中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 2 期（总第 193 期）　2022 年 2 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

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 25.00 元，全年 300.00 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

email：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

2022 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

研究论文

（239）基于指纹图谱和网络药理学的木蝴蝶质量标志物预测分析 …… 赵淼，包永睿，王帅，等

（247）基于深度学习的化学结构识别研究 …… 蚁佳才，张小琛，刘丹

（254）膜分离技术与传统工艺联合对山茱萸皂苷的分离纯化 …… 黎叶凡，朱华旭，唐志书，等

（261）血塞通滴丸整合溶出度测定方法的建立 …… 闫伟伟，罗慧玉，唐殿飞，等

（266）巨噬细胞外泌体 - 脂质体杂化纳米粒的制备及表征 …… 鲍倩倩，王强，桑冉，等

（271）雷公藤甲素二元醇质体的制备及评价 …… 管咏梅，杨丽娜，胡育森，等

（278）基于网络药理学和动物实验探讨红曲治疗脑小血管病的作用机制 …… 孙纪，苏恒，聊晓玉，等

（284）共载 GNA 和 PLHSpT 脂质立方液晶纳米粒的制备、表征以及体外抗肿瘤活性研究 …… 魏晴，林彤远，王强，等

（291）地龙对肺炎支原体感染小鼠肺组织中表皮生长因子 EGF 表达的影响 …… 梁明川，蒙艳丽，王晓溪，等

（297）黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠的抗炎作用及机制研究 …… 郑东梅，王星晨，张莹，等

（304）基于层次分析法 - 熵权法评价不同种类黄酒对酒当归饮片的影响 …… 杨子烨，张桂梅，王佩华，等

（310）Box-Behnken 设计 - 响应面法优化木瓜标准汤剂的制备工艺 …… 聂淞莹，唐海明，汪鋆植，等

（315）葡萄籽原花青素柔质体凝胶剂的制备工艺研究 …… 窦晨，潘蕊，赵声兰，等

（323）基于网络药理学与实验研究探讨 β- 葡聚糖治疗 S180 腹水瘤的作用机制 …… 杨文卿，姜涛，程路峰

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编

王　玉　向大雄　刘芳群　刘　韶
孙国祥　孙铁民　苏薇薇　张毕奎
范国荣　赵志刚　原永芳　潘卫三

编委（按姓氏笔画排列）

丁劲松　于海洋　马恩龙　王　玉
王立辉　王永军　王　珊　王淑梅
文晓柯　方平飞　尹　桃　邓银华
左美玲　左笑丛　卢海儒　史志华
冯　星　边　原　吕永宁　朱运贵
向大雄　刘芳群　刘茂柏　刘建平
刘高峰　刘塔斯　刘雁鸣　刘　韶
汤海峰　孙平华　孙　进　孙国祥
孙铁民　劳海燕　苏薇薇　李文龙
李文莉　李　昕　李顺祥　李　勇
李晓宇　李健和　李湘平　杨志平
杨星钢　杨献文　肖贵南　肖　雪
何江江　何鸽飞　余自成　谷福根
张毕奎　张　俐　张洪文　张　峻
陈　力　陈卫东　陈西敬　陈勇川
陈　琦　陈　碧　武新安　范国荣
金鹏飞　周　权　屈　建　孟宪生
赵立波　赵志刚　姜德建　娄月芬
宫　建　祝德秋　秦红岩　袁　成
袁　易　贾素洁　夏道宗　原永芳
徐必学　徐　斑　徐　萍　高利臣
郭　韧　郭怀忠　郭建军　唐　芳
曹　玲　常福厚　巢志茂　彭文兴
董亚琳　董得时　蒋孟良　傅　强
温金华　谢　诚　谢奕丹　睢大筵
肇丽梅　翟　青　黎　敏　颜　苗
潘卫三　魏高文

（330）发汗续断中真菌群落的组成分析及其对川续断皂苷Ⅵ积累的影响
…… 周太敏，何华，徐娇，等

（334）药蜀葵中总黄酮提取工艺优化及其生物活性研究
…… 薛涛涛，唐志书，孙强，等

（340）生物发酵菊叶薯蓣富集薯蓣皂苷的研究
…… 崔乃菠，马境谦，余河水，等

（345）鱼子麻黄与普通炮制品煎煮效率比较
…… 朱田密，张亚志，段雪云，等

（349）坤灵丸对卵巢储备功能下降患者体外受精 - 胚胎移植胚胎质量的影响 …… 王海燕，邵小光，王美仙，等

（354）长裂藤黄叶的化学成分研究 …… 王玉婷，于熙，岳佳音，等

（359）柯里拉京对照品的制备及其结构鉴定
…… 郑有德，陈小红，莫太刚，等

（362）匹伐他汀钙光降解杂质的合成 …… 林辉，王正泽，陈慧

（366）全自动二维液相色谱法测定甲氨蝶呤血药浓度及其临床应用
…… 刘加涛，孙小珊，宋帅，等

综述

（371）天然黄酮类化合物改善酒精性肝病作用及机制的研究进展
…… 沈佳妍，徐婧淇，刘淼，等

（382）内皮祖细胞和慢性阻塞性肺疾病 …… 彭淮淮，梁桂宾，何智辉

（388）基于膜技术的中药浓缩研究进展
…… 李金晶，钱大玮，刘红波，等

药物分析与检验

（394）保肾片超高效液相色谱指纹图谱的建立及化学模式识别分析
…… 陆鉴，李金慈，盛华，等

（399）红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱相关性研究 …… 毛小文，祁梅，顾志荣，等

（405）LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 ***N***- 亚硝基二甲胺和 ***N***- 亚硝基二乙胺的含量 …… 杨越莛，郑枫，蔡浒，等

（410）超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱法定性分析枸橼酸莫沙必利中的杂质 …… 王军，邱荣英，郭玉，等

（415）化胃舒颗粒中红参的皂苷类成分含量测定方法及其降解产物研究
…… 辛旭阳，邹桂欣，赵玥，等

青年编委（按姓氏笔画排列）

丁　骁　于世慧　王　刚　王春江
王　洪　方伟进　孔维军　朱志红
刘丽华　刘　宏　刘宏飞　刘剑敏
刘梦扬　孙万阳　孙丙军　孙晓慧
孙　逸　苏　丹　杜恩明　李语玲
李　娟　李新刚　肖朝江　吴成军
邱玉玲　何　艳　邹振兴　张妙红
张纯刚　张　凭　张程亮　陈国宁
陈富超　罗　聪　金　锐　周志旭
赵　亮　赵　娣　胡　楠　姜　雷
贾王平　徐文峰　徐　硕　郭海彪
黄　芳　梅升辉　龚力民　梁光平
寇龙发　蒋跃平　蒋德旗　韩立峰
韩晓芳　韩晓鹏　程汝滨　舒　畅
曾贵荣　蒙光义　廖德华　潘　昊
魏　博

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

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。

药物与临床

（421）Filgotinib 治疗类风湿关节炎疗效及安全性的 meta 分析 …… 赵倩，温瑾，陈瑞祥，等

（429）蒙特卡洛模拟优化左氧氟沙星治疗 6 种细菌感染的给药方案 …… 马攀，刘芳，冯伟，等

药品不良反应信号监测专题

（435）基于 FAERS 数据库的司维拉姆和碳酸镧不良事件信号挖掘研究 …… 吴攀，舒亚民，何绪成，等

（441）唑来膦酸注射液不良反应信号的挖掘与评价 …… 谈仪炯，席宇飞，范国荣，等

（447）钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂类药物相关膀胱癌风险：一项上市后监测数据的真实世界分析 …… 潘晨，曹明楠，马华瑞，等

医院药学

（452）基于 NONMEM 法建立重症患者亚胺培南群体药动学模型 …… 罗雪梅，金路，梁培，等

（456）2015—2020 年湖南省医疗机构肾毒性药物用药情况分析 …… 尹文俊，周凌云，周颖玉，等

（463）肺炎克雷伯菌 RAPD 基因分型及其与氨基糖苷类药敏分型对比研究 …… 罗灿，陈昕怡，王敏，等

（468）腹透相关性腹膜炎患者万古霉素腹腔内给药后的血药浓度影响因素分析 …… 阳巍，黄海花，熊海燕，等

药品不良反应

（473）万古霉素致迟发型药物热合并白细胞与血小板减少 …… 余英琳，彭怀东

（475）曲妥珠单抗治疗乳腺癌致心脏毒性 1 例 …… 阳媛颖，蒋炳涧，李文群，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*238*zh*P*25.0*42*2022-2

本期责任编辑：陆窈窈，彭金飞，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 2 February 20 2022

Consultant
ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief
LI Huan-de

Chief of Editorial Office
ZHANG Bi-Kui

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) 82258487/84895602

Fax
(0731) 82258487

Website of Authors
http://znyx.cbpt.cnki.net

Email
znyxzz2003@vip.163.com

Published by
Central South Pharmacy Publishing House

Advertisement Publishing Certification
4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

(239) Predictive analysis of quality marker of *Oroxylum indicum* based on fingerprint and network pharmacology
…… *ZHAO Miao, BAO Yong-rui, WANG Shuai, et al*

(247) Chemical structure recognition based on deep learning
…… *YI Jia-cai, ZHANG Xiao-chen, LIU Dan*

(254) Isolation and purification of saponins from *Cornus saponins* by traditional process combined with membrane separation technology
…… *LI Ye-fan, ZHU Hua-xu, TANG Zhi-shu, et al*

(261) Determination method for the integrated dissolution of Xuesaitong dropping pills …… *YAN Wei-wei, LUO Hui-yu, TANG Dian-fei, et al*

(266) Preparation and characterization of macrophages derived exosomes-liposomes hybrid nanoparticles
…… *BAO Qian-qian, WANG Qiang, SANG Ran, et al*

(271) Preparation and evaluation of triptolide binary ethosomes
…… *GUAN Yong-mei, YANG Li-na, HU Yu-sen, et al*

(278) Molecular mechanism of red yeast rice for cerebral small vessel diseases based on network pharmacology and animal experiment
…… *SUN Ji, SU Heng, LIAO Xiao-yu, et al*

(284) Preparation, characterization and in vitro antitumor activity of GNA and PLHSpT lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles
…… *WEI Qing, LIN Tong-yuan, WANG Qiang, et al*

(291) Effect of earthworm on the expression of epidermal growth factor in lung tissue of mice infected with mycoplasma pneumoniae
…… *LIANG Ming-chuan, MENG Yan-li, WANG Xiao-xi, et al*

(297) Anti-inflammatory effect of Astragalus membranaceus-Rhizoma Anemarrhenae couplet medicines on rats with pulmonary fibrosis and related mechanism
…… *ZHENG Dong-mei, WANG Xing-chen, ZHANG Ying, et al*

(304) Effect of different rice wine on the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces by analytic hierarchy process-entropy weight method
…… *YANG Zi-ye, ZHANG Gui-mei, WANG Pei-hua, et al*

(310) Optimization of preparation technology of standard decoction of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai by Box-Behnken design and response surface method
…… *NIE Song-ying, TANG Hai-ming, WANG Jun-zhi, 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
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2022 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.

(315) Preparation of grape seed proanthocyanidins flexible nanoliposome gel
……*DOU Chen, PAN Rui, ZHAO Sheng-lan, et al*

(323) Mechanism of *β*-glucan for S180 ascites tumor based on network pharmacology and experimental study
…… *YANG Wen-qing, JIANG Tao,CHENG Lu-feng*

(330) Compositions of fungal community and their effect on asperosaponin Ⅵ accumulation in sweated *Dipsacus asper*
…… *ZHOU Tai-min, HE Hua, XU Jiao, et al*

(335) Extraction optimization and biological activities of total flavonoids from *Althaea officinalis*
……*XUE Tao-tao, TANG Zhi-shu, SUN Qiang, et al*

(340) Enriched dioscin from *Dioscorea composita* Hemsl. by biological fermentation ……*CUI Nai-bo, MA Jing-qian, YU He-shui, et al*

(345) Decoction efficiency of ephedra decoction pieces in the shape of fish roe and commonly processed products
……*ZHU Tian-mi, ZHANG Ya-zhi, DUAN Xue-yun, et al*

(349) Effect of Kunling pill on the embryo quality of patients with diminished ovarian reserve and in vitro fertilization-embryo transfer
…… *WANG Hai-yan, SHAO Xiao-guang, WANG Mei-xian, et al*

(354) Chemical constituents in the leaves of *Garcinia lancilimba*
…… *WANG Yu-ting, YU Xi, YUE Jia-yin, et al*

(359) Preparation and structure identification of corilagin reference substance
…… *ZHENG You-de, CHEN Xiao-hong, MO Tai-gang, et al*

(362) Synthesis of photodegradation impurities from pitavastatin calcium
……*LIN Hui, WANG Zheng-ze, CHEN Hui*

(366) Determination of methotrexate in the plasma by automatic two-dimensional liquid chromatography and its clinical application
…… *LIU Jia-tao, SUN Xiao-shan, SONG Shuai, et al*

(371) Research progress in the effect of natural flavonoids on improving alcoholic liver disease and related mechanism
…… *SHEN Jia-yan, XU Jing-qi, LIU Miao, et al*

(382) Endothelial progenitor cells and chronic obstructive pulmonary disease
…… *PENG Huai-huai, LIANG Gui-bin, HE Zhi-hui*

(388) Research progress in the concentration of traditional Chinese medicine based on membrane technology
…… *LI Jin-jing, QIAN Da-wei, LIU Hong-bo, et al*

(394) UPLC fingerprints and recognition of chemical patterns of Baoshen tablets
…… *LU Yin, LI Jin-ci, SHENG Hua, et al*

(400) Correlation of HPLC fingerprint of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix
…… *MAO Xiao-wen, QI Mei, GU Zhi-rong, et al*

(405) Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in trimethyl phloroglucinol by LC-MS/MS method
…… *YANG Yue-ting, ZHENG Feng, CAI Xu, et al*

(410) Qualitative analysis of impurities in mosapride citrate by UPLC-Q-TOF-MS
…… *WANG Jun, QIU Rong-ying, GUO Yu, et al*

(416) Content determination of ginsenosides and degradation products of red ginseng in Huaweishu granules
…… *XIN Xu-yang, ZOU Gui-xin, ZHAO Yue, et al*

(421) Efficacy and safety of filgotinib for rheumatoid arthritis: a meta analysis
…… *ZHAO Qian, WEN Jin, CHEN Rui-xiang, et al*

(429) Optimization of dose regimen of levofloxacin for 6 bacterial infections based on Monte Carlo simulation
…… *MA Pan, LIU Fang, FENG Wei, et al*

(435) Adverse drug events of sevelamer and lanthanum carbonate based on the FAERS database …… *WU Pan, SHU Ya-min, HE Xu-cheng, et al*

(441) Data mining and evaluation of adverse drug reaction signals of zoledronic acid injection …… *TAN Yi-jiong, XI Yu-fei, FAN Guo-rong, et al*

(447) Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors related bladder cancer: a real-world analysis of post-marketing surveillance data
…… *PAN Chen, CAO Ming-nan, MA Hua-rui, et al*

(452) Population pharmacokinetics of imipenem in critically ill patients based on nonlinear mixed effect model
…… *LUO Xue-mei, JIN Lu, LIANG Pei, et al*

(456) Use of nephrotoxic drugs in medical institutions in Hunan Province from 2015 to 2020 … *YIN Wen-jun, ZHOU Ling-yun, ZHOU Ying-yu, et al*

(463) Typing of *Klebsiella pneumoniae* strains by random amplification of polymorphic DNA and comparison with aminoglycosides typing
…… *LUO Can, CHEN Xin-yi, WANG Min, et al*

(468) Influencing factors of blood concentration of vancomycin after intraperitoneal administration in patients with peritoneal dialysis related peritonitis …… *YANG Wei, HUANG Hai-hua, XIONG Hai-yan, et al*

研究论文

基于指纹图谱和网络药理学的木蝴蝶质量标志物预测分析

赵森[1]，包永睿[1, 2, 3]，王帅[1, 2, 3]，李天娇[1, 2, 3]，孟宪生[1, 2, 3*]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116600；2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心，辽宁 大连 116600；3. 辽宁省现代中药研究工程实验室，辽宁 大连 116600）

摘要：目的 基于中药质量标志物的理论依据，结合 HPLC 指纹图谱和网络药理学方法，预测木蝴蝶 *Oroxylum indicum* 中潜在的质量标志物并测定其含量。**方法** 基于文献筛选木蝴蝶活性成分，运用高效液相色谱法建立木蝴蝶药材指纹图谱，确认共有峰并进行指认；再运用网络药理学方法构建“活性成分 - 靶点 - 通路”网络，预测木蝴蝶质量标志物，并测定其含量。**结果** 文献研究确定黄酮类成分为木蝴蝶质量标志物的主要来源范围；建立 10 批木蝴蝶药材指纹图谱，通过偏最小二乘法判别分析（PLS-DA）明确了木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B 等 5 种成分为主要标志性成分；结合网络药理学有效性和成分特有性以及质量标志物理念，初步预测木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷为木蝴蝶潜在的质量标志物。**结论** 通过特征图谱和网络药理学分析预测了木蝴蝶中的质量标志物，可为木蝴蝶药材的质量控制和药效作用机制研究提供参考。

关键词：木蝴蝶；质量标志物；指纹图谱；网络药理学；含量测定

中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0239-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.001

Predictive analysis of quality marker of *Oroxylum indicum* based on fingerprint and network pharmacology

ZHAO Miao[1], BAO Yong-rui[1, 2, 3], WANG Shuai[1, 2, 3], LI Tian-jiao[1, 2, 3], MENG Xian-sheng[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning Multi-dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine Technical Innovation Center*, *Dalian Liaoning* 116600; 3. *Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory*, *Dalian Liaoning* 116600)

Abstract: Objective To predict potential quality markers (Q-Marker) of *Oroxylum indicum* based on the theoretical basis of Q-Marker of traditional Chinese medicine combined with fingerprint detection and network pharmacology, and to determine the content of Q-Marker. **Methods** Based on literature, the active ingredients of *Oroxylum indicum* were screened. The method for characteristic spectrum of *Oroxylum indicum* was developed, and common peaks and assign chromatographic peaks were matched. Based on network pharmacology analysis of corresponding targets and pathways of active ingredients and constructing “components-targets-pathways”, the characteristics of pharmacological effects of *Oroxylum indicum* were explored. Q-Marker were predicted and their contents were determined. **Results** Flavonoids were the main source of *Oroxylum indicum* Q-Marker. The fingerprints of 10 batches of *Oroxylum indicum* samples were established, and 5 components including oroxin A and oroxin B were identified as the main marker components by PLS-DA. Combining network pharmacological activity and component specificity as well as Q-Marker concept,

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 81874342）。

作者简介：赵森，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：284096730@qq.com *__通信作者__：孟宪生，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药效物质组学及作用机制整合研究，email：mxsvvv@126.com

oroxin A, oroxin B, chrysin-7-*O*-*β*-*D*-glucoronide, baicalein and chrysin were predicted to be the potential Q-Markers of *Oroxylum indicum*. **Conclusion** Q-Marker in *Oroxylum indicum* is predicted by characteristic spectrum and network pharmacology, which provides reference for the research on quality control of *Oroxylum indicum* and the mechanism related to drug efficacy.

Key words: *Oroxylum indicum*; quality marker; fingerprint; network pharmacology; content determination

木蝴蝶来源于紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum*（L.）Vent. 的干燥成熟种子，始载于《滇南本草》[1]，味苦、甘，性凉，归肺经、肝经，具有清肺利咽、疏肝和胃的功效，常用于治疗肺热咳嗽、喉痹、音哑、肝胃气痛等，主产于福建、台湾、广东、海南、广西、四川、贵州、云南等地。木蝴蝶主要含有黄酮及其苷类、挥发油及脂肪酸类、对羟基苯乙醇和环己醇及紫檀碱类化合物等，其中黄酮类是木蝴蝶的主要成分，现代药理学研究表明木蝴蝶具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等作用[2]。

质量标志物（Q-Marker）是在溯源与传递性、特有性、可测性、有效性以及处方配伍这五项核心原则的基础上产生的[3]，现已广泛应用于广藿香、南柴胡、甘草等中药及复方制剂[4-7]的质量研究中，为中药及复方制剂中与临床作用相关的化学物质的研究提供了新思路。本实验在课题组前期研究[8]的基础上，采用高效液相色谱法对木蝴蝶药材进行定性定量研究，并结合多元统计学方法，初步筛选出差异标志物，进一步利用网络药理学进行有效性分析，从化学和生物信息角度分析预测木蝴蝶的潜在 Q-Marker，为木蝴蝶的质量控制及后续开发提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型快速高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；Sartorius CP225D 电子分析天平（北京赛多利斯天平有限公司）；Poroshell 120 SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×100 mm，2.7 μm，美国安捷伦科技有限公司）。

1.2 试药

10 批木蝴蝶药材，产地分别为湖南、安徽、福建、贵州、广东、广西、四川成都、四川眉山、云南昆明、云南丽江，编号为 S1 ～ S10，经辽宁中医药大学许亮教授鉴定为 *Oroxylum indicum*（L.）Vent. 的干燥成熟种子。木蝴蝶苷 A（批号：111595-201604）、木蝴蝶苷 B（批号:111915-201608）、黄芩素（批号：111595-200301）、白杨素（批号：111701-200503）、金丝桃苷（批号：1521-200204）、白杨素 7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷（批号：111701-200607）对照品（中国食品药品检定研究院，质量分数均大于 98%）；乙腈、甲醇（色谱纯，德国 Merck 公司）；水（纯净水，杭州娃哈哈集团有限公司）。

2 方法与结果

2.1 基于“五原则”的木蝴蝶药材 Q-Marker 来源的文献分析

关于木蝴蝶药材的质量标准，2020 年版《中国药典》[2] 仅规定了木蝴蝶苷 B 的含量限度，检测指标单一，难以体现木蝴蝶的整体质量。中药 Q-Marker 是刘昌孝院士提出的新概念，中药 Q-Marker 是存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质，有助于进一步提升中药有效性 - 物质基础 - 质量控制标志性成分的关联度[3, 9]。本文通过文献整合，从传统药性及药效因素、化学成分特有性及可测性、体内代谢转化等方面对木蝴蝶的 Q-Marker 进行预测，为建立木蝴蝶药材的准确的质量评价标准和科学全面的质量控制方法提供依据。

2.1.1 基于传统药性药效的 Q-Marker 预测分析

药性理论与功效研究是中药临床应用的前提条件，可以从不同角度客观描述中药治疗疾病的机制与性能，因此可作为 Q-Marker 预测分析的依据之一[10]。木蝴蝶味苦、甘，性凉，归肺经、肝经，苦能清热解毒，凉则燥湿泻火。现代研究表明，苦凉清热药在对抗炎性反应、抗过氧化损伤、抗炎性细胞因子等方面有良好的表现，其物质基础多以黄酮类、生物碱类为主[11]。木蝴蝶入药始载于《滇南本草》[1]，其能定喘，消痰，破蛊积，又能补虚，宽中，进食。后《本草纲目拾遗》[12]记载其能治心气痛、肝气痛，下部湿热。而 2020 年版《中国药典》[2] 记录木蝴蝶具有清肺利咽、疏肝和胃的功效，可用于治疗肺热咳嗽、喉痹、音哑、肝胃气痛。木蝴蝶的清热止咳及保肝作用得

益于其丰富的黄酮类成分，如木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩苷、白杨素、黄芩素等。综上所述，木蝴蝶中的黄酮类成分是其发挥功效的物质基础，可作为木蝴蝶 Q-Marker 筛选的潜在成分。

2.1.2 基于化学成分特有性及可测性的 Q-Marker 预测分析 木蝴蝶中化学成分众多，主要包括黄酮及其苷类、挥发油及脂肪酸类、对羟基苯乙醇类、环己醇及紫檀碱类化合物等。其中黄酮及其苷类成分为木蝴蝶的主要有效物质，在抗炎、抗氧化、抗肝癌等方面表现出良好的生物活性。何民友等 [13] 利用多反应选择性检测的方法对木蝴蝶配方颗粒中黄酮类指标性的代表成分（木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、黄芩苷、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷）进行检测，该方法线性关系良好，回收率高，能够对木蝴蝶进行快速鉴别并有效检测化学成分含量；也有学者基于 UPLC-MS/MS 法测定不同产地木蝴蝶中 10 种黄酮类成分，发现不同产地的黄酮类成分在含量上存在差异 [14]。由此可知，木蝴蝶黄酮类可能与木蝴蝶有效性密切相关，且均可进行定量检测与分析，由此可作为 Q-Marker 的潜在成分。

2.1.3 基于体内代谢转化的 Q-Marker 预测分析 中药成分复杂多样，但其有效成分需要吸收入血、到达靶器官并作用于相应靶点后才能发挥药效 [15]。因此，分析给药后药物的代谢过程，筛选出药效成分，有助于阐明其药效物质基础并确定 Q-Marker。张博崴 [16] 考察了木蝴蝶黄酮类成分中黄芩苷元的肠道代谢动力学，发现口服给药后黄芩苷元在肠内有较高分布，1 h 时含量为总给药量的 87%，12 h 时含量为总给药量的 20%，远高于肠道药理活性的起效浓度。尹金妥 [17] 研究发现木蝴蝶苷 B 在大鼠体内可通过羰基化，乙酰化水解为黄芩素和木蝴蝶苷 A，进一步以苷元和单糖形式代谢。上述研究均表明，木蝴蝶黄酮类成分可作为木蝴蝶质量控制的重要指标。

2.2 木蝴蝶指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×100 mm，2.7 μm），流动相为乙腈（B）-0.1% 甲酸水溶液（A），程序梯度洗脱（0 ～ 10 min，15% ～ 57%B；10 ～ 15 min，57% ～ 65%B），柱温 30 ℃，进样量 10 μL，检测波长 270 nm，流速 0.6 mL • min^{-1}。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别取各产地木蝴蝶药材，精密称定，按照木蝴蝶黄酮类成分最佳提取纯化工艺条件进行制备 [18]。取纯化物 0.1 g，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，用 50% 甲醇溶液稀释至刻度，过 0.22 μm 微孔滤膜，作为供试品溶液，4 ℃保存，备用。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 取木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、白杨素、白杨素 7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、黄芩素、金丝桃苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 0.593、0.404、0.122、0.388、0.223、0.503 mg•mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.4 方法学考察

① 参照峰的选择：2020 年版《中国药典》将木蝴蝶苷 B 作为评价木蝴蝶质量的指标性成分，其含量较高，色谱峰较稳定，故选择木蝴蝶苷 B 作为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

② 精密度试验：取 S1 批次木蝴蝶供试品溶液，连续进样 6 次，记录色谱图。结果木蝴蝶的各共有峰相对保留时间 *RSD* ＜ 0.37%，相对峰面积 *RSD* ＜ 3.9%，说明仪器精密度良好。

③ 稳定性试验：取 S1 批次木蝴蝶供试品溶液，分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样分析，记录色谱图。各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.22%，相对峰面积 *RSD* ＜ 4.0%，表明样品稳定性较好。

④ 重复性试验：平行制备 6 份 S1 批次木蝴蝶供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.86%，相对峰面积 *RSD* ＜ 3.0%，表明方法重复性较好，符合指纹图谱要求。

2.2.5 指纹图谱的建立与评价 取 10 批木蝴蝶药材，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将 10 批供试品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版），以 S1 为参照，采用多点校正法进行色谱匹配，中位数法生成叠加图谱及对照图谱 R，共标定 20 个共有峰。结果 S1 ～ S10 相似度依次为 0.917、0.929、0.998、0.991、0.959、0.994、0.995、0.996、0.987、0.996，表明各批次木蝴蝶药材具有良好的一致性。经过与混合对照品溶液图谱的比对，指认了其中的 6 个色谱峰，分别为 5 号峰金丝桃苷、8 号峰木蝴蝶苷 B、13 号峰木蝴蝶苷 A、16 号峰白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、18 号峰黄芩素、20 号峰白杨素。10 批木蝴蝶指纹图谱叠加图见图 1，共有模式及对照品图谱见图 2。

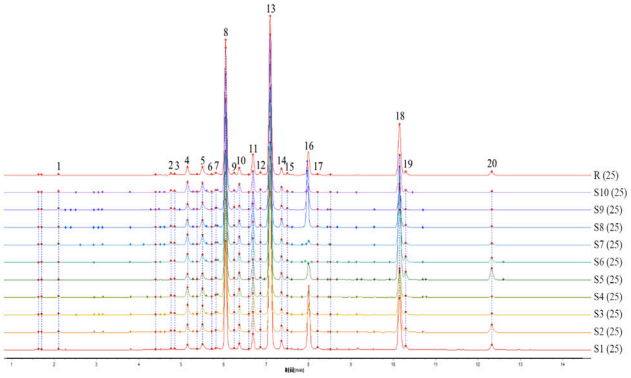


图 1 10 批木蝴蝶药材指纹图谱叠加图

Fig 1 HPLC fingerprints of 10 batches of *Oroxylum indicum*

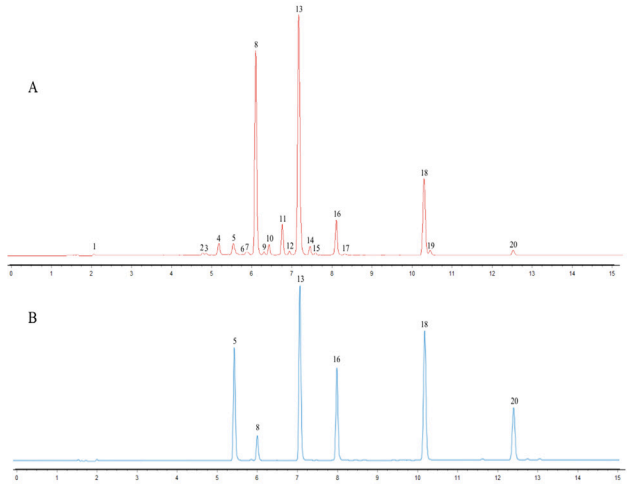


图 2 木蝴蝶指纹图谱共有模式图（A）及混合对照品色谱图（B）

Fig 2 Chromatogram of reference fingerprint of *Oroxylum indicum* （A）and reference substances（B）

5. 金丝桃苷（hyperoside）；8. 木蝴蝶苷 B（oroxin B）；13. 木蝴蝶苷 A（oroxin A）；16. 白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷（chrysin-7-*O*-*β*-*D*-glucoronide）；18 黄芩素（baicalein）；20. 白杨素（chrysin）

2.2.6 偏最小二乘法判别分析（PLS-DA） 采用 PLS-DA 对木蝴蝶 20 个共有峰进行分析，得分矩阵图和变量重要性投影预测结果分别见图 3、4。模型拟合参数 $R^2_X = 0.792$，$R^2_Y = 0.903$，模型预测参数 $Q^2 = 0.532$，均大于 0.5，可知该模型稳定，预测能力较好。图 3 显示木蝴蝶药材 S1 ～ S5 聚为一类，S6 ～ S10 聚为一类，说明不同产地的木蝴蝶药材在成分上存在差异。

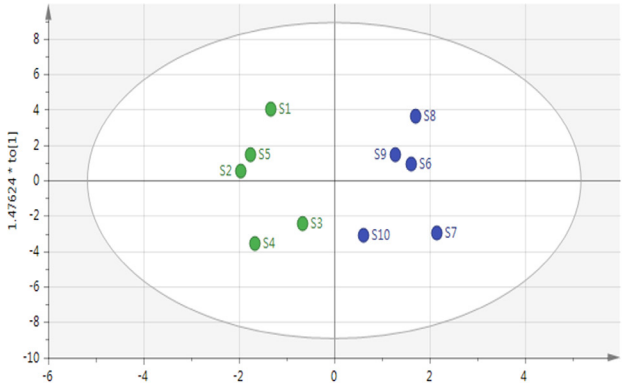


图 3 10 批木蝴蝶样品的 PLS-DA 得分图

Fig 3 PLS-DA score plot for 10 batches of *Oroxylum indicum*

为更好地明确不同产地木蝴蝶药材中差异较大的物质，结合各变量的 VIP（variable importance in the projection）值正态分布图（见图 4），筛选出贡献较大的 6 个变量（VIP ＞ 1），VIP 值由大到小依次为 18 号峰（黄芩素）、16 号峰（白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷）、8 号峰（木蝴蝶苷 B）、20 号峰（白杨素）、13 号峰（木蝴蝶苷 A）、11 号峰。这些成分在区分不同产地木蝴蝶时起到重要作用，是木蝴蝶的差异标志物。

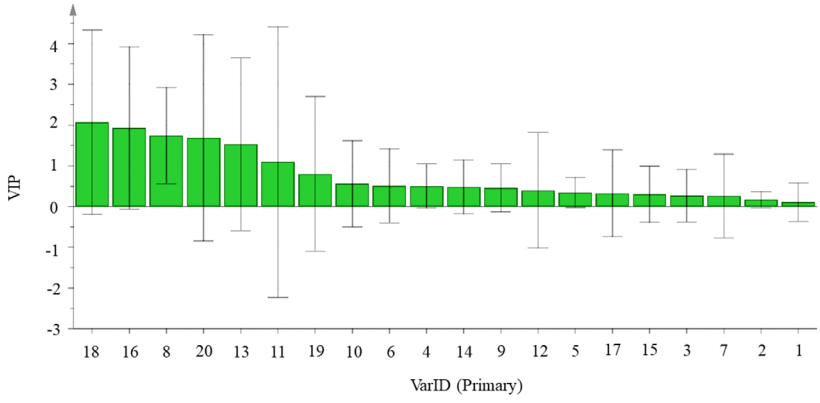


图 4 木蝴蝶药材的重要变量

Fig 4 Important variables of *Oroxylum indicum*

2.3 网络药理学研究

木蝴蝶具有清肺利咽、疏肝和胃的功效，其主要活性成分为黄酮类化合物，包括木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素等成分，具有抗炎、抗氧化、抗肝癌等药理活性 [19-21]。本实验基于文献研究结合指纹图谱的可测性及可溯性，确定指纹图谱所指认的木蝴蝶苷 B、木蝴蝶苷 A、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷 5 个活性

成分为候选化合物。

2.3.1　活性成分靶点信息的收集　利用中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP（http://tcmspw.com/tcmsp.php）、BATMAN-TCM（http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/）、Uniprot（https://www.uniprot.org/）共得到木蝴蝶苷 B、木蝴蝶苷 A、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷 5 个候选化合物的 63 个作用靶点，本课题组研究表明前期木蝴蝶苷 B 具有促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖和转移的作用[8]，但未在数据库中搜寻到相关靶点，故仅对其余 4 个化合物进行后续分析。

2.3.2　蛋白 - 蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络的构建　将 4 个有效活性成分涉及的靶点基因导入 STRING 数据库获取蛋白 - 蛋白相互作用数据信息，选取最高置信度蛋白交互参数评分值（＞ 0.9），构建 PPI 网络。将得到的 tsv 格式文件导入 Cytoscape 软件，按照度值（degree）由大到小进行排序，见图 5。排名前 10 的基因分别为 *AKT1*、*TP53*、*FOS*、*HIF1A*、*PTGS2*、*CASP3*、*MMP9*、*NOS3*、*HSP90AA1*、*IL-4*，它们可能是木蝴蝶的关键靶点基因。

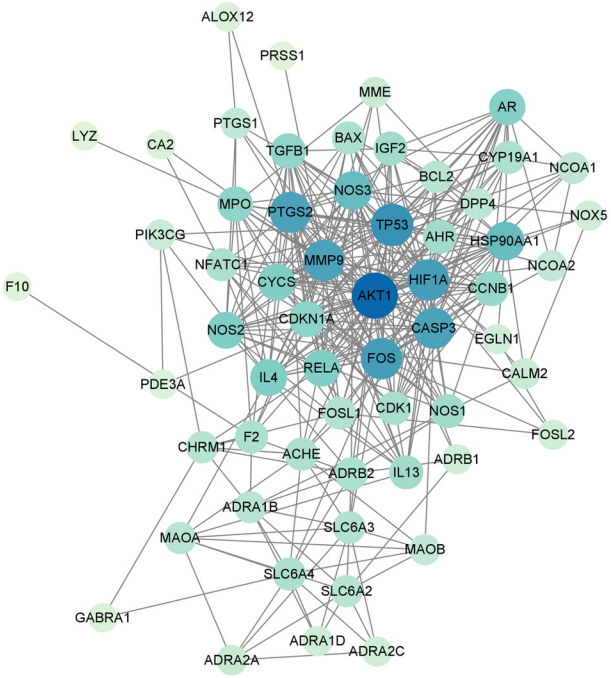


图 5　蛋白 - 蛋白相互作用网络构建

Fig 5　Construction of protein-protein interaction network

2.3.3　GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析

① GO 功能富集分析：采用 DAVID 6.8 数据库（https：//David-d.ncifcrf.gov/home.jsp），以 P ＜ 0.05、FDR ＜ 0.05 作为筛选条件对上述 63 个作用靶点进行 GO 功能分析，共获得 257 条结果，其中生物过程（biological process，BP）占 180 个，细胞组成（cellular component，CC）占 23 个，分子功能（molecular function，MF）占 54 个，根据 P 值由大到小排序，取前 20 条结果，进行可视化分析，如图 6 所示。结果显示生物过程主要涉及到细胞凋亡、RNA 聚合酶Ⅱ启动子转录、白细胞介素 IL-18 生物合成过程的正调控等；分子功能主要富集在氧化还原酶活性、转录因子活性、组蛋白激酶活性等；细胞组分主要富集在细胞核周围区域。

② KEGG 通路富集分析：利用 DAVID 6.8 数据库以 P ＜ 0.05、FDR ＜ 0.05 为筛选条件对上述 63 个作用靶点进行 KEGG 通路富集分析，结果共得到 20 个条目，如图 6 所示。主要涉及的通路有：癌症通路（pathways in cancer）、细胞凋亡通路（apoptotic signaling pathway）、PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）信号通路、HIF-1 信号通路（HIF-1 signaling pathway）、乙型肝炎（hepatitis B）等，以上结果表明中药木蝴蝶具有多成分、多靶点的作用特点，能够通过调控多条通路达到治疗疾病的目的。

2.3.4　“活性成分 - 靶点 - 通路”网络构建与分析　本研究根据筛选得到的 4 个成分、63 个靶点和 20 条通路，运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分 - 靶点 - 通路”网络图，结果见图 7。以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度（degree）为参考，发现木蝴蝶苷 A、白杨素、白杨素 7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、黄芩素 4 个化合物连接度差异不大，均可能是木蝴蝶的活性成分，*AKT1*、*TP53*、*CASP3*、*MMP9*、*IL-4* 可能是木蝴蝶活性成分作用于肿瘤、神经活性配体等信号通路潜在的关键作用靶点。

2.4　木蝴蝶药材 Q-Marker 的含量测定

2.4.1　对照品溶液的制备　精密称定木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、白杨素、白杨素 7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、黄芩素对照品，加入甲醇制得质量浓度为 0.593、0.404、0.122、0.388、0.223 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4.2　方法学考察

① 线性关系考察：精密称取“2.4.1”项下混合对照品溶液，用甲醇倍比稀释成系列对照品溶液，进样测定，以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 1。

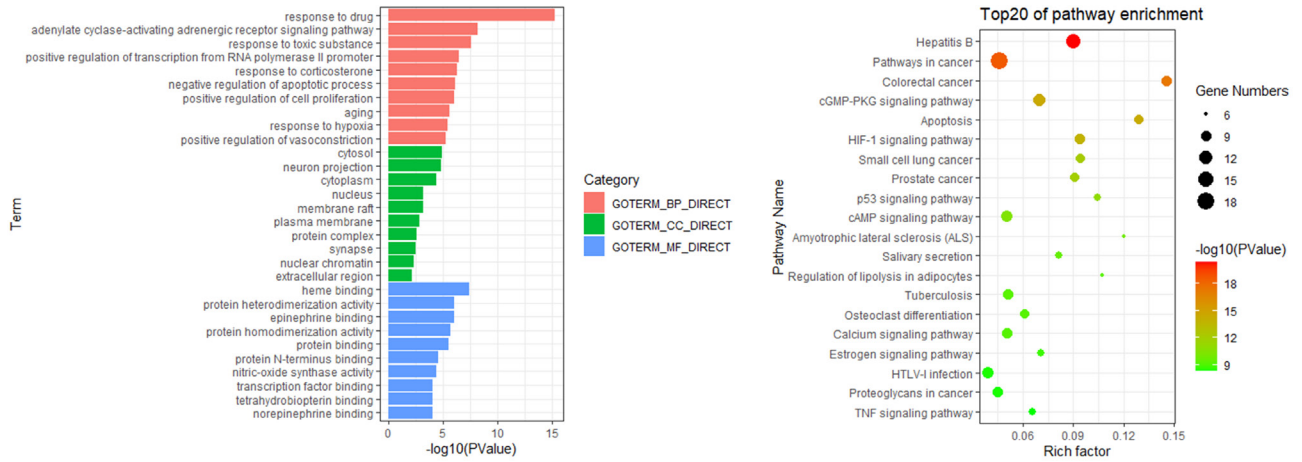


图 6 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

Fig 6 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis

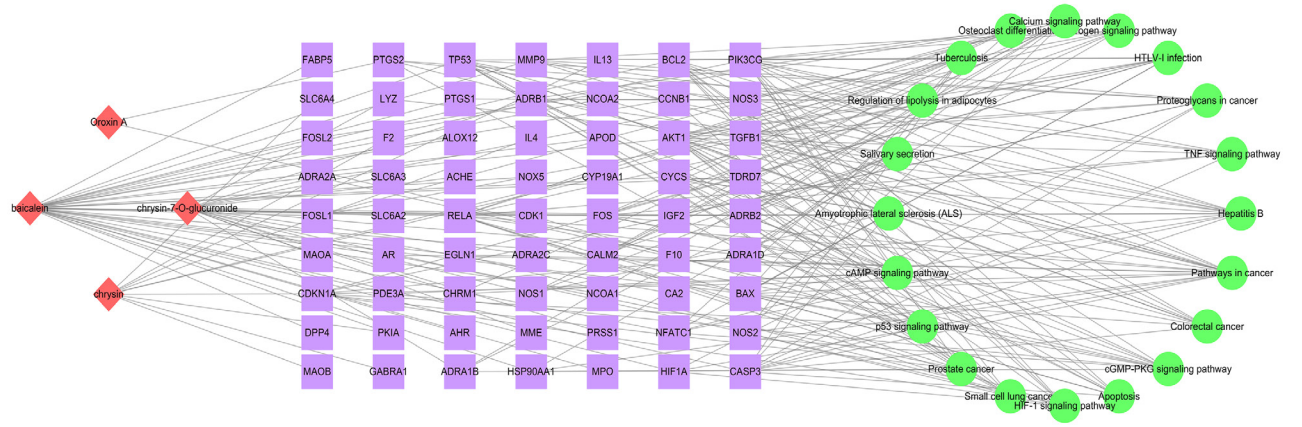


图 7 木蝴蝶“活性成分 - 靶点 - 通路”网络

Fig 7 Network prediction of compound-target-pathway of *Oroxylum indicum*

表 1 5 个指标性成分的线性回归方程

Tab 1 Linear regression equation for 5 labeled components

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（mg • mL^{-1}）
木蝴蝶苷 A	$Y = 4.201\times10^{3}X + 27.27$	0.9998	0.165 ～ 0.810
木蝴蝶苷 B	$Y = 2.967\times10^{3}X - 55.13$	0.9992	0.158 ～ 0.725
黄芩素	$Y = 2.221\times10^{3}X - 35.57$	0.9994	0.033 ～ 0.412
白杨素	$Y = 4.354\times10^{3}X - 49.48$	0.9999	0.027 ～ 0.337
白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷	$Y = 3.409\times10^{3}X - 13.09$	0.9993	0.049 ～ 0.575

② 精密度试验：取 S1 批次木蝴蝶供试品溶液，连续进样 6 次，结果供试品溶液中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷的峰面积 *RSD* 分别为 2.1%、2.0%、0.69%、0.75%、1.9%，表明仪器精密度良好。

③ 重复性试验：取 S1 批次木蝴蝶供试品溶液 6 份，进样测定，结果供试品溶液中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷的峰面积 *RSD* 分别为 2.1%、2.2%、1.4%、1.2%、1.8%，表明该方法的重复性良好。

④ 稳定性试验：取 S1 批次木蝴蝶供试品溶液，分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样测定，结果供试品溶液中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷的峰面积 *RSD* 分别为 1.1%、1.8%、1.4%、1.5%、1.2%，表明木蝴蝶供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

⑤ 加样回收试验：精密称取 6 份已知含量的 S1 批次木蝴蝶粉末，根据样品中各成分含量，按 1∶1 比例精密加入相应对照品，按“2.2.2”

项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积。计算供试品中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷的平均加样回收率分别为 101.10%、98.88%、100.52%、99.93%、98.76%，*RSD* 分别为 0.87%、1.0%、0.82%、0.63%、0.51%，表明该方法回收率良好。

2.4.3 样品测定 分别精密称取 10 批木蝴蝶样品，按照“2.2.2”项下方法的制备供试品溶液，进样测定，计算木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩素、白杨素、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷的含量，结果见表 2。

表 2 10 批木蝴蝶样品含量测定结果 (mg·g^{-1})

Tab 2 Content of 10 batches of *Oroxylum indicum* (mg·g^{-1})

样品	木蝴蝶苷 A	木蝴蝶苷 B	黄芩素	白杨素	白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷
S1	28.36	15.09	11.85	0.98	10.16
S2	27.11	20.68	9.16	1.48	4.25
S3	25.66	22.60	7.52	0.24	1.62
S4	25.13	24.04	5.31	0.17	0.95
S5	26.82	20.29	9.43	2.25	2.70
S6	26.44	21.95	9.05	0.93	0.04
S7	25.09	23.00	6.23	0.32	0.61
S8	28.31	19.52	7.63	0.27	8.64
S9	27.12	20.53	5.87	0.06	7.49
S10	25.62	23.46	6.70	0.22	0.84

3 讨论

中药质量是临床疗效的保证，是中药产业发展的生命线，中药成分复杂、质量参差不齐，因此建立更加科学、全面的质量评价方法尤为重要。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段，建立在中药化学成分系统研究的基础上，分析中药的化学成分类型，对中药进行整体质量控制；网络药理学通过构建“疾病 - 基因 - 靶点 - 药物”作用网络，预测中药主要作用通路及靶点，并进一步阐释中药的作用机制，从理论上证明了中药成分的有效性；Q-Marker 是可以定性定量的特有性化学成分，能够将中药有效性 - 物质基础 - 质量控制标志性成分相关联，解决在中药有效性基础上的中药质量评估问题 [22-25]。

本研究采用指纹图谱和网络药理学相结合的方法分析预测木蝴蝶的 Q-Marker。首先通过查阅文献初步锁定木蝴蝶 Q-Marker 的来源范围为黄酮类化合物，临床研究表明黄酮类化合物具有抑菌、抗肿瘤、降血糖的功效，用于改善糖尿病、心血管疾病和肿瘤等多种疾病 [26-28]。通过建立木蝴蝶的指纹图谱从传递和溯源性的角度对木蝴蝶进行分析，认为木蝴蝶苷 B、木蝴蝶苷 A、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、黄芩素、白杨素可作为木蝴蝶的差异化合物；进一步采用网络药理学从有效性的角度对其进行分析，发现木蝴蝶苷 A 等 4 种活性成分能通过调控 *AKT1*、*TP53*、*CASP3*、*MMP9*、*IL-4* 等靶点作用于癌症通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、免疫信号等关键信号通路发挥抗炎，抗肿瘤，抗氧化作用。木蝴蝶苷 A 通过抑制 AKT/GSK3*β* 和 STAT3 信号通路的活性从而抑制肺腺癌细胞增殖 [29]；黄芩素可通过抑制 AKT 信号传导途径降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达，从而抑制结肠癌细胞的侵袭和转移 [30]；白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷可通过干预 HRAS、JUN、PTPRC 调节 PI3K-AKT、花生四烯酸代谢等信号通路发挥抗炎及免疫调节作用 [31]；白杨素能够通过促进心肌 MMP-2 的表达并激活 MAPK 信号通路改善急性心肌梗死大鼠的心脏恢复功能 [32]；木蝴蝶苷 B 通过调节 MAPK 信号通路、Ca 离子信号通路和磷脂酶信号通路发挥体内抗肝癌活性 [33]。由此可见筛选得到的靶点和通路与木蝴蝶抗炎抗肿瘤的现代药理活性相契合 [34]，表明木蝴蝶 Q-Marker 的选取符合其药理药效特点。最后从化学成分可测性的角度对其主要成分进行定量分析，5 种成分含量较高，可测性好，在不同产地木蝴蝶中差异显著，适合作为木蝴蝶的 Q-Marker 成分。

综上所述，本研究初步预测木蝴蝶苷 B、木蝴蝶苷 A、白杨素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸苷、黄芩素、白杨素为木蝴蝶潜在的 Q-Marker，为后期深入研究木蝴蝶药效及作用机制提供参考，也有助于完善木蝴蝶的质量控制体系，提高质量控制水平。

参考文献

[1] 兰茂 . 滇南本草 [M]. 3 卷 . 昆明：云南人民出版社，1977.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：66.

[3] 刘昌孝，陈士林，肖小河，等 . 中药质量标志物（Q-Marker）：中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药，2016，47（9）：1443-1457.

[4] 曲中原，吴双，郑岩，等 . 基于指纹图谱和网络药理学的南柴胡质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2021，52（9）：2678-2686.

[5] 李欢欢，林丽，郭爽，等 . 基于网络药理学及定性定量研究的甘草质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2020，51（10）：2680-2688.

[6] 温捷，薛蓉，季德，等 . 指纹图谱结合网络药理学的瓜

萎饮片质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2021，52（9）：2687-2695.
[7] 李成成，苑楠楠，白桦芳，等 . 基于 HPLC 指纹图谱和网络药理学的消炎退热颗粒质量标志物（Q-Marker）预测 [J]. 中草药，2021，52（13）：3885-3895.
[8] 李楠楠 . 中药木蝴蝶总黄酮抗肝肿瘤活性及作用机制研究 [D]. 大连：辽宁中医药大学，2019.
[9] 张铁军，白钢，陈常青，等 . 基于“五原则”的复方中药质量标志物（Q-Marker）研究路径 [J]. 中草药，2018，49（1）：1-13.
[10] 张铁军，白钢，刘昌孝 . 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报，2019，54（2）：187-196.
[11] 张振宇 . 王灿晖教授应用苦寒清热法治疗内伤杂病的研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2010.
[12] 赵学敏 . 本草纲目拾遗 [M]. 北京：人民卫生出版社，1963.
[13] 何民友，魏梅，程学仁，等 . 基于 UPLC-MS /MS 对木蝴蝶配方颗粒 6 种成分含量测定及特征图谱研究 [J]. 中国现代中药，2020，22（2）：271-277.
[14] 魏欣，杨金霞，孙雅晴，等 . UPLC-MS/MS 法同时测定木蝴蝶中 10 个有效成分 [J]. 中草药，2020，51（8）：2221-2225.
[15] 郭锐，苏瑾，李志雄，等 . 基于网络药理学及 ADME 预测分析血脂灵片治疗血脂异常的 Q-Marker [J]. 中成药，2019，41（1）：63-69.
[16] 张博崴 . 木蝴蝶黄酮改善糖尿病鼠糖代谢的肠道机制研究 [D]. 大连：大连理工大学，2018.
[17] 尹金妥 . 基于液质联用技术的四种黄酮类成分的体内外代谢研究 [D]. 石家庄：河北医科大学，2020.
[18] 李楠楠，王帅，孟宪生，等 . 基于全时段多波长融合指纹图谱的中药木蝴蝶中总黄酮类成分研究 [J]. 中南药学，2016，14（1）：1-4.
[19] Le TDH，Nguyen XT. Influence of flavonoids from *Oroxylum indicum* Vent. towards α-chymotrypsin in relation to inflammation [J]. Tap Chi Duoc Hoc，2005，45（8）：23-26.
[20] 戴卉卿，陈承瑜，杨滨 . 22 种黄酮、酚酸类化合物和 9 种中药清除 AAPH 活性考察 [J]. 中国中药杂志，2010，35（17）：2296-2302.
[21] Li NN，Men WX，Zheng YB，et al. Oroxin B induces apoptosis by down-regulating microRNA-221 resulting in the inactivation of the PTEN/PI3K/AKT pathway in liver cancer [J]. Molecules，2019，24（23）：4384-4399.
[22] 佘一鸣，胡永慧，韩立云 . 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药，2017，48（12）：2557-2563.
[23] 夏金鑫，梅茜，郭爽，等 . 基于指纹图谱和网络药理学对当归四逆汤中桂枝的 Q-Marker 预测分析 [J]. 中草药，2020，51（10）：2634-2641.
[24] 解静，高杉，李琳，等 . 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药，2019，50（10）：2257-2265.
[25] 张铁军，许浚，申秀萍，等 . 基于中药质量标志物（Q-Marker）的元胡止痛滴丸的“性 - 效 - 物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药，2016，47（13）：2199-2211.
[26] Zhang BW，Li X，Sun WL，et al. Dietary flavonoids and acarbose synergistically inhibit alpha-glucosidase and lower postprandial blood glucose [J]. J Agric Food Chem，2017，65（38）：8319-8330.
[27] Lu Y，Joerger R，Wu C. Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of scutellaria baicalensis georgi [J]. J Agric Food Chem，2011，59（20）：10934-10942.
[28] Jang EJ，Cha SM，Choi SM，et al. Combination effects of baicalein with antibiotics against oral pathogens [J]. Arch Oral Blol，2014，59（11）：1233-1241.
[29] 茅一民 . 中药活性成分木蝴蝶苷 A 抑制肺腺癌细胞增殖的机制研究 [D]. 杭州：浙江大学，2016.
[30] Rui XJ，Yan X，Zhang K. Baicalein inhibits the migration and invasion of colorectal cancer cells via suppression of the AKT signaling pathway [J]. Oncol Lett，2016，11（1）：685-688.
[31] 韩彦琪，刘耀晨，武琦，等 . 基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）机制研究 [J]. 中草药，2020，51（11）：2967-2976.
[32] 苏冰峰，王修，马国华 . 白杨素改善急性心肌梗死大鼠心功能的作用及对 MMP-2/MAPK 表达的影响 [J]. 中国药师，2020，23（11）：2128-2132.
[33] 李楠楠，孟宪生，包永睿，等 . 基于代谢组学木蝴蝶总黄酮抗肝肿瘤作用机制研究 [J]. 中南药学，2019，17（12）：2034-2039.
[34] 高彦宇，刘思宇，沈芳玲，等 . 木蝴蝶药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中医药学报，2021，49（5）：102-106.

（收稿日期：2021-10-04；修回日期：2021-11-17）

基于深度学习的化学结构识别研究

蚁佳才，张小琛，刘丹*（国防科技大学计算机学院，长沙 410073）

摘要：目的 通过深度学习方法，研究如何对科学文献中的化学结构进行有效识别以达到药物重新发现的目的。**方法** 提出一个针对化学结构识别的编码器 - 解码器模型。该模型通过分子指纹预训练学习分子的结构和性质信息，并将其融合到下游任务。此外，模型还融合了注意力机制，在提升模型特征提取能力的同时，增强了模型的可解释性。**结果** 在两个基准测试集上进行测试，本模型相比其他方法取得了具有竞争力的效果，并且提供了有效的可解释结果。**结论** 本研究提出的基于预训练和注意力机制的深度学习模型，显著提高了化学结构识别的准确率，为药物研发提供了加速引擎。

关键词：药物重新发现；分子指纹；深度学习；化学结构识别
中图分类号：O641 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0247-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.002

Chemical structure recognition based on deep learning

YI Jia-cai, ZHANG Xiao-chen, LIU Dan* (*School of Computer Sciences*, *National University of Defense Technology*, *Changsha* 410073)

Abstract: Objective To determine how to efficiently identify chemical structures in scientific literature for the purpose of drug rediscovery, by a deep learning-based approach. **Methods** An encoder-decoder model for chemical structure recognition was proposed. The model learned the structural and property information of molecules through molecular fingerprinting pre-training and incorporated it into the downstream tasks. The model also incorporated an attention mechanism to enhance the interpretability and feature extraction capability. **Results** Being tested on two benchmarks, the model achieved competitive results compared with those by other methods and provided interpretable results. **Conclusion** The deep learning model based on pre-training and attention mechanism in this study significantly improves the accuracy in chemical structure recognition and accelerates drug development.

Key words: drug rediscovery; molecular fingerprint; deep learning; chemical structure recognition

科研工作者通常将经过大量实验收集的化学知识转化为文献中的图文描述，这些海量的知识是化合物重新发现及药物发现研究的巨大财富[1]。文献中的化合物结构是药物发现的核心，而这些结构信息在大多数情况下是以图像的形式呈现，这些有价值的信息对于机器来说是非结构化且不可读的[2]。因此，自动化地将化学结构由图像转换成人类或机器可读的格式，对于从大量文献中挖掘知识是非常重要的，该过程被称为化学结构识别（chemical structure recognition，CSR）[1]。

对于机器可读的分子结构，目前采用广泛的包括国际通用技术和统一标准的线性码简化分子线性输入系统（simplified molecular input line entry system，SMILES）[3]以及分子的三维表示，如图、矩阵或连接表等。SMILES 可以减少存储空间，提升检索效率，并且可以很方便地编码分子结构、性质信息以及转换成其他三维表示，因此被广泛应用于各种与化合物分子相关的研究中。在 CSR 中，其目标是将化学结构图像转换为相应的 SMILES 字符串，即图像到文本的转换。图 1

基金项目：国家自然科学基金项目（No. U1811462，No. 62102430，No. 62102447）。
作者简介：蚁佳才，男，硕士研究生，主要从事人工智能药物研发工作，email：yjc@nudt.edu.cn *通信作者：刘丹，女，硕士，助理研究员，主要从事科技哲学研究，email：danliu@nudt.edu.cn

展示了阿司匹林（aspirin）的化学结构以及相应的 SMILES，从图中可以直观地看出，除了识别出图像中相应的元素以外，还需要根据相应重构算法将这些元素的符号组合成有效的 SMILES。

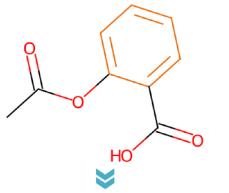


图 1 化学结构识别示意图

Fig 1 Diagram of chemical structure recognition

本文采用深度学习的方法 [4]，基于编码器 - 解码器架构，融合注意力机制 [5] 和分子指纹 [6] 先验知识，构建了一个深度学习模型——基于指纹预训练的化学结构识别（chemical structure recognition based on fingerprint pre-train，CSR-FP），现报道如下。

1 相关研究工作

1.1 基于规则的方法

20 世纪 90 年代初，第一个完整的化学结构识别系统 Kekulé 发布了。Kekulé 是一个基于规则的工具，通过将单一化学结构图进行分割、向量化、图像分块、图像腐蚀、图像膨胀以及光学字符识别等一系列步骤，最终将化学结构图转换为新的分子图表示 [7]。随后，越来越多的研究人员开始关注这一领域，研发出了各种开源软件。Rajan 等 [1] 总结了该领域的研究进展，并比较了 3 个基于规则的开源软件 OSRA、MolVec 和 Imago，为未来的深入研究提供了参考。传统的分子图像识别方法在很大程度上依赖于专家知识，并且需融合新的待检测图像特征，费时费力。另外，这些工具通常步骤繁琐，导致计算时间较长。具体来说，大多数基于规则的方法往往包括以下步骤：① 扫描，即扫描包含化学结构图的页面区域，并将其从页面中分割出来；② 矢量化，即将位图转换为矢量图；③ 搜索虚线和楔形线，即使用专门的算法来识别立体化学信息，如虚线键和楔形键；④ 光学字符识别，即使用光学字符识别（optical character recognition，OCR）算法识别原子和常规键。并结合一些工具使用规则来纠正 OCR 引擎不能正确识别的原子或原子组；⑤ 图编译，即将原子视为节点，将化学键视为边，并通过图重构算法将其编译成分子图；⑥ 后处理，例如将一些超原子转化为原来的原子序列。

1.2 基于深度学习的方法

近年来，深度学习在计算机视觉领域取得了较大突破，如图像分类 [8]、目标检测 [9]、语义分割 [10] 以及图像字幕 [5] 等。CSR 可以视为特殊的图像字幕任务，与自然语言文本生成不同，CSR 的条件更为严苛，例如其生成的元素字符往往出现多个重复元素，并且上下文信息联系更加紧密，且元素字符具有唯一性，而自然语言往往可以使用多种同义词进行替换。基于深度学习的方法的优点在于它们不需要制订复杂的规则，模型可以自动拟合学习高维特征空间，并且具有更好的泛化能力等。

目前基于深度学习的方法主要包括 MSE-DUDL[2]、Chemgrapher[11] 以及 DECIMER[12]。其中，MSE-DUDL 主要研究如何将文献中的化学结构进行分割并识别成机器可读的形式。其使用一个类似 U-Net[13] 的分割网络从文献中分割出化学结构图，并使用卷积神经网络（convolutional neural network，CNN）结合循环神经网络（recurrent neural network，RNN）进行预测。作为两阶段模型的代表，Chemgrapher 则使用一个分割网络来识别每个像素的类型，包括原子、键和电荷，并使用一个预测网络预测每个被识别的像素的类型，包括原子、键和电荷类型。两阶段模型可以有效地减少分子图像识别的噪声，但它们可能会受到与优化有关的问题的影响，如误差传播。DECIMER 使用一个预训练好的 Inception V3 模型 [14] 作为特征提取器，提取图像特征后进行 RNN 解码。而这种方式下，特征提取器和 RNN 没有进行联动学习，模型不能学习到有价值的化学图像表征，导致模型的识别率较低。目前，基于深度学习的方法有的对计算资源要求极高，有的标记数据集难以获得，而有的识别精度则较低。

融合先验知识的方法在许多任务中都展现出了非常好的效果 [15-16]。在本研究中，我们首先构建了一个预训练模型来学习化学图像的指纹表示，并将该训练好的模型作为下游任务的编码器进行微调。分子指纹是一种人工编码，其包含分子的子结构信息、性质信息等。因此，通过预训练，模型可以学习到某些片段的潜在表征，有助于下游任务，如结构识别任务的特征提取。这种方法在训练数据不足的情况下能增强模型的泛化性，例如在本文的模型训练中，CSR-FP 用 60 万张化学结构图像进行训练，其在用 Indigo 生成的数据集的效果 [SMILES 序列准确率（SSA）值约为 84.29%] 与使用 6900 万张训练图像的 MSE-DUDL 效果（SSA 值为 82%）相当。并且，本文在 CSR-

FP 的解码器中引入了注意力机制，这使得模型具有更好的可解释性。最终，本文选取了 OSRA、MolVec 以及 DECIMER 作为基线方法，在两个基准数据集上进行评估，CSR-FP 均取得了非常大的改进。

2　基于指纹预训练的化学结构识别

本文提出的 CSR-FP 的工作流示意图如图 2 所示。所有的数据都经过统一的预处理，处理后的数据首先进行预训练。通过一个基于指纹预训练的编码器（pre-trained encoder based on fingerprint pre-train，PE-FP）模型学习先验知识表征，然后在 PE-FP 模型后连接一个全连接层作为 CSR-FP 的编码器，学习图像的高维特征，再经过 LSTM 解码得到标准 SMILES。

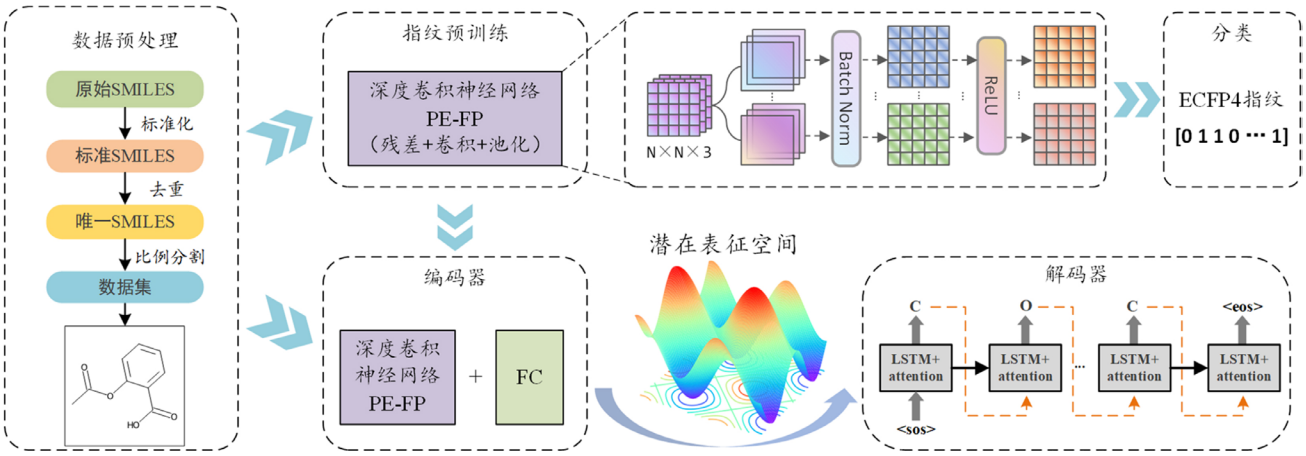


图 2　CSR-FP 工作流示意图

Fig 2　Diagram of CSR-FP workflow

2.1　数据处理

为了获得有价值且具代表性的数据，本文选择 ZINC 20 数据库（https：//zinc20.docking.org/）[17-18] 作为本研究的数据源。该数据库包含超过 7.5 亿个可购买的化合物和超过 2.3 亿个可购买的可对接的化合物。如图 2 所示，使用 RDKit 化学工具包将所有原始 SMILES，标准化得到标准 SMILES，然后对转换后的 SMILES 进行去重，得到唯一 SMILES，最后对数据集进行分割，按照 8∶1∶1 的比例获取训练数据集，并验证和测试数据集。另外，本研究中使用的化学结构图像采用 Indigo 化学工具包 [19] 生成，并对图像进行归一化和缩放，所有的图像分辨率重置为 256×256。对于 PE-FP 模型的标签处理，使用 RDKit 生成预训练化学结构图像的扩展连通性指纹（extended connectivity fingerprint，ECFP4）指纹，该指纹维度为 256。而对于 CSR-FP 模型的标签处理，则简单地计算所有 SMILES 字符并添加到标签字典中。为了识别字符串的开始，结束以及填充位，在字典中添加＜ sos ＞、＜ eos ＞和＜ pad ＞标记。最终，本文选取从 ZINC 20 数据库中随机分层采样的 600 000 张化学结构图像作为 CSR-FP 模型训练的数据集。

为了与其他工具进行比较，本研究采用不同方法，分别为标准化学结构图像数据集（Standard-CSI）和噪声图像数据集（NI）上进行测试。两个数据集均包含 10 000 张化学结构图像。其中 Standard-CSI 数据集的图像使用 Indigo 工具包生成。NI 数据集模拟了真实世界情况下的化学结构图像，即图像中会随机出现不同比例的图像噪声。模型的训练数据集与两个基准数据集没有重复样本，所有的基线方法在基准数据集上进行测试，该过程重复 10 次。

2.2　模型架构

编码 - 解码的思维最早在机器翻译中被广泛应用，后来由于其强大的特征空间探索能力，许多基于人工智能的方法均采用此架构。CSR-FP 模型在编码器 - 解码器架构 [20] 的基础上，融合了预训练模型 PE-FP 和注意力机制，增强了模型的特征提取能力和可解释性。CSR-FP 和 PE-RP 的模型架构如图 3 所示，其中红色方框中的部分连接 256 个二分类分类器进行分子指纹学习，本研究利用长度为 256 的 ECFP4 指纹作为预训练的标签。随后，通过去除分类器并且连接一个简单的线性转换器，将得到的隐式向量转换为隐式矩阵，输入到解码器中。这里，CSR-FP 模型的编码器输出的特征图大小是 8×8，其通道为 512。图中紫色方框中的内容为 CSR-FP 的解码器，解码器在每次迭代中都会生成一个 SMILES 字符。在训练过程中，生成字符时，模型对于前一个时间步生成的内容是可见的，而验证时则不可见。

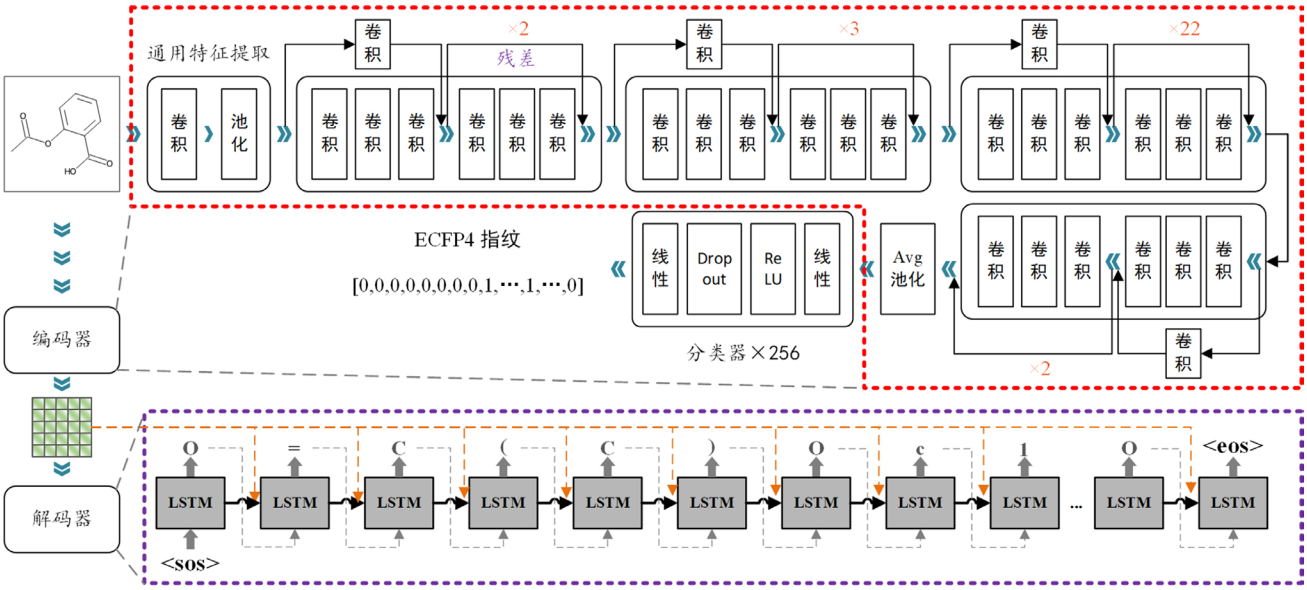


图 3　模型架构示意图

Fig 3　Diagram of the model architecture

从图中还可以看出，CSR-FP 的编码器中使用了多个残差连接，其是一个类 ResNet 的模型[21]，通过残差连接，可以更好地解决网络退化问题。

假设模型预测的结果为 $\hat{Y}=\{\hat{y}_1, \hat{y}_2 \cdots \hat{y}_N\}$，$\hat{y}_i \in \Phi^V$，其中 N 是 SMILES 的长度，V 是字典的大小。模型的损失函数可以表示为：

$$loss(\hat{Y},Y)=-\sum_{s}^{N}\log\left[\frac{\exp(\hat{y}_s[y_s])}{\sum_{j}^{V}\exp(\hat{y}_s[j])}\right] \quad (1)$$

其中 $\hat{y}_s[y_s]$ 表示第 s 个预测字符中，下标为 y_s 的预测值。

另外，CSR-FP 在解码器中加入了注意力机制，在生成 SMILES 字符时，计算特征矩阵与前一时间步的隐含向量之间的注意力分数。这种机制可以有效克服 RNN 长期依赖造成的梯度消失和爆炸问题，在提升模型特征提取能力的同时，还可以增加模型的可解释性。

2.3　指纹预训练

本研究使用 ECFP4 指纹作为预训练的训练标签。其中，ECFP4 指纹是一串由“0”和“1”位比特组成的 256 长度的向量。因此，在训练过程中，设置 256 个分类器分别进行二分类学习。在本研究中，我们使用了 100 万个化合物分子进行指纹预训练。

ECFP 指纹又称为 Morgan 指纹，是一种扩展连通性指纹。具体来说，ECFP4 是以半径为 2，计算每个原子的圆形区域的化学环境标识符。因此，该指纹包含了分子中多个片段的结构信息，在 QSAR/QSPR 任务中有着广泛的应用。

2.4　评价指标

为了更全面、更严格地评估模型的性能，本文采用了以下三个指标进行评估：

SMILES 序列的准确率（SSA）：在该指标下，只有当生成的 SMILES 序列与原始序列完全相同时才被认为是正确的结果。该指标从分子水平上宏观分析模型的识别精度。

ATS：本文使用 Tanimoto 系数来衡量生成的分子的 Morgan 指纹和原始分子的 Morgan 指纹之间的相似性。

Tanimoto 相似度 1.0 系数（TS@1.0）：该指标是指生成的分子指纹与原始分子指纹之间 Tanimoto 相似度为 1.0 的比例。TS@1.0 和 ATS 为从分子相似度层面上进行分析，这些指标可以为下游任务，例如分子性质的预测等奠定基础。

2.5　注意力机制

一般来说，图像中包含了多个不同的内容，化学结构图像也不例外，其中不同的原子或化学键对应的图像块可以看成是不同的区域。因此，如果在生成 SMILES 字符时能准确估计图像中某一区域的重要性，那么模型在性能上将会得到质的提升。并且，在生成文本内容时，每个字符之间都有一定的联系，因此，在生成当前字符时，应该整合已经生成的文本信息，即当前时间步 S_t 之前的迭代（S_0，S_1，…，S_{t-1}）生成的 SMILES 字符信息。在解码器的每个时间步中，模型输出一个隐藏向量 h 和一个单元向量 c，其中初始向

量 h_0 和 c_0 是将编码器的特征向量输入全连接层得到的。每个时间步中注意力分数的计算方式可以简单地形式化为：

$$att_{score} = L_{\alpha}\{\tanh[L_f(F) + L_h(h_t)]\} \quad (2)$$

其中，L 是一个线性转换，F 是特征矩阵，h_t 是解码器第 t 个时间步的隐式向量。

3　结果

3.1　数据集分析

为了提升模型的泛化能力，在进行指纹预训练时，多样性更高、应用域更广的数据对于提升预训练模型的学习能力是非常重要的。针对该问题，我们在采集预训练样本时，利用分子骨架多样性对分子多样性进行度量，采集骨架多样性高的样本进行训练。预训练数据集的分子骨架分析以及原子数目分布结果，见图 4。

由图 4A 可知，分子骨架数量平均值为 1.154，且数据主要分布在最小值 1 处。小部分样本分布在 2 和 3 中。从图 4C 中可以看出，小于 3 的分子骨架数量占比为 97.76%。这些数据说明了该预训练数据集的分子结构多样性非常丰富。从图 4B 可以看出，原子数目大部分集中在 20 ～ 40，比较符合高成药性化合物的特点。总而言之，通过该数据集学习到的化学空间表征是更有效的。

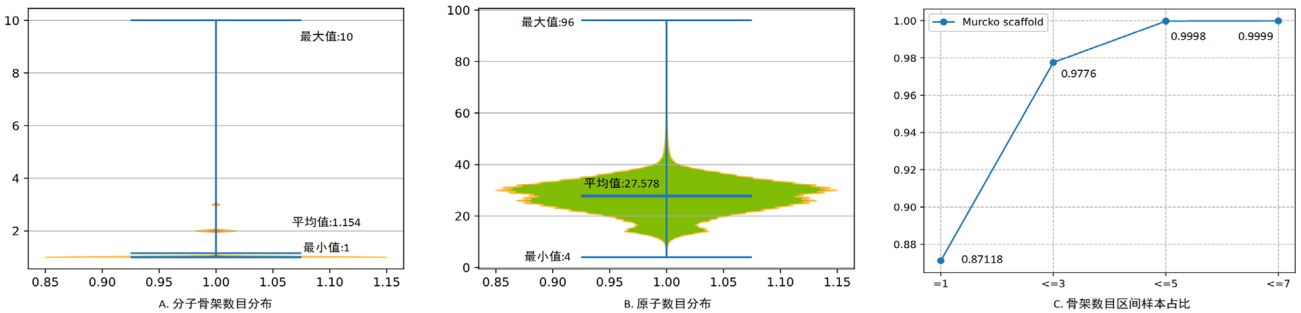


图 4　预训练数据集统计图

Fig 4　Statistical diagram of pre-trained dataset

3.2　基线对比实验

为了验证本文提出的模型的有效性，本文将 CSR-FP 模型与一些现有的模型和工具进行了比较。其中，基于规则的工具有 OSRA 和 MolVec，基于深度学习的工具有 DECIMER 和 CSR-FP。评估指标的统计数据见表 1。

表 1　模型性能对比结果

Tab 1　Model performance

数据集	方法	SSA/%	ATS/%	TS@1.0/%
Standard-CSI	OSRA	22.05±0.22	54.15±0.36	36.92±0.62
Standard-CSI	MolVec	17.18±0.41	50.59±0.24	31.18±0.23
Standard-CSI	DECIMER	38.19±0.34	87.52±0.21	47.54±0.22
Standard-CSI	CSR-FP	84.29±0.12	92.14±0.13	87.49±0.16
NI	OSRA	19.52±0.46	51.41±0.37	32.02±0.19
NI	MolVec	8.714±0.37	34.79±0.19	18.01±0.35
NI	DECIMER	17.42±0.27	68.46±0.29	22.16±0.38
NI	CSR-FP	82.19±0.17	88.19±0.18	84.86±0.21

对于以上三个评估数据，我们主要关注 SSA 值。从表 1 中可以看出，CSR-FP 在两个数据集上均取得了具有竞争力的结果。具体来说，两个基于规则的工具在两个数据集上的效果均不理想，例如 OSRA 和 MolVec 在 Standard-CSI 数据集上的 SSA 值只有 22.05% 和 17.18%，而 DECIMER 和 CSR-FP 则为 38.19% 和 84.29%。这说明相对于基于深度学习的方法，基于规则的方法泛化能力较差。而对于带有噪声的图像，前三者的识别精度均低于 20%，可能是因为基于规则的方法没有加入降噪的规则。DECIMER 则是直接使用一个特征提取器而没有和解码器进行联动学习，这会大大降低模型的特征学习能力。总体来说，CSR-FP 通过融合分子指纹预训练以及注意力机制，大大提升了模型的特征提取能力。

3.3　可视化结果

在 CSR-FP 模型中，编码器的输出为一个 512 通道的 8×8 特征图，在解码器生成字符时，模型计算特征图与隐式向量的注意力分数。因此，本文随机选取了一个正确识别的分子并将其每个字符生成时模型对 64 个图像块的注意力分数进行了可视化。如图 5 所示，第一个和最后一个子图分别表示原始的分子图片与所有字符叠加的注意力权重图。从最后一个子图可以看出，模型能够大致识别整个图片中的分子区域。从中间的字符权重子图也可以看出，模型关注的区域与相关

原子的位置有所重合。虽然某些字符的关注权重可能有所偏差，但是模型可以利用注意力信息，整合上下文信息以提升解码能力。未来，我们将通过扩大特征图以细化模型对分子图像块的信息抽取能力。

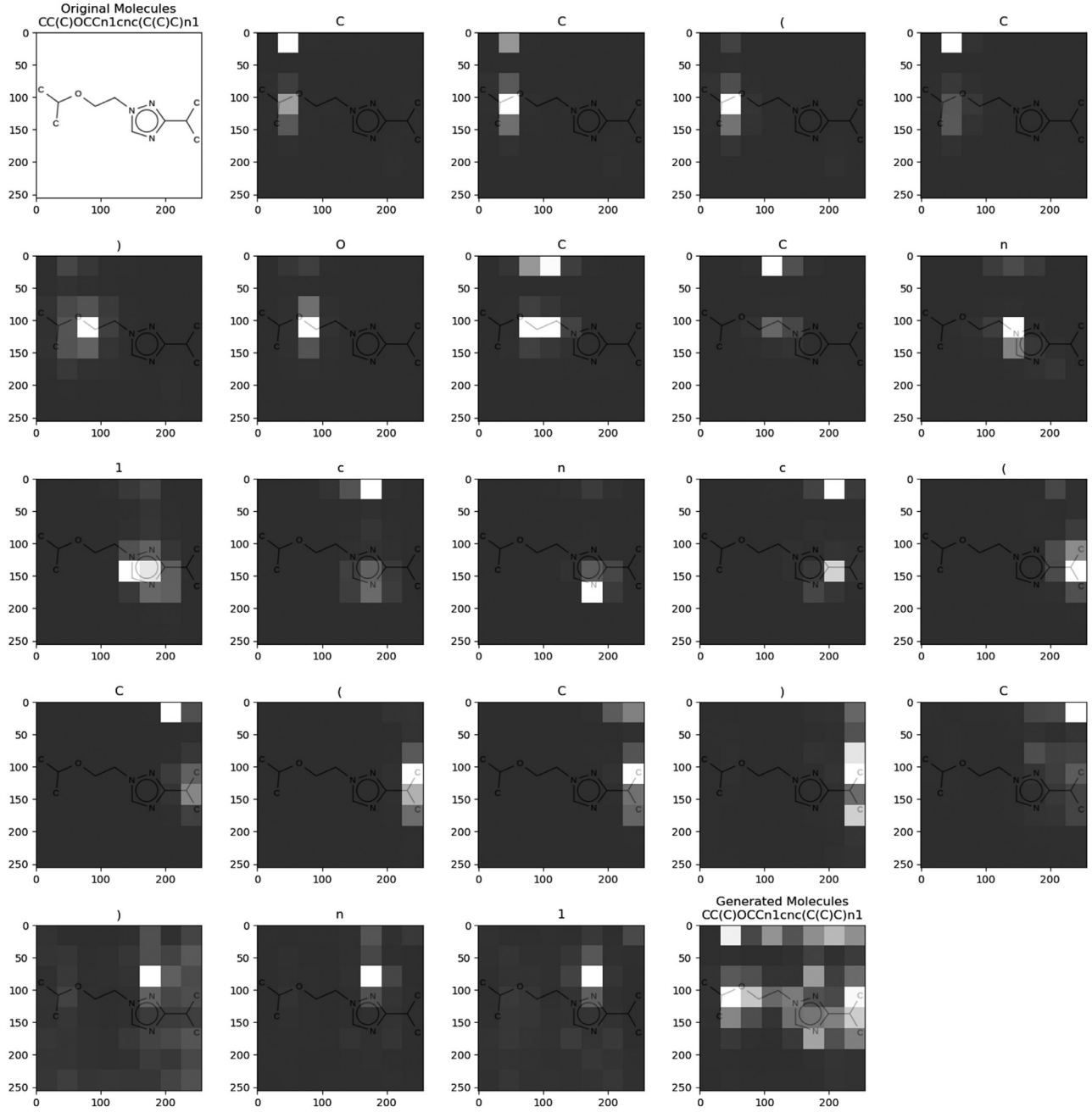


图 5 注意力机制示例图

Fig 5 Example diagram of attentional mechanisms

4 结论

针对 CSR，本文构建了一个基于编码器 - 解码器架构的模型 CSR-FP。该模型能较好地学习分子图像的表征，并且具备良好的可解释性。两个基准数据集测试结果表明该模型在目前已有的工具和方法中取得了具有竞争力的效果。具体来说，本文的贡献主要包括三个方面：

第一，构建了一个基于编码器 - 解码器架构的模型 CSR-FP，该模型能较好地学习分子图像空间表征，与其他工具及方法相比取得了具有竞争力的效果。该工作可在如下链接获取：https：//github.com/Jiacai-Yi/CSR-FP。

第二，采用了深度学习的方法，融合了分子指纹知识，即模型在学习分子图像空间时能结合

预训练学习到的分子结构信息和性质信息，对于生成更有效的空间表征具有指导意义。

第三，解码器融合了注意力机制，使模型在解码每个 SMILES 字符时都与编码形成的特征图做注意力计算，不仅提升了模型的特征提取能力，同时让模型具有更好的可解释性。

后续工作中，我们将深入探讨化学结构图像内在特征对模型性能的影响，并且构建与该任务更匹配的模型。并且，由于我们最终的目标是在大量文献中分割并识别准确的分子结构，因此，未来还需要在排除文本干扰、准确识别 R- 基团以及识别复杂的立体异构分子等问题上进行深入研究。

参考文献

[1] Rajan K，Brinkhaus HO，Zielesny A，et al. A review of optical chemical structure recognition tools [J]. J Cheminformatics，2020，12（1）：60.

[2] Staker J，Marshall K，Abel R，et al. Molecular structure extraction from documents using deep learning [J]. J Chem Inf Model，2019，59（3）：1017-1029.

[3] Krenn M，Häse F，Nigam A，et al. Self-Referencing Embedded Strings（SELFIES）：a 100% robust molecular string representation [J]. Machine Learning：Science and Technology，2020，1（4）：045024.

[4] Van Engelen JE，Hoos HH. A survey on semi-supervised learning [J]. Mach Learn，2020，109（2）：373-440.

[5] Xu K，Ba J，Kiros R，et al. Show，attend and tell：Neural image caption generation with visual attention. The 32nd International Conference on Machine Learning [C]. Lille，France：ACM，2015：2048-2057.

[6] Rogers D，Hahn M. Extended-connectivity fingerprints [J]. J Chem Inf Model，2010，50（5）：742-754.

[7] Mcdaniel JR，Balmuth JR. Kekulé：OCR-optical chemical（structure）recognition [J]. J Chem Inf Comput Sci，1992，32（4）：373-378.

[8] Lecun Y，Bottou L，Bengio Y，et al. Gradient-based learning applied to document recognition [J]. P IEEE，1998，86（11）：2278-2324.

[9] Girshick R，Donahue J，Darrell T，et al. Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation [C] //IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Columbus，USA：IEEE Computer Society，2014：580-587.

[10] Long J，Shelhamer E，Darrell T. Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation [C]//IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition，Boston，MA，USA，2015.

[11] Oldenhof M，Arany A，Moreau Y，et al. ChemGrapher：optical graph recognition of chemical compounds by deep learning [J]. J Chem Inf Model，2020，60（10）：4506-4517.

[12] Rajan K，Zielesny A，Steinbeck C. DECIMER：towards deep learning for chemical image recognition [J]. J Cheminformatics，2020，12（1）：1-9.

[13] Ronneberger O，Fischer P，Brox T. U-net：Convolutional networks for biomedical image segmentation [C]//International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention，Munich，Germany：Springer inter national publishing，2015：234-241.

[14] Szegedy C，Vanhoucke V，Ioffe S，et al. Rethinking the inception architecture for computer vision [C]//Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition，Las Vegas，NV：IEEE，2016：2818-2826.

[15] Xia T，Wang Y，Tian Y，et al. Using prior knowledge to guide BERT’s attention in semantic textual matching tasks [J]. Proceedings of the Web Conference，2021，2021：2466-2475.

[16] Liu W，Zhou P，Zhao Z，et al. K-bert：Enabling language representation with knowledge graph [C]//Proceedings of the AAAI Conference on Artificial Intelligence，New York，USA：AAAI，2020：2901-2908.

[17] Irwin JJ，Sterling T，Mysinger MM，et al. ZINC：a free tool to discover chemistry for biology [J]. J Chem Inf Model，2012，52（7）：1757-1768.

[18] Irwin JJ，Tang KG，Young J，et al. ZINC20——a free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery [J]. J Chem Inf Model，2020，60（12）：6065-6073.

[19] Pavlov D，Rybalkin M，Karulin B，et al. Indigo：universal cheminformatics API [J]. J Cheminformatics，2011，3（Suppl 1）：P4.

[20] Cho K，Merrienboer BV，Gülçehre Ç，et al. Learning phrase representations using RNN encoder-decoder for statistical machine translation [C]//Proceedings of the 2014 Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing，Doha，Qatar：Association for computational Linguistics，2014：1724-1734.

[21] He K，Zhang X，Ren S，et al. Deep residual learning for image recognition [C]. Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition，Las Vegas，NV：IEE，2016：770-778.

（收稿日期：2021-11-11；修回日期：2021-11-28）

膜分离技术与传统工艺联合对山茱萸皂苷的分离纯化

黎叶凡[1, 2]，朱华旭[3*]，唐志书[1, 2*]，刘红波[1, 2]，宋忠兴[1, 2]，姬莎莎[1, 2]（1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心，陕西 咸阳 712083；2. 秦药特色资源研究与开发国家重点实验室（培育）/陕西省创新药物研究中心，陕西 咸阳 712083；3. 南京中医药大学/江苏省植物药深加工工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心，南京 210023）

摘要：目的 将膜分离技术与传统工艺大孔树脂吸附联合对山茱萸皂苷进行分离纯化。**方法** 采用不同孔径的微滤、超滤膜对山茱萸皂苷进行精制；对不同种类的大孔树脂进行优化；以 HPD-300 型大孔树脂对不同处理方式药液的饱和吸附量、吸附率、解吸率评价大孔树脂污染程度。**结果** 最佳分离纯化工艺为 0.22 μm 微滤膜，50 kDa 的超滤膜对山茱萸皂苷分离纯化，HPD-300 型大孔树脂对山茱萸皂苷进一步纯化。使用微滤超滤预处理药液后，HPD-300 型大孔树脂饱和吸附量提高 40%。**结论** 适宜的微滤膜、超滤膜与大孔树脂吸附联用可以达到分离纯化山茱萸皂苷的目的。经过微滤超滤前处理的药液可有效降低大孔树脂污染，提高使用次数，增加树脂使用寿命，降低传统生产成本。

关键词： 山茱萸皂苷；微滤；超滤；膜技术；大孔树脂

中图分类号： R284 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)02-0254-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.003

Isolation and purification of saponins from *Cornus saponins* by traditional process combined with membrane separation technology

LI Ye-fan[1, 2], ZHU Hua-xu[3*], TANG Zhi-shu[1, 2*], LIU Hong-bo[1, 2], SONG Zhong-xing[1, 2], JI Sha-sha[1, 2] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine/Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resource Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Xianyang Shaanxi* 712083; 2. *State Key Laboratory of Research & Development of Typical Qin Medicine Resources (Cultivation)/Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang Shaanxi* 712083; 3. *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine/Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Deep Processing of Plant Medicines/Jiangsu Province Collaborative Innovation Center for Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources, Nanjing* 210023)

Abstract: Objective To separate and purify *Cornus saponins* by combining membrane separation technology with traditional macroporous resin adsorption. **Methods** The purification of *Cornus saponins* was conducted by microfiltration and ultrafiltration membranes with different pore sizes. Different kinds of macroporous resins were optimized. The degree of macroporous resin pollution was evaluated by the saturated adsorption capacity, adsorption rate and desorption rate of HPD-300 macroporous resin for different treatment methods. **Results** The optimum separation and purification process was 0.22 μm microfiltration membrane, 50 kDa ultrafiltration membrane for the separation and purification of *Cornus saponins*, and HPD-300 macroporous resin for further purification of *Cornus saponins*. After the solution was pretreated by microfiltration and ultrafiltration, the saturated adsorption capacity of HPD-300 macroporous resin increased by 40%. **Conclusion** Suitable

基金项目： 国家自然科学基金项目（No.81773919）；国家自然科学基金项目（No.81803744）；现代农业产业技术体系建设专项资金（No. CARS-21）；咸阳市 2020 重大科技专项（No.2020K01-20）。

作者简介： 黎叶凡，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量体系评价与研究，email：446415268@qq.com *通信作者：朱华旭，女，博士，主要从事药分离过程原理与适宜技术研究，email：huaxu72@126.com；唐志书，男，博士，主要从事中药资源开发与中药质量分析研究，email：tzs6565@163.com

microfiltration membrane, ultrafiltration membrane and macroporous resin adsorption can separate and purify *Cornus saponins*. The solution pretreated by microfiltration and ultrafiltration can effectively reduce the pollution of macroporous resin, improve the number of usages, increase the service life of resin and reduce the traditional production cost.

Key words: Cornus saponin; microfiltration; ultrafiltration; membrane technology; macroporous resin

山茱萸（*Cornus saponins* Sieb. et Zucc.）落叶乔木或灌木，产于中国山西、陕西、甘肃等，其果实称“萸肉”。供药用，味酸涩，性微温，为收敛性强壮药，有补肝肾止汗的功效[1]。富含皂苷、氨基酸和多糖等多种成分，山茱萸皂苷类物质是山茱萸的主要活性成分之一，主要有莫诺苷、马钱苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷等[2]。大量研究表明山茱萸皂苷可保护血管细胞，治疗糖尿病并发症[3-4]，同时具有免疫调节和抑菌等作用[5]。

传统山茱萸皂苷分离纯化大多使用化学沉淀法、正丁醇萃取法、重结晶法、分馏法[6]，传统纯化方法存在效率低、步骤繁琐，重复性差、纯化周期长，一些方法有机溶剂残留严重等缺点，无法应用于大量皂苷的分离纯化[7]。大孔吸附树脂为一种常用的纯化手段，具有吸附解吸速度快、吸附容量大、容易再生、使用寿命长等优点[8]，现已被广泛应用于皂苷的分离和富集[9]。

膜分离技术（membrane separation technology，MST）是一门分离新技术[10]。利用“筛分”效应实现大分子与小分子分离，具有效率高、污染小、节省能源等优点[11]，已广泛应用于食品、医药、环境等多个领域，成为当今分离科学中最重要的手段之一[12-14]。MST 主要利用相对分子质量的差异达到分离的目的，对皂苷的分离纯化有非常重要的应用价值[15]。目前已经应用 MST 对绞股蓝皂苷[16]、三七叶苷[17]、油茶皂苷[18]、胡芦巴总苷[19]等多种皂苷类成分进行了分离纯化，且显示出良好的效果。

本试验将传统大孔树脂吸附的分离纯化工艺与现代 MST 联合，以过膜前后皂苷含量、除杂率、回收率、指标成分转移率、膜污染程度为评价指标，综合评价不同孔径的微滤膜、超滤膜，不同种类大孔树脂对山茱萸皂苷的适用性。以大孔树脂的饱和吸附量、吸附率、解吸率评价大孔树脂污染程度。

1 材料

1.1 仪器

N-1300 型旋转蒸发仪（上海爱郎仪器有限公司）；UV-2600 型紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；调温型电热套（北京科伟永兴仪器有限责任公司）；电热恒温水浴锅（上海科恒实业发展有限公司）；SHZ-D（Ⅲ）型循环水式真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司）；Sartorius CPA225D 型电子分析天平（德国赛多利斯科学仪器有限公司，精度：十万分之一）；Scout 型电子天平（奥豪斯仪器常州有限公司，精度：百分之一）；LNG-HFM-101 型实验室膜分离设备（上海朗极膜分离设备工程有限公司）；Waters 2695 HPLC 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；KQ-300DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DHG-9202-3 型红外线恒温鼓风干燥箱（金坛区华城敏科实验仪器厂）；YKF-150 型制水机（杭州华新净水有限公司）。

1.2 试药

山茱萸药材购自陕西兴盛德药业有限公司，经陕西中医药大学刘世军教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》有关质量规定；人参皂苷 Re（批号：110754-202028，供含量测定用）、马钱苷（批号：111640-201808，供含量测定用）对照品（中国食品药品检定研究院）；莫诺苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷对照品（批号分别为 121768-202014、111396-201911、111345-201908，供含量测定用，上海源叶生物科技有限公司）；PVDF 微滤膜（0.1 μm，0.22 μm，0.45 μm）、PES 超滤膜（100 kDa，50 kDa，30 kDa，10 kDa，5 kDa）（美 国 Biomax 公司）；乙腈（色谱纯，霍尼威尔贸易上海有限公司）；磷酸（色谱纯，天津市天士力化学试剂有限公司）；甲醇、香草醛、高氯酸、冰醋酸均为分析纯；HPD-600、HPD-300、D-101、H-103、AB-8、NKA-9 型大孔树脂（西安蓝深特种树脂有限公司）；水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 山茱萸皂苷的测定

精密称取人参皂苷 Re 对照品 2 mg，加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，作为对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 于具塞试管中，水浴加热挥干溶剂，精密加入新鲜配制的 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL、

高氯酸 0.8 mL，振摇混匀后于 60 ℃ 水浴加热 15 min 取出，冰水冷却 2 min 后，加冰醋酸 5 mL 摇匀，静置 5 min。溶液在 400 ～ 800 nm 范围内扫描，对照空白试剂，测得人参皂苷 Re 的最大吸收波长为 540 nm，故选择 540 nm 为测定波长 [20-21]。以吸光度（A）为纵坐标，人参皂苷 Re 质量浓度（C）为横坐标，绘制标准曲线。计算得标准曲线回归方程：$A = 20.826C - 0.1222$，$R^2 = 0.9997$。结果表明，人参皂苷 Re 在 5 ～ 30 μg • mL^{-1} 与吸光度呈良好的线性关系。

2.2　皂苷的提取工艺流程

称取山茱萸饮片适量，将药材粉碎后加入圆底烧瓶，加 10 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次，每次 2 h，冷却过滤，合并滤液，离心弃沉淀得上清液，上清液减压浓缩至无醇味，加 6 倍量蒸馏水混合均匀，即得山茱萸水溶液 [22]，备用。山茱萸水溶液用 MST 进行纯化精制 [23-24]，再使用传统大孔树脂吸附工艺进一步纯化。

2.3　指标成分转移率的测定

2.3.1　色谱条件 [25]　色谱柱 Ultimate XB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；PDA 二极管阵列检测器；柱温 30 ℃；体积流量 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 240 nm；进样量 10 μL；梯度洗脱条件见表 1。

表 1　HPLC 梯度洗脱条件

Tab 1　Gradient elution conditions of HPLC

时间 /min	A. 0.3% 磷酸 /%	B. 乙腈 /%
1	90	10
5	86	14
9	84	16
12	83	17
15	72	28
18	66	34
25	90	10

2.3.2　对照品溶液的配制　精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的莫诺苷、马钱苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷对照品各 9.98、9.97、9.96、9.97 mg，置 10 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀，即得质量浓度各为 0.998 mg • mL^{-1}、0.997 mg • mL^{-1}、0.996 mg • mL^{-1}、0.997 mg • mL^{-1} 的莫诺苷、马钱苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷对照品储备液。

2.3.3　混合对照品溶液的配制　取獐牙菜苷对照品储备液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀，得 0.05 mg • mL^{-1} 獐牙菜苷对照品溶液。取獐牙菜苷对照品溶液 1 mL、取马钱苷对照品储备液 0.6 mL、莫诺苷对照品储备液 0.8 mL、山茱萸新苷对照品储备液 0.1 mL 置于 10 mL 量瓶中，得混合对照品溶液 [26]。

2.3.4　供试品溶液的制备　分别精密量取各供试品溶液 1 mL，置于蒸发皿中，水浴蒸干溶剂，加 80% 甲醇溶解，置于 10 mL 量瓶中，加 80% 甲醇定容至刻度，摇匀，经 0.22 μm 滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.3.5　线性关系考察　精密吸取马钱苷、莫诺苷对照品储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀。取獐牙菜苷对照品储备液 0.1、0.5、1、1.5、2 mL 分别置于 100 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀。取山茱萸新苷对照品储备液 0.5、1、1.5、2、2.5 mL 分别置于 100 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀。各进样 10 μL 测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），进行线性回归 [27]，得回归方程见表 2。

表 2　各成分线性关系 ($n = 6$)

Tab 2　Linear relationship of components ($n = 6$)

成分	回归方程	R^2	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
马钱苷	$Y = 2\times10^7X - 2.19\times10^3$	0.9998	9.98 ～ 99.8
莫诺苷	$Y = 2\times10^7X - 1.47\times10^4$	0.9998	9.97 ～ 99.7
獐牙菜苷	$Y = 2\times10^7X - 8.86\times10^3$	0.9999	0.996 ～ 19.92
山茱萸新苷	$Y = 1\times10^7X - 4.30\times10^4$	0.9998	4.99 ～ 24.93

2.3.6　除杂率（Q）与皂苷回收率（P）的计算　$Q = (Q_1 - Q_2)/Q_1\times100\%$，式中 Q_1 为山茱萸水溶液固形物含量，Q_2 为透过液固形物含量。$P = (P_2/P_1)\times100\%$，式中 P_2 为透过液皂苷含量，P_1 为原液皂苷含量。Q 值越大，说明该除杂方式去除杂质效果越好；P 值越大，说明透过液中的皂苷含量越高。

2.3.7　指标成分转移率（T）的计算　$T = C_p/C_f\times100\%$，式中 C_p 为渗透液中马钱苷、莫诺苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷含量，C_f 为原液中马钱苷、莫诺苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷含量。T 值越大，说明山茱萸皂苷中单成分转移率越高。

2.3.8　膜污染程度的测定　使用通量下降率（M）表示膜污染程度：$M = (J_0 - J)/J_0\times100\%$，$J_0$ 为初始纯水通量，J 为污染膜的纯水稳定通量。M 越大，表示透过量衰减越大，污染越严重。

2.4　微滤膜技术的精制处理 [28]

山茱萸水溶液分别经膜孔径为 0.1、0.22、0.45 μm 的聚偏氟乙烯微滤膜（MF）处理，得微滤渗透液。以过膜前后除杂率、皂苷回收率、指标成分转移率及膜污染程度为评价标准，考察不同孔径的聚偏氟乙烯微滤膜对该体系的适用性。膜微滤操作条件：过膜温度 25 ℃，过膜压差值 0.3 MPa，结果见

表 3、4。皂苷含量、回收率与指标成分转移率随膜孔径的增大而增大；膜污染程度与除杂率随膜孔径的增大而减小。可能由于乙醇提取得到的山茱萸水溶液中低极性成分和皂苷形成不溶于水的复合物被微滤膜截留下来，膜孔径小，导致山茱萸水溶液中杂质拦截多，微滤膜的膜孔径构架上吸附杂质变多，在微滤膜表面形成的滤饼层较厚，导致皂苷的透过减少，从而皂苷含量、回收率与指标成分转移率下降明显。同理，膜孔径越小拦截杂质较多，除杂率越高，膜表面污染物的沉积使小孔径膜产生了更为严重的膜污染，导致膜污染速度加快，膜污染程度严重，从而造成此现象。综合考虑 0.22 μm 孔径的微滤膜（MF0.22）最为适用。

表 3　微滤膜孔径对除杂率和皂苷回收率的影响 (n = 3)

Tab 3　Effect of pore size of microfiltration membrane on impurity removal rate and saponin recovery rate (n = 3)

MF 膜孔径 / μm	皂苷含量 /%	除杂率 /%	皂苷回收率 /%
0.1	47.43±2.21	35.45±2.76	80.24±2.51
0.22	53.88±3.56	28.72±1.89	93.71±3.23
0.45	75.51±3.32	10.73±3.12	96.35±1.96

表 4　微滤膜孔径对皂苷成分转移率与膜污染程度的影响 (n = 3)

Tab 4　Effect of pore size of microfiltration membrane on saponin transfer rate and membrane pollution degree (n = 3)

MF 膜孔径 / μm	指标成分转移率 /%				膜污染程度 /%
	马钱苷	莫诺苷	獐芽菜苷	山茱萸新苷	
0.1	68.16±2.76	75.44±1.21	72.34±1.78	63.41±2.65	56.67±1.88
0.22	83.34±1.86	84.39±1.54	80.15±2.31	78.29±1.87	45.52±2.15
0.45	89.45±3.11	88.57±2.16	85.65±1.44	83.15±1.63	32.77±1.64

2.5　超滤膜技术的精制处理

山茱萸水溶液分别经膜孔径为截留相对分子质量分别为 5、10、30、50、100 kDa 的聚醚砜超滤膜（UF）处理，得超滤膜渗透液。以过膜前后除杂率、皂苷回收率、指标成分转移率及膜污染程度为评价标准，考察不同孔径的聚醚砜超滤膜对该体系的适用性。膜微滤操作条件：过膜温度 25 ℃，过膜压差值 0.3 MPa，结果见表 5、6。从表 5、6 可知，皂苷含量、回收率与指标成分转移率随膜孔径的增大而增大；膜污染程度与除杂率随膜孔径的增大而减小。综合考虑各项因素，选择 50 kDa 孔径的超滤膜（UF50）来纯化山茱萸皂苷较为适宜。

表 5　超滤膜孔径对除杂率和皂苷回收率的影响 (n = 5)

Tab 5　Effect of ultrafiltration membrane pore size on impurity removal rate and saponin recovery (n = 5)

UF 膜孔径 /kDa	皂苷含量 /%	除杂率 /%	皂苷回收率 /%
5	10.12±1.81	51.60±2.67	52.68±2.39
10	15.64±1.37	48.41±1.03	60.43±1.56
30	32.28±2.05	43.74±1.12	83.45±0.97
50	35.53±1.32	40.31±2.78	86.33±1.09
100	43.86±2.15	22.98±2.14	95.25±2.34

表 6　超滤膜孔径对皂苷成分转移率与膜污染程度的影响 (n = 5)

Tab 6　Effect of ultrafiltration membrane pore size on saponin transfer rate and membrane pollution degree (n = 5)

UF 膜孔径 / kDa	指标成分转移率 /%				膜污染程度 /%
	马钱苷	莫诺苷	獐芽菜苷	山茱萸新苷	
5	28.64±1.34	31.09±1.52	25.27±1.66	34.68±1.84	58.60±2.67
10	33.41±2.15	36.59±2.08	32.19±1.45	47.38±1.65	46.41±1.03
30	51.37±1.76	57.72±1.79	51.39±1.81	65.34±2.08	37.74±1.12
50	54.86±1.53	60.81±1.52	53.61±2.17	68.93±1.89	34.31±2.78
100	65.32±2.37	71.23±2.13	68.33±1.95	80.16±2.01	22.98±2.14

2.6　大孔树脂技术的精制处理

2.6.1　大孔树脂种类筛选　试验选取 6 种适合分离山茱萸皂苷的大孔吸附树脂（见表 7）[29]，从中选出最优树脂用于分离纯化山茱萸皂苷。

① 大孔树脂预处理：将大孔树脂用 95% 乙醇于室温下浸泡 24 h，倾去上层乙醇，湿法装柱，用 95% 乙醇冲洗树脂柱，至流出液加水不产生白色浑浊为止；再用纯化水冲洗树脂柱至流出液无醇味；然后，用 2 BV 体积 5%HCl 溶液冲洗树脂柱，再用纯化水冲洗至流出液呈中性；再用 2 BV 体积 5%NaOH 溶液冲洗树脂柱，最后用纯化水冲洗至流出液呈中性 [30]，备用。

② 静态吸附 [31-33]：精密称取已预处理好的大孔树脂 HPD-600、HPD-300、D-101、H-103、AB-8、NKA-9 各 10 g，置于 150 mL 锥形瓶中，加入山茱萸水溶液 40 mL，置于 25 ℃恒温水浴摇床上，以 110 $r \cdot min^{-1}$ 的速度震荡 4 h，静置 12 h，使其达到饱和吸附，吸取上层药液检测 [34]。

表 7　大孔树脂种类与性质 (n = 6)

Tab 7　Types and properties of macroporous resin (n = 6)

树脂型号	平均孔径 /μm	比表面积 /（$m^2 \cdot g^{-1}$）
HPD-600	80 ～ 90	550 ～ 600
HPD-300	90 ～ 110	500 ～ 550
D-101	90 ～ 100	500 ～ 550
H-103	85 ～ 95	1000 ～ 1100
AB-8	130 ～ 140	480 ～ 520
NKA-9	100 ～ 120	500 ～ 550

③ 静态解吸：取上述达到静态饱和吸附药液的大孔树脂 [35-36]，滤过，水洗净，吸干表面水分，加入 55% 乙醇 40 mL，置于 25 ℃恒温水浴摇床上，以 110 $r \cdot min^{-1}$ 的速度震荡 2 h，静置 8 h，使其解吸完全，以大孔树脂吸附洗脱前后除杂率、皂苷回收率、指标成分转移率为评价标准，考察不同种类的大孔树脂对该体系的适用性 [37]。结果见表 8。

表 8　大孔树脂种类对除杂率和皂苷回收率及皂苷成分转移率的影响 (n = 6)

Tab 8　Effect of macroporous resin types on impurity removal rate, saponin recovery rate and saponin component transfer rate (n = 6)

树脂类型	皂苷含量 /%	除杂率 /%	皂苷回收率 /%	指标成分转移率 /%			
				马钱苷	莫诺苷	獐芽菜苷	山茱萸新苷
AB-8	44.73±2.05	30.19±1.68	62.44±1.66	70.15±1.66	75.07±1.57	65.16±1.35	59.23±1.58
HPD-300	65.59±1.87	42.33±1.93	88.16±2.03	87.61±2.33	93.72±1.69	85.33±1.89	83.17±1.77
D-101	58.34±2.13	35.82±2.07	77.45±1.84	80.13±1.89	86.39±1.74	76.47±1.76	72.32±1.59
H-103	48.67±1.94	31.94±1.57	68.58±2.18	74.76±2.15	78.51±2.02	68.94±1.54	63.67±1.62
HPD-600	61.56±2.23	38.61±2.18	82.92±1.73	83.49±2.19	90.18±1.58	81.69±2.11	78.34±1.88
NKA-9	55.34±1.85	33.74±1.86	73.66±1.84	77.42±1.38	82.43±1.69	72.17±1.23	67.23±1.97

由表 8 可知，HPD-300 型大孔树脂的皂苷含量达到（65.59±1.87）%，除杂率为（42.33±1.93）%，皂苷回收率为（88.16±2.03）%，这 3 个指标成分均高于其他 5 种大孔树脂，指标性成分转移率相较于其他 5 种大孔树脂也有明显的提高，HPD-300 型大孔树脂对山茱萸皂苷体系的适用性较好，故选择 HPD-300 型大孔树脂来分离纯化山茱萸皂苷。

2.7　微滤膜与超滤膜联用技术的精制处理

先将山茱萸水溶液经 MF0.22 微滤膜滤过后，再将微滤膜渗透液经 UF50 超滤膜滤过，收集超滤膜渗透液。以处理前后的除杂率、皂苷回收率、指标成分转移率为评价标准，考察膜联用方式对该体系的适用性。结果见表 9。

表 9　不同联用方式对除杂率和皂苷回收率及皂苷成分转移率的影响 (n = 4)

Tab 9　Effects of different combination methods on impurity removal rate, saponin recovery rate and saponin component transfer rate (n = 4)

联用方式	皂苷含量 /%	除杂率 /%	皂苷回收率 /%	指标成分转移率 /%			
				马钱苷	莫诺苷	獐芽菜苷	山茱萸新苷
HPD-300（1 号）	52.02±1.58	64.59±1.56	69.82±1.79	60.51±1.71	55.76±1.28	57.83±1.33	57.12±1.77
MF0.22 ＋ UF50（2 号）	48.32±1.49	48.61±1.31	75.82±2.48	56.34±1.65	53.42±1.39	51.43±1.71	54.35±1.62
MF0.22 ＋ HPD-300（3 号）	55.98±1.16	67.64±2.07	66.17±1.54	65.81±1.33	57.17±1.51	62.58±1.65	57.29±1.44
UF50 ＋ HPD-300（4 号）	58.24±1.32	71.41±1.91	62.62±2.01	71.28±1.62	63.48±1.65	65.61±1.44	58.73±1.57
MF0.22 ＋ UF50 ＋ HPD-300（5 号）	65.05±1.27	75.22±2.54	57.57±1.67	75.33±1.43	68.35±1.32	70.06±1.52	60.49±1.51

2.8　膜技术与大孔树脂联用技术的精制处理

分别将“2.4”“2.5”“2.7”项下得到的微滤膜渗透液、超滤膜渗透液、微滤超滤联用渗透液，经浓缩后分别加入到 HPD-300 大孔树脂柱中，静置吸附 2 h。先用蒸馏水冲洗至流出液无色，再用 55% 乙醇洗脱，收集乙醇洗脱液。以处理前后除杂率、皂苷回收率、指标成分转移率为评价标准，考察不同联用方式对该体系的适用性。结果见表 9。

由表 9 可知，微滤超滤联用处理山茱萸水溶液（2 号）与传统工艺大孔树脂吸附（1 号）相比，在纯化方面确实无法达到大孔树脂纯化的效果，可能由于单纯使用膜处理纯化药液，不能去除小于膜孔径的杂质，而传统大孔树脂可以吸附较多粒径小的杂质，无法使用单纯膜技术处理替代大孔树脂分离纯化山茱萸皂苷。联用（5 号）在皂苷含量、除杂率、回收率与指标性成分转移率上效果显著，明显高于传统大孔树脂吸附工艺与其他联用方式。将不同分离原理的膜分离技术与大孔树脂分离联用，去除杂质的范围较广，得到的山茱萸皂苷含量高，故选择联用技术来纯化山茱萸皂苷。

2.9　膜技术前处理对大孔树脂使用效率及次数的影响

2.9.1　饱和吸附量　将“2.2”“2.7”项下所得的山茱萸水溶液、微滤超滤联用渗透液分别作为大孔

树脂的上样溶液，以 2 BV·h^{-1} 的速度进行上样，分段收集 55% 乙醇洗脱液，每份收集 50 mL，收集 1 ～ 10 份流出液，测定皂苷含量。流出液中皂苷浓度如果达到上样液浓度的 10% 时，称为泄漏点，当流出液中皂苷浓度达到上样液浓度的 100% 时，称为饱和点 [38-39]。计算吸附率（E）：E（%）=（M_1 − M_2）/M_1×100%（M_1 为吸附前溶液皂苷质量；M_2 为吸附后溶液皂苷质量）。

从图 1、2 看出，山茱萸水溶液的大孔树脂饱和吸附量为 300 mL，经过微滤超滤处理的药液饱和吸附量为 500 mL，饱和吸附量提高 40%。经过微滤超滤前处理，可以使大孔树脂饱和吸附量明显提高，可能由于山茱萸水溶液中杂质较多，过多地占据大孔树脂孔道，或者覆盖在树脂表面直接导致吸附的药液量减少。而经由微滤超滤处理的山茱萸透过液，其中可吸附的杂质等物质减少，可以减轻树脂孔道堵塞，减少树脂表面杂质覆盖。大孔树脂的饱和吸附量增加明显，直接提高大孔树脂的最大使用效率。

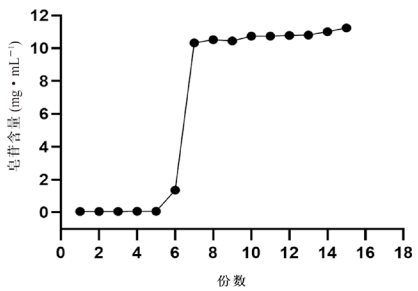


图 1　山茱萸水溶液在大孔树脂上泄露曲线

Fig 1　Leakage curve of *Cornus saponins* saponin stock solution on macroporous resin

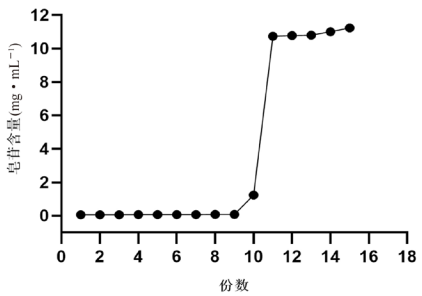


图 2　山茱萸微滤超滤渗透液在大孔树脂上泄露曲线

Fig 2　Leakage curve of *Cornus saponins* ultrafiltration permeate on macroporous resin

2.9.2　大孔树脂使用次数静态吸附实验　称取已处理好的大孔树脂 HPD-300 各 10 g，置于 150 mL 锥形瓶中，分别取 “2.2” “2.7” 项下所得的山茱萸水溶液、微滤超滤联用渗透液各 40 mL，置于 25 ℃恒温水浴摇床上以 110 r·min^{-1} 的速度震荡 4 h，静置 2 h，使其达到饱和吸附 [40-41]，吸取上层药液测定皂苷的浓度。比较山茱萸水溶液、微滤超滤联用渗透液两者使用多次后吸附率的变化。再将已吸附饱和药液的 HPD-300 大孔树脂滤过，水洗净，吸干表面水分。各加入 55% 乙醇 40 mL，置于 25 ℃恒温水浴摇床上，以 110 r·min^{-1} 的速度震荡 4 h，静置 2 h。使其解吸完全，测定洗脱液的皂苷浓度。比较山茱萸水溶液、微滤超滤联用渗透液两者使用多次后解吸率的变化，解吸后，适量蒸馏水洗至无醇味，大孔树脂完成一次使用。同样操作重复 10 次，计算出每次的吸附率与解吸率。对比相同使用次数条件下，两种药液吸附率与解吸率变化 [42]。计算解吸率（W）：W（%）= M_3/（M_1 − M_2）×100%（M_3 为解吸溶液中皂苷质量；M_2 为吸附后溶液皂苷质量；M_1 为吸附前溶液皂苷质量）。

由图 3 中可知，首次使用时大孔树脂对山茱萸水溶液、微滤超滤联用渗透液吸附率分别为 93.48% 与 93.71%，吸附率差异较小。在使用第 4 次时两者溶液吸附率分别为 88.73% 与 92.11%，山茱萸水溶液吸附率明显下降。到使用第 10 次时两者溶液吸附率分别为 79.36% 与 85.31%。由于使用次数增加，树脂表面及内部都会残留许多非吸附性成分或杂质，导致树脂表面被覆盖或孔道被部分填充，待测物再次填充难度增大，吸附量下降。由图 4 中可知，在初次使用时两者溶液解吸率分别为 98.34% 与 98.17%，解吸率同样差异较小。使用第 10 次时两者溶液解吸率分别为 80.25% 与 87.74%，解吸率差别较大。由于使用次数增加，树脂吸附量下降，直接导致吸附的皂苷量减少，解吸出来的皂苷量降低，解吸率随之下降。经过微滤超滤前处理的山茱萸水溶液有效提高大孔树脂的吸附率与解吸率，可增加大孔树脂的使用次数，提高大孔树脂使用寿命。

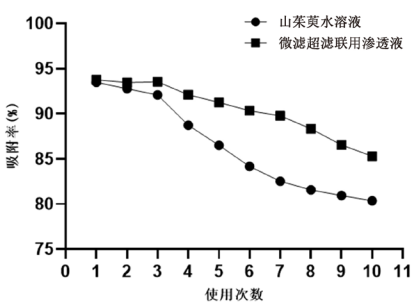


图 3　大孔树脂使用次数与吸附率变化趋势

Fig 3　Change trend of the times of use and adsorption rate of macroporous resin

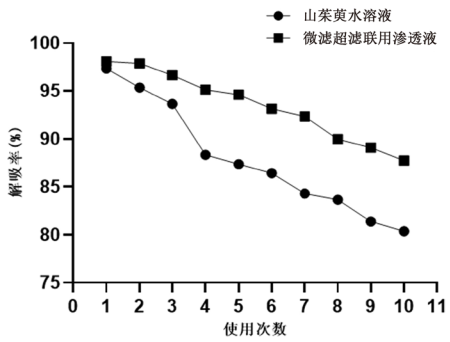


图 4 大孔树脂使用次数与解吸率变化趋势

Fig 4 Change trend of the times of use and desorption rate of macroporous resin

3 讨论

本试验采用 MST 与传统大孔树脂吸附工艺联合对山茱萸水溶液进行了精制处理。从皂苷含量、除杂率、回收率、指标成分转移率及膜污染程度等多方面综合分析了不同膜孔径及不同大孔树脂种类对山茱萸水溶液液精制效果的影响。山茱萸水溶液经联用精制处理后，除杂率分别比前期研究的传统工艺大孔树脂吸附提高 11.63%，马钱苷、莫诺苷、獐芽菜苷与山茱萸新苷单成分含量较传统工艺大孔树脂洗脱有明显提高，联用技术可克服传统工艺中存在的有效成分损失严重、生产效率低等不足。且研究发现在使用 0.22 μm 孔径的微滤膜与 50 kDa 孔径超滤膜，联用 HPD-300 型大孔树脂吸附工艺的条件下，能够有效去除杂质，并对指标成分有较好的保留率。

本研究优化工艺操作性与复制性强，可尝试推广到生产中，用以提高皂苷含量，降低生产成本，提高生产效率，为日后此类研究提供了新的思路和方法。

本研究的不足：只考察了膜孔径，没有考察过膜条件的影响因素，包括过膜压力、膜材料以及过膜药液温度的影响。对不同纯化工艺得到的山茱萸皂苷缺少药效学方面的考察。下一步试验中需要对这些问题进行深入研究。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：29.
[2] 胡本祥，彭亮，杨冰月，等 . “秦药”的现代研究概况 [J]. 中草药，2018，49（21）：4949-4959.
[3] 潘小华，赵池，叶小兰 . 山茱萸的药理作用研究进展 [J]. 中国药房，2009，20（30）：2398-2400.
[4] 曹喻灵 . 山茱萸总皂苷对白血病 K562 细胞凋亡的影响 [D]. 衡阳：南华大学，2013.
[5] 雷小小，苏艳莹，李美云，等 . 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫诺苷的研究进展 [J]. 上海中医药杂志，2018，52（1）：104-108.
[6] 王贤 . 现代提取分离技术在中药纯化分离中的应用 [J]. 家庭医药 • 就医选药，2016（7）：121-125.
[7] 熊先明，金萍，郑金红 . 分离纯化新技术在中药提纯中的应用 [J]. 中国老年保健医学，2012，10（4）：110-111.
[8] 黄鹤洁 . 大孔吸附树脂在分离提取中药皂苷有效部位中的应用 [J]. 亚太传统医药，2009，5（6）：41-43.
[9] 陈秦娥，梁金龙 . 中药提取、分离与纯化新技术进展 [J]. 医药工程设计，2012，33（4）：65-68.
[10] 冯敬文，黄桂芬，江建航，等 . 膜分离技术在金边土鳖活性成分分离中的应用 [J]. 中国处方药，2020，18（7）：34-36.
[11] 陈雪婷，徐文杰，李洁环 . 膜分离技术在布渣叶黄酮类化合物提取中的应用 [J]. 湖南中医杂志，2020，36（2）：143-144.
[12] 黄莎莎，赵文静，张悦，等 . 中药酚酸类成分在 PES 膜分离过程中的透过机制研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（1）：106-112.
[13] 宋逍，段玺，徐萌，等 . 葛根中有效成分葛根素膜分离工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2019，30（10）：2314-2317.
[14] 吴彦，俞金伟，黄东业，等 . 膜分离技术精制罗汉果香味成分及应用 [J]. 烟草科技，2019，52（7）：51-60.
[15] 时国庆，马甜甜，刘珂，等 . 膜技术制备山茱萸皂苷的研究 [J]. 河南化工，2015，32（9）：19-23.
[16] 易克传，岳鹏翔，李慧 . 膜分离技术纯化绞股蓝皂苷 [J]. 北京工商大学学报（自然科学版），2010，28（3）：23-26.
[17] 李维莉，马银海，张亚平，等 . 无机陶瓷膜 - 树脂联用技术纯化三七叶苷的工艺研究 [J]. 中药材，2009，32（6）：980-982.
[18] 赵敬娟 . 油茶皂苷的提取及膜分离纯化的研究 [D]. 合肥：安徽农业大学，2009.
[19] 李季文，景明 . 膜分离与树脂法联用提取分离胡芦巴总苷的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2009，15（1）：12-13.
[20] 彭亮，李知敏，祝珍芳 . 大孔吸附树脂纯化蒺藜中总皂苷工艺的优化 [J]. 中成药，2011，33（5）：886-889.
[21] 平静，李清，陈晓辉，等 . 大孔吸附树脂纯化山药总皂苷的工艺研究 [J]. 中成药，2011，33（10）：1810-1813.
[22] 王红菊 . 山茱萸总皂苷提取工艺及改善糖尿病相关机制研究 [D]. 西安：陕西师范大学，2015.
[23] 贺娟妮 . 山茱萸中三种环烯醚萜苷的微波提取及高效液相色谱测定 [D]. 西安：陕西师范大学，2011.
[24] 韩志慧，张景伟，赵玉丛，等 . 7 种山茱萸总皂苷提取分离方法效果比较 [J]. 郑州大学学报（医学版），2005（3）：466-468.
[25] 肖红，王东春，舒琴，等 . 山茱萸不同炮制品中 8 个化学成分的含量测定 [J]. 中国现代中药，2021（8）：1444-1450.
[26] 仲达，王艳 . 山茱萸醇提物 HPLC 指纹图谱及其聚类分析 [J]. 安徽医药，2015，19（11）：2077-2080.
[27] 侯懿娜 . 三七总皂苷的大孔树脂吸附特性 [D]. 昆明：云

南中医学院，2016.
[28] 陈萍虹，杨晓林，徐迪 . 膜分离技术及其应用现状 [J]. 化工中间体，2014（7）：8-11.
[29] 周玫，梁志远，甘秀海，等 . D101 大孔树脂富集白术内酯Ⅰ和Ⅲ工艺研究 [J]. 安徽农业科学，2016，44（24）：131-135.
[30] 杨宁，刘艳妮，康杰芳 . 山茱萸药材 HPLC 指纹图谱的优化研究 [J]. 药物分析杂志，2014，34（11）：1989-1994.
[31] 赵惠茹，龙静，杨黎彬，等 . HPD-300 大孔吸附树脂对山茱萸总皂苷分离工艺的优化 [J]. 中成药，2014，36（2）：416-419.
[32] 李欣孺，赵峰，龙伟，等 . 山茱萸总皂苷的大孔吸附树脂分离与纯化研究 [J]. 医药导报，2009，28（6）：767-770.
[33] 吴红，梁恒，吴道澄，等 . 大孔吸附树脂法分离纯化山茱萸总皂苷 [J]. 第四军医大学报，2003，24（8）：689-692.
[34] 刘韶，阳秀娟 . 大孔树脂分离纯化陈皮中多甲氧基黄酮类化合物 [J]. 天然产物研究与开发，2014，26（10）：1562-1567.
[35] 韩志慧，张景伟，赵玉丛，等 . 7 种山茱萸总皂苷提取分离方法效果比较 [J]. 郑州大学学报（医学版），2005，40（3）：466-468.
[36] 徐建国，胡青平，田呈瑞，等 . 大孔吸附树脂纯化山茱萸总皂苷的动态吸附条件研究 [J]. 西北植物学报，2005，25（11）：2330-2334.
[37] 施群，施淑琴，俞文英，等 . 石香薷总黄酮的大孔树脂动态吸附纯化工艺研究 [J]. 中华中医药学刊，2014，32（7）：1655-1658.
[38] 刘慧敏，杜守颖，陆洋，等 . 大孔树脂纯化葛根的使用次数和再生方法 [J]. 天津中医药，2014，31（3）：177-180.
[39] 刘希博，段姚尧，潘欣，等 . 大孔树脂精制黄芩中黄芩苷的工艺研究 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2013，22（6）：473-475.
[40] 皮文霞，蔡宝昌，潘扬，等 . 大孔树脂与活性炭富集山茱萸总苷的实验研究 [J]. 中药材，2002，25（5）：349-351.
[41] 欧阳丽娜，吴雪，李兰林，等 . 大孔吸附树脂富集纯化竹节参总皂苷工艺条件优选 [J]. 中成药，2011，33（7）：1163-1168.
[42] 孙永成，郭传宝，王伟，等 . 大孔树脂使用次数对羟基红花黄色素 A 吸附率的影响 [J]. 世界科学技术（中医药现代化），2011，13（4）：697-699.

（收稿日期：2021-09-27；修回日期：2021-10-25）

血塞通滴丸整合溶出度测定方法的建立

闫伟伟，罗慧玉，唐殿飞，丁杰，陈正源（张家口市食品药品检验中心，河北 张家口 075000）

摘要：目的 建立基于质量分数权重系数法的血塞通滴丸整合溶出度检验方法。**方法** 参照《中国药典》2020 年版四部溶出度测定法第三法（小杯法）；采用高效液相色谱法测定不同时间点血塞通滴丸中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 5 种指标成分的溶出度，以质量分数加权后计算整合溶出度；对整合溶出度进行相似分析及模型拟合，计算溶出参数 T_{50}，T_d，T_{85}。**结果** 采用试验确定的溶出条件，15 min 时血塞通滴丸整合溶出度均大于 85%。整合溶出度与 5 种指标成分溶出曲线均相似（$f_2 > 50$）。溶出模型以 Weibull 模型最好，溶出参数 T_{50}，T_d，T_{85} 分别为 3.87 min、5.19 min、12.33 min。**结论** 该溶出度检查方法准确可靠、方法简便；以质量分数加权后的整合溶出度能较好地表征血塞通滴丸的体外溶出行为。

关键词：血塞通滴丸；整合溶出度；溶出曲线；相似因子
中图分类号：R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0261-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.004

Determination method for the integrated dissolution of Xuesaitong dropping pills

YAN Wei-wei, LUO Hui-yu, TANG Dian-fei, DING Jie, CHEN Zheng-yuan (*Zhangjiakou Food and Drug Inspection Center*, *Zhangjiakou Hebei* 075000)

基金项目：张家口市重点研发计划项目（No.2021027D）。
作者简介：闫伟伟，女，主管药师，主要从事食品药品检验检测工作，email：254432404@qq.com

Abstract: Objective To establish an integrated dissolution test method for Xuesaitong dropping pills based on weight coefficient of the mass fraction. **Methods** According to the small cup method in Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition), the dissolution of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Re, ginsenoside Rb_1 and ginsenoside Rd in Xuesaitong dropping pills at different time points was determined by HPLC. The integrated dissolution was calculated by weight of mass fraction. Similarity analysis and model fitting were conducted for the integrated dissolution. The dissolution parameters T_{50}, T_d, and T_{85} were calculated. **Results** The dissolution of Xuesaitong dropping pills was more than 85% after 15 min under the experimental conditions. The integration dissolution curves were similar to those of the 5 indexes ($f_2 > 50$). Weibull model was the best model for the dissolution test. The dissolution parameters T_{50}, T_d and T_{85} were 3.87 min, 5.19 min and 12.33 min, respectively. **Conclusion** The dissolution test method is accurate, reliable and simple. The dissolution behavior of Xuesaitong dropping pills in vitro are well characterized by the integrated dissolution weighted by the mass fraction.

Key words: Xuesaitong dripping pill; integrated dissolution; dissolution curve; similarity factor

血塞通滴丸是由三七总皂苷提取物应用固体分散技术制成的制剂，具有活血祛瘀、通脉活络等多种功效。临床上多用于治疗中风偏瘫、心脉脑络癖阻、胸痹、心绞痛及脑血管病后遗症等多种病症[1]。查阅资料发现，目前已有关于血塞通滴丸临床应用[2]、制备工艺[3-4]、定性鉴别及含量测定[5-6]等方面的研究，但未涉及到溶出度相关报道。溶出度是模拟口服固体制剂在胃肠道中的崩解和溶出情况用来评价制剂活性成分的体内生物利用度和药物的内在品质[7-8]，会影响药物的吸收并反映制剂的工艺[9]。本试验以三七总皂苷中的三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Rd 为指标成分，通过质量权重系数法对皂苷组分进行溶出度整合并以此表征其整体溶出情况，为血塞通滴丸的溶出度检测提供准确可行的检验方法，为其质量控制及评价提供参考。

1 材料

LC-2010A HT 型高效液相色谱仪（岛津公司）；CPA225D 分析天平（德国赛多利斯集团，感量：0.01 mg）；RCZ-8M 溶出仪（天大天发科技有限公司）；Milli-Q Integral 纯水 / 超纯水机（美国 Millipore 公司）。血塞通滴丸信息见表 1。对照品三七皂苷 R_1（批号：110745-201921，纯度：90.4%）、人参皂苷 Rg_1（批号：110703-201530，纯度：91.7%）、人参皂苷 Re（批号：110754-202028，纯度：93.9%）、人参皂苷 Rb_1（批号：110704-202028，纯度：93.1%）和人参皂苷 Rd（批号：111818-201603，纯度：92.1%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇、乙腈为色谱纯，磷酸、冰醋酸、磷酸二氢钾、醋酸钠均为分析纯，水由超纯水机制备。

表 1 血塞通滴丸样品信息

Tab 1 Sample information of Xuesaitong dropping pills

编号	厂家	批号	生产年份
A-1	朗天药业	20190401	2019
B-1	昆药集团	181004	2018
B-2	昆药集团	191243	2019
B-3	昆药集团	200113	2020
C-1	神威药业	19082721	2019

2 方法与结果

2.1 色谱条件[10-11]

色谱柱：Thermo C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈 - 水，梯度洗脱（0～21 min，22% 乙腈；21～45 min，22%～48% 乙腈；45～55 min，48%～55% 乙腈；55～60 min，55% 乙腈；60～62 min，55%～22% 乙腈；62～72 min，22% 乙腈）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：203 nm；柱温：30 ℃；进样量：20 μL，记录色谱图（见图 1）。

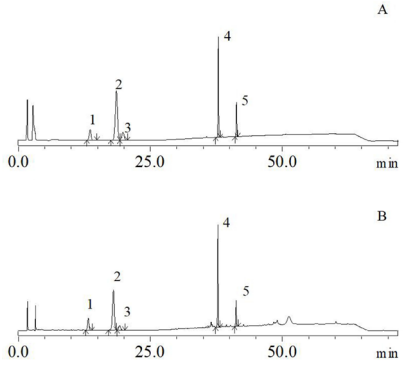


图 1 混合对照品（A）和供试品溶液（B）的 HPLC 图

Fig 1 HPLC of mixed reference（A）and sample solution（B）

1. 三七皂苷 R_1（notoginsenoside R_1）；2. 人参皂苷 Rg_1（ginsenoside Rg_1）；3. 人参皂苷 Re（ginsenoside Re）；4. 人参皂苷 Rb_1（ginsenoside Rb_1）；5. 人参皂苷 Rd（ginsenoside Rd）

2.2　溶液的制备

2.2.1　混合对照品溶液的制备　分别精密称取三七皂苷 R_1 及人参皂苷 Rg_1、Rb_1、Rd 对照品各 22.90、23.32、22.40、21.82 mg，分别置于 5 mL 棕色量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得质量浓度分别为 4.1403、4.2769、4.1709、4.0192 mg·mL^{-1} 的对照品储备液；另精密称取人参皂苷 Re 对照品 13.37 mg 置于 25 mL 棕色量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得质量浓度为 0.5022 mg·mL^{-1} 的人参皂苷 Re 对照品储备液。精密量取上述各储备液适量置于同一 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇定容，得三七皂苷 R_1 0.041 40 mg·mL^{-1}，人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 质量浓度分别为 0.1634、0.016 72、0.1564、0.050 24 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　以脱气后的 200 mL 水为溶出介质，转速为 50 r·min^{-1}，照溶出度测定法《中国药典》2020 年版四部通则[12]0931 溶出度测定方法第三法（小杯法）操作；取滴丸 10 粒，共 6 份，称定质量后投入溶出杯中，立即启动溶出仪并计时。于 2、5、8、10、15、20、25、30、45 min 分别取样，每次 1 mL，同时补充等量同温度的水，各时间点溶出液置 0 ℃以下放置 30 min，待基质析出后，迅速滤过，即得。

2.2.3　含量测定溶液的制备　取本品 50 粒，精密称定质量，计算平均粒重，研细，取约相当于 10 粒质量的粉末，精密称定，置于 200 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，置 0 ℃以下放置 30 min，待基质析出后，迅速滤过，即得。

2.3　方法学考察

2.3.1　线性关系考察　精密吸取“2.2.1”项下各对照品储备液适量，加甲醇分别稀释制成不同质量浓度的对照品溶液，进样测定，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度（mg·mL^{-1}）为横坐标（X）绘制标准曲线，结果见表 2。

表 2　各指标成分的线性方程和相关系数

Tab 2　Linear regression equation and related coefficient of index components

成分	线性方程	R^2	线性范围 /（mg·mL^{-1}）
三七皂苷 R_1	$Y = 6.53\times10^6X + 1.16\times10^4$	0.9996	0.005 18 ～ 0.207
人参皂苷 Rg_1	$Y = 8.03\times10^6X - 5.18\times10^4$	0.9991	0.0107 ～ 0.534
人参皂苷 Re	$Y = 6.49\times10^6X - 3.46\times10^3$	0.9995	0.002 51 ～ 0.0502
人参皂苷 Rb_1	$Y = 4.69\times10^6X + 1.41\times10^4$	0.9994	0.0130 ～ 1.043
人参皂苷 Rd	$Y = 5.84\times10^6X - 2.58\times10^3$	0.9997	0.003 36 ～ 0.502

2.3.2　精密度试验　取“2.2.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 峰面积的 *RSD* 分别为 0.28%、0.63%、0.56%、0.40% 和 0.72%，表明仪器精密度良好。

2.3.3　重复性试验　取“2.2.2”项下的 15 min 溶出液（批号：200113）共 6 份，进样检测，结果三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 峰面积的 *RSD* 分别为 1.3%、1.3%、1.8%、1.5% 和 1.9%，表明方法重复性良好。

2.3.4　稳定性试验　取“2.2.2”项下的 15 min 溶出液（批号：200113），分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，结果三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 峰面积的 *RSD* 分别为 0.86%、0.62%、1.1%、1.1% 和 0.91%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5　加样回收试验　取批号为 200113 样品，精密称定 6 份，每份约 0.2447 g，分别置于 25 mL 量瓶中，按大致 1∶1 比例进行加样，用甲醇稀释至刻度，滤过，精密量取 5 mL 置于 25 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，0 ℃以下放置 30 min，待基质析出后，滤过，进样，记录色谱峰并计算回收率。结果三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 的平均回收率分别为 99.68%、99.60%、98.36%、97.60%、97.99%，*RSD* 分别为 0.69%、0.62%、0.64%、0.46%、0.73%。

2.4　溶出度计算

2.4.1　溶出度计算　以各时间点溶出液的色谱峰面积按线性方程计算该成分的溶出量（M_t），$M_t = C_t\times V_1 + \sigma_{i=1}^{n-1} C_i\times V_2$，公式中 C_t 为某时间点的质量浓度（mg·mL^{-1}），V_1 为溶出介质体积（mL），V_2 为取出液体积（mL）。取“2.2.3”项下溶液，按“2.1”项下色谱条件测定样品峰面积，计算各指标成分的含量（以 mg·g^{-1} 计），含量乘以溶出样品的质量计算该成分的累计溶出量（M）。溶出度公式为：$Q_t = M_t/M\times100\%$，Q_t 为 t 时间某成分的溶出度。

2.4.2　整合溶出度计算　中药具有多组分、整体论治的特点[13]，仅靠对单一活性药物成分进行溶出行为的考察指标评价其质量，不能全面体现中药多成分协同作用的特点。本试验参考文献[14]，通过引入质量权重系数，以质量分数为各指标项的权重系数（即质量分数权重系数）综合表征血塞通滴丸皂苷组分的溶出度，以客观真实地反映血

塞通滴丸皂苷组分的整体溶出情况。其中，以皂苷组分的质量分数为整体单位，即为质量权重系数参照，各指标成分质量权重系数为该成分与组分质量分数之比。各成分质量权重系数公式如下：

φ_{R1}=（933.13/4737.72）×100% ＝ 19.70%，φ_{Rg1}=（801.01/4737.72）×100% ＝ 16.91%，φ_{Re}=（917.14/4737.72）×100% ＝ 19.99%，φ_{Rb1}=（1109.29/4737.72）×100% ＝ 23.41%，φ_{Rd}=（947.15/4737.72）×100% ＝ 19.99%。

根据每一时间点下 5 种指标成分的溶出度（Q_i）与各自的权重系数，计算血塞通滴丸在该时间点下的整合溶出度，则 $Q = \varphi_{R1} \times Q_{R1} + \varphi_{Rg1} \times Q_{Rg1} + \varphi_{Re} \times Q_{Re} + \varphi_{Rb1} \times Q_{Rb1} + \varphi_{Rd} \times Q_{Rd}$。

2.5　溶出条件的选择

2.5.1　溶出介质的选择　以批号为 200113 的血塞通滴丸为研究对象，采用小杯法测定，固定其他条件不变，分别考察了水、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质时的整合溶出度，以该样品在 3 种溶出介质中的整合溶出度为纵坐标、溶出时间为横坐标，绘制 3 种介质中的整合溶出曲线，见图 2。结果表明溶出介质的改变对整合溶出度影响较大，选择水作为溶出介质时，血塞通滴丸溶出迅速，在样品达到溶出平衡后，整合溶出度最大，因此确定水作为溶出介质。

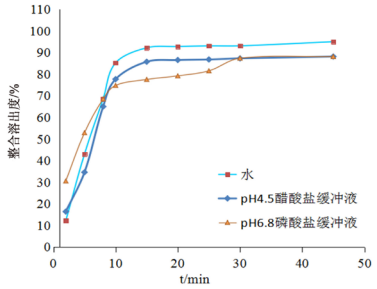


图 2　血塞通滴丸在不同介质中的整合溶出度

Fig 2　Integrated dissolution in different dissolution media of Xuesaitong dropping pills

2.5.2　转速的选择　按拟定溶出条件，采用小杯法测定，固定其他条件不变，以 50 r • min^{-1} 与 75 r • min^{-1} 进行转速筛选，结果表明两种转速条件下的整合溶出度比较接近，且在 50 r • min^{-1} 转速下 15 min 时整合溶出度即可达 85%，因此确定转速为 50 r • min^{-1}。

2.5.3　限度和取样时间的选择　以 B 厂家的 3 批次样品为研究对象，按拟订条件进行累计溶出度测定，结果见图 3。根据文献[15-16]确定溶出度取样时间点为溶出曲线中第一次连续两点平均溶出度均在 85% 以上，且此两点溶出度的平均值之差在 5% 以内（即“平台期”）时的第一时间点，并将该点溶出度减去 15% 作为溶出限度。本实验的 3 批次样品在 15 min 时溶出趋于平稳，溶出度在 85% 以上，故确定取样时间点为 15 min，同时，该点的溶出度减去 15% 为 77.03%，确定溶出限度为 75%。

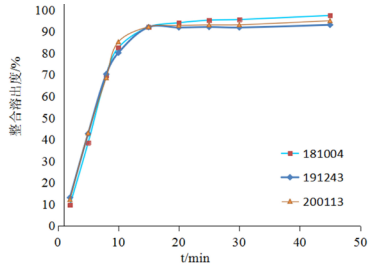


图 3　B 厂家样品整合溶出度曲线

Fig 3　Integrated dissolution curve of samples from manufacturer B

2.6　溶出曲线绘制与比较

以批号为 200113 的血塞通滴丸为研究对象，绘制了 5 种指标成分溶出度与整合溶出度的溶出曲线，结果见图 4；以整合溶出度为参比，采用非模型依赖的相似因子（f_2）法比较各成分溶出曲线的相似性。f_2 的计算公式为：

$$f_2 = 50 \times \lg\left[\frac{100}{\sqrt{1+\frac{1}{n}\sigma_{t=1}^{n}(R_t - T_t)^2}}\right]$$

公式中 n 为时间点个数，R_t 为参比样品（或变更前样品）在 t 时刻的溶出度值，T_t 为试验批次（变更后样品）在 t 时刻的溶出度值。f_2 越接近 100，相似度越高；当 f_2 在 50 ～ 100 时，表示溶出行为相似，无显著性差异。通过计算，本样品中三七皂苷 R_1 及人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 和 Rd 的 f_2 因子分别为 76.2389、80.3563、70.7574、80.9373 和 62.0467，均大于 50，表明整合溶出曲线与 5 种指标成分的溶出曲线相似性较好，可以反映血塞通滴丸皂苷组分的整体溶出情况。

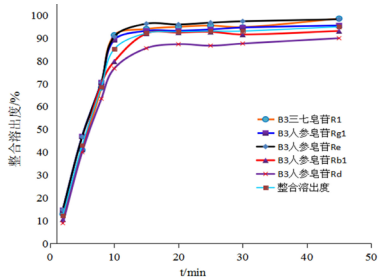


图 4　5 种指标成分与整合溶出度溶出曲线

Fig 4　5 indexes and integrated dissolution curve

2.7　溶出模型拟合与比较

取批号为 200113 血塞通滴丸，采用不同的模型进行拟合，推测药物溶出机制，结果见表 3，以

Weibull 模型最好。选用 Weibull 模型计算该批次样品溶出参数 T_{50}、T_d 和 T_{85}，结果分别为 3.87 min、5.19 min 和 12.33 min，表明血塞通滴丸在 15 min 内溶出度可达到 85% 以上，可实现速效的目的。

表 3 整合溶出度拟合结果

Tab 3 Fitting of integrated dissolution

模型	拟合方程	R^2
零级释放方程	$Q = 1.4905t + 48.5300$	0.4996
一级释放方程	$\ln(1 - Q) = -0.0637t + 3.8157$	0.6993
Weibull 方程	$\ln[1/(1 - Q)] = 1.0383\ln t - 5.3163$	0.9267
Peppas 方程	$\ln Q = 0.6107\ln t + 2.6312$	0.7680
Higuchi 方程	$Q = 14.3210t^{1/2} + 19.0630$	0.6826

2.8 样品测定

按拟定溶出度测定方法对 3 个企业 5 批次血塞通滴丸样品进行溶出度试验，平均整合溶出度见表 4，不同企业的血塞通滴丸样品在 15 min 时溶出度均已达到所设定的限度要求。

表 4 5 批血塞通滴丸溶出度试验测定 ($n = 6$)

Tab 4 Dissolution of 5 batches of Xuesaitong dropping pills ($n = 6$)

批号	整合溶出度 /%	*RSD*/%
20190401	90.36	0.85
181004	92.06	1.26
191243	92.03	1.08
200113	92.20	1.35
19082721	86.03	0.95

3 讨论

由于血塞通滴丸样品中每粒滴丸含三七总皂苷较少，5 种指标成分含量相对较低，为提高准确度，本试验选择考察 10 粒血塞通滴丸的溶出度，同时选择小杯法，溶出介质体积选择 200 mL，以降低试验偏差。有文献报道三七总皂苷在 pH 1.0 盐酸溶液中不稳定，易发生水解而生成脂溶性苷元 [17]；在预试验时，课题组以 pH 1.2 盐酸溶液为溶出介质时，有部分成分色谱峰未检测到，故本试验仅选用 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水进行溶出曲线的测定及溶出介质的筛选。

为使各色谱峰与相邻峰分离度大于 1.5，本试验参考文献 [10, 18] 并进行优化，确定以乙腈 - 水流动相系统进行梯度洗脱，取得了满意的分离效果，且理论板数按人参皂苷 Rg_1 计算大于 6000。本试验同时对比了各指标成分的含量与溶出 60 min 后快速搅拌 30 min（250 r • min $^{-1}$）的最大溶出量的差异以确定完全溶出点，结果两种方法含量无明显差别，故确定以制剂自身含量为完全溶出点，作为溶出度的计算参照，以准确反映样品的真实溶出度。

滴丸制剂在制备过程中混有不同比例的聚乙二醇等成型基质 [4]，容易对仪器及系统造成严重损害，根据血塞通滴丸含量测定方法 [19]，将样品溶液置于 0 ℃以下 30 min，待基质析出后再过滤进样可减少对仪器的损害。

参考文献

[1] 闫荟，费嘉，王苏会，等 . 血塞通滴丸长期试验及其影响性考察 [J]. 中国医药导刊，2008，10（9）：1438-1440.

[2] 闵祖良 . 血塞通滴丸配合氟桂利嗪治疗偏头痛 73 例 [J]. 陕西中医，2013，34（11）：1476-1477.

[3] 侯一哲，黎翩，张剑，等 . 血塞通滴丸滴制过程关键影响因素辨识 [J]. 中国中药杂志，2021，46（4）：103-109.

[4] 屈云萍，蔡向杰，王娇，等 . 星点设计 - 响应面法优化血塞通滴丸成型工艺及冷凝液指纹图谱研究 [J]. 中国药房，2016，27（34）：4829-4832.

[5] 侯一哲，黎翩，肖红敏，等 . 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究 [J]. 中草药，2019，50（11）：2552-2559.

[6] 闫荟，钟蕾，王苏会，等 . 血塞通滴丸的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2008，14（11）：1-4.

[7] 郑晓霞，徐剑，田洪星，等 . 妇科再造丸的体外溶出度测定 [J]. 中国药房，2018，29（18）：2497-2500.

[8] 江茂源，张臻，石金凤，等 . 基于甘草中 2 种成分同时测定的附子理中丸溶出行为研究 [J]. 中国中药杂志，2018，43（5）：952-958.

[9] 吴嫣艳，郭青，周佳益 . 黄杨宁片溶出度测定方法研究及溶出行为评价 [J]. 药物分析杂志，2019，39（12）：2273-2278.

[10] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：909.

[11] 李敏，叶慧，陈骁鹏，等 . 高效液相色谱法同时测定血塞通片中 5 种皂苷类成分含量 [J]. 中国药业，2019，28（18）：24-26.

[12] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：135-137.

[13] 牛晨瑾，许浚，张铁军 . 丹七方不同剂型的体外溶出度比较 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（8）：1-4.

[14] 张晴，杜守颖，陆洋，等 . 不同血塞通胶囊的人参皂及三七皂苷溶出度对比研究 [J]. 环球中医药，2015，8（11）：1362-1366.

[15] 谢沐风 . 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准 [J]. 中国医药工业杂志，2012，43（3）：243-252.

[16] 杨桂英，董琨，宫晓平，等 . 腺苷钴胺片溶出度试验方法的建立 [J]. 中国药房，2014，25（25）：2376-2378.

[17] 钟玲，臧志和 . 三七总皂苷微孔渗透泵控释片体外释放度研究 [J]. 中成药，2007，29（6）：821-824.

[18] 李敏，叶慧，陈骁鹏，等 . 高效液相色谱法同时测定血塞通片中 5 种皂苷类成分含量 [J]. 中国药业，2019，28（18）：24-26.

[19] 国家食品药品监督管理总局 . 国家食品药品监督管理总局标准血塞通滴丸 YBZ00232012 [S]. 2012.

（收稿日期：2021-04-15；修回日期：2021-06-18）

巨噬细胞外泌体 - 脂质体杂化纳米粒的制备及表征

鲍倩倩[1, 2, 3]，王强[1, 2, 3]，桑冉[4, 5]，王雷[1, 2, 3*]，陈卫东[1, 2, 3*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 中药复方安徽省重点实验室，合肥 230012；3. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室，合肥 230012；4. 蚌埠医学院第一附属医院，安徽 蚌埠 233000；5. 蚌埠医学院，安徽 蚌埠 233030）

摘要：目的 制备巨噬细胞外泌体 - 脂质体杂化纳米粒（MEL NPs），并对其理化性质进行研究。**方法** 超声法制备 MEL NPs，通过马尔文粒度分析仪、透射电镜、荧光分光光度计、以及 Western blot 对制备的 MEL NPs 进行表征，倒置荧光显微镜和流式细胞仪观察 Hepa 1-6 细胞对 MEL NPs 的摄取。**结果** MEL NPs 的平均粒径为（98.20±0.45）nm，PDI =（0.17±0.02），Zeta 电位为（－ 16.23±1.00）mV，具有明显的囊泡结构。融合后的 MEL NPs 中 DiI 荧光强度恢复，DiD 荧光强度降低；外泌体的标志蛋白 Alix 和 TSG101 在 MEL NPs 中均有表达；脂质体与外泌体融合后促进了细胞摄取。**结论** 本方法成功制备了 MEL NPs，制备方法简单可靠，且具有良好的细胞摄取率，为后续进一步研究奠定基础。

关键词：外泌体；脂质体；荧光共振能量转移；细胞摄取

中图分类号：RTQ460 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0266-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.005

Preparation and characterization of macrophages derived exosomes-liposomes hybrid nanoparticles

BAO Qian-qian[1, 2, 3], WANG Qiang[1, 2, 3], SANG Ran[4, 5], WANG Lei[1, 2, 3*], CHEN Wei-dong[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application*, *Hefei* 230012; 4. *The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College*, *Bengbu Anhui* 233000; 5. *Bengbu Medical College*, *Bengbu Anhui* 233030)

Abstract: Objective To prepare macrophages derived exosomes-liposomes hybrid nanoparticles (MEL NPs) and to determine its physicochemical properties. **Methods** The MEL NPs were prepared by sonication method, and its characterization was evaluated by dynamic light scattering, transmission electron microscopy, fluorescence spectrophotometer and Western blot. The uptake of MEL NPs by Hepa 1-6 cells was recorded by inverted fluorescence microscope and flow cytometry. **Results** The average particle size of MEL NPs was (98.20±0.45) nm, PDI was (0.17±0.02) and Zeta potential was (－ 16.23±1.00) mV. MEL NPs had spherical vesicular structure. DiI fluorescence intensity recovered and DiD fluorescence intensity decreased in MEL NPs after the fusion. Exosomes markers Alix and TSG101 were both expressed in MEL NPs. The fusion of liposomes and exosomes promoted the cellular uptake. **Conclusion** MEL NPs are successfully prepared with good cellular uptake. The simple and reliable preparation process lays the foundation for further research.

Key words: exosome; liposome; fluorescence resonance energy transfer; cellular uptake

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 81773988）；国家自然科学基金面上项目（No. 82073923）；安徽高校自然科学研究项目（No. KJ2019A0314）。

作者简介：鲍倩倩，女，在读硕士研究生，主要从事纳米药物代谢动力学研究，email：2372387675@qq.com *通信作者：王雷，男，主要从事中药分析和纳米药物代谢动力学研究，email：wanglei@ahtcm.edu.cn；陈卫东，男，教授，博士研究生导师，主要从事药代动力学、药学和药剂学研究，email：anzhongdong@126.com

外泌体（exosomes，Exos）是一种几乎所有类型的细胞都会分泌的细胞外囊泡，其直径约为 100 nm[1]。近年来，Exos 作为载药体系受到了越来越广泛的关注，与其他载药系统相比，Exos 因源于自体而具有免疫原性低、生物相容性高等特点；更重要的是，Exos 具有潜在的靶向能力，有助于提高药物的靶向能力 [2-3]。但载药量较低、修饰的灵活性低 [4]，且稳定性差 [5] 等缺点极大地制约了 Exos 作为药物载体的进一步开发应用。

脂质体（liposomes，Lips）是磷脂在水中形成的一种具有磷脂双分子层的囊泡，粒径一般在 40 ～ 200 nm。Lips 因其载药性能良好、易于制备和修饰灵活而被作为药物载体广泛应用，但 Lips 属于外源性物质，易被单核巨噬细胞系统快速清除且靶向性较差 [4，6]。Exos 与 Lips 在结构上相似，都具有脂质双分子层，粒径相近 [7]；在生理功能上，两者具有良好的互补性。因此，将这两种纳米囊泡融合形成一个新的杂化纳米囊泡可以保留两者的优点。这种巨噬细胞外泌体 - 脂质体杂化纳米粒（macrophages derived exosomes-liposomes hybrid nanoparticles，MEL NPs）同时具有 Exos 的内源性和 Lips 修饰的灵活性，还能提高 Exos 的稳定性 [8]。基于此，本研究采用超声法融合 Exos 与 Lips，并对融合后的 MEL NPs 进行表征，为 MEL NPs 作为药物载体的后续研究提供基础。

1 材料

1.1 仪器

DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；Tecnai G2 SpirtBiotwin 透射电子显微镜（美国赛默飞公司）；Nano ZS90 马尔文粒度分析仪（美国马尔文公司）；anti-JP-1 高速低温离心机、L-90K 超高速低温离心机、CYTOMICS FC 500 流式细胞仪（美国贝克曼公司）；F-4600 荧光分光光度计（日本 Hitachi 公司）；THUNDER 倒置荧光显微镜（德国徕卡公司）；JY92-Ⅱ超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

1.2 试药

DMEM 高糖培养基、青霉素 - 链霉素、胎牛血清（美国 Hyclone 公司）；细胞膜橙色荧光探针（DiI）染料（大连美仑生物技术有限公司）；细胞膜红色荧光探针（DiD）、细胞膜绿色荧光探针（DiO）染料（上海碧云天试剂公司）；3% 醋酸双氧铀染液（河南锐欣实验用品有限公司）；胆固醇、蛋黄卵磷脂（上海源叶生物科技有限公司）；泊洛沙姆 188（北京金克隆生物技术有限公司）；多聚甲醛、DAPI、抗荧光淬灭剂（安徽 Biosharp 公司）；一抗稀释液、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、ECL 发光液（山东 SparkJade 公司）；TSG101、Alix 抗体（成都正能生物公司）。

1.3 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞 Raw 264.7 和肝癌细胞 Hepa 1-6 购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠腹腔巨噬细胞 Raw 264.7 在 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中，采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。待细胞融合度到 80% 左右，用不完全培养基继续培养 24 h 后，收集细胞上清液。

2.2 Exos 提取

采用超高速离心法提取 Exos，细胞上清液 4 ℃、300 g 离心 10 min 去除细胞，然后 4 ℃、2000 g 离心 10 min 去除死细胞，4 ℃、10 000 g 离心 30 min 去除细胞碎片。取上清液 4 ℃、100 000 g 离心 70 min，所得沉淀即为 Exos 粗提物。沉淀用 PBS 重悬后，于 4 ℃、100 000 g 离心 70 min，所得沉淀用 PBS 重悬后保存在－ 80 ℃备用。

2.3 Lips 制备

精密称取处方量的蛋黄卵磷脂、胆固醇，溶于 3 mL 无水乙醇中，处方量的泊洛沙姆 188 溶于 50 ℃ 预热的 20 mL ddH_2O 中，用 1 mL 注射器在液面下将溶解完全的有机相缓慢注入至水相中，50 ℃，1000 r • min^{-1} 搅拌 2 h 使有机溶剂挥发，即得 Lips。

2.4 MEL NPs 的制备

采用超声孵育法制备 MEL NPs：取 4 份 Exos（200 μg 蛋白）分别与 200、1000、2000、4000 μg 的 Lips 混合均匀后用 PBS 定容至 500 μL，80 W 超声 10 min（5 s 开，5 s 关）后，37 ℃孵育 1 h。

2.5 MEL NPs 的表征

2.5.1 形态学观察 各取 10 μL 的 Exos、Lips、MEL NPs 稀释液滴加在铜网上，用 1% 醋酸双氧铀染液进行染色，染色完成后用滤纸吸去多余的染液，在透射电镜下观察其形态。

2.5.2 粒径和 Zeta 电位 取 Lips、Exos、MEL NPs 母液，适量稀释后测定纳米囊泡的平均粒径以及 Zeta 电位。

2.5.3 外泌体的标志性蛋白检测 使用适量的 RIPA 裂解液（含 1%PMSF 溶液）提取 Raw 264.7 细胞、Exos 以及 MEL NPs 总蛋白，定量后调整

蛋白浓度，100 ℃煮沸 8 min 后进行电泳，转膜，封闭，洗涤和孵育抗体（TSG101 和 Alix 抗体浓度为 1∶1000，二抗浓度为 1∶12 000），ECL 发光液显影曝光。

2.5.4　荧光共振能量转移分析　荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）是指当一个供体荧光基团的发射光谱与受体荧光基团的激发光谱有部分重叠，当两个基团的距离足够接近时，处于激发状态的供体能将其荧光能量转移给受体，从而激发受体的荧光。膜融合会导致两个荧光基团的距离增加，FRET 效应减弱，供体的荧光强度随着融合的进行而恢复，相反，受体的荧光强度降低 [9]。本研究以 DiI 作为荧光供体，DiD 作为荧光受体，两者按摩尔比 1∶7 加至脂质体中得到 FRET 脂质体，去除游离染料后与 Exos 融合得到 MEL NPs，测量 Lips 和 MEL NPs 在 550 ～ 750 nm 的荧光光谱，通过 MEL NPs 中 DiD 荧光强度的减弱判断是否发生融合。

2.6　MEL NPs 的细胞摄取

在 MEL NPs 中加入适量 DiO 染料，37 ℃避光孵育 15 min，10 000 g 离心 10 min 初步去除多余的染料，然后将上清液转移至 100 kDa 超滤离心管内，10 000 g 离心 10 min，弃去上清液，加入 200 μL PBS 重悬，重复 3 次，即得 DiO 标记的 MEL NPs。

将 Hepa 1-6 细胞以适宜的密度接种于覆盖有细胞爬片的 12 孔板中，待细胞贴壁后，加入 DiO 标记的 MEL NPs 共孵育 2 h 后，4% 多聚甲醛固定 15 min，DAPI 标记细胞核，抗荧光淬灭剂封片，倒置荧光显微镜观察。

将 Hepa 1-6 细胞以适宜的密度接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，加入 DiO 标记的 MEL NPs 共孵育 2 h 后，预冷的 PBS 洗涤细胞 3 遍，加入胰酶消化细胞，1200 r • min $^{-1}$ 离心 5 min，弃去上清液。预冷的 PBS 洗涤细胞两次，弃上清液，PBS 重悬，流式细胞仪上机检测。

3　结果

3.1　MEL NPs 的制备条件优化

以粒径、PDI 和 FRET 效应作为考察指标，考察 Exos 与 Lips 的比例对 MEL NPs 制备的影响，结果见表 1。由表 1 可知，各条件下制备的 MEL NPs 粒径均在 100 nm 左右，尺寸分布比较均匀，稳定性良好。Exos 与 Lips 的比例为 1∶1、1∶5 和 1∶10 时，FRET 效应减弱，证明 Exos 与 Lips 融合成功。研究表明，不同比例的 Exos 和 Lips 混合会改变杂化纳米粒中 Exos 和 Lips 的百分比，且在一定范围内，随着 Lips 比例的增大，杂化纳米粒中 Lips 的比例也会随之增大 [9]。由于 MEL NPs 的建立是为后期载药奠定基础，而药物是载在 Lips 中，考虑到载药量、同时保留 Exos 的内源性优势，选择 1∶5 进行后续研究。

表 1　Exos 与 Lips 的比例对 MEL NPs 的影响 (n = 3)

Tab 1　Influence of different Exos to Lips ratios on MEL NPs (n = 3)

Exo∶Lips	粒径 /nm	PDI	FRET 效应减弱
1∶1	114.83±2.91	0.17±0.02	有
1∶5	97.25±2.66	0.20±0.02	有
1∶10	115.63±1.60	0.16±0.002	有
1∶20	102.56±2.77	0.17±0.02	无

3.2　MEL NPs 的表征

3.2.1　形态表征　纳米粒的形态见图 1。Lips、Exos 与 MEL NPs 均呈囊泡状结构，这些纳米囊泡大小相似，形态近似球形。

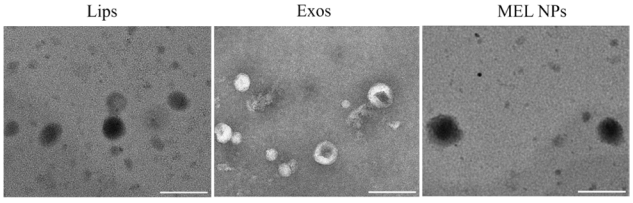


图 1　透射电镜观察 Lips、Exos 和 MEL NPs 的形态（标尺：200 nm）

Fig 1　Morphology of Lips，Exos and MEL NPs were imaged with transmission electron microscopy（scar bar：200 nm）

3.2.2　粒径及 Zeta 电位表征　结果见图 2，Lips、Exos 和 MEL NPs 的粒径分别为（91.79±0.31）nm（PDI ＝ 0.16±0.003）、（127.17±0.45）nm（PDI＝0.22±0.01）和（98.20±0.45）nm（PDI＝0.17±0.02），Zeta 电位分别为（－ 24.53±0.58）mV、（－ 13.13±0.34）mV 和（－ 16.23±1.00）mV。MEL NPs 的粒径大于 Lips，可能是 Lips 与 Exos 的融合增加了水分子的相互作用点，从而增加了水化层数。此外，相较于 Exos，MEL NPs 的电位和 PDI 有所降低，表明 MEL NPs 具有良好的尺寸均匀性和稳定性。

3.2.3　Western blot 表征　结果见图 3，所提取的 Exos 和超声融合后的 MEL NPs 均表达 Alix 和 TSG101 蛋白，且表达量显著高于 Raw 264.7 细胞，表明超声融合不影响外泌体的性质。

3.2.4　FRET 表征　结果见图 4，Lips 光谱为融合前，MEL NPs 光谱为融合后，融合后 MEL NPs 的 DiI 荧光强度恢复，DiD 荧光强度降低，FRET 效应减弱，表明 FRET 荧光供体和受体之间的距离增加，Lips 与 Exos 成功融合。

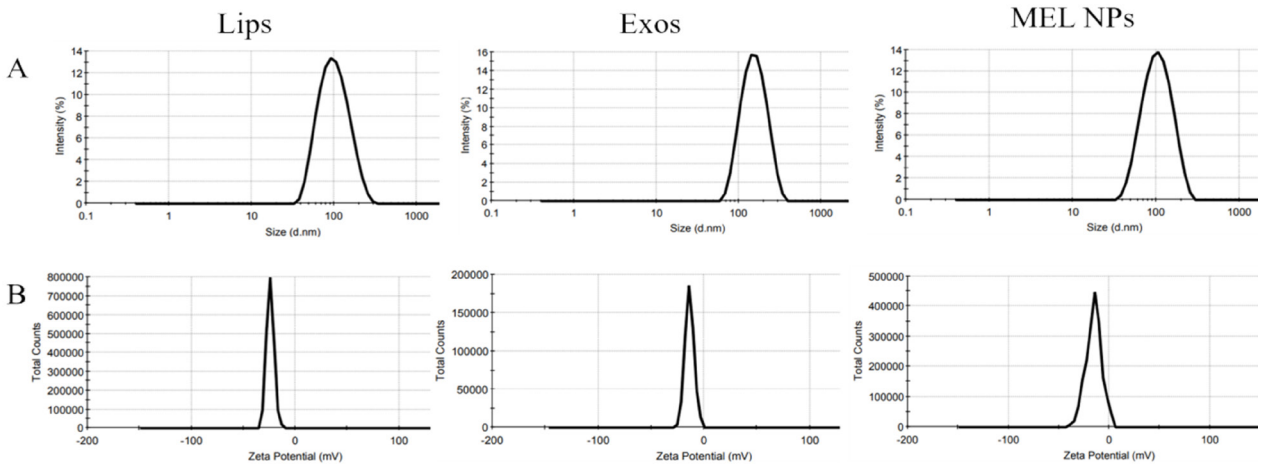


图 2　马尔文纳米粒度仪检测 Lips、Exos 和 MEL NPs 的粒径（A）和 Zeta 电位分布（B）

Fig 2　Size distribution（A）and Zeta potential（B）of Lips，Exos，and MEL NPs measured by dynamic light scattering

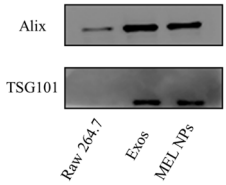


图 3　Western blot 检测融合后外泌体标志蛋白的 Alix 和 TSG101 的表达

Fig 3　Exos markers Alix and TSG101 detected by Western blot after the fusion

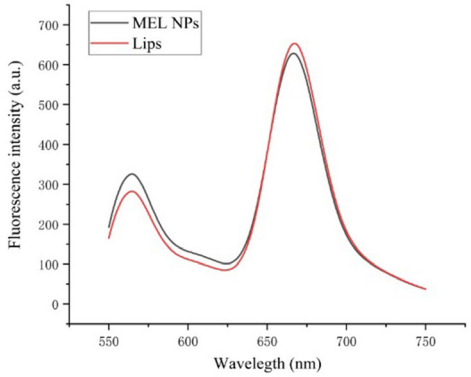


图 4　FRET 验证 Lips 与 Exos 融合

Fig 4　Verify Lips and Exos fusion through FRET

3.3　MEL NPs 的细胞摄取

由图 5 可知，相比 Lips，Hepa 1-6 细胞对于 MEL NPs 的摄取有所增加，表明超声融合并未破坏 Exos 的体外靶向能力。

4　讨论

巨噬细胞是先天性免疫细胞的主要组成部分，其在炎症调节和肿瘤的发生、发展中起着至关重要的作用 [10]。Exos 可以携带亲本细胞的信息，从而具有亲本细胞的功能。例如，人巨噬细胞 Exos 可以携带高水平的 miR-142 和 miR-223，在进入肝癌细胞后，抑制肝癌细胞的增殖 [11]。M1 型巨

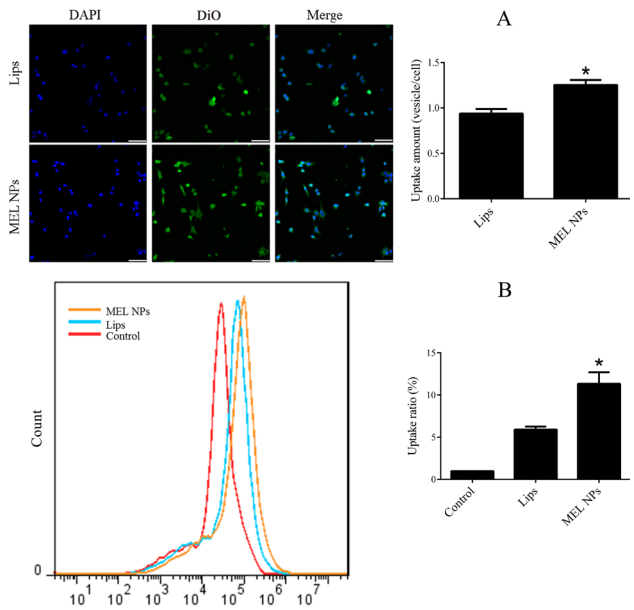


图 5　倒置荧光显微镜（A）和流式细胞仪（B）检测 Hepa 1-6 细胞对 Lips 和 MEL NPs 的摄取

Fig 5　Inverted fluorescence microscope（A）and flow cytometry（B）recorded the uptake of Lips and MEL NPs by Hepa 1-6 cells

注（Note）：与 Lips 组比较，$^{*}P < 0.05$，标尺：100 μm（Compared with the Lips group，$^{*}P < 0.05$，scar bar：100 μm）。

噬细胞 Exos 可以诱导肿瘤局部炎性微环境，从而增强紫杉醇的体内抗肿瘤作用 [12]。巨噬细胞 Exos 在肿瘤和炎症中的重要作用以及其内源性的优点，让其作为药物载体受到了研究者越来越广泛的关注。但 Exos 载药量的不足可能会限制其进一步的应用，而 Lips 在载药量方面具有显著优势，将 Exos 和 Lips 融合可以将两者的优势结合，同时规避各自的劣势 [9]。这种混合膜杂化纳米粒载药系统近年来受到了国内外学者的广泛关注。Rayamajhi 等 [4] 将巨噬细胞来源的小细胞外囊泡与负载阿霉素的 Lips 融合，制备出具有靶向

能力且可在酸性条件下 pH 敏感性释放药物的混合膜杂化纳米粒。Cheng 等[13]将过表达 CD47 的 CT26 细胞 Exos 与负载光热剂的热敏 Lips 融合制备混合膜杂化纳米粒，该杂化纳米粒可以通过竞争性结合 SIRPα 来增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬，并可以通过近红外激光照射光热剂消融肿瘤细胞，具有优异的体内外抗肿瘤效果。混合膜杂化纳米粒载药系统同时具有 Exos 和 Lips 的优点，表现出优异的靶向性，高载药量和对单核巨噬细胞系统的逃避，是一种很有应用前景的载药系统。

Exos 的提取方法主要有超高速离心法、免疫亲合法、PEG 沉淀法、尺寸排阻色谱法和微流体技术等，其中超高速离心法因操作简单，成本相对低廉并且获得的 Exos 纯度较高而被广泛使用[14-16]。

MEL NPs 的制备方法主要有孵育法、超声法、反复冻融法，所有这些技术在 Exos 特性的保持方面各有优劣，孵育法可能导致制备的 MEL NPs 颗粒粒径不均一，而反复冻融过程中 Exos 蛋白可能遭到破坏[3-5，9，17]。本研究采用超声法制备 MEL NPs，通过马尔文粒度分析仪、透射电镜、荧光分光光度计、Western blot、倒置荧光显微镜以及流式细胞仪对其进行了一系列表征，发现超声融合在未破坏 Exos 内源性优势的同时提高其稳定性，这为其作为药物载体进行进一步研究提供了一定的基础。

参考文献

[1] Théry C，Witwer KW，Aikawa E，et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018（MISEV2018）:a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. J Extracell Vesicles，2018，7（1）：1535750.

[2] Yang TZ，Martin P，Fogarty B，et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in danio rerio [J]. Pharm Res，2015，32（6）：2003-2014.

[3] Lin Y，Wu JH，Gu WH，et al. Exosome-liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs [J]. Adv Sci（Weinh），2018，5（4）：1700611.

[4] Rayamajhi S，Nguyen TDT，Marasini R，et al. Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery [J]. Acta Biomater，2019，94：482-494.

[5] Hu M，Zhang J，Kong L，et al. Immunogenic hybrid nanovesicles of liposomes and tumor-derived nanovesicles for cancer immunochemotherapy [J]. ACS Nano，2021，15（2）：3123-3138.

[6] 董丽娜，蔡璐璐，赵明明，等 . 生物大分子载体在肿瘤纳米靶向药物研发中的应用研究进展 [J]. 山东医药，2019，59（35）：83-87.

[7] Elkhoury K，Koçak P，Kang A，et al. Engineering smart targeting nanovesicles and their combination with hydrogels for controlled drug delivery [J]. Pharmaceutics，2020，12（9）：849.

[8] Zhang C，Song J，Lou L，et al. Doxorubicin-loaded nanoparticle coated with endothelial cells-derived exosomes for immunogenic chemotherapy of glioblastoma [J]. Bioeng Transl Med，2021，6（3）：e10203.

[9] Piffoux M，Silva AKA，Wilhelm C，et al. Modification of extracellular vesicles by fusion with liposomes for the design of personalized biogenic drug delivery systems [J]. ACS Nano，2018，12（7）：6830-6842.

[10] Shapouri-Moghaddam A，Mohammadian S，Vazini H，et al. Macrophage plasticity，polarization，and function in health and disease [J]. J Cell Physiol，2018，233（9）：6425-6440.

[11] Aucher A，Rudnicka D，Davis DM. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation [J]. J Immunol，2013，191（12）：6250-6260.

[12] Wang PP，Wang HH，Huang QQ，et al. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation [J]. Theranostics，2019，9（6）：1714-1727.

[13] Cheng LL，Zhang XG，Tang JJ，et al. Gene-engineered exosomes-thermosensitive liposomes hybrid nanovesicles by the blockade of CD47 signal for combined photothermal therapy and cancer immunotherapy [J]. Biomaterials，2021，275：120964.

[14] 王飘飘，王会会，彭代银，等 . 巨噬细胞来源的外泌体不同提取方法的比较 [J]. 中国药理学通报，2018，34（4）：589-592.

[15] Sidhom K，Obi PO，Saleem A. A review of exosomal isolation methods：is size exclusion chromatography the best option? [J]. Int J Mol Sci，2020，21（18）：6466.

[16] Weng YJ，Sui ZG，Shan YC，et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling [J]. Analyst，2016，141（15）：4640-4646.

[17] Aryal S，Nguyen TDT，Pitchaimani A，et al. Membrane fusion-mediated gold nanoplating of red blood cell：a bioengineered CT-contrast agent [J]. ACS Biomater Sci Eng，2017，3（1）：36-41.

（收稿日期：2021-10-10；修回日期：2021-11-12）

雷公藤甲素二元醇质体的制备及评价

管咏梅，杨丽娜，胡育森，李哲，陈丽华，朱卫丰，吴文婷*，臧振中*（江西中医药大学，现代中药制剂教育部重点实验室，南昌 330004）

摘要：目的 制备包载雷公藤甲素（TP）的二元醇质体并考察其体外透皮性能。**方法** 采用注入-探头式超声法制备 TP 二元醇质体，以粒径和包封率为评价指标，通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化 TP 二元醇质体的制备工艺，并对其进行表征，以改良的 Franz 扩散池研究其体外透皮吸收性能。**结果** TP 二元醇质体制备工艺：TP 投药量为 8.3 mg，卵磷脂浓度为 6.9 mg·mL^{-1}，醇相用量为 38.5%，二元醇比（乙醇∶丙二醇）为 7∶3，胆卵比（胆固醇∶卵磷脂）为 1∶5，制备温度为 35 ℃，转速为 600 r·min^{-1}，水合时间为 30 min，超声功率为 200 W，制得的 TP 二元醇质体外观澄清透明，有淡蓝色乳光，平均粒径为（124.7±0.46）nm，PDI 为（0.166±0.02），Zeta 电位为（－14.7±0.47）mV，在 4 ℃下稳定性较好；体外经皮给药 24 h，普通醇质体、二元醇质体和 TP 乙醇水溶液中 TP 单位面积累积透过量分别为（549.99±47.97）、（751.62±27.38）、（957.71±40.20）μg·cm^{-2}，且制备的二元醇质体与 Higuchi 模型拟合度较高。**结论** 制备的 TP 二元醇质体粒径小且均一，易保存，具有良好的透皮吸收特性。

关键词：雷公藤甲素；二元醇质体；Box-Behnken 设计；体外透皮
中图分类号：R283.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0271-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.006

Preparation and evaluation of triptolide binary ethosomes

GUAN Yong-mei, YANG Li-na, HU Yu-sen, LI Zhe, CHEN Li-hua, ZHU Wei-feng, WU Wen-ting*, ZANG Zhen-zhong* (*Key Laboratory of Modern Preparations of TCM*, *Ministry of Education*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To prepare binary ethosomes containing triptolide (TP) and determine its in vitro transdermal performance. **Methods** The injection-probe ultrasonic method was used to prepare TP binary ethosomes. The evaluation indicators included particle size and encapsulation efficiency. The single factor test and Box-Behnken response surface method were used to optimize the preparation of TP binary ethosomes. The modified Franz diffusion cells were used to determine its in vitro transdermal absorption. **Results** The preparation of TP binary ethosomes was as follows: the dosage of TP was 8.3 mg, the concentration of lecithin was 6.9 mg·mL^{-1}, the proportion of alcohol was 38.5%, and the proportion of glycol (ethanol∶propylene glycol) was 7∶3, the ratio of cholesterol∶lecithin was 1∶5, the preparation temperature was 35 ℃, the rotation speed was 600 r·min^{-1}, the hydration lasted 30 min, and the ultrasonic power was 200 W. The appearance of the TP binary ethosomes was clear and transparent with light blue opalescence. The particle size was (124.7±0.46) nm, PDI was (0.166±0.02), Zeta potential was (－14.7±0.47) mV, and it was stable at 4 ℃. After the 24 h transdermal administration in vitro, the cumulative permeation per unit area of TP per unit area of ordinary alcohol, glycol, and TP ethanol aqueous solution was (549.99±47.97), (751.62±27.38), and (957.71±40.20) μg·cm^{-2}. The prepared binary ethosomes fit well with the Higuchi model. **Conclusion** The TP binary ethosomes prepared have small particle size and uniformity and good transdermal absorption characteristics.

Key words: triptolide; binary ethosomes; Box-Behnken design; transdermal in vitro

基金项目：国家自然科学基金地区基金（No.82060722）；江西省自然科学基金面上项目（No.20202BAB206081）；重点研发创新方法专项（No.2020IM010500）；江西省教育厅科学技术研究项目（No.GJJ201230）。

作者简介：管咏梅，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：guanym2008@163.com *通信作者：臧振中，男，博士研究生，主要从事中药制造新工艺和新装备研究，email：Zangzhenzhongvip@163.com；吴文婷，女，博士研究生，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：wuwenting0109@163.com

雷公藤甲素（triptolide，TP）是从传统中药雷公藤中提取出的环氧二萜内酯类化合物，具有显著的免疫调节、抗炎、抗生育及抗肿瘤等作用[1]，但严重的毒副反应，尤其是肝肾毒性，限制了其临床应用[2-4]。研究发现，TP 经皮给药，既可减少消化道毒性，避免首过效应，又可透过皮肤缓慢、持续地发挥疗效[5]。醇质体（ethosome）作为新一代脂质体，是由磷脂、高体积分数乙醇（或丙二醇等）和水组成的具囊泡结构的给药载体。与普通脂质体相比，其结构稳定、包封率较高、粒径较小，有更好的膜流动性，可使药物透过皮肤角质层或黏膜细胞，使其在皮肤真皮层上滞留量更多，是良好的皮肤与黏膜给药载体[6-9]，在局部和全身治疗方面均具有较好的应用前景。二元醇质体（binary ethosome）是在醇质体的基础上进一步改进而得的，具有制备简单、性质更稳定、生物利用度更高及缓释药物等特点[10-13]。同时，卵磷脂作为醇质体的必备成分，具有一定的抗氧化效果[14-15]，也可在一定程度上减少皮肤毒性，增强患者的顺应性。因此，本试验拟将 TP 制备成二元醇质体，以增加其皮肤渗透量，缩短起效时间，提高 TP 的疗效，为 TP 经皮给药方式提供新的参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；TP-6 智能透皮试验仪（天津正通科技有限公司）；Malwern Nano-S 纳米粒度仪（英国马尔文公司）；超声波细胞粉碎仪（上海五相仪器有限公司，型号：JY92-IIDN）；SIGMA3-18K 高速冷冻离心机（美国 SIGMA 公司）；透射电子显微镜（TEM）（FEI TeenaiTM Spirit TEM 120KV）；ZNCL-BS 智能磁力搅拌器（西安安泰仪器科技有限公司）；BS124S 电子分析天平（北京 Sartorius 仪器系统有限公司）；EPED-ESL-10TH 试验室级超纯水器（南京易普易达科技发展有限公司）；KQ3200E 型超声波清洗器（昆明市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

大豆卵磷脂（LipoidS100，德国 Lipoid 公司，批号：8030760）；胆固醇（北京索莱宝生物有限公司，批号：527G035）；TP 对照品（质量分数≥ 98%，成都普菲德生物技术有限公司，批号：200724）；丙二醇、无水乙醇（分析纯，西陇科学股份有限公司）；甲醇（色谱级，美国 Tedia 公司）；超纯水（南京易普达科技发展有限公司）。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠，体质量（200±20）g，购自江西中医药大学试验动物中心，许可证号 SCXK（赣）2018-0003。

2 方法与结果

2.1 TP 二元醇质体的制备[16]

称取适量大豆卵磷脂、胆固醇及丙二醇于烧杯中，加入 TP 乙醇水溶液，置磁力搅拌器（30 ℃，500 r • min^{-1}）上混合均匀，作为醇相，吸取于注射器中；另取含一定量超纯水的烧杯置于磁力搅拌器中，将注射器中醇相缓慢滴加于水相，水合 30 min，冰浴探头式超声（200 W，超声 5 s，间隙 5 s）5 min，混悬液用 0.22 μm 滤膜滤过，即得 TP 二元醇质体。空白二元醇质体同法制得。

2.2 TP 含量测定

2.2.1 HPLC 条件 色谱柱：Gemini-NX C_{18} 110A（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（50∶50，*V/V*），检测波长：218 nm，柱温：30 ℃，流速：1.0 mL • min^{-1}，进样量：10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 TP 二元醇质体 0.4 mL，甲醇破乳定容于 5 mL 量瓶中，超声 10 min，0.22 μm 滤膜滤过，即得 TP 二元醇质体供试品溶液。空白对照溶液除不加药物外同法可制得。

2.2.3 方法学考察

① 线性试验：精密称取 TP 对照品 5.0 mg 置 10 mL 量瓶中，甲醇定容，即得质量浓度为 500 μg • mL^{-1} 的 TP 对照品储备液，用甲醇分别稀释为 20、50、100、125、250、400 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液，HPLC 分别测定峰面积，以 TP 质量浓度（x，μg • mL^{-1}）对峰面积（y）作线性回归，得方程为：$y = 19.13x - 178.6$，$r = 0.9993$，线性浓度范围为 20 ～ 400 μg • mL^{-1}。

② 专属性试验：将空白对照溶液、对照品溶液及 TP 二元醇质体供试品溶液，按照“2.2.1”项下条件检测，结果显示 TP 对照品溶液与 TP 二元醇质体供试品溶液出峰时间相同，且空白对照溶液在相应位置无干扰峰，表明专属性良好。

③ 精密度试验：分别取低、中、高 3 个质量浓度（20、100、250 μg • mL^{-1}）的 TP 对照品溶液连续进样 6 次，结果得日内 *RSD* 分别为 0.79%、0.66%、1.1%；连续测定 3 日，得日间 *RSD* 分别为 0.85%、0.80%、0.88%，表明仪器精密性良好。

④ 稳定性试验：供试品溶液于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样检测，结果 24 h 内样品的 *RSD* 为 0.69%，表明样品稳定性良好。

⑤ 重复性和回收率试验：制备 6 份相同质量浓度（40 μg • mL^{-1}）对照品溶液，进样检测，*RSD* 为 1.6%，表明重复性良好。取空白二元醇质

体溶液 1 mL 共 9 份，加入同体积 20、100、250 μg·mL^{-1} 的对照品溶液（n = 3），涡旋震荡，超声，进样测定，结果表明低、中、高质量浓度的 TP 加样回收率均在 95% ～ 105%，*RSD* 分别为 2.5%、1.9%、0.25%，符合要求。

2.3 包封率的测定

考察超滤离心法测定包封率的条件，向 Nanosep 10 kDa 超滤管加入 400 μL 醇质体，分别以不同转速（4000、8000、12 000、16 000、20 000 r·min^{-1}）和时间（5、10、15、20、25 min）离心，取续滤液，甲醇定容至 5 mL 量瓶，进样检测。结果离心转速为 16 000 r·min^{-1}、离心时间为 15 min，组内样品浓度 *RSD* 均小于 5%，重现性高。

设超滤离心后定容的溶液中 TP 浓度为 $C_{游}$，取等量（400 μL）TP 二元醇质体加甲醇破乳定容至 5 mL，测得 TP 浓度为 $C_{总}$，包封率 EE（%）=（1 − $C_{游}/C_{总}$）×100%，其中 $C_{游}$表示游离药物的量；$C_{总}$为 TP 二元醇质体悬液中药物的总量。

2.4 单因素考察

参考相关文献[17-19]，可知制备温度、磁力搅拌器转速、水合时间、超声功率、胆卵比（胆固醇∶卵磷脂）、二元醇比例、TP 投药量、卵磷脂、醇相用量等 9 个因素对二元醇质体的制备工艺有较大影响，因此需考察各因素对包封率和粒径的影响，明确制备工艺参数。

考察不同制备温度（25、35、45、55、65 ℃）、不同转速（300、400、500、600、700 r·min^{-1}）、不同水合时间（10、20、30、40、50 min）、不同超声功率（100、150、200、250、300 W）、胆卵比（1∶10、2∶10、3∶10、4∶10、5∶10）、二元醇（乙醇∶丙二醇）比例（9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5）、TP 投药量（2、4、6、8、10 mg）、卵磷脂用量（0.25%、0.50%、1.0%、1.50%、2.0%、2.50%、3.0%）、醇相用量（20%、30%、40%、50%、60%）的影响，从粒径和包封率的变化趋势可确定 TP 二元醇质体的制备温度为 35 ℃、转速为 600 r·min^{-1}、水合时间为 30 min、超声功率为 300 W、二元醇比例为 7∶3、胆卵比为 1∶5；而在试验中发现投药量、卵磷脂用量及醇相用量三个因素对制剂稳定性影响较大，因此需进一步优化工艺参数（见图 1）。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化处方

根据单因素试验结果，选择投药量、卵磷脂用量及醇相用量作为研究因素，运用 Design Expert 8.0.6 软件优化处方，以粒径和包封率为评价指标，因素水平表和试验组设计分别见表 1 和表 2。

表 1 因素水平表

Tab 1 Factor and level

水平	因素		
	A. 投药量 /mg	B. 卵磷脂用量 /（mg·mL^{-1}）	C. 醇相用量 /%
−1	6	2	30
0	8	6	40
1	10	10	50

表 2 Box-Behnken 试验设计表

Tab 2 Box-Behnken experimental design table

No.	A. 投药量 /mg	B. 卵磷脂用量 /（mg·mL^{-1}）	C. 醇相用量 /%	粒径 /nm	包封率 /%
1	8.00	6.00	40.00	127.80	61.47
2	8.00	10.00	50.00	222.80	64.60
3	6.00	6.00	50.00	227.80	62.98
4	8.00	6.00	40.00	132.10	75.34
5	8.00	2.00	50.00	214.30	70.17
6	8.00	6.00	40.00	123.80	72.14
7	8.00	10.00	30.00	151.20	55.62
8	10.00	6.00	30.00	161.60	59.81
9	6.00	10.00	40.00	118.40	52.96
10	8.00	6.00	40.00	128.20	66.24
11	8.00	6.00	40.00	133.20	66.78
12	10.00	6.00	50.00	235.80	70.61
13	6.00	2.00	40.00	126.30	36.95
14	10.00	10.00	40.00	126.50	60.54
15	10.00	2.00	40.00	130.10	53.88
16	6.00	6.00	30.00	145.40	58.32
17	8.00	2.00	30.00	127.80	37.49

2.5.1 粒径模型方程拟合 通过各项结果得回归方程为：Y_1 = 129.02 + 4.51A + 2.55B + 39.34C + 1.08AB − 2.05AC − 3.72BC + 4.97A^2 − 8.66B^2 + 58.67C^2。可知在该条件下，对 TP 二元醇质体粒径影响因素由大到小为 C > A > B，即醇相用量>投药量>卵磷脂用量，且各因素存在交互作用，方程 R^2 = 0.9888，失拟项为 0.0577，表明相对于纯误差没有显著性差异，证明回归方程拟合成功。显著性检验结果显示 C^2 < 0.0001，为极其显著。采用二次多项回归方程对试验数据拟合，以粒径为中心，绘制等高线和三维曲面图，预测 TP 二元醇质体的最佳处方，结果见图 2。

2.5.2 包封率模型方程拟合 通过各项结果得回归方程为：Y_2 = 68.39 + 4.20A + 4.40B + 7.14C − 2.34AB + 1.54AC − 5.92BC − 5.68A^2 − 11.64B^2 + 0.21C^2。可知在该条件下，对 TP 二元醇质体包封率影响因素由大到小为 C > B > A，即醇相用量>卵磷脂用量>投药量，且各因素存在交互作用，方程 R^2 = 0.8680，失拟项为 0.3527，表明相对于纯误差没有显著性差异，证明回归方程拟合成功。显著性检验结果显示 B^2 < 0.005，较为显著。采用二次多项回归方程

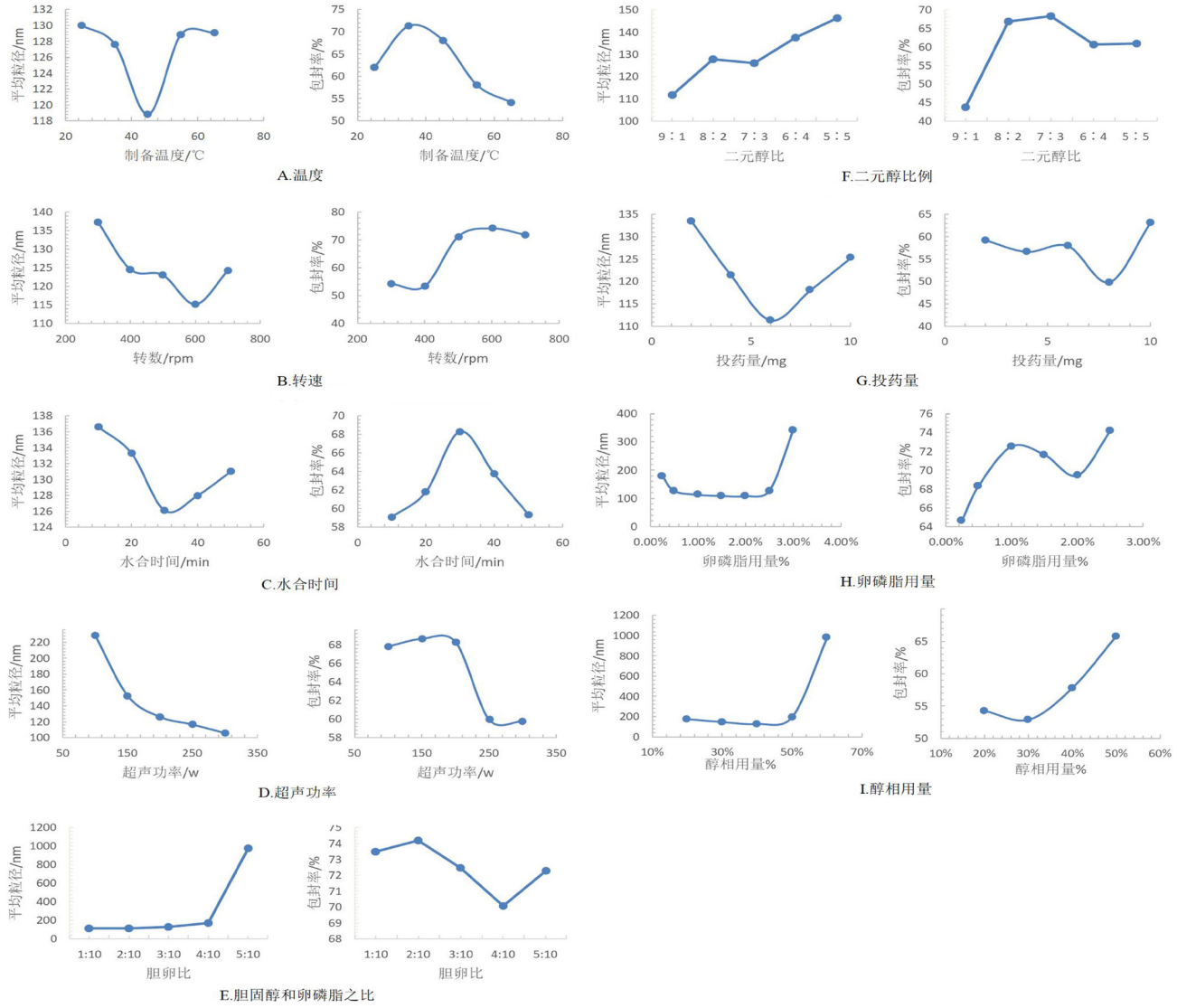


图 1 单因素试验考察各因素对二元醇质体制备工艺的影响

Fig 1 Effect of various factors on the preparation of binary ethosomes by single factor test

对试验数据拟合，以包封率为中心，绘制等高线和三维曲面图，预测 TP 二元醇质体的最佳处方，结果见图 3。

2.5.3 最优处方及验证试验 由响应面优化的结果可知，最终确定处方方案：TP 投药量为 8.3 mg，卵磷脂浓度为 6.9 mg·mL^{-1}，醇相用量为 38.5%。进行 3 次平行试验，粒径的预测值为 125.634 nm，实际值为（124.7±0.46）nm，*RSD* 为 0.37%，包封率的预测值为 68.3377 nm，实际值为（67.26±1.33）nm，*RSD* 为 2.0%，表明预测值与实际值无显著性差异，建立的模型预测性良好。

2.6 TP 二元醇质体质量评价

2.6.1 外观评价 制备最优处方的醇质体，观察其外观澄清透明，有淡蓝色乳光。

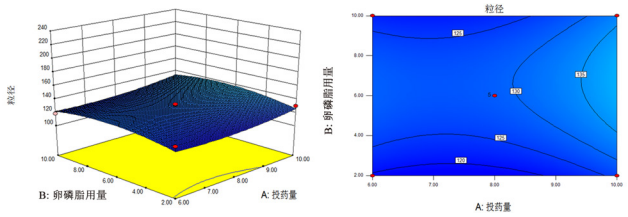
2.6.2 粒径、PDI 与电位分布 按最优处方平行制备 TP 二元醇质体 3 份，使用 27% 乙醇生理盐水稀释 10 倍，测定最优处方的二元醇质体（n = 3）平均粒径为（124.7±0.46）nm，PDI 为（0.166±0.02），Zeta 电位为（－14.7±0.47）mV，如图 4。

2.6.3 形态观察 吸取 TP 二元醇质体 20 μL 滴加于铜网上，5% 磷钨酸负染，干燥后置于透射电镜下观察 TP 二元醇质体为类球囊状，如图 5。

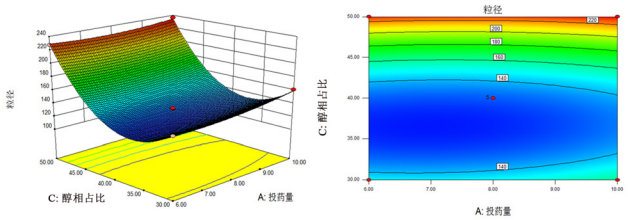
2.6.4 稳定性考察 将 3 份 TP 二元醇质体分别放置于 4 ℃冰箱及 25 ℃恒温箱中保存 7 d，测定包封率、粒径和 PDI，结果见表 3，可知 4 ℃各项指标均优于 25 ℃，可能是 4 ℃下乙醇挥发减少，卵磷脂稳定性较好，因此选择在低温条件 4 ℃下进行保存。

2.7 体外透皮研究

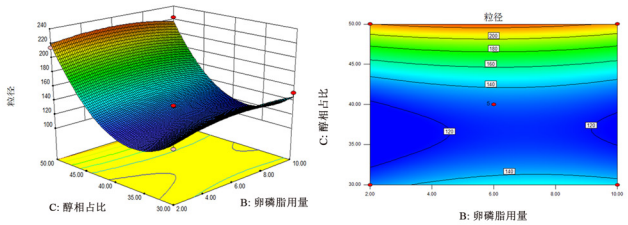
2.7.1 供试液的制备 按照“2.1”项下制备 TP 二元醇质体溶液；将丙二醇换为乙醇同“2.1”项下方法制得 TP 普通醇质体和 TP 乙醇水溶液。



A.投药量与卵磷脂浓度



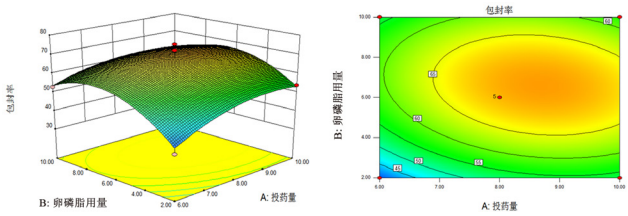
B.醇相占比与投药量



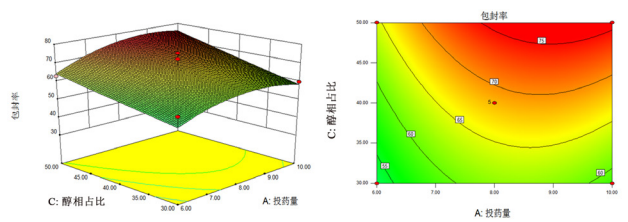
C.醇相占比与卵磷脂浓度

图 2　粒径的效应值与各因素的三维曲面图和等高线图

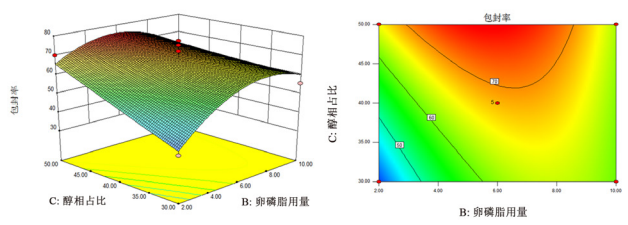
Fig 2　Three-dimensional surface plot and contour plot of the effect value of particle size and factors



A.投药量与卵磷脂浓度



B.醇相占比与投药量



C.醇相占比与卵磷脂浓度

图 3　包封率的效应值与各因素的三维曲面图和等高线图

Fig 3　Three-dimensional surface plot and contour plot of the effect value of the encapsulation rate and factors

表 3　二元醇质体稳定性试验 (n = 3)

Tab 3　Stability test of binary ethosomes (n = 3)

时间 /d	粒径 /nm		PDI		包封率 /%	
	4 ℃	25 ℃	4 ℃	25 ℃	4 ℃	25 ℃
0	125.3±0.46	125.3±0.46	0.173±0.004	0.173±0.004	68.28±1.33	66.35±1.45
3	126.2±1.28	127.93±1.10	0.195±0.018	0.198±0.012	66.74±1.63	66.74±1.63
7	130.6±2.11	149.26.6±5.61	0.226±0.014	0.278±0.010	63.31±2.29	53.11±2.74

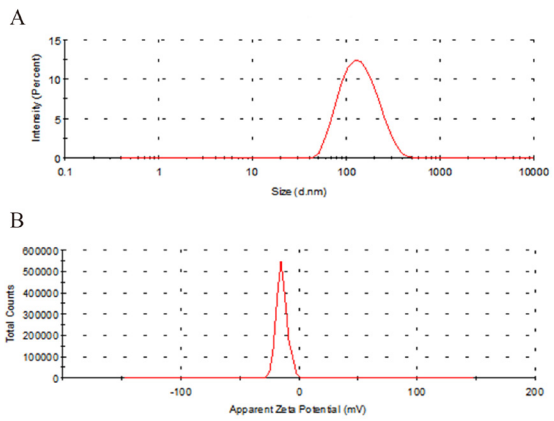


图 4　二元醇质体粒径与 Zeta 电位分布

Fig 4　Particle size and Zeta potential distribution of binary ethosomes

A. 粒径（particle size）；B. 电位（Zeta potential）

2.7.2　Franz 扩散池体外透皮试验　大鼠麻醉后除去腹部粗毛和绒毛，剪下腹部皮肤后颈椎脱臼处死，去除腹部皮肤下多余的脂肪和组织用生理盐水并清洗干净，滤纸擦干。取 30% 乙醇生理盐水 15 mL 为接收液，大鼠皮平铺在改良的 Franz 扩散池上，角质层朝上，真皮层朝下，排出装置内气泡，封口后置于池中 [水浴（37±0.2）℃，300 r • min^{-1}]，活化皮肤 30 min 以上，TP 乙醇水溶液、TP 普通醇质体、TP 二元醇质体溶液分别给药 1 mL，于 2、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL，同时补充等量的 37 ℃接收液，测定样品含量。

2.7.3　标准曲线的建立　精密量取质量浓度为 500 μg • mL^{-1} 的 TP 对照品储备液 1.6 mL 置 10 mL 量瓶中，用 30% 乙醇生理盐水定容，即得 80 μg • mL^{-1} 的 TP 稀释对照品溶液，逐级对半稀释，得到 40、20、10、5、2.5、1.25 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，0.22 μm 滤膜滤过，进样测定峰面积，以 TP 质量浓度（x，μg • mL^{-1}）对峰面积（y）作线性回归得方程为：y = 19.45x + 2.198，r = 0.9999，线性范围为 1.25 ～ 80 μg • mL^{-1}。

2.7.4　方法学考察　方法同“2.2.3”项下，结果日内，日间精密度 *RSD* 均小于 0.76%，24 h 样品稳

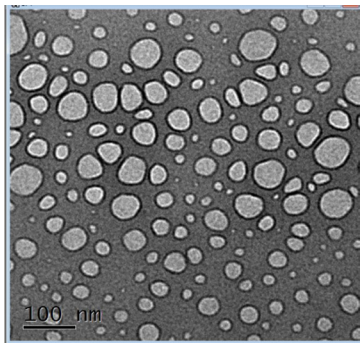


图 5　二元醇质体透射电镜图（×40 000）

Fig 5　Transmission electron microscopy of the binary ethosomes（×40 000）

定性 *RSD* 为 0.35%，重复性 *RSD* 为 1.1%，均符合要求。

取某给药组 24 h 接收液 0.5 mL 共 9 份，加入同体积 2.5、10、40 μg·mL^{-1} 的对照品溶液（n = 3），涡旋震荡，超声，按照“2.2.1”项下条件检测，结果表明回收率均在 95% ～ 105%，*RSD* 分别为 3.8%、4.1%、1.4%，符合要求。

取最低质量浓度 1.25 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，按照“2.2.1”项下条件检测，信噪比大于 10，定量限检验符合要求。

2.7.5　单位面积累积透过量　利用体外透皮试验中 TP 普通醇质体、TP 二元醇质体和 TP 乙醇水溶液的累积透过量与时间的关系进行释放特性研究，根据拟合方程结果及渗透动力学参数表示 TP 二元醇质体的体外透皮效果。公式如下：

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_iV_i)/A$$

上式中 Q_n 为第 n 各时间点的单位面积累积透过量，A 表示有效透皮面积，C_n 为第 n 个点测得的药物浓度，V 为接收池体积，V_i 为每次取样体积。

计算 TP 普通醇质体、TP 二元醇质体和 TP 乙醇水溶液各个时间点的单位面积累积透过量，绘制透过量（Q_n，μg·cm^{-2}）-时间（t，h）曲线，结果见图 6，表明 TP 普通醇质体、TP 二元醇质体和 TP 乙醇水溶液中 TP 在 24 h 单位面积累积透过量分别为（549.99±47.97）、（751.62±27.38）、（957.71±40.20）μg·cm^{-2}。将数据进行零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程模型拟合，结果见表 4，根据 R^2 可知，TP 二元醇质体符合 Higuchi 方程，对 Q_n（μg·cm^{-2}）-t（h）进行线性回归分析，得直线斜率即为稳态透皮速率（J_s），渗透动力学参数以拟合度最高的方程为准，见表 5。

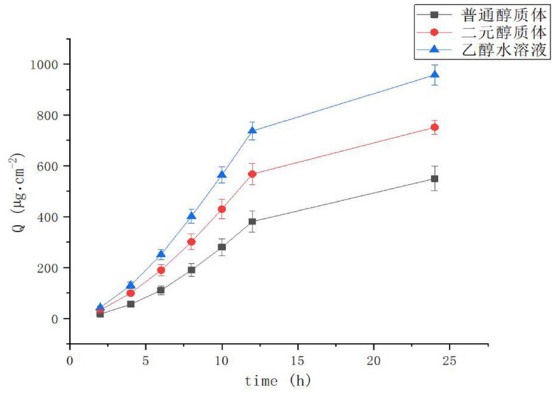


图 6　普通醇质体、二元醇质体和 TP 乙醇水溶液的 Q_n（n = 3）

Fig 6　Q_n of ethosomes，binary ethosomes and ethanol-water solution of triptolide（n = 3）

表 4　TP 普通醇质体、TP 二元醇质体和 TP 乙醇水溶液的体外透皮量 - 时间模型拟合

Tab 4　Model fitting equation of in vitro transdermal volume-time of ethosomes，binary ethosomes and ethanol-water solution of triptolide

制剂	模型	拟合结果	拟合优度（R^2）
TP 普通醇质体	零级动力学模型	$Q = 25.406t - 13.209$	0.9363
	一级动力学模型	$\lg Q = 0.0598t + 1.5894$	0.6935
	Higuchi 模型	$Q = 166.55t^{1/2} - 254.70$	0.9635
TP 二元醇质体	零级动力学模型	$Q = 33.964t + 18.784$	0.9038
	一级动力学模型	$\lg Q = 0.0535t + 1.8577$	0.6719
	Higuchi 模型	$Q = 255.79t^{1/2} - 313.12$	0.9565
TP 乙醇水溶液	零级动力学模型	$Q = 43.162t + 33.698$	0.8934
	一级动力学模型	$\lg Q = 0.053t + 1.9791$	0.6613
	Higuchi 模型	$Q = 288.11t^{1/2} - 391.47$	0.9531

表 5　TP 普通醇质体、TP 二元醇质体和 TP 乙醇水溶液的渗透动力学参数

Tab 5　Osmotic kinetic parameters of ethosomes，binary ethosomes and ethanol-water solution of triptolide

制剂	Q-t 方程	R^2	Q_{24}/（μg·cm^{-2}）	J_s/（μg·cm^{-2}·h）
TP 普通醇质体	$Q = 166.55t^{1/2} - 254.70$	0.9635	549.99±47.97	166.55
TP 二元醇质体	$Q = 255.79t^{1/2} - 313.12$	0.9565	751.62±27.38	255.79
TP 乙醇水溶液	$Q = 288.11t^{1/2} - 391.47$	0.9531	957.71±40.20	288.11

体外透皮给药研究发现，TP 二元醇质体的释药速率和累积释放量要明显高于普通醇质体，且相较于 TP 乙醇水溶液，TP 二元醇质体的 TP 释放与 Higuchi 模型拟合度较高，表明 TP 二元醇质体具有较好的皮肤穿透力。

3　讨论

近年来，外用制剂的开发为有毒中药的临床应用带来更广阔的前景，尤其是在提高药物渗透、安全无毒等理念的研究环境下，柔性脂质体一出现就备受关注。二元醇质体在其制备方式上打破了传统醇质体的束缚，提示更多元化醇质体开发的可能性。

TP 作为雷公藤的主要活性成分，能对关节炎

等疾病起到良好的治疗作用[21-22]，且经皮给药制剂是关节炎治疗中常用的给药方式，具有能直接作用于病灶部位、起效速度快及毒副作用小等优点，故本研究将 TP 制成二元醇质体并对其进行质量评价。参考醇质体制备工艺，以粒径和包封率作为重要的评价指标，选取对二元醇质体影响较大的投药量、卵磷脂用量、醇相用量三个因素进行 Box-Behnken 设计，优化处方，最终确定 TP 二元醇质体制备工艺为制备温度 35 ℃、转速 600 $r \cdot min^{-1}$、水合时间 30 min、超声功率 300 W、二元醇比为 7∶3、胆卵比为 1∶5，TP 投药量 8.3 mg，卵磷脂浓度 6.9 $mg \cdot mL^{-1}$，醇相用量 38.5%，并加以验证。经过外观、粒径、PDI 与电位、形态、稳定性的检测，证明制得的 TP 二元醇质体分布均匀，稳定性较好，且释药速率和累积释放量均高于普通醇质体，相较于 TP 乙醇水溶液，与 Higuchi 模型拟合度较高，具有较好的皮肤穿透力，可为 TP 经皮给药剂型提供参考。接下来课题组会将其制备成凝胶剂，并对其进行评价，旨在为 TP 临床应用提供一种更为安全、有效的药物制剂。

参考文献

[1] 余雅婷，朱卫丰，金晨，等 . 雷公藤甲素的剂型改进及给药方式研究进展 [J]. 中国新药杂志，2016，25（12）：1359-1362.

[2] 刘斌，樊丹平，舒海洋，等 . 雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（20）：181-190.

[3] 缪莹莹，罗岚，舒婷，等 . 雷公藤多苷与等量雷公藤甲素所致肝脏毒性差异及分子机制探究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（16）：3468-3477.

[4] 周玉燕，陆萧雅，夏丽，等 . 牛蒡子苷通过抑制炎症通路降低雷公藤甲素所致肾毒性 [J]. 南方医科大学学报，2020，40（10）：1399-1405.

[5] 余雅婷，朱卫丰，陈丽华，等 . 雷公藤甲素微乳凝胶的制备及体外透皮性能考察 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（13）：1087-1091.

[6] Dayan N，Touitou E. Cariers for skin delivery of tri-hexyphenidyl Hcl：ethosomes vs. liposomes [J]. Biomaterials，2000，21（18）：1879-1885.

[7] 饶跃峰，张幸国，赵青威，等 . 非那甾胺醇质体和脂质体的经皮渗透比较研究 [J]. 中国药学杂志，2007，42（23）：1790-1793.

[8] 施晓琴，赵继会，王志东，等 . 醇质体在经皮给药方面的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（12）：352-355.

[9] 王菁华，程曼曼，施沁青，等 . 大分子药物透皮递送策略研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（4）：671-678.

[10] 黄永佳，刘娟，赵静，等 . 负载氢醌的甘油 - 丙二醇二元醇质体的制备及体外经皮渗透研究 [J]. 重庆医科大学学报，2020，45（6）：824-827.

[11] 邢文善，路芳，徐阳 . 经皮给药新型脂质体——二元醇质体的研究进展 [J]. 中国医药导刊，2018，20（4）：221-224.

[12] Gamal FA，Sayed OM，Abo ElEla FI，et al. Treatment of basal cell carcinoma via binary ethosomes of vismodegib：in vitro and in vivo studies [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2020，21（2）：51-62.

[13] Moolakkadath T，Aqil M，Ahad A，et al. Fisetin loaded binary ethosomes for management of skin cancer by dermal application on UV exposed mice [J]. Int J Pharm，2019，560（5）：78-91.

[14] 罗有文，卢劲晔，曹云，等 . 深海鱼油与大豆卵磷脂对犬血脂和抗氧化功能的影响 [J]. 家畜生态学报，2019，40（4）：48-51.

[15] 伍艳霞，谭翠容，娄悦，等 . 卵磷脂的抗氧化性研究 [J]. 广州化工，2019，47（1）：46-48.

[16] 何良飞，陶玲，管咏梅，等 . 雷公藤甲素阿魏酸醇质体的制备与评价 [J]. 中草药，2018，49（12）：2817-2825.

[17] 何冰倩，李俊丽，刘小平，等 . 苦参碱二元醇质体的制备及其质量评价 [J]. 中成药，2014，36（8）：1770-1773.

[18] 危红华，赵晓旭，李莎莎，等 . 苦参方二元醇质体凝胶剂的制备及体外经皮给药研究 [J]. 中华中医药杂志，2013，28（9）：2762-2766.

[19] 袁李芳，何文，陈莎 . 盐酸青藤碱二元醇质体的制备及其体外性质研究 [J]. 山西医科大学学报，2012，43（9）：658-661.

[20] 徐璞，张雷，尚亚卓，等 . EGCG 阳离子醇质体的制备及性能评价 [J]. 日用化学工业，2021，51（2）：98-103，114.

[21] 林娇娇，苏立阳，曾雅婷，等 . 超声引导下腔内注射雷公藤甲素纳米粒治疗兔类风湿关节炎的试验研究 [J]. 临床超声医学杂志，2021，23（7）：483-487.

[22] 朱春赟，张永太，郭腾，等 . 雷公藤甲素甘油醇质体与凝胶贴膏经皮给药改善大鼠佐剂型关节炎症状的比较研究 [J]. 上海中医药杂志，2020，54（11）：78-84.

（收稿日期：2021-08-01；修回日期：2021-10-08）

基于网络药理学和动物实验探讨红曲治疗脑小血管病的作用机制

孙纪[1, 2, 3]，苏恒[4]，聊晓玉[1, 2, 3]，桂文琪[1, 2, 3]，方媛[1, 2, 3]，韩岚[1, 2, 3*]，彭代银[1, 2, 3*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230000；2. 中药复方安徽省重点实验室，合肥 230000；3. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥 230000；4. 安徽康和中药科技有限公司，安徽 亳州 236000）

摘要：目的 通过网络药理学和动物实验，初步探究红曲治疗脑小血管病（CSVD）的作用机制。**方法** 通过 PubChem、SwissTargetPrediction 等数据库获取红曲成分及作用靶点，运用 GeneCards、OMIM 等数据库获取 CSVD 的疾病靶点，结合 Cytoscape 3.7.1 软件构建“药物 - 成分 - 靶点”网络；取交集靶点输入 STRING 11.0 数据库，构建 PPI 网络；利用 DAVID 6.8 数据库进行 GO 和 KEGG 分析。建立大鼠 CSVD 模型，通过 Morris 水迷宫、HE 染色、ELISA、Western blot 等验证网络药理学分析结果。**结果** 筛选出 43 个活性成分，37 个关键靶点，GO 分析结果涉及神经炎症、细胞增殖等，KEGG 结果涉及 PI3K-Akt 和 RAS 信号通路等；动物实验结果显示，红曲干预后可显著改善 CSVD 大鼠海马 CA1 区损伤，降低血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α 炎症因子水平，上调 PI3K/AKT/mTOR 蛋白的表达。**结论** 本研究结合动物实验对网络药理学预测结果进行验证，发现红曲可能通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路改善 CSVD 模型大鼠的症状，为红曲的临床应用提供依据。

关键词：网络药理学；红曲；脑小血管病；分子机制

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0278-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.007

Molecular mechanism of red yeast rice for cerebral small vessel diseases based on network pharmacology and animal experiment

SUN Ji[1, 2, 3], SU Heng[4], LIAO Xiao-yu[1, 2, 3], GUI Wen-qi[1, 2, 3], FANG Yuan[1, 2, 3], HAN Lan[1, 2, 3*], PENG Dai-yin[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230000; 2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compound Prescriptions in Anhui Province*, *Hefei* 230000; 3. *Anhui Daodi Traditional Chinese Medicine Quality Improvement Collaborative Innovation Center*, *Hefei* 230000; 4. *Anhui Kanghe Chinese Medicine Technology Co.*, *Ltd.*, *Bozhou Anhui* 236000)

Abstract: Objective To preliminarily determine the mechanism of action of red yeast rice (HQ) for cerebral small vessel disease (CSVD) based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The components and targets of red yeast rice were obtained from databases such as PubChem and SwissTargetPrediction, and disease targets of CSVD were obtained from databases such as GeneCards and OMIM, and a “drug-component-target” network was constructed by combining with Cytoscape 3.7.1 software. The intersection targets were taken from STRING 11.0 database to construct PPI network. DAVID 6.8 database was used for the GO and KEGG analysis. The CSVD model was established, and the network pharmacological analysis was verified by Morris water maze, HE staining,

基金项目：安徽道地中药材品质提升协同创新中心项目（皖教科 [2013]2 号）；安徽省教育厅项目（皖教秘科 [2014]44 号）；安徽省科技重大专项计划项目（No. 16030801104）；横向科研项目（No. 2020HZ013）。

作者简介：孙纪，男，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：932518737@qq.com *通信作者：韩岚，女，教授，主要从事中药药理学研究，email：hanlan56@ahtcm.edu.cn；彭代银，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药资源研究与开发、中药药理学研究，email：pengdaiyin@163.com

ELISA, Western blot, etc. **Results** Totally 43 active ingredients and 37 key targets were screened. The GO analysis involved neuroinflammation, cell proliferation, etc. The KEGG involved PI3K-Akt, and RAS signaling pathway, etc. Animal experiment showed that the red yeast rice significantly improved the damaged of hippocampal CA1 area in CSVD rats, which reduced the serum levels of IL-6, IL-1β, and TNF-α inflammatory factors, and up-regulates the expression of PI3K/AKT/mTOR protein. **Conclusion** This study verifies the prediction of network pharmacology in combination with animal experiments. Red yeast rice may improve the symptoms of CSVD rat model by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway, and provide a basis for the clinical application of red yeast rice.

Key words: network pharmacology; red yeast rice; cerebrovascular disease; molecular mechanism

脑小血管病（CSVD）是直径介于 40 ～ 200 μm 的脑血管病变引起的综合征 [1]，临床表现为脑白质病变、脑微出血、腔隙性梗死等 [2]。研究表明，CSVD 与痴呆、卒中等疾病关系密切，约有 45% 的血管性痴呆和 20% 的缺血性卒中由 CSVD 引起 [3]。西医治疗 CSVD 主要通过溶栓药、降压药、抗血小板等早期干预，效果不佳且不良反应较大。中医理论认为 CSVD 属“络病”范畴，治法为扶正祛邪，中药治络病效果显著，不良反应较少，已成为近年来的研究热点。

红曲（red yeast rice，HQ）为药食两用中药，生产历史悠久，药用记载始于《饮膳正要》[4]。2020 年版《中国药典》[5] 记载红曲为紫色红曲霉 *Monascus purpureus* Went 寄生于粳米发酵而得。其味甘，性温，无毒，归肝、脾经，有活血化瘀、通经活络功效。现代药理研究表明，红曲成分中 Monacolin K 及其衍生物、红曲色素、γ- 氨基丁酸等具有显著的降血脂、降血压、神经保护、改善微循环等作用 [6-7]，提示红曲可作为治疗 CSVD 的潜在药物。

网络药理学是基于生物信息学、药理学等的综合性学科，通过构建生物分子互作网络，系统化诠释分子作用机制 [8]。因此，本研究基于网络药理学研究方法构建红曲“药物 - 成分 - 靶点”网络，获取相关成分、靶点、通路信息，通过动物实验对网络药理学结果进行验证，探讨红曲治疗 CSVD 的物质基础和分子机制。

1 资料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 数据库及软件 TCMSP（https：//tcmsp-e.com/）、SwissTargetPrediction 数据库（http：//www.swisstargetprediction.ch/）、GeneCards 数据库（https：//www.genecards.org/）、OMIM 数据库（https：//omim.org/）、CTD 数据库（https：//ctdbase.org/）、DisGeNET 数据库（https：//www.disgenet.org/）、Uniprot（https：//www.uniprot.org/）、STRING 11.0 数据库（https：//string-db.org/）、DAVID 6.8 数据库（https：//david.ncifcrf.gov/home.jsp）、CytoScape 3.7.1 软件。

1.1.2 红曲成分及作用靶点收集 通过 PubChem、SwissTargetPrediction 及文献收集红曲成分，根据里宾斯基五规则进行筛选。将红曲成分文件上传至 SwissTargetPrediction 数据库，选择物种为“Homo sapiens”，获取红曲作用靶点，并对靶点进行去重整合。

1.1.3 CSVD 疾病靶点筛选 将“Cerebral Small Vessel Disease”输入 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、CTD 数据库、DisGeNET 数据库寻找 CSVD 疾病靶点。

1.1.4 交集靶点 Venny 分析 登入 Venny 2.1 网站，将 CSVD 疾病靶点信息输入 List 1，红曲作用靶点输入 List 2，获取交集靶点信息。

1.1.5 构建红曲“药物 - 成分 - 靶点”网络 利用 CytoScape 3.7.1 软件构建药物红曲“药物 - 成分 - 靶点”网络，通过 CytoScape 3.7.1 软件工具 NetworkAnalyzer 对网络进行拓扑参数分析，收集主要活性成分及靶点度值（degree）信息。

1.1.6 PPI 网络构建 将“1.1.4”项下的交集靶点导入 STRING 11.0 数据库，限定物种为“Homo sapiens”，置信度区间大于 0.4，构建 PPI 网络。利用 CytoScape 3.7.1 软件进行参数分析，以大于 Degree 均值为条件筛选关键靶点。

1.1.7 GO 和 KEGG 富集分析 选择获取的关键靶点导入 DAVID 6.8 数据库，限定物种为“Homo sapiens”，获取 GO、KEGG 富集结果并进行可视化分析。

1.2 动物实验

1.2.1 仪器与试药 酶标仪（318MC，美国赛默飞世尔科技公司）；石蜡包埋机（YB-7B，孝感市亚光医用电子技术有限公司）；离心机（LC-4016，安徽中科中佳科学仪器有限公司）；恒温振荡培养箱（BHWY-100BC，常州杰博森仪器有限公司）；

红曲（批号：210201，亳州市京皖中药饮片厂），经安徽中医药大学中药资源室鉴定为正品。TNF-α、IL-6、IL-1β 试剂盒（睿信生物公司）；尼莫地平（批号：200108，亚宝药业集团股份有限公司）。

1.2.2 动物 SPF 级雄性大鼠，体质量 200 ～ 230 g[杭州医学院，生产许可证号：SCXK（浙）2019-0002，动物伦理编号：AHUCM-rats-2021051]。

1.2.3 红曲水提液的制备 取红曲原料药，粉碎，过筛，加入药物总量 10 倍的水煎煮 1 h 后，过滤并保留滤液，再加入药物总量 8 倍的水煎煮 1 h，过滤并保留滤液；合并两次滤液，旋转蒸发浓缩成 3 g • kg^{-1} 的提取液备用。

1.2.4 CSVD 模型大鼠的复制 健康雄性 SD 大鼠 200 ～ 230 g，麻醉后钝性分离右颈总动脉（common carotid artery，CCA）采用丝线于右侧 CCA 远、近心端进行永久性结扎，距离约 1.5 cm 左右，结扎完成后缝合皮肤，放回笼中饲养。7 d 后永久性结扎左侧 CCA，操作步骤同上。假手术组仅分离 CCA，不进行结扎操作。大鼠出现癫痫、偏瘫等异常行为则判断模型复制成功。

1.2.5 实验分组与给药 大鼠随机分为 6 组，每组 10 只，分别为假手术组、模型组、红曲高剂量组（3 g • kg^{-1}）、红曲中剂量组（1.5 g • kg^{-1}）、红曲低剂量组（0.75 g • kg^{-1}）、尼莫地平组（20 mg • kg^{-1}），按体质量灌胃给药，假手术组、模型组灌胃等量生理盐水，每日一次，连续 30 d。

1.2.6 Morris 水迷宫实验 水迷宫为黑色圆形水池，等分为 4 个象限，平台置于象限中。将大鼠面向池壁从 4 个象限随机选择入水点，记录其在 2 min 内寻找并爬上平台所需时间，即逃避潜伏期；撤除平台，从平台所在象限对侧选入水点，观察其在 2 min 内穿越平台次数。实验为期 5 d，前 4 d 用于训练大鼠，第 5 日进行实验。

1.2.7 海马 CA1 区病理观察 各组大鼠麻醉后，从胸膛部剪开暴露心脏，用 4% 多聚甲醛进行灌注，灌注完成后将大鼠断头取脑，随后用石蜡包埋、切片，于显微镜下观察海马 CA1 区。

1.2.8 指标检测 大鼠麻醉后腹主动脉取血，静置 30 min，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，收集上层血清，根据试剂盒说明书进行检测。

1.2.9 Western blot 实验 大鼠断头处死，迅速取出海马组织置于冰上，剪碎，按每 20 mg 组织加入 150 ～ 250 μL 裂解液的比例加入裂解液，匀浆直至完全裂解。裂解后的样品 4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液，定量后贮存于－ 80 ℃冰箱用于蛋白测定，结果用 Image J 软件进行灰度分析。

1.3 统计分析方法

各组数据用 SPSS 23.0 软件进行分析，结果用“均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）”表示，多组间数据采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验，$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学预测研究

2.1.1 红曲成分及作用靶点收集 经筛选共获得 43 种红曲主要成分，包含 Monacolin 类、红曲色素类、十氢萘衍生物、有机酸等；将红曲成分上传至 SwissTargetPrediction 数据库预测，去重合并共获得 391 个潜在作用靶点。

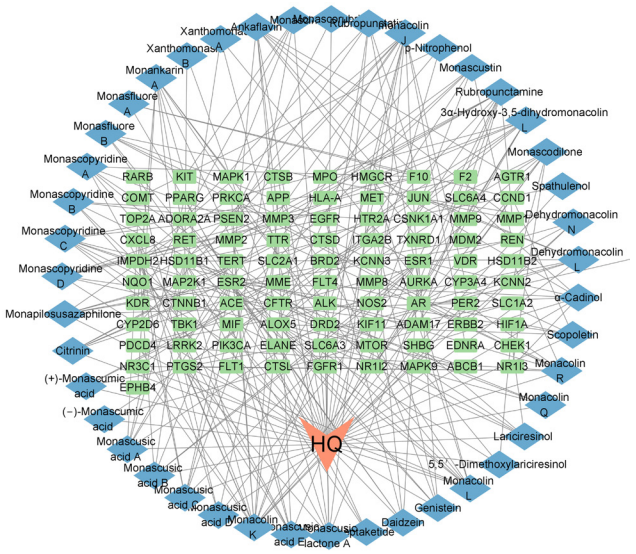
2.1.2 红曲作用靶点及 CSVD 疾病及预测 “Cerebral Small Vessel Disease”作为检索信息输入 GeneCards、OMIM、DisGeNET、CTD 数据库寻找治疗 CSVD 疾病的靶点，去重合并后共获得 1126 个疾病靶点。

2.1.3 交集靶点收集 登入 Venny 2.1 网站，将 1126 个 CSVD 疾病靶点和 391 个红曲作用靶点信息输入列表，共获得交集靶点 91 个。

2.1.4 药物 - 成分 - 靶点网络 如图 1 所示，利用 CytoScape 3.7.1 软件构建“药物 - 成分 - 靶点”网络，运用软件内置工具 NetworkAnalyzer 对网络进行拓扑参数分析，收集活性成分度值（Degree）信息，结果显示 Degree 值排名靠前的成分有 Monacolin K、Monacolin J、Ankaflavin 等，提示上述成分可能在红曲治疗 CSVD 过程中起重要作用。

2.1.5 PPI 网络构建 将交集靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络，如图 2 所示。结果显示 PPI 网络有 91 个节点，752 条边，平均 Degree 值为 16.7，EGFR、MAPK1、ESR1、CLCX8 等大于 Degree 均值关键靶点共计 37 个，提示这些蛋白可作为红曲治疗 CSVD 的关键靶点。

2.1.6 GO 和 KEGG 富集分析 运用 DAVID 6.8 数据库进行 GO 和 KEGG 分析，GO 分析结果涉及 171 个生物过程，33 个细胞组分和 51 个分子功能，选取排名前 10 结果绘制条形柱状图，如图 3 所示；结果表明红曲中的活性成分可能通过参与神经炎症、细胞增殖、信号转导等过程发挥治疗 CSVD 作用。KEGG 分析得到 104 个通路，选取排名前 20 通路绘制气泡图，如图 4 所示。去除与 CSVD 无关的通路，获得 PI3K-Akt 信号通路、RAS 信号通路等。其中，PI3K-Akt 信号通路的 count 值最大，表示该差异蛋白富集显著性较大。近年来的研究已证实 PI3K-Akt 信号通路在痴呆类脑血管病中的治疗是通过调节下游靶蛋白


HQ
Xanthomonas A
Ankaflavin
Monascorubrin
Rubropunctatin
Monacolin K
p-Nitrophenol
Monascustin
Rubropunctamine
3α-Hydroxy-3,5-dihydromonacolin L
Monascodilone
Spathulenol
Dehydromonacolin N
Dehydromonacolin L
α-Cadinol
Scopoletin
Monacolin R
Monacolin Q
Lariciresinol
5,5'-Dimethoxylariciresinol
Monacolin L
Genistein
Daidzein
Isoakuammiline
Monascusic acid
Monascusic acid A
Monascusic acid B
Monascusic acid C
Monascusic acid D
Monascusic acid E
Monascusic acid F
Monascusic acid G
Monascusic acid H
Monascusic acid I
Monascusic acid J
Monascusic acid K
Monascusic acid L
Monascusic acid M
Monascusic acid N
Monascusic acid O
Monascusic acid P
Monascusic acid Q
Monascusic acid R
Monascusic acid S
Monascusic acid T
Monascusic acid U
Monascusic acid V
Monascusic acid W
Monascusic acid X
Monascusic acid Y
Monascusic acid Z
Monascusic acid AA
Monascusic acid AB
Monascusic acid AC
Monascusic acid AD
Monascusic acid AE
Monascusic acid AF
Monascusic acid AG
Monascusic acid AH
Monascusic acid AI
Monascusic acid AJ
Monascusic acid AK
Monascusic acid AL
Monascusic acid AM
Monascusic acid AN
Monascusic acid AO
Monascusic acid AP
Monascusic acid AQ
Monascusic acid AR
Monascusic acid AS
Monascusic acid AT
Monascusic acid AU
Monascusic acid AV
Monascusic acid AW
Monascusic acid AX
Monascusic acid AY
Monascusic acid AZ
Monascusic acid BA
Monascusic acid BB
Monascusic acid BC
Monascusic acid BD
Monascusic acid BE
Monascusic acid BF
Monascusic acid BG
Monascusic acid BH
Monascusic acid BI
Monascusic acid BJ
Monascusic acid BK
Monascusic acid BL
Monascusic acid BM
Monascusic acid BN
Monascusic acid BO
Monascusic acid BP
Monascusic acid BQ
Monascusic acid BR
Monascusic acid BS
Monascusic acid BT
Monascusic acid BU
Monascusic acid BV
Monascusic acid BW
Monascusic acid BX
Monascusic acid BY
Monascusic acid BZ
Monascusic acid CA
Monascusic acid CB
Monascusic acid CC
Monascusic acid CD
Monascusic acid CE
Monascusic acid CF
Monascusic acid CG
Monascusic acid CH
Monascusic acid CI
Monascusic acid CJ
Monascusic acid CK
Monascusic acid CL
Monascusic acid CM
Monascusic acid CN
Monascusic acid CO
Monascusic acid CP
Monascusic acid CQ
Monascusic acid CR
Monascusic acid CS
Monascusic acid CT
Monascusic acid CU
Monascusic acid CV
Monascusic acid CW
Monascusic acid CX
Monascusic acid CY
Monascusic acid CZ
Monascusic acid DA
Monascusic acid DB
Monascusic acid DC
Monascusic acid DD
Monascusic acid DE
Monascusic acid DF
Monascusic acid DG
Monascusic acid DH
Monascusic acid DI
Monascusic acid DJ
Monascusic acid DK
Monascusic acid DL
Monascusic acid DM
Monascusic acid DN
Monascusic acid DO
Monascusic acid DP
Monascusic acid DQ
Monascusic acid DR
Monascusic acid DS
Monascusic acid DT
Monascusic acid DU
Monascusic acid DV
Monascusic acid DW
Monascusic acid DX
Monascusic acid DY
Monascusic acid DZ
Monascusic acid EA
Monascusic acid EB
Monascusic acid EC
Monascusic acid ED
Monascusic acid EE
Monascusic acid EF
Monascusic acid EG
Monascusic acid EH
Monascusic acid EI
Monascusic acid EJ
Monascusic acid EK
Monascusic acid EL
Monascusic acid EM
Monascusic acid EN
Monascusic acid EO
Monascusic acid EP
Monascusic acid EQ
Monascusic acid ER
Monascusic acid ES
Monascusic acid ET
Monascusic acid EU
Monascusic acid EV
Monascusic acid EW
Monascusic acid EX
Monascusic acid EY
Monascusic acid EZ
Monascusic acid FA
Monascusic acid FB
Monascusic acid FC
Monascusic acid FD
Monascusic acid FE
Monascusic acid FF
Monascusic acid FG
Monascusic acid FH
Monascusic acid FI
Monascusic acid FJ
Monascusic acid FK
Monascusic acid FL
Monascusic acid FM
Monascusic acid FN
Monascusic acid FO
Monascusic acid FP
Monascusic acid FQ
Monascusic acid FR
Monascusic acid FS
Monascusic acid FT
Monascusic acid FU
Monascusic acid FV
Monascusic acid FW
Monascusic acid FX
Monascusic acid FY
Monascusic acid FZ
Monascusic acid GA
Monascusic acid GB
Monascusic acid GC
Monascusic acid GD
Monascusic acid GE
Monascusic acid GF
Monascusic acid GG
Monascusic acid GH
Monascusic acid GI
Monascusic acid GJ
Monascusic acid GK
Monascusic acid GL
Monascusic acid GM
Monascusic acid GN
Monascusic acid GO
Monascusic acid GP
Monascusic acid GQ
Monascusic acid GR
Monascusic acid GS
Monascusic acid GT
Monascusic acid GU
Monascusic acid GV
Monascusic acid GW
Monascusic acid GX
Monascusic acid GY
Monascusic acid GZ
Monascusic acid HA
Monascusic acid HB
Monascusic acid HC
Monascusic acid HD
Monascusic acid HE
Monascusic acid HF
Monascusic acid HG
Monascusic acid HH
Monascusic acid HI
Monascusic acid HJ
Monascusic acid HK
Monascusic acid HL
Monascusic acid HM
Monascusic acid HN
Monascusic acid HO
Monascusic acid HP
Monascusic acid HQ
Monascusic acid HR
Monascusic acid HS
Monascusic acid HT
Monascusic acid HU
Monascusic acid HV
Monascusic acid HW
Monascusic acid HX
Monascusic acid HY
Monascusic acid HZ
Monascusic acid IA
Monascusic acid IB
Monascusic acid IC
Monascusic acid ID
Monascusic acid IE
Monascusic acid IF
Monascusic acid IG
Monascusic acid IH
Monascusic acid II
Monascusic acid IJ
Monascusic acid IK
Monascusic acid IL
Monascusic acid IM
Monascusic acid IN
Monascusic acid IO
Monascusic acid IP
Monascusic acid IQ
Monascusic acid IR
Monascusic acid IS
Monascusic acid IT
Monascusic acid IU
Monascusic acid IV
Monascusic acid IW
Monascusic acid IX
Monascusic acid IY
Monascusic acid IZ
Monascusic acid JA
Monascusic acid JB
Monascusic acid JC
Monascusic acid JD
Monascusic acid JE
Monascusic acid JF
Monascusic acid JG
Monascusic acid JH
Monascusic acid JI
Monascusic acid JJ
Monascusic acid JK
Monascusic acid JL
Monascusic acid JM
Monascusic acid JN
Monascusic acid JO
Monascusic acid JP
Monascusic acid JQ
Monascusic acid JR
Monascusic acid JS
Monascusic acid JT
Monascusic acid JU
Monascusic acid JV
Monascusic acid JW
Monascusic acid JX
Monascusic acid JY
Monascusic acid JZ
Monascusic acid KA
Monascusic acid KB
Monascusic acid KC
Monascusic acid KD
Monascusic acid KE
Monascusic acid KF
Monascusic acid KG
Monascusic acid KH
Monascusic acid KI
Monascusic acid KJ
Monascusic acid KK
Monascusic acid KL
Monascusic acid KM
Monascusic acid KN
Monascusic acid KO
Monascusic acid KP
Monascusic acid KQ
Monascusic acid KR
Monascusic acid KS
Monascusic acid KT
Monascusic acid KU
Monascusic acid KV
Monascusic acid KW
Monascusic acid KX
Monascusic acid KY
Monascusic acid KZ
Monascusic acid LA
Monascusic acid LB
Monascusic acid LC
Monascusic acid LD
Monascusic acid LE
Monascusic acid LF
Monascusic acid LG
Monascusic acid LH
Monascusic acid LI
Monascusic acid LJ
Monascusic acid LK
Monascusic acid LL
Monascusic acid LM
Monascusic acid LN
Monascusic acid LO
Monascusic acid LP
Monascusic acid LQ
Monascusic acid LR
Monascusic acid LS
Monascusic acid LT
Monascusic acid LU
Monascusic acid LV
Monascusic acid LW
Monascusic acid LX
Monascusic acid LY
Monascusic acid LZ
Monascusic acid MA
Monascusic acid MB
Monascusic acid MC
Monascusic acid MD
Monascusic acid ME
Monascusic acid MF
Monascusic acid MG
Monascusic acid MH
Monascusic acid MI
Monascusic acid MJ
Monascusic acid MK
Monascusic acid ML
Monascusic acid MM
Monascusic acid MN
Monascusic acid MO
Monascusic acid MP
Monascusic acid MQ
Monascusic acid MR
Monascusic acid MS
Monascusic acid MT
Monascusic acid MU
Monascusic acid MV
Monascusic acid MW
Monascusic acid MX
Monascusic acid MY
Monascusic acid MZ
Monascusic acid NA
Monascusic acid NB
Monascusic acid NC
Monascusic acid ND
Monascusic acid NE
Monascusic acid NF
Monascusic acid NG
Monascusic acid NH
Monascusic acid NI
Monascusic acid NJ
Monascusic acid NK
Monascusic acid NL
Monascusic acid NM
Monascusic acid NN
Monascusic acid NO
Monascusic acid NP
Monascusic acid NQ
Monascusic acid NR
Monascusic acid NS
Monascusic acid NT
Monascusic acid NU
Monascusic acid NV
Monascusic acid NW
Monascusic acid NX
Monascusic acid NY
Monascusic acid NZ
Monascusic acid OA
Monascusic acid OB
Monascusic acid OC
Monascusic acid OD
Monascusic acid OE
Monascusic acid OF
Monascusic acid OG
Monascusic acid OH
Monascusic acid OI
Monascusic acid OJ
Monascusic acid OK
Monascusic acid OL
Monascusic acid OM
Monascusic acid ON
Monascusic acid OO
Monascusic acid OP
Monascusic acid OQ
Monascusic acid OR
Monascusic acid OS
Monascusic acid OT
Monascusic acid OU
Monascusic acid OV
Monascusic acid OW
Monascusic acid OX
Monascusic acid OY
Monascusic acid OZ
Monascusic acid PA
Monascusic acid PB
Monascusic acid PC
Monascusic acid PD
Monascusic acid PE
Monascusic acid PF
Monascusic acid PG
Monascusic acid PH
Monascusic acid PI
Monascusic acid PJ
Monascusic acid PK
Monascusic acid PL
Monascusic acid PM
Monascusic acid PN
Monascusic acid PO
Monascusic acid PP
Monascusic acid PQ
Monascusic acid PR
Monascusic acid PS
Monascusic acid PT
Monascusic acid PU
Monascusic acid PV
Monascusic acid PW
Monascusic acid PX
Monascusic acid PY
Monascusic acid PZ
Monascusic acid QA
Monascusic acid QB
Monascusic acid QC
Monascusic acid QD
Monascusic acid QE
Monascusic acid QF
Monascusic acid QG
Monascusic acid QH
Monascusic acid QI
Monascusic acid QJ
Monascusic acid QK
Monascusic acid QL
Monascusic acid QM
Monascusic acid QN
Monascusic acid QO
Monascusic acid QP
Monascusic acid QQ
Monascusic acid QR
Monascusic acid QS
Monascusic acid QT
Monascusic acid QU
Monascusic acid QV
Monascusic acid QW
Monascusic acid QX
Monascusic acid QY
Monascusic acid QZ
Monascusic acid RA
Monascusic acid RB
Monascusic acid RC
Monascusic acid RD
Monascusic acid RE
Monascusic acid RF
Monascusic acid RG
Monascusic acid RH
Monascusic acid RI
Monascusic acid RJ
Monascusic acid RK
Monascusic acid RL
Monascusic acid RM
Monascusic acid RN
Monascusic acid RO
Monascusic acid RP
Monascusic acid RQ
Monascusic acid RR
Monascusic acid RS
Monascusic acid RT
Monascusic acid RU
Monascusic acid RV
Monascusic acid RW
Monascusic acid RX
Monascusic acid RY
Monascusic acid RZ
Monascusic acid SA
Monascusic acid SB
Monascusic acid SC
Monascusic acid SD
Monascusic acid SE
Monascusic acid SF
Monascusic acid SG
Monascusic acid SH
Monascusic acid SI
Monascusic acid SJ
Monascusic acid SK
Monascusic acid SL
Monascusic acid SM
Monascusic acid SN
Monascusic acid SO
Monascusic acid SP
Monascusic acid SQ
Monascusic acid SR
Monascusic acid SS
Monascusic acid ST
Monascusic acid SU
Monascusic acid SV
Monascusic acid SW
Monascusic acid SX
Monascusic acid SY
Monascusic acid SZ
Monascusic acid TA
Monascusic acid TB
Monascusic acid TC
Monascusic acid TD
Monascusic acid TE
Monascusic acid TF
Monascusic acid TG
Monascusic acid TH
Monascusic acid TI
Monascusic acid TJ
Monascusic acid TK
Monascusic acid TL
Monascusic acid TM
Monascusic acid TN
Monascusic acid TO
Monascusic acid TP
Monascusic acid TQ
Monascusic acid TR
Monascusic acid TS
Monascusic acid TT
Monascusic acid TU
Monascusic acid TV
Monascusic acid TW
Monascusic acid TX
Monascusic acid TY
Monascusic acid TZ
Monascusic acid UA
Monascusic acid UB
Monascusic acid UC
Monascusic acid UD
Monascusic acid UE
Monascusic acid UF
Monascusic acid UG
Monascusic acid UH
Monascusic acid UI
Monascusic acid UJ
Monascusic acid UK
Monascusic acid UL
Monascusic acid UM
Monascusic acid UN
Monascusic acid UO
Monascusic acid UP
Monascusic acid UQ
Monascusic acid UR
Monascusic acid US
Monascusic acid UT
Monascusic acid UU
Monascusic acid UV
Monascusic acid UW
Monascusic acid UX
Monascusic acid UY
Monascusic acid UZ
Monascusic acid VA
Monascusic acid VB
Monascusic acid VC
Monascusic acid VD
Monascusic acid VE
Monascusic acid VF
Monascusic acid VG
Monascusic acid VH
Monascusic acid VI
Monascusic acid VJ
Monascusic acid VK
Monascusic acid VL
Monascusic acid VM
Monascusic acid VN
Monascusic acid VO
Monascusic acid VP
Monascusic acid VQ
Monascusic acid VR
Monascusic acid VS
Monascusic acid VT
Monascusic acid VU
Monascusic acid VV
Monascusic acid VW
Monascusic acid VX
Monascusic acid VY
Monascusic acid VZ
Monascusic acid WA
Monascusic acid WB
Monascusic acid WC
Monascusic acid WD
Monascusic acid WE
Monascusic acid WF
Monascusic acid WG
Monascusic acid WH
Monascusic acid WI
Monascusic acid WJ
Monascusic acid WK
Monascusic acid WL
Monascusic acid WM
Monascusic acid WN
Monascusic acid WO
Monascusic acid WP
Monascusic acid WQ
Monascusic acid WR
Monascusic acid WS
Monascusic acid WT
Monascusic acid WU
Monascusic acid WV
Monascusic acid WW
Monascusic acid WX
Monascusic acid WY
Monascusic acid WZ
Monascusic acid XA
Monascusic acid XB
Monascusic acid XC
Monascusic acid XD
Monascusic acid XE
Monascusic acid XF
Monascusic acid XG
Monascusic acid XH
Monascusic acid XI
Monascusic acid XJ
Monascusic acid XK
Monascusic acid XL
Monascusic acid XM
Monascusic acid XN
Monascusic acid XO
Monascusic acid XP
Monascusic acid XQ
Monascusic acid XR
Monascusic acid XS
Monascusic acid XT
Monascusic acid XU
Monascusic acid XV
Monascusic acid XW
Monascusic acid XX
Monascusic acid XY
Monascusic acid XZ
Monascusic acid YA
Monascusic acid YB
Monascusic acid YC
Monascusic acid YD
Monascusic acid YE
Monascusic acid YF
Monascusic acid YG
Monascusic acid YH
Monascusic acid YI
Monascusic acid YJ
Monascusic acid YK
Monascusic acid YL
Monascusic acid YM
Monascusic acid YN
Monascusic acid YO
Monascusic acid YP
Monascusic acid YQ
Monascusic acid YR
Monascusic acid YS
Monascusic acid YT
Monascusic acid YU
Monascusic acid YV
Monascusic acid YW
Monascusic acid YX
Monascusic acid YY
Monascusic acid YZ
Monascusic acid ZA
Monascusic acid ZB
Monascusic acid ZC
Monascusic acid ZD
Monascusic acid ZE
Monascusic acid ZF
Monascusic acid ZG
Monascusic acid ZH
Monascusic acid ZI
Monascusic acid ZJ
Monascusic acid ZK
Monascusic acid ZL
Monascusic acid ZM
Monascusic acid ZN
Monascusic acid ZO
Monascusic acid ZP
Monascusic acid ZQ
Monascusic acid ZR
Monascusic acid ZS
Monascusic acid ZT
Monascusic acid ZU
Monascusic acid ZV
Monascusic acid ZW
Monascusic acid ZX
Monascusic acid ZY
Monascusic acid ZZ
Monascusic acid AAA
Monascusic acid AAB
Monascusic acid AAC
Monascusic acid AAD
Monascusic acid AAE
Monascusic acid AAF
Monascusic acid AAG
Monascusic acid AAH
Monascusic acid AAI
Monascusic acid AAJ
Monascusic acid AAK
Monascusic acid AAL
Monascusic acid AAM
Monascusic acid AAN
Monascusic acid AAO
Monascusic acid AAP
Monascusic acid AAQ
Monascusic acid AAR
Monascusic acid AAS
Monascusic acid AAT
Monascusic acid AAU
Monascusic acid AAV
Monascusic acid AAW
Monascusic acid AAX
Monascusic acid AAY
Monascusic acid AAZ
Monascusic acid ABA
Monascusic acid ABB
Monascusic acid ABC
Monascusic acid ABD
Monascusic acid ABE
Monascusic acid ABF
Monascusic acid ABG
Monascusic acid ABH
Monascusic acid ABI
Monascusic acid ABJ
Monascusic acid ABK
Monascusic acid ABL
Monascusic acid ABM
Monascusic acid ABN
Monascusic acid ABO
Monascusic acid ABP
Monascusic acid ABQ
Monascusic acid ABR
Monascusic acid ABS
Monascusic acid ABT
Monascusic acid ABU
Monascusic acid ABV
Monascusic acid ABW
Monascusic acid ABX
Monascusic acid ABY
Monascusic acid ABZ
Monascusic acid ACA
Monascusic acid ACB
Monascusic acid ACC
Monascusic acid ACD
Monascusic acid ACE
Monascusic acid ACF
Monascusic acid ACG
Monascusic acid ACH
Monascusic acid ACI
Monascusic acid ACJ
Monascusic acid ACK
Monascusic acid ACL
Monascusic acid ACM
Monascusic acid ACN
Monascusic acid ACO
Monascusic acid ACP
Monascusic acid ACQ
Monascusic acid ACR
Monascusic acid ACS
Monascusic acid ACT
Monascusic acid ACU
Monascusic acid ACV
Monascusic acid ACW
Monascusic acid ACX
Monascusic acid ACY
Monascusic acid ACZ
Monascusic acid ADA
Monascusic acid ADB
Monascusic acid ADC
Monascusic acid ADD
Monascusic acid ADE
Monascusic acid ADF
Monascusic acid ADG
Monascusic acid ADH
Monascusic acid ADI
Monascusic acid ADJ
Monascusic acid ADK
Monascusic acid ADL
Monascusic acid ADM
Monascusic acid ADN
Monascusic acid ADO
Monascusic acid ADP
Monascusic acid ADQ
Monascusic acid ADR
Monascusic acid ADS
Monascusic acid ADT
Monascusic acid ADU
Monascusic acid ADV
Monascusic acid ADW
Monascusic acid ADX
Monascusic acid ADY
Monascusic acid ADZ
Monascusic acid AEA
Monascusic acid AEB
Monascusic acid AEC
Monascusic acid AED
Monascusic acid AEE
Monascusic acid AEF
Monascusic acid AEG
Monascusic acid AEH
Monascusic acid AEI
Monascusic acid AEJ
Monascusic acid AEK
Monascusic acid AEL
Monascusic acid AEM
Monascusic acid AEN
Monascusic acid AEO
Monascusic acid AEP
Monascusic acid AEQ
Monascusic acid AER
Monascusic acid AES
Monascusic acid AET
Monascusic acid AEU
Monascusic acid AEV
Monascusic acid AEW
Monascusic acid AEX
Monascusic acid AEY
Monascusic acid AEZ
Monascusic acid AFA
Monascusic acid AFB
Monascusic acid AFC
Monascusic acid AFD
Monascusic acid AFE
Monascusic acid AFF
Monascusic acid AFG
Monascusic acid AFH
Monascusic acid AFI
Monascusic acid AFJ
Monascusic acid AFK
Monascusic acid AFL
Monascusic acid AFM
Monascusic acid AFN
Monascusic acid AFO
Monascusic acid AFP
Monascusic acid AFQ
Monascusic acid AFR
Monascusic acid AFS
Monascusic acid AFT
Monascusic acid AFU
Monascusic acid AFV
Monascusic acid AFW
Monascusic acid AFX
Monascusic acid AFY
Monascusic acid AFZ
Monascusic acid AGA
Monascusic acid AGB
Monascusic acid AGC
Monascusic acid AGD
Monascusic acid AGE
Monascusic acid AGF
Monascusic acid AGG
Monascusic acid AGH
Monascusic acid AGI
Monascusic acid AGJ
Monascusic acid AGK
Monascusic acid AGL
Monascusic acid AGM
Monascusic acid AGN
Monascusic acid AGO
Monascusic acid AGP
Monascusic acid AGQ
Monascusic acid AGR
Monascusic acid AGS
Monascusic acid AGT
Monascusic acid AGU
Monascusic acid AGV
Monascusic acid AGW
Monascusic acid AGX
Monascusic acid AGY
Monascusic acid AGZ
Monascusic acid AHA
Monascusic acid AHB
Monascusic acid AHC
Monascusic acid AHD
Monascusic acid AHE
Monascusic acid AHF
Monascusic acid AHG
Monascusic acid AHH
Monascusic acid AHI
Monascusic acid AHJ
Monascusic acid AHK
Monascusic acid AHL
Monascusic acid AHM
Monascusic acid AHN
Monascusic acid AHO
Monascusic acid AHP
Monascusic acid AHQ
Monascusic acid AHR
Monascusic acid AHS
Monascusic acid AHT
Monascusic acid AHU
Monascusic acid AHV
Monascusic acid AHW
Monascusic acid AHX
Monascusic acid AHY
Monascusic acid AHZ
Monascusic acid AIA
Monascusic acid AIB
Monascusic acid AIC
Monascusic acid AID
Monascusic acid AIE
Monascusic acid AIF
Monascusic acid AIG
Monascusic acid AIH
Monascusic acid AII
Monascusic acid AIJ
Monascusic acid AIK
Monascusic acid AIL
Monascusic acid AIM
Monascusic acid AIN
Monascusic acid AIO
Monascusic acid AIP
Monascusic acid AIQ
Monascusic acid AIR
Monascusic acid AIS
Monascusic acid AIT
Monascusic acid AIU
Monascusic acid AIV
Monascusic acid AIW
Monascusic acid AIX
Monascusic acid AIY
Monascusic acid AIZ
Monascusic acid AJA
Monascusic acid AJB
Monascusic acid AJC
Monascusic acid AJD
Monascusic acid AJE
Monascusic acid AJF
Monascusic acid AJG
Monascusic acid AJH
Monascusic acid AJI
Monascusic acid AJJ
Monascusic acid AJK
Monascusic acid AJL
Monascusic acid AJM
Monascusic acid AJN
Monascusic acid AJO
Monascusic acid AJP
Monascusic acid AJQ
Monascusic acid AJR
Monascusic acid AJS
Monascusic acid AJT
Monascusic acid AJU
Monascusic acid AJV
Monascusic acid AJW
Monascusic acid AJX
Monascusic acid AJY
Monascusic acid AJZ
Monascusic acid AKA
Monascusic acid AKB
Monascusic acid AKC
Monascusic acid AKD
Monascusic acid AKE
Monascusic acid AKF
Monascusic acid AKG
Monascusic acid AKH
Monascusic acid AKI
Monascusic acid AKJ
Monascusic acid AKK
Monascusic acid AKL
Monascusic acid AKM
Monascusic acid AKN
Monascusic acid AKO
Monascusic acid AKP
Monascusic acid AKQ
Monascusic acid AKR
Monascusic acid AKS
Monascusic acid AKT
Monascusic acid AKU
Monascusic acid AKV
Monascusic acid AKW
Monascusic acid AKX
Monascusic acid AKY
Monascusic acid AKZ
Monascusic acid ALA
Monascusic acid ALB
Monascusic acid ALC
Monascusic acid ALD
Monascusic acid ALE
Monascusic acid ALF
Monascusic acid ALG
Monascusic acid ALH
Monascusic acid ALI
Monascusic acid ALJ
Monascusic acid ALK
Monascusic acid ALL
Monascusic acid ALM
Monascusic acid ALN
Monascusic acid ALO
Monascusic acid ALP
Monascusic acid ALQ
Monascusic acid ALR
Monascusic acid ALS
Monascusic acid ALT
Monascusic acid ALU
Monascusic acid ALV
Monascusic acid ALW
Monascusic acid ALX
Monascusic acid ALY
Monascusic acid ALZ
Monascusic acid AMA
Monascusic acid AMB
Monascusic acid AMC
Monascusic acid AMD
Monascusic acid AME
Monascusic acid AMF
Monascusic acid AMG
Monascusic acid AMH
Monascusic acid AMI
Monascusic acid AMJ
Monascusic acid AMK
Monascusic acid AML
Monascusic acid AMM
Monascusic acid AMN
Monascusic acid AMO
Monascusic acid AMP
Monascusic acid AMQ
Monascusic acid AMR
Monascusic acid AMS
Monascusic acid AMT
Monascusic acid AMU
Monascusic acid AMV
Monascusic acid AMW
Monascusic acid AMX
Monascusic acid AMY
Monascusic acid AMZ
Monascusic acid ANA
Monascusic acid ANB
Monascusic acid ANC
Monascusic acid AND
Monascusic acid ANE
Monascusic acid ANF
Monascusic acid ANG
Monascusic acid ANH
Monascusic acid ANI
Monascusic acid ANJ
Monascusic acid ANK
Monascusic acid ANL
Monascusic acid ANM
Monascusic acid ANN
Monascusic acid ANO
Monascusic acid ANP
Monascusic acid ANQ
Monascusic acid ANR
Monascusic acid ANS
Monascusic acid ANT
Monascusic acid ANU
Monascusic acid ANV
Monascusic acid ANW
Monascusic acid ANX
Monascusic acid ANY
Monascusic acid ANZ
Monascusic acid AOA
Monascusic acid AOB
Monascusic acid AOC
Monascusic acid AOD
Monascusic acid AOE
Monascusic acid AOF
Monascusic acid AOG
Monascusic acid AOH
Monascusic acid AOI
Monascusic acid AOJ
Monascusic acid AOK
Monascusic acid AOL
Monascusic acid AOM
Monascusic acid AON
Monascusic acid AOO
Monascusic acid AOP
Monascusic acid AOQ
Monascusic acid AOR
Monascusic acid AOS
Monascusic acid AOT
Monascusic acid AOU
Monascusic acid AOV
Monascusic acid AOW
Monascusic acid AOX
Monascusic acid AOY
Monascusic acid AOZ
Monascusic acid APA
Monascusic acid APB
Monascusic acid APC
Monascusic acid APD
Monascusic acid APE
Monascusic acid APF
Monascusic acid APG
Monascusic acid APH
Monascusic acid API
Monascusic acid APJ
Monascusic acid APK
Monascusic acid APL
Monascusic acid APM
Monascusic acid APN
Monascusic acid APO
Monascusic acid APP
Monascusic acid APQ
Monascusic acid APR
Monascusic acid APS
Monascusic acid APT
Monascusic acid APU
Monascusic acid APV
Monascusic acid APW
Monascusic acid APX
Monascusic acid APY
Monascusic acid APZ
Monascusic acid AQA
Monascusic acid AQB
Monascusic acid AQC
Monascusic acid AQD
Monascusic acid AQE
Monascusic acid AQF
Monascusic acid AQG
Monascusic acid AQH
Monascusic acid AQI
Monascusic acid AQJ
Monascusic acid AQK
Monascusic acid AQL
Monascusic acid AQM
Monascusic acid AQN
Monascusic acid AQO
Monascusic acid AQP
Monascusic acid AQQ
Monascusic acid AQR
Monascusic acid AQS
Monascusic acid AQT
Monascusic acid AQU
Monascusic acid AQV
Monascusic acid AQW
Monascusic acid AQX
Monascusic acid AQY
Monascusic acid AQZ
Monascusic acid ARA
Monascusic acid ARB
Monascusic acid ARC
Monascusic acid ARD
Monascusic acid ARE
Monascusic acid ARF
Monascusic acid ARG
Monascusic acid ARH
Monascusic acid ARI
Monascusic acid ARJ
Monascusic acid ARK
Monascusic acid ARL
Monascusic acid ARM
Monascusic acid ARN
Monascusic acid ARO
Monascusic acid ARP
Monascusic acid ARQ
Monascusic acid ARR
Monascusic acid ARS
Monascusic acid ART
Monascusic acid ARU
Monascusic acid ARV
Monascusic acid ARW
Monascusic acid ARX
Monascusic acid ARY
Monascusic acid ARZ
Monascusic acid ASA
Monascusic acid ASB
Monascusic acid ASC
Monascusic acid ASD
Monascusic acid ASE
Monascusic acid ASF
Monascusic acid ASG
Monascusic acid ASH
Monascusic acid ASI
Monascusic acid ASJ
Monascusic acid ASK
Monascusic acid ASL
Monascusic acid ASM
Monascusic acid ASN
Monascusic acid ASO
Monascusic acid ASP
Monascusic acid ASQ
Monascusic acid ASR
Monascusic acid ASS
Monascusic acid AST
Monascusic acid ASU
Monascusic acid ASV
Monascusic acid ASW
Monascusic acid ASX
Monascusic acid ASY
Monascusic acid ASZ
Monascusic acid ATA
Monascusic acid ATB
Monascusic acid ATC
Monascusic acid ATD
Monascusic acid ATE
Monascusic acid ATF
Monascusic acid ATG
Monascusic acid ATH
Monascusic acid ATI
Monascusic acid ATJ
Monascusic acid ATK
Monascusic acid ATL
Monascusic acid ATM
Monascusic acid ATN
Monascusic acid ATO
Monascusic acid ATP
Monascusic acid ATQ
Monascusic acid ATR
Monascusic acid ATS
Monascusic acid ATT
Monascusic acid ATU
Monascusic acid ATV
Monascusic acid ATW
Monascusic acid ATX
Monascusic acid ATY
Monascusic acid ATZ
Monascusic acid AUA
Monascusic acid AUB
Monascusic acid AUC
Monascusic acid AUD
Monascusic acid AUE
Monascusic acid AUF
Monascusic acid AUG
Monascusic acid AUH
Monascusic acid AUI
Monascusic acid AUJ
Monascusic acid AUK
Monascusic acid AUL
Monascusic acid AUM
Monascusic acid AUN
Monascusic acid AUO
Monascusic acid AUP
Monascusic acid AUQ
Monascusic acid AUR
Monascusic acid AUS
Monascusic acid AUT
Monascusic acid AUU
Monascusic acid AUV
Monascusic acid AUW
Monascusic acid AUX
Monascusic acid AUY
Monascusic acid AUZ
Monascusic acid AVA
Monascusic acid AVB
Monascusic acid AVC
Monascusic acid AVD
Monascusic acid AVE
Monascusic acid AVF
Monascusic acid AVG
Monascusic acid AVH
Monascusic acid AVI
Monascusic acid AVJ
Monascusic acid AVK
Monascusic acid AVL
Monascusic acid AVM
Monascusic acid AVN
Monascusic acid AVO
Monascusic acid AVP
Monascusic acid AVQ
Monascusic acid AVR
Monascusic acid AVS
Monascusic acid AVT
Monascusic acid AVU
Monascusic acid AVV
Monascusic acid AVW
Monascusic acid AVX
Monascusic acid AVY
Monascusic acid AVZ
Monascusic acid AWA
Monascusic acid AWB
Monascusic acid AWC
Monascusic acid AWD
Monascusic acid AWE
Monascusic acid AWF
Monascusic acid AWG
Monascusic acid AWH
Monascusic acid AWI
Monascusic acid AWJ
Monascusic acid AWK
Monascusic acid AWL
Monascusic acid AWM
Monascusic acid AWN
Monascusic acid AWO
Monascusic acid AWP
Monascusic acid AWQ
Monascusic acid AWR
Monascusic acid AWS
Monascusic acid AWT
Monascusic acid AWU
Monascusic acid AWV
Monascusic acid AWW
Monascusic acid AWX
Monascusic acid AWY
Monascusic acid AWZ
Monascusic acid AXA
Monascusic acid AXB
Monascusic acid AXC
Monascusic acid AXD
Monascusic acid AXE
Monascusic acid AXF
Monascusic acid AXG
Monascusic acid AXH
Monascusic acid AXI
Monascusic acid AXJ
Monascusic acid AXK
Monascusic acid AXL
Monascusic acid AXM
Monascusic acid AXN
Monascusic acid AXO
Monascusic acid AXP
Monascusic acid AXQ
Monascusic acid AXR
Monascusic acid AXS
Monascusic acid AXT
Monascusic acid AXU
Monascusic acid AXV
Monascusic acid AXW
Monascusic acid AXX
Monascusic acid AXY
Monascusic acid AXZ
Monascusic acid AYA
Monascusic acid AYB
Monascusic acid AYC
Monascusic acid AYD
Monascusic acid AYE
Monascusic acid AYF
Monascusic acid AYG
Monascusic acid AYH
Monascusic acid AYI
Monascusic acid AYJ
Monascusic acid AYK
Monascusic acid AYL
Monascusic acid AYM
Monascusic acid AYN
Monascusic acid AYO
Monascusic acid AYP
Monascusic acid AYQ
Monascusic acid AYR
Monascusic acid AYS
Monascusic acid AYT
Monascusic acid AYU
Monascusic acid AYV
Monascusic acid AYW
Monascusic acid AYX
Monascusic acid AYY
Monascusic acid AYZ
Monascusic acid AZA
Monascusic acid AZB
Monascusic acid AZC
Monascusic acid AZD
Monascusic acid AZE
Monascusic acid AZF
Monascusic acid AZG
Monascusic acid AZH
Monascusic acid AZI
Monascusic acid AZJ
Monascusic acid AZK
Monascusic acid AZL
Monascusic acid AZM
Monascusic acid AZN
Monascusic acid AZO
Monascusic acid AZP
Monascusic acid AZQ
Monascusic acid AZR
Monascusic acid AZS
Monascusic acid AZT
Monascusic acid AZU
Monascusic acid AZV
Monascusic acid AZW
Monascusic acid AZX
Monascusic acid AZY
Monascusic acid AZZ
Monascusic acid BAA
Monascusic acid BAB
Monascusic acid BAC
Monascusic acid BAD
Monascusic acid BAE
Monascusic acid BAF
Monascusic acid BAG
Monascusic acid BAH
Monascusic acid BAI
Monascusic acid BAJ
Monascusic acid BAK
Monascusic acid BAL
Monascusic acid BAM
Monascusic acid BAN
Monascusic acid BAO
Monascusic acid BAP
Monascusic acid BAQ
Monascusic acid BAR
Monascusic acid BAS
Monascusic acid BAT
Monascusic acid BAU
Monascusic acid BAV
Monascusic acid BAW
Monascusic acid BAX
Monascusic acid BAY
Monascusic acid BAZ
Monascusic acid BBA
Monascusic acid BBB
Monascusic acid BBC
Monascusic acid BBD
Monascusic acid BBE
Monascusic acid BBF
Monascusic acid BBG
Monascusic acid BBH
Monascusic acid BBI
Monascusic acid BBJ
Monascusic acid BBK
Monascusic acid BBL
Monascusic acid BBM
Monascusic acid BBN
Monascusic acid BBO
Monascusic acid BBP
Monascusic acid BBQ
Monascusic acid BBR
Monascusic acid BBS
Monascusic acid BBT
Monascusic acid BBU
Monascusic acid BBV
Monascusic acid BBW
Monascusic acid BBX
Monascusic acid BBY
Monascusic acid BBZ
Monascusic acid BCA
Monascusic acid BCB
Monascusic acid BCC
Monascusic acid BCD
Monascusic acid BCE
Monascusic acid BCF
Monascusic acid BCG
Monascusic acid BCH
Monascusic acid BCI
Monascusic acid BCJ
Monascusic acid BCK
Monascusic acid BCL
Monascusic acid BCM
Monascusic acid BCN
Monascusic acid BCO
Monascusic acid BCP
Monascusic acid BCQ
Monascusic acid BCR
Monascusic acid BCS
Monascusic acid BCT
Monascusic acid BCU
Monascusic acid BCV
Monascusic acid BCW
Monascusic acid BCX
Monascusic acid BCY
Monascusic acid BCZ
Monascusic acid BDA
Monascusic acid BDB
Monascusic acid BDC
Monascusic acid BDD
Monascusic acid BDE
Monascusic acid BDF
Monascusic acid BDG
Monascusic acid BDH
Monascusic acid BDI
Monascusic acid BDJ
Monascusic acid BDK
Monascusic acid BDL
Monascusic acid BDM
Monascusic acid BDN
Monascusic acid BDO
Monascusic acid BDP
Monascusic acid BDQ
Monascusic acid BDR
Monascusic acid

组及尼莫地平组大鼠海马 CA1 区细胞排列趋于规则、紧密，病变程度均有明显改善，表明红曲对 CSVD 模型大鼠的海马组织具有一定的保护作用。

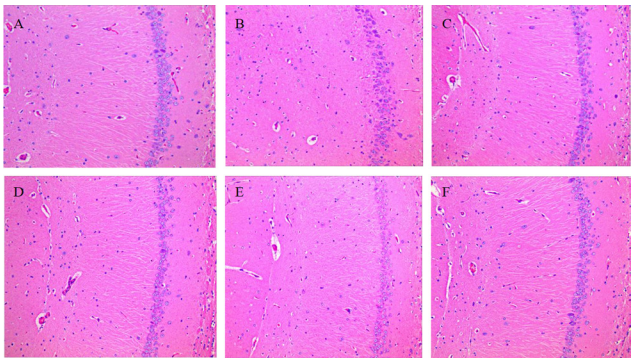


图 5　CSVD 模型大鼠海马 CA1 区 HE 染色（×200）

Fig 5　HE staining of CA1 area of hippocampus in CSVD model rats（×200）

A. 假手术组（sham group）；B. 模型组（model group）；C. 红曲高剂量组（HQ high dose group）；D. 红曲中剂量组（HQ middle dose group）；E. 红曲低剂量组（HQ low dose group）；F. 尼莫地平组（nimodipine group）

2.2.3　指标测定　如表 2 所示，与假手术组相比，模型组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量显著增高（$P < 0.01$）；与模型组相比，红曲高、中剂量组及尼莫地平组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），红曲低剂量组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 水平显著降低（$P < 0.05$），IL-6 水平无统计学意义。表明红曲能显著降低 CSVD 大鼠血清中炎症因子水平，显示出红曲具有良好的抗炎作用。

表 2　红曲对 CSVD 大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 2　Effect of HQ on TNF-α，IL-6 and IL-1β inflammatory factors in serum of CSVD rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	TNF-α/（ng•L^{-1}）	IL-6/（ng • L^{-1}）	IL-1β/（ng•L^{-1}）
假手术组	312.58±24.79	46.32±6.27	28.71±7.62
模型组	491.52±39.89$^{\#\#}$	70.23±12.37$^{\#\#}$	42.37±4.36$^{\#\#}$
红曲高剂量组	372.62±45.59**	54.41±10.77**	30.44±6.23**
红曲中剂量组	394.23±20.35*	62.32±13.27**	32.25±5.27*
红曲低剂量组	412.61±49.58*	68.45±5.86	34.36±5.86*
尼莫地平组	336.65±25.95**	50.37±10.68**	31.25±4.68**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

2.2.4　Western blot 实验　蛋白电泳结果如图 6 所示。结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠海马区 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.01$）；与模型组比较，红曲高、中剂量组及尼莫地平组 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），红曲低剂量组 PI3K、mTOR 表达水平显著升高（$P < 0.05$），Akt 蛋白表达水平差异无统计学意义。结果表明红曲可通过调节 PI3K-AKT-mTOR 通路，调控神经细胞增值、凋亡过程，发挥对于 CSVD 模型大鼠的治疗作用。

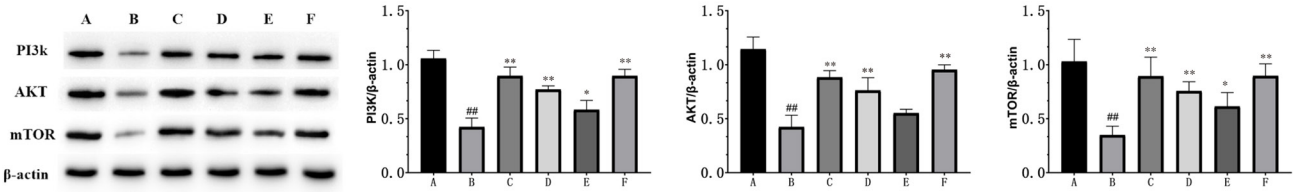


图 6　各组大鼠海马区 PI3K，Akt，mTOR 蛋白表达水平图（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Fig 6　Expression levels of PI3K，Akt and mTOR protein in the hippocampus of each group of rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

A. 假手术组（sham group）；B. 模型组（model group）；C. 红曲高剂量组（HQ high dose group）；D. 红曲中剂量组（HQ middle dose group）；E. 红曲低剂量组（HQ low dose group）；F. 尼莫地平组（nimodipine group）

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3　讨论

CSVD 是临床常见的脑血管疾病，与高血脂、高血压等危险因素关系密切[9]。中医理论尚未明确定义 CSVD，通常认为其属于络病，病位在脑，由浊邪入血，入髓伤髓所致[10]。临床治疗 CSVD 应以活血化瘀、化浊益髓的中药为主[11]。红曲具有活血化瘀、健脾消食的功效，临床上常用的中成药血脂康、脂必妥均以红曲为主要成分，广泛用于治疗高血脂、动脉粥样硬化、心脑血管病等[12-14]，可作为治疗 CSVD 的潜在药物。

本研究运用网络药理学方法筛选获得 Monacolin K、Ankaflavin、GABA 等 43 个红曲活性成分，PIK3CA、MTOR、MAPK1 等 1126 个脑小血管病靶点；PPI 网络分析共发现 91 个节点，752 条边，平均 Degree 值为 16.7，获得 EGFR、MAPK1、ESR1 等 37 个关键靶点；GO 分析结果涉及 171 个生物过程、33 个细胞组分、51 个分子功能，主要涉及神经炎症、信号转导、细胞增殖等。研究表明，神经炎症在脑血管疾病的发展中起重要作用，降低相关炎症因子如 TNF-α、IL-6、IL-1β 等

水平，可改善血脑屏障通透性，减轻脑组织损伤，促使大脑结构功能恢复正常[15-16]。KEGG 分析结果得到 104 个通路，主要有 PI3K-Akt、Rap1、RAS 通路等，PI3K-Akt 通路研究较为广泛，其在脑卒中、血管性痴呆等疾病的治疗中起着重要作用。Qi 等[17]研究发现 3- 丁基苯酞（NBP）能通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 CSVD 大鼠神经细胞凋亡，恢复细胞基本功能，提高大鼠学习记忆能力。Chen 等[18]研究表明人参皂苷 Rg_1 可通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路增加缺血性卒中后血管内皮生长因子的表达，促进脑内血管生成，改善脑血流量。

本研究选择不同剂量红曲干预 CSVD 模型大鼠，探究其作用机制，对网络药理学研究结果进行验证。Morris 水迷宫实验结果显示，红曲能显著缩短 CSVD 大鼠的逃避潜伏期，增加穿越平台次数，表明红曲显著改善 CSVD 模型大鼠的短期学习记忆能力；HE 病理切片结果显示红曲治疗组大鼠海马 CA1 区细胞形态完整、排列整齐，核仁和胞浆界限清晰，不同剂量红曲治疗组海马 CA1 区病变程度均有明显改善，高、中剂量效果较为明显；网络药理学 GO 分析结果表明，红曲治疗 CSVD 可能与神经炎症、细胞增殖、信号转导等生物过程相关，其中神经炎症在 CSVD 发展过程起重要作用。生化指标结果显示，不同剂量红曲治疗组可显著降低 CSVD 模型大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子水平，其效果呈剂量依赖性；网络药理学研究结果显示红曲中 Monacolin 类、红曲色素等为其活性成分，本研究结果中红曲能显著降低 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平可能与上述成分有关。KEGG 分析结果显示，涉及 CSVD 的有 PI3K-Akt、RAS、Rap1 信号通路等。研究表明 PI3K-Akt 信号通路可通过调节下游靶蛋白 mTOR 活性，参与自噬清除 β 淀粉样蛋白的沉积、恢复细胞功能等发挥神经保护作用[17-18]；Western blot 结果表明，与假手术组相比，模型组 PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平显著降低；与模型组相比，红曲治疗组可不同程度增加 PI3K、AKT、mTOR 蛋白水平，提示红曲可通过上调 PI3K/AKT/mTOR 蛋白的表达，参与调控神经元细胞增殖、分化、凋亡等发挥治疗 CSVD 的作用。

综上，通过网络药理学和分子对接，构建红曲治疗 CSVD 的成分、疾病、作用靶点、相关通路之间的复杂网络关系，展现了中药多成分、多靶点、多途径的治疗优势。通过 Morris 水迷宫，海马组织 HE 染色，TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子检测，PI3K、AKT、mTOR 蛋白测定等实验验证网络药理学预测结果，初步揭示了红曲治疗 CSVD 的药效机制，可为后期深入探究其治疗 CSVD 机制提供理论依据。

参考文献

[1] Pantoni L. Cerebral small vessel disease：from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges [J]. Lancet Neurol，2010，9（7）：689-701.

[2] Wardlaw JM，Smith C，Dichgans M，et al. Small vessel disease：mechanisms and clinical implications [J]. Lancet Neurol，2019，18（7）：684-696.

[3] Tsai CF，Thomas B，Sudlow CL. Epidemiology of stroke and its subtypes in Chinese *vs* white populations：a systematic review [J]. Neurology，2013，81（3）：264-272.

[4] 思慧 . 王国辰，张年顺注释 . 饮膳正要 [M]. 北京：中国中医药出版社，2008：93.

[5] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：906-907.

[6] Zhu B，Qi F，Wu J，et al. Red yeast rice：a systematic review of the traditional uses，chemistry，pharmacology，and quality control of an important Chinese folk medicine [J]. Front Pharmacol，2019，10（2）：1449.

[7] 王思鉴，袁若兰，沈佳妍，等 . 活血化瘀中药改善代谢相关脂肪性肝病的研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（3）：484-491.

[8] Hopkins AL. Network pharmacology：the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol，2008，4（11）：682-690.

[9] 陈玮琪，潘岳松，陈霞，等 . 脑小血管病治疗药物临床试验设计规范专家共识 [J]. 中国卒中杂志，2021，16（3）：288-297.

[10] 李鑫，张杰，刘伟，等 . 援药药对“制何首乌 - 虎杖”治疗脑小血管病的理论探析 [J]. 天津中医药，2021，38（5）：565-571.

[11] 孟庆琦，米妍，侯悦 . 基于神经血管单元各组成部分保护作用的中药抗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（17）：5445-5454.

[12] 周香珍，林书发，何书华 . 红曲药学评价研究进展 [J]. 中国现代中药，2016，18（7）：936-941.

[13] 沈珺珺，曾柏全，王卫，等 . 红曲米的代谢功能及其应用研究进展 [J]. 食品与机械，2014，30（5）：294-298.

[14] 李雪梅，沈兴海，段震文，等 . 红曲生物活性的研究进展 [J]. 时珍国医国药，2011，22（12）：2989-2991.

[15] 李红娥，袁云，吴春云 . 脑缺血性损伤中灯盏乙素对小胶质细胞介导的神经炎症反应作用的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志，2017，33（2）：237-240.

[16] 任靓明，田红旗 . 炎症因子及其抑制剂对脑缺血再灌注损伤作用的研究进展 [J]. 中国医药导报，2021，18（12）：61-64.

[17] Qi YY，Feng XF，Qiu L，et al. 3-*n*-butylphthalide inhibits the apoptosis of nerve cells in rats with cerebral small vessel disease via the PI3K/Akt pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol，2019，23（10）：4474-4480.

[18] Chen Y，Duan Y，Yang X，et al. Inhibition of ERK1/2 and activation of LXR synergistically reduce atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2015，35（4）：948-959.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-11-30）

共载 GNA 和 PLHSpT 脂质立方液晶纳米粒的制备、表征以及体外抗肿瘤活性研究

魏晴[1]，林彤远[1, 2]，王强[1]，王雷[1, 3, 4]，陈卫东[1, 3, 4*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2.华东师范大学附属芜湖医院（芜湖二院），药剂科，安徽 芜湖 241100；3. 中药复方安徽省重点实验室，合肥 230012；4. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所，合肥 230012）

摘要：目的 本研究旨在制备载 GNA 与 PLHSpT 的脂质立方液晶纳米粒 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]，并对其理化性质及体外药效学进行研究。**方法** 采用高温乳化蒸发 - 低温固化法制备同时包裹 GNA 与 PLHSpT 的脂质立方液晶纳米粒 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]，通过单因素考察与正交试验等确定最优处方。利用 DLS、TEM、DSC、体外释放等体外表征最优处方下 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的外观形貌、粒径、粒径分布、Zeta 电位、稳定性、包封率、体外释放曲线及累积释放率等物理性质，MTT 法检测 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 对 SK-BR-3 细胞增殖的抑制作用。**结果** 最优处方下的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 平均粒径为（133.7±0.57）nm，多分散系数 PDI 为（0.171±0.01），Zeta 电位为（－ 12.40±0.41）mV，GNA 和 PLHSpT 包封率分别为（89.70±0.39）% 和（87.74±0.71）%，透射电镜显示最优处方下的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 呈球形或者类球形，表面无黏连，对 SK-BR-3 细胞的 IC_{50} 值为（3.46±0.11）μg • mL $^{-1}$。**结论** 最优处方下的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 粒径分布均匀，药物包封率高，有明显的缓释效果且具有一定的抗肿瘤效果。

关键词：脂质立方液晶纳米粒；高温乳化 - 低温固化法；综合加权评分法；体外表征；抗肿瘤
中图分类号：R943，R749 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0284-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.008

Preparation, characterization and in vitro antitumor activity of GNA and PLHSpT lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles

WEI Qing[1], LIN Tong-yuan[1, 2], WANG Qiang[1], WANG Lei[1, 3, 4], CHEN Wei-dong[1, 3, 4*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Department of Pharmacy*, *Wuhu Hospital Affiliated to East China Normal University* (*Wuhu Second Hospital*), *Wuhu Anhui* 241100; 3. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compound Prescriptions of Anhui Province*, *Hefei* 230012; 4. *Institute of Pharmaceutical Preparations*, *Anhui Academy of Chinese Medical Sciences*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To prepare lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles loaded with GNA and PLHSpT [Cubs-(GNA ＋ PLHSpT)] and to determine the [Cubs-(GNA ＋ PLHSpT)] physicochemical properties and in vitro pharmacodynamics. **Methods** Lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles [Cubs-(GNA ＋ PLHSpT)] that simultaneously encapsulated GNA and PLHSpT were prepared by the emulsification evaporation-low-temperature solidification method. The optimal prescription was determined by single factor and orthogonal test. The appearance morphology, particle size, particle size distribution, Zeta potential, encapsulation efficiency and in vitro cumulative release rate of optimal prescriptions [Cubs-(GNA ＋ PLHSpT)] was determined by DLS, TEM, DSC and in vitro release. MTT method was used to detect the inhibitory effect of [Cubs-(GNA ＋

基金项目：中华医学会临床药学分会 - 吴阶平医学基金会科研基金（No. LCYX-Q010）；国家自然科学基金面上项目（No. 81773988，No. 82073923）。

作者简介：魏晴，女，在读硕士研究生，主要从事药物新剂型研究与开发，email：1452486855@qq.com * **通信作者：**陈卫东，男，教授，博士研究生导师，主要从事药代动力学、药学和药剂学研究，email：anzhongdong@126.com

PLHSpT)] on the proliferation of SK-BR-3 cells. **Results** The average particle size of [Cubs-(GNA ＋ PLHSpT)] of the optimal prescription was (133.7±0.57) nm, the polydispersity coefficient PDI was (0.171±0.01), and the Zeta potential was (－ 12.40±0.41) mV, and the encapsulation rates of GNA and PLHSpT were (89.70±0.39)% and (87.74±0.71)%, respectively. Transmission electron microscope showed that [Cubs- (GNA ＋ PLHSpT)] was spherical or quasi-spherical with no adhesion on the surface. The IC_{50} value for SK-BR-3 cells was (3.46±0.11) μg • mL^{-1}. **Conclusion** The optimal prescriptions of [Cubs- (GNA ＋ PLHSpT)] show uniform particle size distribution, high drug encapsulation efficiency, obvious sustained-release effect and certain anti-tumor effect.

Key words: lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles; emulsification evaporation-low temperature solidification method; comprehensive weighted scoring method; in vitro characterization; antitumor

癌症发病隐匿，大部分癌症患者明确诊断时已属进展期，错过了最佳手术时间，这部分患者主要依赖于化疗药物治疗[1-2]。但是大多数化疗药物本身不具有肿瘤特异性，通过静脉全身给药，杀伤肿瘤细胞的同时，对正常细胞也有较大的毒性，甚至会破坏免疫系统，这些因素阻碍了化疗药物在临床上的广泛应用[3-4]。为提高化疗药物的水溶性及靶向性，降低毒副作用，纳米载药体系应运而生[5-6]。近年来，纳米技术的发展为解决药物稳定性低、水溶性差、半衰期短、选择性低等问题提供了新的思路和突破点。脂质立方液晶作为新兴载药体系逐渐受到关注，脂质立方液晶纳米粒作为纳米载体一个新兴的分支，其具有生物可降解性、避免药物发生化学和生理降解以提高药物稳定性、控制药物释放等特点[7]。适用于各种药物的包载，包括小分子药物、多肽、蛋白质和核酸等。除此以外，脂质立方液晶纳米粒的特殊空间结构，使其具有可同时包载亲脂性和亲水性药物的潜力[8-9]。

中药藤黄是藤黄科植物藤黄所分泌出的干燥树脂，新藤黄酸（gambogenic acid，GNA，$C_{38}H_{47}O_8$）（结构式见图 1A）是中药藤黄中的主要抗肿瘤化学成分之一，其对多种肿瘤细胞都有不同程度的抑制作用。新藤黄酸的抗肿瘤作用是通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期进展和抑制肿瘤血管生成而产生的，其可以抑制细胞周期蛋白依赖激酶催化活性位点，阻断细胞周期 G_0/G_1 期，直接杀伤肿瘤细胞[10-11]。其抗肿瘤活性强且确切，对肺癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、胃癌等都具有较好的疗效，对正常动物造血系统和免疫功能不产生或很少产生影响[12-14]。然而其水溶性差、体内消除快、静脉给药血管刺激性强、生物利用度低等缺陷，严重限制了其在临床上的广泛应用[15-18]。

PLHSpT（结构式见图 1B）是一种含磷酸化的丝 / 苏氨酸的多肽序列，与乳腺癌特异性靶点 Polo 样激酶 1（polo-like kinase 1，PLK1）特异性高亲和（K_d ＝ 0.45±0.11 μmol • L^{-1}）[19]。PLK1 作为肿瘤确诊以及肿瘤愈后重要的标记物之一，在正常细胞中低表达甚至不表达，而在乳腺癌甚至晚期乳腺癌脑转移过程中高表达。因此，PLHSpT 可作用于 PLK1 来阻滞肿瘤细胞使其停留在有丝分裂的 G_2/M 期，进而导致肿瘤细胞凋亡[20-22]。但 PLHSpT 体内稳定性差、穿膜能力差。新型的磷酸化多肽类药物联合传统的中药单体同时使用，能够显著增强肿瘤细胞对药物的敏感性，增加协同抗肿瘤的效果。PLHSpT 与 GNA 两种药物对肿瘤细胞的杀伤原理截然不同，两者作用于肿瘤细胞周期的不同阶段及代谢途径，可多种途径共同起到协同抗肿瘤的效果。本研究旨在制备共载 GNA 与 PLHSpT 的脂质立方液晶纳米粒 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]，并对其理化性质及体外药效学进行研究。

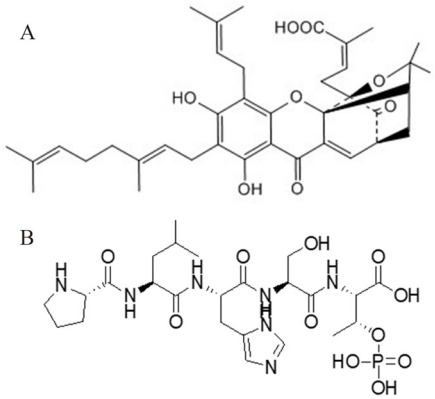


图 1　GNA 的结构式（A）和 PLHSpT 的结构式（B）

Fig 1　Structure formula of GNA（A）and PLHSpT（B）

1　材料

1.1　仪器

岛津 LC-15C 高效液相色谱仪、SPD-15C 紫外检测器（日本岛津公司）；AB135-S 型十万分之一电子分析天平（德国 Mettler Toledo 公司）；DF-101B 集热式恒温磁力搅拌器（金坛市鑫鑫实验仪器厂）；LC-4016 低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；Zetasizer3000HS 型激光粒度仪（英国 Malvern 公司）；Hitachi-HT7700 透射电镜（上海沪西分析仪器厂有限公司）；KQ-300B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DZF-6050 型真空干燥箱（上海傅讯实业有限公司）；ESCO 二氧化碳培养箱（新加坡 Esco 公司）；Cascada 超纯水仪（美国 PALL 公司）。

1.2 试药

GNA 对照品（纯度≥ 98%，由安徽中医药大学药学院 GNA 课题组提供）；PLHS-PThr-NH2（PLHSpT）（纯度≥ 95%，上海沐晋生物科技有限公司）；泊洛沙姆 407（p407）（BASF 公司）；单油酸甘油酯（GMO）（天津希恩思生化科技有限公司）；无水乙醇（上海润捷化学试剂有限公司）；甘露醇（阿拉丁试剂公司）；色谱甲醇（瑞典 Oceanpak 公司）；胎牛血清（Gibco 公司）；DMEM 培养基（赛百慷上海生物科技股份有限公司）；青霉素 - 链霉素溶液、0.25% 胰酶、MTT（Biosharp 公司）。

1.3 细胞

乳腺癌 SK-BR-3 细胞购自中国科学院上海细胞所。

2 方法与结果

2.1 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的制备

基于实验室前期研究基础，采用乳化蒸发 - 低温固化法制备 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]。即将适量 GNA 和 GMO 在 60 ℃的水浴中完全溶解于 5.00 mL 无水乙醇中，得到有机相。将处方比例的磷酸化五肽和泊洛沙姆 407 溶于定量水中，水浴加热到与油相相同温度构成水相。然后在搅拌的条件下，于水浴中用 1 mL 注射器缓慢匀速将生成的有机溶液注入水溶液中，继续搅拌直至有机溶剂挥发完全得到均匀乳状液，在搅拌条件下将热乳液倒入适量冰水中冰浴，待其在冰水中完全分散即得淡黄色澄清透明脂质立方液晶纳米粒。

2.2 单因素考察及正交试验

影响脂质立方液晶纳米粒的制备因素很多，如乳化温度与时间、固化温度与时间、转速、GNA 与 PLHSpT 的比例等。根据实验室前期研究基础，在原有处方基础上以外观、粒径、粒径分布和包封率作为考察指标，考察 GNA 与 PLHSpT 不同比例、搅拌速度、GNA 加入量、药脂比等对载药体系的影响，筛选 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 脂质立方液晶纳米粒的最优处方。

2.2.1 GNA 与 PLHSpT 质量比筛选 将水溶性磷酸化五肽作为水相加入反应体系中，在固定其他条件不变的情况下，以粒径、粒径分布、外观、包封率为考察指标。考察不同质量比（m_{GNA} ∶ m_{PLHSpT} ＝ 1 ∶ 1，2 ∶ 1，4 ∶ 1，6 ∶ 1，8 ∶ 1，10 ∶ 1，12 ∶ 1） 下 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的制备情况。结果 GNA 与 PLHSpT 不同质量比对 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的 PDI 影响较小，对其外观、粒径与包封率有明显影响，综合考虑选择 8 ∶ 1 ～ 12 ∶ 1 较为适宜。

2.2.2 搅拌速度的选择 在固定其他条件不变的情况下，仅改变转速的大小，选择搅拌速度分别为 400、800、1000 $r \cdot min^{-1}$ 制备 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 溶液，以粒径、粒径分布、外观、包封率作为考察指标，结果搅拌速度为 400 $r \cdot min^{-1}$ 时粒径、粒径分布、外观及包封率均不理想；搅拌速度为 800、1000 $r \cdot min^{-1}$ 时外观无较明显差别，但受粒径与包封率的影响较大，当转速为 1000 $r \cdot min^{-1}$ 时，其粒径较小、分散性较好、包封率较高，故选择搅拌速度为 1000 $r \cdot min^{-1}$。

2.2.3 GNA 加入量的选择 在固定其他制备条件不变的情况下，改变 GNA 加入量（5、8、10 mg）制备 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 溶液，以粒径、粒径分布、外观、包封率作为考察指标，考察不同 GNA 加入量对 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的影响。结果当 GNA 加入量逐渐增大时，其平均粒径与 PDI 也逐渐增大，包封率随之减小，所制备的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 乳液透明度亦随之降低，蓝色乳光消失，故选择 5 ～ 6.5 mg 进行后续考察。

2.2.4 药脂比的选择 在固定其他制备条件不变的情况下，选择药脂比 1 ∶ 10、1 ∶ 20、1 ∶ 30、1 ∶ 40 制备 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 溶液，以粒径、粒径分布、外观、包封率作为考察指标，结果粒径分布对药脂比影响较小，随着药脂比的增加，粒径与包封率有一定变化，当药脂比过大时很不稳定，溶液较浑浊，放置一段时间会有沉淀产生，综合比较药脂比在 1 ∶ 20 ～ 1 ∶ 30 较佳。

2.2.5 综合加权评分法综合评价 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的处方 以单因素考察的结果为基础，分别选择 m_{GNA} ∶ m_{PLHSpT} 比例（A）、药脂比（*w*/*w*）

（B）、GNA 加入量（C）、空白因素（D），按正交试验表 $L_9(3^4)$ 试验方案考察各因素对包封率和粒径的影响。最佳工艺条件要满足包封率高、粒径小的特点，因此采用综合加权评分法考察最优工艺条件，考虑到包封率对制剂影响大于粒径，因此包封率与粒径的权重比分别为 60%、40%，即 GNA 包封率（EE_1）、PLHSpT 包封率（EE_2）、粒径分别按 30%、30%、40% 的权重系数计分，综合评分标准为：$Y_{总}=Y_{EE_1}/Y_{EE_1\,max}\times30\%+Y_{EE_2}/Y_{EE_2\,max}\times30\%-Y_{Size}/Y_{Size\,max}\times40\%$，即综合评分总分等于各项指标与各项指标最大值之比乘以各指标加权系数之和 [23]。正交设计各因素水平见表 1，加权评分结果及方差分析见表 2 ～ 3。

表 1　因素水平表

Tab 1　Factor and level of orthogonal experiment

水平	因素			
	A	B	C	D
1	8∶1	15%	5.0	—
2	10∶1	20%	5.5	—
3	12∶1	25%	6.5	—

表 2　正交设计与综合评分结果

Tab 2　Orthogonal design and comprehensive scoring results

试验号	因素				EE_1/%	EE_2/%	粒径 / nm	综合评分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	73.80	70.98	139.43	18.86
2	1	2	2	2	87.54	85.68	136.21	29.28
3	1	3	3	3	79.96	76.75	138.56	23.12
4	2	1	2	3	74.61	72.39	137.70	20.00
5	2	2	3	1	89.12	86.65	134.65	30.49
6	2	3	1	2	74.40	72.26	130.20	21.53
7	3	1	3	2	72.48	68.59	176.73	9.41
8	3	2	1	3	87.66	85.67	157.00	24.76
9	3	3	2	1	76.90	76.85	182.50	12.49
K_1	23.75	16.09	21.72					
K_2	24.01	28.18	20.59					
K_3	15.56	19.05	21.01					
极差	8.45	12.09	1.13					

表 3　方差分析表

Tab 3　Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	138.76	2	12.77	19.00	$P>0.05$
B	238.19	2	21.92	19.00	$P<0.05$
C	1.95	2	0.18	19.00	$P>0.05$

注：$F_{0.05}(2,2)=19.00$，$F_{0.01}(2,2)=99.00$。

由表 2 可知，各因素影响主次顺序为 B ＞ A ＞ C，由表 3 可知，B 因素有显著性意义。因此，综合分析以包封率和粒径为考察指标得到的评分结果，确定 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 最佳处方工艺条件为 $A_2B_2C_1$，即 m_{GNA}∶m_{PLHSpT} 为 10∶1，药脂比（*w*/*w*）为 20%，GNA 加入量为 5 mg，搅拌速度为 1000 r • min^{-1}。

2.3　[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的质量评价

2.3.1　外观考察　由图 2 可知，所制备的空白立方液晶纳米粒外观带有淡蓝色乳光的澄清透明液体，没有沉淀或絮凝，而 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 则呈现黄色。

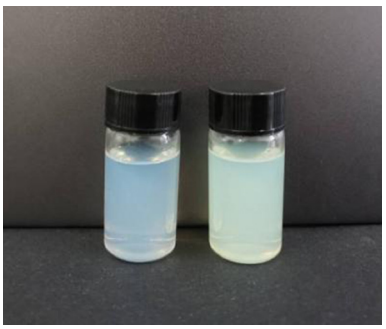


图 2　空白立方液晶纳米粒（左）和 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]（右）的外观

Fig 2　Appearance of the blank Cubs（left）and [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]（right）

2.3.2　形态学考察　取适量纳米乳液滴加于有碳膜的铜网上，静候 30 min 用滤纸吸去多余纳米乳液，并用 2.0% 的磷钨酸溶液负染约 2 min，自然晾干后置于透射电镜下观察 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的外观形态，结果见图 3。从图 3 可以看出，制备的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 近似圆形，稍立体，粒子与粒子之间无粘连。

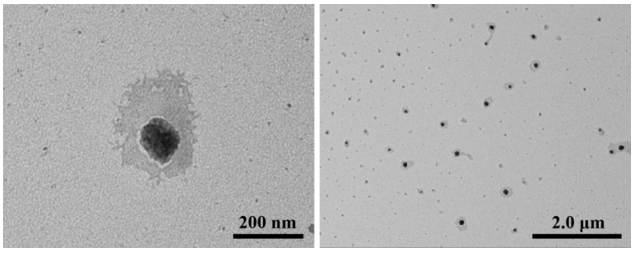


图 3　[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的透射电镜图

Fig 3　Transmission electron microscopy of [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]

2.3.3　平均粒径与 Zeta 电位　取适量的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 用超纯水稀释 30 倍，在室温条件下用纳米激光粒度仪分别测定其粒径和 Zeta 电位。由图 4 可知，本试验制备的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 平均粒径为（133.7±0.57）nm，多分散系数 PDI 为（0.171±0.01），Zeta 电位为（−12.40±0.41）mV，表明本试验所制备的脂质立方液晶纳米粒粒径较小，粒径分布的范围较窄，Zeta 电位绝对值小于 30 mV。

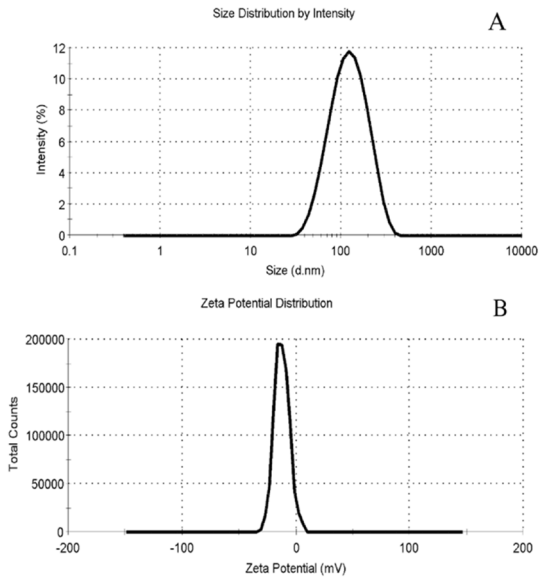


图 4 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的粒径分布图（A）及 Zeta 电位图（B）

Fig 4 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] particle size distribution（A）and Zeta potential（B）

2.3.4 DSC 分析 以空铝坩埚为对照，分别取 GNA、GMO、p407、物理混合物、GNA-Cubs、[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 冻干品各适量，于铝坩埚中升温扫描，扫描速度为 10 ℃ • min $^{-1}$，扫描范围为 20 ～ 200 ℃，采用 origin 8.0 软件对数据进行分析，即得样品的 DSC 图谱。图 5 结果显示，GNA 在 61.17 ℃出现一个较尖的特征峰，p407 与 GMO 分别在 36.87 ℃和 106.36 ℃出现一个较钝的特征峰，物理混合物则在 50.57 ℃和 88.41 ℃观察到两个特征峰，而 GNA-Cubs 的特征峰在 116.92 ℃出现，[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 则在 151.83 ℃出现一个新的特征峰，且 GNA 和各个辅料的特征峰均消失，这说明所制备的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 中，药物已经被载体包载或者吸附，不再是单纯的物理混合，即 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 形成了新的物相。

2.3.5 包封率的测定 基于实验室前期研究基础，选择微柱离心法用于 EE_1 的测定，选用超滤离心法用于 EE_2 的测定。包封率（EE%）计算公式如下：

$$EE_1\% = M_1/M_0 \times 100\%$$

$$EE_2\% = (W_2 - W_1)/W_2 \times 100\%$$

式中 M_1、M_0、W_1、W_2 分别为过柱后脂质立方液晶纳米粒内被包封 GNA 的质量、分散体系中总 GNA 的质量、游离 PLHSpT 的含量、脂质立方液晶纳米粒中总 PLHSpT 的含量。依据公式计算可知，本试验中所制备的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT] 中 EE_1 为（89.70±0.39）%，EE_2 为（87.74±0.71）%。

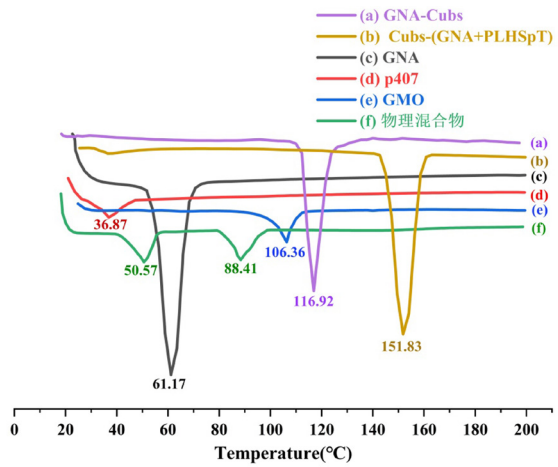


图 5 6 种样品的 DSC 图

Fig 5 DSC map of 6 samples

2.3.6 体外释放

① 色谱条件：岛津 LC-15C 高效液相色谱仪、SPD-15C 紫外检测器（日本岛津公司）；色谱柱：COSMOSIL C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温：30 ℃；流速：1.0 mL • min $^{-1}$；进样量：20 μL；流动相：甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（90∶10，V/V）；检测波长：360 nm。

② 释放介质：根据实验室前期的基础，选择 pH ＝ 7.4 的磷酸盐缓冲液作为释放介质，添加 1% 的吐温 80 作为增溶剂，对 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 载药体系的体外释放行为进行初步考察。

③ 标准曲线：取适量的 GNA 对照品溶液，加 PBS 溶液（含 1% 的吐温 80）制备成不同浓度的对照品溶液，12 000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，取上清液，进样测定。以峰面积（y）为纵坐标、质量浓度（x）为横坐标作标准曲线图进行线性拟合，得到 GNA 线性回归方程：$y = 1.06\times10^4x - 2.64\times10^3$（$R^2 = 0.9997$，$n = 8$），结果表明 GNA 在 1.0 ～ 64.0 μg • mL $^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

④ 体外释放研究：本试验采用透析法（21 mm，8000 ～ 14 400 Da）对等量的 GNA 溶液以及 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 体外释放性能进行考察，以 GNA 溶液为对照。分别取等量的 GNA 溶液以及 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 置于预先处理好的透析袋中，然后将透析袋浸入相同的释放介质中，在 37 ℃下以 200 r • min $^{-1}$ 搅拌。在预定的时间点各取样 1 mL，同时补加等量释放介质，12 000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，取上

清液进样后测定，按以下公式计算累计释药百分比（Q）并绘制累计释放曲线，如图 6 所示。游离 GNA 在释放介质中释放迅速，8 h 后几乎释放完全，累计释放率达 99.63%；[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 载体中药物的释放前 12 h 快速释放，12 h 后释放趋于平缓，在 24 h 内累计释放率为 72.26%。

$$Q = \{ C_i V_1 + (C_1 + C_2 + \cdots + C_{i-1}) V_2 \} / M \times 100\%$$

其中，C_1，C_2，C_{i-1}，C_i 分别为第 1，2，i － 1，i 等时间点释放介质中 GNA 的浓度；V_1 表示释放介质总体积；V_2 表示所取样品的体积。

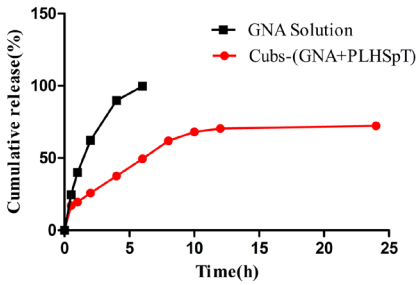


图 6　GNA 及 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的体外释药曲线

Fig 6　In vitro release profile of GNA solution and [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]

2.4　[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 体外抗肿瘤活性研究

2.4.1　细胞培养　将人乳腺癌细胞株 SK-BR-3 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素混合液的 DMEM（含 1.5 g • L^{-1} $NaHCO_3$）培养基的透气培养瓶中，置于饱和湿度二氧化碳培养箱中培养（37 ℃，5%CO_2），24 ～ 48 h 后更换培养液继续培养（具体时间视细胞生长状态以及培养基状态而定），待细胞密度达 70% ～ 90%（约培养 3 ～ 5 d），即按 1 ∶ 2 的比例进行传代培养。

2.4.2　体外抗肿瘤评价　细胞分为调零组，对照组，空白纳米立方液晶、游离 GNA、游离 PLHSpT、PLHSpT-Cubs、GNA-Cubs、[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 给药组。

将生长状态优良的 SK-BR-3 细胞消化，制成单细胞悬液并计数以备用，以 1×10^5 个 / 孔，每孔悬液体积为 200 μL，接种至 96 孔板内，照分组及浓度梯度的数量铺板，剩余空白孔铺满 PBS（避免边缘效应），培养箱孵育 24 h 后，实验组各孔（每个药物不同浓度各设 6 个复孔）加入对应药物，37 ℃孵育 36 h，吸去旧培养基，每孔加入 200 μL 新鲜培养基及 20 μL 含 5 mg • mL^{-1} MTT 的 DMEM 混合液，继续培养 4 h，吸去培养基，每孔加入 150 μL 二甲基亚砜（DMSO），摇床恒温（37 ℃）充分避光震荡 10 min，使反应生成的紫蓝色结晶物充分溶解，在自动酶标仪上以 490 nm 波长测定实验孔每孔 OD 值，计算细胞存活率（%）和半抑制浓度（IC_{50}），结果游离 GNA、游离 PLHSpT、PLHSpT-Cubs、GNA-Cubs、[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 的 IC_{50} 分别为（14.33±0.59）、（15.67±0.68）、（9.03±0.41）、（6.73±0.22）、（3.46±0.11）μg • mL^{-1}，结果见图 7。

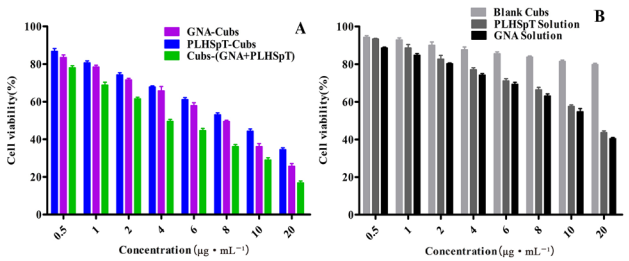


图 7　不同浓度制剂（A）以及游离药物（B）对 SK-BR-3 细胞存活率的影响（Mean±SD，n ＝ 3）

Fig 7　Effect of different agent concentrations（A）and different concentrations of free drugs（B）on the survival rate of SK-BR-3 cells（B）（Mean±SD，n ＝ 3）

由图 7 可知，与游离 GNA 和游离 PLHSpT 相比，空白脂质立方液晶纳米粒毒性较低，对细胞影响较小，游离 GNA 对 SK-BR-3 细胞的抑制作用优于游离 PLHSpT。与单独载 GNA 或 PLHSpT 的纳米立方液晶相比，[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 对 SK-BR-3 细胞的的细胞抑制效果更明显，对 SK-BR-3 细胞的 IC_{50} 值最小，为（3.46±0.11）μg • mL^{-1}，抑制效果是游离 GNA 的 4.14 倍，游离 PLHSpT 的 4.52 倍，GNA-Cubs 的 1.95 倍，PLHSpT-Cubs 的 2.61 倍。[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 对细胞抑制率随 GNA 浓度增大而增大，说明同时包载 GNA 和 PLHSpT 的脂质立方液晶纳米粒能发挥协同作用，其体外抗肿瘤效果最好。

3　讨论

本研究采用高温乳化蒸发 - 低温固化法制备了同时包裹 GNA 与 PLHSpT 的脂质立方液晶纳米粒 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）]，通过单因素与正交试验确定最优处方，得到粒径较小，分布均匀，理化特性理想的脂质立方液晶。并通过外观、类型、粒径、多分散系数、透射电镜、DSC 等方法对其进行了系统的表征。结果表明，最优处方下的 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 平均粒径为（133.7±0.57）nm，多分散系数 PDI 为（0.171±0.01），Zeta 电位

为（－ 12.40±0.41）mV；GNA 和 PLHSpT 包封率分别为（89.70±0.39）% 和（87.74±0.71）%。透射电镜显示 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 呈球形或者类球形，DSC 分析结果亦验证了确有新的物相生成。体外释药曲线表明，与游离 GNA 相比，[Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 具有明显的缓释效果。MTT 法检测 [Cubs-（GNA ＋ PLHSpT）] 对 SK-BR-3 细胞有明显的增殖抑制作用，初步证明了脂质立方液晶纳米粒可以增强 GNA 对肿瘤的抑制作用。

对传统载药系统而言，本实验借助脂质立方液晶纳米粒同时包载 PLHSpT 及 GNA，提高了 PLHSpT 的体内稳定性、细胞穿膜能力，同时也延长了 GNA 体内半衰期、增加了体内生物利用度、减少了其对血管的刺激性。对乳腺癌而言，新型肽类药物 PLHSpT 与中药 GNA 单体可通过不同作用机制实现抗肿瘤作用，两种药物联合应用有望使该复方脂质立方液晶纳米粒载药体系对乳腺癌细胞的杀伤力增加，提高抗肿瘤效果，为后续研究提供一定理论基础。

参考文献

[1] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2020 [J]. Ca-Cancer J Clin，2020，70（1）：1-24.

[2] Liu L，Wu Y，Cong W，et al. Experience of women with breast cancer undergoing chemotherapy：a systematic review of qualitative research [J]. Qual Life Res，2021，1（1）：166-172.

[3] Song B，Wu S，Li W，et al. Folate modified long circulating nano-emulsion as a promising approach for improving the efficiency of chemotherapy drugs in cancer treatment [J]. Pharm Res-dordr，2020，37（12）：224-231.

[4] Nabil G，Alzhrani R，Alsaab HO，et al. CD44 targeted nanomaterials for treatment of triple-negative breast cancer [J]. Cancers，2021，134（4）：1-12.

[5] Garg M，Goyal A，Kumari S，et al. An update on recent advances in cubosome：a novel drug delivery system [J]. Curr Drug Metab，2021，13（5）：367-379.

[6] Duan HX，Liu YH，Gao ZG，et al. Recent advances in drug delivery systems for targeting cancer stem cells [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（1）：55-70.

[7] Bazylińska U，Kulbacka J，Schmidt J，et al. Polymer-free cubosomes for simultaneous bioimaging and photodynamic action of photosensitizers in melanoma skin cancer cells [J]. J Colloid Interf Sci，2018，522（25）：163-173.

[8] Luo Q，Lin TY，Zhang CY，et al. A novel glycerylmonoolein-bearing cubosomes for Gambogenic acid：preparation，cytotoxicity and intracellular uptake [J]. Int J Pharmaceut，2015，495（3）：30-39.

[9] 初明慧，纪宏宇，王海荣，等 . 纳米立方液晶系统作为抗肿瘤药物载体的研究进展 [J]. 中国药师，2018，21（4）：710-714.

[10] Elia AE，Rellos P，Haire LF，et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain [J]. Cell，2003，115（1）：83-95.

[11] 陈润哲，陈宝安 . 新藤黄酸的抗肿瘤作用研究进展 [J]. 转化医学电子杂志，2016，3（3）：48-50.

[12] Xu L，Meng X，Xu N，et al. Gambogenic acid inhibits fibroblast growth factor receptor signaling pathway in erlotinib-resistant non-small-cell lung cancer and suppresses patient-derived xenograft growth [J]. Cell Death Dis，2018，9（3）：262-266.

[13] Huang X，Chen Y，Peng D，et al. Solid liquid nanoparticles as delivery systems for ganbogenic acid [J]. Colloid Surface B，2013，1（102）：391-397.

[14] Lin TY，Luo Q，Zhu TT，et al. A novel glycerylmonoolein-bearing cubosomes forGambogeni c acid：preparation，cytotoxicity and intracellular uptake [J]. Int J Pharmaceut，2015，495（3）：30-39.

[15] Lin T，Huang X，Wang Y，et al. Long circulation nanostructured lipid carriers for gambogenic acid：formulation design，characterization，and pharmacokinetic [J]. Xenobiotica，2017，47（9）：793-799.

[16] Lin TY，Fang QY，Peng DY，et al. PEgylated non-ionic surfactant vesicles as drug delivery systems for Gambogenic acid [J]. Drug Deliv，2013，20（7）：277-284.

[17] Tang XZ，Sun J，Ge T，et al. PEGylated liposomes as delivery systems for gambogenic acid：characterization and in vitro/in vivo evaluation [J]. Colloid Surface B，2018，172（1）：26-36.

[18] Huang P，Yang LL，Wang CY，et al. Preparation and characterization of folate targeting magnetic nanomedicine loaded with gambogenic acid [J]. J Nanosci Nanotechnol，2015，15（7）：4774-4783.

[19] Elia AE，Rellos P，Haire LF，et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain [J]. Cell，2003，115（1）：83-95.

[20] Lin T，Min H，Jiang C，et al. Design，synthesis and biological evaluation of phosphopeptides as Polo-like kinase 1 Polo-box domain inhibitors [J]. Bioorgan Med Chem，2018，26（12）：3429-3437.

[21] Xu J，Shen C，Wang T，et al. Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase 1 [J]. Nat Struct Mol Biol，2013，20（9）：1047-1053.

[22] Zitouni S，Nabais C，Jana S，et al. Polo-like kinases：structural variations lead to multiple functions [J]. Nat Rev Mol Cell Bio，2014，15（7）：433-452.

[23] 容艳芬，刘先琼，刘艳菊 . 多指标综合加权评分研究姜半夏炮制工艺 [J]. 湖北中医药大学学报，2017，19（2）：31-35.

（收稿日期：2021-07-29；修回日期：2021-09-13）

地龙对肺炎支原体感染小鼠肺组织中表皮生长因子 EGF 表达的影响

梁明川，蒙艳丽*，王晓溪，王博，徐慧星，王欣，王磊，王伟明*（黑龙江省中医药科学院，哈尔滨 150036）

摘要：目的　探讨地龙对肺炎支原体感染小鼠肺上皮组织的影响。**方法**　利用 Biacore 技术检测地龙提取液在体外与表皮生长因子（EGF）蛋白的结合能力，再配合体内药效学实验进行验证。将 60 只雌雄各半的 BALB/c 小鼠随机分为空白组，模型组，阳性对照组（阿奇霉素 22.5 mg·kg^{-1}），地龙高（4.7 g·kg^{-1}）、中（2.35 g·kg^{-1}）、低剂量组（1.175 g·kg^{-1}）；经鼻滴入 20 μL 1×10^6 CCU 肺炎支原体培养液建立肺炎支原体模型。模型小鼠经药物治疗两周后，HE 染色法观察给药前后小鼠肺组织病理差异，通过免疫组化（IHC）、Western blot 和 RT-PCR 方法测定各组小鼠肺组织中 EGF 蛋白和 mRNA 的表达量。**结果**　Biacore 实验结果表明在体外地龙提取液与 EGF 蛋白能较好地结合；HE 染色显示，地龙中、高剂量组均能促进肺组织结构完整，减少炎性细胞；与模型组比较，地龙中、高剂量组小鼠的 EGF 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高（$P < 0.05$）。**结论**　地龙可通过影响 EGF 的表达，改善肺炎支原体感染症状，修复损伤的肺上皮组织。

关键词：肺炎支原体；地龙；Biacore；表皮生长因子；中医药
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0291-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.009

Effect of earthworm on the expression of epidermal growth factor in lung tissue of mice infected with mycoplasma pneumoniae

LIANG Ming-chuan, MENG Yan-li*, WANG Xiao-xi, WANG Bo, XU Hui-xing, WANG Xin, WANG Lei, WANG Wei-ming* (*Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Harbin* 150036)

Abstract: Objective　To determine the effect of earthworm on the lung epithelial tissue of mycoplasma pneumoniae (MP) infected mice. **Methods**　The binding ability of earthworm extract to epidermal growth factor (EGF) protein in vitro was detected by Biacore technology, and was further verified by in vivo pharmacodynamic experiment. Sixty BALB/c mice, half male and half female, were randomly divided into a control group, a model group, a positive control group (azithromycin 22.5 mg·kg^{-1}), and earthworm high (4.7 g·kg^{-1}), medium (2.35 g·kg^{-1}) and low (1.175 g·kg^{-1}) dose groups. The MP models were established by the nasal instillation of 20 μL 1×10^6 CCU MP culture medium. After two weeks of treatment, the pathological differences in the lung tissues of mice before and after the treatment were observed by HE staining, and the expressions of EGF protein and mRNA in the cells of each group of mice were determined by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR. **Results**　The results of Biacore assay showed that earthworm extract combined well with EGF protein in vitro. HE staining showed that earthworm medium and high dose groups promoted the integrity of the lung tissue structure and reduced inflammatory cells. Compared with

基金项目：黑龙江省自然科学基金（No.LH2019H089）；国家自然科学基金项目（No.82174060）；黑龙江省中医药科研项目（No.2HY2020-047）；黑龙江省卫生健康委科研课题（No.20210202040011）。
作者简介：梁明川，男，硕士研究生，主要从事新药研发，email：liangmingchuan2021@163.com　*__通信作者__：蒙艳丽，女，硕士研究生导师，副研究员，主要从事中药药理学研究，email：mengyanli2000@163.com；王伟明，女，博士研究生导师，研究员，主要从事中药新药研发，email：wangweiming475@yahoo.com

the model group, the EGF protein and mRNA expression levels in earthworm medium and high dose groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Earthworm can improve the symptoms of MP infection and repair the damaged lung epithelial tissue by affecting the expression of EGF.

Key words: mycoplasma pneumoniae; earthworm; Biacore; epidermal growth factor; traditional Chinese medicine

肺炎支原体（mycoplasma pneumoniae，MP）是呼吸道传播和感染中最为常见的一种致病菌[1]，在儿童群体中致病率较高[2-3]。研究表明，MP 感染可以直接造成肺呼吸道黏膜上皮细胞的损伤，是破坏肺组织结构完整，诱发多种肺部系统疾病的主要影响因素[4]。所以修复受损的肺组织在 MP 感染的治疗中尤为重要。

表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）在支原体肺炎的治疗和呼吸道黏膜修复中的作用逐渐成为研究的热点。研究显示，EGF 于 1962 年被首次发现。EGF 存在于大多数体液分泌物及组织中，尤其在肺脏中 EGF 表达较高[5]。EGF 可以对多种组织的表皮细胞如呼吸道上皮细胞的增殖、分化和修复起重要作用，并能促进肺血管类疾病的发生、发展[6]。实验表明，芩百清肺浓缩丸可通过调控小鼠肺组织中 EGF 的表达修复受损的肺上皮细胞[7]。

Biacore 分子互作检测实验基于表面等离子共振（surface plasmon resonance，SPR）技术，具有高灵敏度、免标记、实时监测、样品用量少等优点，在生物制药、新药研发等相关领域有着广泛的应用[8]。徐明杭等[9]通过 Biacore 实验钓取了芩百清肺浓缩丸中与 TGF-β1 蛋白结合的亲和活性成分为黄芩苷，并通过亲和力实验进行验证。

地龙又名蚯蚓，主要含有蚯蚓素、蚯蚓毒素、花生四烯酸等活性成分。当代研究表明，地龙对 MP 肺炎有较好的治疗作用。地龙可通过调控 TGF 与 α-SMA 的表达来改善肺纤维化症状[10]。本实验主要通过 Biacore 系统检测地龙与 EGF 蛋白体外是否存在有效结合，并应用 MP 感染动物模型，采用免疫组化（immunohistochemistry，IHC）、Western blot 及 RT-PCR 实验进行体内验证，阐明地龙对小鼠肺组织 EGF 表达的影响，为地龙治疗 MP 感染的进一步研究和开发提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

60 只 8 周龄 BALB/c 小鼠，雌雄各半。购自哈尔滨医科大学，饲养于黑龙江省中医药科学院实验动物中心，许可证编号 SCXK（黑）2019-001。本研究中的动物实验得到了黑龙江省中医药科学院保护和使用委员会的批准（许可证号：[2011]93），依照《黑龙江省实验动物护理和使用指南》进行。采用人道主义方式脱颈椎处死实验动物。

1.2 试药

地龙药材购买自同仁堂香坊店，并由黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为巨蚓科动物参环毛蚓的干燥完整体；TRIzol 试剂（美国 Invitrogen，批号：113604）；一抗 EGF（Bioss 公司，批号：bs-0086R）；EGF 蛋白（Acro 公司，批号：H525b）；Biacore T200 试剂盒、CM5 芯片（GE-Healthcare 公司，批号：10280148）；RT-PCR 试剂盒（CWBIO 公司，批号：29520），引物合成由上海 Invitrogen 公司完成。

1.3 仪器

Reverse Transcribe PCR 仪 Tc-24/H（b）（中国博日生物公司）；KD-BM 生物组织包埋机、KD-TS3A 自动组织脱水机（浙江科迪仪器设备公司）。

1.4 提取地龙原液

称取地龙饮片 200.2 g，剪碎，用 70% 的乙醇回流提取两次，将两份提取液过滤并合并，调整相对密度为 1.35（60 ℃）的浸膏，4 ℃冰箱保存备用。

2 方法

2.1 蛋白纯度检测

通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 EGF 蛋白的纯度，EGF 蛋白的相对分子质量为 6.3 kDa。EGF 用去离子水制备成 200 mg·L^{-1} 的蛋白溶液，经过制胶、上样、电泳和切胶后，考马斯亮蓝染色 2 h，再用脱色液进行脱色至背景完全清晰。使用凝胶成像仪对凝胶进行拍照并分析，与 marker 相对分子质量条带比较。

2.2 Biacore 预富集实验

采用单一通道流通方式，将 EGF 蛋白偶联在 2 通道上，1 通道作为参比通道。本实验室前期实验数据表明 pH 为 4.0 时的醋酸盐溶液偶联效果

最好[9-10]，故配制 pH 4.0 的醋酸盐溶液并各取 97 μL 与 3 μL EGF 蛋白（400 mg·L^{-1}）配制蛋白溶液加入到无盖的 1.5 mL 离心管中。芯片结合采用氨基偶联方式，另取一个无盖的 1.5 mL 离心管加入 200 μL 氢氧化钠放置在指定位置上。设置偶联条件为温度 25 ℃，进样 60 s，流速 10 μL·min^{-1}，0.05 mol·L^{-1} NaOH 再生 30 s 进行预结合实验，观察 RU 值（Resonance unit，响应单位）。

2.3 Biacore 配体偶联实验

取 100 μL EDC 与 100 μL NHS 混合均匀，以活化芯片表面。量取 140 μL 乙醇胺将 1 通道封闭。用 pH 4.0 醋酸钠缓冲液 180 μL ＋ EGF 20 μL（400 mg·L^{-1}）配制蛋白溶液，蛋白以脉冲进样的方式结合到芯片表面，芯片表面结合不牢的蛋白使用 PBS 缓冲液冲洗掉。偶联时间设置为 600 s，流速为 10 μL·min^{-1}。

2.4 地龙原液与 EGF 蛋白结合实验

用 PBS 配制质量浓度为 4.8 g·L^{-1} 的地龙蛋白原液。进样程序：进样速度 10 μL·min^{-1}，进样时间 60 s，等待时间 60 s，再生 30 s。从 Biacore 输出的传感图结果中观察和分析 RU 值。

2.5 体内动物实验

2.5.1 MP 培养 在无菌环境下复苏 MP，培养在含胎牛血清的 PPLO 培养基中，37 ℃孵箱培养，每日观察，直至培养基变黄，按 1∶9 比例传代。

2.5.2 建立 MP 感染模型 将 60 只小鼠雌雄分笼混养，适应性饲养 7 d 后，随机分为 6 组，分别为空白组，模型组，阳性对照组（阿奇霉素），地龙高、中、低剂量组，每组 10 只。除空白组外，各组小鼠连续 3 d 以鼻滴入的方式给药 20 μL 1×10^6 CCU MP 培养液，MP 感染成功后[11]，阳性对照组（阿奇霉素 22.5 mg·kg^{-1}），地龙高（4.7 g·kg^{-1}）、中（2.35 g·kg^{-1}）、低（1.175 g·kg^{-1}）剂量组，每日灌胃给药 1 mL，共 10 d，空白组与模型组每日灌胃给予同等剂量的生理盐水。10 d 后脱颈椎处死小鼠，取小鼠肺组织于－80 ℃保存，备用后续实验。

2.5.3 HE 染色观察肺组织形态变化 取各组小鼠新鲜的左肺组织提前用甲醛固定过夜后，石蜡包埋。在－20 ℃冰冻 4 h 后，使用组织切片机将组织切成厚度为 5 μm 的切片，使用 HE 染色试剂盒进行操作，树脂封片。置于室温通风处晾干 2 h，在显微镜下观察肺组织形态并拍照记录。

2.5.4 IHC 法检测肺组织中 EGF 的表达 取各组小鼠右肺组织用自动石蜡包埋机包埋，切成厚度为 5 μm 的切片。使用免疫组化试剂盒说明书进行操作。树脂封片后，20× 光镜下显微镜观察 EGF 的表达，采用 Image J 分析软件分析图像，计算 EGF 的平均光密度值（*OD* 值），对结果进行半定量分析。

2.5.5 Western blot 实验检测肺组织中 EGF 蛋白表达水平 取各组小鼠右肺组织提取组织蛋白，检测蛋白浓度，15% SDS-PAGE 电泳，EGF 蛋白分子量约为 6 kDa，切胶范围为 0 ～ 11 kDa，转 PVDF 膜，Rabbit anti-EGF 抗 体 1∶1000 稀 释，4 ℃孵化整夜，山羊抗兔二抗室温避光封闭孵化 60 min，ECL 显影液封闭 2 min。使用凝胶成像分析仪进行显影，而后用凝胶图像处理软件 Image J 定量分析目标条带的灰度值，以 β-actin 蛋白对目的蛋白进行标准化，分析蛋白变化差异。

2.5.6 RT-PCR 法检测肺组织中 EGF mRNA 表达水平 提取各组小鼠左肺组织中的总 mRNA，酶标仪检测 RNA 浓度。EGF 引物委托上海 Invitrogen 公司进行合成。使用一步法 RT-PCR 试剂盒步骤对目的基因进行扩增。引物基因序列：上游 5'-GTCACCCACAGAAACAAT-3'，下游 5'-AGGAGCGAACCTACTAAA-3'；β-actin F：5'-GACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'，R：5'-AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析方法，计算目的基因的表达量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 26 统计学软件进行结果分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，单因素方差分析方法分析组间差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 蛋白纯度

通过图 1 可以看出，目的蛋白 EGF 条带清晰对应相对分子质量在 0 ～ 11 kDa，符合 EGF 分子量范围。EGF 蛋白说明书表明蛋白纯度大于 0.95，符合 Biacore 操作要求，可用于后续操作。

3.2 EGF 蛋白偶联实验

应用 pH 4.0 的醋酸盐溶液缓冲液结果显示目的蛋白 EGF 与 CM5 芯片的偶联值达到 616.6，表明 EGF 蛋白成功与芯片偶联，见图 2。

3.3 地龙与 EGF 结合实验

由图 3 中可知，蛋白 2 通道曲线始终高于参比 1 通道，峰 2（地龙）的 binding 值与基线有较高差值，表明地龙药液与 EGF 蛋白在体外可以有效结合。

3.4 肺组织 HE 染色

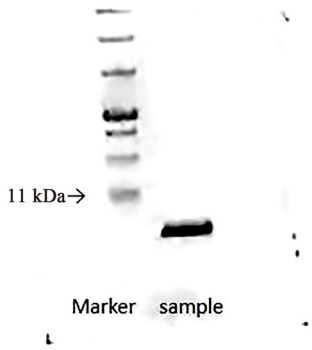


图 1 EGF 蛋白纯度检测

Fig 1 Purity detection of EGF protein

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
4	284.0	5	26858.7	0.06	0.01	0.03	0.0	Yes	Baseline
4	849.0	5	27060.0	0.09	0.01	-0.05	201.4	No	EDC/NHS
4	1532.0	5	27731.0	0.95	0.02	-0.51	872.3	No	Ligand
4	2018.0	5	27475.3	0.09	0.01	0.05	616.6	No	Immobilized

图 2 Biacore 实验中 EGF 蛋白与芯片偶联

Fig 2 EGF protein and chip couple in Biacore experiment

肺组织 HE 染色见图 4。空白组肺组织 HE 染色结果显示肺泡组织结构清晰，肺泡壁完整；与空白组相比，模型组小鼠肺组织肺泡间隔增厚或被破坏，有大量炎性细胞浸润，支气管上皮脱落。地龙各剂量组给药后，可见炎性细胞减少，地龙中、高剂量组仅有少量炎性细胞，肺泡结构清晰完整，表明地龙中、高剂量组可有效改善 MP 感染症状。

3.5 IHC 法检测地龙对肺组织 EGF 蛋白表达的影响

由图 5、6 可知，与空白组比较，模型组 *OD* 值有所降低（$P < 0.05$）；与模型组比较，地龙低、中、高剂量组 *OD* 值均升高（$P < 0.05$），其中地龙中、高剂量组 *OD* 值升高显著，EGF 着色点增加明显，表明地龙中、高剂量组可显著增加肺组织中 EGF 的表达。

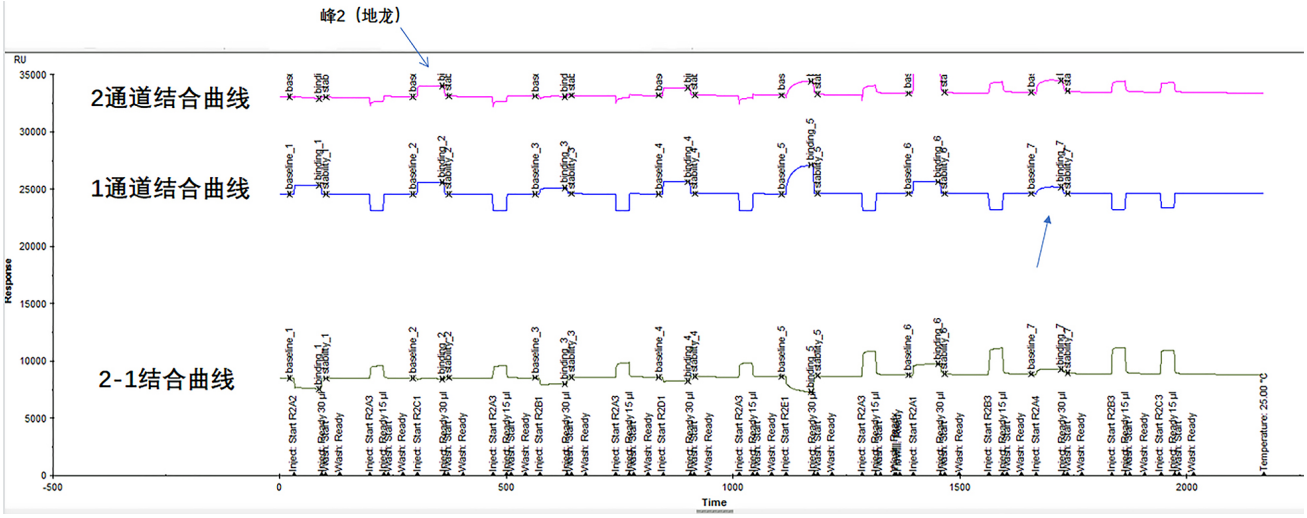


图 3 Biacore 实验地龙与 EGF 蛋白结合

Fig 3 Binding of earthworm to EGF protein in Biacore experiment

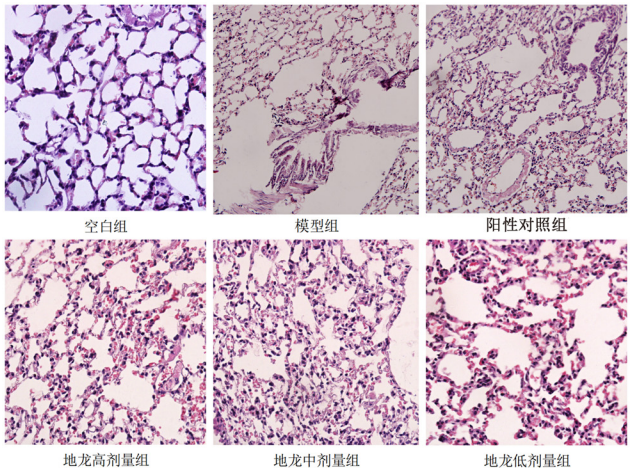


图 4 BALB/c 小鼠肺病理学观察（×20）

Fig 4 Pathological observation of lung in BALB/c mice（×20）

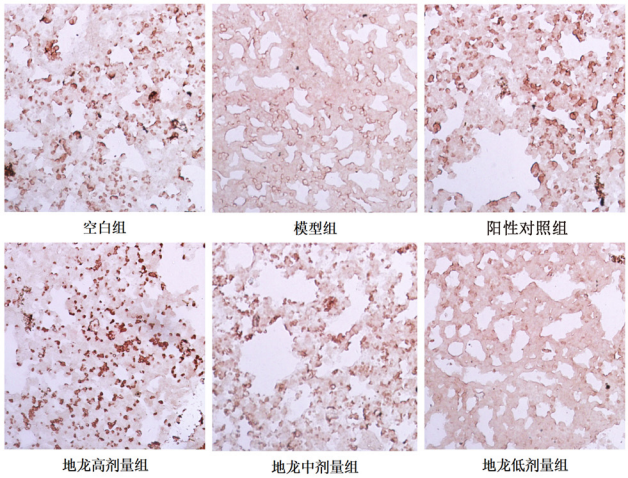


图 5 地龙对肺组织 EGF 蛋白表达的影响（×20）

Fig 5 Effect of earthworm on EGF protein expression in lung tissue（×20）

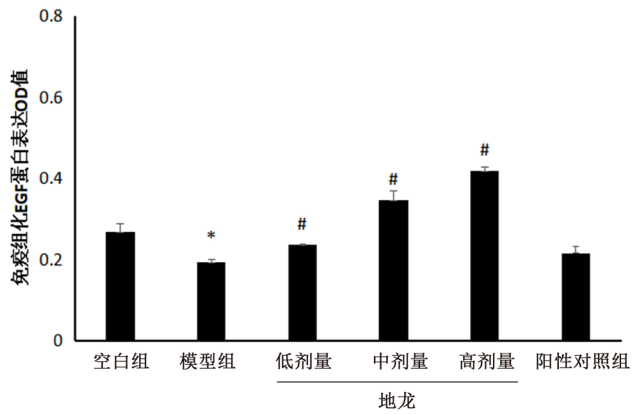


图 6　各组小鼠肺组织 EGF 蛋白表达 *OD* 值

Fig 6　*OD* value of EGF protein expression in lung tissue of mice in each group

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

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

3.6　Western blot 检测地龙对肺组织 EGF 蛋白表达水平的影响

如图 7 所示，与空白组比较，模型组 EGF 蛋白水平明显下降（$P < 0.05$）。与模型组比较，地龙中、高剂量组 EGF 蛋白表达均升高（$P < 0.05$）。

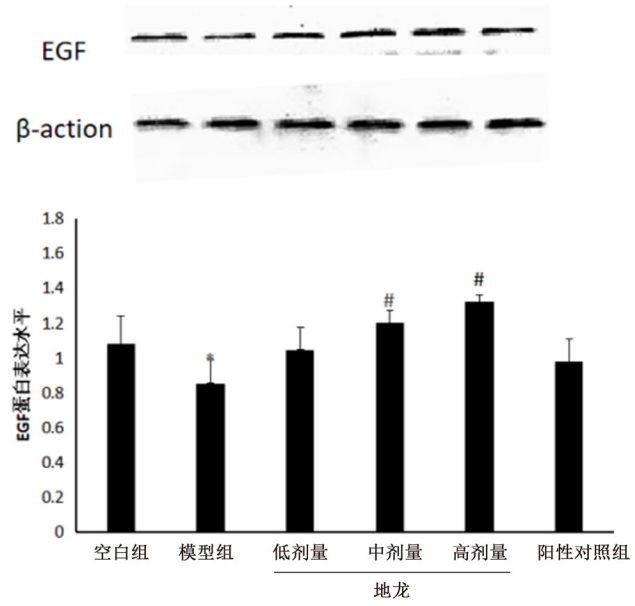


图 7　地龙对肺组织中 EGF 蛋白表达的影响

Fig 7　Effect of earthworm on the expression of EGF protein in the lung tissue

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

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

3.7　地龙对肺组织 EGF mRNA 表达的影响

图 8 显示，与空白组比较，模型组小鼠 EGF mRNA 表达显著降低（$P < 0.05$）；与模型组比较，模型小鼠经地龙给药治疗后，地龙中、高剂量组小鼠的 EGF mRNA 表达水平明显增加（$P < 0.05$）。

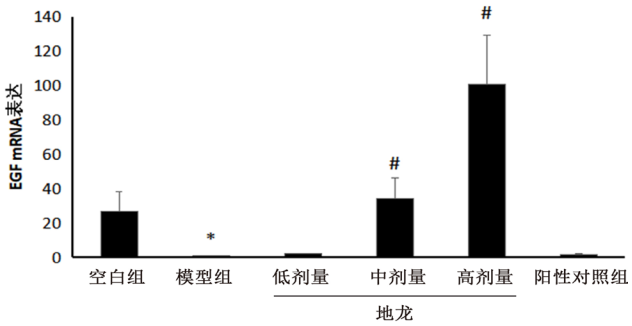


图 8　地龙对肺组织 EGF mRNA 表达的影响

Fig 8　Effect of earthworm on EGF mRNA expression in lung tissue

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

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

4　讨论

MP 是引发呼吸系统感染的常见致病菌，潜伏期通常为 14 ～ 21 d，严重感染时会发展为 MP 肺炎 [12]。目前关于 MP 肺炎致病机制仍不十分明确，如不及早干预，会导致病情恶化，引发其他呼吸道疾病。临床上，阿奇霉素对治疗小儿支原体肺炎具有较好的疗效，是治疗 MP 感染的常用药物，但近年关于阿奇霉素的不良反应报道逐渐增多，阿奇霉素长期静脉滴注会引发胃肠反应、局部疼痛等 [13]，急需寻找新的治疗药物。地龙作为一味应用广泛的动物类中药，在现代临床常用于治疗肺部疾病。研究表明，地龙可显著降低 MP 感染小鼠 IFN-γ、IL-6 水平 [14]。本实验中 HE 染色表明，地龙中、高剂量组能修护受损的肺组织，改善 MP 感染造成的肺组织结构异常损害。

EGF 具有较强的促进细胞分裂作用，在体内外刺激多种组织及细胞的增殖、分化，并通过自分泌和旁分泌等多种方式调节呼吸道上皮细胞的分化及成熟 [15]。其修复功能可能与线粒体的运转功能有关，EGF 可以使受损的表皮细胞代谢加快，运动活性增强，老化的组织及细胞得到更新。研究表明 EGF 对胎儿肺成熟有促进作用 [16] 以及有助于消除成人肺水肿 [17]。EGF 可调控成年大鼠肺泡Ⅱ型的细胞增生，促进肺部的生长发育 [18]。目前关于治疗 MP 引起的肺损伤的相关研究较少，也并无阿奇霉素通过调控 EGF 蛋白治疗 MP 感染的相关报道。故本研究基于 EGF 蛋白探究地龙治疗 MP 的作用机制，进一步开发治疗 MP 感染的中药新药。本课题组前期大量实验

表明应用 Biacore 实验技术可有效在体外预测药物与靶蛋白的结合效果 [10-11]，本实验通过 Biacore 实验证实了在体外地龙可与 EGF 蛋白存在稳定结合。IHC、Western blot 及 RT-PCR 体内药效学实验表明，地龙中、高剂量组能明显提高 EGF 蛋白和 mRNA 的表达，表明地龙可通过调控 EGF 的表达水平，改善 MP 感染症状，阐明了地龙治疗 MP 感染的作用机制。但与模型组相比，阿奇霉素阳性对照组对 EGF 蛋白和 mRNA 的表达没有明显统计学差异，原因可能为阿奇霉素并不能通过调控 EGF 蛋白发挥治疗 MP 感染的作用。

本研究显示，地龙可通过提高 EGF 的表达，修复受损伤的肺组织，改善 MP 感染引起的呼吸道症状，进一步阐明了地龙治疗 MP 感染的作用机制，为中药新药研制提供了一种创造性的思路。但地龙药材中化学成分复杂，与 EGF 蛋白结合的具体单体成分还需进一步研究。

参考文献

[1] Youn YS，Lee SC，Rhim JW，et al. Early additional immune-modulators for mycoplasma pneumoniae pneumonia in children：an observation study [J]. J Infect Chemother，2014，，46（4）：239-247.

[2] Shah SS，Matthew T，Seth SC，et al. Macrolide therapy and outcomes in a multicenter cohort of children hospitalized with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. J Hosp Med，2012，7（4）：311-317.

[3] 姚琳，张俊威，王博，等 . 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体感染大鼠肺组织中 TGF-β 和 SP-A 表达的影响 [J]. 中国药理学通报，2016，32（4）：564-569.

[4] Shimizu T，Kimura Y，Kida Y，et al. Cytadherence of Mycoplasma pneumoniae induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4 [J]. Infect Immun，2014，82（7）：3076-3086.

[5] 袁红霞，陈虹亮，代国知，等 . 黄芩素对肺炎支原体的抑制作用及对小鼠肺上皮细胞的保护机制研究 [J]. 中国医师杂志，2014，16（7）：919-922.

[6] 刁锡东，周冬，蒋玉红 . 支原体肺炎儿血清表皮生长因子测定的临床意义 [J]. 实用儿科临床杂志，1998（6）：329.

[7] 蒙艳丽，杨阳，王欣，等 . 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体感染模型小鼠和细胞肺表皮生长因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志，2014，29（4）：1089-1092.

[8] Stuart K，Jennifer C，Hanno S，et al. Direct comparison of label-free biosensor binding kinetics obtained on the Biacore 8K and the carterra LSA [J]. Slas Discov，2020，25（9）：977-984.

[9] 徐明杭，蒙艳丽，王晓溪，等 . 黄芩苷对肺纤维化小鼠组织中纤维化因子 TGF-β1 及 mmp2，timp2 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2020，45（23）：5738-5744.

[10] 王慧慧，蒙艳丽，杨志敏，等 . 地龙对肺纤维化小鼠肺组织中纤维化因子 TGF-β1 及 α-SMA 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2019，44（24）：5473-5478.

[11] Meng YL，Wang WM，Lv DD，et al. The effect of platycodin D on the expression of cytoadherence proteins P1 and P30 in mycoplasma pneumoniae models [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2017，（49）：188-193.

[12] 朱虹 . 小儿肺炎支原体肺炎的临床诊治分析 [J]. 中国医药指南，2019，17（33）：172-173.

[13] Brown RJ，Louissa MS，Phillips S，et al. Detection of macrolide resistant mycoplasma pneumoniae in England，September 2014 to September 2015 [J]. Euro Surveill，2015，20（48）：30078.

[14] 岑凯莹，王海颖 . 鱼腥草、地龙、桑白皮提取物对肺炎支原体感染小鼠模型 IL-6 和 IFN-γ 表达的影响 [J]. 中国中医急症，2018，27（7）：1140-1143.

[15] 朱婷，王瑾，陈海华，等 . 支气管哮喘患者血清中 VEGF、EGF 等相关生长因子表达及与临床表型、肺功能以及病情程度相关性研究 [J]. 标记免疫分析与临床，2017，24（12）：1345-1350.

[16] 徐素君，陈敏，叶菁华，等 . 表皮生长因子和基质金属蛋白酶 2、9 在妊高征患者胎盘中表达水平与围产儿结局的相关性研究 [J]. 中国卫生检验杂志，2020，30（20）：2485-2488.

[17] 陈兴，刘群 . 表皮生长因子治疗吸入性损伤大鼠的实验研究 [J]. 中华损伤与修复杂志（电子版），2009，4（1）：13-19.

[18] 吴甜，屈艺，母得志 . 早产儿支气管肺发育不良的研究进展 [J]. 中华妇幼临床医学杂志（电子版），2016，12（3）：339-343.

（收稿日期：2021-10-05；修回日期：2021-11-20）

黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠的抗炎作用及机制研究

郑东梅[1]，王星晨[1]，张莹[4]，刘星星[4]，刘雪英[2*]，王庆伟[1, 3*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046；2. 空军军医大学药学系药物化学教研室，西安 710032；3. 西安秦皇医院，西安 710600；4. 西安培华学院，西安 710125）

摘要：目的 考察黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠的抗炎作用及机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠根据随机数表法分为正常组、模型组、醋酸泼尼松组、黄芪组、知母组、黄芪 - 知母药对组，每组 10 只。除正常组外，其余各组气管内灌注博来霉素（5 mg•kg^{-1}）构建肺纤维化大鼠模型，于造模后第 2 日灌胃治疗，连续 28 d。HE 和 Masson 染色观察肺组织病理变化；血细胞检测仪测定各组外周血炎性细胞数；ELISA 试剂盒测定血清中肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、转化生长因子 -β_1（TGF-β_1）、白介素 -10（IL-10）含量；免疫组织化学法和 Western blot 法检测肺组织 α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、核转录因子 -κB p65（NF-κB p65）、TNF-α 蛋白表达情况。**结果** 模型组大鼠肺泡腔充满分泌物及渗出物，炎性浸润明显增加，肺实变区胶原纤维聚集成块状，经黄芪 - 知母药对治疗后肺组织炎性及纤维化病理损伤明显减轻，血清 TNF-α 和 TGF-β_1 含量明显降低，IL-10 含量明显上升，肺组织中 NF-κB p65、TNF-α 和 α-SMA 蛋白表达水平显著下调（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论** 黄芪 - 知母药对能有效抑制肺纤维化大鼠成纤维细胞的增殖与分化，减少细胞外基质的沉积，其作用机制可能是抑制 α-SMA、NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达，减少 TNF-α 和 TGF-β_1 释放，上调 IL-10 含量，进而改善炎性浸润。

关键词：黄芪；知母；药对；抗炎；肺纤维化

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0297-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.010

Anti-inflammatory effect of Astragalus membranaceus-Rhizoma Anemarrhenae couplet medicines on rats with pulmonary fibrosis and related mechanism

ZHENG Dong-mei[1], WANG Xing-chen[1], ZHANG Ying[4], LIU Xing-xing[4], LIU Xue-ying[2*], WANG Qing-wei[1, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Department of Medicinal Chemsitry*, *School of Pharmacy*, *Air Force Medical University*, *Xi'an* 710032; 3. *Xi'an Qinhuang Hospital*, *Xi'an* 710600; 4. *Xi'an Peihua University*, *Xi'an* 710125)

Abstract: Objective To determine the anti-inflammatory effect of Astragalus membranaceus and Rhizoma Anemarrhenae couplet medicines on rats with pulmonary fibrosis and its mechanism. **Methods** Male SD rats were divided into a normal group, a model group, a prednisone acetate group, an Astragalus membranaceus group, a Rhizoma Anemarrhenae group and an Astragalus membranaceus-Rhizoma Anemarrhenae group according to the random number table with 10 rats in each group. The rat model with pulmonary fibrosis was constructed by the intratracheal instillation of bleomycin (5 mg • kg^{-1}) in all groups except the normal group, and treated by gavage on the second day after modeling for 28 days consecutively. The histopathological changes in the lung were observed by HE and Masson staining, the number of inflammatory cells in the peripheral blood was measured by hemocytometer. The content of tumor necrosis factor-α (TNF-α), transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) and interleukin-10 (IL-10) in the serum was determined by ELISA. The protein

基金项目：1226 工程卫生专业重大项目（No.AWS16J018）；国家自然科学基金项目（No.8157070160）。

作者简介：郑东梅，女，硕士研究生，主要从事中药药物代谢动力学及药理学研究，email：1326517805@qq.com **通信作者：**王庆伟，男，博士，主任药师，主要从事药物代谢动力学及药理学研究，email：wqwlxy@163.com；刘雪英，女，博士，副教授，主要从事药物代谢动力学及药理学研究，email：xyliu0427@163.com

expression of α-smooth muscle actin (α-SMA), nuclear factor κB P65 (NF-κB P65) and TNF-α was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The alveolar cavity of the rats in the model group was filled with secretions and exudates, the inflammatory infiltrates were significantly increased, and collagen fibers in the solid lung area gathered into a mass. The serum TNF-α and TGF-β_1 levels were significantly reduced, the IL-10 level were significantly increased, and NF-κB p65, TNF-α and α-SMA protein expression levels in lung tissues was significantly down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) after the treatment with Astragalus membranaceus and Rhizoma Anemarrhenae. **Conclusion** The mechanism of action of Astragalus membranaceus and Rhizoma Anemarrhenae lies in the effective inhibition of the proliferation and differentiation of fibroblasts and reduction of extracellular matrix deposition in the fibrotic rats, probably by inhibiting α-SMA, NF-κB p65, and TNF-α protein expression, reducing the release of TNF-α and TGF-β_1, up-regulating IL-10 content and improving the inflammatory infiltration.

Key words: Astragalus membranaceus; Rhizoma Anemarrhenae; couplet medicines; anti-inflammation; pulmonary fibrosis

肺纤维化（pulmonary fibrosis，PF）是肺脏损伤后常见的病理过程，目前研究认为肺纤维化不可逆，严重者可引起呼吸衰竭[1]。中医将肺纤维化归属为“肺痿”范畴，肺痿以气虚为根本病机[2]，病证以痰、热最为多见，病位在肺、胃，可累及脾肾，病理上肺脾肾三脏病变可互相影响；现代医学认为，纤维化类疾病均表现为细胞外基质的沉积，其生物过程包含某些炎性细胞、纤维化因子、炎症因子及相关蛋白参与的关键通路等[3]。

黄芪，归脾、肺经，可补肺脾之气，生津止渴。知母，归肺、胃、肾经，可滋肾阴，润肺燥，泻肾火。近代医家张锡纯所著的《医学衷中参西录》中记载黄芪、知母常作为药对配伍的方剂有玉津汤、升陷汤、理郁升陷汤及速降糖煎Ⅱ号[4-5]，现代药学专著《施今墨对药》《中药药对大全》均收录了黄芪 - 知母药对[6-7]。在黄芪 - 知母药对有效成分含量的测定中，陈沛鑫等[8]发现，与单味药相比，两者同比例配伍时更有利于成分溶出与转化。研究发现，黄芪 - 知母同比例配伍常用于治疗肺病，在新型冠状病毒肺炎中也有应用，但其作用机制尚不明确[9-10]。肺部疾病常伴随着炎症的产生，慢性炎症可进一步发展为肺纤维化，严重者甚至发展为肺癌[11]。基于此，本实验拟采用博来霉素诱导大鼠肺纤维化，初步研究黄芪 - 知母药对（1∶1）对肺纤维化的抗炎作用，并探讨其机制，为中药的临床应用及二次开发提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 62 只，体质量（200±20）g [空军军医大学实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（军）2015-006]。

1.2 试药

黄芪、知母均购于西安天晟中药饮片公司，经陕西中医药大学白吉庆教授鉴定，黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. *var. mongholicus*（Bge.）Hsiao 的干燥根；知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge 的干燥根茎。

称取黄芪、知母药材，每份约 3 kg，6 倍量 80% 乙醇加热回流提取，每次 2 h，合并醇提取液，旋蒸，浓缩，减压回收乙醇，得黄芪浸膏 1.335 kg，浓缩至每克提取物相当于原药材 1.972 g；得知母浸膏 1.686 kg，浓缩至每克提取物相当于原药材 1.532 g，置 4 ℃冰箱冷藏备用。

注射用盐酸博来霉素（H 20055883，瀚晖制药有限公司）；苏木精伊红（HE）染色液（G1005，武汉谷歌生物科技有限公司）；Masson 染色套装（G1006，Servicebio）；转化生长因子 -β_1（TGF-β_1）试剂盒、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）试剂盒、白介素 -10（IL-10）试剂盒（江苏酶免有限公司）；核转录因子 -κB p65（NF-κB p65）抗体（AF5006）、α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）抗体（AF1032）（Affinity 公司）；TNF-α（ER 1919-22）、GAPDH 抗 体（ET 1601-4）（华安生物有限公司）；HRP 标记山羊抗兔抗体（GB 23303）、组化试剂盒 DAB 显色剂（G1211）（Servicebio 公司）。

1.3 仪器

xn300 血细胞分析仪（希斯美康）；全自动酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；RM2016 病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜、Nikon DS-U3 型成像系统（日本尼康）；XSP-C204 型显微镜（CIC）；TANON-5200 型全自动化学发光图像分析系统（上海天能科技有限公司）。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

健康 SD 雄性大鼠 62 只，适应性喂养 1 周后，随机选取 52 只，腹腔注射 20% 乌拉坦（5 mL•kg^{-1}）进行麻醉，在大鼠颈部剪 1 cm 小口，钝性镊子逐层分离颈部肌肉，直至暴露气管，用 1 mL 注射器缓慢注入博来霉素（5 mg • kg^{-1}），注入后立即将大鼠直立并左右旋转，使药液在肺内均匀分布，建立大鼠纤维化模型。取剩余同批次大鼠 10 只，作为正常组。造模 2 周后，随机选取经博来霉素处理过的大鼠 2 只处死，取肺组织行 HE 和 Masson 染色，观察到有大量炎性改变和胶原生成，确定肺纤维化模型复制成功 [12]。造模成功后，取剩余的 50 只大鼠，运用随机数表法将其分为模型组、醋酸泼尼松组、黄芪组、知母组、黄芪 - 知母药对组，每组 10 只。正常组给予 0.5% 的羧甲基纤维素钠（CMC-Na）水溶液灌胃；模型组造模后予以 0.5% 的 CMC-Na 水溶液灌胃；醋酸泼尼松组给予醋酸泼尼松 3 mg • kg^{-1}；黄芪、知母给药剂量参照《中药药理与实验方法》中人与大鼠表皮面积换算，分别为 0.6846 g • kg^{-1} 和 0.8812 g • kg^{-1}；黄芪 - 知母药对组给药剂量以黄芪、知母生药量计算。所有药物均用 0.5% 的 CMC-Na 配制成溶液，每日给药一次，每次 5 mL • kg^{-1}，连续给药 28 d。

2.2 取材

末次给药后，大鼠禁食不禁水 12 h，腹腔注射 20% 乌拉坦（5 mL • kg^{-1}）麻醉，颈总动脉取血用于外周血细胞检测。取肺组织，水洗，滤纸吸干，称定质量，左侧肺叶固定于 4% 多聚甲醛，右侧肺叶于冻存管－ 80 ℃冰箱备用。

2.3 HE 染色观察肺脏病理学变化

各组大鼠左侧部分肺组织制成石蜡切片，将脱蜡水化的切片进行苏木精染色，盐酸水溶液分化，氨水水溶液返蓝，伊红染色，脱水，封片，观察肺脏炎性细胞浸润，肺泡腔内有无渗出物，有无充血水肿改变等，并采用 Image J 软件对炎性细胞的蓝色阳性染色进行相对定量分析，通过计算炎性细胞阳性面积和阳性区域进行定量。

2.4 Masson 染色观察肺脏胶原沉积程度

Masson 染色按照试剂盒依次操作，左侧肺组织切片脱水，封片，观察肺泡结构及纤维结节，胶原沉积情况，并采用 Image J 软件对胶原纤维的蓝色阳性染色进行相对定量分析，通过计算胶原纤维阳性面积和阳性区域进行定量。

2.5 ELISA 试剂盒测定大鼠血清中 TNF-α、IL-10、TGF-β_1 水平

将冻存的血清样本梯度放入－ 20 ℃和 4 ℃解冻，试剂盒平衡到室温，按照 ELISA 试剂盒说明书步骤加样，温育，洗板，检测血清中 TNF-α、IL-10、TGF-β_1 含量变化。

2.6 免疫组织化学法检测 NF-κB p65、TNF-α、α-SMA 蛋白阳性表达

石蜡切片脱蜡、水化后，枸橼酸抗原修复缓冲液中进行抗原修复，置内源性过氧化物封闭液室温避光孵育 25 min，3%BSA 室温封闭 30 min；加 α-SMA（1 ∶ 1000）、TNF-α（1 ∶ 100）、NF-κB p65（1 ∶ 600）一抗，4 ℃孵育过夜；加二抗（1 ∶ 200），室温孵育 50 min；DAB 显色；苏木素复染、脱水封片，阳性表达呈棕黄色或深棕。

2.7 Western blot 法定量检测 NF-κB p65、TNF-α、α-SMA 蛋白表达

将右侧肺组织剪碎，在冰上匀浆，加入裂解液裂解 30 min，10 000 g • min^{-1}，4 ℃离心 10 min，取上清液进行蛋白定量，调整蛋白量后，取等量裂解产物，加入上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳，电泳后转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，加一抗，4 ℃孵育过夜，PBST 洗涤，加二抗，室温孵育 1 h，PBST 洗涤，化学发光法显色，成像扫描分析系统保存图像。以 GAPDH 蛋白表达水平作为内参，以各样本与相应内参灰度值比值为蛋白相对含量。

2.8 统计分析

SPSS 25.0 统计学软件进行分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠病理变化的影响

正常组大鼠肺泡结构清晰，无充血水肿结节现象；模型组大鼠肺泡间隔增宽，肺泡腔内充满分泌物及渗出物且大量炎性浸润（HE 染色，见图 1a），肺实变区胶原增生明显且聚集成块状

（Masson 染色，见图 1b），炎症相对面积显著增高（$P < 0.01$，见图 2a），肺脏纤维化相对面积显著增高（$P < 0.01$，见图 2b）。与模型组比较，醋酸泼尼松组大鼠肺组织水肿、充血不明显，肺脏损伤较为明显和炎性改变减轻，肺泡腔见少量纤维组织及炎性浸润，其炎症及纤维化相对面积均显著下降（$P < 0.01$）。黄芪 - 知母药对组大鼠肺泡结构较完整，肺泡腔内少量渗出物，纤维增生不严重，可见少量炎性浸润及纤维结节出现，其炎症及纤维化相对面积均显著下降（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。单味黄芪、知母治疗后，肺泡结构基本完整，但肺泡腔内仍较多炎性浸润，纤维结节较多，与模型组相比，其炎症和纤维化相对面积均有下降，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

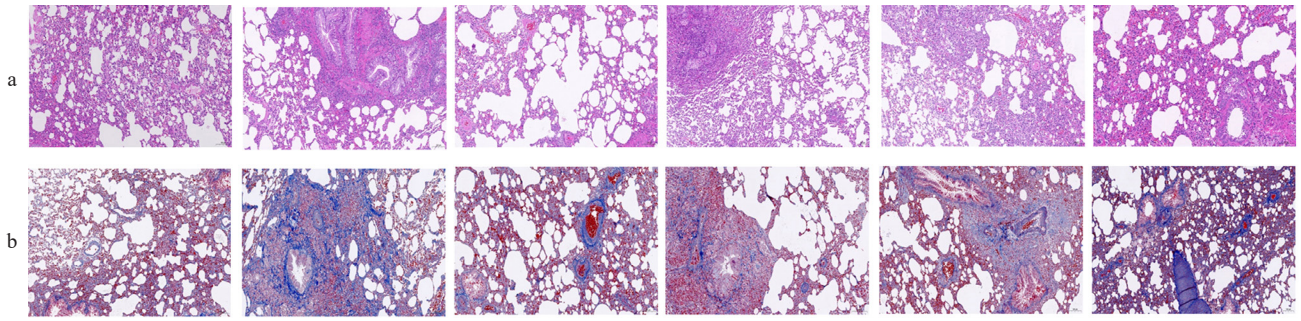


图 1 给药 28 d 后各组大鼠 HE 染色（a）和 Masson 染色（b）情况（×100，$n = 3$）

Fig 1 HE staining (a) and Masson staining (b) of rats 28 days after the administration (×100, $n = 3$)

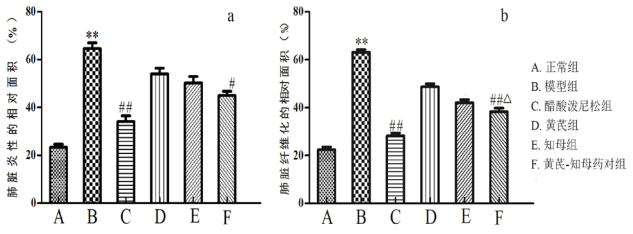


图 2 各组肺纤维化大鼠肺脏炎性细胞（a）及纤维化面积（b）情况（$n = 3$）

Fig 2 Relative area of pulmonary inflammatory cells (a) and fibrosis (b) of rat in each group ($n = 3$)

注（Note）：与正常组相比，$^{**}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与黄芪组相比，$^{\triangle}P < 0.05$（Compared with the normal group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the Astragalus membranaceus group，$^{\triangle}P < 0.05$）。

3.2 黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠外周血炎性细胞数目的影响

与正常组相比，模型组大鼠外周血白细胞数（WBC）、中性粒细胞数（PMN）、单核细胞数（MO）、淋巴细胞数（LYM）、嗜酸性细胞数（EO）均显著升高（$P < 0.01$）。与模型组相比，醋酸泼尼松组 WBC、PMN、MO、LYM、EO 含量均显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；黄芪 - 知母药对组 WBC、PMN、MO、LYM 显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；黄芪、知母组 WBC、PMN、MO、EO、LYM 含量均有降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 3。

3.3 黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠血清中炎症因子含量的影响

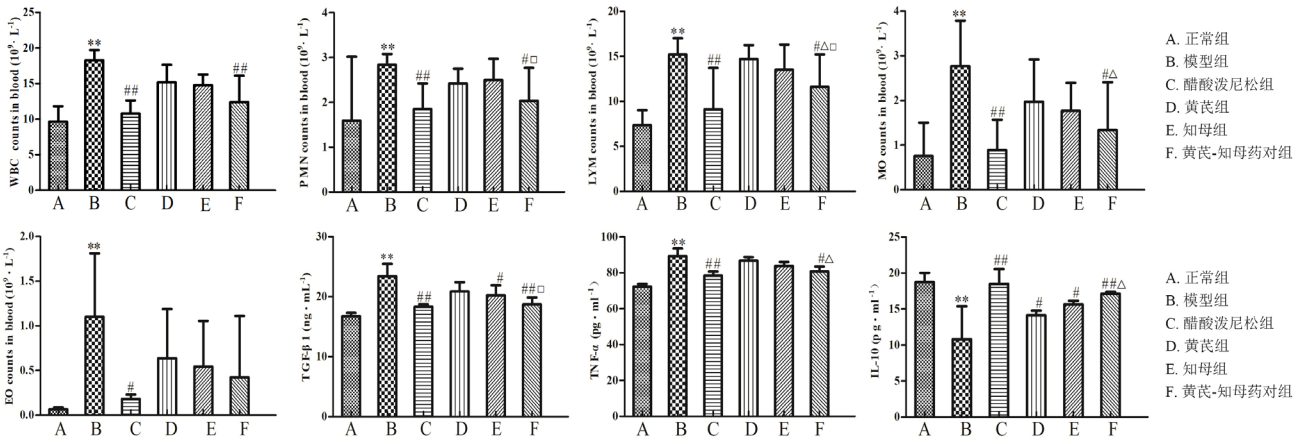
与正常组相比，模型组大鼠血清 TNF-α、TGF-β_1 含量均显著升高（$P < 0.01$），IL-10 水平显著降低（$P < 0.01$）。与模型组相比，醋酸泼尼松和黄芪 - 知母药对组大鼠血清 TNF-α、TGF-β_1 含量均显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$），IL-10 含量显著升高（$P < 0.01$）；知母组大鼠血清中 TGF-β_1 含量显著降低（$P < 0.05$）；黄芪组、知母组大鼠血清中 IL-10 含量均显著升高（$P < 0.05$），但 TNF-α 含量变化差异无统计学意义，见图 3。

3.4 黄芪 - 知母药对对肺纤维化大鼠 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白表达的影响

与正常组相比，模型组大鼠肺泡区 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白阳性率及蛋白表达显著升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；与模型组相比，醋酸泼尼松组与黄芪 - 知母药对组大鼠肺组织中 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白阳性率及蛋白表达显著下降（$P < 0.05$，$P < 0.01$）（见图 4 及图 5）。

4 讨论

肺纤维化是一种慢性、进行性、致命性的纤维化间质性疾病，发病率呈上升趋势[13]。目前临床多采用激素、免疫抑制剂及肺移植手术等进行治疗，但有一定的不良反应及风险。近年来，中医药以多途径、多靶点、副作用少、疗效显著等特点成为肺纤维化疾病的替代疗法之一。肺纤维化疾病的发展可逐渐演变形成虚损性疾病，久之

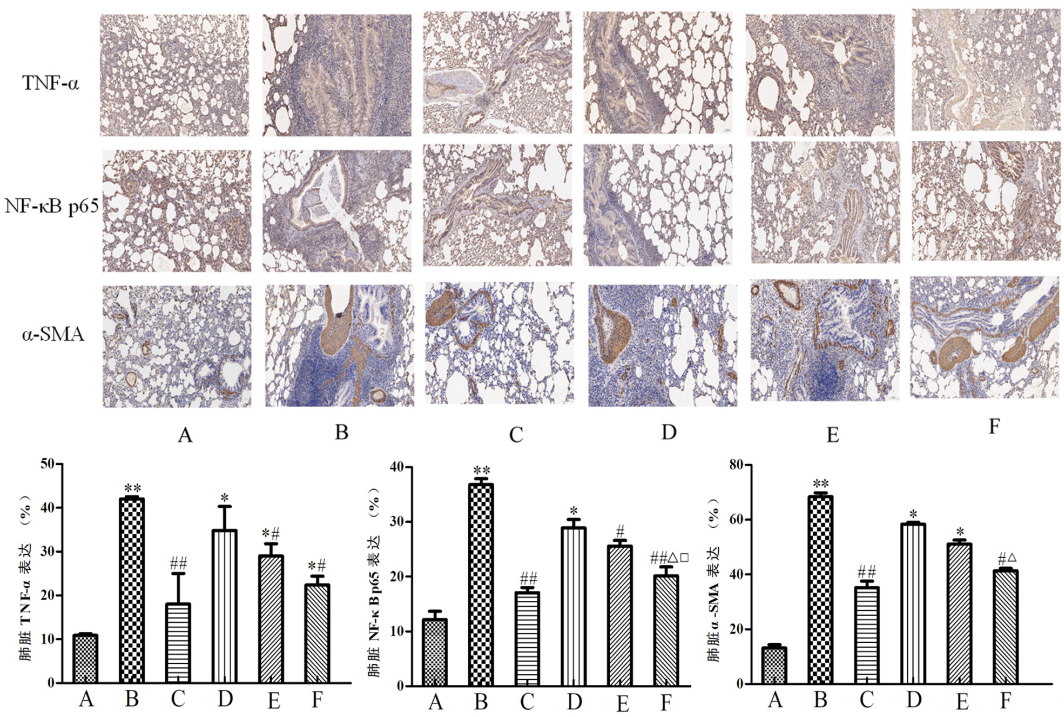


A. 正常组　B. 模型组　C. 醋酸泼尼松组　D. 黄芪组　E. 知母组　F. 黄芪-知母药对组

图 3　黄芪 - 知母药对对大鼠外周血细胞数目和血清中炎性因子的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig 3　Effect of Astragalus membranaceus and Rhizoma Anemarrhenae couplet medicines on the number of peripheral blood cells and serum inflammatory factor contents in pulmonary fibrosis rats（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

注（Note）：与正常组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与黄芪组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与知母组相比，$^{\square}P<0.05$（Compared with the normal group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the Astragalus membranaceus group，$^{\triangle}P<0.05$；compared with the Rhizoma anemarrhenae group，$^{\square}P<0.05$）。



A. 正常组　B. 模型组　C. 醋酸泼尼松组　D. 黄芪组　E. 知母组　F. 黄芪-知母药对组

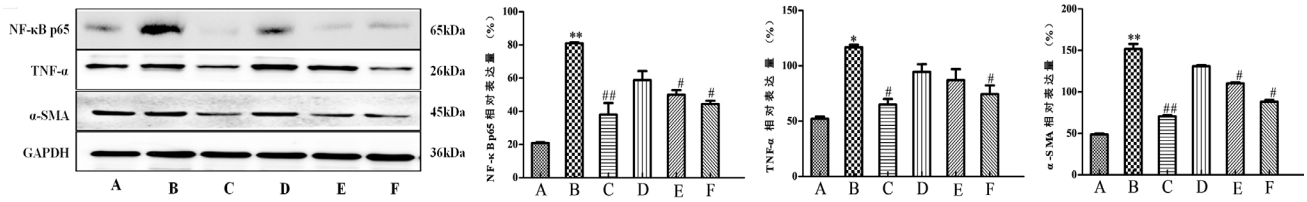
图 4　各组大鼠肺组织中 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白免疫组织化学法染色结果（×100，$n=3$）

Fig 4　Immunohistochemical staining of TNF-α，NF-κB p65，and α-SMA proteins in the pulmonary tissues of rats in each group（×100，$n=3$）

注（Note）：与正常组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与黄芪组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与知母组相比，$^{\square}P<0.05$（Compared with the normal group，$^{**}P<0.01$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the Astragalus membranaceus group，$^{\triangle}P<0.05$；compared with the Rhizoma anemarrhenae group，$^{\square}P<0.05$）。

患者肺脏损伤、消耗元气、肺虚失养，以致肺气闭郁、阴血亏耗，最终导致肺纤维化的发生。研究发现益气养阴法较常规的激素及免疫抑制剂治疗副作用更少，可改善患者肺功能、血氧饱和度，减缓肺纤维化进程[14]。

研究发现，黄芪作为治疗肺纤维化使用频率较高的补益类药物，可通过调控 TNF-α 的生成，抑制 NF-κB 的活性来减轻肺组织炎症损伤，保持



A. 正常组　B. 模型组　C. 醋酸泼尼松组　D. 黄芪组　E. 知母组　F. 黄芪-知母药对组

图 5　黄芪 - 知母药对对大鼠肺组织中 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白表达的影响

Fig 5　Effect of Astragalus membranaceus and Rhizoma Anemarrhenae couplet medicines on TNF-α, NF-κB p65, and α-SMA protein expression in pulmonary tissues of rats

注（Note）：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

肺组织结构的完整 [14]。知母作为清热兼滋阴药，通过降低肺脏系数，提高肺脏、血清中肺表面活性物质相关蛋白表达，减轻气道及肺组织炎性细胞浸润，减少肺损伤 [15-16]。黄芪 - 知母作为经典药对之一，均归肺经，其中黄芪性温，味甘，可益气、升阳而固涩；知母性寒，味苦，滋阴、苦降而滑利，两者合用，一温一寒、一升一降、一收一散，达相辅相成之效，以此为基础的中药方剂清金益气汤已在临床广泛应用 [17]。已有研究表明，黄芪中总黄酮和皂苷类成分通过介导氧化应激和炎症反应干预博来霉素诱导的大鼠肺纤维化，其中总皂苷通过调控 TGF-β/smad 信号抑制早期纤维化结节的产生 [18]。研究发现，知母主要化学成分为皂苷和双苯吡酮类，知母皂苷 BⅡ是皂苷类成分的代表，其可在 mRNA 和蛋白质水平上减少炎性细胞因子如 IL-6 及 TNF-α 的生成，且对核因子 NF-κB 的活性具有一定抑制作用 [19]。有研究通过网络药理学发现双苯吡酮类芒果苷通过结合关键蛋白靶点环氧合酶 -2（COX-2），影响 NF-κB 炎症通路，从而发挥抗炎作用 [20]。另有学者发现炎症反应失控是导致纤维化发生的根源，也是促进肺纤维化病程进展的重要机制 [21]。肺脏发生纤维化后，肺脏组织细胞和相应免疫细胞释放大量炎性因子如 TGF-β_1、IL-10、TNF-α，这些炎性因子相互作用，引发一系列级联反应，加重肺损伤 [22]。本实验通过测定肺纤维化大鼠外周血炎性细胞数和肺纤维化大鼠血清中 TNF-α、TGF-β_1 和 IL-10 的含量，发现黄芪 - 知母药对可调控炎性因子 TNF-α、TGF-β_1 和 IL-10 的水平，从而改善炎性损伤。

本实验进一步观察了 NF-κB 炎症通路中 TNF-α、NF-κB p65、α-SMA 蛋白的阳性变化，探讨黄芪 - 知母药对调控肺纤维化大鼠 NF-κB 炎症反应通路的作用机制。TNF-α 是参与炎症反应关键的促炎因子，其过表达会趋化中性粒细胞，增加局部淋巴细胞的浸润，诱发炎性改变。据研究报道，TNF-α 基因启动子含 NF-κB 位点，激活 NF-κB 信号通路 [23]，NF-κB 信号通路是调控炎症反应的重要通路之一，也是肺纤维化形成的关键环节。文献研究发现，在博来霉素诱导的肺纤维化过程中存在 NF-κB 过度活化，亚基 NF-κB p65 磷酸化及总 NF-κB p65 表达增加会释放过量 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 等炎症因子，使肺成纤维细胞增殖分化、活力增强，过度产生 α-SMA，加快肺纤维化病变的程度 [24]；α-SMA 是活化的成纤维细胞的标志，其过度产生导致纤连蛋白、胶原蛋白等细胞外基质的过度分泌，胶原异常分泌是肺纤维化形成的根本原因，故 α-SMA 表达水平的多少判断纤维化程度 [25]。此外，TNF-α 可直接刺激肺成纤维细胞增殖，合成胶原蛋白，促进肺纤维化进程 [26]，因此抑制 NF-κB 通路激活，减少 TNF-α 的释放及 α-SMA 的合成是治疗肺纤维化的关键。本实验采用 Western blot 法和免疫组织化学双重定性定量考察 TNF-α、NF-κB p65 和 α-SMA 蛋白在肺纤维化大鼠肺组织中表达的情况，发现黄芪、知母、黄芪 - 知母药对可在不同程度上抑制肺纤维化大鼠 TNF-α、NF-κB p65 和 α-SMA 蛋白表达，其中黄芪 - 知母药对治疗后肺脏 NF-κB P65 蛋白表达较单味药治疗更低，这与组织病理学（Masson 染色）观察结果一致。

综上所述，黄芪 - 知母药对可减轻肺脏炎症进而控制纤维化的发展，其机制可能与减少 TNF-α、TGF-β_1 的释放及 α-SMA 的合成，升高抗炎因子 IL-10 水平，调控 NF-κB 信号通路表达有关。本研究仅从炎症介质调控方面探讨了黄芪 - 知母药对治疗肺纤维化的作用和机制，其他作用机制需进一步研究证实。

参考文献

[1] 卢文佳 . 格拉斯哥及改良格拉斯哥预后评分对特发性肺纤维化急性加重患者预后的意义 [J]. 临床肺科杂志，2021，26（9）：1326-1331.

[2] 魏媛，郭思佳，宋雅琳，等 . 肺痿、肺痹与肺间质纤维化证候认识 [J]. 吉林中医药，2020，40（1）：28-32.

[3] 张冬冬，刘晓明，李芮 . 中医药干预细胞外基质沉积抗肺纤维化研究进展 [J]. 河南中医，2021，41（5）：794-799.

[4] 刘晓汉 . 速降糖煎剂治疗糖尿病 30 例临床观察 [J]. 陕西中医，1980，1（5）：9-10.

[5] 秦英荣 . 黄芪知母参七汤治疗糖尿病的临床研究 [J]. 内蒙古中医药，2020，39（6）：12-13.

[6] 吕景山 . 施今墨对药 [M]. 北京：人民军医出版社，2013.

[7] 胥庆华 . 中药药对大全 [M]. 北京：中国中医药出版社，1996.

[8] 陈沛鑫，李卫民，高英，等 . HPLC 测定知母 - 黄芪药对中芒果苷、毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（22）：72-75.

[9] 杨福双，苏鑫 . 张锡纯黄芪、知母同用 18 方配伍解析 [J]. 上海中医药杂志，2017，51（10）：76-78.

[10] 胡耀木，吴悠，张秋娥，等 . 基于数据挖掘与“内热伤阴耗气”探讨糖尿病合并新型冠状病毒肺炎的中药治疗 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（3）：850-855.

[11] 石晓雁，冯新宇，曾玉兰 . 中国人群特发性肺纤维化伴肺癌的 Meta 分析 [J]. 华中科技大学学报（医学版），2021，50（3）：370-377.

[12] 田晟，曹文富，张永越，等 . 益气化瘀化痰方对肺纤维化大鼠的干预作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志，2019，35（2）：101-106.

[13] Wuyts WA，Wijsenbeek M，Bondue B，et al. Idiopathic pulmonary fibrosis：best practice in monitoring and managing a relentless fibrotic disease [J]. Respiration，2020，99（1）：73-82.

[14] 廖钢，陈家前，廖颖文，等 . 养阴益气类中药组方治疗肺纤维化的临床分析 [J]. 中国医学创新，2018，15（20）：125-129.

[15] 谢瑾玉 . 补肾益气中药仙灵脾和黄芪对哮喘大鼠 TNF-α 和 NF-κB 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2006，26（8）：723-727.

[16] 黄霖晗 . 黄芪甲苷对肺纤维化小鼠 α-SMA、I 型和 III 型胶原表达影响 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（1）：47-50.

[17] 潘守杰，杨宁娟，马瑞 . 清金益气汤加减疗法在气阴两虚型晚期非小细胞肺癌治疗中的效果分析 [J]. 湖北中医杂志，2021，43（4）：37-39.

[18] 赵梦雅，姜梦笔，杨欣，等 . 基于网络药理学和分子对接探讨黄芪治疗特发性肺纤维化的分子机制 [J]. 天然产物研究与开发，2021，33（9）：1582-1592.

[19] Lu WQ，Qiu Y，Li TJ，et al. Timosaponin B-II inhibits pro-inflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells [J]. Arch Pharm Res，2009，32（9）：1301-1308.

[20] 白雪 . 基于抗炎作用的知母生物评价方法研究 [D]. 大理：大理大学，2021.

[21] 杨雪梅 . NF-κB 诱捕 ODNs 抑制肺成纤维细胞胶原形成的实验研究 [D]. 重庆：第三军医大学，2008.

[22] 李才 . 器官纤维化 [M]. 北京：人民卫生出版社，2003.

[23] Gou S，Zhu T，Wang W，et al. Glucagon like peptide-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis，involving the inactivation of NF-kappaB in mice [J]. Int Immunopharmacol，2014，22（2）：498-504.

[24] Jiang F，Liu GS，Dusting GJ，et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses [J]. Redox Biol，2014，2（1）：267-272.

[25] Borthwick LA，Wynn TA，Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta，2013，1832（7）：1049-1060.

[26] Hou J，Ma T，Cao H，et al. TNF-alpha-induced NF-kappaB activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. J Cell Physiol，2018，233（3）：2409-2419.

（收稿日期：2021-09-07；修回日期：2021-11-16）

基于层次分析法 - 熵权法评价不同种类黄酒对酒当归饮片的影响

杨子烨，张桂梅，王佩华，王慧楠，姜明瑞，张婧秋，岳珠珠，王志成，胡宇峰，王英姿*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 结合层次分析法（AHP）- 熵权法（EWA）对不同种类黄酒炮制的酒当归饮片进行质量综合评价研究，为其他中药饮片质量评价提供参考。**方法** 对比 15 批不同种类黄酒的理化性质，包括总糖、非糖固形物、总酸、氨基酸态氮、氧化钙含量、酒精度和 pH 值，并用其对当归进行炮制，以阿魏酸、多糖、醇溶浸出物、水溶浸出物、总灰分、酸不溶性灰分为评价指标，采用 AHP-EWA 建立酒当归质量的量化评价模型，并对黄酒理化性质与酒当归饮片质量综合评分进行相关性分析，探究不同种类黄酒对酒当归饮片质量的影响。**结果** 黄酒的总糖、酒精度与其炮制的酒当归饮片质量存在一定相关性。**结论** 黄酒的种类对酒当归饮片质量具有一定影响，采用 AHP-EWA 确定各指标的权重，提高了酒当归饮片评价结果的可靠性，可为酒当归饮片质量评价研究提供参考。

关键词：层次分析法；熵权法；酒当归；质量评价

中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0304-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.011

Effect of different rice wine on the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces by analytic hierarchy process-entropy weight method

YANG Zi-ye, ZHANG Gui-mei, WANG Pei-hua, WANG Hui-nan, JIANG Ming-rui, ZHANG Jing-qiu, YUE Zhu-zhu, WANG Zhi-cheng, HU Yu-feng, WANG Ying-zi* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To evaluate the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces processed by different types of rice wine by analytic hierarchy process (AHP)-entropy weight method (EWA), and to provide reference for the quality evaluation of traditional Chinese medicine decoction pieces. **Methods** The physical and chemical properties of 15 batches of rice wine were compared, including total sugar, non-sugar solid, total acid, amino acid nitrogen, calcium oxide content, alcohol, and pH value. The *Angelica sinensis* was processed with rice wine, and the evaluation indexes (ferulic acid, polysaccharides, alcohol-soluble extracts, water-soluble extracts, total ash, and acid-insoluble ash) were used to establish a quantitative evaluation model for the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces with AHP-EWA. **Results** There was correlation between the total sugar and alcohol content of the excipient rice wine and the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces. **Conclusion** The type of rice wine has certain influence on the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces. AHP-EWA can be used to determine the weight of each index, improve the reliability of the evaluation results, and provide a reference for the quality control of wine *Angelica sinensis* decoction pieces.

Key words: analytic hierarchy process; entropy weight method; wine *Angelica sinensis*; quality evaluation

基金项目：国家重点研发计划资助（No.2018YFC1707000）。

作者简介：杨子烨，女，在读硕士研究生，主要从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究，email：903207161@qq.com *通信作者：王英姿，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究，email：wangyzi@sina.com

当归是伞形科植物 *Angelicae sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根，药用历史悠久，具有补血活血，调经止痛的功效[1]，经酒炙后可以增强其活血化瘀、通经活络的作用，引药上行[2]。2020 年版《中国药典》四部通则 0213 规定“酒炙时，除另有规定，一般用黄酒”，但由于黄酒的种类繁多，其酒精度、含糖量、总酸等理化性质各不相同，对饮片质量的影响程度也不同[3-4]，目前未见黄酒种类对酒当归饮片质量影响的研究报道。

因此，本试验在黄酒理化性质的基础上，以市场上常用的干型、半干型、半甜型黄酒炮制的 15 批酒当归饮片为研究对象，以饮片中阿魏酸、多糖、醇溶浸出物、水溶浸出物、总灰分、酸不溶性灰分为指标，采用层次分析法（AHP）- 熵权法（EWA）对其进行综合评价，为酒当归饮片的药效物质基础及饮片质量评价研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

MS-5 型炒货机（迈斯机械有限公司）；日本岛津高效液相色谱仪（SIL-20A 自动进样器，SPD-20A 紫外可见检测器，CTO-10A SVP 柱温箱）；BSI10 型 1/1 万电子天平（Sartorius）；KH7200DB 型数控超声波清洗机（昆山禾创超声仪器有限公司）；ZN-02 小型粉碎机（北京兴时利和科技发展有限公司）；Research plus 单道可调量程移液器（3120000267，德国 Eppendorf）；电热恒温鼓风干燥箱（DHG-9030A，北京北方利辉实验仪器设备有限公司）；紫外 - 可见分光光度计（756PC，上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；电热恒温水浴锅（HH-S4）、SX-2.5-10 箱式电阻炉（北京科伟永兴仪器有限公司）；涡旋仪（MX-S，DRAGONLAB）；U-3010 型色度仪（日本株式会社日立高新技术）。

1.2 试药

生当归饮片（北京华邈药业有限公司，批号：XE0241），经北京中医药大学刘春生教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根。乙腈、甲醇 [色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，其余试剂均为分析纯，水为纯净水。阿魏酸对照品（批号：110773-201614，纯度：99.0%，中国食品药品检定研究院），无水葡萄糖对照品（批号：E1624080，纯度≥ 99.0%，aladdin）；5% 苯酚溶液（Biotopped）。

收集了 15 批黄酒，涵盖 11 个黄酒产地及 3 种黄酒类型，黄酒的类型由总糖含量区分，GB/T 13662-2018《黄酒》国家推荐标准规定：干黄酒含糖量小于 15 g • L^{-1}，半干黄酒含糖量为 15 ～ 40 g • L^{-1}，半甜型黄酒含糖量为 40.1 ～ 100 g • L^{-1}。黄酒的具体信息见表 1。

表 1 黄酒样品信息

Tab 1 Sample information

编号	来源	产地	类型	批号
J1	会稽山加饭酒	浙江绍兴	半干型	6905321179012
J2	老恒和陈年花雕酒	浙江湖州	半干型	6914239201579
J3	绍兴元红酒	浙江绍兴	干型	6921334981084
J4	塔牌陈年贡酒	浙江绍兴	干型	6901206031055
J5	绍兴黄酒	浙江绍兴	干型	6910384699612
J6	企业提供 1	北京	干型	190801
J7	企业提供 2	甘肃临夏	半甜型	6918104518182
J8	即墨黄酒	山东青岛	半甜型	6903608015732
J9	企业提供 3	浙江杭州	干型	F-SYHJ-19-13
J10	企业提供 4	浙江绍兴	半干型	6925455803157
J11	石库门黄酒	上海	半干型	6025455803157
J12	企业提供 5	河北保定	半干型	D210101
J13	企业提供 6	浙江杭州	干型	F-SYHJ-19-12
J14	古南丰黄酒	安徽宣城	半干型	6920761100792
J15	银明黄酒	四川南充	半干型	6920398557884

2 方法与结果

2.1 样品的制备

分别取当归饮片 100 g，加不同种类辅料黄酒（J1 ～ J15）10 mL、拌匀，闷润 1.0 h 至黄酒被吸尽，于 120 ℃炒制 15 min，取出放凉，即得（S1 ～ S15）。

2.2 黄酒理化性质测定

取收集的 15 批黄酒，根据 GB/T 13662-2018《黄酒》中相关方法对理化性质（总糖、非糖固形物、总酸、氨基酸态氮、氧化钙、酒精度和 pH 值）进行测定，结果见表 2，各批黄酒理化性质具有一定差异，但均符合国家辅料标准。

2.3 阿魏酸的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Agilent Extend-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：乙腈 -0.085% 磷酸（17∶83），检测波长：316 nm，进样量：10 μL，进样时间：30 min，流速：1.0 mL • min^{-1}，柱温：35 ℃，HPLC 色谱图见图 1。

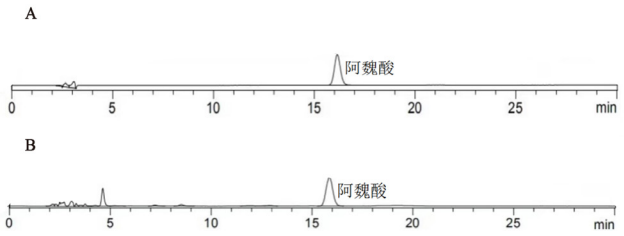


图 1 对照品（A）和酒当归供试品（B）的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of the reference substance（A）and wine *Angelica sinensis* decoction pieces（B）

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取酒当归粉末（过 3 号筛）0.20 g，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，

表 2 黄酒理化性质测定结果 (n = 3)

Tab 2 Physical and chemical property of rice wine (n = 3)

样品	总糖 /（g·L^{-1}）	非糖固形物 /（g·L^{-1}）	总酸 /（g·L^{-1}）	氨基酸态氮 /（g·L^{-1}）	氧化钙 /（g·L^{-1}）	酒精度 /%	pH
J1	33.600	32.440	5.295	0.684	0.025	17.197	4.21
J2	32.480	38.173	5.640	0.698	0.021	16.853	4.18
J3	7.600	17.627	3.936	0.362	0.079	13.006	4.09
J4	10.000	31.120	3.957	0.651	0.031	16.023	4.19
J5	14.000	18.993	3.657	0.593	0.001	12.507	4.04
J6	12.000	14.467	3.242	0.303	0.008	13.057	4.09
J7	49.600	56.464	3.894	0.420	0.233	13.037	4.07
J8	50.300	13.341	4.137	0.420	0.088	13.667	4.28
J9	8.600	26.124	3.867	0.476	0.026	11.237	4.19
J10	30.000	19.087	3.977	0.266	0.050	13.433	4.15
J11	30.600	22.880	6.930	1.134	0.247	14.532	4.59
J12	30.800	16.820	2.970	0.392	0.058	14.940	4.35
J13	9.600	51.560	6.210	0.266	0.516	12.320	4.53
J14	31.400	14.460	4.230	0.658	0.092	14.000	4.25
J15	16.600	22.560	3.209	0.406	0.155	8.665	4.53

精密加入 70% 甲醇 20 mL，密塞，称定质量，于 80 ℃水浴加热回流 30 min，放冷，再次称定质量，用 70% 甲醇补足减失的质量，摇匀后静置，取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 5.10 mg 置于 50 mL 棕色量瓶中，加 70% 甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，作为对照品备用液。精密吸取 2.5 mL 对照品备用液，置于 25 mL 棕色量瓶中，用 70% 甲醇定容至刻度，摇匀后即得 10.10 μg·mL^{-1} 的阿魏酸对照品溶液。

2.3.4 线性关系考察 称取适量阿魏酸对照品，配制质量浓度分别为 2、6、10、16、18、20 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，进样测定，以峰面积为纵坐标，样品质量浓度为横坐标，得回归方程为：$A = 6.07\times10^4C + 2.71\times10^4$，$R^2 = 0.9992$，结果表明阿魏酸在 2 ～ 20 μg·mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取“2.3.3”项下的对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，结果阿魏酸峰面积的 *RSD* 为 0.38%，表明精密度良好。

2.3.6 重复性试验 精密称取同一批酒当归样品粉末共 6 份，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，得阿魏酸含量的 *RSD* 为 1.9%，结果表明方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 精密称取同一批酒当归供试品溶液，分别在 0、2、4、8、10、12 h 时进样分析，得阿魏酸含量的 *RSD* 为 0.83%，结果表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.8 加样回收试验 精密称取适量已知阿魏酸含量的同一批酒当归样品粉末 6 份，按照等比的量分别精密加入阿魏酸对照品，制备供试品溶液，进样测定。得阿魏酸的回收率在 96.76% ～ 104.51%，平均回收率为 101.74%，*RSD* = 1.1%，表明该方法准确可靠。

2.3.9 样品含量测定 分别取 15 批酒当归粉末，制备样品溶液，依“2.3.1”项下色谱条件测定。计算酒当归中阿魏酸指标成分的含量，结果见表 3。

表 3 黄酒炒制当归饮片中主要成分平均含量 (n = 3，%)

Tab 3 Average content of main components in different wine *Angelica sinensis* decoction pieces (n = 3，%)

编号	阿魏酸	多糖	醇溶浸出物	水溶浸出物	总灰分	酸不溶性灰分
S1	0.052	4.970	0.611	0.622	5.340	0.480
S2	0.051	4.510	0.609	0.639	5.290	0.420
S3	0.050	4.100	0.542	0.588	4.790	0.580
S4	0.045	3.570	0.594	0.593	4.490	0.380
S5	0.050	4.300	0.539	0.535	5.000	0.560
S6	0.050	4.250	0.510	0.599	5.020	0.540
S7	0.050	4.020	0.555	0.623	5.330	0.700
S8	0.048	3.860	0.584	0.624	4.970	0.480
S9	0.040	3.970	0.605	0.624	4.740	0.540
S10	0.048	3.790	0.602	0.607	5.000	0.410
S11	0.045	4.280	0.584	0.646	4.840	0.360
S12	0.049	4.120	0.592	0.643	5.030	0.360
S13	0.049	3.020	0.601	0.604	6.290	0.520
S14	0.048	4.410	0.596	0.567	4.480	0.390
S15	0.047	3.650	0.607	0.576	4.570	0.410

2.4 当归多糖的含量测定

2.4.1 测定条件 精密量取供试品溶液 1.0 mL，置具塞试管中，加入 5% 苯酚溶液 2.0 mL，再加入浓硫酸 7 mL，涡旋摇匀 20 s 后置于 70 ℃水浴中加热 20 min，取出，冰浴 5 min 后静置 1 h。另以蒸馏水 1.0 mL 加入相应的试剂同法操作作为空白，在 490 nm 处测定吸光度。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取在 105 ℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 10.38 mg，置于 100 mL 棕色量瓶中，用蒸馏水溶解并稀释至刻度，摇匀，得 0.1038 mg·mL^{-1} 的葡萄糖对照品溶液。

2.4.3　供试品溶液的制备　精密称取酒当归样品粉末（过 3 号筛）0.20 g，精密称定，加 80% 乙醇 100 mL 回流 1 h，滤过，弃去滤液。滤渣加水 50 mL 回流 2 h，趁热抽滤，滤液全部转移到 100 mL 棕色量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，摇匀即得。

2.4.4　线性关系考察　取葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，分别加水稀释至 2 mL，取样 1 mL，置于具塞试管中，显色，于 490 nm 下测定吸光度，以溶液质量浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标，得到线性回归方程：$A = 0.105C - 0.0135$，$R^2 = 0.999$。结果表明，当归多糖在 5.19 ～ 51.90 μg • mL^{-1} 与吸光度呈良好的线性关系。

2.4.5　精密度试验　取对照品溶液 1 mL，显色后于 490 nm 处测定吸光度，重复 6 次，结果吸光度 *RSD* 为 0.055%，说明仪器精密度良好。

2.4.6　重复性试验　精密称取同一批当归样品粉末，平行制备 6 份供试品溶液，显色后分别在 490 nm 处测定吸光度并计算含量，结果吸光度 *RSD* 为 1.4%，表明该方法重复性良好。

2.4.7　稳定性试验　精密称取样品粉末，制备供试品溶液，分别于显色后 0、10、20、40、60、120 min 时测定，结果吸光度 *RSD* 为 0.57%，表明样品在 120 min 内稳定性良好。

2.4.8　加样回收试验　精密称取已知多糖含量的酒当归样品 6 份，等比分别精密加入葡萄糖对照品溶液，制备供试品溶液，显色后，于 490 nm 处测定并计算，结果加样回收率分别为 98.64%、101.14%、101.65%、99.81%、97.27%、102.14%，*RSD* 为 1.9%，表明该方法准确度高。

2.5　浸出物的含量测定

用 70% 乙醇和水作为溶剂，照 2020 年版《中国药典》四部通则 2201 热浸法测定，计算供试品中醇溶性浸出物和水溶性浸出物的含量，结果见表 3。

2.6　总灰分和酸不溶性灰分

按照 2020 年版《中国药典》四部通则 2302 计算总灰分和酸不溶性灰分含量，结果见表 3。

2.7　权重系数的组合赋权

2.7.1　AHP 主观赋权　根据酒当归饮片各指标间的相互关系，建立了 3 个层次的综合评价模型，分别为目标层 A、指标层 B 和方案层 C，见图 2。第一层为目标层，即不同酒当归的质量评价；第二层为指标层，即与酒当归质量相关的影响因子；第三层为方案层，即酒当归样品。根据酒当归中各指标成分的重要性及含量，确定 6 项指标的优先顺序：阿魏酸＞多糖＞醇溶浸出物＝水溶浸出物＞总灰分＝酸不溶性灰分，构建各指标成分的成对比较的优先矩阵。按照公式（1）计算初始权重系数，据公式（2）计算归一化权重系数。模型的随机一致性比率 $CR = CI/RI$，可以验证所得权重系数是否合理，当 $CR < 0.1$ 时，可判定矩阵符合一致性检验 [5-7]。比较矩阵情况及各参数结果见表 4。

$$A_j' = (a_{j1}a_{j2}\cdots a_{jm})^{1/m} \quad (1)$$

$$A_j = A_j' / \sum_{j=1}^{m} A_j' \quad (2)$$

表 4　酒当归中 6 个指标两两比较的判断优先矩阵及权重系数

Tab 4　Judgment priority matrix and weight coefficient of 6 indexes in wine *Angelica sinensis* decoction pieces

指标成分	阿魏酸	多糖	醇溶浸出物	水溶浸出物	总灰分	酸不溶性灰分	A_j'	A_j	λ_{max}	*CR*
阿魏酸	1	2	3	3	5	5	2.334	0.389	6.000	0.000
多糖	1/2	1	3/2	3/2	5/2	5/2	1.170	0.195		
醇溶浸出物	1/3	2/3	1	1	5/3	5/3	0.780	0.130		
水溶浸出物	1/3	2/3	1	1	5/3	5/3	0.780	0.130		
总灰分	1/5	2/5	3/5	3/5	1	1	0.468	0.078		
酸不溶性灰分	1/5	2/5	3/5	3/5	1	1	0.468	0.078		

2.7.2　EWA 客观赋权　熵权法是计算指标的信息熵，利用指标的差值程度来衡量已知数据中包含的有效信息和指标权重，可用于在多指标评价系统中用来确定各指标权重 [8]。集合酒当归 15 个评价对象和 6 个评价指标，形成熵权评价体系的初始数据矩阵 $A = \{X_{ij}\}$（$i = 1、2、3\cdots m$；$j = 1、2、3\cdots n$）。然后对每个指标原始数据按照公式 3 进行标准化处理。根据熵的定义（公式 4），确定各个指标的熵值 H_1、H_2、$H_3\cdots H_j$。最后根据熵值计算评价指标的权重（公式 5），具体结果见表 5。

$$Y_{ij} = [X_{ij} - \min(X_i)]/[\max(X_i) - \min(X_i)] \quad (3)$$

$$H_{ij} = -(1/\ln n)\sum_{i=1}^{n} f_{ij}\ln f_{ij} \quad (4)$$

$$W_j = (1 - H_j)/n - \sum_{j=1}^{n} H_j \quad (5)$$

2.7.3　组合权重的确定　采用 AHP 得到的指标权重与 EWA 得到的指标熵权相结合，根据 $W_{综合} = A_jW_j/\sum_{J=1}^{n} A_jW_j$ 得到综合权重 [9]。确定得阿魏酸、多糖、醇溶浸出物、水溶浸出物、总灰分、酸不溶性灰分最终权重分别为 0.347、0.213、0.147、0.144、0.064、0.086。

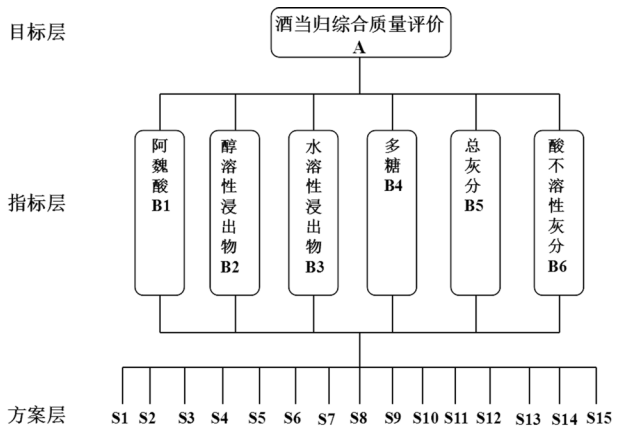


图 2　AHP 评价结构模型

Fig 2　Structure model evaluation by analytic hierarchy process

表 5　EWA 计算酒当归各指标信息熵及权重

Tab 5　Information entropy and weight of each index in wine *Angelica sinensis* decoction pieces by EWA

指标	信息熵 H_j	权重 W_j
阿魏酸	0.9639	0.1452
多糖	0.9558	0.1781
醇溶浸出物	0.9543	0.1840
水溶浸出物	0.9551	0.1806
总灰分	0.9669	0.1333
酸不溶性灰分	0.9556	0.1788

2.7.4　综合评分　从质量评价的角度分析，阿魏酸、多糖、醇溶浸出物和水溶浸出物的含量越高质量越好，总灰分和酸不溶性灰分含量越低质量越好[10-11]。因此，为了统一评价标准，将总灰分和酸不溶性灰分含量进行取倒数转换。评价指标统一后，将酒当归饮片含量测定原始数据进行标准化处理，按公式 $Y_{ij} = (X_{ij} - \min X_{ij}) / (\max X_{ij} - \min X_{ij})$ 进行计算，结果见表 6。

表 6　酒当归饮片原始数据标准化

Tab 6　Standardization of the original data of wine *Angelica sinensis* decoction pieces

编号	阿魏酸	多糖	醇溶浸出物	水溶浸出物	总灰分	酸不溶性灰分
S1	1.0000	1.0000	1.0000	0.8348	0.4403	0.4853
S2	0.9426	0.7641	0.9771	1.0000	0.4679	0.7059
S3	0.8443	0.5538	0.3151	0.5082	0.7751	0.2191
S4	0.4016	0.2821	0.8360	0.5556	0.9923	0.8916
S5	0.8443	0.6564	0.2873	0.0000	0.6386	0.2647
S6	0.8689	0.6308	0.0000	0.6135	0.6262	0.3137
S7	0.8443	0.5128	0.4414	0.8435	0.4458	0.0000
S8	0.6393	0.4308	0.7326	0.8599	0.6574	0.4853
S9	0.0000	0.4872	0.9423	0.8580	0.8094	0.3137
S10	0.7131	0.3949	0.9125	0.6899	0.6386	0.7489
S11	0.4508	0.6462	0.7276	1.0715	0.7415	1.0000
S12	0.7295	0.5641	0.8072	1.0386	0.6200	1.0000
S13	0.7869	0.0000	0.9036	0.6618	0.0000	0.3665
S14	0.6639	0.7128	0.8539	0.3034	1.0000	0.8416
S15	0.5574	0.3231	0.9612	0.3942	0.9316	0.7489

根据综合评价函数计算不同批酒当归饮片的综合得分并进行排序。综合得分＝阿魏酸 ×0.347 ＋多糖 ×0.213 ＋醇溶浸出物 ×0.147 ＋水溶浸出物 ×0.144 ＋总灰分 ×0.064 ＋酸不溶性灰分 ×0.086。不同黄酒炮制酒当归饮片的各指标含量及综合评分各不相同，表明酒当归饮片质量与黄酒种类有关，结果见表 7。

表 7　不同黄酒对酒当归饮片影响的综合评价结果

Tab 7　Effect of different rice wine on wine *Angelica sinensis* decoction pieces

编号	综合评分	综合排序	编号	综合评分	综合排序
S1	89.71	1	S5	59.89	9
S2	86.81	2	S3	59.13	10
S12	76.72	3	S6	58.43	11
S11	68.88	4	S15	54.25	12
S14	68.78	5	S4	53.87	13
S10	67.03	6	S13	53.27	14
S8	62.89	7	S9	44.46	15
S7	61.71	8			

2.7.5　黄酒理化性质与酒当归质量相关性分析　采用 SPSS 20.0 统计软件对黄酒理化性质指标与酒当归饮片质量 AHP-EWA 综合评分进行相关性分析，结果显示黄酒的总糖、酒精度与酒当归质量具有明显相关性，见表 8。当总糖含量在 8.6 ～ 33.6 g • L^{-1}（干型、半干型），相关系数 r 达到 0.812（$P < 0.01$），两者关系更紧密。

表 8　黄酒理化性质与酒当归饮片质量的相关性分析结果 (*r*)

Tab 8　Correlation between physical and chemical properties of rice wine and the quality of wine *Angelica sinensis* decoction pieces (*r*)

相关系数	总糖	非糖固形物	总酸	氨基酸态氮	氧化钙	酒精度	pH
r	0.515$^{\#}$	0.007	0.334	0.376	－0.249	0.752$^{\#\#}$	0.0095

注（Note）：$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

2.7.6　酒当归有效成分含量与颜色值相关性分析　利用色度仪对 15 批酒当归饮片样品进行测定。以 D65 为光源，经标准白板校正后，记录色度值 L^*（表示明度）、a^*（表示红绿方向）、b^*（表示黄蓝方向）。样品颜色可用总色值 E^*ab 表示，公式为 $E^*ab = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$。每个样品重复测定 3 次，取平均值，结果见表 9。采用 SPSS 20.0 统计软件对酒当归饮片中阿魏酸、多糖、醇溶浸出物、水溶浸出物、总灰分、酸不溶性灰分含量与颜色值 L^*、a^*、b^*、E^*ab 进行相关性分析。结果显示，阿魏酸含量与 a^*、b^* 成正相关；多糖含量与 L^*、E^*ab 成正相关，见表 10。

3　讨论

本研究初步表明了不同种类黄酒炮制的酒当归饮片质量存在一定的差异。J1、J2、J10、J11、

表 9　15 批酒当归有效成分含量与颜色值测定结果 (n = 3)

Tab 9　Content of active ingredients and color values of 15 batches of wine *Angelica sinensis* decoction pieces

编号	*L**	*a**	*b**	*E*ab*
J1	79.47	2.31	22.41	82.60
J2	78.99	2.27	22.01	82.03
J3	80.72	2.29	21.73	83.63
J4	75.69	2.03	20.41	78.42
J5	80.34	2.35	21.94	83.32
J6	80.16	2.36	22.02	83.16
J7	79.95	2.32	21.83	82.91
J8	78.96	2.26	20.93	81.72
J9	79.55	2.16	20.07	82.07
J10	78.21	2.28	22.12	81.31
J11	79.07	2.14	20.79	81.79
J12	79.67	2.19	21.57	82.57
J13	76.52	2.26	21.16	79.42
J14	77.11	2.16	20.68	79.86
J15	78.41	2.03	20.11	80.97

表 10　酒当归饮片有效成分含量与颜色值相关性分析结果 (r)

Tab 10　Correlation between content of active ingredients and color values of wine *Angelica sinensis* decoction pieces (r)

指标成分	*L**	*a**	*b**	*E*ab*
阿魏酸	0.273	$0.656^{\#\#}$	$0.817^{\#\#}$	0.363
多糖	$0.540^{\#}$	0.345	0.473	$0.565^{\#}$
醇溶浸出物	− 0.557	− 0.550	− 0.367	− 0.566
水溶浸出物	0.103	− 0.019	0.076	0.107
总灰分	− 0.027	0.533	0.453	0.036
酸不溶性灰分	0.501	0.626	0.314	0.507

注（Note）：$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

J12、J14 半干型黄酒炮制的酒当归饮片综合评分较高，其次是 J7、J8 半甜型黄酒炮制的饮片，J3、J4、J5、J6、J9、J13 干型黄酒炮制的饮片综合评分较低。相关性分析发现，黄酒的理化性质中总糖的含量与酒当归饮片质量有较明显的相关性，且总糖含量在 8.6 ～ 33.6 g • L^{-1}（干型、半干型），与酒当归饮片质量成正相关。另外，酒精度与酒当归质量具有显著相关性，酒精度在 8.665% ～ 17.197% 与酒当归饮片质量成正相关。S15 酒当归饮片为半干型黄酒 J15 炮制，但其质量综合评分较低，可能是因为在用 AHP-EWA 计算时，阿魏酸是药典规定的酒当归的指标成分，多糖为酒当归中的主要药理活性成分 [12-13]，因此赋予阿魏酸、多糖权重系数高于其他指标成分，而 S15 酒当归饮片中测得的阿魏酸、多糖含量较低，故该批次综合评分较低；且 S15 炮制使用的黄酒 J15 的酒精度在 15 批黄酒样品中最低，本研究结果和文献报道都表明酒精度与酒当归质量具有明显相关性 [3]，因此 S15 酒当归饮片质量评分低于其他半干型黄酒炮制的酒当归饮片质量评分。不同黄酒炮制的酒当归饮片颜色具有一定的差异，酒当归饮片有效成分含量与其颜色值相关性分析发现，色度值与阿魏酸、多糖具有显著正向关联性。在一定程度上 *a**、*b** 越高，阿魏酸含量越高；*L**、*E*ab* 越高，多糖含量越高。本研究表明，酒当归指标成分阿魏酸、多糖与饮片表观颜色值具有显著相关性。

本试验在研究黄酒理化性质差异的基础上，对酒当归中阿魏酸、多糖、醇溶浸出物、水溶浸出物、总灰分、酸不溶性灰分含量进行测定，并采用 AHP-EWA 法对酒当归饮片进行综合质量评价，探讨了辅料黄酒内在性质对酒当归质量的影响，结果表明该方法可使酒当归质量评价结果更客观，可为其他中药材及中药饮片的质量评价提供参考。

参考文献

[1] 翁倩倩，赵佳琛，金艳，等 . 经典名方中当归的本草考证 [J]. 中国现代中药，2021，23（2）：218-227.

[2] 钮敏洁，蔡皓，曹岗 . 中药酒制及其机理研究概述 [J/OL]. 中药材，2020，43（11）：2838-2842.

[3] 刘爽，张振凌，李军，等 . 基于主成分分析法评价不同种类辅料对酒白芍饮片的影响 [J]. 中药材，2019，42（1）：78-82.

[4] 吴国学，张振凌 . 不同种类酒炮炙对牛膝饮片指纹图谱的影响 [J]. 世界中医药，2017，12（6）：1443-1446.

[5] 李慧，刘其南，张丽，等 . 基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺 [J]. 中草药，2016，47（16）：2832-2837.

[6] 顾志荣，潘新波，王亚丽，等 . 基于 AHP 和 BPNN 结合模型优化当归烟熏加工工艺 [J]. 中国新药杂志，2014，23（22）：2664-2670.

[7] 周亚福，李思锋，黎斌，等 . 基于层次分析法的秦岭重要药用植物资源评价研究 [J]. 中草药，2013，44（15）：2172-2182.

[8] 忻晓东，张秀芳，王舒琪，等 . 艾叶挥发油提取工艺研究 [J]. 中药材，2020，43（1）：150-154.

[9] 曲彤，袁培培，张琳，等 . 基于 AHP- 熵权法结合 D- 最优设计响应面法优化玄参蒸制工艺 [J]. 中草药，2019，50（10）：2325-2331.

[10] 周苏娟，麦小梅，赵斌，等 . TOPSIS 与灰色关联分析在不同产地炒莪蔚子质量评价中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（15）：40-43.

[11] 冯治国，赵祺，朱强，等 . 基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量 [J]. 中草药，2021，52（12）：3689-3695.

[12] 王虎山 . 酒当归炮制工艺及质量标准研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2004.

[13] 华永丽，郭延生，杨洪申，等 . 酒当归饮片质量标准研究 [J]. 中成药，2010，32（10）：1724-1729.

（收稿日期：2021-08-09；修回日期：2021-09-29）

Box-Behnken 设计 - 响应面法优化木瓜标准汤剂的制备工艺

聂淞莹[1]，唐海明[2]，汪鋆植[1*]，王丹阳[1]，颜华玲[1]，胡浩宁[1]，黄永梅[1]（1. 三峡大学生物与制药学院，湖北 宜昌 443000；2. 湖北恒安芙林药业股份有限公司，湖北 宜昌 443103）

摘要：目的 优化木瓜标准汤剂的制备工艺，为木瓜配方颗粒的制备提供参考。**方法** 以加水量、煎煮时间、煎煮次数为影响因素，绿原酸、原儿茶酸、*L*- 苹果酸、莽草酸、奎尼酸含量和出膏率为评价指标，层次分析法结合 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化制备工艺。**结果** 最佳条件为药材饮片加 8 倍量水，煎煮 3 次，一煎 40 min，二、三煎均为 30 min。**结论** 该方法合理可行，可为工业生产、产业开发和木瓜标准汤剂的提取工艺提供理论基础。

关键词：木瓜；标准汤剂；制备工艺；层次分析；响应面法
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0310-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.012

Optimization of preparation technology of standard decoction of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai by Box-Behnken design and response surface method

NIE Song-ying[1], TANG Hai-ming[2], WANG Jun-zhi[1*], WANG Dan-yang[1], YAN Hua-ling[1], HU Hao-ning[1], HUANG Yong-mei[1] (1. *College of Biology Pharmacy*, *China Three Gorges University*, *Yichang Hubei* 443000; 2. *Hubei Heng'an Fulin Pharmaceutical Industry Group Co.*, *Ltd*, *Yichang Hubei* 443103)

Abstract: Objective To optimize the preparation of standard decoction of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai C. *speciosa*, and provide reference for the preparation of formula granules of C. *speciosa*. **Methods** The volume of water added, decocting time and times were used as the factors, the content of chlorogenic acid, protocatechuic acid, *L*-malic acid, shikimic acid, quinic acid and dry extract rate as the evaluation indexes to optimize the preparation by analytic hierarchy process (AHP) combined with response surface Box-Behnken design. **Results** The optimum conditions were as follows: decoction with 8 times of water for 3 times, the first time for 40 min, the second and third time each 30 min. **Conclusion** The method is reasonable and feasible, and can provide theoretical basis for the industrial production, development and extraction of standard decoction of C. *speciosa*.

Key words: *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai; standard decoction; preparation technology; analytic hierarchy process method; response surface method

木瓜又名“皱皮木瓜”“铁脚梨”，为蔷薇科植物贴梗海棠[*Chaenomeles speciosa*（Sweet）Nakai] 的干燥近成熟的果实，具有舒筋活络、和胃化湿的作用，主要化学成分为三萜类、苯丙素类、黄酮类、有机酸类等。其具有镇痛、抗炎、增强免疫、保肝、抗胃溃疡与肠损伤、抗肿瘤等药理活性[1]。中药饮片标准汤剂是基于中医理论和临床用药，参考现代提取方法，经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎剂[2]。由于中药材成分复杂，且受产地、区域、气候、环境、加工方式的影响[3-5]，传统汤剂制备工艺很难保证临床疗效的一致性和制备工艺的合理性。因此，本文采用多指标层次分析法（AHP）[6-7] 计算各指标权重，并结合 Box-Behnken 响应面法优化木瓜标准汤剂的制备工艺参数，旨在为木瓜标准汤剂的制备提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

基金项目：湖北省科技重大专项（No.2020AC007）。

作者简介：聂淞莹，男，在读硕士研究生，主要从事药品质量控制研究，email：niesongyin@163.com *通信作者：汪鋆植，男，博士，教授，主要从事土家族药物活性评价和质量控制研究，email：horsedog@163.com

Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱系统（包括高压输液系统、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外可见光检测器、数据处理系统，赛默飞科技有限公司）；RE-52AA 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；TD24K 离心机（湖北湘仪仪器公司），PB-10 型 pH 计（德国赛多利斯公司）；XSE205DU 型十万分之一电子天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司），ME204T/02 型万分之一天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司），DTC-27 型数控超声波清洗器（湖北鼎泰高科有限公司）。

1.2　试药

绿原酸（批号：110753-202018，含量：96.1%）、原儿茶酸（批号：110809-201906，含量：97.7%）、*L*- 苹果酸（批号：190014-201302，含量：100%）（对照品，中国食品药品检定研究院）；莽草酸（批号：C11015240）、奎尼酸（批号：C11520221）（对照品，含量≥ 98%，上海麦克林生化科技有限公司）；木瓜药材购自湖北宜昌市长阳土家族自治县，经三峡大学王玉兵教授鉴定为贴梗海棠的干燥近成熟果实，符合 2020 年版《中国药典》一部要求。乙腈为色谱纯（湖北弗顿生化科技有限公司）；乙醇为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；磷酸为分析纯（天津市科密欧化学试剂有限公司）；水为超纯水（经 Milli-Q Reference 系统净化），其余试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　各成分含量测定

2.1.1　色谱条件　采用 Agilent ZORBAX SB-Aq（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱；流动相乙腈（A）-0.01% 磷酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 8 min，1%A；8 ～ 15 min，1% ～ 8%A；15 ～ 25 min，8% ～ 10%A；25 ～ 35 min，10% ～ 15%A；35 ～ 40 min，15%A；40 ～ 45 min，15% ～ 1%A；45 ～ 55 min，1%A）；检测波长 0 ～ 8 min：212 nm；9 ～ 55 min：280 nm；流速 0.8 mL • min $^{-1}$；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2　对照品溶液制备　分别精密称取各对照品适量，用流动相 B 溶解，制成质量浓度分别为绿原酸 99.5 μg • mL $^{-1}$、原儿茶酸 18.5 μg • mL $^{-1}$、*L*- 苹果酸 1940.0 μg • mL $^{-1}$、莽草酸 536 .0 μg • mL $^{-1}$、莽草酸 4176.0 μg • mL $^{-1}$ 的储备液，各精密吸取适量，用流动相 B 稀释，即得各质量浓度分别为 40.3、9.3、194.0、106.2、208.8 μg • mL $^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3　供试品溶液制备　精密吸取木瓜水煎液 10 mL，置于 50 mL 量瓶中，无水乙醇定容至刻度，醇沉 2 h，4000 r • min $^{-1}$ 离心 5 min，精密吸取上清液 5 mL，蒸干，残渣加入流动相 B 溶液溶解，定容至 10 mL，摇匀，即得，置于 4 ℃冰箱中保存。

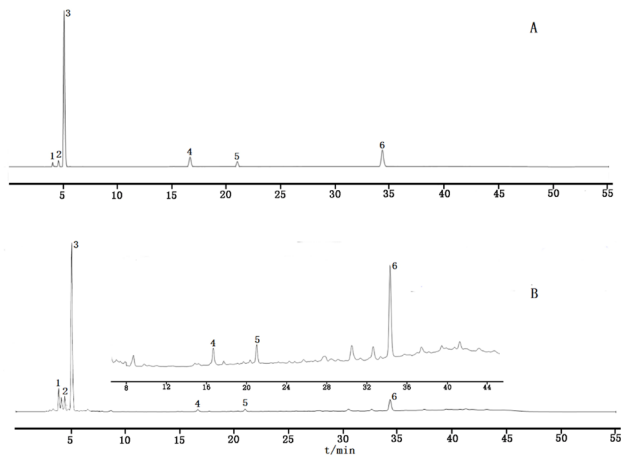


图 1　混合对照品溶液（A）及木瓜提取样品溶液（B）的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of mixed reference substance（A）and extracted C. *speciosa* sample（B）

1. 奎尼酸（quinic acid）；2. *L*- 苹果酸（*L*-malic acid）；3. 莽草酸（shikimic acid）；4.5- 羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural）；5. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；6. 绿原酸（chlorogenic acid）

2.1.4　线性关系考察　精密吸取“2.1.2”项下对照品储备液适量，流动相 B 溶液配制成 6 种系列质量浓度的溶液，各进样 10 μL 测定。以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，结果见表 1。

表 1　各成分线性关系

Tab 1　Linearity of various constituents

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg•mL $^{-1}$）
绿原酸	$Y = 0.3288x - 0.3177$	0.9998	9.9 ～ 99.5
原儿茶酸	$Y = 0.3303x - 0.0105$	0.9999	0.925 ～ 18.5
L- 苹果酸	$Y = 0.0082x - 0.0381$	0.9996	97 ～ 1940
莽草酸	$Y = 0.4993x + 0.3606$	0.9999	26.8 ～ 536
奎尼酸	$Y = 0.0053x - 0.1515$	0.9997	208.8 ～ 4176

2.1.5　精密度试验　精密吸取对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测得绿原酸、原儿茶酸、*L*- 苹果酸、奎尼酸、莽草酸峰面积的 *RSD* 分别为 0.71%、1.4%、1.2%、0.16%、1.6%，表明仪器精密度良好。

2.1.6　重复性试验　取同一制备工艺下的标准汤剂，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，测得绿原酸、原儿茶酸、*L*- 苹果酸、奎尼酸、莽草酸峰面积的 *RSD* 分别为 0.94%、1.6%、1.9%、0.62%、1.0%，表明该方法重复性良好。

2.1.7　稳定性试验　取同一份供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，测得绿原酸、原儿茶酸、*L*- 苹果酸、奎尼酸、莽草酸峰面积 *RSD* 分别为 1.2%、0.95%、0.78%、1.4%、1.3%，

表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8　加样回收试验　精密吸取供试品溶液 5 mL，共 6 份，精密加入对照品溶液适量，进样测定，计算回收率。结果绿原酸、原儿茶酸、*L*-苹果酸、奎尼酸、莽草酸平均加样回收率分别为 96.9%、98.2%、98.6%、99.5%、99.5%，*RSD* 分别为 2.5%、1.8%、1.9%、0.86%、1.6%。

2.2　单因素试验

精密称取木瓜饮片 100 g，加入水浸泡 45 min，考察加水量（6、7、8、9、10 倍）、煎煮时间（20、30、40、50、60 min）、煎煮次数（1、2、3 次）、浓缩温度（50、60、70、80 ℃）等因素，以绿原酸、原儿茶酸、*L*-苹果酸、奎尼酸、莽草酸含量以及出膏率为指标，通过单因素控制变量法，绘制含量动态分布趋势图和出膏率动态图，结果见图 2。根据试验结果，考虑实际操作，选择加水量 8 倍、煎煮 30 min、煎煮 2 次作为响应面法的考察水平。

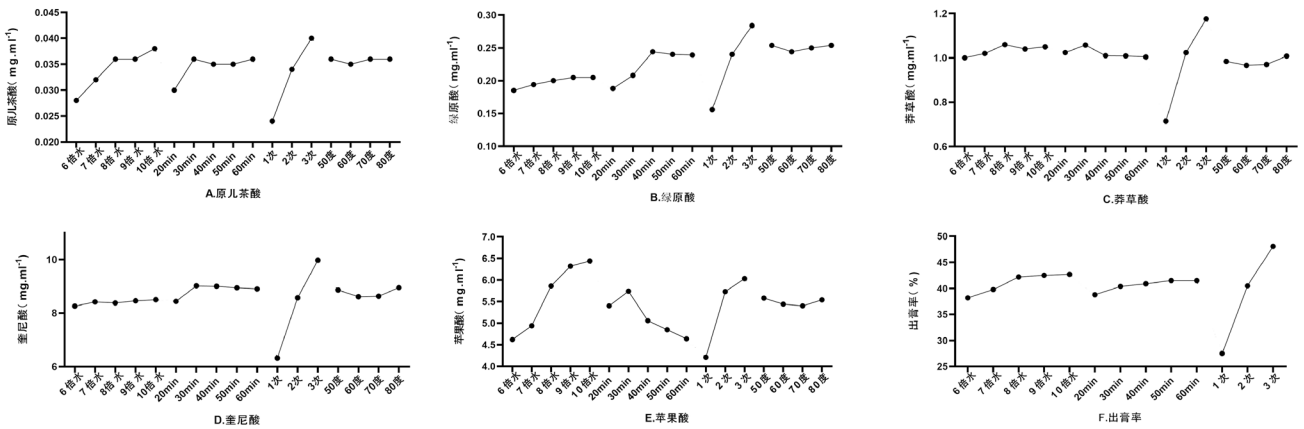


图 2　各成分含量及出膏率动态分布趋势

Fig 2　Dynamic distribution trends for various constituents content and dry extract rate

2.3　层次分析法计算权重

经测定，木瓜水煎液中主要含有绿原酸、原儿茶酸、莽草酸、*L*-苹果酸、奎尼酸等有机酸。根据木瓜标准汤剂药理、药效作用强弱、各成分含量 [8] 并结合文献 [9] 将权重指标予以量化。即将 6 个指标分为 4 个层次，并确定指标的优先顺序：出膏率＞绿原酸＞原儿茶酸＞*L*-苹果酸＝奎尼酸＝莽草酸，据此进行成对比较，构建优先判断矩阵，得到相对评分，结果见表 2，发现 *CR* ＜ 0.1，表明矩阵符合一致性检验，权重系数合理有效。综合评分 $Y = 0.2519\times$ 绿原酸含量＋ $0.1243\times$ 原儿茶酸含量＋ $0.0519\times$ 奎尼酸含量＋ $0.0519\times$ 莽草酸含量＋ $0.0519\times$*L*-苹果酸含量＋ $0.4682\times$ 出膏率。

表 2　各指标权重系数

Tab 2　Weight coefficients for various indicators

指标	绿原酸	原儿茶酸	*L*-苹果酸	奎尼酸	莽草酸	出膏率	权重系数	*CR*
绿原酸	1	3	5	5	5	1/3	0.2519	0.0218
原儿茶酸	1/3	1	3	3	3	1/5	0.1243	
苹果酸	1/5	1/3	1	1	1	1/7	0.0519	
奎尼酸	1/5	1/3	1	1	1	1/7	0.0519	
莽草酸	1/5	1/3	1	1	1	1/7	0.0519	
出膏率	3	5	7	7	7	1	0.4682	

2.4　响应面法

根据 Box-Behnken 试验设计原理，综合单因素影响试验结果，以加水量（A）、煎煮时间（B，第二、三煎加水量为第一次加水量－1 倍）、煎煮次数（C，第二、三煎煎煮时间为第一次煎煮时间－ 10 min）为考察因素。设计因素与水平表（见表 3）。以绿原酸、原儿茶酸、苹果酸、奎尼酸、莽草酸含量以及出膏率的综合评分为评价指标，响应面法优化制备工艺，结果见表 4。

采用 Design-Expert 10.0 软件进行多元线性回归和二项拟合，得到方程为 $Z = 0.19 + 0.012A + 4.087\times10^{-3}B + 0.042C + 1.45\times10^{-3}AB - 1.575\times10^{-3}AC + 6.875\times10^{-3}BC - 2.045\times10^{-3}A^2 + 5.705\times10^{-3}B^2 - 0.014C^2$（$R^2 = 0.9920$），方差分析见表 5，可知各因素影响程度依次为 C＞A＞B；模型 $P < 0.0001$，表明其达到极显著水平，失拟项不显著 $P = 0.1356 > 0.05$，说明模型合适。各因素之间两两交互作用对木瓜标准汤剂制备工艺的影响见图 3。可知最优工艺为加 8.173 倍水煎煮 39.919 min，煎煮 2.997 次，结合实际操作，将其修正为加 8 倍水煎煮 40 min，煎煮 3 次。

根据优化工艺进行 3 批验证试验，结果显示 3 份木瓜饮片标准汤剂的综合评分分别为 0.230、0.224、0.230，平均值为 0.228，*RSD* 为 1.7%。与预测值 0.240 较为接近，说明该工艺合理可行。

表 3 Box-Behnken 设计因素与水平表

Tab 3 Factor and level of Box-Behnken design

水平	因素		
	A. 加水量 / 倍	B. 煎煮时间 /min	C. 煎煮次数 / 次
－1	7	20	1
0	8	30	2
1	9	40	3

取木瓜饮片适量，按照一般饮片标准汤剂工艺（一煎 7 倍量水 30 min，二煎 6 倍量水 20 min，浓缩至 5 倍饮片质量）进行煎煮，平行 3 次，测得 6 种指标平均值分别为 0.192%、0.0457%、7.23%、9.21%、1.18%、36.15%，综合评分为 0.179。优化后的木瓜标准汤剂制备工艺综合评分优于一般制备工艺。

表 4 响应面试验方案与结果

Tab 4 Design and results of response surface method

序号	加水量 / 倍	煎煮时间 /min	煎煮次数 / 次	绿原酸 /%	原儿茶酸 /%	苹果酸 /%	奎尼酸 /%	莽草酸 /%	出膏率 /%	综合评分
1	9	20	2	0.262	0.0389	7.09	9.83	1.19	42.22	0.2078
2	8	30	2	0.188	0.0396	7.02	10.64	1.24	40.26	0.1988
3	8	30	2	0.243	0.0445	6.77	10.58	1.20	39.18	0.1937
4	7	40	2	0.192	0.0457	7.23	10.81	1.23	37.12	0.1843
5	8	30	2	0.301	0.0428	6.49	11.10	1.24	38.48	0.1907
6	8	30	2	0.285	0.0400	7.25	11.04	1.30	38.66	0.1919
7	9	40	2	0.289	0.0371	7.84	9.18	1.11	44.35	0.2178
8	8	40	1	0.203	0.0377	9.00	10.79	1.32	27.75	0.1414
9	8	30	2	0.297	0.0381	7.50	10.25	1.27	39.18	0.1941
10	7	30	3	0.276	0.0401	6.53	10.45	1.24	43.46	0.2137
11	9	30	3	0.246	0.0451	5.72	10.57	1.20	46.48	0.2274
12	9	30	1	0.305	0.0419	8.14	12.22	1.43	28.58	0.1459
13	7	30	1	0.344	0.0406	7.53	10.66	1.22	24.55	0.1259
14	8	20	1	0.241	0.0364	8.55	10.90	1.36	28.72	0.1459
15	7	20	2	0.284	0.0412	7.20	10.79	1.25	36.18	0.1801
16	8	40	3	0.352	0.0441	7.37	9.78	1.18	48.98	0.2398
17	8	20	3	0.237	0.0390	7.72	9.71	1.21	44.11	0.2168

表 5 响应面回归模型的方差分析

Tab 5 Variance analysis for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	*F* 检验	*P* 值
模型	0.017	9	1.856×10^{-3}	96.13	＜ 0.0001
A	1.126×10^{-3}	1	1.126×10^{-3}	58.31	0.0001
B	1.337×10^{-4}	1	1.337×10^{-4}	6.92	0.0332
C	0.014	1	0.014	742.25	＜ 0.0001
AB	8.410×10^{-6}	1	8.410×10^{-6}	0.44	0.5284
AC	9.922×10^{-6}	1	9.922×10^{-6}	0.51	0.4815
BC	1.891×10^{-4}	1	1.891×10^{-4}	9.79	0.0163
A^2	1.761×10^{-5}	1	1.761×10^{-5}	0.91	0.3529
B^2	1.370×10^{-4}	1	1.370×10^{-4}	7.10	0.0301
C^2	7.753×10^{-4}	1	7.753×10^{-4}	40.16	0.0004
残差	1.352×10^{-4}	7	1.931×10^{-5}	—	—
失拟项	9.684×10^{-5}	3	3.228×10^{-5}	3.37	0.1356
纯误差	3.831×10^{-5}	4	9.578×10^{-6}	—	—
总误差	0.017	16	—	—	—

3 讨论

3.1 评价指标的确定

指标成分含量、指标成分转移率和出膏率是评价木瓜标准汤剂的重要参数。在指标成分含量方面，2020 年版《中国药典》是以齐墩果酸和熊果酸为指标进行质量评价，但该类成分在提取过程中转移率较低 [10]，且在水煎液中基本不能溶出，故不太适合作为评价标准汤剂的指标。本研究经前期 HPLC 色谱定性分析，检测到木瓜水煎液中主要包含水溶性有机酸，如绿原酸、原儿茶酸、*L*- 苹果酸、莽草酸、奎尼酸等。大量研究表明该类成分具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、镇痛、保肝、抗病毒等作用 [11-14]。因此，本研究采用层次分析法对 5 种有机酸含量和出膏率得到的权重系数进行综合评分。

3.2 有机酸稳定性探讨

在单因素试验中，*L*- 苹果酸、莽草酸、奎尼酸含量随煎煮时间的延长，呈现先增加后降低的变化，其原因是该类成分在 20 min 内逐渐被提取，但随着时间的延长，脂肪族有机酸受热不稳定，其含量下降。绿原酸在 40 min 时含量下降，该成分为咖啡酸奎尼酸内酯，在 pH 2.0 ～ 3.0 或 3.0 ～ 8.0 时，能被酸或碱催化发生水解 [15]。木瓜标准汤剂 pH 值介于 2.9 ～ 3.6，绿原酸在此条件下易水解。且绿原酸含量与受热温度和时间有关，受热温度越高，受热时间越长，绿原酸越易分解 [16]。但在本研究中发现，在减压浓缩木瓜标准汤剂时，随温度的增加和时间的延长，绿原酸损失率较少，并且在汤剂浓缩时，保持了浓缩的真空状态，猜测绿原酸

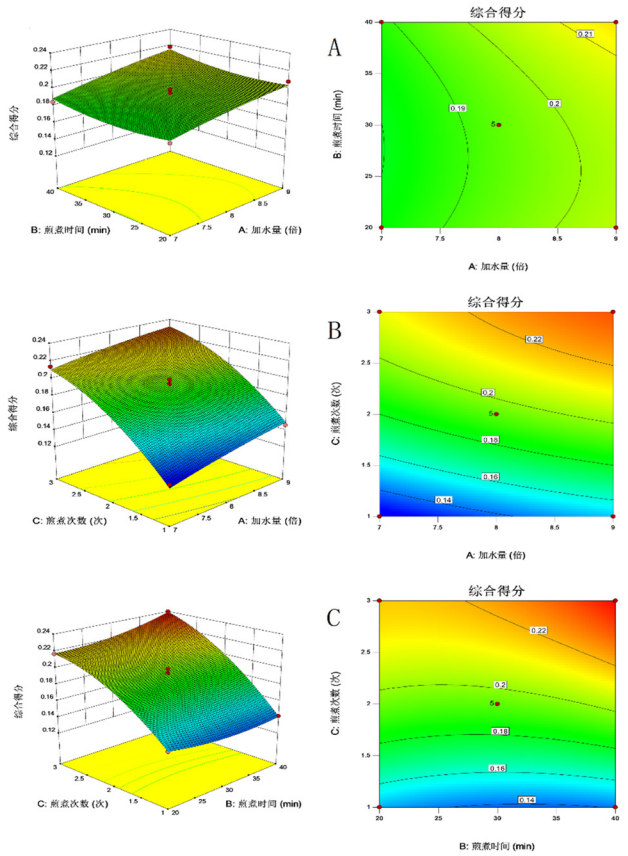


图 3 各因素交互作用响应面图和等高线图

Fig 3 Response surface and contour plots for interaction between factors

含量可能与空气接触有关。后期在制备木瓜标准汤剂的同时，应尽量避免与空气的接触，可采用减压浓缩、抽真空的制备工艺。

3.3 中药饮片标准汤剂探讨

中药饮片标准汤剂一直以来备受关注，标准汤剂中的“标准”主要包括中药材的来源、提取加工的统一性以及质量控制的严谨性[17-18]，在不同来源、产地和提取加工方式下，其水煎液质量也不尽相同。因此，规范中药饮片的制备工艺成为中药饮片标准汤剂的重点。中药具有多成分、多靶点的特性，水溶性成分并不能完全表征中药的特性。中药标准汤剂是严格以水作为提取溶剂，不能以有机溶剂进行提取，这就限制了脂溶性成分在标准汤剂中的溶出。而目前研究的中药标准汤剂不光是单一的中药饮片，还延伸出了各种中药炮制品的标准汤剂[19]、中药煮散[20]以及复方标准汤剂[21]，后续关于标准汤剂的研制是否会以醇提和水提混合制备的方式还不得而知。随着现代科技的进步，标准汤剂的制备工艺也在不断完善，不仅能为其配方颗粒提供标准化的制备方案，还能为其临床应用和相关新剂型提供理论基础。

参考文献

[1] 邹妍，鄢海燕 . 中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2019，46（7）：507-515.
[2] 邓哲，荆文光，王淑慧，等 . 中药饮片标准汤剂研究进展与讨论 [J]. 中国中药杂志，2019，44（2）：242-248.
[3] 钟红 . 川产道地药材品质形成原理的影响因素分析 [J]. 成都中医药大学学报，2014，37（4）：11-13.
[4] 杨晖，陈四清 . 道地药材的环境影响及保护和发展 [J]. 时珍国医国药，2015，26（8）：1971-1972.
[5] 王晓阁，龙全江，周宙，等 . 不同产地加工法对宣木瓜药材中齐墩果酸和熊果酸含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2014，21（11）：75-78.
[6] 郭怡敬，于欢，龚千锋，等 . 葛根标准汤剂制备工艺的优化 [J]. 中成药，2021，43（3）：584-589.
[7] 胡兆流，陈秋谷，王佛长，等 . 多指标权重分析法结合正交试验优选补脾养肾颗粒的水提工艺 [J]. 中国药房，2019，30（19）：2656-2662.
[8] 李颖，朱志军，李莹丽，等 . 基于多指标权重分析和均匀设计法优选麦冬提取工艺 [J]. 中国药师，2019，22（1）：44-47.
[9] 袁强华，呼梅，谈静 . 化扁方标准汤剂制备工艺 [J]. 中成药，2019，41（7）：1672-1675.
[10] 李文兵，许玲，卢君蓉，等 . 基于 HPLC 指纹图谱的枇杷叶蜜炙前后标准汤剂质量控制研究 [J]. 中草药，2020，51（13）：3444-3450.
[11] Naveed M，Hejazi V，Abbas M，et al. Chlorogenic acid（CGA）：a pharmacological review and call for further research [J]. Biomed Pharmacother，2018，97：67-74.
[12] 许金华，苏联麟，王巧晗，等 . HPLC 法测定五味子不同炮制品中柠檬酸、*L*- 苹果酸和 5- 羟甲基糠醛的含量 [J]. 西北药学杂志，2017，32（5）：548-551.
[13] Wang GF，Shi LP，Ren YD，et al. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid，quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro [J]. Antiviral Res，2009，83（2）：186-190.
[14] Bai J，Wu Y，Zhong K，et al. A comparative study on the effects of quinic acid and shikimic acid on cellular functions of *Staphylococcus aureus* [J]. J Food Prot，2018，81（7）：1187-1192.
[15] 陈钢，侯世祥，胡平，等 . 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究 [J]. 中国中药杂志，2003，28（3）：223-225.
[16] 王云峰，陆兔林，毛春芹，等 . 通关藤浸膏中绿原酸的稳定性考察 [J]. 中国药房，2008，19（12）：916-918.
[17] 李艳，白明，宋亚刚，等 . 中药标准汤剂的研究与思考 [J]. 中草药，2018，49（17）：3977-3980.
[18] 陈士林，代云桃 . 标准汤剂——提升中药配方颗粒质量的重要桥梁 [N]. 中国医药报，2021-03-09（第 3 版）.
[19] 陈天朝，耿梦丽，马彦江，等 . 丹参不同炮制品饮片与标准汤剂的物性参数及化学成分相关性 [J]. 中成药，2021，43（3）：824-829.
[20] 俱蓉，李响，朱向东，等 . 中药煮散的历史沿革、制备工艺及药效学研究进展 [J]. 中国药房，2020，31（23）：2924-2927.
[21] 陈盛君，王协和，陈可冀，等 . 中药复方清达颗粒标准汤剂的研究 [J]. 药物分析杂志，2021，41（5）：875-884.

（收稿日期：2021-08-02；修回日期：2021-09-15）

葡萄籽原花青素柔质体凝胶剂的制备工艺研究

窦晨[1, 2]，潘蕊[1, 2]，赵声兰[1, 2*]，程欣[1, 2, 3*]（1. 云南中医药大学 中药学院，昆明　650500；2. 云南中医药大学 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室，昆明　650500；3. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室，昆明　650500）

摘要：目的　探究葡萄籽原花青素柔质体（GSP-FL）的体外释放规律及葡萄籽原花青素柔质体凝胶（GSP-FLG）的制备工艺。**方法**　采用正交试验法，以卡波姆-940、甘油、三乙醇胺的用量为影响因素，以 pH 值、光泽度、失水率、均匀度、稳定性、涂展性等为评价指标，筛选出 GSP-FLG 的最佳制备工艺，并对 GSP-FL 及 GSP-FLG 的透皮性能及体外释放能力进行考察。**结果**　GSP-FL 的透皮释放及透析袋释放曲线均符合 Weibull 释放动力学方程。最终优化得到的 GSP-FLG 制备工艺为每 50 g 凝胶中含有 0.5% 卡波姆 940，10% 甘油及 1% 三乙醇胺，GSP-FLG 的透皮释放符合 Weibull 释放动力学方程，透析袋释放曲线符合 Ritger-peppas 释放动力学方程，具有一定的缓释效果；且 GSP-FLG 的药物皮肤滞留量显著高于葡萄籽原花青素凝胶（$P < 0.05$）。**结论**　以柔质体为载体，将葡萄籽原花青素进一步制备成凝胶剂，有利于皮肤局部给药并具有缓释效果，易于发挥柔质体和凝胶剂的优势，具有广阔的应用前景。

关键词：葡萄籽原花青素；柔质体；凝胶剂；制备
中图分类号：R944　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0315-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.013

Preparation of grape seed proanthocyanidins flexible nanoliposome gel

DOU Chen[1, 2], PAN Rui[1, 2], ZHAO Sheng-lan[1, 2*], CHENG Xin[1, 2, 3*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Yunnan University of Chinese Medicine*, *Kunming* 650500; 2. *The Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province*, *Yunnan University of Chinese Medicine*, *Kunming* 650500; 3. *Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines*, *Yunnan University of Chinese Medicine*, *Kunming* 650500)

Abstract: Objective　To determine the in vitro release characteristics of grape seed proanthocyanidins flexible nanoliposomes (GSP-FL) and the preparation technology of grape seed proanthocyanidins flexible nanoliposome gel (GSP-FLG). **Methods**　Orthogonal test was used. Carbomer-940, glycerol and triethanolamine were taken as the influencing factors, while pH value, gloss, water loss rate, evenness, stability, and coating properties were taken as the evaluation indexes. The best preparation process of GSP-FLG was screened, and the transdermal and release ability of GSP-FL and GSP-FLG was investigated. **Results**　The transdermal release and dialysis bag release curves of GSP-FL conformed to the Weibull release kinetic equation. The optimized preparation of GSP-FLG was 0.5% carbomer 940, 10% glycerol and 1% triethanolamine per 50 g gel. The transdermal release curve of GSP-FLG conformed to the Weibull release kinetic equation, and the release curve of dialysis bag conformed to the Ritger-peppas release kinetic equation, with a certain sustained-release effect. Moreover, the skin retention of GSP-FLG was significantly higher than that of GSP-G ($P < 0.05$). **Conclusion**　The flexible liposomes is used as the carrier, and further prepared into gel,

基金项目：云南省科技厅 - 云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目（No.202001AZ070001-008）；云南省科技厅生物医药重大科技专项（No.2018ZF013，No.202002AA100007）；云南省重点实验室培育计划项目（No.2017DG006）。

作者简介：窦晨，女，在读硕士研究生，主要从事药物新剂型研究，email：2721472641@qq.com　*通信作者：程欣，女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事纳米医药、药物新剂型等研究，email：chengxin920@126.com；赵声兰，女，教授，硕士研究生导师，主要从事药食同源资源的开发与利用研究，email：13330431529@163.com

it has achieved the effect of local skin delivery and sustained release, and has made full use of the advantages of flexible plastids and gel, and has broad application prospects.

Key words: grape seed proanthocyanidin; flexible nanoliposomes; gel; preparation

葡萄籽原花青素（grape seed proanthocyanidins，GSP）是从葡萄籽中提取出来的一种黄酮类多酚化合物。据研究报道，原花青素具有抗氧化[1]、清除自由基[2]、抗癌[3]、抗菌[4]、抑制酪氨酸酶[5]等药理学活性，可作为一种生态可持续和低成本的天然抗氧化剂来源，具有重要的经济效益和社会效益。但其分子结构中的酸性酚羟基和不饱和键使其缺乏长期储存稳定性，容易降解、氧化、聚合等[6]。

将药物包载于柔质体中可增强药物在皮肤中的渗透性[7]，改善水溶性和增加药物稳定性，并控制生物活性剂的释放[8-9]。但作为缓释载体，其物理性质不稳定，磷脂双分子层渗透性的增加会导致生物活性分子的泄漏失活、储存周期缩短以及易于聚集、融合或沉淀，并且由于脂质体的流动性使其不宜长时间停留在皮肤上，均限制了柔质体的广泛应用。凝胶剂作为广泛使用的药物剂型，系指药物与适宜基质制成具有凝胶特性的半固体或稠厚液体制剂[10]。将脂质体分散在凝胶基质中制备成脂质体凝胶剂，形成多贮库型系统，能够有效解决流动性问题[11]，有效提高药物皮肤滞留时间、稳定性及缓释性的优点[12]。本文将包载原花青素的柔质体嵌入水凝胶中，探究药物的释放规律，为 GSP 的进一步开发利用提供依据。

1 材料

1.1 试药

原花青素对照品（批号：1024K021SX，纯度≥ 95%，北京索莱宝科技有限公司），GSP（天津市尖峰天然产物研究开发有限公司，批号：002200604028，纯度≥ 95%），大豆卵磷脂（Solarbio 公司，批号：1112J021），胆固醇（BIOSHARP 生物公司，批号：624J033），脱氧胆酸钠（BIOSHARP 生物公司，批号：909P021，纯度＞ 99%），卡波姆 940（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C12058025），甘油（广东光华科技股份有限公司，批号：20200113），PEG-400（批号：C1925030）、三乙醇胺（批号：C2127395）（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。

1.2 仪器

超声波处理器（德国 elma 公司，型号：P180H）；旋转蒸发仪（倍捷科技，型号：OSB-2100）；纳米激光粒度仪（美国布鲁克海文公司，型号：90Plus 型）；安捷伦高效液相色谱仪（安捷伦，型号：1260infin）；氮吹仪（天津市恒奥科技发展公司，型号：HSC-12A）。

1.3 实验动物

SPF 级 KM 小鼠，雄性，体质量（20±2）g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）k2017-0005]。

2 方法与结果

2.1 GSP 含量测定的方法学建立

2.1.1 色谱条件 色谱条件 1：色谱柱：ZORBAX SB-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5.0 μm）；溶剂为 20% 乙醇 - 生理盐水时，流动相为乙腈∶水＝ 18∶82，流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 280 nm，进样量 10 μL，柱温 30 ℃。

色谱条件 2：溶剂为甲醇时，流动相为甲醇∶水＝ 32∶68，进样量 10 μL，柱温 25 ℃，流速 1 mL • min^{-1}，检测波长 280 nm。

2.1.2 专属性考察 取空白柔质体（BFL）、葡萄籽原花青素柔质体（GSP-FL）、空白脂质体（BL）、葡萄籽原花青素脂质体（GSP-L）的透皮接收液以及 GSP 对照品溶液按色谱条件 1 进样分析。取甲醇溶液、原花青素甲醇溶液、原花青素对照品甲醇溶液，按色谱条件 2 进样分析。由于 GSP 的出峰时间较早，伴有溶剂峰的干扰，因此在计算时需扣除溶剂峰峰面积。

2.1.3 线性关系考察 精密称取适量的原花青素对照品，加 20% 乙醇 - 生理盐水和甲醇溶解，分别配成系列对照品溶液，按照色谱条件 1 和 2 进样分析，计算得到的线性回归方程分别为 y_1 ＝ 2391.5x － 4.943，R^2 ＝ 0.9991，结果表明原花青素在 0.0181 ～ 0.2896 mg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好；y_2 ＝ 1486.8x － 159.67，R^2 ＝ 0.9997，结果表明原花青素在 0.1252 ～ 0.4382 mg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.4 精密度实验 配制 GSP 对照品溶液，按色谱条件 1 连续进样 8 次，结果对照品溶液中原花青素峰面积的 *RSD* 值为 1.1%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性实验 取 GSP-FL 体外经皮渗透样品 6 份进行重复性考察，按色谱条件 1 进样分析，结果样品中原花青素峰面积的 *RSD* 值为 1.8%，表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性实验 精密量取 GSP-FL 体外经皮渗透液 1.0 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤，放置 0、2、4、6、8、12 h 后，按色谱条件 1 进样分析，结果显示原花青素峰面积的 *RSD* 值为 2.4%，表明样品在 12 h 内稳定性较好。

2.1.7 加样回收实验 取 GSP-FL 体外经皮渗透接收液样品 0.5 mL（含原花青素 0.1318 mg）9 份，分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液各 2 份，按色谱条件 1 进样分析，结果低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 100.82%、102.78%、104.62%，*RSD* 值分别 1.3%、0.37%、1.7%。精密称定 GSP 样品粉末 9 份加入甲醇溶解，分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液各 3 份，按色谱条件 2 进样分析，结果低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 97.8%、100.3%、102.7%，*RSD* 值分别为 1.2%、0.33%、0.23%。符合方法学要求。

2.2 GSP-FL 与 GSP-L 的制备

根据前期实验研究得到的最佳制备工艺，采用薄膜分散 - 超声法制备 GSP-FL。精密称定一定量的卵磷脂、胆固醇溶于 15 mL 氯仿中，将脱氧胆酸钠溶于 5 mL 甲醇中超声溶解后置于圆底烧瓶中混合均匀，在 40 ℃水浴条件下，减压旋转蒸发除去有机溶剂，直至在烧瓶内壁上形成干燥透明的均匀薄膜。精密称取处方量的 GSP 溶于 6 mL 水中，将水相加到圆底烧瓶中，在 40 ℃水浴条件下继续旋转水合 30 min 后，所得混合液于超声波处理器冰浴超声混匀（150 ～ 180 W，5 min），0.22 μm 微孔滤膜过滤后得到 GSP-FL。同法制备得到不加膜软化剂脱氧胆酸钠的 GSP-L，于冰箱 4 ℃密封保存待用。采用超速离心法测定 GSP-FL 包封率为（70.79± 0.02）%，载药量为（1.16±0.01）%，粒径为（156.47±7.03）nm，PDI 为 0.26±0.01，Zeta 电位为（－ 42.35±4.00）mV（n ＝ 5）。

2.3 GSP-FL 凝胶剂（GSP-FLG）的制备

精密称取一定量的凝胶基质，加入适量的纯水过夜，使其充分溶胀，加入适量保湿剂、促渗剂，滴加三乙醇胺调整 pH 值后，再加入适量 GSP-FL 混悬液后，加入纯水至 50 g，搅拌均匀即得。同法制备不加药物的空白凝胶。

2.3.1 凝胶基质的筛选 分别精密称定确定质量的凝胶基质卡波姆 940、卡波姆 934、羧甲基纤维素钠、明胶、西黄蓍胶各 0.5 g，加入适量纯水溶胀过夜，用研钵研磨直至细腻，加入甘油 2 g，用三乙醇胺调节 pH 至 6.5，用纯水补充至 50 g。结果表明，卡波姆 940 能够形成凝胶，黏度适宜、易于涂布，因此使用卡波姆 940 作为凝胶剂的基质。

2.3.2 凝胶剂的评价指标 根据《中国药典》2020 年版对凝胶剂的规定，一般应检查 pH 值，胶粒应分散均匀，不应下沉结块，凝胶剂应均匀、细腻、在常温时保持胶状、不干涸或液化等。因此，本文主要考察凝胶剂的失水率、成型性、pH 值、均匀度、光泽度、稳定性等因素。

① pH 值。将制备好的凝胶剂置于 100 mL 烧杯中，按照 1∶50（*W/W*）加入超纯水，超声 30 min，充分搅拌使其溶解，室温条件下用 pH 计测定其 pH 值。

② 稳定性实验。离心实验：精密称取 1 g 凝胶剂于离心管中，3500 r • min $^{-1}$ 离心 30 min，观察样品是否分层；低温实验：精密称取 1 g 凝胶剂于离心管中，密封保存于－ 20 ℃冰箱中，观察样品是否分层；热恒温实验：精密称取 1 g 凝胶剂于离心管中，60 ℃放置 6 h，观察是否分层。

③ 涂展性实验。在一块干净的玻璃板上画一个直径为 1 cm 的圆，取 1 g 凝胶剂涂在圆内，并覆盖一块干净的玻璃板，取 1 kg 重物压在玻璃板上，5 min 后量取凝胶剂延展后的直径。

④ 失水率实验。精密称定 5 g 凝胶剂放入干燥至恒重的玻璃器皿内，将其质量记为 W_a，置于 55 ℃的烘箱中干燥，每隔 1 h 后取出，放冷之后，称定总质量记为 W_b，继续干燥至质量不再损失时为终点，计算每个时刻的失水率（S）。

$$S = (W_a - W_b)/5 \times 100\%$$

2.3.3 卡波姆 940 用量的考察 精密称定 0.05、0.25、0.50、0.75、1.00 g [即分别为 0.1%、0.5%、1%、1.5%、2%（*W/W*）] 的卡波姆 940 均匀洒于纯水表面，充分溶胀，用研钵研磨直至细腻，加入甘油 2 g，丙二醇 2 g，用三乙醇胺调节 pH 至 6.5，用纯水补充至 50 g。主要以外观，成型性，黏稠性，涂展性来考察卡波姆 940 的用量。结果显示，当卡波姆 940 用量超过 1% 时，凝胶剂随着卡波姆 940 用量的增加，黏度逐渐增大。因此卡波姆 940 的用量应控制在 1% 以内。

2.3.4 保湿剂的选择 精密称定卡波姆 940 约 0.5 g，均匀洒于纯水表面，充分溶胀，不加保湿剂

或以甘油2 g、PEG-400 2 g、甘油∶PEG-400（1∶1）为保湿剂，再加入丙二醇 2 g，用三乙醇胺调节 pH 至 6.5，用纯水补充至 50 g。以失水率为指标，考察最适保湿剂的种类。结果显示，在 1 ～ 6 h 内甘油具有较小的平均失水率，因此选择甘油为保湿剂。

2.3.5　保湿剂用量的选择　精密称定卡波姆 940 0.5 g，均匀洒于纯水表面，使其充分溶胀，分别加入 1、2、3、4、5 g 甘油，再加入丙二醇 2 g，充分搅匀，用三乙醇胺调节 pH 至 6.5，用纯水补充至 50 g。以失水率为指标，考察保湿剂的最适用量，结果显示，当甘油用量为 3 g 时，凝胶剂具有较小的失水率。

2.3.6　三乙醇胺用量的考察　精密称定卡波姆 940 0.5 g，均匀洒于纯水表面，充分溶胀，加入 3 g 甘油，2 g 丙二醇，分别加入 0.1、0.5、1、2、3 g 三乙醇胺，充分搅匀，用纯水补充至 50 g。以外观、涂展性、黏度、pH 值为指标，考察三乙醇胺的用量。结果显示，当凝胶剂的 pH ＞ 8 时，状态较稀，不易涂布。因此，三乙醇胺的用量采用 0.1、0.5、1 g 这三个水平作为影响因素。

2.3.7　正交实验设计与优化选择　根据单因素实验结果，选择卡波姆、甘油和三乙醇胺用量作为影响凝胶剂的主要因素进行考察，综合评分标准见表 1，采用 L_9（3^4）正交设计表进行基质筛选，优化处方（见表 2）。

表 1　综合评分标准 (20 分)

Tab 1　Comprehensive scoring criteria (20 points)

指标	优	良	中	差
成型性（2 分）	形成凝胶（2 分）			不形成凝胶（0 分）
光泽度（3 分）	表面平滑有光泽（2.4 ～ 3 分）	平整有光泽（0.9 ～ 2.3 分）	平整无光泽（0.1 ～ 0.8 分）	无光泽不平整（0 分）
均匀度（3 分）	细腻（2.4 ～ 3 分）	较细腻（0.9 ～ 2.3 分）	粗糙（0.1 ～ 0.8 分）	较粗糙（0 分）
pH 值（3 分）	5.5 ～ 6.5（2.4 ～ 3 分）	6.5 ～ 7.5（0.9 ～ 2.3 分）	4.5 ～ 5.5（0.1 ～ 0.8 分）	＜ 4.5 或＞ 7.5（0 分）
涂展性（3 分）	6.5 ～ 7.5（2.4 ～ 3 分）	5.5 ～ 6.5（0.9 ～ 2.3 分）	5 ～ 5.5 或 7.5 ～ 8（0.1 ～ 0.8 分）	＜ 5 或＞ 8（0 分）
稳定性（3 分）				
离心实验	无分层（1 分）			分层（0 分）
低温实验	无分层（1 分）			分层（0 分）
热恒温实验	无分层（1 分）			分层（0 分）
6 h 平均失水率（3 分）	75% ～ 79%（2.4 ～ 3 分）	80% ～ 85%（0.9 ～ 2.3 分）	86% ～ 90%（0.1 ～ 0.8 分）	

表 2　正交实验因素与水平

Tab 2　Orthogonal experimental factor and level

水平	因素		
	A. 卡波姆用量 /g	B. 甘油用量 /g	C. 三乙醇胺 /g
1	0.25	1	0.1
2	0.5	3	0.5
3	1	5	1

表 3　正交实验结果

Tab 3　Orthogonal experimental results

No.	A	B	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	14.5
2	1	2	2	2	18.3
3	1	3	3	3	16.1
4	2	1	2	3	15.8
5	2	2	3	1	13.7
6	2	3	1	2	14.0
7	3	1	3	2	9.0
8	3	2	1	3	11.4
9	3	3	2	1	14.8
K_1	16.3	13.1	13.3	14.3	—
K_2	14.5	14.6	16.3	13.8	—
K_3	11.7	15.0	12.9	14.4	—
R	4.6	1.9	3.4	0.6	—

2.3.8　正交实验结果　以综合评分为评价指标，各因素对综合评分的影响分别为 A ＞ C ＞ B，因素 A 和 C 对综合评分具有显著影响（$P < 0.05$），因此考虑 GSP-FLG 凝胶基质的最佳制备工艺条件为 $A_1B_3C_2$，即每 50 g 凝胶中含有卡波姆940 0.5%，甘油 10% 及三乙醇胺 1%（见表 3、表 4）。

2.3.9　验证实验　按优选的处方工艺制备 4 批 GSP-FLG，对其进行考察，其 6 h 的平均失水率分别为 23.26%、24.33%、22.22%、30.36%，凝胶质地光滑有光泽、涂展性、稳定性良好，综合评分分别为 16.5、16.9、17.0、16.2，平均值为 16.65，*RSD* 为 2.2%，结果表明制备工艺合理，稳定可行且结果可靠。

2.4　GSP-FL、GSP-FLG 的体外经皮渗透实验

2.4.1　离体小鼠皮肤的制备　将昆明种小鼠脱颈椎处死后，固定于木板上，小心剔除腹部毛发，立即剪下其腹部皮肤，剥离皮下组织及脂肪，将其浸泡于生理盐水，选用表皮完整无破损皮肤于－ 80 ℃冷冻保存，备用。

2.4.2　经皮渗透实验　采用 Franz 透皮扩散池法，

表 4　方差分析结果

Tab 4　Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F	P
A	31.749	2	40.914	＜ 0.05
B	5.602	2	7.219	＞ 0.05
C	20.469	2	26.378	＜ 0.05
误差	0.78	2		

注（Note）：$F_{0.05(2,2)} = 19.0$。

分别以游离 GSP 为对照进行 GSP-FL 及 GSP-L 的体外经皮渗透实验，以葡萄籽原花青素凝胶（GSP-G）为对照进行 GSP-FLG 的体外经皮渗透实验。将预处理好的鼠皮固定于透皮杯上，使角质层面向样品供给池，真皮层面向接收池，用夹子夹紧。向样品池中加入等量的 GSP、GSP-FL 及 GSP-L 样品溶液（含 GSP 9.30 mg）或 1 g 凝胶剂（含 GSP 13.12 mg）并均匀铺展开，再向接收池加入 20% 乙醇 - 生理盐水作为接收介质，于水浴温度（32±0.5）℃，转速 300 r • min^{-1} 的条件下进行实验。分别于第 0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 取样，同时补加等量同温度的接收介质。接收液用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后，按色谱条件 1 进样分析，计算 GSP 在不同时间点的单位面积累积透过量 Q_t（mg • cm^{-2}），以时间 t（h）为横坐标，以 Q_t 为纵坐标作图，结果如图 1 所示。对曲线中的直线部分进行线性回归，直线的斜率即为稳态透皮速率 [J_s，mg/（cm^2 • h）]。

$$Q_t = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / S$$

S 为有效扩散面积，V 为接收液总体积，C_n 为第 n 次取样时接收液中药物的质量浓度，C_i 为第 i 次取样时接收液中药物的质量浓度，V_i 为取样体积。

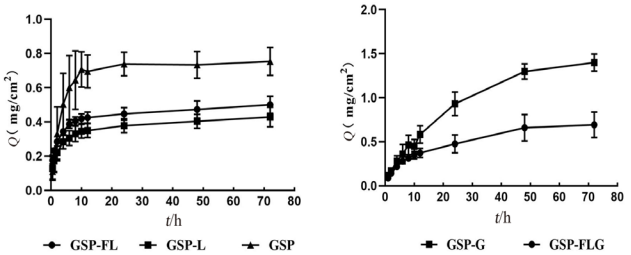


图 1　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G、GSP-FLG 单位面积累积透过量曲线（$\bar{x}\pm s$，$n = 4$）

Fig 1　Cumulative transmittance curve of GSP-FL，GSP-L，GSP，GSP-G，and GSP-FLG drugs per unit area（$\bar{x}\pm s$，$n = 4$）

结果如表 5 所示，GSP 组表现出明显的突释现象，GSP-FL 组（含 GSP 9.30 mg）24 h 的单位面积累积透过量显著高于 GSP-L 组（$P < 0.05$），稳态透皮速率也高于 GSP-L 组，猜测柔质体的可形变性使其比脂质体更易透过皮肤。GSP-FLG 组（含 GSP 13.12 mg）72 h 的单位面积累积透过量显著低于 GSP-G 组（$P < 0.01$），稳态透皮速率也低于 GSP-G 组，因此 GSP-FLG 表现为明显的缓释效果。通过药物释放动力学方程对体外经皮渗透结果进行拟合，结果显示 GSP-FL、GSP-L、GSP-G 及 GSP-FLG 组均以 Weibull 方程进行拟合时具有较好的拟合度；而 GSP 组以一级动力学方程拟合度较高。拟合结果如表 6 所示。

表 5　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G 和 GSP-FLG 累积释放动力学参数（$\bar{x}\pm s$，$n = 4$）

Tab 5　Cumulative release kinetics parameters of GSP-FL，GSP-L，GSP，GSP-G and GSP-FLG（$\bar{x}\pm s$，$n = 4$）

组别	Q_t	R^2	J_s/[mg/（cm^2 • h）]	Q_{24}/（mg • cm^{-2}）	Q_{72}/（mg • cm^{-2}）
GSP	$Q = 0.0721t + 0.1359$	0.9236	0.0721	0.739±0.0695	0.7533±0.082
GSP-L	$Q = 0.0255t + 0.1484$	0.9018	0.0255	0.3778±0.0412	0.4286±0.057
GSP-FL	$Q = 0.0289t + 0.2012$	0.9046	0.0289	0.4475±0.0368*	0.5005±0.050
GSP-G	$Q = 0.0485t + 0.9976$	0.9976	0.0485	0.9317±0.133	1.3996±0.097
GSP-FLG	$Q = 0.032t + 0.0738$	0.9719	0.032	0.4757±0.101	0.6926±0.145##

注（Note）：与 GSP-L 组相比，*$P < 0.01$；与 GSP-G 组相比，##$P < 0.01$（Compared with the GSP-L group，*$P < 0.01$；compared with the GSP-G group，##$P < 0.01$）。

2.4.3　药物的皮肤滞留量测定　体外透皮实验结束后，取出小鼠皮肤，用生理盐水反复冲洗小鼠皮肤表面，直到将皮肤表面的药物清洗干净为止，再剪下给药部位置于 10 mL 离心管中，用眼科剪将其剪碎，加入甲醇 4 mL，置于匀浆机中使其破碎，水浴超声 30 min，140 00 r • min^{-1} 离心 30 min 后，弃去鼠皮，将上清液用氮气吹干，以甲醇复溶，过 0.22 μm 微孔滤膜后，按色谱条件 2 进样分析测定 GSP 的药物含量，测定药物的皮肤滞留量（Q）＝药物量 / 有效扩散面积（2.92 cm^2）。结果显示，GSP-FL 组 72 h 皮肤内药物滞留量显著高于 GSP 组（$P < 0.01$）。GSP-FLG 组在 72 h 皮肤内药物滞留量显著高于 GSP-G 组（$P < 0.05$），见表 7。

2.5　*体外释放度考察*

精密量取 2 mL 游离 GSP 溶液、GSP-FL、

表 6　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G 和 GSP-FLG 药物单位面积累积透过量曲线方程拟合（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Tab 6　Equation fitting of cumulative transmittance curve per unit area of GSP-FL，GSP-L，GSP，GSP-G and GSP-FLG（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

拟合方式	组别	方程	R^2
零级释放动力学方程	GSP	$Q=0.0061t+0.4404$	0.2862
	GSP-L	$Q=0.0031t+0.2512$	0.5010
	GSP-FL	$Q=0.0032t+0.3176$	0.4572
	GSP-G	$Q=0.0185t+0.2593$	0.8977
	GSP-FLG	$Q=0.008t+0.2103$	0.8386
一级释放动力学方程	GSP	$Q=0.7371(1-e^{-0.2844t})$	0.9973
	GSP-L	$Q=0.3686(1-e^{-0.4641t})$	0.8451
	GSP-FL	$Q=0.4342(1-e^{-0.6198t})$	0.8282
	GSP-G	$Q=1.4657(1-e^{-0.0434t})$	0.991
	GSP-FLG	$Q=0.6625(1-e^{-0.0762t})$	0.9513
Higuchi 方程	GSP	$Q=0.0727t^{1/2}+0.2983$	0.5366
	GSP-L	$Q=0.0339t^{1/2}+0.1891$	0.7374
	GSP-FL	$Q=0.0355t^{1/2}+0.2517$	0.6965
	GSP-G	$Q=0.1857t^{1/2}-0.0752$	0.9802
	GSP-FLG	$Q=0.0817t^{1/2}+0.0597$	0.9646
Weibull 方程	GSP	$Q=0.7410(1-e^{-[0.283(t-0.019)]^{0.9487}})$	0.9972
	GSP-L	$Q=0.4285(1-e^{-[0.2863(t-0.1806)]^{0.4422}})$	0.9941
	GSP-FL	$Q=0.4947(1-e^{-[0.4044(t-0.1358)]^{0.4345}})$	0.9921
	GSP-G	$Q=1.4522(1-e^{-[0.0386(t-2.5093)]^{1.169}})$	0.9956
	GSP-FLG	$Q=0.9078(1-e^{-[0.0284(t-0.3397)]^{0.5705}})$	0.9933
Ritger-peppas 方程	GSP	$Q=0.3385(t^{0.2235})$	0.7195
	GSP-L	$Q=0.2031(t^{0.1899})$	0.9019
	GSP-FL	$Q=0.2629(t^{0.1655})$	0.8855
	GSP-G	$Q=0.1462(t^{0.5443})$	0.9763
	GSP-FLG	$Q=0.1302(t^{0.4043})$	0.9797

GSP-L 混悬液以及 1 g GSP-G 和 GSP-FLG 至透析袋（100 kDa）中，以 8 mL 20% 乙醇 - 生理盐水为释放介质，于 Franz 体外透皮扩散池上以 300 r·min^{-1} 的转速恒温（32±0.5）℃释放，分别于 0.5、2、4、6、8、12、24、48、72 h 后取样，同时补加等量同等温度的释放介质，接收液用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后，按照“2.1.1”项下色谱条件 1 进样分析，计算药物的累积释放量，累积释放率＝累积释放量 / 投药量。结果如表 8 所示，GSP 组在 12 h 后累积释放率逐渐增加，48 h 时后显著高于 GSP-FL 组（$P<0.01$），至 72 h 仍呈释放趋势，表现出明显的突释现象。与 GSP-L 组相比，12 h 后 GSP-FL 组的累计释放率逐渐增加，48 h 后显著高于 GSP-L 组（$P<0.01$），GSP-L 与 GSP-FL 表现出长时间的缓释效果。GSP-G 组的累计释放率在 12 h 后显著高于 GSP-FLG 组（$P<0.01$），至 72 h 仍呈释放趋势，表现出明显

表 7　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G 和 GSP-FLG 的药物皮肤滞留量（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 7　Drug skin retention of GSP-FL，GSP-L，GSP，GSP-G and GSP-FLG（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

剂型	Q/（μg·cm^{-2}）
GSP-L	42.79±0.981
GSP-FL	46.22±0.439**
GSP	39.89±0.173
GSP-G	41.12±1.69
GSP-FLG	48.02±0.45$^{\#}$

注（Note）：与 GSP 组相比，$^{**}P<0.01$；与 GSP-G 组相比，$^{\#\#}P<0.01$（Compared with the GSP group，$^{**}P<0.01$；compared with the GSP-G group，$^{\#\#}P<0.01$）。

的突释现象，而 GSP-FLG 组则在 12 h 后缓慢释放。将药物制备成 GSP-FLG 后，在 12 h 内的药物累积释放率显著小于 GSP-FL 组（$P<0.05$），表明凝胶剂型使药物缓释效果更加明显。通过药物释放动力学方程对体外药物累积释放结果进行拟合，结果显示 GSP-FL、GSP-L 组以 Weibull 方程，GSP-G 以 Higuchi 方程进行拟合时具有较好的拟合度，而 GSP 、GSP-FLG 组以 Ritger-peppas 拟合度较高。拟合结果如表 9 所示。。

3　讨论

体外透皮实验时接收液应该满足漏槽条件，常用的透皮接收液有生理盐水、等渗磷酸盐缓冲液等，对一些脂溶性强的物质，常在接收液中加入醇类和非离子表面活性剂等。GSP 作为聚合物，低聚部分分子量小，水溶性好，随着聚合度增加，溶解度逐渐降低 [13-14]。前期尝试过在生理盐水、PBS 中加入吐温 20、无水乙醇来进行溶解度考察，发现 GSP 在无水乙醇 - 生理盐水中具有较好的溶解度且满足漏槽条件，但超过 20% 的乙醇对皮肤有较强脂质提取和屏障破坏作用，并且容易挥发 [15]，所以在实验中选择 20% 乙醇 - 生理盐水作为接收介质。透皮吸收首选的皮肤屏障是人体皮肤，但由于获得人体皮肤组织较为困难，常用动物皮肤来代替。在使用大鼠皮肤出现了药物的累积透过量低的问题，为减少皮肤差异性的问题，统一采用同一批昆明种小鼠的腹部皮肤作为渗透膜进行透皮实验。

透析袋实验中，通过释药曲线与拟合方程分析 GSP-FL 及 GSP-FLG 的释药机制，由释药曲线推测，GSP-FL 组释药分为快释和缓释，在 10 h 后药物开始缓慢释放，推测药物快释过程是由于柔质体中未被包载药物的快速释放。而 GSP-FLG 组也表现出同样的释药规律，12 h 后包裹于脂质

表 8　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G 和 GSP-FLG 药物体外累积释放实验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=4$，%)

Tab 8　In vitro cumulative release data of GSP-FL, GSP-L, GSP, GSP-G and GSP-FLG ($\bar{x}\pm s$，$n=4$，%)

时间（h）	GSP	GSP-L	GSP-FL	GSP-G	GSP-FLG
0.5	7.77±0.011	10.71±0.013	8.60±0.0072	4.76±0.005	5.39±0.007*
1	10.59±0.014	13.70±0.013	11.47±0.008	7.00±0.010	8.15±0.0156*
2	14.58±0.015	16.98±0.018	15.72±0.013	10.38±0.015	11.00±0.021*
4	20.66±0.022	21.36±0.026	20.91±0.004	16.67±0.020	15.83±0.027*
6	25.02±0.033	23.76±0.031	24.43±0.013	20.98±0.0189	18.79±0.032*
8	28.47±0.031	25.35±0.032	27.35±0.011	24.49±0.025	20.49±0.038*
10	30.96±0.033	26.87±0.03	30.04±0.014	26.59±0.021	22.12±0.038*
12	32.41±0.032	27.70±0.037	31.17±0.017	29.07±0.019△	23.55±0.040*
24	38.77±0.024	30.57±0.036	35.99±0.017#	40.04±0.012△	31.01±0.050
48	60.38±0.021*	40.08±0.010	46.75±0.0235##	62.44±0.014△	46.77±0.078
72	63.58±0.042*	40.20±0.008	47.55±0.0232##	73.97±0.018△	50.35±0.107

注（Note）：与 GSP-FL 相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 GSP-L 相比，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与 GSP-FLG 组相比，△$P<0.01$（Compared with the GSP-FL group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；compared with the GSP-L group，#$P<0.05$，##$P<0.01$；compared with the GSP-FLG group，△$P<0.01$）。

表 9　GSP-FL、GSP-L、GSP、GSP-G 和 GSP-FLG 药物累积释放率曲线方程拟合 ($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

Tab 9　Equation fitting of cumulative release rate curve of GSP-FL, GSP-L, GSP, GSP-G and GSP-FLG ($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

拟合方式	组别	方程	R^2
零级释放动力学方程	GSP	$Q=0.0075t+0.0.1749$	0.8658
	GSP-L	$Q=0.0037t+0.1899$	0.7396
	GSP-FL	$Q=0.005t+0.1884$	0.741
	GSP-G	$Q=0.0094t+0.1272$	0.9347
	GSP-FLG	$Q=0.0061t+0.1271$	0.8919
一级释放动力学方程	GSP	$Q=0.5886\,(1-e^{-0.0.0742t})$	0.8992
	GSP-L	$Q=0.3437\,(1-e^{-0.2283t})$	0.7013
	GSP-FL	$Q=0.4351\,(1-e^{-0.1349t})$	0.8751
	GSP-G	$Q=0.7354\,(1-e^{-0.0434t})$	0.9619
	GSP-FLG	$Q=0.4801\,(1-e^{-0.0648t})$	0.9135
Higuchi 方程	GSP	$Q=0.0735t^{1/2}+0.0533$	0.9765
	GSP-L	$Q=0.0372t^{1/2}+0.1257$	0.9160
	GSP-FL	$Q=0.0506t^{1/2}+0.1011$	0.9225
	GSP-G	$Q=0.0899^{1/2}-0.0175$	0.9975
	GSP-FLG	$Q=0.0589t^{1/2}+0.0306$	0.9874
Weibull 方程	GSP	$Q=2.0585\,(1-e^{-[0.0016\,(t-0.0233)]^{0.4415}})$	0.9827
	GSP-L	$Q=0.7311\,(1-e^{-[0.0074\,(t-0.2019)]^{0.3030}})$	0.9836
	GSP-FL	$Q=0.5714\,(1-e^{-[0.0505\,(t-0.0492)]^{0.4848}})$	0.9920
	GSP-G	$Q=9.9378\,(1-e^{-[0.0001\,(t-0.1501)]^{0.5313}})$	0.9969
	GSP-FLG	$Q=3.5\,(1-e^{-[0.0002\,(t-0.0978)]^{0.442}})$	0.9893
Ritger-peppas 方程	GSP	$Q=0.1174\,(t^{0.4037})$	0.9851
	GSP-L	$Q=0.1470\,(t^{0.2461})$	0.9789
	GSP-FL	$Q=0.1377\,(t^{0.3048})$	0.9747
	GSP-G	$Q=0.0783\,(t^{0.5282})$	0.9973
	GSP-FLG	$Q=0.0835\,(t^{0.4278})$	0.9913

体中的药物通过凝胶缓慢释放药物，推测药物快释是由于凝胶剂中附在脂质体表面的或包埋较浅的原花青素或未被包载的游离药物的释放，12 h 后包裹在脂质体中的药物通过凝胶缓慢释放。脂质体被致密的凝胶基质固定，使得其聚集、相容更加困难，增加脂质体的稳定性，也进一步增强了药物的缓释效果，徐蕾[16]在进行高乌甲素脂质体凝胶透皮释药考察的实验中也得出了同样的释药规律。通过透析袋释药初步考察脂质体凝胶的释放过程，发现 GSP-FLG 的释放过程符合 Ritger-peppas 释放特性。陈积[17]进行体外透皮实验发现，复方莪术油脂质体凝胶中吉马酮和维 A 酸 24 h 的累积透皮量均显著低于复方莪术油凝胶，可长时间稳态释药，具有缓释作用，相较于药物凝胶，脂质体凝胶的缓释作用更加显著。

本实验比较了 GSP、GSP-L、GSP-FL 的体外透皮性能，游离的 GSP 表现出突释效果，将其制备为柔质体后，可显著降低其释放速率，达到缓释效果。相比 GSP-L，由于 GSP-FL 的柔韧性和形变性，表现出更高的累计释放率和透皮速率。GSP-FL 的皮肤滞留量显著高于 GSP，说明将其制备为柔质体能使药物更多地滞留在皮肤内。而将柔质体进一步制备成凝胶后可减少其流动性，使药物长时间与皮肤接触，皮肤滞留量更高，有利于药物在皮肤局部发挥作用；并且水凝胶无油腻感，易涂展，局部给药后易吸收，具有制备工艺简单、稳定性好等优点[18]。张小灵[19]制备的双丹脂质体凝胶剂具有较强缓释作用，可延长给

药时间，皮肤内药物贮量较大，药物大多蓄积在真皮层中，有利于瘢痕的治疗。时军等[20]制备的丹皮酚阳离子脂质体凝胶的累积透过量、药物透皮速率与皮肤蓄积量亦显著大于普通凝胶。有研究报道，GSP 具有抑制酪氨酸酶的活性[21]，而酪氨酸酶是黑色素生成的关键限速酶[22-23]，因此有望将 GSP-FLG 开发为具有美白功效的化妆品制剂，但其效果还需要进一步实验验证。

本研究以柔质体为载体，并将其进一步制备成凝胶剂，实现了皮肤局部给药并具有缓释的效果，充分发挥了柔质体和凝胶剂的优势，具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 杨洋，张磊，李学文 . 氢氧化钠降解原花青素聚合度及抗氧化活性分析 [J]. 现代食品科技，2021，37（9）：1-11.

[2] 陈月英，王彦平，孙瑞琳，等 . 葡萄皮渣原花青素微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究 [J]. 北方园艺，2016（11）：123-126.

[3] 邱兰丽，颜梓一，贺延苓，等 . 原花青素抗癌的生物学机制研究进展 [J]. 药物生物术，2020，27（2）：173-176.

[4] 高洁，赵玮钦，程政 . 石榴皮原花青素对变异链球菌生物膜形成及相关毒力基因表达的影响 [J]. 山西医科大学学报，2020，51（8）：847-851.

[5] 周梦圆，徐丽娟，谭城，等 . 槲皮素和原花青素对豚鼠白癜风模型黑素合成的影响 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2018，34（11）：641-644.

[6] 高冠勇，陈文娜，武玉波，等 . 花生红衣原花青素稳定性分析及其抗氧化性研究 [J]. 食品工业，2018，39（8）：209-212.

[7] Maestrelli F，González-Rodríguez ML，Rabasco AM，et al. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery [J]. Int J Pharm，2005，298（1）：55-67.

[8] Thierry S. Newer approaches to the treatment of acne vulgaris [J]. Am J Clin Dermatol，2012，13（6）：357-364.

[9] Sharma BB，Jain SK，Vyas SP. Topical liposome system bearing local anaesthetic lignocaine：preparation and evaluation [J]. Microencapsul，1994，11（3）：279-286.

[10] 杨志欣，卞士嘉，王闻文，等 . 苦参总黄酮脂质体凝胶剂的制备工艺研究 [J]. 药物评价研究，2020，43（11）：2201-2206.

[11] 赖滢滢，周若鹏，张英丰，等 . 蛇床子素脂质体凝胶剂的制备及其体外透皮试验的初步研究 [J]. 广东药学院学报，2016，32（1）：5-8.

[12] 李莎莎 . 氨甲环酸柔性纳米脂质体凝胶的制备及体外释药研究 [D]. 西安：西北大学，2014.

[13] 李淼，胡文泽，岳国鑫，等 . 高聚原花青素降解技术研究进展 [J]. 食品工业科技，2021，8：1-13.

[14] 刘玟君，李金洲，陈子隽，等 . 原花青素的研究进展 [J]. 湖北农业科学，2021，60（14）：5-9.

[15] 周四元，韩丽 . 药剂学 [M]. 1 版 . 北京：科学出版社，2017：1-495.

[16] 徐蕾 . 经皮给药高乌甲素脂质体凝胶的研制 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2019.

[17] 陈积 . 复方莪术油脂质体凝胶的制备及其药效学评价 [D]. 遵义：遵义医学院，2018.

[18] 唐世军，廉英 . 酮咯酸氨丁三醇眼用凝胶剂的制备工艺与质量控制 [J]. 中南药学，2013，11（3）：170-173.

[19] 张小灵 . 双丹脂质体凝胶剂的制备及抗增生性瘢痕研究 [D]. 广州：广东药科大学，2017.

[20] 时军，王芳，滕希峰，等 . 丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂的稳定性及离体皮肤渗透试验研究 [J]. 中药材，2012，35（5）：803-807.

[21] 陈小鑫 . 抗氧化剂原花色素对蘑菇酪氨酸酶活性的影响及机理研究 [D]. 厦门：厦门大学，2014.

[22] Matés JM，Pérez-Gómez C，Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases [J]. Clin Biochem，1999，32（8）：595-603.

[23] Hearing VJ，Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals [J]. FASEB J，1991，5（14）：2902-2909.

（收稿日期：2021-10-18；修回日期：2021-11-02）

基于网络药理学与实验研究探讨β-葡聚糖治疗S180腹水瘤的作用机制

杨文卿[1]，姜涛[2]，程路峰[1*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011；2. 新疆医学动物模型研究重点实验室，乌鲁木齐 830011）

摘要：目的 基于网络药理学对β-葡聚糖治疗S180腹水瘤的作用靶点进行筛选，并用S180腹水瘤小鼠模型对相关作用靶点进行实验验证。**方法** ① 通过Swiss Target Prediction、Geen Cards及OMIM数据库对β-葡聚糖活性成分进行筛选并对S180腹水瘤相关靶点进行预测；运用String数据库构建蛋白互作网络图，并结合生物信息分析软件（Cytoscape 3.8.3）构建成分靶点互作网，预测β-葡聚糖的作用靶点；利用R Studio进行GO及KEGG信号通路分析。② 采用CCK-8法检测β-葡聚糖对S180细胞活性的影响。③ 建立S180腹水瘤皮下实体瘤模型，并给予顺铂（腹腔注射顺铂0.2 mg·kg^{-1}）、不同剂量β-葡聚糖（50 mg·kg^{-1}、100 mg·kg^{-1}、200 mg·kg^{-1}灌胃），21 d后处死小鼠，对各组抑瘤率及脾脏指数进行比较；采用ELISA法检测荷瘤小鼠血清中TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6水平；Western blot法检测Bcl-2、Bax、VEGFA、JAK2及STAT3蛋白表达，对富集得到的通路进行验证，研究β-葡聚糖治疗肿瘤的作用机制。**结果** ① 收集得到β-葡聚糖作用靶点33个与腹水瘤靶点3116个，并得到交集靶点12个，对交集靶点进行蛋白互作发现VEGFA、STAT3等8个关键靶点，KEGG分析发现β-葡聚糖通过PI3K-Akt、MAPK等炎性通路治疗S180腹水瘤。② CCK-8实验结果显示β-葡聚糖对S180细胞无直接抑制作用。③ 体内实验显示，与模型组比较，β-葡聚糖中、高剂量组小鼠瘤质量均明显减少（$P<0.05$，$P<0.01$）。与模型组比较，β-葡聚糖能明显提高小鼠的IL-2、TNF-α、IFN-γ水平，降低IL-4、IL-6的水平。Western blot结果显示β-葡聚糖能明显上调Bax表达并下调Bcl-2表达（$P<0.05$，$P<0.01$），引起VEGF/JAK2/STAT3的表达明显下调（$P<0.05$，$P<0.01$）。**结论** β-葡聚糖可通过作用于JAK与Bcl-2靶点干预PI3K-Akt通路且能够影响VEGF/JAK/STAT3调控EGFR通路，抑制肿瘤的增长，促进肿瘤的凋亡，从而对腹水瘤发挥治疗作用。

关键词：β-葡聚糖；腹水瘤；网络药理学；免疫调节
中图分类号：R965 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0323-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.014

Mechanism of β-glucan for S180 ascites tumor based on network pharmacology and experimental study

YANG Wen-qing[1], JIANG Tao[2], CHENG Lu-feng[1*] (1. *School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi* 830011; 2. *Xinjiang Key Laboratory of Medical Animal Model Research*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To screen the targets of β-glucan for S180 ascites tumor by network pharmacology and to verify the related action targets on the S180 ascites tumor mouse model by experimental. **Methods** ① The β-glucan active ingredients were screened and S180 ascites tumor-related targets were predicted by Swiss Target Predictio, Geen Cards and OMIM databases, respectively. The protein-protein interaction network (PPI) was constructed with STRING database, and the component-target interaction network was constructed by the biological information analysis software (Cytoscape 3.8.3) to predict the action targets of β-glucan. GO and KEGG signaling pathways were analyzed with R Studio. ② CCK-8 method was used

基金项目：2021年新疆维吾尔自治区研究生创新项目（No.XJ2021G193）。
作者简介：杨文卿，女，硕士，主要从事肿瘤药理学研究，email：1514413447@qq.com *通信作者：程路峰，男，教授，主要从事肿瘤药理学研究，email：lewis_clf@163.com

to detect the effect of β-glucan on S180 cell activity. ③ The S180 ascites tumor model was established as a subcutaneous solid tumor. The mice were administrated cisplatin (intraperitoneal injection of cisplatin 0.2 mg • kg $^{-1}$) and different doses of β-glucan (50, 100, 200 mg • kg $^{-1}$ intragastrically), and sacrificed 21 days later. The tumor inhibition rate and spleen index were compared among the groups. The serum levels of TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, and IL-6 in tumor-bearing mice were detected by ELISA. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, VEGFA, JAK2 and STAT3 proteins to validate the enrichment-obtained pathway and determine the mechanism of β-glucan in the treatment of tumors. **Results** ① Among the 33 β-glucan action targets and 3116 ascites tumor targets collected, 12 were intersecting targets, and 8 key targets such as VEGFA and STAT3 were found through protein interaction with the intersecting targets. KEGG analysis showed that β-glucan treated S180 ascites tumor through PI3K-Akt, MAPK and other inflammatory pathways. ② CCK-8 experiment showed that β-glucan had no direct inhibition on S180 cells. ③ In vivo experiments showed that compared with the model group, the tumor mass of the β-glucan medium and high dose groups were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). β-glucan obviously increased the levels of IL-2, TNF-α, and IFN-γ, while reduced the levels of IL-4 and IL-6. Western blot showed that β-glucan significantly up-regulated the expression of Bax, down-regulated the expression of Bcl-2, and VEGF/JAK2/STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** β-glucan can interfere with PI3K-Akt pathway by acting on JAK and Bcl-2 targets and affect VEGF/JAK/STAT3 to regulate EGFR pathway, inhibit tumor growth and promote tumor apoptosis, thereby exerting therapeutic effects on ascite tumors.

Key words: β-glucan; ascites tumor; network pharmacology; immune regulation

近年来，癌症的发病率逐年升高[1]。有研究发现 2018 年全球新发癌症人数达 1810 万，我国占 24%（约 430 万）[2]。目前对于肿瘤的治疗以免疫治疗与靶向治疗为主，但治疗过程中易产生耐药、副作用大等问题[3]。

天然多糖为结构多样的生物大分子，从不同的植物、动物以及微生物中分离得到，在抗氧化[4]、抗凝血[5]、抗肿瘤[6]及刺激免疫[7]等方面表现出良好的活性。多种食用菌多糖已在体内外体现出明显的抗肿瘤及免疫调节作用[8-9]。本研究利用网络药理学方法，以β-葡聚糖与腹水瘤作为研究对象，预测相关靶点及通路，并建立相关模型对其进行实验验证，以阐述其抗肿瘤的作用机制。

1 材料

1.1 软件与数据库

β-葡聚糖靶点的预测：Swiss Target Prediction 数据库（http：//www.swisstargetprediction.ch）；疾病靶点的获取：Geen Cards 数据库（https：//www.genecards.org）；OMIM 数据库（https：//omim.org）。靶点间相互作用关系分析：String 网站（https：//string-db.org）。相关关系图的绘制：Draw Veen 网站（http：//bioinfornatics.psb.ugent.be/webtools/Veen/）。互作网络图的绘制：Cytoscape 3.8.0 软件。相关通路分析：R Studio 3.6.3 软件。

1.2 细胞株与实验动物

S180 细胞（中乔新舟细胞库）；C57 小鼠，雌鼠体质量 20 ～ 23 g；雄鼠体质量 28 ～ 31 g，SPF 级 [新疆医科大学实验动物中心，合格证编号：SCXK（新）2018-0002]。

1.3 试药

β-葡聚糖（S24487，上海源叶）；顺铂（IC0440，索莱宝公司）；胎牛血清（FBS10099-141，Gibco）；RPMI1640 培养基（AE29163439，Hyclone）；双抗链霉素混液（Gibco）；二甲基亚砜（DMSO，Sigma）；小鼠白细胞介素（IL）-2、IL-4、IL-6、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、γ 干扰素（IFN-γ）酶联免疫吸附（ELISA）试剂盒（钰博生物有限公司）。Bcl-2、Bax、Caspase-3、VEGF、JAK2、STAT3 兔抗小鼠抗体（Abcam）；山羊抗兔二抗（Bioss，bs-40295G-HRP）。

1.4 仪器

光学显微镜、3-18K 离心机（Sigma）；蛋白电泳仪及转印仪（Bio-Rad）；凝胶图像分析软件。

2 方法

2.1 β-葡聚糖及腹水瘤疾病靶点预测

采用 Swiss Target Prediction 对β-葡聚糖作用靶点进行预测，使用 Geen Cards 与 OMIM 数据库预测腹水瘤疾病靶点。

2.2 β-葡聚糖抗肿瘤作用靶点预测与 Network 网络图的构建

将上述β-葡聚糖作用靶点与抗肿瘤相关靶点导入 Veen 数据库进行交互分析，将药物作用靶点与 Veen 图中交集靶点导入 Cytoscape 3.8.0，获得药物 - 疾病 - 靶点相互作用网络图。

2.3 蛋白互作、GO 与 KEGG 分析

将交互靶点导入 String 数据库，将得到的蛋白互作关系网导入 Cytoscape 软件，得到 PPI 互作图。使用 R Studio 对所有预测靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析，获得目的靶点参与关键通路的信息。

2.4 *β*- 葡聚糖对 S180 细胞活性的影响

取对数生长期的 S180 细胞接种于 96 孔板中，每孔 5000 个细胞，培养 2 h 后，加入不同浓度的 *β*- 葡聚糖，每组设置 5 个复孔，同时设定空白对照组。药物分别作用 24、48 h 后，每孔加入 10 μL 的 CCK-8，孵育 1.5 h，使用酶标仪于 450 nm 处测定光密度值（*OD*）。根据公式记录 *β*- 葡聚糖对 S180 细胞的抑制率。抑制率（%）＝[（$OD_{对照孔}$－$OD_{实验孔}$）/（$OD_{对照孔}$－$OD_{空白孔}$）]×100%。

2.5 动物模型的建立

取对数生长期 S180 细胞，调整细胞密度为 7×10^5 个 • mL^{-1}，于每只小鼠皮下接种 0.2 mL 细胞悬液，并对小鼠荷瘤情况进行观察及记录，接种部位出现实体瘤并伴随腹部肿大则提示造模成功。

2.6 分组及给药

取 80 只造模成功的荷瘤小鼠，适应环境饲养 1 周后随机分为正常组，模型组，顺铂组，*β*- 葡聚糖低（50 mg • kg^{-1}）、中（100 mg • kg^{-1}）、高（200 mg • kg^{-1}）剂量组。正常组与模型组灌胃等体积的蒸馏水，顺铂组按照 0.2 mg • kg^{-1} 的剂量腹腔注射顺铂，*β*- 葡聚糖组按照对应剂量灌胃给药。隔日给药，1 次 • d^{-1}。连续给药 3 周，每周根据动物体质量情况调整给药体积。

2.7 观察指标

2.7.1 测定各组小鼠的抑瘤率及脾脏指数 给药 21 d 后，眼球取血，颈椎脱臼法处死小鼠。检测各组小鼠的抑瘤率及脾脏指数。抑瘤率（%）＝[（模型组肿瘤质量－实验组肿瘤质量）/ 模型组肿瘤质量]×100%，脾脏指数＝脾脏质量 / 体质量。

2.7.2 小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF-*α*、IFN-*γ* 的含量 采小鼠眼球静脉血，放置 6 h，使血清充分析出，1500 r • min^{-1} 离心 10 min，收集血清。参照 ELISA 试剂盒说明书方法测定小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、TNF-*α*、IFN-*γ* 的含量。

2.7.3 蛋白印迹法（Western blot）测定小鼠瘤组织中 Bax、Bcl-2、VEGFA、JAK2、STAT3 蛋白的表达 将瘤组织加入液氮，研磨粉碎。通过增量法称定质量，按照每 1 mg 添加 10 μL 的比例添加裂解液（RIPA：PMSF ＝ 100：1），置于冰上裂解 30 min。裂解后于 4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取高温变性后的蛋白质（20 μg/lane），采用 8%SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离，转移至 PVDF 膜上，使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，用 1×TBST 清洗 3 次，每次 10 min，一抗 4 ℃孵育过夜；加入辣根过氧化物酶标记的二抗避光孵育 2 h；曝光、显影、定影。用凝胶图像分析软件分析各条带光密度值，以 *β*-actin 为内参照，目的蛋白相对表达量以目的蛋白与 *β*-actin 光密度比值表示。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 *β*- 葡聚糖作用靶点及腹水瘤靶点预测结果、药物 - 疾病 - 靶点相互作用网络图的构建

分别从数据库中获取 *β*- 葡聚糖的作用靶点 33 个与腹水瘤疾病靶点 3116 个。将上述靶点导入 Veen 数据库进行交互分析（见图 1A），获得交集靶点 12 个用于本实验的后续研究。将药物作用靶点与 Veen 图中交集靶点导入 Cytoscape 3.8.0，获得药物 - 疾病 - 靶点相互作用网络图，涉及 DRD1、VEGFA、FGF2、HPSE、CDK1 等 12 个交集靶点，见图 1B。

3.2 蛋白互作、GO 及 KEGG 分析

将交互基因导入 String 数据库，分析获得 VEGFA、STAT3、FGF2、HSP90AA1 等 8 个靶点的相互作用关系，见图 2A。使用 R Studio 对交集靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析，GO 分析得到 MAPK 激酶的正向调控、内皮细胞趋化性的调节、蛋白激酶活性的激活、血管生成的正向调节、中肾小管形态的发生等生物过程与化学诱导活性、生长因子受体结合、成纤维细胞生长因子受体结合以及热休克蛋白结合等分子功能，见图 2B、2C。通路富集分析得到癌症中的蛋白多糖、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂、钙信号通路、PI3K-Akt 通路、MAPK 信号通路、TH17 细胞分化通路及 HIF-1 信号通路等 15 条通路，见图 2D。

3.3 生物学验证

3.3.1 *β*- 葡聚糖对 S180 细胞活性的影响 如图 3 所示，与对照组相比，各剂量 *β*- 葡聚糖作用 24 h 对 S180 细胞均无直接抑制作用。

3.3.2 *β*- 葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 如表 1 所示，与模型组比较，各给药组均有显著的抑瘤作用。其中顺铂组抑瘤作用最强，抑瘤率达到 64.76%；*β*- 葡聚糖给药组抑瘤率伴随着给药剂量的增加呈上升趋势。

3.3.3 *β*- 葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠脾脏指数的影响

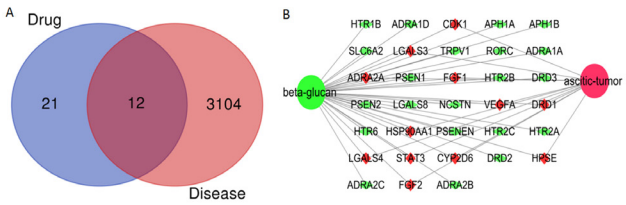


图 1 药物 - 靶点 Veen 图（A）与药物 - 疾病 - 靶点网络图（B）

Fig 1 Drug-target veen diagram（A）and drug-disease-target network diagram（B）

如表 1 所示，与空白组比较，模型组脾脏指数显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，各剂量 β- 葡聚糖给药组脾脏指数均显著降低（$P < 0.01$）。

3.3.4 β- 葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠相关细胞因子的影响 如表 2 所示，与空白组比较，模型组小鼠血清中 IL-2、IL-4 水平明显降低（$P < 0.01$）。与模型组比较，顺铂组及 β- 葡聚糖各给药组 IL-2、IL-4、TNF-α、IFN-γ 水平具有上升趋势，IL-6 水平具有下降趋势。

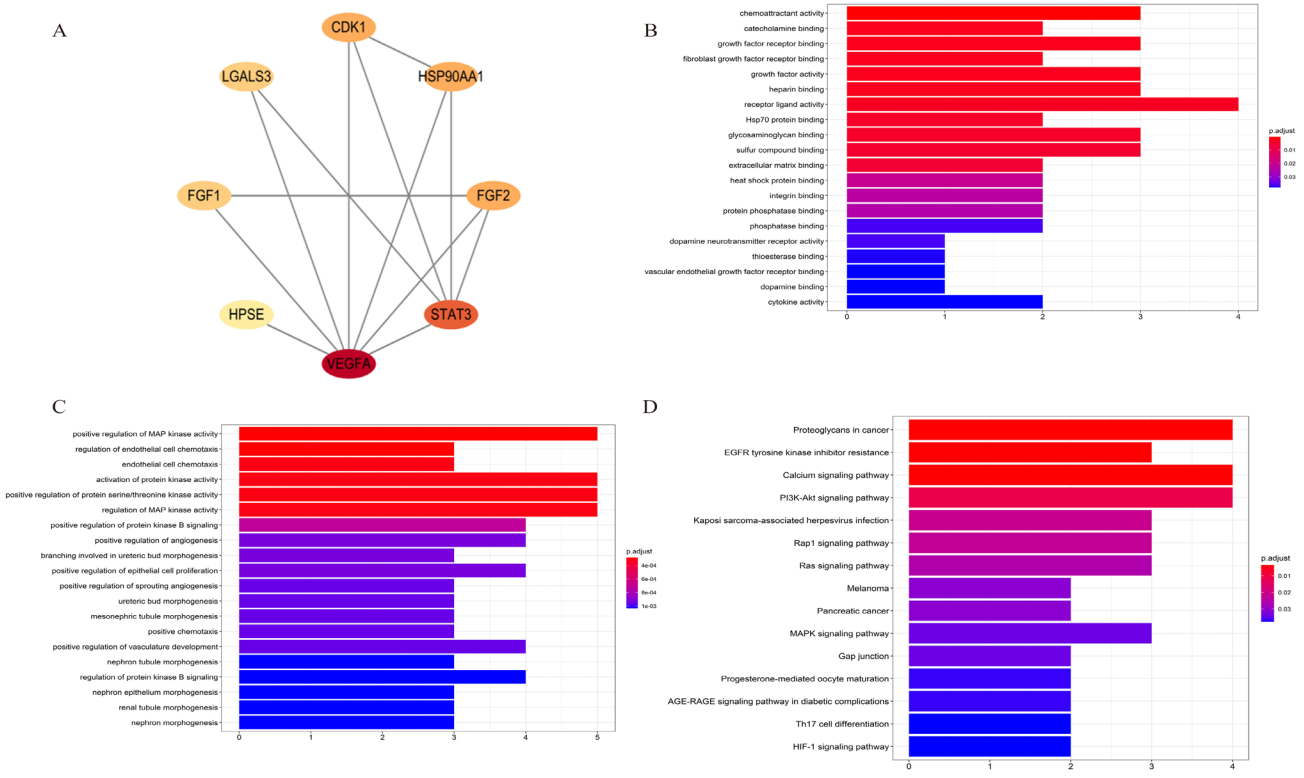


图 2 蛋白互作网与 GO、KEGG 分析

Fig 2 Protein interaction network and GO，KEGG analysis

A. 蛋白互作网络图（protein interaction network）；B. 生物过程图（bioprocess）；C. 细胞组成图（cell composition）；D. 分子功能图（molecular function）

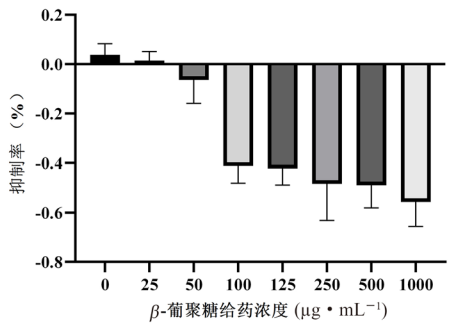


图 3 不同浓度 β- 葡聚糖对 S180 细胞活性的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of β-glucan on S180 cell

3.3.5 β- 葡聚糖对 Bax、Bcl-2、VEGFA、JAK2、STAT3 蛋白表达的影响 如图 4 所示，与模型组比较，顺铂组与 β- 葡聚糖各给药组均能使 Bax 蛋白的表达上调，使 Bcl-2、VEGFA、JAK2 以及 STAT3 蛋白的表达下调。

表 1 β- 葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长及脾脏指数的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Tab 1 Effect of β-glucan on tumor growth and spleen index of S180 tumor-bearing mice（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

组别	瘤质量 /g	抑瘤率 /%	脾脏指数 /（mg•g^{-1}）
空白组	—	—	3.81±0.57
模型组	5.54±0.82	—	9.09±1.37**
顺铂组	1.95±0.42$^{\#\#}$	64.76	5.25±1.01$^{\#\#}$
低剂量组	4.64±0.45$^{\#}$	16.28	5.91±1.32$^{\#\#}$
中剂量组	4.14±0.48$^{\#\#}$	25.32	6.57±1.03$^{\#\#}$
高剂量组	3.04±0.47$^{\#\#}$	45.14	6.66±1.18$^{\#\#}$

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

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

表 2　β-葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠细胞因子的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 2　Effect of β-glucan on cytokines in S180 tumor-bearing mice（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	TNF-α/（pg·mL^{-1}）	IFN-γ/（pg·mL^{-1}）	IL-2/（pg·mL^{-1}）	IL-4/（pg·mL^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）
空白组	183.83±7.98	17.43±4.77	9.46±1.09	7.75±0.68	7.65±0.77
模型组	196.61±17.61	22.36±2.70	5.61±2.20**	4.26±0.35**	12.74±0.77**
顺铂组	283.39±16.45$^{\#\#}$	36.95±3.63$^{\#\#}$	7.00±0.44	5.24±1.40	9.16±1.68
低剂量组	224.26±21.59$^{\#\#}$	20.08±3.07	6.87±1.39	7.22±0.69$^{\#\#}$	9.3±0.64$^{\#}$
中剂量组	234.84±7.91$^{\#\#}$	25.38±3.81	7.23±1.96	5.76±0.72$^{\#\#}$	9.97±1.39$^{\#\#}$
高剂量组	257.78±26.78$^{\#\#}$	31.67±4.09$^{\#\#}$	6.78±1.71	5.08±0.78	11.61±1.33$^{\#\#}$

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

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

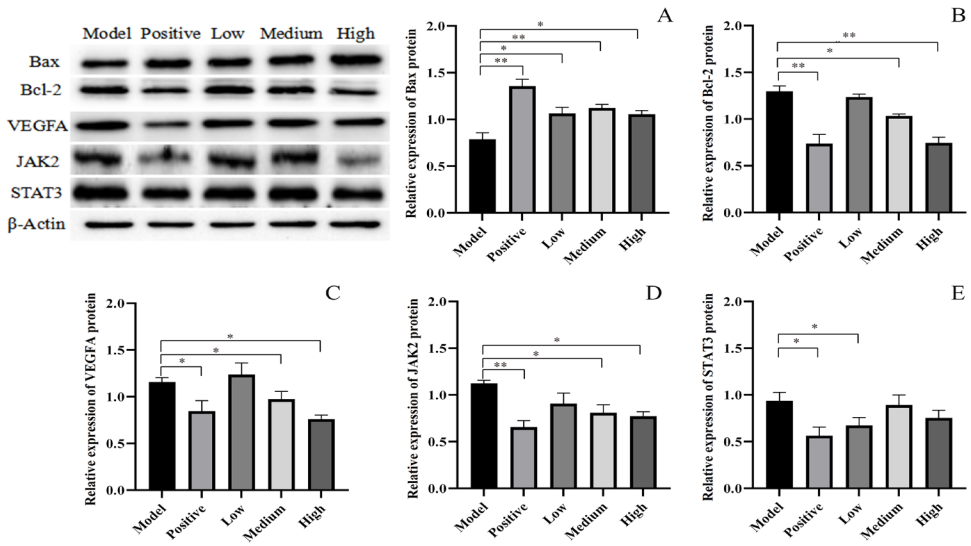


图 4　Bax（A）、Bcl-2（B）、VEGFA（C）、JAK2（D）、STAT3（E）蛋白的相对表达量（$P<0.05$，$P<0.01$）

Fig 4　Relative expression of Bax（A），Bcl-2（B），VEGFA（C），JAK2（D），and STAT3（E）protein（$P<0.05$，$P<0.01$）

4　讨论

作为真菌细胞壁含量最高的多糖[10]，β-葡聚糖可对肿瘤细胞进行有效攻击而对正常细胞无杀伤作用[11]。天然多糖因其治疗效果显著且毒副作用较轻而受到关注[12]。有研究表明，β-葡聚糖作为一种高效的生物应答物能够提高机体免疫力[13]。因此本实验观察β-葡聚糖在体内外对S180 腹水瘤的疗效，并进一步明确其作用机制。

本文通过对已有数据集分析β-葡聚糖可能作用于腹水瘤的靶点，获得 12 个潜在靶点，对其进一步分析明确交集靶点涉及 VEGFA、STAT3 等 8 个靶点；从 GO 与 KEGG 富集结果来看，β-葡聚糖可能通过干预 MAPK 激酶的正向调控、内皮细胞趋化性的调节、蛋白激酶活性的激活、血管生成的正向调节，调控 PI3K-Akt、EGFR、MAPK 等信号通路发挥作用。

本研究发现高剂量β-葡聚糖对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用较好，抑瘤率为 45.14%。本实验选择了能够反映细胞及体液免疫的脾脏指数[14]进行考察，发现各剂量β-葡聚糖给药组均可降低脾脏指数。提示其抗肿瘤机制可能与对机体免疫器官的保护作用相关。

在肿瘤发生发展过程中，T 淋巴细胞会释放出多种细胞因子。细胞因子 TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4 及 IL-6 可以结合自身相对应的受体调节细胞的生长、分化并对免疫应答过程进行调控[15]。其中，TNF-α 含量在一定的范围内可对受损的组织起到修复作用，但当其浓度异常升高时，也会对组织造成一定的损伤[16]。体内实验研究表明，β-葡聚糖能够升高小鼠血清中 TNF-α 含量，可能与增加血清中肿瘤坏死因子含量从而发挥抗肿瘤作用有关。IFN-γ 由活化的 Th 细胞与 NK 细胞产生，可以促进 Th1 细胞的生长发育，对于免疫调控也具有一定的影响[17]。β-葡聚糖能升高小鼠血清中 IFN-γ 水平，可能与其可促进机体产生相应的免疫因子相关。IL-2 可促进 T 细胞的生长，在抑制肿瘤细胞生长的特异性免疫反应中扮演重要角色。IL-4 作为具有生物学活性的细胞因子，可以通过少量的分泌对人体起到保护作用，在感染以及肿瘤的治疗中发挥作用。但当其分泌量较大时，将会促进肿瘤的发生发展。IL-6 最初被作为一种炎症因子被人们所认识，之后越来越多的研究发现 IL-6 在癌症患者的

体内还可作为“促瘤因子”发挥促瘤效应[18]。

有研究发现肿瘤细胞凋亡过程中紊乱的发生与肿瘤的产生密切相关，多种基因共同调控肿瘤细胞的凋亡过程，例如促凋亡基因、抑制凋亡基因及凋亡效应基因等[19]。Bcl-2 家族在凋亡的过程中扮演着重要的角色，以具有对抗凋亡的 Bcl-2 蛋白以及促进凋亡的 Bax 蛋白为代表。当 Bcl-2 表达过高时，可以抑制细胞凋亡；但 Bcl-2 表达不足，Bax 表达过量时，体内的 Bax 同源二聚体占据优势，会促进细胞凋亡[20]。在本实验中，相较于模型组，各给药组的 Bcl-2 蛋白表达量均降低，Bax 蛋白表达量均升高，以顺铂组最为明显，高、中剂量的 *β*- 葡聚糖次之。

JAK-STAT 信号通路经上游细胞因子产生刺激，而对下游包括 *Bcl-2*、*Bax* 及 *VEGF* 等靶基因进行调控并参与细胞增殖、分化、凋亡、血管生成等生物学过程[21]。VEGF 作为生理和病理性血管生成所必需的促血管生成因子在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色[22]。STAT3 作为信号转导子和转录激活蛋白家族成员之一，其异常激活可上调 VEGF 的表达[23]。网络药理学预测结果表明，VEGF、STAT3 靶点在 *β*- 葡聚糖治疗腹水瘤中发挥重要作用。Western blot 结果提示，相较于模型组，小剂量 *β*- 葡聚糖给药组对其抑制作用不显著，而 *β*- 葡聚糖中、高剂量组均能降低 JAK2、STAT3 以及 VEGFA 蛋白的表达量，并能显著抑制肿瘤的生长。

联合作用靶点分析发现 VEGFA、JAK、STAT3 与多条通路密切相关，表皮生产因子通路中的 VEGF/JAK/STAT3 靶点与凋亡抑制基因 *Bcl2* 及促癌基因 *Bax* 的蛋白表达情况如图 5 所示。

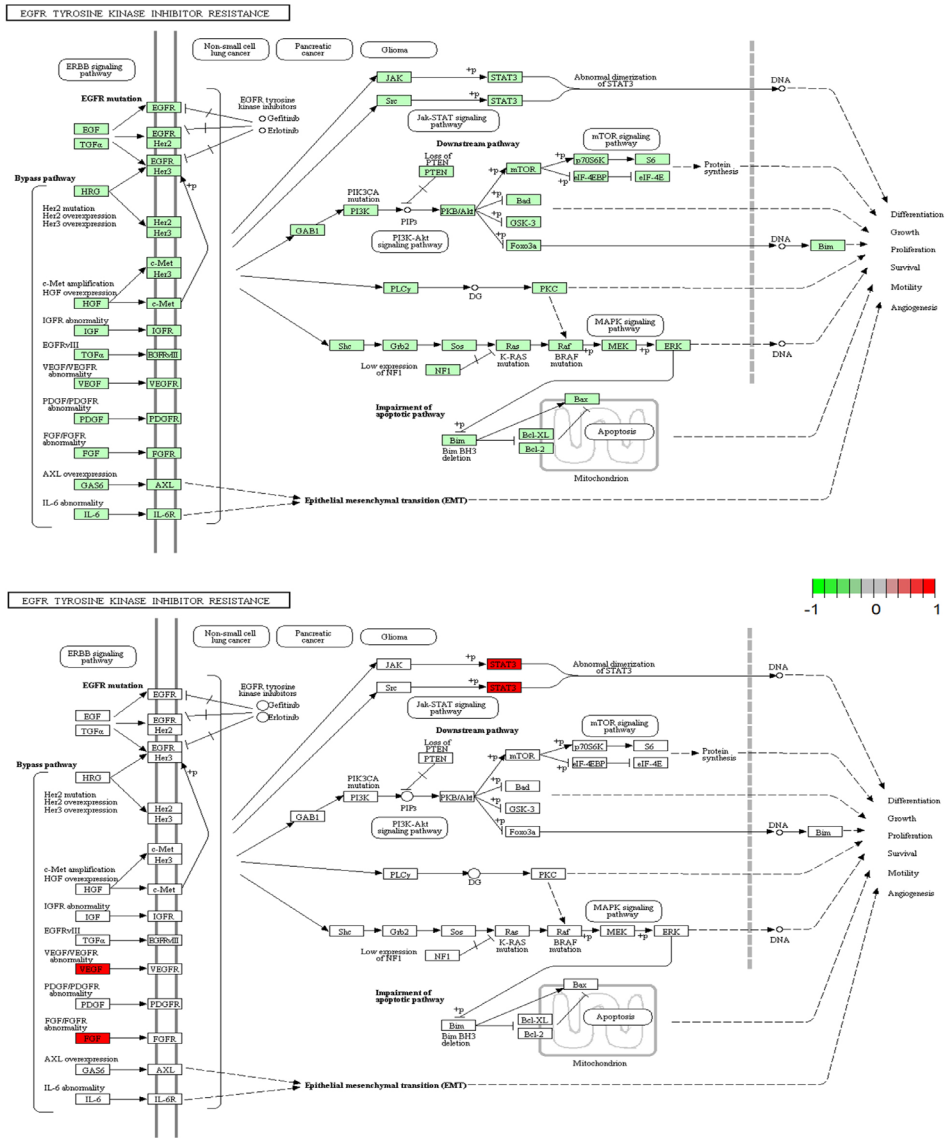


图 5 PI3K-Akt 及 EGFR 富集通路图

Fig 5 PI3K-Akt and EGFR enrichment pathway

一方面，*β*-葡聚糖通过影响 JAK 与 Bcl-2 蛋白相对表达量调控 PI3K-Akt 通路，改善腹水瘤小鼠炎症状态；另一方面，*β*-葡聚糖通过下调 VEGFA、JAK2、STAT3 蛋白表达水平及 IL-6 表达水平，上调 IFN-*γ*、IL-2、IL-4 水平，影响 EGFR 信号通路，从而抑制小鼠腹水瘤组织的表皮生长因子通路，发挥抗肿瘤作用，且*β*-葡聚糖还通过降低 *Bcl2* 和升高 *Bax* 的蛋白表达水平，抑制腹水瘤组织中肿瘤细胞的生长。

综上所述，*β*-葡聚糖可能是通过影响 JAK2/STAT3/VEGF 等靶点，参与调节 PI3K-Akt、EGFR 等通路，从而发挥促进肿瘤凋亡的作用。

参考文献

[1] 张涛，陈仁义，尹勉，等 . 羧甲基 -*β*-1，3- 葡聚糖在 S180 荷瘤小鼠体内的抗肿瘤作用 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2018，27（4）：287-293.

[2] Feng RM，Zong YN，Cao SM，et al. Current cancer situation in China：good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J] Cancer Commun（Lond），2019，39（1）：22.

[3] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2020 [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（1）：7-30.

[4] Xie JH，Wang ZJ，Shen MY，et al. Sulfated modification，characterization and antioxidant activities of polysaccharide from Cyclocarya paliurus [J]. Food Hydrocolloids，2016，53：1-9

[5] Li N，Liu X，He X，et al. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed Monostroma angicava [J]. Carbohydr Polym，2017，159：195-206.

[6] Park HR，Hwang D，Suh HJ，et al. Antitumor and antimetastatic activities of rhamnogalacturonan-Ⅱ-type polysaccharide isolated from mature leaves of green tea via activation of macrophages and natural killer cells [J]. Int J Biol Macromol，2017，99：179-186.

[7] Yang J，Li C，Zhou J，et al. Identification of prognostic genes in leiomyosarcoma by gene co-expression network analysis [J]. Front Genet，2020，10：1408.

[8] Kowalczewska M，Piotrowski J，Jędrzejewski T，et al. Polysaccharide peptides from Coriolus versicolor exert differential immunomodulatory effects on blood lymphocytes and breast cancer cell line MCF-7 in vitro [J]. Immunol Lett，2016，174：37-44.

[9] Yelithao K，Surayot U，Lee C，et al. Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomannans from Schizophyllum commune [J]. Carbohydr Polym，2019，218：37-45.

[10] 陈璐，郭兰芳，闻平 .*β*-葡聚糖对巨噬细胞的增殖及 ERK5 通路的影响 [J]. 江苏大学学报（医学版），2008（3）：248-250，254.

[11] 陶佳，崔进 .*β*-葡聚糖（*β*-glucan）抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中外医疗，2010，29（20）：187，189.

[12] 蔡成岗，蒋新龙，蒋昌海 .*β*-葡聚糖结构功能与开发研究进展 [J]. 农产品加工（学刊），2011（9）：114-117.

[13] 王文婷，王彦珺，林向辉，等 . 鲜人参膏对 H_{22} 荷瘤小鼠抗肿瘤作用的初步研究 [J]. 人参研究，2021，33（2）：22-26.

[14] Chang M，Wu M，Li H. Antitumor activities of novel glycyrrhetinic acid-modified curcumin-loaded cationic liposomes in vitro and in H22 tumor-bearing mice [J]. Drug Deliv，2018，25（1）：1984-1995.

[15] Wang G，Zhao J，Liu J，et al. Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo [J]. Int Immunopharmacol，2007，7（6）：864-870.

[16] Yoshioka Y，Tsutsumi Y，Ikemizu S，et al. Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-alpha improves its antitumor potency [J]. Biochem Biophys Res Commun，2004，315（4）：808-814.

[17] 田雨弘，高鸽，刘颖，等 . 桔梗茎叶皂苷对 H_{22} 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 毒理学杂志，2016，30（1）：45-48.

[18] Lin WW，Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity，inflammation，and cancer [J]. J Clin Invest，2007，117（5）：1175-1183.

[19] 胡晓忠，明杰，甄宝贵，等 . 用酸碱法从面包酵母中提取*β*-（1-3-）-*D* 葡聚糖 [J]. 工业微生物，2000（1）：28-31.

[20] Paul D，Chanukuppa V，Reddy PJ，et al. Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma [J]. J Proteomics，2016，138：95-105.

[21] Lu R，Zhang YG，Sun J. STAT3 activation in infection and infection-associated cancer [J]. Mol Cell Endocrinol. 2017，451：80-87.

[22] 蔡勋全，潘勤聪，沈强，等 . JAK-STAT 信号通路与人直肠癌发生发展的关系 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2015，22（3）：331-336.

[23] Luna-Vargas MPA，Chipuk JE. Physiological and pharmacological control of BAK，BAX，and beyond [J]. Trends Cell Biol，2016，26（12）：906-917.

（收稿日期：2021-07-05；修回日期：2021-10-13）

发汗续断中真菌群落的组成分析及其对川续断皂苷Ⅵ积累的影响

周太敏，何华，徐娇，江维克，潘琪，张成刚，周涛*（贵州中医药大学，贵阳 550025）

摘要：目的 基于续断发汗后川续断皂苷Ⅵ含量升高的现象，探究发汗前后续断中川续断皂苷Ⅵ含量变化的机制。**方法** 对续断发汗前后样品的真菌群落进行了高通量测序，同时利用真菌诱导子与川续断无菌苗的共培养体系对高通量测序筛选出的优势菌进行功能分析。**结果** Alpha 多样性分析结果显示，续断发汗后真菌群落的多样性和丰富度比发汗前高。发汗前后样品中共检出 200 个真菌菌属，有 35 个菌属的相对丰度发生了显著变化，镰刀菌属（*Fusarium* sp.）真菌是续断发汗后样品的优势菌；将从川续断中分离出的镰刀菌属菌株 J35，制备成诱导子与川续断无菌苗共培养 60 d，结果无菌苗根中川续断皂苷Ⅵ的含量与对照相比提高了约 5.4 倍。**结论** 续断发汗会影响药材的真菌群落丰度，而发汗后富集的优势菌会促进川续断皂苷Ⅵ积累。

关键词：续断；发汗加工；川续断皂苷Ⅵ；高通量测序；真菌群落
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0330-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.015

Compositions of fungal community and their effect on asperosaponin Ⅵ accumulation in sweated *Dipsacus asper*

ZHOU Tai-min, HE Hua, XU Jiao, JIANG Wei-ke, PAN Qi, ZHANG Cheng-gang, ZHOU Tao*
(*Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guiyang* 550025)

Abstract: Objective To determine the mechanism of the change of asperosaponin Ⅵ in crude and sweated *Dipsacus asper*. **Methods** The fungal communities in the above two *Dipsacus asper* were sequenced by high-throughput sequencing, and the function of the dominant species screened by high-throughput sequencing was analyzed by the aseptic seedlings of *Dipsacus asper* cultured with corresponding fungal elicitors. **Results** Alpha diversity analysis showed that the diversity and richness of the fungal communities in the sweated samples were higher than that of crude samples. Totally 200 fungal genera were identified in the above two *Dipsacus asper*, and the relative abundance of 35 fungal genera was significantly different. Fungi from the *Fusarium* sp. was the dominant species in the sweated samples. The elicitors were prepared with the strain J35 isolated from this genus in *Dipsacus asper*, and then cultured with the aseptic seedlings of *Dipsacus asper* for 60 d, and the result showed that the content of asperosaponin Ⅵ was increased by about 5.4 times in the above co-culture systems as compared with the control. **Conclusion** Sweating can affect the abundance of fungal community, and the dominant fungi enriched in the sweated *Dipsacus asper* can promote the accumulation of asperosaponin Ⅵ.

Key words: *Dipsacus asper*; sweating processing; asperosaponin Ⅵ; high-throughput sequencing; fungal community

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81860675）；贵州省高层次创新型人才（黔科合平台人才 [2018]5638-2）；贵州省科技计划项目（黔科合基础 [2019]1026 号）。

作者简介：周太敏，女，硕士研究生，主要从事中药及民族药资源分类鉴定及质量控制研究，email：1979721788@qq.com *通信作者：周涛，女，教授，主要从事中药资源学研究，email：taozhou88@163.com

中药材续断来源于川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根，具有补肝肾、强筋骨、续折伤等功效[1]。川续断皂苷Ⅵ是续断药材质量评价的指标成分，现代药理研究表明其能预防骨质疏松、镇痛[2]。2020 年版《中国药典》规定续断药材需进行发汗加工。已有研究结果表明，续断经发汗加工后，川续断皂苷Ⅵ的含量会显著升高[3]，但是其对应的机制尚不清楚。研究表明，真菌在促进萜类、生物碱类等中药活性成分的转化及积累中发挥作用，可以用于提高中药活性成分的含量，其对应的机制主要包括提供底物转化的关键酶[4-6]以及作为诱导子激发特定次级代谢产物的合成[7]。赵慧[8]在厚朴发汗的研究中发现，不同发汗阶段的厚朴中内生真菌的数量存在差异，而内生真菌会对厚朴次级代谢产物的形成具有一定影响。

基于上述研究背景，推测续断发汗后药材中川续断皂苷Ⅵ含量的变化与其真菌群落的构成有一定关系。因此，本研究在前期建立的续断发汗条件的基础上，对续断发汗前后药材中的真菌群落进行高通量测序，分析发汗前后续断中的真菌群落差异，筛选出发汗续断中的优势菌，将优势菌制备成诱导子与川续断无菌苗共培养，探讨优势菌对发汗药材中川续断皂苷Ⅵ含量变化的影响，为解析中药材发汗加工的科学内涵奠定理论基础。

1 材料

1.1 试药

新鲜川续断、川续断成熟种子采于贵州省龙里县，经贵州中医药大学江维克教授鉴定为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry。将根洗净，切段，取部分进行发汗处理[3]，标记为 DP3，未发汗样品标记为 CK。川续断无菌苗来源于贵州中医药大学中药民族药资源研究院组培室；镰刀菌属（*Fusarium* sp.）菌株 J35 由本课题组从川续断中分离鉴定。

对照品川续断皂苷Ⅵ（批号：111685-201305，纯度：99.29%，成都埃法生物科技有限公司）；乙腈（色谱纯）、95% 乙醇（分析纯）（国药集团化学试剂有限公司）；水为自制超纯水；其他试剂均为分析纯。微生物总 DNA 提取采用 DNA 试剂盒（Omega Biotek）；在上海美吉生物医药科技有限公司进行微生物测序。

1.2 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪（Alliance 2695，美国沃特斯公司）；电子天平（AG285，瑞士梅特勒公司）；振荡培养箱（BSD-150，上海博讯医疗生物仪器）；PCR 扩增仪（ABIGene Amp 9700 型，美国）；5810R 台式冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪（美国 Thermo 公司）。

2 方法

2.1 续断发汗前后样品的 DNA 提取和测序

将发汗前后的样品分别用液氮研磨成细粉，平均分为 3 份，DNA 试剂盒提取总 DNA，检测样品 DNA 浓度和纯度，PCR 扩增真菌 ITS1 区，引物：ITS1F（5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'）和 ITS2R（5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'）。扩增体系：引物 ITS1F（5 μmol • L^{-1}）和 ITS2R（5 μmol • L^{-1}）各 0.8 μL，10× 缓冲液和 dNTPs（2.5 mmol • L^{-1}）各 2 μL，rTaq Polymerase 0.2 μL，BSA 0.2 μL，DNA 模板 10 ng，超纯水补足至 20 μL。PCR 扩增程序为：95 ℃预变性 3 min，30 个循环（95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s），72 ℃后延伸 10 min。将真菌扩增子构建 Miseq 文库并测序。

2.2 测序数据分析

原始序列使用 Flash（1.2.11）软件进行序列拼接，Fastp 软件质控。根据聚类分析序列之间的相似性分为多个操作单元（Operational taxonomic unit，OTU），序列相似性域值 97%，Usearch 软件（http：//www.drive5.com/usearch/）对物种 OTU 进行聚类和生物信息统计分析。RDP classifier 软件（https：//sourceforge.net/projects/rdp-classifier/）对每条序列进行物种分类注释。真菌 ITS 数据库为 Unite（Release 8.0 http：//unite.ut.ee/index.php）。利用 Mothur 软件（https：//www.mothur.org/wiki/Download_mothur）进行 Alpha 多样性分析；基于分类学信息（域、界、门、纲、目、科、属、种），运用 R 语言等相关软件对发汗前后样本的群落组成进行分析。根据发汗前后真菌物种差异分析得到的群落丰度数据，找出具有显著差异的物种。

2.3 真菌诱导子的制备及共培养

镰刀菌属（*Fusarium* sp.）菌株 J35 接种于 PDA 液体培养基中，在摇床上以 200 r • min^{-1} 的转速培养 5 d，分为两份。一份用于川续断皂苷Ⅵ含量分析，另一份用于制备真菌诱导子。121 ℃高温高压灭菌 20 min，分离出菌丝体，接种至生长状况健康且较一致的组培苗，共培养 60 d，采用 HPLC 检测川续断皂苷Ⅵ含量。

2.4　川续断皂苷Ⅵ含量的测定

2.4.1　对照品溶液的制备　取适量川续断皂苷Ⅵ对照品精密称定，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，稀释至质量浓度为 0.1016 mg·mL^{-1}。

2.4.2　供试品溶液的制备　取“2.3”项下 PDA 液体培养基发酵培养的真菌，分离菌丝及发酵液。量取发酵液 40 mL 减压浓缩至黏稠，甲醇定容至 40 mL，超声 40 min，过滤，浓缩，吸取 2 mL 色谱甲醇溶解，0.45 μm 滤膜过滤，即得样品。菌丝用甲醇定容至 40 mL，后续制备同发酵液。菌株 J35 制备的诱导子与川续断无菌苗共培养 60 d 后，去除无菌苗根表面琼脂，清水洗净，45 ℃烘干。磨成细粉，称取 10 mg 于 2 mL 离心管中，吸取 1.5 mL 甲醇，超声 30 min，放冷。离心，吸取上清液于 2 mL 离心管中，挥干，精密吸取 400 μL 色谱甲醇溶解，0.45 μm 滤膜过滤，即得样品。

2.4.3　色谱条件　色谱柱为 Symmetry-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈 - 水（30∶70），检测波长为 212 nm，进样量为 20 μL，流速为 1.0 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃ [1]。

3　结果与分析

3.1　续断发汗前后样品测序数据统计

发汗前后样品的原始数据经过质控及过滤后，获得序列数及序列长度等信息，见表 1。序列数平均 52 448 条；碱基数平均为 13 343 250 bp；每条序列平均长度为 255 bp。CK 和 DP3 样本的 Coverage 指数超过 99%（见表 2），表明样本中大多数真菌群落均检测到，数据质量可靠，可用于后续分析。

表 1　续断发汗前后样品的测序数据

Tab 1　Sequencing data in crude and sweated *Dipsacus asper*

样品信息	序列数 / 条	碱基数 /bp	序列长度 /bp
CK_1	49 808	13 793 650	277
CK_2	47 057	12 442 372	264
CK_3	51 635	13 577 654	263
DP3_1	50 195	12 202 047	243
DP3_2	53 205	12 842 421	241
DP3_3	62 788	15 201 356	242

3.2　Alpha 多样性分析

对发汗前后样品的 Alpha 多样性指数的分析见表 2。Shannon 和 Simpson 指数均可反映样品中微生物的多样性。Simpson 指数值越大，说明群落多样性越低；而 Shannon 值越大，说明群落多样性越高。根据上述衡量标准，结合 CK 和 DP3 样本的 Shannon 和 Simpson 指数，表明发汗后续断中真菌群落的多样性升高，但是两者差异并无统计学意义。进一步对两组样本的 Ace 和 Chao 指数进行了分析，结果表明 Ace 和 Chao 指数在 DP3 样品中均较高，表明发汗后续断中真菌群落的丰富度显著提高。

表 2　续断发汗前后样品的 Alpha 多样性评估指数统计

Tab 2　Alpha diversity evaluation indexes in both crude and sweated *Dipsacus asper*

评估指数	CK	DP3
Shannon	2.731±0.265	3.236±0.011
Simpson	0.155±0.053	0.101±0.004
Ace	154.150±13.545	222.940±16.857**
Chao	154.82±13.732	222.400±16.165**
Coverage	0.999±4.250×10^{-5}	0.999±6.40×10^{-5*}

注：与 CK 相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the CK，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

3.3　续断发汗前后样品的真菌群落组成及优势菌分析

CK 和 DP3 样品在属水平上的真菌组成见图 1。续断发汗前后样品中共鉴定到 200 个属的真菌群落，其中有 35 个属的真菌群落在发汗前后样品中的相对丰度具有显著差异（见表 3），表明续断发汗前后样品中真菌组成的种类没有改变，但是其相对丰度发生了明显变化。由表 3 可知，续断发汗后，蜜环菌属（*Armillaria* sp.）及螺旋聚孢霉属（*Clonostachys* sp.）的真菌相对丰度分别下降了 77% 和 81%，而镰刀菌属（*Fusarium* sp.）真菌的相对丰度是发汗前的 16.8 倍左右，成为了优势菌属。

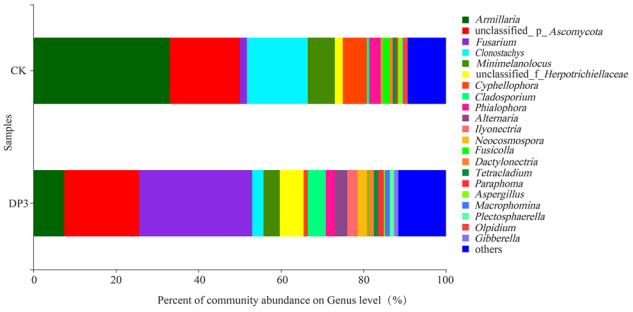


图 1　CK 和 DP3 样本中真菌在属水平上群落组成分析

Fig 1　Community composition of fungi in CK and DP3 samples at the genus level

3.4　优势菌属的真菌 J35 对川续断无菌苗中川续断皂苷Ⅵ含量的影响

课题组利用前期从川续断中分离的镰刀菌属内生真菌 J35（*Fusarium* sp.）进行相关样品中川

表 3　续断发汗前后样品真菌相对丰度差异性分析

Tab 3　Difference of fungi relative abundance in crude and sweated *Dipsacus asper*

菌属	CK 相对丰度	DP3 相对丰度
Armillaria sp.	33.140±8.522	7.487±0.910*
Fusarium sp.	1.635±1.105	27.520±0.874***
Clonostachys sp.	14.760±2.722	2.768±0.315*
Minimelanolocus sp.	6.560±0.176	3.966±0.130*
unclassified_f_*Herpotrichiellaceae*	1.935±0.317	5.786±0.388***
Cyphellophora sp.	5.756±0.836	1.032±0.042*
Cladosporium sp.	0.610±0.112	4.414±0.603**
Alternaria sp.	0.240±0.054	3.055±0.781*
Ilyonectria sp.	0.407±0.259	2.497±0.090**
Neocosmospora sp.	0.149±0.045	2.283±0.112*
Dactylonectria sp.	0.716±0.159	1.300±0.096**
Plectosphaerella sp.	0.122±0.135	1.083±0.399*
Macrophomina sp.	0.011±0.012	1.161±0.358*
Cephalotrichum sp.	0.925±0.244	0.163±0.060*
Titaea sp.	0.782±0.217	0.235±0.024*
Filobasidium sp.	0.292±0.173	0.721±0.0417*
Gibberella sp.	0.031±0.031	0.980±0.115**
Trichoderma sp.	0.052±0.011	0.716±0.267*
unclassified_o_Branch06	0.526±0.111	0.115±0.022*
Thanatephorus sp.	0.126±0.027	0.270±0.062*
Aureobasidium sp.	0.049±0.021	0.342±0.116*
Alatospora sp.	0.317±0.073	0.031±0.013*
Penicillium sp.	0.270±0.071	0.055±0.013*
Hannaella sp.	0.032±0.032	0.277±0.093*
unclassified_o_*Saccharomycetales*	0.003±0.005	0.260±0.099*
unclassified_f_*Nectriaceae*	0.047±0.028	0.160±0.026**
Dictyocheirospora sp.	0.061±0.021	0.136±0.024*
Colletotrichum sp.	0.006±0.010	0.184±0.055*
Cladophialophora sp.	0.159±0.058	0.009±0.009*
Cylindrocarpon sp.	0.025±0.012	0.117±0.019**
Haematonectria sp.	0.009±0.015	0.010±0.038*
Metarhizium sp.	0.008±0.014	0.045±0.011*
Setophoma sp.	0.001±0.002	0.051±0.010*
Uncispora sp.	0	0.212±0.076*
Memnoniella sp.	0	0.084±0.021*

注：与 CK 相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

Note：Compared with the CK，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$.

续断皂苷Ⅵ含量的检测，结果显示，J35 发酵培养的发酵液及分离的菌丝体中虽未检测到川续断皂苷Ⅵ，但 J35 菌丝体制备的诱导子与川续断无菌苗共培养 60 d 后，川续断皂苷Ⅵ含量相比对照组（未加诱导子的川续断无菌苗）显著提高了约 5.4 倍（见图 2）。该结果表明，J35 制备的诱导子能够促进川续断皂苷Ⅵ的积累，推测续断发汗后川续断皂苷Ⅵ含量升高与镰刀菌属真菌相关，可能与镰刀菌属真菌产生的中间代谢产物激发的信号通路有关。

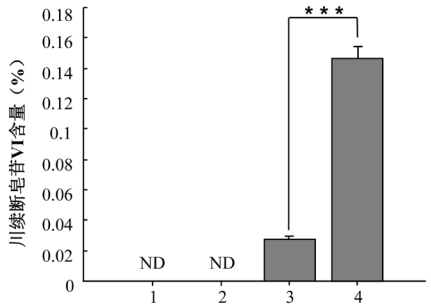


图 2　不同处理样品中川续断皂苷Ⅵ的含量比较分析

Fig 2　Comparative analysis of asperosaponin Ⅵ content in different treatment samples

注：1. J35 发酵液；2. J35 发酵培养分离的菌丝体；3. 未加真菌诱导子处理的无菌苗；4. J35 制备的诱导子与无菌苗共培养。

Note：1. J35 fermentation broth；2. Mycelium isolated by J35 fermentation culture；3. Aseptic seedlings without fungal elicitor treatment；4. Co-culture of elicitors prepared by J35 with aseptic seedlings.

4　讨论

本研究通过真菌群落的高通量测序，发现续断发汗后真菌群落的物种多样性及丰富度均提高，镰刀菌属（*Fusarium* sp.）、新赤壳属（*Ilyonectria* sp.）以及赤霉菌属（*Gibberella* sp.）等真菌群落的相对丰度显著提高，表明发汗过程促进了上述真菌的增殖和代谢，这可能是发汗改变了续断药材的温、湿条件从而影响微生物的代谢活动[9]。

镰刀菌属真菌在续断药材发汗后相对丰度明显增加，其对应菌属的真菌 J35 菌丝体制备的诱导子能显著提高川续断无菌苗根中川续断皂苷Ⅵ的含量，而其本身并不产生川续断皂苷Ⅵ，表明 J35 可能是作为一个诱导因子通过调节或激活信号传导途径中与川续断皂苷Ⅵ合成相关酶的表达，从而影响川续断皂苷Ⅵ的合成和积累[7]，这个过程可能还涉及茉莉酸、水杨酸、一氧化氮以及活性氧等信号分子[10-12]。胡正平等[13]通过茉莉酸甲酯（MeJA）处理川续断的研究表明，MeJA 可通过上调川续断皂苷Ⅵ合成关键酶基因的表达来促进川续断皂苷Ⅵ的积累，进一步表明茉莉酸在促进川续断皂苷Ⅵ积累中的作用。课题组后续将继续探讨 J35 促进川续断皂苷Ⅵ积累的机制，研究续断发汗过程影响三萜皂苷类成分变化的机制，为揭示中药材发汗加工的科学内涵奠定理论基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：343.

[2] 李广润，宫丽丽，吕亚丽，等 . 川续断皂苷Ⅵ药理作用研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志，2014，33（7）：477-480.

[3] 周太敏，龚安慧，何华，等 . 续断“发汗”条件及川续断皂苷Ⅵ含量与色度的相关性研究 [J]. 中国现代中药，2021，23（7）：1250-1253.

[4] 张志龙，郜玉钢，臧埔，等 . 真菌转化中药活性成分研究进展 [J]. 中草药，2019，50（11）：2736-2742.

[5] Yue SD，Le PL，Yong MB，et al. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979 [J]. Chinese J Catal，2014，35（9）：1534-1546.

[6] Yu LZ，Hua L，Yun SW，et al. Biotransformation of artemisinin by *Aspergillus niger* [J]. Appl Microbiol Biot，2015，99（8）：3443-3446.

[7] Zhai X，Jia M，Chen L，et al. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants [J]. Crit Rev Microbiol，2017，43（2）：238-261.

[8] 赵慧 . 厚朴药材的品质评价研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2018.

[9] 段金廒，宿树兰，严辉，等 . 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药，2013，44（10）：1219-1225.

[10] Misra RC，Maiti P，Chanotiya CS，et al. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil [J]. Plant Physiol，2014，164（2）：1028-1044.

[11] 兰文智，余龙江，吴元喜 . 水杨酸对真菌诱导子诱导红豆杉悬浮细胞膜脂过氧化和紫杉醇生物合成的影响 [J]. 西北植物学报，2002，22（1）：78-83.

[12] 徐茂军，董菊芳 . 一氧化氮通过依赖和不依赖活性氧的信号途径介导桔青霉细胞壁诱导子促进红豆杉悬浮细胞中紫杉醇生物合成 [J]. 科学通报，2006，51（14）：1675-1682.

[13] 胡正平，徐娇，周涛，等 . 茉莉酸甲酯对川续断根中川续断皂苷Ⅵ合成积累的影响 [J]. 药学学报，2021，56（8）：2302-2307.

（收稿日期：2021-10-28；修回日期：2021-11-28）

药蜀葵中总黄酮提取工艺优化及其生物活性研究

薛涛涛[1]，唐志书[1]，孙强[1]，胡晓慧[1]，阮凯华[1]，宋忠兴[1]，段金廒[2*]，许洪波[1*]（1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心，秦药特色资源研究开发国家重点实验室（培育），陕西 咸阳 712083；2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心，江苏省方剂高技术研究重点实验室，南京 210023）

摘要：目的 优选药蜀葵中总黄酮的最佳提取工艺，并探讨其体外抗氧化和抗 α-葡萄糖苷酶活性。**方法** 基于单因素实验，选择料液比、提取时间和乙醇浓度为自变量，应用 Box-Benhnken 中心组合法进行药蜀葵总黄酮响应面分析，并采用 D101 大孔树脂对获得的总黄酮进一步富集纯化。考察药蜀葵总黄酮抗氧化和抗 α-葡萄糖苷酶活性。**结果** 工艺优化结果表明，药蜀葵中总黄酮最佳提取条件为：提取次数 2 次，提取温度 80 ℃，料液比为 1∶25（g/mL），乙醇浓度 49.0%，提取时间 2.0 h，总黄酮的平均提取率为 2.15%；经富集纯化所得总黄酮纯度为 53.62%。体外活性研究结果表明，药蜀葵总黄酮有明显的清除 DPPH 和 ABTS 自由基的活性，其 IC_{50} 值分别为（8.36±0.06）μg·mL^{-1} 和（8.45±0.14）μg·mL^{-1}；同时具有显著的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，IC_{50} 值为（76.63±1.12）μg·mL^{-1}。**结论** 本研究首次对药蜀葵总黄酮的提取工艺进行优化，并发现其具有体外抗氧化及 α-葡萄糖苷酶活性抑制作用，为药蜀葵总黄酮的开发利用提供了参考。

关键词：药蜀葵；响应面法；总黄酮；抗氧化；α-葡萄糖苷酶

中图分类号：R284，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0334-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.016

基金项目：陕西省科技统筹创新工程计划项目（No. 2016KTTSSF01-06-01）；陕西省青年科技新星项目（No. 2020KJXX-069）；现代农业产业技术体系建设专项基金项目（No. CARS-21）。

作者简介：薛涛涛，男，硕士研究生，主要从事天然产物分离纯化及制剂研究，email：219040011321@email.sntcm.edu.cn *通信作者：段金廒，男，博士，教授，主要从事中药资源化学与资源循环利用研究，email：dja@njutcm.edu.cn；许洪波，男，博士，副教授，主要从事天然产物分离纯化研究，email：xhb2005@sntcm.edu.cn

Extraction optimization and biological activities of total flavonoids from *Althaea officinalis*

XUE Tao-tao[1], TANG Zhi-shu[1], SUN Qiang[1], HU Xiao-hui[1], RUAN Kai-hua[1], SONG Zhong-xing[1], DUAN Jin-ao[2*], XU Hong-bo[1*] (1. *Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization*, *State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Resources of Qin Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shannxi* 712083; 2. *Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu*, *Jiangsu Key Laboratory of Traditional Chinese Medical Formula Research*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023)

Abstract: Objective To optimize the extraction of total flavonoids from *Althaea officinalis*, and to explore its anti-oxidation and anti-*α*-glucosidase activities in vitro. **Methods** Based on single-factor tests, the Box-Benhnken central combination design was used to determine the response surface with the ratio of liquid to solid, extraction time and ethanol concentration as variables. The total flavonoid was further purified by D101 macroporous resin, its anti-oxidation and anti-*α*-glucosidase activities were investigated in vitro, respectively. **Results** The optimization conditions included extraction twice, extraction temperature at 80 ℃ , the ratio of solid to liquid at 1∶25 (g/mL), ethanol concentration at 49.0%, and extraction for 2.0 h. Under these conditions, the extraction yield of total flavonoids reached 2.15%. The purity of the total flavonoids obtained by enrichment and purification was 53.62%. The in vitro biological activity showed that the total flavonoid of *Althaea officinalis* had obvious DPPH and ABTS free radical scavenging activities with the IC_{50} values of (8.36±0.06) μg • mL^{-1} and (8.45±0.14) μg • mL^{-1}, respectively. Meanwhile, it exhibited significant inhibition on *α*-glucosidase in vitro with the IC_{50} value of (76.63±1.12) μg • mL^{-1}. **Conclusion** The extraction of the total flavonoid of *Althaea officinalis* has been optimized for the first time, revealing anti-oxidation and inhibition on *α*-glucosidase in vitro, which provides a scientific reference for the development and utilization of the total flavonoid from *Althaea officinalis*.

Key words: *Althaea officinalis*; response surface methodology; total flavonoid; anti-oxidation; *α*-glucosidase

药蜀葵（*Althaea officinalis*），为锦葵科蜀葵属的多年生草本植物，其根、茎、叶和花均可入药，主要以根为主，收录于欧洲药典[1]，主产于欧洲等地区[2]，我国多为栽培品种，是药食两用植物，根入药有解表散寒、利尿止咳、消炎解毒的功效，作为茶饮可清喉利咽，还可作为观赏性植物栽培[3-4]。现代药理实验揭示，药蜀葵提取物具有镇咳、抗炎、抗氧化、抗菌、免疫调节和降血糖等作用[5]。国内外化学研究表明，药蜀葵富含黄酮、多糖和酚酸类成分，截至目前，从药蜀葵中共分离得到 40 余个化合物[6]，其中 17 个黄酮类，7 个酚酸类，3 个香豆素类，1 个甾体类，1 个三萜类[7]。药蜀葵作为民间药用植物，资源分布广泛，但是目前对于其基础研究比较薄弱，功效物质成分不明确，作用机制不清晰。迄今为止，尚未有对总黄酮提取工艺优化及相关生物活性的研究报道。本实验首次采用响应面法对药蜀葵茎叶总黄酮的提取工艺进行优化，首次采用 D101 大孔树脂对所得总黄酮进行了富集纯化；并进一步考察药蜀葵总黄酮的抗氧化活性及体外抑制 *α*- 葡萄糖苷酶的活性，以期为药蜀葵总黄酮的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 试药

药蜀葵茎叶收集于永寿县监军镇陕西辉胜现代农业园区，经陕西中医药大学许洪波副教授鉴定为锦葵科蜀葵属植物药蜀葵（*Althaea officinalis*）的茎叶。芦丁对照品（纯度≥ 97%，批号：H24N9Z75966）和维生素 C（V_C，纯度≥ 99%，批号：J19O10R100374）（上海源叶生物科技有限

公司）；DPPH、ABTS（美国 Sigma 公司）；阿卡波糖（纯度≥ 98%，批号：wkq20031707）、对硝基苯基 -*α*-*D*- 葡萄糖吡喃苷（纯度≥ 98%，批号：wkq20071504）（四川省维克奇生物科技有限公司）；D-101 型大孔吸附树脂（天津允开树脂科技有限公司）；其他试剂（分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）。

1.2　仪器

Multiskan GO 全波长酶标仪（Thermo Scientific，USA）；UV-2600 型紫外分光光度计（日本岛津公司）；H-2 型恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；TP-A2000 型电子天平（福州华志科学仪器有限公司）；EYELA N-1100 旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）；KQ-300 DE 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

2　方法与结果

2.1　样品前处理

药蜀葵茎叶样品置于通风阴凉处阴干后，将其剪碎后保存备用。

2.2　总黄酮含量测定

2.2.1　标准曲线的绘制　采用 $NaNO_2$-Al（NO_3）$_3$-NaOH 比色法测定总黄酮含量。用 60% 乙醇溶解芦丁对照品后制得 0.2 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。精确吸取不同体积对照品溶液（0.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL）于 25 mL 量瓶中，加 5% $NaNO_2$ 溶液 1.0 mL，摇匀静置 6 min，加 10% Al（NO_3）$_3$ 溶液 1.0 mL，摇匀静置 6 min，加 4% NaOH 溶液 10.0 mL，60% 乙醇溶液定容至刻度，摇匀静置 15 min，于 510 nm 处测定吸光度（*A*）值。以芦丁质量浓度（*C*）为横坐标（*X*），*A* 为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线并计算回归方程为：$Y = 6.455X + 0.0452$（$r = 0.9990$），表明芦丁在 0.016 ～ 0.056 mg • mL^{-1} 与吸光度线性关系良好。

2.2.2　样品溶液中总黄酮含量的测定　将提取液抽滤后滤液合并浓缩至约 50 mL，转移至 100 mL 量瓶中，然后用 60% 乙醇定容至刻度，摇匀，作为样品溶液。精密吸取 2 mL 样品溶液于 10 mL 量瓶中，用 60% 乙醇定容至刻度，摇匀，即得供试品溶液。精密吸取 0.5 mL 供试品溶液，先后加入 5% $NaNO_2$ 溶液，10% Al（NO_3）$_3$ 溶液和 4% NaOH 溶液，用 60% 乙醇定容至刻度线，15 min 后于 510 nm 处测定吸光度，根据标准曲线计算出测定稀释后样品溶液总黄酮浓度，计算提取率，提取率（%）＝[黄酮的质量浓度（mg • mL^{-1}）× 稀释倍数 × 最初溶液体积（mL）/10]/ 原料质量（g）×100%。

2.3　单因素实验

准确称取 10 g 干燥的茎叶碎片，回流提取，分别考察提取次数（1、2、3、4 次）、提取温度（50、60、70、80、90 ℃）、料液比（1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30，g/mL）、乙醇浓度（40%、50%、60%、70%、80%）和提取时间（1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h）对总黄酮提取率的影响。将供试品溶液按照总黄酮含量测定方法操作，根据标准曲线计算提取率，结果见图 1。综合考虑时间和经济成本，选择提取次数为 2 次，料液比为 1∶25，提取溶剂为 50% 乙醇，单次提取时间为 2 h，提取温度为 80 ℃。

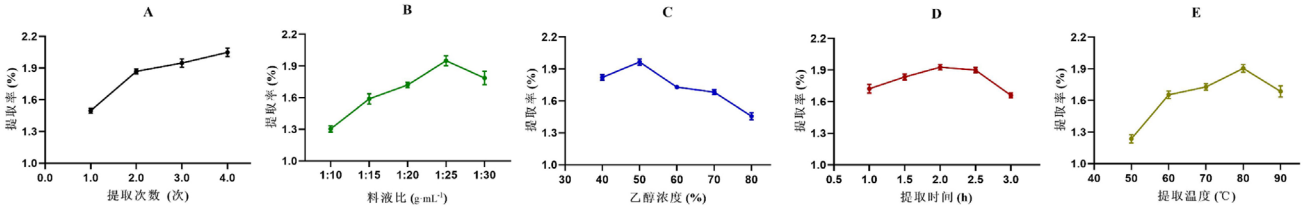


图 1　提取次数（A）、料液比（B）、乙醇浓度（C）、提取时间（D）和提取温度（E）对药蜀葵总黄酮提取率的影响

Fig 1　Effect of extraction time（A），solid-to-liquid ratio（B），ethanol concentration（C），extraction time（D）and extraction temperature（E）on the yield of total flavonoids of *Althaea officinalis*

2.4　响应面实验

2.4.1　响应面实验设计　基于单因素实验结果，以总黄酮提取率为响应值，考察料液比（A）、提取时间（B）和乙醇浓度（C）三个因素，利用 Design Expert 8.0 软件根据 Box-Benhnken 实验设计原理设计并对相关数据进行分析，最后通过模型验证最佳提取工艺。实验设计因素及水平如表 1 所示，结果如表 2 所示，方差分析如表 3 所示。

2.4.2　优化结果及分析　根据 Box-Benhnken 响应面实验结果，利用 Design Expert 8.0 软件对表 2 的数据进行多元回归拟合，得到总黄酮提取率 *Y* 的函数：$Y = 2.244 - 0.05875A - 0.0475B - 0.00875C - 0.0525AB + 0.04AC - 0.0425BC - 0.252A^2 - 0.2345B^2 - 0.182C^2$。

表 1　响应面分析因素及水平

Tab 1　Factor and level of response surface experiment

水平	因素		
	A. 料液比	B. 提取时间 /h	C. 乙醇浓度 /%
－1	1∶20	1.5	40
0	1∶25	2.0	50
1	1∶30	2.5	60

从表 3 可知模型的 $F = 9.290$、$P < 0.01$，差异极显著；失拟项 P 值为 0.6815 > 0.05，无显著性差异，表明所选因素合理，不存在失拟因素；决定系数 $R^2 = 0.9227$ 和校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.8233$ 表明实验模型拟合程度良好；变异系数为 5.02%，说明模型的重现性较好，回归方程能够解释响应值的变异，实验方法可靠，可用于药蜀葵总黄酮提取工艺的条件优化 [8]。模型中一次项 A、B 和 C，二次项 C^2，交互项 AB、AC 和 BC 对响应值的影响均不显著；二次项 A^2、B^2（$P < 0.01$）对响应值的影响极显著，说明实验因素对响应值的影响是非线性关系 [9]。

响应曲面图能够直观反映各因素对提取率的影响程度，坡度越陡峭，说明操作条件对响应值的影响越显著 [8]。如图 2 所示，料液比对药蜀葵总黄酮提取率影响最为显著，其次是乙醇浓度和提取时间。

2.4.3　最佳工艺条件及验证　通过对数据进行分析，得到药蜀葵的最佳提取工艺：提取次数 2 次，提取温度 80 ℃，乙醇浓度 49.135%、料液比 1∶24.451、提取时间 1.987 h，药蜀葵总黄酮提取率理论值为 2.25%。由于实际操作的局限性，调整乙醇浓度为 49.0%、料液比为 1∶25、提取时间为 2.0 h，其他条件不变，进行 3 次验证实验，得到药蜀葵总黄酮的平均提取率为 2.15%，*RSD* 为 0.50%，验证结果与模型预测接近，表明所建立模型可靠，最优工艺可行性高。

表 2　响应面实验设计及结果

Tab 2　Response surface design and experimental results

编号	A. 料液比	B. 乙醇浓度 /%	C. 提取时间 /h	R. 提取率 /%
1	1∶30	50	2.5	1.80
2	1∶20	60	2.0	1.84
3	1∶25	40	2.5	1.91
4	1∶30	40	2.0	1.78
5	1∶25	50	2.0	2.30
6	1∶20	40	2.0	1.87
7	1∶20	50	2.5	1.76
8	1∶25	40	1.5	1.80
9	1∶30	60	2.0	1.54
10	1∶20	50	1.5	1.90
11	1∶25	50	2.0	2.12
12	1∶25	60	2.5	1.77
13	1∶25	50	2.0	2.20
14	1∶25	60	1.5	1.83
15	1∶25	50	2.0	2.20
16	1∶25	50	2.0	2.40
17	1∶30	50	1.5	1.78

表 3　方差分析结果

Tab 3　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	0.780	9	0.087	9.290	0.0039
A	0.028	1	0.028	2.950	0.1296
B	0.018	1	0.018	1.930	0.2076
C	0.001	1	0.001	0.065	0.8055
AB	0.011	1	0.011	1.180	0.3138
AC	0.006	1	0.006	0.680	0.4357
BC	0.007	1	0.007	0.770	0.4089
A^2	0.270	1	0.270	28.560	0.0011
B^2	0.230	1	0.230	24.730	0.0016
C^2	0.140	1	0.140	14.890	0.0062
残差	0.066	7	0.009		
失拟项	0.019	3	0.006	0.540	0.6815
纯误差	0.047	4	0.012		
总和	0.848	16			
$R^2 = 0.9227$	$R^2_{Adj} = 0.8233$				

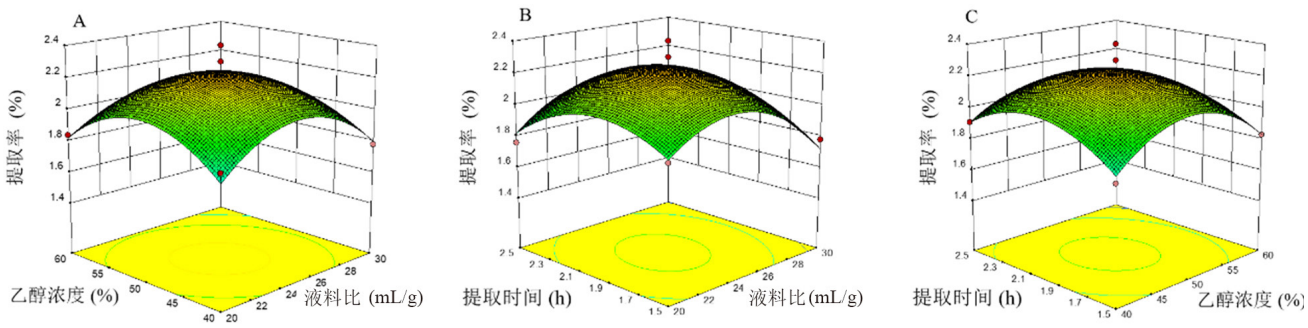


图 2　各提取因素之间的交互影响

Fig 2　Different factors on the yield of flavonoids

2.5　总黄酮的富集和纯化

将最优工艺下的提取液减压浓缩至无醇味，吸附于预处理的大孔树脂色谱柱（D101，12 cm×85 cm），依次用水、70% 乙醇洗脱，收集 70% 洗脱液浓缩为干浸膏，采用“2.2.2”项下方法进行黄酮含量测定。结果显示经过 D101 大孔树脂富集纯化后得到的药蜀葵总黄酮纯度达到 53.62%。

2.6　体外抗氧化活性测试

2.6.1　DPPH 活性测试　参考文献[10]：精密量取 100 μL 不同浓度的样品溶液于 96 孔板中，加入 0.1 mmol • L^{-1}DPPH 溶液 100 μL，避光反应 30 min（室温），于 517 nm 处测定吸光度值（A_S），设置样品对照组 A_{BS}（等量无水乙醇代替 DPPH 溶液），对照组 A_C（等量无水乙醇代替样品溶液），空白对照 A_{BC} 组（无水乙醇）和阳性对照组（V_C）。平行操作 3 次，计算清除率，清除率（%）＝[1 －（A_S － A_{BS}）/（A_C － A_{BC}）]×100%。

2.6.2　ABTS 活性测试　将 7.4 mmoL • L^{-1} ABTS 溶液和 2.6 mmoL • L^{-1} 过硫酸钾溶液按 1∶1 混合，于室温避光放置过夜后得到 ABTS 母液，稀释母液至（0.7±0.02）（$A_{734\,nm}$），即得 ABTS 工作液。精确量取不同浓度的样品溶液 50 μL 于 96 孔板中，加入 150 μL ABTS 工作液，摇匀，静置 6 min，于 734 nm 处测定吸光度值。设置样品对照组、对照组、空白对照组和阳性对照组（同 DPPH 法），平行操作 3 次，清除率计算同 DPPH 法。

结果如图 3A、3C 所示，药蜀葵总黄酮在测定的浓度范围内对 DPPH、ABTS 自由基的清除具有浓度依赖性。其 IC_{50} 值分别为（8.36±0.06）μg • mL^{-1}、（8.45±0.14）μg • mL^{-1}。阳性对照 V_C 的测试结果如图 3B、3D 所示，V_C 在 2.0 ～ 15.6 μg • mL^{-1} 内对 DPPH 自由基的清除能力与浓度呈线性关系，其 IC_{50} 值为（6.40±0.31）μg • mL^{-1}；在 0.5 ～ 3.9 μg • mL^{-1} 内对 ABTS 自由基的清除能力与浓度呈线性关系，其 IC_{50} 值为（2.77±0.09）μg • mL^{-1}。

2.7　体外抑制 *α*- 葡萄糖苷酶活性测试

本研究采用酶标仪微量法作为药蜀葵富集纯化后总黄酮体外抑制 *α*- 葡萄糖苷酶活性的检测手段。实验所用的缓冲溶液、底物溶液和酶液的配制方法参照文献[11]，具体步骤简述如下：

精密称取药蜀葵富集纯化后总黄酮适量，用 PBS 缓冲溶液配制成不同浓度的样品溶液。将 50 μL 样品溶液，100 μL 0.1 U • mL^{-1} *α*- 葡萄糖苷酶溶液（用 pH 6.9，0.1 moL • L^{-1} PBS 配制）依次

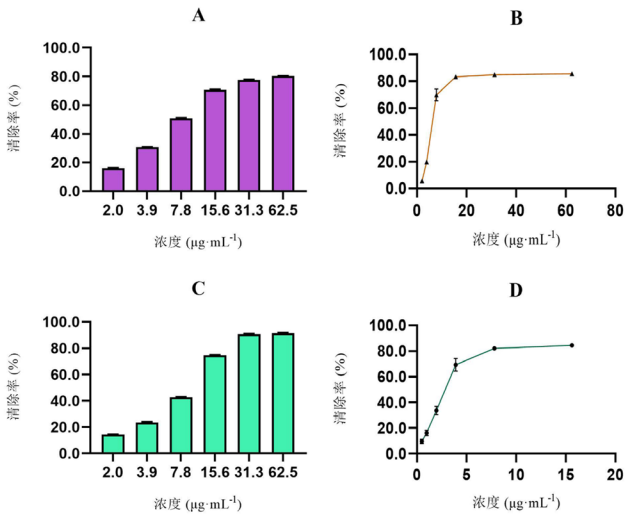


图 3　药蜀葵总黄酮和阳性对照 V_C 对 DPPH（A，B）和 ABTS（C，D）自由基清除能力

Fig 3　Scavenging effect of flavonoids and V_C to DPPH（A，B）and ABTS（C，D）free radical

加入到 96 孔板中，25 ℃下孵育 5 min，立即加入 5 mmoL • L^{-1} 底物（对硝基苯基 -*α*-*D*- 吡喃葡萄糖溶液）50 μL 启动反应，25 ℃下孵育 5 min，孵育前后，记录 405 nm 处吸光度值。本实验设置样品组 A_S（加样品、底物和酶液），酶组 A_C（用 PBS 代替样品），阳性对照组（阿卡波糖），平行操作 3 次，计算抑制率，抑制率（%）＝[（△ A_c － △ A_s）/ △ A_c]×100%。

药蜀葵作为传统的药食两用植物，其具有明确的降血糖功效[12]。基于此，作者对药蜀葵总黄酮进行了 *α*- 葡萄糖苷酶抑制活性测试。结果如图 4，药蜀葵总黄酮在测试浓度范围（7.8 ～ 250.0 μg • mL^{-1}）对 *α*- 葡萄糖苷酶具有明显的抑制作用且呈现浓度依赖性，其 IC_{50} 值为（76.63±1.12）μg • mL^{-1}，抑制作用强于阳性对照阿卡波糖 [IC_{50} 值为（323.43±7.06）μg • mL^{-1}]。

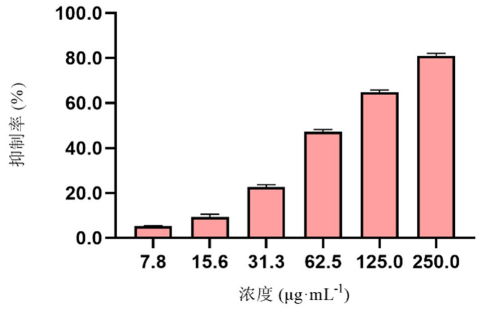


图 4　药蜀葵总黄酮抑制 *α*- 葡萄糖苷酶量效关系

Fig 4　Dose-effect relationship for total flavonoids of *Althaea officinalis* inhibiting *α*-glucosidase

3　讨论和结论

本研究首次利用响应面法设计优化得到药蜀

葵总黄酮的最佳提取工艺条件：提取次数 2 次，提取温度 80 ℃，料液比为 1∶25，提取时间 2.0 h，乙醇浓度 49.0%，在该条件下预测提取率为 2.25%，实际提取率为 2.15%，预测值与测定值相符，表明优化的工艺可靠。由于经过最优提取工艺得到的是含有药蜀葵总黄酮的粗提物，且提取率较低，因此需要对粗提物进一步的富集纯化，以便后续的活性研究。D101 大孔树脂是分离纯化总黄酮应用较为广泛的非极性大孔树脂 [13]；基于后续药蜀葵总黄酮工业化大生产的考虑，本研究选择 D101 大孔树脂进行富集纯化，其总黄酮纯度达到 53.62%。

许多疾病的发生与氧化有着密切的关系，其中自由基引发的氧化会导致机体衰老 [10]。摄入抗氧化物质能够降低自由基对机体的氧化损伤。DPPH 自由基和 ABTS 自由基是表征物质抗氧化活性实验中应用最为经典的模型 [12]。本研究结果表明，药蜀葵总黄酮对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基均具有显著的清除作用，特别是清除 DPPH 自由基的能力与阳性对照 V_C 相当。经过本研究富集纯化所得的总黄酮抗氧化能力显著，可为开发天然高效的抗氧化物质提供思路。

糖尿病是严重威胁人类健康的三大疾病之一 [14]。持续性高血糖会引发一系列并发症，如心血管疾病等。有效控制餐后血糖上升是防治疾病发生的必要措施 [15]。α- 葡萄糖苷酶作为降低餐后血糖的有效分子靶标，在碳水化合物转变为葡萄糖的过程中至关重要 [16]。目前临床常用药物如阿卡波糖等，虽然降血糖作用显著，但长期服用会引起多种不良反应，甚至产生耐药性 [17]。因此，亟待寻找和开发新的 α- 葡萄糖苷酶抑制剂。相较于阿卡波糖，本研究首次发现富集纯化得到的药蜀葵总黄酮抗 α- 葡萄糖苷酶活性显著，其 IC_{50} 值为（76.63±1.12）μg·mL^{-1}。本研究结果可为药蜀葵中总黄酮的开发利用提供参考。

参考文献

[1] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia. 8th ed [S]. 2014：1309-1311.

[2] Al-Snafi AE. The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*：a review [J]. Pharm Tech，2013，5（3）：1378-1385.

[3] Anju IM. A brief review on a Unani drug：Khatmi（*Althaea officinalis*）[J]. Asian J Pharm Pharmacol，2018，4（4）：394-398.

[4] Mujib A，Pipal T，Ali M，et al. In vitro propagation of *Althaea officinalis*：the role of plant growth regulators in morphogenesis [J]. Bio Technologia，2017，98（3）：167-173.

[5] Fahamiya N，Shiffa M，Aslam M，et al. Unani perspective of Khatmi（*Althaea officinalis*）[J]. J Pharmacogn Phytochem，2016，6（5）：357-360.

[6] Xue TT，Xu HB，Tang ZS，et al. Progress in chemical compositions and pharmacological activities of *Althaea officinalis* [J]. Med Res，2021，5（2）：210002.

[7] Ethan BM，Catherine UP，Paul HM，et al. Marshmallow（*Althaea officinalis L.*）monograph [J]. J Herb Pharmacother，2003，3（3）：71-81.

[8] Al-Snafi AE. Medicinal plants with antidiabetic effects（part 2）：plant based review [J]. IOSR J Pharm，2016，6（7-2）：49-61.

[9] 许洪波，王娟娟，唐志书，等 . 响应面法优化枳椇子多糖提取工艺及其体外生物活性研究 [J]. 中药新药与临床药理，2019，30（6）：719-724.

[10] 徐运飞，刘琴，宋珅，等 . 响应面法优化黄参多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性 [J]. 天然产物研究与开发，2015，27（12）：2116-2123.

[11] Phan MAT，Wang J，Tang J，et al. Evaluation of α-glucosidase inhibition potential of some flavonoids from Epimedium brevicornum [J]. LWT-Food Sci Technol，2013，53（2）：492-498.

[12] 曾维才，石碧 . 天然产物抗氧化活性的常见评价方法 [J]. 化工进展，2013，32（6）：1205-1213，1247.

[13] 黄燕秋，谢志茹，朴胜华，等 . 大孔吸附树脂在中药纯化中的应用进展 [J]. 广东化工，2018，45（8）：130-132.

[14] 杨文英 . 中国糖尿病的流行特点及变化趋势 [J]. 中国科学：生命科学，2018，48（8）：812-819.

[15] Khamaisi M，Balanson SE. Stem cells for diabetes complications：a future potential cure [J]. Rambam Maimonides Med J，2017，8（1）：1-9.

[16] 谭哲谓，许利嘉，陈四保 . 植物来源 α- 葡萄糖苷酶抑制剂的研究新进展 [J]. 中南药学，2018，16（7）：982-987.

[17] Gershell L. Type 2 diabetes market [J]. Nat Rev Drug Discov，2005，4（5）：367-368.

（收稿日期：2021-10-19；修回日期：2021-11-16）

生物发酵菊叶薯蓣富集薯蓣皂苷的研究

崔乃菠[1]，马境谦[1]，余河水[1, 3]，李正[1, 2, 3]，何永志[1, 3]，别松涛[1, 3*]（1. 天津中医药大学 中药制药工程学院，天津 301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津 301617；3. 中药制药工程市级实验教学示范中心，天津 301617）

摘要：目的 通过响应面分析法优化菊叶薯蓣的发酵条件，富集菊叶薯蓣中的薯蓣皂苷。**方法** 采用响应面分析法，设计三因素三水平实验，考察发酵时间、发酵温度、接种量对菊叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的影响。采用 HPLC-ELSD 测定薯蓣皂苷的含量。**结果** 回归模型分析表明二次回归方程能够用于菊叶薯蓣生物发酵条件的优化（R^2 = 0.9685），最佳发酵条件为发酵时间 47 h、发酵温度 33.4 ℃、接种量 16.3%。**结论** 响应面分析法能够优化菊叶薯蓣的发酵条件并实现薯蓣皂苷的富集，为菊叶薯蓣的进一步研究与利用提供参考。

关键词：菊叶薯蓣；酵母菌；薯蓣皂苷；最佳发酵条件；响应面分析法
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0340-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.017

Enriched dioscin from *Dioscorea composita* Hemsl. by biological fermentation

CUI Nai-bo[1], MA Jing-qian[1], YU He-shui[1, 3], LI Zheng[1, 2, 3], HE Yong-zhi[1, 3], BIE Song-tao[1, 3*] (1. *School of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Components of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Municipal Experimental Teaching Demonstration Center of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Engineering*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To achieve the enrichment of dioscin by optimizing the fermentation conditions of *Dioscorea composita* Hemsl. **Methods** Response-surface analysis was used to determine the fermentation efficiency. The experimental design involved the three variables: fermentation time, fermentation temperature and inoculum amount. The content of dioscin was determined by HPLC-ELSD. **Results** The mathematical-regression model demonstrated that a quadratic polynomial model could be used to optimize the fermentation conditions (R^2 = 0.9685). The optimal conditions were fermentation for 47 h, fermentation temperature at 33.4 ℃ , and inoculum concentration at 16.3%. **Conclusion** The response surface analysis is an appropriate approach for the optimization of fermentation conditions for dioscin enrichment, which provides reference for the further research and utilization of *Dioscorea composita* Hemsl..

Key words: *Dioscorea composita* Hemsl.; yeast; dioscin; optimal fermentation condition; response surface analysis

菊叶薯蓣（*Dioscorea composita* Hemsl.）为薯蓣科薯蓣属植物，是甾体激素药物的重要来源[1]。薯蓣皂苷主要存在于菊叶薯蓣的根和块茎中[2]，具有抗炎、抗真菌、抗纤维化、免疫调节等多种生物活性，对肝脏、心血管系统等多器官系统具有保护作用[3]。研究发现，菊叶薯蓣中的甾体皂苷类成分经微生物发酵后会发生转化，产生次级皂苷及薯蓣皂苷元[4]。在此过程中，不仅原有成分的含量会发生改变，还可能会产生新的物质，药效成分含量提高，药物活性增强[5-7]。响应面分析法（RSA）是目前常用的多元统计技术，其与中心组合设计（CCD）结合可广泛应用于参数较少但参数间存在交互作用的参数条件的优化[8]，改善了传统技术的不足，节省时间、试剂与材料，降低实验成本[9-10]。目前，此方法已逐渐应用于优化中药有效成分的提取[11-12]。

作者简介：崔乃菠，女，在读硕士研究生，主要从事中药学研究，email：naibo_cui@163.com *通信作者：别松涛，男，副教授，主要从事中药新药品种开发及中药分析研究，email：song9209@tjutcm.edu.cn

2020 年版《中国药典》未收录菊叶薯蓣，也未见生物富集菊叶薯蓣中薯蓣皂苷的报道，本研究以高效液相色谱法测得的菊叶薯蓣中的薯蓣皂苷含量为考察指标，采用单因素实验考察发酵时间、发酵温度、接种量对发酵过程中薯蓣皂苷含量的影响。在此基础上，采用响应面分析法进一步优化发酵条件，富集薯蓣皂苷，为菊叶薯蓣的深入开发与综合利用提供依据。

1 材料

1.1 试药

菊叶薯蓣药材，采自云南省会泽县，经天津中医药大学中药鉴定教研室张丽娟教授鉴定为薯蓣科薯蓣属植物菊叶薯蓣的干燥根茎；活性干酵母（安琪酵母股份有限公司）；马铃薯葡萄糖肉汤（PDB 北京索莱宝科技有限公司）；薯蓣皂苷对照品（批号：Y20A10Z95575，纯度≥ 98%，上海源叶生物科技有限公司）；乙腈（色谱纯，美国 Fisher 公司）；乙醇（色谱纯，天津风船化学试剂科技有限公司）；水为超纯水。

1.2 仪器

Waters e2695HPLC 色谱系统（四元泵、真空在线脱气机、自动进样器、柱温箱和 Empower 色谱工作站，配有 2424 蒸发光散射检测器，美国活特世）；SB-5200DTD 型数控超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；CP1003 电子天平 [奥豪斯仪器（常州）有限公司]；AB135-S 电子分析天平（Mettler Toledo）；中草药粉碎机（天津市泰斯仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水处理系统（美国 Millipore 公司）；恒温培养振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司）；洁净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；台式高速冷冻离心机 H1650R（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；立式压力蒸汽灭菌器（上海云泰仪器仪表有限公司）。

2 方法与结果

2.1 菊叶薯蓣预处理

将干燥的菊叶薯蓣药材粉碎后过 40 目筛，称取 2.0 g 药材粉末和 50 mL 蒸馏水于 150 mL 锥形瓶中，混匀，121 ℃高压灭菌 30 min。将一定接种量的酵母种子液加入菊叶薯蓣溶液中，恒温培养一定时间后，取出发酵液，过滤；精密称取 1.0 g 发酵固体，加 70% 乙醇超声提取 30 min（功率 360 W，频率 40 kHz），补足失重，过 0.22 μm 微孔滤膜，续滤液为菊叶薯蓣发酵产物。

2.2 酵母种子液的制备

在 250 mL 锥形瓶中配制 150 mL PDB 培养基，121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min，将 1.5 g 活性干酵母接种至培养基中。30 ℃、150 r • min $^{-1}$ 恒温振荡培养 22 h，得到酵母种子液。

2.3 检测方式与评价依据

根据文献采用 HPLC-ELSD 法测定发酵前后菊叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量 [9, 13]。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）- 水（B）溶液，梯度洗脱（0 ～ 5 min，25% ～ 30%A；5 ～ 6 min，30% ～ 31%A；6 ～ 10 min，31%A；10 ～ 20 min，31% ～ 60%A；20 ～ 30 min，60% ～ 95%A；30 ～ 32 min，95%A；32 ～ 35 min，95% ～ 25%A）；体积流量 1.0 mL • min $^{-1}$，柱温 30 ℃，蒸发光散射检测器参数：漂移管温度 70 ℃，气体流速 2.8 L • min $^{-1}$。

2.5 薯蓣皂苷的含量测定

精密称取适量薯蓣皂苷对照品，用 70% 乙醇溶解，定容至 10 mL 量瓶中，配得薯蓣皂苷对照品质量浓度为 1.024 mg • mL $^{-1}$，用 70% 乙醇分别稀释成系列浓度对照品溶液，进样测定，记录色谱峰面积，以对照品质量浓度的对数值为横坐标（X），峰面积的对数值为纵坐标（Y），绘制标准曲线，得到线性回归方程：$y = 1.734x + 5.855$，$R^2 = 0.9992$，薯蓣皂苷在 0.0683 ～ 1.024 mg • mL $^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。薯蓣皂苷对照品的色谱图见图 1。

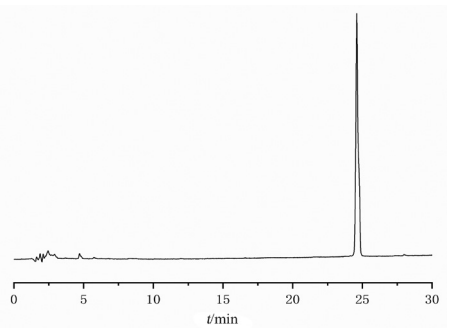


图 1 菊叶薯蓣对照品的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of dioscin standard

2.6 单因素实验

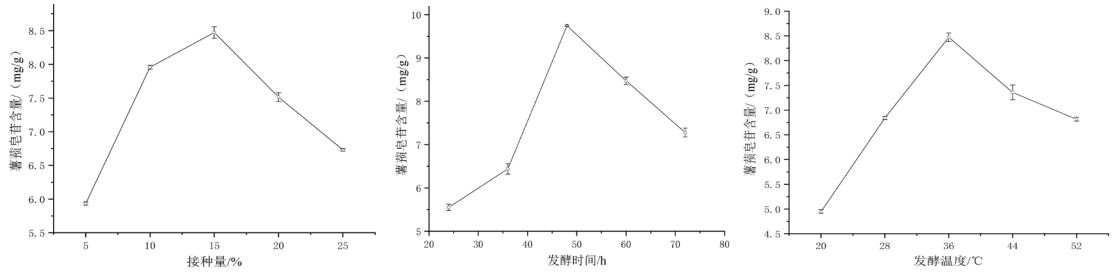
根据预实验，以薯蓣皂苷峰面积为评价指标，考察酵母菌的接种量（5%、10%、15%、20%、25%），发酵时间（24、36、48、60、72 h），发酵温度（20、28、36、44、52 ℃）对发酵过程中薯蓣皂苷含量的影响。

2.6.1 接种量对薯蓣皂苷含量的影响 由图 2A 可知接种量是影响发酵后菊叶薯蓣中薯蓣皂苷含量的一个重要因素。在 5% ～ 15% 时，随着接种量的增加，薯蓣皂苷的含量明显增加，原因是接

种量的增加明显提高了发酵液中酵母菌的含量，提高了发酵效率；当接种量高于 15% 时，薯蓣皂苷的含量随接种量的增加而减小，可能是因为培养基中酵母菌数量过多，产生竞争性抑制，影响菌体生长代谢，减弱了发酵效果；同时会消耗部分指标成分用于菌种繁殖，降低其含量 [14]。故最适接种量的选择为 15%。

2.6.2　发酵时间对薯蓣皂苷含量的影响　由图 2B 可知在 24 ～ 48 h 内，薯蓣皂苷的含量随发酵时间的延长而增加。但超过 48 h，薯蓣皂苷的含量随着发酵时间的增加呈下降趋势。这种现象产生的可能是在发酵初期，培养基中营养物质充足，酵母菌代谢旺盛，有利于向薯蓣皂苷的转化，使其含量增加 [15-16]；时间过长，培养基中的营养物质不断被消耗，酵母菌代谢减慢，薯蓣皂苷含量降低 [17]，或是薯蓣皂苷在皂苷水解酶作用下生成皂苷元或次皂苷，使薯蓣皂苷含量减少 [18]。所以选择最适发酵时间为 48 h。

2.6.3　发酵温度对薯蓣皂苷含量的影响　由图 2C 可知在 20 ～ 36 ℃内，薯蓣皂苷的含量随发酵温度的升高而增加。当温度继续升高，薯蓣皂苷的含量随之下降。原因可能是温度影响了酵母菌的酶促反应。温度过低时，酶活性受到抑制；温度过高则使酶失活 [19-20]。温度为 36 ℃时，酵母菌代谢旺盛，薯蓣皂苷含量最多，所以选择最适发酵温度为 36 ℃。



A　　B　　C

图 2　接种量（A）、发酵时间（B）及发酵温度（C）对薯蓣皂苷含量的影响

Fig 2　Effect of inoculum concentration（A），fermentation time（B），fermentation temperature（C）on dioscin content

2.7　响应面分析实验

在单因素实验的基础上，根据中心组合设计原理，以菊叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量为评价指标，以发酵时间、发酵温度、接种量为自变量，设计三因素三水平响应面分析实验，因素水平见表 1。

表 1　响应面因素及水平

Tab 1　Factor and level of response surface analysis

水平	因素		
	A. 发酵时间 /h	B. 发酵温度 /℃	C. 接种量 /%
－1	36	28	10
0	48	36	15
1	60	44	20

2.7.1　数学模型的建立及方差分析　在单因素实验的基础上，以薯蓣皂苷的含量（Y）为响应值，发酵时间（A）、发酵温度（B）、接种量（C）为自变量，采用中心组合设计法进一步优化发酵条件，实验设计方案及结果见表 2。

根据表 2 数据，采用 Design Expert 8.0.6.1 软件对其进行多元回归拟合，*A*、*B*、*C* 为自变量，*Y* 为响应值进行多元二次回归拟合，得到二次回归方程：

$$Y = 9.56 - 0.20A - 0.82B + 0.89C - 0.37AB - 0.13AC + 0.96BC - 0.65A^2 - 0.83B^2 - 1.17C^2$$

方差分析结果见表 3。该模型差异高度显著（$P_{模型} < 0.0001$），薯蓣皂苷含量失拟项 $P = 0.3807 > 0.05$，失拟不显著；决定系数 $R^2 = 0.9685$、校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9401$，表明薯蓣皂苷含量的真实值与预测值拟合程度较高，误差小；模型变异系数为 5.70%（< 10%），说明模型精确度较高。接种量对薯蓣皂苷的含量影响最大，发酵温度次之，发酵时间影响最小。对回归模型显著性分析可知：模型的一次项 *B*、*C*，二次项及交互项 *BC*，为薯蓣皂苷含量极显著影响因素（$P < 0.01$）；交互项 *AB* 为薯蓣皂苷含量的影响显著因素（$P < 0.05$）；一次项 *A*、交互项 *AC* 对薯蓣皂苷含量影响不显著。

2.7.2　响应面分析　绘制响应面图及等高线图，见图 3。两因素之间交互作用的强弱可以通过等高线的形状判断，圆形表示因素间交互作用不显著，椭圆形表示交互作用显著 [21]。通过等高线图可以看出发酵时间与发酵温度之间交互作用显著，随着发酵时间和发酵温度的提升，薯蓣皂苷的含量先增加后减少；发酵温度与接种量交互作用显著，薯蓣皂苷的含量随发酵温度和接种量的升高呈先增加后减少的趋势；发酵时间、接种量交互作用不显著，随着发酵时间和接种量的增

表 2　响应面分析实验设计方案与结果

Tab 2　Design and result of response surface analysis

序号	A. 发酵时间 /h	B. 发酵温度 /℃	C. 接种量 /%	薯蓣皂苷含量 /（mg • g^{-1}）
1	68.18	36.00	15.00	7.21
2	27.82	36.00	15.00	8.45
3	48.00	36.00	15.00	9.82
4	36.00	28.00	20.00	7.23
5	60.00	28.00	10.00	7.81
6	60.00	44.00	20.00	7.06
7	48.00	49.45	15.00	5.97
8	48.00	36.00	15.00	8.92
9	48.00	36.00	15.00	10.05
10	36.00	44.00	10.00	4.11
11	48.00	36.00	23.41	7.69
12	60.00	44.00	10.00	4.02
13	48.00	36.00	15.00	9.73
14	48.00	36.00	6.59	5.01
15	48.00	36.00	15.00	9.56
16	36.00	28.00	10.00	7.54
17	60.00	28.00	20.00	8.12
18	48.00	36.00	15.00	9.26
19	48.00	22.55	15.00	8.64
20	36.00	44.00	20.00	8.78

表 3　回归模型方差分析

Tab 3　Regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	59.88	9	6.65	34.14	＜ 0.0001
A	0.55	1	0.55	2.81	0.1245
B	9.22	1	9.22	47.30	＜ 0.0001
C	10.93	1	10.93	56.08	＜ 0.0001
AB	1.10	1	1.10	5.66	0.0387
AC	0.13	1	0.13	0.65	0.4374
BC	7.43	1	7.43	38.12	0.0001
A^2	6.07	1	6.07	31.14	0.0002
B^2	10.04	1	10.04	51.51	＜ 0.0001
C^2	19.80	1	19.80	101.61	＜ 0.0001
残差	1.95	10	0.19		
失拟项	1.11	5	0.22	1.33	0.3807
纯误差	0.84	5	0.17		
总和	61.83	19			

加，薯蓣皂苷的含量开始增加，但当两者增加到一定量后薯蓣皂苷的含量开始下降。

2.7.3　验证富集薯蓣皂苷的最佳发酵条件　通过对响应面结果分析，结合 Design Expert 8.0.6.1 软件得到富集薯蓣皂苷的最佳发酵条件为：发酵时间为 46.98 h，发酵温度 33.38 ℃，接种量 16.28%，在此条件下薯蓣皂苷含量的预计值为 9.81 mg•g^{-1}。结合实验可操作性，调整发酵条件为：发酵时间 47 h，发酵温度 33.4 ℃，接种量 16.3%。平行操作 3 次，薯蓣皂苷含量的实际值为 9.38 mg • g^{-1}，与预测值差异不显著，说明此方程可以较准确地模拟各因素对发酵过程中薯蓣皂苷含量的影响，优化富集薯蓣皂苷的发酵条件。

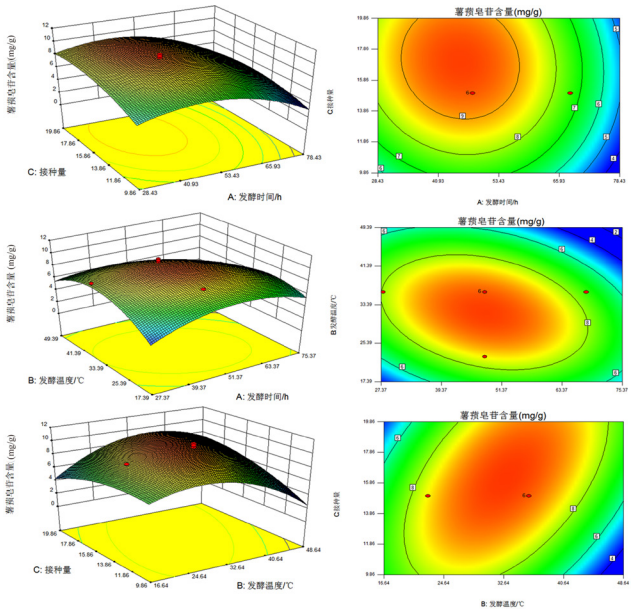


图 3　各因素交互作用对薯蓣皂苷含量影响的响应面及等高线图

Fig 3　Response surface plots and contours of effect of different factors on dioscin content

3　讨论与结论

薯蓣皂苷具有多种药理活性，可用于消肿祛毒、舒筋通络止痛、助消化等 [22]，主要以与纤维素结合的形式存在于植物细胞壁中 [23]。传统的提取方法是用石油醚或者丙酮等有机溶剂直接溶解，产率低且易造成污染。与传统方法相比，利用微生物发酵富集目标成分不需要添加额外的催化剂，具有毒副产物少、反应条件温和、过程简单、生物利用率高等优点 [24]，已被广泛应用于中药的开发与利用 [25-26]。本实验以菊叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量为评价指标，单因素实验考察发酵时间、发酵温度、接种量对薯蓣皂苷含量的影响，采用响应面分析法进一步优化薯蓣皂苷的发酵条件，建立二次回归方程模型。结果表明，接种量对薯蓣皂苷的含量影响最大，发酵温度次之，发酵时间影响最小。在优化后的最佳发酵条件（温度 33.4 ℃，时间 47 h，接种量 16.3%）下，测得薯蓣皂苷含量实际值与预测值相差不大，证明该方程拟合度高，准确性好，可行性高，可为富集薯蓣皂苷的发酵工艺提供参考。

酵母菌属于真核微生物，适应性强、繁殖周期短、代谢途径简单、易于培养，广泛应用于食品、化工、制药等领域 [27-28]，并且有研究表明酵母菌已被用于微生物转化皂苷成分 [29]。利用酵母菌发酵可以富集薯蓣皂苷，可能是因为酵母菌发酵过程中生物酶的产生，破坏了细胞壁，有利于

薯蓣皂苷在提取介质中的扩散[30]。菊叶薯蓣中原薯蓣皂苷含量较高且水溶性良好，薯蓣皂苷含量的增加也可能是因为发酵过程中呋甾皂苷状态的原薯蓣皂苷发生水解，生成苷元母核相同的 F- 环环合螺甾皂苷薯蓣皂苷[31]（见图 6）。

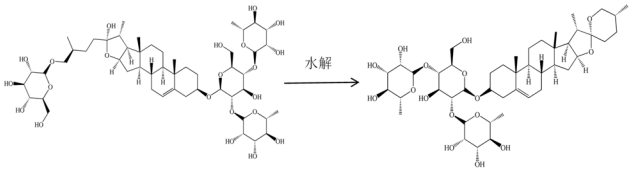


图 6 原薯蓣皂苷转化成薯蓣皂苷的途径

Fig 6 Transformation of protodioscin into dioscin

参考文献

[1] 曾德福，周建婵，钟春梅，等 . 菊叶薯蓣不同发育时期块茎内参基因的筛选 [J]. 植物生理学报，2018，54（3）：509-517.

[2] Diarra ST，李恒，王丽娟，等 . 水杨酸对菊叶薯蓣中薯蓣皂素生物合成的影响 [J]. 氨基酸和生物资源，2015，37（2）：29-34，37.

[3] 董悦生，齐珊珊，刘琳，等 . 米曲霉直接转化盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元 [J]. 过程工程学报，2009，9（5）：993-998.

[4] 张瑜，吴军凯，于丹，等 . 甾体皂苷生物转化研究进展 [J]. 现代生物医学进展，2015，15（22）：4391-4393.

[5] 李艳凤，翟梦颖，李雨昕，等 . 发酵法在中药研究中的应用 [J]. 医学综述，2020，26（4）：753-757.

[6] 刘波，张鹏翼，孟祥璟，等 . 益生菌发酵中药方法概述及其应用研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22（10）：1741-1750.

[7] 王静涵，张斯童，滕利荣，等 . 益生菌发酵中药的研究现状及产品开发 [J]. 食品工业科技，2020，41（14）：337-343，348.

[8] 陈小东，蔡海波，谭文松 . 基于中心组合设计和响应面分析的血清替代物浓度优化 [J]. 高校化学工程学报，2016，30（6）：1328-1334.

[9] Tsegay ZT，Lemma SM，Schaschke SJ. Response surface optimization of cactus pear（Opuntia ficus-indica）with Lantana camara（L. camara）fruit fermentation process for quality wine production [J]. Int J Food Sci，2020，2020：8647262.

[10] Bezerra MA，Santelli RE，Oliveira EP，et al. Response surface methodology（RSM）as a tool for optimization in analytical chemistry [J]. Talanta，2008，76（5）：965-977.

[11] 崔治家，夏鹏飞，杨毛毛，等 . 中心组合设计 - 响应面法优化枸杞子中有效成分的提取工艺研究 [J]. 国际药学研究杂志，2019，46（5）：375-381.

[12] 杨伟群，许晓芸 . 中心组合 - 响应面法优化中药钩藤总黄酮的提取条件 [J]. 化学试剂，2017，39（4）：416-420.

[13] 马境谦，崔乃菠，余河水，等 . 基于 4 种皂苷的定量分析评价干燥方式对菊叶薯蓣有效成分的影响 [J]. 中南药学，2021，19（3）：413-418.

[14] 买尔哈巴 • 艾合买提，杨新平，龙宣杞，等 . 响应面法优化籽瓜皮瓤饲料发酵工艺的研究 [J]. 饲料工业，2020，41（18）：23-28.

[15] 张新新，梁晋如，苏琪，等 . HPLC-ELSD 法同时测定盾叶薯蓣根茎中 5 个皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志，2013，33（7）：1235-1238，1258.

[16] 刘超，陈俊荣，于春涛 . 响应面法优化黄芪固体发酵工艺 [J]. 食品研究与开发，2019，40（7）：184-188.

[17] 卢上飞，谭显东，黄凡，等 . 响应面法优化三七渣固态发酵产红色素工艺 [J]. 食品工业科技，2020，41（16）：97-101，107.

[18] 陈富文，史高峰，王国英，等 . 响应面法优化复方中药发酵工艺 [J]. 中国中医药信息杂志，2014，21（4）：73-77.

[19] 田林双，赵玉婷，戴传超 . 盾叶薯蓣皂苷水解酶发酵条件优化研究 [J]. 中国酿造，2017，36（10）：92-96.

[20] 朱德艳 . 酵母菌发酵制备葛根酵素的工艺优化 [J]. 食品工业科技，2020，41（12）：82-87.

[21] 毋锐琴，杜双奎，李志西，等 . 细菌纤维素发酵培养基的优化及超微观结构分析 [J]. 生物工程学报，2008（6）：1068-1074.

[22] Tao XF，Yin LH，Xu LN，et al. Dioscin：a diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases，cancer，inflammation and infections [J]. Pharmacol Res，2018，137：259-269.

[23] 宋发军 . 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂甙元的研究及生产状况 [J]. 天然产物研究与开发，2002，4（3）：89-93.

[24] 赵子璇，李春峰，杨洪旺，等 . 五环三萜类化合物微生物转化研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2021，33（8）：1415-1426.

[25] 欧志敏，隋志红，石寒冰，等 . 黑曲霉转化牛蒡子水提液中牛蒡子苷的研究 [J]. 中草药，2011，42（4）：698-700.

[26] 孙鹏，李玲，吴丽，等 . 基于生物转化的附子减毒增效考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（22）：16-19.

[27] Sergi M. The role of yeasts in fermentation processes [J]. Microorganisms，2020，8（8）：1142.

[28] Liu L，Dong YS，Qi SS，et al. Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2010，85（4）：933-940.

[29] 章沙沙，张海玲，叶静，等 . 稀有人参皂苷微生物转化研究进展 [J]. 特产研究，2021，43（2）：91-96.

[30] 曾维星，程贤，张笮晦，等 . 生物预处理技术在天然产物提取中的应用研究进展 [J]. 生物质化学工程，2020，54（5）：45-52.

[31] 张瑜，吴军凯，于丹，等 . 甾体皂苷生物转化研究进展 [J]. 现代生物医学进展，2015，15（22）：4391-4393.

（收稿日期：2021-07-24；修回日期：2021-09-24）

鱼子麻黄与普通炮制品煎煮效率比较

朱田密[1, 2, 3]，张亚志[1, 2, 3]，段雪云[1, 2, 3]，闫斌[1, 2, 3]，谢俊飞[4]，曾政[4]，萨吉坦木·依斯马依力[4]，胡晓雪[1, 2, 3]，陈树和[1, 2, 3*]（1. 湖北省中医院药事部，武汉　430061；2. 湖北中医药大学附属医院，武汉　430061；3. 湖北省中医药研究院，武汉　430074；4. 湖北中医药大学药学院，武汉　430065）

摘要：目的　研究中药特色饮片鱼子麻黄的水煎煮效率。**方法**　将相同原药材分别炮制成鱼子麻黄和普通麻黄段，进行水煎煮试验，在相同条件下用水煎煮 3 次，测定出膏率，用 HPLC 法测定水煎液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的煎出量，比较两种炮制品的煎煮效率。**结果**　鱼子麻黄的出膏率和有效成分的煎出量显著高于长度为 10 ～ 20 mm 的普通麻黄段。总出膏率提高 28%，盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱煎出总量分别提高 57% 和 61%。**结论**　鱼子麻黄炮制品的煎煮利用度更高。

关键词：鱼子麻黄；切制；片型；盐酸麻黄碱；盐酸伪麻黄碱；煎出量
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0345-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.018

Decoction efficiency of ephedra decoction pieces in the shape of fish roe and commonly processed products

ZHU Tian-mi[1, 2, 3], ZHANG Ya-zhi[1, 2, 3], DUAN Xue-yun[1, 2, 3], YAN Bin[1, 2, 3], XIE Jun-fei[4], ZENG Zheng[4], Sajitanmu Yisimayili[4], HU Xiao-xue[1, 2, 3], CHEN Shu-he[1, 2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Wuhan* 430061; 2. *Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430061; 3. *Hubei Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Wuhan* 430074; 4. *College of Pharmacy*, *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065)

Abstract: Objective　To determine the decoction efficiency of a special Chinese medicinal decoction named ephedra decoction piceces in the shape of fish roe. **Methods**　The same raw medicinal materials were processed to ephedra decoction pieces in the shape of fish roe and common decoction piceces. Both piceces were decocted for three times under the same conditions. The extract rates were tested. The decoct quantities of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride were tested by HPLC. The decocting efficiency of the two processed products was compared. **Results**　The extraction rates and decoction quantities of active ingredients of ephedra decoction pieces in the shape of fish roe were significantly higher than those of common processed products with the length between 10 to 20 mm. The total extract rate was increased by 28%. The total decoction quantity of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride was increased by 57% and 61%. **Conclusion**　The ephedra decoction pieces in the shape of fish roe have higher decocting utilization than that of common products.

Key words: ephedra decoction piceces in the shape of fish roe; sectioning process; decoction pieces shape; ephedrine hydrochloride; pseudoephedrine hydrochloride; decoction quantity

基金项目：全国中药特色技术传承人才培训项目 [国中医药人教函（2019）43 号]；国家中医药管理局第一批中药炮制技术传承基地建设项目 [国中医药规财发（2015）21 号]；湖北省自然科学基金项目（No.2020CFB438）。

作者简介：朱田密，女，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事中药饮片炮制工艺、质量控制及原理研究，email：sweetness2001@126.com　*通信作者：陈树和，男，主任药师，硕士研究生导师，主要从事医院中药制剂研发、中药饮片质量控制研究，email：chenshuhe606@163.com

麻黄是临床常用中药，为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Mey. 或木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 的干燥草质茎。秋季采割绿色的草质茎，晒干[1]。2020 年版《中国药典》一部载麻黄炮制方法为“除去木质茎、残根及杂质，切段”。饮片成品呈圆柱形的段。各省、市、自治区的炮制规范收载麻黄炮制也是切段，长度不尽相同，有“长段”“中段”和“短段”，有的规定段长度为 1 ～ 2 cm[2]。此外尚有蜜麻黄、麻黄绒、蜜麻黄绒、炒麻黄等炮制品[1, 3]，以麻黄、蜜麻黄最为常用。鱼子麻黄是一种传统手工切制的特色饮片。1963 年版《武汉中药制用规范》以及湖北省中医院全国首批名老中医药专家涂绍川的中药炮制手稿载有其炮制方法，用荷叶包成小把，切 1 分长的段[4]。饮片呈细小段状形似“鱼子”。该方法现已作为中药特色饮片炮制技术进行传承。鱼子麻黄与普通麻黄段的区别在于其切制精细，片形整齐美观。目前尚未见有关鱼子麻黄炮制品煎煮效果或临床疗效的研究报道。本文从成分煎出效率角度对鱼子麻黄的实用性进行研究，并与普通方法炮制的麻黄段对比。

1　材料

1.1　仪器

PB203-E 电子天平（美国梅特勒托利多公司），ES225SM-DR 电子天平（瑞士普利赛斯公司），DZTW 调温电热套（北京市永光明医疗仪器有限公司），Waters e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），4H-6 恒温水浴锅（金坛市易晨仪器制造有限公司），电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2　试药

麻黄原药材（产自内蒙古，由湖北省中医院朱田密副主任药师鉴定为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎，依据 2020 年版《中国药典》一部检验合格，药材按干燥品计算，含盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总量为 1.07%）。盐酸麻黄碱对照品（批号：171241-20180，纯度：100.0%）、盐酸伪麻黄碱对照品（批号：171237-20151，纯度：99.8%）（中国食品药品检定研究院）。极性乙醚连接苯基键合硅胶色谱柱（美国赛分科技有限公司）。煎药用水为自来水，高效液相用水为超纯水，甲醇为色谱纯，磷酸、三乙胺、二正丁胺等试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　饮片炮制

2.1.1　鱼子麻黄的制备[4]　取原药材，择去杂草，剪去根须，抢水洗净，捞起滤干，用干荷叶包成小把（防止切制时麻黄蹦跳），用线索缠扎紧，切成 3 ～ 5 mm 的段，用药筛筛去荷叶、线索，晾干。饮片外观见图 1A。

2.1.2　普通麻黄段的制备[1-2]　取同一批原药材，除去木质茎、残根及杂质，抢水洗净后闷润，切成 10 ～ 20 mm 的段，晾干。饮片外观见图 1B。

图 1　鱼子麻黄（A）与普通麻黄段（B）图

Fig 1　Ephedra decoction pieces in the shape of fish roe（A）and commonly processed products（B）

2.2　麻黄饮片的煎煮试验

分别称取鱼子麻黄与普通麻黄段各 6.0 g，平行操作 4 份[5]。分别置 1000 mL 圆底烧瓶中，每份加水 400 mL，浸泡 20 min，采用电热套回流加热，煎煮 3 次，按沸腾之时计，一煎煎煮 15 min；二煎加水量为 300 mL，煎煮 10 min；三煎加水量为 300 mL，煎煮 10 min。每份饮片每次煎煮后用二层筛网趁热过滤（40 目＋ 80 目）得到煎液，分别放置在烧杯中，放冷，用量筒测量各煎液体积。

2.3　出膏率的测定

精密吸取放冷后的各煎液 25 mL，置于干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，置 105 ℃烘箱中 3 h，取出，冷却，称定质量。根据各煎液体积，计算出膏率。出膏率（%）＝（$W_{膏}$/ 取液量）×得液量 /$W_{饮片}$ ×100%[6]。结果见表 1。

2.4　HPLC 法测定盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的煎出量

2.4.1　色谱条件　参考 2020 年版《中国药典》麻黄项下含量测定色谱条件[1]，以极性乙醚连接苯基键合硅胶为填充剂，以甲醇 -0.092% 磷酸溶液（含 0.04% 三乙胺和 0.02% 二正丁胺）（1.5：98.5）

表 1　不同麻黄饮片水煎煮的出膏率（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Tab 1　Extract rate of different ephedra decoction pieces（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

煎煮次数	出膏率 /%	
	普通麻黄段	鱼子麻黄
一煎	14.9±0.4	21.7±2.3**
二煎	4.2±0.6	4.1±0.9
三煎	3.1±0.7	2.6±0.1
总和	22.2±1.2	28.4±2.5**

注（Note）：与普通麻黄段比较，**$P<0.01$（Compared with the common processed products，**$P<0.01$）。

为流动相，流速 1 mL • min^{-1}，进样量 10 μL，检测波长 210 nm，柱温 25 ℃，记录色谱图，见图 2。

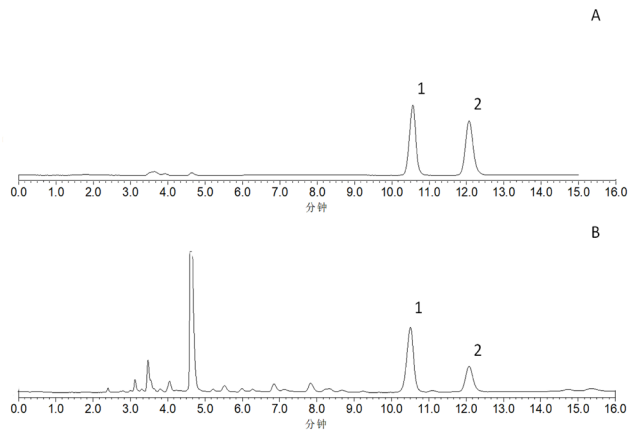


图 2　HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram

A. 混合对照品（reference）；B. 水煎液（decoction）；1. 盐酸麻黄碱（ephedrine hydrochloride）；2. 盐酸伪麻黄碱（pseudoephedrine hydrochloride）

2.4.2　对照品溶液的制备　精密称定盐酸麻黄碱对照品 10.91 mg，盐酸伪麻黄碱对照品 9.92 mg，加甲醇分别制成质量浓度为 52.37、47.52 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4.3　供试品溶液的制备　取麻黄饮片各水煎液，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4.4　线性关系考察　分别取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成含盐酸麻黄碱 850.00、255.00、102.00、20.40、4.08 μg • mL^{-1} 与含盐酸伪麻黄碱 491.42、147.42、58.97、11.79、2.36 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，进样测定。以进样量（X，μg）为横坐标，峰面积积分值（Y）为纵坐标，进行线性回归，得盐酸麻黄碱回归方程 $Y=1315.1X+39.06$（$r=0.9999$），线性范围为 0.0408 ～ 8.50 μg；盐酸伪麻黄碱回归方程 $Y=927.3X+9.162$（$r=0.9999$），线性范围为 0.0236 ～ 4.91 μg。表明两种成分在进样量范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.5　精密度试验　精密吸取同一混合对照品溶液，连续进样 6 次，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积 *RSD* 值分别为 0.94%、1.6%，表明仪器精密度良好。

2.4.6　稳定性试验　精密吸取同一供试品溶液，于制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 分别进样，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积 *RSD* 值分别为 3.2%、5.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.7　重复性试验[7]　取同一麻黄饮片水煎液 6 份，按“2.4.3”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积 *RSD* 值分别为 2.2%、4.6%，表明重复性良好。

2.4.8　加样回收试验[7-8]　精密吸取已测得含量的麻黄饮片水煎液 50 mL 于 100 mL 量瓶中，平行 6 份，各精密加入两种对照品适量，加水至刻度线，摇匀，按“2.4.3”项下方法操作，进样测定，计算得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的平均加样回收率分别为 102.5%、103.5%，*RSD* 分别为 3.4%、4.6%。

2.5　含量结果

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，进样测定。计算各水煎液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的浓度，根据公式计算生物碱煎出量。成分煎出量＝测得成分浓度 × 煎液体积。结果见表 2、图 3。鱼子麻黄三次煎煮的总出膏率比普通麻黄段高 28%，盐酸麻黄碱总煎出量比普通麻黄段高 57%，盐酸伪麻黄碱总煎出量比普通麻黄段高 61%。其中一煎的煎出效率提高得尤为显著。

表 2　不同麻黄饮片水煎煮盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱煎出量（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Tab 2　Decoction quantity of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride from different ephedra decoction pieces（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

煎煮次数	盐酸麻黄碱煎出量 /mg		盐酸伪麻黄碱煎出量 /mg	
	普通麻黄段	鱼子麻黄	普通麻黄段	鱼子麻黄
一煎	21.1±1.4	37.3±1.5**	8.8±0.4	15.7±0.5**
二煎	4.9±0.4	6.3±0.3**	1.9±0.2	2.5±0.1**
三煎	3.5±0.3	2.7±0.2**	1.3±0.1	1.0±0.1**
总和	29.5±2.0	46.3±1.3**	11.9±0.6	19.2±0.4**

注（Note）：与普通麻黄段比较，**$P<0.01$（Compared with the common processed products，**$P<0.01$）。

3　讨论

麻黄饮片的常规用量为 2 ～ 10 g[1]。故选择中位数 6 g 进行煎煮试验，煎煮次数、加水量和煎煮时间参考实际应用情况设计。

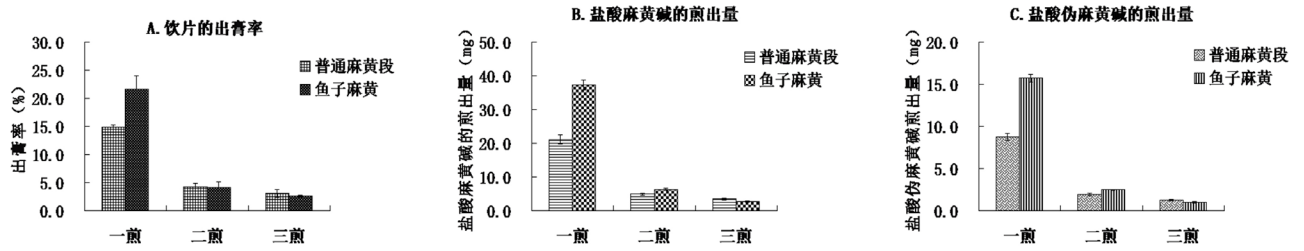


图 3 鱼子麻黄与普通麻黄段的煎煮效率示意图

Fig 3 Decoction efficiency of ephedra decoction pieces in the shape of fish roe and commonly processed products

关于麻黄切制的历史沿革，汉代认为将麻黄切为黄豆大为好，南北朝时期《雷公炮炙论》云“槐砧上用铜刀细锉”，强调锉细，唐代时切成寸段，宋代认为“锉”不如“碎”好，“碎”可使药力易出而无遗力，金元时期以细切、碎和捣为主，明代与前代同，清代在切制方面较简单，认为切段即可[9]。清末至民国时期，药铺商家之间的激烈竞争促使饮片加工技术更加精细，片型规格多样化，如“黄芪柳叶片”“麻黄鱼子样”“槟榔一百零八片”等[10]。此类精良的手工饮片切制工艺已作为传统炮制技艺进行传承。鱼子麻黄与普通麻黄段的实质区别是切制的长度不同。麻黄是草质茎，貌似容易煎透，受饮片长度的影响不大，但结果证明麻黄饮片长度对成分的煎出有显著影响，并经过了反复验证。

中药的煎煮原则上是浸出物质尽量多即浓度高为好[11]，饮片有效成分的煎出率与饮片的片型规格有关[5, 11]。如肉桂丝和粉状肉桂在浸泡煎煮和直接后下两种方式中桂皮醛提取率始终高于块状肉桂，原因是较大块片成分释放较缓慢或被阻碍[12]。又如浙贝母等饮片不易煎煮透心，捣碎后煎出物含量提高 60% 以上[13]。受扩散和吸附的影响，大黄饮片粒度从 3 ～ 4 cm 逐渐减小到超微粉时，煎出的化学成分量呈先增加后减再增加的变化趋势[14]。本文首次报道了麻黄切制长度对煎煮效率的影响，麻黄切细小段显著提高了煎出率。由于麻黄不属于含淀粉多的药材，切细小段后煎煮也不粘连糊化，易于过滤，煎煮的可操作性强。故鱼子麻黄的片型不单美观、精致，也有实用性，有利于疗效发挥。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2021：334.
[2] 于江泳，张村 . 全国中药饮片炮制规范辑要 2016 版 [M]. 北京：人民卫生出版社，2016：487.
[3] 湖北省药品监督管理局 . 湖北省中药饮片炮制规范 2018 年版 [S]. 2019：95-96.
[4] 武汉市中医药学会 . 武汉市卫生局审订 . 武汉中药制用规范 [S]. 1963：129.
[5] 龙全江，常承东，张炳蓉，等 . 中药饮片片型与煎出率关系的探讨 [J]. 中医药学报，1998（5）：33-34.
[6] 朱田密，陈树和，闫斌，等 . 25 种动物和矿物类中药饮片水煎液密度与出膏率相关性研究 [J]. 医药导报，2020，39（7）：970-974.
[7] 王迎春，王梦，曹文利，等 . HPLC 法同时测定麻黄 - 桂枝药对水煎液中 5 种成分的含量 [J]. 河北工业科技，2021，38（3）：192-197.
[8] 易剑平，迟玉明，孟贺，等 . 制川乌炮制废水中生物碱含量的探讨 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2019，21（12）：2725-2732.
[9] 于江泳，陆兔林 . 常用中药饮片炮制规范及操作规程研究 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2019：828.
[10] 罗克松 . 渝和堂药业中药饮片营销策略研究 [D]. 上海：上海交通大学，2013.
[11] 贾印宝 . 中药有效成分与片型、煎煮的关系 [J]. 中成药，1994（5）：22.
[12] 钱冬女，邢加慧，杨可晨 . 不同炮制品及煎煮方法对肉桂水提液有效成分的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志，2019，29（6）：517-519.
[13] 钟燕珠，雷旭，区炳雄，等 . 中药饮片切制规格对煎煮效果的影响 [J]. 现代医院，2014，14（7）：66-67.
[14] 周灿平，王伽伯，肖小河，等 . 饮片粒度对大黄药材蒽醌及鞣质类成分煎出量的影响 [J]. 中医杂志，2009，50（S1）：221-223.

（收稿日期：2021-08-04；修回日期：2021-09-22）

坤灵丸对卵巢储备功能下降患者体外受精 - 胚胎移植胚胎质量的影响

王海燕[1, 2]，邵小光[2]，王美仙[2]，黄杰[2]，陶仕英[1]，史艳彬[2]，王磊[2]，牛建昭[1]，李健[1*]（1. 北京中医药大学中医学院组织胚胎学教研室，北京　102401；2. 大连市妇女儿童医疗中心（集团），大连　辽宁　116000）

摘要：目的　观察坤灵丸对卵巢储备功能下降（DOR）患者体外受精 - 胚胎移植（IVF/ICSI-ET）胚胎质量的影响。**方法**　将 2020 年 1 月至 2021 年 4 月于本中心行 IVF/ICSI-ET 助孕治疗的 DOR 患者随机分为两组，坤灵丸组（n = 50）和对照组（n = 50）。对两组血清雌二醇（E_2）、卵泡刺激素（FSH）、黄体生成素（LH）激素水平及窦卵泡（AFC）进行比较。对 DOR 患者 IVF-ET 采卵后实验室指标，包括获卵数目、2 原核（2PN）受精数目、可利用胚胎数目、优质胚胎数目及优质胚胎率、移植一次妊娠结局、绒毛膜促性腺激素日（即 hCG 日）雌激素（E_2）浓度进行统计分析。**结果**　坤灵丸组用药后 FSH 和 LH 水平低于用药前（P < 0.05）；坤灵丸组优质胚胎数目和优质胚胎率显著高于对照组（P < 0.05）；2PN 受精数目、AFC、hCG 日 E_2 浓度两组差异无统计学意义；坤灵丸组获卵数目、可利用胚胎数目、移植一次妊娠率略高于对照组，但差异无统计学意义。**结论**　坤灵丸能有效调整 DOR 患者激素水平，改善 DOR 患者体外受精 - 胚胎移植的胚胎质量，有望作为 DOR 患者接受体外受精 - 胚胎移植前的干预药物开展更深入的临床观察。

关键词：体外受精 - 胚胎移植；卵巢储备功能下降；坤灵丸
中图分类号：R714.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0349-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.019

Effect of Kunling pill on the embryo quality of patients with diminished ovarian reserve and in vitro fertilization-embryo transfer

WANG Hai-yan[1, 2], SHAO Xiao-guang[2], WANG Mei-xian[2], HUANG Jie[2], TAO Shi-ying[1], SHI Yan-bin[2], WANG Lei[2], NIU Jian-zhao[1], LI Jian[1*] (1. *School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102401; 2. *Dalian Women and Children's Medical Center* (*Group*)*, Dalian Liaoning* 116000)

Abstract: Objective　To determine the effect of Kunling pill on the embryo qualityin patients with in vitro fertilization-embryo transfer (IVF/ICSI-ET) and diminished ovarian reserve function (DOR). **Methods**　DOR patients who received IVF/ICSI-ET assisted pregnancy treatment in our center from January 2020 to April 2021 were randomly divided into a Kunling pill group (n = 50) and a control group (n = 50). The serum levels of E_2, FSH, LH and AFC were compared between the two groups. The indexes of IVF-ET after ovary collection in DOR patients, including the number of eggs obtained, 2PN fertilization, usable embryos, high-quality embryos and the rate of high-quality embryos, outcome of the first pregnancy after the transplantation, and the daily estrogen concentration (E_2) of chorionic gonadotropin (HCG) were analyzed. **Results**　Compared with the Kunling pill group before the treatment, the levels of FSH and LH in the Kunling pill group after the treatment were significantly decresead (P < 0.05), the number and rate of high-quality embryos were significantly increased (P < 0.05). There was no significant difference in the number of 2PN, AFC, E_2 concentration on HCG

基金项目：北京中医药大学重点攻关项目（No.2020-JYB-ZDGG-011）；坤灵丸对卵巢储备功能下降患者胚胎质量影响及其机制探讨 [天士力（辽宁）制药有限责任公司]。

作者简介：王海燕，女，在读博士研究生，副主任医师，主要从事中西医结合基础方面的研究，email：bluedjf@163.com　*通信作者：李健，男，博士研究生导师，主要从事中西医结合基础研究，email：lijian@bucm.edu.cn

day ($P > 0.05$). The number of eggs obtained, usable embryos, and pregnancy rate were slightly higher than those in the control group without significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Kunling pill can effectively adjust the hormone level in DOR patients. Kunling pill can effectively improve the embryo quality of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with DOR, and is expected to be used as an intervention drug before in vitro fertilization-embryo transfer in patients with DOR to carry out further clinical observation.

Key words: in vitro fertilization-embryo transfer; diminished ovarian reserve; Kunling pill

近年来，体外受精 - 胚胎移植（IVF/ICSI-ET）应用于不孕不育患者使众多妇女成功妊娠。但卵巢功能是否正常对体外受精（IVF）妊娠率的影响较大。很多学者研究发现卵巢储备功能低下（DOR）的患者，其妊娠率低，周期取消率高。DOR 指卵巢皮质区卵泡生长发育并形成可受精卵母细胞的能力，此能力取决于原始卵泡的数量和质量。若卵巢内可募集的卵泡数量减少或卵母细胞质量下降，配子生成功能下降，可致生育能力下降，称作卵巢储备功能减退 [1]，也叫卵巢储备功能下降。临床研究发现，DOR 患者容易发生卵巢低反应性（POR），而且胚胎质量差，影响临床妊娠率，如何改善 DOR 患者的胚胎质量是如今研究的热点。

中医认为，DOR 的主要病机是肾精不足、肾虚血瘀 [2]。中药坤灵丸是临床常用中成药，具有调经养血、逐瘀生新的作用，用于月经不调、宫寒、久不受孕、习惯性流产等的治疗。现代研究表明，坤灵丸其活血化瘀成分对于改善子宫动脉血流有一定的作用 [3]。子宫动脉的卵巢支供血卵巢，因此推测坤灵丸改善卵巢血供对提高卵巢功能可能有益 [4]。

本文采用随机对照方法，观察了坤灵丸对 DOR 患者 IVF/ICSI-ET 后胚胎质量的影响，探索针对 DOR 患者开展人工辅助生殖的预处理策略，为坤灵丸在临床的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 DOR 患者的纳入 / 排除标准

纳入标准：患者年龄 25 ～ 42 岁（包括 25 及 42 岁）；符合博洛尼亚 DOR 诊断标准 [自然周期双侧卵巢窦卵泡（AFC）＜ 7 个和 / 或抗苗勒氏管激素（AMH）＜ 1.1 ng • mL $^{-1}$][5]，且治疗前 3 个月均未使用任何改善卵巢储备功能的药物治疗。

排除标准：排除染色体核型异常、生殖器官畸形、手术切除单侧卵巢、肿瘤放疗化疗术后患者；排除早发型卵巢储备功能不全（POI）及卵巢早衰（POF）患者。

1.2 研究对象

本研究经大连市妇女儿童医疗中心伦理委员会批准（批准文件号：2020010）。纳入 2020 年 1 月至 2021 年 4 月于本中心就诊行 IVF/ICSI-ET 助孕的 DOR 患者，共 100 例，随机分为两组：坤灵丸组和对照组，各 50 例，对 DOR 患者 IVF-ET 治疗后的采卵后各项指标情况进行观察。坤灵丸组脱落 4 例（不能按时服药 3 例，发热未采卵 1 例），对照组脱落 1 例（发热未采卵）。坤灵丸组和对照组分别含 46 例和 49 例 DOR 患者，采集静脉血及进行超声 AFC 监测。坤灵丸组口服坤灵丸 15 丸 Bid，用药两个月经周期后来月经第 3 ～ 5 日进行拮抗剂促排，并继续口服坤灵丸至采卵日。对照组应用拮抗剂方案促排卵。分析坤灵丸组及对照组 DOR 患者的激素水平变化、获卵数目、2 个原核（2PN）受精数目，2PN 受精率、可利用胚胎数目、优质胚胎数目、优质胚胎率及注射绒毛膜促性腺激素日（hCG 日）E_2 浓度。

1.3 试药和仪器

三维彩超（美国 Voluson E8，GE）。三气细胞培养箱（德国 Labotect C200），所有胚胎使用一步培养液（美国 globaltotal LP）培养，2PN 胚胎培养至第 3 日（D3，采卵日为 D0）移植或冷冻。Leica DM 2500 显微镜（德国徕卡公司）。BCS196 低温冷台（Linkam Scientic Instruments，英国）。

坤灵丸 [天津天士力（辽宁）制药有限责任公司，浓缩丸，规格：0.125 g/ 丸]。尿促性素（hMG，75 U/ 支，丽珠集团丽珠制药厂），果纳芬注射液（450 U/ 支，默克雪兰诺），西曲瑞克（0.25 mg/ 支，默克雪兰诺），醋酸加尼瑞克（0.25 mg/ 支，默沙东公司）。绒毛膜促性腺激素（hCG，丽珠集团丽珠制药厂），醋酸曲普瑞林注射液（德国辉凌制药有限公司，0.1 mg/ 支）。

1.4 促排方案

来月经第 2 ～ 4 日开始应用 hMG 或果纳芬注射液 150 ～ 300 U 促排，卵泡在 12 ～ 14 mm 时根据黄体生成素水平应用拮抗剂注射用西曲瑞克 0.25 mg 或注射用醋酸加尼瑞克 0.25 mg。优势卵泡至 17 ～ 20 mm 时，应用注射用 hCG 10 000 U 或醋酸曲普瑞林注射液 0.2 mg 扳机，34 ～ 36 h 采卵。采卵后第 1 日（D1）观察是否受精，D3 观察胚胎

质量。视情况选择胚胎冷冻或新鲜移植，移植后 12 ～ 14 d 观察是否受孕。

1.5 优质胚胎诊断标准

优质胚胎：D3 评估 6 细胞以上 1 ～ 2 级的优质胚胎为优质胚胎（来源于 2PN），碎片小于 30% 的胚胎为可利用胚胎，可以进行移植或冷冻。可用胚胎：6 细胞 3 级以上的胚胎，可以移植或冷冻。1 级胚胎，卵裂球大小均等，透亮，无碎片；2 级胚胎，卵裂球大小不均等和 / 或碎片率小于 10%；3 级胚胎，碎片率 10% ～ 50%；4 级胚胎：碎片率＞ 50%。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。非正态分布的数据用中位数（四位间距）[M（P_{25}，P_{75}）] 表示，组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。正态分布数据用均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用独立样本 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者的年龄、基础雌二醇（E_2）、基础卵泡刺激素（FSH）、基础黄体生成素（LH）、抗苗勒氏管激素（AMH）以及体质量指数（BMI）均无显著差异（$P > 0.05$）（见表 1）。AFC、促性腺激素（Gn）使用天数、Gn 用量、受精方式、同型半胱氨酸差异均无统计学意义。

表 1 两组患者一般资料比较 [M(P_{25}，P_{75})]

Tab 1 General data between the two groups [M (P_{25}，P_{75})]

特征		坤灵丸组（$n = 46$）	对照组（$n = 49$）	Z/χ^2	P
年龄 / 岁	女	36.5（32，39）	36（32，38）	－ 0.665	0.506
	男	37（33，39.5）	35（32，38）	－ 1.57	0.116
BMI/（kg・m^{-2}）		22.2（20.15，23.9）	20.85（19.38，25.5）	－ 0.782	0.434
不孕年限 / 年		2（1，4）	2.5（2，5）	－ 1.258	0.208
原发或继发不孕 / 例	原发	27	27	0.125	0.724
	继发	19	22		
受精方式 / 例	IVF	27	32	0.441	0.507
	ICSI	19	17		
AFC/ 个		4（3，5）	4（3，5.5）	－ 0.782	0.434
AMH/（ng・L^{-1}）		0.6（0.49，0.78）	0.69（0.47，0.95）	－ 1.367	0.172
基础 E_2/（pg・mL^{-1}）		40.00（29.48，48.07）	47（33.59，63.93）	－ 1.780	0.075
基础 FSH/（IU・L^{-1}）		8.85（6.89，11.92）	8.48（6.98，11.67）	－ 0.045	0.964
基础 LH/（IU・L^{-1}）		4.34（3.18，7.16）	4.59（3.45，5.7）	－ 0.424	0.671
PRL/（ng・mL^{-1}）		13.54（10.86，20.83）	15.36（11.9，19.31）	0.385	0.700
CA125/（U・mL^{-1}）		14.32（9.21，22.40）	18.11（14.14，26.31）	－ 1.664	0.096
同型半胱氨酸		7.35（6.13，9.05）	8（7，9.83）	－ 1.654	0.098
Gn 起始量 /U		300（281.25，300）	300（225，300）	－ 0.237	－ 0.813
Gn 使用天数 /d		9（8，10）	8.5（7，10）	－ 0.928	0.354
Gn 用量 /U		2475（2006.25，3000）	2400（1968.75，3000）	－ 0.636	0.524

2.2 坤灵丸组用药前后激素水平和 AFC 比较

坤灵丸组用药后 FSH、LH 水平低于用药前（Z ＝ － 3.202、 － 3.116，P ＝ 0.001、0.002）。坤灵丸预处理前后 E_2、AFC 无明显区别（Z ＝－ 0.551，－ 1.073，P ＝ 0.582、0.283）。结果见表 2。

表 2 坤灵丸组用药前后激素水平和 AFC 比较

Tab 2 Hormone level and AFC in Kunling pill group before and after the treatment

时间	E_2/（pg・mL^{-1}）	FSH /（IU・L^{-1}）	LH/（IU・L^{-1}）	AFC/ 个
用药前	40.00（29.48，48.07）	8.85（6.89，11.91）*	4.34（3.18，7.16）*	4（3，5）
用药后	36.35（32.82，45.85）	6.61（5.66，8.69）	3.23（2.34，4.38）	4（3，5）

注（Note）：与坤灵丸组用药后比较，*$P < 0.05$（Compared with the Kunling pill group after the treatment，*$P < 0.05$）。

2.3 两组实验室及临床结局分析

两组比较，获卵数目、2PN 受精受精数目、可利用胚胎数目、2PN 受精率、新鲜周期着床率、妊娠率、HCG 日 E_2 差异无统计学意义（P ＞ 0.05）。坤灵丸组优质胚胎数目和优质胚胎率大于对照组（$P < 0.05$），移植一次妊娠率（56.25%）略高于对照组（50%），但差异无统计学意义。结果见表 3。

3 讨论

3.1 DOR 西医治疗进展

DOR 处于 POI 早期，无临床症状，只有生化水平的异常表现，是育龄期女性最常见的生殖内

表 3 两组患者实验室及临床结局比较 [M(P_{25}，P_{75})，n(%)]

Tab 3 Laboratory and clinical outcomes of the two groups [M(P25，P75)，n(%)]

项目	坤灵丸组（n = 46）	对照组（n = 49）	Z/χ^2	P
获卵数目 / 个	4（2.75，5）	3（2，5）	− 0.751	0.453
2PN 受精数目 / 个	2.5（2，4）	3（2，3）	− 0.498	0.619
可利用胚胎数目 / 个	2.5（2，3.25）	2（1，3）	− 0.903	0.367
优质胚胎数目 / 个	1（0.75，2）	0（0，1）	− 2.936	0.003
2PN 受精率	72.32%（128/177）	69.66%（124/178）	0.303	0.582
优质胚胎率	45.24%（57/126）	30.43%（35/115）	5.583	0.018
新鲜周期着床率	29.82%（17/57）	29.41%（15/51）	0.192	0.661
移植一次妊娠率	56.25%（18/32）	50%（14/28）	0.234	0.628
HCG 日 E_2 浓度 /（pg • mL^{-1}）	873.2（622.5，1103）	918.4（607.65，1396.00）	− 0.284	0.776

分泌疾病，DOR 患者所占比例在门诊不孕女性中占约 10%[6]。妊娠需要优质的胚胎和良好的子宫内膜容受性，优质胚胎是妊娠发生的首要条件。由于 DOR 患者的异质性较高，有一部分患者因为没有高质量的胚胎而被迫取消移植周期。因此如何获得优质胚胎和良好的妊娠结局是研究的重点。轻度的卵巢储备功能减退可以通过增加 Gn 用量改善其临床妊娠结局；真正的 POR 或重度 DOR，应用大剂量的 Gn，即使加大 Gn 用量可募集到的卵子不仅数量少且质量较差，可移植胚胎数减少，妊娠率显著下降，卵巢强力刺激并不能改善重度 DOR 患者的结局 [7]。如何改善 DOR 患者的妊娠结局，成为了众多学者研究的热点。有学者研究了生长激素 [8] 或抗氧化制剂辅酶 Q10[9] 及硫酸脱氢表雄酮 [10] 在 DOR 或 POR 患者 IVF 中的应用，发现其可以提高 DOR 患者的胚胎种植率及临床妊娠率，改善其 IVF-ET 结局。但缺乏大样本的临床对照研究，结果需进一步证实。也有学者研究雌激素、孕激素在 POI 和 POF 中的应用，有一定短期疗效，但会影响肝肾代谢能力，增加患癌风险及血栓风险等，长期应用具有诸多弊端 [11]。

3.2 坤灵丸用于 IVF 前预处理机制

当前西医试管婴儿技术的应用，为 DOR 患者带来了希望，但不同于卵巢储备功能良好的患者，DOR 患者基础卵泡数目少，胚胎获得数目少，优质胚胎相对少。有时需要反复的控制性卵巢刺激（COS）以追求更多的获卵数和更多的胚胎，需多次采卵才能最大机会受孕 [12]。但这一治疗方案价格高昂，可控的个体化 COS 方案有限。拮抗剂（GnRH-A）方案近年被临床广泛应用，在 POR 患者中，GnRH-A 和 GnRH-a 长方案对于 IVF 临床结局的影响无显著差异，GnRH-A 方案可减少 Gn 用量，缩短 Gn 用药时间 [13]。因此本文 DOR 患者统一选用 GnRH-A 方案，对患者有益且能排除促排方案不均一的影响。在西医促排治疗的基础上用坤灵丸预处理，调节 H-P-O 轴以改善卵巢储备功能、提高卵巢反应性、减少激素药物的应用、从而增加妊娠率，临床效果好，不良反应少。坤灵丸由 31 味中药材组成，其中肉苁蓉、鹿角胶、地黄、龟甲胶、五味子起到补肝肾、益精血的作用。主要用于肾虚、气滞血瘀，但基本涵盖了不孕症的基本证型，可改善卵巢功能，提高子宫内膜容受性并具有调经养血、逐瘀生新的功效，在临床上用于促排卵 [14]、子宫内膜增生 [15]、卵巢早衰 [16]、降低 IVF-ET 流产率 [17] 等。但尚无对 DOR 患者的 IVF 临床对照研究。

3.3 本文研究结果及文献回顾

本研究为前瞻性研究，结果显示两组基础内分泌情况差异均无统计学意义。坤灵丸组用药后 FSH 和 LH 水平低于用药前，提示坤灵丸能够调节激素水平，降低 DOR 患者 FSH 和 LH 水平。高 FSH 对胚胎质量有负面影响，降低基础 FSH 水平，预防卵泡早期发育，能使促排时卵泡更加同步。研究表明，基础 FSH 水平增高与获卵数、可利用胚胎数和移植胚胎数下降显著相关，与受精率和流产率无明显相关性 [18]。基础 LH 升高对促排过程及结局也有负面影响。外周血基础 LH 升高（≥ 10 U • L^{-1}）主要见于两类患者，一类是临床常见的多囊卵巢综合征（PCOS）患者，另一类是卵巢功能低下或者衰竭的患者，以高龄或围绝经期女性多见。从分析的数据来看，对于基础 LH 水平过高（≥ 10 U • L^{-1}）的患者，尝试使用全程拮抗剂平稳控制 LH 水平是可行的，可能有助于降低高危患者早发 LH 峰的风险，改善助孕结局 [19]。研究结果显示坤灵丸组获卵数目、2PN 受精数、可利用胚胎数目、移植一次妊娠率略高于对照组，而优质胚胎数目和优质胚胎率显著优于对照组（P < 0.05）。有研究表明在补肾疏肝法的基础上适当加用活血药，可以改善血循环，增

加卵巢血流量，还可以升高 E_2、降低 FSH 及抑制颗粒细胞凋亡、促进血管生成，在增加卵巢指数方面均有明显的优势[20]。尤昭玲等[21]将 IVF-ET 过程进行分期，并根据各期的临床特点，应用中医分期辅助治疗，发现采用相应的中药口服，能收集到足够数量的优质卵细胞，提高胚胎的质量，提高子宫内膜对胚胎的容受性，达到提高临床妊娠率和活产率的目的。张宁[22]发现在 IVF-ET 治疗前 3 个月，口服补肾化痰中药能提高优质胚胎率、临床妊娠率，降低卵巢过度刺激综合征的发生率。动物实验发现应用中药方剂对 DOR 大鼠的卵巢功能具有保护作用[23]。坤灵丸在大鼠胚胎 - 胎仔发育的药理毒性实验研究表明，相当于人类口服剂量 43.2 倍的剂量对大鼠母体及胎仔无明显影响[24]。因此，坤灵丸应用于临床安全可靠。

综上所述，坤灵丸对于提高优质胚胎数目及优质胚胎率有帮助。在 IVF 应用拮抗剂的基础上预先应用坤灵丸，尽管没有提高获卵数目，妊娠率无显著性差异，但是能显著提高优质胚胎率，而且安全性高。下一步将增大样本量，统计累计妊娠率和活产率，对坤灵丸提高 DOR 患者优质胚胎质量的分子机制进行深入探讨。

参考文献

[1] Ata B，Seyhan A，Seli E. Diminished ovarian reserve versus ovarian aging：overlaps and differences [J]. Curr Opin Obstet Gynecol，2019，31（3）：139-147.

[2] 龚晓，赵巍，张丽娜，等 . 癸源方加减治疗不同年龄卵巢储备功能下降的临床疗效 [J]. 上海中医药大学学报，2013，27（6）：35-39.

[3] 江庆霖，周瑞年，李玮，等 . 戊酸雌二醇联合坤灵丸对子宫内膜影响的观察 [J]. 四川医学，2009，30（6）：826-828.

[4] 高攀 . 坤泰胶囊对卵巢储备功能减退患者生殖内分泌及卵巢血供的影响 [J]. 中国妇幼保健，2019，34（9）：2080-2083.

[5] Ferraretti AP，Marca AL，Fauser BCJM，et al. ESHRE consensus on the definition of ‘ poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization：the Bologna criteria [J]. Hum Reprod，2011，26，（7）：1616-1624.

[6] Maheshwari A，Fowler P，Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve should we perform tests of ovarian reserve routinely [J]. Hum Reprod，2006，21（11）：2729-2735.

[7] 熊夏思，陈士岭，孙玲，等 . 体外受精治疗中促性腺激素的剂量和卵巢反应性与临床结局的关系 [J]. 南方医科大学学报，2008，28（5）：712-714.

[8] Li X，Wang L，Lv F，et al. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimula-tion cycles [J]. Medicine，2017，96（12）：e6443.

[9] Ozcan P，Ficicioglu C，Kizilkale O，et al. Can coenzyme Q10 supplementation protect the ovarian reserve against oxidative damage? [J]. J Assist Reprod Genet，2016，33：1223-1230.

[10] Narkwichean A，Maalouf W，Campbell BK，et al. Efficacy of dehydroepiandrosterone to improve ovarian response in women with diminished ovarian reserve：a meta-analysis [J]. Reprod Biol Endocrinol，2013，11：44.

[11] 中华医学会妇产科学分会绝经学组 . 绝经相关激素补充治疗的规范诊疗流程 [J]. 中华妇产科杂志，2013，48（2）：155-158.

[12] 周灿权，袁媛 . 控制性卵巢刺激方案个体化思考 [J]. 中国实用妇科与产科杂志，2015，31（1）：10-12.

[13] 马黔红，朱桂金，孙赟，等 . 促性腺激素释放激素拮抗剂方案在辅助生殖领域中使用的专家共识 [J]. 中华妇产科杂志，2015，50（11）：805-809.

[14] 丁雪梅，张翠珍，杨艳丽，等 . 坤灵丸联合氯米芬治疗排卵障碍性不孕临床分析 [J]. 河北医学，2013，19（4）：625-626.

[15] 丁芳，王亮，郝蕾，等 . 坤灵丸对子宫内膜增生模型大鼠的实验研究 [J]. 河北中医药学报，2018，33（6）：1-4.

[16] 邓学妹 . 坤灵丸治疗卵巢早衰的临床观察 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2018，6（23）：166-167.

[17] 吴维，何明，阳艳，等 . 坤灵丸联合低分子肝素在体外授精 - 胚胎移植中应用的临床研究 [J]. 湖北中医药大学学报，2020，22（4）：108-111.

[18] Abdalla H，Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve [J]. Hum Reprod，2004，19（4）：893-898.

[19] 林海燕，李予，焦雪丹，等 . 基础 LH 水平过高患者拮抗剂方案中全程使用拮抗剂的效果观察 [J]. 生殖医学杂志，2020，29（11）：1403-1409.

[20] 许小凤 . 补肾活血法对卵巢储备功能低下干预的效应机理研究与临床证治探讨 [D]. 南京：南京中医药大学，2010.

[21] 尤昭玲，王若光，谈珍瑜，等 . 体外受精 - 胚胎移植中医辅治方案的构建 [J]. 湖南中医药大学学报，2009，29（5）：3-5.

[22] 张宁 . 中药干预在多囊卵巢综合征患者体外受精 - 胚胎移植治疗中疗效评价 [J]. 辽宁中医药大学学报，2011，13（7）：56-58.

[23] 马堃，吴静娴，张会仙，等 . 补肾活血促卵方治疗肾虚血瘀型卵巢储备功能低下所致不孕的临床研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（11）：2644-2649.

[24] 刘妍，唐桂毅，温和，等 . 坤灵丸对雌性大鼠生育力及胚胎 - 胎仔发育影响的研究 [J]. 药物评价研究，2018，41（7）：1235-1240.

（收稿日期：2021-07-22；修回日期：2021-09-26）

长裂藤黄叶的化学成分研究

王玉婷[1]，于熙[1]，岳佳音[1]，华会明[2]，孙雅婷[1*]（1. 沈阳医学院药学院，沈阳 110034；2. 沈阳药科大学中药学院，沈阳 110016）

摘要：目的 对长裂藤黄（*Garcinia lancilimba*）叶中的化学成分进行研究。**方法** 采用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱等分离方法，从长裂藤黄叶 95% 乙醇提取物的二氯甲烷萃取部位分离单体化合物；通过理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。**结果** 共分离得到 8 个化合物，分别鉴定为山柰酚（**1**）、芹菜素（**2**）、5，7- 二羟基 -6，4'- 二甲氧基黄酮（**3**）、槲皮素（**4**）、木犀草素（**5**）、pancibiflavonol（**6**）、藤黄双黄酮（**7**）和 litchtocotrienol A（**8**）。**结论** 根据 SciFinder 数据库检索，化合物 **1** ～ **8** 均为首次从长裂藤黄中分离得到。

关键词：长裂藤黄；黄酮；结构鉴定
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0354-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.020

Chemical constituents in the leaves of *Garcinia lancilimba*

WANG Yu-ting[1], YU Xi[1], YUE Jia-yin[1], HUA Hui-ming[2], SUN Ya-ting[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Shenyang Medical College*, *Shenyang* 110034; 2. *School of Chinese Materia Medica*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents in the leaves of *Garcinia lancilimba.* **Methods** The compounds were isolated and purified from the CH_2Cl_2 fraction of 95% ethanol extraction of *Garcinia lancilimba* by silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatographies, and semi-preparative HPLC. The structures of the isolated compounds were elucidated by physicochemical properties and spectral data analysis. **Results** Eight compounds were obtained and their structures were identified as kaempferol (**1**), apigenin (**2**), 5, 7-dihydroxy-6, 4'-dimethoxyflavone (**3**), quercetin (**4**), luteolin (**5**), pancibiflavonol (**6**), morelloflavone (**7**) and litchtocotrienol A (**8**). **Conclusion** Compounds **1** － **8** have been obtained from *Garcinia lancilimba* for the first time based on SciFinder database.

Key words: *Garcinia lancilimba*; flavonoid; structure identification

长裂藤黄（*Garcinia lancilimba*）为藤黄科（Guttiferae）藤黄属（*Garcinia*）植物，主要分布于我国云南省东南部，广西西部和西南部地区，生于低丘、荫坡、潮湿的沟谷密林下[1]。藤黄属植物有着悠久的民间用药历史，具有消炎作用，其代表性化合物为山酮类化合物、间苯三酚类化合物、萜类化合物和黄酮类化合物[2-5]。现代药理学研究显示，该属植物具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌和抗炎等多种药理作用[6-10]。长裂藤黄是中国特有的藤黄属植物，但对其化学成分研究相对较少且研究部位为茎[11-12]，为了更好地开发利用长裂藤黄的化学结构和生物活性，本文对长裂藤黄叶的化学成分进行研究。本文采用硅胶柱色谱、开放 ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、反相半制备高效液相色谱等多种色谱手段从长裂藤黄叶 95% 乙醇提取液的二氯甲烷萃取物中分离得到 8 个化合物，包括 5 个黄酮类，2 个双黄酮类，1 个生育三烯酚类，分别鉴定为山柰酚

基金项目：沈阳医学院博士科研启动基金（No.20195073，No.20195074）。
作者简介：王玉婷，女，主要从事天然产物研究，email：Wyt15904020859@163.com *通信作者：孙雅婷，女，博士，讲师，主要从事天然药物的化学成分及活性研究，email：sunyatingna@163.com

（kaempferol，**1**）、芹菜素（apigenin，**2**）、5，7-二羟基 -6，4'- 二甲氧基黄酮（5，7-dihydroxy-6，4'-dimethoxyflavone，**3**）、槲皮素（quercetin，**4**）、木犀草素（luteolin，**5**）、pancibiflavonol（**6**）、藤黄双黄酮（morelloflavone，**7**）、litchtocotrienol A（**8**）。通过理化常数测定、波谱数据分析等方法确定了化合物的结构（见图 1）。

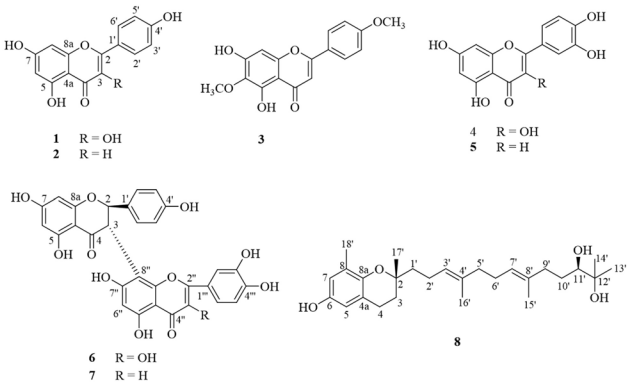


图 1　化合物 **1** ～ **8** 的结构式

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

1　材料

Bruker ARX-400 核磁共振波谱仪（Bruker 公司，TMS 内标）；Bruker micrOTOF-Q 高分辨电喷雾质谱仪（Bruker 公司）；J-715 圆二色谱仪（日本 JASCO）；高效液相色谱仪（日本岛津，配备 SPD-20A 紫外检测器，LC-6AB 高压输液泵）；色谱柱（YMC ODS-A，250 mm×20 mm，5 μm）；Bruker IFS-55 红外光谱仪（KBr 压片）；N1100D-WB 旋转蒸发仪（日本 EYELA）；柱色谱用硅胶（200 ～ 300 目、100 ～ 200 目）和薄层色谱用硅胶（青岛海洋化工厂）；ODS 柱色谱填料（100 μm，日本 YMC 公司）；Sephadex LH-20（GE 公司）；色谱纯甲醇、乙腈（天津科密欧公司），其他常规试剂均为分析纯。

长裂藤黄叶于 2010 年采自云南省西双版纳热带植物园，经陈渝工程师鉴定为藤黄属植物长裂藤黄 *Garcinia lancilimba* 的叶。样品标本保留于沈阳药科大学中药学院天然药物化学教研室。

2　提取分离

长裂藤黄叶 12.4 kg 在提取罐中用 95% 乙醇浸渍加热提取 3 次，每次 3 h，合并提取液，回收溶剂。将该醇提物混悬于水中，依次用等体积的石油醚、二氯甲烷和正丁醇萃取，分别减压回收溶剂，得到二氯甲烷萃取物 270 g。

取二氯甲烷萃取物 270 g，进行硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷 - 甲醇系统（100∶0 ～ 0∶100）进行梯度洗脱得到 5 个组分 Fr.A ～ Fr.E。Fr.C 组分进行硅胶柱色谱分离，以石油醚 - 丙酮系统（100∶5 ～ 0∶100）进行梯度洗脱，得到 7 个亚组分 Fr.C1 ～ Fr.C7。Fr.C3 经 ODS 开放柱色谱（甲醇 - 水：30% ～ 100%）和高效液相色谱纯化得到化合物 **1**（5.0 mg）和化合物 **2**（3.0 mg）。Fr.C5 依次经过 ODS 柱色谱（甲醇 - 水：40% ～ 100%）、重结晶以及高效液相色谱（流动相：80% 甲醇）纯化得到化合物 **8**（30.0 mg）。Fr.C6 经 ODS 柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化得到化合物 **3**（5.6 mg）、化合物 **4**（3.2 mg）和化合物 **5**（3.5 mg）。Fr.D 组分进行硅胶柱色谱分离，以石油醚 - 丙酮系统（100∶5 ～ 100∶50）进行梯度洗脱，得到 4 个亚组分 Fr.D1 ～ Fr.D4。Fr.D3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和高效液相色谱纯化得到化合物 **6**（4.0 mg）和化合物 **7**（7.0 mg）。

3　结构鉴定

化合物 **1**：黄色粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基，推测可能为黄酮类化合物。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱表明 δ 12.47（1H，s，5-OH）为 5 位酚羟基质子信号，δ 9.53（1H，brs）为一个活泼质子信号；一组 B 环 AA'BB' 偶合系统质子信号 δ 8.02（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2'，6'），6.92（2H，d，J = 8.8 Hz，H-3'，5'），提示有 4'- 羟基取代；同时还显示了一组 A 环 6，8 位间位偶合芳香质子信号 δ 6.41（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.16（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），表明 A 环为 5，7- 二羟基取代。氢谱信号归属为：δ 12.47（1H，s，5-OH），9.53（1H，brs，7/4'-OH），8.02（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2'，6'），6.92（2H，d，J = 8.8 Hz，H-3'，5'），6.41（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.16（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6）。该化合物的波谱数据与文献 [13] 基本一致，鉴定化合物 **1** 为山柰酚（kaempferol）。

化合物 **2**：淡黄色粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基，推测可能为黄酮类化合物。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱中：δ 12.46（1H，s，5-OH）为与羰基缔合的羟基质子信号；一组 B 环 AA'BB' 偶合系统质子信号 δ 7.98（2H，d，J = 8.3 Hz，H-2'，6'），6.90（2H，d，J = 8.3 Hz，H-3'，5'），提示有 4'- 羟基取代；A 环 6，8 位间位偶合芳香质子信号 δ 6.44（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.15（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），表明 A 环为 5，7- 二羟基取代；与化合物 **1** 相比，多了一个芳氢质子信号 δ 6.68（1H，s，H-3），为黄酮母核 3 位的质子。氢谱信号归属为：δ 12.46（1H，s，5-OH），7.98（2H，d，J = 8.3

Hz，H-2'，6'），6.90（2H，d，J = 8.3 Hz，H-3'，5'），6.68（1H，s，H-3），6.44（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.15（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6）。该化合物的波谱数据与文献[14]基本一致，鉴定化合物 **2** 为芹菜素（apigenin）。

化合物 **3**：黄色粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基，推测可能为黄酮类化合物。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱表明含有 5 位缔合酚羟基质子信号 δ 13.01（1H，s，5-OH）；一组 B 环 AA'BB' 偶合系统较低场质子信号 δ 8.02（2H，d，J = 8.6 Hz，H-2'，6'），7.10（2H，d，J = 8.6 Hz，H-3'，5'），同时还显示两个芳香质子信号 δ 6.84（1H，s），6.58（1H，s），提示化合物为 A 环和 3 位有独立氢取代的黄酮类化合物；另外还给出了两个甲氧基信号 δ 3.85（3H，s，4'-OCH_3），3.75（3H，s，6-OCH_3），提示有 4'- 甲氧基存在。氢谱信号归属为：δ 13.01（1H，s，5-OH），8.02（2H，d，J = 8.6 Hz，H-2'，6'），7.10（2H，d，J = 8.6 Hz，H-3'，5'），6.84（1H，s，H-3），6.58（1H，s，H-8），3.85（3H，s，4'-OCH_3），3.75（3H，s，6-OCH_3）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）共显示 17 个碳信号并归属为：δ_C 182.1（C-4），163.3（C-2），162.3（C-4'），158.0（C-8a），152.7（C-5），152.5（C-7），131.5（C-6），128.3（C-2'，6'），122.9（C-1'），114.6（C-3'，5'），103.9（C-4a），103.0（C-3），94.4（C-8），59.9（6-OCH_3），55.6（4'-OCH_3）。该化合物的波谱数据与文献[15]基本一致，鉴定化合物 **3** 为 5，7- 二羟基 -6，4'- 二甲氧基黄酮（5，7-dihydroxy-6，4'-dimethoxyflavone）。

化合物 **4**：黄色粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基，推测可能为黄酮类化合物。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱中 δ 12.48（1H，s，H-5）为 5 位缔合酚羟基质子信号；给出 B 环上 ABX 偶合系统氢质子信号 δ 7.65（1H，d，J = 2.1 Hz，H-2'），7.53（1H，dd，J = 8.6，2.1 Hz，H-6'），6.84（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'），提示该黄酮母核 B 环上有 3'，4'- 二取代；A 环上给出间位偶合质子信号 δ 6.42（1H，d，J = 2.2 Hz，H-8），6.19（1H，d，J = 2.2 Hz，H-6）。氢谱信号归属为：δ 12.48（1H，s，5-OH），7.65（1H，d，J = 2.1 Hz，H-2'），7.53（1H，dd，J = 8.6，2.1 Hz，H-6'），6.84（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'），6.42（1H，d，J = 2.2 Hz，H-8），6.19（1H，d，J = 2.2 Hz，H-6）。该化合物的波谱数据与文献[16]基本一致，鉴定化合物 **4** 为槲皮素（quercetin）。

化合物 **5**：黄色针状结晶（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基，推测可能为黄酮类化合物。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱中给出 5 位缔合的酚羟基质子信号 δ 12.62（1H，s，5-OH）；给出 B 环上 ABX 偶合系统氢质子信号 δ 7.46（1H，d，J = 2.4 Hz，H-2'），7.44（1H，dd，J = 8.6，2.4 Hz，H-6'），6.92（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'）；A 环上给出间位偶合质子信号 δ 6.44（1H，d，J = 2.1 Hz，H-8），6.19（1H，d，J = 2.1 Hz，H-6）；氢谱中还有一个 δ 6.63（1H，s，H-3）的芳氢质子信号。氢谱信号归属为：δ 12.62（1H，s，5-OH），7.46（1H，d，J = 2.4 Hz，H-2'），7.44（1H，dd，J = 8.6，2.4 Hz，H-6'），6.92（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'），6.63（1H，s，H-3），6.44（1H，d，J = 2.1 Hz，H-8），6.19（1H，d，J = 2.1 Hz，H-6），以上数据与文献[17]基本一致，故鉴定化合物 **5** 为木犀草素（luteolin）。

化合物 **6**：黄色无定形粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱中 δ 12.51，12.32 为两个与羰基缔合的羟基质子信号，9.32（2H，brs）为两个活泼质子信号。δ 7.63（1H，d，J = 1.8 Hz，H-2'''），7.56（1H，brd，J = 8.6 Hz，H-6'''），6.90（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'''）为一组典型的苯环上 ABX 偶合系统；δ 6.14（1H，s，H-6''）为一个孤立的芳氢信号。δ 7.12（2H，d，J = 8.4 Hz，H-2'，6'）和 6.37（2H，d，J = 8.4 Hz，H-3'，5'）为苯环上一组 AA'BB' 偶合系统质子信号，提示 B 环上有 4'- 羟基存在，δ 5.93（2H，brs，H-8，6）为 A 环上一组间位偶合的质子信号，表明 A 环为 5，7- 二羟基取代，δ 5.75（1H，d，J = 12.0 Hz，H-2）和 4.81（1H，d，J = 12.0 Hz，H-3）为二氢黄酮母核 C 环 2，3 位上的处于反式直立键上的两个质子信号。氢谱信号归属为：δ 12.51（5''-OH），12.32（5-OH），9.32（2H，brs，7/4'/4'''/5'''-OH），7.63（1H，d，J = 1.8 Hz，H-2'''），7.56（1H，brd，J = 8.6 Hz，H-6'''），7.12（2H，d，J = 8.4 Hz，H-2'，6'），6.90（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5'''），6.37（2H，d，J = 8.4 Hz，H-3'，5'），6.14（1H，s，H-6''），5.93（2H，brs，H-8，6），5.75（1H，d，J = 12.0 Hz，H-2），4.81（1H，d，J = 12.0 Hz，H-3）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）谱中共给出 30 个碳信号，归属为：δ_C 196.4（C-4）、175.7（C-4''）、166.7（C-

7）、163.8（C-5）、163.6（C-7"）、162.9（C-8a）、159.7（C-5"）、157.3（C-4'）、154.1（C-8"a）、147.7（C-4'"）、145.1（C-3'"）、145.1（C-2"）、135.3（C-3"）、128.8（C-1'）、128.5（C-2'，6'）、121.8（C-1'"）、120.4（C-6'"）、115.7（C-5'"）、114.7（C-2'"）、114.4（C-3'，5'）、102.3（C-4"a）、101.6（C-4a）、100.2（C-8"）、98.1（C-6"）、96.2（C-6）、95.3（C-8）、80.9（C-2）、48.1（C-3）。综合分析该化合物的波谱数据，并结合 ESIMS 给出的分子离子峰 $[M+H]^+$ *m/z* 573.10，推测其可能为一个黄酮母核的 C-8" 位与另一个二氢黄酮母核的 C-3 位通过碳碳键连接而形成的双黄酮类化合物。ECD 谱中显示 212 nm 处负 Cotton 效应（－ 27）、284 nm 处正 Cotton 效应（＋ 22）和 356 nm 处正 Cotton 效应（＋ 6）。该化合物的波谱数据及其 ECD 数据同文献 [18-19] 基本一致，鉴定为 pancibiflavonol。由于 C-3 位上连接基团的空间位阻较大，旋转受阻而出现构象异构，在氢谱中表现为具有一定比例的两种异构体的混合，升温核磁后（80 ℃）的图谱则表现为单一形式的一组核磁信号。

化合物 **7**：黄色无定形粉末（甲醇），10% 硫酸乙醇溶液显黄色；三氯化铁 / 铁氰化钾溶液显蓝色，提示结构中存在酚羟基。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）谱中 δ 13.06，12.31 为两个与羰基缔合的羟基质子信号，9.38（2H，brs）为两个活泼质子信号。δ 7.41（2H，m，H-2'"/6'"），6.90（1H，d，J ＝ 8.8 Hz，H-5'"）为一组典型的苯环上 ABX 偶合系统；δ 6.55（1H，s，H-3"），6.19（1H，s，H-6"）为两个孤立的芳氢信号。δ 7.16（2H，d，J ＝ 8.3 Hz，H-2'，6'） 和 6.39（2H，d，J ＝ 8.3 Hz，H-3'，5'）为苯环上一组 AA'BB' 偶合系统质子信号，提示 B 环上有 4'- 羟基存在，δ 5.96（2H，brs，H-8，6）为 A 环上一组间位偶合的质子信号，表明 A 环为 5，7- 二羟基取代，δ 5.75（1H，d，J ＝ 12.0 Hz，H-2）和 4.86（1H，d，J ＝ 12.0 Hz，H-3）为二氢黄酮母核 C 环 2，3 位上处于反式直立键上的两个质子信号。氢谱数据与化合物 **6** 相比，仅黄酮母核上多了一个 δ 6.55 的氢质子信号。氢谱信号归属为：δ 13.06（5"-OH），12.31（5-OH），9.38（2H，brs，7/4'/4'"/5'"-OH），7.41（2H，m，H-2'"/6'"），7.16（2H，d，J ＝ 8.3 Hz，H-2'，6'），6.90（1H，d，J ＝ 8.8 Hz，H-5'"），6.55（1H，s，H-3"），6.39（2H，d，J ＝ 8.3 Hz，H-3'，5'），6.19（1H，s，H-6"），5.96（2H，brs，H-8，6），5.75（1H，d，J ＝ 12.0 Hz，H-2），4.86（1H，d，J ＝ 12.0 Hz，H-3）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）谱中共给出 30 个碳信号，归属为：δ_C 196.4（C-4）、181.5（C-4"）、166.8（C-8a）、163.9（C-2"）、163.3（C-7）、162.9（C-7"）、160.6（C-5"）、157.4（C-4'）、155.4（C-8"a）、149.7（C-4'"）、145.7（C-3'"）、128.6（C-2'，6'）、128.3（C-1'）、121.2（C-1'"）、119.3（C-6'"）、116.2（C-5'"）、114.5（C-3'，5'）、113.3（C-2'"）、102.8（C-4"a）、102.2（C-3"）、101.5（C-4a）、100.7（C-8"）、98.8（C-6"）、96.3（C-8）、95.4（C-6）、81.0（C-2）、48.4（C-3），其中 C-5 的化学位移值被覆盖。综合分析该化合物的波谱数据，并结合 ESIMS 给出的分子离子峰 $[M+H]^+$ *m/z* 557.10，推测其可能为一个黄酮母核 C-8" 位与另一个二氢黄酮母核的 C-3 位通过碳碳键连接而形成的双黄酮类化合物。ECD 谱中显示 221 nm 处负 Cotton 效应（－ 43）、284 nm 处正 Cotton 效应（＋ 38）和 348 nm 处正 Cotton 效应（＋ 12）。该化合物的波谱数据及 ECD 数据与文献 [19] 基本一致，鉴定为藤黄双黄酮（morelloflavone）。与化合物 **6** 相似，该化合物氢谱中也由于旋转受阻而出现两组信号，可以通过升温核磁使其变为单一形式的一组核磁信号。

化合物 **8**：浅棕色油状，10% 硫酸乙醇溶液显棕色。HRESIMS 给出准分子离子峰 $[M+Na]^+$ *m/z* 453.2976，确定该化合物的分子式为 $C_{27}H_{42}O_4$（计算值为 453.2975）。红外光谱在 3427 cm^{-1} 处的吸收峰提示存在羟基信号，在 1384，2973 cm^{-1} 处的吸收峰提示甲基的存在，在 1640，933 cm^{-1} 处的吸收峰提示苯环的存在。^{1}H NMR（400 MHz，C_5D_5N）谱结合 HMBC，HSQC，^{1}H-^{1}H COSY 图谱（见图 2），将氢信号归属为：δ 6.97（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-7），6.84（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-5），5.36（1H，t，J ＝ 6.4 Hz，H-7'），5.24（1H，t，J ＝ 6.4 Hz，H-3'），3.74（1H，m，H-11'），2.68（2H，m，H-4），2.62（1H，m，H-9'），2.34（1H，m，H-9'），2.30（3H，s，H-18'），2.21（2H，m，H-2'），2.17（2H，m，H-6'），2.07（2H，m，H-5'），2.05（1H，m，H-10'），1.81（1H，m，H-10'），1.75（1H，m，H-3a），1.74（1H，m，H-1'），1.68（3H，s，H-15'），1.67（1H，m，H-3b），1.64（3H，s，H-16'），1.63（1H，m，H-1'），1.51（3H，s，H-13'），1.48（3H，s，H-14'）1.27（3H，s，H-17'）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）谱中共给出 27 个碳信号，归属为：δ_C 151.2（C-6）、145.2（C-8a）、135.7（C-8'）、135.0（C-4'）、126.9（C-8）、124.8（C-3'）、124.4（C-7'）、121.5（C-4a）、116.8（C-7）、113.7（C-5）、78.2（C-11'）、

75.2（C-2）、72.5（C-12'）、40.0（C-5'）、39.8（C-1'）、37.5（C-9'）、31.6（C-3）、30.7（C-10'）、26.8（C-6'）、25.9（C-13'）、25.8（C-14'）、24.0（C-17'）、22.7（C-4）、22.4（C-2'）、16.4（C-18'）、16.2（C-15'）、15.8（C-16'）。此核磁数据与文献[20]中化合物 litchtocotrienol A 的数据基本一致，故确定化合物的平面结构。根据 ECD 谱中 215 nm 处正 Cotton 效应（＋ 15）和 293 nm 处负 Cotton 效应（－ 4.6）确定 C-2 的绝对构型为 *R* 型[21]。采用钼盐诱导 ECD 的方法确定 C-11' 位的绝对构型，此方法用来测定邻二醇类结构的绝对构型[22]。根据 ECD 谱中特征的 302 nm 处的负 Cotton 效应确定 C-11' 位的绝对构型为 *R*。综合分析，鉴定化合物 **8** 为 litchtocotrienol A。

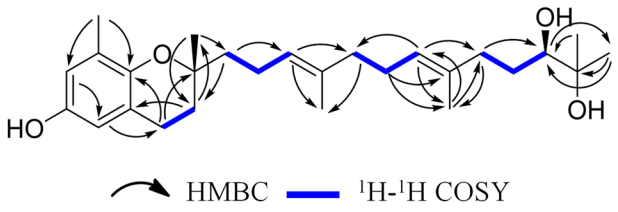


图 2 化合物 **8** 的主要 HMBC 和 COSY 相关信号

Fig 2 Key HMBC（H→C），and COSY correlation of compound **8**

4 讨论

近年来藤黄属植物一直是天然药物领域研究的热点，其化学成分种类丰富，结构新颖，活性强，如黄酮、呫吨酮、间苯三酚、萜类等化合物。本文对长裂藤黄的化学成分进行了研究，从中分离得到 8 个化合物，丰富了藤黄属次级代谢产物的多样性，为探索藤黄属的化学成分提供了参考。从近几年分离得到的化合物的结构复杂性以及活性数据来看，藤黄属植物还有很大的研究发展空间，有待于进一步深入研究。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志（第 50 卷）[M]. 北京：科学出版社，1990.

[2] Han QB，Xu HX. Caged garcinia xanthones：development since 1937 [J]. Curr Med Chem，2009，16（28）：3775-3796.

[3] Le DH，Nishimura K，Takenaka Y，et al. Polyprenylated benzoylphloroglucinols with DNA polymerase inhibitory activity from the fruits of *Garcinia schomburgkiana* [J]. J Nat Prod，2016，79（7）：1798-1807.

[4] Bui TQ，Bui AT，Nguyen KT，et al. A depsidone and six triterpenoids from the bark of *Garcinia celebica* [J]. Tetrahedron Lett，2016，57（23）：2524-2529.

[5] Stark TD，Salger M，Frank O，et al. Antioxidative compounds from *Garcinia buchananii* stem bark [J]. J Nat Prod，2015，78（2）：234-240.

[6] 郑赵情，张莉，沈凯凯，等 . 藤黄的研究进展 [J]. 世界中医药，2016，11（7）：1180-1188.

[7] Zhang L，Feng J，Kong S，et al. Nujiangexathone A，a novel compound from *Garcinia nujiangensis*，suppresses cervical cancer growth by targeting hnRNPK [J]. Cancer Lett，2016，380（2）：447-456.

[8] Tian DS，Gu W，Wang LP，et al. Cytotoxic and anti-oxidant biphenyl derivatives from the leaves and twigs of *Garcinia multiflora* [J]. Phytochem Lett，2017，19：132-135.

[9] Sriyatep T，Siridechakorn I，Maneerat W，et al. Bioactive prenylated xanthones from the young fruits and flowers of *Garcinia cowa* [J]. J Nat Prod，2015，78（2）：265-271.

[10] Fan YM，Yi P，Li Y，et al. Two unusual polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols，including a pair of enantiomers from *Garcinia multiflora* [J]. Org Lett，2015，17（9）：2066-2069.

[11] Yang NY，Han QB，Cao XW，et al. Two new xanthones isolated from the stem bark of *Garcinia lancilimba* [J]. Chem Pharm Bull，2007，55（6）：950-952.

[12] Han QB，Tian HL，Yang NY，et al. Polyprenylated xanthones from *Garcinia lancilimba* showing apoptotic effects against HeLa-C3 cells [J]. Chem Biodivers，2008，5（12）：2710-2717.

[13] 胡喜兰，朱慧，刘存瑞，等 . 凤仙花的化学成分研究 [J]. 中成药，2003，25（10）：833-834.

[14] 彭金咏，范国荣，吴玉田，等 . 败酱草化学成分的分离及结构鉴定 [J]. 药学学报，2006，41（3）：236-240.

[15] 崔鸿江，林燕 . 蒙药材莲座蓟化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发，2013，25（3）：349-351.

[16] 韩伟立，刘利，张晓琦，等 . 鲁桑叶化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2007，32（8）：695-698.

[17] 王文蜀，周亚伟，叶蕴华，等 . 半枝莲中黄酮类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2004，29（10）：957-959.

[18] Ito C，Itoigawa M，Miyamoto Y，et al. A new biflavonoid from *Calophyllum panciflorum* with antitumor-promoting activity [J]. J Nat Prod，1999，62（12）：1668-1671.

[19] Li XC，Joshi AS，Tan B，et al. Absolute configuration，conformation，and chiral properties of flavanone-（3→8"）-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata* [J]. Tetrahedron，2002，58（43）：8709-8717.

[20] Lin YC，Chang JC，Cheng SY，et al. New bioactive chromanes from *Litchi chinensis* [J]. J Agric Food Chem，2015，63（9）：2472-2478.

[21] de Mesquita ML，Araujo RM，Bezerra DP，et al. Cytotoxicity of delta-tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines [J]. Bioorgan Med Chem，2011，19（1）：623-630.

[22] 刘静，杜丹，司伊康，等 . Mo_2（OAc）$_4$ 试剂在邻二醇类结构绝对构型确定中的应用 [J]. 有机化学，2010，30（9）：1270-1278.

（收稿日期：2021-04-06；修回日期：2021-07-08）

柯里拉京对照品的制备及其结构鉴定

郑有德[1]，陈小红[1]，莫太刚[1, 2, 3]，樊三虎[1, 2, 3]，骆学庆[1]，孟伦秀[1]，张定堃[3]（1. 成都三勒浆药业集团四川华美制药有限公司，成都　610045；2. 乳品营养与功能四川省重点实验室，成都　610023；3. 成都三勒浆药业集团–成都中医药大学产学研联合实验室，成都　610045）

摘要：目的　制备柯里拉京对照品并鉴定其结构。**方法**　采用叶下珠属植物叶下珠，加水煎煮浸提，滤过，滤液分别通过 D101 大孔吸附树脂、Diaion HP 大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶（Sephadex LH-20）吸附洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，加入乙腈（50% ～ 60%）反复重结晶得到类白色结晶。经过纯度分析、含量分析及波谱分析对该结晶进行确证。**结果**　本工艺提取收率可达 0.8%。制备所得柯里拉京产品纯度高（99.9% 以上），且易于实现产业化放大。**结论**　该物质符合中药化学检验用对照品的相关要求，可作为含柯里拉京成分的药材及其制剂质量控制以及中药药效物质基础研究用的化学对照品。

关键词：柯里拉京；对照品；结构鉴定
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0359-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.021

Preparation and structure identification of corilagin reference substance

ZHENG You-de[1], CHEN Xiao-hong[1], MO Tai-gang[1, 2, 3], FAN San-hu[1, 2, 3], LUO Xue-qing[1], Meng Lun-xiu[1], ZHANG Ding-kun[3] (1. *Sichuan Huamei Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu Sanajon Pharmaceutical Group, Chengdu* 610045; 2. *Sichuan Key Laboratory of Dairy Nutrition and Function, Chengdu* 610023; 3. *Industry-University-Research Union Laboratory, Chengdu Sanajon Pharmaceutical Group-Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 610045)

Abstract: Objective　To determine the structure of corilagin reference substance and prepare it. **Methods**　The *Phyllanthus urinaria* L. was decocted, extracted and filtered with water. The filtrate was eluted by D101 macroporous adsorption resin, Diaion HP macroporous resin and Sephadex LH-20, respectively. The eluent was collected, concentrated and recovered the solvent under reduced pressure before adding acetonitrile (50% ～ 60%) and recrystallizing repeatedly to obtain nearly white crystals. **Results**　The extraction yield of corilagin was 0.8% with high purity (over 99.0%), which was suitable for industrial scale-up. **Conclusion**　The substance meets the requirements of reference substance for chemical inspection of traditional Chinese medicine, and can be used as the chemical reference for the quality control of medicinal materials, preparations containing corilagin, and the basic research of pharmacodynamic substances in traditional Chinese medicine.

Key words: corilagin; reference substance; structure identification

柯里拉京（corilagin，分子式：$C_{27}H_{22}O_{18}$），又称柯子次鞣素、诃里拉京，属天然植物多酚单宁酸类化合物，为类白色固体粉末，可溶于甲醇、乙醇、二甲基亚砜等有机溶剂。柯里拉京是一种可以从许多植物提取的水溶性逆没食子酸鞣质，如蜜柑草属植物、牦牛儿苗属植物、老鹳草属植物、大戟属植物、铁苋属植物、安石榴属植物、槭属植物及榄仁树属植物等。柯里拉京为叶下珠、老鹳草、蜜柑草、白三草等植物的有效成分，也存在于余甘子、龙眼、橄榄、诃子中等。研究表明柯里拉京具有多种生物活性，如抗肿瘤、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗纤溶、降血压、抑制病毒、抗菌、抗炎等[1-2]。

本文以叶下珠全草为研究对象制备高纯度柯

作者简介：郑有德，男，工程师，主要从事保健食品、健康食品研究与开发，email：zhengyd@newhope.cn

里拉京对照品[3-6]，现报道如下。

1 材料

大戟科油柑属植物叶下珠（*Phyllanthus urinaria* L.）干燥全草购于成都五块石药材市场，产地四川广元，经吴燕成总工程师确认。95% 乙醇（批号：20021018）、盐酸（批号：20020816）（分析纯，成都光华化学试剂厂），乙腈（分析纯，上海陆都实业有限公司，批号：20021028），丙酮（分析纯，重庆东试化工有限公司，批号：20021116），D101 大孔树脂（天津南开大学精细化学试验厂，批号 20021206），Sephadex LH-20（瑞典，批号：292931），Diaion HP-20（日本三菱化学公司，批号：2H508），硅胶 GF254（化学纯，国家药典委员会监制青岛海洋化工集团公司，批号：9639）；紫外灯、Water 2996 高压液相色谱仪（Waters）。

2 方法与结果

2.1 提取分离与纯化

① 称取叶下珠干燥全草 300 g，铡成 3 ～ 5 cm 的段，加入 20 倍以上纯水浸泡 0.5 h，分别微沸煎煮 1.5、1 h，滤过，合并两次滤液，减压浓缩至约 1.2 kg，离心除去沉淀。② 浓缩液通过 D101 大孔吸附树脂，用至少 20 L 纯化水洗涤，检测后弃去水液。用 70% 乙醇洗脱至无柯里拉京检出，洗脱液减压浓缩，置入蒸发皿中挥去残留乙醇，得浓缩液 200 ～ 400 mL。③ 浓缩液放冷，滤过，滤液通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂，用 10 L 以上纯化水洗涤，检测后弃去水溶液。用 70% 乙醇洗脱，至无柯里拉京洗出，洗脱液减压浓缩，入蒸发皿中挥去残留乙醇，浓缩液放冷加入 7 倍乙腈搅拌均匀，沉淀 0.5 h，滤除沉淀，滤液减压浓缩回收乙腈，再入蒸发皿中挥去残留乙腈，得浓缩液约 100 mL。④ 浓缩液放至室温，小心置 Sephadex LH-20 柱上端，用约 10 L 蒸馏水洗涤，检测后弃去洗涤液。用 20% 丙酮液洗脱，至无柯里拉京检出，洗脱液减压浓缩，入蒸发皿中挥去残留丙酮至有较多晶体析出，冷至室温，充分冷藏，抽滤出结晶。⑤ 柯里拉京粗结晶，用 50% ～ 60% 乙腈反复重结晶至得到近白色结晶。结晶挥去溶剂后放入五氧化二磷干燥器干燥至恒重，得柯里拉京 2.4 g，平均收率约 0.8%。

2.2 纯度分析

2.2.1 薄层色谱 取柯里拉京，加甲醇制成每 mL 含 5 mg 的溶液，照薄层色谱法（《中国药典》2020 年版四部附录）试验，取此溶液 4、8、12、16、20 μL，点于硅胶 GF_{254} 薄层板或十八烷基键合硅胶（PR-18 $F_{254}S$）薄层板上，分别以乙腈 -10% 醋酸（9∶1）或乙腈 -H_2O（2∶8）为展开剂，展开，取出，晾干，于紫外光（365 nm）下观察，或喷以 1%$FeCl_3$- 乙醇溶液，结果薄层板显单一色斑，除主斑点外均未见杂质斑点。

2.2.2 纯度测定[5] 色谱柱：Lunar C_{18}（5 μm，4.6 mm×150 mm）；流动相：甲醇 -0.1% 冰醋酸（20∶80），检测波长：220 nm、254 nm、272 nm、330 nm；柱温：30 ℃，进样量：10 μL。结果均未见明显杂质峰。

2.2.3 含量测定 照高效液相色谱法（《中国药典》2020 年版四部）测定。Water 2996 型高效液相色谱仪及 Water 2996 可变波长检测器，Empower 工作站，手动进样器，C_{18} 色谱柱（Lunar，Phenomenex，150 mm×4.6 mm，5 μm），溶剂均为色谱纯，试剂均为分析纯。色谱条件为流动相：乙腈 -0.5% 醋酸（1∶9），检测波长：272 nm，流速：1 mL·min^{-1}，柱温：25 ℃。取柯里拉京约 0.8 mg，各 3 份，精密称定，加水溶解并稀释至 10 mL，摇匀，即得。测得柯里拉京峰面积分别为 2756 356、2724 593、2745 250，*RSD* 为 0.59%，按归一法计算含量 100%。

2.3 结构鉴定

mp 210 ℃（分解）；$[\alpha]_D^{20}$：－ 245（C，1.5，EtOH）；IR（KBr）cm^{-1}：3416（羟基），1715，1695（羰基），1616，1532（苯环）等；MS（FAB）$[M-H]^+$ ＝ 633；MS（ESI）$[M-H]^+$ ＝ 633.07；^{1}H-NMR（400 MHz，MeOD）δ：7.08（2H，s，Galloy，A，H-2，6），6.72（1H，s，HHDP，B，H-2），6.69（1H，s，HHDP，C，H-2），6.39（1H，d，J ＝ 4.0 Hz，Glucose-H-1），4.96 ～ 5.02（2H，m），4.55 ～ 4.57（1H，m），4.49（1H，d，J ＝ 4 Hz），4.17 ～ 4.21（1H，m），4.01 ～ 4.03（1H，m）；^{13}C-NMR（100 MHz，MeOD）δ：95.0（glc-C-1），71.5（glc-C-2），76.1（glc-C-3），65.0（glc-C-4），76.1（glc-C-5），62.4（glc-C-6），120.5（Gal-C-1），110.9（Gal-C-2，6），146.3（Gal-C-3，5），140.4（Gal-C-4），166.6（Gal-C-7），125.4（HHDP，B，C-1），125.5（HHDP，C，C-1'），108.3（HHDP，B，C-2），110.1（HHDP，C，C-2），143.5（HHDP，B，C-3），143.8（HHDP，C，C-3'），135.1（HHDP，B，C-4；C，C-4'），144.3（HHDP，B，C-5；C，

C-5'），115.0（HHDP，B，C-6），115.3（HHDP，C，C-6'），168.5（HHDP，B，C-7），170.1（HHDP，B，C-7'）。

柯里拉京为白色结晶状固体，mp 210 ℃（分解），$[\alpha]_D^{20}$：－ 245（C，1.5，EtOH），其溶液遇三氯化铁呈深兰色，紫外吸收光谱 λ_{max}（MeOH）219 nm、272 nm；IR（KBr）cm^{-1}：提示有羟基（3417），羰基（1715，1695），苯环（3077，1616，1532）；MS（FAB）示 M^+ = 633（M^+-1），结合 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 及 DEPT 谱，推定其分子式为 $C_{27}H_{22}O_{18}$，分子不饱和度为 17。重水交换试验提示具有 11 个羟基，其中 9 个在 ^{1}H-NMR 谱中出现在 δ 8.16 ～ 9.34 的低场位置，提示为酚羟基。根据 ^{13}C-NMR 中的 δ 92.2 及其余 δ 62.2 ～ 77.7 等 5 个碳的化学位移，可判断分子中具有吡喃葡萄糖的结构部分；根据在 ^{1}H-NMR 及 ^{1}H-^{1}H-COSY 谱 δ 7.03（2H，s）、6.56（1H，s）及 6.49（1H，s）出现 4 个不相关的芳质子信号，可以判断该化合物分子中有没食子酰基（galloyl）及 HHDP（六羟基苯甲酰基）基团的取代。由于 ^{1}H-NMR 中除糖 H-1 及糖 H-2 的偶合常数 $J_{1,2}$ 外，其余糖上连位质子 2，3，4，5 间的偶合常数均较小这一特点，表明糖为 $^1C_4$ 构象为船式构象，提示 HHDP 取代于糖的 C-2 及 C-4 或 C-3 及 C-6 位。^{1}H-^{13}C 化学位移相关试验结果可见：糖 H-1 质子（δ 6.20）与 δ 164.8 的酯羰基相关，后者又与没食子酰基（没食子酰，A）上的芳质子（δ 7.03）相关，证明没食子酰基取代于糖 C-1 位；同样，糖 H-3 质子（δ 4.59）与 δ 166.8 的酯羰基相关，后者又与 HHDP（B）上的芳质子（δ 6.58）相关；糖 H-6 质子（δ 4.24）与 δ 167.1 的酯羰基相关，后者又与 HHDP（C）上的芳质子（δ 6.52）相关，证明 HHDP 基取代于糖的 C-3 及 C-6 位。

根据以上理化常数及光谱数据，可确定本化合物为鞣质类化合物柯里拉京（结构式见图 1）。

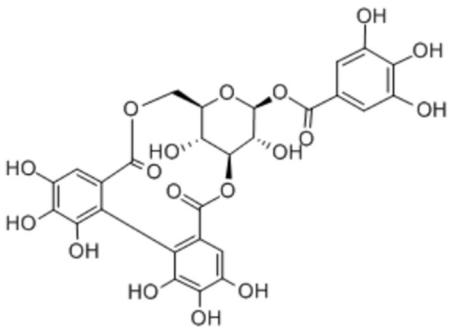


图 1　柯里拉京的结构式

Fig 1　Structure of corilagin

3　小结

叶下珠是提取柯里拉京较好的原料，分离难度小，收率稳定。文献报道陕西、四川、广西产的叶下珠中柯里拉京含量最高[3, 7]。本研究在纯化的同时也对诃子、余甘子药材中柯里拉京的成分进行了初步研究，结果提示以诃子提取物喷干粉及诃子提取液制备柯里拉京时发现其对葡聚糖凝胶污染较大，且分离难度大故而收率较低。余甘子及余甘子汁也尚难以作为提取柯里拉京的原料。

葡聚糖凝胶（Sephadex LH-20）是鞣质分离常用的树脂，其缺点是对某些鞣质吸附太强而不易洗脱，从而影响凝胶寿命。精制纯化过程中分别选用乙醇、甲醇和乙酸、丙酮作为洗脱剂，发现 20% 丙酮作为洗脱剂时效果较好。此外，当重结晶溶剂乙腈浓度为 80% 时会使母液浓缩后析出结晶过快，经摸索发现 50% ～ 60% 乙腈较适宜。

致谢：四川省中药所罗泽渊、周德庆、罗学成；四川华美制药有限公司总工程师吴燕成。本研究中结构鉴定由中国食品药品检定研究院分部等单位协助完成。

参考文献

[1] Li X，Deng Y，Zheng Z，et al. Corilagin，a promising medicinal herbal agent [J]. Biomed Pharmacother，2018，99：43-50.

[2] 陈一燕，陈崇宏 . 柯里拉京药理活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2010，27（5）：390-394.

[3] 闫小玉，孙蒙，杨国光，等 . RP-HPLC 法同时测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和短叶苏木酚的含量 [J]. 沈阳药科大学学报，2012，29（1）：45-48，54.

[4] Jikai L，Yue H，Henkel T，et al. One step purification of corilagin and ellagic acid from *Phyllanthus urinaria* using high-speed countercurrent chromatography [J]. Phytochem Anal，2002，13（1）：1-3.

[5] Hou X，Cheng Z，Wang J. Preparative purification of corilagin from *Phyllanthus* by combining ionic liquid extraction，prep-HPLC，and precipitation [J]. Anal Methods，2020，12（26）：3382-3389.

[6] Adili G，Sun G，Abuduaini M，et al. Simultaneous determination of loading capacity and selectivity in preparative off-line two-dimensional separation：an application for purification of corilagin from *Pomegranate* flower extracts [J]. J Chromatogr A，2020，1622：461129.

[7] 张树峰，明艳林，林毅，等 . 叶下珠属植物活性成分柯里拉京研究进展（综述）[J]. 亚热带植物科学，2010，39（4）：79-83.

（收稿日期：2021-07-13；修回日期：2021-09-30）

匹伐他汀钙光降解杂质的合成

林辉，王正泽，陈慧（南京长澳医药科技有限公司，南京 210038）

摘要：目的 合成匹伐他汀钙光降解杂质。**方法** 以匹伐他汀钙为原料，经盐酸中和制得匹伐他汀。匹伐他汀经氧化、成盐得匹伐他汀钙 5- 酮体（**1**）；匹伐他汀经内酯化、光环化、水解、成盐得匹伐他汀钙闭环体（**2**）。**结果** 两个光降解杂质的结构经核磁共振氢谱、碳谱、氟谱、DEPT 谱和高分辨率质谱确证，纯度经 HPLC 检测均在 99.0% 以上。**结论** 合成的两个杂质可以作为匹伐他汀钙原料药及其制剂质量控制的杂质对照品。

关键词：匹伐他汀钙；光降解杂质；合成
中图分类号：TQ463 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0362-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.022

Synthesis of photodegradation impurities from pitavastatin calcium

LIN Hui, WANG Zheng-ze, CHEN Hui (*Nanjing Changao Pharmaceutical Science and Technology Co., Limited, Nanjing* 210038)

Abstract: Objective To synthesis the two pitavastatin calcium photodegradable impurities. **Methods** Pitavastatin was prepared from pitavastatin calcium salt with hydrogen chloride. Pitavastatin calcium 5-keto form (**1**) was prepared from pitavastatin via oxidation and salinization. Pitavastatin calcium ring-closed form (**2**) was prepared from pitavastatin via lactonization, photocyclization, hydrolysis and salinization from pitavastatin. **Results** The chemical structures of the two photodegradable impurities were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, DEPT and HRMS. The purities were over 99.0% as determined by HPLC. **Conclusion** The synthesized two impurities can be used as the reference substances for the quality control of pitavastatin calcium and its preparations.

Key words: pitavastatin calcium; photodegradable impurity; synthesis

匹伐他汀钙，化学名为（＋）- 双 -｛(3*R*，5*S*，6*E*）-7-[2- 环丙基 -4-（4- 氟苯基）-3- 喹啉基]-3，5- 二羟基 -6- 烯庚酸｝单钙盐，是由日产化学工业株式会社和日本兴和株式会社共同研制的 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制剂，于 2003 年在日本上市，主要用于高胆固醇血症和家族性高胆固醇血症治疗 [1]。

他汀类原料药如匹伐他汀钙、氟伐他汀钙、阿托伐他汀钙和瑞舒伐他汀钙等通常对光照敏感，原料药及制剂产品在生产和贮存过程中若曝露于光环境中，会发生光环化和光氧化反应，分解成不同类型的降解产物 [2-5]。文献 [2, 6] 报道匹伐他汀钙经曝光可分解为（＋）- 双 -｛(3*R*，6*E*）-7-[2- 环丙基 -4-（4- 氟苯基）-3- 喹啉基]-3- 羟基 -5- 氧代 -6- 烯庚酸｝单钙盐（简称 5- 酮体，**1**）和（＋）- 双 -｛(3*R*，5*S*）-5-[6- 环丙基 -7，8- 二氢 -10- 氟苯并 [k] 菲啶 -8- 基]-3，5- 二羟基戊酸｝单钙盐（简称闭环体，**2**）。匹伐他汀钙及其光降解杂质结构式见图 1。

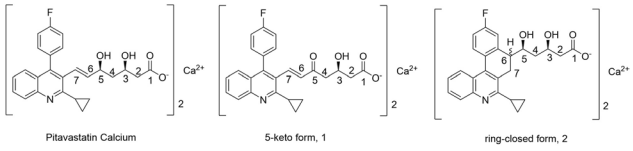


图 1 匹伐他汀钙及其降解杂质的结构式

Fig 1 Structure of pitavastatin calcium and its photodegradable impurities

由于匹伐他汀钙对光照比较敏感，因此在工艺开发和处方研究时，需要考察光照对匹伐他汀钙及有关物质的影响。高效液相色谱（HPLC）法可以准确直观地反映各杂质的变化情况，是目前用于控制药物有关物质的主要方法，但其前提是获得被测杂质的对照品。本文主要研究了匹伐他汀钙光降解产物 **1** 和 **2** 的制备方法，可以为匹伐他汀钙原料药及制剂工艺研究、筛选合适的遮光

作者简介：林辉，男，工程师，主要从事药物合成工艺研究，email：linhui@changao.com

剂和包装材料提供杂质对照品。

本课题组前期以匹伐他汀钙为原料，经 2，3- 二氯 -5，6- 二氰对苯醌（DDQ）氧化，再经柱层析分离得到化合物 **1**，总收率为 28%[1]。但该方法通过饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应，易析出大量固体，包裹产物，造成产物损失。DDQ 氧化性较强，选择性较差，除了氧化 C-5 位羟基外，还会继续氧化 C-3 位羟基，生成副产物 3，5- 二酮体。DDQ 在萃取或者柱层析工序中均不易去除，从而在产物中残留。产物极性大，柱层析分离纯化效果差，产物纯度仅 96.0%。本研究最初参照文献 [7] 方法，以二甲基亚砜为溶剂，采用二氧化锰（MnO_2）氧化匹伐他汀钙制备化合物 **1**，但 HPLC 检测显示无目标产物 **1** 产生。后尝试采用铬氧化物、高锰酸盐、金属铑络合物和高价碘试剂氧化匹伐他汀钙，但这些氧化剂选择性差，副产物多，后处理复杂，产物难分离纯化 [8]。本研究在文献 [9] 研究基础上，选择活性 MnO_2 氧化匹伐他汀游离酸得 5- 氧代匹伐他汀（**3**），再在碱性条件下成钙盐制得化合物 **1**。合成路线如图 2 所示。该路线反应条件温和，可选择性氧化 C-5 位烯丙醇，不会引起双键的异构化，反应收率高；反应液为非均相，后处理只需简单地过滤；底物和产物为羧酸形式，产物易通过柱层析或者重结晶的方式分离纯化。

Grobelny 等 [2] 将匹伐他汀钙样品溶液暴露于紫外光中，HPLC 检测到包含化合物 **2** 在内的 4 种光降解产物。文献 [3，5] 报道了其他他汀类结构如氟伐他汀钙和瑞舒伐他汀钙在水中通过阳光或紫外光照射发生环化反应，产生非对映异构体二氢苯并咔唑和二氢苯并喹唑啉结构，并通过制备 HPLC 分离出毫克级样品用于结构确证。以上 3 种他汀类化合物均含邻乙烯基联苯结构，易发生光环化反应，生成稳定的类二氢菲结构 [10]，因此，本研究选择光环化的方法制备化合物 **2**，最初采用匹伐他汀钙或匹伐他汀游离酸进行光环化，由于产物极性过大，柱层析分离纯化效果差。Cermola 等 [3] 利用重氮甲烷进行甲基化制得甲酯，降低光降解产物的极性，再经制备 HPLC 分离纯化。本研究参考上述方法，将匹伐他汀经对甲苯磺酸催化，分子内脱水内酯化得到匹伐他汀内酯（**4**），化合物 **4** 在光照条件下发生光环化反应制得内酯闭环体非对映异构体（**5**），再在碱性条件下水解、成盐转化为化合物 **2**。合成路线如图 2 所示。该路线选择内酯结构作为底物进行光降解反应，产物极性降低，易分离纯化；底物溶解度更高，溶液状态有利于光环化反应 [11]。

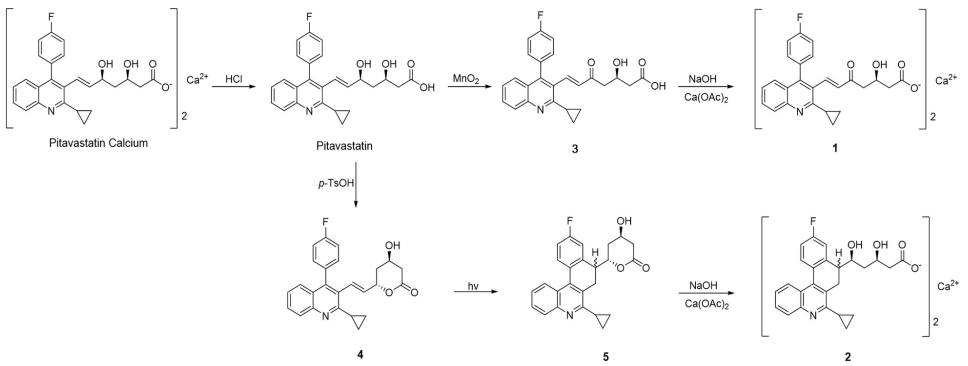


图 2　匹伐他汀钙 5- 酮体和闭环体的合成

Fig 2　Synthetic routes of pitavastatin calcium 5-keto form and ring-closed form

1　仪器与试药

7890 型高效液相色谱仪、6200 Q-TOF 型质谱仪（美国 Agilent 公司）；AV-500 型核磁共振仪、AV-400 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；ZF-1 型三用紫外分析仪（上海光豪）。柱层析使用 100 ～ 200 目硅胶（青岛海洋化工五厂，试剂级）。匹伐他汀钙（江苏天晟药业有限公司，药用级）；活性 MnO_2（成都艾科达化学试剂有限公司）；其他试剂均为市售分析纯。

2　方法

2.1　匹伐他汀的合成

在反应瓶中加入匹伐他汀钙（80.0 g）、乙酸乙酯（400 mL）和水（200 mL），室温下搅拌 15 min。用 10% 盐酸调节 pH 3，继续搅拌 10 min，分液。水层用乙酸乙酯（100 mL×3）萃取。合并有机层用饱和氯化钠溶液（200 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥后抽滤，滤液减压蒸除溶剂，得无色油状物匹伐他汀（72.1 g，以匹伐他汀钙计收率为 94.2%）。

2.2　匹伐他汀钙 5- 酮体（**1**）的合成

将匹伐他汀（30.0 g，71.18 mmol）溶于干燥二氯甲烷（300 mL）中分批加入活性 MnO_2（116.3 g，1.07 mol），回流搅拌 10 h。用硅藻土填充的漏斗抽滤，滤饼用二氯甲烷（50 mL×3）洗涤，合并滤液，减压蒸除溶剂。剩余物经硅胶柱色谱 [洗

脱液为二氯甲烷 - 甲醇（80 ～ 20∶1）]纯化剩余物得浅棕色油状物 **3**。加入水（180 mL），用 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠调节 pH 为 9。冰浴冷却，滴加 1 mol • L^{-1} 乙酸钙（29 mL），搅拌 1 h。抽滤，滤饼水洗涤，烘干，得浅黄色固体 **1**（17.1 g，以匹伐他汀计收率为 54.8%），纯度为 99.0%[HPLC 归一化法：色谱柱 C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 pH 3.8 醋酸钠缓冲溶液，流动相 B 为乙腈，梯度洗脱（0 → 20 min：60%A，20 → 40 min：60% → 30%A，40 → 65 min：30%A）；检测波长 245 nm；柱温 40 ℃；流速 1.0 mL • min^{-1}。相对保留时间 1.3（相对于匹伐他汀钙）]。mp. 139.6 ～ 140.6 ℃；^{1}H NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ：7.89（d，J = 8.35 Hz，1H，Ar-H），7.68（t，J = 7.45 Hz，1H，Ar-H），7.57（d，J = 16.5 Hz，1H，= CH），7.31 ～ 7.43（m，6H，Ar-H），6.34（d，J = 16.5 Hz，1H，= CH），5.61（br，1H，CHOH），4.16（s，1H，CH），2.53 ～ 2.63（m，1H，CH），2.40 ～ 2.45（m，1H，CH_2），2.15 ～ 2.19（m，1H，CH_2），2.05 ～ 2.10（m，1H，CH_2），1.26（s，2H，CH_2），1.09 ～ 1.10（m，3H，CH_2）；^{13}C NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：198.13（C = O），177.90，162.81，160.86，159.68，146.49，145.34，138.41，134.43，132.04，131.88，129.74，128.38，127.31，125.99，125.83，125.14，115.50，115.33，64.97，55.98，47.85，43.78，18.48，15.86，10.69，10.66；HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{23}FNO_4$ [M-Ca + 2H] $^+$ 420.1606，found 420.1609。

2.3　匹伐他汀内酯（**4**）的合成

将匹伐他汀（10.0 g，23.73 mmol）溶于二氯甲烷（100 mL）中，加入一水对甲苯磺酸（0.5 g），回流搅拌 4 h。冰浴冷却，加入饱和碳酸氢钠调节 pH 为 7，分液。有机层用饱和氯化钠溶液（50 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥后抽滤，滤液减压蒸除溶剂。剩余物用乙酸乙酯 - 正己烷重结晶，得类白色固体 **4**（8.4 g，以匹伐他汀计收率为 87.8%）。mp. 127.1 ～ 127.9 ℃；^{1}H NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：8.05（d，J = 6.65 Hz，1H，Ar-H），7.67（t，J = 7.35 Hz，1H，Ar-H），7.31 ～ 7.45（m，2H，Ar-H），7.21 ～ 7.26（m，4H，Ar-H），6.77（d，J = 16.15 Hz，1H，= CH），5.69（dd，J = 1.65，16.15 Hz，1H，= CH），5.22（m，1H，CH），4.28 ～ 4.30（s，1H，CHOH），2.72 ～ 2.76（m，1H，CH_2），2.62 ～ 2.66（m，1H，CH），2.40 ～ 2.45（m，1H，CH），2.2（br，1H，CHOH），1.84（d，J = 14.25 Hz，1H，CH_2），1.66（dd，J = 2.4，13.4 Hz，1H，CH_2），1.40 ～ 1.42（m，2H，CH_2），1.11（d，J = 7.9 Hz，2H，CH_2）；HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{23}FNO_3$ [M + H] $^+$ 404.1656，found 404.1663。

2.4　匹伐他汀钙闭环体（**2**）的合成

将 **4**（5.0 g，12.39 mmol）溶于二氯甲烷（1000 mL）中。将溶液装入透明玻璃量瓶中，置于紫外灯下，365 nm 波长照射 5 d，减压蒸除溶剂。剩余物经硅胶柱色谱 [洗脱液为正己烷 - 乙酸乙酯（1∶1 ～ 2）] 纯化，得黄色油状物 **5**。将 **5**（3.5 g，8.68 mmol）溶于乙腈（35 mL），加入 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠（9 mL），室温搅拌 3 h，减压蒸除溶剂。剩余物加入水（35 mL）稀释，冰浴冷却，滴加 1 mol • L^{-1} 乙酸钙（5.2 mL，5.2 mmol），搅拌 2 h，抽滤，滤饼水洗涤，烘干，得黄色固体 **2**（2.9 g，以 **4** 计收率为 52.7%），纯度为 99.7%[HPLC 归一化法：色谱条件同 **1**，两个非对映异构体相对保留时间分别为 0.53，0.55（相对于匹伐他汀钙），以两个非对映异构体峰面积总和计]。mp. 148.8 ～ 151.5 ℃；^{1}H NMR（500 MHz，MeOH-d_4）δ：8.39（t，J = 9.45 Hz，2H，Ar-H），7.95 ～ 8.00（m，4H，Ar-H），7.68（t，J = 7.1 Hz，2H，Ar-H），7.51 ～ 7.54（m，2H，Ar-H），7.32（d，J = 9.2 Hz，2H，Ar-H），7.17 ～ 7.21（m，2H，Ar-H），4.04 ～ 4.09（m，1H，CH），3.90 ～ 3.96（m，2H，CHOH），3.62 ～ 3.65（m，1H，CH*），3.55 ～ 3.56（m，2H，CHOH），2.88 ～ 3.08（m，4H，CH_2），2.43 ～ 2.50（m，2H，CH），2.05 ～ 2.18（m，4H，CH_2），1.63 ～ 1.80（m，4H，CH_2），1.42 ～ 1.44（m，1H，CH_2），1.26 ～ 1.27（m，1H，CH_2），1.12 ～ 1.20（m，3H，CH_2），1.02 ～ 1.11（m，3H，CH_2）；^{13}C NMR，DEPT（125 MHz，MeOH-d_4）δ：180.22，180.19*，164.92，164.83*，162.25，161.43*，149.01，148.85*，145.55，144.78*，139.91*，139.67，139.91*，132.67，132.37*，129.96，129.80*，129.61，129.42，129.35*，129.32，128.82*，126.75*，126.70，126.18，126.12*，124.25*，124.17，118.03，117.56*，114.70，114.30*，71.01（CH*），69.70（CH），69.51（CH），69.00（CH*），46.71（CH），45.06（2C，CH*，CH_2），45.03（CH_2^*），43.00（CH_2），42.47（CH_2^*），26.71（CH_2），27.61（CH_2^*），15.87（CH），9.27（CH_2），9.89（CH_2^*），8.26（CH_2），7.73（CH_2^*）；^{19}F NMR（376 MHz，MeOH-d_4）δ：－ 114.1（s，Ar-F），－ 114.7（s，Ar-F*）；*归

属于其中信号较弱的异构体。HRMS-ESI calcd for $C_{25}H_{25}FNO_4$ [M-Ca ＋ 2H] $^+$ 422.1762，found 422.1758。

3　结果与讨论

本文在文献基础上对化合物 **1** 的合成方法进行了改进。原料使用匹伐他汀游离酸代替钙盐，降低了底物和产物的极性，容易通过柱层析分离纯化，产物纯度提高到 99.0%（文献 [1] 为 96.0%）。氧化反应氧化剂用 MnO_2 代替 DDQ，反应选择性更高，反应后处理简单。工艺优化发现反应温度、MnO_2 的用量和加入方式对反应速率、副产物含量和反应收率影响较大，反应温度由室温提高至 40 ～ 50 ℃，大大缩短了反应时间；优化 MnO_2 的用量为 15 当量（以匹伐他汀计），通过分批加入 MnO_2 的方式，可减少副产物 **4** 的生成。市售 MnO_2 粒度较小，过滤时加入硅藻土助滤，可以提升过滤速度。合成总收率提高至 52%（文献 [1] 为 28%，以匹伐他汀钙计）。

化合物 **1** 的高分辨率质谱（HRMS）实测值和计算值误差在 ±0.0030 之内，核磁共振氢谱（^{1}H NMR）和碳谱（^{13}C NMR）测试数据与文献 [1, 7] 报道一致。

本文从匹伐他汀钙光降解机制出发，首次报道采用光环化方法成功合成克级化合物 **2**，总收率为 44%，产物纯度为 99.7%。**4** 的光环化反应遵循邻乙烯基联苯类化合物的光环化反应机制 [10-12]：第一步底物 **4** 经光照射发生环化，产生不稳定非对映异构体混合物 **4'**；第二步，中间体 **4'** 由于失去芳香性，结构不稳定，会发生 1，5- 氢迁移反应，生成稳定的二氢苯并 [k] 菲啶结构 **5**。反应机制如图 3 所示。

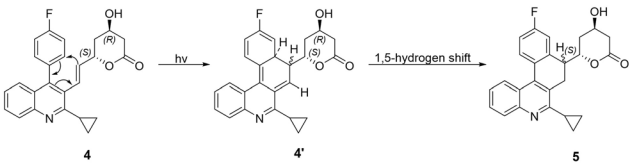


图 3　化合物 **4** 光环化反应机制

Fig 3　Mechanism of compound **4** photocyclization

化合物 **2** 的 HRMS 实测值和计算值误差在 ±0.0030 之内，HPLC 和核磁共振氟谱（^{19}F NMR）分别显示两组峰，表明 **2** 为非对映体混合物，HPLC 的紫外峰积分比例约 1∶1，与文献 [3-6] 报道一致。徐敏等 [13] 研究苯醚甲环唑非对映异构体发现，在核磁共振谱中非对映异构体相应的信号存在差别，特别是 ^{13}C NMR 谱信号峰成对出现。**2** 的 ^{1}H NMR 谱中两种构型 C-6 位碳原子上的质子化学位移分别为 δ_H 4.04 ～ 4.09 和 δ_H 3.90 ～ 3.96，积分比例约 1∶1，与 HPLC 的 UV 峰积分一致。^{13}C NMR 谱显示了 50 个信号，其中 24 组峰成对出现（一强一弱），2 个重叠峰，分别对应非对映异构体中 25 个碳原子。DEPT 谱显示分子中含 5 组仲碳、11 组叔碳和 9 组季碳，符合 **2** 的化学结构式。与匹伐他汀钙的 NMR 数据比较，发现其新增了一个附加环，少了一个烯键和一个芳香质子。

4　结论

本研究成功合成了匹伐他汀钙 5- 酮体（**1**）和闭环体（**2**）两种光降解杂质，并经核磁共振氢谱、碳谱、氟谱、DEPT 谱和 HRMS 等确证结构，纯度经 HPLC 检测均在 99.0% 以上，可以作为匹伐他汀钙原料药及其制剂质量控制的对照品。

参考文献

[1] 李纬，王正泽，林辉，等 . 匹伐他汀钙有关物质的合成 [J]. 药学与临床研究，2017，25（4）：286-288.

[2] Grobelny P，Viola P，Vedaldi D，et al. Photostability of pitavastatin-a novel HMG-CoA reductase inhibitor [J]. J Pharmaceut Biomed，2009，50（4）：597-601.

[3] Cermola F，DellaGrecaa M，Iesce MR，et al. Irradiation of fluvastatin in water structure elucidation of photoproducts [J]. J Photoch Photobio A，2007，189（2）：264-271.

[4] Cermola F，Della Grecaa M，Iesce MR，et al. Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water [J]. Tetrahedron，2006，62（31）：7390-7395.

[5] Astarita A，DellaGreca M，Iesce MR，et al. Polycyclic compounds by sunlight exposure of the drug rosuvastatin in water [J]. J Photoch Photobio A，2007，187（2-3）：263-268.

[6] 小崎雅人，谷泽良夫，川岛弘行 . 光稳定性优异的医药制剂：中国，101300010 [P]. 2008-11-05.

[7] 翟民，张涛，杨学谦，等 . 匹伐他汀钙 5- 氧代杂质的制备方法：中国，201810667189 [P]. 2018-06-26.

[8] 吴超龙，喻敏，姚小泉 . 醇的选择性催化氧化研究进展 [J]. 化工时刊，2017，31（4）：27-35.

[9] 李伟星，周志亮，吴国文，等 . 瑞舒伐他汀钙已知杂质的制备方法：中国，201410156267 [P]. 2014-04-18.

[10] 郭妮，李苑莹，李亚珍，等 . 二芳基乙烯类化合物的光致关环及重排过程的理论研究 [J]. 中国科学（化学），2019，49（10）：1289-1298.

[11] Litvic M，Smic K，Vinkovic V，et al. A study of photodegradation of drug rosuvastatin calcium in solid state and solution under UV and visible light irradiation：the influence of certain dyes as efficient stabilizers [J]. J Photoch Photobio A，2013，252：84-92.

[12] Jarmuzek D，Pedzinski T，Hoffmann M，et al. Phototransformations of pitavastatin-the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. J Photoch Photobio A，2020，389：112243.

[13] 徐敏，张皋，王民昌，等 . 苯醚甲环唑非对映异构体的 NMR 研究 [J]. 波谱学杂志，2010，27（4）：642-649.

（收稿日期：2021-04-06；修回日期：2021-07-08）

全自动二维液相色谱法测定甲氨蝶呤血药浓度及其临床应用

刘加涛，孙小珊，宋帅，苏涌，夏泉*（安徽医科大学第一附属医院药剂科，合肥 230032）

摘要：目的 采用全自动二维液相色谱（2D-LC-UV）法快速测定甲氨蝶呤的血药浓度。**方法** 采用 10% 三氟乙酸去蛋白剂对样本进行前处理后取上清液直接进样，待测物在一维柱 Aston SC2（C_{18}，4.6 mm×25 mm，5 μm）上初步分离，通过中间柱 Aston SN（苯基柱，4.6 mm×10 mm，5 μm）截取保留，最后转移到二维色谱柱 Aston SX1（氰基柱，4.6 mm×75 mm，5 μm）上进一步分离、测定。一维流动相为甲醇 - 乙腈 -10 mmol • L^{-1} 磷酸铵水溶液＝1∶1∶10（*V*/*V*/*V*），流速 0.6 mL • min^{-1}；二维流动相为水（含 1.0 mmol • L^{-1} 磷酸氢二铵水溶液，磷酸调 pH 至 7.40）- 水（含 1.0 mmol • L^{-1} 磷酸氢二铵水溶液，磷酸调 pH 至 3.00）- 甲醇 - 乙腈（16∶60∶10∶14）的混合体系，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃；紫外检测波长 304 nm。使用本方法监测 2019 年 10 月—2020 年 12 月期间使用甲氨蝶呤治疗的 48 份样本的甲氨蝶呤血药浓度。**结果** 甲氨蝶呤可在 10 min 内完整出峰且无杂质干扰，在 0.05 ～ 12.8 μmol • L^{-1} 与峰面积线性关系良好（r ＝ 0.9997），方法学考察均符合要求。检测的 48 份甲氨蝶呤血药浓度样本中 72.9%（35/48）的样本在标准曲线范围内，10.4%（5/48）的样本因使用剂量低未检出，另有 16.7%（8/48）的样本使用大剂量甲氨蝶呤后血药浓度超出正常值上限。**结论** 本方法操作简单，灵敏度、专属性高，稳定性好，能够满足甲氨蝶呤用药后药物浓度监测及解救的需要。

关键词：二维液相色谱；甲氨蝶呤；血药浓度；治疗药物监测

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0366-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.023

Determination of methotrexate in the plasma by automatic two-dimensional liquid chromatography and its clinical application

LIU Jia-tao, SUN Xiao-shan, SONG Shuai, SU Yong, XIA Quan* (*Department of Pharmacy*, *the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University*, *Hefei* 230022)

Abstract: Objective To determine the concentration of methotrexate in the plasma by automatic two-dimensional liquid chromatography (2D-LC-UV). **Methods** The sample was injected for determination after being deproteinized with 10% trifluoroacetic acid agent. The sample was initially separated with a one-dimensional Aston SC2 column (C_{18}, 4.6 mm×25 mm, 5 μm). Then methotrexate was intercepted and retained on an intermediate Aston SN column (phenyl column, 4.6 mm×10 mm, 5 μm). Finally, it was transferred to the two-dimensional Aston SX1 (cyano column, 4.6 mm×75 mm, 5 μm) column for further separation and determination. The one-dimensional mobile phase was methyl alcohol-acetonitrile-10 mmol • L^{-1} ammonium phosphate aqueous solution (1∶1∶10, *V*/*V*/*V*) with a flow rate of 0.6 mL • min^{-1}. The two-dimensional mobile phase was a mixed system of water (1.0 mmol • L^{-1} diammonium phosphate water solution, with pH adjusted to 7.40 with phosphoric acid)-water (1.0 mmol • L^{-1} diammonium phosphate water solution, with pH adjusted to 3.00)-methyl alcohol-acetonitrile (16∶60∶10∶14). The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 40 ℃ and the wavelength was 304 nm. The method was used for 48

基金项目：安徽省“十三五”临床重点专科建设项目（No. 卫科教秘 [2017]529 号）；吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金（No. 320.6750.2020-03-6）。

作者简介：刘加涛，男，博士，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药理和临床药学工作，email：jiatao177@126.com

*__通信作者__：夏泉，男，博士，主任药师，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药理和临床药学工作，email：xiaquan2010@163.com

samples treated with methotrexate from October 2019 to December 2020. **Results** Methotrexate had a complete chromatographic peak within 10 minutes without impurity interference. The linearity was good at 0.05 to 12.8 μmol • L^{-1} (r = 0.9997). The methodology met all the requirements. Totally 48 samples were detected, 35 (72.9%) of which were within the range of the standard curve, 5 (10.4%) of which were not detected due to low dose, and 8 (16.7%) of which exceeded the upper limit of normal value due to the use of high-dose methotrexate. **Conclusion** The two-dimensional liquid chromatography method is simple, sensitive, specific and good stable, which meets the needs of drug concentration monitoring and rescue after methotrexate administration.

Key words: two-dimensional liquid chromatography; methotrexate; plasma concentration; therapeutic drug monitoring

甲氨蝶呤（MTX）是一种抗叶酸药物，通过抑制叶酸生物合成中的关键酶二氢叶酸还原酶发挥活性，广泛用于类风湿关节炎、白血病、淋巴瘤、骨肉瘤等疾病[1]。MTX 血药浓度升高可能导致 MTX 毒性风险增加，包括肾毒性、中枢神经毒性、皮肤毒性、胃肠道毒性、血液学毒性、肝毒性和肺毒性，充分水化和碱化尿液可以减少这些不良反应的发生率[2-3]。MTX 不良反应的发生频率和严重程度与给药途径和血药浓度有关，大多数毒性作用与血药浓度有关，并且如果能早期发现并进行亚叶酸钙解救治疗通常是可逆的。MTX 治疗（尤其是高剂量时）的不良反应发生率高，患者个体间的药代动力学和药效学变化大，需要对 MTX 进行常规监测，以指导亚叶酸类似物的解救治疗方案，降低 MTX 毒性反应[4-5]。

MTX 的监测方法有多种，早期的分析方法虽然灵敏度高，但是耗时耗力并要求使用放射性同位素[6]；而使用抗体的生物分析方法，如放射免疫分析[7]、荧光偏振免疫分析[8]和酶放大免疫测定法[9]，虽具有操作简单、检测速度快和成本低等多种优势，但由于 MTX 与其代谢物之间潜在的抗体交叉反应，导致结果的准确性和特异性降低[10]。此外，采用串联质谱（MS-MS）检测 MTX 的方法虽具有灵敏度高、准确性好等优点[4]，但质谱相关设施昂贵，操作要求较高，医院难以常规配备。因此，本研究旨在建立一种简单、快速、特异、灵敏的 MTX 血药浓度测定的全自动二维高效液相色谱（2D-LC）法，并在使用 MTX 治疗的患者的常规药物浓度监测中进行初步验证。

1　仪器与试药

1.1　仪器

2D-LC-UV 系统由 FLC 全自动二维液相色谱耦合仪（湖南德米特仪器有限公司）及岛津 LC-20A 液相色谱部件构成，FLC 连接第一维色谱泵、第二维色谱泵、检测器、自动进样器等色谱模块；其中第一维色谱系统（LC1）完成样品富集及一维分离，第二维色谱系统（LC2）完成进一步分离检测，两维系统通过智能流路控制系统（TRS）连接，采用“中心切割”模式转移目标物，中间转移柱同时承担转移、拦截杂质的功能，工作站为 Lab Solution 工作站，具体结构示意图见图 1。BT25S 电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；HC-3018R 型高速冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；KDC-1044 型低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；涡旋混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

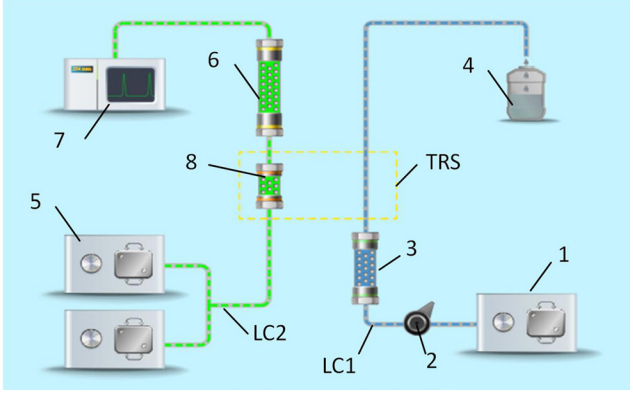


图 1　全自动二维液相色谱工作原理示意图

Fig 1　Schematic diagram of 2D-LC system

1.2　试药

甲氨蝶呤对照品（批号：079K1241，Sigma 公司，纯度：99.9%）；甲醇、乙腈（色谱纯，ACS）；磷酸、磷酸铵、三氟乙酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；ACP-1 去蛋白剂、ACG 保护剂（湖南德米特仪器有限公司），灭菌注射用水（四川科伦药业有限公司），空白马血清

（批号：113I051，北京索莱宝科技有限公司）。

2　方法

2.1　色谱条件

第一维色谱系统中，采用 Aston SC2（C_{18}，4.6 mm×25 mm，5 μm）柱，流动相为 MVV-1D 移动相，流速 0.6 mL • min^{-1}；采用 Aston SN 中间柱（苯基柱，4.6 mm×10 mm，5 μm），流动相为纯水。第二维色谱系统中，采用 Aston SX1 柱（氰基柱，4.6 mm×75 mm，5 μm），流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，紫外检测波长 304 nm，等度洗脱，进样量 400 μL。

2.2　对照品溶液的配制

精密称取甲氨蝶呤对照品 4.54 mg 置于 2 mL 量瓶中，加入适量色谱甲醇充分溶解并定容，配制成 5.0 mmol • L^{-1} 的 MTX 储备液，置于－ 80 ℃，备用。

2.3　质控品溶液的配制

取“2.2”项下对照品溶液 0.2 mL，稀释至 1.0 mL，混匀，得 1.0 mmol • L^{-1} 的 MTX 工作液。取 1.0 mmol • L^{-1} 的 MTX 工作液 0.2 mL，加入空白马血清 20 mL，混匀，得高浓度质控品溶液（10.0 μmol • L^{-1}）。依次配制中浓度（5.0 μmol • L^{-1}），低浓度（0.10 μmol • L^{-1}）质控品溶液，于－ 20 ℃冰箱备用。

2.4　样品处理

采集使用甲氨蝶呤治疗的患者的静脉血 2 mL，以 3000 r • min^{-1} 离心 5 min。取血浆 200 μL 至 1.5 mL EP 管中，加入 ACP-1 去蛋白剂 600 μL，涡旋混匀 2 min，用高速冷冻离心机 4 ℃下 12 000 r • min^{-1} 离心 10 min。取上清液，同样条件下再次离心，取 600 μL 上清液至 1.5 mL 进样瓶中，再加入 60 μL ACG 保护剂，震荡摇匀，即得。

2.5　方法学验证

2.5.1　线性关系考察　取 1.5 mL EP 管若干，分别加入空白血清 191.2 μL，然后加入系列浓度的甲氨蝶呤工作溶液各 8.8 μL，按照“2.4”项下方法处理，即得 12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 和 0.05 μmol • L^{-1} 的血浆样品，进样测定，以峰面积对浓度进行线性回归，计算回归方程。

2.5.2　回收率和精密度　平行制备 0.1、5.0、10.0 μmol • L^{-1} 的低、中、高 MTX 含药血浆样品，按“2.4”项下方法进行样品预处理，进样测定，计算 MTX 浓度。均平行操作 5 次，计算回收率；且每个样品均在 24 h 内重复测定 5 次，计算日内 *RSD*；连续测定 3 d，计算日间 *RSD*。

2.5.3　稳定性考察　平行制备浓度分别为 0.1、5.0、10.0 μmol • L^{-1} 的 MTX 含药血浆样品，按“2.4”项下方法进行预处理，分别考察其室温放置 24 h、－ 20 ℃反复冻融 3 次和－ 20 ℃保存 2 周后 MTX 的稳定性。

2.6　样本

收集 2019 年 10 月 28 日—2020 年 12 月 17 日某院接受甲氨蝶呤治疗的 24 例患者的 48 份血样，其中男性患者 16 例，女性患者 8 例，平均年龄是（24.4±23.8）岁（2 ～ 71 岁），按照“2.3”项下方法处理后进样检测。

3　结果

3.1　系统适应性及专属性考察

分别取空白血浆、含 MTX 对照品血浆和患者血浆样品，按照“2.4”项下方法处理样品，进样检测。结果显示，MTX 的出峰时间为 7.24 min，并且在 MTX 出峰位置无内源性物质干扰，专属性较好，见图 2。

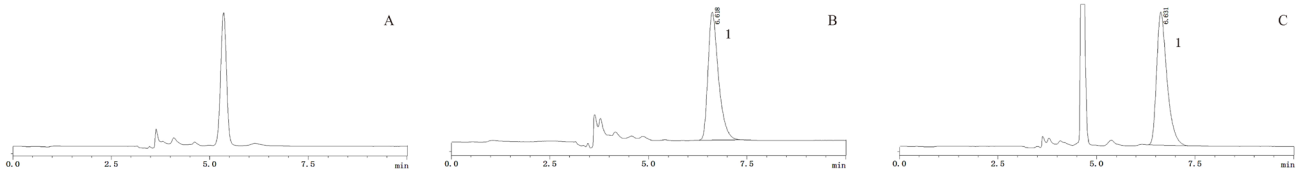


图 2　甲氨蝶呤二维液相色谱图

Fig 2　2D-LC chromatogram of methotrexate

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋甲氨蝶呤（blank plasma ＋ MTX）；C. 给药后血浆（plasma sample after the administration）

1. 甲氨蝶呤（methotrexate）

3.2　线性关系考察

以甲氨蝶呤峰面积为 *Y*，血浆浓度为 *X*，通过最小二乘法进行线性回归，得甲氨蝶呤回归方程为：$Y = 7.416\times10^4 + 4.243\times10^3$（$r = 0.9997$），表明甲氨蝶呤在 0.05 ～ 12.8 μmol • L^{-1} 与峰面积线性关系良好，最低定量限为 0.05 μmol • L^{-1}。

3.3　精密度试验

据“2.5.2”项下方法检测低、中、高 3 个浓度甲氨蝶呤的日内精密度的 *RSD* 值分别为 4.7%、1.6% 和 3.5%，均低于 5.0%；日间精密度的 *RSD*

值分别为 5.9%、2.2% 和 5.7%，均低于 10.0%，表明仪器精密度良好。

3.4 回收试验

根据“2.5.2”项下方法测定得到 0.1、5.0 和 10.0 μmol • L^{-1} 样品的回收率分别为（94.61±5.6）%、（99.17±1.7）% 和（103.99±3.5）%，*RSD* 均小于 10.0%，表明该方法的回收率较高，符合生物样品分析要求。

3.5 稳定性考察

根据“2.5.3”项下方法考察稳定性发现甲氨蝶呤在室温、－ 20 ℃反复冻融和长期冻存后浓度的 *RSD* 值分别在 0.40% ～ 5.9%、0.35% ～ 2.0% 和 1.2% ～ 2.2%，各浓度组的 *RSD* 均小于 6.0%，表明甲氨蝶呤在上述条件下稳定。

3.6 甲氨蝶呤血药浓度测定

对 24 例患者使用 MTX 治疗的患者的 48 份样本进行检测，结果发现 72.9%（35/48）的 MTX 样本药物浓度均在标准曲线范围内，另有 16.7%（8/48）的样本因患者使用大剂量 MTX 后 0 或 24 h 浓度超出正常值上限，0 h 浓度最高可达到 600.26 μmol • L^{-1}（392.3 ～ 600.26 μmol • L^{-1}），24 h MTX 血浓度最高可达到 73.34 μmol • L^{-1}（1.33 ～ 73.34 μmol • L^{-1}）。此外，本研究中有 10.4%（5/48）的样本因患者使用低剂量治疗类风湿关节炎而未检出 MTX。随着时间推移，患者血浆 MTX 浓度显著下降，用药后 48 h 后 83.3%（15/18）的患者 MTX 浓度低于 1.0 μmol • L^{-1}，用药 72 h 后约 88.89%（16/18）的患者 MTX 浓度低于 0.1 μmol • L^{-1}。

4 讨论

长期以来，基于药代动力学指导下的亚叶酸钙治疗是解救危及生命的 MTX 相关毒性的关键 [11]。多数研究发现，如果延迟给予亚叶酸钙将达不到解救治疗的效果，而高剂量的 MTX 需要不成比例的亚叶酸钙解救，这表明亚叶酸钙的解救时间和剂量必须以监测 MTX 水平为基础 [12-13]。MTX 治疗后接受解救治疗的最佳时机尚不清楚，最初研究提示血清水平低于 0.05 μmol • L^{-1} 之前均需要给予支持治疗 [13]。研究表明，在 MTX 用药后 42 ～ 48 h，血药浓度在 0.20 ～ 0.90 μmol • L^{-1} 范围内可停止亚叶酸钙解救治疗 [14]，而 72 h 时的 MTX 浓度应低至 0.10 μmol • L^{-1}[13]。另有研究发现，对于肾功能正常的患者，当 MTX 水平为 0.1 μmol • L^{-1} 时，可以停用甲酰四氢叶酸 [15-16]。为安全起见，本研究纳入的患者均采用 0.1 μmol • L^{-1} 作为解救治疗的阈值，并发现约 88.89%（16/18）的患者在用药结束后 72 h 血浆 MTX 浓度低于 0.1 μmol • L^{-1}，所有患者均未发生严重的毒副作用。

本研究建立测定 MTX 浓度的 2D-LC 法，具有稳定性好、灵敏度高的特点，最低定量限可达到 0.05 μmol • L^{-1}，不仅可以满足大剂量 MTX 化疗后亚叶酸钙解救的需要，而且可用于部分使用 MTX 治疗类风湿关节炎及小儿白血病患者的 MTX 血药浓度监测，可更好地为临床医师提供安全用药参考。

2D-LC 是近年来发展起来的新型液相色谱技术，已经成为药物分析中的重要手段之一 [17]。2D-LC 是由两种不同分离机制的色谱技术提供的不同保留机制的组合，显著提高了分析的敏感性 [18-19]。本研究使用的 2D-LC 采用自动中间柱作为转移接口，不仅具有捕获和传递的功能，而且还具有拦截的功能，使分析物从共洗脱混合物中分离出来。与其他液相色谱系统相比，该系统具有样品前处理简单，色谱柱平衡时间短（通常 10 min 平衡完毕），测定完成后色谱柱无需清洗以及流动相可以长期放置（商业化试剂已事先灭菌和密封）等诸多优点。这些技术大大节省了治疗药物监测工作中的仪器准备和维护时间，增加了血药浓度检测的时效性。此外，本试验中采用特异性的 ACP-1 去蛋白沉淀剂，可有效去除杂质成分，加入的保护剂不仅可稳定药物，还可对色谱柱起到保护作用。

总之，本文所建立的方法操作简单、稳定性和重复性好，能满足临床报告及时性、准确性等要求，有助于医师根据患者的 MTX 血药浓度预先判断不良反应并及时对治疗进行调整，保证患者用药安全有效，提高个体化用药水平。

参考文献

[1] Ouyang Z，Huang J，Ren Y，et al. Studies on the intracellular accumulation process of methotrexate and its correlation with the key protein using an LC-MS/MS method：a novel way to realize prospective individualized medication [J]. Anal Bioanal Chem，2021，413（7）：1799-1807.

[2] Kataoka T，Sakurashita H，Kajikawa K，et al. Low serum albumin level is a risk factor for delayed methotrexate elimination in high-dose methotrexate treatment [J]. Ann Pharmacother，2021，55（10）：1195-1202.

[3] Alsdorf WH，Karagiannis P，Langebrake C，et al. Standardized supportive care documentation improves safety of high-dose methotrexate treatment [J]. Oncologist，2021，

26（2）：e327-e332.
[4] Schofield RC，Ramanathan LV，Murata K，et al. Development and validation of a turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry method for the quantitation of methotrexate and its metabolites 7-hydroxy methotrexate and DAMPA in serum [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2015，1002：169-175.
[5] Mei S，Li X，Jiang X，et al. Population pharmacokinetics of high-dose methotrexate in patients with primary central nervous system lymphoma [J]. J Pharm Sci，2018，107（5）：1454-1460.
[6] Drake JC，Allegra CJ，Chabner BA. A re-evaluation of the competitive protein binding assay for methotrexate binding to dihydrofolatereductase [J]. Biochem Pharmacol，1986，35（7）：1212-1214.
[7] Bore P，Rahmani R，Cano JP，et al. Radioimmunoassays of 7-hydroxymethotrexate and methotrexate [J]. Clin Chim Acta，1984，141（2-3）：135-149.
[8] Fleisher M. Antifolate analogs：mechanism of action，analytical methodology，and clinical efficacy [J]. Ther Drug Monit，1993，15（6）：521-526.
[9] Buice RG，Evans WE，Karas J，et al. Evaluation of enzyme immunoassay，radioassay，and radioimmunoassay of serum methotrexate，as compared with liquid chromatography [J]. Clin Chem，1980，26（13）：1902-1904.
[10] Estève MA，Devictor-Pierre B，Galy G，et al. Severe acute toxicity associated with high-dose methotrexate（MTX）therapy：use of therapeutic drug monitoring and test-dose to guide carboxypeptidase G2 rescue and MTX continuation [J]. Eur J Clin Pharmacol，2007，63（1）：39-42.
[11] Karami F，Ranjbar S，Ghasemi Y，et al. Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical，biological and environmental samples [J]. J Pharm Anal，2019，9（6）：373-391.
[12] Cohen IJ. Defining the appropriate dosage of folinic acid after high-dose methotrexate for childhood acute lymphatic leukemia that will prevent neurotoxicity without rescuing malignant cells in the central nervous system [J]. J Pediatr Hematol Oncol，2004，26（3）：156-163.
[13] Howard SC，McCormick J，Pui CH，et al. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate [J]. Oncologist，2016，21（12）：1471-1482.
[14] Relling MV，Fairclough D，Ayers D，et al. Patient characteristics associated with high-risk methotrexate concentrations and toxicity [J]. J Clin Oncol，1994，12（8）：1667-1672.
[15] Ramsey LB，Balis FM，O’Brien MM，et al. Consensus guideline for use of glucarpidase in patients with high-dose methotrexate induced acute kidney injury and delayed methotrexate clearance [J]. Oncologist，2018，23（1）：52-61.
[16] Nowak TJ，Lorge AH，Rein LE，et al. Implementation and evaluation of high-dose methotrexate administration guidelines [J]. J Oncol Pharm Pract，2019，25（7）：1675-1681.
[17] Venkatramani CJ，Patel A. Towards a comprehensive 2-D-LC-MS separation [J]. J Sep Sci，2006，29（4）：510-518.
[18] Iguiniz M，Heinisch S. Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects，trends and applications [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，145：482-503.
[19] Mani-Varnosfaderani A，Ghaemmaghami M. Assessment of the orthogonality in two-dimensional separation systems using criteria defined by the maximal information coefficient [J]. J Chromatogr A，2015，1415：108-114.

（收稿日期：2021-08-23；修回日期：2021-10-26）

声明

近一段时间通过搜索引擎搜索《中南药学》，出现了很多假冒网站，骗取读者文章或者钱财，我刊声明，《中南药学》杂志的官方网站为：http://znyx.cbpt.cnki.net/，作者可以直接输入我刊网址或者从中国知网首页“作者投稿服务”搜索《中南药学》杂志进行注册投稿。其他网址均为仿冒，我刊也未与任何投稿服务网站合作，请作者不要将自己的文章交给他人或者通过其他中间网站投向我刊，由此造成的损失，作者自己承担后果。特此声明！

《中南药学》编辑部

综述

天然黄酮类化合物改善酒精性肝病作用及机制的研究进展

沈佳妍，徐婧淇，刘淼，王丹，陈倩，王涛，刘梦扬*（天津中医药大学中医药研究院，天津 300190）

摘要：酒精性肝病（ALD）是由于长期或大量饮酒所致的肝脏疾病。初期通常表现为酒精性脂肪肝，如不加以有效治疗，可发展成酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化，严重的可发展为肝癌。近年研究发现，黄酮类化合物具有多种药理活性，在改善脂质代谢、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等方面作用显著，能够有效减轻酒精性肝损伤，有望开发为治疗 ALD 的新型药物。本文对近年来天然黄酮类化合物对 ALD 的治疗作用及相关机制研究进展进行综述，为基于黄酮类化合物治疗 ALD 相关创新药物的研究与开发提供参考和依据。

关键词：酒精性肝病；天然黄酮类化合物；保护机制

中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0371-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.024

Research progress in the effect of natural flavonoids on improving alcoholic liver disease and related mechanism

SHEN Jia-yan, XU Jing-qi, LIU Miao, WANG Dan, CHEN Qian, WANG Tao, LIU Meng-yang*
(*Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300190)

Abstract: Alcoholic liver disease (ALD) is a liver disease caused by long-term or heavy drinking. In the early stage, ALD is usually revealed as alcoholic fatty liver disease. If not treated effectively, it can eventually progress to alcoholic hepatitis, fibrosis, and cirrhosis, or hepatocellular carcinoma. Recent studies found that flavonoids showed many pharmacological activities with significant effect on improving the lipid metabolism, anti-inflammation, anti-oxidation, and anti-tumor. Flavonoids can effectively alleviate the alcoholic liver injury, and are expected to be the new therapeutic agents in ALD treatment. We reviewed the recent research progress in natural flavonoids for ALD and their mechanism to provide reference for the research and development of flavonoids-based innovative drugs for ALD.

Key words: alcoholic liver disease; natural flavonoid; protection mechanism

酒精性肝病（alcoholic liver disease，ALD）是长期过量饮酒引起的一种常见的肝脏疾病，通常由早期酒精性脂肪肝发展为酒精性脂肪性肝炎，进而引发肝纤维化和肝硬化，最终可能导致肝癌的发生。随着经济的发展和生活方式的改变，全球酒精消耗量逐年递增，与之相关 ALD 的发病率也在逐年攀升。仅 2016 年，全球就有 60.7 万人死于酒精引起的肝硬化，因此，对 ALD 的防治已成为目前肝病研究的重点[1]。

研究表明，肝脏脂肪变性、氧化应激、乙醛介导的肝毒性以及炎症反应等多种因素都参与了 ALD 的病理过程，然而 ALD 的确切发病机制仍不完全清楚。临床诊断上，常通过超声、瞬时弹性成像、磁共振、血清生物标志物测定和肝脏活

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82004062）。

作者简介：沈佳妍，女，硕士研究生，主要从事中药脂质代谢调控研究，email：3061585661@qq.com *通信作者：刘梦扬，男，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药脂质代谢调控研究，email：liumengyang0212@tjutcm.edu.cn

检组织学等手段来评估肝脏炎性损伤和纤维化程度[2]。目前戒酒和药物联合治疗是 ALD 的主要干预方法。但对于酒精性肝炎和纤维化的治疗，除了运用糖皮质激素、美他多辛等药物缓解短期症状外，仍然缺乏有效的、可长期使用的治疗药物。近年来，美国食品药品监督管理局批准的新药逐渐减少，但其中天然药物所占比例却稳步上升，超过 60% 的上市药物与天然药物有很大的相关性[3]。因此，提取自天然药物的各种化合物可能是未来 ALD 相关药物开发的重要来源。

黄酮类化合物是指由两个苯环（A 环、B 环）通过三碳链相互连接而成的一类成分，大多具有 6C-3C-6C 的基本骨架。根据 B 环连接位置、C 环氧化程度、C 环是否成环等特点将黄酮类化合物分为黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类、异黄酮类等。黄酮类化合物广泛存在于自然界植物中，特别在芸香科、唇形科、姜科、玄参科、豆科等植物中含量丰富。研究表明，黄酮类化合物药理学活性广泛且毒性相对较低，能够通过调节脂质代谢、抗氧化、抗炎、减少铁沉积、调控肿瘤细胞增殖、抗凋亡、促进自噬等多种途径减轻酒精对肝脏的损伤[4]。因此，本文对近年来天然黄酮类化合物治疗 ALD 的研究进展进行系统性总结，对基于黄酮类化合物相关创新药物的研究和开发具有重要意义。

1 ALD 发病机制

1.1 乙醇代谢及氧化应激

人体摄入酒精后，酒精的主要成分乙醇会透过胃肠黏膜进入血液，而肝脏和大脑流入的血量最多，因此受到的影响最大。在肝脏中，大多数的乙醇在乙醇代谢关键酶——乙醇脱氢酶（ADH）的作用下被代谢为乙醛，乙醛又被乙醛脱氢酶（ALDH）代谢为乙酸。乙醇和乙醛对肝脏的毒性作用是导致 ALD 发生的重要因素。过量的乙醛能够与微管蛋白结合，损害微管系统，导致细胞内正常分泌的蛋白质滞留胞内，造成脂肪排泄障碍，引起肝细胞的肿胀。同时，乙醛还能直接与蛋白质、脂质以及 DNA 结合形成共价化合物，进而影响细胞稳态，改变蛋白质结构，并导致 DNA 损伤或突变。此外，乙醛还可以刺激肝星状细胞（HSC）中转化生长因子（TGF-β）信号转导，推动 ALD 的发展进程。乙醛也能够直接引发肝脏炎症和细胞外基质（ECM）代谢失衡，导致其纤维化。

另一个参与乙醇代谢的关键酶是细胞色素氧化酶 P450（CYP2E1），主要存在于肝细胞的滑面内质网中，在肝细胞的线粒体内也有表达。乙醇在 CYP2E1 的氧化作用下，产生过量的超氧离子、过氧化氢、羟基自由基等活性氧（ROS），当这些代谢产物不断积累超过超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）等抗氧化酶的分解代谢能力时，会导致肝脏的氧化损伤[5]。同时，ROS 对线粒体膜磷脂中的多不饱和脂肪酸产生毒性，导致线粒体功能障碍，诱发 TNF 受体超家族成员 6（Fas）介导的细胞凋亡。此外，ROS 还通过诱导线粒体通透性转换孔的开启来促进 BCL2 相关 X 蛋白（Bax）从细胞质向线粒体内的转位，导致线粒体通透性增加并释放细胞色素 C，引发肝细胞凋亡[6]。受体相互作用蛋白激酶 3（RIP3）介导的坏死也在 ALD 中发挥重要作用。Roychowdhury 等[7]研究发现，小鼠喂食酒精后可以明显上调肝脏 RIP3 的表达水平，而 RIP3 缺失则能显著减轻酒精喂食引发的肝细胞坏死。核因子 E2 相关因子 2（NRF2）是肝脏中抗氧化应激表达过程的重要转录因子，同时也是维持细胞内氧化还原稳态的中枢调节者，在减轻乙醛毒性反应和氧化应激过程中发挥重要的作用。Sun 等[8]研究发现，与野生型小鼠相比，NRF2 敲除小鼠在酗酒后的病死率及肝脏损伤明显增加，ALDH 活性显著降低。此外，酒精的过度摄入会抑制 NRF2 蛋白的表达及活化，从而影响其下游血红素加氧酶 1（HO-1）、NAD（P）H: 醌氧化还原酶 1（NQO1）等抗氧化蛋白的组成型和诱导型表达水平，加重肝脏的氧化损伤。

1.2 脂质代谢

尽管酒精及其代谢物乙醛不会直接促进脂肪酸合成，但乙醛代谢物乙酸酯能够转化为乙酰辅酶 A，而乙酰辅酶 A 可作为脂质合成的前体物质直接参与脂肪酸合成。因此，酒精过度摄入初期引起的常见肝脏反应多表现为过量的脂肪堆积。且长时间酒精过量摄入对三酰甘油的产生、脂肪酸摄取和氧化、三酰甘油输出、肝细胞脂质储存等方面都会产生持续影响，进而影响细胞脂质稳态，导致细胞代谢异常，引发肝细胞氧化应激和炎症，加速肝脏损伤的发展进程。

过量摄入酒精后，多种机制都能够影响肝脏的脂肪生成，从而引发肝脏过度脂质蓄积。急性和慢性酗酒均可导致小鼠肝脏固醇调节元件结合蛋白 1c（SREBP-1c）蛋白表达上调，进而影响乙

酰辅酶 A 羧化酶（ACC）、脂肪酸合成酶（Fasn）和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）等脂肪酸合成相关基因的表达，导致脂肪酸的合成增加。此外，机体过度摄入酒精会抑制沉默信息调节因子 2 相关酶 1（Sirt1）和腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）的表达，使 AMPK 对 ACCSer79 位点的磷酸化降低，导致 ACC 活性增强，脂肪酸合成增加 [9-10]。同时酒精还能通过直接抑制 AMPK 活性，降低其对 SREBP-1c 的磷酸化水平而促进 SREBP-1c 激活，进而诱导肝细胞胞浆中脂素 1（Lipin-1）蛋白表达上调，并增强 Lipin-1 的磷脂酸磷酸酶（PAP）活性，促进肝脏中三酰甘油合成，导致脂肪酸的酯化比例升高，进一步加重肝脏的脂质蓄积 [11]。除了促进脂质的合成外，过量的酒精还会影响脂肪酸的动员和清除。酒精的摄入提高了还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）和氧化型 NAD 的比例（$NADH/NAD^+$），抑制了脂肪酸 β 氧化，加剧肝脏脂肪变性。另一方面，酒精的过度摄入还会引发过氧化物酶体增殖物激活受体 α（PPARα）失活，导致线粒体功能障碍，导致能量动员不足。最近研究发现，慢性酒精摄入还会显著抑制肝细胞的脂噬作用，从而减少胞内脂噬介导的脂质清除 [12]。

1.3 炎症反应

研究发现，机体中促炎因子过度释放所致的免疫反应失衡与 ALD 的发生和发展也存在密切的关系。酗酒会造成以巨噬细胞和中性粒细胞浸润为特征的肝脏炎症。慢性酒精暴露会引起肠道通透性增大，使循环系统中肠道来源的脂多糖（LPS）增多。有研究发现肝损伤的严重程度与血清 LPS 水平存在正相关。高水平的 LPS 由门静脉循环进入肝脏，通过 LPS 结合蛋白（LBP）与肝脏 Kupffer 细胞表面的 CD14 结合，激活 Toll 样受体 4（TLR4）信号通路，继而激活核转录因子 κB（NF-κB），诱导 Kupffer 细胞分泌肿瘤坏死因子（TNF-α）、白细胞介素 6（IL-6）、白细胞介素 8（IL-8）、白细胞介素 17（IL-17）等炎症因子，导致 ALD 的发生。动物肝炎模型和人类肝炎患者的肝脏活检样品中，TNF-α 和 IL-6 的表达水平显著增加。因此对于部分 ALD 患者，TNF-α 和 IL-6 的表达水平可以间接反映 ALD 的严重程度 [13]。炎症因子的大量释放一方面通过炎症反应加剧肝细胞的损伤和坏死，另一方面通过再次影响肠道通透性进而加剧肝脏的炎性损伤。研究表明酒精喂食引发的炎性介质的释放会激活细胞凋亡的外部途径，诱导肝细胞凋亡。其中 Fas/Fas 配体以及 TNF 受体 1（TNF-R1）/TNF-α 系统发挥了主要作用。在 ALD 患者肝脏细胞中均能够检测到显著上调的 Fas 受体和 TNF-R1[14]。Iimuro 等 [15] 研究发现，TNF-α 抗体治疗能够减轻肝脏炎症和坏死，明显改善 ALD 大鼠的肝损伤。Yin 等 [14] 研究发现，与野生型小鼠比，TNF-R1 敲除能够明显改善过度摄入酒精造成的肝损伤，进一步证实了 TNF-α 通过 TNF-R1 途径在早期酒精性肝损伤的发生中发挥重要作用。最近研究发现，含 NLR 家族 PYRIN 域蛋白 3（NLRP3）炎症小体在 ALD 中也发挥着重要作用。Cui 等 [16] 研究结果表明，在乙醇处理后的小鼠巨噬细胞中，NLRP3、白细胞介素 1β（IL-1β）和切割活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1（Caspase-1）表达水平明显上调，导致肝脏中性粒细胞浸润和炎症反应的发生。Wree 等 [17] 研究表明，NLRP3 过度激活会导致小鼠发生严重的肝脏炎症，诱导肝细胞焦亡的发生。此外，酒精还能通过叉形头转录因子 O1（FoxO1）降低 ALD 小鼠肝细胞中 miR-148a 的表达，促进硫氧还蛋白互作蛋白（TXNIP）过表达和 NLRP3 炎性小体激活，从而诱导肝细胞焦亡 [18]。与此同时，NLRP3 炎性小体的激活还能够诱导 HSC 活化和胶原沉积的增加，诱导 ALD 相关肝纤维化的发生 [17]。此外，Kupffer 细胞产生的大量炎症因子和生长因子也能够促进 HSC 的激活，进而促进肝脏纤维化的发生。有证据表明，酒精摄入引发的免疫失衡还会破坏自然杀伤（NK）细胞的抗纤维化功能，进一步加速 ALD 的发展进程 [19]。

2 ALD 的治疗手段

在既往的 40 年中，ALD 的治疗手段仍然以戒酒、营养支持和糖皮质激素干预为主。当前，在营养支持和戒酒的基础上，通过药物治疗减轻 ALD 的损伤程度，改善已存在的继发性营养不良，对症治疗酒精性肝硬化及其并发症是治疗 ALD 的主要原则 [20]。由于 ALD 的发病机制复杂，目前仍然缺乏有效的针对性治疗药物。有研究表明，美他多辛能加速乙醇从血液中清除，一定程度上改善了酒精中毒症状。糖皮质激素则主要用于重症 ALD，且只对患者的短期生存率有一定的改善作用。已酮可可碱、*N*- 乙酰半胱氨酸（NAC）和粒细胞集落刺激因子（G-CSF）在实验中显示出对 ALD 的改善作用，但其可靠性仍需要大量实验证明 [20]。但当 ALD 患者肝功能受到严重损伤引发肝衰竭时，只能通过肝移植进行治疗，因此，亟需筛选并寻找有效的抗 ALD 新型药物。

3 黄酮类化合物对 ALD 的治疗作用及机制

3.1 黄酮类

3.1.1 黄芩苷 黄芩苷是从双子叶唇形科植物黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类化合物，是黄芩的主要活性成分。黄芩具有抗肿瘤、抗炎、抗菌等多种药理作用，能有效保护心血管、肝、肾相关脏器，被广泛应用于中药复方中。近年来，黄芩苷对肝脏的保护作用越来越受到人们的关注。有研究表明，黄芩苷对病毒性肝炎、脂肪肝、胆汁淤积性肝损伤和肝癌等都有很好的防治作用[21]。

研究发现，黄芩苷可以通过调控肝脏钙 / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ（CaMKKβ）/AMPK/ACC 通路，降低肝脏脂肪酸合成，减轻肝脏脂质蓄积[22]。Dai 等[23]运用定量化学蛋白质组学分析发现肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A（CPT-1A）为黄芩苷调控脂质代谢的新靶点，CPT-1A 可以直接与黄芩苷结合并被黄芩苷变构活化，从而减轻肝脏的脂肪变性。Wang 等[24]证实，黄芩苷可以有效减轻乙醇诱导的肝损伤，提高 ALD 大鼠的抗氧化能力。机制上，黄芩苷主要通过激活 NRF2，促进其下游抗氧化酶 NQO1 和 HO-1 的表达，从而增强 ALD 大鼠肝脏抗氧化能力，在慢性酒精性肝损伤小鼠模型中，也观察到同样的肝保护作用。He 等[25]给予小鼠黄芩苷 [200 mg/（kg • d）] 不仅能够增强 NRF2 核转移还能够下调 CYP2E1 以及 ROS 产生相关酶类 NADPH 氧化酶 2（NOX2）、NADPH 氧化酶亚基（P67PHOX）、黄嘌呤氧化酶（XOD）和一氧化氮合成酶（iNOS）的表达，减轻过量 ROS 对肝脏的损害。铁过载也会增加体内 ROS 生成，与酒精发挥协同效应，因此胞内铁水平也参与 ALD 的发展进程。Xu 等[26]用柠檬酸铁和酒精联合刺激 HepG2 细胞，发现细胞的凋亡和蛋白氧化的程度明显加重，而黄芩苷预处理则能够显著抑制酒精与铁结合引起的氧化应激及细胞凋亡。有研究表明，音猬因子（SHH）信号与细胞炎症和氧化应激密切相关，尽管酒精的过度摄入会应激性激活 SHH 通路，但是黄芩苷处理能够显著增加 SHH 及其下游受体蛋白 Patched1（Ptc-1）、Smoothened（Smo）和核内转录因子胶质瘤相关癌基因 1（GLI-1）蛋白的表达，进一步促进 SHH 通路的动员激活，减轻酒精所致 L02 细胞损伤和死亡[27]。Kim 等[28]研究发现，黄芩苷可以有效改善酒精性脂肪肝大鼠的血清谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）水平异常升高，减少炎性细胞浸润，降低肝脏炎症反应，其作用机制可能是黄芩苷通过抑制 TLR4 和髓样分化因子 88（MYD88）的表达，并减少 NF-κB 的核转移来发挥抗炎作用。

3.1.2 汉黄芩素 汉黄芩素是从黄芩中提取的一种黄酮化合物，具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、神经保护等药理活性。大量的体外和体内实验证明，汉黄芩素具有良好的肝脏保护作用。近期研究发现，汉黄芩素能够通过促进体内、外肝细胞中 PPARα 和脂联素受体 2（AdipoR2）的表达，减轻脂肪积累造成的肝细胞毒性[29]。在 ALD 小鼠模型中，Li 等[30]发现汉黄芩素可以通过激活 PPARγ，显著抑制 NF-κB 的磷酸化和核转移活性，减轻酒精引发的肝脏炎症。此外，Du 等[31]研究证明汉黄芩素能够增强 Caspase-9、Caspase-3 的活化，提高 Bax/B 淋巴细胞瘤 2（Bcl-2）的比值，从而抑制 HSC 的活化，减轻肝脏纤维化。Khan 等[32]发现汉黄芩素还能够通过激活 ROS/ERK/NRF2 信号通路发挥较强的抗炎抗氧化作用。研究发现，汉黄芩素通过激活 AKT/GSK-3β 信号通路可以有效减少乙醇诱导的氧化应激引起的肝细胞死亡，在 ALD 中发挥治疗作用[33]。Hong 等[34]研究证明，汉黄芩素通过靶向糖原合成酶激酶 3β（GSK-3β），能够有效诱导肝癌细胞周期阻滞，抑制肿瘤增殖，调控细胞代谢。因此，汉黄芩素可能对酒精性肝硬化、肝癌均有潜在的治疗作用。

3.1.3 木蝴蝶素 木蝴蝶素也是提取自黄芩的一种黄酮类成分，对于肝脏损伤也能够发挥独特的保护作用。研究表明，给予 ALD 小鼠木蝴蝶素 [40 mg/（kg • d）] 处理可以明显减轻慢性酒精喂食导致的小鼠肝脏脂肪蓄积、肝细胞肿胀以及炎性细胞浸润等病理改变。进一步研究发现，木蝴蝶素能够激活 PGC-1α/Mfn2 信号通路，减少酒精诱导引起的线粒体 ROS 积累，减轻肝脏氧化损伤。同时，木蝴蝶素通过抑制 NLRP3 炎症小体通路中 Caspase-1 的活化，减轻肝细胞焦亡[35]。除此之外，木蝴蝶素还能通过下调 *SREBP-1c*、*Fasn*、*Scd1* 等脂质生成相关基因的表达，上调 *Ppara*、*Cpt-1a* 等脂肪酸氧化相关基因的表达，减轻酒精诱导的 L02 细胞脂质蓄积[36]。Jin 等[37]研究发现，木蝴蝶素还可以通过调控 Yes 相关蛋白（YAP）通路，减少 L02 细胞 P16、P21 和 Hmga1 等衰老标志物的表达，减轻酒精造成的肝脏细胞衰老。而 Zhang 等[38]发现木蝴蝶素也可以通

过抑制 YAP/HIF-1α 信号，减少肝窦状内皮细胞（LSEC）的血管生成，减轻小鼠肝纤维化。酒精代谢异常会造成机体发生氧化应激，而氧化应激与肝脏的纤维化密切相关。在肝纤维化小鼠模型中，木蝴蝶素能够通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导自噬的激活，从而抑制活化的 HSC 分泌促炎细胞因子，减轻肝脏炎症及纤维化 [39-40]。此外，Wei 等 [41] 研究发现，木蝴蝶素可以通过激活 PKM1/HNF4α，减少肝癌细胞的增殖，提示其在治疗 ALD 相关肝癌中也具有一定的作用。

3.1.4 牡荆素 牡荆素是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性。研究证明，牡荆素可以明显改善酒精性肝损伤小鼠血清 AST、ALT、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、总胆红素（TBIL）的异常升高及肝脏病理形态改变，使 ALD 小鼠转氨酶、血脂、尿酸等指标趋向正常发展 [42]。在体外实验中，牡荆素能恢复 L02 肝细胞的细胞活力，抑制酒精引起的 AST 升高。Yuan 等 [42] 研究发现，与正常细胞相比，酒精刺激后的 L02 细胞 P53 总蛋白和乙酰化 P53 表达均明显上调，同时 *Sirt1* 和 *Bcl-2* 的基因表达明显受到抑制，而牡荆素能够显著逆转酒精导致的肝脏损伤，表明牡荆素可能通过 Sirt1/P53 介导的线粒体凋亡途径对乙醇诱导的 L02 细胞损伤发挥保护作用。此外，牡荆素处理还能够显著降低 ALD 小鼠肝脏 MDA 含量和 TNF-α 的蛋白表达水平，并增加 SOD 的活性，抑制 ALD 小鼠肝脏氧化应激和炎症，减轻肝损伤。

3.1.5 芹菜素 芹菜素，又称芹黄素、洋芹素，是广泛存在于温热带蔬菜中的一种黄酮类化合物，尤以芹菜中含量为高。芹菜素具有心脑血管保护、抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性。在 56% 酒精灌胃诱导的 ALD 小鼠中，Wang 等 [43] 研究发现芹菜素能够通过增加肝脏谷胱甘肽（GSH）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和谷胱甘肽还原酶（GR）的活力，降低 MDA 含量和 CYP2E1 的蛋白表达，增强机体抗氧化能力，减轻酒精暴饮导致的肝脏氧化损伤。同时芹菜素能够抑制 TNF-α 的表达，减轻肝脏炎症。此外，芹菜素可以调控脂质代谢相关蛋白 PPARα、SREBP-1c、Fasn 表达，减少小鼠肝脏脂质过度蓄积，调控肝脏脂质代谢 [43]。Li 等 [44] 研究发现，芹菜素还能通过 P38-P21 信号通路抑制肝癌细胞的生长。综上所述，芹菜素可减轻 ALD 的肝脏炎症反应、氧化应激和脂质积聚，有效减缓 ALD 的发展进程。

3.2 黄酮醇类槲皮素

槲皮素是一种天然的黄酮醇类化合物，其具有抗氧化、抗病毒、抗炎等多种生物活性。槲皮素可以降低乙醇所致的脂滴包被蛋白 2（PLIN2）的过度表达，刺激自噬溶酶体增多，恢复线粒体形态，从而增强脂质自噬，减轻小鼠酒精性脂肪肝 [45]。P2X7 受体（P2X7R）可以被细胞外 ATP 激活，在脂质代谢、炎症分子释放、氧化应激等方面发挥重要作用。Zhao 等 [46] 研究证明，通过阻断 P2X7R，抑制 NLRP3 炎性小体的生成，能够有效抑制酒精摄取导致的脂质过度积累、炎症反应和氧化应激。另一项研究发现，炎性细胞因子的产生可导致氧化应激，并进一步加重炎症反应和肝脏纤维化。而槲皮素则可以通过 P2X7R 介导 PI3K/Keap-1/NRF2 信号通路减轻酒精诱导的肝脏脂肪变性，抑制炎症因子的过度产生释放 [45]。此外，槲皮素还可以通过提高机体抗氧化酶的活性，抑制 MDA 及 ROS 的生成，上调 NRF2 及 HO-1 蛋白的表达水平，对酒精诱导的肝细胞氧化应激发挥保护作用 [47-48]。长期饮酒导致机体储存铁增多，发生铁过载，从而产生大量过氧化物质，损伤肝细胞，作为一种天然的螯合剂，槲皮素能够螯合机体中的铁，减少铁过载导致的氧化损伤。此外，槲皮素还能够通过 BMP6/SMAD4 信号通路增加铁的转运，减少溶酶体中铁的含量，进一步改善酒精性肝损伤 [49-51]。

3.3 二氢黄酮类——柑橘类黄酮

柑橘类黄酮包括柚皮素、橙皮素、陈皮素和橘皮素等 500 多种化合物，主要存在于柑橘属植物果实的外皮中。根据黄酮结构命名大致可分为黄酮苷类和多甲氧基黄酮等。它们在抗炎、抗氧化、调节脂质代谢和改善胰岛素敏感性方面都具有很好的作用 [52]。

提前给予小鼠含有川陈皮素和橘皮素的柑橘提取物能够有效预防酒精过度摄入导致的肝脏脂质代谢障碍和氧化应激，其作用机制主要是通过激活 AMPK 调控脂质代谢，并通过增加 NRF2 的表达，提高机体抗氧化能力，实现肝保护作用 [53]。此外，柚皮素还能减少细胞凋亡和 DNA 损伤，通过调控 *Cyp2y3*、*Cyp3a56*、*Hmgcra*、*Hmgcrb*、*Fasn*、*Fabp10*、*Fads2* 和 *Echs1* 等脂质代谢相关基因，能够明显改善酒精导致的肝脏脂肪蓄积及肝脏脂肪变性 [54]。多项研究证明，柚皮素可以提高 ALD 大鼠酒精代谢酶的活性，提高机体抗氧化能力，减轻酒精所致的脂质蓄积及肝

损伤。此外，柚皮素还能显著降低 ALD 大鼠血清的 AST、ALT 水平，降低 TNF-α、IL-6、NF-κB、环氧合酶 2（COX-2）、巨噬细胞炎性蛋白 2（MIP-2）、CD14 等炎症标志物的表达水平，减轻酒精喂食所致的大鼠肝脏炎症性损伤 [55-57]。此外，Meng 等 [58] 研究证明，由橙皮素结构修饰而成的橙皮素衍生物 4- 甲基香豆素 -[5，6-g]- 橙皮素（4-MCH）可以显著减少酒精刺激所致的小鼠原代巨噬细胞及 RAW264.7 细胞中 IL-6 和 TNF-α 的释放，抑制 NF-κB 的激活，上调 PPARγ 的蛋白表达，从而减轻酒精所致肝脏炎症反应。

3.4 二氢黄酮醇类

3.4.1 二氢杨梅素 二氢杨梅素又名双氢杨梅素、蛇葡萄素，为二氢黄酮醇类化合物，存在于葡萄科、杨梅科、杜鹃科、藤黄科、大戟科及柳科等植物中，其中在葡萄科的藤茶中含量最高。除具有黄酮类化合物的一般生物学功能外，二氢杨梅素还具有解除醇中毒、预防酒精肝、脂肪肝、抑制肝细胞恶化、降低肝癌的发病率等药理活性。研究发现，二氢杨梅素能够有效缓解乙醇中毒症状，减轻乙醇对肝脏的损伤，目前二氢杨梅素已经在美国作为防止酒精宿醉的营养补充剂使用 [59]。Shen 等 [60] 研究发现二氢杨梅素可以改善大鼠酒精暴露后产生的戒断迹象，包括乙醇耐受性、焦虑增加和癫痫易感性，为酒精使用障碍相关药物的研发提供了启发。Liu 等 [61] 给予人肝微粒体二氢杨梅素处理，体外检测八种人肝脏 CYP 亚 型（即 1A2、3A4、2A6、2E1、2D6、2C9、2C19 和 2C8）变化，结果发现二氢杨梅素能有效抑制 CYP3A4 和 CYP2E1 的活性，显示其对 ALD 治疗的潜在作用。事实上，二氢杨梅素对乙醇诱导的小鼠的肝脏脂肪变性、三酰甘油积累和肝脏炎症损伤均有治疗作用。对酒精喂养的 ALD 小鼠进行腹腔注射二氢杨梅素（5、10 $mg \cdot kg^{-1}$），能够显著提高乙醇代谢相关酶的表达，并降低小鼠血清中炎性细胞因子和趋化因子的水平 [62]。同时，二氢杨梅素能够通过激活 AMPK 通路，增强 CPT-1A 和 ACC 的表达，加速 ALD 小鼠的脂质代谢。体外实验中，二氢杨梅素也能够改善酒精诱导的 HepG2 细胞中炎症因子和趋化因子的表达异常，减轻细胞炎症 [62]。Qiu 等 [63] 研究发现，在酒精诱导的肝损伤小鼠中，二氢杨梅素能够显著降低慢性酒精暴露引起的 AST、ALT、血清碱性磷酸酶（ALP）水平异常升高，部分恢复肝脏细胞病理形态，并显著下调炎症细胞因子 IL-1β 和 IL-6 的表达水平，减轻肝脏炎症。在作用机制上，二氢杨梅素可恢复肝脏中 CYP2E1、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1（Keap-1）、NRF2 和 HO-1 的表达，改善 NF-κB 和 NRF2 的核定位异常，减轻酒精诱导的氧化应激所致的肝脏损伤。此外，二氢杨梅素也可以通过减少 TGF-β 的表达，抑制肝脏纤维化，并影响肝癌细胞增殖及迁移，诱导小鼠肝癌细胞凋亡，从而起到多重肝保护作用 [64]。

3.4.2 水飞蓟素 水飞蓟素是提取于水飞蓟植物的干燥果实及种子的一种天然的黄酮木脂素类化合物，其主要成分为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁和水飞蓟亭 [65]。水飞蓟素是一种自由基清除剂，能够调节与氧化应激、炎症反应和纤维化发生相关的酶，起到肝保护作用 [66]。Das 等 [67] 研究发现，水飞蓟素可以通过增强机体抗氧化酶含量，减轻酒精导致的机体氧化应激压力。Song 等 [68] 研究表明，水飞蓟素能够以剂量依赖的方式下调血清中 ALT 的含量，减轻肝细胞坏死和脂质沉积，从而减轻急性酒精摄入引起的肝损伤，进一步的研究发现，水飞蓟素主要是通过减少肝脏 TNF-α 的产生来发挥作用。此外，水飞蓟素对慢性酒精性脂肪肝也有改善作用，能够明显减轻酒精饲料喂食引起的肝脏脂质过度积聚和炎症，这些作用主要是通过下调 NF-κB、细胞间黏附分子 1（ICAM-1）、IL-6 等蛋白的表达实现的 [69]，其抗炎、抗氧化作用显著，耐受性好，不良事件发生率低，目前已经被广泛应用于酒精相关性肝病的治疗中。大量临床研究结果显示，水飞蓟素可以明显降低酒精肝患者的转氨酶水平，并增强肝脏抗氧化酶活性，减轻酒精性肝损伤。此外，在 ALD 合并肝硬化患者中，长期摄入水飞蓟素还能有效降低患者的病死率 [65]。

3.5 异黄酮类——葛根素

葛根素是从豆科植物葛及野葛的根中分离出的异黄酮类衍生物。Liu 等 [70] 研究发现，葛根素能够通过调控 AMPKα/ACC 信号通路，减轻酒精诱导的肝脏脂肪变性。此外，葛根素还能够明显改善乙醇所致的肝脏三酰甘油和胆固醇异常上升，调节脂质代谢相关基因（*Cyp2y3*、*Cyp3a65*、*Adh8a*、*Adh8b*、*Hmgcrb* 和 *Fasn*）、内质网应激和 DNA 损伤相关基因（*Chop*、*Edem1* 和 *Atf6*）的表达，并降低炎症因子（IL-1β、TNF-α）表达水平，从而减轻肝脏脂质蓄积及炎症。Tian 等 [71] 研究发现，葛根素还可以调节 COX-2 和花生四烯酸 -5- 脂氧合酶（ALOX5）途径，减轻乙醇所致

的大鼠慢性酒精性肝损伤。此外，葛根素也能够通过抑制聚 ADP 核糖聚合酶 1（PARP1）的表达来减轻小鼠肝纤维化程度[72]。

4 前景与展望

随着 ALD 发病率的逐年升高，由其引发的肝硬化和肝癌发生也明显增多。目前戒酒仍然是临床上 ALD 防治的主要手段，但即便是完全酒精戒断，仍有约 73% 的患者会最终发展为慢性肝炎及肝纤维化。因此开发新的 ALD 针对性药物显得越来越重要。越来越多的研究表明，黄酮类化合物具有突出的肝保护作用，可能为 ALD 相关治疗药物的研发提供新的思路和借鉴。其中二氢杨梅素能够明显减轻酒精中毒症状和使用依赖，有望开发为酒精使用障碍相关药物；芹菜素、槲皮素、葛根素等均有明显的减少脂质合成、增强促进脂质代谢的作用，能够减轻酒精引起的肝脏脂质蓄积；水飞蓟素、汉黄芩素、柑橘类黄酮等抗炎抗氧化作用显著，有望成为防治酒精性肝炎的待开发药物成分；而汉黄芩素、黄芩素、木蝴蝶素等对肝脏纤维化有明显改善作用，能够有效减缓 ALD 的纤维化发展进程。目前，黄酮类化合物防治 ALD 的临床研究还处于起步阶段，相关化合物影响 ALD 的具体机制、其临床应用的安全性和长期有效性还有待进一步研究。但鉴于其在防治 ALD 各个病程阶段的显著作用，对近年来天然黄酮类化合物抗 ALD 的基础研究进行系统性总结具有非常重要的意义。在此本文归纳综述了天然药物中的黄酮类化合物对 ALD 的改善作用及相关机制的研究进展（见表 1 及图 1），揭示黄酮类化合物在 ALD 治疗方面有开发潜力，为天然药物更高效地应用于临床提供新的思路，也为基于黄酮类化合物治疗 ALD 的新药研发和应用提供科学依据和参考。

表 1 天然药物中的黄酮类化合物对 ALD 的作用机制及分子靶点

Tab 1 Molecular targets of flavonoids from natural medicines on ALD and related mechanism

种类	名称	ALD 模型	给药剂量	药理活性	分子靶点和通路	文献
黄酮	黄芩苷	Wistar 大鼠	50 mg/（kg • d）灌胃 14 d	抗氧化	NRF2/HO-1/NQO1	[24]
		小鼠	200 mg/（kg • d）腹腔注射 11 d	抗氧化	NRF2，CYP2E1	[25]
		Wistar 大鼠	120 mg/（kg • d）灌胃 4 周	抗氧化，抗炎	SHH，Smo，Ptc-1，GLI-1	[27]
		L02 细胞	25/50 μmol • L^{-1} 处理 24 h			
		SD 大鼠	200 mg • kg^{-1} 腹腔注射 2 次	抗炎	TLR4	[28]
		HepG2 细胞	25/50 μmol • L^{-1} 处理 24 h	抗氧化，抗凋亡	iNOS	[26]
	汉黄芩素	C57BL/6J 小鼠	20 mg/（kg • d）灌胃 2 周	减少脂肪毒性	PPARα，AdipoR2	[29]
		NCTC 1469 细胞	25 μmol • L^{-1} 处理 12 h			
		C57BL/6 小鼠	25/50/100 mg/（kg • d）灌胃 16 d	抗炎	PPARγ，NF-κB	[30]
		RAW264.7 细胞	20 μg • mL^{-1} 处理 24 h			
		C57BL/6 小鼠	10/20/40 mg/（kg • d）腹腔注射 5 d	抗纤维化	Caspase-3，Caspase-9，Bax/Bcl-2	[31]
		HSC-T6 细胞，LX2 细胞	1.25 μg • mL^{-1} 处理 36 h			
		HepG2 细胞，MHCC97L 细胞	10/20 μmol • L^{-1} 处理 24 h	调控细胞增殖	GSK-3β	[34]
	木蝴蝶素	ICR 小鼠	40 mg/（kg • d）灌胃 4 周	抗炎、抗细胞焦亡	PGC-1α/Mfn2	[35]
		L02 细胞	20 μmol • L^{-1} 处理 24/48 h		NLRP3，Caspase-1	
		L02 细胞	20 μmol • L^{-1} 处理 24 h	减少脂质合成，增强脂质代谢	SREBP-1c，Fasn，SCD1，PPARα，CPT-1A，HIF-1a	[36]
		ICR 小鼠	40 mg/（kg • d）灌胃 4 周	抗纤维化	YAP/HIF-1α	[38]
		C57BL/6 小鼠	20/30/40 mg/（kg • d）腹腔注射 4 周	抗炎，激活自噬，抗纤维化	PI3K/AKT/mTOR	[39]
		原代肝星状细胞	40 μmol • L^{-1} 处理 24 h			[40]
		HepG2 细胞	6/8/10/15/20/25 μmol • L^{-1} 处理 72/96 h	调控细胞增殖	PKM1/HNF4α	[41]
	牡荆素	昆明小鼠	20/40/80 mg/（kg • d）灌胃 4 周	抗凋亡、抗氧化	Sirt1/P53	[42]
		L02 细胞	5/10/20 μmol • L^{-1} 处理 24 h			
	芹菜素	昆明小鼠	150/240/300 mg/（kg • d）灌胃 30 d	增强脂质代谢，抗氧化	PPARα，SREBP-1c，FASN	[43]
		HepG2 细胞	10/20 μmol • L^{-1}，处理 24 h	调控细胞增殖	P38-P21	[44]
黄酮醇	槲皮素	C57BL/6J 小鼠	100 mg/（kg • d）12 周灌胃	增强脂质自噬	LC3，P62，PLIN2，AMPK	[45]

续表 1

种类	名称	ALD 模型	给药剂量	药理活性	分子靶点和通路	文献
		斑马鱼	25/50/100 μmol • L^{-1} 处理 48 h	减轻脂肪变性	P2X7R，PI3K/Keap-1/NRF2	[46]
		SD 大鼠原代肝细胞	25/50/100/150/200 μmol • L^{-1} 处理 2 h	抗氧化	NRF2/HO-1	[47] [48]
		C57BL/6 小鼠	100 mg/（kg • d）灌胃 15 周	减少铁沉积	BMP6/SMAD4	[49-51]
二氢黄酮	陈皮素 橘皮素	C57BL/6 小鼠	50/100/200 mg/（kg • 12 h）灌胃 3 次	抗氧化，增强脂质代谢	AMPK，NRF2	[53]
	柚皮素	斑马鱼	2.5/5/10 mg • L^{-1} 处理 48 h	增强脂质代谢，减轻内质网应激，抗凋亡	Cyp2y3，Cyp3a65，Hmgcra，Hmgcrb，Fabp10，Fads2，Echs1，Fasn，Chop，Edem1	[54]
		Wistar 大鼠	50 mg/（kg • d）灌胃 14 d	抗炎	TNF-α，IL-6，NF-κB，COX-2，MIP-2，CD14	[55]
二氢黄酮醇	水飞蓟素	C57BL/6 小鼠	200 mg/（kg • 12 h）灌胃 3 次	抗炎	TNF-α	[68]
		BALB/c 小鼠	200 mg/（kg • d）灌胃 12 周	抗氧化，抗炎	IL-10，TNF-α，IFN-γ，VEGF-A，TGF-β，IL-14	[67]
		SD 大鼠	100/150/200 mg/（kg • d）灌胃 6 周	抗氧化，抗炎	NF-κB，ICAM-1，IL-6	[69]
	二氢杨梅素	C57BL/6J 小鼠	5/10 mg/（kg•d）腹腔注射6周（每周5次）	增强脂质代谢，减轻乙醇毒性	AMPK，ACC，CPT-1A	[62]
		HepG2 细胞，VL-17 细胞	2.5/5 μmol • L^{-1} 处理 24 h			
		C57BL/6 小鼠	75/100 mg/（kg • d）加入饮食给药 6 周	增强自噬，抗氧化	P62，Keap-1，HO-1，CYP2E1	[63]
		小鼠 Hepal-6 细胞	10/50/100 μmol • L^{-1} 处理 48 h	调控细胞增殖和迁移	TGF-β	[64]
异黄酮	葛根素	斑马鱼	12.5/25/50 μmol • L^{-1} 处理 48 h	增强脂质代谢，减轻内质网应激，抗炎	Cyp2y3，Cyp3a65，Adh8a，Adh8b，Hmgcrb，Fasn，Chop，Edem1，ATF6，IL-1β，TNF-α	[70]
		SD 大鼠	1 g/（kg • d）灌胃 2 周	抗氧化，增强脂质代谢	ALOX-5，COX-2	[71]

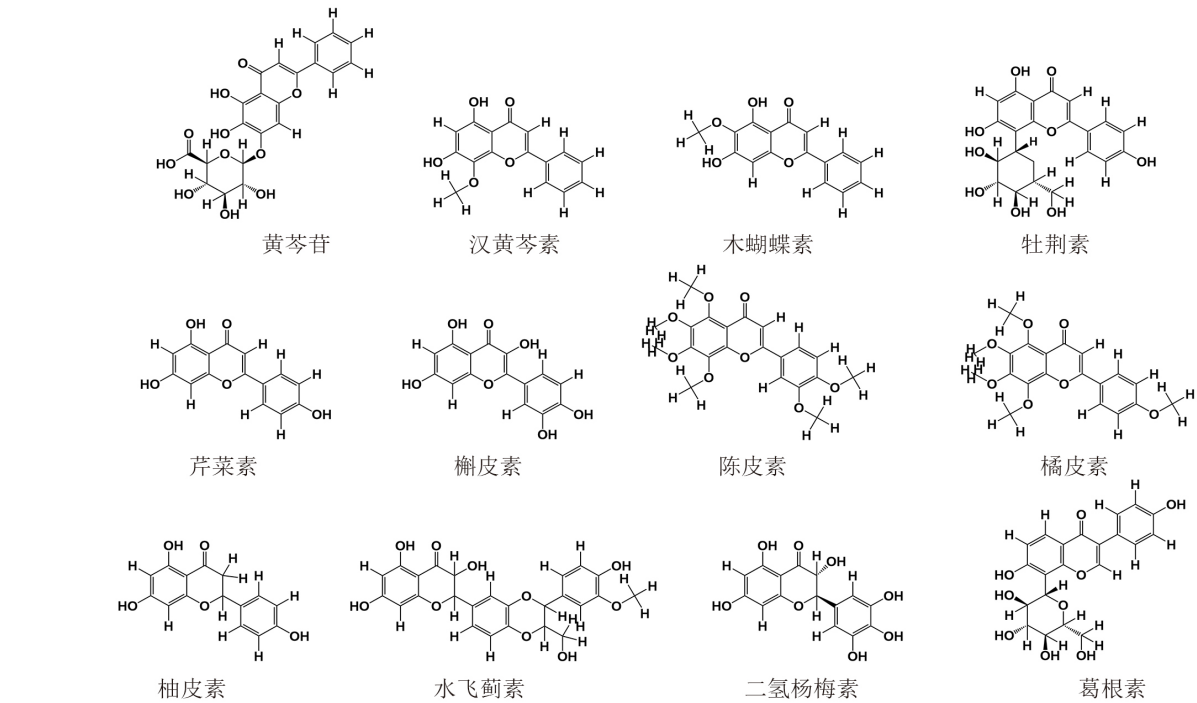


图 1 黄酮类化合物的结构

Fig 1 Structure of flavonoids

参考文献

[1] Wang SC，Chen YC，Chen SJ，et al. Alcohol addiction，gut microbiota，and alcoholism treatment：a review [J]. Int J Mol Sci，2020，21（17）：6413.

[2] Torruellas C，French SW，Medici V. Diagnosis of alcoholic liver disease [J]. World J Gastroenterol，2014，20（33）：11684-11699.

[3] Singal AK，Shah VH. Therapeutic strategies for the treatment of alcoholic hepatitis [J]. Semin Liver Dis，2016，36（1）：56-68.

[4] He Y，Xia Z，Yu D，et al. Hepatoprotective effects and structure-activity relationship of five flavonoids against lipopolysaccharide/D-galactosamine induced acute liver failure in mice [J]. Int Immunopharmacol，2019，68：171-178.

[5] Ceni E，Mello T，Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease：role of oxidative metabolism [J]. World J Gastroenterol，2014，20（47）：17756-17772.

[6] Wang S，Pacher P，De Lisle RC，et al. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury [J]. Alcohol Clin Exp Res，2016，40（6）：1215-1223.

[7] Roychowdhury S，Mchullen MR，Pisano SG，et al. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury [J]. Hepatology，2013，57（5）：1773-1783.

[8] Sun J，Fu J，Li L，et al. Nrf2 in alcoholic liver disease [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2018，357：62-69.

[9] Na AY，Yang EJ，Jeon JM，et al. Protective effect of isoliquiritigenin against ethanol-induced hepatic steatosis by regulating the SIRT1-AMPK pathway [J]. Toxicol Res，2018，34（1）：23-29.

[10] Nagappan A，Kim JH，Jung DY，et al. Cryptotanshinone from the salvia miltiorrhiza bunge attenuates ethanol-induced liver injury by activation of AMPK/SIRT1 and Nrf2 signaling pathways [J]. Int J Mol Sci，2019，21（1）：265.

[11] You M，Arteel GE. Effect of ethanol on lipid metabolism [J]. J Hepatol，2019，70（2）：237-248.

[12] Williams JA，Ding WX. Role of autophagy in alcohol and drug-induced liver injury [J]. Food Chem Toxicol，2020，136：111075.

[13] Mathews S，Feng D，Maricic I，et al. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration [J]. Cell Mol Immunol，2016，13（2）：206-216.

[14] Yin M，Wheeler MD，Kono H，et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice [J]. Gastroenterology，1999，117（4）：942-952.

[15] Iimuro Y，Gallucci RM，Luster MI，et al. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat [J]. Hepatology，1997，26（6）：1530-1537.

[16] Cui K，Yan G，Xu C，et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1beta in mice [J]. J Hepatol，2015，62（6）：1311-1318.

[17] Wree A，Eguchi A，Mcgeough MD，et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis，liver inflammation，and fibrosis in mice [J]. Hepatology，2014，59（3）：898-910.

[18] Heo MJ，Kim TH，You JS，et al. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1，facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression [J]. Gut，2019，68（4）：708-720.

[19] Seki E，Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis：functional links and key pathways [J]. Hepatology，2015，61（3）：1066-1079.

[20] Singh S，Osna NA，Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease：a review [J]. World J Gastroenterol，2017，23（36）：6549-6570.

[21] Yang JY，Li M，Zhang CL，et al. Pharmacological properties of baicalin on liver diseases：a narrative review [J]. Pharmacol Rep，2021，73（5）：1230-1239.

[22] Xi Y，Wu M，Li H，et al. Baicalin attenuates high fat diet-induced obesity and liver dysfunction：dose-response and potential role of CaMKKbeta/AMPK/ACC pathway [J]. Cell Physiol Biochem，2015，35（6）：2349-2359.

[23] Dai J，Liang K，Zhao S，et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（26）：E5896-E5905.

[24] Wang X，Chang X，Zhan H，et al. Curcumin and baicalin ameliorate ethanol-induced liver oxidative damage via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Food Biochem，2020，44（10）：1-12.

[25] He P，Wu Y，Shun J，et al. Baicalin ameliorates liver injury induced by chronic plus binge ethanol feeding by modulating oxidative stress and inflammation via CYP2E1 and NRF2 in mice [J]. Oxid Med Cell Longev，2017，2017：4820414.v

[26] Xu Y，Feng Y，Li H，et al. Ferric citrate CYP2E1-independently promotes alcohol-induced apoptosis in HepG2 cells via oxidative/nitrative stress which is attenuated by pretreatment with baicalin [J]. Food Chem Toxicol，2012，50（9）：3264-3272.

[27] Wang H，Zhang Y，Bai R，et al. Baicalin attenuates alcoholic liver injury through modulation of hepatic oxidative stress，inflammation and sonic hedgehog path-

way in rats [J]. Cell Physiol Biochem，2016，39（3）：1129-1140.

[28] Kim SJ，Lee SM. Effect of baicalin on toll-like receptor 4-mediated ischemia/reperfusion inflammatory responses in alcoholic fatty liver condition [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2012，258（1）：43-50.

[29] Chen J，Liu J，Wang Y，et al. Wogonin mitigates nonalcoholic fatty liver disease via enhancing PPARalpha/AdipoR2，in vivo and in vitro [J]. Biomed Pharmacother，2017，91：621-631.

[30] Li HD，Chen X，Yang Y，et al. Wogonin attenuates inflammation by activating PPAR-gamma in alcoholic liver disease [J]. Int Immunopharmacol，2017，50：95-106.

[31] Du XS，Li HD，Yang XJ，et al. Wogonin attenuates liver fibrosis via regulating hepatic stellate cell activation and apoptosis [J]. Int Immunopharmacol，2019，75：105671.

[32] Khan NM，Haseeb A，Ansari MY，et al. Wogonin，a plant derived small molecule，exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes [J]. Free Radic Biol Med，2017，106：288-301.

[33] Seo EJ，Kim S，Yoo K，et al. Substance P blocks ethanol-induced hepatotoxicity [J]. Life Sci，2018，203：268-275.

[34] Hong M，Almutairi MM，Li S，et al. Wogonin inhibits cell cycle progression by activating the glycogen synthase kinase-3 beta in hepatocellular carcinoma [J]. Phytomedicine，2020，68：153174.

[35] Kai J，Yang X，Wang Z，et al. Oroxylin a promotes PGC-1alpha/Mfn2 signaling to attenuate hepatocyte pyroptosis via blocking mitochondrial ROS in alcoholic liver disease [J]. Free Radic Biol Med，2020，153：89-102.

[36] Jin H，Lian N，Bian M，et al. Oroxylin A prevents alcohol-induced hepatic steatosis through inhibition of hypoxia inducible factor 1alpha [J]. Chem Biol Interact，2018，285：14-20.

[37] Jin H，Lian N，Bian M，et al. Oroxylin A inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via YAP pathway [J]. Cell Prolif，2018，51（3）：e12431.

[38] Zhang C，Bian M，Chen X，et al. Oroxylin A prevents angiogenesis of LSECs in liver fibrosis via inhibition of YAP/HIF-1alpha signaling [J]. J Cell Biochem，2018，119（2）：2258-2268.

[39] Chen W，Zhang Z，Yao Z，et al. Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation [J]. Int Immunopharmacol，2018，56：148-155.

[40] Shen M，Guo M，Wang Z，et al. ROS-dependent inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling is required for Oroxylin A to exert anti-inflammatory activity in liver fibrosis [J]. Int Immunopharmacol，2020，85：106637.

[41] Wei L，Dai Y，Zhou Y，et al. Oroxylin A activates PKM1/HNF4 alpha to induce hepatoma differentiation and block cancer progression [J]. Cell Death Dis，2017，8（7）：e2944.

[42] Yuan H，Duan S，Guan T，et al. Vitexin protects against ethanol-induced liver injury through Sirt1/p53 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol，2020，873：173007.

[43] Wang F，Liu JC，Zhou RJ，et al. Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPARalpha-mediated lipogenic gene expression [J]. Chem Biol Interact，2017，275：171-177.

[44] Li Y，Cheng X，Chen C，et al. Apigenin，a flavonoid constituent derived from P. villosa，inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by CyclinD1/CDK4 regulation via p38 MAPK-p21 signaling [J]. Pathol Res Pract，2020，216（1）：152701.

[45] Zeng H，Guo X，Zhou F，et al. Quercetin alleviates ethanol-induced liver steatosis associated with improvement of lipophagy [J]. Food Chem Toxicol，2019，125：21-28.

[46] Zhao X，Gong L，Wang C，et al. Quercetin mitigates ethanol-induced hepatic steatosis in zebrafish via P2X7R-mediated PI3K/ Keap1/Nrf2 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2021，268：113569.

[47] Liu S，Hou W，Yao P，et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes [J]. Toxicol In Vitro，2010，24（2）：516-522.

[48] Jie Q，Tang Y，Deng Y，et al. Bilirubin participates in protecting of heme oxygenase-1 induction by quercetin against ethanol hepatotoxicity in cultured rat hepatocytes [J]. Alcohol，2013，47（2）：141-148.

[49] Li Y，Chen M，Xu Y，et al. Iron-mediated lysosomal membrane permeabilization in ethanol-induced hepatic oxidative damage and apoptosis：protective effects of quercetin [J]. Oxid Med Cell Longev，2016，2016：4147610.

[50] Tang Y，Li Y，Yu H，et al. Quercetin prevents ethanol-induced iron overload by regulating hepcidin through the BMP6/SMAD4 signaling pathway [J]. J Nutr Biochem，2014，25（6）：675-682.

[51] Tang Y，Li Y，Yu H，et al. Quercetin attenuates chronic ethanol hepatotoxicity：Implication of “free” iron uptake and release [J]. Food Chem Toxicol，2014，67：131-138.

[52] Assini JM，Mulvihill EE，Huff MW. Citrus flavonoids

and lipid metabolism [J]. Curr Opin Lipidol，2013，24（1）：34-40.

[53] Choi BK，Kim TW，Lee DR，et al. A polymethoxy flavonoids-rich Citrus aurantium extract ameliorates ethanol-induced liver injury through modulation of AMPK and Nrf2-related signals in a binge drinking mouse model [J]. Phytother Res，2015，29（10）：1577-1584.

[54] Lin H，Zhou Z，Zhong W，et al. Naringenin inhibits its alcoholic injury by improving lipid metabolism and reducing apoptosis in zebrafish larvae [J]. Oncol Rep，2017，38（5）：2877-2884.

[55] Szkudelska K，Nogowski L，Nowicka E，et al. In vivo metabolic effects of naringenin in the ethanol consuming rat and the effect of naringenin on adipocytes in vitro [J]. J Anim Physiol Anim Nutr（Berl），2007，91（3-4）：91-99.

[56] Jayaraman J，Jdsudoss VA，Menon VP，et al. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury [J]. Toxicol Mech Methods，2012，22（7）：568-576.

[57] Jayaraman J，Namasivayam N. Naringenin modulates circulatory lipid peroxidation，anti-oxidant status and hepatic alcohol metabolizing enzymes in rats with ethanol induced liver injury [J]. Fundam Clin Pharmacol，2011，25（6）：682-689.

[58] Meng HW，You HM，Yang Y，et al. 4-Methylcoumarin-[5，6-g]-hesperetin attenuates inflammatory responses in alcoholic hepatitis through PPAR-gamma activation [J]. Toxicology，2019，421：9-21.

[59] Liu D，Mao Y，Ding L，et al. Dihydromyricetin：A review on identification and quantification methods，biological activities，chemical stability，metabolism and approaches to enhance its bioavailability [J]. Trends Food Sci Technol，2019，91：586-597.

[60] Shen Y，Lindemeyer AK，Gonzalez C，et al. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication [J]. J Neurosci，2012，32（1）：390-401.

[61] Liu L，Sun S，Rui H，et al. In vitro inhibitory effects of dihydromyricetin on human liver cytochrome P450 enzymes [J]. Pharm Biol，2017，55（1）：1868-1874.

[62] Silva J，Yu X，Moradian R，et al. Dihydromyricetin protects the liver via changes in lipid metabolism and enhanced ethanol metabolism [J]. Alcohol Clin Exp Res，2020，44（5）：1046-1060.

[63] Qiu P，Dong Y，Li B，et al. Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. Toxicol Lett，2017，274：31-41.

[64] Liu B，Zhou W，Chen X，et al. Dihydromyricetin induces mouse hepatoma Hepal-6 cell apoptosis via the transforming growth factor-beta pathway [J]. Mol Med Rep，2015，11（3）：1609-1614.

[65] Gillessen A，Schmidt HH. Silymarin as supportive treatment in liver diseases：a narrative review [J]. Adv Ther，2020，37（4）：1279-1301.

[66] Tighe SP，Akhtar D，Iqbal U，et al. Chronic liver disease and silymarin：a biochemical and clinical review [J]. J Clin Transl Hepatol，2020，8（4）：454-458.

[67] Das SK，Mukherjee S. Biochemical and immunological basis of silymarin effect，a milk thistle（*Silybum marianum*）against ethanol-induced oxidative damage [J]. Toxicol Mech Methods，2012，22（5）：409-413.

[68] Song Z，Deaciuc I，Song M，et al. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice [J]. Alcohol Clin Exp Res，2006，30（3）：407-413.

[69] Zhang W，Hong R，Tian T. Silymarin’s protective effects and possible mechanisms on alcoholic fatty liver for rats [J]. Biomol Ther（Seoul），2013，21（4）：264-249.

[70] Liu YS，Yuan MH，Zhang CY，et al. Puerariae lobatae radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism [J]. Biomed Pharmacother，2021，134：111121.

[71] Tian L，Fan F，Zheng S，et al. Puerarin exerts the hepatoprotection from chronic alcohol-induced liver injury via inhibiting the cyclooxygenase-2 and the 5-lipoxygenase pathway in rats [J]. Complement Med Res，2021，28（2）：104-113.

[72] Wang S，Shi XL，Feng M，et al. Puerarin protects against CCl4-induced liver fibrosis in mice：possible role of PARP-1 inhibition [J]. Int Immunopharmacol，2016，38：238-245.

（收稿日期：2021-10-25；修回日期：2021-11-16）

内皮祖细胞和慢性阻塞性肺疾病

彭淮淮[1]，梁桂宾[2]，何智辉[2*]（1. 中南大学湘雅二医院，长沙 410011；2. 中南大学湘雅三医院，长沙 410013）

摘要：慢性阻塞性肺疾病是呼吸系统常见疾病，其特征是慢性肺气肿和伴气道阻塞的支气管炎。在全球范围内，慢性阻塞性肺疾病的发病率和病死率极高，给个人、社会造成了极大的经济负担。内皮祖细胞作为内皮细胞的前体细胞，可以通过多种途径促进新血管形成，在慢性阻塞性肺疾病的发展中发挥了重要作用。本综述回顾了慢性阻塞性肺疾病和内皮祖细胞在发病机制和临床应用中的关系，以期为内皮祖细胞在慢性阻塞性肺疾病治疗中的应用提供参考。

关键词：慢性阻塞性肺疾病；内皮祖细胞；呼吸系统

中图分类号：R563.9 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0382-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.025

Endothelial progenitor cells and chronic obstructive pulmonary disease

PENG Huai-huai[1], LIANG Gui-bin[2], HE Zhi-hui[2*] (1. *The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410011; 2. *The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410013)

Abstract: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a common disease of the respiratory system, characterized by chronic emphysema and bronchitis with airway obstruction. On a global scale, the morbidity and mortality of COPD are extremely high, which not only imposes a heavy economic burden on individuals but also on the society. Endothelial progenitor cells (EPCs) contribute to neovascularization and play an important role in the development of COPD. This article reviewed the relationship between COPD and EPCs in pathogenesis and clinical application to provide references for the application of EPCs in the treatment of COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; endothelial progenitor cell; respiratory system

慢性阻塞性肺疾病（COPD）是一种以持续呼吸道症状和不可逆气流受限为特征的疾病。由于持续面临风险因素和人口老龄化，COPD 所造成的全球负担将在未来几十年持续加重，而其发病机制尚不完全明确。其治疗以控制症状、延缓疾病进展为原则，尚无可治愈药物。内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞，在出生后血管生成、血管再生及修复中发挥重要作用。近年来内皮祖细胞在 COPD 中的作用备受关注，本文就内皮祖细胞在肺气肿及 COPD 发病机制的研究进展进行综述。

1 内皮祖细胞的定义

内皮祖细胞是造血干细胞的亚类，主要来自骨髓，在功能和表型上与成熟的内皮细胞不同，可以在体外分化为内皮细胞，并在体内促进血管生成和血管稳态。在成人外周血中发现了两种内皮祖细胞：具有较高黏附能力和低增殖能力的早期内皮祖细胞、具有较低黏附能力和高增殖能力的晚期内皮祖细胞[1]。早期内皮祖细胞呈纺锤形，主要存在于骨髓中，特异性表达 CD34、CD45 和 VEGFR-2（KDR/Flk-1），增殖能力低，形成集落及小管的能力弱，但具有促血管生成旁分泌能力[2]。晚期内皮祖细胞呈鹅卵石状，具有较强的增殖能力，可促进血管新生，也被称为内皮集落形成细胞。晚期内皮祖细胞能归巢至缺血坏死组织处，通过融入新生微血管壁来形成新的毛细血管[3]，分泌多种促血管因子（如粒细胞克隆刺激因子、内皮型一氧化氮合酶等）[4]，促内皮新生，促损伤血管修复。

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81870040）。

作者简介：彭淮淮，女，硕士，主要从事内皮祖细胞与慢性阻塞性肺疾病研究，email：1898212196@csu.edu.cn *通信作者：何智辉，女，博士，主任医师，主要从事内皮祖细胞与慢性阻塞性肺疾病、脓毒血症研究，email：hzh703@csu.edu.cn

2 内皮祖细胞和 COPD

内皮祖细胞在生理和病理情况下参与血管生成，在各系统疾病中起重要作用。COPD 的主要病理变化包括微血管损伤和肺动脉高压。本文回顾了内皮祖细胞的数量和功能对 COPD 患者或肺气肿动物模型的影响。

2.1 临床研究

2.1.1 内皮祖细胞的数量和 COPD 内皮祖细胞的数量在 COPD 的发生和发展中起着重要作用。研究表明，循环内皮祖细胞数量的减少参与了 COPD 的进展，并与疾病的严重程度相关。早期 COPD（GOLD 1）患者循环内皮祖细胞数量增加，在修复和重建血管的同时也导致动脉壁增厚和肺部高压 [5]。晚期 COPD 患者（GOLD 2 ～ 4）、稳定期 COPD 患者循环内皮祖细胞数量减少 [6-7]，与稳定期 COPD 患者相比，急性加重期 COPD（AECOPD）患者内皮祖细胞数量明显减少 [8]。然而，Sala 等 [9] 研究却证明，与稳定期 COPD 患者和健康对照组相比，AECOPD 患者内皮祖细胞数量更多，但稳定期 COPD 患者和对照组之间的内皮祖细胞数量没有显著差异。另一项研究表明，与吸烟对照组相比，中度 COPD（GOLD 2）患者内皮祖细胞数量下降，而重度 COPD（GOLD 4）患者内皮祖细胞数量无明显差异 [10]。Huertas 等 [11] 发现，与体质量指数（BMI）正常的 COPD 患者相比，低 BMI 的 COPD 患者的内皮祖细胞数量显著降低，并且炎症因子如肿瘤坏死因子 *α*（TNF-*α*）、白介素 6（IL-6）和单核细胞趋化蛋白 -1（MCP-1）升高，提示内皮祖细胞下降可能与炎症有关 [12]。此外，与性别、年龄和吸烟状况均相当的对照组相比，COPD 患者（GOLD 3）的外周循环内皮祖细胞数量无明显减少 [13]，这可能是全身炎症和低氧血症所致。研究中使用的不同内皮祖细胞表型、不同计数方法可能是导致这些研究结果不一致的原因。

2.1.2 内皮祖细胞的功能和 COPD 肺泡巨噬细胞在分泌促炎症介质和蛋白酶方面的功能障碍可以诱导氧化应激，吞噬凋亡细胞，从而促进 COPD 的进展 [14]。COPD 患者出现内皮功能障碍和细胞凋亡，可引起肺血管的减少和重构。内皮祖细胞的基本功能包括分泌、黏附和增殖等。研究表明内皮祖细胞功能的改变可能影响 COPD 的进展。

许多细胞因子，如血管内皮生长因子（VEGF）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、基质细胞衍生因子 -1*α*（SDF-1*α*）、促红细胞生成素（EPO），神经营养因子，神经生长因子和肝细胞生长因子都能促进内皮祖细胞向组织特定部位的归巢 [15]。血管趋化因子（CCL2、CXCL1、CXCL7、CXCL12）与其相应受体（CCR2、CXCR2、CXCR4）的相互作用调节在归巢过程中内皮祖细胞的迁移、募集和黏附 [16]。

吸烟者和 COPD 患者的内皮祖细胞功能和生物活性受损。在低 BMI 的 COPD 患者（GOLD 2 ～ 3）中，VEGF 和造血生长因子水平显著降低，影响了内皮祖细胞的归巢和动员能力 [11]。Liu 等 [17] 招募了 25 名有吸烟史的 COPD 患者（GOLD 2 ～ 3）和 16 名健康、年龄匹配、不吸烟的志愿者。测试了所有受试者内皮祖细胞的管道形成能力、血小板 / 内皮细胞黏附分子 1（PECAM-1）在内皮祖细胞表面的表达、内皮祖细胞集落形成单位的数量以及 CXCR4 在内皮祖细胞中的表达。结果表明，COPD 患者血管形成明显减少，早期内皮祖细胞中 CXCR4 表达降低，增殖能力受损，集落形成单位数量减少，晚期内皮祖细胞中 PECAM-1 表达明显减少。此外，AECOPD 患者的早期内皮祖细胞迁移能力下降，不能诱导血管形成，CXCR4 表达减少更为明显，而稳定期 COPD 患者的晚期内皮祖细胞在血管形成方面存在明显缺陷 [18]。与稳定期 COPD 患者的晚期内皮祖细胞相比，AECOPD 晚期患者的内皮祖细胞附着于基质胶诱导的小管数量明显减少 [8]。Liu 等 [17] 和 Yang 等 [19] 研究均指出 COPD 患者内皮祖细胞黏附能力下降，增殖能力明显受损。

微小 RNAs（miRNAs）是一类非编码 RNA 分子，可以调节细胞的增殖、分化和凋亡。miR-34a 和 miR-126 参与内皮祖细胞活性的调节 [20-22]。p53 可上调 miR-34a 的表达，诱导细胞凋亡，而 miR-126-3p 可促进内皮祖细胞的释放。沉默信息调节因子 1（Sirt1）通过调节 p53 依赖性凋亡来抑制促凋亡蛋白的表达 [23]。*p16* 基因属于 INK4 基因家族，是仅次于 p53 的常见肿瘤抑制基因，在细胞衰老中起关键作用 [24]。

Kato 等 [10] 招募了 252 名吸烟 COPD 患者和 106 名吸烟非 COPD 者，检测了所有受试者内皮祖细胞、Sirt1 RNA、miR-34a 和 miR-126 的表达数量。与吸烟非 COPD 者相比，中度 COPD 患者内皮祖细胞数目和 Sirt1 RNA 以及 miR-126-3p 的表达均显著降低，而 miR-34 的表达显著增加，内皮祖细胞的衰老与凋亡增加。然而上述项目在吸烟非 COPD 者与重度 COPD 患者中无明显差

异。而重度 COPD 患者中内皮祖细胞和 miR-126-3p 水平相对较高可能与激素的使用以及治疗时间的差异性有关。

与吸烟非 COPD 患者相比，吸烟 COPD 患者外周血内皮祖细胞中 p16 mRNA 及蛋白表达显著增高，增殖能力降低，存在 G_1/S 期停滞。敲除 COPD 患者内皮祖细胞中 *p16* 基因可以显著减轻这些患者内皮祖细胞的细胞周期停滞 [25]。

TNF-*α* 是体外祖细胞凋亡的有效诱导剂，可促进内皮祖细胞凋亡 [26]，而 COPD 患者的 TNF-*α* 水平升高 [27]。

吸烟引起的氧化应激是 COPD 的主要危险因素。与健康非吸烟者相比，吸烟者和 COPD 患者（GOLD 2）的内皮祖细胞中 DNA 衰老和损伤水平更高，血管生成能力受损，且这些变化与年龄无关 [28]，表明香烟烟雾诱导的氧化应激可导致内皮祖细胞的系统性损伤，而其子细胞可以“继承”这种 DNA 损伤，从而引起表观遗传变化。

COPD 合并慢性低氧血症的患者血浆去甲肾上腺素水平和 *β*2AR 的活化均升高，导致活性氧（ROS）表达增加和内皮祖细胞功能障碍。予以 *β*2AR 拮抗剂治疗后，可以观察到内皮祖细胞内 ROS 的表达降低，增殖能力提高 [18]。

重组人 C 反应蛋白（CRP）在一定浓度下（≥ 15 mg • mL^{-1}）可显著减少内皮祖细胞的数量，并抑制其功能 [29]。AECOPD 患者的 CRP[8] 和 IL-6[10] 表达升高，内皮祖细胞数量减少，且功能受损，这表明内皮祖细胞功能障碍可能与炎症反应增强有关。

COPD 患者肺中内皮间充质转化（EndMT）的过程被激活 [30]。间充质细胞是修复伤口的关键结缔组织细胞。成纤维细胞是肺中主要的间充质细胞，在气道重塑和肺泡组织间质修复中起重要作用。EndMT 意味着内皮细胞失去黏附特性和极性，形成高度侵袭性的成纤维细胞 / 成肌纤维细胞。据报道，内皮祖细胞可以在许多疾病中转化为间充质样细胞 [31]。COPD 患者中是否存在 EndMT 或内皮祖细胞转化为间充质样细胞尚需进一步研究。

2.2 基础研究

肺气肿是 COPD 的主要病理特征，也是 COPD 发病机制研究的热点。肺气肿动物模型的建立有多种方式，根据不同的机制，采用了各种建模方法来建立肺气肿或 COPD 的动物模型，从而使探索内皮祖细胞在 COPD 发病机制中的作用成为可能。

2.2.1 动物模型中内皮祖细胞的数量 研究表明，肺气肿小鼠中内皮祖细胞的数量明显减少 [32-34]。胰高血糖素样肽 1（GLP-1）可以减轻肺内炎症反应，增加小鼠内皮祖细胞数量，降低肺气肿面积 [35]。Shi 等 [36] 将内皮祖细胞移植到径吸烟诱导的 COPD 小鼠气管中，发现内皮祖细胞数量增加可以减轻肺气肿，降低气道阻力，增加肺顺应性。

2.2.2 动物模型中内皮祖细胞的功能

① 内皮祖细胞的生物活性：基质金属蛋白酶（MMPs）与许多生理和病理过程有关，其中 MMP-2 和 MMP-9 通过不同的基质蛋白在肺组织重建和修复中起重要作用。MMP-9 可以释放可溶性配体（sKitL）将静止状态的造血干细胞变为增殖状态，同时，MMP-9 还可通过细胞外间质降解、中性粒细胞趋化和炎症增强等途径介导肺部炎症反应 [37]。MMP-2 可损害内皮祖细胞功能，特别是血管生成能力 [38]。MMP-2 和 MMP-9 在 COPD 患者和肺气肿小鼠中的表达均升高 [39-40]。但也有研究发现肺气肿小鼠的 MMP-9 活性、*c-Kit* 基因和蛋白的表达以及 sKitL 水平均降低，导致从骨髓到外周血的内皮祖细胞供应减少 [34]。

② 炎症反应与内皮祖细胞：在 COPD 整个过程中以及急性发作期间，炎症反应被认为是最重要的机制。在吸烟诱导的 COPD 小鼠中，气管内内皮祖细胞移植降低了肺组织中 MMP-2、MMP-9 的活性和 TUNEL 阳性细胞的数量，因此减少了气道炎症，减轻了肺气肿 [36]。内皮祖细胞在体外抑制脂多糖（LPS）刺激的嗜中性粒细胞中 TNF-*α*、IL-1*β*、髓过氧化物酶（MPO）和 MMP-9 的分泌，减少炎症细胞的浸润，减轻肺损伤 [41]。

③ 氧化 - 抗氧化失衡与内皮祖细胞：氧化 - 抗氧化剂失衡是 COPD 的重要机制，在 AECOPD 患者中，ROS 引起的氧化应激反应增加。香烟烟雾和其他有害颗粒物在吸入时会产生过多的氧化物，从而直接损害肺组织。氧化物不仅可以直接破坏蛋白质、脂质和核酸等生化大分子物质，导致细胞功能障碍或细胞死亡，还可以破坏细胞外基质，引起蛋白酶 - 抗蛋白酶失衡 [42]。

Shi 等 [36] 以香烟烟雾暴露法建立 COPD 小鼠模型，并在第 30 日和第 90 日对 COPD 小鼠气管注射内皮祖细胞。第 120 日测定肺功能、细胞凋亡、炎症细胞、MMP-2 和 MMP-9 的水平，结果表明，注射内皮祖细胞可以增强肺泡中 MMP-2 和 MMP-9 的表达。早期和晚期内皮祖细胞治疗均能

明显抑制小鼠血清和肺泡灌洗液的抗氧化活性的降低，减轻肺气肿的发生，且早期干预组的抗氧化活性高于晚期干预组。这提示内皮祖细胞气管内注射可能通过减轻炎症浸润、抑制蛋白水解酶活性、提高抗氧化活性等途径减轻肺气肿，延缓肺功能障碍的进展。

④ 内皮祖细胞和弹性蛋白酶 - 抗弹性蛋白酶失衡：弹性蛋白酶系统失衡会分解 COPD 患者肺部的组织蛋白。炎性细胞可以释放弹性蛋白酶，过多的弹性蛋白酶会损害肺实质，造成肺气肿。内皮祖细胞可在体外抑制中性粒细胞弹性蛋白酶（NE）的分泌，体内移植的内皮祖细胞可以下调 NE 水平并减轻肺损伤 [41]。内皮祖细胞还可能参与了肺气肿或 COPD 中弹性蛋白酶失衡的机制。肺气肿小鼠的 Alpha1- 抗胰蛋白酶浓度降低 [35]。气管内注射内皮祖细胞可降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达，抑制蛋白水解酶的活性，并部分缓解吸烟引起的肺气肿 [36]。内皮祖细胞移植可以通过抑制 NE 表达减轻大鼠肺损伤，通过调节蛋白酶系统并控制内皮祖细胞对血管生成过程的影响，有效地控制病理性血管生成 [41]。然而，另一项研究发现，内皮祖细胞可以表达 NE，通过调节脂联素的活性和修复受损血管能力来改善内皮功能 [43]。但是，在 COPD 或肺气肿的动物模型中还没有这方面的相关研究。

⑤ 内皮祖细胞和表观遗传学变化：5-Aza-2'- 脱氧胞苷（5-Aza-CdR，又名地西他滨）是使用最广泛的 DNA 甲基化抑制剂，可触发脱甲基化，从而导致表观遗传沉默基因的连续激活 [44]。5-Aza-CdR 可以显著降低 CSE 处理小鼠内皮祖细胞中的 p16 mRNA 的升高。CSE 处理后小鼠内皮祖细胞的增殖、黏附和分泌能力降低，eNOS 的表达水平下降，而地西他滨可以减轻上述变化 [33]。此外，地西他滨能增强 CSE 诱导的肺气肿小鼠内皮祖细胞和肺组织中干细胞抗原 -1（Sca-1）的表达，从而改善小鼠肺气肿 [45]。这些结果提示，DNA 甲基化影响了内皮祖细胞的功能障碍和衰老，这可能与肺气肿的发病机制有关。

2.3 内皮祖细胞在 COPD 治疗中的应用

一项研究招募了 80 例 COPD 合并肺动脉高压的患者，分为对照组和治疗组。对照组常规给予氧气、抗感染、祛痰等治疗，治疗组给予 Rho 激酶抑制剂法舒地尔和常规治疗。结果显示，法舒地尔降低了 COPD 和肺动脉高压患者的肺动脉压，其机制之一是外周血中内皮祖细胞数量增多和功能增强减少了肺内皮的损害并改善了肺血管结构的重建，从而达到治疗效果 [46]。另一项研究比较了内皮祖细胞移植加常规疗法与单纯常规疗法对特发性肺动脉高压患者的疗效。结果显示，内皮祖细胞移植加常规治疗组的患者在 6 min 内行走距离显著增加，平均肺动脉压、肺血管阻力明显下降，心输出量上升 [47]。在小鼠模型中，内皮祖细胞的气管内移植可通过减少炎症浸润，减少凋亡，抑制蛋白水解活性和增加抗氧化活性来减轻肺气肿和肺功能障碍 [36]。由此看来，提高内皮祖细胞数量或提升其功能可能对 COPD 患者大有裨益。此外，已有临床研究证实，通过动员内皮祖细胞可以促进慢性迁延不愈伤口的好转 [48]，内皮祖细胞移植后心肌梗死患者的心肌存活率和灌注显著增加 [49]，内皮祖细胞自体移植对严重肢体缺血患者具有明显疗效 [50]。这些研究也提示：除了戒烟和运动，外源性祖细胞或负责激活内源性祖细胞体液因子的给药可能是新的 COPD 的潜在疗法 [51]。

在 COPD 患者和肺气肿动物模型中，内皮祖细胞数量的变化和生物学活性的损害是导致 COPD 或肺气肿进展的重要因素。此外，肺气肿的主要发病机制，例如炎症、氧化 - 抗氧化失衡、表观遗传学等，也与内皮祖细胞相关，内皮祖细胞在 COPD 或肺气肿发病机制中的重要性有目共睹，促进内皮祖细胞在血管生成中作用的潜在机制可被视为 COPD 未来新治疗方法的努力方向。

参考文献

[1] Hur J，Yoon CH，Kim HS，et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2004，24（2）：288-293.

[2] Sieveking DP，Buckle A，Celermajer DS，et al. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations：insights from a novel human angiogenesis assay [J]. J Am Coll Cardiol，2008，51（6）：660-668.

[3] Mathers CD，Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. PLoS Med，2006，3（11）：e442.

[4] Praça C，Rosa SC，Sevin E，et al. Derivation of brain capillary-like endothelial cells from human pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells [J]. Stem Cell Reports，2019，13（4）：599-611.

[5] Schweitzer KS，Johnstone BH，Garrison J，et al. Adipose stem cell treatment in mice attenuates lung and systemic injury induced by cigarette smoking [J]. Am J Respir Crit Care Med，2011，183（2）：215-225.

[6] Vogelmeier CF，Criner GJ，Martinez FJ，et al. Global strategy for the diagnosis，management，and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med，2017，195（5）：557-582.

[7] Mengyu H，Hong S，Lixiang S，et al. Meta-analysis of the level of circulating endothelial progenitor cells in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Univ Med Nanjing，2018，38（2）：272-276.

[8] Liu X，Liu Y，Huang X，et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Mol Med Rep，2017，16（4）：5294-5302.

[9] Sala E，Villena C，Balaguer C，et al. Abnormal levels of circulating endothelial progenitor cells during exacerbations of COPD [J]. Lung，2010，188（4）：331-338.

[10] Kato R，Mizuno S，Kadowaki M，et al. Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res，2016，17（1）：139.

[11] Huertas A，Testa U，Riccioni R，et al. Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI [J]. Respir Physiol Neurobiol，2010，170（1）：23-31.

[12] Doyle MF，Tracy RP，Parikh MA，et al. Endothelial progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema [J]. PLoS One，2017，12（3）：e0173446.

[13] Mairi B，Hoogenboom MM，Padfield GJ，et al. Endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2013，305（12）：L964-L969.

[14] Szucs B，Szucs C，Petrekanits M，et al. Molecular characteristics and treatment of endothelial dysfunction in patients with COPD：a review article [J]. Int J Mol Sci，2019，20（18）：4329.

[15] Zeng W，Wen C，Wu Y，et al. The use of BDNF to enhance the patency rate of small-diameter tissue-engineered blood vessels through stem cell homing mechanisms [J]. Biomaterials，2012，33（2）：473-484.

[16] Hristov M，Zernecke A，Liehn EA，et al. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury [J]. Thromb Haemost，2007，98（2）：274-277.

[17] Liu X，Xie C. Human endothelial progenitor cells isolated from COPD patients are dysfunctional [J]. Mol Cell Biochem，2012，363（1-2）：53-63.

[18] Liu X，Tan W，Liu Y，et al. The role of the beta2 adrenergic receptor on endothelial progenitor cells dysfunction of proliferation and migration in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. Expert Opin Ther Targets，2013，17（5）：485-500.

[19] Yang Y，Gan Y，Cao J，et al. Decreased and dysfunctional circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin Med J（Engl），2013，126（17）：3222-3227.

[20] Sikora E，Bielak-Zmijewska A，Mosieniak G. What is and what is not cell senescence [J]. Postepy Biochem，2018，64（2）：110-118.

[21] Zhao T，Li J，Chen AF. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2010，299（1）：E110-116.

[22] Lechman ER，Gentner B，van Galen P，et al. Attenuation of miR-126 activity expands HSC in vivo without exhaustion [J]. Cell Stem Cell，2012，11（6）：799-811.

[23] Castro RE，Ferreira DM，Afonso MB，et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol，2013，58（1）：119-125.

[24] He S，Sharpless NE. Senescence in health and disease [J]. Cell，2017，169（6）：1000-1011.

[25] He Z，Peng H，Gao M，et al. p300/Sp1-mediated high expression of p16 promotes endothelial progenitor cell senescence leading to the occurrence of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Mediators Inflamm，2021，2021：5599364.

[26] Xu S，Zhao Y，Yu L，et al. Rosiglitazone attenuates endothelial progenitor cell apoptosis induced by TNF-alpha via ERK/MAPK and NF-kappaB signal pathways [J]. J Pharmacol Sci，2011，117（4）：265-274.

[27] Yao Y，Zhou J，Diao X，et al. Association between tumor necrosis factor-alpha and chronic obstructive pulmonary disease：a systematic review and meta-analysis [J]. Ther Adv Respir Dis，2019，13：1-17.

[28] Paschalaki KE，Starke RD，Hu Y，et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence [J]. Stem cells（Dayton，Ohio），2013，31（12）：2813-2826.

[29] Verma S，Kuliszewski MA，Li SH，et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival，differentiation，and function：further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease [J]. Circulation，2004，109（17）：2058-2067.

[30] Sohal SS. Endothelial to mesenchymal transition（EndMT）：an active process in chronic obstructive pulmonary disease（COPD）? [J]. Respir Res，2016，17：20.

[31] Zhang Z，Zhang T，Zhou Y，et al. Activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells by regulating the forkhead box subgroup O-3a signaling [J]. Cell Physiol Biochem，2015，35（4）：1643-1653.

[32] Tsuji T，Aoshiba K，Yokohori N，et al. A systemically administered EP2 receptor agonist stimulates pulmonary angiogenesis in a murine model of emphysema [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat，2009，90（3-4）：85-88.

[33] He ZH，Chen Y，Chen P，et al. 5-Aza-2’-deoxycytidine protects against emphysema in mice via suppressing p16Ink4a expression in lung tissue [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2017，12：3149-3158.
[34] He S，He Z，Chen Y，et al. C-Kit/c-Kit ligand interaction of bone marrow endothelial progenitor cells is influenced in a cigarette smoke extract-induced emphysema model [J]. Experimental lung research，2013，39（6）：258-267.
[35] Skurikhin EG，Pershina OV，Pakhomova AV，et al. Endothelial progenitor cells as pathogenetic and diagnostic factors，and potential targets for GLP-1 in combination with metabolic syndrome and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Mol Sci，2019，20（5）：1105.
[36] Shi Z，Chen Y，Cao J，et al. Intratracheal transplantation of endothelial progenitor cells attenuates smoking-induced COPD in mice [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2017，12：947-960.
[37] Wells JM，Gaggar A，Blalock JE. MMP generated matrikines [J]. Matrix Biology，2015，44-46：122-129.
[38] Cheng XW，Kuzuya M，Nakamura K，et al. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice [J]. Circ Res，2007，100（6）：904-913.
[39] Bchir S，Nasr HB，Bouchet S，et al. Concomitant elevations of MMP-9，NGAL，proMMP-9/NGAL and neutrophil elastase in serum of smokers with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Cell Mol Med，2017，21（7）：1280-1291.
[40] Kirschvink N，Vincke G，Fievez L，et al. Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats [J]. Toxicology，2005，211（1-2）：36-48.
[41] Mao M，Hao L，Wang Y，et al. Transplantation of endothelial progenitor cells attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury via inhibiting the inflammatory secretion of neutrophils in rats [J]. Am J Med Sci，2019，357（1）：49-56.
[42] Betsuyaku T. Oxidative stress in pathogenesis of COPD [J]. Nihon Rinsho，2007，65（4）：633-636.
[43] Lavoie V，Kernaleguen AE，Charron G，et al. Functional effects of adiponectin on endothelial progenitor cells [J]. Obesity（Silver Spring），2011，19（4）：722-728.
[44] Plimack ER，Kantarjian HM，Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies [J]. Leuk Lymphoma，2007，48（8）：1472-1481.
[45] He ZH，Chen Y，Chen P，et al. Decitabine enhances stem cell antigen-1 expression in cigarette smoke extract-induced emphysema in animal model [J]. Exp Biol Med（Maywood），2016，241（2）：131-139.
[46] Pei L，Hongmei Z，Yijun T，et al. Influence of Rho kinase inhibitor Fasudil on late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients with pulmonary artery hypertension [J]. Bosn J Basic Med Sci 2014，14（1）：40-44.
[47] Wang XX，Zhang FR，Shang YP，et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension：a pilot randomized controlled trial [J]. J Am Coll Cardiol，2007，49（14）：1566-1571.
[48] Ma YH，Lei YH，Zhou M，et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy in the management of chronic wounds and its correlation with CD34（＋）endothelial progenitor cells [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi，2011，91（45）：3214-3218.
[49] Taljaard M，Ward MR，Kutryk MJ，et al. Rationale and design of Enhanced Angiogenic Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction（ENACT-AMI）：the first randomized placebo-controlled trial of enhanced progenitor cell therapy for acute myocardial infarction [J]. Am Heart J，2010，159（3）：354-360.
[50] Liotta F，Annunziato F，Castellani S，et al. Therapeutic efficacy of autologous non-mobilized enriched circulating endothelial progenitors in patients with critical limb ischemia——the SCELTA trial [J]. Circ J，2018，82（6）：1688-1698.
[51] Ohnishi S，Nagaya N. Tissue regeneration as next-generation therapy for COPD——potential applications [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis，2008，3（4）：509-514.

（收稿日期：2021-08-05；修回日期：2021-10-06）

基于膜技术的中药浓缩研究进展

李金晶[1]，钱大玮[2]，刘红波[1*]，唐志书[1*]，宋忠兴[1]，姬莎莎[1]，崔春利[1]（1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心，秦药特色资源研究与开发国家重点实验室（培育），陕西省创新药物研究中心，陕西 咸阳 712083；2. 南京中医药大学/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心，南京 210023）

摘要：传统中药热浓缩方式存在耗时长、能耗高、成分损失大等不足。绿色、节能、高效的膜技术已在分离、纯化、浓缩等方面得到了广泛应用。本文总结了纳滤、反渗透、膜蒸馏及膜集成技术在中药浓缩领域中的研究进展，并探讨分析了膜技术应用于中药浓缩方面的相关问题，为推进膜技术的深入应用与发展提供参考。

关键词：中药；浓缩；纳滤；反渗透；膜蒸馏；膜集成

中图分类号：TQ028.8 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0388-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.026

Research progress in the concentration of traditional Chinese medicine based on membrane technology

LI Jin-jing[1], QIAN Da-wei[2], LIU Hong-bo[1*], TANG Zhi-shu[1*], SONG Zhong-xing[1], JI Sha-sha[1], CUI Chun-li[1] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resource Industrialization by Shaanxi & Education Ministry*, *State Key Laboratory of Research & Development of Typical Qin Medicine Resources* (*Cultivation*), *Shaanxi Innovative Drug Research Center*, *Xianyang Shaanxi* 712083; 2. *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, *Jiangsu Province Collaborative Innovation Center for the Industrialization Process of Traditional Chinese Medicine Resources*, *Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Deep Processing of Plant Medicines*, *Nanjing* 210023)

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) thermal concentration methods have disadvantages such as long time, high-energy consumption, and large loss of ingredients. Membrane technology, which is green, energy saving and highly efficient, has been widely used in separation, purification and concentration. This paper summarized the research progress in ultrafiltration, reverse osmosis, membrane distillation and integrated membrane technology in the concentration of TCM. The problems related to the application of membrane technology in the concentration of TCM were discussed and analyzed, to provide reference for the further application and development of membrane technology in the concentration of TCM.

Key words: traditional Chinese medicine; concentration; nanofiltration; reverse osmosis; membrane distillation; integrated membrane

中药制药工艺包括提取、分离、浓缩、干燥等操作工序；其中，浓缩是中药制药的关键操作单元之一[1]。传统热浓缩工艺能耗高、耗时长，中药有效成分尤其是热敏性成分在长时间高温浓缩过程中会造成大量损失，从而影响中药制剂质量。

目前常见的浓缩技术包括传统热法蒸发（单效、多效蒸发）、膜技术（纳滤、反渗透、膜蒸馏等）[2]、冷冻浓缩[3]、离心浓缩等。膜浓缩技术是

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803744，No.81773919）；陕西省教育厅重点实验室项目（No.19JS018）。

作者简介：李金晶，女，硕士研究生，主要从事中药制剂新技术研究，email：15776993769@163.com *通信作者：唐志书，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药资源综合利用研究，email：tzs6565@163.com；刘红波，男，讲师，主要从事中药制剂新技术研究，email：15319084280@126.com

在一定操作条件（如压力）下，以膜为介质，当物料溶液经过膜表面时，只允许水及小于膜孔径的物质通过膜面，而形成透过液；物料溶液中体积大于膜表面微孔、与膜孔相近或与膜材料不具有亲和性的物质则被截留在膜的进料液侧，成为浓缩液，进而实现对原溶液中溶质与水的分离，达到浓缩目的。国家发改委在《产业结构调整指导目录（2019 年本）》中鼓励药物生产过程中的膜分离、超临界萃取、新型结晶、系统控制等技术的开发与应用，基本药物质量和生产技术水平的提升及成本的降低，原料药生产节能降耗减排技术、中药质量控制新技术的开发与应用，面向新时代要求，多领域技术交叉融合，将新技术广泛渗透于中药产业结构中。

目前，膜技术已逐渐应用于中药提取物 [4]、食品饮料 [5] 等物料的浓缩过程。超滤（ultrafiltration，UF）、纳滤（nanofiltration，NF）、反渗透（reverse osmosis，RO）技术利用物理筛分、渗透扩散等原理，将溶液中的溶质与溶剂进行分离，其过程原理如图 1 所示。膜蒸馏（membrane distillation，MD）技术是利用疏水微孔膜两侧温度差所产生的蒸汽压力差为推动力，以实现溶质与溶剂的分离，其过程原理如图 2 所示。与热浓缩工艺相比，膜浓缩技术具有操作温度低、能耗低、成分损失少等优势，适用于物料尤其是热敏性物料的浓缩处理。将具有独特优势的膜技术应用于中药制药的浓缩操作单元中，对传统工艺进行技术升级革新，替代或部分替代损失大、能耗高、效率低的中药制备工艺，可有效提升中药制药工艺水平，提高中药产品质量，对促进中药产业高质量发展具有重要意义。

本文主要概述了纳滤、反渗透、膜蒸馏及膜集成技术在中药浓缩操作单元中的应用状况，分析了不同类型膜技术在中药浓缩工艺中的应用特点与适用性，并探讨了影响中药膜浓缩技术深入应用的相关问题及对策，为推进膜浓缩技术在中药制药领域中的应用与发展提供参考。

1　膜技术在中药浓缩中的应用

1.1　纳滤及其集成技术应用

纳滤是 20 世纪 80 年代后期发展起来的一种介于超滤和反渗透之间的新型膜技术，其以压力差为驱动力，相对于反渗透有更低的操作压力。纳滤膜的截留分子量在 100 ～ 1000 Da，膜孔径为纳米级别，适合分离大小约为 1 nm 的溶质组分 [6]，广泛应用于超纯水制备、污水处理 [7]、食品浓缩 [8-11] 等。基于纳滤无热效应浓缩、选择性截留及低压低能耗操作的优势特点，将其开发应

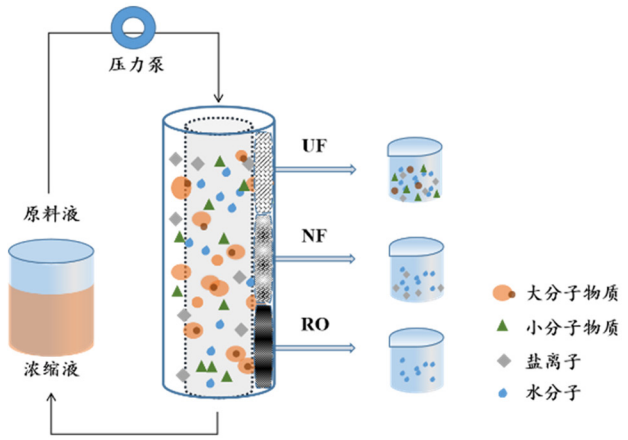


图 1　超滤、纳滤及反渗透技术过程原理示意图

Fig 1　Process principles of ultrafiltration，nanofiltration and reverse osmosis technology

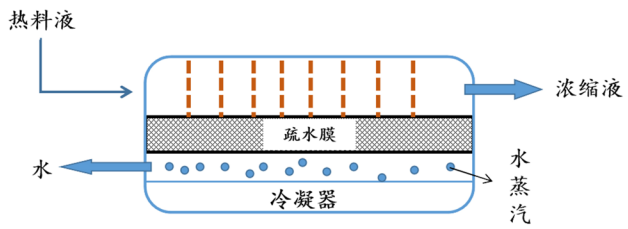


图 2　膜蒸馏技术过程原理示意图

Fig 2　Process principle of membrane distillation technology

用于中药浓缩过程，通过测定浓缩前后中药有效成分保留情况及浓缩效率，筛选最佳纳滤浓缩工艺，评价纳滤浓缩应用于中药领域的适用性。

伍永富等 [12] 采用截留分子量 200 Da 的纳滤膜浓缩板蓝根水提液，发现其对（*R*，*S*）告依春的保留率为 97.50%，对板蓝根水提液中其他成分无明显影响，且浓缩效率高。唐永范等 [13] 采用截留分子量 500 Da 的纳滤膜浓缩枸杞原液后，枸杞冻干粉中枸杞多糖含量达 35%，超氧化物歧化酶酶活性为 56 U·mg^{-1}，比传统热浓缩得到的枸杞多糖活性提高 20 ～ 30 倍。李存玉等 [14-16] 分别对金银花、川芎、延胡索水提液进行了纳滤膜浓缩工艺研究，通过响应面法对膜工艺进行了筛选，在最优工艺条件下有效成分截留率均在 90% 以上。时浩等 [17] 以丹酚酸 B 的截留率和膜通量为考察指标，研究膜截留分子量、操作压力、膜吸附率等因素对丹参水提液纳滤膜浓缩效果的影响，发现丹酚酸 B 截留率随纳滤膜截留分子量的减小而增大，操作压力对丹酚酸 B 截留率影响较小，膜通量随膜截留分子量及操作压力的增大而增大，选择截留分子量为 300 Da 的纳滤膜浓缩丹参水提液，对丹酚酸 B 成分的保留率为 99.5%，吸附率仅为 0.31%。张可人等 [18] 采用截留分子量 200 Da 的纳滤膜浓缩复方古汉养生精提取液，其

对有效成分高淫羊藿苷的截留率达 99.03%；陈亚军等 [19] 分别采用传统常压煎煮法及纳滤膜法浓缩复方生化汤，发现相较于常压浓缩，经截留分子量 150 Da 的纳滤膜浓缩后，有效成分甘草酸、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 转移率提高了 4% ～ 30%，保留率提高了 1.04 ～ 1.47 倍。

超滤膜的截留分子量一般在 500 ～ 500 000 Da，膜孔径一般在 0.002 ～ 0.5 μm，介于微滤膜与纳滤膜之间，能够截留高分子物质、细菌、病毒等 [20]，可用于中药料液的前处理 [21]，常与纳滤、反渗透膜技术进行联合应用，以去除中药料液中通常为无显著生物活性的高分子杂质，提高中药料液的澄清度，降低膜污染。陈骁鹏等 [22] 首先采用 30 kDa 超滤膜去除山茱萸水提液中大分子物质，提高溶液澄清度及稳定性，其多糖去除率为 48.9%，马钱苷透过率为 98.4%；进一步采用截留分子量 400 Da 的纳滤膜浓缩超滤透过液，对马钱苷的截留率为（91.9±1.7）%。宋晓春等 [23] 先采用 50 nm 超滤陶瓷膜过滤当归水提液，表明其可以在去除高分子杂质的基础上对阿魏酸的保留率大于 90%，接着采用截留分子量为 200 Da 的纳滤膜进行浓缩，阿魏酸损失率仅为 0.1%。另有研究分别将川贝母提取液、益母草水提液先进行超滤预处理再进一步采用纳滤浓缩，发现超滤过程对总蛋白的去除率分别为 98.61%、94.38%，同时有效成分的透过率达 98.57%、99.37%，表明超滤能够去除大分子杂质的同时有效保留小分子目标物，为进一步实现高效纳滤浓缩提供支持 [24-25]。

1.2 反渗透及其集成技术应用

反渗透是渗透的逆过程。反渗透膜致密分离层孔径在 1 nm 以下，微孔过渡层孔径在 0.01 μm 左右，支撑层孔径多在亚微米至微米级范围，是最精细的一种分离膜。基于极细孔径优势，反渗透膜过程能有效截留所有溶解盐及分子量大于 100 Da 的有机物，同时允许水分子通过。其应用从海水淡化 [26]、纯水制备 [27]、废水处理 [28] 领域不断延伸，逐渐进入食品、药品浓缩领域 [29-30]。同时，反渗透技术具有高效低能、无需热源、操作简便等优点，将其开发应用于中药浓缩操作单元，通过评价反渗透浓缩的可行性、能耗损失及浓缩效率，优化浓缩工艺，实现反渗透技术在中药浓缩领域的发展。

叶勇等 [31] 采用反渗透膜浓缩丹参芍药水提液。结果表明，当提取液 pH 为 5，温度为 40 ℃，操作压力为 0.3 MPa 时，反渗透浓缩产品质量显著改善，有效成分的保留量高于减压浓缩的 1 倍以上，而能耗、时间只有减压浓缩的 10%、20%。金唐慧等 [32] 以四逆汤水提液为模型，深入探究经反渗透浓缩后溶液的相关理化参数关系，发现渗透压与电导率、盐度以及总可溶性固体存在显著线性关系，反渗透浓缩液与原液特征图谱相似度高达 0.968。严滨等 [33] 以中药鼻炎康提取液、复方珍珠暗疮提取液和维 C 银翘提取液为研究对象，通过分析膜浓缩中间过程参数，水分去除率及成分保留率，考察反渗透膜浓缩中药复方提取液的可行性，结果表明反渗透膜浓缩过程平均膜通量在 14 L/（m^2 • h），可去除中药提取液 60% 以上的水分，有效成分保留率在 90% 以上。宋晓燕等 [34] 将反渗透浓缩与真空蒸发浓缩进行对比，结果发现：物料浓缩至相对密度达 1.03 时，反渗透膜浓缩的耗能是真空蒸发浓缩的 50%，耗时是真空蒸发浓缩的 70%；同时经反渗透膜浓缩后，丹酚酸 B 保留量约为真空蒸发浓缩的 1.5 倍。上述研究结果表明，在时效、能耗及成分保留方面，反渗透膜技术表现出较好的优势性。

邝洁容等 [35] 采用超滤 - 反渗透联用技术浓缩糖肾康水提液，为了提高后期反渗透浓缩效率，降低膜污染，首先采用 200 nm 超滤膜除去颗粒性杂质，50 kDa 超滤膜除去大分子物质，再运用反渗透膜去除提取液中水分，通过谱效分析以及药毒性评价说明超滤和反渗透联用技术可以有效富集效应成分，保证药效。张刘红等 [36] 探究超滤预处理对反渗透浓缩效率的影响，结果表明浓缩 4 h 后，经超滤预处理的药液浓缩倍数为 3.2 倍，通量衰减了 67.64%；未经超滤预处理的药液浓缩倍数为 1.6 倍，通量衰减了 85.35%，利用高效液相色谱特征图谱评级处理前后黄芩水提液中主要化学组成的变化，各试液相似度均＞ 0.99，进一步说明了膜集成在扩宽浓缩倍数方面的优势性。

1.3 膜蒸馏及其集成技术应用

膜蒸馏是一种采用疏水微孔膜为分隔介质，以膜两侧蒸汽压力差为传质传热驱动力的分离过程。该过程可以看作是膜分离与膜蒸馏过程的集合。膜蒸馏技术 [37] 在 1963 年被首次提出，其操作设备简单、浓缩过程温度低、脱盐率高，并且能够得到高纯度的蒸馏液，适用于高渗透压物料的浓缩，因此，广泛应用于海水淡化、苦咸水脱盐、废水处理、热敏性化学物质浓缩和回收、食品、中药提取液浓缩 [38] 等。

蔡宇等 [39] 采用真空膜蒸馏技术对益母草提取液进行浓缩，结果表明，益母草溶液质量比从 3% 提升至 10% 的过程中，透过液中益母草有效成分含量为 0，表明膜蒸馏法可以在不损失

有效成分的基础上达到浓缩目的。采用同法浓缩赤芍提取液也得到较为相似的结果[40]，进一步体现了膜蒸馏应用于浓缩过程在成分保留方面的优势；同时还探讨了影响膜蒸馏浓缩效率的因素，即在膜蒸馏过程中，温度、真空度越高，则浓缩效率越高，在一定范围内增大流速对提高浓缩效率也有利。粘立军等[41]选取处方前胡、薄荷、杏仁等 9 味中药材混合水提液进行多效膜蒸馏浓缩试验，将中药提取液质量浓度浓缩至 16 倍时，造水比及膜通量仍可达 5 ～ 5.55 和 1.6 L/（m^2 • h），并且节能效果相当于六效蒸发器。同时通过膜组件稳定性试验结果表明 30 d 内膜组件性能稳定，造水比仍可保持在 7.0 ～ 7.5，显示了良好的长期操作稳定性。另有学者采用微滤 - 膜蒸馏联用技术浓缩上述 9 味中药混合提取液，着眼于分析不同浓缩比条件下浓缩液中成分的含量变化，结果表明，浓缩比为 12 时，有效成分保留率为 88% ～ 91%；浓缩比为 16 时，有效成分保留率为 86% ～ 89%[42]。石飞燕等[43]运用真空膜蒸馏技术浓缩黄芩提取液，结果表明，随着进料温度、真空度以及体积流量的增大，膜通量增加；而体积流量增加会引起膜压力增大，进一步增加膜润湿性而导致截留率下降。而在进料温度为 59 ℃，真空度为 94 ～ 95 kPa，料液体积流量为 1.0 ～ 1.2 L • min^{-1} 时，黄芩苷截留率可达 100%，表明真空膜蒸馏法用于黄芩提取液浓缩效果显著，具有较好的应用前景。

2 膜技术在中药浓缩应用中的问题分析

2.1 膜技术应用于中药浓缩的主要问题及对策

膜污染是制约膜技术在中药浓缩领域深入发展的关键性问题。在膜浓缩过程中，中药物料的微粒、胶体粒子及溶质分子与膜之间存在机械或化学作用，从而引起对膜表面及膜孔的吸附或沉积，导致膜孔变小或堵塞，增加浓缩时摩擦阻力，降低膜渗透通量，导致浓缩效率下降以及浓缩倍数受限。探究膜污染产生的原因需要将物料性质与渗透过程原理相结合，中药提取液中包含几十种或上百种小分子成分以及生物高分子物质，其中非药效共性高分子物质不仅导致膜污染，同时还会与小分子药效物质之间产生包裹、缠结、吸附等作用，影响小分子药效成分的透过[44]。目前主要通过模拟中药溶液环境对膜浓缩中间过程污染情况进行研究，但不同中药体系存在成分性质差异，故在膜过程中不仅需要对共性物质进行考察，还需要探究成分之间的相互作用而引起的污染问题。膜材料自身特性也是影响膜污染的原因之一[45]，不同膜材料与中药物质的相互作用存在较大差异，可通过完善不同膜材料应用于中药浓缩过程的相关参数、过程模型、作用机制，筛选最佳膜材料及操作条件；可同时尝试进行膜改性，针对中药高分子物质特性，增强基底膜亲水或疏水性、利用化学合成改变膜表面电荷或在膜表面引入功能基团与侧链，从改性膜表面化学性质及膜孔微观结构表征出发，开发具有抗污染性能好，通量高的中药浓缩专用膜。对于膜浓缩过程中存在的浓差极化问题，更多研究方法在于非可视化的膜参数表征（包括渗透通量、跨膜压力、经验模型、截留效能等）反映浓差极化程度。而在浓差极化的可视化表征基础上，应用计算机准确模拟发展过程，进一步分析浓差极化特征参数与影响因素[46]，可以更好地探索膜过程浓差极化行为的影响规律，对控制膜污染有重要意义。

中药膜浓缩技术推广滞缓的原因还在于缺少相关基础参数的支撑及应用的长期适用性考察，例如不同中药提取液浓缩终点的确定及浓缩程度评价指标、单位或复方中药水提液在浓缩过程中固含及各有效成分的动态损失率、中药浓缩液的基本性质参数及生物活性评价、中药膜浓缩过程能耗数据的采集、膜蒸馏技术的能源耦合稳定性等，故通过聚焦中药膜浓缩技术的适宜性基础研究，延伸至探究膜技术在中药浓缩领域应用的可持续性，为推动中药膜浓缩技术产业化发展提供更多有力支持。

2.2 膜集成技术是提高膜浓缩效率的有效途径

膜集成是多个膜或膜与非膜技术之间的联用[47]。中药水提液是由无机盐、胶体等悬浮物和溶解性有机物所组成的复杂体系，单一膜技术在浓缩药液过程中存在一定原理性缺陷，如纳滤、反渗透浓缩由于高渗透压的限制，很难一步浓缩至传统蒸发法所达到的浓度，故浓缩倍数受限；膜蒸馏过程中存在膜通量不稳定，通量衰减快等自身缺陷。膜集成技术的提出，是为了更高效地利用膜的优点来进行相关物质的分离、浓缩，提高浓缩过程处理效率，降低膜污染，维持膜通量，延长膜清洗周期、寿命。各膜技术之间的集成优势如表 1 所示，通过取长补短，科学联用，优化膜技术在浓缩领域的应用。

例如超滤 - 纳滤 - 反渗透集成优势在于尽管超滤可以去除大分子有机物质和胶质物质，但无法达到纳滤膜去除无机离子、预防结垢的能力，而反渗透浓缩可以进一步扩宽纳滤膜浓缩比

范围，使物料达到最佳浓缩效果。张赛男等[50]对玫瑰茄浸提液进行超滤分离提纯，纳滤、反渗透浓缩，分析果胶截留率、色素透过率以及膜通量等指标，确定了加工玫瑰茄花青素的最佳膜集成组件的组合，即 UH100 超滤膜与 NS027 纳滤膜联用，在压力 0.4 MPa、1.5 MPa，操作温度 30 ～ 35 ℃、40 ℃时产品得率高，并且纯化物中花青素含量可达 32.7 mg • g^{-1}（干粉重），为生产高纯度的玫瑰茄色素产品提供了一个较好的方法。袁亮等[51]采用微滤 - 超滤 - 纳滤多级膜浓缩黄芩苷提取液，当提取液浓缩比达 2.4 时，有效成分保留率为 96%，水分去除率为 55% 以上，展现了多级膜集成技术应用于黄芩苷提取液浓缩的可行性。在增加料液浓缩倍数的问题上将膜技术与传统浓缩技术相集成，可以极大缩短药液的受热时间，保证中药药效成分的稳定，同时改善传统浓缩耗能高的问题。

表 1 膜集成的优势性

Tab 1 Advantage of membrane integration

膜集成组件	集成优势
UF-NF	UF 常用于 NF 浓缩样品前处理，能缓解膜通量的衰减速率，降低膜系统的污染，提高纳滤浓缩效率
UF-RO	利用 UF 去除中药水提液中低药效高分子物质，以减轻 RO 浓缩过程中膜污染现象，RO 污染膜再生能力强，再清洗后通量几乎可以完全恢复
NF-RO[48]	NF 可以去除无机离子、预防结垢，与 RO 集成可以减轻浓缩过程中通量下降快的问题，提高浓缩效率；RO 可以进一步加压，扩宽料液浓缩比
RO-MD	RO 的高透水速率与 MD 的高浓度物料浓缩特性相结合具有一定优势
FO-MD[49]	将 FO 与 MD 相结合，能有效地解决 MD 膜污染及膜孔润湿问题，强化膜蒸馏性能

3 结语与展望

将新技术应用于中药制药过程成为中药现代化发展的关键。国家药品监督管理局于 2020 年 12 月发布了《关于促进中药传承创新发展的实施意见》，指出要“促进中药守正创新，支持运用符合中药产品特点的新技术、新工艺”。而膜技术在中药浓缩中的应用正是多学科融合、新技术运用的展现，其绿色、节能、高效的特点使膜技术在中药领域中的应用具有特殊优势。

膜污染是阻碍膜浓缩技术在中药制药过程中深入应用的关键问题之一。料液预处理、膜工艺参数调控、膜装备结构优化、耐污染特种膜开发、膜集成技术应用等均是降低膜污染的有效措施。通过针对膜系统的科学设计与合理优化，进一步提高膜技术的应用效果，膜技术将会在中药浓缩方面发挥更大的作用，有利于提升中药制药技术水平，提高中药产品质量。

参考文献

[1] 刘明言，余根，王红 . 中药提取液浓缩新工艺和新技术进展 [J]. 中国中药杂志，2006，31（3）：184-187.

[2] 钟文蔚，黎万钰，丁菲，等 . 基于中药水提液浓缩过程溶液环境特征参数相关性的瞬时能耗计算方法探索——以玉屏风散水提液为例 [J]. 中草药，2021，52（7）：1937-1944.

[3] Haas ICDS，Espindola JSD，de Liz GR，et al. Gravitational assisted three-stage block freeze concentration process for producing enriched concentrated orange juice（*Citrus sinensis* L.）：multi-elemental profiling and polyphenolic bioactives [J]. J Food Eng，2022，315：110802.

[4] 郭维图 . 膜分离技术在中药提取液浓缩中的应用 [J]. 机电信息，2007，161（23）：8-15.

[5] Koop BL，Knapp MA，Di Luccio M，et al. Bioactive compounds from Jambolan（*Syzygium cumini*（L.））extract concentrated by ultra-and nanofiltration：a potential natural antioxidant for food [J]. Plant Foods Hum Nutr，2021，76（1）：90-97.

[6] 陈翠仙 . 膜分离 [M]. 北京：化学工业出版社，2017：56.

[7] Lin D，Liang H，Li G. Factors affecting the removal of bromate and bromide in water by nanofiltration [J]. Environ Sci Pollut Res Int，2020，27（20）：24639-24649.

[8] Macedo A，Monteiro J，Duarte E. A contribution for the valorisation of sheep and goat cheese whey through nanofiltration [J]. Membranes，2018，8（144）：1-17.

[9] Li C，Ma Y，Li H，et al. Exploring the nanofiltration mass transfer characteristic and concentrate process of procyanidins from grape juice [J]. Food Sci Nutr，2019，7（5）：1-7.

[10] Arend GD，Adorno WT，Rezzadori K，et al. Concentration of phenolic compounds from strawberry（Fragaria X ananassa Duch）juice by nanofiltration membrane [J]. J Food Eng，2017，201：36-41.

[11] Arriola NA，Santos GD，Prudêncio ES，et al. Potential of nanofiltration for the concentration of bioactive compounds from watermelon juice [J]. Int J Food Sci Technol，2014，49（9）：1-9.

[12] 伍永富，朱河澄，冯天炯，等 . 板蓝根水提液纳滤浓缩工艺研究 [J]. 中国药业，2017，26（14）：4-6.

[13] 唐永范，刘振青，郎葆，等 . 一种枸杞活性成分提取物的制备方法：CN99124189.4 A [P]. 2001-06-06.

[14] 李存玉，马赟，吴晨曦，等 . 响应面分析法优化金银花的纳滤浓缩工艺 [J]. 中药材，2017，40（6）：1389-1392.

[15] 李存玉，马赟，刘奕洲，等 . Box-Behnke 响应面法优化川芎水提液纳滤工艺 [J]. 中成药，2017，39（2）：296-300.

[16] 李存玉，马赟，黄顺发，等 . 响应曲面法优化纳滤浓缩延胡索水提液的工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2016，27（11）：2641-2644.

[17] 时浩，李存玉，瞿其扬，等 . 丹参水提液的纳滤浓缩工艺考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（17）：43-45.
[18] 张可人，钟源，赵梦姣，等 . 超滤 - 纳滤技术纯化、浓缩古汉养生精提取液的工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2019，30（4）：874-876.
[19] 陈亚军，姜苏，辛晓娜，等 . 纳滤 - 超滤联用技术优化新生化口服液制备工艺 [J]. 中成药，2017，39（6）：1297-1300.
[20] 闫治攀，武瑞洁 . 超滤膜分离技术在中药制剂生产中的应用进展 [J]. 中成药，2018，40（7）：1571-1575.
[21] 鄢忠森，瞿芳，梁恒，等 . 超滤膜污染以及膜前预处理技术研究进展 [J]. 膜科学与技术，2014，34（4）：108-114，127.
[22] 陈骁鹏，吴芸，叶慧 . 超滤 - 纳滤联用技术优化山萸肉中马钱苷浓缩工艺 [J]. 国际中医中药杂志，2021，43（4）：363-368.
[23] 宋晓春，王继龙，魏舒畅，等 . 超滤 - 纳滤集成技术纯化、浓缩当归水提取液的工艺考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（3）：13-15.
[24] 骆灵敏，郑敏霞 . 超滤 - 纳滤联合用于川贝母生物碱的浓缩工艺 [J]. 实用药物与临床，2019，22（1）：60-64.
[25] 李存玉，马赟，刘奕洲，等 . 超滤 - 纳滤联用优化益母草生物碱的浓缩工艺 [J]. 中国中药杂志，2017，42（1）：100-106.
[26] Alonso JJS，El Kori N，Melián-Martel N，et al. Removal of ciprofloxacin from seawater by reverse osmosis [J]. J Environ Manage，2018，217：337-345.
[27] 徐绍东，安占强，张志岭 . 反渗透制取纯水技术 [J]. 中国氯碱，2008（2）：30-32.
[28] Zheng T，Qiu Z，Dai Q，et al. Study of biogas slurry concentrated by reverse osmosis system：characteristics，optimization，and mechanism [J]. Water Environ Res，2019，91（11）：1447-1454.
[29] Lauzin A，Pouliot Y，Britten M. Understanding the differences in cheese-making properties between reverse osmosis and ultrafiltration concentrates [J]. J Dairy Sci，2020，103（1）：201-209.
[30] Gunathilake KDPP，Li JY，Rupasinghe HPV. Reverse osmosis as a potential technique to improve antioxidant properties of fruit juices used for functional beverages [J]. Food Chem，2014，148：335-341.
[31] 叶勇，张永波 . 复方中药膜分离工艺和节能性研究 [J]. 时珍国医国药，2008，19（8）：1884-1885.
[32] 金唐慧，张刘红，朱华旭，等 . 反渗透浓缩对四逆汤物料体系理化参数的影响及其相关性研究 [J]. 中国中药杂志，2014，39（8）：1421-1425.
[33] 严滨，林丽华，叶茜，等 . 反渗透技术在鼻炎康等中药提取液浓缩中的应用 [J]. 膜科学与技术，2012，32（4）：70-79.
[34] 宋晓燕，罗爱勤，刘洁瑜，等 . 肾石通颗粒提取浓缩工艺和节能性研究 [J]. 中国执业药师，2013，10（7）：28-31.
[35] 邝洁容，陈伯丛 . 超滤 - 反渗透结合谱效分析法纯化浓缩糖肾康颗粒提取液的工艺评价与验证 [J]. 广州中医药大学学报，2018，35（3）：501-506.
[36] 张刘红，钱余义，刘静，等 . 超滤 - 反渗透集成工艺浓缩黄芩水提液的可行性 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（23）：1-5.
[37] Lawson KW，Lloyd DR. Membrane distillation. II. Direct contact MD [J]. J Membr Sci，1996，120：123-133.
[38] 潘林梅，石飞燕，郭立玮 . 基于膜蒸馏的中药水提液浓缩技术应用前景及问题探讨 [J]. 南京中医药大学学报，2014，30（1）：97-100.
[39] 蔡宇，陈冰冰，高增梁 . 益母草提取液真空膜蒸馏浓缩试验研究 [J]. 浙江化工，2003，34（8）：5-7.
[40] 李建梅，王树源，徐志康，等 . 真空膜蒸馏法浓缩益母草及赤芍提取液的实验研究 [J]. 中成药，2004，26（5）：423-424.
[41] 粘立军，韩月芝，陆莹莹，等 . 多效膜蒸馏技术在中药提取液浓缩中的应用研究 [J]. 中国医药工业杂志，2013，44（1）：76-80.
[42] 张恭孝，杨荣华，孟宪锋 . 微滤 - 膜蒸馏技术浓缩中药提取液的生产工艺 [J]. 山东化工，2018，47（6）：28-31.
[43] 石飞燕，李博，潘林梅，等 . 真空膜蒸馏法浓缩黄芩提取液的工艺研究 [J]. 中成药，2015，37（1）：95-99.
[44] 宋宏臣，王建明，郭立玮 . 基于中药 “非药效共性高分子物质” 分子结构解析的膜材料设计与膜过程优化机制及方法探索 [J]. 中国中药杂志，2019，44（18）：4060-4066.
[45] 刘忠洲，张国俊，纪树兰 . 研究浓差极化和膜污染过程的方法与策略 [J]. 膜科学与技术，2006，26（5）：1-15.
[46] 尚文涛 . 纳滤过程浓差极化行为特征与 LIF-PIV 可视化表征研究 [D]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2017.
[47] 潘林梅，李博，郭立玮，等 . 基于膜及其集成过程的中药 “绿色浓缩” 技术研究进展、关键科学问题与对策 [J]. 中草药，2019，50（8）：1768-1775.
[48] Talaeipour M，Nouri J，Hassani AH，et al. An investigation of desalination by nanofiltration，reverse osmosis and integrated（hybrid NF/RO）membranes employed in brackish water treatment [J]. J Environ Health Sci Eng，2017，15：1-9.
[49] 龙婉晓 . 高性能正渗透 - 膜蒸馏耦合技术处理高盐废水的研究 [D]. 湘潭：湘潭大学，2017.
[50] 张赛男，李林福，陈毅勇 . 超滤、纳滤膜技术分离浓缩玫瑰茄花青素研究 [J]. 食品工业科技，2015，36（23）：143-151.
[51] 袁亮，周显宏，肖凯军，等 . 多级膜浓缩黄芩苷提取液的研究 [J]. 现代食品科技，2008，24（3）：237-240.

（收稿日期：2021-09-05；修回日期：2021-11-02）

药物分析与检验

保肾片超高效液相色谱指纹图谱的建立及化学模式识别分析

陆鉴，李金慈，盛华，唐安福，苏华，汤浩*（东部战区总医院药剂科，南京 210002）

摘要：目的 建立保肾片超高效液相色谱（UPLC）指纹图谱，结合聚类分析（CA）和偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18}（2.7 μm, 4.6 mm×50 mm）型色谱柱，以甲醇 -0.2% 冰醋酸水溶液进行梯度洗脱，流速 0.8 mL·min^{-1}，检测波长 260 nm，柱温 30 ℃，建立 16 批保肾片的 UPLC 指纹图谱并进行共有模式和相似度评价。采用 SPSS 进行 CA 分析、SIMCA 软件进行 OPLS-DA 分析，对其进行整体质量评价。**结果** 建立了保肾片的 UPLC 指纹图谱，确定了 12 个共有峰，通过对照品比对指认出 5 个成分，分别为 1 号峰没食子酸、9 号峰芦荟大黄素、10 号峰大黄素、11 号峰大黄酚、12 号峰大黄素甲醚。16 批保肾片相似度为 0.860 ～ 0.997，CA 分析发现样品聚成两类，表明不同批次的保肾片尚存在一定差异，通过 OPLS-DA 得出批次间显著性差异成分为 11 号峰、4 号峰和 3 号峰。**结论** 建立的保肾片指纹图谱和化学模式识别方法稳定可靠、简便易行、高效快速，可更加全面系统地提供保肾片化学成分信息，为综合评价制剂质量的稳定性和均一性提供参考。

关键词：保肾片；超高效液相色谱；指纹图谱；相似度分析；化学模式识别；质量控制
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0394-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.027

UPLC fingerprints and recognition of chemical patterns of Baoshen tablets

LU Yin, LI Jin-ci, SHENG Hua, TANG An-fu, SU Hua, TANG Hao* (*Department of Pharmacy*, *General Hospital of Eastern Theater Command*, *Nanjing* 210002)

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprints and chemical pattern recognition model of Baoshen tablets. **Methods** The chromatographic separation was conducted on an Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} (2.7 μm, 4.6 mm×50 mm) column at 30 ℃ by gradient elution with methanol-0.2% acetic acid solution as the mobile phase at 0.8 mL·min^{-1}. The similarity of the 16 batches Baoshen tablets fingerprints, the cluster analysis (A) and partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed by the corresponding softwares respectively. **Results** The UPLC fingerprints of Baoshen tablets were established. Twelve common peaks were marked in the fingerprint, and five of them were identified as gallic acid (peak 1), aloe-emodin (peak 9), emodin (peak 10), chrysophanol (peak 11) and physcion (peak 12). The similarity of the 16 batches of samples was 0.860 ～ 0.997, indicating difference in different batches of Baoshen tablets. The samples were clustered into 2 groups by CA, and the main different components were peak 11, peak 4 and peak 3 screened by OPLS-DA. **Conclusion** The UPLC fingerprint and chemical pattern recognition are stable, efficient and rapid, which can provide comprehensive and systematic chemical information of Baoshen tablets the quality control and overall evaluation.

Key words: Baoshen tablet; UPLC; fingerprint; similarity analysis; chemical pattern recognition; quality control

基金项目：军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题（编号：14ZJZ08）。
作者简介：陆鉴，男，硕士，主管药师，主要从事药物分析研究，email：fzz19821201@sohu.com *通信作者：汤浩，男，硕士，副主任药师，主要从事中药制剂新技术研究，email：tang_hao0518@ sina.com

保肾片是由蓼科植物大黄经醇提和水提等一系列工艺制成的中药制剂，为东部战区总医院肾脏科的常用制剂，在临床用药中占据重要地位。该药具有升清消浊、调节代谢的作用，通过缓解“残余肾”的高代谢状态、影响氮质代谢及肾系膜细胞增殖和功能而发挥保护肾功能的作用，临床主要用于慢性肾功能不全氮质血症期的治疗[1]。保肾片现有质量标准是采用薄层色谱法对制剂中的大黄素进行鉴别，并结合高效液相色谱法对大黄酸、大黄素和大黄酚的总量进行测定[2]。然而，中药是以多组分、多靶点发挥作用的，对其中某一个或某几个指标成分的控制难以全面反映其整体质量[3-4]。

中药多为复杂的化学成分群，采收、加工、生产等各个环节均会对质量产生影响，而中药质量直接影响其临床疗效和用药安全。如何对复杂的中药体系进行合理的质量控制，始终是中药现代化发展过程中的热点与难点问题。中医治疗疾病的理论精髓是整体观念和辨证论治，在尚不能明确中药全部药效物质的今天，应遵循中药的用药特点、基于中药整体物质群科学地建立其特色的、系统的质量评价方法[5]。中药指纹图谱实现了以现有分析技术为载体全面挖掘中药中的化学成分信息，目前在中药真伪鉴别、质量一致性评价等方面应用广泛，并已受到国内国际一致认可[6-8]。然而完全通过人为方式辨识指纹图谱的庞大数据信息是不可能且不客观的，因此常常将化学模式识别技术与指纹图谱相结合来进行多维数据的解析。因此，本研究采用超高效液相色谱法（UPLC）首次建立了本院制剂保肾片的指纹图谱，通过相似度评价对保肾片的质量稳定性进行整体评价，通过聚类分析（CA）和正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）寻找不同批次样品间的差异，为综合评价制剂质量、提升质控标准提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity Ⅱ 型 UPLC 仪，配备 G7117B DAD 检测器、OpenLAB CDS ChemStation 工作站（美国安捷伦科技公司）；AE240 型电子天平（梅特勒 - 托利多）；HH-4 型数显恒温水浴锅（国华电器有限公司）；GM-0.33A 型真空泵、0.45 μm 针头过滤器（天津津腾科技有限公司）。

1.2 试药

没食子酸（批号：110831-201204，含量：89.9%）、大黄素（批号：110756-201512，含量：98.7%）、大黄酚（批号：110796-201621，含量：99.2%）、大黄素甲醚（批号：110758-201013，含量：99.8%）、芦荟大黄素（批号：110795-201308，含量：98.0%）（对照品，中国食品药品检定研究院）；甲醇为色谱纯（美国 Tedia 公司），冰醋酸为分析纯（上海申博化工有限公司），超纯水为实验室自制。16 批保肾片（规格：0.3 g/片自制，编号 S1 ～ S16，批号分别为 20200116、20200224、20200325、20200420、20200514、20200602、20200611、20200626、20200710、20200805、20200901、20200925、20201015、20201029、20201117、20201216），各批次制剂所用饮片来源见表 1。

表 1 原料饮片样品信息

Tab 1 Information of raw herbal materials

编号	厂家	批号	基源	产地
S1	华云药业	190901	药用大黄	青海
S2	华云药业	190901	药用大黄	青海
S3	华云药业	191001	药用大黄	青海
S4	华云药业	191001	药用大黄	青海
S5	华云药业	191001	药用大黄	青海
S6	华云药业	191201	药用大黄	青海
S7	华云药业	191201	药用大黄	青海
S8	华云药业	191201	药用大黄	青海
S9	华云药业	191201	药用大黄	青海
S10	华云药业	191201	药用大黄	青海
S11	北川华宁	200706	药用大黄	甘肃
S12	北川华宁	200706	药用大黄	甘肃
S13	北川华宁	200706	药用大黄	甘肃
S14	北川华宁	200706	药用大黄	甘肃
S15	南京鹤龄	191101	唐古特大黄	青海
S16	南京鹤龄	191101	唐古特大黄	青海

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Poroshell 120 EC-C_{18}（2.7 μm，4.6 mm×50 mm）；流动相：甲醇（A）-0.2% 冰醋酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 6.0 min，6% ～ 20%A；6.0 ～ 15.0 min，20% ～ 40%A；15.0 ～ 28.0 min，40% ～ 60%A；28.0 ～ 33.0 min，60%A；33.0 ～ 36.0 min，60% ～ 100%A；36.0 ～ 39.0 min，100%A）；流速 0.8 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 1 μL；检测波长 260 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取本品 20 片，去薄膜衣，研细，精密称取 0.5 g 置圆底烧瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，水浴加热回流 1 h，取

出放冷，再次称定质量，甲醇补足减失质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取没食子酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量，置于量瓶中，加甲醇溶解并定容，制成含没食子酸 50.55 μg·mL^{-1}、芦荟大黄素 51.30 μg·mL^{-1}、大黄素 51.75 μg·mL^{-1}、大黄酚 59.55 μg·mL^{-1}、大黄素甲醚 68.40 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，4 ℃储存备用。

2.3 *方法学考察*

2.3.1 精密度试验 取 S1 号样品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，以峰面积较大、分离度较好的 3 号峰为参照，结果 12 个共有峰相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.11%、相对峰面积 *RSD* 为 2.3% ～ 2.8%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取 S1 号样品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样分析，记录色谱图。以 3 号峰的保留时间和峰面积为参照，结果 12 个共有峰相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.20%、相对峰面积 *RSD* 为 1.8% ～ 2.4%，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取 S1 号样品 6 份，按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液，进样分析，记录色谱图，以 3 号峰为参照，结果 12 个共有峰相对保留时间 *RSD* 为 0.011% ～ 0.18%、相对峰面积 *RSD* 为 0.87% ～ 1.1%，表明方法重复性良好。

2.4 *指纹图谱的建立及分析*

分别取 S1 ～ S16 号保肾片，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，进样分析。采用“中药指纹图谱相似度评价系统（2012A 版）”软件进行色谱图数据的分析处理，以 S1 号样品图谱为参照，时间窗宽度设为 0.1 s，采用中位数法生成对照图谱 R，经多点校正后全谱峰匹配建立指纹图谱，结果见图 1。共确定了 12 个共有峰，共有峰峰面积之和占色谱图总峰面积的 81.11%，符合要求。取“2.2.2”项下对照品溶液进样分析，根据保留时间和紫外吸收光谱进行对比，指认出 12 个共有峰中的 5 个，分别为 1 号峰（没食子酸）、9 号峰（芦荟大黄素）、10 号峰（大黄素）、11 号峰（大黄酚）、12 号峰（大黄素甲醚），见图 2。

根据“中药指纹图谱相似度评价系统（2012A 版）”计算得出 S1 ～ S16 号保肾片样品与对照指纹图谱的相似度在 0.860 ～ 0.997，具体结果见表 2，其中 14 批样品的相似度均大于 0.9，表明

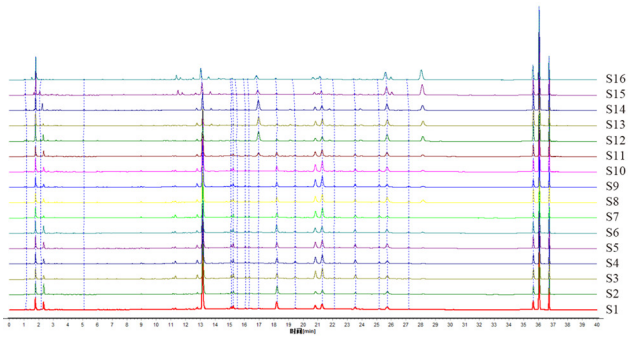


图 1 16 批保肾片的 UPLC 指纹图谱

Fig 1 UPLC fingerprints of 16 batches of Baoshen tablets

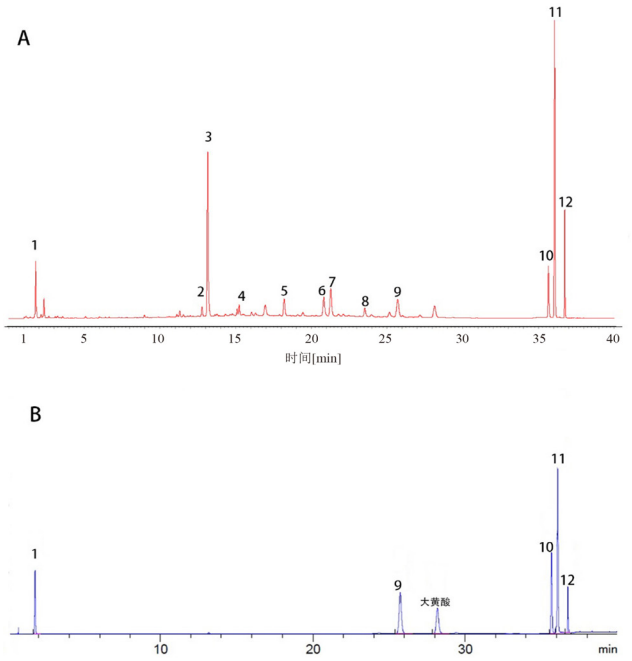


图 2 混合对照品色谱图（A）与对照图谱 R（B）

Fig 2 UPLC chromatogram of mixed reference substances（A）and control fingerprint R（B）

1. 没食子酸（gallic acid）；9. 芦荟大黄素（aloe-emodin）；10. 大黄素（emodin）；11. 大黄酚（chrysophanol）；12. 大黄素甲醚（physcion）

不同批次保肾片相似度较高，制剂工艺较稳定。S15、S16 两批保肾片的相似度相对较低，可能与原料药材不同有关。

表 2 16 批保肾片相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 16 batches of Baoshen tablets

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.964	S9	0.952
S2	0.965	S10	0.988
S3	0.973	S11	0.997
S4	0.969	S12	0.919
S5	0.988	S13	0.928
S6	0.989	S14	0.904
S7	0.922	S15	0.867
S8	0.993	S16	0.860

以 3 号峰为参照峰（S 峰），计算 16 批样品中

各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果各批样品的相对保留时间 *RSD* 为 0.060% ～ 0.65%，波动极小，但相对峰面积 *RSD* 为 14% ～ 110%，波动较大，表明不同批次保肾片中共有成分的含量存在差异。

2.5　化学模式识别分析

2.5.1　CA　以共有峰峰面积与样品取样量的比值作为变量建立数据矩阵，导入 SPSS 25.0 统计软件，以平方欧氏距离为度量标准，采用组间联接法进行系统聚类，结果见图 3。由树状图可知，类间距为 5 ～ 10 时样品可分为两类，第一类样品为 S1 ～ S10，相似度均大于 0.99，第二类样品为 S11 ～ S16，相似度相差较大，说明 16 批保肾片整体质量基本稳定，但因原料饮片来源不同导致各批次制剂的共有成分存在差异。

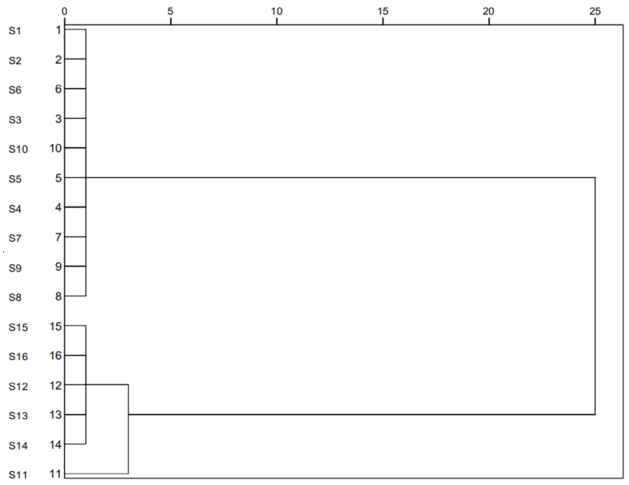


图 3　16 批保肾片的 CA 结果

Fig 3　Cluster analysis of 16 batches of Baoshen tablets

2.5.2　OPLS-DA　由上述 CA 分析和相似度分析结果可知，不同批次保肾片样品之间存在一定差异。为了进一步明确 16 批保肾片之间的差异，将“2.5.1”项下数据矩阵导入 Simca-P14.1 多元统计软件，对样品共有峰聚类所得的两大类进行 OPLS-DA 分析。由图 4 可知，样品分组区分良好，当提取 2 个主成分时，模型主成分回归系数为：RX^2 = 0.893，RY^2 = 0.998，Q^2 = 0.994，均高于 0.5，且差距小于 0.2，说明所建模型有效，且有较高的稳定性和预测能力。由载荷图（见图 5）可看出 11 号、4 号和 3 号色谱峰距离中心的离散程度较高，说明这几种成分对保肾片制剂的质量稳定性影响较大。变量重要性投影值（variable importance in projection，VIP）可直观反映各变量对模型分类的整体贡献度，当 VIP ＞ 1.0 时表明该色谱峰为具有统计学意义的差异标志物。由图 6 可知，VIP 值大于 1.0 者为峰 11（VIP ＝ 2.1746）、峰 4（VIP ＝ 2.0980）、峰 3（VIP ＝ 1.1045），提示这 3 种成分对不同批次保肾片的质量一致性具有显著影响，在生产过程的质量控制中可重点关注它们的变化情况。

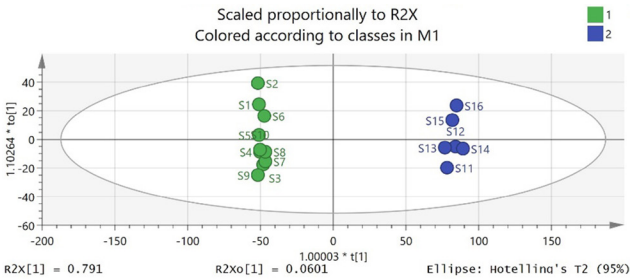


图 4　16 批保肾片 OPLS-DA 得分图

Fig 4　OPLS-DA score plot of 16 batches of Baoshen tablets

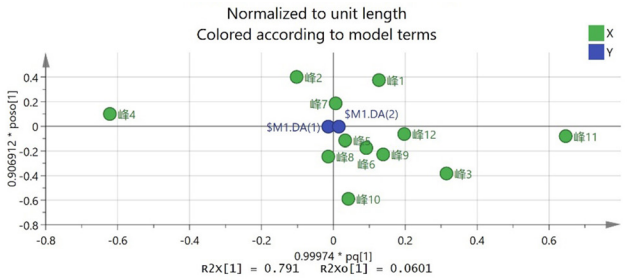


图 5　16 批保肾片 OPLS-DA 载荷图

Fig 5　OPLS-DA loading plot of 16 batches of Baoshen tablets

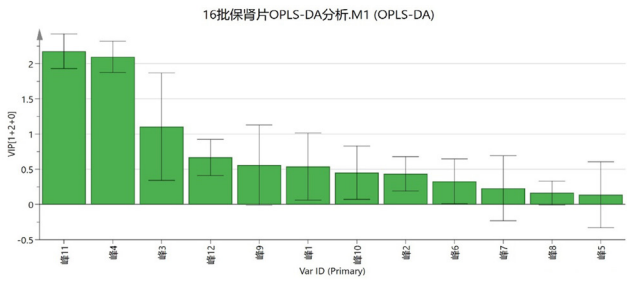


图 6　16 批保肾片 OPLS-DA 变量重要性投影图

Fig 6　OPLS-DA VIP plot of 16 batches of Baoshen tablets

2.6　指标成分含量测定

按文献方法 [2] 对 16 批样品中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量进行测定，结果见表 3 和图 7。由结果可看出，各批次样品中大黄酸的含量差异较大，其余两种成分的含量存在波动，结果与 OPLS-DA 相一致，这可能是原料饮片厂家更换所导致。

3　讨论

本研究采用 UPLC 建立保肾片的指纹图谱，与普通液相色谱法相比，具有分离度更高，检测更灵敏，分离时间更短的优势 [9]。在文献研究基础上 [10-11]，以色谱图的出峰数和峰面积为指标，对保肾片的提取条件（提取溶剂、提取方法、回流时间）进行了考察，结果显示以甲醇为溶剂水浴加热回流

表 3 保肾片中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量测定结果 (mg/ 片)

Tab 3 Content of rhein，emodin and chrysophanol in Baoshen tablets (mg/slice)

编号	大黄酸	大黄素	大黄酚	3 种成分总量
S1	0.07	0.99	4.06	5.12
S2	0.08	0.92	3.82	4.82
S3	0.09	1.07	4.18	5.35
S4	0.09	1.07	4.10	5.26
S5	0.07	1.24	5.66	6.98
S6	0.14	1.06	4.61	5.81
S7	0.05	0.59	2.48	3.12
S8	0.14	1.06	4.61	5.81
S9	0.19	0.82	3.18	4.18
S10	0.30	1.15	5.05	6.49
S11	0.37	1.30	5.23	6.90
S12	1.01	1.67	5.77	8.45
S13	1.20	1.99	5.69	8.88
S14	1.09	1.82	6.13	9.04
S15	2.21	1.56	4.80	8.58
S16	2.18	1.47	4.70	8.34

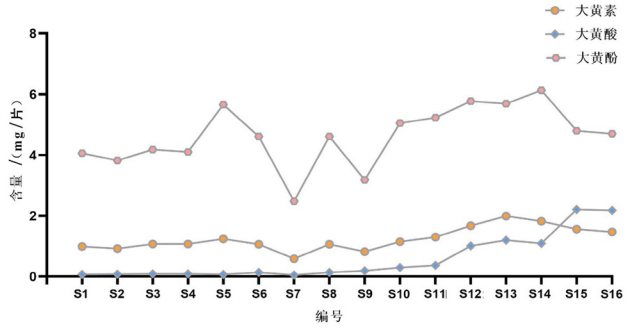


图 7 指标成分含量测定折线图

Fig 7 Content determination of index components

1 h 所获得的供试品溶液色谱峰最多且响应值较高。通过调整流动相的组成和洗脱梯度，比较不同流速（0.8、1.0、1.2 mL • min^{-1}）、不同柱温（25、30、35 ℃）、不同波长（254、260、280 nm）条件下的分离分析效果，发现在本文色谱条件下所获得的色谱图基线更平稳、色谱峰信息更全面、峰形与分离度俱佳。

指纹图谱提供的信息庞大而复杂，需要采用合理的数据挖掘工具对其进一步解析，化学模式识别技术则可有效解决这一问题，具有良好的预测性和广泛的适用性 [12-13]。常用的化学模式识别方法分为聚类分析（CA）、主成分分析（PCA）等无监督模式识别和 OPLS-DA、线性判别分析等有监督模式识别两种，它们不仅可单独使用，还可结合在一起用于中药质量控制 [14]。本文将 CA 与 OPLS-DA 相结合用于保肾片指纹图谱数据挖掘。

本研究通过相似度分析发现 16 批保肾片指纹图谱相似度在 0.860 ～ 0.997，12 个共有峰的相对保留时间高度吻合（*RSD* 小于 0.65%），说明该制剂的指纹图谱稳定可靠。CA 发现 16 批保肾片可以分为两类，S1 ～ S10 聚为一类，S11 ～ S16 聚为一类，说明更换原料药材厂家对制剂质量的均一稳定性产生了一定的影响。为了明确差异所在，进一步采用 OPLS-DA 进行筛选，得到了峰 3、峰 4、峰 11 显著性差异成分 3 种，其中 11 号峰为大黄酸，3 号峰和 4 号峰未能与对照品比对，后期需通过质谱等技术进一步研究。通过对保肾片指标性成分进行含量测定，发现各批次样品中大黄酚的含量差异较大，这与 OPLS-DA 结果相一致。

大黄是一种典型的多基原、多产地药材，《中国药典》2020 年版中收载的正品大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. *ex* Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎。大黄对生长环境要求较为严苛，其生长过程中的温度、湿度、光照、遗传、土壤状态、采收时间等因素均会影响药材质量 [15]。已有研究表明药用大黄和唐古特大黄亲缘关系较近 [16]，指纹图谱 CA 和 PCA 均不能将其区分开，但指标成分含量测定结果显示唐古特大黄中游离型蒽醌与结合型蒽醌的总含量均高于其他大黄品种 [17]。本研究中发现保肾片制剂原料饮片更换后对制剂质量产生了一定的影响，大黄酸、大黄素、大黄酚总量均大于 3.0 mg/ 片，整体上符合当前质量标准的要求，但大黄酸的含量差异较大，S15、S16 的原料药材来源于唐古特大黄，大黄酸含量显著高于其他批次保肾片。由此可见现有的质量标准尚不能完全体现保肾片生产全过程的质量稳定性，若将含量测定与指纹图谱相结合，可更全面、客观地表征药物信息及工艺稳定性。

综上所述，本试验建立了保肾片的 UPLC 指纹图谱，分析方法稳定可靠、简便易行、高效快速，进一步结合 CA 和 OPLS-DA 对指纹图谱进行综合评价，可较全面地反映制剂的整体信息和特征信息，为保肾片制剂质量控制的改善和标准的提高提供了科学依据。

参考文献

[1] 苏全胜，翟金盛，林勇，等 . 保肾片治疗 160 例便秘患者的疗效观察 [J]. 医学研究所学报，2004，17（11）：989-990.

[2] 王曙东，乔立业，方李，等 . 保肾片的质量标准研究 [J]. 中国药师，2014，17（8）：1300-1302.

[3] 晏媛，许重远，刘世霆 . 中药及其制剂指纹图谱质量标准的研究 [J]. 医药导报，2005，24（12）：1160-1162.
[4] 潘丽，王峥涛，杨莉 . 中药质量标准研究的关键科学问题与相关前沿分析技术应用展望 [J]. 上海中医药杂志，2020，54（1）：14-20.
[5] 孙国祥，闫波，侯志飞，等 . 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（7）：673-681.
[6] 余一鸣，胡永慧，韩立云，等 . 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药，2017，48（12）：2557-2563.
[7] Zhang C，Zheng X，Ni H，et al. Discovery of quality control markers from traditional Chinese medicines by fingerprint-efficacy modeling：current status and future perspectives [J]. J Pharm Biomed Anal，2018，159：296-304.
[8] 刘东方，赵丽娜，李银峰，等 . 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药，2016，47（22）：4085-4094.
[9] 谭鹏，李春雨，章从恩，等 . 超高效液相色谱法在中药分析领域中的应用现状及展望 [J]. 中草药，2018，49（24）：5938-5945.
[10] 李丹丹，裴文菡，郭泰麟，等 . 不同道地来源大黄药材的多指标成分测定、指纹图谱研究及一致性评价 [J]. 中南药学，2020，18（4）：641-647.
[11] 李金慈，乔立业，江静怡，等 . 基于 UPLC 色谱指纹图谱及化学模式识别的新保肾片质量控制研究 [J]. 中国药师，2021，24（6）：1193-1197.
[12] 刘学仁，张莹，何光召 . 化学模式识别技术在药物分析中的应用于研究进展 [J]. 数理医药学杂志，2011，24（1）：101-104.
[13] 孙立丽，王萌，任晓亮 . 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药，2017，48（20）：4339-4345.
[14] 于洋，李军，李宝国 . 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药，2018，40（5）：1139-1142.
[15] 陈艳琰，唐于平，陈嘉倩，等 . 大黄资源化学研究进展与利用策略 [J]. 中草药，2018，49（21）：5170-5178.
[16] 李桢 . 不同品种大黄生物活性物质分析及其亲缘关系鉴定 [D]. 成都：西华大学，2016.
[17] 严辉，谢舒平，濮宗进，等 . 基于 UPLC-PDA 指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价大黄质量 [J]. 中草药，2020，51（18）：4755-4762.

（收稿日期：2021-07-29；修回日期：2021-10-26）

红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱相关性研究

毛小文[1]，祁梅[2]，顾志荣[2*]，马转霞[1]，葛斌[2*]，吕鑫[1]，张锐[1]（1. 甘肃中医药大学药学院，兰州 730000；2. 甘肃省人民医院药剂科，兰州 730000）

摘要：目的 采用 HPLC 法对红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的指纹图谱进行相关性研究，并考察四者之间化学成分的差异。**方法** 采用 Wondasil C_{18}-WR 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），以乙腈 -0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 280 nm，柱温 35 ℃，建立 15 批红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的指纹图谱。**结果** 15 批红芪饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮的平均含量略低于药材，配方颗粒中 4 种有效成分的平均含量略低于标准汤剂；15 批红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 指纹图谱确认了 13 个共有特征峰，并指认出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 4 种化学成分。**结论** 红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的主要化学成分基本相同；HPLC 指纹图谱反映了四者多成分的整体面貌，为红芪配方颗粒的质量控制提供了参考。

关键词：红芪；标准汤剂；配方颗粒；含量测定；指纹图谱
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0399-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.028

基金项目：甘肃省中医药管理局科研项目（No.GZK-2019-41）；甘肃省人民医院研发攻关项目（No.18GSSY2-3）；甘肃省人民医院青年科研项目（No.16GSSY7-2）。

作者简介：毛小文，男，硕士，主要从事中药炮制与制药工艺研究，email：mxw2418@163.com *通信作者：葛斌，男，主任药师，主要从事中药炮制与制药工艺研究，email：gjy0630@163.com；顾志荣，男，硕士，主管药师，主要从事中药炮制与制药工艺研究，email：guzr8817@163.com

Correlation of HPLC fingerprint of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix

MAO Xiao-wen[1], QI Mei[2], GU Zhi-rong[2*], MA Zhuan-xia[1], GE Bin[2*], LYU Xin[1], ZHANG Rui[1] (1. *College of Pharmacy*, *Gansu University of Chinese Medicine*, *Lanzhou* 730000; 2. *Gansu People's Hospital*, *Lanzhou* 730000)

Abstract: Objective To determine the correlation of fingerprint of raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and dispensing granules of Hedysari Radix by HPLC, and observe the difference of the main chemical components in different forms. **Methods** Wondasil C_{18}-WR column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used with mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution at 1.0 mL • min^{-1}, with detection wave of 280 nm, and temperature of 35 ℃. The HPLC fingerprint of 15 batches of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix were established. **Results** The average content of calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin and 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone in the 15 batches of decoction pieces were slightly lower than that of the raw herbs, and the average contents of the 4 active ingredients in the dispensing granules were slightly lower than that of the standard decoction. There were 13 common peaks in all the fingerprint of the 15 batches of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix, presenting a good correlation. Four out of the 13 common peaks were indentified calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin, and 7-hydroxy-4'-methoxy isoflavone. **Conclusion** The main chemical components of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix are basically the same. The HPLC fingerprint reflects the overall situation of components in different forms. It can provide the reference for the quality control of dispensing granules of Hedysari Radix.

Key words: Hedysari Radix; standard decoction; dispensing granule; content determination; fingerprint spectrum

红芪为豆科植物多序岩黄芪（*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.）的干燥根，味甘，性微温，归肺、脾经，有补气固表、利尿、排脓托毒、敛疮生肌等功效，临床上常用于治疗气虚乏力、中气下陷、表虚自汗、气虚水肿、痈疽难溃等症[1]。红芪为甘肃十大陇药之一，大面积栽培于陇南武都东南部山区地带。现代药理研究表明，红芪中含多糖、黄酮、皂苷等多种生物活性成分[2-3]，具有提高免疫力、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用[4-8]。

以符合炮制标准的红芪饮片为原料，通过现代提取、浓缩、喷雾干燥、制粒等技术制备成红芪配方颗粒。但由于缺乏有效的质量标准和监测能力，导致配方颗粒成分不清，质量参差不齐。《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求（征求意见稿）》于 2019 年由国家药监局发布，该要求提出了“标准汤剂”这一概念，作为衡量中药免煎剂是否与临床汤剂基本一致的标准，并指出药材、饮片、中间体（浸膏或干膏粉）和免煎颗粒之间的特征性图谱应具有关联性。目前，关于红芪指纹图谱的报道多集中于基原[9-11]与炮制品[12]的研究，但红芪配方颗粒质量全程控制尚无相关研究报道。本研究建立了红芪药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒的 HPLC 指纹图谱，对其相关性进行评价，并考察四者之间化学成分的差异，旨在为红芪配方颗粒替代传统饮片的可行性研究及其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-16 型高效液相色谱仪（日本岛津）；BT125D 型十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器）；DD-5M 型低速大容量离心机（湘仪）；HH-6 型恒温水浴锅（西安超杰数显）；SB25-12DTD 型超声波清洗机（宁波新芝）；YC-1000 型实验室喷雾制粒包衣机（上海雅程）；DZF-6090 型真空干燥箱（上海一恒）。

1.2 药材

毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：CHB171102）、芒柄花苷（批号：CHB171026）、毛蕊异黄酮（批号：CHB171102）、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮（批号：CHB151026）（对照品，含量均≥ 98%，成都克洛玛生物科技有限公司）；乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯（天津大茂化学试剂厂）；水为超纯水；15 批红芪药材均购于甘肃陇南，见表 1，经甘肃中医药大学中药鉴定教研室李硕副教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根，符合 2020 年版《中国药典》一部相关规定。参照药典中的红芪炮制方法（除去杂质，大小分开，洗净，润透，切厚片，干燥）将 15 批红芪药材炮制为红芪饮片。

表 1 15 批红芪药材来源信息

Tab 1 Source information of 15 batches of Hedysari Radix

编号	产地	编号	产地
H1	宕昌县韩院乡石家山村	H7 ～ 8	礼县永兴乡永兴村
H2	宕昌县贾河乡雪岭村	H9 ～ 10	礼县永兴乡林边村
H3	宕昌县庞家乡对坡村	H11	武都区安化镇任家山村（米仓山）
H4	宕昌县临江行毛羽山村	H12	武都区龙凤乡草坪村
H5	宕昌县将台乡扎麻拉村	H13 ～ 14	武都区安化镇朱家坪村
H6	宕昌县哈达铺镇新寨村	H15	武都区磨坝乡东岳山村

2 方法与结果

2.1 红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒中有效成分的含量测定

2.1.1 色谱条件[11-13] 色谱柱为 Wondasil C_{18}-WR（4.6 mm×150 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 7 min，15% ～ 16%A；7 ～ 17 min，16% ～ 18%A；17 ～ 19 min，18% ～ 27%A；19 ～ 29 min，27% ～ 29%A；29 ～ 31 min，29% ～ 30%A；31 ～ 61 min，30% ～ 60%A；61 ～ 63 min，60% ～ 100%A），检测波长 280 nm，流速 1.0 mL·min^{-1}，进样体积 10 μL，柱温 35 ℃。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含 0.02、0.06、0.02、0.15 mg 的混合对照品溶液，即得。

2.1.3 供试品溶液的制备[14-15] 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求（征求意见稿）》，制备红芪的标准汤剂（每克标准汤剂相当于 2.50 g 饮片），编号 H1 ～ H15，具体方法如下：取红芪饮片 100 g，精密称定，加 9 倍量水浸泡 30 min，武火煮沸，文火保持微沸 30 min，趁热滤过；药渣加 7 倍水煎煮，武火煮沸，文火保持微沸 30 min，趁热滤过，合并 2 次煎液，减压浓缩，冷冻干燥得标准汤剂粉末。

同法制得煎液，再减压浓缩，喷雾干燥，制备同批号的配方颗粒（每克配方颗粒相当于 2.35 g 饮片）。

称取 15 批红芪药材粗粉 6.0 g、饮片粗粉 6.0 g（均过 4 号筛），标准汤剂粉末 3.0 g、配方颗粒粉末 3.0 g（研细），分别置于具塞锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）60 min，放冷，补足失重，以 4000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，定容于 25 mL 量瓶中，即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，即得系列浓度混合对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件测定，记录峰面积。以质量浓度（X）为横坐标，峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，见表 2。

表 2 各成分线性关系

Tab 2 Linearity of constituents

成分	回归方程	r	线性范围 /（mg·mL^{-1}）
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 1.18\times10^{7}X - 7.40\times10^{3}$	0.9995	0.0010 ～ 0.0080
芒柄花苷	$Y = 1.19\times10^{7}X - 1.36\times10^{4}$	0.9996	0.0030 ～ 0.0240
毛蕊异黄酮	$Y = 2.42\times10^{7}X - 9.05\times10^{3}$	0.9997	0.0010 ～ 0.0080
7-羟基-4'-甲氧基异黄酮	$Y = 3.639\times10^{7}X - 6.30\times10^{4}$	0.9996	0.0075 ～ 0.0600

2.1.5 精密度试验 取同一标准红芪药材供试品溶液（H1），连续进样 6 次。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮峰面积的 *RSD* 分别为 1.3%、0.79%、1.4%、1.9%，表明仪器的精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批红芪药材（H1），平行制备 6 份供试品溶液，进样测定。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7-羟基-4'-甲氧基异黄酮峰面积的 *RSD* 值分别为 2.8%、1.6%、2.6%、1.4%，表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一红芪药材供试品溶液（H1），分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样，记录峰面积。结果显示毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮峰面积的 *RSD* 分别为 1.4%、1.6%、2.4%、1.9%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.1.8 加样回收试验 取红芪药材（H1）约 3 g，共取 6 份样品，精密加入适量毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮对照品，置具塞锥形瓶中，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率。结果显示红芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮平均回收率分别为 99.5%、100.1%、100.8%、99.6%，*RSD* 分别为 2.2%、1.8%、2.5%、1.3%，说明该方法回收率良好。

2.1.9 样品含量测定 按“2.1.1”项下色谱条件测定 15 批红芪样品，结果见表 3。毛蕊异黄酮葡萄糖苷（A）、芒柄花苷（B）、毛蕊异黄酮（C）、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮（D）在 15 批红芪药材与饮片中的平均含量分别为 13.56、25.33、9.90、185.46 μg·g^{-1} 与 8.55、18.00、7.19、137.28 μg·g^{-1}，红芪药材加工成饮片会有少量的成分损失，故红芪饮片中 4 种有效成分平均含量略低于药材；15 批红芪标准汤剂与配方颗粒中 4 种有效成分的平均含量分别为 51.45、93.25、18.49、159.84 μg·g^{-1} 与 36.16、60.26、15.88、119.09 μg·g^{-1}，由于加入辅料故配方颗粒 4 种有效成分含量偏低。

2.2 红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 指纹图谱

2.2.1 对照品溶液的制备 取“2.1.2”项下的混合对照品溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，4 ℃下保存备用。

表 3 含量测定结果 (μg·g^{-1})

Tab 3 Content determination (μg·g^{-1})

编号	药材				饮片				标准汤剂				配方颗粒			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
H1	14.22	25.24	10.65	178.06	9.72	23.33	9.42	171.49	43.92	84.25	15.96	133.44	31.24	71.56	17.56	123.02
H2	13.42	23.12	9.29	165.44	6.86	14.45	5.65	107.70	65.16	113.47	21.51	177.56	40.17	58.95	18.09	124.37
H3	12.85	32.88	11.61	216.59	9.62	15.42	5.76	115.55	54.58	83.13	19.40	155.33	41.29	62.91	19.53	128.77
H4	18.63	31.78	10.88	209.14	7.64	18.26	7.00	124.70	54.63	98.50	20.13	171.09	41.25	61.43	18.41	127.29
H5	12.37	22.33	9.56	192.94	7.51	14.82	5.88	117.67	66.64	109.55	21.88	187.34	36.64	53.42	14.91	117.25
H6	9.90	17.33	8.97	177.31	8.50	20.04	7.88	143.62	42.67	77.64	16.29	143.33	32.79	68.36	16.33	122.26
H7	11.24	22.72	9.93	189.66	9.67	21.45	8.89	169.40	24.75	75.49	15.47	140.80	38.06	48.43	11.80	121.70
H8	13.11	34.64	12.66	220.06	8.93	12.44	8.03	149.23	43.98	77.59	16.22	144.93	43.87	61.00	16.40	125.23
H9	11.39	17.88	6.83	141.80	8.32	18.96	7.20	144.78	41.35	73.49	15.98	145.39	37.29	67.32	14.69	113.40
H10	10.43	19.09	7.75	157.70	7.01	15.28	5.98	112.85	59.49	93.39	19.24	169.49	36.77	61.50	14.01	109.35
H11	10.28	19.21	7.57	148.00	8.61	20.56	8.56	138.45	53.05	78.51	16.77	153.16	23.68	57.21	15.48	118.63
H12	12.99	21.45	8.08	148.31	9.67	17.91	7.21	144.52	56.67	86.62	18.25	167.55	33.67	61.49	17.87	128.81
H13	17.12	29.29	10.47	198.82	8.19	18.20	7.22	137.24	61.51	103.62	18.58	165.32	37.24	64.20	15.14	114.44
H14	18.77	33.13	12.14	216.70	8.91	18.89	5.73	129.04	65.33	122.49	21.54	164.95	35.31	52.89	15.22	110.13
H15	16.67	29.87	12.11	221.34	9.15	19.92	7.47	153.02	37.96	121.01	20.10	177.89	33.14	53.25	12.73	101.65
平均	13.56	25.33	9.90	185.46	8.55	18.00	7.19	137.28	51.45	93.25	18.49	159.84	36.16	60.26	15.88	119.09

2.2.2 HPLC 指纹图谱的建立 15 批红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒供试品溶液按“2.1.3”项下方法制备，进样测定，记录色谱图，结果见图 1。

2.2.3 相关性分析 将 15 批红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒 HPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版），采用中位数法生成对照指纹图谱，选择时间宽度为 0.1。图 2 为指纹图谱。标准汤剂、配方颗粒共有 14 个色谱峰，但均未检测到峰 11、14、17、18；红芪药材、饮片共有 17 个色谱峰，但均未检测到峰 3。经比较分析后确定红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒共有 13 个共有峰。通过与混合对照品紫外吸收及保留时间进行对比，确认峰 5、8、12、13 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮。因 13 号峰在红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒中分离度和峰高均最佳，故选择该峰为参照峰。

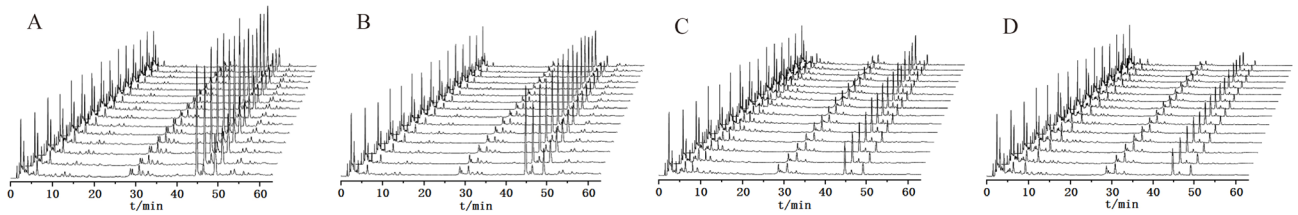


图 1　15 批红芪药材（A）、饮片（B）、标准汤剂（C）、配方颗粒（D）HPLC 指纹图谱

Fig 1　HPLC fingerprint of 15 batches of raw herbs，decoction pieces，standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix

表 4 为红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱相似度结果。红芪配方颗粒与标准汤剂对照指纹图谱相似度为 0.946，两者有效成分差异很小，为红芪配方颗粒质量控制提供了依据。

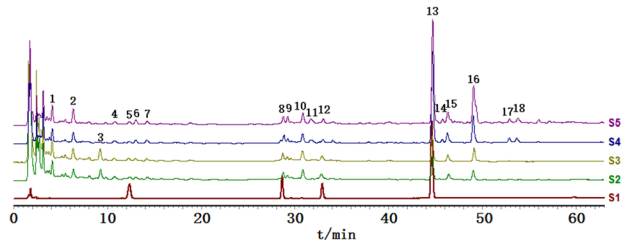


图 2　混合对照品（S1）、红芪配方颗粒（S2）、标准汤剂（S3）、饮片（S4）、药材（S5）的 HPLC 对照指纹图谱比较

Fig 2　HPLC reference fingerprint of mixed control（S1），dispensing granules（S2），standard decoction（S3），decoction pieces（S4），and raw herbs（S5）of Hedysari Radix

表 4　红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒相似度结果

Tab 4　Similarity of HPLC fingerprint of raw herbs，decoction pieces，standard decoction and dispensing granules of Hedysari Radix

样品	药材对照图谱	饮片对照图谱	标准汤剂对照图谱	配方颗粒对照图谱
药材对照图谱	1.000			
饮片对照图谱	0.988	1.000		
标准汤剂对照图谱	0.799	0.765	1.000	
配方颗粒对照图谱	0.802	0.726	0.946	1.000

2.2.4　精密度试验　取同一红芪配方颗粒供试品溶液（H1），连续进样 6 次，记录峰面积。以峰 13 为参照，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别小于 2.5% 和 1.6%，表明仪器的精密度良好。

2.2.5　重复性试验　取同一批红芪配方颗粒（H1），平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录峰面积。以峰 13 为参照，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别小于 1.7% 和 1.9%，表明该方法重复性良好。

2.2.6　稳定性试验　取同一红芪配方颗粒供试品溶液（H1），分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，记录峰面积。以峰 13 为参照，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别小于 1.8% 和 2.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3　讨论

3.1　色谱条件优化

本研究综合考察了乙腈 - 甲酸水溶液和乙腈 - 磷酸水溶液在不同配比条件下色谱峰的峰形和分离度情况，以乙腈 -0.3% 甲酸水溶液、乙腈 -0.1% 甲酸水溶液及乙腈 -0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱时，乙腈 - 甲酸水溶液所得色谱峰的基线不平直，而乙腈 - 磷酸水溶液基线平直，出峰数量、保留时间和分离度良好；考察不同波长下（240、254、280 nm）的指纹图谱，在 280 nm 条件下，所得峰面积、峰形、保留时间和出峰数量最佳。

3.2　指纹图谱与特征峰

本研究共确定了 13 个共有特征峰，且能在 5、8、12、13 号峰位置与毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、7- 羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 4 种化学成分相对应。通过对红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒 HPLC 指纹图谱的比对发现，红芪的药材和饮片中未发现 3 号峰，而该成分在标准汤剂与配方颗粒中均存在，而峰 11、14、17、18 在标准汤剂和配方颗粒中均未检测到，但在红芪药材和饮片中均存在。这一现象可能是红芪（药材和饮片）在煎煮、浓缩和喷雾干燥过程中由于高温导致其药液中的一部分化学成分发生了转化，需要进一步研究。

3.3　红芪药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒之间的相关性评价

配方颗粒作为中药饮片改革的新趋势，具有免煎煮、方便携带等优点 [16]。但经制剂工艺加工而成的中药配方颗粒已失去了饮片所具有的外观辨别特征，在显微结构下也不易鉴别，并且以单一成分衡量质量标准很难反映配方颗粒的整体特征 [17-18]。中药指纹图谱能最大限度获取配方颗粒、药材及饮片之间的化学信息，高效地将中药配方颗粒的内在信息反馈在图谱中，直观观察和

评价内在质量[19]。本试验建立红芪药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒 HPLC 指纹图谱，考察其相似度，并对其相关性进行评估。结果表明，饮片与标准汤剂、配方颗粒对照图谱相似度分别为 0.765、0.726，这可能与标准汤剂和配方颗粒的制备过程中要经过一系列的高温（如煎煮、浓缩干燥）处理，导致一些成分产生变化（如 3 号峰的出现）有关。比较发现，红芪药材与饮片的相似度为 0.988，配方颗粒和标准汤剂的相似度为 0.946，表明药材与饮片、配方颗粒与标准汤剂之间相似度良好，本研究可为配方颗粒替代标准汤剂提供参考。

4 小结

中药汤剂疗效显著，但存在煎煮费时、携带不便、保存困难等缺点。中药配方颗粒解决了中药汤剂的不足，作为中药饮片的一种补充形式，逐渐被人们认可。但中药配方颗粒成分复杂，质量标准难以把控。本试验将红芪配方颗粒和 HPLC 指纹图谱相结合，可为红芪配方颗粒的质量控制提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：159.

[2] 邓六勤，吴保仪，陈洁，等 . 中药红芪化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国药物经济学，2013，48（S3）：36-39.

[3] Liu XY，Li JP，Chen XY，et al. Determination of eight active components in Radix Hedysari by HPLC and its cluster analysis [J]. Acta Pharm Sin B，2016，51（5）：786-791.

[4] 王磊，卫东锋，李菲，等 . 红芪多糖对老年性痴呆细胞模型损伤保护作用的差异蛋白质研究 [J]. 中药药理与临床，2018，34（3）：62-68.

[5] Wei DF，Cheng WD，Wei YX，et al. Phosphorylated modification and in vitro antioxidant activity of Radix Hedysari polysaccharide [J]. Glycoconj J，2012，29（4）：167-172.

[6] Xue ZY，Shi GG，Fang YY，et al. Protective effect of polysaccharides from Radix Hedysari on gastric ulcers induced by acetic acid in rats [J]. Food Funct，2019，10（7）：3965-3976.

[7] 崔方，韩增护，刘小花，等 . 红芪提高免疫功能活性部位的谱效关系研究 [J]. 中草药，2016，47（1）：101-105.

[8] 杨杰，卫东锋，李晓东，等 . 红芪多糖对脑微血管内皮细胞氧化损伤保护作用的差异蛋白质研究 [J]. 中药药理与临床，2016，32（2）：113-118.

[9] 顾志荣，马天翔，许爱霞，等 . 基于傅里叶变换红外光谱的甘肃红芪产地溯源模型建立 [J]. 时珍国医国药，2019，30（9）：2267-2269.

[10] 顾志荣，许爱霞，祁梅，等 . 基于傅里叶变换红外光谱指纹特征的甘肃 8 个主产县红芪药材鉴别研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2018，25（11）：62-67.

[11] 杨秀娟，李硕，杨志军，等 . 甘肃不同产地红芪的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（7）：3070-3073.

[12] 李越峰，牛江涛，曹瑞，等 . 甘肃道地药材红芪与炙红芪指纹图谱对比研究 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（16）：1634-1638.

[13] 叶迎，王瑞海，包强，等 . 甘肃一、二年生红芪与黄芪黄酮类成分指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（3）：83-89.

[14] 朱敏，魏惠珍，金浩鑫，等 . 金银花配方颗粒、标准汤剂含量测定及指纹图谱研究 [J]. 天然产物研究与开发，2019，31（1）：110-115.

[15] 方雯雯，成守玲，陈培胜，等 . 白芷药材 - 饮片 - 提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究 [J]. 中草药，2016，47（18）：3211-3214.

[16] 吴用彦，李青蔚，李红亮 . 中药配方颗粒的研究现状及存在问题的思考 [J]. 中南药学，2019，17（1）：78-83.

[17] 林伟雄，乐智勇，车海燕，等 . 吴茱萸汤颗粒剂、配方颗粒剂及传统汤剂中指标成分的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（13）：30-34.

[18] 冀艳花，高晗，常云凤，等 . 白鲜皮饮片 - 标准汤剂 - 配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（18）：81-87.

[19] 陶金华，狄留庆，文红梅，等 . 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨 [J]. 中国中药杂志，2009，34（18）：2410-2413.

（收稿日期：2021-08-30；修回日期：2021-10-13）

LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺的含量

杨越莛[1]，郑枫[1]，蔡浒[1]，柳文媛[1, 2*]（1. 中国药科大学药物分析系，南京　211198；2. 浙江省原料药安全研究中心（工艺技术创新平台），杭州　310018）

摘要：目的　建立高效液相色谱 - 串联质谱法检测三甲基间苯三酚原料药中的基因毒性杂质 *N*- 亚硝基二甲胺（NDMA）和 *N*- 亚硝基二乙胺（NDEA）的含量。**方法**　色谱柱为 Inertsil ODS-3（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为 0.1% 甲酸溶液（A）- 甲醇（B），按程序进行梯度洗脱，在大气压化学电离源下以正离子、多重反应监测模式进行检测。**结果**　NDMA 和 NDEA 的检测限分别为 0.8454 ng • mL^{-1} 和 0.2340 ng • mL^{-1}，定量限分别为 2.818 ng • mL^{-1} 和 0.7800 ng • mL^{-1}，线性范围分别为 2.818 ～ 18.79 ng • mL^{-1} 和 0.7800 ～ 5.200 ng • mL^{-1}。**结论**　该方法专属性强，灵敏度高，适用于三甲基间苯三酚原料药中 NDMA 和 NDEA 的测定。

关键词：*N*- 亚硝基二甲胺；*N*- 亚硝基二乙胺；基因毒性杂质；三甲基间苯三酚；液相色谱 - 串联质谱

中图分类号：R917.101　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0405-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.029

Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in trimethyl phloroglucinol by LC-MS/MS method

YANG Yue-ting[1], ZHENG Feng[1], CAI Xu[1], LIU Wen-yuan[1, 2*] (1. *Department of Pharmaceutical Analysis*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing*　211198; 2. *Zhejiang Center for Safety Study of Drug Substances* (*Industrial Technology Innovation Platform*), *Hangzhou*　310018)

Abstract: Objective　To determine the genotoxic impurities named *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) in trimethyl phloroglucinol (TMP) by LC-MS/MS. **Methods**　Inertsil ODS-3 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, with gradient elution of 0.1% formic acid solution and methanol as mobile phase. The analytes were detected in an atmosphere pressure chemical ionization under positive ion mode with multiple reaction monitoring. **Results**　For NDMA and NDEA, the LOD was 0.8454 ng • mL^{-1} and 0.2340 ng • mL^{-1}, the LOQ was 2.818 ng • mL^{-1} and 0.7800 ng • mL^{-1}, and the linear range was 2.818 ～ 18.79 ng • mL^{-1} and 0.7800 ～ 5.200 ng • mL^{-1}, respectively. **Conclusion**　The method is specific and sensitive, and can be used to determine the content of NDMA and NDEA in TMP.

Key words: *N*-nitrosodimethylamine; *N*-nitrosodiethylamine; genotoxic impurity; trimethyl phloroglucinol; LC-MS/MS

基因毒性杂质（genotoxic impurities，GTIs），又称遗传毒性杂质，是一类具有致癌性和致突变性的特殊杂质。该类物质大多具有亲电活性[1]，能与 DNA 发生共价结合并对其造成直接或间接损伤，从而进一步诱导肿瘤或遗传疾病的生成[2]。

与一般杂质不同，基因毒性杂质在极低浓度时便可触发效应，其低水平高毒性的特点引起了医药行业的广泛关注[3]，严格控制药物中基因毒

作者简介：杨越莛，女，硕士研究生，主要从事药物现代仪器分析工作，email：915747393@qq.com　*通信作者：柳文媛，女，教授，主要从事以药物发现为导向的复杂体系药效物质基础与活性筛选技术体系研究和以药物质量控制为导向的体外质量评价与体内处置研究，email：liuwenyuan8506@163.com

性杂质也显得格外重要起来。

2018 年，“缬沙坦事件”的爆发将基因毒性杂质带进了大众视野之中[4]，各国监管部门也开始出台和完善相关指导原则[5-6]。研究表明，*N*-亚硝基类化合物在经体内代谢后会表现出极强的基因毒性[7-10]，严重威胁人类健康。早在 1987 年，国际癌症研究机构就明确把 *N*-亚硝基二甲胺（*N*-nitrosodimethylamine，NDMA）和 *N*-亚硝基二乙胺（*N*-nitrosodiethylamine，NDEA）列为 2A 类致癌物质[11-14]；ICH《M7（R1）：评估和控制药物中 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在的致癌风险》也将该类化合物归属于“关注队列”之中[15]，旨在让药学研究者们给予高度重视。

间苯三酚注射液主要适用于消化系统以及胆道功能障碍引起的急性痉挛性疼痛[16]，其活性成分为三甲基间苯三酚（trimethyl phloroglucinol，TMP）和间苯三酚二水合物（phloroglucinol，PGO），同时 TMP 也是 PGO 工艺路线中间体 1，3，5-三甲氧基苯（1，3，5-tribromobenzene，PGO-1）精制后的成品，合成路线见图 1。以苯胺为原料进行间苯三酚起始物料 1，3，5-三溴苯（1，3，5-tribromobenzene，PGO-01）的合成，在这一步骤中残留的重氮化试剂可能会造成亚硝酸钠污染，进而与 *N*，*N*-二甲基甲酰胺中的二甲胺和二乙胺反应生成 NDMA 和 NDEA。

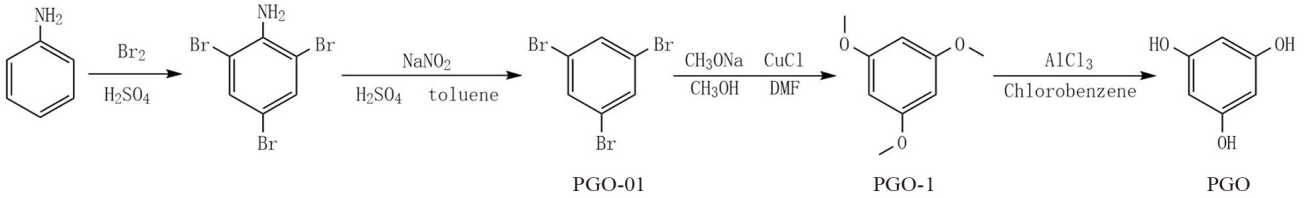


图 1　PGO 合成工艺路线

Fig 1　Synthesis of PGO

目前常用的 NDMA 和 NDEA 分析方法有高效液相色谱法（HPLC）[17]、气相色谱法（GC）[18]、液相色谱 - 质谱联用法（LC-MS）[19-21]、气相色谱 - 质谱联用法（GC-MS）[22] 等。由于亚硝胺杂质的残留水平一般较低，常规检测器往往不能满足其检测要求，因此在分析该类杂质时通常会考虑衍生化方法或是选择高分辨检测器以提高方法的灵敏度。为保证药品质量以及用药安全，需对间苯三酚中间产物 TMP 中可能含有的基因毒性杂质 NDMA 和 NDEA 进行分析与控制。目前国内外尚未有相关研究报道，因此本研究旨在建立一套适用于 TMP 中 NDMA 和 NDEA 检测的高效液相色谱 - 串联质谱法，该方法专属性强，灵敏度高，准确度和重复性好，可为间苯三酚注射液原料药的质量控制提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Shimadzu LC-20AT 液相色谱仪（LC-20AT 二元梯度泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱，日本岛津公司）；SCIEX TRIPLE QUAD 3500 质谱仪（美国 AB Sciex 公司）；赛多利斯 SQP 电子天平、赛多利斯 BSA124S 电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；KH-250DB 型数控超声波清洗仪（昆山禾创超声仪器有限公司）。

1.2　试药

NDMA（含量：97.80%，批号：510166-201902）、NDEA（含量：99.70%，批号：510168-201902）（对照品，中国食品药品检定研究院）；TMP 供试品（批号：20191201、20191202、20191203，扬州三药）；甲醇（色谱级，批号：1069707004，德国默克）；甲酸（色谱级，批号：C11119020，上海麦克林生化科技有限公司）；实验用水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Inertsil ODS-3 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：0.1% 甲酸溶液（A）- 甲醇（B）；梯度洗脱程序见表 1；柱温：40 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}；进样量：60 μL。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.01	85	15
2.00	85	15
2.01	30	70
5.50	30	70
5.51	85	15
10.00	85	15

2.2　质谱条件

离子源：大气压化学电离源（APCI）；检测模式：正离子模式，多重反应监测（MRM）；气帘气压力（CUR）：35 psi；碰撞气（CAD）：8 psi；雾化电流（NC）：3.0 μA；离子源温度（TEM）：650 ℃；雾化气（GS1）：65 psi；NDMA 离子对（*m/z*）：75.1/58.2、去簇电压（DP）：42 V、碰撞气能量（CE）：18 eV、驻留时间：400 ms；NDEA 离子对（*m/z*）：103.0/75.1、DP：19 V、CE：22 eV、驻留时间：200 ms；阀切换程序：0.00 min，B 阀；2.20 min，A 阀；6.00 min，B 阀。

2.3　溶液配制

2.3.1　空白溶剂　即稀释溶剂，0.1% 甲酸溶液：甲醇＝ 85∶15。

2.3.2　混合对照品溶液　取 NDMA 约 24 mg 或取 NDEA 约 13 mg，精密称定，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀即得 NDMA 或 NDEA 对照品储备液。精密移取 NDMA 对照品储备液 0.2 mL 和 NDEA 对照品储备液 0.1 mL，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀；精密移取上述溶液 1 mL，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.3　标准限度混合杂质对照溶液　精密移取混合对照品溶液 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加稀释溶剂稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.4　TMP 供试品溶液　取 TMP 供试品约 200 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解，加稀释溶剂稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.5　供试品加样溶液　取 TMP 供试品约 200 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，精密移取混合对照品溶液 1 mL，加甲醇超声溶解，加稀释溶剂稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4　专属性

分别取空白溶剂、标准限度混合杂质对照溶液、TMP 供试品溶液及供试品加样溶液进样分析并记录色谱图，结果显示 NDMA 和 NDEA 的测定不会受到干扰，方法专属性良好，见图 2。

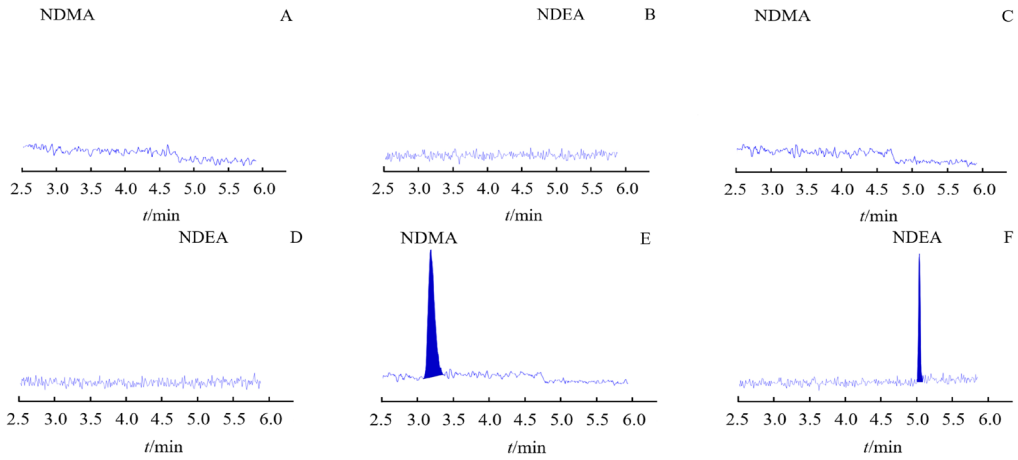


图 2　TMP 中 NDMA 和 NDEA 测定的典型色谱图

Fig 2　Typical chromatogram of NDMA and NDEA in TMP

A、B. 空白溶剂（blank solution）；C、D.TMP 供试品溶液（sample solution）；E、F. 标准限度混合杂质对照溶液（mixed reference solution）

2.5　检测限和定量限

精密移取“2.3.2”项下混合对照品溶液，逐级稀释合适倍数后进样，分别将信噪比（*S/N*）为 3 和 10 作为检测限和定量限。结果 NDMA 的检测限为 0.8454 ng • mL^{-1}，定量限为 2.818 ng • mL^{-1}；NDEA 的检测限为 0.2340 ng • mL^{-1}，定量限为 0.7800 ng • mL^{-1}。

2.6　线性关系考察

分别精密移取“2.3.2”项下混合对照品溶液 0.3、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，加稀释溶剂稀释，制得系列线性溶液。以待测杂质峰面积（*y*）对其质量浓度（*x*，ng • mL^{-1}）作图并进行线性回归计算，结果 NDMA 的回归方程为 $y = 3638.1x + 1156.9$，$r = 0.9996$，线性范围为 2.818 ～ 18.79 ng • mL^{-1}，NDEA 的回归方程为 $y = 2183.6x + 38.444$，$r = 0.9998$，线性范围为 0.7800 ～ 5.200 ng • mL^{-1}。

2.7　精密度

取“2.3.3”项下标准限度混合杂质对照溶液，连续进样 6 次，记录各杂质的峰面积和保留时间。结果显示，NDMA 峰面积的 *RSD* 为 1.5%，保留时间的 *RSD* 为 0.12%；NDEA 峰面积的 *RSD* 为 4.7%，保留时间的 *RSD* 为 0.060%，表明仪器精密度良好。

2.8　重复性和中间精密度

平行配制两份标准限度混合杂质对照溶液、6 份 TMP 供试品溶液和 6 份供试品加样溶液来考察方法重复性。结果显示 NDMA 和 NDEA 含量的 *RSD* 分别为 1.7% 和 6.2%，表明方法重复性良好。不同分析人员在不同日期重复上述试验考察方法中间精密度，结果显示 NDMA 和 NDEA 含量的 *RSD* 分别为 2.3% 和 6.3%，精密度试验中 NDMA 和 NDEA 含量的 *RSD* 分别为 2.3% 和 6.0%，表明方法中间精密度良好。

2.9　回收试验

分别平行配制两份标准限度混合杂质对照溶液和 3 份 TMP 供试品溶液，按“2.3.5”项下方法配制杂质限度为 50%、100% 和 150% 的供试品加样溶液，每个水平平行配制 3 份。结果 NDMA 和 NDEA 的平均回收率在 98.82% ～ 107.49%，*RSD* 在 1.7% ～ 3.4%。

2.10　稳定性

取标准限度混合杂质对照溶液、TMP 供试品溶液和供试品加样溶液室温放置，分别在 0、3、6、9、12 和 15 h 进样分析，记录各杂质峰面积并计算其变化率。结果显示标准限度混合杂质对照溶液中 NDMA 和 NDEA 的峰面积变化率分别低于 3.6% 和 6.1%；供试品加样溶液中 NDMA 和 NDEA 的峰面积变化率分别低于 4.4% 和 11.2%，表明溶液稳定性良好。

2.11　耐用性

改变流动相的起始比例（%）、流速（mL • min^{-1}）、柱温（℃）和不同型号色谱柱以考察分析环境的微小变动对方法的影响，发现在各个色谱条件下 NDMA 和 NDEA 的检测均不会受到干扰，方法耐用性良好，具体结果见表 2。

表 2　NDMA 和 NDEA 的耐用性试验结果

Tab 2　Durability test of NDMA and NDEA

色谱条件	NDMA 含量 /%	*RSD*/%	NDEA 含量 /%	*RSD*/%
标准条件	0.000 045 47	3.3	0.000 012 99	5.0
流动相 86∶14	0.000 046 51		0.000 013 45	
流动相 84∶16	0.000 048 52		0.000 012 18	
标准条件	0.000 045 47	2.0	0.000 012 99	6.0
流速 0.9 mL • min^{-1}	0.000 045 60		0.000 013 11	
流速 1.1 mL • min^{-1}	0.000 047 14		0.000 014 44	
标准条件	0.000 045 47	1.7	0.000 012 99	5.7
柱温 39 ℃	0.000 046 22		0.000 013 26	
柱温 41 ℃	0.000 047 07		0.000 011 89	
标准条件	0.000 045 47	2.6	0.000 012 99	1.4
更换色谱柱	0.000 047 17		0.000 013 25	

2.12　样品检测

分别取 3 批 TMP 样品（批号：20191201、20191202、20191203）进行检测，结果均无 NDMA 和 NDEA 检出。

3　讨论

3.1　NDMA 和 NDEA 的限度制订

N- 亚硝基类杂质致癌风险普遍较高，若完全按照 ICH M7（R1）指南提出的毒理学关注阈值（TTC）1.5 μg • d^{-1} 来进行限度控制并不合理。对于 NDMA 和 NDEA 这类有相关致癌性试验数据的杂质而言，可通过在数据库中查找 TD_{50} 值来计算每日可接受摄入量（acceptable intake，AI）。目前，美国食品药品监督管理局（FDA）公布了 NDMA 和 NDEA 的 AI 值分别为 96 ng • d^{-1} 和 26.5 ng•d^{-1}。为实现 *N*- 亚硝基类杂质的严格控制，按国内说明书记载的最大用药剂量 200 mg • d^{-1} 计算，将 TMP 原料药中 NDMA 和 NDEA 限度分别制订为 0.48 μg • g^{-1} 和 0.13 μg • g^{-1}。

3.2　条件优化

本研究在前期方法摸索时分别考察了水 - 甲醇、0.1% 甲酸溶液 - 甲醇和 0.1% 甲酸溶液 -0.1% 甲酸甲醇溶液三种流动相。经比较发现，水 - 甲醇体系下 NDMA 峰形矮胖，响应较低。通过在水相中添加甲酸能够明显改善上述问题，而继续在有机相中添加甲酸并不会对 NDMA 和 NDEA 的峰形及响应造成太大影响。因此，为在保证试验结果的同时尽可能简化操作步骤，最终选择了 0.1% 甲酸溶液 - 甲醇。

在色谱柱的选择上，先后考察了 Megres C_{18} 柱、Ultimate XB-C_{18} 柱和 Inertsil ODS-3 柱。其中，Megres C_{18} 柱在使用过程中压力太高，超过仪器可承受的最大压力；Ultimate XB-C_{18} 也存在压力偏高的问题，虽可使用，但各待测物色谱峰普遍出峰较晚，分析时间长，故也不选用。而 Inertsil ODS-3 柱较好地解决了上述问题，在有效缩短分析时长的同时，还能保证理想的分离度与峰形，因此最终选择了 Inertsil ODS-3 柱。

在离子源的选择上，先后比较了电喷雾电离源（ESI）和 APCI 两种常用的离子源。使用 ESI 时发现 NDMA 和 NDEA 响应均比较低，灵敏度较差；而 APCI 作为一种有效的电离补充方式可以较好地解决这一问题，这可能与 NDMA 和 NDEA 自身的分子量以及极性有关。基于上述试验结果，最终选择 APCI 为电离方式。

3.3 总结与展望

本研究建立了 TMP 原料药中基因毒性杂质 NDMA 和 NDEA 的检测分析方法并完成了相应的全套方法学验证。结果显示，该法能够同时对 NDMA 和 NDEA 进行准确定量分析，可为间苯三酚注射液原料药的质量研究提供参考，保障药品有效性与用药安全性。

参考文献

[1] 朱文泉，马健，李敏 . 基因毒性杂质的挑战与控制策略——从 ICH 指导纲领到实际操作层面 [J]. 中国食品药品监管，2020（12）：29-44.

[2] Matveeva OA，Kovaleva EL. Modern approaches to estimating the content of genotoxic impurities in drugs（a review）[J]. Pharm Chem J，2016，49（11）：765-770.

[3] Giordani A，Kobel W，Gally HU. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process [J]. Eur J Pharm Sci，2011，43（1-2）：1-15.

[4] 杨竹，杭太俊，郭晓迪，等 . *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质的研究进展 [J]. 药学与临床研究，2020，28（4）：270-274.

[5] 张霁，张英俊，聂飚 . 药物研发中基因毒性杂质的控制策略与方法探索进展 [J]. 中国医药工业杂志，2018，49（9）：1203-1220.

[6] 叶倩，耿兴超，张河战，等 . 亚硝胺类遗传毒性杂质的监管策略及思考 [J]. 中国药事，2021，35（2）：127-137.

[7] Liu J，Xie B，Mai BL，et al. Development of a sensitive and stable GC-MS/MS method for simultaneous determination of four *N*-nitrosamine genotoxic impurities in sartan substances [J]. J Anal Sci Technol，2021，12（1）：3.

[8] Buist HE，Devito S，Goldbohm RA，et al. Hazard assessment of nitrosamine and nitramine by-products of amine-based CCS：alternative approaches [J]. Regul Toxicol Pharmacol，2015，71（3）：601-623.

[9] Paula SN，Colaco A，Gil DCRM，et al. *N*-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity：time-related effects on histology and oxidative stress [J]. Exp Toxicol Pathol，2014，66（9-10）：429-436.

[10] 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.

[11] Sörgel F，Kinzig M，Abdel-Tawab M，et al. The contamination of valsartan and other sartans，part 1：new findings [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，172：395-405.

[12] Pottegard A，Kristensen KB，Ernst MT，et al. Use of *N*-nitrosodimethylamine（NDMA）contaminated valsartan products and risk of cancer：danish nationwide cohort study [J]. BMJ，2018，362：k3851.

[13] 章为，王晓菲，易必新，等 . UPLC-APCI-MS/MS 法测定二甲双胍格列吡嗪片中 *N*- 亚硝基二甲胺 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1568-1571.

[14] 朱萌萌，叶群，周婷婷，等 . 气相色谱 - 串联质谱法测定肉制品中 10 种挥发性 *N*- 亚硝胺类化合物 [J]. 色谱，2019，37（2）：207-215.

[15] European Medicines Agency. ICH guideline M7 on assessment and control of DNA reactive（mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk step 4 [S]. 2018：13-14.

[16] 李健和，易利丹，彭六保，等 . 间苯三酚的药理作用与临床应用 [J]. 中国新药与临床杂志，2011，30（7）：494-499.

[17] Masada S，Tsuji G，Arai R，et al. Rapid and efficient high-performance liquid chromatography analysis of *N*-nitrosodimethylamine impurity in valsartan drug substance and its products [J]. Sci Rep，2019，9（1）：11852.

[18] 咸瑞卿，巩丽萍，邢晟，等 . 气相色谱 - 热能分析仪法测定缬沙坦及其制剂中的 *N*- 二甲基亚硝胺 [J]. 药物分析杂志，2019，39（8）：1501-1505.

[19] 徐艳梅，韩彬，闫凯，等 . 高效液相色谱 - 串联质谱法同时检测厄贝沙坦原料药及其片剂中 3 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 药物分析杂志，2021，41（4）：720-725.

[20] 刘津津，廖晓斌，周真明，等 . 高效液相色谱串联质谱法测定含藻水氯化消毒后 7 种亚硝胺物质 [J]. 分析化学，2015，43（4）：502-506.

[21] 杨阳，王帅，贾立明，等 . 液相色谱 / 串联质谱法测定水中 8 种亚硝胺方法优化研究 [J]. 环境化学，2019，38（3）：708-711.

[22] Tsutsumi T，Akiyama H，Demizu Y，et al. Analysis of an impurity，*N*-nitrosodimethylamine，in valsartan drug substances and associated products using GC-MS [J]. Biol Pharm Bull，2019，42（4）：547-551.

（收稿日期：2021-09-05；修回日期：2021-11-06）

超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱法定性分析枸橼酸莫沙必利中的杂质

王军[1, 2, 3]，邱荣英[1, 2, 3]，郭玉[1, 3]，李铁健[1, 2, 3]，张贵兰[4]，张贵民[1, 2, 3*]（1. 山东新时代药业有限公司，山东 临沂 273400；2. 国家手性制药工程技术研究中心，山东 临沂 273400；3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东 临沂 276005；4. 山东省临沂市兰山区柳青街道社区卫生服务中心，山东 临沂 276005）

摘要：目的 建立超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱法定性分析枸橼酸莫沙必利中的杂质。**方法** 采用 YMC-Triart C_{18} 色谱柱，以 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵水溶液与乙腈进行梯度洗脱，检测波长 274 nm。质谱使用电喷雾离子源（ESI 源），正离子模式检测。**结果** 共分离到 6 个杂质，结合杂质的精确分子量与二级质谱图，参考莫沙必利的碎裂机制，解析了杂质结构。结合合成路线与杂质结构，推测杂质 2 为降解杂质，其余杂质为工艺杂质。**结论** 本方法可为枸橼酸莫沙必利的工艺优化与质量控制提供参考。

关键词： 超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱法；枸橼酸莫沙必利；杂质结构；质量控制
中图分类号： R927 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)02-0410-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.030

Qualitative analysis of impurities in mosapride citrate by UPLC-Q-TOF-MS

WANG Jun[1, 2, 3], QIU Rong-ying[1, 2, 3], GUO Yu[1, 3], LI Tie-jian[1, 2, 3], ZHANG Gui-lan[4], ZHANG Gui-min[1, 2, 3*] (1. *Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong* 273400; 2. *National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong* 273400; 3. *Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi Shandong* 276005; 4. *Community Health Service Center of Liuqing Street, Lanshan District, Linyi Shandong* 276005)

Abstract: Objective To qualitatively analyze impurities in mosapride citrate by ultrahigh performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Methods** The chromatographic separation was performed on a YMC-Triart C_{18} column, with 10 mmol • L^{-1} ammonium acetate solution and acetonitrile as the mobile phase by gradient elution. The wavelength was 274 nm. The MS was performed with an electrospray ionization (ESI) source and positive ion mode. **Results** Six impurities were obtained. According to accurate mass and MS^2 spectrum of the 6 impurities, as well as fragmentation pathway of mosapride, the structures of the 6 impurities were set up. According to synthetic route and structure of impurities, impurity 2 was inferred to be degradation impurity, and other impurities were process impurities. **Conclusion** The method provides a reference for the optimization of manufacture process and quality control of mosapride citrate.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS; mosapride citrate; structure of impurity; quality control

枸橼酸莫沙必利，化学名为 4- 氨基 -5- 氯 -2- 乙氧基 -*N*-{[4-（4- 氟苯基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺枸橼酸盐二水合物，化学结构见图 1。该药是大日本制药有限公司开发的消化道促动力药，于 1998 年 6 月首次在日本上市 [1]。该药为第一个 5-HT4 受体激动剂 [2]，通过兴奋胃肠道胆碱能中间神经元及肌间神经丛的 5- 羟色胺受体，促进乙酰胆碱的释放，从而增强胃肠道运动，改善功能性

作者简介： 王军，男，工程师，主要从事药物分析研究，email：wj521lunan@163.com *通信作者：张贵民，男，高级工程师，主要从事中药、化药与生物制品的新药研发，email：Lunanzhangguimin@163.com

消化不良患者的胃肠道症状，且不影响胃酸的分泌[3]。另外其还可与其他药物联用，治疗反流性食管炎[4]及由此引起的咳嗽[5]。由于枸橼酸莫沙必利良好的疗效[6-8]，其在临床应用越来越广泛。

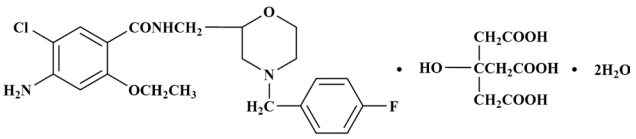


图 1 枸橼酸莫沙必利结构式

Fig 1 Structure of mosapride citrate

目前对枸橼酸莫沙必利的研究主要集中在合成[1-2]、临床疗效[4-8]、制剂[9-12]与代谢[13-16]方面，对其手性分离也有报道[17]。但关于其杂质研究方面的报道较少[18-20]。近几年 LC-MS 联用技术在杂质谱分析中的应用越来越广泛，可对药物中存在的未知杂质进行结构推导[21]。本文采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱法（UPLC-Q-TOF-MS）定性分析了枸橼酸莫沙必利中的 6 个杂质，可为其工艺优化与质量研究提供参考。

1 仪器与试药

1290 Infinity Ⅱ型超高效液相色谱仪、G6540B 四极杆 - 飞行时间质谱仪（美国 Agilent 公司），配有电喷雾离子源（ESI）以及 MassHunter B.06.00 数据处理系统。

枸橼酸莫沙必利（纯度：99.0%，企业 A）；杂质 2 对照品（2- 乙氧基 -4- 氨基 -5- 氯苯甲酸，批号：520190901F，纯度：99.9%）、杂质 3 对照品（4- 氨基 -5- 氯 -2- 乙氧基 -*N*-{[（4- 苄基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺，批号：MSBL-G-180301Z，纯度：99.5%）、杂质 4 对照品（4- 氨基 -5- 溴 -2- 乙氧基 -*N*-{[4-（4- 氟苯基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺，批号：MSBL-E-180201Z，纯度：99.9%）、杂质 5 对照品（4- 氨基 -5- 氯 -2- 乙氧基 -*N*-{[4-（3- 氟苯基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺，批号：MSBL-F-180301Z，纯度：99.2%）（山东新时代药业有限公司）；乙酸铵（色谱纯，美国 Sigma-Aldrich 公司）；乙腈（色谱纯，美国 Merck 公司）；水为自制超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱 YMC-Triart C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.9 μm）；流动相：A 为 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵水溶液，B 为乙腈；梯度洗脱程序（0 ～ 5 min，15%B；5 ～ 10 min，15% ～ 30%B；10 ～ 20 min，30% ～ 90%B；20 ～ 21 min，90% ～ 15%B；21 ～ 25 min，15%B）；柱温 40 ℃；波长 274 nm，流速 0.3 mL • min^{-1}；进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源（ESI）源；正离子模式检测；扫描范围 *m/z* 50 ～ 800；毛细管电压 4 kV；裂解电压 55 V；锥孔电压 40 V；雾化气温度：350 ℃；干燥气流速 8 L • min^{-1}。

2.3 供试品溶液的配制

称取枸橼酸莫沙必利样品适量，用流动相定量稀释至约 1 mg • mL^{-1}，取适量过 0.2 μm 滤膜，作为供试品溶液。

2.4 杂质对照品溶液的配制

分别称取杂质 2、3、4、5 对照品适量，用流动相稀释至约 10 μg • mL^{-1}，作为杂质对照品溶液。

3 结果与讨论

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 方法的优化

日本药典中检测枸橼酸莫沙必利原料药的方法使用柠檬酸盐水溶液与乙腈进行梯度洗脱分析[22]，由于柠檬酸盐难以挥发，故无法进入质谱分析，故需选择挥发性流动相。笔者分别比较 0.1% 甲酸水溶液、0.1% 乙酸水溶液、10 mmol • L^{-1} 乙酸铵水溶液与乙腈进行梯度洗脱，发现 10 mol • L^{-1} 乙酸铵水溶液与乙腈梯度洗脱时各杂质分离度较好；参考文献报道[18-19]，本研究最终采用了 ESI 源，在正离子模式下进行样品分析，且各杂质具有较好的质谱响应值，有利于杂质的定性分析。

3.2 供试品溶液总离子流图

供试品溶液进入 UPLC-Q-TOF-MS 后，总离子流图见图 2，按照出峰时间依次对杂质进行编号（1 ～ 6），主峰为莫沙必利。

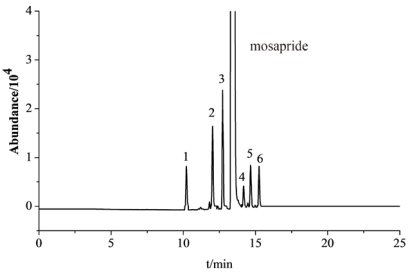


图 2 枸橼酸莫沙必利供试品溶液的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatogram of mosapride citrate

3.3 莫沙必利质谱信息

样品主成分莫沙必利的二级质谱图见图 3，母离子峰 *m/z* 422.1652 为 $[M+H]^+$ 峰，其二级质谱碎片为 *m/z* 198.0319，且 *m/z* 198.0319 与 *m/z* 200.0291 丰度比约为 3∶1，表明其含一个 Cl 原子。结合文献报道[19]，其裂解途径如图 3 所示，莫沙必利中连接 A、B 两部分的酰胺键断裂后，A 部分形成了 *m/z* 198.0319 碎片离子，该碎片可为杂质结构解析提供重要依据。

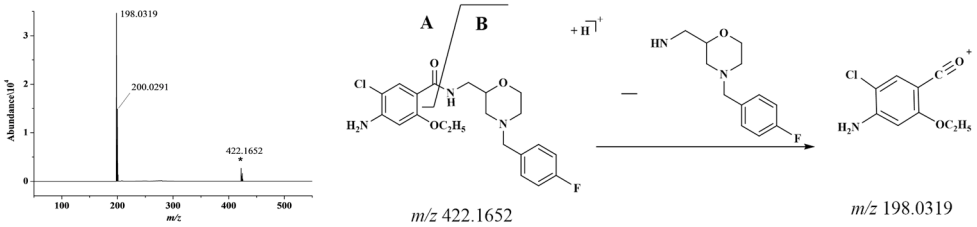


图 3　莫沙必利的二级质谱图及裂解途径

Fig 3　MS^2 spectra of mosapride and fragmentation pathway

3.4　杂质结构解析

3.4.1　杂质质谱信息　6 个杂质经过 UPLC-Q-TOF-MS 分析后，获得各杂质的精确分子量与二级质谱碎片，具体质谱信息见表 1。结合杂质的精确分子量，利用 MassHunter 软件计算获得分子式，再结合二级质谱碎片信息对杂质结构进行解析，化学结构见图 4。

表 1　枸橼酸莫沙必利中杂质的质谱信息

Tab 1　MS information of impurities in mosapride citrate

No.	保留时间 /min	母离子 /（*m/z*）	分子式	误差 /（×10^{-6}）	碰撞能量 /eV	碎片离子 /（*m/z*）
1	10.21	440.1752[M ＋ H]$^+$	$C_{21}H_{27}ClFN_3O_4$	1.14	15	198.0317；271.0844
2	12.02	216.0424[M ＋ H]$^+$	$C_9H_{10}ClNO_3$	0.93	8	169.9999；198.0314
3	12.73	404.1746[M ＋ H]$^+$	$C_{21}H_{26}ClN_3O_3$	2.48	20	198.0316
4	14.17	466.1142[M ＋ H]$^+$	$C_{21}H_{25}BrFN_3O_3$	1.29	20	241.9813
5	14.66	422.1646[M ＋ H]$^+$	$C_{21}H_{25}ClFN_3O_3$	1.18	20	198.0316
6	15.25	367.1232[M ＋ H]$^+$	$C_{18}H_{20}ClFN_2O_3$	3.55	15	198.0321

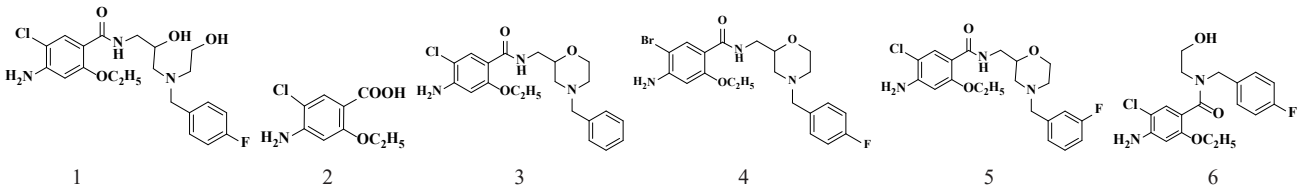


图 4　枸橼酸莫沙必利中杂质的结构式

Fig 4　Structure of impurities in mosapride citrate

3.4.2　杂质结构解析　结合莫沙必利的裂解规律与杂质二级碎片离子对各杂质结构解析如下。

杂质 1：二级质谱图见图 5，母离子 *m/z* 440.1752 [M ＋ H]$^+$，经软件计算分子式为 $C_{21}H_{27}ClFN_3O_4$，比莫沙必利分子式多一分子 H_2O。由于 *m/z* 198.0317 碎片仍存在，参考莫沙必利裂解机制，该杂质含有 A 部分结构，因此判断 B 部分结构多了一分子 H_2O。经软件计算碎片 *m/z* 271.0844 离子组成为 $C_{12}H_{16}ClN_2O_3^+$，为母离子失去基团 $C_9H_{11}FNO$ 生成；而 *m/z* 271.0844 继续失去基团 C_3H_7NO 则生成碎片 *m/z* 198.0317。由此推断杂质 1 的结构与可能的二级断裂机制如图 5 所示。

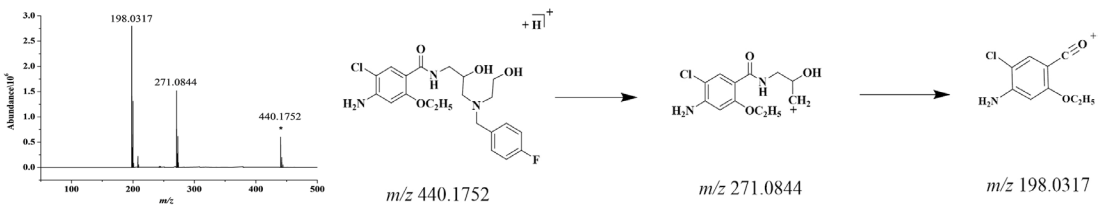


图 5　杂质 1 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 5　MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 1

杂质 2：二级质谱图见图 6，母离子 *m/z* 216.0424 [M ＋ H]$^+$，经软件计算分子式为 $C_9H_{10}ClNO_3$，其中二级碎片含有 *m/z* 198.0314，说明含有 A 部分结构。由于母离子 *m/z* 216.0424 比 *m/z* 198.0314 多 18 Da，可判断杂质 2 脱水生成碎片 *m/z* 198.0314，由此判断杂质 2 含有 OH 基团；碎片离子 *m/z* 169.9999 为 *m/z* 198.0314 脱去乙基形成的。由此推断杂质 2 的结构与可能的二级断裂机制如图 6 所示。通过与杂质 2 对照品对比，保留时间、母离子与二级碎片离子均一致，鉴定该杂质为 2- 乙氧基 -4- 氨基 -5- 氯苯甲酸。

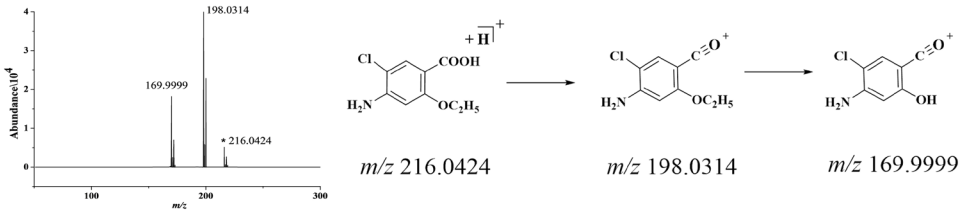


图 6　杂质 2 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 6　MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 2

杂质 3：二级质谱图见图 7，母离子 *m/z* 404.1746 $[M + H]^+$，经过软件计算分子式为 $C_{21}H_{26}ClN_3O_3$，比莫沙必利少一个 F 原子。其中碎片离子 *m/z* 198.0316 存在，说明含有 A 部分结构，该部分为酰胺键断裂生成，由此可推断杂质 3 的结构与可能的二级断裂机制如图 7 所示。结合文献报道 [18-19]，并通过与杂质 3 对照品对比，保留时间、母离子与二级碎片离子均一致，鉴定该杂质为 4- 氨基 -5- 氯 -2- 乙氧基 -*N*-{[（4- 苄基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺。

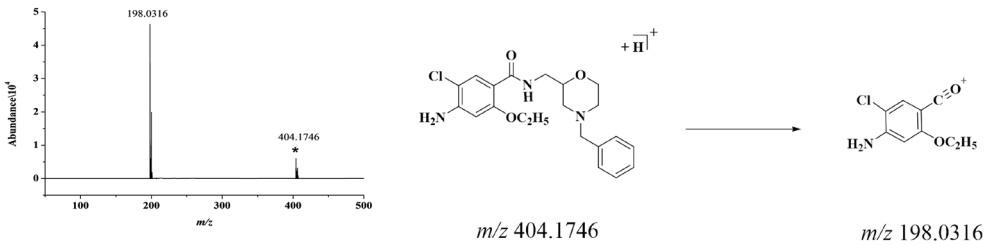


图 7　杂质 3 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 7　MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 3

杂质 4：二级质谱图见图 8，母离子 *m/z* 466.1142 $[M + H]^+$ 与 *m/z* 468.1111 $[M + H]^+$ 丰度比约为 1∶1，初步判断内含一个 Br 原子，经过软件计算分子式为 $C_{21}H_{25}BrFN_3O_3$，与莫沙必利分子式相比，可判断 Br 原子取代了 Cl 原子；碎片离子 *m/z* 241.9813 与 *m/z* 243.9810 丰度比约为 1∶1，可判断碎片内含一个 Br 原子，参考莫沙必利断裂机制，初步判断杂质 4 失去 B 部分基团生成该碎片。由此推断杂质 4 的结构与可能的断裂机制如图 8 所示。通过与杂质 4 对照品对比，保留时间、母离子与二级碎片离子均一致，鉴定该杂质为 4- 氨基 -5- 溴 -2- 乙氧基 -*N*-{[4-（4- 氟苯基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺。

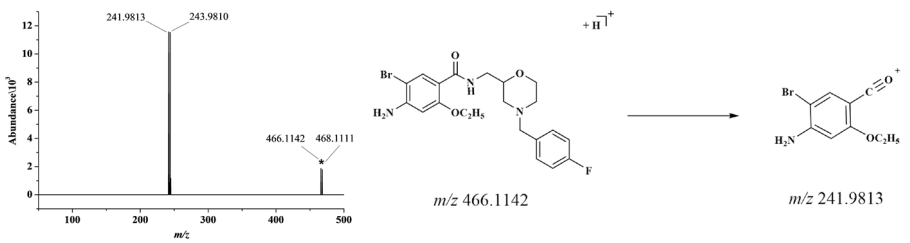


图 8　杂质 4 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 8　MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 4

杂质 5：二级质谱图见图 9，母离子 *m/z* 422.1646 $[M + H]^+$，经过软件计算分子式为 $C_{21}H_{25}ClFN_3O_3$，与莫沙必利互为同分异构体。由于存在碎片离子 *m/z* 198.0316，该基团为酰胺键断裂生成，说明含有 A 部分结构。结合合成工艺 [2]，初步判断为 F 原子位置异构，通过与杂质 5 对照品对比，保留时间、母离子与二级碎片离子均一致，鉴定该杂质为 4- 氨基 -5- 氯 -2- 乙氧基 -*N*-{[4-（3- 氟苯基）-2- 吗啉基] 甲基 } 苯甲酰胺，判断杂质 5 的结构与可能的二级断裂机制如图 9 所示。

杂质 6：二级质谱图见图 10，母离子 *m/z* 367.1232 $[M + H]^+$，经过软件计算分子式为 $C_{18}H_{20}ClFN_2O_3$。由于存在碎片离子 *m/z* 198.0321，说明含有 A 部分结构。碎片 *m/z* 198.0321 为母离子失去基团 $C_9H_{11}FNO$ 生成，参考“3.4.3”项下的合成路线，该基团与化合物Ⅲ分子式一致，由此判断杂质 6 的结构与可能的二级断裂机制如图 10 所示。

3.4.3　杂质来源推测　根据文献报道 [2, 20]，枸橼酸莫沙必利的合成路线如图 11 所示。结合表 1 中的杂质质谱信息与图 11 合成路线对各杂质来源推导如下。

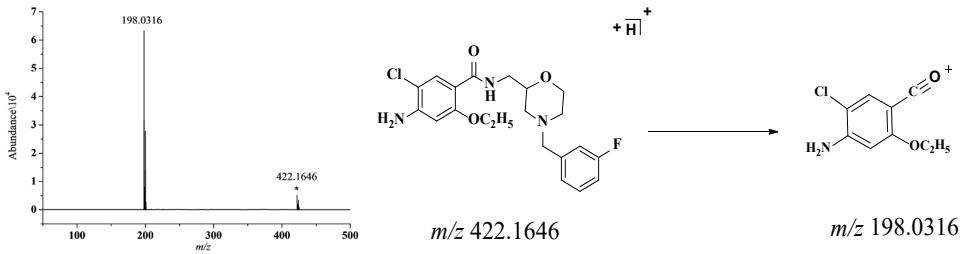


图 9 杂质 5 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 9 MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 5

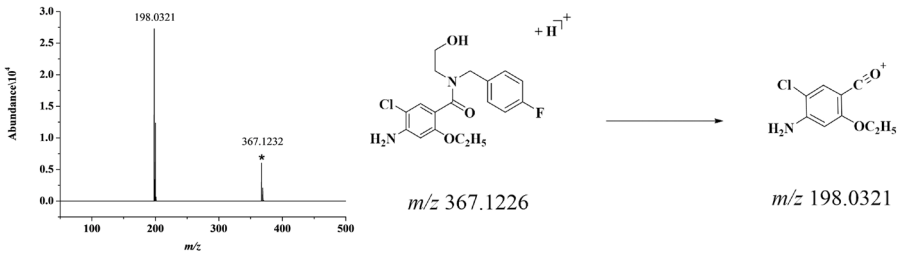


图 10 杂质 6 的 MS^2 质谱图及可能裂解途径

Fig 10 MS^2 spectrum and fragmentation pathway of impurity 6

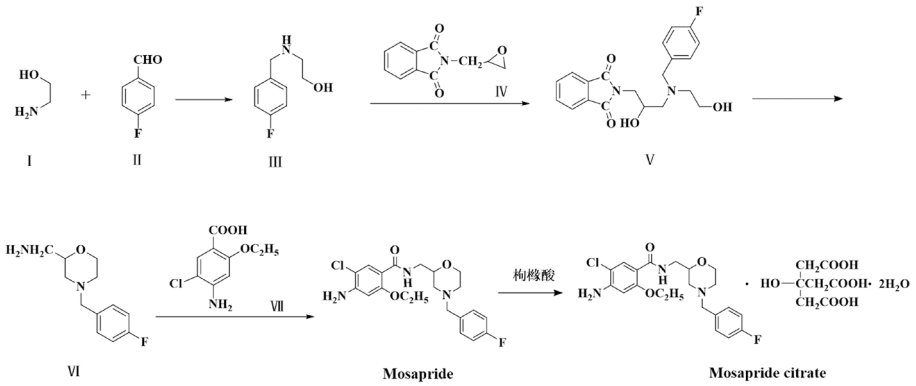


图 11 枸橼酸莫沙必利合成路线

Fig 11 Synthetic route of mosapride citrate

杂质 1 为化合物Ⅴ生成化合物Ⅵ过程中，两个 OH 未发生脱水缩合形成吗啉环，继续参与下一步反应，最终形成了该杂质；杂质 2 为枸橼酸莫沙必利酰胺键水解生成 [20]；杂质 3 结构上比莫沙必利少了一个 F 原子，初步判断为化合物Ⅱ（对氟苯甲醛）中含有部分苯甲醛杂质，苯甲醛参与合成反应最终生成了该杂质，该杂质已见报道 [18-19]；杂质 4 为化合物Ⅶ中含有部分溴代杂质（2- 乙氧基 -4- 氨基 -5- 溴苯甲酸），该溴代杂质与化合物Ⅵ反应生成；杂质 5 为化合物Ⅱ中含有的间氟苯甲醛参与合成反应生成；杂质 6 为残余的化合物Ⅲ与化合物Ⅶ发生副反应生成。

4 小结

由于美国、欧盟的药品注册管理部门对杂质鉴定有严格要求，对药物中含量≥ 0.1% 的杂质要求进行结构确证 [23]，鉴定结构后可为原料药的质量控制与合成工艺提供依据。由于 TOF 技术能准确测定样品的精确分子量，而且在全扫描和二级质谱分析过程中具有非常高的灵敏度 [24]，本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 法对枸橼酸莫沙必利中的 6 个杂质进行了定性研究，通过与杂质对照品对比，鉴定了其中 4 个杂质。需进一步优化工艺路线与存储条件，避免杂质的产生。本文可为枸橼酸莫沙必利的工艺优化与质量控制提供参考。

参考文献

[1] 张理星，臧超，夏明军，等 . 枸橼酸莫沙必利的合成工艺 [J]. 中国医药工业杂志，2017，48（11）：1578-1581.

[2] 郑琦宏，何军邀，黄喜生 . 枸橼酸莫沙必利的合成 [J]. 宁波大学学报，2002，15（2）：20-22.

[3] 刘春军，严方方，闫花丽 . 高效液相色谱法测定枸橼酸莫沙必利片及分散片溶出度 [J]. 解放军医药杂志，2016，28（7）：110-112.

[4] 安雪莲 . 奥美拉唑联合莫沙必利治疗返流性食管炎的临床研究 [J]. 中西医结合心血管病杂志，2019，7（3）：66.

[5] 陈丽秋 . 艾司奥美拉唑加莫沙必利治疗反流性咳嗽 56 例 [J]. 海峡药学，2019，31（5）：112-113.
[6] Tetsuo T，Yumi K，Ryoichi K. The 5-HT4 agonists cisapride，mosapride，and CJ-033466，a novel potent compound，exhibit different human ether-a-go-go-related gene（hERG）-blocking activities [J]. J Pharmacol Sci，2007，105：207-210.
[7] 潘艳，严柳媚 . 莫沙必利治疗胃食管反流病的临床疗效 [J]. 临床合理用药，2019，12（2C）：90-91.
[8] Liu KT，Meng ZJ，Li Y，et al. Preparation and evaluation of mosapride citrate dual-release dry suspension [J]. AAPS，2019，20（155）：1-12.
[9] 孙亚敏，栾会妮，徐勤娟，等 . HPLC 法测定枸橼酸莫沙必利分散片的有关物质 [J]. 山东化工，2020，49（19）：82-89.
[10] 孙秀芹，隋海超 . 枸橼酸莫沙必利糖浆的制备及质量控制 [J]. 药学研究，2013，32（2）：101-102.
[11] 吴善霞，张贵民，郭玉，等 . HPLC 法评价枸橼酸莫沙必利颗粒的溶出度 [J]. 沈阳药科大学学报，2014，31（12）：935-939.
[12] Nageswara RR，Nagaraju D，Alvia SN，et al. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of related-substances of mosapride citrate in bulk drugs and pharmaceuticals [J]. Pharm Biomed Anal，2004，36：759-767.
[13] 宫艺杰 . 枸橼酸莫沙必利片的初步一致性评价 [D]. 太原：山西医科大学，2018.
[14] 潘群，秦永平，向瑾，等 . HPLC-MS/MS 法测定人血浆中莫沙必利及其代谢物含量 [J]. 药物分析杂志，2009，29（11）：1842-1845.
[15] 孙晓红 . 莫沙必利的代谢和药物动力学研究 [D]. 沈阳：沈阳药科大学，2009.
[16] 张筱祎，杨婵婵，王桂红，等 . 固相萃取 - 液相色谱 - 串联质谱法测定人血浆中莫沙必利的浓度 [J]. 中南药学，2015，13（3）：280-283.
[17] 蔡梅，李忠红，杨丹 . 枸橼酸莫沙必利的手性分离 [J]. 海峡药学，2008，20（3）：56-58.
[18] 刘文华，王颖，盛龙生 . 枸橼酸莫沙必利有关杂质的研究 [J]. 中国药科大学学报，2001，32（2）：133-136.
[19] Ravindra KY，Moses BJ，Sarma MSP，et al. Application of LC-MS/MS for the identification of a polar impurity in mosapride，a gastroprokinetic drug [J]. J Pharm Biomed Anal，2003，32：361-368.
[20] 王栋，李学明，王永禄，等 . 一种枸橼酸莫沙必利及其制剂中五种关键杂质的检测方法：中国，CN 111505154 A [P]. 2020-08-07.
[21] 陈晓雨，李银峰，林秀云，等 . LC-MS 技术在化学药杂质分析中的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2014，29（6）：696-700.
[22] Editorial Board of the Japanese Pharmacopoeia. The Japanese Pharmacopoeia XVII [S]. Ministry of Health，Labour and Welfare：MHLW Press，2016：1276.
[23] 雷勇胜，宋离明，蒋庆锋 . 液质联用技术在药物的有关物质分析中的应用 [J]. 现代仪器，2011，4（17）：9-13.
[24] 彭耀文，申兰慧，王丽，等 . 液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱联用技术在药物分析中的应用 [J]. 中南药学，2015，13（9）：962-965.

（收稿日期：2021-07-29；修回日期：2021-09-29）

化胃舒颗粒中红参的皂苷类成分含量测定方法及其降解产物研究

辛旭阳，邹桂欣，赵玥，刘晶，尤献民，马跃海*（辽宁省中医药研究院，沈阳 110034）

摘要：目的 建立化胃舒颗粒中人参皂苷类成分的含量测定方法，推测皂苷类成分降解的产物和原因。**方法** 采用 HPLC 法，建立红参中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rg_3 及 Rh_2 含量测定方法；对红参煎液、化胃舒全方液、红参与乌梅共煎液及红参与不含乌梅的处方中其他药材共煎液等 4 种供试液中 5 种人参皂苷含量进行测定和比较。**结果** 红参煎液中人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 的含量分别为 134.2 mg、54.88 mg 和 234.3 mg；化胃舒全方液中未检测到人参皂苷 Rg_1 和 Re，人参皂苷 Rb_1 含量为 58.52 mg；红参与乌梅共煎液中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 成分均消失；在缺乌梅的化胃舒处方中人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 的含量分别为 40.58 mg、41.29 mg 和 120.8 mg；上述 4 种供试液中均未检测到人参皂苷 Rg_3 和 Rh_2。**结论** 乌梅药材是降低人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 含量的主要因素，处方中其他药材也有一定的作用；初步认为人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 会发生降解，但并未降解为稀有皂苷人参皂苷 Rg_3 和 Rh_2。

关键词：红参；人参皂苷；降解；高效液相色谱法；含量测定
中图分类号：R284，R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0415-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.031

基金项目：辽宁省中药资源普查项目（No.2019010）。

作者简介：辛旭阳，男，实习研究员，主要从事中药质量控制研究，email：356406183@qq.com *通信作者：马跃海，男，副研究员，主要从事中药新药研究，email：1282126439@qq.com

Content determination of ginsenosides and degradation products of red ginseng in Huaweishu granules

XIN Xu-yang, ZOU Gui-xin, ZHAO Yue, LIU Jing, YOU Xian-min, MA Yue-hai* (*Liaoning Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034)

Abstract: Objective To determine the content of ginsenosides in Huaweishu granules and reasons of the degradation products. **Methods** HPLC method was used to determine ginsenosides Rg_1, Re, Rb_1, Rg_3, and Rh_2 in Red ginseng. The content of 5 ginsenosides in the aqueous extract of Red ginseng, Huaweishu, Red ginseng with smoked plum, and Huaweishu without smoked plum was determined and compared. **Results** The content of ginsenoside Rg_1, Re and Rb_1 in the aqueous extract of Red ginseng were 134.2 mg, 54.88 mg and 234.3 mg, respectively; ginsenoside Rg_1 and Re were not detected in aqueous extract of Huaweishu and the contents of ginsenoside Rb_1 was 58.52 mg; ginsenoside Rg_1, Re and Rb_1 were not detected in the aqueous extract of Red ginseng with smoked plum; the content of ginsenoside Rg_1, Re and Rb_1 were 40.58 mg, 41.29 mg and 120.8 mg in aqueous extract of Huaweishu without smoked plum; ginsenoside Rg_3 and Rh_2 were not detected in any of the four solutions. **Conclusion** Smoked plum may be the main factor to reduce the content of ginsenoside Rg_1, Re and Rb_1, and other herbs in the prescription also have a certain effect. ginsenoside Rg_1, Re, and Rb_1 are degraded, but not into the rare saponin ginsenoside Rg_3 and Rh_2.

Key words: red ginseng; ginsenoside; degradation; HPLC; content determination

化胃舒颗粒由红参、白术、茯苓、当归、甘草、乌梅、半夏、陈皮、黄芪等药材组成，具有降逆止呕、益气健脾等功效，用于缓解癌症患者化疗引起的食欲不振、恶心等不良反应[1-3]。红参为处方中君药，所含人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 等人参皂苷有耐缺氧、抗疲劳、提高机体免疫功能等药理作用[4-8]，是与化胃舒颗粒质量密切相关的一类化学成分。但研究中发现，在化胃舒颗粒中没有检测到人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 等成分，分析有可能在提取过程中发生了降解。已有文献资料报道，人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 等成分易受温度、pH 值等因素的影响而发生降解等化学反应，在酸性条件下会降解成不同的次级苷，包括抗肿瘤活性较强的人参皂苷 Rg_3、Rh_2 等，其具有抑制肿瘤细胞的黏附、浸润、增殖以及抗肿瘤新生血管形成作用[9-19]，因此探讨化胃舒颗粒中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 降解的原因及是否生成了具有活性的降解产物人参皂苷 Rg_3 和 Rh_2，对保证化胃舒颗粒的疗效具有重要意义。

红参中的人参皂苷成分与其他药材配伍时，在提取、浓缩及干燥过程中会发生变化[20]，化胃舒颗粒是由多种中药药材组成的复方制剂，包括当归和酸性较强的乌梅等。前期研究结果提示，处方中黄芪、陈皮、玄参、甘草及乌梅等药材会对化胃舒颗粒中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 含量有影响[21]，本试验通过比较红参煎液、化胃舒全方液、红参与乌梅共煎液及去除乌梅的全方共煎液等 4 种煎液中，人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rg_3、Rh_2 的含量变化，以期为化胃舒颗粒中药效物质基础成分的测定及质量控制提供依据。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；色谱工作站（Agilent Chemstation 工作站）；DAD 二极管阵列检测器；FA1004 电子天平（上海光正医疗仪器有限公司）；KQ-250DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

人参皂苷 Rg_1（批号：111730-201027），Re（批号：110754-200822），Rb_1（批号：110704-201122），Rh_2（批号：111748-200501），Rg_3（批号：110804-200603）（供含量测定用，中国食品药品检定研究院）。红参、白术、茯苓、当归、甘草、乌梅、半夏、陈皮、黄芪（亳州市星跃药业有限责任公司，符合《药品经营质量管理规范》要求）。甲醇、乙腈为色谱纯（安徽天地高纯溶剂有限公司），水为二次蒸馏水，其余试剂均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 人参皂苷 Rg_1、Re 及 Rb_1 的含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱 C_{18}（Synergiolar-Rp，250 mm×4.6 mm，4 μm），柱温为 30 ℃，流

动相 A 为乙腈，B 为 0.1% 磷酸水溶液，梯度洗脱（0 ～ 10 min，0% ～ 3%A；10 ～ 20 min，3% ～ 10%A；20 ～ 25 min，10% ～ 33%A；25 ～ 30 min，33% ～ 50%A；30 ～ 35 min，50% ～ 80%A；35 ～ 37 min，80% ～ 83%A）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 203 nm；进样量为 10 ～ 20 μL。人参皂苷对照品混合溶液及红参供试品溶液典型 HPLC 图见图 1。

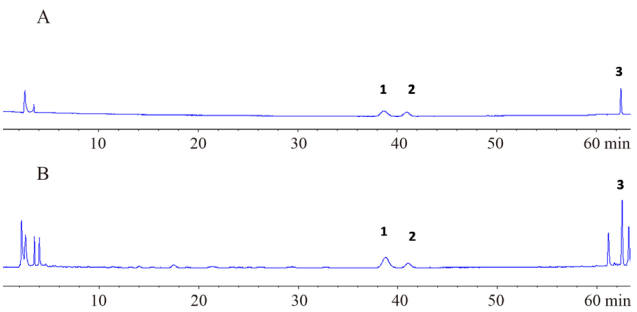


图 1　混合对照品（A）、红参供试品溶液（B）的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of mixed reference substance（A）and red ginseng sample（B）

1. 人参皂苷 Rg_1（ginsenosides Rg_1）；2. 人参皂苷 Re（ginsenosides Re）；3. 人参皂苷 Rb_1（ginsenosides Rb_1）

2.1.2　混合对照品溶液的制备　精密称取人参皂苷 Rg_1、Re 及 Rb_1 对照品各适量，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，制成每 1 mL 各含 Rg_1、Re、Rb_1 为 2.047、1.855、2.589 mg 的混合对照品储备溶液，备用。

2.1.3　红参水煎溶液的制备　取红参药材 80 g（破碎），置 2000 mL 圆底烧瓶中，加入 8 倍量（6400 mL）水，加热回流提取 4 h，滤过，放冷后，备用。

2.1.4　供试品溶液的制备　精密量取红参水煎溶液适量，加水稀释至 100 mL，摇匀，置分液漏斗中，用水饱和正丁醇提取 4 次，每次 30 mL，合并正丁醇提取液，用氨试液洗 2 次，每次 50 mL，续用正丁醇饱和水洗 1 次，正丁醇液蒸干，残渣用适量水溶解，上样于预处理的 D_{101} 大孔吸附树脂柱（20 cm×1.5 cm）上，用 4 BV 的蒸馏水洗脱，弃去洗脱液，再用 5 BV 的 70% 乙醇洗脱，收集洗脱液，水浴蒸干，残渣加甲醇溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，作为红参供试品溶液（折合红参生药量 0.2 g·mL^{-1}）。

2.1.5　线性关系考察　精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，分别置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，精密吸取各溶液 10 μL，按“2.1.1”项下色谱条件测定，以对照品进样量（X）为横坐标，相应各峰面积（Y）为纵坐标绘制标准曲线，并计算回归方程，结果 Y_{Rg_1} = 252.3X + 2.510，r = 0.9994，线性范围 0.4094 ～ 10.24 μg；Y_{Re} = 317.3X + 94.68，r = 0.9993，线性范围 0.3710 ～ 9.125 μg；Y_{Rb_1} = 421.1X + 125.6，r = 0.9995，线性范围 0.5178 ～ 12.95 μg，各成分在范围内与峰面积线性关系良好。

2.1.6　精密度试验　取红参水煎溶液适量，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件平行进样 6 次，测定人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 峰面积，计算 *RSD* 分别为 1.2%、2.0% 和 1.1%，表明方法的精密度良好。

2.1.7　稳定性试验　精密吸取“2.1.6”项下供试品溶液，分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时进样，测定人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 峰面积，计算 *RSD* 分别为 2.0%、1.8%、1.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8　重复性试验　精密量取红参提取液适量，平行 6 份，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 含量分别为 131.2、50.17、237.1 mg·g^{-1}，*RSD* 分别为 1.0%、1.3%、1.9%，表明方法重复性良好。

2.1.9　加样回收试验　精密量取红参水煎溶液适量，平行 6 份，精密加入人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 对照品溶液适量，再加水至约 100 mL，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 回收率及 *RSD*，结果见表 1，表明方法的加样回收率良好。

2.2　人参皂苷 Rh_2、Rg_3 含量测定方法

2.2.1　色谱条件　Kromail C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相 A 为乙腈，B 为 0.05% 磷酸水溶液，梯度洗脱（0 ～ 40 min，40% ～ 60%A；40 ～ 50 min，60% ～ 100%A），流速为 1.0 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃，检测波长为 203 nm，进样量为 20 ～ 50 μL。

2.2.2　对照品溶液的制备　精密称取人参皂苷 Rg_3 及 Rh_2 对照品各适量，分别置 5 mL 量瓶中，加甲醇使溶解并定容至刻度，摇匀，备用；分别精密量取上述各溶液 2 mL，置同一 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，制成每 1 mL 各含人参皂苷 Rg_3、Rh_2 为 1.050 mg、1.194 mg 的混合对照品溶液，备用。

2.2.3　供试品溶液的制备　取样品液 100 mL，用水饱和正丁醇提取 6 次，每次 30 mL，合并正丁醇提取液，水浴蒸干，残渣加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中，摇匀，备用。

表 1 人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 加样回收试验

Tab 1 Recovery of ginsenosides Rg_1, Re and Rb_1

化合物	样品中原含量 /mg	检出量 /mg	加入量 /mg	检出总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%
人参皂苷 Rg_1	0.6629	0.6826	0.6987	1.3455	97.70	97.92	0.72
	0.6629	0.6782	0.6987	1.3411	97.07		
	0.6629	0.6789	0.6987	1.3418	97.17		
	0.6629	0.6877	0.6987	1.3506	98.43		
	0.6629	0.6872	0.6987	1.3501	98.35		
	0.6629	0.6902	0.6987	1.3531	98.78		
人参皂苷 Re	0.2535	0.2590	0.2683	0.5125	96.53	96.56	0.65
	0.2535	0.2602	0.2683	0.5137	96.98		
	0.2535	0.2562	0.2683	0.5097	95.49		
	0.2535	0.2610	0.2683	0.5145	97.28		
	0.2535	0.2598	0.2683	0.5133	96.83		
	0.2535	0.2583	0.2683	0.5118	96.27		
人参皂苷 Rb_1	1.1980	1.1582	1.2108	2.3562	95.66	95.84	0.31
	1.1980	1.1621	1.2108	2.3601	95.98		
	1.1980	1.1569	1.2108	2.3549	95.55		
	1.1980	1.1642	1.2108	2.3622	96.15		
	1.1980	1.1567	1.2108	2.3547	95.53		
	1.1980	1.1647	1.2108	2.3627	96.19		

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8 及 1.6 mL，分别置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，精密吸取各溶液 20 μL，进样测定，以对照品进样量（X）为横坐标，相应峰面积（Y）为纵坐标，绘制标准曲线，并计算回归方程。结果 $Y_{Rg3} = 1497X + 51.42$，$r = 0.9998$，线性范围为 0.4200 ～ 6.72 μg；$Y_{Rh2} = 1957X + 22.21$，$r = 0.9999$，线性范围为 0.478 ～ 7.642 μg。

2.3 化胃舒颗粒中红参中苷类成分降解研究

2.3.1 研究思路 研究思路见图 2。

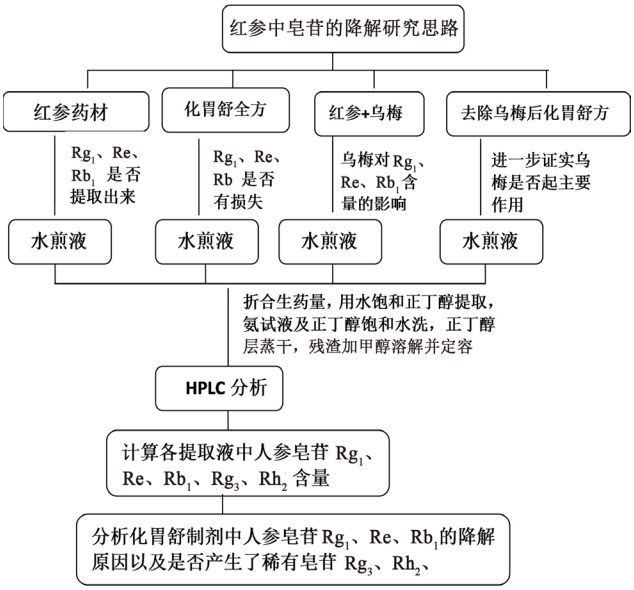


图 2 红参中皂苷的降解研究思路

Fig 2 Research ideas on the degradation of ginsenoside

2.3.2 样品溶液的制备 红参单煎液制备参见“2.1.3”项下方法。

① 全处方共煎液：按处方称取相当于红参 80 g 处方量的所有药材适量，加入 8 倍量水，回流提取 4 h，滤过，放冷后，取滤液，备用。

② 红参配乌梅共煎液：取红参 80 g，乌梅片 165 g，加水 8 倍量，回流提取 4 h，滤过，放冷，取滤液，备用。

③ 去除乌梅外红参与其他药材共煎液：除乌梅药材外，按处方取相当于红参 80 g 处方量的其他药材，加入 8 倍量水，回流提取 4 h，滤过，放冷后，取滤液，备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.3.2”项下各溶液适量，置分液漏斗中，按“2.1.3”项下方法制备人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 供试品溶液，按“2.2.3”项下方法制备人参皂苷 Rg_3、Rh_2 供试品溶液，滤过，备用。

2.3.4 测定方法与结果 分别吸取对照品、供试品溶液及加标样品溶液 20 ～ 50 μL，注入液相色谱仪中，分别按“2.1.1”及“2.2.1”项下色谱条件测定，计算相当于每 100 g 红参药材中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 及 Rg_3、Rh_2 含量，结果见表 2，其典型 HPLC 色谱图见图 3 ～ 4。

从表 2 可知，红参提取液中人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 的含量分别为 134.2、54.88 和 234.3 mg，而在化胃舒全处方提取液中人参皂苷 Rg_1 和 Re 没有被检测到，Rb_1 的含量也下降约 75%；红参与乌梅共煎液中未检测到人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1；而在

表 2　不同煎提液中人参皂苷的含量 (mg)

Tab 2　Contents of ginsenoside in different extracts (mg)

煎提液	Rg_1	Re	Rb_1	Rg_3	Rh_2
红参单煎液	134.2	54.88	234.3	—	—
全处方共煎液	—	—	58.52	—	—
红参与乌梅共煎液	—	—	—	—	—
去除乌梅外红参与其他药材共煎液	40.58	41.29	120.8	—	—

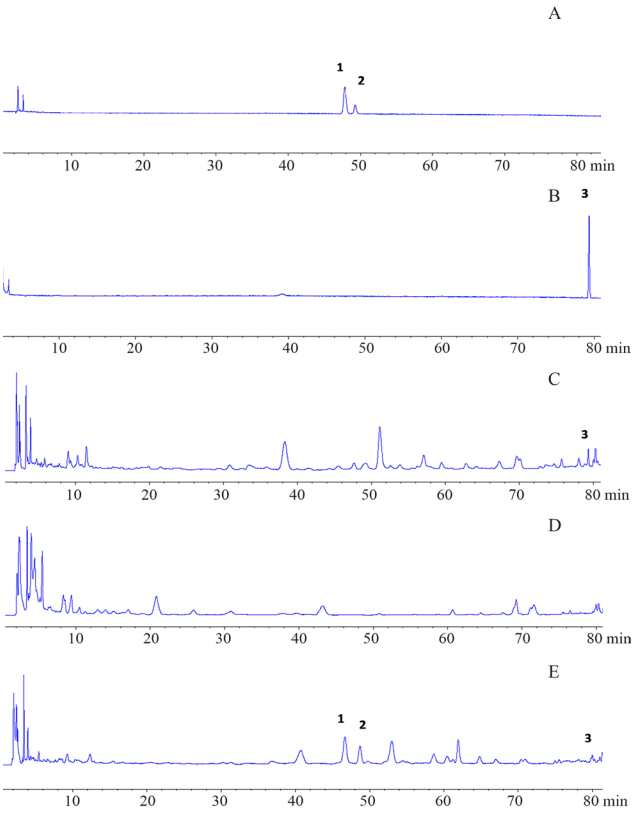


图 3　化胃舒颗粒中人参皂苷类成分的 HPLC 图

Fig 3　HPLC of ginsenosides in aqueous extract of Huaweishu

A. 人参皂苷 Rg_1、Re 对照品（ginsenosides Rg_1 and Re reference）；B. 人参皂苷 Rb_1 对照品（ginsenosides Rb_1 reference）；C. 全处方共煎液（aqueous extract of Huaweishu）；D. 红参配乌梅共煎液（aqueous extract of red ginseng with smoked plum）；E. 去除乌梅共煎液（Huaweishu without smoked plum）；1. 人参皂苷 Rg_1（ginsenosides Rg_1）；2. 人参皂苷 Re（ginsenosides Re）；3. 人参皂苷 Rb_1（ginsenosides Rb_1）

缺乌梅的化胃舒处方中可以检出人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1，只是含量有所降低。在 4 种煎提液中，经加标样品验证，均未检测到人参皂苷 Rg_3 和 Rh_2。

3　讨论

3.1　检测波长的确定

在 2020 年版《中国药典》一部红参饮片项下，人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 的检测波长为 203 nm，没有人参皂苷 Rg_3 及 Rh_2 的测定波长，在本试验中曾对这 5 种待测成分的对照品溶液进行在线紫外扫描，结果均为末端吸收，结果 5 种成分的吸收曲线

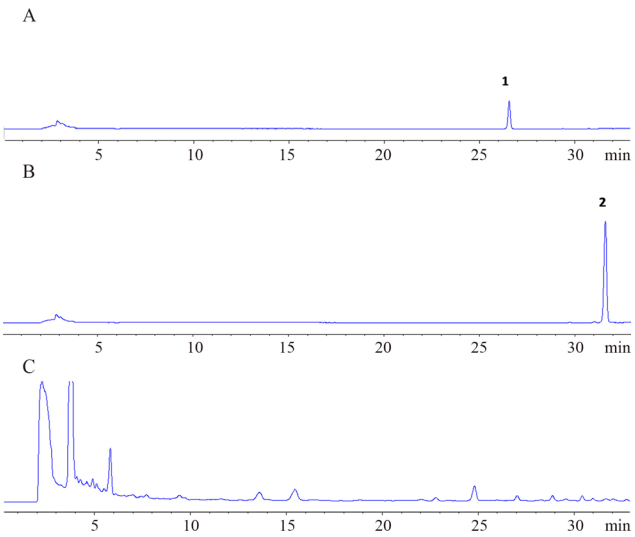


图 4　人参皂苷 Rg_3 对照品（A）、人参皂苷 Rh_2 对照品（B）、全处方共煎液（C）的 HPLC 图

Fig 4　HPLC of ginsenosides Rg_3（A），ginsenosides Rh_2（B）and aqueous extract of Huaweishu（C）

1. 人参皂苷 Rg_3（ginsenosides Rg_3）；2. 人参皂苷 Rh_2（ginsenosides Rh_2）

相似，因此参考人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 检测波长，将人参皂苷 Rg_3 及 Rh_2 的测定波长确定为 203 nm。

3.2　乌梅对化胃舒中人参皂苷的影响

从表 2 可知，在化胃舒全处方共煎液中，人参皂苷 Rg_1，Re 没有检测到，人参皂苷 Rb_1 含量显著降低，可能是由于这 3 种成分被降解。有文献报道在特定的化学环境或生物环境下，常见人参皂苷的糖苷键可发生断裂，降解为稀有人参皂苷 Rh_2 及 Rg_3 等 [22]。人参皂苷 Rh_2 属于人参二醇型单糖皂苷，人参皂苷 Rg_3 属于人参二醇型双糖皂苷，在醋酸溶液酸性条件下，二醇组人参皂苷在提取过程中发生降解，可以获得人参皂苷 Rg_3[23]，另外人参皂苷 Rb_1 发生水解可以转化为 20*R* 和 20*S*-人参皂苷 Rg_3，Rb_1 和 Rg_3，二者呈现明显的互为消长关系 [24]。乌梅中含有丰富的有机酸，其水煎液 pH 值在 2.7 左右 [25]，本研究中，红参与乌梅配伍提取时，人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 的含量均未检出，提示处方中乌梅药材所含酸性化合物可将人参皂苷水解，缺乌梅的化胃舒药材配伍共煎液中可检测到人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 含量也证实了这一结果，在去除乌梅后，共煎液中人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 都能检出，只是含量有所降低，这也说明在化胃舒的处方中可能还存在其他成分，影响人参皂苷 Rg_1、Re 和 Rb_1 的含量。

3.3　人参皂苷 Rg_3、Rh_2 测定方法优化及峰确认

由于人参皂苷 Rg_3、Rh_2 在红参中的含量很低，复杂的处理过程会使其收率损失较大，因此供试

品溶液制备中直接用正丁醇提取的方法，与其他杂质成分的分离在色谱条件优化中解决，试验中对人参皂苷 Rg_3、Rh_2 进行了多种色谱条件试验，并进行加标验证及在线紫外光谱扫描以保证测定结果的准确性，结果表明在人参皂苷 Rg_3 与 Rh_2 保留时间附近有其他色谱峰，但都不是人参皂苷 Rg_3 与 Rh_2。

3.4 小结

本文建立了化胃舒颗粒中红参与不同药材配伍共煎液中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rg_3 和 Rh_2 的 HPLC 色谱方法，测定了上述人参皂苷成分与化胃舒颗粒中不同药材配伍时的含量，并对化胃舒颗粒中未检出人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 成分的原因进行了推测和验证，提出乌梅药材是降低人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 含量的主要因素，处方中其他药材也有一定的影响；初步推断人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 发生了降解，但并没有降解为稀有人参皂苷 Rg_3 和 Rh_2，由于人参皂苷水解的过程受多种因素影响，产物复杂，进一步的研究还在进行中。

参考文献

[1] 孟莉，向绍杰，刘小虎，等 . 化胃舒颗粒对 DNCB 致小鼠迟发型超敏反应模型的影响 [J]. 中国医药科学，2018，8（13）：49-51.

[2] 殷紫，向绍杰，乔敏，等 . 化胃舒颗粒对抗化疗药引起呕吐药效学实验研究及作用机制探讨 [J]. 辽宁中医杂志，2013，40（6）：1252-1255.

[3] 孟莉，贾冬，向绍杰，等 . 化胃舒颗粒体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 实验动物科学，2013，30（3）：6-9.

[4] 孙娜，徐钢，徐珊，等 . 人参炮制对其化学成分和药理作用的影响 [J]. 中国药房，2016，27（6）：857-859.

[5] 赵远，戴佳丽，吕佳，等 . 人参及其炮制品对小鼠耐缺氧抗疲劳作用的研究 [J]. 辽宁中医杂志，2014，41（5）：1040.

[6] 沈干，金钰，陈德监，等 . 人参皂苷 Rbl 与红景天苷对抗皮肤光老化作用的研究 [J]. 东南大学学报（医学版），2010，29（3）：336-339.

[7] 王毅，姜艳，王本祥，等 . 人参皂苷 Rg_1 及其肠内菌代谢产物 Rh_1 对小鼠免疫细胞功能的影响 [J]. 药学学报，2002，37（12）：927-929.

[8] 潘维华，刘晓颖，王英平，等 . 人参皂苷对小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞免疫活性的影响 [J]. 特产研究，2011（1）：16-19.

[9] 王蔚，王旭，余苏云，等 . 人参皂苷 Rg_3 调节免疫检查点 PD-L1 抑制肺癌 Lewis 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. 中草药，2019，50（1）：166-171.

[10] Tatsuka M，Maedam，Ota T. Anticarcinogenicefect and enhancemen of metast aticpotential of BALB/C3T3 cells by ginsenoside Rh_2 [J]. Chin J Cancer Res，2001，92（11）：1184-1189.

[11] Ota T，Maed AM，Odashim AS，et al. G1 phase-specific suppression of the CDK2 activity by ginsenoside [J]. Life Sci，1996，60（2）：39-44.

[12] 毕缓，曾宇，付水，等 . 人参皂苷 Rg_3 联合 125I 粒对患者血清 TGF 和 VEGF 的影响 [J]. 疑难病杂志，2019，18（3）：280-284.

[13] 李烨婷，唐有为 . 人参皂苷 Rg_3 体外通过抑制 Wnt/β 联蛋白通路阻止胃癌 SGC7901 细胞血管生成拟态的形成 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2019，26（5）：518-523.

[14] 安辉，李思思，高野，等 . 人参皂苷 Rg_3 协同 TRAIL 促进肺癌 H358 细胞凋亡的机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2019，26（9）：988-992.

[15] 闫克敏，肖海娟，杨林，等 . 人参皂苷 Rh_2 对结肠癌耐药细胞 HCT116/L-OHP 侵袭迁移能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（13）：73-78.

[16] 胡双双，闫克敏，王娇娇，等 . 人参皂苷 Rh_2 对胃癌细胞 SGC7901/ADR 耐药敏感性的影响 [J]. 中草药，2019，49（17）：4113-4117.

[17] 郑雪莹，曹宁宁，裴帅，等 . 人参皂苷 Rh_2 抗肝癌作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（20）：208-213.

[18] 李靖，郑旭薇，贾建光，等 . 人参皂苷 Rh_2 对低浓度的奥沙利铂诱导人胃癌 SGC-7901 侧群细胞凋亡的增敏作用 [J]. 蚌埠医学院学报，2018，43（5）：561-567.

[19] 王露，权利娜 . 人参皂苷 Rh_2 对乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 凋亡和微小核糖核酸表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（16）：1794-1797.

[20] 贝圆，冯俭，罗方利，等 . 人参当归配伍对人参中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 溶出率的影响 [J]. 华西药学杂志，2013，28（6）：619-621.

[21] 王玲玲，邹桂欣，王光函，等 . 化胃舒复方配伍对红参苷类成分的影响 [J]. 辽宁中医杂志，2019，46（7）：1477-1480.

[22] 陈阿丽，崔永霞，李俊伟，等 . 人参与含不同成分的中药配伍后人参皂苷的动态变化研究 [J]. 中国医药导报，2009，6（18）：61-62.

[23] 刘迎，陈妍心，吴谦，等 . 20（*S/R*）- 人参皂苷 Rg_3 的制备及调节 Th2/Th1 免疫失衡活性 [J]. 高等学校化学学报，2018，39（11）：2419-2424.

[24] 冯仲扬，张燮 . HPLC 检测人参皂苷在温和酸性条件下的降解变化 [J]. 中国药学杂志，1997，32（12）：772-774.

[25] 李建民，秦伟华 . 乌梅与其伪品的鉴别 [J]. 时珍国药研究，1998，9（2）：125.

（收稿日期：2021-07-28；修回日期：2021-09-30）

药物与临床

Filgotinib 治疗类风湿关节炎疗效及安全性的 meta 分析

赵倩[1]，温瑾[2*]，陈瑞祥[2]，代伟[2]，刘晓波[1]，张清树[1]，何姣[1]（1. 大理大学药学院，云南 大理 671000；2. 云南省第三人民医院药剂科，昆明 650011）

摘要：目的 对 filgotinib 治疗类风湿关节炎（RA）的疗效及安全性进行系统评价，为 RA 的治疗提供参考。**方法** 计算机检索 PubMed、Embase、Cochrane Library、Web of Science、中国知网、维普及万方数据库，检索时限均为建库至 2021 年 1 月，收集 filgotinib 治疗 RA 的随机对照试验。采用 RevMan 5.3 软件进行 meta 分析。**结果** 共纳入 5 项研究，3544 例患者。Meta 分析结果显示，试验组病情缓解 20%（ACR20，*RR* ＝ 1.58，95%*CI* ＝ 1.41 ～ 1.77，*P* ＜ 0.000 01）、病情缓解 50%（ACR50，*RR* ＝ 2.19，95%*CI* ＝ 1.89 ～ 2.53，*P* ＜ 0.000 01）、病情缓解 70%（ACR70，*RR* ＝ 2.76，95%*CI* ＝ 2.38 ～ 3.20，*P* ＜ 0.000 01）、28 个关节活动度评分（DAS28-CRP）≤ 3.2（*RR* ＝ 1.96，95%*CI* ＝ 1.79 ～ 2.14，*P* ＜ 0.000 01）、DAS28-CRP ＜ 2.6（*RR* ＝ 2.58，95%*CI* ＝ 2.27 ～ 2.94，*P* ＜ 0.000 01）的患者比例显著高于对照组；安全性方面，试验组发生总不良事件（*RR* ＝ 1.06，95%*CI* ＝ 1.01 ～ 1.10，*P* ＝ 0.010）、感染（*RR* ＝ 1.13，95%*CI* ＝ 1.03 ～ 1.24，*P* ＝ 0.01）和上呼吸道感染（*RR* ＝ 1.50，95%*CI* ＝ 1.11 ～ 2.02，*P* ＝ 0.009）的风险高于对照组，而使用 filgotinib 降低了血红蛋白减少的发生率（*RR* ＝ 0.61，95%*CI* ＝ 0.50 ～ 0.74，*P* ＜ 0.000 01）。亚组分析显示，filgotinib 50 mg 组疗效与对照组相比无显著差异，而 100 mg、200 mg 组的疗效显著高于对照组，且 200 mg 组疗效最佳。**结论** Filgotinib 治疗 RA 具有较好的疗效，有轻微不良反应，可能是 RA 治疗的新方法。由于本研究纳入文献数量有限，该结论还有待大样本量研究进一步验证。

关键词：Filgotinib；类风湿关节炎；meta 分析；随机对照试验
中图分类号：R593.2，R977.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0421-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.032

Efficacy and safety of filgotinib for rheumatoid arthritis: a meta analysis

ZHAO Qian[1], WEN Jin[2*], CHEN Rui-xiang[2], DAI Wei[2], LIU Xiao-bo[1], ZHANG Qing-shu[1], HE Jiao[1] (1. *College of Pharmacy*, *Dali University*, *Dali Yunnan* 671000; 2. *Department of Pharmacy*, *Yunnan Third People's Hospital*, *Kunming* 650011)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy and safety of filgotinib for rheumatoid arthritis (RA), and to provide reference for the treatment of RA. **Methods** We retrieved PubMed, Embase, Cochrane Library, Web of Science, CNKI, VIP and Wanfang database from their establishment to January 2021. Randomized controlled trials of filgotinib for RA were collected. Meta analysis was performed by RevMan 5.3 software. **Results** Five RCTs involving 3544 patients were included. The meta analysis showed that the proportion of patients of the trial group who met the 20% remission (ACR20, *RR* ＝ 1.58, 95%*CI* ＝ 1.41 － 1.77, *P* ＜ 0.000 01), 50% remission (ACR50, *RR* ＝ 2.19, 95%*CI* ＝ 1.89 － 2.53, *P* ＜ 0.000 01), 70% remission (ACR70, *RR* ＝ 2.76, 95%*CI* ＝ 2.38 － 3.20, *P* ＜ 0.000 01), and 28 joint disease activity scores (DAS28-CRP) ≤ 3.2

基金项目：云南省科技厅——云南中医学院应用基础研究联合专项项目 [No.2018FF001（-062）]。
作者简介：赵倩，女，硕士研究生，主要从事临床药学工作，email：2438042427@qq.com *__通信作者__：温瑾，女，硕士，主管药师，主要从事药物基因组学、治疗药物监测等工作，email：ynwjin@163.com

(*RR* = 1.96, 95%*CI* = 1.79 − 2.14, *P* < 0.000 01), DAS28-CRP < 2.6 (*RR* = 2.58, 95%*CI* = 2.27 − 2.94, *P* < 0.000 01) were all significantly higher than those of the control group. In terms of safety, the risk of adverse events (*RR* = 1.06, 95%*CI* = 1.01 − 1.10, *P* = 0.010), infection (*RR* = 1.13, 95%*CI* = 1.03 − 1.24, *P* = 0.01) and upper respiratory tract infection (*RR* = 1.50, 95%*CI* = 1.11 − 2.02, *P* = 0.009) of the trial group were higher than those of the control group, and the risk of hemoglobin reduction was decreased due to the use of filgotinib (*RR* = 0.61, 95%*CI* = 0.50 − 0.74, *P* < 0.000 01). Subgroup analysis showed that there was no significant difference between the efficacy of filgotinib (50 mg) group and the control group, while the efficacy of the 100 mg and the 200 mg groups were significantly higher than those in the control group, and the efficacy of the 200 mg group was the best. **Conclusion** Filgotinib is effective for RA with mild side effects, and it may be a new strategy for RA. Due to the limited number of literatures included in this study, which needs support from future studies.

Key words: filgotinib; rheumatoid arthritis; meta analysis; randomized controlled trial

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）因慢性、持续性的炎症导致患者关节破坏、畸形、残疾和生活质量下降，对患者造成了严重的心理负担[1]。早期使用甲氨蝶呤（MTX）可以达到缓解疾病或降低疾病活动的目的[2-4]，对于预防残疾、关节破坏以及提高生活质量至关重要。然而，单独使用 MTX 仅能使约 40% 的患者达到这一目标[5]，对于 MTX 无效的患者，生物类抗风湿药可改善患者的病情，但不良反应较大[6]，使得 RA 患者的预后较差。因此，临床急需寻找新的治疗方法。

Janus 激酶（Janus kinase，JAK）抑制剂是一类靶向合成抗风湿药，具有控制炎症及免疫反应的作用，对一系列炎性疾病（如 RA、强直性脊柱炎等）具有较好的疗效[7-8]。Filgotinib 是一种口服、可逆的 JAK1 抑制剂，临床试验显示 filgotinib 具有比阿达木单抗更优的疗效[9]，该药于 2020 年 9 月在欧洲和日本获批上市，用于对常规治疗无反应的中重度 RA 患者[10]。目前，JAK 抑制剂已作为 RA 患者的补充疗法，对于传统抗风湿药无反应的患者疗效显著。若 filgotinib 能够作为一种全新的 JAK 抑制剂应用于临床，将会为 RA 患者带来更多的效益。但目前国内对 filgotinib 的研究相对较少，且缺乏相关的系统评价。本研究对 filgotinib 治疗 RA 的疗效及安全性进行了全面评价，旨在为其今后在国内的研究及应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 研究对象 国内外公开发表的随机对照试验（RCT）。RA 患者，年龄≥ 18 岁，诊断标准为 2010 年美国风湿病学会（American College of Rheumatology，ACR）或欧洲抗风湿联盟标准[11]。试验组：filgotinib（50 mg、100 mg、200 mg，qd），对照组：安慰剂或 MTX。

1.1.2 结局指标 疗效指标：① 按 ACR 标准判断病情缓解 20%、50%、70% 的患者比例（ACR20、ACR50、ACR70）；② 以 C 反应蛋白计算的 28 个关节活动度评分达到低疾病活动（DAS28-CRP ≤ 3.2）、临床缓解（DAS28-CRP < 2.6）的患者比例。安全性指标：① 总不良事件发生率；② 其他不良事件发生率（严重不良事件、感染、严重感染、带状疱疹感染、上呼吸道感染、鼻咽炎）；③ 血液系统不良事件发生率（所有级别的血红蛋白、血小板、中性粒细胞、淋巴细胞减少）。

1.1.3 排除标准 ① 其他炎性风湿性关节炎疾病；② 治疗疗程不足 12 周的研究；③ 仅有摘要的文献；④ 对临床试验进行再次分析的文献；⑤ 基础研究、综述等。

1.2 文献检索策略

对 PubMed、Embase、Cochrane Library、Web of Science、中国知网、维普、万方数据库的文献进行全面检索，检索时间为各数据库建库至 2021 年 1 月。中文检索词包括“类风湿关节炎”“非戈替尼”；英文检索词包括“Rheumatoid arthritis”“Filgotinib”“GLPG0634”。采用主题词与自由词结合的方式进行检索。中文检索式：主题（非戈替尼＋ filgotinib）* 主题（类风湿关节炎）；英文检索式为：[（GLPG0634[Supplementary Concept]）OR（filgotinib[Title/Abstract]）]AND（Rheumatoid

arthritis[Title/Abstract])。

1.3　文献筛选及资料提取

由两名作者对文献进行筛选，最终确定纳入文献并提取纳入研究基本信息、患者基本信息、干预措施、背景治疗、结局指标等。如遇分歧，双方协商或请求第三名作者解决。

1.4　纳入文献质量评价

两名作者根据 Cochrane 系统评价员手册 5.1.0 提供的偏倚风险评估工具的要求，对 5 项评估内容（随机序列生成、分配隐藏、盲法、结果数据的完整性和其他偏倚来源）进行“高风险”，“不清楚”和“低风险”评价 [12]。

1.5　统计学方法

采用 RevMan 5.3 统计软件进行 meta 分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。疗效及安全性指标以相对危险度（relative risk，*RR*）和 95% 置信区间（confidence intervals，*CI*）表示。以 Q 检验和 I^2 检验评估异质性，根据异质性结果采用相应的模型进行 meta 分析（$P > 0.1$，$I^2 < 50\%$，采用固定效应模型；反之，采用随机效应模型）。

2　结果

2.1　文献检索结果及纳入研究基本信息

检索数据库得到相关文献 488 篇，筛选后，最终纳入 5 项研究 [9，13-16]，共 3544 例患者。筛选流程详见图 1，纳入文献基本信息见表 1。

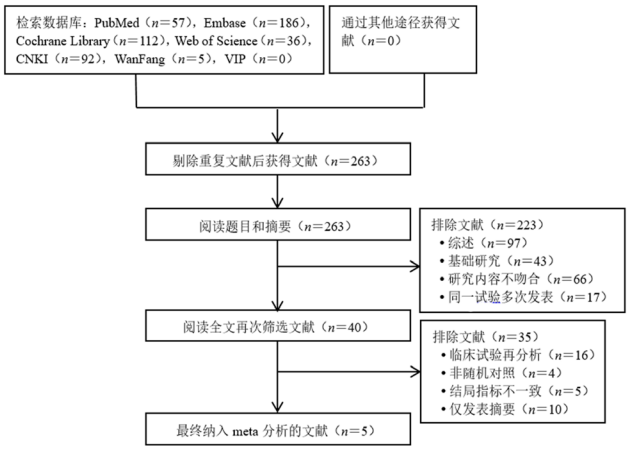


图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Literature screening

表 1　纳入研究基本信息

Tab 1　General information of included study

纳入研究	组别	干预措施	例数	年龄 / 岁	性别 / 例		疗程 / 周	背景治疗	结局指标
					女	男			
Westhovens 2017[13]	试验组	filgotinib 50 mg qd	82	53±1.5	69	13	24	MTX	①②③④⑤
		filgotinib 100 mg qd	85	52±1.4	65	20			
		filgotinib 200 mg qd	86	55±1.3	74	12			
	对照组	安慰剂	86	52±1.4	70	16			
Kavanaugh 2017[14]	试验组	filgotinib 50 mg qd	72	52±1.6	62	10	24	MTX	①②③④⑤
		filgotinib 100 mg qd	70	53±1.4	53	17			
		filgotinib 200 mg qd	69	52±1.4	60	9			
	对照组	安慰剂	72	52±1.4	56	16			
Genovese 2019[15]	试验组	filgotinib 100 mg qd	153	55±12.0	119	34	24	bDMARD	①②③④⑤
		filgotinib 200 mg qd	148	56±12.5	120	27			
	对照组	安慰剂	148	56±12.1	121	27			
Combe 2021[9]	试验组	filgotinib 100 mg qd	480	53±12.6	399	81	52	MTX	①②③④⑤
		filgotinib 200 mg qd	477	52±12.8	379	98			
	对照组	安慰剂	477	53±12.8	391	86			
Westhovens 2021[16]	试验组	filgotinib 100 mg qd ＋ MTX	207	54±12.6	158	49	52	未提及	①②③④⑤
		filgotinib 200 mg qd ＋ MTX	416	53±13.8	325	91			
	对照组	MTX	416	53±13.7	312	104			

注：① ACR20、ACR50、ACR70 患者比例；② DAS28-CRP ≤ 3.2、DAS28-CRP < 2.6 的患者比例；③ 总不良事件发生率（total incidence of adverse events）；④ 其他不良事件发生率（incidence of other adverse events）；⑤ 血液系统不良事件发生率（incidence of hematological system adverse events）；bDMARD：生物类抗风湿药（biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs）。

2.2　纳入文献质量评价

两位作者独立进行文献质量评价，5 项研究中 3 项 [13-15] 描述了随机序列产生的方法及分配隐藏，5 项 [9，13-16] 研究均使用了盲法，并且结局数据完整，均未选择性报告结果，所有研究均不清楚是否有其他偏倚来源（见图 2）。

2.3　Meta 分析结果

2.3.1　ACR20　5 项研究 [9，13-16] 均报道了ACR20。

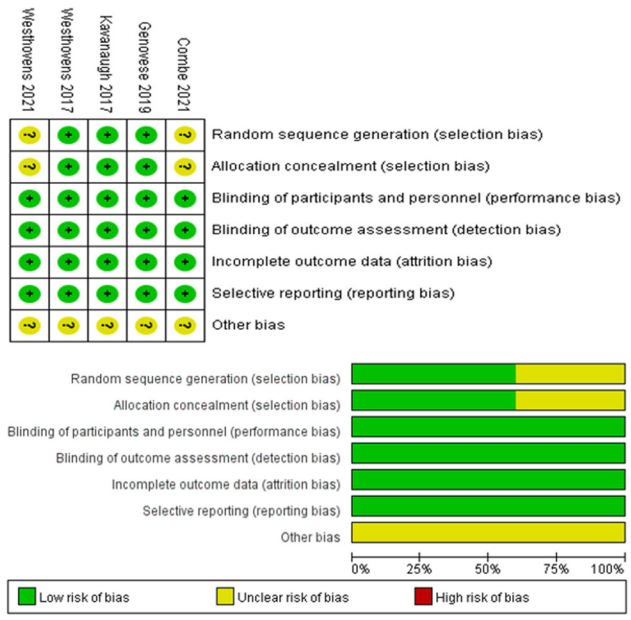


图 2　偏倚风险

Fig 2　Bias risk

异质性检验（I^2 = 77%，P < 0.000 01），采用随机效应模型进行 meta 分析。结果显示，试验组的 ACR20 显著高于对照组（RR = 1.58，95%CI = 1.41 ～ 1.77，P < 0.000 01）。对试验组剂量进行亚组分析，结果显示 50 mg 剂量组 ACR20 与对照组无显著差别，而 100 mg 组（RR = 1.50，95%CI = 1.26 ～ 1.78，P < 0.000 01）、200 mg 组（RR = 1.66，95%CI = 1.37 ～ 2.01，P < 0.000 01）的 ACR20 显著高于对照组，见图 3。

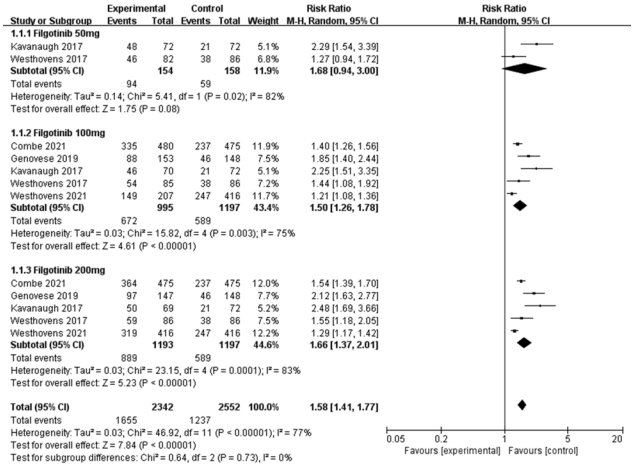


图 3　ACR20 的 meta 分析森林图

Fig 3　Forest plot of meta-analysis of ACR20

2.3.2　ACR50　5 项研究[9, 13-16]均报道了 ACR50。异质性检验（I^2 = 47%，P = 0.03），采用随机效应模型进行 meta 分析。结果显示，试验组 ACR50 显著高于对照组（RR = 2.19，95%CI = 1.89 ～ 2.53，P < 0.000 01）。其中，filgotinib 50 mg 组（RR = 2.51，95%CI = 1.59 ～ 3.97，P < 0.0001）、100 mg 组（RR = 1.91，95%CI = 1.57 ～ 2.34，P < 0.000 01）、200 mg 组（RR = 2.41，95%CI = 1.93 ～ 3.00，P < 0.000 01）的 ACR50 均显著高于对照组，见图 4。

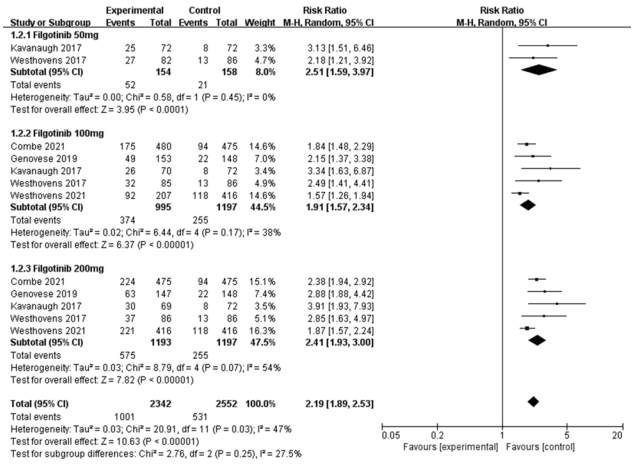


图 4　ACR50 的 meta 分析森林图

Fig 4　Forest plot of meta-analysis of ACR50

2.3.3　ACR70　5 项研究[9, 13-16]均报道了 ACR70，异质性检验（I^2 = 0%，P = 0.51），采用固定效应模型进行 meta 分析。结果显示，试验组的 ACR70 显著高于对照组（RR = 2.76，95%CI = 2.38 ～ 3.20，P < 0.000 01）。并且亚组分析也显示 filgotinib 50 mg 组（RR = 2.19，95%CI = 1.02 ～ 4.66，P = 0.04）、100 mg 组（RR = 2.46，95%CI = 1.96 ～ 3.09，P < 0.000 01）、200 mg 组（RR = 3.05，95%CI = 2.49 ～ 3.74，P < 0.000 01）的 ACR70 均显著高于对照组，见图 5。

2.3.4　DAS28-CRP ≤ 3.2（低疾病活动）　5 项研究[9, 13-16]均报道了 DAS28-CRP ≤ 3.2 的患者比例。异质性检验（I^2 = 0%，P = 0.55），采用固定效应模型进行 meta 分析。结果显示试验组 DAS28-CRP ≤ 3.2 的患者比例显著高于对照组（RR = 1.96，95%CI = 1.79 ～ 2.14，P < 0.000 01），亚组分析表明 filgotinib 50 mg 剂量组对患者 DAS28-CRP 的改善没有明显作用（RR = 1.68，95%CI = 0.82 ～ 3.44，P = 0.16），而 100 mg 组（RR = 1.77，95%CI = 1.55 ～ 2.03，P < 0.000 01）、200 mg 组（RR = 2.12，95%CI = 1.88 ～ 2.40，P < 0.000 01）显著改善了患者 DAS28-CRP，见图 6。

2.3.5　DAS28-CRP < 2.6（临床缓解）　5 项研究[9, 13-16]均报道了 DAS28-CRP < 2.6 的患者比例。异质性检验（I^2 = 14%，P = 0.31），采用固定效应模型进行 meta 分析。结果显示试验组达到 DAS28-

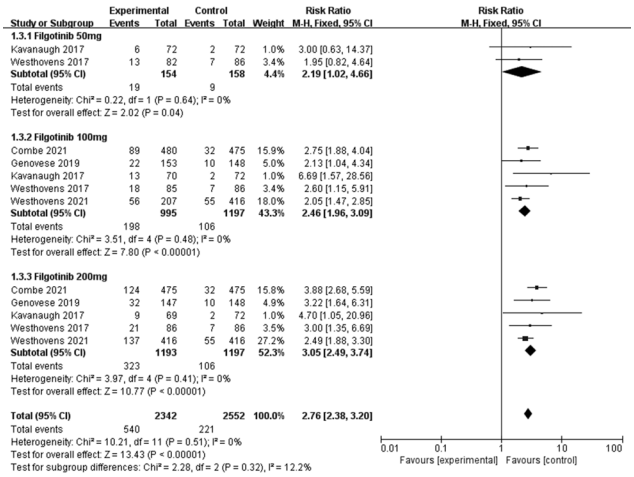


图 5　ACR70 的 meta 分析森林图

Fig 5　Forest plot of meta-analysis of ACR70

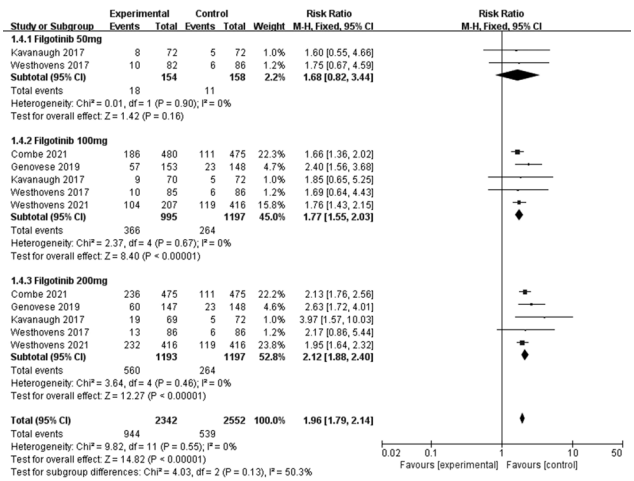


图 6　DAS28-CRP ≤ 3.2 的 meta 分析森林图

Fig 6　Forest plot of meta-analysis of DAS28-CRP ≤ 3.2

CRP < 2.6 的患者比例显著高于对照组（*RR* = 2.58，95%*CI* = 2.27 ～ 2.94，*P* < 0.000 01）。亚组分析表明 filgotinib 50 mg 剂量没有增加 DAS28-CRP < 2.6 的患者比例（*RR* = 1.77，95%*CI* = 0.87 ～ 3.60，*P* = 0.11），而 100 mg 组（*RR* = 2.35，95%*CI* = 1.93 ～ 2.86，*P* < 0.000 01）、200 mg 组（*RR* = 2.84，95%*CI* = 2.38 ～ 3.38，*P* < 0.000 01）达到 DAS28-CRP < 2.6 的患者比例显著高于对照组，见图 7。

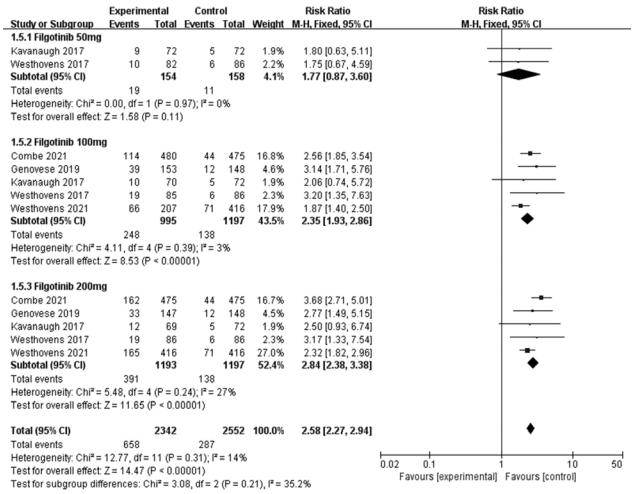


图 7　DAS28-CRP < 2.6 的 meta 分析森林图

Fig 7　Forest plot of meta-analysis of DAS28-CRP < 2.6

2.3.6　filgotinib 的疗效　为了进一步探索 filgotinib 治疗 RA 的最佳剂量，对比了 200 mg 与 100 mg、50 mg 的疗效，结果显示 filgotinib 200 mg 剂量组的疗效显著优于 100 mg 组，而 200 mg 剂量组疗效虽优于 50 mg 组，但差异无统计学意义，见表 2。

表 2　不同剂量 filgotinib 疗效的 meta 分析

Tab 2　Meta analysis of efficacy in different doses of filgotinib

结局指标	研究数	异质性		模型	效应值		
		I^2	*P*		*RR*	95%*CI*	*P*
filgotinib 200 mg *vs* 100 mg							
ACR20	5	0%	0.97	固定	1.09	1.03 ～ 1.15	0.001
ACR50	5	0%	0.91	固定	1.25	1.13 ～ 1.38	< 0.0001
ACR70	5	0%	0.47	固定	1.29	1.10 ～ 1.51	0.001
DAS28-CRP ≤ 3.2	5	14%	0.33	固定	1.20	1.09 ～ 1.33	0.0002
DAS28-CRP < 2.6	5	25%	0.25	固定	1.26	1.10 ～ 1.44	0.001
filgotinib 200 mg *vs* 50 mg							
ACR20	2	0%	0.48	固定	1.15	0.98 ～ 1.35	0.10
ACR50	2	0%	0.88	固定	1.28	0.96 ～ 1.70	0.09
ACR70	2	0%	0.98	固定	1.55	0.92 ～ 2.62	0.10
DAS28-CRP ≤ 3.2	2	37%	0.21	固定	1.76	1.03 ～ 3.02	0.04
DAS28-CRP < 2.6	2	0%	0.63	固定	1.61	0.95 ～ 2.74	0.08

2.4　安全性分析

2.4.1　总不良事件　对纳入的 5 项研究[9, 13-16]进行了不良事件的分析，结果显示 filgotinib 治疗稍微增加了总不良事件的发生率（*RR* = 1.06，95%*CI* = 1.01 ～ 1.10，*P* = 0.010），亚组分析表明，仅有 filgotinib 200 mg 组增加了不良事件的发

生，但与 100 mg 组（P ＝ 0.35）和 50 mg 组（P ＝ 0.44）相比并无显著差别（见图 8）。

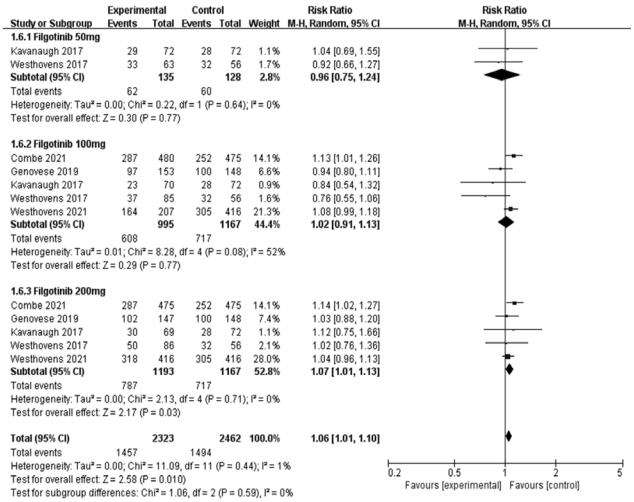


图 8　不良事件 meta 分析森林图

Fig 8　Forest plot of meta-analysis of adverse events

2.4.2　其他不良事件　本次研究分析了 5 项 RCT 严重不良事件、感染、严重感染、上呼吸道感染、带状疱疹感染以及鼻咽炎的发生情况。结果表明，使用 filgotinib 治疗增加了感染（RR ＝ 1.13，95%CI ＝ 1.03 ～ 1.24，P ＝ 0.01）和上呼吸道感染（RR ＝ 1.50，95%CI ＝ 1.11 ～ 2.02，P ＝ 0.009）的发生率，而对严重不良事件、严重感染、带状疱疹感染及鼻咽炎的发生无影响，见表 3。

2.4.3　血液系统不良事件　本次 meta 分析还研究了使用 filgotinib 治疗导致的血液系统不良事件的发生率。结果表明，与对照组相比，使用 filgotinib 治疗降低了血红蛋白减少的发生率（RR ＝ 0.61，95%CI ＝ 0.50 ～ 0.74，P ＜ 0.000 01，见图 9），增加了中性粒细胞减少的发生率（RR ＝ 1.53，95%CI ＝ 1.03 ～ 2.29，P ＝ 0.04），而对淋巴细胞及血小板减少没有影响，见表 4。

表 3　安全性指标的 meta 分析

Tab 3　Meta analysis of adverse events

结局指标	研究数	例数	异质性		模型	效应值		
			I^2/%	P		RR	95%CI	P
严重不良事件发生率	5	3490	0	0.78	固定	0.98	0.76 ～ 1.26	0.85
感染发生率	4	3144	40	0.11	固定	1.13	1.03 ～ 1.24	0.01
严重感染发生率	5	3490	0	0.85	固定	1.17	0.72 ～ 1.90	0.52
带状疱疹感染发生率	4	3343	0	0.87	固定	1.37	0.71 ～ 2.66	0.35
上呼吸道感染发生率	3	2917	19	0.29	固定	1.50	1.11 ～ 2.02	0.009
鼻咽炎发生率	3	2917	0	0.77	固定	1.29	0.99 ～ 1.68	0.06

表 4　血液系统不良事件的 meta 分析

Tab 4　Meta analysis of adverse events in hematology

结局指标	总体		50 mg		100 mg		200 mg	
	RR[95%CI]	P	RR[95%CI]	P	RR[95%CI]	P	RR[95%CI]	P
血红蛋白减少发生率	0.61 [0.50 ～ 0.74]	＜ 0.000 01	0.92 [0.61 ～ 1.39]	0.70	0.50 [0.36 ～ 0.69]	＜ 0.0001	0.60 [0.44 ～ 0.82]	0.001
中性粒细胞减少发生率	1.53 [1.03 ～ 2.29]	0.04	0.25 [0.04 ～ 1.49]	0.13	1.42 [0.77 ～ 2.62]	0.27	2.12 [1.18 ～ 3.79]	0.01
淋巴细胞减少发生率	1.10 [0.83 ～ 1.45]	0.50	1.10 [0.51 ～ 2.39]	0.80	0.79 [0.50 ～ 1.26]	0.33	1.39 [0.94 ～ 2.06]	0.10
血小板减少发生率	0.95 [0.46 ～ 1.95]	0.88	0.30 [0.01 ～ 7.14]	0.45	1.18 [0.42 ～ 3.28]	0.76	0.88 [0.29 ～ 2.68]	0.83

2.5　敏感性分析

本研究采用改变效应模型的方法对疗效及安全性指标进行敏感性分析，当改变原本的效应模型后，各项指标的结果没有发生较大变化，表明敏感性较低，本次 meta 分析结果较稳定，具体如表 5 所示。

2.6　发表偏倚分析

以 DAS28-CPR ＜ 2.6 的患者比例为指标绘制倒漏斗图，结果显示本研究存在发表偏倚的可能性较小，见图 10。

3　讨论

JAK 是一种非受体酪氨酸激酶，包括 JAK1、JAK2、JAK3 和选择性酪氨酸激酶 2（TYK2）等 4 个成员，其中 JAK1 在介导炎症细胞因子信号中起重要作用，JAK2 在介导骨髓和红细胞生成中起重要作用，JAK3 在免疫稳态和淋巴细胞生成中起关键作用 [17]。JAK 与信号传导及转录激活因子（signal transducers and activators of transcription proteins，STAT）形成重要的信号传导通路，参与 RA 的发病机制。在 RA 患者中，肿瘤坏死因子、白介素 1、白介素 6 以及干扰素等细胞因子的水平明显上升，这些细胞因子相互作用，通过不同的途径激活 JAK-STAT 信号通路，从而导致 RA 患者的炎症反应、滑膜细胞分泌异常以及持续的关节破坏 [18]。Filgotinib 可通过选择性抑制 JAK1，阻止 JAK-STAT 信号通路的激活，从而改善 RA

表 5　敏感性的 meta 分析结果

Tab 5　Meta analysis of sensitivity

结局指标	固定效应模型		随机效应模型	
	RR[95%*CI*]	*P*	*RR*[95%*CI*]	*P*
ACR20	1.48 [1.41 ～ 1.55]	＜ 0.000 01	1.58 [1.41 ～ 1.77]	＜ 0.000 01
ACR50	2.10 [1.92 ～ 2.30]	＜ 0.000 01	2.19 [1.89 ～ 2.53]	＜ 0.000 01
ACR70	2.76 [2.38 ～ 3.20]	＜ 0.000 01	2.68 [2.31 ～ 3.10]	＜ 0.000 01
DAS28-CRP ≤ 3.2	1.96 [1.79 ～ 2.14]	＜ 0.000 01	1.94 [1.77 ～ 2.11]	＜ 0.000 01
DAS28-CRP ＜ 2.6	2.58 [2.27 ～ 2.94]	＜ 0.000 01	2.53 [2.18 ～ 2.94]	＜ 0.000 01
不良事件发生率	1.06 [1.01 ～ 1.11]	0.01	1.06 [1.01 ～ 1.10]	0.01
严重不良事件发生率	0.98 [0.76 ～ 1.26]	0.85	0.99 [0.77 ～ 1.29]	0.96
上呼吸道感染发生率	1.50 [1.11 ～ 2.02]	0.009	1.47 [1.04 ～ 2.08]	0.03
血红蛋白减少发生率	0.61 [0.50 ～ 0.74]	＜ 0.000 01	0.64 [0.51 ～ 0.80]	＜ 0.0001

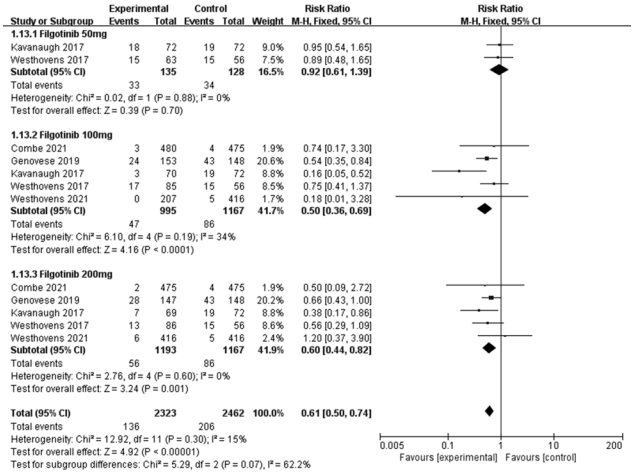


图 9　血红蛋白减少的 meta 分析森林图

Fig 9　Forest plot of meta-analysis of decreased haemoglobin

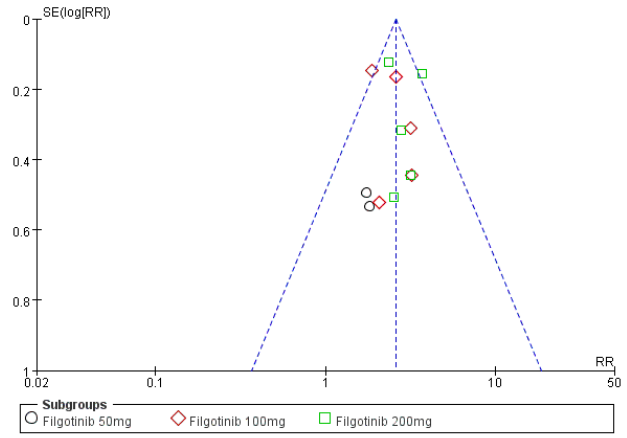


图 10　DAS28-CPR ＜ 2.6 的倒置漏斗图

Fig 10　Inverted funnel plot of the incidence of DAS28-CRP ＜ 2.6

患者的临床症状。

本研究对 filgotinib 治疗 RA 的疗效及安全性进行 meta 分析，结果显示，使用 filgotinib 治疗提高了患者达到 ACR20、ACR50、ACR70 以及 DAS28-CRP ≤ 3.2、DAS28-CRP ＜ 2.6 的比例。对剂量进行亚组分析后，认为 filgotinib 200 mg 疗效可能优于 100 mg 和 50 mg。为了进一步验证这一结果，本文对比了 200 mg 与 100 mg、50 mg 的疗效，结果显示 filgotinib 200 mg 剂量组的疗效显著优于 100 mg 剂量组，而 200 mg 剂量组疗效虽优于 50 mg 组，但差异无统计学意义。这可能与 50 mg 组患者数量较少（154 例）致其结果不稳定有关。因此，filgotinib 不同剂量之间的疗效差异还有待进一步探索。安全性方面，filgotinib 治疗稍微增加了患者总不良事件、感染、上呼吸道感染的发生率，与既往研究报道一致 [19-20]。在本次研究中，filgotinib 200 mg 虽轻微增加了总不良事件的发生，但与 100 mg 和 50 mg 组相比，并无显著差异，这提示 filgotinib 治疗 RA 发生的不良事件可能与剂量无关。此外，本研究还评估了使用 filgotinib 治疗导致的血液系统不良事件，与对照组相比，filgotinib 治疗使患者发生血红蛋白减少的风险显著降低，而对血小板及淋巴细胞无影响。总之，本研究表明 filgotinib 对 RA 具有较好的疗效，且不良反应较少。这可能得益于两个方面：首先，filgotinib 可选择性抑制 JAK1，减轻 RA 患者的炎症反应；其次，filgotinib 的主要代谢产物（GS-829845）具有一定的活性，能够在一定时间内维持 filgotinib 的作用效果 [21]。

本研究对不同剂量 filgotinib 的疗效差异进行了分析，对今后 filgotinib 的研究及应用提供了循证参考。但本研究也存在一定的局限性：① 纳入的研究数量少，总体样本量相对较小，某些指标的结果可能不具代表性，需要更多的 RCT 和更大的样本量来验证；② 某些指标在进行 meta 分析时，存在明显的异质性，这可能与原始研究纳入患者的种族、合并的基础疾病以及入组试验时 RA 的严重程度等有关，由于目前的研究有限，无法对上述原因进行验证；③ 目前缺少 filgotinib 对比阳性药物的临床研究，因此无法评价 filgotinib 与阳性药物对比的疗效及安全性。

综上所述，filgotinib 对 RA 具有较好的疗效，能够在很大程度上缓解患者的病情，改善患者的生活质量，并且该药为口服药，可大大提高患者的用药依从性。因此，filgotinib 可以作为 RA 治疗的新选择。但由于本次 meta 分析纳入的研究数量有限，得出的结论还需大量的临床试验来进一步验证。

参考文献

[1] Deb A，Dwibedi N，LeMasters T，et al. Burden of depression among working-age adults with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis，2018，2018：8463632.

[2] Smolen JS，Landewé RBM，Bijlsma JWJ，et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs：2019 update [J]. Ann Rheum Dis，2020，79（6）：685-699.

[3] Bedoui Y，Guillot X，Sélambarom J，et al. Methotrexate an old drug with new tricks [J]. Int J Mol Sci，2019，20（20）：5023.

[4] Singh JA，Saag KG，Bridges SJ，et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis [J]. Arthritis Rheumatol，2016，68（1）：1-26.

[5] Hazlewood GS，Barnabe C，Tomlinson G，et al. Methotrexate monotherapy and methotrexate combination therapy with traditional and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis：a network meta-analysis [J]. Cochrane Database Syst Rev，2016，2016（8）：CD010227.

[6] Kalden JR，Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors：implications for rheumatoid arthritis treatment [J]. Nat Rev Rheumatol，2017，13（12）：707-718.

[7] Meyer SC，Levine RL. Molecular pathways：molecular basis for sensitivity and resistance to JAK kinase inhibitors [J]. Clin Cancer Res，2014，20（8）：2051-2059.

[8] Banerjee S，Biehl A，Gadina M，et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases：current and future prospects [J]. Drugs，2017，77（5）：521-546.

[9] Combe B，Kivitz A，Tanaka Y，et al. Filgotinib versus placebo or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate：a phase Ⅲ randomised clinical trial [J]. Ann Rheum Dis，2021，80（7）：848-858.

[10] Dhillon S，Keam SJ. Filgotinib：first approval [J]. Drugs，2020，80（18）：1987-1997.

[11] Aletaha D，Neogi T，Silman AJ，et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria：an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. Arthritis Rheum，2010，62（9）：2569-2581.

[12] 汪洋 . Cochrane 偏倚风险评估工具简介 [J]. 中国全科医学，2019，22（11）：1322.

[13] Westhovens R，Taylor PC，Alten R，et al. Filgotinib（GLPG0634/GS-6034），an oral JAK1 selective inhibitor，is effective in combination with methotrexate（MTX）in patients with active rheumatoid arthritis and insufficient response to MTX：results from a randomised，dose-finding study（DARWIN1）[J]. Ann Rheum Dis，2017，76（6）：998-1008.

[14] Kavanaugh A，Kremer J，Ponce L，et al. Filgotinib（GLPG0634/GS-6034），an oral selective JAK1 inhibitor，is effective as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis：results from a randomised，dose-finding study（DARWIN2）[J]. Ann Rheum Dis，2017，76（6）：1009-1019.

[15] Genovese MC，Kalunian K，Gottenberg JE，et al. Effect of filgotinib vs placebo on clinical response in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis refractory to disease-modifying antirheumatic drug therapy：the FINCH 2 randomized clinical trial [J]. JAMA，2019，322（4）：315-325.

[16] Westhovens R，Rigby WFC，van der Heijde D，et al. Filgotinib in combination with methotrexate or as monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis and limited or no prior exposure to methotrexate：the phase 3，randomised controlled FINCH 3 trial [J]. Ann Rheum Dis，2021，80（6）：727-738.

[17] 纪前前，郭伟伟，张倩倩，等 . JAK 抑制剂在类风湿性关节炎治疗中的研究进展 [J]. 中国药房，2016，27（5）：711-713.

[18] Migita K，Komori A，Torigoshi T，et al. CP690，550 inhibits oncostatin M-induced JAK/STAT signaling pathway in rheumatoid synoviocytes [J]. Arthritis Res Ther，2011，13（3）：R72.

[19] Tanaka Y，Kavanaugh A，Wicklund J，et al. Filgotinib，a novel JAK1-preferential inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis：an overview from clinical trials [J]. Mod Rheumatol，2021，31（2）：1-11.

[20] Jegatheeswaran J，Turk M，Pope JE. Comparison of Janus kinase inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis：a systemic literature review [J]. Immunotherapy，2019，11（8）：737-754.

[21] Richez C，Truchetet ME. Evaluating filgotinib for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Expert Opin Pharmacother，2021，22（18）：2435-2444.

（收稿日期：2021-06-10；修回日期：2021-08-10）

蒙特卡洛模拟优化左氧氟沙星治疗 6 种细菌感染的给药方案

马攀，刘芳，冯伟，赵全凤，戴青，熊丽蓉，陈勇川*（陆军军医大学第一附属医院药学部，重庆　400038）

摘要：目的　评价左氧氟沙星不同给药剂量（250 mg、500 mg、750 mg qd）对 6 种临床常见致病菌的疗效。**方法**　采用琼脂倍比稀释法测定某区域大型三甲综合医院临床分离的 339 株常见致病菌的最低抑菌浓度，根据文献资料确定左氧氟沙星的药动学 / 药效学（PK/PD）模型，应用蒙特卡洛模拟方法分析左氧氟沙星的药效。**结果**　左氧氟沙星 250 mg 给药方案对应 PK/PD 靶值的累积反应分数（CFR），仅金黄色葡萄球菌在 90% 以上，其余菌种可能达不到良好疗效；对于肺炎链球菌和流感嗜血杆菌感染，可采用左氧氟沙星 500 mg 的经验给药方案；对于肺炎克雷伯菌应经验给药 750 mg 才能使 CFR 在 90% 以上。但对于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌，即使采用 750 mg 的给药方案，CFR 仍然未能达到 90%，预示疗效不佳。**结论**　不同给药剂量的左氧氟沙星单独治疗对临床常见致病菌的疗效不同，临床经验性治疗时应注意选择，尤其是在大肠埃希菌和铜绿假单胞菌感染时，应结合药敏检验报告并考虑联合用药。

关键词：左氧氟沙星；临床合理用药；最低抑菌浓度；蒙特卡洛模拟；药动学 / 药效学
中图分类号：R978.1＋9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0429-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.033

Optimization of dose regimen of levofloxacin for 6 bacterial infections based on Monte Carlo simulation

MA Pan, LIU Fang, FENG Wei, ZHAO Quan-feng, DAI Qing, XIONG Li-rong, CHEN Yong-chuan*
(*Department of Pharmacy*, *the First Affiliated Hospital of Army Medical University*, *Chongqing* 400038)

Abstract: Objective　To evaluate the efficacy of levofloxacin at different dose regimens (250 mg, 500 mg, and 750 mg qd) on 6 common clinical pathogens. **Methods**　Agar doubling dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration of levofloxacin against 339 common pathogenic bacteria isolated from a major tertiary hospital. The pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) of levofloxacin were determined based on literature data. Monte Carlo simulation method was used to analyze the pharmacodynamics of levofloxacin. **Results**　The cumulative response score (CFR) of the PK/PD target value corresponding to the levofloxacin 250 mg dosing regimen was above 90% for *Staphylococcus aureus,* while the rest was less than 90% and might not achieve a good effect. For *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* infections, the CFR of levofloxacin 500 mg dosage regimen reached above 90%; for *Klebsiella pneumoniae*, 750 mg should be administered empirically to reach above 90% CFR. However, for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, even with the highest dosing regimen of 750 mg, the CFR still failed to reach 90%, indicating poor efficacy. **Conclusion**　Levofloxacin at different dosage has different therapeutic effects on common clinical pathogens. In clinical empirical treatment, attention should be paid to seletion, especially in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* infections, drug sensitivity test reports combined with other medications should be considered for better efficacy.

Key words: levofloxacin; clinical rational use; minimum inhibitory concentration; Monte Carlo simulation; pharmacokinetics/pharmacodynamics

基金项目：重庆市科委基金（No.cstc2017shmsA130043）。

作者简介：马攀，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学、体内药物分析、医疗大数据方面的研究，email：472447635@qq.com
*通信作者：陈勇川，男，硕士研究生导师，副主任药师，主要从事临床药理、体内药物分析方面的研究，email：zwmcyc@163.com

左氧氟沙星属于氟喹诺酮类抗菌药物，对包括金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等多种革兰氏阳性菌以及大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和流感嗜血杆菌等革兰氏阴性菌均有抑制作用，在临床上应用广泛[1]。近年来，细菌对喹诺酮类药物的耐药性逐渐增长，或因给药剂量不足导致体内药物浓度较低，细菌在“亚抑菌浓度”下存活，为耐药突变体创造了有利的环境，增加了耐药的风险，从而导致抗感染治疗的失败[2]。

左氧氟沙星是浓度依赖性抗菌药物，其药效学与药时曲线下面积（area under the drug concentration-time curve，*AUC*）密切相关，药物的 *AUC* 与其最低抑菌浓度（minimal inhibition concentration，*MIC*）的比值（*AUC*/*MIC*）和药物的峰浓度（maximum plasma concentration，C_{max}）与 *MIC* 的比值（C_{max}/*MIC*）是决定这类药物能否达到最佳杀菌效果的关键药效学参数[3]。抗菌药物的临床疗效与其药动学（pharmacokinetics，PK）/ 药效学（pharmacodynamics，PD）参数密切相关[4]，临床可根据 PK/PD 参数的靶值来制订最佳给药方案，在尽可能达到最佳的治疗效果的同时降低细菌耐药性的发生。但目前，临床上抗感染方案的设计多依赖于临床医师的主观判断，缺乏统计学上的客观评价。近年来，蒙特卡洛模拟（Monte Carlo simulation，MCS）在化学及多种自然科学中应用广泛[5-6]，在抗菌药物的临床研究中，可用其模拟 PK/PD 模型，优化抗菌药物的给药方案。MCS 是一种基于“随机数”的计算方法，充分考虑了不同患者对同一药物处置过程的差异，又考虑了同种致病菌的不同菌株对药物敏感性的差异，通过计算机进行多达上万次模拟，提高预测结果的准确性，在提高抗菌药物的临床疗效方面具有巨大的优势[7-9]。

本研究对左氧氟沙星常用给药方案治疗临床 6 种常见致病菌的疗效进行研究，结合其药动学参数、药效学靶值以及 *MIC* 数据，通过 MCS 考察不同剂量左氧氟沙星对致病菌的最佳临床疗效靶值的达标情况，针对不同菌种推荐合适的左氧氟沙星给药剂量，为左氧氟沙星治疗常见病原菌感染的剂量选择提供科学的客观依据，并减少因剂量不足导致抗感染治疗失败所诱发的细菌耐药。

1 材料

1.1 菌株来源

受试菌共 6 种合计 339 株，均来自某大型三甲综合医院临床科室送检标本（包括痰、分泌物、尿液等）中的分离菌株，包括革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，SA）48 株、肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*，SP）52 株；革兰氏阴性菌大肠埃希菌（*Escherichia coli*，EC）76 株、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*，KP）60 株、流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*，Hi）51 株、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*，PA）52 株。具体信息见表 1。

表 1 菌株信息 (n = 339)

Tab 1 Strain information (n = 339)

项目	数量	占比 /%
菌株标本来源		
组织	10	2.95
腹水	10	2.95
静脉血	13	3.83
伤口分泌物	15	4.43
其他 *	25	7.38
尿液	29	8.55
脓液	28	8.26
痰液	209	61.65
菌株种类		
SA	48	14.16
SP	52	15.34
EC	76	22.42
KP	60	17.70
Hi	51	15.04
PA	52	15.34

注（Note）：*包括创伤口、导管、导管血、胆汁、前列腺液、耳分泌物、咽拭子、体表、灌洗液、脑脊液、眼分泌物（* including wound，catheter，catheter blood，bile，prostate fluid，ear secretion，pharyngeal swab，body surface，lavage fluid，cerebrospinal fluid and eye secretion）。

1.2 药品来源

左氧氟沙星片（第一三共制药，规格：0.5 g/片，批号：BW02661），左氧氟沙星对照品（批号：130455-201607，含量以 $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ 计为 97.3%，中国食品药品检定研究院）。

2 方法

2.1 左氧氟沙星的含量测定

精密称取适量左氧氟沙星片（以左氧氟沙星计约 0.1 g），置 100 mL 量瓶中，加 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，再精密量取续滤液 5 mL，置 50 mL 量瓶中，用 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。参照 2015 年版《中国药典》左氧氟沙星项下的方法[10]采用 Waters2690 高效液相色谱仪测定药品含量。

2.2　左氧氟沙星对细菌的 *MIC* 测定

根据含量测定结果，按照美国临床与实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）M100 30th 配制抗菌药物储备液，并参照 CLSI 推荐的琼脂二倍稀释法测定左氧氟沙星的 *MIC*，MIC_{50}、MIC_{90} 分别表示抑制 50% 和 90% 的细菌所需的最低药物浓度 [11]。试验操作过程均严格按照《全国临床检验操作规程》（第 4 版）[12] 进行，每批试验均设立质控菌株以确保整个试验的准确性，药敏折点标准依据 CLSI 抗微生物药物敏感性试验的执行标准进行判读。

2.3　左氧氟沙星的 PK 参数

左氧氟沙星片说明书列出的单次口服左氧氟沙星 250 mg、500 mg 及 750 mg 的 PK 参数见表 2[13]。而有研究显示单次口服左氧氟沙星 50 ～ 1000 mg，平均 C_{max} 约为 0.6 ～ 9.4 mg • h • L^{-1}，*AUC* 约为 4.7 ～ 108 mg • h • L^{-1}，*AUC* 均呈线性增加且左氧氟沙星在多剂量给药方案中的药动学与单剂量给药方案相似，可以预测其药动学变化情况 [14]。

表 2　左氧氟沙星片不同给药剂量的 PK 参数

Tab 2　PK parameters of different doses of levofloxacin

给药剂量 /mg	C_{max}/（μg • mL^{-1}）	$AUC_{0\sim24}$/（μg • h • L^{-1}）
250	2.8±0.4	27.2±3.9
500	5.1±0.8	47.9±6.8
750	9.3±1.6	101±20

2.4　MCS

根据 PK/PD 模型对不同剂量给药方案分别进行 MCS，当 *MIC* 为某一特定值时，可获得靶指数的达标概率（probability of target attainment，PTA）；当 *MIC* 为菌株群体的分布值时，可计算 PK/PD 指数对目标的累积反应分数（cumulative fraction of response，CFR），PTA 最高或 CFR ＞ 90% 者可能为最优选择 [15]。本研究应用 Oracle Crystal Ball（v11.1）软件对左氧氟沙星在不同给药剂量下对目标菌群进行 MCS，通过比较 PTA 或 CFR 的大小，得到其针对不同菌种的最佳给药方案。

左氧氟沙星属于喹诺酮类药物，是浓度依赖性抗菌药物，以 *AUIC* 表示其临床抗菌有效性的主要参考指标，即 $AUIC = AUC_{0\sim24}/MIC$[2]。根据参考文献 [16-18]，设定左氧氟沙星对革兰氏阳性菌的最佳临床疗效靶值为 $AUIC$（$AUC_{0\sim24}/MIC_{90}$）≥ 30，对革兰氏阴性菌的最佳临床疗效靶值为 $AUIC \geq 125$。

设定 10 000 次模拟左氧氟沙星在不同剂量给药方案下的 *AUIC* 靶值。在模拟过程中，假定 PK 参数 $AUC_{0\sim24}$ 遵循正态分布，PD 参数 *MIC* 遵循自定义离散分布。根据各自的概率分布，将不同剂量的 $AUC_{0\sim24}$ 和 *MIC* 值分别进行模拟，得到 3 种剂量下的 *AUIC* 群体数据。以 $AUIC \geq 30$ 作为考察革兰氏阳性菌的靶值，以 $AUIC \geq 125$ 作为考察革兰氏阴性菌的靶值。具体流程见图 1。

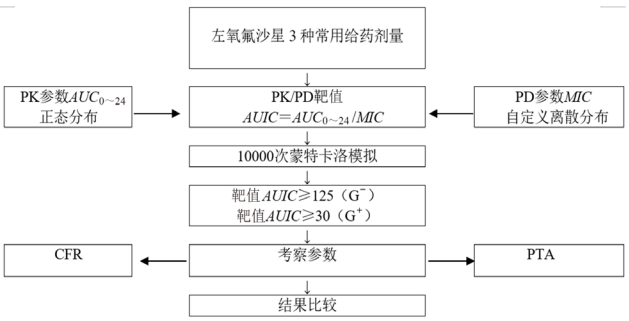


图 1　蒙特卡洛模拟流程图

Fig 1　Flow chart of Monte Carlo simulation

3　结果

3.1　左氧氟沙星含量测定结果

按照 2015 年版《中国药典》，左氧氟沙星的含量以左氧氟沙星计应为标示量的 90.0% ～ 110.0%，对左氧氟沙星片进行含量测定，含量为 99.10%，符合药典规定。

3.2　*MIC* 结果

本研究中左氧氟沙星对肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的敏感率最高，对大肠埃希菌及铜绿假单胞菌的敏感率较低。对各种常见临床病原菌的 *MIC* 结果详见表 3。

表 3　口服左氧氟沙星对临床分离菌株的 *MIC* 分布情况

Tab 3　*MIC* distribution of levofloxacin oral preparations to clinically isolated strains

菌种	*MIC* 范围 /（μg • mL^{-1}）	MIC_{50}/（μg • mL^{-1}）	MIC_{90}/（μg • mL^{-1}）	敏感 /%	中介 /%	耐药 /%
金黄色葡萄球菌（n = 48）	0.125 ～ 2	0.125	0.5	95.8	4.2	0
肺炎链球菌（n = 52）	0.25 ～ 1	0.5	1	100	0	0
大肠埃希菌（n = 76）	＜ 0.008 ～ 4	0.25	1	85.5	9.2	5.3
肺炎克雷伯菌（n = 60）	＜ 0.008 ～ 2	0.031 25	0.5	95	3.3	1.6
铜绿假单胞菌（n = 52）	0.25 ～ 2	0.5	1	90.4	9.6	0
流感嗜血杆菌（n = 51）	＜ 0.004 ～ 1	0.0156	0.25	100	0	0

3.3　MCS 左氧氟沙星不同给药方案下的 CFR、PTA 结果

CFR 结果详见表 4，当以左氧氟沙星 24 h 给药 250 mg 为最佳给药方案时，对于革兰氏阳性菌达到靶值 *AUIC* ≥ 30，金黄色葡萄球菌的 CFR 为 93.99%，而肺炎链球菌的 CFR 仅为 70.86%。对于革兰氏阴性菌 *AUIC* ≥ 125，左氧氟沙星对 4 种菌的 CFR 均未达到 90% 的目标。

表 4　左氧氟沙星在不同给药剂量下对临床菌株的 CFR (%)

Tab 4　CFR of strain infections treated with different doses of levofloxacin (%)

剂量 /mg	*AUIC* = 30		*AUIC* = 125			
	SA	SP	EC	KP	PA	Hi
250	93.99	70.86	50.21	77.60	3.58	88.48
500	96.05	99.84	68.81	85.04	23.80	92.18
750	99.91	99.97	85.90	95.13	72.26	98.27

当以左氧氟沙星 24 h 给药 500 mg 为最佳给药方案时，对于革兰氏阳性菌，金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌的 CFR 均大于 90%。对于革兰氏阴性菌，仅有流感嗜血杆菌的 CFR 大于 90%，其余菌种的 CFR 均未达标。

当以左氧氟沙星 24 h 给药 750 mg 为最佳给药方案时，对于革兰氏阳性菌达到靶值 *AUIC* ≥ 30，金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌的 CFR 几乎接近 100%。对于革兰氏阴性菌 *AUIC* ≥ 125，流感嗜血杆菌和肺炎克雷伯菌的 CFR 大于 90%，大肠埃希菌的 CFR 接近 90%，而铜绿假单胞菌为 72.26%。

PTA 结果如图 2 所示，当 PTA 高于 90% 时预期可取得良好的抗菌效果和临床疗效。对于临床上较敏感的细菌，如阳性菌的 *MIC* ≤ 0.5 μg • mL^{-1}，阴性菌的 *MIC* ≤ 0.125 μg • mL^{-1} 时，每日给药 250 mg 即可使 PK/PD 靶值对应的 PTA ≥ 90%；当阳性菌的 *MIC* ≤ 1 μg • mL^{-1}，阴性菌的 *MIC* ≤ 0.25 μg • mL^{-1} 时，每日给药 500 mg 所达到 PK/PD 靶值对应的 PTA ≥ 90%；当阳性菌的 *MIC* ≤ 2 μg • mL^{-1}，阴性菌的 *MIC* ≤ 0.5 μg • mL^{-1} 时，每日给药 750 mg 才能使 PK/PD 靶值对应的 PTA ≥ 90%。

4　讨论

左氧氟沙星因其抗菌谱广、抗菌活性强已成为临床中最常用的抗感染药物之一，是肺炎、鼻窦炎、支气管炎、尿路感染以及肾盂肾炎的临床治疗用药或经验用药[19]。近年来革兰氏阴性菌对氟喹诺酮类药物的耐药性逐渐增加[20]，耐药形势日益严峻，而目前市场上大多数仿制药的左氧氟

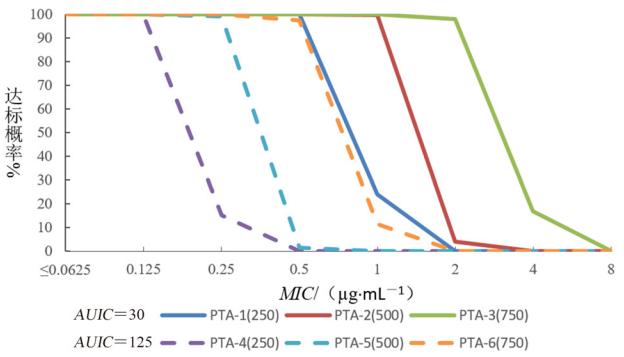


图 2　不同给药剂量左氧氟沙星对临床菌株的达标概率（PTA）分布

Fig 2　PTA of different doses of levofloxacin for clinically isolated strains

沙星口服制剂推荐剂量为每次 200 ～ 300 mg，一日服用 2 ～ 3 次，从本研究结果看，给药剂量为 200 ～ 300 mg 时，左氧氟沙星对大多数细菌的 PK/PD 靶值均未能达标，且左氧氟沙星属于浓度依赖性抗菌药物，若单次给药剂量不足，不仅达不到良好的治疗效果反而可能产生耐药。本研究结果表明，在 250 mg 或 500 mg 剂量下，左氧氟沙星很难对革兰氏阴性菌引起的感染产生良好的治疗效果，尤其是 250 mg 对常见临床病原菌感染有效的可能性更小。左氟沙星原研药的说明书早已将其用法用量改为每 24 h 给药一次，250 mg 或 500 mg 或 750 mg[13]，因左氧氟沙星主要以原形经尿排出，尿排泄率高达 80%[3]，在尿液中药物浓度较高，因此仅在尿路感染时推荐给药剂量为 250 mg，在医院内肺炎、急性细菌性鼻窦炎以及急性肾盂肾炎等感染推荐的治疗剂量均已达到 750 mg。

抗感染治疗成功的关键是抗菌药物的浓度达到治愈感染所需的 *MIC*[21]，本研究发现无论是对革兰氏阳性菌还是阴性菌，若细菌较敏感，即使 *MIC* 小于 0.125 μg • mL^{-1}，3 种给药剂量的 PTA 都能高于 90%。但临床感染情况复杂，耐药问题严峻，治疗不够敏感的细菌可能出现 PTA 断崖式下降，无法保证良好的抗感染效果。本研究通过 MCS 建立了左氧氟沙星的 PK/PD 模型，分别得到了能够反映最佳临床疗效的参考指标 CFR 和 PTA。一般而言，抗菌药物给药剂量对某一细菌 CFR 值高于 90% 时，提示该剂量对该细菌具有最大杀菌效果，为最佳剂量；对某一细菌在某一 *MIC* 值下 PTA 高于 90% 时，提示该给药剂量对不高于该 *MIC* 值的细菌具有最大杀菌效果[22]。有研究结果显示，对于敏感的金黄色葡萄球菌感染，可采用左氧氟沙星 250 mg 剂量，此时的

CFR 已超过 90%[23]。对于肺炎链球菌和流感嗜血杆菌，可采用左氧氟沙星 500 mg 剂量，对于肺炎克雷伯菌应采用 750 mg 剂量的左氧氟沙星才能使 CFR ≥ 90%，与本研究结果一致。但对于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌，即使采用 750 mg 的剂量，CFR 仍然未能达到 90%，说明这两种细菌更容易对左氧氟沙星产生耐药，尤其是铜绿假单胞菌的 CFR 仅为 72.26%，已有文献报道临床上多重耐药铜绿假单胞菌检出率持续升高，警醒医院应重视防控工作 [24]。

超广谱 *β*- 内酰胺酶（ESBLs）为大肠埃希菌最常见的耐药原因 [25-26]，考虑到临床细菌耐药等复杂情况，尤其是近年发现的产 ESBLs 大肠埃希菌对左氧氟沙星的耐药呈上升趋势 [27]，且质粒介导的喹诺酮类耐药（plasmid-mediated quinolone resistance，PMQR）机制致耐药菌株逐年增加 [28-29]，课题组初步研究发现产 ESBLs 和 / 或携带 *qnr* 基因的大肠埃希菌可能导致细菌对左氧氟沙星耐药从而达不到 PK/PD 临床靶值，该研究结果也部分解释了使用 750 mg 剂量的左氧氟沙星对大肠埃希菌仍未达到临床最佳疗效靶值的原因 [30]。铜绿假单胞菌具有易定植、易变异和多重耐药的特点，2014 年中华医学会呼吸病学分会感染学组在《铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识》中提出，对铜绿假单胞菌感染尤其是多重耐药铜绿假单胞菌，联合用药治疗临床感染的效果优于单药，最常用的联合治疗方案为抗铜绿假单胞菌 *β*- 内酰胺类加氨基糖苷类或氟喹诺酮类 [31]。本研究结果亦提示临床在使用左氧氟沙星治疗铜绿假单胞菌、大肠埃希菌这两类临床菌株时可能疗效欠佳，在真实的细菌耐药情况下，建议参考药敏检验报告，谨慎选择左氧氟沙星的给药剂量或者联合用药，甚至考虑换用其他更有效的抗菌药物。

为了准确评估 *AUC*/*MIC*，应该使用游离药物浓度，但因左氧氟沙星属于低血浆蛋白结合率药物 [3]，故本研究并未进行游离血药浓度的换算。另外，本研究 MCS 的 PK/PD 达标靶值是基于血中药物浓度所得，不能反映感染部位，而不同的感染部位左氧氟沙星的浓度可能不同，如左氧氟沙星主要经尿路排泄，尿中浓度较高，在肺泡巨噬细胞中的药物浓度也高于血药浓度，针对这些部位的感染，在较低的 PK/PD 靶值条件下也可获得较好的治疗效果 [15]，而本研究并未针对不同感染部位对左氧氟沙星的达标情况进行 MCS 分析。

应用 MCS 方法制订合理的给药方案，该方法结合药动学和药效学数据，既考虑了不同患者对同一种抗菌药物处置过程的差异，又考虑了同种病原菌的不同菌株对同种药物敏感性之间的差异 [32]。通过 MCS 在计算机水平上建立了左氧氟沙星的 PK/PD 模型，分别得到能够反映临床治疗有效的参考指标 CFR 和 PTA，为抗感染治疗中早期经验性抗菌药物给药方案的制订提供一定的科学依据。

参考文献

[1] 何广伟 . 氟喹诺酮类药物在结核病治疗中的研究进展 [J]. 医学信息，2019，32（7）：64-66.

[2] 马攀，陈勇川，胡显飞，等 . 仿制和原研左氧氟沙星的体外抗菌活性比较 [J]. 中南药学，2021，19（1）：56-61.

[3] 张菁，吕媛，于凯江，等 . 抗菌药物药代动力学 / 药效学理论临床应用专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2018，41（6）：409-446.

[4] Armstrong ES，Mikulca JA，Cloutier DJ，et al. Outcomes of high-dose levofloxacin therapy remain bound to the levofloxacin minimum inhibitory concentration in complicated urinary tract infections [J]. BMC Infect Dis，2016，16（1）：710-716.

[5] Souhar O，Marceau A，Loubet B. Modelling and inference of maize pollen emission rate with a Lagrangian dispersal model using Monte Carlo method [J]. J Agr Sci，2020，158（5）：383-395.

[6] Li DY，Gao ZQ，Vasudevan NK，et al. Molecular mechanism for azeotrope formation in ethanol/benzene binary mixtures through gibbs ensemble Monte Carlo simulation [J]. J Phys Chem B，2020，124（46）：3371-3386.

[7] Lewis SJ，Chaijamorn W，Shaw AR，et al. In silico trials using Monte Carlo simulation to evaluate ciprofloxacin and levofloxacin dosing in critically ill patients receiving prolonged intermittent renal replacement therapy [J]. Renal Replacement Therapy，2016，2（1）：1-4.

[8] Deguchi T，Seike K，Yasuda M，et al. Evaluation by Monte Carlo simulation of levofloxacin dosing for complicated urinary tract infections caused by *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Infect Chemother，2011，17（5）：726-730.

[9] Trang M，Dudley MN，Bhavnani SM. Use of Monte Carlo simulation and considerations for PK-PD targets to support antibacterial dose selection [J]. Curr Opin Pharmacol，2017，36（10）：107-113.

[10] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：154.

[11] Clinical and Laboratory Standards Institute [S]. M100，30th，2020.

[12] 中华人民共和国卫生部医政司 . 全国临床检验操作规程 [M]. 4 版 . 北京：人民卫生出版社，2015：574-594.

[13] U. S. Food & Drug Administration. Lable [EB/OL].

（2021-6-18）https：//www. fda. gov/media/75773/download.
[14] Fish D，Chow AT. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin [J]. Clin Pharmacokinet，1997，32（2）：101-119.
[15] 刘峰，邓贵新，卢兰芬，等 . 蒙特卡洛模拟评价和优化产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌血流感染抗菌药物给药方案 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（2）：195-199.
[16] Segreti S，Jones RN，Bertino JS. Challenges in assessing microbial susceptibility and predicting clinical response to newer-generation fluoroquinolones [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2012，28（1）：3-11.
[17] Pickerill KE，Paladino JA，Schentag JJ. Comparison of the fluoroquinolones based on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters [J]. Pharmacotherapy，2000，20（4）：417-428.
[18] Mouton JW. Breakpoints：Current practice and future perspectives [J]. Int J Antimicrob Agents，2002，19（4）：323-331.
[19] Machado ME，Mercado K，Bernal Mc ET，et al. Prescription and indications for the use of fluoroquinolones in a group of outpatients in Colombia [J]. Biomedica，2020，40（2）：382-390.
[20] 国家卫生计生委合理用药专家委员会 . 耐药革兰阴性菌感染诊疗手册 [M]. 北京：人民卫生出版社，2015：52.
[21] Miller RA，Walker RD，Carson J，et al. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria [J]. Dis Aquat Organ，2005，64（3）：211-222.
[22] 邱海波，施毅 . 耐药革兰阳性球菌感染诊疗手册 [M]. 北京：人民卫生出版社，2018：83.
[23] Jaruratanasirikul S，Jaspattananon A，Wongpoowarak W，et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics modeling of oral levofloxacin [J]. Chotmaihet Thangphaet，2018，99（8）：886-892.
[24] 陈卫民 .2017-2019 年医院铜绿假单胞菌检出情况及耐药性分析 [J]. 临床合理用药杂志，2021，14（29）：22-24.
[25] Sorlózano A，Gutiérrez J，de Dios LJ，et al. High presence of extended-spectrum beta-lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. Microbiol Res，2007，162（4）：347-354.
[26] Wienke M，Pfeifer Y，Weissgerber P，et al. In vitro activity of tigecycline and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from a university hospital in south-western Germany [J]. Chemotherapy，2012，58（3）：241-248.
[27] Sedighi I，Arabestani M，Rahimbakhsh A，et al. Dissemination of extended-spectrum β-lactamases and quinolone resistance genes among clinical isolates of uropathogenic escherichia coli in children [J]. Jundishapur J Microbiol，2015，8（7）：91-84.
[28] Machuca J，Briales A，Labrador G，et al. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli* [J]. J Antimicrob Chemother，2014，69（12）：3203-3215.
[29] Priyadarshini BA，Mahalakshmi K，Kumar VN，et al. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates：an ideal prognosticator in treating multidrug-resistant strains [J]. Int J Microbiol，2019，2019（1）：6850108-6850114.
[30] 马攀，陈勇川，冯伟，等 . 携带耐药基因的肠杆菌科细菌对左氧氟沙星防耐药突变浓度的影响研究 [J]. 中国抗生素杂志，2021，46（10）：945-951.
[31] 施毅 . 铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2014，37（1）：9-15.
[32] Tanigawara Y，Nozawa K，Tsuda H. Optimal dose finding of garenoxacin based on population pharmacokinetics/pharmacodynamics and Monte Carlo simulation [J]. Eur J Clin Pharmacol，2012，68（1）：39-53.

（收稿日期：2021-08-31；修回日期：2021-11-01）

药品不良反应信号监测专题

基于 FAERS 数据库的司维拉姆和碳酸镧不良事件信号挖掘研究

吴攀[1, 2, 3]，舒亚民[4]，何绪成[5]，刘艳鑫[6]，陈力[1, 2*]（1. 四川大学华西第二医院 药学部/循证药学中心，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. 邛崃市妇幼保健计划生育服务中心药剂科，成都 611530；4. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部，武汉 430030；5. 彭州市第二人民医院药剂科，成都 611934；6. 彭州市人民医院药学部，成都 611930）

摘要：目的 基于 FAERS 数据库对新型磷结合剂司维拉姆和碳酸镧进行不良事件（ADE）信号挖掘，探索其发生的特点，为临床用药提供参考。**方法** 提取 FAERS 数据库 2015 年第一季度至 2020 年第四季度共 24 个季度的 ADE 报告数据，利用 ROR 法和 MHRA 法对司维拉姆和碳酸镧的相关报告进行数据挖掘，得到有效信号后，再利用 MedDRA 规范进行汉化及系统归类。**结果** 采用 ROR 法和 MHRA 法进行计算后，司维拉姆共得到 121 个信号，信号累及 19 个不同的系统器官（SOC），碳酸镧共得到 64 个信号，信号累及 17 个不同的 SOC。比较司维拉姆和碳酸镧特异的 ADE 信号，发现司维拉姆为皮肤及皮下组织类疾病（皮肤溃疡）和内分泌系统疾病（甲状腺功能减退症），碳酸镧为各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（咀嚼疾病）和免疫系统疾病（肉状瘤病）。**结论** 本研究获得的常见 ADE 信号及其累及系统与说明书具有一致性，证实了本研究方法的可靠性。司维拉姆和碳酸镧发生 ADE 累及的主要系统具有差异性，可为临床用药提供参考，有利于促进临床合理用药。

关键词：司维拉姆；碳酸镧；FAERS；不良反应信号挖掘；报告比值比法；综合标准法
中图分类号：R969.3，TP311.13　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0435-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.034

Adverse drug events of sevelamer and lanthanum carbonate based on the FAERS database

WU Pan[1, 2, 3], SHU Ya-min[4], HE Xu-cheng[5], LIU Yan-xin[6], CHEN Li[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy/Center for Evidence-based Pharmacy*, *West China Second Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Gynecological Diseases*, *Ministry of Education*, *Chengdu* 610041; 3. *Department of Pharmacy*, *Qionglai Maternal and Child Health and Family Planning Service Center*, *Chengdu* 611530; 4. *Department of Pharmacy*, *Tongji Hospital*, *Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030; 5. *Department of Pharmacy*, *Pengzhou Second People's Hospital*, *Chengdu* 611934; 6. *Department of Pharmacy*, *Pengzhou People's Hospital*, *Chengdu* 611930)

Abstract: Objective To determine the characteristics of adverse drug events (ADE) of sevelamer and lanthanum carbonate based on the FAERS database, and to provide reference for clinical use of novel phosphorous binders. **Methods** Totally 24 quarters of ADE reports from FAERS database from the first quarter of 2015 to the fourth quarter of 2020 were collected, and the related reports of sevelamer and lanthanum carbonate were mined with ROR and MHRA methods. After obtaining the effective signal, the MedDRA specification was used for the localization and systematic classification.

基金项目：四川省科技厅项目（No. 2019JDR0163）。
作者简介：吴攀，男，药师，主要从事临床药学工作，email：990515318@qq.com　*__通信作者__：陈力，男，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药工作，email：13674852@qq.com

Results Totally 121 signals were obtained for sevelamer and 64 signals for lanthanum carbonate, which involved 19 and 17 system organs (SOC), respectively. ADEs of sevelamer mainly occurred in the skin and subcutaneous tissue disorders (skin ulcers) and endocrine disorders (hypothyroidism), while those of lanthanum carbonate in the musculoskeletal and connective tissue disorders (mastication disorders) and immune system disorders (sarcoidosis). **Conclusion** The common ADE signals and system involved in this study are consistent with those of instruction, indicating the reliability of this method. The main systems involved by sevelamer and lanthanum carbonate are different, which also provides reference for rational clinical drug use.

Key words: sevelamer; lanthanum carbonate; FAERS; adverse reaction signal data mining; reported odds ratio method; comprehensive standard method

高磷血症是慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD），尤其是CKD后期最常见的并发症之一，是诱发患者机体出现软组织钙化、矿物质代谢异常、血管转移性钙化以及甲状旁腺功能亢进的重要因素。随着对血清磷代谢紊乱研究的深入，目前认为高磷血症是CKD增加患者发病率、住院率和病死率的重要风险因素[1]。CKD患者均需口服磷结合剂以减少肠道磷吸收，但传统磷结合剂为含钙、铝的复合物，不良反应（ADR）多[2]。近年来，不含钙和铝的新型磷结合剂，司维拉姆和碳酸镧越来越多地被用于临床。相关研究显示，司维拉姆可有效降低终末期肾病维持性透析患者的血磷水平，且不升高血钙，并降低钙磷沉积水平，是一种理想的降磷药物，ADR以胃肠道反应多见，如便秘、消化不良、食欲不振等[3-4]。碳酸镧长期应用于高磷血症的维持性血液透析患者，能有效地将血磷水平控制在肾脏病生存质量指导（kidney disease outcomes quality initiative，K/DOQI）临床实践指南推荐的目标范围，ADR少且轻微，还能降低成纤维细胞生长因子23（fibroblast growth factor 23，FGF23）和甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）水平，且不引起血钙的蓄积[5]。但由于司维拉姆和碳酸镧在国内上市时间短，相关药品不良事件（adverse event，ADE）多为个案报道或者病例系列报道，缺乏大规模上市后安全性再评价研究。本研究拟通过数据挖掘技术对新型磷结合剂司维拉姆和碳酸镧上市后的ADE报告进行信号检测和分析，探索ADE发生的状况和一般规律，为临床安全用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

本研究数据来源于美国食品药品管理局（FDA）不良事件报告系统（FDA adverse event reporting system，FAERS）。FAERS数据报告者为医务工作者或用药患者，多为自发呈报，主要收集发生在美国境内外用药相关的自发性安全报告及上市后临床研究报告。FAERS数据库自2004年开始对外公开，其数据每季度进行更新。本研究主要提取FAERS数据库中2015年第一季度至2020年第四季度共24个季度的ADE报告；排除重复报告后，共得到“首要怀疑药物”的相关报告27 335 800例，从中筛选出首要怀疑药物为司维拉姆、碳酸镧的报告分别2414、1232例。

1.2 方法

本研究采用报告比值比法（ROR法）和综合标准法（MHRA法）分别计算ROR值和比例报告比值（PRR），并筛选潜在ADE信号。将ROR法中95%*CI*下限大于1且报告数不少于3例的事件和MHRA法中PRR＞2、χ^2＞4且报告数不少于3例的事件定义为ADE信号[6]。

本文采用国际医学用语词典（Medical Dictionary for Regulatory Activities，MedDRA）中药物不良反应术语集的首选系统器官分类（system organ class，SOC）和首选术语（preferred term，PT），对每例报告的ADR名称按照系统和器官进行规范化编码，可有效减少因ADR报告术语不同导致的差异性，从而提高研究的准确度和可信度。

1.3 数据处理

使用Microsoft Excel 2010软件进行统计，并对标准化后的结果进行统计和计算。

2 结果

2.1 ADE基本信息

2015年第一季度至2020年第四季度由司维拉姆引起的ADE涉及970例患者，其中男性患者376例，女性患者125例，性别不详469例。

在已知年龄的患者中，60岁以上的患者共398例，占比最大的为消费者；报告国家前五位分别是美国、日本、法国、中国、以色列。

2015年第一季度至2020年第四季度由碳酸镧引起的ADE涉及531例患者，其中男性患者197例，女性患者122例，性别不详212例。在已知年龄的患者中，占比最大的为60岁以上的患者；在报告者职业中，最多的为消费者；报告国家前五位分别是日本、美国、意大利、德国、中国。详见表1。

2.2 司维拉姆与碳酸镧ADE信号挖掘结果

对检索到的司维拉姆数据进行筛选后，得到有ADE信号的报告1278例，共121种；对检索到的碳酸镧数据进行筛选后，得到有ADE信号的报告643例，共64种，两药报告数居前20位的相关结果见表2。

2.3 ADE信号累及系统器官比较

根据MedDRA的SOC对有信号的PT进行SOC分类排序，其中司维拉姆有信号的SOC为19个，碳酸镧有信号的SOC为17个，两药ADE信号累及系统见表3。

2.4 ADE信号胃肠系统疾病比较

根据MedDRA术语集中的高位组语（HLGT）对有信号的PT进行胃肠系统疾病HLGT分类排序，其中司维拉姆、碳酸镧有信号的胃肠系统疾病HLGT均为11个，详见表4。

表 1　司维拉姆及碳酸镧相关 ADE 报告基本信息

Tab 1　Basic information of sevelamer and lanthanum carbonate related ADE reports

信息	分类	司维拉姆		碳酸镧	
		上报数 / 例	构成比 /%	上报数 / 例	构成比 /%
性别	女	125	12.89	122	22.98
	男	376	38.76	197	37.10
	不详	469	48.35	212	39.92
年龄组	18 岁以下	17	1.75	23	4.33
	18 ～ 60 岁	213	21.96	58	10.92
	60 岁以上	398	41.03	141	26.55
	不详	342	35.26	309	58.19
报告者	不清楚	20	2.06	13	2.45
	健康专家	35	3.61	17	3.20
	药师	69	7.11	49	9.23
	医师	171	17.63	87	16.38
	其他健康专家	293	30.21	106	19.96
	消费者	382	39.38	259	48.78
年份	2015	262	27.01	97	18.27
	2016	126	12.99	123	23.16
	2017	161	16.60	97	18.27
	2018	190	19.59	110	20.72
	2019	156	16.08	51	9.60
	2020	75	7.73	53	9.98
国家（前五位）		美国 677	69.79	日本 229	43.13
		日本 127	13.09	美国 223	42.00
		法国 20	2.06	意大利 18	3.39
		中国 17	1.75	德国 13	2.45
		以色列 17	1.75	中国 9	1.69

表 2　司维拉姆、碳酸镧信号数前 20 位排序

Tab 2　Top 20 signals of sevelamer and lanthanum carbonate

不良事件	司维拉姆		不良事件	碳酸镧	
	PT 值	ROR 值 [95%*CI*]		PT 值	ROR 值 [95%*CI*]
住院治疗 *	94	14.78（12.02，18.17）	检出残留药品 *	88	659.89（529.79，821.94）
死亡 *	85	2.8（2.25，3.47）	死亡 *	71	4.69（3.69，5.96）
肠内晶体沉积 *	73	23 676.19（15851.29，35363.82）	便秘	27	6.26（4.28，9.17）
便血 *	55	26.31（20.13，34.39）	产品使用过程中的技术性错误 *	26	5.61（3.8，8.27）
高磷酸血症 *	53	1074.55（808.63，1427.93）	血磷升高	25	489.74（328.22，730.77）
产品使用问题 *	47	4.65（3.48，6.2）	食欲减退	17	3.45（2.13，5.56）
动静脉瘘部位并发症 *	36	678.34（483.51，951.66）	产品质量问题 *	17	5.54（3.43，8.93）
便秘	34	3.99（2.85，5.6）	糜烂性胃炎	16	169.16（103.11，277.52）
腹痛	33	3.73（2.65，5.26）	肠梗阻	16	20.77（12.68，34.02）
结肠炎	31	21.17（14.85，30.18）	胃溃疡 *	14	35.98（21.24，60.96）
胃肠出血	30	5.88（4.1，8.43）	肠梗阻（机能性）	14	62.55（36.91，106.01）
吞咽困难	25	7.09（4.78，10.51）	大肠穿孔	14	108.44（63.95，183.88）
血红蛋白降低 *	18	4.37（2.75，6.95）	检出残留产品 *	14	158.59（93.47，269.08）
直肠溃疡	17	389.3（239.65，632.27）	胃癌 *	13	47.47（27.47，82.03）
药物相互作用	17	2.87（1.78，4.63）	慢性胃炎	11	188.98（104.12，343.01）
心绞痛 *	17	16.51（10.24，26.61）	腹膜炎 *	11	28.83（15.92，52.22）
大肠穿孔	16	62.99（38.47，103.13）	上腹痛	10	2.42（1.3，4.51）
腹部不适	15	2.1（1.27，3.49）	黑便 *	10	21.82（11.71，40.66）
大肠溃疡	15	152.72（91.62，254.59）	无不良事件 *	10	3.72（2，6.93）
憩室炎 *	14	10.51（6.21，17.78）	肠胃结石 *	9	367.73（189.86，712.25）

注（Note）：* 为说明书中未提及的ADE（* means ADE not mentioned in the instruction）。

表 3 司维拉姆、碳酸镧导致 ADE 信号累及系统

Tab 3 ADE signals of systems/organs involved from sevelamer and lanthanum carbonate

SOC	司维拉姆		碳酸镧	
	报告数	构成比 /%	报告数	构成比 /%
胃肠系统疾病	508	39.75	239	37.17
全身性疾病及给药部位各种反应	137	10.72	95	14.77
各类检查	129	10.09	130	20.22
各类损伤、中毒及操作并发症	118	9.23	56	8.71
各种手术及医疗操作	106	8.29	—	—
代谢及营养类疾病	66	5.16	20	3.11
感染及侵染类疾病	55	4.30	22	3.42
心脏器官疾病	54	4.23	7	1.09
呼吸系统、胸及纵隔疾病	21	1.64	14	2.18
血管与淋巴管类疾病	18	1.41	3	0.47
产品问题	16	1.25	20	3.11
良性、恶性及性质不明的肿瘤（包括囊状和息肉状）	15	1.17	18	2.80
社会环境	8	0.63	—	—
内分泌系统疾病	7	0.55	—	—
肾脏及泌尿系统疾病	5	0.39	3	0.47
肝胆系统疾病	5	0.39	3	0.47
皮肤及皮下组织类疾病	4	0.31	—	—
血液及淋巴系统疾病	3	0.23	3	0.47
各类神经系统疾病	3	0.23	3	0.47
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	—	—	4	0.62
免疫系统疾病	—	—	3	0.47

表 4 司维拉姆、碳酸镧导致 ADE 件信号胃肠系统疾病累及系统

Tab 4 ADE signals of sevelamer and lanthanum carbonate in gastrointestinal disorders

胃肠系统疾病 HLGT	司维拉姆		碳酸镧	
	报告数	构成比 /%	报告数	构成比 /%
胃肠系统出血（不另分类）	134	26.38	16	6.69
胃肠道系统症状和体征	119	23.43	38	15.90
胃肠溃疡及穿孔	102	20.08	62	25.94
胃肠系统炎症	63	12.40	17	7.11
胃肠运动及排便状况	34	6.69	27	11.30
胃肠类疾病（不另分类）	20	3.94	33	13.81
胃肠良性肿瘤类	14	2.76	—	—
胃肠系统血管疾病	12	2.36	3	1.26
吸收不良类疾病	4	0.79	—	—
憩室类疾病	3	0.59	3	1.26
肛门和直肠类疾病（不另分类）	3	0.59	—	—
胃肠道狭窄及梗阻类疾病	—	—	33	13.81
腹膜及腹后膜类疾病	—	—	4	1.67
牙齿和牙龈类疾病	—	—	3	1.26

3 讨论

3.1 ADE 发生的人群特点

本研究中由司维拉姆引起的 ADE 共涉及 970 例患者，其中女性患者占 12.89%，男性患者占 38.76%；由碳酸镧引起的 ADE 共涉及 531 例患者，其中女性患者占 22.98%，男性患者占 37.1%；两药导致的 ADE 涉及人群中男性占比皆高于女性。年龄方面，60 岁以上的患者占比均较高，提示中老年患者在使用司维拉姆或碳酸镧时更容易发生 ADE，应谨慎选择。

3.2 ADE 信号分析

本研究所得到的司维拉姆和碳酸镧 ADE 信号与已知的安全性信息基本一致，主要集中在胃肠系统疾病，并且与药品说明书收录基本相同，说明本研究具有一定的可信度。但两药 ADE 也各有不同之处，例如，司维拉姆的特异 ADE 信号为皮肤及皮下组织类疾病（皮肤溃疡）和内分泌系统疾病（甲状腺功能减退症）；碳酸镧的特异 ADE 信号为各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（咀嚼疾病）和免疫系统疾病（肉状瘤病）。提示存在这些系统疾病的患者应注意个体化给药。

信号强度靠前的且未收录在说明书中的信号，司维拉姆包括肠内晶体沉积、高磷酸血症、动静脉瘘部位并发症等；碳酸镧包括检出残留药品、肠胃结石、胃癌、胃溃疡等。这些信号提示两药仍然可能存在尚未被充分认识的安全性问题，在今后临床用药中需要充分关注。

3.3 信号关联性最强且说明书未提及的 ADE

司维拉姆关联性最强的新的 ADE 是肠内晶体沉积。国外有多个病例报道，司维拉姆在肠内晶体沉积而引起结肠憩室穿孔、胃肠道黏膜损伤、下消化道出血、肠梗阻等胃肠系统疾病 [7-10]。目前，药物晶体引起的胃肠系统疾病的病理生理学还不是很清楚，可能是其降低了体外人肠上皮细胞的代谢活性并诱导了屏障功能障碍和细胞死亡。此外，药物晶体触发了中性粒细胞和单核细胞胞外陷阱的释放 [11]。有报道指出停用司维拉姆后，胃肠道症状（如胃肠道出血和腹痛）和黏膜损伤似乎可以恢复 [12]。对于有腹部大手术史或慢性便秘史的患者应尽可能避免使用司维拉姆治疗，因为严重胃肠道并发症的风险很高 [9]。因此临床使用司维拉姆应注意仔细询问患者的既往史，避免严重胃肠道并发症的发生。

碳酸镧关联性最强的新的 ADE 为检出残留药品。有报道指出镧可以在肝脏和骨骼中蓄积，

然而目前尚缺乏碳酸镧对肝脏和骨不良影响的证据[13-14]。一项在 60 名日本患者中进行的研究发现，大约 40% 的透析患者中存在镧沉积，主要集中在胃部[15]。相关研究结果表明，镧沉积会导致胃黏膜损伤，但镧沉积与黏膜损伤的因果关系及机制有待进一步研究[16]。镧沉积引起的慢性炎症是否是胃癌发展的危险因素也是一个重要的问题。有报道称，早期胃癌患者在胃黏膜中发现有镧沉积[17-18]。因此提示临床长期使用碳酸镧时应对患者定期进行胃镜检查，避免镧沉积导致胃黏膜损伤甚至胃癌的发生。

3.4 两药 ADE 比较

本研究发现，司维拉姆和碳酸镧共同的 ADE 集中在胃肠系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应和各类检查。

在胃肠系统疾病中，由于司维拉姆对肠道中其他生物分子的非特异性吸附，可能会损害胃肠道中脂溶性维生素 D、E 和 K 的吸收[19]，从而影响胃肠道系统。而碳酸镧致胃肠道不良反应的机制尚不明确，但镧在胃肠道吸收量很低，且药物本身不透明，药片残留后腹部 CT 可见不透明状影，提示患者出现直肠出血、大便嵌顿、结肠穿孔可能与患者服用碳酸镧后，药片在胃和小肠与磷相结合，形成不溶性复合物，增强结肠内压力相关[20]。对司维拉姆和碳酸镧胃肠系统疾病进行 HLGT 分类报告数排序，司维拉姆中排第一的是胃肠系统出血（不另分类），碳酸镧排第一的是胃肠溃疡及穿孔；比较司维拉姆和碳酸镧胃肠系统疾病的特异 ADE，司维拉姆为胃肠道狭窄及梗阻类疾病、腹膜及腹后膜类疾病、牙齿和牙龈类疾病。碳酸镧为胃肠良性肿瘤类、吸收不良类疾病、肛门和直肠类疾病（不另分类）。在患者合并以上胃肠系统基础疾病时，应避免使用该类药物或在用药过程中加强用药监护，关注患者是否出现相关症状，同时，与其他可能出现相同 ADR 的药物联合使用时，也应注意是否会增加 ADR 的发生风险。

在全身性疾病及给药部位各种反应中司维拉姆和碳酸镧致 ADE 信号报告数最多的都是死亡，这可能与原发疾病相关。

在各类检查中报告数最多和信号强度最强的 ADE，司维拉姆是肠内晶体沉积，而碳酸镧是检出残留药品。这与信号关联性最强且说明书未提及的 ADE 相一致。

3.5 研究局限性

说明书收录的 ADR 是在理想情况下通过病例对照研究、队列研究等临床研究得到的，存在受试者有严格的纳入条件、研究样本量少、治疗时间有限和难以发现罕见 ADR 等缺点，上市前临床试验难以获取各药品完整的安全性信息，而上市后 ADR 信号检测可以部分弥补上述缺点。本研究正是通过对大量 ADE 自发上报数据库进行信号挖掘，更能反映出药品上市后的安全性，对减少患者 ADE 的发生具有重要意义。但是需要注意的是，FAERS 数据库本身具有一定的局限性：FAERS 以欧美人群的数据为主，存在人种差异，故不一定能够真实反映中国用药人群的 ADE 发生情况；其次，FAERS 是不良事件报告库，其事件的发生缺乏与药品的相关性评价；同时，FAERS 数据库属于自发呈报系统，其中部分 ADE 报告可能带有随意性和偏倚，低报、漏报、内容不完整性等也会对结果造成影响[21]。此外，由于 FAERS 数据库中的数据没有药物使用人群的总数，因此只能对药物与不良事件之间的关联强度进行测算，而无法统计不良事件的发生率[22]。本研究挖掘到的不良事件信号仅表示研究药物与该信号存在统计学的关联性，但在临床选用药物时仍需进一步的临床试验研究[23]。目前，数据挖掘技术还无法替代药物流行病学和传统统计方法在临床上的应用，因此本研究得出的结果仅供临床决策作为参考。

4 结论

本研究利用 ROR 法和 MHRA 法对司维拉姆和碳酸镧的相关报告进行数据挖掘，获得的常见 ADE 信号及其累及系统与说明书具有一致性，证实了本研究方法的可靠性。司维拉姆和碳酸镧发生 ADE 累及的主要系统集中在胃肠系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应和各类检查，且有各自特异的 ADE 提示临床在使用两药时应该注意有相应病史的患者，注意个体化给药，为临床用药提供参考，有利于促进临床合理用药。

参考文献

[1] 向清，黄雪霞，曾剑锋，等 . 新型磷结合剂在慢性肾脏病中应用的进展 [J]. 临床医药文献电子杂志，2019，6（41）：192，194.

[2] 史明君，谢红浪 . 新型磷结合剂在慢性肾脏病中的应用 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2011，20（6）：559-564.

[3] 牛丹，吕佳，王晓培，等 . 司维拉姆治疗维持性透析患者高磷血症有效性和安全性观察 [J]. 陕西医学杂志，

2017，46（10）：1455-1457.
[4] 霍延红，张鑫，张文博，等 . 碳酸司维拉姆治疗维持性透析患者高磷血症的有效性和安全性 [J]. 武警医学，2019，30（1）：64-67.
[5] 彭菲，刘鹏，施文剑，等 . 碳酸镧应用于高磷血症维持性血液透析患者的长期临床疗效和安全性 [J]. 中国新药与临床杂志，2016，35（10）：724-729.
[6] Subeesh V，Maheswari E，Singh H，et al. Novel adverse events of iloperidone：a disproportionality analysis in US Food and Drug Administration adverse event reporting system（FAERS）database [J]. Curr Drug Saf，2019，14（1）：21-26.
[7] Keri KC，Veitla V，Samji NS. Ischemic colitis in association with sevelamer crystals [J]. Indian J Nephrol，2019，29（3）：191-193.
[8] Oka Y，Miyazaki M，Monobe Y. Sevelamer crystals found in necrotic mucosa of a perforated diverticulum [J]. Ther Apher Dial，2018，22（4）：411-412.
[9] Claudia Y，Evangelina M，Eduardo H，et al. Gastrointestinal complications induced by sevelamer crystals [J]. Clin Kidney J，2017（4）：539-544.
[10] Cockrell HC，Cottrell-Cumber S，Brown K，et al. Sevelamer crystals-an unusual cause of large bowel obstruction [J]. J Surg Case Rep，2021，2021（6）：rjab228.
[11] Kim T，Oliveira SD，Lautenschlager S，et al. Drug crystal-related gastrointestinal complications involve crystal-induced release of neutrophil and monocyte extracellular traps [J]. Cells，2020，9（11）：2481.
[12] Schoot TS，Römkens TE，Hoogeveen EK. Lower gastrointestinal bleeding in a patient receiving sevelamer：Case report [J]. SAGE Open Med Case Rep，2021，9：2050313X211000488.
[13] Hutchison AJ，Barnett ME，Krause R，et al. Lanthanum Carbonate Study Group. Lanthanum carbonate treatment，for up to 6 years，is not associated with adverse effects on the liver in patients with chronic kidney disease Stage 5 receiving hemodialysis [J]. Clin Nephrol，2009，71（3）：286-295.
[14] Shigematsu T，Tokumoto A，Nakaoka A，et al. Effect of lanthanum carbonate treatment on bone in Japanese dialysis patients with hyperphosphatemia [J]. Ther Apher Dial，2011，15（2）：176-184.
[15] Floege J. Phosphate binders in chronic kidney disease: a systematic review of recent data[J]. J Nephrol，2016，29（3）：329-340.
[16] Ohno A，Miyoshi J，Tanabe H，et al. Gastropathy associated with lanthanum phosphate deposition that was endoscopically tracked for 3 years. A case report [J]. BMC Gastroenterol，2020，20（1）：292.
[17] Takatsuna M，Takeuchi M，Usuda H，et al. Case of early-stage gastric cancer identified in the gastric mucosa with lanthanum phosphate deposition [J]. Endosc Int Open，2019，7（7）：E893-E895.
[18] Tabuchi M，Takeshima F，Akazawa Y，et al. Early gastric cancer with diffuse lanthanum deposition [J]. Intern Med，2019，58（3）：447-478.
[19] Susantitaphong P，Jaber BL. Potential interaction between sevelamer and fat-soluble vitamins：a hypothesis [J]. Am J Kidney Dis，2012，59（2）：165-167.
[20] 李璐璐，张耕 . 碳酸镧所致不良反应文献分析 [J]. 药物流行病学杂志，2018，27（11）：769-773.
[21] 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.
[22] Rodriguez EM，Staffa JA，Graham DJ，et al. The role of databases in drug postmarketing surveillance [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2001，10（5）：407-410.
[23] 王娜，夏暄，周月阳，等 . 基于美国 FAERS 数据的索磷布韦维帕他韦与艾尔巴韦格拉瑞韦不良事件安全警戒研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1700-1705.

（收稿日期：2021-08-01；修回日期：2021-10-02）

唑来膦酸注射液不良反应信号的挖掘与评价

谈仪炯，席宇飞，范国荣，熊学惠*（上海交通大学附属第一人民医院临床药学科，上海　200080）

摘要：目的　挖掘和评价唑来膦酸注射液上市后的不良反应（ADR）信号，为临床合理安全用药提供依据。**方法**　采用比例报告比法（PRR）和报告比值比法（ROR）对 2004 年第 1 季度至 2020 年第 3 季度美国 FDA 不良事件报告系统（FAERS）中接收的唑来膦酸注射液报告进行 ADR 信号挖掘。**结果**　检索得到唑来膦酸注射液为怀疑及合并用药的药物不良事件（ADE）报告共 50 395 份，数据进行分析处理后得到 1995 个阳性信号，主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（占 21.59%）、全身性疾病及给药部位各种反应（占 18.04%）、胃肠系统疾病（占 9.12%）、感染及侵染类疾病（占 6.43%）等方面。在报告频数及信号强度排名前 20 位的首选术语（PTs）中未在说明书中出现的阳性信号共 37 个，包括尿路感染（PRR 值、χ^2 值、ROR 值的 95%*CI* 下限分别为 1.94、292.75、1.80）、血 25-羟维生素 D_3 升高（PRR 值、χ^2 值、ROR 值的 95%*CI* 下限分别为 79.74、143.16、24.01）、快感缺乏（PRR 值、χ^2 值、ROR 值的 95%*CI* 下限分别为 18.44、15 028.18、17.91）等。这 37 个阳性信号累及器官系统 13 个，以感染及侵染类疾病占首位。**结论**　使用唑来膦酸注射液时应注意药物可能引起的各种肌肉骨骼疾病、全身性疾病，同时对说明书中未提及的尿路感染、血 25-羟维生素 D_3 升高、快感缺乏等新的不良反应也需要引起关注。

关键词：唑来膦酸；不良反应信号；数据挖掘
中图分类号：R969.3，TP311.13　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0441-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.035

Data mining and evaluation of adverse drug reaction signals of zoledronic acid injection

TAN Yi-jiong, XI Yu-fei, FAN Guo-rong, XIONG Xue-hui* (*Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai* 200080)

Abstract: Objective　To provide reference for rational drug use through mining and evaluating adverse drug reactions (ADR) signals of zoledronic acid injection. **Methods**　The proportional reporting ratio (PRR) and reporting odds ratio (ROR) were used to find the ADR signal of zoledronic acid injection from the first quarter of 2004 to the third quarter of 2020 in the US FDA Adverse Event Reporting System (FAERS). **Results**　Among 50 395 adverse reaction reports retrieved related to zoledronic acid injection, 1995 risk signals were clinically significant, covering on musculoskeletal and connective tissue disorders (21.59%), general disorders and administration site conditions (18.04%), gastrointestinal disorders (9.12%), and infections and infestations (6.43%). Totally 37 positive ADR signals which were not recorded in the drug instructions were identified among the top 20 preferred terms (PTs) according to frequency and reporting strength, mainly including urinary tract infection (PRR ＝ 1.94, χ^2 ＝ 292.75, 95%*CI* lower limit of ROR ＝ 1.80), blood 25-hydroxycholecalciferol elevation (PRR ＝ 79.74, χ^2 ＝ 143.16, 95%*CI* lower limit of ROR ＝ 24.01) and anhedonia (PRR ＝ 18.44, χ^2 ＝ 15 028.18, 95%*CI* lower limit of ROR ＝ 17.91). These 37 positive signals involved 13 systems and organs, with infections and infestations being the first place. **Conclusion**　Musculoskeletal and systemic diseases may be induced by the administration of zoledronic acid injections. Special attention should be paid to newly identified ADRs not listed in the drug instructions, such as urinary tract infection, blood 25-hydroxycholecalciferol elevation and anhedonia.

Key words: zoledronic acid; adverse drug reaction signal; data mining

基金项目：2019 年上海市临床重点专科项目（No.shslczdzk06501）。
作者简介：谈仪炯，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：517933922@qq.com　*__通信作者__：熊学惠，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学和药品不良反应监测工作，email：xuehuixiong@126.com

唑来膦酸是第三代双膦酸盐类药物，主要药理作用为通过抑制破骨细胞活性和诱导破骨细胞凋亡来抑制骨吸收[1]。与其他双膦酸盐相比，唑来膦酸对羟基磷灰石的亲和力高[2]，能优先被运到骨质破坏部位。临床常使用唑来膦酸注射剂型，目前上市的该类药物商品名包括密固达和择泰两种，其中密固达规格为每支 5 mg，主要用于骨质疏松症的治疗；择泰规格为每支 4 mg，主要用于恶性高钙血症、实体肿瘤骨转移和多发性骨髓瘤引起的骨骼损害的治疗。尽管唑来膦酸注射液临床使用方便、疗效确切，但随着骨质疏松和肿瘤骨转移患者的日益增多，该类药物的临床使用不断增加，药物不良反应（adverse drug reaction，ADR）也不断出现，需要引起医务人员的重视。2011 年美国食品药品监督管理局（FDA）发布唑来膦酸可能增加肾衰竭风险的警告，提出禁用于严重肾功能不全患者。据报道，唑来膦酸还可导致流感样症状、低钙血症、下颌骨坏死、房颤、非典型骨折等不良反应[3-5]。鉴于目前尚无唑来膦酸注射液 ADR 信号挖掘的研究报道，本文基于美国 FDA 不良事件报告系统（FDA Adverse Events Reporting System，FAERS）对唑来膦酸注射液不良事件（adverse drug events，ADE）信息进行数据分析，挖掘药物相关的 ADR 信号，为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

FAERS 数据库是一个旨在支持 FDA 对药品上市后监测计划的数据库。OpenVigil 2.1（http：//openvigil.sourceforge. net/）是 FAERS 数据库的药物警戒数据提取、挖掘和分析工具。本研究使用 OpenVigil 2.1 查询 FAERS 数据库，选取 2004 年第 1 季度至 2020 年第 3 季度接收的唑来膦酸注射液（密固达、择泰及未标注商品名）的所有报告。

1.2 数据处理

本研究采用检索药物名称包括“zoledronic acid”“zoledronate”，依次限定目标药物的商品名为“reclast”“aclasta”“zometa”并进行复合检索，得到目标药物为怀疑（含首要怀疑、次要怀疑）及合并用药的 ADE 报告，并对其进行去重处理。

1.3 信号挖掘方法

目前最常用的信号挖掘方法为比例失衡法[6]，其中报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）和比例报告比值法（proportional reporting ratio，PRR）因计算简单、发现信号能力好、能估计相对危险度等优点被广泛应用[7]。本研究采用这两种方法对唑来膦酸注射液进行信号挖掘，ROR 法中以报告数 $n \geqslant 3$，95%*CI* 下限≥ 1 提示生成 1 个 ADR 信号；PRR 法以 $n \geqslant 3$，PRR 值≥ 2 且 $\chi^2 \geqslant 4$ 生成 1 个 ADR 信号[8]。满足信号条件则提示唑来膦酸注射液与 ADR 之间存在统计学上的关联性。

1.4 信号数据分析

本研究按照《药事管理医学用语词典》（MedDRA 24.0）对挖掘出的 ADR 信号进行系统器官分类（SOC），针对 ADR 信号数量最多的累及系统展开分析，并将唑来膦酸注射液按密固达、择泰分别按信号频数、信号强度前 20 位的 ADR 信号进行排序，去重后记为唑来膦酸注射液的主要 ADR 信号。

2 结果

2.1 唑来膦酸注射液 ADE 报告基本情况

2004 年第 1 季度至 2020 年第 3 季度共报告 ADE 数量为 9 373 236 份，唑来膦酸注射液为怀疑及合并用药的 ADE 报告共 50 395 份，其中密固达 14 671 份，择泰 25 074 份，10 650 份报告未标注商品名。报告女性患者 32 374 份（占 64.24%）、男性患者 14 949 份（占 29.66%），3072 份报告未注明性别。主要年龄范围为 50 ～ 75 岁。50 395 份 ADE 报告中，严重的 ADE 报告有 22 074 份（占 43.80%），以“死亡”及“住院或住院时间延长”为主（见表 1）；ADE 主要报告国家为美国，其次为日本和加拿大（见图 1）；2004 至 2011 年 ADE 报告数量呈逐渐递增趋势，2011 年后报告数量呈下降趋势（见图 2）。

2.2 唑来膦酸注射液 ADR 信号挖掘结果

50 395 份 ADE 报告中，经 ROR 法和 PRR 法共挖掘得到 1995 个 ADR 信号，主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（占 21.59%）、全身性疾病及给药部位各种反应（占 18.04%）、胃肠系统疾病（占 9.12%）、感染及侵染类疾病（占 6.43%）等方面，其中密固达 ADR 信号在全身性疾病及给药部位各种反应（占 28.40%）、各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（占 19.60%）、各类神经系统疾病（占 11.02%）、各类损伤中毒及手术并发症（占 7.83%）等方面占比较大，而择泰的 ADR 信号主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（占 23.67%）、全身性疾病及给药部位各种反应（占 14.31%）、胃肠系统疾病（占 9.36%）、感染及侵扰类疾病（占 7.78%）等方面（见图 3）。

2.3 唑来膦酸注射液报告主要累及系统的 ADR 信号

在排名前 6 的 SOC 中，频数最高的 ADR 信号（PTs）分别为骨坏死（频数 8267）、死亡（频数 5887）、恶心（频数 1874）、骨髓炎（频数 2030）、

表 1　唑来膦酸相关 ADE 报告的基本信息

Tab 1　Primary information of reported ADE of zoledronic acid

类别	唑来膦酸（密固达）		唑来膦酸（择泰）		唑来膦酸（未注明）		合计	
	份数	占比 /%	份数	占比 /%	份数	占比 /%	份数	占比 /%
性别								
女性	12 497	85.18	13 410	53.48	6467	60.72	32 374	64.24
男性	1573	10.72	10 203	40.69	3173	29.79	14 949	29.66
未知	601	4.10	1461	5.83	1010	9.48	3072	6.10
年龄 / 岁								
＜ 18	7	0.05	21	0.08	89	0.84	117	0.23
18 ～＜ 50	298	2.03	1413	5.64	579	5.44	2290	4.54
50 ～＜ 75	3327	22.68	8847	35.28	3596	33.77	15 770	31.29
≥ 75	2337	15.93	2977	11.87	1590	14.93	6904	13.70
缺失	8702	59.31	11 816	47.12	4796	45.03	25 314	50.23
严重的 ADE								
死亡	3755	25.59	4625	18.45	1692	15.89	10 072	19.99
住院或住院时间延长	2674	18.23	4468	17.82	2018	18.95	9160	18.18
危及生命	450	3.07	348	1.39	262	2.46	1060	2.10
残疾	433	2.95	1077	4.30	272	2.55	1782	3.54

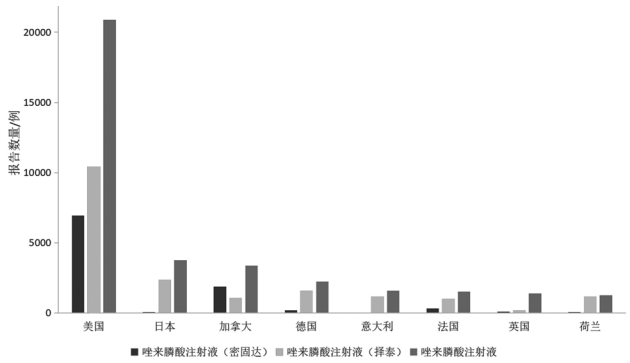


图 1　唑来膦酸相关 ADE 报告数量排名前 8 的国家

Fig 1　Top 8 countries of reported ADE of zoledronic acid

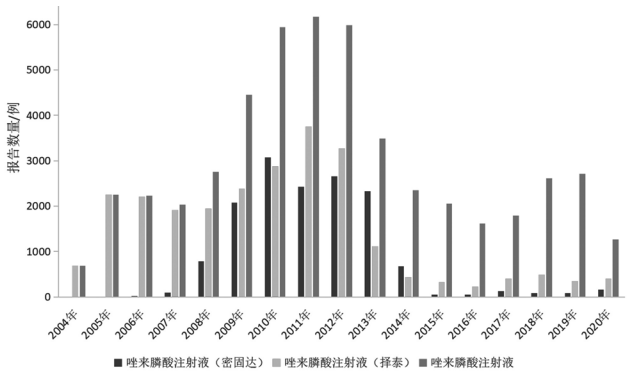


图 2　2004 至 2020 年唑来膦酸相关 ADE 报告数量

Fig 2　Number of reported ADEs of zoledronic acid from 2004 to 2020

跌倒（频数 1969）、贫血（频数 1146），主要 SOC 中频数排名前 10 的 PTs 见表 2。

2.4　唑来膦酸注射液主要及新的 ADR 信号

表 3 为唑来膦酸注射液报告总体频数及强度排名前 20 的 ADR 信号，表 4 为密固达、择泰信号频数前 20 的 ADR 信号，表 5 为密固达、择泰信号强度前 20 的 ADR 信号。将表中的 ADR 信号与密固达、择泰中国上市说明书作比较，去重后共得到 37 个未在

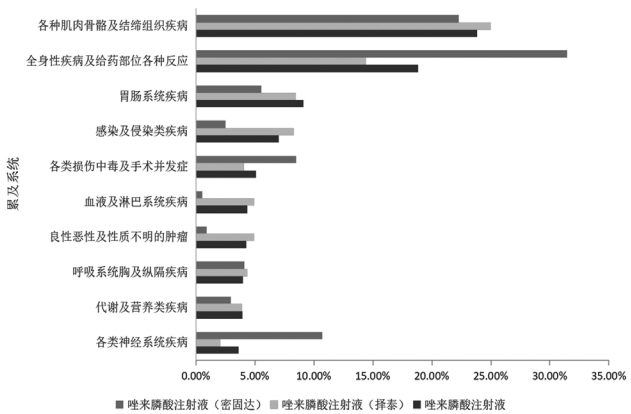


图 3　唑来膦酸 ADR 信号占比排名前 10 位的 SOC 分布

Fig 3　Systems and organs involved in the top 10 ADR signals of zoledronic acid

说明书中出现的信号，涉及 13 个 SOC。在这些新的 ADR 信号中，感染及侵染类疾病相关的信号最多，提示唑来膦酸与感染可能存在相关性。

3　讨论

50 395 份报告中，女性所占比例远高于男性，可能原因为骨质疏松症发病率中女性高于男性，王雨荷等 [9] 关于原发性骨质疏松症危险因素的 meta 分析结果表明骨质疏松症女性患者是男性的 6 ～ 8 倍。年龄分布主要在 50 ～ 75 岁，可能与骨质疏松及肿瘤患者的好发人群主要为中老年人有关 [10]。唑来膦酸相关的 ADR 报告数量从 2004 年开始逐年增加，在 2011 年达到高峰，此后呈下降趋势，可能是随着该药上市后使用量的增大，其相关的 ADR 也逐年增加，相关人员对其 ADR 的关注程度及认知度逐年提升，之后通过对 SOC 相关 ADR 的及时识别及预防措施的使用，ADR 报告数量下降。

3.1　ADR 发生的 SOC 特点

表 2 不同唑来膦酸主要 SOC 中频数排名前 10 的 PTs

Tab 2 PTs of the top 10 in main SOC of zoledronic acid

SOC	ADR 信号（PTs）	频数	PRR	χ^2 值（PRR）	ROR 值 95% 下限	SOC	ADR 信号（PTs）	频数	PRR	χ^2 值（PRR）	ROR 值 95% 下限
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	骨坏死	8267	103.59	53 9699.30	120.24	感染及侵染类疾病	骨髓炎 *	2030	42.11	66 409.36	41.74
	颌骨骨坏死	5359	89.06	31 5467.60	96.22		感染	1372	4.87	4129.48	4.71
	骨骼异常	2556	56.90	10 7433.91	57.24		感染性肺炎	1321	1.95	616.00	1.87
	关节痛	2448	3.18	3656.62	3.16		尿路感染 *	651	1.94	292.75	1.80
	颌骨疼痛	2068	33.84	55 767.48	33.60		齿龈炎 *	622	39.90	19 378.66	37.02
	背痛	1700	3.31	2722.74	3.23		排脓 *	494	66.66	23 441.99	60.71
	骨痛	1696	13.21	17 903.72	12.97		牙脓肿 *	459	17.64	6566.92	16.16
	肌痛	1558	3.72	3060.50	3.62		蜂窝织炎 *	431	3.72	840.07	3.40
	肢体疼痛	1531	2.26	1078.22	2.19		鼻窦炎 *	426	2.10	242.44	1.92
	下颌骨外露	984	403.63	12 4098.17	368.10		脓毒症 *	400	1.66	102.59	1.50
全身性疾病及给药部位各种反应	死亡	5887	2.73	6662.40	2.88	各类损伤中毒及手术并发症	跌倒 *	1969	2.71	2128.52	2.66
	疼痛	5612	4.26	14 035.48	4.54		损伤	1631	4.41	4222.80	4.30
	发热	2519	3.47	4401.82	3.45		股骨骨折	680	6.44	3018.98	6.03
	疲乏	2166	1.36	214.95	1.32		肋骨骨折	382	9.09	2615.42	8.25
	不适	1558	1.40	180.12	1.34		病理性骨折	363	36.08	10 334.58	32.46
	乏力	1548	1.92	683.47	1.85		骨折	358	7.15	1817.63	6.47
	身体状况恶化	1464	7.25	7618.89	7.06		髋部骨折	348	4.60	955.46	4.16
	延迟愈合 *	1424	21.25	24 667.56	20.66		压缩性骨折	280	29.31	6587.04	25.97
	流感样疾病	1175	5.21	3898.77	5.01		牙折	277	11.00	2368.92	9.79
	寒战	937	3.95	2023.63	3.75		足部骨折	257	6.17	1073.98	5.47
胃肠系统疾病	恶心	1874	1.05	5.35	1.01	血液及淋巴系统疾病	贫血	1146	2.73	1243.17	2.61
	腹泻	1503	1.18	43.61	1.13		血红蛋白降低	815	3.72	1591.19	3.51
	呕吐	1428	1.35	132.20	1.29		血小板减少症	506	2.15	309.32	1.98
	牙病	819	14.02	9201.46	13.25		白细胞计数降低	494	2.24	334.99	2.06
	牙疼	810	21.94	14 462.46	20.70		中性粒细胞减少症	480	2.01	240.61	1.84
	便秘	771	1.88	316.84	1.76		血细胞容量减低	476	9.87	3598.14	9.08
	腹痛	648	1.29	41.01	1.19		红细胞计数下降	474	9.08	3246.15	8.35
	牙齿脱落	563	16.46	7500.45	15.26		淋巴结病 *	409	5.30	1383.57	4.83
	吞咽困难	527	2.20	340.80	2.03		血小板计数降低	399	1.85	153.39	1.68
	口腔疼痛	527	11.10	4562.86	10.26		淋巴细胞计数降低 *	283	7.14	1433.56	6.37

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADR not mentioned in the instruction）。

原研药物唑来膦酸注射液说明书中提及的 ADR，如颌骨坏死、骨痛、肌痛、流感样症状等均出现在本次挖掘的 ADR 信号中。ADR 信号主要涉及的 SOC 与说明书记录及用药警示信息基本一致，进一步证实了本研究的可信度。

3.2 新的信号及累及器官系统

在挖掘出的 37 个新的 ADR 信号中，有些阳性信号如跌倒、延迟愈合、高压氧疗、尿钙降低等虽然未被记载在药品说明书中，却是说明书已记录不良反应的具体表现形式。而尿路感染、血 25- 羟维生素 D_3 升高、快感缺乏等并未记载在说明书中，这些不良反应的发现可为临床合理用药及说明书更新提供参考。在新的 ADR 信号中，感染及侵染类疾病的 PTs 最多，包括尿路感染、骨髓炎、蜂窝织炎、牙脓肿等。说明书中仅有结膜炎、葡萄膜炎、虹膜炎等眼部感染的记录。国内外文献中有少量唑来膦酸引起感染的报道。刘燕 [11] 报道了唑来膦酸致骨髓炎 4 例，指出近年来该类药物引起的药物相关性骨髓炎的不良事件有增多的趋势，应引起临床的重视。阳晓霞等 [12] 报道了唑来膦酸相关眶周炎症 1 例，指出患者如在使用双磷酸盐期间已反复或者顽固出现眼部炎症时应立即终止使用。De 等 [13] 对使用双膦酸盐导致颌骨坏死并引起放线菌骨髓炎感染的病例进行了总结，指出当颌骨因外伤或牙周病而接触到口腔放线菌时，患者使用双膦酸盐发生放线菌骨髓炎感染的可能性较高。唑来膦酸引起感染的机制尚不明确，有文献推断可能为其引发 T 细胞介导的细胞因子释放触发免疫或毒性反应进而引起的炎症反应 [14-15]。唑来膦酸导致的血 25- 羟维生素 D_3 升高未见相关报道，原发性骨质疏松症诊疗指南（2017 版）中提到维生素 D 不足会影响其他抗骨质疏松药物的疗效，对于饮食摄入不足的患者，使用唑来膦酸时需适当补充维生素 D[16]，然而本研究发

表 3 唑来膦酸报告频数及报告强度排名前 20 的 ADR 信号

Tab 3 Top 20 ADR signals of zoledronic acid of signal reports and signal strength

排序	报告频数					信号强度				
	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）
1	骨坏死	8267	103.59	539 699.30	120.24	下颌损伤切除	24	4439.89	4083.74	600.90
2	死亡	5887	2.73	6662.40	2.88	骨内血管瘤 *	11	2034.95	1697.02	262.77
3	疼痛	5612	4.26	14 035.48	4.54	干骺端骨折	7	1294.97	974.57	159.34
4	颌骨骨坏死	5359	89.06	315 467.60	96.22	脓肿治疗 *	13	1202.47	1922.87	271.41
5	焦虑	2571	3.23	3946.66	3.22	细菌组织标本鉴定 *	4	739.98	451.14	82.71
6	拔牙	2566	111.09	174 973.44	111.32	阻塞性角化病 *	4	739.98	451.14	82.71
7	骨骼异常	2556	56.90	107 433.91	57.24	骨显像	38	585.82	5184.29	306.34
8	发热	2519	3.47	4401.82	3.45	第一级死骨	664	520.50	90 150.20	454.51
9	关节痛	2448	3.18	3656.62	3.16	牙科治疗	185	482.03	24 496.50	367.94
10	疲乏	2166	1.36	214.95	1.32	下颌骨切除术	25	462.49	3158.00	222.23
11	颌骨疼痛	2068	33.84	55 767.48	33.60	巨细胞性齿龈瘤	5	462.49	531.96	89.73
12	骨髓炎 *	2030	42.11	66 409.36	41.74	牙 X 射线	17	449.27	2088.25	186.37
13	跌倒 *	1969	2.71	2128.52	2.66	鼻窦转移性癌	12	443.99	1431.73	156.45
14	恶心	1874	1.05	5.35	1.01	高压氧疗 *	152	439.36	19 567.76	329.03
15	呼吸困难	1814	1.45	253.80	1.40	伤口清创术	306	438.83	39 511.32	359.33
16	背痛	1700	3.31	2722.74	3.23	良性肛门直肠肿瘤	7	431.66	777.06	111.63
17	骨痛	1696	13.21	17 903.72	12.97	骨清创术	421	403.54	53 013.89	343.10
18	损伤	1631	4.41	4222.80	4.30	下颌骨外露	985	402.25	124 089.35	366.92
19	头痛	1602	1.11	16.17	1.05	下颌骨假体使用者	8	369.99	861.55	111.43
20	肌痛	1558	1.40	180.12	1.34	佩 - 吉综合征 *	8	369.99	861.55	111.43

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADR not mentioned in the instruction）。

表 4 不同唑来膦酸报告频数排名前 20 的 ADR 信号

Tab 4 Top 20 ADR signals of zoledronic acid of signal reports

排序	密固达					择泰				
	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）
1	死亡	2541	4.03	6019.02	4.47	骨坏死	7982	197.76	870 257.60	280.80
2	疼痛	1337	3.44	2357.08	3.48	颌骨骨坏死	3797	111.52	320 598.34	126.26
3	关节痛	1263	5.62	4818.98	5.71	疼痛	3670	5.57	13 905.95	6.13
4	发热	1148	5.39	4129.33	5.43	拔牙（牙齿前突）	2447	207.72	323 387.90	218.60
5	肌痛	924	7.55	5222.70	7.47	死亡	2404	2.23	1692.96	2.26
6	跌倒 *	910	4.29	2311.02	4.21	焦虑	2389	6.04	10 036.49	6.30
7	头痛	872	2.07	492.42	1.99	骨骼异常	2358	103.33	187 236.30	108.67
8	流感样疾病	805	12.19	8143.15	11.96	骨髓炎 *	1858	76.21	114 565.84	78.09
9	骨痛	765	19.77	13 242.57	19.32	颌骨疼痛	1586	50.17	67 410.86	50.68
10	恶心	735	1.42	94.36	1.34	损伤	1533	8.33	9743.49	8.36
11	肢体疼痛	730	3.70	1443.71	3.56	延迟愈合 *	1307	38.94	43 777.17	38.70
12	不适	635	1.96	302.66	1.85	身体状况恶化	1242	12.33	12 552.81	12.19
13	呕吐	547	1.78	188.68	1.66	感染 *	1177	8.39	7524.26	8.25
14	寒战	541	7.78	3168.33	7.38	疲乏	1044	1.32	82.81	1.25
15	疲乏	532	1.15	10.38	1.06	呼吸困难	1032	1.65	270.95	1.58
16	背痛	519	3.45	902.54	3.24	快感缺乏 *	955	18.44	15 028.18	17.91
17	乏力	508	2.16	317.59	2.01	背痛	906	3.53	1640.85	3.39
18	呼吸困难	497	1.36	47.80	1.25	畸形 *	862	54.26	39 319.56	52.23
19	头晕	460	1.33	39.02	1.23	贫血	858	4.10	2001.59	3.93
20	感觉异常	454	2.60	447.32	2.41	骨转移	858	67.73	2001.59	65.11

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADR not mentioned in the instruction）。

现，唑来膦酸可能导致血 25- 羟维生素 D_3 升高，因此，在使用唑来膦酸的同时如合用维生素 D，应注意监测血清中维生素 D 的水平，防止维生素 D 过高引起中毒。关于引起快感缺乏的 ADR，提示在使用该类药物时可适当关注患者的情绪变化，但也不排除数据库本身的缺陷带来的误差，需要

表 5 不同唑来膦酸信号强度前 20 的 ADR 信号检测结果

Tab 5 Top 20 ADR signals of zoledronic acid of signal strength

排序	密固达					择泰				
	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）	ADR 信号（PTs）	频数	PRR 值	χ^2 值（PRR）	95%*CI* 下限（ROR）
1	唾液分析异常 *	3	382.74	494.92	91.48	下颌损伤切除	24	8947.74	8232.85	1211.55
2	螯合治疗 *	3	239.21	358.59	63.47	骨内血管瘤 *	11	4101.05	3422.69	529.67
3	骨髓炎引流 *	4	196.28	454.12	64.01	脓肿治疗 *	13	2423.35	3879.41	547.11
4	心脏瓣膜成形术 *	3	127.58	217.21	36.94	阻塞性角化病 *	4	1491.29	911.32	166.70
5	大肠吻合术 *	4	94.50	245.90	33.07	巨细胞性齿龈瘤	5	932.06	1075.31	180.85
6	急性期反应	17	94.30	1286.96	56.72	放射性同位素扫描	39	908.76	10 024.54	508.57
7	牙 X 射线	3	91.13	161.67	27.18	鼻窦转移性癌	12	894.77	2892.91	315.35
8	血 25- 羟维生素 D_3 升高 *	3	79.74	143.16	24.01	高压氧疗 *	152	885.45	39 526.74	665.04
9	尿钙降低 *	5	77.79	272.75	30.75	良性肛门直肠肿瘤	7	869.92	1570.63	225.00
10	巩膜水肿	4	77.32	204.91	27.40	第一级死骨	629	865.33	163 269.38	769.33
11	获得性爪形趾 *	6	75.05	328.67	32.22	骨清创术	421	813.26	107 107.85	697.23
12	脊髓性跛行 *	5	70.88	250.22	28.14	下颌骨假体使用者	8	745.65	1741.99	224.59
13	夹板使用 *	3	70.88	128.35	21.50	佩 - 吉综合征 *	8	745.65	1741.99	224.59
14	慢性乳头状瘤皮炎 *	5	67.86	240.26	27.00	骨修复术	61	710.69	14 631.26	464.37
15	血重金属含量升高 *	3	61.73	112.67	18.87	牙槽成形术	41	694.81	9677.86	414.52
16	硬膜下积液 *	3	54.68	100.30	16.82	血肌酐降低 *	9	671.08	1917.36	224.96
17	骨折移位	13	51.83	553.18	29.47	胸壁手术 *	13	605.84	2763.87	251.21
18	钙离子减少	7	49.61	265.85	23.00	面部和口腔 X 线检查异常	28	579.95	6107.21	321.11
19	眼周炎	8	45.97	287.64	22.44	外伤后骨质疏松症 *	9	559.23	1788.41	199.11
20	尿白蛋白 / 肌酐比率升高	7	42.94	230.72	19.98	气管镜检查 *	3	559.23	463.53	93.45

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADR not mentioned in the instruction）。

进一步的研究证实。

3.3 严重 ADE

50 395 份 ADE 报告中，严重的 ADE 占比较高，特别是死亡，可能与唑来膦酸的适应证有关。虽然密固达说明书中规定其用于骨质疏松的治疗，但在实际临床中也将其用于实体肿瘤骨转移和多发性骨髓瘤引起的骨骼损害的治疗。这些患者预期寿命普遍较短，在使用过程中容易出现与原发疾病有关的不良进展甚至死亡。因此患者结局并不一定与唑来膦酸注射液的使用存在直接的因果关系。

3.4 研究局限

本研究仍存在一定的局限性：未考虑药物相互作用及疾病本身对信号的影响；FAERS 数据库中 ADE 报告主要来源于美国，分析结果更加适用于美国的患者，由于人种、地域差异，其结果在中国可能存在一定偏差；FAERS 数据库为自发呈报系统，数据库中部分 ADR 报告存在低报漏报、内容不完整等情况 [17]；PRR 法和 ROR 法挖掘到的结果只能表明药物与 ADR 信号有统计学关联，明确的因果关系还需要进一步研究和评估。

4 结论

本研究基于信号挖掘方法对唑来膦酸注射液的 ADR 信号进行全面分析，发现除说明书已有的 ADR 外，还存在说明书未提及的尿路感染、血 25- 羟维生素 D_3 升高、快感缺乏等风险，提示医务工作者在使用中应加强相关 ADR 的监测，才能确保临床安全合理用药，同时新的 ADR 信号的发现可为更新说明书中的 ADR 提供参考。

参考文献

[1] 李佩芳，宁宁 . 唑来膦酸注射液治疗骨质疏松症的研究进展 [J]. 华西药学杂志，2016，31（4）：436-438.

[2] Nancollas GH，Tang R，Phipps RJ，et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone：differences in interactions with hydroxyapatite [J]. Bone，2006，38（5）：617-627.

[3] 张俊越，龚维明 . 唑来膦酸注射液治疗骨质疏松不良反应的研究进展 [J]. 山东医药，2020，60（13）：107-110.

[4] Coleman R，Burkinshaw R，Winter M，et al. Zoledronic acid [J]. Expert Opin Drug Saf，2011，10（1）：133-45.

[5] Dhillon S. Zoledronic acid（Reclast，Aclasta）：a review in osteoporosis [J]. Drugs，2016，76（17）：1683-1697.

[6] 代菲，陈盛新，舒丽芯，等 . 5 种信号挖掘方法在药物不良反应检测中的分析和应用 [J]. 中国医院药学杂志，2012，32（20）：1674-1677.

[7] Hauben M，Zhou X. Quantitative methods in pharmacovigilance：focus on signal detection [J]. Drug Saf，2003，26（3）：159-186.

[8] Sakaeda T，Tamon A，Kadoyama K，et al. Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system [J]. Int J Med Sci，2013，10（7）：796-803.

[9] 王雨荷，刘红，李艳，等 . 中国原发性骨质疏松症危险因素的 Meta 分析 [J]. 中国骨质疏松杂志，2021. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3701.R.20210709.0942.002.html.

[10] 罗令，孙晓峰，皮丕喆，等 . 近 10 年来我国中老年人群骨质疏松症患病率的荟萃分析 [J]. 中国骨质疏松杂志，2018，24（11）：1415-1420.
[11] 刘燕 . 唑来膦酸致骨髓炎 4 例 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（7）：39-42.
[12] 阳晓霞，李勤 . 唑来膦酸相关眶周炎症 1 例 [J]. 广东医学，2017，38（4）：607.
[13] de Ceulaer J，Tacconelli E，Vandecasteele SJ. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw（BRONJ）：the missing link? [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2014，33（11）：1873-1880.
[14] Tian YM，Wang R，Liu LY，et al. Acute bilateral uveitis and right macular edema induced by a single infusion of zoledronic acid for the treatment of postmenopausal osteoporosis as a substitution for oral alendronate：a case report [J]. BMC Musculoskelet Disord，2016，17：72.
[15] Woo TC，Joseph DJ，Wilkinson R. Serious ocular complications of zoledronate [J]. Clin Oncol（R coll Radiol），2006，18（7）：545-546.
[16] 夏维波，章振林，林华，等 . 原发性骨质疏松症诊疗指南（2017）[J]. 中国骨质疏松杂志，2019，25（3）：281-309.
[17] Alomar M，Tawfiq AM，Hassan N，et al. Post marketing surveillance of suspected adverse drug reactions through spontaneous reporting：current status，challenges and the future [J]. Ther Adv Drug Saf，2020，11：1-11.

（收稿日期：2021-05-06；修回日期：2021-08-10）

钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂类药物相关膀胱癌风险：一项上市后监测数据的真实世界分析

潘晨[1]，曹明楠[2]，马华瑞[3]，廖音[1]，崔璨[1]，张志琪[1]，崔向丽[1*]（1.首都医科大学附属北京友谊医院药剂科，北京 100050；2.首都医科大学附属北京天坛医院药学部，北京 100070；3.北京市昌平区中医医院，北京 102200）

摘要：目的 挖掘和评价钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2（SGLT2）抑制剂和膀胱癌不良事件的关联性及特点。**方法** 基于 FAERS 数据（2013 年 1 月至 2021 年 3 月），采用比例失衡分析法和贝叶斯分析法对 SGLT2 抑制剂类药物与膀胱癌的相关性进行挖掘和评价，并且比较不良事件的预后。**结果** SGLT2 抑制剂相关不良事件共 49 425 例，其中膀胱癌相关 195 例。SGLT2 抑制剂相关膀胱癌患者中，老年患者多于中年患者（35.72% *vs* 24.10%），男性患者明显多于女性患者（71.28% *vs* 13.33%）。与其他 SGLT2 抑制剂相比，达格列净 ROR[5.65，95%*CI* =（4.64，6.88）]、PRR[5.61，95%*CI* =（4.62，6.81）]，IC（2.48，IC*025* = 2.04） 和 EBGM（5.59，EBGM*05* = 4.74）值最大，达格列净与膀胱癌关联性最强。SGLT2 抑制剂类药物死亡比例和住院比例没有显著性差异。**结论** 挖掘和分析 SGLT2 抑制剂类药物相关膀胱癌的风险和特点，可对该不良事件进行持续监测，为药品上市后安全评价提供依据。

关键词：钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂；达格列净；膀胱癌；美国食品药品监督管理局不良事件报告系统

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0447-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.035

Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors related bladder cancer: a real-world analysis of post-marketing surveillance data

PAN Chen[1], CAO Ming-nan[2], MA Hua-rui[3], LIAO Yin[1], CUI Can[1], ZHANG Zhi-qi[1], CUI Xiang-li[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University*, *Beijing* 100050; 2. *Department of Pharmacy*, *Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University*, *Beijing* 100070; 3. *Hospital of Traditional Chinese Medicine of Changping District*, *Beijing* 102200)

基金项目：国家卫健委卫生技术评估重点实验室 2019 年度开放基金项目（编号：FHTA2019-02）；北京市医院管理中心 2020 年培育项目（编号：PG2020002）。

作者简介：潘晨，女，硕士，主要从事合理用药和药物警戒方面的研究，email：13261394090@163.com *通信作者：崔向丽，女，博士，主要从事医院药学方面的研究，email：cui10@163.com

Abstract: Objective To determine the link between sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor and risk of bladder cancer. **Methods** Disproportionality analysis and Bayesian analysis were used in data mining to screen the suspected bladder cancer after the use of SGLT2 inhibitors based on the FAERS data from January 2013 to March 2021. The fatality and hospitalization rates of SGLT2 associated bladder cancer were also investigated. **Results** Totally 49 425 cases of SGLT2 inhibitor-related adverse events were collected, 195 of which were related to the bladder cancer. SGLT2 inhibitors associated bladder cancer appeared to influence more elderly patients than the middle-aged (35.72% *vs* 24.10%), Men outnumbered women (71.28% *vs* 13.33%). Dapagliflozin showed a stronger bladder cancer association than other SGLT2 inhibitors, with the highest reporting odds ratio [ROR ＝ 5.65, 95%*CI* ＝ (4.64, 6.88)], proportional reporting ratio [PRR ＝ 5.61, 95%*CI* ＝ (4.62, 6.81)], information component (IC ＝ 2.48, IC 025 ＝ 2.04), and empirical Bayes geometric mean (EBGM ＝ 5.59, EBGM*05* ＝ 4.74). We found no significant difference in the fatality rate and hospitalization rate among various SGLT2 inhibitors. **Conclusion** Bladder cancer related to various SGLT2 inhibitors are profiled covering the occurrence rate, clinical characteristics, and prognosis. We can continuous to monitor the adverse events to provide evidence for post-marketing safety evaluation of drugs.

Key words: sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor; dapagliflozin; bladder cancer; FDA adverse event reporting system

钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2（sodium-glucose co-transporter 2，SGLT2）抑制剂可降低心血管事件死亡率、减缓肾脏疾病发展，目前已广泛应用于 2 型糖尿病的治疗，常见的不良反应包括泌尿生殖系统感染 [1-3]。临床也越来越关注长期使用 SGLT2 抑制剂造成的反复泌尿系统感染是否会增加膀胱癌发生的概率。目前尚没有基于美国食品药品监督管理局不良事件报告系统（Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System，FAERS）对 SGLT2 抑制剂和膀胱癌的关联性进行评价的研究。本研究的目的是通过对真实世界上市后监测数据的挖掘，明确 SGLT2 抑制剂和膀胱癌的关联性，描述 SGLT2 抑制剂相关的膀胱癌事件的特点以及 SGLT2 抑制剂类药物的预后情况。

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。以 SGLT2 抑制剂药品商品名和通用名为检索词进行检索，提取数据库中 33 个季度（2013 年 1 月 1 日至 2021 年 3 月 31 日）的不良事件报告，SGLT2 抑制剂类药物在美国上市的时间见表 1。本研究分析目标药物或首要怀疑药物为 SGLT2 抑制剂的报告，剔除 SGLT2 抑制剂未列为首要怀疑药物的报告。

1.2 膀胱癌不良事件术语

FAERS 数据库采用国际医学用语词典（Medical Dictionary for Drug Regulatory Activities，MedDRA）中的首选术语（preferred term，PT）编码不良事件，本研究在参考既往有关膀胱癌研究的基础上 [4-5]，检索 MedDRA 23.0 版本，确定 4 个膀胱癌不良事件 PT：“Bladder cancer[10005003]”“Bladder cancer recurrent[10005005]”“Bladder transitional cell carcinoma[10005084]”“Transitional cell carcinoma[10044412]”。

表 1 美国上市的四种 SGLT2 抑制剂

Tab 1 Four SGLT2 inhibitors approved in American

中文通用名	英文通用名	商品名	上市时间
卡格列净	Canagliflozin	Invokana	2013 年
达格列净	Dapagliflozin	Farxiga	2014 年
恩格列净	Empagliflozin	Jardiance	2014 年
埃格列净	Ertugliflozin	Steglatro	2017 年

1.3 评价方法

本研究基于比例失衡分析法和贝叶斯分析法挖掘 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌不良事件信号，包括报告比值法（reporting odds ratio，ROR）、比例报告比值法（proportional reporting ratio，PRR）、贝叶斯置信度递进神经网络法（Bayesian confidence propagation neural network，BCPNN）和伽马泊松分布缩减法（multi-item Gamma Passion shrinker，MGPS）[6] 四种方法，表 2 列举了比例失衡分析法四格表，表 3 列举了四种方法计算公式和评价标准，其中 a、b、c、d 的定义见表 2。

表 2　比例失衡分析法四格表

Tab 2　Four quadrants of measure of disproportionality analysis

药物	目标不良事件报告数	其他不良事件报告数	合计
目标药物	a	b	a + b
其他药物	c	d	c + d
合计	a + c	b + d	a + b + c + d

1.4　统计方法

应用 R 语言 3.3.2 版本进行数据处理分析。对于分类变量以频数（百分比）描述，采用卡方检验或 Fisher 精确检验；对于连续性变量：如果符合正态分布，以均值 ± 标准差描述，采用独立样本 *t* 检验；如果不符合正态分布，以中位数（四分位间距）描述，采用 Wilcoxon 秩和检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 3　四种方法的公式和评价标准

Tab 3　Summary of major algorithms in signal detection

方法	公式	评价标准
ROR	$ROR = (a/b)/(c/d)$ $95\%CI = e^{\ln(ROR) \pm 1.96\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}$	95%*CI* > 1，*n* ≥ 3
PRR	$PRR = [a/(a+c)]/[b/(b+d)]$ $95\%CI = e^{\ln(PRR) \pm 1.96\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}$	PRR ≥ 2 95%*CI* > 1，*n* ≥ 3
BCPNN	$IC = \log_2 a(a+b+c+d)/[(a+c)(a+b)]$ $IC025 = e^{\ln(IC) - 1.96\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}$	IC025 > 0
MGPS	$EBGM = a(a+b+c+d)/[(a+c)(a+b)]$ $EBGM05 = e^{\ln(EBGM) - 1.64\sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}}$	EBGM05 > 2，*n* > 0

2　结果

2.1　SGLT2 抑制剂相关膀胱癌报告筛选流程

共获得 SGLT2 抑制剂相关不良事件报告 52 337 份，剔除 SGLT2 抑制剂未列于首要怀疑药物报告 2912 份，共获得 SGLT2 抑制剂相关不良事件报告 49 425 份，其中疑似 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌报告 195 份（见图 1），占 SGLT2 抑制剂相关不良事件 0.39%。

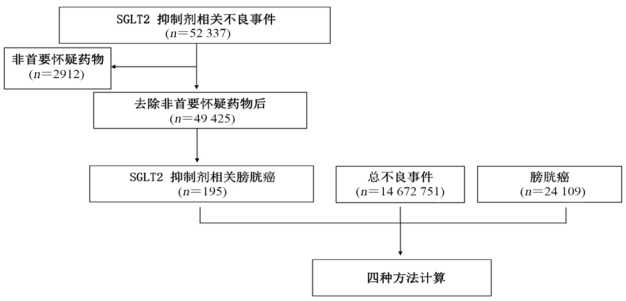


图 1　筛选流程图

Fig 1　Selection process

2.2　SGLT2 抑制剂相关膀胱癌报告基本信息

SGLT2 抑制剂相关膀胱癌患者及不良事件报告基本特征见表 4，达格列净相关膀胱癌事件报告例数最多（*n* = 101），其次为恩格列净（*n* = 50）和卡格列净（*n* = 44），埃格列净（2017 年美国上市）未见膀胱癌相关报道。

195 例 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌不良事件中，年龄不详患者 78 例（40%），老年患者（≥ 65 岁）比中年患者（45 ～ 64 岁）报告数量多（35.72% *vs* 24.10%）；性别不详患者 30 例（15.38%），男性患者比女性患者报告数量多（71.28% *vs* 13.33%）；报告者以医疗人员为主（85.64%）；报告 66.67% 来自北美洲，19.49% 来自欧洲。临床结局方面：死亡患者 12 例（6.15%），威胁生命患者 15 例（7.69%），住院患者 29 例（14.97%），其他结局患者 139 例（71.28%）。

SGLT2 抑制剂相关膀胱癌不良事件发生和接收报告年份见图 2。每份报告均有接收报告年份，但 89 例（45.64%）不良事件发生年份不详。SGLT2 抑制剂相关膀胱癌呈现先增长后减少趋势，2016 － 2019 年数量相对较高。

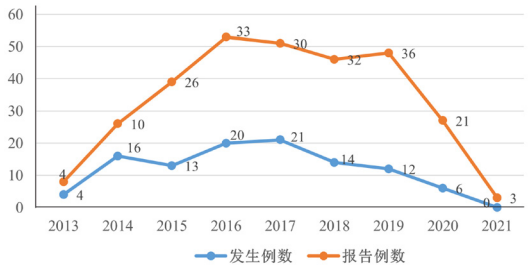


图 2　SGLT2 抑制剂不同年份报告例数和发生例数

Fig 2　Number of reports and events of SGLT2 inhibitors related bladder cancer

2.3　四种方法检测 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌事件

ROR、PRR、BCPNN 和 MGPS 四种方法分析结果见表 5，SGLT2 抑制剂整体和达格列净四种方法分析结果都显示达到阳性信号标准；达格列净 ROR、PRR、IC、EBGM 值最高，信号强度最高；恩格列净 ROR 和 BCPNN 两种方法达到阳性信号标准，卡格列净仅 BCPNN 法达到阳性信号标准。埃格列净未见膀胱癌相关报告，暂未进行计算。

表 4 FAERS 数据库收到的 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌报告的基本特征

Tab 4 Demographic and clinical characteristics of patients with SGLT2 inhibitors related bladder cancer from the FAERS database

特征	报告数 [*n*（%）]	特征	报告数 [*n*（%）]
发生年份		地区	
2020	6（3.08）	北美洲	130（66.67）
2019	12（6.15）	欧洲	38（19.49）
2018	14（7.18）	亚洲	15（7.69）
2017	21（10.77）	大洋洲	5（2.56）
2016	20（10.26）	非洲	3（1.54）
2015	13（6.67）	南美洲	2（1.03）
2014	16（8.21）	不详	2（1.03）
2013	4（2.05）	适应证	
不详	89（45.64）	糖尿病	132（67.69）
年龄 / 岁		其他	1（0.51）
＜ 44	0（0.00）	不详	62（31.79）
45 ～ 64	47（24.10）	药品	
65 ～ 74	53（27.0）	卡格列净	44（22.56）
75 ～ 84	17（8.72）	达格列净	101（51.79）
≥ 85	0（0.00）	恩格列净	50（25.64）
不详	78（40.00）	埃格列净	0（0.00）
性别		结局	
男	139（71.28）	死亡	12（6.15）
女	26（13.33）	威胁生命	15（7.69）
不详	30（15.38）	住院	29（14.97）
报告者		其他	139（71.28）
医疗人员	167（85.64）		
患者	28（14.36）		

2.4 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌预后分析

分析 SGLT2 抑制剂类药物相关膀胱癌的死亡比例（见图 3），发现恩格列净相关的膀胱癌未造成患者死亡，卡格列净和达格列净相关膀胱癌的死亡比例（11.36% *vs* 6.93%）差异没有统计学意义（$P = 0.51$）；卡格列净、达格列净和恩格列净相关膀胱癌导致的住院比例（34.09% *vs* 27.72% *vs* 26.00%）中卡格列净相关膀胱癌导致的住院比例最高，但差异无统计学意义（$P = 0.65$）。

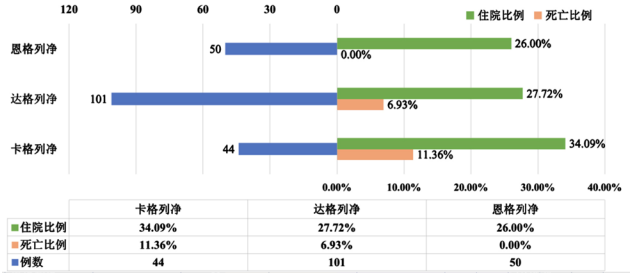


图 3 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌的报告例数、对应的死亡比例和住院比例

Fig 3 Number of reports, fatality rates and hospitalization rates of SGLT2 related bladder cancer

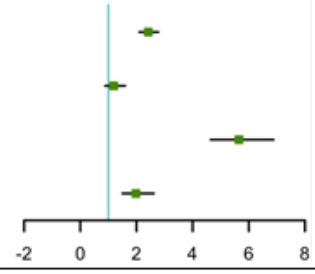
3 讨论

本研究用四种方法对 FAERS 数据库的原始数据进行挖掘，探讨 SGLT2 抑制剂在上市后膀胱癌相关不良事件的监测情况。纳入 4 个 SGLT2 抑制剂，其中达格列净用四种方法均检测到阳性信号，且相关膀胱癌风险最高，临床需要提高警惕；恩格列净和卡格列净分别有两种和一种方法检测到阳性信号；埃格列净上市时间晚（2017 年），未观察到膀胱癌相关不良事件。膀胱癌一般有几年的潜伏期 [7]，典型如环磷酰胺导致的膀胱癌发生时间中位数是 2.7 年 [8]，故现在下定论也为时过早，仍需延长观察时间，对各大不良反应数据库数据持续进行监测并汇总分析，开展随访期长的临床研究等。

表 5 四种方法检测 SGLT2 相关膀胱癌事件信号

Tab 5 Signals of SGLT2 inhibitors related bladder cancer by four algorithms

药物	*n*	ROR（95%*CI*）	PRR（95%*CI*）	IC（IC025）	EBGM（EBGM05）
SGLT2 抑制剂	195	2.42（2.10，2.78）	2.41（2.10，2.79）	1.26（1.10）	2.40（2.13）
卡格列净	44	1.19（0.88，1.60）	1.19（0.88，1.59）	0.25（0.18）	1.19（0.93）
达格列净	101	5.65（4.64，6.88）	5.61（4.62，6.81）	2.48（2.04）	5.59（4.74）
恩格列净	50	1.98（1.50，2.62）	1.98（1.50，2.61）	0.98（0.74）	1.98（1.57）



目前已发表的对于 SGLT2 抑制剂是否会增加膀胱癌的风险还没有一致结论：2015 年 [9] 和 2017 年 [4] 的两项 meta 分析结果以及 2021 年 [10] 的一项挖掘欧洲数据库的研究均表明 SGLT2 抑制剂与膀胱癌的风险增加相关；但 2017 年的 meta 分析结果遭到了 Kohler[5] 和 Shaikh[11] 两位学者的质疑，且 2014 年 [12] 和 2019 年 [13] 的两项动物实验以及 2019 年 [14] 的一项 meta 分析结果均表明 SGLT2 抑制剂不增加膀胱癌风险，关于 SGLT2 抑制剂是否会引起膀胱癌风险增加目前存在争议 [15-16]。本研究用真实世界数据分析结果支持了 SGLT2 抑制剂可能增加膀胱癌风险的观点。

对本研究中使用 SGLT2 抑制剂后膀胱癌风险增加分析如下：① SGLT2 抑制剂相关的慢性尿路感染，引起反复膀胱刺激导致膀胱癌风险增加 [9]；② SGLT2 抑制剂增加尿液葡萄糖浓度，为肿瘤细胞提供营养 [17]；③ 用药后泌尿生殖系统感染增多，促使患者积极检查，利于发现早期膀胱癌，但并不排除部分患者用药前已罹患膀胱癌 [4，18]。

一项纳入 5478 例使用 SGLT2 抑制剂患者的研究发现 9 例膀胱癌，均为男性，其中 7 例≥ 65 岁 [9]。本研究也观察到老年、男性患者所占比例更高。提示临床对于老年男性患者更需警惕膀胱癌风险。预后方面，本研究暂未观察到 SGLT2 抑制剂相关的膀胱癌致死比例和住院比例差异有统计学意义，需进一步扩大样本量研究。

本研究仍存在以下局限性：① FAERS 数据库没有使用 SGLT2 抑制剂总人群的信息，对于年龄和性别的影响也只能描述性分析，无法进行卡方检验；② 患者可能在用药之前已罹患膀胱癌，但未及时就诊导致未发现，故 SGLT2 抑制剂与膀胱癌的因果关系并不能肯定；③ 本研究未对合并用药进行分析，尚无法评估合并用药的影响，有待进一步研究。

综上，本研究基于 FAERS 数据库，对 SGLT2 抑制剂相关膀胱癌进行了信号挖掘，提示对于使用 SGLT2 抑制剂尤其是使用达格列净的患者，需要警惕膀胱癌的风险，并且有必要进行长期持续的真实世界数据监测。

参考文献

[1] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）[J]. 中华糖尿病杂志，2021，13（4）：315-409.

[2] 国家老年医学中心，中华医学会老年医学分会，中国老年保健协会糖尿病专业委员会 . 中国老年糖尿病诊疗指南（2021 年版）[J]. 中华老年医学杂志，2021，40（1）：1-33.

[3] 李鑫，李焕德 . 一类全新机制的 2 型糖尿病治疗药物 SGLT2 抑制剂 [J]. 中南药学，2018，3（1）：289-296.

[4] Tang H，Dai Q，Shi W，et al. SGLT2 inhibitors and risk of cancer in type 2 diabetes：a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Diabetologia，2017，60（10）：1862-1872.

[5] Kohler S，Lee J，George JT，et al. Bladder cancer in the EMPA-REG OUTCOME trial [J]. Diabetologia，2017，60（12）：2534-2535.

[6] Chen G，Ning LJ，Qin Y，et al. Acute kidney injury following the use of different proton pump inhibitor regimens：a real-world analysis of post-marketing surveillance data [J]. J Gastroenterol Hepatol，2021，36（1）：156-162.

[7] Clayson DB，Cooper EH. Cancer of the urinary tract [J]. Adv Cancer Res，1970，13（1）：271-381.

[8] Talar-Williams C，Hijazi YM，Walther MM，et al. Cyclophosphamide-induced cystitis and bladder cancer in patients with Wegener granulomatosis [J]. Ann Intern Med，1996，124（1）：477-484.

[9] Ptaszynska A，Cohen SM，Messing EM，et al. Assessing bladder cancer risk in type 2 diabetes clinical trials：the dapagliflozin drug development program as a ‘Case Study’ [J]. Diabetes Ther，2015，6（3）：357-375.

[10] García M，Arteche-Martinez U，Lertxundi U，et al. SGLT2 inhibitors and bladder cancer：analysis of cases reported in the European Pharmacovigilance Database [J]. J Clin Pharmacol，2021，61（2）：187-192.

[11] Shaikh A. SGLT2 inhibitors and cancer：why further evidence is required [J]. Diabetologia，2017，60（12）：2536-2537.

[12] Reilly TP，Graziano MJ，Janovitz EB，et al. Carcinogenicity risk assessment supports the chronic safety of dapagliflozin an inhibitor of sodium-glucose co-transporter 2 in the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes Ther，2014，5（1）：73-96.

[13] Billger M，Kirk J，Chang J，et al. A study in a rat initiation-promotion bladder tumour model demonstrated no promoter/progressor potential of dapagliflozin [J]. Regul Toxicol Pharmacol，2019，103（1）：166-173.

[14] Dicembrini I，Nreu B，Mannucci E，et al. Sodium-glucose co-transporter-2（SGLT-2）inhibitors and cancer：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Diabetes Obes Metab，2019，21（8）：1871-1877.

[15] Dąbrowski M. Diabetes antidiabetic medications and cancer risk in type 2 diabetes：focus on SGLT-2 inhibitors [J]. Int J Mol Sci，2021，22（4）：1680-1685.

[16] Pelletier R，Ng K，Alkabbani W，et al. Adverse events associated with sodium glucose co-transporter 2 inhibitors：an overview of quantitative systematic reviews [J]. Ther Adv Drug Saf，2021，12（1）：204-209.

[17] Fujita Y，Inagaki N. Renal sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a novel therapeutic approach to treatment of type 2 diabetes：clinical data and mechanism of action [J]. J Diabetes Investig，2014，5（3）：265-275.

[18] Viswanathan M，Berkman ND. Development of the RTI item bank on risk of bias and precision of observational studies [J]. J Clin Epidemiol，2012，65（2）：163-178.

（收稿日期：2021-07-10；修回日期：2021-08-20）

医院药学

基于 NONMEM 法建立重症患者亚胺培南群体药动学模型

罗雪梅，金路，梁培，葛卫红*（南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京 210008）

摘要：目的 基于非线性混合效应模型法（NONMEM）软件建立亚胺培南群体药动学模型，用于重症感染患者的临床用药方案支持。**方法** 收集 2018 年 6 月—2019 年 6 月本院重症监护室病房中给予亚胺培南西司他丁治疗的 144 名患者（模型组 95 名，验证组 49 名）的临床资料，采用 NONMEM 法估算亚胺培南的群体药动学参数，建立群体药动学模型。将建好的模型完成拟合优度诊断、自举法内部验证及外部验证考察模型预测能力，完成模型验证。并就不同给药情况进行蒙特卡洛模拟，计算达标率。**结果** 最终群体药动学模型为二室模型，各参数的典型值分别为 *CL* 8.95 L·h^{-1}，*Q* 1.82 L·h^{-1}，V_1 24.7 L，V_2 30.5 L，患者内生肌酐清除率和性别显著影响亚胺培南清除率。当肾功能减退时可以减半剂量，而女性患者 *MIC* ＞ 1 mg·L^{-1} 时，可能需要联合用药。**结论** 该群体药动学模型可以用于重症患者的亚胺培南给药剂量的指导。

关键词：非线性混合效应模型法；亚胺培南；群体药动学模型；重症患者；血药浓度
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0452-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.037

Population pharmacokinetics of imipenem in critically ill patients based on nonlinear mixed effect model

LUO Xue-mei, JIN Lu, LIANG Pei, GE Wei-hong* (*Department of Pharmacy*, *the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To establish a population pharmacokinetic (PPK) model for imipenem in critically ill patients for individualized medication by nonlinear mixed effect model (NONMEM). **Methods** The clinical data of 144 ICU patients (95 in the model group, 49 in the valid group) from June 2018 to June 2019 were collected, and the PPK model of imipenem was determined by NONMEM. The internal validity of the model was evaluated by Goodness of fit diagnosis and Bootstrap. The external validation was used to evaluate the predicaility and reliability. Monte Carlo simulations were conducted to estimate the probability of target attainment. **Results** NONMEM demonstrated that the data fit the two-compartment model. Typical population estimates of *CL*, *Q*, V_1 and V_2 were 8.95 L·h^{-1}, 1.82 L·h^{-1}, 24.7 L and 30.5 L, respectively. CL_{cr} and gender might affect the clearance rate of imipenem. Dose should be halved in renal dysfunction and female patients might need combination therapy when *MIC* ＞ 1 mg·L^{-1}. **Conclusion** The population pharmacokinetic model is valid and useful for the use of imipenem in critically ill patients.

Key words: nonlinear mixed effect model; imipenem; population pharmacokinetic model; critically ill patient; serum drug concentration

亚胺培南是临床上广泛使用的β-内酰胺类广谱抗菌药物，适用于多种病原体所致的混合感染，常用于重症患者的抗感染治疗[1]。但是重症患者病情的复杂性以及患者自身病理生理状态的改变，

基金项目：南京药学会——常州四药医院药学科研基金资助项目（No. 2019YX007）。
作者简介：罗雪梅，女，主管药师，主要从事临床药学和药物分析研究，email：yixuejiai@sina.com *通信作者：葛卫红，女，主任药师，主要从事临床药学研究，email：6221230@sina.com

使得亚胺培南在体内的药代动力学（PK）和药效学（PD）差异较大，根据指南、说明书的剂量给药常会导致不良反应的发生或疗效不足等[2]。

亚胺培南为时间依赖型抗菌药物，血药浓度高于最低抑菌浓度（*MIC*）才能有效杀菌，近年来，越来越多的研究[3-6]证实血药浓度监测（TDM）、群体药代动力学（PPK）研究可以有效帮助碳青霉烯类抗菌药物尽早达到目标浓度，并减少不良反应的产生。本文旨在应用非线性混合效应模型法（NONMEM）建立亚胺培南 PPK 模型，为重症患者的临床个体化给药提供用药参考。

1 材料与方法

1.1 一般资料

纳入标准：年龄≥ 18 周岁；ICU 住院患者；亚胺培南西司他丁钠用药≥ 2 d。排除标准：妊娠、哺乳期妇女；资料不全者。本研究收集 2018 年 6 月—2019 年 6 月在本院进行亚胺培南血药浓度监测的 ICU 病房住院患者。记录人口学资料、用药情况、肾功能指标、肝功能指标、感染指标、重症评分等。

1.2 给药剂量和浓度测定

患者临床静脉给予亚胺培南西司他丁钠 1 ～ 3 g，每 8 或 12 h 给药。滴注 4 剂后于第 5 次给药前采集 2 mL 静脉血（CRRT 患者在非泵入侧的静脉抽取），置于促凝管中，3000 r • min $^{-1}$ 离心 8 min，取上清液 300 μL，加入稳定剂（MOPS）及内标（5- 羟基吲哚 -3- 醋酸），涡旋，经超滤管离心后，取滤过液 30 μL 进样，HPLC 法分析测定[7]。

1.3 亚胺培南 PPK 模型建立

1.3.1 最简模型建立 本研究中亚胺培南的给药方式为静脉滴注，考察具有一级消除特征的一房室、二房室模型（其中 *CL* 为中央室清除率，V_1 为中央室表观分布容积，*Q* 为室间清除率，V_2 为周边室表观分布容积，*THETA* 为群体典型值，*ETA* 为个体间变异）。比较目标函数值（OFV）和模型拟合度，选择最优者为结构模型，并分别比较不同随机效应模型，变异值最小者为佳。随机效应包括个体内和个体间随机效应。

1.3.2 最终模型建立 将年龄（AGE）、体质量（WT）、性别（SEX）、肌酐清除率（CLcr）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、白细胞计数（WBC）、SOFA 评分、APACHE Ⅱ 评分等协变量逐一引入到基础模型中分析。将协变量逐一加入最简模型中，若某一模型引入协变量后，目标函数相对于先前的 OFV 减少＞ 3.84（$d_f = 1$），则认为该协变量对模型有显著性影响（$P < 0.05$）。当所有对模型有显著性影响的协变量都引入到模型中后，即得到全量回归模型。继而反向剔除，目标函数相对于先前的 OFV 增加＞ 6.63（$d_f = 1$），认为该协变量的存在有显著性影响（$P < 0.01$），将该协变量保留在模型中，得到最终模型。

1.3.3 模型的评价 绘制拟合优度图，包括血药浓度实测值 - 群体预测值（DV-PRED）；血药浓度实测值 - 个体预测值（DV-IPRED），权重残差 - 血药浓度群体预测值（WRES-PRED）；权重残差 - 时间（WRES-TIME），观察趋势线。在原数据集的基础上应用 Bootstrap 法创建 1000 个用于验证的数据集，比较 Bootstrap 计算得到的参数与 NONMEM 计算的原始参数的结果[8]，验证模型预测性能。

1.3.4 模型的外部验证 根据 49 名验证组患者的临床指标数据，使用本研究建立的亚胺培南 PPK 模型对其血药浓度进行预测，比较个体预测值与实测值，以相关系数（*R*）、平均绝对误差（*MAE*）、均方根误差（*RMSE*）以及平均绝对百分比误差（*MAPE*）来评价模型预测的准确度与精密度。

1.4 蒙特卡洛模拟

运用美国 Oracle 公司的水晶球软件 Oracle Crystal Ball（V11.1.2.3.0）对亚胺培南的不同给药情况进行蒙特卡洛模拟。设置 5000 次运算次数模拟临床疗效。假设药动学参数 V_d、*CL* 服从对数正态分布，游离药物分数（*f*）服从均匀分布，*MIC* 服从离散分布。置信区间设置为 95%，亚胺培南 100%T ＞ *MIC* 为有较好的杀菌作用。计算不同患者给药方案在各特定的 *MIC* 值获得的目标概率即达标概率（PTA）。

2 结果

2.1 基本信息

144 名 ICU 病房住院患者（模型组 95 名，验证组 49 名）。基本信息见表 1。

2.2 最终模型

通过 NONMEM 软件拟合后，二房室模型的 OFV 比一房室模型小 8.063，选择二房室模型。各参数的典型值分别是，*CL* 为 8.95 L • h^{-1}，*Q* 为 1.82 L • h^{-1}，V_1 为 24.7 L，V_2 为 30.5 L。固定效应影响因素为 CL_{cr} 及 *SEX*。公式如下：

$$CL\ (\mathrm{L \cdot h^{-1}}) = 8.55 \times (CL_{cr}/91.87)^{0.251} \times (1 + 0.139 \times SEX) + \eta CL$$

表 1　模型组与验证组患者的临床资料

Tab 1　Baseline characteristics of patients in the model and validation groups

基本信息	模型组	验证组
患者人数 /*n*	95	49
样品量 / 例	106	49
性别（男 / 女）	56/39	38/11
年龄 / 岁	61.17±18.21	60.93±17.20
体质量 /kg	57.74±8.60	55.31±9.10
肌酐清除率 /（mL • min^{-1}）	88.59±64.88	71.22±57.86
谷丙转氨酶 /（U • L^{-1}）	144.04±667.65	128.93±579.23
谷草转氨酶 /（U • L^{-1}）	236.05±1469.69	219.60±1148.51
白细胞计数 /（10^9 • L^{-1}）	14.45±10.71	15.42±13.08
SOFA 评分 / 分	7.35±4.82	9.70±5.42
APACHE Ⅱ评分 / 分	21.62±7.67	23.26±8.09

CL_{cr}（mL • min^{-1}）= U_{cr}（μmol）/S_{cr}（μmol • h^{-1}）/0.72

CL 为清除率群体值，CL_{cr} 为肌酐清除率，*SEX* 为性别，U_{cr} 为 12 h 尿肌酐值，S_{cr} 为当日的血肌酐浓度值。

2.3　最终模型评价

最终评价模型的实测值（DV）与群体预测值（PRED）、个体预测值（IPRED）的散点图拟合优度优于基础模型（见图 1）。最终模型权重残差值（WRES）绝大部分分布在 ±2 之间（见图 2），模型拟合效果理想，预测浓度能较准确地反应实测浓度。

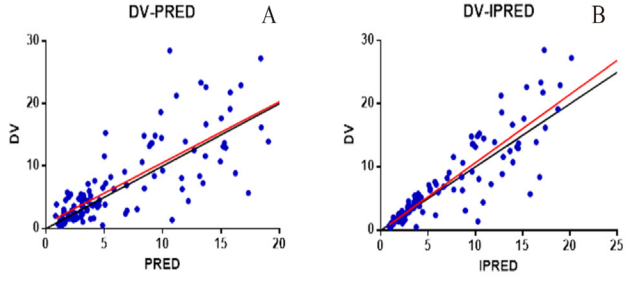


图 1　群体预测值（A）和个体预测值（B）与血药浓度实测值散点图

Fig 1　Scatter plots of imipenem serum concentrations（DV）vs PRED（A）and individual predicted concentrations（IPRED）（B）

2.4　模型内部验证

采用 bootstrap 法对模型进行验证，1000 次计算中有 922 次成功收敛，稳健率为 92.2%，模型稳定性较好。将 bootstrap 参数与最终模型参数进行对比，结果见表 2，通常认为 PK 参数的相对标准误（*RSE*）＞ 30% 就认为不可信 [9]。本研究中参数大部分的 *RSE* 值均＜ 30%，说明参数相对可信。

2.5　模型外部验证

本研究共收集了 49 名进行亚胺培南血药浓度测定的患者信息，包括 SEX、WT、给药剂量、滴注时间、给药疗程、给药期间每日的 CL_{cr} 等。DV 与 IPRED 的散点图见图 3，线性回归方程为 $Y = 0.8297X + 0.8986$，$R^2 = 0.8086$。*MAE* 为 1.28，*RMSE* 为 2.00，*MAPE* 为 0.44。

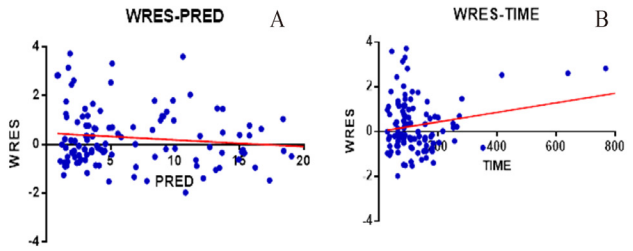


图 2　最终模型权重残差与群体预测值（A）及时间（B）散点图

Fig 2　Scatter plots of weighted residual（WRES）*vs* PRED（A）and time from final model（B）

表 2　最终模型参数与 Bootstrap 参数比较

Tab 2　Parameters of final model and Bootstrap

参数	值	Bootstrap		相关偏差
		中位值	95%*CI*	（*RSE*）/%
CL/（L • h^{-1}）	8.55	7.89	7.937 ～ 8.106	7.72
V_1/L	24.34	24.76	24.269 ～ 25.243	1.73
Q/（L • h^{-1}）	1.58	1.64	1.696 ～ 1.787	3.80
V_2/L	44.51	42.45	12.196 ～ 2310.449	4.63
CL_{cr}-*CL*	0.25	0.26	0.257 ～ 0.264	4.00
SEX-*CL*	0.139	0.15	0.142 ～ 0.152	7.91
CL-ω_1	2.13	1.74	1.821 ～ 2.008	18.31
V_2-ω_2	0.16	0.078	0.638 ～ 1.061	51.25
σ_1	0.16	0.15	0.154 ～ 0.160	6.25

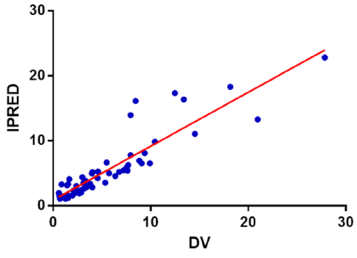


图 3　49 名验证患者的实测值（DV）与个体预测值 IPRED 的散点图

Fig 3　Scatter plots of imipenem serum concentrations（DV）vs individual predicted concentrations（IPRED）of 49 patients

2.6　蒙特卡洛模拟结果

将模型中筛选出的 CL_{cr} 与 SEX 分别进行模拟，CL_{cr} 按照肾功能情况设定值为 120，80，50 和 20 mL • min^{-1}，性别为男和女。根据不同 *MIC*（0.25、0.5、1、2、4、8 和 16 mg • L^{-1}）得到的靶指数的 PTA 绘制不同给药方案在各 *MIC* 下的 PTA 图，结果见图 4。

3　讨论

群体药动学模型的临床应用，使得药物浓度的

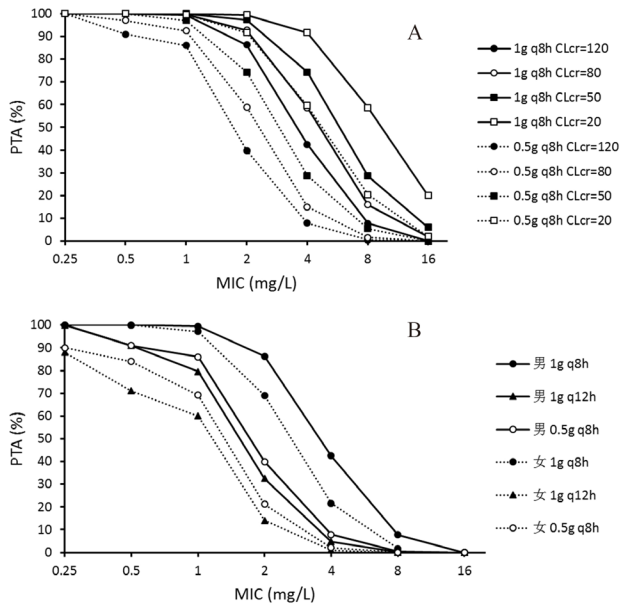


图 4　不同肌酐清除率（A）与性别（B）下的 PTA 值

Fig 4　PTA values of different creatinine clearances（A）and gender（B）

预测变得更加及时和准确，这对于危重症患者的救治极为重要。亚胺培南为临床广泛使用的一种广谱抗菌药物，可用于多种疾病的治疗与预防，虽然目前报道的不良反应不多且比较轻微，但仍有肾损伤、癫痫或肌颤等 [10-11] 发生。临床用药过程中，特别对于危重症患者，如果能依据监测药物浓度的结果进行个体化用药，将更好地有助于临床治疗。

本研究纳入了 AGE、WT、CL_{cr}、WBC 等诸多协变量。但经过对模型的正向引入和反向剔除后，最终只纳入了 CL_{cr} 和 SEX 两个协变量。Chen 等 [12] 建立的亚胺培南群体药动学模型中，影响因素为 CL_{cr}，WT 以及 ECMO，ECMO 未纳入本研究中，其个影响因素与本研究中的 CL_{cr} 和 SEX 是近似的，即可能与性别的不同，体重的不同相关。其他没有纳入的因素有可能是因为所纳入的患者人数有限，且情况比较复杂，所测得的浓度为诸多影响因素的综合结果，所以没有体现出来。

本研究比较了一房室模型与二房室模型，二房室模型 OFV 更小，最终选择了二房室模型，从内部、外部验证结果来看，该模型的预测能力对临床重症患者亚胺培南用药具有一定的指导意义。后期会纳入更多患者的数据，对模型进行修正。

本研究通过数学模型计算了不同 CL_{cr} 与性别下各 *MIC* 值对应的 PTA 值，从结果可见，当肾功能减退（$CL_{cr} \leqslant 80\ mL \cdot min^{-1}$），*MIC* ＝ 1 $mg \cdot L^{-1}$ 时，减半给药 0.5 g q8 h 基本就可以达到 PTA（＞ 90%），而对于女性患者，当 *MIC* ＞ 1 $mg \cdot L^{-1}$ 时，1 g q8h 仍难达到 PTA。这提示，可能需要更换用药或者联合其他抗菌药物。

参考文献

[1] 温爱萍，李哲，李任，等 . HPLC 法测定人血浆中游离亚胺培南浓度 [J]. 中国药物应用与监测，2015，12（3）：151-154.

[2] 郭玲，罗雪梅，梁培，等 . 重症患者 β 内酰胺类抗生素治疗药物监测的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，13（33）：1271-1275.

[3] Mattioli F，Fucile C，Del Bono V，et al. Population pharmacokinetics and probability of target attainment of meropenem in critically ill patients [J]. Eur J Clin Pharmacol，2016，72（7）：839-848.

[4] Couffignal C，Pajot O，Laouénan C，et al. population pharmacokinetics of imipenem in critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia and evaluation of dosage regimens [J]. Br J Clin Pharmacol，2014，78（5）：1022-1034.

[5] Akashita G，Hosaka Y，Noda T，et al. PK/PD analysis of biapenem in patients undergoing continuous hemodiafiltration [J]. J Pharm Health Care Sci，2015，1：31-40.

[6] Dong J，Xiong W，Chen Y，et al. Optimal dosing regimen of biapenem in Chinese patients with lower respiratory tract infections based on population pharmacokinetic/pharmacodynamics modelling and Monte Carlo simulation [J]. Int J Antimicrob Agents，2016，47（3）：202-209.

[7] 郭玲，罗雪梅，梁培，等 . 高效液相色谱法测定重症患者亚胺培南血药浓度及 PK/PD 达标率研究 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（16）：1598-1601.

[8] 钱倾 . 哌拉西林他唑巴坦在肾脏内科患者中的群体药动学及药效学研究 [D]. 苏州：苏州大学，2015.

[9] 杨文领，张现化，闵青，等 . 辛伐他汀在血液透析患者的群体药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志，2013，29（6）：429-436.

[10] 朱稚丹，陈冬青，王良玉，等 . 心力衰竭并严重感染患者应用亚胺培南西司他丁致神经系统不良反应分析 [J]. 中国现代药物应用，2008，23（2）：30.

[11] 张海龙 . 亚胺培南西司他丁钠在老年人中的应用及不良反应 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，16（97）：143-144.

[12] Chen W，Zhang D，Lian W，and et al. Imipenem Population Pharmacokinetics：therapeutic drug monitoring data collected in critically ill patients with or without extracorporeal membrane oxygenation [J]. Antimicrob Agents Chemother，2020，64（6）：e00385-20.

（收稿日期：2021-07-05；修回日期：2021-11-18）

2015—2020 年湖南省医疗机构肾毒性药物用药情况分析

尹文俊[1]，周凌云[1]，周颖玉[2]，周光亮[3]，朴慧玲[1]，刘昆[1]，谷旭瑞[1]，胡灿[1]，谢悦良[1]，左笑丛[1*]
（1. 中南大学湘雅三医院，长沙 410013；2. 中国药学会科技开发中心，北京 100020；3. 遵义医科大学，贵州 遵义 563006）

摘要：目的 分析 2015—2020 年湖南省医疗机构肾毒性药物的使用情况，为临床合理用药提供数据支持。**方法** 以全国 1026 家中国药学会医药经济信息网（CMEI）网员医疗机构药品采购数据库为基础，选取肾素 - 血管紧张素系统（RAS）抑制药、全身用抗细菌药、全身用抗病毒药、利尿剂、免疫抑制剂、抗肿瘤药和含碘造影剂中使用金额和用量排名前 20 位，且肾脏损伤不良反应发生率≥ 1% 的药物作为肾毒性药物进行研究，分析 2015—2020 年常见肾毒性药物类别在湖南省和全国的年均使用金额和用量及药物年均金额占比、年均金额占比差值、年均用量占比、年均用量占比差值和使用人次。**结果** 最终纳入 21 个药物作为肾毒性药物进行分析，2015—2020 年湖南省年均金额占比和用量占比都高于全国平均水平的药品有碘海醇、呋塞米、坎地沙坦酯、甲氨蝶呤、美罗培南、吉西他滨和顺铂，最高者为碘海醇；湖南省年均使用人次数排前五者分别为碘海醇、呋塞米、碘佛醇、坎地沙坦酯和阿德福韦酯，全国年均使用人次排前五者分别为呋塞米、坎地沙坦酯、阿德福韦酯、碘海醇和氢氯噻嗪；湖南省次高渗碘造影剂的年均金额占比和 / 或年均用量占比高于全国平均水平，袢利尿药、保钾利尿药和血管升压素 V_2 受体拮抗剂的年均用量占比也高于全国平均水平。**结论** 湖南省医疗机构使用碘海醇、呋塞米等 7 种肾毒性药物的年均金额和年均用量占比高于全国平均水平，以碘海醇使用金额和使用量占比位列榜首，如何在使用这些药物时降低其肾毒性的发生风险仍需深入研究。

关键词： 湖南省医疗机构；肾毒性药物；碘海醇；药源性肾损伤
中图分类号： R978.1 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)02-0456-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.038

Use of nephrotoxic drugs in medical institutions in Hunan from 2015 to 2020

YIN Wen-jun[1], ZHOU Ling-yun[1], ZHOU Ying-yu[2], ZHOU Guang-liang[3], PIAO Hui-ling[1], LIU Kun[1], GU Xu-rui[1], HU Can[1], XIE Yue-liang[1], ZUO Xiao-cong[1*] (1. *The Third Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 2. *Science and Technology Development Center of Chinese Pharmaceutical Association*, *Beijing* 100020; 3. *Zunyi Medical University*, *Zunyi Guizhou* 563006)

Abstract: Objective To analyze the use of nephrotoxic drugs in medical institutions in Hunan from 2015 to 2020, and provide data support for clinical rational use of drugs. **Methods** Based on the drug purchase database of 1026 medical institutions of Chinese Medical Economic Information Network (CMEI), we selected the top 20 cost and quantity of drugs acting on renin angiotensin system (RAS), systemic anti-bacterial drugs, systemic antiviral drugs, diuretics, immunosuppressants, antineoplastic drugs and iodine containing contrast agents, and the drugs with an adverse reaction rate of kidney injury ≥ 1% were used as nephrotoxic drugs for research. We analyzed the average annual cost and quantity of common nephrotoxic drugs, the proportion of the average annual cost, the difference in the proportion of the average annual cost, the proportion of average annual quantity, the difference in proportion of the average annual quantity, and the user-times of each nephrotoxic drug in Hunan and China from 2015 to 2020. **Results** Totally 21 drugs were included as nephrotoxic drugs for the

基金项目： 国家自然科学基金项目（No.81973400，No. 82104305）；湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ5792，No. 2021JJ40957）；中南大学湘雅临床大数据系统建设项目（No.76）。
作者简介： 尹文俊，男，硕士，主要从事临床药学工作，email：yinwjxysyy@126.com *通信作者：左笑丛，女，博士，主任药师，主要从事临床药学与药理学研究，email：zuoxc08@126.com

analysis. The average cost and dosage ratio of iohexol, furosemide, candesartan cilexetil, methotrexate, gemcitabine, meropenem, and cisplatin in Hunan from 2015 to 2020 were higher than the national average level, with iohexol being the highest. The top 5 user-times drug in Hunan included iohexol, furosemide, voversol, candesartan cilexetil and adefovir dipivoxil. While those of quantity in China covered furosemide, candesartan cilexetil, adefovir dipivoxil, iohexol and hydrochlorothiazide. Proportion of the average annual cost and/or the average annual quantity of sub-hypertonic iodine contrast agents in Hunan were higher than the national average level. Proportion of the average annual quantity of loop diuretics, potassium-sparing diuretics, and vasopressin V_2 receptor antagonists in Hunan were also higher. **Conclusion** Compared with the national average level, the average annual cost and the average annual quantity of 7 nephrotoxic drugs in medical institutions in Hunan are higher. The proportion of the average annual cost and the average annual quantity of iohexol rank the first. So how to reduce the risk of nephrotoxicity of these drugs needs further research.

Key words: Hunan medical institution; nephrotoxic drug; iohexol; drug-induced renal injury

慢性肾脏病是我国最主要的慢性疾病之一，给我国经济带来了巨大的负担[1]。药源性肾损伤（drug-induced kidney injury，DIKI）是指在药物治疗剂量下导致肾脏出现的不良反应和药物过量或不合理应用导致的肾脏损害。DIKI 约占住院患者急性肾损伤（AKI）患者的 26.5% ～ 42.9%[2-3]，是导致慢性肾脏病发病率增加的重要原因之一。20% 的 AKI 患者在 3 年后会发展成慢性肾脏病[4]，6.6% 的 AKI 患者在肾功能完全恢复后的几个月里具有更严重的慢性肾脏病和死亡风险[5-6]。我国疾病预防控制中心 2020 年的数据显示，湖南省的慢性肾脏疾病负担在全国排名第二[7]，而患者的肾毒性药物暴露比例达 75.5%[8]，提示使用肾毒性药物可能是导致湖南省患者慢性肾脏疾病负担重的重要原因。为进一步分析湖南省肾毒性药物的使用情况，本研究分析了 2015—2020 年湖南省医疗机构肾毒性药物的用药情况，并与全国同期数据进行对比，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 数据来源

常见的肾毒性药物类别为作用于肾素 - 血管紧张素系统（RAS）的药物、全身用抗细菌药、全身用抗病毒药、利尿剂、免疫抑制剂、抗肿瘤药、含碘造影剂[9-11]。以全国 1026 家中国药学会医药经济信息网（CMEI）网员医疗机构和湖南省 34 家网员医疗机构的采购数据库为基础，提取 2015—2020 年上述药物在湖南省和全国的使用金额、金额占比、用量、用量占比。全国 1026 家医疗机构级别分布为：三级医疗机构 741 家（72.2%），二级及以下医疗机构 285 家（27.8%）；湖南省 34 家医疗机构级别分布为：三级医疗机构 31 家（91.2%），二级及以下医疗机构 3 家（8.8%）。

选取肾脏损伤不良反应发生频率为常见不良反应（发生率≥ 1%），并且使用金额和数量在所在肾毒性药类别前 20 的肾毒性药物进行分析，共纳入 21 个药物。确定药物致肾脏损伤不良反应发生率≥ 1% 的方法：① 查阅药品说明书；② 通过两名高级职称临床药师背对背根据临床经验和查阅文献后一致认定肾脏损伤不良反应发生率≥ 1%。

1.2 分析指标

① 常见肾毒性药物类别 2015—2020 年在湖南省和全国年均使用金额和年均用量；② 纳入分析的药物 2015—2020 年在湖南省和全国的年均金额占比和年均金额占比差值（湖南省年均金额占比减去全国年均金额占比）；③ 药物 2015—2020 年在湖南省和全国的年均用量占比和年均用量占比差值（湖南省年均用量占比减去全国年均用量占比）；④ 药物 2015—2020 年在湖南省和全国的使用人次和年均使用人次（使用人次＝药物总用量 / 患者每次就诊平均所需药物用量，患者每次就诊平均所需药物量是根据指南或者说明书，每次就诊时，该药物对主要适应证所需使用的常用量）。除特殊说明外，统一抗菌药物治疗疗程为 7 d，高血压、糖尿病等慢性病用药为 14 d。考虑到药物导致的肾损伤发生率是以患者为单位，而非药物为单位进行计算，因此本研究采用使用人次进行分析。

2 结果

2.1 常见肾毒性药物类别的使用金额和用量情况

湖南省和全国年均使用金额最高者均为全身用抗细菌药，最低者均为利尿剂；湖南省和全国年均用量最多的是全身用抗细菌药，最小的是含碘造影剂，造影剂的年均使用金额排名和全身用抗病毒药的年均用量排名高于全国，免疫抑制剂的年均使用金额排名和利尿剂的年均用量排名低于全国，见表 1。

表 1 湖南省和全国常见肾毒性药物类别 2015—2020 年年均使用金额和用量情况

Tab 1 Average annual cost and quantity of common nephrotoxic drugs in China and Hunan from 2015 to 2020

种类	湖南省年均使用金额 / 万元	排序	全国年均使用金额 / 万元	排序	湖南省年均用量 /（万支 / 片）	排序	全国年均用量 /（万支 / 片）	排序
全身用抗细菌药	158 440.80	1	3 390 543.31	1	9522.05	1	215 532.15	1
抗肿瘤药	84 295.61	2	2 638 958.26	2	957.92	6	22 766.15	6
免疫抑制剂	20 002.78	4	462 509.95	3	1754.41	5	42 742.81	5
含碘造影剂	22 656.29	3	451 738.69	4	101.95	7	1900.98	7
全身用抗病毒药	19 183.42	5	438 935.90	5	2401.52	3	48 571.63	4
作用于 RAS 的药物	8618.03	6	410 808.58	6	3141.25	2	116 227.32	2
利尿剂	1441.81	7	45 922.30	7	2354.32	4	54 756.35	3

2.2 肾毒性药物基本信息

本研究共纳入 21 个肾毒性药物进行分析，药物类别、品种数及不良反应发生情况见表 2。

表 2 纳入研究的肾毒性药物

Tab 2 Nephrotoxic drugs included in this study

药物类别	品种数	药物名称	不良反应发生情况	药物类别	品种数	药物名称	不良反应发生情况
全身用抗细菌药	2	万古霉素	发生率为 1% ～ 5%[12]	含碘造影剂	7	泛影葡胺	发生率为 2.3% ～ 6.4%[16]
		美罗培南	发生率为 2.13%[13]			碘比醇	
抗肿瘤药物	4	顺铂	常见不良反应 *			碘海醇	
		替吉奥	发生率为 0.1% ～ 5%*			碘佛醇	
		吉西他滨	常见不良反应 *			碘美普尔	
		甲氨蝶呤	高剂量诱发肾损伤 *			碘帕醇	
免疫抑制剂	2	他克莫司	常见不良反应 *			碘普罗胺	
		环孢素	常见不良反应 *	全身用抗病毒药	2	阿昔洛韦	发生率为 17.8%[17-18]
利尿剂	3	氢氯噻嗪	常见不良反应[14-15]			阿德福韦酯	发生率≥ 2%[19]
		呋塞米		作用于 RAS 的药物	1	坎地沙坦酯	发生率为 6.3%*
		托拉塞米					

注（Note）：*来自于说明书（from instructions）。

2.3 肾毒性药物在 2015—2020 年的年均使用金额及其占比情况

湖南省年均使用金额前五的分别是美罗培南、碘海醇、他克莫司、碘佛醇和吉西他滨；全国年均使用金额前五的分别是美罗培南、替吉奥、他克莫司、碘海醇和吉西他滨。两者使用金额最大的药物均为美罗培南，湖南省使用金额最小的药物是碘美普尔；全国使用金额最小的药物是氢氯噻嗪。

湖南省肾毒性药物年均金额占比高于全国平均水平，年均金额占比差值排前五的分别是碘海醇、呋塞米、阿昔洛韦、坎地沙坦酯和碘佛醇；湖南省肾毒性药物年均金额占比低于全国平均水平，年均金额占比差值排前五名的分别是托拉塞米、他克莫司、碘普罗胺、环孢素和碘帕醇（见表 3 和图 1）。

2.4 肾毒性药物在 2015—2020 年的年均用量及其占比情况

湖南省和全国年均用量排前五的药物相同，分别是呋塞米、他克莫司、环孢素、坎地沙坦酯和氢氯噻嗪，用量最小的药物都是碘美普尔。

在湖南省年均用量占比高于全国平均水平的肾毒性药物中，年均用量占比差值前五的药物分别是碘海醇、呋塞米、顺铂、甲氨蝶呤和坎地沙坦酯；在湖南省年均用量占比低于全国平均水平的肾毒性药物中，年均用量占比差值前五分别是替吉奥、碘普罗胺、环孢素、他克莫司和碘帕醇（见表 3 和图 2）。

2.5 肾毒性药物在 2015—2020 年的年均使用人次情况

2015—2020 年湖南省年均使用人次排前五的分别是碘海醇、呋塞米、碘佛醇、坎地沙坦酯和阿德福韦酯；全国年均使用人次排前五的分别是呋塞米、坎地沙坦酯、阿德福韦酯、碘海醇和氢氯噻嗪（见表 4）。

2.6 2015—2020 年碘造影剂的使用情况

湖南省次高渗造影剂的年均金额占比高于全国平均水平，等渗造影剂和高渗造影剂低于全国平均水平；湖南省次高渗造影剂和高渗造影剂的年均用量占比高于全国平均水平，等渗造影剂低于全国平均水平（见表 5）。

2.7 2015—2020 年利尿剂的使用情况

湖南省保钾利尿药和血管升压素 V_2 受体拮抗剂的年均金额占比高于全国平均水平，袢利尿药、噻嗪类及类噻嗪类利尿药低于全国平均水平；湖南省袢利尿药、保钾利尿药和血管升压素 V_2 受体

表 3　2015—2020 年湖南省和全国肾毒性药物年均金额占比和年均用量占比

Tab 3　Proportion of average annual cost，and quantity of nephrotoxic drugs in Hunan and China from 2015 to 2020

药物名称	年均使用金额 / 万元		年均用量 /（万支 / 片）		年均金额占比 /%		年均用量占比 /%	
	湖南省	全国	湖南省	全国	湖南省	全国	湖南省	全国
美罗培南	12 511.35	220 072.93	170.17	2235.56	7.82	6.51	1.79	1.05
替吉奥	3126.94	138 748.62	96.05	3728.84	3.88	5.88	9.75	17.36
他克莫司	4278.51	129 351.66	306.33	8558.86	20.88	27.77	16.73	19.58
碘海醇	7546.31	92 825.44	34.65	438.36	34.74	21.31	34.4	23.33
吉西他滨	3480.62	80 570.23	17.97	348.06	4.48	3.30	1.88	1.56
碘佛醇	3565.14	60 350.73	17.73	347.49	16.01	13.66	17.53	18.38
万古霉素	2532.94	56 817.79	25.05	536.31	1.61	1.69	0.26	0.25
环孢素	1580.84	54 786.76	288.52	8451.41	7.92	12.12	16.35	19.89
碘普罗胺	1067.12	46 797.67	3.18	155.85	4.94	10.72	3.17	8.27
碘帕醇	1129.10	35 899.85	4.03	127.87	5.3	8.25	4.05	6.74
托拉塞米	558.67	26 088.52	86.73	3025.78	44.32	58.45	3.70	5.52
阿德福韦酯	730.18	25 037.61	114.03	3256.45	3.77	5.43	5.33	7.32
坎地沙坦酯	571.99	17 619.46	243.79	7675.18	6.82	4.29	7.67	6.65
碘比醇	35.63	10 220.19	0.09	30.75	0.25	2.41	0.12	1.66
呋塞米	256.79	6222.38	847.88	18 195.92	17.06	12.74	35.92	33.2
顺铂	473.26	5586.55	39.46	370.17	0.63	0.24	4.14	1.71
甲氨蝶呤	648.05	11 382.49	164.67	3093.07	0.60	0.36	6.31	4.78
碘美普尔	3.25	4037.02	0.007	9.18	0.01	0.76	0.01	0.44
阿昔洛韦	652.08	2992.27	157.23	3368.79	3.74	0.72	6.79	7.04
氢氯噻嗪	7.95	225.80	194.59	5833.17	0.57	0.50	8.45	10.71
泛影葡胺	158.27	3201.65	6.58	109.78	0.69	0.71	6.75	5.96

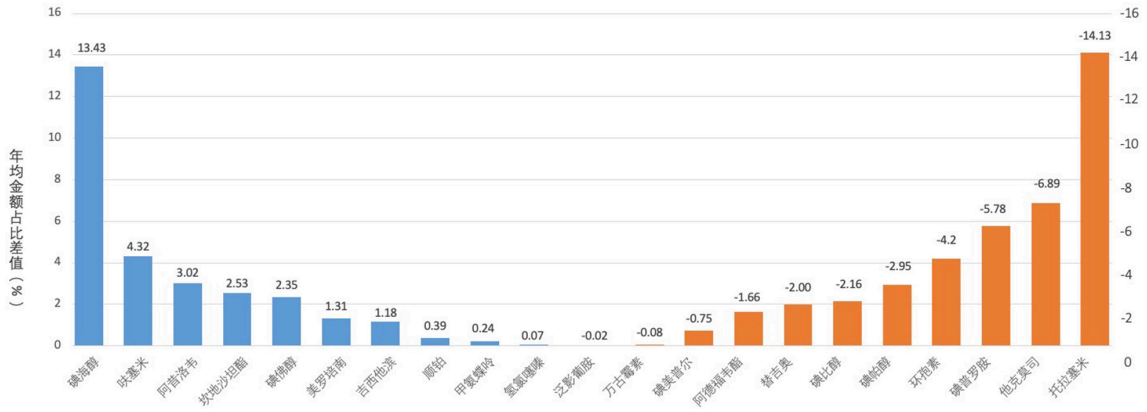


图 1　肾毒性药物在湖南省和全国 2015—2020 年年均金额占比的差值

Fig 1　Difference in the proportion of average annual cost between Hunan and the national average level from 2015 to 2020

拮抗剂的年均用量占比高于全国平均水平，噻嗪类及类噻嗪类利尿药低于全国平均水平（见表 6）。

3　讨论

肾毒性药物暴露是肾脏疾病发生的重要原因，研究表明全国 AKI 患者有肾毒性药物暴露史的比例为 71.6%，而湖南省的比例高达 75.5%，高于全国平均水平 [7]。因此比较湖南省和全国肾毒性药物使用差异，对提高我省合理用药水平十分重要。

本研究中共纳入了 7 类常见的肾毒性药物，从使用金额和用量排名来看，湖南省和全国排前五的药物类别相同，但是湖南省碘造影剂的年均使用金额排名和全身用抗病毒药的年均用量排名高于全国，免疫抑制剂的年均使用金额排名和利尿剂的年均用量排名要低于全国，与全国比较，湖南省在这四类药物的使用上存在差异，这可能与病种的分布、用药习惯、经济水平和诊疗水平有关。湖南省碘造影剂的年均使用金额排名高于全国平均水平，但是免疫抑制剂的年均使用金额排名却要更低。本文分析了两类药物年均使用金额占比，免疫抑制剂在湖南省和全国无明显差异（1.747% *vs* 1.741%），而造影剂在湖南省的年均使用金额占比明显高于全国（1.979% *vs* 1.673%），进一步分析了两类药物年均用量占比，

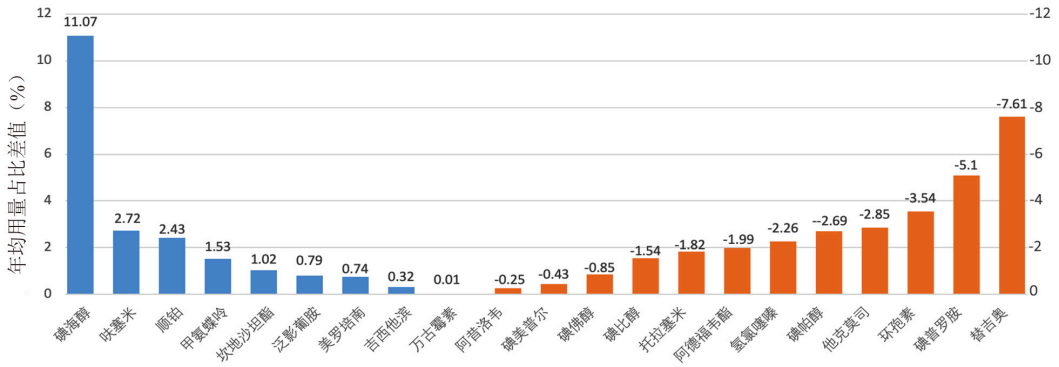


图 2　湖南省和全国 2015—2020 年年均用量占比的差值

Fig 2　Difference in the proportion of average annual cost between Hunan and China from 2015 to 2020

表 4　2015—2020 年湖南省和全国肾毒性药物年均使用人次比较

Tab 4　Annual user-times of nephrotoxic drugs in Hunan and China from 2015 to 2020

排名	湖南省		全国	
	药物名称	年均使用人次	药物名称	年均使用人次
1	碘海醇	346 475	呋塞米	6508 079
2	呋塞米	302 817	坎地沙坦酯	5482 273
3	碘佛醇	177 300	阿德福韦酯	4652 129
4	坎地沙坦酯	174 136	碘海醇	4383 875
5	阿德福韦酯	162 900	氢氯噻嗪	4090 638
6	氢氯噻嗪	138 811	碘佛醇	3474 952
7	泛影葡胺	65 819	托拉塞米	1811 513
8	美罗培南	62 083	碘普罗胺	1558 508
9	托拉塞米	59 070	碘帕醇	1278 684
10	顺铂	51 270	泛影葡胺	1097 830
11	碘帕醇	40 307	美罗培南	929 225
12	碘普罗胺	31 788	顺铂	778 929
13	他克莫司	25 318	他克莫司	717 476
14	阿昔洛韦	14 989	碘比醇	307 482
15	甲氨蝶呤	13 479	环孢素	293 361
16	万古霉素	8960	阿昔洛韦	264 034
17	环孢素	8942	替吉奥	222 545
18	吉西他滨	7895	甲氨蝶呤	207 622
19	替吉奥	6270	万古霉素	192 079
20	碘比醇	900	吉西他滨	169 323
21	碘美普尔	70	碘美普尔	91 811

免疫抑制剂在湖南省和全国无明显差异（1.073% *vs* 1.117%），而造影剂在湖南省的年均用量占比明显高于全国平均水平（0.0624% *vs* 0.0497%），这可能与湖南省的医疗水平相关。李季[20]采用基于主成分分析和聚类分析的各地区医疗水平状况研究发现湖南省的综合医疗水平排第八，在全国为中上，造影剂被广泛用于辅助疾病的诊断。

在 2015—2020 年年均金额占比和用量占比方面，湖南省使用的碘海醇、呋塞米、坎地沙坦酯、顺铂、甲氨蝶呤、美罗培南和吉西他滨共 7 个品种均高于全国平均水平，其中最高者为碘海醇。碘海醇是临床常用的碘造影剂之一，碘造影剂导致的急性肾损伤也称为造影剂肾病（contrast induced acute kidney injury，CI-AKI），是医院获得性 AKI 的第三大病因[21]。碘造影剂根据渗透压大小可分为高渗、次高渗和等渗造影剂三种类型，目前认为渗透压越高肾脏毒性越强[22]，即肾毒性由大到小依次为高渗造影剂＞次高渗造影剂＞等渗造影剂。从表 5 可以明显看出湖南省高渗和次高渗造影剂的年均用量占比远高于全国平均水平，次高渗造影剂的年均金额占比也高于全

表 5　2015—2020 年湖南省和全国碘造影剂年均金额及用量占比 (%)

Tab 5　Proportion of the average annual cost and quantity of iodine contrast agents in Hunan and China from 2015 to 2020 (%)

年份	高渗造影剂年均金额占比		次高渗造影剂年均金额占比		等渗造影剂年均金额占比		高渗造影剂年均用量占比		次高渗造影剂年均用量占比		等渗造影剂年均用量占比	
	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国
2015	0.59	0.58	75.66	68.91	8.09	15.28	8.60	8.32	64.35	62.72	2.71	4.93
2016	0.58	0.58	68.66	65.00	14.21	18.79	8.48	6.74	61.25	62.62	4.64	6.69
2017	0.81	1.08	63.41	60.14	18.75	22.26	7.05	6.82	60.51	60.37	6.58	8.50
2018	0.71	0.73	58.25	55.36	23.18	26.64	6.16	5.00	59.38	58.27	9.10	11.48
2019	0.77	0.67	53.26	50.91	27.34	30.75	5.61	4.67	55.04	55.43	11.16	14.53
2020	0.67	0.61	52.03	47.72	28.71	33.31	4.60	4.23	54.51	53.41	11.91	16.51
平均值	0.69	0.71	61.88	58.01	20.05	24.51	6.75	5.96	59.28	58.80	7.68	10.44

注（Note）：高渗造影剂（泛影葡胺；次高渗造影剂：碘海醇、碘佛醇、碘普罗胺、碘帕醇、碘比醇、碘化油、碘美普尔）；等渗造影剂（碘克沙醇）[hypertonic contrast medium（meglumine diatrizoate；subhypertonic contrast media：iohexol，ioversol，iopromide，iopamidol，iobitridol，iodized oil，iomeprol）；isotonic contrast medium（iodixanol）]。

表 6 湖南省和全国利尿剂 2015—2020 年年均金额及用量占比比较 (%)

Tab 6 Proportion of the average annual cost and quantity diuretics between Hunan and the national average level from 2015 to 2020 (%)

年份	袢利尿药年均金额占比		噻嗪类及类噻嗪类利尿药年均金额占比		保钾利尿药年均金额占比		血管升压素 V_2 受体拮抗剂年均金额占比		袢利尿药年均用量占比		噻嗪类及类噻嗪类利尿药年均用量占比		保钾利尿药年均用量占比		血管升压素 V_2 受体拮抗剂年均用量占比	
	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国	湖南	全国
2015	78.75	79.56	4.26	7.14	16.64	9.43	0.35	3.85	39.03	35.5	13.52	19.25	47.46	45.24	0.00	0.01
2016	70.72	77.85	3.04	6.46	17.69	9.83	8.54	5.85	37.44	37.73	11.62	16.59	50.91	45.66	0.02	0.03
2017	73.44	77.46	2.33	6.06	18.12	9.73	6.10	6.76	40.12	38.64	9.73	15.35	50.13	45.96	0.02	0.04
2018	58.46	71.19	2.02	5.44	15.08	9.56	24.45	13.80	39.17	39.64	8.99	13.83	51.64	46.42	0.20	0.12
2019	44.92	67.07	1.54	4.65	10.15	8.08	43.38	20.19	40.88	41.18	7.98	12.34	50.79	46.29	0.36	0.21
2020	45.60	65.92	1.27	4.21	8.62	8.01	44.50	21.85	41.21	42.04	6.96	11.51	51.42	46.23	0.39	0.21
平均值	61.98	73.18	2.41	5.66	14.38	9.11	21.22	12.05	39.64	39.12	9.80	14.81	50.39	45.97	0.17	0.10

注（Note）：袢利尿药：布美他尼、呋塞米、托拉塞米；噻嗪类及类噻嗪类利尿药：氢氯噻嗪、吲达帕胺；保钾利尿剂：螺内酯、阿米洛利、氨苯蝶啶、复方盐酸阿米洛利；血管升压素 V_2 受体拮抗剂：托伐普坦（Loop diuretics：bumetanide，furosemide，torasemide；Thiazides and thiazide like diuretics：hydrochlorothiazide，indapamide；Potassium sparing diuretics：spironolactone，amiloride，aminopteridine，compound amiloride hydrochloride；Vasopressin V_2 receptor antagonist：tovaptan）。

国平均水平；而等渗造影剂的年均金额占比和用量占比都远低于全国平均水平。等渗造影剂 CI-AKI 的发生率是最低，但是价格昂贵，约为次高渗造影剂的 2 倍，所以临床使用较少。

用量最大的次高渗造影剂的品种也最多，包括碘海醇、碘佛醇、碘帕醇、碘普罗胺、碘美普尔、碘比醇。碘海醇在湖南省医疗机构的使用比例高于全国平均水平，一方面湖南省碘海醇年均金额占比和用量占比高于全国平均水平，另一方面在年均使用人次排名前五的药物中，碘海醇在湖南省与全国的排名差异最大，在湖南省排第一，全国排第五。碘普罗胺、碘美普尔、碘比醇在湖南省的年均金额占比和用量占比要明显低于全国平均水平。虽然这些造影剂都属于次高渗造影剂，但是研究表明碘海醇与次高渗造影剂其他品种比较可能具有更高的肾脏毒性。美国放射学院和国家肾脏基金会关于肾病患者静脉使用碘造影剂的共识声明明确提到有间接证据表明碘海醇比其他次高渗造影剂可能具有更高的 CI-AKI 风险 [23]，ACC/AHA ST 段抬高心肌梗死患者处理指南和 ACC/AHA/SCAI 经皮冠状动脉介入治疗指南中也均建议使用除碘海醇以外的等渗造影剂或低渗造影剂 [24]。

在 2015—2020 年的年均使用人次方面，碘海醇、呋塞米、坎地沙坦酯和阿德福韦酯在湖南省和全国都排前五名。呋塞米在全国排第一名，在湖南省排第二名，呋塞米是经典的袢利尿药，利尿作用强，价格便宜，入选了国家基本药物目录。呋塞米在湖南省的年均金额占比和用量占比均高于全国平均水平，但是其同类型利尿剂托拉塞米却要低于全国平均水平，说明在袢利尿药的使用方面，湖南省的医疗机构使用呋塞米的比例比全国高。为了进一步分析湖南省和全国医疗机构在利尿剂使用上的差异，本文按照类别对利尿剂进行了分析，湖南省袢利尿剂的年均金额占比低于全国，年均用量占比更高，噻嗪类及类噻嗪类利尿剂的年均金额占比和用量占比都低于全国。说明湖南省医疗机构虽然更偏向于选择呋塞米，但是全国医疗机构更偏向于选择使用其他具有肾毒性利尿剂方面，如托拉塞米和氢氯噻嗪。目前关于何种利尿剂肾损伤的发生率更高，暂无确切的结论，一项基于法国国家药物警戒数据库（FPVD）中自发报告的不良反应数据的研究显示在单独使用利尿剂的患者中，呋塞米的发生率最高，为 11.63%[25]。

4 结论

与全国医疗机构相比，湖南省医疗机构使用碘海醇、呋塞米等 7 种肾毒性药物的年均金额和年均用量占比高于全国，以碘海醇使用金额和使用量占比位列榜首，如何在临床使用这些药物时降低其肾毒性的发生风险仍需深入研究。

参考文献

[1] Zhang L，Wang F，Wang L，et al. Prevalence of chronic kidney disease in China：a cross-sectional survey [J]. Lancet，2012，379（9818）：815-822.

[2] 车妙琳，严玉澄，张芸，等 . 上海市药物性急性肾衰竭临床现况分析 [J]. 中华医学杂志，2009，（11）：744-749.

[3] Xu X，Nie S，Liu Z. et al. Epidemiology and clinical correlates of AKI in Chinese hospitalized adults [J]. J Am Soc Nephro，2015，10（9）：1510-1518.

[4] Rodríguez-Romo R，Berman N，Gómez A，et al. Epigen-

etic regulation in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition [J]. Nephrology（Carlton），2015，20（10）：736-743.

[5] See EJ，Jayasinghe K，Glassford N，et al. Long-term risk of adverse outcomes after acute kidney injury：a systematic review and meta-analysis of cohort studies using consensus definitions of exposure [J]. Kidney Int，2019，95（1）：160-172.

[6] Coca SG，Singanamala S，Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury：a systematic review and meta-analysis [J]. Kidney Int，2012，81（5）：442-448.

[7] Zhang L，Wang F，Wang L，et al. Prevalence of chronic kidney disease in China：a cross-sectional survey [J]. Lancet，2012，379（9818）：815-822.

[8] Yang L，Xing G，Wang L，et al. Acute kidney injury in China：a cross-sectional survey [J]. Lancet，2015，386（10002）：1465-1471.

[9] Perazella MA. Pharmacology behind common drug nephrotoxicities [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2018，13（12）：1897-908.

[10] 刘琛，盖迪，闫素英，等 . 住院患者发生药源性急性肾损伤情况的回顾性分析 [J]. 药物不良反应杂志，2020（4）：247-251.

[11] Schetz M，Dasta J，Goldstein S，et al. Drug-induced acute kidney injury [J]. Curr Opin Crit Care，2005，11（6）：555-565.

[12] 万古霉素临床应用中国专家共识（2011 版）[J]. 中国新药与临床杂志，2011，30（8）：561-573.

[13] 杜朝阳，谢铮铮，赵莹，等 . 美罗培南致住院患者急性肾损伤的药物不良反应分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（23）：2431-2433.

[14] 吴晓静，陈楠 . 利尿剂与急性肾损伤 [J]. 中华内科杂志，2010，49（7）：626-628.

[15] 车妙琳，严玉澄，张芸，等 . 上海市药物性急性肾衰竭临床现况分析 [J]. 中华医学杂志，2009，89（11）：744-749.

[16] van der Molen AJ，Reimer P，Dekkers IA，et al. Post-contrast acute kidney injury-Part 1：definition，clinical features，incidence，role of contrast medium and risk factors：recommendations for updated ESUR Contrast Medium Safety Committee guidelines [J]. Eur Radiol，2018，28（7）：2845-2855.

[17] https://www.cdr-adr.org.cn/drug_1/aqjs_1/drug_aqjs_xxtb/200806/t20080626_36887.html,20061106.

[18] Lee EJ，Jang HN，Cho HS，et al. The incidence，risk factors，and clinical outcomes of acute kidney injury（staged using the RIFLE classification）associated with intravenous acyclovir administration [J]. Ren Fail，2018，40（1）：687-692.

[19] 关米洁 . 阿德福韦酯与肾损伤 [J]. 国际泌尿系统杂志，2017，37（6）：956-959.

[20] 李季 . 基于主成分分析和聚类分析的各地区医疗水平状况研究 [J]. 软件，2020，41（6）：242-246.

[21] Hu M，Yan G，Tang H，et al. Effect of combining furosemide with standard hydration therapy on contrast-induced acute kidney injury following coronary angiography or intervention in a high-risk population [J]. Angiology，2021，72（2）：138-144.

[22] Mamoulakis C，Tsarouhas K，Fragkiadoulaki I，et al. Contrast-induced nephropathy：basic concepts，pathophysiological implications and prevention strategies [J]. Pharmacol Ther，2017，180：99-112.

[23] Davenport MS，Perazella MA，Yee J，et al. Use of intravenous iodinated contrast media in patients with kidney disease：consensus statements from the American College of Radiology and the National Kidney Foundation [J]. Radiology，2020，294（3）：660-668.

[24] Kushner FG，Hand M，Smith SC，et al. American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice G. 2009 Focused Updates：ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction（updating the 2004 guideline and 2007 focused update）and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention（updating the 2005 guideline and 2007 focused update）：a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. Circulation，2009，120（22）：2271-2306.

[25] Pierson-Marchandise M，Gras V，Moragny J，et al. French National Network of Pharmacovigilance Centres. The drugs that mostly frequently induce acute kidney injury：a case-noncase study of a pharmacovigilance database [J]. Br J Clin Pharmacol，2017，83（6）：1341-1349.

（收稿日期：2021-01-05；修回日期：2021-11-08）

肺炎克雷伯菌 RAPD 基因分型及其与氨基糖苷类药敏分型对比研究

罗灿[1]，陈昕怡[1]，王敏[1*]，李先平[1]，李采霞[2]（1. 中南大学湘雅二医院检验科，长沙　410011；2. 中国人民解放军联勤保障部队第 904 医院（无锡市太湖医院）生殖中心，江苏　无锡　214044）

摘要：目的　检测肺炎克雷伯菌（KPN）随机扩增多态性 DNA 分析（RAPD）基因分型情况，分析其与氨基糖苷类药敏分型的差异性。**方法**　采用 4 种 RAPD 引物（RAPD 1，RAPD 2，RAPD 3，OPA 2）对 82 株临床分离的 KPN 进行分型，观察分离菌 RAPD 分型结果的差异，并与氨基糖苷类药敏分型进行对比分析。**结果**　82 株 KPN 对阿米卡星（AMK）、庆大霉素（GEN）、妥布霉素（TOB）的耐药率分别为 19.51%、64.63%、41.46%。82 株 KPN 的氨基糖苷药敏分型可分为 9 种（①～⑨）。4 种 RAPD 引物间分型结果对比显示，OPA 2 分型 [4] 型与 RAPD 2 分型 b 型相符度最高（65.22%，15/23）。以 RAPD 分型为标准，RAPD 2 分型 b 型与氨基糖苷药敏分型②型的相符度最高（38.71%，12/31）；以药敏分型为标准，药敏分型①型（对 AMK，GEN 和 TOB 均耐药）与 RAPD 3 分型 I 型的相符度最高（62.50%，10/16），药敏分型②型（对 AMK，GEN 和 TOB 均敏感）与 RAPD 2 分型 b 型的相符度最高（52.17%，12/23）。**结论**　4 种引物都可用于 KPN 基因多态性分型研究。RAPD 分型和氨基糖苷类药敏分型结果不完全一致。对氨基糖苷类药物全耐药、全敏感的 KPN 进行 RAPD 分型时建议分别选择 RAPD 3、RAPD 2 引物。

关键词：肺炎克雷伯菌；随机扩增多态性 DNA 分析；基因分型；氨基糖苷类分型
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0463-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.039

Typing of *Klebsiella pneumoniae* strains by random amplification of polymorphic DNA and comparison with aminoglycosides typing

LUO Can[1], CHEN Xin-yi[1], WANG Min[1*], LI Xian-ping[1], LI Cai-xia[2] (1. *Clinical Laboratory*, *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Reproductive Center*, *the* 904*th Hospital of Joint Logistic Support of Chinese People's Liberation Army* (*Wuxi Taihu Hospital*), *Wuxi Jiangsu* 214044)

Abstract: Objective　To detect the random amplified polymorphic DNA (RAPD) genotyping of *Klebsiella pneumoniae* (KPN) strains and compared them with aminoglycoside typing. **Methods** RAPD primers (RAPD 1, RAPD 2, RAPD 3 and OPA 2) were used for the genotyping of 82 clinical KPN strains collected randomly. The difference of RAPD primers genotyping was observed and compared with aminoglycoside typing. **Results**　The resistance rates of the 82 KPN strains to amikacin (AMK), gentamicin (GEN) and tobramycin (TOB) were 19.51%, 64.63% and 41.46%, respectively. The 82 strains of KPN were grouped into 9 types (①－⑨) by aminoglycoside typing. The 4 RAPD primers typing showed that the highest concordance was between OPA 2 type [4] and RAPD 2 type b (65.22%, 15/23). Based on the RAPD typing, RAPD 2 type b was most consistent with aminoglycoside type ② (38.71%, 12/31). Based on the aminoglycoside typing, type ① (resistant to AMK, GEN and TOB) was most consistent with RAPD 3 type I (62.50%, 10/16); while type ② (susceptible to AMK, GEN and TOB) was most consistent with RAPD 2 type b (52.17%, 12/23). **Conclusion**　The 4 primers can all be used in the genotyping of polymorphism of KPN. RAPD typing

基金项目：2017 年湖南省技术创新引导计划项目（No.2017SK50122）。
作者简介：罗灿，女，硕士，主要从事肺炎克雷伯菌方面的研究，email：2567476062@qq.com　**[*]通信作者：**王敏，女，博士，主要从事宫颈癌的分子致癌机制和病原微生物耐药机制方面的研究，email：wangmin0000@csu.edu.cn

and aminoglycoside typing are not always. For RAPD typing of aminoglycoside all resistant and all susceptible KPN, RAPD 3 and RAPD 2 primers are recommended.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; random amplified polymorphic DNA; genotyping; aminoglycosides typing

肺炎克雷伯菌（KPN）是常见的医院机会致病菌，可引起肺炎、肝脓肿、泌尿系统感染、败血症、创伤感染、脑膜炎等感染[1]。2017 年中国细菌耐药监测网（CHINET）的数据显示，KPN 在我国临床菌株分离率中居第二位（14.68%），仅次于大肠埃希菌（19.27%）[2]。据文献报道，氨基糖苷类药物可以作为临床经验治疗 KPN 感染的首选用药[3]。以氨基糖苷类药敏分型为代表的表型分型，简便快速，能较好地指导临床用药。但药敏分型仅据表型特征进行分类，无法满足从基因水平上发现菌株之间的联系和变异来追踪感染源的要求。对 KPN 进行基因分型，了解其感染的分子流行病学是医院感染分析的重要任务。作为 KPN 基因分型技术之一，RAPD 分型快速、简便、经济、多态性检出率高、可自动化分析[4]，可在 DNA 水平上反映生物品种鉴定、系谱分析、追溯生物同源性。本文采用 RAPD 技术对临床分离的 82 株 KPN 进行基因分型，并与氨基糖苷类药敏分型进行对比分析，为追溯 KPN 的同源性，防止 KPN 的克隆性传播以及指导临床 KPN 的治疗提供依据。

1 材料

1.1 菌株

收集中南大学湘雅二医院 2016 年 8 月至 2017 年 2 月住院患者临床标本中分离的非重复 KPN 82 株，分离自痰标本、粪便标本、尿液标本、血液标本、分泌物标本和咽拭子标本。标本主要分布于 ICU、呼吸内科、新生儿科、神经外科等病区。菌株均经 Phoenix 100 全自动细菌鉴定系统鉴定后再按第九版伯杰氏细菌鉴定手册要求确认。

1.2 试药和仪器

MasterMixPCR 扩增试剂、DNA Marker I（100-600bp）、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技（北京）有限公司]；Phoenix 100 全自动细菌鉴定系统（美国 BD 公司）；PCR 扩增仪（美国应用生物系统公司）；JY300C 型电泳仪（北京君逸东方电泳设备有限公司）；FluorChem FC2 凝胶成像系统（美国 Alpha Innotech 公司）。

1.3 RAPD 引物

引物序列 RAPD 1（5'-GGGATGGAAC-3'）、RAPD 2（5'-AAGAGCCCGT-3'）、RAPD 3（5'-AACGCGCAAC-3'）和 OPA 2（5'-TGCCGAGCTG-3'）均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 方法

2.1 细菌的培养及鉴定

分离的肺炎克雷伯菌经 Phoenix 100 全自动细菌鉴定系统鉴定后再按第九版伯杰氏细菌鉴定手册要求确认。该系统进行鉴定的同时自动生成对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素的药敏结果。按照美国临床和实验室标准协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）推荐的氨基糖苷类药敏结果判断标准判定结果[5-6]。

2.2 细菌 DNA 提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取肺炎克雷伯菌 DNA。

2.3 RAPD 扩增

RAPD 扩增反应总体系为 20 μL：DNA 模板 1 μL，2×Taq PCR Master MIX 10 μL，引物 2 μL，ddH_2O 7 μL。扩增条件：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃变性 1 min，32 ℃退火 2 min，72 ℃延伸 2 min，共 45 个循环，最后 72 ℃延伸 15 min。取 5 μL RAPD 产物，进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳（80 V·cm^{-1}×0.5 h），凝胶成像系统观察并拍照。观察电泳条带的数目、位置、荧光强弱进行 RAPD 分型。结果判读：条带完全相同或 1 条 /2 条不同判定为同一克隆株[7]。

2.4 RAPD 基因分型相符程度计算

RAPD 分型两两比较最高相符程度（%）=（对比 RAPD 分型所占比例最高者菌株数 / 标准 RAPD 分型主要型别菌株数）×100%；氨基糖苷药敏分型结果与 RAPD 分型结果最高相符程度（%）=（氨基糖苷类药敏分型所占比例最高者 /RAPD 分型主要型别相同菌株数）×100%；RAPD 分型与氨基糖苷类药敏分型结果对比最高相符程度（%）=（每种 RAPD 引物所得分型结果中所占比例最高者 / 氨基糖苷类药敏分型型别相同菌株数）×100%。

3 结果

3.1 KPN 氨基糖苷耐药及药敏分型情况

82 株 KPN 对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素的耐药率分别为 19.51%（16/82），64.63%（53/82），41.46%（34/82）（见表 1）。

表 1　82 株 KPN 氨基糖苷类药敏结果

Tab 1　Aminoglycoside resistance and antimicrobial susceptibility of 82 KPN

菌株数	抗菌药物			药敏分型
	阿米卡星	庆大霉素	妥布霉素	
16	R	R	R	①
23	S	S	S	②
21	S	R	S	③
14	S	R	R	④
4	S	S	R	⑤
1	S	S	M	⑥
1	S	M	S	⑦
1	M	R	M	⑧
1	S	R	M	⑨
耐药率	19.51%	64.63%	41.46%	

注：R 代表耐药，M 代表中介，S 代表敏感。

Note：R for resistance，M for middle，S for susceptibility.

82 株 KPN 经氨基糖苷药敏分型可分为 9 种（①～⑨），其中①型占 19.51%（16/82），②型占 28.05%（23/82），③型占 25.61%（21/82），④型占 17.07%（14/82）（见图 1）。

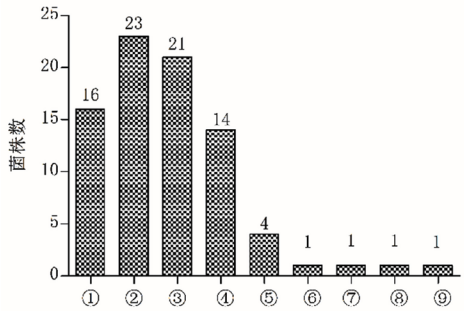


图 1　82 株 KPN 氨基糖苷药敏分型

Fig 1　Aminoglycoside typing of 82 KPN

3.2　KPN RAPD 分型情况

82 株 KPN 经 RAPD 扩增条带数目多在 1 ～ 7 条，形成的图谱清晰，带型稳定，多态性丰富。实验菌株用 RAPD 1 引物分为 20（A ～ T）种，以 C 型（25.61%，21/82）为主，其次为 D 型（15.85%，13/82）以及 B 型（14.63%，12/82）；用 RAPD 2 分为 22（a ～ v）种，以 b 型（37.80%，31/82）为主，其次为 e 型（7.32%，6/82）以及 a 型（6.10%，5/82）；用 RAPD 3 分为 17（Ⅰ～ⅩⅦ）种，以Ⅰ型（42.68%，35/82）为主，其次为Ⅱ型（17.07%，14/82）以及Ⅳ型（8.54%，7/82）；用 OPA 2 分为 17（[1] ～ [17]）种，以 [4] 型（28.05%，23/82）为主，其次为 [3] 型（18.29%，15/82）以及 [2] 型（13.41%，11/82）。各引物扩增产物电泳条带分型结果见图 2 ～ 5。

3.3　KPN 引物间 RAPD 分型比较

将 RAPD 1 与 RAPD 2，RAPD 1 与 RAPD 3，

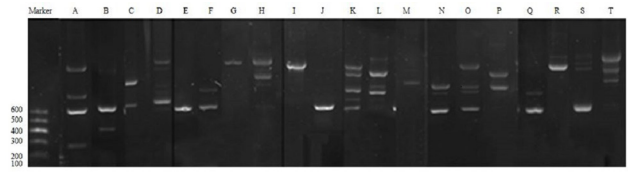


图 2　82 株 KPN 的 RAPD 1 基因分型

Fig 2　RAPD 1 genotyping of 82 KPN

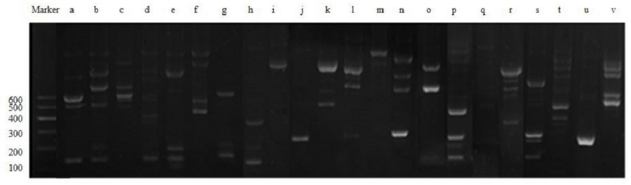


图 3　82 株 KPN 的 RAPD 2 基因分型

Fig 3　RAPD 2 genotyping of 82 KPN

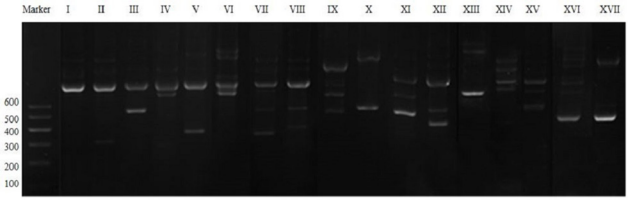


图 4　82 株 KPN 的 RAPD 3 基因分型

Fig 4　RAPD 3 genotyping of 82 KPN

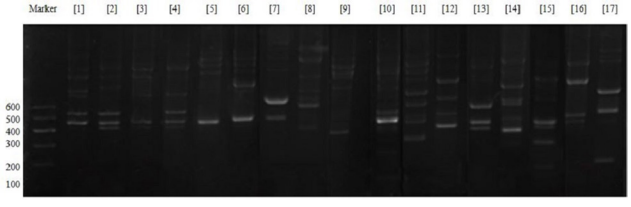


图 5　82 株 KPN 的 OPA 2 基因分型

Fig 5　OPA 2 genotyping of 82 KPN

RAPD 1 与 OPA 2，RAPD 2 与 RAPD 3，RAPD 2 与 OPA 2，RAPD 3 与 OPA 2 引物在 82 株 KPN 中的基因分型结果进行两两比较，RAPD 引物间基因分型相符程度从高到低依次为 OPA 2 与 RAPD 2（65.22%）、RAPD 1 与 RAPD 3（57.14%）、OPA 2 与 RAPD 3（52.17%）、RAPD 2 与 OPA 2（48.39%）、RAPD 2 与 RAPD 3（35.48%）、RAPD 3 与 RAPD 1（34.29%）和 RAPD 3 与 OPA 2（34.29%）等。OPA 2 分型 [4] 型与 RAPD 2 分型 b 型相符度最高（65.22%，15/23），RAPD 1 分型 C 型与 RAPD 3 分型Ⅰ型相符度次之（57.14%，12/21）。4 种引物扩增结果对比见表 2。

3.4　RAPD 分型和氨基糖苷药敏分型对比分析

以 RAPD 分型为标准分型（见表 3），RAPD 2 分型 b 型（12 株）与氨基糖苷药敏分型②型（31 株）的相符度最高（38.71%，12/31），OPA 2 分型 [4] 型与药敏分型③型的相符度次之（34.78%，8/23）。以药敏分型为标准分型（见表 4），对阿

表 2 4 种引物间 RAPD 分型对比

Tab 2 RAPD typing of 4 primers

标准 RAPD 分型			对比 RAPD 分型		
引物	型别	株数	引物	最高相符程度 /%	基因型（个数）
RAPD 1	C	21	RAPD 2	23.81	a (2) b (5) c (1) d (1) e (5) l (3) i (1) j (1) r (2)
RAPD 1	C	21	RAPD 3	57.14	Ⅰ (12) Ⅱ (2) Ⅲ (1) Ⅳ (3) Ⅸ (1) ⅩⅥ (1) ⅩⅧ (1)
RAPD 1	C	21	OPA 2	33.33	[2] (2) [3] (4) [4] (7) [5] (1) [6] (2) [10] (1) [12] (2) [14] (2)
RAPD 2	b	31	RAPD 1	22.58	B (7) C (5) D (5) E (1) J (3) N (1) O (5) P (2) S (2)
RAPD 2	b	31	RAPD 3	35.48	Ⅰ (11) Ⅱ (8) Ⅲ (1) Ⅳ (5) Ⅴ (1) Ⅵ (1) Ⅶ (1) Ⅷ (1) ⅩⅡ (1) ⅩⅣ (1)
RAPD 2	b	31	OPA 2	48.39	[1] (1) [2] (3) [3] (4) [4] (15) [5] (2) [9] (1) [10] (4) [16] (1)
RAPD 3	I	35	RAPD 1	34.29	A (1) B (3) C (12) D (4) E (1) G (2) H (1) Ⅰ (2) J (2) N (1) O (4) S (2)
RAPD 3	I	35	RAPD 2	31.43	A (5) b (11) d (3) e (7) h (1) i (2) j (2) m (1) n (1) o (1) q (1)
RAPD 3	I	35	OPA 2	34.29	[1] (4) [2] (4) [3] (5) [4] (12) [5] (3) [6] (2) [10] (4) [16] (1)
OPA 2	[4]	23	RAPD 1	26.09	B (5) C (6) D (1) E (1) H (1) J (2) M (1) N (1) O (1) P (2) S (2)
OPA 2	[4]	23	RAPD 2	65.22	a (1) b (15) e (1) j (2) n (2) o (1) u (1)
OPA 2	[4]	23	RAPD 3	52.17	Ⅰ1 (2) Ⅱ (4) Ⅲ (1) Ⅳ (4) Ⅶ (1) Ⅷ (1)

米卡星、庆大霉素和妥布霉素 3 种抗生素全耐药型（①型）与 RAPD 3 分型 I 型的相符度最高（62.50%，10/16），对 3 种药物均敏感型（②型）与 RAPD 2 分型 b 型的相符度较高（52.17%，12/23）。

表 3 RAPD 分型结果与药敏结果对比 (以 RAPD 分型为标准)

Tab 3 RAPD typing and aminoglycosides typing (with RAPD typing as standard)

RAPD 分型			氨基糖苷类药敏分型	
引物	型别	株数	最高相符程度 /%	分型（个数）
RAPD 1	C	21	28.57	① (4) ② (6) ③ (4) ④ (4) ⑤ (1) ⑥ (1) ⑧ (1)
RAPD 2	b	31	38.71	① (6) ② (12) ③ (6) ④ (5) ⑤ (1) ⑦ (1)
RAPD 3	I	35	28.57	① (10) ② (10) ③ (9) ④ (4) ⑥ (1) ⑨ (1)
OPA 2	[4]	23	34.78	① (3) ② (7) ③ (8) ④ (4) ⑥ (1)

4 讨论

KPN 是院内感染的常见病原体之一，其引起的高感染率和高病死率已成为全球关心的公共卫生问题。近年来 KPN 对不同种类抗菌药物的耐药率呈逐年上升的趋势。据统计，在 2005 － 2014 年间，KPN 对第 3 代头孢菌素耐药率从 20% 上升到 80% ～ 90%，氟喹诺酮类药物耐药率从 40% 上升到 60% 左右，其他抗菌药物的耐药率也有不同程度的升高 [8-10]。本实验 82 株 KPN 对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素的耐药率较高，分别为 19.51%、64.63%、41.46%，与相关报道一致 [11]。氨基糖苷耐药 KPN 的流行和传播使 KPN 的控制变得愈加困难，对菌株的正确分型是进行细菌流行病学及抗菌药物研究的关键。判定传播关系中病原菌的基因型是否一致仍是分子流行病学的重要任务 [12-13]。目前基因分型的方法主要包括 RAPD、MLST、PFGE 等。PFGE 是分子分型方法的金标准，具有分型能力强，结果容易判断和重复性好等优点 [14]；MLST 能够分析不同时间不同地区临床分离株的遗传相关性；但两者实验条件要求高，操作复杂，费用昂贵。RAPD 采用一条随机通用引物，通过对基因组 DNA 扩增所得带型来进行分型，能直接对各种微生物 DNA 进行分析，可作为一种快速的筛查手段和方法。

本实验中 82 株 KPN 采用 RAPD 1 引物分为 20 种（A ～ T 型）；用 RAPD 2 分为 22 种（a ～ v 型）；用 RAPD 3 分为 17 种（Ⅰ～ⅩⅦ型）；用 OPA 2 分为 17 种（[1] ～ [17] 型）。KPN 的基因多态性分布可能与菌株的来源以及 RAPD 技术灵敏度高有关。本实验结果表明部分菌株表现为同一 RAPD 型，说明本院 KPN 确实存在一定程度的克隆性传播。虽然 4 种 RAPD 引物都可以有效地对 KPN 进行基因分型，但是 4 种引物的分型能力存在差异，其中 RAPD 2 和 OPA 2 的分型能力强于 RAPD 1 和 RAPD 3。

本实验比较了 4 种引物 RAPD 分型的相符程度。4 种引物间 RAPD 分型结果比较中，与其他 3 种 RAPD 引物分型结果相符程度最高的为 OPA 2 引物，结合上文所述的 RAPD 2 和 OPA 2 的分型能力强于 RAPD 1 和 RAPD 3，提示 OPA 2 为本实验室 KPN 进行 RAPD 分型的最优引物。总体来说，4 种引物间的分型相符程度并不高，原因可能是 RAPD 引物只能扩增与之特异结合的基因组 DNA，反映部分基因组信息，造成结果片面。翟平平等 [15] 用 20 条随机引物对 4 株肠出血性大肠埃希菌进行 3 轮 RAPD 实验，只有 5 条引物扩增图谱得到较稳定的结果，其余引物出现无扩增条带、稳定性较差等问题。这与本实验结果共同说明选择合适的引物以及对 RAPD 反应体系

表 4　氨基糖苷类药敏分型结果与 RAPD 分型结果对比 (以 RAPD 分型为标准)

Tab 4　Aminoglycosides typing and RAPD typing (with RAPD typing as standard)

氨基糖苷类药敏分型		RAPD 分型		
型别	株数	引物	最高相符程度 /%	基因型 (个数)
①	16	RAPD 1	31.25	A (1) C (4) D (5) G (1) H (1) L (1) O (1) S (1) T (1)
①	16	RAPD 2	37.50	a (2) b (6) e (3) k (1) m (1) o (1) r (1) v (1)
①	16	RAPD 3	62.50	Ⅰ (10) Ⅱ (1) Ⅲ (1) Ⅴ (1) Ⅸ (1) ⅩⅣ (1) ⅩⅥ (1)
①	16	OPA 2	25.00	[1] (1) [2] (1) [3] (4) [4] (3) [5] (1) [6] (1) [7] (1) [10] (1) [14] (1) [16] (1) [17] (1)
②	23	RAPD 1	26.09	A (1) B (4) C (6) D (3) E (2) G (1) H (1) J (1) N (1) O (1) P (1) Q (1)
②	23	RAPD 2	52.17	a (4) b (12) d (1) e (3) g (1) i (1) q (1)
②	23	RAPD 3	43.48	Ⅰ (10) Ⅱ (4) Ⅳ (4) Ⅴ (2) Ⅵ (1) Ⅶ (1) Ⅷ (1)
②	23	OPA 2	30.43	[1] (1) [2] (4) [3] (5) [4] (7) [5] (2) [9] (1) [10] (3)
③	21	RAPD 1	28.57	A (1) B (6) C (4) D (4) F (1) I (2) O (2) R (1)
③	21	RAPD 2	28.57	b (6) e (1) f (1) h (1) i (1) j (2) l (3) n (2) o (1) q (1) s (1) t (1)
③	21	RAPD 3	42.86	Ⅰ (9) Ⅱ (3) Ⅳ (1) Ⅴ (2) Ⅹ (1) Ⅺ (1) ⅩⅤ (1) ⅩⅥ (1) ⅩⅧ (2)
③	21	OPA 2	38.10	[2] (2) [3] (2) [4] (8) [5] (1) [6] (1) [8] (1) [10] (3) [12] (2) [15] (1)
④	14	RAPD 1	28.57	B (2) C (4) D (1) I (1) J (2) K (1) M (1) O (1) R (1)
④	14	RAPD 2	35.71	b (5) d (1) e (2) i (1) n (1) p (1) q (1) r (1) u (1)
④	14	RAPD 3	35.71	Ⅰ (4) Ⅱ (5) Ⅲ (2) Ⅳ (2) Ⅻ (1)
④	14	OPA 2	28.57	[1] (2) [2] (2) [3] (3) [4] (4) [6] (1) [10] (1) [11] (1)
⑤	4	RAPD 1	25.00	C (1) D (1) J (1) L (1)
⑤	4	RAPD 2	50.00	b (1) g (1) l (2)
⑤	4	RAPD 3	25.00	Ⅴ (1) Ⅸ (1) Ⅻ (1) ⅩⅤ (1)
⑤	4	OPA 2	25.00	[2] (1) [10] (1) [12] (1) [13] (1)

进行优化是保证 RAPD 可靠度的前提。

本实验中 RAPD 扩增所得分型结果多于氨基糖苷类耐药分型，且 RAPD 分型和氨基糖苷类药敏分型结果不完全一致，这与相关报道一致[16]。在本实验中，同一种 RAPD 分型包含的菌株对应多种氨基糖苷类药敏表型，RAPD 2 和 OPA 2 分型与药敏结果相符程度较高，可能原因是在抗菌药物的作用下，基因型相同的菌株表型发生了改变。此外，耐药表型相同的菌株基因型不一定相同，提示氨基糖苷耐药表型受多种遗传因子的综合影响。其中相符程度最高的是①型（AMK、GEN 和 TOB 全耐药）与 RAPD 3 分型 I 型（62.50%，10/16），其次是②型（AMK、GEN 和 TOB 全敏感）与 RAPD 2 分型 b 型（52.17%，12/23）。这表明 RAPD 3、RAPD 2 分别对氨基糖苷类药物全耐药、全敏感的 KPN 进行基因分型的特异度较高，提示在已知 KPN 的氨基糖苷类药敏分型时，可选择相应 RAPD 引物进行基因分型，以便追溯菌株同源性。

本实验验证了 RAPD 技术是一种快速敏感、结果清晰、多态性好的分型方法，建立了适用于本实验室的 KPN 的 RAPD 分型方法，提示选择合适的分型引物是 RAPD 正确分型的重要影响因素。就本实验室而言，OPA 2 是最优引物，而对氨基糖苷类药物全耐药、全敏感的 KPN 进行 RAPD 分型时应分别选择 RAPD 3、RAPD 2 引物。

参考文献

[1] 许立，郭英华，刘长庭 . 肺炎克雷伯菌对临床常见抗生素耐药机制研究进展 [J]. 解放军医学院学报，2019，40 (2)：186-189.

[2] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2018，18 (3)：241-251.

[3] 蒙光义，王冬晓，钟丽球，等 . 肺炎克雷伯菌耐药率变迁与抗菌药物使用强度的相关性分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39 (16)：1639-1644.

[4] 侯晓智，张晔，钱锋，等 . 随机扩增多态性 DNA 技术及其应用 [J]. 上海实验动物科学，2001 (1)：56-59.

[5] 李坤，史伟峰 . 肺炎克雷伯菌分型方法研究进展 [J]. 国际检验医学杂志，2010，31 (9)：993-995.

[6] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 [M]. 28th ed. Wayne，PA：Clinical and Laboratory Standards Institute，2018：122.

[7] 王明英，孙立颖，黄磊，等 . 儿科住院患者耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性监测及分子流行病学特征 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35 (15)：1592-1595，1632.

[8] 运乃茹，李绍红，刘秀书 . 2005-2009 年肺炎克雷伯菌耐药性变化的分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2010，(10)：898-900.

[9] 李慧娟，周东鹏，赵楠 . 2011-2013 年肺炎克雷伯菌的分布与耐药性变迁 [J]. 中华医院感染学杂志，2015 (12)：2670，2672.

[10] 程君，魏文娟，杨海飞，等 . 安徽省 809 株肺炎克雷伯菌感染的临床分布、耐药性与基因型分布 [J]. 中国抗生素杂志，2016，41 (6)：460-465.

[11] 宋敏，向成玉，丁银环，等 . 铜绿假单胞菌氨基糖苷类耐药基因及多基因分型研究 [A]// 基层医疗机构从业人员科技论文写作培训会议论文集 [C]. 北京：中国中药杂

志社，2016.
[12] Lin CK，Lin JC. Development of PCR premiers based on a fragment from randomly amplified polymorphic DNA for the detection of *Escherichia* coli O157：H7/NM [J]. Mol Cell Proteomics，2007，21（3）：182-189.
[13] Laing C，Pegg C，Yawney D，et al. Rapid determination of Escherichia coli O157：H7 lineage types and molecular subtypes by using comparative genomic fingerprinting [J]. Appl Envir Microbio，2008，74（21）：6606-6615.
[14] 刘伟，王菊光，王丽丽，等 . 对引起食物中毒的副溶血性弧菌的 PCR 毒力基因检测和 PFGE 同源性分析 [J]. 中国卫生检验杂志，2014，24（5）：726-728.
[15] 翟平平，李嘉文，王芳，等 . 肠出血性大肠杆菌变种的 RAPD 分型研究 [J]. 食品科学，2012，33（17）：184-187.
[16] 朱成宾，高应东 . RAPD 在金黄色葡萄球菌分型中的应用研究进展 [J]. 临床输血与检验，2009，11（3）：283-285.

（收稿日期：2021-07-29；修回日期：2021-09-29）

腹透相关性腹膜炎患者万古霉素腹腔内给药后的血药浓度影响因素分析

阳巍[1]，黄海花[1*]，熊海燕[1]，周千一[1]，范秀珍[1]，曹新策[2]，刘伟[3]（邵阳学院附属第一医院，1.临床药学中心，2.检验科，3.肾内科，湖南 邵阳 422000）

摘要：目的 监测腹透相关性腹膜炎（PDRP）患者万古霉素腹腔内给药后的血药浓度，并分析相关影响因素。**方法** 选取 2017 年 10 月至 2021 年 1 月在邵阳学院附属第一医院行腹腔内给予万古霉素且监测血药浓度的 45 例 PDRP 患者进行分析，万古霉素腹腔内给药方案为体质量≤ 60 kg 者 1 g/ 次，体质量＞ 60 kg 者 20 mg·kg^{-1} 给药（每次剂量不超过 2 g），给药后第 3 日采血监测血药浓度，根据血药浓度分为高血药浓度组（≥ 15 μg·mL^{-1}）及低血药浓度组（＜ 15 μg·mL^{-1}），比较两组一般资料及实验室指标，多因素 Logistic 回归分析影响万古霉素血药浓度的因素。**结果** 45 例接受万古霉素治疗且血药浓度监测者中高血药浓度者 13 例，低血药浓度者 32 例。万古霉素高血药浓度组患者少尿或无尿比例显著高于低血药浓度组（$P < 0.05$），而每日腹透液交换次数则显著低于低血药浓度组（$P < 0.05$）。Logistic 回归分析发现，每日腹透液交换次数是影响万古霉素血药浓度的独立危险因素（$P < 0.05$）。每日腹透液交换次数相同时，少尿或无尿患者万古霉素血药浓度值与尿量正常患者比较差异无统计学意义。随着每日腹透液交换次数的增加，尿量正常患者万古霉素血药浓度呈降低趋势（$P < 0.05$）。**结论** PDRP 腹腔内万古霉素给药后的血药浓度有个体差异，在优化患者万古霉素腹腔内给药时需考虑每日腹透液交换次数，当每日腹透液交换次数增加时，应适当增加万古霉素给药剂量或增加给药频率并加强监测，以便血药浓度达标。

关键词：腹膜透析；腹膜炎；万古霉素；血药浓度
中图分类号：R978.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)02-0468-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.040

Influencing factors of blood concentration of vancomycin after intraperitoneal administration in patients with peritoneal dialysis related peritonitis

YANG Wei[1], HUANG Hai-hua[1*], XIONG Hai-yan[1], ZHOU Qian-yi[1], FAN Xiu-zhen[1], CAO Xin-ce[2], LIU Wei[3] (1. *Clinical Pharmacy Center*, 2. *Laboratory Department*, 3. *Department of Nephrology*, *First Affiliated Hospital of Shaoyang College*, *Shaoyang Hunan* 422000)

基金项目：湖南省卫生健康委科研计划课题项目（No.C20180779）。
作者简介：阳巍，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：36828972@qq.com *通信作者：黄海花，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：280228373@qq.com

Abstract: Objective To monitor the blood concentration of vancomycin in patients with peritoneal dialysis associated peritonitis (PDRP) after intraperitoneal administration, and to explore the related factors for the blood concentration of vancomycin. **Methods** Totally 45 patients with PDRP who received vancomycin intraperitoneally and blood concentration monitoring in our hospital from October 2017 to January 2021 were selected and analyzed. According to the blood concentration, the intraperitoneal administration scheme of vancomycin was 1 g each time for those with body mass ＜ 60 kg, or 20 mg • kg^{-1} each time for those with body mass ＞ 60 kg (the dose each time was less than 2 g). Blood samples were taken on the third day after the administration to monitor the blood concentration, which were divided into a high blood concentration group (≥ 15 μg • mL^{-1}) and a low blood concentration group (＜ 15 μg • mL^{-1}). The general data and laboratory indexes of the two groups were compared and multivariate Logistic regression was used to analyze the related factors for vancomycin blood concentration. **Results** Among the 45 patients, 13 had high blood drug concentration and 32 had low blood drug concentration. The proportion of low urine volume or anuria in the high concentration group was significantly higher than that in the low group (P ＜ 0.05). The number of daily peritoneal dialysis fluid exchange in the high concentration group was significantly lower than that in the low concentration group (P ＜ 0.05). Multivariate Logistic regression analysis showed that daily exchange of peritoneal dialysis fluid was an independent risk factor for vancomycin concentration (P ＜ 0.05). When the exchange times of abdominal pain were the same every day, there was no significant difference in the vancomycin plasma concentration between patients with oliguria or anuria and patients with normal urine volume. With the increase of daily peritoneal dialysis exchange, the blood concentration of vancomycin decreased in patients with normal urine volume (P ＜ 0.05). **Conclusion** The blood concentration of vancomycin in PDRP after intraperitoneal administration is different individually, so the daily exchange of peritoneal dialysis fluid should be considered when optimizing the intraperitoneal administration of vancomycin. When increasing the number of daily exchanges of peritoneal dialysis fluid during the treatment, the dose or the administration frequency should be increased strengthening as well as the monitoring.

Key words: peritoneal dialysis; peritonitis; vancomycin; blood concentration

腹透相关性腹膜炎（peritoneal dialysis-related peritonitis，PDRP）是持续性不卧床腹膜透析患者的一种多见的并发症，是导致腹膜透析患者转至血液透析的主要原因，长时间的腹膜炎会引发腹膜衰竭，甚至导致死亡[1]。积极有效的治疗可以使血液透析患者重回腹膜透析，其中抗菌药物规范化使用非常关键。中国腹膜透析相关感染防治专家组发布的《腹膜透析相关性感染的指南》[2]中指出 PDRP 经验用药应该同时覆盖革兰氏阳性菌（G^+菌）和革兰氏阴性菌（G^-菌），若致病菌株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（*Methicillin resistant staphylococcus aureus*，MRSA），可采用万古霉素治疗。但临床使用万古霉素时需将其血药浓度保持在特定范围，以发挥其最佳疗效。经验性使用万古霉素会增加 G^+菌耐药风险，且过高浓度的万古霉素也会增加耳毒性、肾毒性及过敏等不良反应[3]。血药浓度、并发败血症、伴有肾功能受损以及使用血管活性药物均可能影响药物清除率，从而产生个体间的药代动力学差异[4]，因此万古霉素在 PDRP 患者体内，尤其在危重患者中，其生理病理情况不同，临床给药方案也需个体化。本研究对 PDRP 患者万古霉素腹腔给药者临床资料进行回顾性分析，探讨影响血药浓度的相关因素，旨在为 PDRP 患者万古霉素个体化用药提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院 2017 年 10 月至 2021 年 1 月收治的 45 例行万古霉素治疗且监测血药浓度的 PDRP 患者临床病例资料（伦理批件号：2019016）。纳入标准：① 年龄 18 ～ 75 岁；②体质量 40 ～ 85 kg；③ 根据国际腹膜透析学会 2016 版《腹膜透析相关性感染的指南》[5]的诊断标准诊断为 PDRP；④ 入选前 72 h 内未用过有效抗菌药物，或曾用过抗菌药物无效的住院患者；⑤ 可疑 G^+菌感染或明确致病菌为 MRSA 的 PDRP 的患者。排除标准：① 入院 48 h 内难以交流者；② 无法获知用药情况者；③ 合并其他部位感染而需要其他抗菌

药物治疗者；④ 入院前已使用万古霉素及疗程未达第二次重复给药时间的患者。按万古霉素第一次腹腔内给药后第 3 日血药浓度分为高血药浓度组（≥ 15 μg • mL^{-1}，13 例）及低血药浓度组（< 15 μg • mL^{-1}，32 例）。

1.2 方法

1.2.1 资料采集 收集患者性别、年龄、体质量、尿量、用药前白细胞、血红蛋白、白蛋白、总蛋白、C 反应蛋白、降钙素原、转氨酶、血肌酐、尿素氮、尿酸、血钾、血钙、血磷、血 CO_2 结合力、腹透液总细胞数、腹透液白细胞数、腹痛液多核百分率、每日腹透液交换次数，记录给药方案等信息。

1.2.2 万古霉素使用和血药浓度测定方法 体质量≤ 60 kg 的患者采取万古霉素（0.5 g/ 支，礼来苏州制药有限公司）1 g/ 次，体质量> 60 kg 的患者予以 20 mg • kg^{-1} 给药（每次剂量不超过 2 g）。在患者入院当日 22：00，临床医师将万古霉素加入 2 L 腹膜透析液中，在配液后 10 min 内注入腹腔，留腹过夜（9 h）。在给药后第 3 日 7：00 取空腹状态下前臂静脉血 5 mL，在本院建立的高效液相色谱条件下对万古霉素血药浓度进行检测。万古霉素腹腔内给药频次根据血药浓度监测结果而定，即当血药浓度低于 15 μg • mL^{-1} 则再次腹腔给药，一般每 3 ～ 5 日给药一次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件分析数据，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，采用独立样本 t 检验或秩和检验；计数资料采用 χ^2 检验；借助多因素 Logistic 回归分析影响因素。$P < 0.05$ 则为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料分析

纳入的 45 例 PDRP 患者万古霉素腹腔给药后第 3 日测定其血药浓度，血药浓度平均值为（12.31±5.57）μg•mL^{-1}。其中高血药浓度组（≥ 15 μg•mL^{-1}）13 例，血药浓度平均值为（19.74±3.03）μg•mL^{-1}，低血药浓度组（< 15 μg•mL^{-1}）32 例，血药浓度平均值为（9.29±2.82）μg • mL^{-1}。以 ISPD 指南 [5] 中建议的 15 μg • mL^{-1} 为目标值，给药后第 3 日万古霉素血药浓度达标率为 28.9%。

2.2 两组一般资料及实验室指标比较

高血药浓度组与低血药浓度组患者性别、年龄、体质量、万古霉素用药剂量、用药前白细胞、血红蛋白、白蛋白、总蛋白、C 反应蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、血肌酐、尿素氮、尿酸、血钾、血钙、血磷、腹透液相关检查结果及住院日比较差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。高血药浓度组患者少尿（指 24 h 尿量< 400 mL）或无尿（指 24 h 尿量< 100 mL）比例显著高于低血药浓度组（$P < 0.05$），高血药浓度组患者每日腹透液交换次数显著低于低血药浓度组（$P < 0.05$）。见表 1。

2.3 多因素 Logistic 分析万古霉素血药浓度的影响因素

为分析万古霉素血药浓度的影响因素，将低血药浓度组与高血药浓度组患者有显著差异的因素作为自变量（无尿或少尿＝ 1，尿量每日> 400 mL ＝ 2；每日腹透液交换次数为连续变量），将万古霉素血药浓度作为因变量（低血药浓度组＝ 1，高血药浓度组＝ 2），并进行多因素 Logistic 分析，发现每日腹透液交换次数是影响万古霉素血药浓度的独立危险因素（$P < 0.05$，见表 2）。

2.4 每日腹透液交换次数相同情况下不同尿量患者万古霉素血药浓度的比较

每日腹透液交换次数相同时，少尿或无尿患者万古霉素血药浓度与尿量正常（每日尿量≥400 mL）患者比较无明显差异（$P > 0.05$），见表 3。

2.5 尿量正常患者不同腹透液交换次数时万古霉素血药浓度的比较

随着每日腹透液交换次数的增加，尿量正常患者万古霉素血药浓度呈降低趋势（$F = 6.906$，$P = 0.003$，见表 4）。

3 讨论

G^+ 感染现已成为 PDRP 感染常见病原菌 [6]。目前针对 G^+ 菌感染的 PDRP 患者，《ISPD 腹膜炎治疗指南（2016）》提倡采用第一代头孢菌素或万古霉素进行治疗 [5]，但国内 PDRP 患者对第一代头孢菌素类抗菌药物具有较高耐药率，因此我国学者普遍主张将万古霉素作为 PDRP 患者 G^+ 菌感染的经验性治疗药物 [2]。

目前临床将万古霉素稳态血药浓度作为评估其是否发挥有效抗菌疗效的参考指标，并推荐 PDRP 患者万古霉素间断腹腔给药方案为 15 ～ 30 mg • kg^{-1}，每 5 ～ 7 日给药一次，波谷血药浓度目标值应≥ 15 μg • mL^{-1} [5]。国内研究发现按照 1 g q3d 的方案治疗 PDRP 患者时首次万古霉素谷浓度仅为（10.51±2.79）μg • mL^{-1}，低于目标浓度，达标率为 2.4%[7]。本研究按照体质量≤ 60 kg 者，每次 1 g，体质量> 60 kg 者每次 20 mg • kg^{-1} 给药的方案发现，PDRP 患者万古霉素首次给药后第 3 日血药浓度平均值为（12.31±5.57）μg • mL^{-1}，低于指南推荐的目标浓度，达标率为 28.9%，提示万古霉素达标率低，应注意分析原因及在首次给药时增加给药剂量。基于此，本研究按照万古霉素第一次腹腔内给药后第 3 日的血药浓度分为高血药浓度组（≥ 15 μg • mL^{-1}）

表 1　两组一般资料及实验室指标比较

Tab 1　General data and laboratory indexes between two groups

项目	低血药浓度组（32 例）	高血药浓度组（13 例）	t/χ^2 值	P 值
性别（男 / 女）	20/12	10/3	0.865	0.352
年龄 / 岁	53.22±10.09	53.54±9.45	0.101	0.921
体质量 /kg	56.13±11.33	61.88±11.56	1.524	0.142
万古霉素用药剂量 /g	1.03±0.12	1.15±0.24	1.308	0.099
少尿或无尿 [n（%）]	3（9.38%）	5（38.46%）	5.351	0.021
白细胞 /（$10^9 \cdot L^{-1}$）	9.32±2.91	8.02±3.32	1.315	0.189
中性粒细胞比率 /%	80.08±10.93	83.65±7.05	1.299	0.203
血红蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	98.69±16.69	96.15±19.31	0.414	0.683
白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	29.12±6.06	32.33±6.98	1.409	0.176
总蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	54.65±9.66	56.99±8.63	0.850	0.405
C 反应蛋白 /（$mg \cdot L^{-1}$）	81.27±52.37	54.90±47.79	1.478	0.140
谷丙转氨酶 /（$U \cdot L^{-1}$）	23.01±19.94	16.47±8.01	0.326	0.745
谷草转氨酶 /（$U \cdot L^{-1}$）	21.97±12.00	19.46±8.11	0.413	0.679
血肌酐 /（$\mu mol \cdot L^{-1}$）	967.92±270.05	806.12±293.48	1.928	0.054
尿素氮 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	16.89±6.94	14.02±5.22	0.990	0.322
尿酸 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	328.27±78.30	371.22±81.37	1.641	0.121
血钾 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	3.43±0.66	3.54±0.81	0.462	0.650
血钙 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	2.09±0.22	2.16±0.15	0.990	0.322
血磷 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	1.27±0.52	1.14±0.43	0.338	0.735
血铁 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	4.85±2.78	5.83±4.07	0.351	0.726
血 CO_2 结合力 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	27.15±1.41	27.38±4.46	0.676	0.499
腹透液清亮 [n（%）]	10（31.25）	4（30.77）	0.001	0.975
李凡他试验阳性 [n（%）]	13（40.63）	7（53.85）	0.654	0.419
腹透液总细胞数 /（$10^6 \cdot L^{-1}$）	5207.62±5817.93	3313.94±3859.83	0.601	0.548
腹透液白细胞数 /（$10^6 \cdot L^{-1}$）	4986.25±5005.98	3409.14±3568.71	0.393	0.695
腹透液多核细胞百分比 /%	74.66±34.24	81.34±37.42	0.851	0.395
每日腹透液交换次数 / 次	4.84±0.37	3.85±0.69	4.942	＜ 0.001
平均住院日 /d	11.23±4.64	9.72±2.96	0.974	0.330

表 2　多因素 Logistic 分析万古霉素血药浓度影响因素

Tab 2　Multivariate Logistic analysis of relative factors influencing vancomycin blood concentration

变量	β	SE	$Wald$	P	OR（95%CI）
每日腹透液交换次数	3.008	0.908	10.969	0.001	20.248（3.414 ～ 120.090）
尿量	－ 0.212	1.202	0.031	0.860	0.809（0.077 ～ 8.534）
常量	－ 12.396	4.041	9.411	0.002	

表 3　每日腹透液交换次数相同情况下不同尿量患者万古霉素血药浓度比较

Tab 3　Vancomycin blood concentration in patients with different urine volumes but the same number of daily peritoneal dialysis exchanges

项目	每日腹透液交换 3 次		每日腹透液交换 4 次		每日腹透液交换 4 次	
	例数	血药浓度 /（$\mu g \cdot mL^{-1}$）	例数	血药浓度 /（$\mu g \cdot mL^{-1}$）	例数	血药浓度 /（$\mu g \cdot mL^{-1}$）
少尿或无尿	3	20.76±4.98	3	16.00±2.95	2	9.96±1.63
尿量正常	1	23.00±0.00	9	14.69±5.06	27	9.94±4.42
t 值		0.389		0.417		0.005
P 值		0.735		0.686		0.996

表 4　尿量正常患者不同腹透液交换次数时万古霉素血药浓度比较

Tab 4　Vancomycin blood concentration in patients with non oliguria or anuria with different peritoneal dialysis exchanges

组别	例数	万古霉素血药浓度 /（$\mu g \cdot mL^{-1}$）
每日腹透液交换 3 次	1	23.00±0.00
每日腹透液交换 4 次	9	14.69±5.45
每日腹透液交换 5 次	27	9.94±4.42*

注：与每日腹透液交换 4 次比较，*P ＜ 0.05。

Note：Compared with 4 daily peritoneal dialysis exchanges，*P ＜ 0.05.

及低血药浓度组（＜ 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$），并以此分析影响万古霉素血药浓度的影响因素。

万古霉素为亲水性抗菌药物，体质量高及肥胖患者因其脂肪细胞及脂肪组织数量的增加导致万古霉素药物表观分布容积增加，清除率也增加[8]。体质量高及肥胖患者接受万古霉素治疗时更易出现血药浓度偏高现象，但也有浓度显著性降低的报道[9]。本研究中高血药浓度组患者体质量高于低浓度组，但差异无统计学意义。梁宝方

等[10]报道，白蛋白水平为影响 ICU 患者万古霉素血药浓度的主要因素，合并感染的低白蛋白血症患者机体内产生的炎性介质会破坏血管内皮细胞，血管通透性升高，第三间隙组织水肿明显，游离药物进一步扩散至血管外间隙，药物清除增快，导致有效血药浓度降低。但也有研究发现，万古霉素蛋白结合率为 30% ～ 60%，因此白蛋白水平对其血药浓度的影响可能相对较小[11]。本研究结果显示，与高浓度组比较，万古霉素低浓度组患者其白蛋白水平偏低，但差异无统计学意义。

万古霉素主要经肾脏清除，此外还包括肾外清除和腹膜透析等体外清除，因此万古霉素血药浓度与体质量、肾功能、白蛋白、透析液体积及每日腹膜透析情况等密切相关[12-14]。万古霉素给药方式或给药剂量需参考患者肾功能水平予以调整，尿量多少会参与体内万古霉素清除，进而影响万古霉素血药浓度[15]。本研究发现，万古霉素高血药浓度组患者少尿或无尿比例显著高于低血药浓度组，而每日腹透液交换次数相同时，少尿或无尿患者万古霉素血药浓度与尿量正常患者比较无显著差异。腹腔给药后，万古霉素通过腹膜的毛细血管网进入人体循环，当腹透液进行更换时，万古霉素再从血液进入腹腔继续发挥杀菌作用，从而延长万古霉素腹腔内停留时间，提高其生物利用度。但随着腹透液交换次数的增加，弃去的腹透液带走了部分万古霉素，使进入体循环的药物减少，血药浓度也相应降低[16]。腹膜透析患者一般每日进行 4 次腹透液交换，PDRP 时腹腔冲洗可将炎症产物及微生物冲出体外，有利于控制感染，因此在 PDRP 急性期会根据感染情况提高每日腹透液交换次数。本研究结果显示，万古霉素高血药浓度组患者每日腹透液交换次数显著低于低血药浓度组，随着每日腹透液交换次数的增加，尿量正常患者万古霉素血药浓度呈降低趋势，且多因素 Logistic 分析发现每日腹透液交换次数是影响万古霉素血药浓度的独立危险因素。因此，建议在急性期治疗过程中增加每日腹透液交换次数时，应适当增加万古霉素给药剂量或增加给药频率，并加强监测。若每日腹透液交换次数增加，万古霉素按照每次 20 mg • kg^{-1} 的给药方案腹腔给药时，可考虑在首次给药后第 2 日早晨（即给药后 33 h）即进行血药浓度监测，如低于 15 μg • mL^{-1} 应追加 1 次剂量。

综上，万古霉素作为 PDRP 患者临床治疗初始经验用药，其血药浓度有个体差异，临床给药需考虑患者残余尿量及每日腹透液交换次数的影响，并对万古霉素血药浓度监测，以便及时调整用药方案。但本研究仍有不足，如纳入的病例数少，对某些混杂因素分析存在困难，这些均可能给研究结果带来偏倚，故后续需增加样本量，尽可能排除混杂因素，进一步验证影响万古霉素血药浓度的相关因素。

参考文献

[1] Cho Y，Struijk DG. Peritoneal dialysis-related peritonitis：a typical and resistant organisms [J]. Semin Nephrol，2017，37（1）：66-76.

[2] 中国腹膜透析相关感染防治专家组 . 腹膜透析相关感染的防治指南 [J]. 中华肾脏病杂志，2018，34（2）：139-148.

[3] 王旭，叶静 . 某院肾衰患者使用万古霉素的治疗药物监测 [J]. 新疆医学，2020，50（9）：993-995.

[4] 初阳 . 万古霉素有效性的影响因素分析及群体药代动力学研究 [D]. 沈阳：中国医科大学，2019.

[5] Li PK，Szeto CC，Piraino B，et al. ISPD peritonitis recommendations：2016 update on prevention and treatment [J]. Perit Dial Int，2016，36（5）：481-508.

[6] 赵巧，陈洋洋，李忻阳，等 . 单中心腹膜透析相关性腹膜炎的致病菌及药敏分析 [J]. 中国实验诊断学，2019，23（12）：2133-2137.

[7] 杭永付，徐德宇，薛领，等 . 腹透相关性腹膜炎腹腔给予万古霉素血药浓度的特点及与疗效的关系 [J]. 中国药学杂志，2019，54（12）：1031-1034.

[8] 吕萌，马姝丽 . 万古霉素在超重、肥胖患儿中的给药方案及药物监测的 Meta 分析 [J]. 中国抗菌药物杂志，2019，44（1）：139-145.

[9] 蒙龙，李娟，龙锐，等 . 万古霉素在肥胖人群与正常人群中药动学参数的系统评价 [J]. 重庆医科大学学报，2015，40（2）：309-313.

[10] 梁宝方，苏建伟，沈利汉，等 . ICU 患者影响万古霉素血药浓度的相关因素分析 [J]. 中国抗菌药物杂志，2020，45（8）：819-824

[11] 葛洁，丁一，关月，等 . 低蛋白血症对儿童万古霉素血药浓度监测的影响分析 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（12）：1360-1363.

[12] 阳巍，熊海燕，黄海花，等 . 品管圈在提高治疗药物血药浓度达标率中的应用 [J]. 中南药学，2019，17（1）：129-132.

[13] 许建文，黄品芳，林慧芬，等 . 肾功能正常患者万古霉素稳态谷浓度分布及影响因素分析 [J]. 中国抗菌药物杂志，2020，45（2）：199-203.

[14] Lam E，Lien YTK，Kraft WK，et al. Vancomycin in peritoneal dialysis：clinical pharmacology considerations in therapy [J]. Perit Dial Int，2020，40（4）：384-393.

[15] 崔继耀 . 重症患者万古霉素血药浓度影响因素的研究 [D]. 长春：吉林大学，2017.

[16] 何建强，朱文芳，罗燕萍，等 . 延长的每日血液透析对万古霉素的清除作用 [J]. 江苏大学学报（医学版），2010，20（6）：511-513，516.

（收稿日期：2021-09-09；修回日期：2021-11-11）

药品不良反应

万古霉素致迟发型药物热合并白细胞与血小板减少

余英琳，彭怀东*（广州医科大学附属第二医院药学部，广州 510260）

关键词：万古霉素；迟发型药物热；白细胞减少；血小板减少
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2022)02-0473-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.041

1 病例资料

患者，女，64 岁，因“左足皮肤高分化鳞状细胞癌合并皮肤感染”于 2018 年 3 月 5 日入院治疗。患者 10 年前开始出现左足皮肤反复破溃、渗血，2015 年 8 月于外院诊断为左足皮肤高分化鳞状细胞癌，多次使用紫杉醇和奈达铂化疗，2017 年 7 月开始行放射治疗，至本次入院时放疗疗程仍未结束。患者既往有高血压病 6 年，近半年规律服用比索洛尔（2.5 mg）联合氨氯地平（5 mg qd）治疗，血压控制可。患者无药物过敏史，个人史、家族史亦无特殊。入院体格检查：体温 36.7 ℃，脉搏 91 次 • min^{-1}，呼吸 20 次 • min^{-1}，血压 109/71 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），体质量 71 kg。患者左足根部肿胀、溃烂，创面大小约 4 cm×5 cm，表面有少量脓苔，可见肌肉，肢端感觉、血液循环及运动正常。血常规示：白细胞（WBC）$5.20\times10^9 \cdot L^{-1}$，中性粒细胞（NEUT）$3.50\times10^9 \cdot L^{-1}$，红细胞（RBC）$3.70\times10^9 \cdot L^{-1}$，血小板（PLT）$242\times10^9 \cdot L^{-1}$，淋巴细胞（LYMPH）$1.00\times10^9 \cdot L^{-1}$。肝功能、肾功能、电解质检查大致正常。胸片提示：右下肺肺大疱。心电图检查无明显异常。

患者于 2018 年 3 月 8 日硬外麻下行“左大腿下 1/3 截肢术”，手术顺利，3 月 8 日至 3 月 9 日使用头孢哌酮他唑巴坦 2.5 g ivd bid 抗感染治疗。患者术后一般情况良好，切口轻度红肿并有少量渗血、渗液。3 月 14 日患者出现发烧，最高体温 38.7 ℃，切口渗血、渗液，边缘红肿，临床医师考虑脂肪液化和感染可能，再次给予头孢哌酮他唑巴坦 2.5 g ivd bid 治疗，并拆开切口引流换药，取渗液做细菌培养。3 月 16 日切口渗液培养提示有耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）生长（+++），对替加环素、万古霉素、利福平、利奈唑胺、甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑等药物敏感。予停用头孢哌酮他唑巴坦，改为万古霉素 1 g ivd q12 h 治疗。患者 3 月 16 日最高体温 38.1 ℃，血常规：WBC $5.74\times10^9 \cdot L^{-1}$，NEUT $4.02\times10^9 \cdot L^{-1}$，RBC $3.30\times10^9 \cdot L^{-1}$，PLT $271\times10^9 \cdot L^{-1}$。患者使用万古霉素后发烧症状改善，3 月 17 日后未再出现明显发热，切口仍有较多渗出液，边缘红肿，临床医师考虑切口液化坏死，于 3 月 21 日行床边切口清创术，术后使用 VSD 负压引流，可引流出少量乳白色脓液。3 月 21 日患者血常规：WBC $6.10\times10^9 \cdot L^{-1}$，NEUT $4.09\times10^9 \cdot L^{-1}$，RBC $3.40\times10^9 \cdot L^{-1}$，PLT $353\times10^9 \cdot L^{-1}$。复查肝功能、肾功能、电解质大致正常。

患者 3 月 24 日下午突发寒颤，体温 39.3 ℃，心率 100 次 • min^{-1}，血压 144/75 mmHg，予急查血常规、血培养，给予复方氨基比林注射液 2 mL 肌内注射 1 h 后体温可降至正常。检查结果回报血常规：WBC $3.53\times10^9 \cdot L^{-1}$，NEUT $2.75\times10^9 \cdot L^{-1}$，RBC $3.50\times10^9 \cdot L^{-1}$，PLT $277\times10^9 \cdot L^{-1}$。3 月 25 日下午患者再次出现高热，最高体温 40.0 ℃，并伴有寒颤、心悸（心率 110 次 • min^{-1}）等症状，再次抽血送培养，给予复方氨基比林注射液肌内注射和冰敷后体温降至 37.8 ～ 38.3 ℃，血常规：WBC $2.70\times10^9 \cdot L^{-1}$，NEUT $2.20\times10^9 \cdot L^{-1}$，RBC $3.50\times10^9 \cdot L^{-1}$，PLT $127\times10^9 \cdot L^{-1}$。3 月 26 日患者仍有发烧，体温维持在 37.6 ～ 39.6 ℃。3 月 27 日最高体温 39.4 ℃，血常规：WBC $1.56\times10^9 \cdot L^{-1}$，NEUT $1.00\times10^9 \cdot L^{-1}$，RBC $3.20\times10^9 \cdot L^{-1}$，PLT $76\times10^9 \cdot L^{-1}$。3 月 24 日和 3 月 25 日血培养回报

基金项目：广州市卫生健康科技项目（No. 20211A010061）；广东省医院药学研究基金（No. 2016A30）。
作者简介：余英琳，女，主管药师，主要从事医院药学工作，email：lynncheerio@163.com *__通信作者：__彭怀东，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：phdloveyou@163.com

阴性。患者高热时伴寒颤，不发烧时精神状态好、食欲正常，无咳嗽、咳痰、流涕、咽痛，无腹痛、腹泻，无肌肉关节疼痛，无尿频、尿急、尿痛。左足截肢切口皮肤仍有轻度红肿，停留引流管有少许乳白色脓液流出，无明显热、痛感。3 月 28 日查降钙素原（PCT）为 0.26 μg•L^{-1}。综合患者治疗过程、医嘱和检查资料，考虑万古霉素导致药物热合并白细胞、血小板下降的可能性大，于 3 月 28 日上午停用万古霉素，下午最高体温 38.8 ℃，3 月 29 日热峰下降至 37.8 ℃，3 月 30 日后未出现发烧。患者 3 月 28 日使用重组人粒细胞集落刺激因子 200 μg ih 一次，3 月 29 日血常规示：WBC 20.97×10^9 • L^{-1}，NEUT 17.41×10^9 • L^{-1}，RBC 3.20×10^9 • L^{-1}，PLT 121×10^9 • L^{-1}，4 月 2 日复查血常规：WBC 8.68×10^9 • L^{-1}，NEUT 5.29×10^9 • L^{-1}，RBC 3.40×10^9 • L^{-1}，PLT 355×10^9 • L^{-1}。之后，患者切口逐渐愈合，3 月 28 日后未再使用万古霉素治疗，也未再次出现明显发烧（体温＞ 38.0 ℃）及白细胞、血小板下降。

本例患者因截肢术后切口感染、切口渗液培养出 MRSA 而使用万古霉素治疗，在用药第 9 日开始出现高热，发烧时伴寒颤，时间均出现在下午，经对症处理后体温降低，同时患者的白细胞、血小板进行性下降，排除了败血症、肺部感染、肿瘤复发、血液病等相关诊断后，怀疑为万古霉素所致，停药后患者发烧症状在 48 h 内改善，5 d 后复查白细胞、血小板均恢复至正常水平。患者出现高热、白细胞和血小板下降与万古霉素的使用有时间相关性，停药后逐渐恢复，可判断为使用万古霉素所致。

2 讨论

万古霉素导致药物热、白细胞和 / 或血小板下降与严重感染导致的发烧、血细胞下降难以区分，缺乏特异性检测方法，通常依靠排除性诊断，容易误诊。文献报道万古霉素引起药物热常发生在初次用药后的 7 ～ 14 d，多为迟发型药物热，一般为中度以上发烧，可高达 40 ℃，停药后体温一般在 48 h 内降为正常 [1-4]。其机制为抗原抗体复合物激动吞噬细胞释放内源性致热源所致，发生率不详。万古霉素导致白细胞及中性粒细胞减少的发生率在 2% 左右 [5]，通常出现在用药 1 周以后，多合并发烧并且在停药后 2 ～ 5 d 内自行恢复 [6-8]，使用粒细胞集落刺激因子能迅速改善粒细胞缺乏症 [9]。万古霉素导致血小板减少症的发生率尚不清楚，发生机制通常认为是药物依赖性特异质高敏反应，当致敏药物存在时，刺激机体产生抗血小板抗体（PAIgG），该抗体的 Fab 片段与血小板膜上的相关抗原特异性结合，暴露出 Fc 片段并与巨噬细胞的 Fc 受体结合，引起血小板被吞噬破坏。血小板下降一般在初次用药后 1 ～ 2 周开始出现，停药后 1 周左右可恢复正常，但药物依赖性抗体会在体内持续多年，因此对于发生过万古霉素致血小板减少的患者，应避免再次使用该药 [10]。

本例患者使用万古霉素后出现发热、白细胞及血小板下降的时间和停药后恢复时间与文献报道基本一致。万古霉素导致药物热合并白细胞减少较常见 [11-12]，同时合并血小板减少尚未见文献报道，临床上如能及时发现，停药后通常不会造成严重的后果。本例警示，对使用万古霉素治疗的患者，应定期监测血常规，特别是用药 1 周以后出现高热、白细胞和 / 或血小板下降的患者，除排查感染控制不佳外，还应考虑万古霉素导致不良反应的可能。

参考文献

[1] 何翠瑶，樊继山，吴青，等 . 临床药师对一例万古霉素致药物热的分析和处理 [J]. 药学服务与研究，2017，17（2）：120-123.

[2] 许美娟，沈云，刘兴才，等 . 临床药师参与 1 例万古霉素致药物热病例的药物治疗实践 [J]. 中南药学，2018，16（1）：132-134.

[3] 陶宏，曹国文，佟光明，等 . 1 例万古霉素致药物热的会诊案例分析 [J]. 华西药学杂志，2013，28（6）：654.

[4] 董迪，李静，张威 . 注射用万古霉素致小儿药物热 1 例 [J]. 中国药物警戒，2014，11（5）：316-316.

[5] 桑福德 . 抗微生物治疗指南 [M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2014：106.

[6] 刘丽英，李勇，古淑仪 . 万古霉素致白细胞减少症 38 例回顾性分析 [J]. 中国药物警戒，2012，9（2）：117-118.

[7] 杨莹，卓少宏，赖宏志，等 . 万古霉素致儿童白细胞减少不良反应分析 [J]. 中国实用医药，2017，12（8）：137-138.

[8] 马雪，唐尧 . 万古霉素致白细胞与中性粒细胞严重减少一例 [J]. 华西医学，2011（11）：1619-1620.

[9] Rowland SP，Rankin I，Sheth H. Vancomycin-induced thrombocytopaenia in a patient with severe pancreatitis [J]. BMJ Case Rep，2013，2013：bcr2013200830.

[10] 王星 . 万古霉素致血小板减少症的研究进展 [J]. 药物不良反应杂志，2017，19（4）：282-284.

[11] 肖桂荣，李伦瑾，徐珽 . 注射用万古霉素致药物热与白细胞减少 1 例 [J]. 药物流行病学杂志，2014，23（1）：65-66.

[12] 毛璐，何绥平，李静 . 万古霉素致发热及白细胞减少 [J]. 药物不良反应杂志，2003，5（5）：334-335.

（收稿日期：2021-08-09；修回日期：2021-11-05）

曲妥珠单抗治疗乳腺癌致心脏毒性 1 例

阳媛颖[1]，蒋炳润[2]，李文群[1*]，张毕奎[1*]（1.中南大学湘雅二医院药学部，长沙　410011；2. 湘西土家族苗族自治州人民医院乳甲外科，湖南　吉首　416000）

关键词：曲妥珠单抗；乳腺癌；心脏毒性
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)02-0475-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.02.042

曲妥珠单抗是一种重组 DNA 人源化单克隆抗体，是用于治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌的靶向药物。曲妥珠单抗的出现，使早期 HER2 阳性乳腺癌的复发风险以及死亡率大大降低，显著改善了早期患者的不良预后。但与此同时，曲妥珠单抗对心脏造成的损伤不容忽视，其常见不良反应为无症状性左室射血分数（LVEF）下降、ST-T 改变、心律失常以及充血性心力衰竭。本文报道了 1 例曲妥珠单抗治疗乳腺癌所致 LVEF 下降的案例，供临床参考。

1　病例摘要

1.1　基本信息

患者，女，45 岁，土家族，2020 年 10 月 21 日因右乳头反复破溃伴结痂 2 月余，B 超发现右乳肿块半月余入院（湘西土家族苗族自治州人民医院乳甲外科）。既往体健，否认高血压、糖尿病史。原发肿块位于右乳 8 点距乳头约 3 cm 位置，可扪及约 3 cm×2.0 cm 肿块，质硬韧，形态欠规则，边界欠清楚，活动度差。行右乳肿块巴德针穿刺活检术，病理结果示：右乳浸润性癌。穿刺石蜡结果：（右乳）浸润性导管癌Ⅱ级。免疫组化（IHC）：ER（90% ＋）、PR（80% ＋）、AR（40% ＋）、CerbB-2（＋＋＋）、KI-67（30% ＋）、P63（－）、P120（＋）、E-CAD（＋）、EGFR（－）、NM23（＋），有明确手术指征。遂于 2020 年 10 月 28 日行右乳癌改良根治术。据体查及术后病检结果，患者为未绝经女性，乳腺癌中高危组（pT2NOMO，ⅡA 期），右乳浸润性导管癌，激素受体阳性，拟行 AC 序贯 PH（吡柔比星 100 mg、环磷酰胺 1000 mg 4 周期后序贯紫杉醇 270 mg 及曲妥珠单抗）化疗后予乳腺癌卵巢功能抑制（OFS）＋托瑞米芬辅助内分泌治疗 5 ～ 10 年。2020 年 11 月 27 日至 2021 年 3 月 19 日期间进行 6 周期化疗，化疗期间予以对症支持处理，一般情况尚可，无明显特殊不适。患者于 2021 年 4 月 8 日患者再次入院，拟行第 7 周期化疗。入院后查心功能提示肌酸激酶同工酶（CK-MB）增高，心电图提示频发性室性早搏，心脏超声提示左室轻大，左室壁运动幅度减弱，二、三尖瓣及主动脉瓣少量反流，LVEF 减少至 49%，见图 1A、B，考虑曲妥珠单抗所致，建议停用。各项检查示无明显化疗禁忌，于 4 月 11 日行 AC 序贯 P 方案化疗（吡柔比星 100 mg、环磷酰胺 1000 mg 4 周期后序贯紫杉醇 270 mg），同时予以口服氟伐他汀钠胶囊、富马酸比索洛尔片、阿司匹林肠溶片预防心血管疾病发生。患者于 5 月 7 日行 AC 序贯 P 第 8 周期化疗。复查超声示 LVEF 为 62%，考虑心功能基本恢复正常（见图 1C、D）。根据指南于 5 月 9 日再次予以曲妥珠单抗靶向治疗，6 月 2 日复查超声心动图示：心内结构及功能未见异常，LVEF 为 68%（见图 1E、F），后未随访，情况不明。

1.2　病例分析

患者既往体健，体格检查及心电图未见异常，基线 LVEF 为 69%，在化疗近 5 个月后 LVEF 下降至 49%，相对基线下降近 20%，考虑患者此时使用药物的风险大于获益，暂停使用曲妥珠单抗。1 个月后重复评估 LVEF 为 62%，表明患者心脏功能好转，可以在密切监测下继续使用曲妥珠单抗靶向治疗。患者使用曲妥珠单抗前接受了 4 周期 AC 方案，AC 方案化疗结束后，心功能评价未见异常。序贯使用曲妥珠单抗以及紫杉醇后 2 周期出现无症状的 LVEF 下降，考虑到紫杉醇对心脏的损伤表现为心动过缓、心脏传导阻滞和心律失

基金项目：国家自然科学基金（No. 81973406，No.81703518）。
作者简介：阳媛颖，女，硕士研究生，主要从事肿瘤心脏病学研究，email：yyy0629@163.com　*通信作者：李文群，男，博士，主管药师，硕士研究生导师，主要从事肿瘤心脏病学研究，email：liwq1204@csu.edu.cn；张毕奎，男，博士，主任药师，博士研究生导师，主要从事肿瘤心脏病学研究，email：505995@csu.edu.cn

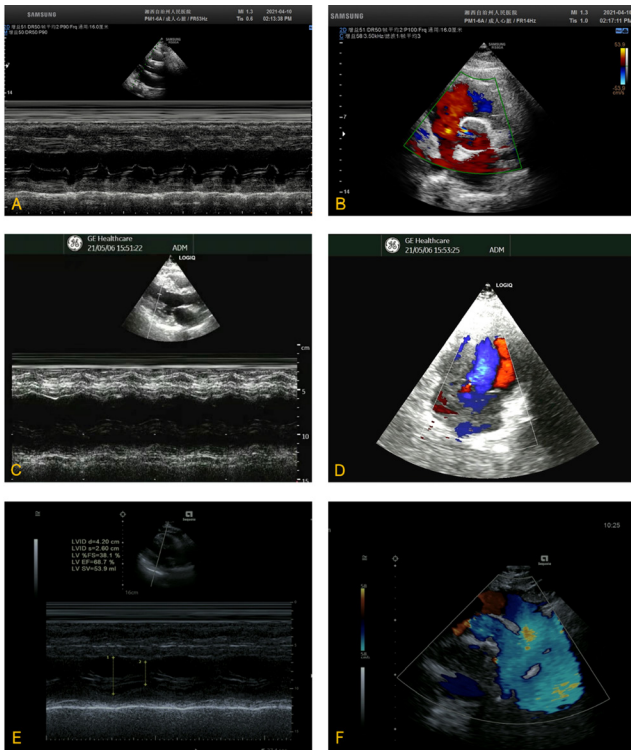


图 1 1 例曲妥珠单抗治疗乳腺癌致左心室功能不全患者心脏彩超图
A，B. 4 月 8 日；C，D. 5 月 7 日；E，F. 6 月 2 日

常，发生率低，而曲妥珠单抗的心脏毒性临床表现中以无症状 LVEF 下降常见，根据经验先停用曲妥珠单抗，继续使用紫杉醇治疗。单独使用紫杉醇化疗一周期后发现患者心脏功能好转，心脏损伤未进一步加重，提示患者出现的心脏毒性与曲妥珠单抗关系更加密切。参考国家药品不良反应监测中心不良反应因果关系判断的基本原则（见表 1）[1]：① 无症状 LVEF 下降与曲妥珠单抗有合理的时序关系；② 无症状 LVEF 下降是曲妥珠单抗已知的不良反应类型；③ 不能用其他原因解释；④ 停用曲妥珠单抗后，不良反应症状消失；⑤ 重复用药反应是否再现情况不明。综合评估后，认为患者出现心脏毒性很可能与曲妥珠单抗有关。

2 讨论

研究显示，单独使用曲妥珠单抗进行化疗，HER2 阳性早期乳腺癌患者心功能障碍的发生率为 2% ～ 7%，而与紫杉醇联合使用时心脏毒性的发生率上升至 13%[2]。曲妥珠单抗诱发心脏毒性一般出现在用药 4 ～ 5 个月后，而本患者两周期治疗后即出现 LVEF 明显下降，推测可能与紫杉醇联合使用有关。曲妥珠单抗诱发心脏毒性的危险因素包括年龄（＞ 60 岁）、曾使用或同时使用蒽环类化疗药物、冠心病、高血压、糖尿病、基线 LVEF 较低以及肥胖，其中既往接触蒽环类药物是最重要的危险因素 [3]。对于上述危险因素除使用心电图、超声心动图监测心功能变化外，也可通过检测心脏损伤生物标志物来判断是否发生心脏毒性。已有研究表明服用曲妥珠单抗后肌钙蛋白（cTnT、cTnI）和 B 型脑利钠肽前体（NT-Pro-BNP）升高可以识别出心脏毒性发生风险更高以及心功能难以恢复的患者 [4]，为临床曲妥珠单抗治疗期间 LVEF 下降的早期迹象指标。不同于蒽环类药物介导的心肌损伤与累积剂量有关且大多不可逆转 [5]，曲妥珠单抗诱发的心脏毒性呈非剂量依赖性并且可以逆转。因此，一旦出现心脏毒性，及时进行剂量调整或暂停用药，给予护心治疗，可以使曲妥珠单抗安全应用于临床。

表 1 国家药品不良反应监测中心不良反应因果关系判断原则

内容	因果关系等级				
	肯定有关	很可能有关	可能有关	可疑	无关
反应在用药后，是否符合合理时间顺序	是	是	是	是	是
是否符合已知的不良反应类型	是	是	是	否	情况不明
非药物其他原因是否可以解释	否	否	难以判定	难以判定	情况不明
减量或停药后不良反应是否转归	是	是	难以判定	难以判定	情况不明
重复用药反应是否再现	是	情况不明	情况不明	情况不明	否

参考文献

[1] 杜文民，王永铭，程能能 . 药品不良反应的判定与其研究方法（续完）[J]. 中国药物警戒，2005（1）：11-13，28.

[2] Slamon DJ，Leyland-Jones B，Shak S，et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 [J]. N Engl J Med，2001，344（11）：783-792.

[3] Dempsey N，Rosenthal A，Dabas N，et al. Trastuzumab-induced cardiotoxicity：a review of clinical risk factors，pharmacologic prevention，and cardiotoxicity of other HER2-directed therapies [J]. Breast Cancer Res Treat，2021，188（1）：21-36.

[4] 王雪清 . 蒽环类药物与曲妥珠单抗对乳腺癌 HER-2 阳性患者心脏毒性的分析研究 [D]. 呼和浩特：内蒙古医科大学，2020.

[5] 孙一琦，李新刚，沈素 . 以多柔比星为基础的化学药物治疗致心脏毒性相关危险因素研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（3）：500-506.

（收稿日期：2021-07-05；修回日期：2021-09-08）