3 Hz，H-2"），3.73（1H，m，H-3"），3.52（1H，m，H-4"），3.31（1H，dd，J = 3.5，11.6 Hz，H-5a"），3.26（1H，dd，J = 5.2，11.6 Hz，H-5b"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：157.3（C-2），133.6（C-3），177.8（C-4），160.9（C-5），97.8（C-6），165.2（C-7），92.2（C-8），156.3（C-9），104.9（C-10），120.8（C-1'），115.5（2'），145.1（C-3'），148.6（C-4'），115.4（C-5'），121.8（C-6'），107.9（C-1"），82.1（C-2"），77.0（C-3"），85.8（C-4"），60.6（C-5"）。以上数据与文献[12]基本一致，化合物 **6** 鉴定为蒿蓄苷。

化合物 **7**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 465（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.63（1H，br s，5-OH），6.38（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），6.20（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.88（2H，s，H-2'，6'），5.43（1H，s，H-1"），3.62

（1H，m，H-2"），3.55（1H，dd，J ＝ 9.6，2.7 Hz，H-3"），3.17（1H，t，J ＝ 9.6 Hz，H-4"），3.98（1H，m，H-5"），0.91（3H，d，J ＝ 6.2 Hz，H-6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：156.4（C-2），134.3（C-3），177.8（C-4），161.3（C-5），98.7（C-6），164.1（C-7），93.5（C-8），157.5（C-9），104.1（C-10），123.4（C-1'），107.9（C-2'，6'），145.8（C-3'，5'），136.5（C-4'），102.0（C-1"），71.3（C-2"），70.0（C-3"），70.4（C-4"），70.6（C-5"），17.6（C-6"）。以上数据与文献[13-14]基本一致，化合物 **7** 鉴定为杨梅苷。

化合物 **8**：黄色粉末（甲醇），ESI-MS m/z 465（$[M + H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.62（1H，br s，5-OH），6.20（1H，d，J ＝ 2.5 Hz，H-6），6.41（1H，d，J ＝ 2.5 Hz，H-8），7.53（1H，d，J ＝ 2.3 Hz，H-2'），6.82（1H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-5'），7.66（1H，dd，J ＝ 8.5，2.3 Hz，H-6'），5.37（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1"），3.35（1H，m，H-2"），3.26（1H，m，H-3"），3.38（1H，m，H-4"），3.45（1H，m，H-5"），3.57（1H，m，H-6"a），3.66（1H，m，H-6"b）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：156.3（C-2），133.5（C-3），177.5（C-4），161.3（C-5），98.7（C-6），164.2（C-7），93.6（C-8），156.4（C-9），104.0（C-10），121.1（C-1'），115.2（C-2'），144.9（C-3'），148.5（C-4'），116.0（C-5'），122.0（C-6'），101.8（C-1"），71.2（C-2"），73.2（C-3"），68.0（C-4"），75.9（C-5"），60.2（C-6"）。以上数据与文献[15]基本一致，化合物 **8** 鉴定为金丝桃苷。

4 讨论

本试验从歪头菜的 80% 乙醇提取物中共分离鉴定了 8 个黄酮类化合物，除金丝桃苷外，其余化合物均为首次从该植物中分离鉴定。近年来关于歪头菜的系统化学成分和药理活性研究较少，本研究进一步丰富了歪头菜的化学成分，为其后续药理活性研究的开展和质量评价提供了物质基础。但是本研究重点关注了其主要的化学成分黄酮类化合物，其他类型成分仍需进一步的系统研究。

参考文献

[1] 乔俊缠，任常胜，曹春然，等 . 歪头菜的形态组织鉴定 [J]. 中药材，1997，20（3）：132-135.

[2] 李骁，赵龙，王佩，等 . 野豌豆属蒙药药用植物的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中草药，2015，46（12）：1814-1818.

[3] 尚小生，加杨东知，李冬红 . 甘南野生歪头菜的种植技术 [J]. 畜牧兽医杂志，2021，40（1）：65-66.

[4] 唐伟，南志标 . 不同温度下 PEG-6000 渗透胁迫对歪头菜种子发芽的影响 [J]. 草业科学，2019，36（5）：1323-1332.

[5] 韩瑜，强维亚 . 利用 SMART 技术构建歪头菜叶片全长 cDNA 文库 [J]. 草业科学，2014，31（1）：83-88.

[6] 高权荣，乔俊缠，渠弼 . 蒙药歪头菜总黄酮含量测定 [J]. 中国民族医药杂志，2002，8（2）：35.

[7] Tang W，Coulter J，Hu XW，et al. Plastic-film mulch improves *Vicia unijuga* seed yield and yield components under subalpine climate conditions [J]. Arch Agrono Soil Sci，2020，66（9）：1171-1187.

[8] 杜群，甘军委，高苏妮，等 . 鹿药中 3 种黄酮的结构鉴定及含量测定 [J]. 中南药学，2017，15（5）：661-663.

[9] 李秋月，苏锦松，王洪玲，等 . 西藏猫乳化学成分研究 [J]. 中药材，2020，43（10）：2445-2447.

[10] 李汝鑫，程锦堂，焦梦娇 . 钩藤叶化学成分研究 [J]. 中草药，2017，48（8）：1499-1505.

[11] 沈寿茂，张晶，李广志，等 . 一点红地上部分的化学成分研究（Ⅱ）[J]. 中国药学杂志，2013，48（21）：1815-1819.

[12] Benabderrahmane W，Lores M，Benaissa O，et al. Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxyacantha* L（Rosaceae）[J]. Nat Prod Res，2021，35（4）：627-632.

[13] Hwang IW，Chung SK. Isolation and identification of myricitrin，an antioxidant flavonoid，from *Daebong Persimmon* Peel [J]. Prev Nutr Food Sci，2018，23（4）：341-346.

[14] 刘志国，张予川，吉双，等 . 杨梅树皮化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2010，27（1）：34-36.

[15] 苑祥，李震源，梅丽娟，等 . 醉马草中黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药，2021，52（4）：937-942.

（收稿日期：2021-07-10；修回日期：2021-09-20）

伏九贴敷药物通过调控 RORγt、Foxp3 mRNA 表达重塑 Th17/Treg 免疫平衡的抗哮喘机制初探

付昆，杨艳，陆一菱，仲蓬，何春杨，徐敏*（成都市第三人民医院，西南交通大学附属医院，重庆医科大学附属成都第二临床学院，成都　610031）

摘要：目的　通过考察伏九贴敷药物对哮喘模型大鼠气道炎症反应、Th17/Treg 相关细胞因子及特异性转录因子（RORγt mRNA、Foxp3 mRNA）表达的影响，研究其调节 Th17/Treg 平衡的抗哮喘效应。**方法**　采用卵蛋白（OVA）和氢氧化铝联合致敏激发建立大鼠哮喘模型，然后于大鼠大椎穴、肺俞穴和肾俞穴给予伏九贴敷药物，每次贴敷 4 h，隔日 1 次，共给药 7 次。取肺组织进行 PAS 染色观察气道上皮杯状细胞增生和黏液分泌变化，并进行病理评分。采用实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）检测大鼠肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-17、IL-10、RORγt mRNA、Foxp3 mRNA 的相对表达量。**结果**　哮喘模型大鼠气道黏膜上皮可见大量 PAS 染色阳性细胞存在，病理评分明显高于正常组；同时 TNF-α、IL-1β及 Th17 相关的 IL-17、RORγt 表达增加，而 Treg 相关的 IL-10、Foxp3 表达减少，IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3 升高，出现 Th17/Treg 失衡现象。干预后，伏九贴敷药物能明显减少哮喘大鼠气道上皮 PAS 阳性细胞，降低其病理评分；并且下调 TNF-α、IL-1β、IL-17 及 RORγt 表达，升高 IL-10、Foxp3 的表达水平，降低 IL-17/IL-10、RORγt/Foxp3 水平。相关性分析显示，Th17 相关因子 RORγt 和 IL-17 的表达以及 IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3 比值与 TNF-α、IL-1β表达水平成正相关，而 Treg 相关因子 Foxp3、IL-10 的表达与 TNF-α、IL-1β表达量成负相关。提示 Th17 可能为促炎因素，而 Treg 能抑制炎症介质表达。**结论**　伏九贴敷药物可能通过下调 RORγt、IL-17 表达水平，同时上调 Foxp3、IL-10 的表达，使 IL-17/IL-10、RORγt/Foxp3 比值降低，促进 Th17/Treg 趋于平衡，从而减少炎症介质 TNF-α、IL-1β的表达量，减轻肺组织气道炎症反应，发挥抗哮喘作用。

关键词：伏九贴敷药物；哮喘；Th17/Treg 平衡；Foxp3；RORγt
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2511-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.006

Anti-asthmatic mechanism of Fujiu patching medicine in restoring Th17/Treg immune balance via regulating RORγt and Foxp3 mRNA expressions

FU Kun, YANG Yan, LU Yi-ling, ZHONG Peng, HE Chun-yang, XU Min* (*The 3rd People's Hospital of Chengdu*, *Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University*, *the 2nd Affiliated Chengdu Clinical College of Chongqing Medical University*, *Chengdu*　610031)

Abstract: Objective　To determine the anti-asthmatic effect of Fujiu patching medicine involved in regulating Th17/Treg balance on the airway inflammation responses and the expressions of Th17-related, Treg-related cytokines, RORγt and Foxp3 mRNA (the specific transcription factor for Th17 and Treg respectively), in asthmatic model rats. **Methods**　The asthma rat model was established by using the suspension mixing with Ovalbumin (OVA) and aluminium hydroxide to sensitize and challenge rats. After that, the Fujiu patching medicine was applied to Dazhui, Feishu and Shenshu acupoints in rats for 4 hours, once every other day for 7 times. After the last application, the lung tissues were collected. The goblet cell hyperplasia and mucus secretion in the airway epithelium were observed by PAS staining, and their pathological alterations were scored. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used

基金项目：四川省中医药管理局中医药科研专项课题（No. 2020JC0009）；成都市卫计委医学科研课题（No. 2018104）。
作者简介：付昆，男，硕士，副主任药师，主要从事中药药理与毒理学研究，E-mail：dizardfk@sina.com　*通信作者：徐敏，女，硕士，主任药师，主要从事中药品质与临床药学研究，E-mail：xumincd@aliyun.com

to determine the relative gene expressions of inflammatory mediators (TNF-α and IL-1β), Th17-related cytokines IL-17, Treg-related cytokines IL-10 as well as the expressions of RORγt and Foxp3 mRNA. **Results** Many PAS-positive cells were found in the airway epithelium of asthmatic model rats, and the pathological scores were significantly higher than those in the normal group. Furthermore, TNF-α and IL-1β expressions as well as Th17-related IL-17 and RORγt expressions were increased, while Treg-related IL-10 and Foxp3 expressions were reduced. Consequently, the ratios of IL-17/IL-10 and RORγt/Foxp3 rose, leading to Th17/Treg imbalance. After the treatment, Fujiu patching medicine relieved the PAS-positive epithelial cells in the airway of asthmatic rats and lowered its pathological score. Moreover, they decreased the mRNA expressions of TNF-α, IL-1β, IL-17, and RORγt but elevated the expression levels of IL-10 and Foxp3 mRNA, causing the drops in IL-17/IL-10 and RORγt/Foxp3. The correlation analysis showed that expressions of Th17-related RORγt and IL-17 as well as ratios of IL-17/IL-10 and RORγt/Foxp3 were positively associated with TNF-α and IL-1β expressions, respectively. Conversely, the expressions of Treg-related Foxp3 and IL-10 had a negative correlation with TNF-α and IL-1β expressions, suggesting Th17 might be the proinflammatory factor, while Treg might inhibit the expressions of inflammatory mediators. **Conclusion** Fujiu patching medicine may impel the decline in ratios of IL-17/IL-10 and RORγt/Foxp3 and a consequent tendency of Th17/Treg to balance via down-regulating the expression levels of RORγt and IL-17, and up-regulating Foxp3 and IL-10 expressions, which in turn reduces the expression levels of inflammatory mediators such as TNF-α and IL-1β to alleviate the airway inflammation in the lung of asthmatic rats.

Key words: Fujiu patching medicine; asthma; Th17/Treg balance; Foxp3; RORγt

伏九贴敷是本院开展的特色中医外治疗法，由白芥子、甘遂、延胡索、细辛组成，通过药物透皮作用和穴位刺激共同作用防治哮喘等呼吸系统疾病。因该疗法选用带有刺激性的药物，引起局部充血、发泡促进药物的吸收，故而对皮肤刺激性较大。组方中白芥子药物为皮肤刺激性的源头，生白芥子刺激性强于炒白芥子。本课题组前期就此疗法皮肤刺激性与抗哮喘作用相关性进行了研究[1]，发现伏九贴敷药物中生白芥子和炒白芥子的比例各半时，既可维持疗效，又能减轻其对皮肤的副作用。故本研究以该生、炒白芥子配比处方剂量探讨伏九贴敷药物的抗哮喘作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠，体质量 180 ～ 220 g [成都达硕实验动物有限公司，动物生产许可证：SCXK（川）2019-189]。于 18 ～ 25 ℃，12 h 明暗周期交替，适应性饲养 5 d，自由饮水、进食。

1.2 试药

醋延胡索、醋甘遂、生芥子、炒芥子、细辛均购自四川省中药饮片有限公司，批号分别为 200318、190524、200506、191203、200420，由成都市食品药品检验研究院文永盛主任药师鉴定为正品。按芥子∶延胡索∶甘遂∶细辛＝2（生、炒各半）∶1∶1∶1 比例将各药物粉碎为 100 目细粉混合，以生姜汁调成糊状制成伏九贴敷药物备用。

卵蛋白（OVA，货号：A5253，Sigma 公司），Al（OH）$_3$（批号：20161130，国药集团化学试剂有限公司），地塞米松磷酸钠注射液（批号：2001202，国药集团容生制药有限公司），三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇（批号分别为 10006818、80109218、10009218，国药集团化学试剂有限公司），苏木素、PAS 试剂盒（武汉谷歌生物），Trizol（Invitrogen），HyPure Molecular Biology Grade Water（HyClone），5×All-In-One RT Master Mix、EvaGreen Express 2×qPCR Master Mix-No Dye（abcam）。

1.3 仪器

PL-203 电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]，NE-C801 压缩式雾化器 [欧姆龙（大连）有限公司]，JJ-12J 脱水机、JB-P5 包埋机（武汉俊杰电子有限公司），RM2016 切片机（上海徕卡仪器有限公司），KZ-II 匀浆仪（赛维尔生物），D3024R 高速冷冻型微型离心机（SCILOGEX），SLAN-96S PCR analysis system（上海宏石医疗科技有限公司），K2800 核酸分析仪（北京凯奥科技发展有限公司），Eclipse E100 光学显微镜（Nikon）。

2 方法

2.1 模型建立

实验第 1 日、7 日于大鼠腹腔注射 1 mL 含有 OVA（100 mg）、氢氧化铝（100 mg）的混合液致敏。第 15 日开始，每日给予大鼠 1% OVA 雾化吸入，激发哮喘，每日 1 次，每次 20 min，连续 7 d。密切观察大鼠激发后的反应情况：有无呼吸急促、喘息、发绀等症状，行动有无改变。以大鼠出现烦躁呛咳、呼吸加快、幅度加大、点头呼吸运动、腹肌痉挛、频繁挠鼻及站立不稳、竖毛等典型哮喘样发作症状为激发成功。

2.2 分组与给药

将 30 只 SD 大鼠按体质量随机分为 5 组：正常组、模型组、假贴敷组、伏九贴敷药物组和地塞米松组。除正常组外，其余各组大鼠按“2.1”项下方法造模。正常组大鼠同法于第 1 日、7 日腹腔注射生理盐水 1 mL，第 15 日开始以生理盐水同法雾化吸入，连续 7 d。末次雾化后，正常组和模型组不做任何处理。伏九贴敷药物组大鼠用 8% Na_2S 进行脱毛，第 2 日取调制好的伏九贴敷药物适量，按照《实验针灸学》取穴方法[2]敷于大椎、肺腧（双侧）、肾腧（双侧）穴并用胶布固定，每次贴敷 4 h，隔日贴敷 1 次，共给药 7 次。假贴敷组同样贴上无药空白胶布。地塞米松组腹腔注射地塞米松 0.5 mg·kg^{-1}，隔日 1 次，共给药 7 次。

2.3 肺组织气道病理考察

末次给药 24 h 后处死大鼠，取右肺组织固定 24 h。石蜡包埋、3 μm 切片；脱蜡，依次高碘酸→ Schiff 试剂→苏木素染色；中性树胶封片，显微镜观察 PAS 染色结果，并根据支气管周围 PAS 染色阳性细胞密集程度进行病理评分，0 分：无或偶见；1 分：稀疏、散在；2 分：较密集；3 分：大量。

2.4 肺组织辅助性 T 细胞 17（Th17）、调节性 T 细胞（Treg）细胞因子及转录因子基因表达的检测

取肺组织 100 mg 置于无 RNA 酶的离心管中匀浆，12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，Trizol 抽提总 RNA，核酸分析仪检测 RNA 浓度及纯度。采用 5×All-In-One RT Master Mix 反转录 RNA，配制 20 μL 反应体系以转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系：2×qPCR Mix 10 μL，7.5 μmol·L^{-1} primer 1.2 μL，Template 2.0 μL，ddH_2O 6.8 μL。反应条件：95 ℃预变性 10 min；95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 60 s，40 个循环。60 ℃→95 ℃，每 15 s 升温 0.3 ℃进行熔解曲线分析。以 β-actin 为内参基因，检测目标基因和 β-actin C_t 值，采用 $2^{-\triangle\triangle C_t}$ 法（$\triangle C_t = C_{t\text{目标基因}} - C_{t\beta\text{-actin}}$）计算 mRNA 的相对表达量。各 mRNA 引物序列见表 1。

表 1　qRT-PCR 检测各基因引物信息

Tab 1　Primers of various genes for qRT-PCR determination

基因		引物序列（5'-3'）	片段长度 /bp
β-actin	F	TGTCACCAACTGGGACGATA	165
	R	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
TNF-α	F	AGCACGGAAAGCATGATCCG	108
	R	TGAGAAGAGGCTGAGGCACA	
IL-1β	F	CTATGTCTTGCCCGTGGAGC	108
	R	GCAGGTCGTCATCATCCCAC	
Foxp3	F	AGGCACTTCTCCAGGACAGACC	144
	R	AGACTCCAGTGGCAGCAGTAGG	
RORγt	F	CAAGTCATCTGGCATCCACTACGG	133
	R	GCGGCTGGTTCGGTCAATGG	
IL-10	F	CCTGCTCTTACTGGCTGGAGTGA	90
	R	TGGGTCTGGCTGACTGGGAAGT	
IL-17	F	TGATGCTGTTGCTGCTACTGA	195
	R	GTGAAGTGGAACGGTTGAGGTA	

2.5 统计方法

正态分布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行单因素方差分析检验，若方差齐采用 LSD 法进行多重比较，方差不齐则用 Dunnett’s T_3 检验；非正态分布资料采用非参数秩和检验，数据则以中位数（四分位间距）表示。采用 Pearson 积差法进行相关分析。以 SPSS 23.0 软件进行统计分析，$P < 0.05$ 认为组间差异具有统计学意义。

3　结果

3.1 伏九贴敷药物对哮喘大鼠肺组织气道炎症病理变化的影响

杯状细胞及黏液细胞数量可以反映气道黏液分泌情况[3]。肺组织样本经 PAS 染色后，镜检可见支气管上皮细胞中 PAS 阳性细胞数量的改变明显。正常组大鼠支气管上皮细胞中几乎未查见 PAS 阳性细胞，在模型组和假贴敷组大鼠中容易见到支气管上皮较多的 PAS 阳性细胞，伏九贴敷药物组和地塞米松组 PAS 阳性细胞则相对稀疏，如图 1 所示。通过半定量评分显示，模型组气道上皮 PAS 染色阳性细胞密集程度计分为 1.5（1，2.25）[数据以中位数（四分位间距）表示，下同] 明显高于正常组 0（0，0），表明哮喘大鼠气道黏液分泌增多，炎症反应重；而假贴敷组评分为 1（1，3）和模型组比较无明显差异，说明空白胶布贴敷对哮喘并没有治疗作用。伏九贴敷和地塞米松组阳性细胞密集程度评分均为 0（0，0.25），明显低于模型组。

3.2 伏九贴敷药物对哮喘大鼠 Th17、Treg 细胞因子及特异性转录因子表达的影响

从图 2 可以看出，与正常组比较，模型组肺中 TNF-α、IL-1β、IL-17、RORγt mRNA 相对表达量升高（$P < 0.01$ 或 $P < 0.05$），IL-10 和 Foxp3 mRNA 的表达降低（$P < 0.01$），IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3

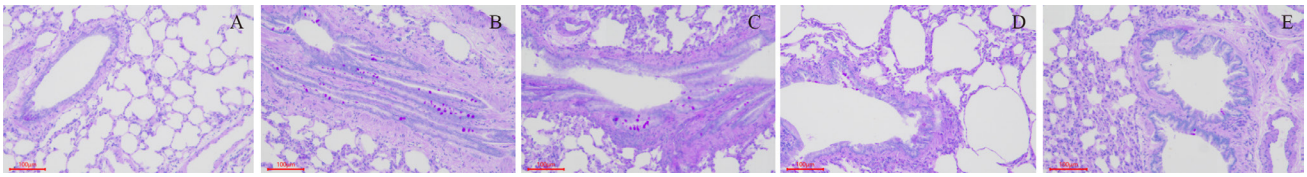


图 1 伏九贴敷药物对哮喘大鼠肺组织气道 PAS 阳性细胞病理改变的影响（Bar ＝ 100 μm）

Fig 1 Effect of Fujiu patching medicine on the pathological alterations of PAS positive cells in the lung airway epithelium of asthmatic rat models（Bar ＝ 100 μm）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 假贴敷组（sham patching group）；D. 伏九贴敷药物组（Fujiu patching medicine group）；E. 地塞米松组（dexamethasone group）

表达升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，假贴敷组的 Foxp3 mRNA 表达降低（$P < 0.01$），其余各基因的 mRNA 表达水平无差异。与模型组比，给予伏九贴敷药物后，TNF-α、IL-1β、IL-17、RORγt mRNA 的表达水平下调，而 IL-10 和 Foxp3 mRNA 的表达量增加，IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3 比值降低（$P < 0.01$ 或 0.05），阳性药地塞米松对上述 mRNA 显示出同样的调控效果。

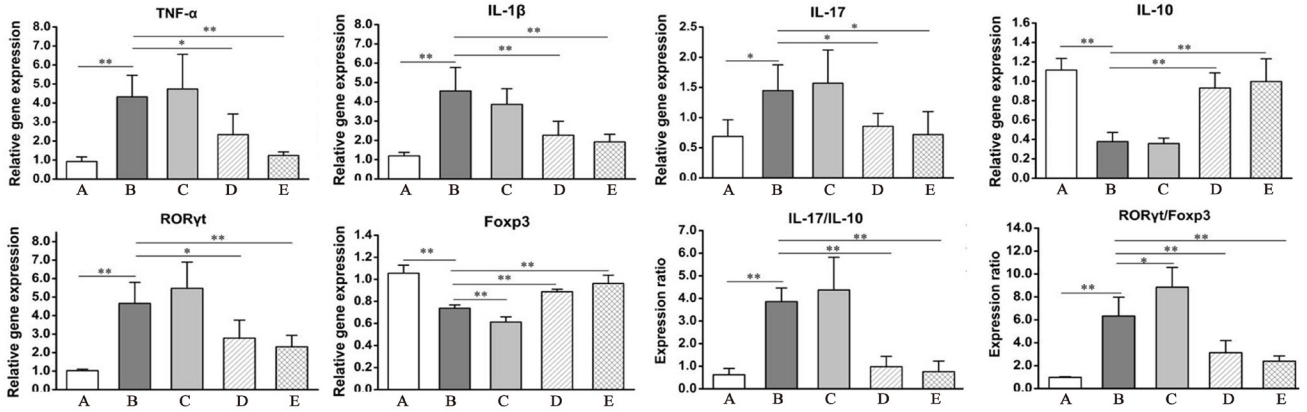


图 2 伏九贴敷药物对各组大鼠肺中基因 mRNA 相对表达量的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 2 Effect of Fujiu patching medicine on the relative mRNA expressions of various genes in the lung of different rats（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 假贴敷组（sham patching group）；D. 伏九贴敷药物组（Fujiu patching medicine group）；E. 地塞米松组（dexamethasone group）

3.3 相关性分析

Pearson 相关分析显示，哮喘大鼠肺 IL-17 和 RORγt 的表达水平与炎性介质 TNF-α、IL-1β 表达成正相关（$P < 0.01$）；IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3 表达量比值与 TNF-α、IL-1β 表达水平成正相关（$P < 0.001$）；而 IL-10 和 Foxp3表达水平则与 TNF-α、IL-1β 表达成显著负相关（$P < 0.001$）。分析结果见图 3。

4 讨论

哮喘是多种细胞和细胞成分参与的慢性气道炎症性疾病，可引起炎症、黏液分泌过多、血管再生和气道重塑[4]。免疫功能异常被认为是哮喘发生发展的病机，其中 Th 起着至关重要的作用[5]。Th17 细胞能释放 IL-17，并间接招募中性粒细胞和聚集嗜酸性粒细胞，进一步加重哮喘发作[6-7]。而表达叉头盒蛋白 3（Foxp3）转录因子的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 细胞具有维持自身耐受的功能[8]，它通过 IL-10、TGF-β 等细胞因子发挥作用，主要参与免疫应答和其他免疫细胞功能的调节，进而将与 T 细胞有关的免疫应答控制在适当的范围内，避免对机体的损害[9]。不少证据表明，哮喘是通过 Treg 细胞及其细胞因子来抑制的，而 Th17 细胞及其细胞因子则会加重哮喘的症状，揭示了这些细胞的活性与哮喘的病理和治疗效果有关[10]。因此，Th17/Treg 及其相关细胞因子 IL-17/IL-10 的失衡也是哮喘发病机制的重要病理生理基础[11]，恢复 Th17/Treg 免疫平衡是治疗哮喘的关键，目前已成为研究领域的热点。Th17 细胞的分化受维 A 酸相关孤儿受体 γt（RORγt）的特异性调控，$CD4^+$ T 细胞向 Th17 细胞的分化往往伴随着家族特异性转录因子 RORγt 和标志性细胞因子 IL-17 的表达[12-13]。另一方面，Foxp3 是 Treg 细胞不可缺少的主要转录因子，它的稳定表达对 Treg 细胞的发育和功能至关重要，Foxp3 缺乏会导致 $CD4^+$ T 细胞向 Treg 细胞分化不足[14]。Foxp3 可通过与 RORγt 的直接相互作用抑制 Th17

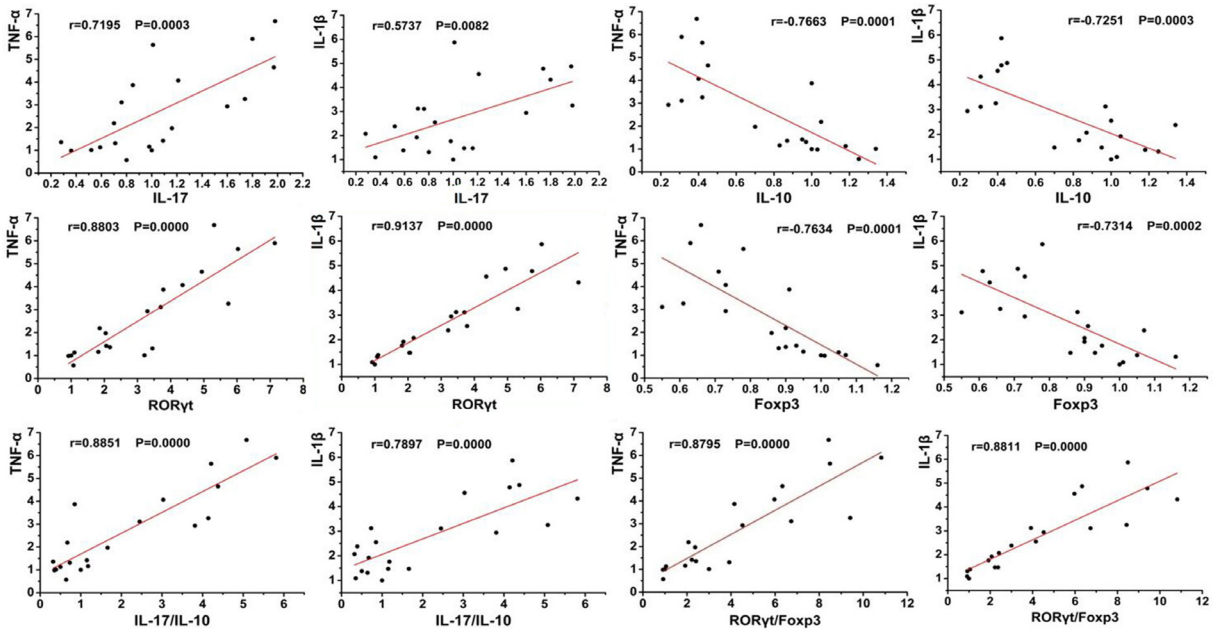


图 3　大鼠肺组织各 mRNA 表达相关性分析结果

Fig 3　Correlation among various mRNA expressions in the lung tissue of rat

细胞的分化 [15]。因此 RORγt 与 Treg 细胞的 Foxp3 在功能上相互制约，成为维持 Th17/Treg 细胞平衡的关键 [16]。

哮喘的本质是变态反应性疾病。当过敏原进入体内时，T 细胞和 B 细胞分化为浆细胞，产生 IgE 抗体，激活肥大细胞。肥大细胞脱颗粒，分泌 IL-1β、TNF-α、MIP-1α、IL-13 等细胞因子和各种趋化因子，这些细胞因子共同作用引起白细胞浸润和持续炎症 [17-18]。哮喘的慢性气道炎症组织学特征可表现为支气管黏膜杯状细胞增生，黏液分泌过多等。PAS 阳性细胞多少可间接反映气道炎症的杯状细胞增生和黏液分泌情况 [3]。本实验通过 OVA/Al（OH）$_3$ 联合造模发现，哮喘大鼠肺组织气道黏膜上皮 PAS 阳性细胞密集，存在大量杯状细胞增生和黏液分泌，病理改变评分显著高于正常组，气道炎症反应严重。此外，模型组 Th17 相关细胞因子 IL-17、特异转录因子 RORγt mRNA 表达水平升高，说明 Th17 细胞分化优势明显；而 IL-10、Foxp3 mRNA 表达出现下降，提示 Treg 细胞发育和功能受阻，使得 IL-17/IL-10 和 RORγt/Foxp3 比值上升，哮喘大鼠体内出现了向 Th17 优势分化的 Th17/Treg 失衡。机体免疫平衡被打破，继而出现变态反应，大量炎性细胞因子释放，TNF-α、IL-1β mRNA 表达增加，最终引起哮喘大鼠的气道炎症反应。从相关性分析结果也可以看出，Th17 相关的 IL-17 和 RORγt 的表达水平与炎性介质 TNF-α、IL-1β 表达正相关，而 Treg 相关的 IL-10 和 Foxp3 表达水平与之负相关。提示 Th17 可能为促炎因素，而 Treg 可能抑制炎症因子表达。同时 IL-17/IL-10、RORγt/Foxp3 比值也和炎性因子 TNF-α、IL-1β 表达正相关，说明如果 IL-17 和 RORγt 表达下调的同时 IL-10、Foxp3 表达增加可使 IL-17/IL-10 及 RORγt/Foxp3 比值降低，炎性因子 TNF-α、IL-1β 表达会随之减少。IL-17/IL-10、RORγt/Foxp3 比值的下降预示着 Th17/Treg 平衡在重新恢复，机体免疫功能增强，哮喘炎症反应可随之改善。

本院开展的伏九贴敷是以清代医家张璐发明的中药白芥子外涂法为基础，由白芥子、延胡索、细辛、甘遂组成，临床外治哮喘疗效确切，为其药物作用机制研究提供了可靠依据。方中作为君药的白芥子的主要成分有白芥子苷、芥子酶、芥子碱等。白芥子苷经过芥子酶的作用，可水解生成硫代异氰酸对羟苄酯，该成分能使皮肤发红甚至发泡，从而破坏皮肤屏障功能，促药渗透。此外，白芥子醇提物对炎症早期的水肿和渗出有明显的抑制作用 [19]。延胡索在方中与白芥子皆为主药，其主要成分为延胡索乙素，具有很强的镇痛、镇静等作用，本方取其行气活血止痛之功效，可以起到加强或促进其他药物吸收、减轻皮肤刺激、缓解疼痛的效果。细辛中的 α- 细辛脑可松弛支气管平滑肌，减轻黏膜充血和水肿，缓解下呼吸道阻塞。*L*- 细辛脂素可能通过抑制 T 细胞的增殖与活化，抑制气道嗜酸性粒细胞炎症反应来抑制速发型哮喘反应 [20]。生甘遂醇提取物具有强烈刺激

性，方中应用可能为取其对皮肤的刺激性，助力其他药物有效成分通过皮肤渗透到气管、肺等组织中发挥作用。纵观全方，四味药多组分协同作用，共奏抗炎平喘之效。本文试图从分子水平以Th17/Treg平衡为切入点进一步揭示伏九贴敷药物防治哮喘的机制。结果显示，伏九贴敷药物可以明显减少哮喘模型大鼠的气道上皮杯状细胞增生和黏液分泌，有效缓解哮喘的气道炎症反应。并且可以下调 IL-17、RORγt mRNA 表达水平，同时上调 IL-10、Foxp3mRNA 的表达，使 IL-17/IL-10、RORγt/Foxp3 比值重新趋于平衡，重塑 Th17/Treg 免疫平衡，从而减少炎症介质 TNF-α、IL-1β 的表达量，最终减轻肺组织气道炎症，发挥抗哮喘作用。由此可见，对 Th17/Treg 失衡的影响可能是伏九贴敷药物治疗哮喘的作用机制之一。

伏九贴敷通过穴位贴敷使腧穴局部皮肤充血，促进药物的吸收；继而发挥全身作用，使免疫系统发生相应的改变，以达到抗炎、平喘及提高机体免疫力的目的。从临床报道看，伏九贴敷能有效缓解哮喘症状，减少发作次数，增强患者的抵抗力，远期疗效较好，不良反应少，尤其是在治疗哮喘缓解期及协助西药巩固发作期疗效、降低西药不良反应方面具有特殊优势[21]，具备积极推广运用的价值。为此，本文从 Th17/Treg 平衡角度浅析了伏九贴敷药物影响机体免疫系统的抗哮喘作用机制，为该疗法临床应用提供了一定的理论支持，但更深入的作用机制以及透皮吸收的量效关系还有待进一步研究。

参考文献

[1] 杨艳，付昆，徐敏，等 . 伏九贴敷疗法皮肤刺激性与抗哮喘作用相关性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（1）：193-196.

[2] 李忠仁 . 实验针灸学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2003：325-326.

[3] Cho JY，Miller M，McElwain K，et al. Combination of corticosteroid therapy and allergen avoidance reverses allergen-induced airway remodeling in mice [J]. J Allergy Clin Immunol，2005，116（5）：1116-1122.

[4] Almeida-Oliveira AR，Aquino-Junior J，Abbasi A，et al. Effects of aerobic exercise on molecular aspects of asthma：Involvement of SOCS-JAK-STAT [J]. Exerc Immunol Rev，2019，25：50-62.

[5] Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts [J]. N Engl J Med，2001，344（1）：30-37.

[6] Pelletier M，Maggi L，Micheletti A，et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells [J]. Blood，2010，115（2）：335-343.

[7] Nakagome K，Matsushita S，Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol，2012，158（Suppl 1）：96-102.

[8] Barsheshet Y，Wildbaum G，Levy E，et al. CCR8^{+} FOXp3^{+} Treg cells as master drivers of immune regulation [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2017，114（23）：6086-6091.

[9] Wang W，Jing W，Liu Q. Astragalus oral solution ameliorates allergic asthma in children by regulating relative contents of CD4^{+} CD25^{high}CD127^{low} Treg cells [J]. Front Pediatr，2018，6：255.

[10] Dong M，Wang WQ，Chen J，et al. Acupuncture regulates the balance of CD4^{+} T cell subtypes in experimental asthma mice [J]. Chin J Integr Med，2019，25（8）：617-624.

[11] 耿立梅，闫红倩，于向艳，等 . 穴注加贴敷对哮喘大鼠血清 IL-10、IL-17 和肺组织 ICAM-1 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志，2019，25（8）：1137-1140.

[12] Na H，Lim H，Choi G，et al. Concomitant suppression of TH2 and TH17 cell responses in allergic asthma by targeting retinoic acid receptor-related orphan receptor gammat [J]. J Allergy Clin Immunol，2018，141（6）：2061-2073.

[13] Mickael ME，Bhaumik S，Basu R. Retinoid-related orphan receptor RORγt in CD4^{+} T cell-mediated intestinal homeostasis and inflammation [J]. Am J Pathol，2020，190（10）：1984-1999.

[14] Chen T，Hou X，Ni Y，et al. The imbalance of FOXP3/GATA3 in regulatory t cells from the peripheral blood of asthmatic patients [J]. J Immunol Res，2018，2018：3096183.

[15] Jin B，Zhang C，Geng Y，et al. Therapeutic effect of Ginsenoside Rd on experimental autoimmune encephalomyelitis model mice：Regulation of inflammation and Treg/Th17 cell balance [J]. Mediators Inflamm，2020，2020：8827527.

[16] Bera MM，Lu B，Martin TR，et al. Th17 cytokines are critical for respiratory synoytial virus-associated airway hyperreponsiveness through regulation by complement C3a and tachykinins [J]. J Immunol，2011，187（8）：4245-4255.

[17] Pullen NA，Barnstein BO，Falanga YT，et al. Novel mechanism for FcεRI-mediated signal transducer and activator of transcription 5（STAT5）tyrosine phosphorylation and the selective influence of STAT5B over mast cell cytokine production [J]. J Biol Chem，2012，287（3）：2045-2054.

[18] Jensen BM，Bartko EA，Baumann K，et al. Measuring histamine and cytokine release from basophils and mast cells [J]. Methods Mol Biol，2020，2163：247-262.

[19] 李小莉，张迎庆，黄通华 . 白芥子提取物的抗炎镇痛作用研究 [J]. 现代中药研究与实践，2007，21（6）：28-30.

[20] 张瑶，宋志永，王林丽 . 细辛的药理作用及临床应用 [J]. 中国药业，2007，16（14）：62-63.

[21] 施小敏，唐运涛，董琰，等 . 自拟复方白芥子散外敷治疗哮喘的实验室研究 [J]. 成都中医药大学学报，2005，28（3）：28-29.

（收稿日期：2021-06-08；修回日期：2021-07-28）

呋塞米杂质 B 的潜在毒性预测研究

姜宏宇[1, 2]，王翰洵[1]，王健[1*]（1. 沈阳药科大学制药工程学院，沈阳 110016；2. 东北制药集团股份有限公司，沈阳 110027）

摘要：目的 基于计算化学方法，研究呋塞米工艺路线中杂质 B 的潜在毒性。**方法** 通过分子模拟方法，预测呋塞米工艺路线中杂质 B 可能影响的蛋白靶标，以及可能引起的毒副作用。**结果** 预测发现，杂质 B 可能会与碳酸酐酶 2、甲状腺素结合球蛋白和巨噬细胞抑制因子结合。该结果可能与呋塞米使用过程中的甲状腺功能亢进有关。**结论** 分子模拟方法可用于研究药物制备过程中杂质的潜在靶标，进而预测其可能引起的毒副作用。

关键词：呋塞米；计算化学；靶点识别；毒性预测
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2517-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.007

Potential toxicity of impurity B in furosemide preparation

JIANG Hong-yu[1, 2], WANG Han-xun[1], WANG Jian[1*] (1. *School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016; 2. *Northeast Pharm Inc., Shenyang* 110027)

Abstract: Objective To determine the potential toxicity of the impurity B in furosemide preparation with computation chemistry methods. **Methods** Target-proteins influenced by impurity were predicted with molecular modeling. **Results** Three proteins were identified as possible targets for impurity B：carbonic anhydrase Ⅱ, thyroxine-binding globulin and macrophage migration inhibitory factor. These results might be related to the hyperthyroidism of furosemide usage. **Conclusion** Molecular modeling helps predict the target of impurities, and evaluate the toxicity.

Key words: furosemide; computational chemistry; target recognition; toxicity prediction

呋塞米（furosemide），化学名称为 4-氯 -2-[（2- 呋喃甲基）氨基]-5- 磺酰氨基苯甲酸，是一种强效速效类利尿药，通过抑制肾小管髓袢升支粗段对 NaCl 的主动重吸收，排出大量接近于等渗的尿液[1]。呋塞米主要用于各种水肿，且能预防肾功能衰竭，对高血压也有一定治疗效果[2]。

呋塞米的制备过程中，以 2，4- 二氯 -5- 磺酰胺基苯甲酸为原料，在碱性条件下形成钠盐后，和糠胺于 130 ℃反应生成呋塞米钠盐（见图 1）。再经过乙醇精制后，酸化得到呋塞米。但是该工艺制备的呋塞米粗品会生成微量杂质 2- 氨基 -5- 氨磺酰基 -4- 氯苯甲酸（美国药典杂质 B，欧洲药典杂质 C，本文简称杂质 B，见图 2）。在原料糠胺的制备中，常用到甲醇的氨溶液，且氨分子在糠胺精制过程中因溶解度高，沸点低而难以被彻底除去，因此氨分子作为糠胺中的杂质被带入到呋塞米的合成中。在呋塞米的合成过程中，碱性条件下羧酸基团的氢离子被电离，产生负电中心，对糠胺和氨分子均具有位置限定作用，另外，磺酰胺基和羧基的钝化作用使得羧基的临位氯容易离去。这些因素导致杂质 B 不可避免地出现在产物中。另一方面，呋塞米结构稳定性较差。在贮存、制剂生产过程中，呋塞米受到光照、加热及酸性等条件易被降解成产物 B，因此呋塞米应在避光，阴凉处保存，同时对该降解杂质的检测方法也有大量报道[3-5]。相比于其他仅在生产和贮存过程中可能产生的杂质 [如 2，4- 二氯 -5- 氨磺酰基苯甲酸、2- 氯 -4-（2- 糠氨基）-5- 氨磺酰基苯甲酸、2，4- 双（2- 糠氨基）-5- 氨磺酰基苯甲酸等]，呋塞米在进入体内后，杂质 B 也作为人类体内代谢产物出现[6-7]。该杂质在体内可能会与某些蛋白靶标发生结合，进而引发药品的不良反应[8]。

作者简介：姜宏宇，男，硕士研究生，主要从事专利过期药物的合成工艺研究，E-mail：miranda86@126.com *通信作者：王健，男，教授，主要从事创新药物设计方面的研究，E-mail：jianwang@syphu.edu.cn

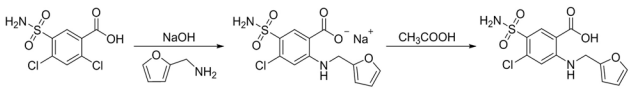


图 1 呋塞米的工业合成路线

Fig 1 Industrial synthetic route of furosemide

本文通过计算化学方法，预测该杂质的潜在毒性，为药物杂质研究提供新的视角。

1 仪器与试药

BT-25S 电子天平（赛多利斯）；Milli-Q Advantage 纯水仪（美国 Millipore 公司）；呋塞米、呋塞米相关物质 B [纯度均为 98%，西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司]。

2 方法

2.1 杂质 B 与呋塞米的结构相似性分析

杂质 B 与呋塞米的结构分析通过 Forge 软件进行，将两个化合物的结构转变为三维空间结构，并导入 Forge 进行构象搜索和柔性叠合，根据力场特征进行相似性分析。

2.2 杂质 B 的靶标预测

将杂质 B 的结构，在 RCSB PDB 数据库中进行结构相似性检索，选择蛋白 - 配体共结晶中配体与杂质 B 具有最大相似性的蛋白靶标。根据数据库提供的以配体结构相似性排序方法，将检索结果排名由高到低排序，确定前三个蛋白为杂质 B 最为可能的潜在蛋白靶标。

2.3 杂质 B 与靶标作用方式分析

通过 Glide 程序将杂质 B 与预测的靶标进行分子对接，分析其作用方式。通过分子动力学程序 Desmond，研究蛋白 - 化合物复合物在溶液状态下的动态过程。提取分子动力学轨迹文件，分析杂质 B 在蛋白质活性位点的结合方式和亲和力。

2.4 杂质 B 的 ADME/Tox 性质预测

通过 SWISSADME 在线程序（http：//www.swissadme.ch/）预测杂质 B 的吸收、分配、代谢、排泄或毒性（ADME/Tox）性质。SWISSADME 通过已有的毒性或药代动力学经验模型对给定的小分子进行计算，并给出模型预测的可能结果。

2.5 生物学实验

在 37 ℃，将 THLE-2 细胞在 5% 二氧化碳培养箱中孵育（Thermal Fisher Scientific）。培养基采用 DMEM（Biological Industries），并添加 10%FBS（Biological Industries，Certified Foetal Bovine Serum）和 1% 青霉素 - 链霉素双抗（Biological Industries）。在 96 孔板中加入不同浓度的杂质 B，将对照细胞用赋形剂处理，孵育 2 h。加入 MTT 溶液（0.5 mg • mL $^{-1}$）（Beyotime，ST1537）并孵育 4 h 加入结晶紫溶液（Beyotime，C0121），使用酶标仪在 492 nm 下测量吸光度。

3 结果

3.1 杂质 B 与呋塞米的结构相似性比较

通过比较杂质 B 与呋塞米的结构，可以发现二者在结构上具有很大的相似性，都具有电负性基团，而且两者在理化性质上也有较高的相似性，这揭示杂质 B 与呋塞米可能会被同类型的蛋白靶点识别。相比于呋塞米，缺少了亲酯呋喃环的杂质 B，分子量和 Slog*P* 值相对呋塞米均有显著的下降，但拓扑极性表面积（TPSA）未有明显改变。由两个分子的分子场叠合图可以看出两个分子除 *N*- 甲基呋喃侧链以外的特征极为相似（见图 2）。

3.2 杂质 B 的潜在靶点

在 RCSB PDB 数据库中，根据杂质 B 的结构式检索，发现有三个蛋白质可能会识别杂质 B（见表 1）。

表 1 杂质 B 潜在靶点

Tab 1 Potential targets of impurity B

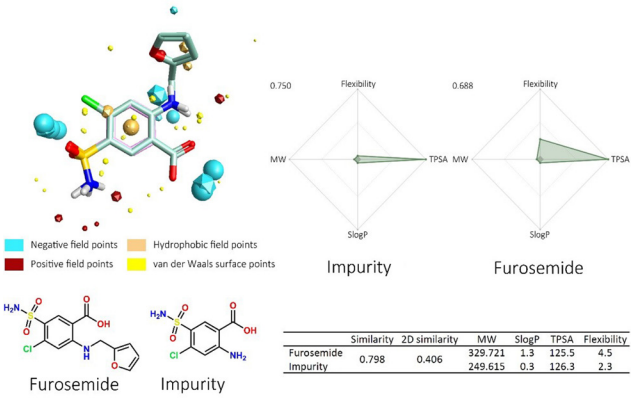
靶点名称	英文名称	PDB 编号	生物学功能
碳酸酐酶 2[9]	carbonic anhydrase Ⅱ	1Z9Y	利尿
甲状腺素结合球蛋白[10]	thyroxine-binding globulin	2XN5	甲状腺机能亢进
巨噬细胞抑制因子[11]	macrophage migration inhibitory factor	3RF4	心肌梗死缺血再灌注损伤

3.3 杂质 B 与潜在靶点的作用方式分析

通过分子对接和分子动力学模拟研究，预测杂质 B 与三个靶蛋白在生理条件下的动态结合方式，发现杂质 B 与这三个靶点结合的可能性较高。其中，杂质 B 与碳酸酐酶的锌离子形成配位键，与 His64、Hid94、Glu106 和 Thr199 形成氢键（见图 3）；与甲状腺素结合球蛋白 Asn278 和 Arg301 形成氢键（见图 4）；杂质 B 与巨噬细胞抑制因子 Pro1，Met2 和 Asp92 形成氢键（见图 5）。由此推断，杂质 B 可能会对以上三个蛋白具有调节活性。本研究发现其中一个靶点碳酸酐酶 2 本身是呋塞米的作用靶点，因而推测杂质 B 具有和呋塞米类似的利尿活性。此外，预测得到的靶点甲状腺素结合球蛋白，其生物学功能与甲状腺机能亢进相关，可以推测呋塞米杂质也可能具有类似不良反应。

3.4 杂质 B 与呋塞米的 ADME/Tox 预测

通过 Swiss ADME prediction 网站，预测杂质 B 与呋塞米的 ADME/Tox 的性质，结果发现杂质 B 与呋塞米除不饱和以及极性两项偏离模型外



	Similarity	2D similarity	MW	SlogP	TPSA	Flexibility
Furosemide	0.798	0.406	329.721	1.3	125.5	4.5
Impurity			249.615	0.3	126.3	2.3

图 2　杂质 B 与呋塞米结构相似性比较

Fig 2　Structural similarity between impurity B and furosemide

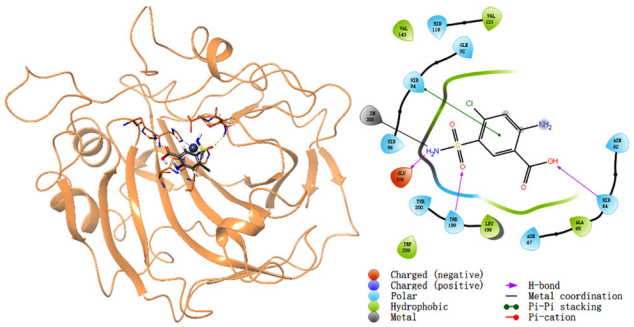


图 3　杂质 B 与碳酸酐酶 2（PDB 编号：1Z9Y）的结合方式

Fig 3　Binding pattern of impurity B with carbonic anhydrase Ⅱ protein pocket（PDB code 1Z9Y）

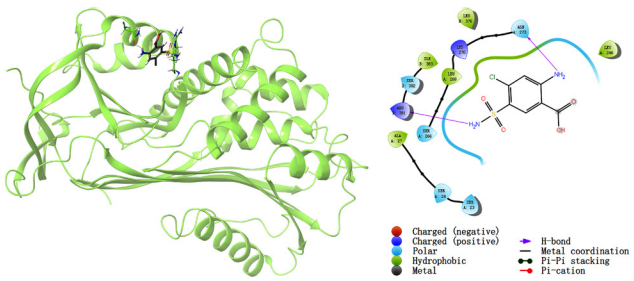


图 4　杂质 B 与甲状腺素结合球蛋白（PDB 编号：2XN5）的结合方式

Fig 4　Binding pattern of impurity B with thyroxine-binding globulin protein pocket（PDB code 2XN5）

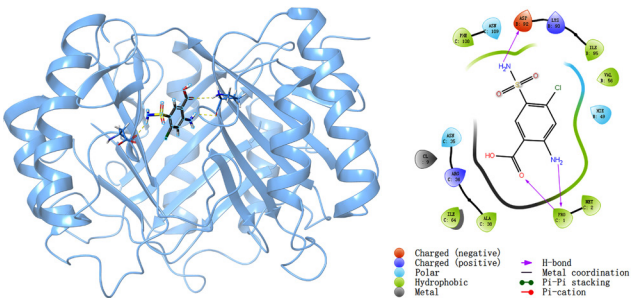


图 5　杂质 B 与巨噬细胞抑制因子（PDB 编号：3RF4）的结合方式

Fig 5　Binding pattern of impurity B with macrophage migration inhibitory factor protein pocket（PDB code 3RF4）

其他性质良好。对比呋塞米，该杂质体现出相似的成药性特征，有较好的肠道透过性，且不易被 P-gp 蛋白作为底物排出细胞，因此可以认定两者性质相似（见图 6）。

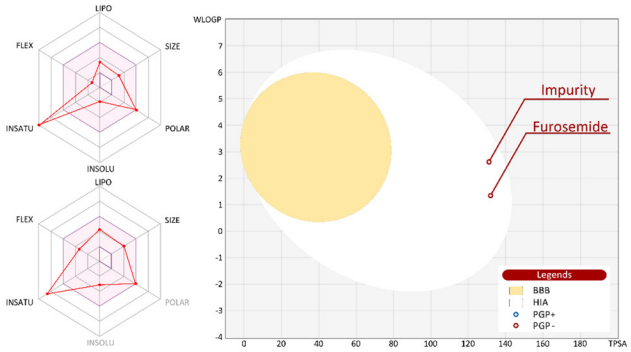


图 6　杂质 B 与呋塞米的 ADME/Tox 性质预测

Fig 6　Prediction of ADME/Tox properties for impurity B and furosemide

3.5　杂质 B 的细胞毒活性

药物杂质不仅可影响药物的纯度，超过限量的杂质可能导致毒副作用。由于呋塞米杂质 B 的代谢途径尚未有相关报道，因此本工作假定该化合物通过肝脏代谢，并测试其对于人肝永生化细胞株 THLE2 的毒性。检测杂质 B 对人肝脏细胞 THLE-2 存活率的影响，发现杂质 B 仅能轻微降低人肝脏细胞 THLE-2 的成活率，并具有浓度依赖性（见图 7）。因此，推断杂质 B 没有明显毒性。

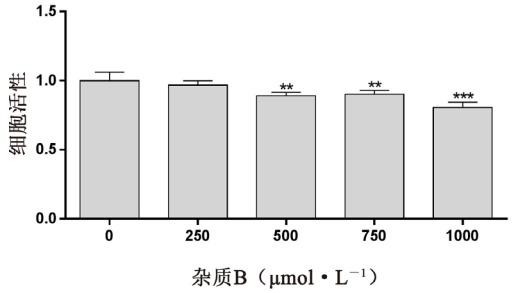


图 7　杂质 B 对 THLE-2 细胞的影响

Fig 7　Effect of impurity B on THLE-2 cells

注（Note）：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

4　总结

综上所述，本文通过分子叠合及分子场模型，分子对接和药代动力学性质预测等计算化学方法，研究呋塞米杂质 B 的潜在毒性。杂质 B 与呋塞米结构相似但柔性更低且水溶性更好，可能与碳酸酐酶 2、甲状腺素结合球蛋白和巨噬细胞抑制因子结合并具有与呋塞米相同的利尿活性。仅从计算模型预测结果来看，杂质 B 毒性可能较小，易于透过肠道吸收且具有与呋塞米相似的成药性，有待相关药理实验进一步证明。同时，通过体外实验，验证杂质 B 对于 THLE-2 细胞没有明显影响。对该结果

的进一步验证可以通过对杂质 B 与碳酸酐酶 2、甲状腺素结合球蛋白以及巨噬细胞抑制因子的表面等离子共振等实验确定其与上述蛋白的结合能力。进一步的生物学验证可通过对健康小鼠以杂质 B 灌胃，测定离体甲状腺质量以及体质量的变化验证其毒性。预测方法的推广，对于新药研发中避免因候选药物毒性导致失败具有重要意义。

参考文献

[1] Afari ME，Aoun J，Khare S，et al. Subcutaneous furosemide for the treatment of heart failure：A state-of-the art review [J]. Heart Fail Rev，2019，4（3）：309-313.

[2] Kuriyama A，Urushidani S. Continuous versus intermittent administration of furosemide in acute decompensated heart failure：A systematic review and meta-analysis [J]. Heart Fail Rev，2019，24（1）：31-39.

[3] 黄萍，刘萍 . HPLC 法测定呋塞米片中的有关物质 B [J]. 广州化工，2017，45（15）：151-153.

[4] 王峰，陶巧凤 . HPLC 法测定呋塞米注射液中的有关物质及含量 [J]. 药物分析杂志，2012，32（6）：1081-1083.

[5] Cies JJ，Moore WS，Chopra A，et al. Stability of furosemide and chlorothiazide stored in syringes [J]. Am J Health Synt Pharm，2015，72（24）：2182-2188.

[6] Lee MG，Chiou WL. Evaluation of potential causes for the incomplete bioavailability of furosemide：Gastric first-pass metabolism [J]. J Pharmacokinet Biopharm，1983，11（6）：623-640.

[7] Carda-Broch S，Esteve-Romero J，Ruiz-Angel MJ，et al. Determination of furosemide in urine samples by direct injection in a micellar liquid chromatographic system [J]. Analyst，2002，127（1）：29-34.

[8] Marzan AL，Tabassum R，Jahan B，et al. Preparation and characterization of stable nanosuspension for dissolution rate enhancement of furosemide：A quality by design（QbD）[J]. Approach Curr Drug Deliv，2018，15（5）：672-685.

[9] Rebelein JG，Cotelle Y，Garabedian B，et al. Chemical optimization of whole-cell transfer hydrogenation using carbonic anhydrase as host protein [J]. ACS Catal，2019，9（5）：4173-4178.

[10] Qi XQ，Loiseau F，Chan WL，et al. Allosteric modulation of hormone release from thyroxine and corticosteroid-binding globulins [J]. J Biol Chem，2011，286（18）：16163-16173.

[11] Cho Y，Vermeire JJ，Merkel JS，et al.Drug repositioning and pharmacophore identification in the discovery of hookworm MIF inhibitors [J]. Chem Biol，2011，18（9）：1089-1101.

（收稿日期：2019-06-17；修回日期：2021-02-26）

LC-MS/MS 自身内标法测定人血浆中达比加群浓度

王峰[1]，何昕[3]，钱懿轶[2*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 云南省阜外心血管病医院药剂科，昆明 650000；3. 昆明医科大学研究生院，昆明 650500）

摘要：目的 建立液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）法测定人血浆中达比加群浓度。**方法** 以达比加群自身标准溶液（6.24 ng·mL^{-1}）为内标，色谱柱为 Aston SN 苯基柱（2.1 mm×50 mm，5 μm），流动相采用甲醇 - 水溶液（含甲酸和氨水浓度分别为 4 mmol·L^{-1}）（33∶67，*V/V*）进行等度洗脱。流速 0.8 mL·min^{-1}，柱温 45 ℃，进样量 1 μL。基于全自动二维液相色谱串联质谱耦合仪和本研究组开发的阀切换技术，待测样品和内标依次进样，进样时间间隔 0.4 min。在电喷雾离子化源（ESI）正离子条件和多反应监测模式（MRM）下扫描，检测离子对为 *m/z* 472.15/289.10。**结果** 达比加群在 5.204 ～ 520.4 ng•mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 0.9997），日内、日间精密度＜ 3%，准确度为 91.75% ～ 113.16%，提取回收率为 88.03% ～ 92.42%，基质效应为 100.35% ～ 102.84%。**结论** 本方法首次以达比加群自身为内标，方法新颖，样品处理简单，分析过程快速、高效，测定结果准确，适用于达比加群血药浓度的测定。

关键词：达比加群；LC-MS/MS；血药浓度；自身内标法

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2520-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.008

基金项目：云南省教育厅科学研究基金项目（No.2018JS245）；云南省阜外心血管病医院院级科研基金项目（No.2019YFKT-08）。

作者简介：王峰，男，硕士，主管药师，主要从事治疗药物监测研究，E-mail：wangfeng-LVCM@163.com ***通信作者：**钱懿轶，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学相关研究，E-mail：1270117602@qq.com

Determination of dabigatran concentration in human plasma by LC-MS/MS method with self-internal standard

WANG Feng[1], HE Xin[3], QIAN Yi-yi[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *the Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Department of Pharmacy*, *Fuwai Yunnan Cardiovascular Hospital*, *Kunming* 650000; 3. *Graduate School of Kunming Medical University*, *Kunming* 650500)

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method to determine the concentration of dabigatran in human plasma. **Methods** The standard solution of dabigatran was used as the internal standard. The separation was conducted on an Aston SN phenyl column (2.1 mm×50 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of methanol-deionized water (containing 4 mmol • L^{-1} of formic acid and ammonia) at 33∶67 (*v/v*). The flow rate was 0.8 mL • min^{-1}. The column temperature was 45 ℃. The injection volume was 1 μL. With the fully automatic two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometer coupling instrument and the valve switching program developed, the sample and IS were injected respectively at an interval of 0.4 min. Electrospray ionization source under positive ion and multiple reaction monitoring mode were used. Ion transition was monitored with mass-to-charge ratio of *m/z* 472.15/289.10 for the quantification. **Results** This method showed good linearity at the concentration of 5.204 － 520.4 ng • mL^{-1} (r ＝ 0.9997). The intra- and inter-day precisions were less than 3% and the accuracy was at 91.75% － 113.16%. The mean extraction recovery was 88.03% － 92.42%. The mean matrix effect was 100.35% － 102.84%. **Conclusion** This novel method uses dabigatran as the IS, simplifies the sample preparation, and analyzes rapidly and accurately, which is suitable for determining the concentration of dabigatran in human plasma.

Key words: dabigatran; LC-MS/MS; plasma concentration; self-internal standard method

达比加群酯是一类新型口服抗凝剂（novel oral anticoagulants，NOACs），属非肽类直接凝血酶抑制剂。因其与传统抗凝药如华法林相比，给药剂量相对固定，治疗过程中无需频繁进行剂量调整和凝血功能监测，用药依从性较高[1-2]，所以于 2013 年在国内上市后广泛用于非瓣膜性房颤成人患者的卒中和全身性栓塞预防[3]。然而，抗凝治疗本身具有长期性、个体差异性和出血高风险性等特点，达比加群酯导致的出血风险也随着该药的逐渐应用而受到广泛关注。美国食品药品监督管理局建议将达比加群血药浓度控制在 40 ～ 200 ng • mL^{-1}[4]，提示达比加群血药浓度水平或可作为预测该药疗效和不良反应的有效指标。液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）具有良好的灵敏度和准确性[5]，本研究拟建立一种人血浆中达比加群浓度的 LC-MS/MS 测定法，并引入一种阀切换技术，以自身为内标，达到快速、准确检测并易于推广的效果，为促进达比加群酯安全合理用药，优化抗凝策略提供科学依据。

1　材料

达比加群对照品（加拿大 Toronto Research Chemicals 公司，纯度＞ 98%，批号：1-JYS-153-1）；甲醇、乙腈为色谱级（美国 Anaqua Chemicals 公司）；甲酸、氨水为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；实验用水为去离子水；空白马血清（北京政博伟业生物科技有限公司，批号：180824）。

LCMS-8050 型三重四级杆质谱仪（日本岛津公司）；色谱系统包括 LC-30AD 型色谱泵、SIL-30AC 型自动进样器、CBM-20A 型控制器；MS-Mate 9600 全自动二维液相色谱串联质谱耦合仪（湖南德米特仪器有限公司）；Milli-Q plus 纯水仪（美国 Millipore 公司）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Aston SN 苯基柱（2.1 mm×50 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（含 4 mmol • L^{-1} 甲酸、氨水）＝ 33∶67（*V/V*）；流速：0.8 mL • min^{-1}；柱温：45 ℃；进样量：1 μL；等度洗脱。

每份待测样品自动进样的同时，二维液相色谱串联质谱耦合仪自动抽去设定剂量的样品溶液作为内标储存于耦合仪中，再通过阀切换装置，在进样后 0.4 min，将预先储存在耦合仪中的内标溶液（6.24 ng • mL^{-1}）注入色谱柱中分析，进而达到

待测物和内标为同一物质，但在不同时间出峰的效果，第一个为目标峰，第二个为自校内标峰。

2.2　*质谱条件*

采用电喷雾离子化源（ESI）正离子模式检测；多反应监测模式（MRM）扫描；定性分析检测离子对：*m/z* 472.15/172.05，碰撞电压：－ 25 V；定量分析检测离子对：*m/z* 472.15/289.10，碰撞电压：－ 20 V；驻留时间：497 ms；脱溶剂气温度：250 ℃；接口温度：300 ℃；加热块温度：350 ℃；雾化气（氮气）流速：3 L • min^{-1}；加热气：氮气流速 10 L • min^{-1}，空气流速 10 L • min^{-1}；碰撞气（氩气）压力：270 kPa；接口电压：4 kV。

2.3　*溶液配制与血浆样品处理*

2.3.1　溶液配制　精密称取达比加群对照品 5.31 mg，用甲醇定容至 50 mL，制备 104.08 μg • mL^{-1} 的达比加群储备液。储备液先用空白马血清制备成 5.204 μg • mL^{-1} 的达比加群标准溶液，再用空白马血清逐步稀释为 5.204、26.02、52.04、104.08、260.2、520.4 ng • mL^{-1} 的标准血浆样品和低、中、高 3 种浓度（10、100、400 ng • mL^{-1}）的质控样品。另取储备液，用甲醇制备成 6.24 ng • mL^{-1} 的内标工作液。上述溶液均保存于－ 20 ℃冰箱。

2.3.2　人血浆 / 马血清样本处理　精密吸取人血浆 / 马血清样品 200 μL 置于 1.5 mL EP 管中，精密加入蛋白沉淀剂（乙腈 - 甲醇＝ 80∶20，*V/V*）500 μL，室温下涡旋振荡 1 min 后，14 500 r • min^{-1} 离心 8 min，取 500 μL 上层清液转移至进样瓶中待测分析。

2.4　*方法学考察*

2.4.1　专属性　分别制备空白溶剂、空白马血清、空白人血浆、空白马血清＋达比加群对照品（30 ng • mL^{-1}，50 ng • mL^{-1}）、用药患者给药后血浆样本，按“2.3.2”项下方法操作，进样分析。典型色谱图见图 1，空白试剂、空白马血清和空白人血浆在待测物和内标峰处无干扰，待测物和内标保留时间分别为 1.26 min 和 1.81 min，峰形良好。

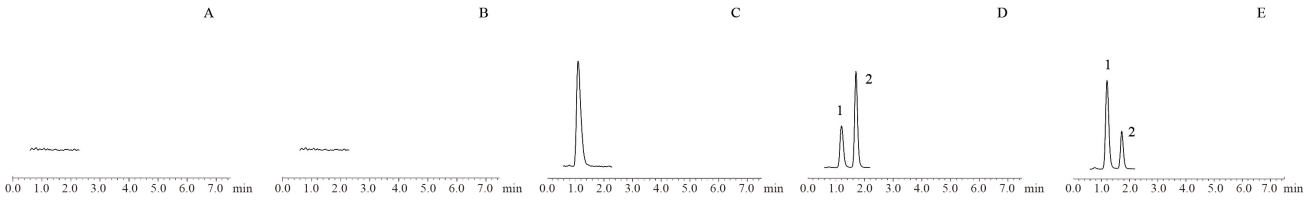


图 1　典型色谱图

Fig 1　Typical chromatograms

A. 空白马血清（blank horse serum）；B. 空白人血浆（blank human plasma）；C. 马血清＋达比加群对照品（30 ng • mL^{-1}）[horse serum ＋ dabigatran standard (30 ng • mL^{-1})]；D. 马血清＋达比加群对照品（50 ng • mL^{-1}）＋内标 [horse serum ＋ dabigatran standard (50 ng • mL^{-1}) ＋ IS]；E. 患者给药后血浆样品（plasma of patient after the administration）；1. 待测物达比加群（dabigatran as analyte）；2. 内标（IS）

2.4.2　标准曲线与定量下限　按“2.3.1”项下方法配制标准血浆样品，再按“2.3.2”项下方法处理后进行分析，以达比加群待测物质量浓度（ng • mL^{-1}）为横坐标（*x*）、待测物与内标峰面积比值为纵坐标（*y*），采用加权最小二乘法进行线性回归，得回归方程为 $y = 0.0092x + 0.0358$（$r = 0.9997$），表明达比加群在 5.204 ～ 520.4 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，定量下限为 5.204 ng • mL^{-1}。

2.4.3　精密度与准确度　取“2.3.1”项下高（400 ng•mL^{-1}）、中（100 ng•mL^{-1}）、低（10 ng•mL^{-1}）质量浓度质控样品和 5.204 ng • mL^{-1} 的标准血浆样品（作为定量下限浓度样品），按“2.3.2”项下方法处理，每个浓度制备 5 份样品，连续测定 3 d，根据当日标准曲线计算质控样品的测定浓度，计算得质控样品和定量下限浓度样品日内、日间精密度 *RSD* 分别为 1.4% ～ 2.5% 和 1.0% ～ 2.9%，准确度分别为 92.72% ～ 111.54% 和 91.75% ～ 113.16%。

2.4.4　提取回收率和基质效应　按“2.3.2”项下方法处理高、中、低浓度质控样品，每个浓度平行测定 5 份，测得待测物峰面积为 *A*；另取空白马血清处理后取上清液，加入与高、中、低浓度质控样品相对应的对照品溶液，每个浓度制备 5 份样品，测得待测物峰面积为 *B*；取同体积超纯水代血浆，按“2.3.1”项下方法配制高、中、低相应浓度的样品，直接进样分析，每个浓度平行测定 5 份，测得待测物峰面积为 *C*。按下列公式计算：提取回收率＝ *A/B*×100%，基质效应＝ *B/C*×100%。结果见表 1，表明本测定法提取回收率较高，测定过程无明显基质效应。

2.4.5　稳定性　高、中、低浓度质控样品，每个浓度制备 5 份样品，分别于不同条件下放置，再按“2.3.2”项下方法处理并分析，每个浓度平行测定 5 份，考察不同条件下稳定性。考察条件及结果见表 2。

2.5　*方法学应用*

将本测定法应用于 20 例（男 11 例，女 9

表 1　提取回收率和基质效应考察结果 (n = 5)

Tab 1　Extraction recovery and matrix effect (n = 5)

理论浓度 /（ng • mL^{-1}）	提取回收率 /%		基质效应 /%	
	$\bar{x}\pm s$	*RSD*/%	$\bar{x}\pm s$	*RSD*/%
10	90.85±3.57	3.9	101.21±3.99	4.0
100	92.42±2.59	2.8	100.35±1.99	2.0
400	88.03±2.16	2.5	102.84±2.38	2.4

表 2　不同条件下达比加群的稳定性考察结果 (n = 5)

Tab 2　Stability of dabigatran under various conditions (n = 5)

条件	理论浓度 /（ng • mL^{-1}）	实测浓度 /（ng • mL^{-1}）	准确度 /%	*RSD*/%
室温放置 24 h	10	10.32±0.55	103.20	5.4
	100	97.44±1.50	97.44	1.5
	400	383.72±7.50	95.93	2.0
自动进样器放置（4 ℃，24 h）	10	9.46±0.20	94.55	2.2
	100	92.63±2.23	92.63	2.4
	400	365.36±4.93	91.34	1.4
3 次冻融（－ 20 ℃至室温）	10	10.46±0.57	104.56	5.5
	100	98.53±4.03	98.53	4.1
	400	390.23±7.21	97.56	1.9
－ 20 ℃储存 15 d	10	9.88±0.31	98.80	3.1
	100	97.16±2.49	97.16	2.6
	400	380.88±6.96	95.22	1.8

例）平均年龄（66.05±9.32）岁、服用达比加群酯胶囊患者的血药浓度测定。所有患者以“110 mg q12 h”方案用药，在末次给药后 10 ～ 14 h 空腹采血并立即分离血浆，按“2.3.2”项下方法处理并分析。测得 20 例患者达比加群血药浓度为 25.1 ～ 257.0 ng•mL^{-1}，平均值为（92.60±49.90）ng • mL^{-1}。具体结果见表 3。

3　讨论

3.1　方法先进性

内标法是 LC-MS/MS 对生物样本进行定量分析时常采用的方法[6]，通过引入内标校正样品预处理造成的损失、进样体积差异、基质效应对离子化过程的影响等因素造成的误差。按照理想内标应与待测物具备相似物理化学性质这一原则，内标可分为同位素内标、待测物的结构类似物以及与待测物质谱行为相近的物质[7]。其中，同位素内标与待测物在色谱保留、质谱裂解等方面几乎一致，因而应用最为广泛，已发表的 LC-MS/MS 测定法，以达比加群 -d_3 和 [^{13}C]- 达比加群为内标者居多[8-11]。但同位素内标往往价格高昂、获取难度大，测定成本较高，不利于实现常规化监测。本研究参考“多维”概念，借助二维液相色谱串联质谱耦合仪，引入阀切换技术，首次建立了一种以待测物达比加群自身为内标的人血浆中达比加群浓度 LC-MS/MS 测定法，以固定浓度的达比加群标准溶液为内标，实现待测样品和内标的“二维”进样和“一维”色谱分离。同时本法采用等度洗脱，简化了色谱条件，待测物和内标保留时间分别为 1.26 min 和 1.81 min，每份样品从样品进样、内标进样和分析时长仅为 2.4 min，与文献方法相比缩短了分析时间，提升了分析效率，较好地实现了经济、快速、高效测定的目的，有利于临床常规化开展达比加群血药浓度监测的推广。

表 3　达比加群血药浓度监测结果及临床应用

Tab 3　Blood drug concentration monitoring and clinical practice of dabigatran

编号	性别	年龄 / 岁	用药次数	血药浓度 /（ng • mL^{-1}）	肌酐清除率 /（mL • min^{-1}）	出血 / 栓塞事件及不良事件史
01	男	52	＞ 6	76.6	58.91	无
02	男	62	＞ 6	25.1	98.40	无
03	男	81	＞ 6	96.3	34.79	既往服用达比加群期间出现消化道出血 2 次
04	女	63	6	91.6	68.16	无
05	女	60	6	48.9	84.20	无
06	女	64	8	83.3	70.90	无
07	男	78	9	109.1	40.50	无
08	女	76	6	99.2	49.63	无
09	男	67	7	94.4	50.80	既往服用达比加群期间出现鼻出血 1 次，尿潜血 1 次
10	女	73	7	75.8	64.97	无
11	女	49	8	84.7	54.51	出现大小便潜血 1 次
12	男	58	11	66.9	71.86	无
13	女	76	＞ 6	40.5	55.61	无
14	女	73	＞ 6	154.6	39.69	凝血功能异常（PT：13 s，APTT：40.9 s）
15	男	64	＞ 6	97	57.35	无
16	男	63	＞ 6	257	43.02	凝血功能异常（PT：20.6 s，APTT：67.3 s，INR：1.91）
17	女	70	18	122.4	47.39	无
18	男	57	8	122.9	80.53	无
19	男	57	6	35.6	75.82	无
20	男	79	13	70.0	55.73	无

3.2　达比加群血药浓度监测的临床意义探索

从本研究选取的 20 例服用达比加群酯的患

者血药浓度数据分析，以 110 mg q12 h 方案服用达比加群酯的患者，用药 6 次后，血药浓度变异较大，且临床观察到的凝血指标异常升高不良事件有可能与高血药浓度有关，从患者的既往出血 / 栓塞不良事件史考虑，相同用法用量达比加群用于不同患者，或者同一患者不同时期以相同用法用量达比加群酯治疗，均有可能存在疗效和安全性的差异，提示患者在后续用药过程中，有必要进行达比加群血药浓度监测。虽然目前国内外文献报到了一些达比加群血药浓度的监测方法 [12-14]，但对临床应用价值尚无探索。RE-LY 研究 [15] 数据提示达比加群酯活性代谢物浓度存在较大个体差异与 *CES1* 和 *ABCB1* 基因多态性相关，提示达比加群血药浓度监测对进一步揭示药效学差异，促进临床合理用药具有重要的意义，且该方法有希望成为一个相较于肌酐清除率和凝血检查指标如部分凝血活酶时间（APTT）、蛇毒凝血时间（ECT）、稀释凝血时间（dTT）、凝血酶时间（TT）和稀释的蝰蛇毒时间（dRVVT）等指标更精准、快速和经济的监测方法 [16]。随着达比加群酯的特异性拮抗剂 idarucizumab 获批上市 [17]，除了为达比加群酯用药安全性和药效提供评估依据之外，达比加群血药浓度还有可能为特异性拮抗剂的个体化用药提供指引，同时随着我国药品一致性评价政策 [18] 的推进，达比加群血药浓度监测也有助于同类国产新药的研发。

4 结论

本研究首次以达比加群自身为内标，以 LC-MS/MS 方法测定达比加群血药浓度并初步应用于临床，方法新颖，样品处理简单，分析过程快速、高效，测定结果准确，适用于达比加群血药浓度的测定。该方法的初步临床应用结果显示，有较好的临床应用前景并更好地促进达比加群酯的个体化用药。

参考文献

[1] Stangier J，Eriksson BI，Dahl OE，et al. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement [J]. J Clin Pharmacol，2005，45（5）：555-563.

[2] Stangier J，Stahle H，Rathgen K，et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate，an oral direct thrombin inhibitor，are not affected by moderate hepatic impairment [J]. J Clin Pharmacol，2008，48（12）：1411-1419.

[3] 张广求，张美祥，王树平 . 新型口服抗凝药物适应证及指南推荐意见 [J]. 实用心脑肺血管病杂志，2018，26（9）：1-5.

[4] Schulman S，Kearon C，Kakkar AK，et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism [J]. N Engl J Med，2009，361（24）：2342-2352.

[5] Amiral J，Dunois C，Amiral C，et al. An update on laboratory measurements of Dabigatran：Smart specific and calibrated dedicated assays for measuring anti-Ⅱa activity in plasma [J]. Transfus Apher Sci，2016，54（3）：428-437.

[6] 胡凤梅 . 测定人血浆中氯吡格雷 LC-MS/MS 方法的改进和应用 [D]. 上海：中国科学院大学（中国科学院上海药物研究所），2018.

[7] Bodnar-broniarczyk M，Pawiński T，Kunicki PK. Isotope–labeled versus analog internal standard in LC-MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples-A compensation of matrix effects [J]. J Chromatogr B，2019，1104：220-227.

[8] Baldelli S，Cattaneo D，Pignatelli P，et al. Validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of dabigatran，rivaroxaban and apixaban in human plasma [J]. Bioanalysis，2016，8（4）：275-283.

[9] Lagoutte-renosi J，Le Poupon J，Girard A，et al. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban，dabigatran，rivaroxaban in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2018，1100-1101：43-49.

[10] 吴婷婷，夏霄彤，傅静兰，等 . 液质联用法同时测定人血浆中达比加群和利伐沙班的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（10）：1038-1041.

[11] 徐蕾，杨婉花，陈冰 . LC-MS/MS 法测定血浆中达比加群浓度及在房颤消融围术期抗凝治疗中的应用 [J]. 中国临床药学杂志，2018，27（4）：230-234.

[12] Boonen K，Schmitz E，Rozestraten F，et al. Real life dabigatran and metabolite concentrations，focused on inter-patient variability and assay differences in patients with atrial fibrillation [J]. Clin Chem Lab Med，2017，55（12）：2002-2009.

[13] 陈敏，阳丽梅，罗冬梅，等 . HPLC-MS/MS 法测定人血浆中达比加群的浓度 [J]. 福建医药杂志，2018，40（6）：118-123.

[14] 陈明，范先煜，汪硕闻，等 . HPLC-MS/MS 法测定人血浆中达比加群浓度及其临床应用 [A]// 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会 . 第九届全国治疗药物监测学术年会论文摘要集 [C]. 苏州，2019.

[15] Reilly PA，Lehr T，Haertter S，et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients：The RE-LY Trial（Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy）[J]. J Am Coll Cardiol，2014，63（4）：321-328.

[16] 高桦，任静，门剑龙 . 曾经困惑——达比加群酯治疗的实验室监测 [J]. 临床检验杂志，2019（11）：806-809.

[17] Reardon DP，Owusu K. Idarucizumab for dabigatran reversal guideline [J]. Crit Pathw Cardiol，2016，15（2）：33-35.

[18] 国家药品监督管理局 . 国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见（国办发 [2016]8 号）[EB/OL]. [2016-03-05]. http：//www. nmpa. gov. cn/WS04/CL2079/333300. html.

（收稿日期：2021-01-05；修回日期：2021-05-10）

注射用曲札芪苷类过敏反应检测体系的应用

杨炳治[1, 2]，杨旭娟[2]，黄茜[2]，曹亚茹[2]，刘国光[2]，刘一丹[2*]（1. 丽江文化旅游学院，云南　丽江　674100；2. 昆药集团股份有限公司药物研究院，昆明　650100）

摘要：目的　应用类过敏体内外评价体系，初步对注射用曲札芪苷进行安全性评价。**方法**　采用 RBL-2H3 细胞模型和小鼠体内模型（ICR 及昆明种），以 Compound48/80 和清开灵注射液为阳性对照组，体外采用 MTT 法检测细胞活力，以组胺和 β-氨基己糖苷酶的释放率为检测指标；体内通过尾静脉注射含伊文思蓝的受试物，检测小鼠耳廓蓝染发生率，伊文思蓝渗出量，血液中组胺、免疫球蛋白 IgE（IgE）及细胞内皮生长因子含量。**结果**　RBL-2H3 细胞体外检测显示，200 μg·mL^{-1} 注射用曲札芪苷与阴性对照组比较，组胺和 β-氨基己糖苷酶释放率差异无统计学意义；相当于临床剂量 50 倍（1.75 mg·mL^{-1}）的注射用曲札芪苷未引起小鼠发生类过敏反应。**结论**　初步建立的类过敏反应体内外检测体系，适用于中药注射剂类过敏反应的快速筛查，注射用曲札芪苷在该体系中未见类过敏反应发生，初步说明具有较高的安全性。

关键词：曲札芪苷；类过敏反应；安全性评价
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2525-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.009

Allergic reaction evaluation system of piceatannol-3'-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside for injection

YANG Bing-zhi[1, 2], YANG Xu-juan[2], HUANG Xi[2], CAO Ya-ru[2], LIU Guo-guang[2], LIU Yi-dan[2*] (1. *Lijiang Culture and Tourism College*, *Lijiang*　*Yunnan*　674100; 2. *Institute of Medicine*, *Kunming Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Kunming*　650100)

Abstract: Objective　To evaluate the safety of piceatannol-3'-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside for injection with an in vivo and in vitro allergy evaluation system. **Methods**　RBL-2H3 cell models and in vivo mouse models (ICR and Kunming species) were used. Compound48/80 and Qingkailing injection were used as the positive control group. MTT method was used in vitro to detect the cell viability, and the release rate of histamine and *β*-aminoglycosidase was used as the detection index. The test substance containing Evans blue was injected through the tail vein to detect the incidence of blue staining of the ears of mice, the amount of EB exudation, and the levels of histamine, IgE and VEGF in the blood. **Results**　In vitro detection of RBL-2H3 cells showed that compared with the negative control group, the release rates of histamine and *β*-aminoglycosidase were not significantly different. Piceatannol-3'-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside for injection equivalent to 50 times (1.75 mg·mL^{-1}) the clinical dose did not cause any allergic reactions in mice. **Conclusion**　The in vivo and in vitro detection system for allergic reactions is suitable for the rapid screening of allergic reactions to Chinese medicine injections. Piceatannol-3'-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside for injection is safe without any allergic reactions.

Key words: piceatannol-3'-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside; allergic reaction; safety evaluation

中药注射剂是我国特有的中药剂型，已有几十年的发展历史。随着科技进步，中药注射剂作为现代中药剂型的发展方向之一，已广泛应用于危重疾病急救及感染性疾病、心脑血管疾病和恶性肿瘤等的治疗，在保障人类健康中发挥着重要作用[1]。然而，中药注射剂通常是由多种药材组成的复方，每

作者简介：杨炳治，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，E-mail：yangbinghzi@163.com　*通信作者：刘一丹，女，高级工程师，硕士研究生导师，主要从事新药研发药理工作，E-mail：ly_dandy@163.com

味中药成分复杂多样，部分中药药效物质基础还未明确。此外中药材的质量受产地、采收季节影响较大，因产地、生长环境、采摘时间、存放时间长短不同等，导致同种药材的有效或有毒成分含量不同[2]，容易出现安全隐患。刘爽等[3]报道的文献中，整理了 2010—2015 年各年度国家药品不良反应监测通报的中药注射剂排名情况，可见排名始终位居前列的有清开灵注射液、参麦注射液、双黄连注射液。易艳等[4]报道的文献中，不良反应报道较多的 3 种中药注射剂，分别为鱼腥草注射液、生脉注射液和清开灵注射液，结果显示临床 1.5 倍和 3.3 倍浓度的生脉注射液和清开灵注射液均可以引发小鼠发生以血管通透性增高为主要表现的轻微类过敏反应，并且呈现一定的量效关系。因此阳性对照物除了化合物 Compound48/80（C48/80）还增加了清开灵注射液。

注射用曲札芪苷是从拉萨大黄药材乙醇提取物中分离、纯化得到，具有抗氧化、抗炎、抗神经细胞凋亡作用;能缩小缺血再灌注引起的脑梗死面积、减轻脑水肿，能改善脑卒中动物的行为学障碍、促进神经缺失症状的恢复。注射用曲札芪苷是昆药集团独创的一类创新药，目前已获得临床批件（No. 2018L02062）。本文旨在建立 RBL-2H3 细胞脱颗粒体外类过敏检测体系，对中药注射剂安全性进行快速初步评价，再结合小鼠体内类过敏检测体系进行综合分析，为企业中药注射剂类过敏反应做出及早预警和消除隐患提供一定技术手段，同时为企业注射剂再评价工作奠定基础。

1 材料

1.1 试药

注射用曲札芪苷（昆药集团药物研究院，批号：170101，规格：20 mg/瓶）；C48/80（Sigma 公司，批号：Lot#056M4067V，－ 20 ℃保存）；清开灵注射液（吉林省集安益盛药业股份有限公司，批号：17011604，规格：2 mL/支）。伊文思蓝（EB，上海源叶生物科技有限公司，批号：M26S6L3294）；甲酰胺（生工生物工程股份有限公司，批号：CB18BA0025）；MEM 培养基（HyClone 公司，批号：AC11016265）；胎牛血清（Gibco 公司，批号：1778586）；青 - 链霉素（BI 公司，批号：1731651）；PBS 缓冲液（Biosharp 公司，批号：67035331）；曲拉通 X-100（TritonX-100，批号：20161121，规格：500 mL/瓶）；氯化钠注射液（浙江国镜药业有限公司，批号：A170525A1）；ELISA 试剂盒（上海源叶生物科技有限公司，批号：201801）；噻唑蓝（MTT，Aladdin 公司，批号：A1720090）；二甲基亚砜（DMSO，批号：BCBH5215V，Sigma 公司）。

1.2 细胞株和实验动物

大鼠嗜碱性白血病细胞株（RBL-2H3，广州吉妮欧生物科技有限公司）。SPF 级雄性 ICR 小鼠，体质量 18 ～ 22 g [昆药集团动物室，生产许可证：SCXK（滇）K2014-0001]。SPF 级雄性昆明种小鼠，体质量 18 ～ 22 g [昆明医科大学实验动物中心，生产许可证：SCXK（滇）K2015-0002]。饲养于 IVC 动物室，温度 20 ～ 25 ℃，湿度 40% ～ 70%，12 h 明暗交替，适应性饲养 2 d 进入实验。

1.3 仪器

PowerWaveXS2 全波长酶标仪（BioTek，Gene Company Limited）；XK96-A 快速混匀器（江苏新康医疗器械有限公司）；Milli-Q 超纯水机（Merch Millipore 德国）；SYNERGY HT 多功能酶标仪（BioTex 公司）；XD-202 倒置显微镜（南京江南永新光学有限公司）；CO_2 培养箱（Themo 公司）；STS-3 脱色摇床（上海琪特分析仪器有限公司）；96 孔无菌细胞培养板（Gibco 公司）；各系列量程手动移液器及离心管、不同规格 Tip 头（Eppendorf 公司）。

2 方法

2.1 体外检测方法建立

2.1.1 细胞活力的测定[5-6] 将对数期的细胞配制成细胞悬液，按接种密度分为 4 组：0.5×10^4、1×10^4、2×10^4、2.5×10^4 个 / 孔，分别于 0、6、12、24、36、48、60 h 取样检测细胞活力，分别于对应时间点前 4 h 给予 MTT 液，50 μL/ 孔，并补足培养液至 200 μL，放入培养箱中继续培养 4 h，小心弃去上清液，加入 DMSO（200 μL/ 孔）震荡溶解 5 min，于 570 nm 处测定吸光度（*OD*）。

2.1.2 *β*- 氨基己糖苷酶释放率的测定 取对数期 RBL-2H3 细胞，加入 96 孔板随机分为阴性对照组（氯化钠注射液）、阳性对照组（C48/80 40 μg • mL^{-1} 或清开灵注射液 1/32 原液、1/64 原液、1/128 原液）、注射用曲札芪苷组（200、100、50 μg • mL^{-1}），每个浓度 3 个复孔，每孔 250 μL，培养 1 h 后，取上清液，4 ℃、4000 r • min^{-1} 离心 20 min，收集上清液；原细胞孔每孔加入 250 μL 的 0.1%TritonX-100，作用 30 min，取上清液，4 ℃、4000 r • min^{-1} 离心 20 min，收集上清液。在 96 孔酶标板上，每孔加入 *β*- 氨基糖苷（7 mmol • L^{-1}）50 μL，0.1%TritonX-100 5 μL，各组上清液 45 μL，37 ℃孵育 90 min 后，每孔加入终止液 $NaCO_3$-$NaHCO_3$ 150 μL，在 405 nm 处使用酶标仪检测光吸收 *A* 值；*β*- 氨基己糖苷酶释放率（%）＝[（各组上清样品酶活性光吸收 *A* 值－调零孔光吸收 *A* 值）/（各组上清样品酶活性光吸收 *A* 值＋各组细胞裂解孔光吸收 *A* 值－调零孔光吸收 *A* 值）]×100%。

2.1.3　组胺释放率的测定　按 ELISA 试剂盒说明，利用酶标仪分别测定待测的细胞上清和裂解后细胞上清的光吸收 *A* 值，计算药物作用后细胞组胺释放率。组胺释放率（%）＝各组组胺上清释放量 /（各组组胺上清释放量＋各组细胞裂解组组胺量）×100%。

2.2　注射用曲札芪苷体内检测类过敏反应

2.2.1　小鼠体内检测体系的建立[7]　取 60 只雄性 ICR 小鼠，随机分为阴性对照组（氯化钠注射液）、阳性对照组 [C48/80 1.25 mg • mL^{-1} 或相当于临床剂量 20 倍和 10 倍的清开灵高、低剂量组（0.7、0.35 mL）]、相当于临床剂量 50 倍和 30 倍数的注射用曲札芪苷高、低剂量组（1.75、1.05 mg • mL^{-1}）受试组，每组 10 只。将含有 0.8% 伊文思蓝（EB）指示剂与各给药组按体积比 1∶1 进行配制，以 20 mL • kg^{-1} 静脉注射（iv）给药。30 min 后，摘眼球取血，并分别用肝素抗凝管和普通离心管收集血液各约 1 mL，放置 2 h 后，3000 r • min^{-1} 离心 5 min，收集上清液待测。脱颈椎处死小鼠，沿小鼠耳廓剪下耳朵，并记录小鼠耳朵反应率 [反应率（%）＝出现耳廓蓝染的动物数 / 组内动物数 ×100%]，剪碎小鼠耳朵，放入 5 mL 的离心管中，加入 2 mL/ 管甲酰胺浸泡 48 h[8-9]。昆明种小鼠模型建立与 ICR 小鼠相同。

2.2.2　伊文思蓝渗出量及其升高率的计算　小鼠耳朵浸泡 48 h 后，4000 r • min^{-1} 离心 20 min，取上清液，加入 96 孔酶标板中，每孔 200 μL，酶标仪 610 nm 处测定光吸收 *A* 值，并计算 EB 渗出量（μg），EB 渗出升高率（%）＝（测试组 EB 含量－对照组 EB 含量）/ 对照组 EB 含量 ×100%。

2.2.3　ELISA 法检测动物血液中组胺、IgE 及 VEGF 含量　离心所收集的血液、血浆和血清按 ELISA 试剂盒说明分别测定组胺、血管内皮生长因子（VEGF）与免疫球蛋白（IgE），计算含量。

2.2.4　统计学方法　运用 IBM SPSS 23.0 统计软件进行统计分析，计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较，采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD 方法比较，$P \leqslant 0.05$ 时差异有统计学意义。

3　结果

3.1　体外实验结果

3.1.1　RBL-2H3 细胞生长曲线　由于对数期细胞代谢最活跃，对外界刺激敏感性最强，是进行药物影响实验的最佳对象。根据图 1 的细胞生长曲线，可知接种密度为 0.5×10^4 个 / 孔在所选时间段内一直处于对数生长期，因此细胞最佳种植密度为：0.5×10^4 个 / 孔、作用时间为 24 h。

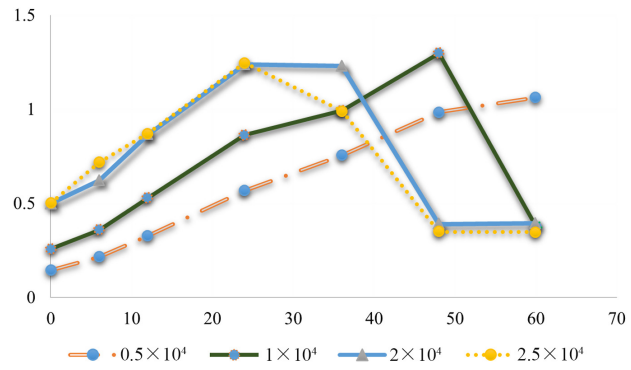


图 1　RBL-2H3 细胞生长曲线

Fig 1　RBL-2H3 cell growth curve

3.1.2　*β*- 氨基己糖苷酶和组胺释放率　从表 1 可以看出，与阴性对照组相比，C48/80、清开灵注射液 1/32 原液组、1/64 原液组 *β*- 氨基己糖苷酶释放率和组胺释放率显著升高（$P < 0.01$）；注射用曲札芪苷各剂量组差异均无统计学意义。

表 1　细胞上清 *β*- 氨基己糖苷酶释放率和组胺释放率 ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

Tab 1　Release rate and histamine release rate of cell supernatant *β*-aminoglycosidase ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

组别	体系终浓度	*β*- 氨基己糖苷酶释放率 /%	组胺释放率 /%
阴性对照组	—	6.30±2.83	58.80±2.78
C48/80	40 μg • mL^{-1}	19.16±1.50**	70.84±5.64**
清开灵注射液	1/32 原液	29.32±1.60**	77.66±7.48**
	1/64 原液	15.35±2.15**	70.03±2.26**
	1/128 原液	8.81±1.08	64.37±4.69
注射用曲札芪苷	200 μg • mL^{-1}	10.32±1.92	63.89±3.50
	100 μg • mL^{-1}	9.99±1.55	53.69±2.65
	50 μg • mL^{-1}	10.56±2.33	49.36±7.34

注：与阴性对照组相比，**$P \leqslant 0.01$。

Note：Compared with the negative control group，**$P \leqslant 0.01$.

3.2　体内实验结果

3.2.1　ICR 小鼠血管通透性情况　从表 2 可以看出，与阴性对照组相比，C48/80 与相当于临床剂量倍数 20 倍和 10 倍的清开灵高、低剂量组中 EB 渗出量升高（$P < 0.01$）；相当于临床剂量 30 倍和 50 倍的注射用曲札芪苷组差异无统计学意义；其中 C48/80、清开灵注射液高、低剂量 EB 升高率≥ 150%，类过敏较严重[10-11]。

3.2.2　ELISA 试剂盒检测 ICR 小鼠相关因子　从表 3 可以看出，与阴性对照组相比，C48/80、清开灵注射液高、低剂量组的 VEGF 和组胺明显升高（$P < 0.01$）；清开灵高、低剂量组的 IgE 明显降低（$P < 0.01$）；注射用曲札芪苷高、低剂量组 IgE、VEGF、组胺差异均无统计学意义。

3.2.3　ICR 小鼠耳朵蓝染情况　ICR 小鼠耳朵蓝

表 2　受试物诱导 ICR 小鼠耳廓血管通透性增高反应 (n = 10)

Tab 2　Increased auricle vascular permeability induced by test substance in ICR mice (n = 10)

组别	浓度	耳蓝染动物数	反应率 /%	EB 渗出量 / μg	EB 渗出升高率 /%
阴性对照组（0.4%EB）	—	0	0	0.11±0.05	—
C48/80	1.25 mg·mL^{-1}	10	100	0.64±0.11**	481.81
清开灵注射液	0.7 mL	8	80	0.32±0.19**	199.40
	0.35 mL	8	80	0.27±0.11**	151.55
注射用曲札芪苷组	1.75 mg·mL^{-1}	3	30	0.12±0.05	16.38
	1.05 mg·mL^{-1}	2	20	0.11±0.05	8.12

注：与阴性对照组相比，**$P \leqslant 0.01$。

Note：Compared with the negative control group，**$P \leqslant 0.01$.

染情况见图 2，C48/80 组反应率为 100%；清开灵高、低剂量组反应率为 80%。注射用曲札芪苷高剂量耳蓝染动物数为 3，反应率为 30%，低剂量耳蓝染动物数为 2，反应率为 20%。

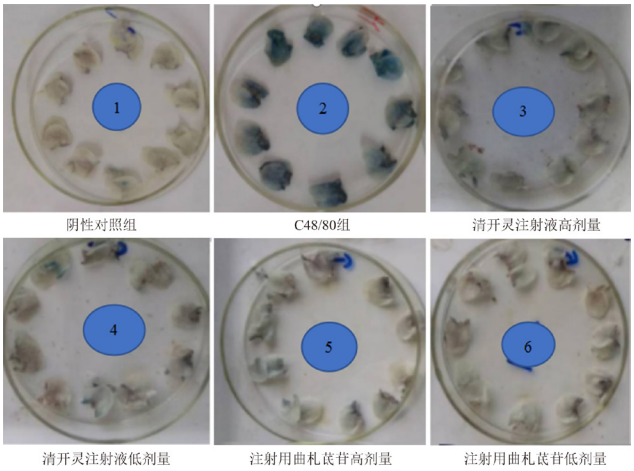


图 2　ICR 小鼠耳朵蓝染情况

Fig 2　ICR mice the conditions of auricle blue staining

表 3　ELISA 试剂盒测 ICR 小鼠相关因子 ($\bar{x}\pm s$，n = 10)

Tab 3　Detection of related factors in ICR mice by ELISA ($\bar{x}\pm s$，n = 10)

组别	浓度	IgE/（ng·mL^{-1}）	VEGF/（ng·mL^{-1}）	组胺 /（ng·mL^{-1}）
阴性对照组（0.4%EB）	—	71.02±5.41	5.59±2.14	0.15±0.12
C48/80	1.25 mg·mL^{-1}	61.67±12.57	13.07±2.71**	0.53±0.16**
清开灵注射液	0.7 mL	50.96±6.07**	11.05±2.07**	0.55±0.14**
	0.35 mL	48.55±16.64**	9.98±1.34**	0.44±0.16**
注射用曲札芪苷组	1.75 mg·mL^{-1}	59.78±12.04	6.25±1.07	0.25±0.09
	1.05 mg·mL^{-1}	57.23±14.64	7.62±0.58	0.24±0.09

注：与阴性对照组相比，**$P \leqslant 0.01$。

Note：Compared with the negative control group，**$P \leqslant 0.01$.

3.2.4　昆明种小鼠血管通透性情况　表 4 结果显示，与阴性对照组相比，C48/80 组与相当于临床剂量倍数 20 倍和 10 倍的清开灵高、低剂量组 EB 渗出量升高（$P < 0.01$）；相当于临床剂量倍数 50 倍和 30 倍的注射用曲札芪苷组差异无统计学意义。

表 4　受试物诱导昆明种小鼠耳廓血管通透性增高反应 (n = 10)

Tab 4　Increased auricle vascular permeability induced by test substance in Kunming mice (n = 10)

组别	浓度	耳蓝染动物数	反应率 %	EB 渗出量 / μg	EB 渗出升高率 /%
阴性对照组（0.4%EB）	—	1	10	0.20±0.07	—
C48/80	1.25 mg·mL^{-1}	10	100	0.54±0.14**	173.98
清开灵注射液	0.7 mL	10	100	0.43±0.09**	114.65
	0.35 mL	9	90	0.34±0.13**	70.40
注射用曲札芪苷组	1.75 mg·mL^{-1}	0	0	0.08±0.09	45.84
	1.05 mg·mL^{-1}	0	0	0.04±0.07	−21.01

注：与阴性对照组相比，**$P \leqslant 0.01$。

Note：Compared with the negative control group，**$P \leqslant 0.01$.

3.2.5　ELISA 试剂盒检测昆明种小鼠相关因子　从表 5 可以看出，与阴性对照组相比，清开灵高、低剂量组和注射用曲札芪苷高、低剂量组 IgE 降低（$P < 0.01$）；C48/80 组、清开灵高、低剂量组组胺含量升高（$P < 0.01$）；C48/80 组、清开灵高、低剂量组 VEGF 升高（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；注射用曲札芪苷组高、低剂量组 VEGF、组胺差异无统计学意义。

3.2.6　昆明种小鼠耳朵蓝染情况　昆明种小鼠耳朵蓝染情况见图 3，C48/80 组反应率为 100%，清开灵高剂量组反应率为 100%，清开灵低剂量组反应率为 90%；注射用曲札芪苷高、低剂量组反应率为 0。

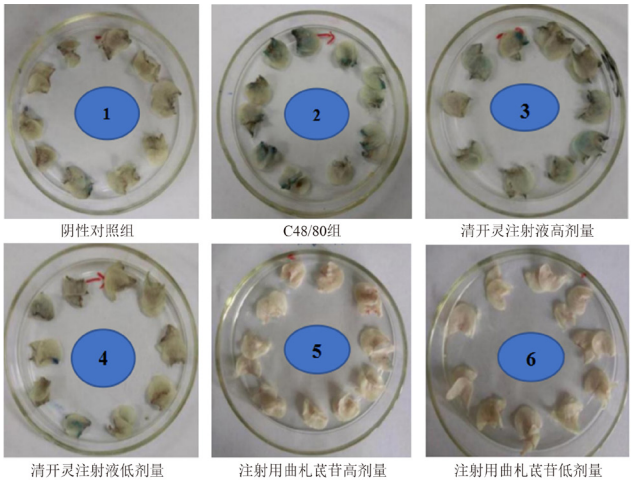


图 3　昆明种小鼠耳朵蓝染情况

Fig 3　Auricle blue staining in Kunming mice

表 5　ELISA 试剂盒测昆明种小鼠相关因子（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 5　Detection of related factors in Kunming mice by ELISA（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	浓度	IgE/（ng·mL^{-1}）	VEGF/（ng·mL^{-1}）	组胺/（ng·mL^{-1}）
阴性对照组（0.4%EB）	—	62.35±7.44	6.46±2.29	0.35±0.23
C48/80	1.25 mg·mL^{-1}	52.50±10.27	11.74±1.6**	0.61±0.12**
清开灵注射液	0.7 mL	41.88±18.92**	10.22±1.5**	0.63±0.13**
	0.35 mL	39.29±10.35**	9.48±1.65*	0.61±0.12**
注射用曲札芪苷组	1.75 mg·mL^{-1}	41.45±7.59**	7.95±1.84	0.35±0.16
	1.05 mg·mL^{-1}	42.23±14.93**	5.59±2.07	0.25±0.09

注：与阴性对照组相比，$^{*}P\leqslant 0.05$，$^{**}P\leqslant 0.01$。

Note：Compared with the negative control group，$^{*}P\leqslant 0.05$，$^{**}P\leqslant 0.01$.

4　讨论

国家食品药品监督管理局要求注射用曲札芪苷申报临床批件时要有更灵敏的过敏反应检测方法，而目前国际上缺乏对类过敏检测的统一方法，公认的有非免疫介导 IgE、类过敏所致靶细胞脱颗粒机制、激活补体系统机制、激活激肽释放酶 - 激肽系统途径、急性过敏途径以及细胞骨架重排；体内模型的建立主要依据的是非免疫介导 IgE 机制与释放炎症介质导致血管通透性增加；释放炎症介质导致血管通透性增加从而引发类过敏反应的概念已比较成熟。与此同时非免疫介导 IgE 机制还需进一步验证，力争有更为详实的数据支持。

本研究通过试剂盒检测 ICR 小鼠和昆明种小鼠的相关因子，发现 C48/80 组的 IgE 与阴性对照组相比没有明显差异；但在 ICR 小鼠中，清开灵高、低剂量组 IgE 与阴性对照组差异具有统计学意义；在昆明种小鼠中，清开灵和注射用曲札芪苷高、低剂量组 IgE 与阴性对照组差异具有统计学意义；所有组别的 IgE 与阴性对照组相比，都具有明显的下降趋势。为了进一步明确类过敏反应的作用趋势，后期需要更多的数据进行验证。

RBL-2H3 细胞质内含有丰富的嗜碱性颗粒，当细胞发生类过敏反应时，会释放组胺、β- 氨基己糖苷酶等各类细胞因子 [12-13]。其中组胺是经典的过敏介质，但检测结果的稳定和重复性较差，需要在短时间内迅速完成实验测定 [14]。VEGF 亦被称为血管通透因子，是一种分泌型多肽和强力内皮细胞分裂剂。VEGF 能够与血管内皮细胞表面受体结合，产生一系列细胞信号级联反应，从而导致微血管内皮通透性增高 [15-16]。C48/80 能够激活 G 蛋白，进而激活蛋白激酶 C 和 Ca^{2+} 通道，使内质网释放 Ca^{2+} 进入细胞内，肥大细胞和嗜碱性粒细胞内的颗粒囊泡移向胞浆膜并释放生物介质，从而引发类过敏反应 [17-18]。EB 是一种无明显毒性的蓝色染料，可迅速与血浆蛋白（主要为白蛋白）结合，形成蛋白结合物 [19-20]。当血管通透性升高时，其可随着血浆蛋白渗出到血管外的组织间隙中，造成组织明显蓝染，以反应率、EB 渗出升高率为指标，定量定性分析样品在小鼠体内类过敏的反应程度 [21]。

综上所述，EB 渗出量与药物剂量成正相关趋势，且 ICR 小鼠较为敏感，本研究通过对注射用曲札芪苷的初步评价可得其在该体内外体系中不存在类过敏反应，安全性较高，这也对其用法用量提供一定的指导意义。

参考文献

[1] 李连达，李贻奎，张金艳 . 中药注射剂安全性研究的关键问题 [J]. 河南中医学报，2014，28（1）：1-3.

[2] 雷蕾，蒲旭峰，杨奎，等 . 鱼腥草注射液静脉给药不良反应的实验研究Ⅰ. 犬静脉给药不良反应研究 [J]. 中药药理与临床，2007，23（5）：131-133.

[3] 刘爽，乔艳，刘高峰 . 中药注射剂不良反应与不合理用药问题分析 [J]，中南药学，2016，14（11）：1177-1182.

[4] 易艳，李春英，张宇实，等 . 3 种中药注射剂类过敏反应评价及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志，2015，40（14）：2711-2716.

[5] 康黎静，谢家骏，易娟娟，等 . 若干药物的大鼠皮肤类过敏试验 [J]. 中成药，2014，36（10）：2033-2036.

[6] 康黎静，谢家骏，赵琳，等 . 大鼠皮肤类过敏试验评定标准的探讨 [J]. 中国中药杂志，2015，40（20）：4044-4051.

[7] 梁爱华，李春英，易艳，等 . 药物类过敏反应的临床前评价方法研究（Ⅰ）——小鼠类过敏反应评价方法的建立和验证 [J]. 中国中药杂志，2012，37（13）：1865-1870.

[8] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy：A new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. Toxicology，2005，216（2-3）：106.

[9] 王化龙，李振虎，吴红华，等 . 一种药物注射剂类过敏反应高内涵检测方法的初步建立 [J]. 中国中药杂志，2016，41（10）：1903-1909.

[10] Wang F，Li C，Zheng Y，et al. Study on the anaphylactoid of three phenolic acids in Honeysuckle [J]. J Ethnopharmacol，2015，170：1-7.

[11] Wang F，Weng Z，Li C，et al. A reliable method for the

evaluation of the anaphylactoid reaction caused by injectable drugs [J]. Molecules，2016，21（10）：1352.
[12] 孟祥英 . 中药注射剂的不良反应及其研究进展 [J]. 中国保健营养，2012，22（6）：599-600.
[13] Altman AM，Jr CC，Simons FE，et al. Anaphylaxis in America：A national physician survey [J]. Allergy Clin Immunol，2015，135（3）：830-833.
[14] 陈玉琼，张萃 . 中药类过敏反应研究进展 [J]. 广东药学院学报，2013，29（4）：465-468.
[15] 闫位娟，李连达，张美玉，等 . 7 种中药注射剂对 Beagle 犬类过敏反应研究 [J]. 中国新药杂志，2010，19（20）：1895-1898.
[16] 罗霞，王青，周联，等 . 几种常见中药注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响 [J]. 中药新药与临床药理，2014，20（6）：506-510.
[17] 熊克朝，李泽君，李志刚，等 . 参麦注射液致 RBL-2H3 细胞脱颗粒的研究 [J]. 药物评价研究，2015，38（2）：140-146.
[18] Chakraborty S，Kar N，Kumari L，et al. Inhibitory effect of a new orally active cedrol-loaded nanostructured lipid carrier on compound 48/80-induced mast cell degranulation and anaphylactic shock in mice [J]. Int J Nanomed，2017，12：4849-4868.
[19] Galli SJ，Tsai M，Piliponsky AM. The development of allergic inflammation [J]. Nature，2008，454（7203）：445-454.
[20] Mcneil BD，Pundir P，Meeker S，et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions [J]. Nature，2015，519（7542）：237-241.
[21] 徐煜彬，窦德强 . 中药注射剂类过敏研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（14）：2765-2773.

（收稿日期：2021-06-05；修回日期：2021-07-20）

基于多指标 - 响应曲面法优选“建昌帮”姜天麻提取工艺

周莉莉[1]，张霞[2]，彭巧珍[3]，谢宇璐[2]，叶喜德[2*]，金镭[1*]（1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院药剂科，合肥 230031；2. 江西中医药大学药学院，南昌 330004；3. 南昌航空大学信息工程学院，南昌 330063）

摘要：目的 基于 UPLC 定量测定与响应曲面法从多指标和综合评价角度优选“建昌帮”姜天麻提取工艺。**方法** 采用 UPLC 定量分析，色谱柱为 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），体积流量 0.2 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，以流动相为乙腈（A）-0.05% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 14 min，3% ～ 29%A）；检测波长为 220 nm。以天麻素，天麻苷元，对羟基苯甲酸，巴利森苷 A、B、C、E 及综合评分为评价指标，在考察料液比、提取时间、提取温度、粒径、提取溶剂等单因素的基础上，运用响应曲面设计法对药效成分影响较大的料液比、提取温度及提取溶剂之间的交互作用进行考察，并优选出姜天麻最佳提取工艺。**结果** 姜天麻最佳提取工艺：70% 乙醇，料液比 1∶15，80 ℃超声 40 min。**结论** 优选出的姜天麻提取工艺稳定可行，可为“建昌帮”姜天麻深入研究及临床应用提供理论依据。

关键词：姜天麻；超高效液相色谱；天麻素；天麻苷元；对羟基苯甲酸；巴利森苷
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2530-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.010

Extraction of *Gastrodia elata* processed with ginger juice from Jianchangbang by multi-index-response surface methodology

ZHOU Li-li[1], ZHANG Xia[2], PENG Qiao-zhen[3], XIE Yu-lu[2], YE Xi-de[2*], JIN Lei[1*] (1. *No.* 901 *Hospital of the Chinese People's Liberation Army of Logistic Support*, *Hefei* 230031; 2. *School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 3. *School of Information Engineering of Nanchang Hangkong University*, *Nanchang* 330063)

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81760712）；江西省中医药中青年骨干人才（第一批）培养计划（赣中医药科教字〔2020〕2 号）；江西省中医药标委会 2021 年第一批标准化项目（No.2021A13）。
作者简介：周莉莉，女，主要从事中药炮制研究，E-mail：545173922@qq.com *__通信作者__：叶喜德，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事中药炮制研究，E-mail：552376722@qq.com；金镭，男，硕士，主管药师，主要从事中药研究，E-mail：369548689@qq.com

Abstract: Objective To determine and optimize the extraction technology of *Gastrodia elata* processed with ginger juice by response surface methodology and UPLC method. **Methods** The UPLC quantitative analysis was used. The column was Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with a volume flow rate of 0.2 mL • min^{-1} and a column temperature of 35 ℃. The evaluation index: the mobile phase was acetonitrile (A)-0.05% phosphoric acid aqueous solution (B), with gradient elution (0 － 14 min, 3% － 29%A). The detection wavelength was 220 nm. Gastrodin, gastrodigenin, *p*-hydroxybenzoic acid, parishin A, B, C, E and comprehensive score were used as the evaluation indexes. Response surface design was used to determine the effect of interaction among solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction solvent on the extraction process of *Gastrodia elata* based on the single factor of solid-liquid ratio, extraction time, extraction temperature, particle size and extraction solvent. **Results** The best extracted technology of *Gastrodia elata* was 70% ethanol as extraction solvent, the ratio of material to liquid is 1∶15, and the extraction temperature was 80 ℃ for 40 min by ultrasonic extraction. **Conclusion** The optimized extraction process of *Gastrodia elata* is stable and feasible, which provides scientific basis for the formulation of quality standards and research and application of *Gastrodia elata*.

Key words: *Gastrodia elata* processed with ginger juice; UPLC; gastrodin; 4-hydroxybenzyl alcohol; *p*-hydroxybenzoic acid; parishin

天麻为兰科无绿叶并寄生草本植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎 [1]。性甘、味平，入肝经。具熄风止痉、祛风之痛之效，为治偏头痛之要药。始载于《神农本草经》并列之为上品 [2]。天麻主含酚类、多糖、有机酸类、甾醇类、氨基酸及多种微量元素等成分 [3]。

天麻炮制方法较多，如煨法、酒炙、蜜麸炒等，但未见炮制机制的研究。天麻姜制始载于《幼幼集成》[4]，后为江西“建昌帮”列为其特色饮片之一 [5]。目前江西、广东、福建等各地方炮制规范均收录了姜天麻 [6-8]，但均未见其炮制机制的研究。“建昌帮”认为姜制天麻可增强其祛痰熄风，定眩止痛之功。研究表明，天麻经姜制后，其化学成分发生了变化，而且动物行为学试验表明该炮制利于天麻对大鼠脑组织的保护 [9-10]，且姜天麻对硝酸甘油诱导的大鼠偏头痛抑制作用强于《中国药典》收录的天麻炮制品 [11-12]。显然，天麻经姜制后药效增强，与其发生的有效成分变化有关。但如何使这些成分充分溶出，仍缺乏最佳提取工艺。基于前期炮制品制备探讨的姜天麻炮制工艺 [13]，本研究采用 UPLC 定量分析，以天麻素，天麻苷元，对羟基苯甲酸，巴利森苷 A、B、C、E 等多指标为质量评价方法，并结合响应曲面法 [14] 对料液比、提取温度及提取溶剂之间的交互作用进行考察，优选出姜天麻最佳提取工艺参数，提高该炮制品中有效成分得率，为后续研究提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity（e2695）超高效液相色谱仪（新加坡 Waters 公司）；TGL-16B 高速离心机（上海安亭科学仪器厂）；AR240 十万分之一电子天平（Mettler Toledo 公司）；KQ-500E 超声清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

天麻素（批号：CHB190212）、天麻苷原（CHB190214）、对羟基苯甲醇（批号：CHB180226）、巴利森苷 A（批号：CHB180222）、巴利森苷 B（批号：CHB180223）、巴利森苷 C（批号：CHB180224）、巴利森苷 E（批号：CHB180225）（对照品，质量分数≥ 98%，成都克洛玛生物科技有限公司）；水为超纯水，乙腈、甲醇为色谱纯，磷酸为分析纯。

天麻、生姜于（代富安虫草参茸行，批号：20200173），经江西中医药大学龚千锋教授鉴定分别为兰科天麻（*Gastrodia elata* Blume.）干燥块茎、植物姜（*Zingiber officinale* Rose.）的新鲜根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），体积流量 0.2 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃。流动相为乙腈（A）-0.05% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱：0 ～ 14 min，3% ～ 29%A；检测波长为 220 nm。理论塔板数按天麻素峰计算不低于 5000。

2.2 对照品制备

精密称取天麻素 0.002 58 g、天麻苷元 0.004 96

g、对羟基苯甲酸 0.002 48 g、巴利森苷 A0.002 54 g、巴利森苷 B 0.004 97 g、巴利森苷 C 0.002 37 g、巴利森苷 E 0.002 22 g，用水溶液（乙腈 - 水＝ 3∶97）定容于 5 mL 量瓶中。

2.3　*供试品制备*

2.3.1　姜天麻制备[13]　按“建昌帮”炮制规范炮制，打粉过 3 号筛，备用。

2.3.2　供试品制备　精密称取姜天麻粉末 1.00 g，置 50 mL 锥形瓶中，加入 20 mL 70% 乙醇溶液，摇匀，静置 30 min，称定重量，30 ℃超声 30 min，放冷，再称定重量，用 70% 乙醇溶液补足减失量，过滤，取续滤液 10 mL，挥去溶液，用水溶液（乙腈 - 水＝ 3∶97）溶解，定容置 25 mL 量瓶。取溶液适量，离心（15 000 r • min^{-1}、10 min），0.22 μm 滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.3.3　混合对照品的制备　吸取“2.2”项下各对照品天麻素 200 μL、天麻苷元 10 μL、对羟基苯甲酸 20 μL、巴利森苷 A 200 μL、巴利森苷 B 200 μL、巴利森苷 C 150 μL、巴利森苷 E 250 μL 加入 2 mL EP 管，高速离心后，过 0.22 μm 滤膜，即得混合对照品。

2.4　*方法学考察*

分别精密吸取混合对照品、供试品溶液各 2 μL，注入液相色谱仪测定。天麻素，天麻苷元，对羟基苯甲酸，巴利森苷 A、B、C、E 的保留时间分别为 2.91、4.74、6.81、7.07、11.46、9.39、10.03 min。混合对照品与供试品各成分分离度良好，见图 1。

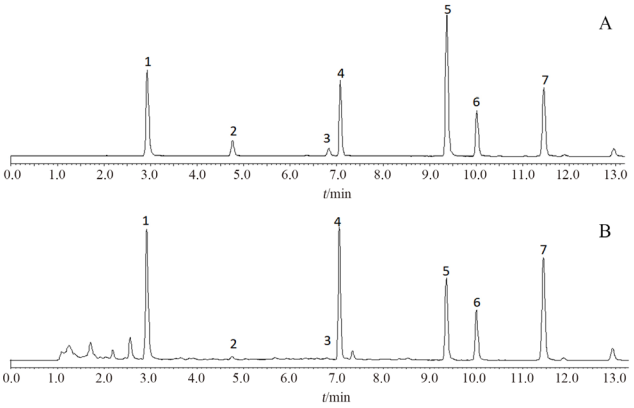


图 1　天麻对照品（A）和供试品溶液（B）

Fig 1　Gastrodia elata reference substance（A）and test solution（B）

1. 天麻素（gastrodin）；2. 天麻苷元（4-hydroxybenzyl alcohol）；3. 对羟基苯甲酸（*p*-hydroxybenzoic acid）；4. 巴利森苷 E（barrioside E）；5. 巴利森苷 B（barrioside B）；6. 巴利森苷 C（barrioside C）；7. 巴利森苷 A（barrioside A）

2.4.1　线性关系考察　吸取“2.3.3”项下混合对照品溶液，逐级稀释并进样测定，结果见表 1。

表 1　各成分线性关系考察结果

Tab 1　Linearity of each component

化合物	回归方程	R^2	线性范围 /（mg • g^{-1}）
天麻素	$Y = 1.000\times10^6X - 9.767\times10^3$	0.9996	0.0100 ～ 0.3000
天麻苷元	$Y = 1.968\times10^5X - 2.206\times10^3$	0.9996	0.0010 ～ 0.0300
对羟基苯甲酸	$Y = 9.644\times10^4X + 7.161\times10^3$	0.9997	0.0010 ～ 0.0300
巴利森苷 A	$Y = 8.690\times10^5X + 7.996\times10^3$	0.9999	0.0493 ～ 0.2959
巴利森苷 B	$Y = 2.000\times10^6X - 1.792\times10^4$	1.000	0.0965 ～ 0.5790
巴利森苷 C	$Y = 5.276\times10^5X + 6.790\times10^3$	0.9999	0.0296 ～ 0.1774
巴利森苷 E	$Y = 7.581\times10^5X - 400.7$	1.000	0.0539 ～ 0.3233

2.4.2　精密度考察　取混合对照品重复进样 6 次，进行精密度试验。天麻素、天麻苷元和对羟基苯甲酸的峰面积 *RSD* 分别为 0.68%、1.1%、1.3%；巴利森苷 A、B、C、E 的峰面积 *RSD* 分别为 0.19%、0.22%、0.46%、0.37%。

2.4.3　稳定性考察　于 1、4、8、12、16、24 h 测定同一份供试品溶液（7 号样品）的稳定性，得天麻素、天麻苷元和对羟基苯甲酸的峰面积 *RSD* 分别为 0.27%、2.82%、3.0%；巴利森苷 A、B、C、E 的峰面积 *RSD* 分别为 1.3%、0.57%、2.1%、0.37%。

2.4.4　重复性考察　精密称取同一炮制方法下姜天麻粉末 1.00 g，依“2.3.2”项下方法（7 号样品）制备，分别平行制备 6 份。分别进样 2 μL，测定峰面积，得天麻素、天麻苷元和对羟基苯甲酸的峰面积 *RSD* 分别为 2.8%、2.0%、2.8%；巴利森苷 A、B、C、E 的峰面积 *RSD* 分别为 2.4%、2.8%、1.4%、1.5%。

2.4.5　加样回收考察　精密量取已测定的供试品溶液 3 份，每份 1 mL，分别按供试品的 80%、100%、120% 加入混合对照品溶液（天麻素 0.100 mg • mL^{-1}，天麻苷元 0.010 mg • mL^{-1}，对羟基苯甲酸 0.010 mg • mL，巴利森苷 A、B、C、E 分别为 0.099、0.193、0.059、0.108 mg • mL^{-1}）每个平行 3 份，进样测定各指标含量，测得天麻素、天麻苷元和对羟基苯甲酸平均回收率

（*RSD*）分别为 103.12%（1.8%）、98.67%（2.8%）、100.34%（1.8%）。巴利森苷 A、B、C、E 平均回收率（*RSD*）分别为 101.56%（3.0%）、104.65%（1.8%）、99.13%（2.4%）、102.43%（2.5%）。

2.5　提取工艺单因素考察

由于天麻中巴利森苷类成分具有热不稳定性 [15]。因此，选择适宜的提取溶媒、提取时间和提取温度是提高该类成分得率的主要因素。本研究选择提取溶媒、提取时间、超声温度、提取时间、料液比、粒径条件进行考察。

称取姜天麻粉末 1.0000 g 5 份，固定其他条件不变，分别考察不同提取溶剂（水和不同浓度乙醇）、超声温度（20、30、40、50、60 ℃）、提取时间（20、30、40、50、60 min）、料液比（1∶15、1∶20、1∶25、1∶30、1∶35）、粒径（过 10、24、50、60、80 目筛）对提取效率的影响，结果如图 2 所示。

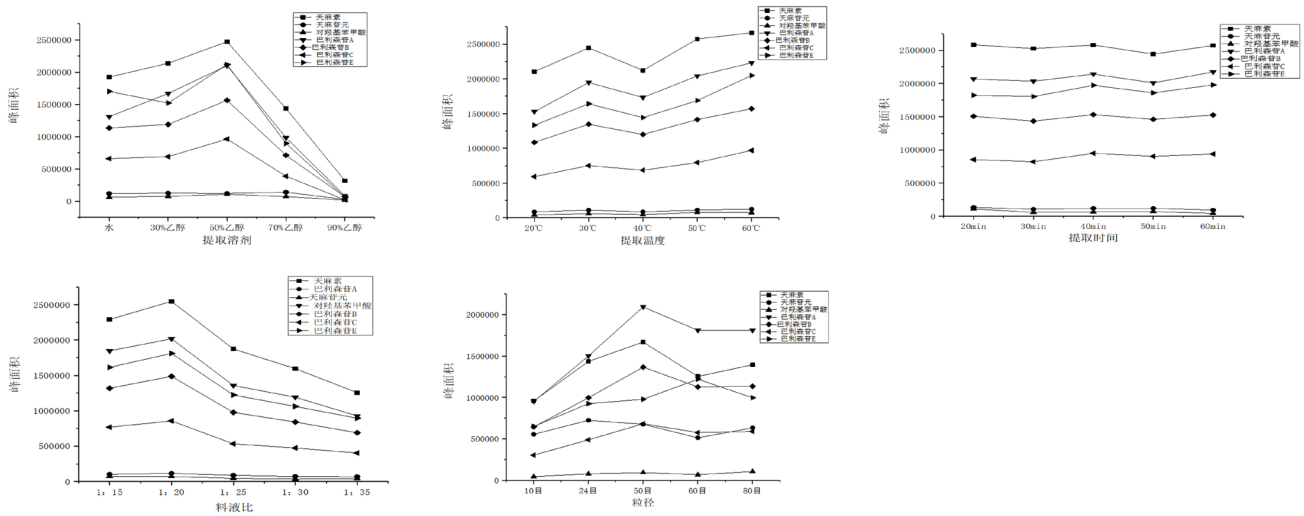


图 2　不同提取条件对提取效率的影响

Fig 2　Effect of different extraction conditions on extraction efficiency

2.6　响应曲面试验

2.6.1　试验设计　根据“2.5”项下单因素试验考察结果，设计因素水平见表 2。

表 2　响应面因素及水平

Tab 2　Factor and level of response surface

水平	提取溶剂（A）/%	提取温度（B）/℃	料液比（C）/（g•mL^{-1}）
1	30	40	1∶25
2	50	60	1∶20
3	70	80	1∶15

2.6.2　试验结果　通过天麻目前研究进展及药理作用权重分配，确定综合评分（Z）＝天麻素×30%＋天麻苷元×20%＋对羟基苯甲酸×10%＋巴利森苷 A×10%＋巴利森苷 B×10%＋巴利森苷 C×10%＋巴利森苷 E×10%。设计 3 因素 3 水平试验设计方案，应用 Design-Expert V8.0.6 软件，中心组合设计 Box-Behnken 分析处理，得到 3 因素 3 水平共 17 组试验。试验方案分析及结果见表 3。

2.6.3　响应面分析　响应曲面 3D 图（见图 3）分析可得，倾斜度越高说明两因素交互作用越明显，并且颜色越深变化加剧 [16]。由 3D 响应图可知溶剂与温度、料液比交互作用显著，响应面存在极值，由等高图可得提取温度对综合得分的影响大于提取溶剂与料液比。

最后得到姜制天麻最佳工艺条件为 70% 乙醇提取溶剂，提取温度 78.49 ℃，料液比 1∶15，天麻素，天麻苷元，对羟基苯甲酸及巴利森苷 A、B、C、E 和综合得分预测值分别为 0.2641、0.0066、0.0107、0.2759、0.11676、0.1170、0.3294、1.7599 mg•g^{-1}。基于此，结合单因素和实际生产考虑，姜制天麻工艺条件可为清蒸切片润制，70% 乙醇、80 ℃、1∶15 超声提取 40 min。

2.6.4　验证试验　精密称取 1.0000 g 姜天麻 3 份，按照优选最佳工艺进行提取，结果平均综合评分为 1.8083 与模型预测值（1.7599）相近，相对误差小于 5%。

3　讨论

课题组前期相继开展了姜天麻炮制前后主成分差异、药效等方面研究 [17-19]，证实了天麻经姜制后可使其药效增强，并与炮制后的变化成分密切相关，但未就姜天麻有效成分提取工艺开展研究。而响应曲面法依据试验中的随机误差，可连

表 3　响应面设计方案及试验结果

Tab 3　Response surface design

No.	A. 溶剂 /%	B. 温度 /℃	C. 料液比 /（g • mL $^{-1}$）	天麻素 /（mg • g $^{-1}$）	天麻苷元 /（mg•g $^{-1}$）	对羟基苯甲酸 /（mg • g $^{-1}$）	巴利森苷 A/（mg • g $^{-1}$）	巴利森苷 B/（mg • g $^{-1}$）	巴利森苷 C/（mg • g $^{-1}$）	巴利森苷 E/（mg • g $^{-1}$）	综合评分
1	50	60	0.54	0.234	0.003	0.006	0.231	0.182	0.105	0.257	1.493
2	30	80	0.54	0.202	0.005	0.007	0.165	0.117	0.079	0.249	1.237
3	70	40	0.54	0.141	0.003	0.003	0.117	0.075	0.051	0.132	0.809
4	30	40	0.54	0.1996	0.003	0.008	0.161	0.114	0.073	0.241	1.204
5	50	40	0.40	0.138	0.002	0.002	0.127	0.080	0.054	0.157	0.839
6	50	60	0.54	0.276	0.004	0.015	0.262	0.102	0.107	0.205	1.530
7	30	60	0.67	0.238	0.007	0.007	0.198	0.135	0.092	0.289	1.453
8	30	40	0.40	0.188	0.004	0.015	0.184	0.119	0.084	0.244	1.219
9	70	60	0.40	0.115	0.002	0.001	0.104	0.062	0.039	0.103	0.661
10	50	80	0.40	0.153	0.003	0.005	0.137	0.088	0.061	0.178	0.938
11	50	60	0.54	0.245	0.003	0.014	0.233	0.185	0.105	0.269	1.549
12	50	60	0.54	0.297	0.003	0.015	0.288	0.119	0.108	0.231	1.662
13	50	80	0.67	0.278	0.006	0.008	0.269	0.165	0.116	0.333	1.740
14	50	40	0.67	0.225	0.006	0.007	0.207	0.131	0.087	0.261	1.382
15	50	60	0.54	0.219	0.005	0.007	0.283	0.131	0.109	0.262	1.460
16	70	80	0.54	0.247	0.005	0.011	0.233	0.146	0.105	0.283	1.533
17	70	60	0.67	0.229	0.005	0.005	0.218	0.125	0.084	0.225	1.359

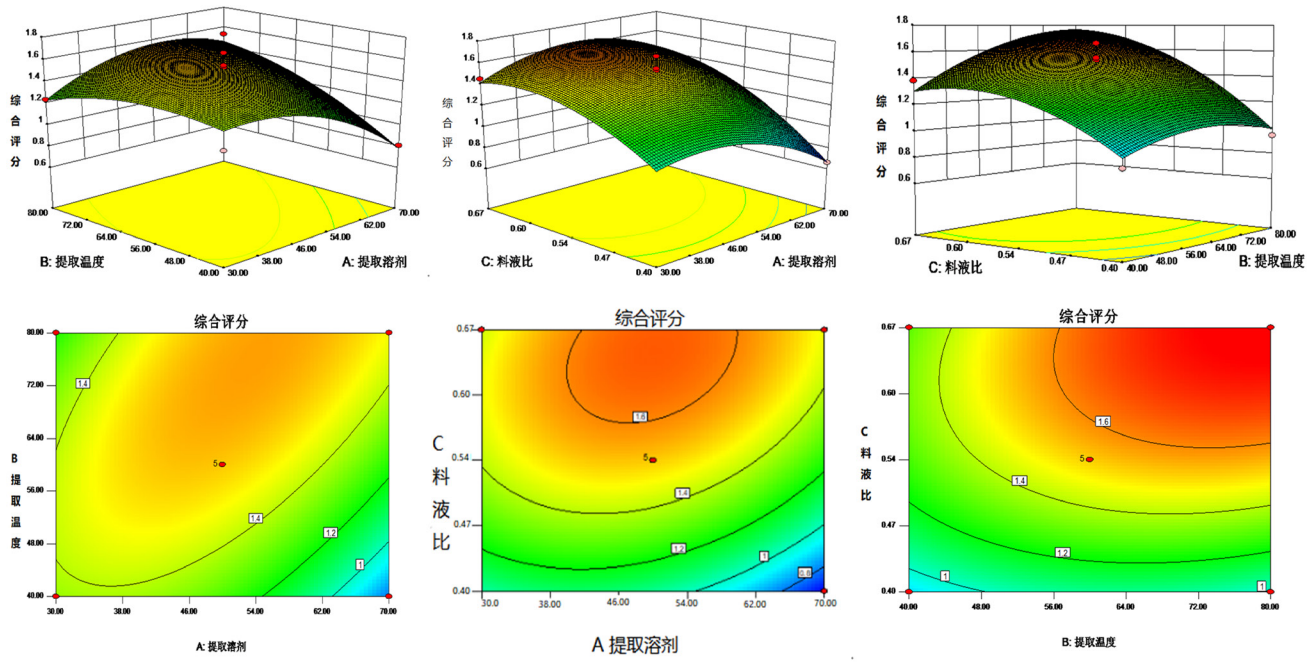


图 3　提取溶剂（A）、提取温度（B）、料液比（C）交互作用

Fig 3　Interaction of extraction solvent（A），extraction temperature（B）and solid-liquid ratio（C）

续对试验中各个水平进行分析，能用相对较少的试验次数，对试验因素水平中的交互作用做较全面的分析 [20-22]。因此，本试验采用响应曲面设计法对姜天麻提取工艺进行优选。

对天麻化学成分研究，常选择天麻素和天麻苷元为主，其工艺优化也多局限于单个成分。但随着研究的深入，天麻中酚类成分更多地被证实为其入血效应成分。如巴利森苷 A、B 分别具有改善学习记忆力、抗哮喘等作用 [23-25]。为此，本试验在考察提取时间、提取温度、料液比、提取溶剂、提取粒径等单因素试验的基础上，选取提取溶剂、料液比和提取温度的交互作用进行响应曲面试验，以天麻素，天麻苷元，对羟基苯甲酸，巴利森苷 A、B、C、E 为指标进行综合评价，

表 4　差分析

Tab 4　Variance analysis

来源	平方和	自由度	离差平方和	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	1.51	9	0.17	12.29	0.001	**
A. 提取溶剂	0.05	1	0.05	4.05	0.084	
B. 提取温度	0.15	1	0.15	11.27	0.012	*
C. 料液比	0.61	1	0.61	44.83	＜ 0.001	**
AB	0.18	1	0.18	12.96	0.008	**
AC	0.03	1	0.03	2.56	0.153	
BC	0.03	1	0.03	2.85	0.135	
A^2	0.17	1	0.17	12.2	0.010	*
B^2	0.04	1	0.04	3.07	0.123	
C^2	0.12	1	0.12	9.00	0.020	*
残差	0.09	7	0.01			
失拟项	0.07	3	0.02	4.03	0.105	
纯误差	0.02	4	0.01			
总和	1.6	16				

注（Note）：$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$R^2 = 0.9405$。

建立了天麻 7 种主要成分 UPLC 含量测定方法，确定“建昌帮”姜天麻最佳提取工艺，且综合评价优化工艺稳定可行，响应模型拟合度良好，达到工艺优化目的。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：59-60.

[2] 尚志钧校注 . 神农本草经 [M]. 北京：学苑出版社，2008：31.

[3] 陆春云，聂鲜钰，林立，等 . 不同贮藏时间对天麻药用成分含量的影响 [J]. 时珍国医国药，2020，31（2）：315-317.

[4] 清 • 陈复正 . 幼幼集成 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1938：73.

[5] 上官贤 . “建昌帮”四味中药的传统炮制法 [J]. 中成药研究，1985（4）：19-20.

[6] 江西省食品药品监督管理局 . 江西省中药饮片炮制规范 [M]. 上海：上海科技出版社，2008：29.

[7] 广东省食品药品监督管理局 . 广东省中药饮片炮制规范 [M]. 广州：广东科技出版社，2011：26.

[8] 福建省食品药品监督管理局 . 福建省中药饮片炮制规范 [S]. 福建：福建科学技术出版社，2012：39.

[9] Ye X，Wang Y，Zhao J，et al. Identification and characterization of key chemical constituents in processed Gastrodia elata using UHPLC-MS/MS and chemometric methods [J]. J Anal Methods Chem，2019，doi:10.1155/2019/4396201.

[10] 李晓芳，叶伟，叶喜德，等 . 天麻姜制前后对小鼠宏观行为和脑组织形态结构的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育，2019，17（21）：97-100.

[11] 张霞，高慧，叶喜德，等 . 江西“建昌帮”姜天麻对硝酸甘油诱导的大鼠偏头痛的作用 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（8）：887-891.

[12] 左雅敏，李琛，袁乐永，等 . 基于血清代谢组学的天麻炮制前后对小鼠生物学效应影响 [J]. 湖北医药学院学报，2020，39（2）：101-107.

[13] 叶喜德，彭巧珍，李旭冉，等 . 正交设计法优选建昌帮姜制天麻炮制工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2018，29（2）：347-349.

[14] 付伟，杨群，薄雯映，等 . 基于 Box-Behnken 法的天麻冻干工艺优化研究 [J]. 中南药学，2021，19（1）：20-24.

[15] 田紫平，肖慧，冯舒涵，等 . 天麻有效成分巴利森苷的降解规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（23）：18-21.

[16] 王勃，张晓燕，吕辰子，等 . 多指标 - 响应曲面法优选酒炖熟地黄最佳炮制工艺 [J]. 中草药，2019，50（9）：2065-2073.

[17] 谢宇璐，叶慧，叶喜德，等 . 基于网络药理学的建昌帮姜天麻对偏头痛作用机制研究 [J]. 江西中医药大学学报，2021，33（2）：63-66.

[18] 张霞，高慧，叶喜德，等 . 建昌帮姜天麻炮制前后挥发性成分差异的气相色谱 - 质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药，2021，32（2）：336-339.

[19] 毕梦非，张荣珍，王亚君 . 定眩颗粒联合天麻素治疗椎基底动脉供血不足的效果 [J]. 中国医药导报，2021，18（17）：94-97.

[20] 杨玉军，孙爱萍，刘琪，等 . 天麻钩藤合剂质量标准的研究 [J]. 中南药学，2018，16（2）：228-232.

[21] 沈华，管红梅，钟燕，等 . 草果酚酸的提取工艺优化 [J]. 中国药房，2021，32（14）：1698-1702.

[22] 李杨，吴慧，马丽媛，等 . 基于响应曲面法的玉米粉复合酶解工艺优化研究 [J]. 粮食与油脂，2021，34（7）：123-127.

[23] 刘海艳，冯斌，王济，等 . 天麻素对抑郁症模型小鼠抑郁行为及其相关细胞因子表达的影响 [J]. 中南药学，2018，16（2）：166-170.

[24] 琚明亮，陆颖，赵静，等 . 天麻钩藤饮加减治疗阿立哌唑所致锥体外系不良反应的临床研究 [J]. 中医药导报，2021，27（3）：73-78.

[25] 袁晶，焦福智，刘欣，等 . 天麻钩藤饮治疗 H 型高血压的 Meta 分析 [J]. 世界中医药，2021，16（14）：2129-2137.

（收稿日期：2021-09-01；修回日期：2021-10-21）

藤石松乙酸乙酯部位的化学成分研究

姚晓长[1]，蒋梅香[2*]，刘阳[1]，邹振兴[3]，谭桂山[1, 3]，李静[1*]（1. 中南大学湘雅医院药学部，长沙 410008；2. 湖南中医药高等专科学校，湖南 株洲 412012；3. 中南大学湘雅药学院，长沙 410013）

摘要：目的 研究藤石松的化学成分。**方法** 藤石松干燥全草用 75% 乙醇提取，所得流浸膏加 3% 酒石酸水溶液分散后，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取，将所得的乙酸乙酯部分采用硅胶、ODS、聚酰胺及半制备 HPLC 等方法进行分离，根据化合物的理化性质和波谱数据进行结构鉴定。**结果** 分离得到 10 个化合物，分别鉴定为呋喃甲醛（**1**）、富马酸单甲酯（**2**）、二氢阿魏酸甲酯（**3**）、二氢阿魏酸乙酯（**4**）、咖啡酸乙酯（**5**）、5，7- 二羟基 -2- 甲基色原酮（**6**）、脱落酸（**7**）、苔色酸乙酯（**8**）、4- 甲氧基苯甲酸（**9**）、香草酸（**10**）。**结论** 化合物 **1** ～ **10** 均为首次从藤石松属植物中分离得到。

关键词：藤石松；化学成分；分离鉴定
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2536-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.011

Chemical constituents of ethyl acetate extract from *Lycopodiastrum casuarinoides*

YAO Xiao-chang[1], JIANG Mei-xiang[2*], LIU Yang[1], ZOU Zhen-xing[3], TAN Gui-shan[1, 3], LI Jing[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 2. *Hunan Traditional Chinese Medical College*, *Zhuzhou Hunan* 412012; 3. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from *Lycopodiastrum casuarinoides*. **Methods** The whole dry grass of *Lycopodiastrum casuarinoides* was extracted with 75% ethanol, and the liquid extract was suspended in 3% tartaric acid aqueous solution and extracted with petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol, respectively. The ethyl acetate extract was isolated and purified by silica, ODS, polyamide and pre-HPLC. The structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. **Results** Ten compounds were isolated and identified as furfural (**1**), monomethyl fumarate (**2**), dihydroferulic acid methyl ester (**3**), dihydroferulic acid ethyl ester (**4**), caffeic acid ethyl ester (**5**), 5, 7-dihydroxy-2-methyl chromone (**6**), abscisic acid (**7**), ethyl orsellinate (**8**), 4-methoxybenzoic acid (**9**), and vanillic acid (**10**). **Conclusion** Compounds **1** — **10** have been isolated from the genus *Lycopodiastrum* for the first time.

Key words: *Lycopodiastrum casuarinoides*; chemical constituent; isolation and identification

石松科（Lycopodiaceae）植物为蕨类植物门石松纲石松目植物，可分为 3 个亚科，共 16 属，全世界范围内分布大约有 388 种，为温带和亚热带气候特有植物，大量存在于针叶林、山区和沼泽地 [1]。在我国共有 6 属 14 种，分别为石松属、拟小石松属、小石松属、垂穗石松属、扁枝石松属和藤石松属 [2]。藤石松 [*Lycopodiastrum casuarinoides*（Spring）Holub] 为藤石松属的单种属植物，主要分布于我国江西、湖南、四川、广西、云南等地，用于风湿骨痛、关节炎、跌打损伤等疾病的治疗 [2]。

基金项目：湖南省教育厅科学研究项目（No.19C1441）。
作者简介：姚晓长，男，主管药师，主要从事中药化学与药物临床试验，E-mail：172679339@qq.com *通信作者：蒋梅香，女，硕士，副教授，主要从事天然药物活性成分研究，E-mail：55870782@qq.com；李静，男，博士后，硕士研究生导师，主要从事天然药物活性成分研究，E-mail：lijingliyun@163.com

既往文献分析表明，藤石松中富含与阿尔茨海默病治疗药物石杉碱甲相同类型的石松生物碱 [3-7]，其生物活性研究亦多以胆碱酯酶抑制活性 [4-5] 为主，偶见少量抗肿瘤 [6-7]、抗炎 [8-9] 等研究。

目前，藤石松中其他类型的化学成分报道较少，本课题组从中分离得到除石松生物碱类外的萜类、色原酮类和脂肪族类等化合物，且药理实验表明石松生物碱类、萜类和脂肪族类化合物均具有胆碱酯酶抑制活性 [5, 10-11]，这说明藤石松的胆碱酯酶抑制活性可能与植物中的多种化学成分相关联。

为进一步研究藤石松化学成分的多样性与生物活性的关联，对藤石松的化学成分进行系统研究，从 75% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分中分离得到 10 个非生物碱类化合物，且化合物 **1** ～ **10**（结构式见图 1）均为首次从藤石松属植物中分离得到。

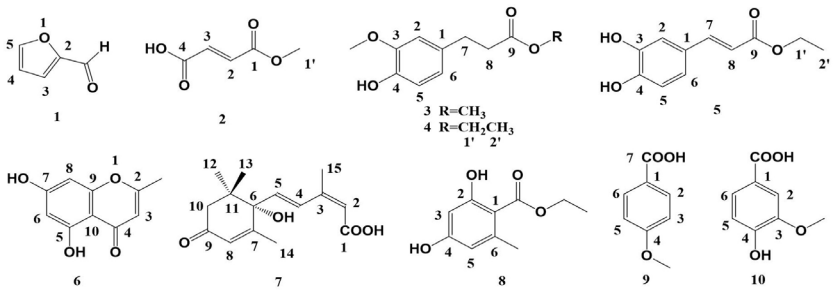


图 1　藤石松中化合物 **1** ～ **10** 的结构

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **10** from *Lycopodiastrum casuarinoides*

1　材料

硅胶（200 ～ 300 目，青岛海洋化工厂）；聚酰胺（80 ～ 100 目，国药集团化学试剂有限公司）；ODS 柱色谱（20 ～ 45 μm，日本 Tokyo）；半制备型 HPLC 色谱（美国 Agilent 1260）；制备色谱柱（北京绿百草科技发展有限公司 SilGreen C_{18} 色谱柱）；高分辨质谱仪（美国 Agilent 6540 Q-TOF）；Avance-400、500 型核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、二氯甲烷、甲醇均为分析纯（成都科龙化工试剂厂）；乙腈为色谱纯（美国 Sigma 公司）。

藤石松全草采集于湖南省宜章县和花垣县，经厦门大学李振基教授鉴定为石松科藤石松属植物藤石松 [*Lycopodiastrum casuarinoides*（Spring）Holub] 的干燥全草。样本（No. 20160712）存放于中南大学湘雅药学院药物化学系。

2　提取与分离

藤石松干燥全草 20 kg，用 75% 乙醇回流提取 3 次，每次 2 h，提取液浓缩成流浸膏 1.8 kg。流浸膏加 3% 的酒石酸水溶液混悬至约 20 L，分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取，得到石油醚萃取物（37 g）、乙酸乙酯萃取物（248 g）和正丁醇萃取物（1.2 kg）。

乙酸乙酯萃取物（248 g）经硅胶柱层析，用二氯甲烷 - 甲醇（100∶0 ～ 0∶100，*V/V*）梯度洗脱，薄层色谱检测合并后得到 8 个组分（Fr. A ～ H）。Fr. B（20.8 g）经硅胶柱色谱，以二氯甲烷 - 甲醇（150∶1 ～ 60∶1，*V/V*）梯度洗脱，薄层检测合并得到 Fr. B1 ～ B6。Fr. B1（4.1 g）经硅胶柱色谱，以石油醚 - 乙酸乙酯（30∶1 ～ 1∶5，*V/V*）梯度洗脱，得到化合物 **1**（2.9 mg）。Fr. B2（5.7 g）经硅胶柱色谱，以石油醚 - 乙酸乙酯（15∶1 ～ 1∶5，*V/V*）梯度洗脱，薄层检测合并得到 5 个组分 Fr. B2-1 ～ Fr. B2-5。Fr. B2-1 经硅胶柱色谱，以石油醚 - 乙酸乙酯（2∶1 ～ 1∶5，*V/V*）梯度洗脱，再经 ODS 柱色谱，以甲醇 - 水（70∶30 ～ 95∶5，*V/V*）梯度洗脱，得到化合物 **2**（6.2 mg）。Fr. B2-2 经聚酰胺柱色谱，以甲醇 - 水（3∶7 ～ 9∶1，*V/V*）梯度洗脱，再经半制备 HPLC，以乙腈 - 水（10∶90 ～ 85∶15，*V/V*，60 min）梯度洗脱，得到化合物 **3**（8.5 mg）、**4**（9.2 mg）和 **5**（12.2 mg）。Fr. B3（1.9 g）经 ODS 柱色谱，以甲醇 - 水（3∶7 ～ 8∶2，*V/V*）梯度洗脱，再经半制备 HPLC，以乙腈 - 水（5∶95 ～ 65∶35，*V/V*，60 min）梯度洗脱，得到化合物 **6**（3.3 mg）、**7**（2.5 mg）和 **8**（4.8 mg）。Fr. B4（2.6 g）经 ODS 柱色谱，以甲醇 - 水（2∶8 ～ 8∶2，*V/V*）梯度洗脱后，再经半制备 HPLC，以乙腈 - 水（5∶95 ～ 55∶45，*V/V*，60 min）梯度洗脱，得到化合物 **9**（5.1 mg）和 **10**（7.3 mg）（分离流程见图 2）。

3　结构鉴定

化合物 **1**：无色油状液体，易溶于甲醇。HR-ESI-MS *m/z*：97.0286 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.07（1H，d，J = 3.6 Hz，H-3），6.53（1H，dd，J = 3.6，2.0 Hz，H-4），

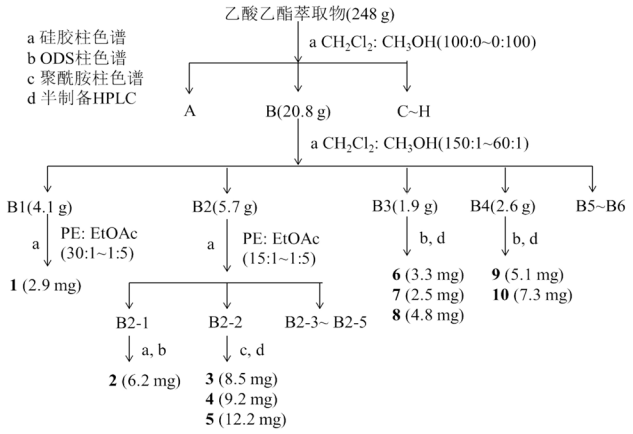


图 2　藤石松乙酸乙酯萃取物的分离流程

Fig 2　Isolation of ethyl acetate extract from *Lycopodiastrum casuarinoides*

7.63（1H，d，J = 2.0 Hz，H-5）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：144.9（C-2），115.2（C-3），111.1（C-4），148.1（C-5），165.1（CHO）。以上数据与文献[12]基本一致，鉴定化合物 **1** 为呋喃甲醛（furfural）。

化合物 **2**：白色粉末，易溶于甲醇。HR-ESI-MS *m/z*：131.0344 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.76（1H，d，J = 15.8 Hz，H-2），6.83（1H，d，J = 15.8 Hz，H-3），3.80（3H，s，OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：166.3（C-1），131.7（C-2），135.4（C-3），165.8（C-4），51.2（C-1'）。以上数据与文献[13]基本一致，鉴定化合物 **2** 为富马酸单甲酯（monomethyl fumarate）。

化合物 **3**：浅黄色粉末，易溶于甲醇、氯仿。HR-ESI-MS *m/z*：211.0978 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：2.63（2H，t，J = 7.9 Hz，H-7），2.90（2H，t，J = 7.7 Hz，H-8），3.70（3H，s，9-OCH_3），3.90（3H，s，3-OCH_3），6.66（1H，dd，J = 8.0，2.0 Hz，H-6），6.69（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2），6.85（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：132.5（C-1），110.9（C-2），146.4（C-3），144.0（C-4），114.3（C-5），120.8（C-6），30.7（C-7），36.1（C-8），173.4（C-9），51.6（3-OCH_3），55.9（9-OCH_3）。以上数据与文献[14]基本一致，鉴定化合物 **3** 为二氢阿魏酸甲酯（dihydroferulic acid methyl ester）。

化合物 **4**：浅黄色粉末，易溶于甲醇、氯仿。HR-ESI-MS *m/z*：225.1135 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：1.26（3H，t，J = 7.1 Hz，H-2'），2.61（2H，t，J = 7.9 Hz，H-7），2.90（2H，t，J = 7.7 Hz，H-8），3.90（3H，s，3-OCH_3），4.15（2H，q，J = 7.1 Hz，H-1'），6.72（1H，dd，J = 8.4，1.6 Hz，H-6），6.73（1H，d，J = 1.6 Hz，H-2），6.85（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：132.5（C-1），110.9（C-2），146.4（C-3），144.0（C-4），114.3（C-5），120.9（C-6），30.7（C-7），36.4（C-8），173.0（C-9），55.9（3-OCH_3），60.4（C-1'），14.2（C-2'）。以上数据与文献[15]基本一致，鉴定化合物 **4** 为二氢阿魏酸乙酯（dihydroferulic acid ethyl ester）。

化合物 **5**：白色粉末，易溶于甲醇、氯仿。HR-ESI-MS *m/z*：209.0814 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.55（1H，d，J = 15.7 Hz，H-7），7.06（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2），6.93（1H，dd，J = 8.0、2.0 Hz，H-6），6.78（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5），6.24（1H，d，J = 15.7 Hz，H-8），4.23（H，q，J = 7.0 Hz，H-1'），1.33（3H，t，J = 7.0 Hz，H-2'）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：126.2（C-1），113.6（C-2），145.4（C-3），144.0（C-4），115.1（C-5），121.5（C-6），145.4（C-7），115.1（C-8），168.0（C-9），60.0（C-1'），13.2（C-2'）。以上数据与文献[16]基本一致，鉴定化合物 **5** 为咖啡酸乙酯（caffeic acid ethyl ester）。

化合物 **6**：黄色针状晶体，易溶于二甲基亚砜。HR-ESI-MS *m/z*：193.0501 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.98（1H，s，H-3），6.21（1H，s，H-6），6.34（1H，s，H-8），1.95（3H，s，2-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：156.7（C-2），110.2（C-3），181.9（C-4），162.0（C-5），99.0（C-6），165.0（C-7），93.7（C-8），158.6（C-9），105.1（C-10），22.2（CH_3）。以上数据与文献[17]基本一致，鉴定化合物 **6** 为 5，7-二羟基 -2- 甲基色原酮（5，7-dihydroxy-2-methyl chromone）。

化合物 **7**：白色粉末，易溶于甲醇。HR-ESI-MS *m/z*：265.1446 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.74（1H，d，J = 16.2 Hz，H-4），6.16（1H，d，J = 16.2 Hz，H-5），5.93（1H，s，H-8），5.80（1H，s，H-2），2.54（1H，d，J = 16.8 Hz，H-10a），2.19（1H，d，J = 16.8 Hz，H-10b），2.01（3H，s，H-15），1.95（3H，s，H-14），1.08（3H，s，H-13），1.05（3H，s，H-12）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：170.9（C-1），121.2（C-2），165.5（C-3），128.5（C-4），134.8（C-5），79.2（C-6），145.6（C-7），126.0（C-8），199.7（C-9），49.3（C-10），41.4（C-11），18.3（C-12），22.2（C-13），23.2（C-14），19.6（C-15）。以上数据与文献[18]基本一致，鉴定化合物 **7** 为脱落酸（abscisic acid）。

化合物 **8**：白色固体，易溶于氯仿。HR-ESI-MS *m/z*：197.0814 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：11.81（1H，s，OH），6.29（1H，d，J = 2.5 Hz，H-3），6.24（1H，d，J = 2.5 Hz，H-5），4.42（2H，q，J = 7.2 Hz，OCH_2CH_3），2.50（3H，s，6-CH_3），1.44（3H，t，J = 7.1 Hz，OCH_2CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：105.9（C-1），165.4（C-2），101.3（C-3），160.1（C-4），111.2（C-5），144.0（C-6），171.6（C = O），61.3（OCH_2CH_3），14.2（OCH_2CH_3），24.3（6-CH_3）。以上数据与文献[19]基本一致，鉴定化合物 **8** 为苔色酸乙酯（ethyl orsellinate）。

化合物 **9**：白色粉末，易溶于氯仿、甲醇。HR-ESI-MS *m/z*：153.0552 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.89（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2，6），6.84（2H，d，J = 8.8 Hz，H-3，5），3.86（3H，s，4-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：120.6（C-1），131.3（C-2，6），114.8（C-3，5），162.4（C-4），170.5（C-7），50.8（OCH_3）。以上数据与文献[20]基本一致，鉴定化合物 **9** 为 4-甲氧基苯甲酸（4-methoxybenzoic acid）。

化合物 **10**：白色结晶，易溶于甲醇。HR-ESI-MS *m/z*：169.0473 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.57（1H，brs，H-2），7.59（1H，m，H-6），6.88（1H，d，J = 8.7 Hz，H-5），3.91（3H，s，OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：123.9（C-1），112.4（C-2），151.3（C-3），147.3（C-4），114.4（C-5），121.7（C-6），168.6（COOH），55.0（OCH_3）。以上数据与文献[21]基本一致，鉴定化合物 **10** 为香草酸（vanillic acid）。

4　讨论

本次研究从藤石松中分离得到 10 个非生物碱类化学成分，包括 1 个糠醛类（**1**）、1 个脂肪族类（**2**）、3 个苯丙素类（**3** ～ **5**）、1 个色原酮类（**6**）、1 个倍半萜类（**7**）、3 个简单芳香族类（**8** ～ **10**），经检索 PubMed、EBSCO-Medline、SciFinder 等数据库，确定化合物 **1** ～ **10** 均为首次从藤石松属植物中分离得到，丰富了藤石松的化学成分类型。

同时，通过文献调研发现，富马酸单甲酯（**2**）对牛奶酸败混合菌的生长具有较好的抑制作用[22]。咖啡酸乙酯（**5**）具有抗肿瘤活性[23]和较强的抗氧化和体外降血糖作用[24]。脱落酸（**7**）可改善或治疗炎症性肠病、糖尿病及动脉粥样硬化[25]。苔色酸乙酯（**8**）具有体外抗菌作用[26]。这些报道表明富马酸单甲酯（**2**）、咖啡酸乙酯（**5**）、脱落酸（**7**）和苔色酸乙酯（**8**）等有可能是藤石松发挥抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降血糖和抗炎等作用的活性成分，且与藤石松的镇痛消肿、跌打损伤等传统功效也可能存在关联性。

从藤石松中分离得到多种类型的化学成分，再进行药理实验或者对其进行生物活性文献调研，为进一步研究藤石松化学成分的多样性与生物活性的关联性奠定了基础，也有利于阐明藤石松传统功效的物质基础。

参考文献

[1] Schuettpelz E，Schneider H，Smith AR，et al. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns [J]. J Syst Evol，2016，54（6）：563-603.

[2] 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所 . 广西植物志第 6 卷蕨类植物 [M]. 南宁：广西科学技术出版社，2013：9-10.

[3] 王义坤，李静，翁俨玫，等 . 石松生物碱研究最新进展 [J]. 中南药学，2017，15（4）：459-466.

[4] Zhang DB，Chen JJ，Song QY，et al. Lycodine-type alkaloids from *Lycopodiastrum casuarinoides* and their acetylcholinesterase inhibitory activity [J]. Molecules，2014，19（7）：9999-10010.

[5] Liu Y，Xu PS，Ren Q，et al. Lycodine-type alkaloids from *Lycopodiastrum casuarinoides* and their cholinesterase inhibitory activities [J]. Fitoterapia，2018，130：203-209.

[6] Qu SM，Shan BH，Wang HT，et al. Lycodine type alkaloids from *Lycopodiastrum casuarinoides* with cytotoxic and cholinesterase inhibitory activities [J]. Fitoterapia，2018，131：86-90.

[7] Zhang HB，Hu J，Li JX，et al. Cytotoxic lycodine alkaloids from the aerial parts of *Lycopodiastrum casuarinoides* [J]. J Asian Nat Prod Res，2020，22（3）：217-224.

[8] 陈春林，邹一平 . 藤石松 microRNA 与硒对类风湿关节炎滑膜细胞凋亡的协同调控 [A]. 武汉：中国细胞生物学学会 2013 年全国学术大会，2013.

[9] Pan K，Xia X，Guo WH，et al. Suppressive effects of total alkaloids of *Lycopodiastrum casuarinoides* on adjuvant-induced arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol，2015，159：17-22.

[10] Liu Y，Li J，Li D，et al. Anti-cholinesterase activities of constituents isolated from *Lycopodiastrum casuarinoides* [J]. Fitoterapia，2019，139：104366.

[11] Liu Y，Yao XC，Li J，et al. New unsaturated fatty acids from the aerial parts of *Lycopodiastrum casuarinoides* [J]. Phytochem Lett，2021，41：55-60.

[12] 于德泉，杨峻山 . 分析化学手册第 7 分册核磁共振波谱分析 [M]. 北京：化学工业出版社，1999：111-112，603.

[13] 杨智，孙国太，邸迎彤，等 . 茶褐牛肝菌化学成分研究 [J]. 热带亚热带植物学报，2018，26（3）：99-106.

[14] 张春丽，徐国波，刘俊，等 . 太子参化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（7）：1132-1135，1164.

[15] 崔婉华，王彦志，李泽之 . 干姜化学成分的分离鉴定 [J]. 中药材，2018，41（2）：334-337.

[16] 黄美华，卢加文，张亚梅，等 . 地黄连化学成分研究 [J]. 中药材，2019，42（5）：1041-1044.
[17] 李阳，王旭，李壮壮，等 . 防风化学成分分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（15）：60-64.
[18] 温建辉，倪付勇，赵祎武，等 . 山银花化学成分研究 [J]. 中草药，2015，46（13）：30-33.
[19] Choudhary MI，Ali M，Wahab AT，et al. New antiglycation and enzyme inhibitors from *Parmotrema cooperi* [J]. Sci Chi Chem，2011，54（12）：1926-1931.
[20] 彭芳，熊亮，何育霖，等 . 益母草化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（21）：1775-1779.
[21] 冯卫生，王建超，何玉环，等 . 辛夷化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志，2015，50（24）：2103-2106.
[22] 刘倩 . 富马酸酯的合成及其抗菌活性研究 [D]. 广州：华南理工大学，2011.
[23] 盛丽 . 异叶败酱化学成分及其抗肿瘤活性和玉米须对Ⅱ型糖尿病小鼠降糖作用的研究 [D]. 合肥：安徽医科大学，2019.
[24] 罗丹 . 西蒙 1 号甘薯茎叶多酚降血糖作用及机制的研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2020.
[25] 张涵，劳兴珍，李海琦，等 . 脱落酸的药理功能及分子靶标的研究进展 [J]. 生物资源，2017，39（5）：322-327.
[26] 张海荣，王训华，穆守臣，等 . 老龙七中苔色酸乙酯的分离及体外抗菌活性研究 [J]. 海峡药学，2019，31（9）：31-34.

（收稿日期：2021-06-17；修回日期：2021-07-16）

柏子仁抗焦虑作用评价及机制探究

蒋征奎[1]，宁二娟[2]，王学方[2]，李晓[2]（1. 郑州大学附属肿瘤医院（河南省肿瘤医院），郑州 450003；2. 河南省植物天然产物开发工程技术研究中心，郑州 450002）

摘要：目的 探索柏子仁的抗焦虑作用及机制。**方法** 将 72 只雄性小鼠随机分为 6 组，分别为柏子仁高、中、低剂量组（400、200 和 100 mg • kg^{-1}），地西泮阳性药物组（1 mg • kg^{-1}），模型组和空白对照组，造模 21 d，造模第 2 周开始给药，连续给药 14 d，采用高架十字迷宫实验、旷场实验、孔板实验和明暗箱实验，对小鼠进行行为学测试。然后，采用酶联免疫法测定小鼠海马组织中 γ- 氨基丁酸（GABA）和谷氨酸（Glu）的水平。**结果** 与模型组比较，高剂量柏子仁给药组对各个模型组小鼠行为学（高架十字迷宫实验、旷场实验、孔板实验和明暗箱实验）改善明显（$P < 0.05$），表现出明显的抗焦虑作用，低剂量和中剂量柏子仁给药组，对各个模型组小鼠的行为学有一定的改善，但差异无统计学意义；高剂量组小鼠海马组织的 GABA 水平明显增加，而 Glu 水平显著降低（$P < 0.05$）。**结论** 柏子仁具有明显的抗焦虑作用，其作用机制可能与增加海马组织 GABA 的水平和降低 Glu 的水平有关。

关键词：柏子仁；抗焦虑；γ- 氨基丁酸；谷氨酸；作用机制
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2540-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.012

Anti-anxiety effect of *Platycladi semen* and related mechanism

JIANG Zheng-kui[1], NING Er-juan[2], WANG Xue-fang[2], LI Xiao[2] (1. *Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University*, *Henan Cancer Hospital*, *Zhengzhou* 450003; 2. *Henan Development Engineering Technology Center for Natural Plant Products* , *Zhengzhou* 450002)

Abstract: Objective To determine the anti-anxiety effect of *Platycladi semen* and its mechanism. **Methods** Totally 72 male mice were randomly divided into 6 groups: the high, medium and low dose of *Platycladi semen* groups (400, 200, and 100 mg • kg^{-1}), the diazepam positive group (1 mg • kg^{-1}), the model group, and the blank control group. At the second week of modeling, the mice were given behavioral tests, namely an elevated plus maze (EPM) test, open field test, hole board test, and light/dark box (LDB) test. After the experiments, the contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) and

基金项目：河南省科技攻关项目（No.152102110115）。
作者简介：蒋征奎，男，硕士，主管药师，主要从事中药质量标准与新药开发，E-mail：kui3456@163.com

glutamate in the hippocampus tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the model group, the high-dose *Platycladi semen* group improved the behaviors of mice (EPM test, open field test, hole board test and LDB test) in each model group with significant statistical differences ($P < 0.05$), and showed a significant anxiolytic effect. While the low-dose and medium-dose *Platycladi semen*, had some improvement on the behavior of mice in each model, but without statistical difference. The gamma-aminobutyric acid level in the hippocampus of the high dose group was increased and glutamate was declined, significantly different as compared with the model group. **Conclusion** *Platycladi semen* shows obvious anti-anxiety effects, whose mechanism may be related to increasing the level of GABA and decreasing the level of glutamate in the hippocampus.

Key words: *Platycladi semen*; anti-anxiety effect; gamma-aminobutyric acid; glutamate; mechanism

随着现代生活节奏的加快和各方面压力的增大，人群中的焦虑现象日益显著并影响深远。焦虑症是一种以持续和广泛焦虑情绪或反复发作的惊恐不安为主要特征的神经症[1]，常伴有心率加快、肌肉紧张、运动性不安、自主神经紊乱和睡眠障碍等表现[2-3]。世界卫生组织对包括我国在内的 28 个国家的 14 项流行病学研究结果表明，西方国家人群的焦虑症终身发病率为 13.6% ～ 28.8%，其中美国高达 28.7%，而我国为 2% ～ 4.7%[4]，女性的发病率高于男性。焦虑症已对人们的正常生活造成严重影响[5-6]，探寻和使用合理有效的治疗药物和手段已成为全球范围内的焦点。目前临床常用的抗焦虑药物主要为苯二氮䓬类药物，鉴于其药物依赖性及较大的不良反应，不建议长期使用；还有抗抑郁药物，如 5- 羟色胺再摄取抑制剂类和去甲肾上腺素再摄取的抑制剂类药物，也具有抗焦虑作用，但其胃肠道不良反应较大，临床使用受到很大的限制。

近年来，越来越多的抗焦虑研究聚焦于传统中医药，以期找到有效的抗焦虑症药物[7]。柏子仁为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis*（L.）Franco 的干燥成熟种仁，性平味甘，入心、肝、肾、大肠经，具有养肝宁心、益智安神、敛汗润燥的功效，广泛应用于治疗焦虑证的名方中[8-9]，现代药理研究表明柏子仁具有改善睡眠、镇静益智和神经保护等作用[10-12]。目前，关于柏子仁的研究多集中在化学成分与临床应用方面[13]，而对于其在抗焦虑方面的药效学机制研究较少。为此，本研究考察了柏子仁醇提物的抗焦虑作用并进行相关的作用机制探讨，以期为临床应用提供依据。

1　材料

1.1　仪器

BS-223S 电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；XR-XG201 高架十字迷宫、XR-XZ301 旷场箱和 XR-XB120 明暗箱实验系统（上海欣软信息科技有限公司）；超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；酶联免疫检测仪（美国伯乐公司）。

1.2　试药

柏子仁 [河南张仲景大药房股份有限公司，经河南大学药学院张保国教授鉴定为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis*（L.）Franco 的干燥成熟种仁]。地西泮（北京益民药业有限公司，批号：20170906，规格：2.5 mg/ 片）；γ- 氨基丁酸（GABA）试剂盒（批号：20180803）、谷氨酸（Glu）ELISA 试剂盒（上海西塘生物科技有限公司，批号：20180902）；其余试剂均为分析纯。

1.3　实验动物

SPF 级昆明种小鼠，雄性，体质量 18 ～ 22 g [河南省实验动物中心，许可证号 SCXK（豫）2016-0002]。

2　方法

2.1　柏子仁醇提物的制备

采用溶剂超声提取法提取柏子仁油：取柏子仁 100 g 粉碎后，加 4500 mL 95% 乙醇，80 ℃提取 55 min，浓缩，得残留物 31.4 g，4 ℃冰箱保存备用。

2.2　造模及给药

选取 72 只小鼠，随机分为 6 组，分别为柏子仁高、中、低剂量（400、200 和 100 mg•kg^{-1}）组，阳性药物组，模型组和空白对照组，每组 12 只。

行为学实验前，将小鼠饲养于昼夜循环正常的鼠笼中，控制室温为（20±2）℃。待小鼠自由摄食饮水 7 d 后，每日安抚 3 min，持续 3 d，以排除或减少无关刺激对实验过程和结果的影响。实验开始后，除空白对照组外，其余 5 组小鼠均以单只单笼的形式饲养，并于每日随机给予以下刺激中的 1 种：断食 24 h、断水 24 h、昼夜循环颠倒 24 h、夹尾 3 min、束缚 3 h、10 ℃冷水游泳

5 min、30 V 电压电击足底，电击 5 s 间歇 5 s，共进行 300 s，持续 21 d 的处理后建立焦虑模型[14]。

造模第 2 周开始，每日进行应激刺激前 1 h，柏子仁高、中、低剂量组分别灌胃给药柏子仁醇提物 400、200 和 100 mg·kg^{-1}，阳性药物组灌胃给予地西泮 1 mg·kg^{-1}，模型组和空白对照组每日灌胃给予等剂量的生理盐水，连续 14 d，末次给药 30 min 后进行行为学实验（包括高架十字迷宫实验、旷场实验、孔板实验和明暗箱实验等），实验时间段固定为每日 08：00 ～ 15：00，在每个实验之前使用 5% 乙醇清洁设备以排除可能的提示效应。在行为学实验结束后，将动物断头取脑，测定海马 GABA 及 Glu 的水平。受试药物用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液一起研磨混匀后给药，每日临用新配。

2.3 高架十字迷宫实验

高架十字迷宫由两个开臂（300 mm×50 mm）和两个闭臂（300 mm×50 mm）组成，实验测试前[15]将每只小鼠放入塑料盒中，自由行走 5 min 后，将其放置于十字迷宫中，闭臂的周围和尾端被 150 mm 高的围栏包围，开臂和闭臂通过中心区域（50 mm×50 mm）连接，使用时升高至离地高度 50 cm 中央平台的中心区域，使其面向开臂并自由活动。然后，采用计算机实时跟踪小鼠在高架上的活动范围和轨迹，记录其于 5 min 内进入开臂（open arm entry，OE）和闭臂的次数（close arm entry，CE）及在开臂与闭臂内的运动时间。以小鼠开臂进入次数与总入臂次数的百分率（percentage of entries to the open arms，OE%）及在开臂内运动时间与入臂的总时间百分率（percentage of entries to the close arms，OT%）作为抗焦虑作用评价的指标。

2.4 旷场实验

旷场实验考察动物总体的活动性和探究行为，在进行此项实验之前至少 12 h，小鼠不能接受任何应激[15]。旷场区域是由一个 250 mm×250 mm 的底面、四面 300 mm 的高壁构成。底部用标记笔分割成 16 个（40 mm×40 mm）相同大小的区域。测试开始时，将小鼠置于中央四格区域中，然后通过设备上方预先固定的摄像机监测 5 min 内小鼠在开场中的活动情况，并通过与摄像机连接的监视器记录小鼠的活动轨迹，进而分析小鼠直立次数、进入旷场中央区域的次数、停留时间及总路程等指标。

2.5 孔板实验

孔板实验于一个体积参数为 440 mm（长）×400 mm（宽）×270 mm（高）的木箱中进行，其底部 4 个孔的孔径均为 30 mm，厚 18 mm，每孔中心离最近壁的距离为 100 mm，孔板箱壁及每一孔周边都装有红外光电管，并与计算机相联，自动记录动物的钻头次数和钻头时间[16]。实验时，将小鼠放置于孔板中央，背对实验员进行考察。以动物两眼消失在洞中为一次钻头动作，记录 5 ～ 10 min 内小鼠的钻头次数及持续时间。

2.6 明暗箱实验

明暗箱实验于一个 400 mm（长）×400 mm（宽）×120 mm（高）的有机玻璃敞箱中进行。于其中央安装一个 100 mm（长）×100 mm（宽）×120 mm（高）的暗箱，构成另两对角的 L 形跑道（明箱），每个暗箱各有一个 35 mm×35 mm 的洞口与两侧的跑道相连[17]。装置上方装有电视扫描和摄像系统，由此观察小鼠的穿箱次数、在明箱滞留时间及运动活性。实验时，将小鼠一起置于明箱中央，背朝通道。然后，观察 5 min 内小鼠的活动情况并记录其于明箱中的停留时间和穿箱次数。每只小鼠考察完成后，用湿海绵将明暗箱彻底清洗并擦拭晾干，以排除残留气味对后期测试小鼠行为的影响。

2.7 小鼠海马组织内 GABA 和 Glu 水平测定[18]

在行为学实验结束后第 2 日，立即将实验动物断头处死，打开颅盖和脑膜，冰台上迅速分离海马组织，称重并置液氮中冷冻保存。实验时，切取约 100 mg 海马组织并放入盛有磷酸盐缓冲液的烧杯中，在冰浴条件下将其制成 10% 的匀浆液。将匀浆液转入离心管内，低温条件下 3000 r·min^{-1} 离心 15 min。弃去沉淀，取上清液，按照 ELISA 试剂盒的操作步骤于 450 nm 波长处检测各孔中 GABA 和 Glu 的吸光度（*OD*）值（实际样品 *OD* 值＝测得样品 *OD* 值－空白 *OD* 值），经绘制的标准曲线计算出相应的浓度，再根据稀释倍数，计算小鼠海马组织中 GABA 和 Glu 的含量。

2.8 统计学处理

所有实验数据以“均数 ± 标准差”的形式表示，采用 SPSS 22.0 统计软件进行组间的单因素方差分析（One-way ANOVA），$P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 柏子仁对焦虑症小鼠的高架十字迷宫实验结果

与空白对照组相比较，模型组小鼠进入开臂的停留时间和开臂进入次数百分率均显著降低（$P < 0.05$），表明造模成功。与模型组比较，不同给药剂量的柏子仁组小鼠进入开臂停留时间和开臂进入次数百分率均有所增加，且呈现一定的剂量相关性，表现出抗焦虑作用。结果见表 1。

3.2 柏子仁对焦虑小鼠的旷场实验结果

与空白对照组比较，模型组小鼠主要在旷场的四周活动，而在中心区域几乎没有活动，表明

表 1　小鼠高架十字迷宫实验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Tab 1　Elevated plus maze test for mice ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	剂量 /（mg·kg^{-1}）	开臂停留时间百分率（OE）/%	开臂进入次数百分率（OT）/%
柏子仁高剂量组	400	37.35±2.37*	39.62±3.77*
柏子仁中剂量组	200	31.25±1.38*	32.34±3.20*
柏子仁低剂量组	100	27.35±2.42	27.54±2.12
阳性药物组	1	41.03±2.42*	44.20±2.89*
模型组	—	25.32±1.98$^{\#}$	26.22±2.98$^{\#}$
空白对照组	—	53.46±2.90	56.78±1.98

注：与空白对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：*vs* the blank control group，$^{\#}P<0.05$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$.

小鼠的焦虑非常明显（$P<0.05$）。与模型组比较，小鼠在旷场中心区域的活动各给药组均有所增加，其中柏子仁高剂量组和阳性药物组有统计学意义（$P<0.05$），提示柏子仁在小鼠旷场实验中表现出抗焦虑作用（见表 2）。

3.3　柏子仁对焦虑小鼠的孔板实验结果

与空白对照组比较，模型组小鼠的钻头次数及钻头持续时间明显减少（$P<0.05$）。与模型组比较，小鼠钻头次数和钻头持续时间各给药组均增加，其中柏子仁高剂量组及阳性药物组有统计学意义（$P<0.05$），提示柏子仁在小鼠孔板实验中表现出抗焦虑作用（见表 3）。

表 2　小鼠旷场实验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Tab 2　Open field test for mice ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	剂量 /（mg·kg^{-1}）	总路径 /cm	中心区域停留时间 /s	中心区域进入次数 / 次	直立次数 / 次
柏子仁高剂量组	400	25 175.41±392.43*	24.82±1.31*	4.95±0.83*	25.45±2.12*
柏子仁中剂量组	200	21 742.55±338.75	20.78±1.15	3.27±1.14	21.08±1.93
柏子仁低剂量组	100	18 978.45±253.24	18.42±1.45	2.98±1.29	20.89±2.18
阳性药物组	1	26 458.52±269.45*	26.17±2.43*	5.92±1.17*	28.79±2.04*
模型组	—	19 042.78±289.78	17.37±1.89	2.15±0.72	17.52±1.98
空白对照组	—	32 789.42±276.58	29.79±1.67	7.18±1.17	32.48±1.45

注：与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：*vs* the model group，$^{*}P<0.05$.

表 3　小鼠孔板实验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Tab 3　Hole board test for mice ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	剂量 /（mg•kg^{-1}）	钻头次数 / 次	钻头持续时间 /s
柏子仁高剂量组	400	43.25±1.77*	43.70±3.52*
柏子仁中剂量组	200	37.22±1.98	39.20±2.20
柏子仁低剂量组	100	33.45±2.17	36.35±3.05
阳性药物组	1	48.57±2.24*	50.74±2.85*
模型组	—	31.58±2.04$^{\#}$	35.54±2.54$^{\#}$
空白对照组	—	60.78±1.78	64.28±2.95

注：与空白对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：*vs* the blank control group，$^{\#}P<0.05$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$.

3.4　柏子仁对焦虑小鼠的明暗箱实验结果

与空白对照组比较，模型组小鼠在明箱中的停留时间及穿箱次数明显减少（$P<0.05$），表明造模成功；与模型组比较，各给药组小鼠在明暗箱中的停留时间和穿行次数均有明显增加，其中柏子仁高剂量组和阳性药物组差异有统计学意义（$P<0.05$）（见表 4）。

表 4　小鼠高明暗箱实验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Tab 4　Light/dark box test for mice ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	剂量 /（mg•kg^{-1}）	明箱停留时间 /s	穿箱次数 / 次
柏子仁高剂量组	400	90.53±6.52*	24.01±1.44*
柏子仁中剂量组	200	73.58±5.87	20.02±2.04
柏子仁低剂量组	100	68.97±4.87	18.95±1.67
阳性药物组	1	93.78±5.78*	26.62±2.76*
模型组	—	62.42±4.58$^{\#}$	17.91±2.12$^{\#}$
空白对照组	—	117.58±6.78	30.42±4.02

注：与空白对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：*vs* the blank control group，$^{\#}P<0.05$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$.

表 5　小鼠海马组织中 GABA 和 Glu 的测定结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

Tab 5　Content of GABA and Glu in the hippocampal tissue in the mice ($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	剂量 /（mg·kg^{-1}）	GABA/（μmol·L^{-1}）	Glu/（μg·g^{-1}）
柏子仁高剂量组	400	4.028±0.782*	3.125±0.245*
柏子仁中剂量组	200	3.357±0.655	3.320±0.135
柏子仁低剂量组	100	3.022±0.481	3.502±0.256
阳性药物组	1	4.283±0.988*	3.029±0.348*
模型组	—	2.742±0.798	3.452±0.256
空白对照组	—	4.662±0.587	2.994±0.184

注：与空白对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：*vs* the blank control group，$^{\#}P<0.05$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$.

3.5　焦虑小鼠海马内 GABA 和 Glu 水平测定

与模型组比较，柏子仁高剂量组小鼠海马 GABA 水平显著增加、Glu 水平显著降低。提示柏子仁可能通过增加海马 GABA 的水平和降低海马 Glu 的水平来发挥抗焦虑作用（见表 5）。

4　讨论

从医学角度上讲，焦虑症是因为神经元之间兴奋和抑制传递不平衡，导致神经回路信息传导不畅引发的。GABA 与 Glu 作为重要的神经递质，在焦虑症中发挥重要的作用。当人体内 GABA 缺

乏时，会产生焦虑、疲倦、忧虑等情绪。Glu 是一种重要的中枢神经系统兴奋性递质，与人体焦虑情绪密切相关。因此，测定海马 GABA 和 Glu 的水平可以间接反映焦虑症患者的病程，选择合适的可以增加海马 GABA 水平和降低海马 Glu 水平的药物，可达到治疗焦虑症的目的。越来越多的研究表明，中药在抗焦虑方面具有很大的研究价值和开发潜力 [19-20]。

本实验采用乙醇超声法可以提取出柏子仁的主要药效成分，如挥发油及脂肪油等，有利于研究柏子仁的药效学及相关机制 [21-22]。进而采用经典、公认的动物模型评价柏子仁的抗焦虑作用。其中，高架十字迷宫和旷场实验利用动物对新环境的探究和恐惧之间的矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态，既可以建立模型也可测量焦虑反应，更能反映药物的抗焦虑作用。孔板实验可用于考察动物在特定环境下的情绪和焦虑状态及对应激的反映。明暗箱实验中的明箱停留时间是最有效的药物抗焦虑作用评价指标。

结果表明本次实验模型成功构建，柏子仁醇提物给药组在各模型上均表现出抗焦虑的行为学特征，其中柏子仁高剂量组与模型组比较可以显著改善小鼠的行为表现，具有明显的抗焦虑作用。柏子仁提取物高剂量组可以显著提高焦虑小鼠海马 GABA 的水平和显著降低 Glu 的水平，表明柏子仁抗焦虑作用机制可能与调节海马的 GABA 及 Glu 的水平有关。本研究为柏子仁的临床合理应用提供可靠依据，也为进一步研究柏子仁的药效和作用机制提供参考。

焦虑症的发生机制复杂，虽然在本次实验选择的动物模型当中，柏子仁提取物表现出较理想的抗焦虑作用，且可以改变脑内神经递质 GABA 和 Glu 的水平。但是，由于实验条件的限制，对其机制的探讨尚需加强。后续研究需结合病理改变及神经递质的信号传导通路，以进一步深入阐明柏子仁的抗焦虑作用机制，为其临床应用和产品开发提供理论依据。

参考文献

[1] Sharma P，Rosário MC，Ferrão YA，et al. The impact of generalized anxiety disorder in obsessive-compulsive disorder patients [J]. Psychiat Res，2021，300：113898.

[2] 张慧霞，米勇 . 广泛性焦虑障碍的中西医研究进展 [J]. 新疆中医药，2019，37（2）：149-151.

[3] 陆峥 .《中国焦虑障碍防治指南》总论 [A]//2011 年浙江省神经病学学术年会论文汇编 [C]. 杭州：浙江省医学会神经病学分会，2011.

[4] 顾宝东，丰广魁 . 焦虑症的中医病因病机和治法 [J]. 吉林中医药，2014，34（1）：4-6，37.

[5] Gümüs K. The effects of preoperative and postoperative anxiety on the quality of recovery in patients undergoing abdominal surgery [J]. J Peri Anesth Nurs，2021，36（2）：174-178.

[6] Lima EM，Gois J，Paiva ML，et al. Anxiety symptoms are the strongest predictor of quality of life in temporal lobe epileps [J]. Seizure-Eur J Epilep，2021，88：78-82.

[7] 熊庭旺，吴芹，刘杰，等 . 基于神经递质途径抗焦虑中药及其复方研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（1）：14-19.

[8] 陈陆松，江琛，齐小强 . 柏子养心方合疏肝宁神散治疗广泛性焦虑障碍 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（22）：200-203.

[9] Cao JH，DuanYH，Liu YZ，et al. Metabolomics coupled with Systems Dock reveal the protective effect and the potential active components of Naozhenning granule against traumatic brain injury [J]. J Ethnopharmacol，2020，246：112247.

[10] 卢军，芦霜 . 柏子仁研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2013，15（3）：247-250.

[11] Zhu JJ，Yang JJ，Wu GJ，et al. Comparative antioxidant，anticancer and antimicrobial activities of essential oils from *Semen Platycladi* by different extraction methods [J]. Ind Crop Prod，2020，146：112206.

[12] 王爱梅 . 柏子仁水提物抗抑郁作用的实验研究 [J]. 光明中医，2016，31（11）：1559-1560.

[13] 周静，许一凡 . 柏子仁化学成分与药理活性研究进展 [J]. 化学研究，2019，30（4）：429-433

[14] 陈陆松，江琛，齐小强 . 柏子养心方合疏肝宁神散治疗广泛性焦虑障碍 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（22）：200-203.

[15] 方欢乐，韩宁娟，李晓明，等 . 百合地黄汤抗焦虑作用的研究 [J]. 海南医学院学报，2019，25（5）：326-329.

[16] 付治凤，陈春林 . 丁苯酞的抗焦虑作用及机制研究 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2016，30（10）：1014.

[17] 耿欣，杨悦，叶晓楠，等 . 生与炒酸枣仁配伍对小鼠抗焦虑作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（8）：21-25.

[18] 岳滢滢，许乐思，陈雨，等 . 疏肝和胃汤对抑郁模型大鼠伏隔核区谷氨酸、γ- 氨基丁酸含量的影响 [J]. 时珍国医国药，2018，29（4）：803-805.

[19] 杜芸，曲淼 . 焦虑障碍的中西医结合临床诊疗要点与思考 [J]. 中国临床医生杂志，2020，48（3）：122-124.

[20] 李麦嘉，叶田园，齐冬梅，等 . 焦虑症治疗药物和干预手段临床试验研究现状 [J]. 中国全科医学，2021，24（11）：1418-1425.

[21] 崔金玉，李瑞海，贾天柱 . 柏子仁总萜类成分的提取及制剂工艺优化 [J]. 中国药师，2017，20（3）：434-437.

[22] 李瑞海，冯琳，马欣悦，等 . 脂肪油和总二萜含量与柏子仁质量的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（12）：9-11.

（收稿日期：2021-06-24；修回日期：2021-08-09）

基于星点设计 - 响应面法的红景天提取物冻干口崩片制备工艺研究

李红鑫[1]，吴菲[1]，吴婧楠[1]，孙常胜[1]，薛婉莹[1]，李思潼[1]，马宏瑞[2]，蔡程科[1*]，王洪飞[2*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 北京量子高科制药科技有限公司，北京 102200）

摘要：目的 通过优化工艺制备出合格的冻干型红景天提取物口崩片。**方法** 以口崩片的外观性状和崩解时间为主要评价指标，设置综合评分表，采用单因素考察和星点设计 - 响应面法对口崩片的处方进行优化研究。**结果** 红景天提取物口崩片最佳处方条件为：红景天提取物 50.00 mg/ 片、普鲁兰多糖 14.88 mg/ 片、甘露醇 17.69 mg/ 片、黄原胶 0.48 mg/ 片。所得口崩片片形饱满、表面光洁、颜色均匀、崩解迅速。**结论** 红景天提取物口崩片制备工艺简单，稳定可靠，可用于大规模生产。

关键词：红景天提取物；冷冻干燥；口崩片；星点设计 - 效应面法

中图分类号：R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2545-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.013

Preparation of oral disintegrating tablets of rhodiola extract based on central composite design and response surface methodology

LI Hong-xin[1], WU Fei[1], WU Jing-nan[1], SUN Chang-sheng[1], XUE Wan-ying[1], LI Si-tong[1], MA Hong-rui[2], CAI Cheng-ke[1*], WANG Hong-fei[2*] (1. *School of Chinese Meteria Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 2. *Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Co., Ltd, Beijing* 102200)

Abstract: Objective To obtain qualified oral disintegrating tablets of rhodiola extract by optimizing the preparation technology. **Methods** The appearance characteristics and disintegration time of the tablets were used as the main evaluation indexes, to set up a comprehensive rating scale. The formulation of the tablets was optimized by single factor investigation and central composite design and response surface methodology. **Results** The optimal conditions of the oral disintegrating tablets were as follows: rhodiola extract 50.00 mg/tablet, pullulan polysaccharide 14.88 mg/tablet, mannitol 17.69 mg/tablet and xanthan gum 0.48 mg/tablet. The oral disintegrating tablets were prepared with good appearance and fast disintegration. **Conclusion** The optimized preparationprocess of rhodiola extract oral disintegrating tablets is stable and reliable, which can be used in mass production.

Key words: rhodiola extract; freeze-drying; oral disintegrating tablet; central composite design and response surface methodology

红景天主产于西藏、青海等高寒地区，为景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata*（Hook. f. et Thoms.）H. ohba 的干燥根和根茎 [1]。红景天具有较高的药用价值，《本草纲目》中就有“红景天，本经上品，祛邪恶气，补诸不足，已知补益药中所罕见”的记载 [2]。中医学认为其味甘、苦，性平，归肺、心经，具有益气活血、通脉平喘之功。现代药理研究表明，其主要有效成分红景天苷、酪醇具有抗疲劳，保护心血管系统、中枢神经系统、呼吸系统以及抗肿瘤等作用 [3-5]，故保健品中常添加红景天提取物用于补充体力 [6]、提高缺氧耐受力 [7] 等。目前，市场上存在 200 余种红景天提取物的产品，但传统剂型诸如口服液存在携带不便，胶囊、片剂需要用水送服等，影响了人们

基金项目：国家科技重大专项研发项目（No.2011ZX09201-201-15）；北京市科技计划专项研发项目（No.Z16010101390）。

作者简介：李红鑫，女，硕士研究生，主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究，E-mail：2447310046@qq.com *通信作者：蔡程科，男，博士，教授，主要从事中药新剂型与新制剂研究，E-mail：cck98@126.com；王洪飞，男，博士，主要从事药物速释制制的研发和产业化研究，E-mail：bjwhf@vip.sina.com

长期使用的依从性，而采用冷冻干燥法制备的口腔崩解片具有疏松多孔的骨架结构，可在口腔中快速崩散，无需水送服，服用方便，口感佳，稳定性好，携带方便，更适宜于多年龄段的人群在各场景服用，满足其日常保健的需求，符合制剂“三小、三效、五方便”原则。因此本研究拟采用 Qsorb® 冷冻干燥技术制备红景天提取物口崩片，并采用星点设计 - 效应面法对处方条件进行优化，为中药提取物的后续剂型开发提供参考。

1 材料

1.1 试药

红景天药材（批号：20010401，青海量子高科生物工程有限公司，规格：1 kg/ 袋）；普鲁兰多糖（批号：7E1412，日本林原株式会社）；明胶（批号：20160125，甘肃阿敏生物清真明胶有限公司）；壳聚糖（批号：A22J12X138337，上海源叶生物科技有限公司）；羟丙基甲基纤维素（批号：0108176，日本信越化学工业株式会所）；甘露醇（批号：301712086，山东天利药业有限公司）；β- 环糊精（批号：20181205，山东滨州智源生物科技有限公司）；甘氨酸（批号：10207312，阿法埃莎）；黄原胶（批号：160201，湖北葛店人福药用辅料责任公司）；三氯蔗糖（批号：Z115011708，山东中怡三氯蔗糖制造有限公司）；γ- 环糊精（德国瓦克）；海藻酸钠（阿拉丁）；纯净水（娃哈哈饮用纯净水）。

1.2 仪器

PA6-GF30 高剪切混合乳化机（上海威宇机电制造有限公司）；SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵（巩义市英峪华科仪器厂）；GLZ-0.4 m^3 真空冷冻干燥机（北京速原真空技术有限公司）。

2 方法与结果

2.1 红景天提取物口崩片的制备方法

按处方称取红景天提取物浸膏（红景天细粉用 8 倍量 95% 乙醇浸提 3 次，每次 24 h，合并醇提液，减压回收乙醇至含水量 25%），固定红景天提取物 50 mg/ 片，添加相应辅料，置于剪切杯中，加水定容至 40 g，搅拌均匀，3000 r • min^{-1}，剪切 5 min，转移至脱气瓶内，磁力搅拌抽真空至无气泡。按照 400 mg/ 片的量将药液分装于泡罩中，－60 ℃冰箱预冻 5 min 后进行冷冻干燥。冻干曲线：－32 ℃进箱，升至－ 30 ℃，维持 1 h；－ 30 ℃升至－15 ℃，维持2.5 h，－15 ℃升至－ 5 ℃，维持 1 h；－5 ℃升至 25 ℃，维持 1 h，升温速率为 1 ℃•min^{-1}，压升合格出箱，分装，即得。

2.2 红景天提取物口崩片的质量评价标准

由 5 名实验人员分别通过预设的综合评分表对口崩片的饱满度、光洁度、颜色均匀度、融片程度、成形性和崩解时间进行等级评价并打分，评分规则见表 1，共计 6 个评价指标，每个评价指标 5 分，满分 30 分。口崩片质量越好，综合评分越高。

表 1 红景天口崩片综合评价

Tab 1 Comprehensive evaluation of oral disintegrating tablets of rhodiola extract

评价指标	评价方法	评分标准	分数 / 分
饱满度	从泡罩中取出口崩片，在光线明亮处观察，描述其外形	片形饱满，中心鼓起明显，呈“皇冠状”	4 ～ 5
		片形饱满或较饱满，表面平坦或中心略鼓起	2 ～ 3
		片形不饱满，表面凹陷	0 ～ 1
光洁度	从泡罩中取出口崩片，在光线明亮处观察，描述其光洁度	片剂表面光滑无裂纹、麻点	4 ～ 5
		片剂表面粗糙，但无裂纹、麻点	2 ～ 3
		片剂表面粗糙，且有裂纹、麻点	0 ～ 1
颜色均匀度	从泡罩中取出口崩片，在光线明亮处观察，描述其颜色均匀度	片剂表面、横截面颜色均匀、色泽一致	4 ～ 5
		片剂表面颜色均匀，但横截面出现颜色分层；或片剂表面颜色不均，但横截面颜色均匀	2 ～ 3
		片剂表面、横截面均出现颜色不一的现象	0 ～ 1
融片程度	从泡罩中取出口崩片，在光线明亮处观察表面融化程度，倒置观察底部融化程度，掰开观察中心融化程度。口崩片发生融化时颜色加深，与周围未融化部分产生色差	片剂底部和横截面颜色均匀，无分层	4 ～ 5
		片剂底部颜色均匀，但横截面出现分层；或底部颜色较深，但横截面颜色均匀	2 ～ 3
		片剂底部颜色较深且横截面分层	0 ～ 1
成形性	从泡罩中取出口崩片，在光线明亮处观察，描述片剂的完整性及硬度	取片完整	4 ～ 5
		取片时有少量残留物黏于铝窝	2 ～ 3
		取片时易碎、极易黏底	0 ～ 1
崩解时间	取口崩片 6 片，分别于相同高度投入盛有 40 mL、（37±2）℃蒸馏水的培养皿中，在其入水时开始计时，直至口崩片完全崩解溶散，记录崩解时间	0 ～ 3 s	5
		3 ～ 5 s	4
		5 ～ 8 s	3
		8 ～ 12 s	2
		12 ～ 40 s	1
		≥ 40 s	0

2.3　星点设计 - 响应面法优化处方

2.3.1　实验设计　根据课题组前期单因素实验，应用 Design Experts 10 软件，以影响口崩片综合质量的黏合剂（普鲁兰多糖，8～40 mg/ 片）、骨架剂（甘露醇，8～40 mg/ 片）、助悬剂（黄原胶，0.08～0.72 mg/ 片）的用量为因素，进行三因素五水平的星点设计，并以综合评分（Y）为评价指标进行响应面分析，对处方进行优化，如表 2、3 所示。

表 2　因素水平表

Tab 2　Factor and level

因素	水平				
	− 1.682	− 1	0	1	1.682
X_1	8	14.49	24	33.51	40
X_2	8	14.49	24	33.51	40
X_3	0.08	0.21	0.4	0.59	0.72

表 3　星点设计实验结果

Tab 3　Experimental results of CCD

实验编号	普鲁兰多糖 /mg	甘露醇 / mg	黄原胶 / mg	外观评分 / 分	崩解时间评分 / 分	综合评分 / 分
1	14.49	14.49	0.21	23	5	28
2	33.51	14.49	0.21	17	0	17
3	14.49	33.51	0.21	15	5	20
4	33.51	33.51	0.21	17	0	17
5	14.49	14.49	0.59	25	4	29
6	33.51	14.49	0.59	17	0	17
7	14.49	33.51	0.59	17	5	22
8	33.51	33.51	0.59	17	1	18
9	8	24	0.4	17	5	22
10	40	24	0.4	17	1	18
11	24	8	0.4	19	2	21
12	24	40	0.4	15	2	17
13	24	24	0.08	19	5	24
14	24	24	0.72	21	4	25
15	24	24	0.4	23	4	25
16	24	24	0.4	23	4	26
17	24	24	0.4	23	4	25
18	24	24	0.4	23	4	27
19	24	24	0.4	23	4	26
20	24	24	0.4	23	4.69	28

2.3.2　模型拟合　应用 Design Experts 10 软件对实验数据进行拟合，模拟回归系数的显著性检验结果见表 4。以 Y 为评价指标对黏合剂浓度（X_1）、骨架剂浓度（X_2）、助悬剂浓度（X_3）进行拟合，得到综合评分（Y）的二项式拟合方程为：$Y = 16.518\ 75 + 0.383\ 20X_1 + 0.583\ 36X_2 + 14.570\ 24X_3 + 0.022\ 097X_1X_2 - 0.138\ 11X_1X_3 + 0.138\ 11X_2X_3 - 0.023\ 770X_1^2 - 0.027\ 676X_2^2 - 15.479\ 63X_3^2$（$r = 0.9120$，$P = 0.0003$）。从相关系数 r 可知，采用二项式方程拟合本研究的效果良好，且该模型具有显著性，可在一定程度上正确反映 Y 与 X_1、X_2、X_3 之间的关系。表 4 结果表明 X_1 和 X_2 对 Y 的影响显著（$P < 0.05$）。综合以上，说明该模型选择合理，可用二项式回归方程对红景天提取物口崩片的处方进行预测与分析。

表 4　方差分析结果

Tab 4　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	309.00	9	34.33	11.52	0.0003
X_1	98.77	1	98.77	33.14	0.0002
X_2	31.46	1	31.46	10.56	0.0087
X_3	2.36	1	2.36	0.79	0.3941
X_1X_2	32.00	1	32.00	10.74	0.0083
X_1X_3	0.50	1	0.50	0.17	0.6907
X_2X_3	0.50	1	0.50	0.17	0.6907
X_1^2	66.70	1	66.70	22.38	0.0008
X_2^2	90.43	1	90.43	30.34	0.0003
X_3^2	4.53	1	4.53	1.52	0.2460
残差	29.80	10	2.98		
失拟项	22.97	5	4.59	3.36	0.1047
误差	6.83	5	1.37		
总离差	338.80	19			

2.3.3　处方的优化与预测　根据以上结果分析，固定其中一个因素为中值，根据 Design Expert 软件拟合的等高线图及三维效应面图如图 1 ～ 3 所示。最优工艺条件为：黏合剂普鲁兰多糖用量为 14.88 mg/ 片，骨架剂甘露醇用量为 17.69 mg/ 片，助悬剂黄原胶用量为 0.48 mg/ 片。

2.3.4　工艺验证　根据以上结果，按照最优处方制备 3 批样品，见图 4，进行综合评分。所得 3 批口崩片片形饱满，颜色均匀，表面光洁、无裂纹、无裂边，无融片现象，置于水中能够快速崩解，测得其平均崩解时限为 2.69 s。平均实际综合评分为 27.3 分，与预测值 28.047 分的误差为 2.66%，证明处方可行。

3　讨论

本实验以质量综合评分为指标，采用单因素实验和星点设计 - 响应面法对红景天提取物口崩片进行工艺优化。优化后的处方为：红景天提取物 50 mg/ 片，普鲁兰多糖 14.88 mg/ 片，甘露醇 17.69 mg/ 片，黄原胶 0.48 mg/ 片。所得红景天提取物口崩片片形饱满、颜色均匀、表面光洁、无融片现象、崩解迅速，说明处方组成合理，工艺稳定。

红景天提取物口崩片主要用于提高缺氧耐受力 [8-10] 和抗疲劳 [11-12]，可在一定程度上减轻高原反应症状。作为一款保健食品，红景天提取物口崩片无须用水，置于口腔中遇唾液即可快速崩解，极大地提高了使用的便利性。

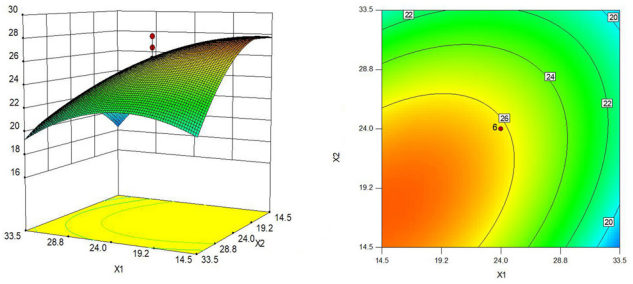


图 1 普鲁兰多糖（X_1）和甘露醇（X_2）用量交互作用对综合评分影响

Fig 1 Effect of interaction of pullulan polysaccharide dosage（X_1）and mannitol（X_2）on the comprehensive score

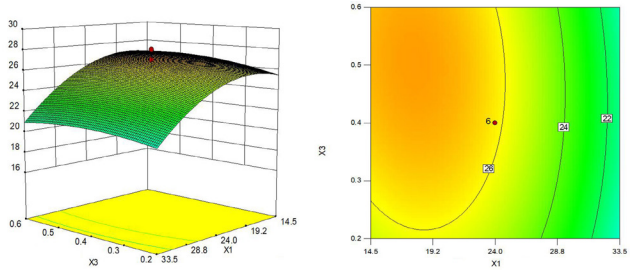


图 2 普鲁兰多糖（X_1）和黄原胶（X_3）用量交互作用对综合评分影响

Fig 2 Effect of interaction of pullulan polysaccharide dosage（X_1）and xanthan gum（X_3）on the comprehensive score

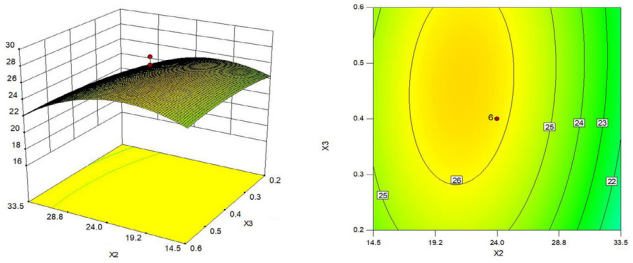


图 3 甘露醇（X_2）和黄原胶（X_3）用量交互作用对综合评分影响

Fig 3 Effect of interaction of mannitol dosage（X_2）and xanthan gum（X_3）on the comprehensive score

图 4 工艺优化后的红景天提取物口崩片

Fig 4 Oral disintegrating tablets of rodiola extract after the optimization

实验发现，以普鲁兰多糖 24 mg/ 片，甘露醇分别为 24、40、8 mg/ 片为处方制备的 3 种口崩片质量相差很大，后两者片形较差，不易崩解。推测口崩片的片形与普鲁兰多糖和甘露醇的配比有关，在普鲁兰多糖用量均为 24 mg/ 片的情况下，普鲁兰多糖与甘露醇的配比为 1∶0.3（24 mg∶8 mg）时，由于黏合剂用量高而骨架剂用量较低，导致口崩片空隙减小、质地紧实且不易冻干，底部的融化使得外部水分难以进入口崩片内部，造成崩解时间延长；普鲁兰多糖与甘露醇的配比为 1∶1.7（24 mg∶40 mg）时，由于骨架剂用量增大，使得口崩片的结构紧密、孔隙不够疏松，进而影响了崩解时间。而当普鲁兰多糖与甘露醇的配比为 1∶1（24 mg∶24 mg）时，骨架剂与黏合剂的用量适宜，口崩片质量较高[13]。后期可专门针对基质中骨架剂和黏合剂的配比进行专门的考察实验，探寻其中规律，提高基质配方的普适性，为其他品类的冻干型口崩片的处方设计提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 版 . 一部 [S]. 2020：161-162.

[2] 郭爱民，曹建民，周海涛 . 红景天对大鼠运动性肾缺血再灌注血清和肾组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 和 IL-18 水平的影响 [J]. 沈阳体育学院学报，2013，32（5）：74-79.

[3] 王小博，侯娅，王文祥，等 . 藏药红景天的药理作用及其机制研究进展 [J]. 中国药房，2019，30（6）：851-856.

[4] 刘孟华，李沛波，苏薇薇 . 红景天化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中南药学，2006，4（6）：463-466.

[5] 高元峰，陈兴，陈里新，等 . 红景天苷对大鼠离体心脏缺血 - 再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中南药学，2010，8（2）：115-118.

[6] 马文俊，刘有菊，红梅，等 . 金诃牌红景天含片缓解体力疲劳功能的实验研究 [J]. 中国处方药，2019，17（1）：40-41.

[7] 石路，王旭萍 . 红景天对高原缺氧环境下人体运动前后血流动力学的作用 [J]. 高原医学杂志，2017，27（2）：42.

[8] 陈茜，徐忠伟，马闻 . 红景天苷对缺氧心肌细胞保护作用的蛋白组学分析 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2020，29（4）：8-15，2.

[9] 史佩，杨立霞，王楠 . 红景天苷对低氧条件下大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（9）：4195-4199.

[10] 冯中凯 . 红景天口服液抗缺氧能力临床研究 [A]// 北京九州启航文化交流中心 . 第二届医师进修峰会暨中医药产业发展论坛学术会议论文汇编 [C]. 北京九州启航文化交流中心，2018.

[11] 李晶，李瑞刚，睢博文，等 . 红参和红景天配伍前后主要成分及抗疲劳活性的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（13）：87-96.

[12] 陈阳阳 . 基于系统药理学平台解析中药红景天抗疲劳的作用机制 [D]. 咸阳：西北农林科技大学，2018.

[13] 吴茜，李红鑫，李聘，等 . 地龙提取物冻干口崩片的制备工艺研究 [J]. 中南药学，2021，19（3）：426-430.

（收稿日期：2021-06-10；修回日期：2021-07-05）

阿胶强骨口服液对大鼠缺铁性贫血的改善及其对铁代谢的调节作用机制初探

恰木斯亚·吐尔逊哈里[1]，美拉依·吉恩斯[1]，武嘉林[1, 2*]（1. 新疆医科大学中医学院，乌鲁木齐　830011；2. 新疆华世丹药业股份有限公司，乌鲁木齐　830011）

摘要：目的　建立缺铁性贫血大鼠模型，观察阿胶强骨口服液对缺铁性贫血大鼠的作用效果，并初步探讨其作用机制。**方法**　低铁饲料结合耳缘静脉放血建立缺铁性贫血大鼠模型，28 d后选取血红蛋白（HGB）＜ 90 g·L^{-1}的大鼠分组给药。连续干预 28 d，观察动物状态，并检测血常规 HGB、红细胞数（RBC）、红细胞比容（HCT）、红细胞平均血红蛋白量（MCH）、红细胞平均血红蛋白浓度（MCHC）、红细胞平均体积（MCV）、血清铁（SI），ELISA 法检测大鼠二价金属转运蛋白（DMT-1）和膜铁转运蛋白（FPN-1）含量。**结果**　造模 4 周后模型对照组大鼠 RBC、HGB、HCT、MCH、MCHC、MCV 显著降低（P ＜ 0.05）。药物干预 4 周后，与模型对照组比较，阿胶强骨口服液各剂量组大鼠 HGB、HCT、MCH、MCHC、MCV 均显著增加（P ＜ 0.05），并趋于正常对照组水平；阿胶强骨口服液中、高剂量组大鼠 SI（P ＜ 0.05）和 DMT-1 蛋白含量显著增加（P ＜ 0.01）；高剂量组大鼠 FPN-1 蛋白含量显著增加（P ＜ 0.01）。**结论**　阿胶强骨口服液对缺铁性贫血大鼠具有显著的治疗效果，既能提高血红蛋白含量，又能提高血清铁含量，其作用机制与肠道 DMT-1 与 FPN-1 密切相关。

关键词：阿胶强骨口服液；缺铁性贫血；血红蛋白
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2549-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.014

Ejiao Qianggu oral liquid improves iron deficiency anemia in rats and mechanism of iron metabolism regulation

Qiamusiya·Tuerxunhali[1], Meilayi·Jiensi[1], WU Jia-lin[1, 2*] (1. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 2. *Xinjiang Huashidan Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective　To establish the rat model of iron deficiency anemia, determine the effect of Ejiao Qianggu oral liquid on the rats model of iron deficiency anemia, and discuss its mechanism. **Methods**　Rat models of iron deficiency anemia were established by low iron diet combined with auricular vein bloodlet. Rats with hemoglobin (HGB) ＜ 90 g·L^{-1} were selected after 28 days. After continuous intervention for 28 days, the rat status was observed. Blood routine HGB, red blood cell (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), and serum iron (SI) were measured. ELISA was used to detect the duodenal divalent metal transporter (DMT-1) and membrane iron transfer protein transport (FPN-1). **Results**　After 4 weeks of modeling, the RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC and MCV in model group were significantly decreased (P ＜ 0.05). Compared with the model control group, the HGB, HCT, MCH, MCHC and MCV in the Ejiao Qianggu low-dose, medium-dose and high-dose groups were significantly increased (P ＜ 0.05); the SI and hemoglobin content and the DMT-1 protein in the medium- and high-dose Ejiao Qianggu oral liquid groups were significantly

基金项目：兵团专利运用与产业化项目（No.2018BD002）。
作者简介：恰木斯亚·吐尔逊哈里，女，硕士研究生，主要从事中药药理与临床研究，E-mail：1763171646@qq.com　*通信作者：武嘉林，男，主任药师，高级工程师，主要从事新药研发与应用研究，E-mail：13909911268@qq.com

increased ($P < 0.01$); and the protein content of FPN-1 in the high dose group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Ejiao Qianggu oral liquid has a significant therapeutic effect on with rats iron deficiency anemia, by increasing both the hemoglobin content and the serum iron content. Its mechanism is closely related to intestinal DMT-1 and FPN-1.

Key words: Ejiao Qianggu oral liquid; iron deficiency anemia; hemoglobin

贫血影响着全球大约 30% 的人们的健康，其中有 50% 是由缺铁引起的 [1]。缺铁性贫血（IDA）是由于铁摄入不足、吸收不良、转运受损、利用障碍等原因引起的机体铁缺乏，导致人体血液中红细胞生成减少而引起的贫血，在经济不发达地区的婴幼儿、育龄妇女中多发 [2]。口服铁剂是最常见的治疗缺铁性贫血的手段，但近几年报道口服铁剂不良反应较多，例如水溶性差、生物利用率低，导致过量的游离铁进入体内，刺激胃肠道引起恶心、呕吐、腹部不适等，且过量补铁造成铁超载的同时会引发肝脏、心血管的损伤和神经退行性病变 [3]。因此近年来毒副作用较低、作用温和、多成分的中药补铁剂在临床应用中凸显其优势。

阿胶强骨口服液是由熟地、阿胶、黄芪等中药组成，依据传统中医学理论，具有补益肝肾、填精壮骨、生血扶正等功效。前期研究 [4-6] 发现其对贫血有一定疗效，以往研究多集中在阿胶强骨口服液的含量测定、质量标准研究等方面，未见其对缺铁性贫血及铁代谢影响的研究。本实验拟研究阿胶强骨口服液对大鼠缺血性贫血的改善作用并初步探讨其对铁代谢的调节作用，为阿胶强骨口服液应用于临床治疗缺铁性贫血提供实验依据。

1 材料

1.1 试药

阿胶强骨口服液（新疆华世丹药业股份有限公司，规格：10 mL/ 支，批号：2019111802）；硫酸亚铁（山西力玖药业有限公司，批号：180319）；复方阿胶浆（山东东阿阿胶股份有限公司，批号：1806027）；低铁饲料（睿迪生物科技深圳有限公司，批号：18073112，含铁量 6.7 mg • kg^{-1}）；膜铁转运蛋白（FPN-1）酶联免疫分析试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，批号：20200517）；二价金属转运蛋白（DMT-1）酶联免疫试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，批号：20210518）。

1.2 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 180 ～ 200 g [新疆医科大学实验动物研究中心，实验动物生产许可证号：SCXK（新）2018-0002]，饲养于新疆医科大学动物中心 SPF 级屏障环境，维持室温在（24±2）℃，湿度 50% ～ 60%，采用 12 h 昼夜节律 7：00 ～ 19：00 饲养。

1.3 仪器

分析天平（FA104，上海恒平科学仪器有限公司）；ABM 型小动物麻醉机（异氟醚，上海玉研科学仪器有限公司）；全自动生化分析仪（750 型，日本光学株式会社）；酶标仪（Model 680，美国伯乐公司）；台式冷冻高速离心机（5417R，德国 EPPENDORF 公司）。

2 方法

2.1 IDA 大鼠模型的建立

60 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 5 d 后，随机分为正常对照组（8 只）和造模组（52 只）。根据文献 [7] 方法加以改进，模型组饲喂低铁饲料、饮用去离子水，每隔 3 d 耳缘静脉放血 1 mL。依据查阅的相关研究及临床鉴定标准，血红蛋白（HGB）< 90 g • L^{-1}，符合轻度缺铁性贫血判断标准，表明造模成功。正常对照组投喂正常饲料并给予自来水，每周称重并记录体质量。造模 28 d 后采血进行分析，检测实验大鼠 HGB。

2.2 分组与给药

2.2.1 动物分组 造模过程中死亡 4 只，造模成功的模型大鼠随机分为 6 组：模型对照组，硫酸亚铁组（阳性药物组），复方阿胶浆组，低、中、高剂量阿胶强骨组，每组 8 只。

2.2.2 给药

① 硫酸亚铁组：灌胃硫酸亚铁混悬液 5 mL • kg^{-1} 及去离子水 10 mL • kg^{-1}（临床用量：成人每日 3 片，规格：含铁 60 mg/ 片，按动物与人体质量比折算，以成人 60 kg 计，大鼠的等效剂量为 5 mL • kg^{-1}）。

② 复方阿胶浆组：6.3 mL • kg^{-1} 灌胃给药（临床用量：每日 20 mL/ 支，按动物与人体体质量比折算，以成人 60 kg 计，大鼠的等效剂量为 6.3 mL • kg^{-1}）。

③ 阿胶强骨口服液组：低、中、高剂量分别为 3.15、6.3、12.6 mL • kg^{-1} 灌胃给药（临床用量：每支 10 mL，每日 3 支；按动物与人体体质量比计算，以成人 60 kg 计，大鼠的等效剂量为 3.15 mL • kg^{-1} 设为低剂量，中剂量为 2 倍即 6.3 mL • kg^{-1}，高剂量为 4 倍即 12.6 mL • kg^{-1}）。

造模完成后，各给药组均连续灌胃 28 d，每隔 3 d 称体质量，并拍照观察状态。灌胃给药期间各药物组、模型对照组饲喂低铁饲料，防止外源性铁的摄入，正常对照组则给予正常饲料。

2.3　指标检测

2.3.1　大鼠体质量及脏器系数测定　各组动物末次给药后，禁食 12h，称重记录末次体质量。完成取血后，脱颈椎处死大鼠，并解剖剥离心脏、肝脏、脾脏，并称量各脏器质量。脏器系数即为各脏器质量 / 大鼠体质量。

2.3.2　血常规检测　造模 28 d 后所有大鼠眼眶取血置含抗凝剂 EDTA-2K 的 EP 管中，用于血常规分析。各组动物末次给药后，禁食 12 h。大鼠麻醉后颈动脉取血 1 mL 置含抗凝剂 EDTA-2K 的 EP 管中，用于血常规分析。

2.3.3　血生化检测　采集的血液放置在 37 ℃培养箱 1 h，冰箱 4 ℃过夜，3000 r • min $^{-1}$ 离心 20 min，吸取上清液，测定血清铁（SI）。

2.3.4　铁代谢相关蛋白检测　采用 ELISA 法检测大鼠 DMT-1、FPN-1。取各组大鼠十二指肠同一部位，切割标本后，称取质量。加入一定量的 PBS 后用手动匀浆器匀浆，充分离心后收集上清液。严格按照试剂盒操作步骤进行检测，计算出各给药组蛋白含量。

2.4　统计学方法

数据使用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间两两比较用 SNK 法；多组不符合正态性比较采用秩和检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　阿胶强骨口服液对缺铁性贫血大鼠体质量及脏器指数的影响

大鼠体质量及各脏器指数如表 1 所示，模型对照组大鼠体质量较正常对照组显著降低（$P < 0.01$），各药物组补铁后大鼠体质量回升，但差异无统计学意义。肝脏是最重要的储铁器官之一，而铁主要以铁蛋白和含铁血黄素形式存在于此 [8]。与模型对照组比较，补铁后各组大鼠肝脏指数、脾脏指数和心脏指数差异均无统计学意义。

表 1　阿胶强骨口服液对缺铁性贫血大鼠体质量及脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n = 8$)

Tab 1　Effect of Ejiao Qianggu oral liquid on body mass and organ index in rats with iron deficiency anemia ($\bar{x}\pm s$，$n = 8$)

组别	体质量 /g	肝脏指数 /%	脾脏指数 /%	心脏指数 /%
正常对照组	416.00±25.07	2.67±0.08	0.19±0.04	0.33±0.04
模型对照组	394.70±61.58$^{\#\#}$	2.40±0.23	0.20±0.04	0.35±0.06
硫酸亚铁组	395.20±43.20	2.26±0.42	0.23±0.07	0.32±0.03
复方阿胶浆组	385.60±43.20	2.21±0.21	0.23±0.04	0.32±0.04
阿胶强骨口服液低剂量组	408.90±30.57	2.33±0.31	0.24±0.05	0.36±0.05
阿胶强骨口服液中剂量组	407.30±46.28	2.42±0.27	0.25±0.06	0.32±0.04
阿胶强骨口服液高剂量组	409.90±43.86	2.37±0.34	0.24±0.04	0.36±0.05

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$）。

3.2　阿胶强骨口服液对大鼠血常规的影响

造模 28 d 后进行血常规检测，结果如图 1 所示。与正常对照组比较，模型对照组大鼠 HGB 下降 [（179.00±8.60）*vs*（78.29±8.60）g • L $^{-1}$，$P < 0.05$]。依据临床鉴定标准，HGB 低于 90 g • L $^{-1}$，符合轻度缺铁性贫血模型评价标准 [9-15]。且模型对照组较正常对照组红细胞数（RBC）、红细胞比容（HCT）、红细胞平均血红蛋白量（MCH）、红细胞平均血红蛋白浓度（MCHC）、红细胞平均体积（MCV）差异均有统计学意义（$P < 0.05$），说明造模成功。

药物干预 28 d 后测试各组大鼠血常规指标。由图 2 可知，各组 HGB 值均不同程度的增加，阿胶强骨口服液低、中、高剂量组较模型对照组 HGB（91.0±6.98）g • L $^{-1}$ 分别增加到（127.8±7.33）、（131.0±9.67）、（131.4±8.33）g • L $^{-1}$；HCT 较模型对照组（26.05±1.64）% 分别增加到（32.78±1.60）%、（35.2±3.73）%、（33.5±2.02）%。HGB 减少是缺铁性贫血的主要表现形式之一 [16-17]。临床上红细胞 MCH 和 MCV 下降多见于缺铁性贫血 [18]。由图 2 可知，在给药期内所有实验组大鼠的 MCH 值和 MCV 值均明显高于模型对照组（$P < 0.05$）；且阿胶强骨口服液各剂量组均趋于正常。

3.3　阿胶强骨口服液对大鼠血清铁及 DMT-1、FPN-1 蛋白的影响

SI 含量检测结果如图 3 所示，与正常对照组比较，模型组 SI 含量显著降低；与模型对照组比较，阿胶强骨口服液中、高剂量组 SI 显著升高（$P < 0.05$），提示阿胶强骨口服液能增加 SI 含量。

大鼠十二指肠 DMT-1、FPN-1 蛋白含量测定结果如图 3 所示。DMT-1 蛋白测定中阿胶强骨中、

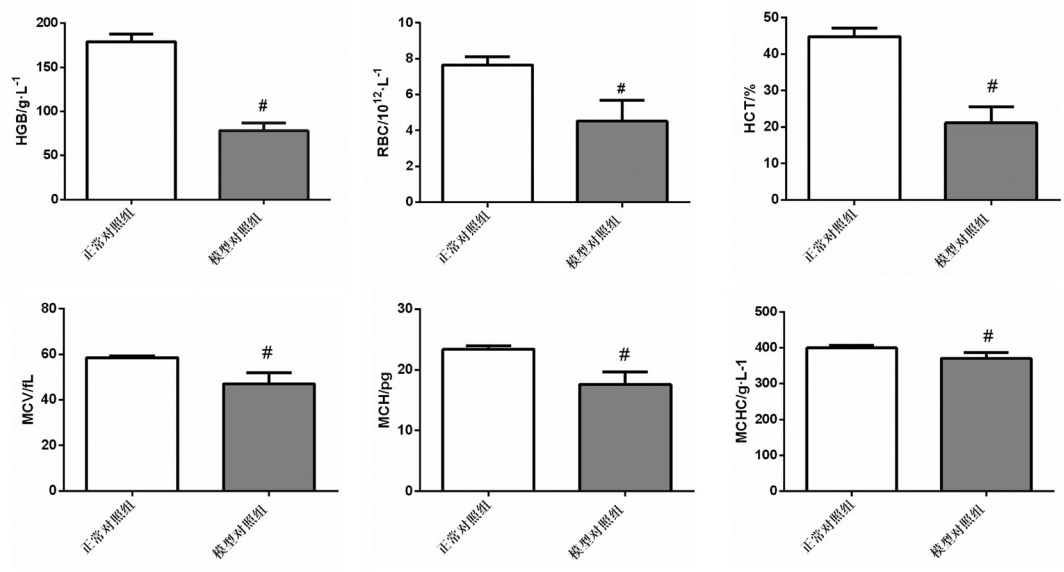


图 1　大鼠造模完成时血常规变化

Fig 1　Blood routine indicators at the completion of modeling in rats

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the normal control group，$^{\#}P < 0.05$）。

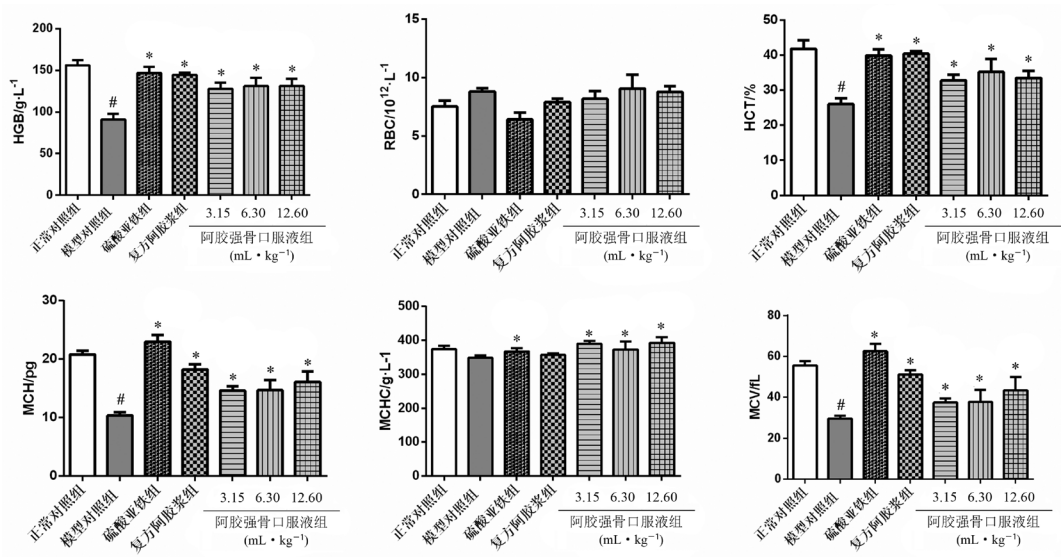


图 2　阿胶强骨口服液对缺铁性贫血大鼠血常规影响

Fig 2　Effect of Ejiao Qianggu oral solution on blood routine examinationin rats with iron deficiency anemia

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型对照组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the normal control group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the model control group，$^{*}P < 0.05$）。

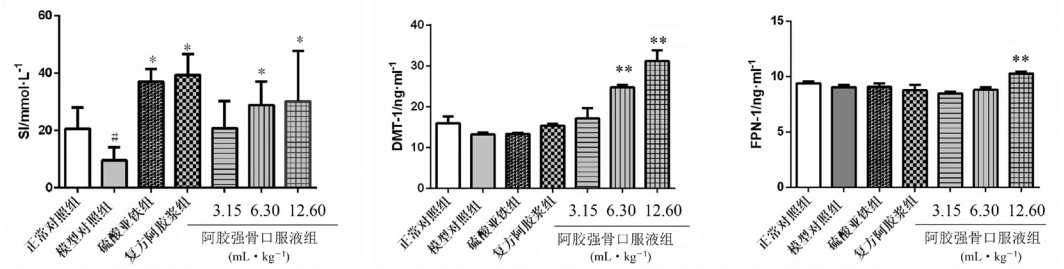


图 3　阿胶强骨口服液对大鼠 SI 及 DMT-1、FPN-1 蛋白的影响

Fig 3　Effect of Ejiao Qianggu oral liquid on the serum iron，DMT-1 and FPN-1 proteins in rats

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the normal control group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the model control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

高剂量组较模型对照组显著升高（$P < 0.01$），提示阿胶强骨口服液显著增强缺铁性贫血大鼠十二指肠 DMT-1 蛋白的表达。FPN-1 蛋白测定中阿胶强骨口服液高剂量组与模型对照组显著升高（$P < 0.01$），提示阿胶强骨口服液高剂量组能显著增强缺铁性贫血大鼠十二指肠 FPN-1 蛋白的表达。

4 讨论

4.1 阿胶强骨口服液药理作用分析

HGB 又称血色素，是红细胞的主要组成部分，能与氧结合，运输氧和二氧化碳。HGB 变化的临床意义基本和红细胞计数的临床意义相似，HGB 能更好地反映贫血的程度 [19-20]。本实验结果显示阿胶强骨口服液能增加 HGB 含量，且效果与阳性药物相当，又能增加 HCT、MCH、MCHC、MCV 含量。模型对照组红细胞数较造模完成时略有增加，可能与贫血模型大鼠长期缺氧（HGB 含量低，贫血），机体代偿性增加红细胞数量有关。铁是构成 HGB 的一种重要组成部分，为机体的必需微量元素之一，参与机体的生命活动。铁离子的主要转运形式是 SI 与转铁蛋白结合 [21-23]。阿胶强骨口服液能增加 SI 含量且与给药剂量呈线性递增关系。食物中的铁离子主要经肠上皮细胞表达的 DMT-1 和 FPN-1 进入血液 [24]。DMT-1 在各组织中都有分布，但是在近端小肠表达最高 [25]。FPN-1 作为跨膜铁输出蛋白，主要在十二指肠绒毛上皮细胞的基底端和基底膜分布，将肠细胞内的铁离子转运出细胞，进入血液 [26]。基于此本研究选择了具有代表性的以上两种蛋白，结果阿胶强骨口服液能增加大鼠十二指肠 DMT-1 和 FPN-1 蛋白含量，推测阿胶强骨口服液通过上调 DMT-1 和 FPN-1 来促进十二指肠对铁的吸收，增加 SI 含量，促进 HGB 合成。

4.2 阿胶强骨口服液组方规律分析

阿胶强骨口服液由熟地、阿胶、枸杞、黄芪、党参、牡蛎等组成，依据“气血互生、气升血长”的传统中医学理论加味而成。

君药熟地补血滋阴，益精填髓。研究表明熟地黄内含梓醇、糖类、氨基酸、地黄苷以及多种微量元素，可增强人体免疫力，促进造血。相关药理实验研究显示熟地黄水提物可增加实验鼠骨髓造血干细胞以及祖细胞的增殖分化过程，能够加速增加 HGB，加速造血功能恢复 [27-28]。

臣药阿胶补血滋阴，润燥，止血。阿胶含有多种氨基酸和微量元素，有增强免疫、促进造血功能、促进骨愈合等作用。现代药理学研究发现阿胶能够治疗贫血，且不影响铁储备 [29]。阿胶中的甘氨酸成分可调节 SI 以发挥加快血液合成 HGB 速度，控制缺铁性贫血 [30]。相关临床实践研究证明中药阿胶在刺激机体红细胞与 HGB 再生功能方面的疗效远远高于铁剂，故多被应用于血小板减少、白细胞减少症以及缺铁性贫血症 [31-32]。本次实验研究也表明阿胶强强骨口服液能显著增加大鼠 SI 含量、HGB 含量，与临床上众多学者的研究结果相同 [33]。

佐药黄芪补气升阳，生津养血。党参具有健脾益肺、养血生津之功效，用于脾肺气虚、气血不足、面色萎黄、心悸气短等症，具有增强造血功能、调节血压等功效，临床上可用于防治高血脂症、低血压、造血功能障碍 [34]。牡蛎重镇安神、潜阳补阴、软坚散结。牡蛎咸寒、敛阴止汗，黄芪性温、补气益损，两者配伍，一补一涩，阴阳兼顾，共俱补虚止汗之功，阴阳气血不足多用此两味。临床对于怀孕妇女及小儿钙质缺乏等有效 [35-37]。

传统中医理论认为熟地、阿胶、黄芪、党参四味药配伍具有补血补气、补精填髓的功效，由此推测阿胶强骨口服液中补血生血的药味主要是熟地、阿胶，其次是黄芪与党参。整个组方君臣佐使分明，依据传统中医理论多角度、多靶点治疗贫血，方中各药味协同使用可气血双补。

综上所述，阿胶强骨口服液能有效改善大鼠缺铁性贫血、促进铁代谢，其作用机制与肠道铁转运相关的 DMT-1、FPN-1 蛋白密切相关。相对阳性对照（硫酸亚铁补铁组）并未出现不良反应。阿胶强骨口服液中具体何种物质治疗贫血则有待进一步深入研究，本结果有望为开发一种新的治疗缺铁性贫血的药物提供实验依据。

参考文献

[1] Anthony L. Iron deficiency anaemia [J]. Lancet，2015，387（10021）：907.
[2] 陆再英 . 内科学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2008：571.
[3] 黄才千 . 铁超载研究进展 [J]. 内科，2008，3（2）：273.
[4] 郭向飞 . 阿胶强骨口服液对去卵巢大鼠骨质疏松模型治疗作用的实验研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2009.
[5] 程丽，汪婷，武嘉林 . HPLC 法同时测定阿胶强骨口服液中 4 种氨基酸 [J]. 中成药，2017，39（3）：636-639.
[6] 范文玺，马芹，魏露露，等 . 阿胶牡蛎口服液对佝偻病模型作用研究 [J]. 中药药理与临床，2013，29（2）：155-157.
[7] 呼延武，马雅静，周祖钊，等 . 雌性大鼠缺铁性贫血模型的建立及相关指标观察研究 [J]. 中国妇幼保健，2015，

30（1）：128-130.
[8] Camaschella C. Iron-deficiency anemia [J]. New Eng J Med，2015，372（19）：1832-1843.
[9] 付星，李述刚，黄茜，等 . 鸡蛋卵转铁蛋白螯合铁及其对大鼠贫血模型的影响 [J]. 中国食品学报，2020，20（2）：26-34.
[10] 赵刚，吕承恬，陈兴，等 . 健脾生血颗粒治疗缺铁性贫血模型大鼠的机理 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2015，17（11）：2335-2340.
[11] 郭锦章，马新超 . 补血灵糖浆治疗小儿营养性贫血 76 例 [J]. 安徽中医学院学报，1989，8（3）：44.
[12] 钟美娟，李咏梅 . 健脾益气养血法治疗小儿缺铁性贫血 40 例 [J]. 上海中医药杂志，1995（7）：19.
[13] 孙伟正，张福侠，张亚峰 . 补血汤治疗缺铁性贫血 42 例临床观察 [J]. 中医药信息，2007，24（5）：41-42.
[14] 段兆洁，卞海明 . 八珍汤联合补铁丸治疗老年缺铁性贫血 64 例临床分析 [J]. 航空航天医学杂志，2013，24（4）：485-486.
[15] 刘晓溪，李潮，李昕权 . 缺铁性贫血大鼠模型建立中行为体态观察 [J]. 中国行为医学科学，2004（3）：34.
[16] 斯兴开，黄赛博，林慧敏，等 . 带鱼酶解肽亚铁螯合物对贫血大鼠的治疗效果 [J]. 中国食品学报，2017，17（5）：18-24.
[17] 师传帅 . 低血红蛋白密度和铁代谢指标对缺铁性贫血的实验诊断研究 [D]. 长春：吉林大学，2017.
[18] 湛秀香 . MCH、MCV 及 RDW 水平检测贫血鉴别诊断中应用分析 [J]. 黑龙江中医药，2020，49（4）：379-380.
[19] 杨真，罗海吉，卢晓翠，等 . 大鼠缺铁性贫血模型建立及各指标观察研究 [J]. 热带医学杂志，2006（3）：284-286，321.
[20] 杨萍，杨旭，邹连娟 . 论血液检验红细胞参数对贫血患者的鉴别诊断价值 [J]. 全科口腔医学电子杂志，2019，6（23）：144，150.
[21] 林健，张卫华，林蔚，等 . 黄芪阿胶补铁口服液改善大鼠缺铁性贫血研究 [J]. 中国当代医药，2018，25（27）：35-37.
[22] 赵刚，吕承恬，陈兴，等 . 健脾生血颗粒治疗缺铁性贫血模型大鼠的机理 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2015，17（11）：2335-2340.
[23] Keshav S，Stevens R. New concepts in iron deficiency anaemia [J]. Brit Gener Prac，2017，67（654）：10-11.
[24] 张立加，蔡静明，沈洁，等 . 铁超载对 NAFLD 大鼠 DMT1 和 FPN1 基因表达影响 [J]. 中国公共卫生，2018，34（5）：716-719.
[25] Gunshin H，Fujiwara Y，Custodio AO，et al. DMT-1 is required forintestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable inplacenta and liver [J]. J Clin Invest，2005，115（5）：1258-1266.
[26] Donovan A，Lima CA，Pinkus JL，et al. The iron exporterferroportin 1 is essential for iron homeostasis [J]. Cell Metab，2005，1（3）：191-200.
[27] 申文玲，彭相君，于丽萍 . 熟地黄活性成分药理作用的相关研究 [J]. 临床医药文献电子杂志，2019，6（85）：194.
[28] 张副兴，裘生梁，祝雨田，等 . 熟地黄多糖提取技术及药理作用研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志，2013，23（2）：153-154.
[29] 张国伟，马俊华，梁玉景，等 . 阿胶化学成分及保健作用研究进展 [J]. 食品科技，2021，46（3）：39-43.
[30] 杜怡波，樊慧蓉，阎昭 . 阿胶的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天津医科大学学报，2018，24（3）：267-270.
[31] 张晓双，白黎明，白璐 . 阿胶对去卵巢小鼠学习记忆及海马 Aβ 影响的研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1600-1604.
[32] 王子凤 . 中药阿胶临床应用分析及药理作用研究 [J]. 基层医学论坛，2020，24（29）：4248-4249.
[33] 杨继芳 . 中药阿胶的临床应用及药理作用 [J]. 中国医药指南，2015，13（26）：206-207.
[34] 李浅予，汤岐梅，侯雅竹，等 . 中药党参的心血管药理研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17（17）：2604-2606.
[35] 田俊娜，王婷婷，王双，等 . 黄芪增益方对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1613-1618.
[36] 叶潇，吴莹莹，左铮云，等 . 牡蛎散中黄芪、牡蛎药对的配伍作用 [J]. 中国中医药现代远程教育，2018，16（6）：96-98.
[37] 苏开鑫，谢华，王宏芬，等 . 牡蛎肉提取物对类固醇性骨质疏松大鼠骨代谢的影响 [J]. 中国自然医学杂志，2009，11（2）：97-99.

（收稿日期：2021-08-15；修回日期：2021-10-14）

复方磺胺甲噁唑片人体生物等效性研究

吴蔚，肖珍，张顺芝，曹天然，黄庆，张小敏，鲁萍*（长沙市第一医院，长沙　410013）

摘要：目的　研究单剂量口服复方磺胺甲噁唑片在中国健康人体内的药动学特征，并评价两种制剂的生物等效性及安全性。**方法**　采用单中心、随机、开放、两周期、自身交叉的试验设计，空腹条件下入组 32 名受试者，随机单次口服受试制剂和参比制剂 1 片（磺胺甲噁唑 0.4 g，甲氧苄啶 80 mg），采用 LC-MS/MS 法测定健康受试者血浆中磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的药物浓度，采用 WinNonlin 软件进行药动学参数的计算，进行生物等效性评价。**结果**　受试者服用受试制剂和参比制剂后，磺胺甲噁唑的主要药动学参数 C_{max} 分别为（29.2±4.6）和（30.8±5.3）μg·mL^{-1}；$AUC_{0\sim t}$ 分别为（430.5±66.8）和（430.2±59.4）h·μg·mL^{-1}；$AUC_{0\sim\infty}$ 分别为（450.9±73.7）和（449.6±65.7）h·μg·mL^{-1}；t_{max} 分别为 3.0（1.5 ～ 5.0）h 和 2.5（0.7 ～ 5.0）h。甲氧苄啶的主要药动学参数 C_{max} 分别为（1.1±0.2）和（1.1±0.2）μg·mL^{-1}；$AUC_{0\sim t}$ 分别为（10.7±2.7）和（10.5±2.5）h·μg·mL^{-1}；$AUC_{0\sim\infty}$ 分别为（11.1±2.7）和（10.9±2.4）h·μg·mL^{-1}；t_{max} 分别为 1.0（0.5 ～ 3.5）h 和 0.7（0.5 ～ 3.5）h。**结论**　两种复方磺胺甲噁唑片在中国健康受试者中具有生物等效性。

关键词：复方磺胺甲噁唑；生物等效；磺胺甲噁唑；甲氧苄啶；健康志愿者
中图分类号：R96，R972　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2555-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.015

Bioequivalence of compound sulfamethoxazole tablets

WU Wei, XIAO Zhen, ZHANG Shun-zhi, CAO Tian-ran, HUANG Qing, ZHANG Xiao-min, LU Ping* (*The First Hospital of Changsha*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective　To determine the pharmacokinetic characteristics of single dose oral administration compound sulfamethoxazole (SMZ) tablets in healthy Chinese people, and to evaluate the bioequivalence and safety of two preparations. **Methods**　A single-center, randomized, open, two-cycle, self-crossover design was adopted. Totally 32 subjects were enrolled under fasting condition. One test preparation or one reference preparation [SMZ 0.4 g, trimethoprim (TMP) 80 mg] was taken orally at random. The drug concentration of SMZ and TMP in the plasma of healthy subjects was determined by LC-MS/MS, and the pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin software. **Results**　After taking the test preparation and the reference preparation, the main pharmacokinetic parameters C_{max} of SMZ was (29.2±4.6) and (30.8±5.3) μg·mL^{-1}, respectively. $AUC_{0\sim t}$ was (430.5±66.8) and (430.2±59.4) h·μg·mL^{-1}, respectively. $AUC_{0\sim\infty}$ was (450.9±73.7) and (449.6±65.7) h·μg·mL^{-1}. t_{max} was 3.0 (1.5 ～ 5.0) h and 2.5 (0.7 ～ 5.0) h. The main pharmacokinetic parameters C_{max} of TMP was (1.1±0.2) and (1.1±0.2) μg·mL^{-1}. $AUC_{0\sim t}$ was (10.7±2.7) and (10.5±2.5) h·μg·mL^{-1}. $AUC_{0\sim\infty}$ was (11.1±2.7) and (10.9±2.4) h·μg·mL^{-1}. t_{max} was 1.0 (0.5 ～ 3.5) h and 0.7 (0.5 ～ 3.5) h, respectively. **Conclusion**　The two tablets are bioequivalent in Chinese healthy volunteers.

Key words: sulfamethoxazole; bioequivalence; sulfamethoxazole; trimethoprim; healthy volunteer

复方磺胺甲噁唑片属于磺胺类抗菌药物，是　磺胺甲噁唑（SMZ）与甲氧苄啶（TMP）的复方

基金项目：湖南省卫生健康委科研计划项目资助项目（No. 202113010356）；湖南省自然科学基金项目（No. 2021JJ80017）。
作者简介：吴蔚，女，硕士，主管药师，主要从事生物药剂学与药动学研究、药物早期临床研究，E-mail：80825976@qq.com
*通信作者：鲁萍，女，主管药师，主要从事药物临床研究，E-mail：1165575947@qq.com

制剂，对革兰氏阳性菌、阴性菌均有较好的抗菌作用。SMZ 作用于二氢叶酸合成酶，TMP 作用于叶酸合成代谢，选择性抑制二氢叶酸还原酶，两者合用可使细菌的叶酸代谢受到双重阻断，协同抗菌作用较单药增强，对其耐药的菌株减少[1]。本文旨在研究复方磺胺甲噁唑片在中国健康受试者体内的药动学特征和安全性，并对两种制剂是否生物等效进行评价，为临床用药安全性和有效性提供数据参考[2]。

1 材料

复方磺胺甲噁唑片（受试制剂，规格：含 SMZ 0.4 g、TMP 80 mg，批号：2001402，山东新华制药股份有限公司）；复方磺胺甲噁唑片（参比制剂，商品名：BACTRIM，规格：含 SMZ 0.4 g、TMP 80 mg，批号：7005301，Sun Pharmaceutical Industries Inc）；SMZ（批号：100025-201505，纯度：99.6%）、TMP（批号：100031-201606，纯度：99.8%）对照品（中国食品药品检定研究院）；SMZ -d4（SMZ-d4，批号：3147-019A3，纯度：98.9%）和甲氧苄啶 -d3（TMP-d3，批号：3066-017B3，纯度：97.2%）对照品（TLC Pharmaceutical Standards）。

LC-20AD 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；API 4000 质谱系统（AB SCIEX 公司）；TGL 16M 离心机（长沙英泰仪器有限公司）；十万分之一分析天平（赛多利斯 SQP/SECURA225D）。

2 方法与结果

2.1 受试者选择

共入组 32 名健康志愿者，男性 26 例、女性 6 例。年龄 18 ～ 36 岁，体质量 45.4 ～ 80.7 kg，体质量指数（BMI）19.2 ～ 24.9 kg • m^{-2}。每个受试者进行两周期试验，洗脱期 7 d。试验方案通过长沙市第一医院临床试验伦理委员会的批准，编号：20200331CSSY00101。受试者均签署知情同意书。

入选标准：① 年龄≥ 18 周岁，体质量男性≥ 50 kg，女性≥ 45 kg，BMI 在 19.0 ～ 26.0 kg • m^{-2}；② 所有受试者经生命体征、心电图及各项实验室检查无异常或为不具有临床意义的异常，无神经系统、心血管系统、内分泌系统、泌尿系统、免疫系统、消化系统、呼吸系统等明确病史。

排除标准：① 既往或目前任何临床严重疾病者或能干扰试验结果的任何其他疾病；② 有药物、食物或其他物质过敏史；③ 试验前 14 d 服用任何药物者；④ 试验前 30 d 使用干扰药物代谢的药物者；⑤ 嗜烟嗜酒者；⑥ 近 3 个月内献血或作为受试者被采样者；⑦ 肌酐清除率≤ 80 mL • min^{-2} 者[3]。

2.2 试验过程

采用随机、开放、自身交叉、双周期、单次给药试验设计。每周期在空腹状态下口服受试制剂或参比制剂 1 片。受试者于给药前 1 d 入住病房，给药前禁食 10 h 以上，药物使用 240 mL 温开水送服。给药前、后 1 h 禁水。分别于每周期给药前（0 h）及给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、12、24、36、48 h 采集静脉血各 4 mL 置于肝素钠抗凝采血管中。全血样品采集后 60 min 内开始离心，2000 g 离心 10 min，2 h 内储存于（－ 70±10）℃冰箱保存。

2.3 血药浓度的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Ultimate UPLC Polar RP（3.0 mm×100 mm，1.8 μm），预柱：ACE 3 μm C_{18} 2.1 mm GUARD CART，流动相：A 为 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵水溶液，B 为乙腈，洗脱条件：0 ～ 3 min，40%A[4-5]；进样量：2.0 μL；流速：0.4 mL • min^{-1}。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源；正离子模式；监测离子对：*m/z* 254.2 → *m/z* 156.2（SMZ），*m/z* 258.2 → *m/z* 160.2（内标 SMZ-d4），监测离子对：*m/z* 291.1 → *m/z* 123.2（TMP），*m/z* 294.1 → *m/z* 123.1（内标 TMP-d3）；离子喷雾电压：4500 V；去簇电压：SMZ 78.0 V，SMZ-d4 70.0 V，TMP 115.0 V，TMP-d3 90.0 V；碰撞能量：SMZ 30.0 V，SMZ-d4 17.0 V，TMP 30.0 V，TMP-d3 28.0 V；气帘气：30 psi；离子源温度：450 ℃。

2.3.3 血浆样品处理 移取血浆样品 50 μL 于 1.5 mL 深孔 96 孔板中，加入内标溶液 20 μL，再加入乙腈 400 μL，涡旋振荡 15 min，离心 15 min（5 ℃、2480 g），移取上清液 50 μL 于另一洁净 96 孔板中，向所有样本加入 50% 乙腈 200 μL，涡旋振荡 3 min，离心 10 min（5 ℃、2480 g），取上清液 2.0 μL 进行分析。

2.3.4 专属性 将空白血浆、加入对照品的血浆样本及受试者服药后血浆样本按“2.3.3”项下方法处理并进样分析，色谱图见图 1，表明方法专属性良好。

2.3.5 标准曲线与定量限 取新配制的标准曲线样本（SMZ：0.50、1.00、2.00、4.00、10.00、20.00、40.00、50.00 μg•mL^{-1}，TMP：0.02、0.05、0.10、0.20、0.40、1.00、1.80、2.00 μg • mL^{-1}）按“2.3.1”项下条件分析，分别以质量浓度为横

坐标，各自峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，进行加权回归，权重因子 $1/\chi^2$，得标准曲线分别为 $Y_{SMZ} = 2.56X - 0.003\ 46$，$R^2 = 0.9976$，$Y_{TMP} = 2.31X - 0.004\ 12$，$R^2 = 0.9976$。SMZ、TMP 定量限分别为 0.5 μg•mL^{-1}、0.02 μg•mL^{-1}。

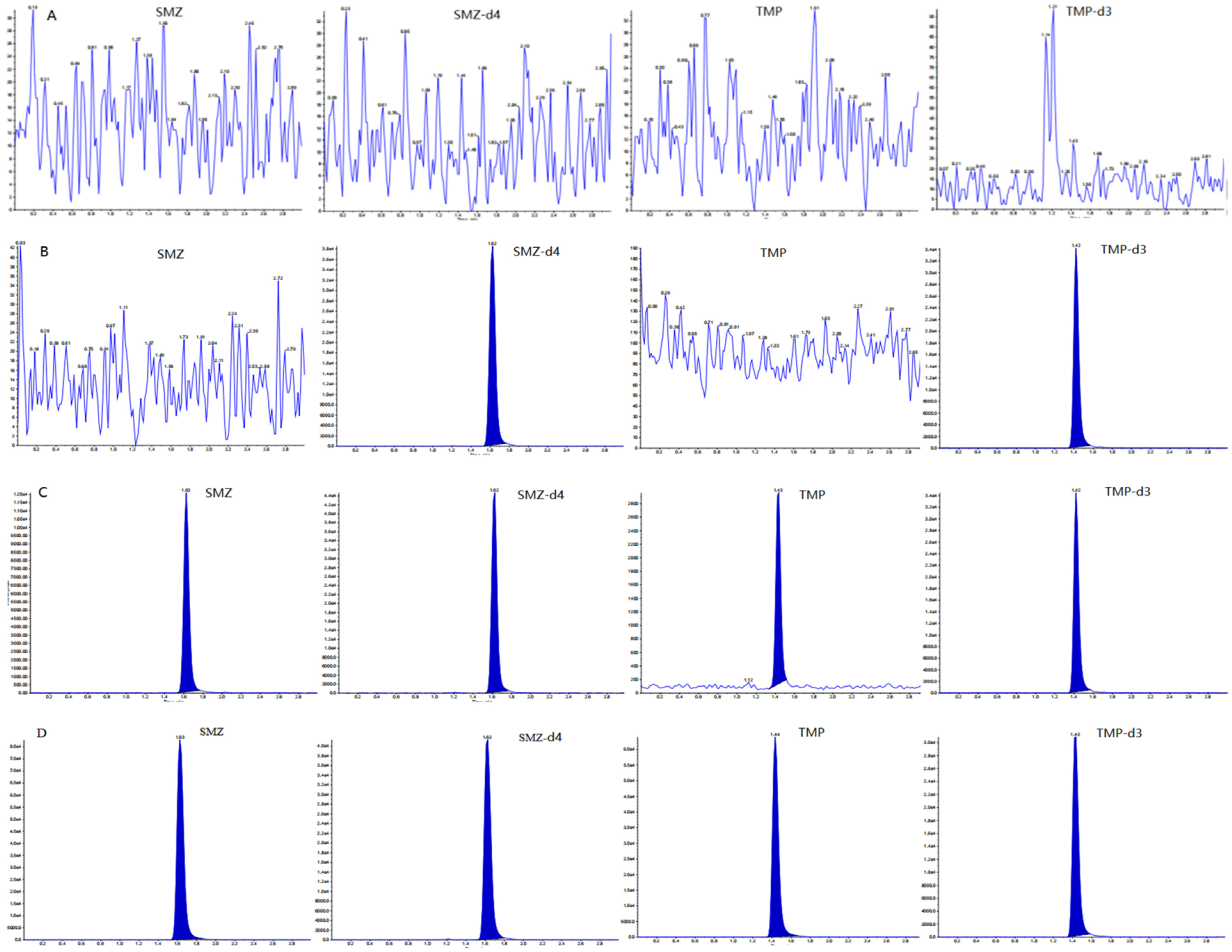


图 1　典型色谱图

Fig 1　Typical multiple reaction monitoring chromatograms

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋ SMZ-d4 或 TMP-d3（blank plasma ＋ SMZ-d4 or TMP-d3）；C. 添加待测物 SMZ（0.5 mg • mL^{-1}）和 TMP（0.02 mg•mL^{-1}）的样品 [blank plasma ＋ SMZ（0.5 mg•mL^{-1}）＋ SMZ-d4，blank plasma ＋ TMP（0.02 mg•mL^{-1}）＋ TMP-d3]；D. 志愿者给药后 0.5 h 样品（volunteers' sample after administration of 0.5 h）

2.3.6　精密度与回收率　配制低、中、高（SMZ：1.50、5.00、35.00 μg • mL^{-1}，TMP：0.06、0.20、1.50 μg • mL^{-1}）3 个质量浓度的质控样本，每个质量浓度平行制备 6 份，连续测定 3 个批次，计算日内、日间精密度及回收率。结果 SMZ 和 TMP 的日内精密度 *RSD* 在 − 3.1% ～ 5.4%，日间精密度 *RSD* 在 0.060% ～ 3.7%；平均回收率在 97.7% ～ 108.3%，对应的 *RSD* 均小于 5%。

2.3.7　基质效应　分别取 6 个不同批次的空白人血浆，每个批次配制一份，按 "2.3.3" 项下方法处理后进样分析，结果 SMZ 高、中、低质控水平样品的内标归一化的基质效应因子变异分别为 0.98%、0.98%、2.00%。TMP 高、中、低质控水平样品的内标归一化的基质效应因子变异分别为 2.15%、2.13%、2.17%。内标和待测物均无基质效应。

2.3.8　稳定性　考察全血样品分别在室温放置 0 h 和 27 h，在 − 20 ℃冰箱存放 17 d，− 80 ℃冰箱中存放 33 d，在 − 20 ℃ 冻融 5 次，在 − 80 ℃ 冻融 5 次，白光室温放置 2 h，在自动进样器（5 ℃，避光）中放置 81 h 的稳定性。结果 SMZ、TMP 质量浓度的 *RSD* 均＜ 9.3%，说明血浆样品在上述条件下稳定性。

2.4　统计学处理

使用 Phoenix WinNonlin 软件 8.2 版本的非房室模型（NCA）计算各受试者的药动学参数 C_{max}、

$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$、$t_{1/2}$、t_{max} 实测值采用非参数 Wilcoxon 法进行统计处理。C_{max} 和 AUC 经对数转换后进行多因素方差分析（ANOVA）、双单侧 t 检验和 90% 置信区间分析，并进行等效性比较，等效区间设定为 80.00% ～ 125.00%。

2.5　血药浓度 - 时间曲线

受试者空腹单次口服磺胺甲噁唑片受试制剂（T）与参比制剂（R）后 SMZ 与 TMP 的平均血药浓度 - 时间图见图 2。两组健康受试者血药浓度 - 时间曲线的变化趋势基本一致。

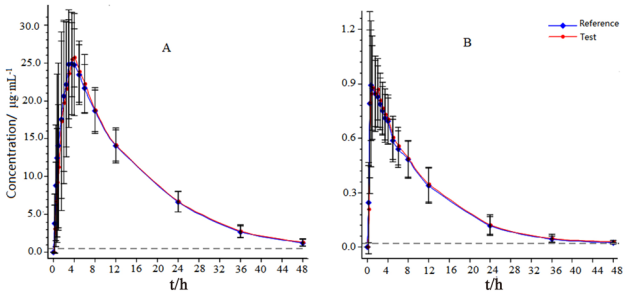


图 2　空腹条件下口服复方磺胺甲噁唑片受试制剂（T）与参比制剂（R）后 SMZ（A）、TMP（B）的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 2　Mean plasma concentration-time curve of SMZ（A）and TMP（B）after single oral administration of test and reference drugs under fasting

2.6　生物等效性评价

受试制剂 / 参比制剂中 SMZ 的几何均值比为 94.97%（91.37% ～ 98.72%），其 90% 置信区间分别为 100.17%（98.34% ～ 102.03%），100.36%（98.41% ～ 102.35%）；TMP 的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 为 103.34%（96.79% ～ 110.34%），102.49%（99.04% ～ 106.07%），102.02%（98.76% ～ 105.38%）。两者几何均值比的 90% CI 均落在 80.00% ～ 125.00%，表明复方磺胺甲噁唑片受试制剂和参比制剂在空腹给药时具有生物等效性（见表 1）。

2.7　安全性评价

本次试验共有 20 例受试者发生 30 例次不良事件（含第一周期 12 号受试者服药前发生的 1 例次不良事件），其中受试制剂共 11 例发生 17 例次不良事件，参比制剂共 9 例发生 12 例次不良事件，除 1 例严重程度为中度（12 号受试者给药前晕针），其余均为轻度，以尿胆红素升高、三酰甘油升高为主。除 1 例受试者三酰甘油升高转归为失访外，其他均为恢复。受试制剂和参比制剂不良事件发生情况总体相似，未出现严重不良事件，所有受试者生命体征平稳，对两种药物的耐受性良好。

表 1　受试者单次口服复方磺胺甲噁唑片受试制剂和参比制剂后 SMZ 和 TMP 的主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Main pharmacokinetic parameters of SMZ and TMP after single oral administration of test or reference drugs of sulfamethoxazole（$\bar{x}\pm s$）

参数	SMZ		TMP	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
C_{max}/（μg·mL^{-1}）	29.2±4.6	30.8±5.3	1.1±0.2	1.1±0.2
$AUC_{0\sim t}$/（h·μg·mL^{-1}）	430.5±66.7	430.2±59.4	10.7±2.7	10.5±2.5
$AUC_{0\sim\infty}$/（h·μg·mL^{-1}）	450.9±73.7	449.6±65.7	11.1±2.7	10.9±2.4
t_{max}/h	3.0（1.5 ～ 5.0）	2.5（0.7 ～ 5.0）	1.0（0.5 ～ 3.5）	0.7（0.5 ～ 3.5）
$t_{1/2}$/h	10.3±1.2	10.2±1.1	7.4±1.3	7.4±1.1

3　讨论

根据 NMPA 发布的《关于可豁免或简化人体生物等效性（BE）试验品种》通告要求，复方磺胺甲噁唑片（SMZ 0.4 g，TMP 80 mg）可豁免餐后生物等效性研究 [6]。因此本文仅进行了空腹研究。复方磺胺甲噁唑片口服后迅速吸收，TMP 和 SMZ 均在 1 ～ 4 h 达血药峰浓度，且 $t_{1/2}$ 均为 8 ～ 10 h，故本研究在 4 h 前设计了 10 个采血点，采血到 48 h。

本研究共有 3 例受试者脱落：12 号受试者第一周期给药前因为晕针未给药退出研究，20 号受试者在第一周期洗脱期随访抽烟符合入住排除标准脱落，8 号受试者第二周期服药前因血压低退出。31 例受试者纳入全分析集、安全数据集、PK 浓度数据集和 PK 参数分析集；31 例受试者纳入 BE 分析集。

4　总结

复方磺胺甲噁唑片是治疗和预防卡氏肺孢子菌肺炎最有效的首选药物，也是国内治疗弓形虫感染的首选用药，对国产的该品种进行生物等效性研究确保质量、疗效与原研药一致具有重大意义。根据 NMPA 发布的《关于可豁免或简化人体生物等效性（BE）试验品种》通告要求，复方磺胺甲噁唑片（SMZ 0.4 g，TMP 80 mg）可豁免餐后 BE 研究 [6]，因此本文仅进行了空腹研究。

根据既往研究，复方磺胺甲噁唑片口服后迅速吸收，TMP 和 SMZ 均在 1 ～ 4 h 达血药峰浓度，且 $t_{1/2}$ 均为 8 ～ 10 h。故本研究在 0 ～ 4 h 设计了 10 个采血点，采血到 48 h。复方磺胺甲噁唑过敏反应较为常见 [7]，本研究在筛选受试者时对本品或其他药物、食物或过敏体质者均进行了排除，给药后 4 h 内对受试者进行了重点监护。同时，该品种在用药期间需足量饮水以防结晶尿和结石的

形成[8]，本研究对受试者饮水也进行了重点管控。

本研究共有 3 例受试者脱落：31 例受试者纳入全分析集、安全数据集、PK 浓度数据集和 PK 参数分析集；31 例受试者纳入 BE 分析集。综合以上数据分析，受试制剂和参比制剂在安全性方面未见明显差异，受试制剂和参比制剂在空腹给药时具有生物等效性。

参考文献

[1] Mahmoud A，James CS，Brad S，et al. Evaluation of sulfonamide detoxification pathways in heamatologic malignancy patients prior to intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis [J]. Brit J Clin Pharm，2010，71（4）：566-574.

[2] 齐谢敏，张婕妤，陈晨，等 . 阿哌沙班片在中国健康受试者体内的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，9（37）：1035-1038.

[3] Rosalba AC，Roberto BE，Doris DCVA，et al. Bioequivalence of two commercial preparations of trimethoprim/sulfamethoxazole：A randomized，single-dose，single-blind，crossover trial [J]. Clin Ther，2007，11（29）：326-333.

[4] 郑恒，丁水平 . 液相色谱 - 串联质谱法测定人血浆中磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，18：2901-2904，2935.

[5] Bedor DGG，Goncalves TM，Ferreira MLL，et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis：Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr B，2008，863（2008）：46-54.

[6] 国家药品监督管理局 . 关于发布可豁免或简化人体生物等效性（BE）试验品种的通告（2018 年第 32 号）[EB/OL]. [2018-05-25]. https://www.nmpa.gov.cn/zhuanti/ypqxgg/ggzhcfg/20180531185701285.html.

[7] 韩潇 . 协和临床用药速查手册 [M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2020：222.

[8] 曹明雪，朱丽丽，蔡华丹 . 复方磺胺甲噁唑在人类免疫缺陷病毒感染者中的不良反应分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2019，19（6）：647-650，655.

（收稿日期：2021-08-15；修回日期：2021-11-02）

荧光光谱法研究萘普生和壳聚糖之间的相互作用

孙杰[1]，张冰卫[2]，徐光富[3*]，李博[2*]（1. 南京市食品药品监督检验院，南京　211198；2. 中国药科大学药学院，南京　210009；3. 中国药科大学理学院，南京　211198）

摘要：目的　研究萘普生和壳聚糖之间相互作用的基本原理，为壳聚糖与萘普生等药物复合物的研究和应用提供基础。**方法**　采用荧光光谱法考察了体系 pH 值、缓冲液用量、水浴时间、水浴温度对荧光猝灭的影响，测定不同类型壳聚糖与萘普生之间的结合常数和结合位点数。**结果**　萘普生与壳聚糖在 pH 5.0 的 BR 缓冲液中，温度为 298 K 时的结合比例为 1∶1，结合常数为 8.29×10^5 L·mol^{-1}，其猝灭类型属于静态猝灭，静电作用是其主要作用力。随着脱乙酰度和分子量的增加，壳聚糖与萘普生之间的结合常数线性增加。**结论**　壳聚糖通过氨基的静电作用与萘普生发生相互作用，可以通过壳聚糖分子量和脱乙酰度的选择来调节其与萘普生的相互作用，为壳聚糖 - 萘普生等药物复合物的制备、释放等研究提供基础。

关键词：萘普生；壳聚糖；荧光光谱法；荧光猝灭；相互作用
中图分类号：R917，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2559-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.016

Interaction between naproxen and chitosan by fluorescence spectroscopy

SUN Jie[1], ZHANG Bing-wei[2], XU Guang-fu[3*], LI Bo[2*] (1. *Nanjing Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing*　211198; 2. *School of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009; 3. *School of Sciences*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing*　211198)

基金项目：国家自然科学基金（No.81202491）；江苏省食品安全地方标准制（修）订项目计划（No.JSSPDB-2018-001）。
作者简介：孙杰，男，硕士，高级工程师，主要从事食药质量安全与实验室管理，E-mail：40979258@qq.com　*通信作者：徐光富，男，副教授，主要从事分析化学研究，E-mail：13951021451@139.com；李博，男，副教授，主要从事药物分析研究，E-mail：libo@cpu.edu.cn

Abstract: Objective To determine the basic principles of the interaction between naproxen and chitosan, and guide the application of chitosan in drug carriers and pharmaceutical excipients. **Methods** Fluorescence spectroscopy was used to determine the effect of system pH, buffer dosage, water bath time, and water bath temperature on the fluorescence quenching. The binding constant and number of binding sites between different types of chitosan and naproxen were determined. **Results** The binding ratio of naproxen and chitosan in the BR buffer with pH 5.0 at 298 K was 1∶1, and the binding constant was 8.29×10^5 L • mol^{-1}. The quenching type belonged to static quenching, with the electrostatic effect being its main force. **Conclusion** The interaction of chitosan and naproxen is mainly based on the electrostatic effect of amino group in chitosan to naproxen, and this interaction could be manipulated with the control of MW and degree of deacetylation of chitosan. This could provide fundamental information for the preparation of chitosan- naproxen complex and further study on its releasing behavior.

Key words: naproxen; chitosan; fluorescence spectrometry; fluorescence quenching; interaction

壳聚糖（chitosan）是氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖组成的多糖，它是天然糖类中唯一大量存在的碱性氨基多糖[1-2]。目前壳聚糖已经被应用于食品、药用辅料、生物医学材料等多个领域，在缓控释制剂、生物医学材料等方面扮演着越来越重要的角色[3-6]。

萘普生（naproxen）是非甾体消炎镇痛药，通过抑制前列腺素合成而起到抗炎镇痛作用[7]。近年来已有利用壳聚糖等对萘普生进行包封[8-9]，开发缓控释制剂等的报道，以改善萘普生的吸收及降低其不良反应。在制剂中，辅料与药物之间可能通过静电力、范德华力、疏水性作用力、氢键作用力等形成包合物、共晶、分散体、复合物等，因此在药物制剂研发过程中，对药物与辅料间相互作用的考察不可缺少[10]。热分析法、红外光谱法、X 衍射法等是常用的药物与辅料相互作用研究方法[11]。

荧光光谱法常用于蛋白质和小分子之间相互作用的研究，利用小分子对蛋白质荧光猝灭，通过 Stem-Volmer 方程计算荧光猝灭常数 K_{sv}，并计算结合常数和结合位点数以及相应的热力学参数 ΔS 和 ΔG，研究结合常数和作用力类型[12]。课题组前期对大分子猝灭剂与小分子荧光物之间的相互作用模型进行了完善，比较了小分子荧光药物与大分子之间相互作用研究模型[13]。本文利用荧光光谱法研究萘普生和壳聚糖之间相互作用的结合常数，推测壳聚糖与萘普生作用的基本原理，从而为壳聚糖与药物的相互作用的研究和应用提供理论基础，也为壳聚糖作为辅料的应用提供基础。

1 材料

F4600 荧光分光光度计（日本日立）；2004-21 智能型超级恒温水槽（常州国华电器有限公司）；pH 计（pHS-3B，上海仪电科学仪器股份有限公司）。萘普生（含量：99.9%，批号：100198-201004，中国食品药品检定研究院），壳聚糖（4 ～ 296 kD，中国药科大学药剂教研室；410 kD，江南大学），其他试剂为分析纯，水为二次蒸馏水。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 萘普生溶液（NPS） 称取 10 mg 萘普生于 10 mL 的量瓶中，甲醇溶解并定容，得萘溶液浓度为 1.74×10^{-4} mol•L^{-1} 的 NPS 溶液，于 4 ℃保存。

2.1.2 壳聚糖溶液（CTS） 称取 0.25 mg 壳聚糖于 25 mL 量瓶中，水溶解并定容，得浓度为 2.44×10^{-7} mol • L^{-1} 的 CTS 溶液，于 4 ℃保存。

2.1.3 Britton-Robinson（BR）缓冲液 取 0.04 mol • L^{-1} 的磷酸、乙酸、硼酸混合酸液，用 0.2 mol • L^{-1} 氢氧化钠调节 pH 至 5。

2.2 激发波长和发射波长的确定

移取 0.1 mL 的 NPS 溶液于 5 mL 量瓶中，加 1.5 mL BR 缓冲液，用水定容，置 1 cm×1 cm 的石英比色皿中，扫描激发光谱和发射光谱，确定最大激发波长（262 nm）和发射波长 [（355±0.5）nm]。荧光激发和发射波长狭缝宽度皆为 5 nm，扫描速度为 1200 nm • min^{-1}，扫描电压为 400 V。

2.3 荧光光谱分析

在 5 mL 量瓶中，依次加入 0.1 mL NPS 溶液、1.5 mL BR 缓冲液，用水定容，摇匀，298 K（25 ℃）恒温水浴 10 min，固定激发波长 262 nm，在 250 ～ 450 nm 扫描 NPS 的荧光光谱图。

在 5 mL 量瓶中，依次加入 0.1 mL NPS 溶液、

1.5 mL BR 缓冲液和不同体积的 CTS 溶液，用水定容，摇匀，配制系列 NPS 和 CTS 混合溶液。将该混合溶液置 298 K（25 ℃）恒温水浴 10 min，固定激发波长 262 nm，在 250 ～ 450 nm 内分别扫描复合物的荧光光谱图，记录各溶液的荧光强度。

2.4　结合常数测定

根据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线（公式 1），以 NPS 溶液 355 nm 处荧光强度为 F_0，NPS 和 CTS 混合溶液的 355 nm 处荧光强度为 F，将 CTS 浓度 [Q] 对荧光猝灭与 F_0/F 进行线性回归，计算 CTS 与 NPS 的相互作用的结合常数 K_a。

$$1/(F_0 - F) = 1/F_0 + 1/K_aF_0[Q] \quad \text{公式（1）}$$

3　结果与讨论

3.1　荧光光谱特征

如图 1 所示，NPS 的荧光发射波长和激发波长分别为 355 nm 和 262 nm。因此后续试验中，分别以 355 nm 和 262 nm 为荧光发射波长和激发波长。

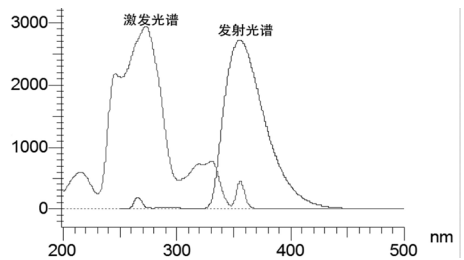


图 1　萘普生的荧光激发光谱图和发射光谱图

Fig 1　Fluorescence excitation and emission spectrogram of NPS

3.2　体系 pH 值对荧光猝灭的影响

分别在 pH 4、5、6、7、8、9、10 的条件下测定 NPS 溶液（1.74×10^{-4} mol·L^{-1}）、CTS 溶液（2.44×10^{-7} mol·L^{-1}）、NPS-CTS 结合物的荧光强度值。结果如图 2 所示，CTS 在各个 pH 值下荧光强度均很弱，与 NPS 的荧光强度相比，可以忽略不计；NPS 的荧光强度随着 pH 值的变化没有明显的变化。

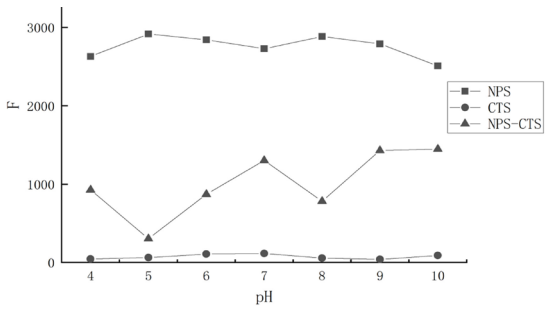


图 2　pH 值对荧光猝灭的影响

Fig 2　Influence of pH on fluorescence quenching

当 pH 值为 5 时，NPS-CTS 的荧光强度最弱，此时 pH 值条件下 CTS 对 NPS 的荧光猝灭程度最大，而对于 NPS 和 CTS 自身的荧光强度没有明显的影响。因此选择与 NPS 的 pK_a 值相近的 pH 5 为测定的 pH 值。由图 3 得出，在 pH 5 时，NPS 和 CTS 相互作用的结合常数相对最大。

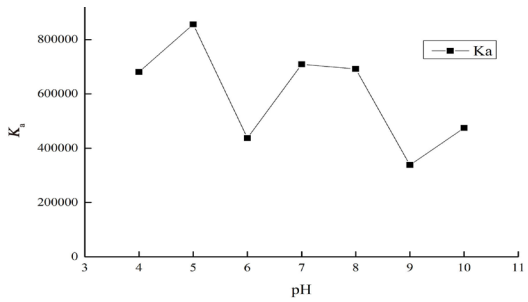


图 3　pH 值对结合常数的影响

Fig 3　Influence of pH on binding constants

3.3　缓冲液的用量对荧光猝灭的影响

确定 BR 缓冲液的 pH 值为 5.0，考察 NPS、CTS、NPS-CTS 在不同用量缓冲液（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL）条件下荧光强度值的变化，结果发现缓冲液用量对荧光强度的影响不大，综合选择 1.5 mL 作为试验条件。

3.4　水浴时间的考察

确定缓冲液的 pH 为 5.0，用量为 1.5 mL，取 NPS 0.7 mL，加 BR 缓冲液 10.5 mL，加 CTS 0.7 mL，用纯净水补足至 35 mL，在 25 ℃恒温水浴中水浴加热，于 0 ～ 67 min 时间点取样测定荧光强度，结果显示在 0 ～ 67 min 内，体系猝灭程度基本不变，复合物在测定时间内稳定，综合选择水浴时间为 10 min。

3.5　荧光猝灭类型

荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭两种，动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的碰撞等导致的猝灭，而静态猝灭是猝灭剂和荧光分子在基态时生成不发光的复合物，从而导致荧光强度降低。在研究分子间相互作用，计算结合常数和结合位点数时，静态猝灭是关键的前提条件。所以首先要对其猝灭类型进行判断。试验考察了不同温度对 NPS 和 CTS 相互作用情况的影响。图 4 为 NPS 在 288、298 和 303 K 与 CTS 相互作用的 Stem-Volmer（公式 2）曲线图，表 1 为各温度计算的 K_{sv}。

表 1　不同温度下 CTS-NPS 的 K_{sv} 常数

Tab 1　K_{sv} of CTS-NPS at different temperatures

T/K	K_{sv}/（$\times10^5$）	r
288	9.10	0.9901
298	8.56	0.9972
303	7.21	0.9916

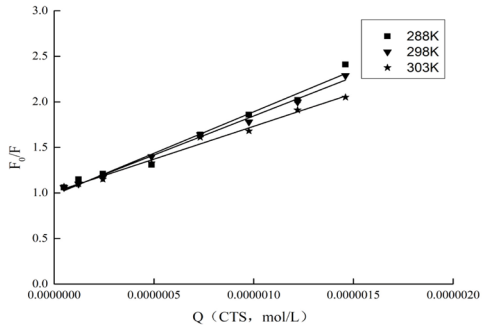


图 4　不同温度下 NPS 与 CTS 相互作用的 Stem-Volmer 曲线图

Fig 4　Stem-Volmer curve of interaction between NPS and CTS

$$F_0/F = K_{sv}[Q] + 1 = K_q\tau_0[Q] + 1$$　公式（2）

如图 4 和表 1 所示，各温度下 Stem-Volmer 曲线呈现良好的线性关系（$r > 0.99$），随着温度的升高，Stem-Volmer 曲线图斜率下降，K_{sv} 常数不断变小，这是因为对于静态猝灭在温度升高时可能引起复合物的稳定性下降，从而减小了静态猝灭的程度，因此可以判断本文研究猝灭属于静态猝灭。在实际操作过程中，为了避免温度太高使得分子热运动加剧从而导致体系在静态猝灭的同时发生动态猝灭，同时为了试验的易于进行，最终选择 298 K 作为试验条件。

3.6　结合常数测定

取 1.74×10^{-4} mol·L^{-1} NPS 溶液，加入不同浓度的 CTS，加 1.5 mL BR 缓冲液，用水定容到 5 mL。激发波长 262 nm，于 200 ～ 500 nm 内扫描得到萘普生的荧光猝灭光谱（见图 5）。

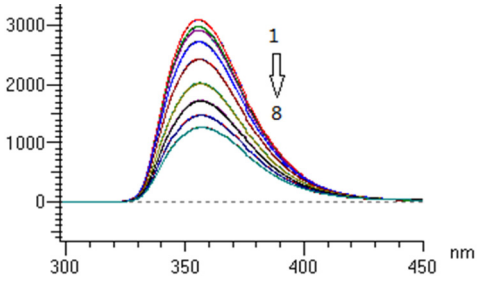


图 5　298 K 时不同浓度 CTS 对萘普生的荧光猝灭光谱图

Fig 5　Fluorescence quenching of NPS with series concentration of CTS at 298 K

注：1 ～ 8 对应 CTS 浓度 4.89×10^{-8} 至 1.46×10^{-6} mol·L^{-1}。

Note：CTS concentration ranging from 4.89×10^{-8} to 1.46×10^{-6} mol·L^{-1} for spectrum 1 ～ 8

如图 5 的猝灭曲线所示，不同浓度 CTS-NPS 溶液的最大发射波长均为 355 nm，表明 CTS 能够与 NPS 发生相互作用进而猝灭 NPS 的荧光。以 355 nm 处的荧光强度，按 Lineweaver-Burk 曲线进行线性回归，得到图 6 的回归曲线图，以截距与斜率的比值计算 K_a，得到 CTS 与 NPS 的结合常数 K_a 为 8.29×10^5 L·mol^{-1}；按公式（3）对双对数曲线进行线性回归，得到图 7 的回归曲线图，其斜率为结合位点数 n，得 CTS 与 NPS 的结合位点数为 1.12，可见 CTS 与 NPS 基本上是 1∶1 结合的。

$$\lg\frac{(F_0-F)}{F} = \lg K_a + n\lg[Q]$$　公式（3）

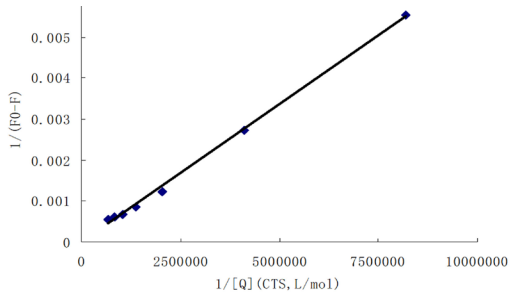


图 6　NPS 和 CTS 相互作用的 Lineweaver-Burk 曲线图

Fig 6　Lineweaver-Burk curve of NPS and CTS

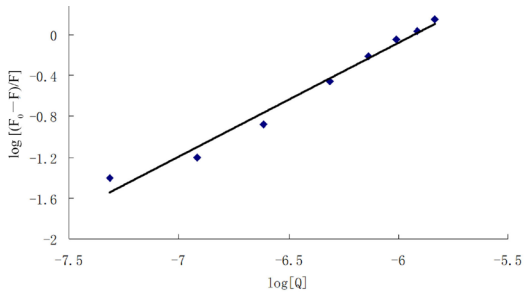


图 7　NPS 和 CTS 相互作用的双对数曲线图

Fig 7　Double logarithmic curve of MET and CTS

3.7　作用力的推测

由不同温度下的结合常数 K_a，通过 Arrhenius 方程计算壳聚糖与萘普生相互作用的热力学参数，结果见表 2。

表 2　壳聚糖与萘普生相互作用的热力学参数

Tab 2　Thermodynamic parameter of reaction between NPS and CTS

T/K	K_a/（$\times10^5$）	1/T/（$\times10^{-3}$）	lnK_a	ΔH/（kJ·mol^{-1}）	ΔS/（J·mol^{-1}·K^{-1}）	ΔG/（kJ·mol^{-1}）
288	8.58	3.47	13.66	− 3.19	102.56	− 32.7
298	8.29	3.36	13.63			− 33.8
303	8.01	3.25	13.59			− 34.3

从表 2 中可以看到，NPS 与 CTS 相互作用的 ΔH < 0，ΔS > 0。由于 ΔS > 0 可能是疏水和静电作用力，ΔH < 0 且较小时为静电作用力，因此 CTS 和 NPS 之间的作用力主要为静电作用力。又因为 ΔS 对 ΔG 的贡献比 ΔH 大，所以还含有疏水作用。表明作用力主要是 CTS 的 -NH_3^+ 与 NPS 的 -COO^- 以静电力结合，1∶1 作用形成分子量较大的复合物而使 NPS 的荧光变弱。同时两者反应的自由能 ΔG < 0，表明反应在正方向上是自发进行的。

3.8　壳聚糖分子量对相互作用的影响

分别考察了分子量为 4、6、8、10、30、50、100、240、296、410 kD 的 CTS 与 NPS 的相互作用，结果如表 3 所示，随着壳聚糖分子量（MW）的逐渐增大，CTS 与 NPS 的结合常数线性增大，回归方程 $K_a = 2.165\ MW - 155.5$，相关系数 r 为 0.9900；同时结合仍为 1∶1 结合。

表 3　不同分子量壳聚糖与萘普生的相互作用

Tab 3　Interaction of CTS with different weight and NPS

CTS 分子量 /kD	K_a/（$\times 10^3$）	n	r
4	1.75	1.08	0.9962
6	4.18	1.59	0.9965
8	12.71	0.75	0.9996
10	34.21	0.75	0.9993
30	43.06	0.75	0.9988
50	60.72	0.80	0.9975
100	285.22	1.09	0.9997
240	503.80	1.28	0.9994
296	723.57	1.06	0.9995
410	829.36	1.12	0.9629

3.9　壳聚糖脱乙酰度对相互作用的影响

分别比较对脱乙酰度 74.4% ～ 88.8% 的 CTS 与 NPS 的相互作用，结果见表 4。

表 4　脱乙酰度对壳聚糖与萘普生相互作用的影响

Tab 4　Effect of degree of deacetylation on the interaction of CTS and NPS

脱乙酰度 /%	K_a/（$\times 10^5$）	n	r
74.4	—	—	—
77.3	3.83	1.24	0.9991
82.9	8.83	0.50	0.9999
88.8	12.29	1.10	0.9982

注（Note）：“—”表示荧光猝灭过小，无法准确计算（“—” means cann’t be calculated because limited fluorescence quenching）

如表 4 所示，CTS 的脱乙酰度（DD）对结合常数影响非常显著，脱乙酰度与结合常数的回归方程为 $K_a = 7.370\times 10^4\ DD - 5.263\times 10^6$，相关系数为 0.9926。结合位点数除了脱乙酰度为 82.9% 的点其他没有明显改变，仍为 1∶1 结合。在脱乙酰度为 74.4% 的较低的脱乙酰度的情况下，CTS 对 NPS 产生的荧光猝灭极弱，且随着 CTS 浓度的增加没有呈现荧光猝灭增强的规律，说明当 CTS 的脱乙酰度较低，游离的 $-NH_2$ 数较少时，其与 NPS 的作用很弱，导致 NPS 的荧光没有明显的被猝灭现象，从也无法准确计算其结合常数和结合位点数；当 CTS 的脱乙酰度逐渐增加时，游离的 $-NH_2$ 数逐渐增多，其与 NPS 的相互作用增强，荧光猝灭现象明显。由此可见，NPS 与 CTS 的相互作用主要是静电作用，CTS 的脱乙酰度对其与 NPS 的相互作用影响较大，且 CTS-NPS 结合的 K_a 值与脱乙酰度呈线性相关，相关系数 r 为 0.9926。

4　结论

本文利用荧光光谱法证实 NPS 与 CTS 可发生相互作用，在 pH 5.0、温度 298 K 时，两者的结合比例为 1∶1，结合常数为 $8.29\times 10^5\ L \cdot mol^{-1}$；其相互作用以静电作用为主。同时进一步发现 CTS 的分子量和脱乙酰度与其和 NPS 的结合常数成正比，且脱乙酰度影响更为显著，表明两者的静电作用通过 CTS 的氨基发生；而结合比例基本不受 CTS 的分子量和脱乙酰度影响。本研究为 CTS-NPS 等复合物的制备及 CTS 作为药物缓控释材料的研究提供基础。

参考文献

[1] 刘亭亭，王传邦，牟丽秋，等 . 壳聚糖及其衍生物作为促渗剂在经皮给药系统中的研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（6）：624-627.

[2] 李然，林世源，陈卉 . *N*，*N*，*N*- 三甲基壳聚糖在口服给药中的应用进展 [J]. 中南药学，2020，18（6）：1038-1041.

[3] 张纯刚，于琛琛，程兰，等 . 白藜芦醇壳聚糖缓释微球在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中南药学，2018，16（9）：1210-1213.

[4] 丛志新，樊慧敏，吴春芝，等 . 原位凝胶剂的研究现状与应用前景 [J]. 中南药学，2018，16（9）：1185-1190.

[5] 曲绪楷，赵志南，王澍，等 . 壳聚糖 / 海藻酸钠 - 法莫替丁胃漂浮骨架片的制备与释药机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（5）：731-734.

[6] 王玉蓉，巨佳，王济，等 . 包载姜黄素的羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖聚电解质复合膜对大鼠口腔溃疡的治疗作用研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1532-1536.

[7] 石笑弋，蒋涛，刘轶，等 . 萘普生注射液的有关物质研究 [J]. 中南药学，2017，15（5）：667-670.

[8] 陈莉敏，李柱来，王津 . 萘普生缓释微球制备工艺及性能研究 [J]. 天然产物研究与开发，2007（5）：878-880，889.

[9] 陈莉敏，李柱来，王津 . 萘普生缓释微囊的制备及其体外释药研究 [J]. 中国海洋药物，2007（6）：20-23.

[10] 张倩，夏学军 . 药物制剂中药物与辅料相互作用的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（1）：32-41.

[11] 张婷，彭红，肖飞，等 . 药用辅料与药物活性成分相互作用及其分析技术研究进展 [J]. 中国新药杂志，2018，27（3）：322-328.

[12] 周玲玲，龚小保 . 人血清白蛋白与 4 种黄酮类化合物相互作用研究 [J]. 中南药学，2017，15（8）：1065-1068.

[13] 张冰卫，李博，夏文水，等 . 用荧光光谱法研究分子间结合常数和结合位点数时的公式选择 [J]. 药学进展，2011，35（7）：296-303.

（收稿日期：2021-07-02；修回日期：2021-09-05）

LC-MS-MS 法测定人血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的浓度

易志恒[1, 2]，李筱旻[3, 4]，申秋莹[3, 4]，潘琳[2]，王珊[2]，向圆圆[2]，李岱[3, 4]，戴伊歆[3]，徐素梅[3, 4*]（1. 中南大学，长沙 410083；2. 湖南迪诺制药股份有限公司，长沙 410331；3. 中南大学湘雅医院Ⅰ期临床试验研究中心，长沙 410008；4. 国家老年疾病临床医学研究中心（湘雅），长沙 410008）

摘要：目的 建立人体血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀浓度测定的 LC-MS-MS 法。**方法** 血浆中目标成分采用叔丁基甲基醚∶乙酸乙酯（1∶1，*V/V*）萃取，以阿托伐他汀 -d_5、邻位阿托伐他汀 -d_5、对位阿托伐他汀 -d_5 为内标，采用 Agilent Zorbax SB-C_{18} 柱（150 mm×2.1 mm，5 μm）分离，流动相 A 为 5 mmol • L^{-1} 的乙酸铵（含 0.1% 甲酸的水溶液），流动相 B 为 5 mmol • L^{-1} 的乙酸铵（含 0.1% 甲酸的甲醇溶液），梯度洗脱。采用 ESI^+ MRM 方式进行离子监测，阿托伐他汀和内标的离子选择通道分别为 *m/z* 559.5 → 440.3 和 564.5 → 445.4。**结果** 三者的线性范围均为 0.05 ～ 20.0 ng • mL^{-1}，定量下限均为 0.05 ng • mL^{-1}，批内和批间 *RSD* 均小于 15%。**结论** 本方法专属性强，重复性好，能准确地测定人血浆中阿托伐他汀及其代谢物浓度，为阿托伐他汀的人体药代动力学研究提供了实验依据。

关键词：液相色谱 - 质谱联用；阿托伐他汀；邻位阿托伐他汀；对位阿托伐他汀；内标法
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2564-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.017

LC-MS-MS determination of atorvastatin，ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma

YI Zhi-heng[1, 2], LI Xiao-min[3, 4], SHEN Qiu-ying[3, 4], PANG Lin[2], WANG Shan[2], XIANG Yuan-yuan[2], LI Dai[3, 4], DAI Yi-xin[3], XU Su-mei[3, 4*] (1. *Central South University*, *Changsha* 410083; 2. *Hunan Dinuo Pharmaceutical Co. Ltd.*, *Changsha* 410331; 3. *Phase I Clinical Trial Center*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 4. *National Clinical Research Center for Geriatric Disorders*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008)

Abstract: Objective To determine the concentration of atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma by LC-MS-MS. **Methods** Atorvastatin-d_5, ortho-hydroxy atorvastatin-d_5, and para-hydroxy atorvastatin-d_5 were used as the internal standard. Human plasma samples were extracted by tert-butyl methyl ether ： ethyl acetate (1 ： 1, *V/V*), and then separated on an Agilent Zorbax SB-C_{18} column (150 mm×2.1 mm, 5 μm) with mobile phase A(5 mmol • L^{-1} ammonium acetate, aqueous solution containing 0.1% formic acid) and mobile phase B (5 mmol • L^{-1} of ammonium acetate, methanol solution containing 0.1% formic acid) with gradient elution. An electrospray ionization source was applied, and multiple reaction monitoring mode was operated in the positive mode with selective channel at *m/z* 559.5 → 440.3 and 564.5 → 445.4 for atorvastatin and its internal standard. **Results** The measured concentration range was 0.05 ～ 20.0 ng • mL^{-1}, the lower limit of quantification was 0.05 ng • mL^{-1}, and the intra-and inter-*RSD* were both less than 15%. **Conclusion** The method is highly sensitive and repetitive, reliable for the

基金项目：国家科技重大专项（重大新药创制）（No. 2017ZX09304014）；湖南省自然科学基金项目（No. 2020JJ9022）；湖南省科学技术创新引导专项（No. 2014XK4007）。
作者简介：易志恒，男，高级工程师，在读博士研究生，主要从事药物制剂研究，E-mail：dnyzh2008@126.com *通信作者：徐素梅，女，硕士，主管药师，主要从事药代动力学研究，xsm1216@csu.edu.cn

determination of atorvastatin and its metabolites in human plasma.

Key words: LC-MS-MS; atorvastatin; ortho-hydroxy atorvastatin; para-hydroxy atorvastatin; internal standard method

阿托伐他汀（atorvastatin，AT）是一种选择性 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制剂，其主要作用机制是通过抑制 HMG-CoA 还原酶，减少胆固醇和脂蛋白的前体物质甲羟戊酸的形成，从而显著降低胆固醇、低密度脂蛋白及三酰甘油水平[1]。同时，阿托伐他汀还具有降低血小板活化和聚集的作用，临床常用于高脂血症的治疗和心脑血管疾病的防治[2-4]。

阿托伐他汀有明显的首过效应，主要由肝脏的 CYP3A4 酶代谢成邻位羟基代谢物（ortho-hydroxy atorvastatin，o-AT）和对位羟基代谢物（para-hydroxy atorvastatin，p-AT），两者的药理活性与阿托伐他汀相当[5]。而阿托伐他汀、o-AT、p-AT 又可动态转化成相应的非活性内酯衍生物[6]。因此，阿托伐他汀及其活性代谢产物 o-AT 和 p-AT 的血浆浓度低，对其药代动力学研究提出了挑战[7]。目前已报道多种分析方法可用于单独测定阿托伐他汀，或同时测定阿托伐他汀及其活性代谢物，如 GC-MS、LC-MS/MS[8-14]，但有前处理繁琐、灵敏度较低或分析时间长等缺陷。

本研究旨在建立一种快速、灵敏、准确、操作简便的 HPLC-MS/MS 法，同时测定阿托伐他汀、o-AT、p-AT，以满足药代动力学研究的需要。

1 材料

1.1 仪器

低温离心机（TDL5M，盐城凯特）；HPLC 系统（ExionLC）；串联四极杆质谱（AB Sciex Triple Quad5500）；数据采集和处理硬件（Analyst 1.6.3，AB Sciex）。

1.2 试药

阿托伐他汀（批号：8-SCC-42-1，含量：96.0%）、邻位阿托伐他汀（批号：13-AUG-16-37，含量：94.8%）、对位阿托伐他汀（批号：13-AUG-16-36，含量：96.1%）；阿托伐他汀 -d_5（批号：2-OMK-4-1，含量：96.0%）、邻位阿托伐他汀 -d_5（批号：39-GHZ-67-1，含量：94.0%）、对位阿托伐他汀 -d_5（批号：39-GHZ-67-1，含量：95.0%）（对照品，Quality Control Chemicals Inc）。

甲酸（HPLC 级，ROE）；甲醇、乙酸乙酯、乙腈（HPLC 级，Burdick & Jackson）；甲基叔丁基醚（HPLC 级，J.T. Baker）；水（HPLC 级，DUKSAN）；乙酸铵（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱：Zorbax SB-C_{18}（2.1 mm×150 mm，5 μm，Agilent）；流动相 A：5 mmol • L^{-1} 的乙酸铵（含 0.1% 甲酸的水溶液），流动相 B：5 mmol • L^{-1} 的乙酸铵（含 0.1% 甲酸的甲醇溶液）；柱温：40 ℃；自动进样器温度：5 ℃；进样体积：30.0 μL。

2.2 质谱条件

ESI^+ 方式进行离子监测；源喷射电压：5500.00 V；源温度：550 ℃；离子源气体 1：35 psi；离子源气体 2：35 psi；碰撞气：4.0 psi；气帘气：20 psi；阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀、阿托伐他汀 -d_5、邻位阿托伐他汀 -d_5、对位阿托伐他汀 -d_5 在 ESI^+ 源电离方式下主要生成 $[M+H]^+$ 峰分别为 *m/z* 559.5、575.20、575.40、564.50、580.3 和 580.2，以此离子作为母离子，对母离子进行碰撞碎裂，碎裂后子离子分别为 *m/z* 440.3、440.4、440.30、445.40、445.40 和 445.60。阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀、阿托伐他汀 -d_5、邻位阿托伐他汀 -d_5、对位阿托伐他汀 -d_5 的碰撞能量均为 34 eV，去簇电压分别为 103 eV、100 eV、100 eV、121 eV、100 eV、112 eV。

2.3 对照品溶液的配制

称量约 1.00 mg 阿托伐他汀钙、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀（对位阿托伐他汀按校正系数来计算实际质量，不同来源对照品的校正系数可能不同），转移至 20 mL 聚丙烯闪烁瓶中，以适量 50% 甲醇溶解，得到质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 的阿托伐他汀钙，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀溶液（约 10.0 mL）。置于－ 80 ℃冰箱保存。

以 50% 甲醇稀释配制以下质量浓度的阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀标准系列溶液（1.00、2.00、5.00、20.00、40.00、100.00、200.00、300.00 和 400.00 ng • mL^{-1}）。

2.4　内标溶液的配制

分别称量约 1.00 mg 阿托伐他汀 -d_5、邻位阿托伐他汀 -d_5、对位阿托伐他汀 -d_5，经校正后计算实际质量（不同来源标准品的校正系数可能不同）。转移至 20 mL 聚丙烯闪烁瓶，以适量 50% 甲醇溶解，得到质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 的阿托伐他汀 -d_5、邻位阿托伐他汀 -d_5、对位阿托伐他汀 -d_5 储备液（约 10.0 mL）。放置于－ 80 ℃冰箱保存。

取 100 μL 储备液，用 50% 甲醇配得 1.00 μg/mL 的中间工作溶液。放置于－ 80 ℃冰箱保存。

用加样器转移 1.00 mL 1.00 μg • mL^{-1} 的中间工作溶液至装有 9.00 mL 50% 甲醇稀释液的 20 mL 聚丙烯闪烁瓶，混匀后得到 100 ng • mL^{-1} 的工作溶液。放置于－ 80 ℃冰箱保存。

2.5　样品制备方法

取血浆样品 200 μL 至玻璃小管内，加入 10 μL 100 ng • mL^{-1} 内标工作溶液，加入 200 μL 6 mol • L^{-1} 的乙酸铵水溶液，10.0 μL 50% 甲醇，再加入 1.00 mL 甲基叔丁基醚和 1.00 mL 乙酸乙酯，机械震荡 5 min，离心（4000 r • min^{-1}）3 min 后，放于－ 80 ℃冰箱冷冻水层，将上层有机层液体倒入标记的玻璃管中，用氮吹仪在 40 ℃（氮气压力 10 ～ 15 psi）吹干，再加入 200 μL 6 mol • L^{-1} 的乙酸铵水溶液重新溶解样品，涡旋混匀，将样品转至 2.0 mL 聚丙烯小管中，高速离心 2 min，转移上层澄清样品溶液至进样小瓶，30 μL 进样，LC-MS-MS 法进行分析。

3　结果

3.1　方法专属性

分别制备空白血浆、空白血浆加阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀和内标的血浆样品，进行 LC-MS-MS 分析，获得色谱图（见图 1）。在本实验条件下，所有空白样品均未见干扰峰，各成分均有效分离。

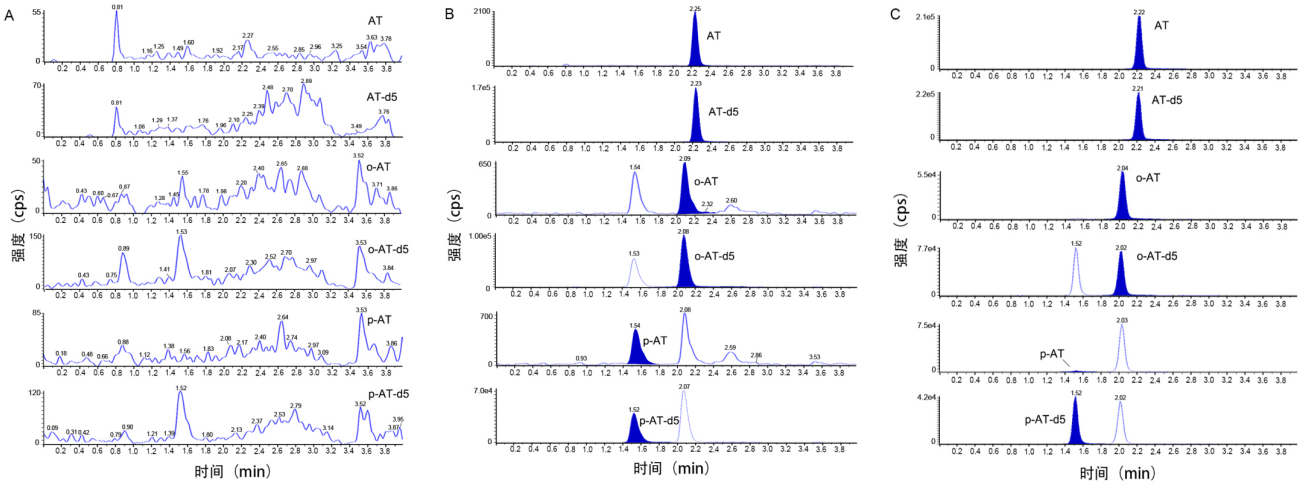


图 1　血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀及其内标的色谱图

Fig 1　Chromatogram of atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin and its internal standard in human plasma

A. 空白血浆（blank human plasma）；B. 空白血浆＋待测物＋内标（blank human plasma ＋ analyte ＋ internal standard）；C. 受试者服药 1.5 h 血浆样品（plasma of one volunteer after 1.5 hour of administration of atorvastatin）

3.2　线性范围及定量下限（LLOQ）

取标准系列溶液 10 μL，加入空白血浆 190 μL，配制系列浓度血浆样品，按“2.7”项下操作，配制质量浓度为 0.050、0.100、0.250、1.00、2.00、5.00、10.0、15.0 和 20.0 ng • mL^{-1} 的阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀系列标准溶液，每一浓度进行 3 样本处理分析，以待测物质量浓度为横坐标，待测物与内标的峰面积比值为纵坐标。采用加权最小二乘法（权重因子 $1/\chi^2$）进行线性回归，结果阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀的回归方程分别为 $Y = 1.230X + 7.35\times10^{-5}$（$r = 0.996$），$Y = 0.604X + 4.12\times10^{-4}$（$r = 0.997$），$Y = 1.400X + 4.92\times10^{-4}$（$r = 0.997$），线性范围均为 0.05 ～ 20.0 ng • mL^{-1}。三者的 LLOQ 均为 0.05 ng • mL^{-1}。

3.3　准确度和精密度

配制定量下限、低、中、高 4 种浓度质控样品（阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀血浆浓度分别为 0.050、0.150、1.50 和 16.0 ng • mL^{-1}）各 6 份，测定日内准确度和精密度；另配制阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀血浆浓度分别为 0.050、0.150、1.50 和

16.0 ng·mL^{-1} 的质控样品，每一浓度进行 6 样本分析，连续测定 3 个分析批，分别计算阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀的日间准确度及精密度，准确度均在 80% ～ 120%，*RSD* 均小于 15%。

3.4　提取回收率

取空白血浆，制备血浆质量浓度分别为0.150、1.50 和 16.0 ng·mL^{-1} 的阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀质控样品，按“2.5”项下操作，每一浓度进行 6 样本分析，获得相应的峰面积；空白基质提取后用质量浓度为 0.150、1.50 和 16.0 ng·mL^{-1} 的阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀的纯溶液复溶样品，测定峰面积。分析批中质控样品的峰面积除以相应浓度的空白样品提取液加入纯溶液峰面积用来计算各质控样品的回收率。阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的提取回收率分别为 64.3% ～ 67.0%（*RSD* 为 3.94% ～ 13.20%），78.3% ～ 100.0%（*RSD* 为 8.9% ～ 19.80%），64.3% ～ 71.4%（*RSD* 为 4.30% ～ 6.0%）。

3.5　基质效应

取血浆样品 200 μL 至玻璃小管内，处理后进样分析，每一浓度进行 6 样本分析；另取相同浓度的标准溶液 20 μL 和内标溶液 50 μL，涡旋混匀，氮气吹干，加入 200 μL 流动相溶解，涡旋震荡 3 min，13 000 r·min^{-1} 离心 5 min，30 μL 进样分析。

对于每批基质，通过计算基质存在下的峰面积与不含基质的相应峰面积比值，计算阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀和内标的基质因子（MF）和内标归一化基质因子（IS-normalised MF），结果见表 1。

表 1　LC-MS/MS 法测定人血浆中阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀及对位阿托伐他汀的基质效应 (n = 6)

Tab 1　Matrix effects of LC-MS-MS method for determination of atorvastatin，ortho-hydroxy atorvastatin，para-hydroxy atorvastatin in human plasma (n = 6)

样品	浓度 /（ng·mL^{-1}）	基质效应 /%	相对标准差 /%
阿托伐他汀	0.150	101	3.5
	16.0	101	0.73
邻位阿托伐他汀	0.150	104	1.0
	16.0	100	0.44
对位阿托伐他汀	0.150	103	5.1
	16.0	102	0.82

3.6　样品稳定性试验

配制质量浓度为 0.150、16.0 ng·mL^{-1} 的阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀，对位阿托伐他汀质控样品，分别考察待测物在下述条件下的稳定性：① 冻融稳定性；② 生物样品前处理过程中的稳定性（室温储存 25 h）；③ 生物基质中待测物的长期稳定性（－ 80 ℃冷冻储存 288 d）；④ 重新进样稳定性。结果见表 2。

表 2　LC-MS/MS 法测定血浆中阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀及对位阿托伐他汀样品稳定性 ($\bar{x}$±CV，%)

Tab 2　Stability of LC-MS-MS method for determination of atorvastatin，ortho-hydroxy atorvastatin，para-hydroxy atorvastatin in human plasma ($\bar{x}$±CV，%)

样品	浓度 /（ng·mL^{-1}）	冻融稳定性	长期存储冷冻稳定性	室温放置稳定性
阿托伐他汀	0.150	96.00±3.83	103.00±0.65	99.30±1.34
	16.0	93.80±2.52	108.00±1.33	95.60±1.00
邻位阿托伐他汀	0.150	92.00±7.10	96.00±5.22	97.30±10.10
	16.0	108.00±2.35	96.90±1.34	111.00±2.65
对位阿托伐他汀	0.150	93.30±3.11	94.70±1.22	98.70±5.45
	16.0	103.00±3.37	93.80±1.02	103.00±0.93

3.7　临床应用

本文所建立的阿托伐他汀及代谢物血药浓度测试方法已成功应用于阿托伐他汀钙片在中国健康受试者中的生物等效性研究。本研究分为两部分：空腹服药试验和餐后服药试验，各纳入 32 例受试者。每部分均采用随机、开放、两制剂、四周期、全重复试验设计。于每周期给药前 10 ～ 40 min 和给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、48、72 h 采集受试者上肢静脉血，每次采血约 4 mL 至含有肝素钠负压真空采血管中，4 ℃以 3500 r·min^{-1} 离心 10 min，分离血浆，测定阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的浓度。空腹和餐后口服单剂量药物后阿托伐他汀及代谢物的主要药代动力学参数分别见表 3 和表 4。

4　讨论

本研究采用同位素氘标作为内标，与待测化合物性质相近，可校正其他因素对待测物测定结果的影响，提高检测的精密度和准确性，这也是近年来开展药代动力学研究或药物一致性评价的原形药物或其代谢产物研究采用较多的方法[15-16]。同时，本研究使用甲基叔丁基醚进行液液萃取，运用梯度洗脱的方法，建立了快速、灵敏、准确、操作简便的

表 3 空腹口服受试制剂或参比制剂后阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀及对位阿托伐他汀的药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Mean pharmacokinetics parameters of atorvaststin，ortho-hydroxy atorvaststin and para-hydroxy atorvaststin after the administration reference and test products under fasting condition ($\bar{x}\pm s$)

参数	阿托伐他汀		邻位阿托伐他汀		对位阿托伐他汀	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
t_{max}/h	0.50（0.25，3.00）	0.50（0.25，4.00）	0.75（0.50，8.00）	1.00（0.50，6.00）	1.50（0.25，24.00）	2.00（0.25，24.00）
C_{max}/（ng·mL^{-1}）	16.09±7.59	13.81±6.99	14.26±6.10	12.82±5.84	0.41±0.19	0.40±0.22
$AUC_{0\sim t}$/（ng·h·mL^{-1}）	63.03±32.12	65.08±31.58	120.81±39.94	125.04±41.39	10.04±6.21	10.70±6.54
$AUC_{0\sim\infty}$/（ng·h·mL^{-1}）	64.60±32.09	66.41±31.68	123.44±38.61	126.70±41.37	13.73±6.41	14.98±7.73
$t_{1/2}$/h	9.44±2.98	9.62±2.84	10.91±2.61	10.65±2.43	30.67±16.69	33.24±34.72

表 4 餐后口服受试制剂或参比制剂后阿托伐他汀，邻位阿托伐他汀及对位阿托伐他汀的药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Mean pharmacokinetics parameters of atorvaststin，ortho-hydroxy atorvaststin and para-hydroxy atorvaststin after the administration reference and test products under fed condition ($\bar{x}\pm s$)

参数	阿托伐他汀		邻位阿托伐他汀		对位阿托伐他汀	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
t_{max}/h	2.00（0.50，6.00）	1.50（0.50，6.00）	6.00（0.50，12.00）	6.00（0.75，12.00）	8.00（4.00，24.00）	8.00（3.00，12.00）
C_{max}/（ng·mL^{-1}）	7.81±3.30	8.28±5.00	94.56±27.32	98.12±41.39	8.95±3.42	9.05±4.45
$AUC_{0\sim t}$/（ng·h·mL^{-1}）	61.90±17.23	61.90±17.23	96.55±27.45	100.03±41.74	13.03±4.22	13.11±5.41
$AUC_{0\sim\infty}$/（ng·h·mL^{-1}）	63.34±17.27	65.57±27.36	6.38±2.23	6.49±2.67	0.34±0.12	0.34±0.15
$t_{1/2}$/h	10.22±3.83	10.284±4.14	13.217±3.51	12.928±3.41	30.55±12.40	28.37±10.92

注（Note）：t_{max} 以中位数（最小值，最大值）表示 [t_{max} is expressed with median（minimum，maximum）]。

HPLC-MS/MS 法，为阿托伐他汀及其主要代谢物人体药代动力学研究提供了依据。

参考文献

[1] Lennernäs H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin [J]. Clin Pharmacokinet，2003，42（13）：1141-1160.

[2] Bełtowski J，Jamroz-Wiśniewska A. Modulation of h（2）s metabolism by statins：A new aspect of cardiovascular pharmacology [J]. Antioxid Redox Signal，2012，17（1）：81-94.

[3] Bellosta S，Ferri N，Bernini F，et al. Non-lipid-related effects of statins [J]. Ann Med，2000，32（3）：164-176.

[4] Bonetti PO，Lerman LO，Napoli C，et al. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? [J]. Eur Heart J，2003，24（3）：225-248.

[5] Park JE，Kim KB，Bae SK，et al. Contribution of cytochromeP450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin [J]. Xenobiotica，2008，38（9）：1240-1251.

[6] Kearney AS，Crawford LF，Mehta SC，et al. The interconversion kinetics，equilibrium，and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor，CI-981 [J]. Pharm Res，1993，10（10）：1461-1465.

[7] Nirogi R，Mudigonda K，Kandikere V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples [J]. J Pharm Biomed Anal，2007，44（2）：379-387.

[8] Bullen WW，Miller RA，Hayes RN. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay foratorvastatin，ortho-hydroxy atorvastatin，and para-hydroxy atorvastatin in human，dog，and rat plasma [J]. J Am Soc Mass Spectrom，1999，10（1）：55-66.

[9] Ramakrishna NV，Koteshwara M，Vishwottam KN，et al. Simple，sensitive and rapid LC-MS/MS method for the quantitation of cerivastatin in human plasma--application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal，2004，36（3）：505-515.

[10] Liu D，Jiang J，Zhou H，et al. Quantitative determination of atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma by LC-MS-MS [J]. J Chromatogr Sci，2008，46（10）：862-866.

[11] Ghosh C，Jain I，Gaur S，et al. Simultaneous estimation of atorvastatin and its two metabolites from human plasma by ESI-LC-MS/MS [J]. Drug Test Anal，2011，3（6）：352-362.

[12] 沈懿，张逸凡，陈笑艳，等 . 阿托伐他汀在中国健康男性志愿者体内的药代动力学及生物等效性 [J]. 中华心血管病杂志，2012（3）：243-247.

[13] 孙斌，魏振满，郭晓东，等 . LC-MS/MS 定量测定人体血浆中阿托伐他汀浓度 [J]. 现代生物医学进展，2013，13（13）：2565-2569.

[14] 罗楠，谭力，张玫，等 . LC-MS/MS 测定大鼠血浆中阿托伐他汀及其活性代谢产物 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（9）：1029-1036.

[15] 李筱旻，徐素梅，周文智，等 . 两种西地那非片在健康人体内的生物等效性 [J]. 中国新药与临床杂志，2020，39（2）：102-107.

[16] 李筱旻，金浩，周文智，等 . 盐酸二甲双胍缓释片在健康人体的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2021，26（4）：408-413.

（收稿日期：2021-09-05；修回日期：2021-10-20）

中药千金黄连丸的抗动脉粥样硬化作用

李静[1, 2, 3]，陈泫锦[1, 2, 3]，佘成烨[1, 2, 3]，邓远雄[1, 2, 3*]（1. 湖南师范大学“小分子靶向药物研究与创制”湖南省重点实验室，长沙　410013：2. 湖南师范大学“化学生物学及中药分析”教育部重点实验室，长沙　410081：3. 湖南师范大学医学院药学系，长沙　410013）

摘要：目的　探讨千金黄连丸（QHW）对动脉粥样硬化大鼠的影响及其初步机制。**方法**　采用高效液相色谱法测定 QHW 提取物中小檗碱和梓醇的含量。采用高胆固醇饮食并给予过量维生素 D_2 诱导大鼠动脉粥样硬化模型，研究 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂的影响以及对动脉粥样硬化大鼠主动脉壁的形态的影响。采用巨噬细胞诱导泡沫细胞模型，研究 QHW 提取物及含药血清对泡沫细胞形成的抑制作用，探讨 QHW 抗动脉粥样硬化的初步机制。**结果**　QHW 提取物能显著调节血脂水平，与模型组比，高剂量组 TC、TG、LDL-C 水平显著下降（$P < 0.01$），HDL-C 水平显著升高（$P < 0.01$）。QHW 提取物可以显著改善动脉粥样硬化大鼠主动脉血管壁的形态特征。含药血清和 QHW 提取物均能降低泡沫细胞中胆固醇酯的含量，防止泡沫细胞形成。其中含药血清降低泡沫细胞中胆固醇酯含量的效果更好。**结论**　QHW 对高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化大鼠具有明显的抗动脉粥样硬化作用。QHW 可能通过抑制泡沫细胞的形成和调节血脂发挥抗动脉粥样硬化的作用。

关键词：千金黄连丸；动脉粥样硬化；血脂；泡沫细胞；黄连；生地黄
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2569-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.018

Anti-atherogenic effect of Chinese polyherbal Qianjin Huanglian Wan

LI Jing[1, 2, 3], CHEN Xuan-jin[1, 2, 3], SHE Cheng-ye[1, 2, 3], DENG Yuan-xiong [1, 2, 3*] (1. *Key Laboratory of Study and Discovery of Small Targeted Molecules of Hunan Province*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410013; 2. *Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research (Hunan Normal University)*, *Ministry of Education*, *Changsha* 410081; 3. *Department of Pharmaceutical Science*, *College of Medicine*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective　To study the effect of Qianjin Huanglian Wan (QHW) on atherosclerotic rats and its possible mechanism. **Methods**　The content of berberine and catalpol in QHW extract was determined by HPLC. Atherosclerotic model rats induced by high cholesterol diet followed by administration of excessive vitamin D_2 were determined. The effect of QHW extract on the blood lipids of atherosclerotic rats was investigated, and the morphological changes of the aortic wall in the atherosclerotic rats were observed. The foam cell models were induced by macrophage. The inhibitory effect of QHW extract on the formation of foam cells was investigated and the anti-atherogenic mechanism of QHW explored. **Results**　QHW extract significantly regulated the blood lipid level. Compared with the model group, the levels of TC, TG and LDL-C in the high-dose group of QHW decreased ($P < 0.01$), and the level of HDL-C increased ($P < 0.01$). The morphological characteristics of the aortic wall in atherosclerotic rats improved in QHW groups. Cell experiments showed that both the serum (from the rats treated with high dose of QHW extract) and QHW extract

基金项目：湖南省自然科学基金（No.2020JJ4437）；湖南省教育厅重点项目（No.18A033）；湖南师范大学“化学生物学及中药分析”教育部重点实验室开放基金（No.KLCBTCMR18-05）；湖南师范大学“大学小分子靶向药物研究与创制”湖南省重点实验室开放基金（No.2019CG05）；湖南省中医药管理局项目（No.2014104）。

作者简介：李静，女，硕士，主要从事药学方面的研究，E-mail: 1344544915@qq.com　*通信作者：邓远雄，男，博士，教授，主要从事药代动力学、中药药代动力学及糖尿病药理研究，E-mail：dyxdjy@126.com

reduced the content of cholesteryl ester in the foam cells and prevented the formation of foam cells. The cholesteryl ester content in the foam cells reduced after treating with high dose of QHW extract. **Conclusion** QHW has anti-atherogenic effect on atherosclerotic rats induced by high-cholesterol diet induced. QHW exerts anti-atherogenic effect by inhibiting the formation of foam cells and regulating the blood lipids.

Key words: Qianjin Huanglian Wan (QHW); atherosclerosis; blood lipid; foam cell; *Rhizoma coptidis*; *Radix Rehmanniae*

动脉粥样硬化是冠心病、脑梗死等心脑血管疾病的主要病因之一，其发病机制复杂，主要危险因素有高血脂、糖尿病、高血压和肥胖等。动脉粥样硬化的药物治疗包括降脂药物、抗凝溶栓药物、抗血小板药物等，这些西药如他汀类药物具有一定的不良反应，如转氨酶、肌酸激酶升高和肌无力等[1-2]。因此，有必要寻找替代治疗方法来避免其不良反应。在替代治疗中，中药治疗是一种很好的方法。中药特别是复方中药具有多成分、多靶点、多效应的特点，且毒性低、不良反应少[3]。

千金黄连丸（QHW，又名黄连丸）是古代中医名著《千金要方》中首次记载的中药方剂，由黄连（*Coptis chinensis* Franch）和生地黄（*Rehmannia glutinosa*（Gaertn）Libosch）组成，含有梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D 等环烯醚萜类成分以及小檗碱、黄连碱、药根碱、巴马汀等生物碱类成分。临床研究表明，QHW 能通过降低血糖治疗糖尿病[4]。实验研究表明 QHW 显著降低 2 型糖尿病小鼠的血糖水平，改善胰岛素抵抗[5-7]，显著改善 2 型糖尿病大鼠的脂质代谢[8]。糖尿病和高血脂是动脉粥样硬化的主要危险因素之一，QHW 可能通过调节血糖水平和脂质代谢而有利于发挥抗动脉粥样硬化作用。笔者采用给大鼠喂食高胆固醇饮食及给与过量的维生素 D2（VD2）的方法诱导动脉粥样硬化大鼠模型来研究 QHW 的抗动脉粥样硬化作用，然后从 QHW 对泡沫细胞形成的影响来探讨其抗动脉粥样硬化作用的初步机制。

1 材料

1.1 实验动物

50 只雄性 SD 大鼠（180±20）g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0004]。C57BL/6J 小鼠，雄性，体质量（20±4）g [上海西普尔 - 必凯实验动物中心，动物许可证号：SCXK（沪）2020-0002]。将大鼠饲养在恒温（25±1）℃和恒湿（55±5）%、12 h 明暗交替、可以自由饮水的 SPF 级动物房中。所有动物于实验开始前 12 h 禁食，期间可以自由饮水。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪，包括四元梯度泵、进样器、柱温箱和检测器以及 Agilent Lab Advisor 色谱工作站。离心机（Thermo Scientific Sorvall Sratos，德国）。超纯水机（Milli-Q Gradient A 10，Milli-pore Inc.，美国）。

1.3 试药

黄连和生地（长沙老百姓大药房），经湖南师范大学药学系牟玲丽教授鉴定为正品。辛伐他汀（10 mg，上海信谊万象药业有限公司）。小檗碱（纯度＞ 98.0%，HPLC）和梓醇（纯度＞ 98.0%，HPLC）（对照品，中国食品药品检定研究院）。胆固醇（纯度＞ 98.0%，上海源叶生物技术有限公司）。磷酸二氢钠、磷酸和 1- 庚烷磺酸钠（分析纯，长沙天恒化学试剂仪器有限公司）。乙腈（色谱级，美国 Tedia Co）。人血浆低密度脂蛋白（LDL，美国 Sigma-Aldrich 公司）。三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。高胆固醇饲料（HCD）由标准饲料（92.6%），胆固醇（2%），猪油（5%），胆酸（0.2%）和丙基硫氧嘧啶（0.2%）组成。

1.4 QHW 提取物的制备

将黄连 50 g、生地 50 g 组成的药材切碎混合，用沸水（1∶10 然后 1∶5，*w/v*）回流 1 h，并收集滤液。合并滤液并真空干燥获得 29.6 g QHW 提取物，HPLC 法[7]测得 QHW 提取物中小檗碱和梓醇的含量分别为 3.6% 和 1.29%。当 QHW 提取物用于动物实验或细胞实验时，剂量用小檗碱进行定量，使用前将提取物悬浮于 0.25% 的羧甲基纤维素溶液中。

2 方法

2.1 动物实验

SD 雄性大鼠 50 只，参考文献方法使用大剂量维生素 D 加高胆固醇饲料法诱导动脉粥样硬化大鼠模型[9]。将 50 只大鼠随机分为 5 组 [正常对照组（NCG）、动脉粥样硬化模型组（AMG）、低剂量 QHW 提取物治疗组（AML）、高剂量 QHW 提取物治疗组（AMH）和辛伐他汀治疗组（AMS）]，每组 10 只。低、高剂量 QHW 提取物的剂量分别为 0.92 和 1.94 g/（kg • d）[相当于小檗碱 33 和 70 mg/（kg • d）]。除正常对照组大鼠外，其余所有大鼠连续 3 d 口服维生素 D_2 30 000 IU/（kg • d），期间给予标准饲料。同时，给予相应组的大鼠灌胃 QHW 提取物或辛伐他汀 [Sim，4 mg/（kg • d）]。从第 4 日起，除正常对照组外，其他组大鼠饲喂高胆固醇饲料 6 周，相应组大鼠连续给予 QHW 或 Sim。正常对照组大鼠一直饲喂常规饲料。

2.2 生化指标

2.2.1 血清中脂质的测定 在实验结束时，通过眶后神经丛从隔夜禁食的大鼠中收集血样，测定 TC、LDL-C、HDL-C、TG 水平。抗动脉粥样硬化指数（AAI）通过以下公式计算：AAI ＝ HDL-C/（TC － HDL-C）。

2.2.2 肝脏中脂质的测定 取肝组织，冰生理盐水冲洗、滤纸吸湿后称取湿重 0.3 g 左右，加入预冷的生理盐水制成 10% 肝匀浆，4 ℃、4000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min，提取上清液，采用酶法测定 TC、TG 含量。

2.3 形态学实验

动物实验结束时，处死所有大鼠，收集血清备用；收集主动脉弓，固定于 Bouin 氏液中，脱水，石蜡包埋，切成 5 mm 的薄片，用苏木精 - 伊红（HE）染色，进行动脉粥样硬化评分[9]。评分时，重点关注层间空间中泡沫细胞的积累、内侧弹性层的直裂、胶原纤维的丰富、脂质钙核周围的增殖和定向障碍平滑肌细胞。此外，根据脂滴和坏死变化将肝损伤的严重程度定义为重、中、轻度三个等级。

2.4 LDL 的氧化

LDL（0.5 $g \cdot L^{-1}$）用磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4，0.01 $mol \cdot L^{-1}$）透析以去除 EDTA。将 $CuSO_4$ 以 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的终浓度添加到上述 LDL 中，37 ℃放置 20 h。LDL 的氧化通过特征颜色从金色变为黄色到半透明无色来指示。通过在 4 ℃下对含有 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ EDTA 的 PBS 透析 24 h 来停止氧化。最后，采用超滤去除溶液中的细菌。通过测量硫代巴比妥酸反应性物质（TBARS）来测定其氧化程度。

2.5 泡沫细胞的诱导[10-11]

从 C57BL/6J 小鼠中收集小鼠巨噬细胞，细胞以 15×10^9/ 瓶（50 mL）的密度培养，在 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中，5%CO_2 条件下培养 12 h。然后将巨噬细胞与氧化性低密度脂蛋白（ox-LDL）一起培养以诱导泡沫细胞。

采用高效液相色谱法测定细胞 TC 含量和游离胆固醇（FC）水平，并采用 Lowry 法测定蛋白质[12]。并且胆固醇酯（CE）水平根据以下公式计算：CE ＝ TC － FC。当细胞 CE/TC 大于 50% 时，细胞被认为变成泡沫细胞[13]。ox-LDL 的浓度和将巨噬细胞转化为泡沫细胞的培养时间根据文献报道确定[14]。ox-LDL 的浓度确定为 20 $mg \cdot L^{-1}$，培养时间确定为 72 h。

2.6 高效液相色谱法测定细胞脂质

用 PBS 漂洗细胞 3 次，加入 0.9% NaOH 溶液超声裂解，得到细胞裂解液。将 0.1 mL 5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 溶液加入到 0.1 mL 细胞裂解液中，并在 50 ℃下孵育 1 h，使胆固醇酯转化为游离胆固醇，得到用于测定 TC 的样品 A。将 0.1 mL 5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 溶液加入到 0.1 mL 细胞裂解液中并在室温下保持 2 min，得到用于测定 TC 的样品 B。将 6% 三氯乙酸（TCA）溶液加入样品 A 或 B 中以去除蛋白质，加入正己烷和异丙醇（4∶1，*V/V*）混合物，以 1500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 后涡旋 5 min。收集上清液，真空干燥处理，残留物用甲醇溶解。取 20 μL 溶液根据课题组前期建立的 HPLC 法[14]测定细胞 TC 含量和 FC 含量。

2.7 QHW 提取物对泡沫细胞形成的影响

巨噬细胞分为正常对照组（NMG）、模型组（FMG）、低（FGL，1.0×10^{-7} $mol \cdot L^{-1}$）、中（FGM，1.0×10^{-6} $mol \cdot L^{-1}$）、高（FGH，1.0×10^{-5} $mol \cdot L^{-1}$）剂量 QHW 提取物处理组，阳性药物组（辛伐他汀 1.0×10^{-6} $mol \cdot L^{-1}$，FGS），一共 6 组。除正常对照组外，所有细胞均用 ox-LDL（20 $mg \cdot L^{-1}$）处理 72 h。所有细胞用 PBS 冲洗 3 次，给予对应药物共培养 24 h 后，收集各组细胞，超声裂解，测定胆固醇含量（TC 和 FC）。

2.8 含药血清对泡沫细胞形成的影响

将巨噬细胞分为正常对照组、模型组、QHW 高剂量含药血清处理组，辛伐他汀血清处理组。除正常对照组外，所有细胞均用 ox-LDL（20 $mg \cdot L^{-1}$）处理 72 h。所有细胞用 PBS 冲洗 3 次。

换新鲜培养液，其中含药血清处理组以“2.3”项下 QHW 含药血清代替胎牛血清加入 RPMI 1640 培养基（含血清 10%）。泡沫细胞辛伐他汀血清处理组（FMS）以“2.3”项下辛伐他汀血清代替胎牛血清加入 RPMI 1640 培养基。正常对照组和模型组加入等体积 PBS。共培养结束后，收集各组细胞，超声裂解，测定胆固醇含量（TC 和 FC）。

2.9 统计分析

所有数据均表示为平均值和标准偏差。数据统计分析采用单因素方差分析（one-way ANOVA），$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂及肝脏脂质的影响

QHW 提取物对实验大鼠血脂的影响见表 1。与正常对照组相比，模型组血清 TC、LDL-C 水平升高，HDL-C 水平下降（$P < 0.01$），表明动脉粥样硬化模型诱导成功。QHW 提取物处理后，血脂情况明显得到了改善。与模型组比较，低、中、高剂量 QHW 提取物治疗组（AMH）的 TC、TG、LDL-C 水平显著下降（$P < 0.01$）。高剂量 QHW 提取物治疗组的 HDL-C 水平显著升高（$P < 0.01$）。抗动脉粥样硬化指数（AAI）结果显示低剂量和高剂量的 QHW 提取物对 AAI 都有显著影响（$P < 0.01$）。

表 1 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂及 AAI 的影响

Tab 1 Effect of QHW extract on the serum lipids and AAI of atherosclerotic rats

组别	剂量 /（mg・kg^{-1}）	TC/（mmol・L^{-1}）	LDL-C /（mmol•L^{-1}）	HDL-C/（mmol•L^{-1}）	TG/（mmol・L^{-1}）	AAI
正常对照组	—	1.74±0.16	0.45±0.06	1.26±0.17	0.67±0.11	2.62±0.56
模型组	—	13.1±2.62$^{\#\#}$	9.83±2.72$^{\#\#}$	0.62±0.08$^{\#\#}$	1.82±0.28$^{\#\#}$	0.05±0.02$^{\#\#}$
低剂量组	33	6.82±1.31**	4.21±1.25**	1.05±0.11**	1.38±0.25**	0.18±0.0.07**
高剂量组	66	4.93±1.22**	3.65±1.07**	1.58±0.13**	1.22±0.19**	0.47±0.13**
阳性药物组	4	5.25±1.13**	4.16±1.26**	0.97±0.09**	1.42±0.23**	0.23±0.08**

注：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

Note：Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$。

QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠肝脏脂质的影响见表 2。与正常组相比，模型组肝脏 TC、TG 水平显著升高。QHW 提取物处理后，肝脏脂质明显得到了改善。与模型组比较，高剂量 QHW 提取物治疗组、阳性对照组的肝脏脂质 TC 和 TG 水平均显著改善（$P < 0.01$）。

表 2 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠肝脏脂质的影响

Tab 2 Effect of QHW extract on the liver lipids of atherosclerotic rats

组别	剂量 /（mg・kg^{-1}）	TC/（mg・g^{-1}）	TG /（mg・g^{-1}）
正常对照组	—	12.98±2.13	4.82±0.52
模型组	—	35.73±6.52$^{\#\#}$	11.36±1.45$^{\#\#}$
低剂量组	33	24.86±2.35**	7.98±0.65**
高剂量组	66	18.88±2.29**	6.42±0.89**
阳性药物组	4	14.25±2.43**	5.47±0.62**

注：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

Note：Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$。

3.2 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠的形态学影响

3.2.1 主动脉病变的改变 光镜下，正常对照组大鼠未见明显主动脉病变（见图 1A），而在动脉粥样硬化模型大鼠中，发现了显著的动脉粥样硬化特征，例如内膜增厚、层间间隙中泡沫细胞增多、内侧弹性层的破裂、胶原纤维丰富、脂质钙核周围的平滑肌增生以及平滑肌细胞方向杂乱（见图 1B）。QHW 提取物处理后，发现内膜完整，无脂质沉积、泡沫细胞，无平滑肌增生，细胞外基质无增加，中膜无钙化（见图 1C），可以看出，经大剂量 QHW 提取物治疗后血管壁中钙核和泡沫细胞消失。并且还发现阳性对照辛伐他汀对动脉粥样硬化大鼠产生相似的作用（见图 1D）。动脉粥样硬化评分见图 2，与模型组相比，中、高剂量 QHW 提取物治疗组的动脉粥样硬化评分均明显降低，表明高剂量 QHW 提取物和辛伐他汀均能有效改善大鼠实验性动脉粥样硬化。

3.2.2 肝脏病变及肝脏指数 HE 染色病理切片显示正常对照组（NCG）肝脏未见异常（见图 3A），模型组大鼠肝脏有严重的脂滴和细胞凋亡变化（见图 3B），高剂量 QHW 提取物治疗后，这些病变略有减轻（见图 3C）。阳性对照药辛伐他汀对动脉粥样硬化大鼠产生相似的作用（见图 3D）。通过分析肝脏指数，进一步发现 QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠肝脏的影响。与正常对照组相比，模型组的肝脏指数显著升高，而高、低剂量 QHW 提取物治疗组的肝脏指数明显降低，说明高低剂量组的 QHW 提取物治疗显著改善了动脉粥样硬化大鼠的肝损害。与模型组相比，阳性药物组的肝脏指数也明显降低，表明辛伐他汀对动脉粥样硬化大鼠表现出相似的作用（见图 4）。

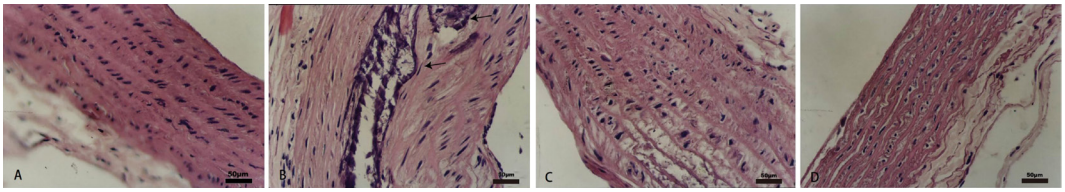


图 1　动脉粥样硬化大鼠主动脉形态结构（HE 染色，400×）

Fig 1　Morphological structure of aorta in atherosclerotic rats（HE staining，400×）

A. 正常对照组（normal control group）；B. 模型组（model group）；C. 高剂量 QHP 提取物组（high dose of QHP extract group）；D. 辛伐他汀组（simvastatin group）；箭头所示为钙核和泡沫细胞（The arrow shows calcium nuclei and foam cells）。

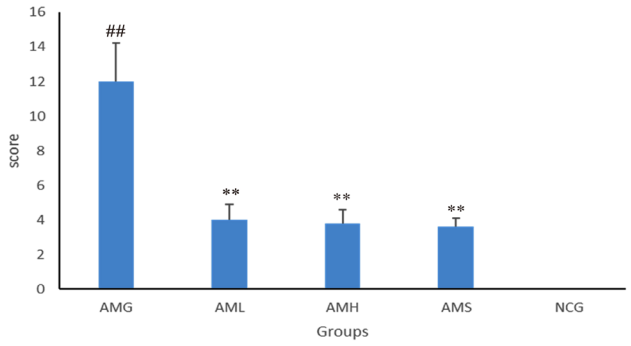


图 2　QHW 提取物对动脉粥样硬化大鼠病理评分的影响。

Fig 2　Effect of QHW extract on the pathological scores of atherosclerotic rats.

注（Note）：与 AMG 的相应值相比，$^{**}P < 0.01$；与 NCG 的相应值相比，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the corresponding value of AMG，$^{**}P < 0.01$；compared with the corresponding value of NCG，$^{\#\#}P < 0.01$）.

3.3　QHW 提取物对泡沫细胞形成的影响

如表 3 所示，当巨噬细胞与 ox-LDL（20 mg·L^{-1}）一起孵育 72 h 时，细胞转化为泡沫细胞，模型组的 CE/TC 为 67.3%。当细胞与 QHW 提取物共培养时，巨噬细胞中的胆固醇酯含量明显降低（$P < 0.01$），脂质沉积减少。QHW 提取物对泡沫细胞中胆固醇酯含量的影响呈剂量依赖性。尤其是高剂量组的 CE/TC 下降至 51.4%，几乎接近巨噬细胞转变为泡沫细胞的临界点。表明 QHW 提取物和辛伐他汀均能改善泡沫细胞中的胆固醇酯含量，抑制泡沫细胞的形成。

3.4　含药血清对泡沫细胞形成的影响

如表 4 所示，当巨噬细胞与 ox-LDL（20 mg·L^{-1}）一起孵育 72 h 时，细胞转化为泡沫细胞，CE/TC 为 67.3%（FMG 组）。当泡沫细胞与

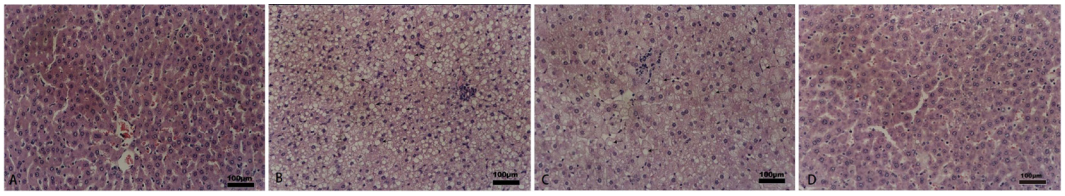


图 3　动脉粥样硬化大鼠肝脏形态结构（HE 染色，200×）

Fig 3　Morphological structure of liver in atherosclerotic rats（HE staining，200×）

A. 正常对照组（normal control group）；B. 模型组（model group）；C. 高剂量 QHP 提取物组（high dose of QHP extract group）；D. 辛伐他汀组（simvastatin group）；箭头所示为脂滴（The arrow shows grease droplets）。

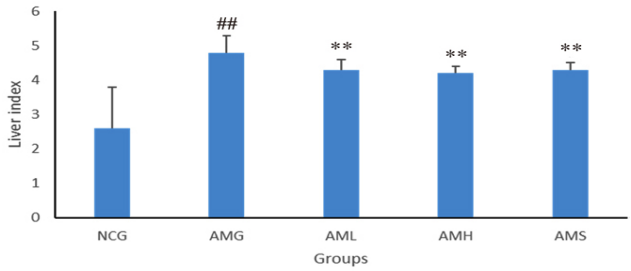


图 4　QHP 提取物对动脉粥样硬化大鼠肝脏指数的影响。

Fig 4　Effect of QHP extract on the liver index of atherosclerotic rats.

注：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

QHW 含药血清共培养时，细胞中的胆固醇酯含量明显降低（$P < 0.01$），CE/TC 为 48.7%，已经非泡沫细胞（泡沫细胞的判断标准是 CE/TC 超过 50%）。同时，阳性药物组的 CE/TC 降低到 52.2%。表明 QHW 含药血清和辛伐他汀含药血清均能显著降低泡沫细胞中的胆固醇酯含量，抑制泡沫细胞的形成。

4　讨论

千金黄连丸（QHW）由黄连与生地组成，黄连为君药，生地为臣药，两者相须为用，发挥滋阴清热的功效，主治消渴（糖尿病）。目前其主要用于治疗 2 型糖尿病及其并发症。2 型糖尿病与动脉粥样硬化及其并发症（如心肌梗塞和外周血管疾病）的发生风险增加密切相关[15-16]。研究 QHW 的抗动脉粥样硬化作用可以为扩大 QHW 的临床适应症范围提供实验依据。

表 3 QHP 提取物对巨噬细胞源性泡沫细胞的影响

Tab 3 Effect of QHP extract on the foam cell derived from macrophage

组别	剂量 /（mol • L^{-1}）	FC/（mg • g^{-1}）	TC/（mg • g^{-1}）	CE/（mg • g^{-1}）	CE/TC/%
对照组	—	28.55±2.51	41.52±3.81	12.96±4.13	31.10±5.21
模型组	—	38.12±2.63	110.23±5.62	72.13±6.21	65.40±5.22$^{\#\#}$
低剂量组	1.0×10^{-7}	38.63±3.62	103.64±8.11	65.05±8.57	62.77±8.02
中剂量组	1.0×10^{-6}	38.32±2.98	92.65±7.87	54.35±7.63	58.65±4.34**
高剂量组	1.0×10^{-5}	38.13±3.35	77.96±4.62	39.84±5.01	51.10±5.31**
阳性药物组	1.0×10^{-6}	37.57±3.26	85.78±5.35	41.92±5.63	56.20±5.52**

注：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

Note：Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$。

表 4 QHP 含药血清对巨噬细胞源性泡沫细胞的影响

Tab 4 Effect of rats serum treated with QHP extract on the foam cell derived from macrophage

组别	FC/（mg • g^{-1}）	TC/（mg • g^{-1}）	CE/（mg • g^{-1}）	CE/TC/%
对照组	28.07±2.46	40.89±3.76	12.79±4.13	31.32±4.33
模型组	37.62±2.97	111.53±6.72	72.68±7.02	65.23±6.13$^{\#\#}$
实验组	35.13±3.35	68.76±4.62	33.54±6.23	48.76±5.65**
阳性药物组	36.27±3.42	75.78±5.28	39.57±6.32	52.21±6.11**

注：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

Note：Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$。

本文采用大鼠动脉粥样硬化模型研究了 QHW 提取物的抗动脉粥样硬化作用。与模型组大鼠相比，在用低剂量或高剂量 QHW 提取物处理组的大鼠主动脉中很少发现典型的动脉粥样硬化的形态学改变，如内膜增厚、泡沫细胞形成、内膜脂质沉积和中膜钙化。尤其是作为动脉粥样硬化大鼠主动脉壁的特征之一，泡沫细胞在 QHW 治疗后全部消失。因此推测 QHW 提取物可能通过抑制泡沫细胞的形成而发挥抗动脉粥样硬化作用，抑制泡沫细胞的形成可能是 QHW 抗动脉粥样硬化的机制和靶点之一。

在动脉粥样硬化病变中，来源于巨噬细胞的泡沫细胞是早期损伤的特征细胞和最早的病理细胞，其形成与 ox-LDL 及其他修饰的低密度脂蛋白有关 [12]。巨噬细胞清道夫受体（SR）如 SR-A 和 CD36 发挥 ox-LDL 的内化作用，并促进巨噬细胞中胆固醇的积聚以形成泡沫细胞 [17-18]。巨噬细胞来源的泡沫细胞在内皮下的积累在动脉粥样硬化的发生和发展中起着非常重要的作用。

为此，本研究采用 ox-LDL 诱导的泡沫细胞模型研究 QHW 抗动脉粥样硬化的初步机制。泡沫细胞经低剂量或高剂量 QHW 提取物处理后，其胆固醇酯含量都显著降低，泡沫细胞特征改善。含药血清对泡沫细胞作用和 QHW 提取物对泡沫细胞的作用相似，而且含药血清对泡沫细胞的效果更好，甚至能将泡沫细胞逆转。QHW 由黄连和生地组成，黄连中含有黄连素（小檗碱）。研究表明，小檗碱可以通过激活 AMPK-SIRT1-PPAR-γ 通路和减少 ox-LDL 的摄取来抑制泡沫细胞的形成 [19]。Lee 等 [20] 报道小檗碱通过增强 LXRa-ABCA1 依赖性胆固醇流出显著抑制 ox-LDL 介导的脂质积累和泡沫细胞的形成。然而，Guan 等 [12] 报道小檗碱可以通过抑制 LOX-1 的表达和促进巨噬细胞来源的泡沫细胞中 SR-BI 的表达来抑制泡沫细胞的形成，而对 SR-A 或 ABCA1 表达没有影响。此外，Yang 等 [17] 证明小檗碱通过抑制 AP-1 活性和激活 Nrf2/HO-1 通路来降低巨噬细胞泡沫细胞中的胆固醇积累。总之，小檗碱可以通过多种分子机制来抑制泡沫细胞的形成，作为 QHW 提取物的主要成分之一，小檗碱可能通过抑制泡沫细胞的形成从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

据报道动脉粥样硬化与高脂血症和高胆固醇血症密切相关 [21]。本研究中，动脉粥样硬化模型大鼠的 TC、LDL-C 和 TG 水平显著升高，而 HDL-C 水平显著降低，表明动脉粥样硬化的形成与高水平的 LDL-C 和 TG 有关，高水平的 LDL-C 和低水平的 HDL-C 都意味着较差的 AAI，高 LDL-C 和低 HDL-C 水平更可能导致动脉粥样硬化。动脉粥样硬化通常是由负载有脂质的巨噬细胞（即泡沫细胞）的积聚引起的 [22]。巨噬细胞吞噬过量的脂质，如 ox-LDL（来自 LDL-C），以形成泡沫细胞。因此，可以推测调节血脂有利于防止动脉粥样硬化。在本研究中，低剂量或高剂量的 QHW 提取物治疗动脉粥样硬化大鼠后，其 TC，LDL-C 和 TG 水平明显降低，而 HDL-C 水平明显升高。生地黄中所含有的梓醇是一种环烯醚萜类成分，可以通过降低 TC、TG 和 LDL-C 的水平并提高 HDL-C 的水平来减轻动脉粥样硬化病变 [23]。此外，黄连中含有的小檗碱也具有调脂作用 [24]。因此，QHW 发挥抗动脉粥样硬化作用的另一个机制可能是 QHW 中所含的小檗碱和梓醇的调脂作用。

此外，QHW 的调脂作用也有益于对动脉粥样硬化大鼠的肝脏的保护。动脉粥样硬化模型大鼠肝脏出现严重的脂滴和形态结构上的凋亡改变，外观上出现肝肿大。低剂量或高剂量 QHW 提取物治疗后，肝脏损伤得到改善，形态结构损伤较少，肝脏轻度受损，并表现为大鼠肝指数降低。QHW 处理后动脉粥样硬化大鼠肝脏脂滴和细胞凋亡的改善可能由于 QHW 提取物的血脂调节作用。肝脏是机体脂质代谢的主要器官之一，QHW 对动脉粥样硬化大鼠肝脏的保护反过来改善其体内脂质代谢，降低 LDL，从而降低泡沫细胞的形成，进一步发挥抗动脉粥样硬化作用。

综上所述，中药 QHW 对高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化大鼠具有显著的抗动脉粥样硬化作用。QHW 具有抑制泡沫细胞形成和调节血脂（降低 TC、TG 和 LDL-C 水平，升高 HDL-C 水平）的作用，可能是通过抑制泡沫细胞的形成和调节血脂发挥抗动脉粥样硬化的作用，但确切的分子机制和靶点有待进一步探索。

参考文献

[1] Moßhammer D，Schaeffeler E，Schwab M，et al. Mechanisms and assessment of statin-related muscular adverse effects [J]. Br J Clin Pharmacol，2014，78（3）：454-466.

[2] Norata GD，Tibolla G，Catapano AL. Statins and skeletal muscles toxicity：from clinical trials to everyday practice [J]. Pharmacol Res，2014，88：107-113.

[3] Shaw D. Toxicological risks of Chinese herbs [J]. Planta medica，2010，76（17）：2012-2018.

[4] 陈可冀 . 23 例糖尿病的疗效观察 [J]. 中医杂志，1961，5：17-19.

[5] 田爱平，邹晨辉，孙素娟，等 . 千金黄连丸加味方对胰岛素抵抗小鼠肾脏的影响 [J]. 中国中药杂志，2009，34（7）：889-892.

[6] 田爱平，邹晨辉，孙素娟，等 . 千金黄连丸加味方对胰岛素抵抗小鼠胰腺的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2009，29（3）：242-245.

[7] Deng Y，Zhang X，Shi Q，et al. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of traditional Chinese medicine Huanglian Wan in streptozocin-induced diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol，2012，144（2）：425-432.

[8] 糟玉琴，冶岱蔚 . 千金黄连丸及其拆方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠脂代谢的实验研究 [J]. 新疆中医药，2012，30：33-35.

[9] Deng YX，Qian ZY，Tang FT. Effects of crocetin on experimental atherosclerosis in rats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs，2004，35（7）：777-781.

[10] Lin SJ，Shyue SK，Shih MC，et al. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation：Role of cell-cycle regulation，mitogen-activated protein kinases，and transcription factors [J]. Atherosclerosis，2007，190（1）：124-134.

[11] Kritharides L，Jessup W，Mander EL，et al. Apolipoprotein AI-mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophages [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，1995，15（2）：276-289.

[12] Guan S，Wang B，Li W，et al. Effects of berberine on expression of LOX-1 and SR-BI in human macrophage-derived foam cells induced by ox-LDL [J]. Am J Chin Med，2010，38（6）：1161-1169.

[13] Maor I，Aviram M. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester [J]. J Lipid Res，1994，35（5）：803-819.

[14] 邓远雄，钱之玉，何丽华，等 . 西红花酸对巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响 [J]. 中国中药杂志，2011，36：1374-1377.

[15] Renard C，Van Obberghen E. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? [J]. Diabetes Metab，2006，32（1）：15-29.

[16] Zhang XJ，Deng YX，Shi QZ，et al. Hypolipidemic effect of the Chinese polyherbal Huanglian Jiedu decoction in type 2 diabetic rats and its possible mechanism [J]. Phytomedicine，2014，21（5）：615-623.

[17] Yang XJ，Liu F，Feng N，et al. Berberine attenuates cholesterol accumulation in macrophage foam cells by suppressing AP-1 activity and activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2020，75（1）：45-53.

[18] Raghavan S，Singh NK，Gali S，et al. Protein kinase Cθ via activating transcription factor 2-mediated CD36 expression and foam cell formation of Ly6Chi cells contributes to atherosclerosis [J]. Circulation，2018，138（21）：2395-2412.

[19] Chi L，Peng L，Pan N，et al. The anti-atherogenic effects of berberine on foam cell formation are mediated through the upregulation of sirtuin 1[J]. Int J Mol Med，2014，34（4）：1087-1093.

[20] Lee TS，Pan CC，Peng CC，et al. Anti-atherogenic effect of berberine on LXRα-ABCA1-dependent cholesterol efflux in macrophages [J]. J Cell Biochem，2010，111（1）：104-110.

[21] Rader DJ，Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis [J]. Nature，2008，451（7181）：904-913.

[22] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis：A perspective for the 1990s [J]. Nature，1993，362（6423）：801-809.

[23] Liu J，Zhang D. Amelioration by catalpol of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits [J]. Planta Med，2015，81（3）：175-184.

[24] Sun R，Yang N，Kong B，et al. Orally administered berberine modulates hepatic lipid metabolism by altering microbial bile acid metabolism and the intestinal FXR signaling pathway [J]. Mol Pharmacol，2017，91（2）：110-122.

（收稿日期：2021-10-29；修回日期：2021-11-29）

药品不良反应信号监测专题

基于 FAERS 数据库的 3 种碳青霉烯类药物不良反应信号挖掘研究

唐春梅[1, 2, 3, 4]，杨思芸[3, 4]，詹阳洋[5]，陈力[1, 2*]（1. 四川大学华西第二医院药学部，成都 610041；2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都 610041；3. 南充市中心医院，川北医学院第二临床学院药学部，四川 南充 637000；4. 个体化药物治疗南充市重点实验室，四川 南充 637000；5. 成都市成华区妇幼保健院药剂科，成都 610021）

摘要：目的 挖掘 3 种碳青霉烯类药物（美罗培南、亚胺培南、厄他培南）的不良反应信号，为临床安全用药提供一定的参考。**方法** 提取 FAERS 数据库 2015 年第一季度至 2020 年第三季度 3 种碳青霉烯类药物的不良反应报告数据，采用报告比值比（ROR）法和比例报告比值（PRR）法对相关报告进行数据挖掘分析。**结果** 3 种碳青霉烯类药物共得到 423 个有效不良反应信号，其中美罗培南有效信号 231 个，亚胺培南有效信号 96 个，厄他培南有效信号 96 个。信号累及 22 个不同的系统器官（SOC），其中美罗培南主要集中于感染及侵染类疾病（构成比 15.83%）、全身性疾病及给药部位各种反应（构成比 15.74%）、皮肤及皮下组织类疾病（构成比 9.94%）；亚胺培南主要集中于全身性疾病及给药部位各种反应（构成比 20.92%）、各类检查（构成比 12.81%）、感染及侵染类疾病（构成比 11.11%）；厄他培南主要集中于各类神经系统疾病（构成比 37.25%）、精神病类（构成比 32.10%）。**结论** ROR 法及 PRR 法分析发现美罗培南、亚胺培南、厄他培南发生不良反应累及的主要系统具有差异性，可为临床用药提供参考，促进临床安全用药。

关键词：碳青霉烯类药物；FAERS 数据库；不良反应信号挖掘；报告比值比；比例报告比值
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2576-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.019

Adverse drug reaction signals of 3 carbapenems based on the FAERS database

TANG Chun-mei[1, 2, 3, 4], YANG Si-yun[3, 4], ZHAN Yang-yang[5], CHEN Li[1, 2*] (1. *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children*, *Sichuan University*, *Ministry of Education*, *Chengdu* 610041; 3. *Department of Pharmacy*, *Second Clinical College of North Sichuan Medical College*, *Nanchong City Central Hospital*, *Nanchong Sichuan* 637000; 4. *Key Laboratory of Individualized Drug Treatment in Nanchong*, *Nanchong Sichuan* 637000; 5. *Department of Pharmacy*, *Chengdu Chenghua District Health Care Hospitat*, *Chengdu* 610021)

Abstract: Objective To explore the adverse drug reaction (ADR) signals of 3 carbapenems (meropenem, imipenem and ertapenem) to supply reference for their clinical safe use. **Methods** The ADR data of 3 carbapenem drugs were collected from the FAERS database from the first quarter of 2015 to the third quarter of 2020, and the reporting odds ratio (ROR) and proportional reporting ratio (PRR) were used for data mining. **Results** Totally 423 ADR signals were obtained from the 3 carbapenems, including 231 from meropenem, 96 from imipenem, and 96 from ertapenem. The signals involved 22 system organ classes. Signals from meropenem mainly covered on infections and infective diseases (15.83%), systemic diseases and various reactions at the administration sites (15.74%), and skin and subcutaneous

基金项目：南充市市校科技战略合作项目（No.18SXHZ0230）；南充市科学技术局应用技术研究与开发资金项目（No.KY-20YFZJ0116）。
作者简介：唐春梅，女，主管药师，主要从事临床药学方面的研究，E-mail：2314581163@qq.com *通信作者：陈力，男，副主任药师，主要从事临床药学与合理用药方面的研究，E-mail：13674852@qq.com

tissue diseases (9.94%). Signals from imipenem mainly involved systemic diseases and various reactions at the administration sites (20.92%), various examinations (12.81%), and infection and infective diseases (11.11%). Signals from ertapenem mainly included various neurological diseases (37.25%), and mental illness (32.10%). **Conclusion** The major systems involved in the ADRs of meropenem, imipenem and ertapenem vary, which deserves attention in clinical safe drug use.

Key words: carbapenem drug; FAERS database; adverse reaction signal mining; ROR; PRR

碳青霉烯类抗菌药物是 1976 年首次被发现的新型*β*-内酰胺类抗菌药物，兼具青霉素和头孢菌素的骨架结构[1]。碳青霉烯类抗菌药物对青霉素结合蛋白具有亲和性且对*β*-内酰胺酶耐受，对 G^+、G^-、需氧菌和厌氧菌都具有抗菌活性[2-3]。该类药物具有抗菌活性强、抗菌谱广等临床特征，目前碳青霉烯类抗菌药物已成为治疗严重细菌感染的首选药物之一。随着碳青霉烯类药物在临床的使用量增加，关于其所致药品不良反应（adverse drug reaction，ADR）的发生也逐渐增多[4]，其可能引发的 ADR 主要包括神经毒性、肾毒性、过敏反应（如药疹）、胃肠道反应、二重感染等，在临床应用中需要加强对碳青霉烯类抗菌药物不良反应的监护[1]。目前临床上常见的碳青霉烯类药物包括美罗培南、亚胺培南、厄他培南等，尽管均为内酰胺类的抗菌药物，但在有效性和安全性等方面具有一定差异。

美国 FDA 不良反应报告系统（FDA adverse event reporting system，FAERS）是一个免费公开的用于收集药品上市后药物不良事件信息的自发呈报数据库，常用于开展 ADR 信号挖掘研究[5]。笔者基于 FAERS 数据库对碳青霉烯类药物在真实世界下的 ADR 进行挖掘分析，以期为碳青霉烯类药物在抗感染治疗中的安全用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

FAERS 数据库于 2004 年始对外免费公开，收集上市后 ADR，并每季度进行更新，以 ASCⅡ或 XML 形式存储[6]。本研究提取 FAERS 中 2015 年第一季度至 2020 年第三季度共 23 个季度所有数据，导入 MY SQL5.7，筛选“role_code”为“首要怀疑药物”的数据共 25 813 158 条。删除重复报告后，以“MEROPENEM”“MERREM”“VABOMERE”为关键词，对“drugname”进行模糊匹配，从中筛选出以美罗培南为首要怀疑药物的报告，共计 3737 例；　以“IMIPENEM”“IMIPENEM AND CILASTATIN”“PRIMAXIN”“RECARBRIO”为关键词，对“drugname”进行模糊匹配，从中筛选出以亚胺培南为首要怀疑药物的报告，共计 1567 例；以“ERTAPENEM”“INVANZ”对“drugname”进行模糊匹配，从中筛选出以厄他培南为首要怀疑药物的报告，共计 2407 例。

1.2　数据处理

本研究采用《ICH 国际医学用语词典》（Medical Dictionary for Regularly Activities，MedDRA）对 3 种碳青霉烯类药物的 ADR 名称进行标准化，系统器官分类（system organ class，SOC）为 ADR 的系统分类，首选术语（PT）为 ADR 的标准名称[7]。数据标准化为信号检测和数据挖掘获得更准确数据提供了基础和保障[8]。

1.3　数据分析

本研究采用比例失衡法中的报告比值比（reporting odds ratio，ROR）法和比例报告比值（proportional reporting ratio，PRR）法进行 ADR 挖掘[9]。通过设定的阈值，95*CI*（ROR）下限＞1 且报告数不少于 3 的事件生成一个信号，筛选出有信号的 PT[10]。统计分析在 WPS 2020 软件的 Excel 中进行。

2　结果

2.1　ADR 报告的基本情况

提取 FAERS 数据库中 2015 年第一季度至 2020 年第三季度共 23 个季度美罗培南、亚胺培南、厄他培南的 ADR 报告数据，删除重复和存疑数据后，共获得“首要怀疑药物”的相关 PT 7711 例次，报告数 2724 份；其中以美罗培南为首要怀疑药物的 PT 3737 例次，报告数 1291 份；以亚胺培南为首要怀疑药物的 PT 1567 例次，报告数 576 份；以厄他培南为首要怀疑药物的 PT 2407 例次，报告数 857 份。上报国家、患者性别与年龄等基本信息见表 1。

2.2　ADR 累及的系统器官

将 3 种碳青霉烯类抗菌药物（美罗培南、亚胺培南、厄他培南）经筛选后的 ADR 信号用 ROR 法和 PRR 法进行统计分析，共计得到 427 个 ADR 信号，包括美罗培南 232 个，亚胺培南 97 个，厄他培南 ADR 98 个。对相同 ADR 进行合并共计得到 423 个有效 ADR 信号，最终得到美罗培南有效信号 231 个（累计 2103 例 ADR 报道），亚胺培南有效信号 96 个（累计 765 例 ADR 报道），厄他培南有效信号 96 个（累计 1106 例 ADR 报道）。

表 1 美罗培南、亚胺培南、厄他培南不良反应报告的基本信息

Tab 1 Basic information of reports on meropenem，imipenem，and ertapenem

信息	美罗培南			亚胺培南			厄他培南		
	亚类	报告例数 /*n*	构成比 /%	亚类	报告例数 /*n*	构成比 /%	亚类	报告例数 /*n*	构成比 /%
性别	男	647	49.89	男	322	55.90	男	452	52.74
	女	511	39.30	女	234	40.63	女	350	40.84
	未知	133	10.81	未知	20	3.47	未知	55	6.42
年龄	＜ 18 岁	120	9.30	＜ 18 岁	43	7.47	＜ 18 岁	16	1.87
	18 ～ 64 岁	564	43.69	18 ～ 64 岁	324	56.25	18 ～ 64 岁	250	29.17
	≥ 65 岁	413	31.99	≥ 65 岁	159	27.60	≥ 65 岁	460	53.68
	未知	194	15.03	未知	50	8.68	未知	131	15.29
	中位数	58		中位数	59		中位数	75	
报告国家（前六）	美国	206	15.96	美国	167	28.99	美国	396	46.21
	德国	189	14.64	中国	105	18.23	法国	141	16.45
	日本	128	9.91	法国	93	16.15	西班牙	62	7.23
	意大利	120	9.30	日本	59	10.24	加拿大	37	4.32
	西班牙	102	7.90	意大利	20	3.47	德国	33	3.85
	以色列	74	5.73	德国	9	1.56	中国	29	3.38

采用 SOC 对有信号的 PT 进行分类，结果显示 3 种碳青霉烯类抗菌药物的 ADR 信号累及 22 个 SOC。其中美罗培南 ADR 涉及 21 个 SOC，主要集中于感染及侵染类疾病、全身性疾病及给药部位各种反应、皮肤及皮下组织类疾病等；亚胺培南 ADR 涉及 17 个 SOC，主要集中于全身性疾病及给药部位各种反应、各类检查、感染及侵染类疾病等；厄他培南 ADR 涉及 16 个 SOC，主要集中于神经系统疾病、精神病类。具体结果见表 2、图 1。

2.3 *美罗培南、亚胺培南、厄他培南的 ADR 信号差别*

将美罗培南、亚胺培南、厄他培南 PT 累计报道数排名前 20 位的不良反应进行比较分析，3 种药物共同的 ADR 信号包括癫痫和惊厥发作；美罗培南与亚胺培南共同的 ADR 信号包括发热、呼吸衰竭、药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状；亚胺培南与厄他培南共同的 ADR 信号为意识模糊状态；美罗培南与厄他培南共同的 ADR 信号为惊厥发作、癫痫。其中美罗培南与药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状、发热和耐药的关联性最强；亚胺培南与呼吸衰竭的关联性最强；厄他培南与癫痫、惊厥发作、意识模糊状态的关联性最强。3 种药物累计报道数排名前 20 位的 ADR 信号见表 3。

3 讨论

3.1 *碳青霉烯类药物 ADR 发生的人口学特征*

本文从 FAERS 数据库中提取美罗培南 ADR 报告 1291 份，亚胺培南 ADR 报告 576 份；厄他培南 ADR 报告 857 份，上报总数排名前 6 的国家为美国、法国、德国、日本、西班牙和意大利，不良反应上报集中于欧美国家，亚洲人群相对较少，但笔者目前未查询到探讨地域、种族对碳青霉烯类 ADR 影响的相关研究，故需进一步研究。在性别上，对于美罗培南、亚胺培南、厄他培南，男性发生 ADR 的比例更大，但目前未查询到性别对碳青霉烯类 ADR 率影响的相关研究，故此结论亦需进一步研究探讨。本研究中所提取的 ADR 报告中大部分患者为中老年，患者年龄＜ 18 岁的病例低于 10%，此结果可能与老年患者发生复杂、严重感染风险高相关，且年长人群的机体组织器官对药物的耐受性下降，更易发生 ADR[11]。本研究未能获取 3 种药物在不同年龄段及不同性别群体中的使用量，故无法确定 ADR 发生率的人群差异。

3.2 *不良反应发生的器官及系统与药物关联性特点*

本研究所得到的 3 种碳青霉烯类药物 ADR 信号发生系统与已知基本一致，主要导致感染、全身性及用药部位、皮肤及皮下组织、神经系统、呼吸系统、血液及淋巴系统、精神系统等方面的损害。但 ADR 系统分布各有不同，在妊娠期、产褥期及围产期状况，生殖系统及乳腺疾病，各种手术及医疗操作等 3 个器官 / 系统中仅挖掘到美罗培南的 ADR 信号，而未发现亚胺培南及厄他培南相关的信号，提示当患者存在这些系统疾病时应谨慎选用美罗培南，特别是妊娠期、产褥期及围产期状况的患者（ADR 报告构成比 1.14%）；耳及迷路类疾病系统仅挖掘到亚胺培南的 ADR 信号，故存在耳及迷路类疾病的患者需谨慎选用亚胺培南；厄他培南在各类神经系统疾病、精神病类系统中 ADR 构成比均高于美罗培南与亚胺培南，故存在神经系统疾病、精神病类患者需谨慎选用厄他培南，尤其是患有精神病的人群。

表 2　美罗培南、亚胺培南、厄他培南累及系统信号数与不良反应数比较

Tab 2　Signals for system involved and adverse events for meropenem，imipenem，and ertapenem

器官系统分类	美罗培南（n = 2103）		亚胺培南（n = 765）		厄他培南（n = 1106）	
	信号数	累计不良事件例数 /n（%）	信号数	累计不良事件例数 /n（%）	信号数	累计不良事件例数 /n（%）
代谢及营养类疾病	10	44（2.09）	5	42（5.49）	—	—
肝胆系统疾病	15	120（5.71）	6	26（3.40）	3	9（0.81）
感染及侵染类疾病	40	333（15.83）	12	85（11.11）	9	40（3.62）
各类检查	26	176（8.37）	16	98（12.81）	3	12（1.08）
各类神经系统疾病	20	165（7.85）	10	69（9.02）	28	412（37.25）
各类损伤、中毒及操作并发症	5	49（2.33）	3	62（8.10）	5	74（6.69）
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	3	14（0.67）	1	5（0.65）	2	13（1.18）
各种手术及医疗操作	1	3（0.14）	—	—	—	—
呼吸系统、胸及纵隔疾病	16	95（4.52）	6	41（5.36）	1	3（0.27）
精神病类	3	18（0.86）	5	25（3.27）	15	355（32.10）
免疫系统疾病	8	79（3.76）	—	—	1	4（0.36）
皮肤及皮下组织类疾病	22	209（9.94）	9	56（7.32）	10	43（3.89）
全身性疾病及给药部位各种反应	16	331（15.74）	10	160（20.92）	3	32（2.89）
妊娠期、产褥期及围产期状况	4	24（1.14）	—	—	—	—
肾脏及泌尿系统疾病	8	122（5.80）	2	7（0.92）	1	4（0.36）
生殖系统及乳腺疾病	1	3（0.14）	—	—	—	—
胃肠系统疾病	8	37（1.76）	1	23（3.01）	6	28（2.53）
心脏器官疾病	4	41（1.95）	1	5（0.65）	2	8（0.72）
血管与淋巴管类疾病	5	54（2.57）	—	—	1	7（0.63）
血液及淋巴系统疾病	15	182（8.65）	5	44（5.75）	6	62（5.61）
眼器官疾病	1	4（0.19）	1	4（0.52）	—	—
耳及迷路类疾病	—	—（—）	3	13（1.70）	—	—

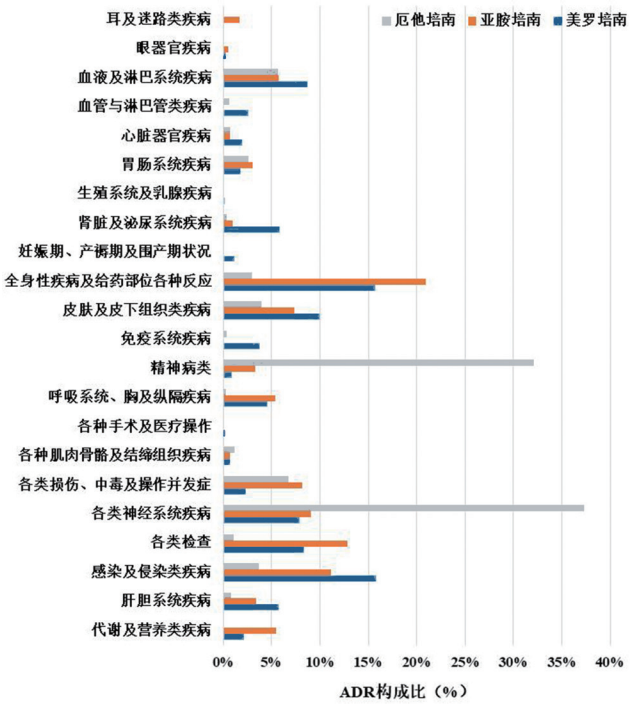


图 1　美罗培南、亚胺培南、厄他培南累及系统不良反应构成比

Fig 1　Involvement system constituent ratio of adverse events of meropenem，imipenem，and ertapenem

说明书中提示碳青霉烯类药物常累及皮肤及皮下组织类疾病，全身性疾病及给药部位各种反应疾病（如药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状、发热），本研究发现美罗培南及亚胺培南这两个 ADR 的发生频率及关联性强度均较高，用药时需密切监测这类 ADR 的发生。且美罗培南说明书 2018 年 6 月 FDA 在警告和注意事项中明确指出美罗培南可致严重皮肤 ADR 如系统症状的药疹、Stevens-Johnson 综合征等[12]，故在临床用药时需密切监测患者的皮肤症状，如疑为严重皮肤反应的症状和体征，应立即停药处理并考虑使用替代疗法。此外本研究还发现美罗培南可致国际标准化比率（INR）升高，而亚胺培南及厄他培南目前尚未见此类不良反应报道。

本研究也发现药品说明书收录不全之处。分别对比 3 种碳青霉烯类药物说明书与本研究中 3 种碳青霉烯类药物 ADR 信号报告频次排前 20 位的不良反应可以发现，本研究挖掘的美罗培南 ADR 报告前 20 位中多器官功能不全综合征、呼吸衰竭等 ADR 均为其说明书未提及的，提示临床使用美罗培南时应警惕此类不良反应的发生。亚胺培南 ADR 报告前 20 位中的呼吸衰竭、耐药、心电图 QT 间期延长、低钙血症、治疗失败、代谢性酸中毒等 ADR 均为亚胺培南说明书尚未记载的 ADR，特别是心电图 QT 间期延长及低钙血症在 3 种碳青霉烯类药物中仅在亚胺培南有报道，提示临床使用中需注意心脏毒性及致代谢及营养

表 3　美罗培南、亚胺培南、厄他培南常见 ADR 信号报告频次 (按降序排列)

Tab 3　Report frequency of ADR signals for meropenem，imipenem，and ertapenem (in descending order)

美罗培南			亚胺培南			厄他培南		
PT	报告例数（n = 2103）[n（%）]	95%*CI*（ROR）	PT	报告例数（n = 765）[n（%）]	95%*CI*（ROR）	PT	报告例数（n = 1106）[n（%）]	95%*CI*（ROR）
耐药 #	67（3.19）	39.44（30.95，50.25）	药物无效 *	80（10.46）	2.27（1.81，2.84）	意识模糊状态 #	113（10.22）	19.26（15.94，23.27）
发热 #	67（3.19）	3.25（2.55，4.13）	产品用于未经批准的适应证 *#	56（7.32）	8.69（6.66，11.35）	惊厥发作 #	76（6.87）	13.36（10.63，16.79）
药物相互作用	49（2.33）	5.33（4.02，7.07）	病原体耐药 *#	32（4.18）	138.16（97.22，196.35）	幻觉	64（5.79）	24.97（19.47，32.01）
全血细胞减少症	46（2.19）	15.71（11.75，21.02）	发热	26（3.40）	3.00（2.04，4.42）	产品用于未经批准的适应证 *	52（4.70）	5.18（3.93，6.81）
急性肾损伤	42（2.00）	2.83（2.09，3.84）	呕吐	23（3.01）	2.02（1.34，3.05）	谵妄	43（3.89）	36.73（27.15，49.68）
病情恶化 *	40（1.90）	2.24（1.64，3.06）	贫血	18（2.35）	3.60（2.26，5.73）	脑病 *	37（3.35）	44.85（32.39，62.09）
药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状 #	40（1.90）	24.00（17.57，32.8）	呼吸衰竭 *#	18（2.35）	10.41（6.54，16.57）	癫痫 #	36（3.25）	34.54（24.84，48.03）
病原体耐药 *	39（1.85）	70.02（50.99，96.14）	耐药 *	16（2.09）	22.19（13.56，36.33）	肌阵挛	32（2.89）	79.82（56.25，113.28）
感染性休克	36（1.71）	14.49（10.43，20.12）	心电图 QT 间期延长 *	15（1.96）	16.3（9.82，7.1）	定向力障碍	28（2.53）	20.27（13.96，29.43）
惊厥发作	34（1.62）	3.76（2.68，5.27）	癫痫	15（1.96）	21.95（13.2，36.51）	幻觉，视觉	26（2.35）	9.69（28.06，14.27）
脓毒症	33（1.57）	4.79（3.40，6.75）	惊厥发作	15（1.96）	3.96（2.38，6.58）	激越	26（2.35）	41.30（36.58，60.88）
肾功能损害	30（1.43）	5.92（4.13，8.48）	血红蛋白降低	14（1.83）	5.23（3.09，8.85）	中性粒细胞减少症	22（1.99）	4.67（3.07，7.11）
血小板减少症	30（1.43）	4.79（3.35，6.87）	意识模糊状态	10（1.31）	2.51（1.35，4.67）	震颤	22（1.99）	3.49（2.29，5.31）
多器官功能不全综合征 *	35（1.66）	13.98（9.70，20.16）	药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状 *	10（1.31）	14.21（7.63，26.48）	神经毒性	21（1.90）	33.06（21.5，50.83）
低血压	26（1.24）	2.17（1.47，3.19）	低钙血症 *	10（1.31）	21.40（11.49，39.87）	嗜睡	21（1.90）	2.70（1.75，4.14）
癫痫	25（1.19）	15.31（10.32，22.69）	血小板计数降低	10（1.31）	3.66（1.97，6.82）	全身强直阵挛性癫痫发作	17（1.54）	20.88（12.95，33.67）
超敏反应	25（1.19）	2.13（1.44，3.16）	治疗失败 *	10（1.31）	3.64（1.96，6.78）	精神状态改变	17（1.54）	8.70（5.40，14.03）
呼吸衰竭 *	24（1.14）	5.79（3.88，8.65）	肝脏毒性	9（1.18）	17.09（8.87，32.92）	白细胞减少症	17（1.54）	3.72（2.31，5.99）
过敏性休克	22（1.05）	17.30（11.37，26.32）	低钠血症	9（1.18）	6.59（3.42，12.7）	意识丧失	17（1.54）	20.08（12.45，32.37）
嗜酸粒细胞增多症	22（1.05）	23.64（15.53，35.97）	代谢性酸中毒 *	9（1.18）	12.77（6.63，24.6）	癫痫持续状态	16（1.45）	38.71（23.66，63.35）

注：* 表示未在说明书中出现的 PT；# 表示 3 种药物前 20 PT 中相同的 ADR 信号关联强度在的最大值。

Note：*means PT not included in the spectification；# represents the maximum ADR signal correlation strength in 20 PT among the three drugs.

类疾病发生。厄他培南 ADR 报告前 20 位中脑病为厄他培南说明书尚未记载的 ADR。以上结果均提示在临床抗感染方案选择时应注意个体化给药，监测患者用药安全性。

3.3　研究的局限性

FAERS 数据库源于自发呈报，来源比较复杂，性别、年龄、剂量等数据信息缺失较多，部分 ADR 报告可能带有随意性和偏倚，数据信息

缺失等也会对结果造成影响[13-14]。该系统收集的ADR报告主要来自于欧美国家（如美国、德国等），亚洲人群的ADR报告数据相对较少，且目前关于碳青霉烯类药物的ADR与种族人群、地理区域的关系尚无明确研究报道，故本研究结果是否适用于中国人群尚待验证。此外，由于无法获取3种碳青霉烯类药物的实际使用量，无法计算出ADR的实际发生率[15]。虽然ROR法和PRR法能减少由于对照组选择所带来的偏倚，所得结果一致性较好[16]，且本研究通过提高信号探查的阈值以增加准确性，但仍无法完全排除假阳性的信号，部分信号还可能被漏查。本研究的信号挖掘结果仅代表ADR与药物存在统计学上的关联性，无法明确碳青霉烯类药物与该ADR在生物学上具有因果关联，仍需要进一步的临床研究证实[17-18]。目前的信号挖掘研究技术尚无法取代生物统计学及药物流行病学研究在临床中的应用，故本研究结果仅供临床用药选择决策参考。

4　结论

本研究基于FAERS数据库中3种碳青霉烯类抗菌药物的ADR，采用比例失衡法中的ROR法和PRR法进行信号挖掘分析，获得的常见ADR信号及ADR累及系统与药品说明书具有一致性，证实本研究结果真实可信。3种药物出现ADR的主要累及系统有一定的差异性，美罗培南主要集中于感染及侵染类疾病、全身性疾病及给药部位各种反应、皮肤及皮下组织类疾病；亚胺培南主要集中于全身性疾病及给药部位各种反应、各类检查、感染及侵染类疾病；厄他培南主要集中于各类神经系统疾病、精神病类。ADR报告前20位且至少两药共同的ADR信号中，厄他培南与癫痫、惊厥发作、意识模糊状态的关联性强；亚胺培南与病原体耐药、产品用于未经批准的适应证、呼吸衰竭的关联性强；美罗培南与药物反应伴嗜酸粒细胞增多和全身性症状、发热、耐药的关联性强。本研究还检测到了3种碳青霉烯类药物说明书中未记载的ADR，这些发现均可为临床安全用药提供一定的参考。

参考文献

[1] 金卫，武鑫，王瑞兰 . 碳青霉烯抗生素的药品不良反应及其预防措施研究进展 [J]. 药学服务与研究，2016，16（5）：327-330.

[2] Papp-Wallace KM，Endimiani A，Taracila MA，et al. Carbapenems：Past，present，and future [J]. Antimicrob Agents Chemother，2011，55（11）：4943-4960.

[3] Chahine EB，Ferrill MJ，Poulakos MN.Doripenem：A new carbapenem antibiotic [J]. Am J Health Syst Pharm，2010，67（23）：2015-2024.

[4] 王广飞，李静，卢金森，等 . 碳青霉烯类抗菌药物致药品不良反应报告 [J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17（6）：830-832，835.

[5] 孔金霞，白雪霏，谢昊，等 . 基于FAERS的非索非那定药品不良反应信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1137-1142.

[6] 包旭 . 美国OpenFDA公众健康项目介绍 [J]. 中国执业药师，2015，12（10）：18-22.

[7] Pearson RK，Hauben M，Goldsmith DI，et al. Influence of the MedDRA hierarchy on pharmacovigilance data mining results [J]. Int J Med Inform，2009，78（12）：e97-e103.

[8] 李婵娟 . 药品不良反应信号检测方法理论及应用研究 [D]. 西安：第四军医大学，2008.

[9] 代菲，舒丽芯，储藏，等 . 简述分析几种信号监测方法在药物不良反应中的应用 [J]. 药学实践杂志，2012，30（5）：380-383.

[10] Evans SJW，Waller PC，Davis S. Use of proportional reporting ratios（PRRs）for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2001，10（6）：483-486.

[11] 胡晓雯，刘璐，冉怡雯，等 . 基于FAERS的铂类药物不良事件信号挖掘研究 [J]. 肿瘤药学，2020，10（5）：608-616.

[12] The U. S. Food and drug administration. MEROPENEM for injection AND SODIUM CHLORIDE injection，for intravenous use Labeling-Package Insert SUPPL-40[EB/OL].（2018-06-05）https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda _ docs/label/2018/050706s040lbl.

[13] 李苑雅，张艳，沈爱宗 . 基于自发呈报系统药品不良反应信号检测方法的研究进展 [J]. 安徽医药，2015，19（7）：1233-1236.

[14] 陈乾，陈力，程艺 . 基于美国FAERS数据库亮丙瑞林和戈舍瑞林不良反应信号检测 [J]. 医药导报，2020，39（10）：1366-1374.

[15] Rodriguez EM，Staffa JA，Graham DJ. The role of databases in drugpostmarketing surveillance [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2001，10（5）：407-410.

[16] 江静，侯永芳，刘秀娟，等 . 药品不良反应信号检测方法概述 [J]. 中国药物警戒，2010，7（2）：78-80.

[17] 张晓兰，夏佳 . 浅谈药物警戒中的安全信号与信号管理 [J]. 药物流行病学杂志，2012，21（2）：90-94.

[18] 张佳颖，常壤丹，陈力，等 . 比例失衡法在纳武利尤单抗不良反应信号挖掘中的应用 [J]. 肿瘤药学，2019，9（5）：798-803.

（收稿日期：2021-06-28；修回日期：2021-08-05）

基于美国 FAERS 数据库的新型降脂药前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂药物不良信号的数据挖掘与分析

张莎，祝德秋*（同济大学附属同济医院，上海 200065）

摘要：目的 利用美国 FDA 不良事件报告系统（FAERS）数据库挖掘前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（PCSK9）抑制剂上市后的药品不良事件（ADE）信号，为临床用药安全提供参考。**方法** 利用报告比值比（ROR）法对美国 FAERS 数据库 2015 年第三季度至 2020 年第二季度共 20 个季度的 PCSK9 抑制剂的不良事件报告进行数据挖掘。**结果** 共挖掘到以 alirocumab 和 evolocumab 为首要怀疑药品的 ADE 报告分别为 12 341 例和 69 462 例。将 PT 信号强度与出现频次前 20 位信号进行分析，alirocumab 最终获得 37 个信号，信号数最多的系统器官分类（SOC）为全身性疾病及给药部位各种反应（n = 7，18.92%）；evolocumab 最终获得 36 个信号，信号数最多的 SOC 为全身性疾病及给药部位各种反应（n = 9，25%）和各类损伤、中毒及手术并发症（n = 9，25%）。**结论** 临床使用 PCSK9 抑制剂时，除应密切关注注射部位反应、骨骼肌肉组织疾病、呼吸系统疾病等安全问题外，还应警惕心脏器官疾病以及相关检查指标等潜在的高风险 ADR 信号。挖掘和评价基于 FAERS 数据库获得的 PCSK9 抑制剂的不良事件报告相关信号，可为其临床合理应用提供依据。

关键词： 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂；不良反应；比例失衡法；数据挖掘；alirocumab；evolocumab

中图分类号： R969.3 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2021)12-2582-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.020

Adverse drug events signals of PCSK9 inhibitors based on the FAERS database

ZHANG Sha, ZHU De-qiu* (*Tongji Hospital*, *School of Medicine*, *Tongji University*, *Shanghai* 200065)

Abstract: Objective To mine the signals of adverse drug events (ADE) of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors with data from Adverse Event Reporting system (FAERS) database, and to provide reference for safe and rational drug use. **Methods** Reporting odds ratio (ROR) was used in the data mining and signal detection of alirocumab and evolocumab to the second quarter of related ADEs reports in FAERS, from the third quarter of 2015 to the second quarter of 2020, 20 quarters in total. **Results** Totally 12 341 and 69 462 ADE reports with alirocumab and evolocumab as the primarily suspected drugs were collected. The signal strength and the top 20 signals were analyzed. Totally 37 signals of alirocumab were obtained, and the SOC with most signals was general disorders and administration site conditions (n = 7, 18.92%). Totally 36 signals of evolocumab were obtained, and the SOC with most signals was systemic diseases and various reactions at the administration site (n = 9, 25%), besides injury, poisoning and procedural complications (n = 9, 25%). **Conclusion** In the clinical use of PCSK9 inhibitors, we should pay close attention to injection site reactions, respiratory, thoracic and mediastinal disorders, musculoskeletal and connective tissue disorders. It is also necessary to be alert for the occurrence

基金项目： 2018 年上海市临床药学重点专科建设项目（No. 沪卫计药政 [2018]8 号）。

作者简介： 张莎，女，硕士，主要从事临床药学工作，E-mail：1287214222@qq.com * **通信作者：** 祝德秋，女，主任药师，博士研究生导师，主要从事医院药学和药事管理工作，E-mail：zdq_0726@163.com

of such potential ADEs as cardiac disorders. The mining and evaluation of PCSK9 inhibitors ADE signals based on FAERS provide the basis for their rational clinical use.

Key words: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor; ADR signal; measure of disproportionality; data mining; alirocumab; evolocumab

药品不良事件（adverse drug events，ADE）监测是上市后再评价的重要途径，可以反映药品在实际使用中的安全性。其主要方法是基于对自发呈报数据库（spontaneous reporting system，SRS）的数据挖掘，从而获取药物与 ADE 之间可能存在的因果关联，尽早发现潜在的 ADE 信号，可及时进行药品上市后安全性再评价 [1]。美国食品药品管理局（FDA）不良事件报告系统（adverse events reporting system，FAERS）数据库是自发报告系统（spontaneous reporting system，SRS）最主要的数据库之一，可有效用于药物警戒，反映药物上市后在真实世界的安全性 [2-4]。

随着生物技术及免疫学技术的快速发展，新型降脂药——前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（proprotein convertase subtilisin/kexin type 9，PCSK9）进入研究者的视野，通过选择性抑制 PCSK9 靶点降低低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C），进而减少心血管不良事件的发生 [5]。因此，对 PCSK9 抑制剂的研究成为降脂治疗的一个里程碑，具有十分重要的意义 [6]。目前上市的 PCSK9 抑制剂主要有 alirocumab 与 evolocumab 两种药物，于 2015 年获美国 FDA 正式批准上市，并先后于 2018 年 /2019 年获国家药品监督管理局批准在中国上市。由于其上市时间短，目前关于其安全性研究大多源于临床试验数据 [6-7]，缺乏大数据的系统性分析研究，药物上市后在真实世界的安全性有待更多的研究论证。因此，本研究通过对 FAERS 数据库进行挖掘和筛选，利用报告比值比法（reporting odd ratio，ROR）对 PCSK9 抑制剂 ADE 信号进行分析，以期为临床安全用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　数据来源

本研究数据来源于美国 FAERS 数据库，该数据库相比其他数据库的数据要更加真实准确、规范与完善，并且在 ADE 的发现、报告、评价与控制过程中得到了广泛的认同 [8]。FAERS 数据库于 2004 年 1 月起开始对公众开放，每三个月会将最新的数据汇总发布 [9]。收集 alirocumab 和 evolocumab 上市后至 2020 年第 2 季度在 FAERS 数据库中能检索到的所有 ADE 报告进行分析。本研究以 alirocumab 与 evolocumab 通用名为检索词，下载相对应的报告进行后续分析，每份报告内包含报告编号、报告日期、报告来源、患者的基本信息、给药途径、ADE 及结局等相关信息。

1.2　数据筛选

根据 FAERS 的使用方法，去除重复的报告，从中选出用药名称为 alirocumab 与 evolocumab 为目标药物及首要怀疑药物的报告。

1.3　数据标准化

由于 FAERS 数据库是 SRS 数据库，其上报的数据存在上报名称不规范、存在冗余报告等问题 [10]，为减少因语言描述不同造成的偏倚，需要对所得到的数据进行标化。采用《ICH 国际医学用语词典》（MedDRA）将其标化成首选语（preferred terms，PT），并映射到对应的系统器官分类（system organ class，SOC），完成 ADE 国际术语统一化。

1.4　数据分析

比例失衡法中的 ROR 是目前在 ADE 分析统计方法中灵敏度较高的方法。该方法基于四格表（见表 1），通过比较目标药品的 ADE 报告数与其他所有药品的报告数，以检测其潜在的 ADE 信号。报告数≥ 3 且 ROR 的 95%*CI* 下限＞ 1，则提示生成一个信号，即药品与事件之间存在潜在关联 [9]。统计分析采用 SPSS 22.0 软件和 Microsoft Excel 软件。

1.5　不良事件分类

通过 MedDRA 筛选出对应 PT，再通过系统器官分类（SOC）进行分类。

2　结果

2.1　alirocumab 和 evolocumab 的不良事件报告基本情况

自 alirocumab 和 evolocumab 上市至 2020 年第 2 季度以来，FAERS 数据库共收到 alirocumab 药物相关 ADE 报告共 34 491 例，evolocumab 药物相关 ADE 报告共 101 939 例。其中以 alirocumab 和 evolocumab 为首要怀疑药物的 ADE 报告分

表 1　比例失衡法四格表

Tab 1　Fourfold table of measures of disproportionality

药品种类	目标不良反应报告数	其他不良反应报告数	合计
目标药物	a	b	a ＋ b
其他药物	c	d	c ＋ d
合计	a ＋ c	b ＋ d	N ＝ a ＋ b ＋ c ＋ d

注（Note）：ROR ＝（a/c）/（b/d），95%CI ＝ $e^{\ln(ROR)\pm1.96\sqrt{[1/a+1/b+1/c+1/d}}$。

别为 12 341 例和 69 462 例。均以女性患者居多，分别为 55.76% 和 53.99%，ADE 报告国家以欧美为主，其中美国报告数最多，占总 ADE 数的 97% 以上，详见表 2。

表 2　FAERS 中 alirocumab 和 evolocumab 相关不良事件报告基本信息

Tab 2　Primary information of alirocumab and evolocumab related adverse events reports in FAERS

类别	alirocumab		evolocumab	
	例数（*n*）	占比 /%	例数（*n*）	占比 /%
性别				
男	4804	38.93	28 644	41.24
女	6881	55.76	37 504	53.99
不详	656	5.31	3314	4.77
年龄 / 岁				
＜ 18	5	0.04	36	0.05
18 ～ 64	3043	24.66	19 553	28.15
≤ 65	5222	42.31	26 577	38.26
不详	4071	32.99	23 296	33.54
报告国家（前五）				
美国	12 000	97.24	67 788	97.59
英国	102	0.83	313	0.45
德国	61	0.49	296	0.43
西班牙	28	0.23	215	0.31
日本	20	0.16	191	0.27
ADE 结局				
不详	10 554	85.51	62 135	89.45
其他	1024	8.3	4643	6.68
住院治疗 - 需要收治住院或延长住院时间	688	5.58	2194	3.16
死亡	75	0.61	382	0.55
残疾	/	/	108	0.16
合计	12 341	100	69 462	100

2.2　alirocumab 和 evolocumab 信号强度和报告数排名前 20 位的 ADE 信号

对分别以 alirocumab 和 evolocumab 为首要怀疑药物的 ADE 进行信号分析，以 PT 信号强度与出现频次对前 20 个信号进行排序。详见表 3 和表 4。

2.3　alirocumab 和 evolocumab 新的可疑 ADR 信号

挖掘出信号强且分别与 alirocumab 和 evolocumab 相关且未在说明书上标注的新的可疑 ADR 信号。alirocumab 最终获得 37 个信号，其中包括已被药品说明书收录的 ADE 17 个（45.95%），未收录的 20 个（54.05%）；evolocumab 最终获得 36 个信号，其中包括已被药品说明书收录的 ADE 18 个（50%），未收录的 18 个（50%）。将上述二次筛选后有信号的 PT 按照 SOC 进行分类，alirocumab 信号数最多的 SOC 为全身性疾病及给药部位各种反应（*n* ＝ 7，18.92%），其次主要涉及各类损伤、中毒及手术并发症、各类检查、各种肌肉骨骼及结缔组织疾病等；evolocumab 信号数最多的 SOC 为全身性疾病及给药部位各种反应（*n* ＝ 9，25%）和各类损伤、中毒及手术并发症（*n* ＝ 9，25%），详见表 5。排除非 ADR 后，alirocumab 和 evolocumab 相关的未在药品说明书中提及的新的疑似的 ADR 信号主要涉及各类检查，呼吸系统、胸及纵隔疾病，心脏器官疾病等 SOC，包括有低密度脂蛋白升高、血肌酸磷酸激酶 MM 升高、鼻漏、急性心脏事件、注射部位干燥、胰腺炎等，详见表 6。

3　讨论

本研究通过对 FEARs 数据库进行 ADE 信号挖掘发现，alirocumab 和 evolocumab 相关 ADE 报告主要分布在年龄＞ 18 岁的患者，这可能与血脂异常患病人群多为中老年人有关。ADE 上报人员国家主要集中在欧美，中国较少，这可能与该药在中国上市不久，其使用率不高以及 FARES 为美国数据库在国内使用不多等因素有关。

3.1　非 ADR 且信号强烈的 ADE

FAERS 数据库包括了一切与药品使用有关的环节所出现的不利的和非预期的结果（如检查结果的异常）、体征或疾病均应上报，包括偶然或故意的药物使用过程问题、药物剂量问题、药物滥用等导致的 ADE，以及由于患者自身的背景疾病等因素导致的 ADE 等 [11]，即 ADE 包括了药物直接导致的药物不良反应（ADR）以及其他的不良事件。因此本研究将挖掘到的 ADE 信号分为非 ADR 的 ADE、说明书已收录的 ADR 和新的疑似 ADR 三类逐一进行分析。

本研究首先对非 ADR 且信号强烈的 ADE 进行数据挖掘分析发现，alirocumab 的相关信号中发生例次和信号强度排名均在前 20 位的 PT 均为非 ADR 的 ADE，包括器械使用问题、装置问题以及药物剂量遗漏；evolocumab 的相关信号中发生例次和信号强度排名均在前 20 位的 PT 包括意外暴露于产品、鼻漏、注射部位青肿以及产品使用程

表 3　alirocumab 信号强度和报告数排名前 20 位的 ADE 信号

Tab 3　Top 20 ADE signals of alirocumab of strength and number of reports

PT（按信号强度计）	报告数	ROR 值	95%*CI*	PT（按频次计）	报告数	ROR 值	95%*CI*
器械使用问题	396	155.135	138.999 ～ 173.143	药物剂量遗漏	1914	21.076	19.901 ～ 22.32
用药部位损伤	13	146.844	80.806 ～ 266.85	肌痛	953	9.295	8.698 ～ 9.933
经皮腔内斑块旋切术	3	237.027	64.161 ～ 875.638	装置问题	851	29.364	27.357 ～ 31.517
低密度脂蛋白降低	79	77.938	61.747 ～ 98.375	肌肉痉挛	609	5.759	5.307 ～ 6.249
高脂血症Ⅱ a 型	6	118.541	49.939 ～ 281.38	注射部位痛	552	3.52	3.232 ～ 3.835
血肌酸磷酸激酶 MM 升高	4	129.297	44.549 ～ 375.262	关节痛	504	2.545	2.327 ～ 2.782
不适当的用药时间安排	30	61.961	42.65 ～ 90.016	肢体疼痛	485	2.799	2.556 ～ 3.065
低密度脂蛋白异常	20	63.009	39.873 ～ 99.57	疲乏	482	1.166	1.064 ～ 1.277
装置运行问题 NEC	109	46.29	38.109 ～ 56.228	流感样疾病	479	8.296	7.569 ～ 9.093
低密度脂蛋白升高	216	43.536	37.908 ～ 50	疼痛	476	1.374	1.253 ～ 1.505
急性心脏事件	4	98.087	34.478 ～ 279.054	器械使用问题	396	155.135	138.999 ～ 173.143
装置问题	851	29.364	27.357 ～ 31.517	注射部位青肿	393	10.147	9.171 ～ 11.226
胰腺炎	7	57.231	26.492 ～ 123.633	腹泻	391	1.185	1.071 ～ 1.31
血胆固醇降低	38	32.291	23.319 ～ 44.716	瘙痒	369	2.239	2.019 ～ 2.484
装置相关损伤	202	24.455	21.233 ～ 28.167	皮疹	369	1.672	1.507 ～ 1.854
药物剂量遗漏	1914	21.076	19.901 ～ 22.32	产品使用问题	348	4.241	3.811 ～ 4.719
血三酰甘油降低	8	37.195	18.267 ～ 75.734	注射部位红斑	339	4.329	3.885 ～ 4.824
设备故障	52	23.065	17.49 ～ 30.417	咳嗽	321	2.349	2.102 ～ 2.624
注射部位干燥	9	28.711	14.742 ～ 55.918	鼻漏	292	9.134	8.127 ～ 10.265
不正确的产品存储	60	14.271	11.046 ～ 18.437	注射部位出血	292	7.014	6.242 ～ 7.881

表 4　evolocumab 信号强度和报告数排名前 20 位的 ADE 信号

Tab 4　Top 20 ADE signals of evolocumab of signal strength and reports

PT（按信号强度计）	报告数	ROR 值	95%*CI*	PT（按频次计）	报告数	ROR 值	95%*CI*
低密度脂蛋白降低	473	185.982	161.58 ～ 214.07	药物剂量遗漏	6697	7.55	7.346 ～ 7.76
心脏运动过度综合征	23	135.197	75.353 ～ 242.568	产品使用程序技术性错误	6590	15.664	15.252 ～ 16.086
血胆固醇降低	331	78.737	68.675 ～ 90.275	注射部位痛	6433	8.288	8.073 ～ 8.509
低密度脂蛋白异常	78	60.087	45.931 ～ 78.606	意外暴露于产品	3918	25.23	24.364 ～ 26.127
外用部位肿块	41	53.034	36.869 ～ 76.285	背痛	3538	5.122	4.948 ～ 5.301
穿刺部位肿胀	8	86.194	35.232 ～ 210.871	肌痛	3457	6.17	5.958 ～ 6.389
注射恐惧	366	30.251	26.992 ～ 33.904	注射部位青肿	3159	16.689	16.071 ～ 17.331
穿孔部位疼痛	16	44.976	25.462 ～ 79.443	鼻漏	2789	18.097	17.383 ～ 18.84
意外暴露于产品	3918	25.23	24.364 ～ 26.127	未依说明书用药	2304	1.359	1.303 ～ 1.417
药品监控步骤执行不正确	62	29.065	22.065 ～ 38.287	关节痛	2193	2.021	1.936 ～ 2.109
低密度脂蛋白升高	531	21.138	19.28 ～ 23.176	流感样疾病	2178	7.101	6.797 ～ 7.418
鼻漏	2789	18.097	17.383 ～ 18.84	肢体疼痛	2040	2.148	2.055 ～ 2.246
配药错误	33	24.671	17 ～ 35.802	肌肉痉挛	2018	3.466	3.314 ～ 3.625
装置给药剂量有误	598	17.978	16.499 ～ 19.589	注射部位出血	1841	8.509	8.112 ～ 8.924
设备交付系统问题	31	23.584	16.082 ～ 34.585	鼻咽炎	1676	3.272	3.115 ～ 3.437
注射部位青肿	3159	16.689	16.071 ～ 17.331	装置问题	1503	9.274	8.797 ～ 9.777
设备故障	206	18.354	15.859 ～ 21.241	用药剂量不足	1418	6.608	6.262 ～ 6.974
血浆分离置换法	5	43.095	15.662 ～ 118.579	咳嗽	1302	1.738	1.645 ～ 1.837
缺乏注射部位轮换	35	22.3	15.577 ～ 31.925	注射部位肿胀	1135	4.896	4.612 ～ 5.198
产品使用程序技术性错误	6590	15.664	15.252 ～ 16.086	感觉异常	1008	1.176	1.105 ～ 1.252

序技术性错误，4 个 PT 中有 2 个均为非 ADR 的 ADE。Alirocumab 和 evolocumab 的相关信号中发生例次和信号强度排名均在前 20 位的 PT 主要都是非 ADR 且信号强烈的 ADE，这可能与该类药品的剂型以及使用方法有关，因 PCSK9 抑制剂为注射剂，且需要通过皮下注射给药，给药方法较为复杂。这提示使用该药品前，医务人员应对患者如何正确使用提供适当训练，并将此作为患者用药教育的重点，以提高患者用药安全性。

3.2　说明书已收录的 ADR

本研究对信号强度和信号频次排名前 20 位的 ADE 报告进行分析发现，alirocumab 和 evolocumab 所得的 ADR 信号与药品说明书和文献研究基本一致[6-7]。排除非 ADR 后，两药药品说明书中提及且信号强烈的 ADR 信号种类数最多的 SOC 均为“全身性疾病及给药部位各种反应”，主要表现为注射部位反应，包括注射部位疼痛、青肿、出血、肿胀、感觉异常以及流感样疾病等。这与 PCSK9 抑

表 5 alirocumab 和 evolocumab 不良事件信号与累及的系统和器官

Tab 5 alirocumab and evolocumab related ADE signals and systems and organs involved

累及的系统和器官（SOC）	alirocumab		evolocumab	
	有信号的 PT	信号数	有信号的 PT	信号数
各类损伤、中毒及手术并发症	用药部位损伤，不适当的用药时间安排 *，装置相关损伤 *，药物剂量遗漏 *，不正确的产品存储 *，产品使用问题 *	6	意外暴露于产品 *，药品监控步骤执行不正确 *，配药错误 *，装置给药剂量有误 *，缺乏注射部位轮换 *，产品使用程序技术性错误 *，药物剂量遗漏 *，未依说明书用药 *，用药剂量不足 *	9
全身性疾病及给药部位各种反应	注射部位干燥 *，注射部位痛，疲乏 *，流感样疾病，疼痛，注射部位青肿，注射部位出血	7	外用部位肿块，穿刺部位肿胀，穿孔部位疼痛，注射部位青肿，注射部位痛，流感样疾病，注射部位出血，注射部位肿胀，感觉异常	9
各类检查	低密度脂蛋白降低，血肌酸磷酸激酶 MM 升高 *，低密度脂蛋白异常，低密度脂蛋白升高 *，血胆固醇降低 *，血三酰甘油降低 *	6	低密度脂蛋白降低，血胆固醇降低 *，低密度脂蛋白异常，低密度脂蛋白升高 *	4
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	肌痛，肌肉痉挛，关节痛，肢体疼痛	4	背痛，肌痛，关节痛，肢体疼痛，肌肉痉挛	5
呼吸系统、胸及纵隔疾病	咳嗽，鼻漏 *	2	鼻漏 *，鼻咽炎，咳嗽	3
产品问题	器械使用问题 *，装置运行问题 NEC*，装置问题 *，设备故障 *	4	设备交付系统问题 *，设备故障 *，装置问题 *	3
各种手术及医疗操作	经皮腔内斑块旋切术 *	1	血浆分离置换法 *	1
心脏器官疾病	急性心脏事件 *	1	注射恐惧 *	1
皮肤及皮下组织类疾病	瘙痒，皮疹，注射部位红斑	1	心脏运动过度综合征 *	1
胃肠系统疾病	胰腺炎 *，腹泻	3	—	—
代谢及营养类疾病	高脂血症Ⅱ a 型 *	2	—	—

注：* 表示未在 alirocumab 说明书中出现的 PT。

Note：* Indicates the PT that is not appearing in the alirocumab instructions.

表 6 新的疑似不良反应信号与累及的系统和器官

Tab 6 New signs of suspected ADRs of alirocumab and evolocumab and systems and organs involved

累及的系统和器官（SOC）	alirocumab 有信号的 PT	evolocumab 有信号的 PT
各类检查	血肌酸磷酸激酶 MM 升高，低密度脂蛋白升高，血胆固醇降低，血三酰甘油降低	血胆固醇降低、低密度脂蛋白升高
呼吸系统、胸及纵隔疾病	鼻漏	鼻漏
血管与淋巴管类疾病	急性心脏事件	
代谢及营养类疾病	高脂血症Ⅱ a 型	—
胃肠系统疾病	胰腺炎	—
全身性疾病及给药部位各种反应	注射部位干燥，疲乏	—
心脏器官疾病	—	心脏运动过度综合征

制剂类药物说明书记载的一致，这可能与该药为针剂，需要定期皮下注射给药有关，从而导致注射部位反应明显。因此如何减轻患者注射部位症状，改善患者用药感受值得深思；其次，两药主要涉及的 SOC 均为“组织疾病”，包括背痛、肌痛、关节痛、肢体疼痛等骨骼肌肉相关 ADR，这与目前 PCSK9 抑制剂临床试验的结果一致。有临床研究显示 alirocumab 组肌痛发生率高于安慰剂组（5.4% *vs* 2.9%，$P < 0.01$）[12]；目前尚无文献报道 PCSK9 抑制剂会引发严重肌肉组织损伤横纹肌溶解症。在之后的研究中，仍应关注 PCSK9 抑制剂的骨骼肌相关 ADR，并重视有无横纹肌溶解症的发生。此外，本研究发现相较于 evolocumab、alirocumab 在皮肤及皮下组织类疾病，各类损伤、中毒及手术并发症和胃肠系统疾病等发生了更多的 ADR，在之后的临床使用中需要更加注意。

3.3 新的疑似 ADR 信号

本研究对信号强度和信号频次排名前 20 位的 ADE 报告进行分析发现，alirocumab 和 evolocumab 相关信号中分别发现了 20 个和 18 个新的 ADE 信号，排除非 ADR 后，药品说明书中未提及且信号强烈的 ADR 信号共有 15 个，主要涉及的 SOC 为各类检查、心脏器官疾病、胃肠系统疾病、呼吸系统、胸及纵隔疾病。

横纹肌溶解症为他汀类药物引起的严重肌肉组织损伤的 ADR，严重者可致死。FDA 报道称每 100 万名患者中将会有 0.3 ～ 13.5 例发生横纹肌溶解症 [13]。虽然目前尚无文献报道 alirocumab 会引发横纹肌溶解症，但是本研究发现药品说明书中未提及且信号强烈的 ADR 血肌酸磷酸激酶 MM 升高，虽然该信号频次低但是信号强度高（ROR ＝ 44.549）。因此，考虑到横纹肌溶解症

的危害性，在临床应用 PCSK9 抑制剂类药物时，一旦发生可疑血肌酸磷酸激酶 MM 升高，建议立即停药观察。

Alirocumab 和 evolocumab 发现心脏器官疾病的新的可疑高风险信号，包括急性心脏事件和心脏运动过度综合征等不良反应，虽然发生频次低但信号强度高，ROR 分别为 34.478 和 75.353。理论上，ROR 值越高，ADR 与用药之间的关系就越密切。然而在 alirocumab 和 evolocumab 说明书中均未记载对心血管患病率和死亡率的影响，这可能与药品上市前研究的局限性有关。考虑到此类 ADR 的风险性与信号强度较高，在之后临床应用过程中应注意监测，提高警惕。此外，alirocumab 和 evolocumab 均发现“鼻漏”这一新的疑似 ADR 信号，且发生频次均排名在前 20 位，以 evolocumab 发生信号强度更高（ROR = 17.383）。这一信号与药品说明书中记载的鼻咽炎、咳嗽等呼吸系统 ADR 尚有联系，可进一步提示该风险信号可能是 PCSK9 抑制剂新的警戒信号，建议临床关注。

本研究还挖掘到 evolocumab 未出现，但 alirocumab 出现的胰腺炎、高脂血症Ⅱa型、注射部位干燥、疲乏等新的疑似 ADR 信号，但是发生例数均较少，后续需要更多的研究去探究这些疑似 ADR 信号与该药的关联性。

3.4　研究局限性

由于 FAERS 数据库为自发呈报数据库，对报告者身份没有限制，因此报告数据可能质量不一：① 上报名称不规范；② 存在冗余报告与重复数据；③ 数据信息不全；④ 药物与 ADR 报告信息不对应等。

另外通过 ROR 法挖掘目标药物与目标 ADR 的统计学关联性时，当 ADR 报告数量很少时，ROR 法用于信号挖掘的准确性可能降低 [14]。当信号检测出现比例失衡时，仅代表信号的产生，但对于结果的临床意义仍需进一步验证。

4　结论

临床使用 PCSK9 抑制剂时，除应密切关注注射部位反应、骨骼肌肉组织疾病、呼吸系统疾病等安全问题外，还应警惕心脏器官疾病以及相关检查指标等潜在的高风险 ADR 信号。本研究通过对 FAERS 数据库的 ADE 报告进行数据挖掘与分析，探索 alirocumab 和 evolocumab 上市后在真实世界临床应用中的可疑 ADR 信号，获得了相对更加真实完整的药品安全信息，为临床用药提供参考，以保障患者用药安全。

参考文献

[1] 赵洪琼，田晓江，唐学文，等 . 基于 FDA 不良事件数据库对甲巯咪唑与丙硫氧嘧啶药物风险信号的数据挖掘与评价 [J]. 医药导报，2018，37（10）：1261-1266.

[2] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2019 [J]. CA Cancer J Clin，2019，69（1）：7-34.

[3] Herbst RS，Heymach JV，Lippman SM. Lung cancer [J]. N Engl J Med，2008，359（13）：1367-1380.

[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] Mullard A. Cholesterol lowering block buster candidates speed into phase Ⅲ trials [J]. Nat Rev Drug Discov，2012，11（11）：817-819.

[6] 吕冬青，田雨苗，任毅，等 . 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂在降脂治疗中的应用及其对心血管的保护意义 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17（11）：1638-1642.

[7] 罗聪聪，鲍春荣，何斌 . 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 单克隆抗体治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的临床研究进展 [J]. 上海交通大学学报（医学版），2018，38（3）：339-342.

[8] 吴斌，肖桂荣，罗敏，等 . 基于 FAERS 的新型冠状病毒肺炎治疗用药安全信号挖掘研究：α- 干扰素 [J]. 医药导报，2020，39（4）：492-497.

[9] 胡巧织，罗敏，王华玲，等 . 基于 FAERS 的新型冠状病毒肺炎治疗用药安全信号挖掘研究：利巴韦林 [J]. 医药导报，2020，39（4）：513-518.

[10] 黎润灵 . FAERS 数据库药物不良反应挖掘与分析 [D]. 哈尔滨：哈尔滨工程大学，2017.

[11] 杨悦 . 药品 . 上市许可持有人直接报告不良反应制度实施问题研究 [J]. 中国药物警戒，2019，16（11）：649-653，665.

[12] Rashid H，Meredith IT，Nasis A. PCSK9 monoclonal antibodies in 2016：Current status and future challenges [J]. Heart Lung Circ，2017，26（8）：786-798.

[13] Kareem H，Sahu D，Rao MS，et al. Statin induced rhabdomyolysis with non oliguric renal failure：A rare presentation [J]. J Clin Diagn Res，2017，11（3）：FD01-FD02.

[14] 陈晨，夏雪，蔡毅范，等 . 基于美国 FAERS 数据库的西妥昔单抗不良反应信号挖掘研究 [J]. 肿瘤药学，2019，9（4）：676-681.

（收稿日期：2021-05-18；修回日期：2021-07-07）

综述

高原低氧环境下机体药动学参数变化对临床用药的启示

周杨[1]，朱俊博[1]，李向阳[1, 2*]（1. 青海大学医学院，西宁 810001；2. 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室，西宁 810016）

摘要：低氧对高原地区人类生命活动影响显著，研究低氧环境下药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄的变化，可以为高原地区临床合理用药提供参考依据。本文综述了药动学参数以及代谢产物暴露量在高原低氧环境中的改变，并提出了高原地区需要对患者给药方案进行重新评估的建议。

关键词：高原；低氧环境；代谢产物；药动学；合理用药

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2588-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.021

Effect of changes in pharmacokinetic parameters on clinical medication under hypoxic environment at high altitude

ZHOU Yang[1], ZHU Jun-bo[1], LI Xiang-yang[1, 2*] (1. *Medical College of Qinghai University*, *Xining* 810001; 2. *State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture*, *Qinghai University*, *Xining* 810016)

Abstract: Hypoxia has a significant impact on human life activities in plateau areas. It is important to explore the changes in absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs in the body under hypoxia environment to guide the rational clinical use of drugs. This article reviewed the effect of hypoxia on pharmacokinetic changes in prototype drugs and metabolites, and provide reference for the reassessment of patient's dosing regimens at high altitude.

Key words: high altitude; hypoxia environment; metabolite; pharmacokinetics; rational drug use

高原地区具有低气压、低氧、低湿度、低温、昼夜温差大、强紫外线等特殊环境特征，其中低氧对高原地区人类生命活动的影响最为显著。20 世纪 80 年代以来，许多学者开始关注高原低氧条件下机体内药物代谢的变化，在缺氧环境中，人体会产生一系列生理性甚至病理性变化，影响药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程，导致药动学特征发生改变[1-3]。另外，药物进入机体后，能够在各种酶的催化下进行代谢，生成结构相近的代谢产物。高原低氧条件下，代谢产物量的变化对于代谢产物安全性评价带来了新的思考。近年来，进入高原旅居人群越来越多，然而目前缺乏高原地区临床用药的指导建议，用药剂量与频次还是遵循平原地区的经验与建议，导致其合理安全用药无法得到保障。另外，平原地区确定的代谢产物安全性评估的数据在高原地区也会发生变化。因此，开展高原药物药动学研究，为高原人群合理安全用药提供理论支持成为高原药学和药物代谢研究的热点。本文综述了药动学参数在低氧下的变化，提出了高原地区需要对药物代谢产物安全性进行重新评估的建议，并且为高原地区临床给药方案的调整提供了指导意见。

1 低氧对机体药动学的影响

随着越来越多的人意识到高原地区用药不同于平原地区，许多学者尝试将各类实验动物，比如家兔、大鼠等进行模拟低氧以及高原实地造模[4-5]，从而得到相关药动学变化数据，为高原低氧对人体内药动学参数变化提供了一定依据。

基金项目：国家自然科学基金（No. 81760673）；青海省创新平台建设项目（No. 2021-ZJ-T03）。

作者简介：周杨，男，硕士研究生，主要从事药物代谢动力学研究，E-mail：qhuchouyang@163.com *通信作者：李向阳，男，教授，博士研究生导师，主要从事高原药物代谢动力学研究，E-mail：qhmclxy@163.com

1.1 低氧对大鼠药动学的影响

大鼠作为最常用的实验动物，在高原缺氧实验中应用广泛。许多学者将大鼠置于低压氧舱中进行造模，从而探究模拟高原低氧对大鼠体内药物药动学的变化。Gola 等[6]研究发现，将大鼠置于海拔高度相当于 7620 m 的低压氧舱处置 1 d 后，布洛芬在大鼠体内的半衰期（$t_{1/2}$）和平均滞留时间（*MRT*）显著延长了 42% 和 51%，将造模时间延长至 7 d 及 14 d，发现布洛芬在大鼠体内的代谢变化趋势与前者一致，仍旧表现为 *MRT*、$t_{1/2}$ 及表观分布容积（V_d）增大，清除率（*CL*）降低[7]。将大鼠置于低氧箱（9%O_2）持续低氧造模 72 h 后发现，芍药苷[8]和罗红霉素[9]的峰浓度（C_{max}）与浓度 - 时间曲线下面积（*AUC*）均显著降低，而 *MRT* 和 $t_{1/2}$ 变化无显著差异，同时罗红霉素在大鼠体内 *CL* 明显增加，其原因可能是药物转运体的功能在低氧条件下发生改变。本课题组通过模拟急性和慢性缺氧实验[10]，将大鼠置于海拔高度相当于 5000 m 的低压氧舱造模 4 d 和 30 d 后，对乙酰氨基酚、盐酸二甲双胍的药动学参数发生了显著变化，其中，对乙酰氨基酚急性和慢性缺氧组药动学变化趋势完全一致。与平原对照组相比，急、慢性缺氧组的 *MRT*、$t_{1/2}$、*AUC* 均显著增加，V_d、*CL*、消除速率（K_e）均显著降低。另外，相比于平原对照组，急性缺氧使盐酸二甲双胍的 *MRT*、$t_{1/2}$ 延长了 24.6% 和 27.8%，差异有统计学意义，而 C_{max} 变化差异无统计学意义；慢性缺氧使盐酸二甲双胍的 *MRT*、$t_{1/2}$ 延长了 53.6% 和 56.6%，C_{max} 降低了 25.6%。

近年来高原实地造模研究逐渐增多，Gong 等[11]研究发现，相较于正常组大鼠，地西泮及地塞米松在缺氧组大鼠体内达峰时间（T_{max}）增大、*MRT* 延长，其中地西泮缺氧组 C_{max} 增加而地塞米松降低，提示缺氧对药物地西泮和地塞米松的体内药动学特征改变并不完全一致，需要对各个具体药物进行研究讨论。不仅如此，不同海拔高度导致机体不同程度的缺氧也会使药物在大鼠体内的药动学参数变化程度不一。

大鼠急进 4010 m 高原后，普萘洛尔、呋塞米和丁螺环酮的药动学参数变化显著，其 *AUC*、*MRT*、$t_{1/2}$、C_{max} 均显著增加，*CL*、V_d 均显著降低[12-14]；与这 3 个药物有所不同的是，醋甲唑胺在大鼠体内的吸收、分布、代谢、排泄未发生变化，氨茶碱的 T_{max} 显著减小[12]；甲硝唑的 *AUC* 和 C_{max} 分别降低了 31.6% 和 44.5%，*CL* 和 V_d 分别增加了 45.7% 和 44.3%[15]；美托洛尔的 *AUC* 和 C_{max} 降低了 15.4% 和 35.7%，而 *CL* 增加了 212.5%[16]，提示美托洛尔与普萘洛尔虽然同为 β 受体阻滞剂，但各药物在高原低氧环境中机体内的代谢情况并不一致，需要进一步探究分析。

大鼠急进 4300 m 高原后，莫沙比利、硝苯地平、阿莫西林、地塞米松、左氧氟沙星的 *AUC*、C_{max} 均显著增大，*MRT* 明显延长，*CL*、V_d 均显著降低[17-21]，但是这些药物 $t_{1/2}$ 变化情况有所不同，其中地塞米松的 $t_{1/2}$ 缩短，阿莫西林、莫沙比利、硝苯地平、左氧氟沙星的 $t_{1/2}$ 延长。然而并不是所有药物在急进 4300 m 高原后的药动学参数变化趋势都是如此，Luo 等[22]研究发现，与平原组相比，诺氟沙星高原组的 *AUC* 显著性降低 16.04%，C_{max} 和 $t_{1/2}$ 显著性降低 25.93%、34.02%，*MRT* 延长 30.88%，*CL*、V_d 升高 23.53% 和 42.50%。

综上，无论是低压氧舱造模还是高原实地造模，绝大多数药物在缺氧大鼠体内的代谢变化明显，主要表现为 *AUC*、*MRT*、C_{max} 增大，*CL*、V_d 降低。主要药动学参数变化见表 1。

1.2 低氧对其他动物药动学的影响

除大鼠外，其他实验动物也常用于高原低氧药动学的研究，但由于转运至高原实地存在更高难度和要求，因此大多是在平原地区进行低氧造模。家兔在模拟 4572 m 高度的低压氧舱间歇性造模 35 h 后，苯巴比妥、乙酰水杨酸、乙酰唑胺和庆大霉素在其体内的 $t_{1/2}$ 和 *MRT* 均显著延长，K_e 显著降低[23]。通过模拟高原低氧，将家兔暴露于低氧条件下，苯妥英的 *AUC* 增加，*CL* 显著降低[24]。Letarte 等[25]和 Perreault 等[26]对低氧血症以及高碳酸血症对茶碱和沙丁胺醇药动学的影响进行探究，发现相对于正常组，低氧血症组家兔茶碱的 *CL* 显著降低；沙丁胺醇的 $t_{1/2}$ 显著提高，V_d 增加了 2 倍。du Souich 等[27]研究发现，通过模拟高原急性缺氧，比格犬体内地尔硫䓬的药动学特征无显著变化，但是缺氧 120 h 后，地尔硫䓬的 V_d 和 *CL* 均降低 20%。王晴晴等[28]通过模拟低氧，发现缺氧小鼠体内阿苯达唑的 *CL* 降低，*AUC* 增大、C_{max} 升高。不难发现，各药物在机体内的 *CL* 大多呈降低趋势，提示药物在各机体内代谢减慢。主要药动学参数变化见表 2。

1.3 低氧对人体药动学的影响

值得注意的是，药物代谢酶在人体与动物体内的活性和表达并不相同，代谢产物也存在差异，从而导致低氧环境中药物在各机体代谢情况不同。Powell 等[29]研究发现，茶碱在心功能衰竭、慢性阻塞性肺疾病和肺性心脏病的患者体内的 *CL* 显著降低了 30% ～ 60%，而这些疾病的形成均与急性缺氧相关，所以其推测缺氧会导致机体药物代谢发生变化。这一推论在后续的研究中

表 1 低氧条件下大鼠药物药代动力学参数的变化

Tab 1 Pharmacokinetic changes of drugs in rats at hypoxic condition

药物	处理方式	*MRT*	C_{max}	$t_{1/2}$	K_e	*AUC*	V_d	*CL*	文献
布洛芬	在模拟 7620 m 海拔高度的低压氧舱中造模 6 h 和 24 h	↑	—	↑	—	—	—	—	[6]
布洛芬	在模拟 7620 m 海拔高度的低压氧舱中造模 6 h 和 24 h	↑↑$^{△}$	—	↑↑$^{△}$	—	—	↑↑$^{△}$	↓↓$^{△}$	[7]
芍药苷	低氧箱（9%O_2）持续低氧 72 h	—	↓	—	—	↓	—	—	[8]
罗红霉素	低氧箱（9%O_2）持续低氧 72 h	↑	↓	—	—	↓	↑	↑	[9]
对乙酰氨基酚	在模拟 5000 m 海拔高度的低压氧舱中造模 4 d 和 30 d	↑↑$^{△}$	↑↑$^{△}$	↑↑$^{△}$	↓↓$^{△}$	↑↑$^{△}$	↓↓$^{△}$	↓↓$^{△}$	[10]
盐酸二甲双胍	在模拟 5000 m 海拔高度的低压氧舱中造模 4 d 和 30 d	↑↑$^{△}$	↓$^{△}$	↑↑$^{△}$	↓↓$^{△}$	—	—	—	[10]
地西泮	缺氧造模	↑	↑	—	—	↑	—	—	[11]
丁螺环酮	由海拔 55 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	↑	↑	↑	—	↑	↓	↓	[12]
醋甲唑胺	由海拔 55 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	—	—	—	—	—	—	—	[12]
氨茶碱	由海拔 55 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	—	—	—	—	—	—	—	[12]
美托洛尔	由海拔 50 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	↑	↓	↑	—	↓	↓	↑	[12]
呋塞米	由海拔 55 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	↑	↑	↑	—	↑	—	↓	[13]
普萘洛尔	由海拔 50 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	↑	↑	↑	—	↑	↓	↓	[14]
甲硝唑	由 1500 m 低海拔地区急进海拔 4300 m 的高原	—	↓	—	—	↓	↑	↑	[15]
阿莫西林	由海拔 50 m 处平原急进海拔 4300 m 的高原	↑	↑	↑	—	↑	↓	↓	[17]
地塞米松	急性缺氧 12 h（急进 4300 m 的高海拔地区）	↑	↑	↓	—	↑	↓	↓	[18]
莫沙比利	急性缺氧 12 h（急进 4100 m 的高海拔地区）	↑	↑	↑	—	↑	↑	↓	[19]
硝苯地平	由海拔 1500 m 地区急进海拔 4300 m 的高原	↑	—	—	—	↑	—	↓	[20]
左氧氟沙星	由海拔 55 m 处平原急进海拔 4010 m 的高原	↑	↑	↑	—	↑	↓	↓	[21]
诺氟沙星	由平原急进海拔 4300 m 的高原	↑	↓	↓	—	↓	↑	↑	[22]

注（Note）：— . 无变化或缺少数据（without significant change or lack of data）；△ . 慢性缺氧（chronic hypoxia）。

表 2 低氧条件下家兔、犬和小鼠药物药动学参数的变化

Tab 2 Pharmacokinetic changes of drugs in rabbits，dogs，and mice at hypoxic condition

药物	物种	处理方式	*MRT*	C_{max}	$t_{1/2}$	K_e	*AUC*	V_d	*CL*	文献
茶碱	家兔	急性缺氧 570 min（暴露于低氧和 / 或高浓度 CO_2 环境中）	—	—	—	—	—	—	↓	[25]
苯妥英	家兔	急性缺氧（暴露于 48 mmHg 气压的缺氧环境中）	—	—	—	—	↑	—	↓	[24]
乙酰水杨酸	家兔	在 429 mmHg 压力下，相当于 4572 m 高度的低压低氧状态造模 5 h • d^{-1}，持续 7 d	↑	—	↑	↓	—	↓	↓	[23]
庆大霉素	家兔	在 429 mmHg 压力下，相当于 4572 m 高度的低压低氧状态造模 5 h • d^{-1}，持续 7 d	↑	—	↑	↓	—	↑	↓	[23]
苯巴比妥	家兔	在 429 mmHg 压力下，相当于 4572 m 高度的低压低氧状态造模 5 h • d^{-1}，持续 7 d	↑	—	↑	↓	—	↓	↓	[23]
乙酰唑胺	家兔	在 429 mmHg 压力下，相当于 4572 m 高度的低压低氧状态造模 5 h • d^{-1}，持续 7 d	—	—	↑	↓	—	↑	—	[23]
沙丁胺醇	家兔	缺氧 4 d（暴露于低氧或高浓度 CO_2 环境中）	—	—	↑	—	—	↑	—	[26]
地尔硫䓬	犬	暴露于 8% 的 FiO_2 中 1 h 或 120 h	—	—	—	—	—	↓$^{△}$	↓$^{△}$	[27]
阿苯达唑	小鼠	在模拟 5500 m 海拔高度的低压氧舱中造模 2 周	—	↑	↑	—	↑	↑	↓	[28]

注（Note）：— . 无变化或缺少数据（without change or lack of data）；△ . 慢性缺氧（chronic hypoxia）。

也得到了证实[30]。至此，人们开始逐渐重视低氧对人体药动学的影响。

为了能得到更加贴合临床的数据，越来越多的学者招募平原健康志愿者到高海拔地区开展药动学试验。试验发现，缺氧程度会对高原低氧环境下药物代谢产生重要影响。在 4000 m 海拔以上的地区，Kamimori 等[31]研究发现，缺氧导致吲哚菁绿在志愿者体内的 *CL* 和 V_d 均显著增加，*AUC* 显著性降低；咖啡因的 *CL* 显著增加，$t_{1/2}$ 明显延长，*AUC* 显著降低。不同于患者，茶碱在急进 4500 m 高原的健康志愿者体内的药动学参数未发生显著变化，提示急性缺氧并未改变其在健康人体内的代谢情况[32]。乙酰唑胺急、慢性缺氧组 *CL* 均显著增加，*AUC* 均显著降低，急性缺氧使 V_d 显著降低，而慢性缺氧使 V_d 显著增加[33]。高原急、慢性缺氧使哌替啶 *MRT* 显著延长，*CL* 显著降低[34]。一项关于碳酸锂的研究表明，与平原组相比，高原急性缺氧组 $t_{1/2}$、V_d 分别增加了 64.1% 和 18.9%，*CL* 降低了 24.3%；高原慢性缺氧组 $t_{1/2}$、V_d 分别增加了 111.4% 和 35.8%，*CL* 降低了 37.3%[35]。

研究发现，平原志愿者在 1 d 内急进 3600 m 高原以及生活半年后，呋塞米和泼尼松龙在体内的代谢均发生改变，呋塞米在高原急、慢性缺氧组志愿者体内 C_{max} 降低，*CL* 增加，$t_{1/2}$ 延长，急性缺氧使呋塞米 *AUC*、*MRT* 和 V_d 均减少，而慢性缺氧反而使呋塞米的 *AUC*、*MRT* 和 V_d 增大[36]。急、慢性缺氧条件下，泼尼松龙缺氧组的药动学特征变化趋势一致，均表现为 *AUC*、C_{max} 增大，*CL*、V_d 降低[37]。根据本课题组前期研究，磺胺甲噁唑在进入 3800 m 高原的健康志愿者体内的

代谢情况发生改变，结果显示，急、慢性缺氧组的 *AUC* 分别增加 17.8% 和 8.0%，$t_{1/2}$ 延长 11.51% 和 19.9%，*CL* 降低 17.82% 和 8.91%[1]。

同时，进入高原人群体内药动学的变化也启示学者对高原世居人群进行相关探究。虽然世居高原人群对缺氧环境有一定习服，但是药物在机体内代谢仍与平原地区不尽相同。而各种族间生活习惯的差异和遗传因素的影响也导致同一药物在不同种族人群中安全性、功效和给药方案有所不同[38]。本课题组研究发现，与平原汉族相比，磺胺甲噁唑和利多卡因在世居高原汉族和藏族志愿者体内的吸收、代谢和消除发生显著变化，两个药的高原组均表现为 $t_{1/2}$、*AUC* 升高、*CL* 降低[2, 39]。与此同时，世居高原组之间的磺胺甲噁唑也存在差异，藏族组的 *AUC* 比汉族组显著降低 10.8%，而利多卡因的药动学参数并无显著差异。目前关于世居高原人群的体内药动学试验较少，仍需更多学者进一步研究探讨。

综上，在高原低氧环境中大部分药物在人体内代谢减慢，药物代谢动学参数主要表现为 *AUC* 升高，*MRT* 和 $t_{1/2}$ 延长，K_e 和 *CL* 降低，且与在实验动物中的变化趋势基本一致。不同药物在高原低氧环境下药动学参数的变化见表 3。

表 3　低氧条件下人体药物药动学参数的变化

Tab 3　Pharmacokinetic changes of drugs in human beings at hypoxia

药物	处理方式	*MRT*	C_{max}	$t_{1/2}$	K_e	*AUC*	V_d	*CL*	文献
茶碱	急性缺氧（氧分压与海拔 4500 m 处相当）	—	—	—	—	—	—	—	[32]
维拉帕米	急性缺氧（氧分压与海拔 4500 m 处相当）	—	—	—	—	—	—	—	[32]
呋塞米	急性缺氧（急进 3600 m 高海拔地区造模 15 h）；慢性缺氧（相同方法造模 6 个月）	—	↓↓△	—	—	↓↑△	↓↑△	↓↑△	[36]
泼尼松龙	急性缺氧（急进 3600 m 高海拔地区造模 15 h）；慢性缺氧（相同方法造模 6 个月）	—	↑↑△	—	—	↑↑△	↓↓△	↓↓△	[37]
碳酸锂	急性缺氧（急进 4360 m 高海拔地区造模 15 h）；慢性缺氧（相同方法造模 10 个月）	↑↑△	—	↑↑△	—	—	↑↑△	↓↓△	[35]
哌替啶	急性缺氧（急进 4360 m 高海拔地区造模 7 d）；慢性缺氧（相同方法造模 10 个月）	↑	—	↑	—	—	—	↓	[34]
咖啡因	进入 4360 m 高海拔地区造模 16 d	—	—	↓△	↑△	↓△	—	↑△	[31]
吲哚青绿	进入 4360 m 高海拔地区造模 16 d	—	—	—	—	↓△	↑△	↑△	[31]
乙酰唑胺	急性缺氧（急进 4360 m 高海拔地区造模 1 d）；慢性缺氧（相同方法造模 10 个月）	↓	—	—	—	↓↓△	↓↑△	↑↑△	[33]
磺胺甲噁唑	急性缺氧（急进 3800 m 高海拔地区造模 16 h）；慢性缺氧（相同方法造模 1 年）	—	—	↑↑△	—	↑↑△	—	↓↓△	[1]
利多卡因	居住在海拔高度为 2200 ～ 4500 m 的汉族和藏族志愿者	↑△	—	↑△	—	—	↑△	↓△	[2]

注（Note）：— . 无变化或缺少数据（without significant change or lack of data）；△ . 慢性缺氧（chronic hypoxia）。

2　低氧对药物代谢产物的影响

人体血浆中暴露量占比超过药物相关物质总量 10% 的代谢产物，在开展大规模临床试验前，有必要对其进行代谢产物安全性评价（metabolites in safety testing，MIST）[40]。而新药在进行代谢产物安全性评估前，无论是毒理模型实验还是人体试验都极少将海拔对机体的影响纳入到实验中进行考量，当某一代谢产物的暴露量在平原地区人体试验中占比未达到总药物暴露量的 10% 时，该代谢产物往往无需进行临床前毒理实验的研究[41]。然而当药物在高原地区使用时，其在机体内的代谢往往与平原地区不一致，除了原药药动学参数发生变化外，其代谢产物往往也会发生变化，包括代谢途受到干扰、代谢产物暴露量的变化等[42]。研究发现，阿苯达唑的代谢产物阿苯达唑亚砜的 *AUC* 在模拟低氧的小鼠体内低于常氧组[28]。在高原缺氧条件下，茶碱的代谢产物 1，3-二甲基尿酸、维拉帕米的代谢产物去甲维拉帕米 *AUC* 均略低于平原组[32]，而磺胺甲噁唑的代谢产物 N^4- 乙酰磺胺甲噁唑在急性和慢性缺氧条件下 *AUC* 均升高，其中慢性缺氧变化显著[1]。倘若平原地区低暴露量代谢产物在高原地区增高，这些代谢产物在尚未得到临床前毒理学研究的情况下是否会对机体产生毒副作用犹未可知。因此探究高原低氧条件下，药物代谢产物的变化也显得尤其重要。

另外，动物种属与人体存在差异，当某种代谢产物在人体中的暴露量与动物种属不成比例时，就存在安全性风险[43]。根据药物代谢产物安全性试验指导原则的要求，当某个人体主要暴露代谢物在任何一种实验动物种属有较低的暴露量时，这个代谢物的安全性被认为没有在毒理实验中得到测试[44]。根据目前对母药研究显示，高原低氧对同一种药物在不同物种内的暴露量变化有所不同，呋塞米在缺氧大鼠体内 *AUC* 增大了 156.21%[13]，而在慢性缺氧人体内仅增大了 10.02%，在急性缺氧人体内反而降低了 9.33%[36]；茶碱在缺氧家兔体内的 *AUC* 增大了 34.17%[25]，但是在缺氧人体内并没有显著变化，仅仅降低了 1.65%[32]，从而说明高原缺氧环境在不同物种内的代谢情况并不一致。所以，药物的代谢产物在各物种内的暴露量也会发生变化，倘若平原地区

动物体内低于人体暴露量的代谢产物在高原地区高于人体暴露量，当该代谢产物恰巧是人体主要暴露代谢物，则会出现该代谢产物缺乏非临床毒理实验数据而在高原地区存在用药风险的情况。

3 高原地区临床用药指导

3.1 青藏高原人口及医疗分布现状

高原地区具有低气压、缺氧、低湿度、低温、昼夜温差大、强紫外线等特殊环境特征，其中低氧对高原地区人类生命活动的影响最为显著。根据机体在不同海拔高度的缺氧程度及生理反应，将高原划分为 4 个海拔高度：1500 ～ 2500 m 为中度海拔；2500 ～ 4500 m 为高度海拔；4500 ～ 5500 m 为特高海拔；5500 ～ 8848 m 为极高海拔 [45]。青藏高原作为我国海拔最高、面积最广的高原，常居人口达 957 万，因此了解青藏高原人口及医疗分布现状更具有代表意义。根据青海西藏两省的统计年鉴 [46-48] 及各县政府官网数据初步统计得出，青海省共有 35 个县设立于高度海拔地区，其中约 380 万常住人口，具体县名、海拔及大致人口情况见表 4。西藏自治区共有 59 个县设立于高海拔地区，其中约 282 万常住人口；共有 13 个县设立于特高海拔地区，其中约 45 万常住人口，具体县名、海拔及大致人口情况见表 5。结合第七次人口普查结果，青藏高原近 75% 的人群生活在高度海拔以上，并且随着经济交往和旅游活动的日益增多，平原人群进入高原地区也越来越频繁。针对这些人群的防护及用药方案的制订对当地医疗机构提出了较高的要求。

根据目前对青藏高原高海拔区县医疗力量的初步统计，青海、西藏两省绝大部分高海拔地区都至少满足“一县一院”的医疗配备，即一个县配备有县人民医院或藏医院，且青藏高原地区医院的数目及等级与该区县海拔的高度成负相关，与人口的数量成正相关。但是对于近 300 家所处高海拔的医院，几乎没有专门的针对用药方案调整的指南，除个别医师的经验用药外，绝大多数医院仍遵循平原地区的给药剂量和频次，这对于高海拔地区人群的给药存在一定的风险，因此拟出高原地区临床给药的指导建议迫在眉睫。

3.2 高原地区临床用药建议

无论是高原实地还是低压氧舱造模，除个别药物外，大部分药物在各类机体内代谢减慢，主要呈现出 *AUC* 升高，*MRT* 和 $t_{1/2}$ 延长，K_e 和 *CL* 降低的变化趋势。不仅如此，缺氧时间的长短、海拔高度的不同以及遗传因素的影响导致药物在各机体内代谢情况均有所差异。因此，本文针对高原地区临床用药的方案提出以下建议：

① 在针对高原患者用药时，在参照平原地区给药方案的基础上，绝大多数药物需注意适当降低给药剂量、延长给药间隔、减少给药频次。② 缺氧时间的差异导致机体药动学参数变化程度也有所差别。临床工作者在指导用药前应仔细询问清楚患者进入高原的时间长短，从而对世居、久居及短期旅居高原人群间用药方案进行区别制订。③不同海拔高度导致机体的缺氧程度也所有不同，其缺氧程度往往与海拔高度成正相关 [49]。针对青藏高原海拔高度大于 2500 m 的 107 个县，其用药方案的制订更需因地制宜，在给药剂量的减少幅度、给药间隔的增加程度上积累经验从而提升当地用药合理性。④ 青藏高原少数民族众多，各种族间遗传因素及生活习俗的差异也导致同一药物在不同种族人群中代谢情况有所不同，针对不同民族也需制订不同的给药方案。⑤ 久居及世居高原人群在进入低海拔地区时，其原本的用药方案应及时做出调整，从而避免不合理用药导致的医疗事故。⑥ 仍存在少部分药物在缺氧机体内无需减少剂量甚至需加大给药剂量，高原医护人员应把基础研究中的成果应用到临床实际中，在给药剂量、给药间隔等方案的制订上更加符合当地实情。

4 结语

高原低氧下药动学的研究前期主要集中在大鼠、家兔等动物，且多采用缺氧模型或低压氧舱模拟低氧，难以模拟低湿度、低温、强紫外线等高原特征，无法反映高原的真实环境。机体进入高原地区后，处于自然缺氧环境，机体为应对低氧通过外周化学感受器，间接刺激呼吸中枢引起早期通气量增加，以及后期红细胞、代谢酶等机体的变化都是持续进行的一个过程，而采用低压氧舱等方式模拟高原环境，实验动物常常需要进行处置，即使在大型模拟舱内，对动物进行处置时也需将饲养舱模拟海拔降至不影响人类活动的高度，这便不能保证整个实验过程中动物始终处于稳定的海拔，从而造成间歇缺氧，导致实验结果出现差异 [50-51]。

目前对高原低氧环境下，药动学参数发生变化的机制研究主要集中于Ⅰ相药物代谢酶 CYP450 和 ABC 药物转运体，如低氧会使代谢酶 CYP1A1、CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的活性和表达降低，CYP3A6 和 CYP2D6 的活性和表达升高 [52-54]；低氧条件下，肝脏及肠组织中 MRP2、PEPT1、OATP1B1、OAT1、OCT1 等转运体的表达均显著升高 [55-56]。这些酶和转运体表达的变化也均围绕核受体 [57-58] 和细胞因子 [59-60] 的调节进行。在低氧环境中，Ⅱ相药物代谢酶和可溶性载体（SLC）转运体表达及功能到底如何变化，除

表 4　青海省高海拔地区人口及海拔统计

Tab 4　Population and altitude at high altitude areas of Qinghai province

市 / 自治州	区 / 县	人口 / 万	辖区海拔 /m	政府所在地海拔 /m	海拔所处范围 *	辖区医院数目 / 个
西宁	湟源县	13.6	2470 ～ 4898	2666	高海拔	3
	湟中县	48.18	2225 ～ 4488	2645	高海拔	5
	大通回族土族自治县	46.8	2280 ～ 4622	2720	高海拔	11
海东	互助土族自治县	39	2100 ～ 4374	2520	高海拔	4
	化隆回族自治县	30	2600 ～ 2800	2848	高海拔	10
海北藏族自治州	海晏县	3.6	2726 ～ 4583	3000	高海拔	3
	门源回族自治县	16.2	2388 ～ 5254	2880	高海拔	4
	祁连县	5	平均 3169	2810	高海拔	1
	刚察县	4.2	3300 ～ 3800	3300	高海拔	2
黄南藏族自治州	同仁县	9.4	2160 ～ 4971	2480	高海拔	8
	尖扎县	6.4	2050 ～ 4614	1990	高海拔	5
	泽库县	7.7	2800 ～ 4971	3660	高海拔	3
	河南蒙古族自治县	4	平均 3600	3510	高海拔	2
海南藏族自治州	共和县	13	平均 3200	2880	高海拔	12
	同德县	6.6	平均 3660	2980	高海拔	5
	兴海县	8.2	平均 3924	3306	高海拔	2
	贵南县	6.8	2150 ～ 4500	3100	高海拔	3
果洛藏族自治州	玛沁县	5.7	2900 ～ 4200	3730	高海拔	5
	班玛县	3	4000 ～ 5000	3560	高海拔	2
	甘德县	3.8	平均 4300	4020	高海拔	2
	达日县	3.7	平均 4200	3970	高海拔	3
	久治县	3	3568 ～ 5369	3620	高海拔	2
	玛多县	1.4	平均 4500	4300	高海拔	1
玉树藏族自治州	玉树市	11	平均 4493	3710	高海拔	7
	杂多县	6.5	平均 4200	4080	高海拔	3
	称多县	6.1	平均 4500	3825	高海拔	2
	治多县	4.8	平均 4500	4193	高海拔	2
	囊谦县	11.8	平均 4000	3660	高海拔	2
	曲麻莱县	4.6	平均 4500	4223	高海拔	2
海西蒙古族藏族自治州	德令哈市	7.3	平均 2980	2980	高海拔	6
	格尔木市	13	2625 ～ 3350	2850	高海拔	7
	茫崖市	6.3	2689 ～ 3800	2940	高海拔	4
	乌兰县	4	平均 4000	2960	高海拔	2
	都兰县	7.4	2677 ～ 5536	3180	高海拔	2
	天峻县	2.2	平均 4000	3408	高海拔	2

注（Note）：*. 海拔所处范围的设定以区 / 县政府所在地海拔为准（the setting of the altitude range is based on the altitude of local government）。

核受体和细胞因子外，是否还存在其他调节机制都尚未可知，值得进一步研究探讨。

药物在体内的代谢产物，若超过总药物暴露量的 10% 时，按照代谢产物安全性评价指导原则，需要进行代谢产物的非临床安全性评估 [44]。而在平原地区进行药物暴露量实验时，往往忽略那些低暴露量的代谢产物。这些代谢产物受高原缺氧的影响，其暴露量可能增大超过总体药物暴露量的 10%，因此增大了高原地区人群的用药风险。目前为止，对高原地区药物代谢产物的研究较少，这将是高原药学研究的又一重点内容。

针对目前高原地区临床用药的现状，本文提出应结合患者所处海拔高度、患者缺氧时间及患者种族进行综合考虑，在平原地区的用药指南上，大多数药物需减少给药剂量、增大给药间隔等建议。然而在面对实际情况时，仍存在以下具体问题亟需解决：① 不同民族间用药差异的区别研究较少，现有的研究间存在争议，具体的变化情况需进行更多药物的多民族研究试验；② 各海拔高度及不同缺氧时间导致的机体缺氧程度无法量化，且实验动物与人体间存在差异，给药剂量的具体调整方案仍需临床工作者进一步探究；③ 在临床实际给药方案制订时，给药剂量的减少幅度和给药间隔的增大程度较难把控，需要对患者进行血药浓度监测才能达到较好的效果，而此项工作患者依从性较差，且对高原各县的医疗力量

表 5 西藏自治区高海拔地区人口及海拔统计

Tab 5 Population and altitude at high altitude areas of Tibet autonomous region

市 / 区	区 / 县	人口 / 万	辖区海拔 /m	政府所在地海拔 /m	海拔所处范围 *	辖区医院数目 / 个
拉萨	城关区	20	平均 3650	3650	高海拔	7
	堆龙德庆区	5	3640 ～ 5500	3680	高海拔	1
	达孜区	3	3670 ～ 5548	3670	高海拔	1
	林周县	6	平均 3860	3760	高海拔	1
	当雄县	5.4	平均 4300	4393	高海拔	1
	尼木县	3.6	平均 4000	3809	高海拔	1
	曲水县	3.7	3500 ～ 5774	3568	高海拔	1
	墨竹工卡县	5.7	平均 4200	4467	高海拔	1
日喀则	桑珠孜区	11	平均 3836	3940	高海拔	3
	南木林县	8	平均 4300	4050	高海拔	2
	江孜县	7	平均 4100	4000	高海拔	3
	定日县	6.2	平均 4500	4447	高海拔	1
	萨迦县	5	平均 4400	4468	高海拔	1
	拉孜县	6	平均 4500	3000	高海拔	1
	昂仁县	6	平均 4513	4380	高海拔	1
	谢通门县	5	平均 4200	4380	高海拔	2
	白朗县	5	3850 ～ 5300	3893	高海拔	1
	仁布县	4	平均 3950	5278	特高海拔	1
	康马县	3.4	平均 4300	4300	高海拔	1
	定结县	2	平均 4400	4217	高海拔	1
	仲巴县	2	平均 5000	4772	特高海拔	1
	亚东县	1.3	2700 ～ 4500	3400	高海拔	1
	吉隆县	2	平均 4200	4200	高海拔	1
	聂拉木县	2	平均 4300	3794	高海拔	2
	萨嘎县	1.2	平均 4600	4513	特高海拔	1
	岗巴县	1	平均 4700	4619	特高海拔	1
昌都	卡若区	12.4	平均 4280	3250	高海拔	6
	江达县	10	平均 3600	3800	高海拔	1
	贡觉县	5	平均 4021	3640	高海拔	2
	类乌齐县	5	平均 4500	3810	高海拔	1
	丁青县	8.5	3500 ～ 6328	3873	高海拔	1
	察雅县	6	平均 3500	3159	高海拔	1
	八宿县	5	平均 4000	3260	高海拔	1
	左贡县	5	平均 3750	3780	高海拔	1
	芒康县	9	平均 4313	3870	高海拔	3
	洛隆县	5	平均 3700	3640	高海拔	1
	边坝县	4.4	平均 4000	3733	高海拔	1
林芝	巴宜区	6.7	平均 3000	3275	高海拔	9
	工布江达县	3	平均 3600	3420	高海拔	1
	米林县	2.3	平均 3700	3256	高海拔	3
	波密县	3.1	平均 4200	2720	高海拔	2
	朗县	2	平均 3700	3515	高海拔	2
山南	乃东区	7.7	平均 3560	3713	高海拔	8
	扎囊县	4	平均 3620	3668	高海拔	1
	贡嘎县	5	平均 3750	3571	高海拔	1
	桑日县	2	平均 4065	3574	高海拔	1
	琼结县	2	平均 3850	4526	特高海拔	1
	曲松县	2	平均 4200	3987	高海拔	1
	措美县	1	平均 4500	4242	高海拔	2
	洛扎县	2	平均 3820	3800	高海拔	1
	加查县	2.2	平均 4000	3240	高海拔	1
	隆子县	4	平均 3900	3980	高海拔	1
	错那县	2	平均 4400	4380	高海拔	2

续表 5

市 / 区	区 / 县	人口 / 万	辖区海拔 /m	政府所在地海拔 /m	海拔所处范围 *	辖区医院数目 / 个
	浪卡子县	4	平均 4480	4469	高海拔	1
那曲	色尼区	14.4	平均 4500	4527	特高海拔	6
	嘉黎县	3.2	平均 4500	4488	高海拔	2
	比如县	7	平均 4000	3960	高海拔	1
	聂荣县	3	平均 4700	4794	特高海拔	2
	安多县	4	平均 5200	4705	特高海拔	1
	申扎县	2	平均 4700	4672	特高海拔	2
	索县	5	平均 4100	3980	高海拔	2
	班戈县	4.2	平均 4600	4717	特高海拔	1
	巴青县	5	平均 4500	4142	高海拔	1
	尼玛县	4	平均 4700	4521	特高海拔	1
	双湖县	1.3	平均 5000	4437	高海拔	2
阿里地区	噶尔县	4.2	平均 4500	4283	高海拔	3
	普兰县	1	平均 3900	3900	高海拔	1
	札达县	1	平均 4500	3700	高海拔	1
	日土县	1	平均 4500	4300	高海拔	1
	革吉县	2	平均 4700	4567	特高海拔	1
	改则县	2.7	平均 4500	4300	高海拔	1
	措勤县	1.3	平均 4700	4657	特高海拔	1

注（Note）：* 海拔所处范围的设定以区 / 县政府所在地海拔为准（the setting of the altitude range is based on the altitude of local government）。

提出了更高的要求；④ 久居及世居高原人群由于长期缺氧，对缺氧环境已经产生一定习服，此类人群返回低海拔地区接受治疗时用药方案是否与平原地区人群一致犹未可知，仍需研究总结。

参考文献

[1] Li XY，Gao F，Li ZQ，et al. Comparison of the pharmacokinetics of sulfamethoxazole in male chinese volunteers at low altitude and acute exposure to high altitude versus subjects living chronically at high altitude：An open-label，controlled，prospective study [J]. Clin Ther，2009，31（11）：2744-2754.

[2] Zhang J，Zhu J，Yao X，et al. Pharmacokinetics of lidocaine hydrochloride metabolized by CYP3A4 in Chinese Han volunteers living at low altitude and in native han and tibetan Chinese volunteers living at high altitude [J]. Pharmacology，2016，97（3-4）：107-113.

[3] Zhou X，Nian Y，Qiao Y，et al. Hypoxia plays a key role in the pharmacokinetic changes of drugs at high altitude [J]. Curr Drug Metab，2018，19（11）：960-969.

[4] Wang C，Yan M，Jiang H，et al. Mechanism of aquaporin 4（AQP 4）up-regulation in rat cerebral edema under hypobaric hypoxia and the preventative effect of puerarin [J]. Life Sci，2018，193：270-281.

[5] 王宁，马慧萍，武柠子，等 . 急性缺氧对大鼠部分生理病理变化的影响 [J]. 中南药学，2017，15（7）：883-888.

[6] Gola S，Keshri GK，Gupta A. Hepatic metabolism of ibuprofen in rats under acute hypobaric hypoxia [J]. Exp Toxicol Pathol，2013，65（6）：751-758.

[7] Gola S，Gupta A，Keshri GK，et al. Evaluation of hepatic metabolism and pharmacokinetics of ibuprofen in rats under chronic hypobaric hypoxia for targeted therapy at high altitude [J]. J Pharm Biomed Anal，2016，121：114-122.

[8] 徐唯哲，赵妍，秦一，等 . 低氧与常氧状态下芍药苷在大鼠体内的药代动力学比较 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（2）：336-340.

[9] 邵涛，秦一，徐平湘，等 . 低氧与常氧状态下罗红霉素在大鼠体内的药代动力学比较 [J]. 中国药理学通报，2016，32（11）：1596-1601.

[10] 年永琼 . 模拟高原低氧对盐酸二甲双胍和对乙酰氨基酚药代动力学特征的影响 [D]. 西宁：青海大学，2019.

[11] Gong W，Liu S，Xu P，et al. Simultaneous quantification of diazepam and dexamethasone in plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic comparison between normoxic and hypoxic rats [J]. Molecules，2015，20（4）：6901-6912.

[12] 张娟红 . 高原环境对药物药代动力学影响的基础研究 [D]. 兰州：兰州大学，2013.

[13] 李文斌 . 急进高原后药物药代动力学参数变化影响因素研究 [D]. 西安：第四军医大学，2013.

[14] Wenbin L，Rong W，Hua X，et al. Effects on pharmacokinetics of propranolol and other factors in rats after acute exposure to high altitude at 4010 m [J]. Cell Biochem Biophys，2015，72（1）：27-36.

[15] 谢媛 . 高原缺氧环境及肠道微生物对美托洛尔和甲硝唑代谢的影响 [D]. 兰州：兰州大学，2020.

[16] 张娟红，王荣，谢华，等 . 急进高原对普萘洛尔和美托洛尔在大鼠体内药代动力学的影响 [J]. 南方医科大学学报，2014，34（11）：1616-1620.

[17] 张娟红，王荣，谢华，等 . 高原环境对阿莫西林药代参数的影响研究 [J]. 解放军药学学报，2014，30（2）：125-127，131.

[18] 黄小玉，王荣，尹强，等 . 急进高原前后 Wistar 大鼠体内地塞米松药动学参数比较 [J]. 中国医院药学杂志，

2015，35（8）：702-705.
[19] 张娟红，向大伟，王荣，等 . 不同环境条件下大鼠体内莫沙必利药代动力学比较研究 [J]. 解放军医药杂志，2013，25（6）：24-27.
[20] 陈玉艳 . 饮食及高原环境对硝苯地平药代动力学参数的影响 [D]. 宁夏：宁夏医科大学，2019.
[21] 王昌，贾正平，李文斌，等 . UFLC-MS/MS 法测定急进高原前后大鼠体内左氧氟沙星含量及其药代动力学差异 [J]. 华中科技大学学报（医学版），2017，46（2）：160-164.
[22] Luo B，Wang R，Li W，et al. Pharmacokinetic changes of norfloxacin based on expression of MRP2 after acute exposure to high altitude at 4300 m [J]. Biomed Pharmacother，2017，89：1078-1085.
[23] Vij AG，Kishore K，Dey J. Effect of intermittent hypobaric hypoxia on efficacy & clearance of drugs [J]. Indian J Med Res，2012，135（2）：211-216.
[24] du Souich P，Varin F，Courteau H. Effect of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on kinetics and concentrations of phenytoin in the cerebrospinal fluid of conscious rabbits [J]. Neuropharmacology，1986，25（8）：857-862.
[25] Letarte L，du Souich P. Influence of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on theophylline kinetics in the conscious rabbit [J]. Am Rev Respir Dis，1984，129（5）：762-766.
[26] Perreault S，Saunier C，Ong H，et al. Influence of hypoxia and hypercapnia on the kinetics and hypokaliaemic effect of salbutamol in the rabbit [J]. Xenobiotica，1995，25（3）：271-281.
[27] du Souich P，Hartemann D，Saunier C. Effect of acute and chronic moderate hypoxia on diltiazem kinetics and metabolism in the dog [J]. Pharmacology，1993，47（6）：378-385.
[28] 王晴晴，万陈飞，朱彪，等 . 低氧条件下阿苯达唑在小鼠体内的药代动力学研究 [J]. 高原医学杂志，2016，26（3）：3-7.
[29] Powell JR，Vozeh S，Hopewell P，et al. Theophylline disposition in acutely ill hospitalized patients. The effect of smoking，heart failure，severe airway obstruction，and pneumonia [J]. Am Rev Respir Dis，1978，118（2）：229-238.
[30] Richer M，Lam YW. Hypoxia，arterial pH and theophylline disposition [J]. Clin Pharmacokinet，1993，25（4）：283-299.
[31] Kamimori GH，Eddington ND，Hoyt RW，et al. Effects of altitude（4300 m）on the pharmacokinetics of caffeine and cardio-green in humans [J]. Eur J Clin Pharmacol，1995，48（2）：167-170.
[32] Streit M，Göggelmann C，Dehnert C，et al. Cytochrome P450 enzyme-mediated drug metabolism at exposure to acute hypoxia（corresponding to an altitude of 4500 m）[J]. Eur J Clin Pharmacol，2005，61（1）：39-46.
[33] Ritschel WA，Paulos C，Arancibia A，et al. Pharmacokinetics of acetazolamide in healthy volunteers after short-and long-term exposure to high altitude [J]. J Clin Pharmacol，1998，38（6）：533-539.
[34] Ritschel WA，Paulos C，Arancibia A，et al. Pharmacokinetics of meperidine in healthy volunteers after short-and long-term exposure to high altitude [J]. J Clin Pharmacol，1996，36（7）：610-616.
[35] Arancibia A，Paulos C，Chávez J，et al. Pharmacokinetics of lithium in healthy volunteers after exposure to high altitude [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2003，41（5）：200-206.
[36] Arancibia A，Nella Gai M，Paulos C，et al. Effects of high altitude exposure on the pharmacokinetics of furosemide in healthy volunteers [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2004，42（6）：314-320.
[37] Arancibia A，Gai MN，Chávez J，et al. Pharmacokinetics of prednisolone in man during acute and chronic exposure to high altitude [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2005，43（2）：85-91.
[38] Tornatore KM，Reed KA，Venuto RC. Racial differences in the pharmacokinetics of methylprednisolone in black and white renal transplant recipients [J]. Pharmacotherapy，1993，13（5）：481-486.
[39] 李向阳 . 高原低氧环境中磺胺甲噁唑的药物动力学研究 [D]. 沈阳：沈阳药科大学，2010.
[40] Schadt S，Bister B，Chowdhury SK，et al. A Decade in the MIST：Learnings from Investigations of Drug Metabolites in Drug Development under the “Metabolites in Safety Testing” Regulatory Guidance [J]. Drug Metab Dispos，2018，46（6）：865-878.
[41] Frederick CB，Obach RS. Metabolites in safety testing：“MIST” for the clinical pharmacologist [J]. Clin Pharmacol Ther，2010，87（3）：345-350.
[42] Liao WT，Liu B，Chen J，et al. Metabolite modulation in human plasma in the early phase of acclimatization to hypobaric hypoxia [J]. Sci Rep，2016，6：22589.
[43] Holmberg AA，Ekdahl A，Weidolf L. Systemic exposure to the metabolites of lesogaberan in humans and animals：A case study of metabolites in safety testing [J]. Drug Metab Dispos，2014，42（6）：1016-1021.
[44] Gao H，Jacobs A，White RE，et al. Meeting report：Metabolites in safety testing（MIST）symposium-safety assessment of human metabolites：What’s REALLY necessary to ascertain exposure coverage in safety tests? [C]. AAPS J，2013，15（4）：970-973.
[45] 张娟玲，李向阳 . 高原低氧影响药物代谢的研究进展 [J]. 药学学报，2015，50（9）：1073-1079.
[46] 青海省统计局，国家统计局青海调查分队 . 青海统计年鉴 [M]. 北京：中国统计出版社，2020.
[47] 西藏自治区地方志办公室 . 西藏年鉴 [M]. 拉萨：西藏人民出版社，2018.
[48] 西藏自治区统计局，国家统计局西藏调查总队 . 西藏统计年鉴 [M]. 北京：中国统计出版社，2020.
[49] Eide RP，Asplund CA. Altitude illness：update on prevention and treatment [J]. Curr Sports Med Rep，2012，11（3）：124-130.
[50] 霍妍，赵安鹏，李雪，等 . 急性高原病的动物模型研究现状 [J]. 中国药理学通报，2021，37（1）：26-30.
[51] Huang X，Zhou Y，Zhao T，et al. A method for establishing the high-altitude cerebral edema（HACE）model by acute hypobaric hypoxia in adult mice [J]. J Neurosci Methods，2015，

245：178-181.
[52] Li X，Wang X，Li Y，et al. Effect of exposure to acute and chronic high-altitude hypoxia on the activity and expression of CYP1A2，CYP2D6，CYP2C9，CYP2C19 and NAT2 in rats [J]. Pharmacology，2014，93（1-2）：76-83.
[53] Li X，Wang X，Li Y，et al. The activity，protein，and mRNA expression of CYP2E1 and CYP3A1 in rats after exposure to acute and chronic high altitude hypoxia [J]. High Alt Med Biol，2014，15（4）：491-496.
[54] 陈芃，李永平，朱俊博，等 . 急进高原对大鼠药物代谢酶 CYP2D6 活性和蛋白表达的影响 [J]. 青海师范大学学报（自然科学版），2014，30（4）：41-45.
[55] Dopp JM，Moran JJ，Abel NJ，et al. Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model [J]. Pharmacotherapy，2009，29（4）：365-372.
[56] Li W，Li J，Wang R，et al. MDR1 will play a key role in pharmacokinetic changes under hypoxia at high altitude and its potential regulatory networks [J]. Drug Metab Rev，2015，47（2）：191-198.
[57] Duan YB，Zhu JB，Yang JX，et al. Regulation of high-altitude hypoxia on the transcription of CYP450 and UGT1A1 mediated by PXR and CAR [J]. Front Pharmacol，2020，11：574176.
[58] 段雅彬，朱俊博，杨建鑫，等 . microRNA 介导低氧对药物代谢酶和转运体的调控 [J]. 药学学报，2021，56（1）：50-60.
[59] Merry HE，Phelan P，Doaks M，et al. Functional roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-Beta in hypoxia and reoxygenation [J]. Ann Thorac Surg，2015，99（4）：1200-1205.
[60] Bigham AW，Lee FS. Human high-altitude adaptation：Forward genetics meets the HIF pathway [J]. Genes Dev，2014，28（20）：2189-2204.

（收稿日期：2021-02-05；修回日期：2021-06-05）

劳拉替尼在 ALK 阳性非小细胞肺癌中的应用

侯举，孙吉，欧阳丽辉，黄娟娟，何鸽飞*（长沙市第一医院药剂科，长沙　410005）

摘要：劳拉替尼是一个强效、高脑渗透性的三代间变性淋巴瘤激酶（ALK）抑制剂，比第二代 ALK 抑制剂有更好的抑制活性，几乎能克服所有 ALK 单一突变产生的耐药。2021 年 3月美国食品药品监督管理局批准了劳拉替尼用于 ALK 阳性的非小细胞肺癌一线治疗。本文重点对劳拉替尼治疗 ALK 阳性的非小细胞肺癌的临床疗效与应用、药代动力学特点、不良反应及管理、与药物间的相互作用及其发生的耐药机制与应对措施进行综述，旨在为其临床应用提供参考。

关键词：劳拉替尼；非小细胞肺癌；间变性淋巴瘤激酶抑制剂；临床应用
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2597-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.022

Application of lorlatinib in ALK-positive non-small cell lung cancer

HOU Ju, SUN Ji, OU YANG Li-hui, HUANG Juan-juan, HE Ge-fei* (*Department of Pharmacy*, *The First Hospital of Changsha*, *Changsha* 410005)

Abstract: Lorlatinib is a potent, brain-penetrant, third-generation inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK). It is more potent than the second-generation inhibitors, and retains potency against all known single ALK resistance mutations. The US Food and Drug Administration has approved lorlatinib as a first-line treatment for ALK-positive non-small cell lung cancer in March 2021. This article reviewed the clinical efficacy and clinical using, pharmakinetic characteristics, adverse reactions and management, drug-drug interactions, resistance mechanism and counter measures of lorlatinib to provide reference for clinical application.

Key words: lorlatinib; non-small cell lung cancer; anaplastic lymphoma kinase inhibitor; clinical application

作者简介：侯举，男，硕士研究生，主管药师，主要从事医院药学工作，E-mail：hjnfykdx@163.com　*通信作者：何鸽飞，女，硕士研究生导师，主任药师，主要从事临床药学工作，E-mail：326366726@qq.com

在全世界范围内，肺癌是最常见、最致命的恶性肿瘤之一。肺癌从组织学上分为小细胞癌和非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC），其中 NSCLC 约占肺癌比例的 85% ～ 90%[1-2]。NSCLC 在分子水平上是一组异质性疾病，其中间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase，ALK）与 5'末端棘皮动物微管结合蛋白（echinoderm microtubule associated protein-like 4，EML4）重排形成的 *EML4-ALK* 融合基因是 NSCLC 的致癌驱动基因，也是 ALK 重排最常见的融合基因 [3]。在中国 NSCLC 患者中 ALK 融合基因突变率占 3.3% ～ 11.6%。ALK 阳性的 NSCLC 患者大多年轻（中位年龄 52 岁）、不吸烟或轻度吸烟，不同地理位置的发病率无显著差异，而且晚期 ALK 阳性的 NSCLC 患者常伴有脑转移 [4-6]。因此，*EML4-ALK* 融合基因是 NSCLC 具有吸引力的治疗靶点。2011 年上市的克唑替尼（crizotinib）是治疗 ALK 阳性 NSCLC 的第一个 ALK 抑制剂，随后开发了抑制能力更强的二代 ALK 抑制剂色瑞替尼（ceritinib）、阿来替尼（alectinib）和布加替尼（brigatinib）[7]。尽管 ALK 抑制剂最初有强大疗效，但随着时间的推移，大多数药物不可避免地产生获得性耐药突变和脑转移而出现肿瘤进展，大部分患者无法长期获益。在接受克唑替尼治疗的患者中，有 20% ～ 30% 发生 ALK 激酶结构域的二级耐药突变；在接受了第二代 ALK 抑制剂的患者中，有 50% ～ 70% 的患者发生了继发性 ALK 耐药突变 [8]。在一项前瞻性研究中，未接受过任何治疗的 ALK 阳性 NSCLC 患者的脑转移发生率在 26% ～ 38%，真实世界的数据的研究报告中，70% ～ 80% 的患者在劳拉替尼（lorlatinib）治疗前有脑转移 [9]，劳拉替尼是一种新型的第三代 ALK 抑制剂，比一、二代 ALK 抑制剂有更高的全身和颅内疗效，且几乎对所有已知的 ALK 耐药单突变均有效 [10-11]。2018 年相继在日本和美国获批上市，2019 年在欧盟获批，2020 年 2 月在中国香港获批上市 [12-14]。本文对劳拉替尼治疗 ALK 阳性的 NSCLC 的临床疗效与应用、不良反应及管理、药物间的相互作用及其产生的耐药机制与应对措施进行综述，以期为临床用药提供参考。

1 临床疗效与应用

2018 年，美国食品药品监督管理局（US Food and Drug Administration，FDA）已经批准劳拉替尼用于 ALK 阳性 NSCLC 的二线治疗。2021 年 3 月 FDA 正式批准劳拉替尼用于 ALK 阳性 NSCLC 的一线治疗 [15]。劳拉替尼起始剂量为 100 mg • d^{-1}，如果患者出现明显的不良反应可减量至 75 mg • d^{-1}，然后降至 50 mg • d^{-1}；如果患者不能耐受 50 mg • d^{-1}，应停用劳拉替尼 [16]。

在与克唑替尼“头对头”的Ⅲ期临床试验（NCT03052608）分析结果显示，此前未经治疗的晚期 ALK 阳性 NSCLC 患者中，劳拉替尼组的进展或死亡风险比克唑替尼组低 72%。接受克唑替尼治疗的患者，中位无进展生存期（median progression-free survival，mPFS）为 9.3 个月，劳拉替尼治疗组患者的 mPFS 尚未达到，相比克唑替尼，劳拉替尼可显著延长 mPFS。72% 接受劳拉替尼治疗的患者颅内缓解持续时间超过了 12 个月，而克唑替尼治疗组患者的这一数据为 0%。劳拉替尼治疗基线存在脑转移的患者，颅内应答率为 82%，其中完全颅内应答率高达 71%，而标准的一线治疗药物阿来替尼和布加替尼相应的完全颅内应答分别为 38% 和 28%。作为一线治疗，劳拉替尼可能在治疗和预防脑转移方面有效。在既往未接受治疗的 ALK 阳性 NSCLC 患者中，劳拉替尼治疗后的患者比克唑替尼治疗后的患者有更长的 PFS，更高的总体疗效和颅内反应，以及更好的生活质量 [11]。这些特征被认为有助于延缓没接受任何治疗患者继发性耐药的产生，与序贯治疗相比，患者可获得更持久的临床效益。

2 药代动力学特点

劳拉替尼主要通过 CYP3A4和 UGT1A4 代谢。在体外研究发现，劳拉替尼的血浆蛋白结合率为 66%。单次静脉注射后，劳拉替尼的平均稳态分布体积为 305 L，平均绝对生物利用度为 81%，脑脊液与劳拉替尼血药浓度的平均比值为 0.75。单次口服劳拉替尼 100 mg 后，其平均血浆半衰期为 24 h，平均清除率为 11 L • h^{-1}。劳拉替尼口服吸收迅速，给药后 1 ～ 2 h 出现血药浓度峰值。在每日推荐剂量 100 mg 时，C_{max} 均值 [变异系数（*CV*）%] 为 577 ng • mL^{-1}（42%），$AUC_{0\sim24\,h}$ 为 5650 ng • h • mL^{-1}（39%），稳态持续时间为 2 h（0.5 ～ 23 h）。每日多次口服劳拉替尼 100 mg 可诱导 CYP3A4，导致劳拉替尼自身诱导代谢 [17]。食物、年龄、性别、种族和体重对劳拉替尼的药代动力学参数无显著影响。在尿液和粪便排泄的劳拉替尼分别为 48% 和 41%（其中原药分别为＜ 1% 和 9%），表明劳拉替尼药物原形在尿中的排泄相当少。轻度至中度肾损害（*CL*cr 30 ～ 89 mL • min^{-1}）、轻度肝损害（总胆红素≤正常值上限和谷草转氨酶（AST）＞正常值上限或者总胆红素＞正常值上限的 1.5 倍和 AST 不限）、CYP3A5 和 CYP2C19 的代谢表型对

劳拉替尼的药代动力学参数也无显著影响。中度至重度肝损害对劳拉替尼药代动力学的影响尚不清楚[16]。劳拉替尼在肝损伤癌症患者的临床试验（NCT03726333）正在进行，预计完成时间在2023 年 4 月[18]。重度肾损害患者对劳拉替尼的耐受性良好，给药 100 mg·d^{-1}，患者没有发生严重的不良反应，但重度肾损害患者的 AUC_{inf} 升高了 41%[19-20]。

3　不良反应及管理

劳拉替尼的安全性是可控的，在Ⅰ/Ⅱ期临床试验中，劳拉替尼最常见的不良反应（发生率≥ 20%）为高胆固醇血症（81%）、高三酰甘油血症（60%）、水肿（43%）、体重增加（43%）、周围神经病变（30%）、认知影响（23%）、情绪影响（22%）、呼吸困难、疲劳、关节痛、腹泻、视力障碍和房室传导阻滞等，这些不良反应大多是 1 级和 2 级；高胆固醇血症和高三酰甘油血症是最常见的 3 ～ 4 级不良事件，发生率均为 15.6%。有 39% 的患者报告了中枢神经系统的不良反应，这些反应是轻微、短暂、调整剂量后可逆的[21]。另有个别病例报道，劳拉替尼可以诱发蛋白尿、急性胰腺炎、肺栓塞[22-24]。在Ⅲ期临床试验中（NCT03052608）有 7% 接受劳拉替尼治疗的患者因不良事件而停药[11]，有近 40% 发生中枢神经系统不良事件，目前没有治疗导致死亡相关的报道，但对于那些需要快速思考和快速处理的职业（如机械作业及操作精密仪器等），劳拉替尼可能不是最佳的治疗药物选择[25]。

3.1　高脂血症

Ⅰ/Ⅱ期临床试验阶段，每日接受 100 mg 劳拉替尼治疗的 295 名患者中，高脂血症是劳拉替尼最常见的不良事件，发生高脂血症的中位时间为 15 d（范围 1 ～ 219 d）。尽管高胆固醇血症和高三酰甘油血症的发生率很高，但很少导致临时停药（7%）或剂量减少（3%），通过适当的药物治疗（降脂药物）和必要的剂量调整在很大程度上是可控的；81% 的患者至少需要一种降脂药物治疗[26]，瑞舒伐他汀和普伐他汀被推荐为劳拉替尼治疗患者的一线降脂药物。他汀类药物的起始剂量应根据患者的基线心血管风险确定。一级预防普伐他汀的起始剂量为 20 mg·d^{-1} 或瑞舒伐他汀 5 mg·d^{-1}，二级预防普伐他汀的起始剂量为 40 mg·d^{-1} 或瑞舒伐他汀 20 ～ 40 mg·d^{-1}。正在服用其他他汀类药物的二级预防患者应改用同等剂量的普伐他汀或瑞舒伐他汀。如果需要使用非他汀类药物治疗，首选与 CYP450 酶相关性最小的非诺贝特（200 mg·d^{-1}），其次是鱼油和烟酸，不推荐吉非贝齐和他汀类药物同时使用，特别禁止吉非贝齐与辛伐他汀联合用药。如果他汀类药物和非诺贝特治疗无效，可选用依折麦布（10 mg·d^{-1}）。推荐在基线、开始治疗后的 1、2 和 3 个月以及此后每 3 个月进行一次完整的血脂谱检查，在服用劳拉替尼 48 h后监测肝功能，建议在使用前和使用后定期监测心电图[27-28]。

3.2　中枢神经系统的影响

Ⅰ/Ⅱ期临床试验表明，劳拉替尼最常见的中枢神经系统不良事件主要包括认知功能（27%）、情绪（23%）和言语（12%）的变化，通常在治疗的前 2 个月内出现[26，29]。使用劳拉替尼前，应对患者进行情绪和认知的评估。中枢神经系统不良事件的程度通常较轻，且呈间歇性，减量后可得到改善或消除。对 1 级中枢神经系统不良事件可以通过短暂的剂量中断，恢复后以相同或更低剂量治疗；2 级或 3 级不良事件需要暂时停药，直到症状缓解到≤ 1 级，然后减少剂量恢复治疗；4 级不良事件应永久停用劳拉替尼。

3.3　水肿

在Ⅰ/Ⅱ期临床试验中，水肿是劳拉替尼中断治疗（5.8%）和剂量减少（6.1%）最常见的原因之一，有 57% 的患者经劳拉替尼治疗后会发生水肿，发生水肿的中位时间为 42 d（范围 1 ～ 232 d），中位持续时间为 163 d[26，29]。对于轻度至中度的水肿，建议使用紧身袜、抬高腿部、增加运动、限制盐的摄入量，并可结合呋塞米进行治疗。对于难治性水肿，可加用螺内酯。如果水肿持续或恶化，可减少劳拉替尼的剂量，如果患者不能耐受 50 mg·d^{-1} 劳拉替尼，应永久停用。

3.4　周围神经病变

在Ⅰ/Ⅱ期临床研究中，有 47% 的患者经劳拉替尼治疗后会出现周围神经病变，通常出现的症状是夜间四肢刺痛、麻木和疼痛，一般程度较轻、可逆，中位发病时间为 77 d（范围 1 ～ 723 d），因发生周围神经病变需中断和剂量减少的比例各占 5%[26，29]。维生素 B_1、维生素 B_6 以及治疗周围神经病变相关的疼痛药物（如加巴喷丁或普瑞巴林）可缓解症状。对于 1 ～ 2 级的周围神经病变，可减少劳拉替尼的剂量；如果发生 3 ～ 4 级周围神经病变，治疗应暂时停止，直到不良事件降低到 2 级（无风险）以下或恢复到基线水平，才能减少剂量恢复使用。

4　劳拉替尼与药物间的相互作用

劳拉替尼既是 CYP3A 的中度诱导剂，也是 CYP3A的底物。同时使用强 CYP3A 诱导剂（如苯妥英、利福平和卡马西平等）可发生严重的肝

毒性。一项小样本量Ⅰ期临床试验表明劳拉替尼可与中度 CYP3A 诱导剂（如莫达非尼）安全联用[30]。与强 CYP3A 抑制剂（如伊曲康唑、克拉霉素和茚地那韦等）联合使用会增加劳拉替尼的血药浓度，从而增加劳拉替尼不良反应的发生率和严重程度。因此，应避免同时使用强 CYP3A 诱导剂和抑制剂。如不可避免联合强 CYP3A 诱导剂，应在停止使用 CYP3A 诱导剂 3 个半衰期后服用劳拉替尼，如不得不联用强 CYP3A 抑制剂，劳拉替尼应减量至 75 mg·d^{-1}，而对于因不良反应已减少至 75 mg·d^{-1} 的患者需将劳拉替尼的剂量减至 50 mg·d^{-1}[16，31]。服用劳拉替尼期间应避免服用西柚汁或西柚[32]。质子泵抑制剂（如雷贝拉唑）对劳拉替尼药代动力学的影响没有临床意义[16]。

劳拉替尼可使咪达唑仑（CYP3A4/5 底物）的 AUC_{inf} 和 C_{max} 分别降低 64% 和 50%。因此，劳拉替尼应避免与 CYP3A4/5 底物同时给药[16]。劳拉替尼也是 CYP2B6、CYP2C9 和 UGT 的弱诱导剂，但与这些酶的底物共同使用时，不需要调整剂量[33]。劳拉替尼可使激素避孕药失效，对于需避孕的女性患者服用劳拉替尼的同时应使用非激素避孕方式[16]。

劳拉替尼是 P-糖蛋白（*p*-glycoprotein，P-gp）抑制剂，如必须与 P-gp 或其他转运蛋白底物共同使用时，建议临床进行密切监测，如劳拉替尼使 P-gp 敏感底物非索非那定的 AUC_{inf} 和 C_{max} 分别降低了 67% 和 63%。劳拉替尼不是 P-gp 的底物，与转运体抑制剂或诱导剂联用预计不会有相关性[33]。

5 劳拉替尼的耐药机制和应对措施

虽然劳拉替尼是全新的第三代 ALK 抑制剂，且几乎对目前临床已知的所有获得性 ALK 单一突变均有效，之前经其他 ALK 抑制剂（第一代和第二代）治疗失效后，劳拉替尼仍具有强大的抗肿瘤活性，但随着时间的推移，劳拉替尼获得性耐药也不可避免。在目前的研究中，关于导致劳拉替尼耐药是仅在连续暴露于其他药物后才出现。多种导致劳拉替尼耐药的生物学机制已被确定，包括 ALK 激酶结构域的继发性突变和脱靶旁路机制。

5.1 劳拉替尼的耐药机制

5.1.1 激酶结构域的继发性突变 ALK 酪氨酸激酶结构域的继发性复合突变是主要的耐药机制。最近有报道称，在接受劳拉替尼治疗的患者中，ALK 激酶结构域复合突变导致了约 35% 的疾病进展[34]。已经发现的 ALK 激酶结构域的复合突变主要包括 *I1171S* + *G1269A*，*I1171N* + *L1198F*/*D1203N*/*L1256F*/*F1174I*/*L1198H*/*L1196M*，*G1202R* + *G1269A*/*L1196M*/*T1151M*/*F1174L*/*R1192P*/*F1174C*/*S1206Y*，*C1156Y* + *L1198F*/*G1269A*，*D1203N* + *F1245V*，*L1196M* + *D1203N*，*G1202R* + *G1269A* + *L1204V*/*L1198F*，*E1210K* + *D1203N* + *G1269A* 等[35]。而一些导致劳拉替尼耐药的复合突变会对第一代或第二代 ALK 抑制剂再次敏感。例如，*C1156Y* + *L1198F* 和 *I1171N* + *L1256F* 分别对克唑替尼和阿来替尼再次敏感。此外，*I1171N* + *L1198F* 突变体比 *I1171N* 单突变体对克里唑替尼更敏感。同时，色瑞替尼和布加替尼可以克服对 *I1171N* + *L1196M* 的耐药性[36-37]。

5.1.2 脱靶旁路机制 2 型神经纤维瘤（neurofibromatosis type 2，NF2）功能丧失或上皮 - 间质分化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）被确定为耐药的旁路机制。在体内和体外已证实雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）抑制剂对 NF2 缺失介导的劳拉替尼耐药具有敏感性。对于 EMT 介导的耐药，鸡肉瘤病毒基因（sarcoma gene，SRC）抑制剂（如塞卡替尼）联合劳拉替尼在患者来源的细胞系上非常敏感。这都为旁路机制导致的劳拉替尼耐药提供了潜在的治疗方法[34]。

5.2 劳拉替尼耐药后的应对措施

5.2.1 筛选其他激酶抑制剂 对劳拉替尼耐药的 ALK 阳性 NSCLC 是目前主要的挑战和未被满足的临床需求，劳拉替尼治疗出现疾病进展后，除了标准化疗（培美曲塞联合铂类）或免疫治疗（贝伐珠单抗、阿替利珠单抗）外，治疗策略选择有限。目前，研究人员在努力探索劳拉替尼耐药后的应对措施。Mizuta 等[38] 发现治疗 FMS 样酪氨酸激酶 3（fms-like tyrosine kinase 3，FLT_3）突变阳性的复发或难治性（治疗抵抗）急性髓系白血病（acute myeloid leukemia，AML）成人患者的多靶点激酶抑制剂吉瑞替尼（gilteritinib）在体内和体外对导致劳拉替尼耐药的复合突变 *I1171N* + *F1174I* 和 *I1171N* + *L1198H* 有效，且对除 *G1202R* 和 *D1203N* 外的耐药单突变体均有抑制作用。这可能为劳拉替尼耐药后提供新的治疗途径。

5.2.2 联合治疗 Choudhury 等[39] 报道了 2 例经劳拉替尼治疗出现进展的 ALK 阳性 NSCLC 病例。患者之前都接受过其他 ALK 抑制剂和化疗治疗，几乎没有其他治疗选择，而经劳拉替尼和贝伐珠单抗联合治疗后病情控制持续了 5 ～ 9 个月。对既往经劳拉替尼治疗疾病进展的患者，劳

拉替尼和贝伐珠单抗联合治疗可能有助于规避靶上和靶外耐药性。这种探索在劳拉替尼失败的情况下联合免疫治疗的策略是具有前瞻性的，但目前没有临床大样本研究报道。

5.2.3　开发下一代 ALK 抑制剂　针对劳拉替尼出现的复合突变耐药，已有第四代 ALK 抑制剂（TPX-0131 和 NVL-655）正在开发。根据目前公开的临床前数据，TPX-0131 具有中枢神经系统渗透作用，对 ALK 野生型以及 26 个 ALK 突变体（单一和复合突变）都有相当高的敏感性，激酶半抑制浓度（IC_{50}）值均不高于 6.6 nmol·L^{-1}，对 *I1171N*、*I1171S*、*I1171T*、*G1269S* 的敏感性不如二、三代 ALK 抑制剂。另外 TPX-0131 的体外数据研究表明，其可克服顺式 ALK 三重突变，目前正在启动Ⅰ/Ⅱ期临床研究。NVL-655 对 ALK 野生型及 *G1202R* ＋ *G1269A*/*L1196M*/*L1198F* 突变类型在细胞或生化激酶水平有相当高的抑制活性，同时也具有中枢神经系统穿透作用。第四代 ALK 抑制剂给难治性复合突变的 ALK 阳性 NSCLC 患者带来了新的希望，但需要更多的临床研究验证[40-42]。

6　结语

随着劳拉替尼被 FDA 批准为 ALK 阳性 NSCLC 的一线治疗，与标准一线治疗药物阿来替尼或布加替尼相比，劳拉替尼有更高效的颅内抗肿瘤活性，并可克服对第一、二代 ALK 抑制剂共同耐药的 *G1202R* 突变。ALK 抑制剂的序贯治疗可能会促进 ALK 获得性耐药突变，导致难治的复合突变产生，因复合突变体不太可能出现在未接受过 ALK 抑制剂治疗的患者中，而且持久控制脑转移患者的脑转移和在诊断时预防无脑转移患者的脑转移是选择 ALK 抑制剂的重要考虑因素[43]。真实世界的分析表明，对于难治的 ALK 阳性 NSCLC 患者，劳拉替尼的 mPFS 随着 ALK 抑制剂暴露增加而降低[44]。因此，前期使用劳拉替尼可能可以抑制或延缓耐药性，使患者临床获益更持久。未来劳拉替尼对 ALK 阳性 NSCLC 的治疗格局可能发生显著的变化。

尽管劳拉替尼不良反应的程度一般为轻到中度，但也并不意味着不存在相关的用药风险。要严格控制患者的血脂水平以防发生可能与之相关的静脉血栓栓塞并重点关注可能引起的致命不良反应（如急性胰腺炎）和患者用药期间的情绪变化。

劳拉替尼出现的耐药仍是临床面临的重大课题，耐药的机制可能会发展，单一的疗法可能不足以提高患者的总生存率，联合治疗可能是未来的发展方向，且确定耐药途径可能有助于开发合理的组合策略。

参考文献

[1] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2021[J]. Ca-Cancer J Clin，2021，71（1）：7-33.

[2] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. Ca-Cancer J Clin，2018，68（6）：394-424.

[3] Soda M，Choi YL，Enomoto M，et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer [J]. Nature，2007，448（7153）：561-566.

[4] Yu H，Sun S，Hu X，et al. Chinese perspectives on clinical efficacy and safety of alectinib in patients with ALK-positive advanced non-small cell lung cancer [J]. Oncotargets Ther，2019，12：6481-6495.

[5] Shaw AT，Yeap BY，Mino-Kenudson M，et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK [J]. J Clin Oncol，2009，27（26）：4247-4253.

[6] Toyokawa G，Seto T，Takenoyama M，et al. Insights into brain metastasis in patients with ALK ＋ lung cancer：Is the brain truly a sanctuary?[J]. Cancer Metast Rev，2015，34（4）：797-805.

[7] Atal S，Asokan P，Jhaj R. Recent advances in targeted small-molecule inhibitor therapy for non-small-cell lung cancer-an update [J]. J Clin Pharm Ther，2020，45（3）：580-584.

[8] Sui A，Song H，Li Y，et al. BRAF V600E mutation as a novel mechanism of acquired resistance to ALK inhibition in ALK-rearranged lung adenocarcinoma：A case report [J]. Medicine，2021，100（8）：e24917.

[9] Lee PH，Chen KC，Hsu KH，et al. Real-world efficacy and safety of lorlatinib in treating advanced ALK-positive non-small cell lung cancer patients [J]. Anti-Cancer Drug，2021，Doi：10.1097/CAD.0000000000001107.

[10] Yoda S，Lin JJ，Lawrence MS，et al. Sequential ALK inhibitors can select for lorlatinib-resistant compound ALK mutations in ALK-positive lung cancer [J]. Cancer Discov，2018，8（6）：714-729.

[11] Shaw AT，Bauer TM，de Marinis F，et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer [J]. New Engl J Med，2020，383（21）：2018-2029.

[12] Syed YY. Lorlatinib：First global approval [J]. Drugs，2019，79（1）：93-98.

[13] Seto T，Hayashi H，Satouchi M，et al. Lorlatinib in previously treated anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer：Japanese subgroup analysis of a global study [J]. Cancer Sci，2020，111（10）：3726-3738.

[14] 重磅！抗癌利器劳拉替尼在香港市场上市，逆转耐药，同时控制脑转移. https://www.sohu.com/a/376589160_120053803.

[15] Rosa K. FDA expands approval of lorlatinib for frontline ALK+NSCLC. https://www.onclive.com/view/fda-ex-

pands-approval-of-lorlatinib-for-frontline-alk-positive-nsclc.
[16] U.S.food and drug administration. LORBRENA（lorlatinib）tablets，for oral use. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210868s000lbl.pdf.
[17] Chen J，O'Gorman MT，James LP，et al. Pharmacokinetics of lorlatinib after single and multiple dosing in patients with anaplastic lymphoma kinase（ALK）-positive non-small cell lung cancer：results from a global phase I/II study [J]. Clin Pharmacokinet，2021，https://doi.org/10.1007/s40262-021-01015-z.
[18] Hepatic impairment study for lorlatinib in cancer patients. https：//www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03726333?term＝NCT03726333&draw＝2&rank＝1.
[19] Lin S，Gong J，Pithavala Y. P2.14-39 Effects of renal function on lorlatinib safety and pharmacokinetics [J]. J Thorac Oncol，2019，14（10）：S844-S845.
[20] Lin S，Gong J，Pelletier K，et al. Final results from a renal impairment study of lorlatinib [J]. Clin Pharmacol Ther，2021，109：S48-S49.
[21] El Darsa H，Abdel-Rahman O，Sangha R. Pharmacological and clinical properties of lorlatinib in the treatment of ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer [J]. Expert Opin Pharmaco，2020，21（13）：1547-1554.
[22] Lee CS，Wanchoo R，Seetharamu N. Lorlatinib induced proteinuria：A case report [J]. J Oncol Pharm Pract，2021，27（4）：1037-1039.
[23] Yildiz I. Liver and pancreatic injury in response to ALK inhibitors in a patient with primary signet ring cell carcinoma of the lung：A case report [J]. Case Rep Oncol，2021，14（1）：107-111.
[24] Toyozawa R，Haratake N，Toyokawa G，et al. Lorlatinib-induced pulmonary embolism in an ALK-positive non-small cell lung cancer patient [J]. JTO CRR，2020，2（1）：100005.
[25] Xia B，Nagasaka M，Zhu VW，et al. How to select the best upfront therapy for metastatic disease? Focus on ALK-rearranged non-small cell lung cancer（NSCLC）[J]. Transl Lung Cancer R，2020，9（6）：2521-2534.
[26] Bauer TM，Felip E，Solomon BJ，et al. Clinical management of adverse events associated with lorlatinib [J]. The Oncologist，2019，24（8）：1103-1110.
[27] Choo JRE，Soo RA. Lorlatinib for the treatment of ALK-positive metastatic non-small cell lung cancer [J]. Expert Rev Anticanc，2020，20（4）：233-240.
[28] Blais N，Adam JP，Nguyen J，et al. Evaluation and management of dyslipidemia in patients treated with lorlatinib [J]. Curr Oncol，2021，28（1）：265-272.
[29] Reed M，Rosales ALS，Chioda MD，et al. Consensus recommendations for management and counseling of adverse events associated with lorlatinib：A guide for healthcare practitioners [J]. Adv Ther，2020，37：3019-3030.
[30] Li J，Pithavala YK，Gong J，et al. The effect of modafinil on the safety and pharmacokinetics of lorlatinib：A phase Ⅰ study in healthy participants [J]. Clin Pharmacokinet，2021，https://doi.org/10.1007/s40262-021-01026-w.
[31] Nagasaka M，Ge Y，Sukari A，et al. A user's guide to lorlatinib [J]. Crit Rev Oncol Hemat，2020，151：102969.
[32] Zhao D，Chen J，Chu M，et al. Pharmacokinetic-based drug-drug interactions with anaplastic lymphoma kinase inhibitors：A review [J]. Drug Des Dev Ther，2020，14：1663-1681.
[33] Chen J，Bearz A，Kim D，et al. P1.01-84 Interaction of lorlatinib with CYP2B6，CYP2C9，UGT，and P-gp probe drugs in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol，2019，14（10）：S392-S393.
[34] Recondo G，Mezquita L，Facchinetti F，et al. Diverse resistance mechanisms to the third-generation ALK inhibitor lorlatinib in ALK-rearranged lung cancer [J]. Clin Cancer Res，2020，26（1）：242-255.
[35] Zhu VW，Nagasaka M，Madison R，et al. A novel sequentially evolved EML4-ALK v3 G1202R/S1206Y in cis double mutation confers resistance to lorlatinib：A brief report and literature review [J]. JTO CRR，2021，2（1）：100116.
[36] Okada K，Araki M，Sakashita T，et al. Prediction of ALK mutations mediating ALK-TKIs resistance and drug re-purposing to overcome the resistance [J]. Ebiomedicine，2019，41：105-119.
[37] Shaw AT，Friboulet L，Leshchiner I，et al. Resensitization to crizotinib by the lorlatinib ALK resistance mutation L1198F [J]. New Engl J Med，2016，374（1）：54-61.
[38] Mizuta H，Okada K，Araki M，et al. Gilteritinib overcomes lorlatinib resistance in ALK-rearranged cancer [J]. Nat Commun，2021，12（1）：1-16.
[39] Choudhury NJ，Young RJ，Sellitti M，et al. Lorlatinib and bevacizumab activity in ALK-rearranged lung cancers after lorlatinib progression [J]. Jco Precis Oncol，2020，4：1333-1338.
[40] Cui JJ，Rogers E，Zhai D，et al. TPX-0131：a next generation macrocyclic ALK inhibitor that overcomes ALK resistant mutations refractory to currently approved ALK inhibitors [J]. Cancer Res，2020，80（16 Suppl）：5226.
[41] Murray BW，Zhai D，Deng W，et al. TPX-0131，a potent CNS-penetrant，next-generation inhibitor of wild-type ALK and ALK-resistant mutations [J]. Mol Cancer Ther，2021，20（9）：1499-1507.
[42] Ou SHI，Nagasaka M，Brazel D，et al. Will the clinical development of 4th-generation "double mutant active" ALK TKIs（TPX-0131 and NVL-655）change the future treatment paradigm of ALK ＋ NSCLC?[J]. Transl Oncol，2021，14（11）：101191.
[43] Nagasaka M，Ou SHI. Lorlatinib should be considered as the preferred first-line option in patients with advanced ALK-rearranged NSCLC [J]. J Thorac Oncol，2021，16（4）：532-536.
[44] Zhu VW，Lin YT，Kim DW，et al. An international real-world analysis of the efficacy and safety of lorlatinib through early or expanded access programs in patients with tyrosine kinase inhibitor-refractory ALK-positive or ROS1-positive NSCLC [J]. J Thorac Oncol，2020，15（9）：1484-1496.

（收稿日期：2021-07-08；修回日期：2021-09-03）

胆汁淤积症的生物机制研究进展

卢颖[1]，秦琳[1]，谭道鹏[1]，鲁艳柳[1]，何芋岐[1]，杨艳[2]，张倩茹[1*]，周旭美[1*]（1. 遵义医科大学药学院 国家级药学实验教学示范中心 基础药理教育部重点实验室，贵州　遵义　563000；2. 遵义医科大学附属医院药剂科，贵州　遵义　563000）

摘要：胆汁淤积为临床常见的消化系统疾病，是由遗传、药物、环境等多种因素引起的胆汁合成与排出障碍的病理生理过程。胆汁在体内过度蓄积，导致肝脏细胞的结构与功能受到破坏，进而引发或加剧黄疸性肝炎、胆汁性肝纤维化甚至肝硬化等多种肝脏疾病，对患者的健康与生命造成威胁。本文着重从胆汁淤积的形成因素、生物机制等方面，对胆汁淤积的研究进展进行综述，为临床治疗胆汁淤积提供思路和参考。

关键词：胆汁淤积；胆汁酸通路；生物机制

中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2603-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.023

Research progress in the biological mechanism of cholestasis

LU Ying[1], QIN Lin[1], TAN Dao-peng[1], LU Yan-liu[1], HE Yu-qi[1], YANG Yan[2], ZHANG Qian-ru[1*], ZHOU Xu-mei[1*] (1. *National Demonstration Center for Experimental* (*Pharmacy*) *Education*; *Key Laboratory of Basic Pharmacology*, *School of Pharmacy*, *Zunyi Medical University*, *Zunyi Guizhou* 563000; 2. *Affiliated Hospital of Zunyi Medical University*, *Department of Pharmacy*, *Zunyi Guizhou* 563000)

Abstract: Cholestasis, as a common clinical disease of digestive system, is a pathophysiological process of bile synthesis and excretion disorder caused by many factors such as heredity, drugs and environment. Excessive accumulation of the bile in the body leads to the destruction of the structure and function of liver cells, and causes or aggravates liver diseases such as jaundice hepatitis, biliary fibrosis and even cirrhosis, which pose a threat to the health and life of patients. This paper reviewed the research progress of cholestasis from its formation and biological mechanism to provide ideas and references for clinical treatment of cholestasis.

Key words: cholestasis; bile acid pathway; biological mechanism

胆汁淤积是由于胆汁分泌及排泄障碍引起的肝脏以及体循环内胆汁酸、胆固醇及胆红素等胆汁成分过度堆积的一种病理生理过程。在具有原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化（PBC）、非酒精性脂肪性肝病等慢性肝病史的住院患者中，胆汁淤积发病率高达 10.26%[1]。胆汁淤积的临床表现以发热、疲劳、瘙痒、黄疸等非特异性症状为主[2]，起病隐匿且妊娠、药物、手术、环境等多种因素均可导致其恶化，若不能及时改善则可能发展为肝硬化乃至肝衰竭，对患者的生命健康造成巨大危害，而目前对于胆汁淤积的发生机制及病程变化尚不十分明确。因此，本文对近 10 年来胆汁淤积的相关研究进展进行回顾，对胆汁淤积症的发病机制、形成因素及相关疾病进行总结与呈现，以期为胆汁淤积症的临床治疗与药物研发提供相关线索。

基金项目：贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（No. QZYY2017-030）；贵州省科技计划项目（黔科合支撑 [2019]2953 号）；黔科合平台人才 [2019]5657；黔科合支撑 [2020]4Y072；黔科合平台人才（No. [2017]5733-062，[2017]5733-060）。

作者简介：卢颖，女，硕士研究生，主要从事临床药学工作，E-mail：1014327807@qq.com　***通信作者：**周旭美，女，教授，主要从事临床药学及体内药物分析研究，E-mail：zmczxm@163.com；张倩茹，女，副教授，主要从事中药有效物质筛选研究，E-mail：qrzhang_iris@foxmail.com

1 胆汁淤积症的类型

按照发病部位的差异，胆汁淤积症可分为肝内胆汁淤积与肝外胆汁淤积两种类型[3]。肝内胆汁淤积主要由于肝脏内部胆汁酸代谢和转运障碍，导致胆汁成分入血；肝外胆汁淤积则是由胆结石、寄生虫、肿瘤等因素导致胆总管部分或完全阻塞、肝外疝和嵌顿，引起肝外胆管系统异常梗阻。按照发病机制的不同，胆汁淤积症可分为遗传性胆汁淤积（又称原发性胆汁淤积）与获得性胆汁淤积（又称继发性胆汁淤积）两种[4]。遗传性胆汁淤积是致病基因突变引起的胆汁淤积，且具有一定的家族遗传性；获得性胆汁淤积通常是由后天因素（包括妊娠、药物、手术、环境等）引起的胆汁淤积。

2 胆汁淤积的发病机制

胆汁淤积症普遍认为是肝细胞和胆管上皮细胞结构与功能发生异常，转运蛋白功能受损，胆汁酸通路中酶活性降低或细胞骨架发生改变，导致胆汁流量的减少和胆汁淤积形成[5]。例如，进行性家族性肝内胆汁淤积症（PFIC）是一种常发生在婴儿时期的遗传性胆汁淤积性肝病，其发病机制与调控肝细胞运输系统的 *ATP8B1*、*ABCB11*、*ABCB4*、*TJP2*、*NR1H4* 等基因发生突变，胆酸盐外排泵（BSEP）、多药耐药 3 蛋白（MDR3）等肝细胞转运蛋白表达减少甚至缺失有关。目前发现的 PFIC 有 1 ～ 6 型，肝组织病理通常可见肝细胞及毛细胆管胆汁淤积，其中 PFIC-1 型肝组织病理特征为电镜下的粗颗粒状胆汁，部分肝细胞可形成腺泡样假玫瑰花结[6]，免疫组化可发现 γ- 谷氨酰转肽酶表达缺失；PFIC-2 型肝组织病理特征为肝巨细胞的形成，肝细胞排列紊乱，免疫组化可发现 BSEP 表达缺失；PFIC-3 型肝组织的病理特征为胆管增生和纤维化，免疫组化显示 MDR3 蛋白表达减少；PFIC-4 型电镜可见紧密连接异常，免疫组化显示紧密连接蛋白 2 的表达缺失[7]。

随着人们对胆汁淤积的研究不断深入，其发病机制还被认为有：① 胆汁成分改变或胆管发生损伤，胆囊结石、肿瘤栓塞、药物、寄生虫等因素引起肝内外胆管阻塞导致胆汁淤积，发生胆道梗阻的大鼠肝脏可观察到肝细胞肿胀、炎症细胞浸润、小胆管增生、胆管壁增厚、肝细胞点状坏死、纤维组织增生等病理改变[8]；② 机体发生炎症反应诱导肝细胞内信号通路或刺激炎症细胞因子[9]，导致胆汁流动受阻引起胆汁淤积。在环境、病毒等刺激下机体产生自身免疫反应被认为是 PBC 最为可能的发病机制，PBC 依据其病理学特征可分为胆管炎期、胆管增生期、瘢痕和纤维化期和肝硬化期，病理表现包括肝内胆管结构破坏、炎症扩张或碎屑样坏死、纤维化间隔和再生结节等[10]。

近年来，胆管上皮细胞的碳酸氢根分泌功能受损被认为是胆汁淤积的发病机制之一，有假说提出，碳酸氢根分泌减少并在胆管上皮细胞内累积，使胆汁酸进入胆管上皮细胞致细胞损伤凋亡，胆道屏障破坏，机体发生免疫损伤或氧化应激反应从而引起胆汁淤积[11]。

3 胆汁淤积的形成因素

3.1 遗传性因素

SLC25A13、*ATP8B1*、*ABCB11* 等基因缺陷可能引起 PFIC、良性复发性肝内胆汁淤积症等遗传性胆汁淤积性疾病[12]。

3.2 获得性因素

3.2.1 年龄 新生儿胆汁淤积性黄疸分为先天性胆道闭锁性黄疸和非胆道闭锁性胆汁淤积性黄疸，造成新生儿胆汁淤积的因素包括胆汁酸合成异常、胆管闭锁、结石等[13]。而老年人因肝脏功能减退，对药物的代谢能力降低，更容易发生药物性肝损伤，造成胆汁淤积性黄疸[14]。由此可见，新生儿与老年人由于肝脏等器官发育不成熟或出现衰退等原因均可能造成胆汁淤积。

3.2.2 妊娠 在妊娠期间，孕妇体内雌激素水平异常可损害 BSEP、MDR3、多药耐药相关蛋白 2（MRP2）等转运蛋白的表达与功能，抑制卵母细胞胆汁酸外排，造成妊娠期肝内胆汁淤积（ICP），危及胎儿生命健康[15]。ICP 的危险因素除常见的激素紊乱与病毒、尿道感染外，还包括孕妇的年龄、孕前体重、受教育程度、多胎妊娠、口服避孕药史等[16]。

3.2.3 手术 特发性术后胆汁淤积通常发生在心脏外科手术或腹部大手术后 1 ～ 2 周，可能是由于术中使用麻醉剂、体外循环血量降低、失血过多等原因引起肝脏缺氧缺血，导致肝细胞功能障碍甚至肝细胞死亡。此外，长期的肠外营养与肠道功能衰竭均可导致肝内胆汁淤积[17]，这种胆汁淤积被称为肠外营养相关胆汁淤积，与新生儿喂养不当、肠道菌群失衡、禁食时长、感染等有关[18]。手术造成的胆汁淤积通常与患者营养与能量得不到充分供给导致肝脏、胃肠道正常生理功能无法有效维持相关。

3.3 药物

非甾体抗炎药、抗高血压药、抗糖尿病药、抗惊厥药、降脂药和精神药物等多种临床药物可引起胆汁淤积、药物性胆管病和消失性胆管综合征，其中阿莫西林等抗菌药物比其他种类的药物更容易造成急性或慢性的胆汁淤积[19]。药物造成的胆汁淤积通常是由于药物自身毒性、自身免疫反应等原因造成胆道生理结构被破坏[20]。

3.4　疾病

胆汁淤积是败血症、肝外细菌感染和酒精性肝炎的常见并发症。当机体发生炎症反应或致病菌侵入血液循环并在体内生长繁殖产生毒素引起全身性感染，可继发肝脓肿、胆结石以及胆管炎等疾病，造成胆汁淤积，胆汁酸激活炎症巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体被认为是胆汁淤积相关脓毒症的发病机制[21]。

3.5　生活习惯

胆石症是指胆道系统形成结石，大部分的结石为胆固醇结石，胆固醇结石中胆固醇含量约占 90%。胆固醇摄入过多引发高胆固醇血症，进而导致胆固醇结石的形成。胆固醇积聚于胆道中造成胆汁淤积，而胆石症的发生与膳食结构、日常用水水质等均有着密切联系[22]。

3.6　其他

胆汁淤积的形成还可能与地理位置、季节交替等环境变化有关，例如妊娠期肝内胆汁淤积症的发病率差异在不同地理位置之间为 0.05% ～ 20%。在芬兰等低硒地区 ICP 发病率较高[23]，有假说提出，血清硒水平的降低可能是 ICP 的病因之一，原因是谷胱甘肽过氧化物酶是一种依赖于硒的强抗氧化剂，硒水平的降低可能引起氧化应激反应[24]。此外，研究人员发现 ICP 发病率具有季节性变化，在冬季达到峰值，而在夏季有下降的趋势[23]。与此同时，有研究显示 ICP 患者在夏季的血清硒水平明显高于冬季[25]，进一步表明地理位置与季节变化共同影响着 ICP 的发病率。此外，环境改变可使处于 PBC 潜伏期的患者病情恶化为临床症状明显期，在长期吸烟、接触某些特殊化学物品及有毒垃圾的人群中 PBC 发病率较高，这可能与环境改变造成机体免疫功能低下引起肝内胆汁淤积有关[26]。

4　胆汁淤积的生物机制

4.1　胆汁酸合成

胆汁酸作为胆固醇的代谢产物，可分为初级胆汁酸和次级胆汁酸。在胆汁酸合成过程中发生多级酶促反应，涉及到多种酶[27]，例如胆固醇 7*α*- 羟化酶（CYP7A1）、3*β*- 羟基 -C27- 类固醇脱氢酶（HSD3B7）等[28]。若这些酶的功能与活性发生改变甚至失活时均可能会导致胆汁酸合成速度异常，正常的胆汁酸结构与生理功能受到破坏，胆汁酸亲水性降低，有毒的胆汁酸中间产物形成，造成胆汁淤积。

CYP7A1、HSD3B7 是初级胆汁酸合成的关键酶。CYP7A1 属于细胞色素 P450 氧化还原酶系，受法尼醇 X 受体（FXR）的调控进而影响胆汁酸合成速度[29]，当 CYP7A1 表达过低时抑制胆固醇分解，导致胆固醇在体内蓄积形成高胆固醇血症。HSD3B7 是初级胆汁酸合成通路中唯一的异构酶，可维持胆汁酸正常生理功能、促进胆固醇吸收[30]。HSD3B7 缺乏或失活通常表现为儿童时期的肝脏受损，可引发胆汁淤积性肝病、新生儿黄疸、先天性胆汁酸合成缺陷症等多种疾病[31]。

Δ4-3- 氧代类固醇 5*β*- 还原酶（AKR1D1）、胆汁酸 - 辅酶 A 氨基酸 -*N*- 酰基转移酶（BAAT）等是次级胆汁酸合成的关键酶。AKR1D1 是一种具有还原能力的酶，对固醇核环结构具有修饰作用并参与类固醇激素代谢，当 AKR1D1 发生缺陷时，具有肝毒性的胆汁酸在肝内积累，造成新生儿进行性胆汁淤积症、新生儿肝衰竭、先天性胆汁酸合成缺陷症等疾病[32]。BAAT 参与胆汁酸酰化，催化胆酸、鹅去氧胆酸等游离型胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合，形成结合型胆汁酸[33]。BAAT 发生缺陷引起胆汁酸与氨基酸错误结合，导致肝内胆汁淤积、家族性高胆烷血症等疾病，临床上可表现为瘙痒、黄疸、生长迟缓、凝血时间延长、脂溶性维生素吸收不良等症状[34]。胆汁酸合成途径见图 1。

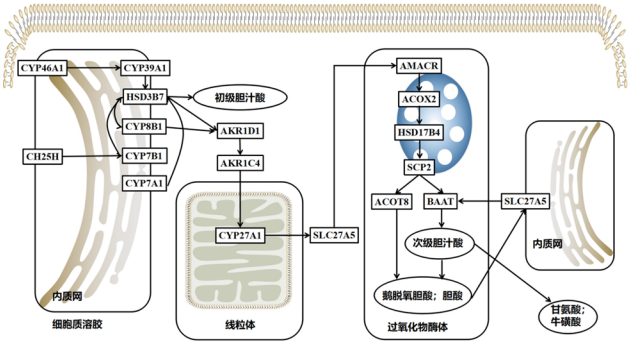


图 1　胆汁酸合成途径（KEGG：ko00120）

Fig 1　Synthesis pathway of bile acid（KEGG：ko00120）

4.2　胆汁酸转运

胆汁酸在肠道通过顶端 Na^+ 依赖性胆汁酸转运体（ASBT）、有机溶质转运蛋白 *α*/*β* 被重吸收

进入门静脉，并通过肝细胞基底膜上的 Na^+依赖性牛磺胆汁酸盐协同转运多肽（NTCP）、非 Na^+依赖型有机阴离子转运多肽（OATPs）返回肝脏。重吸收回肝脏的胆汁酸再与新合成的结合型胆汁酸一起由肝细胞胆管侧膜 BSEP 分泌入胆道系统，而未被重吸收的胆汁酸由 MRP2 分泌入胆道系统，完成胆汁酸由胆囊至小肠的转运。胆汁酸转运促进胆汁流动，也促进了内源性化合物如胆红素、激素以及包括药物在内的外源性物质的消除。而当胆汁酸转运体受到抑制或发生缺陷时，胆汁酸的转运与排泄受损，肝脏和血液中胆汁酸水平升高，引起炎症反应或胆管堵塞，造成胆汁淤积。胆汁酸转运蛋白主要分为 ABC 转运蛋白家族、溶质载体蛋白家族两类。胆汁酸转运与重吸收见图 2。

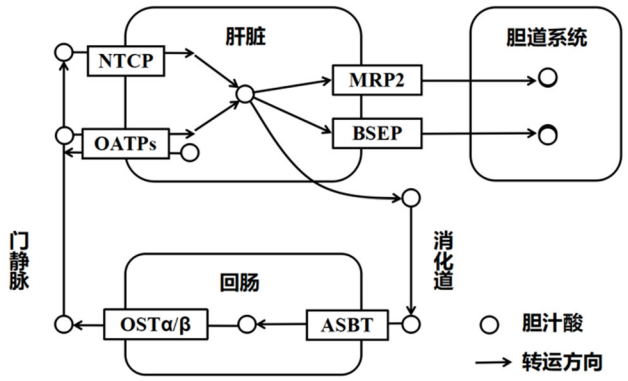


图 2 胆汁酸转运与重吸收

Fig 2 Transport and reabsorption of bile acid

4.2.1 溶质载体蛋白家族 溶质载体蛋白家族为跨膜转运蛋白，包括 NTCP、ASBT 等转运蛋白。NTCP 可将大约 90% 的结合型胆汁酸摄入肝细胞 [35]，剩余约 10% 的结合型胆汁酸由 OATPs 摄入肝细胞内，当 NTCP 转运胆汁酸功能被抑制时，OATPs 表达上调对胆汁酸转运起代偿作用 [36]。NTCP 使肝细胞对胆汁酸敏感，胆汁酸在肝细胞中不断积累刺激炎症细胞因子的表达，使机体产生炎症反应造成胆汁淤积性肝损伤 [37]。

ASBT 又称回肠胆汁酸转运蛋白，肠道内 95% 以上的胆汁酸经 ASBT 转运。ASBT 与胆汁淤积症的发病和治疗有关。ASBT 的表达显著上调、FXR 表达下调时可引发 PFIC[38]。A4250、volixibat、maralixibat 等 ASBT 抑制剂减少了胆汁重吸收，使得胆汁的消除速率大于胆汁生成速率，用于多种类型胆汁淤积性肝病的治疗。

Citrin 蛋白属于线粒体内溶质载体蛋白家族载体蛋白，其编码基因为 *SLC25A13*，主要参与氨基酸在线粒体内外的转运，与尿素循环密切相关。*SLC25A13* 基因突变是婴儿发生胆汁淤积的常见诱因，可导致新生儿肝内胆汁淤积症。

4.2.2 ABC 转运蛋白家族 ABC 转运家族有 7 个亚族，BSEP 属于 ABC 转运蛋白家族 B 亚族，其编码基因为 *ABCB11*，是胆酸盐分泌的限速转运体，可将胆酸盐从肝细胞内排出至胆管，并贮存于胆囊内。BSEP 蛋白缺陷导致 PFIC2、良性复发性肝内胆汁淤积症、ICP 等多种疾病 [39]。

MRP2 属于 ABC 转运蛋白家族 C 亚族，编码基因为 *ABCC2*。MRP2 可将胆红素转运并随胆汁进入胆管，减轻胆酸盐细胞毒性作用。当毛细胆管排泌胆酸的正常通道受阻引起胆汁淤积时 MRP2 表达下调，而位于肝细胞基底外侧膜的胆酸转运蛋白（MRP3）表达上调，MRP3 与 MRP4 可介导胆汁酸、胆红素、药物等底物外排入血液，在 MRP2 功能受损时形成代偿机制 [40]。

MDR3 属于 ABC 转运蛋白家族 B 亚族，MDR3 缺陷可导致胆固醇从胆汁中析出结晶形成结石阻塞胆道，影响胆道磷脂分泌，造成 PFIC3、ICP、PBC、低磷脂相关胆石症等 [41]。

4.3 胆汁酸代谢调控

胆汁酸作为代谢调控因子可以激活核受体和膜受体，对胆汁酸代谢进行负反馈调节。多条通路与胆汁酸负反馈调节有关，其中较为重要的通路是 FXR-SHP 通路，在此通路中，FXR 由于胆汁酸的不断累积而被激活，诱导下游的小异二聚体伴侣表达，抑制 CYP7A1 活性，负反馈调节胆汁酸的合成 [42]。另一方面，胆汁酸 -FXR-FGF15/19 信号通路是胆汁酸代谢调控的重要肠道途径，在此通路中，肠道 FXR 被过度蓄积的胆汁酸激活，诱导回肠细胞上的成纤维细胞生长因子 15/19 表达，成纤维细胞生长因子与肝细胞表面成纤维细胞生长因子受体发生特异性结合，从而抑制胆汁酸合成，避免胆汁酸过度累积 [43]。胆汁酸代谢调控见图 3。

4.3.1 核受体 核受体是调控胆汁酸代谢的一类关键信号传导蛋白。FXR 等核受体位于细胞核内，可与进入细胞内的配体发生特异性结合，并通过信息传导调控多种蛋白的表达。FXR 又称胆汁酸受体，可上调 BSEP、MDR2/3、MRP2、ASBT、OST*α*/OST*β* 表达，促进胆汁酸肠道重吸收。同时，FXR 可下调 NTCP、OATPs 表达，避免胆汁酸在肝脏过度累积 [44]。FXR 编码基因为 *NR1H4*，有研究显示，PFIC5 是由 *NR1H4* 基因突变引起的胆汁

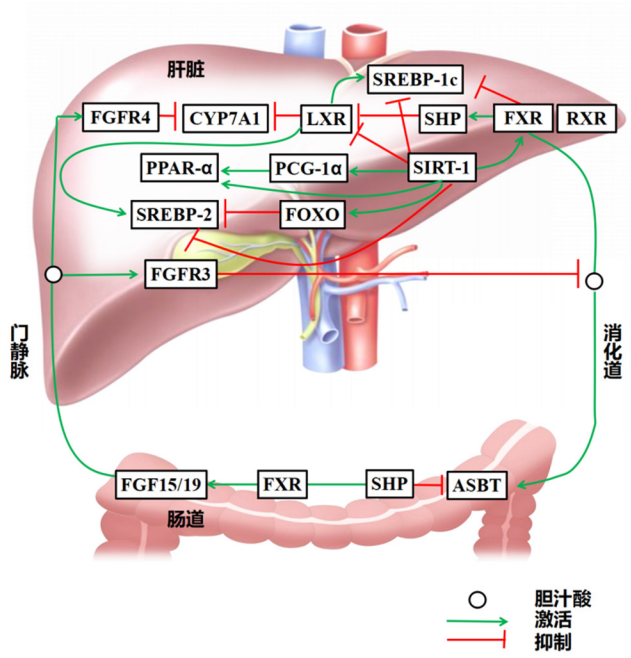


图 3　胆汁酸代谢调控

Fig 3　Regulation of bile acid metabolism

淤积症 [45]。类视黄醇 X 受体为维生素 A 类似物，可以和 FXR 等多种核受体形成二聚体从而发挥生理功能，参与胆汁酸代谢 [46]。

维生素 D 受体为甾体激素受体，与维生素 D3 结合诱导 CYP3A4 表达上调，促进石胆酸代谢 [47]。在妊娠期间母体免疫系统中，维生素 D 还可以通过维生素 D 受体作用于辅助性 T 细胞，使 Th1 型细胞向 Th2 型细胞方向转换，防止 ICP 发生 [48]。

4.3.2　膜受体　G 蛋白胆汁酸偶联受体 5 作为膜受体，可被胆汁酸特异性识别。研究表明，具有 G 蛋白胆汁酸偶联受体 5 缺陷的小鼠易发生胆汁淤积性肝损伤 [49]。

5　展望

胆汁淤积是一种由胆汁分泌或排泄障碍引起的病理生理过程，胆汁淤积未得到及时有效的治疗将会造成肝脏进一步的损伤，甚至引发肝纤维化、肝硬化等较为严重的肝脏相关疾病。本文通过将胆汁淤积的生物机制同胆汁酸合成、转运、代谢调控等生物过程及相关靶点进行联系，进一步阐述了 FXR、NTCP、ASBT 等蛋白可能具有作为胆汁淤积临床治疗潜在靶点的可能性，对胆汁淤积的形成与发展进行了总结，对后续研究具有一定的启发性。

参考文献

[1] Cao X，Gao Y，Zhang W，et al. Cholestasis morbidity rate in first-hospitalized patients with chronic liver disease in Shanghai [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi，2015，23（8）：569-573.

[2] 李磊，宁玲 . 胆汁淤积的诊断策略 [J]. 内科理论与实践，2018，13（6）：339-343.

[3] 邹刚，袁光辉 . 肝内胆汁淤积与肝外梗阻性黄疸的诊断及鉴别诊断 [J]. 医学新知杂志，1999，9（2）：61-62.

[4] 周学谦，陈文生 . 胆汁淤积的分子机制与治疗靶点 [J]. 内科理论与实践，2018，13（6）：388-393.

[5] 韩平，田德安 . 肝内胆汁淤积发病机制及药物治疗新进展 . 胃肠病学和肝病学杂志，2016，25（5）：584-588.

[6] 舒赛男，骆冉 . 进行性家族性肝内胆汁淤积症诊治及研究进展 [J]. 中国实用儿科杂志，2013，28（4）：300-304.

[7] 李丽婷，王建设 . 进行性家族性肝内胆汁淤积症研究进展 [J]. 传染病信息，2019，32（2）：162-165.

[8] 雷俊，陶强，杨文萍，等 . 胆道梗阻大鼠的肝脏病理变化及动态观察 [J]. 江西医药，2015，50（8）：752-754，848.

[9] Zheng W，Lu Y，Tian S，et al. Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR [J]. J Biol Chem，2018，293（32）：12535-12541.

[10] 杨建军 . 原发性胆汁性肝硬化 25 例临床分析 [J]. 当代医学，2013，19（33）：108-109.

[11] 常英昊，景丹，徐文姣，等 . 碳酸氢根伞在原发性胆汁性胆管炎发病机制中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（3）：714-717.

[12] 邓宝成，刘沛 . 进行性家族性肝内胆汁淤积症的研究现状 [J]. 临床肝胆病杂志，2015，31（10）：1599-1604.

[13] 伍高红，陈嘉敏，黄辉文，等 . 新生儿胆汁淤积的病因及发病机制研究进展 [J]. 医学综述，2021，27（6）：1066-1073.

[14] Weersink RA，Alvarez-Alvarez I，Medina-Cáliz I，et al. Clinical characteristics and outcome of drug-Induced liver injury in the older patients：From the young-old to the oldest-old [J]. Clin Pharmacol Ther，2021，109（4）：1147-1158.

[15] Piechota J，Jelski W. Intrahepatic cholestasis in pregnancy：Review of the literature [J]. J Clin Med，2020，9（5）：1361-1367.

[16] Gao XX，Ye MY，Liu Y，et al. Prevalence and risk factors of intrahepatic cholestasis of pregnancy in a Chinese population [J]. Sci Rep，2020，10（1）：1-7.

[17] Mitra A，Ahn J. Liver disease in patients on total parenteral nutrition [J]. Clin Liver Dis，2017，21（4）：687-695.

[18] Madnawat H，Welu AL，Gilbert EJ，et al. Mechanisms of parenteral nutrition-associated liver and gut injury [J]. Nutr Clin Pract，2020，35（1）：63-71.

[19] Sundaram V，Björnsson ES. Drug-induced cholestasis [J]. Hepatol Commun，2017，1（8）：726-735.

[20] Visentin M，Lenggenhager D，Gai Z，et al. Drug-Induced bile duct injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864（4 Pt B）：1498-1506.

[21] Hao H，Cao L，Jiang C，et al. Farnesoid X receptor regulation of the NLRP3 inflammasome underlies cholesta-

sis-associated sepsis [J]. Cell Metab，2017，25（4）：856-867. e5.
[22] 刘昌，孟凡迪，王瑞涛 . 胆石症基础研究现状与展望 [J]. 中国实用外科杂志，2021，41（1）：48-51.
[23] 李意杰，刘海燕，韩文晖，等 . 4081 例住院孕妇妊娠期肝内胆汁淤积症发病率及分布特征 [J]. 复旦学报（医学版），2018，45（4）：490-495.
[24] 赵亚宁，鲁小娜 . 妊娠期肝内胆汁淤积症患者血清及脐血硒水平检测及其意义 [J]. 陕西医学杂志，2013，42（10）：1317-1318.
[25] 彭焕彦，王燕，孙殿兴 . 妊娠期肝内胆汁淤积的研究进展 [J]. 临床误诊误治，2017，30（2）：113-116.
[26] 何方平，陈兰 . 原发性胆汁性肝硬化的流行病学及自然病程研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志，2013，16（2）：97-98.
[27] 赵元辰，崔乃强 . 胆汁酸与肠道菌群相关性研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志，2018，24（5）：666-671.
[28] 吴文晓，王婷，耿兴超，等 . 药物性胆汁淤积型肝损伤的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2020，29（2）：143-151.
[29] Peng L，Piekos S，Guo GL，et al. Role of farnesoid X receptor in establishment of ontogeny of phase-I drug metabolizing enzyme genes in mouse liver [J]. Acta Pharm Sin B，2016，6（5）：453-459.
[30] Shea HC，Head DD，Setchell KD，et al. Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a 3alpha-hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2007，104（28）：11526-11533.
[31] 代东伶 . 先天性胆汁酸合成障碍 [J]. 临床儿科杂志，2015，33（4）：301-305.
[32] 李晓青，林崟，施文婕，等 . 支链脂肪酸及其抗炎作用研究进展 [J]. 中国油脂，2019，44（9）：98-103.
[33] Styles NA，Shonsey EM，Falany JL，et al. Carboxy-terminal mutations of bile acid CoA：*N*-acyltransferase alter activity and substrate specificity [J]. J Lipid Res，2016，57（7）：1133-1143.
[34] Hadžić N，Bull LN，Clayton PT，et al. Diagnosis in bile acid-CoA：Amino acid *N*-acyltransferase deficiency [J]. World J Gastroenterol，2012，18（25）：3322-3326.
[35] Slijepcevic D，Roscam Abbing RLP，Katafuchi T，et al. Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice [J]. Hepatology，2017，66（5）：1631-1643.
[36] Li TT，An JX，Xu JY，et al. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver [J]. World J Clin Cases，2019，7（23）：3915-3933.
[37] Zollner G，Fickert P，Zenz R，et al. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases [J]. Hepatology，2001，33（3）：633-646.
[38] 李晓峰，龚敬宇，王建设 . 胆汁酸的肠肝循环与胆汁淤积性肝病 [J]. 临床肝胆病杂志，2017，33（10）：1922-1927.
[39] Henkel SA，Squires JH，Ayers M，et al. Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis [J]. World J Hepatol，2019，11（5）：450-463.
[40] 杨玉洁，刘蕾，徐苗，等 . 调控肝脏转运体对肝脏疾病防治的意义 [J]. 华西药学杂志，2020，35（3）：316-324.
[41] Dröge C，Bonus M，Baumann U，et al. Sequencing of FIC1，BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants [J]. J Hepatol，2017，67（6）：1253-1264.
[42] Kim KH，Choi S，Zhou Y，et al. Hepatic FXR/SHP Axis Modulates Systemic Glucose and Fatty Acid Homeostasis in Aged Mice [J]. Hepatology，2017，66（2）：498-509.
[43] 贾南南，门秀丽，吴静 . 有机溶质转运体 OST*α*-OST*β* 的研究进展 [J]. 生理科学进展，2018，49（3）：197-201.
[44] Cariello M，Piccinin E，Garcia-Irigoyen O，et al. Nuclear receptor FXR，bile acids and liver damage：Introducing the progressive familial intrahepatic cholestasis with FXR mutations [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864（4 Pt B）：1308-1318.
[45] Gomez-Ospina N，Potter CJ，Xiao R，et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis [J]. Nat Commun，2016，7（1）：10713.
[46] Zheng W，Lu Y，Tian S，et al. Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR [J]. J Biol Chem，2018，293（32）：12535-12541.
[47] Qin X，Wang X. Role of vitamin D receptor in the regulation of CYP3A gene expression [J]. Acta Pharm Sin B，2019，9（6）：1087-1098.
[48] 苏贞文，姜艳华，黄红丽，等 . 维生素 D 受体和稽留流产的免疫相关性 [J]. 中国实用医药，2017，12（4）：46-48.
[49] Deutschmann K，Reich M，Klindt C，et al. Bile acid receptors in the biliary tree：TGR5 in physiology and disease [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864（4 Pt B）：1319-1325.

（收稿日期：2021-06-04；修回日期：2021-09-06）

SIRT1 在心血管疾病中的研究进展

武丹，祝德秋*（同济大学附属同济医院药剂科，上海　200065）

摘要：沉默信息调节因子 2 相关酶 1（SIRT1）是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的第Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶，通过对靶蛋白的去乙酰化作用发挥生理学效应。在心血管系统中，SIRT1 参与调节线粒体功能、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡与自噬等过程。SIRT1 的活性异常与心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤、心肌肥厚、糖尿病心肌病、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生与发展密切相关。本文就 SIRT1 在心血管疾病中的作用予以综述，为研究心血管疾病的病理机制以及制订临床防治方案提供新的思路。

关键词：SIRT1；心血管疾病；SIRT1 激动剂
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2609-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.024

Role of SIRT1 in cardiovascular diseases

WU Dan, ZHU De-qiu* (*Department of Pharmacy, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai* 200065)

Abstract: SIRT1 is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)-dependent deacetylating enzyme, whose physiological effects are achieved by deacetylation of target proteins. In the cardiovascular system, SIRT1 is involved in the regulation of mitochondrial function, oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy. The abnormality of SIRT1 activity is closely related to the occurrence and development of many cardiovascular diseases, such as heart failure, ischemia-reperfusion injury, myocardial hypertrophy, diabetic cardiomyopathy, atherosclerosis, and so on. This paper summarized the role of SIRT1 in cardiovascular diseases to provide new ideas for the pathological mechanism of cardiovascular diseases and clinical therapies.

Key words: SIRT1; cardiovascular disease; SIRT1 activator

心血管疾病（CVD）是我国城乡居民的首要死亡原因，患病人数推测为 2.9 亿，且患病率和死亡率仍处于上升阶段，因此对其防治刻不容缓[1]。组蛋白去乙酰化酶（HDAC）通过介导蛋白质去乙酰化调控蛋白质的功能或活性，根据与酵母中组蛋白的同源性，哺乳动物中 HDACs 可以分为 4 类：Ⅰ型包括 HDAC1/2/3/8，仅存在于细胞核中；Ⅱ型包括 HDAC4 ～ 7，9 ～ 10，可以在细胞核和细胞质中穿梭；Ⅲ型包括沉默信息调节因子 2 相关酶（SIRT），包括 7 个同源类似物 SIRT1 ～ 7，活性依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）；Ⅳ型包括 HDAC11。研究表明，不同的 HDACs 对于 CVD 有着不同的调控作用，其中Ⅲ型 HDAC SIRT1 可通过介导下游蛋白分子赖氨酸残基的去乙酰化，调控心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤、心肌肥厚、糖尿病心肌病、动脉粥样硬化等疾病的发生发展；同时 SIRT1 激动剂白藜芦醇也表现出了良好的心血管保护潜力。本文将就 SIRT1 调控的信号通路在 CVD 中的作用进展进行综述。

1　SIRT1 的特征

1987 年，Rine 等[2]发现了一种能够使酵母交配型基因沉默的蛋白质，将其命名为沉默信息调节因子 2（sir2）。在随后的研究中，人们相继在哺乳动物体内发现了 7 种 sir2 的同源基因，分别命名为 SIRT1 ～ 7，统称为 sirtuin 家族。哺乳

基金项目：上海市临床药师重点专科建设项目（沪卫计药政〔2018〕8 号）。
作者简介：武丹，女，主管药师，主要从事心血管药理学研究，E-mail：wudan-hazzel@163.com　*通信作者：祝德秋，女，主任药师，主要从事药理学、临床药学等方面的研究，E-mail：zdq_0726@163.com

动物的 SIRT 具有不同的亚细胞定位：SIRT1 和 SIRT2 存在于细胞核和细胞质，SIRT3、SIRT4 和 SIRT5 存在于线粒体，SIRT6 和 SIRT7 位于细胞核[3]。SIRT 是依赖于 NAD^+ 的 HDAC。NAD^+ 是 SIRT 去乙酰化过程的限速酶，NAD^+ 与 NADH 浓度的比值越高，SIRT 的去乙酰化酶活性越强。在 NAD^+ 存在的情况下，SIRT 通过脱去下游靶蛋白赖氨酸残基上的乙酰基发挥作用。

SIRT 家族是衰老与寿命的调控因子，在神经退行性疾病、心血管疾病、糖尿病、代谢性疾病等年龄相关性疾病中发挥保护作用[4]。在 sir2 的 7 个同源基因中，目前对 SIRT1 的研究最为深入。SIRT1 在组织中分布广泛，在心脏、肾脏、肝脏、大脑、胰腺、骨骼肌的表达较高。SIRT1 作用的底物除组蛋白外，还包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 -1α（PCG-1α）、叉头框转录因子（FoxO）、核因子 κB（NF-κB）、p53、内皮型一氧化氮合酶（eNOS）等多种非组蛋白。SIRT1 的表达和活性受多种转录因子、病理应激状态调控。FoxO、E2F 转录因子 1、苏素化修饰因子、c-jun 氨基末端激酶（JNK1）等能增加 SIRT1 的表达和活性；而 p53、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）、肿瘤高甲基化基因 1 等能抑制 SIRT1 的活性和表达[3, 5]。

2 SIRT1 在心血管系统中的生理学作用

SIRT1 在心血管系统中发挥着重要作用，调控心肌梗死、心肌肥大、心肌病、血脂异常等心血管疾病的发生与发展。SIRT1 在哺乳动物心脏中高度表达，并通过脱乙酰化作用发挥调节线粒体功能、减轻氧化应激反应、抑制细胞凋亡、抑制炎性反应等作用。

2.1 调节线粒体功能

心脏为血液流动提供动力，需要消耗大量能量，而线粒体是能量的主要来源。线粒体通过氧化磷酸化产生三磷酸腺苷（ATP）为心肌细胞提供能量，并维持细胞内环境稳定。线粒体功能的稳定对于维持心脏正常生理功能至关重要。小鼠心脏缺乏 SIRT1 使其表现出与线粒体功能障碍密切相关的进行性扩张型心肌病，心肌细胞缩小，心肌纤维缺失，心肌细胞线粒体肿胀和嵴缺失。心肌细胞增强因子（Mef2）通过乙酰化修饰激活，参与调控心脏分化与线粒体生物发生。小鼠心脏 SIRT1 的缺失干扰了 Mef2 的乙酰化模式，降低了 Mef2a 和 Mef2d 的乙酰化水平，同时升高了 Mef2c 的乙酰化水平，导致线粒体 DNA 含量及其编码基因表达降低，促使线粒体生物发生异常并抑制线粒体呼吸[6]。

PCG-1α 是调控线粒体生物发生的核受体转录辅活化子，其水平降低与线粒体生物发生的不足有关，从而导致线粒体功能障碍。SIRT1 对 PGC-1α 发挥脱乙酰基作用使其活化，活化的 PGC-1α 进一步激活核呼吸因子 1/2（NRF-1/2）和线粒体转录因子 A（TFAM），增加线粒体的生物发生。在氧化应激状态的大鼠心肌细胞 H9c2 中，白藜芦醇通过激活 SIRT1 诱导 PGC-1α、NRF-1 和 NRF-2 的表达，而给予 SIRT1 抑制剂尼克酰胺后，这些转录因子的表达被抑制[7]。

腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）是调控能量代谢的重要分子。SIRT1 激活 LKB1（liver kinase B1），使其下游的 AMPK 表达增加。AMPK 进一步促进尼克酰胺磷酸核糖转移酶（Nampt）的转录，使细胞内 NAD^+ 水平升高，SIRT1 活性增加。Meng 等[8]对卵巢切除小鼠进行冠状动脉结扎术建立心肌缺血模型，发现白藜芦醇使小鼠缺血心肌的 SIRT1 表达和活性增强，AMPK 信号被激活，从而抑制了线粒体通透性转换孔的病理性开放，缓解了线粒体肿胀程度和细胞氧化应激水平，恢复了线粒体功能，减少了缺血性心脏病小鼠心肌细胞的损伤。同时，白藜芦醇通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路，使线粒体呼吸链酶复合物Ⅰ、Ⅳ、Ⅴ活性恢复，促进了 ATP 合成（见图 1）。

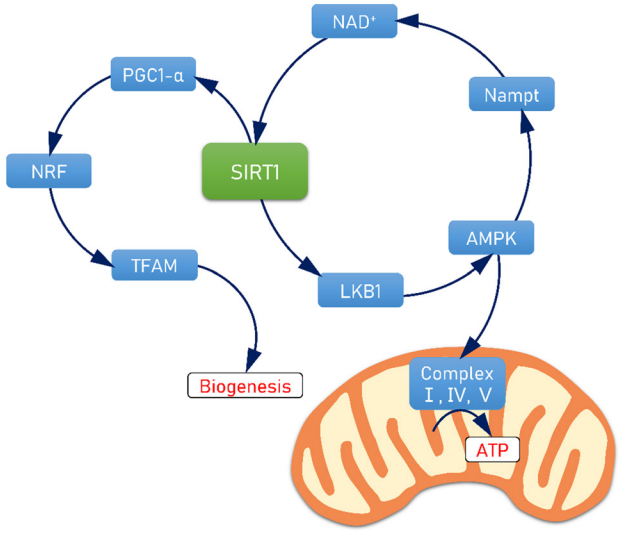


图 1 SIRT1 通过 PCG-1α 与 AMPK 信号通路调节线粒体功能

Fig 1 SIRT1 regulated the mitochondrial function through PGC-1α/AMPK pathway

2.2 抑制氧化应激

在病理状态下，线粒体持续产生的活性氧（ROS）蓄积在细胞内，引起氧化应激，破坏细胞

稳态，诱导细胞发生死亡级联反应。ROS 过量生成是诱导细胞死亡的重要生理机制。SIRT1 对细胞内氧化还原平衡状态具有高度敏感性，可通过多种途径减少 ROS 生成，从而保护心血管功能。

超氧化物歧化酶（SOD）是一类具有抗氧化作用的金属酶，在抵御 ROS 损伤中发挥重要作用。有研究表明，白藜芦醇增加细胞核中 SIRT1 的表达，诱导锰超氧化物歧化酶（Mn-SOD）的生成，缓解心力衰竭小鼠心肌的氧化应激损伤；而在心肌特异性 SIRT1 过表达小鼠中，SIRT1 通过刺激 FoxO1 的转录活性，上调 Mn-SOD 的表达，抑制氧化应激，促进心肌细胞存活 [9]。Olmos 等 [10] 报道，SIRT1 参与调节血管内皮细胞中 FoxO3a/PGC-1α 复合物的形成，使 Mn-SOD、过氧化氢酶、过氧化物酶 5 和硫氧还蛋白还原酶 2 等氧化应激保护因子的 mRNA 和蛋白水平升高。

2.3 抑制炎症反应

炎症反应是细胞损伤或应激使免疫系统受到激活后机体产生的防御反应。SIRT1 能够抑制 NF-κB 炎症信号通路，减少炎性因子释放，从而减轻炎症反应。NF-κB 受到 SIRT1 调控，SIRT1 与 NF-κB 的 P65/RelA 亚单位结合，降低 P65/RelA 乙酰化程度，使 NF-κB 失活，减少其下游肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -1β（IL-1β）等炎性因子的表达 [11]。Li 等 [12] 发现，对于心脏缺血 / 再灌注损伤小鼠，应用咖啡酸邻硝基苯乙酯（CAPE-o NO_2）后 SIRT1 表达增加，并通过 NF-κB 途径抑制了心脏组织中 ROS 生成和炎性因子的表达，减少缺氧复氧诱导的氧化应激与炎症反应。

2.4 抑制细胞凋亡

细胞凋亡是一种自主有序的程序性死亡，过高的炎性细胞因子或 ROS 水平可诱导细胞进入凋亡。心肌细胞凋亡是心力衰竭等多种心脏疾病发生发展的重要病理基础。心肌细胞的不可再生性使其在发生凋亡时数量减少，从而损害心脏功能。心脏特异性 SIRT1 过表达使氧化应激下心肌细胞的凋亡显著降低，心肌损伤减轻。Yuan 等 [13] 的研究发现，阿霉素（DOX）降低了补体 C1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 3（CTRP3）的表达，而心脏特异性过表达 CTRP3 激活了 SIRT1，从而抑制炎症反应和心肌细胞凋亡，减轻了 DOX 诱导的心功能不全。

SIRT1 可通过 FoxO1 信号通路，使抗凋亡蛋白 Bcl-xL 表达增加，同时下调促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bcl 相关 X 蛋白（Bax），抑制心肌细胞凋亡。而 Chen 等 [14] 报道，在缺氧 H9c2 细胞中给予白藜芦醇，SIRT1 对 FoxO1 的功能具有双重影响，SIRT1 经 FoxO1 信号通路，促进了超氧化物歧化酶 Mn-SOD 的转录，增加了 Mn-SOD 表达，抑制了细胞凋亡；同时，细胞周期依赖性激酶特异性抑制蛋白 $p27^{KIP1}$ 被激活，使 FoxO1 诱导细胞周期停滞的作用增强。

p53 在调控细胞周期与凋亡中发挥重要作用，其活性受 Bcl 相关 X 蛋白（Bax）介导。SIRT1 可降低 p53 的乙酰化程度，抑制 Bax 启动子与 p53 的结合，下调 Bax 的表达，减少 p53 依赖途径的细胞凋亡。

此外，Luo 等 [15] 报道，在低氧诱导的 H9c2 细胞中，肌醇依赖性激酶 1α（IRE1α）被激活，而 SIRT1 过表达可降低 IRE1α 活性，抑制 IRE1α 通过 JNK/c-jun 和 NF-κB/p65 途径介导的 H9c2 心肌细胞凋亡。

2.5 调控细胞自噬

自噬是一种依赖于溶酶体的常见细胞代谢过程，对于维持细胞正常功能有着重要的作用。根据底物的选择性，可以将自噬分为选择性自噬和非选择性自噬，前者包括线粒体自噬、内质网自噬、核糖体自噬等 [16]。在人类心肌细胞缺氧 / 复氧损伤后，提高 SIRT1 表达可以激活线粒体自噬，减少心肌细胞损伤 [17-18]。此外，Silva 等 [19] 发现，衣霉素或异丙肾上腺素诱导的内质网应激反应中，SIRT1 缺乏小鼠表现出自噬抑制和心功能不全加重，进一步研究发现，SIRT1 可激活 eEF2K/eEF2 通路增强心肌细胞的内质网自噬，减轻衣霉素诱导的内质网应激反应，从而促进心肌细胞存活。

3 SIRT1 在 CVD 中的作用

CVD 的发展是一个连续的过程，涉及氧化应激、炎症、细胞凋亡与自噬等多种机制。心肌细胞不可再生，因此延长心肌细胞的寿命、维持心肌细胞活力，对心脏疾病的防治至关重要。SIRT1 通过参与调节细胞的能量代谢，减少氧化应激条件下细胞的凋亡和衰老，促进细胞自噬，最终保护心血管功能，减轻 CVD 的发展。研究表明，SIRT1 可调控心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤、心肌肥厚、糖尿病心肌病、动脉粥样硬化等 CVD 的发生与过程。

3.1 对心力衰竭及左心室功能的影响

心力衰竭是常见的心血管疾病终末期临床表

现，展现出复杂的表型，如心肌细胞死亡、心肌纤维化、心肌收缩力降低等。心力衰竭的发生涉及到氧化应激、心肌细胞凋亡、肌浆网 Ca^{2+}-ATPase（SERCA2a）功能不足等机制。在晚期心力衰竭患者的心肌组织中，SIRT1 表达显著减少，Mn-SOD 及抗凋亡分子 Bcl-xL 受到明显抑制，而促凋亡分子 Bax 的表达明显增加；SIRT1 的缺乏可能通过 p53 和 FoxO1 信号通路，介导了心肌细胞凋亡 [20]。SIRT1 激动剂白藜芦醇能够增加心肌细胞核 SIRT1 表达，促进 Mn-SOD 生成，保护心肌免受氧化应激损伤。

SERCA2a 是调节细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的酶，其表达或活性不足直接影响细胞内 Ca^{2+} 稳态，降低心肌收缩力，从而引发心力衰竭。Gorski 等 [21] 的研究表明，在多种动物的衰竭心脏中，SIRT1 激动剂增强了 SERCA2a 的活性，进一步研究发现，SIRT1 可能通过对 SERCA2a 赖氨酸残基 K492 的去乙酰化作用，促进了 ATP 与 SERCA2a 的结合，从而恢复衰竭心脏的心肌功能。

临床试验也证实了 SIRT1 激动剂能够改善心功能。Magyar 等 [22] 发现，SIRT1 激动剂白藜芦醇（10 mg·d^{-1}，持续 3 个月）能够显著改善稳定型冠心病患者的左心室舒张功能，左心室收缩功能也略有改善。Militaru 等 [23] 的研究也表明，口服白藜芦醇（20 mg·d^{-1}，持续 60 d）能够显著降低稳定型心绞痛患者的 B 型利钠肽水平，改善左心室功能，减少心绞痛发生次数；而白藜芦醇与果糖硼酸钙联用时，对心绞痛患者的生活质量改善更为明显。

3.2 对心肌缺血再灌注损伤的影响

冠状动脉阻塞是诱发缺血性心脏病的主要原因。恢复冠状动脉的血流供给可减轻心肌的缺血缺氧状态以及心肌坏死，但心肌缺血再灌注（I/R）常常会加剧心肌损伤。SIRT1 通过调节 I/R 过程中的主要病理过程，如氧化应激、炎症、细胞凋亡等，减轻 I/R 损伤，改善心肌功能。在心脏 I/R 小鼠模型中，心脏特异性 SIRT1 敲除使心肌梗死面积和心肌细胞凋亡率显著增加，而心脏特异性 SIRT1 过表达减少了心肌梗死面积和心肌细胞凋亡；进一步研究发现，SIRT1 上调了 Mn-SOD、硫氧还蛋白 1、Bcl-xL 等促存活分子的表达，下调了促凋亡分子 Bax 和活化的 caspase-3，同时刺激了 FoxO1 的转录活性，抑制了心肌细胞的氧化应激，保护心脏免受 I/R 损伤 [24]。应用 SIRT1 激动剂也能产生类似生物学的效应，白藜芦醇可通过激活 SIRT1，减少心肌梗死面积，降低 I/R 导致的心肌损伤；而 SIRT1 抑制剂尼克酰胺以剂量依赖性方式，加重心肌细胞凋亡。缺血后处理（IPC）是减轻 I/R 损伤的有效方式之一，SIRT1 在 IPC 中的有益作用与 PI3K/Akt 信号通路有关，SIRT1 的去乙酰化作用使 Akt 活化，促进 Akt 与 PIP3 结合，SIRT1 通过激活 PI3K/Akt 途径，恢复了 IPC 介导的心脏保护作用 [25]。

3.3 对心肌肥厚的影响

心脏长期负荷过度导致心肌细胞体积增大，心肌厚度和重量增加。在心脏压力超负荷和氧化应激条件下，SIRT1 水平显著上调。SIRT1 在抑制心肌肥厚中的作用较为复杂。自发性高血压大鼠的心脏 SIRT1 表达升高，心肌细胞内 SIRT1 mRNA 与蛋白表达及心肌肥厚程度成正相关。此外，抑制 SIRT1 表达可以减少压力超负荷所引起的心肌肥厚和心力衰竭；而 PPARγ 和 SIRT1 表达同时增加，会加重心功能不全 [26]。但是，Li 等 [27] 报道 SIRT1 减少了蛋白激酶 C-ζ（PKC-ζ）的乙酰化，降低了 PKC-ζ 途径诱导的心肌肥厚。

3.4 对糖尿病心肌病的影响

糖尿病心肌病是指在心肌代谢紊乱及心脏微血管病变的基础上，导致的心肌广泛灶性坏死，与线粒体的生物发生功能受损有关。Ma 等 [28] 研究表明，心脏特异性 *SIRT1* 基因敲除小鼠表现出糖尿病心肌病的症状，包括心肌肥厚和功能障碍、胰岛素抵抗和糖代谢异常；进一步研究发现，白藜芦醇激活了 SIRT1，SIRT1 通过介导 PGC-1α 的去乙酰化，诱导 NRF-1/2、ERR-α 和 TFAM 的表达增加，逆转了糖尿病心肌病小鼠的线粒体生物发生和线粒体功能，减轻心脏舒张功能障碍。

糖尿病导致心肌 eNOS 表达降低，NO 合成受损，诱导氧化应激和细胞凋亡。Fourny 等 [29] 研究表明，在糖尿病大鼠左心室心肌注射腺病毒载体 Ad-SIRT1 能上调心脏 SIRT1 表达，减少心肌细胞内 eNOS 乙酰化，增加 eNOS 磷酸化；SIRT1 过表达改善了糖尿病大鼠的心功能，缩小了心肌梗死面积，减轻了心肌缺血再灌注损伤和氧化应激。Koka 等 [30] 研究表明，在糖尿病小鼠缺血再灌注的心脏中，SIRT1 的过表达不仅抑制心肌细胞超氧化物的产生，还提高了抗氧化酶 SOD 的活性。而 SIRT1 在糖尿病心肌病中的抗凋亡作用与 FoxO 有关。在自发性糖尿病 Goto-Kakizaki 大鼠中，SIRT1 激活 FoxO3a 信号通路的同时脱去了 p53 赖氨酸 373/382 位点的乙酰基，抑制了 p53 活

性，从而减轻了糖尿病心脏的重塑和心肌细胞凋亡[31]。此外，糖尿病心肌功能受损与 SERCA2a 的水平降低有关。Sulaiman 等[32]报道，糖尿病小鼠心脏的 SIRT1 活性降低，使 SERCA2a 下调；白藜芦醇能激活 SIRT1 增强 SERCA2a 表达，从而改善糖尿病小鼠的心脏功能。

临床研究表明，糖尿病冠心病患者补充白藜芦醇（500 mg·d^{-1}，持续 4 周）可使外周血单个核细胞的 PPAR-γ 和 SIRT1 上调，患者对胰岛素的敏感性显著升高，空腹血糖、胰岛素、胰岛素抵抗显著降低[33]。

3.5 对动脉粥样硬化的影响

动脉粥样硬化的发生与泡沫细胞形成密切相关。泡沫细胞主要来源于由单核细胞分化成的巨噬细胞以及血管平滑肌细胞（VSMC）。这两种来源的泡沫细胞的形成都可被 SIRT1 抑制。SIRT1 通过介导肝 X 受体（LXR）赖氨酸 K432 的脱乙酰基，促进胆固醇逆向转运，清除巨噬细胞中的胆固醇，抑制巨噬源性泡沫细胞形成。此外，SIRT1 还通过抑制 NF-κB 信号通路，减少氧化型低密度脂蛋白（oxLDL）受体 -1 的表达，降低巨噬细胞对 oxLDL 的摄取，从而减少巨噬源性泡沫细胞的形成[34]。而在 VSMC 中，SIRT1 功能的降低使 NF-κB 活性增强，促进 oxLDL 诱导细胞内胆固醇和脂质滴的积累，增加了 VSMC 源性泡沫细胞的形成和迁移能力；在给予 SIRT1 激活剂 STR1720 后，SIRT1 的表达上调，NF-κB 信号通路受到抑制，SRT1720 剂量依赖性地减少了 oxLDL 诱导的 VSMC 源性泡沫细胞的形成[35]。

此外，血脂异常也是动脉粥样硬化的诱发因素之一。而 SIRT1 信号通路的激活能够改善血脂水平。在 ApoE$^{-/-}$ 小鼠中，SIRT1 激动剂 SRT3025 通过抑制前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（Pcsk9）的表达，使血浆总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和极低密度脂蛋白胆固醇显著降低，主动脉斑块明显缩小，抑制动脉粥样硬化的发生[36]。临床研究显示，健康吸烟人群口服 SIRT1 激动剂 SRT2104（2.0 g·d^{-1}，持续 28 d）能够降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和三酰甘油浓度[37]。而糖尿病冠心病患者补充白藜芦醇（500 mg·d^{-1}，持续 4 周）后，高密度脂蛋白胆固醇水平显著增加，总胆固醇与高密度脂蛋白胆固醇的比值显著降低[33]。

3.6 对其他 CVD 的影响

Zhou 等[38]发现，在血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）诱导的高血压小鼠中，SIRT1 表达和脱乙酰基活性显著降低，下游靶蛋白 p53 的乙酰化水平显著升高；进一步研究发现，在 VSMC 中，SIRT1 过表达能够抑制 AngⅡ输注引起的收缩压升高，降低 TGF-β1 启动子特异性结合位点上 NF-κB 的结合，从而减轻胸主动脉和肾主动脉的血管重塑。而 AngⅡ参与诱导基质金属蛋白酶（MMP）活性升高，刺激主动脉炎症反应，诱发主动脉夹层。SIRT1 通过介导 NF-κB 和内源性 MMP 拮抗剂 TIMP-1 的去乙酰化，抑制 MMP 基因活性和转录，在受到氧化应激和炎性刺激时维持主动脉壁结构的完整性，从而减少主动脉夹层的发生[39]。

衰老使血管内皮 SIRT1 功能部分丧失，NO-sGC-cGMP 信号传导受损，血管舒张功能下降。增强老年小鼠血管内皮 SIRT1 的表达后，COX-2 介导的血管收缩反应受到抑制，血管平滑肌细胞中 sGCβ1 的表达和活性增加，缓解了年龄诱导的血管舒张反应减弱[40]。

4 展望

现有研究证实，在心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤、心肌肥厚、糖尿病心肌病、动脉粥样硬化等疾病的病理过程中，SIRT1 能够减少细胞损伤，改善心血管功能。SIRT1 作为能够改善心血管功能的靶点，其激动剂作为潜在的治疗药，有望应用于多种 CVD，具有一定的开发价值。目前，临床前研究已经展现了 SIRT1 激动剂对 CVD 的治疗作用，但临床研究的数量以及样本量仍然有限。但是，SIRT1 表达过高（12.5 倍）时会导致心肌细胞凋亡，心功能减退[41]。而且，SIRT1 可以减少转录因子核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）乙酰化以及依赖 Nrf2 的相关抗氧化基因转录[42]，可能会加重心脏损害，这些使得 SIRT1 激动剂的应用受到一定的局限。综上所述，研究 SIRT1 在心血管中的作用机制，开发以 SIRT1 为靶点的药物，将为心脏疾病的预防与治疗提供新的思路与方案。

参考文献

[1] 胡盛寿，杨跃进，郑哲，等.《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志，2019，34（3）：209-220.

[2] Rine J，Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in Saccharomyces cerevisiae [J]. Genetics，1987，116（1）：9-22.

[3] Palomer X，Aguilar-Recarte D，García R，et al. Sirtuins：To be or not to be in diabetic cardiomyopathy [J]. Trends Mol Med，2021，27（6）：554-571.

[4] Guarente L，Franklin H. Epstein lecture：Sirtuins，aging，and medicine [J]. N Engl J Med，2011，364（23）：2235-2244.

[5] Wang AJ，Zhang J，Xiao M，et al. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity：novel roles of sirtuin 1-mediated signaling pathways [J]. Cell Mol Life Sci，2021，78（7）：3105-3125.

[6] Planavila A，Dominguez E，Navarro M，et al. Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice：a role for Sirt1-Mef2 in adult heart [J]. J Mol Cell Cardiol，2012，53（4）：521-531.

[7] Li YG，Zhu W，Tao JP，et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun，2013，438（2）：270-276.

[8] Meng Z，Jing H，Gan L，et al. Resveratrol attenuated estrogen-deficient-induced cardiac dysfunction：role of AMPK，SIRT1，and mitochondrial function [J]. Am J Transl Res，2016，8（6）：2641-2649.

[9] Hsu CP，Zhai P，Yamamoto T，et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. Circulation，2010，122（21）：2170-2182.

[10] Olmos Y，Sánchez-Gómez FJ，Wild B，et al. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1α complex [J]. Antioxid Redox Signal，2013，19（13）：1507-1521.

[11] Kong P，Yu Y，Wang L，et al. circ-Sirt1 controls NF-κB activation via sequence-specific interaction and enhancement of SIRT1 expression by binding to miR-132/212 in vascular smooth muscle cells [J]. Nucleic Acids Res，2019，47（7）：3580-3593.

[12] Li D，Wang X，Huang Q，et al. Cardioprotection of CAPE-oNO against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF-κB pathway in vivo and in vitro [J]. Redox Biol，2018，15：62-73.

[13] Yuan YP，Ma ZG，Zhang X，et al. CTRP3 protected against doxorubicin-induced cardiac dysfunction，inflammation and cell death via activation of Sirt1 [J]. J Mol Cell Cardiol，2018，114：38-47.

[14] Chen CJ，Yu W，Fu YC，et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun，2009，378（3）：389-393.

[15] Luo G，Jian Z，Zhu Y，et al. Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress [J]. Int J Mol Med，2019，43（5）：2033-2043.

[16] Doblado L，Lueck C，Rey C，et al. Mitophagy in human diseases [J]. Int J Mol Sci，2021，22（8）：3903.

[17] Wang B，Yang Q，Sun Y-Y，et al. Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice [J]. J Cell Mol Med，2014，18（8）：1599-1611.

[18] Chang X，Zhang T，Meng Q，et al. Quercetin improves cardiomyocyte vulnerability to hypoxia by regulating SIRT1/TMBIM6-related mitophagy and endoplasmic reticulum stress [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：5529913.

[19] Silva JPD，Monceaux K，Guilbert A，et al. SIRT1 protects the heart from ER stress-Induced injury by promoting eEF2K/eEF2-dependent autophagy [J]. Cells，2020，9（2）：426.

[20] Karbasforooshan H，Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy [J]. Biomed Pharmacother，2017，90：386-392.

[21] Gorski PA，Jang SP，Jeong D，et al. Role of SIRT1 in modulating acetylation of the sarco-Endoplasmic reticulum Ca-ATPase in heart failure [J]. Circ Res，2019，124（9）：e63-e80.

[22] Magyar K，Halmosi R，Palfi A，et al. Cardioprotection by resveratrol：A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease [J]. Clin Hemorheol Microcirc，2012，50（3）：179-187.

[23] Militaru C，Donoiu I，Craciun A，et al. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris：Effects on lipid profiles，inflammation markers，and quality of life [J]. Nutrition，2013，29（1）：178-183.

[24] Eid RA，Bin-Meferij MM，El-Kott AF，et al. Exendin-4 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by upregulation of SIRT1 and SIRT3 and activation of AMPK [J]. J Cardiovasc Transl Res，2020，doi：10.1007/s12265-020-09984-5.

[25] Ding M，Hu L，Yang H，et al. Reduction of SIRT1 blunts the protective effects of ischemic post-conditioning in diabetic mice by impairing the Akt signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2019，1865（6）：1677-1689.

[26] Oka S，Alcendor R，Zhai P，et al. PPARα-Sirt1 complex mediates cardiac hypertrophy and failure through suppression of the ERR transcriptional pathway [J]. Cell Metab，2011，14（5）：598-611.

[27] Li J，Huang J，Lu J，et al. Sirtuin 1 represses PKC-ζ activity through regulating interplay of acetylation and phosphorylation in cardiac hypertrophy [J]. Br J Pharmacol，2019，176（3）：416-435.

[28] Ma S，Feng J，Zhang R，et al. SIRT1 Activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice [J]. Oxid Med Cell Longev，2017，2017：4602715.

[29] Fourny N，Lan C，Sérée E，et al. Protective effect of resveratrol against ischemia-Reperfusion injury via enhanced high energy compounds and eNOS-SIRT1 expression in type 2 diabetic female rat heart [J]. Nutrients，2019，11（1）：105.

[30] Koka S，Aluri HS，Xi L，et al. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 with tadalafil attenuates mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic hearts：Potential role of NO/SIRT1/PGC-1α signaling [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2014，306（11）：H1558-H1568.
[31] Vahtola E，Louhelainen M，Merasto S，et al. Forkhead class O transcription factor 3a activation and Sirtuin1 overexpression in the hypertrophied myocardium of the diabetic Goto-Kakizaki rat [J]. J Hypertens，2008，26（2）：334-344.
[32] Sulaiman M，Matta MJ，Sunderesan NR，et al. Resveratrol，an activator of SIRT1，upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2010，298（3）：H833-H843.
[33] Hoseini A，Namazi G，Farrokhian A，et al. The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease [J]. Food Funct，2019，10（9）：6042-6051.
[34] Yang J，Lin X，Wang L，et al. LncRNA MALAT1 enhances ox-LDL-Induced autophagy through the SIRT1/MAPK/NF-κB pathway in macrophages [J]. Curr Vasc Pharmacol，2020，18（6）：652-662.
[35] Zhang MJ，Zhou Y，Chen L，et al. Impaired SIRT1 promotes the migration of vascular smooth muscle cell-derived foam cells [J]. Histochem Cell Biol，2016，146（1）：33-43.
[36] Miranda MX，Van Tits LJ，Lohmann C，et al. The Sirt1 activator SRT3025 provides atheroprotection in Apoe-/- mice by reducing hepatic Pcsk9 secretion and enhancing Ldlr expression [J]. Eur Heart J，2015，36（1）：51-59.
[37] Venkatasubramanian S，Noh RM，Daga S，et al. Cardiovascular effects of a novel SIRT1 activator，SRT2104，in otherwise healthy cigarette smokers [J]. J Am Heart Assoc，2013，2（3）：e000042.
[38] Zhou L，Zhang S，Bolor-Erdene E，et al. NAMPT/SIRT1 attenuate Ang II-Induced Vascular remodeling and vulnerability to hypertension by inhibiting the ROS/MAPK pathway [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：1974265.
[39] Fry JL，Shiraishi Y，Turcotte R，et al. Vascular smooth muscle Sirtuin-1 protects against aortic dissection during Angiotensin Ⅱ-induced hypertension [J]. J Am Heart Assoc，2015，4（9）：e002384.
[40] Guo Y，Xu C，Man AWC，et al. Endothelial SIRT1 prevents age-induced impairment of vasodilator responses by enhancing the expression and activity of soluble guanylyl cyclase in smooth muscle cells [J]. Cardiovasc Res，2019，115（3）：678-690.
[41] Alcendor RR，Gao S，Zhai P，et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart [J]. Circ Res，2007，100（10）：1512-1521.
[42] Kawai Y，Garduño L，Theodore M，et al. Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2）regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization [J]. J Biol Chem，2011，286（9）：7629-7640.

（收稿日期：2021-07-02；修回日期：2021-08-16）

《中南药学》2022 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流，我刊现在开始启动 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，带基金项目的文章优先刊登；
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

药物分析与检验

色选分级技术在通渭金银花质量等级划分上的应用研究

郭然[1]，代熙[1]，黄厚钰[1]，韦智江[1]，翟玉生[2]，陈耀[2]，李卫东[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 通渭县清凉沅金银花产业扶贫开发有限公司，甘肃 定西 743300）

摘要：目的 研究利用色选机对金银花进行色选分级的科学性，并为通渭金银花制订质量等级标准，以期推进通渭金银花产业的发展和国际贸易进程。**方法** 采集通渭 11 个乡镇经色选机分级后的金银花 44 份，并进行色泽、黄条（含开放花）率、黑头（含黑条）率和枝叶率 4 项外观指标检测，绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草苷和 3 种酚酸总量 5 项成分含量指标以及水分、总灰分和酸不溶性灰分 3 项常规理化指标的测定及分析。**结果** 经色选分级后的 44 份金银花可以被聚为 4 类，且相同等级归为同一类别的样品数占总样品数的 93.18%。**结论** 用色选机对金银花进行质量等级划分具有可行性。

关键词：金银花；色选机；等级；质量标准
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2616-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.025

Color grading technology in the quality classification of *Lonicera japonica* Flos in Tongwei

GUO Ran[1], DAI Xi[1], HUANG Hou-yu[1], WEI Zhi-jiang[1], ZHAI Yu-sheng[2], CHEN Yao[2], LI Wei-dong[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 2. *Qingliang Yuan Honeysuckle Industry Poverty Alleviation Development Co., Ltd. in Tongwei, Dingxi Gansu* 743300)

Abstract: Objective To facilitate the international trade, the rationality and accuracy of color sorter in grading *Lonicera japonica* Flos, and to establish the grade quality standard for Tongwei was honeysuckle. **Methods** Totally 44 samples of *Lonicera japonica* Flos from 11 townships in Tongwei were collected. The color, yellow stripe rate (including blooming flower), black head rate (including black stripe), branch and leaf rate were measured. The content of chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, luteoloside and the total content of the 3 phenolic acids were determined. Besides, the water content, total ash and acid-insoluble ash were also measured. The data were analyzed by IBM SPSS Statistics 26. **Results** The 44 selected samples of *Lonicera japonica* Flos were grouped into 4 categories, and the samples of the same grade in the same category accounted for 93.18% of the total. **Conclusion** The color sorter facililates the grading of *Lonicera japonica* Flos.
Key words: *Lonicera japonica* Flos; color sorter; grade; quality standard

随着新型冠状病毒肺炎疫情在全球蔓延并加重，抗疫成为全人类面临的重要问题。越来越多的临床证明，以“三药三方”为代表的中药在这场抗疫中发挥了重要作用，尤其是连花清瘟胶囊、金花清感颗粒[1-2]，金银花是这两种药物的主要成分药材。金银花质量严重影响药物的临床疗效，其质量控制对人类大健康需求以及金银花产业发展至关重要[3]。研究表明，金银花花蕾的发育程度不同其颜色不同，对应药材的药效成分含量会有差异，两者呈一定相关性[4]，这为金银花的色

基金项目：国家自然科学基金项目（No.31370360）。
作者简介：郭然，女，硕士，主要从事中药资源开发与利用研究，E-mail：guolran@qq.com *通信作者：李卫东，男，博士研究生导师，主要从事中药资源评价与利用研究，E-mail：liweidong2005@126.com

选分级提供了理论依据。色选分级技术已在茶叶、蔬菜等领域广泛应用，物料进入色选机的第一层分选室后，从传感器和背景板间穿过，在光源的作用下，传感器接收颜色信号，经处理后产生输出信号，驱动喷阀工作，将枝叶等异物吹至背部接料斗内流走，其余物料继续下落，经过第二层分选室再次分选后至出料口流走，达到对物料精选和分级的目的[5]。能否通过颜色差异应用色选分级技术进行金银花质量等级划分，是本研究关注的主要问题。自 2013 年以来，北京中医药大学金银花研究团队在通渭县的 11 个乡镇，完成了从金银花北花一号新品种[6-7]的试种、中试，到 2000 亩示范和大面积推广过程。至 2020 年，已累计推广种植金银花 10 万亩，金银花产业成为了当地的经济支柱产业。

本研究以经色选机分级后的通渭金银花为材料，运用现代质量评价手段和多元统计分析方法，验证通渭金银花色选分级技术的科学性，为色选分级技术在金银花产业中的推广和应用提供理论依据。同时，制订通渭金银花质量等级标准，为其产业发展奠定基础。

1　材料与方法

1.1　样品收集

样品分别采自甘肃省定西市通渭县 11 个乡镇，经北京中医药大学李卫东研究员鉴定为忍冬科植物忍冬（*Lonicera japonica* Thunb.）的干燥花蕾或带初开的花。色选机分级为特级、一级、二级和三级，产地加工方式为烘干。样品共计 44 份，详细信息见表 1。

表 1　金银花样品信息

Tab 1　Information of *Lonicerae Japonicae* Flos

编号	产地	外观色泽	色选等级
1	碧玉镇	浅绿	特级
2	碧玉镇	黄绿	一级
3	碧玉镇	黄色少绿	二级
4	碧玉镇	黄色	三级
5	李店乡	绿色	特级
6	李店乡	绿色少黄	一级
7	李店乡	浅黄	二级
8	李店乡	黄色	三级
9	三铺乡	青绿	特级
10	三铺乡	绿色少黄	一级
11	三铺乡	黄色少绿	二级
12	三铺乡	浅黄	三级
13	陇川镇	绿色	特级
14	陇川镇	浅绿少黄	一级
15	陇川镇	浅黄	二级
16	陇川镇	黄色	三级
17	榜罗镇	浅绿	特级
18	榜罗镇	黄绿	一级
19	榜罗镇	浅黄少绿	二级
20	榜罗镇	黄色	三级
21	寺子乡	青绿	特级
22	寺子乡	绿色少黄	一级
23	寺子乡	浅黄少绿	二级
24	寺子乡	浅黄少绿	三级
25	常河镇	浅绿	特级
26	常河镇	浅绿少黄	一级
27	常河镇	浅黄	二级
28	常河镇	黄色	三级
29	新景乡	绿色	特级
30	新景乡	浅绿	一级
31	新景乡	浅黄少绿	二级
32	新景乡	黄色	三级
33	襄南镇	青绿	特级
34	襄南镇	浅绿少黄	一级
35	襄南镇	黄色少绿	二级
36	襄南镇	黄色	三级
37	平襄镇	浅绿	特级
38	平襄镇	浅绿少黄	一级
39	平襄镇	浅绿少黄	二级
40	平襄镇	浅黄	三级
41	鸡川镇	绿色	特级
42	鸡川镇	浅绿少黄	一级
43	鸡川镇	浅黄少绿	二级
44	鸡川镇	黄色	三级

1.2　试药与仪器

绿原酸（批号：MUST-17030620）、异绿原酸 C（批号：MUST-15081414）、木犀草苷（批号：MUST-17030405）（成都曼斯特生物科技有限公司，纯度均≥ 98%），异绿原酸 A（批号：Z05M10X87215）（上海源叶生物科技有限公司，纯度≥ 98%），乙腈 [色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，甲醇、乙醇（分析纯），水为娃哈哈矿泉水。

6CSX-300IIIA（TD3）型人工智能色选机（合肥美亚光电技术股份有限公司），CBM-20A 型岛津高效液相色谱仪（日本岛津公司），KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），1/10 万电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]，粉碎机、马弗炉、电热套、HH-S4A 型电热恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）。

1.3　金银花外观性状检测

以色泽、黄条、开放花、黑头、黑条、枝叶含量等指标对金银花的外观性状进行量化表征[8]。从每份样品中随机称取 10 g 金银花，分离出黄条、开放花、黑头、黑条、枝叶等部分，称定质量（精确至 0.01 g）。由于开放花、黑条数量极少，故分别与黄条、黑头指标合并表征。分别计算以上各部分质量分数，可得到黄条（含开放花）率、黑头（含黑条）率和枝叶率。色泽用连

续排列正整数 1，2，3……进行编码，对纯青花不含黄条者赋值“1”；花浅绿含极少黄条者赋值“2”；花浅绿含较多黄条者赋值“3”；花黄或色难辨者赋值“4”[9]。

1.4 金银花主要活性成分含量测定

按 2020 年版《中国药典》金银花【含量测定】项下方法检测样品中酚酸类和木犀草苷成分含量，其中酚酸类成分包括绿原酸、3，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸（异绿原酸 A）和 4，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸（异绿原酸 C）[10]。

1.5 金银花常规理化指标测定

按 2020 年版《中国药典》金银花【检查】项下规定方法检测样品中的水分、总灰分和酸不溶性灰分[10]。

1.6 数据处理与分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 统计分析软件对金银花样品外观性状、主要活性成分含量和常规理化指标进行描述性统计分析和相关性分析，筛选出与等级和活性成分显著相关的指标，进行系统聚类分析以验证色选机分级的合理性；最后对所有指标进行 K- 均值聚类分析。

2 结果与分析

2.1 金银花外观性状、主要成分及理化指标检测结果

图 1 为产自通渭县李店乡的金银花色选等级图，对应表 1 的样品编号为“5 ～ 8”。44 份金银花外观性状、酚酸类、木犀草苷含量及水分、总灰分和酸不溶性灰分含量测定结果，见表 2。

图 1 通渭李店乡金银花色选等级图

Fig 1 Color grading picture of *Lonicera japonica* Flos

A. 特级（super class）；B. 一级（first class）；C. 二级（second class）；D. 三级（third class）

2.2 金银花各项指标描述性统计

对 44 份金银花样品的上述各指标进行描述性统计分析，并计算变异系数，结果见表 3。各项指标的变异系数在 4.58% ～ 104.87%，除总灰分变异系数为 4.58% 外，其余各项指标的变异系数均＞ 10%，表明除总灰分外，其余各项指标在 44 份金银花样品间存在较大差异。

2.3 相关性分析

对 44 份金银花样品的色选等级与除总灰分外的 11 项指标进行皮尔逊相关性检验，结果见表 4。除酸不溶性灰分外，其余指标与色选等级的相关性有统计学意义。其中外观性状指标、水分和木犀草苷与色选等级成极显著正相关，酚酸类指标含量与色选等级成极显著负相关。因此将上述 4 项外观性状指标和 5 项成分含量指标及水分作为系统聚类分析的变量，以验证色选机分级结果的科学性。

进一步对 4 项外观性状指标和 5 项成分含量指标进行皮尔逊相关性检验，结果见表 5。色泽、黄条（含开放花）率和黑头（含黑条）率与酚酸类成分含量成极显著负相关，与木犀草苷成极显著正相关。即随着色泽变黄，黄条（含开放花）率和黑头（含黑条）率升高，酚酸类成分含量降低，木犀草苷含量则会升高。枝叶率与 4 种成分含量均没有显著性相关关系。分析造成木犀草苷与外观性状成负相关的原因，可能与金银花中黄酮类成分随着金银花的发育呈现先上升后下降的趋势有关[11]。而枝叶率与成分含量没有显著相关关系，主要是因为所取样品中枝叶含量极低，表明色选机能较好地将枝叶从金银花药材中分离出来。上述结果表明，金银花的外观性状在一定程度上可以反映其内在质量，故色选机通过判定金银花外观性状从而对其进行分级，具有科学性。

2.4 系统聚类分析

以上述 4 项外观性状和 5 项成分含量及水分指标为变量，以 44 份样品标准化处理后的数据为个案，采用质心聚类法，余弦度量标准，进行系统聚类分析，得样品聚类谱系图，见图 2。将 44 份样品归为 4 类，Ⅰ类样品 11 份（编号：32、40、16、8、28、4、20、12、44、24、36），参考表 1 对照编号可知 11 份样品均为三级；Ⅱ类样品 8 份（编号：7、23、19、31、11、43、35、39），均为二级；Ⅲ类样品 11 份（编号：1、5、25、29、21、33、9、17、37、13、41），均为特级；Ⅳ类样品 14 份（编号：22、26、2、6、30、34、10、42、14、27、18、38、3、15），其中一级 11 份，二级 3 份，一级占比 78.57%。一级和二级存在部分交叉现象，但相同等级归为同一类别的样品数占总样品数的 93.18%。由此可见，用色选机对金银花进行等级划分具有高度可行性。

表 2　金银花外观性状、主要成分及常规理化指标测定 (%)

Tab 2　Determination of appearances，main components and physical and chemical indexes of *Lonicera japonica* Flos (%)

编号	色泽编码	黄条（含开放花）率	黑头（含黑条）率	枝叶率	绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 C	3 种酚酸总量	木犀草苷	水分	总灰分	酸不溶性灰分
1	1	4.10	0.90	0.02	3.53	2.45	0.19	6.17	0.10	7.91	6.02	0.60
2	2	8.50	1.20	0.05	3.34	2.47	0.20	6.01	0.11	8.43	5.92	0.57
3	3	14.50	2.60	0.10	3.27	1.91	0.16	5.34	0.15	9.71	5.62	0.65
4	3	32.10	3.10	0.70	3.09	1.64	0.14	4.88	0.18	10.10	5.80	0.62
5	1	4.60	1.00	0.01	3.66	2.52	0.19	6.38	0.11	9.00	5.92	0.68
6	2	9.00	1.44	0.20	3.54	2.62	0.22	6.38	0.11	10.12	6.15	0.87
7	3	17.60	2.70	0.10	2.93	1.75	0.16	4.84	0.16	10.21	5.87	0.47
8	4	38.40	2.10	0.20	2.71	1.29	0.13	4.14	0.19	11.59	5.47	0.40
9	1	2.50	0.80	0.40	3.91	3.69	0.28	7.88	0.09	6.17	6.15	0.58
10	2	8.10	1.50	0.10	3.71	2.43	0.19	6.32	0.12	6.89	5.90	0.52
11	3	15.00	2.20	0.80	3.61	2.27	0.18	6.05	0.13	7.03	5.65	0.50
12	4	50.80	3.40	1.30	3.32	2.30	0.18	5.80	0.17	10.42	5.62	0.45
13	1	4.30	0.90	0.09	3.52	3.25	0.23	7.01	0.10	6.06	6.12	0.47
14	2	7.80	1.10	0.80	3.83	3.37	0.20	7.40	0.11	6.50	5.85	0.45
15	4	12.20	1.90	0.40	3.40	2.22	0.14	5.76	0.13	7.45	5.67	0.48
16	4	32.10	2.90	0.40	3.08	2.35	0.14	5.57	0.18	7.89	5.65	0.40
17	1	5.70	0.80	0.20	3.69	2.65	0.18	6.53	0.10	8.67	5.55	0.48
18	2	11.30	1.30	0.80	3.43	2.57	0.16	6.16	0.10	8.93	5.50	0.45
19	3	17.10	1.80	0.70	3.24	2.20	0.15	5.59	0.13	10.71	5.40	0.47
20	4	31.10	2.90	0.80	3.17	2.11	0.13	5.41	0.15	10.76	5.35	0.35
21	1	3.50	1.10	0.30	3.69	3.36	0.22	7.27	0.09	7.38	6.10	0.50
22	2	7.10	2.50	0.09	3.38	2.07	0.14	5.59	0.12	7.70	5.40	0.42
23	3	18.90	2.80	0.11	2.76	2.05	0.12	4.92	0.15	10.02	5.50	0.40
24	3	46.20	4.10	1.30	2.70	2.05	0.12	4.88	0.18	10.69	5.55	0.65
25	1	4.90	1.10	0.03	3.58	2.56	0.18	6.33	0.12	10.25	5.85	0.67
26	2	9.70	2.50	0.05	3.45	2.79	0.20	6.44	0.13	9.88	5.72	0.52
27	4	12.20	3.20	0.20	3.14	2.19	0.15	5.48	0.17	11.09	5.55	0.48
28	4	35.00	3.00	0.50	2.45	1.47	0.12	4.04	0.21	11.27	5.25	0.60
29	1	5.00	0.60	0.07	3.33	2.87	0.18	6.37	0.12	9.84	5.57	0.40
30	1	8.60	1.00	0.60	3.27	2.55	0.16	5.99	0.12	9.34	5.65	0.45
31	2	15.40	2.20	1.10	3.01	2.05	0.14	5.20	0.15	8.94	5.45	0.52
32	4	32.40	3.20	0.30	2.81	1.67	0.12	4.60	0.19	9.14	5.40	0.57
33	1	3.90	0.70	0.12	3.67	3.40	0.24	7.31	0.11	7.39	6.00	0.72
34	2	7.80	1.20	0.03	3.11	1.99	0.16	5.25	0.14	10.41	4.97	0.50
35	3	21.70	2.60	0.10	2.64	1.65	0.11	4.41	0.15	9.76	5.57	0.52
36	4	52.70	2.90	0.30	2.99	2.03	0.15	5.17	0.19	8.37	5.77	0.80
37	1	5.40	0.80	0.01	3.51	2.81	0.19	6.51	0.13	8.50	5.72	0.78
38	2	12.80	1.20	0.03	3.25	2.36	0.15	5.76	0.14	8.03	5.47	0.50
39	2	22.20	2.10	0.01	3.16	1.94	0.13	5.22	0.17	8.09	5.27	0.42
40	4	31.80	2.40	0.40	2.82	1.81	0.13	4.76	0.18	9.16	5.60	0.72
41	1	4.00	1.10	0.01	3.56	2.90	0.21	6.67	0.14	8.18	5.65	0.65
42	2	9.10	2.30	0.02	3.69	2.51	0.18	6.38	0.12	7.17	5.77	0.78
43	3	17.80	2.90	0.50	3.35	2.27	0.15	5.77	0.14	8.03	5.55	0.65
44	4	52.40	3.40	0.90	2.82	1.62	0.11	4.55	0.19	9.87	5.40	0.63

2.5　通渭金银花质量等级标准划分

本研究对通渭金银花的色泽、黄条（含开放花）率、黑头（含黑条）率、枝叶率、绿原酸、木犀草苷、总酚酸、水分、总灰分和酸不溶性灰分 10 项指标进行等级标准划分。并以除色泽外的其余 9 项指标为变量，44 份样品标准化处理后的数据为观测值，进行 K- 均值聚类分析。目前市场上通常将金银花划分为 3 个等级或 4 个等级 [12]，由上述分析发现，若将金银花分为 4 个等级，部分相邻两个等级的指标观测值较为接近，不易区分，并且用色选机进行色选时分 4 级比分 3 级费时费工。故为节约成本和更好地实现“优质优价”，本标准

表 3　金银花各项指标描述性统计分析

Tab 3　Descriptive statistics for various indexes of *Lonicera japonica* Flos

指标	极小值	极大值	均值	标准差	变异系数 /%
色泽	1	4	2.48	1.19	47.98
黄条（含开放花）率 /%	2.50	52.70	17.44	14.47	82.99
黑头（含黑条）率 /%	0.60	4.10	1.99	0.94	47.31
枝叶率 /%	0.01	1.30	0.35	0.36	104.87
绿原酸 /%	2.45	3.91	3.28	0.35	10.82
异绿原酸 A/%	1.29	3.69	2.34	0.54	23.25
异绿原酸 C/%	0.11	0.28	0.17	0.04	22.87
3 种酚酸总量 /%	4.04	7.88	5.78	0.90	15.50
木犀草苷 /%	0.09	0.21	0.14	0.03	22.74
水分 /%	6.06	11.59	8.93	1.44	16.13
总灰分 /%	4.97	6.15	5.66	0.26	4.58
酸不溶性灰分 /%	0.35	0.87	0.55	0.12	22.57

表 4　金银花有效指标与商品等级的相关性分析

Tab 4　Correlation analysis of effective index and commodity grade of *Lonicera japonica* Flos

指标	色选等级	
	r	*P*
色泽	0.941	＜ 0.001
黄条（含开放花）率	0.885	＜ 0.001
黑头（含黑条）率	0.881	＜ 0.001
枝叶率	0.534	＜ 0.001
绿原酸	－ 0.771	＜ 0.001
异绿原酸 A	－ 0.785	＜ 0.001
异绿原酸 C	－ 0.766	＜ 0.001
3 种酚酸总量	－ 0.814	＜ 0.001
木犀草苷	0.874	＜ 0.001
水分	0.480	0.001
酸不溶性灰分	－ 0.123	0.427

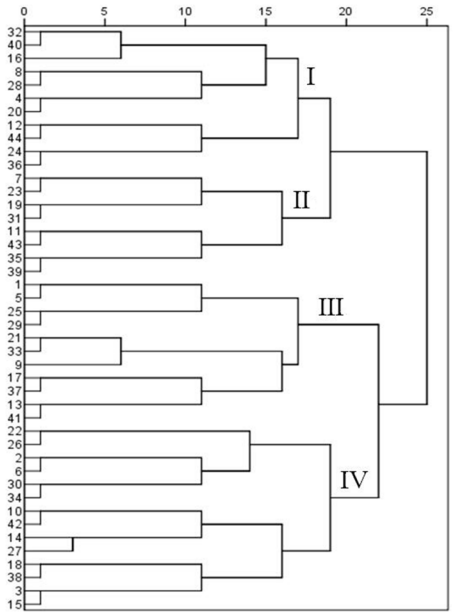


图 2　44 份金银花样品的系统聚类分析树状图

Fig 2　Tree view by hierarchical cluster analysis with 44 samples of *Lonicera japonica* Flos

将金银花质量等级划分为 3 个级，即将 K- 均值聚类结果规定为 3 类。方差分析和聚类结果见表 6 及表 7。由方差分析可知枝叶率和酸不溶性灰分等级间差异未达到显著性水平，故仅作为参考指标列出。根据 K- 均值聚类分析所得最终聚类中心，对通渭金银花制订质量等级标准，结果见表 8。

3　讨论

金银花作为传统大宗中药材，在市场上一直遵循“按质论价、优质优价”的原则。因此，采

表 5　金银花有效成分含量与外观性状指标的相关性分析

Tab 5　Correlation between the content of effective components and appearance of *Lonicera japonica* Flos

指标	色泽		黄条（含开放花）率		黑头（含黑条）率		枝叶率	
	r	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
绿原酸	－ 0.699	＜ 0.001	－ 0.715	＜ 0.001	－ 0.687	＜ 0.001	－ 0.222	0.147
异绿原酸 A	－ 0.749	＜ 0.001	－ 0.658	＜ 0.001	－ 0.697	＜ 0.001	－ 0.158	0.306
异绿原酸 C	－ 0.693	＜ 0.001	－ 0.641	＜ 0.001	－ 0.696	＜ 0.001	－ 0.274	0.072
3 种酚酸总量	－ 0.761	＜ 0.001	－ 0.709	＜ 0.001	－ 0.724	＜ 0.001	－ 0.194	0.206
木犀草苷	0.818	＜ 0.001	0.852	＜ 0.001	0.799	＜ 0.001	0.292	0.055

表 6　金银花等级相关主要指标 K- 均值聚类方差分析

Tab 6　Variance on K-means clustering of main indexes related to *Lonicera japonica* Flos grade

指标	聚类		误差		*F*	*P*
	均方	d_f	均方	d_f		
黄条（含开放花）率	2366.794	2	11.377	38	208.028	＜ 0.001
黑头（含黑条）率	11.056	2	0.283	40	39.041	＜ 0.001
枝叶率	0.324	2	0.065	38	4.979	0.012
绿原酸	1.358	2	0.05	40	27.379	＜ 0.001
木犀草苷	9.521	2	0.275	40	34.606	＜ 0.001
3 种酚酸总量	0.015	2	0	40	63.472	＜ 0.001
水分	10.693	2	1.666	41	6.417	0.004
总灰分	0.443	2	0.038	40	11.648	＜ 0.001
酸不溶性灰分	0.004	2	0.014	40	0.304	0.74

表 7　金银花等级相关主要指标最终聚类中心

Tab 7　Final cluster center of main indexes related to *Lonicera japonica* Flos grade

指标	聚类		
	1	2	3
黄条（含开放花）率 /%	6.42	34.89	16.45
黑头（含黑条）率 /%	1.23	2.93	2.39
枝叶率 /%	0.19	0.52	0.28
绿原酸 /%	3.54	2.95	3.13
木犀草苷 /%	6.42	4.86	5.35
3 种酚酸总量 /%	0.11	0.18	0.15
水分 /%	8.32	10.09	9.03
总灰分 /%	5.83	5.51	5.56
酸不溶性灰分 /%	0.56	0.54	0.53
聚类中心个案数	21	10	13
各级占比 /%	47.73	22.73	29.54

用科学合理的分级方法对金银花产业的发展尤为重要。目前常用的金银花分级方法为传统人工分级法。传统的辨状论质，从感官上对金银花进行等级划分的方式，不仅要求分辨者具有极强的专业能力，而且效率较低，这严重阻碍了金银花产业的发展进程。色选机的出现，较好地解决了这一问题。研究发现，色选机在茶叶、种子、水果和蔬菜的分级或清选中广泛应用，且清选和分级作用非常明显，且色选机根据茶叶和茶梗之间的色差即可对茶进行较好的分级 [5，13]。综上，色选机是一种根据颜色来对物料进行分选的设备。

金银花外观颜色性状与其质量之间存在相关性。熊吟等 [14] 通过研究金银花有效成分含量与颜色值 L^* 之间的相关性发现，L^* 在 43.1% 的程度上受绿原酸、木犀草苷、总黄酮 3 个有效成分影响。王玲娜等 [11] 通过探索不同发育时期金银花颜色和每个花蕾活性成分量的相关性发现，金银花的颜色与活性成分量密切相关，且酚酸类、黄酮类化合物量在二白期（花蕾绿色）、大白期（花蕾绿白色）最高。杨晓芸 [4] 经研究发现，绿原酸、木犀草苷、多酚类、叶绿素含量高低关系为：绿色＞黄绿色＞绿白色＞黄白色＞黄色。这均揭示了传统认为金银花为绿色的质量较好、黄色的质量较差的科学内涵。本研究认为，以金银花外观颜色性状为依据进行色选分级具有科学性。

表 8　通渭金银花质量等级标准划分建议表

Tab 8　Suggestion for classification of grade quality standard of *Lonicera japonica* Flos in Tongwei

等级	色泽	黄条（含开放花）率 /%	黑头（含黑条）率 /%	枝叶率 /%	绿原酸 /%	总酚酸 /%	木犀草苷 /%	水分 /%	总灰分 /%	酸不溶性灰分 /%
一级	青绿含极少黄条	≤ 6.42	≤ 1.23	≤ 0.19	≥ 3.54	≥ 6.42	≥ 0.11	≤ 8.32	≤ 5.83	≤ 0.56
二级	浅绿含部分黄条	≤ 16.45	≤ 2.39	≤ 0.28	≥ 3.13	≥ 5.35	≥ 0.15	≤ 9.03	≤ 5.56	≤ 0.53
三级	色黄或色泽难辨	≤ 34.89	≤ 2.93	≤ 0.52	≥ 2.95	≥ 4.86	≥ 0.18	≤ 10.09	≤ 5.51	≤ 0.54

质量等级标准的制订是金银花色选分级的基础。周洁等 [15] 以 39 份全国不同产区的金银花为样品进行质量等级标准研究，并将金银花划分为 4 个等级，规定绿原酸含量一等≥ 2.04%、二等≥ 2.06%、三等≥ 2.49%、四等≥ 1.50%；木犀草苷含量一等≥ 0.07%、二等≥ 0.05%、三等≥ 0.05%、四等≥ 0.07%。张欢等 [16] 以采自封丘、平邑、巨鹿三大主产区的 34 份金银花为研究对象，进行等级标准划分，规定绿原酸含量一等≥ 2.89%、二等≥ 2.53%、三等≥ 1.98%、四等≥ 1.51%；木犀草苷含量一等≥ 0.078%、二等≥ 0.072%、三等≥ 0.068%、四等≥ 0.052%。冯峰等 [12] 以 2020 年版《中国药典》为依据，并结合采自 21 个不同产区的金银花样品检测结果，建议将金银花质量等级标准划分为 3 个等级，其中绿原酸含量一等≥ 2.30%、二等≥ 1.80%、三等≥ 1.50%；3 种酚酸总含量一等≥ 4.20%、二等≥ 4.00%、三等≥ 3.80%。本研究发现，通渭县栽植的金银花主要药用成分绿原酸和木犀草苷含量高出药典规定的 2 ～ 3 倍。究其原因，可能与当地土壤疏松适宜，日照充足，昼夜温差大，土壤、空气、水资源污染程度低等优势地理条件有关 [17]。

4　结论

通过对采自通渭 11 个乡镇的 44 份金银花样品进行测定与分析，结果证明用色选机对金银花进行等级划分具有可行性。同时，制订通渭金银花质量等级标准，所制订的通渭金银花等级标准要求较高。这将推动通渭金银花走向行业前端，并促进其国际化贸易发展进程。

参考文献

[1] 杨玉莹，窦晓鑫，王方园，等 . 抗新型冠状病毒肺炎“三药三方”之中医理论探讨 [J]. 天津中医药，2020，38（6）：700-705.

[2] Li MW，Wang YX，Jin J，et al. Inhibitory activity of honeysuckle extracts against influenza a virusin vitroandin vivo [J]. Virol Sin，2020，36（3）：1-11.

[3] Wu PL，Wang PS，Gu MY，et al. Human health risk assessment of pesticide residues in honeysuckle samples from different planting bases in China [J]. Sci Total Environ，

2020，759：142747.
[4] 杨晓芸 . 金银花颜色气味与化学成分的相关性研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2013.
[5] 秦军卫，李俊峰 . 色选机品目归类与技术发展探讨 [J]. 农机质量与监督，2019（9）：16-18.
[6] 刘佳，张静茹，李卫东，等 . 花蕾期延长型金银花化学组分及主要药效成分含量变化研究 [J]. 中医药信息，2016，33（2）：16-19.
[7] 张静茹，白根本，李卫东，等 . 花蕾期延长型金银花挥发性成分研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（23）：4340-4343.
[8] 邓爱平，张悦，方文韬，等 . 皮花叶茎及全草类药材商品规格等级标准——以牡丹皮杜仲金银花等 7 种药材为例 [J]. 中国现代中药，2019，21（6）：723-730.
[9] 陈两绵，高慧敏，刘晓谦，等 . 中药材传统商品等级的科学性——以金银花为例 [J]. 中国中药杂志，2020，45（9）：2091-2102.
[10] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：221.
[11] 王玲娜，孙希芳，张芳，等 . 不同发育时期金银花颜色与活性成分的相关性分析 [J]. 中草药，2017，48（15）：3182-3188.
[12] 冯峰，段晓怡，徐美霞，等 . 金银花质量等级标准研究 [J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（18）：6656-6662.
[13] 张皓臻，肖宏儒，梅松，等 . 茶叶分选技术的现状和未来 [J]. 农业工程，2014，4（5）：59-63.
[14] 熊吟，肖潇，闫永红，等 . 基于色度分析原理的金银花有效成分含量与颜色值相关性研究 [J]. 中华中医药学刊，2013，31（3）：667-680.
[15] 周洁，邹琳，刘伟，等 . 金银花商品规格等级标准研究 [J]. 中药材，2015，38（4）：701-705.
[16] 张欢，王恒，郝江波，等 . 金银花药材质量等级标准的划分 [J]. 贵州农业科学，2017，45（5）：80-84.
[17] 张增强，杜银川，魏军团，等 . 通渭县发展金银花产业的优势及对策 [J]. 甘肃农业科技，2017（2）：70-72.

（收稿日期：2021-06-25；修回日期：2021-07-21）

两广地区地龙中 22 种无机元素量变规律研究

陈林明，林晓坤，王智民，杨群华，黄寿辉（广州汇标检测技术中心，广州 510700）

摘要：目的 测定广东、广西地龙中 22 种无机元素含量，并探索其元素量变规律。**方法** 采用电感耦合等离子体质谱法对地龙中 22 种无机元素进行测定，并对其进行直观分析、Mann-Whitney U 检验分析、元素指纹图谱分析、主成分分析、聚类分析、相关分析。**结果** 22 种无机元素在各自线性范围内与测定值线性关系良好（$r \geq 0.999$）。30 份样品中检测出 19 种无机元素，但均未检出 Li、Cr、Ni。绘制了广地龙 22 种无机元素指纹图谱，该谱图具有一定的规律性，K、S 和 Pb 含量较高，其中有害元素 Pb 含量超标明显。通过多种方法分析，发现广西、广东地区地龙呈现出明显差异，其中 Sr、Zn 含量均有显著性差异。**结论** 两广地区地龙中 22 种无机元素的分布呈规律性波动，地龙对环境中 Pb、Sr、Zn 元素具有较强生物富集作用，养殖户应加强对其检测。

关键词：地龙；无机元素；电感耦合等离子体质谱法；变化规律
中图分类号：R286，R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2622-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.026

Quantitative variation of 22 inorganic elements in pheretima from Guangdong and Guangxi

CHEN Lin-ming, LIN Xiao-kun, WANG Zhi-min, YANG Qun-hua, HUANG Shou-hui (*Guangzhou Huibiao Testing Technology Center, Guangzhou* 510700)

Abstract: Objective To determine the content of 22 inorganic elements in pheretima from Guangdong and Guangxi, and explore their changes. **Methods** Totally 22 inorganic elements were

作者简介：陈林明，男，硕士，主管药师，主要从事中药质量标准研究，E-mail：km250292740@126.com *通信作者：林晓坤，男，主要从事中药质量标准研究，E-mail：250292740@qq.com

determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Intuitive analysis, Mann-Whitney U test, elemental fingerprint analysis, principal component analysis, cluster analysis and correlation analysis were conducted. **Results** The linear relationships of 22 inorganic elements were good ($r \geqslant 0.999$). Nineteen inorganic elements in 30 samples were detected except Li, Cr and Ni. The fingerprint of 22 elements was plotted, displaying certain regularity. The content of K, S and Pb was high, and the element Pb exceeded its content standard obviously. There were significant differences between the content of Sr and Zn, as well as the pheretima samples from two origins. **Conclusion** The distribution of the 22 tested inorganic elements in pheretima from Guangdong and Guangxi fluctuates regularly. The pheretima has a strong bioenrichment on Pb, Sr and Zn, so farmers should monitor the detection of such elements.

Key words: pheretima; inorganic element; ICP-MS; changing pattern

地龙又名蚯蚓，始载于《神农本草经》，为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*（E. Perrier）、通俗环毛蚓 *Pheretima vu1garis* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi*（Michaelsen）或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前一种习称“广地龙”，后 3 种习称“沪地龙”。广地龙春季至秋季捕捉，沪地龙夏季捕捉，及时剖开腹部，除去内脏和泥沙，洗净，晒干或低温干燥作即得地龙药材 [1]。

地龙药用能清热定惊、通络、平喘、利尿，在临床主要用于高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂、肺热喘咳、水肿尿少等的治疗 [1]。现代研究表明，地龙具有抗凝血、促进创面愈合等作用，这与其含有的无机微量元素有关 [2]。例如，硫化汞（HgS）就具有中枢神经抑制的药理作用 [3]。但随着工业对土壤与水环境的重金属污染加剧，地龙机体中富集的重金属含量也增加，导致中药地龙重金属超标，使人体健康受到潜在威胁 [4-5]。

目前，中药无机元素含量研究集中在重金属元素，然而，非重金属元素的研究仍然偏少，各类药材的无机元素研究仍不全面 [6]。例如，二氧化硫的检测研究较多，但对于硫元素检测的报道则较少。此外，对于同一种药材，因产地不同而其钾含量存在着巨大差异，如菊花含钾量在 790 ～ 53 200 mg • kg^{-1}[6]。因此，非重金属元素的测定同样具有现实意义。本研究采用电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）对广西、广东地区地龙中 22 种无机元素（5 种常量元素与 17 种微量元素）进行测定，并对元素之间相关性及量变规律进行了分析，为中药地龙的质量评价提供参考。

1　仪器与试药

7900 型电感耦合等离子体质谱（美国安捷伦公司）；ETHOS UP 型微波消解仪（意大利 Milestone 公司）；XPE26 微量天平、XS205DU 电子天平（梅特勒 - 托利多国际贸易有限公司）；DHG-9013A 电热鼓风干燥箱（上海一恒仪器有限公司）；KS-500E1 超声波清洗机（福州瑞豪医疗器械有限公司）；Milli-Q 型超纯水机（Millipore Bedford MA，美国）；TH-Ⅱ型数控薄层显色加热器（上海科哲生化科技有限公司）。

Multi Element Standards 2A 27 种标准溶液包含 Ag、Al、As、Ba、Be、Ca、Cd、Co、Cr、Cs、Cu、Fe、Ga、K、Li、Mg、Mn、Na、Ni、Pb、Rb、Se、Sr、Tl、U、V、Zn（部件号 8500-6940，美国 Agilent 公司，质量浓度 10 mg • L^{-1}）；SPEXertificate 9 种标准溶液包含 Mo、Pd、Re、S、Sb、Si、Sn、Ti、W（批号：1-194AB）、SPEXertificate 20 种标准溶液包含 B、Na、Mg、Al、K、Ca、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Cd、Ba、W（批号：2-192AB）（美国 SPEX 公司，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）；内标溶液：^{73}Ge（批号：GSB04-1728-2004）、^{115}In（批 号：GSB04-1731-2004）、^{209}Bi（批号：GSB04-1719-2004）的单元素标准溶液（1000 μg • mL^{-1}，中国计量科学研究院国家标准物质研究中心）；色谱级硝酸（Fisher scientific 公司）；高纯氩气（福州联创特种气体有限公司）。

30 份样品（编号为 S1 ～ S30）均于 2020 年 5 月购自药材市场，其中 S1 ～ S14 产于广东省，S15 ～ S30 产于广西壮族自治区。所有样品由福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*（E. Perrier）的干燥体（习称“广地龙”）。

2　方法

2.1　溶液的制备

2.1.1　供试品与空白溶液的制备　精密称取样品粉末 0.5 g（过 5 号筛）于微波消解罐中，加硝酸 8.0 mL，放置过夜，按操作规程进行消解处

理：先经 10 min 由室温升温至 130 ℃，并维持 5 min 消解，再 10 min 由 130 ℃升温至 165 ℃，并维持 10 min 消解，然后 15 min 由 165 ℃升温至 180 ℃，并维持 30 min 消解。消解完毕后，放冷，取出消解罐置于加热板上将酸挥尽，冷却后将消解液转移至 50 mL 量瓶，并洗涤消解罐 3 次，洗液合并至量瓶中，用超纯水定容后摇匀，即得供试品溶液。同法同步制备试剂空白溶液试验。

2.1.2　混合对照品溶液的制备　精密量取 Si、S、Ti、W、Pb 的混合对照品母液，标记为混标 1；精密量取元素 Li、Na、Mg、Al、K、Ca、Cr、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr、Cd、Ba 的混合对照品母液，标记为混标 2，用 5%HNO_3 把混标 1 和混标 2 稀释成 5、10、20、50、100 μg • mL^{-1} 的混合对照品。

2.2　*测定条件*

质谱条件：仪器自动调谐设定工作参数，以灵敏度、背景、稳定性等各项指标对仪器的工作参数进行优化。测定条件：等离子射频功率 1550 W，等离子气体 15 L • min^{-1}，辅助气体流量 1 L • min^{-1}，雾化气流量 1 L • min^{-1}，补偿 / 稀释气体 1 L • min^{-1}，雾化室温度 2 ℃，蠕动泵速度 0.3 r • min^{-1}。积分时间 1 s，延迟时间 1 s，重复次数 3 次；测量方式：标准曲线法；读数方式：峰强。以 ^{73}Ge、^{115}In、^{209}Bi 为内标。

2.3　*标准曲线的制备*

根据试样中待测元素的水平配制标准溶液，依次测定 20 种无机元素的系列质量浓度标准溶液，加入 ^{73}Ge、^{115}In、^{209}Bi 内标溶液，同法配制标准空白溶液。Li、Na、Mg、Al、Si、S、K、Ca、Ti、Cr、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Se、Sr 以 ^{73}Ge 为内标，Cd、Ba 以 ^{115}In 为内标，W、Pb 以 ^{209}Bi 为内标。以对照品质量浓度为横坐标（X），以待测元素与相应内标计数值的比值为纵坐标（Y），绘制标准曲线。计算各元素标准品的回归方程、相关系数和线性范围。结果各元素在 0 ～ 100 μg • L^{-1} 与测定值线性关系良好，在测各元素时，记录测量 11 次空白溶液所产生的信号值，计算标准偏差，以 3 倍标准偏差时的浓度作为检测限，详见表 1。

2.4　*方法学考察*

2.4.1　精密度试验　取混合对照品溶液连续进样 6 次，22 种无机元素的 *RSD* 值在 1.2% ～ 3.0%，表明仪器的精密性良好。

2.4.2　重复性试验　精密称取样品（S13）6 份，制成供试品溶液，测定 22 种元素的含量。除 Li、Cr、Ni 未检出，Na、Mg、Al、Si、S、K、Ca、Ti、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Se、Sr、Cd、Ba、W、Pb 的含量均值分别为 0.76、0.69、0.57、0.06、7.96、9.87、0.13、0.01、0.02、0.87、0.01、0.23、0.02、0.01、0.01、0.01、0.02、0.02、16.22 mg • kg^{-1}，对应 *RSD* 值均在 1.6% ～ 3.0%，说明方法重复性良好。

表 1　22 种无机元素的线性回归方程，相关系数，检测限和线性范围

Tab 1　Linear regression equation，relevant coefficient，detection limit and linearity for 22 elements

元素	回归方程	r	检测限 /（μg•mL^{-1}）	线性范围 /（μg•mL^{-1}）
Li	$Y = 1.6091X + 0.0090$	0.9990	0.0001	0 ～ 100
Na	$Y = 12.0919X + 3.2028$	0.9999	0.0098	0 ～ 100
Mg	$Y = 4.4562X + 0.6418$	0.9999	0.0009	0 ～ 100
Al	$Y = 0.8739X + 0.0487$	0.9996	0.0076	0 ～ 100
Si	$Y = 0.5862X + 0.0640$	0.9990	0.0159	0 ～ 100
S	$Y = 0.0033X + 0.0054$	0.9996	0.0243	0 ～ 100
K	$Y = 2.0701X + 0.0893$	0.9999	0.0017	0 ～ 100
Ca	$Y = 0.0588X + 0.0038$	0.9997	0.0122	0 ～ 100
Ti	$Y = 1.2672X + 0.0041$	0.9999	0.0026	0 ～ 100
Cr	$Y = 80.6294X + 4.8625$	0.9999	0.0002	0 ～ 100
Mn	$Y = 24.6421X + 0.1677$	0.9999	0.0001	0 ～ 100
Fe	$Y = 55.5005X + 18.4381$	0.9999	0.0046	0 ～ 100
Ni	$Y = 43.5558X + 1.4701$	0.9994	0.0001	0 ～ 100
Cu	$Y = 113.8286X + 0.3380$	0.9990	0.0002	0 ～ 100
Zn	$Y = 8.7224X + 0.4454$	0.9997	0.0008	0 ～ 100
As	$Y = 6.5683X + 0.0026$	0.9999	0.0001	0 ～ 100
Se	$Y = 0.2109X + 2.6396\times10^{-5}$	0.9998	0.0002	0 ～ 100
Sr	$Y = 23.8556X + 0.0348$	0.9995	0.0001	0 ～ 100
Cd	$Y = 2.2093X + 2.8963\times10^{-4}$	0.9994	0.0003	0 ～ 100
Ba	$Y = 1.5759X + 0.0036$	1.000	0.0001	0 ～ 100
W	$Y = 8.3430X + 0.0033$	0.9998	0.0001	0 ～ 100
Pb	$Y = 0.9852X + 0.0589$	0.9996	0.0001	0 ～ 100

2.4.3　稳定性试验　取样品（S13）1 份，制成供试品溶液，分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 测定 22 种元素的含量。除 Li、Cr、Ni 未检出，其余元素的 *RSD* 值均在 1.3% ～ 2.5%。表明待测溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4　加样回收试验　精密称取已测定的地龙样品（S13）6 份，每份 0.5 g，精密加入一定量的各元素的标准溶液，测定其含量，计算 22 种元素的回收率。除 Li、Cr、Ni 未检出，其余元素回收率分别在 98.7% ～ 103.3%，*RSD* 值均在 1.5% ～ 2.7%。

2.5　*样品含量测定*

按“2.1”项下方法制备各地龙样品的供试品溶液，按“2.2”项下条件测定各样品中 22 种无机元素的含量。30 份地龙样品中 22 种无机元素的含量见表 2。

3　结果与分析

3.1　*直观分析*

由表 2 可知，部分元素含量差别较大。在

表 2　广地龙 22 种元素的含量 (mg・kg^{-1})

Tab 2　Content of 22 elements in pheretima (mg・kg^{-1})

编号	Li	Na	Mg	Al	Si	S	K	Ca	Ti	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Se	Sr	Cd	Ba	W	Pb
S1	—	0.71	0.76	0.69	0.05	8.19	10.59	0.14	0.01	—	0.02	0.87	—	0.01	0.36	0.02	—	0.01	—	0.02	—	29.07
S2	—	0.68	0.74	0.82	0.05	8.60	9.02	0.23	0.01	—	0.14	1.12	—	0.01	0.60	0.01	0.02	0.02	0.01	0.09	—	29.73
S3	—	0.72	0.71	0.42	0.06	9.45	9.82	0.12	—	—	0.02	0.66	—	0.01	0.33	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02	—	33.35
S4	—	0.74	0.68	0.44	0.05	8.03	10.28	0.18	—	—	0.02	0.79	—	0.01	1.00	0.13	0.01	0.01	—	0.02	—	36.84
S5	—	0.79	0.77	0.76	0.03	8.50	10.46	0.18	0.01	—	0.04	1.01	—	0.01	0.37	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	—	28.49
S6	—	0.56	0.71	1.41	0.05	7.60	9.23	0.15	0.01	—	0.10	1.22	—	0.01	0.32	0.01	0.01	0.01	—	0.02	—	41.89
S7	—	0.65	0.77	2.27	0.07	7.67	9.41	0.15	0.04	—	0.06	1.96	—	0.01	0.24	0.01	0.01	0.01	—	0.03	—	39.23
S8	—	0.60	0.70	0.52	0.03	7.83	10.02	0.13	—	—	0.02	0.78	—	0.01	0.34	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	—	30.05
S9	—	0.25	0.70	0.05	0.05	8.13	8.16	0.12	—	—	0.02	0.29	—	—	0.50	0.06	0.01	—	—	—	—	31.85
S10	—	1.02	0.75	0.46	0.10	8.17	11.60	0.14	0.01	—	0.08	0.56	—	0.01	0.68	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	—	31.13
S11	—	0.62	0.74	0.25	0.07	7.56	10.08	0.21	—	—	0.07	0.60	—	0.01	1.01	0.02	0.01	0.04	—	0.04	—	40.17
S12	—	0.64	0.68	0.96	0.06	7.97	9.91	0.18	0.01	—	0.02	1.68	—	0.02	0.32	—	0.01	0.04	0.01	0.10	0.02	46.19
S13	—	0.75	0.71	0.57	0.06	7.99	9.89	0.13	0.01	—	0.02	0.86	—	0.01	0.22	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	16.05
S14	—	0.80	0.83	2.71	0.13	7.94	8.24	0.15	0.08	—	0.08	2.62	—	0.02	0.23	—	0.01	0.01	—	0.02	—	6.54
S15	—	0.72	0.71	1.39	0.05	7.66	9.22	0.28	0.01	—	0.03	1.16	—	0.01	0.20	—	0.01	0.01	—	0.03	—	36.14
S16	—	0.88	0.75	0.77	0.05	7.97	10.78	0.12	0.01	—	0.02	0.91	—	0.01	0.28	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	—	18.02
S17	—	0.89	0.79	0.57	0.05	8.53	11.14	0.17	0.01	—	0.02	0.80	—	0.01	0.30	0.01	0.01	—	0.01	0.02	—	23.74
S18	—	1.15	0.85	1.26	0.05	9.22	8.84	0.20	0.04	—	0.06	1.63	—	0.01	0.17	—	0.01	0.02	—	0.02	—	7.58
S19	—	0.68	0.77	0.80	0.05	8.35	10.52	0.15	0.01	—	0.02	0.75	—	0.01	0.45	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	—	17.54
S20	—	0.64	0.70	0.36	0.06	7.77	10.08	0.19	—	—	0.04	0.73	—	0.01	0.39	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	—	19.71
S21	—	0.70	0.69	0.90	0.06	7.83	8.67	0.14	0.01	—	0.03	0.80	—	0.01	0.37	0.01	0.01	0.01	—	0.01	—	25.38
S22	—	1.04	0.67	0.41	0.12	6.91	10.27	0.11	—	—	0.02	0.53	—	0.01	0.19	0.01	0.01	—	0.01	0.01	—	23.38
S23	—	0.58	0.63	0.40	0.06	8.33	7.72	0.15	—	—	0.12	0.58	—	0.01	0.49	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	—	20.52
S24	—	0.78	0.79	0.46	0.08	8.12	11.26	0.14	—	—	0.02	0.66	—	0.01	0.49	0.01	0.01	0.01	—	0.03	—	25.78
S25	—	0.62	0.72	2.11	0.12	7.89	9.52	0.16	0.02	—	0.04	1.86	—	0.01	0.24	0.02	0.01	0.01	—	0.04	—	22.00
S26	—	0.54	0.73	0.10	0.09	7.66	10.43	0.10	—	—	0.02	0.38	—	—	0.20	0.01	0.01	—	0.01	0.01	—	7.97
S27	—	0.42	0.69	0.20	0.04	7.59	9.16	0.13	—	—	0.01	0.78	—	—	0.15	—	0.01	—	—	0.03	—	20.57
S28	—	1.01	0.74	1.94	0.08	7.13	10.62	0.12	0.01	—	0.04	1.33	—	0.01	0.18	0.01	0.01	—	0.01	0.01	—	26.20
S29	—	0.58	0.73	0.35	0.16	7.68	10.26	0.11	—	—	0.01	0.47	—	—	0.25	0.01	0.01	—	—	0.01	—	24.60
S30	—	0.76	0.77	1.09	0.05	7.37	10.68	0.13	0.01	—	0.02	0.86	—	0.01	0.15	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	—	6.43

注（Note）：“—”为未检出（Stands for not detected）。

30 份样品中，3 种元素 Li、Cr、Ni 均未检出，5 种元素 Ti、Cu、As、Sr、Cd 未检出样品占全部样品的比率分别约为 40%、13%、17%、23%、47%。另外，仅有 2 份样品含有 W。根据现行《中国药典》对地龙规定的部分重金属元素限量标准：重金属总量（以 Pb 计）不得过 30 mg・kg^{-1}，由表 2 可见，有 33.3% 的样品 Pb 超标，同时 Pb 是所有样品中被测元素含量最高的元素，说明广地龙生长环境存在 Pb 污染情况，这可能与两广地区电镀、印染等工业发展有关。

3.2　Mann-Whitney U 检验分析

由于数据属于非正态分布，在 SPSS 23.0 统计软件中，采用 Mann-Whitney U 检验分析广东、广西地龙中各元素含量的差异。结果显示，广东、广西地龙中 Pb、Sr、Zn 含量有明显差异（$P < 0.05$），两地的地龙所含其他 19 种元素含量无显著性差异。

3.3　广地龙无机元素特征图谱分析

根据定量测定的元素结果，将 30 份样品的 22 种元素按原子序数顺序制作含量分布曲线，形成广地龙元素指纹图谱。由图 1 可知 30 份样品呈现相似的峰形，且各元素含量分布呈现规律性的波动。显然，地龙所含 S、K、Pb 元素含量较高，其中含 S 较多可能是由于地龙含有许多带二硫键的核酸酶样蛋白，例如 EWD1、EWD2 等，这些多肽类成分具有良好的抗纤维化作用[7]；但地龙中含 Pb 量最高，值得相关养殖企业关注。

3.3　主成分分析

把 30 份样品的结果代入 SIMCA 14.1 软件中，点击“summary of fit”，得到 2 个主成分，其中 R^2X 为 0.43，Q^2 为 0.125，表明当前 2 个主成分的模型预测能力较差，故不进一步分析各主要成分解析表达式与各样品的主成分综合得分。点击“scores”得到主成分得分图（见图 2），可以看出样品 S14 是 PCA 分析中的异常点，此外，来自广东的地龙 S1 ～ S13（Group 1）基本与主成分 t[2] 成正相关，而来自广西的地龙 S15 ～ S30（Group

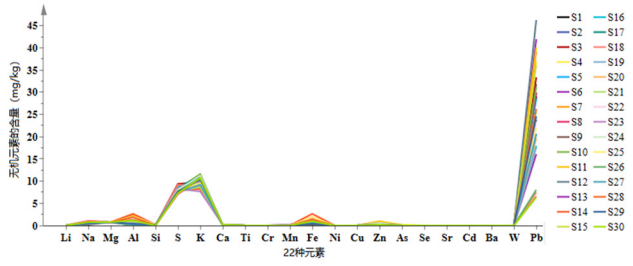


图 1 广地龙 22 种元素指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of 22 elements in pheretima

2）则成负相关，即 PCA 能够区分两个地区的地龙。点击 "loadings"，系统自动剔除 Li、Cr、Ni（均未检出）与 W（所有样品中仅 2 份样品有检出，数据缺乏整体代表性），得到加载散点图（见图 3），18 种元素分布于区间 p[1] －0.2 ～ 0.5，p[2] －0.3 ～ 0.4，说明 18 种无机元素的分布基本呈均匀分散。

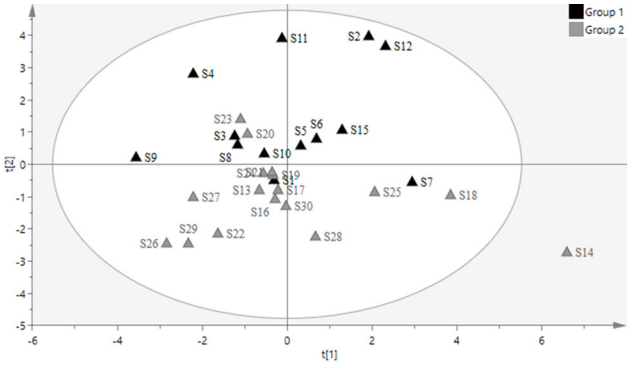


图 2 30 批样品在元素含量主成分的分布图

Fig 2 Distribution of 30 batch samples in principal components of elements' contents

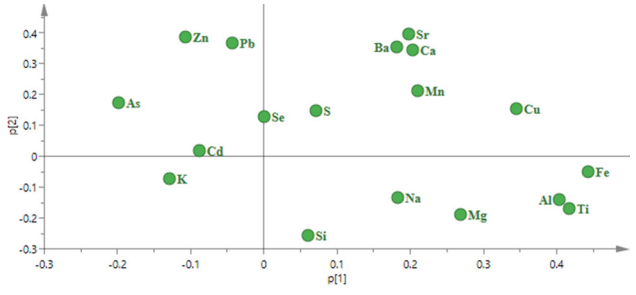


图 3 22 种元素加载散点图

Fig 3 Loading scatter plot for 22 elements

3.4 聚类分析

数据导入 SPSS 软件，平方欧氏距离法，得到系统聚类分析结果，如图 4 所示。所有样品被分成两大类，样品 S1 ～ S12 及 S15 聚成一大类（Group 1），剩余样品聚成另一大类（Group 2）。在 Group 1 中，样品 S1 ～ S12 均来自广东，仅 S15 来自广西类似地，在 Group 2 中绝大部分样品来自广西。说明系统聚类分析无法 100% 区分广东和广西地龙；但从 22 种无机元素含量角度可发现广东、广西地龙之间整体存在明显的差异。具体临床疗效是否存在差别还有待后期深入研究。

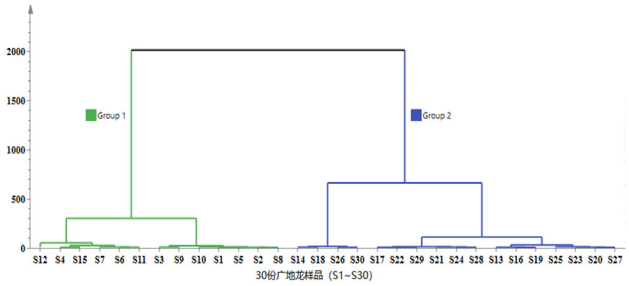


图 4 所有样品聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis for all samples

3.5 相关性分析

除去 Li、Cr、Ni（未检出），对所有样品的剩余 19 种元素含量进行 Person 相关性分析，结果表明，Al、Cu、Fe、Ti 互成正相关（$P < 0.01$），此外成正相关的还有：As 与 Zn；Ba 与 Ca、Sr；Ca 与 Sr；Cu 与 Sr（$P < 0.01$）；Al 与 Mg；Ba 与 Cu、Pb、W；Ca 与 Mn；Cd 与 K、Se；Cu 与 Na；Fe 与 Mg；K 与 Na；Mg 与 Na；Pb 与 Sr、Zn；Sr 与 W、Zn（$P < 0.05$）。成负相关的有：Al 与 Zn；K 与 Mn；Mg 与 Pb（$P < 0.05$）；Mg 与 Ti（$P < 0.01$）。

4 讨论

本研究所测 22 种元素中，5 种为常量元素（Na、Mg、S、K、Ca），其余 17 种为微量元素。其中，人体必需微量元素有 6 种：Fe、Cu、Zn、Se、Cr、Sr，非必需微量元素有 4 种：Ba、Ti、Li、W，可能必需微量元素有 3 种：Mn、Si、Ni，有害元素有 4 种：As、Cd、Pb、Al。参照《中国居民膳食营养素参考摄入量第 2 部分：常量元素》（WST 578.2—2018）标准，所测 30 批地龙样品中，5 种常量元素含量均符合规定。参照《中国居民膳食营养素参考摄入量第 3 部分：微量元素》（WS/T 578.3—2017）标准，所测 30 批地龙样品中，6 种人体必需微量元素含量均符合规定。4 种非必需微量元素的人体正常摄入值暂无标准可依。30 批样品中有害元素 As、Cd 的含量均远低于《中国药典》2020 年版（四部 9302 中药有害残留物限量制订指导原则）规定限量值[8]，但 Pb 含量均超标 1 ～ 8 倍，提示地龙养殖环境存在 Pb 污染。1989 年，世界卫生组织把 Al 列为食品污染源之一，建议每日 Al 摄入量应控制在 4 mg 以下，过多摄入会损害脑细胞，30 批样品中 Al 元素含量均低于 3 mg • kg^{-1}，相对安全。

30 批样品中，除 Pb、Al 外，S、Ka、Fe、Zn

含量较高。其中，生物体内 S 元素是某些蛋白的关键元素，有助于人体软组织损伤的再生修复[9]。地龙富含有一种特殊物质：金属硫蛋白，该蛋白含量高会使 S 含量变高[7]。目前普遍认为 K 对人体有益，但过量摄入会导致心肾功能障碍[10]。研究表明，胎菊、北板蓝根、蝉蜕等药材含 K 超过 3000 mg • kg^{-1}，可能与土壤使用钾肥有关。本研究所测地龙含 K 量均低于 15 mg • kg^{-1}（远低于 3000 mg • kg^{-1}），因此相对安全。Fe 元素是血红蛋白的重要组成成分，主要用于氧气的运输，地龙 Fe 含量高利于其发挥通络之功效。研究表明，Zn 元素利于伤口愈合，其加速创面愈合功效可能与地龙含较多 Zn 有关[10-11]。

本研究发现，主成分分析能够区分广东、广西地区的地龙，这与聚类分析结果一致，说明两广地区的地龙在整体上存在无机元素含量的差异。根据 Mann-Whitney U 检验分析结果可知，该差异主要是由于两个地区地龙中 Pb、Sr、Zn 含量均存在显著差异所致。且相关性分析结果显示 Pb、Sr、Zn 元素的含量互成显著正相关。文献报道，广地龙对 Zn、Pb 具有较强的生物富集作用[11]。类似地，曾林等[12]用不同 Pb 质量分数浓度的土壤驯养地龙，发现地龙对 Pb 的富集量随时间的增加。综上可以推测，两广地区生态环境中 Pb、Sr、Zn 元素的含量存在显著差异；同时，地龙对这 3 种元素具有较强地生物富集作用。

广地龙的主产区如广州、玉林等地，其土壤、水质均存在不同程度的隐性重金属污染[13]。地龙独特的生活习性，使其极易受到土壤环境的影响，尤其是对部分重金属具有自然富集作用，对人体可能存在潜在健康威胁。但有研究证明，地龙中有害元素的风险并不完全取决于有害元素的总量，而是取决于各元素在机体中化合的价态[14]。然而，机体中金属元素的结合状态大多数是未知的，因此只有对其进行结合态以及结合物的毒理研究，才能做出准确的风险评估。目前，只能从养殖方面入手，加强土壤、水质、饲料管理，尽量减少地龙的重金属污染。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：127.

[2] 吴波 . 参环毛蚓对重金属镉离子的生理响应及其变化规律的研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2010.

[3] 王一博，陈朝军，陆景坤，等 . 药用硫化汞理化性质及药效、毒理学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（23）：356-359.

[4] Liu X，Xiao R，Li R，et al. Bioremediation of Cd-contaminated soil by earthworms（*Eisenia fetida*）：Enhancement with EDTA and bean dregs [J]. Environmental Pollution，2020，266：115191.

[5] 张莉，张婷婷，李丹 . 中药材地龙的质量状况研究 [J]. 中国药事，2020，34（7）：825-828.

[6] 王艺舟，曲国峰，李敏，等 . 六种常见中药材钾，硫，铬，锰，钒，锆元素含量的研究 [J]. 核技术，2019，42（6）：47-55.

[7] 刘巧，毕启瑞，谭宁华 . 地龙蛋白多肽类成分的研究进展 [J]. 中草药，2019，50（1）：252-261.

[8] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：520.

[9] 汪子铮 . 常用跌打损伤中药中硫元素的含量测定与研究 [D]. 太原：山西大学，2012.

[10] 胡芮 . 羧甲基壳聚糖锌促进创伤愈合作用的研究 [D]. 青岛：中国海洋大学，2015.

[11] 李晓东 . 不同品种地龙中微量元素及重金属元素含量分析 [J]. 黑龙江科技信息，2016（28）：94.

[12] 曾林，张杰 . 铅在蚯蚓体内富集作用的研究 [J]. 环境科技，2007，20（S2）：1-3.

[13] 赵连华，杨银慧，胡一晨，等 . 我国中药材中重金属污染现状分析及对策研究 [J]. 中草药，2014，45（9）：1199-1206.

[14] 李耀磊，左甜甜，徐健，等 . 基于 ICP-MS 法对 4 种动物源性药材中 16 种无机元素的测定及量变规律研究 [J]. 药物评价研究，2020，43（2）：248-254.

（收稿日期：2020-12-03；修回日期：2021-02-22）

高效液相色谱法测定头孢拉定胶囊有关物质及方法学验证

杜玮炜[1, 2]（1. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂，广州 510515；2. 广东省化学药原料与制剂关键技术研究企业重点实验室，广州 510515）

摘要：目的 建立高效液相色谱法测定头孢拉定胶囊中的有关物质。**方法** 采用高效液相色谱法。色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相 A 为 2.72 g·L^{-1} 磷酸二氢钾（用稀磷酸调节 pH 值至 3.0），流动相 B 为甲醇，进行梯度洗脱；紫外检测波长为 220 nm；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL·min^{-1}。**结果** 头孢拉定胶囊中各杂质峰均分离完全，在相应范围内与峰面积线性关系良好，平均回收率均在 93% ～ 108%。**结论** 本方法操作简便，准确度高，适用于头孢拉定胶囊的有关物质测定。

关键词：头孢拉定；有关物质；高效液相色谱法；方法学验证
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2628-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.027

HPLC determination of related substances in cefradine capsules and validation of methodology

DU Wei-wei[1, 2] (1. *Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou* 510515; 2. *Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical General Factory/Key Laboratory of Key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations of Guangdong Province, Guangzhou* 510515)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of related substances in cefradine capsules by HPLC. **Methods** HPLC was performed on a C_{18} column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase A of 2.72 g·L^{-1} potassium dihydrogen phosphate buffer (adjusting pH to 3.0 with phosphoric acid), and mobile phase B of methanol for the linear gradient elution. The detection wavelength was 220 nm. The column temperature was 30 ℃ , and the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. **Results** Each impurity peak in cefradine capsules was completely separated. The calibration curves were linear in their corresponding ranges, and the recoveries of these impurities were between 93% — 108%. **Conclusion** This simple, accurate method can be used for the determination of related substances in cefradine capsules.

Key words: cefradine; related substance; HPLC; validation of methodology

头孢拉定（cefradine，Velosef）是由百时美施贵宝公司于 1972 年研究成功的第一代半合成头孢类抗菌药物。其适应证为用于敏感菌导致的各种呼吸道、泌尿生殖道及皮肤软组织感染等。除注射剂外，头孢拉定可制成多种口服制剂，包括头孢拉定干混悬剂、头孢拉定片、头孢拉定胶囊和头孢拉定颗粒。

头孢拉定原料有关物质 HPLC 检查方法收载于《中国药典》2020 年版[1]，其有关物质检验方法的色谱条件与含量测定方法（同时测定头孢氨苄含量）相同，以水 - 甲醇 -3.86% 醋酸钠溶液 -4% 醋酸溶液（1564∶400∶30∶6）为流动相等度洗脱各杂质。2020 年版《中国药典》中头孢拉定的各种制剂产品要么没有设置有关物质检查项（头孢拉定干混悬剂和头孢拉定颗粒），要么采用和原料相同的色谱条件进行杂质检验（头孢拉定胶囊、头孢拉定片和注射用头孢拉定）。然而《中国药典》方法具有一定的局限性：对弱保留的杂质分离效果较差[2-3]。起始原料 7-ADCA 峰和二氢苯甘氨酸（杂质 B）峰与溶剂峰保留时间

作者简介：杜玮炜，女，硕士，工程师，主要从事药物质量研究，E-mail：4399661@qq.com

相近（见图 1 和图 2）；其他主要降解杂质杂质 C、D、E 均在 3 ～ 5 min 内出峰（见图 3）。并且按照《中国药典》方法，除头孢氨苄峰和头孢拉定主峰外，起始原料 7-ADCA 作为已知杂质按照外标法定量，而最大的另一个工艺杂质——4'，5'- 二氢头孢拉定峰被认为是其他单杂，在头孢拉定胶囊中按照 2.5% 的限度控制，其他重要的能够体现制剂产品质量的降解产物（杂质 C、D、E）反而不能得到有效的控制。

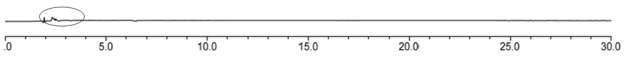


图 1 《中国药典》有关物质测定方法溶剂色谱图

Fig 1　Chromatogram of solvent by ChP method

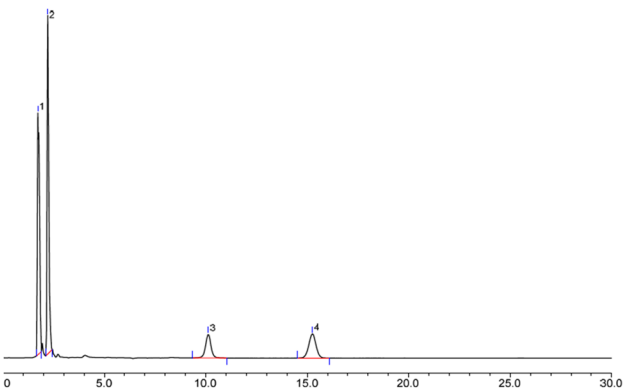


图 2 《中国药典》方法杂质混合对照品溶液色谱图

Fig 2　Chromatogram of mixed impurity standards by ChP method

1.7-ADCA；2. 杂质 B（impurity B）；3. 头孢氨苄（cefalexin）；4. 头孢拉定（cefradine）

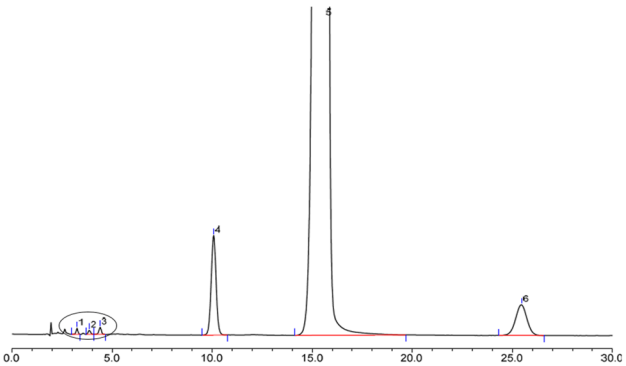


图 3 《中国药典》方法供试品溶液色谱图

Fig 3　Chromatogram of sample by ChP method

1. 杂质 C（impurity C）；2. 杂质 D（impurity D）；3. 杂质 E（impurity E）；4. 头孢氨苄（cefalexin）；5. 头孢拉定（cephradine）；6. 4'，5'-二氢头孢拉定（4'，5'-dihydro-cephradine）

为解决上述问题，本研究参考英国药典 [4] 对方法进行了研究和改进，建立了方便、准确、专属性强及灵敏度高的头孢拉定胶囊有关物质 HPLC 测定法并对其进行了方法学验证。

1　仪器与试药

安捷伦 1260 高效液相色谱仪（DAD 检测器，Agilent 公司），戴安 U-3000 高效液相色谱仪（DAD 检测器，Thermo Fisher 公司），CPA225D 十万分之一电子天平（Sartorius 公司）。头孢拉定胶囊（施贵宝、英国 KENT），头孢拉定（批号：130427-201107，纯度：88.3%）、杂质 A（7-ADCA，批号：130416-201006，纯度：98.5%）（对照品，中国食品药品检定研究院），杂质 B（二氢苯甘氨酸，EP，批号：3.0，纯度：100%）；杂质 C（批号：PILD0701-C01，纯度：96.84%）、杂质 D（批号：PILD0607-D01，纯度：96.84%）、4'，5'- 二氢头孢拉定（批号：PILD1226-EQ01，纯度：98.75%）（对照品，广州牌牌生物科技有限公司）；杂质 E（深圳卓越生物科技有限公司，批号：PILD0419-E08，纯度：98.24%）；杂质 F（批号：1534-079A3，纯度：100%）、杂质 G（批号：2144-023A2，纯度：99.8%）（美国 TLC），甲醇（色谱纯，美国 Merck 公司），其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

2　方法及结果

2.1　色谱条件

色谱柱：费罗门 Luna 5u C_{18}（2）100A（150 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长：220 nm；柱温：30 ℃；进样量：25 μL；流动相：以 2.72 g·L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（用稀磷酸调 pH 至 3.0）为流动相 A，以甲醇为流动相 B，按表 1 进行线性梯度洗脱；流速：1.0 mL·min^{-1}。

表 1　流动相梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution program of mobile phase

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ～ 2.5	99.5 ～ 97	0.5 ～ 3
2.5 ～ 11	97 ～ 75	3 ～ 25
11 ～ 13	75 ～ 60	25 ～ 40
13 ～ 16	60	40
16 ～ 19	60 ～ 20	40 ～ 80
19 ～ 19.1	20 ～ 99.5	80 ～ 0.5
19.1 ～ 25	99.5	0.5

2.2　系统适用性

取头孢拉定对照品和头孢氨苄对照品适量，用流动相 A 溶解并稀释制成每 1 mL 中约各含 0.12 mg 的溶液，取 25 μL 注入液相色谱仪，记录色谱

图，头孢氨苄峰与头孢拉定峰间的分离度为 6.7（不得低于 4.0），符合系统适用性要求，见图 4。

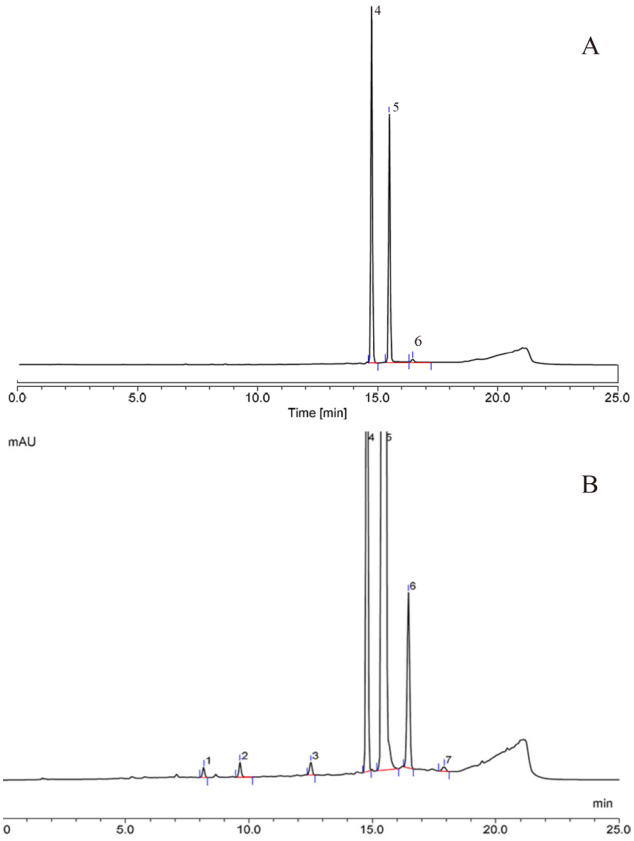


图 4　系统适用性色谱图（220 nm）

Fig 4　Chromatogram of system suitability (220 nm)

A. 对照品（control）；B. 供试品（sample）；1. 杂质 C（impurity C）；2. 杂质 D（impurity D）；3. 杂质 E（impurity E）；4. 头孢氨苄（cefalexin）；5. 头孢拉定（cefradine）；6. 4'，5'- 二氢头孢拉定（4', 5'-dihydrocephradine）

2.3　供试品溶液的配制

取头孢拉定胶囊内容物，精密称取适量，加流动相 A 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 6 mg 的溶液，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.4　对照溶液的配制

精密量取供试品溶液 1.0 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相 A 稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液（1% 自身对照）。

2.5　测定法

分别精密量取供试品溶液和对照品溶液各 25 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。相对保留时间（以下简称 RRT）为 0.52 的峰为杂质 C；RRT 为 0.62 的峰为杂质 D；RRT 为 0.80 的峰为杂质 E；RRT 为 1.06 的峰为 4'，5'- 二氢头孢拉定。杂质 C、D、E 及 4'，5'- 二氢头孢拉定按自身对照法计算含量。

3　方法学验证

3.1　专属性

3.1.1　强制破坏试验　空白溶剂及各辅料对有关物质测定不会造成干扰。样品在酸、碱、氧化、光照、高温等条件下破坏得到的杂质峰均与头孢拉定峰的分离度符合要求（不低于 1.5），降解产物峰之间也具有良好的分离度，各破坏条件下主峰纯度因子均大于 990。通过比较试验前后总峰面积的变化，物料平衡（$A_{破坏后总峰面积}/A_{破坏前总峰面积}\times100\%$）在 90% ～ 110%，方法专属性符合要求，结果详见表 2。

表 2　强制破坏性试验测定结果

Tab 2　Determination of forced degradation test

破坏方式	主峰纯度因子	物料平衡 /%
未破坏	998.234	100.0
酸破坏	995.954	98.4
碱破坏	991.697	90.9
高温破坏	999.585	98.7
氧化破坏	998.256	93.1
高湿破坏	998.917	99.8
光照破坏	996.145	97.5

3.1.2　杂质对照品外加法　取杂质 A、B、C、D、E、4'，5'- 二氢头孢拉定、杂质 F 及杂质 G 适量，分别溶解于流动相 A 后加至供试品溶液中，精密量取 25 μL，注入液相色谱仪，已知杂质无干扰（见图 5）。

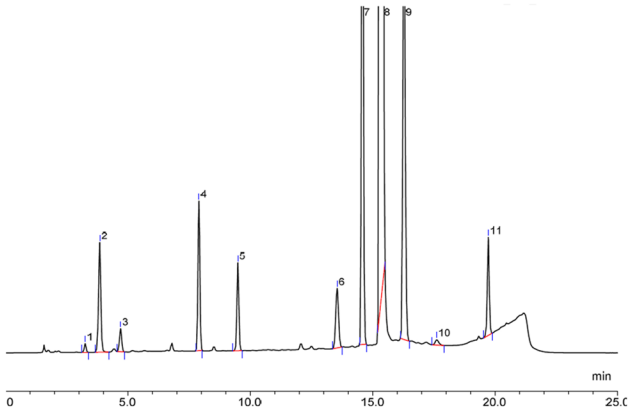


图 5　杂质混合对照品外加溶液色谱图（220 nm 波长）

Fig 5　Chromatogram of mixed impurity standards added in sample solution (220 nm)

2. 杂质 A（impurity A）；3. 杂质 B（impurity B）；4. 杂质 C（impurity C）；5. 杂质 D（impurity D）；6. 杂质 F（impurity F）；7. 头孢氨苄（cefalexin）；8. 头孢拉定（cefradine）；9. 4'，5'- 二氢头孢拉定（4', 5'-dihydrocephradine）；11. 杂质 G（impurity G）

3.2　线性关系及检测限和定量限

通过配制 6 份系列浓度梯度的标准溶液对本方法的线性和范围进行验证。以各杂质浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归。将杂

质对照品溶液稀释至相应的浓度，根据信噪比 10∶1，计算得各杂质的定量限；信噪比 3∶1，计算得各杂质的检测限。结果表明杂质 A ～ G、4'，5'- 二氢头孢拉定及头孢拉定在相应范围内线性符合要求，方法灵敏度符合要求。

表 3　杂质线性方程、检测限和定量限结果

Tab 3　Regression equation，LOD and LOQ of impurities

化合物	线性方程	范围 /（μg • mL^{-1}）	R^2	定量限（LOD）/%	检测限（LOQ）/%
杂质 A	$Y = 0.535X + 0.196$	1.5 ～ 60.6	0.999	0.011	0.003
杂质 B	$Y = 0.122X - 0.028$	1.5 ～ 59.2	0.999	0.076	0.023
杂质 C	$Y = 0.319X + 0.168$	3.1 ～ 124.0	0.999	0.011	0.003
杂质 D	$Y = 0.310X + 0.003$	1.6 ～ 64.7	1.00	0.0023	0.0007
杂质 E	$Y = 0.612X - 0.007$	6.2 ～ 121.5	1.00	0.0004	0.0001
杂质 F	$Y = 0.377X - 0.116$	1.5 ～ 60.5	0.999	0.020	0.006
4'，5'- 二氢头孢拉定	$Y = 0.385X + 0.462$	8.5 ～ 339.9	0.999	0.014	0.004
杂质 G	$Y = 0.416X - 0.057$	1.5 ～ 60.4	1.00	0.004	0.0013
头孢拉定	$Y = 0.397X + 0.754$	1.6 ～ 65.4	0.999	0.006	0.002

3.3　准确度、精密度及耐用性试验

通过杂质对照品加样回收试验计算方法准确度；结合重复性和中间精密度判断方法精密度；改变柱温、流速、检测波长、流动相 pH 对方法耐用性进行验证，结果见表 4 ～ 5，表明该方法适用于头孢拉定胶囊有关物质检测。

表 4　验证项目测定结果

Tab 4　Determination of validation

验证项目	验证结果
准确度（各杂质在低浓度、中浓度、高浓度下的回收率）	杂质 A：95% ～ 101%；杂质 B：94% ～ 101%；杂质 C：98% ～ 105%；杂质 D：103% ～ 108%；杂质 E：95% ～ 101%；杂质 F：101% ～ 108%；杂质 G：101% ～ 107%；4'，5'- 二氢头孢拉定：93% ～ 103%；方法准确度符合要求
精密度	各杂质仪器精密度测定的 *RSD* 为 0.040% ～ 0.28%；重复性 *RSD* 为 1.5% ～ 2.6%；中间精密度 *RSD* 为 2.1% ～ 6.1%，符合可接受标准。方法精密度符合要求

表 5　耐用性试验结果

Tab 5　Durability test

色谱条件	杂质含量 /%								分离度
	杂质 A	杂质 B	杂质 C	杂质 D	杂质 E	杂质 F	杂质 G	4'，5'- 二氢头孢拉定	
标准条件	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.08	0.07	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.4
25 ℃	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.07	0.07	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.2
35 ℃	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.08	0.07	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.3
0.9 mL • min^{-1}	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.08	0.07	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.7
1.1 mL • min^{-1}	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.08	0.08	＜ LOD	＜ LOD	0.9	5.4
215 nm	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.08	0.07	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.4
225 nm	＜ LOD	＜ LOD	0.05	0.07	0.06	＜ LOD	＜ LOD	1.0	5.4
pH 2.8	＜ LOD	＜ LOD	0.03	0.06	0.07	＜ LOD	＜ LOD	0.9	5.9
pH 3.2	＜ LOD	＜ LOD	0.04	0.07	0.06	＜ LOD	＜ LOD	1.0	6.2

3.4　样品测定

取国内外上市头孢拉定胶囊样品 5 批，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，采用“2.1”项下色谱条件测定有关物质，结果见表 6。在 5 批头孢拉定胶囊制剂中均未检出杂质 A、杂质 B、杂质 F 和杂质 G，除去工艺杂质 4'，5'- 二氢头孢拉定外，最大单杂均为杂质 E。国内地产化原研产品（施贵宝）的有关物质略好于国外上市（英国 KENT）的同品种制剂。

4　讨论

《中国药典》采用外标法控制杂质 A（7-ADCA）不得过 1.0%，而杂质 A（7-ADCA）在国内上市的 390 批次头孢拉定胶囊 [2] 和国内外上市制剂（施贵宝、英国 KENT）以及强制破坏样品中均未检出。较为复杂的外标法操作显得必要性不强，并且药典对杂质 A（7-ADCA）规定标准过

表 6 头孢拉定胶囊有关物质测定结果 (%)

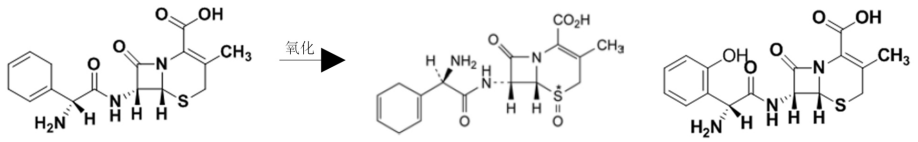
Tab 6 Determination of related substances in samples (%)

厂家	规格	批号	杂质 C	杂质 D	杂质 E	4'，5'- 二氢头孢拉定	其他最大单一杂质	总杂质
施贵宝	0.25 g	AAN0199	0.08	0.14	0.25	1.2	0.06	0.53
		AAV5025	未检出	0.07	0.24	1.2	未检出	0.31
英国 KENT		0002D5	0.15	0.17	0.32	1.4	0.08	0.90
		0002D6	0.14	0.17	0.30	1.2	0.08	0.94
		0001D7	0.14	0.21	0.28	1.2	0.09	1.0

高，需要进行适当的降低。

4'，5'- 二氢头孢拉定是头孢拉定合成的工艺产物（还原产物），其含量稳定，不会随着稳定性留样过程而增加。英国药典中 4'，5'- 二氢头孢拉定用含量测定方法测定（检测波长 254 nm），限度定为 2.0%（外加校正因子 1.6），并将 4'，5'- 二氢头孢拉定、头孢氨苄和头孢拉定一起作为活性成分计入含量。虽然《中国药典》的色谱条件和英国药典不同，但有关物质的检测波长也是 254 nm，从理论上判断，两种方法中 4'，5'- 二氢头孢拉定的校正因子应相当，《中国药典》中有关物质单个杂质 2.5% 的限度算上校正因子其实为 4.0%，显著高于英国药典的这一限度。在全国范围内选择 9 个代表性头孢拉定制剂生产地区，从中随机抽取 20 批头孢拉定胶囊（每个地区 1 ～ 4 批），有关物质最大单杂为 1.2% ～ 1.7%[5]，显著小于《中国药典》中有关物质单个杂质 2.5% 的限度要求，进一步说明药典规定标准过高。而本研究提供的方法，用 220 nm 检测 4'，5'- 二氢头孢拉定，校正因子经计算在 0.9 ～ 1.1（1.03），适合用自身对照法定量。

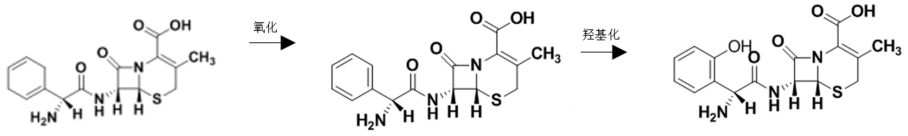
除头孢菌素外（头孢拉定、头孢氨苄、4'，5'- 二氢头孢拉定），杂质 C、杂质 D 和杂质 E 的含量较大（其降解见图 6 ～ 7），且随稳定性放样时间的延长及稳定性放样温度的升高而增长，其含量可反映头孢拉定降解水平，有必要对其进行限量规定。



头孢拉定　　杂质 C/ 杂质 D

图 6 杂质 C、D 降解机制图

Fig 6 Degradation mechanisms of impurity C and impurity D



头孢拉定　　头孢氨苄　　杂质E

图 7 杂质 E 降解机制图

Fig 7 Degradation mechanisms of impurity E

综上所述，《中国药典》标准中头孢拉定有关物质方法杂质分离效果不佳，单杂限度过高，且对反映头孢拉定胶囊降解水平的杂质 C、杂质 D 和杂质 E 无法控制。本研究建立的头孢拉定胶囊有关物质分析方法，能更有效的分离出各杂质，且简单、灵敏，专属性高，适用于头孢拉定胶囊有关物质的测定。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：324-326.

[2] 杨志荣，凌云，周京红 . 头孢拉定胶囊有关物质的研究 [J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15（104）：228，129.

[3] 刘成红，魏立平，吴艳，等 . 头孢拉定胶囊有关物质的研究 [J]. 中国抗生素杂志，2014，39（1）：36-39，44.

[4] European Pharmacopoeia 9.0 [S]. Strasbourg：European Directorate for the Quality of Medicines，2017：1788-1789.

[5] 张斗胜，李进，顾立素，等 . 2005 年国产头孢拉定制剂监督抽验结果与质量评价 [J]. 药品评价，2006，3（1）：53-56.

（收稿日期：2021-06-21；修回日期：2021-08-20）

芪苓益肾颗粒高效液相色谱指纹图谱物质基准研究及7种成分含量测定

王隆隆[1]，杨忠杰[1]，张海风[1]，陈恒文[2]，杜跃亮[1]，吴作敏[1]，王韵旨[1]，宁萌[1]，于晓涛[1*]（1.漯河市中心医院，河南　漯河　462300；2. 中国中医科学院广安门医院，北京　100000）

摘要：目的　建立芪苓益肾颗粒物质基准的高效液相色谱指纹图谱，并建立同时测定其 7 种指标成分含量的方法。**方法**　采用 GL Sciences ODS-3（5 μm，4.6 mm×250 mm）色谱柱，0.05% 磷酸 - 水 - 乙腈为流动相梯度洗脱，流速 1 mL • min $^{-1}$，柱温 35 ℃，检测波长 254 nm。通过相似度分析，对共有峰进行归属。采用聚类分析，主成分分析及正交偏最小二乘法 - 判别分析对指纹图谱数据进行评价，并筛选关键性成分，测定 7 种活性成分的含量。**结果**　15 批芪苓益肾颗粒物质基准的对照指纹图谱的相似度均超过 0.93，标定了 22 个共有峰，指认了 18 个色谱峰。15 批物质基准分为两类，并筛选出 5 种关键性成分，分别是峰 10（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、峰 17（芒柄花苷）、峰 18（毛蕊异黄酮）、峰 1 及峰 20（芒柄花素）。同时测定了毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯共 7 种成分的含量，各物质基准的质量分数范围分别是 1.09 ～ 1.68、0.27 ～ 0.63、0.06 ～ 0.45、0.51 ～ 0.99、0.31 ～ 0.68、0.29 ～ 0.59、0.25 ～ 0.96 mg•g $^{-1}$。**结论**　该方法操作简单、重复性、稳定性较好，可为该制剂物质基准的质量控制与评价提供参考。

关键词：芪苓益肾颗粒；物质基准；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2633-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.028

HPLC fingerprint of Qiling Yishen granules and the determination of 7 components

WANG Long-long[1], YANG Zhong-jie[1], ZHANG Hai-feng[1], CHENG Heng-wen[2], DU Yue-liang[1], WU Zuo-min[1], WANG Yun-zhi[1], NING Meng[1], YU Xiao-tao[1*] (1. *Centralis Hospitalis Luohe*, *Luohe Henan* 462300; 2. *Guang'anmen Hospital*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100000)

Abstract: Objective　To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for the Qiling Yishen granules substance standard, and to simultaneously determine the contents of 7 index components. **Methods**　GL Sciences ODS-3 (5 μm, 250 mm×4.6 mm) chromatographic column was used with 0.05% phosphoric acid-water (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was 1 mL • min $^{-1}$, the column temperature was 35 ℃ , and the detection wavelength was 254 nm. The total peak was assigned by similarity analysis. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the fingerprint data and screen the key components. The contents of 7 active ingredients was determined. **Results**　The similarity of the control fingerprint spectrum based on the Qiling Yishen granule. Totally 22 consensus peaks were standardized, and 18 columns peaks were identified. CA, PCA and OPLS-DA divided the 15 batches of material standards

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82074396）；河南省医学科技攻关计划（No.LHGJ20191429）；漯医专〔2021〕207 号（2021LYZKJXM046）；河南省工程研究中心（豫发改高技〔2019〕569 号）；漯河市工程技术研究中心（漯科 [2018]88 号）；漯河市创新型科技团队（漯科 [2018]88 号）。

作者简介：王隆隆，男，中药师，主要从事院制剂研发与质量标准控制，E-mail：wall0395@163.com　*通信作者：于晓涛，男，副主任药师，主要从事医院制剂管理与制剂研发，E-mail：lhyxt001@163.com

into two categories. Five key components were screened out, namely peak 10 (calycosin 7-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside), peak 17 (formononetin), peak 18 (calycosin), peak 1 and peak 20 (formononetin). The contents of 7 components including verbasil glucoside, ferulic acid, ligustride Ⅰ, formononetin, calycosin, formononetin, and ligustilide were at 1.09 － 1.68, 0.27 － 0.63, 0.06 － 0.45, 0.51 － 0.99, 0.31 － 0.68, 0.29 － 0.59, 0.25 － 0.96 mg • g^{-1}. **Conclusion** The method is simple, reproducible, and stable, which can provide reference for the quality control and evaluation of the preparation material standard.

Key words: Qiling Yishen granule; material standard; fingerprint; content determination

芪苓益肾颗粒由黄芪、当归、茯苓、枸杞子 4 味药材组成，是根据经典名方《当归补血汤》结合本院长期临床应用加减形成的有效临床验方，进而研制而成的新制剂，具有益气养血、健脾益肾等功效，临床用于气血两亏、脾肾不足所知的头晕目眩、面色萎黄、食少纳差、气短无力、病后体虚。对肿瘤化疗后白细胞减少、慢性肾功能不全、蛋白尿等疗效显著。

目前中药新药研发较为困难，其难点就在于不同产地、批次的中药饮片对复方中物质基准的影响不易控制[1-4]。而中药复方指纹图谱注重完整性，中药化学模式识别强调差异性，两者结合即保证了中药数据的完整性又能揭示不同批次间的差异[5-7]，可为中药质量的控制提供标准。因此，本研究应用 HPLC 法建立 15 批芪苓益肾颗粒的指纹图谱，通过指纹图谱相似度评价，并结合聚类分析（CA）、主成分分析（PCA）及正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLSDA）法，综合比较不同批次间的差异并查找产生差异的因素，同时对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯 7 种成分进行含量测定，为芪苓益肾颗粒的开发和质量控制提供参考，进一步为制剂工艺及药效研究提供依据[8-11]。

1 材料

高效液相色谱仪（日本岛津 LC-20AD 型，包括二元泵，全波长紫外检测器，柱温箱，自动进样器，工作站）；DHG-9070 型电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；SB25-12D 超声波清洗机（宁波新芝生物科技有限公司）；FW-80 型微型高速万能试样粉碎机（天津市工兴电器厂）；AUW-120D 型十万分之一电子天平（日本 SHIMADZU 公司）；Milli-Q 超纯水机（美国 Millipore 公司）；5810R 高速离心机（美国 Eppendorf 公司）。

对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：111920-201606，纯度：97.6%）、阿魏酸（批号：110773-201614，纯度：99.0%）（中国食品药品检定研究院）；洋川芎内酯Ⅰ（批号：DSTDY000901，纯度：99.45%）、芒柄花苷（批号：DSTDC004401，纯度：98.99%）、毛蕊异黄酮（批号：DST-18120901，纯度：99.84%）、芒柄花素（批号：DST-19033005，纯度：99.03%）、藁本内酯（批号：DST190315-007，纯度：98.52%）（成都德思特生物科技有限公司）；乙腈、甲醇均为色谱纯（美国 Fisher 公司）；磷酸为色谱纯（天津科密欧化学试剂有限公司）；乙醇为分析纯；水为饮用水或超纯水。

制备 15 批芪苓益肾颗粒所用的中药饮片均来自道地药材主产区或栽培品主产区，具体信息见表 1。经郑州大学药学院贾陆教授鉴定，黄芪为豆科植物蒙古黄芪（*Astragalus mongholicus* Bunge）的干燥根；当归为伞形科植物当归（*Angelica sinensis*）的干燥根，茯苓为多孔菌科真菌茯苓 [*Poria cocos*（Schw.）Wolf] 的干燥菌核，枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实，均符合 2020 年版《中国药典》一部相关项下规定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[11-12]

采用 GL Sciences ODS-3（5 μm，4.6 mm×250 mm，UP）色谱柱，以（0.05% 磷酸 - 水）（A）- 乙腈（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 10 min，11%B；10 ～ 40 min，11% ～ 27%B；40 ～ 50 min，27%B；50 ～ 65 min，27% ～ 40%B；65 ～ 75 min，80%B；75 ～ 80 min，80%B；80 ～ 81 min，80% ～ 11%B；81 ～ 100 min，11%B）；柱温 35 ℃；进样量 10 μL；流速 1 mL • min^{-1}，检测波长 254 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯对照品适量，加甲醇分别制成质量浓度为 1.86、1.92、1.75、2.14、2.02、1.96、1.42 mg • mL^{-1} 的对照品储备液；精密量取上述各储备液适量，混匀，制得各成分质

表 1　15 批芪苓益肾颗粒药材产地信息

Tab 1　Origin of 15 batches of Qiling Yishen granules

批次	产地			
	黄芪	当归	茯苓	枸杞子
S1	山西	湖北	云南	青海
S2	山西	甘肃岷县	安徽安庆	宁夏
S3	山西	甘肃渭源	安徽岳西	青海
S4	山西	甘肃岷县	云南	甘肃中宁
S5	山西	湖北	安徽岳西	甘肃中宁
S6	内蒙古	甘肃岷县	安徽安庆	宁夏
S7	内蒙古	甘肃渭源	安徽岳西	宁夏
S8	内蒙古	湖北	云南	青海
S9	内蒙古	甘肃渭源	安徽岳西	青海
S10	内蒙古	湖北	云南	甘肃中宁
S11	甘肃	甘肃岷县	云南	宁夏
S12	甘肃	甘肃岷县	安徽岳西	宁夏
S13	甘肃	甘肃渭源	安徽安庆	青海
S14	甘肃	甘肃渭源	安徽安庆	甘肃中宁
S15	甘肃	湖北	安徽安庆	甘肃中宁

量浓度为 181.18、20.04、17.10、24.60、44.82、29.24、50.42 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液（纯度均已折算），密封保存。

2.2.2　供试品溶液　依据芪苓益肾颗粒处方称取饮片，按工艺方法制备 S1 ～ S15 共 15 批芪苓益肾颗粒，为干燥细粉。取样品 5 g，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加 50% 甲醇 30 mL，超声 0.5 h，用 50% 甲醇补足失重，13 000 r • min^{-1} 离心 3 min，取上清液为供试品溶液。

2.2.3　阴性样品溶液　分别制备缺黄芪、当归、茯苓、枸杞子的阴性样品细粉，参照“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3　*方法学验证*

2.3.1　精密度试验　取芪苓益肾颗粒供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均≤ 1.0%，各色谱峰相对峰面积的 *RSD* 均≤ 1.6%，表明仪器精密度良好。

2.3.2　重复性试验　取芪苓益肾颗粒样品（样品 S11），平行制备供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件测定，以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均≤ 0.9%，各色谱峰相对峰面积的 *RSD* 均≤ 1.1%，表明方法重复性良好。

2.3.3　稳定性试验　取芪苓益肾颗粒供试品（样品 S11）适量，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、6、9、24、48 h 测定，以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均≤ 1.0%，各色谱峰相对峰面积的 *RSD* 均≤ 2.0%，表明供试品在 48 h 内稳定。

2.4　*芪苓益肾颗粒 HPLC 指纹图谱研究*

按“2.2.2”项下方法制备 15 批芪苓益肾颗粒供试品溶液（S1 ～ S15），按“2.1”项下色谱条件测定，记录各色谱图。

2.4.1　参照峰的选定　在 15 批芪苓益肾颗粒供试品溶液色谱图中毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留时间适中、峰面积大且稳定、分离度高，故以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰 [13]。

2.4.2　相对保留时间和相对峰面积　计算 15 批芪苓益肾颗粒指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果显示，各共有峰保留时间的 *RSD* 均小于 0.22%，表明 15 批样品共有峰的出峰时间相对稳定；各共有峰峰面积 *RSD* 相差较大，说明芪苓益肾颗粒各成分批次间存在差异。

2.4.3　芪苓益肾颗粒 HPLC 指纹图谱相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对 15 批芪苓益肾颗粒供试品色谱图进行分析。以 S11 为参照图谱（采用中位数法、时间宽度为 0.1 min），进行多点校正和峰匹配，15 批芪苓益肾颗粒 HPLC 色谱图及对照图谱叠加图，见图 1。共标定了 22 个共有峰，以对照图谱为参照进行相似度计算，15 批供试品的相似度均大于 0.93，分别为 0.975、0.939、0.938、0.939、0.984、0.986、0.972、0.99、0.983、0.988、0.985、0.986、0.987、0.982、0.981。表明所建立的芪苓益肾颗粒指纹图谱质量稳定，可以反映其指纹特征。

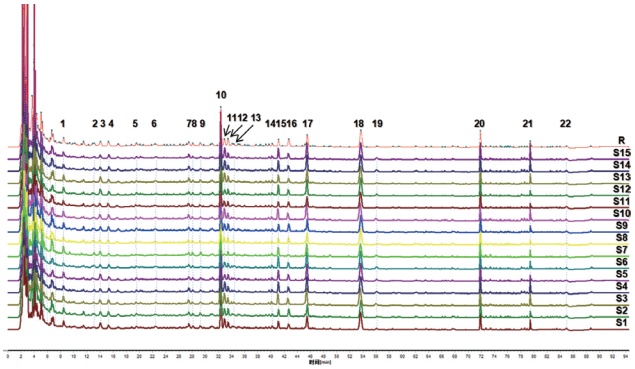


图 1　15 批芪苓益肾颗粒 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱（R）

Fig 1　HPLC fingerprint and control fingerprint（R）of 15 batches of Qiling Yishen granules

2.4.4　芪苓益肾颗粒共有峰化学成分指认及归属

取芪苓益肾颗粒供试品溶液、阴性样品溶液、混合对照品液进样分析，按“2.1”项下色谱条件测定，结果见图 2。经与化学对照品色谱（S6）、当归阴性色谱（S1）、茯苓阴性色谱（S2）、枸杞子阴性色谱（S3）、黄芪阴性色谱（S4）及供试品

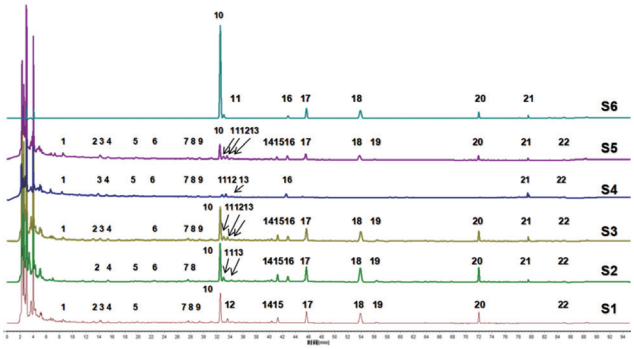


图 2 芪苓益肾颗粒共有峰化学成分指认及归属 HPLC 图

Fig 2 HPLC of chemical composition identification and attribution of common peaks of Qiling Yishen granules

S1. 当归阴性样品溶液（negative sample without Angelica）；S2. 茯苓阴性样品溶液（negative sample without Poria cocos）；S3. 枸杞子阴性样品溶液（negative sample without Chinese wolfberry）；S4. 黄芪阴性样品溶液（negative sample without Astragalus membranaceus）；S5. 供试品（sample）；S6. 混合对照品（mixed reference）；10. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（calycosin 7-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside）；11. 阿魏酸（ferulic acid）；16. 洋川芎内酯Ⅰ（ligustride Ⅰ）；17. 芒柄花苷（formononetin）；18. 毛蕊异黄酮（calycosin）；20. 芒柄花素（formononetin）；21. 藁本内酯（ligustilide）

色谱（S5）比较共指认了 18 个色谱峰，分别为峰 6、峰 11（阿魏酸）、峰 13、峰 16（洋川芎内酯Ⅰ）及峰 21（藁本内酯）归属于当归，峰 1、峰 3、峰 9 及峰 12 归属于茯苓，峰 5 归属于枸杞子，峰 2、峰 10（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、峰 14 ～ 15、峰 17（芒柄花苷）、峰 18（毛蕊异黄酮）、峰 19、峰 20（芒柄花素）归属于黄芪。

2.4.5 聚类分析（CA） 采用 z-score 标准化法将 15 批芪苓益肾颗粒供试品 22 个共有峰的峰面积进行数据处理，将处理后数据导入 SPSS 21 数据分析软件进行聚类分析 [16-17]，测量区间为平方欧氏距离，聚类结果见图 3。当平方欧式距离为 9 时，可将 15 批芪苓益肾颗粒样品分为两类，其中 S1、S2、S3、S4、S5、S6 聚合为一类，其余样品聚为一类。聚类结果表明，不同批次样品存在差异，与药材的不同产地来源具有一定相关性，例如，聚合为一类的 S1 ～ S5 中的黄芪产地均来自山西，聚合为一类的 S9、S13、S14 中当归的产地均来自甘肃渭源，聚合为一类的 S7、S11、S12 中的枸杞子产地均来自宁夏，药材来源产地不同对样品质量差异的控制产生一定影响。

2.4.6 主成分分析（PCA） 采用 SPSS 21 和 SIMCA 14.1 软件对 15 批样品共有峰峰面积标准化和处理，进行主成分分析 [18]。以特征值＞ 1 为提取标准，共提取出 5 个主成分，分别是峰 10（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、峰 17（芒柄花苷）、峰 18（毛蕊异黄酮）、峰 1、峰 20（芒柄花素），得

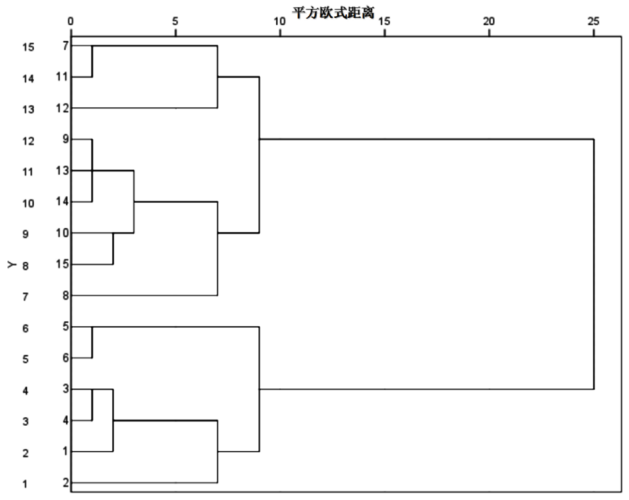


图 3 15 批芪苓益肾颗粒聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 15 batches of Qiling Yishen granules

到主成分的累积方差贡献率 92.6%，能概括样品数据的绝大部分信息，故选取 5 个主成分进行评价，在 5 个主成分中特征值较大的是主成分 1，其累积方差贡献率达 74.285%。同时，图 4 主成分分析结果可知 PCA 将 15 批芪苓益肾颗粒分为两类，S1 ～ S6 聚合为一类，S7 ～ S15 聚合为一类，与聚类分析结果一致。

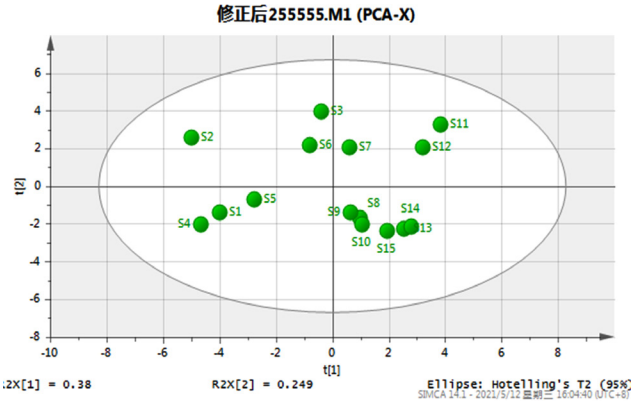


图 4 主成分分析得分图

Fig 4 Principal component analysis score

2.4.7 正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）

采用 SIMCA 14.1 软件，将 15 批芪苓益肾颗粒样品的 22 个共有峰峰面积标准化处理后的数据以监督模式化学识别方法 OPLS-DA 进行建模分析，得分矩阵图、载荷散点图和变量重要投影值图 [15，19]，见图 5。结果显示，在置信区间（95%）内，15 批样品存在一定差异性。根据分布可将 15 批样品分为两类，样品 S1 ～ S6 为一类，S7 ～ S15 为一类。OPLS-DA 载荷散点图，每个点代表一个共有峰自变量，距离原点越远，对样品的区分越强。结合 VIP 图可以为进一步确定对上述样品分类贡献较大的成分，以 VIP 值＞

1.0 为有意义变量，共提取出 5 个特征峰，依次为峰 10（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、峰 17（芒柄花苷）、峰 18（毛蕊异黄酮）、峰 1、峰 20（芒柄花素），说明这 5 种成分可能是 15 批芪苓益肾颗粒物质基准分类的差异性标志物。

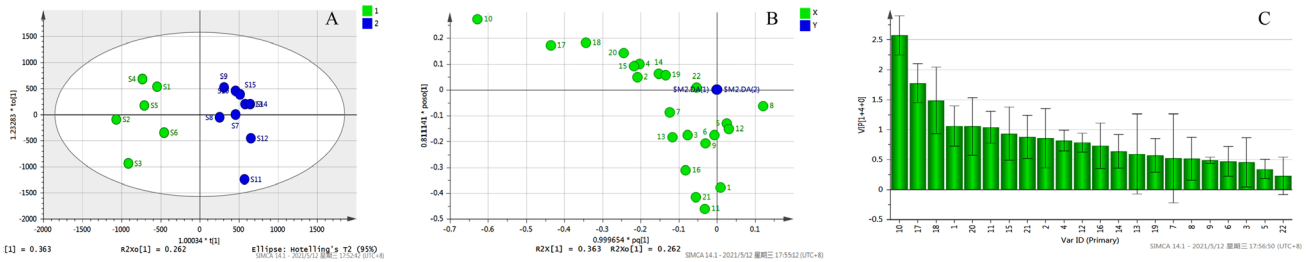


图 5　15 批芪苓益肾颗粒 OPLS-DA 分析结果

Fig 5　OPLS-DA analysis of 15 batches of Qiling Yishen granules

A. OPLS-DA 得分散点图（scatter plot of OPLS-DA score）；B. OPLS-DA 载荷散点图（scatter diagram of OPLS-DA load）；C. OPLS-DA VIP 值图（OPLS-DA VIP value chart）

2.5　7 种指标成分含量测定

2.5.1　专属性试验　取“2.2.1”项下混合对照品溶液和供试品溶液（S11）适量，按“2.1”项下色谱条件分别进样，在毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯对照品相应位置上，供试品溶液均有相对应色谱峰出现，且色谱峰分离度与峰形均较好，结果见图 2。

2.5.2　线性关系考察　精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液，用甲醇稀释成不同质量浓度的系列混合对照品溶液。按“2.1”项下条件进样，记录峰面积。以质量浓度为横坐标（X），以峰面积为纵坐标（Y），进行线性拟合，结果见表 2。

表 2　各化学成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab 2　Regression equation，correlation coefficient and linearity

化合物	线性方程	r^2	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=2.545\times10^4X-1532$	0.9999	30.94 ～ 216.58
阿魏酸	$Y=1.454\times10^4X+436.3$	0.9996	12.22 ～ 85.54
洋川芎内酯Ⅰ	$Y=1.812\times10^4X-414.8$	0.9998	7.15 ～ 50.05
芒柄花苷	$Y=1.794\times10^4X+211.4$	0.9998	16.21 ～ 113.47
毛蕊异黄酮	$Y=4.062\times10^4X-339.1$	0.9998	15.22 ～ 106.54
芒柄花素	$Y=2.129\times10^4X-141.3$	0.9998	10.08 ～ 70.42
藁本内酯	$Y=6.387\times10^4X-178.3$	0.9997	10.12 ～ 70.84

2.5.3　精密度试验　取“2.2.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积。结果 7 种成分峰面积的 *RSD* 均在 0.21% ～ 0.72%，表明仪器精密度良好。

2.5.4　重复性试验　取供试品溶液（S11）适量，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。结果 7 种成分峰面积 *RSD* 均在 0.52% ～ 1.9%，表明该方法重复性良好。

2.5.5　稳定性试验　取供试品溶液（S11）适量，室温下存放 0、6、12、24、48 h，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。结果 7 种成分峰面积的 *RSD* 均在 0.98% ～ 2.2%，表明供试品溶液 48 h 内稳定。

2.5.6　加样回收试验　取已知含量的样品（S11）适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 9 份。精密量取“2.2.1”项下对照品储备液适量，配制与样品含量相同的混合对照品溶液，在上述供试品溶液中精密加入相当于样品体积 50%、100%、150% 的混合对照品溶液各 3 份，混合均匀，按“2.1”项下色谱条件进样。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯低、中、高浓度平均回收率均在 97.99% ～ 102.33%，*RSD* 均＜ 2.0%，表明方法准确度良好。

2.5.7　样品含量测定　取 15 批芪苓益肾颗粒供试品液，按“2.1”项下色谱条件测定，结果见表 3。15 批芪苓益肾颗粒样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藁本内酯的质量分数范围分别为 1.09 ～ 1.68、0.27 ～ 0.63、0.06 ～ 0.45、0.51 ～ 0.99、0.31 ～ 0.68、0.29 ～ 0.59、0.25 ～ 0.96 mg • g^{-1}，结果表明批次间成分含量存在一定差异，例如黄芪产地为甘肃的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量较高；当归产地为湖北的洋川芎内酯Ⅰ含量较低。其中 15 批样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数最为突出，最高达到 1.68 mg • g^{-1}。

3　讨论

3.1　提取方法的考察

制备完成 15 批芪苓益肾颗粒样品细粉后，本试验分别考察了水、甲醇、80% 甲醇及 50% 甲醇作溶剂制备供试品溶液，根据色谱峰的数量、

表 3 芪苓益肾颗粒中 7 种成分的含量

Tab 3 7 components in the Qiling Yishen granules

样品号	含量 /（mg·g^{-1}）						
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	阿魏酸	洋川芎内酯Ⅰ	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	藁本内酯
S1	1.30	0.38	0.45	0.80	0.34	0.29	0.41
S2	1.29	0.33	0.18	0.81	0.31	0.34	0.33
S3	1.22	0.27	0.07	0.82	0.41	0.34	0.87
S4	1.22	0.29	0.06	0.74	0.43	0.36	0.29
S5	1.36	0.50	0.14	0.67	0.68	0.53	0.61
S6	1.43	0.54	0.22	0.71	0.62	0.54	0.57
S7	1.10	0.32	0.28	0.55	0.57	0.50	0.25
S8	1.22	0.38	0.39	0.61	0.61	0.53	0.35
S9	1.09	0.38	0.35	0.51	0.50	0.41	0.90
S10	1.53	0.63	0.42	0.96	0.62	0.55	0.95
S11	1.45	0.60	0.27	0.90	0.59	0.52	0.96
S12	1.49	0.33	0.28	0.90	0.63	0.55	0.31
S13	1.64	0.34	0.28	0.99	0.62	0.54	0.44
S14	1.27	0.35	0.08	0.79	0.59	0.58	0.28
S15	1.68	0.33	0.12	0.61	0.44	0.59	0.67

峰形及化学成分溶出全面性等综合考虑，本文选择以 50% 甲醇为溶剂制备供试品溶液。

3.2 色谱方法考察

本研究前期考察了不同高效液相色谱仪（安捷伦 1260 型、岛津 LC-20AD）；不同厂家（Agilengt、YMC、Phenomenex、GL Sciences）色谱柱；不同流动相 [甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -（0.1% 磷酸 - 水）、乙腈 -（0.05% 磷酸 - 水）]；不同流速（0.8、1 mL·min^{-1}）；不同柱温（30、35 ℃）；不同检测方式（分段波长法、波长全扫法）及不同检测波长（230、254、260、315 nm 等）等对色谱图的影响，最终确定以岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪、GL Sciences ODS-3（5 μm，4.6 mm×250 mm，UP）色谱柱、（0.05% 磷酸 - 水）（A）- 乙腈（B）为流动相梯度洗脱、柱温 35 ℃、流速 1 mL·min^{-1}，检测波长 254 nm 为色谱方法。

3.3 含量测定指标成分选定

本研究经对照品与供试品及各阴性样品色谱图对照，共确认了 18 个色谱峰的归属，其中 7 种已知成分分别为黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和当归中的阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、藁本内酯。在 OPLS-DA 试验中，以 VIP 值＞ 1 为特征，选取 5 个特征性成分，本试验选择差异较大且已知的 4 种成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素同时进行含量测定。因上述 4 种成分均归属于黄芪饮片，且依据本处方组方原理，结合文献资料当归中药理活性成分的综合研究 [20-22]，发现当归中阿魏酸有抗血栓、抗炎、降血脂等作用，发挥活血祛瘀功效 [23]；藁本内酯、洋川芎内酯Ⅰ有抗炎、镇痛及舒张血管等作用，可改善微循环，提高机体免疫调节，发挥“益气补血”功效 [24-25]；三者药理作用与本方益气养血，健脾益肾功效相关性联系较紧密，本研究增加 VIP 值靠前且已知的峰 11（阿魏酸）、峰 15（洋川芎内酯Ⅰ）、峰 21（藁本内酯）的含量测定，以期为芪苓益肾颗粒物质基准质量标准提供参考。

3.4 结果分析

由于饮片的来源、产地不同，15 批芪苓益肾颗粒物质基准的含量存在一定差异，样品图谱中 22 个共有峰的相似度均高于 0.93。通过指纹图谱结合化学模式识别法，发现 15 批芪苓益肾颗粒物质基准的质量存在显著差异，进一步利用 CA、PCA 及 OPLC-DA 法筛选出了对 15 批样品差异产生贡献较大的 5 个特征峰，分别是峰 10（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、峰 17（芒柄花苷）、峰 18（毛蕊异黄酮）、峰 1 及峰 20（芒柄花素）。

本研究建立了同时测定 7 种有效成分的定量分析方法，包括 4 种物质基准成分（毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素），对制订芪苓益肾颗粒物质基准的质量标准，全面控制该制剂物质基准质量具有指导意义。

参考文献

[1] 代云桃，靳如娜，吴治丽，等 . 基于标准汤剂（物质基准）的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（2）：164-174.

[2] 孙昱 . 经典名方研发的现存问题及相关考虑 [J]. 药物评价研究，2020，43（5）：969-972.

[3] 张鹏，刘安，邬兰，等 . 经典名方概述与开发探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（15）：183-194.

[4] 刘艳，章军，杨林勇，等 . 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（1）：1-9.

[5] 曹宁宁，杨文静，林映仙，等 . 经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究 [J]. 中草药，2020，51（10）：2773-2780.

[6] 施崇精，李希，冯建安，等 . 古代经典名方济川煎物质基准 HPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中草药，2020，51（15）：3930-3936.

[7] 邹纯才，鄢海燕 . 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年（1988—2017 年）研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志，2018，43（10）：1969-1977.

[8] 刘江，陈兴福，邹元锋 . 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志，2012，37（8）：1081-1088.

[9] 杨君，迟美玉，黄健，等 . 中药质量控制与补虚通瘀颗粒各药材研究进展 [J]. 实用药物与临床，2020，23

(11)：1042-1046.
[10] 游梦，夏梦棋，于亚云，等 . 基于指纹图谱结合多成分化学模式分析的复方垂盆草降酶颗粒质量控制研究 [J]. 中国现代应用药学，2020，37 (21)：2610-2616.
[11] 靳如娜，齐晓甜，孙蓉，等 . 经典名方当归补血汤的药效物质基础和质量控制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25 (16)：220-228.
[12] 王隆隆，张海风，杨忠杰，等 . 双石清热合剂 6 种有效成分含量测定及提取工艺优化 [J]. 中南药学，2021，19 (5)：873-878.
[13] 姚静，施钧瀚，桂新景，等 . 基于 HPLC 指纹图谱评价的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分析 [J]. 中草药，2019，50 (11)：2567-2574.
[14] 吴安，张誉晴，赵志峰，等 . 经典名方枇杷清肺饮的 UPLC 指纹图谱及多指标成分含量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27 (14)：12-20.
[15] 王琳，蒋燕萍，江华娟，等 . 经典名方身痛逐瘀汤物质基准 UPLC 指纹图谱建立及其 5 种成分含量测定 [J]. 中国中药杂志，https：//doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210319.302.
[16] 邓颖嘉，何燕珊，刘奇越，等 . 基于化学计量方法建立牛膝及酒牛膝指纹图谱 [J]. 中药材，2021 (4)：912-916.
[17] 刘敏，曹国琼，张仕林，等 . 杜仲补天素丸的 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及含量测定 [J]. 中国药房，2021，32 (8)：961-966.
[18] 刘鹤，贺丹彤，邢春来，等 . 甘姜苓术汤 HPLC 指纹图谱及含量测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志，2021，41 (1)：42-50.
[19] 张誉晴，吴安，邹婷，等 . 经典名方圣愈汤的 UPLC 指纹图谱建立及多成分定量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27 (8)：8-16.
[20] 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/OL]. 中国中药杂志，https：//doi. org/10.19540/j.cnki. cjcmm. 20200828.201.
[21] 吴修红，刘静，朴成玉，等 . 当归补血汤治疗糖尿病肾病作用机制研究进展 [J]. 中医药学报，2021，49 (2)：79-82.
[22] 王文越，刘珊，吕琴，等 . 黄芪 - 当归药对益气活血药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27 (6)：207-216.
[23] 张欣，高增平 . 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22 (1)：138-147.
[24] 张丽娟，刘继勇，姚翀，等 . 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国药学杂志，2015，50 (13)：1081-1084.
[25] 何树苗，陈元堃，曾奥，等 . 藁本内酯药理作用及机制研究进展 [J]. 广东药科大学学报，2021，37 (2)：152-156.

（收稿日期：2021-05-27；修回日期：2021-07-12）

D- 甘露醇标准样品的研制

晋文慧[1]，陈伟珠[1]，张怡评[1]，方华[1]，洪专[1]，蒋声铸[2*]，巢志茂[3*]（1. 自然资源部第三海洋研究所，自然资源部海洋生物资源开发利用工程技术创新中心，福建　厦门　361005；2. 厦门塔斯曼生物工程有限公司，福建　厦门　361021；3. 中国中医科学院中药研究所，北京　100700）

摘要：目的　通过国家标准化管理委员会批准立项，研制 D- 甘露醇标准样品。**方法**　采用海带为原料，通过 95% 乙醇提取、减压浓缩、低温析晶、反复水溶、脱色、热过滤、重结晶、残余溶剂去除等制备和纯化过程，获得高纯 D- 甘露醇单体，采用元素分析，旋光性分析，红外光谱，质谱和核磁共振技术对其进行结构鉴定。并通过高效液相色谱蒸发光散射检测分析技术，进行均匀性、稳定性和 8 家实验室联合定值检验。**结果**　该样品在 95%*CI* 内样品均匀性良好，在 2 ～ 4 ℃条件下，24 个月内稳定性良好，定值测定结果确定其特性标准值为 (99.84±0.12) % (置信度 95%，k = 2)，达到了国家标准样品的技术要求。**结论**　成功研制了 D- 甘露醇国家标准样品，可用于 D- 甘露醇含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制。

关键词：D- 甘露醇；标准样品；均匀性；稳定性；定值；海带
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2639-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.029

基金项目：福建省科技计引导项目（No.2020N0027）；福建省海洋经济发展资金项目（No. 2019-2021；FJHJF-L-2021-4）；国家重点研发计划项目（No. 2016YFF0201104）。

作者简介：晋文慧，女，助理研究员，主要从事天然产物国家标准样品的研制，E-mail：whjin@tio.org.cn　*通信作者：蒋声铸，男，工程师，主要从事天然植物生物技术研究，E-mail：jszlqh@163.com；巢志茂，男，研究员，主要从事天然产物国家标准样品的研制，E-mail：chaozhimao@163. com

Development of D-mannitol certified reference material

JIN Wen-hui[1], CHEN Wei-zhu[1], ZHANG Yi-ping[1], FANG Hua[1], HONG Zhuan[1], JIANG Sheng-zhu[2*], CHAO Zhi-mao[3*] (1. *Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources*, *the Third Institute of Oceanography*, *Ministry of Natural Resources*, *Xiamen Fujian* 361005; 2. *Xiamen Tasman Bio-tech Co.*, *Ltd.*, *Xiamen Fujian* 361021; 3. *Institute of Chinese Materia Medica*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700)

Abstract: Objective To develop a D-mannitol certified reference material by Standardization Administration of the People's Republic of China. **Methods** D-mannitol was prepared from *Laminaria japonica* Aresch via 95% ethanol extraction, vacuum concentration, repeated column chromatography separation, recrystallization of petroleum ether-ethyl acetate, and residual solvent removal. Its chemical structure was identified by elemental analysis, optical activity analysis, infrared spectrum, mass spectrum, and nuclear magnetic resonance methods. Its homogeneity, stability, and cooperative certification by 8 laboratories were systematically checked by high performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector. **Results** The homogeneity and stability of D-mannitol reference material were good, and the certified purity of the reference material was (99.84±0.12)% (95% confidence level, k = 2). The stability was good within 24 months storage period at 2 － 4 ℃. The reference material of D-mannitol conformed to directives for the work guide of reference materials. **Conclusion** The national reference material of D-mannitol is developed successfully, which can be used for the determination of D-mannitol content, the evaluation of detection methods, and the detection and quality control of related products.

Key words: D-mannitol; certified reference material; homogeneity; stability; certification; *Laminaria japonica* Aresch

D- 甘露醇（D-mannitol）为单糖，六元醇，为白色或无色结晶性粉末，无臭，具有清凉甜味，微涩，甜度约为蔗糖的 70%，是海带中重要的生物活性物质[1-7]。研究表明，甘露醇在体内不被代谢，具有脱水、利尿、降颅内压及眼内压的作用，可治疗颅内高压和青光眼[8-15]。临床主要用于颅内压增高症的急救用药，还用于肠道准备，脱水效果迅速、可靠、反跳小，并且具有镇咳、平喘等作用。甘露醇毒副作用小，溶液性质稳定，不参与体内代谢，治疗眼部炎症时不改变其通透性，是高渗脱水剂中的首选药。甘露醇一般容易耐受，很快经肾脏排泄，可用于糖尿病患者。

甘露醇在食品、医药、化工等行业中，具有广阔的应用前景，常作为相关产品质量控制的重要指标性成分。目前市场上含 D- 甘露醇的产品及药品均需要以 D- 甘露醇作为检测标准，但目前，我国尚未研制出 D- 甘露醇国家标准样品，相关企业、检测机构、科研院所和医院基本采用的是进口高纯试剂，价格昂贵，且纯度参差不齐，没有进行过定值试验，也没有不确定度的数据评价，准确性、可比性、可溯源性均不能保证[16-18]。由于国内市场需求较大，因此，迫切需要开展 D- 甘露醇物质标准样品的研发。本研究以海带为原料，通过提取、浓缩、低温析晶、反复重结晶、去除残余溶剂等制备和纯化过程，获得高纯 D- 甘露醇单体，按现行国家标准 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则（3）标准样品：定值的一般原则和统计方法》[19] 要求，系统开展了标准样品的研制工作，以提供获得国家标准样品证书的 D- 甘露醇国家标准样品。

1 材料

1.1 仪器

400 MHz 型核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；LTQ Orbitrap Velos pro 质谱仪（美国 Thermo 公司）；Vario EL cube 元素分析仪（德国 Elementar 公司）；VERTEX 70 红外光谱仪（德国 Bruker 公司）；电感耦合等离子体质谱仪 iCAP 7200（美国 Thermo 公司）；Waters 高效液相色谱仪（e2695 型），配蒸发光散射检测器和工作站（美国 Waters 公司）；AL104 电子天平（瑞士 Mettoler Toledo 公司）；SXJQ-120 型搅拌器、R-1001-VN 型旋转蒸发器、MPC201Tp 型隔膜真空泵、DLSB-10/20 型低温冷却循环泵（郑州长城科工贸有限公司）；马弗炉 SX2-4-10G（苏州江东精密仪器有限公司）。

1.2　试药

乙醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；实验室用水为重蒸水，乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；干燥的海带（厦门农贸市场，产自漳州，由福建中医药大学黄鸣清教授鉴定为海带 *Laminaria japonica* Aresch 的叶状体，样品保存于自然资源部第三海洋研究所实验室）。

2　方法与结果

2.1　样品的制备

2.1.1　D- 甘露醇粗提物的制备　称取海带干粉 2 kg 放入反应釜中，加入 90% 乙醇 80 L，在 80 ℃加热条件下，浸提 1 h，上述操作重复 3 次，合并提取液，在旋转蒸发仪上减压浓缩，并进行低温析晶，即得 D- 甘露醇粗提物。

2.1.2　D- 甘露醇纯化精制　将 D- 甘露醇粗提物加 0.9 倍的水溶解后，加热使其溶解，保持沸腾 5 min 左右，放冷结晶。不断搅拌，防止结块，离心分离，得第一次重结晶物。加 1.0 倍量的蒸馏水，0.1 倍量的活性炭，加热使其溶解保持 0.5 h，在 90 ℃左右减压过滤得滤液，冷却结晶、离心，得结晶物。将此结晶物分别加 0.7 倍、0.5 倍的水进行重结晶，方法同上。

将上述 D- 甘露醇用 0.1 倍量以上的 95% 乙醇进行醇洗，离心甩干，最终获得并收集白色高纯晶体，经鉴定为 D- 甘露醇。

2.2　结构鉴定

2.2.1　元素分析　分子式为 $C_6H_{14}O_6$，理论值计算，按照 C 原子 12.0000，H 原子 1.0078，理论值 C [%] 39.54、H [%] 7.75，实际测定平均值 C [%]39.63、H [%] 7.83。测定值与理论值相符。

2.2.2　旋光性分析　称取甘露醇样品，置于 25 mL 量瓶中，加入 8 mL 钼酸铵溶液（0.1 g • mL^{-1}），再加入 4 mL 硫酸溶液（0.5 mol • L^{-1}），加水稀释至刻度，摇匀，在 25 ℃下测定。测得其比旋度 $[\alpha]_D^{25}$ = 137.80，与数据库中 D- 甘露醇的比旋度 $[\alpha]_D^{25}$ = 137 ～ 145 一致，证明立体构型是 D 型。

2.2.3　红外光谱　通过 KBr 压片法测定红外光谱。从结果可知，3400 cm^{-1} 为 -OH 的伸缩振动，1421 cm^{-1} 为 $-CH_2$ 的变形振动，1289 cm^{-1} 为 $-CH_2OH$ 基团中 -OH 的变形振动，1082 cm^{-1} 为 -CHOH 基团中 -OH 的变形振动，1018 cm^{-1} 为 -CHOH 基团中 C-O 的伸缩振动，630 cm^{-1} 为形成氢键的 OH 产生的变性振动。样品的红外光谱数据说明结构中存在 $-CH_2$、-OH、$-CH_2OH$、-CHOH 等基团。

2.2.4　高分辨质谱　采用 APCI 电离源（正离子模式），高分辨质谱测得的准分子离子峰 *m/z* = 205.0689 $[M + Na]^+$，与对应的精确分子量 205.0684（分子式 $C_6H_{14}O_6$）相符。

2.2.5　核磁共振波谱　以 D_2O 为溶剂，测定 ^1H、^{13}C、HSQC 的核磁共振数据，并对其进行归属。^{13}C NMR 显示 3 个碳原子峰，位于 δ 63.14、69.15 和 70.72。通过 HSQC 可以认为，δ 63.14 的碳原子对应 ^1H NMR 的 δ 3.74（dd，J = 11.6，2.4 Hz，2H）和 3.54（dd，J = 11.6，6.0 Hz，2H）的 4 个质子，应为 1、6 位的 2 个 CH_2，它们具有同样的碳原子的化学位移，但是质子的耦合常数具有差异，说明 1 位和 6 位的质子各自相邻的 2 和 5 位的 CH 质子具有不等的立体环境。δ 3.64（ddd，J = 8.8，6.0，2.0 Hz，2H）既具有与 J = 2.0 和 6.0 Hz 耦合常数的 1、6 位质子产生耦合，也有与 3、4 位质子产生的耦合（J = 8.8 Hz），为 2、5 位的 2 个质子峰。δ 3.67（d，J = 8.8 Hz，2H）峰具有与 2、5 位质子的耦合。通过 HSQC 的对应关系得知，1、6 位 CH_2 质子对应的碳原子为 δ 63.14，2、5 位 CH 质子对应的碳原子为 δ 70.72，3、4 位 CH 质子对应的碳原子位于 δ 69.15。D- 甘露醇核磁共振数据的解析结果与文献 [20] 报道完全一致（见图 1）。

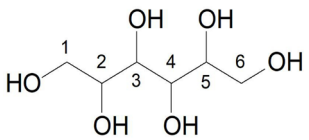


图 1　D- 甘露醇结构式

Fig 1　Structure of D-mannitol

2.3　D- 甘露醇的纯度分析

2.3.1　高效液相色谱蒸发光散射法　NH_2 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）（Thermo Hypersil GOLD Amino），流动相：乙腈 - 水（70∶30，*V*/*V*），流速：1 mL • min^{-1}；漂移管温度：65 ℃，增益：50，气体压力：40 psi，进样量：10 μL。精密称取 D- 甘露醇 1 mg，加 1 mL 甲醇溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得 1 mg • mL^{-1} 的样品溶液。采用峰面积归一化法对 D- 甘露醇进行纯度分析。该样品除溶剂峰外，无明显杂质峰出现，见图 2。

2.3.2　离子色谱法　色谱柱：CarboPac PA10（250 mm×4.0 mm，5 μm）（Thermo），流动相：H_2O-NaOH（250 mmol•L^{-1}）（84∶16，*V*/*V*），流速：0.80 mL • min^{-1}，柱温：30 ℃。精密称取 D- 甘露醇 1 mg 置 10 mL 量瓶中，加去离子水溶解并稀释至刻度，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得 1 mg • mL^{-1} 的样品溶液。采用离子色谱法对 D- 甘露醇进行纯度分析。该样品除溶剂峰外，仅单一洗脱峰，无明显杂质峰出现，见图 3。

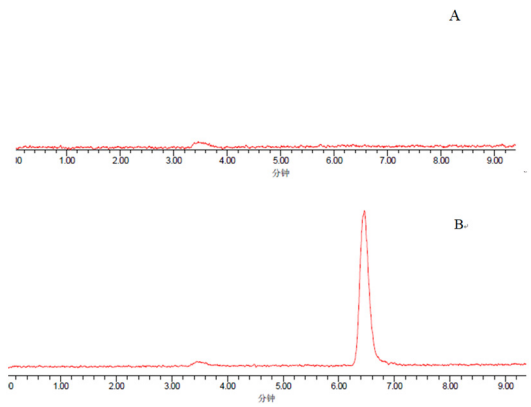


图 2　D- 甘露醇的高效液相色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of D-mannitol

A. 溶剂 - 水（solvent-water）；B. D- 甘露醇（D-mannitol）

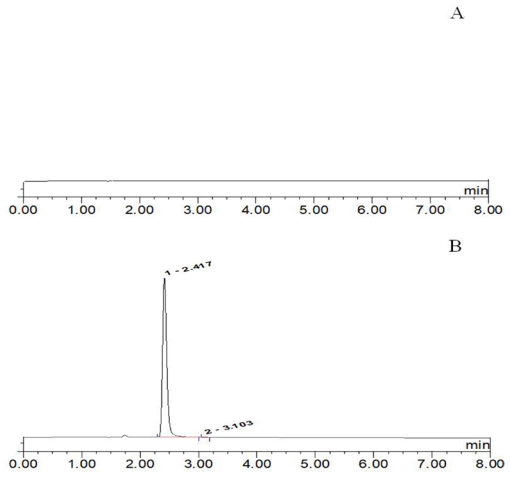


图 3　D- 甘露醇的离子色谱图

Fig 3　Ion chromatography of D-mannitol

A. 溶剂 - 水（solvent-water）；B. D- 甘露醇（D-mannitol）

2.3.3　溶剂残留的测定　按照《中国药典》2020 年版第四部 [21] 的方法，对 D- 甘露醇的残留溶剂进行检测，精确称取 D- 甘露醇样品约 1.8 g，平行称量样品 6 份，用水加热溶解到 10 mL 顶空瓶中，采用气相色谱法测定，外标曲线法进行定量分析，以水为空白基质，平行测定 6 次，均未检测到甲醇、乙醇等提取过程中接触的有机溶剂的残留。

2.3.4　水分残留的测定　采用卡尔费休法（Metrohm AG）进行 6 次平行测定，结果水分残留率为 0.049%、0.050%、0.051%、0.049%、0.050%、0.051%，平均值为 0.050%，*RSD* 为 0.018%。

2.3.5　灰分测定　通过高温灼烧法，测得其灰分小于 0.01%；通过质谱法测定 Na、K、Ca、Mg、Fe 5 种金属元素，结果 Na、K、Ca、Mg、Fe 元素均低于检测限。

2.4　均匀性检验

根据 GB/T15000.3-2008《标准样品工作导则（3）标准样品：定值的一般原则和统计方法》[19] 的指导，开展了标准样品均匀性检验的研究工作。本批次 D- 甘露醇单体样品共分装 200 瓶，每瓶 5 mg，从 1 号到 200 号，通过在线随机数生成器随机挑选和重复测量的方法，本次抽样数目为 15 个，采用单因素多水平试验方差分析法进行纯度的均匀性检验，按“2.3.1”项下方法测定，每个样品重复测 3 次。用峰面积归一化法计算纯度，然后用方差分析法进行均匀性检验。结果见表 1 及表 2。

表 1　D- 甘露醇标准品均匀性检验

Tab 1　Homogeneity of certified reference material of D-mannitol

编号	测量 1/%	测量 2/%	测量 3/%	平均值 /%
28	99.88	99.84	99.86	99.86
39	99.83	99.86	99.89	99.86
48	99.85	99.83	99.86	99.85
58	99.87	99.86	99.84	99.86
72	99.83	99.86	99.86	99.85
73	99.83	99.82	99.83	99.83
93	99.88	99.85	99.89	99.87
105	99.84	99.87	99.88	99.86
108	99.82	99.83	99.86	99.84
127	99.87	99.87	99.89	99.88
132	99.89	99.86	99.83	99.86
171	99.85	99.85	99.86	99.85
176	99.84	99.87	99.88	99.86
190	99.87	99.86	99.85	99.86
192	99.85	99.86	99.88	99.86

表 2　D- 甘露醇标准品均匀性试验的方差分析

Tab 2　Variance analysis of homogeneity test of certified reference material of D-mannitol

变差源	方差和（*SS*）	自由度（d_f）	均方差（*MS*）
组间	0.006 933	14	0.000 495
组内	0.010 467	30	0.000 349
总和	0.017 400	44	

根据方差分析结果计算，统计量 $F = MS_{组间}/MS_{组内} = 0.000\ 495/0.000\ 349 = 1.42$，通过查 F 界值表，F 值小于 $F(0.05, 14, 30)$ 的值 2.04，说明在 95% 的置信区间，D- 甘露醇样品均匀性良好。

瓶间方差：$S_A^2 = (MS_{组间} - MS_{组内})/n = (0.000\ 495 - 0.000\ 349)/3 = 0.000\ 049$

瓶间标准偏差：$S_{bb} = S_A = 0.01\%$

均匀性实验的不确定度（U_{bb}）等于瓶间标准偏差（S_{bb}），故 $U_{bb} = S_{bb} = 0.01\%$。

2.5　稳定性检验

2.5.1　长期稳定性　取标准样品的若干样品瓶，按市售包装样式进行包装，在 2 ～ 4 ℃条件下放置 24 个月，并分别于第 0、6、12、18、24 个月随机抽取 3 个样品瓶，在进行外观性状检查后，按“2.3.1”项下方法配制样品溶液并测定。每份样品连续进样两次，然后用峰面积归一化法求出其

纯度的平均值，结果见表 3。根据检测结果，D-甘露醇标准样品具有 24 个月的长期稳定性。

表 3　D- 甘露醇标准样品的纯度稳定性

Tab 3　Stability of certified reference material of D-mannitol

时间 / 月	纯度 /%	性状
0	99.85	白色粉末
6	99.81	白色粉末
12	99.89	白色粉末
18	99.85	白色粉末
24	99.86	白色粉末

根据导则 [19] 对稳定性研究的要求，采用直线模型，对表 3 中长期稳定性试验测得的纯度数据进行分析。根据表 3 所示检测结果，斜率 b_1 根据下式计算：

$$b_1=\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})(Y_i-\bar{Y})}{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})^2}=\frac{0.36}{360}=0.001$$

式中 X_i 为每次检测时间（月数）；$\bar{X}=12$，为表 3 中每次检测间隔的时间总和月数与间隔检测的次数之比；Y_i 为每次测得的纯度（%）；$Y=99.85\%$，为表 3 中 5 次检测纯度的平均值。

截距 b_0 由下式计算：$b_0=Y-b_1X=99.852-(0.001\,000\times12)=99.84\%$。

直线上的点的标准偏差可由下式计算：

$$S^2=\frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_i-b_0-b_1X_i)^2}{n-2}=0.002\,920/3=0.00\,0973$$

取其平方根 $s=0.031\,198\%$，与斜率相关的不确定度用下式计算：

$$S(b_1)=\frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})^2}}=0.031\,198/\sqrt{360}=0.001\,644$$

自由度为 $n-2$ 和 $P=0.95$（95% 置信水平）的分布 t 因子等于 3.182。由于 $|b_1|<t_{0.95,\,n-2}\times s(b_1)=3.182\times0.001\,644\%=0.005\,231\,6\%$，故斜率是不显著的，说明未观测到不稳定性，表明 D- 甘露醇在 24 个月实验周期内稳定性良好。

长期稳定性试验的不确定度（U_{lts}）计算公式为 $U_{lts}=s(b_1)\times t$（试验时间月数）。将相应数据代入公式计算，得值为长期试验稳定性的不确定度贡献度即为：

$$U_{lts}=S_b\times t=0.001\,644\%\times24=0.04\%$$

以上直线模型分析结果表明，D- 甘露醇标准样品在低温密闭环境下保存 24 个月稳定性良好。试验结果说明，在实际保藏条件（温度：2 ～ 4 ℃）下，D- 甘露醇的稳定期不低于 2 年。

2.5.2　短期稳定性　将样品模拟运输条件，测定运输条件下（25 ℃）样品 6 d 内的稳定性。分别于 0、2、4、6 d 进行检测，采用峰面积归一化法测定样品配制后的稳定性，样品纯度分别为 99.86%、99.82%、99.87%、99.85%，*RSD* 为 0.022%，说明样品在模拟运输条件下 6 d 内稳定。

2.5.3　样品溶液稳定性　为考察样品配制后，在多长时间内可以准确使用，考察样品配制 4 ℃放置 7 d 的稳定性。取本品 1 mg，加 1 mL 的甲醇溶解得 1 mg·mL^{-1} 的样品溶液，分别于 0、0.5、1、2、4、7 d 检测，采用峰面积归一化法测定样品配制后的稳定性，样品纯度分别为 99.86%、99.85%、99.87%、99.84%、99.85%、99.83%，*RSD* 为 0.014%，故样品配制后 7 d 内保持稳定。

2.6　定值分析

根据导则 [19] 规定及实际条件，采用 8 家实验室协作试验定值的方式进行 D- 甘露醇标准样品的定值，每家分别随机抽取 2 瓶样品送检，每个样品平行测试 2 次，对 8 家实验室的 6 个数据进行统计，按“2.3.1”项下色谱条件，每瓶重复测定 3 次，应用峰面积归一化法进行定量 [22]（见表 4）。

表 4　8 家实验室 D- 甘露醇纯度定值数据

Tab 4　Certification data of D-mannitol in 8 laboratories

序号	检测结果 /%						平均值 /%	标准偏差 /%
	1	2	3	4	5	6		
1	99.76	99.78	99.78	99.79	99.80	99.84	99.79	0.027
2	99.83	99.87	99.87	99.87	99.89	99.90	99.87	0.024
3	99.81	99.82	99.83	99.84	99.86	99.87	99.84	0.022
4	99.97	99.97	99.98	99.98	99.98	99.98	99.98	0.052
5	99.87	99.90	99.91	99.93	99.95	99.95	99.92	0.031
6	99.76	99.79	99.83	99.84	99.87	99.88	99.83	0.046
7	99.80	99.82	99.82	99.89	99.89	99.90	99.85	0.045
8	99.84	99.82	99.83	99.81	99.85	99.83	99.83	0.014

对所采集的测定结果，采用格拉布斯（Grubb’s）检验法进行检验，未发现异常值，测定结果呈正态分布。通过以上对检验数据的考察，所得数据符合导则 [19] 的要求。采用峰度法检验各实验室数据的正态性，没有检出异常值。故各组所有数据全部有效，进行下一步统计，再用 Grubb’s 法对每家实验室的平均值进行检验，将其看成一组测定值进行异常值检验，实验室间的 Grubb’s 统计量 G 均小于 $G'_{0.95\,(6)}$ 和 $G'_{0.99\,(6)}$，因此将各家实验室测得的数据作为无偏估计值，计算 8 家测定结果的平均值及标准偏差。通过统计分析，总平均值为 $\bar{x}=99.86\%$。对表 4 的数据进行方差分析，结果见表 5。

表 5　对 8 家实验室定值数据的方差分析结果

Tab 5　Variance for purity test data by 8 laboratories

变差源	方差和（*SS*）	自由度（d_f）	均方差（*MS*）
组间（实验室之和）	0.144 815	7	0.003 298
组内（实验组之间）	0.035 883	40	0.000 897

总和	0.180 698	47	—

2.7 定值分析的不确定度评定

根据导则[19]规定，定值结果由特性值和不确定度组成。根据全部测定结果，计算 D- 甘露醇标准样品的特性值和不确定度。

因未检测到甲醇、乙醇等溶剂残留，且 Na、K、Ca、Mg、Fe 元素均低于检测限，故由溶剂残留及灰分引起的不确定度均可忽略不计。水分引起的不确定度包括仪器产生的不确定度和测量重复产生的不确定度。电子天平（最大称样量为 32 g，精确度为 0.01 mg），按照均匀分布，仪器产生的不确定度为 U_1 = 0.01%，水分测量结果及总的不确定度为 $U_{水}$ = 0.02%。

实验数据经统计分析，确定了 D- 甘露醇标准样品的实验室内重复性标准偏差 S_r 为 0.021%，复现性标准偏差 S_L 为 0.058%，综合稳定性检验不确定度，均匀性检验不确定度，定值检验不确定度，水分测定不确定度等实验结果可得，D- 甘露醇特性标准值为（1 − 0.02%）×99.86% = 99.84%。合成不确定度 U = 0.06%，扩展不确定度 $U_{95} = kU = 2 \times 0.06\% = 0.12\%$（$P$ = 95%，k = 2）。D- 甘露醇标准样品的纯度为 99.84%，置信度为 95% 的扩展不确定度值为 0.12%。

3 结论

本文建立了 D- 甘露醇的制备分离纯化方法，制备所得的 D- 甘露醇标准样品，根据标准样品工作导则[19]的要求，按照研制流程对其进行了稳定性、均匀性以及定值检测研究，定值结果为 99.84%，符合国家标准样品的技术规范要求。所研制的 D- 甘露醇标准样品填补了国内该领域研究的空白，不仅可用于 D- 甘露醇含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制，对海带等含有 D- 甘露醇的相关产品及药品的检测提供了标准样品，也为检测结果的准确性、可比性以及溯源性提供了技术支撑。

参考文献

[1] 张怡评，陈伟珠，洪专，等 . 海带化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中医药导报，2014，20（13）：61-64.

[2] 林慧婷，王培鑫，赖斌，等 . 海带多糖的功能活性及应用进展 [J]. 食品研究与开发，2020，41（14）：188-195.

[3] 杨玉莹，王倩，郝豪奇，等 . 海带多酚的提取分离纯化及其体外活性 [J]. 生物加工过程，2018，16（6）：52-56.

[4] 王璐，南海函，陈少波，等 . 海带化学成分研究 [J]. 浙江农业科学，2016，57（8）：1280-1284.

[5] 林国荣，姚剑瑞，杨杰坤 . 海带多糖和甘露醇的提取工艺研究 [J]. 福建水产，2014，36（3）：205-210.

[6] 魏倩倩 . 甘露醇的生产与应用研究进展 [J]. 食品工业科技，2010，31（12）：401-404.

[7] 陈伟珠，晋文慧，张怡评，等 . 离子色谱法测定海带中甘露醇的含量 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（3）：914-918.

[8] 赵晓晓，李亚前，王淑梅，等 . 甘露醇对万古霉素在家兔体内血脑屏障透过能力及脑脊液药动学的影响 [J]. 中南药学，2020，18（4）：582-586.

[9] Nurmi HM，Latti AM，Brannan JD，et al. Comparison of mannitol and citric acid cough provocation tests [J]. Resp Med，2019，158：14-20.

[10] Patil H，Gupta R. A comparative study of bolus dose of hypertonic saline，mannitol，and mannitol plus glycerol combination in patients with severe traumatic brain injury [J]. World Neurosurg，2019，125：e1-e8.

[11] Sun SW，Li YP，Zhang HZ，et al. The effect of mannitol in the early stage of supratentorial hypertensive intracerebral hemorrhage：A systematic review and meta-analysis [J]. World Neurosurg，2019，124：386-396.

[12] Waskowski J，Pfortmueller CA，Erdoes G，et al. Mannitol for the prevention of peri-operative acute kidney injury：A systematic review [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg，2019，58（1）：130-140.

[13] Kullkarni SS，Suryanan R，Rinella JV，et al. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of highconcentration lyophilized protein formulations [J]. Eur J Pharm Biopharm，2018，131：70-81.

[14] Chukwuma CI，Matsabisa MG，Erukainure OL，et al. Shahidul Islam D-mannitol modulates glucose uptake ex vivo；suppresses intestinal glucose absorption in normal and type 2 diabetic rats [J]. Food Biosci，2019，29：30-36.

[15] Montes-cortes DH，Novelo-del Valle JL，Olivares-corich IM，et al. Impact of intestinal mannitol on hyperammonemia，oxidative stress and severity of hepatic encephalopathy in the ED [J]. Am J Emerg Med，2018，36（9）：1570-1576.

[16] 晋文慧，张怡评，方华，等 . 二十碳四烯酸甲酯标准样品的研制 [J]. 化学分析计量，2019，28（2）：1-5.

[17] 马玉翠，吴晓毅，王尉，等 .β- 谷甾醇标准样品的研制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（16）：90-95.

[18] 张怡评，陈伟珠，晋文慧，等 . 亚油酸甲酯标准样品的研制 [J]. 国际药学研究杂志，2020，47（11）：982-988.

[19] 标准样品工作导则：（3）标准样品：定值的一般原则和统计方法 . 中华人民共和国国家标准 . 中国国家质量监督检验总局，中国国家标准化管理委员会 [S]. 北京：中国标准出版社，2008.

[20] 朱仝飞，李萍，胡娟娟，等 . 西藏胡黄连中 1 个新的裂环环烯醚萜苷类成分 [J]. 中草药，2013，44（23）：3260-3263.

[21] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：67-68.

[22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会 . GB/T8170-2008 数值修约与极限数值的表示和判定 [S]. 北京：中国标准出版社，2008.

（收稿日期：2021-05-14；修回日期：2021-07-16）

高效液相色谱法测定克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量

郭丹峰[1]，雷建刚[1]，章泽恒[2*]（1. 嘉实（湖南）医药科技有限公司，长沙　410217；2. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心，长沙　410013）

摘要：目的　建立高效液相色谱法测定克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠的含量。**方法**　以 Agilent Zorbax SB-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱；以 0.006 mol • L^{-1} 的四丁基氢氧化铵溶液（用甲酸调节 pH 至 3.5）为流动相 A，甲醇为流动相 B，梯度洗脱；流速为 1.0 mL • min^{-1}；柱温为 30 ℃；进样量为 20 μL；检测波长为 254 nm。**结果**　阴性样品溶液对依地酸二钠检测无干扰；依地酸二钠在 0.10 ～ 6.05 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好线性关系（r = 0.998）；检测限为 0.03 μg•mL^{-1}；回收率（n = 3）在 98.4% ～ 101.5%。**结论**　本方法专属性好，灵敏度和准确度高，操作简单，适用于克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠的含量检测。

关键词：克林霉素磷酸酯注射液；高效液相色谱法；依地酸二钠
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2645-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.030

HPLC determination of disodium edetate in clindamycin phosphate injection

GUO Dan-feng[1], LEI Jian-gang[1], ZHANG Ze-heng[2*] (1. *Harvest (Hunan) Pharmaceutical Co., Ltd, Changsha* 410217; 2. *Hunan Center for Drug Evaluation, Certification and Adverse Drug Reaction Monitoring, Changsha* 410013)

Abstract: Objective　To develop an HPLC method to determine disodium edetate in clindamycin phosphate injection. **Methods**　HPLC was adopted on an Agilent Zorbax SB-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase A was 0.006 mol • L^{-1} tetrabutylammonium hydroxide solution (adjust pH to 3.5 with formic acid) and the mobile phase B was methanol at a flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 254 nm. **Results**　The negative sample solution did not affect the detection of disodium edetate. The concentration of disodium edetate was linear at 0.10 ～ 6.05 μg • mL^{-1} (r = 0.998), the limit of detection was 0.03 μg • mL^{-1}, and the recovery (n = 3) was at 98.4% ～ 101.5%. **Conclusion**　This method is specific, sensitive and accurate, with simple operation, which is suitable for the detection of disodium edetate in clindamycin phosphate injection.

Key words: clindamycin phosphate injection; HPLC; disodium edetate

克林霉素磷酸酯为化学半合成的克林霉素衍生物，体外无抗菌活性，在碱性磷酸酯酶作用下迅速水解为克林霉素，进而表达药理活性，其抗菌谱、抗菌活性及治疗效果与克林霉素相同。克林霉素磷酸酯和克林霉素相比，具有更优的脂溶性及渗透性，临床应用更加广泛[1-2]。克林霉素磷酸酯注射液中功能性辅料包括苯甲醇和依地酸二钠，苯甲醇含量的限度和检测方法已被《中国药典》收录[3]，依地酸二钠限度和检测方法未被收录，也无文献报道。

依地酸二钠作为金属离子螯合剂，可防止由原辅料、生产设备和包材引入的元素杂质催化药液发生氧化水解或生成絮状沉淀，提高药物的稳定性[4-5]，但其浓度过高时可能引起血钙浓度下降。为保证保障患者的用药安全，应建立克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量检测方法并对其含量进行有效控制。

1　材料

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪（Agilent Technologies Co. Ltd，USA）；梅特勒 XS105DU

作者简介：郭丹峰，男，硕士，主要从事化学仿制药的药学研究，E-mail：guodf@harvest-pharm.com　***通信作者：**章泽恒，男，副主任中药师，主要从事药物制剂和药品监管，E-mail：719563428@qq.com

型分析天平、梅特勒 FE-28 型 pH 计（METTLER TOLEDO，Switzerland）；Milli-Q 超纯水仪（Merck KGaA，Germany）。

依地酸二钠（批号：R028C1，纯度以 100% 计，USP）；甲醇（色谱纯，Sigma）；水为超纯水；甲酸（分析纯，国药集团）；25% 四丁基氢氧化铵（分析纯，天津光复）；三氯化铁（分析纯，阿拉丁）；克林霉素磷酸酯注射液（批号：DP6232，辉瑞，规格为 300 mg/2 mL，依地酸二钠的处方含量为 0.5 mg • mL^{-1}；批号：20063021，与辉瑞处方和规格相同的自制品）；按照参比制剂处方配制不含依地酸二钠的克林霉素磷酸酯注射液（批号：200615，自制）。

2　方法

2.1　色谱条件

照高效液相色谱法（《中国药典》2020 年版四部通则 0512）测定，用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Agilent Zorbax SB-C_{18}，4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.006 mol • L^{-1} 的四丁基氢氧化铵溶液（取 25% 四丁基氢氧化铵溶液 6 mL，加水至 1000 mL，混匀，用甲酸调节 pH 至 3.5）为流动相 A，甲醇为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 15 min，75%A；15 ～ 30 min，75% ～ 20%A；30 ～ 31 min，20% ～ 75%A；31 ～ 40 min，75%A）；检测波长为 254 nm；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL • min^{-1}，进样量为 20 μL。

2.2　溶剂的制备

取三氯化铁适量，用超纯水稀释制成含三氯化铁 0.1 mg • mL^{-1} 的溶液，作为溶剂。

2.3　对照品溶液的制备

精密称取依地酸二钠适量，用超纯水稀释制成含依地酸二钠 100 μg • mL^{-1} 的溶液作为对照品储备溶液。精密量取对照品储备溶液适量，用溶剂稀释制成含依地酸二钠 5 μg • mL^{-1} 的溶液，作为对照品溶液。

2.4　供试品溶液的制备

精密量取供试品 1 mL，用溶剂稀释至 100 mL，作为供试品溶液。

3　结果

3.1　专属性试验

精密量取不含依地酸二钠的克林霉素磷酸酯注射液 1 mL，用溶剂稀释至 100 mL，得阴性样品溶液。取空白溶液（溶剂）、对照品溶液、阴性样品溶液和供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进样，结果空白溶液及阴性样品溶液对依地酸二钠测定无干扰，依地酸二钠峰形良好，见图 1。

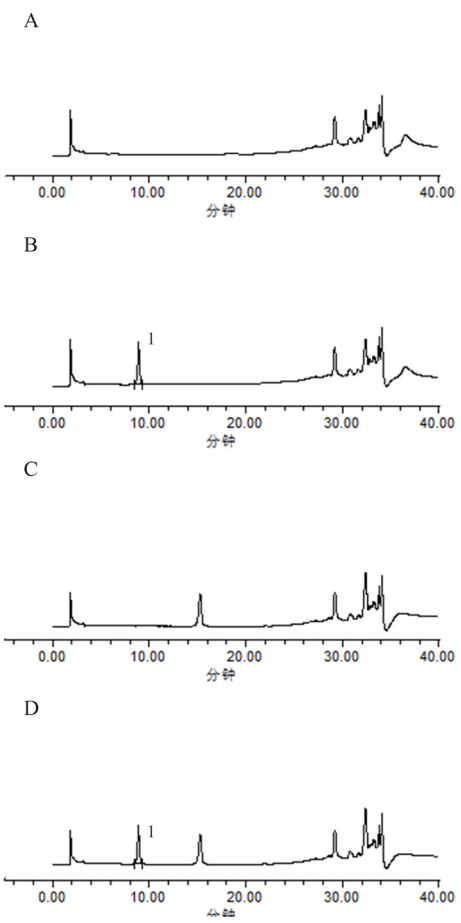


图 1　克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of disodium edetate in clindamycin phosphate injection

A. 空白溶液（blank solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 阴性样品溶液（negative sample solution）；D. 供试品溶液（sample solution）；1. 依地酸二钠（disodium edetate）

3.2　检测限和定量限考察

取对照品溶液适量，用溶剂稀释成含不同浓度依地酸二钠的溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，当信噪比（*S/N*）＝ 3 时，依地酸二钠浓度为 0.03 μg • mL^{-1}，为检测限；当 *S/N* ＝ 10 时，依地酸二钠浓度为 0.10 μg • mL^{-1}，为定量限。

3.3　线性关系考察

精密量取对照品储备溶液适量，用溶剂稀释制成含依地酸二钠 0.10、0.50、1.01、3.02、5.04、6.05 μg • mL^{-1} 的系列标准溶液，分别进样，以依地酸二钠浓度为横坐标，以对应峰面积为纵坐标，按最小二乘法计算线性回归方程，即 $Y = 2.60\times10^{4}X - 1.32\times10^{3}$，$r = 0.998$，结果说明依地酸二钠在 0.10 ～ 6.05 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

3.4　精密度试验

取“2.3”项下对照品溶液，重复进样 6 次，

依地酸二钠峰面积 *RSD* 为 0.27%，说明仪器精密度良好。

3.5　重复性试验

精密量取供试品（批号：20063021）1 mL，用溶剂稀释至 100 mL，作为供试品溶液，平行制备 6 份，进样测定，按外标法以峰面积计算，供试品中依地酸二钠含量的平均值为 0.49 mg • mL^{-1}，*RSD* 为 0.21%，说明本方法具有良好的重复性。

3.6　溶液稳定性试验

取“2.3”项下对照品溶液和“2.4”项下供试品（批号：20063021）溶液，在室温条件下保存，分别于 0、4、8、16、24、48 h 进样测定，记录色谱图中依地酸二钠峰面积，结果对照品溶液中依地酸二钠峰面积 *RSD* 为 1.2%，供试品溶液中依地酸二钠峰面积 *RSD* 为 0.77%，表明对照品溶液和供试品溶液在室温条件下 48 h 内稳定。

3.7　回收试验

以依地酸二钠理论浓度为基准 100%，精密量取“2.3”项下对照品储备液 1、5、6 mL 分别置于 100 mL 量瓶中，再分别加入不含依地酸二钠的克林霉素磷酸酯注射液 1 mL，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为 20%、100% 和 120% 的回收试验溶液，各浓度平行配制 3 份。精密量取上述回收率溶液，进样测定，计算回收率。依地酸二钠的回收率在 98.4% ～ 101.5% 内（n = 3），*RSD* 为 0.71%，表明本方法的回收率良好。

3.8　影响因素试验

对克林霉素磷酸酯注射液（批号：20063021）和按处方自制的克林霉素磷酸酯注射液（批号：DP6232）开展影响因素试验，除去注射液的外包装以及标签，考察高温（60 ℃）和光照（光源强度 5500 lux、近紫外灯能量 85 μW • cm^{-2}）对依地酸二钠含量的影响。精密量取供试品 1 mL，用溶剂稀释至 100 mL，作为影响因素试验的供试品溶液，照“2.1”项下色谱条件进样，计算依地酸二钠的含量，结果见表 1。

表 1　不同考察条件下样品中依地酸二钠含量测定结果

Tab 1　**Content determination of disodium edetate under different investigation conditions**

考察条件	依地酸二钠含量 /（mg • mL^{-1}）	
	20063021	DP6232
0 d	0.49	0.50
60 ℃、5 d	0.49	0.51
60 ℃、10 d	0.48	0.50
60 ℃、30 d	0.49	0.50
光照 5 d	0.40	0.47
光照 10 d	0.32	0.45

4　讨论

4.1　溶剂的选择

依地酸二钠易与金属元素螯合，直接进样依地酸二钠时受色谱系统中金属元素的影响主峰拖尾严重 [6]。为改善主峰峰形，可先使依地酸二钠与 Fe^{3+} 或 Cu^{2+} 离子形成稳定的螯合物，再注入液相色谱系统。EDTA-Fe 螯合物与 EDTA-Cu 螯合物相比，稳定性更强，且所得色谱峰峰形更好，以 EDTA-Fe 螯合物的形式检测依地酸二钠含量的方法更为常见 [7-9]。当溶剂中三氯化铁质量浓度为 0.1 mg • mL^{-1}（摩尔浓度为 0.6 mmol • L^{-1}），可保证对照品溶液和供试品溶液中 5 μg • mL^{-1} 的依地酸二钠（摩尔浓度为 0.015 mmol • L^{-1}）全部转化为螯合物。

4.2　耐用性讨论

当流动相 A 的 pH 值为 3.3 ～ 3.7，柱温为 25 ～ 35 ℃，流速为 0.8 ～ 1.2 mL • min^{-1}，依地酸二钠峰形无明显变化，且苯甲醇、克林霉素磷酸酯及其有关物质对依地酸二钠检测无干扰，含量检测结果与拟订的色谱条件一致，说明本方法具有良好的耐用性。待依地酸二钠出峰后，流动相中有机相比例逐渐升高至 80%，确保供试品溶液中所有组分均被洗脱出色谱系统，防止残留在色谱柱中影响后续样品检测。

4.3　影响因素试验结果讨论

辉瑞和自制的克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠的初始含量均为 0.5 mg • mL^{-1}，与处方量一致，换算成百分浓度为 0.05%，在静脉给药输液中的参考用量 0.01% ～ 0.075%[10]。高温条件下，依地酸二钠含量均无变化，预测在规定的贮藏条件下（遮光、密闭、阴凉），辉瑞和自制的克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量均不会发生改变。光照条件下，依地酸二钠含量均有所下降，但自制的克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量降低速度更快。有文献报道了元素杂质在光照条件下催化依地酸二钠降解 [11-12]，因此推测自制的克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量降低速度更快与自制药液中元素杂质的含量更高有关，有待进一步证实。

本文建立的克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量检测方法方法学验证表明该方法具有较好的专属性、重复性、准确性等，同时该方法操作简便，适用于实验室的日常放行检测。

参考文献

[1]　张丽宝，王芳，蔡相涛，等 . 克林霉素磷酸酯注射液一致性评价研究 [J]. 山东化工，2020，49（22）：124-125.

[2] 陈琦，李锡文，李路光 . 克林霉素磷酸酯注射液稳定性的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2009，15（7）：31-33.
[3] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：548.
[4] 赵磊，刘北力，蒋黄卉，等 . 高效液相色谱法测定碳酸氢钠注射液中乙二胺四乙酸二钠 [J]. 化学分析计量，2020，29（1）：23-25.
[5] 郑俊民 . 药用辅料手册 [M]. 4 版 . 北京：化学工业出版社，2005：263.
[6] 陆滢 . 反相高效液相色谱法测定替硝唑氯化钠注射液中乙二胺四乙酸二钠含量 [J]. 中国药业，2013，22（24）：37-38.
[7] 陈达，居斌，赵述强，等 . HPLC 法考察硫酸奈替米星注射液中依地酸二钠的含量 [J]. 药学研究，2018，37（1）：23-26.
[8] 许秦，刘依涵 . HPLC 法检测面条中的乙二胺四乙酸二钠 [J]. 现代食品，2018，11（21）：174-179.
[9] 上海聚可医药科技有限公司 . 一种乙酰半胱氨酸液体制剂中依地酸二钠的含量测定方法：CN201810878482.9[P]. 2020-02-14.
[10] 王向东，尧婷，徐卫国 . 高效液相色谱法测定碳酸氢钠注射液中依地酸二钠的限量 [J]. 机电信息，2017（29）：39-44.
[11] 尤翔宇 . 三维电极法处理 EDTA 废水的基础研究 [D]. 长沙：中南大学，2013.
[12] 林琳，袁志文 . 生物降解乙二胺四乙酸（EDTA）研究进展 [J]. 净水技术，2008，27（5）：10-13.

（收稿日期：2021-09-02；修回日期：2021-10-18）

基于 QuEChERS-GC-MS/MS 法同时测定湘产黄精中的 74 种农药残留

马杰[1, 2]，丁野[1, 2]，孙辉[1, 2*]，王湘波[1, 2]（1. 湖南省药品检验研究院，长沙 410001；2. 湖南省药品质量评价工程技术中心，长沙 410001）

摘要：目的 建立 QuEChERS 结合气相色谱 - 串联质谱（GC-MS/MS）法测定黄精中的有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类等 74 种农药的残留。**方法** 样品经乙腈涡旋提取、QuEChERS 净化、乙腈定容后，由 HP-5MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）分离，采用气相色谱串联质谱技术检测，采用多反应监测模式（MRM），内标法定量。**结果** 74 种农药在 4 ～ 400 ng • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系，相关系数均大于 0.97；检测限和定量限分别在 0.04 ～ 3.32 和 0.14 ～ 11.05 mg • kg^{-1}，3 个不同浓度添加水平的平均回收率在 60% ～ 120% 的农药数占比为 94.6%，*RSD* 均小于 15%。**结论** 本方法的灵敏度、准确度和精密度均符合农药多残留检测技术要求，适用于黄精中农药残留的筛查检测，对黄精的规范种植有一定的参考价值。

关键词：黄精；农药残留量；QuEChERS；GC-MS/MS
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2648-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.031

Simultaneous determination of 74 pesticide residues in Polygonati Rhizoma from Hunan by QuEChERS-GC-MS/MS

MA Jie[1, 2], DING Ye[1, 2], SUN Hui[1, 2*], WANG Xiang-bo[1, 2] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To determine 74 pesticide residues in Polygonati Rhizoma by QuEChERS combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** The samples

基金项目：湖南省科药联合基金项目（No.2020JJ9034）。
作者简介：马杰，男，硕士，主管中药师，主要从事中药材及饮片的质量检验与研究工作，E-mail：majie172@qq.com *通信作者：孙辉，男，博士，副主任药师，主要从事中药质量检验与研究工作，E-mail：470039516@qq.com

were extracted by acetonitrile vortex, purified by QuEChERS, and volume fixed by acetonitrile. They were detected by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS) after separation with HP-5MS capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), and were finally analyzed with multiple reaction monitoring mode (MRM). The internal standard method was used for the quantitative analysis. **Results** All the 74 pesticides showed a good linear relationship at 4 ～ 400 ng • mL^{-1}, with the correlation coefficients greater than 0.97. The limits of detection and limits of quantification were 0.04 ～ 3.32 mg • kg^{-1} and 0.14 ～ 11.05 mg • kg^{-1}, respectively. The average recoveries of pesticides with three concentration levels ranged from 60% to 120% (accounting for 94.6%), and the *RSD* was less than 15%. **Conclusion** The sensitivity, accuracy and precision of this method all meet the technical requirements for the detection of pesticide residues. It is suitable for the screening and detection of pesticide residues in Polygonati Rhizoma, and can provide a reference for the standardized cultivation of Polygonati Rhizoma.

Key words: Polygonati Rhizoma; pesticide residue; QuEChERS; GC-MS/MS

黄精是百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum Coll.*et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 的干燥根茎，具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效[1]，是药食同源的多用途植物，为我国常用大宗中药材品种。随着国内外对黄精开发的热度不断升温，特别是在营养保健、中国老年疾病预防等方面的需求增大，黄精的种植规模不断扩大。在黄精的各种来源中，尤以湖南产的多花黄精品质为上乘[2-3]。为了防治病虫害[4-5]，黄精药材种植者往往凭借经验用药，种植过程中乱用、滥用、误用农药时有发生，导致质量安全隐患，从而制约了黄精产业的发展和升级。目前，黄精中的农药多残留检测报道较少，缺乏较为系统、可靠的检测方法。

QuEChERS 法是近年来中成药中农药多残留成分较为常用的前处理方法之一[6-7]，具有快速（Quick）、简单（Easy）、廉价（Cheap）、有效（Effective）、可靠（Rugged）及安全（Safe）的优势，其利用吸附剂填料与样品基质中的杂质相互作用达到对供试品除杂净化的目的，以实现杂质的最低限度干扰。气相色谱 - 串联质谱联用（GC-MS/MS）技术灵敏度高、专属性强，可一次完成对多种农药残留的痕量分析，目前已被广泛应用于中药材中农药多残留的测定。QuEChERS 联合 GC-MS/MS，成功解决了各种复杂基质中药材中多种农药残留的检测问题[8-9]。

为实现对黄精药材中农药残留风险评价，本文建立了一种 QuEChERS-GC-MS/MS 同时测定药材中 74 种农药残留量的方法，并测定了湖南省内收集的 4 批次黄精样品中的农药残留情况。

1　仪器与试药

7890B/7010 型三重四级杆气相色谱质谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；AE240 型天平（德国梅特勒托利多公司）；EYELA CM-1000 高速震荡仪（上海爱朗仪器有限公司）。

乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；SHIMSEN 样品前处理净化盐包（含无水硫酸镁 6.0 g 与无水乙酸钠 1.5 g），SHIMSEN 样品前处理净化材料 [含无水硫酸镁 900 mg、*N*- 丙基乙二胺（PSA）300 mg，十八烷基硅烷键合硅胶 300 mg，硅胶 300 mg，石墨化炭黑 90 mg，日本岛津公司]；冰醋酸为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；实验用水均为高纯水（经 Milli-Q 超纯水器纯化）；74 种农药对照品溶液（批号：30765XT/30766XT/30767XT，质量浓度均为 100 μg • mL^{-1}，北京曼哈格生物科技有限公司）；氘代莠去津内标储备液（ethylamino D5，批号：20441XB，100 μg • mL^{-1}）。4 批样品购自药材市场及中药饮片生产企业，产地均为湖南，经丁野主任中药师鉴定为黄精 Polygonatum sibiricum Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 的干燥根茎。

2　方法与结果

2.1　色谱条件[10-12]

HP-5MS 弹性石英毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm），载气为高纯氦气，恒压模式，柱前压为 124 kPa；进样口温度为 280 ℃，脉冲不分流进样。程序升温：初始温度 70 ℃，保持 2 min，先以 25 ℃ • min^{-1} 升温至 140 ℃，再以 4 ℃ • min^{-1} 升温至 200 ℃，最后以 7 ℃ • min^{-1} 升温至 280 ℃，保持 8 min。

2.2　质谱条件

EI 源，70 eV，离子源温度为 270 ℃，接口温度为 280 ℃。碰撞气：氮气（纯度≥ 99.999%）；溶剂延迟：5 min；质谱监测模式：MRM 模式分段；

每种化合物选择两对离子对。保留时间、离子对、 碰撞能等如表 1 所示。

表 1 74 种农药的保留时间、监测离子对、碰撞电压 (CE)

Tab 1 Retention time，monitoring ion pairs and collision voltage of the 74 pesticides

No.	农药	保留时间 /min	定量离子对（*m/z*）	碰撞电压 /V	定性离子对（*m/z*）	碰撞电压 /V
1	敌敌畏	5.677	109.0 → 79.0	8	184.9 → 93.0	12
2	二苯胺	9.897	169.0 → 168.2	15	169.0 → 140.0	35
3	四氯硝基苯	9.638	260.9 → 203.0	10	214.9 → 179.0	10
4	杀虫脒	10.589	195.9 → 181.0	5	151.9 → 117.1	10
5	氟乐灵	10.944	305.9 → 264.0	5	264.0 → 160.1	10
6	*α*-666	11.307	181.1 → 145.1	15	216.9 → 181.1	5
7	氯硝胺	11.783	206.1 → 176.0	10	206.0 → 148.0	20
8	六氯苯	11.570	283.8 → 213.9	30	283.8 → 248.8	15
9	五氯甲氧基苯	11.771	280.0 → 237.0	22	280.0 → 265.0	12
10	*β*-666	12.360	181.0 → 145.1	15	216.9 → 181.1	5
11	*γ*-666	12.563	181.0 → 145.1	15	216.9 → 181.1	5
12	五氯硝基苯	12.776	295.0 → 237.0	18	237.0 → 143.0	30
13	特丁硫磷	12.900	230.9 → 129.0	30	230.9 → 175.0	10
14	*δ*-666	13.600	181.1 → 145.1	15	216.9 → 181.1	5
15	百菌清	13.820	263.8 → 168.0	25	263.8 → 229.0	20
16	七氟菊酯	14.128	177.1 → 127.1	15	197.0 → 141.1	10
17	五氯苯胺	14.498	265.0 → 194.0	22	265.0 → 230.0	15
18	乙烯菌核利	15.546	211.9 → 145.0	30	212.0 → 109.0	40
19	甲基毒死蜱	15.498	285.9 → 271.0	15	286.0 → 93.0	20
20	甲基对硫磷	15.500	262.9 → 109.0	10	262.9 → 79.0	30
21	七氯	15.655	271.8 → 236.9	15	273.7 → 238.9	15
22	八氯二丙醚	16.199	129.9 → 94.9	20	108.9 → 83.0	10
23	皮蝇磷	16.187	284.9 → 269.9	15	286.0 → 271.0	15
24	甲基五氯苯硫醚	16.838	295.8 → 263.0	15	295.8 → 281.0	20
25	杀螟硫磷	16.889	276.9 → 109.0	15	260.0 → 125.0	10
26	苯氟磺胺	17.234	123.0 → 77.1	20	223.9 → 123.1	10
27	艾试剂	17.258	262.9 → 192.9	35	254.9 → 220.0	24
28	三氯杀螨醇	17.957	139.0 → 111.0	15	251.0 → 139.0	10
29	毒死蜱	17.983	313.8 → 257.8	8	313.8 → 285.8	15
30	对硫磷	18.010	290.9 → 109.0	12	290.9 → 80.9	23
31	三唑酮	18.150	208.0 → 181.1	5	208.0 → 111.0	20
32	氯酞酸二甲酯	18.173	298.9 → 221.0	25	300.9 → 223.0	25
33	溴硫磷	18.748	330.8 → 315.8	15	328.8 → 313.8	15
34	仲丁灵	18.913	266.0 → 220.2	10	266.0 → 174.2	20
35	顺式环氧七氯	19.325	352.8 → 262.9	15	354.8 → 264.9	15
36	氧化氯丹	19.385	184.9 → 85.0	30	386.7 → 262.7	15
37	反式环氧七氯	19.325	352.8 → 262.9	15	354.8 → 264.9	15
38	二甲戊乐灵	19.631	251.8 → 162.2	10	251.8 → 161.1	15
39	哌草丹	20.098	144.9 → 112.1	5	144.9 → 69.1	15
40	三唑醇	20.285	128.0 → 65.0	25	168.0 → 70.0	10
41	氟虫腈	20.459	350.8 → 254.8	15	366.8 → 212.8	35
42	腐霉利	20.546	282.8 → 96.0	10	284.8 → 96.0	10
43	反式氯丹	20.564	372.8 → 265.8	15	374.8 → 265.8	15
44	乙基溴硫磷	21.108	358.7 → 302.8	15	302.8 → 284.7	15
45	顺式氯丹	21.380	372.9 → 265.9	20	271.9 → 236.9	15
46	*o*，*p*′ -DDE	21.058	246.0 → 176.2	30	248.0 → 176.2	30
47	*α*- 硫丹	21.144	194.9 → 159.0	5	276.7 → 241.9	15
48	氟节胺	22.007	143.0 → 107.1	20	143.0 → 117.0	20
49	狄氏剂	22.507	262.9 → 193.0	35	277.0 → 241.0	5
50	*o*，*p*′ -DDD	23.089	235.0 → 165.2	20	237.0 → 165.2	20
51	*p*，*p*′ -DDE	22.744	246.1 → 176.2	30	315.8 → 246.0	15
52	异狄氏剂	23.450	262.8 → 193.0	35	244.8 → 173.0	30

续表 1

No.	农药	保留时间 /min	定量离子对（*m/z*）	碰撞电压 /V	定性离子对（*m/z*）	碰撞电压 /V
53	除草醚	23.638	202.0 → 139.1	20	282.9 → 253.0	10
54	溴虫腈	24.123	246.9 → 227.0	15	327.8 → 246.8	15
55	*p*，*p*′ -DDD	24.500	235.0 → 165.2	20	237.0 → 165.2	20
56	*o*，*p*′ -DDT	24.570	235.0 → 165.2	20	237.0 → 165.2	20
57	*β*-硫丹	23.889	206.9 → 172.0	15	267.0 → 196.0	14
58	硫丹硫酸盐	25.540	271.9 → 237.0	15	387.0 → 289.0	4
59	*p*，*p*′ -DDT	25.822	235.0 → 165.2	20	237.0 → 165.2	20
60	溴满酯	27.457	341.0 → 183.0	15	341.0 → 185.0	30
61	联苯菊酯	27.731	181.0 → 165.0	25	181.0 → 166.0	20
62	甲氰菊酯	27.862	208.0 → 181.0	5	265.0 → 210.0	8
63	甲氧滴滴涕	27.709	227.0 → 169.0	25	227.0 → 212.0	18
64	灭蚁灵	28.536	271.8 → 236.8	15	273.8 → 238.8	15
65	苯醚菊酯	28.432	183.0 → 168.0	12	183.0 → 153.0	12
66	氟丙菊酯	29.230	181.0 → 152.0	30	207.8 → 181.1	10
67	氯氟氰菊酯	29.230	208.0 → 181.0	5	197.0 → 141.0	10
68	氯菊酯	30.339	183.1 → 168.1	10	183.1 → 165.1	10
69	氟氯氰菊酯	30.336	163.0 → 127.0	5	226.0 → 206.0	12
70	氯氰菊酯	31.500	181.0 → 152.0	10	181.0 → 127.0	30
71	氟氰戊菊酯	31.684	156.9 → 107.1	15	198.9 → 157.0	10
72	奎禾灵	31.546	371.8 → 298.9	10	163.0 → 136.0	10
73	氰戊菊酯	32.595	167.0 → 125.1	5	225.0 → 119.0	18
74	溴氰菊酯	33.750	181.0 → 152.1	25	252.7 → 174.0	8
内标	氘代莠去津	12.253	205.0 → 105.0	18	205.0 → 127.0	12

2.3　溶液的配制

2.3.1　供试品溶液　将样品置于－ 18 ℃冷冻 48 h 后，立即粉碎得黄精粉末。取黄精粉末（过二号筛）3 g，精密称定，置于 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中，加入超纯水 15 min，涡旋使充分浸润，静置 30 min；精密加入 1% 醋酸乙腈（取冰醋酸溶液 1 mL，加乙腈至 1000 mL）15 mL 和内标溶液 100 μL，涡旋震荡 5 min，冰浴冷却 5 min，加入前处理净化盐包（含无水硫酸镁 6.0 g 与无水乙酸钠 1.5 g），涡旋混合 5 min，离心 5 min（8000 r • min^{-1}）；取上清液 9 mL 置于含 SHIMSEN 样品前处理净化材料的塑料离心管中，涡旋混合 1 min，离心，精密吸取上清液 5 mL 置氮吹仪上于 40 ℃水浴浓缩至约 0.4 mL，加乙腈定容至 1 mL，涡旋混匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3.2　混合对照品溶液的制备　取对照品溶液，加含 0.05% 醋酸的乙腈配制成 0.1 μg • mL^{-1} 和 1 μg • mL^{-1} 的两种混合对照品溶液。

2.3.3　内标溶液的制备　取氘代莠去津内标储备液适量，加乙腈制成质量浓度为 6 μg • mL^{-1} 的溶液。

2.3.4　空白基质的筛选　取黄精样品，按照“2.3.1”项下方法制备，进样分析，找出未检出 74 种目标农药的空白基质样品，最终确认样品 4 为空白基质样品。

2.3.5　基质混合对照品溶液的制备　取空白样品 3 g，共 6 份，同“2.3.1”项下方法处理至“置氮吹仪上于 40 ℃水浴浓缩至约 0.4 mL”，分别加入混合对照品溶液（0.1 μg • mL^{-1}）50、100 μL，混合对照品溶液（1 μg • mL^{-1}）50、100、200、400 μL，加乙腈定容至 1 mL，涡旋混匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得基质混合对照品溶液，系列质量浓度分别为 5、10、50、100、200、400 ng • mL^{-1}。

精密吸取上述溶液各 1 μL，进样测定，按标准曲线法计算供试品中 74 种农药残留量。基质混合对照品溶液、检出样品溶液总离子流图见图 1，检出农药的 MRM 检测结果质谱图见图 2。

2.4　方法学验证

2.4.1　线性关系　精密吸取系列混合对照品溶液各 1 μL，进样测定，记录各待测组分的色谱峰面积，以各成分的质量浓度为横坐标（*X*）、各成分峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标（*Y*），进行回归分析，结果表明，各农药对照品线性关系良好，见表 2。

2.4.2　精密度试验　取“2.3.5”项下质量浓度为 100 ng • mL^{-1} 的对照品溶液，分别精密吸取 1 μL，进样测定 6 次，计算各农药对照品峰面积的 *RSD*，结果均小于 15%（$n = 6$），表明仪器的精

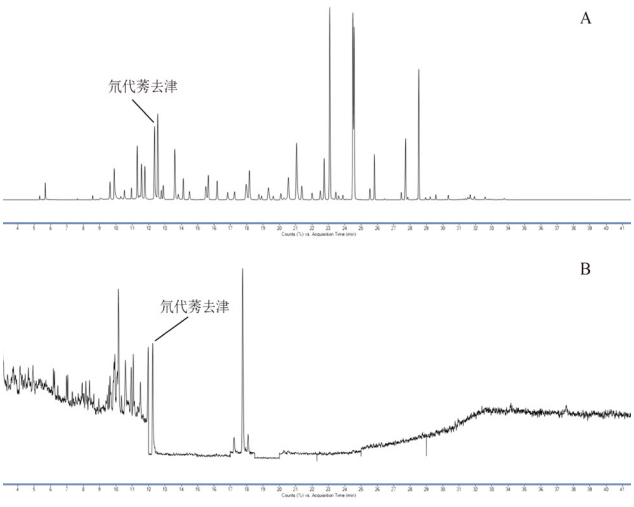


图 1 总离子流图

Fig 1 TIC of 74 pesticides

A. 基质混合对照品（mixed control）；B. 供试品（sample）

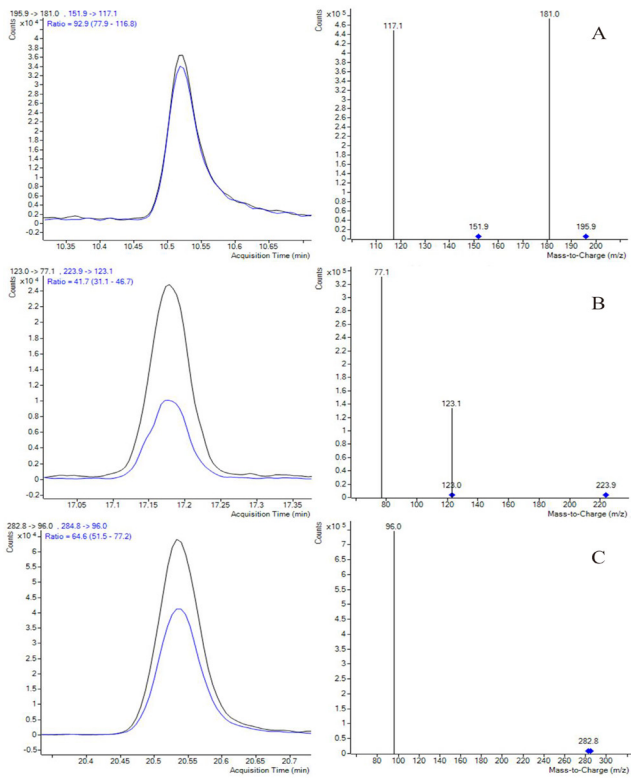


图 2 3 种检出农药的 MRM 检测结果质谱图

Fig 2 Typical mass chromatograms of MRM monitoring results of 3 pesticides

A. 杀虫脒（chlordimeform）；B. 苯氟磺胺（dichlofluanid）；C. 腐霉利（procymidone）

密度满足试验要求。

2.4.3 重复性试验 取同一黄精样品（1 号），共 6 份，制成供试品后测定，样品检出杀虫脒、苯氟磺胺和腐霉利，故以样品中的杀虫脒、苯氟磺胺和腐霉利的峰面积计算含量后求得 *RSD*，结果三者的 *RSD* 分别为 6.3%、4.3% 和 5.9%，均小于 15%，符合农药残留检测的要求。

2.4.4 加样回收试验 取空白样品 3 g，共 9 份，分别精密加入混合对照品溶液（0.1 μg • mL^{-1}）50、100、500 μL，每个浓度各重复 3 份，同供试品溶液的制备方法处理，即得加样回收对照品溶液。按“2.1”项下色谱质谱条件测定并计算回收率，结果平均回收率均在 60% ～ 140% 的农药数占比为 94.6%，*RSD* 均小于 15%，结果见表 2。

2.4.5 检测限（LOD）与定量限（LOQ） 根据《中国药典》2015 年版四部“药品质量标准分析方法验证指导原则”中信噪比法计算检测限与定量限，以上述线性关系考察中质量浓度为 5 ng • mL^{-1} 的各目标农药的信噪比。按 3 倍信噪比对应的目标物浓度作为检测限，以 10 倍信噪比对应的目标物浓度作为定量限，结果见表 2。

2.5 样品测定

按建立的方法处理并测定 4 批收集的样品，结果见表 3，样品中检出农药品种为杀虫脒、苯氟磺胺和腐霉利，其余农药均未检出。

3 讨论

本文首次将 QuEChERS 前处理方法结合 GC-MS/MS 检测技术用于黄精药材中多种农药残留的快速分析检测。

经前期调研，黄精以林下套种、杉树林下种植和大田种植等为主要生产模式，由于是多年生植物，使用农药消灭病虫害是保证黄精产量的重要方法之一，并且由于历史原因耕地土壤中有机氯类、有机磷类等农药品种会有较大残留，因此，本研究选择包含有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类在内的 74 种农药品种作为对照较为全面。

对黄精饮片的前处理条件进行了三个方面的摸索，包括乙腈高速匀浆直接提取、直接提取＋PSA 固相萃取小柱净化和 QuEChERS 法，结果 QuEChERS 法能够较好地除去黄精样品中的多糖、色素等不利于农药测定的干扰杂质，降低了因污染对分析仪器稳定性的影响。黄精中含多糖成分较多，在粉碎和样品前处理过程中容易粘连结块，本试验在使黄精样品得到充分冷冻后再立即粉碎，在加入 QuEChERS 前处理盐包之前冰浴冷却溶液，并在其后的步骤中控制好溶液温度，避免了粉碎和前处理样品过程中的结块现象。采用药典通则 2341 项下推荐的质谱参数，部分农药品种的响应偏低，因此本研究对监测离子对、碰撞电压分别进行了优化。

本法 74 种农药残留在 4 ～ 400 ng • mL^{-1} 内线性关系良好，检测限和定量限分别在 0.04 ～ 3.32 和 0.14 ～ 11.05 mg • kg^{-1}，3 个不同浓度添加水平的

表 2 相关系数、线性范围、检测限、定量限和加样回收率

Tab 2 Correlation coefficient，Linear range，LOD，LOQ and recovery

No.	农药	相关系数（*r*）	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	检测限（LOD）/（μg • kg^{-1}）	定量限（LOQ）/（μg • kg^{-1}）	回收率（*RSD*）/%		
						低	中	高
1	敌敌畏	0.9956	5.015 ～ 401.2	0.53	1.75	124（5.1）	113（4.8）	110（4.3）
2	二苯胺	0.9939	4.905 ～ 392.4	0.39	1.29	113（4.9）	108（3.5）	105（6.5）
3	四氯硝基苯	0.9982	4.95 ～ 396	0.32	1.06	105（6.5）	104（5.7）	99（2.7）
4	杀虫脒	0.9983	4.86 ～ 388.8	0.30	1.01	139（5.7）	133（4.9）	129（6.0）
5	氟乐灵	0.9952	4.775 ～ 382	0.22	0.72	67（8.5）	74（9.6）	75（8.7）
6	*α*-666	0.9983	4.885 ～ 390.8	0.15	0.50	91（2.5）	94（4.6）	95（5.1）
7	氯硝胺	0.9965	4.825 ～ 386	3.32	11.05	88（4.6）	92（3.2）	96（4.5）
8	六氯苯	0.9956	4.83 ～ 386.4	0.04	0.14	75（6.7）	81（7.2）	79（7.8）
9	五氯甲氧基苯	0.9982	4.71 ～ 376.8	0.12	0.39	65（8.9）	72（8.3）	66（7.4）
10	*β*-666	0.9976	5.02 ～ 401.6	0.11	0.36	97（2.1）	98（3.4）	103（2.6）
11	*γ*-666	0.9948	4.875 ～ 390	0.07	0.23	95（3.1）	97（4.2）	93（5.4）
12	五氯硝基苯	0.9977	4.98 ～ 398.4	0.13	0.45	97（4.1）	103（4.9）	95（3.6）
13	特丁硫磷	0.9966	4.935 ～ 394.8	0.20	0.67	83（7.6）	87（8.1）	84（6.4）
14	*δ*-666	0.9969	4.93 ～ 394.4	0.22	0.73	114（4.6）	108（3.7）	104（3.1）
15	百菌清	0.9973	4.96 ～ 396.8	0.19	0.64	128（7.4）	122（9.2）	109（6.3）
16	七氟菊酯	0.9958	4.835 ～ 386.8	0.16	0.53	113（6.1）	101（4.2）	99（4.5）
17	五氯苯胺	0.9978	4.64 ～ 371.2	0.35	1.15	93（7.4）	102（9.2）	96（6.8）
18	乙烯菌核利	0.9896	5.015 ～ 401.2	0.28	0.94	79（4.6）	82（6.3）	76（7.5）
19	甲基毒死蜱	0.9935	4.88 ～ 390.4	0.46	1.53	98（6.8）	102（7.2）	94（7.8）
20	甲基对硫磷	0.9892	4.615 ～ 369.2	0.09	0.30	107（10.6）	103（7.8）	106（8.5）
21	七氯	0.9982	4.81 ～ 384.8	0.12	0.40	89（7.2）	97（4.2）	96（5.4）
22	八氯二丙醚	0.9916	4.92 ～ 393.6	0.29	0.95	73（7.6）	72（3.2）	86（6.8）
23	皮蝇磷	0.9948	4.885 ～ 390.8	0.18	0.62	103（6.2）	99（5.9）	104（8.5）
24	甲基五氯苯硫醚	0.9981	4.445 ～ 355.6	0.08	0.25	112（7.7）	106（7.1）	99（4.8）
25	杀螟硫磷	0.9999	4.845 ～ 387.6	0.11	0.38	93（6.6）	97（6.2）	101（7.5）
26	苯氟磺胺	0.9913	4.775 ～ 382	0.82	2.72	74（10.1）	78（9.2）	75（8.3）
27	艾试剂	0.9963	4.99 ～ 399.2	0.22	0.74	87（9.6）	95（9.5）	91（8.9）
28	三氯杀螨醇	1.0000	4.925 ～ 394	0.22	0.72	88（6.6）	102（4.1）	96（2.8）
29	毒死蜱	0.9905	4.73 ～ 378.4	0.30	1.00	102（2.7）	94（2.2）	98（2.5）
30	对硫磷	0.9782	4.76 ～ 380.8	1.24	4.13	98（4.8）	89（5.4）	93（4.9）
31	三唑酮	0.9999	4.815 ～ 385.2	1.18	3.94	85（8.1）	116（9.3）	96（7.6）
32	氯酞酸二甲酯	0.9918	5.005 ～ 400.4	0.13	0.44	68（9.6）	62（8.2）	66（5.5）
33	溴硫磷	0.9902	4.86 ～ 388.8	0.63	2.10	93（7.5）	112（6.7）	104（5.1）
34	仲丁灵	0.9778	4.465 ～ 357.2	0.13	0.43	86（10.6）	98（9.7）	99（8.4）
35	顺式环氧七氯	0.9958	4.825 ～ 386	0.26	0.85	104（8.4）	107（8.2）	102（6.3）
36	氧化氯丹	0.9959	4.925 ～ 394	0.20	0.66	108（5.7）	99（7.9）	106（7.4）
37	反式环氧七氯	0.9958	4.93 ～ 394.4	0.26	0.85	113（3.1）	102（2.2）	107（3.7）
38	二甲戊乐灵	0.9820	4.97 ～ 397.6	0.58	1.93	66（9.6）	72（11.5）	74（10.7）
39	哌草丹	0.9876	4.735 ～ 378.8	0.06	0.20	61（6.9）	75（8.2）	78（6.5）
40	三唑醇	0.9756	4.64 ～ 371.2	1.90	6.34	118（8.4）	104（8.1）	126（8.2）
41	氟虫腈	0.9823	3.775 ～ 302	0.77	2.56	98（6.6）	102（9.2）	106（7.5）
42	腐霉利	1.0000	4.865 ～ 389.2	0.24	0.79	93（8.8）	107（6.7）	101（5.9）
43	反式氯丹	0.9932	4.79 ～ 383.2	0.22	0.74	94（5.4）	109（7.1）	114（9.5）
44	乙基溴硫磷	0.9902	4.87 ～ 389.6	0.22	0.74	119（10.3）	112（2.9）	109（6.7）
45	顺式氯丹	0.9945	4.66 ～ 372.8	0.21	0.69	98（9.6）	86（11.7）	106（5.9）
46	*o*，*p′* -DDE	0.9922	4.935 ～ 394.8	0.10	0.33	61（3.8）	95（6.1）	101（12.9）
47	*α*-硫丹	0.9941	5.025 ～ 402	0.41	1.38	106（8.8）	97（6.7）	101（5.9）
48	氟节胺	0.9999	4.84 ～ 387.2	0.30	1.01	113（8.5）	110（11.3）	98（6.1）
49	狄氏剂	0.9949	4.845 ～ 387.6	0.32	1.05	96（5.9）	119（6.5）	95（5.0）
50	*o*，*p′* -DDD	0.9935	4.98 ～ 398.4	0.20	0.67	94（5.3）	101（3.7）	102（5.4）
51	*p*，*p*’-DDE	0.9921	4.87 ～ 389.6	0.19	0.64	101（7.2）	95（3.5）	69（14.5）

续表 2

No.	农药	相关系数（*r*）	线性范围 /（ng·mL^{-1}）	检测限（LOD）/（μg·kg^{-1}）	定量限（LOQ）/（μg·kg^{-1}）	回收率（*RSD*）/%		
						低	中	高
52	异狄氏剂	0.9965	5.015 ～ 401.2	0.25	0.85	95（3.3）	97（2.7）	96（2.9）
53	除草醚	0.9999	4.78 ～ 382.4	0.17	0.58	101（8.2）	93（2.2）	87（6.1）
54	溴虫腈	0.9999	4.99 ～ 399.2	2.83	9.42	112（3.7）	97（3.1）	103（5.2）
55	*p*，*p*′ -DDD	0.9998	4.855 ～ 388.4	0.04	0.14	98（4.7）	105（4.9）	94（5.5）
56	*o*，*p*′ -DDT	0.9999	4.445 ～ 397.6	0.15	0.51	101（7.8）	92（7.5）	96（3.6）
57	*β*-硫丹	0.9924	4.875 ～ 390.8	0.29	0.97	107（12.1）	113（9.3）	134（11.7）
58	硫丹硫酸盐	0.9998	4.445 ～ 355.6	0.31	1.04	105（6.9）	98（2.7）	109（6.4）
59	*p*，*p*′ -DDT	0.9999	4.875 ～ 390	0.09	0.29	104（5.8）	87（6.2）	96（5.3）
60	溴满酯	0.9902	3.775 ～ 302	0.53	1.77	127（6.9）	112（4.5）	87（13.3）
61	联苯菊酯	0.9999	4.915 ～ 393.2	0.21	0.69	115（4.8）	105（4.9）	95（5.5）
62	甲氰菊酯	0.9999	4.63 ～ 370.4	0.65	2.18	102（4.1）	98（3.0）	96（4.3）
63	甲氧滴滴涕	0.9907	4.77 ～ 381.6	0.51	1.71	98（4.7）	123（4.1）	105（3.8）
64	灭蚁灵	0.9971	4.66 ～ 372.8	0.04	0.14	107（5.1）	105（12.5）	94（3.5）
65	苯醚菊酯	0.9999	4.785 ～ 382.8	0.60	2.01	104（3.2）	119（6.8）	94（8.6）
66	氟丙菊酯	0.9988	4.96 ～ 396.8	2.04	6.79	92（5.4）	91（3.9）	86（8.2）
67	氯氟氰菊酯	0.9967	4.765 ～ 381.2	0.11	0.37	101（7.4）	83（4.4）	88（3.8）
68	氯菊酯	0.9940	4.64 ～ 371.2	0.16	0.52	81（3.7）	89（5.4）	92（7.1）
69	氟氯氰菊酯	0.9930	4.82 ～ 385.6	0.34	1.14	85（7.3）	94（4.9）	105（5.6）
70	氯氰菊酯	0.9978	4.665 ～ 373.2	3.04	10.12	111（3.7）	109（5.4）	132（7.1）
71	氟氰戊菊酯	0.9979	4.94 ～ 395.2	1.54	5.12	99（3.7）	102（10.8）	94（7.5）
72	奎禾灵	0.9945	4.605 ～ 368.4	0.12	0.40	101（4.3）	98（5.9）	106（4.4）
73	氰戊菊酯	0.9972	4.66 ～ 372.8	1.91	6.36	60（8.1）	81（6.0）	75（4.6）
74	溴氰菊酯	0.9947	5.01 ～ 400.8	1.70	5.66	98（8.1）	97（7.9）s	108（10.9）

表 3 黄精农药残留测定结果 (μg·kg^{-1})

Tab 3 Determination of pesticide residues in 4 batches of Rhizoma Polygonati (μg·kg^{-1})

序号	杀虫脒	苯氟磺胺	腐霉利
1	11.79	4.94	17.16
2	9.16	—	22.94
3	—	11.83	9.84
4	—	—	—

平均回收率在 60% ～ 120% 的农药数占比为 94.6%，*RSD* 均小于 15%，适用于不同基原的湘产黄精（黄精和多花黄精）的 74 种农药残留检测，对湘产黄精生产种植中农药监控有一定意义。由于本次试验仅收集 4 批次的样本，代表性不足，并不能完全反映湖南产黄精的农药污染真实情况。为实现湘产黄精的整体农残监控及用药安全的全面了解，可通过对产地农药使用习惯、土壤污染状况开展实地调研、收集更多产地的样品后，应用本研究建立的方法进行测定并进行风险评估。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：319.

[2] 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.

[3] 梁忠厚，李有清，邹青，等 . 湖南省黄精产业发展现状与对策 [J]. 湖南生态科学学报，2020，7（3）：35-42.

[4] 孙世伟，刘爱勤，桑利伟，等 . 5 种杀螨剂对黄精二斑叶螨防治试验 [J]. 西南农业学报，2009，22（3）：655-658.

[5] 叶家东 . 皖南山区黄精栽培中主要虫害的防控 [J]. 基层农技推广，2020，8（11）：83-84.

[6] 方翠芬，唐登峰，郑成 . GC-MS/MS 法同时测定三七片和三七胶囊中 24 种农药残留量 [J]. 西北药学杂志，2017，32（6）：690-693.

[7] 肖丽和，刁璇，谢耀轩，等 . QuEChERS 联合在线 GPC-GC-MS 检测冠心丹参胶囊中 20 种有机氯农药残留 [J]. 中国新药杂志，2014，23（15）：1749-1753.

[8] 谭鹏，张海珠，许莉，等 . 基于 QuEChERS-GC-QQQ-MS/MS 法同时测定知母中 58 种农药残留 [J]. 中草药，2018，49（14）：3397-3405.

[9] 耿昭，李小红，苟琰，等 . QuEChERS 法结合气相色谱 - 串联质谱法测定贝母类中药中 53 种农药残留 [J]. 中草药，2020，51（20）：5337-5347.

[10] 崔丽丽，闫梅霞，逄世峰，等 . 灵芝中 17 种农药的 QuEChERS- 气相色谱 - 质谱联用快速检测技术 [J]. 食品科学，2019，40（12）：326-331.

[11] 熊颖，李纯，任晋，等 . SPE-LC-MS/MS 和 SPE-GC-MS/MS 测定绞股蓝中 109 种农药残留 [J]. 中南药学，2020，18（12）：2044-2049.

[12] 马杰，罗疆南，李瑞莲，等 . QuEChERS 联合 GC-MS/MS 法测定心可宁胶囊中的 17 种有机氯农药残留量 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1156-1160.

（收稿日期：2021-05-18；修回日期：2021-06-29）

盐酸倍他司汀中基因毒性杂质甲醛的测定

李沫，张耀文，孙苓苓，徐万魁*（辽宁省药品检验检测院，国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，沈阳　110036）

摘要：目的　建立气相色谱法测定盐酸倍他司汀原料中甲醛的含量。**方法**　采用 6% 氰丙基苯基 -94% 二甲基聚硅氧烷为固定液的毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm），溶液直接进样，以水为溶剂，程序升温，氢火焰离子化检测器，进样口温度为 230 ℃，检测器温度为 250 ℃。**结果**　溶剂不干扰测定。甲醛在 0.055 ～ 1.109 ng • mL^{-1} 与测定值线性良好，重复性良好，检测限为 0.018 ng • mL^{-1}，定量限为 0.055 ng • mL^{-1}，低、中、高浓度甲醛的平均回收率分别为 100.6%、96.9%、97.0%，*RSD* 分别为 0.79%、2.1%、1.9%。**结论**　该方法简便、准确、灵敏度高、重现性好，适用于盐酸倍他司汀中基因毒性杂质甲醛的检查。

关键词：盐酸倍他司汀；基因毒性杂质；甲醛
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2655-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.032

Determination of genotoxic impurity formaldehyde in betahistine hydrochloride

LI Mo, ZHANG Yao-wen, SUN Ling-ling, XU Wan-kui* (*Liaoning Institute for Drug Control*, *NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drug*, *Shenyang*　110036)

Abstract: Objective　To determine formaldahyde in betahistine hydrochloride by gas chromatography method. **Methods**　Formaldahyde was separated on a DB-624 capillary chromatographic column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with temperature programming. Nitrogen was used as the carrier gas. The temperature of the injector was 230 ℃. The temperature of flame ionization detector was 250 ℃. **Results**　Determination was not interferred by the solvent. Good linearity was showed in the range of 0.055 － 1.109 ng•mL^{-1}. The LOD and LOQ of formaldahyde in betahistine hydrochloride was 0.018 ng • mL^{-1} and 0.055 ng • mL^{-1}, respectively. The average recovery rate of low, medium and high dose formaldahyde was 100.6%, 96.9%, and 97.0% with *RSD* at 0.79%, 2.1% and 1.9%, respectively. **Conclusion**　The method is specific, accurate and convenient, which can be used for the determination of formaldahyde in betahistine hydrochloride.

Key words: betahistine hydrochloride; genotoxic impurity; formaldahyde

盐酸倍他司汀（betahistine hydrochloride）化学名为 *N*- 甲基 -2- 吡啶乙胺二盐酸盐，商品名为美克乐（Microer），是由意大利佛曼蒂（Formenti）制药集团开发的一种组胺 H_1 受体激动剂，是一种常用的血管扩张药，临床上主要用于治疗各种眩晕综合征、慢性缺血性脑血管疾病、美尼尔氏综合征和相关的眩晕症状 [1-4]。

甲醛是一种有特殊刺激性气味的无色气体，易溶于水和乙醇，作为重要的化工原料被广泛应用于有机合成、合成药品、材料、涂料、橡胶等行业 [5-7]。甲醛是盐酸倍他司汀在合成过程中的残留溶剂之一。基因毒性杂质可从基因突变、染色体畸变、DNA 损伤与修复等多个方面同 DNA 发生直接或间接的相互作用，从而改变 DNA 的结构与构象或引起 DNA 的损伤，进而影响 DNA 的功能或改变其遗传特性，最终引起突变、癌变、

基金项目：辽宁省自然基金资助计划项目（No.2020-MS-073，No.2020-MS-074）。
作者简介：李沫，女，副主任药师，主要从事化学药品质量标准研究，E-mail：lemonbz@163.com　*通信作者：徐万魁，男，主任药师，主要从事药品标准研究，E-mail：xuwank@163.com

畸变等遗传毒性[8-11]。甲醛是确定的基因毒性杂质，人体长期接触甲醛会对呼吸系统、皮肤、肝肺功能和神经系统等造成危害。

近年来，随着基因毒性杂质法规的逐渐完善，美国和欧洲药品监督管理对药品中含有潜在基因毒性杂质的限度要求越来越高，药物中基因毒性杂质如果控制不当，可能会导致临床安全隐患，同时会影响新药上市，甚至导致已上市药品的召回事件[9]。开展盐酸倍他司汀中基因毒性杂质质量控制的研究是非常必要的，故本研究建立了盐酸倍他司汀原料中基因毒性杂质甲醛的分析方法，以保证盐酸倍他司汀原料的安全性。

1　仪器与试药

1.1　仪器

GC-2010Plus 型气相色谱仪（配有 AOC-5000 型自动进样器和氢火焰离子化检测器，日本岛津公司），ALC-1100.2 型分析天平（瑞士 Sartorius 公司），ME204E 型分析天平（美国 Mettler 公司）。

1.2　试药

水中甲醛溶液标准物质（中国计量科学研究院，批号：18001，含量：9.69 mg • mL^{-1}），盐酸倍他司汀（A 厂原料药，批号：202010、202012、202016），纯化水（杭州娃哈哈集团有限公司，批号：20200301）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

采用气相色谱法测定，色谱柱：DB-624（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；检测器：氢火焰离子化检测器（FID）；进样口温度：230 ℃；检测器温度：250 ℃，程序升温：起始温度为 40 ℃，以 20 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 200 ℃，维持 1 min；载气：氮气；柱流速：3.0 mL • min^{-1}；进样方式：溶液直接进样，进样量：1 μL，分流比：1∶1。

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品溶液　精密量取水中甲醛溶液标准物质，用水逐级稀释至质量浓度为 5.5 ng • mL^{-1}，作为对照品储备液；精密量取对照品储备液 1 mL 置 20 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液（质量浓度为 0.275 ng • mL^{-1}）。

2.2.2　供试品溶液　精密称取盐酸倍他司汀 0.1 g 置 10 mL 量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀；精密量取 1 mL 置 20 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.3　系统适用性试验

分别量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂（水）进样，记录色谱图，结果见图 1，空白溶剂色谱峰不干扰测定。

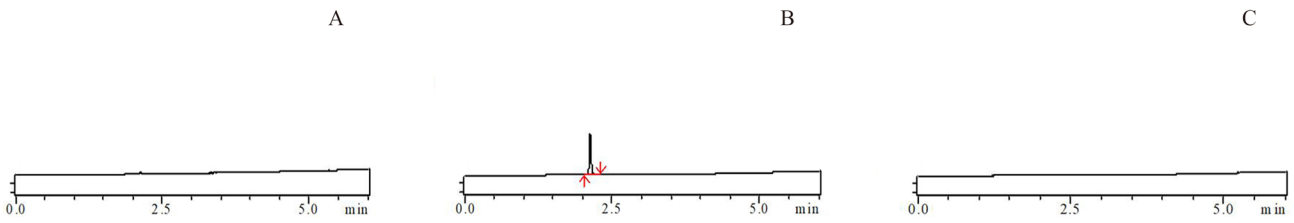


图 1　空白溶剂（A）、对照溶液（B）和供试品溶液（C）气相色谱图

Fig 1　GC chromatogram of the blank solution（A），the control solution（B）and the reference solution（C）

2.4　线性关系考察

取对照品储备液适量并稀释成系列质量浓度溶液，进样，记录色谱图，以各成分色谱峰面积（*A*）为纵坐标，以质量浓度（*C*）为横坐标，进行线性回归。结果表明，甲醛在 0.055 ～ 1.109 ng • mL^{-1} 与测定值线性关系良好，线性方程为 $A = 1.76\times10^{4}C + 2.20\times10^{3}$，$r = 1.000$。

2.5　定量限与检测限

精密量取“2.4”项下 0.055 ng • mL^{-1} 的溶液适量，稀释后进样，以色谱峰的信噪比 *S/N* 为 3 计算检测限，以 *S/N* 为 10 计算定量限。结果表明，甲醛的检测限为 0.018 ng • mL^{-1}，定量限为 0.055 ng • mL^{-1}。

2.6　精密度试验

2.6.1　重复性试验　称取盐酸倍他司汀 0.1 g，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 20 mL 量瓶中，加甲醛对照品储备液 1 mL，用水稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液，平行操作 6 份，分别进样，结果 6 份供试品溶液中甲醛含量均值为 0.269 ng • mL^{-1}，*RSD* 为 0.70%，表明该方法重复性良好。

2.6.2　中间精密度试验　照“2.6.1”项下方法配制溶液，在不同时间由另一名试验人员进样测定，记录峰面积，计算含量。结果 12 份供试品溶液中甲醛含量均值为 0.269 ng • mL^{-1}，*RSD* 为

0.60%，表明该方法中间精密度良好。

2.7 回收试验

称取盐酸倍他司汀 0.1 g（甲醛含量为 0），精密称定，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 20 mL 量瓶中，分别精加甲醛对照品储备液 0.8、1.0 和 1.2 mL，每个浓度 3 份，用水稀释至刻度，摇匀，作为回收率样品溶液。取回收率样品溶液和“2.2”项下对照品溶液，分别进样，计算得甲醛低、中、高浓度的平均回收率分别为 100.6%、96.9%、97.0%，*RSD* 分别为 0.79%、2.1%、1.9%。

2.8 耐用性试验

按“2.2”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液，分别考察起始柱温 [（40±5）℃]、柱流速 [（3±5）mL • min^{-1}] 条件对试验结果的影响，并考察相同填料、不同色谱柱 [TG-624（30 m×0.32 mm，1.8 μm），TG-624（30 m×0.53 mm，3 μm）] 对试验结果的影响。结果显示试验条件的变动对保留时间、分离度、样品检出情况影响较小，方法耐用性良好。

2.9 稳定性试验

按“2.6.1”项下方法配制溶液，分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样，考察峰面积的 *RSD*，结果表明对照品溶液和供试品溶液 *RSD* 分别为 0.48% 和 0.64%，溶液在 10 h 内稳定。

2.10 样品测定

按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果样品中均未检出甲醛。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

待测物甲醛和样品盐酸倍他司汀在水中均有良好的溶解性，尤其是甲醛，考虑到其标准物质是水溶液，故选择水作为溶剂。

3.2 检测方法的选择

目前检测药品中微量的甲醛，主要的测定方法有分光光度法、荧光光度法、高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）和高效液相 / 气相色谱 - 质谱联用法（HPLC/GC-MS）等 [12]。前 3 种方法，样品都需要衍生化后再进行测定，试验操作繁琐，检验灵敏度低。HPLC/GC-MS 法具有灵敏度高、分辨率高、检测限低等优点，但是仪器成本较为昂贵，应用不够广泛。本研究选择气相色谱直接进样法，操作简单快捷，避免了样品预处理的繁琐步骤和试剂消耗量大的缺点，同时满足了检测灵敏度的需求，为甲醛的检测提供了切实可行的试验方法。

3.3 色谱条件的选择

本试验选用 DB-624 毛细管色谱柱（固定液为 6% 氰丙基苯基 -94% 二甲基聚硅氧烷），此色谱柱对弱极性有机溶剂有较好的适用性。为了使样品不干扰测定，本试验采用程序升温的方法，并对升温条件进行了优化，使待测物有比较合适的保留时间的同时，样品中的成分不干扰待测物的分离。

3.4 甲醛限度确定的依据

根据毒理数据查询 CPBD（致癌效力数据库）可知，甲醛的最小毒理学数据 TD_{50} = 1.35 mg/（kg•d），ADI = TD_{50}/5000×50 kg = 1.35 μg•d^{-1}，盐酸倍他司汀最大日剂量 Dose 为 50 mg • d^{-1}，最终甲醛的限度为 ADI/Dose = 2.7×10^{-5} g • g^{-1}。

参考文献

[1] 俞伟，颜国明，尹超，等 . 盐酸倍他司汀及其关键中间体的合成综述 [J]. 上海医药，2020，41（9）：75-79.

[2] 张廷志 . 盐酸倍他司汀治疗眩晕症的临床效果分析 [J]. 临床合理用药，2016，6（33）：25-26.

[3] 杨远君 . 社区应用倍他司汀治疗椎底动脉供血不足的临床观察 [J]. 中国社区医师，2018，15（8）：11.

[4] 周敏，丁云晖，李德祥 . 盐酸倍他司汀片溶出度测定方法的研究 [J]. 上海化工，2018：43（8）：37-40.

[5] 顾晓春 . 吹扫捕集 - 气相色谱法测定地表水中甲醛 [J]. 能源与环境，2018（6）：79-80.

[6] 张燕君 . 顶空毛细管柱气相色谱法测定地表水中的甲醛 [J]. 广州化工，2019，47（4）：89-90.

[7] 周宇艳，马明，蔡婧，等 . 顶空 - 气相色谱法测定纸类产品中游离甲醛 [J]. 理化检验，2016，52（2）：155-158.

[8] 石富江，王全军 . 基因毒性杂质的毒理学评估策略 [J]. 中国新药杂志，2021，30（3）：232-235.

[9] 朱文泉，马健 . 基因毒性杂质的挑战与控制策略 [J]. 中国食品药品监管，2020，12（5）：29-44.

[10] 汪生，杭太俊 . 药物中基因毒性杂质检测策略的研究 [J]. 中国新药杂志，2019，28（23）：2840-2846.

[11] 张芮腾，青旺旺，廖星星，等 . 药物中基因毒性杂质检测方法研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（3）：327-332.

[12] 刘连委 . 药品中微量甲醛检测方法研究进展 [J]. 化学工程师，2018，32（1）：54-56.

（收稿日期：2021-05-12；修回日期：2021-07-14）

苦参碱及其氯化钠注射液有关物质检查方法研究

严菲[1]，顾小燕[2]，陈民辉[1]，曹玲[1*]（1. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；2.中国药科大学，南京 211198）

摘要：目的 改进苦参碱氯化钠注射液现行标准中有关物质的测定方法，为科学制订有关物质测定方法提供参考和依据。**方法** 采用 Waters Xbridge C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈 -0.05 mol·L^{-1} 磷酸二氢钾溶液 [（用三乙胺调节 pH 值至（6.2±0.1）]（10∶90）为流动相，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 220 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL；线性斜率法计算各杂质相对校正因子。**结果** 在拟定的色谱条件下，苦参碱与相关杂质完全分离，辅料对主成分及有关物质测定无干扰；槐定碱、槐果碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱的相对校正因子分别为 0.72、2.12、1.38、1.81；3 家企业 3 批原料的单杂均小于 0.3%，杂质总量为 0.38% ～ 0.56%；3 家企业 8 批苦参碱氯化钠注射液的单杂均小于 0.5%，杂质总量为 0.32% ～ 1.05%。**结论** 改进后的方法更具合理性、准确性和专属性，可用于苦参碱及其氯化钠注射液的有关物质测定。

关键词：苦参碱原料；苦参碱氯化钠注射液；有关物质；高效液相色谱法；相对校正因子
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2658-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.033

Determination method of related impurities of matrine or its sodium chloride injection

YAN Fei[1], GU Xiao-yan[2], CHEN Min-hui[1], CAO Ling[1*] (1. *Jiangsu Institute of Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019; 2. *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: Objective To improve the determination method of related impurities in the current standard of matrine and its sodium chloride injection, and to provide reference for the scientific determination of related impurities. **Methods** A Waters XBridge C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.05 mol·L^{-1} potassium dihydrogen phosphate solution [adjusting pH to (6.2±0.1) with triethylamine] (10∶90) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 ℃ , and the injection volume was 10 μL. The relative correction factors of each impurity were calculated by the linear slope method. **Results** Under the proposed chromatographic conditions, matrine and related impurities were completely separated, and the excipients had no interference to the determination of principal components and related substances. The relative correction factors of sophoridine, sophocarpine, oxymatrine and oxysophocarpine were 0.72, 2.12, 1.38 and 1.81, respectively. The single impurity of the 3 batches of raw materials from the 3 enterprises were all less than 0.3%, and the total impurity was 0.38% — 0.56%. The single impurity of 8 batches of matrine and sodium chloride injection from 3 enterprises was all less than 0.5%, and the total impurity was 0.32% — 1.05%. **Conclusion** The improved method is more reasonable, accurate and specific, which can be used for the determination o related impurities of matrine and its sodium chloride injection.

Key words: matrine; matrine and sodium chloride injection; related impurity; HPLC; relative correction factor

基金项目：重大新药创制科技重大专项（No.2017zx09191001）。
作者简介：严菲，女，硕士，主要从事药品质量标准研究，E-mail：37931658@qq.com *通信作者：曹玲，女，主任药师，主要从事药品质量标准研究，E-mail：clidc@sina.com

苦参是豆科植物苦参的干燥根，味苦，性寒，其主要功效为清热燥湿，杀虫，利尿，用于热痢，便血，黄疸尿闭，赤白带下，阴肿阴痒，湿疹，湿疮等病症[1]。苦参碱是苦参中含量最高的主要活性成分之一，其分子结构式见图 1，属于四环喹嗪啶类。苦参碱具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤等作用[2]，孙静等[3]研究结果显示苦参碱对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型具有显著的治疗作用。

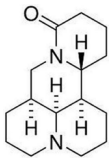


图 1　苦参碱结构式

Fig 1　Structural formula of matrine

苦参碱及其氯化钠注射液在各国药典中均未收载，现行国家标准[4-5]中有关物质检查采用 HPLC 法，但仅控制总杂质含量。苦参碱原料在强碱破坏等条件下能产生槐定碱、氧化苦参碱和槐果碱等杂质，文献报道[6-7]苦参碱和槐果碱在一定条件下能转化成较为稳定的氧化形态，即氧化苦参碱和氧化槐果碱。因此，本文拟确定氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱和槐定碱为苦参碱原料及氯化钠注射液中可能存在的已知杂质。在现行标准色谱条件下，上述 5 种目标物质无法完全分离，且同时分析苦参碱原料及其氯化钠注射液中苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱和槐定碱的色谱方法尚未见报道。

本文在参考文献方法[8-9]的基础上，优化了现行标准中有关物质的色谱条件，使 5 种目标物质均能良好分离，为科学修订苦参碱及其氯化钠注射液的有关物质方法提供参考和依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

CPA225D 型电子天平（德国赛多利斯天平公司）；LC-20AB 高效液相色谱仪（岛津公司）；Milli-Q 超纯水仪（Millipore 公司）；Branson 8800 超声波清洗仪（Branson 公司）；DHG-9041A 电热恒温干燥箱（精宏实验设备公司）；Seven mile pH 计（梅特勒公司）。

1.2　试药

磷酸二氢钾、三乙胺（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；乙腈（色谱纯，Tiedia 公司）；水为超纯水。对照品苦参碱（批号：110805-202010，纯度：98.7%）、氧化苦参碱（批号：110780-201909，纯度：92.5%）、氧化槐果碱（批号：111652-200301，纯度：100.0%）、槐定碱（批号：110784-201706，纯度：98.8%）（中国食品药品检定研究院），槐果碱（批号：X3420010，纯度：98.17%，上海安谱实验科技股份有限公司）。样品基本信息见表 1。

表 1　样品信息

Tab 1　Information of sample

样品	生产企业	批号
原料	企业 A	90200226
	企业 B	20170211
	企业 C	Y030-2003004
苦参碱氯化钠注射液	企业 A	20200607、20200608、20200609
	企业 B	1808201、1808211、1808212
	企业 C	20010541、20010542

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Waters Xbridge C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液 [用三乙胺调节 pH 值至（6.2±0.1）]（10∶90）；流速：1.0 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；检测波长：220 nm；柱温：30 ℃。

2.2　溶液的制备

2.2.1　系统适用性溶液　取苦参碱原料及各杂质对照品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成含苦参碱 0.8 mg • mL^{-1} 和各杂质 10 μg • mL^{-1} 的溶液，即得。

2.2.2　供试品溶液　取苦参碱原料适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成 0.8 mg • mL^{-1} 的溶液，作为苦参碱原料供试品溶液；取苦参碱氯化钠注射液作为苦参碱氯化钠注射液供试品溶液。

2.2.3　对照溶液　精密量取供试品溶液 1 mL，加流动相定量稀释制成 8 μg • mL^{-1} 的溶液，作为对照溶液。

2.2.4　对照品储备液　精密称取苦参碱对照品和已知各杂质对照品各 10 mg 于 10 mL 量瓶中，用流动相超声溶解并稀释至刻度，摇匀，得质量浓度约为 1 mg • mL^{-1} 的混合对照品储备液。

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验　精密量取“2.2.1”项下系统适用性溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件测定，色谱图见图 2。结果表明，各杂质与苦参碱之间、各杂质之间分离度均大于 1.5。

2.3.2　专属性试验　① 酸破坏溶液：称取苦参碱原料约 16 mg，置 20 mL 量瓶中，加 6 mol • L^{-1} 盐酸溶液 2 mL，放置 24 h，用 6 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性，加流动相稀释至刻度，摇匀，滤过；② 碱破坏溶液：称取苦参碱

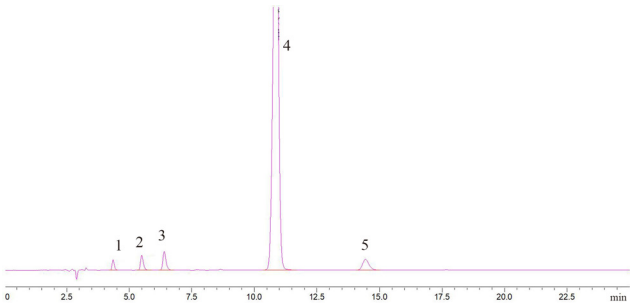


图 2 苦参碱系统适用性色谱图

Fig 2 Chromatogram of matrine for system suitability

1. 槐定碱（sophoridine）；2. 氧化苦参碱（oxymatrine）；3. 氧化槐果碱（oxysophocarpine）；4. 苦参碱（matrine）；5. 槐果碱（sophocarpine）

原料约 16 mg，置 20 mL 量瓶中，加 6 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液 2 mL，放置 24 h，用 6 mol·L^{-1} 盐酸溶液调节 pH 值至中性，加流动相稀释至刻度，摇匀，滤过；③ 氧化破坏溶液：称取苦参碱原料约 16 mg，置 20 mL 量瓶中，加 30% 过氧化氢溶液 2 mL，放置 24 h，加流动相稀释至刻度，摇匀，滤过；④ 高温破坏溶液：称取经 60 ℃加热 6 h 后放冷的苦参碱原料约 16 mg，置 20 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过；⑤ 光照破坏溶液：称取置（4500±500）Lx 光照了 24 h 的苦参碱原料约 16 mg，置 20 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过。分别精密吸取上述 5 种溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件测定，色谱图见图 3。由图可知，破坏试验产生的杂质之间、杂质与主成分之间分离效果良好，表明该方法专属性强。

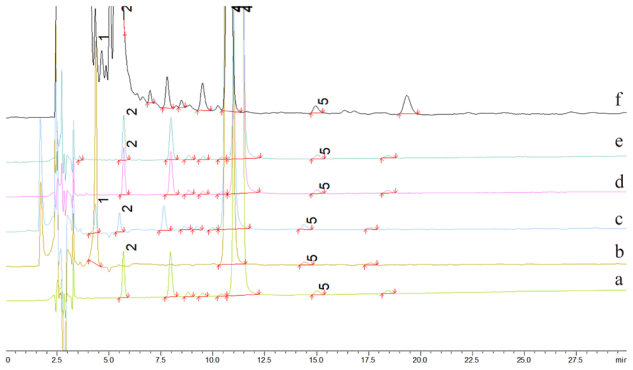


图 3 苦参碱专属性试验色谱图

Fig 3 Chromatogram of the specific properties of matrine

a. 苦参碱原料（matrine）；b. 强酸破坏（decomposed by hydrochloric acid）；c. 强碱破坏（decomposed by sodium hydroxide）；d. 高温破坏（decomposed by heating）；e. 光照破坏（decomposed by light）；f. 氧化破坏（decomposed by hydrogen peroxide）；1. 槐定碱（sophoridine）；2. 氧化苦参碱（sophocarpine oxide）；3. 氧化槐果碱（sophocarpine，oxymatrine）；4. 苦参碱（matrine）；5. 槐果碱（sophocarpine）

对征集到的空白辅料，用流动相配制成空白辅料溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，考察混合辅料对有关物质检查的影响。色谱图见图 4。结果表明辅料对苦参碱有关物质检查无干扰。

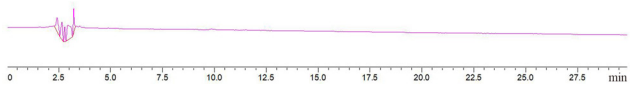


图 4 苦参碱氯化钠注射液空白辅料溶液色谱图

Fig 4 Chromatogram of matrine sodium chloride injection for blank auxiliary solution

2.3.3 苦参碱与杂质的标准曲线及各杂质相对校正因子的测定 精密吸取对照品储备液适量，加流动相稀释制成分别含苦参碱和各杂质质量浓度约为 1、5、10、25、50、100、250 μg·mL^{-1} 的系列对照品溶液。精密吸取上述 5 种溶液各 10 μL，分别注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件测定保留时间和峰面积。以溶液质量浓度（*C*）为横坐标，峰面积（*A*）为纵坐标，进行线性回归；以苦参碱为参照物，用标准曲线法计算得各杂质的相对校正因子，结果见表 2。根据《中国药典》（2020 年版）四部 9102 药物杂质分析指导原则及化学药物杂质研究的技术指导原则，杂质的校正因子在 0.9 ～ 1.1，可采用主成分的自身对照法进行定量测定，其余杂质采用加校正因子的主成分自身对照法进行定量测定。

2.3.4 定量限和检测限的测定 取上述线性对照品溶液逐步稀释，精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件测定，以 *S/N* ≈ 10 为定量限，*S/N* ≈ 3 为检测限，结果见表 2。

2.3.5 精密度试验 精密吸取质量浓度为 10 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件测定，平行进样 6 次，记录峰面积，结果显示苦参碱及各杂质峰面积的 *RSD* 均小于 2%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性考察

① 苦参碱原料：取苦参碱原料（批号：20170211），按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液和对照溶液各 6 份，进样测定，结果苦参碱原料中各杂质、单个最大未知杂质及总杂质含量 *RSD* ＜ 5%，表明方法重复性良好。

② 苦参碱氯化钠注射液：取苦参碱氯化钠注射液（批号：20010542），按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液和对照溶液各 6 份，进样测定，结果苦参碱氯化钠注射液中各杂质、单个最大杂质及总杂质含量 *RSD* ＜ 5%。

2.3.7 回收试验

表 2　苦参碱和各杂质相对保留时间、线性关系和相对校正因子的测定结果

Tab 2　Determination results of relative retention time，linearity and relative correction factor of matrine and impurities

化合物	相对保留时间	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	回归方程	r	相对校正因子	定量限 /（ng • mL^{-1}）	检测限 /（ng•mL^{-1}）
苦参碱	1.00	1.026 ～ 256.5	$y = 6.196\times10^{3}x + 507.2$	1.000	—	205.2	102.6
槐定碱	0.36	0.9889 ～ 247.2	$y = 4.491\times10^{3}x + 1.700\times10^{3}$	0.9999	0.72	395.6	158.2
槐果碱	1.32	0.9876 ～ 246.9	$y = 1.313\times10^{4}x + 1.308\times10^{3}$	1.000	2.12	493.8	246.9
氧化苦参碱	0.51	0.9278 ～ 231.9	$y = 8.567\times10^{3}x + 303.9$	1.000	1.38	231.9	77.3
氧化槐果碱	0.59	1.046 ～ 261.5	$y = 1.122\times10^{4}x - 25.63$	1.000	1.81	348.6	116.2

① 苦参碱原料：分别精密量取对照品储备液和已知杂质含量的同一批苦参碱原料适量，加流动相制成含各杂质和苦参碱分别约为 10 μg•mL^{-1}、0.8 mg • mL^{-1} 的溶液，按“2.2.3”项下方法制备对照溶液，平行制备 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样分析。表 3 结果表明可以采用该方法对苦参碱原料中已知各杂质进行定量分析且准确度好。

表 3　苦参碱原料的回收试验结果 (%)

Tab 3　Recovery of matrine (%)

样品	槐定碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	槐果碱
1	99.1	100.7	99.7	99.2
2	98.9	98.5	99.2	100.1
3	99.3	99.9	98.4	98.7
4	99.6	100.1	99.3	99.6
5	100.5	99.3	100.8	99.4
6	98.7	99.6	99.1	100.0
平均 /%	99.4	99.7	99.4	99.5
RSD/%	0.6	0.8	0.8	0.5

② 苦参碱氯化钠注射液：分别精密量取对照品储备液适量，用已知杂质含量的同一批苦参碱氯化钠注射液剂制成含各杂质和苦参碱分别约为 10 μg • mL^{-1}、0.8 mg • mL^{-1} 的溶液，按“2.2.3”项下方法制备对照溶液，平行制备 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样分析。表 4 结果表明可以采用该方法对苦参碱氯化钠注射液中已知各杂质进行定量分析且准确度好。

表 4　苦参碱氯化钠注射液的回收试验结果

Tab 4　Recovery of matrine sodium chloride injection

样品	回收率 /%			
	槐定碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	槐果碱
1	98.8	99.6	99.5	98.8
2	99.5	98.6	99.6	99.1
3	98.7	99.3	98.8	98.4
4	100.1	100.3	100.6	100.2
5	99.3	99.8	99.5	99.0
6	99.6	99.0	99.4	99.2
平均 /%	99.3	99.2	99.6	99.1
RSD/%	0.5	0.8	0.6	0.6

2.3.8　稳定性试验　按“2.2.2”项下方法配制苦参碱原料及其氯化钠注射液供试品溶液，在室温下放置，分别于 0、2、4、8、12 h 进样分析，结果显示 12 h 内苦参碱原料及其氯化钠注射液供试品溶液中各杂质和杂质总量 *RSD* 均小于 0.5%，表明两者溶液稳定性良好。

2.4　*苦参碱原料及其氯化钠注射液有关物质测定*

精密称取苦参碱及氯化钠注射液，按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法配制，按“2.1”项下色谱条件测定，结果见表 5。

表 5　苦参碱及苦参碱氯化钠注射液的杂质含量测定结果

Tab 5　Content of impurity of matrine and matrine sodium chloride injection

	生产企业	批号	杂质含量 /%					
			槐定碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	槐果碱	单个最大未知杂质	总杂质
原料	企业 A	90200226	ND	0.07	ND	ND	0.16	0.38
	企业 B	20170211	ND	0.01	ND	ND	0.13	0.56
	企业 C	Y030-2003004	ND	0.07	ND	ND	0.13	0.39
苦参碱氯化钠注射液	企业 A	20200607	ND	0.24	ND	ND	0.16	0.32
		20200608	ND	0.37	0.11	ND	0.23	0.46
		20200609	ND	0.18	ND	ND	0.19	0.53
	企业 B	1808201	ND	0.41	ND	ND	0.41	0.69
		1808211	ND	0.32	ND	ND	0.47	0.96
		1808212	0.08	0.39	ND	ND	0.38	0.87
	企业 C	20010541	ND	0.21	ND	ND	0.29	0.79
		20010542	ND	0.19	ND	ND	0.45	1.05

注（Note）：“ND”表示未检出（The symbol ”ND” showed that the contents were not detected）。

3　讨论

3.1　*色谱系统的选择*

苦参碱原料药现行标准中有关物质检查项采用的流动相为乙腈 - 水（用磷酸调节 pH 值为 2.0）- 乙醇 = 80∶10∶8，色谱柱为 NH_2 柱；其氯化钠注射液现行标准中有关物质流动相采用乙腈 - 磷酸

溶液（100 mL 水加三乙胺 0.2 mL，用磷酸调节 pH 值至 3.2）＝4∶96，色谱柱为 C_{18} 柱。试验发现上述两种色谱系统均不能很好地分离 5 种目标物质，且 NH_2 柱色谱系统基线波动很大，重现性更差。因此，本试验选择 C_{18} 柱色谱系统进行优化。

3.2 *流动相的选择*

考察了 4%、10%、15% 乙腈的比例对各色谱峰出峰时间的影响，结果表明乙腈比例越高出峰时间越快，10% 乙腈条件下各色谱峰保留时间合适，各峰分离度良好；考察了 0.01、0.02、0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液浓度对各色谱峰峰形及分离度的影响，结果表明磷酸二氢钾溶液浓度越高峰形越好，分离度影响不大，故选择 0.05 mol • L^{-1} 浓度的磷酸二氢钾溶液；进一步考察水相的 pH，用三乙胺调节 pH 值至 5.0、5.6、6.2、6.8，随着水相 pH 值的增加，各峰分离度明显改善，且 pH 为 6.2 时，苦参碱保留时间约为 11 min，故最终选择流动相为乙腈 -0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液 [用三乙胺调节 pH 值至（6.2±0.1）]（10∶90）。

3.3 *色谱柱的选择*

采用 3 种不同品牌色谱柱 [Waters XBridge C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、SHIMADZU VP-ODS C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Agilent Eclipse XDB C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）] 考察其对 5 种目标物质之间分离度的影响，最终选择 Waters XBridge C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，可以达到良好分离测定的要求。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：211.

[2] 赵昕，孙娜，白喜云，等 . 苦参碱对 PRRSV 的体外抑制作用及机制研究 [J]. 中国兽医学报，2013，33（6）：808-812.

[3] 孙静，赵荣华，郭珊珊，等 . 苦参碱氯化钠注射液对人冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证小鼠病证结合模型的治疗作用 [J]. 药学学报，2020，55（3）：366-373.

[4] WS-10001-（HD-0047）-2002. 国家药品标准化药地标升国标 [S]. 2002.

[5] WS1-（X-018）-2006Z-2011. 国家药品标准新药转正标准 [S]. 2006.

[6] 贾敏鸽，孙文基 . 苦参及其复方中苦参碱与氧化苦参碱的转化研究 [J]. 药物分析杂志，2003，23（2）：90-93.

[7] 王忠效，高斌，黄建军，等 . 氧化槐果碱的制备工艺：CN 00133351.8 [P]. 2004-05-26.

[8] 张杰，向大雄，罗杰英，等 . 苦参药材中苦参碱含量测定方法比较研究 [J]. 中南药学，2005，3（5）：266-267.

[9] 艾雄，曾三平 . 高效液相色谱法测定当归苦参丸中苦参碱和氧化苦参碱 [J]. 中南药学，2007，5（2）：142-144.

（收稿日期：2021-05-05；修回日期：2021-06-17）

筋骨宁膏中黄曲霉毒素的测定

倪倩[1]，南文萍[2]，张俐[1*]（1. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；2. 南京中医药大学，南京 210023）

摘要：目的 建立免疫亲和萃取 UHPLC-MS/MS 法测定筋骨宁膏中的黄曲霉毒素，了解土鳖虫相关外用制剂中黄曲霉毒素污染现状。**方法** 筋骨宁膏经正己烷溶解，70% 甲醇萃取，再用免疫亲和柱萃取，UHPLC-MS/MS 法进行分析测定。**结果** 采用本法提取测定筋骨宁膏中黄曲霉毒素，重复性、进样精密度与准确度均符合要求。**结论** 本法可用于土鳖虫相关贴膏剂中黄曲霉毒素的测定。

关键词：黄曲霉毒素；土鳖虫；贴膏剂；免疫亲和柱；UHPLC-MS/MS

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2662-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.034

Determination of aflatoxin in Jinguning ointment

NI Qian[1], NAN Wen-ping[2], ZHANG Li[1*] (1. *Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019; 2. *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023)

Abstract: Objective To determine aflatoxin in Jinguning ointment by immunoaffinity extraction

作者简介：倪倩，女，硕士，主要从事中药分析与质量控制，E-mail：1003698670@qq.com *通信作者：张俐，女，硕士，主要从事中药分析与质量控制，E-mail：timsmother@126.com

UHPLC-MS/MS, and to understand the contamination of aflatoxin in Euplyphaga Steleophaga related external preparations. **Methods** Jinguning ointment was dissolved in *n*-hexane, extracted with 70% methanol, extracted with immunoaffinity column, and then analyzed by UHPLC-MS/MS. **Results** The repeatability, precision and accuracy of the method all met the requirements. **Conclusion** This method can be used to determine aflatoxin in Euplyphaga Steleophaga related ointment.

Key words: aflatoxin; Euplyphaga Steleophaga; ointment; immunoaffinity column; UHPLC-MS/MS

筋骨宁膏由骨碎补、凤仙透骨草、五加皮、生天南星、续断、蒲公英、当归、羌活、红花、土鳖虫、桃仁、乳香、没药、樟脑、冰片、桉叶油、水杨酸甲酯、盐酸苯海拉明组成。其功效为活血化瘀、消肿止痛、舒筋活络，主要用于闭合性骨折和跌打损伤。

其药味之一土鳖虫别名蜚虫、地鳖和土鳖，为鳖蠊科（Corydiidae）昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker. 或冀地鳖 *Steleophagaplancyi*（Boleny）的雌虫干燥体。其性寒，味咸，有破淤血、续筋骨的功效，是跌打损伤、消肿止痛和活血化瘀中成药的常用组成成分。土鳖虫在采收、加工、运输及储存环节中，极易发生霉变并产生黄曲霉毒素（aflatoxins，AFs）。黄曲霉毒素是一种强致癌的霉菌毒素，最常见的是黄曲霉 G1（Aflatoxin G1，AFG1）、G2（Aflatoxin G2，AFG2）、B1（Aflatoxin B1，AFB1）、B2（AflatoxinB2，AFB2）。其中 AFB1 的毒性最大，分布最广，属于Ⅰ类致癌物。近年来，陆续有文献报道土鳖虫中黄曲霉毒素超标的现象[1-2]。有研究表明，AFB1 对人皮肤成纤维细胞具有明显的细胞毒性作用[3]，说明对外用制剂控制黄曲霉毒素也很有必要。《中国药典》2020 年版一部对土鳖虫中黄曲霉毒素规定了限度，AFB1 限度为 5 μg·kg^{-1}，AFB1、AFB2、AFG1 与 AFG2 的总量限度为 10 μg·kg^{-1}[4]，但未对土鳖虫相关制剂黄曲霉毒素进行控制，相关检测方法并不完善。

本文利用黄曲霉毒素的溶解性（易溶于油、三氯甲烷、甲醇和乙腈，不溶于水、乙醚和正己烷），对可能存在污染的贴膏剂制品建立了新的提取方式，为黄曲霉毒素的检测与监管提供新思路。

1 仪器与试药

ExionLC 型超高效液相色谱、AB QTRAP 4500 LC/MS/MS（美国 SCIEX 公司）；CPA0045 型万分之一电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；TG16-WS 离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水处理系统。色谱柱 PhenomenxTitank C_{18}（2.1 mm×150 mm，1.8 μm）。甲醇、乙腈均为色谱纯；水为超纯水；免疫亲和色谱柱（北京华安麦科生物技术有限公司）。黄曲霉毒素混合对照品溶液（AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 标示质量浓度分别为 1.04、0.38、1.08、0.38 μg·mL^{-1}，批号：610001-202006，中国食品药品检定研究院）。筋骨宁膏（土鳖虫处方量占处方生药总量 6.7%，江苏百益制药有限公司，批号分别为 200601-1、210201）。

2 方法与结果

2.1 液相 - 质谱条件

色谱柱：PhenomenxTitank C_{18}（2.1 mm×150 mm，1.8 μm）；流动相以 10 mmol·L^{-1} 醋酸铵溶液为流动相 A，以甲醇为流动相 B；柱温 25 ℃；流速 0.3 mL·min^{-1}；按表 1 程序进行梯度洗脱。

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 ～ 4.5	65 → 15	35 → 85
4.5 ～ 6	15 → 0	85 → 100
6 ～ 6.5	0 → 65	100 → 35
6.5 ～ 10	65	35

离子源：电喷雾离子源（ESI），正离子检测方式；多反应检测（MRM 模式）；气帘气：35 psi；离子源温度：550 ℃；电喷雾电压：5500 V；雾化器：55 MPa；辅助器：60 MPa；各化合物监测离子对和碰撞电压（CE）见表 2。

表 2 监测离子对和碰撞电压

Tab 2 Monitoring ion pair and collision voltage

名称	母离子 /（*m/z*）	子离子 /（*m/z*）	CE/V
AFG2	331.1	245.1	40
	331.1	285.0	37
AFG1	329.1	243.1	35
	329.1	311.1	38
AFB2	315.1	259.1	38
	315.1	287.1	34
AFB1	313.1	269.0	43
	313.1	285.1	30

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密量取黄曲霉毒素混合对

照品溶液 500 μL，置 50 mL 量瓶中，用 70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，即为线性 1 号溶液。精密量取线性 1 号溶液 5、4、3、2 和 1 mL，分别置 25、25、25、25 和 50 mL 量瓶中，用 70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，作为线性溶液 2、3、4、5 和 6 号溶液。

2.2.2　供试品溶液　精密称取本品 1 g，置 50 mL 离心管中，加入 10 mL 正己烷浸渍 1 h，涡旋 3 min，即可将背衬层表面的膏状层完全溶解，呈乳液状。再精密加入 10 mL70% 甲醇，涡旋 3 min 后，9000 r • min^{-1} 离心 5 min，此时膏状层和背衬层在瓶底聚集，溶液分为澄清的上下两层，黄曲霉毒素溶解于下层的 70% 甲醇中，精密量取下层液体 6 mL，置 20 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，9000 r • min^{-1} 离心 5 min，取全部上清液，通过免疫亲和柱，流速 3 mL • min^{-1}，用水 20 mL 洗脱，弃去洗脱液，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜滤过（0.22 μm），取续滤液，即得。

2.3　系统适用性试验

精密量取空白溶剂（甲醇）与线性 2 号溶液各 5 μL，分别注入超高效液相色谱 - 质谱仪，考察各组分峰形（见图 1）。结果各成分峰形较好，响应值高，空白溶剂中未提取出离子峰，说明对检测无干扰，所选择的监测离子对较为合适。

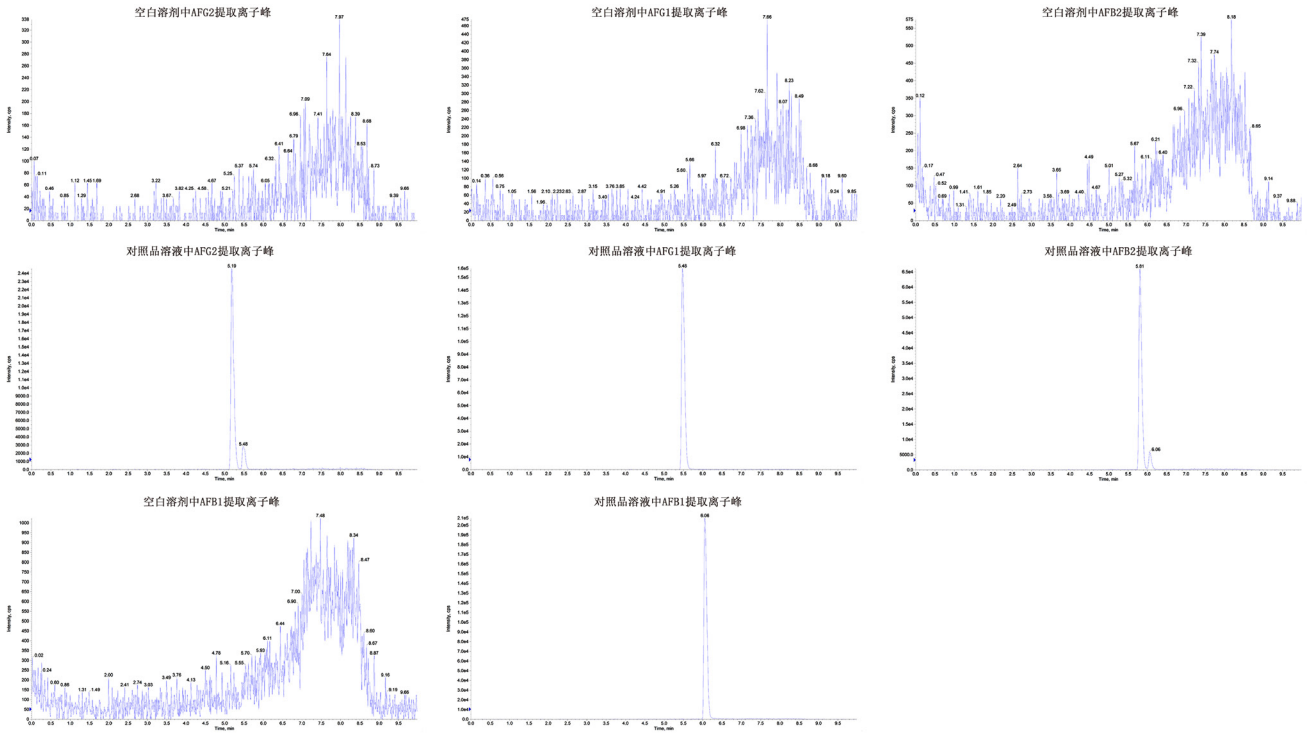


图 1　空白溶剂和对照品溶液的提取离子峰图

Fig 1　Extracted ion chromatogram of blank solvent and reference solution

2.4　线性关系考察

取“2.2”项下系列线性溶液，精密量取 5 μL，注入超高效液相色谱 - 质谱仪，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，进样质量浓度为横坐标，绘制标准曲线。结果见表 3。

表 3　线性关系与范围

Tab 3　Linear relation and range

成分	范围 /（ng • mL^{-1}）	线性方程	相关系数
AFG2	0.076 ～ 3.800	$Y = 5.97\times10^{4}X + 2.50\times10^{3}$	0.9999
AFG1	0.216 ～ 10.80	$Y = 1.48\times10^{5}X + 5.40\times10^{3}$	1.000
AFB2	0.076 ～ 3.800	$Y = 1.44\times10^{5}X + 3.19\times10^{3}$	1.000
AFB1	0.208 ～ 10.40	$Y = 1.86\times10^{5}X + 1.02\times10^{4}$	1.000

2.5　精密度试验

精密量取线性 2 号溶液 5 μL，连续进样 6 次，以峰面积计算 *RSD*，考察精密度。结果 AFG2 峰面积 *RSD* 为 0.75%，AFG1 为 1.6%，AFB2 为 1.6%，AFB1 为 1.8%，表明本法精密度良好。

2.6　重复性试验

精密称取本品 1 g，按“2.2.2”项下方法操作，平行制备 6 份，结果 6 份样品中均未检出黄曲霉毒素。

2.7　检测限与定量限

取线性 6 号溶液逐级稀释至 *S/N* 约为 3，即为检测限，*S/N* 约为 10，即为定量限。结果表明，

本法灵敏度较高，符合检测要求（见表 4）。

表 4　检测限与定量限结果

Tab 4　LOD and LOQ

成分	检测限 /（μg • kg^{-1}）	定量限 /（μg • kg^{-1}）
AFG2	0.016	0.024
AFG1	0.014	0.068
AFB2	0.012	0.054
AFB1	0.031	0.160

2.8　加样回收试验

精密称取本品 1 g，精密加入线性 1 号溶液 350 μL，按“2.2”项下方法操作，平行制备 6 份，进样测定，结果加样回收率见表 5。结果表明，各成分回收率在 72.80% ～ 86.40%，*RSD* 均小于 10%，说明本法可有效提取出制剂样品中的黄曲霉毒素。

表 5　加样回收试验结果

Tab 5　Recovery

成分	加入量 /ng	测得量 /ng	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%
AFG2	1.330	0.968	72.80	74.8	7.2
	1.330	1.078	81.00		
	1.330	1.055	79.30		
	1.330	0.902	67.80		
	1.330	0.931	70.00		
	1.330	1.035	77.80		
AFG1	3.780	3.028	80.10	81.5	3.6
	3.780	2.942	77.80		
	3.780	3.140	83.10		
	3.780	3.036	80.30		
	3.780	3.069	81.20		
	3.780	3.266	86.40		
AFB2	1.330	1.017	76.40	80.5	5.4
	1.330	1.117	84.00		
	1.330	1.106	83.20		
	1.330	1.045	78.60		
	1.330	1.000	75.20		
	1.330	1.139	85.70		
AFB1	3.640	2.775	76.20	81.4	4.3
	3.640	2.908	79.90		
	3.640	3.109	85.40		
	3.640	2.935	80.60		
	3.640	2.945	80.90		
	3.640	3.097	85.10		

2.9　样品测定结果

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 5 μL，进样测定，结果表明，2 批样品中均未检出黄曲霉毒素。

3　讨论

3.1　提取方法的确立

黄曲霉毒素的提取多采用甲醇 - 水或乙腈 - 水的提取方式，但是贴膏剂中具有活性物质的膏状层不溶于甲醇 - 水或乙腈 - 水体系，导致包裹在其中的成分难以被提取出。本文中的提取方法将膏状层完全溶解在正己烷中，再用甲醇 - 水进行提取，大大提高了黄曲霉毒素的提取回收率。

另外，比较了乙腈 - 水与甲醇 - 水的提取效率，结果表明，乙腈 - 水与甲醇 - 水的提取回收率几乎无差别，但乙腈 - 水提取液颜色偏深，说明干扰物多于甲醇 - 水体系，因此最终选择甲醇 - 水作为提取溶剂。

3.2　分析方法的确立

本文参考 2020 年版《中国药典》四部通则 2351 真菌毒素测定法，对质谱条件进行了人工优化，使得 4 个黄曲霉毒素的检测灵敏度更高。

3.3　存在的不足

本文虽然为土鳖虫相关贴膏剂类产品黄曲霉毒素的测定与监管提供了新方法与新思路，但依然存在不足，由于样本量较少，不能全面评估该类产品的质量。鉴于土鳖虫相关产品黄曲霉毒素污染情况较为严重，并且黄曲霉毒素对表皮细胞存在一定毒性，透皮吸收情况也尚不明确，因此应该加大对此类产品的质量监控，获取足量数据后再对此类产品的质量监管采取合理措施。

参考文献

[1] 于鹏浩，张磊，秦家安，等 . 免疫亲和柱净化光化学衍生高效液相色谱 - 荧光检测法同时测定土鳖虫中黄曲霉毒素 B1，B2，G1，G2，M1，M2 [J]. 中国中药杂志，2019，44（23）：5083-5087.

[2] 余诗琪，汪波，吕盼，等 . 固相萃取 - 液质联用法测定土鳖虫中 12 种真菌毒素 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2019，21（7）：1411-1417.

[3] 刘珊，罗仲秋，谭洪 . 黄曲霉毒素 B1 对原代人皮肤成纤维细胞毒性作用研究 [J]. 实用医院临床杂志，2017，14（5）：30-32.

[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：四部通则 2351.

（收稿日期：2021-07-12；修回日期：2021-08-13）

医院药学

某地区新生儿痰标本金黄色葡萄球菌分离株耐药情况及分子特征

黄金华[1]，傅锦坚[2*]，梁婧[3]，蓝茜榆[1]（柳州市妇幼保健院，1.药学部，2.预防保健科，3.新生儿科，广西 柳州 545001）

摘要：目的 通过对某地区新生儿病区痰标本分离出的金黄色葡萄球菌（SA）耐药情况及分子特征进行回顾性研究分析，为防治新生儿 SA 感染提供理论依据。**方法** 收集本院 2014 年 1 月至 2017 年 12 月新生儿病区呼吸道痰样本中分离出的 SA 株，进行菌株的抗菌药物敏感性试验、检测菌株的耐药基因、毒力因子检测。**结果** 52 株 SA 中，对青霉素耐药率高达 98.08%，对氨苄西林耐药率为 73.08%，对环丙沙星、万古霉素、利奈唑胺无耐药，耐药基因及毒力基因检测检出 12 株 *mecA* 基因、11 株 *SCCmecIVd* 基因、12 株大环内酯类 *ermC* 耐药基因、10 株四环素 *tetK* 耐药基因和 5 株携带 PVL 毒力因子基因，其他耐药基因未检出。**结论** 新生儿病区痰标本分离的 SA 菌株呈现多重耐药性，因新生儿的特殊生理特点，抗 SA 治疗药物比较局限，应在药物敏感性试验前提下，借助 SA 耐药基因及毒力因子检测等手段，合理选择抗 SA 药物治疗。

关键词：金黄色葡萄球菌；新生儿；痰；药物敏感性试验；基因分型；抗菌药物
中图分类号：R446.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2666-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.035

Antibiotic resistance and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from sputum samples in neonatology

HUANG Jin-hua[1], FU Jin-jian[2*], LIANG Jing[3], LAN Xi-yu[1] (1. *Department of Pharmacy*, 2. *Department of Prevention and Health Care*, 3. *Department of Neonatal Pediatrics*, *Liuzhou Maternity and Child Health Care Hospital*, *Liuzhou Guangxi* 545001)

Abstract: Objective To retrospectively analyze the antibiotic resistance and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from sputum samples in neonatology, and provide theoretical basis for the prevention and treatment of neonatal *Staphylococcus aureus* infection. **Methods** We collected *Staphylococcus aureus* isolated from the sputum samples from January 2014 to December 2017 in our hospital, and antimicrobial susceptibility test, genotyping and virulence gene detection were conducted. **Results** Among the 52 strains, resistance rate for penicillin reached 98.08%, that for ampicillin reached 73.08%, while for ciprofloxacin, vancomycin and linezolid the resistance rate was zero. Virulence gene detection found that 12 strains carried *mecA* gene, 11 strains carried *SCCmecIVd* gene, 12 strains carried macrocyclic ester *ermC* gene, 10 strains carried tetracycline *tetK* gene and 5 strains carried PVL virulence gene. **Conclusion** *Staphylococcus aureus* isolated from the sputum samples shows multiple drug resistance. Due to the physiological characteristics of newborns, antibiotic use for the infection is limited. It is important to reasonably select anti SA drugs with the help of drug sensitivity test and gene detection for drug resistance and virulence.

Key words: *Staphylococcus aureus*; neonatology; sputum; drug sensitivity test; genotyping; antibiotics

基金项目：柳州市科学技术局重点研发计划（No. 2018BJ10504）。
作者简介：黄金华，女，副主任药师，主要从事临床药学研究，E-mail：spirit0607@163.com *通信作者：傅锦坚，女，博士，副主任技师，主要从事多重耐药菌的分子流行病学研究，E-mail：fujinjianaa@126.com

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，SA）是临床常见感染病原菌之一，根据 2014 至 2017 年中国儿童及新生儿患者（≤ 14 岁）细菌耐药监测报告可见 [1]：SA 分离率已占儿童及新生儿组革兰氏阳性菌分离率的首位，并呈逐年上升趋势。SA 最常侵犯 4 个月以下的婴幼儿，该年龄段 SA 的阳性分离较高 [2]，新生儿免疫系统发育不完善，抵抗力弱，容易感染，为了解本地区新生儿 SA 耐药情况及分子特征，对 2014—2017 年柳州市妇幼保健新生儿病区痰标本分离出的 52 株 SA 株耐药情况及 *mecA* 基因、*SCCmec* 分型、大环内酯类耐药基因（*ermA*，*ermC*）、四环素耐药基因（*tetM* 和 *tetK*）、杀白细胞素（panton-valentine leukocidin，PVL）毒力因子的分子特征进行回顾性研究分析，为防治新生儿呼吸道 SA 感染提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

收集本院 2014 年 1 月至 2017 年 12 月新生儿病区呼吸道痰液送检样本中分离出的 SA 株，剔除重复菌株，同一患者只选取一株分离株进行分析，共 52 株。

1.2 分离鉴定

细菌的分离鉴定按文献 [3] 描述的方法进行。根据收集标本当年发布的美国临床和实验室标准化协会所制订的标准采用 CLSI 纸片法检测所有菌株对青霉素、阿莫西林克拉维酸钾、氨苄西林、头孢氨苄、红霉素、克林霉素、庆大霉素、复方新诺明、环丙沙星、左氧氟沙星、四环素、利福平、万古霉素、利奈唑胺这 14 种抗菌药物的敏感性。采用头孢西丁纸片扩散法初步检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant SA，MRSA）和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（methicillin-susceptible SA，MSSA）。

1.3 耐药基因及 PVL 毒力因子基因检测

采用聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）方法检测大环内酯类耐药基因（*ermA*，*ermC*）、四环素耐药基因（*tetM* 和 *tetK*）[4]、PVL 毒力因子基因 [5]。参照文献 [6-7] 采用多重聚合酶链反应（M-PCR）对 SA 携带的 *mecA* 基因及 *mecA* 基因的具体 *SCCmec* 分子分型进行检测。引物序列及产物长度条件参考文献 [7]，PCR 扩增条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 45 s，65 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 90 s，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。扩增产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙啶（0.5 μg • mL $^{-1}$）染色后成像，记录结果。

1.4 统计学方法

运用统计学软件 SPSS 23.0 进行数据分析，对等级变量和率的差异采用 χ^2 检验或 Fisher’s 精确检验，所有的检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离的 SA 对抗菌药物耐药情况及耐药基因检出情况

52 株 SA 对青霉素、氨苄西林耐药率非常高，分别为 98.08%、73.08%，对利福平、左氧氟沙星耐药率较低（均为 1.92%），对环丙沙星、万古霉素、利奈唑胺无耐药，具体见表 1。采用头孢西丁敏感试验筛查，同时采用 PCR 方法检测 *mecA* 基因。头孢西丁敏感试验筛查阳性菌均检出 *mecA* 基因，检出 MRSA 11 株，检出率为 21.15%，SA 对氨苄西林、阿莫西林克拉维酸钾、红霉素、头孢氨苄的耐药性较 MSSA 高（$P < 0.05$）。耐药基因仅检出 *mecA*、*SCCmecIVd* 基因、大环内酯类 *ermC* 耐药基因、四环素 *tetK* 耐药基因和毒力因子 PVL 基团，其他耐药基因未检出。其中 *mecA* 基因检出 12 株，*SCCmecIVd* 基因检出 11 株，大环内酯类 *ermC* 耐药基因检出 12 株，四环素 *tetK* 耐药基因检出 10 株，毒力因子 PVL 基因检出 5 株，具体检测情况见表 2，部分菌株分型见图 1 ～ 3。

2.2 携带 *ermC*、*tetK* 耐药基因抗菌药物耐药情况及分子学特征情况

携带 *ermC* 耐药基因的金黄色葡萄球菌对红霉素耐药率为 75.00%，克林霉素耐药率为 66.67%，其中携带 *mecA* 基因 4 株，*SCCmecIVd* 基因 3 株，*tetK* 耐药基因 2 株，毒力因子 PVL 3 株；携带 *tetK* 耐药基因的金黄色葡萄球菌对四环素耐药率为 90.0%，其中检出携带 *mecA* 基因 4 株，*SCCmecIVd* 基因 3 株，*tetK* 耐药基因 2 株，毒力因子 PVL 2 株（见表 3 ～ 6）。

3 讨论

3.1 SA 耐药基因检测对抗菌药物选择的影响

SA 的耐药机制比较复杂，可能携带 *mecA* 基因、大环内酯类耐药基因（*ermC*）、四环素耐药基因（*tetM* 和 *tetK*）、PVL 毒力因子等耐药基因及因子，本研究检测出携带大环内酯类 *ermC* 耐药基因的菌株相对于未携带大环内酯类 *ermC* 耐药基因的菌株对红霉素、克林霉素的敏感性有统计学意义（$P < 0.05$）；携带四环素 *tetK* 耐药基因的菌株相对于未携带四环素 *tetK* 耐药基因的菌

表 1　SA 抗菌药物耐药情况

Tab 1　Antimicrobial resistance of SA

抗菌药物	MRSA（n = 11）		MSSA（n = 41）		χ^2	P
	例数	百分比 /%	例数	百分比 /%		
氨苄西林	11	100.00	27	65.85	5.140	0.023
复方新诺明	1	9.09	2	4.88	0.283	0.595
青霉素	11	100.00	40	97.56	0.274	0.601
庆大霉素	2	18.18	3	7.32	1.178	0.278
红霉素	8	72.73	8	19.51	11.530	0.001
克林霉素	7	63.64	10	24.39	6.071	0.014
四环素	5	45.45	7	17.07	3.936	0.047*
阿莫西林克拉维酸钾	11	100.00	1	2.44	46.504	＜ 0.001
利福平	0	0.00	1	2.44	0.274	0.601
左氧氟沙星	1	9.09	0	0.00	3.800	0.051
头孢氨苄	11	100.0	0	0.00	52.000	＜ 0.001
环丙沙星	0	0.00	0	0.00	—	—
万古霉素	0	0.00	0	0.00	—	—
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	—	—

注：*采用 Fisher’s 精确检验，则 P 值＝ 0.1。

Note：*The data were analyzed by Fisher’s exact test，P = 0.1。

表 2　SA 耐药基因及 PVL 毒力因子基因检测情况

Tab 2　Drug resistance gene and PVL virulence gene

基因	MRSA（n = 11）		MSSA（n = 41）		χ^2	P
	例数	百分比 /%	例数	百分比 /%		
mecA	11	100.00	1	2.44	46.504	＜ 0.001
SCCmecIVd	11	100.00	0	0.00	52.000	＜ 0.001
ermC	3	27.27	9	21.95	0.138	0.710
tetK	3	27.27	7	17.07	0.581	0.446
PVL	1	9.09	4	9.76	0.004	0.947

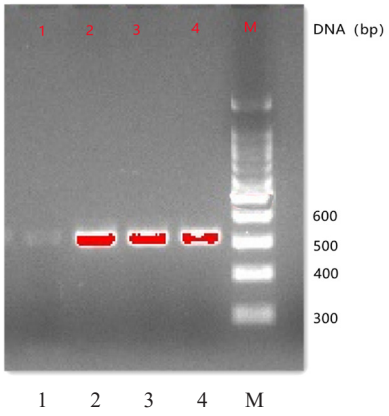


图 1　部分菌株 *mecA* 基因 PCR 扩增电泳图

Fig 1　Polymerase chain reaction amplification electrophoresis for *mecA* gene

注（Note）：第 2 ～ 4 泳道：*mecA* 基因 PCR 产物（533 bp）[Lane 2 ～ 4：PCR products of *mecA* gene（533 bp）]。

株对四环素的敏感性有统计学意义（P ＜ 0.05）。当 SA 检出携带大环内酯类 *ermC* 耐药基因时，则不宜选择大环内酯类抗菌药物、林可酰胺类抗

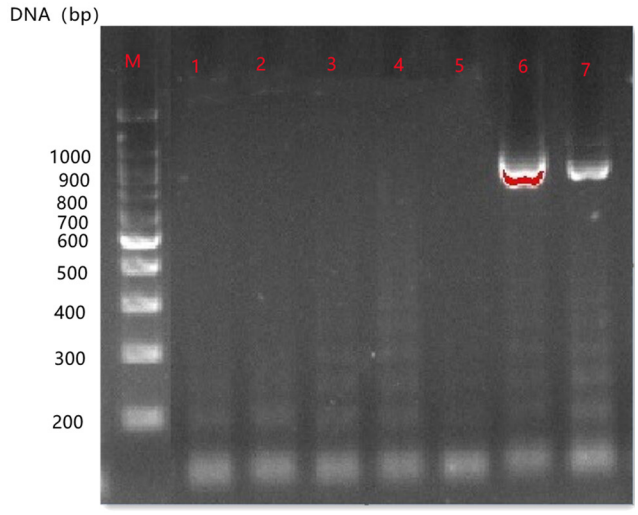


图 2　部分菌株 *SCCmec* 分子分型基因 PCR 扩增电泳图

Fig 2　Polymerase chain reaction amplification electrophoresis for *SCCmec* gene

注（Note）：第 6 和 7 条：*SCCmecIVd* 基因 PCR 产物（881 bp）[Lane 6 and 7：PCR products of *SCCmecIVd*（881 bp）]。

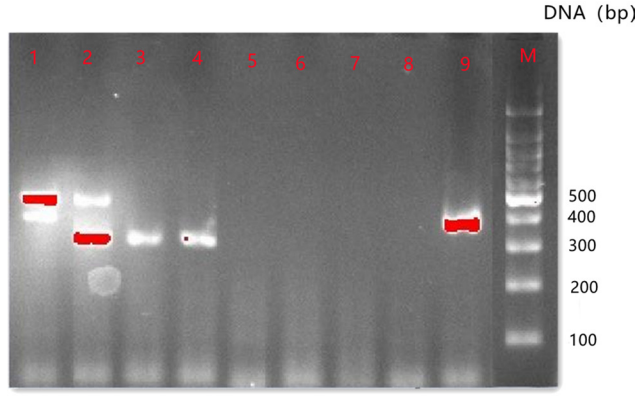


图 3　部分菌株 ermC、tetK、PVL 毒力因子基因 PCR 扩增电泳图

Fig 3　Polymerase chain reaction amplification electrophoresis for ermC，tetK and PVL virulence gene

注（Note）：第 1 和 2 条：*ermC* 基因 PCR 产物（520 bp）[Lane 1 and 2：PCR products of *ermC* gene（520 bp）]；第 1 和 9 条：PVL 毒力因子基因 PCR 产物（433 bp）[Lane 1 and 9：PCR products of PVL virulence gene（433 bp）]；第 2 ～ 4 条：tetK 基因 PCR 产物（360 bp）[Lane 2 to 4：PCR products of tetK gene（360 bp）]。

菌药物抗感染治疗；如检出携带四环素 *tetK* 耐药基因时，则不宜选择四环素类药物抗感染治疗。

mecA 基因编码的青霉素结合蛋白 2a（PBP2a）能够替代结合失活的 PBPs 发挥转肽酶的功能，促进细胞壁的合成而产生耐药性[8]。由于 MRSA 产生的耐药是因 MRSA 获得 *mecA* 基因，编码产生新的青霉素结合蛋白 2a（PBP2a），造成对 β-内酰胺类药物耐药，CLSI 明确指出一旦在 SA 中检测到 *mecA* 基因，即可认定为 MRSA[9]。本研究中有 1 株 SA 菌株头孢西丁筛查

表 3 携带 *ermC* 耐药基因对抗菌药物耐药情况

Tab 3 Drug resistance of bacteria antibiotics carrying *ermC* resistance gene

抗菌药物	*ermC* 阳性（$n=12$）		*ermC* 阴性（$n=40$）		χ^2	P
	例数	百分比 /%	例数	百分比 /%		
氨苄西林	9	75.00	29	72.50	0.029	0.864
复方新诺明	0	0.00	3	7.50	0.955	0.328
青霉素	11	91.67	40	100.00	3.399	0.065
庆大霉素	1	8.33	4	10.00	0.030	0.864
红霉素	9	75.00	7	17.50	14.327	＜0.001
克林霉素	8	66.67	9	22.50	8.183	0.004
四环素	3	25.00	9	22.50	0.033	0.857
阿莫西林克拉维酸钾	3	25.00	9	22.50	0.033	0.857
利福平	0	0.00	1	2.50	0.306	0.580
左氧氟沙星	1	8.33	0	0.00	3.399	0.065
头孢氨苄	3	25.00	8	20.00	0.138	0.170
环丙沙星	0	0.00	0	0.00	—	—
万古霉素	0	0.00	0	0.00	—	—
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	—	—

表 4 携带 *ermC* 耐药基因及 PVL 毒力因子基因检测情况

Tab 4 *ermC* resistance gene and PVL virulence gene

基因	*ermC* 阳性（$n=12$）		*ermC* 阴性（$n=40$）		χ^2	P
	菌株 / 例	百分比 /%	菌株 / 例	百分比 /%		
mecA	4	33.33	8	20.00	0.924	0.336
SCCmecIVd	3	25.00	8	20.00	0.138	0.710
tetK	2	16.67	8	20.00	0.066	0.797
PVL	3	25.00	2	5.00	4.249	0.039*

注：*采用 Fisher’s 精确检验，P 值＝0.074。

Note：*The data were analyzed by Fisher’s exact test，$P=0.074$。

表 5 携带 *tetK* 耐药基因抗菌药物耐药情况

Tab 5 Drug resistance of bacteria antibiotics carrying *tetK* resistance gene

抗菌药物	*tetK* 阳性（$n=10$）		*tetK* 阴性（$n=42$）		χ^2	P
	例数	百分比 /%	例数	百分比 /%		
氨苄西林	6	60.00	32	76.19	1.076	0.300
复方新诺明	1	10.00	2	4.76	0.408	0.523
青霉素	10	100.00	41	97.62	0.243	0.622
庆大霉素	0	0.00	5	11.90	1.317	0.251
红霉素	4	40.00	12	28.57	0.495	0.482
克林霉素	3	30.00	14	33.33	0.041	0.840
四环素	9	90.00	3	7.14	31.237	＜0.001
阿莫西林克拉维酸钾	3	30.00	9	21.43	0.334	0.563
利福平	0	0.00	1	2.38	0.243	0.622
左氧氟沙星	0	0.00	1	2.38	0.243	0.622
头孢氨苄	3	30.00	8	19.05	0.581	0.446
环丙沙星	0	0.00	0	0.00	—	—
万古霉素	0	0.00	0	0.00	—	—
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	—	—

表 6 携带 *tetK* 耐药基因及 PVL 毒力因子基因检测情况

Tab 6 *tetK* resistance gene and PVL virulence gene

基因	*tetK* 阳性（$n=10$）		*tetK* 阴性（$n=42$）		χ^2	P
	例数	百分比 /%	例数	百分比 /%		
mecA	4	40.00	8	19.05	1.997	0.158
SCCmecIVd	3	30.00	8	19.05	0.581	0.446
ermC	2	20.00	10	23.81	0.066	0.797
PVL	2	20.00	3	7.14	1.536	0.215

试验阴性，但检出 *mecA* 基因阳性，则仍可认定这株菌株为 MRSA。

SCCmec 盒式染色体是一种新型的可移动元件，大小为 21 ～ 67 kbp，该元件主要包括 *mec* 基因复合体和染色体重组酶基因 *ccr* 复合体。根据 *mec* 和 *ccr* 基因复合体结构不同，可将 *SCCmec* 主要分为 5 种基因型 [10-11]。医院感染 MRSA 菌株多携带 *SCCmec* Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型，社区感染 MRSA 菌株多携带 *SCCmec* Ⅳ、Ⅴ。本研究检出的 12 株携带 *mecA* 基因的 SA，同时携带 *SCCmecIVd* 基因，考虑来自于社区获得性感染。因社区健康儿童鼻前庭 SA 定植率可达 38.9%[12]，在临床治疗上首先要判断是定植菌还是致病菌，以减少不必要的抗菌药物使用，促进临床抗 SA 治疗的合理性。

PVL 是由 SA 产生的一种外毒素，可引起机体释放多种炎性介质，引发血管扩张、炎性细胞浸润、组织坏死等一系列炎性反应，最终使细胞坏死或凋亡而危及生命。本研究的 SA 株主要来自呼吸道标本，共检出 5 株菌株携带 PVL 毒力因子，其中携带 *ermC* 耐药基因的 SA 中检出 PVL 毒力因子 3 株，未携带 *ermC* 耐药基因的 SA 中检出 PVL 毒力因子 2 株，如采用 χ^2 检验时 $P<0.05$，差异有统计学意义。但因当 1 ≤理论数（T）＜ 5，$n \geq 40$ 时，采用 Fisher’s 精确检验计算 $P>0.05$，则差异无统计学意义。不同地区 SA 所携带的耐药基因及毒力等情况可能会有所不同，如一项对 1992—2010 年医院 MRSA 克隆分布的研究显示：分离出携带 *ermC* 介导的红霉素和克林霉素耐药的 MSRA 菌株检出 PVL 呈阴性 [13]，而一项携带 PLV 毒力因子的 MRSA 研究中发现：MRSA 分离菌中检出携带 PVL 毒力检出率为 29.2%，其中携带 *ermC* 耐药基因占 18.6%，是最常见的耐药基因 [14]。

3.2 结语

因新生儿的特殊生理特点，复方新诺明、四环素、左氧氟沙星、环丙沙星不能用于新生儿，

庆大霉素等氨基糖苷类抗菌药物因耳毒性、肾毒性等不良反应，儿童须在监测药物血药浓度的前提下谨慎使用，一般也不首选，因此对于新生儿 SA 的药物治疗选择上比较局限。本研究发现，本地区新生儿痰液中检出的 SA 对青霉素、氨苄西林耐药高，因此在临床上新生儿抗 SA 治疗不应选用青霉素、氨苄西林作为 SA 的常规抗感染治疗用药，对于 MSSA 可选择红霉素、阿莫西林克拉维酸钾、头孢氨苄作为首选治疗方案，对于 MRSA 则选用万古霉素、利奈唑胺治疗。对于检出大环内酯类耐药基因的 SA 菌株，除了对大环内酯类药物耐药外，对克林霉素耐药比例也比较高，因此，应同时做克林霉素诱导试验（即 D 试验），以便为临床用药提供参考。

参考文献

[1] 全国细菌耐药监测网 . 2014 至 2017 年中国儿童及新生儿患者细菌耐药监测研究 [J]. 中华医学杂志，2018，98（40）：3279-3287.

[2] 傅锦坚，蒋丽华，谭丽丽，等 . 儿童金黄色葡萄球菌感染及其耐药性分析 [J]. 中国妇幼保健，2015，30（27）：4643-4645.

[3] Macnow T，O Toole D，Delamora P，et al. Utility of surveillance cultures for antimicrobial resistant organisms in infants transferred to the neonatal intensive care unit [J]. Pediatr Infect Dis J，2013，32（12）：e443-e450.

[4] Guo D，Liu Y，Han C，et al. Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from pigs：Implication for livestock-association markers and vaccine strategies [J]. Infect Drug Resist，2018，11（8）：1299-1307.

[5] Chen Z，Han C，Huang X，et al. A molecular epidemiological study of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* contamination in the airport environment [J]. Infect Drug Resist，2018，11（11）：2363-2375.

[6] Zhang KY，McClure JA，Elsayed S，et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types Ⅰ to Ⅴ in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Micro-Biol，2005，43（10）：5026-5033.

[7] 傅锦坚，叶小华，姚振江，等 . 健康儿童鼻携带 MRSA *SCCmec* 分型及耐药性分析 [J]. 中国药房，2014，25（46）：4343-4346.

[8] van Griethuyden A，van Loo I，van Belkum A，et al. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* stains [J]. J Clin Microbiol，2005，43（3）：1361-1365.

[9] Ontsira NE，Atipo IB，Moyen R，et al. Molecular detection of helicobacter pylori and its antimicrobial resistance in brazzaville，congo [J]. Helicobacter，2015，20（4）：316-320.

[10] Ito T，Okuma K，Ma XX，et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome：Genomic island SCC [J]. Drug Resist Updat，2003，6（1）：41-52.

[11] Ito T，Ma XX，Takeu chi F，et al. Novel type Ⅴ staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase，ccrC [J]. Antimicrob Agents Chemother，2004，48（7）：2637-2651.

[12] 傅锦坚，叶小华，樊燕平，等 . 广州健康儿童鼻前庭定植金黄色葡萄球菌危险因素研究 [J]. 重庆医学，2015，44（26）：3669-3671，3698.

[13] Boswihi SS，Udo EE，Al-Sweih N. Shifts in the clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kuwait hospitals：1992—2010 [J]. PLoS One，2016，11（9）：e0162744.

[14] Goudarzi M，Navidinia M，Beiranvand E，et al. Phenotypic and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones carrying the panton-valentine leukocidin genes disseminating in Iranian hospitals [J]. Microbial Drug Resistance（Larchmont，N. Y.），2018，24（10）：1543-1551.

（收稿日期：2021-06-18；修回日期：2021-09-27）

沙格雷酯片合理使用评价标准的建立及应用

司福国[1]，崔佳[1*]，曹迪[1]，程军[1]，王海坤[2]（1. 安徽省蚌埠市第三人民医院药学部，安徽　蚌埠　233000；2. 亳州市人民医院药学部，安徽　亳州　236800）

摘要：目的　建立沙格雷酯片合理使用评价标准，分析其临床使用合理性，提出改进措施。**方法**　以沙格雷酯片药品说明书为基础，参考《马丁代尔药物大典（原著第 37 版）》及国内外相关指南及共识，建立沙格雷酯片合理使用评价标准。采用回顾性分析方法，对某院 2019 年 1 月 1 日至 2020 年 12 月 31 日沙格雷酯片门诊处方进行合理使用的统计及调查分析。**结果**　共纳入 93 张沙格雷酯片门诊处方，用药合理率为 28.0%，不合理用药主要为无适应证用药（65.6%）、用法用量不适宜（6.5%）、存在潜在药物相互作用（11.8%）。**结论**　沙格雷酯片使用合理率低，应制订相应的干预措施，促进合理使用，保证用药安全。

关键词：沙格雷酯片；评价标准；合理用药
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2671-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.036

Evaluation criteria for rational use of sarpogrelate tablets

SI Fu-guo[1], CUI Jia[1*], CAO Di[1], CHENG Jun[1], WANG Hai-kun[2] (1. *Department of Pharmacy*, *Third People's Hospital of Bengbu*, *Bengbu Anhui* 233000; 2. *Department of Pharmacy*, *People's Hospital of Bozhou*, *Bozhou Anhui* 236800)

Abstract: Objective　To establish the evaluation criteria for rational use of sarpogrelate tablets and to make the improvement measures. **Methods**　Evaluation criteria were established with reference to drug instruction, domestic and foreign guidelines, and "Martindale: The Complete Drug Reference (Version No.37)". The outpatient prescriptions of sarpogrelate tablets from Januray 1st, 2019 to December 31st, 2020 were analyzed retrospecively for rationality according to the evaluation criteria of a hospital. **Results**　Totally 93 outpatient prescriptions of sargrelide tablets were included. The rationality rate was 28.0%. Irrational medications mainly included medications without indications (65.6%), inappropriate usage and dosage (6.5%), and potential drug interaction (11.8%). **Conclusion**　The rationality rate of sagrelate is low. Intervention measures should be established to ensure the safe use of sagrelate tablets.

Key words: sarpogrelate tablet; evaluation criterium; rational drug use

动脉硬化闭塞症是由于脂质斑块在管腔内聚集，形成血栓致动脉狭窄和闭塞，使肢体出现供血不足，发生疼痛、溃疡甚至坏疽的疾病，在中老年中的发病率、死亡率逐年增加。研究发现，动脉硬化闭塞症发生时，可产生 5- 羟色胺（5-HT）、血小板源性生长因子，导致血管收缩、血小板聚集、血供减少[1]。沙格雷酯为新型选择性 5-HT_2 受体抑制剂，其适应证为改善慢性动脉闭塞症所引起的溃疡、疼痛以及冷感等缺血性症状，该药可抑制血管收缩及抗血小板聚集，对动脉硬化闭塞症的病变处有明显靶向性，明显改善血管紧张性及血液流变学，已成为该类疾病的一线治疗药物。由于该药同时具有调节微循环、提高皮肤表面温度及扩张血管的药理作用[2]，同样受到临床关注，已被用于治疗其他疾病（如糖尿病病足）。国内目前尚无沙格雷酯片合理应用评

基金项目：蚌埠市科技发展指导性项目（No.20160322）。
作者简介：司福国，男，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：77316453@qq.com　*通信作者：崔佳，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：114087729@qq.com

价标准的相关研究，本文通过合理使用标准的建立，对某院沙格雷酯片门诊处方进行回顾性分析与评价，旨在为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 合理应用评价标准的建立

以本院在用的沙格雷酯片（生产企业：田边三菱制药株式会社；规格：100 mg/ 片）说明书为基础[3]，查阅《马丁代尔药物大典（原著第 37 版）》[4]，结合国内外临床治疗指南及专家共识[5-6]，经医院合理用药工作小组（由 3 名副主任药师，6 名临床药师组成）内部讨论，拟订沙格雷酯片合理应用评价标准初稿，咨询医院相关临床专家，从科学、实用、可操作三个方面对沙格雷酯片合理应用评价标准初稿进行讨论及修改完善，以确定所选择指标能否发现临床应用沙格雷酯片时存在的问题，最终形成沙格雷酯片合理应用评价标准，见表 1。在此标准中，沙格雷酯片超说明书用药推荐级别参考欧美糖尿病相关指南的定义[7]，分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅱa、Ⅱb 及Ⅲ5 个推荐级别；证据级别水平定义参考《糖尿病微循环障碍临床用药专家共识（2021 年版）》推荐定义[6]，分为 A、B、C 3 个证据水平。

表 1 沙格雷酯片合理应用评价标准

Tab 1 Evaluation criteria for rational use of sarpogrelate tablets

指标	评价依据	评价结果
适应证	① 改善慢性动脉闭塞症所引起的溃疡、疼痛以及冷感等缺血性症状；② 糖尿病病足（Ⅰ，A）[5-6]；③ 糖尿病神经病变（Ⅱb，C）[6]；④ 糖尿病肾病（Ⅱb，C）[6]	0：符合①或②或③或④；1：不符合①或②或③或④或有禁忌证用药
禁忌证	① 出血性患者（血友病、毛细血管脆弱症、消化道溃疡、尿道出血、咯血、玻璃体出血等）；② 孕妇或已有可能怀孕的妇女	
用法用量	① 慢性动脉闭塞症：100 mg tid；② 糖尿病并发症：100 mg tid	0：符合①或②；1：不符合①或②
用药疗程	未明确规定	
药物相互作用	① 与抗凝药（如华法林）、抗血小板凝聚作用的药物（如阿司匹林、噻氯匹定等），青霉素（如阿洛西林）等联合使用，有加剧出血或延长出血时间的可能；② 与非甾体抗炎药（如布洛芬）联用，增加出血特别是胃肠出血的风险	0：不符合①或②；1：符合①或②
不良反应监测	① 注意过敏症、血液系统、消化系统、肝肾功能、循环器官等不良反应的监测；② 发生相关 ADR，立即停药，及时对症处理，同时填写 ADR 报表及上报	0：符合①或②；1：不符合①或②

注（Note）：0 为合理，1 为不合理（0 is reasonable and 1 is unreasonable）。

1.2 处方来源

采用医院合理用药软件抽取 2019 年 1 月 1 日—2020 年 12 月 31 日所有沙格雷酯片的门诊处方，统计患者基本情况、诊断、沙格雷酯片用药等信息，若患者有多种诊断，则与处方医师沟通，了解患者实际情况，选择与沙格雷酯片治疗目的相符的诊断。

2 结果

2.1 一般情况

共统计沙格雷酯片处方 93 张，分布在 11 个科室，其中全科医学科 37 张，普外科 24 张，风湿免疫科 11 张，心内科 9 张，内分泌科 3 张，神经外科、微创外科、血液内科各 2 张，离休门诊、神经内科、胸心外科均为 1 张。93 张处方中，男性患者为 45 张，女性患者为 48 张；平均年龄为（73.6±12.3）岁，31 ～ 40 岁 2 张，41 ～ 60 岁 5 张，61 岁及以上 86 张。

2.2 用药合理性评价

93 张处方中，适应证合理的处方有 26 张，占比为 28.0%，其中符合说明书规定用药的 17 张，超说明书用药 9 张。超说明书用药中，糖尿病周围神经病变 6 张，糖尿病病足 2 张，糖尿病周围神经病变合并糖尿病病足 1 张（处方诊断为糖尿病伴并发症、糖尿病伴多个并发症，咨询处方医师后，其诊断应为糖尿病周围神经病变、糖尿病周围神经病变合并糖尿病病足）。沙格雷酯片不合理用药情况见表 2。

3 讨论

3.1 有循证医学证据的超适应证用药

本研究经统计发现，仅 26 张为适应证合理处方，其中 9 张处方为超说明书用药。《中国糖尿病足防治指南（2019 年版）（Ⅱ）》[5] 及《糖尿病微循环障碍临床用药专家共识（2021 年版）》[6] 均收录了沙格雷酯片治疗糖尿病病足，后者还收录了沙格雷酯片治疗糖尿病周围神经病变及糖尿病肾病。糖尿病微循环障碍是糖尿病慢性并发症如糖尿病肾病、糖尿病周围神经病变、糖尿病病足共同的病因之一。沙格雷酯片通过拮抗 5-HT_2 受体，可抑制血管收缩，抗血小板凝集，调节微循环，提高皮肤表面温度，对血管也有一定的扩张作用[2]，

表 2　沙格雷酯片不合理用药情况

Tab 2　Statistics of irrational use of sarpogrelate tablets

类型	处方数 / 张	构成比 /%	具体内容
无适应证用药	61	65.6	高血压合并冠心病（11）、糖尿病合并高血压及冠心病（8）、动脉硬化（6）、高血压（6）、冠心病（6）、下肢缺血（5）、高血压合并冠心病及脑血管意外（3）、高血压合并脑血管病及冠心病（3）、高血压合并心房颤动及冠心病（2）、动脉痉挛（1）、高血压合并脑血管意外（1）、静脉曲张（1）、糖尿病（1）、下肢动脉栓塞（1）、下肢动脉血栓形成（1）、下肢深静脉栓塞（1）、下肢疼痛（1）、周围血管疾病（1）、肺源性心脏病（1），动脉栓塞（1）
用法用量不适宜	6	6.5	慢性动脉闭塞症：0.10 g qd（3）、0.10 g bid（2）；糖尿病病足：0.10 qd（1）
药物相互作用	11	11.8	阿司匹林（4）、阿司匹林 + 氯吡格雷（4）、氯吡格雷（3）

不仅可以减少溃疡面积，还可以增加踝肱指数、足背动脉的血流、无痛行走的距离 [8]；同时对周围神经可增加供养，改善周围神经病变 [9]。

3.2　无适应证用药情况分析

无适应证用药的处方中，沙格雷酯片用于治疗高血压、冠心病或合并两者诊断的处方较多，《稳定型冠心病基层合理用药指南 2021 年版》[10]、《稳定性冠心病诊断与治疗指南 2018 年版》[11] 均未推荐沙格雷酯作为抗血小板药用于治疗稳定型冠心病。《中国高血压防治指南（2018 年修订版）》[12] 推荐抗血小板药物用于缺血性心脑血管疾病患者，但并未包含沙格雷酯。《高血压合并动脉粥样硬化防治中国专家共识》[13] 指出：高血压合并动脉粥样硬化患者，应进行抗血小板治疗，但推荐药物并无沙格雷酯。

以“沙格雷酯”“高血压”“冠心病”“Sarpogrelate”“hypertension”“Coronary Diseas”为检索词检索循证医学数据库 Cochrane Library 以及原始数据库如知网、万方、维普、PubMed 等，未检索到沙格雷酯治疗高血压相关研究，也未检索到冠心病相关高质量的系统评价、meta 分析及随机对照研究（RCT），仅有少数研究表明，沙格雷酯可缓解 2 型糖尿病合并不稳定型心绞痛患者的病情 [14]，减少糖尿病患者冠状动脉斑块体积 [15] 及增加冠心病患者的脑血流量 [16]，但目前缺乏高质量及大样本的 RCT 或指南及专家共识的支持。因此，沙格雷酯片治疗冠心病，目前尚无充分的循证医学证据。

Cochrane Library 系统评价数据库中收录一篇口服抗血小板药治疗急性缺血性脑卒中的系统评价显示：患者在出现中风症状的 48 h 内服用阿司匹林，150 ～ 300 mg qd，可减少早期复发性缺血性中风以及早期出血并发症的主要风险，长期使用可改善预后，而沙格雷酯、氯吡格雷、噻氯匹定等其他口服抗血小板药物对急性卒中的疗效并无可靠证据 [17]。一篇纳入 488 000 名卒中患者，涉及 11 种抗血小板方案进行卒中二级预防作用的 meta 分析结果显示 [18]：沙格雷酯片相对于其他抗血小板方案并无显著优势，且其出血事件发生数最多。其余诊断如动脉痉挛、动脉栓塞、静脉曲张、动脉硬化等，经检索循证医学数据库及原始数据库均无相关研究，故判定为无循证医学证据用药。

3.3　用法用量不适宜及疗程

沙格雷酯片用法用量不适宜的主要表现为给药频次不适宜。沙格雷酯半衰期较短，为 0.69 h[3]，bid、qd 的给药频次不能确保有效和稳定的血药浓度，疗效难以保证。建议医师严格按照说明书规定内容开具处方，同时药师应严格执行“四查十对”，尤其是用法用量，以保证患者用药安全有效。

需要注意的是，沙格雷酯片说明书及相关指南或专家共识均未明确其用药疗程，有研究表明其疗程可长达 12 周 [19]，故本文未对该药的用药疗程进行评价。

3.4　存在药物相互作用

经调查并无出血性患者使用沙格雷酯片，也并未发现与该药相关的不良反应（ADR），但有 11 张处方为沙格雷酯片联用抗血小板凝聚药，其中联用阿司匹林 4 张，联用阿司匹林＋氯吡格雷 4 张，联用氯吡格雷 3 张。有报道 1 例 74 岁女性患者行人工血管旁路移植术，术前血小板计数为 $167\times10^9\cdot L^{-1}$，术后给予氯吡格雷与沙格雷酯进行抗血小板治疗，术后第 6、7、9 月的血小板计数分别是 $240\times10^9\cdot L^{-1}$、$272\times10^9\cdot L^{-1}$、$1\times10^9\cdot L^{-1}$，患者在此期间并无感染及其他特殊药品、食品、化学用品接触史，在停用氯吡格雷与沙格雷酯后患者血小板计数恢复正常 [20]。建议医师开具抗血小板药的处方时，选择单一用药，若必须联用其他抗血小板药，可对患者血小板进行定期监测，以保证用药安全。

4　结语

本研究发现，沙格雷酯片用药合理率较低，

主要问题为无适应证用药、用法用量不适宜、潜在药物相互作用，分析其原因主要有：① 医师对药物熟悉度不够，未能仔细阅读药品说明书；② 医院目前开展的处方审核为处方后审核，未进行处方前置审核；③ 医院合理用药软件未能完全将药品适应证、禁忌证、用法用量等内容予以体现及警示，其功能需进一步完善；④ 部分医师的用药安全意识不足，未能重视合理用药。医院应进一步加强药师下临床力度，加强院内合理用药培训及宣传，提高医师合理用药及安全用药意识，开展处方点评及处方前置审核，进一步完善合理用药软件，以确保患者用药安全。目前，对于用法用量不适宜及潜在药物相互作用，合理用药软件已经实现在医师开具处方时给予用药警示；而对于适应证不适宜，需借助合理用药软件进行适应证管理规则梳理和用药警示。同时，临床药师也需对临床相关科室进行沙格雷酯片合理使用的相关培训，对沙格雷酯片用药的循证医学证据进行定期收集，以促进该药的合理使用。

参考文献

[1] Fukuda S，Fujioka S，Hosaka S，et al. Relationship between arteriosclerosis obliterans and the ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg，2014，20（1）：44-47.

[2] 李明锐 . 沙格雷酯对糖尿病足病人血清胆红素及炎症因子水平的影响 [J]. 蚌埠医学院学报，2018，43（7）：861-863，867.

[3] 田边三菱制药株式会社 . 盐酸沙格雷酯片 [Z]. 2015.

[4] 希恩 . C，斯威曼 . 马丁代尔药物大典（原著第 37 版）[M]. 北京：化学工业出版社，2013：1901.

[5] 中华医学会糖尿病学分会，中华医学会感染病学分会，中华医学会组织修复与再生分会 . 中国糖尿病足防治指南（2019 版）（Ⅱ）[J]. 中华糖尿病杂志，2019，11（3）：161-189.

[6] 糖尿病微循环障碍临床用药专家共识（2021 年版）[J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2021，13（4）：49-57.

[7] Ryden L，Grant PJ，Anker SD，et al. ESC Guidelines on diabetes，pre-diabetes，and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD：The task force on diabetes，pre-diabetes，and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology（ESC）and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes（EASD）[J]. Eur Heart J，2013，34（39）：3035-3087.

[8] 高伟，王芳，刘关键，等 . 盐酸沙格雷酯治疗周围动脉疾病疗效与安全性的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志，2012，12（3）：341-346.

[9] 刘国庆，徐伟民，鲁梅芳，等 . 盐酸沙格雷酯对糖尿病周围神经病变的疗效观察 [J]. 临床内科杂志，2006，4（7）：501.

[10] 中华医学会 . 稳定性冠心病基层合理用药指南 [J]. 中华全科医师杂志，2021，20（4）：423-434.

[11] 王斌，李毅，韩雅玲 . 稳定性冠心病诊断与治疗指南 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46（9）：680-694.

[12] 中国高血压防治指南修订委员会 . 中国高血压防治指南（2018 年修订版）[J]. 中国心血管杂志，2019，24（1）：24-56.

[13] 赵连友，孙英贤，李玉明，等 . 高血压合并动脉粥样硬化防治中国专家共识 [J]. 中华高血压杂志，2020，28（2）：116-123.

[14] 康雪冰，张颖，燕妮 . 沙格雷酯治疗 2 型糖尿病合并不稳定型心绞痛 68 例临床评价 [J]. 中国药业，2015，24（24）：74-76.

[15] Lee DH，Chun EJ，Hur JH，et al. Effect of sarpogrelate，a selective 5-HT2A receptor antagonist，on characteristics of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes [J]. Atherosclerosis，2017，257：47-54.

[16] Satomura K，Takase B，Hamabe A，et al. Sarpogrelate，a specific $5HT_2$-receptor antagonist，improves the coronary microcirculation in coronary artery disease [J]. Clin Cardiol，2002，25（1）：28-32.

[17] Sandercock PA，Counsell C，Tseng MC，et al. Oral antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev，2014，2014（3）：CD000029.

[18] Malloy RJ，Kanaan AO，Silva MA，et al. Evaluation of antiplatelet agents for secondary prevention of stroke using mixed treatment comparison meta-analysis [J]. Clin Ther，2013，35（10）：1490-1500. e7.

[19] Lee HC，Lee SR，Han KR，et al. Efficacy and safety of DP-R202 in patients with chronic artery occlusive disease：Multicenter randomized double-blind active-controlled parallel group phase Ⅲ clinical study [J]. Clin Ther，2016，38（3）：557-573.

[20] 郭建明，谷涌泉，李学峰，等 . 氯吡格雷和沙格雷酯联用致血小板减少 [J]. 药物不良反应杂志，2012，14（1）：50-52.

（收稿日期：2021-06-17；修回日期：2021-08-09）

新冠疫情后湖南省居民用药行为风险 KAP 调查

何丹[1, 2]，梁群[1, 3]，张超[4]，陈婷[1]，刘欣[5]，钟佳[6]，邓婷[6]，谭胜蓝[1*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，中南大学临床药学研究所，长沙　410011；2. 中国人民解放军联勤保障部队第九二一医院，长沙　410003；3. 江西省肿瘤医院药剂科，南昌　330029；4. 湖南省药学会，长沙　410011；5. 南县人民医院，湖南　益阳　413299；6. 湖南省长沙市望城区人民医院，长沙　410200）

摘要：目的　了解新冠疫情发生后湖南省居民用药知识 - 态度 - 行为（KAP）状态和影响因素，为后疫情时代进行更有效的合理用药科普宣教提供参考。**方法**　于 2020 年 5 月－ 7 月对湖南省不同地区居民开展用药 KAP 线上问卷调查，分析居民用药知识、态度和行为的情况及影响因素。**结果**　共收到有效问卷 1512 份。居民用药知识、态度和行为平均得分分别为（59.32±20.22）、（33.09±8.80）和（56.95±10.52）分，均达到评价标准中的“良好”，但行为得分较 2018 年在湖南省进行的 KAP 调查增加。多元线性回归分析表明，新冠疫情后显著影响居民用药 KAP 的因素包括年龄、居住地、医疗保障状况、受教育程度和工作状况。**结论**　疫情发生后湖南省居民用药 KAP 情况整体良好，但不安全用药行为风险较疫情前有所增加。后疫情时代应根据防疫要求和时代特点，利用多种平台与手段进行用药宣教，尤其应加强对老年人、居住在农村、低教育水平和无业人群的用药教育。

关键词：科普宣教；用药安全；合理用药；知识 - 态度 - 行为；新型冠状病毒肺炎
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2675-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.037

KAP survey on drug usage behavior risk of residents in Hunan province after the COVID-19 outbreak

HE Dan[1, 2], LIANG Qun[1, 3], ZHANG Chao[4], CHEN Ting[1], LIU Xin[5], ZHONG Jia[6], DENG Ting[6], TAN Sheng-lan[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Institute of Clinical Pharmacy*, *Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha*　410011; 2. *Department of Pharmacy*, 921 *Hospital of Chinese People's Liberation Army Joint Logistics Support Force*, *Changsha*　410003; 3. *Department of Pharmacy*, *Jiangxi Provincial Cancer Hospital*, *Nanchang*　330029; 4. *Hunan Pharmaceutical Association*, *Changsha*　410011; 5. *Nanxian People's Hospital*, *Yiyang*　*Hunan*　413299; 6. *People's Hospital of Wangcheng District*, *Changsha*　410200)

Abstract: Objective　To investigate the status and influencing factors of KAP (knowledge-attitude-practice, KAP) among residents in Hunan province during the COVID-19 epidemic to provide reference for more effective education of rational drug usage in the near future. **Methods**　The online KAP questionnaire survey on medication safety was conducted among residents in different areas of Hunan province from May to July, 2020, and the status and influencing factors of knowledge, attitude and practice of medication usage were analyzed. **Results**　Totally of 1512 valid questionnaires were received. The average scores of medication knowledge, attitude and practice of residents were (59.32±20.22), (33.09±8.80) and (56.95±10.52), respectively, all meeting the “good” grade in the evaluation criteria. However, the average practice score was higher than the one conducted in 2018 in Hunan province. Multiple linear regression analysis showed that the factors significantly affecting residents' knowledge,

基金项目：湖南省科学技术厅惠普性政策与创新环境建设计划（No.2020ZK4080）；湖南省居民用药安全行为风险 KAP 调查研究（No. CMEI2020KPYJ0015）；吴阶平医学基金会（No.320.6750.2020-04-36）。
作者简介：何丹，男，副主任药师，主要从事临床药学工作，E-mail：147282342@qq.com　*通信作者：谭胜蓝，女，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：sltan@csu.edu.cn

attitude and practice of medication usage included age, place of living, medical insurance status, education background and working status. **Conclusion** After the outbreak of the COVID-19, the knowledge, attitude and practice of medication usage of residents in Hunan province are generally good. However, the risk of unsafe medicine usage behavior has increased after the epidemic. In the post-epidemic era, we should use a variety of platforms and means to carry out medication safety education, especially focusing on the elderly, people living in rural areas, residence with low educational level and the unemployed.

Key words: popular science propaganda; drug safety; rational drug usage; knowledge-attitude-practice; COVID-19

随着我国社会和经济的不断发展，人民生活水平、文化程度整体提高，医药信息广泛传播，公众自我药疗现象与日增多[1-2]。然而在自我药疗人群中大多数并非医药专业人员，不合理用药行为时有发生[3]。用药不合理，不仅达不到医疗保健目的，反而可能存在严重的安全隐患[4]，如造成患者病情加重、发生药害事件以及社会资源浪费等不良后果[5-6]。

2019 年底，一场突如其来的新型冠状病毒肺炎疫情（简称新冠疫情）迅速席卷全球。为有效打赢这场抗击疫情的狙击战，我国卫生健康委员会迅速制订各种有效政策，其中一条就是保持社交距离，提倡避免人员聚集。而广大百姓也因为对未知病毒的恐慌，尽量减少了去医院就诊的频次。与此同时，各级医院组织的现场医药科普宣教讲座和医务人员进社区义诊等活动大部分也因为疫情而取消。为了解疫情发生后湖南省居民用药知识、态度、行为情况以及影响因素，笔者对居民进行了一个大样本的知识 - 态度 - 行为调查（knowledge-attitude-practice，KAP），这种调查方法是将人们行为分为获取知识、接受知识的态度及产生行为三个过程[7]。本研究利用 KAP 理论和问卷，于 2020 年 5—7 月对湖南省不同地区的常住居民用药情况进行在线调研，旨在探讨新冠疫情发生后湖南省居民用药 KAP 现状和影响因素，为后疫情时代制订更有效的合理用药科普宣教及居民安全用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 调查对象

本研究采用非概率抽样的方法[8]，于 2020 年 5—7 月对湖南省不同地区常驻居民发放线上问卷的方式进行调查，调查对象需年龄≥ 19 岁，且能独立完成问卷调查。本研究调查的对象包括不同性别、年龄、收入水平、居住地、医保种类、教育程度、工作状况、职业的人群。

1.2 调查方法

1.2.1 调查内容 调查问卷采用中国药学会科技开发中心设计的《中国居民用药行为风险 KAP 调查问卷》，具有良好的信效度[9]。本次问卷调查一共包括 71 题，覆盖 4 个方面的内容，包括居民基本信息（8 题）、用药知识的了解情况（28 题）、接触用药教育态度（11 题）和用药安全行为（24 题）。每个问题根据用药风险程度设置 6 个选项。

1.2.2 问卷结果的评价标准 根据答题选项，用数字量化每题涉及的用药风险。针对用药知识了解情况的问题，得分 28 ～ 56 分为优秀，57 ～ 84 分为良好，85 ～ 112 分为及格，≥ 113 分为不及格。针对用药态度的问题，得分 11 ～ 22 分为优秀，23 ～ 33 分为良好，34 ～ 44 分为及格，≥ 45 分为不及格。针对用药行为的问题，得分 24 ～ 48 分为优秀，49 ～ 72 分为良好，73 ～ 96 分为及格，≥ 97 分为不及格。分值越高表明不安全用药知识、态度和行为发生频率越高，提示用药风险越大。

1.2.3 问卷调查的质量控制 同一 IP 地址只能提交一份问卷，以避免同一受访者重复提交。在“问卷设计”中“质量控制”项下设定“填写所花时间小于 1 min”的答卷标记为无效问卷。针对回收的问卷，调查员筛选过滤回答问题矛盾的问卷，避免提交无效问卷。

1.3 统计方法

通过线上问卷系统，导出 EXCEL 汇总数据，采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。采用 n 和 % 描述定性资料，采用（$\bar{x} \pm s$）描述定量资料。以独立样本 t 检验、单因素方差分析和多元线性回归分析考察各变量对居民用药知识 - 态度 - 行为的影响。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 调查对象一般情况

本次调查对象为 19 岁以上湖南省内不同地

区常住居民，其社会人口学特征的频数和百分比见表 1。调查对象 34.0% 为男性，以城镇居民较多（占 74.2%），医疗保障方式以社会基本医疗保险（79.8%）为主，受访者大都具有大专及以上学历（71.7%），涉及职业较广。本次被调查者的社会人口学特征与 2018 年在湖南省开展 KAP 调查对象无明显差异 [10]。

2.2 居民用药风险 KAP 得分情况

在用药知识方面，受访者对问卷中所涉及药品合理使用知识的问题，答题正确率为 79.07%，居民用药知识平均得分为（59.32±20.22）分，整体评分为良好。不同性别、年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、工作状况、职业的受访者之间的得分差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。在用药态度方面，居民用药态度平均得分为（33.09±8.80）分，整体评分为“良好”，不同医疗保障状况、职业的受访者的差异有统计学意义（$P < 0.05$）。在用药行为方面，居民用药行为平均得分为（56.95±10.52）分，整体评分为良好，不同受教育程度的受访者差异有统计学意义（$P < 0.05$）（见表 1）。

表 1　被调查对象一般人口社会学特征及用药风险 KAP 得分情况

Tab 1　General demographic sociological characteristics and KAP score of drug use risk of the investigated subjects

因素	分组	例数 /*n*	构成比 /%	知识		态度		行为	
				得分	*P*	得分	*P*	得分	*P*
性别	男	514	34.0	61.37±20.58	0.005	32.70±8.26	0.215	57.00±10.48	0.904
	女	998	66.0	58.26±19.96		33.29±9.06		56.93±10.55	
年龄 / 岁	19 ～ 34	456	30.2	54.54±18.59	＜ 0.001	32.90±8.50	0.818	56.91±10.64	0.877
	35 ～ 49	762	50.4	59.39±19.54		33.05±8.66		57.07±10.76	
	50 ～ 64	260	17.2	65.95±22.14		33.44±9.39		56.57±9.89	
	≥ 65	34	2.2	71.00±22.28		33.88±11.26		57.85±8.31	
人均月收入 / 元	＜ 1000	96	6.3	69.45±25.78	＜ 0.001	34.35±11.40	0.096	58.69±16.84	0.129
	1000 ～ 2000	97	6.4	67.10±21.51		31.97±8.02		56.18±9.25	
	2001 ～ 4000	390	25.8	62.28±21.16		33.56±8.88		56.46±10.93	
	4001 ～ 6000	398	26.3	56.73±18.73		33.42±9.05		56.37±10.07	
	＞ 6000	531	35.1	55.82±17.83		32.47±8.08		57.58±9.17	
居住地	城镇居民	1122	74.2	57.19±18.36	＜ 0.001	33.03±8.81	0.642	57.20±10.09	0.130
	农村居民	390	25.8	65.42±23.80		33.27±8.77		56.26±11.65	
医疗保障情况	社会基本医疗保险	1206	79.8	58.46±19.34	＜ 0.001	32.69±8.36	0.004	56.70±9.54	0.183
	商业保险	46	3.0	62.59±23.52		33.46±11.79		59.46±18.81	
	自费医疗	62	4.1	70.81±24.19		33.76±10.00		57.21±10.06	
	公费医疗	160	10.6	56.56±17.59		35.04±9.37		57.44±10.65	
	其他	38	2.5	75.42±31.43		36.03±11.94		59.66±21.28	
受教育程度	研究生	86	5.7	51.74±14.09	＜ 0.001	32.31±7.78	0.516	58.92±8.32	0.001
	本科	598	39.6	53.70±17.08		32.75±8.51		57.32±9.98	
	大专	399	26.4	56.94±18.03		33.37±8.38		56.20±9.39	
	中专或高中	251	16.6	66.61±20.27		33.60±9.91		56.77±12.05	
	初中	160	10.6	76.08±23.40		32.99±9.02		55.74±11.30	
	小学	18	1.2	83.94±26.71		35.56±13.10		65.56±21.56	
工作状况	在职	1202	79.5	56.65±18.89	＜ 0.001	32.94±8.42	0.386	56.79±9.69	0.052
	离退休	122	8.1	69.24±19.18		34.01±10.69		56.00±10.34	
	无 / 失业	188	12.4	69.90±23.46		33.41±9.79		58.61±14.77	
职业	企业工人	141	9.3	66.29±20.33	0.002	32.62±9.58	＜ 0.001	56.38±13.79	0.751
	公司职员	244	16.1	58.62±17.16		31.70±8.20		57.28±8.66	
	机关干部	122	8.1	62.46±18.32		32.48±7.87		56.84±8.19	
	医疗机构	437	28.9	47.68±13.73		34.88±8.24		57.29±9.71	
	教师	88	5.8	61.27±20.26		31.78±8.62		54.93±9.16	
	企业经营管理	67	4.4	62.39±17.78		30.13±9.25		56.25±7.30	
	自由职业	219	14.5	69.77±22.90		32.51±8.59		57.30±12.76	
	学生	30	2.0	54.30±13.86		30.67±5.37		57.73±9.21	
	其他	164	10.8	67.68±22.76		34.35±10.66		56.91±12.09	

2.3 居民用药风险 KAP 影响因素分析

以性别、年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、接受教育程度、工作状况和职业为自变量，以知识得分、态度得分和行为得分为因变量，采用最小二乘（OLS）法进行多元线性回归，分析影响湖南省居民用药风险 KAP 的影响因素，结果见表 2。

影响本次 KAP 调查居民用药知识得分的因素包括年龄，居住地，医疗保障状况、受教育程度和工作状况。医疗保障状况显著影响居民用药态度得分。而影响居民用药行为得分的因素为工作状况。

表 2 影响居民用药风险 KAP 的多元线性回归统计结果

Tab 2 Multiple linear regression to analyze the influencing factors of KAP

因素	知识（K）		态度（A）		行为（P）	
	t	*P*	*t*	*P*	*t*	*P*
性别	－1.516	0.130	1.288	0.198	－0.297	0.767
年龄	4.353	＜0.001	0.521	0.603	－0.867	0.386
月收入	－0.714	0.475	－0.581	0.561	0.958	0.338
居住地	2.803	0.005	0.209	0.835	－1.428	0.153
医疗保障	2.757	0.006	3.771	＜0.001	1.739	0.082
教育程度	8.647	＜0.001	0.750	0.453	－0.791	0.429
工作状况	2.545	0.011	－0.148	0.882	2.780	0.006
职业	0.922	0.357	0.151	0.880	－0.423	0.672

3 讨论

受新冠疫情的影响，本次调查共发放有效问卷 1512 份，均为线上形式，受访者以女性居多，占 66%；青、中年为主，多为在职工作者；大部分人的受教育程度较高，具有大专及以上学历；城镇居民比例高于农村居民；收入大多处于中等及以上水平。本次调查对象的社会人口学资料跟 2018 年在湖南省部分地区进行的调查受试者类似[10]，可能与这些人群更关注自身健康、易获取网络信息、愿意参加线上调查有关。为了更好地覆盖不同年龄、文化层次、居住地和工作状态地人群，今后开展 KAP 调查问卷应采用线上和线下相结合的方式，并且应尽量多覆盖老年人、文化水平不高及农村居民，以增加对这部分人群用药知识、态度和行为的了解。

本研究发现年龄、居住地、医疗保障状况、受教育程度、工作状况均对用药知识有显著影响，与重庆市居民用药知识 KAP 调查分析结果一致[11]。可能是受访者的年龄越大，居住地越偏远，医疗保障状况越差，受教育的程度越低，或者无业的状况下，其安全用药知识获取途径不足，更易存在不合理用药隐患。

本研究结果还提示影响居民用药态度得分的因素为医疗保障状况，与既往在重庆市、山西省和昆明市等地居民用药行为风险 KAP 调查分析结果一致[11-13]。本次调查，拥有社会基本医疗保险的受访者平均态度得分最低，为（32.69±8.36）分，拥有其他医保人员态度得分最高，为（36.03±11.94）分，可能原因是拥有社会基本医疗保险的受访者通常接受过相对更高的文化教育，拥有较好的职业，获取安全用药知识途径更多。

本研究还发现工作状况是影响新冠疫情后湖南省居民用药行为得分的最主要因素，无 / 失业人群平均行为得分最高，为（58.61±14.77）分，与其他地区的调查结果相似[11-14]。提示今后在开展合理用药教育活动时，应重视对这类人群，进行有针对性的指导。

相较于 2018 年在湖南省开展的居民 KAP 调查，本次调查居民的平均用药知识和态度得分相差不大[10]，但是居民的平均用药行为得分 [（56.95±10.52）分 *vs*（53.24±10.93）分] 有所升高，提示疫情发生后人们的用药风险增加。造成这种现象的原因主要有两个：

一方面，虽然互联网医疗已在我国推行了较长时间，但真正大规模应用还是疫情发生后，疫情期间，大量民众通过互联网医疗模式，在线诊疗和在线购药等方式解决自身医疗需求。互联网医疗的快捷便利特性，以及各种丰富的医疗资源共享优势，为很多患者解决了不少医疗问题。然而，在互联网医疗过程中，不少患者存在自我药疗过度的现象，而且目前对互联网平台购买处方药等行为的监管仍有待加强，导致公众不安全用药行为风险有所增加。

另一方面，疫情发生后，因为社交隔离政策等疫情防控的需求，百姓接受医务人员面对面安全用药的讲座减少，患者去医疗机构就诊的频次

减少，还有少部分百姓盲目药疗以期提高免疫力，这些行为均会导致不安全用药风险增加。

目前全球疫情形势仍十分严峻，虽然我国的疫情已经控制很好，但是还有小幅的反弹。后疫情时代，防疫抗疫工作将常态化。如何保障公众安全用药行为是一个重要科学问题。医药工作者可组织临床经验丰富的药学人员就居民自我药疗进行线上答疑；开发合理用药相关小程序和公众号来提高居民的安全用药；邀请医学和药学专家开展线上直播讲座；制作安全用药科普公益视频；编写安全用药科普书与科普文章等。

本研究存在的局限性：受线上调查设计的限制，老年人、受教育程度较低、农村居民接受调查的比例低，而且这些人群的用药知识、态度和行为得分也更高，提示用药风险更大，今后开展KAP 调查时应线上与线下相结合，尽量多覆盖这类人群，以帮助制订更好的科普宣教方案，加强对用药高风险人群的教育。另外，由于问卷的问题较多，一些受访者没有足够的耐心完整填写问卷。有些问题有相近或相似的选项，受访者很难选择。有些问题需要专业背景，如对抗菌药物的理解不一致可能导致调查偏倚 [15]。

4　结论

本研究通过对新冠疫情发生后湖南省不同居民用药的 KAP 调查，发现本省居民用药的整体情况良好，但不安全用药行为风险较疫情前有所增加。年龄、居住地、医疗保障状况、受教育程度和工作状况等因素显著影响居民用药知识、态度和行为。针对后疫情的时代特点，医药工作者应充分利用 5G 网络和大数据技术，加强用药科普宣教，以期提高居民安全用药知识，规范用药行为，减少不合理用药带来的健康损害和资源浪费，尤其应重点关注低教育水平、老年人和农村居民的用药情况。

参考文献

[1] Bertoldi AD，Camargo AL，Silveira MP，et al. Self-medication among adolescents aged 18 years：The 1993 Pelotas（Brazil）birth cohort study [J]. J Adolesc Health，2014，55（2）：175-181.

[2] Lei X，Jiang H，Liu C，et al. Self-medication practice and associated factors among residents in Wuhan，China [J]. Int J Environ Res Public Health，2018，15（1）：68.

[3] 张蓉，鲜江锋 . 自我药疗中不合理用药现象分析 [J]. 求医问药（下半月），2012，10（12）：161.

[4] 刘丽华，何丹，张超，等 . 湖南省部分地区居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志，2019，17（1）：74-79.

[5] 潘雯，那军，礼彦侠，等 . 媒体医药信息对辽宁省居民自我诊疗行为影响 [J]. 中国公共卫生，2016，32（2）：175-178.

[6] 张佳颖，郭西芮，吴行伟，等 . 居民用药风险“知识 - 态度 - 行为”调查及影响因素研究 [J]. 中国药房，2018，29（11）：1445-1448.

[7] Shraim NY，Al Taha TA，Qawasmeh RF，et al. Knowledge，attitudes and practices of community pharmacists on generic medicines in Palestine：A cross-sectional study [J]. BMC Health Serv Res，2017，17（1）：847.

[8] 吴增基，吴鹏森，苏振芳 . 现代社会调查方法 [M]. 3 版 . 上海：上海人民出版社出版，2019.

[9] 范倩倩，李秋月，朱珠，等 . 从对北京居民用药安全知信行的探索性调查看公众用药误区 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（6）：368-371.

[10] 喻娅婷，刘丽华，张超，等 . 湖南省居民用药行为风险 KAP 调查与分析 [J]. 中南药学，2018，16（12）：1812-1816.

[11] 冉海龙，董育珠，杜倩，等 . 重庆市居民用药行为风险 KAP 的调查研究 [J]. 临床医学研究与实践，2021，6（14）：22-25，44.

[12] 谢雪虎，周洁，刘霞，等 . 山西省居民用药行为风险 KAP 调查分析及对策研究 [J]. 中国现代医药杂志，2020，22（11）：1-5.

[13] 张帆，宋沧桑 . 昆明市居民用药行为风险 KAP 调查 [J]. 药品评价，2018，15（8）：16-21.

[14] 李轶凡，盖迪，韩朝宏，等 . 北京居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志，2019，17（3）：59-63.

[15] Wu YX，Wang EH，Zhao XJ，et al. Knowledge，attitude，and practice of medication among Haikou residents [J]. Ann Palliat Med，2021，10（6）：6883-6891.

（收稿日期：2021-11-10；修回日期：2021-12-10）

临床药师在临床

基于加速康复外科关节置换术临床药学服务模式实践与探讨

余江丽[1, 2]，李平[2, 3]，吴韧[4]，刘萍[4]，鲁琼[2*]（1. 南昌市第三医院临床药学室，南昌 330009；2. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；3. 张家界市中医医院临床药学室，湖南 张家界 427000；4. 中南大学湘雅二医院骨科，长沙 410011）

摘要：目的 基于加速康复外科（ERAS）探索并创建针对关节置换术临床药学服务模式。**方法** 运用 ERAS 理念核心内容建立关节置换术患者抗感染、抗凝、镇痛标准化管理流程，开展药学门诊服务。**结果** 本院关节置换术后的感染率由 1.02% 下降到 0.51%；NRS 疼痛评分从最初的平均 6.85 分（THA）和 7.63 分（TKA）分别下降到 4.45 分和 4.32 分；关节置换术后无血栓事件发生。**结论** 新型药学服务模式的建立，降低了关节置换术患者感染发生率以及血栓事件，进一步缓解了患者的疼痛，提高了患者满意度。

关键词：加速康复外科；关节置换术；药学服务
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2680-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.038

Clinical pharmacy service model based on enhanced recovery after surgery joint arthroplasty

YU Jiang-li[1, 2], LI Ping[2, 3], WU Ren[4], LIU Ping[4], LU Qiong[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Nanchang Third Hospital*, *Nanchang* 330009; 2. *Department of Pharmacy*, *the Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011; 3. *Department of Pharmacy*, *Zhangjiajie Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Zhangjiajie Hunan* 427000; 4. *Department of Orthopedics*, *the Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To create a clinical pharmacy service model based on enhanced recovery after surgery (ERAS) for joint arthroplasty. **Methods** The core concept of ERAS was used to help establish a standardized management of anti-infection, anticoagulation, and analgesia for patients undergoing joint arthroplasty, and to offer pharmaceutical outpatient services. **Results** The infection rate dropped from 1.02% to 0.51%, the pain score dropped from the initial average 6.85 to 4.45 points (THA), and 7.63 to 4.32 points (TKA). There were no thrombotic events after joint arthroplasty. **Conclusion** The new pharmaceutical care model reduces the incidence of infections and thrombotic events in patients undergoing joint arthroplasty, relieves the pain of patients and improves patients satisfaction.

Key words: enhanced recovery after surgery; joint arthroplasty surgery; pharmaceutical care

关节置换术已成为治疗终末期关节疾病可靠、成功率高的治疗方式，其疗效已得到临床广泛认可。在 2017—2018 年间，加拿大共进行髋关节置换术（total hip arthroplasty，THA）约 6 万次和膝关节置换术（total knee arthroplasty，TKA）7 万次，费用超过 12 亿美元，手术量比前 5 年增加了约 17%，且还将持续增加[1]。预计到 2030 年澳大利亚 THA 和 TKA 数量将分别增加 208% 和 276%[2]，美国 TKA 的数量将增加 673%[3]。随着我国人口老龄化，关节置换术患者数量剧增。加速康复外科（ERAS）是采用系列循证医学证据，通过多学科协作，优化围术期临

作者信息：余江丽，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：yujiangli525@163.com ***通信作者：**鲁琼，女，副主任药师，副教授，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，E-mail：christy513@163.com

床路径，降低手术创伤的应激反应、减少术后并发症、提高手术安全性和患者满意度，达到加速康复目的[4]。为推进 ERAS 发展，进一步实现外科诊疗规范化，保障患者医疗安全，2019 年，国家卫生健康委员会发布了《关于开展加速康复外科试点工作的通知》文件，《中国髋、膝关节置换术加速康复——围术期管理策略专家共识》也指出，ERAS 应用于 THA/TKA 的核心在于提高手术操作技术和优化围术期管理，包括减少创伤和出血、优化疼痛与睡眠管理、预防感染、预防静脉血栓栓塞症（venous thromboembolism，VTE）等[4]。围术期疼痛、抗凝、抗感染管理，以及血压、血糖、营养管理等多方面涉及药物治疗[5-6]，药物治疗相关的用药问题多有发生，包括药物滥用、药物相互作用以及药物不良反应等。

本院作为首批 ERAS 骨科试点医院，为辅助医院更好地开展并优化此项工作，临床药师主动参与 ERAS 关节置换术患者管理，基于循证医学证据，在关节置换术中促进临床药物治疗的规范性，针对抗感染、抗凝、镇痛等相关用药建立患者专人档案、专属药师服务，并开展出院后药学门诊随访，探索创建关节置换术患者临床药学服务新模式。旨在降低术中、术后感染发生率，减少 VTE 等并发症，优化疼痛管理，提高疗效，进一步增加患者满意度，共同改善外科临床整体康复治疗水平。

1　建立关节置换术 ERAS 药学服务标准化操作流程

ERAS 团队中临床药师核心工作是基于循证医学证据，促进关节置换术患者临床药物治疗的规范性，其中合理地抗感染、抗凝、镇痛是关键，开展以合理用药为核心内容的药物治疗管理。结合本院实际情况，设立 ERAS 关节置换专人专岗药师，进行规范化培训后，着重在 ERAS 核心要素预防感染、预防 VTE、镇痛以及药学随访门诊等方面全方位优化药学服务操作流程，以优化关节置换术患者临床结局和就医感受，详见图 1。

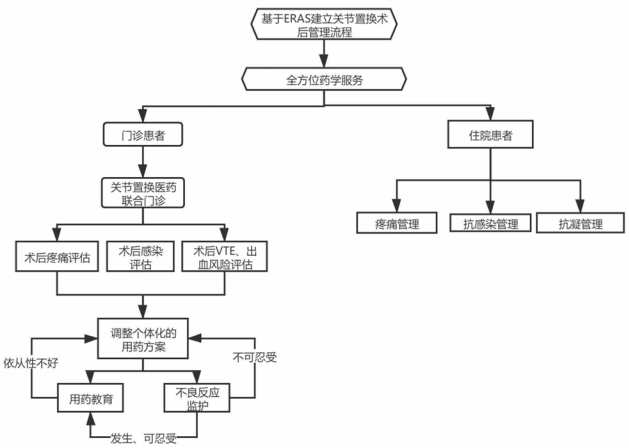


图 1　ERAS 标准化操作流程

Fig 1　ERAS standardized operation process

2　关节置换术 ERAS 中感染治疗管理

假体周围关节感染（PJI）及术后切口感染仍然是关节置换严重的并发症，这是全膝置换术后最常见失败原因之一[7]，也是引起人工关节旷置、涉及多次翻修手术的最主要原因[8]。Namba 等[9]对 56 216 例 THA 和 TKA 患者进行研究发现术后深部感染率为 0.72%，Chen 等[10]进行的 meta 分析显示，THA 和 TKA 患者术后浅表感染及深部感染发生率分别为 2.5% 和 0.9%。与没有假体周围感染的患者比，原发性 THA 后因 PJI 引起的翻修患病率增加了 2.6 倍，并呈上升趋势[11]。PJI 不仅使患者身心受创，医疗康复费用剧增，极大影响患者及家属日常生活，且增加潜在的医患矛盾，给社会带来巨大经济负担。临床药师通过建立 ERAS 抗感染治疗管理工作路径（见图 2），参与抗感染治疗管理具有重要意义。

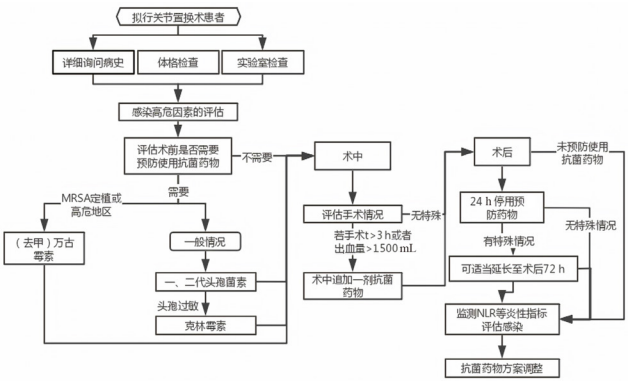


图 2　ERAS 抗感染治疗管理工作路径

Fig 2　Specific working path of ERAS in the management of anti-infection treatment

根据 2015 年抗菌药物临床应用指导原则，人工关节置换术为Ⅰ类切口手术，但因为有置入物，围术期可视情况预防使用一代或二代头孢菌素类抗菌药物[12]，但术后用药疗程不得超过 24 h。较多医师和患者都担心感染的发生率会增加，因此临床药师在术前开始监测患者各项指标并与医师一同进行手术前评估，医师严格执行术前和术中无菌操作。临床药师结合患者药物过敏史、既往用药史，关节 B 超、穿刺液涂片、培养结果以及实验室检查指标 [目前临床较为普遍、快捷判断骨关节感染的评价指标有白细胞计数（WBC）、中性粒细胞比值（N%）、C 反应蛋白（CRP）、红细胞沉降率（ESR）、降钙素原（PCT）等，但均无特异性；研究发现 CRP 联合中性粒细胞与淋

表 1　新型药学服务模式前后感染发生率

Tab 1　Incidence of infection before and after the new pharmacy service model

时间段	关节置换术	*n*	术后感染数 /*n*	感染发生率 /%
药师参与前	TKA	879	9	1.02
（2017.1 － 2019.2）	THA	592	6	
药师参与后	TKA	939	5	0.51
（2019.2 － 2020.12）	THA	626	3	

巴细胞比值（NLR）对关节置换术后感染有较高的预测价值，可作为术后早期感染的判断指标 [13] 等]，综合判断感染的严重程度，结合抗菌药物药代动力学特征，及时启动或调整抗菌药物方案，尽早控制感染，加速患者出院与术后康复。临床药师加入治疗团队后，通过规范操作流程，对感染指标进行监测并个体化给药，使本院关节置换术后的感染率由 1.02% 下降到 0.51%，见表 1。

3　关节置换术 ERAS 中疼痛治疗管理

外科手术通常伴随着术后疼痛，有研究将疼痛描述为“第五生命体征”，并强调改善疼痛的必要性 [14]。吴维强等 [15] 报道 THA 后会出现不同程度疼痛，其中，重度疼痛患者占 60%，中度疼痛患者占 30%。疼痛会导致多种不利事件，如住院时间延长和康复延迟，增加静脉血栓栓塞风险 [16]。因此，患者围手术期疼痛评估和处理对于避免关节置换术不利事件发生至关重要。目前常用的疼痛评分有数字评价量表（numerical ratings scale，NRS）、视觉模拟评分（visual analogue scale，VAS）、语言评价量表（verbalde description scale，VDS）以及面部疼痛表情量表（FPS-R）等 [17]。有效的围术期疼痛管理可以改善患者的生活质量和术后功能恢复。

临床药师参与临床治疗团队开展围术期疼痛管理，首先建立患者疼痛管理档案，运用 NRS 或 FPS-R 评估患者疼痛程度；通过询问病史及实验室检查结果评估患者心血管、消化系统及肾脏功能，根据评估结果选择合适的镇痛药物。镇痛方案需要遵循预防性镇痛、多模式镇痛和个体化镇痛三个方面的原则 [17]。预防性镇痛建议选择不影响血小板功能的药物；术中镇痛推荐使用“鸡尾酒”式镇痛药物进行局部浸润注射；术后镇痛建议根据疼痛程度阶梯性、个体化镇痛 [18]。同时监护患者用药的疗效与不良反应，及时调整治疗药物（见图 3）。新模式下 ERAS 理念对疼痛管理更加科学、系统，强调围术期个性化镇痛、多模式镇痛、超前镇痛等相结合。使患者在镇痛的同时，避免药物相关不良影响，做到精准给药，THA 患者 NRS 疼痛评分从最初的平均 6.85 分下降到 4.45 分，TKA 患者平均评分从 7.63 分下降到 4.32 分，见表 2，极大程度减少患者的痛苦，促进了加速康复。

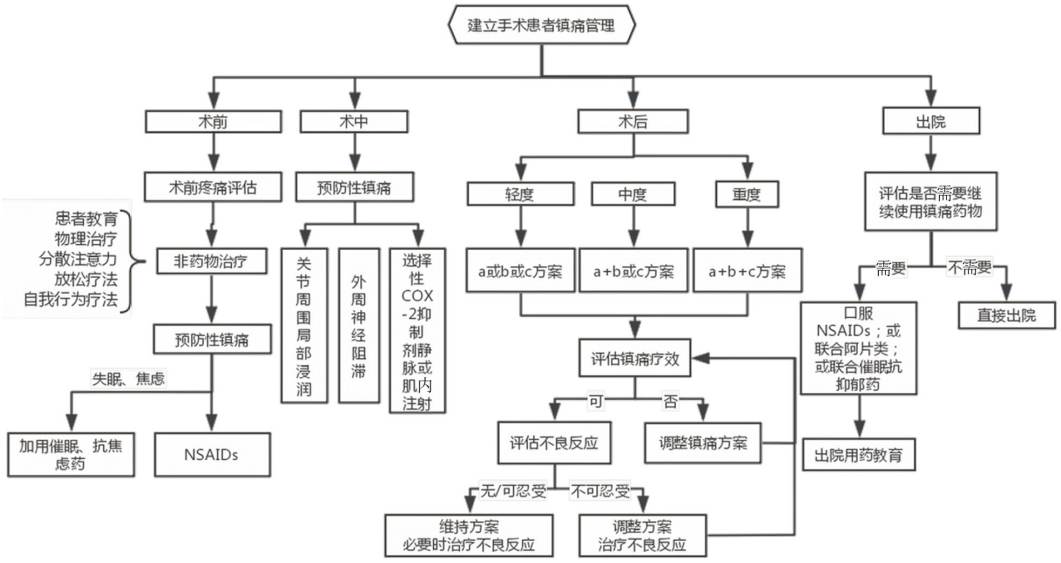


图 3　ERAS 镇痛治疗管理工作路径

Fig 3　Specific working path of ERAS in the management of analgesic treatment

注（Note）：a. PCIA 阿片类药物或 NSAIDs（PCIA opioids or NSAIDs）；b. 口服 NSAIDs 或阿片类药物（po NSAIDs or opioids）；c. 静脉注射 / 滴注或肌内注射阿片类药物或 NSAIDs（iv/ivgtt/im opioids or NSAIDs）。

4　关节置换术 ERAS 中抗凝治疗管理

VTE 是骨科大手术后常见的严重并发症，是导致围术期死亡及院内非预期死亡的重要因素之一 [19]。VTE 包括深静脉血栓（deep vein thrombosis，DVT）和肺动脉血栓栓塞症（pulmonary thromboembolism，PTE）。Januel 等 [20] 报道 THA/TKA 患者术后症状性 DVT 发生率为 0.63%（TKA）和 0.26%（THA），PTE 发生率为 0.27%（TKA）和 0.14%

表 2　新型药学服务模式前后疼痛管理疼痛评分

Tab 2　Pain score before and after the new pharmaceutical care model

时间段		参与评分人数（例）	平均评分	
			入院时	出院时
药师参与前	TKA	678	8.86±1.03	7.63±1.03*
（2017.1－2019.2）	THA	302	7.98±1.08	6.85±1.05*
药师参与后	TKA	785	8.73±1.98	4.32±1.42##
（2019.2－2020.12）	THA	419	7.75±1.30	4.45±1.01##

注（Note）：与入院时比较，*P ＜ 0.05；与药师参与前比较，##P ＜ 0.05（Compared with the time of admission，*P ＜ 0.05；compared with before the participation of the clinical pharmacist，##P ＜ 0.05）。

（THA）。在欧、美国家 DVT 发生率为 2.22% ～ 3.29%，PTE 发生率为 0.87% ～ 1.99%，在中国 DVT 发生率为 1.8% ～ 2.9%[19，21]。VTE 轻则引起下肢肿胀、疼痛、皮肤色素沉着、胸闷、呼吸困难等导致患者身体不适，重则延长住院时间，发生休克甚至死亡[22]。由于骨科大手术患者是 VTE 发生的极高危人群，对骨科大手术后进行常规有效的抗凝预防措施，可显著降低 DVT、PTE 发生率，并缩短住院时间，减少医疗费用[19]。

目前关节置换围术期血栓药物预防仍存在许多争议。对于如何规范抗凝药物的使用、识别 VTE 高风险患者、权衡抗凝与出血风险，临床药师建立 ERAS 抗凝治疗管理具体工作路径，见图 4。对接受骨科大手术患者进行静脉血栓预防，进行术前凝血功能以及 B 超检查，结合 Caprini 评分法进行 VTE 危险度评分情况选择预防措施。一般情况下，对术后 VTE 中危伴出血者，首选物理预防，待出血风险降低后再加用药物预防[19]，高、极高风险患者通常需采取抗凝药物治疗，各类抗凝药物具体使用方法见表 3。THA 及 TKA 后抗凝药物持续预防用药时间应根据《中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南》推荐预防用药时间最短为 10 d，可视情况延长至 11 ～ 35 d[22]。新药学服务模式抗凝管理以来，关节置换术后无一例血栓事件发生，保障了关节置换术预后的重要一程。

表 3　关节置换围术期抗凝药物使用方法

Tab 3　Perioperative use of anticoagulants for joint replacement

药物	用法用量	使用时机（术后）/h	使用时机（硬膜外腔导管拔出后）/h
低分子肝素	预防剂量，皮下注射	12	4（依诺肝素）
磺达肝癸钠	2.5 mg，皮下注射	6 ～ 24	4
阿哌沙班	2.5 mg bid po	12 ～ 24	5
利伐沙班	10 mg qd po	6 ～ 10	6

5　随访管理

随着关节置换术患者增多，需求门诊专业随访管理患者人数不断攀升，为满足广大患者服务需求，本院自 2019 年 8 月开设了“关节置换医药联合随访门诊”。截止 2020 年 12 月术后随访管理患者达 895 人，其中涉及感染管理占 67.4%，抗凝管理占 34.1%，镇痛管理占 24.8%；在患者就诊结束后发放满意度调查表，调查表包括患者的基本信息，对临床药师的服务态度、专业水平、解答是否详细、是否对本人有帮助以及意见或建议等。共收集到 524 份调查表，其中满意人数 312 份，非常满意 208 份，不满意 0 份，一般 4 份，回访患者满意度 99.2%。该联合门诊的开设，通过药师与门诊患者进行“0”距离交流，识别和干预患者药物相关问题，保障关节置换患者全程药师参与药物治疗管理，为患者用药安全以及快速康复保驾护航。

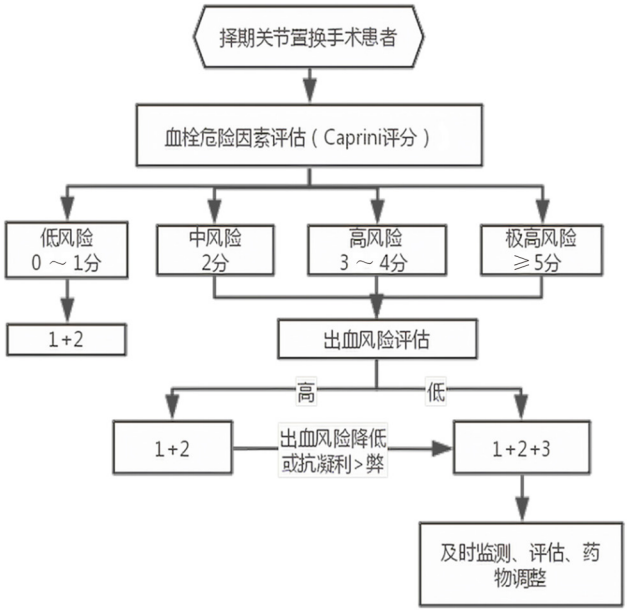


图 4　ERAS 抗凝治疗管理工作路径

Fig 4　Specific working path of ERAS in the management of anticoagulation

注（Note）：1. 基本预防：① 手术操作规范；② 正确使用止血带；③ 术后抬高患肢；④ 注重预防 VET 宣教；⑤ 适度补液。2. 物理预防：足底静脉泵、间歇充气加压装置及梯度压力弹力袜等。3. 药物预防：普通肝素，低分子肝素，Xa 因子抑制剂类，维生素 K 拮抗剂，抗血小板药物等（1. Basic prevention：① surgery operation specification；② use tourniquet correctly；③ elevate the affected limb after operation；④ pay attention to the prevention of VTE education；⑤ . moderate fluid rehydration. 2. Physical prevention：plantar vein pump，intermittent inflation and compression device and gradient pressure elastic stockings，etc. 3. Drug prevention：unfractionated heparin，low molecular weight heparin，factor Xa inhibitors，vitamin K antagonists，antiplatelet drugs，etc.）。

6　总结

现阶段，临床药学的评价标准尚无明文规

定，工作内容、实践模式和质量评价等都需进一步摸索[23]。国内外药学服务模式多样，但在外科手术 ERAS 中的药师服务模式却鲜少报道，本课题组临床药师响应国家最新政策指导，建立基于 ERAS 关节置换术药学服务模式，规范了抗感染、抗凝、镇痛的标准化流程，开设“关节置换医药联合随访门诊”。

新型药学服务模式相较于无临床药师参与的传统模式，其优势在于：① 制订个性化用药方案，减少了抗感染、抗凝、镇痛药物的滥用；② 加强用药教育，改善患者依从性；③ 精简药物品类，避免药物相互作用，多方面促进合理用药，极大降低关节置换手术风险、提高关节置换手术安全性和患者满意度。新型药学服务模式更高层次的意义在于积极促进了药师转型，开设以药物治疗管理（medication theraphy management，MTM）为核心的标准化药学门诊服务；形成了有药学人参与的 ERAS-MDT 团队，加强了专病专科建设，全面促进了以患者为中心的合理用药，让患者体验更加精准、专业、优质的药学服务。

参考文献

[1] Costello CA，Liu M，Furey A，et al. Association between epidemiological factors and nonresponders to total joint replacement surgery in primary osteoarthritis patients [J]. J Arthroplasty，2020，11（20）：1-9.

[2] Ackerman IN，Bohensky MA，Zomer E，et al. The projected burden of primary total knee and hip replacement for osteoarthritis in Australia to the year 2030 [J]. BMC Musculoskel Dis，2019，20（90）：1-10.

[3] Kurtz S，Ong K，Lau E，et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the united states from 2005 to 2030 [J]. J Bone Joint Surg Br，2007，89（4）：780-785.

[4] 周宗科，翁习生，曲铁兵，等 . 中国髋、膝关节置换术加速康复——围术期管理策略专家共识 [J]. 中华骨与关节外科杂志，2016，9（1）：1-9.

[5] McIsaac DI，Wong CA，Bryson GL，et al. Association of poly pharmacy with survival，complications，and healthcare resource use after elective noncardiac surgery [J]. Anesthesiology，2018，128（6）：1140-1150.

[6] 广东省药学会 . 加速康复外科围手术期药物治疗管理医药专家共识 [J]. 今日药学，2020，30（6）：361-371.

[7] Koh CK，Zeng I，Ravi S，et al. Periprosthetic joint infection is the main cause of failure for modern knee arthroplasty：An analysis of 11134 knees [J]. Clin Orthop，2017，475（9）：2194-2201.

[8] Vertullo CJ，de Steiger RN，Lewis PL，et al. The effect of prosthetic design and polyethylene type on the risk of revision for infection in total knee replacement [J]. J Bone Joint Surg Br，2018，100（23）：2033-2040.

[9] Namba RS，Inacio MCS，Paxton EW. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty [J]. J Bone Joint Surg Br，2013，95（9）：775-782.

[10] Chen J，Cui Y，Li X，et al. Risk factors for deep infection after total knee arthroplasty：A meta-analysis [J]. Arch Orthop Traum Su，2013，133（5）：675-687.

[11] Lenguerrand E，Whitehouse MR，Porter ADBS，et al. Revision for prosthetic joint infection following hip arthroplasty [J]. Bone Joint Res，2017，6（6）：391-398.

[12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 关于印发抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）的通知）[EB/OL].（2015-7-24）[2021.1. 20]. http：//www. nhc. gov. cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk. htm?id ＝ c18e1014de6c45ed9f6f9d592b43db42.

[13] 鲁琼，涂超，王洋波，等 . CRP 和 NLR 在骨关节置换术后早期感染中的预测价值 [J]. 医学临床研究，2019，36（1）：124-126.

[14] Tompkins DA，Hobelmann JG，Compton P. Providing chronic pain management in the “Fifth Vital Sign” Era：Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma [J]. Drug Alcohol Depend，2017，173（12）：S11-S21.

[15] 吴维强 . 多模式镇痛在膝关节置换中的应用效果观察 [J]. 青海医药杂志，2019，49（7）：4-6.

[16] Min BW，Kim Y，Cho HM，et al. Perioperative pain management in total hip arthroplasty：Korean hip society guidelines [J]. Hip Pelvis，2016，28（1）：15-23.

[17] 沈彬，翁习生，廖刃，等 . 中国髋、膝关节置换术加速康复——围术期疼痛与睡眠管理专家共识 [J]. 中华骨与关节外科杂志，2016，9（2）：91-97.

[18] 张启栋，曹光磊，何川，等 . 膝关节单髁置换术围手术期管理专家共识 [J]. 中华骨与关节外科杂志，2020，13（4）：265-271.

[19] 中华医学会骨科学分会 . 中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南 [J]. 中华骨科杂志，2016，36（2）：65-71.

[20] Januel JM，Chen G，Christiane R. Symptomatic in-hospital deepvein thrombosis and pulmonary embolism following hip and knee arthroplasty among patients receiving recommended prophylaxis [J]. JAMA Cardiol，2012，307（3）：294-303.

[21] Dixon J，Ahn E，Zhou L，et al. Venous thromboembolism rates in patients undergoing major hip and knee joint surgery at Waitemata District Health Board：A retrospective audit [J]. Inter Med J，2015，45（4）：416-422.

[22] 中华医学会麻醉学分会，围手术期深静脉血栓肺动脉血栓栓塞症诊断、预防与治疗专家共识 [M]. 北京：人民卫生出版社，2014：228-233.

[23] 王硕，林洁，谈维，等 . 我国药学人员资质管理的法律法规现状分析 [J]. 中国药事，2019，33（2）：158-165.

（收稿日期：2021-05-14；修回日期：2021-07-14）

基于治疗药物监测干预丙戊酸和利福平药物相互作用的案例分析

史群志，吴戈，刘芳群，鲁虹*（南华大学附属长沙中心医院药学部，长沙　410004）

摘要：目的　结合实际案例，对利福平与丙戊酸钠联用时的药物相互作用进行分析，为丙戊酸给药方案的优化提供参考。**方法**　通过丙戊酸治疗药物浓度监测（TDM），报道和分析两例案例，同时查阅相关文献进行讨论。**结果**　两例患者在丙戊酸钠和利福平联用时，增加丙戊酸钠日服药剂量后其血药浓度反而下降。文献研究指出利福平能加速丙戊酸的代谢，导致其血药浓度下降，其中病例 1 患者停用利福平改用利福喷丁后丙戊酸血药浓度上升。**结论**　利福平能降低丙戊酸血药浓度，因此临床上应避免丙戊酸钠和利福平联用，临床药师借助 TDM 成功干预了有临床意义的药物相互作用，TDM 是临床药师参与制订临床药物治疗方案的有效技术手段。

关键词：治疗药物监测；药物相互作用；丙戊酸钠；利福平

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2685-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.039

丙戊酸钠是临床常用的广谱抗癫痫药物，但其在临床上的治疗指数低，安全有效血药浓度范围较窄（50 ～ 100 μg • mL $^{-1}$），服药周期长，容易发生不良反应，并且丙戊酸钠血药浓度与药效的相关度明显大于剂量与药效的相关度，体内药动学存在明显的个体差异，血药浓度波动较大，剂量难以掌握[1]，故临床需对其进行治疗药物监测（TDM）。有研究显示丙戊酸经细胞色素 P450 2C19 酶代谢[2-3]，目前关注较多的主要是丙戊酸钠与碳青霉烯类的药物相互作用[4-6]，但丙戊酸钠和一线抗结核药利福平联用时是否存在药物相互作用，相关报道较少。本研究报道了两例肺结核合并癫痫患者，在长期使用抗癫痫药物丙戊酸钠治疗后同时开始使用含利福平的抗结核治疗，通过对其用药情况及血药浓度的分析讨论可以为丙戊酸钠和利福平联用时的药物调整提供经验和依据，保证临床用药的有效安全。

1　病例概况

病例 1：患者男，25 岁，72 kg，2021 年 3 月 14 日无明显诱因出现剑突下疼痛，为隐痛，与呼吸运动无关，无发作及缓解规律，静息状态下亦可发生。于外院就诊，胸片及肺部 CT 示“双肺纹理稍增多、增粗、紊乱，右上肺可见点片状模糊影，密度不均，夹杂斑点状钙化影”，考虑“右上肺继发型肺结核可能”。4 月 12 日为进一步明确肺部病变来本院就诊，门诊以“肺部病变查因”收入院。患者自幼有肢体阵发性颤动，以双手为甚。曾因反复出现“瞬时意识丧失、跌倒在地”等症被诊断为“癫痫”，规律服用丙戊酸钠缓释片 0.5 g qd，自诉症状控制良好。本次入院检查结果示：凝血常规、血常规、血沉、D- 二聚体、电解质、肝肾功能、心肌酶、大便常规、C 反应蛋白等均正常，肺部 CT 可见右上肺尖明显结节影，周围有斑片状渗出，故完善 PPD 皮试、T-SPOT. TB、痰 AFB 和痰快培等检查，并监测丙戊酸钠血药浓度。4 月 14 日检查结果回报，结核感染 T 细胞检测阳性（＋）；痰涂片找抗酸杆菌阴性，确诊为肺结核，抗结核方案予以利福平 0.6 g qd、乙胺丁醇 0.75 g qd、吡嗪酰胺 0.5 g tid 和异烟肼 0.3 g qd，注射用薄芝糖肽 4 mL qd 调节免疫；丙戊酸钠血药谷浓度监测结果回报 2.47 μg • mL $^{-1}$，患者确认每日规律服药，临床药师建议先增加丙戊酸用药剂量为 0.5 g q12 h，复查丙戊酸钠血药浓度，医师接受建议。4 月 21 日患者复查丙戊酸钠血药谷浓度，结果小于 0.5 μg • mL $^{-1}$，临床药师查阅资料，考虑患者丙戊酸钠血药浓度下降不排除与利福平的酶诱导效应有关，建议停用利福平，改用利福喷丁 0.6 g biw 抗结核治疗，医师接受建议，于 4 月 22 日改用利福喷丁抗结核。4 月 27 日患者再次复查丙戊酸

基金项目：长沙市 2019 年第二批重点研发、平台和人才科技计划项目（No.kq1907019）。

作者简介：史群志，男，硕士，主管药师，主要从事治疗药物监测研究，E-mail：shiqunzhi@qq.com　*通信作者：鲁虹，女，硕士，副主任药师，主要从事治疗药物监测和药物相互作用研究，E-mail：luhonghaha@sina.com

钠血药谷浓度，结果为 32.91 μg·mL^{-1}，考虑患者病情好转平稳，当日出院。两周后，患者门诊复查丙戊酸血药浓度结果为 71.26 μg·mL^{-1}，达到有效浓度范围。

病例 2：患者男，54 岁，47 kg，2021 年 1 月中旬无明显诱因出现咳嗽咳痰，咳嗽夜间较重，3 月开始出现盗汗，于外院就诊，肺部 CT 示：双肺纹理增多、紊乱，右肺门旁见不规则片状不均性高密度影，右肺上中野呈不均性密影，内见空洞，双肺内见多发大小不等结节状、片状密影，纵隔内见多发淋巴结增大，右侧胸膜不均性增厚。诊断：双肺多发病变，肺结核？占位？建议结核病专科进一步诊治。遂于 4 月 26 日来本院就诊，门诊以“肺部病变查因”收入院。既往史：患者 9 年前因外伤致颈椎骨折，手术治疗后开始出现癫痫，长期服用丙戊酸钠缓释片 0.5 g qod，自诉癫痫控制可，近 8 年未发作。本次入院诊断：肺结核？感染？继发性癫痫。入院后予以注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠 2.0 g q8 h 抗感染，羧甲司坦口服溶液 10 mL tid 化痰，维生素 B_1 穴位注射益肺，丙戊酸钠缓释片 0.5 g qod 控制癫痫。4 月 27 日血常规示血红蛋白 88 g·L^{-1}，中性粒细胞百分比 84%，凝血常规纤维蛋白原检测 5.1 g·L^{-1}，血沉 90 mm·h^{-1}，C 反应蛋白 113 mg·L^{-1}，其他结果均未见明显异常。4 月 28 日患者稍咳嗽、咳少量黄脓痰，较前减少，检查回报：结核抗体 IgG 阳性（＋），结核抗体 IgM 阴性，痰涂片找抗酸杆菌阳性（1＋，2＋），结核感染 T 细胞检测阳性（＋）；丙戊酸钠血药谷浓度结果为 28.37 μg·mL^{-1}。4 月 28 日予以利福平 0.45 g qd，乙胺丁醇 0.75 g qd，吡嗪酰胺 0.5 g tid 抗结核，同时予甘草酸二胺肠溶胶囊 150 mg tid、九味肝泰胶囊 1.4 g tid 护肝，结核丸辅助抗结核。患者自诉近期发作小抽搐一次，考虑症状控制欠佳，临床药师建议调整丙戊酸钠缓释片为 0.5 g qd，1 周后复查丙戊酸钠血药浓度。5 月 4 日患者稍咳嗽、咳黄绿脓痰，较前减少，神经内科会诊建议完善动态脑电图，同意临床药师建议，增加丙戊酸钠至 0.5 g qd。5 月 11 日患者复查丙戊酸钠血药浓度结果为 21.99 μg·mL^{-1}，临床药师考虑患者丙戊酸钠血药浓度下降不排除与利福平的酶诱导效应有关，建议停用利福平，改用利福喷丁 0.45 g biw 抗结核治疗，医师采纳。5 月 12 日患者病情好转予以出院。

2 主要治疗过程与药物监护

2.1 利福平与丙戊酸钠相互作用

两例患者在住院期间均进行了抗癫痫联合抗结核治疗。对抗癫痫药物丙戊酸钠血药浓度在增加给药剂量或频次后却下降的原因进行分析：吡嗪酰胺和乙胺丁醇经过肝脏代谢，对细胞色素 P450（CYP450）没有诱导和抑制作用，检索 PubMed、CNKI 和万方数据库，没有相关报道，故排除乙胺丁醇、吡嗪酰胺与丙戊酸钠的药物相互作用；注射用丙戊酸钠药品说明书中提到利福平可能降低丙戊酸盐的血药浓度，导致疗效降低，当与利福平联合使用时，有必要调整丙戊酸盐的给药剂量，因此考虑利福平所致丙戊酸钠血药浓度下降的可能性最大。

利福平是抗结核治疗的一线治疗药物，是 CYP450 氧化酶和 P-糖蛋白运输系统的强诱导剂[7]，对 CYP3A、CYP1A2、CYP2C 和 CYP2D6 均存在酶诱导作用[8]，导致其与很多药物存在明显的相互作用。利福平在人体内外能显著诱导 CYP2C19 的表达[9]。丙戊酸在体内主要经 CYP450 酶系代谢，代谢特点是剂量与稳态药物浓度之间呈非线性关系，且 CYP2C19 在人体内参与丙戊酸代谢，其基因多态性可影响丙戊酸血药浓度[2]。

本报道中，病例 1 患者入院第 2 日测定丙戊酸钠血药浓度，结果仅 2.47 μg·mL^{-1}，给药方案由 0.5 g qd 调整为 0.5 g q12 h，血药浓度结果降低至 0.5 μg·mL^{-1} 以下，停用利福平，改用利福喷丁抗结核治疗，丙戊酸钠给药方案仍为 0.5 g q12 h，5 d 后丙戊酸钠血药浓度升至 32.91 μg·mL^{-1}。病例 2 患者长期服用丙戊酸钠 0.5 g qod，入院第 2 日测定丙戊酸钠血药浓度结果为 28.37 μg·mL^{-1}，给药方案为 0.5 g qd 后血药浓度结果却下降了，为 21.99 μg·mL^{-1}，停用利福平，改用利福喷丁抗结核治疗，第 2 日患者因病情好转要求出院。

这两例患者的共同特点是在服用丙戊酸钠缓释片期间加用了抗结核药物利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇，目前暂未有研究指出吡嗪酰胺和乙胺丁醇存在酶诱导作用，而利福平是强的肝药酶诱导剂，能加速药物的代谢，使药物的血药浓度下降，疗效降低[7, 9-10]，且病例 1 患者在停用利福平，换用利福喷丁抗结核治疗，其他治疗方案未改变时，丙戊酸钠血药浓度上升，因此考虑利福平所致丙戊酸钠血药浓度下降可能性较大。

2.2 利福平与丙戊酸钠联合使用的报道

药师进一步查阅文献，发现国内尚无丙戊酸钠与利福平药物相互作用的报道，国外仅有少许报道。2014 年 Hanrath 报道[11]了一名 54 岁女性长期服用卡马西平、丙戊酸钠和氯硝西泮抗癫痫治疗，丙戊酸钠维持剂量为 2500 mg·d^{-1}时血药浓度为 82 μg·mL^{-1}，在使用利福平治疗 10 d 后复查丙戊酸血药浓度已低于 12 μg·mL^{-1}。2017 年 Delucia 等[12]报道了一名 58 岁的西班牙躁郁症患者，对丙戊酸耐受良好，由于未坚持治疗而住进精神科急诊病房，且考虑存有潜伏性肺结核感染，以利福平 0.3 g qd 抗结核治疗 3 个月，入院后予以氯氮平 10 mg 和丙戊酸 1500 mg 治疗精神症状，继续予以利福平抗结核治疗，治疗 3 d 后监测丙戊酸血药浓度，结果为 25.9 μg•mL^{-1}，临床增加丙戊酸用药剂量至 2000 mg·d^{-1}，躁狂症状仍持续存在，后加用氯硝西泮 0.5 mg bid，增加丙戊酸用药剂量至 2500 mg·d^{-1}以控制症状，后复查丙戊酸浓度为 32.6 μg·mL^{-1}，仍低于有效治疗浓度范围，临床怀疑是利福平加速了丙戊酸的代谢，停用利福平改用异烟肼 0.3 g qd 抗结核治疗，丙戊酸用药剂量仍为 2500 mg•d^{-1}，血药浓度上升至 66.4 μg·mL^{-1}，抗结核治疗方案由利福平调整为异烟肼后患者丙戊酸血药浓度上升了 104%，且患者情绪稳定。这两例报道都考虑丙戊酸血药浓度下降和利福平酶诱导作用可能性较大。

2.3 治疗矛盾下的替代方案

对于需要联合使用抗结核药物和丙戊酸钠治疗的患者，在肝药酶诱导剂利福平导致丙戊酸钠血药浓度不达标时可以考虑使用其他抗结核药物（如利福喷丁、利福布汀，多项研究指出利福喷丁、利福布汀的酶诱导作用弱于利福平，对 CYP450 酶诱导作用强度是利福平＞利福喷丁＞利福布汀[8, 13-14]），并通过丙戊酸治疗药物浓度监测来调整给药方案，达到治疗效果。

3 结论

丙戊酸是治疗癫痫发作和持续状态的常用药物，其在肝脏代谢；利福平是一线抗结核药物，是强效 CYP450 酶诱导剂，能加速丙戊酸的代谢，导致丙戊酸血药浓度明显下降而降低疗效，临床应避免两者联合使用。对于需要同时抗结核和抗癫痫治疗的患者，可选用利福喷丁或利福布汀代替，并在 TDM 下进行剂量调整。

参考文献

[1] 刘莎，金梅，傅川，等 . 丙戊酸钠血药浓度与抗癫痫疗效及影响因素分析 [J]. 重庆医学，2016，45（21）：3805-3807.

[2] 王育琴，齐晓涟，黄越，等 . 丙戊酸药物浓度与 CYP2C19 基因多态性关系的研究 [J]. 中国医院药学杂志，2003，23（11）：670-673.

[3] 于洁，邵宏，聂小燕，等 . CYP2C19 基因多态性对癫痫患者丙戊酸血药浓度的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2007，12（6）：700-704.

[4] 杜欣，李欣燚，谢晓慧，等 . 碳青酶烯类药物对丙戊酸血药浓度影响及两药联用后癫痫发作影响因素——文献 Meta 分析 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（4）：395-399.

[5] 傅启伟，符林瑜 . 碳青酶烯类药物联合丙戊酸钠治疗重症感染合并癫痫患者血药浓度及其肝肾损害 [J]. 中华医院感染学杂志，2020，30（20）：3080-3084.

[6] 万仁圣，刘晓琰 . 特殊人群中碳青霉烯类与丙戊酸钠的相互作用 [J]. 医药导报，2018，37（8）：1009-1011.

[7] Finch CK，Chrisman CR，Baciewicz AM，et al. Rifampin and rifabutin drug interactions：An update [J]. Arch Intern Med，2002，162（9）：985-992.

[8] Burman WJ，Gallicano K，Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials [J]. Clin Pharmacokinet，2001，40（5）：327-341.

[9] 孟慧杰，石伟龙，胡永芳 . 1 例利福平与华法林相互作用的案例报道及文献分析 [J]. 中国药学杂志，2015，50（6）：550-553.

[10] 林志强，傅新阳，陈婷婷，等 . 利福平影响伏立康唑血药浓度两例并文献复习 [J]. 中国感染与化疗杂志，2021，21（3）：292-296.

[11] Hanrath MA，Swart EL. Insulten door interative van anti-epileptica met rifampicine [J].Ned Tijdschr Geneeskd，2014，158：A7707.

[12] Delucia B，Mahon J. Serum valproic acid levels during initial conversion of antituberculoid therapy in bipolar mania：A case report and literature review [J].Psychosomatics，2017，58：446-449.

[13] Albert PL，Kelly RM，Asenath R，et al. Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure-activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics：Evaluation of rifampin，rifapentine and rifabutin [J]. Chem Biol Interact，1997，107（1-2）：17-30.

[14] Mary ET，Milap CN. Rifapentine：Its role in the treatment of tuberculosis [J]. Ann Pharmacother，1999，33（11）：1203-1210.

（收稿日期：2021-08-20；修回日期：2021-10-02）

围术期血小板减少患者的药学监护

丁英龙[1]，秦琼[2]，谢诚[2]，薛领[2]，周玲[2*]（1. 苏州大学附属第一医院心脏大血管外科，江苏 苏州 215006；2. 苏州大学附属第一医院药学部，江苏 苏州 215006）

摘要：目的 探讨临床药师如何监护围术期血小板减少患者。**方法** 临床药师从血小板的形成机制、高危诱发因素和药物使用等方面对血小板减少患者进行分析和讨论，并实施药学监护。**结果** 在围术期血小板减少患者的药学监护中，临床药师通过制订药学监护路径，实现对血小板减少的有效预防及纠正。**结论** 药师应深入了解血小板减少的形成机制、危险诱发因素及预防措施，结合患者具体情况，开展个体化的药学监护。

关键词：围术期；血小板减少；药学监护
中图分类号：R974，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2688-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.040

围术期出现血小板减少，可增加缺血和出血并发症的风险，心脏手术后患者血小板减少发病率较其他手术或内科疾病高。在引起围术期血小板减少的原因中，除免疫因素导致的血小板破坏外，还存在与治疗相关的药物因素、心肺转流（cardio pulmonary bypass，CPB）以及进行主动脉球囊反搏仪（intra-aortic balloon pump，IABP）置入等，围术期血小板减少的治疗也有其特殊性[1]。其中，肝素诱导的血小板减少症（heparin Induced thrombocytopenia，HIT）是在应用肝素类药物过程中出现的，由抗体介导的肝素不良反应，以血小板减少、伴或不伴血栓形成为主要临床表现[2-3]。因此，早期诊断术后 HIT、积极干预可减少并发症的发生。

近年来，随着低分子肝素（low molecular weight heparin，LMWH）在临床上广泛使用，HIT 伴血栓形成的病例也逐年增加，相关病死率高达 5% ～ 10%[4]。HIT 的实验室诊断是基于免疫测定法检测 HITab 的存在，并证明该抗体在功能测试中诱导血小板聚集。对于 HIT 伴血栓形成患者，一方面血小板计数较低，出血风险较高；另一方面处于高凝高血栓风险状态，需要积极抗凝，预防血栓形成，给临床带来极大诊疗困扰，也给药学监护工作增加了难度。市场上非肝素抗凝剂种类繁多且临床适用阶段不同，并无规范诊疗策略。现有研究已涉及新型口服抗凝剂（new oral anticoagulants，NOACs）、血浆置换及免疫抑制治疗，具体方法的选择需基于多学科的共同评估[5]。笔者通过在院内对 HIT 患者进行药学监护，探讨临床药师在 HIT 患者治疗中的监护要点，以进一步提高药物治疗的安全性和有效性。

1 HIT 患者的药学监护及实例

1.1 肿瘤患者围术期药学监护

因恶性肿瘤接受大手术的患者在住院期间给予肝素类药物预防性抗凝，是临床上公认的治疗方案，治疗肿瘤相关深静脉血栓多使用普通肝素（UFH）、LMWH 或磺达肝癸钠。LMWH 用于恶性肿瘤患者静脉血栓栓塞症（VTE）的初期治疗，疗程至少 6 个月[6]。临床上一旦确诊或高度疑似 HIT 应立即停用肝素并使用非肝素抗凝剂替代抗凝治疗，初始治疗阶段主要使用达肝癸钠替代抗凝治疗[5, 7]。因此，在对 HIT 伴血栓形成肿瘤患者进行药学监护的过程中，临床药师应关注肝素治疗的适度应用，监护 HIT 发生的同时，防止血栓形成的发生和加重。

监护实例 1：患者，女性，72 岁，身高 156 cm，体质量 49 kg，主因体检发现右上肺占位 3 个月余入院。入院后，在全麻下行胸腔镜下肺肿瘤切除术（右上），术中快速病理提示右上肺腺癌。术后第 3 日，血小板计数为 $172\times10^{9}\cdot L^{-1}$。术后第 4 日，患者如厕时突发晕倒。增强 CT 示：肺动脉栓塞；右侧胸腔积液。右肺动脉下支分别行尿激酶 0.9% 氯化钠注射液（尿激酶用量 10 万单位）灌注消融，血管通畅度较前明显

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803628）；苏州市科技计划民生科技项目（No.SYSD2019178，No.SYSD2020179）；江苏省药学会科研项目资助项目（No.Q2019056，No.H202023）；江苏省研究型医院学会精益化用药科研基金（No.JY202025）。
作者简介：丁英龙，男，博士，主治医师，主要从事心脏大血管外科临床工作，E-mail：401610848@qq.com *通信作者：周玲，女，主任药师，主要从事临床药学工作，E-mail：clsx5430@126.com

改善。患者因病情危重，出现少尿，尿量＜ 20 mL • h^{-1} ↓，查生化提示肝肾功能急性损伤。考虑肺循环障碍引发的急性心源性肝肾脏器损伤，患者病情危重，转至 ICU，行连续肾脏替代疗法（continuous renal replacement therapy，CRRT）。同时，予那屈肝素钙注射液 4100 AxaIU sc q12 h。术后第 5 日，患者血小板开始减少，血小板计数谷值为 34×10^9 • L^{-1} ↓。术后第 6 日，免疫全套检查结果提示，IgG 抗体检测阴性，排除 HIT Ⅱ型，考虑该患者为多种混杂因素情况下的血小板减少。患者 4Ts 评分 [5] 得 5 分，为中度 HIT 可能性。考虑本院药品可及性，药师建议行 CRRT 时停用肝素，使用枸橼酸钠体外抗凝；考虑患者重度肾功能不全，停用那屈肝素钙，更换为依诺肝素注射液 0.4 mL sc qd。术后第 14 日，患者血小板计数恢复正常为 112×10^9 • L^{-1}。

1.2　PCI 患者围术期药学监护

随着经皮冠状动脉介入术（percutaneous coronary intervention，PCI）的不断推广以及 IABP 的广泛应用，围术期给予肝素或低分子肝素以及抗栓治疗引发的 HIT 发生率逐渐增加 [8]。PCI 术可损伤血管内皮，导致斑块破裂并释放组织因子入血，激活凝血系统、凝血酶和血小板活化，易形成血栓，术后常需抗血小板治疗。由于 IABP 需较长时间在体内放置球囊及肝素化，易出现感染、出血、血小板减少、肢体缺血、栓塞等并发症。对重度血小板减少的患者应暂停抗血小板药物。但是，单纯早期停用肝素而不用其他药物替代治疗，其临床效果不佳 [9]。临床药师应密切关注其血小板的动态变化，并熟练掌握各种替代抗栓药物的适应证和抗栓治疗的时机。

监护实例 2：患者，男性，50 岁，因胸痛 1 d，加重 2 h 急诊入院。入院后行 PCI 术和 IABP 术，术前血小板计数 174×10^9 • L^{-1}，术后给予低分子肝素 5000 U sc q12 h 抗凝治疗及肝素注射液封管，同时予阿司匹林 100 mg po qd 和替格瑞洛 90 mg po bid 双联抗血小板治疗，血常规示血小板计数 22×10^9 • L^{-1} ↓。患者 4Ts 评分得 4 分，提示 HIT 中度可能，立即停用肝素类相关药物。术后第 1 日，复查血小板计数两次为 15×10^9 • L^{-1} ↓及 9×10^9 • L^{-1} ↓。术后第 2 日，复查血小板 17×10^9 • L^{-1} ↓，停止 IABP 术，停用阿司匹林和替格瑞洛。血栓弹力图示：凝血因子活性（R）4.6 min ↓，纤维蛋白原功能（K）3.2 min ↑，血小板聚集强度（MA）43.1 min ↓，DIC 组套：D 二聚体 1.21 μg•mL^{-1} ↑，提示患者凝血功能正常，期间无血栓和出血现象。术后第 4 日，阿司匹林和替格瑞洛继续使用。术后第 7 日，血小板恢复至 143×10^9 • L^{-1}，未再出现血小板减少。术后第 8 日，再次行 PCI 术处理其余狭窄血管。考虑肝素诱导患者血小板减少可能，药师建议改用比伐卢定 1.75 mg/（kg • h）术中抗凝，术后血小板计数正常，继续予阿司匹林 100 mg po qd 和替格瑞洛 90 mg po bid 抗血小板治疗。

监护实例 3：患者，男，60 岁，主因反复活动后胸闷 10 余年，加重 3 d 急诊入院。1 年前曾于外院行冠状动脉造影术（coronary artery angiography，CAG），术中示单支血管狭窄 50%，出院后未规律服药。既往否认有血液病史。入院 3 d 前外院查血常规未见明显异常，血小板计数 189×10^9 • L^{-1}。入院后诊断为急性心肌梗死（Killip Ⅰ级），急诊行 CAG ＋经皮冠状动脉腔内血管成形术（percutaneous transluminal coronary angioplasty，PTCA），术中予以肝素 6000 U 和替罗非班 10 mL qd 动脉注射＋60 mL qd ivgtt。术后 1 h 查血常规示血小板计数 1×10^9 • L^{-1} ↓，考虑药物导致血小板减少可能，同时予输注 1 单位血小板。替罗非班诱导的血小板减少发生率为 0.1% ～ 2%，一般于首次应用药物几小时后出现严重的血小板减少。替罗非班相关的血小板减少症均属于免疫性血小板减少性紫癜（immune thrombocyte penicpurpura，ITP），患者的临床症状不符合替罗非班导致的血小板减少。3 h 后复查血常规示血小板计数 30×10^9 • L^{-1} ↓，患者 4Ts 评分得 4 分，提示 HIT 中度可能，停用肝素相关药物。术后第 1 日，查血常规示血小板计数 36×10^9 • L^{-1} ↓，予阿司匹林 100 mg po qd 抗血小板治疗。术后第 2 日，查血常规示血小板计数 39×10^9 • L^{-1} ↓。术后第 3 日，查血常规示血小板计数 56×10^9 • L^{-1} ↓。术后第 4 日，予氯吡格雷 75 mg po qd 双联抗血小板治疗。术后第 6 日，行 CAG ＋ PCI，考虑肝素诱导患者血小板减少可能，药师建议术中予比伐卢定 1.75 mg/（kg • h）抗凝治疗，术后查血常规示血小板计数 183×10^9 • L^{-1}。第 2 次术后第 1 日，查血常规示血小板计数 247×10^9 • L^{-1}，第 2 日，查粪常规潜血阴性，病程中患者无明显出血表现。

2　讨论

2.1　HIT 伴血栓形成患者的药学监护要点

高龄、肿瘤、多个器官功能不全或衰竭、合并感染、抗菌药物使用，任何一种情况都可能导致血小板计数下降 [10]。因此，大多数 HIT 患者属

于多种混杂因素情况下的血小板减少[5]。患者临床转归，与及时制订有针对性的药学监护有关，包括抗凝方案制订、抗凝时机评估、肝肾功能衰竭后药物剂量以及用药安全几个方面。

监护要点：① 如果肝素治疗中发生血小板减少，应该考虑使用另一种不同类型的抗凝药物进行替代；② 如果没有可替代的药物，而又必须使用肝素，可以考虑使用低分子肝素；③ 如果选择低分子肝素，至少每日监测一次血小板计数，并尽早终止治疗，因为首发血小板减少症的患者在替代治疗后病情可以继续发展。

一项对比枸橼酸盐与肝素在连续性肾脏替代中的安全性和有效性 meta 分析[11-12]：全身或局部肝素抗凝的成本低，过量可用鱼精蛋白拮抗，但是 HIT 的风险增高。局部应用枸橼酸抗凝与全身或局部肝素抗凝相比，在延长滤器时长和降低出血风险方面有明显的优势。故枸橼酸更加适用于 HIT 患者 CRRT 抗凝剂替代物。未来应注重 CRRT 设备以及导管材质的开发，减少或避免治疗过程中使用抗凝药物。

2.2 HIT 伴抗血小板治疗患者的药学监护要点

在患者 PCI 术后抗血小板治疗时，临床药师应密切观察患者的血小板计数变化，及时采取相应治疗措施，谨防 HIT 的发生。HIT 诊断明确时，应停用肝素。阿司匹林和替格瑞洛引起的血小板减少多发生于服药两周内，且常伴随白细胞 / 中性粒细胞减少。2017 年 ESC《ST 段抬高型急性心肌梗死管理指南》推荐 HIT 拟行 PCI 患者首选比伐卢定抗凝[13]。PCI 术后疑似 HIT 患者，在阿加曲班或比伐卢定替代治疗的同时，短期内联合血小板 GPⅡb/Ⅲa 受体拮抗剂可增加抗凝效果，且安全性未受影响[14-15]。

监护要点：① 比伐卢定常用于急性期抗凝，长期使用易形成抗体，引发过敏反应及严重出血事件，需警惕药物相关不良反应的发生；② 熟悉导致血小板减少的药物种类，排除其他药物导致血小板减少。参照 2017 年中国《肝素诱导的血小板减少症专家共识》，对围术期 HIT 的药学监护要点进行总结，如表 1 所示。

表 1 围术期血小板减少患者的药学监护路径

时间点		治疗方案	监护要点
术前	诊断	诊断标准：HIT 在 4Ts 评分和血小板数量动态监测基础上，联合 HIT 抗体检测和 / 或血小板功能试验进行排除诊断和确诊 临床症状：伴血栓或出血	① 合并血栓：熟悉掌握 4Ts 评分量表使用，HIT 相关危险因素识别，尤其在诊断 HIT 后的 4 ～ 6 周都存在血栓形成风险；② 合并出血：出血较少见，常规不建议预防性输注血小板，但如果发生严重出血或需行手术，可考虑在停用肝素后输注血小板；③ 合并感染：既往有肝素诱导血小板减少史，尽量不选择可能致血小板减少的抗菌药物品种；④ 合并药物：排除其他药物导致血小板减少，导致血小板减少的药物包括血小板 GPⅡb/Ⅲa 受体抑制剂（GPI），氯吡格雷，抗菌药物（磺胺类药物、氨苄青霉素、哌拉西林、万古霉素等），含奎宁的药物或饮料，化疗药物（如吉西他滨）等
术中	监护	手术室间应备药品：肝素钠、鱼精蛋白、比伐卢定、抗菌药物（一、二代头孢或克林霉素）	① 肝素过量：过量时可用鱼精蛋白中和，鱼精蛋白不能完全中和肝素的抗 Xa 活性，需要同时予血小板计数监测；② 肝素致不良反应：对于静脉推注肝素 30 min 后发生急性全身反应（如发热、寒战）和循环、呼吸系统症状（如高血压、心动过速、呼吸困难、胸痛或心搏骤停）的患者，强烈提示急性 HIT 风险，应立即停用可疑药品，并予血小板计数监测
术后	抗栓治疗方案	替代治疗 推荐抗凝药物：达那肝素（证据等级 1B）、来匹卢定（证据等级 1C）、阿加曲班（证据等级 1C）、比伐卢丁（证据等级 2C）、磺达肝癸钠（证据等级 2C）[16] 抗血小板药物：不推荐既往有 HIT 病史患者选择替罗非班和氯吡格雷	① 抗凝药物选择：HIT 合并血栓形成，推荐非肝素抗凝；对于 PCI 术前发生急性 HIT 或亚急性 HIT 的患者，建议 PCI 术中使用比伐芦定或者阿加曲班；② 肝肾功能不全药物选择：发生 HIT 时，肝肾功能均异常的患者可使用比伐芦定，但应依据肝肾功能适当减量；③ 与其他抗凝药物转换：HIT 患者血小板计数恢复 $150\times10^9\cdot L^{-1}$，开始使用华法林抗凝 ① 可能导致血小板下降的抗血小板药物主要是替罗非班和氯吡格雷，需要结合临床症状加以鉴别诊断；② 替罗非班，一般于首次应用药物几小时后出现严重的血小板减少；③ 氯吡格雷导致血小板减少多发生在用药后的两周以内
其他			肾脏替代治疗：① 肾脏替代治疗（透析或者超滤）患者，如果透析前或在透析过程中发生急性 HIT，或亚急性 HIT 患者，均推荐应用阿加曲班作为替代抗凝药物；② 比伐芦定也可用于肾透析患者；③ 对于既往有 HIT 病史且需持续肾脏替代治疗或者留置导管的患者，推荐局部使用枸橼酸盐抗凝

3 结语

对于围术期患者，若并发血小板减少，将导致患者住院时间延长、死亡风险大大提高。早期准确诊断 HIT 并及时干预一定程度上有助于控制

疾病发展，最佳管理策略需多学科协作为患者制订个体化治疗方案。临床药师应关注患者血小板水平、感染指标、肝肾功能以及血栓进展情况，了解血小板的形成机制、危险诱发因素及预防措施，结合患者具体情况，参与制订合理的抗凝和抗血小板治疗方案，以达到对 HIT 的预防和有效治疗，为临床患者提供优质的药学服务。

参考文献

[1] 颜亚岚，陈伟新 . 心脏外科围术期肝素诱导血小板减少症的诊治进展 [J]. 中国心血管病研究，2019，17（4）：311-315.

[2] Cuker A，Arepally GM，Chong BH，et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism：Heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood Adv，2018，2（22）：3360-3392.

[3] Favaloro EJ，McCaughan G，Mohammed S，et al. HIT or miss? A comprehensive contemporary investigation of laboratory tests for heparin induced thrombocytopenia [J]. Pathology，2018，50（4）：426-436.

[4] Laura R，Emmanuelle S. GTH 2021 state of the art-cardiac surgery：The perioperative management of heparin-induced thrombocytopenia in cardiac surgery [J]. Hamostaseologie，2021，41（1）：59-62.

[5] 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会 . 肝素诱导的血小板减少症中国专家共识 [J]. 中华医学杂志，2018，6（6）：408-417.

[6] Lee A YY，Levine MN，Baker RI，et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer [J]. N Engl J Med，2003，349（2）：146-153.

[7] Al-Eidan FAS，Alrawkan S，Alshammary H，et al. Comparison of argatroban and fondaparinux for the management of patients with isolated heparin-induced thrombocytopenia [J]. Ann Hematol，2018，97（11）：2055-2059.

[8] Sheu JJ，Tsai TH，Lee FY，et al. Early extracorporeal membrane oxygenator-assisted primary percutaneous coronary intervention improved 30-day clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction complicated with profound cardiogenic shock [J]. Crit Care Med，2010，38（9）：1810-1817.

[9] Gremmel T，Frühwirth K，Kopp CW，et al. Frequency of heparin/platelet factor 4-dependent platelet antibodies in patients undergoing angioplasty and stenting for cardiovascular disease and their role for on-clopidogrel platelet reactivity [J]. Clin Res Cardiol，2012，101（6）：445-452.

[10] 屈强，屈健，刘理 . 临床药师参与 1 例多因素导致血小板减少诊治的药学实践 [J]. 中南药学，2019，17（6）：925-927.

[11] Bai M，Zhou M，He L，et al. Citrate versus heparin anticoagulation for continuous renal replacement therapy：an updated meta-analysis of RCTs [J]. Intensive Care Med，2015，41（12）：2098-2110.

[12] Liu C，Mao Z，Kang H，et al. Regional citrate versus heparin anticoagulation for continuous renal replacement therapy in critically ill patients：A meta-analysis with trial sequential analysis of randomized controlled trials [J]. Crit Care，2016，20（1）：144.

[13] Ibanez B，James S，Agewall S，et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation [J]. Kardiol Pol，2018，76（2）：229-313.

[14] 孔晓琳，刘冠男，高丽霓，等 . PCI 术后肝素诱导性血小板减少症研究进展 [J]. 临床急诊杂志，2020，165（3）：81-85.

[15] Foroughinia F，Farsad F，Gholami K，et al. Usefulness of danaparoid sodium in patients with heparin-induced thrombocytopenia after cardiac surgery [J]. J Res Pharm Pract，2015，4（2）：73-78.

[16] 范思佳，高会远，张永飞，等 . 冠状动脉粥样硬化 PCI 术后肝素诱导血小板减少症的诊治 [J]. 中国实验诊断学，2014，18（10）：1731-1733.

（收稿日期：2021-06-16；修回日期：2021-09-06）

临床药师参与妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁中毒的药学实践与思考

张俊杰[1, 2]，张韶辉[1]，郭珩[1]，杨彩华[2*]（1. 武汉市第一医院药学部，武汉 430022；2. 南方医科大学南方医院药学部，广州 510515）

摘要：妊娠合并肾功能不全患者使用硫酸镁中毒的风险很高，严重威胁到母婴的生命安全。使用硫酸镁时，合适的给药剂量以及全方位的药学监护，可以避免不良反应的发生。本文报道了临床药师在参与两例妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁蓄积中毒的解救过程中，利用其专业的临床药学实践，结合使用硫酸镁的循证证据，制订了硫酸镁在妊娠合并肾功能不全患者中个体化用药策略和标准化治疗监护流程，全方位保障硫酸镁在产科病区安全有效地使用，可明显提高妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁使用的安全性，保障了母儿用药安全。

关键词：临床药师；妊娠；肾功能不全；硫酸镁；中毒

中图分类号：R587，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2692-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.041

肾功能不全是指各种原因引起的肾脏功能严重障碍[1]，妊娠可引起原有肾脏损害加重，发生急性肾损伤甚至并发子痫前期等；严重肾功能不全又会造成胎儿生长受限、早产、死胎等，因此妊娠合并肾功能不全存在较高风险[2-3]。硫酸镁是产科常用药，多用于早产和妊娠期高血压疾病的预防与治疗[4-5]，其安全范围相对较窄，稍过量即可引起呼吸抑制、血压剧降、心搏骤停等，且镁离子易通过胎盘屏障到达胎儿体内，影响其骨骼发育[6]。因此妊娠期肾功能不全患者在使用硫酸镁时应明确药物剂量、给药途径及给药速度，并加强不良反应监护。本文介绍了临床药师参与两例妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁蓄积中毒的解救过程，并制订妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁安全用药标准流程，协助医护解决临床实际问题，保障围生期用药安全。

1 病例报告

病例 1：患者，女，32 岁，身高 155 cm，体质量 48 kg，BMI：19.98 kg·m^{-2}，BSA：1.47 m^2，P4G1，EDC：9.14。患者因“发现血压升高 2 年，停经 29^{+4} 周，双下肢水肿伴头晕 1 月，血压再次升高 1 周”入院。入院查体：T 36.8 ℃，P 59 次·min^{-1}，R 18 次·min^{-1}，BP 183/119 mmHg（1 mmHg = 133.3 Pa），胎心 148 次·min^{-1}，双下肢轻度水肿，膝腱反射存在。实验室检查：血肌酐（SCr）176 μmol·L^{-1}、尿蛋白（2 +）；Mg^{2+}浓度 0.96 mmol·L^{-1}，临床诊断为慢性高血压并子痫前期（重度）。入院后给予地塞米松促胎肺成熟，25% 硫酸镁注射液（杭州民生，10 mL/2.5 g，批号：1906171）20 mL 冲击治疗及 60 mL 持续静脉滴注两次，硝苯地平降压。入院第 2 日晚 20：00 患者全身发热，面部潮红，四肢乏力，查体示膝反射消失，评估当日尿量约 200 mL，P 85 次·min^{-1}、R 22 次·min^{-1}、BP 161/109 mmHg，胎监基线波动在 110 ～ 118 次·min^{-1}，变异消失。考虑镁离子中毒，暂停硫酸镁，查离子六项：Mg^{2+}浓度 5.05 mmol·L^{-1}，立即予 10% 葡萄糖酸钙缓慢静脉推注。请临床药师协助制订后续诊疗方案。

孕妇起始给予硫酸镁负荷剂量 5 g，计算其维持剂量约 2 g·h^{-1}，且患者 24 h 硫酸镁使用剂量约 28 g，超过 24 h 限定极量。用药 1 d 后患者出现镁离子中毒症状，Mg^{2+}浓度高达 5.05 mmol·L^{-1}，立即予 10% 葡萄糖酸钙缓慢静脉推注解毒，因抢救及时，孕妇中毒症状逐渐缓解，胎监基线上升至 125 次·min^{-1}，母儿脱离危险。临床药师建议，该孕妇 SCr 176 μmol·L^{-1}（肾功能不全），根据肾功能情况，可予标准负荷剂量硫酸镁，但不予维持剂量。且孕妇体质量偏低，血浆蛋白低，血浆镁 65% 游离，35% 与蛋白结

基金项目：中国药学会科技开发中心项目（No.CMEI2021KPYJ00303）。

作者简介：张俊杰，女，主管药师，主要从事妇产科临床药学工作，E-mail：whuzhangjunjie@163.com *通信作者：杨彩华，女，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：xiaoyang856@163.com

合，酌情减量，每 6 h 一次并密切监测血清镁浓度。医师接纳临床药师建议，暂不予硫酸镁维持治疗，积极控制原发疾病。入院第 4 日，患者因血压较高，疾病进展，急诊行剖宫产术，娩出一早产活婴，转入新生儿科。

病例 2：患者，女，28 岁，身高 147 cm，体质 量 58 kg，BMI：26.8 kg·m^{-2}，BSA：1.55 m^2，P1G0，EDC：9.9。因“确诊 IgA 肾病 2$^+$年，停经 28^{+5} 周，发现胎儿发育小于孕周 2$^+$月，肌酐增高 2 d，腹痛 1 d”入院。入院查体：T 36.7 ℃，P 71 次·min^{-1}，R 18 次·min^{-1}、BP 131/79 mmHg，无双下肢水肿。实验室检查：SCr 118 μmol·L^{-1}，尿蛋白（3 +）。临床诊断为肾病综合征合并妊娠，先兆早产。请临床药师协助制订妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁治疗的用药方案。

该孕妇 SCr 118 μmol·L^{-1}，临床药师建议给予硫酸镁负荷剂量 5 g，维持剂量 1 g·h^{-1}，每 1 ～ 2 h 行镁毒性临床评估，密切监测血清镁浓度，医师接纳药师建议。入院当日给予硫酸镁 20 mL 冲击治疗和 60 mL 以 1 g·h^{-1} 静脉滴注。入院第 2 日复查 SCr 125 μmol·L^{-1}，Mg^{2+} 浓度为 3.28 mmol·L^{-1}，膝反射存在。第 3 日复查 Mg^{2+} 浓度为 3.94 mmol·L^{-1}，膝反射存在。患者虽 Mg^{2+} 浓度＞ 3.50 mmol·L^{-1}，暂无临床中毒症状，临床药师建议停用硫酸镁，不予葡萄糖酸钙拮抗，因葡萄糖酸钙可能加重肾脏负担。临床医师采纳临床药师意见，当日复查 SCr 123 μmol·L^{-1}，肾功能损伤未进展。患者因难免早产，于入院第 3 日分娩一早产活婴，转入新生儿科，产后复查 Mg^{2+} 浓度为 3.40 mmol·L^{-1}，降至正常值范围。

2 分析讨论

2.1 妊娠合并肾功能不全患者使用硫酸镁的现状

硫酸镁是重度子痫前期预防子痫发作和治疗子痫的一线药物，也常规用于保护胎儿脑神经，临床常用剂量为负荷剂量 5 g，维持剂量 1 ～ 2 g·h^{-1}。对于肾功能不全的妊娠期妇女，硫酸镁并发不良反应甚至中毒风险明显升高，应调整剂量。有系统评价表明，硫酸镁维持剂量的输注速度超过 2 g·h^{-1} 可增加围产期死亡率 [7]。李文武 [8] 分析某省药品不良反应监测中心数据库 157 例硫酸镁注射液不良反应报告，发现 69.43% 不良反应为妊娠期患者在治疗先兆子痫、子痫和早产中发生。王利杰等 [9] 调查某三甲医院 1023 例慢性肾功能不全患者合理用药情况时发现用法用量不适宜所占比例最大，达 32.17%。

妊娠期女性随着胎龄增加，SCr 水平动态下降，妊娠合并肾功能不全患者的肾功能目前尚无统一可靠的评估工具。李静静等 [10] 回顾性分析发现妊娠期高血压疾病患者使用硫酸镁后血镁浓度水平波动较大，维持给药期间和给药结束后的血镁浓度达标率均较低。由于肾功能不全的妊娠患者硫酸镁安全有效用药剂量尚未标准规范化，因此其安全有效的临床应用流程需要临床药师通过查找循证证据协助临床制订，注意结合患者的肾功能损伤程度、硫酸镁代谢途径和药代动力学特点进行药物剂量调整。

2.2 硫酸镁的体内代谢及中毒处理

硫酸镁肌内注射或静脉注射后 80% 经肾脏排泄，排泄速度与血镁浓度和肾小球滤过率有关。如果患者肾功能受损，则硫酸镁蓄积，血液中镁离子浓度会快速升高，进而导致镁中毒 [11]。妊娠期镁离子的生理浓度为 0.75 mmol·L^{-1}，有效治疗浓度为 1.80 ～ 3.00 mmol·L^{-1}，超过 3.50 mmol·L^{-1}，可能出现中毒症状，当血清镁浓度为 3.50 ～ 5.00 mmol·L^{-1} 时，可出现膝腱反射消失；当浓度为 5.00 ～ 6.50 mmol·L^{-1} 时，可出现呼吸麻痹；当浓度大于 7.50 mmol·L^{-1} 时，可出现心脏传导变化；当浓度大于 12.50 mmol·L^{-1} 时，可发生心搏骤停，危害极大 [12]。且镁离子可自由透过胎盘，造成新生儿高镁血症，表现为肌张力低，吸吮力差，不活跃，哭声不响亮等，少数有呼吸抑制现象。在硫酸镁使用过程中，注意监护血镁浓度、肾功能、硫酸镁滴速等，应密切监护患者膝腱反射、呼吸、尿量、脉搏、胎儿胎心等，若出现中毒反应，予 10% 葡萄糖酸钙溶液 1 g 静脉推注，持续 2 ～ 5 min，行床边胎心监护，必要时行剖宫产。

2.3 妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁安全用药标准流程

国内目前尚无妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁安全用药标准流程。在协助医护诊疗团队成功解救硫酸镁中毒孕妇实践中，结合循证证据 [13-14]，我们制订了硫酸镁标准化治疗监护流程，全方位保障硫酸镁在产科病区安全有效地使用（见图 1）。

3 总结

临床药师通过参与妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁使用的临床实践，结合制订的标准治疗流

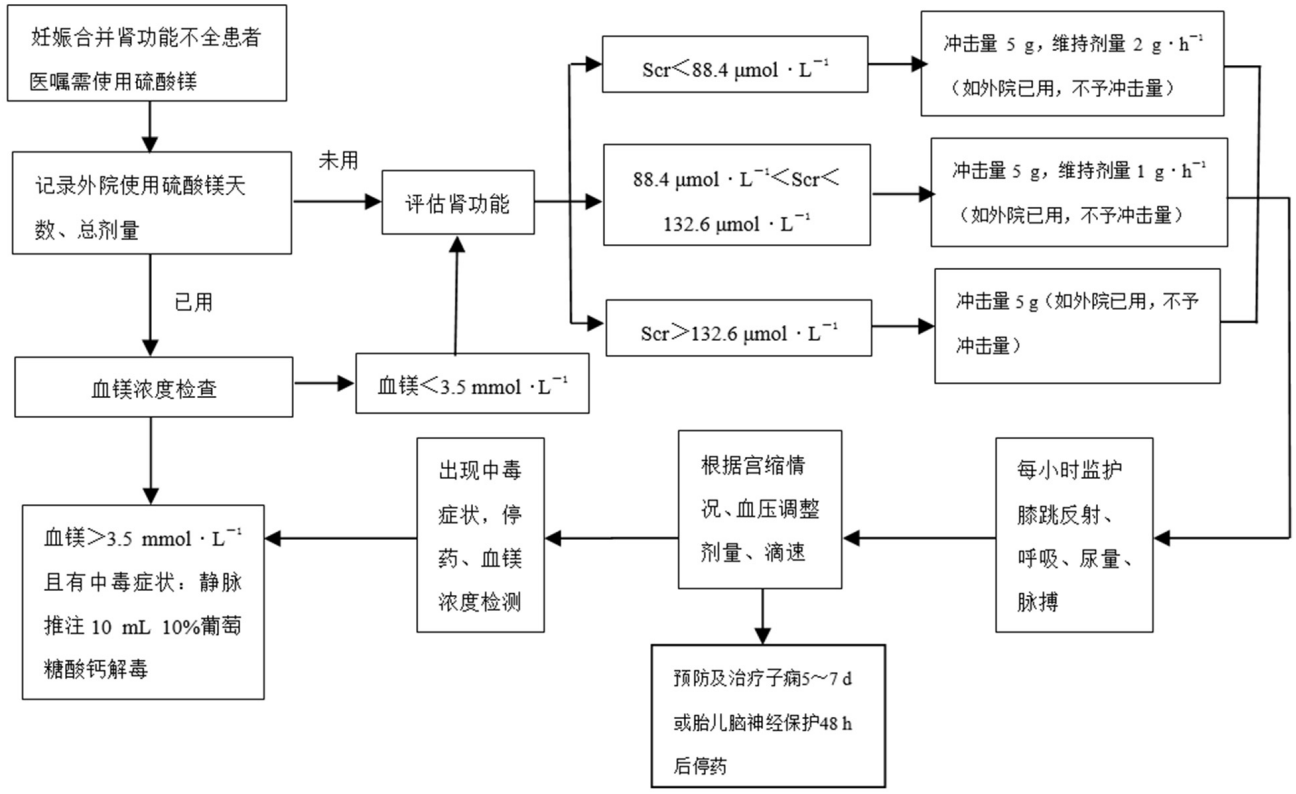


图 1 妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁安全用药标准流程

程，针对不同适应证、不同个体，根据患者临床症状、毒副反应及药物浓度情况制订个体化给药方案，提高临床使用硫酸镁的安全性，规避妊娠合并肾功能不全患者硫酸镁中毒危害的发生，改善了母儿预后。临床药师发挥专业优势，服务患者，从而保障孕产妇用药的安全性和有效性。

参考文献

[1] Krane NK，Hamrahian M. Pregnancy：Kidney diseases and hypertension [J]. Am J Kidney Dis，2007，49（2）：336-345.

[2] Wang F，Xing T，Wang N，et al. A clinical study of pregnancy-associated renal insufficiency [J]. Kidney Blood Press Res，2011，34（1）：34-40.

[3] 黄雯，妊娠对肾脏的影响及慢性肾脏病患者的妊娠问题 [J]. 中华肾病研究电子杂志，2018，7（6）：245-249.

[4] Yamasaki M. Magnesium and pregnancy [J]. Clin Calcium，2012，22（8）：1205-1210.

[5] Zhang J，Ma X，Hao L，et al. A systematic review and meta-analysis of outcomes of pregnancy in CKD and CKD outcomes in pregnancy [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2015，10（11）：1964-1978.

[6] Kathleen FB，Felice S，Mohammed HE，et al. Pharmacokinetics and placental transfer of magnesium sulfate in pregnant women [J]. Am J Obstet Gynecol，2016，214（6）：737 e1-739.

[7] Crowther CA，Brown J，Mckinlay CJ. Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour [J]. Cochrane Db Syst Rev，2014，15（8）：CD001060.

[8] 李文武 . 157 例硫酸镁注射剂不良反应 / 事件报告分析 [J]. 中国药物警戒，2013，10（12）：737-739，743.

[9] 王利杰，李继泉，亢卫华，等 . 我院慢性肾功能不全患者合理用药情况调查及典型案例分析 [J]. 中南药学，2019，17（1）：121-125.

[10] 李静静，张昌生，李德品 . 硫酸镁在妊娠期高血压疾病患者中的浓度监测及分析 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（6）：596-600.

[11] Okusanya BO，Oladapo OT，Long Q，et al，Clinical pharmacokinetic properties of magnesium sulphate in women with pre-eclampsia and eclampsia [J]. BJOG，2016，123（3）：356-366.

[12] Lu JF，Nightingale CH. Magnesium sulfate in eclampsia and pre-eclampsia：Pharmacokinetic principles [J]. Clin Pharmacokinet，2000，38（4）：305.

[13] Alexander JM，Mcintire DD，Leveno KJ，et al，Selective magnesium sulfate prophylaxis for the prevention of eclampsia in women with gestational hypertension [J]. Obstet Gynecol，2006，108（4）：826-832.

[14] American College of Obstetricians and Gynecologists. Gestational hypertension and preeclampsia [J]. Obstet Gynecol，2020，135：e237-260.

（收稿日期：2021-08-11；修回日期：2021-08-27）

药物与临床

如意金黄散联合抗菌药物治疗皮肤软组织感染的临床研究

邢竹兰，王敏（南京市高淳中医院，南京　211300）

摘要：目的　探讨如意金黄散联合抗菌药物治疗皮肤软组织感染的临床疗效。**方法**　选取某院外科病区 2021 年 2 月—2021 年 9 月收治的 60 例皮肤软组织感染患者，采用随机数字法分为对照组和治疗组各 30 例。对照组静脉滴注常规抗菌药物，治疗组在对照组基础上外敷如意金黄散。观察两组的临床疗效，比较两组 VAS 评分、中医证候评分、临床症状改善时间和感染性相关指标。**结果**　治疗组总有效率是 96.67%，高于对照组的 80.00%（$P < 0.05$）；治疗组 VAS 评分、中医证候评分比对照组显著降低（$P < 0.05$）；治疗组感染相关指标显著低于对照组（$P < 0.05$），治疗组各临床症状改善平均时间均明显短于对照组（$P < 0.05$）。两组患者白细胞计数（WBC）、中性粒细胞百分比（NE%）、C 反应蛋白（CRP）均较治疗前显著降低（$P < 0.05$）；且治疗后治疗组炎症指标显著低于对照组（$P < 0.05$）。**结论**　如意金黄散外敷患处联合常规抗菌药物治疗皮肤软组织感染具有较好的临床疗效，可以显著缩短患者临床症状缓解时间，降低感染性相关指标，提高治愈率，具有临床推广应用价值。

关键词：如意金黄散；抗菌药物；皮肤软组织感染；临床症状；感染
中图分类号：R978　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2695-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.042

Clinical efficacy of Ruyi Jinhuang powder combined with antibiotics for skin and soft tissue infection

XING Zhu-lan, WANG Min (*Nanjing Gaochun Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Nanjing* 211300)

Abstract: Objective　To determine the clinical efficacy of Ruyi Jinhuang powder combined with antibiotics for skin and soft tissue infection. **Methods**　Totally 60 patients with skin and soft tissue infection in the surgical ward from February to September in 2021 were selected and divided into a control group and a treatment group (30 in each group by randomization). The control group was intravenously injected with conventional antibiotics, while Ruyi Jinhuang powder was used besides conventional antibiotics in the treatment group. The clinical efficacy of the two groups was observed, and VAS score, TCM syndrome score, clinical symptom improvement time and infectivity related indexes were compared between the two groups. **Results**　The total effective rate of the treatment group was 96.67%, and that of the control group was 80.00% ($P < 0.05$). The VAS and TCM syndrome scores in treatment group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The infection-related indexes of the treatment group were lower than those of the control group ($P < 0.05$), and the clinical symptom relief time in the treatment group was shorter than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with before the treatment, the white blood cell count, neutrophil percentage and C-reactive protein in both groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The inflammatory index in the treatment group was significantly lower than than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion**　Ruyi Jinhuang powder combined with conventional antibiotics is effective for skin

作者简介：邢竹兰，女，副主任药师，主要从事临床药学研究，E-mail：1607859327@qq.com

and soft tissue infection, which can significantly shortens the clinical symptom relief time, reduces infection related indicators, and improves the cure rate.

Key words: Ruyi Jinhuang powder; antibacterial drug; skin and soft tissue infection; clinical symptom; infectivity

皮肤软组织感染为外科常见的感染性疾病。因组织损伤或细菌感染引起，主要包括疖、痈、脓肿、丹毒、急性淋巴管炎、蜂窝织炎等病种。临床表现有红、肿、热、痛和功能障碍，可伴有发热、血白细胞增高等临床症状。致病菌多为金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、大肠埃希菌等。感染严重时可以引起全身症状，使创口难愈、病程延长，预后较差的还会复发，给患者带来痛苦，同时也增加了经济负担。抗菌药物局部或全身应用为常规治疗方法，虽然能够有效缓解症状，但由于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）的出现，肠杆菌科对喹诺酮类药物的耐药也在增加，特别是合并铜绿假单胞菌的感染，给治疗带来难度。如意金黄散为中草药散剂，在临床上具有清热解毒、消肿止痛、改善皮温等功效，相关循证医学证据也表明了患处外敷清热解毒类中药能有效缓解肿胀、疼痛等症状[1]。本院充分发挥中医特色，探索改良传统配方制成的如意金黄散外敷联合抗菌药物治疗皮肤软组织感染，临床疗效显著，值得推广。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究对象为 2021 年 2 月—2021 年 9 月期间在南京市高淳中医院外科病区治疗的 60 例皮肤软组织感染患者，采用随机数字法将其分为对照组和治疗组各 30 例。对照组男性 17 例，女性 13 例；年龄 29 ～ 84 岁，平均年龄（62.87±14.34）岁；合并糖尿病 5 人、高血压 6 人。治疗组男性 18 例，女性 12 例；年龄 36 ～ 84 岁，平均年龄（63.36±12.57）岁，合并糖尿病 4 人、高血压 7 人。两组患者血糖、血压均控制在达标水平，两组上述资料比较差异无统计学意义，具有可比性。研究经伦理委员会批准（编号：KY-AP-202001）。

诊断标准：西医诊断符合《外科疾病诊断与疗效标准》中皮肤软组织感染的相关诊断[2]。中医诊断符合《中医外科病证诊断疗效标准》的相关诊断[3]。

纳入标准：① 符合皮肤软组织感染的诊断标准；② 经检查确诊为细菌性感染；③ 皮肤软组织感染分级诊断为 2 ～ 3 级者；④ 需要住院和非肠道给予抗菌药物治疗的患者；⑤ 患者同意参加本次研究。

排除标准：① 不符合皮肤软组织感染的诊断标准和纳入标准；② 排除毛囊炎、疖、压疮感染患者；③ 孕妇；④ 合并严重肝肾功能异常、严重心脑血管等疾病者；⑤ 合并免疫功能低下者或恶性肿瘤；⑥ 患者依从性差；⑦ 易发生过敏者。

1.2 研究方法

皮肤软组织感染的抗菌谱可受年龄、病程、抗菌药物暴露史等因素影响。根据《抗菌药物临床应用指导原则（2015）》《热病桑德福抗微生物治疗指南（48）》，临床结合患者病史、症状、体征、实验室指标、细菌培养及药敏试验，给予对照组有效的抗菌药物治疗，外科主任和从事抗菌药物合理应用管理的临床药师评估抗感染治疗方案，确保抗菌药物的疗效。同时对感染局部破溃处采用碘伏消毒、外科换药，每日一次。治疗组在抗菌药物治疗基础上给予如意金黄散外敷：用碘伏轻轻消毒皮肤后，将打成粉状的如意金黄散以醋调和成稠糊状涂于患处疼痛红肿处，厚度为 2 ～ 3 cm，再以纱布覆盖包扎，每隔 6 h 换药一次。对于破溃处伤口，以棉籽垫于破溃创口周围红肿处，破溃处避开敷药；对于淤血严重或其他原因导致皮肤变薄易破损部位，为避免刺激，以蜂蜜和水调拌后外敷患处，方法如上。

两组糖尿病患者均给予饮食控制、适当运动及口服降糖药物或胰岛素注射等方法将血糖控制在强化治疗达标水平：空腹血浆葡萄糖（FPG）水平＜ 7.0 mmol • L^{-1}，餐后 2 h 血浆葡萄糖水平＜ 9.0 mmol • L^{-1}。两组高血压患者均给予饮食控制、适当运动及口服降压药物将血压控制在达标水平＜ 140 mmHg/90 mmHg。

1.3 疗效评价标准[4]

临床治愈：皮损完全消退，无红肿、渗出，体温、白细胞计数和中性粒细胞百分比降至正常，细菌培养为阴性；显效：皮损消退为 60% ～ 90%，体温、血常规恢复正常，细菌培养为阴性；有效：皮损消退 30% ～ 59%，血常规和 / 或体温

有所恢复，但未达正常范围，细菌培养阳性或阴性交替；无效：皮损消退少于 30%，血常规和体温均不正常。总有效率（%）=（临床治愈＋显效＋有效）/ 总例数 ×100%。

根据中医证侯计分进行疗效评价。红肿明显缓解：治疗后红肿证侯评分减少≥ 60%；皮温明显下降：治疗后皮温评分降低≥ 60%；疼痛明显减轻：治疗后疼痛评分减少≥ 60%；创口开始愈合：观察到新鲜肉芽组织开始生长。

1.4　观察指标

① VAS 评分：采用 VAS 疼痛评分法对两组患者治疗前、后疼痛进行评价，0 ～ 10 分表示患者疼痛的不同程度，评分越高表示患者疼痛越重 [5]；② 中医证候计分：以《中药新药临床研究指导原则》为评价标准，对患者红肿、皮温升高、触痛、硬结等进行中医证候评分，根据证候严重程度分别评分为 0 ～ 3 分，分值越高，代表证候越重；③ 观察并记录两组患者红肿、皮温升高、疼痛明显改善以及创面开始愈合时间；④ 感染性相关指标：分别于治疗前后采集两组患者静脉血 2 mL，混匀后放入血常规一体机中检测白细胞计数（WBC）、中性粒细胞百分比（NE%）和 C- 反应蛋白（CRP）水平。

1.5　不良反应观察

观察两组患者治疗期间是否出现肿胀加重、皮疹等不良反应情况。

1.6　统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析和处理，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，治疗前后行配对 t 检验，两组之间用 t 检验；计数资料用百分率（%）表示，行 χ^2 检验。$P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　两组临床疗效比较

治疗后，对照组临床治愈 13 例，显效 7 例，有效 4 例，无效 6 例，治疗有效率为 80.00%；治疗组临床治愈 17 例，显效 9 例，有效 3 例，无效 1 例，总有效率为 96.67%；治疗组总有效率显著高于对照组（$P < 0.05$）。

2.2　两组 VAS 疼痛评分对比

治疗前，两组 VAS 评分比较差异无统计学意义。与治疗前比较，治疗后两组 VAS 评分明显下降，且治疗组降低较多（见表 1）。

表 1　两组 VAS 评分对比

Tab 1　VAS scores between the two groups

组别	治疗前	治疗后
对照组	6.35±0.61	4.27±0.59*
治疗组	6.41±0.63	2.01±0.26*#

注：与治疗前比较，*$P < 0.05$；与对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with before the treatment，*$P < 0.05$；compared with the control group，#$P < 0.05$.

2.3　两组中医证候评分对比

两组治疗前中医证候评分比较无差异；两组治疗后红肿、皮温升高、触痛等中医证候评分较治疗前明显下降，且治疗组降低较多，见表 2。

表 2　两组中医证候评分对比

Tab 2　TCM syndrome score between the two groups

组别	红肿		皮温升高		触痛		硬结	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	2.48±0.56	1.68±0.35*	2.54±0.57	1.74±0.36*	2.57±0.58	1.76±0.37*	2.29±0.39	1.72±0.38*
治疗组	2.70±0.53	0.68±0.16*#	2.80±0.54	0.57±0.18*#	2.81±0.55	0.57±0.17*#	2.30±0.39	0.98±0.26*#

注：与治疗前比较，*$P < 0.05$；与对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with before the treatment，*$P < 0.05$；compared with the control group，#$P < 0.05$.

2.4　两组症状改善时间比较

与对照组比较，治疗组红肿改善平均时间、皮温下降平均时间、疼痛减轻平均时间、创口开始愈合平均时间均明显缩短（$P < 0.05$），见表 3。

表 3　两组症状改善时间比较

Tab 3　Symptom improvement time between the two groups

组别	红肿明显缓解（$n = 60$）/d	皮温明显下降（$n = 60$）/d	疼痛明显减轻（$n = 60$）/d	创口开始愈合（$n = 32$）/d
对照组	5.27±3.26	8.13±0.93	7.13±0.97	12.31±0.75
治疗组	3.75±0.65#	2.53±0.53#	2.87±0.56#	6.0±0.88#

注：与对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，#$P < 0.05$.

2.5　两组感染性相关指标比较

治疗后，两组患者 WBC、NE%、CRP 均较治疗前显著降低；且治疗后治疗组相关的炎症指标均显著低于对照组，见表 4。

2.6　两组不良反应比较

两组患者在治疗过程中均未出现过敏性皮疹

表 4 两组感染性相关指标比较

Tab 4 Infectivity related indicators between the two group

组别	WBC/（$\times10^9 \cdot L^{-1}$）		NE（%）		CRP/（$mg \cdot dL^{-1}$）	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	13.91±1.81	8.55±1.20*	85.71±7.02	65.51±7.98*	54.53±9.29	21.15±5.06*
治疗组	14.02±1.90	7.15±0.91*#	87.84±7.21	56.84±6.50*#	54.65±9.35	10.27±3.46*#

注：与治疗前比较，*$P < 0.05$；与对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with before the treatment，*$P < 0.05$；compared with the control group，#$P < 0.05$.

等不良反应症状。

3 讨论

皮肤、软组织感染主要为病原菌所致的表皮、真皮或皮下组织的化脓性炎症。发病诱因包括生理、病理、外伤性皮肤屏障功能障碍或机体的免疫力降低等。西医以抗感染治疗为主，随着抗菌药物的大量使用，耐药菌株不断出现，抗感染治疗面临着细菌耐药而导致治疗失败的挑战。如果治疗不当，会造成深部组织坏死，严重可引起截肢，甚至危及生命。

本院在临床应用时将此方中生南星替换成制南星应用以降低生南星的毒性和致敏性，减少皮肤的刺激作用[6]。未破溃患者采用醋调外敷，敏感性皮肤采用蜂蜜和水调外敷或垫以棉籽外敷，可缓和刺激。且蜂蜜所含的成分为葡萄糖氧化酶，可促进伤口愈合[7]。诸药透皮吸收后可直达病灶而发挥药效，起到抑制细菌、减轻疼痛和促进创面愈合的功效。

本研究结果显示，联合中药外敷的治疗组总有效率显著高于对照组，炎症指标显著低于对照组，提示联合如意金黄散治疗皮肤软组织感染较单用抗菌药物疗效更佳。金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌是引起皮肤软组织感染最常见的病原菌，而在一些复杂的皮肤软组织感染中，大肠埃希菌、铜绿假单胞菌等也较为常见[8]。据 2021 年 1—6 月中国细菌耐药监测网（CHINET）显示，金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中甲氧西林耐药株（MRCNS）的检出率分别为 30.3% 和 80.7%，MRSA 和 MRCNS 对大环内酯类、喹诺酮类和氨基糖苷类等抗菌药物的耐药率均显著高于甲氧西林敏感株。革兰氏阴性杆菌对氨苄西林耐药较高，对于头孢他啶、头孢曲松等耐药也在增加[9]。细菌耐药的影响可因患者抗菌药物用药史、危险因素、病程长短等表现不同，导致感染严重程度不同，预后也不同。治疗不当可导致病变加重，出现严重的全身反应，成为临床中抗感染治疗的难题。如何增强皮肤软组织感染的抗感染疗效，又不会导致细菌耐药的增加，成为临床治疗的难题。现代药理研究已明确如意金黄散方中药物的抗菌作用，如黄柏、姜黄等能促进局部血液循环，激活巨噬细胞吞噬功能，从而抑制细菌的生长和繁殖[10]；大黄具有抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌作用，调节免疫功能[11]。马卓等[12]研究发现，如意金黄散在 1∶16 稀释时对金黄色葡萄球菌有抗菌作用；在 1∶32 稀释时对溶血性链球菌有抗菌作用；在 1∶4 稀释时对铜绿假单胞菌有抗菌作用。本次临床研究进一步证实了如意金黄散对于皮肤软组织感染的疗效，可以增强抗菌药物活性，提高临床治愈率，同时减少抗菌药物的过度使用和细菌耐药的产生。

两组治疗后 VAS 评分和中医证候评分明显降低，治疗组降低更显著，提示如意金黄散能够显著改善红肿、皮温升高、疼痛等症状。两组症状改善时间比较提示治疗组症状改善时间明显缩短，起效很快，特别在降低皮温、缓解疼痛方面明显快于对照组，本研究中治疗组破溃创口的患者症状改善时间，比对照组时间明显缩短，因为如意金黄散方中药物有清热解毒、消肿止痛的功效，其作用可能是通过有效调控炎症反应时的 TNF-α、IL-1、IL-8 等炎症因子的表达实现[13]。且敷药可直接作用于患处皮肤，皮下丰富的血管易于药物吸收。

综上所述，加用如意金黄散外敷治疗，显著增加临床治愈，可使热、痛锐减，临床使用中患者对敷药后症状的改善非常满意。特别是在一些严重的、复杂的或伴有创面破溃的皮肤软组织感染中使用，可以明显增强抗感染药物的疗效，加快创口愈合，且使用方便，患者依从性好。经本院改良后的处方和用药方法，患者在使用中均未发生不良反应，值得临床推广。

参考文献

[1] 孙丹，赵一丁，胡梦雨，等 . 如意金黄散在皮肤科的应用 [J]. 临床医学研究与实践，2020，5（17）：194-196.

[2] 李荣，王子明 . 外科疾病诊断与疗效标准 [M]. 上海：上海中医药大学出版社，2006：411-145.

[3] 国家中医药管理局科教司 . 中医外科病证诊断疗效标准 [M]. 北京：中国标准出版社，1997：20.

[4] 郑筱萸 . 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2002：81.
[5] 付永亮 . 清痹汤治疗膝骨关节炎的 VAS 评分 WOMAC 骨关节炎指数的变化 [J]. 内蒙古中医药，2017，7（13）：35-36.
[6] 林坤河，韦建华，邓超澄，等 . 炮制对天南星化学成分及药理作用的影响研究概况 [J]. 广西中医药，2018，41（4）：73-75.
[7] 文娇 . 六合丹外敷治疗产科静脉留置针所致静脉炎 [J]. 中医学报，2018，33（12）：2319-2322.
[8] 邢桂生 . 皮肤软组织感染病原菌分布及耐药分析 [J]. 中国消毒学杂志，2018，35（7）：53-56.
[9] Shukla SK，Gebregiworgis T，Purohit V，et al. Metabolic repro-gramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia [J]. Cancer Metab，2014（2）：18.
[10] 张斯琪，曾臣红，陈冲，等 . 如意金黄散的现代研究进展 [J]. 中成药，2018，40（2）：411-415.
[11] 周聪和，谭新华，李彪 . 金黄散外用抗感染实验研究 [J]. 辽宁中医杂志，1989（12）：35-36.
[12] 马卓，刘小平，何福艳，等 . 甲氧苄啶配用如意金黄散的抗菌实验研究 [J]. 湖北中医杂志，2001，3（3）：5-6.
[13] 张远哲，朱晓燕，黎豫川 . 如意金黄散对阳症疮疡大鼠疗效及 INF-γ 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（3）：1280-1282.

（收稿日期：2021-10-05；修回日期：2021-11-03）

重症患者应用万古霉素联合不同 β- 内酰胺类抗菌药物治疗的急性肾损伤风险比较

续茜桥，杨春静，时正媛*（首都医科大学附属北京世纪坛医院药学部，北京　100038）

摘要：目的　探究重症患者应用万古霉素联合哌拉西林他唑巴坦（VPT）与万古霉素联合美罗培南（VM）、万古霉素联合氨曲南（VA）、万古霉素联合头孢哌酮舒巴坦（VCS）之间急性肾损伤（AKI）发生率及临床预后的差异。**方法**　回顾性研究 2017 年 9 月至 2020 年 4 月接受 VPT、VM、VA、VCS 联合治疗至少 48 h 的重症患者病例，按联合使用的 β- 内酰胺类抗菌药物进行分组，收集各组临床资料，比较 AKI 发生率和临床预后。应用多因素 Logistic 回归对 AKI 发生的危险因素进行分析。**结果**　共纳入 133 例病例，其中 VPT 组 32 例、VM 组 64 例、VA ＋ VCS 组 37 例。AKI 总发生率为 22.56%。VPT 组、VM 组、VA ＋ VCS 组间 AKI 发生率差异有统计学意义（40.63% *vs* 17.19% *vs* 16.22%，$P < 0.05$）。三组间肾脏替代治疗率、院内病死率差异无统计学意义（$P > 0.05$）。多因素 Logistic 回归分析发现，应用 VPT（$OR = 3.324$，95%*CI*：1.266 ～ 8.733，$P = 0.015$）、万古霉素谷浓度增加（$OR = 1.066$，95%*CI*：1.018 ～ 1.116，$P = 0.006$）和急性生理与慢性健康评估Ⅱ（APACHE-Ⅱ）评分升高（$OR = 1.110$，95%*CI*：1.027 ～ 1.200，$P = 0.009$），是重症患者发生 AKI 的独立危险因素。**结论**　重症患者应用万古霉素联合 VPT 治疗出现 AKI 风险高于联合 VM、VA 与 VCS，需要谨慎用药。

关键词：急性肾损伤；万古霉素；哌拉西林他唑巴坦；美罗培南；氨曲南；头孢哌酮舒巴坦；β- 内酰胺
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)12-2699-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.043

Acute kidney injury risks in critically ill patients receiving vancomycin and concomitant beta-lactam antibiotics

XU Xi-qiao, YANG Chun-jing, SHI Zheng-yuan* (*Department of Pharmacy*, *Beijing Shijitan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100038)

Abstract: Objective　To determine the difference in the incidences of acute kidney injury (AKI) and clinical outcomes in critically ill patients receiving vancomycin and concomitant piperacillin-

作者简介：续茜桥，女，药师，主要从事治疗药物监测研究，E-mail：xuxiqiao@bjsjth.cn　*通信作者：时正媛，女，副主任药师，主要从事体内药物分析研究，E-mail：shizhengyuan@bjsjth.cn

tazobactam (VPT), meropenem (VM), aztreonam (VA), or cefoperazone-sulbactam (VCS). **Methods** A retrospective study was conducted on critically ill patients who received at least 48 h of combination therapy with VPT, VM, VA or VCS from September, 2017 to April, 2020. The patients were grouped by beta-lactam antibiotics administered concomitantly. The clinical data of all patients were obtained to compare the incidences of AKI and clinical outcomes in different groups. Multivariate Logistic regression was used to evaluate the independent risk factors associated with AKI. **Results** Totally 133 critically ill patients were included in the study: 32 patients in the VPT group, 64 in the VM group, and 37 in the VA ＋ VCS group. AKI occurred in 30 out of the 133 patients (22.56%). There was a significant difference in the incidence of AKI in the VPT group, VM group and VA ＋ VCS group (40.63% *vs* 17.19% *vs* 16.22%, $P < 0.05$). No significant difference was found in the proportion of renal replacement therapy and hospital mortality ($P > 0.05$). In the multivariate Logistic regression, the use of VPT ($OR = 3.324$, 95%*CI*: 1.266 － 8.733, $P = 0.015$), vancomycin trough levels increased ($OR = 1.066$, 95%*CI*: 1.018 － 1.116, $P = 0.006$), and APACHE-Ⅱ score ($OR = 1.110$, 95%*CI*: 1.027 － 1.200, $P = 0.009$) were the 3 independent risk factors of AKI. **Conclusion** Critically ill patients treated with VPT have higher risk of AKI as compared with VM, VA or VCS, which should be used with caution.

Key words: acute kidney injury; vancomycin; piperacillin-tazobactam; meropenem; aztreonam; cefoperazone-sulbactam; beta-lactam

急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）是重症患者的常见并发症，其中药物是导致 AKI 的重要因素之一[1]。重症患者常需要合并使用多种药物治疗，而 AKI 的发生会进一步降低经肾排泄药物的清除，增加药物体内暴露，导致药物不良反应风险进一步上升。因此更需高度重视用药安全性。万古霉素（vancomycin）联合 β- 内酰胺类抗菌药物广泛用于重症患者抗感染治疗[2]。近年来有研究发现，万古霉素联合哌拉西林他唑巴坦（VPT）治疗后 AKI 的发生率高于万古霉素联合美罗培南（VM）或万古霉素联合头孢类药物[3-4]。然而目前在重症人群中进行的研究尚未达成一致性结论[5-6]，研究中涉及的 β- 内酰胺类抗菌药物品种也较为有限。综上，本研究将探究重症患者应用万古霉素联合不同 β- 内酰胺类抗菌药物后 AKI 发生率及预后情况，评估联合治疗的安全性，为进一步优化抗感染治疗提供支持。

1 资料和方法

1.1 病例选择

回顾性收集本院 2017 年 9 月至 2020 年 4 月重症监护室收治患者的病例资料。纳入标准：① 年龄≥ 18 岁；② 应用万古霉素联合 β- 内酰胺类抗菌药物进行抗感染治疗至少 48 h；③ 接受万古霉素谷浓度监测。排除标准：① 慢性肾脏病 5 期；② 联合治疗前接受肾脏替代治疗（RRT）；③ 血药浓度监测前更换过万古霉素或 β- 内酰胺类抗菌药物用法用量；④ 病例资料缺失。

1.2 资料收集

收集的资料包含性别、年龄、体质量、感染部位、合并症、急性生理与慢性健康评估Ⅱ（APACHE-Ⅱ）评分、万古霉素用法用量、β- 内酰胺类抗菌药物品种及用法用量、合并用药、万古霉素谷浓度水平、联合用药前血清肌酐（Scr）及肌酐清除率（Ccr）水平、用药后 7 d 内 Scr 水平。

合并症包括糖尿病、慢性呼吸疾病、慢性肾脏病、肝功能不全、慢性心力衰竭、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肿瘤、脓毒症。

β- 内酰胺类抗菌药物品种包括哌拉西林他唑巴坦、美罗培南、氨曲南、头孢哌酮舒巴坦。

合并用药包括袢利尿剂、非甾体抗炎药（NSAIDs）、血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（ACEI/ARB）、抗真菌药（氟康唑、伏立康唑、两性霉素 B）、氨基糖苷类抗菌药物、血管活性药。

1.3 药物治疗

万古霉素剂量 0.5 ～ 1.0 g，q6 ～ q12 h；哌拉西林他唑巴坦剂量 2.25 ～ 4.5 g，q6 ～ q12 h；美罗培南剂量 0.5 ～ 2 g，q8 ～ q12 h；氨曲南剂量 2 g，q8 h；头孢哌酮舒巴坦剂量 3 g，q8 h。万古霉素和所有 β- 内酰胺类抗菌药物均采取静脉滴注给药。

1.4 血药浓度监测

患者静脉滴注万古霉素至血药浓度达稳（一般为给药 3 ～ 4 次）后，于下一次给药前 30 min 静脉采血 3 mL，血液标本以 3000 r • min^{-1} 离

心 10 min，分离上清液，应用全自动化学发光仪（美国雅培公司）测定万古霉素谷浓度。

1.5　AKI 评估

AKI 按照改善全球肾脏病预后组织急性肾损伤临床实践指南（2012 年版）[7] 中 Scr 标准进行评定和分级。对于发生 AKI 的病例记录 AKI 持续时间、是否导致 RRT、是否发生院内死亡等相关信息。

1.6　统计分析

应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析比较组间差异。偏态分布的计量资料以中位数 M 和四分位数间距（P_{25}，P_{75}）表示，采用 Kruskal-Wallis 秩和检验比较组间差异。计数资料以百分率（%）表示，采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验比较差异。应用单因素及多因素 Logistic 回归对 AKI 发生的危险因素与 AKI 分级的影响因素进行分析。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　基本资料

按纳入排除标准，最终纳入病例 133 例。其中男 75 例，女 58 例；年龄 40 ～ 99 岁，平均年龄（76.57±12.44）岁，所有患者均合并肺部感染；VPT 32 例、VM 64 例、万古霉素联合氨曲南（VA）20 例、万古霉素联合头孢哌酮舒巴坦（VCS）17 例。为便于统计分析，将 VA 与 VCS 合并为一组。患者基本资料见表 1。三组之间各项基本资料差异均无统计学意义。

表 1　患者基本资料

Tab 1　Baseline of patient characteristics

项目	VPT（n = 32）	VM（n = 64）	VA + VCS（n = 37）	F 或 χ^2	P
年龄 / 岁	79.25±11.90	74.95±13.86	77.05±9.94	1.31	0.27
性别（男 / 女）	16/16	36/28	23/14	1.03	0.62
体质量 /kg	61.44±13.09	61.80±9.70	61.40±7.05	0.02	0.98
用药前 Scr/（μmol • L^{-1}）	80.03±32.66	77.28±37.81	73.70±37.56	0.36	0.70
用药前 Ccr/（mL • min^{-1}）	67.71±50.44	75.32±44.43	73.96±38.56	0.83	0.44
万古霉素剂量 /（g • d^{-1}）	2.00（1.50，2.00）	2.00（1.50，2.00）	2.00（1.55，2.00）	0.27	0.87
万古霉素谷浓度 /（μg • mL^{-1}）	18.57±1.67	14.89±1.28	16.96±1.81	0.31	0.11
感染部位 / 例（%）					
泌尿系统	19（59.38）	30（46.88）	23（62.16）	2.67	0.26
血流	4（12.50）	3（4.69）	1（2.70）	3.29	0.25
合并症 / 例（%）					
糖尿病	21（65.63）	43（67.19）	24（64.86）	0.06	0.97
慢性呼吸疾病	16（50.00）	24（37.50）	13（35.14）	1.87	0.38
慢性肾脏病	12（37.50）	15（23.44）	12（32.43）	2.27	0.34
肝功能不全	8（25.00）	21（32.81）	15（40.54）	1.88	0.40
慢性心力衰竭	30（93.75）	49（76.56）	32（86.49）	4.90	0.08
冠状动脉粥样硬化性心脏病	29（90.62）	49（76.56）	33（89.19）	4.27	0.13
肿瘤	8（25.00）	16（25.00）	7（18.92）	0.55	0.78
脓毒症	26（81.25）	54（84.38）	29（78.38）	0.58	0.77
APACHE-Ⅱ评分	22.59±6.53	21.98±7.24	21.62±6.77	0.17	0.84
合并用药 / 例（%）					
袢利尿剂	21（65.63）	43（67.19）	22（59.46）	0.63	0.75
NSAIDs	2（6.25）	4（6.25）	4（10.81）	0.80	0.69
ACEI/ARB	2（6.25）	2（3.13）	1（2.70）	0.73	0.71
抗真菌药	15（46.88）	30（46.88）	13（35.14）	1.50	0.49
氨基糖苷	11（34.38）	11（17.19）	10（27.03）	3.70	0.15
血管活性药	9（28.13）	16（25.00）	12（32.43）	0.65	0.75

2.2　AKI 发生情况及预后比较

133 例病例中共 30 例发生 AKI，发生率为 22.56%。各组 AKI 发生情况及预后比较见表 2。VPT 组 AKI 发生率为 40.63%，VM 组 AKI 发生率为 17.19%，VA + VCS 组 AKI 发生率为 16.22%，三组间 AKI 发生率差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

2.3　重症患者 AKI 的危险因素分析

2.3.1　重症患者发生 AKI 的危险因素分析　以是否发生 AKI 为因变量（是 = 1，否 = 0），以性别（男 = 1，女 = 2）、用药前 Ccr（Ccr > 90 mL • min^{-1} = 1，90 ≤ Ccr < 60 mL • min^{-1} = 2，60 ≤ Ccr < 30 mL • min^{-1} = 3，Ccr ≤ 30 mL • min^{-1} = 4；设置哑变量，以 Ccr > 90 mL • min^{-1} 为参照）水平、糖尿病（是 = 1，否 =

表 2 各组 AKI 发生情况及预后 [*n*(%)]

Tab 2 AKI and outcomes in different groups [*n*(%)]

项目	VPT（*n* = 32）	VM（*n* = 64）	VA + VCS（*n* = 37）	*F* 或 χ^2	*P*
AKI	13（40.63）	11（17.19）	6（16.22）	7.89	0.02
1 级	4（12.50）	3（4.69）	3（8.11）	1.90	0.40
2 级	5（15.63）	3（4.69）	1（2.70）	5.39	0.07
3 级	4（12.50）	5（7.81）	2（5.41）	1.17	0.61
AKI 持续时间 /d	7.69±8.93	7.00±5.42	12.50±20.69	0.06	0.94
导致 RRT	1（3.13）	3（4.69）	1（2.70）	0.30	1.00
院内病死	9（28.13）	20（31.25）	11（29.73）	0.10	0.97

0）、慢性呼吸疾病（是＝1，否＝0）、肝功能不全（是＝1，否＝0）、慢性心力衰竭（是＝1，否＝0）、动脉粥样硬化性心脏病（是＝1，否＝0）、肿瘤（是＝1，否＝0）、脓毒症（是＝1，否＝0）、VPT（是＝1，否＝0）、VM（是＝1，否＝0）、VA + VCS（是＝1，否＝0）、血管活性药（是＝1，否＝0）、袢利尿剂（是＝1，否＝0）、NSAIDs（是＝1，否＝0）、ACEI/ARB（是＝1，否＝0）、抗真菌药（是＝1，否＝0）、氨基糖苷类抗菌药物（是＝1，否＝0）、年龄、体质量、万古霉素剂量、万古霉素谷浓度及 APACHE-Ⅱ评分为自变量进行单因素 Logistic 回归分析，结果见表 3。取 $P < 0.05$ 的变量代入多因素 Logistic 逐步回归模型中分析，结果显示应用 VPT、万古霉素谷浓度增加和 APACHE-Ⅱ评分升高为重症患者发生 AKI 的独立危险因素，见表 4。

表 3 重症患者发生 AKI 的单因素 Logistic 回归分析结果

Tab 3 Univariate Logistic regression of risk factors of AKI in critically ill patients

变量	*B*	*SE*	*Wald* 值	*P*	*OR*	95%*CI*
VPT	1.218	0.448	7.409	0.006	3.381	1.406 ～ 8.128
抗真菌药	0.860	0.424	4.112	0.043	2.362	1.029 ～ 5.423
血管活性药	1.303	0.437	8.888	0.003	3.682	1.563 ～ 8.674
万古霉素谷浓度	0.078	0.022	12.217	＜ 0.001	1.081	1.035 ～ 1.130
APACHE-Ⅱ评分	0.116	0.036	10.275	0.001	1.123	1.046 ～ 1.206

表 4 重症患者发生 AKI 的多因素 Logistic 回归分析结果

Tab 4 Multivariate Logistic regression of risk factors of AKI in critically ill patients

变量	*B*	*SE*	*Wald* 值	*P*	*OR*	95%*CI*
VPT	1.201	0.493	5.943	0.015	3.324	1.226 ～ 8.733
万古霉素谷浓度	0.064	0.023	7.469	0.006	1.066	1.018 ～ 1.116
APACHE-Ⅱ评分	0.104	0.040	6.850	0.009	1.110	1.027 ～ 1.200

2.3.2 发生 AKI 患者的 AKI 分级影响因素分析

对 30 例 AKI 患者 AKI 分级的影响因素进行分析，因变量设置为 AKI 分级（1 级＝1，2 级＝2，3 级＝3），自变量设置同“2.3.1”项下。单因素有序多分类 Logistic 回归分析未发现与 AKI 分级相关的因素（$P > 0.05$）。

3 讨论

我国重症患者 AKI 发生率约为 30%，AKI 的发生严重影响了患者的临床预后 [8]。同时，重症患者在治疗过程中不得不合并使用多种肾毒性药物，药物治疗的安全性不容忽视。万古霉素与具有抗铜绿假单胞菌作用的 *β*- 内酰胺类抗菌药物联合治疗可以覆盖耐甲氧西林金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌，达到广谱抗菌效果，因而常用于重症患者的抗感染治疗。但同时这两类药物均有可能导致重症患者 AKI，尤其是万古霉素，其肾毒性一直以来受到广泛的关注 [9]。目前认为万古霉素相关 AKI 与其给药剂量、给药途径、治疗持续时间、谷浓度水平、合并使用其他肾毒性药物有关 [10]。

近年来不断有研究者评估万古霉素联合不同 *β*- 内酰胺类抗菌药物进行抗感染治疗时的 AKI 风险，发现 VPT 较万古霉素联合其他 *β*- 内酰胺类抗菌药物（主要为 VM 和头孢吡肟）治疗出现 AKI 的风险更高，可达 9 倍 [11]。本研究在纳入 VM 病例的基础上，还纳入了 VA 和 VCS 的病例进行比较。应用 Logistic 回归分析校正其他因素后显示，VPT 治疗是重症患者 AKI 发生的独立危险因素，与 Blevins 等 [12] 的研究结果相似。但也有一些研究未发现 VPT 会增加重症患者的 AKI 风险 [5-6]，原因可能在于研究对象之间存在异质性。本研究中研究对象的平均年龄、肺部感染的比例较同类研究高，可以为类似人群提供一定参考。

研究表明，万古霉素的肾毒性与急性肾小管坏死和 / 或梗阻性肾病有关，*β*- 内酰胺类抗菌药物的肾毒性可能与急性间质性肾炎相关 [9]。但 VPT 联合治疗肾毒性增强的机制尚未完全阐明。Jensen 等 [13] 发现 VPT 延缓了重症患者肾功能的恢复，而美罗培南和头孢呋辛并没有这种作用，推测可能与此因素有关。并且还有观点认为 VPT 可能会导致万古霉素相关肾小管损伤复杂化 [10]，具体机制还需进一步研究。

本次研究还发现，虽然 VPT 组 AKI 风险显著升高，但 RRT 发生率和院内病死率与其他两组的差异无统计学意义，与温小龙等 [14] 的研究结果相似。此结果从一定程度上表明 VPT 虽然会升高 AKI 发生风险，但最终对临床预后的影响比较有限，通过及时减量或停药并进行对症处理，肾脏损害通常可恢复。然而 AKI 的发生依旧会延长重症患者的病程，给患者治疗带来不良影响。因此对于 AKI 高风险的重症患者应该谨慎应用 VPT 方案进行抗感染治疗。此外，Kane-Gill 等 [15] 发现应用 VPT 的重症患者尿液中金属蛋白酶组织抑制因子 -2 和胰岛素样生长因子结合蛋白（[TIMP-

2] • [IGFBP7] ）水平在用药后第一日即出现显著升高，并且与 AKI 发生显著相关。同时 VPT 患者在用药后第一日尿液 [TIMP-2] • [IGFBP7] 的水平显著高于单独使用万古霉素或 VPT。由此可见，在 VPT 治疗期间通过监测肾损伤标志物，早期识别 AKI 并迅速采取减量或停药措施或许是未来可尝试的方向。

综上所述，VPT 是重症患者 AKI 发生的独立危险因素，需要谨慎选择或在严密监测下应用。本研究作为回顾性研究存在一些局限性。首先研究纳入的病例数较少，未能分别对 VA 与 VCS 组进行分析，并且未能纳入万古霉素单药治疗的病例进行统计分析。其次，本研究在评估 AKI 时仅参考了 KDIGO 指南中 Scr 标准而未考虑尿量标准，可能存在偏倚。另外，本次研究仅统计了患者住院期间的临床结局，未进行长期随访。未来仍需大规模临床研究对重症患者应用万古霉素联合不同 β- 内酰胺类抗菌药物治疗的安全性进行评估。

参考文献

[1] Taber SS，Pasko DA. The epidemiology of drug-induced disorders：The kidney [J]. Expert Opin Drug Saf，2008，7（6）：679-690.

[2] （美）戴维 • 吉尔伯特著 . 热病——桑福德抗微生物治疗指南 . 范宏伟，译 [M]. 46 版 . 北京：中国协和医科大学出版社，2017：39-43.

[3] Ide N，Sato S，Sawaguchi K. Risk of acute kidney injury in patients treated with vancomycin and piperacillin/tazobactam compared to vancomycin and meropenem or doripenem：A retrospective cohort study [J]. Yakugaku Zasshi，2019，139（12）：1609-1614.

[4] Mullins BP，Kramer CJ，Bartel BJ，et al. Comparison of the nephrotoxicity of vancomycin in combination with cefepime，meropenem，or piperacillin/tazobactam：A prospective，multicenter study [J]. Ann Pharmacother，2018，52（7）：639-644.

[5] Buckley MS，Hartsock NC，Berry AJ，et al. Comparison of acute kidney injury risk associated with vancomycin and concomitant piperacillin/tazobactam or cefepime in the intensive care unit [J]. J Crit Care，2018，48（1）：32-38.

[6] Hammond DA，Smith MN，Painter JT，et al. Comparative incidence of acute kidney injury in critically ill patients receiving vancomycin with concomitant piperacillin-tazobactam or cefepime：A retrospective cohort study [J]. Pharmacotherapy，2016，36（5）：463-471.

[7] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury [J]. Nephron Clin Pract，2012，120（4）：179-184.

[8] 雷莹，聂晟，孙丹华，等 . 中国危重症住院患者急性肾损伤的流行病学分析 [J]. 南方医科大学学报，2016，36（6）：744-750.

[9] Petejova N，Martinek A，Zadrazil J，et al. Acute kidney injury in septic patients treated by selected nephrotoxic antibiotic agents-pathophysiology and biomarkers-A review [J]. Int J Mol Sci，2020，21（19）：7115.

[10] Filippone EJ，Kraft WK，Farber JL. The nephrotoxicity of vancomycin [J]. Clin Pharmacol Ther，2017，102（3）：459-469.

[11] Luther MK，Timbrook TT，Caffrey AR，et al. Vancomycin plus piperacillin-tazobactam and acute kidney injury in adults：A systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care Med，2018，46（1）：12-20.

[12] Blevins AM，Lashinsky JN，McCammon C，et al. Incidence of acute kidney injury in critically ill patients receiving vancomycin with concomitant piperacillin-tazobactam，cefepime，or meropenem [J]. Antimicrob Agents Chemother，2019，63（5）：e02658-18.

[13] Jensen JU，Hein L，Lundgren B，et al. Kidney failure related to broad-spectrum antibiotics in critically ill patients：Secondary end point results from a 1200 patient randomised trial [J]. BMJ Open，2012，2（2）：1-8.

[14] 温小龙，邢柏 . 万古霉素单药与联合 β- 内酰胺类药物对脓毒症患者急性肾损伤发生和预后的影响 [J]. 天津医药，2021，49（1）：36-41.

[15] Kane-Gill SL，Ostermann M，Shi J，et al. Evaluating renal stress using pharmacokinetic urinary biomarker data in critically ill patients receiving vancomycin and/or piperacillin-tazobactam：A secondary analysis of the multicenter sapphire study [J]. Drug Saf，2019，42（10）：1149-1155.

（收稿日期：2021-05-12；修回日期：2021-06-20）

药品不良反应

托伐普坦相关不良反应文献分析

刘艳[1]，刘慧[2]，王娟[3]，高君[4]，张娟娟[1]，季荣星[1]，杨柳[5]，瞿珍清[6]（1. 河南省省立医院药学部，郑州 451161；2. 河南省商丘市第一人民医院药学部，河南 商丘 476900；3. 河南省省立医院心血管内科，郑州 451161；4. 河南省郑州人民医院药学部，郑州 450000；5. 商水县人民医院药剂科，河南 周口 466100；6. 佛山市高明区人民医院心血管内科，广东 佛山 528500）

摘要：目的 探讨托伐普坦不良反应的临床表现特点，为临床安全用药提供参考。**方法** 检索中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 和 Embase 数据库（截至 2021 年 3 月 31 日），收集关于托伐普坦相关不良反应个案报道，对纳入病例中患者一般情况、托伐普坦用药情况、不良反应名称、发生时间、主要检验指标及临床表现、处置及转归等进行统计分析。**结果** 纳入托伐普坦相关不良反应报道 14 篇，共计 15 例患者。患者平均年龄（64.87±19.16）岁，男性 5 例，女性 10 例。患者来自 5 个国家，以中国报道最多。不良反应主要发生在用药后 1 ～ 7 d，以高钠血症和肝胆系统损害多见，黄绿视为新的不良反应。14 例患者给予停药并对症处理后症状好转，1 例经对症处理后症状无改善，患者死亡。**结论** 临床中应加强托伐普坦的药学监护，密切防范不良反应的发生，保障临床安全用药。

关键词：托伐普坦；不良反应；文献分析
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2704-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.044

托伐普坦（tolvaptan）是首个选择性非肽类口服血管加压素 V_2 受体拮抗剂，通过拮抗血管加压素的作用从而增加尿液中水排泄量，促进游离水的清除，降低尿液渗透压，升高血钠水平 [1]。与呋塞米等传统利尿剂相比，托伐普坦主要优势为改善容量过载却不恶化血清电解质或肾功能 [2-3]，并且发挥作用时无需被分泌至肾小管腔内，利尿作用也并不完全依赖人体内的血钠以及白蛋白，因此作用效率更高 [4]。托伐普坦于 2009 年 5 月首次获美国 FDA 批准上市，2011 年 9 月在我国上市。目前在我国托伐普坦仅批准用于明显的高容量性和正常容量性低钠血症 [包括伴有心力衰竭、肝硬化以及抗利尿激素分泌异常综合征（SIADH）的患者] 和心力衰竭引起的体液潴留的药物治疗。在美国、日本、欧盟等国家托伐普坦也被批准用于治疗常染色体显性遗传性多囊肾病（ADPKD）[5-7]。托伐普坦上市初期因价格昂贵且医保无法报销的限制，其在临床上的应用并不广泛，但近年来因其不恶化电解质和肾功能的优势而在心力衰竭方面应用越来越广泛。托伐普坦说明书中常见的药品不良反应（ADR）为口渴、口干和多尿，临床使用时观察到的 ADR 还有高钠血症及肝功能损伤等 [8-11]，但多为个案报道，尚无系统性的研究。本文对国内外发生托伐普坦相关 ADR 的个案进行整理分析，以期为临床合理用药提供参考与依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

中文以“托伐普坦，不良反应”为检索词，英文以“tolvaptan，adverse reaction，side effect，case”为检索词分别检索中国知网、万方、维普数据库和 PubMed、Web of Science、Embase 数据库，检索时间从建库至 2021 年 3 月 31 日，收集托伐普坦相关 ADR 的病例报告类文献。文献纳入标准：① ADR 与托伐普坦相关；② 患者基本信息、临床表现及治疗等资料相对完整；③ 文献语种限汉语和英语。排除标准：① 非病例报告类文献；② 重复发表或含重复病例的文献。

1.2 方法

由两位研究者独立进行文献筛选，交叉核对后选定纳入分析的文献，遇到分歧讨论解决。提取患者的性别，年龄，托伐普坦用药指征和用药情况，ADR 名称、发生时间、临床表现、临床处

基金项目：2019 年河南省医学科技攻关计划（联合共建）项目（No.LHGJ20190841）。
作者简介：刘艳，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：lyJenny106@163.com

置及转归等。应用 SPSS 19.0 统计软件，参考世界卫生组织不良反应术语集（WHOART）2015 中文更新版[12]及我国国家药品不良反应监测中心采用的评价标准进行统计分析[13]。

2　结果

共收集到 14 篇文献报道[9-11，14-24]，涉及 15 例患者，纳入托伐普坦致不良反应类型 8 类，包括高钠血症、癫痫样发作、肝功能障碍、肌酸激酶升高、发热、休克、急性肾损伤和黄绿视。除黄绿视外均为说明书上已知 ADR 类型。具体结果见表 1。

表 1　托伐普坦相关不良反应患者的临床资料

No.	名称	累及系统 / 器官	基本信息	用药指征	用药剂量	发生时间	临床表现	处置及转归	再暴露
1[9]	高钠血症	代谢和营养障碍	中国，女，79 岁	急性心力衰竭	7.5 mg po qd，2 d 后加量至 15 mg po qd	14 d	血钠最高 166 mmol • L^{-1}，烦渴，精神疲倦	停药，补充葡萄糖溶液，其他利尿剂加量，14 d 后恢复正常	未再暴露
2[10]	高钠血症		中国，男，68 岁	急性失代偿性心力衰竭	7.5 mg po qd	3 d	血钠最高 173 mmol • L^{-1}，精神错乱，四肢不自主抖动	停药，多饮水，5 d 后恢复正常	再次使用，再次出现高钠血症
3[14]	高钠血症		中国，女，63 岁	急性心肌梗死后心力衰竭	15 mg po qd	6 d	血钠最高 161 mmol • L^{-1}，意识不清、呼之不应、呼吸衰竭、循环衰竭	停药，利尿、补低渗液、降钠，患者死亡	未再暴露
4[15]	高钠血症		日本，女，60 岁	肝切除术后（术后液体潴留致胸膜腔积液和严重水肿）	7.5 mg po qd	4 d	血钠最高 174 mmol • L^{-1}，意识障碍	停药，输液，4 d 后血钠恢复正常，意识好转	未再暴露
5[16]	高钠血症和癫痫样发作	代谢和营养障碍及中枢神经系统损害	中国，男，86 岁	慢性心力衰竭急性失代偿	7.5 mg po qd，加量至 15 mg po qd	6 d	血钠最高 164 mmol • L^{-1}，肢体抽搐伴意识不清，持续约半小时	停药，减少钠盐摄入，补液，抗癫痫等，4 d 后未再发	未再暴露
6[17]	癫痫发作	中枢及外周神经系统损害	中国，女，83 岁	低钠血症	15 mg po qd	2 d	突发抽搐，表现为双眼上翻，四肢抽动	停药，镇痉治疗抽搐症状后缓解	未再暴露
7[11]	肝损伤	肝胆系统损害	美国，女，86 岁	SIADH	15 mg po bid	1 d	肝酶升高，高胆红素血症	停药，8 d 后好转	未再暴露
8[18]	急性肝衰竭		日本，女，36 岁	ADPKD	起始 15 mg po qd，加量至 60 mg po qd	5 个月	肝衰竭：肝酶、总胆红素进行性升高，凝血酶原时间延长、肝萎缩、肝腹水	停药，进行肝移植，86 d 后好转	未再暴露
9[19]	特异质肝毒性		意大利，女，41 岁	ADPKD	60 mg（45 mg ＋ 15 mg）及 90 mg（60 mg ＋ 30 mg）po qd 各服用 28 d，维持 120 mg（90 mg ＋ 30 mg）po qd	16 周	肝酶升高	停药，8 周后恢复正常	再次使用，未发生 ADR
10[20]	肌酸激酶升高	肌肉骨骼系统损害	西班牙，男，41 岁	ADPKD	早 45 mg，晚 15 mg	20 d	肌酸激酶、乳酸脱氢酶升高，无症状	停药，4 周后降至基础水平	未再暴露
11[20]	肌酸激酶升高		西班牙，男，43 岁	ADPKD	早 45 mg，晚 15 mg	17 d	肌酸激酶、乳酸脱氢酶升高，无症状	停药，6 周后恢复正常	未再暴露
12[21]	发热	全身性损害	中国，女，68 岁	SIADH	15 mg po qd	1 d	高热，纳差，心悸	停药，72 h 后体温降至正常，症状明显好转	再次使用，再次发热

续表 1

No.	名称	累及系统 / 器官	基本信息	用药指征	用药剂量	发生时间	临床表现	处置及转归	再暴露
13[22]	休克		中国，男，88 岁	充血性心力衰竭	4 d 的每日用量分别为 3.75 mg，7.5 mg，7.5 mg，15 mg	4 d	血压下降，口渴，容量不足	减量至 7.5 mg·d^{-1}，给予生理盐水扩容，低血压持续 14 h，后血压维持在 125/60 mmHg	再次使用，未发生 ADR
14[23]	过敏导致急性肾损伤	泌尿系统损害	日本，女，84 岁	充血性心力衰竭	起始 7.5 mg po qd，用药 3 d，停 4 d，再次给予 3.75 mg po qd	11 d	血嗜酸性粒细胞及 β_2- 微球蛋白升高；肾功能损伤	停药，水化，症状好转	未再暴露
15[24]	黄绿视	视觉损害	中国，女，47 岁	副肿瘤综合征导致低钠血症	15 mg po qd，后减量为 7.5 mg po qd	1 h	视物模糊，黄绿视，头晕，周身不适	停药，卧床休息、吸氧，3 ～ 4 h 后黄绿视消失	再次使用，再次出现黄绿视

2.1 患者国籍及年龄分布情况

15 例病例分别来自 5 个国家，其中以中国报道最多，为 8 例，日本 3 例，西班牙 2 例，美国 1 例，意大利 1 例。其中男性 5 例，女性 10 例，男女比例为 1∶2。年龄为 36 ～ 88 岁，平均年龄（64.87±19.16）岁；各年龄段中，＞ 70 岁患者占比最多，达 40.00%。

2.2 用药剂量、用药指征、合并基础疾病及用药情况

15 例患者中，托伐普坦用药指征为心力衰竭的 6 例，ADPKD 的 4 例，SIADH 的 2 例，低钠血症的 2 例，肝切除术后（术后液体潴留致胸膜腔积液和严重水肿）的 1 例。14 例患者有合并症记录，主要合并症为高血压病、冠心病、慢性肾脏疾病等；12 例有合并用药记录，合用药物 1 ～ 16 种，包括抗血小板、抗凝、利尿、降压、降脂及抗感染药物等。

15 例病例中，4 例用于低钠血症及 SIADH 的患者用药剂量均为 15 mg·d^{-1}；6 例心力衰竭患者，4 例用药最大剂量为 15 mg·d^{-1}，2 例为 7.5 mg·d^{-1}；4 例 ADPKD 患者，3 例用药最大剂量为 60 mg·d^{-1}，1 例为 120 mg·d^{-1}；1 例肝切除术后患者用药剂量为 7.5 mg·d^{-1}。

2.3 ADR 发生时间

15 例患者中，托伐普坦相关 ADR 发生时间最短为用药后 1 h，最长为 5 个月，主要发生在用药后 1 ～ 7 d，共 8 例，占 53.33%。

2.4 ADR 累及器官 / 系统及其临床表现

15 例 ADR 中以代谢和营养障碍为主，1 例病例同时合并了代谢和营养障碍、中枢及外周神经系统损害。具体分布如下：代谢和营养障碍 5 例，肝胆系统损害 3 例，肌肉骨骼系统损害 2 例，全身性损害 2 例，中枢及外周神经系统损害 2 例、泌尿系统损害 1 例、视觉系统损害 1 例。代谢和营养障碍的表现为高钠血症，血钠最高升至 161 ～ 174 mmol·L^{-1}，且均出现了精神症状；肝胆系统损害不良反应表现为肝酶升高，其中 1 例为急性肝衰竭；肌肉骨骼系统损害表现为肌酸激酶升高，最高升至 5 ～ 6 倍于基础值；全身性损害表现为发热和休克；中枢及外周神经系统损害均表现为癫痫发作；泌尿系统损害表现为过敏导致急性肾损伤；视觉系统损害表现为黄绿视。

2.5 ADR 处置与转归

15 例 ADR 中，14 例停药处理，1 例将药物减量处理；1 例高钠血症患者停药经对症处理后症状无好转，最终出现意识不清、呼吸及循环衰竭，家属放弃抢救，患者死亡；1 例急性肝衰竭患者进行了肝脏移植，其余患者均经利尿、补液、保肝、解痉、水化等治疗后症状好转。

2.6 ADR 相关性判定

15 例病例中，文献中根据评价标准明确给予关联性评价的为 4 例，分别是肯定 1 例，很可能 2 例，可能 1 例。相关性判定工具为：诺氏评估量表 1 例；WHO-UMC 不良反应 - 事件因果关系判断原则 1 例[25]；国家药品不良反应关联性评价标准 2 例，其余 11 例文献中未给予关联性评价。笔者根据我国药品不良反应相关性评价标准[13]对所有文献进行再评价，结果分别为肯定 2 例，很可能 9 例，可能 4 例。

3 讨论

3.1 ADR 发生与患者的关系

托伐普坦是新型口服利尿药，从表 1 看患者平均年龄为（64.87±19.16）岁，年龄分布中＞ 70 岁年龄段患者最多，与心力衰竭、SIADH 及低

钠血症的流行病学趋势相符合[26]。虽然研究表明年龄和肾功能损害对托伐普坦血药浓度无明显影响，但老年患者合并用药种类多，对药物耐受性相对较弱，易发生 ADR。本文收集的 ADR 中，1 例 84 岁充血性心力衰竭患者在使用托伐普坦 7.5 mg·d^{-1} 后出现急性肾损伤，该患者入院前肾功能无异常，提示即使肾功能正常的老年患者在使用托伐普坦期间仍应加强用药监护。

3.2 ADR 发生与时间的关系

从表 1 看出，托伐普坦相关 ADR 多发生在用药后 1 ～ 7 d，最长为 5 个月（急性肝衰竭）。因此建议加强从开始应用托伐普坦 7 d 内的药学监护，肝脏毒性的发生时间可能较长，可加强长期监测。

3.3 代谢和营养障碍、中枢及外周神经系统损害

本文纳入托伐普坦单纯代谢和营养障碍 ADR 4 例，均为严重高钠血症，血钠最高至 174 mmol·L^{-1}；单纯中枢及外周神经系统损害 1 例，为癫痫发作；代谢和营养障碍合并中枢及外周神经系统损害 1 例，为高钠血症合并癫痫样发作。托伐普坦具有强大的自由水清除作用，通过排水利尿作用使血液浓缩，可能出现高钠血症，有时会伴有意识障碍。研究表明，高钠血症临床发生率为 1.7% ～ 13%[2, 27-28]，主要表现为嗜睡、肌肉抽搐、昏迷，甚至出现脑出血和蛛网膜下腔出血等一系列的中枢神经系统功能障碍[29]。本文中的 5 例高钠血症患者均出现了精神厌倦、意识错乱、四肢抽搐、意识不清等临床表现。例 6 为单纯癫痫样发作，其血钠仅升高至 137 mmol·L^{-1}，并未发生高钠血症，考虑其癫痫发作可能与血钠上升较快有关[17]。英国药品和健康产品管理局早在 2012 年就发出警告：托伐普坦致患者血钠水平升高过快使中枢神经发生脱髓鞘改变，从而诱发癫痫风险[30]。Diringer 等[31]研究也表明血钠显著或过快升高与癫痫样发作等神经症状相关。因此，临床在使用托伐普坦时须密切监测血钠变化，防止血钠上升过高或过快 [升高速度＞ 12 mEq/（L·24 h）] 导致脱髓鞘改变或者诱发癫痫。

相关研究表明轻度高钠血症患者（150 ～ 155 mmol·L^{-1}）和严重（＞ 155 mmol·L^{-1}）高钠血症者死亡风险分别是正常血钠患者的 2.32 倍和 3.54 倍[32]，因此高钠血症应被列为重要的不良事件来积极预防。有研究表明基线血清钠浓度，血清钾浓度，血尿素氮:肌酐比，初始托伐坦剂量以及年龄为高钠血症的危险因素[33]。日均剂量＞ 7.5 mg 及年龄≥ 75 岁是迟发性（＞ 7 d）高钠血症的独立危险因素[27]。还有研究发现托伐普坦导致的高钠血症与低血钾合并高血压有关[28]。针对上述危险因素，Kinugawa 等[33]研究得出高钠血症的危险评分公式，危险评分＝ 0.125× 血钠浓度（mmol·L^{-1}）＋ 0.032×（血尿素氮 / 血肌酐，血尿素氮和血肌酐单位均为 mg·dL^{-1}）－ 0.436× 血钾（mmol·L^{-1}）＋ 0.014× 年龄（岁），评分≥ 17.80 的患者定义为高危人群。对于高危人群其起始剂量建议为 3.75 mg·d^{-1}，如效果差，对于耐受该药物者可考虑将给药剂量增至 7.5 mg·d^{-1}。本文纳入 5 例高钠血症患者均表现为严重高钠血症，其中 4 例患者按照上述公式进行了危险评分，2 例评分＞ 17.80，其中例 3[14] 危险评分为 18.05，为发生高钠血症的高危人群，基线血压为 110/74 mmHg，但患者基线血尿素氮 / 血肌酐比值为 37.60，可能存在肾脏灌注不足，提示血容量不足，故以 3.75 mg·d^{-1} 的较低剂量开始应用更为合适，但该患者选用的托伐普坦的初始剂量为 15 mg·d^{-1}；另外危险评分＞ 17.80 的例 4[15] 选用的初始剂量为 7.5 mg·d^{-1}，这 2 例剂量均偏大，可考虑减少起始剂量。综上所述，临床在应用托伐普坦时，可参照上述危险评分标准进行评分，达到高危人群评分，可按照上述推荐剂量；未达到高危人群评分，也建议以≤ 7.5 mg·d^{-1} 为起始剂量，更为严密地监测肾功能、电解质变化，并及时预防血容量不足。本文纳入的 4 例单纯高钠血症患者，除 1 例死亡外，其余 3 例均首先停用托伐普坦，同时给予补液、利尿及降钠处理后好转。

3.4 肝胆系统损害

本文纳入肝胆系统损害 ADR 3 例，其中 2 例用药指征为 ADPKD。托伐普坦治疗 ADPKD 关键试验[34]和随后进行的开放标签的安全性研究（NCT01214421）发现，肝酶升高概率为 4.90%（安慰剂组为 1.20%），胆红素升高概率为 1.90%（安慰剂组为 0.90%），但在此试验中发现 2 例 Hy’s 法则案例[34]。另一个托伐普坦治疗 ADPKD 患者的开放标签跟踪试验中发现 3 例 Hy’s 法则案例[35]。在临床试验数据库中发现，如出现 2 例就强烈提示该药在扩大人群的应用中可能引起严重的药物性肝损伤问题[36]。因此，国家药品监督管理局目前尚未批准托伐普坦用于治疗 ADPKD，且美国 FDA 于 2013 年取消了托伐普坦治疗肝硬化这一适应证。另外 1 例患者的用药指征为 SIADH，其发生肝胆系统损害可能与患者高龄（86 岁）和起始剂量较大（30 mg·d^{-1}）有关，提示在使用较大剂量托伐普坦治疗时要对患者肝功

能尽早加强监测。

根据《药物性肝损伤诊治指南》中关于 DILI 的严重程度分级，2 例患者肝损伤较严重，1 例为 3 级（重度肝损伤），1 例为 5 级（致命）[36]。纳入分析的 3 例患者中，托伐普坦用药最大剂量分别为 30、60 和 120 mg·d^{-1}。发生 5 级肝损伤（急性肝衰竭）的患者最大用药剂量为 60 mg·d^{-1}，提示肝损伤严重程度并未呈现明显剂量相关性，与既往研究报道一致 [35]。托伐普坦相关的肝细胞损伤发生在用药后 3 ～ 18 个月 [35]。本文纳入病例除 1 例患者在使用托伐普坦治疗 1 d 后出现肝脏毒性，其余 2 例分别在使用后 16 周和 5 个月发生肝脏毒性，提示在使用托伐普坦时肝脏毒性应进行长期监测，在治疗 ADPKD 时的给药 2 周、4 周，之后每月监测直至 18 个月，再之后每 3 个月监测一次。

目前托伐普坦导致肝损伤的机制尚不明确，Slizgi 等 [37] 研究发现抑制肝胆汁酸转运可能是托伐普坦治疗 ADPKD 患者相关肝损伤的生物学机制之一。Wu 等 [38] 通过研究发现托伐普坦延缓细胞周期进程，引起 DNA 损伤，并诱导人 HepG2 细胞的凋亡。托伐普坦药品说明书中指出肝损伤患者不能再次使用托伐普坦，除非确定肝损伤的发生与使用托伐普坦无关，但例 9 停药 8 周肝酶恢复正常后，再次使用托伐普坦 60 mg·d^{-1}，未再发生肝毒性 [19]。关于患者使用托伐普坦出现肝毒性后是否再次重启该药治疗尚需进一步临床证实。

3.5 肌肉骨骼系统损害

本文纳入肌肉骨骼系统损害 2 例，均表现为肌酸激酶升高，最高升至 5 ～ 6 倍于基础值；2 例患者均未表现出肌酸、肌无力等临床症状，这提示托伐普坦导致肌酸激酶升高也可不伴随肌酸肌无力等临床表现，不能仅通过患者症状判断是否出现肌酸激酶升高，应重视肌酸激酶的检测。托伐普坦致肌酸激酶升高机制尚不明确，可能与托伐普坦导致肌细胞内 cAMP 减少有关 [20]。

3.6 其他系统 ADR

在视觉系统中，1 例是由于低钠血症给予托伐普坦 15 mg·d^{-1} 对症治疗，1 h 后出现黄绿视，减量至 7.5 mg 再次出现该症状，考虑该 ADR 很可能是托伐普坦引起，为新发 ADR。对于一过性色视觉异常多考虑与药物有关。目前关于托伐普坦所致黄绿视的机制尚不清楚，有文章指出黄绿视的形成可能与托伐普坦代谢过程的中间产物抑制 Na^+-K^+-ATP 酶，影响视网膜内皮细胞膜上 P 糖蛋白发挥作用有关 [24]。托伐普坦导致黄绿视尽管罕见但应引起临床重视。本文纳入托伐普坦过敏致急性肾损伤 1 例，因托伐普坦可能会出现肾衰竭等严重肾疾病（发生率＜ 1%），应加强对肾功能的监测，出现异常时，应立即停药，并给予适当处置。此外，托伐普坦还可引起发热、休克等 ADR，虽然发生率不高，但仍需医务人员关注。

4 总结

综上所述，托伐普坦作为新型利尿剂，现已广泛应用于临床，为低钠血症及心力衰竭患者提供了新的选择，但其 ADR 不容忽视。托伐普坦国内上市时间短，报道 ADR 相对较少，药品生产、流通及使用部门应重视其引起的 ADR 并且积极上报，不断完善药品说明书。本研究纳入的 ADR 涉及全身多个系统 / 器官、其中黄绿视为说明书中未记载的不良反应，另有 2 例 ADR 怀疑为合并用药导致，临床用药过程中应加强对托伐普坦的药学监护，以提高临床用药的安全性。

参考文献

[1] Gheorghiade M，Gattis WA，O’Connor CM，et al. Effects of tolvaptan，a vasopressin antagonist，in patients hospitalized with worsening heart failure：A randomized controlled trial [J]. JAMA，2004，291（16）：1963-1971.

[2] Gheorghiade M，Niazi I，Ouyang J，et al. Vasopressin V2-receptor blockade with tolvaptan in patients with chronic heart failure：Results from a double-blind，randomized trial [J]. Circulation，2003，107（21）：2690-2696.

[3] Costello-Boerrigter LC，Smith WB，Boerrigter G，et al. Vasopressin-2-receptor antagonism augments water excretion without changes in renal hemodynamics or sodium and potassium excretion in human heart failure [J]. Am J Physiol Ren Physiol，2006，290（2）：F273-278.

[4] Huo CW. The short-term efficacy and safety of tolvaptan on patients with chronic heart failure complicated with hyponatremia [J]. Chin J Mod Drug Appl，2021，15（1）：128-129.

[5] Torres VE，Chapman AB，Devuyst O，et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. N Engl J Med，2012，367（25）：2407-2418.

[6] Muto S，Kawano H，Higashihara E ，et al. The effect of tolvaptan on autosomal dominant polycystic kidney disease patients：A subgroup analysis of the Japanese patient subset from TEMPO 3：4 trial [J]. Clin Exp Nephrol，2015，19（5）：867-877.

[7] Torres VE，Chapman AB，Devuyst O，et al. Tolvaptan in later-stage autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. N Engl J Med，2017，377（20）：1930-1942.

[8] Shanmugam E，Doss CRP，George M，et al. Effect of tolvaptan on acute heart failure with hyponatremia-A randomized，double blind，controlled clinical trial [J]. Indian Heart J，2016，68（Suppl 1）：S15-S21.

[9] Li TT ，Zhang WX. Hypernatremia induced by tolvaptan

in one acute heart failure patient [J]. Chin J New Drugs Clin Rem，2019，38（11）：68-70.
[10] Li T，Li GS. Hypernatremia induced by low-dose tolvaptan in a patient with refractory heart failure：A case report [J]. Medicine，2019，98（27）：e16229.
[11] Khan MY，Rawala MS，Siddiqui M，et al. Tolvaptan-induced liver injury：Who is at risk? A case report and literature review [J]. Cureus，2019，11（6）：e4842.
[12] 国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应术语使用指南 [M]. 北京：2016.
[13] 国家食品药品监督管理局药品安全监管司，国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应报告和监测工作手册 [EB/OL].（2012-11）[2020-05-10]. http：//www. cdr-adr. org. cn/xzzx/hyzl/hyzl2013nd/201304/t20130426_5436. html.
[14] 夏月平，王倩，崔炜 . 托伐普坦治疗急性心肌梗死后心力衰竭致高钠血症一例 [J]. 中华心力衰竭和心肌病杂志，2020，4（1）：63-65.
[15] Iida H，Maehira H，Mori H，et al. Post-hepatectomy tolvaptan-induced hypernatremia in a hepatocellular carcinoma patient with cirrhosis：A case report [J]. Surgical Case Reports，2020，6（1）：1-5.
[16] 卢玟伽，杨贤，兰希，等 . 托伐普坦和头孢哌酮钠舒巴坦钠致高钠血症和癫痫样发作 1 例 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（8）：121-122.
[17] Bi QJ，Cheng XH. One case of epileptic seizures induced by tolvaptan [J]. Chin J New Drugs Clin Rem，2015，34（9）：687-688.
[18] Endo M，Kan K，Matsuo H，et al. Role of liver transplantation in tolvaptan-associated acute liver failure [J]. Kidney Int Rep，2019，4（11）：1653-1657.
[19] Pellegrino AM，Petruzzelli LA，Riccio E，et al. Idiosyncratic hepatic toxicity in autosomal dominant polycystic kidney disease（ADPKD）patient in combined treatment with tolvaptan and amoxicillin/clavulanic acid：A case report [J]. BMC Nephrol，2019，20（1）：426-429.
[20] Agraz-Pamplona I，Larrosa-Garcia M，Bury-Macias RP，et al. Case report：Tolvaptan-associated creatine kinase elevation in two patients with autosomal dominant polycystic kidney disease（ADPKD）[J]. Eur J Clin Pharmacol，2020，76（1）：1473-1475.
[21] 严轶文，沈华 . 托伐普坦引起药物热一例报道 [J]. 药学服务与研究，2015，15（3）：188，192.
[22] Zhang ZG，Liu XM. A case report with shock induced by tolvaptan in an elderly patient with congestive heart failure [J]. Medicine，2018，97（1）：e8706.
[23] Yamaguchi M，Nishihira K，Okubo T，et al. Acute renal injury induced by hypersensitivity to tolvaptan in an elderly patient with congestive heart failure [J]. Int Med，2015，54（10）：1243-1246.
[24] 崔明新，黄海力，李小梅 . 托伐普坦致黄绿视 1 例 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（6）：749.
[25] Tantikul C，Dhana N，Jongjarearnprasert K，et al. The utility of the World Health Organization-The Uppsala Monitoring Centre（WHO-UMC）system for the assessment of adverse drug reactions in hospitalized children [J]. Asian Pac J Allergy Immunol，2008，26（2-3）：77-82.
[26] 国家卫生计生委合理用药专家委员会，中国药师协会 . 心力衰竭合理用药指南（第 2 版）[J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2019，11（7）：1-78.
[27] Konstam MA，Gheorghiade M，Burnett JC，et al. Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure：The EVEREST Outcome Trial [J]. JAMA，2007，297（12）：1319-1331.
[28] Torres VE，Higashihara E，Devuyst O，et al. Effect of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease by CKD stage：Results from the TEMPO 3：4 trial [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2016，11（5）：803-811.
[29] ADRsogué HJ，Madias NE. Hypernatremia [J]. N Engl J Med，2000，342（20）：1493-1499.
[30] Drug safety update tolvaptan（Samsca）：Over-rapid increase in serum sodium and risk of serious neurological events[EB/OL].（2014-12-11）[2019-09-18].
[31] Diringer M. Handbook of clinical neurology [M]. Vol 141. Netherlands：Elsevier Science publishing company inc，2017：705.
[32] Funk GC，Lindner G，Druml W，et al. Incidence and prognosis of dysnatremias present on ICU admission [J]. Intensive Care Med，2010，36（2）：304-311.
[33] Kinugawa K，Sato N，Inomata T，et al. Novel risk score efficiently prevents tolvaptan-induced hypernatremic events in patients with heart failure [J]. Circ J，2018，82（5）：1344-1350.
[34] Torres VE，Chapman AB，Devuyst O，et al. TEMPO 3：4 Trial investigators. tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. N Engl J Med，2012，367（25）：2407-2418.
[35] Watkins PB，Lewis JH，Kaplowitz N，et al. Clinical pattern of tolvaptan-associated liver injury in subjects with autosomal dominant polycystic kidney disease：Analysis of clinical trials database [J]. Drug Saf，2015，38（11）：1103-1113.
[36] Yu LC，Mao YM，Chen CW. The guideline of drug-induced liver injury [J]. J Prac Hepatol，2017，20（2）：257-274
[37] Slizgi JR，Lu Y，Brouwer KR，et al. Inhibition of human hepatic bile acid transporters by tolvaptan and metabolites：Contributing factors to drug-induced liver injury? [J]. Toxicol Sci，2016，149（1）：237-250.
[38] Wu Y，Beland FA，Chen S，et al. Mechanisms of tolvaptan-induced toxicity in HepG2 cells [J]. Biochemical Pharmacology，2015，95（4）：324-336.

（收稿日期：2021-06-03；修回日期：2021-07-27）

蒲地蓝消炎制剂致肝损伤 8 例并文献复习

刘金春[1, 2]，张帆[3]，陈重[3]，房其军[4]，张海霞[1, 2*]（南京鼓楼医院，1. 药学部，2. 南京临床药学中心，3. 感染科，4. 中医科，南京 210008）

摘要：目的 探索蒲地蓝消炎制剂的肝脏毒性，促进临床合理用药。**方法** 收集本院 2020 年 1 月－2021 年 8 月因服用蒲地蓝消炎制剂出现肝损伤的患者 8 例。根据药物性肝损伤 Roussel Uclaf 因果关系评估量表进行评分，通过临床资料分析受损靶细胞的临床分型、严重程度分级及患者预后，并探讨蒲地蓝消炎制剂致肝损伤的可能原因、临床特征及危险因素。**结果** 8 例患者 RUCAM 评分为 6～8 分，均为肝细胞损伤型，其中 2 例轻度，2 例中度，4 例重度，经治疗后均临床治愈。中药黄芩具有潜在的肝毒性，可能是蒲地蓝消炎制剂肝毒性的病因。女性、过敏体质、联合使用其他肝损伤药物以及违背中医辨证论治可能是蒲地蓝消炎制剂肝损伤的风险因素。**结论** 临床医师和药师应重视蒲地蓝消炎制剂潜在的肝毒性，在临床使用过程中，医师应遵循中医辨证论治原则，并在用药过程中严密监测患者肝功能指标。

关键词：蒲地蓝；药物性肝损伤；黄芩；肝功能
中图分类号：R969.3，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)12-2710-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.045

8 cases of liver injury caused by Pudilan anti-inflammatory preparations and literature review

LIU Jin-chun[1, 2], ZHANG Fan[3], CHEN Zhong[3], FANG Qi-jun[4], ZHANG Hai-xia[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, 2. *Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy*, 3. *Department of Infectious Disease*, 4. *Department of Traditional Chinese Medicine*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To determine the liver toxicity of Pudilan anti-inflammatory preparations to promote clinical rational drug use. **Methods** Totally 8 cases of liver injury induced by Pudilan anti-inflammatory preparations were collected in our hospital from January 2020 to August 2021. Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM) was used to assess the causality between the drug and the liver injury. The clinical classification, severity and prognosis of 8 patients with liver injury were analyzed based on the clinical data. In addition, the possible causes, clinical characteristics and risk factors of liver injury caused by Pudilan anti-inflammatory preparations were determined through literature review. **Results** The RUCAM scores of the 8 patients were 6 to 8 points, all of whom showed hepatocellular pattern, including 2 of mild degree, 2 of moderate degree and 4 of severe degree. After appropriate treatment, all the patients recovered. Literature review found that Scutellariae Radix had potential hepatotoxicity, which may be the cause of hepatotoxicity of Pudilan anti-inflammatory preparations. Female, anaphylaxis, joint use of other hepatotoxic drugs, and violations of traditional Chinese medicine syndrome differentiation treatment might be the risk factors for liver injury in Pudilan anti-inflammatory preparations. **Conclusion** Clinicians and pharmacists should pay attention to the potential hepatotoxicity of Pudilan anti-inflammatory preparations. During the clinical use of Pudilan anti-inflammatory preparations, physicians should follow the principles of traditional Chinese medicine syndrome differentiation treatment, and closely monitor the liver function indexes of patients.

Key words: Pudilan; drug-induced liver injury; Scutellariae Radix; liver function

基金项目：南京大学医院管理研究所课题项目和南京鼓楼医院医学发展医疗救助基金会资助项目（No.NDYG2020052）；中国毒理学会临床毒理专项研究课题（No.CST2019CT305）。

作者简介：刘金春，男，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：liujinchun@njglyy.com *通信作者：张海霞，女，副主任中药师，主要从事临床药学工作，E-mail：zhx_510@hotmail.com

药物性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）是最常见和最严重的药物不良反应（adverse drug reaction，ADR）之一[1]，重者可致急性肝衰竭（acute liver injury，ALF）[2]，甚至死亡或需要肝移植才能存活[3]。一项关于 DILI 的系统回顾和荟萃分析显示，在东方国家草药是导致 DILI 最常见的病因之一，占 25.3%[4]。蒲地蓝消炎制剂由蒲公英、苦地丁、板蓝根和黄芩 4 味中药组成，有清热解毒、抗炎消肿之功，常用剂型包括口服液、片剂和胶囊剂等[5]，其中口服液和胶囊剂被《中国药典》2020 年版收录[6]。在我国，蒲地蓝消炎制剂在医院门、急诊应用非常广泛[7]，特别是在众多中医院，处方量常年位居中成药用量前列[8]。蒲地蓝消炎制剂说明书及专家共识中对于其不良反应的记载为：恶心、呕吐、腹胀、腹痛、腹泻、乏力、头晕、皮疹、瘙痒等[5]，均未提及肝损伤。然而，近年来陆续有一些报道提示蒲地蓝消炎制剂可能存在潜在的肝毒性[9-11]。临床药师在感染科日常药学服务工作中发现疑似诊断或临床诊断为蒲地蓝消炎制剂所致肝损伤患者 8 例，现报告如下。

1 资料与方法

收集南京鼓楼医院感染科 2020 年 1 月—2021 年 8 月收治的因单独或合并服用蒲地蓝消炎制剂出现肝损伤的患者 8 例（病例 1 ～ 8），对患者的性别、年龄、基础疾病、合并用药情况、受损靶细胞的临床分型、肝损伤严重程度分级、DILI 因果关系评价、治疗措施及预后等情况进行综合分析。通过文献复习探索蒲地蓝消炎制剂致肝损伤的可能病因，结合中国知网中报道的 2 例（病例 9 ～ 10）蒲地蓝消炎制剂致肝损伤病例[9-10]，分析蒲地蓝消炎制剂致肝损伤临床特征及危险因素，为临床合理使用蒲地蓝消炎制剂及其所致肝损伤的识别与治疗提供参考依据。

2 结果

2.1 一般情况

10 例肝损伤患者中女性 8 例，男性 2 例；年龄在 22 ～ 66 岁，平均年龄（43.2±14.2）岁，患者基本情况见表 1。

根据中国《药物性肝损伤诊治指南》2015 年版[12]及中国《中草药相关肝损伤临床诊疗指南》2016 年版[13]，患者损伤靶细胞类型分型：9 例为肝细胞损伤型；严重程度分级：3 例轻度，2 例中度，5 例重度；Roussel Uclaf 因果关系评分（Roussel Uclaf Causality Assessment Method，RUCAM）：9 例为“很可能有关”（6 ～ 8 分），1 例为“高度相关”（＞ 8 分）。所有患者入院后均排除病毒性肝炎、酒精性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、自身免疫性肝病、胆道梗阻等其他可能肝损伤病因，患者 1 疑似诊断中草药相关肝损伤（herb-induced liver injury，HILI）；患者 2 ～ 8 及 10 临床诊断 HILI；患者 9 再激发试验阳性，可确诊 HILI。患者初次就诊实验室检查结果见表 2。

3 例患者行肝脏穿刺组织病理活检，患者 4 组织病理镜下见肝小叶、汇管区、中央静脉炎症细胞浸润，汇管区淋巴细胞 - 浆细胞浸润，肝小叶灶性坏死，病理诊断：符合 DILI（F 0，G 2 ～ 3，S 1）；患者 6 组织病理镜下见肝小叶、汇管区、中央静脉炎症细胞浸润，汇管区纤维组织增生，病理诊断：组织学不除外 DILI（F 0，G 0，S 0）；患者 7 组织病理镜下见肝小叶、汇管区、中央静脉炎症细胞浸润，汇管区纤维组织增生，病理诊断：不完全排除 DILI（F 0，G 1，S 0 ～ 1）。10 例患者 RUCAM 评分明细见表 3。

2.2 治疗措施及预后

发现肝损伤后，所有患者均及时停用可疑药物。患者 3 因高血压病长期口服的缬沙坦胶囊、美托洛尔片及患者 4 因睡眠障碍长期口服的艾司唑仑片考虑与本次 DILI 无相关性，未停用。所有患者入院后给予保肝药物治疗，合并高胆红素血症的患者同时给予利胆药物治疗，其中患者 5 接受人工肝血浆置换治疗 3 次。8 例患者预后良好，无患者出现肝衰竭或死亡，其中 4 例患者在两周内肝功能指标恢复正常或达到出院标准，2 例患者 21 ～ 30 d 内达到出院标准，仅患者 4 住院时间超过 30 d。门诊后续随访显示，患者 1 肝功能指标好转后失访，患者 2 ～ 8 于肝炎门诊随访至肝功能完全恢复正常，肝功能指标恢复平均时间为（51.7±38.6）d（18 ～ 127 d）。

3 讨论

3.1 蒲地蓝消炎制剂致肝损伤的原因分析

蒲地蓝消炎制剂说明书、专家共识及中国 HepaTox 网站（http：//www.hepatox.org）均未记载肝损伤不良反应。有限的关于蒲地蓝消炎制剂致肝损伤病例报道中也未叙述可能的原因[9-10]。根据《亚太肝脏研究协会药物性肝损伤共识指南》及《欧洲肝病学会药物性肝损伤临床实践指南》等权威指南，中草药和膳食补充剂所致肝损伤属于特异质型 DILI，临床医师需认识到草药和膳食补充剂是引起肝损伤的潜在相关致病因素[14-15]。

蒲地蓝消炎制剂由蒲公英、苦地丁、板蓝根和黄芩 4 味中药组成，其中蒲公英、苦地丁和板蓝根未见肝毒性报道，而关于黄芩及其相关制剂的肝毒性近年来多有报道。Yang 等[16]报道了 1 例使用中国草药黄芩再次激发后出现复发性肝损伤

表 1 蒲地蓝消炎制剂致肝损伤情况分析

Tab 1 Liver injury caused by Pudilan anti-inflammatory preparations

No.	性别	年龄 / 岁	剂型	用法用量	发病时间	中医证型	基础疾病	合并用药	受损靶细胞的临床分型	严重程度分级	RUCAM 评分	组织病理	治疗药物	预后	肝功能指标恢复时间
1	男	25	口服液	10 mL tid	14 d	热重于湿	无	感冒灵颗粒、连花清瘟胶囊、板蓝根颗粒	肝细胞损伤型	重度	6	NA	复方甘草酸苷；熊去氧胆酸；腺苷蛋氨酸	好转	失访
2	女	57	口服液	10 mL tid	2 d	热重于湿	过敏性哮喘、高脂血症	参松养心胶囊	肝细胞损伤型	轻度	6	NA	多烯磷脂酰胆碱；还原型谷胱甘肽	治愈	32 d
3	女	49	口服液	10 mL bid	1 d	热重于湿	高血压病、高脂血症	缬沙坦胶囊、美托洛尔片	肝细胞损伤型	重度	6	NA	还原型谷胱甘肽；多烯磷脂酰胆碱；水飞蓟素；熊去氧胆酸	治愈	35 d
4	女	66	口服液	10 mL tid	6 d	脾虚湿滞	双肾囊肿、贫血、高胆固醇血症、糜烂性胃炎	艾司唑仑片、草药（春柴胡、当归、黄芪、金银花）	肝细胞损伤型	重度	7	药物性肝炎	异甘草酸镁；还原型谷胱甘肽；双环醇；腺苷蛋氨酸；熊去氧胆酸	治愈	127 d
5	女	52	口服液	10 mL tid	180 d	热重于湿	声带息肉	金嗓开音胶囊、金嗓散结胶囊	肝细胞损伤型	重度	6	NA	还原型谷胱甘肽；异甘草酸镁；苦黄；熊去氧胆酸；腺苷蛋氨酸	治愈	81 d
6	女	39	口服液	10 mL tid	7 d	热重于湿	无	无	肝细胞损伤型	轻度	7	药物性肝炎	双环醇；还原型谷胱甘肽；异甘草酸镁；熊去氧胆酸	治愈	37 d
7	女	46	片剂	1.4 g tid	6 d	热重于湿	贫血	无	肝细胞损伤型	中度	8	药物性肝炎	异甘草酸镁；还原型谷胱甘肽；水飞蓟素；腺苷蛋氨酸	治愈	18 d
8	男	46	片剂	1.05 g tid	2 d	湿重于热	无	无	肝细胞损伤型	中度	7	NA	还原型谷胱甘肽；苦黄；当飞利肝宁；双环醇	治愈	32 d
9	女	22	口服液	NA	30 d	NA	颈部淋巴结肿大	无	无法判断	重度	11	NA	水飞蓟素；甘草酸二铵；苦黄；还原型谷胱甘肽；复合辅酶；促肝细胞生长素	治愈	无数据
10	女	30	口服液	NA	2 d	NA	无	无	肝细胞损伤型	轻度	7	NA	水飞蓟宾；门冬氨酸鸟氨酸；还原性谷胱甘肽；乙酰谷酰胺	好转	无数据

注（Note）：NA . 表示无资料（Means that the data cannot be obtained）。

表 2 患者初次就诊实验室检查结果

Tab 2 Laboratory examinations of the patients at initial diagnosis

No.	谷丙转氨酶 /（U•L^{-1}）	谷草转氨酶 /（U•L^{-1}）	碱性磷酸酶 /（U•L^{-1}）	总胆红素 /（μmol•L^{-1}）	直接胆红素 /（μmol•L^{-1}）	国际标准化比值
1	1680	878	315.5	95.2	55.2	1.22
2	487.3	676.6	110.7	8.5	1.4	0.95
3	415	132	151.3	101.7	67.3	0.88
4	1023.6	1254	226.7	234	135.4	1.13
5	649	780	169	216	146	1.05
6	559.9	239.7	324.9	37.4	24.8	0.90
7	803	522	411.7	63	22.2	0.95
8	1474.2	808.5	127.4	47.2	17.5	0.95
9	1488	1178	NA	348.6	NA	NA
10	967.7	966.7	228	28.9	10.8	NA

的病例。Mantani 等[17]对其所在医院 2430 例服用含黄芩制剂的门诊病例进行了回顾性分析，共有 1547 例（63.7%）患者进行了肝功能检查，其中有 19 例（1.2%）患者出现肝损伤，不能否认与所服用的黄芩制剂有关。Yan 等[18]在动物实验中探讨了口服黄芩提取物的潜在慢性肝毒性，当使用 2500

表 3　患者 RUCAM 评分 (分)

Tab 3　RUCAM score (分)

计分项目	项目	得分	患者得分									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
服药至起病时间	初次用药 5 ～ 90 d　非初次用药 1 ～ 15 d	＋2	2			2		2	2		2	
	＜ 5 d 或＞ 90 d　＞ 15 d	＋1		1	1		1			1		1
停药至起病时间	≤ 15 d	＋1										
停药后病程	ALT 自峰值的幅度											
	8 d 内下降 ≥ 50% ULN	＋3	3	3		3	3		3	3	3	3
	30 d 内下降 ≥ 50% ULN	＋2			2			2				
	＞ 30 d 后下降 ≥ 50% ULN	＋0										
	＞ 30 d 后下降＜ 50% ULN	－2										
危险因素	有饮酒	＋1										
	无饮酒	＋0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
年龄	≥ 55 岁	＋1		1		1						
	＜ 55 岁	＋0	0		0		0	0	0	0	0	0
其他药物	无合并用药或缺少相关资料	＋0			0			0	0	0	0	0
	有合并用药且时间有提示性	－1					－1					
	肝毒性药物且时间有提示性	－2	－2	－2		－2						
	有其他致肝损伤证据的药物（如再激发反应阳性）	－3										
其他原因	完全排除组 Ⅰ* 及组 Ⅱ#	＋2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	完全排除组 Ⅰ	＋1										
	排除组 Ⅰ 中 4 ～ 5 项	＋0										
	排除组 Ⅰ 中不足 4 项	－2										
	非药物性因素可能性高	－3										
既往信息	产品说明有相关记载	＋2										
	有文献报告，但产品说明无记载	＋1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	未知	＋0										
药物再激发反应	阳性	＋3									3	
	可疑阳性	＋1										
	阴性	－2										
	未做或无法判断	＋0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
总分			6	6	6	7	6	7	8	7	11	7

注（Note）：判断标准：＞ 8 分高度相关；6 ～ 8 分很可能有关；3 ～ 5 分可能有关；1 ～ 2 分可能无关；≤ 0 分无关；*组Ⅰ包括甲型肝炎，乙型肝炎，丙型肝炎（急性），胆道梗阻，酒精中毒，两周内有低血压、休克或肝脏缺血史；#组Ⅱ包括自身免疫性疾病，巨细胞病毒，EB 病毒，疱疹病毒感染（Judgment criteria：＞ 8 points means ‘highly relevant’，6 ～ 8 points means ‘probably relevant’，3 ～ 5 points means ‘possibly relevant’，1 ～ 2 points means ‘possibly irrelevant’，≤ 0 points means ‘irrelevant’. * group I includes hepatitis A，hepatitis B，hepatitis C（acute），biliary obstruction，alcoholism，and a history of hypotension，shock or liver ischemia within 2 weeks；# Group Ⅱ includes autoimmune diseases，cytomegalovirus，Epstein-Barr virus and herpesvirus infection）。

mg/（kg • d）剂量提取物饲喂雄性和雌性大鼠 26 周后，肝组织出现了以白细胞浸润为主的炎症改变，停药后可恢复正常。Chow 等 [19] 综述了 50 篇 PubMed 数据库收录的中国传统草药致肝损伤的研究，所有肝损伤病例均经过 RUCAM 评估法确定因果关系，其中有 23 例与黄芩有关。Shii 等 [20] 采用高效液相色谱法测定了在日本批准上市的 28 种含黄芩的汉方煎液中黄芩苷的日剂量含量，对比了相应提取物制剂中记载的黄芩苷含量，结果显示汉方煎液中黄芩苷的日剂量是相应提取物制剂的 1.7 ～ 4.0 倍，推测近年来日本含黄芩的汉方煎液导致肝功能障碍不良反应发病频度增加，可能原因是汉方煎液中黄芩苷含量过高。2021 年，Ballotin 等 [21] 对 HILI 进行了系统性综述与分析，在纳入的 936 份病例中，发现了 79 种与 HILI 有关的草药或草药化合物，其中何首乌、绿茶提取物、康宝莱、鸡血藤、黄芩等最常见。尽管，黄芩在诸多细胞和动物模型研究中显示良好的抗炎、抗氧化、保肝功效 [22-24]，并且其主要成分之一的黄芩素在Ⅰ期临床试验中显示出较好的安全性，实验室检查未见肝脏毒性迹象 [25]。但是，鉴于中草药制剂成分复杂、相互作用不明确以及特异质型 DILI 的个体差异性，黄芩制剂的肝毒性应引起处方医师和药师的警惕与重视。

3.2　蒲地蓝消炎制剂致肝损伤的临床特征和预后

中草药开始应用至发生肝损伤的中位时间为 1 ～ 3 个月，HILI 的临床表现无特异性，可以引起目前已知的所有急性、亚急性和慢性肝损伤类型，可以仅表现为无症状的肝脏生化指标异常，部分患者出现胃肠道症状，淤胆患者可出现皮肤和巩

膜黄染、皮肤瘙痒等，少数患者可出现肝外过敏征，严重者可进展为肝衰竭，甚至死亡[13]。文献分析结果显示：HILI 患者女性居多（65.2%），以肝细胞损伤型为主（70%），绝大部分患者临床痊愈（82.8%），有 6.6% 的病例需要肝移植才能存活[21]。根据美国急性肝衰竭研究组（the U.S. Acute Liver Failure Study Group，ALFSG）的数据，相比于固有型 DILI，特异质型 DILI 患者转氨酶中度升高伴黄疸更为明显[26]，出现肝性脑病仅发生在约 1/3 的 ALF 患者中[27]。值得关注的是，虽然特异质型 DILI 相关的 ALF 进展较慢，但往往预后较差[2]，有更高的肝移植率和死亡率[28]。对于疑似 HILI 患者，当肝脏生化指标迅速升高时，应立即停用可疑中草药，根据患者病情予适当的保肝、利胆药物治疗，进展至肝衰竭或肝功能失代偿可考虑人工肝支持，必要时行肝移植治疗，大部分 HILI 患者在停用导致肝损伤中草药后预后较好[13]。本报道中，10 例患者中有 8 例起病时间≤ 14 d，起病相对较急；9 例为肝细胞损伤型，9 例伴胆红素升高，无 ALF 病例，及时停用可疑药物并予对症治疗后，10 例患者生化指标均显著好转，其中 7 例患者门诊随访至生化指标完全恢复正常，临床特征和预后与指南及文献报道基本一致。

3.3 蒲地蓝消炎制剂致肝损伤的危险因素分析

3.3.1 宿主因素 目前，特异质型 DILI 发病机制尚未明确，存在较大的个体差异[21]；宿主因素，包括高龄、女性、饮酒史及基础慢性肝病等是特异质型 DILI 重要的风险因素[26, 29-30]；有文献报道女性是 HILI 的独立危险因素[31]。本文 10 例患者中，8 例为女性，由此可见，女性可能对蒲地蓝消炎制剂的不良反应表现出更高的易感性。

3.3.2 基础疾病 乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒感染、自身免疫性肝病等慢性肝病基础可能增加患者对 DILI 的易感性[12]。另外，过敏体质或药物过敏史是中药制剂不良反应常见的影响因素[32]；蒲地蓝消炎制剂说明书在“注意事项”一栏中亦明确指出“过敏体质者慎用”。本文 10 例患者均无慢性肝病基础，其中病例 2 合并过敏性哮喘病史，有可能增加不良反应的发生风险。

3.3.3 联合用药 药物相互作用是临床上 DILI 风险增加不容忽视的因素，联合服用潜在的肝毒性药物与 DILI 的风险增加有关[33]。有研究表明，同时使用可导致肝损伤的药物可能会导致危险相关分子模式（danger-associated molecular patterns，DAMPs）的释放，这可能会增强适应性免疫反应，并增加联合用药引起特异质型 DILI 的风险[34]。本文有 2 例患者联合使用肝毒性的药物，病例 1 联合使用感冒宁颗粒（含对乙酰氨基酚[26]），病例 4 合并使用草药汤剂（含柴胡[35]），可能增加了患者出现肝损伤的风险。

3.3.4 不合理用药 2011 年，国家中医药管理局出台的《中药处方格式及书写规范》指出，医师开具中药处方时，应当以中医药理论为指导，体现辨证论治和配伍原则。临床使用中成药及中药注射剂时，应建立在中医理论基础之上，注意严格掌握适应证与禁忌证[36]。蒲地蓝的功效长于清热解毒，利咽消肿，适用于热毒壅盛证引起的咽喉肿痛[5]。由此可见，就常见的上呼吸道感染而言，如果是风寒外束或是虚体感冒均不适宜使用蒲地蓝消炎制剂。蒲地蓝消炎制剂说明书中也明确指出“脾胃虚寒者慎用”。另有研究表明，自行用药、超量用药是清热类中药不良反应 / 事件发生的最主要原因[37]。本文 10 例患者有 6 例自行用药，其中 4 例因“上呼吸道感染”，1 例因“足癣”，1 例因“颈部淋巴结肿大”。不仅违背了中医辨证论治的理念，自行服用蒲地蓝消炎制剂也可能增加肝损伤等不良反应发生的风险。

4 总结

蒲地蓝消炎制剂存在潜在的肝毒性，其组方中的黄芩可能是导致肝毒性的原因。在临床诊疗中，医师应遵循中医辨证论治原则，在开具中药及其相关制剂时应做到“晰药性、合医理、重安全、有告知”，需认识到中草药及其相关制剂是引起肝损伤的潜在相关致病因素，能够及时识别与正确处理 HILI，并加强患者的健康宣教。

参考文献

[1] Tujios SR，Lee WM. Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs：Challenges in diagnosis and therapy [J]. Liver Int，2018，38（1）：6-14.

[2] Kakisaka K，Suzuki Y，Jinnouchi Y，et al. Unfavorable prognosis of patients with acute liver injury due to drug-induced liver injury and acute exacerbation of hepatitis B virus infection [J]. Hepatol Res，2019，49（11）：1286-1293.

[3] Reuben A，Tillman H，Fontana RJ，et al. Outcomes in adults with acute liver failure between 1998 and 2013：An observational cohort study [J]. Ann Intern Med，2016，164（11）：724-732.

[4] Low E，Zheng Q，Chan E，et al. Drug induced liver injury：East versus west-a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Mol Hepatol，2020，26（2）：142-154.

[5] 王连心，苗青，谢雁鸣，等 . 蒲地蓝消炎口服液临床应用专家共识 [J]. 中国中药杂志，2019，44（24）：5277-5281.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1787-1788.

[7] 薛春苗，王艳梅，王莹，等 . 基于真实世界处方信息的蒲地蓝消炎口服液临床应用调查研究 [J]. 临床药物治疗

杂志，2019，17（5）：77-80.
[8] 戴丹萍，李晓笑，蒋敏红，等 . 2017 ～ 2019 年我院儿科住院患儿中成药临床应用分析 [J]. 中医药管理杂志，2020，28（21）：67-69.
[9] 汪铮，张波，曹弘 . 蒲地蓝口服液致急性药物性肝炎 1 例 [J]. 医药前沿，2011，1（23）：183-184.
[10] 陈万杰 . 蒲地蓝消炎口服液致药物性肝损伤的临床分析 [J]. 临床医药文献杂志，2018，5（101）：148-151.
[11] 戎萍，潘桂贽，王昕，等 . 蒲地蓝消炎口服液不良反应报告率的 Meta 分析 [J]. 中药药理与临床，2020，36（2）：206-214.
[12] 中华医学会肝病学分会药物性肝病学组 . 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志，2015，23（11）：810-820.
[13] 中华中医药学会肝胆病分会 . 中草药相关肝损伤临床诊疗指南 [J]. 中国中药杂志，2016，41（7）：1165-1171.
[14] Devarbhavi H，Aithal G，Treeprasertsuk S，et al. Drug-induced liver injury：Asia Pacific Association of Study of Liver Consensus Guidelines [J]. Hepatol Int，2021，15（2）：258-282.
[15] Andrade R，Andrade Chair RJ，Aithal GP，et al. EASL clinical practice guidelines：Drug-induced liver injury [J]. J Hepatol，2019，70（6）：1222-1261.
[16] Yang L，Aronsohn A，Hart J，et al. Herbal hepatoxicity from Chinese skullcap：A case report [J]. World J Hepatol，2012，4（7）：231-233.
[17] Mantani N，Oka H，Watanabe T，et al. Incidence of liver injury related to kampo medicine containing scutellaria baicalensis at our clinic [J]. Kampo Med，2017，68（4）：377-381.
[18] Yan Y，Yong Z，Chunying L，et al. Potential chronic liver toxicity in rats orally administered an ethanol extract of Huangqin（*Radix Scutellariae* Baicalensis）[J]. J Tradit Chin Med，2018，38（2）：242-256.
[19] Chow H，So T，Choi C，et al. Literature review of traditional Chinese medicine herbs-induced liver injury from an oncological perspective with RUCAM [J]. Integr Cancer Ther，2019，18：153473541986947.
[20] Shii T，Kuroda M，Shamoto N，et al. An analysis of the ingredients in decoctions and extracts of Kampo medicines：Amounts of baicalin and baicalein in Kampo medicines containing *Scutellariae Radix* [J]. J Japanese Geriatr Soc，2020，57（1）：72-80.
[21] Ballotin VR，Bigarella LG，Brandão ABM，et al. Herb-induced liver injury：Systematic review and meta-analysis [J]. World J Clin Cases，2021，9（20）：5490-5513.
[22] Song JW，Long JY，Xie L，et al. Applications，phytochemistry，pharmacological effects，pharmacokinetics，toxicity of *Scutellaria baicalensis* Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19：A review [J]. Chin Med，2020，15（1）：102-127.
[23] Liao H，Ye J，Gao L，et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines：A comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother，2021，133（3）：110917.
[24] 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.
[25] Li M，Shi A，Pang H，et al. Safety，tolerability，and pharmacokinetics of a single ascending dose of baicalein chewable tablets in healthy subjects [J]. J Ethnopharmacol，2014，156：210-215.
[26] Goldberg DS，Forde KA，Carbonari DM，et al. Population-representative incidence of drug-induced acute liver failure based on an analysis of an integrated health care system [J]. Gastroenterology，2015，148（7）：1353-1361.
[27] Reddy KR，Ellerbe C，Schilsky M，et al. Determinants of outcome among patients with acute liver failure listed for liver transplantation in the United States [J]. Liver Transpl，2016，22（4）：505-515.
[28] Chalasani NP，Maddur H，Russo MW，et al. ACG clinical guideline：Diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Am J Gastroenterol，2021，116（5）：878-898.
[29] Teschke R，Zhu Y，Jing J. Herb-induced liver injury in Asia and current role of RUCAM for causality assessment in 11160 published cases [J]. J Clin Transl Hepatol，2020，8（2）：200-214.
[30] Teschke R，Danan G. Idiosyncratic drug-induced liver injury（DILI）and herb-induced liver injury（HILI）：Diagnostic algorithm based on the quantitative Roussel Uclaf Causality Assessment Method（RUCAM）[J]. Diagnostics（Basel），2021，11（3）：458-471.
[31] Chalasani N，Fontana R，Bonkovsky H，et al. Causes，clinical features，and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States [J]. Gastroenterology，2008，135（6）：1924-1934.
[32] 魏戌，谢雁鸣 . 中药注射剂不良反应的影响因素与发生机制分析 [J]. 中国中药杂志，2012，37（18）：2748-2751.
[33] Yazici C，Mutlu E，Bonkovsky H，et al. Risk factors for severe or fatal drug-induced liver injury from amoxicillin-clavulanic acid [J]. Hepatol Res，2015，45（6）：676-682.
[34] Cho T，Kok LY，Uetrecht J. Testing possible risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury using an amodiaquine mouse model and co-treatment with 1-methyl-d-tryptophan or acetaminophen [J]. ACS Omega，2021，6（7）：4656-4662.
[35] 曹琼 . 柴胡及其复方对肝毒性影响的研究进展 [A]//2011 年全国医药学术论坛交流会暨临床药学与药学服务研究进展培训班论文集 [C]. 太原，2011.
[36] 陈炯华，俞冲，王永炎，等 . 中医辨证论治思维与中药不良反应 / 事件相关性探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志，2010，16（6）：530-531.
[37] 黄胜男，张冰，林志健，等 . 清热类中药的不良反应 / 事件与药学监护 [J]. 长春中医药大学学报，2015，31（4）：701-709.

（收稿日期：2021-06-05；修回日期：2021-08-10）

特利加压素致自主神经功能紊乱 1 例

曹铭晨，胡晓燕，唐宁，杨智威，任炜，汪川，邢晓敏，荆凡波，李蕾*（青岛大学附属医院，山东 青岛 266000）

关键词：特利加压素；不良反应；自主神经功能紊乱；出汗；发热
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2021)12-2716-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.046

1 病例资料

患者，女，56 岁，因 5 d 前无明显诱因出现黑便，伴腹胀及阵发性腹痛，无发热，无恶心、呕吐，无胸闷、憋气，于 2020 年 8 月 12 日于本院急诊内科就诊。上腹部 CT 动态增强扫描见肝左叶及胆囊术后改变、肝脏多发占位介入术后、脾肿大、十二指肠憩室；彩色多普勒超声检查见腹腔积液；核磁共振（MRI）平扫＋增强扫描见肝硬化、脾大并食管胃底静脉曲张。既往有肝恶性肿瘤、乙型肝炎史，无高血压、糖尿病，否认药物、食物过敏史。入院体检：体温 36.5 ℃，脉搏 90 次 • min^{-1}，呼吸 17 次 • min^{-1}，血压 110/63 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），身高 165 cm，体质量 67 kg。生化检查：白细胞计数 3.24×10^{9} • L^{-1}↓，淋巴细胞计数 0.61×10^{9} • L^{-1}↓，红细胞计数 2.56×10^{12} • L^{-1}↓，血红蛋白 86 g • L^{-1}↓，红细胞压积 26.20%↓，平均红细胞体积 102.30 fL↓，淋巴细胞百分率 18.80%↓，单核细胞百分率 10.80%↑，血小板 52×10^{9} • L^{-1}↓，平均血小板体积 11.9 fL↑，红细胞体积分布宽度 59.70 fL↑，血小板比积 0.06%↓，血清谷草转氨酶 141.00 U • L^{-1}↑，血清谷丙转氨酶 116.00 U • L^{-1}↑，白蛋白 23.60 g • L^{-1}↓，总胆红素 94.30 μmol • L^{-1}↑。入院诊断：肝恶性肿瘤、乙型肝炎后肝硬化失代偿期伴腹腔积液、食管胃底静脉曲张破裂出血。

患者入院后治疗方案采用止血、保肝、抑酸、降低门静脉压力等治疗，分别给予注射用泮托拉唑钠（规格为 40 mg/ 支，扬子江药业集团有限公司，批号：20061231）40 mg ＋ 100 mL 0.9% 氯化钠注射液 ivgtt st，异甘草酸镁注射液 G（规格为 50 mg/10 mL，正大天晴药业集团股份有限公司）100 mg ＋ 250 mL 5% 葡萄糖注射液 ivgtt st，注射用矛头蝮蛇血凝酶（规格为 2 U/ 支，蓬莱诺康药业有限公司，批号：2001153）2U iv st，呋塞米注射液（规格为 20 mg/2 mL，河南润弘制药股份有限公司，批号：2001163）20 mg iv st，酚磺乙胺注射液（规格为 500 mg/2 mL，山东方明药业集团股份有限公司，批号：20051872）500 mg iv st，特利加压素（规格为 1 mg/ 支，深圳翰宇药业股份有限公司，批号：1127200506）1 mg iv q6 h。特利加压素静脉注射后约 30 min 后患者自觉全身燥热、周身不适，同时伴随出汗，测量体温正常，停用特利加压素 2 h 后该不良反应得到缓解，因患者仍有出血倾向，且不良反应尚不能完全确认由特利加压素导致，故再次使用该药，不良反应再次出现。笔者查阅上述药物的药品说明书及相关文献资料，发现仅注射用矛头蝮蛇血凝酶说明书中指出可能导致发热、多汗等不良反应且发生率较低，其他药物未发现可能导致类似不良反应的报道。进一步查阅该患者病历，患者于 2020 年 6 月因食管胃底静脉曲张破裂出血就诊于本院急诊内科，给予包括泮托拉唑钠、异甘草酸镁注射液 G、注射用矛头蝮蛇血凝酶、呋塞米注射液、酚磺乙胺注射液的止血、保肝、抑酸治疗方案，期间未发生任何不良反应。本次治疗方案中仅有特利加压素为新增药物，提示该不良反应与特利加压素关联性最高。根据诺氏药物不良反应评估量表，特利加压素药物不良反应评分为 7 分，该患者全身燥热、出汗、周身不适由特利加压素引起的可能性为很可能，结果见表 1。

2 讨论

特利加压素是一种人工合成的前体药物，体内被氨基肽酶水解三甘氨酰基后转化为活性代谢产物[1]，具有释放缓慢、无需持续静脉给药的特点[2]。临床上近年来广泛应用于消化、泌尿、生殖系统出血、感染性休克、门静脉高压症、肝肾综合征、肝硬化合并肝腹水等的治疗。特利加压素的主要作用部位为内脏和皮肤，选择性地作用

作者简介：曹铭晨，男，硕士，药师，主要从事临床药学研究，E-mail：383642665@qq.com *通信作者：李蕾，女，主管护师，主要从事护理学研究，E-mail：lwlry@126.com

表 1　诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	得分情况			
	是	否	未知	评分理由
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告		0		说明书中未记载该 ADR，中外文献未见结论性报告
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	2			使用特利加压素后发生该 ADR
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	1			特利加压素停用后该 ADR 缓解
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	2			再次使用特利加压素后该 ADR 再次发生
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR		2		结合患者病情及其余药物，不存在能单独引起该 ADR 的原因
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现			0	未应用安慰剂
7. 药物在血液或其他体液中是否达毒性浓度			0	未监测药物浓度
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解			0	未改变药物剂量
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应		0		患者先前未曾暴露于同类药物并出现类似反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应		0		未发现存在客观证据
总得分				7 分

于内脏循环动脉血管平滑肌 V_1 受体，收缩内脏血管，降低门静脉血流量及压力，从而控制食管胃底急性静脉曲张破裂出血 [3-5]。特利加压素通过收缩内脏动脉显著增加有效循环血容量，并直接作用于肾单位集合管及球旁细胞受体，使内源性血管收缩系统（交感神经系统及肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统）失活，增加肾血流量和肾小球滤过率，降低肾血管阻力，改善肾功能减少腹水量 [6]。

特利加压素常见的不良反应包括恶心、呕吐、腹痛、腹泻、低钠血症及血压升高等，其他罕见的不良反应包括心律失常、心动变缓、冠状动脉供血不足、心肌梗死、缺血性结肠炎和皮肤坏死等，个别患者还出现支气管肌肉痉挛而导致呼吸困难，或子宫肌肉痉挛，子宫肌肉和子宫内膜的血液循环障碍等 [6-12]。还有部分患者的血清 Na^+ 水平明显降低而导致急性低钠血症，甚至诱发神志异常、癫痫、渗透性脱髓鞘综合征等严重的神经系统不良反应 [9-12]。

人体的自主神经系统不良反应临床表现涉及全身多个系统，患者自觉症状较多，如胸闷憋气、心慌气短、胃肠道不适、失眠健忘、头痛头晕、僵硬发紧、皮肤发热但体温正常、阵热阵汗、皮肤发麻发痒或全身游走性疼痛和异常感觉等 [13-14]。特利加压素药品说明书的不良反应项中指出患者可能会因为血管收缩而出现面部和体表苍白，而周身皮肤发热、出汗通常与局部皮肤毛细血管扩张有关，临床通常不会把这种不良反应与特利加压素相关联。作者查阅近几年文献发现未见类似报道，仅 2016 年有文献指出全身燥热、出汗、周身不适可能是特利加压素新的不良反应，但未详细报道，并指出需要临床继续关注 [15]。特利加压素导致自主神经系统功能紊乱的不良反应原因尚不明确，推测可能有以下几种可能：① 由于特利加压素需要在体内经过酶解作用生成活性代谢物赖氨酸 - 加压素后，继续在肝脏、肾脏和其他组织中被降解，患者肝功能异常导致药物的体内代谢过程改变，造成药物的半衰期延长，分布在组织的药物浓度或血药浓度升高等一系列改变，可能是药物代谢途径异常增加了不良反应的发生风险；② 特利加压素是一种人工合成的多肽类药物，本药品生产相关材料中指出，其合成过程中可能产生 6 种由不同氨基酸序列组成的多肽类杂质 A ～ F，考虑可能这些多肽类杂质造成蛋白质相关的过敏反应；③ Na^+、K^+、Ca^{2+} 等离子平衡在维持人体神经系统静息和兴奋方面发挥重要作用，特利加压素可能导致患者的血清 Na^+ 水平明显降低，同时呋塞米的利尿作用增强异甘草酸镁注射液的排钾作用，易导致血清钾值的下降，此外泮托拉唑钠注射液说明书中也指出其可能导致低钠血症、低钾血症、低钙血症等不良反应，综合以上因素考虑患者体内 K^+、Na^+、Ca^{2+} 等电解质水平的突然改变可能诱发自主神经功能的紊乱。因此，临床医务人员关注特利加压素导致自主神经功能紊乱相关的不良反应，及时发现并积极干预，避免药源性不良反应风险的发生。

参考文献

[1] 张晶巧，祁兴顺 . 特利加压素对肝硬化合并急性上消化道出血患者肾功能的影响 [J]. 临床肝胆病杂志，2020，36（7）：1576.

[2] Moore K，Jamil K，Verleger K，et al. Real-world treatment patterns and outcomes using terlipressin in 203 patients with the hepatorenal syndrome [J]. Aliment Pharmacol Ther，2020，52（2）：351-358.

[3] Bai Z，An Y，Guo X，et al. Role of terlipressin in cirrhotic patients with ascites and without hepatorenal syndrome：A systematic review of current evidence [J]. Can J Gastroenterol Hepatol，2020，2020：5106958.

[4] Li X L，Zhu X D，Xiao N，et al. A prospective study of

the effect of terlipressin on portal vein pressure and clinical outcomes after hepatectomy：A pilot study [J]. Surgery，2020，167（6）：926-932.
[5] Kohler A，Perrodin S，de Gottardi A，et al. Effectiveness of terlipressin for prevention of complications after major liver resection—A randomized placebo-controlled trial [J]. HPB（Oxford），2020，22（6）：884-891.
[6] An Y，Bai Z，Guo X，et al. Effect of terlipressin on renal function in liver cirrhosis with ascites：A pilot study [J]. J Clin Exp Hepatol，2020，10（6）：643-645.
[7] Han X，Li J，Yang J M，et al. A retrospective analysis of hyponatremia during terlipressin treatment in patients with esophageal or gastric variceal bleeding due to portal hypertension [J]. JGH Open，2020，4（3）：368-370.
[8] Xu X，Lin S，Yang Y，et al. Development of hyponatremia after terlipressin in cirrhotic patients with acute gastrointestinal bleeding：A retrospective multicenter observational study [J]. Expert Opin Drug Saf，2020，19（5）：641-647.
[9] Rodriguez R，Cucci M，Kane S，et al. Novel vasopressors in the treatment of vasodilatory shock：A systematic review of angiotensin Ⅱ，selepressin，and terlipressin [J]. J Intensive Care Med，2020，35（4）：327-337.
[10] Schultz J，Andersen A，Lyhne MD，et al. Terlipressin increases systemic and lowers pulmonary arterial pressure in experimental acute pulmonary embolism [J]. Crit Care Med，2020，48（4）：e308-e315.
[11] Arora V，Maiwall R，Rajan V，et al. Terlipressin is superior to noradrenaline in the management of acute kidney injury in acute on chronic liver failure [J]. Hepatology，2020，71（2）：600-610.
[12] Pan X，Zhou Z，Jin X，et al. Clinical characteristics and risk factors of severe hyponatremia in cirrhotic patients treated with terlipressin [J]. J Clin Pharm Ther，2020，45（1）：191-198.
[13] 赵海丹，王健 . 自主神经功能紊乱中医辨证分型 [J]. 辽宁中医药大学学报，2012，14（4）：150-152.
[14] 杨兴全 . 植物神经功能紊乱治疗概述 [J]. 中国民族民间医药，2015，24（3）：39-40.
[15] 王忠英，刘菲菲，刘畅，等 . 11 例特利加压素不良反应分析与护理 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2016，1（5）：141-142.

（收稿日期：2021-05-25；修回日期：2021-07-31）

帕博利珠单抗致免疫相关性重症肌无力 1 例

徐小婷[1]，马芳[2*]，刘文辉[3]，罗芝英[3]，孙宝[3]，刘艺平[3]，叶溪[4]（1. 上饶市人民医院药学部，江西 上饶 334000；2.中南大学湘雅二医院肿瘤中心，长沙 410011；3.中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；4.广西壮族自治区人民医院药学部，南宁 530021）

关键词：胸腺瘤；免疫相关不良反应；PD-1 抑制剂；帕博利珠单抗；重症肌无力
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2021)12-2718-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.12.047

1 临床资料

患者，女，31 岁，身高 160 cm，体质量 42 kg，体表面积 1.49 m^2。既往体健，否认肝炎、结核、疟疾病史，否认高血压、心脏病、高血糖等病史。患者于 2018 年 4 月于当地医院检查发现左纵膈肿物，并于 2018 年 5 月 15 日行左前纵膈肿块扩大切除术，术后病理提示胸腺瘤，肿瘤有弥漫增生的淋巴样细胞与其间散在分布的包浆透亮，含透明核的上皮细胞混合组，符合 B1 型胸腺瘤。术后 1 月余患者左侧眼睑下垂，诊断为重症肌无力（眼肌型），给予新斯的明联合强的松治疗后好转。2018 年 7 月 11 日行调强放疗（DT50 Gy/25 F）。2020 年 6 月 15 日因胸腔种植行左开胸腺瘤转移病症扩大切除术，术后病理：PD-L1（CPS：80）。于 2020 年 8 月 12 日至 10 月 9 日行第 1 ～ 4 周期的化疗联合免疫治疗：环磷酰胺 1000 mg ivgtt d1 ＋多柔吡星 40 mg ivgtt d1 ＋顺铂 105 mg ivgtt d1 ＋帕博利珠单抗 100 mg ivgtt d1 q21 d。11 月 9 日和 11 月 30 日分别行第 1 和第 2 周期免疫维持治疗：帕博利珠单抗 100 mg ivgtt d1 q21 d。

患者在行第 2 周期免疫维持治疗后，出现咳嗽、咳痰，并感饮流质时易从鼻孔反流。11 月 30 号肺部 CT：双肺散在多发结节灶，左侧胸

作者简介：徐小婷，女，主要从事临床药学方面的研究，E-mail：920434389@qq.com *通信作者：马芳，女，博士，副主任医师，主要从事胸部肿瘤的研究，E-mail：fangma@csu.edu.cn

膜增厚。12 月 9 日因咳嗽、咳痰加重伴气促入院。查体：体温 36.3 ℃，脉搏 108 次 • min^{-1}，呼 吸 20 次 • min^{-1}，血 压 109/86 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。实验室检查：白细胞计数 6.65×10^{9} • L^{-1}，中性粒细胞比值 83.70% ↑，淋巴细胞计数 0.54×10^{9} • L^{-1} ↓，淋巴细胞比值 8.10% ↓，血沉 81 mm • h^{-1} ↑，C 反应蛋白 10.40 mg•L^{-1} ↑，真菌、结核杆菌、巨细胞病毒、流感病毒等病原学检查无明显异常。肺功能：（用药后）用力肺活量 1.79 L ↓，一秒用力呼气容积 1.54 L，一秒用力呼气量占用力肺活量比值 86%。中重度限制性通气功能障碍，肺弥散功能轻度损害，支气管舒张试验阴性。予以左氧氟沙星注射液 0.5 g ivgtt qd。2020 年 12 月 11 日肺部 CT：双肺弥漫微结节及多发渗出、实变，较前稍进展。患者咳嗽咳痰症状大致同前，改用哌拉西林舒巴坦钠 4.5 g ivgtt bid。12 月 13 日痰培养：大肠埃希菌＋＋＋，哌拉西林舒巴坦敏感，继续当前方案抗感染治疗。12 月 16 日患者诉晚夜间阵发性咳嗽，复查肺部 CT：双肺弥漫小气道结节及多发渗出、实变，较前稍进展；12 月 17 日患者感说话较前含糊、口唇咽喉及四肢无力（活动后更明显）感加重自行挂神经内科门诊就诊，考虑重症肌无力可能性大，予以溴吡斯的明 60 mg po tid。12 月 18 日患者仍诉乏力明显，夜间咳嗽加重，考虑患者有 PD-1 抑制剂的用药史，免疫检查点抑制剂相关性肺炎及相关性重症肌无力可能性大，停用哌拉西林舒巴坦钠，予以甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg ivgtt qd。12 月 21 日肺部 CT：双肺弥漫小气道结节较前稍好转；右肺上叶新增多发片状磨玻璃影，考虑感染可能性大。给予美罗培南 1 g ivgtt q8 h。12 月 25 日：白细胞计数 12.14×10^{9} • L^{-1} ↑，中性粒细胞比值 97.30% ↑，血沉 61 mm • h^{-1} ↑，C 反应蛋白 9.69 mg • L^{-1} ↑，患者仍诉咳嗽，活动后心率增快，心率 128 次 • min^{-1} ↑，氧饱和度波动在 90% 左右；说话含糊、口唇咽喉及四肢无力感加重；院外检测的神经肌肉接头抗体兰尼碱受体钙释放通道抗体：阳性；乙酰胆碱受体抗体：10.63 nmol • L^{-1} ↑（参考值＜ 0.45 nmol • L^{-1}），结合患者症状及抗体检查结果，“重症肌无力”诊断明确。考虑患者肺部病变在抗菌药物及激素处理后仍有进展，说话、咽喉部吞咽及四肢无力较前困难，12 月 26 日予以静注人免疫球蛋白（pH 4）20 g ivgtt qd（连用 5 d）。6 d 后患者咳嗽咳痰好转，吞咽困难均较前好转。2021 年 1 月 1 日，将甲泼尼龙琥珀酸钠减量至 60 mg ivgtt qd。1 月 4 日肺部 CT：左肺下叶术区纤维索条较前好转，双肺弥漫小气道结节较前减少，右肺上叶多发片状磨玻璃影较前减少。白细胞计数 6.15×10^{9} • L^{-1}，中性粒细胞比值 72.7%，血沉 62 mm • h^{-1} ↑，C 反应蛋白 1.07 mg • L^{-1}。1 月 6 日患者感咳嗽、吞咽困难及四肢肌力状态较前明显好转，予以出院。出院带药：甲泼尼龙片 40 mg po qd，每周减 8 mg；头孢呋辛酯片 250 mg po bid。

2 讨论

2.1 免疫相关不良反应和胸腺瘤

PD-1 抑制剂通过免疫检查点 PD-1/PD-L1 通路，激活效应 T 细胞，在发挥抗肿瘤作用的同时也伴有免疫相关不良反应（irAEs）的发生 [1]。irAEs 常发生在皮肤、内分泌、肝脏、胃肠道、肺、类风湿性 / 骨骼肌等器官，还可发生在神经、血液、肾脏及心脏等部位 [2]。其中神经毒性较罕见，如脑炎、重症肌无力和格林巴利综合征等，且早期如未及时诊治将导致严重后果 [3-4]。重症肌无力属于神经系统免疫性疾病中较严重的一种，在使用帕博利珠单抗的患者中较为罕见（＜ 1%）。由于胸腺瘤发病率低，同时易合并自身免疫性疾病，如重症肌无力 [5-7]，目前尚没有大型临床试验评价免疫检查点抑制剂在胸腺瘤中的安全性。唯一一项使用帕博利珠单抗治疗胸腺上皮肿瘤的Ⅱ期临床试验，因在研究早期 irAEs 的高发病率（71.4%，5 例，其中 1 例肌无力），该试验修改了研究方案，停止纳入胸腺瘤患者 [8]。检索 PubMed 和中国知网截至 2021 年 6 月 30 日的案例，共报道帕博利珠单抗治疗胸腺瘤患者 9 例 [9-16]，77.8%（7 例）患者出现了 3 级以上的 irAEs，其中 33.3%（3 例）出现免疫相关性重症肌无力。可以看出，胸腺瘤患者的 irAEs 较其他恶性肿瘤的发生率要高，其中包括免疫相关性重症肌无力。

2.2 导致该患者重症肌无力的可能因素

患者两年行左前纵膈肿块切除术后发现眼肌型重症肌无力，此次免疫治疗后患者诉说话、咽喉部吞咽及四肢无力，并发现抗乙酰胆碱受体抗体受体水平升高，被诊断为重症肌无力，很可能是胸腺瘤和 PD-1 抑制剂两种因素共同影响的结果。因为在胸腺瘤中，肿瘤性胸腺上皮有可能诱导未成熟 $CD4^{+}CD8^{+}CD3^{+}$ 淋巴细胞分化为 $CD4^{+}CD8^{-}$ 或 $CD4^{-}CD8^{+}$ 自身反应性淋巴细胞，鉴于胸腺瘤中缺乏功能性胸腺髓质，导致这些自身反应性细胞在循环中逃逸，进而产生自身免疫现象；此外，肿瘤性胸腺细胞会导致 HLA-A24 和 HLA-B8 水平增加，这也被证明能够增加胸腺瘤患者自身免疫风险 [5]。另一方面就是药物因素，有报道显示：PD-1/PD-L1 抑制剂能够激活效应 T

细胞，进而引起肿瘤细胞凋亡并释放大量的自身抗原或新抗原，导致 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ Th 细胞的异常活化；同时通过抑制 Foxp3 的表达，引起调节性 T 细胞功能衰减，诱导自身免疫激活，导致器官损伤 [6]。

2.3 免疫相关不良反应的防治

在治疗上，患者因咳嗽、咳痰，饮流质时易从鼻孔反流等症状入院，使用抗菌药物与抗胆碱药物治疗后症状逐渐加重，根据《免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南》[2] 中免疫相关性肺炎和免疫相关性肌无力分级为 3 ～ 4 级，立即给予激素冲击治疗。8 d 后患者的咳嗽咳痰明显好转，但是说话及咽喉部吞咽较前困难，甚至出现吞咽呛咳，加用了免疫球蛋白，持续 5 d 后，患者症状明显缓解。一般而言，对于治疗中度或重度 irAEs 需要中断 PD-1 抑制剂治疗，并使用糖皮质激素进行免疫抑制 [17-19]。而对于肌无力或肌无力危象患者需要同时考虑合并使用免疫球蛋白、血浆置换、依库丽单抗、利妥昔单抗或甲氨蝶呤 [20]。此外，有报道表示：虽然免疫球蛋白与血浆置换治疗肌无力危象同样有效，但血浆置换对乙酰胆碱受体抗体阳性的肌无力患者起效更快，效果更好 [21]。目前，没有证据支持或反驳在开始 PD-1 抑制剂治疗前对无重症肌无力患者进行抗乙酰胆碱受体抗体检测的效用。在临床中对既往存在肌无力或抗乙酰胆碱受体抗体阳性的胸腺瘤患者进行治疗时，在排除了其他治疗（比如分子靶向治疗、化疗等）的可能性之后，如果患者考虑接受免疫治疗，必须充分告知可能存在的风险，在权衡风险与获益的前提下进行免疫治疗。

参考文献

[1] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.

[2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 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 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：1-116.

[3] Spain L，Walls G，Julve M，et al. Neurotoxicity from immune-checkpoint inhibition in the treatment of melanoma：A single centre experience and review of the literature [J]. Ann Oncol，2017，28（2）：377-385.

[4] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：A systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.

[5] 谈仪炯，林洁，许蒙，等 . PD-1 抑制剂导致神经系统不良反应的报道及相关分析 [J]. 中南药学，2020，173（6）：187-190.

[6] Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision [J]. Nat Rev Immunol，2002，2（5）：309-322.

[7] Blum TG，Misch D，Kollmeier J，et al. Autoimmune disorders and paraneoplastic syndromes in thymoma [J]. J Thorac Dis，2020，12（12）：7571-7590.

[8] Cho J，Kim HS，Ku BM，et al. Pembrolizumab for patients with refractory or relapsed thymic epithelial tumor：An open-label phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2019，37（24）：2162-2170.

[9] Shen L，Chen HY，Wei QC. Immune-therapy-related toxicity events and dramatic remission after a single dose of pembrolizumab treatment in metastatic thymoma：A case report [J]. Front Immunol，2021，12（621858）：1-6.

[10] Hachisuka Yk，Fujioka Sj，Uomoto Ms. A case of recurrent thymoma treated with pembrolizumab as the fifth-Line chemotherapy [J]. Gan To Kagaku Ryoho，2020，47（10）：1485-1487.

[11] 龙浪，罗锋，王力，等 . PD-1 抑制剂治疗复发难治性胸腺瘤 1 例报道及文献复习 [J]. 现代肿瘤医学，2020，28（17）：2977-2981.

[12] Argentiero A，Solimando AG，Ungaro V，et al. Case report：Lymphocytosis associated with fatal hepatitis in a thymoma patient treated with anti-PD1：New insight into the immune-related storm [J]. Front Oncol，2020，10（583781）：1-8.

[13] Thilo Z，Stefan A，Anna CR，et al. Response to pembrolizumab in a patient with relapsing thymoma [J]. J Thorac Oncol，2016，11（12）：147-149.

[14] Konstantina T，Konstantinos R，Anastasios K，et al. Fatal adverse events in two thymoma patients treated with anti-PD-1 immune check point inhibitor and literature review [J]. Lung Cancer，2019，135（1）：29-32.

[15] Hyun JW，Kim GS，Kim SH，et al. Fatal simultaneous multi-organ failure following pembrolizumab treatment for refractory thymoma [J]. Clin Lung Cancer，2019，21（2）：e74-e77.

[16] Ji HS，Choi YJ，Lee J，et al. Pembrolizumab induced myasthenic crisis with hyperCKemia in a patient with thymoma [J]. J Clin Neurolo，2020，16（3）：497-498.

[17] Shirai T，Sano T，Kamijo F，et al. Acetylcholine receptor binding antibody-associated myasthenia gravis and rhabdomyolysis induced by nivolumab in a patient with melanoma [J]. Jpn J Clin Oncol，2016，46（1）：86-88.

[18] Suzuki S，Ishikawa N，Konoeda F，et al. Myasthenic crisis and polymyositis induced by one dose of nivolumab [J]. Neurology，2017，89（11）：1127-1134.

[19] 中华医学会呼吸病学分会肺癌学组 . 免疫检查点抑制剂相关肺炎诊治专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2019，42（11）：820-825.

[20] Narayanaswami P，Sanders DB，Wolfe G，et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis [J]. Neurology，2021，96（3）：114-122.

[21] Dhawan PS，Goodman BP，Harper CM，et al. IVIG versus PLEX in the treatment of worsening myasthenia gravis：What is the evidence?：A critically appraised topic [J]. Neurologist，2015，19（5）：145-148.

（收稿日期：2021-05-12；修回日期：2021-08-07）