◆ 中国科技核心期刊
◆ 美国CA、波兰IC收录期刊
◆ 中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊
◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊

ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2022年8月 第20卷 第8期
Volume 20 Number 8 August 2022

CENTRAL
SOUTH
PHARMACY

◆ 中成药处方审核的证据与标准专题
◆ CRE感染不良结局的危险因素及药物治疗评价专题
◆ 人源化实验动物模型在生物医药领域的应用及质量控制
◆ 微囊泡在肿瘤中的研究进展

8
2022

ISSN 1672-2981
08>
9 771672 298224

中南药学 第二十卷 第八期 第1713~1962页 二〇二二年八月

中国科技核心期刊

（中国科技论文统计源期刊）

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所
Institute of Scientific and Technical Information of China
北京复兴路 15 号 100038　　www.istic.ac.cn

2021年12月

证书编号：2020-G599-2463
有效期至：2022年12月

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 8 期（总第 199 期）　2022 年 8 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

E-mail：znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证：4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2022 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

中成药处方审核的证据与标准专题

（1713）中成药处方审核的证据体系与通用规则构建研究 …… 金锐，郭红叶，韩仙鸽，等

（1720）感冒类中成药处方审核技术要点 …… 金锐，郭红叶，田佳鑫，等

CRE 感染不良结局的危险因素及药物治疗评价专题

（1727）碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染后死亡的风险因素研究 …… 陈敬兰，李胜兰，刘韶，等

（1736）头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗革兰氏阴性菌感染的 meta 分析 …… 胡琴，唐博文，刘韶，等

实验动物与生物医药专题

（1743）湖南省实验动物资源支撑生物医药科技创新与产业发展调研报告（2022 年）…… 黄丽，曾颖，常伟

（1747）人源化实验动物模型在生物医药领域的应用及质量控制 …… 张妙红，曾贵荣，姜德建

中药新剂型与新技术专题

（1751）麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱及抗氧化活性研究 …… 张胜娜，周衡朴，刘英杰，等

（1757）微囊泡在肿瘤中的研究进展…… 谢舟颖，袁一超，熊友香，等

研究论文

（1765）高良姜素过饱和自纳米乳的制备及质量评价 …… 方杰，李颜伶，秦铭，等

（1773）金银花化学成分及抗菌消炎活性研究 …… 肖蕾，包正雪，郁阳，等

（1781）窄治疗指数药物利伐沙班片在中国健康受试者中的生物等效性研究 …… 王铸辉，阳晓燕，张行飞，等

（1786）含氨基酸或小肽的阳离子抗菌药物…… 王艳，吴条，唐美，等

（1793）头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响 …… 王玲，袁丽，郑林，等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编（按姓氏笔画排列）

王　玉　向大雄　刘　韶　刘芳群
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　珊　王立辉　王永军　王淑梅
王朝辉　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　韶　刘芳群
刘茂柏　刘建平　刘高峰　刘塔斯
刘雁鸣　汤海峰　孙　进　孙平华
孙国祥　孙铁民　劳海燕　苏薇薇
李　昕　李　勇　李文龙　李文莉
李顺祥　李晓宇　李健和　李湘平
杨志平　杨星钢　杨献文　肖　雪
肖贵南　何江江　何鸽飞　余自成
谷福根　张　俐　张　峻　张毕奎
张洪文　陈　力　陈　琦　陈　碧
陈卫东　陈西敬　陈勇川　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　珽　徐　萍　徐必学
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
睢大贇　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（1799）基于电子舌技术与人工口尝评价相结合的银杏叶提取物掩味技术研究 …… 薛婉莹，李红鑫，吴婧楠，等

（1803）1- 脱氧野尻霉素对高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的血糖和内质网应激通路的影响 …… 周碧兰，彭电，曾慧，等

（1810）塞来昔布胶囊体内外相关性的研究 …… 丁强，金波，管志美，等

（1815）檍木叶中黄酮类化合物的分离和鉴定 …… 黎冠兰，王知斌，吴林武，等

（1820）五步蛇蛇毒对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响研究 …… 曾晓艳，林雅丽，刘应蛟，等

（1824）基于拉曼光谱的中药甘味辨识方法研究 …… 沙晗，刘淑明，王慧，等

（1829）琥珀酸在哌柏西利片中的应用研究…… 钱进，霍立茹，张倩倩

（1834）超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法评价白芍 - 甘草对抑郁大鼠大脑皮层中神经递质含量的影响 … 杜晖，杨会鸽，刘鹏鸣，等

（1839）50 型硬脂酸功能性相关指标的考察 …… 谢莹莹，刘雁鸣，郑金凤，等

（1844）过氧化碳酰胺合成工艺的优化 …… 林新文，唐闪光，朱光冕，等

综述

（1850）TRPV4 在心血管疾病治疗中的研究进展 …… 邵俊兰，焦小雨，唐春雷

（1856）阿美替尼在表皮生长因子受体突变阳性非小细胞肺癌中的应用 …… 侯举，孙吉，邓轩宇，等

（1861）化疗药物引发肿瘤转移的现象及机制探讨 …… 李乐，吴启鹏，江振洲

（1867）免疫检查点抑制剂抗肿瘤作用的因素影响研究进展 …… 曾峥，罗丹玲，钟明利，等

（1875）胰腺癌的药物再利用…… 骆鸿仪，江经纬

（1882）开心散化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 …… 孙东杰，贺梦媛，薛晴，等

药物分析与检验

（1890）高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学方法评价瑶药材网络鸡血藤根的质量 …… 严赟，郭雯雯，林小娟，等

（1895）藏药材唐古特铁线莲质量标准提升 …… 万玉莹，陈晓奇，王喜锟，等

（1902）高效液相色谱法测定尿素的有关物质 …… 李颖，谢莹莹，郑金凤，等

青年编委（按姓氏笔画排列）

丁　骁　于世慧　王　刚　王　洪
王春江　方伟进　孔维军　朱志红
刘　宏　刘丽华　刘宏飞　刘剑敏
刘梦扬　孙　逸　孙万阳　孙丙军
孙晓慧　苏　丹　杜恩明　李　娟
李语玲　李新刚　肖朝江　吴成军
邱玉玲　何　艳　邹振兴　张　凭
张妙红　张纯刚　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　硕　徐文峰　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。

（1907）ICP-AES 法测定功效型牙膏中多种元素的含量
…… 吴莉，张再平，方方，等

（1911）超高效液相色谱 - 串联质谱法测定柴胡中 4 种成分的含量
…… 郭宇鸽，柏玉冰，李洪权，等

（1916）GC-MS/MS 法测定不同级别乳酸中残留溶剂的含量
…… 张悦，赵勇，郑金凤，等

（1919）高效液相色谱法同时测定华北獐牙菜中 5 种有效成分的含量
…… 刘学良，刘安平，李维业，等

药物与临床

（1923）西罗莫司四联免疫抑制治疗方案在肾移植术后初期的疗效及不良反应研究 …… 钱卿，范敏，薛冬，等

药事管理

（1928）患者自主报告医疗机构制剂疗效与不良反应系统的设计思路与初步实践 …… 钟露苗，曾令贵

（1933）新型药学服务模式下医院药学教学培养体系建设初探
…… 夏天一，陈孟莉

（1937）药用辅料监管法规、质量标准现状分析及应对措施
…… 王贺，钱利武，阚红卫

（1941）抗肿瘤药物临床试验方案违背的现状及预防策略
…… 唐琪，谭英红，衡建福，等

（1946）儿科 24 小时静脉用药集中调配管理体系的构建与探讨
…… 蒋志平，彭骞，罗芳梅，等

临床药师在临床

（1950）1 例进展性脑梗死患者抗血小板药物个体化用药方案分析
…… 阳巍，黄海花，范秀珍

药品不良反应

（1953）卡培他滨致皮肤色素沉着伴黑素细胞痣 1 例并文献复习
…… 管玉瑶，邹文

（1955）帕博利珠单抗致免疫性肝损伤…… 孙丽丹，嵇书霞，张丹，等

（1958）长时间停用奥沙利铂再次使用致过敏性休克 1 例
…… 吴玉佩，张丽娜，尹岳松

（1960）尼达尼布致 1 例严重全身皮肤损害的病例分析及文献报告
…… 谈心

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*254*zh*P*25.0*47*2022-8

本期责任编辑：邬志娟，陆窈窈，彭金飞，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 8 August 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

(1714) Evidence system and general rule construction for Chinese patent medicine prescription review ····· *JIN Rui, GUO Hong-ye, HAN Xian-ge, et al*

(1721) Key technical points of prescription review of Chinese patent medicine for cold treatment ····· *JIN Rui, GUO Hong-ye, TIAN Jia-xing, et al*

(1728) Mortality-related risk factors after carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection ····· *CHEN Jing-lan, LI Sheng-lan, LIU Shao, et al*

(1737) Meta-analysis of randomized controlled trials of ceftolozane-tazobactam for gram-negative bacteria infections ····· *HU Qin, TANG Bo-wen, LIU Shao, et al*

(1747) Application and quality control of humanized experimental animal models in the biomedical field ····· *ZHANG Miao-hong, ZENG Gui-rong, JIANG De-jian*

(1752) Fingerprint and antioxidant activity of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction ····· *ZHANG Sheng-na, ZHOU Heng-pu, LIU Ying-jie, et al*

(1757) Research progress of microvesicle in tumor ····· *XIE Zhou-ying, YUAN Yi-chao, XIONG You-xiang, et al*

(1765) Preparation and quality evaluation of galangin supersaturating self-nanoemulsifier ····· *FANG Jie, LI Yan-ling, QIN Ming, et al*

(1773) Chemical constituents from Lonicerae japonicae flos and their antibacterial and anti-inflammation activity in vitro ····· *XIAO Lei, BAO Zheng-xue, YU Yang, et al*

(1781) Bioequivalence of narrow therapeutic index drug rivaroxaban tablets in Chinese healthy volunteers ····· *WANG Zhu-hui, YANG Xiao-yan, ZHANG Xing-fei, et al*

(1786) Cationic antimicrobial agents containing amino acids or small peptides ····· *WANG Yan, WU Tiao, TANG Mei, et al*

(1793) Effect of *Polygonum capitatum* extract on plasma protein binding rate of levofloxacin ····· *WANG Ling, YUAN Li, ZHENG Lin, 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.

(1799) Taste masking of Ginkgo biloba leaf extract based on the combination of electronic tongue technology and artificial oral tasting evaluation ····· *XUE Wan-ying, LI Hong-xin, WU Jing-nan, et al*

(1804) Effect of 1-deoxynojirimycin on blood glucose and endoplasmic reticulum stress pathways in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic mice ····· *ZHOU Bi-lan, PENG Dian, ZENG Hui, et al*

(1810) In vivo and in vitro correlation of celecoxib capsules ····· *DING Qiang, JIN Bo, GUAN Zhi-mei, et al*

(1815) Isolation and identification of flavonoids from the leaves of *Aralia elata* ····· *LI Guan-lan, WANG Zhi-bin, WU Lin-wu, et al*

(1820) Effect of agkistrodon acutus venom on RAW264.7 macrophages inflammatory response induced by lipopolysaccharide ····· *ZENG Xiao-yan, LIN Ya-li, LIU Ying-jiao, et al*

(1825) Identification of sweetness in traditonal Chinese medicine based on Raman spectroscopy ····· *SHA Han, LIU Shu-ming, WANG Hui, et al*

(1829) Application of succinic acid in piperacillin tablets ····· *QIAN Jin, HUO Li-ru, ZHANG Qian-qian*

(1834) Effect of the herb pair Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on the content of neurotransmitters in the cerebral cortex of depressed rats by UPLC-MS/MS ····· *DU Hui, YANG Hui-ge, LIU Peng-ming, et al*

(1839) Functionality related characteristics of stearic acid type 50 ····· *XIE Ying-ying, LIU Yan-ming, ZHENG Jin-feng, et al*

(1844) Optimization of the synthesis process of urea peroxide ····· *LIN Xin-wen, TANG Shan-guang, ZHU Guang-mian, et al*

(1850) Research progress of TRPV4 in the treatment of cardiovascular diseases ····· *SHAO Jun-lan, JIAO Xiao-yu, TANG Chun-lei*

(1856) Application of aumolertinib for epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer ····· *HOU Ju, SUN Ji, DENG Xuan-yu, et al*

(1861) Tumor metastasis induced by chemotherapeutic drugs and mechanism ····· *LI Le, WU Qi-peng, JIANG Zhen-zhou*

(1867) Factors affecting the antitumor function of immune checkpoint inhibitors ····· *ZENG Zheng, LUO Dan-ling, ZHONG Ming-li, et al*

(1875) Drug repurposing in pancreatic cancer ····· *LUO Hong-yi, JIANG Jing-wei*

(1882) Chemical constituents, pharmacological effect and clinical application of Kaixin powder and prediction of quality-markers ····· *SUN Dong-jie, HE Meng-yuan, XUE Qing, et al*

(1890) **Quality evaluation of Yao medicine *Millettia reticulata* radix with HPLC fingerprint coupled with chemometrics**
····· *YAN Yun, GUO Wen-wen, LIN Xiao-juan, et al*

(1895) **Quality standard of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.**
····· *WAN Yu-ying, CHEN Xiao-qi, WANG Xi-kun, et al*

(1902) **Determination of related substances in the urea by HPLC**
····· *LI Ying, XIE Ying-ying, ZHENG Jin-feng, et al*

(1907) **Determination of multiple elements in efficacy toothpaste by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer**
····· *WU Li, ZHANG Zai-ping, FANG Fang, et al*

(1911) **Simultaneous determination of 4 components in *Bupleurum chinense* DC. by UPLC-MS/MS**
····· *GUO Yu-ge, BAI Yu-bing, LI Hong-quan, et al*

(1916) **Determination of residual solvents in different grades of lactic acid by GC-MS/MS method**
····· *ZHANG Yue, ZHAO Yong, ZHENG Jin-feng, et al*

(1920) **Simultaneous determination of five active ingredients in *Swertia wolfangiana* Grun. by HPLC** ····· *LIU Xue-liang, LIU An-ping, LI Wei-ye, et al*

(1923) **Efficacy and adverse reactions of quadruple immunosuppressive therapy with sirolimus in the first 3 months after kidney transplantation**
····· *QIAN Qing, FAN Min, XUE Dong, et al*

(1928) **Design and patient's spontaneous reporting of efficacy and adverse drug reactions of hospital preparations**
····· *ZHONG Lu-miao, ZENG Ling-gui*

(1933) **Training and teaching of hospital pharmacy program under new model of pharmacy service** ····· *XIA Tian-yi, CHEN Meng-li*

(1937) **Current situation and countermeasures of regulations and quality standards for pharmaceutical excipients**
····· *WANG He, QIAN Li-wu, KAN Hong-wei*

(1941) **Current situation and prevention strategies of protocol deviation in antitumor drug clinical trials**
····· *TANG Qi, TAN Ying-hong, HENG Jian-fu, et al*

(1946) **Construction of 24 h pharmacy intravenous admixture service management system for pediatric patients**
····· *JIANG Zhi-ping, PENG Qian, LUO Fang-mei, et al*

中成药处方审核的证据与标准专题

【编者按】

中成药处方审核是医院药学工作的重要组成，但长期以来，中成药处方审核点评的证据不健全、标准不清晰，影响了其深入发展。与西药的临床评价不同，中成药的临床使用应遵循以中医药理论、人用经验和临床试验“三结合”的证据评价特点，形成符合中医药特点的审核点评标准。本专题开展研究，通过理论梳理和实践总结，构建了“八合一”的中成药处方审核知识储备和证据体系，形成了中成药适应证审核、药品遴选审核、联合用药审核和用法用量审核的通用规则，并配有大量具体案例的示范解读，举一反三，融会贯通，以期让药学工作者对中成药审方的全局有一定的认识，对重复用药界定、适应证范围划定等难点问题有可操作的解决方案。

【特邀专家简介】

金锐，男，中药学博士，中国中医科学院西苑医院药学部副主任药师，临床中药师，信息药师。具有中西药联合培养教育背景，中华中医药学会医院药学专业委员会青年委员、中国科协科普专家、《中南药学》青年编委。主要从事中药临床药学和中医药基本理论的研究，主持省部级课题 1 项，市级课题 2 项，以第一作者发表学术文章 50 余篇，SIC 收录 1 篇，主笔专家共识 4 个，主编学术专著 2 部和科普专著 3 部。率先在国内开展中药处方合理性评价标准的探索研究，形成了系列成果；率先在国内开展“汤液经法图”的科学研究，阐明了中医组方配伍的五味补泻原理。运营公众号“小金药师说药事”，原创科普文章 700 余篇，2019 年人民日报社获选“荣耀医者”科普影响力十大人物。

中成药处方审核的证据体系与通用规则构建研究

金锐，郭红叶，韩仙鸽，王文青，李培红*（中国中医科学院西苑医院，北京　100091）

摘要：目的　建立中成药处方审核的证据体系，确定中成药的审方原则和通用规则，为中成药审方工作的标准化和规范化发展提供支持。**方法**　在 2018 年中成药处方点评专家共识的基础上，结合审方工作实践，归纳提炼用于中成药处方审核的证据源。基于常用中成药和常见不合理处方范例，确定中成药审方的原则和通用规则。**结果**　构建完成了“八合一”的中成药审方知识储备和证据体系，包括中医药基本理论、药品说明书及其修订内容、《中国药典》、国家行政主管部门颁布的指导原则和合理用药警示信息、中医指南和专家共识、临床案例、现代科学角度的非临床研究成果、网络媒体的相关信息。依据上述证据体系，形成了中成药处方适应证审核、药品遴选审核、联合用药审核和用法用量审核的原则和通用规则库，并且以 38 个常用中成药的 54 项审核内容为例进行了解读与示范。**结论**　建成了综合性、标准化的中成药处方审核证据体系和通用规则库，为该项工作的规范发展提供参考。

关键词：中成药；处方审核；证据体系；审核规则；中医药理论
中图分类号：R288，R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1713-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.001

基金项目：首都卫生发展科研专项（No. 首发 2020-2-2081）。
作者简介：金锐，男，博士，副主任药师，主要从事中药临床药学和中医药基本理论研究，email：jinrui9862@126.com　*通信作者：李培红，女，硕士，主任药师，主要从事中药药事管理与中药临床药学工作，email：lipeihong_xy@126.com

Evidence system and general rule construction for Chinese patent medicine prescription review

JIN Rui, GUO Hong-ye, HAN Xian-ge, WANG Wen-qing, LI Pei-hong* (*Xiyuan Hospital*, *Chinese Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100091)

Abstract: Objective To establish the evidence system for the review of Chinese patent medicine prescriptions, determine the principles and general rules of Chinese patent medicine prescription review, and provide support for the standardization of Chinese patent medicine prescription review. **Methods** Based on the consensus on the review of Chinese patent medicine prescriptions in 2018, combined with the work practice of the reviewer, the evidence sources for the review of Chinese patent medicine prescriptions were summarized and refined. Based on the examples of common Chinese patent medicines and common irrational prescriptions, the key principles for the review of prescriptions of Chinese patent medicine were established. **Results** An "eight in one" knowledge reserve and evidence system for the prescription review of Chinese patent medicine was constructed, including the basic theory of traditional Chinese medicine, drug instructions and their revised contents, Chinese Pharmacopoeia, guiding principles and rational drug use warning information issued by the state administrative department, traditional Chinese medicine guidelines and expert consensus, clinical cases, non clinical research results from the perspective of modern science, and related information of online media. According to the above evidence system, the key principles of prescription indication review, drug selection review, combined drug review, and usage and dosage review of Chinese patent drugs were formed, which were interpreted and demonstrated by taking 54 review items of 38 commonly used Chinese patent drugs as examples. **Conclusion** A comprehensive and standardized evidence system and general rule base for prescriptions of Chinese patent medicine have been established, which can provide a reference for the standardized review of Chinese patent medicine prescriptions.

Key words: Chinese patent medicine; prescription review; evidence system; review rule construction; theory of traditional Chinese medicine

处方审核是医疗机构药师的基本职责之一，药师通过对药物治疗方案的药学审核和药学评估，促进合理用药。开展处方审核的必要条件之一，就是建立处方审核的证据体系，构建处方审核的规则集。从知识储备角度看，药品说明书和疾病诊疗的循证指南，应该是药品处方审核的主要证据。但是，由于中成药说明书存在诸多"尚不明确"之处，而中医疾病诊疗指南关于中成药的内容也大多以简要例举为主，所以，目前各医疗机构开展中成药处方审核的主观性较强，总体上缺少符合中医药特点的客观化和标准化的内容[1-3]。本文在北京地区前期的两个中成药处方点评专家共识[4-5]基础上，提出中成药处方审核的证据体系，梳理构建中成药审方规则的方法学，为规范中成药处方审核提供参考。

1 中成药处方审核的知识储备和证据体系

无论是窗口审核还是前置审核，处方审核的临床价值与审方规则的证据体系息息相关。准确、丰富的知识储备和审方规则，有助于审方药师或审方系统识别出有临床意义的不合理处方，并给出合理方案。考虑到中成药说明书存在不完善之处，且中医疾病诊疗指南对于中成药的描述也相对简单，故中成药处方审核工作的重中之重，应该是建立相应的知识储备和证据体系，构建相关的审方规则。

根据《北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）》第 6 条陈述的内容，"中成药处方点评的依据包括直接资料和间接资料，两者相互印证，综合而成最终判准。直接资料包括但不限于药品说明书、《中国药典》《中成药临床应用指导原则》、卫生行政主管部门颁布的诊疗指南和国家药品监督管理局定期发布的合理用药通报。间接资料包括但不限于中医医案、临床文献、相关指南和专家共识[6]，结合前期的处方审核工作经验，本文也将中成药处方审核的证据体系分为直接资料和间接资料两部分。其中，直接

资料包括中医药基本理论、药品说明书及其修订内容、《中国药典》以及国家卫生健康委员会、国家药品监督管理局和国家中医药管理局颁布的法律法规和指导原则等。间接资料包括中医指南和专家共识、临床案例、现代科学角度的非临床研究成果、网络媒体报道等。

1.1 中医药基本理论

中医药基本理论是中成药合理使用的指导性理论，也是中成药处方合理性评价的最高判准，包括阴阳五行、六淫七情、脏腑气血、四气五味、君臣佐使等中医辨证论治理论和中药药性理论。采用传统中药药性和组方配伍理论，可以认识中成药的性效特点，明确其临床功效[7]。采用传统八纲辨证理论，可以分析中成药的适应证，明确适用人群和不适用人群的临床特点。同时，对于以经典名方为底方的中成药，可以通过对其方剂来源和演变的分析，为处方用药是否符合传统治疗思路提供参考。

例如，六味地黄丸是钱乙在张仲景八味肾气丸的基础上，减去辛热药附子与肉桂而成，故其功效特点是补肾滋阴，而不是补肾气。凡是符合肾阴虚证表现的疾病状态，无论是腰痛、小便不利、糖尿病，还是小儿遗尿，均可采用六味地黄丸治疗。同时，以肾气虚证表现为主的、以肾阳虚证表现为主的疾病状态，不适合选用六味地黄丸作为治疗药物。所以，处方开具六味地黄丸时，诊断仅有“腰痛”或“糖尿病”或“肾阳虚”或“肾气虚”时，均为适应证不适宜。而给诊断为“遗尿，肾阴虚证”的 6 岁患儿开具六味地黄丸，并根据小儿年龄进行减量之后，可视为合理处方。

1.2 药品说明书及其修订内容

药品说明书是药品临床使用的法律依据之一，应当在处方审核中予以重视。目前大部分中成药的说明书，能够准确表述药品的适应证、用法用量和注意事项信息，但在不良反应、禁忌证和联合用药信息上存在一定程度缺失[8]。中成药说明书【功能主治】项下的证型信息，以及注意事项中关于不适用人群的信息，是中成药处方适应证审核的直接依据。中成药说明书的【用法用量】信息，是中成药处方用法用量审核的直接依据。同时，国家药品监督管理局会定期对中成药品种进行说明书修订，更新药品的不良反应和禁忌证信息。

例如，连花清瘟胶囊的说明书明确提示“不宜在服药期间同时服用滋补性中药”“风寒感冒者不适用”。所以，在处方审核时，连花清瘟胶囊与任何以熟地黄、阿胶、黄精为君臣药，以滋阴补肾为主要功效的中成药联用时，均应视为联合用药不适宜。同时，诊断为“风寒感冒”或者未明确感冒证型但开具了连花清瘟胶囊的中成药处方，均可视为适应证不适宜。

1.3 《中国药典》

《中国药典》一部规定了常用中药饮片的基原、性状、鉴别、炮制、功能与主治、用法与用量、贮藏等信息，也记载了常用中成药的处方、制法、鉴别、含量测定、功能与主治、用法与用量等信息。其中，对于部分中药饮片和中成药，标注了相应的【注意】，提示特殊人群禁用或慎用。上述提示信息对于含有此类饮片中成药临床应用的不适用人群提供参考依据。

例如，根据《中国药典》记载，毒性中药苦楝皮的【注意】内容为“孕妇及肝肾功能不全者慎用”[9]。所以，含有苦楝皮的中成药，例如祛瘀散结胶囊、健儿疳积散等，无论说明书是否标注相关信息，用于肝肾功能损伤的患者时，应视为药品遴选不适宜。

1.4 国家卫生健康委员会、国家药品监督管理局和国家中医药管理局颁布的指导原则和合理用药警示信息

2010 年国家中医药管理局发布的《中药处方格式及书写规范》《中成药临床应用指导原则》，2018 年国家卫生健康委员会发布的《医疗机构处方审核规范》，以及国家药品监督管理局定期发布的合理用药警示信息等，均可作为中成药处方审核的直接依据，形成规范性审核和适宜性审核的规则。

例如，2014 年，国家药品监督管理局发布了《关注口服何首乌及其成方制剂引起的肝损伤风险》，明确提示超剂量、长期连续用药会增加何首乌的肝损伤风险[10]。因此，处方以何首乌为君臣药的中成药，应严格遵照用法用量使用，并根据不同的适应证严格管控用药时长：对于急性病证单次用药时长超过 7 d 的处方，慢性病证单次用药时长超过 4 周的处方，均可应视为超疗程用药。

1.5 中医指南和专家共识

各类疾病的中医诊疗指南和中西医结合诊疗指南，都会涉及对疾病不同证型的标准诊断与治疗，也会推荐各个证型治疗用的中药饮片复方和中成药。这些疾病诊疗指南和专家共识，可为相关中成药的适应证审核提供参考依据。

例如，根据《血脂异常中西医结合诊疗专家共识》，银杏叶片可用于高脂血症气虚血瘀型患者的治疗（推荐强度：强；证据级别：低）[11]。所以，对于诊断为“高脂血症，气虚血瘀型”并

且开具了银杏叶片的中成药处方，可不认定为适应证不适宜。

1.6 临床案例

临床上存在一些因中成药不合理使用而造成的药害案例，包括过量服用含毒性饮片中成药而造成的急性毒性问题，以及长期不对症服用中药而造成的慢性损害问题等。在符合中医药理论认识的前提下，这些临床案例可作为中成药处方审核的参考依据。

例如，基于临床案例的流行病学研究已经证实，长期服用含有蒽醌类成分的大黄、番泻叶或决明子帮助排便，会增加出现结肠黑变病的风险，导致药源性疾病[12]。从中医角度看，这就是长期不对症用药造成的药害事件，上述中药药性寒凉，仅适用于实热型便秘，不适用于虚证便秘。因此，在进行 65 岁以上老年患者的便秘治疗处方的审核时，如果缺失中医诊断而开具含有大黄、番泻叶的通便中成药（例如麻仁润肠丸、牛黄解毒片、当归龙荟丸），或者超长疗程开具上述中成药，均应视为不合理处方。

1.7 现代科学角度的非临床研究成果

采用现代科学的研究手段，可以从植物学科属种的角度确定中药的基原，从化学成分或成分群角度认识中药起效的物质基础，从靶点受体或分子生物学角度理解中药的药理作用。这些现代科学的研究成果有助于理解中药的性效特点，也可以从全新的角度，为中成药处方审核提供参考依据。

例如，在中药肝损伤研究领域，明确发现含有吡咯烷类生物碱的中药，例如菊科的千里光和菊三七，能够导致肝脏小静脉闭塞而出现肝损伤[13]。所以，菊三七不可以替代三七用于心脑血管疾病的治疗，而含有千里光的千柏鼻炎片、清热散结胶囊等中成药，也具有潜在的肝损伤风险。所以，为肝功能不全的患者开具含有千里光的上述中成药，应视为药品遴选不适宜。

1.8 网络媒体的相关信息

在网络媒体的报道中，常会有一些中成药不合理使用造成的药害案例，或者关于某一个中成药的热点话题，或者国内外患者群体对于中成药使用的真实反馈等。在遵循中医药基本理论的基础上，在严谨、客观的分析讨论之后，很多媒体报道的案例或话题内容也可以作为中成药处方审核的参考依据，或者为中成药处方审核工作提供参考意见。

例如，网络媒体曾经报道一则药害事件“27 岁的研究生从入院到去世仅 7 d”，还原了一个因为过量服用含有对乙酰氨基酚的感冒药导致肝衰竭的真实案例[14]。结合很多中西药复方制剂（例如维 C 银翘片、感冒清胶囊）含有对乙酰氨基酚和氯苯那敏的情况，可围绕此话题形成专项的处方审核和用药宣教策略。将中西药复方制剂作为重点品种，在处方审核时给予重点关注和管理，包括严格适应证、严格用法用量、严格用药疗程等。

根据国务院 2019 年《关于促进中医药传承创新发展的意见》，应建立符合中医药特点的中药临床疗效评价方法，应构建中医药理论、人用经验与临床试验相结合的中药审评证据体系。本文提到的上述 8 类依据，恰好可以从不同的维度，表达和构成了这样的综合性审评证据体系（见表 1）。

表 1　中成药处方审核证据所属的范围

Tab 1　Scope of evidence for Chinese patent medicine prescription review

审核证据	中医药理论	人用经验	临床试验	非临床研究
中医药基本理论	√			
药品说明书及其修订内容	√	√	√	
《中国药典》	√			√
国家卫生健康委员会、国家药品监督管理局和国家中医药管理局发布的指导原则和合理用药警示信息	√	√	√	√
中医临床指南和专家共识	√	√	√	
临床案例		√	√	
现代科学角度的非临床研究成果				√
网络媒体的报道		√		

2 中成药处方审核通用规则的构建

在中成药临床使用的证据体系基础上，遵循安全有效的原则，可分别构建审方规则，包括适应证审核规则、药品遴选审核规则、联合用药审核规则和用法用量审核规则四部分。

2.1 适应证审核的通用规则

适应证审核是中成药处方适宜性审核的首要内容。无论是传统中成药还是现代中成药，均应以药品说明书的中医病证诊断为合理诊断形式，说明书明确标注有西医疾病名称的，应以中医病证诊断＋西医疾病诊断的形式为合理诊断[15]。例如，根据药品说明书，加味逍遥丸的合理诊断为“肝郁血虚证”，复方丹参滴丸的合理诊断为“冠心病，气滞血瘀证”。同时，根据中医诊断学、中医内科学等中医药基本理论知识，这些合理的中医诊断往往会具有一些等价概念、上位概念、下位概念和错位概念（见表 2），各医疗机构可以根据实际情况，决定是否将这些近似诊断视为合理。最后，对超出药品说明书的诊断，应纳入医院的超说明书用药管理流程，提交药事管理与药物治疗学委员会审评。

表 2　中成药合理诊断的等价概念、上位概念、下位概念和错位概念示例

Tab 2　Examples of equivalent concept，superior concept，inferior concept and dislocated concept for rational diagnosis of chinese patent medicine

中成药合理诊断	等价概念	上位概念	下位概念	错位概念
加味逍遥丸	肝郁脾虚证	肝郁气滞证	肝郁血虚＋血热证	气血两虚证
“肝郁血虚证”	肝脾不和证	血虚证	肝郁脾虚＋肾虚证	气滞血瘀证
复方丹参滴丸	胸痹＋气滞血瘀证	冠心病	冠心病＋气滞血瘀证＋气血两虚证	冠心病＋气虚证
“冠心病＋气滞血瘀证”	冠心病＋气血阻滞证	冠心病＋血瘀证	冠心病＋气滞血瘀证＋心衰＋心肾阳虚证	脑血管病＋痰瘀阻络证
连花清瘟颗粒	咳嗽＋痰热证	感冒	痰热阻肺证＋气虚证	风寒感冒
“肺热咳喘”	上呼吸道感染＋肺卫热证	咳嗽＋痰浊内阻	肺热咳嗽＋咳嗽变异性哮喘	咳嗽＋肺肾阴虚证

2.2　药品遴选审核的通用规则

药品遴选审核是针对儿童、妊娠哺乳期、老年人、肝肾功能不全患者、其他基础疾病患者等特殊人群选药合理性的审核。中成药药品遴选审核的直接参考依据，首先是药品说明书【禁忌证】和【注意事项】内容，其次是《中国药典》和中医药基本理论中关于中成药全方或组方里单味中药的安全性认识。同时，可以参考中医指南和专家共识、临床案例和现代科学角度的非临床研究成果进行辅助审核（见表 3）[16-18]。对于有相关人群治疗经验的中医师，可以按照禁用和慎用分别审核：禁用药品禁止使用；慎用药品在符合使用条件的前提下应视为合理。对于非中医背景的西医师和全科医师，禁用和慎用药品应均视为禁止使用。

表 3　中成药药品遴选审核的直接依据和辅助依据示例

Tab 3　Examples of direct and indirect evidence for selection review of Chinese patent medicine

药品＋禁 / 慎用人群	直接依据			辅助依据		
	药品说明书	《中国药典》	中医药理论	中医指南和专家共识	临床案例	非临床研究
牛黄解毒片＋妊娠期人群	孕妇禁用	雄黄“孕妇禁用”	雄黄是经典毒性中药，妊娠禁用	《骨髓增生异常综合征中西医结合诊疗专家共识》提出妊娠期禁用含砷制剂 [19]	有孕妇曾服用含雄黄“转胎药”，孩子出现六指和内耳畸形 [20]	雄黄的含药血清对小鼠细胞胚胎的生长发育有影响 [21]。雄黄灌胃给药对大鼠生育力和早期胚胎发育没有明显的毒性作用 [22]
清热散结胶囊＋肝功能异常人群	尚不明确	未提示	《全国中草药汇编》和《本草拾遗》：有小毒	《ACG 临床指南：特异质性药物诱导性肝损伤的诊断和处理》提示关注千里光和吡咯烷类生物碱的肝毒性问题 [23]	国外临床案例报道，千里光可引起严重肝损伤 [24]	千里光所含生物碱成分对体外培养的小鼠胚胎有明显的毒性作用 [25]，可导致以肝小静脉闭塞为主的肝损伤 [24]
强力枇杷露＋儿童	儿童禁用	罂粟壳“儿童禁用”	《本草纲目》：酸主收涩，故初病不可用之;《普济方》用于小儿久吐泻	《中医儿科临床诊疗指南・细菌性痢疾》中阳虚痢的推荐用药中含有罂粟壳 [26]	有小儿滥用罂粟壳中毒的临床报道 [27-28]；也有文献挖掘研究发现，小儿腹泻多个证型的治疗前 20 位中药里含有罂粟壳 [29]	罂粟壳含有阿片类生物碱，具有中枢兴奋和抑制双重作用，具有成瘾性 [30]
安脑片＋老年人（非脑梗急性期）	尚不明确	朱砂“肝肾功能不全者禁用”	其底方为安宫牛黄丸，为急危重症抢救药;《中华本草》：冰片“气血虚者忌服”，牛黄和栀子“脾虚便溏慎服”，水牛角“中虚者慎服”，朱砂“不宜久服多服”，雄黄“阴亏血虚忌服”，石膏“脾胃虚寒忌服”	《北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告》陈述 11 提示，老年人使用单纯攻邪类中成药应谨慎 [6]	有安脑片（说明书用量减半口服）用于中老年偏头痛的临床报道 [31]；有其底方安宫牛黄丸用于老年急性脑梗死的临床报道 [32]	冰片在体内可转化为有毒性的樟脑 [33]。朱砂、雄黄对肝肾功能有影响。栀子含有的京尼平具有肝毒性风险 [34]

2.3　联合用药审核的通用规则

联合用药审核主要包括重复用药审核、药性 / 药势冲突审核和配伍禁忌审核三部分。其中，重复用药审核采用多因素决策分析法，从功效描述、组方药味重复度、功效亚类、特殊组分重复情况、用法用量等属性综合判定，前期已经形成

一些量化、可操作性的判定方法[4-6，35]。药性 / 药势审核包括寒热冲突审核、虚实冲突审核和表里冲突审核。寒热冲突是指，对于单一寒证或热证，药性纯粹的寒性药和热性药不宜联用。虚实冲突是指，对于单一虚证或实证，药性纯粹的攻邪药和补虚药不宜联用。表里冲突主要是指解表药与滋补药不宜联用。配伍禁忌审核主要审查中成药成分之间是否存在十八反、十九畏的情况。同时，根据组方药味和功效特点，上述不合理联用情况可以进一步根据严重程度细分，并采取不同的处置措施[36-37]。中成药联合用药审核举例及处置见表 4。

2.4　用法用量审核的通用规则

中成药用法用量审核包括用法审核、用量审核和用药疗程审核。药品的用法以说明书用法为准，不增加安全风险的超说明书用法，可以视为合理；增加安全风险的超说明书用法，建议视为不合理[38]。用量以说明书日最大量为准，不超过说明书日最大量的用法用量，应视为合理；超过说明书日最大量的用量，可根据药品的组方药味特点和功效特点区别处置。对于不含毒性饮片的中成药，或治疗急性病证的短期用药情况下，为非特殊人群的患者开具超出日总量最大量的药物治疗方案，可不视为不合理，但日总量也不宜超过说明书最大量的 150%。疗程审核应关注单次处方用药时长和连续多次处方的用药总时长，说明书明确提示疗程的、属于急性病证治疗用药的、非临床试验发现长期用药潜在风险的中成药，均不宜长期使用[39]。中成药用法用量审核建议见表 5。

表 4　中成药联合用药审核举例及处置

Tab 4　Examples of review combinations of Chinese patent medicine

类型	A 药	B 药	不适宜原因	严重程度分级	建议处置措施
重复用药	复方丹参滴丸	速效救心丸	均含有冰片，同功效亚类	高	拒绝调配
	复方丹参滴丸	血塞通软胶囊	均含有三七，成分全包含	中	提醒＋建议调整用量
	复方丹参滴丸	丹蒌片	均含有丹参，但非君药	低	提醒
	复方丹参滴丸	银杏叶片	虽功效相同，但成分完全不同	低	可视为合理处方
药性 / 药势冲突	附子理中丸	六神丸	寒性药与热性药联用，且两者含有毒性成分	高（寒热冲突）	拒绝调配
	风寒感冒颗粒	银翘解毒软胶囊	寒性药与热性药联用	中（寒热冲突）	提醒＋建议更换药品
	感冒清热颗粒	蓝芩口服液	寒热并用型中成药与寒性药联用	低（寒热冲突）	可视为合理处方
	葛根芩连丸	泻痢固肠丸	一则用于实热泄泻，一则用于脾虚泄泻，且其中之一含有毒性成分	高（虚实冲突）	提醒＋建议更换药品
	羚羊清肺丸	苏黄止咳胶囊	一则用于痰黄咳嗽，一则用于干咳无痰	中（虚实冲突）	提醒＋建议更换药品
	板蓝根颗粒	养阴清肺口服液	一则用于实热证，一则用于虚热证	低（虚实冲突）	可视为合理处方
	连花清瘟颗粒	补肾益脑丸	解表药与滋补药联用，且两者均含有毒性成分	高（表里冲突）	提醒＋建议更换药品
	复方鲜竹沥液	复方阿胶浆	止咳祛痰药与滋补药联用，且其一含有毒性成分	中（表里冲突）	提醒＋建议更换药品
	通宣理肺丸	人参健脾丸	解表药与补气药（非滋补）联用	低（表里冲突）	可视为合理处方
十八反、十九畏配伍禁忌	藿香正气水	小活络丸	一则含有毒性成分半夏，一则含有毒性成分乌头	高	提醒＋建议调整用量
	川贝枇杷糖浆	天麻丸	一则含有非毒性成分川贝母，一则含有毒性成分附子	中	提醒
	乳癖消颗粒	六君子丸	一则含有非毒性成分海藻，一则含有非毒性成分甘草	低	可视为合理处方

注：上述联用均有正确的相应诊断，且均为足量联用。

Note：The above-mentioned combined use has correct corresponding diagnosis, which are all full dose medication.

3　讨论

中成药处方审核对于促进合理用药和药事管理的意义不言而喻，但从目前现状看，中成药处方审核的标准规则还不完善，不同医疗机构的审核内容存在缺失甚至错误。实际上，处方审核完全可以借鉴成熟的处方点评经验，将合适的点评规则前置为审核规则，以此来保证中成药处方审核的内容与深度。国内目前已经发表了若干中成药处方点评的药学共识以及各类疾病的中成药治疗的临床共识，这些内容均可作为中成药处方审核的参考依据。各医疗机构可以根据自己的实际情况，在遵循一般共识指南的前提下，建立本医疗机构的中成药处方审核规则[40-41]。但是，此类中成药审方规则的建立，务必注意以下几个原则：① 中成药处方审核规则的理论基础和证据体系，应以中医药基本理论为最高判准；② 建立分类设置和分类管理的审方体系，对不同科室、不同医师、不同药品、不同审方结果给予区别对待，抓住主要矛盾；③ 适应证审核是中成药处方审核的首要环节，应坚持基于中医病证诊断的适应证审核模式；④ 联合用药审核是中成药处

表 5　中成药用法用量审核建议

Tab 5　Suggestion for usage and dosage review of Chinese patent medicine

审核项目	药品	说明书要求	处方情况	审核建议
用法审核	藿香正气水	口服	口服	合理
			外涂或滴鼻	合理
	六一散	调服或外用	外涂	合理
			阴道用	不合理
用量审核	附子理中丸（大蜜丸）	一次 1 丸，一日 2 ～ 3 次	一次 1 丸，一日 1 次	合理
			一次 2 丸，一日 2 次	不合理
	参苓白术颗粒（6 g/ 袋）	一次 1 袋，一日 3 次	一次 1 袋，一日 2 次	合理
			一次 2 袋，一日 2 次	合理
			一次 2 袋，一日 3 次	不合理
	感冒清热颗粒（12 g/ 袋）	一次 1 袋，一日 2 次	一次 1 袋，一日 1 次	合理
			一次 1 袋，一日 3 次	合理
			一次 2 袋，一日 2 次	不合理
疗程审核	保妇康栓	7 ～ 8 d 一疗程	14 d	不合理
	强骨胶囊	3 个月一疗程	28 d	合理
	安脑片	未明确	14 d	不合理
	当归龙荟丸	未明确	28 d	不合理
	牛黄解毒片	未明确	28 d	不合理

方审核的热点和难点，应坚持基于药味药性与配伍的联合用药审核模式；⑤ 建立系统的、长期的、实用的非中医药背景医师药师的“西学中”培训计划；⑥ 药学部门应建立中成药处方点评审核专家组，由临床中药师负责全院的审核规则制订和修订工作。

参考文献

[1] 连佳，张泰，赵彤彤 . 门诊中药药学服务标准化探讨 [J]. 中国医药导报，2021，18（2）：183-186.

[2] 金锐，孙路路，鄢丹 . 中成药重复用药的现状、问题和对策（一）[J]. 中南药学，2016，14（4）：337-341.

[3] 刘佳，任昭，刘桦 . 某院前置审核系统中成药处方审核规则拓展优化 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（20）：2127-2132，2156.

[4] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）[J]. 中国医院药学杂志，2018，38（18）：1877-1887，1892.

[5] 金锐，赵奎君，郭桂明，等 . 中成药临床合理用药处方点评北京共识 [J]. 中国中药杂志，2018，43（5）：1049-1053.

[6] 王宇光，金锐 .《北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）》的解读 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1207-1209.

[7] 金锐，王宇光，张冰 . 试论完善传统中医药组方合理性评价技术在中药新药审评中的重要性 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（9）：1117-1122.

[8] 陆贝贝 . 125 份临床常用中成药说明书内容调查分析与建议 [J]. 中医药管理杂志，2022，30（4）：54-55.

[9] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：212.

[10] 国家药品监督管理局 . 药品不良反应信息通报（第 61 期）关注口服何首乌及其成方制剂引起的肝损伤风险 [EB/OL].（2014-07-16）. https：//www. nmpa. gov. cn/directory/web/nmpa/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20140716151101983. html.

[11] 安冬青，吴宗贵，梁春，等 . 血脂异常中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国全科医学，2017，20（3）：262-269.

[12] 黄政凯，林志健，王雨，等 . 大黄素致结肠黑变病的机制研究与风险预警 [J]. 中国药物警戒，2021，18（8）：753-759.

[13] 赵雍，梁爱华，刘婷，等 . 千里光、千柏鼻炎片和总生物碱大鼠胚胎毒性研究 [J]. 中国中药杂志，2010，35（3）：373-377.

[14] 澎湃新闻 . 感冒药不能过量也不能混着吃：27 岁研究生入院到去世仅 7 天 [EB/OL].（2018-04-18）. https://m.thepaper.cn/newsDetail_forward_2083796.

[15] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（四）：适应证不适宜 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（13）：1161-1167.

[16] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（五）：老年人群用药遴选 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（14）：1253-1260.

[17] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（六）：妊娠期人群用药遴选 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（17）：1529-1534，1615.

[18] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（十）：儿童用药 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（11）：1003-1008.

[19] 中国中西医结合学会血液学专业委员会骨髓增生异常综合征专家委员会 . 骨髓增生异常综合征中西医结合诊疗专家共识（2018 年）[J]. 中国中西医结合杂志，2018，38（8）：914-920.

[20] 刁明芳，孙建军，刘阳，等 . 孕期服用雄黄致先天性内耳畸形 1 例 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2015，29（15）：1390-1391.
[21] 黄珍祯，张超超，樊海艇，等 . 小鼠胚胎毒性试验方法的建立及在评价中药早期胚胎毒性中的应用 [J]. 医学信息，2019，32（9）：71-73.
[22] 李咏梅，吴文斌，樊海艇，等 . 雄黄灌胃给药对大鼠生育力与早期胚胎发育毒性的研究 [J]. 中国药学杂志，2012，47（24）：1990-1994.
[23] 于乐成，陈成伟 . ACG 特异质性药物性肝损伤临床诊治指南解读 [J]. 肝脏，2014，19（8）：570-574.
[24] 尹利顺，李晓宇，孙蓉 . 千里光临床不良反应成因分析 [J]. 中国药物警戒，2015，12（3）：160-163.
[25] 韩佳寅，易艳，梁爱华，等 . 千里光对小鼠体外培养胚胎的胚胎毒性研究 [J]. 药学学报，2014，49（9）：1267-1272.
[26] 丁樱，闫永彬，韩姗姗，等 . 中医儿科临床诊疗指南・细菌性痢疾（制订）[J]. 中医儿科杂志，2017，13（4）：1-6.
[27] 赵青云，李新静 . 小儿罂粟壳中毒 28 例救治体会 [J]. 中国乡村医药，2007（6）：65.
[28] 柴宗斌 . 小儿罂粟壳煎剂中毒 32 例救治分析 [J]. 中国社区医师，2002（12）：31-32.
[29] 王小芳 . 基于中医传承辅助平台系统探析名中医治疗小儿泄泻的证治规律 [D]. 南京：南京中医药大学，2020.
[30] 谭为，杨秀颖，张莉，等 . 中药罂粟壳毒的历史认识与现代研究 [J]. 中药药理与临床，2019，35（2）：159-162.
[31] 张晓宏 . 安脑片治疗中老年血管性偏头痛患者 48 例 [J]. 中国老年学杂志，2012，32（20）：4518-4519.
[32] 徐晓玉，朱亚涛，张晓曼，等 . 安宫牛黄丸联合常规西医治疗对老年急性脑梗死神经功能和凝血功能的影响 [J]. 实用中医内科杂志，2020，34（8）：31-34.
[33] 路艳丽，耿兴超，汪巨峰，等 . 冰片的安全性评价研究现状 [J]. 中国新药杂志，2016，25（6）：645-649，658.
[34] 李晓静，严东明，冯琴，等 . 栀子苷及京尼平的动物肝毒性机制研究进展 [J]. 世界中医药，2021，16（17）：2652-2656.
[35] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（二）：重复用药 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（7）：565-570.
[36] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（九）：寒热并用 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（3）：201-206
[37] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（三）：十八反、十九畏配伍禁忌 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（11）：969-975，1007.
[38] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（一）：超说明书剂量用药 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（6）：473-477.
[39] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（八）：疗程与用药时长问题 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（22）：1979-1985.
[40] 王文青，刘津，田佳鑫，等 . 小金胶囊点评规则探索与临床应用 [J]. 中南药学，2020，18（5）：888-892.
[41] 林雪颖，王茜，李敏妍，等 . 致康胶囊合理性评价标准的建立与应用 [J]. 中南药学，2018，16（8）：1136-1138.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-05-08）

感冒类中成药处方审核技术要点

金锐，郭红叶，田佳鑫，张爽，伊博文*（中国中医科学院西苑医院药学部，北京　100091）

摘要：目的　建立感冒类中成药处方审核的技术要点。**方法**　在现有中成药处方点评专家共识和审方实践的基础上，基于覆盖感冒治疗全部中医证型的 22 种常用中成药（以通用名计）的组方和功效特点，确定处方审核的技术要点。**结果**　从适应证审核、药品遴选审核、联合用药审核、用法用量审核和用药疗程审核五大方面，形成 15 大项 33 小项的审核技术要点，详细论述了不合理的诊断类型、不适用的人群特点、不适宜的联用方式、不建议的超量情况和不恰当的疗程安排等内容。同时，对各个审核技术要点进行例证分析，归纳总结出 10 余项审核通则。**结论**　构建了感冒类中成药的处方审核技术要点和通用规则，为中成药处方审核提供技术支持。

关键词：处方审核；中成药；感冒；审核要点；标准
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1720-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.002

基金项目：首都卫生发展科研专项（首发 2020-2-2081）。

作者简介：金锐，男，博士，副主任药师，主要从事中药临床药学和中医药基本理论研究，email：jinrui9862@126.com　*通信作者：伊博文，男，硕士，副主任药师，主要从事中药药事管理和中药制剂研究，email：yibowen0229@126.com

Key technical points of prescription review of Chinese patent medicine for cold treatment

JIN Rui, GUO Hong-ye, TIAN Jia-xing, ZHANG Shuang, YI Bo-wen* (*Xiyuan Hospital*, *Chinese Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100091)

Abstract: Objective To determine the key technical points of prescription review of Chinese patent medicine for cold. **Methods** On the basis of the existing expert consensus on prescription review of Chinese patent medicine and the prescription review practice, the technical points were determined based on the formulation and efficacy characteristics of 22 commonly used Chinese patent medicines (in general name) covering all traditional Chinese medicine syndrome types of cold treatment. **Results** This paper collected the technical points of 15 major items and 33 minor items from the five aspects of indication review, namely drug selection review, combined medication review, usage and dosage review and course of treatment review. The unreasonable diagnosis type, unsuitable population characteristics, unsuitable combination mode, over dose situation and improper treatment arrangement were discussed in detail. At the same time, the key points of each review technology were analyzed by examples. More than 10 general technical rules were summarized. **Conclusion** The key technical points and general rules of prescription review of Chinese patent medicine for cold are established to provide technical support for the prescription review of Chinese patent medicine.

Key words: prescription review; Chinese patent medicine; cold; main point of prescription review; standard

感冒是常见的外感疾病，一年四季皆可发生，是由外感邪气侵袭肺卫所致的表证，主要症状表现包括发热（伴或不伴恶寒）、鼻塞流涕（清涕或黄涕）、全身酸痛、咽痛咳嗽、腹痛腹泻等，一般病程为 3 ～ 7 d。感冒的治则治法是解表祛邪，外感邪气不同、人体体质不同，则感冒所表现的证型不同，根据不同的证型选择不同的治疗药物，以辛散解表为主。

感冒类中成药品种多，使用频率高，但不对证用药常见，不合理联用常见，亟需形成规范、统一的感冒类中成药处方审核技术要点，为药师审核提供学术支持。本文在现有中成药处方点评专家共识 [1-3] 和前期审方实践的基础上，尝试建立感冒类中成药的处方审核技术要点。

1　适用范围

中医诊断为感冒，西医诊断为上呼吸道感染、普通型感冒、胃肠型感冒、流行性感冒，开具感冒治疗类中成药的处方，包括但不限于：九味羌活丸、小柴胡颗粒、风寒感冒颗粒、双黄连口服液、玉屏风颗粒、正柴胡饮颗粒、芎菊上清丸、连花清瘟胶囊、金花清感颗粒、参苏丸、荆防颗粒、保济丸、桑菊感冒片、银黄颗粒、银翘解毒丸、维 C 银翘片、暑湿感冒颗粒、疏风解毒胶囊、感冒清胶囊、感冒清热颗粒、感冒疏风丸、藿香正气水，以及相同通用名、相同给药途径的其他剂型。

2　适应证审核要点

2.1　适应证审核要点一：诊断书写

此类中成药处方应包括提示感冒的中医 / 西医诊断及提示感冒证型的中医诊断，其中，提示感冒的中医诊断为“感冒”“感冒病”“外感病”“外感表证”及其等价诊断，提示感冒的西医诊断为“上呼吸道感染”“上感”及其等价诊断，提示感冒证型的中医诊断分为以下 5 类：

2.1.1　风寒感冒　“风寒证”“风寒袭表证”“风寒表证”及其等价诊断。

2.1.2　风热感冒　“风热证”“风热外袭证”“肺热证”及其等价诊断。

2.1.3　暑湿感冒　“暑湿证”“暑湿内蕴证”“暑热病”及其等价诊断。

2.1.4　气虚感冒　“气虚证”“体虚外感”“气虚证＋风寒表证”及其等价诊断。

2.1.5　复合感冒　“寒热错杂证”“寒包火”“少阳感冒”等相关诊断。

缺少其中之一，即可视为临床诊断书写不全。例如，诊断为“上呼吸道感染”开具银翘解毒丸的处方，可视为临床诊断书写不全。诊断为“外感”开具“藿香正气口服液”的处方，亦可视为临床诊断书写不全。

2.2　适应证审核要点二：诊断与用药相符

提示感冒证型的中医诊断应与感冒治疗类中成药的功效相匹配，包括：

2.2.1　辛温解表药　说明书标注“辛温解表”“疏风散寒”“解表散寒”等功效的辛温解表药（感冒疏风丸、风寒感冒颗粒、九味羌活丸、荆防颗粒等），处方应书写风寒感冒相关诊断，否则应视为适应证不适宜。例如，诊断为“风热外感”而开具九味羌活丸的处方，应视为适应证不适宜。

2.2.2　辛凉解表药　说明书标注“疏散风热”“辛凉解表”“清热解表”等功效的辛凉解表药（双黄连口服液、连花清瘟胶囊、金花清感颗粒、桑菊感冒片、银黄颗粒、银翘解毒丸、疏风解毒胶囊、维 C 银翘片、感冒清胶囊等），处方应书写风热感冒相关诊断，否则应视为适应证不适宜。例如，诊断为“风邪感冒”而开具金花清感颗粒的处方，应视为适应证不适宜。

2.2.3　祛暑解表药　说明书标注“清暑”“祛暑解表”“解表化湿”等功效的祛暑解表药（保济丸、藿香正气水、暑湿感冒颗粒等），处方应书写暑湿感冒相关诊断，否则应视为适应证不适宜。例如，诊断为“风热外感”而开具暑湿感冒颗粒的处方，应视为适应证不适宜。

2.2.4　扶正解表药　说明书标注“扶正解表”“益气解表”等功效的扶正解表药（玉屏风颗粒、参苏丸等），处方应书写气虚感冒相关诊断，或符合药品说明书的诊断，否则应视为适应证不适宜。例如，诊断为“感冒＋气虚证”而开具参苏丸的处方，应视为合理处方。参苏丸的说明书功效为“疏风散寒，祛痰止咳”，故诊断为“风寒感冒”而开具参苏丸的处方，亦可视为合理处方。

2.2.5　寒热并用解表药　采用比例基本相当的寒性药与热性药构成，且同时具有清热和散寒作用的寒热并用感冒药（小柴胡颗粒、正柴胡饮颗粒、芎菊上清丸、感冒清热颗粒、儿感清口服液、防风通圣丸等），处方应书写复合感冒相关诊断，或符合药品说明书和中医药基本理论认识的诊断，否则应视为适应证不适宜。例如，诊断为“上呼吸道感染，寒热错杂证”而开具小柴胡颗粒的处方，应视为合理处方。小柴胡颗粒源于伤寒少阳病治疗方小柴胡汤，故诊断为“少阳感冒”而开具小柴胡颗粒的处方，亦可视为合理处方。小柴胡颗粒的说明书注意事项标注“风寒感冒者不适用”，故诊断为“风寒感冒”开具小柴胡颗粒的处方，应视为适应证不适宜。

2.3　适应证审核要点三：分类管理

处方既未书写感冒相关中医诊断又未书写感冒相关西医诊断者，应视为适应证不适宜或无适应证用药。建议审核不通过，返回医师端修改。例如，诊断为“高血压”开具银翘解毒软胶囊，应视为无适应证用药，返回医师端修改。

处方只书写提示感冒证型的中医诊断、未书写感冒相关西医诊断者，视为合理。例如，诊断为“暑犯肺卫证”开具藿香正气软胶囊，应视为合理处方。

处方只书写感冒相关西医诊断、未书写提示感冒证型的中医诊断者，应视为临床诊断书写不全或适应证不适宜。可视不同科室、不同医疗机构的具体要求决定是否返回医师端。不返回医师端的处方，应作为不合理处方进入处方点评流程。例如，对于中医科处方，诊断为“上呼吸道感染”开具金花清感颗粒，可视为临床诊断书写不全，返回医师端修改；对于西医呼吸科处方，诊断为“上呼吸道感染”开具感冒清热颗粒，可根据医疗机构具体情况，视为合理或不合理处方。

3　药品遴选审核要点

3.1　药品遴选审核要点一：儿童、妊娠哺乳期和老年人

儿童、老年人和妊娠哺乳期妇女的用药审核应遵循药品说明书要求，说明书明确标注“禁用”或“忌用”的，均应视为药品遴选不适宜，建议选择同功效亚类的其他药品。例如，正柴胡饮颗粒说明书标明“孕妇禁用”，故为妊娠期妇女开具正柴胡饮颗粒，应视为药品遴选不适宜，建议返回医师端，可选择同类药品，例如感冒清热颗粒或小柴胡颗粒。

说明书标注“慎用”的，可根据医师执业类别、临床经验丰富程度以及患者的具体情况，进行分类管理。具有慎用人群用药经验的中医类别医师，为实际用药风险较低的慎用人群患者（如 15 岁体格发育正常的儿童、肝肾功能正常且无恶性基础疾病的老年人、非孕早期且各项健康指征良好的妊娠期妇女）开具此类药品时，可视为合理；其余情形，建议视为不合理。

说明书未明确要求的，或者仅标注“在医师指导下使用的”，可以参考表 1 进行审核。其中，感冒治疗类中成药涉及的妊娠禁忌药包括：《中国药典》标识的慎用中药（桂枝、枳壳、天花粉）、传统活血行气药（赤芍、川芎）、毒性中药（生半夏）和其他重点关注中药细辛（含马兜铃酸）等。

儿童应首选儿童专用中成药，无适用的儿童专用中成药时，也可选择非儿童专用中成药，但应注意是否含有儿童禁用或慎用的成分，注意用法用量的调整。

表 1　感冒治疗中成药的特殊人群选药

Tab 1　Drug selection of Chinese patent medicines for cold for special patient groups

中成药	儿童（3 ～ 18 岁）	老年人（60 岁以上）	孕妇	哺乳期妇女
九味羌活丸	建议可用，6 岁以内慎用	建议可用	建议慎用	建议慎用
小柴胡颗粒	建议可用	建议可用	建议可用，文献有孕 10 ～ 16 周的用药经验 [4]	建议可用
风寒感冒颗粒	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用
双黄连口服液	建议可用	建议可用	建议可用	建议可用
玉屏风颗粒	建议可用	建议可用	建议可用，有孕 4 ～ 39 周的用药经验 [5]	建议可用
正柴胡饮颗粒	建议可用	建议可用	说明书禁用	建议可用
芎菊上清丸	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用
连花清瘟胶囊	建议可用，可选颗粒剂，有 5 个月～ 10 岁患儿用药经验	建议可用，有 60 ～ 85 岁患者的用药经验	建议慎用	建议可用
金花清感颗粒	建议可用	建议可用，有 60 ～ 72 岁患者的用药经验	建议慎用	建议可用
参苏丸	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用
荆防颗粒	建议可用，有 1 ～ 11 岁患儿用药经验	建议可用	建议慎用	建议可用
保济丸	建议可用，有 4 ～ 11 岁患儿用药经验	建议可用，有 60 ～ 75 岁患者的用药经验	建议慎用	建议可用
桑菊感冒片	建议可用	建议可用	建议可用，文献有妊娠早、中、晚期的用药经验 [6-7]	建议可用
银黄颗粒	建议可用，有 1 ～ 7 岁患儿用药经验，2 岁内患儿用量减半	建议可用	建议可用	建议可用
银翘解毒丸	建议可用，有 1 ～ 14 岁患儿用药经验	建议可用	说明书慎用，文献有孕 3 ～ 8 个月的用药经验，建议可用 [8-9]	建议可用
维 C 银翘片	建议慎用，说明书示新生儿和早产儿禁用，有 6 ～ 8 岁患儿用药经验	建议可用，用量酌减	说明书慎用	说明书慎用
暑湿感冒颗粒	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用
疏风解毒胶囊	建议可用，有 1 ～ 12 岁患儿用药经验	建议可用	建议慎用	建议可用
感冒清胶囊	建议慎用，说明书示婴幼儿慎用	建议可用，用量酌减	说明书慎用	说明书慎用
感冒清热颗粒	建议可用，有 6 个月～ 12 岁患儿用药经验	建议可用	建议可用	建议可用
感冒疏风丸	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用
藿香正气口服液	建议可用	建议可用	建议慎用	建议可用

注：“建议可用”的中药也应在中医师指导下，确定适合的用法用量后使用。

Note：It is suggested that the usable Chinese patent medicines should also be used under the guidance of Chinese medicine practitioners with rational usage and dose.

3.2　药品遴选审核要点二：肝肾功能不全患者

肝肾功能不全患者的用药审核应遵循药品说明书要求，说明书标注“禁用”或“忌用”的，均视为药品遴选不适宜。例如，维 C 银翘片说明书要求“严重肝肾功能不全者禁用”，故为诊断中含有“肝功能衰竭”“肾功能衰竭”“慢性肾脏病三期”“尿毒症”等提示肝肾功能严重损伤的患者开具处方维 C 银翘片时，应当视为药品遴选不适宜，建议返回医师端，可选择同类药品，例如银翘解毒丸、疏风解毒胶囊等。

说明书标注“肝肾功能不全者慎用”或者标注“肝病、肾病严重者在医师指导下使用的”，可根据医师执业类别、临床经验丰富程度以及患者的具体情况进行分类管理。具有慎用人群用药经验的中医类别医师，为轻、中度肝肾功能异常的患者开具此类药品时，可视为合理；其余情形，建议视为不合理。

说明书未明确要求的，可通过组方成分进行初步评估，即：

① 含有对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的感冒类中西药复方制剂，因具有明确的肝肾损伤风险，建议视为药品遴选不适宜，选择同类其他药品。

② 除外中西药复方制剂，其余感冒治疗类中成药一般不含有潜在肝损伤成分（如朱砂、雄黄、川楝子、何首乌、黄药子等），用药疗程一般也较短（不超过 14 d），故肝损伤风险整体不高。根据文献报告，藿香正气水有引起肝损伤的个案报道 [10]，连花清瘟胶囊有引起过敏合并肝损伤的个案报道 [11]，对于上述药品应加强药学监护。小柴胡颗粒的原方小柴胡汤，既有导致肝损伤的文献

报道，也有治疗药物性肝损伤的文献报道[12-15]。一般认为，不对证和超长疗程服用是小柴胡汤导致肝损伤的主要原因之一，例如文献报道的小柴胡汤所致肝损伤案例，用药目的为缓解疲乏或治疗肝炎，且用药疗程均在 3 ～ 7 周[13]。

③ 个别感冒治疗类中成药含有细辛（如九味羌活丸），如果处方诊断含有“肾病”“肾功能不全”及其等价诊断，应加强药学监护，或选择同功效亚类的其他药品。

3.3 药品遴选审核要点三：高血压、心脏病等特殊疾病患者

特殊疾病患者（例如高血压、糖尿病、心脏病、前列腺肥大等）的用药审核应遵循药品说明书要求，说明书标注“禁用”和“忌用”的，均可视为药品遴选不适宜。说明书未明确要求的，或者仅标注“在医师指导下使用的”，建议视为合理。说明书标注“慎用”的，可根据医师执业类别、临床经验丰富程度以及患者慢病管理的水平，进行分类管理。具有慎用人群用药经验的中医类别医师，为慢病管理良好的患者开具此类药品时，可视为合理；其余情形，建议视为不合理。

例如，感冒疏风丸说明书标注“高血压、心脏病患者慎用”，故医师为诊断中含有“高血压”的患者开具感冒疏风丸时，应视为药品遴选不适宜，可更换为同样具有疏风散寒功效的感冒清热颗粒。

3.4 药品遴选审核要点四：中西药复方制剂

含有化学药物成分的中西药复方制剂，应严格遵循其中化学药物成分的禁忌证进行药品遴选。如对乙酰氨基酚慎用于孕妇、哺乳期妇女、膀胱颈梗阻、幽门十二指肠梗阻、甲状腺功能亢进、青光眼、消化性溃疡、高血压和前列腺肥大者，所以合并有以上疾病诊断的患者，在感冒时开具处方含有对乙酰氨基酚的维 C 银翘片和感冒清胶囊，应视为药品遴选不适宜，建议返回医师端修改。

4 联合用药审核要点

4.1 联合用药审核要点一：重复用药

① 治疗同一证型的感冒，且含有 3 个以上相同成分或含有相同成分的超过 30% 的两个中成药足量联用时，可视为重复用药。例如，感冒疏风丸与风寒感冒颗粒均含有麻黄、紫苏叶、防风、桂枝、苦杏仁、桔梗、甘草和生姜，相同成分占 8/11，且麻黄为两药的君药，故两者的足量联用属于重复用药。又如，桑菊感冒片与芎菊上清丸均含有连翘、菊花、薄荷、桔梗和甘草，相同成分分别占 5/8（桑菊感冒片）和 5/15（芎菊上清丸），且均以菊花、连翘等疏风清热中药为主导，故两者的足量联用属于重复用药。再如，双黄连口服液与疏风解毒胶囊均含有连翘，相同成分分别占 1/3（双黄连口服液）和 1/8（疏风解毒胶囊），但两者君药不同，双黄连口服液为辛凉解表的金银花，疏风解毒胶囊为清热解毒利湿的虎杖，故可不认定为重复用药。

② 同时含有麻黄、苦杏仁、石膏和甘草的感冒药，应为麻杏石甘汤的衍生方，足量联用时，可视为重复用药。如连花清瘟颗粒与金花清感颗粒均含有麻黄、石膏、苦杏仁、甘草、金银花、连翘等，且均以疏风清热止咳为主，属于同一底方的衍生方，故足量使用属于重复用药。

③ 成分完全包含的两个感冒中成药足量联用时，可视为重复用药。例如，银黄颗粒含有金银花和黄芩，而双黄连口服液的组方为金银花、黄芩和连翘，金花清感颗粒也含有金银花和黄芩，双黄连口服液的组方完全包含银黄颗粒，故两者的足量联用属于重复用药。

④ 具有相同功效、含有相同毒性饮片的两个感冒中成药足量联用时，可视为重复用药。例如，感冒清热颗粒解表散寒清热，三拗片解表宣肺散寒，两者均具有疏风散寒的功效，均含有小毒中成药苦杏仁，故两者的足量联用属于重复用药。

4.2 联合用药审核要点二：药性冲突

① 药性纯粹的辛温解表药与药性纯粹的辛凉解表药足量联用时，可视为药性冲突。如感冒疏风丸以麻黄汤为底方，全方由温热性中药组成，仅含有白芍一味微寒性中药，故其为药性纯粹的辛温解表药；疏风解毒胶囊以清热解毒为主，全方由寒凉性中药组成，仅含有甘草一味平性中药，故其为药性纯粹的辛凉解表药。两者的足量联用属于药性冲突。

② 以治疗寒热错杂型感冒为主的寒热并用感冒中成药，与药味数较少（一般少于 5 味）且重复度低于 30% 的辛温解表药、辛凉解表药或寒热并用解表药联用时，可不认定为药性冲突。如感冒清热颗粒由几乎相同比例的温热性中药（荆芥穗、防风、紫苏叶、白芷、苦杏仁）和寒凉性中药（柴胡、薄荷、葛根、苦地丁、芦根）组成，且常用于寒热错杂的复杂型感冒，故其与银黄颗粒、双黄连口服液等药味数较少的辛凉解表药的联用，可不认定为药性冲突。

③ 治疗感冒的解表药与具有滋补功效的滋补药（由熟地黄、阿胶、女贞子等滋补中药组成）和药性温热的温补药（由红参、鹿茸、淫羊藿等温补中药组成）联合使用时，可视为药性冲突。如连花清瘟颗粒与温补肾阳为主的安神补脑液联合

使用，可视为药性冲突。芎菊上清丸与滋补肾阴为主的六味地黄丸联合使用，可视为药性冲突。

4.3 联合用药审核要点三：配伍禁忌

① 根据 2018 版专家共识关于中成药联用时存在十八反、十九畏情形的处理原则[1]，感冒类中成药的联用、感冒类中成药与其他疾病治疗中成药的联用，存在违反十八反、十九畏配伍原则的，可不视为配伍禁忌，但应提醒临床加强监测。如心通口服液含有海藻，九味羌活丸含有甘草，心通口服液与九味羌活丸的联用，可不视为配伍禁忌，加强随访监测即可。

② 感冒类中成药的联用、感冒类中成药与其他疾病治疗中成药的联用，不论是否存在十八反、十九畏配伍禁忌，只要符合两个及以上毒性饮片联用的，均应提醒临床加强监测。如藿香正气口服液含有毒性饮片半夏，感冒清热颗粒含有毒性饮片苦杏仁，小活络丸含有毒性饮片川乌，无论是藿香正气口服液与小活络丸联用，还是感冒清热颗粒与小活络丸联用，均应加强随访监测，对可能的不良反应进行用药交代。

4.4 联合用药审核要点四：中西药联用

① 含有对乙酰氨基酚、氯苯那敏等化学药成分的中西药复方制剂，与含有相同药理作用成分的西药联合使用时，应视为重复用药。如含有对乙酰氨基酚和氯苯那敏的维 C 银翘片，与西药酚麻美敏片足量联用时，应视为重复用药，返回医师端修改。

② 含有麻黄的感冒类中成药与含有伪麻黄碱的西药感冒药联合使用时，应视用法用量而定，足量联用视为联合用药不适宜。如感冒疏风丸与酚麻美敏片足量联用时，可视为联合用药不适宜。

③ 辅料含有乙醇的感冒类中成药（例如藿香正气水）与头孢类、甲硝唑类等抗菌药物及安眠药等易与乙醇发生相互作用的西药联合使用时，应视为配伍禁忌。如藿香正气水含有 40% ～ 50% 的乙醇，与头孢呋辛联用时，应视为配伍禁忌，返回医师端修改。

④ 由于麻黄碱具有一定的升压作用，故含有麻黄的感冒类中成药（例如感冒疏风丸、风寒感冒颗粒、连花清瘟胶囊）与西药降压药联合使用时，中成药说明书明确为“高血压患者禁用或慎用”的，应视为配伍禁忌，避免联用；中成药说明书提示“高血压患者在医师指导下使用的”，可不视为配伍禁忌，加强监测即可。未经良好控制的恶性高血压患者，不宜使用含麻黄的中成药。如连花清瘟胶囊说明书明确“高血压患者慎用”，故连花清瘟胶囊与西药降压药的联合使用，应视为配伍禁忌。银翘解毒丸说明书提示“高血压严重者应在医师指导下使用”，故银翘解毒丸与西药降压药的联合使用，可不视为配伍禁忌，加强随访监测即可。又如，诊断中含有“恶性高血压”，同时开具含有麻黄的风寒感冒颗粒与西药降压药的处方，应视为配伍禁忌。

⑤ 辅料含有蔗糖的中成药及含有甘草、大枣等具有潜在影响血糖作用的中成药与西药降糖药联合使用时，应密切监测，但可不视为配伍禁忌。如荆防颗粒含有甘草，辅料为蔗糖，同时开具荆防颗粒与格列美脲的处方，可不视为配伍禁忌，加强随访监测即可。

5 用法用量审核要点

5.1 用法用量审核要点一：日总量控制

依据药品说明书，以每日最大量为基本审核单元，不超过每日最大量的处方，即视为合理处方。如为一般成人的风热犯肺型流感，处方金花清感颗粒，一次 1 袋，一日 2 次（说明书为一次 1 袋，一日 3 次），日总量小于说明书常规量，应视为合理处方。

5.2 用法用量审核要点二：超说明书用量

在 3 ～ 7 d 的疗程内，对于不含有毒性饮片（例如苦杏仁、半夏）的感冒类中成药，为一般成人（非特殊人群）开具说明书最大量 150% 的用量，可不视为用法用量不适宜。如一般成人的风热感冒，处方双黄连口服液，一次 2 支，一日 2 次（说明书为一次 1 支，一日 3 次），日总量为说明书最大量的 150%，可不视为用法用量不适宜，但应加强监测。

在 3 ～ 7 d 的疗程内，对于含有毒性饮片（例如苦杏仁、半夏）的感冒类中成药，为一般成人（非特殊人群）开具超过说明书最大量的处方，可根据处方科室或医师的具体情况，分类界定和管理，但应提示临床加强监测。

文献资料显示，多个感冒治疗类中成药存在超说明书剂量使用的文献报道[16-19]。如感冒清热颗粒（含苦杏仁）在治疗感冒时，有一次 1 袋，一日 3 次的治疗经验，超过说明书日最大量（2 袋）1.5 倍，有效性和安全性良好。连花清瘟胶囊（含苦杏仁）在治疗单纯疱疹病毒性角膜炎时，有一次 5 粒，一日 3 次的治疗经验，超过说明书日最大量（12 粒）1.25 倍，有效性和安全性良好[16]。

5.3 用法用量审核要点三：儿童与老年人用药

根据《中成药临床应用指导原则》，老年人用药，一般为常用量。儿童用药，应根据年龄进行减量。具体方法为：“一般情况 3 岁以内服 1/4

成人量，3 ～ 5 岁的可服 1/3 成人量，5 ～ 10 岁的可服 1/2 成人量，10 岁以上与成人量相差不大即可”[20]。例如，为 6 岁“寒包火”型感冒患儿开具感冒清热颗粒，处方用量为一次半袋，一日 2 次（说明书为一次 1 袋，一日 2 次），应视为合理处方。

6　疗程审核要点

感冒为急性病证，一般疗程为 3 ～ 7 d，连续用药不宜超过 7 d。处方用药时长超过 7 d 的，可视为用药疗程不适宜。例如，诊断为“上呼吸道感染”，开具连花清瘟胶囊 10 d，可视为用药疗程不适宜。

7　其他

处方审核中，对于存在超说明书用药的处方（包括超适应证、超用法用量、禁慎用人群用药等情况）和存在超常规标准用药的处方（包括超疗程用药、多品种重复联用等），应在充分评估有效性、安全性和可替代性证据后，交由医院或更高级别的药事管理与药物治疗学委员会讨论决策。讨论通过的可视为有条件的合理处方；讨论不通过的依然视为不合理处方。

8　小结与讨论

本文对感冒类中成药处方审核的技术要点进行陈述和举例，为相关中成药的处方审核提供细化的规则范式，各级各类医疗机构可结合自身的实际情况参考使用。随着中成药临床应用证据的积累及国家卫生行政部门药品管理政策的变化，处方审核规则应积极调整。

同时，应加大西医学习中医的培训力度，建议采用“培训一批、要求一批”的方法，逐步实现西医师在临床进行简明辨证选药，并书写中医病证诊断。例如，总结梳理医疗机构内感冒治疗中成药品种，针对西医呼吸内科和全科的医师开展专项培训，包括适应证、人群特点、不适宜的联合用药等，培训考核完成后，即可要求医师在处方相应中成药时书写中医病证诊断。

参考文献

[1] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（18）：1877-1887.

[2] 王宇光，金锐 .《北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）》的解读 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1207-1209.

[3] 金锐，鄢丹，杨欣妤，等 . 中成药处方点评专家共识的编写思路、依据与方法 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1204-1207.

[4] 杨大士，吴著球 . 小柴胡汤加味在母儿 ABO 血型不合孕期中的应用 [J]. 中国中医药现代远程教育，2010，8（8）：169.

[5] 张宜群 . 玉屏风颗粒联合阿莫西林胶囊治疗孕妇上呼吸道感染 120 例 [J]. 中国中医急症，2010，19（2）：297.

[6] 朱蕊 . 小柴胡汤合桑菊饮加减治疗妊娠感冒 56 例 [J]. 实用中医药杂志，2012，28（6）：470-471.

[7] 商良波，夏晨 . 桑菊饮加减治疗妊娠合并上呼吸道感染 206 例 [J]. 实用中医内科杂志，2008，22（8）：58-59.

[8] 祝玉慧，田磊，徐宁 . 银翘散加减治疗妊娠甲型 H1N1 流感 12 例 [J]. 中国中医药信息杂志，2010，17（7）：74-75.

[9] 陈艳，杨静 . 银翘散加减治疗妊娠外感发热 156 例 [J]. 天津中医药大学学报，2009，28（3）：115.

[10] 刘松松，谢益明 . 101 例藿香正气水药品不良反应文献分析 [J]. 中国药物警戒，2017，14（5）：317-320.

[11] 陈强，曲珊珊，孟祥磊 . 连花清瘟胶囊致过敏反应合并肝损伤 [J]. 药物不良反应杂志，2016，18（5）：396-397.

[12] 王玉芝 . 小柴胡汤治疗肝病的临床研究 [J]. 中成药，2000，23（4）：48-50.

[13] 陈达民 . 草药小柴胡汤引起的肝损伤 [J]. 国外医学（消化系疾病分册），1996，16（1）：61.

[14] 刘德山 . 小柴胡汤引起药物性肝损伤 1 例 [J]. 国外医学（中医中药分册），1994，10（3）：33.

[15] 孙建忠，赵素彬 . 小柴胡汤加味治疗药物性肝损伤 4 例 [J]. 实用医学杂志，1993，9（1）：34.

[16] 夏本立，石静，贾娜，等 . 抗病毒口服液和感冒清热颗粒预防甲型 H1N1 流感的效果观察 [J]. 人民军医，2010，53（9）：645-646.

[17] 怀伟 . 美敏伪麻口服液与感冒清热颗粒治疗急性上呼吸道感染的临床疗效观察 [J]. 临床医药实践，2009，18（18）：451-452.

[18] 谢有良 . 连花清瘟胶囊治疗单纯疱疹病毒性角膜炎 30 例 [J]. 中国中医基础医学杂志，2014，20（6）：847-848.

[19] 金锐主编 . 中成药处方点评的理论与实践 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019.

[20] 国家中医药管理局 . 中成药临床应用指导原则 [S]. 2010.

（收稿日期：2022-05-29；修回日期：2022-06-29）

CRE 感染不良结局的危险因素及药物治疗评价专题

【编者按】

抗菌药物耐药已成为公众健康最大的威胁之一，耐碳青霉烯肠杆菌科细菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae，CRE）感染的高死亡率和疾病负担是临床诊疗和医院感染控制关注的重要问题，对 CRE 具有活性的新型抗菌药物的开发与应用是研究的热点。同时，抗菌药物的临床合理使用也成为预防和治疗 CRE 感染的重要措施。抗菌药物治疗 CRE 感染的临床数据正在慢慢丰富，但更多与临床密切相关的关键问题需要研究与解决，如碳青霉烯酶型检测并报告、体外药物敏感性试验、联合药敏以筛选精准有效的抗感染治疗方案、血药浓度监测、药物不良反应监测与报告、疾病和药物负担的问题等。本专题拟基于实验室和临床数据，开展专题研究来识别 CRE 感染患者发生临床治疗不良结局的相关危险因素，并评价真实世界中药物治疗 CRE 感染的有效性、安全性和经济性。

【特邀专家简介】

邓晟，男，药学博士，遗传学博士后，中南大学湘雅医院药学部副主任，主任药师，硕士研究生导师。主要从事临床药学、临床药理学和遗传学研究。现任中国药理学会药物基因组学专业委员会常委、中国老年医学学会感染管理质量控制分会委员、中华医学会细菌感染与耐药防治分会青年委员、湖南省药学会理事、湖南省药师协会药物警戒与安全专业委员会副主委等职。曾获中国药学会 - 阿斯利康医院药学优秀青年药师奖、中华医学会临床药学分会优秀临床药师奖、中国药学会 - 施维雅青年医院药学奖和湖南省“优秀药师”等荣誉称号。主持国家自然科学基金 2 项、湖南省自然科学基金 3 项、厅级课题多项，在国内外期刊发表论文 67 篇，其中 SCI 收载 41 篇，获得中国发明专利授权 2 项。

碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染后死亡的风险因素研究

陈敬兰[1]，李胜兰[1]，刘韶[1]，黄勋[2]，汪要望[2]，邓晟[1*]，胡琴[1, 3, 4*]（1.中南大学湘雅医院药学部，长沙 410008；2.湘雅医院医院感染控制中心，长沙 410008；3.中南大学医院管理研究所，长沙 410008；4.湘雅卫生与健康发展研究中心，长沙 410008）

摘要：目的　明确住院患者感染碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌（CRE）的死亡相关风险因素，并比较不同抗菌药物治疗方案对 CRE 住院患者死亡率的影响。**方法**　对 2021 年 1 月至 12 月在中南大学湘雅医院诊断为 CRE 感染的住院患者进行回顾性队列研究。分析不同治疗结局组患者的临床特征、微生物学特征和抗菌药物治疗方案。通过单因素分析和多因素 Logistic 回归分析 CRE 感染患者死亡相关风险因素。**结果**　共纳入 90 例患者（67 株感染肺炎克雷伯菌、12 株感染大肠埃希菌），主要感染类型是肺部感染（77.7%，70/90），其次是血流感染（22.2%，20/90）。患者的全因死亡率为 16.7%（15/90）。多因素分析显示，中心静脉置管（OR = 6.351；95%CI，1.415 ～ 28.502；P = 0.016）、感染性休克（OR = 57.074；95%CI，3.285 ～ 991.775；P = 0.005）、早期合理的目的性治疗（OR = 0.091；95%CI，0.010 ～ 0.842；P = 0.035）是 CRE 感染后死亡的独立影响因素。单药治疗（8.3%，2/24）比联合治疗（25%，4/16）的死亡

基金项目：中南大学湘雅医院管理科研基金（No.2019GL08）；湖南省自然科学基金科药联合基金（No. 2022JJ80045）。

作者简介：陈敬兰，女，在读硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：1483475270@qq.com　*通信作者：胡琴，女，硕士，主管药师，主要从事抗菌药物临床合理应用，email：huqin199107@163.com；邓晟，男，主任药师，主要从事临床药学工作，email：dengsxy@sina.com

率更低（$P = 0.320$）。**结论**　中心静脉置管、感染性休克是 CRE 感染患者死亡率增加的危险因素，早期及时启动合理的抗菌药物治疗（检出 CRE 48 h 内）可改善患者的临床结局。

关键词：碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌；风险因素；死亡率；抗菌药物
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1728-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.003

Mortality-related risk factors after carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection

CHEN Jing-lan[1], LI Sheng-lan[1], LIU Shao[1], HUANG Xun[2], WANG Yao-wang[2], DENG Sheng[1*], HU Qin[1, 3, 4*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 2. *Center of Infection Control*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 3. *Institute of Hospital Administration*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 4. *Xiangya Health Development Research Center*, *Changsha* 410008)

Abstract: Objective To determine the mortality-related risk factors for hospitalized patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infection, and to compare the clinical effect of antimicrobial regimens on the mortality. **Methods** Data pertaining to patients from Xiangya Hospital, Central South University with CRE infections between January and December 2021 were retrospectively collected. The clinical characteristics, microbiological characteristics and antimicrobial therapies of the patients with different outcomes were analyzed. The mortality-related risk factors were analyzed by univariate and multivariate Logistic regression. **Results** Totally 90 patients were included (67 *Klebsiella pneumoniae* and 12 *Escherichia coli*). The main infection included pulmonary infection (77.7%, 70/90), followed by bloodstream infection (22.2%, 20/90). The all-cause mortality was 16.7% (15/90). Multivariate analysis showed that central venous catheter ($OR = 6.351$; 95%CI, 1.415 － 28.502; $P = 0.016$), septic shock ($OR = 57.074$; 95%CI, 3.285 － 991.775; $P = 0.005$), and early appropriate definite therapy ($OR = 0.091$; 95%CI, 0.010 － 0.842; $P = 0.035$) were independent factors for death after CRE infection. Monotherapy (8.3%, 2/24) had a lower mortality rate than combination therapy (25%, 4/16) ($P = 0.320$). **Conclusion** Central venous catheter and septic shock are risk factors for increased mortality in patients with CRE infection. Early and timely antimicrobial therapy (within 48 hours after CRE detection) may improve the clinical outcome of patients.

Key words: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; risk factor; mortality; antimicrobial

碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae，CRE）已成为严重威胁人类健康的病原体之一[1]。CRE 是指对任何一种碳青霉烯类抗菌药物耐药（美罗培南、亚胺培南的 $MIC \geqslant 4$ mg・L^{-1}，厄他培南的 $MIC \geqslant 2$ mg・L^{-1}），或者产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌[2]。

近年来，CRE 的感染率逐年上升。2007 年浙江省首次报告了产生碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌（carbapenem-resistant *K. pneumoniae*，CRKP）后，中国几乎所有省份都报告了 CRE 感染[3-4]。2018 年一项流行病学研究显示，我国每 10 000 例出院病例中就有 4 例曾发生 CRE 感染[4]。2021 年中国细菌耐药监测网（China Antimicrobial Surveillance Network，CHINET）数据显示，肺炎克雷伯菌对碳青霉烯的耐药率逐年升高，从 2005 年的 2.9% 提高到 2021 年的 24.4%，耐药形势十分严峻[5]。

CRE 引起的感染尤其是血流感染（blood stream infection，BSI）与高死亡率相关。一项包含 62 个研究的荟萃分析表明，感染 CRKP 的死亡率为 42.1%，其中 BSI 为 54.3%[6]。有研究表明感染性休克、Pitt 菌血症评分、美罗培南 $MIC \geqslant 8$ mg・L^{-1}、不合理抗菌药物治疗等是 CRE 感染患者死亡的独立影响因素[7-8]。在我国，CRE 感染患者死亡相关的风险因素尚不完全清楚，且缺乏抗菌药物方案影响 CRE 感染患者治疗结局的真实世界研究。

目前常用于治疗 CRE 感染的药物主要有碳青霉烯类、多黏菌素、替加环素、氨基糖苷类以及新型复方制剂头孢他啶阿维巴坦（ceftazidime/avibactam，CAZ-AVI）等[1, 9]。然而，哪种药物具有最好的疗效和安全性，联合用药还是单独用药，如何调整碳青霉烯类的给药方式等，存在不一致的研究结果[10-11]。本研究目的是确定住院患者感染 CRE 的死亡风险因素，并比较不同抗菌药物治疗方案对感染 CRE 的住院患者死亡率的影响。

1 方法

1.1 研究设计和患者收集

本研究是单中心回顾性队列研究，于 2021 年 1 月至 12 月份在中南大学湘雅医院收集 CRE 感染的住院患者信息。有如下情况的患者将不纳入本次研究分析：① 年龄小于 14 岁；② 合并其他致病菌感染；③ 缺失重要的医疗记录；④ 定植 CRE 菌；⑤ 重复入院的患者，只纳入第一次感染 CRE 的住院记录；⑥ 反复感染 CRE 的患者，只有第一次阳性标本培养报告被纳入分析，其他排除。本研究的首要结局是全因死亡率，次要结局是临床治疗失败，包括临床症状和体征恶化或持续，或微生物未清除，感染反复出现。

1.2 数据收集

① 临床特征：患者基本资料（性别、年龄等），临床指标（白细胞计数、降钙素原等），基础疾病（糖尿病、慢性肾病等），侵入性操作（中心静脉置管、气管插管等），医院相关因素（住院时长、是否入住 ICU 等）；② 病原学特征：感染类型，病原体类型，药敏情况等；③ 抗菌治疗方案；④ 患者结局：首要结局与次要结局。

1.3 细菌分离和微生物学检测

菌株进行初步鉴定和收集后，根据美国临床和实验室标准协会（Standard of Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）指南要求，采用 Mueller-Hinton 肉汤稀释法或者稀释琼脂平板法测定了 24 种抗菌药物的抑菌圈直径（KB）值和最低抑菌浓度（*MIC*）。根据 CLSI 指南文件断点规定，碳青霉烯耐药定义为美罗培南、亚胺培南的 *MIC* ≥ 4 mg • L^{-1} 或厄他培南的 *MIC* ≥ 2 mg • L^{-1}，而美罗培南、亚胺培南的 KB ≤ 19 mm，厄他培南的 KB ≤ 18 mm 也属于耐药（http：//www.clsi.org）。此外，CAZ-AVI 的 *MIC* 折点参考 CLSI 和 EUCAST 制定的范围，将 *MIC* ≤ 8 mg • L^{-1} 定义为敏感。必要时开展联合药敏试验。替加环素和多黏菌素的折点分别根据美国食品药品监督管理局的标准和欧洲抗菌药物敏感性测试委员会（European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）来设定（http：//www.eucast.org）。

1.4 研究定义

合并感染指的是在同一部位同时检出 CRE 和其他致病菌（如鲍曼不动杆菌 / 铜绿假单胞菌 / 金黄色葡萄球菌等），或者在无菌部位（如血液）检出致病菌，而非无菌部位检出 CRE。抗菌药物暴露定义为在检出 CRE 前 30 d 内使用抗菌药物大于 72 h（检出 CRE 前 48 h 内除外）。敏感药物根据 CLSI 断点法来确定。经验性治疗定义为在检出 CRE 前 48 h 内使用抗菌药物治疗，若使用了敏感药物，则为合理的经验性治疗。目的性治疗定义为在检出 CRE 之后使用了抗菌药物治疗，若在检出 CRE 5 d 内使用敏感药物则为合理的目的性治疗，若在检出 CRE 48 h 内使用敏感药物治疗则为早期合理的目的性治疗。活性药物治疗定义为检出 CRE 后至少使用一种敏感药物的治疗；单药治疗定义为只使用一种敏感药物治疗[12-13]；联合治疗定义为使用两种或两种以上的敏感药物治疗；基于 CAZ-AVI 的治疗定义为使用 CAZ-AVI 或联合其他药物的治疗；基于多黏菌素的治疗定义为除了 CAZ-AVI 的治疗之外，使用多黏菌素或联合其他药物的治疗；基于替加环素的治疗定义为除了 CAZ-AVI 和多黏菌素的治疗之外，使用替加环素或联合其他药物的治疗[14]；基于碳青霉烯的治疗定义为除了 CAZ-AVI、多黏菌素和替加环素的治疗之外，使用碳青霉烯或联合其他药物的治疗。而包含某抗菌药物的治疗定义为该患者在治疗期间使用了此抗菌药物。若患者有多个治疗方案，则根据患者的结局和抗菌药物及时长来确定其最终治疗方案。若治疗结局较差，则纳入最后一种方案；若两周内微生物清除，则纳入先前的方案[13]。

1.5 数据分析

使用 SPSS statistic 26 软件进行分析。将 CRE 患者分为生存组和死亡组进行基线特征比较。单样本 K-S 检验用于验证数据是否符合正态分布。正态分布连续性变量用均值 ± 标准差表示，组间比较用独立样本 *t* 检验；非正态分布连续性变量用中位数（四分位间距）表示，组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。分类变量采用卡方检验。本研究患者例数为 90，若单元格期望频数均大于 5，使用 Pearson 卡方检验的结果；若存在单元格期望频数小于 5，则使用 Fisher 精确概率法检验的结果。将单变量分析中 $P < 0.1$ 的变量纳入二元 Logistic 回归分析模型，比较 *P* 值，并列出优势比（*OR*）和相应的 95% 置信区间（*CI*），分析 CRE 感染的死亡风险因素。

1.6　伦理批准

本研究经中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准（伦理审批号：202109174），该研究的试验设计和方案充分考虑安全性和公平性，其研究内容和结果不会对研究对象造成伤害和风险，不存在利益冲突。

2　结果

2.1　患者临床特征

本研究总共收集到 357 例感染 CRE 的住院患者。通过纳排标准筛选后，最终有 90 例患者纳入分析（见图 1）。表 1 描述了按人口统计学和临床特征分类的患者的死亡率和生存率。患者中位年龄为 62 岁（四分位数间距：52.5 ～ 71.0 岁），90 例患者中有 61 例（67.8%）为男性。大部分患者是医院获得性感染（82.2%，74/90），最常见的基础疾病是实体肿瘤（27.8%，25/90），最常见的侵入性操作是气管插管（30%，27/90）和中心静脉置管（17.8%，16/90），而最常见的感染部位是肺部感染（77.8%，70/90），其次是血流感染（22.2%，20/90）（见表 1）。

表 1　CRE 感染患者临床特征的比较

Tab 1　Clinical characteristics in patients with CRE infection

变量	生存组（n = 75）	死亡组（n = 15）	总数（n = 90）	P 值
人口学特征				
年龄（岁）[中位数（IQR）]	61（52.0 ～ 69.0）	67（57.0 ～ 71.0）	62（52.5 ～ 71.0）	0.240
男性 [n（%）]	53（70.7）	8（53.3）	61（67.8）	0.313
医院相关因素				
医院获得性感染 [n（%）]	59（78.6）	15（100）	74（82.2）	0.109
社区获得性感染 [n（%）]	16（21.3）	0（0）	16（17.8）	0.109
住院时长 [中位数（IQR）]	21（12.0 ～ 32.0）	16（12.0 ～ 26.0）	19（12.0 ～ 31.0）	0.138
检出 CRE 后的住院时长 /d [中位数（IQR）]	12（6.0 ～ 21.0）	9（2.0 ～ 13.0）	11（5.0 ～ 20.3）	0.052
入住 ICU [n（%）]	39（52.0）	12（80.0）	51（56.7）	0.046
入住 ICU 时长 /d[中位数（IQR）]	1（0 ～ 11.0）	4（0 ～ 12.0）	1.5（0 ～ 12.0）	0.360
检出 CRE 后住 ICU 时长 /d[中位数（IQR）]	0（0 ～ 5.0）	0（0 ～ 7.0）	0（0 ～ 6.0）	0.575
疾病严重程度评分				
Charlson 合并症指数 [中位数（IQR）]	4（3.0 ～ 7.0）	4（3.0 ～ 6.0）	4（3.0 ～ 6.3）	0.671
APACHE Ⅱ [中位数（IQR）]	8（5.0 ～ 11.0）	10（5.0 ～ 15.0）	8（5.0 ～ 11.3）	0.191
基础情况				
糖尿病 [n（%）]	13（17.3）	1（6.7）	14（15.6）	0.515
终末期肝病 [n（%）]	5（6.7）	1（6.7）	6（6.7）	1.0
终末期肾病 [n（%）]	3（4.0）	2（13.3）	5（5.6）	0.410
心力衰竭 [n（%）]	4（5.3）	1（6.7）	5（5.6）	1.0
实体肿瘤 [n（%）]	20（26.7）	5（33.3）	25（27.8）	0.833
血液肿瘤 [n（%）]	2（2.7）	0（0）	2（2.2）	1.0
实体器官移植 [n（%）]	0（0）	1（6.7）	1（1.1）	0.368
中性粒细胞缺乏 [n（%）]	2（2.7）	4（26.7）	6（6.7）	0.005
6 个月内接受化疗 [n（%）]	5（6.7）	2（13.3）	7（7.8）	0.725
3 个月内接受手术 [n（%）]	45（60）	5（33.3）	50（55.6）	0.058
侵入性操作				
机械通气 [n（%）]	13（17.3）	2（13.3）	15（16.7）	1.0
中心静脉置管 [n（%）]	9（12.0）	7（46.7）	16（17.8）	0.005
气管插管 [n（%）]	22（29.3）	5（33.3）	27（30.0）	1.0
腰椎 / 胸椎 / 骨髓穿刺 [n（%）]	24（32.0）	3（20.0）	27（30.0）	0.537
气管切开 [n（%）]	13（17.3）	2（13.3）	15（16.7）	1.0
引流管 [n（%）]	6（8.0）	0（0）	6（6.0）	0.571
临床指标				
白细胞计数（WBC）				
＞ $10\times10^9\cdot L^{-1}$	31（41.3）	10（66.7）	41（45.6）	0.072
＜ $4\times10^9\cdot L^{-1}$	4（5.3）	2（13.3）	6（6.7）	
（4 ～ 10）$\times10^9\cdot L^{-1}$	39（52.0）	4（26.7）	43（47.8）	
中性粒细胞百分比（N%）				
＞ 70%	54（72.0）	13（86.7）	67（74.4）	0.387
＜ 70%	21（28.0）	2（13.3）	23（25.6）	
C 反应蛋白 /（$mg\cdot L^{-1}$）[中位数（IQR）]	63.5（16.7 ～ 105.5）	91.7（43.3 ～ 119.0）	75.3（17.2 ～ 112.0）	0.389

续表 1

变量	生存组（n = 75）	死亡组（n = 15）	总数（n = 90）	P 值
降钙素原				
＞ 2 ng • mL^{-1}	10（13.3）	7（46.7）	17（18.9）	0.007
＜ 0.05 ng • mL^{-1}	6（8.0）	1（6.7）	7（7.8）	
0.05 ～ 2 ng • mL^{-1}	50（66.7）	7（46.7）	57（63.3）	
2 ～ 10 ng • mL^{-1}	8（10.7）	4（26.7）	12（13.3）	
＞ 10 ng • mL^{-1}	3（4.0）	2（13.3）	5（5.6）	
白蛋白（g • L^{-1}）[（均值 ± 标准差）]	33.3±5.2	32.3±8.9	33.1±5.9	0.689
肌酐（μmol • L^{-1}）[中位数（IQR）]	72.5（58.85 ～ 105.4）	88.0（58.3 ～ 108.8）	74.2（58.8 ～ 106.7）	0.649
谷丙转氨酶 /（U • L^{-1}）[中位数（IQR）]	26.7（16.3 ～ 50.9）	30.3（12.8 ～ 48.3）	26.9（15.5 ～ 50.9）	0.721
谷草转氨酶 /（U • L^{-1}）[中位数（IQR）]	33.7（20.75 ～ 49.85）	41.6（21.5 ～ 61.2）	33.8（20.8 ～ 50.8）	0.677
感染类型				
感染性休克 [n（%）]	0（0）	6（40.0）	6（6.7）	0.000
脓毒症 [n（%）]	7（9.3）	9（60.0）	16（17.8）	0.000
血流感染 [n（%）]	13（17.3）	7（46.7）	20（22.2）	0.031
肺部感染 [n（%）]	56（74.7）	14（93.3）	70（77.8）	0.212
尿路感染 [n（%）]	18（24.0）	0（0）	18（20.0）	0.077
腹腔内感染 [n（%）]	10（13.3）	5（33.3）	15（16.7）	0.129
颅内感染 [n（%）]	7（9.3）	1（6.7）	8（8.9）	1
皮肤和软组织感染 [n（%）]	4（5.3）	1（6.7）	5（5.6）	1
胆道感染 [n（%）]	4（5.3）	1（6.7）	5（5.6）	1
感染灶可根除 [n（%）]	33（44.0）	6（40.0）	39（43.3）	0.775
3 d 内清除感染灶 [n（%）]	5（6.7）	0（0）	5（5.6）	0.585
感染灶仍然存在 [n（%）]	34（45.3）	5（33.3）	39（43.3）	0.569

注：IQR：四分位数间距（inter quartile rang）。

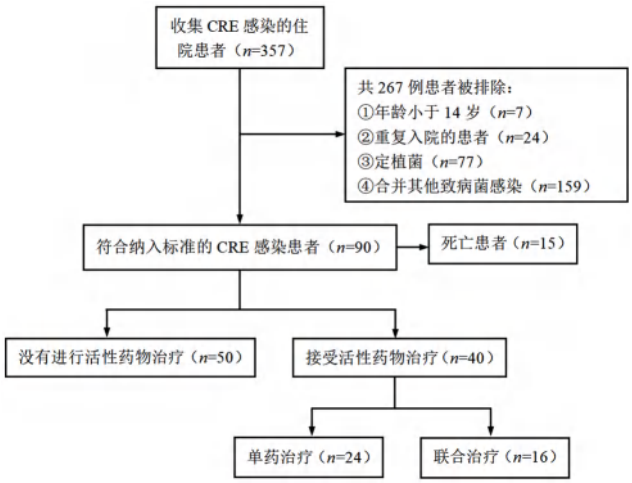


图 1　CRE 感染患者的纳排流程图

Fig 1　Included patients with CRE infection

2.2　CRE 菌株的微生物学特征

在 90 例患者中，分别有 67 株肺炎克雷伯菌、12 株大肠埃希菌、8 株阴沟肠杆菌、1 株奇异变形杆菌、1 株产酸克雷伯菌和 1 株摩根摩根菌。在这 90 株菌株中，标本来源占比最高的是痰液（32.2%），其次分别是分泌物（22%），引流液（11.1%），血液（11.1%），尿液（10.0）等。患者的微生物清除都比较低（11.1%），存活患者微生物清除为 13.3%，而死亡患者的微生物清除为 0.0%（见表 2）。

表 2　CRE 感染患者微生物学体征 [n(%)]

Tab 2　Microbiological characteristics of patients with CRE infection [n(%)]

变量	生存组（n = 75）	死亡组（n = 15）	总数（n = 90）	P 值
病原体				
肺炎克雷伯菌	57（76.0）	10（66.7）	67（74.4）	0.520
大肠埃希菌	9（12.0）	3（20.0）	12（13.3）	0.414
阴沟肠杆菌	6（8.0）	2（13.3）	8（8.9）	0.616
产酸克雷伯菌	1（1.3）	0（0）	1（1.1）	1
奇异变形杆菌	1（1.3）	0（0）	1（1.1）	1
摩根摩根菌	1（1.3）	0（0）	1（1.1）	1
标本来源				
血液	8（10.7）	2（13.3）	10（11.1）	0.671
痰液	23（30.7）	6（40.0）	29（32.2）	0.549
支气管肺泡灌洗液	5（6.7）	1（6.7）	6（6.7）	1.000
引流液	7（9.3）	3（20.0）	10（11.1）	0.361
创面	2（2.7）	0（0.0）	2（2.2）	1.000
尿液	9（12.0）	0（0.0）	9（10）	0.347
分泌物	18（24.0）	2（13.3）	20（22.2）	0.506
其他（脓液 / 脑脊液）	3（4.0）	1（6.7）	4（4.4）	1.000
微生物清除	10（13.3）	0（0.0）	10（11.1）	0.203
7 d 内	1（1.3）	0（0.0）	1（1.1）	1
14 d 内	3（4.0）	0（0.0）	3（3.3）	1
14 d 以上且出院之前	6（8.0）	0（0.0）	6（6.7）	0.584

2.3　CRE 感染死亡风险因素的分析

患者的总死亡率为 16.7%（15/90）。相对于

存活的患者，死亡患者表现出更高的白细胞计数（＞$10\times10^9\cdot L^{-1}$，66.7% *vs* 41.3%；$P=0.072$）和降钙素原（＞2 ng•mL^{-1}，47.6% *vs* 13.3%；$P=0.007$），具有更高的中性粒细胞缺乏症（26.7% *vs* 2.7%；$P=0.005$）、菌血症（46.7% *vs* 17.3%；$P=0.031$）、脓毒症（60.0% *vs* 9.3%；$P=0.000$）及感染性休克发生率（40.0% *vs* 0%；$P=0.000$），更多入住 ICU（80.0% *vs* 52.0%；$P=0.046$）、中心静脉置管（46.7% *vs* 12.0%；$P=0.005$）（见表 1）和抗菌药物暴露（86.7% *vs* 61.3%；$P=0.059$）；而相对于死亡患者，更多的存活患者接受了早期合理的目的性治疗（44.0% *vs* 13.3%；$P=0.026$）（见表 3）。

表 3　CRE 感染患者抗菌药物使用情况

Tab 3　Antimicrobial treatments of patients with CRE infection

治疗	生存组（$n=75$）	死亡组（$n=15$）	总数（$n=90$）	P 值
抗菌药物暴露（30 d 内）[n（%）]	46/75（61.3）	13/15（86.7）	59/90（65.6）	0.059
经验性治疗 [n（%）]	53/75（70.7）	14/15（93.3）	67/90（74.4）	0.130
合理的经验性治疗（48 h 内）[n（%）]	19/75（25.3）	5/15（33.3）	24/90（26.7）	0.749
目的性治疗 [n（%）]	58/75（77.3）	10/15（66.7）	68/90（75.6）	0.583
早期合理目的性治疗（48 h 内）[n（%）]	33/75（44）	2/15（13.3）	35/90（38.9）	0.026
合理目的性治疗（5 d 内）[n（%）]	33/75（44）	4/15（26.7）	37/90（41.1）	0.213
活性药物治疗 [n（%）]	34/75（45.3）	6/15（40）	40/90（44.4）	0.704
基于 CAZ-AVI 的治疗 [n（%）]	4/34（11.8）	1/6（16.7）	5/40（12.5）	1.000
基于多黏菌素 B 的治疗 [n（%）]	8/34（23.5）	4/6（66.7）	12/40（30）	0.110
基于替加环素的治疗 [n（%）]	5/34（14.7）	1/6（16.7）	6/40（15）	1.000
基于碳青霉烯类的治疗 [n（%）]	13/34（38.2）	0/6（0）	13/40（32.5）	0.115
单药治疗 [n（%）]	22/34（64.7）	2/6（33.3）	24/40（40）	0.320
多黏菌素 B	5	1	6	
碳青霉烯类	12	0	12	
CAZ-AVI	1	1	2	
氨曲南	1	0	1	
左氧氟沙星	1	0	1	
哌拉西林他唑巴坦	2	0	2	
联合治疗 [n（%）]	12/34（35.3）	4/6（66.7）	16/40（60）	0.320
基于 CAZ-AVI	3	0	3	
CAZ-AVI ＋替加环素	2	0	2	
CAZ-AVI ＋碳青霉烯类	1	0	1	
基于多黏菌素 B	3	3	6	
多黏菌素 B ＋碳青霉烯类	3	2	5	
多黏菌素 B ＋碳青霉烯类＋替加环素	0	1	1	
基于替加环素	5	1	6	
替加环素＋碳青霉烯类	5	0	5	
替加环素＋左氧氟沙星	0	1	1	
基于碳青霉烯类	1	0	1	
碳青霉烯类＋复方新诺明	1	0	1	

将单因素分析中 $P<0.1$ 的 13 个变量纳入二元 Logistic 回归模型进行多因素分析。结果显示，中心静脉置管、感染性休克和早期合理的目的性治疗是感染 CRE 后死亡的独立影响因素。其中，中心静脉置管（$OR=6.351$；95%CI，1.415 ～ 28.502；$P=0.016$）和感染性休克（$OR=57.074$；95%CI，3.285 ～ 991.775；$P=0.005$）是 CRE 感染后死亡的危险因素，而早期合理目的性治疗（$OR=0.091$；95%CI，0.010 ～ 0.842；$P=0.035$）是 CRE 感染后死亡的保护因素（见表 4）。

表 4　CRE 感染患者发生死亡的 Logistic 多因素分析

Tab 4　Multivariate Logistic regression analysis of death in patients with CRE infection

变量	OR（95%CI）	P 值
中心静脉置管	6.351（1.415 ～ 28.502）	0.016
感染性休克	57.074（3.285 ～ 991.775）	0.005
早期合理目的性治疗（48 h 内）	0.091（0.010 ～ 0.842）	0.035

2.4　*抗菌药物治疗*

表 3 列出了 90 例患者的抗菌药物使用情况，单药治疗（8.3%）比联合治疗（25%）的死亡率更低，但差异没有统计学意义（$P=0.320$）。图 2 比较了患者治疗死亡率的影响，与没有接受相应治疗的患者相比，接受早期合理目的性治疗的患者具有显著更低的死亡率（$P=0.016$），接受合

理目的性治疗与活性药物治疗的死亡率也更低。对患者治疗过程中包含几种抗菌药物的死亡率进行了一个比较，其中含有 CAZ-AVI（20%，1/5）和碳青霉烯（20.7%，6/29）的治疗死亡率较低，而含有多黏菌素 B（31.3%，5/16）和替加环素（35.7%，5/14）的治疗死亡率相对较高。

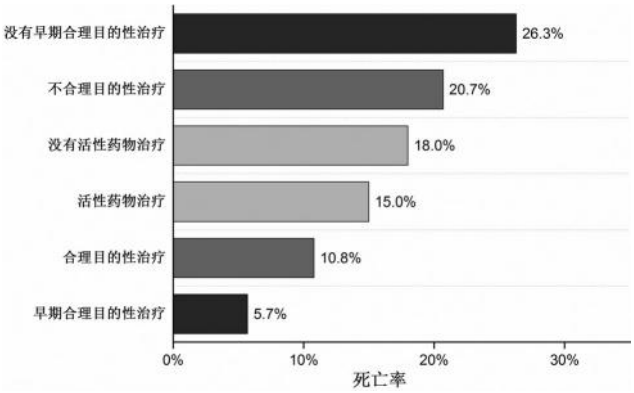


图 2　CRE 感染患者接受各治疗的病死率比较

Fig 2　Mortality rates among patients with CRE infections after treatments

3　讨论

本研究患者的全因死亡率为 16.7%，低于此前报道的 30% ～ 80%[6, 15]，因为本研究的感染类型主要是肺部感染，其次是血流感染。与许多研究结果一样 [16-17]，本研究表明菌血症能显著增加 CRE 感染患者的死亡率（OR = 4.173，P = 0.017）。

影响患者预后的因素还有很多，包括病情严重程度、微生物特征、个体危险因素和抗菌治疗效果。几个反映疾病严重程度的评分，如急性生理和慢性健康评分（APACHE Ⅱ）[18-19]、Charlson 合并症指数（CCI）[20]、Pitt 菌血症评分 [21-22]、序贯器官衰竭估计（SOFA）评分 [23] 均是 CRE 感染患者死亡率的独立影响因素。

我国临床分离的 CRE 菌株中 97.4% 为产碳青霉烯酶，包括 KPC-2（51.6%）、NDM（35.7%）和 OXA-48（7.3%），其分布特征总体以 KPC 酶为主，肺炎克雷伯菌成人分离株主要产 KPC 酶，大肠埃希菌主要产 NDM 型金属酶 [24]。Tamma 等 [25] 的研究表明产碳青霉烯酶的 CRE 菌株更具毒性，并且与较差的结果相关。研究表明，美罗培南 $MIC \leqslant 8\ mg \cdot L^{-1}$ 的患者接受以美罗培南为基础的治疗效果良好，$MIC \leqslant 4\ mg \cdot L^{-1}$ 的患者预后更好 [7]。美罗培南 $MIC \geqslant 8\ mg \cdot L^{-1}$ 是影响 CRE 死亡率的独立危险因素 [21]，然而本研究部分 CRE 菌株未检测碳青霉烯酶型，美罗培南是用琼脂稀释法测的 KB 值，故无法评估碳青霉烯酶和美罗培南 MIC 对患者预后的影响。此外，有研究表明微生物清除特别是在 7 d 内清除的患者生存率明显更高 [8, 17]，与本研究一致。

本研究确定了三个 CRE 感染患者死亡的独立影响因素：中心静脉置管、感染性休克和早期合理目的性治疗。脓毒症及其引起的感染性休克是危重患者的一个重要且常见的问题，与住院时间和死亡率密切相关 [26]。本研究中感染性休克的死亡率为 100%，且其多因素分析中 OR 值高达 57.074，是影响 CRE 患者死亡的重大危险因素。危重患者的生命支持干预，如动脉插管、中心静脉置管、机械通气等，可导致黏膜的损伤，大多数细菌通过黏膜屏障进入血流，从而增加血流感染的发生率 [27]，而本研究表明中心静脉置管是 CRE 患者死亡的独立危险因素（P = 0.016）。此外，中性粒细胞缺乏症患者缺乏对抗细菌感染的能力，其治疗依赖于立即使用抗菌药物，杀死感染细菌。因此，中性粒细胞减少症患者可能需要新的治疗管理方法 [28]。

有研究提出应高度重视 CRE 抗感染的早期治疗，但是开始治疗的时间存在争议 [22]，抗菌药物的使用天数也存在争议。Gutiérrez-Gutiérrez 等 [29] 的研究认为 5 d 内使用活性药物治疗能够显著降低患者的 30 d 死亡率（P < 0.0001），而 48 h 内使用活性药物治疗没有显著的差异。但是一项 meta 结果分析表明，在检出 CRE 的 48 h 内使用活性药物治疗的生存率明显提高 [30]。同样，本研究发现在检出 CRE 后 48 h 内进行活性药物治疗可显著降低死亡率（5.7% *vs* 26.3%，P = 0.026），然而 5 d 内的使用活性药物治疗患者的死亡率差异没有统计学意义。这提示在 48 h 内给药并及时进行抗菌药物敏感性检测可改善临床疗效。有研究认为接受短期的抗菌药物治疗的患者预后较差 [12, 27]，而有研究却认为短期抗菌药物治疗是保护因素 [31]。但是因为 CRE 感染的危重患者临床情况频繁变化，抗菌药物治疗方案需要随时调整，所以很难评估抗菌药物的使用天数对患者预后的影响。

同样，关于 CRE 抗菌药物的治疗方案目前仍有很多争议，关于单独用药还是联合用药，“老”抗菌药物（多黏菌素、替加环素、氨基糖苷类）的疗效如何，如何调整碳青霉烯类药物给药方式，新型复方制剂如 CAZ-AVI 的疗效和安全性如何，尚未形成一致的结论。

目前的研究证据更支持联合治疗（方案中不包含 CAZ-AVI）[22, 29]，但是基于 CAZ-AVI 的治疗显示联合治疗和单药治疗的死亡率没有显著差异 [32-33]。本次研究中单药治疗（8.3%）比联合治疗（25.0%）的死亡率更低（P = 0.320）（使用 CAZ-

AVI 的患者数量较少），部分原因可能是接受单药治疗的患者症状较轻或感染源容易控制[34]。

研究表明多黏菌素单药治疗 CRE 感染的疗效不好[35]。Medeiros 等[36]的研究纳入 89 名患者，结果表明多黏菌素单药治疗 CRKP-BSI 死亡率高，而多黏菌素联合用药特别是联合阿米卡星具有更好的疗效。同样，Balkan 等[12]研究表明，与非多黏菌素为基础的方案相比，以多黏菌素为基础的双重联合，最好是三重联合，疗效更好（$P < 0.001$）。Shen 等[14]认为基于多黏菌素联合治疗的方案比基于替加环素联合治疗的方案具有更高的生存率。近年来，使用碳青霉烯治疗 CRE 感染仍具有广泛的争议，研究表明使用高剂量碳青霉烯、延长输注、双碳青霉烯或者与其他抗菌药物联合似乎成为几种可选择的临床方案[37-39]。有研究认为包含碳青霉烯治疗死亡率显著降低[34，39]，但也有研究认为包含碳青霉烯的治疗具有较差的治疗结局[21]。当美罗培南 *MIC* 较高水平时，可考虑使用高于许可水平的高剂量美罗培南给药方案，进行治疗药物监测（TDM）以取得更好的临床疗效[40]。CAZ-AVI 于 2015 年由美国食品药品监督管理局批准用于治疗复杂性腹腔、泌尿系统和医院获得性肺部感染[41]。有几项研究报道了 CAZ-AVI 和其他抗菌药物相比，具有更低的死亡率[32，42]。虽然初步证据表明 CAZ-AVI 可能是治疗 CRKP 感染的有效手段，但在中国这方面的临床经验仍然有限，特别是缺乏上市后真实世界研究数据来评价其治疗 CRE 感染的有效性和安全性[43]。本研究使用多黏菌素、替加环素、碳青霉烯类、CAZ-AVI 的死亡率分别为 31.3%、35.7%、20.7%、20%，与先前的研究结果基本一致[32，42]。

本研究也存在一些不足：第一，本研究是回顾性设计，因此容易出现选择偏差和回忆偏差；第二，由于数据的缺失，无法将其他的影响死亡的风险因素纳入分析，比如 CRE 产酶情况、美罗培南 *MIC*、抗菌药物的使用剂量和持续时间等；第三，本研究是单中心研究，且样本量较小。

4　结论

本研究分析了我院 CRE 感染患者的死亡风险因素，并比较了不同抗菌方案治疗对死亡率的影响。结果表明中心静脉置管，尤其是感染性休克（$OR = 57.074$）能显著增加 CRE 感染患者的死亡率，在临床上应当引起高度重视。单药治疗和联合治疗死亡率差异没有统计学意义，且治疗 CRE 的最佳抗菌治疗方案并未确定。但选择合理的抗菌药物并及时进行早期治疗（检出 CRE 48 h 内）可有效改善患者的临床预后。

参考文献

[1] Tamma PD，Aitken SL，Bonomo RA，et al. Infectious diseases society of America guidance on the treatment of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacterales（ESBL-E），carbapenem-resistant Enterobacterales（CRE），and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance（DTR-P. aeruginosa）[J]. Clin Infect Dis，2021，72（7）：e169-e183.

[2] Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [EB/OL]. Clinical and Laboratory Standards Institute，2017，M100-s27（http：//www. clsi. org）.

[3] Nordmann P，Naas T，Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. Emerg Infect Dis，2011，17（10）：1791-1798.

[4] Zhang Y，Wang Q，Yin Y，et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections：report from the China CRE network [J]. Antimicrob Agents Chemother，2018，62（2）：e01882-17.

[5] Hu F，Guo Y，Yang Y，et al. Resistance reported from China Antimicrobial Surveillance Network（CHINET）in 2018 [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2019，38（12）：2275-2281.

[6] Xu L，Sun X，Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob，2017，16（1）：18.

[7] Chen L，Han X，Li Y，et al. Assessment of mortality-related risk factors and effective antimicrobial regimens for treatment of bloodstream infections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales [J]. Antimicrob Agents Chemother，2021，65（9）：e0069821.

[8] Liu KS，Tong YS，Lee MT，et al. Risk factors of 30-day all-cause mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection [J]. J Personalized Med，2021，11（7）：616.

[9] Paul M，Carrara E，Retamar P，et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases（ESCMID）guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli（endorsed by european society of intensive care medicine）[J]. Clin Microbiol Infect，2022，28（4）：521-547.

[10] Trecarichi EM，Tumbarello M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections [J]. Virulence，2017，8（4）：470-484.

[11] Agyeman AA，Bergen PJ，Rao GG，et al. A systematic review and meta-analysis of treatment outcomes following antibiotic therapy among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections [J]. Int J Antimicrob Agents，2020，55（1）：105833.

[12] Balkan II，Aygun G，Aydin S，et al. Blood stream infections due to oxa-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae：treatment and survival [J]. Int J Infect Dis，2014，26：51-56.

[13] Wang X，Wang Q，Cao B，et al. Retrospective observation-

al study from a Chinese network of the impact of combination therapy versus monotherapy on mortality from carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. Antimicrob Agents Chemother，2019，63（1）：e01511-18.

[14] Shen L，Lian C，Zhu B，et al. Bloodstream infections due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*：a single-center retrospective study on risk factors and therapy options [J]. Microb Drug Resist，2021，27（2）：227-233.

[15] Seo H，Lee SC，Chung H，et al. Clinical and microbiological analysis of risk factors for mortality in patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. Int J Antimicrob Agents，2020，56（4）：106126.

[16] Palacios-Baena ZR，Oteo J，Conejo C，et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain [J]. J Infection，2016，72（2）：152-160.

[17] Lim FK，Liew YX，Cai Y，et al. Treatment and outcomes of infections caused by diverse carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacterales [J]. Front Cell Infect Microbiol，2020，10：579462.

[18] Brescini L，Morroni G，Valeriani C，et al. Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy [J]. BMC Infect Dis，2019，19（1）：611.

[19] Tumbarello M，Trecarichi EM，De Rosa FG，et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*：differences in therapy and mortality in a multicentre study [J]. J Antimicrob Chemother，2015，70（7）：2133-2143.

[20] Andrey DO，Dantas PP，Martins WBS，et al. An emerging clone，klebsiella pneumoniae carbapenemase 2-producing K. pneumoniae sequence type 16，associated with high mortality rates in a CC258-endemic setting [J]. Clin Infect Dis，2020，71（7）：e141-e150.

[21] Lee NY，Tsai CS，Syue LS，et al. Treatment outcome of bacteremia due to non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia：role of carbapenem combination therapy [J]. Clin Ther，2020，42（3）：e33-e44.

[22] Wang X，Wang Q，Cao B，et al. Retrospective observational study from a Chinese network of the impact of combination therapy versus monotherapy on mortality from carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. Antimicrob Agents Chemother，2019，63（1）：e01511-18.

[23] Rivera-Espinar F，Machuca I，Tejero R，et al. Impact of KPC production and high-level meropenem resistance on all-cause mortality of ventilator-associated pneumonia in association with *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother，2020，64（6）：e02164-19.

[24] Han R，Shi Q，Wu S，et al. Dissemination of carbapenemases（KPC，NDM，OXA-48，IMP，and VIM）among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from adult and children patients in China [J]. Front Cell Infect Microbiol，2020，10：314.

[25] Tamma PD，Goodman KE，Harris AD，et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. Clin Infect Dis，2017，64（3）：257-264.

[26] Perner A，Gordon AC，De Backer D，et al. Sepsis：frontiers in diagnosis，resuscitation and antibiotic therapy [J]. Intensive Care Med，2016，42（12）：1958-1969.

[27] Zhou C，Jin L，Wang Q，et al. Bloodstream infections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales：risk factors for mortality，antimicrobial therapy and treatment outcomes from a prospective multicenter study [J]. Infect Drug Resist，2021，14：731-742.

[28] Li C，Li Y，Zhao Z，et al. Treatment options and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bloodstream infection in a Chinese university hospital [J]. J Infect Public Health，2019，12（1）：26-31.

[29] Gutiérrez-Gutiérrez B，Salamanca E，De Cueto M，et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae（increment）：a retrospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis，2017，17（7）：726-734.

[30] Kohler PP，Volling C，Green K，et al. Carbapenem resistance，initial antibiotic therapy，and mortality in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia：a systematic review and meta-analysis [J]. Infect Control Hosp Epidemiol，2017，38（11）：1319-1328.

[31] Cienfuegos-Gallet AV，Ocampo de Los Ríos AM，Sierra Viana P，et al. Risk factors and survival of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a KPC endemic setting：a case-control and cohort study [J]. BMC Infect Dis，2019，19（1）：830.

[32] Tumbarello M，Raffaelli F，Giannella M，et al. Ceftazidime-avibactam use for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. Pneumoniae* infections：a retrospective observational multicenter study [J]. Clin Infect Dis，2021，73（9）：1664-1676.

[33] Tumbarello M，Trecarichi EM，Corona A，et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam salvage therapy in patients with infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* [J]. Clin Infect Dis，2019，68（3）：355-364.

[34] Navarro-San Francisco C，Mora-Rillo M，Romero-Gómez MP，et al. Bacteraemia due to oxa-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae：a major clinical challenge [J]. Clin Microbiol Infect，2013，19（2）：e72-e79.

[35] Hou SY，Wu D，Feng XH. Polymyxin monotherapy versus polymyxin-based combination therapy against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*：a systematic review and meta-analysis [J]. J Glob Antimicrob Resist，2020，23：197-202.

[36] Medeiros GS，Rigatto MH，Falci DR，et al. Combination therapy with polymyxin B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection [J]. Int J Antimicrob

Agents，2019，53（2）：152-157.
[37] Cancelli F，Oliva A，De Angelis M，et al. Role of double-carbapenem regimen in the treatment of infections due to carbapenemase producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae：a single-center，observational study [J]. Biomed Res Int，2018，2018：2785696.
[38] Cojutti P，Sartor A，Righi E，et al. Population pharmacokinetics of high-dose continuous-infusion meropenem and considerations for use in the treatment of infections due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother，2017，61（10）：e00794-17.
[39] Giannella M，Trecarichi EM，Giacobbe DR，et al. Effect of combination therapy containing a high-dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection [J]. Int J Antimicrob Agents，2018，51（2）：244-248.
[40] Pea F，Della Siega P，Cojutti P，et al. Might real-time pharmacokinetic/pharmacodynamic optimisation of high-dose continuous-infusion meropenem improve clinical cure in infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*? [J]. Int J Antimicrob Agents，2017，49（2）：255-258.
[41] Dietl B，Martínez LM，Calbo E，et al. Update on the role of ceftazidime-avibactam in the management of carbapenemase-producing Enterobacterales [J]. Future Microbiol，2020，15：473-484.
[42] Van Duin D，Lok JJ，Earley M，et al. Colistin versus ceftazidime-avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [J]. Clin Infect Dis，2018，66（2）：163-171.
[43] Kuang H，Zhong C，Wang Y，et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with multidrug-resistant gram-negative bacterial infections treated with ceftazidime/avibactam [J]. J Glob Antimicrob Resist，2020，23：404-407.

（收稿日期：2022-05-09；修回日期：2022-06-16）

头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗革兰氏阴性菌感染的 meta 分析

胡琴[1，2，3]，唐博文[4]，刘韶[1]，陈敬兰[1]，门鹏[5]，邓晟[1*]（1. 中南大学湘雅医院药学部，长沙　410008；2. 中南大学医院管理研究所，长沙　410008；3. 湘雅卫生与健康发展研究中心，长沙　410008；4. 中南大学湘雅药学院，长沙　410013；5. 北京大学第三医院药剂科，北京　100191）

摘要：目的　评价头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗革兰氏阴性菌感染的临床疗效、微生物学反应和安全性。**方法**　利用计算机检索 Cochrane Library、Embase、PubMed 三个外文数据库和万方数据知识服务平台、知网、维普中文科技期刊全文数据库三个中文数据库，纳入比较头孢洛扎 / 他唑巴坦与对照组治疗细菌感染的有效性和安全性的随机对照试验（RCTs）。主要结局指标为临床治愈率和细菌清除率，次要结局指标为不良事件发生率、严重不良事件发生率和全因病死率。两名研究员独立提取并分析数据，评价偏倚风险并使用 Review Manager 5.3 进行 meta 分析。**结果**　共纳入 4 项研究，涉及 2924 例患者。Meta 分析结果表明，在微生物学改良意向治疗（mMITT）人群（$OR = 0.92$，95%CI：0.68 ～ 1.23，$P = 0.55$）和临床可评价人群（$OR = 1.07$，95%CI：0.80 ～ 1.43，$P = 0.63$）中，头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗细菌感染的临床治愈率不亚于对照组。头孢洛扎 / 他唑巴坦对肠杆菌科（$OR = 1.55$，95%CI：1.18 ～ 2.03，$P = 0.002$）和大肠埃希菌属亚组（$OR = 1.91$，95%CI:1.27 ～ 2.88，$P = 0.002$）有较强的微生物清除能力。此外，头孢洛扎 / 他唑巴坦与对照组在不良事件发生率（$OR = 1.07$，95%CI:0.91 ～ 1.26，$P = 0.41$）、严重不良事件发生率（$OR = 1.25$，95%CI：0.87 ～ 1.78，$P = 0.22$）以及全因病死率（$OR = 1.02$，95%CI：0.75 ～ 1.39，$P = 0.91$）方面没有显著差异。**结论**　在治疗革兰氏阴性菌感染时，头孢洛扎 / 他唑巴坦与一线治疗方案相比在临床治愈率方面具有非劣效性，并具有更好的细菌清除率，且安全性良好。

关键词：头孢洛扎 / 他唑巴坦；有效性；细菌清除率；安全性；meta 分析
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1736-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.004

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金（No. 2022JJ80045）；中南大学湘雅医院管理科研基金（No. 2019GL08）。
作者简介：胡琴，女，硕士，主管药师，主要从事抗菌药物临床合理应用研究，email：huqin199107@163.com　*__通信作者：__邓晟，男，主任药师，主要从事临床药学研究，email：dengsxy@sina.com

Meta-analysis of randomized controlled trials of ceftolozane-tazobactam for gram-negative bacteria infections

HU Qin[1, 2, 3], TANG Bo-wen[4], LIU Shao[1], CHEN Jing-lan[1], MEN Peng[5], DENG Sheng[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 2. *Institute of Hospital Administration*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 3. *Xiangya Health Development Research Center*, *Changsha* 410008; 4. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 5. *Department of Pharmacy*, *Third Hospital of Peking University*, *Beijing* 100191)

Abstract: Objective To assess the clinical efficacy, safety and microbiological responses of ceftolozane-tazobactam for gram-negative bacteria infections by meta-analysis. **Methods** The systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs) was conducted to determine the efficacy and safety of ceftolozane-tazobactam for bacterial infections. Electronic databases such as the Cochrane library, Embase, PubMed, and three Chinese databases were searched for RCTs of ceftolozane-tazobactam for bacterial infections (infection sites not limited). The primary outcomes included the clinical cure rate and bacterial clearance rate, whereas the secondary outcomes covered the risk of adverse events (AEs), risk of serious adverse events and all-cause mortality. Two reviewers independently assessed the risk of bias, collected and analyzed the data. The meta-analysis was performed with Review Manager 5.3. **Results** Four RCTs involving 2924 patients were ultimately included. The ceftolozane-tazobactam combination obtained a clinical outcome non-inferior to that of the control group in the treatment of bacterial infection in both the microbiologically modified intention-to-treat (mMITT) population group (OR = 0.92, 95%CI: 0.68 — 1.23, P = 0.55) and the clinically evaluable population group (OR = 1.07, 95%CI: 0.80 — 1.43, P = 0.63). Besides, ceftolozane-tazobactam had a stronger microbiological eradication rate for Enterobacteriaceae (OR = 1.55, 95%CI: 1.18 — 2.03, P = 0.002) and the subgroup of *Escherichia coli* (OR = 1.91, 95%CI: 1.27 — 2.88, P = 0.002). Furthermore, no significant differences were found between ceftolozane-tazobactam and the control group in the risk of AEs (OR = 1.07, 95%CI: 0.91 — 1.26, P = 0.41), serious AEs (OR = 1.25, 95%CI: 0.87 — 1.78, P = 0.22) or all-cause mortality (OR = 1.02, 95%CI: 0.75 — 1.39, P = 0.91). **Conclusion** In the treatment of bacterial infections, the efficacy of ceftolozane-tazobactam is as good as that of first-line drugs, with better microbiological responses safety and tolerance.

Key words: ceftolozane-tazobactam; efficacy; bacterial clearance rate; safety; meta-analysis

革兰氏阴性菌（gram-negative bacteria，GNB）可通过产生β-内酰胺酶、AmpC过表达、降低外膜蛋白表达、外排泵等多种机制获得耐药性[1]，包括肠杆菌科和铜绿假单胞菌在内的革兰氏阴性菌对多种药物的耐药性不断上升，多药耐药菌引起的感染导致死亡风险增高[2]，已成为全球公认的重大公共卫生问题。

由于细菌耐药性的不断增加，治疗细菌感染尤其是革兰氏阴性菌引起的感染仍是一种挑战[1]。碳青霉烯类药物长期以来一直是耐药细菌引起的严重感染的一线治疗方法[3]。然而，碳青霉烯类药物的广泛应用导致细菌耐药形势更加严峻。2017年，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将耐碳青霉烯肠杆菌科细菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae，CRE）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*，CRPA）、鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*，CRAB）列为全球最高优先病原体类别（即关键病原体）[4]。多药耐药革兰氏阴性菌（multidrug-resistant gram-negative bacteria，MDR-GNB）造成的感染流行是一个全球性威胁。因此，开发对MDR-GNB具有活性的新型抗菌药物是医疗卫生领域科研和临床的重要课题[5]。

传统的β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂（β-lactamase/β-lactamase inhibitor combination，BLBLI）治疗耐碳青霉烯类细菌感染的效果较差[6]。头孢洛扎/他唑巴坦是一种新型BLBLI

联合药物，具有可靠的体外抗革兰氏阴性菌活性[7-8]，于 2014 年 12 月，经美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准首先在美国上市，用于成人患者治疗由敏感的革兰氏阴性菌导致的复杂性尿路感染（complicated urinary tract infections，cUTIs）和复杂性腹腔内感染（complicated intra-abdominal infections，cIAIs）。随后于 2015 年在欧洲药品管理局（European Medicines Agency，EMA）获批上市，但迄今为止，头孢洛扎 / 他唑巴坦尚未在中国上市。

头孢洛扎的杀菌作用主要是通过抑制青霉素结合蛋白（penicillin-binding protein，PBP）抑制细胞壁的生物合成，对铜绿假单胞菌和肠杆菌科菌株具有较强的抗菌活性[9]。他唑巴坦是某些 *β*-内酰胺酶（如特异性青霉素酶和头孢菌素酶）的不可逆抑制剂，临床体外无抗菌活性，可与某些染色体和质粒介导的 *β*- 内酰胺酶结合。头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗成人 cIAIs 和 cUTIs 的临床疗效与对照组相当[10]。除 cIAIs 和 cUTIs 外，肺部感染是最常见的感染类型，关于其治疗医院获得性肺炎（hospital-acquired pneumonia，HAP）的研究也有报道[11]，但没有全面的分析。目前头孢洛扎 / 他唑巴坦在细菌感染治疗中的地位尚不明确。细菌清除率是评价抗菌药物治疗感染性疾病微生物反应的重要指标，尤其是对多药耐药菌引起的感染。

本文对已发表的头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗革兰氏阴性菌感染的随机对照试验（randomized controlled trials，RCTs）进行 meta 分析，以期为临床合理用药提供循证依据。

1　方法

1.1　文献检索

检索 Cochrane Library、PubMed、Embase、中国知网、维普中文科技期刊全文数据库、万方数据知识服务平台，检索时限截至 2020 年 11 月 1 日。独立检索关键词包括“ceftolozane/tazobactam”“Zerbaxa”“CXA201”“CLZ-TAZ”“TOL-TAZ”和“头孢洛扎 / 他唑巴坦”。出版语言没有限制。检索到的文章和补充材料的参考文献列表也经人工检查，避免遗漏相关研究。

1.2　文献纳入与排除

为了避免偏差，两位研究者通过阅读标题和摘要独立对文章进行评估，剔除重复研究及非 RCT 研究，并阅读全文判断是否符合纳入标准。纳入标准：纳入对比头孢洛扎 / 他唑巴坦联合或不联合甲硝唑与其他抗菌药物治疗革兰氏阴性菌感染患者人群的有效性和安全性，干预组接受头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗，对照组接受其他抗菌药物治疗。纳入的研究应提供至少一个结局指标：a）临床治愈率；b）细菌清除率；c）不良事件发生率；d）严重不良事件发生率；e）全因病死率。排除标准：排除体外研究、药代动力学研究、动物实验、个案报道、经济学研究、观察性研究等非 RCT 研究。

人群亚组定义[10]：改良意向治疗（modified intention to treat，MITT）人群包括接受头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗的所有意向治疗患者。微生物学改良意向治疗（mMITT）人群定义为有病原微生物学检出结果的 MITT 患者。临床可评价（clinical evaluation，CE）人群包括接受研究药物治疗、遵守临床试验方案并在治疗试验访视（TOC）期间可评估临床反应的患者。微生物可评价（ME）人群包括已确定基线病原微生物学结果并可评估微生物学反应的 CE 患者。

1.3　数据提取与偏倚风险分析

根据预先设计的数据提取表，由两位研究者独立提取相关信息并评估偏倚风险，两位研究者之间的分歧由第三位研究者解决。每项研究提取的信息为：① 研究作者和出版年份；② 研究特征，包括研究设计、样本量和用药疗程；③ 患者特征，包括年龄、性别、感染类型和病原菌；④ 干预组用药方案和对照组用药方案；⑤ 结局指标。

采用 Cochrane 偏倚风险评估工具对纳入研究的研究质量和偏倚风险进行评价[12]，评价结果分别用“偏倚低风险”“偏倚风险未知”和“偏倚高风险”表示。

使用 Review Manager 5.3 统计软件进行 meta 分析。根据纳入研究之间的异质性，若 $P > 0.10$ 或 $I^2 < 50\%$，提示各研究结果间的差异无统计学意义，则采用固定效应模型；反之则采用随机效应模型。计算数据的比值比（*OR*）和 95% 置信区间（*CI*）。

2　结果

2.1　纳入研究及其基本特征

首次检索文献 8922 篇，删除重复文献后，共保留文献 6061 篇。对文章的标题、摘要和全文进行筛选后，最终纳入 4 篇文章[11，13-15]进行 meta 分析。所有文章的出版语言为英文。共纳入 2924 例患者。文献筛选过程见图 1。4 项纳入研究的详细基线信息见表 1。

表 1　纳入研究的基本情况

Tab 1　Basic information of the included studies

纳入研究	样本量	年龄 / 岁	性别（男）	感染类型	病原菌	干预组	对照组	疗程 /d	结局指标
Kollef 等 [11]	362/364	60.5±16.7/59.5±17.2	262/255	HAP	肠杆菌科，铜绿假单胞菌	头孢洛扎 / 他唑巴坦 3 g q8 h	美罗培南 1 g q8 h	8 ～ 14	①②③④⑤
Solomkin 等 [13]	487/506	50.8±16.3/50.4±16.9	218/248	cIAIs	肠杆菌科，铜绿假单胞菌	头孢洛扎 / 他唑巴坦 1.5 g ＋甲硝唑 0.5 g q8 h	美罗培南 1 g 加安慰剂 q8 h	4 ～ 14	①②③④⑤
Wagenlehner 等 [14]	543/540	49.1±19.7/48.1±20.2	105/103	cUTIs	肠杆菌科，铜绿假单胞菌	头孢洛扎 / 他唑巴坦 1.5 g q8 h	左氧氟沙星 0.75 g qd	7	①②③④⑤
Lucasti 等 [15]	83/39	48.5±18.8/46.4±18.5	45/24	cIAIs	肠杆菌科，铜绿假单胞菌	头孢洛扎 / 他唑巴坦 1.5 g ＋甲硝唑 0.5 g q8 h	美罗培南 1 g 加安慰剂 q8 h	4 ～ 7	①②③④⑤

注（Note）：① 临床有效率（clinical efficacy rate）；② 细菌清除率（bacterial clearance rate）；③ 不良反应发生率（adverse effects rate）；④ 严重不良事件发生率（serious adverse effects rate）；⑤ 全因病死率（all-cause mortality）。

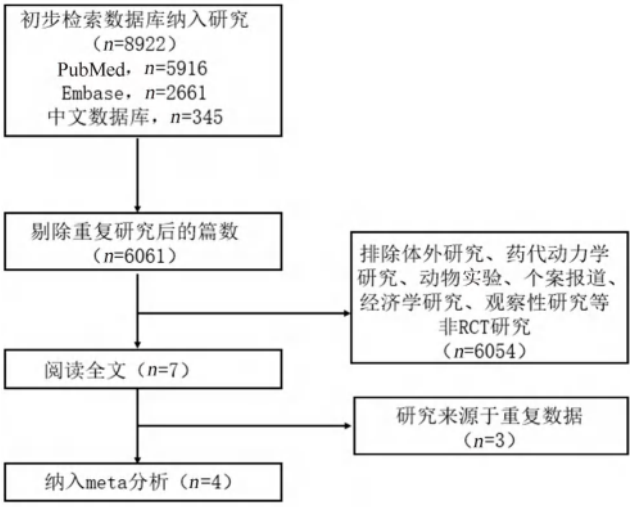


图 1　文献检索图

Fig 1　Literature retrieval diagram

2.2　文献质量

所有研究均为 RCTs，采用计算机随机或区组随机、双盲、多中心设计，比较头孢洛扎 / 他唑巴坦与对照组的临床疗效和安全性。纳入研究中报告的退出研究的人数依次为 12/726（1.7%）[10]，14/993（1.4%）[11]，15/1083（1.4%）[12] 和 6/122（4.9%）[13]，退出率均小于 10%。各研究均没有选择性报告数据，其他偏倚情况不清楚，结果见图 2。

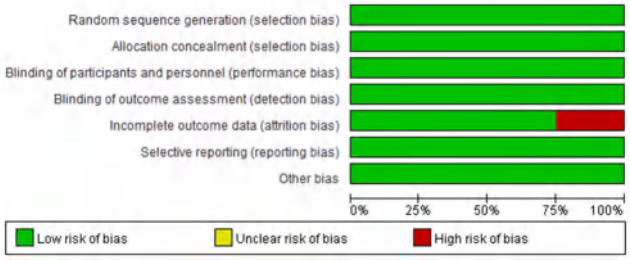


图 2　纳入研究的偏倚风险评价结果

Fig 2　Bias risk assessment results of the included studies

2.3　Meta 分析结果

2.3.1　临床治愈率　总体来说，不考虑感染类型、人群和病原菌亚组的情况下，头孢洛扎 / 他唑巴坦的临床治愈率与对照组的差异无统计学意义（OR ＝ 0.96，95%CI：0.83 ～ 1.11，P ＝ 0.60，I^2 ＝ 20%）。mMITT 人群在 TOC 访视时，随机效应模型的分析结果显示干预组的临床治愈率与对照组的差异无统计学意义（OR ＝ 0.92，95%CI：0.68 ～ 1.23，P ＝ 0.55，I^2 ＝ 73%）。固定效应模型的分析结果显示，头孢洛扎 / 他唑巴坦在 MITT 人群的（OR ＝ 0.94，95%CI：0.76 ～ 1.18，P ＝ 0.62，I^2 ＝ 12%）、CE 人群（OR ＝ 1.07，95%CI：0.80 ～ 1.43，P ＝ 0.63，I^2 ＝ 0%）的临床治愈率与对照组的差异无统计学意义，且异质性较小（见图 3）。

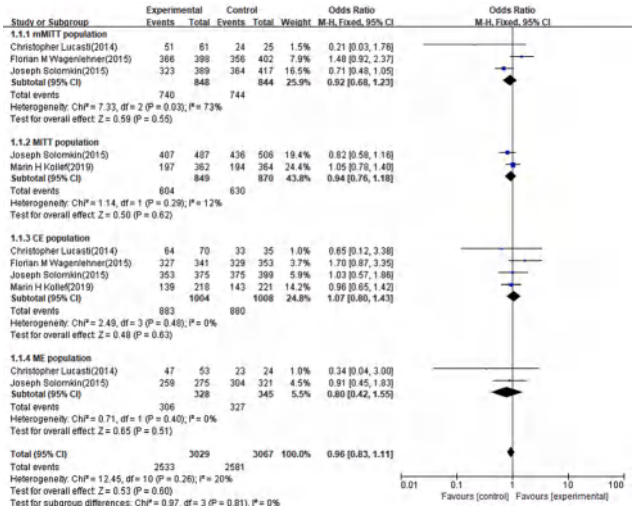


图 3　头孢洛扎 / 他唑巴坦的临床治愈率

Fig 3　Overall clinical cure rates of ceftolozane-tazobactam

2.3.2　细菌清除率　纳入研究的 meta 分析结果显示，使用头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗相较对照组可得到更好的细菌清除率（OR ＝ 1.52，95%CI：1.23 ～ 1.87，P ＜ 0.0001，I^2 ＝ 0%）。在 TOC 访

视时，mMITT 群体（OR = 1.45，95%CI：1.13 ～ 1.86，P = 0.004，I^2 = 0%）和 ME 群体（OR = 1.70，95%CI：1.16 ～ 2.50，P = 0.007，I^2 = 39%）的细菌清除率均优于对照组，差异具有统计学意义（见图 4）。

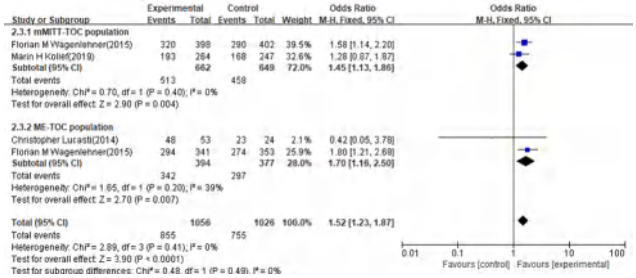


图 4　头孢洛扎 / 他唑巴坦的总体细菌清除率

Fig 4　Overall bacterial clearance rate of ceftolozane-tazobactam

4 篇研究中有 3 篇报道了细菌清除率，meta 分析结果显示，以肠杆菌科细菌为目标，头孢洛扎 / 他唑巴坦的细菌清除率高于对照组（OR = 1.55，95%CI：1.18 ～ 2.03，P = 0.002，I^2 = 61%）。以铜绿假单胞菌为目标，头孢洛扎 / 他唑巴坦与对照组之间细菌清除率的差异没有统计学意义（OR = 1.14，95% CI：0.60 ～ 2.16，P = 0.69，I^2 = 19%）（见图 5）。

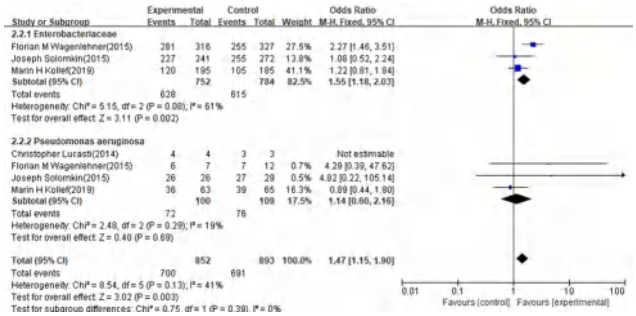


图 5　头孢洛扎 / 他唑巴坦对肠杆菌科和铜绿假单胞菌的细菌清除率

Fig 5　Bacterial clearance rate of ceftolozane-tazobactam on Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*

在肠杆菌科亚组分析中，头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗大肠埃希菌导致的感染时，细菌清除率显著优于对照组（OR = 1.91，95%CI：1.27 ～ 2.88，P = 0.002，I^2 = 42%）。在治疗肺炎克雷伯菌（OR = 2.78，95%CI：0.93 ～ 8.30，P = 0.07，I^2 = 0%）和产超广谱 β- 内酰胺酶肠杆菌科感染时，细菌清除率与对照组之间差异没有统计学意义（OR = 1.37，95%CI：0.84 ～ 2.23，P = 0.21，I^2 = 55%）（见图 6）。

2.3.3　不良事件和病死率　在安全性结局指标方面，头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗组与对照组在不良事件发生率（OR = 1.07，95%CI：0.91 ～ 1.26，

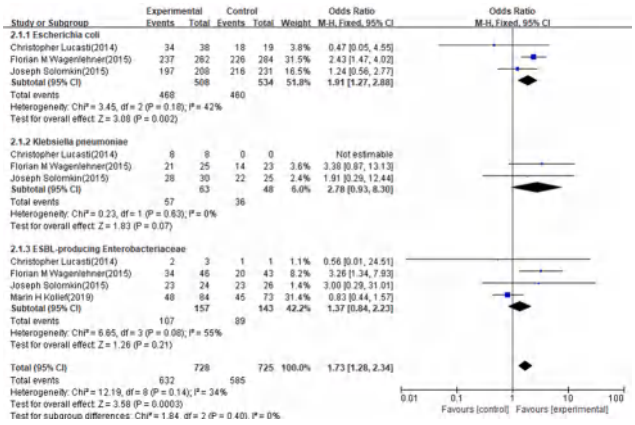


图 6　头孢洛扎 / 他唑巴坦对肠杆菌科亚组的细菌清除率

Fig 6　Bacterial clearance rate of ceftolozane-tazobactam on different pathogens

P = 0.41，I^2 = 0%）、严重不良事件发生率（OR = 1.25，95%CI：0.87 ～ 1.78，P = 0.22，I^2 = 47%）以及全因病死率（OR = 1.02，95%CI：0.75 ～ 1.39，P = 0.91，I^2 = 0%）方面的差异均没有统计学意义（见图 7）。

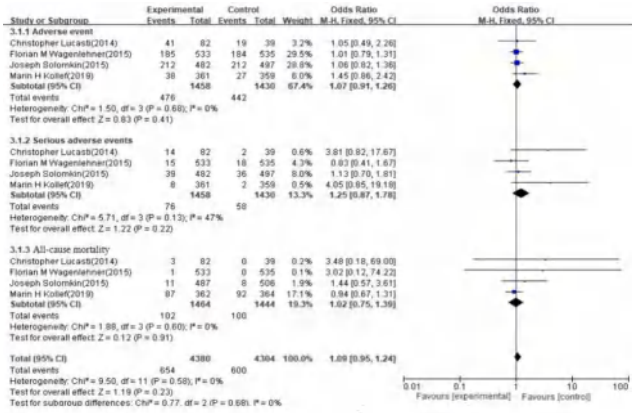


图 7　不良事件发生率与全因病死率

Fig 7　Forest diagram of adverse event risks and all-cause mortality

3　讨论

本 meta 分析共纳入了 4 项研究 [11，13-15]，评估头孢洛扎 / 他唑巴坦作为单一药物或联合甲硝唑与目前一线治疗方案（主要是碳青霉烯类和氟喹诺酮类）在 cIAIs、cUTIs 和 HAP 治疗中的安全性和有效性。其中，两项研究集中于 cIAIs[13，15]，一项研究针对 cUTIs[14]，另一项研究针对 HAP[11]。

本研究结果表明，在 MITT 人群和 CE 人群中，头孢洛扎 / 他唑巴坦的临床治愈率分别为（54.4%，197/362）和（63.8%，194/364），美罗培南的临床治愈率分别为（63.8%，139/218）和（64.7%，143/221），两者相当。Meta 分析结果显示，头孢洛扎 / 他唑巴坦的总临床治愈率与对照组相当（OR = 0.96，95%CI：0.83 ～ 1.11，P =

0.60，I^2 = 20%）。在不同人群亚组分析中，头孢洛扎 / 他唑巴坦的临床治愈率不低于具有良好异质性的一线方案。在 cUTIs 的治疗中，对照组为左氧氟沙星，而在 cIAIs 的治疗中，对照组为基于美罗培南的治疗方案。

多项研究表明，头孢洛扎 / 他唑巴坦对耐药肠杆菌科细菌和铜绿假单胞菌具有强大的体外活性。研究结果支持在怀疑或确认肠杆菌科细菌或铜绿假单胞菌引起的 cUTIs 时使用头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗 [16]，但目前还没有研究开展头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗耐药菌感染的 meta 分析。在最近的一项研究中，头孢洛扎 / 他唑巴坦的细菌清除率在基于两个 RCTs 的荟萃分析中与对照组相似 [10]。在本研究中，使用头孢洛扎 / 他唑巴坦比对照组具有更好的细菌学清除率。TOC 访视时，mMITT 组和 ME 组的细菌清除率均优于对照组。在病原菌亚组分析中，头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗肠杆菌科和大肠埃希菌亚组所致感染的临床治愈率优于一线方案，这与头孢洛扎 / 他唑巴坦体外活性的研究结果一致 [8]。

在由左氧氟沙星耐药菌引起的 cUTIs 患者中，使用头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗 7 d 比大剂量左氧氟沙星（> 1.5 g • d^{-1}）治疗更有效（OR = 1.70，95%CI：1.29 ～ 2.25，P = 0.0002）[17]，提示在氟喹诺酮类药物耐药性增加的情况下，头孢洛扎 / 他唑巴坦可能是一种替代治疗 [18]。有研究表明头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗由产超广谱内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌引起的 cUTIs 时，临床治愈率较对照组更高 [19]。一项基于观察性研究的 meta 分析表明，使用头孢他啶 / 阿维巴坦和头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗 MDR-GNB 感染（包括耐碳青霉烯的铜绿假单胞菌和耐碳青霉烯的肠杆菌科细菌）临床有效率较高 [20]。此外，一项回顾性、多中心、观察性队列研究认为头孢洛扎 / 他唑巴坦用于耐药铜绿假单胞菌感染时优于黏菌素或氨基糖苷类药物 [21]。

本研究结果显示，头孢洛扎 / 他唑巴坦组不良反应以头痛、胃肠道不适、发热为主，部分病例出现肝功能异常，不良事件发生率与对照组相似。纳入的研究中患者死亡原因均与治疗药物无关，由于缺乏全面的全因病死率相关数据，研究结果存在局限性。头孢洛扎 / 他唑巴坦的安全性尚需要更多的临床研究来进一步评价。加拿大一项使用头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗细菌感染的真实世界研究经验表明，其临床治愈率为 64.4%，细菌清除率为 0.5%[22]，与本研究结果基本一致。

本研究具有一定的局限性。首先，只有 4 项患者数量有限的 RCTs 被纳入，因纳入研究少，本研究未对不同感染部位进行亚组分析，使得研究结果不具有针对性，无法评估头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗某个部位感染的临床疗效。其次，本研究虽然对头孢洛扎 / 他唑巴坦的微生物学反应进行分析，但未对耐药菌的结果进行荟萃分析，无法验证文献报道中头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗耐碳青霉烯铜绿假单胞菌和耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的细菌清除率。再次，本 meta 分析没有评估头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗有多种合并症的重症患者的有效性和安全性。现有研究报道，糖尿病患者在使用头孢洛扎 / 他唑巴坦时，临床治愈率较低，不良事件发生率明显高于非糖尿病患者 [23]。因此，有必要进行进一步的临床研究来阐明在治疗特定人群的细菌感染时头孢洛扎 / 他唑巴坦的有效性和安全性。

4　结论

本研究显示，与一线治疗方案相比，头孢洛扎 / 他唑巴坦治疗革兰氏阴性菌感染导致的 HAP、cIAIs 和 cUTIs 在临床治愈率方面无差异。在病原菌亚组分析中，头孢洛扎 / 他唑巴坦对大肠埃希菌等肠杆菌科细菌导致的感染在细菌清除率方面优于对照组。其安全性尚可，但仍需进一步评估。目前，临床上耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌检出率增加，头孢洛扎 / 他唑巴坦可能是耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染的替代治疗方案之一。但新一代广谱抗菌药物应在有明确指证时使用，以延缓细菌耐药，且在有明确病原微生物学证据和药物敏感性试验结果时用药更合适。

参考文献

[1] Marston HD，Dixon DM，Knisely JM，et al. Antimicrobial resistance [J]. JAMA，2016，316（11）：1193-1204.

[2] Lister PD，Wolter DJ，Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*：clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms [J]. Clin Microbiol Rev，2009，22（4）：582-610.

[3] Golan Y. Empiric therapy for hospital-acquired，gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections：a systematic literature review of current and emerging treatment options [J]. BMC Infect Dis，2015，15：313.

[4] Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections [J]. Clin Infect Dis，2019，69（Suppl 7）：s565-s575.

[5] Trecarichi EM，Tumbarello M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections [J]. Virulence，2017，8（4）：470-484.

[6] Harris PN，Tambyah PA，Paterson DL. *β*-lactam and *β*-lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum *β*-lactamase producing Enterobacteriaceae：time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? [J]. Lancet Infect Dis，2015，15（4）：475-485.

[7] Escolà-Vergé L，Pigrau C，Almirante B. Ceftolozane/tazobactam for the treatment of complicated intra-abdominal and urinary tract infections：current perspectives and place in therapy [J]. Infect Drug Resist，2019，12：1853-1867.

[8] Farrell DJ，Flamm RK，Sader HS，et al. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam tested against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* with various resistance patterns isolated in u. S. Hospitals（2011-2012）[J]. Antimicrob Agents Chemother，2013，57（12）：6305-6310.

[9] Van Duin D，Bonomo RA. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam：second-generation *β*-lactam/*β*-lactamase inhibitor combinations [J]. Clin Infect Dis，2016，63（2）：234-241.

[10] Cheng IL，Chen YH，Lai CC，et al. The use of ceftolozane-tazobactam in the treatment of complicated intra-abdominal infections and complicated urinary tract infections-a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Int J Antimicrob Agents，2020，55（2）：105858.

[11] Kollef MH，Nováček M，Kivistik Ü，et al. Ceftolozane-tazobactam versus meropenem for treatment of nosocomial pneumonia（aspect-np）：a randomised，controlled，double-blind，phase 3，non-inferiority trial [J]. Lancet Infect Dis，2019，19（12）：1299-1311.

[12] Higgins JP，Altman DG，Gøtzsche PC，et al. The cochrane collaboration’s tool for assessing risk of bias in randomised trials [J]. BMJ，2011，343：d5928.

[13] Solomkin J，Hershberger E，Miller B，et al. Ceftolozane/tazobactam plus metronidazole for complicated intra-abdominal infections in an era of multidrug resistance：results from a randomized，double-blind，phase 3 trial（ASPECT-CIAI）[J]. Clin Infect Dis，2015，60（10）：1462-1471.

[14] Wagenlehner FM，Umeh O，Steenbergen J，et al. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections，including pyelonephritis：a randomised，double-blind，phase 3 trial（ASPECT-CUTI）[J]. Lancet，2015，385（9981）：1949-1956.

[15] Lucasti C，Hershberger E，Miller B，et al. Multicenter，double-blind，randomized，phase ii trial to assess the safety and efficacy of ceftolozane-tazobactam plus metronidazole compared with meropenem in adult patients with complicated intra-abdominal infections [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（9）：5350-5257.

[16] Miller B，Popejoy MW，Hershberger E，et al. Characteristics and outcomes of complicated intra-abdominal infections involving *Pseudomonas aeruginosa* from a randomized，double-blind，phase 3 ceftolozane-tazobactam study [J]. Antimicrob Agents Chemother，2016，60（7）：4387-4390.

[17] Chen M，Zhang M，Huang P，et al. Novel *β*-lactam/*β*-lactamase inhibitors versus alternative antibiotics for the treatment of complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infection：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Expert Rev Anti Infect Ther，2018，16（2）：111-120.

[18] Huntington JA，Sakoulas G，Umeh O，et al. Efficacy of ceftolozane/tazobactam versus levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections（CUTIS）caused by levofloxacin-resistant pathogens：results from the aspect-cuti trial [J]. J Antimicrob Chemother，2016，71（7）：2014-2021.

[19] Popejoy MW，Paterson DL，Cloutier D，et al. Efficacy of ceftolozane/tazobactam against urinary tract and intra-abdominal infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*：a pooled analysis of phase 3 clinical trials [J]. J Antimicrob Chemother，2017，72（1）：268-272.

[20] Wilson GM，Fitzpatrick M，Walding K，et al. Meta-analysis of clinical outcomes using ceftazidime/avibactam，ceftolozane/tazobactam，and meropenem/vaborbactam for the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections [J]. Open Forum Infect Dis，2021，8（2）：ofaa651.

[21] Pogue JM，Kaye KS，Veve MP，et al. Ceftolozane/tazobactam vs polymyxin or aminoglycoside-based regimens for the treatment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Clin Infect Dis，2020，71（2）：304-310.

[22] Zhanel GG，Dhami R，Baxter M，et al. Real-life experience with ceftolozane/tazobactam in canada：results from the clear（canadian leadership on antimicrobial real-life usage）registry [J]. J Glob Antimicrob Resist，2021，25：346-350.

[23] Popejoy MW，Long J，Huntington JA. Analysis of patients with diabetes and complicated intra-abdominal infection or complicated urinary tract infection in phase 3 trials of ceftolozane/tazobactam [J]. BMC Infect Dis，2017，17（1）：316.

（收稿日期：2022-05-09；修回日期：2022-07-11）

实验动物与生物医药专题

【编者按】

实验动物作为基础性、先导性、战略性生物资源，是生命科学原始创新的重要载体、生物技术基础性突破的支撑要素、生物医药产业能级跃升的保障基石。本专题从实验动物支撑生物医药科技创新与产业发展的角度，聚焦实验动物资源管理与质控、新型实验动物模型的发展与应用、实验动物源生物制品的开发与转化等领域，旨在为实验动物与生物医药两大研究领域的专家与学者搭建交流的平台。

【特邀专家简介】

姜德建，男，博士，研究员，湖南省实验动物中心主任，湖南省实验动物学会副理事长，中国毒理学会理事，新药药效与安全性评价湖南省重点实验室主任，湖南省药物非临床研究科技创新创业团队带头人，先后获湖湘青年科技人才、湖南省青年科技奖、中国药理学会施维雅青年药理学家奖、药明康德生命化学奖等荣誉，主要研究方向是实验动物模型标准化与药物非临床评价，主持国家级和省级重点研发项目 8 项，获省部级科技进步奖 3 项，发表论文 60 余篇，申请专利 10 余项，完成 2 个实验动物标准制定，主持新药非临床研究 200 余项。

湖南省实验动物资源支撑生物医药科技创新与产业发展调研报告（2022 年）

黄丽[1, 2]，曾颖[1]，常伟[1*]（1. 湖南省科学技术厅省实验动物管理办公室，长沙　410013；2. 湖南远泰生物技术有限公司，长沙　410217）

摘要：本调研报告从湖南省实验动物资源基本情况、实验动物支撑生物医药科技创新与产业发展、助力推动实验动物工作高质量发展三个方面，系统地分析了我省实验动物资源与产业发展趋势、现实需求和问题短板，旨在为推动“十四五”湖南省实验动物工作创新发展规划落实落地、提质增效提供数据基础和决策参考。

关键词：实验动物；实验动物资源调查；生物医药科技创新；生物医药产业发展；现代实验动物设施

中图分类号：R85　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1743-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.005

实验动物科学研究、技术创新水平深刻影响着生命健康发展质量，是生物技术创新突破的内源动力和先进性的重要标志。全面建设现代化国家的新征程上，应充分发挥实验动物资源价值作用，深入践行新发展理念，推动实验动物工作高质量发展。湖南省科技厅省实验动物管理办公室于 2021 年下半年开展了全省首次系统性实验动物领域专项调研，从我省实验动物资源基本情况、实验动物支撑生物医药科技创新与产业发展、助力推动实验动物工作高质量发展三个方面，全面分析了我省实验动物资源与产业发展趋势、现实需求和问题短板，旨在为推动“十四五”全省实验动物工作创新发展规划落实落地、提质增效提供数据基础和决策参考。

1　湖南省实验动物资源基本情况

本次调研采取线上问卷调查与线下咨询调查

作者简介：黄丽，女，主要从事科技咨询与管理服务，email：67385512@qq.com　*通信作者：常伟，男，主要从事科技管理工作，email：changw@kjt.hunan.gov.cn

相结合的方式进行，调研内容包括实验动物设施面积、生产使用情况、动物模型及资源开发利用、科研业绩、人员结构、“十四五”期间主要需求等方面，全省 37 个实验动物许可证单位、800 余名涉实验动物科研工作者参与调研。

调研结果显示，近年来，湖南实验动物领域坚持“管创贯通”工作思路，在依法监管和研发创新两个维度上初步构建了全省实验动物工作整体框架，建立了涵盖实验动物资源开发与服务、设施建设与运行、质量与生物安全监管、供给结构调整、改革创新等方面的工作体系，形成了高质量安全发展的良好势头。

1.1　实验动物设施及产品规模持续扩大

截至 2020 年底，全省依申请按程序发放实验动物许可证 51 个，其中使用许可证 35 个，生产许可证 16 个，实验动物设施总面积约 3.2 万平方米。其中，实验动物许可证数量较 2018 年增长了 4%，实验动物设施总面积较 2018 年增长了 14%。据统计，2020 年全省年生产实验动物 6 个品种 14 个品系，其中 SPF 级 4 个品种 12 个品系，普通级 2 个品种 2 个品系，包括大鼠、小鼠、豚鼠、兔和小型猪等（见图 1）。实验动物年产量 170 万只，在全国排名第六，销往北京、上海、广东、四川、陕西、云南、辽宁、吉林、河北、河南、江苏、浙江、新疆等 27 个省市自治区，2020 年实验动物年销售总产值已增长至 7897 万元（见图 2），已初步形成品牌效应。

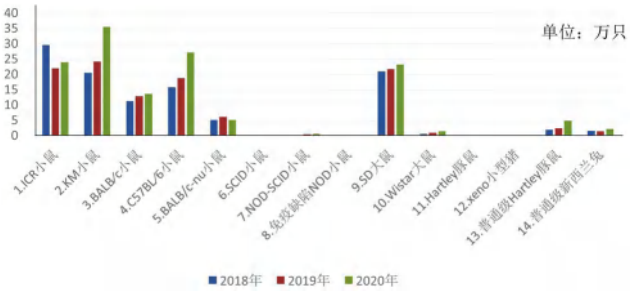


图 1　湖南省实验动物生产情况

1.2　地方特色实验动物资源开发利用成效突出

近年来，我省开发了以东方田鼠、医用异种移植（Designated Pathogen Free，DPF）供体猪、红鲫鱼为代表的具有湖南地方特色的国家实验动物资源，建立了《异种移植用无指定病原体医用供体猪》[1]、《实验动物 东方田鼠微生物学与寄生虫学等级及监测》[2]、《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》[3]、《实验用雪貂的饲养环境及设施规范》[4]等地方标准 13 个，全国排名第三（见图 3）。特别是 DPF 猪的培育成功，为胰岛细胞异种移植的研究与应用打下了坚实的基础。

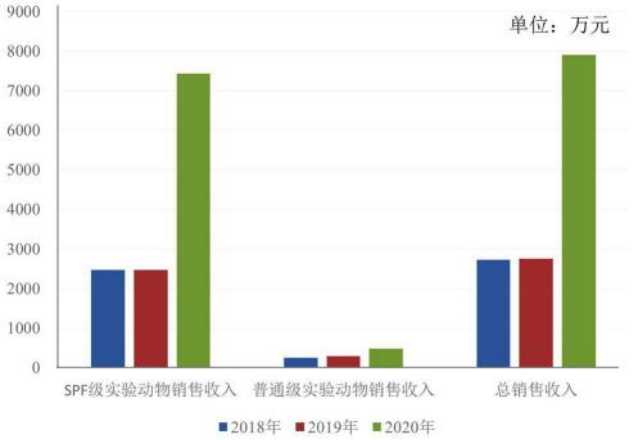


图 2　2018—2020 年全省实验动物销售情况

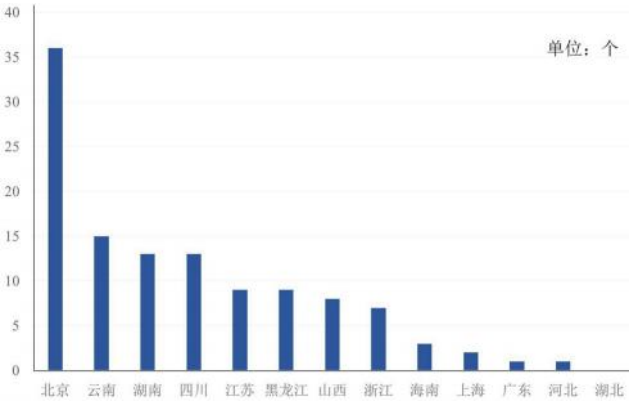


图 3　国内各省份实验动物地方标准对比

1.3　科技创新支撑保障作用显著增强

1.3.1　项目实施方面　2018—2020 年，我省连续启动实施多个实验动物领域省级重点研发计划项目，在全人源化基因工程小鼠、实验动物源抗体研发及应用等方面居国内前列，取得了多项突破性科研成果。

1.3.2　平台建设方面　我省先后组建了“人类重大疾病动物模型研究湖南省重点实验室”“模式动物与干细胞生物学湖南省重点实验室”“实验动物源抗体研发湖南省工程技术中心”和“人类重大疾病动物模型研究示范性国际合作基地”4 个省级创新平台，实现零的突破，并走在全国前列。

1.3.3　科研成果方面　据统计，参与调研的科研人员 3 年间作为主要作者在 SCI 期刊、中文核心期刊发表的论文中，涉实验动物论文篇数占 49%，获得专利中涉实验动物专利占 29%，获得省部级以上的奖项中涉实验动物奖项占 59%。

1.4　关联产业渐显雏形

实验动物关联产业如动物实验研究、实验动物源生物制品生产等汇聚了一批高新技术企业，如湖南普瑞玛药物研究中心有限公司（湖南省实验动物中心）建有中南地区面积最大、品种最全的动物实验设施，新药与医疗器械非临床研究能

力和产业规模处于国内前列；湖南远泰生物技术有限公司鼠单抗、兔单抗、人源单抗平台在国内处于领先地位。

1.5　高层次人才队伍加快建立

全省实验动物领域人才队伍结构逐步优化，重点依托在湘三所“双一流”大学（中南大学、湖南大学、湖南师范大学），凝聚了一批进入国家级、省级人才计划的高水平创新人才，初步建立了实验动物领域管理和科研专家队伍。设施管理人员方面，全省设施管理人员 581 人，从职称看，高级职称占 8%，中级职称占 19%，初级职称及以下占 73%；从学历看，博士占 7%，硕士占 21%，学士占 25%，大专及以下占 47%；从专业看，畜牧学、兽医学占 23%，医学、生物学占 41%，其他专业占 36%。涉实验动物科研人员方面，获得高级职称占 31%，副高级、中级职称占 50%，其他人员占 19%。

2　实验动物支撑生物医药科技创新与产业发展情况

2.1　创新发展动能仍需增强

高端人才不足、高能级创新平台缺乏、自主创新能力不够、产业尚未成势等问题仍然存在。

2.1.1　人才方面　实验动物专业人才不足，直接从事实验动物研究的高端人员缺乏，青年人才培育引进力度不够，部分科研人员自主创新意识和知识产权意识不强，科研水平和创新协作能力有待提高。

2.1.2　平台方面　创新平台体系化建设需加强，平台能级不高、共享能力较低，缺乏国家级平台，承担国家和省级实验动物领域重点项目较少，产出具有原创性引领性的实验动物科研成果不多。

2.1.3　创新方面　体现创新能力的指标较弱，尚无相关领域的国家重点研发计划项目立项，而国内先进省份如江苏省已完成国家重大科研项目 10 余项，说明我省实验动物领域自主研发与创新能力还存在较大提升空间。

2.2　资源供给不适应发展需求

高品质实验动物资源开发、实验动物设施建设难以满足高质量发展需求，不平衡不充分的问题逐渐凸显。

2.2.1　资源方面　目前，江苏省建有 3 个公益性实验动物基础资源平台，非人灵长类种群存栏量达到 12 916 只。我省实验动物品种主要以大鼠、小鼠及兔等小型实验动物为主，实验猪、犬等中大型实验动物生产单位各只有 1 家，资源供应短缺，非人灵长类实验猴生产仍是空白。尚未建立实验动物资源共享平台，存在共享程度低、资源浪费、供需不匹配等问题。

2.2.2　设施方面　从规模上看，目前，省内取得许可证的设施仅 56 个（41 家单位），设施总面积仅为 4.14 万平方米，远低于江苏、浙江等省份，部分单位存在“一笼难求”现象。从建设水平看，在材料绿色节能、管理系统信息化、高端仪器配备等方面仍显不足，很大程度上影响了相关科研实验的规范化、标准化操作。从生物安全等级看，我省暂无生物安全高等级实验室，严重制约了新发突发传染病发病机制、疫苗研发、药物筛选等研究。

2.2.3　协调发展方面　从发展格局看，存在区域分布不平衡问题，长沙市设施单位占比达到 70%，中南大学、湖南中医药大学两所高校设施面积占到了全省设施总面积的 20%，且发展不充分，提供实验动物品种和服务缺口较大。从开放合作看，我省实验动物领域开放发展氛围欠缺，实质性“走出去”交流协作较少，国内外科技创新合作有待加强。

2.3　支撑生物医药产业发展力较弱

据调查，江苏省已构建了覆盖设施建设、中大型实验动物资源培育、笼器具生产、实验动物标准化、实验动物模型研制、动物实验安全性评价的完整产业链，直接形成 40 亿产业规模，有力支撑了生物医药产业的快速崛起。广东省投资约 3.5 亿建设粤港澳大湾区生物技术和实验动物科技产业园，支撑生物医药产业创新和生物医药强省战略。湖南省作为中国中部重要省份，地处东部沿海地区和中西部地区过渡带、长江开放经济带和沿海开放经济带结合部，承东启西，拥有良好的实验动物产业基础与发展潜力。但目前我省实验动物行业龙头企业数量较少，产业规模较小，产业链基本环节不够健全，发展呈碎片化状态，经济效益和市场竞争力还有很大增长空间和发展潜力。

3　推动湖南省实验动物工作高质量发展对策建议

3.1　健全体制机制，推进治理效能显著提高

3.1.1　推进法规制度建设　遵循科学立法、民主立法、依法立法基本原则，高质量高效率开展《湖南省实验动物管理条例》立法调研，力争正式纳入 2023 年省人大立法计划，努力形成湖南特色鲜明、法则系统健全、统筹协调有力、支撑保障高效的法制文本，打造全国实验动物法治建设省域高地。深化实验动物领域“放管服”改革，

健全依法行政工作机制，制定出台《湖南省实验动物生物安全监管实施方案》《湖南省实验动物生物安全突发事件应急预案》等 2 个规范性文件及《实验动物行政许可服务指南》，积极推进实验动物许可“证照分离”改革，加强实验动物科技伦理治理，全面提升优化营商环境的制度供给和政务服务水平。

3.1.2　强化多方协调联动　在项目指南凝练、管理制度健全、生物安全监管、违法违规行为处置等方面，加强同省教育厅、农业农村厅、卫生健康委、市场监管局等部门的政策衔接、工作协同，充分发挥各自职能优势，形成发展合力。强化各途径方式场景法治宣传，建立健全省、市、县三级上下贯通横向联动的管理机制，形成覆盖全省的实验动物质量和生物安全监测管理网络。激活湖南省实验动物学会高端智库、科普宣传、共享平台建设服务功能，为湖南省实验动物工作高质量发展提供决策咨询和智力支撑。

3.2　*着力创新驱动，引领发展动力持续增强*

3.2.1　提升关键核心技术创新能力　坚持面向人民生命健康，着眼抢占生物技术源头制高点，聚焦实验动物资源开发及标准化、自发性卵巢癌等疾病动物模型的建立及应用、动物异种移植、动物源抗体制备及应用、以动物模型为载体的交叉复合技术研创等方面，广泛凝聚整合创新资源要素，用好新型举国体制的湖南模式，加快关键核心技术攻坚，力争在“十四五”期间国家重点研发计划项目上主动设计、汇报沟通、立项成功，为湖南省成为关键核心技术的重要诞生地贡献实验动物领域新力量。

3.2.2　统筹布局创新平台建设　深化对高能级创新平台创新策源功能和要素集聚能力的认识，推动建设具有全球影响力、世界先进水平的国家级异种移植科技创新平台，一体推进创新医疗器械动物实验工程技术研究中心、实验动物源抗体技术及应用研究国际联合实验室、医用基因工程模式猪技术创新中心等实验动物领域基础研究平台、技术创新平台建设，支撑“芙蓉实验室”创建、重大科学问题研究和特色优势产业发展。

3.2.3　激发人才创新创造活力　依托科技创新平台、科研项目等，培育集聚实验动物领域高水平科技人才和创新团队，加强国内外科技交流合作，造就一支规模适当、结构合理、支撑有力的高素质人才队伍。深化产教融合、校企合作，重点依托湖南农业大学建设湖南省实验动物学人才培养基地。创新实验动物管理和从业人员培训模式，优化培训结构内涵，探索打造交互性、场景化、沉浸式“线上课堂”，不断提升参训学员推动实验动物工作高质量安全发展的能力和水平。

3.3　*坚持需求牵引，助推生物医药产业整体跃升*

突出企业尤其是龙头企业在产业创新中的主体地位，为实验动物产业化创新发展引入科技金融源泉活水，加快推进湖南省实验动物关联产业技术创新战略联盟挂牌成立，重点围绕中高端动物模型、高价值实验动物源抗体、创新型实验动物设备器械、高品质实验动物生物产品等高阶方向拓展产业空间，进一步集聚资源要素，打通基础研究、技术创新、成果转化、市场应用全链条，着力打造具有全国竞争力的特色实验动物产业链和供应链，催生湖南省生物经济新业态，为湖南省生物医药产业发展注入新动能、塑造新优势。

4　结语

实验动物是生物医药战略产业的基础性保障资源，是面向人民生命健康的科技创新离不开的前置性支撑载体，是国家战略科技力量的有机组成部分，发展实验动物科学及其产业具有重大的现实意义和深远的战略意义。未来湖南省应深入挖掘实验动物资源价值，在创新上，要实现实验动物科技自立自强，抢占人类重大疾病动物模型研创前沿科学研究制高点；在协调上，要统筹布局实验动物重大科研基础设施、创新及公共服务平台；在绿色上，要推进以“智能化、信息化、绿色化、法治化”为导向的现代化实验动物设施建设，筑牢实验动物质量及生物安全防线；在开放上，要加强实验动物领域国际与区域科技及产业合作，融入新发展格局；在共享上，要加快实验动物科研成果转化，助力提升人民群众生命健康质量。

参考文献

[1]　湖南省质量技术监督局 . 异种移植用无指定病原体（Designated Pathogen Free，DPF）医用供体猪 . DB43/T 959.1-2014 [S]. 2014.

[2]　湖南省质量技术监督局 . D 实验东方田鼠饲养与质量控制技术规程 . B43/T 951-2014 [S]. 2014.

[3]　湖南省质量技术监督局 . 实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制 . DB43 ／ T 1191-2016 [S]. 2016.

[4]　湖南省质量技术监督局 . 实验用雪貂的饲养环境及设施规范 . DB43/T 2288-2022 [S]. 2022.

（收稿日期：2022-06-07；修回日期：2022-07-11）

人源化实验动物模型在生物医药领域的应用及质量控制

张妙红[1, 2]，曾贵荣[1, 2]，姜德建[1, 2, 3*]（1.湖南省实验动物中心，长沙　410331；2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室，长沙　410331；3. 肿瘤模型与个体化诊治湖南省重点实验室，长沙　410011）

摘要：人源化实验动物模型具有与人更为接近的生理病理特征，在肿瘤精准治疗、药物研发、抗体开发等生物医药领域有广泛的应用价值，但缺乏质量控制标准限制了其应用。因此，对人源化实验动物模型质量进行系统研究有助于推动其在生物医药领域的应用。

关键词：人源化实验动物模型；质量控制；生物医药

中图分类号：R945　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1747-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.006

Application and quality control of humanized experimental animal models in the biomedical field

ZHANG Miao-hong[1, 2], ZENG Gui-rong[1, 2], JIANG De-jian[1, 2, 3*] (1. *Hunan Experimental Animal Center*, *Changsha* 410331; 2. *Hunan Key Laboratory for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs*, *Changsha* 410331; 3. *Hunan Key Laboratory of Tumor Models and Individualized Medicine*, *Changsha* 410011)

Abstract: The physiological and pathological characteristics of humanized experimental animal models are similar to those of humans, which have been widely used in the biomedical fields, such as tumor precision therapy, drug research and development, and antibody development. However, the lack of quality control standards limits their application. Systematic study on the quality of humanized experimental animal models helps promote their application in the biomedical industry.

Key words: humanized experimental animal model; quality control; biomedical industry

人源化实验动物模型是将来自于人的基因、细胞或组织针对性导入到实验动物体内，使其获得与人类更为接近的生理病理特征[1]。人源化实验动物模型可用于人感染性疾病的发病机制、病理过程的研究等，可作为非人灵长类动物的替代动物模型，在肿瘤精准治疗、药物研发、抗体开发等生物医药领域有广泛的应用价值。但目前人源化实验动物模型缺乏规范的制备程序和质量控制标准，导致其临床表型和对药物反应不尽相同，极大地限制了其在生物医药工业领域的应用。因此，对人源化实验动物模型质量进行系统研究，加强其标准化和一致性，将有助于推动其在生物医药领域的应用。

1　人源化实验动物模型的分类

人源化实验动物模型根据构建方式不同可分为两大类：基因型动物模型和移植型动物模型。

1.1　基因型人源化实验动物模型

基因人源化实验动物模型是将人基因插入或替代至模型动物基因中，进而产生人基因嵌合动物模型。基因人源化动物模型体内表达部分人类蛋白，能模拟体内蛋白反应或者细胞信号传导[2]。

1.2　移植型人源化实验动物模型

移植型人源化实验动物模型是将人（肿瘤）细胞或人（肿瘤）组织异种移植至实验动物体内，继而在动物体内生长。与传统的人恶性肿瘤细胞系来源的异种移植（cell line-derived xenograft，CDX）比较，患者肿瘤组织来源的异种移植（patient-derived xenograft，PDX）能较好地保留

基金项目：湖南省重点研发项目（No.2020DK2003）；国家重点研发项目（No.2021YFE0192100）；湖南省企业科技创新创业团队（No.2021）。

作者简介：张妙红，女，硕士，副研究员，主要从事重大疾病动物模型病理学研究，email：zhangmiaohong@hnse.org　*通信作者：姜德建，男，博士，研究员，主要从事实验动物模型与新药非临床研究，email：jiangdejian@hnse.org

患者肿瘤的基因和表型特性，克服了肿瘤细胞系因长期体外培养缺乏正常的细胞基质和肿瘤微环境进而导致同质化改变的缺点，具有更广泛的应用价值[3-5]。

由于异种移植免疫排斥反应难以避免，移植型人源化实验动物模型须提前进行免疫抑制或者采用免疫缺陷动物。将人造血干细胞（hematopoieticstem cells，HSCs）移植至采用低剂量 X 线全身照射等方法清理骨髓的重度免疫缺陷小鼠，然后再将患者的肿瘤组织移植于该动物建立人源化肿瘤模型（humanized patient-derived xenograft，Hu-PDX）[6]。因人 HSCs 在小鼠体内可以产生各种免疫细胞，使肿瘤生长微环境与人体更相似，可更好地保留原发肿瘤的异质性。

2　人源化实验动物模型在生物医药领域的应用

2.1　基因修饰型人源化动物模型的应用

2.1.1　在人源化抗体制备中的应用　利用转基因小鼠可实现在小鼠体内制备人源化抗体，达到生产治疗性抗体。与体外生产人源化抗体技术比较，通过小鼠体内直接生产的人源化抗体因经过体内自然筛选过程，无论在亲和力、抗体形成的后加工修饰等方面都具有明显的应用优势[7]。如美国 Regeneron 制药公司研发获得的 Veloclmmune 小鼠，基于该技术平台已获得包括抗 IL-4 受体抗体、抑制 IL-4 和 IL-13 信号通路以及抗 IL-6 受体抗体 4 个人源抗体药物。2017 年获批的抗 IL-6 受体抗体，通过抑制 IL-6 信号通路，降低肝细胞释放炎症相关因子，实现治疗风湿性关节炎等自身免疫性疾病作用。

2.1.2　在抗体药物评价中的应用　对于肿瘤免疫（CAR-T/Checkpoint），其作用方式是调动自体免疫进行杀伤，故需要有一种模型在临床前阶段模拟人体内的免疫环境。通过基因修饰将小鼠细胞跨膜蛋白膜外部分进行人源化改造，从而结合基于人蛋白结构开发的抗体药物，可以保留细胞内鼠源的信号通路，激活相关的免疫反应。在抗体药物的体内药效学研究与非临床安全性评价具有广泛的应用价值[8-9]。如采用小鼠 T 细胞淋巴瘤肿瘤细胞系 EL4，在转基因的 PD-1 人源化小鼠中建立肿瘤细胞系移植模型，用于人源化 PD-1 单抗联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂罗米地辛治疗 T 细胞淋巴瘤的临床前研究[10]。通过对免疫检查点相关的小鼠基因（如 CTLA4 和 PD1 等）进行人源化修饰，构建能与抗 CTLA4 和 PD1 人源化抗体相互作用的人源化小鼠，可为这类抗体药物的临床前筛选与评估提供有效的工具。

2.1.3　在人感染性疾病模型建立中的应用　乙肝病毒、人类免疫缺陷病毒等在宿主选择上具有严苛的人细胞嗜性，因缺乏合适的感染动物模型，严重限制了对其致病机制的研究和抗病毒药物及疫苗的筛选进展。人肝嵌合小鼠和重建人免疫系统小鼠则分别突破了这两种病毒的感染限制[9]，为模拟这些病原体自然感染人的过程和产生的病理生理改变、新型疫苗的开发和治疗方法的发展提供了重要研究手段。

2.1.4　在 Hu-PDX 模型中的应用　在 NOG/NSG 等免疫缺陷小鼠的基础上，导入与髓系类细胞发育成熟相关的人细胞因子，如 IL-3、GM-CSF，具有明显增加移植 HSCs 在小鼠体内的成熟，提高 Hu-PDX 模型的成瘤效率[11]。

2.1.5　在药物代谢特征研究中的应用　在基因修饰型人源化模型的研制领域中，已经成功建立了包括针对外源生物质受体 [如芳香烃受体（AHR）、组成雄烷受体（CAR）、过氧化物酶体增殖物激活受体（PPARa）和孕烷 X 受体（PXR）等]，针对细胞色素 P450（CYP）家族成员的 [如 CYP2A6、CYP2C9、CYP2C18/2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A7] 以及针对 UDP 葡糖醛酸基转运酶（UGT）、2B7 和 NAT 转运酶 2 等。与野生型小鼠相比，CYP450 基因修饰型人源化模型在药物体内代谢与安全评价方面，更能准确反映人代谢产物的实际状况[12]。

2.2　PDX 模型在肿瘤研究中的应用

2.2.1　肿瘤精准医学研究　PDX 模型经验证能够保留原发肿瘤的特性，精准模拟肿瘤生长、肿瘤多样性、肿瘤进展及转移潜能等特性[13]。有研究显示，具有不同预后和亚型的肿瘤建立 PDX 模型仍然会保持原有分型，利用 PDX 模型进行敏感型和抗药型模型之间的蛋白组学或遗传学比较，可以识别出预后生物标志物，从而进一步进行临床精准治疗[14]。此外，PDX 模型还可用于解决许多临床相关问题，包括预测临床预后、临床前药物评估、生物学研究、肿瘤异质性对治疗反应的影响、肿瘤进展过程中和在治疗压力下肿瘤动态进化模式以及对治疗耐受的机制研究。

2.2.2　抗肿瘤药物研发　通过建立特定基因型或蛋白表型的 PDX 小鼠模型，可针对性地筛选和开发相应靶点的先导化合物，大大促进新型抗肿瘤药物的研发。有研究者在使用重建人免疫系统（HIS）动物建立 PDX，构建了重建 HIS ＋ PDX

动物模型，是目前最接近临床肿瘤患者情况的模型，可用于抗肿瘤药物临床前的药效和毒理实验，为免疫毒性的评价提供更多信息，推动抗肿瘤药物的研发。

3 人源化实验动物模型的质量控制

3.1 影响动物模型质量的因素

3.1.1 缺乏统一的技术标准和规范 人源化实验动物的使用目前大多仍停留在基础研究领域，尚未在临床个体化诊疗与新药临床前研究等生物医药工业领域广泛使用，主要原因与其质量保障体系缺乏系统研究，供应链上生产、饲养和应用等多环节相关的技术标准与规范不完善有关。因此，建立人源化动物关键共性技术规范，动物质量评价标准以及在药物研究中如何选择合适动物的技术标准，将有助于推动人源化动物在生物药非临床药效与安全性评价中的广泛应用。

3.1.2 模型制备问题 人源化实验动物模型在肿瘤研究领域取得了重要进展，但仍存在一定局限性，主要表现在：

① 制备周期长，植入率低，成本高；

② 移植到免疫缺陷小鼠中的人类肿瘤基质细胞和细胞外基质有可能被小鼠组织所替代；

③ 潜在的淋巴瘤转移：如果供体患者有 EB 病毒感染史，PDX 的植入可在宿主小鼠中引起淋巴瘤，但不会引起预期的肿瘤；

④ 肿瘤组织异质性问题：一开始有效的药物，易产生耐药性。

3.1.3 饲养环境问题 人源化动物是免疫缺陷动物基础上再复合了疾病，对饲养环境要求高。国内外尚无对饲养环境参数以及对人源化动物质量影响的研究。

3.2 亟待解决的质量控制问题

3.2.1 基因修饰型人源化实验动物模型 基因修饰型人源化小鼠模型在生物学特性上的差异导致其在药物开发中的应用受到限制，需要从以下几个方面解决一致性和稳定性问题：

① 导入人源基因的技术方法：目前导入人源基因的主要方法有原核注射、利用小鼠 ES 细胞系进行传统基因打靶、采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术，以及在此基础上的技术改进。通过不同技术制备的相同基因型人源化小鼠模型可能存在表型和生物学特性以及对药物的反应不尽相同。

② 小鼠免疫缺陷程度：目前常用的人源化免疫缺陷小鼠有 SCID、NOD/SCID 以及在此基础上敲除 *IL2rg* 基因开发的极重度免疫小鼠（NOD/SCID IL2Rg$^{-/-}$），这些小鼠在 T 和 B 细胞功能恢复、NK 细胞活性上均不一致。

③ 基因敲除策略：IL-2Rγ 链的缺失会导致 T 细胞、B 细胞发育和功能严重受损，并完全阻止了 NK 细胞的发育。因此，在 NOD/scid 背景下通过引入 *IL2rg* 突变后就可以形成 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞三种细胞同时功能缺失的小鼠。日本东京大学和美国 Jackson 实验室先后培育了 NOG、NSG 和 NRG 等极重度免疫缺陷小鼠[15]。NOG 是在 NOD/Shi-scid 小鼠导入了一个截短的 *IL2rg* 基因（缺乏胞内段，可以结合细胞因子，但不能传递信号），NSG 是在 NOD/Lt-scid 小鼠导入一个完全删除的 *IL2rg* 基因。国内李鹏教授研究团队也成功构建了基于 *IL2rg* 不同突变体敲除的 NSI 品系[16]。这些极重度免疫缺陷小鼠尽管在免疫学状态上高度相近，但是在体质量、脐带血移植能力等生物学特性上有差异。此外，人源化动物自身的残余肝细胞对药物代谢的背景影响，易引起肿瘤的发生，稳定性差，从而导致其在新药筛选和安全性评价中的应用受到限制。

3.2.2 移植型人源化实验动物模型 目前 PDX 在临床肿瘤个体化诊疗中尚未广泛使用，除了模型制备周期长、植入率低、成本高等因素以外，由于肿瘤组织存在异质性和模型制备尚无统一的技术规范密切相关。PDX 模型需要在以下几个方面考虑一致性和稳定性问题：

① 人源一致性：临床患者肿瘤组织与人源化动物模型之间病理学、分子生物学、基因特征的一致性；② 同批次一致性：同一批次人源化动物个体之间病理学、分子生物学、基因特征的一致性；③ 传代一致性：不同传代数模型之间及不同代数模型之间病理学、分子生物学、基因特征的一致性；④ 多重稳定性：临床患者肿瘤组织不同传代数模型之间及不同代数模型之间病理学、分子生物学、基因特征的一致性。

因此，完善 PDX 实验动物模型构建的技术规范和质量标准，是促进 PDX 模型在临床前研究中广泛应用的关键手段。

4 结语

人源化实验动物模型具有与人更为接近的生理病理特征，在肿瘤精准治疗、药物研发、抗体开发等生物医药领域应用具有一定的优势。进一步加强对人源化实验动物模型质量的研究将有助于推动其在生物医药领域的广泛应用。

参考文献

[1] 魏泓 . 医用动物实验技术 [M]. 北京：人民卫生出版社，2016.

[2] Samuelsson K，Scheer N，Wilson ID，et al. Genetically humanized animal models. In Chackalamannil S，Rotella DP，Ward SE（Eds.），Comprehensive Medicinal Chemistry Ⅲ [M]. Elsevier，2017：130-149.

[3] Georges LMC，De Wever O，Galván JA，et al. Cell line derived xenograft mouse models are a suitable in vivo model for studying tumor budding in colorectal cancer [J]. Front Med（Lausanne），2019，6：139.

[4] Kopetz S，Lemos R，Powis G. The promise of patient-derived xenografts：the best laid plans of mice and men [J]. Clin Cancer Res，2012，18（19）：5160-5162.

[5] Hidalgo M，Amant F，Biankin AV，et al. Patient-derived xenograft models：an emerging platform for translational cancer research [J]. Cancer Discov，2014，4（9）：998-1013.

[6] Kleinmanns K，Gullaksen SE，Bredholt G，et al. Humanized ovarian cancer patient-derived xenografts for improved preclinical evaluation of immunotherapies [J]. Cancers（Basel），2022，14（13）：3092.

[7] Mompó SM，González-Fernández Á. Antigen-specific human monoclonal antibodies from transgenic mice [J]. Methods Mol Biol，2019，1904：253-291.

[8] 宋征，马璟 . 人源化动物模型在肿瘤免疫治疗药物临床前研究中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2018，32（3）：7.

[9] Wang M，Yao LC，Cheng M，et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy [J]. FASEB J，2018，32（3）：1537-1549.

[10] 温霆宇，刘鹏 . 人源化 PD-1 单抗联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂罗米地辛治疗 T 细胞淋巴瘤的临床前研究 [J]. 癌症，2021，40（3）：127-136.

[11] Meraz IM，Majidi M，Meng F，et al. An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses [J]. Cancer Immunol Res，2019，7（8）：1267-1279.

[12] 慈小燕，李薇，崔涛，等 . 细胞色素 P450 酶诱导模型的建立及其应用 [J]. 中国新药杂志，2018，27（6）：688-694.

[13] Tentler JJ，Tan AC，Weekes CD，et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development [J]. Nat Rev Clin Oncol，2012，9（6）：338-350.

[14] Yarla NS，Madka V，Pathuri G，et al. Molecular targets in precision chemoprevention of colorectal cancer：an update from pre-clinical to clinical trials [J]. Int J Mol Sci，2020，21（24）：9609.

[15] Ito R，Takahashi T，Katano I，et al. Current advances in humanized mouse models [J]. Cell Mol Immunol，2012，9（3）：208-214.

[16] 李鹏，刘志新，蒋志武，等 . 一种免疫缺陷小鼠模型的建立方法：CN103409468B [P]. 2015-08-12.

（收稿日期：2022-06-13；修回日期：2022-07-18）

中药新剂型与新技术专题

【编者按】

随着科学技术的发展，中药新剂型与新技术在中药现代化中发挥着重要作用。近年来，微囊泡受到越来越多关注，在体内精准靶向与体内有效运送方面被广泛研究。微囊泡是细胞分泌的一种胞外膜性细胞器，可以充当细胞间信使作用，将不同物质靶向输送到特定部位。因此，微囊泡是较好的药物体内运输载体，可应用于中药剧毒物，例如砒霜。利用微囊泡的体内靶向作用可以实现药物体内特异性分布，减少其毒性，增加其靶向作用。将微囊泡运用于中药剧毒物的关键在于药物质量控制。同时，质量评价也是中药现代化的重要环节。现代研究多用指纹图谱控制质量，中药指纹图谱系指中药经适当处理后，采用一定的分析方法得到的能够体现中药整体特性的图谱。“整体性”和“模糊性”为其显著特点。其在鉴别药材的真伪、易混淆品种，控制成药的质量，临床研究用“新药”的质量控制和监督等方面发挥着重要的作用。

【特邀专家简介】

朱志红，女，博士，浙江中医药大学药学院讲师，硕士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术的开发与研究。主持基金共 3 项，其中国家自然科学基金人才项目青年科学基金 1 项，曾参与国家自然科学基金《砒霜活性成分三氧化二砷脂质囊纳米粒脑胶质瘤深部渗透靶向递药系统研究》、《价态调控三氧化二砷前药逐级递进靶向递药系统肝细胞癌胞内转运及其机制研究》与《高转膜率肿瘤 EGFR 靶向的纳米脂质载体的构建和评价》的研究工作，发表学术论文 20 余篇，其中 SCI 收录 10 余篇，获得国家发明专利 5 项。兼任浙江省药学会青年委员会委员，《中南药学》编委，担任《药剂学专业试题库》与《中药药剂学题库》编委等。

麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱及抗氧化活性研究

张胜娜[1]，周衡朴[2]，刘英杰[1]，吴素香[2]，林洁[3]，朱志红[2*]（1. 瑞安市中医院，浙江　瑞安　325200；2. 浙江中医药大学，杭州　311400；3. 温州医科大学附属第三医院，浙江　瑞安　325200）

摘要：目的　制备麸炒枳壳标准汤剂，进行质量及抗氧化活性研究。**方法**　制备 15 批麸炒枳壳标准汤剂，采用高效液相色谱法测定标准汤剂中柚皮苷和新橙皮苷的含量，建立标准汤剂的指纹图谱，对共有峰相对峰面积进行聚类分析和主成分分析。测定枳壳标准汤剂的总抗氧化能力（FRAP 法）、DPPH 自由基清除能力及 ABTS 自由基清除能力。**结果**　15 批麸炒枳壳标准汤剂的出膏率为 10.42% ～ 16.51%；柚皮苷含量为 7.27% ～ 12.81%，转移率为 19.04% ～ 42.26%；新橙皮苷含量为 4.98% ～ 8.72%，转移率为 13.87% ～ 24.19%。指纹图谱确定了 12 个共有峰，相似度均大于 0.95，聚类分析将 15 批麸炒枳壳分为两类。主成分分析得到 3 个主成分，累积贡献率为 83.831%。枳壳标准汤剂总抗氧化能力值为 [（0.1847±0.0258），100 μg • mL^{-1}]，ABTS 自由基清除能力可达 [（80.42±11.93）%，2500 μg • mL^{-1}]，DPPH 自由基清除能力可达 [（94.98±8.65）%，2500 μg • mL^{-1}]。**结论**　麸炒枳壳标准汤剂制备规范，含量和指纹图谱测定方法精密度、稳定性和重复性良好，可为麸炒枳壳配方颗粒质量控制提供参考，麸炒枳壳标准汤剂有良好的体外抗氧化效果。

关键词：麸炒枳壳标准汤剂；含量测定；柚皮苷；新橙皮苷；指纹图谱；抗氧化

中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1751-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.007

基金项目：温州市医药卫生科学研究项目（No.2019ZB022）。

作者简介：张胜娜，女，硕士，副主任中药师，主要从事中药学研究，email：zsn0223@163.com　*通信作者：朱志红，女，博士，讲师，主要从事药物新剂型与新技术研究，email：zzhjanny@163.com

Fingerprint and antioxidant activity of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction

ZHANG Sheng-na[1], ZHOU Heng-pu[2], LIU Ying-jie[1], WU Su-xiang[2], LIN Jie[3], ZHU Zhi-hong[2*] (1. *Ruian Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Rui'an Zhejiang* 325200; 2. *Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine*, *Hangzhou* 311400; 3. *The Third Affiliated Hospital* , *Wenzhou Medical University*, *Rui'an Zhejiang* 325200)

Abstract: Objective To prepare Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction, and determine its quality and antioxidant activity. **Methods** The content of naringin and nehesperidin in the standard decoction was determined by HPLC. The fingerprint of the standard decoction was established. Cluster analysis and principal component analysis were performed on the relative peak area of common peaks. Total antioxidant capacity (FRAP), DPPH free radical scavenging capacity and ABTS free radical scavenging capacity of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction were determined. **Results** The extraction rate of 15 batches of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction was 10.42% ～ 16.51%. The content of naringin was 7.27% ～ 12.81%, with the transfer rate of 19.04% ～ 42.26%. The content of new hesperidin was 4.98% ～ 8.72%, with the transfer rate of 13.87% ～ 24.19%. The fingerprint determined 12 common peaks, similarity being greater than 0.95. The 15 batches of Aurantii Fructus Praeparatus were divided into 2 categories by cluster analysis. Three principal components were obtained from principal component analysis, with a cumulative contribution rate of 83.831%. The total antioxidant capacity (Trolox Nmol) of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction was [(0.1847±0.0258), 100 μg • mL^{-1}], and ABTS radical scavenging ability was [(80.42±11.93)%, 2500 μg • mL^{-1}]. DPPH radical scavenging activity was [(94.98±8.65)%, 2500 μg • mL^{-1}]. **Conclusion** Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction is prepared, and the determination is precise, stable and repeatable, which provides reference for the quality control of Aurantii Fructus Praeparatus formula particles. Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction shows good antioxidant effect in vitro.

Key words: Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction; content determination; naringin; neohesperidin; fingerprint; antioxidant

麸炒枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实枳壳的炮制品，用于理气宽中，行滞消胀等[1-3]。中药饮片标准汤剂能作为一种标准，标化不同的临床用药形式，提高用药的准确性和剂量的一致性[4-7]；中药配方颗粒是传统中药饮片、汤剂的改良产品，是中药现代化的重要成果，中药饮片经提取研究制备成标准汤剂，然后采用不同的方法制成中药配方颗粒，因此对中药饮片的标准汤剂进行质量控制也是有必要的。本研究遵循标准汤剂制备要求，制备麸炒枳壳标准汤剂，采用冷冻干燥技术将其制备成标准汤剂冻干粉，计算出膏率，以柚皮苷和新橙皮苷为指标成分，测定其含量，计算转移率，建立指纹图谱，为建立麸炒枳壳标准汤剂的质量标准提供参考；同时进行体外抗氧化活性研究，为麸炒枳壳标准汤剂的临床应用及麸炒枳壳配方颗粒的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 科技有限公司）；Free Zone 2.5L 冷冻干燥机（美国 Labconco 公司）；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；RE-3000 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；Synergy H1 酶标仪（美国伯腾公司）。

1.2 试药

柚皮苷（批号：110722-201815，纯度≥ 98%，中国食品药品检定研究院），新橙皮苷（批号：200155-160801，纯度≥ 98%，江苏永健医药科技有限公司），维生素 C（北京索莱宝科技有限公司，批号：20240706），DPPH 自由基清除能力试剂盒、羟自由基清除能力试剂盒、总抗氧化能力试剂盒（江苏艾迪生生物科技有限公司，批号：

G20220114S），甲醇、乙腈（色谱级，美国天地有限公司），水为超纯水，其他试剂为分析级。

1.3　药材

麸炒枳壳共 15 批（FZK1 ～ FZK15），经瑞安市中医院副主任中药师刘英杰鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实枳壳的炮制品。经检验均符合《中国药典》2020 年版规定，样品来源见表 1。

表 1　麸炒枳壳饮片的来源

Tab 1　Source of Aurantii Fructus Praeparatus

序号	批号	产地	公司
FZK1	181101	江西	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FZK2	181102	江西	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FZK3	181103	江西	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FZK4	190301	江西	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FZK5	190204	江西	浙江中医药大学中药饮片有限公司
FZK6	171103	江西	郑州瑞龙制药股份有限公司
FZK7	180701	江西	浙江国新中药饮片有限公司
FZK8	181121	江西	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FZK9	190215	江西	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FZK10	180905	浙江	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FZK11	190215	浙江	浙江华东中药饮片有限公司
FZK12	190318	浙江	浙江华东中药饮片有限公司
FZK13	170102	四川	凉山新鑫中药饮片有限公司
FZK14	190101	江西	浙江桐君堂中药饮片有限公司
FZK15	160807	四川	四川沱江源药业有限公司

2　方法与结果

2.1　麸炒枳壳标准汤剂冻干粉的制备及出膏率的测定

称取 15 批麸炒枳壳饮片各 100 g，煎煮 2 次。一煎加入饮片 8 倍量水，浸泡 30 min，武火煮沸，文火保持微沸 30 min。二煎加入饮片 6 倍量水，武火煮沸，文火保持微沸 30 min。趁热用 3 层纱布滤过，合并 2 次滤液，50 ℃减压浓缩至 100 mL，冷冻干燥，得标准汤剂冻干粉，计算出膏率，结果见表 2。

2.2　柚皮苷、新橙皮苷的测定

2.2.1　液相色谱条件　色谱柱：Agilent SB-C_{18}（4.5 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈 - 水（20∶80）（用磷酸调节 pH 值至 3）；检测波长：283 nm；流速：1 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；温度：30 ℃。供试品及对照品图谱见图 1。

2.2.2　对照品溶液的制备　取柚皮苷、新橙皮苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 分别含柚皮苷和新橙皮苷 80.19 μg、79.08 μg 的溶液，即得。

2.2.3　供试品溶液的制备　取麸炒枳壳冻干粉或药材粉末约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称重，加热回流 1.5 h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 10 mL，置 25 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

表 2　麸炒枳壳标准汤剂测定结果

Tab 2　Determination of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction

序号	出膏率 /%	饮片含量 /%		冻干粉含量 /%		转移率 /%	
		柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷
FZK1	14.68±0.39	3.01±0.30	2.22±0.22	7.27±0.04	4.98±0.02	34.55±3.29	19.16±0.47
FZK2	14.35±0.18	3.36±0.02	2.65±0.01	9.90±0.11	7.09±0.07	42.26±0.80	18.22±0.20
FZK3	10.42±0.09	4.01±0.02	2.87±0.02	7.32±0.0	5.11±0.02	19.04±0.17	14.54±0.12
FZK4	14.41±0.28	5.72±0.02	4.38±0.01	9.58±0.03	7.05±0.03	24.15±0.50	18.83±0.37
FZK5	14.43±0.17	5.06±0.07	3.90±0.05	9.15±0.34	7.34±0.26	26.11±0.83	18.72±0.23
FZK6	14.29±0.12	5.19±0.08	3.87±0.03	9.73±0.03	7.35±0.02	26.78±0.21	19.17±0.13
FZK7	13.30±0.20	5.49±0.03	4.77±0.02	9.17±0.01	7.26±0.01	22.23±0.46	15.30±0.23
FZK8	14.47±0.19	5.29±0.13	3.57±0.08	7.35±0.47	5.26±0.33	20.14±1.65	21.45±0.28
FZK9	11.30±0.23	4.48±0.04	3.40±0.03	10.54±0.20	8.23±0.13	26.60±0.57	14.87±0.31
FZK10	13.40±0.14	7.48±0.17	5.10±0.12	12.81±0.30	8.72±0.03	22.96±0.90	19.65±0.21
FZK11	13.44±0.11	4.67±0.06	2.60±0.03	10.71±0.47	5.78±0.25	30.80±1.19	24.19±0.17
FZK12	11.34±0.04	3.86±0.32	2.46±0.33	7.43±0.13	5.56±0.10	21.98±1.88	17.91±0.79
FZK13	11.15±0.45	3.89±0.01	3.13±0.01	7.65±0.10	5.91±0.07	21.93±1.15	13.87±0.55
FZK14	13.46±0.10	4.58±0.19	3.83±0.15	8.88±0.38	6.80±0.28	26.09±0.78	16.12±0.11
FZK15	16.51±0.08	4.65±0.05	3.78±0.05	8.66±0.02	7.02±0.02	30.78±0.26	20.39±0.08

2.2.4　线性关系考察　精密称取柚皮苷 4.90 mg、新橙皮苷 4.80 mg，用甲醇配制成含柚皮苷 7.65 ～ 980.00 μg • mL^{-1}、新橙皮苷 7.50 ～ 960.00 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液，以峰面积（Y）对质量浓度（X，μg • mL^{-1}）进行线性回归。结果柚皮苷的标准曲线为：$Y = 1.22\times10^5X + 6.67\times10^5$，$r = 0.9994$，柚皮苷在 7.65 ～ 980.00 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好；新橙皮苷的标准曲线为：$Y = 1.43\times10^5X + 1.87\times10^5$，$r = 0.9994$，新橙皮苷在 7.50 ～ 960.00 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.2.5　精密度试验　精密吸取对照品溶液 10 μL，按“2.2.1”项下条件进样 6 次，结果柚皮苷和新橙

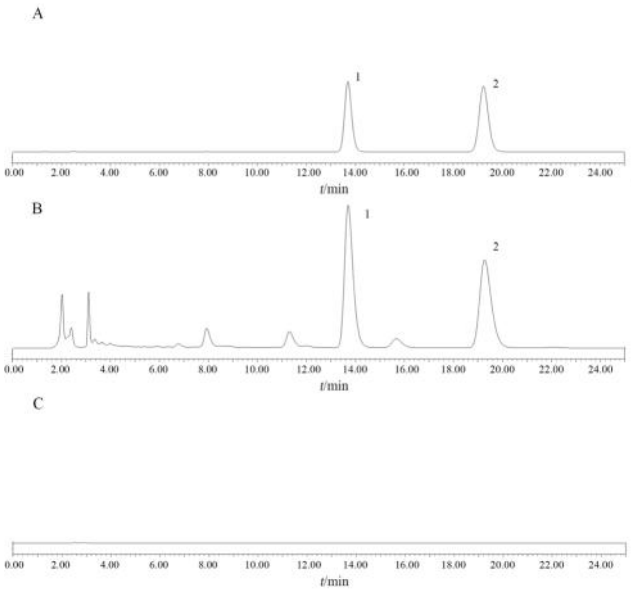


图 1　枳壳标准汤剂 HPLC 图谱

Fig 1　HPLC chromatogram of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction

A. 对照品（reference substance）；B. 枳壳标准汤剂（Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction）；C. 空白溶剂（blank solvent）；1. 柚皮苷（naringin）；2. 新橙皮苷（neohesperidin）

皮苷峰面积 *RSD* 均为 1.3%，说明仪器精密度良好。

2.2.6　稳定性试验　取麸炒枳壳冻干粉（批号：181101）约 0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，放置 0、2、4、6、8、24 h 后进样测定。测得柚皮苷和新橙皮苷峰面积 *RSD* 分别为 1.3% 和 2.2%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7　重复性试验　取麸炒枳壳冻干粉（批号：181101）6 份，每份约 0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果柚皮苷和新橙皮苷含量 *RSD* 均为 1.7%，说明该方法重复性良好。

2.2.8　加样回收试验　精密称取 6 份同一批已知柚皮苷、新橙皮苷含量的麸炒枳壳冻干粉 40 mg，加入柚皮苷、新橙皮苷含量 100% 的对照品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率。柚皮苷和新橙皮苷平均加样回收率分别为 100.25% 和 100.76%，*RSD* 分别为 0.85% 和 0.81%，表明该方法准确可靠。

2.3　样品的含量测定

取 15 批麸炒枳壳冻干粉供试品溶液进样测定，使用外标两点法制作随行标准曲线，计算柚皮苷、新橙皮苷含量。进样测定峰面积，测定 15 批麸炒枳壳中柚皮苷、新橙皮苷含量 [1]，计算转移率。

转移率（%）＝冻干粉中指标成分含量 / 饮片中指标成分含量 ×100%

15 批麸炒枳壳的出膏率为 10.42% ～ 16.51%；柚皮苷的含量为 7.27% ～ 12.81%，转移率为 19.04% ～ 42.26%；新橙皮苷含量为 4.98% ～ 8.72%，转移率为 13.87% ～ 24.19%（见表 2）。

2.4　麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱的建立

2.4.1　色谱条件　色谱柱：Agilent SB-C_{18}（4.5 mm×250 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）- 水（B），梯度洗脱（0 ～ 20 min，25% ～ 40%A；20 ～ 44 min，42% ～ 62%A；44 ～ 50 min，62% ～ 80%A；50 ～ 60 min，80% ～ 100%A；60 ～ 70 min，100% ～ 25%A）；检测波长：330 nm；流速：1 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；柱温：30 ℃。

2.4.2　精密度试验　精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 10 μL，按“2.3.1”项下条件进样 6 次，测得柚皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.15% 和 2.4%，新橙皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.16% 和 2.5%，说明仪器精密度良好。

2.4.3　稳定性试验　取麸炒枳壳冻干粉（批号：181101）约 0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，放置 0、2、4、6、8、24 h 后，进样测定。结果柚皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.76% 和 4.1%，新橙皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.83% 和 4.1%，说明柚皮苷和新橙皮苷在 24 h 内稳定。

2.4.4　重复性试验　取麸炒枳壳冻干粉（批号：181101）6 份，每份约 0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，柚皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.18% 和 3.0%，新橙皮苷保留时间和峰面积 *RSD* 分别为 0.21% 和 4.8%，说明该方法重复性良好。

2.4.5　指纹图谱相似度分析　精密吸取各批供试品溶液 10 μL，注入高效液相色谱仪得指纹图谱，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行色谱峰匹配，找出共有峰。结果表明 15 批麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱中共出现 12 个共有峰，且分离度较好，见图 2。以 FZK1 为参照，采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012A）软件，分析色谱数据，计算相似度，依次为 0.988、0.992、0.989、0.989、0.993、0.997、0.995、0.993、0.992、0.993、0.981、0.966、0.992、0.988、0.988，15 批麸炒枳壳标准汤剂相似度均大于 0.95，符合指纹图谱要求（大于 0.9）。

2.4.6　聚类分析　将共有峰峰面积导入 SPSS 26 进行聚类分析，结果见图 3。15 批麸炒枳壳可分为两类：Ⅰ类是 FZK2、FZK3、FZK4、FZK6、FZK7、FZK11、FZK12，Ⅱ类是 FZK1、FZK5、FZK8、FZK9、FZK10、FZK13、FZK14、FZK15。结果表明不同产地不同批次的麸炒枳壳存在一定差异。

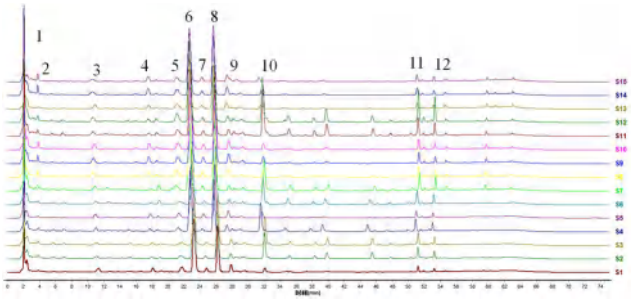


图 2　麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱

Fig 2　Fingerprints of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction

6. 柚皮苷（naringin）；8. 新橙皮苷（neohesperidin）

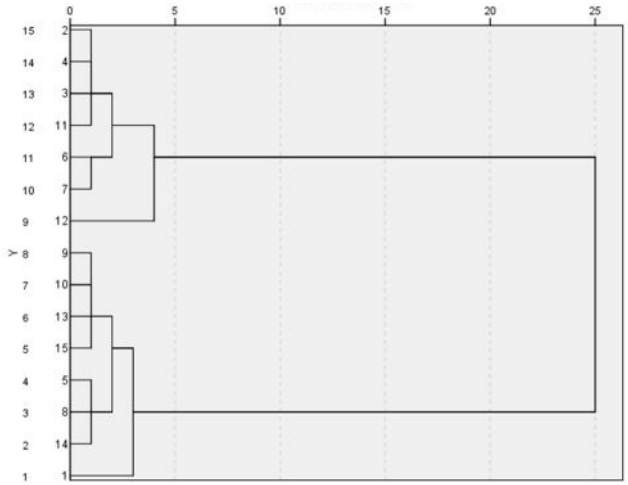


图 3　麸炒枳壳标准汤剂聚类分析图

Fig 3　Cluster analysis of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction

2.4.7　主成分分析　使用 SPSS 26 软件对数据标准化后进行主成分分析，设定特征值大于 1，结果见表 3。共筛选出 3 个主成分，第 3 个成分的累积方差贡献率达 83.831%。表明多种成分引起麸炒枳壳的质量差异，且前 3 个主成分能反映麸炒枳壳的基本特征。以这 3 个成分绘制主成分平面得分图（见图 4），可将样品分为两类，与聚类分析结果一致。

2.5　体外抗氧化作用

2.5.1　供试品溶液的配制

① 麸炒枳壳标准汤剂供试品溶液：取一定量的麸炒枳壳标准汤剂冻干粉，用纯水配制成 1、10、50、100、500、1000、2500 μg 生药 • mL^{-1} 系列质量浓度的供试品溶液，备用。

② 麸炒枳壳药材供试品溶液：取麸炒枳壳药材，用 80% 乙醇回流提取 2 次，每次 60 min，回收乙醇，浓缩液冷冻干燥，冻干粉用纯水配制成 1、10、50、100、500、1000、2500 μg 生药 • mL^{-1} 系列质量浓度的供试品溶液，备用。

③ 维生素 C 供试品溶液：取一定量的维生素 C，纯水配制成 1、10、50、100、500、1000、2500 μg • mL^{-1} 系列质量浓度的供试品溶液，备用。注意避光。

2.5.2　体外抗氧化试验　按说明书中方法，以维生素 C 和水溶性维生素 E（Trolox）为对照，进行试验，结果见图 5。

表 3　主成分方差分析结果

Tab 3　Variance analysis of principal component

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积 /%	总计	方差百分比	累积 /%
1	6.413	58.303	58.303	6.413	58.303	58.303
2	1.632	14.841	73.144	1.632	14.841	73.144
3	1.176	10.687	83.831	1.176	10.687	83.831
4	0.892	8.105	91.936			
5	0.372	3.379	95.315			
6	0.291	2.649	97.965			
7	0.119	1.078	99.043			
8	0.070	0.640	99.683			
9	0.020	0.183	99.866			
10	0.013	0.121	99.987			
11	0.001	0.013	100.000			

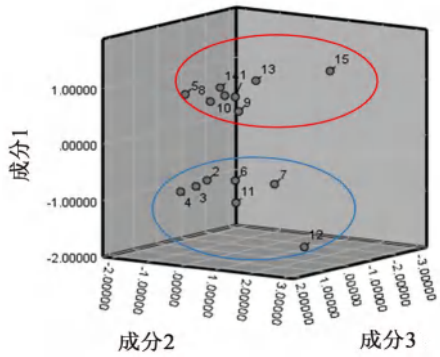
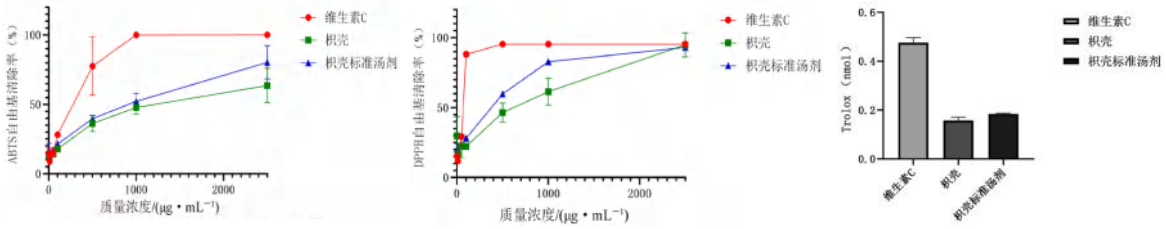


图 4　主成分得分图

Fig 4　Principal component score



A　　B　　C

图 5　各成分的 ABTS 自由基清除能力（A）、DPPH 自由基清除能力（B）、总抗氧化能力（C）

Fig 5　Scavenging effect of Aurantii Fructus Praeparatus standard decoction on ABTS（A），DPPH（B）and total antioxidant capacity（C）

ABTS 自由基清除能力结果显示，当质量浓度为 2500 μg • mL^{-1} 时，枳壳标准汤剂 ABTS 自由基清除能力可达（80.42±11.93）%，稍弱于维生素 C，强于枳壳药材。说明枳壳标准汤剂和枳壳药材具有一定的抗氧化能力，且枳壳标准汤剂＞枳壳药材。

DPPH 自由基清除能力结果显示，当质量浓度为 2500 μg • mL^{-1} 时，枳壳标准汤剂 DPPH 自由基清除能力可达（94.98±8.65）%，与维生素 C 的清除能力相当，说明枳壳标准汤剂和枳壳药材具有良好的 DPPH 自由基清除能力。

总抗氧化能力结果显示，当质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 时，维生素 C 的 Frap 值为（0.4756±0.0211），枳壳标准汤剂的 Frap 值为（0.1847±0.0258），枳壳药材的 Frap 值为（0.1576±0.0132），说明枳壳标准汤剂和枳壳药材有一定的总抗氧化能力。

3　讨论

3.1　色谱条件的筛选

在建立麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱的过程中，考察了甲醇、乙腈、磷酸水等作为流动相以及不同流动相梯度对指纹图谱的影响，最终确定了以甲醇 - 水为流动相，检测波长为 330 nm，流速为 1 mL • min^{-1}，进样量为 10 μL，柱温为 30 ℃，此时色谱峰数最多且分离度均较好。

3.2　标准汤剂质量控制

2020 年版《中国药典》中，枳壳的含量测定指标是柚皮苷和新橙皮苷，麸炒枳壳标准汤剂中柚皮苷和新橙皮苷的含量和转移率均较高，体现了其质量稳定、有效成分含量高。麸炒枳壳标准汤剂指纹图谱中特征峰超过 10 个，各批次麸炒枳壳图谱相似度高，该方法适用于麸炒枳壳标准汤剂质量控制。

3.3　抗氧化作用

本试验比较了枳壳标准汤剂和枳壳药材的体外抗氧化活性，枳壳标准汤剂和枳壳药材均具有一定的抗氧化能力，但测得的几项标准汤剂抗氧化活性均强于药材。可能是标准汤剂中多糖、苷类、蛋白质、氨基酸等水溶性成分含量较高，且这些成分均具有一定的抗氧化作用 [8-9]。

3.4　小结

枳壳含有黄酮类、生物碱类等成分，柚皮苷和新橙皮苷为黄酮类的主要成分，麸炒后含量均略微下降 [10]。本试验可为麸炒枳壳饮片的质量控制和临床应用提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 版 . 一部 [S]. 2020：257-258.
[2] 曾晓艳，陈婷，谭伟民，等 . 枳壳的生物学特性及化学成分研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（7）：869-872.
[3] 祝婧，钟凌云，王凤娇，等 . 中药枳壳“宽中除胀”作用及炮制增效机制分析 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（5）：1914-1920.
[4] 刘冲，刘荫贞，乐智勇，等 . 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究 [J]. 中草药，2017，48（8）：1577-1583.
[5] 林伟雄，乐智勇，车海燕，等 . 甘草饮片标准汤剂的研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（5）：830-835.
[6] 毛小文，祁梅，顾志荣，等 . 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 [J]. 中南药学，2022，20（2）：399-404.
[7] 魏悦，曹静亚，张丽先，等 . 金银花药材、标准汤剂、中间体、配方颗粒指纹图谱及过程质量评价研究 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（4）：495-499.
[8] 王璐，汪丽霞，吴婷婷，等 . 不同炮制方法对衢枳壳药效指标成分含量及抗氧化活性的影响 [J]. 中国药房，2022，33（7）：830-835.
[9] 刘小娟，方月娟，夏道宗，等 . 衢枳壳总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性 [J]. 中成药，2020，42（7）：1687-1691.
[10] 李正红，夏放高，陈海芳，等 . 枳壳麸炒前、后主要活性成分的含量变化 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（19）：18-21.

（收稿日期：2022-03-21；修回日期：2022-05-23）

微囊泡在肿瘤中的研究进展

谢舟颖，袁一超，熊友香，孙巧仪，朱新悦，张纪平，朱志红*（浙江中医药大学，杭州　311402）

摘要：微囊泡是正常生理或病理情况下都会分泌的一种膜性胞外细胞器，不仅可作为新型药物载体，也可在疾病的诊断、预后等方面发挥作用，具有良好的生物相容性、靶向性，并为实施精准医疗提供新的思路。本文通过查阅近年来国内外相关文献，归纳微囊泡分离及纯化的方式和在疾病进程中的阶段性作用，以期为微囊泡的进一步开发利用提供参考。

关键词：微囊泡；给药系统；分离与纯化；微囊泡的运用

中图分类号：R54　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1757-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.008

Research progress of microvesicle in tumor

XIE Zhou-ying, YUAN Yi-chao, XIONG You-xiang, SUN Qiao-yi, ZHU Xin-yue, ZHANG Ji-ping, ZHU Zhi-hong* (*Zhejiang University of Chinese Medicine*, *Hangzhou* 311402)

Abstract: Microvesicles are membranous extracellular organelles secreted under normal physiological or pathological conditions. They can not only be used as new drug carriers, but also play a role in the diagnosis and prognosis of diseases. They have good biocompatibility and targeting, also provide new ideas for the implementation of precision medicine. This paper aimed to provide a reference for the further development and utilization of microvesicles by referring to the relevant literatures home and abroad in recent years, and summarizing the methods of separation and purification of microvesicles and their phased roles in the course of disease.

Key words: microvesicle; drug delivery system; separation and purification; application of microvesicle

微囊泡是一种膜性胞外细胞器，是由被激活细胞的细胞膜产生的异质囊泡，其直径通常在 100 ～ 1000 nm[1-3]。微囊泡在人体内分布较广泛，多种细胞都具有分泌微囊泡的生理功能，且在出血、炎症刺激等特定情况下也会形成微囊泡 [4]。释放到循环系统中的微囊泡具有调节凝血和血管功能的作用，可以影响细胞凋亡和分化、刺激炎症因子释放 [5]。此外，微囊泡可以充当细胞间信使，将不同物质从亲本细胞转移到靶细胞。因此，微囊泡逐渐成为实现体内药物靶向转运的载体。本文通过查阅近年来国内外相关文献，归纳微囊泡分离及纯化的方式和在疾病进程中的阶段性作用，以期为微囊泡的进一步开发利用提供参考。

1　资料来源

1.1　检索方法

检索 PubMed、中国期刊全文数据库（CNKI）2006 年至 2022 年 3 月的相关文献。在 PubMed 数据库检索中输入“Microvesicle，Cancer，Isolation and Identification”，单词之间以“AND”形式检索，在中文期刊全文数据库中输入主题词“微囊泡、癌症、分离与纯化”以“并且”形式关联选择模糊查询进行检索。主要选择内容与微囊泡治疗癌症有关的文章，同一领域文献则选择近期发表在权威杂志的文章。

1.2　资料筛选

纳入标准：文献所述内容与分离提取微囊泡及微囊泡在癌症等疾病中的应用密切相关。

排除标准：内容较旧或者重复的文献。

1.3　资料的提取与文献质量评价

通过计算机检索，初检得到文献 128 篇，其

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82003954）；浙江中医药大学 2020 年度校级科研基金项目（No.2019ZG39）；浙江中医药大学校级科研基金项目 -2019 年度国家自然科学基金预研专项（No.2020ZZ08）。

作者简介：谢舟颖，女，本科在读，email：272201716@qq.com　*__通信作者：__朱志红，女，博士，讲师，主要从事药物新剂型与新技术研究，email：zzhjanny@163.com

中英文 104 篇，中文 24 篇。通过阅读摘要进行初筛，共保留 68 篇文献进一步分析。

2　微囊泡的特点

微囊泡是由两亲性分子形成的多腔室双分子层球形结构 [6]，内含蛋白质、脂质、核酸等生物活性物质，其表面含有的特殊蛋白质标志物是其鉴定分离的基础 [7]。其次，微囊泡的来源众多，不同来源的微囊泡在不同疾病中发挥的作用亦不同 [4]。Diamant 等 [8] 研究表明外周动脉疾病患者体内大量存在的血小板源性的微囊泡能加快疾病进程，因而病理性微囊泡成为动脉血管疾病治疗的新突破口；张戎等 [9] 发现骨髓间充质干细胞来源的微囊泡可促使干细胞重新恢复成骨分化能力和免疫调节能力，可用于治疗骨质疏松；尚政军 [10] 研究发现肿瘤细胞来源的微囊泡能加快口腔鳞状细胞癌的病情发展，为此类疾病的治疗提供了新的思路。

微囊泡较好的生物相容性与细胞间信使作用，为药物体内的有效运输提供了新的可能性 [3]。此外，微囊泡的成分会在机体发生疾病时产生相应变化，有助于时刻监测疾病进程，实现诊疗一体化 [2]。余自力 [11] 以人体液来源的微囊泡为载体，将具有抗肿瘤作用的 siRNA 载入其中得到了较好的肿瘤靶向治疗效果。

3　微囊泡的形成和分泌

微囊泡由细胞表面起泡向外出芽和分裂释放而得，质膜的脂质和蛋白质组成以及 Ca^{2+} 水平方面的分子重排、核内体分选复合体机制均是参与微囊泡释放过程的重要因素 [12]。如细胞内 Ca^{2+} 增加引起质膜不对称磷脂分布改变，导致肌动蛋白细胞骨架维持解聚促进微囊泡脱落 [13]；小 GTPaseADP- 核糖基化因子 6（ARF6）能通过酶机制引起放线肌球蛋白收缩以释放微囊泡 [14]。多数真核细胞在生理和病理状态下都会释放微囊泡，肿瘤细胞的致癌信号和独特的肿瘤微环境（缺氧、酸度）均为微囊泡分泌提供了良好的条件 [15]。

4　微囊泡的获取、分离与纯化

4.1　微囊泡的获取

正常情况下，机体细胞单位时间内产生微囊泡较少，当研究需要大量微囊泡时需对细胞进行特殊处理，现阶段的主要处理方式有细胞饥饿法、紫外线照射法或放射法 [3]。

4.1.1　细胞饥饿法　细胞饥饿法即在培养细胞时，选用无血清或低血清培养基减少细胞可获取的营养物质迫使细胞处于饥饿状态，从而短时间内分泌大量微囊泡。细胞饥饿法简单易操作，适用于初级实验或者预实验，但因每种细胞对饥饿的耐受力不同，需进行预实验以准确掌握饥饿时间，保证细胞存活的同时获得最多数量的微囊泡。姚嘉等 [16] 运用细胞饥饿法获得了人脐带间充质干细胞分泌的微囊泡。

4.1.2　紫外线照射法　紫外线照射法是通过适量紫外照射对细胞进行预处理，使其产生大量微囊泡。该法操作简单，紫外线照射剂量是关键，紫外线照射剂量过低则产生微囊泡数量不够，过高则易导致细胞死亡。该法适用于初级实验和需求量、准确度都较高的实验。刘娟等 [17] 用中长波紫外线辐射诱导皮肤成纤维细胞产生微囊泡，结果表明紫外线辐射后生成的微囊泡可导致人皮肤成纤维细胞形态发生改变，倒置显微镜下出现较多的细胞碎片，细胞体积变大，过度伸展，并使细胞增殖率降低。

4.1.3　放射法　放射法是用射线照射细胞使其大量分泌微囊泡。射线杀伤力较强，极易使细胞死亡，导致实验失败，故多数情况下并不采用放射法。

4.2　微囊泡的分离与纯化

微囊泡大量产生之后，需对其进行分离与纯化。目前可用差速离心法、免疫亲和捕获技术、微流体技术等对微囊泡进行分离 [18]。

4.2.1　差速离心法　差速离心法利用离心力将不同直径的微囊泡分开，是最常用的分离提取微囊泡的方法。其优势在于操作简单、成本低廉；缺点在于纯度不够高。Chen 等 [19] 在提取人神经干细胞来源微囊泡时，采用超速离心法多次离心提纯微囊泡，结果表明超速离心法可获得粒径为 20 ～ 200 nm 的微囊泡，且获得的人神经干细胞来源微囊泡可以促进神经细胞的修复和再生。

4.2.2　免疫亲和捕获技术　免疫亲和捕获技术是使用和微囊泡表面特异性标志物相对应抗体的磁珠与微囊泡共同培养，使抗原与抗体结合形成沉淀，从而将微囊泡吸附出来。该法一般应用于复杂生物流体或者小体积液体微囊泡。Zhang 等 [20] 利用此技术成功纯化得到可作为药物载体且被叶酸修饰的微囊泡。

4.2.3　微流体技术　微流体技术是知晓目标粒子直径后，利用仪器控制流体速度、障碍颗粒物尺寸及对流控制粒子，分流出接近、小于或大于阈值直径的三种粒子，使得到的微囊泡纯度更高。Santana 等 [21] 基于微流体技术，利用三种直径不同的微球成功分离出微囊泡。Santana 等 [21] 首先通过细胞饥饿法诱导产生微囊泡，随后将离心分离的微囊泡上清液通过 0.22 μm Steriflip 过滤器过

滤，利用过滤器中荧光聚戊二烯微球的三种直径（51 nm、190 nm 和 2.01 μm）来分离出不同大小的微囊泡。

截至目前，由于微囊泡体积小、密度低造成其分离难度大，想要得到纯净的微囊泡则必须将其与其余膜结构区分开来，难度更高，为得到较为纯净的微囊泡，一些新技术，例如利用折射不同波长的纳米探针实现对囊泡的特异性生物检测与分离、利用软光刻方法制备微流控芯片并用恒压注射泵制备大小均匀的微囊泡等技术应运而生[22]。

4.3 微囊泡的表征

4.3.1 电子显微镜 扫描电子显微镜和透射电子显微镜是用于微囊泡表征和可视化的常规方法之一，运用电子束穿过微囊泡可得到直观的图像，但一般测量前需对微囊泡进行固定、脱水等处理，这会对微囊泡造成损害，且电镜仅可用于微囊泡形态、直径的测定，不可测定其浓度。冷冻电镜（cryo-EM）能区分微囊泡和非泡状颗粒，获得更详细的微囊结构信息，如 Garaeva 等[23]运用 cryo-EM 对天然葡萄柚来源的微囊泡进行表征，获得了粒径、脂质双分子层厚度及形态等信息。并且 cryo-EM 能减少预处理从而有效避免微囊泡形态变化及损伤。低温电子断层扫描可进一步建立微囊泡三维图像，验证其球形形态[24]。

4.3.2 纳米粒子跟踪分析（NTA）和电阻脉冲传感（RSP） NTA 可通过追踪悬浮粒子的布朗运动估计粒子的平均尺寸与浓度，操作简单迅速，检测过程几乎对微囊泡无影响，也可通过荧光检测微囊泡上的抗原组成。Dlugolecka 等[25]运用荧光 NTA 检测非小细胞肺癌患者支气管肺灌洗液来源的微囊泡相关蛋白获得了其浓度、大小、分布及表面表型，但对于如血浆等复杂生物流体，此法检测灵敏度降低。大囊泡可能掩盖小囊泡，荧光强度不够则无法被检测，这些都会降低检测结果的准确性。

RSP 是一种基于 Coulter 原理测定悬浮液中微囊泡大小与浓度的方法，测量前须除去大颗粒和蛋白质防止其堵塞装置孔道，运用广泛，但其检测重现性有待提高。Cimorelli 等[26]已证实微流控 RSP 对 65 ～ 75 nm 生物流体中微囊泡有较好的测量重现性，并以此建立了一个准确且可重复的操作程序以检测微囊泡浓度和粒径分布。

NTA 和 RSP 是最常用于估计粒子大小和浓度的两种方法，但无法区分微囊泡和非微囊泡颗粒。

4.3.3 流式细胞术（FC） FC 可用于确定单个微囊泡的细胞来源，对其进行高分辨率和定性分析，提供浓度、表型等相关信息，但微囊泡光散射信号微弱，小微囊泡携抗原少，免疫荧光测量存在一定误差且重现性差，大多传统流式细胞仪对直径＜ 500 nm 的微囊泡灵敏度不够[27]。Pospichalova 等[28]研究表明，通过蛋白质和脂质特异性染料或第一抗体标记微囊泡能提高 FC 检测灵敏度，实现对微囊泡进行常规定量分析和表征。成像流式细胞术（IFC）结合了传统流式细胞仪和显微镜的优点，能获取高质量的多光谱图像，对单个微囊泡的检测准确度更高，Ofir-Birin 等[29]通过对疟原虫来源微囊泡内蛋白质、RNA 和脂质进行荧光标记，加以 IFC 实时追踪，能直观地监测疟疾患者免疫细胞对微囊泡的摄取及摄取后微囊泡运载物质的分布，为探究微囊泡内化过程提供了又一强有力的方法。

4.3.4 抗体特异性酶联免疫吸附测定（ELISA）和蛋白免疫印记分析 纳米到微米级微囊泡表达特异性抗体，ELISA 通过与抗体相连的酶产生的检测信号，检测和定量测定特定细胞来源的微囊泡，但微囊的异质性和亚型限制了此法对微囊泡总浓度的测定[30]。Ma 等[31]建立高亲和力磷脂酰丝氨酸结合剂 TIM4-ELISA 系统，运用多种抗体提高检测微囊泡的灵敏度成功鉴定出一种微囊泡分泌抑制剂和三种微囊泡分泌激活剂。

蛋白免疫印记分析用于确认微囊泡主要标记物（Alix 或 CD63）和微囊泡的蛋白质的存在。Sung 等[32]运用蛋白质印迹法对脊柱硬膜外脂肪间充质干细胞细胞外囊泡进行表征，以外体融合蛋白 flotillin 2、CD81 等微囊泡标志物作为分析指标。

Dong 等[33]利用尺寸排阻分离和光子晶体纳米结构结合 CD63 配体研制了一种集成芯片，可灵敏定量测定微囊泡。

4.3.5 其他 其他方法还有动态光散射、原子力显微镜、荧光激活细胞分选等，以上方法各有利弊，故微囊泡的表征常采用多种方法，从而实现对微囊泡进行精确全面的分析识别、对微囊泡亚群进行分类以及对具有功能效应的特征进行深入研究。

5 微囊泡在肿瘤疾病中的作用

微囊泡具有较好的生物相容性且表面易修饰，可将靶向基团通过“自然嵌合”等方式与之结合，使其具有靶向性[34-35]。此外，微囊泡可通过调节分子和信号通路，参与肿瘤发展，可用于各类癌症早期的诊断、监测及预后[36]。微囊泡作为细胞间信号传导的通路，其数量的变化与疾病

的产生密切相关[37-38]。

5.1 肝癌

肝癌细胞通常表现为耐药性强、易复发，且多数患者确诊即为晚期，因此确定一个合适的肝癌早期诊断指标显得尤为重要。考虑到无论是正常细胞还是病变细胞，都通过释放微囊泡与其他细胞产生联系。Hsu 等[39]对肝癌细胞分泌的微囊泡中的 M2 型丙酮酸激酶（PKM2）进行检测，发现肝癌患者血浆微囊泡中 PKM2 明显升高，可作为肝癌早期诊断标志。而吴丁[40]提出的石墨烯场效应晶体管生物传感器大幅提高了微囊泡的检测灵敏度，提高了其在临床应用的可能性。

肝癌的转移扩散是导致患者病情恶化的重要原因，肝癌分泌的微囊泡与其癌症的发展密切相关，可将其作为潜在的治疗靶点。He 等[41]研究表明上皮细胞来源的微囊泡作为 CRISPR/Cas9 的载体可治疗肝癌，且进一步研究表明肝癌细胞来源的微囊泡可以介导肝癌细胞对索拉非尼的耐药[42]，提示这类微囊泡可能不能作为肝癌治疗中抗肿瘤药物传递的载体。Kogure 等[43]提出肝癌细胞来源的微囊泡与肝癌细胞增殖有所关联，肝癌细胞分泌的微囊泡通过介导 miRNA 的转移来激活相关信号通路并调节 TAK1 的表达，从而增强肝癌细胞增殖能力。Fang 等[44]发现肝癌细胞分泌的微囊泡含有 miR-103 可在破坏内皮细胞的同时加剧肝癌细胞扩散，因此，若能抑制肝癌细胞分泌微囊泡可对肝癌病情产生极大缓解。

5.2 肺癌

肺癌是全球病死率最高的癌症，肺癌死亡的人数占所有癌症死亡人数的 18.4%[45]。Kanazawa 等[46]经研究发现肺癌患者中血小板微囊泡及单核细胞微囊泡数量高于健康人，故认为血小板微囊泡浓度可作为非小细胞肺癌的进展指标。Tseng 等[47]发现贫血小板血浆中的组织因子阳性微囊泡可预示肺癌向远处转移，可作为检测肺癌扩散的指标。

肺癌患者血小板来源的微囊泡在促进 A549 细胞增殖的同时可加强促血管生成基因的表达，加快肺癌的发展。Janowska-Wieczorek 等[48]给小鼠静脉注射其血小板来源的微囊泡后发现人肺癌细胞系 A549 迁移性明显增强，进一步证明微囊泡在肿瘤迁移和血管生成中发挥重要作用。在肺癌预后研究中，通过测定 107 例非小细胞肺癌患者血小板微囊泡和内皮细胞微囊泡的数量及循环总微囊泡数量，表明微囊泡基线水平与肺癌预后息息相关，基线水平高则表示预后良好[49-50]。

5.3 卵巢癌

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一，是妇科恶性肿瘤病死率最高的疾病[51]。研究表明在卵巢癌患者血液中微囊泡数量明显上升，可成为临床“体液检查”的理想选择[52]。Cicek 等[53]发现卵巢癌患者血清中分离出来的微囊泡包含特定的 miRNA，可以用于恶性肿瘤的早期检测的标志。Barnabas 等[54]在 Q-Exactive 质谱仪上对微囊泡样品进行数据分析，并成功构建一个 9 个蛋白质的分类器，经验证能正确识别所有卵巢癌患者Ⅰ期病变，其实验结果为微囊泡能成为早期癌症诊断依据提供有力证据。

Mancilla 等[55]通过研究浆液性卵巢癌小鼠模型，发现辛伐他汀可影响肿瘤细胞释放微囊泡数量及微囊泡的组成，导致微囊泡诱导的肿瘤细胞侵袭和迁移明显减少，有望成为新的治疗卵巢癌的途径。在治疗过程中耐药性是卵巢癌治疗失败的主要原因之一。多个实验结果表明，肿瘤细胞能释放大量含各种蛋白酶、mRNA 和信号分子的微囊泡，在肿瘤发展过程中起到重大作用，最终可导致细胞耐药[56-57]。同时 Jorfi 等[58]研究表明，肿瘤细胞利用微囊泡排出抗肿瘤药物，产生耐药性。

5.4 乳腺癌

乳腺癌在全球女性癌症中的发病率为 24.2%，位居女性癌症的首位，其中 52.9% 患者来自发展中国家。秉持着早发现早治疗的原则，Kosaka 等[59]通过研究发现乳腺癌患者血清中微囊泡数量明显高于常人，有望作为临床诊断的标志。

在治疗过程中，朱链[34]利用叶酸与生物素双修饰的微囊泡，负载紫杉醇和 Bcl-2siRNA，实验结果表明对乳腺癌细胞有较强杀伤效果。Risha 等[60]研究发现乳腺癌细胞分泌微囊泡中的癌症治疗靶点活性高于非癌性细胞微囊泡。Chulpanova 等[61]从 IL2 过表达间充质干细胞中分离的微囊泡可激活 Cd8T 用于杀死三阴性乳腺癌细胞。在化疗过程中，汪林军等[62]研究发现血浆微泡中的 mRNA 可能是预测乳腺癌患者化疗疗效的潜在标志物，有望通过检测血浆微泡中的 mRNA 及时调整化疗方案。Park 等[63]发现载有 CXCL12 特异性 miRNA 的微囊泡，可减少乳腺癌细胞增殖，抑制乳腺癌的进一步发展。Menck 等[57]通过研究表明乳腺癌细胞分泌的微囊泡含有大量细胞外基质金属蛋白酶诱导剂，可加剧肿瘤细胞发展。Menck 等[14]在随后研究中发现在转移性乳腺癌患者血液中的微囊泡也存在类似现

象，这说明乳腺癌细胞能通过分泌微囊泡扩散，为临床抑制乳腺癌提供了潜在途径。

6 其他

6.1 微囊泡在肺部疾病中的运用

通过检测不同来源微囊泡的数量及其携带的标志物可诊断肺纤维化的发生及判断肺栓塞的程度[64-65]。研究发现，微囊泡对哮喘、肺动脉高压、肺癌等疾病也起到一定的治疗作用[66-68]。肺部疾病的预后检查中常以不同来源微囊泡及其携带的生物标志物变化情况为依据判断慢性阻塞性肺疾病、急性呼吸窘迫综合征康复患者的康复情况[69]。

6.2 微囊泡在心血管疾病中的运用

微囊泡随着血液循环与众多细胞接触且影响受体细胞的表型，所以细胞源性微囊泡在心血管疾病的预测、发生和进展中是一个重要标志物[70]。微循环系统内的微囊泡与内皮细胞的比值可作为心血管功能障碍的生物标志物和动脉粥样硬化的提示，并且利用微囊泡特异性可区分不同阶段和不同发展程度的心血管疾病[71]。在治疗中，微囊泡可改善血脂异常、高血压，抑制心肌细胞的凋亡[72]。与此同时微囊泡可作为高胆固醇血症患者动脉粥样硬化加速和预后检测的标准[73]。

6.3 微囊泡在组织修复及再生中的运用

不同类型细胞分泌的微囊泡，通过介导不同因子在组织修复中发挥不同作用。

由滑膜或脂肪来源的间充质干细胞分泌的微囊泡，通过介导不同因子实现患骨关节炎后软骨的再生，有望改善类风湿关节炎等[74-75]。自然杀伤细胞、血小板分泌的微囊泡则会抑制内皮细胞的生长及迁移，成为组织修复类疾病康复的阻碍[76-77]。T 细胞来源微囊泡，可改变血管内皮功能和屏障通透性，加剧组织炎症，同时也为治疗提供了新的思路[78]。通过检测已完成异基因造血细胞患者循环微囊泡的数量，及时发现患者是否存在明显血管损伤或凝血现象，以便及早治疗[79]。

6.4 神经细胞及神经系统

神经细胞分泌的微囊泡在神经系统疾病的修复与治疗中发挥重要作用。研究表明胚胎干细胞衍生的神经干细胞分泌的微囊泡，可使受损坐骨神经再生[19]。实验证明，人神经干细胞分泌的微囊泡对经谷氨酸诱导受损的大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 PC12 细胞有修复作用[80]。临床上成人神经系统难以再生，但有实验表明人神经干细胞可促进大鼠神经元轴突的增长，进一步研究可以分析神经干细胞分泌的微囊泡能否促进神经元轴突的增长，可为微囊泡临床应用打下了基础[81]。

7 总结与展望

微囊泡作为新型天然药物传递载体，具有较高的生物相容性、较强的稳定性和有限的免疫原性[82]及细胞毒性，与传统的合成给药载体相比能更安全有效地应用在临床。微囊泡渗透到组织中时，可提高药物的靶向性；作为生物标志物，通过检测血液中不同来源的微囊泡能对癌症等疾病的诊断、治疗以及疾病进程的判断起到良好的辅助作用[83-84]。目前将微囊泡广泛运用在临床上的限制在于难以实现大规模生产和标准化鉴定、表征和定量，效能低而成本高[85-86]；无修饰的微囊泡药物装载效率低，现有的装载方法[82]有待优化创新，建立标准化的微囊泡分离纯化方法及开发临床级微囊泡制备方法也是未来微囊泡研究的重难点；微囊泡在外周血中清除速率较快也是限制其应用的一大因素[87]，且微囊泡在部分疾病的作用研究依旧停留在动物实验阶段[88]。未来攻克的关键就在于如何提高性质稳定的微囊泡的提取效率、拓宽微囊泡的来源并加快微囊泡应用于临床的脚步，从而为患者提供更加精准安全的治疗方案，使微囊泡成为疗效更好、治疗范围更广的药物载体。

总之，真正将微囊泡应用于临床还面临着诸多挑战和困难，但其本身具有合成类药物载体无可比拟的优势，这决定了只要攻克其应用的限制因素，微囊泡必然会在生物医药学领域大放光彩，成为一项全新、先进、高效的递药和治疗手段。

参考文献

[1] 龚文杰，谢晓明，涂长春 . 微囊泡与病毒感染 [J]. 生命科学，2014，26（9）：883-890.

[2] Victor C，Yang XY，Ma YG，et al. Endothelial microvesicles carrying Src-rich cargo impair adherens junction integrity and cytoskeleton homeostasis [J]. Cardiovasc Res，2020，116（8）：1525-1538.

[3] 钟宇彤，黎艳红，林辉，等 . 微囊泡产生及鉴定体系现状分析 [J]. 中国生物医学工程学报，2020，39（3）：362-366.

[4] 任宁，陈树涛，郭绪昆 . 微囊泡的主要生理机制及其与冠心病关系的研究进展 [J]. 山东医药，2013，53（29）：90-92.

[5] 刘与进，范恒，刘星星 . 炎症性肠病与干细胞源性微囊泡的研究进展 [J]. 华中科技大学学报（医学版），2017，46（6）：709-714.

[6] 王会景 . 细胞膜微囊泡多腔室结构调控研究 [D]. 长沙：湖南大学，2018.

[7] 边素艳，刘宏斌 . 细胞外囊泡的分离及鉴定方法 [J]. 新医学，2019，50（9）：658-662.

[8] Diamant M，Tushuizen ME，Sturk A，et al. Cellular mi-

croparticles：new players in the field of vascular disease? [J]. Eur J Clin Invest，2004，34（6）：392-401.
[9] 张戎，鄂玲玲，施松涛，等 . 细胞外微囊泡修复受损小鼠 BMMSCs 用于治疗小鼠骨质疏松症 [A]//2019 年中华口腔医学会牙周病学专业委员会牙周病与植体周病新分类·新理论·新技术高峰论坛会议手册及论文汇编 [C]. 2019：137-139.
[10] 尚政军 . 肿瘤来源的微囊泡通过介导基质细胞的糖代谢重编程促进口腔鳞状细胞癌的进展 [A]// 第十四次中国口腔颌面外科学术会议论文汇编 [C]. 2018：439-440.
[11] 余自力 . 基于细胞源性微囊泡的多功能纳米载体的构建及在肿瘤靶向治疗中的应用 [D]. 武汉：武汉大学，2017.
[12] D'Souza-Schorey C，Schorey JS. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion [J]. Essays Biochem，2018，62（2）：125-133.
[13] Zhu S，Li S，Yi M，et al. Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications [J]. Int J Nanomed，2021，16：7071-7090.
[14] Menck K，Sivaloganathan S，Bleckmann A，et al. Microvesicles in cancer：small size，large potential [J]. Int J Mol Sci，2020，21（15）：5373.
[15] Wang SE. Extracellular vesicles and metastasis [J]. Cold Spring Harbor Perspect Med，2020，10（7）：a037275.
[16] 姚嘉，唐晖，郑俊，等 . 人脐带间充质干细胞来源的微囊泡提取和鉴定 [J]. 中华细胞与干细胞杂质，2016，6（4）：221-227.
[17] 刘娟，周炳荣，王申，等 . 中长波紫外线辐射诱导皮肤成纤维细胞上清液中微囊泡功能的检测 [J]. 中国皮肤性病学杂志，2016，1：1-5.
[18] Coumans F，Brisson AR，Buzas EI，et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles [J]. Circ Res，2017，120（10）：1632-1648.
[19] Chen X，Ye K，Yu JH，et al. Regeneration of sciatic nerves by transplanted microvesicles of human neural stem cells derived from embryonic stem cells [J]. Cell Tissue Banking，2020，21（2）：233-248.
[20] Zhang W，Yu ZL，Wu M，et al. Magnetic and folate functionalization enables rapid isolation and enhanced tumor-targeting of cell-derived microvesicles [J]. ACS Nano，2017，11（1）：277-290.
[21] Santana SM，Antonyak MA，Cerione RA，et al. Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from hetergeneous extracellular shed vesicle populations [J]. Biomed Microdevices，2014，16（6）：869-877.
[22] 唐其省 . 细胞表面新型微囊泡的分离及其特性研究 [D]. 南昌：南昌大学，2016.
[23] Garaeva L，Kamyshinsky R，Kil Y，et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro [J]. Sci Rep，2021，11（1）：6489-6489.
[24] Van NG，Bergam P，Di CA，et al. Apolipoprotein E regulates amyloid formation within endosomes of pigment cells [J]. Cell Reports，2015，13（1）：43-51.
[25] Dlugolecka M，Szymanski J，Zareba L，et al. Characterization of extracellular vesicles from bronchoalveolar lavage fluid and plasma of patients with lung lesions using fluorescence nanoparticle tracking analysis [J]. Cells，2021，10（12）：3473.
[26] Cimorelli M，Nieuwland R，Varga Z，et al. Standardized procedure to measure the size distribution of extracellular vesicles together with other particles in biofluids with microfluidic resistive pulse sensing [J]. PLoS One，2021，16（4）：e0249603.
[27] Görgens A，Nolan JP. Aiming to compare apples to apples：analysis of extracellular vesicles and other nanosized particles by flow cytometry [J]. Cytom Part A，2020，97（6）：566-568.
[28] Pospichalova V，Svoboda J，Dave Z，et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer [J]. J Extracell Vesicles，2015，4（1）：25530.
[29] Ofir-Birin Y，Abou Karam P，Rudik A，et al. Monitoring extracellular vesicle cargo active uptake by imaging flow cytometry [J]. Front Immunol，2018，9：1011.
[30] Serrano-Pertierra E，Oliveira-Rodríguez M，Matos M，et al. Extracellular vesicles：current analytical techniques for detection and quantification [J]. Biomolecules，2020，10（6）：824.
[31] Ma Y，Yoshida T，Matoba K，et al. Identification of small compounds regulating the secretion of extracellular vesicles via a TIM4-affinity ELISA [J]. Sci Rep，2021，11（1）：13471.
[32] Sung SE，Seo MS，Kang KK，et al. Isolation and characterization of extracellular vesicle from mesenchymal stem cells of the epidural fat of the spine [J]. Asian Spine J，2021，16（2）：153-161.
[33] Dong X，Chi J，Zheng L，et al. Efficient isolation and sensitive quantification of extracellular vesicles based on an integrated ExoID-Chip using photonic crystals [J]. Lab Chip，2019，19（17）：2897-2904.
[34] 朱链 . 多功能微囊泡纳米药物递送载体的构建及应用于肿瘤的高效治疗 [D]. 武汉：武汉大学，2017.
[35] 何晓玲，陈仕红，刘祖浩，等 . 抗肿瘤药物靶向制剂研究概况 [J]. 湖北中医药大学学报，2020，22（2）：122-125.
[36] Tamkin A，Steven K，Glen R，et al. Extracellular vesicles as biomarkers in malignant pleural mesothelioma：A review [J]. Crit Rev Oncol Hemat，2020，150：102949.
[37] Knijff D，Koerts J，Nieuwland R，et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum，2002，46（6）：1498-1503.
[38] Brogan PA，Shah V，Brachet C，et al. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young [J]. Arthritis Rheum，2004，50（3）：927-936.
[39] Hsu MC，Hung WC. Pyruvate kinase M2 fuels multiple as-

pects of cancer cells：from cellular metabolism，transcriptional regulation to extracellular signaling [J]. Mol Cancer，2018，17（1）：35.

[40] 吴丁 . 石墨烯场效应晶体管生物传感器超灵敏检测肝癌细胞释放的微囊泡 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2020.

[41] He C，Doulathunnisa JA，Huantian X，et al. Epithelial cell-derived microvesicles：a safe delivery platform of CRISPR/Cas9 conferring synergistic anti-tumor effect with sorafenib [J]. Exp Cell Res，2020，392（2）：112040.

[42] Jaffar AD，He C，Xu HT，et al. Microvesicles mediate sorafenib resistance in liver cancer cells through attenuating p53 and enhancing FOXM1 expression [J]. Life Sci，2021，271：119149.

[43] Kogure T，Patel T. Isolation of extracellular nanovesicle micro RNA from liver cancer cells in culture [J]. Methods Mol Biol，2013，1024（5）：11-18.

[44] Fang JH，Zhang ZJ，Shang LR，et al. Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins [J]. Hepatology，2018，68（4）：1459-1475.

[45] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA-Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[46] Kanazawa S，Nomura S，Kuwana M，et al. Monocyte-derived microparticles maybe a sign of vascular complication in patients with lung cancer [J]. Lung Cancer，2003，39（2）：145-149.

[47] Tseng JC，Chang LC，Jiang BY，et al. Elevated circulating levels of tissue factor-positive microvesicles are associated with distant metastasis in lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2014，140（1）：61-67.

[48] Janowska-Wieczorek A，Wysoczynski M，Kijowski J，et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer [J]. Int J Cancer，2005，113（5）：752-760.

[49] Fleitas T，Martínez-Sales V，Vila V，et al. Circulating endothelial cells and microparticles as prognostic markers in advanced non-small cell lung cancer [J]. PLoS One，2012，7（10）：e47365.

[50] Wang CC，Tseng CC，Hsiao CC，et al. Circulating endothelial-derived activated microparticle：a useful biomarker for predicting one-year mortality in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Biomed Res Int，2014，2014：173401.

[51] Chan JK，Cheung MK，Husain A，et al. Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years [J]. Obstet Gynecol，2006，108（3Pt1）：521-528.

[52] Mezouar S，Mege D，Darbousset R，et al. Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis [J]. Semin Oncol，2014，41（3）：356-348.

[53] Cicek GT，Safinur A，Richard HT，et al. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients [J]. Anal Biochem，2012，428（1）：44-53.

[54] Barnabas GD，Bahar-Shany K，Sapoznik S，et al. Microvesicle proteomic profiling of uterine liquid biopsy for ovarian cancer early detection [J]. Mol Cell Proteomics，2019，18（5）：865-875.

[55] Mancilla P，Liberona MF，Kato S，et al. Simvastatin modifies the internalization，endocytic trafficking，and the content of ovarian cancer cellderived extracellular microvesicles which are responsible of inducing migration and invasion in vitro [J]. Int J Gynecol Cancer，2020，30（Suppl 3）：A192-A193.

[56] Arendt BK，Walters DK，Wu X，et al. Multiple myeloma dell-derived microvesicles are enriched in CD147 expression and enhance tumor cell proliferation [J]. Oncotarget，2014，5（14）：5686-5699.

[57] Menck K，Scharf C，Bleckmann A，et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN [J]. J Mol Cell Biol，2015，7（2）：143-153.

[58] Jorfi S，Ansa-Addo EA，Kholia S，et al. Inhibition of microvesiculation sensitizes prostate cancer cells to chemotherapy and reduces docetaxel dose required to limit tumor growth in vivo [J]. Sci Rep，2015，5（1）：13006.

[59] Kosaka N，Iguchi H，Hagiwara K，et al. Neutral sphingomyelinase 2（nSMase2）-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis [J]. J Biol Chem，2013，288（15）：10849.

[60] Risha Y，Susevski V，Hüttmann N，et al. Breast cancer-derived microvesicles are the source of functional metabolic enzymes as potential targets for cancer therapy [J]. Biomedicines，2021，9（2）：107.

[61] Chulpanova DS，Rizvanov AA，Soloveva VV. Artificial microvesicles isolated from mesenchymal stem cells with IL2 overexpression activate CD8 ＋ T-Killers to kill triple negative breast cancer cells [J]. Blood，2020，136（Supplement 1）：26.

[62] 汪林军，王腾，吴小红，等 . 血浆微泡乳腺癌耐药蛋白 mRNA 水平对乳腺癌化疗疗效的预测价值 [J]. 中华实验外科杂志，2015，32（5）：976-978.

[63] Park JM，Munoz JL，Won BW，et al. Exogenous CXCL12 activates protein kinase C to phosphorylate connexin 43 for gap junctional in-tercellular communication among confluent breast cancer cells [J]. Cancer Lett，2013，331（1）：84-91.

[64] Novelli F，Neri T，Tavanti L，et al. Procoagulant，tissue factor-bearing microparticles in bronchoalveolar lavage of interstitial lung disease patients：an observational study [J]. PLoS One，2014，9（4）：e95013.

[65] Bucciarelli P，Martinelli I，Artoni A，et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism [J]. Thromb Res，2012，129（5）：591-597.

[66] Elia B，Ilaria F，Maria LT，et al. Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration：the long way

through "pharmaceuticalization" for the best formulation [J]. J Control Release，2019，309：11-24.

[67] Farrukh A，Radha M，Jeyaprakash J，et al. Exosomes for the enhanced tissue bioavailability and efficacy of curcumin [J]. AAPS J，2017，19（6）：1691-1702.

[68] Takahashi T，Kobayashi S，Fujino N，et al. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients：a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility [J]. Thorax，2012，67（12）：1067-1074.

[69] Bastarache JA，Fremont RD，Kropski JA，et al. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol，2009，297（6）：L1035-L1041.

[70] Nicoleta A，Eugen A，Florentina S，et al. Intravenous administration of allogenic cell-derived microvesicles of healthy origins defends against atherosclerotic cardiovascular disease development by a direct action on endothelial progenitor cells [J]. Cells，2020，9（2）：423.

[71] Badimon L，Suades R，Vilella-Figuerola A，et al. Liquid biopsies：microvesicles in cardiovascular disease [J]. Antioxid Redox Signal，2019，33（9）：645-662.

[72] Lei Z，Jianyi G，Tianyan C，et al. Microvesicles Derived from human embryonic neural stem cells inhibit the apoptosis of HL-1 cardiomyocytes by promoting autophagy and regulating AKT and mTOR via transporting HSP-70 [J]. Stem Cells Int，2019，2019：6452684.

[73] Suades R，Padró T，Crespo J，et al. Liquid biopsy of extracellular microvesicles predicts future major ischemic events in genetically characterized familial hypercholesterolemia patients [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2019，39（6）：1172-1181.

[74] Li YL，Tu QQ，Xie DM，et al. Triamcinolone acetonide-loaded nanoparticles encapsulated by CD90 ＋ MCSs-derived microvesicles drive anti-inflammatory properties and promote cartilage regeneration after osteoarthritis [J]. J Nanobiotechnol，2022，20（1）：150.

[75] Tsujimaru K，Takanashi M，Sudo K，et al. Extracellular microvesicles that originated adipose tissue derived mesenchymal stem cells have the potential ability to improve rheumatoid arthritis on mice [J]. Regener Ther，2020，15：305-311.

[76] Markova K，Mikhailova V，Milyutina Y，et al. Effects of microvesicles derived from NK cells stimulated with IL-1β on the phenotype and functional activity of endothelial cells [J]. Int J Mol Sci，2021，22（24）：13663.

[77] Schubert P，Culibrk L，Culibrk B，et al. Releasates of riboflavin/UV-treated platelets：microvesicles suppress cytokine-mediated endothelial cell migration/proliferation [J]. Transfusion，2021，61（5）：1551-1561.

[78] Vdovenko D，Balbi C，Di SD，et al. Microvesicles released from activated CD4 ＋ T cells alter microvascular endothelial cell function [J]. Eur J Clin Invest，2022，52（6）：e13769.

[79] Gavriilaki E，Sakellari I，Anyfanti P，et al. Assessment of endothelial injury and pro-coagulant activity using circulating microvesicles in survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Int J Mol Sci，2020，21（24）：9768.

[80] 余佳红，童玉，叶开，等 . 人神经干细胞微囊泡对谷氨酸诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 江苏大学学报（医学版），2020，30（4）：302-306.

[81] 叶开，余佳红，陈天琰，等 . 人神经干细胞源施万样细胞微囊泡促进大鼠神经元轴突生长 [J]. 江苏大学学报（医学版），2019，29（4）：322-326，332.

[82] Meng WR，He CS，Hao YY，et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system：considering cell source [J]. Drug Deliv，2020，27（1）：585-598.

[83] Piffoux M，Ahmad N，Nelayah J，et al. Monitoring the dynamics of cell-derived extracellular vesicles at the nanoscale by liquid-cell transmission electron microscopy [J]. Nanoscale，2018，10（3）：1234-1244.

[84] Nikitidou E，Khoonsari PE，Shevchenko G，et al. Increased release of apolipoprotein E in extracellular vesicles following amyloid-beta protofibril exposure of neuroglial co-cultures [J]. J Alzheimer's Dis，2017，60（1）：305-321.

[85] Monsel A，Zhu YG，Gudapati V，et al. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases [J]. Expert Opin Biol Ther，2016，16（7）：859-871.

[86] Liu A，Zhang XW，He HL，et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease [J]. Expert Opin Biol Ther，2020，20（2）：125-140.

[87] Ratajczak MZ，Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes：discovery，disbelief，acceptance，and the future? [J]. Leukemia，2020，34（12）：3126-3135.

[88] 杨文玲，侯杨峰，邓文艺，等 . 细胞外囊泡在血管钙化中的调节作用 [J]. 生命的化学，2019，39（2）：382-387.

（收稿日期：2022-04-06；修回日期：2022-06-08）

研究论文

高良姜素过饱和自纳米乳的制备及质量评价

方杰，李颜伶，秦铭，吉莉，徐广，马群*（北京中医药大学中药学院，北京　102488）

摘要：目的　研究高良姜素过饱和自纳米乳递药系统（galangin-SSNEDDS）的处方组成，并进行评价。**方法**　通过溶解度试验、配伍试验及伪三元相图，筛选高良姜素自纳米乳处方，运用星点设计 - 效应面法优化处方；再以粒径、抑晶效果及溶出试验等考察高良姜素过饱和自纳米乳处方并对其进行理化性质及稳定性等评价。**结果**　优化得到的高良姜素过饱和自纳米乳处方中油相为油酸聚乙二醇甘油酯（26.68%）、表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油（49.67%）、助表面活性剂为聚乙二醇 400（23.65%）、促过饱和物质为聚乙烯己内酰胺 - 聚醋酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物（Soluplus）（3.0 mg • g^{-1}），载药量为 28.0 mg • g^{-1}。高良姜素过饱和自纳米乳为金黄色透明黏稠液体，分散液为 *O/W* 型乳液，乳化时间为（67±4）s，平均粒径为（29.96±0.71）nm，PDI 为（0.230±0.007），电位为（－6.00±0.63）mV。高良姜素过饱和自纳米乳稳定性良好，可在 2 h 内维持较高的过饱和度，有效避免药物结晶析出，显著提高原料药的释放量。**结论**　高良姜素过饱和自纳米乳制备工艺简单，粒径分布均匀，稳定性好，能有效提高高良姜素的体外释放度，抑制结晶析出，有望提高高良姜素的生物利用度。

关键词：高良姜素；过饱和自纳米乳；星点设计 - 效应面法；过饱和度；体外释放度
中图分类号：R944.1，R284.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1765-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.009

Preparation and quality evaluation of galangin supersaturating self-nanoemulsifier

FANG Jie, LI Yan-ling, QIN Ming, JI Li, XU Guang, MA Qun* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To determine and evaluate the formulation of galangin supersaturating self-nanoemulsifying drug delivery systems (galangin-SSNEDDS). **Methods**　The formulation of galangin-SNEDDS was settled by solubility test, compatibility test, pseudo-ternary phase diagram and central composite design-response surface methodology. The formulation of galangin-SSNEDDS was evaluated with particle size, crystal inhibition effect and dissolution test. The physicochemical properties and stability of galangin-SSNEDDS were also evaluated. **Results**　In the optimized galangin-SSNEDDS formulation, the oil phase was Labrafil M1944CS (26.68%), the emulsifier was Kolliphor ELP (49.67%), the co-emulsifier was PEG 400 (23.65%), the supersaturated promoter was Soluplus (3.0 mg • g^{-1}) and the drug loading was 28.0 mg • g^{-1}. Galangin-SSNEDDS presented as golden yellow transparent viscous liquid. The dispersion was *O/W* emulsion, the emulsification time was (67±4) s, the average particle size was (29.96±0.71) nm, the PDI was (0.230±0.007), and the potential was (－6.00±0.63) mV. Galangin-SSNEDDS showed good stability, which maintained high supersaturation within 2 h, effectively avoided drug crystallization, and significantly increased the bulk drug release. **Conclusion**　Galangin-SSNEDDS has the advantages of simple preparation process, uniform particle size distribution and good stability. It can effectively improve the release of galangin in vitro and inhibit the crystallization, which helps improve

作者简介：方杰，女，在读硕士研究生，主要从事中药新药与质量控制研究，email：fj18810628827@163.com　*通信作者：马群，女，博士，研究员，主要从事中药新药与质量控制研究，email：maqun99@126.com

the bioavailability of galangin.

Key words: galangin; supersaturating self-nanoemulsifying drug delivery system; central composite design-response surface methodology; supersaturation; in vitro release

高良姜素（galangin）是从姜科多年生草本植物高良姜的根及根茎中提取的黄酮类活性成分[1]。现代研究表明，高良姜素在抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、降尿酸等方面具有较好的药理作用。但高良姜素在水中溶解度较差，导致其进入体内吸收少，生物利用度较低，严重限制了其在临床上的应用[2]。近年来，已有学者通过纳米粒[3]、自微乳[4]等增溶技术改善高良姜素的溶解度，但仍存在制备工艺复杂、稳定性差等问题。因此，寻找一种制备工艺简单、稳定性好的增溶技术来改善高良姜素的溶解度及释放度，成为目前亟待解决的问题。

过饱和自纳米乳递药系统（supersaturating self-nanoemulsifying drug delivery systems，SSNEDDS）是在自纳米乳递药系统（self-nanoemulsifying drug delivery systems，SNEDDS）的基础上加入水溶性纤维聚合材料或两亲性聚合物等促过饱和物质形成的，能够有效抑制或延缓自纳米乳进入体内后的析晶情况[5]。过饱和自纳米乳既能提高难溶性药物的溶解度，又能维持药物的过饱和状态，达到延长药物在体内的吸收时间，提高药物生物利用度的目的；同时过饱和自纳米乳还可避免使用大量表面活性剂而带来的安全问题。因此，为解决高良姜素水溶性差、生物利用度低的问题，本试验采用过饱和自纳米乳技术来增溶高良姜素，结合星点设计 - 效应面法、体外溶出试验等筛选优化高良姜素过饱和自纳米乳处方，并对其理化性质、过饱和度、体外释放及稳定性等进行评价，以期增加高良姜素溶解度，改善药物口服吸收，为高良姜素新剂型的研发及其他难溶性药物水溶性的改善提供依据。

1　材料

BT 125D 电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；XW-80A 涡旋混合仪（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津）；XZQ-QX 全温振荡器（哈尔滨市东联电子技术开发有限公司）；KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司），RCT Basic 磁力搅拌器（IKA）；Eclipse E200 偏光显微镜（Nikon）；JEM-1400Flash 透射电子显微镜（日本电子）；ZRS-8G 智能溶出试验仪（天大天发）；Zetasizer Nano ZS90 纳米粒径电位分析仪（Malvern）。

高良姜素对照品（批号：B20430，HPLC ≥ 98%，上海源叶生物科技有限公司）；高良姜素原料药（批号：DST210511-020，HPLC ≥ 98%，成都德思特生物技术有限公司）；肉豆蔻酸异丙酯（isopropyl myristate，IPM）、丙三醇（glycerol）、羟丙基甲基纤维素 K4M（HPMC K4M）、羟丙基甲基纤维素 E6（HPMC E6）（上海麦克林生化科技有限公司）；油酸乙酯（Ethyl Oleate，EO）、中链甘油三酯（MCT）、吐温 80（Tween 80）、聚乙二醇 400（PEG 400）、聚乙二醇 4000（PEG 4000）、聚乙二醇 6000（PEG 6000）、苏丹红、亚甲蓝（源叶生物）；油酸聚乙二醇甘油酯（Labrafil M1944CS）、丙二醇辛酸酯（Capryol 90）、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol）、二乙二醇单乙基醚（Transcutol HP）（法国嘉法狮公司，由广州天润药业有限公司赠送样品）；聚氧乙烯蓖麻油（Kolliphor ELP）、聚氧乙烯氢化蓖麻油（Kolliphor RH 40）、聚乙二醇 15 羟基硬脂酸酯（Solutol HS15）、聚乙烯己内酰胺 - 聚醋酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物（Soluplus）（巴斯夫股份公司，由北京凤礼精求医药股份有限公司赠送样品）；甲醇（色谱级，赛默飞世尔科技有限公司）；磷酸（色谱级，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；氯化钠、磷酸二氢钾（天津市光复科技发展有限公司）；1，2- 丙二醇（1，2-propanediol）、氢氧化钠、盐酸（北京化工厂）；蒸馏水（屈臣氏）；聚乙烯吡咯烷酮 K90（PVP K90）、聚乙烯吡咯烷酮 K30（PVP K30，天津市大茂化学试剂厂）；羧甲基纤维素钠（CMC-Na，山河药辅）。

2　方法与结果

2.1　高良姜素含量测定方法的建立

2.1.1　色谱条件　Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为甲醇 -0.2% 磷酸溶液（64∶36），等度洗脱；流速为 1.0 mL•min^{-1}；柱温为室温；进样量为 10 μL；检测波长为 266 nm。

2.1.2　溶液配制　精密称量高良姜素对照品 10.0 mg 置于 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇溶解，定容至刻度，即得 1.0 mg • mL^{-1} 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液，加适量甲醇稀释，分别配制成高（100 μg • mL^{-1}）、中（50 μg • mL^{-1}）、

低（20 μg • mL^{-1}）质量浓度的对照品溶液。

2.1.3　专属性考察　称取 0.1 g空白过饱和自纳米乳（固定油相、表面活性剂和助表面活性剂总质量为 1 g，按比例精密称定各组分，磁力搅拌均匀后，加入促过饱和物质 0.3 g，涡旋混匀，超声助溶，置于 37 ℃全温振荡器中静置 24 h，即得空白过饱和自纳米乳），并取 1 mL 高良姜素对照品储备液，分别加入适量甲醇稀释至 100 μg • mL^{-1}，进样测定，并记录图谱。结果高良姜素峰形良好，空白溶剂在出峰处无干扰，表明该方法专属性良好，色谱图见图 1。

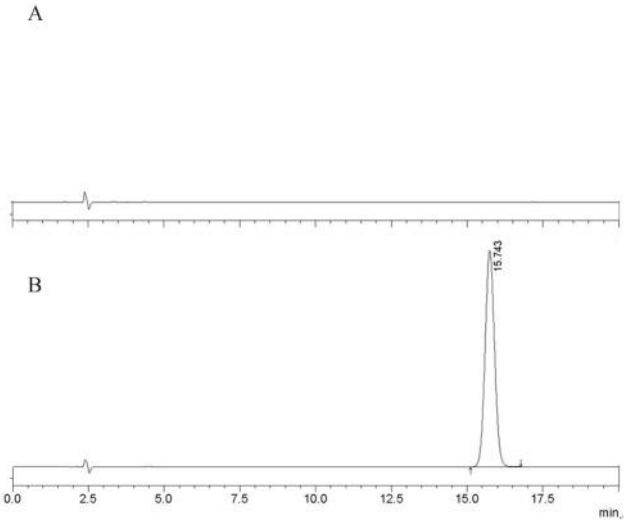


图 1　空白过饱和自纳米乳（A）和高良姜素对照品（B）的液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of blank SSNEDDS（A）and galangin reference solution（B）

2.1.4　线性关系考察　精密吸取“2.1.2”项下对照品储备液，加适量甲醇稀释，配制成 0.8、2、10、20、50、100 μg • mL^{-1} 系列质量浓度的高良姜素对照品溶液，进样测定，以对照品质量浓度为横坐标（X），对应峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得到回归方程为 $Y = 4.245 \times 10^4 X - 1.407 \times 10^4$，$R^2 = 1.000$。结果表明高良姜素在 0.8 ～ 100 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5　精密度考察　取“2.1.2”项下高、中、低质量浓度的对照品溶液，连续进样测定 6 次，记录峰面积，考察日内精密度；同法操作，连续 6 d 相同时间测定样品，记录峰面积，考察日间精密度。经计算，高良姜素高、中、低浓度对照品溶液日内精密度峰面积的 *RSD* 分别为 0.36%、0.20%、0.72%；日间精密度峰面积的 *RSD* 分别为 0.34%、0.22% 和 0.33%，表明仪器的精密度良好。

2.1.6　重复性考察　取“2.1.2”项下高、中、低质量浓度的对照品溶液各 6 份，进样测定，记录峰面积。经计算，高良姜素高、中、低浓度对照品溶液峰面积的 *RSD* 分别为 0.36%、0.060% 和 0.29%，表明该方法重复性良好。

2.1.7　稳定性考察　取“2.1.2”项下高、中、低质量浓度的对照品溶液，放置于室温下，分别于 0、2、4、8、12、24 h 取样测定，记录峰面积。经计算，高良姜素高、中、低浓度对照品溶液峰面积的 *RSD* 分别为 0.28%、0.17% 和 0.19%，表明高良姜素的稳定性良好。

2.1.8　回收率考察　精密量取“2.1.2”项下高良姜素对照品储备液，稀释不同倍数，加入到空白过饱和自纳米乳中，配制成高（100 μg • mL^{-1}）、中（50 μg • mL^{-1}）、低（20 μg • mL^{-1}）质量浓度的供试品溶液，进样分析并计算其回收率，结果高良姜素高、中、低浓度供试品溶液的回收率分别为 101.16%、101.40%、98.99%，*RSD* 值分别为 1.1%、0.20% 和 1.6%，表明方法回收率符合要求。

2.2　缓冲溶液的制备

按《中国药典》2020 年版四部缓冲溶液的配制方法配制 pH 4.5 缓冲液为醋酸 - 醋酸钠缓冲液，pH 6.8 和 pH 7.4 为 PBS 缓冲液。另称取氯化钠 2.52 g，加水 900 mL，用 70 g • L^{-1} 盐酸溶液调节 pH 为 1.2，加水稀释定容至 1000 mL，即得到 pH 1.2 的酸性氯化钠溶液。

2.3　高良姜素在不同辅料中的平衡溶解度考察

称取过量的高良姜素原料药于 15 mL 具塞离心管中，分别加入等量不同的油相（Capryol 90、Labrafil M1944CS、IPM、MCT、EO）、表面活性剂（Labrasol、Kolliphor ELP、Tween 80、Solutol HS15、Kolliphor RH 40）和助表面活性剂（Transcutol HP、Ethanol anhydrous、PEG 400、1，2-propanediol、Glycerol），涡旋混匀，以（37±0.5）℃，100 r • min^{-1} 振荡 24 h，充分平衡后以 9000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液加入适量甲醇稀释，滤过，进样分析，计算高良姜素在各辅料中的溶解度。结果显示，高良姜素在油相中的平衡溶解度大小依次为 Capryol 90（8.43 mg • g^{-1}）＞ Labrafil M1944CS（3.40 mg • g^{-1}）＞ IPM（2.58 mg • g^{-1}）＞ MCT（2.56 mg • g^{-1}）＞ EO（2.31 mg • g^{-1}）；在表面活性剂中的平衡溶解度大小依次为 Labrasol（10.93 mg • g^{-1}）＞ Kolliphor ELP（10.21 mg • g^{-1}）＞ Tween 80（7.23 mg • g^{-1}）＞ Solutol HS15（7.17 mg • g^{-1}）＞ Kolliphor RH40（6.28 mg • g^{-1}）；在助表面活性剂中的平衡溶解

度大小依次为 Transcutol HP（144.49 mg • g^{-1}）＞ Ethanol anhydrous（22.34 mg•g^{-1}）＞ PEG 400（7.75 mg • g^{-1}）＞ 1，2-propanediol（7.37 mg • g^{-1}）＞ Glycerol（2.91 mg • g^{-1}）。因此，油相选择 Capryol 90 和 Labrafil M1944CS，表面活性剂和助表面活性剂选择溶解能力较好的 4 种。

2.4　油相与表面活性剂的配伍试验

将油相和表面活性剂以 1∶9 ～ 6∶4 的质量比，以总质量为 1 g 准确称定各组分，磁力搅拌器 [（37±0.5）℃，400 r • min^{-1}] 搅拌混匀，加入 100 倍量蒸馏水，观察并记录乳化情况，按照目测评分标准 [6] 进行评价，A/B 级视为乳化效果良好，评分标准见表 1。试验得到 Labrafil M1944CS 与 Kolliphor ELP 和 Solutol HS15 在 设定比例下配伍后乳化效果较好；而 Capryol 与各表面活性剂配伍后乳化效果均较差。因此，选择 Labrafil M1944CS 为 油 相，Kolliphor ELP 和 Solutol HS15 为表面活性剂进行后续试验。

表 1　乳化效果评分标准

Tab 1　Evaluation standard of emulsification effect

评级	自乳化时间 /min	外观及状态
A	＜ 1	澄清或略泛蓝色乳光
B	＜ 1	略浑浊，呈蓝白色
C	1 ～ 2	不透明，蓝白色液体
D	＞ 2	色泽灰暗，呈灰白色，略带油状，半固体凝块
E	＞ 2	难乳化，有油滴存在

2.5　助表面活性剂的筛选

固定总质量为 1 g，将表面活性剂与助表面活性剂的质量比（K_m）固定为 1∶1。按质量比 1∶9 ～ 4∶6 准确称取油相和混合表面活性剂（表面活性剂与助表面活性剂）于西林瓶中，搅拌混合均匀，加入 100 倍量蒸馏水中，观察乳化情况。结果显示，Labrafil M1944CS 为油相，Kolliphor ELP 为表面活性剂，PEG 400 为助表面活性剂时在各比例下自乳化评价结果均为 A 级，高于其他组方，故选择 Kolliphor ELP 为表面活性剂，PEG 400 为助表面活性剂。

2.6　伪三元相图的构建

将表面活性剂与助表面活性剂按质量比 9∶1 ～ 1∶9 混合均匀，再与油相按质量比 9∶1 ～ 4∶6 混匀。取 0.1 g 分散至 100 倍量蒸馏水中，观察乳化情况，记录评分为 A/B 级的处方比例，采用 Origin 2018 软件绘制伪三元相图，见图 2。根据结果确定各相（Labrafil M1944CS，Kolliphor ELP 和 PEG 400）质量分数的取值范围分别为 10% ～ 60%、15% ～ 80%、5% ～ 70%。

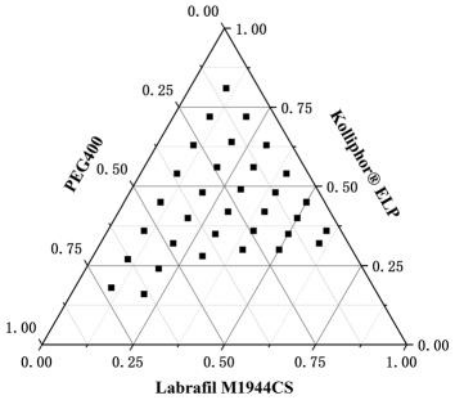


图 2　空白自纳米乳伪三元相图

Fig 2　Pseudo-ternary phase diagram of blank SNEDDS

2.7　高良姜素自纳米乳处方优化

2.7.1　星点设计 - 效应面法　以油相的百分含量（X_1：10% ～ 60%）、K_m（X_2：0.25 ～ 4）为考察因素，以粒径（Y_1）、多分散系数 PDI（Y_2）作为评价指标。采用两因素五水平（±α、0、±1）的星点设计法确定油相和 K_m 的具体用量。因素水平见表 2。按照 Design Expert 8.0.6.1 软件设计的试验方案对辅料进行准确称重制备自纳米乳，取适量加入到 100 倍量蒸馏水中，搅拌均匀，得到水分散液，用纳米粒径电位分析仪测定其粒径及 PDI。高良姜素自纳米乳不同试验设计的效应值结果见表 3。

表 2　试验设计的因素水平及响应值

Tab 2　Factor，level and response values of test design

因素	水平				
	−α	−1	0	+1	+α
X_1（油相）	10	17.32	35	52.68	60
X_2（K_m）	0.25	0.80	2.13	3.45	4

2.7.2　响应面分析　根据数据进行模型拟合，Y_1、Y_2 采用二次多项式回归拟合效果较好。拟合方程如下：

粒 径：$Y_1 = 32.92 + 25.55X_1 - 17.66X_2 - 11.58X_1X_2 + 10.21X_1^2 + 15.49X_2^2$（$R^2 = 0.9650$，$P < 0.0001$）

PDI：$Y_2 = 0.054 + 0.046X_1 + 0.015X_2 - 0.079X_1X_2 + 0.11X_1^2 + 0.091X_2^2$（$R^2 = 0.9617$，$P < 0.0001$）

由上述方程可知，Y_1 和 Y_2 的二次多项式回归方程的回归系数均＞ 0.9，表明方程的拟合效果较好，且 $P < 0.05$，说明结果具有统计学意义。

3D 响应面图和等高线图可直观反应出各因素与响应值及各因素间的交互作用 [7]。如图 3、4，在各取值范围内，固定一因素，粒径随油相百分含量的

表 3　星点设计试验因素水平与结果

Tab 3　Factor and level in central composite design

序号	X_1. 油相百分含量 /%	X_2. K_m	Y_1. 粒径 /nm	Y_2. PDI
1	17.32	0.80	27.72	0.076
2	52.68	0.80	108.8	0.375
3	17.32	3.45	26.04	0.273
4	52.68	3.45	60.79	0.256
5	10.00	2.13	24.81	0.267
6	60.00	2.13	87.42	0.326
7	35.00	0.25	99.08	0.235
8	35.00	4.00	34.29	0.264
9	35.00	2.13	31.80	0.067
10	35.00	2.13	33.69	0.056
11	35.00	2.13	32.83	0.043
12	35.00	2.13	33.06	0.049
13	35.00	2.13	33.23	0.054

增加而增大，随 K_m 的增大而减小；PDI 随油相的增大及 K_m 的增大呈先减小后增大的趋势。试验按照粒径和 PDI 最小进行处方优化，得到高良姜素自纳米乳的最佳处方为油相百分含量为 26.68%，K_m 为 2.10。即 Labrafil M1944CS ∶ Kolliphor ELP ∶ PEG 400 ＝ 26.68% ∶ 49.67% ∶ 23.65%。

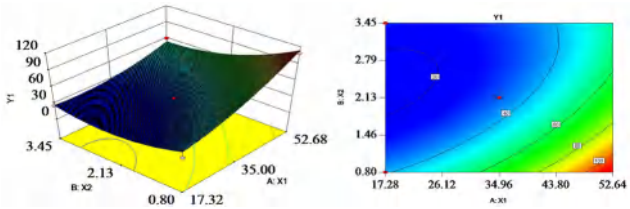


图 3　油相浓度和 K_m 的交互作用对粒径影响的 3D 响应曲面和等高线图

Fig 3　3D response surface and contour map of the interaction between oil phase concentration and K_m on particle size

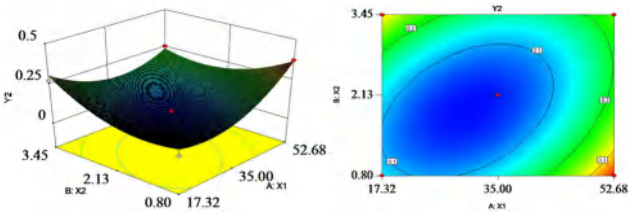


图 4　油相浓度和 K_m 的交互作用对 PDI 影响的 3D 响应曲面和等高线图

Fig 4　3D response surface and contour map of the interaction between oil phase concentration and K_m on PDI

2.7.3　最优条件的验证　根据优化的处方平行制备 3 批自纳米乳，分别测定其粒径及 PDI，计算两者的偏差，验证模型预测的可靠性。模型预测粒径和 PDI 分别为 23.44 nm、0.056，实测值分别为（23.92±0.07）nm 和（0.054±0.01），计算偏差分别为 2.04% 和 3.57%，表明所建立模型的预测性良好，准确度较高。

2.8　高良姜素过饱和自纳米乳处方优化

2.8.1　促过饱和物质种类的筛选　按照处方制备空白自纳米乳，再分别加入过量的高良姜素原料药和等量的促过饱和物质（PVP K30、PVP K90、CMC-Na、HPMC K4M、HPMC E6、Soluplus、PEG 4000、PEG 6000），超声助溶并于 37 ℃恒温搅拌混匀，置于 37 ℃水浴中静置 24 h 得到高良姜素过饱和自纳米乳。取适量过饱和自纳米乳分散于 100 倍量蒸馏水中，测定粒径、PDI 和 Zeta 电位。另取适量过饱和自纳米乳分散至 100 倍量蒸馏水中，静置，每隔一定时间以 3000 r • min^{-1} 离心 20 min，取下层液体置于偏振光显微镜下观察其析晶情况。结果显示，PVP K30 和 Soluplus 与高良姜素自纳米乳处方相容性较好，且粒径小于 100 nm，24 h 内抑晶效果较好，其他促过饱和物质与自纳米乳处方相容性较差，且抑晶效果相对较差。因此，初步选择 PVP K30 和 Soluplus 作为该处方的促过饱和物质。

2.8.2　促过饱和物质用量的筛选

① 促过饱和物质的种类及用量范围：根据处方制备高良姜素自纳米乳，分别加入不同量的 PVP K30 和 Soluplus，涡旋混匀，超声助溶，于 37 ℃全温振荡器中静置 24 h，制得高良姜素过饱和自纳米乳，按照“2.8.1”项下操作观察其析晶情况，并对其粒径及 PDI 进行测定。结果显示，PVP K30 的用量与处方的相容性成负相关，与抑晶效果成正相关。而 Soluplus 的用量在 0.1% ～ 1.0% 内，与处方的相容性和抑晶效果均较好，成正相关且粒径和 PDI 较小。因此选择 Soluplus 作为该处方的促过饱和物质。

② 体外溶出度试验：采用磁力搅拌法 [8] 对 Soluplus 的用量进行筛选。分别称取适量含有等量高良姜素的自纳米乳和过饱和自纳米乳，分散至 50 mL 蒸馏水中，于 0.5、1、2、4、8、16 h 取样 2 mL，同时补加等量蒸馏水，平行 3 份，滤过，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，计算高良姜素的累积溶出度，绘制体外溶出曲线和高良姜素的质量浓度 - 时间曲线下面积（*AUC*），见图 5。由结果可知，*AUC* 大小为：1.0% Soluplus ＞ 0.3% Soluplus ≈ 0.5% Soluplus ＞ 0.1% Soluplus ＞ 高良姜素自纳米乳。不同用量的 Soluplus 均有一定程度的抑晶效果，高良姜素过饱和自纳米乳的 *AUC* 较高良姜素自纳米乳均有显著增加。而①中结果显示，1.0% Soluplus 处方的 PDI 较大且乳化时间较长，综合考虑确定处方中促过饱和物质 Soluplus 的用量为 0.3%，即 3.0 mg • g^{-1}。

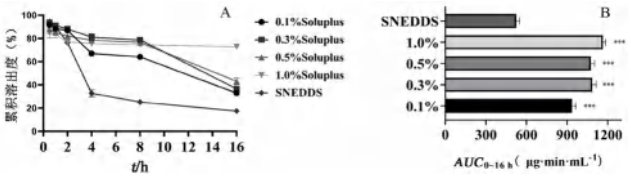


图 5　不同用量促过饱和物质处方中高良姜素体外溶出曲线（A）和 *AUC*（B）（$n = 3$）

Fig 5　In vitro dissolution curve（A）and *AUC* value（B）of galangin in prescription of supersaturated substances with different dosages（$n = 3$）

注：与高良姜素自纳米乳比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Comparison with the galangin-SNEDDS，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

2.8.3　高良姜素过饱和自纳米乳投药量考察　按各相平衡溶解度之和 110%、130% 和 150% 的投药量，制备高良姜素过饱和自纳米乳。取适量分散于 37 ℃的不同 pH 介质中，100 r • min^{-1} 搅拌，于不同时间点取样 1 mL，滤过，甲醇稀释适宜倍数后进样分析，GraphPad Prism 8.0 软件绘制浓度 - 时间曲线，结果如图 6。由结果可知，在两种分散介质中，高良姜素过饱和自纳米乳的释放量均显著高于高良姜素自纳米乳，且当投药量超过一定范围后，会导致制剂不稳定。130% 投药量的高良姜素过饱和自纳米乳在各 pH 介质的释放量相对较高且恒定。因此，确定高良姜素投药量为 130%，即 28.0 mg • g^{-1}。

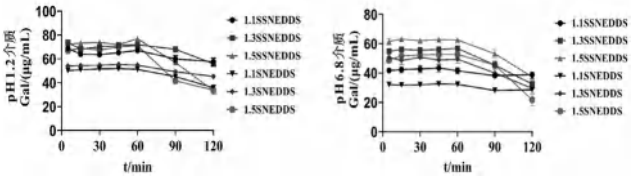


图 6　不同 pH 介质中不同载药量高良姜素浓度 - 时间曲线

Fig 6　Concentration-time curve of galangin with different drug loading in different pH media

2.9　高良姜素过饱和自纳米乳体外评价

2.9.1　外观性状　高良姜素原料药为黄色粉末，制得空白过饱和自纳米乳为无色透明略黏稠液体。加入高良姜素制备高良姜素过饱和自纳米乳，为金黄色黏稠液体，如图 7A。加水分散后得到略泛蓝光、澄清透明的微乳液。

平行取两份高良姜素过饱和自纳米乳 0.4 g，分散至 40 mL 蒸馏水中。分别加入苏丹红和亚甲蓝染料，观察两种染料的扩散速度。若红色扩散快，说明微乳为 *W/O* 型，反之则为 *O/W* 型。结果如图 7B 所示，亚甲蓝染料在乳液中快速扩散。因此，制备得到的高良姜素过饱和自纳米乳经自乳化后得到 *O/W* 型乳剂。

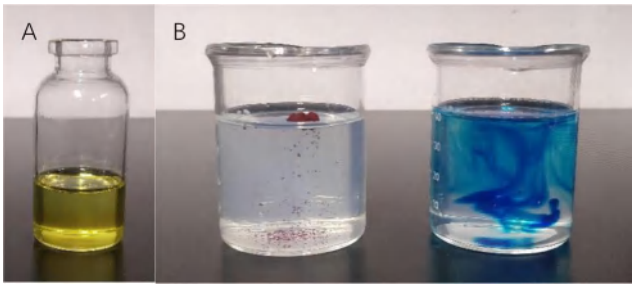


图 7　高良姜素过饱和自纳米乳（A）和其分散液（B）外观性状及类型鉴别

Fig 7　Appearance and type of galangin-SSNEDDS（A）and its dispersion（B）

2.9.2　粒径分布及自乳化速率　取适量高良姜素自纳米乳和过饱和自纳米乳分散至 100 倍蒸馏水中，计时并测定分散液的粒径、PDI 及 Zeta 电位，平行 3 次，结果见表 4。由结果可知，高良姜素过饱和自纳米乳与自纳米乳的乳化效率、粒径和电位的差异相对较小，两种剂型的粒径均较小且分布较为集中。

表 4　高良姜素递药系统粒径分布及自乳化效率结果（$n = 3$）

Tab 4　Particle size distribution and self-emulsifying efficiency of galangin drug delivery system（$n = 3$）

制剂	分散时间 /s	粒径 /nm	PDI	Zeta 电位 /mV
高良姜素过饱和自纳米乳	67±4	29.96±0.71	0.230±0.007	－6.00±0.63
高良姜素自纳米乳	41±3	25.98±0.27	0.077±0.023	－5.88±0.61

2.9.3　形态学考察　取高良姜素过饱和自纳米乳和高良姜素自纳米乳，分散至 50 倍蒸馏水中，取一滴垂直滴加至铜网正面，室温下自然阴干，于 37 ℃烘箱中过夜，形成薄膜后，置于透射电镜下观察乳液形态并拍照。结果如图 8 所示，观察到高良姜素自纳米乳乳滴形状呈圆球形，粒径在 20 ～ 30 nm，大小分布均匀；加入高分子材料后形成高良姜素过饱和自纳米乳经分散后粒径仍小于 200 nm，呈圆球形或椭球形，符合纳米制剂要求。

2.9.4　体外过饱和度评价　取空白自纳米乳，加入 100 倍量 37 ℃的不同 pH 介质中，100 r • min^{-1} 搅拌至分散均匀，得到空白胶束溶液，加入过量高良姜素充分溶解，在“2.1.1”项色谱条件下测定高良姜素在空白胶束中的含量，计算溶解度（$C_{空白}$）。另取载药量为 2.8% 的高良姜素过饱和自纳米乳和高良姜素自纳米乳适量，分散于 100 倍量不同 pH 介质中，测定其体外稀释过程浓度（$C_{分散}$）的变化，计算过饱和度（$S = C_{分散}/C_{空白}$），绘制折线图。

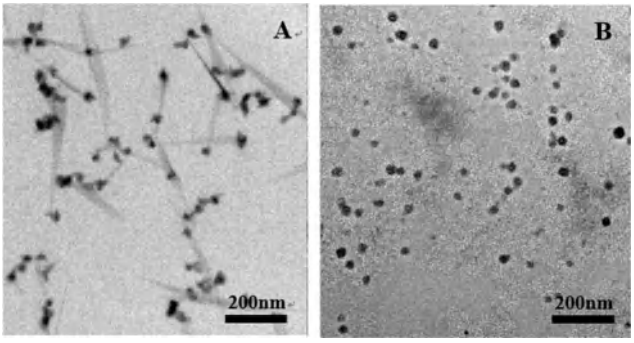


图 8　高良姜素过饱和自纳米乳（A）和高良姜素自纳米乳（B）的形态学观察

Fig 8　Morphology of galangin-SSNEDDS（A）and galangin-SNEDDS（B）

如图 9 所示，高良姜素过饱和自纳米乳在各 pH 介质中均保持较高的过饱和度，其中在 pH 1.2 的酸性介质中药物浓度较高，说明该药物递送系统更易于在胃液中分散，有利于在胃中吸收。

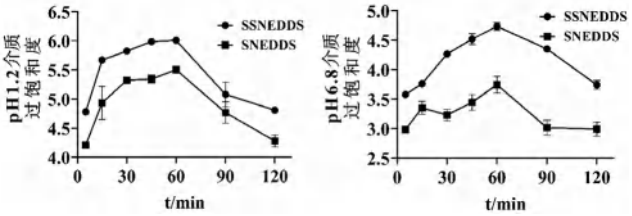


图 9　高良姜素过饱和自纳米乳体外过饱度

Fig 9　Supersaturation in vitro evaluation of galangin-SSNEDDS

2.9.5　体外释放度研究　采用《中国药典》2020 年版四部通则中的溶出度与释放度测定法，分别取 pH 1.2 的酸性氯化钠溶液和 pH 6.8 的缓冲溶液各 500 mL 作为释放介质，温度为（37.0±0.5）℃，转速为（100±1）r • min^{-1}。精密称取 18.0 mg 高良姜素原料药、0.65 g 高良姜素自纳米乳和高良姜素过饱和自纳米乳（约含高良姜素 18.0 mg）分别加到 0 号胶囊，置于溶出杯中，同时开启溶出仪，在 5 min、15 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h 和 2 h 各取样 3 mL，同时补加等量溶出介质，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，绘制药物体外释放曲线。结果如图 10 所示，30 min 内，高良姜素递药系统在 pH 1.2 酸性溶液中的释放达到 80%，在 pH 6.8 缓冲溶液中的释放达到 50%，显著提高了高良姜素的释放速度和释放量。高良姜素过饱和自纳米乳和高良姜素自纳米乳在两种介质中未见显著差异，但根据前期溶出度试验可发现，高良姜素自纳米乳在 2 ～ 4 h 溶出快速下降，而高良姜素过饱和自纳米乳在 8 h 内均保持相对稳定的释放。因此体外释放度结果与溶出度试验结果相符合，也与赖章

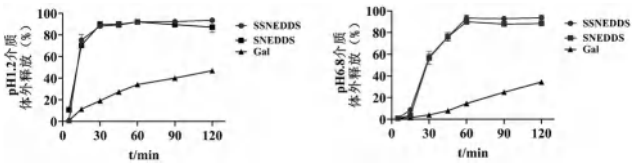


图 10　高良姜素体外释放曲线

Fig 10　In vitro release curve of galangin

婷 [9] 的研究结果相符合。

2.9.6　高良姜素过饱和自纳米乳初步稳定性研究

① 室温稳定性：按照最优处方制备高良姜素过饱和自纳米乳，将其保存在具塞西林瓶中，在室温下放置，分别于 0、30、60、90 d 取样观察，取适量高良姜素过饱和自纳米乳分散于 100 倍量蒸馏水中，采用纳米粒径电位分析仪测定其粒径及 PDI；另取高良姜素过饱和自纳米乳加甲醇稀释至一定浓度，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，测定其含量。结果显示，高良姜素过饱和自纳米乳室温下储存 90 d，其粒径在 30.0 nm 左右，PDI 小于 0.300，含量高于 96.0%，各项指标变化均较小，表明高良姜素过饱和自纳米乳在室温下能够稳定存在。

② 不同 pH 条件下的稳定性：取适量高良姜素过饱和自纳米乳分散至 100 倍量模拟胃肠液中，置于 37 ℃烘箱中，于设定时间点取样，稀释至适宜浓度后滤过，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，计算高良姜素含量。结果显示，高良姜素过饱和自纳米乳在 pH 1.2、pH 4.5、pH 6.8 和 pH 7.4 的分散介质中，含量变化无显著差异，24 h 的药物含量均在 90% 以上，表明高良姜素过饱和自纳米乳在模拟胃肠液中稳定性良好。

2.10　统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件中独立样本 *t* 检验进行统计学分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　讨论

高良姜素近年来的研究多集中在药理作用及作用机制方面 [10-14]，研究结果表明高良姜素的药理作用广泛，在多种疾病的治疗上都具有较好的作用，但其未在临床上广泛使用，可能与高良姜素的水溶性极低，进入体内的吸收利用较差有关。关于改善其水溶性的研究相对较少，严重限制了高良姜素的应用。自纳米乳被认为是脂质制剂中改善低水溶性及口服生物利用度效果最好的剂型之一，也是口服药物递送系统中研究最多的系统之一 [15]，但其为高浓缩状态的药物液体制剂，进入体内经乳化后形成过饱和状态，容易析出药物晶体分子，降低药物在体内的吸收分

布[16]。因此，在自纳米乳基础上加入合适的促过饱和物质进一步制备成过饱和自纳米乳可有效解决这一问题，其作用机制主要有氢键及网状结构、分子量、黏度和疏水作用等[17]。将高良姜素制备成过饱和自纳米乳既可改善高良姜素的水难溶性，又能延缓药物体内过饱和析出，可显著提高药物的生物利用度。

过饱和自纳米乳的处方筛选中，油相与表面活性剂及助表面活性剂的配伍极其重要，本研究为得到较好的乳化效果，将油相分别与对药物溶解度较大的 4 种表面活性剂和助表面活性剂进行配伍筛选，以得到三者相容性和乳化效果好的处方。在自纳米乳中载药量过高会导致制剂的稳定性差，一般通过减少载药量或增加表面活性剂的用量提高制剂稳定性，但表面活性剂的用量过大会对机体产生不良反应。过饱和自纳米乳能够在保持较高载药量的基础上，减少表面活性剂的用量，得到既安全又稳定的制剂。

在过饱和自纳米乳体系中，促过饱和物质的选择要优先考虑与处方的相容性，在研究中发现 PVP K90 的抑晶效果较好，但与处方相容性较差。而筛选出的 Soluplus 在一定范围内与处方相容性好，且在较低含量时仍具有较好的抑晶效果。作为一种新型的药用高分子材料，Soluplus 在难溶性给药系统如口服纳米胶束、包合物、过饱和自纳米乳系统等方面已展现良好的应用前景[18]。

本研究对高良姜素过饱和自纳米乳外观性状的表征、理化性质、过饱和度、体外释放及稳定性进行了研究，结果表明高良姜素过饱和自纳米乳的粒径较小且分布均匀，能维持较高的过饱和度，显著提高了高良姜素原料药的体外释放量，且在 pH 1.2 的酸性介质中释放更高，可为临床应用提供参考。稳定性结果显示高良姜素过饱和自纳米乳在室温条件及不同 pH 分散介质中可稳定存在。综上所述，本研究筛选优化得到的高良姜素过饱和自纳米乳可有效改善高良姜素的水溶性，且稳定性良好，可为高良姜素过饱和自纳米乳及其他难溶性物质的开发利用提供参考依据。

参考文献

[1] 喻明洁，欧阳净，冯伟，等 . 高良姜抗菌作用现代研究进展 [J]. 现代中药研究与实践，2019，33（6）：82-86.

[2] 张旭光，尹航，陈峰，等 . 高良姜素药理活性的研究进展 [J]. 中国现代中药，2016，18（11）：1532-1536.

[3] 陈莹子，朱蓉，孙旭怡，等 . 高良姜素 -PLGA 纳米粒的处方优化及其表征 [J]. 海南医学院学报，2021，27（11）：809-813.

[4] 陈曦文，卢昊，张欣，等 . 单纯形网格法优化设计高良姜素自微乳处方 [J]. 中药材，2020，43（11）：2753-2758.

[5] 严敏嘉 . 穿心莲内酯过饱和自微乳液固压缩片的研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2018.

[6] Jo K，Kim H，Khadka P，et al. Enhanced intestinal lymphatic absorption of saquinavir through supersaturated self-microemulsifying drug delivery systems [J]. Asian J Pharm Sci，2020，15（3）：336-346.

[7] 邹国盛，麦韵炫，张小灵，等 . Box-Behnken 响应面法优化吲哚美辛口服自微乳剂的处方 [J]. 华西药学杂志，2016，31（2）：128-131.

[8] Mu H，Holm R，Mullertz A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs [J]. Int J Pharm，2013，453（1）：215-224.

[9] 赖章婷 . 水飞蓟宾可过饱和自纳米乳体系的构建及体内外性能稳定机制探讨 [D]. 南昌：江西中医药大学，2020.

[10] Zhong X，Huang S，Liu D，et al. Galangin promotes cell apoptosis through suppression of H19 expression in hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Med，2020，9（15）：5546-5557.

[11] 李程，张惠文，容鹏飞 . 高良姜素对肝癌细胞抑制作用的机制 [J]. 临床肝胆病杂志，2020，36（8）：1862-1865.

[12] Sangaraju R，Alavala S，Nalban N，et al. Galangin ameliorates Imiquimod-Induced psoriasis-like skin inflammation in BALB/c mice via down regulating NF-kappaB and activation of Nrf2 signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol，2021，96：107754.

[13] Salama SA，Elshafey MM. Galangin mitigates iron overload-triggered liver injury：up-regulation of PPARgamma and Nrf2 signaling，and abrogation of the inflammatory responses [J]. Life Sci，2021，283：119856.

[14] Huang X，Pei W，Ni B，et al. Chondroprotective and antiarthritic effects of galangin in osteoarthritis：an in vitro and in vivo study [J]. Eur J Pharmacol，2021，906：174232.

[15] Buya AB，Beloqui A，Memvanga PB，et al. Self-nano-emulsifying drug-delivery systems：from the development to the current applications and challenges in oral drug delivery [J]. Pharmaceutics，2020，12（12）：1194.

[16] Gursoy RN，Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems（SEDDS）for improved oral delivery of lipophilic drugs [J]. Biomed Pharmacother，2004，58（3）：173-182.

[17] Park H，Ha ES，Kim MS. Current status of supersaturable self-emulsifying drug delivery systems [J]. Pharmaceutics，2020，12（4）：365.

[18] 吴慧敏，陈雨琪，陈芳，等 . Soluplus 在药物制剂中的应用 [J]. 中国医药工业杂志，2016，47（4）：478-483.

（收稿日期：2022-04-05；修回日期：2022-06-08）

金银花化学成分及抗菌消炎活性研究

肖蕾[1]，包正雪[2]，郁阳[3]，黄金莲[1]，吴静[3]，蔡百祥[3*]（1. 无限极（中国）有限公司，广州　510623；2. 云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室，昆明　650032；3. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室，昆明　650201）

摘要：目的　研究金银花的化学成分及其抗菌消炎活性。**方法**　采用多种色谱方法对金银花的化学成分进行分离纯化，利用光谱法对化合物进行结构鉴定；采用抑制一氧化氮（NO）生成实验、抑制环氧化酶活性实验评价化合物的抗炎活性；采用微量稀释法对化合物进行常规菌、厌氧菌抑制活性评价。**结果**　从金银花药材中分离并鉴定了 22 个主要化学成分，分别为断氧马钱子苷（**1**）、secologanol（**2**）、金吉苷（**3**）、8- 表金吉苷（**4**）、獐牙菜苷（**5**）、7- 酮马钱素（**6**）、断氧马钱子苷半缩醛内酯（**7**）、表断氧马钱子苷半缩醛内酯（**8**）、threoninosecologanin（**9**）、5*S*- 羧基异胡豆苷（**10**）、坎卡酯苷（**11**）、1，2-*O*- 二咖啡酰基 -3- 羟基 - 环戊醇（**12**）、4，5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸（**13**）、咖啡酸（**14**）、绿原酸（**15**）、紫丁香苷（**16**）、芦丁（**17**）、supinaionodie B（**18**）、cordysinin B（**19**）、鸟嘌呤核苷（**20**）、腺嘌呤核苷（**21**）、烟酰胺（**22**）。活性筛选结果表明分离得到的化合物并没有明显的 NO 生成抑制活性，也不能抑制环氧化酶 1 和 2 的活性；化合物 **2**、**5**、**11**、**19** 对厌氧菌变异链球菌显示出抑制作用，化合物 **4**、**6**、**8**、**15** 对金黄色葡萄球菌显示出一定的抑制作用。**结论**　本研究从金银花药材中分离鉴定了 22 个单体化合物，其中化合物 **11**、**12**、**18**、**22** 为首次从该种植物中分离得到，化合物 **2**、**4**、**5**、**6**、**8**、**11**、**15**、**19** 具有抗菌消炎活性。

关键词：金银花；化学成分；结构鉴定；抗菌作用
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1773-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.010

Chemical constituents from Lonicerae japonicae flos and their antibacterial and anti-inflammation activity in vitro

XIAO Lei[1], BAO Zheng-xue[2], YU Yang[3], HUANG Jin-lian[1], WU Jing[3], CAI Bai-xiang[3*] (1. *Infinitus (China) Company Ltd, Guangzhou* 510623; 2. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming* 650032; 3. *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650201)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of Lonicerae japonicae flos and their antibacterial and anti-inflammation activity. **Methods** The chemical components of Lonicerae japonicae flos were separated and purified by chromatography, and the structures of those compounds were further identified by spectroscopy. The anti-inflammation activity was evaluated by suppression against expression of nitric oxide (NO) and cyclooxygenase. At the same time, microdilution method was used for in vitro evaluation of antibacterial activities of conventional bacteria and anaerobic bacteria. **Results** Totally 22 compounds were identified as secoxyloganin (**1**), secologanol (**2**), kingiside (**3**), 8-epikingiside (**4**), sweroside (**5**), ketologanin (**6**), vogeloside (**7**), epi-vogeloside (**8**), threoninosecologanin (**9**), 5*S*-carboxystrictosidine (**10**), (2*E*, 6*S*)-8-[*α*-*L*-arabinopyranosyl- (1"→6')-*β*-*D*-glucopyranosyl]-2, 6-dimethyloct-2-eno-1, 2"-lactone (**11**), 1, 2-*O*-didicaffeoyl-cychopenta-3-ol (**12**), 4, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid (**13**), caffeic acid (**14**), chlorogenic acid (**15**), syringin (**16**), rutin (**17**), supinaionodie B (**18**), cordysinin B (**19**), guanosine (**20**), adenosine (**21**), and nicotiamide (**22**).

作者简介：肖蕾，女，博士，主要从事日化用品开发研究，email：Lei.Xiao@infinitus-int.com　*通信作者：蔡百祥，男，博士后，主要从事植物化学成分研究，email：caibaixiang@mail.kib.ac.cn

The isolated compounds had no evident inhibition on NO production and cyclooxygenase 1 and 2. Compounds **2**, **5**, **11**, and **19** obviously inhibited anaerobic bacteria *Streptococcus mutans*, and compounds **4**, **6**, **8**, and **15** showed certain inhibition on *Staphylococcus aureus*. **Conclusion** Twenty-two compounds have been identified from Lonicerae japonicae flos, and compounds **11**, **12**, **18** and **22** have been obtained for the first time. Compounds **2**, **4**, **5**, **6**, **8**, **11**, **15, and 19** from Lonicerae japonicae flos have certain bacteriostatic effect.

Key words: Lonicerae japonicae flos; chemical constituent; structural identification; antibacterial

金银花来源于忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花，是一味常用的治疗多种疾病的中药。《中国药典》2020 年版一部中描述其具有清热解毒、疏散风热的功效[1]。目前，关于金银花的化学成分报道主要集中在环烯醚萜苷类、三萜皂苷类和有机酚酸类等，现代药理学研究表明金银花中的化学成分具有多种生物活性，包括抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化，增强机体免疫功能等[2-4]。为了进一步阐明中药金银花抗菌消炎的药效物质基础，本文对金银花 70% 乙醇提取物进行化学成分研究，共分离并鉴定了 22 个化合物，分别为断氧马钱子苷（**1**）、secologanol（**2**）、金吉苷（**3**）、8- 表金吉苷（**4**）、獐牙菜苷（**5**）、7- 酮马钱素（**6**）、断氧马钱子苷半缩醛内酯（**7**）、表断氧马钱子苷半缩醛内酯（**8**）、threoninosecologanin（**9**）、5*S*- 羧基异胡豆苷（**10**）、坎卡酯苷（**11**）、1，2-*O*- 二咖啡酰基 -3- 羟基 - 环戊醇（**12**）、4，5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸（**13**）、咖啡酸（**14**）、绿原酸（**15**）、紫丁香苷（**16**）、芦丁（**17**）、supinaionodie B（**18**）、cordysinin B（**19**）、鸟嘌呤核苷（**20**）、腺嘌呤核苷（**21**）、烟酰胺（**22**），其中化合物 **11**、**12**、**18**、**22** 为首次从金银花药材中分离得到。通过抗菌消炎活性实验发现，化合物 **2**、**5**、**11**、**19** 对厌氧菌变异链球菌显示出一定的抑制作用，化合物 **4**、**6**、**8**、**15** 对金黄色葡萄球菌显示出一定的抑制作用。

1　材料

Bruker AV-400 型、DRX-500 型和 AVANCE Ⅲ-600 型核磁共振谱仪（Bruker 公司）；Shimadzu UPLC-IT-TOF 质谱仪（Shimadzu 公司）；Buchi 中压制备色谱（RP-C_{18}，15 mm×230 mm 或 26 mm×460 mm）；Waters1525 型高效液相制备色谱仪（Waters 公司）。柱层析硅胶 200 ～ 300 目（青岛海洋化工厂）；薄层硅胶板（GF254，青岛海洋化学试剂厂）；ODS（40 ～ 60 μm，美国 Sepax 公司）；Waters xbridge C_{18} 色谱柱（19 mm×250 mm，Waters 公司）；硫酸 - 乙醇溶液显色（实验室自制）；其他试剂均为分析纯（国药集团上海化学试剂公司）。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7（中科院上海细胞库），DMEM 培养基、胎牛血清（BI 公司）；Griess 试剂、脂多糖（LPS）、甲基盐酸精氨酸（L-NMMA）（Sigma 公司）；环氧化酶（COX）试剂盒（Cayman，美国）；大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌金黄亚种 ATCC29213、肠沙门氏菌肠亚种 ATCC14028、铜绿假单胞菌 ATCC27853（中国普通微生物菌种保藏管理中心）；白假丝酵母菌 ATCC10231（美国 Microbiologics 公司）；牙龈卟啉单胞菌（Pg）、具核梭杆菌具核亚种（Fn）、变异链球菌（Sm）（广州速研生物有限公司）；Spark 10M 多功能酶标仪（瑞士 TECAN 公司）。

阿司匹林、帕瑞昔布、氨苄西林（上海源叶生物科技有限公司），青霉素 G 钠（Biosharp 公司），金银花药材 [无限极（中国）有限公司，经中国科学院昆明植物研究所蔡祥海研究员鉴定为忍冬科忍冬属金银花 Lonicerae japonicae flos 的干燥花蕾]。鉴定标本存于中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部资源持续利用国家重点实验室。

2　提取与分离方法

金银花药材 2 kg 粉碎，以 10 倍量体积的 70% 乙醇加热回流提取 3 次，每次 2 h，合并提取液，浓缩回收乙醇至无醇味，用适量的蒸馏水混悬，再用乙酸乙酯萃取 3 次，合并乙酸乙酯萃取部分（约 100 g）和水层（约 2 kg）。水层采用大孔吸附树脂以不同浓度的乙醇 - 水溶液进行洗脱（0% ～ 95% 乙醇），洗脱得到纯水，20%、40%、60%、80%、95% 乙醇水洗脱部位。利用 HPLC 来检测不同浓度乙醇的洗脱部位，20% 乙醇洗脱部位在乙腈水系统条件下的色谱峰较多，因此对 20% 乙醇洗脱部位进行化学分离，20% 乙醇洗脱部位采用硅胶色谱柱分离，以三氯甲烷 - 甲醇（50∶1 ～ 0∶1，*V*/*V*）为流动相梯度洗脱，得到 6 个流分部位 Fr.1 ～ Fr.6。Fr.1（约 2 g）经 ODS 中压制备色谱（10% ～ 45% 甲醇 - 水溶液）洗脱分离并经过制备液相纯化（10% ～ 15% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL • min^{-1}）得到化合物 **1**（2.4

mg）、**2**（5.8 mg）、**20**（10 mg）、**21**（8 mg）。Fr.2（约 3 g）经反复中压制备色谱（10% ～ 40% 甲醇 - 水溶液）洗脱分离并经过制备液相纯化（10% ～ 20% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL • min^{-1}）得到化合物 **1**（16 mg）、**3**（22 mg）、**4**（9 mg）、**5**（12 mg）、**6**（10 mg）、**7**（33 mg）。Fr.3（约 5 g）经中压制备色谱（5% ～ 40% 甲醇 - 水溶液）洗脱分离得到亚组分 Fr.3-1 至 Fr.3-6，Fr.3-2 再经过制备液相纯化（10% ～ 20% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL • min^{-1}）得到化合物 **8**（16 mg），**9**（23 mg），**10**（12 mg），**22**（5 mg）。Fr.4（约 5 g）经过中压制备色谱（5% ～ 40% 甲醇 - 水溶液）洗脱并经制备液相纯化（8% ～ 19% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL • min^{-1}）得到化合物 **11**（20 mg），**12**（13 mg），**15**（22 mg），**16**（10 mg）。Fr.5（约 8 g）经过中压制备色谱（5% ～ 45% 甲醇 - 水溶液）洗脱得到亚组分 Fr.5-1 至 Fr.5-6，洗脱组分 Fr.5-2 经制备液相纯化（9% ～ 22% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL • min^{-1}）得到化合物 **13**（33 mg），**14**（20 mg）。Fr.6（约 4 g）经中压制备色谱（10% ～ 55% 甲醇 - 水溶液）以及凝胶柱色谱（甲醇洗脱）再经制备液相纯化（10% ～ 25% 乙腈 -0.01% 甲酸水，流速 10 mL•min^{-1}）得到化合物 **17**（5 mg），**18**（12 mg），**19**（8 mg）。

3 结构解析

化合物 **1**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$；ESI $^+$-MS *m/z*：427 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.44（1H，brs，H-3），5.63（1H，m，H-8），5.47（1H，d，J ＝ 3.7 Hz，H-1），5.25（1H，d，J ＝ 17.0 Hz，H-10a），5.21（1H，d，J ＝ 10.3 Hz，H-10b），4.64（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.87（1H，dd，J ＝ 11.7，1.4 Hz，H-6'b），3.66（3H，s，11-OCH_3），3.65（1H，d，J ＝ 12.2，5.6 Hz，H-10b），3.33（1H，overlapped，H-3'），3.32（1H，overlapped，H-5'），3.29（1H，overlapped，H-5），3.26（1H，t，J ＝ 8.4 Hz，H-4'），3.19（1H，dd，J ＝ 16.5，4.5 Hz，H-2'），2.91（1H，dd，J ＝ 16.5，4.6 Hz，H-6a），2.81（1H，m，H-9），2.91（1H，dd，J ＝ 16.5，9.1 Hz，H-6b）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：177.3（C-7），168.9（C-11），153.3（C-3），134.6（C-8），120.4（C-10），110.4（C-4），99.8（C-1'），97.7（C-1），78.4（C-5'），77.9（C-3'），74.6（C-2'），71.5（C-4'），62.7（C-6'），51.7（11-OCH_3），45.3（C-9），35.8（C-6），28.7（C-5）。化合物 **1** 的氢谱和碳谱数据与文献 [5] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为断氧马钱子苷。

化合物 **2**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{26}O_{10}$；ESI$^+$-MS *m/z*：413 [M＋Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.44（1H，s，H-3），5.63（1H，m，H-8），5.47（1H，d，J ＝ 3.6 Hz，H-1），5.25（1H，d，J ＝ 10.0 Hz，H-10a），5.30（1H，d，J ＝ 17.5 Hz，H-10b），4.69（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.89（1H，d，J ＝ 11.6 Hz，H-6'b），3.70（3H，s，11-OCH_3），3.61（1H，overlapped，H-6'a），3.55（2H，s，H-7），3.38（1H，overlapped，H-3'），3.31（1H，m，H-5'），3.20（1H，t，J ＝ 8.2 Hz，H-4'），2.91（1H，dd，J ＝ 4.5，16.2 Hz，H-2'），2.81（1H，m，H-5），2.21（2H，dd，J ＝ 9.3，16.2 Hz，H-6）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：169.4（C-11），153.5（C-3），135.8（C-8），119.3（C-10），111.6（C-4），100.0（C-1'），97.7（C-1），78.4（C-5'），77.9（C-3'），74.6（C-2'），71.5（C-4'），62.7（C-6'），61.1（C-7），51.7（11-OCH_3），45.3（C-9），33.6（C-6），30.7（C-5）。化合物 **2** 的氢谱和碳谱数据与文献 [6] 报道基本一致，故鉴定该化合物为 secologanol。

化合物 **3**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$；ESI $^+$-MS *m/z*：427 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：7.45（1H，s，H-3），5.66（1H，d，J ＝ 6.0 Hz，H-1），4.76（1H，dd，J ＝ 4.3，6.8 Hz，H-8），4.68（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.88（1H，dd，J ＝ 1.5，11.8 Hz，H-6'a），3.71（3H，s，11-OCH_3），3.64（1H，dd，J ＝ 5.6，12.0 Hz，H-6'b），3.35（1H，t，J ＝ 8.6 Hz，H-3'），3.26（1H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-5'），3.23（1H，overlapped，H-5），3.18（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-4'），3.00（1H，dd，J ＝ 9.0，8.0 Hz，H-2'），2.84（1H，dd，J ＝ 7.5，17.0 Hz，H-6a），2.62（1H，dd，J ＝ 17.0，6.0 Hz，H-6b），2.42（1H，dd，J ＝ 6.0，4.5 Hz，H-9），1.51（3H，d，J ＝ 6.8 Hz，H-10）；^{13}C-NMR（CD_3OD，125 MHz）δ：174.3（C-7），168.1（C-11），154.3（C-3），111.3（C-4），100.0（C-1'），94.2（C-1），78.4（C-5'），77.9（C-3'），76.6（C-8），74.7（C-2'），71.6（C-4'），62.8（C-6'），51.8（OCH_3），39.8（C-9），34.2（C-6），27.9（C-5），18.3（C-10）。化合物 **3** 的氢谱和碳谱数据与文献 [7] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为金吉苷。

化合物 **4**：黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$；ESI $^+$-MS *m/z*：427 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.58（1H，s，H-3），5.49（1H，d，J ＝ 7.7 Hz，H-1），4.70（1H，d，J ＝ 7.9 Hz，H-1'），4.49（1H，m，H-8），3.91（1H，

d，J ＝ 1.5，11.9 Hz，H-6'b），3.72（3H，s，11-OCH_3），3.62（1H，d，J ＝ 6.7，11.9 Hz，H-6'a），3.40 ～ 3.30（3H，overlapped，H-3' ～ 5'），3.07（1H，m，H-5），2.86（1H，dd，J ＝ 4.5，16.4 Hz，H-6a），2.50（1H，dd，J ＝ 11.4，16.4 Hz，H-6b），2.13（1H，m，H-9），1.50（3H，d，J ＝ 6.3 Hz，H-10）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：174.7（C-7），168.3（C-11），154.4（C-3），109.5（C-4），100.6（C-1'），96.2（C-1），78.5（C-5'），77.8（C-3'），75.7（C-2'），74.6（C-8），71.6（C-4'），62.8（C-6'），52.0（11-OCH_3），41.8（C-9），34.6（C-6），28.2（C-5），21.7（C-10）。化合物 **4** 的氢谱和碳谱数据与文献 [8] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 8- 表金吉苷。

化合物 **5**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{16}H_{22}O_9$；ESI $^+$-MS m/z：408 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.59（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-3），5.56（1H，overlapped，H-8），5.53（1H，overlapped，H-1），5.33（1H，m，H-10a），5.27（1H，m，H-10b），4.68（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），4.45（1H，m，H-7b），4.36（1H，m，H-7a），3.89（1H，dd，J ＝ 1.4，11.8 Hz，H-6'a），3.66（1H，dd，J ＝ 5.5，11.8 Hz，H-6'b），3.39（1H，m，H-5），3.35（1H，overlapped，H-3'），3.31（1H，m，H-5'），3.22（1H，overlapped，H-4'），3.18（1H，overlapped，H-2'），2.70（1H，dd，J ＝ 5.6，8.6 Hz，H-9），1.80（1H，m，H-6b），1.70（1H，m，H-6a）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：168.5（C-11），153.9（C-3），133.3（C-8），120.8（C-10），106.0（C-4），99.6（C-1'），97.9（C-1），78.3（C-3'），77.8（C-5'），74.6（C-2'），71.4（C-4'），69.7（C-7），62.6（C-6'），43.7（C-9），28.4（C-5），25.9（C-6）。化合物 **5** 的氢谱和碳谱数据与文献 [9] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为獐牙菜苷。

化合物 **6**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{10}$；ESI $^+$-MS m/z：411 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：7.48（1H，s，H-3），5.63（1H，d，J ＝ 3.0 Hz，H-1），4.67（1H，d，J ＝ 7.9 Hz，H-1'），3.90（1H，dd，J ＝ 1.7，11.8 Hz，H-6'a），3.69（3H，s，11-OCH_3），3.65（1H，dd，J ＝ 6.0，11.8 Hz，H-6'b），3.27 ～ 3.09（3H，m，H-3' ～ 5'），3.27 ～ 3.09（1H，m，H-5），2.63（1H，dd，J ＝ 8.2，19.1 Hz，H-6b），2.51（1H，dd，J ＝ 1.7，19.1 Hz，H-6a），2.35（1H，m，H-9），2.11（1H，m，H-8），1.06（3H，d，J ＝ 6.8 Hz，10-CH_3）；^{13}C-NMR（CD_3OD，125 MHz）δ：220.7（C-7），168.8（C-11），153.2（C-3），111.0（C-4），100.1（C-1'），95.2（C-1），78.4（C-5'），77.9（C-3'），74.6（C-2'），71.5（C-4'），62.7（C-6'），51.8（11-OCH_3），46.5（C-9），44.6（C-8），43.4（C-6），28.2（C-5），13.6（C-10）。化合物 **6** 的氢谱和碳谱数据与文献 [10] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 7- 酮马钱素。

化合物 **7**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{10}$；ESI $^+$-MS m/z：411 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OH）δ：7.58（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-3），5.55（1H，d，J ＝ 1.2 Hz，H-1），5.47（1H，m，H-8），5.31（1H，s，H-7），5.29（1H，m，H-10a），5.26（1H，m，H-10b），4.66（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.54（1H，s，7-OCH_3），3.16（1H，m，H-5），2.67（1H，m，H-9），1.97（1H，m，H-6a），1.44（1H，m，H-6b）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OH）δ：167.7（C-11），154.1（C-3），133.0（C-8），121.1（C-10），105.4（C-7），105.1（C-4），99.6（C-1'），97.8（C-1），78.3（C-5'），77.8（C-3'），74.6（C-2'），71.5（C-4'），62.6（C-6'），57.1（OMe-7），43.7（C-9），31.6（C-6），25.2（C-5）。化合物 **7** 的氢谱和碳谱数据与文献 [11] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为断氧马钱子苷半缩醛内酯。

化合物 **8**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_{10}$；ESI $^+$-MS m/z：411 [M ＋ Na] $^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OH）δ：7.62（1H，d，J ＝ 2.0 Hz，H-3），5.55（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-1），5.48（1H，m，H-8），5.31（1H，s，H-7），5.29（1H，m，H-10a），5.25（1H，m，H-10b），4.68（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.51（3H，s，OMe-7），3.18（1H，m，H-5），2.63（1H，m，H-9），1.85（1H，dd，J ＝ 6.0，13.2 Hz，H-6a），1.69（1H，td，J ＝ 3.0，13.8 Hz，H-6b）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OH）δ：167.5（C-11），154.5（C-3），133.3（C-8），121.0（C-10），105.3（C-4），103.3（C-7），100.2（C-1'），98.4（C-1），78.3（C-5'），77.8（C-3'），74.6（C-2'），71.4（C-4'），62.6（C-6'），56.9（OMe-7），43.5（C-9），30.2（C-6），22.8（C-5）。化合物 **8** 的氢谱和碳谱数据与文献 [12] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为表断氧马钱子苷半缩醛内酯。

化合物 **9**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{20}H_{27}NO_{11}$；ESI $^+$-MS m/z：480 [M ＋ Na] $^+$，^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：7.39（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-3），5.51（1H，overlapped，H-1），5.52（1H，overlapped，H-8），5.31（1H，dd，J ＝

17.0，1.5 Hz，H-10a），5.25（1H，dd，J = 10.2，1.5 Hz，H-10b），5.09（1H，dd，J = 9.6，3.7 Hz，H-7），4.66（1H，d，J = 7.8 Hz，H-1'），4.13（1H，m，H-3"），4.04（1H，d，J = 7.8 Hz，H-2"），3.88（1H，dd，J = 11.7，1.7 Hz，H-6'a），3.66（1H，dd，J = 11.7，5.6 Hz，H-6'b），3.36（1H，overlapped，H-5'），3.34（1H，overlapped，H-4'），3.27（1H，overlapped，H-2'），3.18（1H，dd，J = 8.9，7.9 Hz，H-3'），3.12（1H，m，H-5），2.70（1H，m，H-6b），2.17（1H，overlapped，H-9），2.15（1H，s，H-4"），1.48（3H，d，J = 5.9 Hz，3"-CH_3），1.31（1H，m，H-6a）；^{13}C-NMR（CD_3OD，125 MHz）δ：173.3（C-1"），164.3（C-11），149.2（C-3），133.6（C-8），120.8（C-10），108.1（C-4），99.7（C-1'），97.4（C-1），88.6（C-7），78.5（C-3"），78.3（C-3'），77.8（C-5'），74.7（C-2'），71.5（C-4'），64.9（C-2"），62.6（C-6'），44.6（C-9），31.8（C-6），25.3（C-5），19.2（C-4"）。化合物 **9** 的氢谱和碳谱数据与文献[13]中的波谱数据基本一致，故鉴定化合物 **9** 为 threoninosecologanin。

化合物 **10**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_{28}H_{34}N_2O_{11}$；ESI$^+$-MS m/z：597 [M + Na]$^+$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.82（1H，s，H-17），7.45（1H，d，J = 7.8 Hz，H-9），7.29（1H，d，J = 8.0 Hz，H-12），7.12（1H，t，J = 7.3 Hz，H-11），7.04（1H，t，J = 7.5 Hz，H-10），5.91（1H，d，J = 9.0 Hz，H-19），5.81（1H，m，H-21），5.37（1H，d，J = 17.3 Hz，H-18b），5.25（1H，d，J = 10.5 Hz，H-18a），4.81（1H，d，J = 7.9 Hz，H-1'），4.66（1H，d，J = 11.7 Hz，H-3），4.01（1H，m，H-6'b），3.93（1H，dd，J = 4.8，11.9 Hz，H-6'a），3.79（3H，s，-OCH_3），3.67（1H，dd，J = 7.1，11.6 Hz，H-5），3.43 ～ 3.22（4H，m，H-2' ～ 5'），3.08（1H，m，H-6），3.05（1H，m，H-15），2.76（2H，m，H-6a，H-20），2.22（1H，m，H-14a），2.43（1H，m，H-14b）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：173.4（C-23），171.8（C-22），157.2（C-17），138.5（C-13），135.2（C-19），130.3（C-2），127.5（C-8），123.4（C-11），120.6（C-10），119.7（C-18），119.1（C-9），112.2（C-12），108.6（C-16），108.3（C-7），100.4（C-1'），97.3（C-21），78.8（C-5'），77.9（C-3'），74.6（C-2'），71.7（C-4'），63.1（C-6'），53.0（C-5），52.8（-OCH_3），49.5（C-3），45.3（C-20），34.6（C-14），32.7（C-15），24.0（C-6）。化合物 **10** 的氢谱和碳谱数据与文献[14]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 5*S*-羧基异胡豆苷。

化合物 **11**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_{22}H_{36}O_{11}$；ESI$^+$-MS m/z：499 [M + Na]$^+$，975 [2M + Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.84（1H，t，J = 7.4 Hz，H-3），5.10（1H，dd，J = 8.0，9.6 Hz，H-2"），4.42（1H，d，J = 7.9 Hz，H-1"），4.28（1H，d，J = 9.2 Hz，H-6'b），4.12（1H，d，J = 7.6 Hz，H-1'），3.91（1H，dd，J = 1.6，12.7 Hz，H-5"b），3.84（1H，brs，H-4"），3.74（1H，dd，J = 3.4，9.8 Hz，H-3"），3.61（2H，overlapped，H-8），3.37（1H，overlapped，H-5'），2.21（1H，m，H-4a），3.34（1H，overlapped，H-6'a），3.30（1H，overlapped，H-3'），3.11（1H，dd，J = 8.0，9.0 Hz，H-2'），3.01（1H，t，J = 9.0 Hz，H-4'），2.35（1H，m，H-4b），2.20（1H，m，H-5"a），1.85（3H，s，H-9），1.54（2H，m，H-5），1.58（1H，m，H-6），1.47（2H，m，H-7），0.99（3H，d，J = 6.4 Hz，H-10）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：169.1（C-1），144.4（C-3），128.6（C-2），103.4（C-1"），103.4（C-1'），78.0（C-3'），76.8（C-5'），75.1（C-2'），73.8（C-2"），72.7（C-3"），72.3（C-4'），70.9（C-6'），70.5（C-4"），70.1（C-8），67.8（C-5"），36.2（C-5），35.9（C-7），30.9（C-6），26.1（C-4），22.7（C-10），12.7（C-9）。化合物 **11** 的氢谱和碳谱数据与文献[15]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为坎卡酯苷。

化合物 **12**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{23}H_{22}O_9$；ESI$^+$-MS m/z：465 [M + Na]$^+$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.60（d，1H，J = 16.0 Hz，H-7'），7.50（d，1H，J = 16.0 Hz，H-7"），7.01（d，1H，J = 2.0 Hz，H-2'），6.98（d，1H，J = 2.0 Hz，H-2'，2"），6.90（dd，2H，J = 2.0，8.0 Hz，H-6'，6"），6.75（d，1H，J = 8.0 Hz，H-5'），6.72（d，1H，J = 8.0 Hz，H-5"），6.27（d，1H，J = 16.0 Hz，H-8'），6.18（d，1H，J = 16.0 Hz，H-8"），5.62（m，1H，H-1），5.10（dd，1H，J = 2.4，9.2 Hz，H-2），4.37（m，1H，H-3），2.30（m，2H，H-4），2.20（m，1H，H-5a），2.12（m，1H，H-5b）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：168.5（C-9'），168.2（C-9"），149.6（C-4'，4"），147.6（C-7"），147.5（C-7'），146.7（C-3"），146.7（C-3'），127.6（C-1"），127.6（C-1'），123.1（C-6"），123.1（C-6'），116.4（C-5'，5"），115.1（C-8'，8"），114.7（C-2"），114.7（C-2'），75.94（C-2），69.5（C-1），69.0（C-3），39.5（C-5），38.4（C-4）。化合物 **12** 的氢谱和碳谱数据

与文献[16]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 1，2-*O*- 二咖啡酰基 -3- 羟基 - 环戊醇。

化合物 **13**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$；ESI$^+$-MS *m/z*：517 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）：7.59（1H，d，*J* ＝ 15.9 Hz，H-7'，H-7"），7.51（1H，d，*J* ＝ 15.9 Hz，H-7'，H-7"），7.02（1H，d，*J* ＝ 1.8 Hz，H-2'，H-2"），7.00（1H，d，*J* ＝ 1.8 Hz，H-2'，H-2"），6.92（1H，dd，*J* ＝ 8.1，1.8 Hz，H-6'，H-6"），6.90（1H，dd，*J* ＝ 8.1，1.8 Hz，H-6'，H-6"），6.75（1H，d，*J* ＝ 8.1 Hz，H-5'，H-5"），6.74（1H，d，*J* ＝ 8.1 Hz，H-5'，H-5"），6.28（1H，d，*J* ＝ 15.9 Hz，H-8'，H-8"），6.19（1H，d，*J* ＝ 15.9 Hz，H-8'，H-8"），5.62（1H，brs，H-5），5.11（1H，brs，H-4），4.37（1H，brs，H-3），2.40（2H，H-6），1.99（2H，m，H-2）；^{13}C-NMR（CD_3OD，125 MHz）：168.7（C-9'，9"），168.6（C-9'，9"），149.6（C-4'，4"），147.6（C-7'，7"），147.4（C-7'，7"），146.7（C-3'，3"），146.7（C-3'，3"），127.8（C-1'，1"），127.6（C-1'，1"），123.3（C-6'，6"），117.5（C-8'，8"），116.4（C-5'，5"），115.1（C-2'，2"），115.0（C-2'，2"），114.7（C-8'，8"），76.5（C-1），75.7（C-2），70.2（C-3），69.2（C-5），40.2（C-6），38.5（C-14）。化合物 **13** 的氢谱和碳谱数据与文献[17]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 4，5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸。

化合物 **14**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_9H_8O_4$；ESI$^+$-MS *m/z*：203 [M ＋ Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.54（1H，d，*J* ＝ 16.0 Hz，H-7），7.04（1H，d，*J* ＝ 1.7 Hz，H-2），6.92（1H，dd，*J* ＝ 1.7，8.2 Hz，H-5），6.78（1H，d，*J* ＝ 8.2 Hz，H-6），6.22（1H，d，*J* ＝ 16.0 Hz，H-8）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：171.0（C-9），149.4（C-4），147.0（C-7），146.7（C-3），127.7（C-1），122.8（C-6），116.4（C-8），115.5（C-5），115.0（C-2）。化合物 **14** 的氢谱和碳谱数据与文献[18]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为咖啡酸。

化合物 **15**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$；ESI$^+$-MS *m/z*：355 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.55（1H，d，*J* ＝ 16.0 Hz，H-7'），7.04（1H，d，*J* ＝ 2.0 Hz，H-2'），6.95（1H，dd，*J* ＝ 8.4，2.0 Hz，H-6'），6.77（1H，d，*J* ＝ 8.4 Hz，H-5'），6.25（1H，d，*J* ＝ 16.0 Hz，H-8'），5.32（1H，m，H-3），4.15（1H，m，H-5），3.72（1H，dd，*J* ＝ 8.4，3.2 Hz，H-4），2.25 ～ 2.01（4H，m，H-2，H-6）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：176.9（COOH），168.6（C-9'），149.5（C-4'），147.0（C-7'），146.8（C-3'），127.7（C-1'），122.9（C-6'），116.4（C-5'，8'），115.2（C-2'），76.1（C-1），73.4（C-4），71.9（C-5），71.2（C-3），38.7（C-2），38.2（C-6）。化合物 **15** 的氢谱和碳谱数据与文献[19]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为绿原酸。

化合物 **16**：白色粉末状物；分子式为 $C_{17}H_{24}O_9$；ESI$^+$-MS *m/z*：395 [M ＋ Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.74（2H，s，H-3，5），6.54（1H，d，*J* ＝ 16.1 Hz，H-7），6.37（1H，dt，*J* ＝ 5.5，15.8 Hz，H-8），4.86（1H，s，H-1'），4.22（2H，d，*J* ＝ 5.0 Hz，H-9），3.85（6H，s，-OCH_3），3.78（1H，dd，*J* ＝ 2.1，11.9 Hz，H-6'a），3.66（1H，dd，*J* ＝ 11.8，5.2 Hz，H-6'b），3.48（1H，m，H-2'），3.42（2H，m，H-3'，4'），3.21（1H，m，H-5'）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：154.3（C-3，5），135.8（C-4），135.2（C-7），131.2（C-1），130.0（C-8），105.4（C-2，6），105.3（C-1'），78.3（C-5'），77.8（C-3'），75.7（C-2'），71.3（C-4'），63.5（C-9），62.5（C-6'），57.0（-OCH_3）。化合物 **16** 的氢谱和碳谱数据与文献[20]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为紫丁香苷。

化合物 **17**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_{28}H_{32}O_{16}$；ESI$^+$-MS *m/z*：647 [M ＋ Na]$^+$；^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：7.66（1H，overlapped，H-2'），7.63（1H，overlapped，H-6'），6.87（1H，d，*J* ＝ 7.4 Hz，H-5'），6.41（1H，s，H-8），6.21（1H，s，H-6），5.11（1H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-1"），4.52（1H，s，H-1'''），3.34 ～ 3.80（8H，m，H-2"，3"，4"，5"，2'''，3'''，4'''，5'''），1.12（3H，d，*J* ＝ 5.9 Hz，H-6'''）；^{13}C-NMR（CD_3OD，150 MHz）δ：179.4（C-4），166.0（C-7），162.9（C-5），159.3（C-2），158.5（C-9），149.8（C-4'），145.8（C-3'），135.6（C-3），123.5（C-6'），123.1（C-1'），117.6（C-5'），116.0（C-2'），105.6（C-10），104.7（C-1"），102.4（C-1'''），99.9（C-6），94.8（C-8），78.1（C-3"），77.2（C-5"），75.7（C-2"），73.9（C-4"），72.2（C-5'''），72.0（C-3'''），71.3（C-4'''），69.7（C-6"），68.5（C-2'''），17.8（C-6'''）。化合物 **17** 的氢谱和碳谱数据与文献[21]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为芦丁。

化合物 **18**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{19}H_{30}O_8$；ESI$^+$-MS *m/z*：387 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：5.82（1H，s，

H-4），4.25（1H，d，J = 7.7 Hz，H-1'），3.87（1H，d，J = 11.7 Hz，H-6'b）3.80（1H，d，J = 9.5 Hz，H-6'a），3.67 ～ 3.26（3H，m，H-11），3.44（1H，d，J = 9.5 Hz，H-5'），3.33（1H，m，H-3'），3.19（1H，t，J = 8.1 Hz，H-2'），2.71（2H，m，H-8），2.54（2H，d，J = 17.8 Hz，H-2），2.52（1H，brs，H-2a），2.24（1H，t，J = 5.1 Hz，H-6），2.14（3H，s，H-10）2.04（3H，s，H-13），2.00 ～ 1.65（2H，m，H-7），1.07（2H，s，H-12）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：211.6（C-9），201.2（C-3），169.1（C-5），125.9（C-4），104.4（C-1'），78.1（C-5'），78.0（C-3'），75.9（C-11），75.6（C-2'），71.7（C-4'），63.2（C-6'），46.2（C-6），43.1（C-2），42.9（C-8），40.9（C-1），30.0（C-10），24.7（C-13），24.4（C-7），24.2（C-12）。化合物 **18** 的氢谱和碳谱数据与文献 [22] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 supinaionodie B。

化合物 **19**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{11}H_{15}N_5O_4$；ESI$^+$-MS m/z：304 [M ＋ Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：8.33（1H，s，H-2），8.18（1H，s，H-8），6.06（1H，d，J = 6.0 Hz，H-1'），4.49（1H，m，H-2'），4.43（1H，m，H-3'），4.16（1H，m，H-4'），3.88（1H，dd，J = 2.1，12.5 Hz，H-5'a），3.75（1H，dd，J = 2.4，12.5 Hz，H-5'b）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：157.5（C-6），153.6（C-2），149.9（C-4），141.8（C-8），120.9（C-5），89.2（C-1'），88.4（C-4'），84.6（C-2'），70.8（C-3'），63.2（C-5'），58.7（2'-OCH_3）。化合物 **19** 的氢谱和碳谱数据与文献 [23] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 cordysinin B。

化合物 **20**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_5$；ESI$^+$-MS m/z：306 [M ＋ Na]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：10.64（1H，s，3-NH），7.94（1H，s，H-8），6.49（2H，s，2-NH_2），5.69（1H，d，J = 6.0 Hz，1'-OH），5.39（1H，d，J = 6.0 Hz，2'-OH），5.07（1H，d，J = 4.7 Hz，H-1'），5.01（1H，t，J = 5.5 Hz，3'-OH），4.39（1H，m，H-2'），4.08（1H，m，H-3'），3.87（1H，dd，J = 3.7，7.3 Hz，H-4'），3.52 ～ 3.61（2H，m，H-5'）；^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：156.7（C-6），153.5（C-2），151.3（C-4），135.5（C-8），116.9（C-5），86.3（C-1'），85.1（C-4'），73.6（C-3'），70.3（C-2'），61.3（C-5'）。化合物 **20** 的氢谱和碳谱数据与文献 [24] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为鸟嘌呤核苷。

化合物 **21**：白色粉末状物质；分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$；ESI$^+$-MS m/z：268 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.35（1H，s，H-8），8.14（1H，s，H-2），7.35（2H，s，NH_2），5.87（1H，d，J = 6.2 Hz，H-1'），5.45（1H，d，J = 6.1 Hz，2'-OH），5.42（1H，d，J = 6.2 Hz，3'-OH），5.19（1H，d，J = 4.6 Hz，3'-OH），4.62（1H，m，H-2'），4.15（1H，m，H-3'），3.97（1H，d，J = 2.68 Hz，H-4'），3.53 ～ 3.70（2H，m，H-5'）；^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：156.1（C-6），152.4（C-2），149.0（C-4），139.9（C-8），119.3（C-5），87.9（C-1'），85.9（C-4'），73.4（C-2'），70.6（C-3'），61.7（C-5'）。化合物 **21** 的氢谱和碳谱数据与文献 [24] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为腺嘌呤核苷。

化合物 **22**：白色粉末状物质；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：9.02（1H，brs，H-2），8.68（1H，d，J = 4.2 Hz，H-6），8.28（1H，d，J = 7.9 Hz，H-4），7.54（1H，dd，J = 4.9，7.8 Hz，H-5）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：169.8（C-1），152.8（C-2），149.4（C-6），137.3（C-4），131.4（C-3），125.1（C-5）。化合物 **22** 的氢谱和碳谱数据与文献 [25] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为烟酰胺。

4 化合物的活性研究

4.1 化合物对一氧化氮（NO）生成抑制活性研究

将 RAW264.7 细胞接种至 96 孔板中，用 1 μg • mL^{-1} LPS 进行诱导刺激，同时加入待测化合物（50 μmol • L^{-1}）处理，L-NMMA 为阳性对照。细胞过夜培养后取培养基在 570 nm 处测定吸光值，检测 NO 生成。结果表明所有化合物均未表现出明显的 NO 生成抑制活性。

4.2 化合物对环氧化酶 1 和 2 的抑制活性研究

对分离得到的化合物采用环氧化酶抑制剂筛选试剂盒进行环氧化酶 1 和 2 的抑制活性筛选，以阿司匹林和帕瑞昔布为阳性对照。结果表明所有化合物均未表现出明显的环氧化酶 1 和 2 抑制活性。

4.3 化合物的抗菌活性研究

参照 CLSI 标准检测分离得到的化合物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肠沙门氏菌、铜绿假单胞菌的抑制作用，以青霉素 G 钠为阳性对照。实验结果表明化合物 **4**、**6**、**8**、**15** 对金黄色葡萄球菌表现出一定的抑制作用，结果见表 1。

采用微量稀释法对分离得到的化合物进行口腔厌氧菌 [牙龈卟啉单胞菌（Pg）、具核梭杆菌具核亚种（Fn）、变异链球菌（Sm）] 抑制活性筛选，以氨苄西林为阳性对照。结果表明化合物 **4**、**5**、**8**、**18**、**19** 对牙龈卟啉单胞菌（Pg）、具核梭

表 1　化合物对金黄色葡萄球菌的抑制率

Tab 1　Inhibition rate of the isolated compound on *Staphylococcus aureus*

化合物	浓度	抑制率 /%
化合物 **4**	100 μmol • L^{-1}	58.78±1.01
化合物 **6**	100 μmol • L^{-1}	63.82±1.52
化合物 **8**	100 μmol • L^{-1}	64.65±0.72
化合物 **15**	100 μmol • L^{-1}	64.53±2.54
青霉素 G 钠	5 μg • mL^{-1}	100.06±0.10

杆菌具核亚种（Fn）表现出微弱的抑制作用，化合物 **2**、**5**、**11**、**19** 分别在半数抑菌浓度（MIC_{50}）为 200、200、100、200 μg • mL^{-1} 时对变异链球菌（Sm）显示出与阳性对照相当（氨苄西林 200 μg • mL^{-1}）的抑制作用。

5　结论

本文运用色谱、光谱法等方法对金银花乙醇提取物进行了较为系统的化学成分分离。共分离鉴定了 22 个单体化合物，主要包括环烯醚萜苷类（**1** ～ **11**），核苷类（**19** ～ **21**），生物碱类（**22**），黄酮类（**17**），苯丙素类（**16**），倍半萜类（**18**）以及酚酸类（**12** ～ **15**）成分；其中化合物 **11**、**12**、**18**、**22** 首次在金银花中分离得到。活性研究结果表明，本文从金银花中分离的化学成分化合物 **2**、**5**、**11**、**19** 在 MIC_{50} 为 200、200、100、200 μg • mL^{-1} 时对变异链球菌（Sm）显示出与阳性对照相当（氨苄西林 200 μg • mL^{-1}）的抑制作用，这也表明金银花清热解毒的传统功效和其抗菌活性有一定的关联。本次研究进一步丰富了金银花的化学物质组成和生物活性信息，可为金银花的开发利用提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：230.

[2] Liu Z，Cheng Z，He Q，et al. Secondary metabolites from the flower buds of Lonicerae japonicae flos and their in vitro anti-diabetic activities [J]. Fitoterapia，2016，110：44-51.

[3] 王莹，郝江波，陈佳佶，等 . 基于主要化学成分差异的金银花与山银花种质资源系统评价研究 [J]. 中南药学，2020，18（5）：825-831.

[4] 吴娇，王聪，于海川 . 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（4）：225-234.

[5] Calis I，Sticher O. Secoiridoid glucosides from *Lonicera periclymenum* [J]. Phytochemistry，1984，23（11）：2539-2540.

[6] 倪雅娟，刘艳霞，阮静雅，等 . 尖叶假龙胆全草中环烯醚萜苷类成分的分离与鉴定（Ⅱ）[J]. 中国药物化学杂志，2017，27（2）：133-137.

[7] 李静，潘少斌，王集会，等 . 忍冬果实中的环烯醚萜苷类成分 [J]. 四川农业大学学报，2016，34（2）：190-193.

[8] Kikuchi M，Onoguchi R，Yaoita Y. Three new monoterpene glucosides from Lamium amplexicaule [J]. Helv Chim Acta，2009，92（10）：2063-2070.

[9] 孙彦君，陈豪杰，高美玲，等 . 小驳骨中萜类化学成分研究 [J]. 中草药，2020，50（2）：293-298.

[10] 王晓燕，孙磊，乔善义 . 六味地黄苷糖中糖苷部位的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（17）：2576-2580.

[11] 王楠，杨秀伟 . 复方双黄连粉针剂金银花中间体化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2011，36（12）：1613-1619.

[12] 杨紫刚，丁鲲，许刚，等 . 续断化学成分研究 [J]. 中药材，2012，35（11）：1789-1792.

[13] Song WX，Yang YC，Shi JG. Two new b-hydroxy amino acid-coupled secoiridoids from the flower buds of Lonicerae japonicae flos：isolation，structure，elucidation，semisynthesis and biological activities [J]. Chin Chem Lett，2014，25（9）：1215-1219.

[14] 刘鹏，张恩惠，张薇，等 . 四妙勇安汤水煎液化学成分研究 [J]. 中草药，2018，49（14）：3232-3239.

[15] 梅玉丹，李海波，王振中，等 . 灰毡毛忍冬花蕾中苷类化学成分研究 [J]. 中草药，2020，50（2）：287-292.

[16] 刘可越，刘海军，吴家忠，等 . 款冬花中抑制肺癌细胞 LA795 增殖的活性成分研究 [J]. 复旦学报（自然科学版），2009，48（1）：125-129.

[17] Tabassum N，Lee JH，Yim SH，et al. Isolation of 4，5-O-dicaffeoylquinic acid as a pigmentation inhibitor occurring in artemisia capillaris thunberg and its validation in vivo [J]. Evid-based Complement Altern Med，2016，14：1-11.

[18] 彭电，黄娟，彭谷，等 . 水葱根茎化学成分研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：870-873.

[19] 马圆媛，高映，黄梦婷，等 . 竹叶柴胡的化学成分研究 [J]. 中药材，2021，44（4）：877-881.

[20] 詹煌，陈佳倩，朱梦贞，等 . 宽筋藤正丁醇部位的化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（3）：594-598.

[21] Zhang S，Tao ZM，Zhang Y，et al. Chemical constituents from the stems and leaves of Elaeocarpus glabripetalus [J]. Chin J Nat Med，2010，8（1）：21-24.

[22] Deng F，Tang N，Xu J，et al. New *α*-pyrrolidinonoids and glycosides from *Euphorbia humifusa* [J]. J Asian Nat Prod Res，2008，10（6）：531-539.

[23] 武玉卓，李瑞，邱博琳，等 . 结香内生真菌芬芳镰刀菌化学成分的研究 [J]. 药学学报，2017，52（4）：598-602.

[24] 马河，李方丽，王芳，等 . 白花蛇舌草核苷类化学成分分离 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（14）：57-59.

[25] Kwon HC，Jung IY，Cho SY，et al. Phospholipids from *Bombycis corpus* and their neurotrophic effects [J]. Arch Pharm Res，2003，26（6）：471-477.

（收稿日期：2022-01-24；修回日期：2022-03-02）

窄治疗指数药物利伐沙班片在中国健康受试者中的生物等效性研究

王铸辉[1]，阳晓燕[2*]，张行飞[2]，阳国平[2]，黄洁[2]，邹婵[2]（1. 湖南省药品审评与不良反应监测中心，长沙 410013；2. 中南大学湘雅三医院临床试验研究中心，长沙 410013）

摘要：目的　按窄治疗指数药物标准评价利伐沙班片受试制剂 T 与参比制剂 R 在中国成年健康受试者中的生物等效性。**方法**　空腹和餐后各入组 28 例健康受试者，采用单中心、随机、开放、两制剂、四周期全重复交叉设计，受试者口服单剂量利伐沙班片受试制剂 T 和参比制剂 R 20 mg。采用液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）法测定血浆中利伐沙班的浓度，采用 WinNonlin 8.0 程序数据统计软件按非房室模型计算药动学参数，按窄治疗指数药物标准进行生物等效性评价。**结果**　受试者口服 20 mg 受试制剂 T 和参比制剂 R 后，主要药动学参数如下：空腹组 C_{max} 分别为（195.28±46.01）、（197.48±52.63）ng • mL^{-1}；$AUC_{0\sim t}$ 分别为（1490.58±356.92）、（1439.72±372.20）h • ng • mL^{-1}；$AUC_{0\sim\infty}$ 分别为（1609.00±394.74）、（1538.39±386.49）h • ng • mL^{-1}。餐后组 C_{max} 分别为（402.05±85.67）、（394.42±65.29）ng • mL^{-1}；$AUC_{0\sim t}$ 分别为（2776.66±756.91）、（2728.24±801.16）h • ng • mL^{-1}；$AUC_{0\sim\infty}$ 分别为（2801.41±755.55）、（2760.30±805.05）h • ng • mL^{-1}。两种制剂的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 经对数转换后空腹组 90%*CI* 分别为 94.73% ～ 105.71%、97.55% ～ 110.44% 和 97.81% ～ 111.66%，个体内标准差比值 90%*CI* 上限分别为 1.60、1.42 和 1.45；餐后组 90%*CI* 分别为 96.84% ～ 105.84%、96.09% ～ 108.29% 和 95.89% ～ 107.87%，个体内标准差比值 90%*CI* 上限分别为 1.98、1.30 和 1.31，符合窄治疗指数药物生物等效性评判的标准。**结论**　利伐沙班片受试制剂 T 与参比制剂 R 在空腹和餐后状态下均具有生物等效性。

关键词：利伐沙班片；生物利用度；生物等效性；窄治疗指数药物
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1781-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.011

Bioequivalence of narrow therapeutic index drug rivaroxaban tablets in Chinese healthy volunteers

WANG Zhu-hui[1], YANG Xiao-yan[2*], ZHANG Xing-fei[2], YANG Guo-ping[2], HUANG Jie[2], ZOU Chan[2] (1. *Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Reaction Monitoring*, *Changsha* 410013; 2. *Clinical Trial Research Center*, *the Third Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective　To evaluate the bioequivalence of two rivaroxaban tablets with narrow therapeutic index in Chinese healthy volunteers. **Methods**　Twenty-eight healthy volunteers were respectively recruited in fasting and fed. Single-center, single-dose, open, randomized, and four cycle fully repeated crossover design was used. A single oral dose of rivaroxaban tablets included the test preparation T and the reference preparation R 20 mg each. The concentrations of rivaroxaban in the plasma were determined by LC-MS/MS method. The pharmacokinetic parameters were calculated. The bioequivalence was determined by non-compartment model with WinNonlin (Vision 8.0) and evaluated with according to narrow therapeutic index drug criteria. **Results**　The main pharmacokinetic parameters of a single oral rivaroxaban tablets (20 mg) under fasting condition for test preparation T and reference

作者简介：王铸辉，男，主管药师，主要从事药品、医疗器械监督管理，email：867884013@qq.com　*通信作者：阳晓燕，女，主要从事临床试验医学监护，email：18196578@qq.com

preparation R were as follows: C_{max} was (195.28±46.01) and (197.48±52.63) ng • mL $^{-1}$; $AUC_{0\sim t}$ was (1490.58±356.92) and (1439.72±372.20) h • ng • mL $^{-1}$; $AUC_{0\sim\infty}$ was (1609.00±394.74) and (1538.39±386.49) h • ng • mL $^{-1}$. The main pharmacokinetic parameters of a single oral rivaroxaban tablets (20 mg) under fed condition for test preparation T and reference preparation R were as follows: C_{max} was (402.05±85.67) and (394.42±65.29) ng • mL $^{-1}$; $AUC_{0\sim t}$ was (2776.66±756.91) and (2728.24±801.16) h•ng•mL $^{-1}$; $AUC_{0\sim\infty}$ was (2801.41±755.55) and (2760.30±805.05) h•ng•mL $^{-1}$. The 90%*CI* for the geometric mean ratios of C_{max}, $AUC_{0\sim t}$ and $AUC_{0\sim\infty}$ of test preparation T and reference preparation R under fasting condition was 94.73% ～ 105.71%, 97.55% ～ 110.44%, and 97.81% ～ 111.66%, respectively. The 90%*CI* upper for the limit for intra-individual standard deviation ratio was 1.60, 1.42 and 1.45. The 90%*CI* for the geometric mean ratios of C_{max}, $AUC_{0\sim t}$ and $AUC_{0\sim\infty}$ of T and R under fed condition was 96.84% ～ 105.84%, 96.09% ～ 108.29%, and 95.89% ～ 107.87%, respectively. The 90%*CI* upper for the limit for intra-individual standard deviation ratio was 1.98, 1.30 and 1.31, all of which met the criteria of bioequivalence evaluation of narrow therapeutic index drug. **Conclusion** The test preparation of rivaroxaban tablets is bioequivalent to the reference preparation in both fasting and fed conditions.

Key words: rivaroxaban tablet; bioavailability; bioequivalence; narrow therapeutic index

利伐沙班直接通过抑制凝血因子Ⅹa可中断凝血瀑布的内源性和外源性途径，抑制凝血酶的产生和血栓形成。目前，利伐沙班是血栓栓塞性疾病推荐的一线用药[1-5]。与华法林需频繁监测患者国际标准化比值（INR）相比，利伐沙班的治疗依从性更好。利伐沙班于 2008 年在加拿大和欧盟获得上市批准，2009 年在澳大利亚及中国获批，2011 年在美国获批。本研究旨在评价南京恒生制药有限公司生产的利伐沙班片与参比制剂在中国健康受试者的生物等效性及安全性，为国内利伐沙班仿制药上市审批提供依据。

1 材料

利伐沙班片受试制剂（T，规格：20 mg/ 片，批号：191201，含量：101.2%，南京恒生制药有限公司）；利伐沙班片参比制剂（R，商品名：拜瑞妥，规格：20 mg/ 片，批号：BJ45597，含量：101.1%，Bayer AG）；利伐沙班（对照品，纯度：99.7%，批号：ITM10082849，上海陶素生化科技有限公司）；Rivaroxaban-d4（内标，纯度：98%，批号：9-JHY-173-5，Toronto Research Chemicals）；甲醇、乙腈、甲酸（Merck 公司）；二甲亚砜（DMSO，国药集团）；水为超纯水。HPLC30-AD 超快速液相系统（日本 Shimadzu）；AB Sciex API 5500 质谱仪（美国应用生物系统公司）。

2 方法与结果

2.1 受试者选择

入选标准：年龄 18 ～ 60 周岁，男女均可；体质量指数（BMI）19.0 ～ 26.0 kg • m $^{-2}$，男性受试者体质量≥ 50.0 kg，女性受试者体质量≥ 45.0 kg。试验前签署知情同意书，并对试验内容、过程及可能出现的不良反应有充分了解；志愿者能够和研究者进行良好的沟通，并且理解和遵守本项研究的各项要求。

排除标准：患有需排除的疾病，包括但不限于心血管系统、内分泌系统、神经系统、血液系统、免疫系统（包括个人或家族史遗传性免疫缺陷）、精神病、代谢异常、恶性肿瘤、淋巴组织增生性疾病等病史且研究者认为目前仍有临床意义者；有食物、药物过敏史，尤其对利伐沙班片及辅料中任何成分过敏者；有罕见的遗传性半乳糖不耐受、Lapp 乳糖酶缺乏症或葡萄糖 - 半乳糖吸收不良（如喝牛奶腹泻）者；既往患有任何增加出血性风险或凝血功能障碍疾病者；在服用研究药物前 3 d 进食可能影响药物体内代谢的食物者（包括葡萄柚或葡萄柚产品、火龙果、芒果、柚子、橘子等）；试验前 1 个月内使用过任何抑制或诱导肝脏药物代谢的药物者；生命体征异常者（收缩压＜ 90 mmHg 或＞ 140 mmHg，舒张压＜ 50 mmHg 或＞ 90 mmHg；心率＜ 50 次 • min $^{-1}$ 或＞ 100 次 • min $^{-1}$）或体格检查、心电图、实验室检查异常有临床意义者（以临床医师判断为准）；研究者认为依从性差或者存在不适合参加试验因素的受试者。

本试验经中南大学湘雅三医院伦理委员会批准

（批件号：第 20025 号），所有受试者均签署知情同意书。空腹组筛选 118 例，共有 27 例健康受试者完成试验，包括 2 例女性和 25 例男性，平均年龄为（25.8±5.21）岁，平均体质量为（63.31±7.13）kg，平均 BMI 为（22.17±1.93）kg • m^{-2}；餐后试验筛选 99 例，共有 28 例健康受试者完成试验，包括 5 例女性和 23 例男性，平均年龄为（24.4±5.37）岁，平均体质量为（62.29±7.30）kg，平均 BMI 为（22.61±2.17）kg • m^{-2}。

2.2　试验设计

按照 FDA 的利伐沙班片生物等效性指南，本试验在健康成年志愿者中进行单中心、单剂量、随机、开放、两制剂、四周期全重复交叉的生物等效性试验。其中空腹、餐后受试者均为 28 例，受试者按筛选号顺序随机分为两个给药序列组（T-R-T-R 组 /R-T-R-T 组），在四周期分别口服 20 mg 受试制剂 T 与参比制剂 R，清洗期为 7 d。给药方法：空腹或者高脂餐后 30 min，240 mL 温水送服。服药前 1 h 及服药后 1 h 内禁止饮水，服药前禁食至少 10 h，服药后 4 h 内禁食，服药后 4、10 h 统一进食标准午餐和晚餐。分别在给药 0 时（于给药前 60 min 内）和给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、12、24、36、48 h 采血，每次采集约 4 mL。血样采集至 EDTA-K2 抗凝剂中，混匀后即刻置于冰浴中暂存，1 h 内将血样在约 4 ℃低温条件下离心（1700 g）约 10 min，取分离后的血浆至检测管中和备份管中，离心后的血浆样品在采血后 2 h 内置于－20 ℃低温冰箱，并于每周期采血结束后转移至超低温冰箱保存，直至样品转运。

2.3　血浆样本处理与测定

2.3.1　色谱条件　色谱柱：ACE 3 C_{18}-AR（50 mm×2.1 mm，5 μm）；流动相 A：0.4% 甲酸水溶液（pH 3.2），流动相 B：0.1% 甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0.00 ～ 1.20 min，35%B；1.20 ～ 1.30 min，35% ～ 100%B；1.30 ～ 1.80 min，100%B；1.80 ～ 1.90 min，100% ～ 35%B；1.90 ～ 3.00 min，35%B）；流速：0.6 mL • min^{-1}；柱温：40 ℃；自动进样器温度：4 ℃；进样量：5.00 μL。

2.3.2　质谱条件　正离子电喷雾离子化（ESI）；电离模式；多反应监测模式（MRM）扫描模式；离子源喷雾电压为 5.0 kV，离子源温度为 500 ℃，入口电压 10 V，碰撞气 9 unit，出口电压 13 V，离子源 GS1 为 50 psi，离子源 GS2 为 55 psi。用于定量分析的离子反应为利伐沙班 *m/z* 436.2 → 145.0，内标 Rivaroxaban-d4 *m/z* 440.3 → 145.0。

2.3.3　血浆样品处理　精密移取样本 100 μL（空白样品和内标空白样品取 100 μL 空白人血浆）至 96 孔板中；加入 20 μL 内标工作液，混匀；加入 600 μL 乙腈，加盖 96 孔板盖涡旋 3 min 混匀，3200 g、4 ℃离心 5 min；取 400 μL 上清液至另一 96 孔板中，40 ℃氮气流吹干；加入 200 μL 复溶液 [0.4% 甲酸水溶液（pH3.2）：0.1% 甲酸乙腈（65：35）]，加盖 96 孔板盖涡旋 3 min，即得。

2.4　方法学考察与评价

2.4.1　特异性　取 6 例受试者的空白血浆，按照“2.3.3”项下方法处理后进样，血浆内源性物质的峰面积均小于利伐沙班最低定量下限（LLOQ）（1 ng•mL^{-1}）峰面积的 20%，小于内标峰面积的 5%。结果表明，血浆内源性物质不干扰待测物和内标的测定，该方法的特异性良好（见图 1）。

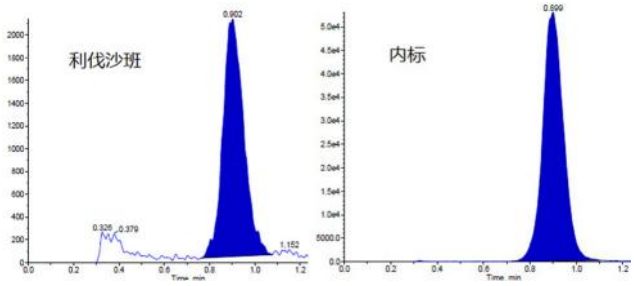


图 1　血浆中分析物和内标的典型色谱图

Fig 1　Typical chromatogram of analyte and internal standard in plasma

2.4.2　标准曲线与 LLOQ　配制标准曲线血浆样品（1、2、10、50、100、250、400、500 ng•mL^{-1}），按“2.3.3”项下方法操作后进样分析，建立利伐沙班的标准曲线。以质控样品质量浓度为横坐标（*X*，ng • mL^{-1}），利伐沙班与内标的峰面积比值为纵坐标（*Y*），采用加权回归法进行回归，权重因子为 $1/\chi^2$。结果表明利伐沙班在 1 ～ 500 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，其回归方程为 $Y = 0.402X + 0.0021$（$R^2 = 0.9986$），LLOQ 为 1 ng • mL^{-1}。

2.4.3　精密度与回收率　配制利伐沙班 LLOQ 质量浓度（1 ng • mL^{-1}）、低质量浓度（LQC，3 ng•mL^{-1}）、中质量浓度 1（MQC1，20 ng•mL^{-1}）、中质量浓度 2（MQC2，200 ng • mL^{-1}）、高质量浓度（HQC，375 ng • mL^{-1}）的质控样品，每个浓度 6 份，重复 3 次，按“2.3.3”项下方法处理后进样分析，结果批内和批间精密度（*RSD*）均＜ 5%，准确度在 99.4% ～ 101.8%。用 LQC、MQC2、HQC 3 个质量浓度样品，比较经提取与未经提取利伐沙

班和内标的各自峰面积比值，结果低、中、高质量浓度的平均提取回收率分别为 96.34%、93.45%、92.01%，*RSD* 分别为 1.8%、0.30%、0.56%。

2.4.4　基质效应　取 6 例受试者的空白血浆，分别考察 LQC、MQC2、HQC 3 个质量浓度的利伐沙班在基质离子存在时色谱峰响应和在基质离子不存在时色谱峰响应的比值。内标归一化基质因子为待测物的基质效应除以内标的基质效应。结果 3 个质量浓度的利伐沙班内标归一化基质因子均值分别为 100%、100% 和 101%。

2.4.5　稳定性　利伐沙班全血样品在冰浴条件下放置 1 h 后离心，稳定性良好；利伐沙班血浆样品在室温和冷藏下放置 24 h、在－30 ～－10 ℃至室温以及－90 ～－60 ℃至室温 3 次冻融循环、在－30 ～－10 ℃以及－90 ～－60 ℃条件下长期冰冻 40 d 稳定性良好；利伐沙班血浆样品处理过程中在 1 ～ 9 ℃条件下放置 24 h 稳定性良好、处理后样品 1 ～ 9 ℃条件下放置 123 h 稳定性良好。

2.5　*药动学参数计算及生物等效性判定*

药动学参数采用非房室模型，使用 Phoenix WinNonlin8.0（美国 Pharsight 公司）软件和 SAS 9.4 进行统计分析。主要药动学参数 $AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$、C_{max} 经自然对数转换后进行多因素方差分析（ANOVA）、双单侧 *t* 检验和 90%*CI* 分析。当受试制剂 T 和参比制剂 R 药动学参数 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 经对数转换后几何均值比的 90%*CI* 均落在 80.00% ～ 125.00%，且受试制剂 T 和参比制剂 R 个体内标准差比值的 90%*CI* 上限≤ 2.5 时 [6]，则认为两制剂具有生物等效性。

2.6　*血药浓度 - 时间曲线*

空腹组完成随机化 28 例，1 例受试者于第一周期给药前退出，共有 27 例受试者完成试验。餐后组完成随机化 28 例，1 例受试者于第四周期给药前退出（已完成 3 周期给药盒采血），共有 27 例受试者全部按计划完成试验。对完成血样采集的样本进行血药浓度检测，空腹组和餐后组平均血药浓度 - 时间曲线见图 2 和图 3。

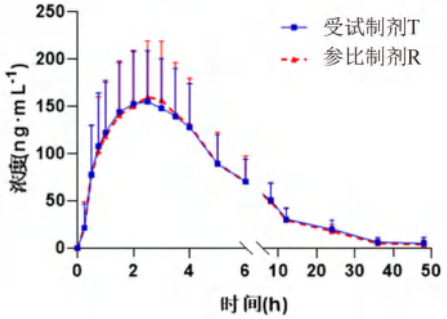


图 2　空腹服用受试制剂和参比制剂的平均药时曲线图

Fig 2　Mean plasma concentration-time curve of 27 subjects after an oral dose of rivaroxaban tablets under fasting condition

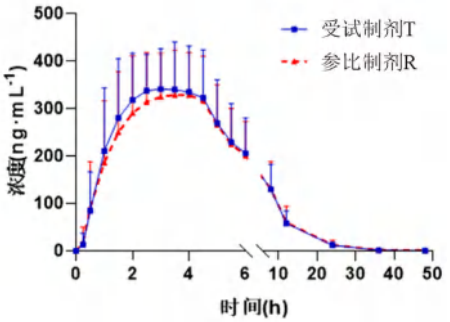


图 3　餐后服用受试制剂和参比制剂的平均药时曲线图

Fig 3　Mean plasma concentration-time curve of 28 subjects after an oral dose of rivaroxaban tablets under fed condition

2.7　*药动学参数*

空腹组 27 例受试者和餐后组 28 例受试者均纳入药动学参数集（PKPS）分析，结果见表 1。

表 1　空腹组和餐后组受试者单次口服利伐沙班片受试制剂和参比制剂的药动学参数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Main pharmacokmetic parameters of rivaroxaban tablets of the test or the reference preparation in both fasting and fed conditions（$\bar{x}\pm s$）

组别	制剂	t_{max}/h*	C_{max}/（ng・mL⁻¹）	$AUC_{0\sim t}$/（h・ng・mL⁻¹）	$AUC_{0\sim\infty}$/（h・ng・mL⁻¹）	$t_{1/2}$/h
空腹组（n ＝ 27）	受试制剂 T	1.50（0.50，4.00）	195.28±46.01	1490.58±356.92	1609.00±394.74	10.12±5.88
	参比制剂 R	2.00（0.50，4.00）	197.48±52.63	1439.72±372.20	1538.39±386.49	10.37±6.82
餐后组（n ＝ 28）	受试制剂 T	2.50（1.00，4.50）	402.05±85.67	2776.66±756.91	2801.41±755.55	4.52±0.95
	参比制剂 R	2.50（0.50，4.50）	394.42±65.29	2728.24±801.16	2760.30±805.05	4.86±1.36

注：* 表示 t_{max} 采用中位数（最小值，最大值）的形式描述。

Note：*means t_{max} is described in terms of median（minimum，maximum）.

2.8　*生物等效性评价*

受试制剂 T 和参比制剂 R 的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 对数转换后的几何均数比值 GMR 的 90%*CI* 均落在 80.00% ～ 125.00%，双单侧 *t* 检验结果与置信区间法结果一致，受试制剂 T 和参比制剂 R 个体内标准差比值的 90%*CI* 上限≤ 2.5，说明两制剂在本实验空腹和餐后给药条件下具有生物等效性 [6]，详见表 2、3。

表 2　空腹口服受试制剂与参比制剂的主要 PK 参数生物等效性评价结果

Tab 2　Main pharmacokmetic parameters of rivaroxaban tablets of the test or the reference preparation in fasting condition

主要 PK 参数	T/R 比值 /%	个体间变异 /%	个体内变异 /%	GMR 的 90%*CI*	个体内标准差比值 90%*CI* 上限	等效性判定结果
C_{max}	100.07	24.80	17.24	94.73 ～ 105.71	1.60	生物等效
$AUC_{0\sim t}$	103.79	25.56	19.55	97.55 ～ 110.44	1.42	生物等效
$AUC_{0\sim\infty}$	104.51	23.99	20.02	97.81 ～ 111.66	1.45	生物等效

表 3　餐后口服受试制剂与参比制剂的主要 PK 参数生物等效性评价结果

Tab 3　Main pharmacokmetic parameters of rivaroxaban tablets of the test or the reference preparation in fed condition

主要 PK 参数	T/R 比值 /%	个体间变异 /%	个体内变异 /%	GMR 的 90%*CI*	个体内标准差比值 90%*CI* 上限	等效性判定结果
C_{max}	101.24	16.73	14.11	96.84 ～ 105.84	1.98	生物等效
$AUC_{0\sim t}$	102.01	33.60	19.05	96.09 ～ 108.29	1.30	生物等效
$AUC_{0\sim\infty}$	101.71	33.29	18.76	95.89 ～ 107.87	1.31	生物等效

2.9　安全性评价

空腹组 27 例受试者全部按计划完成给药、采血和安全性评价，并进入安全性分析集。共有 12 例受试者发生 17 例次不良事件。服用受试制剂 T 期间有 5 例（18.5%）受试者发生了 7 例次不良事件，服用参比制剂 R 期间有 8 例（29.6%）受试者共发生了 10 例次不良事件。不良事件为上呼吸道感染、尿白细胞酯酶阳性、潜血阳性、血三酰甘油升高、血尿酸升高，均为轻度不良事件，未进行任何治疗，均恢复正常。

餐后试验 27 例受试者全部按计划完成给药和采血，1 例受试者完成了 3 个周期给药和采血，共有 28 例受试者进入安全分析集。结果 15 例受试者发生 22 例次不良事件，其中服用受试制剂 T 期间有 8 例（28.6%）受试者发生了 11 例次不良事件；服用参比制剂 R 期间有 10 例（35.7%）受试者发生了 11 例次不良事件。不良事件为上呼吸道感染、咽炎、尿白细胞阳性、尿蛋白检出、心率升高、血三酰甘油升高、腹泻。有 1 例受试者发生中度不良事件“上呼吸道感染”，采取治疗措施后恢复正常。其余均为轻度不良事件，未进行任何治疗，均恢复正常。

本试验研究期间两药安全性相近，未发生严重不良事件，故受试者在空腹及餐后给药条件下口服受试制剂 T 和参比制剂 R 20 mg 后临床安全性良好。

3　讨论

利伐沙班能选择性地阻断Ⅹ a 因子的活性位点起到抗凝作用，其血药浓度的微小变化可能导致血栓或出血，进而危及生命，为窄治疗指数药物[1-5]。与一般化学药物相比，窄治疗指数药物进行生物等效性评价时，应采用更严格的等效性判定标准，以保证有效性和安全性。FDA 在利伐沙班片生物等效性指南中建议，利伐沙班片的生物等效性统计分析应采用平均生物等效性 ABE 法（80% ～ 125%），并比较受试者服用受试制剂 T 和参比制剂 R 的个体内变异，且两药个体内变异标准差比值的 90%*CI* 上限应≤ 2.5[6-10]。

因此，本次研究采用四周期全重复交叉的设计，以获得两药的个体内变异。个体内变异系数取 24%，预计受试制剂与参比制剂药代参数均值差异为 10%，$\alpha = 0.05$，$\beta = 0.2$（把握度 $1 - \beta = 80\%$），利用软件 PASS 11.0 进行样本量计算，计算结果表明纳入不少于 26 例能够可靠的进行等效性判断，考虑脱落，将样本量定为 28 例。结果显示，本次研究利伐沙班个体内变异在 14.11% ～ 20.02%，C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 个体内变异标准差比值的 90%*CI*。

本次研究中，与其他文献中利伐沙班等效性研究结果相似，利伐沙班在空腹组和餐后组中的部分药动学参数（t_{max}、C_{max}、*AUC*、$t_{1/2}$）差异较大。餐后组中的 t_{max}、C_{max}、*AUC* 较大，可能原因是高脂餐后给药，会延长药物的释放，增大药物在体内的吸收，从而增大药物在体内的暴露。在临床治疗上，该药动学性质可以为剂量调整提供依据，$t_{1/2}$ 差异较大，可能原因是餐后组 PK 曲线消除相采样点数量较少，药时曲线不平滑，导致计算出来的 $t_{1/2}$ 与空腹组相比差异较大，是本次研究的不足之处。如果在餐后组增加 18 h 和 30 h 采样点，就能得到更平滑的消除相曲线。

参考文献

[1]　刘春妍，沈纪中，梅笛，等 . 利伐沙班群体药代动力学研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（3）：623-626.

[2] 李丹，王婷，梁莉，等 . 利伐沙班在健康人体的药动学及生物等效性评价 [J]. 中国新药杂志，2021，30（15）：1401-1406.
[3] 陶野，时萍，刘淑芹，等 . 利伐沙班片在中国健康受试者中的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（20）：3189-3193.
[4] 全力力，黎明江，易欣 . 新型口服抗凝药利伐沙班在血栓性疾病中的应用进展 [J]. 医学研究学杂，2018，47（11）：11-14.
[5] 王华伟，喻明，李晓斌，等 . 利伐沙班片在中国健康志愿者中的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（22）：3590-3594.
[6] 国家药品监督管理局 . 窄治疗指数药物生物等效性研究技术指导原则 [S]. 2020.
[7] 王晶，阳国平，黄洁，等 . 醋酸阿比特龙片在中国健康受试者的药代动力学和生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2018，36（16）：1989-1992.
[8] NMPA.《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》[S]. 2016.
[9] 国家药品监督管理局 . 生物等效性研究的统计学指导原则 [S]. 2018.
[10] Food and Drug Administration. Draft guidance on rivaroxaban [S]. 2015.

（收稿日期：2022-05-09；修回日期：2022-06-07）

含氨基酸或小肽的阳离子抗菌药物

王艳，吴条，唐美，邹俊娜（中南大学化学化工学院，长沙　410083）

摘要：目的　针对念珠性阴道炎研究不易诱导耐药菌产生的抗菌药物。**方法**　本文合成了两类阳离子两亲性化合物：短脂肽（SSLP）和氨基酸基阳离子表面活性剂（AACS），并以经典阳离子表面活性剂（CCS）为对照，从抑菌活性、诱导耐药菌产生、溶血率、对哺乳动物细胞毒性等四个方面进行研究，然后通过稳定性和多次阴道刺激性实验确定针对念珠性阴道炎最有效的候选药物。**结果**　SSLP 和 CCS 都有良好的杀菌活性，但是对于人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 具有较高的细胞毒性，而 SSLP 不易诱导细菌产生耐药性，所以外用杀菌消毒如器械消毒时，SSLP 是 CCS 的理想替代品。AACS 中的 N^{α}- 月桂酰基精氨酸乙酯（C12-R-OEt）对于白色念珠菌敏感，不易诱导耐药菌的产生，安全性高，在接近阴道环境 pH 4 的水溶液中稳定，对阴道黏膜无刺激性。**结论**　C12-R-OEt 是最有潜力的念珠性阴道炎外用候选药物。

关键词：念珠性阴道炎；短抗菌脂肽；N^{α}- 酰基精氨酸乙酯；苯扎溴铵；醋酸氯己定
中图分类号：R96，R914　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1786-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.012

Cationic antimicrobial agents containing amino acids or small peptides

WANG Yan, WU Tiao, TANG Mei, ZOU Jun-na (*School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha* 410083)

Abstract: Objective To determine the new antimicrobial agents with low drug resistance in treating vulvovaginal candidiasis. **Methods** We synthesized two categories of cationic amphiphilic compounds: short synthesized lipopeptides (SSLP) and amino acid-based cationic surfactants (AACS). Classical cationic surfactants (CCS) was used as references, and we tested the two categories as to antimicrobial activity, resistance development, hemolytic activity and toxicity to mammalian. Then we conducted stability evaluation and rabbit vaginal irritation tests to identify the most potent candidate for vulvovaginal candidiasis. **Results** SSLP and CCS both showed good antimicrobial activity but high cytotoxicity to human vaginal epithelial cells VK2/E6E7. SSLP displayed low resistance, making it an

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2018JJ2491）。
作者简介：王艳，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗菌肽研究，email：wy-csu@csu.edu.cn

ideal alternative for CCS in external sterilization and apparatus disinfection. N^{α}-lauryl arginine ethyl ester (C12-R-OEt), one type of AACA, was sensitive to *Candida albicans*, and highly unlikely to induce resistant pathogenic microbes. It was safe, stable in aqueous solution at pH 4, without vaginal irritation. **Conclusion** C12-R-OEt is the most potent candidate for effective treatment of vulvovaginal candidiasis.

Key words: vulvovaginal candidiasis; short synthesized lipopeptide; N^{α}-acyl arginine ethyl ester; benzalkonium bromide; chlorhexidine acetate

念珠性阴道炎（vulvovaginal candidiasis，VVC）是女性最困扰的疾病之一，大约 75% 的女性一生至少患一次念珠性阴道炎。更糟糕的是，耐药菌株的出现会导致念珠性阴道炎治疗失败。实际上，耐药菌的出现和迅速传播已成为最大的公共卫生威胁之一，迫切需要研发不易诱导耐药菌产生的新抗菌药物。

人工设计合成的短脂肽（synthetic short lipopeptides，SSLP）[1-2] 模拟天然抗菌肽（antimicrobial peptides，AMP）两亲性的结构特征，带有净正电荷和疏水团，保留了 AMP 的抗菌活性 [3-5]，不同的是，SSLP 的肽链很短，典型的 SSLP 肽链只有 2 ～ 5 个氨基酸残基，而且 SSLP 的疏水团是脂肪酸链部分，一般为 10 ～ 18 个碳原子，这不仅弥补了肽链短的问题，还提高了抗菌活性，同时 SSLP 的结构简单，可以实现工业化生产，克服了天然 AMP 来源有限和价格昂贵的问题，近年来获得大量关注。很多研究表明 SSLP 与 AMP 相似，主要通过破坏膜结构发挥杀菌作用，且抑菌活性依赖于正电荷数与碳链长度的平衡 [6-8]。

阳离子表面活性剂（cationic surfactant，CS）具有 SSLP 相似的结构特征和抗菌活性，包括经典阳离子表面活性剂（classical cationic surfactant，CCS）（如苯扎溴铵、醋酸氯己定 [9]）和氨基酸基阳离子表面活性剂（amino acid-based cationic surfactant，AACS）（如 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯 [10]）。AACS 是 SSLP 的结构类似物，SSLP 的肽链缩短到只有一个氨基酸就成为 AACS，AACS 的结构更加简单，合成更容易，更具优势。

本文研究的 SSLP 包括四种脂二肽 [棕榈酰精氨酰精氨酰胺（C16-RR-NH_2）、棕榈酰赖氨酰赖氨酰胺（C16-KK-NH_2）、棕榈酰精氨酰赖氨酰胺（C16-RK-NH_2）、棕榈酰赖氨酰精氨酰胺（C16-KR-NH_2）] 和一种脂五肽 [葵酰精氨酰赖氨酰色氨酰色氨酰赖氨酰胺（C10-RKWWK-NH_2）]，AACS 包括六种不同碳氢链长的 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯 [N^{α}- 癸酰精氨酸乙酯（C10-R-OEt）、N^{α}- 月桂酰精氨酸乙酯（C12-R-OEt）、N^{α}- 肉豆蔻酰精氨酸乙酯（C14-R-OEt）、N^{α}- 棕榈酰精氨酸乙酯（C16-R-OEt）、N^{α}- 硬脂酰精氨酸乙酯（C18-R-OEt）、N^{α}- 花生酰精氨酸乙酯（C20-R-OEt）]，作为对照的 CCS 包括苯扎溴铵和醋酸氯己定。

1 材料与方法

1.1 试药

L- 精氨酸盐酸盐（阿拉丁生物科技），葵酰氯、月桂酰氯、肉豆蔻酰氯、棕榈酰氯、硬脂酰氯和花生酰氯（萨恩化学），其他用于合成 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯的试剂都为分析纯，苯扎溴铵、醋酸氯己定（国药集团）。C10-RKWWK-NH_2、C16-RR-NH_2、C16-KK-NH_2、C16-RK-NH_2 和 C16-KR-NH_2 由合肥国肽生物技术公司定制合成。

1.2 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯的合成与表征

取 10 mmol *L*- 精氨酸盐酸盐加入 500 mmol 的乙醇中，冰浴搅拌 0.5 h。使用恒压滴液漏斗缓慢滴加 50 mmol 二氯亚砜，待放热结束，常温搅拌 12 h，旋干溶剂得精氨酸乙酯盐酸盐。

将制得的精氨酸乙酯盐酸盐溶解在适量乙醇中，滴加 30 mmol 三乙胺，冰浴搅拌 1 h。将混合液平均分为 6 份，分别滴加适量的葵酰氯、月桂酰氯、肉豆蔻酰氯、棕榈酰氯、硬脂酰氯和花生酰氯，常温搅拌 12 h，旋干溶剂，得到不同酰基链长度的 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯粗品。

采用饱和碳酸氢钠洗涤 - 萃取 - 透析方法进行纯化，纯度经 HPLC 测定均大于 95%，产率大于 80%。^{1}H NMR（布鲁克 AVANCE Ⅲ，400 MHz，DMSO-d_6）表征结果：

C10-R-OEt：δ 4.19（dd，J = 13.0，8.6 Hz，1H），4.12 ～ 4.03（m，2H），3.08（s，2H），2.12（t，J = 7.3 Hz，2H），1.76 ～ 1.68（m，1H），1.65 ～ 1.55（m，1H），1.51 ～ 1.48（m，4H），1.24（s，12H），1.18（t，J = 7.1 Hz，3H），0.86（t，J = 6.5 Hz，3H）。

C12-R-OEt：δ 4.18（dd，J = 13.0，8.4 Hz，1H），4.12 ～ 4.04（m，2H），3.08（s，2H），2.12（t，J = 7.3 Hz，2H），1.76 ～ 1.68（m，1H），1.63 ～ 1.58（m，1H），1.52 ～ 1.46（m，4H），1.24（s，16H），1.18（t，J = 7.1 Hz，3H），0.86（t，J = 6.4 Hz，3H）。

C14-R-OEt：δ 4.16（dd，J ＝ 12.2，7.7 Hz，1H），4.12 ～ 3.98（m，2H），3.11（s，2H），2.11（t，J ＝ 7.2 Hz，2H），1.77 ～ 1.68（m，1H），1.63 ～ 1.54（m，1H），1.51 ～ 1.46（m，4H），1.24（s，20H），1.19（t，J ＝ 7.3 Hz，3H），0.86（t，J ＝ 6.2 Hz，3H）。

C16-R-OEt：δ 4.17（dd，J ＝ 12.6，7.6 Hz，1H），4.09 ～ 4.04（m，2H），3.09（s，2H），2.12（t，J ＝ 7.4 Hz，2H），1.73 ～ 1.67（m，1H），1.63 ～ 1.59（m，1H），1.52 ～ 1.47（m，4H），1.23（s，24H），1.17（t，J ＝ 7.2 Hz，3H），0.85（t，J ＝ 6.4 Hz，3H）。

C18-R-OEt：δ 4.18（dd，J ＝ 12.9，7.8 Hz，1H），4.11 ～ 4.05（m，2H），3.10（s，2H），2.12（t，J ＝ 7.2 Hz，2H），1.75 ～ 1.67（m，1H），1.65 ～ 1.57（m，1H），1.54 ～ 1.44（m，4H），1.24（s，28H），1.17（t，J ＝ 7.0 Hz，3H），0.85（t，J ＝ 6.2 Hz，3H）。

C20-R-OEt：δ 4.19（dd，J ＝ 12.7，7.6 Hz，1H），4.10 ～ 4.04（m，2H），3.07（s，2H），2.11（t，J ＝ 7.2 Hz，2H），1.74 ～ 1.67（m，1H），1.63 ～ 1.56（m，1H），1.49 ～ 1.47（m，4H），1.23（s，32H），1.17（t，J ＝ 7.1 Hz，3H），0.85（t，J ＝ 6.1 Hz，3H）。

1.3　菌株、细胞和培养条件

大肠埃希菌（*E. coli*，ATCC25922）、金黄色葡萄球菌（*S. aureus*，ATCC25923）、白假丝酵母菌（*C. albicans*，ATCC10231）、铜绿假单胞菌（*P. aeruginos*，ATCC27853）、耐甲氧西林金黄葡萄球菌（MRSA，ATCC43300）购自广东省微生物保藏中心，卷曲乳杆菌（*L. crispatus*，CGMCC1.2743）购自中国普通微生物菌种保藏管理中心，菌株于－80 ℃保存在 Microbank 菌种保藏管中。*C. albicans* 使用 RPMI 1640 培养基（3-吗啉丙磺酸缓冲液调节），*E. coli*、*S.aureus*、*P.aeruginos* 和 MRSA 使用 CAMHB 肉汤培养基，*L. crispatus* 使用 MRS 肉汤培养基，37 ℃恒温振荡培养箱中孵育 16 ～ 24 h，其中 *L. crispatus* 置于无氧、含 5%CO_2 的条件下孵育。人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7（上海栩冉生物科技有限公司）采用添加有 10% 胎牛血清（FBS）的 RPMI 1640 培养基（含谷氨酰胺）。

1.4　抑菌活性、溶血活性、细胞毒性和诱导耐药实验

采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度（*MIC*）和最小杀菌浓度（*MMC*），按美国临床实验室标准化协会推荐的用于抗微生物制剂的标准方案进行。杀菌动力学由时间杀菌实验测定[11]，使用新鲜无菌脱纤维羊血进行药物溶血活性实验[12]，药物对于人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 的毒性采用 MTT 法，按文献方法测定细胞死亡率[13]。

1.5　药物稳定性实验

采用加速实验法研究药物的稳定性，配制一系列不同 pH 值（pH 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0）的 C12-R-OEt 水溶液（0.05%），每一种 pH 值的样品均分为两份，放入两个容器中密封，其中一个作为对照样，冷藏保存；另一个于 95 ℃水浴中加热 1 h，然后自然冷却至室温，与对照样一起进行 HPLC 检测，计算相对含量（C）。

采用 $t_{0.9}$ 法（药物分解 10% 的时间）测定药物的理论有效期[14]：5 份 C12-R-OEt 水溶液（0.05%，pH 4.0 的 0.1 mol•L^{-1} 醋酸钠缓冲溶液）分别放在 5 个恒温水浴中加速分解，对照样冷藏保存，分别在两个时间点取样（60 ℃，2.5 h，3 h）、（65 ℃，2.0 h，2.5 h）、（70 ℃，1.5 h，2 h）、（75 ℃，1.0 h，1.5 h）、（80 ℃，0.5 h，1 h），观察产品外观，与对照样一起进行 HPLC 检测，计算相对含量（C）。以相对含量的对数（lg$C$）对时间 t 进行线性回归，通过不同温度 T 的拟合曲线，计算出各 T 的 $t_{0.9}$，再以各 T 的 lg $t_{0.9}$ 对（1/T）进行线性拟合，即可计算出任意温度下药物的理论有效期。

采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪，Agilent SB-C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，流动相 A 为 0.01% 三氟乙酸水溶液，流动相 B 为 0.01% 三氟乙酸乙腈溶液，洗脱梯度（0 ～ 15 min，20% ～ 85%B；15 ～ 17 min，85%B；17 ～ 20 min，85% ～ 20%B），流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 215 nm，柱温 30 ℃，进样量 20 μL。

1.6　多次阴道刺激性实验

委托有资质的机构（苏州出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心）进行家兔多次阴道黏膜刺激实验，依据《消毒技术规范》(2002 年版)[15]，受试物为 C12-R-OEt 水溶液（0.05%，pH 4.0，0.1 mol•L^{-1} 醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液），对照组为 0.9% 氯化钠注射液，报告编号为 HWY201800750。

2　结果与讨论

2.1　抗菌活性

2.1.1　抗菌敏感性实验　表 1 列出了本文研究的 AACS、SSLP 以及作为对照的 CCS 对三种标准菌株（革兰氏阴性菌 *E. coli*、革兰氏阳性菌 *S.aureus* 和真菌 *C. albicans*）的 *MIC* 和 *MMC*，及对 *L. crispatus* 的 *MIC* 和 *MMC*，并计算出选择性

系数（*SR*），*SR* 定义为 *L. crispatus* 和 *C. albicans* *MIC* 的比值（$MIC_{L.c.}/MIC_{C.a.}$），*SR* 越大意味着相对于阴道正常菌群，药物对于真菌有更好的选择性抑制作用。从表 1 可见，除了 C20-R-OEt 对于真菌的 *MIC* 和 *MMC* ＞ 256 μg • mL^{-1} 之外，其他药物对于这三种标准菌株的 *MIC* 为 4 ～ 256 μg • mL^{-1}，*MMC* 为 1×*MIC* 或者 2×*MIC*，都显示出良好的杀菌活性。

具体来说，两种 SSLP 显示出中等的杀菌活性（脂二肽 *MIC* 在 16 ～ 64 μg • mL^{-1}，脂五肽 *MIC* 在 8 ～ 32 μg • mL^{-1}，*SR* ＝ 8）。文献报道富含精氨酸（R）和色氨酸（W）的多肽和脂肽具有最高的抗菌活性，并推荐脂五肽 C10-RKWWK-NH_2 作为很有潜力的抗菌药物 [7]。但是本研究表明，这种脂五肽并没有显示出比别的测试药物更好的抗菌活性和更高的真菌选择性。四种脂二肽（C16-RR-NH_2、C16-KK-NH_2、C16-RK-NH_2 和 C16-KR-NH_2）的 *MIC*、*MMC* 和 *SR* 都相差不大，说明精氨酸和赖氨酸的不同组合及顺序对抗菌活性没有什么影响。两种 CCS（苯扎溴铵和醋酸氯己定）都有较好的抗菌能力（*MIC* 在 4 ～ 16 μg • mL^{-1}，*SR* 在 8 ～ 16）。需要指出的是，N^{α}-酰基精氨酸乙酯抗菌活性随酰基的碳氢链长的增加表现出钟形曲线的变化趋势，与 SSLP 和 CCS 相较而言，C12-R-OEt 和 C14-R-OEt 对于细菌（*E.coli* 和 *S.aureus*）具有更好的抗菌活性（*MIC* 在 8 ～ 16 μg • mL^{-1}，*SR* ＝ 16），C16-R-OEt 和 C18-R-OEt 对于真菌 *C. albicans* 具有更好的抗菌活性（*MIC* ＝ 4 μg • mL^{-1}，*SR* ＝ 16）。

表 1　测试药物的抗菌活性和对真菌的选择性 (μg • mL^{-1})

Tab 1　Antimicrobial activity and fungal selectivity of the test drug (μg • mL^{-1})

测试药物	*MIC*			*MMC*			选择性系数
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*	*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*	（SR^a）
C10-R-OEt	128	128	128	256	256	256	8
C12-R-OEt	16	16	8	16	16	16	16
C14-R-OEt	16	16	8	16	16	8	16
C16-R-OEt	64	32	4	64	32	4	16
C18-R-OEt	256	128	4	＞256	256	4	16
C20-R-OEt	＞256	＞256	16	＞256	＞256	16	8
C16-RK-NH_2	8	8	16	16	16	16	8
C16-KK-NH_2	32	32	32	32	32	32	8
C16-KR-NH_2	8	8	16	16	16	16	8
C16-RR-NH_2	32	32	32	32	32	32	8
C10-RKWWK-NH_2	64	32	16	128	64	32	8
苯扎溴铵	16	16	8	16	32	8	8
醋酸氯己定	4	4	8	4	8	16	16

2.1.2　杀菌动力学　从图 1 杀菌速度曲线可以得出测试药物完全杀灭三种标准菌株所需的最短时间。药物浓度对于细菌和真菌分别设置为 1×*MMC* 和 2×*MMC*，在这些浓度下，100% 菌株会在 24 h 内被完全杀灭，当作用时间限制在 20 min 时，测试药物表现出不同的杀菌动力学特征。C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH_2 有最快的杀菌速度，在 2 ～ 10 min 内杀灭了 100% 的 *E. coli*（见图 1A）和 *S. aureus*（见图 1B），C12-R-OEt 和 C14-R-OEt 杀真菌的速度最快，2 min 内就杀灭了全部的 *C. albicans*（见图 1C）。其他测试药物的杀菌速度都要慢一些（有些数据没有显示在图 1 中）。图 1 的结果说明，从杀灭三种标准菌株的速度来看，C12-R-OEt 性能最佳，C10-RKWWK-NH_2 次之。

2.1.3　对于耐药菌株的抗菌活性　*P. aeruginosa* 是一种对于很多抗菌药物有天然耐药性的条件致病菌，MRSA 不仅对于甲氧西林耐药，对于许多抗菌药物也耐药。表 2 是测试药物对于这两种耐药菌株的 *MIC* 和 *MMC*。除了醋酸氯己定，其他的测试药物都能抑制和杀灭这两种耐药菌株（*MIC* 在 4 ～ 256 μg•mL^{-1}，*MMC* 在 16 ～ 256 μg•mL^{-1}），具体来说，*P. aeruginosa* 能够被完全杀灭，虽然需要的药物质量浓度可能较高（*MMC* ＝ *MIC* 在 8 ～ 256 μg • mL^{-1}），而在药物较低质量浓度时 MRSA 的生长和繁殖就受到抑制（*MIC* 在 4 ～ 8 μg • mL^{-1}），当药物质量浓度增加，MRSA 也会被完全杀灭（*MMC* 在 16 ～ 64 μg • mL^{-1}），其中 C10-RKWWK-NH_2 和 C14-R-OEt 对于这两种耐药菌株都表现出最强的杀菌活性。

2.2　溶血率和细胞毒性

表 3 列出了测试药物对于羊血的溶血活性以及对于人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 的细胞毒性实验结果。除 C20-R-OEt（HC_{50} ＝ 128 μg•mL^{-1}）外，不同酰基链长的 N^{α}- 酰基精氨酸乙酯的溶血

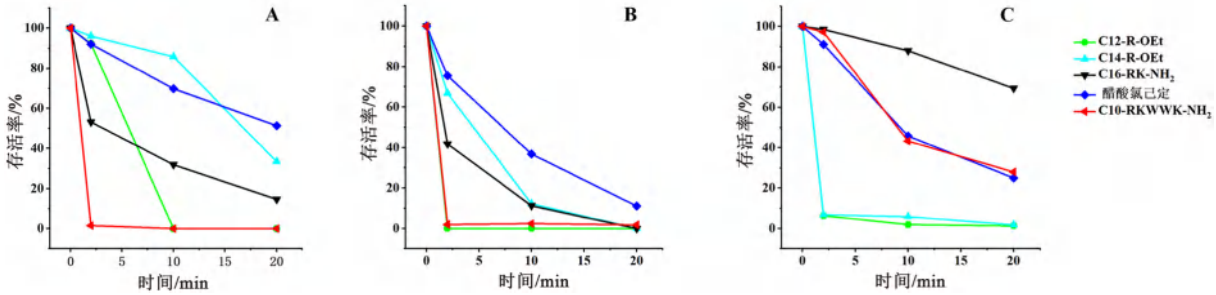


图 1　杀菌动力学

Fig 1　Microbicidal kinetics

A. *E. coli*；B. *S. aureus*；C. *C. albicans*

表 2　测试药物对耐药菌株的抗菌活性 (μg・mL^{-1})

Tab 2　Antimicrobial activity to resistant strains of the test drug (μg・mL^{-1})

测试药物	*P. aeruginos*		MRSA	
	MIC	*MMC*	*MIC*	*MMC*
C12-R-OEt	32	32	8	64
C14-R-OEt	32	32	4	32
C16-R-OEt	128	128	4	32
C18-R-OEt	256	256	4	32
C10-RKWWK-NH$_2$	32	32	4	16
苯扎溴铵	128	＞256	128	＞256
醋酸氯己定	8	8	4	32

活性没有太大差异（HC_{50} = 30 ～ 48 μg・mL^{-1}），而两种 SSLP 之间以及两种 CCA 之间则相差较大。细胞毒性方面，N^{α}- 酰基精氨酸乙酯的细胞毒性随酰基的碳氢链长增加而增大（IC_{50} 从 C12-R-OEt 的 66 μg・mL^{-1} 减小到 C20-R-OEt 的 1.2 μg・mL^{-1}）；两种 SSLP 疏水的碳氢链长不同，细胞毒性也是随着碳氢链长增加而增大；两种 CCA 细胞毒性都较大（IC_{50} 为 6.5 和 7 μg•mL^{-1}）。很明显，药物对于红细胞和人阴道上皮细胞的毒性不一样，用溶血活性来评估 SSLP 对于哺乳动物细胞的毒性[3，7，16]是不充分的，本文的结果说明，作为一种简化的体外药物安全性评估手段，细胞毒性实验不能仅用红细胞，还应该根据给药途径，使用相应组织细胞来进行。

表 3 中还列出了针对真菌 *C. albicans* 的治疗指数（$HC_{50}/MIC_{C.a.}$ 和 $IC_{50}/MIC_{C.a}$），从这两个指标综合来看，最安全的药物是 C12-R-OEt（$HC_{50}/MIC_{C.a.}$ = 6，$IC_{50}/MIC_{C.a.}$ = 8.5），其他药物安全性都相对较差。值得指出的是，C10-RKWWK-NH$_2$ 和醋酸氯己定，从溶血活性的角度来看比较安全（$HC_{50}/MIC_{C.a.}$ 在 8 ～ 16），但是从对 VK2/E6E7 的细胞毒性角度来看，安全性较差（$IC_{50}/MIC_{C.a}$ 在 0.8 ～ 2.3）。

2.3　诱导耐药菌产生情况

综合以上结果，我们选择抑菌活性和安全性都较好的 C12-R-OEt 继续进行研究，同时以 C10-RKWWK-NH$_2$ 和醋酸氯己定为对照，通过 30 d 连续给药，每日测定 *MIC*（见图 2）。从图 2C 可以看出，C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH$_2$ 对于 *C. albicans* 的 *MIC* 变化很小，30 d 内 *MIC* 只增加了一倍（C12-R-OEt 的 *MIC* 从 4 μg・mL^{-1} 变为 8 μg・mL^{-1}，C10-RKWWK-NH$_2$ 的 *MIC* 从 16 μg・mL^{-1} 变为 32 μg・mL^{-1}），而醋酸氯己定的 *MIC* 变化很大，30 d 内 *MIC* 增加了 7 倍（*MIC* 从 8 μg・mL^{-1} 变为 64 μg・mL^{-1}）。C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH$_2$ 对于 *E. coli*（见图 2A）和 *S. aureus*（见图 2B）的 *MIC* 呈现相同的变化趋势，说明同为氨基酸基阳离子两亲性化合物，不易诱导耐药菌产生。有研究认为带正电荷的 AMP 和 SSLP 通过静电作用力结合到带负电荷的微生物细胞膜上，导致膜结构破坏而死亡[1，17]，本研究推测 C12-R-OEt 具有同样的作用机制。虽然多黏菌素也有类似的机制，且近些年多黏菌素的耐药率有增加趋势，但是多黏菌素对革兰氏阴性细菌作用仍然颇强[18]，而从表 1 的结果来看，本文的测试药物对于革兰氏阳性菌和阴性菌的活性相

表 3　测试药物对绵羊红细胞和人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 的细胞毒性 (μg・mL^{-1})

Tab 3　Toxicity to ovine erythrocytes and human vaginal epithelial cells VK2/E6E7 of the test drug (μg・mL^{-1})

测试药物	HC_{50}	$HC_{50}/MIC_{C.a.}$	IC_{50}	$IC_{50}/MIC_{C.a.}$
C12-R-OEt	48	6	66	8.5
C14-R-OEt	30	6.2	25	3.1
C16-R-OEt	38	9.5	15	3.8
C18-R-OEt	36	9	5.7	1.4
C20-R-OEt	128	8	1.2	0.1
C16-RK-NH$_2$	41	2.5	8	0.5
C10-RKWWK-NH$_2$	132	8	37	2.3
苯扎溴铵	40	5	7	0.9
醋酸氯己定	110	14	6.5	0.8

注：HC_{50} 是引起 50% 溶血率的药物浓度，IC_{50} 是引起 50% 细胞活性抑制率的药物浓度。

Note：HC_{50} is the concentration of the test drug for 50% hemolysis. IC_{50} is the concentration of the test drug for the inhibition of VK2/E6E7 cells viability.

当，说明包括 C12-R-OEt 在内的测试药物与多黏菌素的抗菌作用机制有所不同，具体作用机制有待研究。

需要指出的是，虽然醋酸氯己定对两种耐药菌株有很好的抗菌活性（MIC = 4 ～ 8 μg • mL^{-1}，MMC = 8 ～ 32 μg • mL^{-1}），但是考虑到其对人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 细胞毒性较大（$IC_{50}/MIC_{C.a.}$ = 0.8），且诱导耐药菌产生的倾向较大（见图 2），不适合作为念珠性阴道炎外用治疗药物。

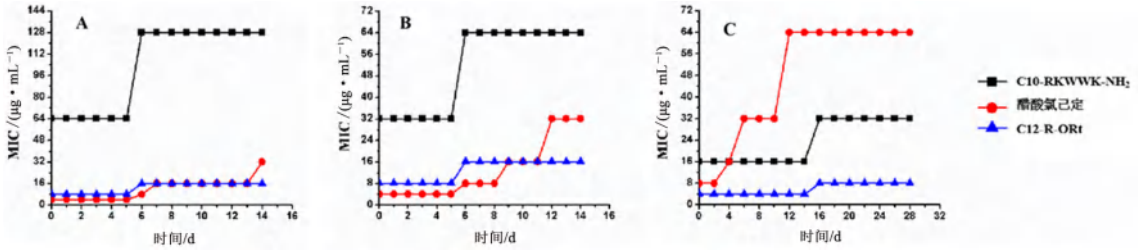


图 2　诱导耐药试验

Fig 2　Serial passage experiments for resistance induction

A. *E. coli*；B. *S. aureus*；C. *C. albicanss*

本文还做了交叉耐药实验，取醋酸氯己定连续给药 30 d 后，MIC 已经增大 7 倍的菌株，转而给药 C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH$_2$，结果发现 MIC 与各自的初试值相同，说明对醋酸氯己定已经开始产生耐药的菌株，仍然对 C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH$_2$ 敏感，说明 C12-R-OEt 和 C10-RKWWK-NH$_2$ 的抑菌机制可能与 CCS 不同。

2.4　稳定性

加速实验法测定了不同 pH 条件下 C12-R-OEt 水溶液的稳定性，以 C10-RKWWK-NH$_2$ 为对照，95 ℃ 加热 1 h 后，C12-R-OEt 含量随 pH 变化呈钟形变化趋势，pH 较低或较高时（pH 1 ～ 2 和 pH 7 ～ 9），C12-R-OEt 的含量显著降低（超过 15%），当 pH 为 3 ～ 6 特别是 pH 为 3 ～ 4 时，C12-R-OEt 含量基本没有变化（回收率超过 98%），C10-RKWWK-NH$_2$ 水溶液比较稳定（pH 4 时回收率为 96%，pH 7 时回收率为 98%），并且水溶液的外观均无变化。然而当以固体形式于 4 ℃ 储存 12 个月后，C12-R-OEt 固体与初试状态无异，C10-RKWWK-NH$_2$ 已经潮解，颜色也从白色变成棕黄色，说明 C10-RKWWK-NH$_2$ 稳定性较差。原因可能是其富含色氨酸，色氨酸是一种不稳定的氨基酸，在多肽链中容易分解着色，说明从化学稳定性角度，设计开发 SSLP 作为临床抗菌药物时应避免使用色氨酸，即便富含色氨酸的脂肽抗菌活性较好[7]。

通过以上加速实验法确定将 C12-R-OEt 配制成 pH 4 的水溶液使用（0.05%，0.1 mol • L^{-1} 醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液），与阴道的 pH 环境基本一致。通过 $t_{0.9}$ 法预测其保质期，首先以相对含量的对数（lg$C$）对时间 t 进行线性回归，根据线性回归方程计算出各 T 的 $t_{0.9}$，结果见表 4，以各 T 的 lg $t_{0.9}$ 对（1/T）进行线性拟合，得到：lg $t_{0.9}$ = 7185.1（1/T）− 20.0（r^2 = 0.9923），据此计算出保质期约为 1.5 年（298 K），可见该溶液比较稳定，可以开发为临床使用的洗液。

表 4　不同温度 (T) 时 lg C 对时间 (t) 的线性回归方程及 $t_{0.9}$

Tab 4　Linear regression equation of lg C versus (t) at different temperatures (T) and $t_{0.9}$

T/K	回归方程[a]	r^2	(1/T) × 10^{-3}/K	$t_{0.9}$/h
333	lg$C$ = 2.0001 − 0.0012t	0.9754	3.0017	38.21
338	lg$C$ = 2.0000 − 0.0029t	0.9985	2.9573	15.78
343	lg$C$ = 2.0002 − 0.0053t	0.9804	2.9142	8.67
348	lg$C$ = 2.0002 − 0.0093t	0.9925	2.8723	4.94
353	lg$C$ = 1.9993 − 0.0222t	0.9873	2.8317	2.03

注：[a] 表示取样时间 t 时 C12-R-OEt 相对于原始浓度的相对百分含量。

Note：[a] represents the percent content of C16-R-OEt as compared with its initial value at sampling time t.

2.5　阴道黏膜刺激实验

根据以上研究结果，C12-R-OEt 具有作为阴道抗菌洗液的潜力，故对其进行了多次家兔阴道黏膜刺激实验。实验组为 C12-R-OEt 水溶液（0.05%，pH 4.0，0.1 mol • L^{-1} 醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液），对照组为 0.9% 氯化钠注射液。阴道解剖观察结果表明，实验组 3 只动物中有 2 只出现充血，1 只出现水肿，对照组 3 只动物中 1 只出现充血，未见其他异常反应。根据组织学观察结果对阴道黏膜的刺激反应进行评分，实验组和对照组平均计分为 7.33 和 6.56，据此计算出实验组的刺激指数为 0.77，根据《消毒技术规范》[15]，刺激指数 < 1 为“无刺激性”，所以 C12-R-OEt 对家兔阴道黏膜刺激实验结果为无刺激性。

3　结论

三种氨基酸基阳离子表面活性剂（C12-R-

OEt，C14-R-OEt 和 C16-R-OEt）、两种短脂肽（C10-RKWWK-NH_2 和 C16-RK-NH_2）和一种经典阳离子表面活性剂（醋酸氯己定）对于三种标准菌株（革兰氏阴性菌 *E. coli*、革兰氏阳性菌 *S.aureus* 和真菌 *C. albicans*）都有抗菌活性，对耐药菌株（*P. aeruginosa* 和 MRSA）也有很好的抑制作用；除了醋酸氯己定，都不易诱导耐药菌产生；C12-R-OEt 具有最快的杀菌速度，C10-RKWWK-NH_2 次之。

短脂肽的溶血活性较小，但是对于人阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 的毒性较大，所以短脂肽可以替代经典阳离子表面活性剂用于器械消毒，但是不适于作为念珠性阴道炎的候选药剂，提示在设计抗菌脂肽时要寻找新的疏水片段代替脂肪酸链，如具有疏水侧链的氨基酸。

C12-R-OEt 结构简单，容易合成，对于念珠菌敏感，不易诱导耐药菌的产生，安全性高，稳定性好，对阴道黏膜无刺激性，最有潜力开发为念珠性阴道炎抗菌洗液。

参考文献

[1] Mandal SM，Barbosa AE，Franco OL. Lipopeptides in microbial infection control：scope and reality for industry [J]. Biotechnol Advs，2013，31（2）：338-345.

[2] Mangoni ML，Shai Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides：similarities and differences in cell specificities and modes of action [J]. Cell Mol Life Sci，2011，68（13）：2267-2280.

[3] Lohan S，Cameotra SS，Bisht GS. Systematic study of non-natural short cationic lipopeptides as novel broad-spectrum antimicrobial agents [J]. Chem Biol Drug Des，2013，82（5）：557-566.

[4] Lohan S，Monga J，Chauhan CS，et al. In vitro and in vivo evaluation of small cationic abiotic lipopeptides as novel antifungal agents [J]. Chem Biol Drug Des，2015，86（4）：829-836.

[5] Sikorska E，Dawgul M，Greber K，et al. Self-assembly and interactions of short antimicrobial cationic lipopeptides with membrane lipids：ITC，FTIR and molecular dynamics studies [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr，2014，1838（10）：2625-2634.

[6] Zhang LJ，Carmichael R. Short antimicrobial lipopeptides：US. A. 2015008029 [P]. 2015.

[7] Fang Y，Zhong W，Wang Y，et al. Tuning the antimicrobial pharmacophore to enable discovery of short lipopeptides with multiple modes of action [J]. Eur J Med Chem，2014，83：36-44.

[8] Laverty G，McLaughlin M，Shaw C，et al. Antimicrobial activity of short，synthetic cationic lipopeptides [J]. Chem Biol Drug Des，2010，75（6）：563-569.

[9] Mathur S，Mathur T，Srivastava R，et al. Chlorhexidine：the gold standard in chemical plaque control [J]. Natl J Physiol Pharm Pharmacol，2011，1（2）：45-50.

[10] Pinazo A，Manresa M，Marques AM，et al. Amino acid-based surfactants：new antimicrobial agents [J]. Adv Colloid Interface Sci，2016，228：17-39.

[11] Eckert R，He J，Yarbrough DK，et al. Targeted killing of Streptococcus mutans by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide [J]. Antimicrob Agents Chemother，2006，50（11）：3651-3657.

[12] Memariani H，Shahbazzadeh D，Ranjbar R，et al. Design and characterization of short hybrid antimicrobial peptides from pEM-2，mastoparan-VT1，and mastoparan-B [J]. Chem Biol Drug Des，2017，89（3）：327-338.

[13] Seyedjavadi SS，Khani S，Zare-Zardini H，et al. Isolation，functional characterization，and biological properties of MCh-AMP1，a novel antifungal peptide from L [J]. Chem Biol Drug Des，2019，93（5）：949-959.

[14] 庞贻慧，鲁纯素 . 药物稳定性预测方法 [M]. 北京：人民卫生出版社，1984：53-58

[15] 中华人民共和国卫生部 . 消毒技术规范（2002 年版）[S]. 2002：131-135.

[16] Ahn M，Murugan RN，Jacob B，et al. Discovery of novel histidine-derived lipo-amino acids：applied in the synthesis of ultra-short antimicrobial peptidomimetics having potent antimicrobial activity，salt resistance and protease stability [J]. Eur J Med Chem，2013，68：10-18.

[17] Ferreira B，Almeida AMD，Nascimento TC，et al. Synthesis and biological evaluation of a new series of *N*-acyl-diamines as potential antibacterial and antifungal agents [J]. Bioorg Med Chem Lett，2014，24：4626-4629.

[18] 王影，李艳然，韩镌竹，等 . 多黏菌素耐药性的研究进展 [J]. 微生物学通报，2017，44（1）：200-206.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-03-03）

头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响

王玲[1, 2]，袁丽[1, 2]，郑林[1]，巩仔鹏[1]，李月婷[1]，潘洁[3]，黄勇[1*]（1.贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室，贵阳　550004；2.贵州医科大学药学院，贵阳　550004；3.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心，贵阳　550004）

摘要：目的　考察头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响。**方法**　采用超高效液相-串联质谱法（UPLC-MS/MS）测定左氧氟沙星含量，色谱柱为 Waters BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）柱，流动相为 0.1% 甲酸乙腈 -0.1% 甲酸水，柱温为 45 ℃，流速为 0.30 mL • min^{-1}，进样体积为 1 μL。以中药灌胃预处理大鼠后，分离血浆与左氧氟沙星作用，通过平衡透析法考察左氧氟沙星在 3 μg • mL^{-1}、6 μg • mL^{-1} 两种浓度下，头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响。**结果**　左氧氟沙星在血浆及透析外液浓度范围内线性关系良好，其精密度、准确度、稳定性、提取回收率及基质效应均符合生物样品分析测定要求。左氧氟沙星单独与大鼠血浆作用，血浆蛋白结合率分别为（22.53±3.16）%、（20.03±8.00）%；大鼠灌胃头花蓼提取物预处理后，分离的血浆与左氧氟沙星蛋白结合率显著增加，分别增加至（43.95±4.14）%、（35.27±6.05）%（$P < 0.05$）。**结论**　头花蓼提取物能够使左氧氟沙星的血浆蛋白结合率升高。

关键词：头花蓼提取物；左氧氟沙星；血浆蛋白结合率；UPLC-MS/MS；平衡透析法
中图分类号：R285，R965　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1793-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.013

Effect of *Polygonum capitatum* extract on plasma protein binding rate of levofloxacin

WANG Ling[1, 2], YUAN Li[1, 2], ZHENG Lin[1], GONG Zi-peng[1], LI Yue-ting[1], PAN Jie[3], HUANG Yong[1*]
(1. *Guizhou Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants*, *Guiyang* 550004; 2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550004; 3. *Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM* (*Ministry of Education*), *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550004)

Abstract: Objective　To determine the effect of *Polygonum capitatum* extract on the plasma protein binding rate of levofloxacin. **Methods**　Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (UPLC-MS/MS) was used to determine the content of levofloxacin. A Waters BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column was used. The mobile phase was 0.1% formic acid acetonitrile-0.1% formic acid water, the column temperature was 45 ℃ , the flow rate was 0.30 mL • min^{-1}, and the injection volume was 1 μL. After pretreatment of rats by gavage with traditional Chinese medicine, the separated plasma interacted with levofloxacin. The effect of *Polygonum capitatum* extract on the protein binding rate of levofloxacin (3 μg • mL^{-1} and 6 μg • mL^{-1}) was investigated by equilibrium dialysis method. **Results**　Levofloxacin showed a good linearity in the concentration of the plasma and dialysis fluid. The precision, accuracy, stability, extraction recovery and matrix effect all met the requirements of biological sample determination. Levofloxacin alone interacted with the rat plasma, and the plasma protein binding rates were (22.53±3.16)% and (20.03±8.00)%, respectively. After the pretreatment with *Polygonum capitatum* extract, the protein binding rate of separated plasma and levofloxacin

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81760675/U1812403）；贵州省科技计划项目（黔科合 [2019]2777 号 /[2019] 5660）；贵州省教育厅项目（黔教合 KY 字 [2017]073）；贵阳市科研创新团队项目（筑科合同 [2017]30-29 号）。
作者简介：王玲，女，在读硕士研究生，主要从事中药药效物质基础及质量控制研究，email：2402392422 @qq.com　*通信作者：黄勇，男，教授，主要从事中药药效物质基础及新药研究，email：HUANGY2020@126.com

increased significantly to (43.95±4.14)% and (35.27±6.05)%, respectively (P ＜ 0.05). **Conclusion** *Polygonum capitatum* extract can significantly increase the plasma protein binding rate of levofloxacin.

Key words: *polygonum capitatum* extract; levofloxacin; plasma protein binding rate; UPLC-MS/MS; equilibrium dialysis method

左氧氟沙星作为喹诺酮类广谱抗菌药物，在临床上广泛用于治疗泌尿生殖系统感染、呼吸道感染和皮肤软组织感染等[1]，在治疗尿路感染方面疗效尤为显著。头花蓼（*Polygonum capitatum*）是一种贵州苗族习用药材，具有清热利湿、利尿通淋、解毒止痛等功效[2]。临床上头花蓼提取物制成的单方制剂热淋清颗粒与左氧氟沙星联用十分广泛，联合使用可提高疗效，缩短疗程，减少抗菌药物的不良反应[3-5]。尽管两者联合应用的临床疗效评价研究较多，但尚未见国内外文献有关于头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率影响方面的研究报道。药物血浆蛋白结合率是药代动力学的重要参数之一，血浆蛋白结合率的变化可引起药物血药浓度的变化，从而改变其药代动力学行为，在临床联合用药方面有重要意义[6]。

中药的成分复杂，绝大多数情况是吸收入血的成分才可以发挥其疗效，其中各成分不仅与化学药产生相互作用，成分间也会相互竞争蛋白结合位点。因此，本文采用连续灌胃大鼠头花蓼提取物后的含药血浆与左氧氟沙星，同时，基于 2×2 析因设计，以左氧氟沙星的浓度和作用方式为考察因素，研究两个因素的主效应以及其交互作用[7]，可更真实客观地了解两药联用后在体内与血浆蛋白结合的过程。本文将采用平衡透析法结合 UPLC-MS/MS 法对左氧氟沙星与大鼠血浆蛋白的结合进行测定，探讨头花蓼提取物对左氧氟沙星蛋白结合率的总体影响，为进一步研究两者在临床联合用药的安全合理性及药代动力学特征提供实验依据。

1　材料

1.1　仪器

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪，TQ-D 三重四极杆质谱仪（包括自动进样器、二元梯度泵、柱温箱、真空脱气机、Masslynx 4.1 质谱工作站，美国沃特世公司）；高速离心机（Allegra X-30 R，美国贝克曼公司）；超声波清洗器（KQ-300DE，昆山市超声仪器有限公司）；氮气吹干仪装置（MTN-2800D，天津奥特塞恩斯仪器有限公司）；多管涡旋振荡器（VX-Ⅲ，北京踏锦科技有限公司）；万分之一电子天平（EL204，上海 METTLER TOLEDO 公司）；实验室专用超纯水机（WP-UP-III-20，四川沃特尔科技发展有限公司）；微量移液器（德国 eppendorf 股份公司）；低温冰箱（BD-328WL，海尔集团公司）；透析袋 MD-25kD（截留相对分子量 8000 ～ 14 000，塞兰博生物制品有限公司）。

1.2　试药

头花蓼提取物 [参照《中国药典》[8] 热淋清颗粒的提取方式提取，出膏率：9.32%，没食子酸含量：42.06 mg • g^{-1}）]；左氧氟沙星对照品（批号：130455-201607，纯度：97.3%）、葛根素对照品（批号：110752-201512，纯度：95.4%）(中国食品药品检定研究院)；甲酸、甲醇（色谱纯，德国默克公司）；纯净水（广州屈臣氏食品饮料有限公司）；其他试剂均为分析纯。

1.3　动物

SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量为（230±10）g [长沙天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0014]。饲养条件：动物房照明充足（12/12 h 光 / 暗周期调节），空调通风良好，相对湿度（50±10）%，室温（22±2）℃，定期对实验室进行消毒。

2　方法

2.1　溶液的配制

2.1.1　对照品溶液和内标的配制

① 精密称取左氧氟沙星适量，用甲醇定容至 10 mL，即得左氧氟沙星对照品（1.002 mg•mL^{-1}）的储备液，置－ 20 ℃保存，备用。

② 精密称取葛根素（4.722 mg），用 50% 甲醇定容至 10 mL，即得葛根素（0.4722 mg•mL^{-1}）的储备液。取内标葛根素储备液适量至 100 mL 量瓶中，用 50% 甲醇定容至刻度，配制成 1 μg • mL^{-1} 的内标溶液，置－ 20 ℃保存，备用。

2.1.2　磷酸缓冲液（PBS）的配制

精密称取 KH_2PO_4 0.2 g，Na_2HPO_4 2.88 g，KCl 0.2 g，NaCl 8.0 g，用适量超纯水溶解，加 1% NaOH 调节 pH 7.4，将溶液转移至 1000 mL 量瓶中，超纯水定容至刻度，即得 0.01 mol•L^{-1} PBS 溶液，储存备用。

2.2　色谱条件

色谱柱：Waters BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）柱；保护柱：Waters Van Guard BEH C_{18}（2.1 mm×5 mm，1.7 μm）柱；柱温：45 ℃，进样器温度：25 ℃；流速：0.30 mL • min^{-1}，进样体积：1

μL；流动相：0.1% 甲酸乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 0.3 min，10%A；0.3 ～ 1.5 min，10% ～ 40%A；1.5 ～ 3 min，40% ～ 90%A；3 ～ 3.2 min，90%A；3.2 ～ 4.0 min，90% ～ 10%A）。

2.3　质谱条件

采用电喷雾电离源（ESI）；正离子模式扫描；毛细管电离电压：3 kV；离子源温度：120 ℃；喷雾气与反吹气：N_2；去溶剂气流速：650 L • h^{-1}，去溶剂气温度：350 ℃；扫描方式为多反应离子监测（MRM），质谱数据采集及处理软件为 Masslynx 4.1 质谱工作站。左氧氟沙星及内标用于定量分析的监测离子见表 1。

表 1　左氧氟沙星及内标的质谱条件

Tab 1　Mass spectrometry conditions for the levofloxacin and internal standards

化合物	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	Cone/V	Collision/V	ESI
葛根素	417.0	267.0	40	20	＋
左氧氟沙星	362.2	261.1	30	10	＋

2.4　样品处理方法

精密量取血浆样品（透析内液）和缓冲液（透析外液）各 100 μL，置 1.5 mL EP 管中，加入 2% 甲酸水 50 μL，涡旋混匀（1 min），加入 50 μL 葛根素内标溶液（1 μg • mL^{-1}），再加入甲醇 400 μL，涡旋混匀（1 min），超声 10 min，离心（12 000 r • min^{-1}、4 ℃，10 min），取上清液置 EP 管中，37 ℃ N_2 吹干，150 μL 50% 甲醇复溶，涡旋混匀 1 min，超声 10 min，离心（12 000 r • min^{-1}、4 ℃，10 min），取上清液进样分析。

2.5　统计学分析

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析，结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，各因素间交互作用采用析因设计方差分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.6　方法学考察

2.6.1　专属性　取 100 μL 大鼠空白血浆（不加内标）、加入对照品和葛根素的血浆、大鼠给药后的血浆，按“2.4”项下方法操作，进样记录各血浆样品色谱图，考察方法专属性。

2.6.2　标准曲线的制备和 LLOQ　取左氧氟沙星对照品储备液适量，分别加入空白血浆和空白缓冲液，得到在血浆中质量浓度为 1.002、2.505、5.010、10.020、20.040、25.050、30.060 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，在缓冲液中的质量浓度为 1.002、2.505、5.010、10.020、20.040、25.050 μg • mL^{-1} 的对照品溶液。按“2.4”项下方法操作，以待测成分与相应葛根素内标峰面积之比（A/A_i）为纵坐标 y，各物质浓度（C）为横坐标 x 进行线性回归，即得标准曲线。左氧氟沙星的定量下限（LLOQ）定义为 $S/N = 10$。

2.6.3　准确度和精密度　分别配制左氧氟沙星大鼠血浆低、中、高（2.505、10.020、25.050 μg•mL^{-1}）和缓冲液低、中、高（2.505、10.020、20.040 μg • mL^{-1}）三种质量浓度的质控（QC）样品，各浓度平行 5 份，按“2.4”项下方法处理，日内连续进样，连续测定 3 d，计算日内和日间精密度。同法平行配制低、中、高三个浓度的 QC 样品 5 份，将测得峰面积代入随行标准曲线计算左氧氟沙星的实际浓度，以实际测得左氧氟沙星的浓度与加入时左氧氟沙星浓度之比计算准确度。

2.6.4　提取回收率和基质效应　取 100 μL 大鼠空白血浆和缓冲液，按“2.6.3”项下方法分别配制低、中、高三个浓度的 QC 样品，每种浓度平行配制 5 份，按“2.4”项下操作（A 样品）；另取 100 μL 空白血浆和缓冲液，除不加左氧氟沙星对照品溶液外，其他按“2.4”项下方法操作，向离心后获得的上清液中加入相应低、中、高三种浓度的左氧氟沙星对照品溶液和内标葛根素，37 ℃ N_2 吹干，残留物以 50% 甲醇 150 μL 溶解（B 样品）；另取上述低、中、高三种浓度的左氧氟沙星对照品溶液与内标葛根素，37 ℃ N_2 吹干，残留物以 50% 甲醇 150 μL 溶解（C 样品）。以 A 样品与 B 样品得到的色谱峰面积之比计算提取回收率，以 B 样品与 C 样品得到的色谱峰面积之比计算基质效应。

2.6.5　样品稳定性　按“2.6.3”项下方法配制左氧氟沙星的空白血浆和缓冲液低、中、高三个浓度 QC 样品，考察样品处理后分别置于室温 6 h（约 20 ℃）中，4 ℃下冷藏 12 h，反复冻融 3 次三种条件下的稳定性。重复 5 样本分析。

2.7　析因实验设计

采用 2×2 析因实验设计，A 因素（浓度）和 B 因素（作用方式）各选择 2 个水平：A_1（3 μg•mL^{-1}）、A_2（6 μg•mL^{-1}），B_1（左氧氟沙星）、B_2（头花蓼提取物预处理），共 4 个组，每组重复 6 次，实验方案见表 2。

表 2　2×2 析因设计及实验方案

Tab 2　2×2 factor design and experiment plan

因素 A	因素 B	
	B_1	B_2
A_1	A_1B_1	A_1B_2
A_2	A_2B_1	A_2B_2

2.8　血浆蛋白结合率测定

将大鼠分为两组：左氧氟沙星组（股动脉取空白血）及头花蓼提取物预处理组 [连续给予大鼠头花蓼提取物（1.86 g • kg^{-1}，参照前期药代动力学实验研究 [9] 的剂量）3 d]，一天两次，末次给药 2 h 后股动脉取血。

参照文献 [10]，将透析袋进行预处理，处理后的透析袋一端折叠用线结扎。按照析因实验分组，取 1 mL 空白血浆（左氧氟沙星组）或取 1 mL 灌胃头花蓼提取物的血浆（头花蓼提取物预处理组）加入透析袋内，透析袋内留一小空气泡，将透析袋另一端扎紧，使其悬浮于盛有 20 mL 缓冲液的广口瓶中，膜外缓冲液左氧氟沙星质量浓度分别为 3 μg • mL^{-1}、6 μg • mL^{-1}，调节透析袋内外液面，使其保持在同一水平面，并避免透析袋贴于瓶壁。将瓶口密封后，于 4 ℃静置 48 h 至药物扩散平衡。透析结束后，用 10% 的高氯酸溶液检查透析外液是否有蛋白漏出，有漏出者则该样品作废。分别测定透析袋内药物浓度 D_t（总浓度）与袋外药物浓度 D_f（游离药物浓度），根据公式计算血浆蛋白结合率：血浆蛋白结合率（%）＝（$D_t - D_f$）/D_t×100%。

3　结果

3.1　方法学考察结果

3.1.1　专属性　空白血浆、空白血浆＋左氧氟沙星对照品＋内标葛根素、大鼠给药后血浆色谱图见图 1，表明血浆中内源性物质不干扰各个成分的测定。

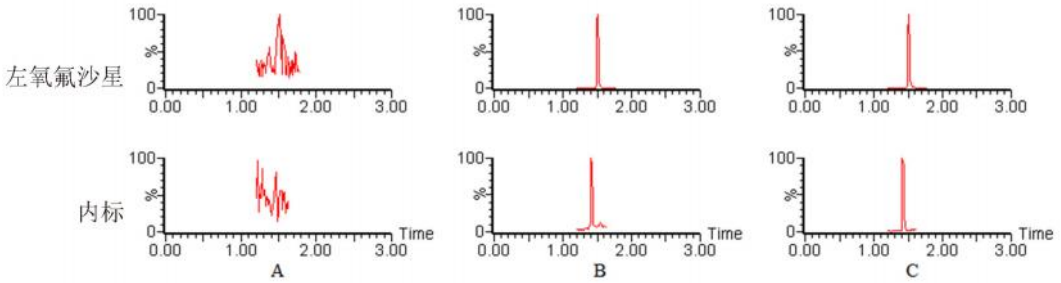


图 1　典型 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig 1　Typical UPLC-MS/MS chromatograms

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋对照品＋内标（blank plasma spiked with levofloxacin and puerarin）；C. 含药血浆＋内标（plasma sample spiked with puerarin）

3.1.2　线性关系及定量下限　大鼠血浆和缓冲液中左氧氟沙星在相应的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系（见表 3）。

表 3　血浆和缓冲液中左氧氟沙星的标准曲线和线性范围

Tab 3　Standard curve and linearity of levofloxacin in plasma and buffer

样品	标准曲线	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	LLOQ/（μg • mL^{-1}）
血浆	$y = 1.0062x + 1.4162$	0.9985	1.002 ～ 30.060	1.002
缓冲液	$y = 0.9470x + 1.3277$	0.9983	1.002 ～ 25.050	1.002

3.1.3　准确度和精密度　左氧氟沙星在大鼠血浆和缓冲液中的日内精密度和日间精密度 *RSD* 均小于 15%，准确度为 89.12% ～ 106.16%，提示该方法准确、可靠、重现性好，符合生物样品分析方法要求（见表 4）。

3.1.4　提取回收率和基质效应　低、中、高三个浓度下左氧氟沙星提取回收率在 91.11% ～ 105.42%，基质效应在 87.99% ～ 103.97%，*RSD* 均小于 15%。结果表明该方法提取回收率良好，不存在明显的基质效应，均满足生物样品分析方法要求（见表 5）。

3.1.5　样品稳定性　左氧氟沙星血浆和缓冲液样品在室温 6 h、冷藏 12 h 和反复冻融 3 次均比较稳定，满足生物样品分析方法要求（见表 6）。

3.2　头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响

左氧氟沙星在 3 μg • mL^{-1}、6 μg • mL^{-1} 下，灌胃头花蓼提取物后，与单用左氧氟沙星组相比，联用组左氧氟沙星的血浆蛋白结合率均显著增加（$P < 0.05$）。随着左氧氟沙星浓度增加，其蛋白结合率均降低（见表 7）。析因方差分析结果见表 8，各因素对左氧氟沙星的蛋白结合率的影响大小为：$F_B > F_A > F_{(A*B)}$，表明作用方式因素对左氧氟沙星的蛋白结合率影响大于浓度因素。

4　讨论

目前，已报道的关于研究药物血浆蛋白结合

表 4　左氧氟沙星在大鼠血浆及缓冲液中的准确度、日内和日间精密度 ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

Tab 4　Accuracy of levofloxacin in the rat plasma and the buffer，intra-day and inter-day precision ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

样品	QC 样品浓度 /（μg・mL^{-1}）	日内			日间		
		浓度 /（μg・mL^{-1}）	精密度（*RSD*）/%	准确度 /%	浓度 /（μg・mL^{-1}）	精密度（*RSD*）/%	准确度 /%
缓冲液	2.505	2.36±0.10	4.1	94.39	2.65±0.17	6.6	106.16
	10.020	8.91±0.48	5.4	89.12	9.16±0.28	3.0	91.61
	20.040	18.84±1.74	9.2	94.21	20.82±1.24	6.0	104.12
血浆	2.505	2.44±0.15	6.1	97.43	2.33±0.22	9.5	93.02
	10.020	8.99±0.75	8.3	89.87	9.41±0.71	7.6	94.15
	25.050	23.39±1.11	4.7	93.58	24.34±1.25	5.2	97.34

表 5　左氧氟沙星在大鼠血浆及缓冲液中的提取回收率和基质效应 ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

Tab 5　Extraction recovery and matrix effect of levofloxacin in the rat plasma and the buffer ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

样品	QC 样品浓度 /（μg・mL^{-1}）	提取回收率		基质效应	
		浓度	*RSD*/%	浓度	*RSD*/%
缓冲液	2.505	91.11±3.19	3.5	87.99±2.46	2.8
	10.020	93.28±3.02	3.2	90.37±4.58	5.1
	20.040	105.42±5.80	5.5	103.97±5.46	5.3
血浆	2.505	95.27±9.74	10.2	101.82±6.35	6.2
	10.020	103.69±6.13	5.9	96.46±4.70	4.9
	25.050	94.19±6.25	6.6	89.10±4.38	4.9

率的方法，主要包括平衡透析法、超滤法、超速离心法、凝胶过滤法等[11]，其中平衡透析法具有操作简单、经济、受实验因素干扰小等优点[12]，故采用最为经典的方法来测定血浆蛋白结合率。据文献报道，血浆蛋白分子量为 69 kD，考虑到血浆中大量内源性物质透析到袋外，可能对血浆蛋白的结合能力有影响，因此本实验采用截留分子量为 8000 ～ 14 000 的 25 kD 透析袋进行实验，效果良好[13]。利用平衡透析法测定蛋白结合率最经典的方法是在透析袋内加入空白血浆，外液放入含药 PBS 溶液，而本文首次将头花蓼提取物多次灌胃后取其血浆研究对左氧氟沙星蛋白结合率的影响。中药具有“多成分、多环节、多途径、多靶点”的作用特点，因此，灌胃后取其血浆更能真实地反映头花蓼口服进入胃肠道后吸收入血的过程，再用体外实验进行蛋白结合率的研究，更能客观反映两药合用后其在体内的蛋白结合情况。

表 6　左氧氟沙星在大鼠血浆和缓冲液中的稳定性 ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

Tab 6　Stability of levofloxacin in the rat plasma and the buffer ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

样品	QC 样品浓度 /（μg・mL^{-1}）	室温 6 h		冷藏 12 h		反复冻融 3 次	
		浓度 /（μg・mL^{-1}）	准确度 /%	浓度 /（μg・mL^{-1}）	准确度 /%	浓度 /（μg・mL^{-1}）	准确度 /%
缓冲液	2.505	2.37±0.21	94.61	2.64±0.23	105.39	2.30±0.21	91.82
	10.020	9.70±0.85	96.81	9.23±1.17	92.12	8.80±0.32	87.82
	20.040	21.16±2.29	105.59	19.60±1.79	97.80	19.08±1.33	95.21
血浆	2.505	2.33±0.22	93.01	2.44±0.32	97.41	2.36±0.24	94.21
	10.020	9.41±0.71	93.91	9.50±1.02	94.81	10.44±1.04	104.19
	25.050	23.09±1.11	92.18	23.87±2.10	95.20	25.60±0.87	102.20

表 7　头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 7　Effect of *Polygonum capitatum* extract on the plasma protein binding rate of levofloxacin ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

检测成分	质量浓度 /（μg・mL^{-1}）	血浆蛋白结合率 /%	
		单用	联用
左氧氟沙星	3	22.53±3.16	43.95±4.14*
	6	20.03±8.00	35.27±6.05*

注（Note）：与单用组相比，$^{*}P<0.05$（Compared with the single group，$^{*}P<0.05$）。

表 8　主效应及交互作用分析结果

Tab 8　Main effect and interaction analysis

源	Ⅲ型平方和	D_f	均方	F	Sig.
校正模型	2261.433	3	753.811	23.592	＜ 0.001
截距	22 246.377	1	22246.377	696.232	＜ 0.001
浓度（A）	187.944	1	187.944	5.882	0.025
作用方式（B）	2016.258	1	2016.258	63.102	＜ 0.001
浓度 * 作用方式（A*B）	57.230	1	57.230	1.791	0.196
误差	639.050	20	31.953	—	—
总计	25 146.860	24	—	—	—
校正的总计	2900.483	23	—	—	—

本实验采用 UPLC-MS/MS 技术结合平衡透析法测定左氧氟沙星的蛋白结合率，结果表明该法可快速、准确地测定左氧氟沙星的含量。本研究采用平衡透析法，对实验平衡时间进行了考察，在 4 ℃ 条件下，平衡 12、24、36、48 和 72 h 后分别测定透析袋内外浓度，结果在平衡 48 h 后，左氧氟沙星与血浆蛋白结合已达到平衡，最终选择 48 h 为平衡时间。同时，本课题组前期药代动力学实验表明，大鼠给予左氧氟沙星后 C_{max} 为（6032.91±1960.11）ng・mL^{-1}，因此，选择 6 μg・mL^{-1} 和 3 μg・mL^{-1} 两个浓度的左氧氟沙星

进行头花蓼提取物对左氧氟沙星蛋白结合率的影响研究[9]。析因方差分析结果表明，两者之间不存在明显的交互作用。其中浓度和作用方式对左氧氟沙星的蛋白结合率均有显著影响，但尚不能认为是两者间的交互作用对左氧氟沙星的蛋白结合率产生影响。

左氧氟沙星的血浆蛋白结合率约为20%～22%，与文献报道血浆蛋白结合率24%～38%存在差异[14]，可能与透析膜的微量吸附有一定关系。另外，左氧氟沙星与大鼠血浆蛋白低度结合，说明其由于血浆蛋白结合率的改变而导致游离药物浓度急剧升高所产生不良反应的可能性不大，因此，增加了与其他药物联用的可能性。药物与血浆蛋白结合的变化影响血液中游离药物浓度，导致药物在体内的分布、代谢、排泄以及目标靶点结合的变化，从而影响药理效应过程。本课题组前期在组织分布与排泄实验中，头花蓼提取物和左氧氟沙星合用后左氧氟沙星在各组织中含量显著降低，尿累积排泄率从 20.69% 下降到 11.84%，粪便累积排泄率从 26.08% 下降到 13.28%[15]。本研究结果表明联合应用头花蓼提取物后左氧氟沙星的蛋白结合率显著增加（$P < 0.05$），药物从血液进入各组织和器官中的药量减少，影响药物在体内的分布和排泄过程，这与前期实验研究结果基本一致。临床研究报道将头花蓼提取物与左氧氟沙星联用来提高其治疗泌尿系统感染的疗效，目前，在药代动力学水平上的研究无法强有力地解释这个问题。药物相互作用可分为药代动力学相互作用和药效学相互作用。在药效学层面，药物如何使机体发挥作用，其作用机制是全面而复杂的，推测可能是由于两种药物对病原菌的协同抑制作用[16-17]，降低细菌在尿路上皮细胞中的黏附能力，加快致病菌排出体外，从而提高疗效，但是这些推测还需要进一步的实验来证实。因此，通过头花蓼提取物对左氧氟沙星血浆蛋白结合率影响的研究，可为两者临床合理用药体内过程研究提供更全面的药代动力学参数，后期可对两者合用的具体机制进行更深入的研究。

参考文献

[1] 张秀芝，闫绍悦，申晓红，等 . 左氧氟沙星的临床应用 [J]. 中国当代医药，2012，19（34）：19-20，23.

[2] 李孟林，梁斌，姚强，等 . 苗药 - 头花蓼研究综述 [J]. 中国医院用药评价与分析，2005，5（6）：383-384.

[3] 房辉，钱辉军 . 热淋清联合左氧氟沙星治疗泌尿系感染的疗效临床研究 [J]. 时珍国医国药，2014，25（4）：899-900.

[4] 沈银奎 . 热淋清颗粒联合左氧氟沙星治疗泌尿系感染 56 例 [J]. 中国药业，2014，23（8）：66-67.

[5] 陈以德，张勇科，龙启，等 . 热淋清联合左氧氟沙星治疗慢性细菌性前列腺炎的临床效果及治疗安全性评价 [J]. 中国当代医药，2018，25（5）：132-134.

[6] 许多，刘梅，杨波，等 . LC-MS/MS 法测定安喘舒丸中腺苷和黄芪甲苷在人血浆中的蛋白结合率 [J]. 中南药学，2016，14（3）：282-285.

[7] 陈桂芬，王英豪，林燕婷 . 基于析因设计解析济川煎对小鼠肠蠕动主效应研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2017，19（5）：56-59.

[8] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1454.

[9] Chen H，Yuan L，Ma X，et al. Herb-drug interaction：the effect of Polygonum capitatum extract on pharmacokinetics of levofloxacin in rats [J]. J Pharmaceut Biomed，2020，195（7）：113832.

[10] 鲍红松，侯靖宇，胡贺佳，等 . 平衡透析法测定羊耳菊提取物中 9 个成分的血浆蛋白结合率 [J]. 中国中药杂志，2019，44（7）：1475-1484.

[11] 关瑾，丁爽，刘芷含，等 . 药物 - 血浆蛋白结合率测定方法的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2014，23（10）：1149-1153.

[12] 燕晓晶，李振国，姜杰，等 . 奥克梯隆型人参皂苷的大鼠血浆蛋白结合率研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（24）：2029-2035.

[13] 卢来春，蒋学华，杨俊毅，等 . 阿莫西林对格列美脲血浆蛋白结合率的影响 [J]. 华西药学杂志，2003（4）：246-250.

[14] 沐宇，石祥奎 . 左氧氟沙星致中枢神经系统不良反应 82 例文献分析 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2019，28（11）：63-66.

[15] Yuan L，Chen H，Ma X，et al. Herb-drug interaction：application of a UPLC-MS/MS method to determine the effect of polygonum capitatum extract on the tissue distribution and excretion of levofloxacin in rats [J]. Evid-Based Compl Alt，2020，2020（3）：1-9.

[16] 杜才伟，倪金花，张亮 . 清淋颗粒辅助左氧氟沙星对尿路感染患者尿液中细菌的清除及炎症因子水平的影响 [J]. 抗感染药学，2020，17（3）：403-405.

[17] Beydokthi SS，Sendker J，Brandt S，et al. Traditionally used medicinal plants against uncomplicated urinary tract infections：hexadecyl coumaric acid ester from the rhizomes of *Agropyron repens*（L.）P. Beauv. with antiadhesive activity against uropathogenic E. coli [J]. Fitoterapia，2017，117：22-27.

（收稿日期：2021-12-08；修回日期：2022-05-27）

基于电子舌技术与人工口尝评价相结合的银杏叶提取物掩味技术研究

薛婉莹[1]，李红鑫[1]，吴婧楠[1]，孙常胜[1]，李思潼[1]，马宏瑞[2]，陈晓娇[2]，孙腾跃[2]，郭杏梅[2]，蔡程科[1*]，王洪飞[2*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 北京量子高科制药科技有限公司，北京　102200）

摘要：目的　研究不同掩味剂单独使用对银杏叶提取物的掩味情况，寻找苦味评价方法。**方法**　以银杏叶提取物水溶液为苦味药物研究载体，以苦度降低值为指标，运用经典人工口尝和电子舌评价法比较纽甜、甜菊苷、三氯蔗糖、阿斯巴甜的掩味效果，并选取不同的浓度，考察加入掩味剂后溶液的苦度变化。**结果**　纽甜在质量浓度范围为 1.25 ～ 5 mg • mL^{-1} 时对于银杏叶的掩味效果变化最为显著（$P < 0.05$），三氯蔗糖和阿斯巴甜对银杏叶的掩味效果也比较显著（$P < 0.05$），甜菊苷对银杏叶没有明显的掩味效果。**结论**　纽甜对银杏叶提取物的掩味效果最好，但纽甜质量浓度超过 3.75 mg • mL^{-1} 时，过于甜腻不能被大多数口尝者接受。

关键词：掩味剂；电子舌；感官评价；苦味评价
中图分类号：R94，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1799-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.014

Taste masking of Ginkgo biloba leaf extract based on the combination of electronic tongue technology and artificial oral tasting evaluation

XUE Wan-ying[1], LI Hong-xin[1], WU Jing-nan[1], SUN Chang-sheng[1], LI Si-tong[1], MA Hong-rui[2], CHEN Xiao-jiao[2], SUN Teng-yue[2], GUO Xing-mei[2], CAI Cheng-ke[1*], WANG Hong-fei[2*] (1. *School of Chinese Meteria Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Beijing* 102200)

Abstract: Objective To determine the flavor masking of Ginkgo biloba leaf extract with different masking agents to find an evaluation method for bitter taste. **Methods** The aqueous solution of Ginkgo biloba leaf extract was taken as the carrier for the study of bitterness, reduction in bitterness as the index, the taste masking effect of neotame, stevia, sucralose and aspartame was compared by the conventioanl oral taste and electronic tongue evaluation. Different concentrations were selected to determine the change of bitterness in the solution after adding the taste masking agents. **Results** The taste masking effect of neosmembrane on Ginkgo biloba leaves was the most significant ($P < 0.05$) at 1.25 ～ 5 mg • mL^{-1}, sucralose and aspartame did show correction effect on Ginkgo biloba leaves ($P < 0.05$), stevia had no obvious taste masking effect on Ginkgo biloba leaves. **Conclusion** The taste masking effect of neotame on Ginkgo biloba leaf extract is the best, but when the concentration of neotame exceeds 3.75 mg • mL^{-1}, it is too sweet and greasy to be accepted by most tasters.

Key words: taste masking agent; electronic tongue; sensory evaluation; bitterness evaluation

中药的成分极其复杂，包括生物碱类、黄酮类、内酯类、苦味肽类、糖苷类、萜类等成分，因成分复杂，异常苦涩，所以口感一直不太能被患者接受，找到能使中药苦度降至大家普遍能接受的方法显得尤为重要[1]。银杏叶作为传统中药，具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘、化浊降脂

基金项目：国家科技重大专项研发项目（No.2011ZX09201-201-15）；北京市科技计划专项研发项目（No.Z16010101390）。
作者简介：薛婉莹，女，硕士，主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究，email：2447310046@qq.com　*通信作者：蔡程科，男，博士，教授，主要从事中药新剂型与新制剂研究，email：cck98@126.com；王洪飞，男，博士，主要从事药物速释制制 的研发和产业化研究，email：bjwhf@vip.sina.com

等作用[2]。现代医学发现银杏叶提取物及其制剂对于治疗心脑血管疾病[3]、阿尔茨海默病[4]和糖尿病肾病[5-6]等疾病具有显著效果。

银杏叶为银杏科银杏（白果树、公孙树）*Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。一般为人工栽培，秋季叶尚绿时采收，及时干燥。银杏叶中含有丰富的黄酮苷类、萜类、生物碱类化合物，这些成分使得银杏叶提取物的药用价值和适用范围十分广泛。但其味道异常苦涩，大大降低了患者的服用适应性，尤其是儿童，其味道可能会导致呕吐等。所以对银杏叶提取物进行掩味是非常有必要的。一般情况下，传统的掩味方式分为以下几种：一种是通过添加掩味剂如高效甜味剂、香精等造成大脑对味觉的混淆，从而对苦味的敏感度降低；另外一种则是通过对制剂进行处理如包衣，制成微囊等降低与味蕾接触的药量或药物浓度，用于延缓或阻止药物在口腔内的溶解[7]。通常来说添加掩味剂是最常用和最简单的掩盖苦味的方法。通过前期的文献调查发现，纽甜、甜菊苷、阿斯巴甜等甜味剂能抑制盐酸小檗碱、黄酮类、生物碱的苦味[8-10]。

甜味物质包含的化合物有很多，且具有各式各样的化学结构，例如糖（蔗糖、葡萄糖），糖醇（山梨醇、甘露醇、木糖醇），肽（阿斯巴甜），蛋白质（单胞素）。甜味剂的效力被定义为蔗糖浓度与甜味剂浓度的比值。如蔗糖和葡萄糖被称为低效价甜味剂，其甜味剂的效力约为 1 或更少（0.6 ～ 0.7）。另一方面，甜味剂效力超过 10 的甜味剂被称为高效甜味剂，如纽甜、三氯蔗糖和阿斯巴甜。对于一些低效价甜味剂，如蔗糖和木糖醇，甜味强度随着浓度的增加而增加。即使同样的效果在低浓度的高效甜味剂时也会发生，但在高浓度的高效甜味剂下，甜味强度的增加会放缓至趋于稳定。由于这些特性，低效甜味剂（如甘露醇和山梨醇）和高效甜味剂（如阿斯巴甜和糖精钠）通常一起用于药物中，以补充甜味度和改善饮用口感。本研究选择了阿斯巴甜和纽甜、甜菊苷、三氯蔗糖这四种甜味剂，利用口尝法和电子舌法探究其对银杏叶提取物的掩味效果，并总结相应的规律，为今后的中药掩味奠定基础。

1　材料

1.1　仪器

SA-402B 型电子舌（日本 Insent 公司）；CP225D 型电子天平（十万分之一，精度：0.01 mg，德国 Sartorius 公司）；JOYN-SXT-02 型索氏提取器（上海乔跃电子科技有限公司）；ADS-800 型吸附树脂（科海司北京科技有限公司）；HHS 型电热恒温水浴锅（上海百典仪器设备有限公司）。

1.2　试药

阿斯巴甜（北京维多化工有限公司，批号：20210424）；纽甜（深圳佳加甜味剂有限公司，批号：20210107）；三氯蔗糖（江西阿尔法高科制药有限公司，批号：20210301）；甜菊苷（曲阜香州甜菊制品有限责任公司，批号:20201107）;银杏叶：2 月采于陕西杨凌，每次采收的银杏叶都及时放入 60 ～ 70 ℃的干燥箱中干燥 24 h，经北京中医药大学中药制剂系蔡程科教授鉴定均符合 2020 年版《中国药典》一部项下有关规定要求；水为纯净水。

2　方法与结果

2.1　银杏叶提取物的制备

取约 1 kg 银杏叶晒干磨成粉，浸于稀乙醇，用索氏提取器加热回流提取，浓缩提取液并回收乙醇。将浓缩提取液用处理后的大孔树脂进行吸附，并用不同浓度梯度的乙醇进行洗脱，收集洗脱液，进行喷雾干燥，回收乙醇并不断浓缩形成浸膏。最后真空干燥，粉碎形成粉末，制得银杏叶提取物粉末。

2.2　盐酸小檗碱溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱 10 g，加水配制成质量浓度为 0.00、0.01、0.05、0.10、0.50 mg • mL^{-1} 的参比液。

2.3　确定苦度评价等级

结合银杏叶的自身特点和查阅文献[11]，确定了苦度值分为五个等级，见表 1，取“2.2”项下的盐酸小檗碱溶液（参比液），给志愿者进行预实验，培训如何对药品的苦味进行评价。

表 1　苦味评价标准

Tab 1　Criteria for bitterness evaluation

等级	口感描述	等级	苦度值	参比液 /（mg • mL^{-1}）
1	几乎没有苦味	Ⅰ	0.5 ～ 1.5	0.00
2	略有苦味	Ⅱ	1.5 ～ 2.5	0.01
3	可接受的苦味	Ⅲ	2.5 ～ 3.5	0.05
4	很苦，但仍然可以忍受	Ⅳ	3.5 ～ 4.5	0.10
5	不能忍受的苦味	Ⅴ	4.5 ～ 5.5	0.50

2.4　样品制备

2.4.1　阳性参比液的配制　取 800 g 自制的银杏叶提取物，加水至 8 L，充分溶解，过滤后，制得阳性参比液。根据志愿者口尝后的综合评分得阳性参比液的苦度值为 5，口感评价为：不能忍受的苦味，且后味非常持久。阳性参比液的苦度值之所以选择 5 是因为选择 3 或 4 的话加入掩味

剂之后苦度值的下降并不会非常明显。

2.4.2　含有掩味剂的样品溶液的制备　取“2.4.1”项下方法制备而成的苦味原液 16 份，每份 400 mL，分别加入纽甜：1.25、2.5、3.75、5 mg•mL^{-1}；三氯蔗糖：5、6.25、7.5、8.75 mg • mL^{-1}；阿斯巴甜：5、7.5、10、12.5 mg • mL^{-1}；甜菊苷：5、10、20、25 mg • mL^{-1}，即得。

2.5　志愿者筛选

经北京中医药大学伦理委员会同意审批后，选择 20 名身体健康的志愿者（10 名男性，10 名女性），对其进行了严格的苦味敏感度筛查，并签署了知情同意书。

2.6　口尝评价法

2.6.1　评价方法　本实验采用口尝评价＋排序法，这是非常常用的评价苦味的方法。首先要先对阳性参比液即未添加掩味剂的溶液进行口尝法评分。首先取 30 mL 的阳性参比液置于纸杯中，由志愿者含入口中，从舌尖至舌根充分感受参比制剂的味道维持 20 s，吐出后漱口 5 次，在志愿者充分感知苦味的时候告知其苦度分级及具体的苦度值。漱口后，确定口中完全无苦味的情况下，方可再次测定样品的苦度值。

参照阳性参比液的测试方法，每轮实验给志愿者测试 4 个样品，按照苦度值从低到高的顺序给样品排序，并结合阳性参比液的苦度值给每个样品一个具体的苦度值，并把志愿者给出的结果记录在药物苦味评分表中。每次志愿者测试完一个样品之后皆要漱口 5 次，待口中完全没有苦味之后 1 ～ 2 min 才能测试下一样品。每两轮样品中间志愿者休息 1 h，并且要保证本实验志愿者测试的样品是随机、单盲的。

2.6.2　异常值的剔除　由于本实验中含有生物样本，且每个受试者之间也会存在个体差异，故导致测试结果中会有异常值。Grubbs 检验法用来判断实验误差，并可将测试结果中的异常值剔除。采用双侧检验，显著水平 $\alpha = 0.05$ 的方式剔除离群值，每一组每一轮仅剔除一个异常值，剔除之后不再进行补充测试。

3　电子舌测定

3.1　SA402B 型电子舌简介

SA402B 型电子舌（日本 Insent 公司）是一种类脂膜电位型电子舌，类脂膜由多种电位型电极组成，与人体味蕾细胞的细胞壁脂质膜类似，能够感知区别不同的样品溶液，感知基本的味道，进而辨识不同的物质。

3.2　仪器参数

采用苦味分析系统 BT0、AN0 共 2 个传感器及 1 个标准电极。传感器经活化、校正后测样。见表 2。

表 2　传感器说明

Tab 2　Descriptions of sensor

序号	传感器名称	性能描述
1	BT0	碱基盐类苦味（H-bitterness）
2	AN0	碱性苦味（B-bitterness 2）

3.3　电子舌测试程序

3.3.1　样品处理方法　将 35 mL 样品置于 50 mL 离心管超声 20 min，待充分溶解后测试，将待测样品稀释 10 倍后取 35 mL 样品置于电子舌特定样品杯中测试。

3.3.2　SA402B 型电子舌测试　平衡：传感器先在清洗液中清洗 90 s，阳性参比液清洗 120 s、继续用含有酒石酸的氯化钾溶液（精密称取 1.12 g 氯化钾和 0.024 g 酒石酸，溶于 250 mL 蒸馏水中，充分溶解后置 500 mL 量瓶中定容）清洗 120 s，传感器在平衡位置归零 30 s。

测试：测试时间 30 s，输出先味值；后用含有酒石酸的氯化钾溶液清洗 3 s，传感器插入新的阳性参比液中测试回味 30 s，循环测试 4 次，去掉第一次循环，取后 3 次平均数据作为测试结果。

4　结果与讨论

4.1　口尝法评价不同掩味剂对银杏叶的掩味结果

对“2.4.2”项下方法制备的样品进行口尝法测试，通过 Grubbs 的检验，用 t 检验评价得到不同浓度不同掩味剂对于银杏叶阳性参比液掩味前后的差别，结果见图 1。

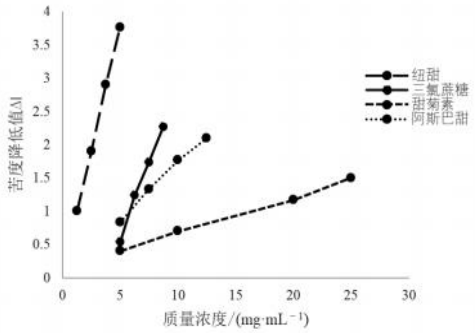


图 1　不同浓度不同掩味剂的苦度值结果

Fig 1　Bitterness of different masking agents at different concentrations

4 种掩味剂抑制苦味的效果和浓度变化的趋势是一致的，随着质量浓度逐渐增大，苦度值随之减小。纽甜在质量浓度 1.25 ～ 5 mg • mL^{-1} 时对于银杏叶的掩味效果变化最为显著，三氯蔗糖和

阿斯巴甜对银杏叶苦味的掩味效果相当，甜菊苷对银杏叶苦味没有明显的掩味效果。

随着纽甜用量的增多，虽然银杏叶的苦味有明显下降，甜度逐渐上升，在纽甜质量浓度超过 3.75 mg • mL^{-1} 时，据口尝者反馈，甜度过高，逐渐影响口尝者喜好，其甜苦相间的口感会使得口尝者感到不适。综合苦度值的下降和口尝者的描述，纽甜作用在银杏叶掩味的最佳质量浓度为 3.75 mg • mL^{-1}。

对纽甜、三氯蔗糖、甜菊苷和阿斯巴甜的 4 种浓度对数与苦度降低值进行线性拟合，结果见表 3，4 种掩味剂在实验浓度下掩味效应与浓度的关系符合韦伯 - 费希纳定律，这说明感觉强度与浓度的对数是成正比的，银杏叶苦度值的下降与掩味剂的浓度也成正比。

表 3　4 种掩味剂的苦度降低值与浓度间的关系模型拟合方程

Tab 3　Model fitting equation for the relationship between bitterness reduction and concentration of 4 taste masking agents

掩味剂种类	最大苦度降低值	对数拟合方程
纽甜	3.77	$\triangle I = 4.2306\log C + 0.2802$
三氯蔗糖	2.27	$\triangle I = 7.0433\log C - 4.3901$
甜菊苷	1.50	$\triangle I = 1.5099\log C - 0.7184$
阿斯巴甜	2.10	$\triangle I = 3.1891\log C - 1.4184$

4.2　电子舌法评价结果

本实验通过对阳性参比液和加入不同浓度掩味剂的样品进行电子舌测试，测得 BT0 碱基盐类苦味和 AN0 碱性苦味。

电子舌对阳性参比液的 AN0 的测试结果为－1.14，说明 AN0 传感器对于银杏叶的苦味并无响应，加入不同的掩味剂结果也是负数，说明 AN0 传感器得到的结果不能作为掩味效果的依据。电子舌对阳性参比液的 BT0 测试结果为 6.09，银杏叶和加入不同的掩味剂的样品均对 BT0 传感器有明显响应，见表 4。纽甜和甜菊苷随着浓度的增大苦度值 I_e 也增大，但对于三氯蔗糖和阿斯巴甜来说随着浓度的增大 I_e 是减小的。所以本文选择 BT0 传感器进行研究。纽甜的浓度变化引起的 BT0 苦味值变化最为剧烈，所以可以初步判断纽甜对于银杏叶的掩味效果最为明显。

表 4　各掩味剂 BT0 碱基盐类苦味结果

Tab 4　Bitterness of BT0 base salts of each taste masking agent

掩味剂种类	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4
纽甜	8.58	11.47	13.59	16.40
三氯蔗糖	5.39	4.38	4.95	4.91
甜菊苷	5.04	5.23	5.68	6.22
阿斯巴甜	11.53	10.99	10.96	10.28

5　讨论

人工口尝法得到的结果是纽甜对银杏叶的掩味效果最佳，纽甜有高甜度、无后苦、低热量等优点，并且对多类中药都具有较好的掩味效果，人的感官在分辨力和敏感度等方面均存在个体差异，对于甜度的喜好也各不相同，所以掩味的时候不是甜度越高越好，应当设置一个合理的范围。电子舌是一种新兴的仿生仪器，多应用于食品口感评价 [12] 和药物味道辨识 [13-14] 等方面，有关电子舌在评价药物的掩味方面的研究相对较少，尤其是中药，更缺乏相对丰富的理论与技术支持。如同本实验，在结合人的感官评判和电子舌的实验结果后，也发现了一些问题，本实验所选择的掩味剂和阳性参比液都是比较简单的体系，比较容易从电子舌的测试结果中找出规律，但是并不是所有的苦味传感器都能有所响应，考虑 AN0 传感器不能应答的原因可能与掩味剂及银杏叶的质量浓度或其固有属性如分子结构相关，实验设计掩味剂主要有阻断味蕾，增甜，混淆大脑对苦味感官等抑制苦味的原理，银杏叶溶于水后比较黏，有些物质可能吸附在传感器上，减少了苦味物质与传感器的接触，影响了电势，或者与电子舌本身性质也有关系。综上所述，电子舌仍需进行优化和改进，才能更好地应用于评价药物的掩味效果，单独使用电子舌对类似的制剂进行处方筛选，发挥其客观、快速、稳定、标准的优点。

本实验电子舌和口尝法两种方法各有优缺点，且得到的结果也都具有参考意义，口尝法能够利用得到的数据拟合出方程和曲线，方便我们对掩味剂的浓度对其掩味效果进行预测，而电子舌得出的实验结果与口尝法的结果也有相似之处，但局限于特定的载体和特定的味觉传感器，本实验揭示了 4 种掩味剂抑制银杏叶苦味的规律，对中药的掩味研究具有一定的参考意义，然而中药的苦味成分非常复杂，本实验所建立的方法仍需要进一步研究。

参考文献

[1] 李学林，张杏芬，刘瑞新 . 中药汤剂掩味技术探讨 [J]. 中医研究，2012，25（12）：67.

[2] 丁之恩 . 银杏 [M]. 北京：中国农业出版社，1997：25-37.

[3] 李淑琴，朱嘉宝，武宇洲，等 . 银杏叶提取物防治心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2016，25（1）：76-81.

[4] 郝新宇 . 银杏叶提取物治疗老年痴呆症的疗效观察 [J]. 中国老年保健学，2017，15（1）：58-59.

[5] 庞欣欣，张雅歌，石秀杰，等 . 银杏叶提取物对糖尿病肾病的治疗进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2019，20（4）：372-374.
[6] Xu AH，Chen HS，Sun BC，et al. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer [J]. World J Gastroenterol，2003，9（11）：2424-2427.
[7] 王优杰，冯怡，徐德生 . 中药复方掩味技术初步研究 [J]. 中国中药杂志，2007，32（13）：1285-1288.
[8] 张璐，施钧瀚，康冰亚，等 . 纽甜对 5 种苦味中药的掩味效果 [J]. 世界科学技术（中医药现代化），2014，16（9）：1904-1907.
[9] 康冰亚，施钧瀚，张璐，等 . 两种掩味剂对苦参水煎液的掩味作用考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（15）：4-7.
[10] 施钧瀚，张杏芬，仇继玺，等 . β- 环糊精对几种苦味中药的掩味作用考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（12）：1-4.
[11] 李学林，张杏芬，刘瑞新，等 . 药物苦度的定量及其与浓度的关系研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现化，2013，15（4）：667-671.
[12] Kim YE，Kim Y，Son HJ，et al. Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking [J]. Food Chem，2017，233（5）：256-262.
[13] Abu-Khalaf N，Zaid AN，Jaradat N，et al. The taste of commercially available clarithromycin oral pharmaceutical suspensions in the palestinian market：electronic tongue and in vivo evaluation [J]. Sensors（Basel），2018，18（2）：454-456.
[14] Coupland JN，Hayes JE. Physical approaches to masking bitter taste：lessons from food and pharmaceuticals [J]. Pharm Res，2014，31（11）：2921-2939.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-06）

1- 脱氧野尻霉素对高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的血糖和内质网应激通路的影响

周碧兰[1]，彭电[1]，曾慧[1]，李海刚[2]（1. 长沙卫生职业学院药学院，长沙　410600；2. 长沙医学院新型药物制剂研发湖南省重点实验室，长沙　410219）

摘要：目的　研究 1- 脱氧野尻霉素（DNJ）对高脂饮食联合链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病小鼠血糖和胰岛损伤的影响，并从内质网应激通路的角度对其机制进行研究。**方法**　采用高脂饮食喂养联合腹腔注射 STZ（35 mg • kg^{-1}）的方法建立糖尿病小鼠模型，将造模成功的糖尿病小鼠随机分为糖尿病组（生理盐水）、二甲双胍组（300 mg • kg^{-1}）、DNJ 组（60 mg • kg^{-1}）、正常对照组（生理盐水），四组小鼠每日 9：00 灌胃一次，每周分别测量各组小鼠的血糖水平和体质量情况，并在给药结束后分别进行口服葡萄糖糖耐量（OGTT）实验和腹腔注射胰岛素耐受（IPITT）实验，同时收集小鼠血浆测定各组小鼠胰岛素水平。此外，结合苏木精 - 伊红染色观察小鼠胰腺组织病理学变化，Western blot 法检测各组小鼠胰腺组织中内质网应激反应 PERK 通路和 IRE1α 通路蛋白表达水平的变化。**结果**　与糖尿病组小鼠相比，DNJ 组小鼠的血糖水平在连续给药后的第 21 日和 28 日明显降低。OGTT 实验结果表明 DNJ 组小鼠的糖耐量水平较糖尿病组小鼠明显改善，IPITT 结果显示 DNJ 能降低糖尿病小鼠的胰岛素水平，改善胰岛素抵抗。苏木精 - 伊红染色结果显示 DNJ 能改善糖尿病小鼠的胰岛损伤。Western blot 结果表明 DNJ 明显下调糖尿病小鼠胰腺组织中 IRE1α、p-JNK、p-PERK 和 p-eIF2α 蛋白的表达。**结论**　DNJ 具有降血糖、改善糖尿病小鼠胰岛素抵抗和减轻胰岛损伤的作用，其作用机制与调控内质网应激反应中 IRE1α 和 PERK 通路中的蛋白表达有关。

关键词：1- 脱氧野尻霉素；糖尿病；血糖；胰岛素；内质网应激
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1803-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.015

基金项目：长沙市自然科学基金项目（No.kq2014030）。
作者简介：周碧兰，女，讲师，主要从事糖尿病药物研究，email：1067656137@qq.com

Effect of 1-deoxynojirimycin on blood glucose and endoplasmic reticulum stress pathways in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic mice

ZHOU Bi-lan[1], PENG Dian[1], ZENG Hui[1], LI Hai-gang[2] (1. *School of Pharmacy, Changsha Health Vocational College, Changsha* 410600; 2. *Hunan Key Laboratory of the Research and Development of Novel Pharmaceutical Preparations, Changsha Medical University, Changsha* 410219)

Abstract: Objective To determine the effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on the blood glucose and islet damage in diabetic mice induced by high-fat diet combined with streptozotocin (STZ), and explore its mechanism via the regulation of endoplasmic reticulum stress pathways. **Methods** Diabetic model mice were induced by high-fat diet combined with intraperitoneal injection of STZ (35 mg • kg $^{-1}$), and were randomly divided into 4 groups: a diabetes group (normal saline), a metformin group (300 mg • kg $^{-1}$), a DNJ group (60 mg • kg $^{-1}$), and a normal control group (normal saline). The mice in the 4 groups were given gavage once daily at 9: 00 am, and the blood glucose level and body weight of mice in each group were measured every week. At the end of the drug intervention, the oral glucose tolerance test (OGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) were performed respectively. At the same time, the plasma of the mice in each group was collected to determine the insulin level. In addition, the pancreatic tissues of the mice in each group were stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the pathological changes in the pancreas, and Western blot was used to detect the protein levels of PERK pathway and IRE1α pathway in the pancreatic tissues of the mice. **Results** Compared with the mice in the diabetes group, the blood glucose levels were significantly decreased on the 21st and 28 th days in the DNJ group. The OGTT showed that DNJ significantly improved the glucose tolerance levels compared with the diabetic group. DNJ also reduced the insulin levels in diabetic mice and improved insulin resistance in the IPITT test. HE staining showed that DNJ improved the islet damage in the diabetic mice. DNJ significantly down-regulated the expression of IRE1α, p-JNK, PERK and eIF2α proteins in the pancreatic tissues of the diabetic mice. **Conclusion** DNJ demonstrates a hypoglycemic effect, improves insulin resistance, and reduces islet damage in diabetic mice, whose mechanism may be associated with the down-regulation of the IRE1α and PERK pathways in the endoplasmic reticulum stress.

Key words: 1-deoxynojirimycin; diabetes melitus; blood glucose; insulin; endoplasmic reticulum stress

糖尿病是一种由胰岛素分泌或作用缺陷所引起的以高血糖为重要特征的慢性疾病，主要分为 1 型和 2 型 [1]。近年来，糖尿病患病率逐年增加，并呈现年轻化的趋势，国际糖尿病联合会统计的数据显示 2017 年全球大约有 4.15 亿糖尿病患者，2045 年将超过 6.29 亿 [2-4]。糖尿病患者由于糖代谢紊乱易导致糖尿病肾病、视网膜病变、糖尿病足等一系列并发症的发生，严重影响患者生存率 [5-7]。

研究证实，糖尿病患者体内的胰岛β细胞数量的减少是导致其胰岛功能受损的重要原因，其与β细胞内发生的内质网应激反应密切相关 [8]。内质网是蛋白质合成和加工的重要细胞器，当合成新蛋白质的需求与内质网促进蛋白质成熟和转运的能力失去平衡之后，易导致内质网应激的发生，而在胰岛β细胞中，存在着高度发达的内质网系统 [9]，尤其是在 2 型糖尿病患者体内的胰岛β细胞中，由于发生胰岛素抵抗，机体内代偿性胰岛素分泌增多，增加了内质网的负担，并且存在高游离脂肪酸和高糖的刺激，从而诱导了β细胞发生内质网应激反应甚至凋亡 [10]，因此，严重的内质网应激是加剧糖尿病胰岛损伤的一个重要机制，积极研发具有减轻胰岛β细胞内质网应激进而减轻胰岛损伤作用的新型控糖药物，对于改善糖尿病患者的生活质量具有十分重要的意义，也能为糖尿病患者提供更多的用药选择。

1- 脱氧野尻霉素（1-deoxynojirimycin，DNJ）

是一种多羟基生物碱成分，存在于桑叶、鸭跖草、风信子和沙参属等植物中，也可从微生物链霉菌和芽孢杆菌中分离得到[11-12]。近年来，多项研究结果表明 DNJ 具有抑制糖代谢紊乱的作用[13-15]，但 DNJ 在糖尿病模型鼠中是否能降低血糖水平、减轻胰岛组织损伤并改善胰岛素抵抗值得我们探究，由于内质网应激可诱导胰岛细胞损伤后进一步引起糖尿病恶化，本研究将进一步探讨 DNJ 对糖尿病的作用是否与调控内质网应激反应及其下游通路蛋白水平有关。

1 材料

1.1 实验动物

实验动物 C57BL/6 小鼠，雄性，鼠龄 5 ～ 6 周，40 只，体质量（18±4）g [南京大学模式动物研究所]。小鼠购入后在动物房适应性喂养 1 周，严格遵守动物管理条例，按照标准条件饲养 [动物房温度（25±3）℃；相对湿度 50% ～ 65%]。昼夜节律照明，并给予小鼠自由饮水和适量的饲料。

1.2 试药与仪器

DNJ、链脲佐菌素（STZ）、4% 多聚甲醛固定液和胰岛素 ELISA 检测试剂盒（美国 Sigma 公司）；盐酸二甲双胍片（浙江亚太药业股份有限公司）；血糖仪和血糖试纸（美国强生公司）；β-actin、p-PERK、p-eIF2α、IRE1α、p-JNK 等抗体和 HRP 标记的二抗（美国 Cell Signaling Technology 公司）；胰岛素注射液（江苏万邦生化医药股份有限公司）；葡萄糖（阿拉丁试剂有限公司）；水合氯醛（上海尚宝生物科技有限公司）；HE（苏木精 - 伊红）染色试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司）；高脂饲料（南通特洛菲饲料科技有限公司，主要成分为面粉、麸皮、玉米、豆粕、玉米、食盐、氨基酸、猪油、蔗糖、胆固醇、各种维生素及微量元素等）；彼爱姆 BM-38XD 倒置荧光显微镜（南京东迈科技仪器有限公司）；酶标仪（Thermo Scientific 公司）；台式高速制冷离心机（上海圣科仪器设备有限公司）。

2 方法

2.1 小鼠分组给药及血糖、体质量测定

选取 30 只正常的雄性 C57BL/6 小鼠建立糖尿病模型，在高脂饲料连续喂养 4 周后，小鼠空腹过夜，每日腹腔注射诱导剂 STZ（35 mg • kg^{-1}），连续 1 周。另选 10 只正常组小鼠普通饲料喂养 4 周后每日腹腔注射同等剂量的柠檬酸盐缓冲液（pH 4.4），连续 1 周。各组小鼠连续注射一周后尾静脉采血法检测小鼠血糖浓度，若连续 3 d 随机检测到的小鼠血糖水平值均大于 16.7 mmol • L^{-1}，则认为糖尿病造模成功。将造模成功的小鼠随机分成糖尿病组（DM 组，生理盐水）、二甲双胍组（MFM 组，300 mg • kg^{-1}）、1- 脱氧野尻霉素组（DNJ 组，60 mg•kg^{-1}），并另设正常对照组（NC 组，生理盐水），四组小鼠每日灌胃给药一次，在给药的第 0、7、14、21 和 28 日分别用血糖仪和试纸测定各组小鼠血糖水平，并称量各组小鼠体质量。

2.2 口服葡萄糖耐量实验和腹腔注射胰岛素耐受实验

在药物干预的第 28 日进行口服葡萄糖耐量实验（OGTT）：将各组小鼠禁食不禁水处理过夜，次日 10 点灌胃给予质量浓度为 0.2 g • mL^{-1} 的葡萄糖溶液（2 g • kg^{-1}，t = 0 h）。在药物干预的第 29 日进行腹腔注射胰岛素耐受实验（IPITT）：将各组小鼠禁食不禁水处理 4 h，腹腔注射 0.05 U•mL^{-1} 的胰岛素溶液（0.5 U•kg^{-1}，t = 0 h）。以上两项操作完成后分别在 t = 0 h 和给予葡萄糖或者胰岛素后 0.25、0.5、1、1.5、2 h 时尾静脉取血检测各个时间点的血糖值，并计算曲线下面积（*AUC*）。

2.3 胰岛素水平测定

腹腔注射 10% 的水合氯醛（300 mg • kg^{-1}）对各组小鼠进行麻醉，待小鼠失去知觉和行动能力后再用手术剪剪开小鼠胸腔，采用 5 mL 注射器进行心脏取血，并将全血标本转移至含有 EDTA 的抗凝管中，再在冷冻离心机中以 3000 r • min^{-1} 离心 5 min，吸取上清得到待测的血浆样品。随后按照胰岛素 ELISA 检测试剂盒中的步骤进行操作，用酶标仪检测各组小鼠血浆样品在 450 nm 波长处的吸光度值，并依据胰岛素标准曲线计算各组小鼠血浆中胰岛素的水平。

2.4 胰腺组织的苏木精 - 伊红染色

将各组实验小鼠解剖后，取小鼠胰腺的部分胰尾组织，用 4% 的多聚甲醛溶液进行固定后用石蜡包埋切片，再用苏木精和伊红染料进行染色，然后用显微镜观察胰腺组织的形态，胰岛的横断面面积用 Image Plus 6.0 软件分析。

2.5 Western blot 法检测 IRE1α 和 PERK 通路中相关蛋白的表达水平

将各组小鼠的胰腺组织用 RIPA 裂解后再超声破碎，4 ℃ 5000 r • min^{-1} 离心 10 min，吸取上清溶液用 BCA 法测定蛋白质含量后，配制适宜浓度的 SDS-PAGE 胶进行 Western blot 实验，分别检测

IRE1α 和 PERK 通路中相关蛋白表达水平的变化。

2.6　统计学检验

实验数据用平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。数据采用 SPSS 软件进行分析，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组比较采用单因素方差分析，若 $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　DNJ 对糖尿病小鼠体质量的影响

造模前，各组小鼠体质量无差异，而造模成功后，随着周龄的增加，正常对照组小鼠体质量逐渐增加，而糖尿病组小鼠体质量增长缓慢，与正常对照组小鼠相比较有减轻的趋势，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与糖尿病组小鼠比较，灌胃给予二甲双胍的第 14、21 和 28 日，可产生延缓糖尿病小鼠体质量增长的作用（$P < 0.05$），但灌胃给予 DNJ 的小鼠体质量变化不明显（$P > 0.05$），见表 1。

表 1　不同组小鼠体质量变化情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes in body mass of mice in different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	造模前体质量 /g	造模后体质量 /g				
			0 日	7 日	14 日	21 日	28 日
NC 组	10	13.2±0.1	25.9±0.3	26.3±0.2	26.9±0.6	27.3±0.8	27.8±0.4
DM 组	8	12.9±0.3	23.1±0.4	24.6±0.1	25.4±0.3	25.6±0.5	26.4±0.3
MFM 组	10	13.1±0.2	22.9±0.3	22.6±0.4	22.5±0.2*	22.3±0.4*	22.2±0.1*
DNJ 组	9	13.0±0.3	22.8±0.2	23.1±0.5	22.9±0.1	23.4±0.2	23.8±0.6

注：与 DM 组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the DM group，$^{*}P < 0.05$.

3.2　DNJ 对糖尿病小鼠血糖和胰岛素水平的影响

正常对照组小鼠的血糖随鼠龄增加而稳定，始终低于 11.1 mmol • L^{-1}，而糖尿病组小鼠的血糖水平明显高于正常对照组小鼠（$P < 0.05$）。与糖尿病组小鼠相比，在灌胃给予阳性药物二甲双胍第 7、14、21、28 日后，小鼠血糖水平明显下降，血糖下降幅度随着给药时间的增加而有所增大（$P < 0.05$）。DNJ 组小鼠的血糖在第 0、7 和 14 日时与糖尿病组相比差异无统计学意义，而在第 21 日和 28 日时血糖水平明显低于糖尿病组小鼠（$P < 0.05$，见图 1A）。

在高脂饮食联合 STZ 诱导的 2 型糖尿病鼠内，由于存在胰岛素抵抗导致其促葡萄糖分解代谢的作用减弱，促使胰岛素代偿性分泌增多以维持血糖浓度相对稳定。由图 1 可知，糖尿病组小鼠的胰岛素水平也明显高于正常组小鼠，给予二甲双胍或 DNJ 后都能降低糖尿病小鼠的胰岛素水平，在一定程度上改善糖尿病小鼠的胰岛素抵抗（$P < 0.05$，见图 1B）。

3.3　DNJ 对糖尿病小鼠 OGTT 和 IPITT 的影响

在 OGTT 实验中，分别灌胃 2 g • kg^{-1} 葡萄糖后，各组小鼠在 0.25 h 时的血糖水平较 0 h 时显著升高（$P < 0.05$，见图 2A）。正常对照组小鼠的血糖水平在餐后 1 h 时明显恢复，并在 2 h 时接近正常水平，但糖尿病组小鼠的血糖在餐后 2 h 仍维持在较高的水平，糖耐量水平异常。二甲双胍组小鼠

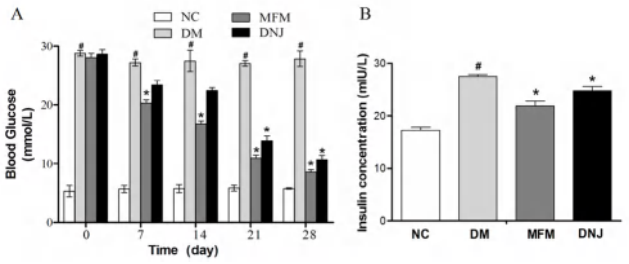


图 1　DNJ 对糖尿病小鼠血糖和胰岛素水平的影响

Fig 1　Effect of DNJ on blood glucose and insulin levels in diabetic mice

注：与 NC 组比较，$^{\#}P < 0.05$；与 DM 组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

在口服葡萄糖后的血糖水平较模型组小鼠显著降低（$P < 0.05$），而 DNJ 组小鼠在餐后 0.25 h 和 0.5 h 的血糖水平与糖尿病组小鼠相比差异无统计学意义，但从餐后 1 h 开始的血糖值明显低于糖尿病组小鼠，并在餐后 2 h 时接近于餐前水平（$P < 0.05$）。从各组小鼠血糖随时间变化曲线的面积值情况来看，糖尿病组小鼠的 *AUC* 较正常对照组小鼠明显增大，而二甲双胍组小鼠的 *AUC* 面积较糖尿病组小鼠显著下降，DNJ 也能在一定程度上恢复糖尿病小鼠的糖耐量水平（$P < 0.05$，见图 2B）。

在 IPITT 实验中，各组小鼠在注射胰岛素后的 0.25 h 达到血糖最低值，在 0.5 h 有小幅度回升，在 1 ～ 2 h 这段时间内基本恢复到原有水平。糖尿病组小鼠在注射胰岛素后的血糖水平明显高于正常对照组小鼠，给予二甲双胍或 DNJ 后，小鼠血

糖水平较糖尿病小鼠有所降低（$P < 0.05$，见图 2C）。从 IPITT 的 *AUC* 图中可知，糖尿病组小鼠的 *AUC* 明显大于正常对照组，出现了胰岛素不耐受的表现，而二甲双胍和 DNJ 均能降低糖尿病小鼠的 *AUC*（$P < 0.05$，见图 2B），这说明二甲双胍和 DNJ 能增加糖尿病小鼠对胰岛素的敏感性。

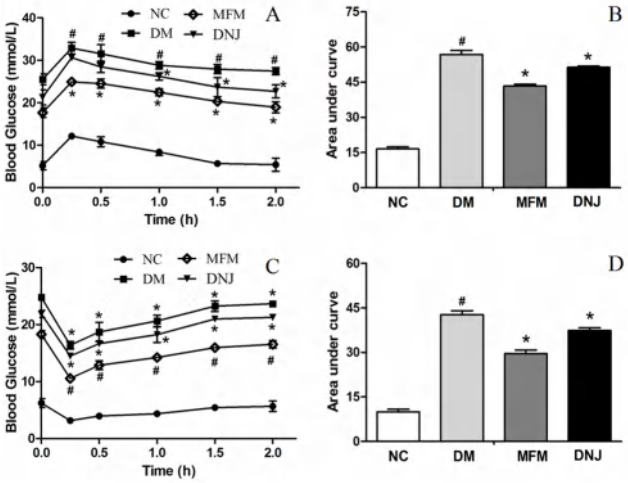


图 2　DNJ 对糖尿病小鼠 OGTT 和 IPITT 的影响

Fig 2　Effect of DNJ on OGTT and IPITT in diabetic mice

注：与 NC 组比较，$^{\#}P < 0.05$；与 DM 组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.4　DNJ 改善糖尿病小鼠胰岛损伤

HE 染色观察各组小鼠胰腺组织中胰岛部分的形态病理学改变，与正常对照组小鼠相比，糖尿病组小鼠的胰岛分布稀疏，胰岛数量和面积明显减少。由图 3 可知，二甲双胍组小鼠的胰岛形态和分布比糖尿病小鼠的更加规则，胰岛面积有所增加。DNJ 也能增加糖尿病小鼠的胰岛面积，改善糖尿病小鼠的胰岛损伤。

3.5　DNJ 调控糖尿病小鼠 IRE1*α* 和 PERK 通路中相关蛋白表达水平

由图 4 可知，糖尿病小鼠胰腺组织中的 IRE1*α* 蛋白水平明显上调，给予药物二甲双胍或 DNJ 后都能明显下调 IRE1*α* 蛋白的表达。与正常对照组小鼠相比，糖尿病小鼠胰腺组织中的 IRE1*α* 蛋白通路中的下游蛋白 JNK 的磷酸化水平显著升高。与糖尿病组小鼠相比，二甲双胍组和 DNJ 组小鼠胰腺组织中的 p-JNK 蛋白水平均明显降低（$P < 0.05$，见图 4A 和 4B）。

与正常对照组小鼠相比，糖尿病小鼠胰腺组织中的 p-PERK 和 p-eIF2*α* 蛋白表达水平显著性升高。给予二甲双胍后，p-PERK 和 p-eIF2*α* 的蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$）。与糖尿病组小鼠相比，DNJ 也能抑制小鼠胰腺组织中 p-PERK 和 p-eIF2*α* 的高表达（$P < 0.05$，见图 4C 和 4D）。

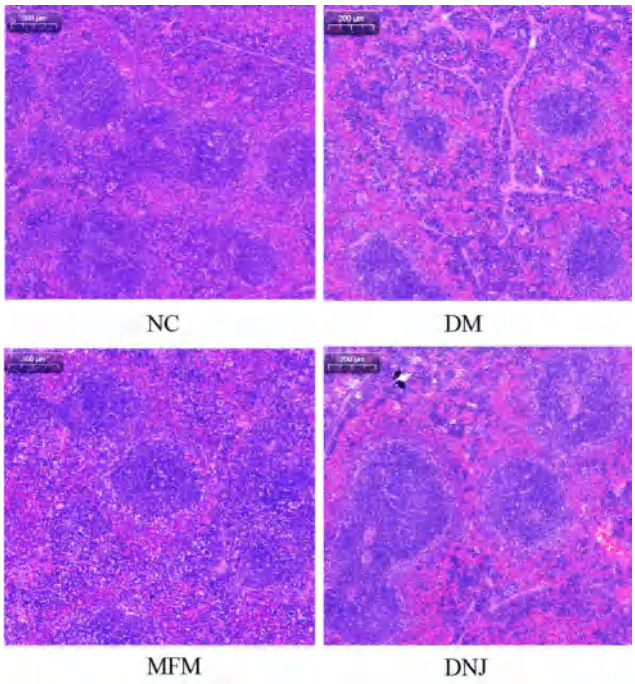


图 3　不同组小鼠胰腺组织 HE 染色图

Fig 3　HE staining of pancreatic tissue of mice in different groups

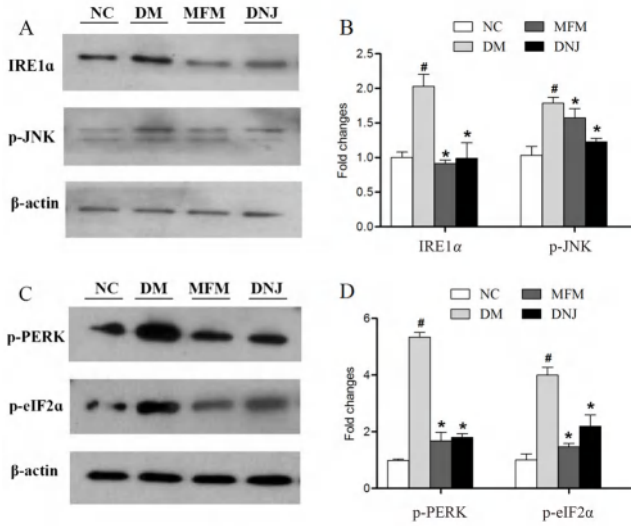


图 4　DNJ 对糖尿病小鼠 IRE1*α* 和 PERK 通路蛋白表达的影响

Fig 4　Effect of DNJ on the expression of the IRE1*α* and PERK pathways in diabetic mice

注：与 NC 组比较，$^{\#}P < 0.05$；与 DM 组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

4　讨论

糖尿病是一种以多饮、多食、多尿和体质量减轻等症状表现为主的代谢性疾病，患者体内持续的高血糖易损伤其心血管和神经系统，导致心

脑血管疾病、肾病、视网膜病等并发症的发生[16]。目前我国已成为糖尿病大国，且 2 型糖尿病占糖尿病总体人群的 90% 以上[4]，研发新型控糖药物对于改善糖尿病患者的生活质量具有十分重要的意义。本研究采用化学诱导剂 STZ 联合高脂食物喂养诱导小鼠发生 2 型糖尿病，探讨 DNJ 对糖尿病的影响及可能的作用机制。本课题组的研究与以往关于 DNJ 的降糖作用研究所用动物模型有一定区别，研究结果也有所不同，以往关于 DNJ 的研究主要集中在其对 STZ 诱导的 1 型糖尿病模型鼠、基因突变型糖尿病鼠、糖尿病肾病大鼠的作用。如 Hu 等[17]研究发现从桑叶中提取分离的 DNJ 能改善 STZ 诱导的 1 型糖尿病模型鼠的葡萄糖代谢和肠道微生物群水平。另一项研究则表明桑叶中 DNJ 能有效抑制分解糖类酶的活性，阻止葡萄糖的吸收[13]。姚佳等[18]研究发现 DNJ 还具有降低糖尿病肾病大鼠的血糖和减轻肾损伤的作用。本课题组的研究结果表明 DNJ 在给药的第 7 日和 14 日对小鼠血糖无影响，但在第 21 日和 28 日时能显著下调糖尿病小鼠的血糖水平，DNJ 对糖尿病小鼠的体质量无明显作用，造成这一情况的原因可能是 DNJ 是一种生物碱成分，起效较缓慢。在给药结束后，我们对小鼠血液中的胰岛素水平进行测定，研究结果表明糖尿病小鼠体内由于存在胰岛素抵抗导致胰岛素代偿性的分泌增加[14，16]，二甲双胍和 DNJ 都能降低糖尿病小鼠的胰岛素抵抗，这说明了胰岛素作为机体内唯一的降血糖激素，在维持糖尿病小鼠血糖稳态方面发挥了重要作用。糖尿病患者存在糖代谢紊乱和胰岛素不耐受的情况，课题组通过 OGTT 实验和 IPITT 实验发现 DNJ 能改善糖尿病小鼠的糖耐量，增加小鼠对胰岛素的敏感性，在延缓糖尿病进程方面具有重要意义。

近年来有研究结果表明 DNJ 可通过不同机制改善血糖水平或胰岛素抵抗。如 Li 等[19]研究发现 DNJ 通过调控 IR-GlUT4 和 ADIPO-GLUT4 通路维持 3T3-L1 脂肪细胞内的葡萄糖稳态水平。Liu 等[20]研究发现 DNJ 通过激活 PI3K/AKT 通路减轻 db/db 型糖尿病小鼠的胰岛素抵抗。在 2 型糖尿病患者的胰岛 β 细胞内由于发生胰岛素抵抗，机体内代偿性胰岛素分泌增多，增加了内质网的负担，此时内质网中的分子伴侣蛋白结合这些代偿性产生或错误折叠的蛋白质如胰岛素，使 IRE1α、PERK 等蛋白被释放并磷酸化而激活，进而使得它们的下游信号通路蛋白如 JNK、eIF2α 等被激活，从而诱发胰岛 β 细胞发生凋亡[21-22]。IRE1α-JNK 通路的下调有助于内质网的稳态，减轻内质网应激反应[23]，此外，PERK-eIF2α 信号通路的调控可选择性地减少蛋白质的翻译，进而阻止新合成的蛋白质进入内质网从而减轻内质网的压力[24]，因此本课题组检测了 DNJ 对 IRE1α、p-JNK、p-PERK 蛋白和下游效应器 p-eIF2α 蛋白表达的影响，结果表明糖尿病小鼠胰腺组织中内质网应激反应相关蛋白 IRE1α、p-JNK、PERK 和 eIF2α 的表达水平明显升高，给予药物 DNJ 可下调这些蛋白的表达，说明内质网应激可导致胰岛损伤，与糖尿病的发生发展密切相关，而 DNJ 可减轻内质网应激反应，改善 2 型糖尿病小鼠的胰岛损伤。

5　结论

本研究表明 DNJ 可通过下调糖尿病小鼠胰腺组织中 IRE1α、p-JNK、PERK 和 eIF2α 蛋白的表达，进而减轻内质网应激反应，发挥降低 2 型糖尿病小鼠血糖、改善胰岛素抵抗和减轻小鼠胰岛损伤的作用（见图 5）。

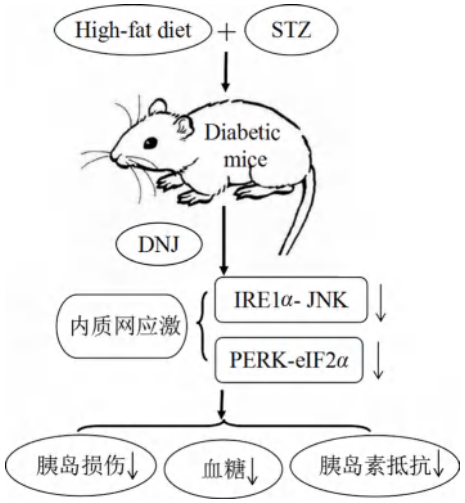


图 5　DNJ 对糖尿病小鼠的作用和作用机制

Fig 5　Effect and mechanism of DNJ on diabetic mice

参考文献

[1] 陈小露，张耀东，王立军，等 . 网络药理学在中药治疗糖尿病领域的研究进展 [J]. 中药材，2021，2（9）：2252-2257.

[2] Kristaningrum ND，Ramadhani DA，Hayati YS，et al. Correlation between the burden of family caregivers and health status of people with diabetes mellitus [J]. J Public Health Res，2021，10（2）：2227-2232.

[3] 曾玉，王华，赵新兰，等 . 胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂治疗糖尿病慢性并发症的研究进展 [J]. 中国老年学杂志，2018，38（18）：4566-4568.

[4] Ernawati U，Wihastuti TA，Utami YW，et al. Effective-

ness of diabetes self-management education（DSME）in type 2 diabetes mellitus（T2DM）patients：systematic literature review [J]. J Public Health Res，2021，10（2）：2240-2246.

[5] 刘涵，侯新国，陈丽 . 关于 2 型糖尿病患者认知功能障碍机制的研究进展 [J]. 中华糖尿病杂志，2021，13（7）：737-739.

[6] 祖力皮亚·阿布拉，李甜，兰怡，等 . 马里苷通过调控自噬保护糖尿病 db/db 小鼠心肌损伤 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1618-1623.

[7] 颜秋霞，马义，洪岸 . PACAP 及其衍生物治疗糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志，2018，38（1）：62-68.

[8] 张路煜，刘玉晖，游宇，等 . 葛根对 2 型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白 GRP78，ATF6 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（20）：82-87.

[9] 石洁，王宁，赵芯欣，等 . 内质网应激在胰岛损伤中作用的研究进展 [J]. 医学研究杂志，2020，49（7）：17-21.

[10] 徐国琴，孙涛，吴丽萍 . 内质网应激与糖尿病关系的研究进展 [J]. 转化医学电子杂志，2018，5（1）：48-52.

[11] Gao K，Zheng C，Wang T，et al. 1-deoxynojirimycin：occurrence，extraction，chemistry，oral pharmacokinetics，biological activities and in silico target fishing [J]. Molecules，2016，21（11）：1600-1609.

[12] Jiang YG，Wang CY，Jin C，et al. Improved 1-deoxynojirimycin（DNJ）production in mulberry leaves fermented by microorganism [J]. Braz J Microbiol，2014，45（2）：721-729.

[13] Li YG，Ji DF，Zhong S，et al. Cooperative anti-diabetic effects of deoxynojirimycin polysaccharide by inhibiting glucose absorption and modulating glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. PLoS One，2013，8（6）：6589-6592.

[14] Takasu S，Parida IS，Onose S，et al. Evaluation of the anti-hyperglycemic effect and safety of microorganism 1-deoxynojirimycin [J]. PLoS One，2018，13（6）：199-207.

[15] Liu Q，Li X，Li C，et al. 1-deoxynojirimycin alleviates liver injury and improves hepatic glucose metabolism in db/db mice [J]. Molecules，2016，21（3）：279-286.

[16] 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）（下）[J]. 中国实用内科杂志，2021，41（9）：757-784.

[17] Hu TG，Wen P，Shen WZ，et al. Effect of 1-deoxynojirimycin isolated from mulberry leaves on glucose metabolism and gut microbiota in a streptozotocin induced diabetic mouse model [J]. J Nat Prod，2019，82（1）：2189-2200.

[18] 姚佳，乔迪，郭鑫，等 . 桑叶中 1- 脱氧野尻霉素对糖尿病肾病大鼠的治疗作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2018，23（5）：517-523.

[19] Li Q，Wang YG，Dai YL，et al. 1-Deoxynojirimycin modulates glucose homeostasis by regulating the combination of IR-GlUT4 and ADIPO-GLUT4 pathways in 3T3-L1 adipocytes [J]. Mol Biol Rep，2019，46（12）：6277-6285.

[20] Liu QU，Li X，Li CY，et al. 1-deoxynojirimycin alleviates insulin resistance via activation of insulin signaling PI3K/AKT pathway in skeletal muscle of db/db mice [J]. Molecules，2015，20（12）：21700-21714.

[21] 周宇，李晶，鲍翠玉 . 内质网应激在糖尿病心肌病中的研究进展 [J]. 中国药理学通报，2017，33（9）：1200-1203.

[22] Kong FJ，Ma LL，Guo JJ，et al. Endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in diabetes-induced neuronal apoptosis and cognitive decline in mice [J]. Clin Sci，2018，132（1）：111-125.

[23] 贺德华，张华，王以兵，等 . 汉黄芩素对肾结石大鼠肾损伤修复作用及 JNK 信号通路的调节作用研究 [J]. 中南药学，2020，18（11）：1795-1799.

[24] Cnop M，Toivonen S，Igoillo-Esteve M，et al. Endoplasmic reticulum stress and eIF2α phosphorylation：the Achilles heel of pancreatic β cells [J]. Mol Metab，2017，6（9）：1024-1039.

（收稿日期：2022-01-14；修回日期：2022-03-30）

塞来昔布胶囊体内外相关性的研究

丁强[1]，金波[1, 2*]，管志美[3]，王彬[1, 4]，周莎莎[1, 4]，殷美园[3]，刘雁鸣[4, 5]，刘翔[3*]（1.天地恒一制药股份有限公司，长沙　410331；2.湖南省骨关节疾病药物工程技术研究中心，长沙　410331；3.湖南省药品审核查验中心，长沙　410013；4.国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001；5.湖南省药品质量评价工程技术研究中心，长沙　410001）

摘要：目的　研究塞来昔布胶囊自研制剂与参比制剂体外溶出的相似性，分析并建立其体内外相关性。**方法**　考察自研制剂与参比制剂在不同溶出介质、不同表面活性剂用量下塞来昔布胶囊的溶出曲线，采用相似因子（f_2）法评价溶出曲线的相似性。同时通过体内生物等效性研究结合体外溶出试验结果分析体外溶出和体内吸收的相关性。**结果**　自研制剂在 5 种溶出介质中的溶出曲线与参比制剂 f_2 均大于 50。采用 0.4%SLS 水作为溶出介质时，体外溶出曲线与体内药动学参数及药时曲线变化趋势一致，提示该介质中溶出曲线具有一定的体内外相关性。**结论**　本研究为塞来昔布胶囊初步建立了具有一定体内外相关性的溶出方法，为仿制药的溶出曲线一致性评价提供了依据。

关键词：塞来昔布胶囊；溶出曲线；生物等效性；体内外相关性
中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1810-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.016

In vivo and in vitro correlation of celecoxib capsules

DING Qiang[1], JIN Bo[1, 2*], GUAN Zhi-mei[3], WANG Bin[1, 4], ZHOU Sha-sha[1, 4], YIN Mei-yuan[3], LIU Yan-ming[4, 5], LIU Xiang[3*] (1. *Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha* 410331; 2. *Hunan Engineering and Technology Research Center for Bone&Joint Disease Drugs, Changsha* 410331; 3. *Hunan Center for Drug Inspection, Changsha* 410013; 4. *NMPA Key Laboratory of Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha* 410001; 5. *Hunan Engineering & Technology Research Center for Quality Evaluation of Pharmaceutical, Changsha* 410001)

Abstract: Objective To research the in vitro dissolution similarity between self-prepared drug and reference drug of celecoxib capsules, and to establish the in vitro and in vivo correlation. **Methods** The dissolution curves of celecoxib capsules in various dissolution media with different concentrations of surfactant were determined, Similarity factor (f_2) was used to evaluate the similarity of dissolution curves between the self-prepared drug and reference drug. The bioequivalence study was used to analyze correlation between in vitro drug dissolution and in vivo drug absorption combined with dissolution test. **Results** The similarity factors (f_2) were all more than 50 between the self-prepared drug and reference drug in five dissolution media.When water (0.4%SLS) was used as dissolution medium, the dissolution curves were consistent with pharmacokinetic parameters and plasma concentration-time curves, the result indicated that the dissolution curves in water (0.4%SLS) had good in vitro and in vivo correlation. **Conclusion** The study helps establish a dissolution method for celecoxib capsules with in vivo-in vitro correlation, and provides the basis for the consistency evaluation of the dissolution curves of generic drugs.

Key words: celecoxib capsule; dissolution curve; bioequivalence study; in vivo and in vitro correlation

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ9052）。
作者简介：丁强，男，中级工程师，主要从事药物制剂开发方面的研究，email：dingq@hinye.com　*通信作者：金波，男，高级工程师，主要从事药物制剂开发与质量标准建立方面的研究，email：jinbo7@163.com；刘翔，男，副主任药师，主要从事药品审查方面的研究，email：145408@qq.com

塞来昔布是辉瑞公司开发的可用于缓解骨关节炎、类风湿关节炎及治疗成人急性疼痛的特异性环氧化酶 -2 抑制剂。与传统的非甾体抗炎药相比，其在保留较好疗效的同时，可显著减少胃肠道不良反应[1]，无论是急性创伤外伤导致的急性疼痛，还是外科手术后的止痛，都是理想的镇痛药物[2]。

随着仿制药质量一致性评价工作的日益深入，通过良好设计保证仿制药与原研制剂质量的一致性十分重要，其中溶出度试验作为评价固体制剂内在质量的重要手段，也是一种评价药物在体内释放和吸收的有效手段[3]。对于具有良好体内 - 体外相关性的药物，可以通过测定体外溶出度来预测药物的体内生物利用度，进而用于制剂的处方筛选和质量评价[4]，因此建立良好的具有体内外相关性的溶出曲线对于仿制药的质量评价有重要的意义。根据生物药剂学分类（BCS），塞来昔布属于 BCS Ⅱ类药物，由于塞来昔布难溶于水，其溶出快慢会直接影响药物在体内的吸收和利用。目前已有塞来昔布胶囊溶出曲线测定及生物等效性研究的文献报道[5-8]，尚未见塞来昔布胶囊体内外相关性溶出曲线的研究，本文旨在以进口塞来昔布胶囊（西乐葆）作为参比制剂，通过筛选具有一定区分力的溶出曲线，并将不同溶出行为的自研制剂与参比制剂进行生物等效性研究，从而建立塞来昔布胶囊具有一定体内外相关性的溶出曲线，为仿制药一致性评价提供依据。

1　材料

1.1　仪器

RT-600 锐拓溶出仪（锐拓仪器设备有限公司）；PB-10 pH 计（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；NewClassic MS105DU 电子天平（梅特勒 • 托利多公司，精度 0.01 mg）；MP1100B 电子天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司，精度 0.01 g）；FAVD-25 智能真空脱气仪（上海富科思分析仪器有限公司）；微孔滤膜（MCE，0.45 μm，天津市津腾实验设备有限公司）；TU-1900 双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）。

1.2　试药

塞来昔布胶囊（规格：0.2 g，西乐葆，批号：L61633、N92682、T94942，Pfizer Pharmaceuticals LLC）；塞来昔布胶囊（规格：0.2 g，批号：170101、181201，天地恒一制药股份有限公司）；塞来昔布对照品（纯度：99.9%，批号：2.0，EDQM）；甲醇（色谱纯，Sigma 试剂公司）；磷酸三钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；盐酸、冰醋酸、氢氧化钠、三水合乙酸钠（分析纯，湖南汇虹试剂有限公司）；十二烷基硫酸钠（SLS，分析纯，湖北葛店人福药用辅料有限责任公司）；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB，分析纯，天津市光复精细化工研究所）；水为自制纯化水。

2　方法与结果

2.1　pH- 溶解度的考察

塞来昔布属于 BCS Ⅱ类即低溶解度高渗透性药物[9-10]，其在 pH 值 1.0 ～ 6.8 的缓冲液中几乎不溶。根据《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》，溶出介质通常采用水、0.1 mol • L^{-1} 盐酸、缓冲液（pH 3 ～ 8）。本研究初步选择在水、pH 1.0 盐酸、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液以及 pH 12.0 磷酸三钠溶液中进行溶出介质的选择，并测定了原料药在不同 pH 介质及加入不同浓度的表面活性剂介质中的饱和溶解度，结果见表 1。

表 1　塞来昔布在不同介质中的饱和溶解度

Tab 1　Saturated solubility of celecoxib in different media

介质	饱和溶解度 /（mg • mL^{-1}）	溶解性	D/S/mL
水溶液	0.0012	几乎不溶	166 667
0.2%SLS 水溶液	0.0456	几乎不溶	4386
0.5%SLS 水溶液	0.2685	极微溶解	745
pH 1.0 盐酸溶液	0.0009	几乎不溶	222 222
0.2%SLS pH 1.0 盐酸溶液	0.0767	几乎不溶	2608
0.5%SLS pH 1.0 盐酸溶液	0.1774	极微溶解	1127
pH 4.5 醋酸盐缓冲液	0.0013	几乎不溶	153 846
0.2%SLS pH 4.5 醋酸盐缓冲液	0.0808	几乎不溶	2475
0.5%SLS pH 4.5 醋酸盐缓冲液	0.2542	极微溶解	787
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	0.0025	几乎不溶	80 000
0.1%CTAB pH 6.8 磷酸盐缓冲液	0.1568	极微溶解	1276
0.2%CTAB pH 6.8 磷酸盐缓冲液	0.3016	极微溶解	663
pH 12.0 磷酸三钠溶液	0.5206	极微溶解	384
0.1%SLS pH 12.0 磷酸三钠溶液	0.7145	极微溶解	280

注：D/S. 给药剂量 / 饱和溶解度。

Note：D/S. dose/saturated solubility.

结果表明，塞来昔布在 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液及水溶液中几乎不溶，在 pH 12.0 磷酸三钠溶液中极微溶解，相对于其他介质溶解度有明显提高，在各介质中加入表面活性剂后，原料药溶解度显著提高。塞来昔布单次给药的最高剂量为 200 mg（D 值），根据测定的饱和溶解度（S 值），计算塞来昔布的

D/S 值，结果表明本品在各介质中溶解所需体积远大于 250 mL，为低溶解性药物。

2.2　溶出度试验条件的选择

2.2.1　溶出方法的选择　本品为常规胶囊剂，《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》中推荐溶出方法为桨法、篮法。美国食品药品监督管理局（FDA）溶出度方法数据库中塞来昔布胶囊的溶出方法为桨法，50 r • min^{-1}，溶出介质是 1%SLS 的 0.04 mol • L^{-1} 磷酸三钠溶液（pH 12.0）1000 mL[11]。塞来昔布胶囊进口药品注册标准（JX20130156）[12] 中溶出度方法也采用相同的方法，故首选桨法作为本品的溶出方法。

2.2.2　检测方法的选择　塞来昔布胶囊进口药品注册标准（JX20130156）中溶出度的检测方法为高效液相色谱法（HPLC），检测波长为 256 nm。考虑到溶出曲线测定样品检测量较大，本研究选择方便快捷的紫外 - 可见分光光度法（UV）进行考察。方法学研究结果表明塞来昔布具有较好的紫外吸收，并且辅料和胶囊壳不干扰塞来昔布的测定，塞来昔布在 0.005 ～ 0.120 mg • mL^{-1} 与吸光度线性关系良好，方法精密度良好（*RSD* 为 0.73%），高、中、低三个浓度的样品平均回收率均在 98.52% ～ 101.65%，回收率的 *RSD* 在 0.84% ～ 1.2%。

2.2.3　溶出介质的选择　根据 pH- 溶解度考察结果，在满足完全溶出的条件下，为了寻找具备良好区分力的溶出条件，选择以 1000 mL 低浓度表面活性剂的缓冲液为介质进行溶出曲线的考察，结果如表 2 所示。

表 2　参比制剂在 5 种不同介质中溶出度的考察

Tab 2　Dissolution of reference drug in 5 different media

溶出介质		体积 / mL	方法	转速 / r • min^{-1}	累积溶出度 /%						
					5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	45 min	60 min
CTAB-pH 6.8 介质	0.3%CTAB-pH 6.8	1000	桨法	50	45.9	62.6	71.8	78.6	86.9	92.7	93.6
	0.1%CTAB-pH 6.8			50	31.4	49.1	58.5	63.9	70.6	76.0	78.8
	0.15%CTAB-pH 6.8			50	38.8	54.6	65.7	71.5	81.3	88.3	91.4
SLS-pH 4.5 介质	0.5%SLS-pH 4.5	1000	桨法	75	39.8	62.9	71.8	79.5	88.3	95.6	97.7
	0.35%SLS-pH 4.5			75	31.6	59.6	65.7	72.5	79.9	85.9	89.3
	0.30%SLS-pH 4.5			75	27.2	50.8	57.4	61.2	68.7	75.2	80.6
SLS-pH 1.0 介质	0.5%SLS-pH 1.0	1000	桨法	75	49.6	56.8	73.4	78.9	85.4	90.2	93.0
	0.4%SLS-pH 1.0			75	30.9	40.4	51.6	66.4	74.6	80.8	83.9
	0.45%SLS-pH 1.0			75	35.1	48.3	59.3	67.2	79.3	88.3	91.9
SLS 水介质	0.5%SLS 水溶液	1000	桨法	50	43.1	70.8	79.5	84.9	90.7	96.8	98.4
	0.4%SLS 水溶液			50	26.4	61.6	75.7	82.7	89.8	94.6	96.9
	0.35%SLS 水溶液			50	23.6	57.1	66.9	72.4	77.2	81.1	84.3
SLS-pH 12.0 介质	1%SLS-pH 12.0	1000	桨法	50	40.2	62.4	76.9	82.0	89.9	94.6	99.4
	0%SLS-pH 12.0			50	38.4	68.7	79.0	84.4	91.5	94.9	96.7

根据上述研究结果选用低浓度 SLS，在满足主药溶出完全的情况下，又具有适当的区分力。最终确定的溶出介质为 0.45%SLS 的 pH 1.0 盐酸溶液、0.35%SLS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、0.15%CTAB 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液、0.4%SLS 的水溶液和 pH 12.0 磷酸三钠溶液。

2.2.4　样品测定方法　取塞来昔布胶囊，采用桨法，溶出介质为 0.15% CTAB 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液、0.4%SLS 的水溶液和 pH 12.0 磷酸三钠溶液 1000 mL，转速为 50 r•min^{-1}；另外以 0.45%SLS 的 pH 1.0 盐酸溶液和 0.35%SLS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液 1000 mL 为溶出介质，转速为 75 r•min^{-1}；分别在第 5、10、15、20、30、45、60 min 时，取溶出液 10 mL，同时补充相同体积和温度的溶出介质，0.45 μm 滤膜过滤，弃去初滤液，精密量取溶出液续滤液 1 mL，加溶出介质稀释至 20 mL，摇匀，作为供试品溶液。另取塞来昔布对照品适量，精密称定，加甲醇 - 水（75∶25）溶液溶解并稀释制成 0.5 mg • mL^{-1} 塞来昔布，摇匀，作为对照品储备液，精密量取对照品储备液适量，加溶出介质定量稀释制成 0.01 mg • mL^{-1} 塞来昔布的溶液，作为对照品溶液。照 UV 法，在 256 nm 的波长处测定供试品溶液及对照品溶液的吸光度，按外标法以吸光度计算溶出量并绘制溶出曲线。

2.3　自研制剂与参比制剂的溶出曲线考察

根据《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》，采用非模型依赖法相似因子（f_2）来比较溶出曲线。f_2 可作为评价产品处方工艺变化以及与参比制剂间溶出曲线差异的评价参数，被 FDA 推荐为比较两条溶出曲线相似性的首选方法[13]，当 f_2 在 50 ～ 100，则认为两者溶出曲线相似。为探索不同处方制备的自研制剂与参比制剂的体内外一致性情况，我们选择采用不同 SLS 和聚维酮 K30 用量制备的两组样品进行研究，考察不同介质条件下自研制剂的溶出行为，两组自研制剂处方组成如表 3 所示，自研制剂与参比制剂溶出曲线对比如图 1 所示。

表 3　不同处方组成研究

Tab 3　Different formulations

组分	处方 A（170101）/mg	处方 B（181201）/mg
塞来昔布	200.0	200.0
乳糖	41.6	46.5
SLS	1.4	8.1
聚维酮 K30	21.6	10.0
交联羧甲基纤维素钠	2.7	2.7
硬脂酸镁	2.7	2.7

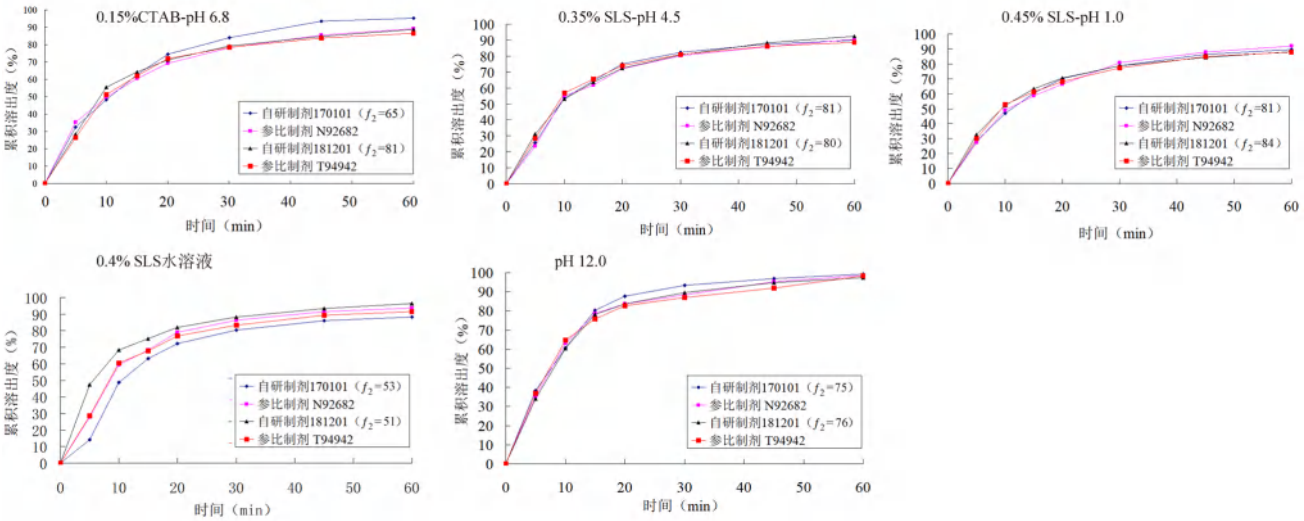


图 1　自研制剂与参比制剂在不同溶出介质溶出曲线对比图

Fig 1　Dissolution curve of self-prepared drug and reference drug in different dissolution medium

结果表明，自研制剂（170101）与参比制剂（N92682），自研制剂（181201）与参比制剂（T94942）在上述 5 种介质中的溶出曲线相似因子 f_2 值均大于 50，表明自研制剂与参比制剂溶出曲线具有相似性。

2.4　自研制剂与参比制剂的生物等效性试验

为进一步评价自研制剂与参比制剂的一致性，本试验研究了健康受试者在空腹状态下，单次口服两种不同处方制备的胶囊与辉瑞制药的塞来昔布胶囊的药动学特征，比较两制剂药动学参数 *AUC* 和 C_{max} 的差异，初步评估生物等效性，为制剂处方工艺是否需进一步优化提供参考。

采用单中心、空腹、随机、开放、两制剂、两周期、双交叉试验设计，12 例健康受试者按筛选号顺序随机分为 A、B 两个给药序列组，每周期单次口服 0.2 g 参比制剂或受试制剂，周期间的洗脱期为 7 d。给药前禁食 10 h 以上，按照给药方案空腹服用试验制剂或参比制剂 0.2 g（1 粒），240 mL 温水送服，服药前及服药后 1 h 内禁止饮水，服药后 4、10 h 统一进食标准午餐和晚餐。受试者分别于给药前（0 h）及给药后 0.5、1、1.5、2、2.25、2.5、2.75、3、3.5、4、5、6、8、10、12、24、48 h 采集静脉血 4 mL，血样采集后置于肝素钠抗凝试管内，于 1 h 内在 4 ℃、1600 g 离心 10 min 分离血浆，立即将血浆于－40 ℃冰箱中进行预冻，样品在储存冰箱中放置 2 ～ 48 h 后置－80 ℃冰箱保存。采用 LC-MS/MS 法测定血浆中塞来昔布的浓度，采用 WinNonlin 软件非房室模型法计算塞来昔布的人体药动学参数[8]，采用多因素多变量方差分析（ANOVA）进行个体间、制剂周期的显著性分析。C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$经对数转换后进行方差分析，计算几何均值比（GMR）的 90% 置信区间（90%*CI*），采用双单侧 *t* 检验方法进行等效性比较，等效标准为 80% ～ 125%。同时 t_{max} 进行 Mann-Whitney U 非参数检验。主要药动学参数见表 4，塞来昔布的平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。

表 4　空腹口服塞来昔布胶囊的主要药动学参数 ($\bar{x}$±s)

Tab 4　Main pharmacokinetic parameters of oral celecoxib capsules under fasting condition ($\bar{x}$±s)

PK 参数	处方 A（n = 12）		处方 B（n = 12）	
	自研制剂 170101	参比制剂 N92682	自研制剂 181201	参比制剂 T94942
C_{max}/（ng • mL^{-1}）	571.70±177.41	699.71±340.52	939.18±586.05	835.133±438.01
$AUC_{0\sim t}$/（h • ng • mL^{-1}）	7109.77±2013.90	7845.15±3168.55	8321.115±3428.96	7832.075±3191.45
$AUC_{0\sim\infty}$/（h • ng • mL^{-1}）	8121.46±3497.70	8190.31±3445.55	8504.523±3418.26	8031.94±3268.39
t_{max}/h	2.40±0.64	3.00±0.93	2.417±0.99	3.583±2.27
$t_{1/2}$/h	14.46±8.53	9.70±2.91	9.026±2.684	8.744±2.75
$MRT_{0\sim t}$/h	13.22±2.73	12.44±2.11	10.64±1.82	11.23±1.99
$MRT_{0\sim\infty}$/h	19.13±11.97	14.33±3.74	11.94±2.60	12.47±3.30

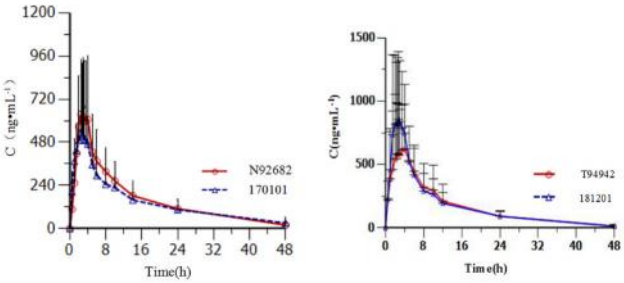


图 2　自研制剂与参比制剂塞来昔布平均药时曲线

Fig 2　Mean plasma concentration-time curve of celecoxib from the self-prepared drug and reference drug

2.5　生物等效性试验结果分析

多因素变量方差分析结果表明，自研制剂与参比制剂主要药动学参数 C_{max}、$AUC_{0\text{-}t}$、$AUC_{0\text{-}\infty}$、$t_{1/2}$ 及 MRT 在个体间、制剂间、周期间差异均无统计学意义（P > 0.05），t_{max} 值经 Mann-Whitney U 非参数检验亦表明不同制剂间差异无统计学意义（P > 0.05）。采用双单侧 t 检验进行等效性比较，结果表明，处方 A 与 B 制备的制剂与参比制剂的 $AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 的 GMR（90%CI）分别为 82.20% ～ 106.52%、89.80% ～ 110.67% 和 92.71% ～ 123.69%、93.33% ～ 123%，均落在 80.00% ～ 125.00%，显示具有生物等效性。而 C_{max} 的 GMR（90%CI）分别为 68.54% ～ 110.43% 和 104.52% ～ 149.51%，表明不同处方条件下制备的自研制剂与参比制剂溶出速率存在差异。

3　讨论

FDA 溶出数据库中塞来昔布胶囊测定的溶出介质为 pH 12.0 的磷酸三钠溶液，并非为生理 pH 值条件，且添加 1%SLS 以达到漏槽条件。实际研究表明 pH 12.0 介质中不添加表面活性剂基本可以达到漏槽条件。从 pH 12.0 介质的体外溶出曲线来看，不同处方制备的样品溶出曲线与参比制剂相似度较高，但从体内研究结果来看，两者之间以及和参比制剂比较均存在一定的差异，结合体内外数据该介质条件不具备体内外相关性。塞来昔布在生理相关 pH 值介质中的溶解度非常低，所以 FDA 溶出数据库中采用 pH 12.0 磷酸三钠溶液（1%SLS）为溶出介质。

C_{max} 和 AUC 是反映受试制剂和参比制剂吸收速率和吸收程度的参数，生物等效性试验的药时曲线显示处方 A 的自研制剂比参比制剂吸收速率慢，处方 B 的自研制剂比参比制剂吸收速率快。体外溶出曲线显示自研制剂与参比制剂在 0.45%SLS 的 pH 1.0 盐酸溶液、0.35%SLS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 0.15%CTAB 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中具有很好的相似性，相似因子较高。在 0.4%SLS 的水溶液中，虽然两制剂与参比制剂的溶出曲线 f_2 值相对偏低（均在 50 左右），采用处方 A 的自研制剂比参比制剂溶出速度慢，而采用处方 B 的自研制剂比参比制剂溶出速度快，与体内研究的药动学参数及药时曲线变化趋势基本一致，因此该介质条件可能具有一定的体内外相关性。

体外溶出曲线是一种评价自研制剂与参比制剂差异的重要方法，通过体内外充分研究，找出具有区分力的溶出曲线，才能在仿制药处方工艺研究中科学评估自研制剂与参比制剂的差异。本研究所得的 0.4%SLS 的水溶液可能是具有区分力的溶出曲线，对塞来昔布胶囊的一致性评价及上市后持续质量评价均具有重要的参考指导意义。

参考文献

[1] 方淑贤，刘云海 . 环氧化酶 -2 抑制剂：塞来昔布 [J]. 中国药师，2002，5（10）：618-621.

[2] 黄建林，吴玉琼，潘云峰 . 塞来昔布治疗类风湿关节炎和骨关节炎有效性和安全性的临床研究 [J]. 中国药物与临床，2004，12（4）：934-938.

[3] 张启明，谢沐风，宁保明，等 . 采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量 [J]. 中国医药工业杂志，2009，40（12）：946-955.

[4] 胡昌勤，潘瑞雪 . 溶出度试验评价 / 预测固体口服制剂生物等效性的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2014，23（1）：44-51.

[5] 杜鹏强，马培志 . 塞来昔布胶囊体外溶出度研究 [J]. 山西职工医学院学报，2017，27（6）：1-3.
[6] 茅为，张卫香，马丁楠 . 塞来昔布胶囊的制备及其溶出度测定 [J]. 广东化工，2020，47（20）：106-108.
[7] 李文强，张玉莉，陈英，等 . 塞来昔布胶囊体外具有区分力溶出曲线的研究 [J]. 生物化工，2020，6（6）：29-32.
[8] 许浩云，陈月，冯岩，等 . 超高效液相 - 串联质谱法测定人血浆中塞来昔布浓度及两种塞来昔布胶囊在中国健康人体内的生物等效性 [J]. 中国新药与临床杂志，2020，39（12）：741-746.
[9] Takagi T，Ramachandran C，Bermejo M，et al. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States，Great Britain，Spain，and Japan [J]. Mol Pharm，2006，3（6）：631-643.
[10] Leslie ZB，Fabio B，Tudor IO. BDDCS applied to over 900 drugs [J]. AAPS J，2011，13（4）：519-547.
[11] Food and Drug Administration（FDA）. Dissolution Methods Database[DB/OL]. https：//www. accessdata. fda. gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults. cfm. [2010-07-01].
[12] 国家食品药品监督管理局 . 塞来昔布胶囊进口药品注册标准 [S]. JX20130156.2014-02-10.
[13] 陈贤春，吴清，王玉蓉，等 . 关于溶出曲线比较和评价方法 [J]. 中国医院药学杂志，2007，27（5）：662-664.

（收稿日期：2022-05-05；修回日期：2022-06-13）

槲木叶中黄酮类化合物的分离和鉴定

黎冠兰，王知斌，吴林武，常耀丹，孙延平，杨炳友，匡海学*（黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室，哈尔滨　150040）

摘要：目的　对槲木叶中的化学成分进行分离与鉴定。**方法**　采用乙醇回流提取，通过 ODS、硅胶、制备型 HPLC 等技术进行分离纯化，利用 NMR 和 MS 等波谱技术鉴定化合物的结构。**结果**　从槲木叶正丁醇组分中分离得到 **9** 个黄酮类化合物，分别鉴定为 4′- 甲氧基 - 二氢查尔酮苷元 -4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**1**）、4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖 - 二氢查尔酮苷元 -4′-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**2**）、异甘草苷（**3**）、4′-*O*-methyldavidioside（**4**）、confusoside（**5**）、4′- 羟基 - 二氢黄酮 -7-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**6**）、山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 芸香糖苷（**7**）、槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**8**）、槲皮素（**9**）。**结论**　化合物 **1** 为未见报道的新化合物，化合物 **2** 为首次从植物中分离得到的新天然产物，化合物 **4**、**5** 为首次从槲木属中分离得到，化合物 **9** 为首次从槲木叶中分离得到。

关键词：槲木；化学成分；黄酮；结构鉴定
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1815-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.017

Identification and isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia elata*

LI Guan-lan, WANG Zhi-bin, WU Lin-wu, CHANG Yao-dan, SUN Yan-ping, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue* (*Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao*, *Ministry of Education*, *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040)

Abstract: Objective To identify and isolate the chemical constituents from the leaves of *Aralia elata*. **Methods** The leaves of *Aralia elata* were extracted by ethanol reflux, and then by *n*-butanol. The separation and purification of the *n*-butanol layer were obtained by ODS, silica gel, preparative

基金项目：国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程—岐黄工程首席科学家支持项目（No. 国中医药人教函〔2021〕7 号）；国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程（岐黄工程）岐黄学者支持项目（No. 国中医药人教函〔2018〕284 号）；2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目（No. 国中医药人教函〔2022〕75 号）；第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目（No. 国中医药人教函〔2022〕76 号）；黑龙江省“头雁”团队支持项目（No. 黑龙江省头雁行动领导小组文件〔2019〕5 号）。
作者简介：黎冠兰，女，硕士，主要从事中药药效物质基础和中药药性理论研究，email：870512867@qq.com　*__通信作者：__匡海学，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药效物质基础和中药药性理论研究，email：hxkuang@hljucm.net

HPLC, and other echniques. The structures were identified by NMR and MS spectroscopy. **Results** Nine compounds were isolated from the leaves of *Aralia elata* and identified as 4′-methoxy dihydrochalcone 4-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (**1**), dihydrochalcone 4-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside-4′-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (**2**), isoliquiritoside (**3**), 4′-*O*-methyldavidioside (**4**), confusoside (**5**), 4′-hydroxy dihydroflavone-7-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (**6**), kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-rutinoside (**7**), quercetin-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (**8**), and quercetin (**9**). **Conclusion** Compound **1** has been reported in the literature for the first time. Compound **2** is isolated for the first time. Compounds **4** and **5** are isolated from this genus for the first time. Compound **9** is isolated from the leaf of this plant for the first time.

Key words: *Aralia elata*; chemical constituent; flavonoid; structure identification

楤木 [*Aralia elata*（Miq.）Seem.] 为五加科楤木属植物，叶为羽状复叶，小叶片较小 [1]。楤木的药用价值始载于《千金方》：“又方截取檐头尖少许，烧灰，水和服，当作孔出脓血取愈”。现代药理学研究表明其具有“适应原”样，有保肝、抗癌等多种作用，具有十分广阔的开发前景 [2]。但迄今为止对楤木的化学成分研究主要集中在皂苷类 [3-4]，对黄酮类化学成分的研究较少，因此为进一步阐明楤木叶的化学成分，充分利用楤木这一药用资源，本文对楤木叶的黄酮类化学成分展开研究。

1　材料

Triple TOF 5600 液质联用仪（美国 AB SCIEX 公司）；Bruker Avance Ⅲ-400 核磁共振光谱仪（德国 Bruker 公司）；Waters 2695-2998 分析型 HPLC（美国 Waters 公司）；SHIMADZU LC-6AD 制备型 HPLC（岛津公司）；反相 ODS（YMC 公司）、柱色谱硅胶（80 ～ 100 目，200 ～ 300 目）和薄层色谱用硅胶板（青岛海洋化工厂）；色谱甲醇（美国默克公司）；其余试剂均为分析纯。

楤木叶于 2009 年 7 月采摘于我国安徽省，经黑龙江中医药大学樊锐锋教授鉴定为五加科楤木属植物楤木 [*Aralia elata*（Miq.）Seem.] 的干燥叶。样品标本保存于黑龙江中医药大学中药化学教研室（20091110）。

2　提取与分离

取干燥的楤木叶 3.5 kg 研成粉末，95% 乙醇回流提取 3 次，每次 2.5 h，滤过，合并乙醇提取液；再以 70% 乙醇回流提取 3 次，每次 2.5 h；滤过，合并乙醇提取液。将两种提取液合并，减压回收溶剂得乙醇提取物。将此提取物加水悬浮后，用正丁醇萃取，萃取液减压浓缩。取正丁醇萃取部位 260.2 g，经硅胶柱色谱，以二氯甲烷 - 甲醇溶剂系统进行梯度洗脱，洗脱液经 TLC 薄层检识合瓶，将成分相近者合并，得到 10 个组分（Fr.1 ～ 10），再经 ODS、Toyopearl 反相柱色谱、制备型 HPLC 等现代分离技术分离纯化得到 **9** 个化合物。

3　结构鉴定

化合物 **1**：黄色无定形粉末。UVλ_{max}^{MeOH}（nm）：209.2，276.4，314.4；IRν_{max}^{KBr}（cm^{-1}）：1480，1650，3376；ESI-MS 在 *m/z*：457.1476 处给出 $[M+Na]^+$ 离子峰（计算值：457.1475）。

在 ^{1}H-NMR（400 MHz，C_5D_5N）谱中，δ_H 7.24（2H，d，J = 8.5 Hz，H-2，H-6）和 7.34（2H，d，J = 8.5 Hz，H-3，H-5）处信号呈现一个苯环 AA′BB′ 偶合系统，提示为对位取代苯环，而 δ_H 6.67（1H，d，J = 2.4 Hz，H-3′），6.59（1H，dd，J = 2.4，9.0 Hz，H-5′）和 7.79（1H，d，J = 9.0 Hz，H-6′）处信号呈现一个苯环 ABX 偶合系统；δ_H 3.23（2H，t，J = 7.6 Hz，H-*α*）和 3.00（2H，t，J = 7.6 Hz，H-*β*）处存在两个亚甲基信号；δ_H 3.70（3H，s，4′-OCH_3）处存在一个甲氧基信号；此外，在 δ_H 5.62（1H，d，J = 7.3 Hz，H-1″）处存在一个糖端基质子信号，根据耦合常数推断该糖苷键为 *β* 构型。酸水解：经 1 mol·L^{-1} 盐酸溶解，水液处理后，用 HPLC 分析，旋光检测器检测，鉴定化合物 **1** 的糖基部分为 *D*- 葡萄糖。

在 ^{13}C-NMR（100 MHz，C_5D_5N）谱中，共呈现 22 个碳信号，其中 δ_C 135.0（C-1）、130.0（C-2、C-6）、117.1（C-3、C-5）、157.2（C-4）处为对位取代苯环信号；δ_C 114.1（C-1′）、165.8（C-2′）、101.7（C-3′）、166.5（C-4′）、107.8（C-5′）、132.6（C-6′）处为 1′、2′、4′- 三取代苯环的碳信号；δ_C 102.3（C-1″）、75.0（C-2″）、78.9（C-3″）、71.3（C-4″）、78.6（C-5″）、62.4（C-6″）处存在一组 *β*-*D*- 葡萄糖基上的碳信号；此外，还有 δ_C 40.2（H-*α*）、29.6（H-*β*）处存在两个亚甲基碳信号，

δ_C 55.7（4′-OCH_3）处存在一个甲氧基碳信号，δ_C 204.4（C ＝ O）处存在一个羰基碳信号，推测该化合物为二氢查尔酮类化合物。

化合物 **1** 苷元部分的核磁数据与 4，2′-dihydroxy-4′-methoxydihydrochalcone 基本一致，主要区别在于化合物 **1** 多出一组葡萄糖基碳氢信号[5]。通过 HMBC 谱确定化合物 **1** 中糖的连接位置。在 HMBC 谱中，δ_H 5.62（1H，d，J ＝ 7.3 Hz，H-1″）和 δ_C 157.2（C-4）相关，表明葡萄糖连接在对位取代苯环的 C-4 位上。δ_H 7.79（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-6′）和 δ_C 165.8（C-2′）相关，δ_H 3.70（3H，s，4′-OCH_3）处甲氧基质子信号和 δ_C 166.5（C-4′）处相关，表明甲氧基和 1′、2′、4′-三取代苯环的 C-4′位相连；δ_H 7.79（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-6′）和 δ_C 204.4（C ＝ O）相关，表明羰基连接在 C-1′位上；此外，δ_H 3.23（2H，t，J ＝ 7.6 Hz，H-α）和 δ_C 135.0（C-1）、204.4（C ＝ O）相关，δ_H 3.00（2H，t，J ＝ 7.6 Hz，H-β）和 δ_C 130.0（C-2、C-6）、204.4（C ＝ O）相关，可以推测 -CH_2-CH_2- 一端与羰基相连，另一端与对位取代苯环的 C-1 位相连。

综上，鉴定化合物 **1** 为 4′- 甲氧基 - 二氢查尔酮苷元 -4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，查阅 SciFinder 发现该化合物为新化合物。通过对 ^{1}H-NMR 谱、^{13}C-NMR 谱、^{1}H-^{1}H COSY 谱、HMBC 谱和 DEPT-135 谱对化合物 **1** 的碳氢数据进行了准确的归属（见表 1）。化学结构见图 1。

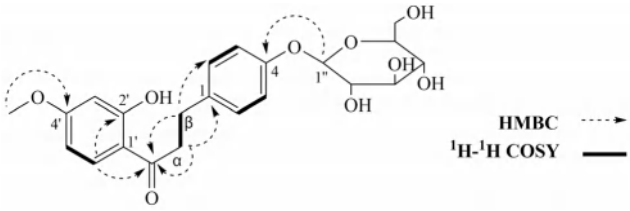


图 1　化合物 **1** 的关键 HMBC 和 ^{1}H-^{1}H COSY 相关

Fig 1　Key HMBC and ^{1}H-^{1}H COSY correlation of compound **1**

化合物 **2**：黄色无定形粉末。ESI-MS *m/z*：605.2 [M ＋ Na]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：3.25（2H，t，J ＝ 7.4 Hz，H-α），2.96（2H，t，J ＝ 7.4 Hz，H-β），7.16（2H，d，J ＝ 8.7 Hz，H-2，H-6），7.00（2H，d，J ＝ 8.7 Hz，H-3，H-5），6.57（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-3′），6.61（1H，dd，J ＝ 2.4，9.0 Hz，H-5′），7.80（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-6′），4.84（1H，d，J ＝ 7.5 Hz，H-1″），3.24～3.90（6H，m，H-2″～6″），4.99（1H，d，J ＝ 7.4 Hz，H-1‴），3.24 ～ 3.90（6H，m，H-2‴～6‴）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：40.9（C-α），30.7（C-β），206.0（C ＝ O），136.3（C-1），130.4（C-2），117.9（C-3），157.6（C-4），117.9（C-5），130.4（C-6），116.0（C-1′），165.8（C-2′），105.0（C-3′），165.1（C-4′），109.4（C-5′），133.4（C-6′），102.5（C-1″），74.9（C-2″），78.3（C-3″），71.4（C-4″），78.0（C-5″），62.5（C-6″），101.3（C-1‴），74.7（C-2‴），78.1（C-3‴），71.2（C-4‴），77.8（C-5‴），62.3（C-6‴）。以上数据与文献[6]数据基本一致，故鉴定化合物 **2** 为 4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖 - 二氢查尔酮苷元 -4′-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，经 SciFinder 数据库检索表明该化合物为新的天然产物。

表 1　化合物 1 的 ^{1}H and ^{13}C-NMR 谱数据 (C_5D_5N 400/100 MHz)

Tab 1　^{1}H and ^{13}C-NMR data of 1 (C_5D_5N 400/100 MHz)

No.	δ_H	δ_C
7（α）	3.23（2H，t，J ＝ 7.6 Hz）	40.2
8（β）	3.00（2H，t，J ＝ 7.6 Hz）	29.6
C ＝ O		204.4
1		135.0
2，6	7.24（2H，d，J ＝ 8.5 Hz）	130.0
3，5	7.34（2H，d，J ＝ 8.5 Hz）	117.1
4		157.2
1′		114.1
2′		165.8
3′	6.67（1H，d，J ＝ 2.4 Hz）	101.7
4′		166.5
5′	6.59（1H，dd，J ＝ 2.4，9.0 Hz）	107.8
6′	7.79（1H，d，J ＝ 9.0 Hz）	132.6
4′-OCH_3	3.70（3H，s）	55.7
1″	5.62（1H，d，J ＝ 7.3 Hz）	102.3
2″	4.32（1H，m）	75.0
3″	4.11（1H，m）	78.9
4″	4.35（1H，m）	71.3
5″	4.37（1H，m）	78.6
6″	4.39（1H，dd，J ＝ 5.2，12.0 Hz）	62.4
	4.54（1H，dd，J ＝ 2.1，12.0 Hz）	

化合物 **3**：淡黄色粉末。ESI-MS *m/z*：419.1 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：7.59（1H，d，J ＝ 15.0 Hz，H-α），7.74（1H，d，J ＝ 15.0 Hz，H-β），7.64（2H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-2，H-6），7.08（2H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-3，H-5），6.23（1H，d，J ＝ 2.5 Hz，H-3′），6.34（1H，dd，J ＝ 2.5，9.0 Hz，H-5′），7.90（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-6′），4.92（1H，d，J ＝ 7.5 Hz，H-1″），3.30 ～ 3.85（6H，m，H-2″～ H-6″）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：119.6（C-α），

144.1（C-β），193.0（C ＝ O），130.3（C-1）、133.0（C-2），117.6（C-3），160.6（C-4），117.6（C-5），133.0（C-6），114.5（C-1′），166.4（C-2′），103.5（C-3′），166.8（C-4′），109.0（C-5′），133.4（C-6′），101.3（C-1″），74.8（C-2″），78.0（C-3″），71.2（C-4″），77.9（C-5″），62.3（C-6″）。以上数据与文献[7]数据基本一致，故鉴定化合物 **3** 为异甘草苷。

化合物 **4**：黄色无定形粉末。ESI-MS *m/z*：457.1 [M ＋ Na]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：3.20（2H，t，*J* ＝ 7.4 Hz，H-α），2.77（2H，t，*J* ＝ 7.4 Hz，H-β），6.92（2H，d，*J* ＝ 8.7 Hz，H-2，H-6），6.58（2H，d，*J* ＝ 8.7 Hz，H-3，H-5），6.73（1H，d，*J* ＝ 2.3 Hz，H-3′），6.54（1H，dd，*J* ＝ 2.3，8.8 Hz，H-5′），7.50（1H，d，*J* ＝ 8.8 Hz，H-6′），3.74（3H，s，4′-OCH_3），4.93（1H，d，*J* ＝ 7.3 Hz，H-1″），3.28（1H，m，H-2″），3.36（1H，m，H-3″），3.36（1H，m，H-4″），3.28（1H，m，H-5″），3.80（1H，dd，*J* ＝ 1.9，12.0 Hz，H-6″a），3.57（1H，dd，*J* ＝ 6.0，12.0 Hz，H-6″b）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：46.0（C-α），30.4（C-β），200.4（C ＝ O），132.9（C-1），130.2（C-2），116.4（C-3），157.1（C-4），116.4（C-5），130.2（C-6），122.6（C-1′），159.7（C-2′），102.3（C-3′），164.8（C-4′），108.7（C-5′），132.5（C-6′），55.8（4′-OCH_3），102.7（C-1″），75.0（C-2″），79.4（C-3″），71.5（C-4″），79.1（C-5″），62.6（C-6″）。以上数据与文献[8]数据基本一致，故鉴定化合物 **4** 为 4′-*O*-methyldavidioside。

化合物 **5**：黄色针状结晶。ESI-MS *m/z*：421.1 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：3.03（2H，t，*J* ＝ 7.4 Hz，H-α），2.96（2H，t，*J* ＝ 7.4 Hz，H-β），6.94（2H，d，*J* ＝ 8.6 Hz，H-2，H-6），6.61（2H，d，*J* ＝ 8.6 Hz，H-3，H-5），6.43（1H，d，*J* ＝ 2.4 Hz，H-3′），6.61（1H，dd，*J* ＝ 2.4，8.9 Hz，H-5′），7.69（1H，d，*J* ＝ 8.9 Hz，H-6′），5.75（1H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-1″），3.21 ～ 3.86（6H，m，H-2″ ～ H-6″）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：40.7（C-α），29.8（C-β），204.8（C ＝ O），131.9（C-1），130.1（C-2），116.4（C-3），157.4（C-4），116.4（C-5），130.1（C-6），115.1（C-1′），165.3（C-2′），104.7（C-3′），164.6（C-4′），108.8（C-5′），132.7（C-6′），101.5（C-1″），74.8（C-2″），78.2（C-3″），71.1（C-4″），78.5（C-5″），62.3（C-6″）。以上数据与文献[9]数据基本一致，故鉴定化合物 **5** 为 confusoside。

化合物 **6**：淡黄色粉末。ESI-MS *m/z*：441.1 [M ＋ Na]$^+$。^{1}H-NMR（C_5D_5N，400 MHz）δ：5.51（1H，dd，*J* ＝ 3.0，13.0 Hz，H-2），2.86（1H，dd，*J* ＝ 3.0，16.5 Hz，H-3a），3.14（1H，dd，*J* ＝ 13.0，16.5 Hz，H-3b），8.14（1H，d，*J* ＝ 8.6 Hz，H-5），6.88（1H，dd，*J* ＝ 2.5，8.6 Hz，H-6），6.79（1H，d，*J* ＝ 2.5 Hz，H-8），7.55（2H，d，*J* ＝ 8.5 Hz，H-2′，H-6′），7.38（2H，d，*J* ＝ 8.5 Hz，H-3′，H-5′），5.62（1H，d，*J* ＝ 7.4 Hz，H-1″），4.07 ～ 4.48（6H，m，H-2″ ～ H-6″）；^{13}C-NMR（C_5D_5N，100 MHz）δ：79.1（C-2），44.1（C-3），190.1（C ＝ O），128.3（C-5），111.5（C-6），166.1（C-7），102.0（C-8），164.1（C-9），114.5（C-10），130.3（C-1′），128.2（C-2′），117.0（C-3′），158.4（C-4′），117.0（C-5′），128.2（C-6′），101.7（C-1″），74.5（C-2″），78.6（C-3″），71.1（C-4″），79.1（C-5″），62.1（C-6″）。以上数据与文献[10]数据基本一致，故鉴定化合物 **6** 为 4′-羟基-二氢黄酮-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **7**：黄色针状结晶。ESI-MS *m/z*：595.1 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ：6.19（1H，d，*J* ＝ 2.0 Hz，H-6），6.38（1H，d，*J* ＝ 2.0 Hz，H-8），8.05（2H，d，*J* ＝ 8.0 Hz，H-2′，H-6′），6.87（2H，d，*J* ＝ 8.0 Hz，H-3′，H-5′），5.11（1H，d，*J* ＝ 7.4 Hz，H-1″），3.25 ～ 3.81（10H，m，H-2″ ～ H-6″，H-2‴ ～ H-5‴），4.51（1H，d，*J* ＝ 1.4 Hz，H-1‴），1.12（3H，d，*J* ＝ 6.2 Hz，H-6‴）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：159.4（C-2），135.5（C-3），179.4（C-4），163.0（C-5），100.0（C-6），166.2（C-7），95.0（C-8），159.4（C-9），105.6（C-10），122.8（C-1′），132.4（C-2′），116.2（C-3′），161.5（C-4′），116.2（C-5′），132.4（C-6′），104.6（C-1″），75.8（C-2″），78.2（C-3″），72.3（C-4″），77.2（C-5″），68.6（C-6″），102.4（C-1‴），72.1（C-2‴），71.5（C-3‴），73.9（C-4‴），69.7（C-5‴），17.9（C-6‴）。以上数据与文献[11]数据基本一致，故鉴定化合物 **7** 为山柰酚-3-*O*-β-*D*-芸香糖苷。

化合物 **8**：黄色针状结晶。ESI-MS *m/z*：465.1 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）

δ:6.14（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），6.32（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），7.64（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2′），6.84（1H，d，J = 8.2 Hz，H-5′），7.62（1H，dd，J = 2.0，8.2 Hz，H-6′），5.22（1H，d，J = 7.0 Hz，H-1″），3.24 ～ 3.86（6H，m，H-2″ ～ H-6″）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ：158.4（C-2），135.7（C-3），179.4（C-4），163.0（C-5），100.0（C-6），166.1（C-7），94.8（C-8），159.0（C-9），105.6（C-10），123.1（C-1′），116.0（C-2′），145.9（C-3′），149.9（C-4′），117.6（C-5′），123.3（C-6′），104.5（C-1″），75.8（C-2″），78.3（C-3″），71.2（C-4″），78.1（C-5″），62.6（C-6″）。以上数据与文献[12]数据基本一致，故鉴定化合物 **8** 为槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷。

化合物 **9**：黄色针状结晶。ESI-MS *m/z*：303.0 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ：6.18（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），6.40（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），7.67（1H，d，J = 2.4 Hz，H-2′），6.88（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5′），7.53（1H，dd，J = 2.4，8.4 Hz，H-6′）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ：147.6（C-2），135.6（C-3），175.7（C-4），156.0（C-5），98.0（C-6），163.7（C-7），93.2（C-8），160.6（C-9），102.9（C-10），121.8（C-1′），114.9（C-2′），144.9（C-3′），146.7（C-4′），115.5（C-5′），119.8（C-6′）。以上数据与文献[13]数据基本一致，故鉴定化合物 **9** 为槲皮素。

4 结论

本文对槲木叶的正丁醇萃取部分进行了深入的化学成分研究，共分离鉴定得到 **9** 个黄酮类化合物，其中，化合物 **1** 为未见报道的新化合物，化合物 **2** 为从植物中分离得到的新天然产物，化合物 **4**、**5** 为首次在槲木属中分离得到，化合物 **9** 为首次从槲木叶中分离得到。这进一步丰富了槲木的化学成分，为深入挖掘其潜在的生物活性成分和质量标志物奠定了基础。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 1978：166-168.

[2] 许旭东，杨峻山 . 木属植物三萜皂甙研究进展 [J]. 药学学报，1997，15（9）：72-81.

[3] 张家鑫，田瑜，孙桂波，等 . 龙牙槲木皂苷类成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药，2013，44（6）：770-779.

[4] 赵博，王华东，王一峰，等 . 槲木主要化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中兽医医药杂志，2015，34（2）：77-80.

[5] Kostrzewa-Susłow E，Janeczko T. Microbial transformations of 7-methoxyflavanone [J]. Molecules，2012，17（12）：14810-14820.

[6] Antus S，Farkas L，Gottsegen Á，et al. Dihydrochalcone-type sweetening agents. Ⅱ . The synthesis of some dihydrochalcones [J]. Acta Chim，1978，98（2）：231-240.

[7] 刘鹏，张恩惠，张薇，等 . 四妙勇安汤水煎液化学成分研究 [J]. 中草药，2018，49（14）：3232-3239.

[8] Tomassini L，Ventrone A，Frezza C. Phytochemical analysis of *Viburnum davidii* Franch. and cholinesterase inhibitory activity of its dihydrochalcones [J]. Nat Prod Res，2021，35（24）：5794-5800.

[9] Tanaka T，Kawamura K，Kohda H，et al.Glycosides of the leaves of *Symplocos* spp.（Symplocaceae）[J]. Chem Pharm Bull，1982，30（7）：2421-2423.

[10] 许旭东，杨峻山 . 安徽槲木中的芳香类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2005，30（5）：398-399.

[11] 郭海茹，朱芳娟，李龙根，等 . 石榴皮化学成分研究 [J]. 云南农业大学学报（自然科学），2019，34（2）：362-369.

[12] 梅玉丹，李海波，王振中，等 . 灰毡毛忍冬花蕾中苷类化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（2）：287-292.

[13] 王宇杰，孙启时 . 金钱草的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志，2005，15（6）：357-359.

（收稿日期：2022-05-15；修回日期：2022-06-30）

五步蛇蛇毒对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响研究

曾晓艳[1]，林雅丽[2]，刘应蛟[2*]，黄玉婷[1]，龚力民[1]，刘塔斯[1]（1. 湖南中医药大学药学院，长沙　410000；2. 江西中医药大学药学院，南昌　330004）

摘要：目的　观察蛇毒对于脂多糖（LPS）诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症的影响，并初步探索其作用机制。**方法**　采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞构建立体外炎症模型，并通过 ELISA 法检测蛇毒 25、50 和 100 μg • mL^{-1} 对 TNF-*α*、IL-6 和 NO 炎症因子分泌或生成的影响；Western blot 法检测细胞中核转录因子（NF-*κ*B P65）、核转录因子 *κ*B 抑制剂激活酶（I*κ*K）及核转录因子 *κ*B 抑制剂（I*κ*B）的蛋白表达水平。**结果**　蛇毒质量浓度在 0 ～ 200 μg • mL^{-1} 时，对 RAW264.7 细胞无毒性作用；质量浓度为 25、50 和 100 μg • mL^{-1} 时对炎症模型分泌细胞因子 TNF-*α*、IL-6 和 NO 有明显的抑制作用，呈剂量依赖性；Western blot 结果显示，蛇毒 50 μg • mL^{-1} 和 100 μg • mL^{-1} 能显著降低 NF-*κ*B p65 及 I*κ*K 蛋白表达水平，升高 I*κ*B 表达水平。**结论**　蛇毒对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞具有抗炎作用，其抗炎活性可能通过抑制 TNF-*α*、IL-6 和 NO 炎症因子分泌和生成实现，其作用机制可能与抑制 NF-*κ*B p65 表达有关。

关键词：蛇毒；脂多糖；RAW264.7 细胞；细胞因子；核因子 *κ*B
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1820-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.018

Effect of agkistrodon acutus venom on RAW264.7 macrophages inflammatory response induced by lipopolysaccharide

ZENG Xiao-yan[1], LIN Ya-li[2], LIU Ying-jiao[2*], HUANG Yu-ting[1], GONG Li-min[1], LIU Ta-si[1] (1. *School of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410000; 2. *School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To observe the effect of agkistrodon acutus venom on lipopolysaccharide (LPS) induced RAW264.7 macrophages inflammation and determine its mechanism. **Methods** RAW264.7 cells were stimulated by LPS, and the model of inflammation in vitro was established. The effect of agkistrodon acutus venom (25, 50 and 100 μg • mL^{-1}) on the inflammation model and on the secretion inflammatory factors TNF-*α*, IL-6 and NO was detected by ELISA. Meanwhile, the expression levels of nuclear transcription factor (NF-*κ*B p65), nuclear factor *κ*B inhibitor activator (I*κ*K) and nuclear factor *κ*B inhibitor (I*κ*B) in each group were detected by Western blot. **Results** Agkistrodon acutus venom at 0 － 200 μg • mL^{-1} had no effect on the RAW264.7 cells. Agkistrodon acutus venom at 25, 50 and 100 μg • mL^{-1} significantly inhibited the secretion of inflammatory factors TNF-*α*, IL-6 and NO dose-dependently ($r = 0.957$, $P < 0.01$). Western blot showed that the protein expression levels of NF-*κ*B p65 and I*κ*K in 50 μg • mL^{-1} and 100 μg • mL^{-1} venom were significantly decreased ($P < 0.001$), while the expression level of I*κ*B was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Agkistrodon acutus venom has anti-inflammatory effects on RAW264.7 macrophages induced by LPS, whose anti-inflammatory activity is by inhibiting the secretion and production of TNF-*α*, IL-6 and NO, and also the inhibition of NF-*κ*B p65 expression.

Key words: agkistrodon acutus venom; lipopolysaccharide; RAW264.7 cell; cytokine; nuclear factor-*κ*B

基金项目：2019 年湖南省自然科学基金项目（No. 2019JJ50435）；2021 年中央财政国家重点野生动植物保护资金项目（No. 2130211）。
作者简介：曾晓艳，女，在读博士研究生，主要从事中药药性理论研究，email：76718924@qq.com　*__通信作者：__刘应蛟，男，副教授，主要从事中药资源与鉴定研究，email：liuyingjiaojiao@sina.com

五步蛇又名蕲蛇，学名尖吻蝮蛇，属于蝰科动物，主要分布在我国湖南、湖北、福建等黄河以南的地区，国外仅见于越南北部[1]。蛇毒是从毒蛇的毒腺中分泌出来的一种毒液，属于生物毒素，是所有毒素中结构最为复杂的一类物质，其主要化学成分为毒蛋白、多肽和酶类等二十种以上的生物活性物质[2]。在神经系统、心血管系统方面应用广泛。随着研究的不断深入，分子生物学和蛋白质组学的发展，蛇毒的一些有效成分被相继提取并应用于临床，在抗肿瘤、抗风湿、抗炎、抗凝血以及神经系统疾病治疗方面均有较好的疗效。

炎症反应是一种重要的机体防御过程，实质上是机体与致炎因子进行抗争的反应，最终使机体的内环境以及内环境和外环境之间达到新的平衡。免疫细胞激活是炎症反应的启动环节。RAW264.7巨噬细胞是炎症反应的重要效应细胞，在脂多糖（LPS）等外界因素刺激后能产生大量炎症细胞因子，如肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）、白细胞介素 6（IL-6）和一氧化氮（NO）等[3]。近年来神经毒素在抗炎方面的研究也成为一个热点，认为神经毒素能通过抑制多型核细胞的迁移产生一个长时程抗炎作用[4]。陶方方等[5]采用蕲蛇蛇毒对胶原诱导型关节炎大鼠血清 TNF-*α*、基质金属蛋白酶 -9（MMP-9）及金属蛋白酶组织抑制物 1（TIMP-1）的影响；蕲蛇毒素对大鼠佐剂性关节炎具有抑制作用[6]；蕲蛇提取物醇溶性和水溶性部位有一定的抗风湿关节炎作用[7]。目前蕲蛇蛇毒对炎症的发生发展还不明确。LPS 作为触发炎症的因子，LPS 与巨噬细胞膜上的 Toll-like 受体接触，刺激巨噬细胞，使巨噬细胞产生多种细胞因子和炎性介质，动物机体在致炎因子的作用下发生炎症反应[8]。此类致炎因子包括 TNF-*α*、IL-6 和 NO 等，对巨噬细胞发挥吞噬、抗原提呈及炎症调节等功能具有重要作用[9-10]。因而本实验采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞形成体外炎症模型，考察不同浓度蛇毒对炎性细胞因子 TNF-*α*、IL-6、NO 分泌的影响，并初步探索其作用机制，为五步蛇蛇毒的深层次开发和利用提供科学依据。

1　材料

1.1　细胞系

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7（普诺赛生命科技有限公司）。

1.2　试药

五步蛇蛇毒（简称蛇毒）取自湖南永州异蛇酒有限公司基地养殖的五步蛇，经低温保存，过滤处理，冷冻结成冰块后进行干燥，再真空干燥，自制得到冻干粉[11]。

PBS 缓冲液（Procell，批号：PB180327）、胎牛血清（FBS，Procell，批号：SA190501）、青霉素 - 链霉素溶液（双抗）（Procell，批号：PB180120）、DMEM 高糖基础培养基（Procell，批号：PM150210）、LPS（Solarbio，批号：426Y039）、噻唑蓝（MTT，Solarbio，批号：309E0511）、二甲亚砜（DMSO，批号：20180105）（国药集团化学试剂有限公司）；TNF-*α*、IL-6 和 NO 检测试剂盒（上海江莱生物科技有限公司）；核转录因子 p65 抗体（NF-*κ*B p65，批号：8242T）、核转录因子 *κ*B 抑制剂激活酶抗体（I*κ*，批号：3416T）和核转录因子 *κ*B 抑制蛋白抗体（I*κ*B，批号：76041T）（美国 CST）；Affinity Purified Antibody peroxidase Labeled Goat anti-Rat lgG（H ＋ L）（美国 KPL，批号：10232580）；ECL 发光液（北京普利莱基因技术有限公司，批号：P1050）。

1.3　仪器

LBI-150-L 洁净工作台（苏静安泰空气技术有限公司）；SW-CJ-1FD 生化培养箱（上海龙跃仪器设备有限公司）；NIB-100 倒置显微镜（南京江南永新光学有限公司）；3111 CO_2 培养箱、1510 酶标仪（赛默飞世尔科技有限公司）；LE204E102 电子天平（梅特勒托利多仪器有限公司）；DYCZ-40A 电泳仪 / 转膜仪（北京六一仪器厂）。

2　方法

2.1　MTT 法检测蛇毒对 RAW264.7 细胞的毒性

2.1.1　细胞处理　将 RAW264.7 细胞复苏后，混悬于含 10% FBS，1% 双抗的 DMEM 培养基中，37 ℃、5%CO_2 培养箱培养，2 ～ 3 d 换液和传代 1 次。

2.1.2　MTT 法检测细胞存活率　取生长状态良好、密度达到 80% ～ 90% 的 RAW264.7 细胞，密度为 2×10^5 个 • mL^{-1}、100 μL/ 孔接种于 96 孔板中，37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 12 h。实验分为空白对照（Kb）组和不同蛇毒浓度组（1、5、10、25、50、100、200、300 μg•mL^{-1}），每组平行 6 孔。蛇毒用 DMEM 培养基配制，并用 0.22 μm 滤膜过滤。对照组换含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基，蛇毒组分别加入不同浓度的蛇毒，放入 37 ℃、5%CO_2 培养箱中继续培养 24 h。然后避光加入 5 mg • mL^{-1} MTT 100 μL 于各孔中，继续培养 4 h。弃去培养液，每孔加入 100 μL DMSO，恒温振荡器上振荡 10 min，用酶标仪于 490 nm 处测定其吸光度，计算细胞存活率（%）＝（实验组平均 *OD* 值 / 对照组平均 *OD* 值）×100%。

2.2　细胞分组处理

参考“2.1.2”的实验结果，取无细胞毒性的蛇毒浓度 25、50 和 100 mg • L^{-1}。取处于生长对数生长期的 RAW264.7 细胞（2×10^8 个 • L^{-1}）移于 6 孔板，37 ℃、5%CO_2 培养箱培养 12 h。细胞分为空白对照（Kb）组、模型（LPS）组、蛇毒 25、50 和 100 mg • L^{-1} 组，各组设 3 个复孔。除空白对照组外，其余组细胞蛇毒预处理 2 h，然后加入 LPS 1 mg • L^{-1}，培养 24 h。吸取各组上清液，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，－ 20 ℃保存备用。

2.3　ELISA 方法检测蛇毒对 TNF-α、IL-6 和 NO 炎症因子分泌或生成的影响

取“2.2”项下上清液，采用小鼠 TNF-α、IL-6 和 NO 检测试剂盒测定上清液中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的含量。

2.4　Western blot 法检测 NF-κB p65、IκK、IκB 的蛋白表达

取“2.2”项下上清液，用预冷的 PBS 洗涤细胞后加入磷酸酶抑制剂（100∶1∶1）混合液，刮取贴壁细胞，冰上裂解 30 min，然后 4 ℃、12 000 r • min^{-1}，离心 30 min，取 2 mL 上清液用于蛋白浓度测定，其余样品加入 4×Loading Buffer，95 ℃金属浴 5 min，－ 80 ℃冻存。选用 10%Gel 和 5%SDS-PAGE 浓缩胶进行电泳，完成后将蛋白转至 PVDF 膜上，用 5% TBST 稀释的 BSA 溶液室温孵育 2 h，加入一抗（1∶1000）过夜，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min；加入二抗曝光。灰度扫描用 Image J 软件定量分析蛋白条带，以 β-Actin 作为内参，检测目的蛋白的表达变化。

2.5　数据处理与统计

数据采用 Graphpad 软件进行分析，组间比较采用双尾 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。灰度扫描用 Image J 软件定量分析蛋白条带，以 β-Actin 作为内参，检测目的蛋白的表达变化。

3　结果

3.1　蛇毒对 RAW264.7 细胞存活率的影响

结果见图 1，与空白对照组比较，蛇毒 300 μg • mL^{-1} 组细胞存活率明显降低（$P < 0.05$），当蛇毒质量浓度在 0 ～ 200 μg • mL^{-1} 时，细胞存活率差异均无统计学意义（$P > 0.05$），即蛇毒对 RAW264.7 细胞没有毒性作用（见图 1）。综合考虑选择 25、50、100 μg•mL^{-1} 作为蛇毒低、中、高剂量组进行后续实验。

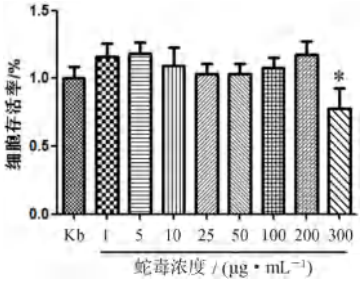


图 1　蛇毒对 RAW264.7 细胞活性的影响

Fig 1　Effect of agkistrodon acutus venom on the cell viability of RAW264.7 cells

注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal control group，$^{*}P < 0.05$.

3.2　蛇毒对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞分泌炎性细胞因子影响

与空白对照组相比，LPS 组中的 TNF-α、IL-6 和 NO 分泌水平显著增加（$P < 0.001$）。与 LPS 组比较，蛇毒 25、50、100 μg • mL^{-1} 剂量组的 TNF-α、IL-6 和 NO 分泌水平均显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$），并且呈剂量依赖性，见图 2。

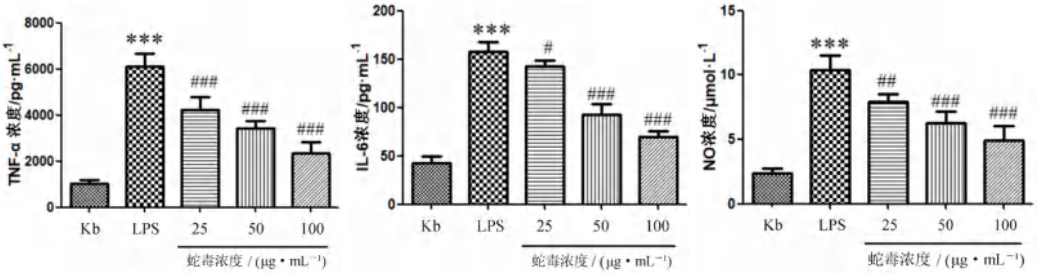


图 2　蛇毒对 TNF-α、IL-6 和 NO 分泌的影响

Fig 2　Effect of agkistrodon acutus venom on the secretion of TNF-α，IL-6，and NO

注：与空白对照组比较，$^{***}P < 0.001$；与 LPS 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Notes：Compared with normal control group，$^{***}P < 0.001$；compared with LPS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

3.3　蛇毒对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的中 NF-κB p65、IκK、IκB 蛋白表达影响

与空白对照组比较，LPS 组 NF-κB p65 及 IκK 蛋白表达显著上调（$P < 0.001$），而 IκB 蛋白表达显著下调（$P < 0.001$）。予以蛇毒干预后 25 μg • mL^{-1} 组的 NF-κB p65 及 IκK 蛋白表达显著降低（$P < 0.01$），IκB 蛋白表达没有明显变化（$P > 0.05$）；蛇毒 50 μg • mL^{-1} 和 100 μg • mL^{-1} 组 的 NF-κB p65 及 IκK 蛋白表达显著降低（$P < 0.001$），IκB 蛋白表达显著升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$），结果见图 3。

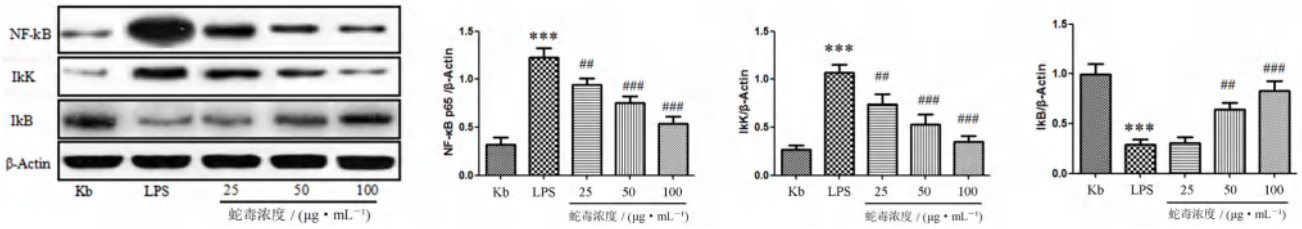


图 3　蛇毒对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的中 NF-κB p65、IκK、IκB 蛋白表达影响

Fig 3　Effect of agkistrodon acutus venom on the protein expression of NF-κB p65，IκK，and IκB in RAW264.7 cells stimulated by LPS

注：与空白对照组比较，$^{***}P < 0.001$；与 LPS 组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Notes：Compared with normal control group，$^{***}P < 0.001$；compared with LPS group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

4　讨论

TNF-α 是由单核细胞 - 巨噬细胞受到促炎因子的刺激后合成和释放的一种关键性促炎性蛋白 [11]，具有广泛生物学活性的炎性介质。TNF-α 的生物活性受其浓度高低的影响，在正常情况下，机体内 TNF-α 的浓度较低，有抗肿瘤、抗感染、促进 B 细胞增殖分化等多种生理功能，可调节免疫应答，是机体免疫防护的重要介质；而当 TNF-α 浓度过高时，反而会作为重要的炎症递质介导炎症反应的病理生理过程，能增加微血管壁的通透性，并刺激中性粒细胞及内皮细胞表面黏附受体，趋化中性粒细胞等炎症细胞，启动炎症反应，介导感染引起的炎症损害 [12]。IL-6 是机体 T 细胞经过活化后分泌的一种重要免疫调节因子，与 TNF-α 相似，并且与 TNF-α 共同参与调节炎症反应，作为一种促炎因子，为反映机体炎症程度的重要指标 [13]。NO 是具有生物活性的气体分子，其大量生成与炎症密切相关，在急性炎症部位会通过细胞毒性效应引起细胞损伤，进而引起炎症相关疾病的发生和发展 [3]。本研究采用 ELISA 法测定相关促炎因子的含量水平，结果表明，与模型组比较，蛇毒低、中、高剂量（25、50、100 μg • mL^{-1}）组均可以通过抑制 TNF-α 和 IL-6 分泌以及 NO 释放，从而达到抗炎的效果。提示蛇毒低、中、高剂量组的抗炎作用与其能够抑制促炎因子 TNF-α、IL-6 和 NO 的释放有密切关系。

核转录因子 κB（NF-κB）广泛存在于细胞质中，参与机体的炎性反应、免疫应答及细胞的生长调控等过程。在静息状态下，NF-κB 与抑制蛋白 IκB 结合形成复合体，被稳定在细胞质中而不能发挥其基因转录调控的功能 [14]。当细胞受到外源性刺激，如 TNF-α、IL-1β、IL-6、NO、T 细胞激活剂、生长因子及病毒感染等，NF-κB 诱导激酶（NIK）为 IκK 的上游激酶，NIK 可引起 IκKα 与 IκKβ 相应位点的磷酸化，通过级联反应，使 IκBs 磷酸化而与 NF-κB 解离，致使 NF-κB 被激活 [15]。可见 NF-κB 信号通路对炎症反应的发生发展过程发挥着重要作用。王君燕等 [16] 证明獐牙菜苦苷对 LPS 诱导的炎症模型中 TNF-α、IL-6 的生成具有抑制作用，其机制可能与抑制 NF-κB 通路相关因子 p65、IKK-α 的表达有关。陈谱等 [17] 认为芍药苷可以阻止 NF-κB 通路激活，抑制软骨细胞炎症及延缓软骨退变。赵康博等 [18] 认为 30 ～ 240 mg • L^{-1} 辣椒碱可以显著降低由 LPS 诱导的 My D88 和 NF-κB mRNA 的表达，提示辣椒碱的抗炎活性可能与 NF-κB 信号通路有关。本研究采用 Western blot 法检测各组细胞中 NF-κB p65、IκK 及 IκB 表达水平。结果显示，蛇毒 50 μg • mL^{-1} 和 100 μg • mL^{-1} 组 NF-κB p65 及 IκK 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.001$），而 IκB 表达显著升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。

现代药理研究认为蛇毒具有镇痛（类似吗啡样镇痛作用包括缓解恶性肿瘤疼痛、神经痛和关节痛等），抗风湿，抗肿瘤以及神经系统疾病治疗方面的作用 [19]。目前，研究者们对于蛇毒粗毒应用于抗炎作用以及机制的研究报道甚少，本实验采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞形成体外炎症模型，观察了蛇毒干预后 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF-κB 信号通路 NF-κB p65、IκK、IκB 表达含量变化，发现蛇毒可以显著抑制 LPS 诱导的 NF-κB 信号通路激活。

综上，本研究结果表明，五步蛇蛇毒可能抑制 TNF-α 和 IL-6 分泌以及 NO 生成，从而达到抗炎的作用，其作用机制可能是上调 NF-κB p65 及 IκK 表达水平，下调 IκB 表达水平，激活 NF-κB 信号通路来抑制炎症反应的发生。

参考文献

[1]　李峰 . 中药鉴定学 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2016：485-487.

[2]　朱扣柱，殷建忠，叶建林，等 . 眼镜蛇毒抗炎成分研究

概况 [J]. 蛇志，2014，26（2）：201-204.
[3] 马丽，冯程程，徐利娟，等 . 温通活血乳膏对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF-α、IL-6、NF-κB 表达的影响 [J]. 中成药，2018，40（9）：2058-2062.
[4] Nunes FPB，Sampaio SC，Santoro ML，et al. Long-lasting anti-infammatory properties of Crotalus durissus terrifcus snake venom in mice [J]. Toxicon，2007，49（8）：1090-1098.
[5] 陶方方，汪丽佩，陈兰，等 . 蕲蛇蛇毒对胶原诱导型关节炎大鼠血清 TNF-α、MMP-9 及 TIMP-1 的影响 [J]. 中华中医药杂志，2014，29（10）：3309-3311.
[6] 文浩平，和七一，邓疆渝，等 . 五步蛇毒素对大鼠佐剂性关节炎的影响 [J]. 毒理学杂志，2010，24（4）：306-308.
[7] 刘宇翔，刘瑶，冯露雅，等 . 蕲蛇蛇毒的研究进展 [J]. 生物化工，2018，4（6）：137-141.
[8] Parrillo JE，Parker MM，Natanson C，et al. Septic Shock in humans：advances in the understanding of pathogenesis cardiovascular dysfunction and therapy [J]. Ann Intern Med，1990，113（3）：227-242.
[9] 杨一新，李桂源 . LPS 所介导的信号转导通路研究进展 [J]. 中南大学学报（医学版），2006，31（1）：141-145.
[10] 刘春杰，杨丽华，张春，等 . 复方中药加味四物汤对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达的影响 [J]. 中兽医医药杂志，2018，37（5）：20-25.
[11] 曾晓艳，郑沛，曹玮龙，等 . 五步蛇蛇毒化学成分分析及其抗肿瘤活性筛选研究 [J]. 中国药师，2022，25（3）：439-444.
[12] 张晴，赵雪姣，童玲，等 . 针叶樱桃浓缩物及其配伍组合物的抗炎作用研究 [J]. 广东药科大学学报，2021，37（4）：91-95.
[13] 李娜，于光志，张葆青，等 . 祛湿通络方对肺炎支原体感染的 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 表达的影响 [J]. 天津中医药大学学报，2020，39（5）：564-569.
[14] 宁乔怡，周静，李东晓，等 . 苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 NF-κBp65，IKK-α 及 IKK-β 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（7）：154-159.
[15] 郝锋，蔡荣林，余情，等 . 电针预处理对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织 NF-κB p65、IκBα、IKKβ 蛋白表达的影响 [J]. 中国针灸，2020，40（10）：1103-1107.
[16] 王君燕，童晔玲，赵文慧 . 獐牙菜苦苷的抗炎活性及其对 NF-κB 通路相关因子 p65 和 IKK-α 表达的影响 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（12）：1817-1820.
[17] 陈谱，阮安民，周俊，等 . 基于 NF-kB 信号通路探讨芍药苷对 LPS 诱导的人软骨细胞炎症及退变的作用机制 [J]. 北京中医药大学学报，2020，43（11）：903-909.
[18] 赵康博，单舒萱，李敬双，等 . 辣椒碱体外抗炎活性的研究 [J]. 饲料研究，2021，44（12）：71-75.
[19] 付大雁 . 五步蛇蛇毒分离纯化中纤溶酶和类凝血酶的研究 [D]. 北京：北京化工大学，2005，4：1-17.

（收稿日期：2022-01-03；修回日期：2022-03-18）

基于拉曼光谱的中药甘味辨识方法研究

沙晗[1]，刘淑明[1]，王慧[1]，田雪梅[1,2]，王耘[1*]（1. 北京中医药大学 中药学院 中药信息工程研究中心，北京 102488；2. 北京中医药大学 生命科学学院，北京　102488）

摘要：目的　对甘味与非甘味中药的拉曼光谱进行比较分析，以此建立识别模型并进行评价筛选。**方法**　139 种甘味中药及 191 种非甘味中药经样品前处理后，利用 SEED 3000 拉曼光谱仪分析，得到每味中药的拉曼谱图，并以 1 cm^{-1} 为单位量化；对量化后的拉曼数据进行特征选取，筛选出与甘味密切相关的特征拉曼位移及其峰强，然后基于多种机器学习算法建立识别模型。**结果**　相较于非甘味中药，甘味中药在 200 ～ 3000 cm^{-1} 内呈现出低强度的拉曼散射；以基尼系数排名前 300 拉曼数据所建立的随机森林模型表现出最佳的分析效果，准确率和精确度大于 80.3%，曲线下面积大于 0.865。**结论**　中药拉曼谱图与药性甘味具有显著相关性，可作为甘味整体量化表征，结合随机森林算法高效、准确地进行判别分析。

关键词：中药；拉曼光谱；药性；甘味；随机森林；特征筛选
中图分类号：R284.1，O657.137　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1824-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.019

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973495）。

作者简介：沙晗，女，硕士研究生，主要从事中药信息融合方面的研究，email：shahan0213@163.com　*通信作者：王耘，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药信息融合和系统中药学方面的研究，email：wangyun@bucm.edu.cn

Identification of sweetness in traditonal Chinese medicine based on Raman spectroscopy

SHA Han[1], LIU Shu-ming[1], WANG Hui[1], TIAN Xue-mei[1, 2], WANG Yun[1*] (1. *Research Center of TCM-Information Engineering*, *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *School of Life Sciences*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To establish identification models and evaluation screening by comparing the Raman spectroscopy of sweet and non-sweet traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** Totally 139 sweet and 191 non-sweet TCM were analyzed with the SEED 3000 Raman spectroscopy after sample pre-treatment to obtain Raman spectroscopy for each TCM, and quantified in units of 1 cm^{-1}. Then feature selection was performed on the quantized Raman data to obtain the characteristic Raman shift and the peak intensity which was closely related to the sweetness. Finally, identification models were established based on a plurality of machine learning algorithms and characteristic Raman data. **Results** Compared with non-sweet TCM, sweet TCM exhibited low-intensity Raman scattering at 200 ～ 3000 cm^{-1}, and the random forest model built with the top 300 Raman data in terms of Gini coefficient showed the best analysis effect (accuracy and precision greater than 80.3%; *AUC* greater than 0.865). **Conclusion** The Raman spectroscopy of TCM has significant correlation with sweetness, which can be used as an overall quantitative characterization of sweet, combined with random forest algorithm for efficiency and accuracy analysis.

Key words: traditional Chinese medicine; Raman spectroscopy; drug property; sweetness; random forest: feature selection

“五味”是中药药性理论的重要组成部分，具体是指“酸”“苦”“甘”“辛”“咸”[1-2]。相较于药性中的“四气”和“归经”，其重要程度虽略有不足，但依然对于临床遣方用药、功效比类归属、药性学术研究等具有重要意义。

目前，研究者以“五味”为研究目标，进行了大量的探索，积累了宝贵的经验。汤学军等[3]探索了中药稀土元素含量分别与“五味”之“辛”“甘”“苦”的关联性，结果发现“辛”味中药的稀土元素含量明显高于“苦”“甘”味中药，以镧系元素最为显著。另有学者认为“五味”的根源在于物质成分，得出“酸”味中药含有更多鞣质、有机酸等成分[4-5]；此外，研究者从味觉受体的角度发现，味觉第一受体家族（T1Rs 家族）的 T1R2/T1R3 以异源二聚体的形式作为甘味受体，可与许多甘味物质相结合[6]；而苦味受体家族（TAS2Rs）家族能与多味“苦”性中药成分作用等[7]。

上述相关研究均在一定程度上丰富了“五味”学说，为揭示其科学内涵提供了依据。但不可忽视的是依然存在着些许局限：① 研究往往是基于单味、几十味中药的小样本量分析，缺乏说服力，不具有普适性；② 中药作为分子集合体系，是一个复杂系统，而仅以元素、单一或少数物质成分及其靶点效应作为整个中药的表征尚有待考证，部分代替整体，忽视中药的宏观整体性，易产生以偏概全的结论。基于以上思考，本研究以药性是中药的固有属性为基本出发点，秉承宏观整体论的观念，以“五味”之“甘”为研究对象，结合大样本量的中药拉曼检测对其进行统计分析，并建立识别模型并进行评价筛选，以期得到甘味的整体量化表征和识别模型，丰富“五味”学说，促进中医药理论现代化发展。

1　材料

1.1　仪器

SEED 3000 近红外拉曼光谱仪（上海如海光电公司）；220V 不锈钢压片模具（天津中世沃克有限公司）；RS-FS1801 中药材超微粉碎机（广州荣事达有限公司）；DZF-6020 真空干燥箱（上海一恒有限公司）。

1.2　试药

纯水（屈臣氏有限公司）。巴戟天、大枣、当归、甘草、防风、黄芪、山药、鹿茸、金银花、麦冬、艾叶、大黄、防己、枸骨叶、麻黄、羌活、益母草等中药共计 330 种（甘味中药 139 种，非甘味中药 191 种）均由安国市桓荣中药材有限公

司提供，且所有药材经鉴定均符合 2020 年版《中国药典》规定，并出具鉴定报告。

2　方法与结果

2.1　样品预处理

330 种中药材采用超纯水洗净，去除表面灰尘等杂质。然后放置于真空干燥箱中 26 ℃恒温干燥 1 h 后，利用超微粉碎机打成粉末 [8]，再利用 220 V 不锈钢压片模具进行压片以备检测。

2.2　检测条件

激光器：Seabreeze Laser；激光器类型：板载激光器；中心波长：785 nm；功率：120 mW；光谱仪：XS11639-B40090157；积分时间：7000 ms；平均采集次数：3 次；平均模式：硬件平均；拉曼位移 200 ～ 3000 cm^{-1}；基线处理 lamdba：10 000，order：2；平滑滤镜 lamdba：20，order：2。

2.3　数据收集方法

中药材经样品预处理后，将压片放置于样品台进行检测，采用连续扫描收集、激光自动模式，共计采集 10 次 [9]。计算每味中药 10 次拉曼谱图的平均谱图 [10]，作为该中药最终拉曼谱图，并将其以 1 cm^{-1} 为单位进行数字量化处理。

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性考察　以当归、冰片、枸杞子、山药、天花粉等为例进行专属性考察。此外，将功率调至 0 mW，采集得到空白谱图。专属性结果见图 1，表明不同中药因性质的差异表现出各异的拉曼谱图，且峰形良好，对中药进行拉曼检测无明显荧光干扰。

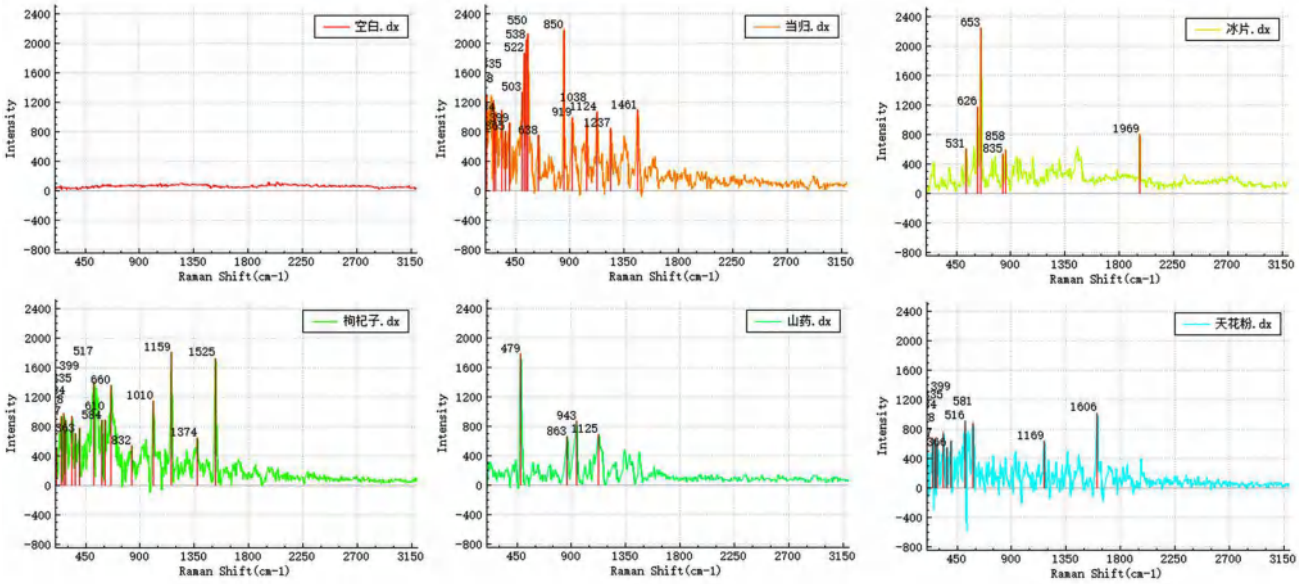


图 1　中药拉曼谱图专属性考察

Fig 1　Raman spectra specificity of TCM

2.4.2　精密度考察　以部分中药如川牛膝、艾叶、杜仲、党参等开展拉曼光谱仪精密度考察。经样品预处理后，先后放置于样品台进行 6 次拉曼光谱平行检测，记录中药拉曼谱图的特征拉曼位移点（cm^{-1}）及其所对应的峰强（*I*），并计算 *RSD* 值。同时，对拉曼谱图进行逆峰位匹配检索，计算谱图相似度。结果 *RSD* 值均小于 3.0%，相似性大于 89.25%，表明拉曼光谱仪精密度良好。

2.4.3　重复性考察　以不同地区（河南、河北、宁夏、山东、安徽）生产的山药、枸杞、茯苓等进行重复性考察。先后进行拉曼检测，记录中药拉曼谱图的特征拉曼位移点（cm^{-1}）及其所对应的峰强（*I*），并计算 *RSD* 值。同时进行逆峰位匹配检索，计算谱图相似度。*RSD* 值均小于 3.3%，相似度大于 87.35%，结果表明重复性良好。

2.5　拉曼光谱比较及特征筛选

基于“2.3”项下数据收集方法，得到 139 种甘味中药与 191 种非甘味中药的最终拉曼谱图数据，并对甘味与非甘味中药的拉曼谱图进行统计比较。结果发现甘味中药组在拉曼位移 200 ～ 3000 cm^{-1} 内的拉曼散射强度普遍低于非甘味中药组，且具有显著性差异。以上结果表明，中药的拉曼谱图在一定程度上与“五味”中的“甘”具有密切的相关性。因此，量化后的中药拉曼谱图可作为甘味的整体量化表征。

通过平均基尼系数降低度（MDG）对谱图数据进行特征筛选，筛选得到 MDG ＞ 0.033 的前 1000 的拉曼位移及其峰强数据如 I2833、I2810、I2557、I2835、I2142、I2187 等，部分结果见图 2。MDG 值越高，说明该数据对于甘味中药组与非

甘味中药组分类越重要，而特征筛选结果表明对于区分中药甘味与非甘味的重要拉曼数据主要集中在谱图的后半段 1600 ～ 3000 cm^{-1}。

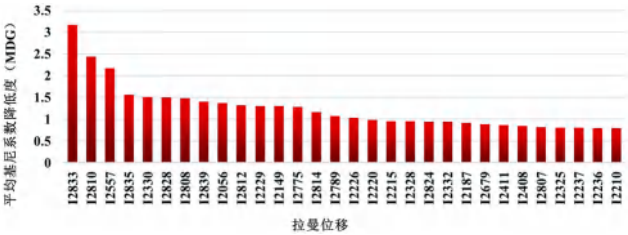


图 2　基于 MDG 的特征筛选

Fig 2　Feature selection based on MDG

2.6　识别模型的建立与评价

甘味中药组与非甘味中药组的拉曼谱图表现出显著性差异，本文基于这种差异建立甘味的辨识模型。为得到良好的识别模型，在软件 Orange 3.29.4 中以“2.5”项下筛选出的与甘味密切相关的前 100 ～ 1000 特征拉曼数据为基准用于辨识模型的构建：分别利用 MDG 前 100、200 … 900、1000 的拉曼数据，结合人工神经网络（ANN）、随机森林（RF）、支持向量机（SVM）、贝叶斯网络（NN）算法，经参数自动寻优法建立针对中药甘味的识别模型，并基于十折交叉验证的准确率（CA）、*AUC* 和精确度等进行模型评价筛选。

评价结果表明 MDG 前 100 至前 1000 的拉曼数据所建模型中，均以 RF 模型表现出最佳的识别效果，其准确率和精确度大于 0.803，*AUC* 均大于 0.865，普遍优于支持向量机（SVM）模型，后者的准确率普遍在 79.1% ～ 79.4%，*AUC* 在 83.1% ～ 85.0%。其中，NN 模型的准确率与 RF 模型准确率和精确度基本一致，但从 *AUC* 而言，RF 模型普遍高于贝叶斯模型，后者 *AUC* 在 0.833 ～ 0.847。ANN 模型效果较差，准确率和精确度在 73.0% ～ 76.7%，低于其他模型。综上，RF 模型展现出最佳的识别效果。

与此同时，以 RF 模型为最优模型，经纵向比对发现利用 MDG 前 300 拉曼数据所建 RF 模型的综合效果最佳（具体参数见表 1）。随着模型中拉曼数据的增加，模型的准确率和 *AUC* 整体呈下降趋势，随机森林模型 *AUC* 和准确率趋势图分别见图 3 和图 4。

当以 MDG 前 600 的拉曼数据建立模型时，RF 模型准确率最高为 81.8%，但其所对应的 *AUC* 相对较低为 0.873；当以 MDG 前 300 的拉曼数据建立模型时，*AUC* 为最高值 0.883，具有最好的识别效果，且其对应的准确率为 81.5%，与最高准确率 81.8% 仅相差 3%，既保证了良好的识别效果，又具有较高的准确率。基于 MDG 前 300 拉曼数据的 RF 模型，可实现对甘味与非甘味中药的高效、准确辨识。

表 1　MDG 排名前 300 拉曼数据各模型的评价参数

Tab 1　Evaluation parameters of models for top 300 Raman data of MDG

模型	*AUC*	准确率 /%	F1	精确度 /%	召回率 /%
RF	0.883	81.5	0.816	81.7	81.5
SVM	0.844	80.3	0.804	81.2	80.3
ANN	0.814	75.2	0.752	75.3	75.2
NB	0.847	81.2	0.813	82.2	81.2

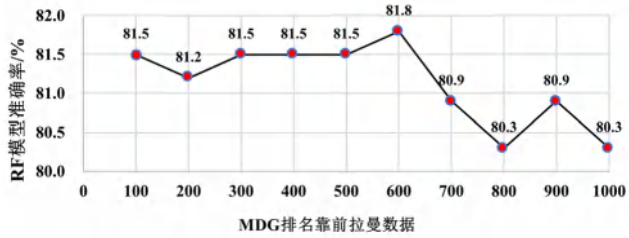


图 3　RF 模型准确率趋势图

Fig 3　Accuracy of RF models

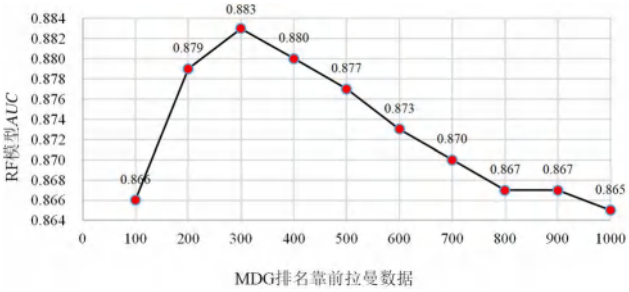


图 4　RF 模型的 *AUC* 趋势图

Fig 4　*AUC* trend chart of RF model

3　讨论

本研究是以甘味为中药的固有属性为基本出发点，扩大分析样本量以得到更加准确可靠、普遍适用的结论。在研究中按 2020 年版《中国药典》所记录的“五味”为准，凡记录有“甘”“微甘”（兼有亦包括在内）统一记作甘味中药组。拉曼光谱是为分子振动散射光谱，而绝大多数的中药可看作是由分子所构成的集合体系，因此，中药拉曼谱图是在分子层面对中药分子集合的整体反映，与传统中医药的整体观念相契合，能够在分子水平作为中药的整体性表征 [11-12]。

相较于其他光谱而言，拉曼光谱易受荧光效应的干扰 [13]，致使噪声较大，在研究中，为最大程度避免荧光效应的干扰，采取如下做法：① 在样品预处理时，将药材洗净，去除表面灰尘、沾染物等杂质；② 由于中药的荧光波长一般大多产生在紫外区域，选定近红外中心波长 785 nm 可在一定程度上有效减少荧光效应的干扰 [13-14]；③ 采取连续采集模式，延长激光对样品的照射时间，利用“光致漂白”效应最大程度降低荧光干

扰[13，15]。同时后继的数据分析中，特征筛选是在多样品测试结果基础上总结、筛选得到具有规律性的信号，而噪声大多无规律可循。因此，通过特征筛选亦可有效降低噪声数据的干扰。

本文在对大批量甘味与非甘味中药进行拉曼检测前，分别选取不同的中药进行了专属性试验、精密度和重复性试验，以确保试验条件并非仅适用于特定的某一味中药，而是对 330 味中药具有普适性。

由于中药拉曼光谱数据高维、非线性、非正态等特点，合适的数据分析方法十分关键。相较于特征提取方法——线性判别（LDA）和主成分分析（PCA）[16-17]，基于 MDG 的特征筛选同样可将高维数据转变为低维数据，快速筛选得到与甘味最为相关的拉曼数据，此外，其不受数据分布限制，在去除冗杂数据的同时保留原有属性，不易产生过拟合结果[18]。综上考虑选择 MDG 进行特征筛选。

根据量子电动力学理论，斯托克斯（STKS）拉曼谱峰的强度（I）计算公式[15]进行计算。由于中药是一个复杂的分子体系，其散射强度是每味中药所有分子相互叠加、影响后的整体表现。甘味中药与非甘味中药的物质基础不同，其相互影响、叠加后的分子振动 - 转动能级有所差异，以及甘味中药整体分子体系极化率和偶极矩变化小，致使极化率张量分量 α_{ij} 随简正坐标的变化率 $\beta\alpha_{ij}/\beta Q_k$ 较低，从而产生低强度的拉曼谱图，是甘味中药与非甘味中药拉曼谱图具有显著性差异的根本原因。在此基础上，甘味中药与非甘味中药的拉曼谱图差异表明了中药拉曼光谱与五味之“甘”的相关联系，亦是利用拉曼光谱辨识甘味中药的基本依据。

本研究以“五味”之“甘”为研究对象，在中药拉曼光谱检测、量化表征以及特征筛选的基础上所建立的 RF 模型表现出较好的识别效果，尤以 MDG 前 300 拉曼数据所建 RF 模型最佳。通过大批量中药拉曼光谱检测，其结果更具说服力。

4　结论

本研究通过大批量中药拉曼光谱的检测，对甘味与非甘味中药的拉曼光谱进行比较分析和识别模型的构建、评价。相较于非甘味中药，甘味中药呈现出低强度的拉曼散射，具有显著性差异；中药拉曼谱图与药性甘味具有显著相关性，可作为甘味整体量化表征，结合 RF 算法高效、准确地进行辨识分析。

参考文献

[1] 史伟，孙东雪 . “五味”理论源流考 [J]. 安徽中医药大学学报，2017，36（5）：7-10.

[2] 王常婷 . 中药五味 [J]. 福建文学，2019，69（10）：79-87.

[3] 汤学军，管竞环 . 中药辛、甘、苦味与稀土元素的关系 [J]. 微量元素与健康研究，1994，11（4）：24-26.

[4] 李文兰，张秀丽，隋峰，等 . 中药性味理论的现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（12）：227-230.

[5] 阮毅铭 . 乌梅的化学成份及药理作用概述 [J]. 中国医药导刊，2008，10（5）：793-794.

[6] Von Molitor E，Riedel K，Krohn M，et al. Sweet taste is complex：signaling cascades and circuits involved in sweet sensation [J]. Front Hum Neurosci，2021，15：667709.

[7] Adler E，Hoon MA，Mueller KL，et al. A novel family of mammalian taste receptors [J]. Cell，2000，100（6）：693-702.

[8] 史芳芳，周孟焦，崔仕远，等 . 涪城麦冬的拉曼光谱分析 [J]. 中医药导报，2020，26（9）：34-36，48.

[9] 刘影，汪晓娟，刘龙 . 拉曼光谱在三七中药识别中应用 [J]. 海峡药学，2020，32（8）：60-62.

[10] 邓家刚，刘进，覃洁萍，等 . 20 种活血化瘀中药提取物的红外光谱分析及其与药性相关性的初步探讨 [J]. 光谱实验室，2010，27（2）：741-744.

[11] Esmonde-White K A，Cuellar M，Uerpmann C，et al. Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing [J]. Anal Bioanal Chem，2017，409（3）：637-649.

[12] 曹露，朱嘉森，管艳艳，等 . 拉曼光谱技术在药物分析领域的研究进展 [J]. 光散射学报，2019，31（2）：101-111.

[13] Goldrick S，Lovett D，Montague G，et al. Influence of incident wavelength and detector material selection on fluorescence in the application of raman spectroscopy to a fungal fermentation process [J]. Bioengineering（Basel），2018，5（4）：79.

[14] 樊凤杰，轩凤来，白洋，等 . 基于三维荧光光谱特征的中药药性模式识别研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2020，40（6）：1763-1768.

[15] 朱自莹，顾仁傲，陆天虹，等 . 拉曼光谱在化学中的应用 [M]. 辽宁：东北大学出版社，1997：31-38.

[16] Gurian E，Di Silvestre A，Mitri E，et al. Repeated double cross-validation applied to the PCA-LDA classification of SERS spectra：a case study with serum samples from hepatocellular carcinoma patients [J]. Anal Bioanal Chem，2021，413（5）：1303-1312.

[17] 杜晶，赵黎明 . 主成分分析应用于综合评价的局限性 [J]. 内蒙古农业大学学报（社会科学版），2007，9（6）：125-127，130.

[18] Sarker IH. Machine learning：algorithms，real-world applications and research directions [J]. SN Comput Sci，2021，2（3）：160.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-05-04）

琥珀酸在哌柏西利片中的应用研究

钱进[1]，霍立茹[1, 2*]，张倩倩[2]（1.徐州医科大学，江苏　徐州　221000；2.南京济群医药科技股份有限公司，南京　211100）

摘要：目的　筛选合适目数的琥珀酸解决哌柏西利片原料流动性、可压性及溶出度较差的问题。**方法**　以琥珀酸的主要功能性指标及哌柏西利的可压性、溶出曲线、有关物质为评价指标，考察不同目数的琥珀酸对哌柏西利片制备的影响。**结果**　筛分 30 ～ 40 目琥珀酸（粒径约为 327.99 μm）制备的哌柏西利片混粉流动性及可压性较好，溶出行为与参比制剂相似，产品质量与参比制剂基本一致，且不同批次样品功能性指标具有一致性。**结论**　30 ～ 40 目琥珀酸（粒径约为 327.99 μm）适用于制备哌柏西利片。

关键词：琥珀酸；哌柏西利；处方研究；溶出曲线；有关物质
中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1829-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.020

Application of succinic acid in piperacillin tablets

QIAN Jin[1], HUO Li-ru[1, 2*], ZHANG Qian-qian[2] (1. *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou Jiangsu* 221000; 2. *Nanjing Gritpharma Co.*, *Ltd.*, *Nanjing* 211100)

Abstract: Objective To screen succinic acid with appropriate mesh number to solve the problems of poor raw material fluidity, compressibility and dissolution of piperacillin tablets, and ensure the drug quality. **Methods** The main functional indexes of succinic acid, and tablet compressibility, dissolution curve and related substances of piperacillin tablets was used as evaluation indexes. The effect of succinic acid with different mesh numbers on the preparation and production of piperacillin tablets was dertermined. **Results** The prepared piperacillin tablets had good powder mixing fluidity and compressibility with succinic acid (30 ～ 40 mesh, particle size at 327.99 μm). The dissolution behavior was similar to the reference preparation, the product quality consistent with the reference preparation, and the functional indexes of different batches of samples were also consistent. **Conclusion** Succinic acid (30 ～ 40 mesh, particle size at 327.99 μm) is suitable for the preparation of piperacillin tablets.
Key words: succinic acid; piperacillin; prescription study; dissolution curve; related substance

哌柏西利片是治疗乳腺癌晚期的主要药物。其片剂因主药含量大，可压性及流动性不佳而较难制剂化，且主药在 pH 4.5 介质中溶解度差而难以产业化，故需选用适宜的辅料进行制备[1-3]。琥珀酸常作为片剂的助溶剂、润滑剂等，具有抗结块、改善流动性及提高药物稳定性和溶解度等作用。不同目数的琥珀酸具有不同特性，能够从结合性、溶解性及稳定性等多方面影响片剂的质量，因此琥珀酸目数的筛选尤为重要。本试验通过对比不同目数琥珀酸的主要功能性指标，分别制备处方研究其对哌柏西利片制备过程中物料流动性、可压性及包衣片的溶出曲线、有关物质的影响，筛选出合适目数（粒径范围）的琥珀酸用于哌柏西利片的制备[4-6]。

1　材料

1.1　仪器

AL104 型电子天平（Mettler Toledo），6S-OCE-DM 微量电子天平（Sartorius），U3000 高效液相色谱仪（DIONEX），BM2000 显微镜（江南永新光学仪器有限公司），GL2-35 干法制粒机（张家港市开创机械制造有限公司），ZPS-8 压片机（上海信源制药机械有限），S250SMART 高速压片机（山东新马制药装备有限公司），三维混合机（南京锐霸科技有限公司），YD-35 硬度仪（天津市鑫洲科技有限公司），MB-35 水分测定仪（奥豪斯仪器有限公司），HELOS/BR-RODOS/T4 激光粒度测定仪

作者简介：钱进，男，在读硕士研究生，主要从事新剂型与新技术的横向研究，email：1589852770@qq.com　*通信作者：霍立茹，女，高级工程师，主要从事药物研究及产业化研究，email：569876435@qq.com

（Sympatec），UV-2600 紫外分光光度计（日本岛津），FADT-1202 自动取样溶出仪（Focs），高效包衣机（深圳信宜特科技有限公司），药品强光照射试验箱（重庆永生实验仪器厂），恒温恒湿箱（施都凯仪器设备有限公司）。

1.2　试药

哌柏西利片（辉瑞公司，批号：EW2912，规格：125 mg/ 片）；哌柏西利片（南京济群医药科技股份有限公司，规格：125 mg/ 片，批号分别为 210320、210402、210411、210422、210506-1/-2）；对照品哌柏西利（批号：20091201，纯度：99.90%）、杂质 A（批号：21416，纯度：99.31%）、杂质 B（批号：21446，纯度：99.31%）（中国食品药品检定研究院）；琥珀酸（南京化学，批号：201030083C、201040091C、201030062C）；微晶纤维素（旭化成，批号：2624，型号：PH102）；羧甲基纤维素钠（德国瑞登梅尔，批号：3201081037）；胶态二氧化硅（德国 Evonik，批号：159011814）；硬脂酸镁（湖州展望，批号：20200103）；薄膜包衣预混剂（上海卡乐康包衣技术有限公司）。

2　方法及结果

2.1　琥珀酸功能性指标测定

结合原料流动性及可压性较差的性质并查阅产品介绍，选择 4 种具有代表性的琥珀酸（30 目、40 目、60 目、80 目）进行考察，通过其相关指标特性进行筛选。

2.1.1　粒径分布的测定　使用激光粒径仪干法进样测定琥珀酸的粒径分布，分散压力为 4 bar，进样速率 70%，使用 RAOXO 2.0 软件对不同目数筛分的琥珀酸粒度分布进行分析，结果见图 1、表 1。

2.1.2　流动性的测定　测定琥珀酸的休止角以考察其流动性，具体方法为将漏斗固定于水平铁架台上，从漏斗中缓慢加入物料至物料圆锥体高度不再增加，量取物料垂直高度及圆锥体半径，以物料垂直高度及圆锥半径比为正切值计算休止角[7]，每批样品测量 3 次取平均值，结果见表 1。

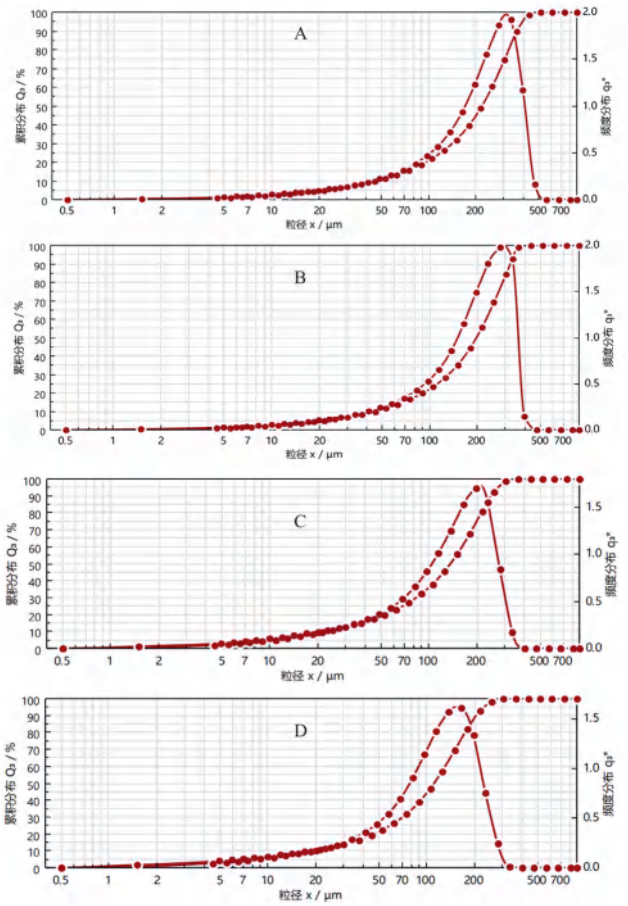


图 1　琥珀酸粒度分布图

Fig 1　Particle size distribution of succinic acid

A. ＞ 30 目（＞ 30 mesh）；B. 30 ～ 40 目（30 ～ 40 mesh）；C. 40 ～ 60 目（40 ～ 60 mesh）；D. 60 ～ 80 目（60 ～ 80 mesh）

2.1.3　堆密度、振实密度及压缩性指数　参照 2020 年版《中国药典》（ChP2020）四部通则 0993[8]，测定不同目数琥珀酸的堆密度及振实密度，根据公式压缩性指数＝ 100×（堆密度－振实密度）/ 堆密度，计算压缩性指数，结果见表 1，不同目数琥珀酸的各指标均存在一定差异，将其作为哌柏西利片组成成分，分别制备成制剂后进一步确定其影响片剂的关键指标及选择最终的目数。

表 1　琥珀酸功能性指标测定

Tab 1　Functional indexes of succinic acid

琥珀酸目数 / 目	粒径 X_{90}/μm	休止角 /°	堆密度 /（g・mL^{-1}）	振实密度 /（g・mL^{-1}）	压缩性指数
＞ 30	366.56	36.80	0.32	0.37	15.63
30 ～ 40	327.99	39.84	0.39	0.47	20.51
40 ～ 60	247.48	45.25	0.42	0.54	28.58
60 ～ 80	206.44	51.32	0.31	0.43	38.71

2.2　制剂相关指标的测定

分别用目数为＞ 30、30 ～ 40、40 ～ 60、60 ～ 80 的琥珀酸与原料、微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、胶态二氧化硅、硬脂酸镁过筛后称重混合，混合后物料进行干法制粒，样品批号对应为 210320、210402、210411、210422，4 批样品其他辅料种类、用量以及制备工艺均不变。

2.2.1　混粉相关指标的测定　① 休止角的测定：

取 4 批样品混粉参照“2.1.2”项下方法测定休止角，每批样品测量 3 次取平均值，结果见表 2。

② 压缩性指数的测定：取 4 批样品混粉参照“2.1.3”项下方法测定压缩性指数，每批样品测量 3 次取平均值，结果见表 2。

③ 颗粒率的测定：参照 ChP2020 四部通则 0982 单筛分法[8]测定 4 批样品预混粉 60 目以上的颗粒率，每批样品测量 3 次，取平均值，结果见表 2。使用 60 ～ 80 目的琥珀酸所制备的混粉休止角明显大于 45°，流动性较差，需关注其片剂含量均匀度是否符合要求。

表 2　混粉相关指标的测定结果

Tab 2　Related indexes of powder mixture

批号	休止角 /°	压缩性指数	60 目以上颗粒率 /%
210320	37.82	17.23	65
210402	40.25	21.45	57
210411	43.42	25.46	61
210422	49.53	31.23	55

2.2.2　片芯相关指标的测定　将 4 批样品在同一压片环境及设备条件下分别压片后进行片剂相关指标的考察。

① 外观及断层：在压片过程中观察各批样品的外观性状及断层现象。4 批样品在实验室压片数量为 500 片左右时均未出现断层现象，片剂片重稳定。继续进一步放大批量（2000 片）并使用工厂设备压制片剂，考察压片是否断层，以确定处方工艺的可行性，结果见表 3 及图 2。

② 硬度的测定：每批样品在连续压片过程中随机取样 20 片使用 MB-35 硬度仪测量片芯硬度，结果见表 3。

③ 含量均匀度的测定：参照 ChP2020 四部通则含量均匀度检查法[8]，每批样品取 10 片片芯检测样品的含量均匀度，结果见表 3。60 ～ 80 目琥珀酸流动性差，出现断层，故而含量均匀度不合格；＞ 30 目琥珀酸压片时，硬度只有 120 N，可压性不好。因此下一步重点考察 30 ～ 40 目和 40 ～ 60 目琥珀酸所制制剂溶出曲线。

表 3　片芯相关指标测定结果

Tab 3　Related indexes of chip core

批号	片芯外观	是否断层	硬度 /N	含量均匀度 /（A ＋ 2.2S）
210320	表面光滑	未断层	100 ～ 120	11.3
210402	表面光滑	未断层	150 ～ 180	10.4
210411	表面光滑	未断层	150 ～ 180	12.9
210422	表面光滑	断层	150 ～ 180	17.5

2.2.3　溶出曲线的测定

① 溶出试验条件：溶出方法为桨法，分别以水、pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，转速均为 75 r • min^{-1}，溶出介质体积均为 900 mL，溶出介质温度均为（37±0.5）℃[9]。

图 2　片芯外观（批号：210402）

Fig 2　Core appearance（batch No.210402）

② 溶液的配制：精密称取哌柏西利片对照品约 12 mg 置 100 mL 量瓶中，加入少量溶出介质超声溶解并定容，再精密移取 5 mL 置 50 mL 量瓶中，加入溶出介质定容，得对照品溶液。分别于各取样时间点取出溶液 10 mL，并补充同等温度的溶出介质 10 mL，将所取样品溶液过滤，取续滤液 1 mL 用介质稀释定容至 10 mL 作为供试品溶液。

③ 溶出曲线的测定：将 210402 及 210411 批片芯均使用同一批薄膜包衣预混剂进行包衣，测定 2 批样品包衣片及参比制剂（各 12 片）在 4 种介质中的溶出曲线，具体方法为取各对照品及供试品溶液，参照 ChP2020 四部通则 0401 紫外 - 可见分光光度法[8]在 353 nm 处测量吸光度，按外标法计算溶出量，绘制溶出曲线，计算相似因子 f_2[10]。

结果表明 2 批自制样品在 pH 1.0、水、pH 6.8 介质中的溶出曲线均与参比制剂相似，在 pH 4.5 中 210402 批样品溶出曲线与参比制剂相似，f_2 ＞ 85，而 210411 批样品溶出速率慢于参比制剂，f_2 只有 61，故接下来对 210402 批样品进行影响因素试验，考察初步稳定性。溶出曲线见图 3。

2.2.4　有关物质的测定

① 色谱条件：色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（250 mm×4.6 mm，5 μm）；柱温为 45 ℃；流速为 1.0 mL • min^{-1}；进样量为 20 μL；检测波长为 250 nm；流动相 A 为 0.03% 三氟乙酸水，B 为 0.03% 三氟乙酸乙腈；稀释溶剂为 0.1 mol • L^{-1} HCl- 乙腈（80∶20），梯度洗脱，洗脱程序如下：0 ～ 10 min，90%A；10 ～ 40 min，90% ～ 70%A；40 ～ 65 min，70% ～ 15%A；65 ～ 66 min，15% ～ 90%A；66 ～ 75 min，90%A。

② 溶液的制备：取包衣片研磨后细粉 50 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，超声溶解，用稀释溶剂稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液

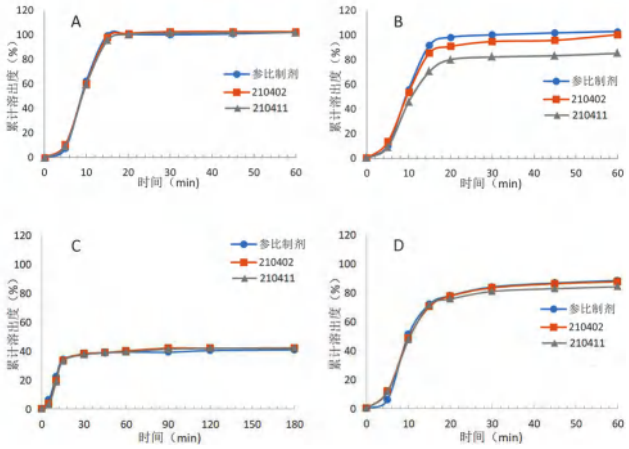


图 3　参比制剂与 2 批自制样品在不同介质中的溶出曲线

Fig 3　Dissolution curve of the reference preparation and 2 batches of self-made samples in different dissolution media

A. pH 1.0 盐酸（pH 1.0 hydrochloric acid）；B. pH 4.5 醋酸盐缓冲液（pH 4.5 acctate buffer）；C. pH 6.8 磷酸盐缓冲液（pH 6.8 phosphate buffer）；D. 水（water）

作为供试品溶液。取哌柏西利、杂质 A、杂质 B，精密称定，用稀释溶剂稀释成每 1 mL 含哌柏西利 0.5 mg 及杂质 A、杂质 B 各含 5 μg 的系统溶液。取各溶液进样测定，各成分分离度符合药典要求，见图 4。

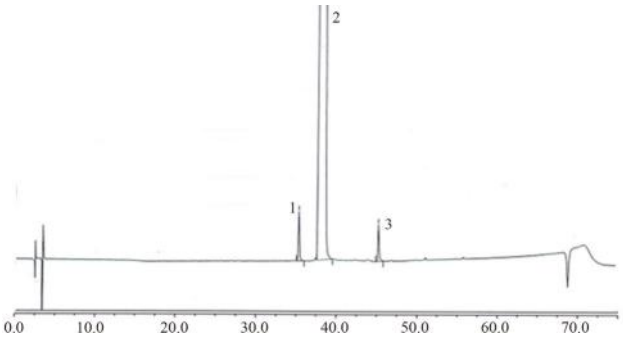


图 4　系统溶液色谱图

Fig 4　Chromatogram of system solution

1. 杂质 A（impurity A）；2. 哌柏西利（piperacillin）；3. 杂质 B（impurity B）

取 210402 批自制样品及参比制剂进行影响因素试验，将各样品分别放置于高温（60 ℃）、高湿（RH 92.5%）以及光照 [（4500±500）lx] 条件下于 5、10、30 d 取样检测有关物质。结果表明自制样品各杂质含量均不高于参比制剂，且杂质增长趋势与参比制剂基本一致，结果见表 4。

表 4　有关物质测定结果

Tab 4　Related substances

影响因素	参比制剂				样品（210402）			
	杂质 A/%	杂质 B/%	其他最大单杂 /%	总杂 /%	杂质 A/%	杂质 B/%	其他最大单杂 /%	总杂 /%
处理前	0.07	0.01	0.03	0.16	0.03	0.01	0.02	0.13
60 ℃放置 5 d	0.07	0.01	0.08	0.23	0.04	0.01	0.06	0.20
60 ℃放置 10 d	0.07	0.02	0.14	0.47	0.04	0.02	0.11	0.43
60 ℃放置 30 d	0.07	0.04	0.45	1.00	0.07	0.04	0.43	0.93
RH92.5% 放置 5 d	0.07	0.01	0.02	0.16	0.05	0.01	0.02	0.15
RH92.5% 放置 10 d	0.07	0.01	0.02	0.17	0.05	0.01	0.02	0.16
RH92.5% 放置 30 d	0.07	0.01	0.03	0.18	0.06	0.01	0.02	0.18
光放置 5 d	0.07	0.01	0.02	0.16	0.04	0.01	0.02	0.15
光放置 10 d	0.07	0.01	0.03	0.18	0.04	0.01	0.02	0.17

2.3　不同批次琥珀酸（30 ～ 40 目）主要功能性指标一致性考察

选用 2 批不同批号（批号：201030083C、201040091C）琥珀酸（30 ～ 40 目）参照“2.1”及“2.2”项下方法测定主要功能性指标并制备样品（批号分别为 210506-1、210506-2）进行研究，以考察不同批次辅料功能是否具有一致性，并确定不同批次辅料制备的样品质量是否一致。结果表明，不同批次的琥珀酸（30 ～ 40 目）主要功能性指标检测结果及制剂相关检测结果均无明显差异，表明该辅料无明显批间差异，制备的样品质量基本一致（见表 5 ～ 7 及图 5）。

表 5　不同批次琥珀酸 (30 ～ 40 目) 功能性指标测定结果

Tab 5　Functional indexes of different batches of succinic acid (30 ～ 40 mesh)

批号	粒径 X_{90}/μm	休止角 /°	堆密度 /（g • mL^{-1}）	振实密度 /（g • mL^{-1}）	压缩性系数
201030083C	324.67	38.42	0.36	0.43	19.44
201040091C	328.55	39.11	0.37	0.45	21.62

3　讨论

3.1　流动性

从流动性角度分析，不同目数的琥珀酸因粒径大小差异导致流动性不同，从而影响制剂混粉的流动性。筛分得到 60 ～ 80 目的琥珀酸，粒径小，批量放大后，压片出现断层，混粉流动性差，不适合进一步研究。小于 60 目的琥珀酸，粒径较大，没有出现断层现象，适合进一步研究。

表 6　不同批次琥珀酸 (30 ～ 40 目) 制剂相关指标测定结果

Tab 6　Related indexes of different batches of succinic acid (30 ～ 40 mesh) preparations

批号	60 目以上颗粒率 /%	休止角 /°	压缩性指数	片芯外观	是否断层	硬度 /N	含量均匀度 /（A＋2.2S）
210506-1	55	39.76	19.44	表面光滑	未断层	150 ～ 180	9.6
210506-2	58	39.14	21.62	表面光滑	未断层	150 ～ 180	11.1

表 7　有关物质测定结果

Tab 7　Related substances

影响因素	样品（210506-1）				样品（210506-2）			
	杂质 A/%	杂质 B/%	其他最大单杂 /%	总杂 /%	杂质 A/%	杂质 B/%	其他最大单杂 /%	总杂 /%
处理前	0.03	0.01	0.03	0.14	0.03	0.01	0.02	0.12
60 ℃放置 5 d	0.04	0.01	0.05	0.18	0.04	0.01	0.05	0.17
60 ℃放置 10 d	0.04	0.02	0.13	0.41	0.04	0.02	0.13	0.41
60 ℃放置 30 d	0.06	0.04	0.45	0.96	0.07	0.04	0.44	0.98
RH 92.5% 放置 5 d	0.05	0.01	0.02	0.15	0.05	0.01	0.02	0.14
RH 92.5% 放置 10 d	0.06	0.01	0.02	0.18	0.05	0.01	0.02	0.15
RH 92.5% 放置 30 d	0.06	0.01	0.03	0.20	0.06	0.01	0.02	0.18
光放置 5 d	0.04	0.01	0.02	0.14	0.04	0.01	0.02	0.12
光放置 10 d	0.04	0.01	0.02	0.16	0.04	0.01	0.02	0.15

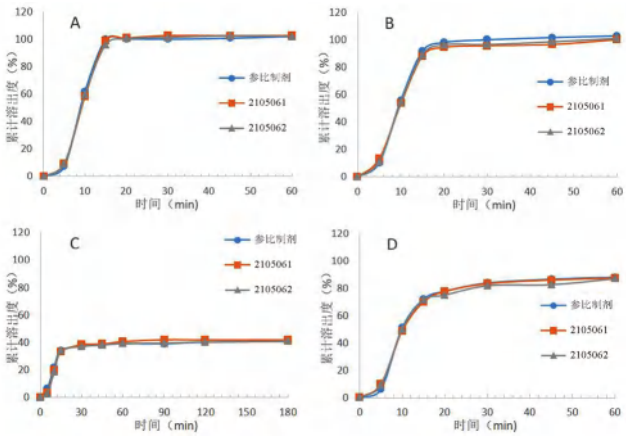


图 5　参比制剂与 2 批自制样品在不同介质中的溶出曲线

Fig 5　Dissolution curve of the reference preparation and 2 batches of self-made samples in different dissolution medium

A. pH 1.0 盐酸（pH 1.0 hydrochloric acid）；B. pH 4.5 醋酸盐缓冲液（pH 4.5 acctate buffer）；C. pH 6.8 磷酸盐缓冲液（pH 6.8 phosphate buffer）；D. 水（water）

3.2　可压性

从可压性角度分析，＞30 目的琥珀酸，粒径大，批量放大压片时，主压片厚调至最小后，片芯硬度仍然只有 120 N，达不到参比制剂的目标硬度（150 ～ 180 N）。故不适合进一步研究。

3.3　崩解特性

崩解特性角度分析，筛分得 30 ～ 40 目琥珀酸所制得制剂在区分力介质中（pH 4.5）崩解现象与参比制剂相似，在 12 min 左右崩解。但是 40 ～ 60 目琥珀酸所制得制剂在 18 min 左右崩解，且终点累计溶出度只有 80% 左右 [5]。

综上所述，琥珀酸（30 ～ 40 目）不同批次样品主要功能性指标检测的结果基本一致，功能具有一致性，所制备的 3 批哌柏西利混粉流动性、可压性均较好，片剂溶出行为与参比制剂相似，产品质量与参比制剂一致，故适合作为哌柏西利的组成成分并进一步用于放大生产 [11-12]。

参考文献

[1] Pandey K，An HJ，Kim SK，et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer：a review [J]. Int J Cancer，2019，145（5）：1179-1188.

[2] Wedam S，Fashoyin-Aje L，Bloomquist E，et al. FDA approval summary：palbociclib for male patients with metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res，2020，26（6）：1208-1212.

[3] Pizzuti L，Giordano A，Michelotti A，et al. Palbociclib plus endocrine therapy in HER2 negative，hormonal receptor-positive，advanced breast cancer：a real-world experience [J]. J Cell Physiol，2019，234（6）：7708-7717.

[4] 徐群杰，丁斯婧，云虹，等 . 聚环氧琥珀酸的研究进展 [J]. 上海电力学院报 . 2009，25（2）：131-133.

[5] 卢彩萍，霍立茹，等 . 微晶纤维素在硫酸氢氯吡格雷片中的应用研究 [J]. 中南药学，2021，19（4）：599-603.

[6] 崔宝国 . 药用辅料在制剂中的应用 [D]. 济南：山东大学，2007.

[7] 董玉秀，宋珍鹏，崔素娟 . 对休止角测定方法的讨论 [J]. 中国药科大学学报，2008，39（4）：317-320.

[8] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：4，151-153.

[9] 徐珂，霍立茹，周静，等 . 基于有关物质及溶出曲线的测定评价苯磺酸氨氯地平片与原研药的一致性 [J]. 中南药学，2020，18（3）：444-448.

[10] 谢沐风 . 溶出曲线相似性的评价方法 [J]. 中国医药工业杂志，2009，40（4）：308-311.

[11] Finn RS，Martin M，Rugo HS，et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2016，375（20）：1925-1936.

[12] Lee J，Park HS，Won HS，et al. Real-world clinical data of palbociclib in asian metastatic breast cancer patients：experiences from eight institutions [J]. Cancer Res Treat，2021，53（2）：409-423.

（收稿日期：2022-01-06；修回日期：2022-03-11）

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法评价白芍 - 甘草对抑郁大鼠大脑皮层中神经递质含量的影响

杜晖[1]，杨会鸽[1]，刘鹏鸣[1]，任静[2*]（1.西安市食品药品检验所，西安　710054；2.空军军医大学第二附属医院药剂科，西安　710038）

摘要：目的　建立超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）法同时测定 5- 羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）和多巴胺（DA）等 3 种神经递质，考察白芍 - 甘草药对对抑郁大鼠大脑皮层中神经递质含量的影响。**方法**　将 50 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组、白芍组和白芍 - 甘草组，每组 10 只。利用长期不可预见性温和应激建立慢性应激大鼠抑郁模型，行为学测试后取大鼠大脑皮层，采用 UPLC-MS/MS 法分别测定 5-HT、NE 和 DA 的含量，以乙腈 -0.1% 甲酸水溶液等度洗脱，多反应监测进行分析。**结果**　3 种神经递质在各自质量浓度范围内与测定值线性关系良好，相关系数均不低于 0.999，检测限为 0.02 ～ 0.03 μg • g^{-1}，平均回收率为 83.7% ～ 94.1%。与空白组比较，模型组大鼠大脑皮层中 5-HT、NE 和 DA 的含量降低（$P < 0.01$）；与模型组比较，白芍组和白芍 - 甘草组大脑皮层中 5-HT、NE 和 DA 的含量均有提高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　UPLC-MS/MS 法可用于单胺类神经递质的定量分析。白芍 - 甘草药对能显著提高抑郁大鼠大脑皮层中神经递质含量水平。

关键词：超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱；单胺类神经递质；5- 羟色胺；去甲肾上腺素；多巴胺；白芍；甘草

中图分类号：R917，R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1834-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.021

Effect of the herb pair Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on the content of neurotransmitters in the cerebral cortex of depressed rats by UPLC-MS/MS

DU Hui[1], YANG Hui-ge[1], LIU Peng-ming[1], REN Jing[2*] (1. *Xi'an Institute for Food and Drug Control*, *Xi'an* 710054; 2. *Department of Pharmacy*, *the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University*, *Xi'an* 710038)

Abstract: Objective To develop an ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometric (UPLC-MS/MS) method to simultaneously determine 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA), and to evaluate the effect of the herb pair Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on the content of neurotransmitters in the cerebral cortex of depressed rats. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a positive control group, a Paeoniae Radix Alba group and a Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma group (10 rats in each group). Chronic stress rat model of depression was established by using long-term unpredictable mild stress. The cerebral cortex of the depressed rats was obtained after the behavior tests, and the content of 5-HT, NE and DA was determined by UPLC-MS/MS, respectively. The isocratic elution was performed with acetonitrile-0.1% formic acid solution, and the multi-reaction monitoring was used for the analysis. **Results** All three neurochemicals showed good linearity in their respective concentration ranges, and the correlation coefficients (r) were no less than 0.999. The limits of detection (LODs) ranged from 0.02 to 0.03 μg • g^{-1}. The average recoveries of

基金项目：陕西省创新人才推进计划（No.2018KJXX-089）。

作者简介：杜晖，男，副主任药师，主要从事药品检验和药物分析研究，email：duhui0504@126.com　*通信作者：任静，女，副主任药师，主要从事医院制剂管理与药理研究，email：renjing515@126.com

the neurochemicals ranged 83.7% ～ 94.1%. The content of 5-HT, NE and DA in the model group was significantly lower than that in the blank group ($P < 0.01$), and the content of neurochemicals in the Paeoniae Radix Alba group and the Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma group was higher than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The herb pair Paeoniae Radix Alba and Paeoniae Radix Alba-Glycyrrhizae Radix significantly improves the level of monoamine neurotransmitters determined by UPLC-MS/MS in the cerebral cortex of depressed rats.

Key words: UPLC-MS/MS; monoamine neurotransmitter; 5-hydroxytryptamine; norepinephrine; dopamine; Paeoniae Radix Alba; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

抑郁症是以显著而持久的心境低落为主要临床特征的慢性综合性脑疾病。随着生活与工作节奏的加快，抑郁症的发病率逐年上升。全球抑郁症患者约为 3.4 亿，且患者数量还在以每年 11.3% 的速率增长 [1-2]。5- 羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）是中枢神经系统的神经递质，它与应答反应和大脑血流变化的调节密切相关 [3]。5-HT、去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）和多巴胺（dopamine，DA）等单胺类神经递质在正常生物体内存在动态平衡，参与抑郁发生的全过程 [4]。分析这些单胺递质可为包括抑郁症在内的多种神经系统疾病机制的研究提供重要依据。通常这类神经递质的检测方法有液相色谱 - 电化学检测 [5-6]、荧光检测 [7-8] 和质谱联用法 [9-10]。质谱法以其灵敏度高而特别适用于神经递质类物质的定量分析。白芍、甘草是治疗抑郁症较常用的配伍组合，在四逆散、逍遥散和柴胡舒肝散等众多古方中均有记载。本研究采用超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）法考察白芍 - 甘草药对对抑郁大鼠大脑中神经递质含量的影响，从而进一步探讨这种变化与抑郁发生的关系。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Xevo TQ-S 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪（美国 Waters 公司）；Milli-Q Advantage 超纯水机（美国 Merck Millipore 公司）；MS105 十万分之一天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；BSA124S-CW 万分之一天平（德国 Sartorius 公司）；HC-3018R 低温冷冻高速离心机（合肥科大创新股份有限公司）。

1.2 试药

白芍和甘草饮片（市售药材，产地陕西，经空军军医大学第二附属医院孙涛副主任药师鉴定为符合《中国药典》2020 年一部要求的合格饮片）；重酒石酸去甲肾上腺素（批号：100169-201103，纯度：94.5%）、盐酸多巴胺（批号：100070-201006，纯度：100.0%）和 5-HT（批号：111656-200101，纯度：100.0%）对照品（中国食品药品检定研究院）；盐酸丁螺环酮片（规格：5 mg，批号：20210509，江苏恩华药业股份有限公司）；4- 乙基邻苯二酚（4-EC，美国 Sigma 公司）；甲醇、乙腈、甲酸和乙酸（色谱纯，德国 Merck 公司）；高氯酸和乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）（分析纯，上海国药集团化学试剂有限公司）；健康 SD 大鼠（5 ～ 7 周龄，约 250 g，西安交通大学实验动物中心，动物合格证号：SCXK2007-001）。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 样品溶液的制备 白芍饮片 1000 g，10 倍水合煎 3 次，减压浓缩至每毫升相当于饮片 2 g；白芍、甘草饮片各 500 g，10 倍水合煎 3 次，减压浓缩至每毫升相当于饮片 2 g。

2.1.2 蛋白沉淀溶液的制备 取高氯酸和 EDTA-2Na 适量，用水稀释制成含 0.1 mol • L^{-1} 高氯酸和 0.1 mmol • L^{-1} EDTA 的蛋白沉淀溶液。

2.1.3 内标工作溶液的制备 精密称取 4-EC 适量，用蛋白沉淀溶液配制成质量浓度为 1 μg • mL^{-1} 的溶液。

2.1.4 混合对照品溶液的制备 精密称取重酒石酸去甲肾上腺素、盐酸多巴胺和 5-HT 对照品各 10 mg，置同一 100 mL 量瓶中，加甲醇适量，振摇使溶解，用甲醇稀释至刻度，作为储备液；精密量取储备液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用蛋白沉淀溶液稀释至刻度；再精密量取上述溶液 0.2、0.5、1、2、5 和 10 mL，置 100 mL 量瓶中，分别加入内标工作溶液 1 mL，用蛋白沉淀溶液稀释制成约 2、5、10、20、50 和 100 ng • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2 色谱 - 质谱条件

2.2.1 色谱条件 安捷伦 C_{18} 色谱柱（150 mm× 2.1 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈（90∶10）；流速 0.3 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 1 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI^+）；接口温度：300 ℃；脱溶剂温度：250 ℃；加热块温度：400 ℃；雾化器流量：3.0 L • min^{-1}；干燥器流量：

10.0 L • min^{-1}；加热器流量：10.0 L • min^{-1}。质谱条件见表 1。

表 1　4 种化合物的质谱分析参数

Fig 1　MS parameters of the 4 compounds

化合物	母离子 *m/z*	子离子 *m/z*
5-HT	177	160
NE	170	152
DA	154	91
4-EC	139	124

2.3　慢性应激大鼠抑郁模型的建立

雄性 SD 大鼠 50 只，分笼饲养，随机分成 A ～ E 4 组，每组 10 只。A 为空白组，B 为模型组，给予蒸馏水；C 为阳性对照组，按照 1.0 mg • kg^{-1} 剂量灌胃给予丁螺环酮；D 和 E 分别为白芍组和白芍 - 甘草组，按照 5 g • kg^{-1} 剂量灌胃给药。采用长期不可预见性温和应激建立慢性应激大鼠抑郁模型，除 A 组外，每组接受多种不同应激，包括禁食和禁水（24 h）、夹尾（2 min）、冰水游泳（5 min）、摇晃（2 次 • s^{-1}，10 min）、拥挤（10 只一笼）和昼夜颠倒，每日刺激 1 次，顺序随机，持续 20 d。造模第 21 日，C ～ E 组开始每日 1 次给药，连续给药 14 d。在造模开始后，分别在每日下午 4 点称量每只大鼠的体质量，比较每组大鼠在体质量增长方面的差异。

2.4　蔗糖偏嗜度实验

蔗糖偏嗜度实验在禁食和禁水 12 h 后进行，训练开始前予大鼠适应饮用蔗糖水。训练开始后，第 1 日在笼内放置两瓶均装有 1% 蔗糖水的水瓶；第 2 日放置一瓶 1% 蔗糖水，一瓶纯水，并相隔 2 h 交换水瓶位置；第 3 日禁水禁食；第 4 日放置一瓶 1% 蔗糖水和一瓶纯水，进行 2 h 饮水量测定。通过称饮水瓶质量测定纯净水和蔗糖水饮用量，以快感缺乏的客观指标蔗糖偏嗜度 [蔗糖偏嗜度（%）＝蔗糖水饮用量 /（蔗糖水饮用量＋纯净水饮用量）×100%] 作为衡量标准，比较造模前后各组动物蔗糖偏嗜度的变化。

2.5　样品溶液的制备

实验结束 24 h 后将大鼠断头处死，分取大鼠大脑皮层组织，置于预冷的生理盐水中洗尽其他残留组织，轻轻擦干，记录组织的质量。精密称取约 0.2 g，在冰浴内的玻璃匀浆管中匀至糜状，加入约 5 mL 的蛋白沉淀液，12 000 g 离心 20 min，取上清液再次 12 000 g 离心 20 min，取上清液按一定比例加入内标工作溶液，并定容至 10 mL，即得。

3　结果

3.1　方法学验证

3.1.1　线性范围、检测限和定量限　精密量取“2.1.4”项下的系列混合对照品溶液，分别注入 UPLC-MS/MS，以主成分峰面积与内标峰面积的比值 y 对质量浓度 x（ng • mL^{-1}）进行线性回归，分别以信噪比为 3 和 10 时，测定 3 种神经递质的检测限（LOD）和定量限（LOQ），具体见表 2。

表 2　3 种化合物的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Tab 2　Linear equations，ranges，correlation coefficients (*r*)，LODs and LOQs of the three compounds

化合物	线性方程	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	*r*	LOD/（μg • g^{-1}）	LOQ/（μg • g^{-1}）
5-HT	$y = 0.1124x - 0.0393$	2.07 ～ 51.85	0.9995	0.02	0.05
NE	$y = 0.1407x - 0.2721$	1.98 ～ 49.55	0.9997	0.03	0.10
DA	$y = 0.1273x - 0.2141$	1.98 ～ 49.53	0.9991	0.03	0.10

3.1.2　回收率和精密度考察　精密称取大脑皮层样品约 0.20 g，置 15 mL 具塞离心管中，分别精密加入低、中、高 3 个浓度水平（0.2、0.5、2 μg • g^{-1}）的混合对照品溶液，按“2.5”项下方法配制样品溶液，计算平均回收率，结果见表 3，3 种神经递质的平均回收率在 83.7% ～ 94.1%，*RSD* 均小于 9.0%。

3.1.3　稳定性考察　将高浓度水平的回收率测试液保存在 4 ℃环境中，并在 6、12、24 和 48 h 后进样分析，3 种化合物的含量变化小于 7.2%，说明样品溶液在 48 h 内保持稳定。

3.1.4　流动相的考察　考察 0.1% 乙酸 - 乙腈（A）、0.1% 乙酸 - 甲醇（B）、0.1% 甲酸 - 乙腈（C）和 0.1% 甲酸 - 甲醇（D）等 4 种流动相体系对待测化合物离子化强度的影响。由于实验采用 0.1 mol • L^{-1} 高氯酸作为蛋白沉淀溶液，故在水相中添加酸保持溶剂与流动相酸度大体一致，从而增强了色谱体系的稳定性。当水中添加乙酸时，5-HT 的灵敏度较甲酸明显降低；同时发现 3 种神经递质在甲醇体系中塔板数略低，所以最终选择 0.1% 甲酸 - 乙腈作为流动相体系。

表 3　3 种化合物的加样回收率 (%)

Tab 3　Spiked recovery of the 3 compounds (%)

化合物	低浓度		中浓度		高浓度	
	加样回收率	*RSD*	加样回收率	*RSD*	加样回收率	*RSD*
5-HT	83.9	8.1	92.7	8.8	94.1	8.5
NE	83.7	6.8	91.7	7.1	92.5	7.9
DA	89.5	7.9	93.8	7.6	91.9	8.8

3.1.5　样品稀释溶剂的选择　实验中分别考察了蛋白沉淀溶液、流动相和水溶液作为样品稀释溶剂，结果发现流动相和水溶液的质谱信号噪音较大，且重现

性较差。最终确定 0.1 mol • L^{-1} 高氯酸作为样品稀释溶剂。由于金属离子会加速单胺递质的氧化，故稀释溶剂中加入 0.1 mmol • L^{-1} EDTA 与金属离子络合。

3.1.6　专属性考察　分取“2.1.2”项下蛋白沉淀溶液和“2.5”项下样品溶液，按“2.2”项下色谱和质谱条件分析测定，结果如图 1 所示，表明蛋白稀释溶液在 4 种化合物峰位处均无干扰，该法具有良好的专属性。

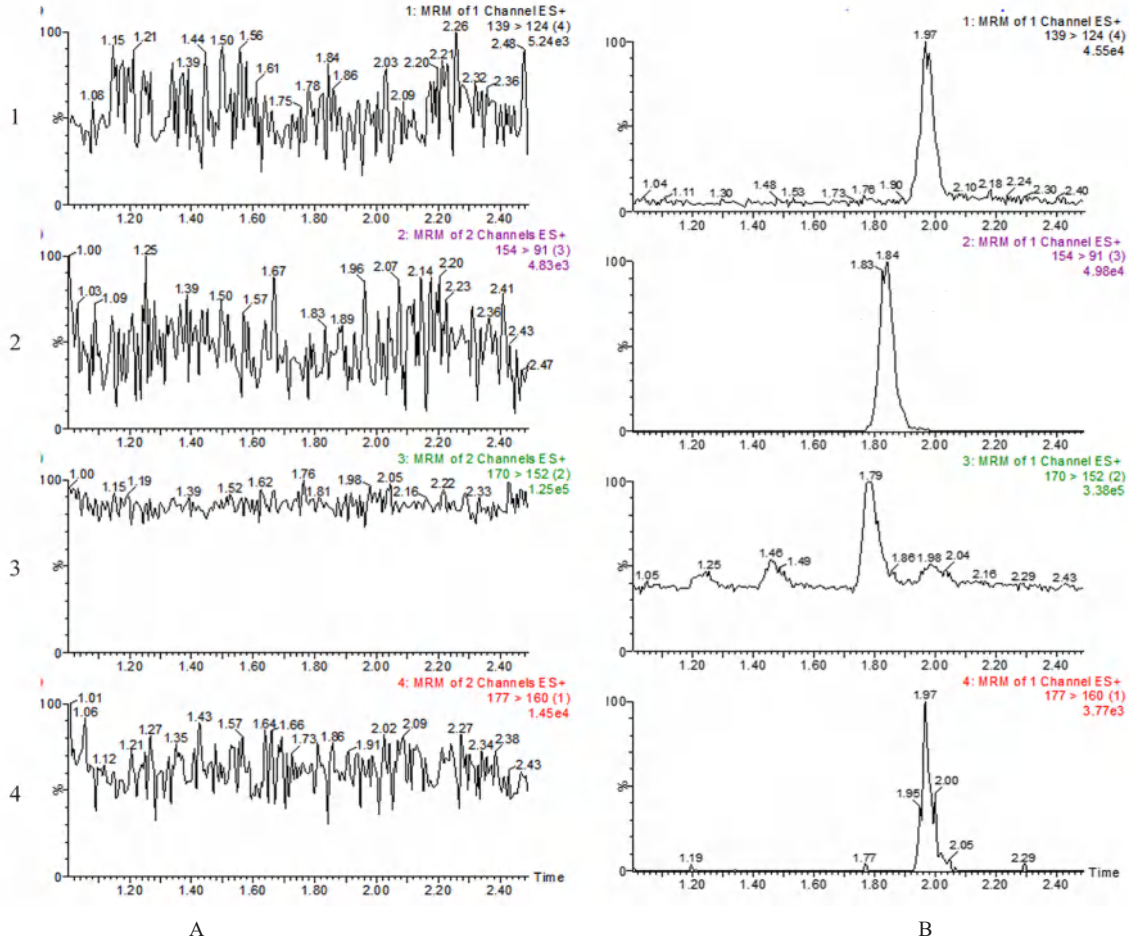


图 1　4 种化合物的 MRM 图

Fig 1　MRM chromatograms of the 4 compounds

A. 蛋白沉淀溶液（solution of protein precipitation）；B. 大鼠大脑皮层（rat cerebral cortex）；1. 4- 乙基邻苯二酚（4-EC）；2. 多巴胺（DA）；3. 去甲肾上腺素（NE）；4. 5- 羟色胺（5-HT）

3.2　行为学测试

在应激之前，对照组大鼠蔗糖偏嗜度 [（78.9±6.9）%] 与模型组大鼠 [（81.3±6.1）%] 无明显差异（$P > 0.05$）。造模 34 d 后，模型组大鼠反应迟钝，活动减少，而阳性对照组、白芍组和白芍 - 甘草组大鼠上述情况均有改善。与空白组比较，模型组大鼠体质量增长明显变慢（$P < 0.01$），蔗糖偏嗜度 [（48.3±2.9）%] 显著降低（$P < 0.01$），提示大鼠造模成功；与模型组比较，阳性对照组体质量增长速率和蔗糖偏嗜度 [（83.1±5.8）%] 百分比均明显提高（$P < 0.01$），显著高于白芍组和白芍 - 甘草组（$P < 0.05$）。

3.3　样品测定结果

如图 2 所示，与空白组比较，模型组大鼠大脑皮层中 5-HT、NE 和 DA 含量均明显降低（$P < 0.01$），结合行为学指标，说明造模成功。与模型组比较，阳性对照组和药物组均能升高大鼠大脑皮层中 5-HT、NE 和 DA 的含量，其中阳性对照组变化最大，且白芍 - 甘草组相较于白芍组更接近空白组。

4　讨论

本研究采用慢性不可预见性应激法建立抑郁大鼠模型，该法操作简便、可靠性高。实验结果表明抑郁症的发病与 5-HT、NE 和 DA 等含量降低有密切关系。5-HT 是抑郁病症中最重要的神经递质之一，它的降低可能引起抑郁发作。本研究选取的模型药物 5-HT 再摄取抑制剂丁螺环酮是新型的一线抗抑郁药物，它通过选择性地抑制 5-HT 重摄取，增加突触间隙内 5-HT 的浓度，发挥抗抑郁作用 [11-12]。有研究表明，抑郁症可能会抑制 NE 的合成和释放，导致突触间隙中 NE 浓度降低 [13]。脑内 NE 代谢产物为 3-

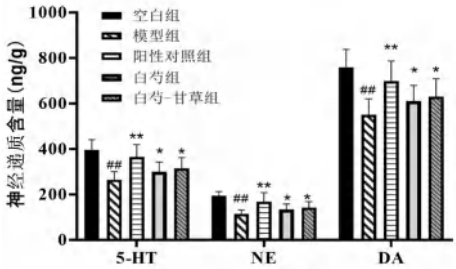


图 2　药物对大鼠大脑皮层中 5-HT、NE 和 DA 含量的影响

Fig 2　Effect of the drugs on the contents of 5-HT、NE and DA in the rat cerebral cortex

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

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

甲氧基 -4- 羟基苯乙二醇，其可作为评价抑郁症发生及发展的指标，提示抑郁症发生及发展与 NE 密切相关 [14]。有报道称，与正常人比较，抑郁症患者前额叶、纹状体和海马等功能区的 DA 含量降低，相关突触功能下调 [15]。上述研究表明 3 种单胺类神经递质的含量水平与抑郁症的发病有着密切关系。

尽管治疗抑郁症的化学药物不断更新，但是均有不同程度的毒副作用，如起效慢、嗜睡、体质量增加等；远期疗效不确切且存在用药依赖，复发率非常高，严重影响了在我国的临床推广和使用 [16]。因此，寻求安全有效的治疗抑郁症的药物是当前亟待解决的问题。中医“抑郁”应归为郁症、虚劳等疾病。白芍具柔肝养血、敛阴止痛的功效，广泛用于郁症的防治 [17-18]；甘草有健脾宁心、和中缓急、调和诸药之功效 [19-20]，两者配伍肝脾同治，共奏缓肝和脾、益血养阴之功，为治疗郁症的常见组方。本研究结果表明，白芍 - 甘草配伍能显著提高大鼠大脑皮层中的单胺类神经递质的含量水平；白芍 - 甘草组方效果相较于白芍单药更接近空白组，但在治疗郁症中白芍 - 甘草不同提取部位对结果的影响及协同作用机制尚不明确。

本研究通过优化流动相和前处理步骤，建立了 UPLC-MS/MS 同时测定 5-HT、NE 和 DA 等 3 种单胺类神经递质的方法。研究表明，白芍 - 甘草药对较模型组能显著提升抑郁大鼠体质量增长速率和蔗糖偏嗜度百分比，并能提高抑郁大鼠大脑皮层中神经递质的含量水平。

参考文献

[1] Ustun TB，Ayuso-Mateos JL，Chatterji S，et al. Global burden of depressive disorders in the year 2000 [J]. Br J Psychiatry，2004，184（5）：386-392.

[2] Altar CA. Neurotrophins and depression [J]. Trends Pharmacol Sci，1999，20（2）：59-61.

[3] Panconesi A. Serotonin and migraine：a reconsideration of the central theory [J]. J Headache Pain，2008，9：267-276.

[4] 李海龙，刘敏，张海，等 . Minocycline 对血管性抑郁小鼠抑郁行为及神经递质的作用 [J]. 中国卒中杂志，2014，9（12）：999-1006.

[5] 曹阳，程巧鸳，卢红阳 . 高效液相色谱电化学法分析伊立替康对大鼠脑内组胺、5- 羟色胺的影响 [J]. 海峡药学，2013，25（1）：31-33.

[6] 韦珊珊，陆雪萍，彭玲芳，等 . HPLC-ECD 法测定大鼠脑组织中单胺类神经递质的含量 [J]. 中国药房，2014，25（25）：2323-2325.

[7] 王丽，朱军，环飞，等 . 高效液相色谱 - 荧光法或超高效液相色谱 - 四极杆 / 轨道阱质谱法测定抑郁症小鼠海马中 5- 羟色胺和相关的 2 种物质含量的比较 [J]. 理化检验（化学分册），2019，55（12）：1384-1388.

[8] 陈娟，王一超，崔蓉，等 . 小鼠脑组织中多巴胺和 5- 羟色胺检测方法的优化试验研究 [J]. 中国卫生检验杂志，2014，24（14）：1996-1999.

[9] 陈磊，杜毅，李盛建，等 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定抑郁大鼠脑脊液中 5- 羟色胺和 5- 羟吲哚乙酸 [J]. 第二军医大学学报，2018，39（12）：1354-1359.

[10] 谢天发，刘长安，刘健 . HPLC-MS/MS 检测小鼠脑部组胺和 5- 羟色胺 [J]. 合肥工业大学学报（自然科学版），2018，41（1）：124-128.

[11] Pineyro G，Blier P. Autoregulation of serotonin neurons：role in antidepressant drug action [J]. Pharmacol Rev，1999，51（3）：533-591.

[12] 陈红霞，张黎明，薛瑞，等 . 以 5-HT_{1A} 受体为靶标的抗抑郁药物研究进展 [J]. 军事医学，2013，37（8）：624-627.

[13] Kitayama IT，Otani M，Murase S，et al. Degeneration of the locus ceruleus noradrenergic neurons in the stress-induced depression of rats [J]. Ann N Y Acad Sci，2008，1148（1）：95-98.

[14] Yoshimura R，Katsuki A，Atake K，et al. Can plasma level of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol predict the response for selective serotonin reuptake inhibitor and serotonin noradrenaline reuptake inhibitor in major depressive disorder? [J]. J Depress Anxiety，2017，6（2）：1-4.

[15] Rasheed N，Ahmad A，Pandey CP，et al. Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats [J]. Neurochem Res，2010，35（1）：22-32.

[16] 范毅 . 选择性 5- 羟色胺再摄取抑制剂类药物的研究进展 . 药物评价研究，2012，35（2）：126-129.

[17] 王景霞，张建军，李伟，等 . 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16（7）：183-184.

[18] 王景霞，张建军，李伟，等 . 白芍提取物对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及大脑皮质单胺类神经递质的影响 [J]. 中国中医药杂志，2010，25（11）：1895-1897.

[19] 宗阳，何书芬，孙冰婷，等 . 甘草抗抑郁作用机制研究及应用概括 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（10）：194-198.

[20] 樊紫周，赵伟鸿，果嘉，等 . 甘草黄酮的抗抑郁作用及对海马脑区神经再生的保护作用 [J]. 药学学报，2012，47（12）：1612-1617.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-04-20）

50 型硬脂酸功能性相关指标的考察

谢莹莹，刘雁鸣*，郑金凤，张悦，蒋贇，赵勇，周颖，刘杨，石蓉，李颖，粟贵（湖南省药品检验检测研究院，国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　对 2020 — 2021 年全国生产及流通领域的 50 型硬脂酸进行考察，对本品的功能性指标进行分析评价。**方法**　考察 39 批次样品的凝点、碘值、酸值、硬脂酸与棕榈酸的比率、粒径分布及比表面积，并对检验数据按不同生产企业、不同级别、不同生产工艺进行统计分析。**结果**　不同厂家硬脂酸部分功能性指标存在显著性差异，同一厂家不同批次产品部分功能性指标存在批间差异。**结论**　本品功能性指标的均一性相对较差，本研究对制剂处方中辅料拟定、选择以及一致性评价中与辅料相关的问题剖析均有一定的参考价值。

关键词：药用辅料；硬脂酸；功能性指标
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1839-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.022

Functionality related characteristics of stearic acid type 50

XIE Ying-ying, LIU Yan-ming*, ZHENG Jin-feng, ZHANG Yue, JIANG Yun, ZHAO Yong, ZHOU Ying, LIU Yang, SHI Rong, LI Ying, SU Gui (*Hunan Institute for Drug Control*, *NMPA Key Laboratory of Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To evaluate the functionality related characteristics of stearic acid type 50 in the production and circulation in China from 2020 to 2021. **Methods** The freezing point, iodine value, acid value, ratio of stearic acid to palmitic acid, particle size distribution and specific surface area of 39 batches of samples were determined. The test data were analyzed according to different manufacturers, grades and production processes. **Results** Some functionality related characteristics of stearic acid greatly varied with manufacturers, and there were differences among different batches of products from the same manufacturer. **Conclusion** The functionality related characteristics of stearic acid type 50 are relatively poor. This study has certain reference value for excipient formulation and selection, and analysis of excipient related problems in consistency evaluation.

Key words: pharmaceutical excipient; stearic acid; functionality related characteristic

一致性评价的成功与否很大程度上取决于制剂中药用辅料是否与参比制剂一致，目前《中国药典》2020 年版四部药用辅料品种项正文已逐步向国外药典靠拢，或严于国外药典，然而制剂的质量、体内外性质、临床疗效仍然存在差别，较大原因与药用辅料的功能性指标有关[1-3]。

硬脂酸作为药用辅料，常用作润滑剂和软膏基质[4]，在《中国药典》2020 年版四部（ChP 2020）[5]、美国药典 2021 版（USP2021）、欧洲药典 10.0 版（EP10.0）、日本药局方 17 版（JP17）和印度药典 2010 年版（IP2010）均有收载[6-9]，各国药典均对功能性指标中的酸值、碘值、凝点、纯度（含量测定）等项目有控制，EP10.0 中硬脂酸作为固体制剂的润滑剂使用时，对粒度分布和比表面积等功能性参数进行了非强制规定。目前市场上硬脂酸可分为 50、70、95 型，需求大多为 50 型，根据本品的类别以及各国药典对其功能性相关指标的控制情况，本文以 50 型硬脂酸为例，结合统计学对该品种的硬脂酸与棕榈酸的比率、凝点、酸值、碘值、粒度、比表面积等 6

基金项目：湖南省自然科学基金 - 科药联合基金项目（No.2021JJ80042）。
作者简介：谢莹莹，女，工程师，实验员，主要从事药用辅料检验检测，email：276468687@qq.com　*通信作者：刘雁鸣，女，主任药师，主要从事药品药用辅料研究，email：380852839@qq.com

个重要的功能性指标进行分析，为提高完善质量标准和提升制剂质量平行稳定提供参考。

1　材料

气相色谱仪（GC-2010plus，日本岛津）；激光粒度分布仪（Mastersizer 3000，马尔文）；静氮吸附仪（JW-BK400，北京精微高博科学技术有限公司）；分析天平（MS 205DU，Mettler Toledo）；气相色谱柱 Agillent DB-Wax（30 m×320 mm，0.50 μm）。

硬脂酸 [7 家生产企业（A ～ G），共 39 批次，药用辅料级别样品共 30 批，化工原料级别样品共 9 批，其中 A ～ D 企业为药用辅料级，E ～ G 企业为化工原料级；A、D 企业为工艺 3，B、C 企业为工艺 2，E、F、G 企业为工艺 1]；本次经电话沟通及现场调研共收集到了 7 家生产企业的工艺简图，包含 3 种工艺，化工原料级别硬脂酸采用合成工艺（在硬化油中加入分解剂，然后水解得粗脂肪酸，再经水洗、蒸馏、脱色即得成品，同时副产甘油；简称工艺 1）；药用辅料级别硬脂酸分别采用精制工艺 1（以化工原料级硬脂酸为原料，不加乙醇重结晶；简称工艺 2）和精制工艺 2（以化工原料级硬脂酸为原料，加乙醇重结晶工艺；简称工艺 3）；水为超纯水。

2　方法

2.1　凝点

凝点系指由液体凝结为固体时，在短时间内停留不变的最高温度，可以区别或检查原辅料的纯杂程度 [5, 10]；参考 ChP2020 四部通则 0613 凝点测定法 [5] 进行硬脂酸凝点的测定。

2.2　碘值

碘值系指供试品充分卤化时所需的碘量，是评价油脂不饱和程度的重要参数，可决定药物的溶解性或分散程度 [5, 11]；参考 ChP2020 四部通则 0713 脂肪与脂肪油测定法 [5] 进行硬脂酸碘值的测定。

2.3　酸值

酸值系指供试品含有的游离脂肪酸的量，可根据酸值的变化有效地判断储存条件的合理性 [12]；参考 ChP2020 四部通则 0713 脂肪与脂肪油测定法 [5] 进行硬脂酸酸值的测定。

2.4　硬脂酸与棕榈酸的比率

生产硬脂酸的原料，主要为棕榈油经过分提的固体成分水解后得到硬脂酸与棕榈酸，因此硬脂酸与棕榈酸的比率可表征硬脂酸的纯度，比率越大，说明硬脂酸中的硬脂酸含量越高 [13]。参考 ChP2020 四部硬脂酸各论 [5] 下的含量测定项进行硬脂酸与棕榈酸的比率的测定，色谱条件：起始温度为 170 ℃，维持 2 min，以 10 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 240 ℃，维持数分钟；进样口温度为 250 ℃；检测器温度为 260 ℃；按面积归一法计算硬脂酸中硬脂酸与棕榈酸的含量，再计算两者的比值。

2.5　粒度和粒径分布

粒度和粒径分布可表征粉体的基本特征，分散粒径的大小对于药物疗效的正常发挥有重要的影响 [5, 14]。参照 ChP2020 “通则 0982 粒度和粒度分布测定法” 第一法和第三法 [5]，采用肉眼、显微镜及干法激光粒度仪进行粒度形态及粒径分布的表征。干法激光粒度仪测定参数为折射率：1.43；吸收率：0.01；遮光度：0.5% ～ 6%；样品盘类型：通用样品盘（带漏斗）；料斗间隙：2 mm；气压：2 bar；进样速度：35%；以累积粒度百分数达 50% 时所对应的粒径（D_{50}）作为评价指标。

2.6　比表面积

比表面积是评价粉末活性、吸附等性能的一项重要参数，药品的有效期、溶解速率与药效依赖于原辅料的比表面积 [15-16]。参照 ChP2020 “通则 0991 比表面积测定法” 第二法容量法对 “比表面积” 进行测定 [5]：在一定 P/P0 值 0.05 ～ 0.30 的范围内，测定硬脂酸中的吸附质吸附量，按 BET 方程作图并计算（多点方式）得到硬脂酸的比表面积。

2.7　数据分析

对所有指标数据按不同企业、不同级别、不同生产工艺分类，采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。

3　结果

3.1　凝点

所有样品凝点结果均符合 ChP2020 的限度（53 ～ 59 ℃）要求 [5]，结果见表 1 ～ 3 及图 1A。不同级别、不同生产工艺间的凝点均无统计学差异（$P > 0.05$），箱式图显示，工艺 2 较工艺 1、3 离散程度大，药用辅料级较化工原料级离散程度大，A、B、C 企业产品较其他生产企业离散程度大。

3.2　碘值

所有样品碘值结果均符合 ChP2020 的限度（≤ 4.0）要求 [5]，结果见表 1 ～ 3 及图 1B。不同级别间的碘值无统计学差异（$P > 0.05$），箱式图显示，工艺 1、3 较工艺 2 离散程度大，药用辅料级较化工原料级离散程度大，A、D、G 企业产品较其他生产企业离散程度大。

3.3　酸值

所有样品酸值结果均符合 ChP2020 的限度（194 ～ 212）要求 [5]，结果见表 1 ～ 3 及图 1C。不同级别间的酸值均无统计学差异（$P > 0.05$），箱式图显示，A、B、G 企业产品较其他生产企业离散程度大。

3.4　硬脂酸与棕榈酸的比率

所有样品硬脂酸的量与硬脂酸和棕榈酸总含量均符合 ChP2020 的限度 [硬脂酸的量：40.0% ～ 60.0%（不包括 60.0%）；硬脂酸和棕榈酸总含量：不低于 90.0%] 要求 [5]，结果见表 1 ～ 3 及图 1D。箱式图显示，药用辅料级较化工原料级离散程度大，G 企业产品较其他生产企业离散程度大。

3.5　比表面积

不同级别、不同工艺间的比表面积均无统计学差异（$P > 0.05$），箱式图显示，化工原料级较药用辅料级离散程度大，A 企业产品较其他生产企业离散程度大。结果见表 1 ～ 3 及图 1E。

3.6　粒径及粒径分布

典型样品照片与显微形貌图见图 2，从典型样品照片与显微形貌图可知，不同企业间的样品形貌具有显著差异，既有粉末又有颗粒，对粒径缺乏统一范围控制，与粒径测定结果大体吻合；不同级别间的 D_{50}，结果见表 1 ～ 3，图 1F 均无统计学差异（$P > 0.05$），箱式图显示，B、C 企业产品较其他生产企业离散程度大。

表 1　不同企业功能性指标结果统计表

Tab 1　Functionality related characteristics by different enterprises

生产企业	批次	凝点 /℃		碘值		酸值		硬脂酸与棕榈酸的比率		D_{50}/μm		比表面积 /（$m^2 \cdot g^{-1}$）	
		均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差
A	16	55.90	0.16	0.24	0.07	208.44	1.22	1.11	0.04	48.14	8.44	0.78	0.09
B	6	55.55	0.43	0.06	0.04	211.19	0.69	0.68	0.01	962.34	175.82	0.53	0.04
C	4	56.57	0.25	0.13	0.04	208.59	0.28	1.24	0.04	2648.35	319.59	1.00	0.02
D	4	55.70	0.08	0.20	0.12	209.97	0.43	0.76	0.08	901.46	83.69	0.37	0.04
E	3	55.90	0.10	0.19	0.01	210.13	0.08	0.85	0.08	899.43	31.68	0.36	0.04
F	3	55.56	0.11	0.12	0.01	210.88	0.63	0.78	0.08	38.75	0.60	1.94	0.03
G	3	55.90	0.10	0.19	0.15	209.04	2.11	0.90	0.27	954.14	77.49	0.57	0.03

表 2　不同级别功能性指标结果

Tab 2　Functionality related characteristics at different levels

级别	批次	凝点 /℃		碘值		酸值		硬脂酸与棕榈酸的比率		D_{50}/μm		比表面积 /（$m^2 \cdot g^{-1}$）	
		均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差
药用辅料	30	55.89	0.38	0.18	0.10	209.21	1.47	0.99	0.21	691.45	891.32	0.70	0.20
化工原料	9	55.78	0.19	0.17	0.08	210.02	1.36	0.84	0.15	630.77	446.61	0.96	0.74

表 3　不同生产工艺功能性指标结果

Tab 3　Functionality related characteristics from different production processes

工艺	批次	凝点 /℃		碘值		酸值		硬脂酸与棕榈酸的比率		D_{50}/μm		比表面积 /（$m^2 \cdot g^{-1}$）	
		均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差
工艺 1	9	55.78	0.19	0.17	0.08	210.02	1.36	0.84	0.15	630.77	446.61	0.96	0.74
工艺 2	10	56.02	0.64	0.09	0.05	210.04	1.49	0.92	0.29	1724.61	907.50	0.73	0.25
工艺 3	20	55.84	0.19	0.22	0.09	208.86	1.34	1.02	0.16	248.67	369.24	0.69	0.18

4　讨论

39 批次 50 型硬脂酸的结果显示：① 不同级别、不同工艺产品的凝点、比表面积等功能性指标结果差异均无统计学意义，但不同生产企业间存在不同程度的差异，如比表面积，7 家生产企业中有≥ 5 家两两比较差异存在统计学意义；② 由箱式图可知，凝点、碘值、硬脂酸与棕榈酸的比率等功能性指标药用辅料级比化工原料级离散程度大；同一企业的部分功能性指标与其他企业相比离散程度较大，如 A 企业，凝点、碘值、酸值、比表面积等 4 个功能性指标离散程度大。

作为药用辅料级硬脂酸采用的均为精制工艺（工艺 2 和工艺 3），起始原料的质量及成型工艺中干燥、粉碎、过筛的参数是决定成品硬脂酸功能性指标的重要因素 [16]；其中起始原料的质量会直接决定功能性指标中的酸值、碘值、凝点以及硬脂酸与棕榈酸的比率等；部分生产企业可能起始原料质量、工艺路线均相同，但因成型工艺中

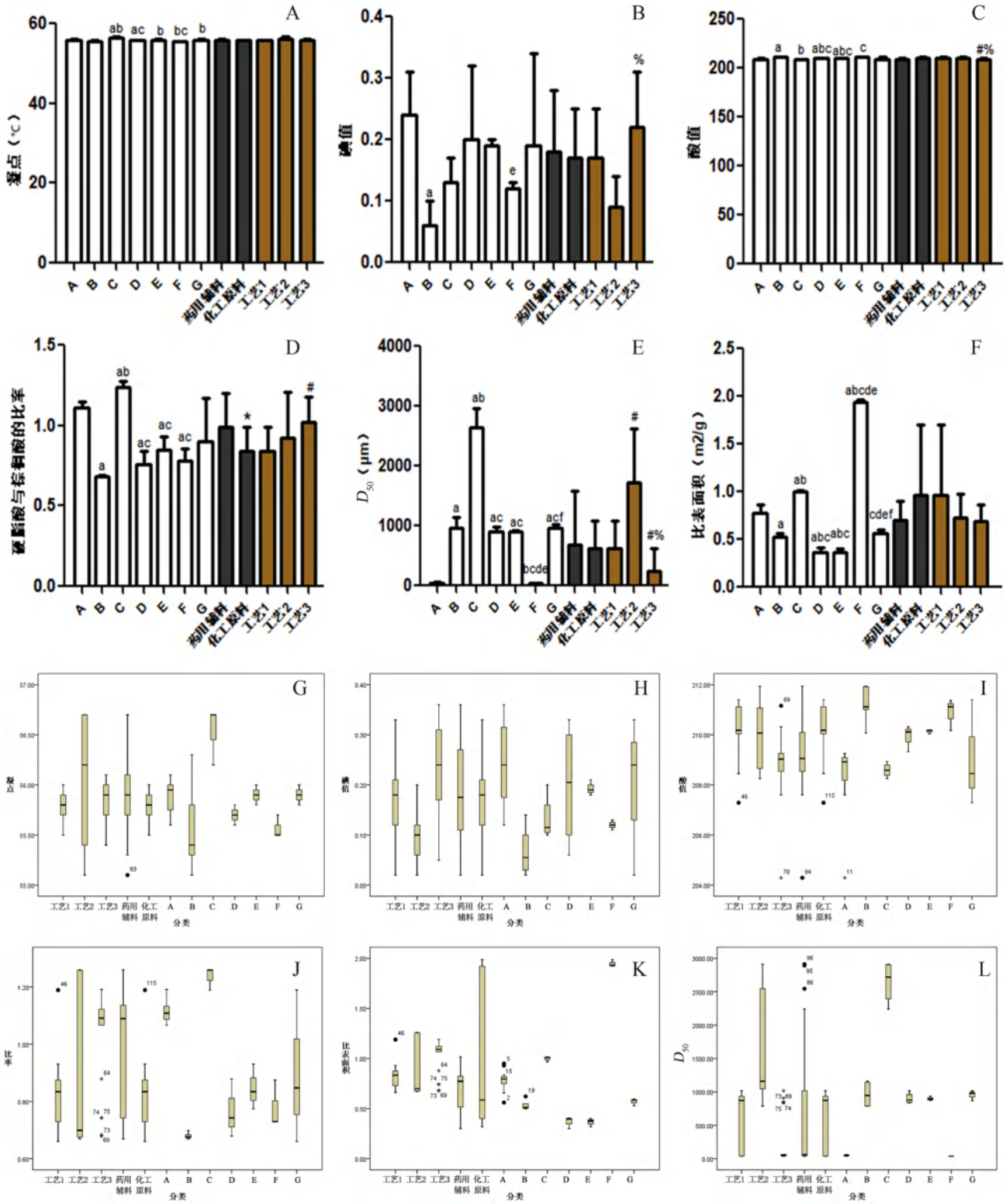


图 1　凝点（A、G）、碘值（B、H）、酸值（C、I）、硬脂酸与棕榈酸的比率（D、J）、D_{50}（E、K）、比表面积（F、L）结果比较图

Fig 1　Freezing point（A and G），iodine value（B and H），acid value（C and I），ratio of stearic acid to palmitic（D and J），specific surface area（E and K），and D_{50}（F and L）

注：与 A 企业比较，$^{a}P < 0.05$；与 B 企业比较，$^{b}P < 0.05$；与 C 企业比较，$^{c}P < 0.05$；与 D 企业比较，$^{d}P < 0.05$；与 E 企业比较，$^{e}P < 0.05$；与 F 企业比较，$^{f}P < 0.05$；与药用辅料级比较，$^{*}P < 0.05$；与工艺 1 比较，$^{\#}P < 0.05$；与工艺 2 比较，$^{\%}P < 0.05$。

Note：Compared with the enterprise A，$^{a}P < 0.05$；compared with the enterprise B，$^{b}P < 0.05$；compared with the enterprise C，$^{c}P < 0.05$；compared with the enterprise D，$^{d}P < 0.05$；compared with the enterprise E，$^{e}P < 0.05$；compared with the enterprise F，$^{f}P < 0.05$；compared with the pharmaceutical excipients，$^{*}P < 0.05$；compared with the process 1，$^{\#}P < 0.05$；compared with the process 2，$^{\%}P < 0.05$.

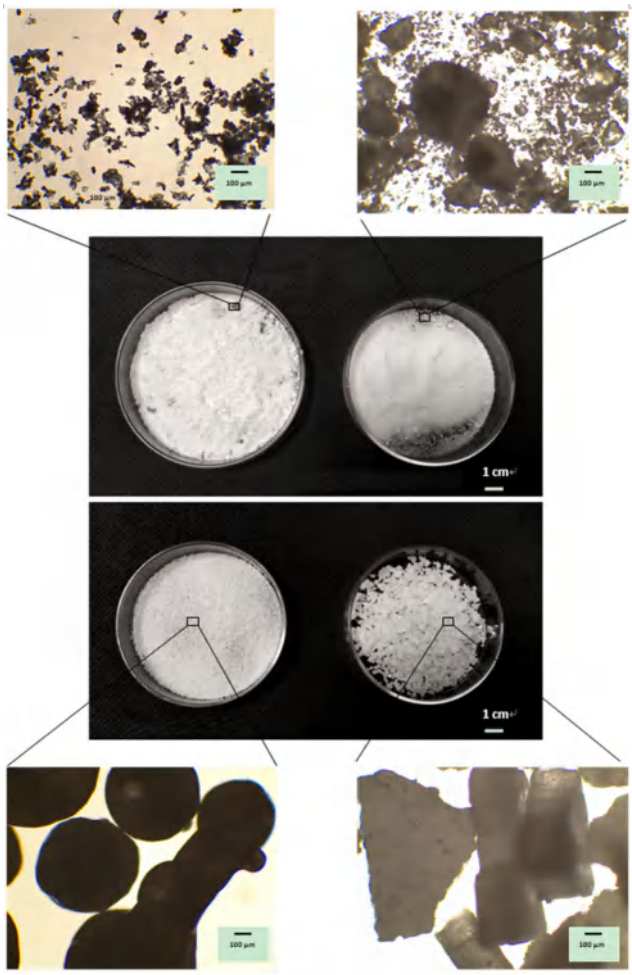


图 2　典型硬脂酸样品照片与显微形貌图

Fig 2　Photos and micromorphology of typical stearic acid

粉碎、过筛的参数的不同，会导致成品中粒度及比表面积的结果有显著差别。作为化工原料级硬脂酸采用的均为合成工艺（工艺 1），由分馏法水解制得，水解纯化工艺是影响工业级硬脂酸质量的关键技术因素 [17-19]；其中硬化油的质量、分解剂加入量、水洗次数及蒸馏参数等均可能会影响成品的功能性相关指标。

功能性指标的考察并不仅仅是保证其本身的质量，同时，保证其在制剂中发挥赋形作用的一致性更为重要；因此，为保证制剂工艺的一致性和质量有效性，建议制剂企业重点关注制剂所需辅料的关键功能性指标。ChP2020 四部硬脂酸各论项下暂未规定粒度分布、比表面积，为了使用企业制剂的质量均一性，建议药用辅料生产企业将粒度分布、比表面积测定结果列入标示项，以便制剂企业使用。

本研究方法与结果对制剂处方中辅料拟定、选择以及一致性评价中与辅料相关的问题剖析均有一定的参考价值。

参考文献

[1] 蔡仲曦，干荣富 . 药物一致性评价实施与药用辅料关联审评的探讨 [J]. 上海医药，2017，38（5）：5.

[2] 龙海燕，刘雁鸣，粟贵，等 . 硬脂酸镁功能性参数对尼群地平片溶出行为影响的研究 [J]. 中南药学，2016，14（12）：1298-1302.

[3] 邓文斌，潘昊，李云建，等 . 2208 型羟丙甲纤维素功能性相关指标的考察与主成分分析 [J]. 药学学报，2021，56（1）：314-318.

[4] 姚静 . 药用辅料应用指南 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2011：205-206.

[5] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：145，148，457，539-545，762.

[6] USP2021 [S]. 2021：6068.

[7] EP. 10.0 [S]. 2019：3655-3656.

[8] JP XVII. [S]. 2016：1606.

[9] IP2010 [S]. 2010：2154-2155.

[10] 何恩惠 . 药物杂质的分类及检查方法 [J]. 世界临床医学，2015，9（7）：277，280.

[11] 白莹，薛林科，李静雅，等 . 碘蓝褪色分光光度法测定食用油脂中碘值 [J]. 理化检验（化学分册），2020，56（10）：3.

[12] 董晓斌 . 食用油游离脂肪酸含量检测方法研究 [D]. 咸阳：西北农林科技大学，2014.

[13] 唐振宁 . 硬脂酸中的十八酸与十六酸含量的简便估算法 [J]. 日用化学工业，1975（5）：35-39.

[14] 许文彬 . 装载阿霉素的磁性纳米药物载体的制备及其生物特性研究 [D]. 吉林：吉林大学，2015.

[15] 张青铃，杨艳希，罗友华，等 . 化学药品对照品的吸湿性，溶解性与比表面积相关性研究 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（11）：7.

[16] 乐大勇，王琼，安静，等 . 复方贝母散超微粉的制备及粉体表征和物理特性对比 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（17）：9-13.

[17] 曹韩韩，杜若飞，杨嘉宁，等 . 基于多元回归分析干法制粒工艺参数与颗粒质量的相关性 [J]. 药学学报，2014，49（3）：406-410.

[18] 安静，殷辉，殷蓉，等 . 国内硬脂酸及其衍生物的合成路线及新工艺 [J]. 河北工业科技，2003，20（1）：10-13.

[19] 刘之诚，闫宁，刘大玮，等 . 一种硬脂酸和油酸的生产工艺，CN104946404A [P]. 2015.

（收稿日期：2021-12-06；修回日期：2022-01-11）

过氧化碳酰胺合成工艺的优化

林新文[1]，唐闪光[2*]，朱光冕[2]，陈娜[3]（1. 湖南省药品审核查验中心，长沙　410001；2. 湖南一格制药有限公司，湖南湘潭　411100；3. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙　410021）

摘要：目的　优化过氧化碳酰胺的处方及其制备工艺，提高其稳定性。**方法**　采用单因素试验法，以过氧化碳酰胺 pH、含量和收率为指标，以 pH 调节剂种类和添加量、依地酸二钠添加量为因素，对其处方进行优化；以溶解水浴温度、析晶温度、真空干燥温度为因素，对其制备工艺进行优化。采用长期试验和加速试验考察过氧化碳酰胺原料的稳定性。**结果**　最优处方及制备工艺为浓过氧化氢溶液 126 g、枸橼酸 0.82 g、依地酸二钠 0.12 g、尿素 60.06 g、溶解水浴温度 30 ～ 40 ℃、析晶温度 0 ～－ 7 ℃、真空干燥温度 30 ～ 40 ℃。经 3 次试验验证，所得过氧化碳酰胺的平均 pH 为 3.6，平均含量为 35.6%，平均收率为 78.4%。长期试验和加速试验表明，过氧化碳酰胺在低温下放置 6 个月，性状、溶液澄清度、pH、干燥失重和含量均无明显变化。**结论**　所得最优处方及制备工艺稳定、可行，可用于过氧化碳酰胺原料的制备。

关键词：过氧化碳酰胺；处方优化；制备工艺优化；螯合剂；含量
中图分类号：R914，O611.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1844-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.023

Optimization of the synthesis process of urea peroxide

LIN Xin-wen[1], TANG Shan-guang[2*], ZHU Guang-mian[2], CHEN Na[3] (1. *Hunan Drug Examination and Inspection Center, Changsha* 410001; 2. *Hunan Yige Pharmaceutical Co., Ltd, Xiangtan Hunan* 411100; 3. *The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410021)

Abstract: Objective To optimize the formulation and preparation technology of urea peroxide and improve its stability. **Methods** The single factor experiment was used. The pH, content and yield were used as indexes, and the formulation was optimized by taking the pH regulator, addition amount and EDTA-2Na addition amount as factors. The preparation technology was optimized by taking the reaction temperature, crystallization temperature, and drying temperature as factors. The stability of urea peroxide was determined by the acceleration test and the long-term test. **Results** The optimal formulation and preparation technology were as follows: hydrogen peroxide 126 g, citric acid 0.82 g, EDTA-2Na 0.12 g, urea 60.06 g, reaction temperature 30 ～ 40 ℃ , crystallization temperature 0 ～ － 7 ℃ , and vacuum drying temperature 30 ～ 40 ℃ . After three experiments, the average pH of urea peroxide was 3.6, the average content was 35.6%, and the average yield was 78.4%. The acceleration test and long-term test showed no significant change in the properties, solution clarity, pH, drying weight loss and the content when urea peroxide was placed at low temperature for 6 months. **Conclusion** The formulation and preparation technology are stable and feasible, and can be used for the preparation of urea peroxide.
Key words: urea peroxide; formulation optimization; preparation technology optimization; chelating agent; content

注射用过氧化碳酰胺是临床上一种常用的静脉给氧药物[1]，由过氧化氢与尿素以氢键结合形成[2]。经静脉注射后，过氧化碳酰胺在体内会先缓慢分解形成过氧化氢，在过氧化氢酶的作用下

作者简介：林新文，男，硕士，主要从事药品、医疗器械生产审核查验工作，email：272511799@qq.com　*通信作者：唐闪光，男，执业药师，主要从事新药开发研究和药品生产质量管理，email：89007304@qq.com

缓慢释放出氧分子，从而改善机体缺氧情况[3]，可用于因缺氧所导致的多种急重症的抢救与治疗[4-6]。该产品自上市销售以来，其安全性和有效性均获得了广大医师和患者的认同。随着生产批次的积累，发现产品在贮存时稳定性不佳，常出现炸瓶等不稳定现象，而这都是由于过氧化碳酰胺原料本身不稳定造成的，所以急需对过氧化碳酰胺原料工艺进行优化，以提高其稳定性，进而提高其制剂的稳定性。

研究发现金属离子、光照、温度等因素[7-8]，都会使过氧化碳酰胺分解，导致其 pH 和含量发生变化。螯合剂作为一种常用的药用辅料[9]，可通过与金属离子以配位键连接形成含金属离子的杂环结构，来减少金属离子对于药品的影响[10-12]。因此，可通过在制备过程中添加金属离子螯合剂[13]和 pH 调节剂[14]来增加过氧化酰胺的稳定性和储藏性能。基于此，本研究以过氧化碳酰胺 pH、含量和收率为指标，pH 调节剂种类和添加量、乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）添加量为因素，对其处方进行优化；以溶解水浴温度、析晶温度、干燥温度为因素，对其制备工艺进行优化；采用长期稳定性试验和加速稳定性试验考察过氧化碳酰胺的稳定性，可为过氧化碳酰胺原料生产产业化提供依据。

1　材料

1.1　仪器

DMH-2 型对开门干燥灭菌烘箱（南京长兴制药机械有限公司）；876A 型数显真空干燥箱（上海浦东跃欣科学仪器厂）；MA105DU 型电子天平（精度：0.1 mg，梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；SSW-600-2S 型恒温水浴锅（上海博讯医疗生物仪器股份有限公司）；PHS-3C 雷磁 pH 计（上海仪电科学仪器股份有限公司）；Labonce-250GS 药品稳定性试验箱（北京兰贝石恒温技术有限公司）。

1.2　试药

尿素（批号：190305，湖南芙蓉制药有限公司）；过氧化氢溶液（批号：191008、191009，成都明日制药有限公司）；枸橼酸（批号：100820170407）、乙二胺四乙酸二钠（批号：102320190701）（湖南尔康制药股份有限公司）；磷酸二氢钠（批号：20210506，分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；磷酸（分析纯，湖南汇虹试剂有限公司）；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　过氧化碳酰胺制备原有工艺

称取 126 g 浓过氧化氢溶液（折合 H_2O_2 为 34.01 g）以及 60.06 g 尿素于烧杯中（使过氧化氢与尿素的摩尔比为 1∶1），35 ℃水浴加热搅拌溶解后保温 5 min，使其充分反应。将反应后的溶液经 0.45 μm 的聚丙烯滤膜过滤后进行冷却析晶，冷却至 0 ～ 4 ℃时开始计时，低温静置析晶 12 ～ 24 h，倾去母液得结晶 1，母液按照上述条件进行第二次结晶，弃第二次结晶后母液得结晶 2，将结晶 1 和结晶 2 混合置于真空干燥箱中，30 ℃左右真空干燥 24 ～ 36 h，即得过氧化碳酰胺（合成工艺见图 1）。

图 1　原有合成工艺路线

Fig 1　Original synthetic process route

2.2　过氧化碳酰胺优化工艺

称取 126 g 浓过氧化氢溶液（折合 H_2O_2 为 34.01 g）于烧杯中，依次加入乙二胺四乙酸二钠 0.12 g 和枸橼酸 0.82 g，搅拌均匀，向搅拌后的溶液中加入 60.06 g 的尿素（使过氧化氢与尿素的摩尔比为 1∶1），30 ～ 40 ℃水浴加热搅拌溶解后保温 5 min，使其充分反应。将反应后的溶液经 0.45 μm 的聚丙烯滤膜过滤后进行冷却析晶，冷却至－ 4 ℃开始计时，维持析晶料液－ 7 ～ 0 ℃低温搅拌析晶 10 ～ 12 h，析晶完成后，将母液收集按照上述条件进行二次析晶，晶体转入过滤器中，经 200 ～ 400 目尼龙筛布过滤，得过氧化碳酰胺湿品。将过氧化碳酰胺湿品铺盘置于真空干燥箱中，30 ～ 40 ℃下真空干燥 24 ～ 36 h，即得过氧化碳酰胺（合成工艺见图 2）。

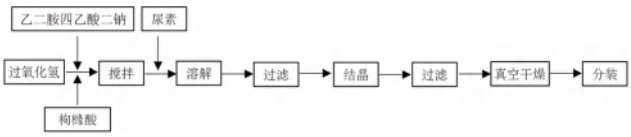


图 2　优化的合成工艺路线

Fig 2　Optimized synthetic process route

2.3　过氧化碳酰胺质量的评价指标

2.3.1　过氧化碳酰胺 pH 测定　取样品 4.0 g 精密称定，加新沸过并放冷的超纯水 15 mL 充分搅拌使其溶解，制备成待测溶液，于 25 ℃测 pH 值，测定 3 次，计算平均值。pH 应在 3.2 ～ 3.7，确保产品符合质控要求。

2.3.2　过氧化碳酰胺的含量测定　由于过氧化碳酰胺为过氧化氢和尿素的晶体加合物[15]，故本试验中过氧化碳酰胺的含量均以其中过氧化氢的含量来计算。取样品 0.1 g 精密称定，置于碘瓶

中，加水 25 mL 与冰醋酸 5 mL 溶解后，加碘化钾 2 g，钼酸铵试液 1 滴，遮光放置 10 min，用 0.1 mol • mL^{-1} 的硫代硫酸钠滴定，至近终点时加淀粉指示液 3 mL，继续滴至蓝色消失，并将滴定的结果用空白试验校正。每 1 mL 硫代硫酸钠滴定液（0.1 mol • mL^{-1}）相当于 1.701 mg 的过氧化氢。

2.3.3　过氧化碳酰胺收率的计算　过氧化碳酰胺合成基本反应方程式如下：

$$H_2O_2 + CH_4N_2O \rightarrow CH_4N_2O \cdot H_2O_2$$

$$收率（\%）= 60.06 \times m/94.07 \times M \times 100\%$$

式中 m 为实际产量（g），M 为尿素质量（g）。

2.4　过氧化碳酰胺处方的优化过程

2.4.1　pH 调节剂的种类　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，0.18 g 乙二胺四乙酸二钠，60.06 g 尿素，pH 调节剂 1.0 g，水浴溶解 35 ℃保温，－4 ℃低温搅拌析晶，真空干燥温度 35 ℃，按“2.2”项下方法制备，“2.3”项下方法测定评价指标，考察不同种类 pH 调节剂对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响。结果显示，pH 调节剂种类对过氧化碳酰胺 pH 有很大影响，当选用磷酸二氢钠＋磷酸或单独的磷酸作为 pH 调节剂时，样品 pH 较高，第一次结晶收率较低。当选用枸橼酸为 pH 调节剂时，样品 pH 较低，第一次结晶收率较高。故选择枸橼酸作为 pH 调节剂。结果见表 1。

表 1　pH 调节剂对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响

Tab 1　Effect of pH regulator on pH、content and yield of urea peroxide

pH 调节剂	第一次结晶			第二次结晶		
	pH	含量 /%	收率 /%	pH	含量 /%	收率 /%
枸橼酸	3.5	35.8	78.6	3.6	35.1	3.2
磷酸二氢钠＋磷酸	3.9	35.0	70.1	3.9	34.7	5.4
磷酸	3.8	35.4	68.8	3.8	35.4	6.5

2.4.2　枸橼酸的用量　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，0.18 g 乙二胺四乙酸二钠，60.06 g 尿素，水浴保温温度 35 ℃，冷却搅拌析晶温度－4 ℃，真空干燥温度 35 ℃，按“2.2”项下方法制备，按“2.3”项下方法测定评价指标，考察枸橼酸添加量（0.64、0.82、1.00、1.18、1.36 g）对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响。结果显示，当枸橼酸添加量为 0.82 g 和 1.00 g 时，过氧化碳酰胺含量和第一次结晶收率均较其他组高，而从添加外来物质越少越好的角度考虑，本文选择枸橼酸添加量为 0.82 g。结果见表 2。

表 2　枸橼酸添加量对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响

Tab 2　Effect of citric acid additive amount on pH、content and yield of urea peroxide

添加量 /g	第一次结晶			第二次结晶		
	pH	含量 /%	收率 /%	pH	含量 /%	收率 /%
0.64	3.8	34.5	76.6	3.7	34.1	4.2
0.82	3.6	35.4	78.8	3.6	35.2	3.0
1.00	3.5	35.2	78.6	3.6	35.1	3.2
1.18	3.4	34.6	77.4	3.6	34.7	3.2
1.36	3.4	34.5	77.2	3.6	34.8	3.5

2.4.3　螯合剂的用量　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，0.82 g 枸橼酸，60.06 g 尿素，水浴保温温度 35 ℃，冷却析晶温度－4 ℃，真空干燥温度 35 ℃，按“2.2”项下方法制备，按“2.3”项下方法测定评价指标，考察不同乙二胺四乙酸二钠添加量（0.12、0.15、0.18、0.21、0.24 g）对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响。结果显示，随着乙二胺四乙酸二钠添加量的增加，过氧化碳酰胺第一次结晶后，含量呈下降趋势，且添加量为 0.12 g 时结晶收率最高，综合试验结果和成本考量，后续工艺选择最小添加量 0.12 g。

2.5　过氧化碳酰胺制备工艺的优化过程

2.5.1　水浴温度　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，按“2.4”项下最优处方，固定冷却析晶温度－4 ℃，真空干燥温度 35 ℃，按“2.2”项下方法制备（由于二次结晶收率较低，且结晶时间较长，故后续工艺均不再进行二次结晶），考察不同水浴温度（25、30、35、40、45 ℃）时尿素的溶解时间和溶解情况，结果见表 4。结合溶解时间和溶解情况，后续工艺选择 30 ～ 40 ℃作为最佳水浴温度。

表 3　螯合剂添加量对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响

Tab 3　Effect of chelating agentadditive amount on pH，content and yield of urea peroxide

添加量 /g	第一次结晶			第二次结晶		
	pH	含量 /%	收率 /%	pH	含量 /%	收率 /%
0.12	3.6	35.3	79.0	3.6	35.2	3.0
0.15	3.6	35.2	78.5	3.6	35.1	3.2
0.18	3.6	34.9	78.8	3.6	35.2	3.0
0.21	3.6	34.6	77.8	3.6	34.8	3.1
0.24	3.6	34.2	76.2	3.6	35.1	3.0

表 4　水浴温度对过氧化碳酰胺溶解反应的影响

Tab 4　Effect of water bath temperature on dissolution reaction of urea peroxide

温度 /℃	溶解时间 /min	溶解情况
25	90	未完全溶解
30	60	完全溶解
35	48	完全溶解
40	37	完全溶解
45	30	表面产生汽泡

2.5.2　析晶温度　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，按“2.4”项下最优处方，固定水浴保温温度 35 ℃，真空干燥温度 35 ℃，按“2.2”项下方法制备，按“2.3”项下方法测定，考察不同析晶温度（0 ～ 4 ℃、－ 4 ～ 0 ℃、－ 8 ～－ 4 ℃、－ 12 ～－ 8 ℃）对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响。结果显示，当析晶温度在 4 ～－ 8 ℃时，可以析出细腻的结晶颗粒；随着温度降低，过氧化碳酰胺含量基本不变，收率呈逐步升高的趋势；当析晶温度为－ 12 ～－ 8 ℃时，液面出现结冰情况，不能进行搅拌；故后续工艺选择 0 ～－ 7 ℃为最佳析晶温度。结果见表 5。

表 5　析晶温度对过氧化碳酰胺 pH、含量和收率的影响

Tab 5　Effect of crystallization temperature on pH，content and yield of urea peroxide

析晶温度 /℃	析晶状态	pH	含量 /%	收率 /%
0 ～ 4	细腻结晶颗粒	3.8	34.2	56.8
－ 4 ～ 0	细腻结晶颗粒	3.6	35.1	77.2
－ 8 ～－ 4	细腻结晶颗粒	3.6	34.8	78.8
－ 12 ～－ 8	液面出现结冰情况，影响搅拌	－	－	－

2.5.3　真空干燥温度　称取 126 g 浓过氧化氢溶液，按“2.4”“2.5”项下优化结果，固定水浴温度 35 ℃，析晶温度 0 ～－ 7 ℃，按“2.2”项下方法制备，按“2.3”项下方法测定，考察不同真空干燥温度（30、35、40、45 ℃）对过氧化碳酰胺 pH 和含量的影响。结果显示，随着干燥温度升高，干燥 24 h 的干燥失重和干燥 36 h 的干燥失重都呈逐步降低的趋势，但在 30 ～ 40 ℃温度区间内，干燥温度对过氧化碳酰胺 pH 变化无影响，且在 35 ℃时过氧化碳酰胺含量最大。故后续工艺选择 30 ～ 40 ℃为最佳真空干燥温度。

表 6　真空干燥温度对过氧化碳酰胺 pH 和含量的影响

Tab 6　Effect of vacuum drying temperature on pH and content of urea peroxide

温度 /℃	干燥 24 h 的干燥失重 /%	干燥 36 h 的干燥失重 /%	pH	含量 /%
30	0.9	0.5	3.6	35.1
35	0.6	0.3	3.6	35.4
40	0.5	0.2	3.6	35.3
45	0.2	0.2	3.9	32.8

2.5.4　结晶次数确认　原工艺采用了母液两次结晶合并后再真空干燥的工艺。此工艺可以小幅提高产品的收率，但是一次结晶收得的湿品，需等与母液再次过夜重结晶的湿品合并才能进入真空干燥工序，一次结晶湿品的暂存时间偏长，不利于生产效率的提高。同时根据上述试验结果，第二次的结晶收率远远低于第一次的结晶收率，且第二次收得量很小，经权衡利弊，可将原两次结晶的工艺改为一次结晶的工艺，一次结晶后的湿品直接进入真空干燥工序，结晶母液弃去不用。

2.6　最佳处方及制备工艺的验证

称取 126 g 浓过氧化氢溶液，按“2.4”“2.5”项下最优处方及制备工艺制备过氧化碳酰胺。按“2.3”项下方法测定评价指标。每份样品平行操作 3 次，取平均值。结果显示，优化的处方和工艺制备的过氧化酰胺其 pH、含量和收率均优于原工艺处方，这表明新处方及制备工艺下生产的过氧化碳酰胺较原工艺稳定，能获得更高的收率，符合产业化要求。结果见表 7。

2.7　样品稳定性试验

2.7.1　长期稳定性试验方法　按“2.4”“2.5”项下最优处方及制备工艺制得过氧化碳酰胺原料。按照 2020 年版《中国药典》四部中“原料药物与制剂稳定性试验指导原则”[16]，对于温度特别敏感的药物，长期试验可在温度（5±3）℃条件下进

表 7　优化的及原处方和工艺的验证结果

Tab 7　Verification of optimal and original formulation and preparation technology

处方和工艺	批号	pH	含量 /%	收率 /%
优化的	1	3.6	35.6	78.5
	2	3.6	35.5	78.2
	3	3.6	35.6	78.5
	平均值	3.6	35.6	78.4
原来的	1	3.8	33.6	50.5
	2	3.9	33.5	50.2
	3	3.9	33.6	50.5
	平均值	3.9	33.6	50.4

行。取适量样品，以市售包装，（5±3）℃条件下放置 6 个月，分别在第 0、3、6、9、12 个月时取样，按照 2020 年版《中国药典》四部“原料药物及制剂稳定性重点考察项目”，考察其性状、pH、溶液的澄清度、干燥失重和含量。结果显示，过氧化碳酰胺性状均为白色结晶状，溶液呈澄清无色，其 pH、干燥失重和含量与第 0 月相比均变化不大，表明其稳定，符合产品生产需求。结果见表 8。

表 8　长期稳定性试验结果

Tab 8　Long-term stability test results

批次	放置时间 / 月	性状	pH	溶液的澄清度	干燥失重 /%	含量 /%
1	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.6	35.6
	3	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.7	35.7
	6	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.6	35.3
	9	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.5
	12	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.4
2	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.5	35.5
	3	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.4
	6	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.8
	9	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.9
	12	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.9
3	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.5	35.6
	3	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.6
	6	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.9
	9	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.1
	12	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.6

2.7.2　加速稳定性试验方法　按“2.4”“2.5”项下最优处方及制备工艺制得过氧化碳酰胺。按照 2020 年版《中国药典》四部中“原料药物与制剂稳定性试验指导原则”[16]，对温度特别敏感的药物，预计只能在冰箱（5±3）℃内保存使用，此类药物的加速试验，可在温度为（25±2）℃，相对湿度为（60±5）% 的条件下进行。取适量样品，以市售包装，于温度为（25±2）℃，相对湿度为（60±5）% 的条件下放置 6 个月，分别在第 0、1、2、3、6 个月时取样，按照 2020 年版《中国药典》四部“原料药物及制剂稳定性重点考察项目”，考察其性状、pH、溶液的澄清度、干燥失重和含量。结果显示，过氧化碳酰胺性状均为白色结晶状，溶液呈澄清无色，其 pH、干燥失重和含量与第 0 月相比均变化不大，表明其稳定，符合产品生产需求。结果见表 9。

表 9　加速稳定性试验结果

Tab 9　Accelerated stability test results

批次	放置时间 / 月	性状	pH	溶液的澄清度	干燥失重 /%	含量 /%
1	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.6	35.6
	1	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.6
	2	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.6	35.5
	3	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.6	35.6
	6	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.6	35.1
2	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.5	35.5
	1	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.4
	2	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.6
	3	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.2
	6	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.4
3	0	白色结晶性粉末	3.6	澄清无色	0.5	35.6
	1	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.5
	2	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.4
	3	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.5	35.6
	6	白色结晶性粉末	3.5	澄清无色	0.4	35.2

3　讨论

3.1　pH 调节剂的选择

过氧化氢作为一种极弱酸（$K_a = 2.4\times10^{-12}$），在自然状态下极不稳定，存在典型的自加速分解过程[17]。孙峰等[18]研究发现，随着过氧化氢的 pH 值增加，反应起始放热温度降低，热失控危险性明显增加，当 pH 值增至 7 以上时，储存的过氧化氢极不稳定，极易发生热失控。故过氧化碳酰胺储存过程中 pH 值的稳定，对过氧化碳酰胺的储存性能有较大的影响。本研究通过单因素试验探究了不同 pH 调节剂及其最佳添加量。结果表明枸橼酸对产品 pH 具有较好的调节性，作为一种天然小分子有机酸，具有无毒无害，水中溶解性能好的优点[19]，且可与二、三价金属离子进行螯合[20]，提高过氧化碳酰胺的稳定性，因此本研究以枸橼酸作为 pH 调节剂。

3.2　螯合剂的选择

乙二胺四乙酸二钠作为药物中常用的金属离子螯合剂，具有广泛的配位性能[21]，对照品中的靶金属具有很高的螯合效率[22]，几乎与所有过渡金属都能生成水溶性好且稳定的螯合物，能有效

防止药物被金属离子催化氧化[23]，增强药物的稳定性，且在高温条件下依然稳定[24]。故本研究选择乙二胺四乙酸二钠作为金属离子螯合剂。

3.3 水浴温度的选择

基于过氧化碳酰胺制备处方的改变，本研究探讨了在新处方下，过氧化碳酰胺制备的最佳工艺。结果表明在 25 ～ 40 ℃，随着温度升高，尿素的溶解时间不断减少，当温度达到 30 ℃时，尿素已完全溶解；当温度达到 45 ℃时，样品表面产生汽泡。这是由于温度升高有利于尿素溶解和合成反应的进行，进而提高过氧化碳酰胺的收率，但温度过高会导致过氧化氢和过氧化碳酰胺分解[25]，因此选择 30 ～ 40 ℃作为最佳反应温度。

3.4 真空干燥温度的选择

此外，本研究还探讨了真空干燥温度对产品干燥失重、pH 和含量的影响。结果表明，在 30 ～ 40 ℃，随着温度的升高产品真空干燥的失重减少，当温度达到 40 ℃、干燥时间 36 h 时，产品失重只有 0.2%，说明此时已基本去除产品中的水分和挥发性物质；且 pH 为 3.6 符合产品质控要求。当温度进一步升高时，产品干燥 36 h 的失重未再减少，但产品的 pH 升高，含量降低，说明此温度下，过氧化碳酰胺已分解，不适宜进行真空干燥。综合试验结果与能耗考量，选择 30 ～ 40 ℃作为真空干燥温度。

本研究通过单因素试验探讨了过氧化碳酰胺制备的最佳处方及其工艺条件，稳定性试验表明新处方及工艺下所生产的产品均符合质控要求，稳定性好，可为过氧化碳酰胺原料生产产业化提供依据。

参考文献

[1] 李军，谌晓玲，熊国炎，等 . 过氧化尿素合成工艺及其稳定剂的研究 [J]. 天然气化工（C1 化学与化工），2017，42（1）：22-26.

[2] 郑正春，彭清，郭丙炎 . 注射用过氧化碳酰胺制备工艺研究 [J]. 中国药业，2009，18（10）：57.

[3] 吴田田，苏婷婷，姜恒 . 合成过氧化尿素之稳定剂研究 [J]. 石油化工高等学校学报，2002，15（1）：25-27.

[4] 马宝满，韦育红，黄澎 . 过氧化碳酰胺联合维生素 C 治疗产程中胎儿窘迫临床观察 [J]. 中国实用医药，2010，5（27）：143-144.

[5] 雷李美，徐华峰 . 注射用过氧化碳酰胺治疗危重症患者低氧血症的疗效观察 [J]. 临床医学，2005，25（11）：40-41.

[6] 平玉兰 . 碳酰胺过氧化氢治疗胎儿宫内窘迫 168 例 [J]. 山东医药，2002，42（19）：80-81.

[7] 刘瑛，王鸿显，赵红坤 . 过碳酰胺稳定剂的筛选研究 [J]. 江苏化工，2002，20（4）：40-41.

[8] 王燕，皇甫慧君，梁燕萍，等 . 几种物质对过氧化尿素稳定性能影响的研究 [J]. 日用化学工业，2007，37（3）：209-211.

[9] 李健和，彭六保，曹俊华，等 . 注射用过氧化碳酰胺氯化钠的研制 [J]. 中国药物应用与监测，2009，6（2）：101-104，123.

[10] 解成骏，李洪潮，张文强，等 . 花生粕制备复合氨基酸螯合锌的研究 [J]. 中国油脂，2019，44（6）：120-123.

[11] 许甲平，鲍宏云，邓志刚，等 . 有机微量元素中螯合率、稳定常数和螯合强度之间的关系 [J]. 饲料广角，2012，23：29-30.

[12] Palma LD，Mecozzi R. Heavy metals mobilization from harbour sediments using EDTA and citric acid as chelating agents [J]. J Hazard Mater，2007，147（3）：768-775.

[13] Cho S，Jang JW，Jung A，et al. Formation of amorphous zinc citrate spheres and their conversion to crystalline ZnO nanostructures [J]. Langmuir，2011，27（1）：371-372.

[14] 朱希增，朱顺兵，刘新华 . 有机磷酸稳定剂对双氧水绝热分解特性的影响 [J]. 化工进展，2014，33（12）：3197-3202.

[15] 俞马宏，崔学军，黄炼军 . 过氧化尿素的制备及其热稳定性研究 [J]. 南京理工大学学报（自然科学版），2005，1：59-61.

[16] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：495.

[17] 朱希增，朱顺兵，张文兴 . 金属离子对双氧水热稳定性的影响研究 [J]. 安全与环境学报，2016，16（5）：173-176.

[18] 孙峰，谢传欣，张帆，等 . pH 值对双氧水绝热分解特性的影响 [J]. 化学工程，2012，40（2）：42-45.

[19] 王海 . 柠檬酸螯合锌、铜、锰化合物的制备与表征 [D]. 合肥：合肥工业大学，2021.

[20] 王美玲，龚玉琼，钟国清 . 柠檬酸锌螯合物的合成与应用 [J]. 中国饲料，2016，16：14-17.

[21] 许超，夏北城，林颖 . EDTA 和柠檬酸对污染土壤中重金属的解吸动力学及其形态的影响 [J]. 水土保持学报，2009，23（4）：146-151.

[22] 彭怡星，贾元超 . 依地酸二钠对注射用艾司奥美拉唑钠的影响 [J]. 海峡药学，2017，29（1）：6-9.

[23] Sun B，Zhao FJ，Lombi E，et al. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA [J]. Environ Pollut，2001，113（2）：111-120.

[24] 刘子嫣，刘美，李宁，等 . 羧酸类螯合剂对于加氢催化剂活性相结构调变作用的研究进展 [J]. 应用化工，2020，49（6）：1552-1556.

[25] 易跃能，杨华，叶樱 . 过氧化碳酰胺的合成 [J]. 华西药学杂志，2010，25（6）：650-651.

（收稿日期：2022-04-13；修回日期：2022-06-24）

综述

TRPV4 在心血管疾病治疗中的研究进展

邵俊兰，焦小雨，唐春雷*（江南大学生命科学与健康工程学院，江苏　无锡　214000）

摘要：瞬时受体电位香草素亚型 4（TRPV4）是存在于细胞膜或细胞内细胞器膜上的非选择性阳离子通道蛋白，作为 Ca^{2+}通透的阳离子选择性通道，TRPV4 能调节人体一系列重要的生理功能，包括调节钙信号、保护内皮细胞屏障完整性等，在心血管疾病中发挥重要作用。本文通过查阅、分析 TRPV4 相关文献，总结其生理和病理功能以及靶向 TRPV4 通道的新药的进展。

关键词：TRPV4；心血管疾病；药物靶点

中图分类号：R972　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1850-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.024

Research progress of TRPV4 in the treatment of cardiovascular diseases

SHAO Jun-lan, JIAO Xiao-yu, TANG Chun-lei* (*School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi Jiangsu* 214000)

Abstract: Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is a non-selective cation channel protein that exists in the cell membranes or intracellular organelle membranes. As a cation-selective channel permeable to calcium ion, TRPV4 regulates a series of important physiological functions in the body, including regulating calcium signal, protecting the integrity of the endothelial cell barrier, etc., plays an important role in the cardiovascular diseases. This article reviewed TRPV4 related literature, and summarized its physiological and pathological functions and the development of new drugs targeting TRPV4 channels.

Key words: TRPV4; cardiovascular disease; drug target

根据国家心血管病中心（School of Life Sciences and Health Engineering）近期发布的报告显示，中国患心血管病的人数约3.3亿，其中患脑卒中1300万，冠心病 1100 万，心力衰竭 890 万，高血压 2.45 亿。2018 年，心血管病死亡占我国城乡居民总死亡原因的首位，在农村为 46.66%，在城市为 43.81%[1]。目前，市面上常有的心血管治疗药主要有五类，包括血管紧张素转化酶抑制剂（angiotensin converting enzyme inhibitor，ACEI）、血管紧张素受体阻滞剂（angiotensin receptor blockers，ARB）、钙通道阻滞剂（calcium channel blockers，CCB）、利尿剂、*β*-受体阻滞剂等。由于心血管治疗药全身性地作用于受体、通道和酶，缺乏较强的特异性，在广泛应用于疾病治疗的同时也会产生不良反应，比如高钾血症、电解质紊乱、直立性低血压等。为减少不良反应，提升患者生活质量，近年来以 TRPV4 为靶点的药物研究新方向已得到越来越多的重视。

瞬时受体电位（transient receptor potential，TRP）超家族由哺乳动物基因组中存在的 28 个 TRP 通道基因编码，并根据 DNA 和蛋白质序列同源性分为七个亚家族：经典瞬时受体电位（transient receptor potential canonical，TRPC），瞬时受体 M 型（transient receptor potential melastatin，TRPM），瞬时受体锚蛋白（transient receptor potential ankyrin，TRPA），瞬时受体多囊蛋白（transient receptor potential polycystin，TRPP），瞬时受体粘脂蛋白（transient receptor potential mucolipin，TRPML）、无机械感受器电位 C（no

作者简介：邵俊兰，女，硕士，主要从事新药分子设计与合成研究，email：3286439513@qq.com　*__通信作者：__唐春雷，男，副教授，主要从事新药分子设计与合成研究，email：tangcl@jiangnan.edu.cn

mechanoreceptor potential，NOMPC，TRPN）和瞬时受体香草素（transient receptor potential vanilloid，TRPV）[2]。TRPV 可以进一步细分为 6 种亚型——TRPV1 ～ 6，其中，TRPV4 蛋白在不同的血管内皮细胞中表达 [3]，参与了多种血管功能，包括应答血流剪切力、调节血管张力、机械信号传导、血管新生等。TRPV4 功能障碍与许多病理生理状态有关，本综述就其在心血管疾病方面发挥的重要性进行探讨。

1　TRPV4 的结构

TRP 通道是四聚体蛋白，大多数 TRP 是非选择性阳离子通道，对钠、氯、钾和钙具有高渗透性，但每种亚型都具有独特的离子渗透性、电导和电压依赖性，并被不同的配体或生理刺激激活。

人类的 *TRPV4* 基因位于染色体 12q23-q24.1 上，有 15 个外显子，这些外显子编码组成全长含有 871 个氨基酸的蛋白质。TRPV4 两侧是大的 N 端和 C 端结构域，中间是 6 个跨膜的 *α*- 螺旋结构域（S1 ～ S6），其 NH_2 末端附近有 3 个锚蛋白重复结构域（ankyrin-repeat domains，ARD），COOH 端区域维持通道蛋白折叠、成熟和运输，允许离子流动的孔位于 S5 和 S6 结构域之间 [4]。孔打开和关闭以允许阳离子穿过膜，门控通常由一种或多种刺激（例如配体结合）控制。

2　TRPV4 的功能与相关疾病

2.1　TRPV4 的生理功能

2.1.1　调节血管通透性　通过激活 TRPV4 通道可以增加内皮 Ca^{2+} 内流，同时激活肌球蛋白轻链激酶，刺激一氧化氮合成，并激活一氧化氮介导的负反馈回路，该回路通过环磷酸鸟苷（cyclic GMP，cGMP）依赖性衰减来增加血管通透性，从而保护血管屏障 [5]。有研究通过观察后肢缺血动物模型发现，TRPV4 激动剂通过诱导缺血后肢的淋巴管生成来改善缺血后肢的血流，缺氧后肢的淋巴管生成促进 Ca^{2+} 通过 TRPV4 通道进入淋巴管内皮细胞，该研究表明通过激活 TRPV4 使淋巴管和血管中 TRPV4 上调将是治疗周边动脉阻塞性疾病的一个有效策略 [6]。

2.1.2　维持细胞屏障　上皮屏障的特征在于细胞内紧密连接，而内皮屏障由细胞间紧密连接和 / 或黏附连接组成，这些连接限制了液体和蛋白质跨组织膜的细胞旁通道，而炎症等病理生理状态会破坏这些屏障的完整性。研究人员通过组织学观察发现 TRPV4 缺陷（$TRPV4^{-/-}$）小鼠的结合上皮细胞间隙较野生型（$TRPV4^{+/+}$）小鼠宽，$TRPV4^{-/-}$ 小鼠结合上皮的外源性示踪渗透比 $TRPV4^{+/+}$ 小鼠更强，而对黏着小带蛋白的免疫反应性比 $TRPV4^{+/+}$ 小鼠更低。该研究表明 TRPV4 在结合上皮细胞黏附连接的形成中起重要作用，这种黏附连接可以调节其通透性 [7]。

2.2　TRPV4 通道异常的相关疾病

2.2.1　心力衰竭　内皮功能障碍是心血管疾病发病机制的第一步，也是心力衰竭患者病死率的重要预测因素。TRPV4 在血管内皮细胞中广泛表达，如主动脉、大动脉（例如颈动脉）和小动脉，以及靶器官（例如肺）中的毛细血管，TRPV4 下调可能会导致血管紧张素Ⅱ诱导的内皮功能障碍。此外，TRPV4 通道在血管生成和动脉发生中起重要作用，它参与了血流剪切应力引起的动脉侧支生长，是治疗主动脉闭塞或狭窄的有效靶点 [8]。

心力衰竭不仅会影响心脏和血管，还会影响肺部，肺充血是心力衰竭的标志性特征之一。来自啮齿动物肺部的证据表明，高肺静脉压诱导的肺水肿是由肺毛细血管内皮 TRPV4 通道的激活驱动的，Thorneloe 等 [9] 研究进一步表明 TRPV4 在充血型心力衰竭患者的肺组织中表达增加。

2.2.2　肺动脉高压　心力衰竭可分为左心衰竭和右心衰竭，其中，左心衰竭会引起全心衰竭，继而累及右心室，从而出现肺动脉高压。在肺动脉平滑肌细胞中，激活 5- 羟色胺受体可以导致 TRPV4 介导 Ca^{2+} 流入，可能介导肺动脉平滑肌细胞增殖 [10]。有研究表明，TRPV4 通道参与肺动脉高压的外膜成纤维细胞活化和外膜重塑，该项研究首次证明了 TRPV4 通道在外膜重塑中的作用 [11]。以上研究提示，TRPV4 是治疗肺动脉高压的潜在有效靶点，值得进一步研究。

2.2.3　高血压　研究表明，高盐饮食诱发的心血管疾病（如高血压）中 TRPV4 与血管张力的调节密切相关 [12]。高血压小鼠的 TRPV4 通道被抑制，无法介导 Ca^{2+} 内流入细胞内，继而导致 TRPV4 在血管舒张中的作用被抑制。

在离体肠系膜动脉中的正常生理情况下，当内皮细胞受到刺激时，细胞膜上的 TRPV4 通道打开，引起胞外的 Ca^{2+} 内流，继而引起下游的 KCa2.3 通道的打开，K^+ 外流，使得膜电位趋于极化，通过肌内皮间隙连接扩散到相邻的平滑肌细胞，同时引起血管舒张 [13]。研究发现，TRPV4 与 KCa2.3 不仅是上下游的关系，两者在生理和功能上相互作用，在内皮细胞中，两者耦联成为一个复合体，刺激内皮依赖性的超极化因子（endothelium derived

hyperpolarizing factor，EDHF）介导的信号传导和随后的血管舒张。TRPV4-KCa2.3 复合体相互作用，是高盐饮食诱发的高血压小鼠小动脉中 EDHF 介导的反应减少的基础[14]。可见 TRPV4-KCa2.3 通道在高血压疾病中发挥着重要作用。

2.2.4　急性肺损伤　急性肺损伤（acute lung injury，ALI）是各种直接和间接致伤因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤，造成弥漫性肺间质及肺泡水肿，导致急性低氧性呼吸功能不全。缺血再灌注诱导的水肿形成是肺移植后导致发病和死亡的最常见也是最重要的原因之一，最近一项在离体的灌注小鼠肺（isolated perfused mouse lungs，IPL）中进行的体外模拟实验表明，与野生型对照相比，TRPV4 缺陷型（$TRPV4^{-/-}$）IPL 的水肿形成增强，表明 TRPV4 对维持肺泡上皮屏障具有保护作用。该研究突出了 TRPV4 通道在肺泡上皮细胞和防止水肿形成方面的新的功能[15]。

3　TRPV4 通路的激活和调控

3.1　TRPV4 相关信号通路（见图 1）

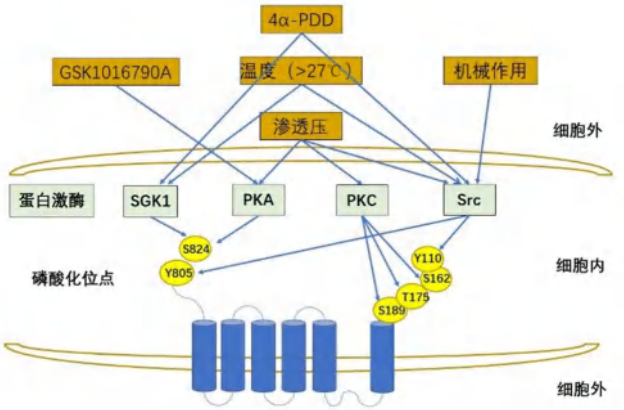


图 1　不同外部刺激下的 TRPV4 信号通路

Fig 1　TRPV4 signal pathway under different external stimuli

注（Note）：SGK1. 血清糖皮质激素蛋白激酶 1（serum glucocorticoid protein kinase-1）；PKA. 蛋白激酶 A（protein kinase A）；PKC. 蛋白激酶 C（protein kinase C）；Src. 酪氨酸蛋白激酶亚家族（SRC family kinases）；S. 丝氨酸（serine）；Y. 酪氨酸（tyrosine）；T. 苏氨酸（threonine）。

蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC）对丝氨酸 162、丝氨酸 189 以及苏氨酸 175 的磷酸化使表达 TRPV4 的人胚胎肾细胞 293 对低渗应激敏感；同时蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）对丝氨酸 824 的依赖性磷酸化使 TRPV4 通道蛋白对低渗应激敏感[16]。TRPV4 激动剂 4α-佛波醇-12，13-十二烷酸酯（4α-phorbol-12，13-didecanoate，4α-PDD）和温度（＞27 ℃），可能会通过血清糖皮质激素蛋白激酶 1（serum glucocorticoid protein kinase-1，SGK1）机制对 TRPV4 的 824 丝氨酸进行磷酸化[17]。在 HeLa 细胞中，Src 家族激酶对苏氨酸 110 和苏氨酸 805 的磷酸化也显示出 TRPV4 对热、剪切应力、低渗肿胀和 4α-PDD 敏感[17]。可见，磷酸化可以调节 TRPV4 活性以响应多种刺激。

3.2　TRPV4 在体内的调控方式

3.2.1　依赖 Ca^{2+} 的调控方式　在平滑肌中，TRPV4 被内皮衍生的代谢产物环氧二十碳三烯酸（epoxyeicosatrienoic acid，EET）激活，导致大的电导钾通道激活和平滑肌超极化。内皮细胞在血管内稳态中起主要作用，其机制独立于复杂的信号级联。这一机制可将大量钙离子快速转运到细胞内，导致钙依赖性一氧化氮（nitric oxide，NO）合成酶的激活，从而诱导 NO 的产生，引起 NO 依赖性血管舒张。已有研究证明在小鼠颈动脉细胞中，TRPV4 通道可在完整的动脉内皮细胞中产生一个独特的局灶性 Ca^{2+}瞬变群体，表明它们在血管内稳态中起到重要的调控作用[18]。

3.2.2　渗透调节　TRPV4 可以在细胞对低渗的反应中被激活，因此，它被认为是一种机械或渗透传感器。TRPV4 通过渗透压的变化随时监测细胞和响应环境，对细胞功能和生存至关重要。研究表明，细胞体积的变化是影响 TRPV4 活性的重要调节因子，细胞肿胀继而导致该通道激活[19]。

3.2.3　机械调节　有研究团队评估 TRPV4 在将小鼠胆管上皮细胞膜液流的机械作用转化为 Ca^{2+} 浓度和胆汁分泌增加方面的潜在作用，证明了 TRPV4 是胆管上皮中的一个功能性机械敏感通道。TRPV4 通过将液体流动转化为细胞内钙信号，是胆管机械敏感信号传导的重要启动者，也是胆管内胆汁形成所必需的顶端信号复合体的重要成员[20]。

4　TRPV4 激动剂和拮抗剂

4.1　天然和合成激动剂

已发现的常见 TRPV4 激动剂有双穿心莲内酯 A（bisandrographolide A，BAA）、4α-PDD、4α-佛波醇-12，13-二己酸酯（4α-phorbol-12，13-dihexanoate，4α-PDH）和 GSK1016790A，其结构如图 2 所示，均能有效激活人 TRPV4。

4.1.1　BAA　David E.Clapham 团队使用钙成像分析筛选了 50 种中草药的提取物库，发现从穿心莲中分离的提取物 BAA 可以激活 TRPV4（EC_{50} = 950 nmol • L^{-1}），并且在完全激活 TRPV4 通道的浓度下对 TRPV1 ～ 3 通道没有影响[21]。

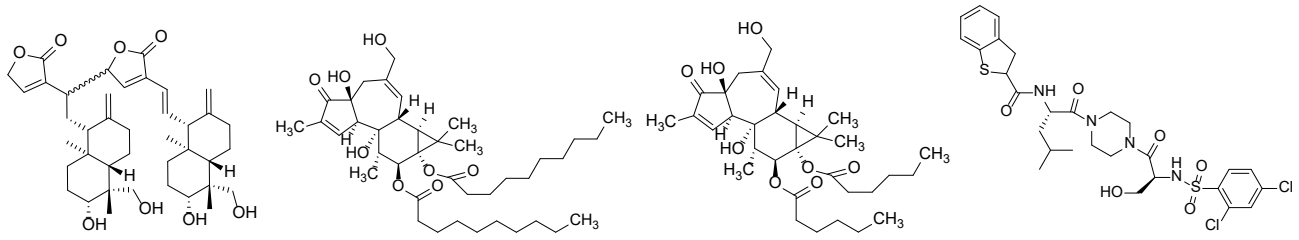


图 2　已开发的 TRPV4 激动剂

Fig 2　Developed TRPV4 agonists

4.1.2　4α-PDD 和 4α-PDH　4α-PDD 是靶向 TRPV4 的合成化合物，研究发现 TRPV4 的 S3 ～ S4 区域是形成 4α-PDD 激活通道的重要位点。随后，新的 4α-PDD 衍生物激动剂被设计和测试用于激活 TRPV4 通道。4α-PDH 显示出非常高的 TRPV4 激活功效（EC_{50} = 70 nmol • L^{-1}），其效力是 4α-PDD 的 5 倍，且比未修饰的 4α-PDD 更稳定。该研究表明，4α-PDD 激活下的 TRPV4 通道在细胞外 Ca^{2+}存在下会增加内皮细胞通透性，继而引起血管舒张 [22]。

4.1.3　GSK1016790A　葛兰素史克公司通过筛选小分子文库鉴定了另一种完全合成的 TRPV4 激动剂——GSK1016790A（EC_{50} = 1 ～ 10 nmol • L^{-1}）。GSK1016790A 是 TRPV4 的特异性小分子激动剂，与传统的 4α-PDD（EC_{50} 在微摩尔范围内）相比，它已被证明是一种更有效的激活剂（EC_{50} 在纳摩尔水平）。研究表明，GSK1016790A 在多种细胞类型中刺激 TRPV4 通道，包括内皮细胞、尿平滑肌细胞、尿路上皮细胞和过度表达 TRPV4 的 HEK-293 细胞 [23]。浓度在 1 nmol • L^{-1} 以上时，GSK1016790A 在表达鼠源和人源 TRPV4 的 HEK 细胞中引发 Ca^{2+} 的流入（EC_{50} 分别为 18 和 2.1 nmol • L^{-1}），引起剂量依赖式的 TRPV4 全细胞电流的激活。GSK1016790A 特异性激活 TRPV4，引发质膜上该通道的表达下调、快速部分脱敏。但是由于 TRPV1 和 TRPV4 在 S3 ～ S4 区域显示出一定程度的相似性（60% 同源性，40% 同一性），GSK1016790A 对 TRPV1 也有一定的抑制作用（EC_{50} = 50 nmol • L^{-1}），在 3 个物种（小鼠、大鼠和狗）的动物实验中，静脉注射 GSK1016790A 的确会导致血压成剂量依赖性降低，但随后会出现严重的循环衰竭，导致体内引起严重的血管效应，进而导致内皮屏障的破坏，并且这种循环衰竭是肺、肠和肾中严重血管渗漏和组织出血的结果 [24]。因此，TRPV4 激动剂不太可能成为有效的治疗剂，限制了研究人员对激动剂的进一步研究开发。

4.2　TRPV4 拮抗剂

已经报道了几种非选择性 TRPV4 拮抗剂，其中比较常见的拮抗剂见图 3。

4.2.1　RN-1734　RN-1734 对 TRPV4 通道具有选择性，对于 hTRPV4、mTRPV4 和 rTRPV4 的 IC_{50} 值分别为 2.3、5.9 和 3.2 μmol • L^{-1}[25]。

4.2.2　HC-067047　HC-067047 是另一个被广泛使用的 TRPV4 拮抗剂，在环磷酰胺诱导的膀胱炎小鼠和大鼠模型中显示出增加膀胱功能的作用（IC_{50} 分别为 133 nmol • L^{-1} 和 17 nmol • L^{-1}），对人 TRPV4 的 IC_{50} 为 48 nmol • L^{-1}。研究表明 HC-067047 可阻断人的肺动脉平滑肌细胞中的 TRPV4 电流和 Ca^{2+}信号 [26-27]。有研究首次发现，在脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的抑郁小鼠模型中海马体 TRPV4 显著增加，使用 TRPV4 抑制剂 HC067047 或敲低海马 TRPV4，可以减弱其抑郁行为。该研究也表明了 TRPV4 通道可能在改善神经炎症介导的抑郁症方面是一个潜在靶点 [28]。

4.2.3　GSK2193874　葛兰素史克公司于 2017 年报道了一种具有口服活性、特异性和选择性的 TRPV4 抑制剂——GSK2193874，它通过重组 TRPV4 通道和天然内皮 TRPV4 电流来抑制 Ca^{2+}内流 [29]。在离体啮齿动物和犬的肺中，GSK2193874 可防止血管通透性增加以及肺动脉高压引起的肺水肿。同时，当 GSK2193874 剂量高达 30 mg • kg^{-1} 时，对大鼠的血压或心率均无影响。此外，在急性和慢性心力衰竭模型中，GSK2193874 预处理可以抑制肺水肿的形成并增强动脉氧合。GSK2193874 同时具有优良的跨物种 TRPV4 效力，在大鼠中，其静脉注射的清除率（CL）= 7.3 mL/（min • kg），口服给药的半衰期（$t_{1/2}$）= 10 h，生物利用度（F）= 31%；在狗中，其静脉注射的 CL = 6.9 mL/（min • kg），口服给药的 $t_{1/2}$ = 31 h，F = 53%。综上，GSK2193874 作为慢性口服药物，具有清除率低、口服生物利用度高、对其他 TRP 通道选择性好、无血流动力学影响等优良特点。这些

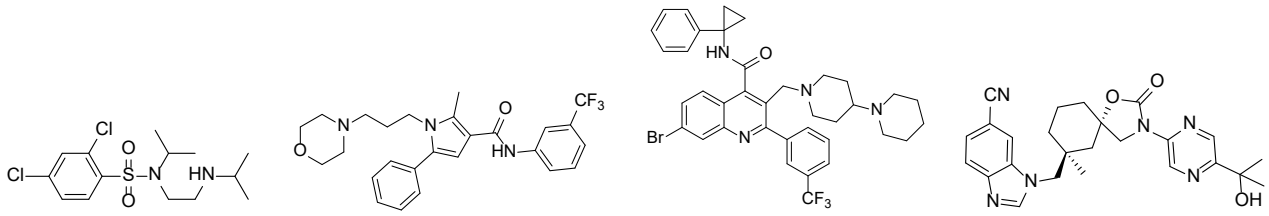


图 3　已开发的 TRPV4 拮抗剂

Fig 3　Developed TRPV4 antagonist

历史悠久的药物已作为体内和体外药理学工具被广泛应用，但其仍存在一些选择性问题和安全性问题，影响了其进一步的临床研究。

4.2.4　GSK2798745　葛兰素史克公司通过高通量筛选发现了另一 TRPV4 拮抗剂 GSK2798745。2019 年，GSK2798745 因其良好的体内药效动力学效应和临床前安全性被报道，其在人体内的平均全身半衰期约为 13 h，IC_{50} = 1.8 nmol • L^{-1}[30]。在健康志愿者和心力衰竭受试者中完成的Ⅰ/Ⅱa 期试验表明，其体外测定的效力值与肺水肿大鼠体内药代动力学 / 药效学模型预测的值一致，GSK2798745 可以在很大程度上阻断肺血管内皮细胞中的 TRPV4 通道。GSK2798745 在健康志愿者（服用量达 14 d）和心力衰竭患者（服用量达 7 d）中均没有观察到明显的安全问题，表明其可以在心力衰竭以及其他适应证的长期临床研究中进行评估。迄今为止，GSK2798745 是唯一一种在人体中进行研究的有效且具有选择性的 TRPV4 抑制剂[31]。

5　小结与展望

心血管疾病及其引发的一系列并发症给患者的生理和心理上都带来巨大的痛苦。TRPV4 在细胞中表达广泛，尤其是在血管内皮细胞中的高表达，使其成为治疗心血管疾病的潜在有效靶点，具有广泛的应用前景。

当前 TRPV4 激动剂作为药物的发展明显滞后于 TRPV4 拮抗剂，这是由于 TRPV4 的不当激活会产生与内皮损伤和肺微血管通透性屏障破坏相关的急性循环衰竭。而当前的临床试验提示我们 TRPV4 拮抗剂可以治疗充血性心力衰竭症状，以及其他涉及 TRPV4 的病理症状，其作为心血管疾病治疗药物具有很大的潜力。但 TRPV4 拮抗剂仍存在一些亟待解决的问题，一方面，已有的 TRPV4 拮抗剂在大多数情况下特异性较差，它们可能会作用于 TRPV 家族其他亚型而产生不良反应；另一方面，目前 TRPV4 拮抗剂数量非常有限，临床研究报道较少。针对以上问题，开发特异性的 TRPV4 拮抗剂是目前的重要研究方向。在未来，期待更多的 TRPV4 拮抗剂的发现以及更多对 TRPV4 拮抗剂的临床疗效评价。

参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组 . 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志，2021，36（6）：521-545.

[2] Wissenbach U，Niemeyer BA，Flockerzi V. TRP channels as potential drug targes [J]. Biol Cell，2004，96（1）：47-54.

[3] Heathcote HR，Lee MD，Zhang X，et al. Endothelial TRPV4 channels modulate vas-cular tone by Ca^{2+} induced Ca^{2+} release at inositol 1，4，5-trispho-s-phate receptors [J]. Br J Pharmacol，2019，176（17）：3297-3317.

[4] Rosenbaum T，Benitez-Angeles M，Sanchez-Hernandez R，et al. TRPV4：a physio and pathophysiologically significantion channel [J]. Int J Mol Sci，2020，21（11）：3837.

[5] Yin J，Hoffmann J，Kaestle SM，et al. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4 [J]. Circ Res，2008，102（8）：966-974.

[6] Yamada H，Sakata N，Tanaka T，et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis rescue murine ischemic hindlimb via transient receptor potential vanilloid 4 [J]. J Pharmacol Sci，2020，146（4）：244-248.

[7] Kitsuki T，Yoshimoto RU，Aijima R，et al. Enhanced junctional epithelial permeability in TRPV4-deficient mice [J]. J Periodont Res，2020，55（1）：51-60.

[8] Chen M，Li XC. Role of TRPV4 channel in vasodilation and neovascularization [J]. Microcirculation，2021，28（6）：e12703.

[9] Thorneloe KS，Cheung M，Bao WK，et al. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure [J]. Sci Trans Med，2012，4（159）：159ra148

[10] Xia Y，Xia LX，Jin Z，et al. Cytochrome P450 epoxygenase-dependent activation of TRPV4 channel participates in enhanced serotonin-induced pulmonary vasoconstricion in chronic hypoxic pulmonary hypertension [J]. Anal Cell

Pathol，2020，2020：8927381.

[11] Cussac LA，Cardouat G，Pillai NT，et al. TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension [J]. Am J Phy-siol Lung Cell Mol Physiol，2020，318（1）：L135-L146.

[12] Sonkusare SK，Bonev AD，Ledoux J，et al. Elementary Ca^{2+} signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function [J]. Sci，2012，336（6081）：597-601.

[13] Seki T，Goto K，Kiyohara K，et al. Downregulation of endothelial transient recept-or potential vanilloid type 4 channel and small-conductance of Ca^{2+}-activated K^{+} channels underpins impaired endothelium-dependent hyperpolarization in hypertension [J]. Hypertension，2017，69（1）：143-153.

[14] He DX，Pan QX，Chen Z，et al. Treatment of hypertension by increasing impaired endothelial TRPV4-KCa2.3 interaction [J]. Embo Mol Med，2017，9（11）：1491-503.

[15] Dietrich A，Chao YK，Kannler M. Transient receptor potential vanilloid 4（TRPV4）channels are essential for alveolar epithelial cell function [J]. Faseb J，2020，34（S1）：1-1.

[16] Deng ZQ，Paknejad N，Maksaev G，et al. Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms [J]. Nat Struct Mol Biol，2018（25）：252-260.

[17] Wegierski T，Lewandrowski U，Muller B，et al. Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli [J]. J Biol Chem，2009，284（5）：2923-2933.

[18] McFarland SJ，Weber DS，Choi CS，et al. Ablation of Endothelial TRPV4 channels alters the dynamic Ca^{2+} signaling profile in mouse carotid arteries [J]. Int J Mol Sci，2020，21（6）：2179.

[19] Toft-Bertelsen TL，MacAulay N. TRPing on cell swelling-TRPV4 senses it [J]. Front Immunol，2021，12：730982.

[20] Li Q，Kresge C，Boggs K，et al. Mechanosensor transient receptor potential vanilloid member 4（TRPV4）regulates mouse cholangiocyte secretion and bile formation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2020，318（2）：G277-G287.

[21] Smith PL，Maloney KN，Pothen RG，et al. Bisandrographolide from andrographis paniculata activates TRPV4 channels [J]. J Biol Chem，2006，281（40）：29897-29904.

[22] Klausen TK，Pagani A，Minassi A，et al. Modulation of the transient receptor potential vanilloid channel TRPV4 by 4*α*-phorbol esters：a structure-activity study [J]. J Med Chem，2009，52（9）：2933-2939.

[23] Thorneloe KS，Sulpizio AC，Lin ZJ. et al. *N*-（（1*S*）-1-{[4-（（2*S*）-2-{[（2，4-dichlorophenyl）-sulfonyl]-amino}-3-hydroxypropanoyl）-1-piperazinyl]carbonyl}-3-methylbutyl）-1-benzothio-phene-2-carboxamide（GSK1016790A），a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity：part Ⅰ [J]. J Pharmaol Exp Ther，2008，326（2）：432-442.

[24] Willette RN，Bao W，Nerurkar S，et al. Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse：part 2 [J]. J Pharmacol Exp Ther，2008，338（1）：408-409.

[25] Vincent F，Acevedo A，Nguyen MT，et al. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators [J]. Biochem Biophy Res Commun，2009，389，（3）：490-494.

[26] Everaerts W，Zhen XG，Ghosh D，et al. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis [J]. Proc Natl Acad Sci，2010，107（44）：19084-19089.

[27] Martin E，Dahan D，Cardouat G，et al. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. Pflug Arch Eur I Phy，2012，464（3）：261-272.

[28] Li W，Xu Y，Liu ZH，et al. TRPV4 inhibitor HC067047 produces antidepressant-like effect in LPS-induced depression mouse model [J]. Neuropharmacology，2021，201：108834.

[29] Cheung M，Bao WK，Behm DJ，et al. Discovery of GSK2193874：an orally active，potent，and selective blocker of transient receptor potential vanilloid 4 [J]. ACS Med Chem Lett，2017，8（5）：549-554.

[30] Brooks CA，Barton LS，Behm DJ，et al. Discovery of GSK2798745：a clinical candidate for inhibition of transient receptor potential vanilloid 4（TRPV4）[J]. ACS Med Chem Lett，2019，10（8）：1228-1233.

[31] Goyal N，Skrdla P，Schroyer R，et al. Clinical pharmacokinetics safety，and tolerability of a novel，first-in-class TRPV4 ion channel inhibitor，GSK2798745，in healthy and heart failure subjects [J]. Am J Cardiovasc Drug，2019，19（3）：335-342.

（收稿日期：2021-12-20；修回日期：2022-01-15）

阿美替尼在表皮生长因子受体突变阳性非小细胞肺癌中的应用

侯举，孙吉，邓轩宇，姚令，黄娟娟，何鸽飞*（长沙市第一医院药剂科，长沙　410005）

摘要：阿美替尼是第三代表皮生长因子受体（EGFR）抑制剂，由国内药企自主研发。2020 年 3 月，阿美替尼获批在中国上市，用于二线治疗晚期 / 转移性 EGFR *T790M* 突变阳性非小细胞肺癌，2021 年 12 月正式获批用于 EGFR 敏感突变非小细胞肺癌患者的一线治疗。最常见的不良事件是肌酸磷酸激酶升高、皮疹、天冬氨酸转氨酶升高、丙氨酸转氨酶升高等。本文从阿美替尼的作用机制、药动学、临床研究、安全性、药物相互作用、耐药机制等方面进行介绍，以期为其临床应用提供参考。

关键词：阿美替尼；非小细胞肺癌；表皮生长因子受体抑制剂；临床研究
中图分类号：R734.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1856-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.025

Application of aumolertinib for epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer

HOU Ju, SUN Ji, DENG Xuan-yu, YAO Ling, HUANG Juan-juan, HE Ge-fei* (*Department of Pharmacy, The First Hospital of Changsha, Changsha* 410005)

Abstract: Aumolertinib, a new third-generation epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, is independently developed by domestic pharmaceuticals. It was approved in March 2020 in China for second-line treatment of EGFR-mutant advanced/metastatic non-small cell lung cancer in patients with EGFR *T790M* mutation. The National Medical Products Administration of China approved aumolertinib as a first-line treatment for patient with EGFR-sensitive-mutations non-small cell lung cancer patients in December 2021. The most common adverse events were increased creatine phosphokinase, skin rash, increased aspartate aminotransferase, increased alanine aminotransferase etc. This paper reviewed the mechanism, pharmakinetics, clinical research, safety, drug interactions, and resistance mechanism of aumolertinib are to provide a reference for its clinical use.

Key words: aumolertinib; non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor inhibitor; clinical research

肺癌是全世界各类恶性肿瘤相关死亡的主要原因[1]，严重影响人类健康。据国家统计数据，我国每年约有 63.1 万人死于肺癌，而且发病率呈上升趋势[2]。非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）是最常见的肺癌组织学类型，约占所有肺癌病例的 85%[3]，5 年生存率不到 5%[4]。表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）基因突变是 NSCLC 最常见的致癌因素之一。*EGFR* 基因突变与性别、种族、吸烟、病理类型有关，与西方国家相比，亚洲人群 EGFR 突变率最高，在我国 NSCLC 患者 EGFR 总突变率约占 50.2%，且在女性和非吸烟者中发生率高[5-6]。EGFR 突变主要发生在外显子 18 ～ 21，约有五种类型的突变，包括外显子 18 的点突变、外显子 19 的缺失（*19del*）、外显子 20 的插入、外显子 20 的点突变和 21 号外显子编码的第 858 个氨基酸由亮氨酸突变成精氨酸（*L858R*）。其中 *19del* 和 *L858R* 约占所有 EGFR 突变的 89.3%[7]。EGFR- 酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-tyrosine kinase inhibitors，EGFR-TKIs）是治疗 EGFR 阳性 NSCLC 的标准治疗方法，可显著改善其预后[8]。EGFR 阳性的 NSCLC 患者对第一代（如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼）或第二代（如阿法替

作者简介：侯举，男，硕士研究生，主管药师，主要从事医院药学工作，email：hjnfykdx@163.com　*通信作者：何鸽飞，女，硕士研究生导师，主任药师，主要从事临床药学工作，email：326366726@qq.com

尼和达克替尼）EGFR-TKIs 初始有显著的敏感性，EGFR-TKIs 的获得性耐药通常在一年内出现，大约 50% ～ 60% 的耐药事件是由获得性耐药引起，如 20 号外显子 790 位点上的苏氨酸被甲硫氨酸取代（*T790M* 突变），从而导致出现肿瘤进展，使患者无法长期获益 [9]。而第三代 EGFR-TKIs 可高度选择性抑制 *T790M* 突变，可提高患者的生存效益。阿美替尼（商品名：阿美乐，结构见图 1）是我国自主研发并拥有自主知识产权的第三代 EGFR-TKI，2020 年 3 月在中国获批上市，用于治疗对第一代或第二代 EGFR-TKIs 耐药的 *T790M* 突变型晚期 NSCLC [10-11]，这是继奥希替尼后，全球第二个获批上市的第三代 EGFR-TKI，2021 年 12 月被正式批准用于 EGFR 敏感突变 NSCLC 患者的一线治疗。本文从阿美替尼的作用机制、药动学、临床研究、安全性、药物相互作用、耐药机制等方面进行介绍，为其临床应用提供参考。

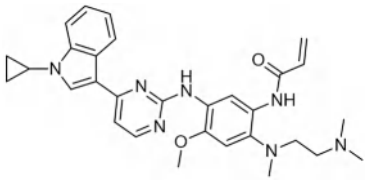


图 1　阿美替尼的化学结构式

Fig 1　Structure of aumolertinib

1　作用机制

阿美替尼是一种高效、选择性的第三代不可逆 EGFR-TKI，其亲电丙烯酰胺作为迈克尔受体在 EGFR 酪氨酸激酶结构域的 ATP 结合位点与 Cys797 的活性硫醇共价不可逆结合，从而阻断肿瘤细胞增殖和抗凋亡的信号通路，抑制肿瘤细胞的生长，可选择性和不可逆地靶向突变型 EGFR *T790M*[12]。

2　药动学

阿美替尼是 CYP3A 的中度敏感底物，在体外主要由 CYP3A 代谢。血浆中原形药物的达峰时间（t_{max}）中位数为 4 h，峰浓度（C_{max}）平均值为 318.5 ng • mL^{-1}，$AUC_{0\sim24}$、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 平均值分别为 5250.24、12 225.55 和 13 210.71 ng • h • mL^{-1}。阿美替尼与人的血浆蛋白结合率均≥ 99.5%，口服 110 mg 阿美替尼后，其表观分布容积（V_d/F）为 554.20 L。阿美替尼在人体内的主要代谢途径是 *N*- 去甲基乙酰胺化和去甲基化，每日 110 mg 的阿美替尼的平均半衰期为 30.7 h，平均末端消除期为 863 h。在粪便和尿液排泄的阿美替尼分别为 84.75% 和 5.44%（其中原药分别为 8.61% 和 0.48%），表明阿美替尼原药和代谢物主要通过粪便排泄，其原形在尿中的排泄相当少。轻度肝功能损伤患者使用时无需进行剂量调整，中重度肝功能损伤患者使用的安全性和有效性尚不明确，轻度和中度肾功能损伤无需进行剂量调整，重度肾功能损伤患者使用的安全性和有效性尚不明确 [13-14]。

3　临床研究

Ⅰ期临床试验（NCT0298110、NCT02981108），招募了 120 例 NSCLC 患者，分别在中国（其中大陆 44 例，台湾地区 69 例）和美国（7 例）的 20 个中心进行。剂量递增组入组 26 例，既往 EGFR-TKI 治疗出现进展 EGFR 敏感突变的晚期 NSCLC 患者，中位年龄 60 岁，30.8% 为男性。分为 4 个剂量组（55 mg，110 mg，220 mg，260 mg），每日口服一次，各剂量组表现出良好的安全性和耐受性，未出现非预期的毒性事件。55 mg 和 110 mg 组未出现任何剂量限制性毒性（DLT），220 mg 组和 260 mg 组各发生 1 例 DLT，260 mg 剂量组发生 1 例 4 级间质性肺病（ILD）。剂量扩展组入组 94 例，既往经 EGFR-TKI 治疗后疾病进展的 *T790M* 突变阳性患者，中位年龄为 61 岁，37.2% 为男性，分为 3 个剂量组（55 mg，110 mg，220 mg）。剂量扩展队列 EGFR *T790M* 突变的患者中，110 mg 组的患者显示出最高的疾病控制率（DCR）（97%），55 mg 组和 220 mg 组的 DCR 分别为 83% 和 94%；110 mg 组的客观缓解率（ORR）与 55 mg 组相似（分别为 55% 和 60%），优于 220 mg 组（42%）。110 mg 组的曲线下平均面积与 220 mg 相似，与 220 mg 剂量组相比 110 mg 剂量组的肌酸磷酸激酶（CPK）升高（分别为 13.3% 和 51.6%），腹泻发生率降低（分别为 19.7% 和 6.7%）。在剂量扩展队列的 94 例 EGFR *T790M* 突变患者中，阿美替尼的 ORR 为 52%，DCR 为 92%，中位无进展生存期（mPFS）为 11.0 个月。Ⅰ期临床的剂量递增阶段和剂量扩展阶段试验，为阿美替尼给药方案提供了依据。Ⅰ期临床研究显示，阿美替尼具有良好的疗效和安全性，并确定Ⅱ期临床试验推荐剂量为 110 mg，每日一次 [15]。

阿美替尼的Ⅱ期临床试验（NCT02981108）在 36 个中心招募了 244 例中国 EGFR *T790M* 阳性晚期或转移性 NSCLC 患者，其中大陆患者 189 例，台湾地区患者 55 例。中位年龄 61 岁，女性患者占比 58.2%，从未吸烟患者占 73.0%，63.5% 的患者伴 *19del* 突变，34.8% 伴 *L858R* 突变，其中 37.3% 的患者有脑转移。阿美替尼二线治疗患者的 ORR 为 68.9%，DCR 为 93.4%，mPFS 为 12.3 个月，中位持续缓解时间（mDOR）为 12.4 个月。阿美替尼对中枢神经系统（CNS）转移也表现出良好的控制，CNS ORR 为 60.9%；CNS DCR 为 91.3%；CNS mPFS 为 10.8 个月；

mDOR 为 11.3 个月。阿美替尼作为局部晚期或转移性 NSCLC 的二线治疗可提供更长的生存获益，中位总生存期（mOS）长达 30.2 个月 [16-18]。

阿美替尼与吉非替尼一线疗效的“头对头”对照Ⅲ期临床试验（NCT03849768），共纳入来自中国 53 个中心共 429 例患者，阿美替尼组 214 例，吉非替尼组 215 例。这些患者均为局部晚期或转移性 NSCLC，此前未接受过其他方案治疗，存在 *19del* 突变或 *L858R* 突变。研究结果初步显示，阿美替尼一线治疗患者的 mPFS 为 19.3 个月，明显超过了吉非替尼一线治疗患者的 mPFS（9.9 个月）。在持久缓解方面，阿美替尼也具有明显的优势，阿美替尼组的 mDOR 达到了 18.1 个月，而吉非替尼组的 mDOR 仅为 8.3 个月 [19]。在所有 *19del* 患者中，阿美替尼组和吉非替尼组的 mPFS 分别为 20.8 个月和 12.3 个月；在所有 *L858R* 突变患者中，阿美替尼和吉非替尼组的 mPFS 分别为 13.4 个月和 8.3 个月；在所有伴有中枢神经系统转移患者中，阿美替尼组和吉非替尼组的 mPFS 分别为 15.3 个月和 8.2 个月。无中枢神经系统转移患者，两组 mPFS 分别为 19.3 个月和 12.6 个月，阿美替尼组和吉非替尼组的客观缓解率和疾病控制率相似（客观缓解率分别为 73.8% 和 72.1%；疾病控制率分别为 93.0% 和 96.7%）。这是世界范围内首个 100% 在中国人群中开展的第三代 EGFR-TKI 一线治疗临床试验，为中国 NSCLC 临床用药方案提供了循证证据。基于此研究结果，阿美替尼被国家药品监督管理局批准用于具有 EGFR *19del* 突变或 *L858R* 突变的局部晚期或转移性 NSCLC 成人患者的一线治疗。

4　安全性

阿美替尼是在奥希替尼骨架基础上进行创新性优化得到的，在吲哚环上用环丙基取代甲基，引入的环丙基可以增加化合物的稳定性，在代谢过程中无脱甲基代谢路径。与奥希替尼相比，不会产生抑制野生型 EGFR 的非选择性代谢产物（如 AZ5104），阿美替尼体内降解产物（HAS-719）对野生型 EGFR 亲和力低，抑制作用弱，可减少常见的不良反应，如腹泻和皮疹等 [15，20]。环丙基的亲脂性也确保了良好的血脑屏障渗透性。Ⅱ期临床研究表明，阿美替尼最常见的不良事件（AEs）有 CPK 升高（19.6%）、皮疹（12.7%）、谷草转氨酶（AST）升高（12.3%）、谷丙转氨酶升高（ALT）升高（11.4%）、白细胞减少（11.2%）、瘙痒（10.7%）、贫血（9%）和腹泻（7.4%）等。最常见的 3 ～ 4 级 AEs 是 CPK 升高（6.9%）和 ALT 升高（1.2%），CPK 升高主要表现为无临床症状的生化指标异常，可逆可管理。在Ⅰ/Ⅱ期临床试验中推荐剂量下未出现 ILD 的报告，因药物相关的 AEs 终止治疗的比例为 2.5%[16-17]。在与吉非替尼“头对头”的Ⅲ期临床试验中，阿美替尼治疗组比吉非替尼治疗组的各类 AEs 的发生率更低，ALT 升高（29.4% *vs* 55.8%）、AST 升高（29.9% *vs* 54.0%）、皮疹（23.4% *vs* 41.4%）、腹泻（16.4% *vs* 35.8%）的发生率都低于吉非替尼，但 CPK 升高（35.5% *vs* 9.3%）的发生率高于吉非替尼。使用阿美替尼一线治疗的患者，严重 AEs 发生率为 4.2%，显著低于吉非替尼治疗组的 11.2%[19]。总体上阿美替尼常见 AEs 可耐受，为临床可控的 1 级或 2 级水平。

ILD 是奥希替尼潜在的致命不良反应，总体发病率为 4%，但奥希替尼诱导的 ILD 发生率在亚洲人群更高。阿美替尼的Ⅰ/Ⅱ期临床研究中，由于样本量有限和随访时间较短，未观察到 ILD 发生。在临床应用中 Jiang 等 [21] 报道了 1 例阿美替尼诱导的 ILD 病例，患者为 70 岁非吸烟女性，诊断为肺腺癌并颅内转移，携带 *19del* 突变。阿美替尼作为一线治疗后患者 3 个月出现了 ILD，并确定了是由阿美替尼诱导的 ILD。经多学科会诊后，患者停用阿美替尼，改用阿法替尼，并接受吸氧和甲基强的松龙治疗后，患者症状消失，ILD 部分缓解。

Wu 等 [22] 报道了 1 例 76 岁非吸烟 EGFR *T790M* 突变阳性 NSCLC 女性患者，经奥希替尼二线治疗诱导 ILD 后，换用阿美替尼继续获益的病例。患者使用奥希替尼二线治疗 3 个月后出现了 3 级 ILD，之后采用培美曲塞和贝伐珠单抗联合治疗，病情稳定，但 6 个疗程后因严重的不良反应中止治疗。换用阿美替尼治疗近 7 个月，达到持续部分缓解，且无 ILD 复发和其他明显的不良反应。

5　药物相互作用

阿美替尼是 CYP3A 的中度敏感底物，在体外主要由 CYP3A 代谢。在临床治疗中患者可能多病共存，需要与其他药物联合应用，如 CYP3A 抑制剂或诱导剂。Liu 等 [23] 研究了利福平和伊曲康唑在健康人体中对阿美替尼药动学的影响。与伊曲康唑合用时，阿美替尼的最大血浆浓度（C_{max}）增加了 56.3%，血浆暴露量（$AUC_{0\sim t}$）增加了 2.38 倍，平均清除率较单用阿美替尼低了约 74.3%。当阿美替尼与利福平合用时，阿美替尼的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 值分别降低 79.3% 和 92.6%，平均清除率比单用阿美替尼高 12 倍。伊曲康唑和利福平对阿美替尼在人体的暴露均有显著影响，在临床使用阿美替尼时，应避免与 CYP3A4 强诱导剂和强抑制剂联合使用；应慎用乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP）和 P-糖蛋白（P-glycoprotein，

P-gp）敏感底物的窄治疗窗药物，避免与升高血CPK的药物（如他汀类药物）联合使用[24]。

6　阿美替尼的耐药机制

尽管阿美替尼可以克服EGFR *T790M*突变，但随着时间的推移，阿美替尼出现的耐药仍不可避免。在Ⅱ期临床试验中，阿美替尼二线治疗出现的依赖性耐药有顺式 *C797S*突变及 *L718Q*突变。旁路路径的激活包括 *PIK3CA*突变、*JAK2*突变、*BRAF*突变和 *KRAS*突变以及 *HER2*扩增和 *FGFR3-TACC3*融合。在临床实际应用中需要密切关注阿美替尼一线治疗及二线治疗出现的耐药机制[25]。

7　与同代上市药物的比较

目前国内上市的第三代EGFR-TKIs除阿美替尼外，在2017年3月和2021年3月奥希替尼和伏美替尼也分别获国家食品药品监督管理局批准上市。三者之间的临床研究数据间接对比见表1。

表1　国内上市的第三代EGFR-TKIs临床研究数据间接对比

Tab 1　Clinical data of domestically marketed third-generation EGFR-TKIs

项目	奥希替尼	阿美替尼	伏美替尼
上市情况	全球上市	中国上市	中国上市
适应证	① EGFR *T790M*突变的局部晚期或转移性NSCLC成人二线治疗；② EGFR外显子19缺失或 *L858R*突变的局部晚期或转移性NSCLC成人一线治疗；③ 具有EGFR敏感突变的NSCLC成人患者肿瘤切除术后的辅助治疗	① EGFR *T790M*突变的局部晚期或转移性NSCLC成人二线治疗；② EGFR外显子19缺失或 *L858R*突变的局部晚期或转移性NSCLC成人一线治疗	EGFR *T790M*突变的局部晚期或转移性NSCLC成人二线治疗
临床试验	AURA3、FLAURA、FLAURA	APOLLO和AENEAS	Ⅱb和FURLONG
ORR	一线治疗：80%[26]；二线治疗：71%[27]	二线治疗：68.9%[16]	二线治疗：74%[30]
mPFS	一线治疗：17.8个月（中国人群）[28]；一线治疗：18.9个月[26]；二线治疗：10.1个月[27]	一线治疗：19.3个月[19]；二线治疗：12.3个月[16]	一线治疗：20.8个月[31]；二线治疗：9.6个月[30]
DCR	一线治疗：97%[26]；二线治疗：93%[27]	二线治疗：93.4%[16]	二线治疗：93.6%[30]
mOS	一线治疗：33.1个月（中国人群）[28]；一线治疗：38.6个月[26]；二线治疗：26.8个月[27]	二线治疗：30.2个月[18]	/
脑渗透能力	一线治疗：CNS mPFS 15.2个月[26]；二线治疗：CNS ORR 70%[29]；二线治疗：CNS mPFS 8.5个月[28]	二线治疗：CNS ORR 60.9%[16]；二线治疗：CNS DCR 91.3%[16]；二线治疗：CNS mPFS 10.8个月[16]	二线治疗：CNS ORR 66%[30]；二线治疗：CNS DCR 100%[30]；一线治疗：CNS mPFS 18个月[31]；二线治疗：CNS mPFS 11.6个月[30]
3级或以上不良事件	一线治疗：34%[26]；一线治疗：54%（中国人群）[28]；二线治疗：23%[27]	二线治疗：33.6%[17]	一线治疗：35%[31]；二线治疗：26%[30]

从表1可以看出，国内已上市的第三代EGFR-TKIs的研究数据虽不能直接进行对比，但终点数据间接比较各有优劣。阿美替尼和伏美替尼有些终点数据尚未成熟，我们期待两者后续的临床研究结果。

8　结语

阿美替尼是中国首个第三代EGFR-TKI创新药，也是首个全部在中国人群中开展一线治疗研究的第三代EGFR-TKI，更能代表中国NSCLC患者的临床获益情况。目前奥希替尼在全球EGFR阳性NSCLC治疗领域中占据主导地位，但经奥希替尼治疗的患者有41%和34%分别出现了1级和2级腹泻、皮疹和其他不良反应，而且奥希替尼与PD-L1免疫检查点抑制剂联合导致的ILD的发生率高[19]，因此，开发可替代的、同样有效的第三代EGFR-TKI可带来更多的竞争和更好的成本效益。

阿美替尼目前临床研究样本量比奥希替尼少，临床应用时间也远短于奥希替尼，在罕见的情况下，阿美替尼有导致ILD的可能，在临床应用过程中要密切关注。而且阿美替尼出现的耐药机制要重点关注。今后也需要更多的研究探索下一代EGFR-TKIs的开发、联合治疗和肿瘤基因突变的动态实时监测，以帮助克服获得性耐药的挑战并提高NSCLC治疗的临床疗效。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. Ca-Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] 郑荣寿，孙可欣，张思维，等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志，2019，49（1）：19-28.

[3] Lu S，Yu Y，Yang Y. Retrospect and prospect for lung cancer in China：clinical advances of immune checkpoint inhibitors [J]. The Oncologist，2019，24（Suppl 1）：S21-S30.

[4] Huang Z，Su W，Lu T，et al. First-line immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer：current landscape and future progress [J]. Front Pharmacol，2020，11：578091.

[5] Shi Y，Au JSK，Thongprasert S，et al. A prospective，molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocar-

cinoma histology（PIONEER）[J]. J Thorac Oncol，2014，9（2）：154-162.

[6] Shi Y，Li J，Zhang S，et al. Molecular epidemiology of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology-mainland China subset analysis of the PIONEER study [J]. PLoS One，2015，10（11）：e0143515.

[7] Zhang YL，Yuan JQ，Wang KF，et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer：a systematic review and meta-analysis [J]. Oncotarget，2016，7（48）：78985.

[8] Papini F，Sundaresan J，Leonetti A，et al. Hype or hope-can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? [J]. Crit Rev Oncol Hemat，2021，166：103454.

[9] Kishikawa T，Kasai T，Okada M，et al. Osimertinib，a third - generation EGFR tyrosine kinase inhibitor：a retrospective multicenter study of its real-world efficacy and safety in advanced/recurrent non-small cell lung carcinoma [J]. Thorac Cancer，2020，11（4）：935-942.

[10] 国家药监局批准甲磺酸阿美替尼片上市 [EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypjgdt/202003 31172101492. html.

[11] 重磅 | 翰森制药 1 类创新药阿美乐®一线适应症获批上市 [EB/OL]. http：//www. hansoh. cn/news/512771. html.

[12] Almalki FA，Shawky AM，Abdalla AN，et al. Icotinib，almonertinib，and olmutinib：a 2D similarity/docking-based study to predict the potential binding modes and interactions into EGFR [J]. Molecules，2021，26（21）：6423.

[13] 甲磺酸阿美替尼片说明书 [EB/OL]. http：//zy. yaozh. com/instruct/sms20210831/51. pdf.

[14] Zhou C，Xie L，Liu W，et al. Absorption，metabolism，excretion，and safety of [14C] almonertinib in healthy Chinese subjects [J]. Ann Transl Med，2021，9（10）：867.

[15] Yang JCH，Camidge DR，Yang CT，et al. Safety，efficacy，and pharmacokinetics of almonertinib（HS-10296）in pretreated patients with EGFR-mutated advanced NSCLC：a multicenter，open-label，phase 1 trial [J]. J Thorac Oncol，2020，15（12）：1907-1918.

[16] Lu S，Wang Q，Zhang G，et al. A multicenter，open-label，single-arm，phase Ⅱ study：the third generation EGFR tyrosine kinase inhibitor almonertinib for pretreated EGFR T790M-positive locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer（APOLLO）[J]. Cancer Res，2020，80（16 Suppl）：Abstract nr CT190.

[17] Lu S，Wang Q，Zhang G，et al. Efficacy of Aumolertinib（HS-10296）in patients with advanced EGFR T790M ＋ NSCLC：updated post-national medical products administration approval results from the APOLLO registrational trial [J]. J Thorac Oncol，2022，17（3）：411-422.

[18] 迄今最长—中位总生存期 30.2 个月！豪森药业阿美乐®建立二线治疗 EGFR-T790M 突变阳性 NSCLC 新标准 [EB/OL]. http：//www. hansoh. cn/news/512756. html.

[19] Lu S，Dong X，Jian H，et al. Randomized phase III trial of aumolertinib（HS-10296，Au）versus gefitinib（G）as first-line treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer（NSCLC）and EGFR exon *19 del* or *L858R* mutations（EGFRm）[J]. J Clin Oncol，2021，39（Suppl 15）：S9013-S9013.

[20] Zhang Y，Zhang Y，Niu W，et al. Experimental study of almonertinib crossing the blood-brain barrier in EGFR-mutant NSCLC brain metastasis and spinal cord metastasis models [J]. Front Pharmacol，2021，12：750031.

[21] Jiang T，Luo Y，Wang B. Almonertinib-induced interstitial lung disease：a case report [J]. Medicine，2021，100（3）：e24393.

[22] Wu L，Zhong W，Li A，et al. Successful treatment of EGFR T790M-mutant non-small cell lung cancer with almonertinib after osimertinib-induced interstitial lung disease：a case report and literature review [J]. Ann Transl Med，2021，9（11）：950.

[23] Liu L，Li W，Yang L，et al. Itraconazole and rifampicin，as CYP3A modulators but not P-gp modulators，affect the pharmacokinetics of almonertinib and active metabolite HAS-719 in healthy volunteers [J]. Acta Pharmacol Sin，2022，43（4）：1082-1090.

[24] 新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2021 年版）[EB/OL]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/ 202112/0fbf3f04092b4d-67be3b3e89040d8489. shtml.

[25] Lu S，Wang Q，Zhang G，et al. 1208P Final results of APOLLO study：overall survival（OS）of aumolertinib in patients with pretreated EGFR T790M-positive locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer（NSCLC）[J]. Ann Oncol，2021，32：S962.

[26] Soria JC，Ohe Y，Vansteenkiste J，et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. New Engl J Med，2018，378（2）：113-125.

[27] Mok TS，Wu YL，Ahn MJ，et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. New Engl J Med，2017，376（7）：629-640.

[28] Cheng Y，He Y，Li W，et al. Osimertinib versus comparator EGFR TKI as first-line treatment for EGFR-mutated advanced NSCLC：FLAURA China，a randomized study [J]. Target Oncol，2021，16（2）：165-176.

[29] Wu YL，Ahn MJ，Garassino MC，et al. CNS efficacy of osimertinib in patients with T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer：data from a randomized phase Ⅲ trial（AURA3）[J]. J Clin Oncol，2018，36（26）：2702-2709.

[30] Shi Y，Hu X，Zhang S，et al. Efficacy，safety，and genetic analysis of furmonertinib（AST2818）in patients with EGFR T790M mutated non-small-cell lung cancer：a phase 2b，multicentre，single-arm，open-label study [J]. Lancet Resp Med，2021，9（8）：829-839.

[31] Shi Y，Chen G，Wang X，et al. Furmonertinib（AST2818）versus gefitinib as first-line therapy for locally advanced or metastatic EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer：a multi-center，double-blind，randomized phase 3 study（FURLONG）[J]. Lancet Respir Med，2022，doi:10.1016/S2213-2600（22）00168-0.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-20）

化疗药物引发肿瘤转移的现象及机制探讨

李乐[1]，吴启鹏[1]，江振洲[1, 2*]（1. 中国药科大学 新药筛选中心，南京　210009；2. 中国药科大学 江苏省药效研究与评价服务中心，南京　210009）

摘要：恶性肿瘤转移是癌症患者死亡的主要原因之一，是影响患者预后的重要因素。尽管化疗药物在临床应用中显示出良好的杀伤肿瘤细胞的作用，但已有研究发现化疗药物与肿瘤转移密切相关。化疗药物可能会通过降低肿瘤细胞黏附力或改变肿瘤细胞微环境，进而促进肿瘤细胞扩散或转移。对于化疗药物，仅关注其临床疗效和不良反应是不够的，还需要对其诱发肿瘤转移和侵袭给予重视。本文对化疗药物引起肿瘤转移的情况和可能的机制进行了总结，为临床合理使用化疗药物提供参考。

关键词：化疗药物；癌症；肿瘤转移

中图分类号：R966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1861-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.026

Tumor metastasis induced by chemotherapeutic drugs and mechanism

LI Le[1], WU Qi-peng[1], JIANG Zhen-zhou[1, 2*] (1. *New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing* 210009; 2. *Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing* 210009)

Abstract: Malignant tumor metastasis is a main cause of death in cancer patients and an important factor for patients prognosis. Although chemotherapeutic drugs have shown good effect on tumor cells in clinical practice, they are closely related to tumor metastasis. Chemotherapeutic drugs may promote tumor cell proliferation or metastasis by reducing tumor cell adhesion or causing changes in the microenvironment of tumor cells. For chemotherapeutic drugs, it is not enough to pay attention only to their clinical efficacy and adverse reactions, but to their induction of tumor metastasis and invasion. This paper summarized the situation and possible mechanism of tumor metastasis caused by chemotherapeutic drugs, providing reference for rational use of chemotherapy drugs.

Key words: chemotherapeutic drug; cancer; tumor metastasis

目前，癌症的治疗手段仍以化疗为主。化疗药物通过作用在肿瘤细胞生长繁殖的不同阶段，抑制或杀死肿瘤细胞。然而，化疗药物可能通过改变肿瘤细胞的生物学特征或引起机体中非肿瘤细胞微环境的变化促进肿瘤的恶性进展和转移扩散。阐明化疗药物诱导转移的机制能够更好地预测肿瘤发生转移的风险，有助于开发新的治疗策略或药物来抑制或拮抗化疗引起的肿瘤转移[1]。

1　肿瘤转移的发生及相关的机制

肿瘤细胞从原发部位扩散到继发部位形成肿瘤的过程称为转移。转移的发生不仅是一个细胞自主的事件，而且受到复杂组织微环境的严重影响。肿瘤转移是一个不断发展的过程，是指恶性肿瘤细胞从原发部位，经淋巴管、血管或体腔等途径，到达其他部位继续生长的过程[2]。肿瘤转移通常预示着不良的预后，包括：① 肿瘤转化，肿瘤细胞首先通过改变自身微环境获得适应转移的能力，同时肿瘤细胞在原发灶大量增殖，新生血管生长。肿瘤细胞发生转化时表现出遗传和表型不稳定，发生基因突变和表型飘移，黏附分子可改变并帮助肿瘤获得转移能力[3]。② 分离和局部侵袭，如果肿瘤细胞要实现远处扩散，首先恶性增殖的细胞与母体肿瘤分离。分离和局部侵袭同时伴随细胞外基质降解和定向细胞运动两个

基金项目：江苏省研究生科研与实践创新计划（No.KYCX20_0666）。

作者简介：李乐，男，硕士，主要从事分子药理学和毒理学研究，email：2216609920@qq.com　*__通信作者：__江振洲，男，研究员，博士研究生导师，主要从事分子药理学和毒理学研究，email：jiangcpu@163.com

过程。伪足的形成是肿瘤细胞有效游离和迁移的关键。伪足具有信号传导、运动和蛋白水解功能。③ 肿瘤细胞在血管内存活和传播，血管生成、淋巴管生成、基质降解以及黏附分子和基质成分之间的相互作用都是肿瘤细胞血管内传播的关键[4]。大多数恶性肿瘤通过有序的扩散进入血管，造成局部浸润和淋巴管浸润，然后导致血行播散[5-6]。④ 增殖和形成肿瘤，播散的肿瘤细胞与靶器官部位的毛细血管壁发生黏合，在靶器官定位并形成微小转移灶，形成与原发肿瘤同样类型的继发瘤[7]。

肿瘤转移是一个复杂的、多因素调控的动态过程，现从以下几个方面介绍主要进展。

1.1　上皮间充质转化（epithelial-to-mesenchymal transition，EMT）促进肿瘤转移

EMT 是上皮细胞获得间充质特征的过程。在此过程中，细胞失去其上皮特征并获得间充质特征。EMT 发生的重要标志是 E- 钙黏蛋白的丢失和间充质标志物波形蛋白表达的增加，E- 钙黏蛋白水平下降可导致细胞黏附力降低，进而促进肿瘤转移与侵袭。EMT 与肿瘤的发生、转移、侵袭和对治疗的耐受有关[8]。EMT 会导致上皮细胞中连接分子表达缺失，破坏细胞极性，从而增强细胞迁移能力。此外，EMT 还可以通过提高基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMP）的表达，从而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障，便于细胞从原发肿瘤分离脱落发生侵袭转移。

1.2　肿瘤干细胞（cancer stem cells，CSCs）参与血管生成

CSCs 是一种具有自我更新和多向分化能力的肿瘤细胞亚群。CSCs 与肿瘤转移密切相关，可增加肿瘤运动性和侵袭性等[9]。血管生成和淋巴管生成是肿瘤转移过程中的重要病理改变，而 CSCs 直接或间接参与血管生成和淋巴管生成[10-12]。血管生成因子和淋巴管生成因子在缺氧条件下由 CSCs 高度表达，这表明 CSCs 在肿瘤发生和发展过程中可间接促进血管生成和淋巴管生成。此外，CSCs 可能通过转化为肿瘤血管生成干细胞 / 祖细胞或通过发展无内皮模式的血管生成拟态来构建肿瘤微循环，从而直接参与血管生成[13]。

1.3　自噬在肿瘤转移不同阶段中的作用

自噬是细胞内利用溶酶体降解细胞器和蛋白质的过程，在维持细胞稳态和更新中发挥作用[14]。自噬通常由营养缺乏、活性氧、缺氧、药物刺激和内质网应激等因素触发。自噬可能导致多种病理状况的发生，如神经退行性病变、衰老和癌症[15]。自噬在肿瘤转移过程的不同阶段中发挥着不同的作用。在肿瘤转移的早期阶段，自噬可能通过防止肿瘤坏死和限制炎性细胞浸润来抑制转移[16]；而在肿瘤转移的晚期阶段，自噬可能通过促进恶性肿瘤细胞在循环中的扩散，增强游离的转移细胞在目的器官中的定植，并诱导转移细胞在新环境中生存，维持肿瘤的代谢、生长和存活，促进肿瘤转移的发生和发展[17-18]。

1.4　表观遗传变化促进肿瘤转移

人类许多疾病的发生伴随着表观遗传变化，表观遗传变化参与了肿瘤形成的早期阶段，并被认为是肿瘤的标志[19]。基因组和表观基因改变参与了肿瘤细胞转化，肿瘤进展和转移的过程。DNA 甲基化是主要的表观遗传修饰，这种修饰由 DNA 甲基转移酶催化。研究表明活化 T 细胞核因子 1（the nuclear factor of activated T cells，NFAT1）在鼻咽癌中由于启动子高甲基化而沉默，沉默的 NFAT1 通过激活整合素亚单位 *α*6（integrin subunit alpha 6，ITGA6）转录促进鼻咽癌 EMT 的发生和转移[20]。Mou 等[21]的研究表明长链非编码 RNA 淋巴结转移相关转录本 1（Long non-coding RNA lymph node metastasis associated transcript 1，LNMAT1）通过招募 *ZESTE* 基因同源物 2 增强子（enhancer of zeste homolog 2，EZH2）到细胞黏附分子 1（cell adhesion molecular 1，CAM1）启动子中抑制 CAM1 的表达，LNMAT1 通过抑制 CAM1 的表达促进恶性黑色素瘤细胞的迁移和侵袭。骨肉瘤中促转移基因易洛魁族同源盒 1（Iroquois homeobox 1，IRX1）启动子的低甲基化导致了 *IRX1* 基因的高表达，而 *IRX1* 通过增强 CXC 趋化因子配体 14（C-X-C Motif Chemokine Ligand 14，CXCL14）/ NF-*k*B 信号传导促进骨肉瘤肺转移[22]。还有研究报道含有 Jumonji 结构域蛋白 2C（Jumonji domain-containing protein 2C，JMJD2C）可以通过降低肺腺癌转移相关转录本 1（metastasis associated in lung denocarcinoma transcript 1，MALAT1）启动子的组蛋白甲基化水平，进而上调 MALAT1 的表达，增强 *β*-catenin 信号通路的活性，从而增强结直肠癌细胞的体内外转移能力[23]。

总的来说，肿瘤发生转移的原因有很多，肿瘤细胞自身因素和肿瘤微环境以及转移前环境的塑造等因素的改变都可以引起肿瘤转移。

2　化疗药物促进肿瘤转移的作用及机制

化疗对于肿瘤的治疗和控制至关重要，然而化疗药物也可能通过诱导肿瘤细胞内或宿主微环境的改变，诱导血管通透性增强，促进肿瘤细胞

生存或增殖，最终促进肿瘤细胞扩散到远处的器官（见图 1）。有研究表明化疗药物可以上调有利于肿瘤生存的蛋白，进而减弱化疗药物对肿瘤细胞的抑制或杀伤作用，增加肿瘤细胞的存活率[24]。

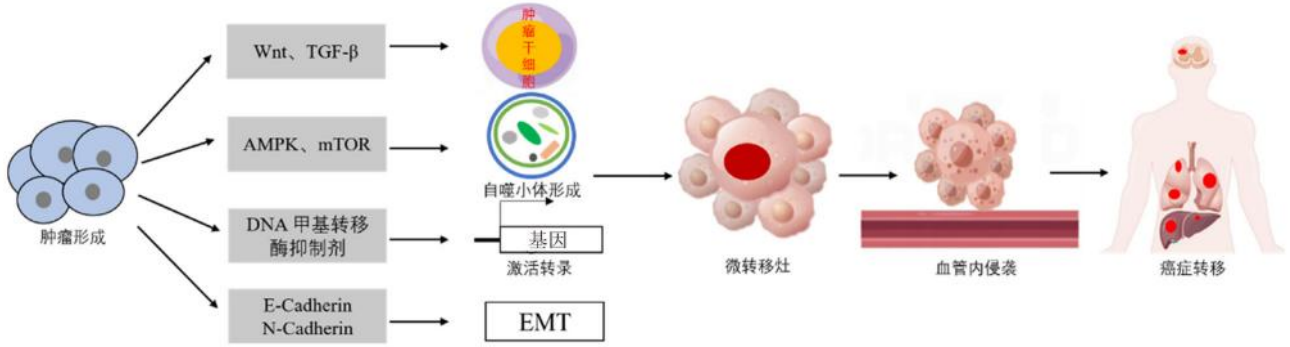


图 1　肿瘤转移机制图（由 Figdraw 绘制）

Fig 1　Mechanism of tumor metastasis（drawn by Figdraw）

2.1　细胞毒性化疗药物

细胞毒性化疗药物是指能够直接杀死肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞生长、增殖的一类化疗药物，作用机制包括抑制肿瘤细胞核酸或蛋白质的合成、干扰大分子物质代谢、干扰微管系统、抑制拓扑异构酶活性等。

2.1.1　环磷酰胺　环磷酰胺属于噁氮磷基团的烷基化剂，它是治疗血液系统恶性肿瘤以及各种上皮性肿瘤的主要药物[25]。研究表明环磷酰胺可通过影响 MMP2、CAM1 和组织金属蛋白酶抑制剂 2（tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2，TIMP2）的表达，增加 T739 小鼠体内肺转移和肿瘤结节的数量和面积，提示环磷酰胺可能通过基质降解蛋白酶和黏附蛋白的协同作用增强小鼠肺癌细胞 LA795 的肺转移过程[26]。Hung 等[27]的研究结果表明，当暴露于环磷酰胺时，乳腺癌细胞 MDA-MB-231 可能通过激活 CXC 趋化因子受体 4（CXC chemokine receptor 4，CXCR4）和下游效应物如 MMP9 和 MMP13 的表达而被诱导迁移。细胞毒性化疗药物环磷酰胺可改变骨微环境，通过增加骨髓源性细胞因子促进前列腺癌骨转移[28]。总之，环磷酰胺临床疗效确切，应用广泛，然而，环磷酰胺长期以来被认为与增加肿瘤转移的潜在风险相关，研究表明，环磷酰胺可能刺激肿瘤细胞微环境而不是肿瘤细胞本身促进转移[29]。

2.1.2　紫杉醇　紫杉醇是一种具有抗肿瘤活性的二萜生物碱类天然抗肿瘤药物，通过促进微管蛋白组装成微管，抑制微管的解聚，阻滞细胞周期进程和有丝分裂，从而抑制肿瘤细胞生长[30]。临床上已被广泛应用于乳腺癌、卵巢癌和部分头颈部癌的治疗。有研究报道了紫杉醇在治疗的同时会促进肿瘤的转移，低浓度紫杉醇（4 nmol • L^{-1}）作用于卵巢癌细胞 SKOV3、上皮性卵巢癌细胞 A2780 后通过激活 PI3K/Akt 通路诱导 MMP1 的表达从而促使存活卵巢癌细胞的迁移能力显著提升[31]。紫杉醇化疗通过激活乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的 Toll 样受体 4（toll like receptor-4，TLR4）通路，从而加剧肿瘤微环境、区域淋巴结的炎症进而显著增加淋巴结和远处器官的转移[32]。还有研究结果表明紫杉醇通过促进淋巴管内皮细胞（lymphatic endothelial cell，LEC）自噬来维持化疗期间的淋巴管结构，并通过诱导血管通透性来增加肿瘤细胞的淋巴转移[33]。总的来说，紫杉醇可以通过诱导 NF-κB 依赖的炎症反应、产生血管生成因子和促生成因子促进肿瘤转移，这些因子直接或间接增强肿瘤侵袭性，或通过调动骨髓髓样细胞，通过旁分泌方式促进肿瘤扩散[34]。

2.1.3　顺铂　顺铂是金属铂类抗肿瘤化疗药物。顺铂通过破坏 DNA、抑制 DNA 合成和有丝分裂、诱导细胞凋亡从而杀死肿瘤细胞。顺铂具有广谱抗肿瘤作用，临床用于治疗卵巢癌、前列腺癌、骨肉瘤等多种实体肿瘤。有研究表明顺铂化疗可能有引起肿瘤转移的风险，Liu 等[35]研究报道了顺铂可以通过调节经典活化巨噬细胞（classically activated macrophages，CAMs）促进卵巢癌 A2780、SKOV3 细胞 EMT 和迁移，趋化因子配体 20（chemokine ligand 20，CCL20）是顺铂刺激的 CAMs 上调的关键细胞因子，介导卵巢癌细胞迁移。顺铂可通过 ERK/AP-1 轴进一步上调肺癌细胞 A549、Pc9 中 DCBLD2 的表达，DCBLD2 通过磷酸化 GSK3β 和稳定 β- 连环蛋白促进 EMT 和转移[36]。总之，顺铂导致的肿瘤转移发生与其诱导促生存信号通路和侵袭标志物有关。

2.1.4　阿霉素和表阿霉素　阿霉素和表阿霉素属于抗生素类抗肿瘤药物，作用机制是药物直接嵌入 DNA 核碱基对之间，干扰转录过程，阻断 DNA/RNA 合成和抑制拓扑异构酶Ⅱ发挥杀伤肿瘤细胞的作用，主要用于治疗白血病、恶性淋巴瘤

和多发性骨髓瘤等多种恶性肿瘤[37]。研究发现阿霉素通过激活 RhoA/MLC 通路，进而增强乳腺癌细胞 MCF7 和 BT474 的迁移和侵袭[38]。也有研究报道阿霉素治疗增加了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 BT549 中损伤 DNA 结合蛋白 1（damaged DNA binding protein 1，DDB1）和 CUL4 相关因子 13（DDB1 and CUL4 associated factor 13，DCAF13）的表达，从而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭[39]。表阿霉素可以显著增加乳腺癌细胞中转移相关蛋白 1（metastasis-associated protein 1，MTA1）的表达，从而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭[40]。

2.2　分子靶向化疗药物

细胞毒性化疗药物对增殖速度快的正常细胞不加选择地破坏，促进了肿瘤治疗学中分子靶向化疗药物的发展。靶向药物通过与肿瘤生长和进展过程中相关分子靶点相互作用，最大限度地减少周围正常组织的损伤，以达到局部杀灭肿瘤细胞的目的[41]。

2.2.1　舒尼替尼　舒尼替尼是一种新型多靶向性治疗的口服药物，是血小板衍生生长因子受体 *α-β*（platelet-derived growth factor receptor-alpha，beta，PDGFR*α-β*）、血管内皮生长因子受体（vascular endothelial growth factor receptor，VEGFR）和干细胞因子受体（stem cell factor receptor，SCFR）的抑制剂，主要用于治疗肾癌、神经内分泌肿瘤和胃肠道间质瘤。研究表明由 P65 诱导的 miR-452-5p 是舒尼替尼的潜在治疗靶点，舒尼替尼抑制 miR-452-5p 进而上调 SMAD4/SMAD7 信号促进肾癌细胞 OSRA2 和 A498 的侵袭和转移[42]。舒尼替尼通过促进 EMT 进程，以神经纤毛蛋白 1（neuropilin 1，NRP1）依赖的方式促进结直肠癌细胞侵袭和转移[43]。舒尼替尼属于 VEGF/VEGFR 抑制剂，可能通过靶向血管内皮细胞，抑制肿瘤血管生成，导致肿瘤细胞内缺氧，进而促进了肿瘤细胞在缺氧条件下的转移和侵袭[44]。

2.2.2　5-氮杂胞苷和地西他滨　DNA 甲基化是一种主要的表观遗传修饰方式，可在不改变 DNA 碱基序列的情况下调节基因表达。DNA 甲基转移酶是一种催化 DNA 甲基化的酶，因为 DNA 甲基化是可逆的，可以通过使用 DNA 甲基转移酶抑制剂来逆转 DNA 异常的高甲基化[45]。DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷和地西他滨是目前利用表观遗传学进行肿瘤治疗使用最广泛的药物[46]。5-氮杂胞苷和地西他滨通过下调 DNA 甲基化水平并诱导肿瘤细胞中表观遗传沉默的肿瘤抑制基因的重新激活，已广泛应用于急性髓系白血病、慢性髓系白血病和骨髓增生异常综合征的临床治疗[47]。

相关的研究表明使用 DNA 甲基转移酶抑制剂存在促进肿瘤转移的可能。研究发现 5-氮杂胞苷处理降低了 SKOV3 和 A2780 细胞中 CpG 岛的甲基化水平，5-氮杂胞苷治疗增加了小鼠异种移植模型中肺转移结节的数量，5-氮杂胞苷对甲基化的抑制增加了卵巢癌细胞中侵袭足的形成并增强了细胞外基质的降解，进而促进了卵巢癌的转移和侵袭[48]。DNA 甲基转移酶抑制剂地西他滨可能通过激活促侵袭基因刺激胰腺癌的侵袭和转移[49]。Kim 等[50]的研究发现地西他滨处理野生型 SKOV3 细胞可剂量依赖性增强干扰素诱导的跨膜蛋白 1（interferon-induced transmembrane protein 1，IFITM1）的表达，进而增加了卵巢癌细胞的迁移和侵袭性。此外，Poplineau 等[51]的研究表明 DNA 甲基转移酶抑制剂地西他滨主要通过 Sp1 募集调节 MMP1 的表达而增加人纤维肉瘤细胞 HT1080 细胞的侵袭潜能。Li 等[52]的研究表明地西他滨通过上调神经前体细胞表达下调因子 4-1（neural precursor cell-expressed，developmentally downregulated 4-1，NEDD4-1）的表达和限制环核苷酸 Ras 鸟嘌呤核苷酸交换因子（cyclic nucleotide-Ras guanine nucleotide exchange factors，CNrasGEFs）的表达促进人胃癌细胞 MGC803 细胞的迁移和侵袭。总的来说，DNA 甲基转移酶抑制剂可以降低基因启动子区的甲基化水平，启动子区的低甲基化水平，包括致癌基因的低甲基化和转移相关抑癌基因的低甲基化，可能增强了肿瘤细胞的转移行为，此外，5-氮杂胞苷可能通过促进 MMP 家族某些基因的重新激活，增加了肿瘤细胞的侵袭性。

2.2.3　贝伐珠单抗　贝伐珠单抗是一种重组人源化免疫球蛋白 G1 单克隆抗体，通过结合血管内皮生长因子 -A（vascular endothelial growth factor-A，VEGF-A），抑制其与 VEGF 受体 -2 的结合，进而抑制 VEGF 的生物学作用，达到抑制肿瘤生长的目的，在临床用于转移性结直肠癌的治疗。然而，长期暴露于贝伐珠单抗会导致大肠癌细胞在体外的迁移和侵袭增加，这与 VEGF 家族配体、胎盘生长因子（placental growth factor，PLGF）和 VEGF-C 的表达增加以及 VEGFR-1 的激活有关[53]。还有研究表明，高剂量贝伐珠单抗可能通过下调 Claudin5 的表达提高人脐静脉内皮细胞的转移能力，进而增加肺癌细胞 A549 的转移和侵袭[54]。Xu 等[55]的研究结果表明，贝伐珠单抗治疗增强了富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2（proline-rich tyrosine kinase 2，Pyk2）的磷酸化，进而促进了胶质瘤细胞 C6 的侵袭。

3 展望

化疗在恶性肿瘤的治疗中已被广泛证明是有效的，在临床中仍然占有突出地位。化疗可以改变机体内环境的平衡和肿瘤细胞的部分特性，部分化疗药物甚至增加了肿瘤的转移发生率，影响肿瘤治疗的结局。化疗药物可能通过在原发性肿瘤中起关键应激源作用，造成组织损伤、缺氧等，促进局部和系统促炎细胞因子和趋化因子的释放，或通过改变或增强巨噬细胞和肿瘤细胞的转移行为促进肿瘤转移。因此，寻找化疗药物促进转移的关键性诊断标志物也是今后努力的方向之一。临床在使用化疗药物时，应注意化疗药物对转移生物标志物或肿瘤微环境的改变，及时更换药物或采用联合用药方案。开发在诱导肿瘤细胞死亡方面具有更大特异性的新药物以及实施新的治疗策略，为每个患者选择最佳方案和剂量，是肿瘤化疗学的当务之急[56]。

参考文献

[1] Karagiannis GS，Condeelis JS，Oktay MH. Chemotherapy-induced metastasis：mechanisms and translational opportunities [J]. Clin Exp Metastasis，2018，35（4）：269-284.

[2] Suhail Y，Cain MP，Vanaja K，et al. Systems biology of cancer metastasis [J]. Cell Syst，2019，9（2）：109-127.

[3] Ibragimova MK，Tsyganov MM，Litviakov NV. Natural and chemotherapy-induced clonal evolution of tumors [J]. Biochemistry（Mosc），2017，82（4）：413-425.

[4] Väisänen A，Tuominen H，Kallioinen M，et al. Matrix metalloproteinase-2（72 kD type Ⅳ collagenase）expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value [J]. J Pathol，1996，180（3）：283-289.

[5] Li G，Satyamoorthy K，Meier F，et al. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions：when seeds meet soil [J]. Oncogene，2003，22（20）：3162-3171.

[6] Chambers AF，Naumov GN，Varghese HJ，et al. Critical steps in hematogenous metastasis：an overview [J]. Surg Oncol Clin N Am，2001，10（2）：243-255.

[7] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis：the‘seed and soil’hypothesis revisited [J]. Nat Rev Cancer，2003，3（6）：453-458.

[8] Pastushenko I，Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. Trends Cell Biol，2019，29（3）：212-226.

[9] 陈晓敏，郭俊明，乐东海，等. 上皮-间质转化：肿瘤转移的重要调控机制 [J]. 中国细胞生物学学报，2013，35（9）：9.

[10] Shiozawa Y，Nie B，Pienta KJ，et al. Cancer stem cells and their role in metastasis [J]. Pharmacol Ther，2013，138（2）：285-293.

[11] Clarke MF，Dick JE，Dirks PB，et al. Cancer stem cells——perspectives on current status and future directions：AACR Workshop on cancer stem cells [J]. Cancer Res，2006，66（19）：9339-9344.

[12] Stacker SA，Baldwin ME，Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread [J]. FASEB J，2002，16（9）：922-934.

[13] Van der Auwera I，Cao Y，Tille JC，et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours [J]. Br J Cancer，2006，95（12）：1611-1625.

[14] Li S，Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis [J]. Int J Oncol，2014，44（6）：1806-1812.

[15] Boya P，Reggiori F，Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. Nat Cell Biol，2013，15（7）：713-720.

[16] Choi AM，Ryter SW，Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. N Engl J Med，2013，368（7）：651-662.

[17] Kenific CM，Thorburn A，Debnath J. Autophagy and metastasis：another double-edged sword [J]. Curr Opin Cell Biol，2010，22（2）：241-245.

[18] Peng YF，Shi YH，Shen YH，et al. Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy [J]. PLoS One，2013，8（9）：e74407.

[19] Lu Z，Luo RZ，Lu Y，et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells [J]. J Clin Invest，2008，118（12）：3917-3929.

[20] Zhang J，Zheng ZQ，Yuan YW，et al. NFAT1 hypermethylation promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by activating ITGA6 transcription [J]. Neoplasia，2019，21（3）：311-321.

[21] Mou K，Zhang X，Mu X，et al. LNMAT1 promotes invasion-metastasis cascade in malignant melanoma by epigenetically suppressing CADM1 expression [J]. Front Oncol，2019，9：569.

[22] Lu J，Song G，Tang Q，et al. IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF-κB signaling [J]. J Clin Invest，2015，125（5）：1839-1856.

[23] Wu X，Li R，Song Q，et al. JMJD2C promotes colorectal cancer metastasis via regulating histone methylation of MALAT1 promoter and enhancing β-catenin signaling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：435.

[24] Wang M，Zhao J，Zhang L，et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis [J]. J Cancer，2017，8（5）：761-773.

[25] Emadi A，Jones RJ，Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer：golden anniversary [J]. Nat Rev Clin Oncol，2009，6（11）：638-647.

[26] Man S，Zhang Y，Gao W，et al. Cyclophosphamide promotes pulmonary metastasis on mouse lung adenocarcinoma [J]. Clin Exp Metastasis，2008，25（8）：855-864.

[27] Hung CM，Hsu YC，Chen TY，et al. Cyclophosphamide

promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases [J]. Cell Biol Int，2017，41（3）：345-352.

[28] Park SI，Liao J，Berry JE，et al. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis [J]. Cancer Res，2012，72（10）：2522-2532.

[29] Yamauchi K，Yang M，Hayashi K，et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice：an opposite effect of chemotherapy [J]. Cancer Res，2008，68（2）：516-520.

[30] Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells [J]. Mol Biol Cell，2014，25（18）：2677-2681.

[31] 刘沛森 . 低浓度紫杉醇促使卵巢癌细胞迁移增强的研究 [D]. 广州：广州医科大学，2020.

[32] Volk-Draper L，Hall K，Griggs C，et al. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner [J]. Cancer Res，2014，74（19）：5421-5434.

[33] Zamora A，Alves M，Chollet C，et al. Paclitaxel induces lymphatic endothelial cells autophagy to promote metastasis [J]. Cell Death Dis，2019，10（12）：956.

[34] DeNardo DG，Brennan DJ，Rexhepaj E，et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy [J]. Cancer Discov，2011，1（1）：54-67.

[35] Liu W，Wang W，Wang X，et al. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis [J]. Cancer Lett，2020，472：59-69.

[36] Chen X，Lv Y，Xu K，et al. DCBLD2 mediates epithelial-mesenchymal transition-induced metastasis by cisplatin in lung adenocarcinoma [J]. Cancers（Basel），2021，13（6）：1403.

[37] Raje S，Pandav K，Barthwal R. Dual mode of binding of anti cancer drug epirubicin to G-quadruplex [d-（TTAGGGT）]4 containing human telomeric DNA sequence induces thermal stabilization [J]. Bioorg Med Chem，2019，27（24）：115131.

[38] Liu CL，Chen MJ，Lin JC，et al. Doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells through the upregulation of the RhoA/MLC pathway [J]. J Breast Cancer，2019，22（2）：185-195.

[39] Sun Z，Zhou D，Yang J，et al. Doxorubicin promotes breast cancer cell migration and invasion via DCAF13 [J]. FEBS Open Bio，2021，21（1）：221-230.

[40] 杨桐 . MTA1 参与化疗应激反应促进乳腺癌细胞转移的作用研究 [D]. 西安：第四军医大学，2015.

[41] Tseng HH，He B. Molecular markers as therapeutic targets in lung cancer [J]. Chin J Cancer，2013，32（2）：59-62.

[42] Zhai W，Li S，Zhang J，et al. Sunitinib-suppressed miR-452-5p facilitates renal cancer cell invasion and metastasis through modulating SMAD4/SMAD7 signals [J]. Mol Cancer，2018，17（1）：157.

[43] Tomida C，Yamagishi N，Nagano H，et al. Antiangiogenic agent sunitinib induces epithelial to mesenchymal transition and accelerates motility of colorectal cancer cells [J]. J Med Invest，2017，64（3-4）：250-254.

[44] Ebos JM，Lee CR，Cruz-Munoz W，et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis [J]. Cancer Cell，2009，15（3）：232-239.

[45] Fahy J，Jeltsch A，Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer：a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies [J]. Expert Opin Ther Pat，2012，22（12）：1427-1442.

[46] Stresemann C，Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine [J]. Int J Cancer，2008，123（1）：8-13.

[47] Liu Z，Gao Y，Li X. Cancer epigenetics and the potential of epigenetic drugs for treating solid tumors [J]. Expert Rev Anticancer Ther，2019，19（2）：139-149.

[48] Cao D，Li D，Huang Y，et al. 5-azacytidine promotes invadopodia formation and tumor metastasis through the upregulation of PI3K in ovarian cancer cells [J]. Oncotarget，2017，8（36）：60173-60187.

[49] Sato N，Maehara N，Su GH，et al. Effects of 5-aza-2’-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness [J]. J Natl Cancer Inst，2003，95（4）：327-330.

[50] Kim NH，Sung HY，Choi EN，et al. Aberrant DNA methylation in the IFITM1 promoter enhances the metastatic phenotype in an intraperitoneal xenograft model of human ovarian cancer [J]. Oncol Rep，2014，31（5）：2139-2146.

[51] Poplineau M，Schnekenburger M，Dufer J，et al. The DNA hypomethylating agent，5-aza-2'-deoxycytidine，enhances tumor cell invasion through a transcription-dependent modulation of MMP-1 expression in human fibrosarcoma cells [J]. Mol Carcinog，2015，54（1）：24-34.

[52] Li D，Xu CY，Cui RJ，et al. DNA methylation inhibitor，decitabine，promotes MGC803 gastric cancer cell migration and invasion via the upregulation of NEDD41 [J]. Mol Med Rep，2015，12（6）：8201-8208.

[53] Fan F，Samuel S，Gaur P，et al. Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration [J]. Br J Cancer，2011，104（8）：1270-1277.

[54] Jia Y，Qin T，Zhang X，et al. Effect of bevacizumab on the tight junction proteins of vascular endothelial cells [J]. Am J Transl Res，2019，11（9）：5546-5559.

[55] Xu CS，Wang ZF，Dai LM，et al. Induction of proline-rich tyrosine kinase 2 activation-mediated C6 glioma cell invasion after anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. J Transl Med，2014，12：148.

[56] Tanaka T，Tanimoto K，Otani K，et al. Concise prediction models of anticancer efficacy of 8 drugs using expression data from 12 selected genes [J]. Int J Cancer，2004，111（4）：617-626.

（收稿日期：2022-01-04；修回日期：2022-04-01）

免疫检查点抑制剂抗肿瘤作用的影响因素研究进展

曾峥[1]，罗丹玲[2]，钟明利[2]，谭亲友[2]，高义[1]，李江[1*]（1. 桂林医学院附属医院药学部，广西　桂林　541001；2. 桂林医学院药学院，广西　桂林　541000）

摘要：免疫检查点抑制剂（ICIs）近年来在肿瘤治疗领域取得突出成就，主要是细胞程序性死亡受体 -1/ 细胞程序性死亡配体 -1 抑制剂和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 -4 抑制剂相关的研究。对于应用 ICIs 的肿瘤患者，因进行化疗前预处理、缓解肿瘤并发症、处理免疫相关不良事件（irAEs）或增强抗肿瘤效果等，常需联合糖皮质激素、抗菌药物、抗血管生成药等，而这些药物是否会影响 ICIs 的疗效，目前有研究进行了探索，本文就此对 ICIs 疗效影响因素进行系统综述。

关键词：免疫检查点抑制剂；糖皮质激素；抗菌药物；抗血管生成药；疗效
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1867-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.027

Factors affecting the antitumor function of immune checkpoint inhibitors

ZENG Zheng[1], LUO Dan-ling[2], ZHONG Ming-li[2], TAN Qin-you[2], GAO Yi[1], LI Jiang[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Affiliated Hospital of Guilin Medical University*, *Guilin Guangxi* 541001; 2. *College of Pharmacy*, *Guilin Medical University*, *Guilin Guangxi* 541000)

Abstract: The research on immune checkpoint inhibitors (ICIs) in the anti-tumor therapy has made great progress. Programmed death-1/ligand-1 (PD-1/PD-L1) and cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA-4) are the most important ones. For tumor patients undergoing ICIs, due to pre-treatment before chemotherapy, alleviation of tumor complications, treatment of immune-related adverse events or enhancement of anti-tumor effects, combination with glucocorticoid, antibacteria-l, and antiangiogenic drugs, etc. is needed. However, whether these drugs affect the efficacy of ICIs has been explored in some studies. This paper reviews the influence factors of ICIs efficacy.

Key words: immune checkpoint inhibitor; glucocorticoid; antibacterial; antiangiogenic drug; efficacy

免疫检查点是免疫细胞上表达的一系列调节免疫激活水平的分子，在维持免疫系统的稳定中发挥重要作用[1]，通常用于缓解抗原激活后的免疫应答。肿瘤细胞因基因突变导致不同新生抗原的表达，从而逃避免疫系统的攻击。细胞程序性死亡受体 -1/ 细胞程序性死亡配体 -1（PD-1/PD-L1）相互作用后，可通过抑制 T 细胞增殖、促进 T 细胞凋亡、促进调节性 T 细胞（regulatory T cells，Tregs）分化增殖而下调 T 细胞活性，还可通过 CTLA-4 与 CD80/CD86 细胞上的 B7 分子结合下调 T 细胞活性和上调 Tregs 活性发挥免疫抑制作用，免疫检查点抑制剂（ICIs）通过阻断它们的结合重新识别肿瘤细胞从而抵抗肿瘤，目前应用最广泛的 ICIs 是针对 PD-1/PD-L1 的单克隆抗体[2-3]。

研究发现，多种因素可以影响免疫疗效。其中，糖皮质激素可通过多种机制影响免疫细胞的分化、凋亡，负性调控免疫系统[4-5]；抗菌药物会导致患者体内菌群失调，进而引起免疫反应紊乱，最终削弱 ICIs 的疗效[6-7]；抗血管生成药可改善肿瘤的微环境，使血管正常化，与 ICIs 具有协同抗肿瘤作用[8-9]。以上药物作用均可能会影响患者应用 ICIs 的疗效，本文就此进行系统综述。

1　糖皮质激素与免疫治疗

1.1　糖皮质激素影响免疫治疗的机制

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160765，No.81660104）；广西科技基地和人才专项（No.2021AC19043）。
作者简介：曾峥，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：zengzhengccmu@163.com　*通信作者：李江，男，教授，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，email：lijiangflash@163.com

糖皮质激素具有免疫抑制效应，目前认为糖皮质激素可能会降低免疫治疗的效果[10]，指南中也指出同时使用糖皮质激素作为相对禁忌证疗法[11]。糖皮质激素可通过多种途径抑制 T 细胞，如诱导 T 细胞凋亡、抑制其增殖活化、增加 Tregs 的数量以及促进细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 -4（CTLA-4）、PD-1 表达等，因此，理论上糖皮质激素可能会抑制 ICIs 的治疗效果[12-13]。

肿瘤患者在启动 ICIs 治疗前后都有可能使用糖皮质激素，有研究提示在 ICIs 治疗早期使用糖皮质激素会出现明显的抑制作用[14-15]；而另有研究发现，糖皮质激素用于处理免疫相关不良事件（irAEs）并没有显著影响患者的总生存期（overall survive，OS）和无进展生存期（progression-free survival，PFS）[16-17]。提示糖皮质激素对 OS 和 PFS 的影响可能因患者的使用时间以及使用原因不同而存在差异。

1.2　治疗早期使用糖皮质激素对 ICIs 疗效的影响

有研究表明，在接受 PD-1/PD-L1 单抗单药或联合 CTLA-4 单抗治疗的晚期非小细胞肺癌（non small cell lung cancer，NSCLC）患者中，开始免疫治疗后 28 d 内接受≥ 10 mg 泼尼松当量的糖皮质激素的患者较对照组患者（剂量＜ 10 mg）的疗效降低，其疾病控制率（DCR）、中位无进展生存期（mPFS）和中位生存期（mOS）均明显下降[15]，Scott 等[18]的报告也显示出相似的结果，在接受纳武利尤单抗治疗的晚期 NSCLC 患者中，在免疫治疗前 30 d 内使用糖皮质激素的患者 OS 降低；Arbour 等[14]进行的一项回顾性研究也证实了在晚期 NSCLC 患者中，开始 PD-1/PD-L1 单抗治疗时使用糖皮质激素的患者较未使用的患者临床获益减少，深入分析发现，ICIs 开始治疗前 30 d 内接受糖皮质激素给药明显与患者预后更差相关；同样，一项小样本量回顾性研究也显示，在晚期黑色素瘤（melanoma，MEL）治疗中，与未接受糖皮质激素治疗的患者相比，早期应用糖皮质激素治疗的患者 mOS 显著降低[19]。

1.3　使用糖皮质激素的治疗目的不同，对 ICIs 的疗效有不同的影响

应用 ICIs 的患者因不同的治疗目的和肿瘤分期，可能有多种指征使用糖皮质激素，如有恶心、疲劳、疼痛、呼吸困难以及 ICIs 引起 irAEs 的肿瘤患者通常给予糖皮质激素作为缓解症状的主要方法，而使用糖皮质激素的治疗目的不同，免疫疗效可能受到影响。

一项回顾性分析显示，基于糖皮质激素使用的原因不同，患者的临床获益不同，应用糖皮质激素缓解肿瘤相关症状（如呼吸困难、疼痛、脑转移症状）的患者预后明显更差，而用于治疗肿瘤无关症状（如慢性阻塞性肺病、肺炎）的患者对预后没有影响[17]。

Ricciuti 等[20]报告显示，应用 PD-1/PD-L1 单抗单药或联合 CTLA-4 单抗治疗的晚期 NSCLC 患者中，治疗开始时接受糖皮质激素治疗的患者 OS 明显缩短，根据糖皮质激素使用原因进行亚组分析显示，用于治疗肿瘤相关症状的患者较肿瘤无关症状患者生存期也显著降低。

进一步分析使用糖皮质激素缓解 irAEs 对患者 OS 的影响，Skribek 等[16]进行的一项回顾性研究表明，在接受 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗的晚期 NSCLC 患者中，根据使用糖皮质激素的原因进行亚组分析，结果显示因 irAEs 接受糖皮质激素治疗的患者对预后没有影响，且该亚组的患者呈现出较好的 PFS 和 OS，而因缓解肿瘤相关症状而接受糖皮质激素的患者在所有亚组中 OS 最短；在黑色素瘤和其他类型肿瘤中也得到类似的结果，多项研究表明，在应用 ICIs 治疗的黑色瘤患者中，接受糖皮质激素以缓解 irAEs 的患者对预后没有影响，且显示出更好的 OS[21-23]。此外，一项大型系统回顾和荟萃分析也证实了在 ICIs 治疗期间，因发生 irAEs 使用糖皮质激素治疗的患者，其生存期没有受到影响[24]。

1.4　化疗前预处理使用糖皮质激素对 ICIs 疗效的影响

化疗药物常会引起恶心、呕吐等不良反应，通常需要使用糖皮质激素进行预处理，有研究表明，在免疫联合化疗前使用糖皮质激素进行预处理，糖皮质激素并未明显影响疗效[25]。另外，一项在转移性 NSCLC 患者中接受 PD-L1 单抗联合化疗和靶向治疗时使用糖皮质激素进行预处理的研究也表明，糖皮质激素并未降低疗效[26]；KEYNOTE407[27] 和 KEYNOTE-189[28] 研究证实了糖皮质激素用于免疫联合化疗前预处理，并未观察到糖皮质激素降低疗效。

1.5　小结

目前，关于使用糖皮质激素对 ICIs 疗效影响的荟萃分析或汇总的文献较少，特别是关于糖皮质激素类型对免疫疗效影响的研究十分有限，Okoye 等[29]研究表明，地塞米松抑制 T 细胞功能的作用显著，而 ICIs 无法克服这种抑制作用，其

疗效会受到影响；王汉萍等[30]研究表明，为避免糖皮质激素相关毒副作用，同时尽量减少其对肾上腺垂体轴的生理抑制，一般多选择中效糖皮质激素，如泼尼松龙或甲基强的松。虽然长效糖皮质激素抗炎作用更加强大，但是生物半衰期长，长期使用不仅会损害 T 细胞功能，而且发生糖皮质激素相关不良反应增加。

本文纳入的研究中（见表 1），在 ICIs 治疗期间，应用糖皮质激素可能会使患者临床获益减少，特别是在早期（ICIs 治疗前后 30 d 内）使用糖皮质激素，患者预后明显更差；且进一步分析显示，糖皮质激素用于治疗有肿瘤相关症状（如疲劳、疼痛、脑转移和呼吸困难）的患者，结局最差；而因发生 irAEs 的糖皮质激素给药不会损害患者预后。因此，在临床工作中，应尽量避免或使用最低有效剂量的糖皮质激素缓解肿瘤相关症状；而在出现严重 irAEs 时，应积极使用糖皮质激素治疗，待患者症状好转后逐渐减少糖皮质激素的剂量，以免发生糖皮质激素相关不良反应。

表 1　纳入关于糖皮质激素影响 ICIs 疗效研究的基本特征

Tab 1　Basic features included in the study on the effect of glucocorticoid on the efficacy of ICIs

作者	肿瘤类型	样本量	服用糖皮质激素（暴露组 *vs* 未暴露组）										
			时机	例数 / *n*	最常见适应证	糖皮质激素类型	ORR/% 或 DCR/%	*P*	mPFS/ 月	*P*	mOS/ 月	*P*
Fucà 等[15]	NSCLC	151	A	35	①	—	DCR：32 *vs* 64	0.39	1.98 *vs* 3.94	0.003	4.86 *vs* 15.14	＜ 0.001
Scott 等[18]	NSCLC	210	A	25	①	a	—	—	—	—	4.3 *vs* 11	0.006
			A	11	②	a	—	—	—	—	16.1 *vs* 10.5	0.5
Arbour 等[14]												
MSKCC	NSCLC		B	53	①	a	ORR：6 *vs* 19	0.2	1.9 *vs* 2.6	0.001	5.4 *vs* 12.1	＜ 0.001
GRCC	NSCLC		B	37			ORR：8 *vs* 18	0.39	1.7 *vs* 1.8	＜ 0.001	3.3 *vs* 9.4	＜ 0.001
Chasset 等[19]	Melanoma	45	B	12	①	a、b	—	—	—	—	4 *vs* 11	＜ 0.001
De Giglio 等[17]	NSCLC	413	A	38	①	—	—	—	1.3 *vs* 2.6	＜ 0.0001	2.2 *vs* 13.8	＜ 0.002
				12	③				2.2 *vs* 2.6	HR：1	13.4 *vs* 13.8	—
Ricciuti 等[20]	NSCLC	650	B	93	①	a	ORR：6.1 *vs* 19.7	0.01	2.0 *vs* 3.4	0.001	4.9 *vs* 11.2	0.001
				27	③		—	—	4.6 *vs* 3.4	0.77	10.7 *vs* 11.2	0.77
Skribek 等[16]	NSCLC	196	C	33	①	—	—	—	1.9 *vs* 4.3	＜ 0.001	4.3 *vs* 14.4	＜ 0.001
				31	②				9.4 *vs* 4.3	0.308	NA *vs* 14.4	0.308
Weber 等[21]	Melanoma	576	C	114	②	—	ORR：29.8 *vs* 31.8	0.736	—	—	NA *vs* 22	—
Horvat 等[22]	Melanoma	298	C	103	②	—	—	—	—	—	—	0.97
Downey 等[23]	Melanoma	139	C	12	②	c	—	—	—	—	19.3 *vs* 30.6	0.23
Petrelli 等[24]	NSCLC、Melanoma、其他	4045	C	2926	①②③	a、b	—	—	—	0.0001	—	0.03
			A	926	③		—	—	—	—	—	0.62

注（Note）：A. 早期，即在 ICIs 治疗前后 30 d 内（early period，30 days before and after the ICIs treatment）；B. 基线，即在 ICIs 治疗首日（baseline，first day of ICIs treatment）；C. 在 ICIs 治疗的任意时间（any time during ICIS treatment）；① 肿瘤相关症状（tumor related symptoms）；② 免疫相关不良事件（immune-related adverse events）；③ 肿瘤无关症状（tumor-independent symptoms）；a. 泼尼松（prednisone）；b. 甲泼尼龙（methylprednisolone）；c. 地塞米松（dexamethasone）；—：未提供（not available）；NA：未达到（not attainable）。

2　抗菌药物与免疫治疗

2.1　抗菌药物影响免疫治疗的机制

肠道微生物群对人体免疫系统的影响是非常大的，从稳定局部屏障到调节全身免疫、代谢、炎症等功能，同时参与恶性肿瘤的发生、发展和转移；多项研究表明，肠道中益生菌能增加肿瘤微环境中 T 细胞的数量[31-34]；增强树突状细胞（dendritic cell，DC）的功能和 Th1 细胞反应，从而使肿瘤组织及肠道 $CD8^+$ T 细胞增殖、活化；下调 $CD4^+$ Tregs 细胞的数量，因此，肠道菌群的变化会影响 ICIs 的抗肿瘤作用，而抗菌药物可使肠道菌群失调，可能会降低 ICIs 的有效性。

2.2　抗菌药物暴露时间窗口对 ICIs 的影响

恶性肿瘤患者常伴有炎症和感染，通常需要使用抗菌药物治疗，而抗菌药物引起的肠道菌群紊乱在其停用后 1 ～ 3 个月才能恢复到基线水平，有些细菌可能需数年才能完全恢复[35-37]。

目前大多研究认为在 ICIs 治疗期间使用抗菌

药物会影响其疗效。Chalabi 等[38]研究的 POPLAR 和 OAK 两项临床试验，均为 NSCLC 患者，阿替利珠组患者使用抗菌药物的 mOS 与未使用抗菌药物组比较显著缩短；进一步分析提示，在均使用抗菌药物的前提下，多西他赛组与阿替利珠组的 mOS 无显著差异，而在未使用抗菌药物的前提下，多西他赛组较阿替利珠组的 mOS 显著降低。Derosa 等[39]研究显示，在纳入的晚期肾细胞癌（RCC）和 NSCLC 患者中使用 PD-1/PD-L1 单抗单药或联合 CTLA-4 单抗治疗前 30 d 内接受抗菌药物治疗，mPFS 和 mOS 显著降低，也检测到在开始 ICIs 治疗前 60 d 内使用抗菌药物的患者，生存期缩短；Routy 等[40]研究发现，在开始接受 PD-1/PD-LI 单抗治疗前 2 个月内或治疗后 1 个月内暴露于抗菌药物的患者，预后更差；Zhao 等[41]也证实了在 ICIs 治疗前后 30 d 内，应用抗菌药物的 NSCLC 患者疾病进展风险增加，生存期缩短；同样也观察到，在 ICIs 治疗前 2 个月或 1 个月内使用抗菌药物的 RCC 患者生存期降低[42]，随后，Lurienne 等[43]进行的一项系统回顾和荟萃分析结果也证实了在 ICIs 治疗前后 30 d、60 d、90 d 内应用抗菌药物的患者，免疫疗效受到损害，尤其是在 ICIs 治疗前后 30 日内疗效降低更明显。

2.3 抗菌药物的类型对 ICIs 的影响

广谱抗菌药物可使肠道菌群失调，破坏肠道生态系统的功能，不仅使参与刺激免疫应答的微生物数量减少，也会增加免疫抑制因子的数量，从而降低 ICIs 的有效性[44]。

有研究表明，在首次 ICIs 治疗前后 2 周内使用抗菌药物的患者较未使用抗菌药物的患者，其免疫应答率（RR）、mPFS 更低，该研究根据抗菌药物使用类型，将患者分为广谱抗菌药物治疗组和窄谱抗菌药物治疗组，结果表明，窄谱抗菌药物组（仅覆盖革兰氏阳性菌的抗菌药物，如万古霉素、利奈唑胺等）并未影响患者 RR，而广谱抗菌药物组（覆盖革兰氏阳性菌和阴性菌或厌氧菌的抗菌药物，如第三、四代头孢菌素，美罗培南等）RR 更低，且应答时间也更长[45]；Mohiuddin 等[46]研究也显示，在首次输注 ICIs 前使用抗菌药物的黑色素瘤患者生存期降低，且抗菌药物暴露患者中需要静脉注射糖皮质激素的免疫介导性结肠炎的 1 年累积发病率显著高于抗菌药物未暴露患者，亚组分析显示，广谱抗菌药物会损害生存率，而窄谱抗菌药物与生存率下降无关。Elkrief 等[47]的研究也证实了广谱抗菌药物显著损害 ICIs 的疗效。

2.4 小结

在本文纳入的所有研究中（见表 2），患者几乎都是接受 ICIs 单药治疗，结果表明，开始 ICIs 治疗前后有限时间窗内（开始治疗前后 90 d 内的抗菌药物暴露）使用抗菌药物会扰乱肠道菌群的组成，破坏肠道菌群平衡，进而降低 ICIs 的疗效，特别是在 ICIs 治疗前后 30 d 内影响更为显著，且抗菌药物暴露患者免疫介导性结肠炎、疾病进展风险增加；此外，应用广谱抗菌药物对 ICIs 疗效损害更大；故应尽量避免在 ICI 治疗前后 30 d 内应用抗菌药物，且要选用相对窄谱的抗菌药物类型。

然而，最近有研究表明，应用化疗联合免疫疗法治疗 NSCLC 患者，抗菌药物暴露并不会影响患者的 ORR 和生存期，因为与单一 ICIs 疗法相比，化学免疫疗法的疗效可能较少依赖于肠道细菌组成，并且抗菌药物的有害影响可能通过 ICIs 和细胞毒性化疗之间的协同作用得到补偿，化疗诱导的肿瘤细胞裂解实际上可以通过促进暴露和呈递先前无法获得的肿瘤抗原来增加肿瘤的抗原性，而局部和全身释放损伤相关的分子模式在增强适应性免疫以及免疫检查点分子（如 PD-L1）阻断方面具有重要的辅助作用[48]；且 Galluzzi 等[49]也表明，化疗能诱导免疫检查点分子的上调，化疗免疫疗法可增加肿瘤患者的临床获益。因此，在化学联合免疫治疗的情况下，不应延迟在伴有感染的患者中应用抗菌药物。

3 抗血管生成药与免疫治疗

3.1 抗血管生成药影响免疫治疗的机制

在临床实践中，选择 ICIs 的一个主要考虑因素是应答率低，目前对 ICIs 单药治疗的频繁耐药性尚未完全解决，但近期有研究表明，联合抗血管生成药治疗可减轻 ICIs 的耐药性。

血管生成发生于许多生理病理过程中（如伤口愈合、糖尿病相关性视网膜病变等），主要是指从现有血管再生成新的血管[50]，在肿瘤的增殖过程中需要营养物质和氧气等，均需要血管生成提供，并且要比正常血管的通透性更强，才能满足肿瘤的快速分裂和转移的需要[51]。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是血管生成的主要调节因子，是免疫抑制微环境的关键介质[52]，可通过阻断 T 细胞向肿瘤浸润、阻止 T 细胞向肿瘤转运、抑制免疫细胞亚群的诱导和增殖、抑制 DC 成熟等机制，使肿瘤细胞发生免疫逃逸，减弱抗肿瘤反应[53-54]。抗血管生成药可使血管正常化，正常的肿瘤血管网可直接缓

表 2　纳入关于抗菌药物影响 ICIs 疗效研究的基本特征

Tab 2　Basic features included in the study regarding the effect of ATB on the efficacy of ICIs

作者	肿瘤类型	主要治疗方案	样本量	使用抗菌药物（暴露组 *vs* 未暴露组）									
				时机	例数	常用抗菌药物类型	疗程 /d	mPFS/ 月	*P*	mOS/ 月	*P*	RR/% 或 PD/% 缓解率	*P*
Chalabi 等 [38]	NSCLC	阿替利珠单抗	757	（1）	169	①	8	—	—	8.5 *vs* 14.1	0.01	—	—
		多西他赛	755		202					9.4 *vs* 10.3	—		
Derosa 等 [39]	RCC	抗 PD-1 和 PD-L1	121	（2）	16	①②	≤ 7：50% ＞ 7：50%	1.9 *vs* 7.4	＜ 0.01	17.3 *vs* 30.6	0.03	PD：75 *vs* 22	＜ 0.01
	NSCLC	抗 PD-1 和 PD-L1	239		48		≤ 7：35% ＞ 7：13%	1.9 *vs* 3.8	0.03	7.9 *vs* 24.6	＜ 0.01	PD：52 *vs* 43	0.26
Routy 等 [40]	NSCLC、RCC、其他	抗 PD-1 和 PD-L1	249	（3）	69	①③	—	3.5 *vs* 4.1	0.017	11.5 *vs* 20.6	＜ 0.001	—	—
Zhao 等 [41]	NSCLC	抗 PD-1、抗 PD-1 ＋化疗		（1）	20	①	—	3.73 *vs* 9.63	＜ 0.0001	6.07 *vs* 21.87	0.0021	PD：35 *vs* 18	0.092
Ahmed 等 [45]	NSCLC、HCC	抗 PD-1 和 PD-L1	74	（4）	17	①④：12 人	8 ～ 14	—	0.012	6 *vs* 22.3	0.003	RR：29 *vs* 62	0.024
			109			⑤：5 人		—	—	—	—	RR：无影响	—
Mohiuddin 等 [46]	Melanoma	抗 PD-1	568	（5）	114	①	—	—	—	27.4 *vs* 43.7	0.01	—	—
Elkrief 等 [47]	Melanoma	抗 PD-1、抗 CTLA-4 ＋化疗	74	（1）	10	⑥	＞ 7：70% ＜ 7：30%	2.4 *vs* 7.3	0.01	10.7 *vs* 18.3	0.17	ORR：0 *vs* 34	＜ 0.01

注（Note）：（1）开始 ICI 治疗前后 30 d 内（30 days before and after the initiating ICI treatment）；（2）ICIs 开始治疗前 30 日内（30 days before the ICIs treatment）；（3）首次 ICI 治疗前 60 d 内或治疗后 30 d 内（60 days before or 30 days after the first ICI treatment）；（4）首次 ICI 治疗前、后 2 周内（2 weeks before and after the first ICI treatment）；（5）首次 ICI 治疗前 3 个月内（3 months before the first ICI treatment）；①*β* 内酰胺类，大多数为第三、四代头孢菌素、喹诺酮类（*β* lactams，mostly the third and fourth generation cephalosporins or quinolones）；② 四环素类（tetracyclines）③ 大环内酯类（macrolides）；④ 美罗培南（meropenem）；⑤ 万古霉素、利奈唑胺（vancomycin，linezolid）；⑥*β* 内酰胺类 ± 酶抑制剂（*β* lactams with or without enzyme inhibitors）。

解缺氧，增加免疫细胞的浸润和活化，使肿瘤微环境由免疫抑制转变为免疫支持 [8-9，55]。

3.2　抗血管生成药对免疫疗效的影响

3.2.1　临床前研究　抗血管生成药可刺激免疫反应，早就有研究发现，多靶点酪氨酸激酶抑制剂（TKI）舒尼替尼可以抑制晚期荷瘤小鼠中 PD-L1 的表达，并显著增加 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞浸润肿瘤细胞，减少 Tregs 的数量 [53，56]，这能增强免疫疗效；随后，Wu 等 [57] 验证了抗 PD-L1 联合舒尼替尼能有效延长肾肿瘤小鼠的生存期。Voron 等 [58] 也报道了 VEGF 可以通过激活细胞膜上受体信号通路来上调 PD-1、CTLA-4 等免疫检查点的表达，因此抗 PD-1 联合抗 VEGF 治疗能有效阻断 PD-1/PD-L1 轴，协同抑制肿瘤生长，特别是对于 VEGF 分泌过多的肿瘤，如结肠癌、肾癌、乳腺癌、肺癌等；Yasuda 等 [59] 研究显示，在结肠腺癌小鼠中观察到抗 PD-1 和抗血管内皮生长因子受体 2（VEGFR2）双重阻断诱导的协同作用，显著抑制了肿瘤的生长，且没有增加明显的毒性。

3.2.2　临床研究　目前已有多项临床研究表明，抗血管生成药联合 ICIs 具有协同抗肿瘤作用（见表 3）。Checkmate012 研究结果显示，接受纳武利尤单抗＋贝伐单抗治疗的晚期 NSCLC 患者较纳武利尤单抗单药治疗患者的 PFS 和 OS 延长，且安全可耐受，出现≥ 3 级 irAEs 的频率较低 [60]。IMpower150 研究也表明了，接受阿替利珠单抗联合贝伐珠单抗联合化疗的 NSCLC 患者与接受贝伐珠单抗联合化疗的患者相比，PFS 和 OS 延长，临床获益增加，两组不良反应无明显差别 [26]。在 TASUKI-52 研究中也验证了 ICI 联合抗血管生成药的协同作用，即接受纳武利尤单抗联合贝伐珠单抗和化疗的晚期非鳞 NSCLC 患者较安慰剂联合贝伐珠单抗和化疗患者 PFS 显著获益，OS 有延长趋势，两组不良反应发生率相似 [62]。

3.3 小结

抗血管生成通过增加抗肿瘤免疫细胞比例，降低免疫检查点表达，阻断负性免疫信号，促进血管正常化等机制与 ICIs 联合可协同促进抗肿瘤治疗并恢复免疫支持微环境。两者联用并未明显增加不良反应，且有协同作用，相关研究见表 3。目前免疫治疗联合抗血管生成联合化疗作为一线方案写入 NSCLC 指南，而在一些肿瘤的后线治疗无标准方案时 ICIs 联合抗血管生成也有良好的效果 [62]。

表 3　关于纳入 ICIs 联合抗血管生成药研究的基本特征

Tab 3　Basic characteristics of incorporation into ICIs combined with antiangiogenic drug study

研究名称	肿瘤类型	总样本量 /*n*	治疗方案	例数 /*n*	ORR/%	mPFS/ 月	*P*	mOS/ 月	*P*
Checkmate012[60]	非鳞 NSCLC	33	纳武单抗＋贝伐珠单抗	12	8	9.3	—	—	—
			纳武单抗	13	10	5.3	—	—	—
IMpower150[26]	NSCLC	2166	ABCP	400	63.5	8.3	＜ 0.001	19.2	0.02
			BCP	400	48.0	6.8		14.7	
TASUKI-52[61]	非鳞 NSCLC	550	纳武利尤单抗＋贝伐珠单抗＋卡铂＋紫杉醇	275	61.5	12.1	＜ 0.001	NA	0.0135
			安慰剂＋贝伐珠单抗＋卡铂＋紫杉醇	275	50.5	8.1		24.7	

注（Note）：ABCP：阿替利珠单抗＋贝伐珠单抗＋卡铂＋紫杉醇（attilizumab ＋ bevarizumab ＋ carboplatin ＋ paclitaxel）；BCP：贝伐珠单抗＋卡铂＋紫杉醇（bevarizumab ＋ carboplatin ＋ paclitaxel）；—：未提供（not available）；NA：未达到（not arrived）。

4 结论

随着免疫疗法广泛成为各种晚期癌症的治疗标准，联合用药可能会改变其抗肿瘤作用，如在免疫治疗早期应用糖皮质激素会损害免疫疗效，且糖皮质激素使用原因不同，疗效有差异，当糖皮质激素用于处理 irAEs 时对免疫疗效影响不明显，但当糖皮质激素用以缓解肿瘤相关症状时与较差的临床结果相关；恶性肿瘤患者常伴有感染，通常需使用抗菌药物治疗，这可能导致患者肠道菌群失调，因其恢复需要较长时间继而影响免疫疗效；而抗血管生成药与 ICIs 联用能相互促进，克服 ICIs 治疗后的耐药性和改善患者预后，提高抗肿瘤效果，因此，在临床工作中，要充分权衡 ICIs 联合用药的利弊，尽可能使免疫疗效获益最大化。

参考文献

[1] Dermani FK，Samadi P，Rahmani G，et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint：potential target for cancer therapy [J]. J Cell Physiol，2019，234（2）：1313-1325.

[2] Pardoll D. Cancer and the immune system：basic concepts and targets for intervention [J]. Semin Oncol，2015，42（4）：523-538.

[3] Chen DS，Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. Nature，2017，541（7637）：321-330.

[4] Wang H，Zhou J，Guo X，et al. Use of glucocorticoids in the management of immunotherapy-related adverse effects [J]. Thorac Cancer，2020，11（10）：3047-3052.

[5] Chen X，Oppenheim JJ，Winkler-Pickett RT，et al. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3$^+$CD4$^+$CD25$^+$T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE [J]. Eur J Immunol，2006，36（8）：2139-2149.

[6] Ianiro G，Tilg H，Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota：between good and evil [J]. Gut，2016，65（11）：1906-1915.

[7] Botticelli A，Zizzari I，Mazzuca F，et al. Cross-talk between microbiota and immune fitness to steer and control response to anti PD-1/PDL-1 treatment [J]. Oncotarget，2017，8（5）：8890-8899.

[8] Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited：from starving tumors to alleviating hypoxia [J]. Cancer Cell，2014，26（5）：605-622.

[9] Fukumura D，Kloepper J，Amoozgar Z，et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics：opportunities and challenges [J]. Nat Rev Clin Oncol，2018，15（5）：325-340.

[10] Marinelli D，Giusti R，Mazzotta M，et al. Palliative-and non-palliative indications for glucocorticoids use in course of immune-checkpoint inhibition. Current evidence and future perspectives [J]. Crit Rev Oncol Hematol，2021，157：103176.

[11] Meriggi F，Zaniboni A. Antibiotics and steroids，the double enemies of anticancer immunotherapy：a review of the literature [J]. Cancer Immunol Immunother，2021，70（6）：1511-1517.

[12] Oppong E，Cato AC. Effects of glucocorticoids in the immune system [J]. Adv Exp Med Biol，2015，872：217-233.

[13] Giles AJ，Hutchinson MND，Sonnemann HM，et al. Dexamethasone-induced immunosuppression：mechanisms and implications for immunotherapy [J]. J Immunother Cancer，2018，6（1）：51.

[14] Arbour KC，Mezquita L，Long N，et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with

non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol，2018，36（28）：2872-2878.

[15] Fucà G，Galli G，Poggi M，et al. Modulation of peripheral blood immune cells by early use of steroids and its association with clinical outcomes in patients with metastatic non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors [J]. ESMO Open，2019，4（1）：e000457.

[16] Skribek M，Rounis K，Afshar S，et al. Effect of corticosteroids on the outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with immune-checkpoint inhibitors [J]. Eur J Cancer，2021，145：245-254.

[17] De Giglio A，Mezquita L，Auclin E，et al. Impact of intercurrent introduction of steroids on clinical outcomes in advanced non-small-cell lung cancer（NSCLC）patients under immune-checkpoint inhibitors（ICI）[J]. Cancers（Basel），2020，12（10）：2827.

[18] Scott SC，Pennell NA. Early use of systemic corticosteroids in patients with advanced NSCLC treated with nivolumab [J]. J Thorac Oncol，2018，13（11）：1771-1775.

[19] Chasset F，Pages C，Biard L，et al. Single-center study under a French Temporary Authorization for Use（TAU）protocol for ipilimumab in metastatic melanoma：negative impact of baseline corticosteroids [J]. Eur J Dermatol，2015，25（1）：36-44.

[20] Ricciuti B，Dahlberg SE，Adeni A，et al. Immune checkpoint inhibitor outcomes for patients with non-small-cell lung cancer receiving baseline corticosteroids for palliative versus nonpalliative indications [J]. J Clin Oncol，2019，37（22）：1927-1934.

[21] Weber JS，Hodi FS，Wolchok JD，et al. Safety profile of nivolumab monotherapy：a pooled analysis of patients with advanced melanoma [J]. J Clin Oncol，2017，35（7）：785-792.

[22] Horvat TZ，Adel NG，Dang TO，et al. Immune-related adverse events，need for systemic immunosuppression，and effects on survival and time to treatment failure in patients with melanoma treated with ipilimumab at memorial sloan kettering cancer center [J]. J Clin Oncol，2015，33（28）：3193-3198.

[23] Downey SG，Klapper JA，Smith FO，et al. Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade [J]. Clin Cancer Res，2007，13（22 Pt 1）：6681-6688.

[24] Petrelli F，Signorelli D，Ghidini M，et al. Association of steroids use with survival in patients treated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. Cancers（Basel），2020，12（3）：546.

[25] 杜成，金山琇，谢晓冬 . 从微观到宏观漫谈肿瘤免疫检查点抑制剂疗效的影响因素 [J]. 中国癌症防治杂志，2021，13（6）：575-584.

[26] Socinski MA，Jotte RM，Cappuzzo F，et al. IMpower150 study group. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC [J]. N Engl J Med，2018，378（24）：2288-2301.

[27] Paz-Ares L，Vicente D，Tafreshi A，et al. A randomized，placebo-controlled trial of pembrolizumab plus chemotherapy in patients with metastatic squamous NSCLC：protocol-specified final analysis of KEYNOTE-407 [J]. J Thorac Oncol，2020，15（10）：1657-1669.

[28] Garassino MC，Gadgeel S，Esteban E，et al. Patient-reported outcomes following pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum in patients with previously untreated，metastatic，non-squamous non-small-cell lung cancer（KEYNOTE-189）：a multicent-re，double-blind，randomised，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2020，21（3）：387-397.

[29] Okoye IS，Xu L，Walker J，et al. The glucocorticoids prednisone and dexamethasone differentially modulate T cell function in response to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immune checkpoint blockade [J]. Cancer Immunol Immunother，2020，69（8）：1423-1436.

[30] 王汉萍，周佳鑫，郭潇潇，等 . 免疫检查点抑制剂相关毒副作用管理之激素的使用 [J]. 中国肺癌杂志，2019，22（10）：615-620.

[31] Alexander JL，Wilson ID，Teare J，et al. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2017，14（6）：356-365.

[32] Wang Y，Wiesnoski DH，Helmink BA，et al. Fecal microbiota transplantation for refractory immune checkpoint inhibitor-associated colitis [J]. Nat Med，2018，24（12）：1804-1808.

[33] 章必成，彭敏，宋启斌 . 肠道微生物群与免疫治疗疗效的关系 [J]. 肿瘤学杂志，2018，24（11）：1056-1059.

[34] Zitvogel L，Ma Y，Raoult D，et al. The microbiome in cancer immunotherapy：diagnostic tools and therapeutic strategies [J]. Science，2018，359（6382）：1366-1370.

[35] Zitvogel L，Daillère R，Roberti MP，et al. Anticancer effects of the microbiome and its products [J]. Nat Rev Microbiol，2017，15（8）：465-478.

[36] Lange K，Buerger M，Stallmach A，et al. Effects of antibiotics on gut microbiota [J]. Dig Dis，2016，34（3）：260-268.

[37] Jakobsson HE，Jernberg C，Andersson AF，et al. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome [J]. PLoS One，2010，5（3）：e9836.

[38] Chalabi M，Cardona A，Nagarkar DR，et al. Efficacy of chemotherapy and atezolizumab in patients with non-small-cell lung cancer receiving antibiotics and proton pump inhibitors：pooled post hoc analyses of the OAK and POPLAR trials [J]. Ann Oncol，2020，31（4）：525-531.

[39] Derosa L，Hellmann MD，Spaziano M，et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol，2018，29（6）：1437-1444.

[40] Routy B，Le Chatelier E，Derosa L，et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science，2018，359（6371）：91-97.

[41] Zhao S，Gao G，Li W，et al. Antibiotics are associated with attenuated efficacy of anti-PD-1/PD-L1 therapies in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2019，130：10-17.

[42] Lalani AA，Xie W，Braun DA，et al. Effect of antibiotic use on outcomes with systemic therapies in metastatic renal cell carcinoma [J]. Eur Urol Oncol，2020，3（3）：372-381.

[43] Lurienne L，Cervesi J，Duhalde L，et al. NSCLC immunotherapy efficacy and antibiotic use：a systematic review and meta-analysis [J]. J Thorac Oncol，2020，15（7）：1147-1159.

[44] 尹月，邱新野，赵志刚，等 . 抗菌药物对 PD-1/PD-L1 抗体免疫治疗有效性影响的研究 [J]. 实用药物与临床，2021，24（3）：267-269.

[45] Ahmed J，Kumar A，Parikh K，et al. Use of broad-spectrum antibiotics impacts outcome in patients treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Oncoimmunology，2018，7（11）：e1507670.

[46] Mohiuddin JJ，Chu B，Facciabene A，et al. Association of antibiotic exposure with survival and toxicity in patients with melanoma receiving immunotherapy [J]. J Natl Cancer Inst，2021，113（2）：162-170.

[47] Elkrief A，Raichani LEl，Richard C，et al. Antibiotics are associated with decreased progression-free survival of advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Oncoimmunology，2019，8（4）：e1568812.

[48] Cortellini A，Ricciuti B，Facchinetti F，et al. Antibiotic-exposed patients with non-small-cell lung cancer preserve efficacy outcomes following first-line chemoimmunotherapy [J]. Ann Oncol，2021，32（11）：1391-1399.

[49] Galluzzi L，Humeau J，Buqué A，et al. Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors [J]. Nat Rev Clin Oncol，2020，17（12）：725-741.

[50] Ramjiawan RR，Griffioen AW，Duda DG. Anti-angiogenesis for cancer revisited：is there a role for combinations with immunotherapy [J]. Angiogenesis，2017，20（2）：185-204.

[51] Kerbel RS. Tumor angiogenesis [J]. N Engl J Med，2008，358（19）：2039-49.

[52] Nagy JA，Dvorak AM，Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis [J]. Annu Rev Pathol，2007，2：251-75.

[53] Finke JH，Rini B，Ireland J，et al. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients [J]. Clin Cancer Res，2008，14（20）：6674-6682.

[54] Meder L，Schuldt P，Thelen M，et al. Combined VEGF and PD-L1 blockade displays synergistic treatment effects in an autochthonous mouse model of small cell lung Cancer [J]. Cancer Res，2018，78（15）：4270-4281.

[55] Huang Y，Yuan J，Righi E，et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherap-y [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（43）：17561-17560.

[56] Ko JS，Zea AH，Rini BI，et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients [J]. Clin Cancer Res，2009，15（6）：2148-2157.

[57] Wu FTH，Xu P，Chow A，et al. Pre-and post-operative anti-PD-L1 plus anti-angiogenic therapies in mouse breast or renal cancer models of micro-or macro-metastatic disease [J]. Br J Cancer，2019，120（2）：196-206.

[58] Voron T，Colussi O，Marcheteau E，et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on $CD8^+$ T cells in tumors [J]. J Exp Med，2015，212（2）：139-148.

[59] Yasuda S，Sho M，Yamato I，et al. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2（VEGFR2）induces synergistic anti-tumour effect in vivo [J]. Clin Exp Immunol，2013，172（3）：500-506.

[60] Manegold C，Dingemans AC，Gray JE，et al. The potential of combined immunotherapy and antiangiogenesis for the synergistic treatment of advanced NSCLC [J]. J Thora-c Oncol，2017，12（2）：194-207.

[61] Sugawara S，Lee JS，Kang JH，et al. Nivolumab with carboplatin，paclitaxel，and bevacizumab for first-line treatment of advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol，2021，32（9）：1137-1147.

[62] Zhang X，Zeng L，Li Y，et al. Anlotinib combined with PD-1 blockade for the treatment of lung cancer：a real-world retrospective study in China [J]. Cancer ImmunolImmunother，2021，70（9）：2517-2528.

（收稿日期：2022-02-25；修回日期：2022-07-13）

胰腺癌的药物再利用

骆鸿仪，江经纬*（中国药科大学，新药筛选中心，江苏省药效研究与评价服务中心，南京　210009）

摘要：胰腺癌是一种高度致命的消化道肿瘤，目前的治疗手段包括手术、传统化疗、靶向疗法等，但治疗效果仍不明显，而新药的开发时间和资金在大幅增加。药物再利用是一种以已知适应证的药物为前提，重新应用于其他疾病治疗的方法。重新利用的药物具有可获得的药理、毒理相关信息和可接受的价格，能以较快的速度进入临床。本文将简要介绍胰腺癌的治疗现状以及一些有希望的潜在候选药物，并进一步讨论药物再利用的障碍和建议，以期为胰腺癌治疗药物的发现提供新的思路。

关键词：胰腺癌；药物再利用；非癌症治疗

中图分类号：R962　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1875-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.028

Drug repurposing in pancreatic cancer

LUO Hong-yi, JIANG Jing-wei* (*Screening Center for New Drugs*, *Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Pancreatic cancer (PC) is a highly lethal tumor in the digestive tract. The current treatment methods include surgery, traditional chemotherapy, targeted therapies and so on, but the therapeutic effect is still not satisfactory. However, the time and funding for the development of new drugs are greatly increased. Drug repurposing is to repurpose drugs with known indications to other diseases. With available pharmacological and toxicological information and an acceptable price, some drugs can be used in the clinic quickly. In this review, the current situation of the treatment of pancreatic cancer and some potential drugs were briefly described, and the obstacles and suggestions of drug repurposing were discussed to provide new drugs for pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; drug repurposing; non-cancer therapy

胰腺癌（pancreatic cancer，PC）是一种高致命性的癌症，预计到 2025 年，胰腺癌将超过乳腺癌成为癌症死亡的第三大原因 [1]。手术切除是治愈胰腺癌的唯一手段，但仅 10% 左右的病例能从中获益。对于转移性胰腺癌患者来说，化疗是常用的治疗手段，但化疗伴随着严重的不良反应。研发新药的成本巨大，需要历经数十年时间，耗费超十亿美元 [2]。因此利用已确定适应证的药物用于抗肿瘤药物的研发在临床药理学中变得越来越重要。这些药物已经进行了安全性、毒性试验，不良反应较少，患者的预后期望得到改善，同时，它们能以较快的速度和较少的成本进入临床。随着人们对肿瘤分子发病机制了解的加深，以及生物信息技术的不断进步，药物再利用正被不断挖掘并广泛应用。本文就胰腺癌的潜在候选药物进行简要介绍。

1　胰腺癌的现状以及困境

胰腺癌是如今最常见的消化道肿瘤之一，发病率和病死率相近，是世界上恶性程度极高的肿瘤，主要类型为胰腺导管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma，PDAC）[3]，因此，本文将以 PDAC 为对象进行介绍。

PDAC 的发生涉及较多因素，其中遗传突变引起的 PDAC 病例占所有病例的 10%，其余病例的发生主要与肥胖、糖尿病、饮食、酗酒、慢性胰腺炎等多种外在因素有关 [4]。在分子机制方面，致癌 *KRAS* 突变、肿瘤抑制基因 *CDKN2A*、*TP53* 和 *Smad4* 的失活是主要原因 [5]。手术是治愈 PDAC 的唯一手段，但胰腺位于机体解剖学深部而不易察觉其早期特征，当患者确诊时大多已处于癌症晚期且肿瘤细胞发生了转移，只有

作者简介：骆鸿仪，女，硕士研究生，主要从事分子 / 肿瘤药理学研究，email：lhyyy_sun@163.com　*通信作者：江经纬，男，副研究员，主要从事分子 / 肿瘤药理学研究，email：jiangjingwei@126.com

15% ～ 20% 的患者符合手术切除的条件 [6]。即使进行外科切除，患者的长期生存仍不容乐观。对大部分的 PDAC 患者来说，化疗是其为数不多的选择。吉西他滨是 PDAC 一线化疗的基础，但易产生耐药性。近年来发展出了作为治疗转移性胰腺癌的金标准的联合方案（FOLFIRINOX）：5-氟尿嘧啶（5-FU）、亚叶酸钙、伊立替康和奥沙利铂 [7]，但伴随的不良反应也多。利用下一代测序（NGS）技术 [8] 可识别肿瘤中的异常突变，开发选择性针对这些异常突变靶点的药物。然而，尽管在多种肿瘤中显示出疗效，靶向疗法未能明显改善晚期 PDAC 的预后，这可能涉及到 PDAC 间质的复杂性和细胞群体的高度异质性 [9]。此外，近年来免疫疗法被认为是治疗癌症的一种有希望的手段，已在多种癌症中显示出疗效，但是在大多数 PDAC 患者中并未表现出显著的临床活性，主要原因在于 PDAC 存在免疫异质性的肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）以及异质致密基质，阻碍了效应免疫细胞的浸润 [10]。

2　药物再利用及其优势

药物再利用是一种以现有已知适应证的药物为基础，寻找新的适应证的创新方式。被重新利用的药物有着大量的非临床和临床数据，相比于从头开发新药，可加快临床评估和批准的速度；并且，许多制药或生物公司建立了庞大的化合物库，囊括了大量的专利内或专利外的药物，使得候选药物具有广泛的可获得性；部分具有再利用潜力的药物已不受专利保护而存在着商业竞争情况，使药物的价格处于大多数患者能接受的较低水平。因此，药物再利用有希望打破当前药物开发困难的局面。

3　胰腺癌的药物再利用

目前，已经有许多研究人员试图评估再利用候选药物在胰腺癌中的作用和潜力。这些药物可针对胰腺癌的不同靶点或通过不同作用机制发挥抗肿瘤作用，如表 1 所示，本文将重点介绍以下药物的临床前研究，同时，使用 ClinicalTrials.gov 数据库搜索发布至 2022 年 2 月 10 日的相关药物在胰腺癌的临床试验。

表 1　胰腺癌的非癌症重利用候选药物

Tab 1　Repurposed non-cancer therapeutic drugs for pancreatic cancer

药物	药物作用	作用机制	文献
匹莫齐特 / 氟哌啶醇	抗精神病药	阻断多巴胺受体 D2（DRD2）、内质网应激、细胞周期阻滞	[11]
五氟利多 / 三氟拉嗪	抗精神病药	引起自噬，激活蛋白磷酸酶 2A（PP2A）	[12-14]
阿司匹林	非甾体抗炎药	抑制糖原合酶激酶 -3β（GSK-3β），抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路，抑制表皮生长因子受体（EGFR），抑制神经氨酸酶 -1（neu-1）	[15-20]
塞来昔布	非甾体抗炎药	抑制成纤维细胞生长因子 2（FGF-2），下调 STAT3/NF-κB，抑制 neu-1	[20-23]
二甲双胍	口服降糖药	上调 miR-663，抑制促纤维增生反应和 PI3K/AKT/mTOR 通路，激活 STING/IRF3/IFN-β 通路	[24-27]
噻唑烷二酮类	口服降糖药	抑制白细胞介素 8（IL-8）和环氧合酶 2（COX-2）表达，影响基质金属蛋白酶和纤溶酶原系统	[28-29]
伊曲康唑	抗真菌药	线粒体膜去极化和生成活性氧，抑制上皮 - 间质转化（EMT）和 TGF-β/Smad2/3 通路	[30-31]
莫能菌素	抗菌药物	抑制 E2F/DP1、STAT1/2、NF-κB、AP-1 和 ELK-1/SPF 通路等	[32]
多西环素	抗菌药物	诱导凋亡，化学增敏，抑制癌症干细胞	[33-36]
沙利霉素	抗菌药物	化学增敏	[37]
他汀类	降脂药	抑制 RhoA 易位，诱导凋亡，抑制癌症干细胞	[38-41]
帕苯达唑	苯并咪唑类驱虫药	DNA 损伤和细胞周期阻滞	[42]
阿苯达唑	苯并咪唑类驱虫药	抑制增殖、诱导凋亡	[43]
芬地林	抗心绞痛药	诱导 K-Ras 错误定位，干扰 *c-Myc* 和 *CD44* 基因的表达	[44-45]
巴多昔芬	调节激素药	抑制 GP130/STAT3 信号通路	[46-47]
地拉罗司	口服铁螯合剂	阻滞细胞周期、诱导凋亡，抑制 Rac1 和 Cdc42 表达，抑制核糖核苷还原酶（RR）	[48-50]
氯喹 / 羟氯喹	抗疟疾药	化学增敏	[51-52]

3.1　抗精神病药物

抗精神病药物主要用于治疗精神分裂症、焦虑或抑郁等方面的精神疾病。除了传统适应证外，对于某些癌症，精神分裂症患者的癌症发病率低于一般人群 [53]，这可能与抗精神病药物的使用有关。

在临床前研究中，多种抗精神病药物被证明具有抗胰腺癌活性。Jandaghi 等 [11] 发现匹莫齐特可诱导 PDAC 细胞发生内质网应激和细胞周期阻滞，引起增殖和迁移的抑制，主要原因是匹莫齐特阻断了多巴胺受体 D2（dopamine receptor D2，DRD2），而 DRD2 在 PDAC 中表达上调。作为另一种 DRD2 受体拮抗剂，氟哌啶醇显示出与匹莫齐特相同的抗肿瘤效果。在 PDAC 原位模型中，氟哌啶醇显著减少了肿瘤体积、肿瘤重量及其转移 [11]。三氟拉嗪和五氟利多同样可诱导内质网应激，引起自噬介导的细胞凋亡 [12-13]。Chien 等 [14] 发现，在暴露于五氟利多的细胞中，细胞生长相关蛋白受到抑制，蛋白磷酸酶 2A（protein phosphatase 2A，PP2A）的酶活性增加，丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶（serine/threonine-protein kinase，

AKT）的磷酸化水平减少。目前，上述药物尚未在 PDAC 的临床试验中进行评估。

3.2 非甾体抗炎药

非甾体抗炎药主要用于治疗疼痛、发烧、关节炎等。长期使用非甾体抗炎药可能降低结直肠癌[54]、食管癌[55]、乳腺癌[56]和肺癌[57]的发病率。

阿司匹林作为一种传统的非甾体抗炎药，已被广泛应用于抗肿瘤研究。对 12 项涉及 4748 例胰腺癌病例研究的报道进行系统性回顾发现，阿司匹林的使用频率和持续时间可能对胰腺癌的发病率具有重要影响[58]。Ou 等[15]将人胰腺癌细胞系 Panc-1 和 Capan-1 暴露于阿司匹林中，细胞增殖受到抑制的同时吉西他滨的抗存活作用显著加强，机制可能与抑制糖原合酶激酶 3β（GSK-3β）有关。此外，阿司匹林通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路引起细胞凋亡[16-17]。体内实验证明阿司匹林通过抑制表皮生长因子受体（EGFR）的激活减少小鼠异种移植瘤的生长以及防止胰腺癌转基因模型小鼠胰腺癌的发生[18-19]，提示阿司匹林对 PDAC 有较强的化学预防作用。目前，一项前瞻性临床研究（NCT04245644）试图评估阿司匹林作为 PDAC 患者化学预防药物的可行性，但结果尚未发表。

除了阿司匹林之外，塞来昔布在 PDAC 中表现出临床前和临床活性。Li 等[21]发现塞来昔布可减少细胞中过表达的成纤维细胞生长因子 2（FGF-2）及其受体的表达，对抗 FGF-2 的促生长作用。塞来昔布下调异常激活的 STAT3/NF-κB 信号通路，抑制细胞的增殖、迁移和侵袭[22-23]。Qorri 等[20]首次证明了阿司匹林和塞来昔布治疗胰腺癌的新机制，即通过特异性抑制哺乳动物神经氨酸酶 -1（neu-1）发挥抗肿瘤活性。然而，在Ⅱ期临床试验中，两项临床试验出现了不一致的疗效。一项临床试验（NCT00068432）显示，吉西他滨和塞来昔布的组合是有临床益处的[59]。另一项临床试验（NCT00176813）结果则显示，将塞来昔布添加到常规化疗药物的组合中并未增加晚期胰腺癌患者化疗的疗效，或许可以考虑将塞来昔布与新型靶向药物组合进行评估[60]。Ⅲ期临床试验（NCT00486460）中，吉西他滨、姜黄素联合塞来昔布正在晚期或无法进行手术的胰腺癌患者中进行评估。

3.3 口服降糖药物

二甲双胍是一种亲脂性双胍类药物，抑制肝脏糖异生并改善外周葡萄糖的利用，其具有安全性、有效性和耐受性，已成为目前广泛应用的口服降糖药物之一，被公认为 2 型糖尿病患者控制血糖的一线药物。除了降糖作用外，二甲双胍已在多种肿瘤中被证明具有抗肿瘤活性。二甲双胍发挥抗肿瘤作用的机制包括抑制哺乳动物雷帕霉素靶标复合物（mTORC）、激活 AMP 活化蛋白激酶（AMPK）、抑制活性氧的生成、降低血清胰岛素的水平、下调线粒体内糖异生等。有关 PDAC 的临床前研究发现，二甲双胍通过上调 miR-663 的表达、抑制促纤维增生反应和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路增强吉西他滨的体内外抗肿瘤活性[24-26]，表现出协同效应。此外，二甲双胍激活 STING/IRF3/IFN-β 通路，促进 TME 中 T 细胞的浸润，抑制肿瘤的生长[27]。Li 等[61]的病例对照研究显示，与未服用二甲双胍的患者相比，使用二甲双胍的糖尿病患者患胰腺癌的风险显著降低。但是Ⅱ期临床试验（NCT01210911）表明，常规抗糖尿病剂量的二甲双胍不能改善接受吉西他滨和厄洛替尼治疗的晚期胰腺癌患者的预后[62]。临床试验（NCT01167738）结果也表明，使用糖尿病常规剂量的二甲双胍不能改善接受标准全身治疗的转移性胰腺癌患者的预后[63]，但仍不能否定二甲双胍在胰腺癌治疗中的作用，应进一步改善肿瘤组织中二甲双胍的浓度以及肿瘤的氧化磷酸化系统，优化患者的治疗效果。

噻唑烷二酮类（TZD）是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）的合成配体，如吡格列酮和罗格列酮，它们是一类新的口服抗糖尿病药物，可减轻与人类肥胖、高血压和葡萄糖耐量降低相关的胰岛素抵抗。已经发现 TZD 对 PDAC 具有抑增殖和抗侵袭作用[28-29]，机制涉及白细胞介素 8（IL-8）和环氧合酶 2（COX-2）的表达以及基质金属蛋白酶和纤溶酶原激活系统。正在进行的Ⅱ期临床试验（NCT01838317），在胰腺癌的标准化疗中加入吡格列酮，试图评估其是否影响肿瘤的大小、体重增加以及生活质量等，目前结果尚未发表。

3.4 抗真菌类药物

伊曲康唑是美国食品药品监督管理局批准的传统抗真菌药物，通过抑制羊毛甾醇 14α- 去甲基化酶降低麦角甾醇的合成，破坏真菌膜。伊曲康唑的抗肿瘤机制主要涉及逆转 P- 糖蛋白介导的肿瘤细胞化疗耐药、抑制血管生成、诱导自噬以及抑制 Hedgehog 通路等。

2015 年，一项回顾性研究发现，一名被认为是不可切除的发展为Ⅲ期的胰腺癌患者接受了 9 个月的伊曲康唑治疗后，胰腺肿瘤可被切除并在几年里没有出现胰腺癌转移或复发[64]；同年，通过回顾接受一线或二线化疗，随后进行伊曲康唑治疗的胰腺癌患者病历发现，伊曲康唑联合化疗有望改善患者的总生存期[65]。临床前研究显示伊

曲康唑通过使线粒体膜去极化和生成活性氧诱导细胞凋亡[30]。伊曲康唑还可通过抑制 PDAC 中的上皮 - 间质转化（EMT）和 TGF-β/Smad2/3 信号传导过程，抑制细胞的迁移和侵袭[31]。

3.5 抗菌药物

已经有多种具有抗肿瘤活性的抗菌药物被注册为抗肿瘤治疗药物，如放线菌素、博来霉素和丝裂霉素等。目前又发现了新的具有抗肿瘤活性的抗菌药物，如莫能菌素、多西环素和沙利霉素等。Wang 等[32]证明莫能菌素抑制细胞增殖和迁移并诱导对吉西他滨耐药的人 PDAC 细胞死亡，与吉西他滨或厄洛替尼联用发挥协同作用，机制是抑制 E2F/DP1、STAT1/2、NF-κB、AP-1 和 ELK-1/SPF 通路以及 EGFR 和 RAF 等的表达。多西环素可诱导细胞凋亡[33-34]，增强吉西他滨和 5-氟尿嘧啶的活性[35-36]，抑制 PDAC 的癌症干细胞样特性和胰腺癌的生长[36]。沙利霉素通过抑制多药耐药，调节 AKT、Hedgehog 和 Notch 信号通路参与癌症进展，同样可以增强 PDAC 中化疗药物的活性[37]，此外，值得注意的是，自噬抑制剂使 PDAC 细胞对沙利霉素更敏感[66]。综上，这三种药物均在临床前研究中显示出了与其他化疗药物联用治疗 PDAC 患者的潜力。目前已有临床试验（NCT02775695）将多西环素添加到常规化疗药物的组合中，评估其对可切除 PDAC 患者癌症干细胞的临床疗效。

3.6 他汀类药物

他汀类药物是 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶的竞争性抑制剂，常用作降脂药物，其通过降低胆固醇的从头合成和诱导低密度脂蛋白受体表达的变化降低血浆胆固醇的水平。除了降脂、调节免疫的作用外，他汀类药物可能因改变血管生成、抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡而具有抗肿瘤活性。

体外研究表明，高浓度的他汀类药物诱导 PDAC 细胞系的生长抑制，且细胞周期和 DNA 复制信号通路中的基因表达均有所减少[67]。他汀类药物通过抑制表皮生长因子（EGF）诱导的 RhoA 易位减少细胞的侵袭[38]，与其他药物联用显示出增强的抗肿瘤效果，如阿托伐他汀、塞来昔布和替比法尼联合使用强烈诱导细胞凋亡和抑制体内肿瘤的生长[39]，并在一定程度上抑制胰腺癌的癌症干细胞[40]。Chen 等[41]证明了匹伐他汀和吉西他滨的组合通过诱导凋亡和坏死引起细胞死亡。2015 年，一项临床病例对照研究显示，他汀类药物的使用与胰腺癌的发病率存在负相关[68]。但在Ⅱ期临床试验（NCT00944463）中，晚期胰腺癌患者使用吉西他滨及辛伐他汀未获得临床益处[69]。前瞻性临床试验（NCT04245644）则正在评估他汀类药物与其他药物组合对 PDAC 患者总生存率的影响，结果尚未发布。

3.7 苯并咪唑类驱虫药

基于苯并咪唑的化合物是广泛使用的驱虫药物，对哺乳动物毒性低而对多种蠕虫有效。常见的苯并咪唑类药物包括阿苯达唑、甲苯咪唑、帕苯达唑和氟苯达唑等。这些药物广泛应用于人类和动物，作为肠道寄生虫安全有效的治疗方法之一。

多项研究表明，苯并咪唑类驱虫药在卵巢癌[70]、前列腺癌[71]、乳腺癌[72]等疾病中具有活性。Florio 等[42]首次提供帕苯达唑作为单一药物或与吉西他滨联合使用治疗 PDAC 的证据，机制涉及 DNA 损伤、微观组织改变和细胞周期阻滞等。此外，将 6 种苯并咪唑类药物暴露于包括胰腺癌细胞株在内的几种肿瘤细胞中，IC_{50} 值范围为 0.01 ～ 3.26 μmol • L^{-1}，对 AsPC-1、BxPC-3 细胞的抑制率在 72% ～ 92%[73]。此外 Chen 等[43]除了证明阿苯达唑可抑制体外二维和三维模型中细胞的迁移，还发现其可减少体内肿瘤的生长。目前，尚需要临床试验进一步探究这些药物的临床活性。

3.8 其他

芬地林是一种钙通道阻滞剂，主要应用于抗心绞痛。在胰腺癌中，抑制钙的内流可能阻止肿瘤的生长[74]。研究人员发现芬地林显示出与阻断钙通道无关的抑癌活性，即芬地林诱导 K-Ras 的错误定位从而抑制 Raf-MAPK 和 PI3K-AKT 信号传导[44]，或许可考虑将芬地林作为抗 Ras 治疗剂应用。此外，芬地林显示出化学增敏作用，除了影响 AKT 和 ERK 的激活，还干扰 PDAC 中 *c-Myc* 和 *CD44* 基因的表达，提示芬地林的使用可提高 PDAC 化疗药物的疗效[45]。

巴多昔芬是一种选择性雌激素调节剂，通常用于预防和治疗绝经后妇女骨质疏松症。IL-6/GP130/STAT3 信号通路在许多癌症中被频繁激活，在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用。巴多昔芬是一种新型的糖蛋白 130（GP130）抑制剂，抑制白细胞介素 6（IL-6）和白细胞介素 11（IL-11）介导的 GP130/STAT3 信号通路[46-47]。一项前瞻性临床试验（NCT04812808）试图评估除化疗外巴多昔芬治疗前后转移性 PDAC 患者转移活检的 GP130/STAT3 的通路情况，结果尚未发表。

由于需要快速增殖，肿瘤细胞对铁的需求量很高，抑制其对铁的吸收成为一种新的治疗策略。作为一种新型的口服铁螯合剂，地拉罗司具有治疗 PDAC 的潜力，其通过阻滞细胞周期、诱

导凋亡[48]以及抑制 Rac1 和 Cdc42 的表达[49]引起 PDAC 细胞增殖和迁移的抑制。此外，地拉罗司与吉西他滨联用通过抑制核糖核苷还原酶（ribonucleoside reductase，RR）显示出明显的抗肿瘤活性[50]，说明地拉罗司和吉西他滨的组合在临床治疗中可能有良好的疗效。

氯喹和羟氯喹是 4-氨基喹啉化合物，主要用于治疗疟疾、系统性红斑狼疮和类风湿关节炎。由于自噬的发生，PDAC 对化疗药物具有高度抗性，氯喹和羟氯喹作为一种自噬抑制剂，已在多个临床前研究中显示出增强化疗药物疗效的作用[51-52]。因此，已经进行临床试验评估氯喹或羟氯喹与标准化疗药物组合的疗效。Ⅰ期临床试验（NCT01777477）[75]表明，氯喹与吉西他滨的组合在治疗转移性或不可切除胰腺癌患者中具有良好的耐受性，临床显示出良好效果。其他几项临床试验（NCT04524702、NCT04669197、NCT01494155）正在进行，结果尚未发布。

4 药物再利用的挑战与建议

目前而言，多种药物已经被重新利用以应对多种疾病，药物再利用取得了令人瞩目的成功，但是这些成功并不能掩盖某些药物再利用过程中的障碍。研究药物再利用项目（REDO）所列的 72 种药物中的 190 项注册临床试验中，95% 由大学、医院、研究机构或非营利组织赞助，3% 由中小型制药公司赞助，2% 由政府赞助，仅仅只有 1% 由大型制药公司赞助[76]，说明药物再利用方面还亟需大量资金的投入。此外，如果药物新的适应证是未被报道的，则可以对此申请专利保护该药物再利用的医疗用途。然而，许多潜在的药物再利用已经在文献中被报道，不具备新颖性和创新性，对专利的申请造成了障碍。与此同时，在再利用药物的注册、报销和普遍实施等方面也存在着困难。目前的监管框架对于非营利性、学术界或公众参与药物再利用的研究开发考虑甚少，这些非营利性组织缺少再利用药物的注册、报销等档案所需具备的相关法律经验和财政资源[77]。

因此，需要加强学术界、生物技术公司、机构和行业之间的协作，促进医药界各团体、组织和企业的合作与交流，充分利用大型制药公司的资金、筛查技术和化合物库以及生物技术公司和学者在疾病生物学领域的宝贵知识和经验，扩大药物再利用的开发与应用。此外，需要根据情况的不同，建立相关机制，实施不同的财政激励措施，包括为新的适应证授予数据排他性和市场保护，大幅降低创新费用和成本[78]。

5 结语与展望

PDAC 是一种难治性的恶性癌症，临床上有效的药物并不多，且新药开发成本较高但成功率低。与之相比，药物再利用可以削减研究费用和整体开发时间，成为一种有前途的将有效药物快速带入临床的方法。本文描述了几种目前正在进行研究的药物，它们通过各种不同机制显示出对胰腺癌的抗肿瘤活性，而且大多数药物不是针对某一种分子的特异性靶向药物。对于具有高度异质性的胰腺癌来说，这种方法具有巨大的潜力。此外，为了增加药物再利用筛选中鉴定的药物应用于临床的机会，减少或延迟肿瘤耐药性的发展，可考虑药物联合治疗。与已知的抗肿瘤药物或具有不同作用机制的再利用药物联合治疗可能比单一疗法更有效。当然，从药物再利用筛选中发现的非癌症候选药物的分子作用机制往往不够详尽，还需要更多的相关研究才能将其带入临床。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Ekins S，Puhl AC，Zorn KM，et al. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development [J]. Nat Mater，2019，18（5）：435-441.

[3] Dhillon J，Betancourt M. Pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Monogr Clin Cytol，2020，26：74-91.

[4] Zhao Z，Liu W. Pancreatic cancer：a review of risk factors，diagnosis，and treatment [J]. Technol Cancer Res Treat，2020，19：1533033820962117

[5] Qian Y，Gong Y，Fan Z，et al. Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：130.

[6] Strobel O，Neoptolemos J，Jäger D，et al. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery [J]. Nat Rev Clin Oncol，2019，16（1）：11-26.

[7] Janssen QP，Buettner S，Suker M，et al. Neoadjuvant FOLFIRINOX in patients with borderline resectable pancreatic cancer：a systematic review and patient-level meta-analysis [J]. J Natl Cancer Inst，2019，111（8）：782-794.

[8] Singh RR. Next-generation sequencing in high-sensitive detection of mutations in tumors：challenges，advances，and applications [J]. J Mol Diagn，2020，22（8）：994-1007.

[9] Peng J，Sun B，Chen C，et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cell Res，2019，29（9）：725-738.

[10] Upadhrasta S，Zheng L. Strategies in developing immunotherapy for pancreatic cancer：recognizing and correcting multiple immune “Defects” in the tumor microenvironment [J]. J Clin Med，2019，8（9）：1472.

[11] Jandaghi P，Najafabadi HS，Bauer AS，et al. Expression

of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice [J]. Gastroenterology，2016，151（6）：1218-1231.

[12] Huang C，Lan W，Fraunhoffer N，et al. Dissecting the anticancer mechanism of trifluoperazine on pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cancers，2019，11（12）：1869.

[13] Ranjan A，German N，Mikelis C，et al. Penfluridol induces endoplasmic reticulum stress leading to autophagy in pancreatic cancer [J]. Tumour Biol，2017，39（6）：1010428317705517.

[14] Chien W，Sun Q，Lee KL，et al. Activation of protein phosphatase 2A tumor suppressor as potential treatment of pancreatic cancer [J]. Mol Oncol，2015，9（4）：889-905.

[15] Ou Y，Zhu WB，Li Y，et al. Aspirin inhibits proliferation of gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells and augments gemcitabine-induced cytotoxicity [J]. Acta Pharmacol Sin，2010，31（1）：73-80.

[16] Lin S，Pan Y，Xu C. Effects of aspirin on pancreatic cancer cells PANC-1 and its potential molecular mechanism [J]. J Buon，2020，25（5）：2449-2455.

[17] Li H，Li L，Song B，et al. Aspirin inhabits proliferation and promotes apoptosis of pancreatic cancer cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Panminerva Med，2019.

[18] Rodriguez Lanzi C，Wei R，Luo D，et al. Phospho-aspirin（MDC-22）inhibits pancreatic cancer growth in patient-derived tumor xenografts and KPC mice by targeting EGFR：enhanced efficacy in combination with irinotecan [J]. Neoplasia，2022，24（2）：133-144.

[19] Mattheolabakis G，Papayannis I，Yang J，et al. Phospho-aspirin（MDC-22）prevents pancreatic carcinogenesis in mice [J]. Cancer Prev Res（Phila），2016，9（7）：624-634.

[20] Qorri B，Harless W，Szewczuk MR. Novel molecular mechanism of aspirin and celecoxib targeting mammalian neuraminidase-1 impedes epidermal growth factor receptor signaling axis and induces apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：4149-4167.

[21] Li J，Luo M，Wang Y，et al. Celecoxib suppresses fibroblast growth factor-2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma PANC-1 cells [J]. Oncol Rep，2016，36（3）：1345-1352.

[22] Li D，Ma Y，Liu W，et al. Celecoxib combined with salirasib strongly inhibits pancreatic cancer cells in 2D and 3D cultures [J]. Int J Med Sci，2020，17（12）：1795-1802.

[23] Zuo C，Hong Y，Qiu X，et al. Celecoxib suppresses proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells by down-regulating STAT3/NF-κB and L1CAM activities [J]. Pancreatology，2018，18（3）：328-333.

[24] Gu Y，Zhang B，Gu G，et al. Metformin increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by reversing EMT through regulation DNA methylation of miR-663 [J]. Onco Targets Ther，2020，13：10417-10429.

[25] Duan W，Chen K，Jiang Z，et al. Desmoplasia suppression by metformin-mediated AMPK activation inhibits pancreatic cancer progression [J]. Cancer Lett，2017，385：225-233

[26] Zhou H，Yao X，Chen X，et al. Mechanism of metformin enhancing the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gem-citabine by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2019，23（23）：10283-10289.

[27] Ren D，Qin G，Zhao J，et al. Metformin activates the STING/IRF3/IFN-β pathway by inhibiting AKT phosphorylation in pancreatic cancer [J]. Am J Cancer Res，2020，10（9）：2851-2864.

[28] Ninomiya I，Yamazaki K，Oyama K，et al. Pioglitazone inhibits the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells [J]. Oncol Lett，2014，8（6）：2709-2714.

[29] Galli A，Ceni E，Crabb DW，et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPARgamma independent mechanisms [J]. Gut，2004，53（11）：1688-1697.

[30] Jiang F，Xing H，Chen W，et al. Itraconazole inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through activation of Bak-1 [J]. J Cell Biochem，2019，120（3）：4333-4341.

[31] Chen K，Cheng L，Qian W，et al. Itraconazole inhibits invasion and migration of pancreatic cancer cells by suppressing TGF-β/SMAD2/3 signaling [J]. Oncol Rep，2018，39（4）：1573-1582.

[32] Wang X，Wu X，Zhang Z，et al. Monensin inhibits cell proliferation and tumor growth of chemo-resistant pancreatic cancer cells by targeting the EGFR signaling pathway [J]. Sci Rep，2018，8（1）：17914.

[33] Mouratidis PXE，Colston KW，Dalgleish AG. Doxycycline induces caspase-dependent apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. Int J Cancer，2007，120（4）：743-752.

[34] Son K，Fujioka S，Iida T，et al. Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells [J]. Anticancer Res，2009，29（10）：3995-4003.

[35] Yi YW，Park NY，Park J，et al. Doxycycline potentiates the anti-proliferation effects of gemcitabine in pancreatic cancer cells [J]. Am J Cancer Res，2021，11（7）：3515-3536.

[36] Liu H，Tao H，Wang H，et al. Doxycycline inhibits cancer stem cell-like properties via PAR1/FAK/PI3K/AKT pathway in pancreatic cancer [J]. Front Oncol，2021，10：619317.

[37] Zhang G，Liang Y，Zhou L，et al. Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells [J]. Cancer Lett，2011，313（2）：137-144.

[38] Kusama T，Mukai M，Iwasaki T，et al. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors [J]. Cancer Res，2001，61（12）：4885-4891.

[39] Ding N，Cui X，Gao Z，et al. A triple combination of atorvastatin，celecoxib and tipifarnib strongly inhibits pancreatic cancer cells and xenograft pancreatic tumors [J]. Int J Oncol，2014，44（6）：2139-2145.

[40] Xu X，Chen J，Ren X，et al. Effects of atorvastatin in combination with celecoxib and tipifarnib on proliferation and apoptosis in pancreatic cancer sphere-forming cells [J]. Eur J Pharmacol，2021，893：173840.

[41] Chen Y，Chen Y，Lin C，et al. Synergistic anticancer effects of gemcitabine with pitavastatin on pancreatic cancer

cell line MIA PaCa-2 in vitro and in vivo [J]. Cancer Manag Res，2020，12：4645-4665.

[42] Florio R，Veschi S，di Giacomo V，et al. The benzimidazole-based anthelmintic parbendazole：a repurposed drug candidate that synergizes with gemcitabine in pancreatic cancer [J]. Cancers，2019，11（12）：2042.

[43] Chen H，Weng Z，Xu C. Albendazole suppresses cell proliferation and migration and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. Anti-cancer Drugs，2020，31（5）：431-439.

[44] van der Hoeven D，Cho K，Ma X，et al. Fendiline inhibits K-Ras plasma membrane localization and blocks K-Ras signal transmission [J]. Mol Cell Biol，2013，33（2）：237-251.

[45] Alhothali M，Mathew M，Iyer G，et al. Fendiline enhances the cytotoxic effects of therapeutic agents on PDAC cells by inhibiting tumor-promoting signaling events：a potential strategy to combat PDAC [J]. Int J Mol Sci，2019，20（10）：2423.

[46] Wu X，Cao Y，Xiao H，et al. Bazedoxifene as a novel GP130 inhibitor for pancreatic cancer therapy [J]. Mol Cancer Ther，2016，15（11）：2609-2619.

[47] Chen X，Tian J，Su GH，et al. Blocking IL-6/GP130 signaling inhibits cell viability/proliferation，glycolysis，and colony forming activity in human pancreatic cancer cells [J]. Curr Cancer Drug Targets，2019，19（5）：417-427.

[48] Harima H，Kaino S，Takami T，et al. Deferasirox，a novel oral iron chelator，shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo [J]. BMC Cancer，2016，16（1）：702.

[49] Amano S，Kaino S，Shinoda S，et al. Invasion inhibition in pancreatic cancer using the oral iron chelating agent deferasirox [J]. BMC cancer，2020，20（1）：681.

[50] Zhao Y，Zheng Y，Zhu Y，et al. M1 macrophage-derived exosomes loaded with gemcitabine and deferasirox against chemoresistant pancreatic cancer [J]. Pharmaceutics，2021，13（9）：1439.

[51] Chen R，Lyu Y，Chen Y，et al. Chloroquine potentiates the anticancer effect of pterostilbene on pancreatic cancer by inhibiting autophagy and downregulating the RAGE/STAT3 pathway [J]. Molecules，2021，26（21）：6741.

[52] Wang G，Chen S，Edwards H，et al. Combination of chloroquine and GX15-070（obatoclax）results in synergistic cytotoxicity against pancreatic cancer cells [J]. Oncol Rep，2014，32（6）：2789-2794.

[53] Fond G，Macgregor A，Attal J，et al. Antipsychotic drugs：pro-cancer or anti-cancer? A systematic review [J]. Med Hypotheses，2012，79（1）：38-42.

[54] Baron JA. Aspirin and NSAIDs for the prevention of colorectal cancer [J]. Recent Results Cancer Res，2009，181：223-229.

[55] Corley DA，Kerlikowske K，Verma R，et al. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer：asystematic review [J]. Gastroenterology，2003，124（1）：47-56.

[56] Takkouche B，Regueira-Méndez C，Etminan M. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs：a meta-analysis [J]. J Natl Cancer Inst，2008，100（20）：1439-1447.

[57] Olsen JH，Friis S，Poulsen AH，et al. Use of NSAIDs，smoking and lung cancer risk [J]. Br J Cancer，2008，98（1）：232-237.

[58] Sun J，Li Y，Liu L，et al. Aspirin use and pancreatic cancer risk：a systematic review of observational studies [J]. Medicine，2019，98（51）：e18033.

[59] Dragovich T，Burris HR，Loehrer P，et al. Gemcitabine plus celecoxib in patients with advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma：results of a phase Ⅱ trial [J]. Am J Clin Oncol，2008：31（2）：157-162.

[60] El-Rayes BF，Zalupski MM，Shields AF，et al. A phase II study of celecoxib，gemcitabine，and cisplatin in advanced pancreatic cancer [J]. Invest New Drugs，2005，23（6）：583-590.

[61] Li D，Yeung SJ，Hassan MM，et al. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer [J]. Gastroenterology，2009，137（2）：482-488.

[62] Kordes S，Pollak MN，Zwinderman AH，et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer：a double-blind，randomised，placebo-controlled phase 2 trial [J]. Lancet Oncol，2015，16（7）：839-847.

[63] Reni M，Dugnani E，Cereda S，et al.（Ir）relevance of metformin treatment in patients with metastatic pancreatic cancer：an open-label，randomized phase Ⅱ trial [J]. Clin Cancer Res，2016，22（5）：1076-1085.

[64] Lockhart NR，Waddell JA，Schrock NE. Itraconazole therapy in a pancreatic adenocarcinoma patient：a case report [Z]. J Oncol Pharm Pract，2016，22（3）：528-532.

[65] Tsubamoto H，Sonoda T，Ikuta S，et al. Combination chemotherapy with itraconazole for treating metastatic pancreatic cancer in the second-line or additional setting [J]. Anticancer Res，2015，35（7）：4191-4196.

[66] Endo S，Nakata K，Sagara A，et al. Autophagy inhibition enhances antiproliferative effect of salinomycin in pancreatic cancer cells [J]. Pancreatology，2017，17（6）：990-996.

[67] Chen C，Wu H，Kong D，et al. Transcriptome sequencing analysis reveals unique and shared antitumor effects of three statins in pancreatic cancer [J]. Oncol Rep，2020，44（6）：2569-2580.

[68] Walker EJ，Ko AH，Holly EA，et al. Statin use and risk of pancreatic cancer：results from a large，clinic-based case-control study [J]. Cancer，2015，121（8）：1287-1294.

[69] Hong JY，Nam EM，Lee J，et al. Randomized double-blinded，placebo-controlled phase Ⅱ trial of simvastatin and gemcitabine in advanced pancreatic cancer patients [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2014，73（1）：125-130.

[70] Elayapillai S，Ramraj S，Benbrook DM，et al. Potential and mechanism of mebendazole for treatment and maintenance of ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol，2021，160（1）：302-311.

[71] Zhou X，Zou L，Chen W，et al. Flubendazole，FDA-approved anthelmintic，elicits valid antitumor effects by targeting P53 and promoting ferroptosis in castration-resistant prostate cancer [J]. Pharmacol Res，2021，164：105305.

[72] Choi HS，Ko YS，Jin H，et al. Anticancer effect of benzimidazole derivatives，especially mebendazole，on triple-negative breast cancer（TNBC）and radiotherapy-resistant TNBC

in vivo and in vitro [J]. Molecules，2021，26（17）：5118.
[73] Florio R，Carradori S，Veschi S，et al. Screening of benzimidazole-based anthelmintics and their enantiomers as repurposed drug candidates in cancer therapy [J]. Pharmaceuticals（Basel），2021，14（4）：372.
[74] Sato K，Ishizuka J，Cooper CW，et al. Inhibitory effect of calcium channel blockers on growth of pancreatic cancer cells [J]. Pancreas，1994，9（2）：193-202.
[75] Samaras P，Tusup M，Nguyen-Kim TDL，et al. Phase I study of a chloroquine-gemcitabine combination in patients with metastatic or unresectable pancreatic cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2017，80（5）：1005-1012.
[76] Pantziarka P，Verbaanderd C，Sukhatme V，et al. ReDO_DB：the repurposing drugs in oncology database [J]. Ecancermedicalscience，2018，12：886.
[77] Verbaanderd C，Meheus L，Huys I，et al. Repurposing drugs in oncology：next steps [J]. Trends Cancer，2017，3（8）：543-546.
[78] Avram S，Curpan R，Halip L，et al. Off-patent drug repositioning [J]. J Chem Inf Model，2020，60（12）：5746-5753.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-03-19）

开心散化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析

孙东杰[1]，贺梦媛[1]，薛晴[1]，于小钧[1]，高鹏[1*]，丛竹凤[2*]（1. 山东中医药大学药学院，济南　250355；2. 山东省肿瘤防治研究院，济南　250117）

摘要：开心散是安神益智的经典名方，临床上常用于抑郁症、阿尔茨海默病的治疗。本文总结近些年来有关开心散的化学成分、药理作用以及临床应用，并依据质量标志物“五原则”对开心散的质量标志物（Q-marker）进行预测分析，提示细叶远志皂苷、远志呫酮Ⅲ、3，6'-二芥子酰基蔗糖、西伯利亚远志糖 A_5、西伯利亚远志糖 A_6、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Re、α-细辛醚、β-细辛醚、茯苓酸可作为开心散的 Q-marker，可为开心散后续研究提供参考。

关键词：开心散；质量标志物；化学成分；药理作用；临床应用；质量控制
中图分类号：R284，R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1882-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.029

Chemical constituents, pharmacological effect and clinical application of Kaixin powder and prediction of quality-markers

SUN Dong-jie[1], HE Meng-yuan[1], XUE Qing[1], YU Xiao-jun[1], GAO Peng[1*], CONG Zhu-feng[2*] (1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan* 250355; 2. *Shandong Institute of Cancer Prevention and Treatment*, *Jinan* 250117)

Abstract: Kaixin powder, a classic prescription for tranquilizing the mind and promoting the intelligence, is clinically used for depression and Alzheimer's disease. The chemical compositions, pharmacological effect, and clinical application of Kaixin powder of recent years have been reviewed in this paper. Tenuifolin, polygalaxanthone Ⅲ, 3, 6'-disinapoylsucrose, sibiricose A_5, sibiricose A_6, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1, ginsenoside Re, α-asarone, β-asarone, and pachymic acid were considered to be the quality-makers of Kaixin powder based on the five principles of quality-markers, which provides a reference for further studies.

Key words: Kaixin powder; quality-marker; chemical composition; pharmacological effect; clinical application; quality control

作者简介：孙东杰，男，在读硕士研究生，主要从事中药制剂学研究，email：2981087491@qq.com　*通信作者：高鹏，男，教授，博士，博士研究生导师，主要从事中药创新药物现代研究，email：gaopeng@sdutcm.edu.cn；丛竹凤，女，主要从事中药创新药物现代研究，email：congzhufeng@163.com

开心散出自唐代孙思邈的《备急千金要方》[1]，具有养心安神、益气定志的功效，是古代治疗抑郁、好忘的名方，现已收录入《古代经典名方目录（第一批）》公布的 100 首经典名方中。全方由远志、人参各四分，茯苓二两，菖蒲一两组成，上四味治下筛，作散剂服用。远志作为君药滋补心肾精血，人参为臣药增强远志补益、交通心肾之功。菖蒲和茯苓为佐药相须为用，增加全方的开窍渗湿之力。四药合用，养心以安神，补脾以益气，开窍以渗湿，标本兼治，明心强志，在现代临床中仍具有很大的应用价值。质量是中药发挥疗效关键的一环，为了保证中药质量的稳定和可控，刘昌孝院士 [2] 提出了质量标志物（Q-maker）的概念，Q-maker 是中药材或者中药制剂本身含有的具有功效的物质，反映中药质量的安全性和有效性，能够被定性定量地检出。本文总结了近些年来有关开心散的化学成分、药理作用、临床应用的有关文献，结合 Q-maker“五原则”对开心散的 Q-maker 进行预测，以期为开心散的质量控制提供理论支持。

1　化学成分

本文从单味药的化学成分和组方化学成分两个方面对开心散的化学成分进行总结。

远志主要含有三萜皂苷、呫酮、糖脂、生物碱、甾醇、简单酚酸类 [3] 等成分。远志作为开心散的君药，是临床常用的开窍类中药。三萜皂苷类是远志的主要活性成分之一，共分离出 56 种三萜皂苷，均为齐墩果烷型。刘庆华等 [4] 运用高效液相色谱（HPLC）对不同月份采收远志中的皂苷进行含量测定，发现 10 月采收的远志，其皂苷含量最高。柴士伟等 [5] 运用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）法对远志进行成分检测，共检测出 36 个化合物，鉴定和推测了 29 种化合物，如西伯利亚远志糖 A_5、西伯利亚远志糖 A_6、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、远志皂苷元、远志呫酮Ⅺ等。名贵中药人参自古以来便是补益佳品，其主要成分包括皂苷、多糖、挥发油、聚炔醇、微量元素等 [6]。人参皂苷作为人参中的活性成分主要存在于人参属植物中，陈树东等 [7] 采用超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法对人参中的 10 种皂苷进行了含量检测，摸索出了用固相萃取净化样品，乙腈 - 水流动相体系代替《中国药典》的甲醇洗脱的方法，该方法能有效地对人参中的人参皂苷进行分离和检测。庄江能等 [8] 采用 HPLC-TOF/MS 对人参中的化学成分进行分析，共检测出 39 个化学成分，其中大部分成分为人参皂苷。魏建华等 [9] 运用气质联用色谱（GC-MS）鉴定出了 44 种人参脂溶性成分，包含 34 种脂肪酸及酯类，6 种萜类，2 种甾烷及甾酮类，1 种醚类，1 种酮类。茯苓在中药方剂中的应用广泛，其化学成分主要为多糖类和三萜类，碱溶性多糖是茯苓骨架的主要构成物质 [10]。韩小娟等 [11] 运用液相色谱 - 二极管阵列光谱检测 / 电喷雾离子化质谱（HPLC-DAD-ESIMS）法测定了茯苓中 13 种三萜类成分，如土莫酸、依布里酸、去氢依布里酸、茯苓酸甲酯等。康安等 [12] 运用超高效液相色谱 - 离子阱 - 静电场轨道阱质谱（UPLC-LTQ-Orbitrap）联用技术对茯苓中化学成分进行分析，共检出 42 个化学成分，其中大部分为羊毛甾烷型三萜。开心散中的菖蒲为石菖蒲，石菖蒲化学成分以挥发油的研究居多，除了挥发油，石菖蒲还含有萜类、黄酮类等物质 [13]。都姣娇等 [14] 运用顶空固相微萃取 - 气质联用色谱（SPME-GC/MS）对石菖蒲的挥发油进行测定，分离出 33 个成分，包括 *α*- 细辛脑、榄香素、毕橙茄烯等。韩建卫等 [15] 使用 GC-MS 对 7 个产地的石菖蒲中的挥发油进行测定，*α*- 细辛醚、*β*- 细辛醚、甲基丁香酚在不同产地石菖蒲挥发油中所占的比例均比较高。胡小玲等 [16] 运用 UPLC-MS 法检测出了石菖蒲中的 86 个成分，其中包含生物碱成分如菖蒲碱甲、4- 羟双氢鞘氨醇、5- 丁基尿苷等。李浩然等 [17] 运用超高效液相串联四极杆飞行时间二级质谱（UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS）技术分析出了开心散煎液中 77 个化学成分，包括 26 个皂苷、20 个寡糖酯、13 个三萜酸、5 个呫酮，还有 13 个其他的成分。刘江云 [18] 运用各种波谱学手段对开心散中的化学成分进行分析，测定出了 37 个化学成分，包括 18 个远志皂苷、17 个人参皂苷及 2 个远志糖脂。

2　药理作用

2.1　抗抑郁

抑郁症被世界卫生组织列为世界第三大疾病负担 [19]，其病因复杂，诸多因素参与了其发病过程，患者长期陷入悲观、绝望等不良情绪，严重影响着患者的生活质量。

2.1.1　对单胺类神经递质系统的影响　单胺假说认为患者的低迷、淡漠是由于大脑神经突触之间负责传递信息的单胺类递质不足导致的 [20]，开心散可以通过增加脑内五羟色胺、去甲肾上腺素、多巴胺、乙酰胆碱等递质含量或者降低这些神经递质的转化分解来减轻抑郁的症状 [21-22]。

2.1.2　对神经营养因子的影响　脑源性神经营养因子（BDNF）具有增强学习记忆，保护神经元尤其是多巴胺能神经元和五羟色胺能神经元的

功能[23]。王瑾等[24]通过观察 LVshBDNF-3 沉默 BNDF 表达大鼠的生命活动，验证了 BNDF 的缺失能直接导致抑郁，对抑郁大鼠给予开心散两周后，给药组 BNDF 表达较模型组有显著提升，且运动更活跃。

2.1.3　对趋化因子表达的影响　小胶质细胞是脑内特殊的免疫细胞，当被激活时，会引发神经炎症，越来越多的研究表明抑郁症的发病和免疫的激活有关。趋化因子 CX3CL1 能激活小胶质细胞，引发神经炎症，肖望重等[25]利用慢性不可预见性温和应激（CUMS）方法建立抑郁大鼠模型，经观察，模型组大鼠 CX3CL1 和 CX3CR1 的表达较空白组显著增加。开心散高剂量（10.8 g•kg^{-1}）连续给药 21 d 后，CUMS 大鼠抑郁症状明显减轻，其 CX3CL1 和 CX3CR1 表达逐渐恢复正常，提示开心散对抑郁的治疗机制可能与降低趋化因子表达有关。

2.1.4　对炎症因子表达的影响　对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质轴的刺激会导致肠道产生炎症因子，炎症因子随循环入脑后同样会激活小胶质细胞，曹程[26]研究发现开心散能改善 CUMS 大鼠的肠道环境，降低大鼠肠道炎症因子的表达以及革兰氏阴性菌的丰度，减轻对小胶质细胞的影响。

2.1.5　对褪黑素（MT）表达的影响　MT 是松果体分泌的一种激素，与抑郁之间存在密切关系，抑郁患者在发病期间 MT 分泌下降[27]。姚海江等[28]发现，引入外源性的 MT 能改善 CUMS 大鼠的抑郁症状。MT 主要通过调节生物节律、神经内分泌、神经免疫来缓解抑郁[29]。蔡川等[30]发现中剂量（130 mg • kg^{-1}）开心散给药后，大鼠的松果体的限速酶活性较模型组显著上升，且 MT 浓度显著增加。包祖晓等[31]通过检测 40 例抑郁患者（对照组）、40 例开心散给药抑郁患者（治疗组）静脉血液中的 MT 水平，发现治疗组在给药 2 周、4 周时对 MT 的调控能力以及情绪均优于对照组。

2.2　抗阿尔茨海默病

老年期痴呆（SD）分为阿尔茨海默病（AD）、血管性痴呆（VD）及混合性痴呆，临床表现为老年人出现长期的全方面的智力下降[32]。AD 作为最典型的 SD，患者病理表现为脑部出现淀粉样蛋白（Aβ）沉积导致的“老年斑”以及神经细胞凋亡。

2.2.1　对自由基表达的影响　降低患者脑内 Aβ 水平和保护 Aβ 导致的神经细胞损伤是缓解 AD 病理过程的重要手段，王丽娜[33]研究开心散血清对 Aβ 诱导损伤神经元细胞模型的作用，发现开心散能提高损伤细胞的存活率，其机制可能与提高超氧化物歧化酶表达，降低淀粉样蛋白前体（APP）的基因的表达有关。

2.2.2　对细胞凋亡的影响　细胞凋亡引起的神经元丢失是 AD 最严重的病理表现，线粒体在细胞凋亡中发挥着重要的作用[34]，Bax 能刺激线粒体释放凋亡激活物，Bcl-2 能抑制 Bax 的活性。师冉等[35]研究开心散对细胞凋亡相关基因的影响，发现开心散能通过降低快速老化模型（SAMP8）小鼠 Bax/Bcl-2 的表达比率，减少线粒体的表达，减少小鼠脑内的神经细胞凋亡，对 AD 病理过程进行干预，以此改善模型小鼠的学习能力。

2.2.3　对炎症因子表达的影响　脑血管病变是 AD 患者经常出现的病理表现[36]，其可能会加剧 AD 的症状，杜婷[37]通过研究发现开心散能够通过减少炎症因子的表达，并且在不改变载脂蛋白 E4 的基础上调低密度脂蛋白受体的表达来减缓五转家族性阿尔茨海默病模型小鼠（5×FAD）模型小鼠的脑损伤症状。

2.3　抗血管性痴呆

VD 是由脑血管病变引起的痴呆，患者脑血管缺氧缺血引发组织性改变，最终导致大脑功能衰退。VD 患者的脑部缺血会导致胞间黏附分子 -1（ICAM-1）表达上调，被 ICAM-1 诱导的白细胞会释放大量的蛋白水解酶，导致血脑屏障透过性升高形成脑水肿，进一步加剧患者脑部的缺氧缺血。刘彦廷等[38]发现开心散能显著改善 VD 患者的智能，并降低患者 ICAM-1 水平，提示开心散可能通过调控 ICAM-1 对 VD 患者发挥治疗作用。脑部长期的缺血性低灌注会使该部位的神经元坏死导致 VD，Pan 等[39]发现开心散能改善 VD 模型小鼠的脑灌注不足和纤溶系统，进而减轻脑缺血导致的 VD，其疗效优于盐酸氟西汀，其机制可能与上调神经发生，降低血脑屏障透过性，平衡纤溶系统有关。李思迪等[40]发现开心散高剂量组（8 g • kg^{-1}）能显著改善永久性脑缺血模型大鼠认知和步行功能。

3　临床应用

开心散自古以来便是治疗情志病的名方，四药配伍，养心开窍，平肝潜阳，交通心肾以安神益智。临床上常用于 SD、抑郁症、认知障碍的治疗。本文就开心散的临床疗效进行总结，具体内容见表 1。

4　Q-marker 预测分析

按照 Q-marker“五原则”，从质量传递与溯源、成分的特有性、成分的有效性、复方配伍环境及成分的可测性对开心散的 Q-marker 进行预测。

表 1　开心散临床应用

Tab 1　Clinical application of Kaixin powder

病名	治疗方法	处方组成	治疗效果	文献
轻中度抑郁症	开心散	远志 12 g、人参 18 g、茯苓 18 g、石菖蒲 12 g	患者 80 例随机分为对照组和治疗组，对照组氟西汀给药，治疗组开心散汤剂给药，根据 HAMD 量表减分情况来对疾病进行评估，结果显示，开心散和氟西汀对抑郁症的治疗效果相当，且开心散起效更快	[41]
术后焦虑抑郁	开心散合六君子汤	远志 10 g、党参 15 g、茯苓 12 g、石菖蒲 10 g、白术 15 g、陈皮 10 g、半夏 10 g、甘草 6 g	患者 54 例随机分为对照组 30 例，试验组 24 例，对照组常规治疗，试验组在此基础上加用开心散合六君子汤，方中六君子汤调理脾胃、提高免疫，开心散缓解抑郁，结果显示实验组在焦虑情绪、中医症候、生活质量方面较对照组均有明显改善	[42]
围绝经期轻度抑郁症	针刺孙思邈十三鬼穴加开心散	远志 10 g、人参 15 g、茯苓 15 g、石菖蒲 10 g	病患 60 例随机分为中药组和针药组，中药组开心散给药，针药组在此基础上加针刺治疗，结果显示，中药组和针药组在抑郁症状方面均有良好的改善，且针灸辅助开心散给药能提高抗抑郁效果	[43]
心脾两虚证抑郁	开心散	远志 10 g、生晒参 10 g、茯苓 15 g、石菖蒲 8 g	患者 60 例随机分为对照组及实验组，对照组常规治疗，实验组在此基础上加用开心散，结果显示，实验组在中医证候、抑郁症状、心衰症状方面较对照组均有明显改善	[44]
血管性痴呆	开心散	远志 20 g、人参 20 g、茯苓 20 g、石菖蒲 10 g	患者 200 例随机分为对照组和治疗组，对照组盐酸多奈哌齐给药，治疗组在此基础上加用开心散，结果显示，治疗组在改善患者智能和血清抗凋亡因子方面效果优于对照组	[45]
阿尔茨海默病	开心散	远志 5 g、人参 5 g、茯苓 5 g、石菖蒲 2.5 g	患者 104 例随机分为对照组和试验组，对照组盐酸多奈哌齐给药，试验组在此基础上加用开心散，结果显示，试验组临床疗效明显优于对照组	[46]
老年焦虑症	开心散	远志 6 g、人参 9 g、茯苓 9 g、石菖蒲 6 g	患者 116 例随机分为西药组、中药组及联合用药组，西药组氟哌噻吨美利曲辛给药，中药组开心散给药，联合用药组开心散和氟哌噻吨美利曲辛片联合给药，结果显示，中药组和西药组疗效相近，但是中药组一年复发率相较于西药组更低，联合用药组效果最好	[47]

4.1　基于质量传递与溯源的开心散 Q-marker 预测分析

以开心散中药物“人参”“茯苓”“石菖蒲”为关键词，以药物口服生物利用度（OB）≥ 30%，类药性（DL）≥ 0.18，药物半衰期（HL）≥ 4 h 为筛选条件，共筛选出 37 个活性成分，其中来自人参 20 个（人参二醇、豆甾醇、*β*- 谷甾醇、人参皂苷 Rh_2、人参皂苷 Rg_4、人参皂苷 Rh_5 等），茯苓 14 个（常春藤皂苷元、茯苓新酸 A、茯苓新酸 B、茯苓酸、16*α*- 羟基栓菌酸等），石菖蒲 3 个（8- 异戊烯基山柰酚、环戊烯醇、山柰酚）。查阅相关文献，贾皓等 [48] 按照药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性（ADMET）性质筛选出了远志中的 36 个化学成分。

大部分的药物只有通过吸收、分布、代谢才能发挥药效，巴寅颖等 [49] 运用 HPLC 测定了大鼠含药血清中的 24 个成分，其中 15 个来自远志，7 个来自石菖蒲，2 个为石菖蒲和远志共有，其中远志呫酮Ⅲ、3，6'- 二芥子酰基蔗糖，*β*- 细辛醚以原形入血。梁雪冰等 [50] 用 HPLC、HPLC-MS 法检测开心散复方的入血和入脑成分，结果显示开心散中 5 种抗抑郁成分（人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、3，6'- 二芥子酰基蔗糖、*α*- 细辛醚、*β*- 细辛醚）均能吸收入血。汪娜等 [51] 运用 UHPLC-MS 法检测 60% 醇提开心散给药大鼠血清中的远志糖酯类成分，结果显示，远志糖酯类成分是主要的入血成分。Maharjan 等 [52] 用 UPLC-TOF-MS 法检测 60% 醇提开心散给药大鼠血清中的远志皂苷成分，共检测出 5 个原形皂苷类成分及 4 个代谢产物。王建勋 [53] 运用 HPLC-MS 法检测开心散的吸收入肠成分，结果显示，入肠成分主要为人参皂苷（人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rg_2、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rb_2 等）、远志寡糖酯（芥子酰基蔗糖、双芥子酰基蔗糖、阿魏酰蔗糖等）、挥发油（*α*- 细辛醚、*β*- 细辛醚、甲基丁香酚等），并且发现石菖蒲中的挥发油对人参皂苷的吸收具有抑制作用。

4.2　基于成分特有性的开心散 Q-marker 预测分析

4.2.1　远志成分的特有性分析　远志为远志科远志属植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 的干燥根，主要含有三萜皂苷、远志呫酮、寡糖酯类、生物碱、甾醇、简单酚酸类等成分，三萜皂苷、远志呫酮、寡糖酯类是其主要的活性成分，其中呫酮类成分以及西伯利亚远志糖 A_5、西伯利亚远志糖 A_6 是远志的特征性成分 [54]。

4.2.2　人参成分的特有性分析　人参为五加科 Araliaceae 植物人参 *Panaxginseng* C.A.Mey. 的干燥根及根茎，主要含有皂苷、多糖、多肽、聚炔醇、挥发油等成分，其中人参皂苷为其主要活性成分和特征性成分 [55]。

4.2.3　茯苓成分的特有性分析　茯苓为非褶菌目多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos*（Schw.）Wolf 的干燥菌核，主要含有三萜类、多糖类、氨基酸、挥发油等成分，多糖类和三萜类是其活性成分，其中茯苓多糖、茯苓酸、去氢茯苓酸和去氢土莫酸为茯苓的特征性成分 [56]。

4.2.3　石菖蒲成分的特有性分析　石菖蒲为天南星科植物石菖蒲（*Acotus tatarinowii* Schott.）的根茎，主要含有挥发油、有机酸、黄酮类、氨基酸类等成分，其中 *γ*- 细辛醚、*β*- 细辛醚、草蒿脑、甲基丁香酚、顺式 - 甲基丁香酚含量较高，被定为特征性成分 [57]。

4.3　基于成分与药效关联的开心散 Q-marker 预测分析

有效性是 Q-marker 的一个重要特征，作为治疗情志病的古代名方，方中远志滋养心肾，人参安神补气，茯苓健脾渗湿，石菖蒲开窍醒神，四药并用，治疗心肾不交，心肾失养之悲伤，健忘，惊悸 [58]。现代临床常将开心散用于 SD、抑郁症、焦虑、认知障碍的治疗。

4.3.1　抗抑郁作用　远志中的 3，6'- 二芥子酰基蔗糖具有良好的抗抑郁活性，刘屏等 [59] 通过研究发现，3，6'- 二芥子酰基蔗糖能明显改善抑郁大鼠的抑郁症状，其机制和增强单胺神经递质表达有关。损伤的 PC12 细胞能模拟抑郁或者焦虑症损伤的神经细胞，涂海华等 [60] 发现远志中的寡糖类成分对抑郁模型中损伤的 PC12 细胞具有保护作用。人参中的人参皂苷具有抗抑郁作用 [61]，赵丽红 [62] 发现人参皂苷 Re 能改善利血平诱导抑郁大鼠的抑郁症状，其机制与增加 TrkB 蛋白的表达有关。王娟等 [63] 发现人参皂苷 Rg_1 能改善 CUMS 小鼠模型的抑郁症状，其机制与调控炎症因子和海马突触相关蛋白的表达有关。周坤 [64] 通过代谢分析、网络药理学、药效学实验发现人参皂苷 Rb_1 及其代谢产物具有抗抑郁活性，其机制与调控神经递质和神经炎症有关。*β*- 细辛醚是石菖蒲主要的活性物质 [65]，孙玉荣等 [66] 通过研究发现 *β*- 细辛醚具有良好的抗抑郁活性，其机制可能与增加海马区蛋白表达有关。

4.3.2　抗 SD　远志中的远志皂苷、寡糖类和多糖类成分具有良好的抗 SD 作用，黄炎等 [67] 通过研究发现远志皂苷能通过保护 $A\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的 AD 大鼠模型海马神经中的线粒体来减轻模型大鼠的痴呆症状，其机制与远志皂苷提高了线粒体中的超氧化物歧化酶以及谷胱甘肽过氧化物酶的表达有关。茅宇娟等 [68] 通过研究发现远志多糖能改善东莨菪碱诱导的学习障碍模型小鼠的学习能力，其机制与增加了脑源性神经营养因子和乙酰胆碱的含量有关。桑旭星 [69] 发现远志寡糖酯能保护 $A\beta_{25\text{-}35}$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞以及改善 *D*- 半乳糖诱导痴呆模型小鼠的学习能力。诸多研究表明人参中的人参皂苷对 AD 有着良好的治疗作用，王莹莹等 [70] 通过研究发现人参皂苷 Rg_1 在冈田酸诱导的 PC12 神经毒性模型中通过抗氧化应激作用发挥抗细胞死亡，保护神经细胞的作用。杨玲玲 [71] 通过研究发现，人参皂苷 Rg_3 以及人参皂苷 Rb_1 能够提高神经内肽酶的活性，减少 *β*- 淀粉样肽的生成，起到保护神经的作用。石菖蒲中的挥发性成分 *β*- 细辛醚是发挥改善学习记忆能力最主要的活性物质，黑鑫鑫等 [72] 通过研究发现 *β*- 细辛醚能够通过降低氧化标志物含量和提高抗氧化物质活性来保护被过氧化氢损伤的 PC12 细胞。

4.4　基于复方配伍环境的开心散 Q-marker 的预测分析

中药按照君臣佐使的原则组成方剂，方中的各味中药配伍能起到增效减毒的作用。有关开心散药对配伍作用机制的研究较多，李卉 [73] 通过研究发现远志皂苷和人参皂苷按照 1∶2 配伍改善 AD 大鼠智能的效力最强。许亚萍等 [74] 使用 HPLC 法检测远志 - 石菖蒲药对水煎液成分相比单味药水煎液的成分变化，发现两药配伍能增加石菖蒲中 *α*- 细辛醚和远志中细叶远志皂苷的溶出。张慧等 [75] 研究远志 - 石菖蒲配伍对水煎液挥发性成分的影响，结果显示潜在毒性物质 *β*- 细辛醚在共煎中含量下降，提示远志和石菖蒲配伍能起到减毒的作用。孟雪等 [76] 通过研究发现石菖蒲中的挥发油能够增加远志中活性成分 3，4，5- 三甲氧基肉桂酸在肠道中的吸收，两药配伍能起到增效的作用。邓敏贞等 [77] 通过研究发现石菖蒲挥发油联合人参皂苷用药能明显增加 AD 小鼠乙酰胆碱转移酶表达水平，降低胶质纤维酸性蛋白表达，且效果优于单味药（$P < 0.05$）。

4.5　基于成分可测性的开心散 Q-marker 预测分析

2020 年版《中国药典》规定四味药材人参、茯苓、远志、石菖蒲含量测定的成分有人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1，细叶远志皂苷、远志呫酮Ⅲ、3，6'- 二芥子酰基蔗糖，挥发油。戴莹等 [78] 建立了开心散中 3，6'- 二芥子酰基蔗糖和 *α*- 细辛醚的含量测定方法，*r* 均大于 0.99，加样回收率均在 95% ～ 105%，表明方法准确可靠。巴寅颖等 [79] 建立了使用 HPLC-DAD 法同时测定开心散中西伯利亚远志糖 A_5、A_6 和远志呫酮Ⅲ3 种抗痴呆成分的含量测定方法，3 种成分的 *r* 均大于 0.99，加样回收率均在 95% ～ 105%，

表明方法准确可靠。

综上所述，细叶远志皂苷、远志呫酮Ⅲ、3，6’-二芥子酰基蔗糖、西伯利亚远志糖 A_5、西伯利亚远志糖 A_6、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Re、*α*-细辛醚、*β*-细辛醚、茯苓酸可作为开心散的 Q-marker，详细信息见表 2 和图 1。

表 2　开心散的质量标志物信息

Tab 2　Information of Q-markers of Kaixin powder

编号	化学名	分子式	CAS	相对分子质量	来源
1	细叶远志皂苷（tenuifolin）	$C_{36}H_{56}O_{12}$	20183-47-5	680.82	远志
2	远志呫酮Ⅲ（polygalaxanthone Ⅲ）	$C_{25}H_{28}O_{15}$	162857-78-5	568.48	远志
3	3，6'-二芥子酰基蔗糖（3，6'-disinapoylsucrose）	$C_{34}H_{42}O_{19}$	139891-98-8	754.69	远志
4	西伯利亚远志糖 A_5（sibiricose A_5）	$C_{22}H_{30}O_{14}$	107912-97-0	518.47	远志
5	西伯利亚远志糖 A_6（sibiricose A_6）	$C_{23}H_{32}O_{15}$	241125-75-7	548.49	远志
6	人参皂苷 Rg_1（ginsenoside Rg_1）	$C_{42}H_{72}O_{14}$	22427-39-0	801.01	人参
7	人参皂苷 Rb_1（ginsenoside Rb_1）	$C_{54}H_{92}O_{23}$	41753-43-9	1109.29	人参
8	人参皂苷 Re（ginsenoside Re）	$C_{48}H_{82}O_{18}$	51542-56-4	947.15	人参
9	茯苓酸（pachymic acid）	$C_{33}H_{52}O_5$	29070-92-6	528.76	茯苓
10	*α*-细辛醚（*α*-asarone）	$C_{12}H_{16}O_3$	2883-98-9	208.25	石菖蒲
11	*β*-细辛醚（*β*-asarone）	$C_{12}H_{16}O_3$	5273-86-9	208.25	石菖蒲

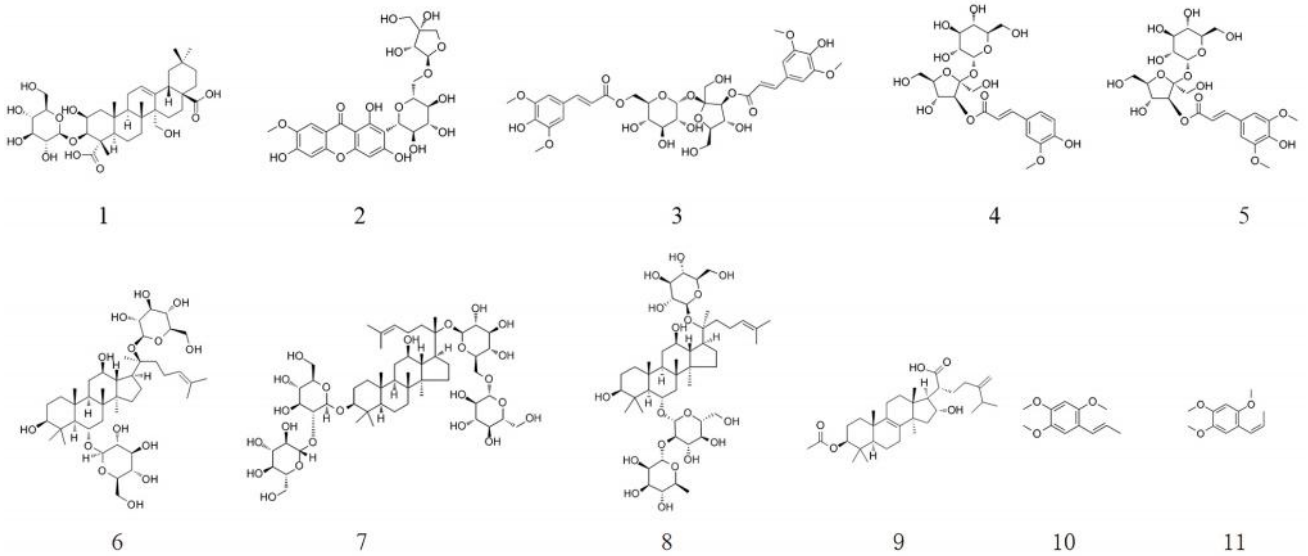


图 1　开心散质量标志物结构

Fig 1　Structure of Q-markers of Kaixin powder

参考文献

[1] 孙思邈 . 备急千金要方 [M]. 鲁兆麟，主校 . 沈阳：辽宁科学技术出版社，1997：11，222-223.

[2] 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.

[3] 李创军 . 远志和华南远志的化学成分及其生物活性研究 [D]. 北京：中国协和医科大学，2008.

[4] 刘庆华，郭海利，姚莹，等 . HPLC 法测定不同月份远志中远志皂苷的含量 [J]. 山西农业科学，2019，47（11）：1881-1883.

[5] 柴士伟，杨帆，于卉娟，等 . UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析远志中的化学成分 [J]. 天津中医药，2018，35（1）：60-64.

[6] 高健，吕邵娃 . 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（1）：127-130，137.

[7] 陈树东，胡文军，孔祥词，等 . 固相萃取 / 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法测定人参、人参叶与人参花中 10 种人参皂苷含量 [J]. 分析测试学报，2021，40（9）：1348-1354.

[8] 庄江能，张海，刘晓帆，等 . HPLC-APCI-TOF/MS 鉴别人参中的化学成分 [J]. 第二军医大学学报，2009，30（7）：812-816.

[9] 魏建华，徐涛，曹立军，等 . 超临界 CO_2 萃取人参脂溶性成分的 GC-MS 分析 [J]. 人参研究，2012，24（4）：19-22.

[10] 邓桃妹，彭代银，俞年军，等 . 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药，2020，51（10）：2703-2717.

[11] 韩小娟，罗建光，陆园园，等 . HPLC-DAD-ESI-MS^n 法鉴定茯苓中的三萜成分 [J]. 药学与临床研究，2009，17（4）：290-293.

[12] 康安，郭锦瑞，谢彤，等 . UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报，

2014，30（6）：561-565.
[13] 杨小金，邓艾平，王奕，等 . 石菖蒲化学成分及药理作用研究进展 [J]. 内蒙古中医药，2017，36（19）：132-133.
[14] 都姣娇，杜安妮 . 固相微萃取 - 气相色谱 - 质谱联用分析石菖蒲中挥发油成分 [J]. 中成药，2014，36（12）：2645-2648.
[15] 韩建卫，李晶，王知斌，等 . GC-MS 联用法分析石菖蒲挥发油的化学成分 [J]. 化学工程师，2019，33（4）：33-36.
[16] 胡小玲，唐怡，袁金斌 . 石菖蒲中生物碱成分的分离与鉴定 [J]. 中国药房，2019，30（5）：642-645.
[17] 李浩然，董萍萍，李华健，等 . 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 快速分析开心散物质基准中的化学成分 [J/OL]. 中国中药杂志，2022，47（4）：938-950.
[18] 刘江云 . 中药经方开心散抗老年性痴呆的物质基础研究 [D]. 北京：中国协和医科大学，2004.
[19] Malhi GS，Mann JJ. Depression [J]. Lancet，2018，392（10161）：2299-2312.
[20] 刘春林，阮克锋，高君伟，等 . 抑郁症的多机制发病 [J]. 生理科学进展，2013，44（4）：253-258.
[21] 卞慧敏，黄玉芳，郭海英，等 . 开心散对东莨菪碱模型大鼠脑内单胺类神经递质和胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中药药理与临床，2000，16（1）：5-7.
[22] Zhu KY，Mao QQ，Ip SP，et al. A standardized chinese herbal decoction，kai-xin-san，restores decreased levels of neurotransmitters and neurotrophic factors in the brain of chronic stress-induced depressive rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2012，2012：149256.
[23] 江东，于建云 . 脑源性神经营养因子临床研究进展 [J]. 神经解剖学杂志，2011，27（2）：221-225.
[24] 王瑾，周小江，胡园，等 . 通过 LVshBDNF-3 沉默大鼠海马 BDNF 研究抑郁症的发生及开心散抗抑郁作用机制 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（3）：1199-1202.
[25] 肖望重，胡青，唐林，等 . 开心散对抑郁模型大鼠海马 CX3CL1-CX3CR1 信号轴的影响 [J]. 中医药导报，2021，27（9）：15-19.
[26] 曹程 . 基于脑 - 肠轴调控的开心散抗抑郁功效物质基础研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2019.
[27] 代娟，李恒芬，曹素霞，等 . 老年抑郁症患者失眠与血浆褪黑素水平的关系 [J]. 中国健康心理学杂志，2010，18（11）：1285-1287.
[28] 姚海江，莫雨平，宋洪涛，等 . 外源性褪黑素对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血清相关激素含量的影响 [J]. 安徽医药，2014，18（6）：1038-1042.
[29] 庞从妃，阳秀英 . 褪黑素的抗抑郁作用机制研究概况 [J]. 右江民族医学院学报，2017，39（3）：232-233，236.
[30] 蔡川，钱国强，赵国平，等 . 开心散对大鼠抑郁症模型内源性褪黑素生物合成的调控研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（11）：1638-1641.
[31] 包祖晓，赵国平，孙伟 . 开心散对抑郁症患者血浆褪黑素的影响 [J]. 中医药学报，2011，39（3）：53-54.
[32] 何伋，路英智，贺敬义，等 . 阿尔茨海默病 [M]. 长春：吉林出版集团吉林科学技术出版社，2013.
[33] 王丽娜 . 开心散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用及机制的研究 [D]. 济南：山东大学，2006.
[34] 胡善明，王亚楠，许正茂，等 . Bcl-2 家族分子在细胞凋亡中的作用研究进展 [J]. 动物医学进展，2021，42（10）：85-89.
[35] 师冉，季旭明，滕佳林，等 . 开心散改善 SAMP8 小鼠 mtDNA 表达及对凋亡相关基因的影响 [J]. 山东中医药大学学报，2017，41（4）：368-371.
[36] Snyder HM，Corriveau RA，Craft S，et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer’s disease [J]. Alzheimers Dement，2015，11（6）：710-717.
[37] 杜婷 . 基于阿尔茨海默病脑小血管病变研究开心散加味对 5xFAD 模型小鼠的治疗作用 [D]. 厦门：厦门大学，2019.
[38] 刘彦廷，蔡忠明，陈应柱 .《千金要方》“开心散” 对血管性痴呆患者血浆 ICAM-1 影响研究 [J]. 中医药临床杂志，2015，27（10）：1423-1425.
[39] Pan J，Lei X，Wang J，et al. Effects of Kaixinjieyu，a Chinese herbal medicine preparation，on neurovascular unit dysfunction in rats with vascular depression [J]. BMC Complement Altern Med，2015，15：291.
[40] 李思迪，金剑，张恒，等 . 开心散对局灶性脑缺血模型大鼠认知和步行功能障碍的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2012，26（3）：425-426.
[41] 包祖晓，赵国平，孙伟，等 . 开心散治疗轻、中度抑郁症临床观察 [J]. 中华中医药学刊，2011，29（5）：987-988.
[42] 王晶 . 开心散合六君子汤治疗早期肺癌术后焦虑抑郁状态的临床疗效观察 [D]. 南京：南京中医药大学，2021.
[43] 谷婷，王瑞辉，吴涛，等 . 针刺十三鬼穴联合开心散治疗围绝经期轻度抑郁症疗效观察 [J]. 中国针灸，2020，40（3）：267-271.
[44] 王太吉 . 开心散治疗慢性心力衰竭合并抑郁症（心脾两虚证）的临床疗效观察 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2017.
[45] 刘彦廷，蔡忠明，陈应柱 . 开心散治疗血管性痴呆疗效观察及对血清 Livin 的影响 [J]. 山西中医，2015，31（8）：14-16.
[46] 林丹霞，陈振 . 开心散联合盐酸多奈哌齐片对阿尔茨海默病的初步临床研究 [J]. 中医临床研究，2018，10（23）：73-75.
[47] 温苹，刘明，范越 . 开心散合用代力新治疗老年焦虑症的临床观察 [J]. 中医药学报，2015，43（1）：111-112.
[48] 贾皓，庞晓丛，赵赢，等 . 远志治疗阿尔茨海默病的网络药理学作用机制 [J]. 中国新药杂志，2018，27（4）：398-404.
[49] 巴寅颖，刘洋，姜艳艳，等 . 开心散血清 HPLC 特征图谱研究 [J]. 北京中医药大学学报，2011，34（6）：409-412，416.
[50] 梁雪冰，吴杰，赵国平，等 . 运用 HPLC 和 GC-MS 研究开心散有效抗抑郁成分大鼠吸收情况 [J]. 辽宁中医杂志，2013，40（2）：365-367.

[51] 汪娜，Hassan AHMAD，贾永明，等 . UHPLC-MS 法鉴定大鼠灌服开心散后血中远志糖酯类化合物及其代谢产物 [J]. 药学学报，2017，52（10）：1592-1598.
[52] Maharjan R，Thapa C，汪娜，等 . 开心散乙醇提取物中远志皂苷的入血成分及体内代谢产物分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（19）：118-123.
[53] 王建勋 . 开心散复方的小肠吸收研究 [D]. 太原：山西医科大学，2010.
[54] 王小雨，刘传鑫，周佳丽，等 . 中药远志的化学成分和药理作用研究进展及其潜在质量标志物预测分析 [J]. 国际药学研究杂志，2020，47（7）：483-495，513.
[55] 高健，吕邵娃 . 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（1）：127-130，137.
[56] 贺梦媛，从竹凤，王红，等 . 真武汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J/OL]. 中华中医药学刊，2022，40（2）：56-62.
[57] 章晓娟，石书婷，易伦朝 . 四川产石菖蒲的挥发性成分色谱指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（2）：459-462.
[58] 易腾达，李玉丽，谭志强，等 . 经典名方开心散功能主治衍变与剂量的关联考证 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（7）：24-33.
[59] 刘屏，王东晓，郭代红，等 . 远志 3，6'- 二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价 [J]. 中国药学杂志，2008，43（18）：1391-1394.
[60] 涂海华，刘屏，马亮，等 . 远志抗抑郁有效部位中寡糖酯单体的分离及活性研究 [J]. 中国中药杂志，2008（11）：1278-1280.
[61] 李倩，柴艺汇，高洁，等 . 人参现代药理作用研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报，2019，41（5）：89-92.
[62] 赵丽红 . 人参皂苷 Re 对利血平诱导抑郁样行为的作用及机制探讨 [D]. 吉林：吉林大学，2021.
[63] 王娟，申丰铭，张峥嵘，等 . 人参皂苷 Rg_1 对慢性应激小鼠抑郁样行为、海马突触蛋白及胶质细胞的作用 [J]. 生物学杂志，2021，38（3）：26-30.
[64] 周坤 . 人参皂苷 Rb_1 通过调控炎症改善 LPS 诱导的小鼠急性抑郁样行为机制及体内药效成分研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.
[65] 刘得水，高志影，费洪新，等 . β- 细辛醚治疗抑郁症模型大鼠的研究进展 [J]. 黑龙江科技信息，2015（35）：140.
[66] 孙玉荣，董海影，王显艳，等 . β- 细辛醚对抑郁模型大鼠行为及海马神经元的影响 [J]. 北京中医药大学学报，2013，36（8）：546-549.
[67] 黄炎，陈逸青，陈勤，等 . 远志皂苷对 Aβ1-40 诱导痴呆大鼠海马神经细胞线粒体的保护作用 [J]. 中药药理与临床，2015，31（1）：93-97.
[68] 茅宇娟，窦训研，谢俊，等 . 远志多糖改善东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的研究 [J]. 中国社区医师，2017，33（25）：5，7.
[69] 桑旭星 . 远志寡糖酯改善实验性痴呆小鼠学习记忆能力及神经保护作用的研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[70] 王莹莹，宋修云，王奇，等 . 人参皂苷 Rg_1 通过抗氧化应激保护冈田酸诱导的 PC12 细胞损伤 [J]. 中国药理学通报，2016，32（10）：1364-1370.
[71] 杨玲玲 . 人参皂苷 Rb_1 及 Rg_3 上调神经内肽酶表达抑制 β- 淀粉样肽神经毒性作用的研究 [D]. 济南：山东大学，2009.
[72] 黑鑫鑫 . 石菖蒲活性成分 β- 细辛醚对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2020.
[73] 李卉 . 配伍人参皂苷对阿尔茨海默病的治疗作用及机制研究 [D]. 吉林：吉林化工学院，2019.
[74] 许亚萍，伍旭明 . 石菖蒲 - 远志药对配伍机制初步探讨 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（12）：5629-5632.
[75] 张慧，王颖，侯林 . 石菖蒲 - 远志药对配对前后水煎液中挥发性成分的含量变化分析 [J]. 药学研究，2015，34（5）：269-271.
[76] 孟雪，贾璞，张毅，等 . P-gp 调控的石菖蒲对远志成分肠吸收特性的影响 [J]. 现代中药研究与实践，2019，33（5）：19-23.
[77] 邓敏贞，宁百乐，王南卜，等 . 石菖蒲挥发油联合人参总皂苷对 APP/PS1 双转基因小鼠乙酰胆碱转移酶、胶质纤维酸性蛋白和海马组织病理形态学的影响 [J]. 中医学报，2019，34（1）：80-85.
[78] 戴莹，姜艳艳，陈小虎，等 . 基于类药成分 3，6'- 二芥子酰基蔗糖和 α- 细辛醚的开心散质量控制方法研究 [J]. 北京中医药大学学报，2011，34（4）：254-257.
[79] 巴寅颖，解素花，吕航，等 . 基于抗痴呆类药成分西伯利亚远志糖 A_5、西伯利亚远志糖 A_6 和远志呫酮Ⅲ的开心散质量控制方法研究 [J]. 北京中医药大学学报，2012，35（4）：273-277.

（收稿日期：2022-01-12；修回日期：2022-03-16）

药物分析与检验

高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学方法评价瑶药材网络鸡血藤根的质量

严赟[2]，郭雯雯[2]，林小娟[2]，张赟赟[1*]，杨海船[1]，王彩玉[3]，黄莉[3]（1. 广西中医药研究院，南宁 530022；2. 广西食品药品检验所，南宁 530021；3. 桂林医学院药学院，广西 桂林 541004）

摘要：目的 建立网络鸡血藤根 HPLC 指纹图谱，为网络鸡血藤根药材质量差异和评价提供参考依据。**方法** 采用高效液相色谱 - 二极管阵列检测器测定 10 批不同产地的网络鸡血藤根药材，并进行相似度评价、聚类分析和主成分分析。**结果** 建立了网络鸡血藤根 HPLC 指纹图谱的共有模式，确认 17 个共有峰，并根据对照品指认 1 个共有峰。10 批药材相似度均大于 0.8，相似度分析结果与聚类分析结果基本一致。主成分分析表明，色谱峰 1、3、6、13、16 可作为网络鸡血藤根质量评价的指标成分，其中 13 号峰为芒柄花素。**结论** HPLC 指纹图谱结合聚类分析和主成分分析可以快速、高效地评价网络鸡血藤根药材的质量，为网络鸡血藤根药材的质量控制提供科学依据。

关键词：网络鸡血藤根；高效液相色谱；指纹图谱；聚类分析；主成分分析
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)08-1890-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.030

Quality evaluation of Yao medicine *Millettia reticulata* radix with HPLC fingerprint coupled with chemometrics

YAN Yun[2], GUO Wen-wen[2], LIN Xiao-juan[2], ZHANG Yun-yun[1*], YANG Hai-chuan[1], WANG Cai-yu[3], HUANG Li[3] (1. *Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences*, *Nanning* 530022; 2. *Guangxi Institute for Food and Drug Control*, *Nanning* 530021; 3. *School of Pharmacy*, *Guilin Medical University*, *Guilin Guangxi* 541004)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Millettia reticulata* radix to provide reference for the quality difference and evaluation. **Methods** HPLC-DAD was used to determine 10 groups of *Millettia reticulata* radix of different origins. Similarity evaluation, cluster analysis and principal component analysis were carried conducted. **Results** The HPLC fingerprint of *Millettia reticulata* radix has been established with 17 common peaks. One of the common peaks was identified. The similarity of *Millettia reticulata* radix was higher than 0.8. The similarity evaluation was consistent with the cluster analysis. The principal component analysis showed that the common peak 1, 3, 6, 13, 16 could be used as the index components for the quality evaluation of *Millettia reticulata* radix. Peak 13 was formononetin. **Conclusion** HPLC fingerprints combined with cluster analysis and principal component analysis can quickly and objectively evaluate the quality of *Millettia reticulata* radix, and provide a scientific basis for its quality control.

Key words: *Millettia reticulata* radix; HPLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

基金项目：广西食品药品监督管理局项目（No.MZY2017002）。
作者简介：严赟，男，副主任药师，主要从事药品质量检测与分析评价工作，email：yanyun1144@163.com *通信作者：张赟赟，女，副主任药师，主要从事药物分析和中药化学研究工作，email：melody0707@163.com

网络鸡血藤根是豆科植物网络崖豆藤 *Millettia reticulata* Benth. 的干燥根，瑶族习用药材。《全国中草药汇编》《中国民族药志要》《中国瑶药学》《广西药用植物名录》等对其原植物、药用价值、地理分布等情况均有简要记述，其具有祛风除湿、通经活络、强筋骨、镇静的功效，用于治疗风湿筋骨痛、四肢麻木、腰膝酸痛、瘫痪、贫血、遗精、盗汗、月经不调、闭经、跌打损伤等病症，为多民族使用的民间草药[1-4]。目前尚无国家标准及地方标准对网络鸡血藤根药材进行质量控制和评价，近年来，广西打造特色健康医药产业，鼓励壮瑶药产业发展壮大，因此有必要全面地评价网络鸡血藤根的化学成分，建立能有效、全面控制该药材的质量标准。中药成分复杂，利用中药指纹图谱中的相似度分析评定各批次样品指纹图谱间的相似程度，描述它们各自化学组分的差异性和波动情况，能更全面地反映出药材的质量[5-8]。主成分分析是近年来中药指纹图谱结合数理统计方法形成的一种方法研究。中药为多成分物质且很多成分均未有研究报道，主成分分析是为了预测该中药可能的主要作用成分，对于该中药进行后期的物质基础研究、质量标准的建立以及药效药理等方面的研究具有指导意义[9-12]。本试验采用高效液相色谱法对 10 批网络鸡血藤根药材进行分析，建立 HPLC 指纹图谱进行相似度分析，并结合聚类分析和主成分分析，为不同产地的网络鸡血藤根质量评价提供理论依据和参考。

1　仪器与材料

1.1　仪器

Waters2695-2998 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Milli-Q 超纯水仪（德国默克）；XS205DU 型电子天平（十万分之一，梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；S120H 超声仪（德国艾尔玛）。

1.2　材料

对照品芒柄花素（批号：111703-200501，供鉴别用，中国食品药品检定研究院，经 HPLC 峰面积归一化法检测，质量分数为 99.12%）；乙腈、磷酸、甲醇、三氯甲烷均为色谱纯，其他化学试剂为分析纯，水为超纯水；10 批广西不同产地网络鸡血藤根药材（见表 1），经广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为豆科植物网络崖豆藤的干燥根。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

表 1　网络鸡血藤根药材来源信息表

Tab 1　Source of *Millettia reticulata* radix

编号	产地	采集日期	药用部位
S1	来宾市金秀县桐木镇古池村	2019-08-07	根
S2	柳州市鹿寨县四排镇甲凤村	2019-08-21	根
S3	桂林市荔浦县茶城乡过村土围屯乡	2019-09-05	根
S4	来宾市象州县水晶乡朝阳屯	2019-09-08	根
S5	河池市宜州区庆远镇矮山	2019-09-09	根
S6	柳州市柳南区洛满镇洛满村	2019-09-16	根
S7	桂林市阳朔县高田镇	2019-10-16	根
S8	桂林市平乐县龙窝镇江口桥头	2019-10-17	根
S9	柳州市柳江县穿山镇	2019-10-18	根
S10	来宾市武宣县金鸡乡新村	2019-10-28	根

色谱柱为 Purospher STAR RP-18 endcapped（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）和 0.4% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（洗脱程序见表 2），流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 249 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution procedure

时间 /min	乙腈 /%	0.4% 磷酸水溶液 /%
0	10	90
60	45	55
80	90	10
85	90	10
86	10	90
91	10	90

2.2　供试品溶液的制备

称取网络鸡血藤根药材粉末（过 2 号筛）约 3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入三氯甲烷 - 甲醇（4∶1）混合溶液 50 mL 超声提取（功率：200 W，频率：37 kHz）30 min，过滤，药渣用 30 mL 三氯甲烷 - 甲醇（4∶1）混合溶液洗涤 3 次，每次 10 mL，合并滤液蒸干，残渣加甲醇溶解定容到 5 mL 量瓶中，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3　对照品溶液制备

精密称取芒柄花素对照品 15.74 mg，置 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解定容作为对照品储备液，精密吸取上述对照品储备液 3 mL 置 20 mL 的量瓶中，加甲醇定容，即得质量浓度为 23.61 μg • mL^{-1} 的对照品溶液。

2.4　指纹图谱方法学考察

2.4.1　精密度试验　取同一批（S1）网络鸡血藤根样品，按“2.2”项下的方法制备，连续进样 6 次，记录指纹图谱，以 4 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 0.14% ～ 4.9%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.091% ～ 1.8%，表明仪器精密度良好。

2.4.2　重复性试验　取同一批（S1）网络鸡血藤根样品，按照“2.2”项下条件平行制备 6 份，进样测定，记录指纹图谱，以 4 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 2.2% ～ 4.9%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.10% ～ 0.13%，表明该方法重复性好。

2.4.3　稳定性试验　取同一批（S1）网络鸡血藤根样品，按照“2.2”项下方法进行制备，分别在 0、1.5、3、6、12、24 h，进样测定，以 4 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 0.18% ～ 4.3%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.060% ～ 0.24%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5　指纹图谱的建立

分别取 10 批不同产地网络鸡血藤根药材，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图，并导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）进行全谱匹配，以 S1 号色谱图为参照图谱，采用中位数法生成共有模式 R，共确定了 17 个共有色谱峰（见图 1）。经过与对照品图谱对比，指认 13 号峰为芒柄花素（见图 2），4 号峰峰面积较大，且分离度符合要求，故设为参照物峰，计算得到 10 批图谱中各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值均小于 1.1%，表明各共有色谱峰保留时间稳定，但相对峰面积的 *RSD* 值为 53.9% ～ 146.4%（见表 3），差异较大。说明 10 批网络鸡血藤根药材在化学成分种类上具有一致性，但各批次同一成分的含量差异明显。

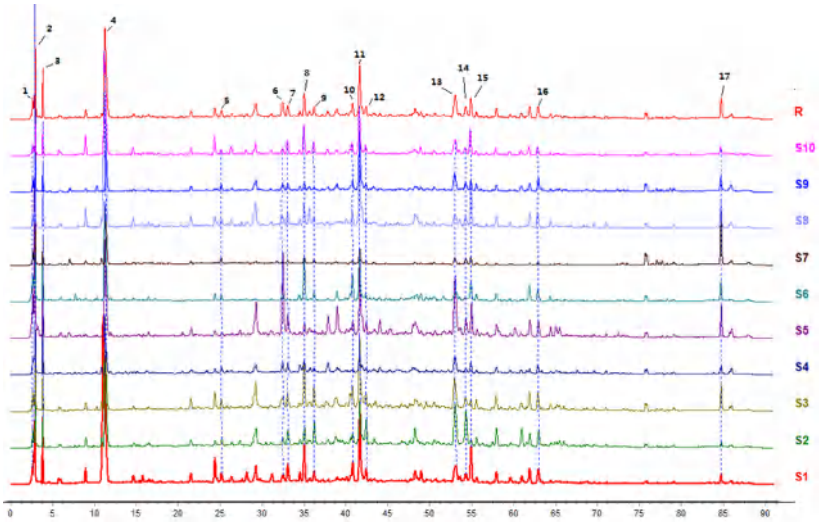


图 1　10 批网络鸡血藤根药材 HPLC 指纹图谱重叠图

Fig 1　Overlapping map of the HPLC fingerprints of 10 batches of *Millettia reticulata* radix

表 3　共有峰相对峰面积

Tab 3　Relative peak area of common peaks

编号	药材编号										*RSD*/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.046	0.135	0.014	0.512	0.390	0.202	0.262	0.063	0.231	0.062	85.0
2	0.186	0.322	2.685	1.647	1.742	0.289	0.564	0.179	0.585	0.129	105.6
3	0.110	0.169	0.202	1.071	0.335	0.224	0.242	0.106	0.295	0.103	100.5
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
5	0.038	0.080	0.077	0.242	0.024	0.045	0.120	0.043	0.143	0.039	79.0
6	0.039	0.097	0.174	0.516	0.763	0.060	0.043	0.073	0.225	0.054	119.4
7	0.062	0.171	0.145	0.455	0.217	0.026	0.067	0.056	0.171	0.093	85.3
8	0.118	0.181	0.396	0.634	0.105	0.322	0.143	0.099	0.157	0.182	73.0
9	0.032	0.273	0.225	0.153	0.072	0.081	0.084	0.058	0.063	0.093	69.4
10	0.071	0.136	0.204	0.131	0.132	0.252	0.062	0.072	0.261	0.075	53.9
11	0.293	0.554	0.771	0.809	0.793	0.388	0.377	0.364	1.638	0.348	64.1
12	0.055	0.282	0.144	0.174	0.122	0.065	0.060	0.033	0.184	0.069	65.5
13	0.116	0.626	0.437	1.147	0.757	0.126	0.206	0.108	0.632	0.171	81.3
14	0.054	0.484	0.195	0.269	0.218	0.030	0.172	0.076	0.270	0.069	75.2
15	0.130	0.057	0.075	0.443	0.287	0.181	0.171	0.212	0.249	0.190	55.8
16	0.061	0.152	0.175	0.411	1.476	0.112	0.058	0.078	0.370	0.069	146.4
17	0.024	0.039	0.183	0.345	0.224	0.133	0.949	0.111	0.308	0.050	115.6

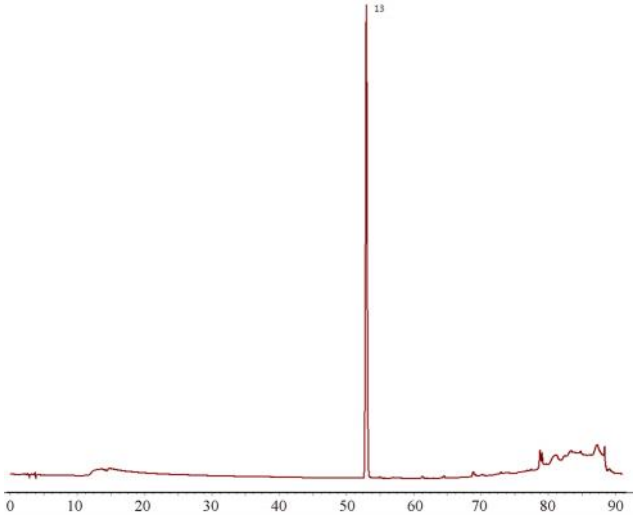


图 2　芒柄花素对照品

Fig 2　Formononetin reference substance

3　数据分析

3.1　指纹图谱相似度分析

采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统》（2012 版），计算 10 批网络鸡血藤根药材的相似度，以 S1 号色谱图为参照图谱，采用多点校正法进行色谱峰匹配，中位数法生成共有模式（R），结果各批药材的相似度值在 0.801 ～ 0.951（见表 4），说明各产地的药材有较好的一致性，本研究建立的指纹图谱可以用于网络鸡血藤根药材的质量控制。

表 4　10 批网络鸡血藤根药材相似度分析结果

Tab 4　Similarity analysis of 10 batches of *Millettia reticulata* radix

药材编号	相似度	药材编号	相似度
S1	0.942	S6	0.951
S2	0.914	S7	0.818
S3	0.942	S8	0.945
S4	0.801	S9	0.873
S5	0.831	S10	0.948

3.2　聚类分析

以网络鸡血藤根药材 HPLC 指纹图谱的 17 个共有峰的峰面积为特征，得到 17×10 阶原始数据矩阵，运用 SPSS 23.0 分析软件对其进行聚类分析，采用组间连接法，以欧式平方距离为测度，Z 标准化，对样品进行聚类分析，结果如图 3。当分类距离为 10 时，10 批网络鸡血藤根药材可以聚为三大类，其中 S1、S4、S6、S7、S8、S9、S10 聚为第Ⅰ类；S2、S3 聚为第Ⅱ类；S5 单独聚为第Ⅲ类。

3.3　网络鸡血藤根指纹图谱的主成分分析

主成分分析运用数学中的降维思想，在基本保留原始指标信息的前提下，以互不相关的综合指标

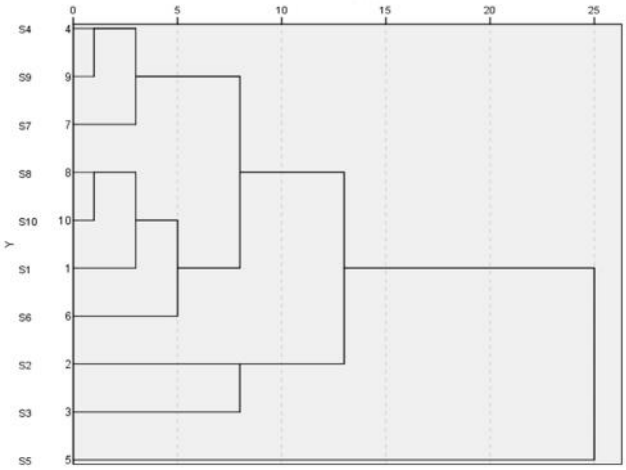


图 3　10 批网络鸡血藤根药材聚类分析图

Fig 3　Cluster analysis diagram of 10 batches of *Millettia reticulata* radix

来反映原始指标所提供的信息。将 10 批样品的 17 个共有峰的峰面积作为变量，通过 SPSS 23.0 软件进行数据 Z 标准化处理，并作为新变量进行主成分分析。计算主成分的特征值及方差贡献率见表 5。从表 5 可以看出，网络鸡血藤根主成分分析中成分 1、2、3、4 主成分的特征值均＞ 1，累积方差贡献率 87.219%。进一步分析主成分载荷矩阵，主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小和作用方向，载荷的绝对值越大，对主成分的贡献越大，见表 6，从表 6 可以看出，主成分 1 的信息来自色谱峰 1、3、6、13、16，其中 13 号峰为芒柄花素，主成分 2 的信息来自色谱峰 9、12、14，主成分 3 的信息来自色谱峰 8、10，主成分 4 的信息来自色谱峰 4、15。

表 5　主成分特征值及方差贡献率

Tab 5　Principal component eigen values and variance contribution rate

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%	总计	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	6.702	39.421	39.421	6.702	39.421	39.421
2	4.061	23.888	63.309	4.061	23.888	63.310
3	2.584	15.202	78.511	2.584	15.202	78.511
4	1.480	8.708	87.219	1.480	8.708	87.219
5	0.891	5.242	92.461			
6	0.613	3.608	96.069			
7	0.338	1.987	98.056			
8	0.258	1.520	99.576			
9	0.072	0.424	100.000			

4　讨论

本研究对 10 批不同产地网络鸡血藤根的 HPLC 指纹图谱进行相似度分析、聚类分析和主成分分析。结果发现 10 批网络鸡血藤根药材之

表 6　主成分载荷矩阵

Tab 6　Principal component loading matrix

峰号	成分			
	1	2	3	4
1	0.892	－0.071	－0.106	0.113
2	0.488	0.233	0.680	－0.347
3	0.741	0.048	0.362	0.362
4	0.045	0.136	0.393	0.860
5	－0.538	0.421	0.395	0.454
6	0.987	0.120	0.046	－0.028
7	0.632	0.652	0.130	0.234
8	－0.196	0.109	0.898	0.226
9	－0.144	0.808	0.464	－0.096
10	0.104	0.086	0.823	0.284
11	0.486	0.391	0.512	0.347
12	0.097	0.942	0.198	0.101
13	0.721	0.679	0.091	－0.077
14	0.179	0.947	－0.017	－0.049
15	0.410	－0.230	0.120	0.818
16	0.993	0.101	－0.004	－0.011
17	0.318	－0.478	0.093	－0.466

间相似度均大于 0.8，说明药材中化学成分相似度较高，各产地的药材有较好的一致性。但是不同产地药材各共有峰含量差异较大，通过对 10 批药材指纹图谱以及 17 个共有峰峰面积的比较，发现相似度低于 0.9 的 4 批药材呈现两个极端，S4、S7、S9 指纹图谱各峰含量相比其他批次都较小，17 个共有峰峰面积总和排名最后三位，S5 指纹图谱各峰含量是 10 批药材中最高的，17 个共有峰峰面积总和排名第一，是排名最后的 S7 总峰面积的 5 倍多，证明了药材的生长环境对药材有效成分的含量影响非常大，这对我们后期规范种植选址具有重要的参考意义。

采用 SPSS 23.0 分析软件系统聚类发现，可聚为三大类，其中 S1、S4、S6、S7、S8、S9、S10 聚为第Ⅰ类；S2、S3 聚为第Ⅱ类；S5 单独聚为第Ⅲ类。由图 3 可以看出 S5 被单独聚为一类，S4、S7、S9 在第Ⅰ类中被单独聚为一小类，与相似度分析的结果基本一致。

采用 SPSS 23.0 分析软件进行主成分分析，确定 4 个主成分，其方差贡献率依次为 39.421%、23.888%、15.202%、8.708%，累积方差贡献率为 87.219%，代表了网络鸡血藤根药材 80% 以上的信息。进一步分析主成分载荷矩阵，考察各峰对主成分的贡献大小。结果表明色谱峰 1、3、6、13、16，对主成分 1 的贡献率较大，可作为网络鸡血藤根质量评价指标成分，其中 13 号峰为芒柄花素，为后期含量测定标准的建立提供依据和参考。

传统瑶药由于成分复杂，需要利用现代色谱技术对尽可能多的化学成分进行表征。本试验建立了不同产地网络鸡血藤根药材 HPLC 指纹图谱，对其中 1 个共有峰进行了化学成分指认，初步反映了网络鸡血藤根整体化学特征，同时结合聚类分析和主成分分析多方面评价网络鸡血藤根质量，为其整体质量控制提供了依据。

参考文献

[1] 王国强 . 全国中草药汇编（卷一）[M]. 3 版 . 北京：人民卫生出版社，2014：336.

[2] 贾敏如，李星炜 . 中国民族药志要 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2005：407.

[3] 覃迅云，罗金裕，高志刚 . 中国瑶药学 [M]. 北京：民族出版社，2002：481.

[4] 广西壮族自治区中医药研究所 . 广西药用植物名录 [M]. 南宁：广西人民出版社，1986：244.

[5] 吴琼，马群，胡北，等 . 牛蒡根提取物指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1624-1628.

[6] 瞿昊宇，何群，谢梦洲，等 . 川芎药材与饮片指纹图谱对比研究 [J]. 亚太传统医药，2021，17（11）：41-46.

[7] 史锐，吴鹏，刘苗苗，等 . 黑果腺肋花楸果实高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（12）：186-189.

[8] 李慧峰，田凡玉，孟霜，等 . 酒五味子的指纹图谱建立及化学模式识别分析 [J]. 中国药房，2021，32（4）：3008-3013.

[9] 周冰倩，高喜梅，杨颖，等 . 不同来源竹茹药材 HPLC 指纹图谱和化学计量学分析 [J]. 中草药，2022，53（3）：853-857.

[10] 张维方，樊克锋，雷敬卫，等 . 地黄药材的红外指纹图谱及多元统计分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2021，41（11）：3392-3398.

[11] 陈锋，张颖，李嘉 . 基于聚类分析和主成分分析的广西小叶金花草高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1883-1886.

[12] 张萍，罗敏，胡克特，等 . 西南鬼灯檠 UPLC-ECD 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析 [J]. 中南药学，2021，19（1）：62-66.

（收稿日期：2021-12-29；修回日期：2022-03-14）

藏药材唐古特铁线莲质量标准提升

万玉莹[2]，陈晓奇[3]，王喜锟[2]，邓顺艳[4]，邹海飞[4]，周燕[4]，达娃卓玛[1, 2*]（1.中药（藏药）质量控制重点实验室 西藏自治区食品药品检验研究院，拉萨　850005；2.西藏大学，拉萨　850012；3.中国科学院成都有机化学研究所，成都　610041；4.中国科学院成都生物研究所，成都　610042）

摘要：目的　提升藏药材唐古特铁线莲的质量标准。**方法**　参照 2020 年版《中国药典》第四部通则，以 19 批自西藏、青海各不同地区采收集的唐古特铁线莲药材为研究对象，对其进行外观性状鉴别，药材组织切片及粉末显微鉴别；以常春藤皂苷元为对照物质，对药材进行薄层色谱（TLC）鉴别及高效液相色谱（HPLC）含量测定研究；对藏药材唐古特铁线莲的各检查项及浸出物进行测定。**结果**　唐古特铁线莲药材在性状、显微和 TLC 鉴别方面均具有专属性特征；水分含量为 7.51% ～ 12.55%，总灰分含量为 4.54% ～ 7.68%，酸不溶性灰分含量为 0.10% ～ 1.06%，热浸法水溶性浸出物含量为 21.16% ～ 40.32%，建议暂定药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分含量分别不得过 13.0%、8.0%、1.00%，热浸法水溶性浸出物含量不得少于 20.0%；常春藤皂苷元在 2.5137 ～ 1005.5 μg • mL^{-1}（r = 0.9999）内与色谱峰面积线性关系良好，其定量限为 25.14 ng，检测限为 7.54 ng；唐古特铁线莲中常春藤皂苷元含量为 0.074% ～ 1.667%，平均加样回收率 98.02% ～ 99.25%，方法准确度良好。建议暂定唐古特铁线莲药材中常春藤皂苷元含量不得少于 0.10%。**结论**　该研究结果可为唐古特铁线莲药材的质量控制和标准提高提供参考。

关键词：藏药材；唐古特铁线莲；质量标准；常春藤皂苷元；Cubic 插值法；统计学原理
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1895-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.031

Quality standard of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.

WAN Yu-ying[2], CHEN Xiao-qi[3], WANG Xi-kun[2], DENG Shun-yan[4], ZOU Hai-fei[4], ZHOU Yan[4], DAWA Zhuo-ma[1, 2*] (1. *National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine*, *Institute of Food and Drug Control of Tibet Autonomous Region*, *Lhasa* 850005; 2. *Tibet University*, *Lhasa* 850012; 3. *Chengdu Institute of Organic Chemistry*, *Chinese Academy of Sciences*, *Chengdu* 610041; 4. *Chengdu Institute of Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Chengdu* 610042)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Tibetan medicinal material *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.. **Methods** According to the 2020 *Chinese Pharmacopoeia* (Volume Ⅳ), 19 batches of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. from different areas of Tibet and Qinghai were used as the research object. The appearance characteristics were identified, and the tissue sections and powder were identified by microscopy. As a control substance, Hederagenin was identified by TLC and determined by HPLC. The inspection items and extract items of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. was determined. **Results** *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. was specific in character, under microscope and in TLC identification. The content ranges of water, total ash, acid insoluble ash and the water-soluble extract of hot leaching were 7.51% － 12.55%, 4.54% － 7.68%, 0.10% － 1.06%, and 21.16% － 40.32% respectively. The contents of moisture, total ash and acid insoluble ash should be no more than 13.0%, 8.0% and 1.00% respectively, and the water-soluble extract of hot leaching should be no less than 20.0%. Hederagenin had a good linearity with the chromatographic peak area at 2.5137 － 1005.5 μg•mL^{-1} (r =

基金项目：西藏自治区自然科学基金项目（No. XZ2019ZRG-168）。
作者简介：万玉莹，女，在读硕士研究生，主要从事藏药质量标准评价方法研究，email：1152769700@qq.com　*通信作者：达娃卓玛，女，博士，主任药师，硕士研究生导师，主要从事藏药质量标准及药物化学研究，email：892395405@qq.com

0.9999). The limits of quantitation and detection were 25.14 ng and 7.54 ng. The content of hederagenin in *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. ranged from 0.074% to 1.667%. The average recovery was 98.02% － 99.25%, with good method accuracy. The content of hederagenin in the *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh. should be no less than 0.10%. **Conclusion** The study provides a scientific basis for the quality control and standard improvement of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh..

Key words: Tibetan medicine; *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.; quality standard; hederagenin; Cubic interpolation method; principle of statistics

唐古特铁线莲 [*Clematis tangutica*（Maxim.）Korsh.] 是毛茛科（Ranunculacea）铁线莲属（*Clematis* L.）藤本植物，又称甘青铁线莲，藏文名称“叶芒那布”，主要分布于青海和西藏等高原地区，地上部分入药 [1]。据《晶珠本草》和《藏药志》等藏药典籍记载，其性辛、甘、温，祛寒，增生胃火，活血通瘀，破痞瘤积聚 [2-3]，对心血管系统疾病有良好的疗效，常用于治疗消化不良，寒性肿瘤等症 [4]，是藏成药益心康泰胶囊的组方药材之一 [5]。目前，从唐古特铁线莲中共分离得到 72 种化学成分，主要是三萜皂苷类化合物，苷元多为齐墩果烷型五环三萜结构，主要分为常春藤皂苷元型三萜皂苷（43 种）和齐墩果酸型三萜皂苷（12 种）。其中常春藤皂苷元型三萜皂苷具有心肌保护抗缺血性脑损伤抗肿瘤细胞和抗菌活性等 [6-11]。

1995 年卫生部颁《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药（第一册）收载的唐古特铁线莲药材质量标准水平低，包括名称、来源、性状、生药鉴别、炮制、性味与归经、功能与主治、用法与用量、贮藏 [12]，无法达到质量控制目的，所以亟需对其质量标准进行修订提高。本研究根据《中国药典》2020 年版第四部通则相关规定，增补薄层鉴别、含量测定、各检查项及浸出物等检测项目 [13]，以其为藏药材质量标准进一步完善奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-CLASS 液相色谱仪（四元泵，PDA 检测器，柱温箱，自动进样器，Empower 色谱数据工作站）；Sartorius BT 25 S（十万分之一）和 BSA124S-CW（万分之一）电子天平（德国赛多利斯公司）；常春藤皂苷元对照品（中国食品药品检定研究院，含量以 98.3% 计）；硅胶 G 板（青岛海洋化工有限公司）。

1.2 试药

唐古特铁线莲药材 19 批次，采集自西藏自治区及青海省不同地区，经西藏自治区藏医院格桑巴珠副主任药师和四川省中医药科学院周毅研究员鉴定为毛茛科植物唐古特铁线莲 [*Clematis tangutica*（Maxim.）Korsh.]。7 ～ 8 月花果期采集地上部分，切段晒干，粉碎后过 2 号筛，混合均匀，备用。样品信息见表 1。甲醇、乙腈为色谱纯（美国 Fisher 公司）；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材性状特征

本品茎细长，有时弯曲，具纵棱，灰棕色或棕褐色，质硬而脆，易折断，断面较平坦，白色；叶卷曲皱缩，破碎，棕褐色或灰绿色，展开后小叶片呈狭长圆形或披针形，深裂，边缘具缺刻状锯齿，背面被疏毛；花呈荷苞状，有的压扁，桔黄色，萼片 4，长椭圆形，先端渐尖，外面被柔毛；果序呈绒球状或扁绒球状，柄长，瘦果倒卵形，长约 4 ～ 7 mm，具长柔毛。气微，味微苦 [12]。唐古特铁线莲干燥药材见图 1。

2.2 显微特征

2.2.1 靠近根部的茎横切面　类圆形，表皮细胞 1 列；双层纤维束呈环状排列，大小不一，月牙形，外环一周环绕约 14 ～ 18 个，内环一周环绕约 11 ～ 13 个；外韧维管束周状排列，呈倒卵形，一周环绕约 7 ～ 8 个，长径约占横切面半径的 2/5，木质部呈倒三角状，形成层不明显；髓部呈类圆形，约占横切面半径的 1/6，髓射线 7 ～ 8 条，放射状分布在髓部外周到皮层（见图 2）。

2.2.2 茎横切面　类圆形，表皮细胞 1 列；皮层偶见次生保护组织周皮细胞 2 ～ 3 列；纤维束呈环状排列，类半圆型，约占横切面半径的 1/4，一周环绕约 12 ～ 13 个；外韧维管束类椭圆形，长径约占横切面半径的 2/5，周状排列，一周环绕约 12 个；髓部约占横切面半径的 1/5，由 15 ～ 20 列细胞环绕排列组成（见图 3）。

2.2.3 主叶脉横切面　上、下表皮细胞各 1 列，椭圆形或类圆形；叶肉大型薄壁细胞，3 ～ 4 列疏松排列；上表皮内侧见栅栏组织 1 ～ 2 列，紧密排列；海绵组织细胞 3 ～ 4 列，疏松排列且不规则；

表 1　唐古特铁线莲药材采集信息

Tab 1　Sample information of *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh.

批号	采收集地点	海拔 /m	地理位置	采集日期
T2020-01	西藏昌都类乌奇县（昌都藏医院收集）	4496	E：96°　23’ 15”，N：31°　27’ 00”	2019 年 8 月
T2020-02	西藏日喀则市江孜县卡堆乡	4041	E：89°　34’ 41”，N：29°　06’ 30”	2019 年 7 月
T2020-03	西藏日喀则亚东县（日喀则藏医院收集）	4706	E：89°　09’ 38”，N：27°　45’ 56”	2019 年 7 月
T2020-04	西藏山南市桑日县增期乡	4739	E：92°　21’ 35”，N：29°　25’ 50”	2019 年 7 月
T2020-05	西藏拉萨林周县（雄巴拉曲藏药厂收集）	4809	E：91°　23’ 14”，N：30°　06’ 42”	2019 年 8 月
T2020-06	西藏山南市桑日县桑株乡	4692	E：92°　13’ 19”，N：29°　24’ 48”	2020 年 7 月
T2020-07	西藏山南措美县（山南藏医院收集）	5041	E：91°　32’ 30”，N：28°　34’ 45”	2020 年 7 月
T2020-08	西藏日喀则市吉隆县贡当乡	4021	E：84°　46’ 03”，N：28°　44’ 28”	2020 年 7 月
T2020-09	青海省西宁市湟中区海子沟乡	2388	E：101°　39’ 38”，N：36°　41’ 43”	2021 年 8 月
T2020-10	青海省西宁市湟中区	2391	E：101°　31’ 58”，N：36°　38’ 36”	2019 年 7 月
T2020-11	青海省贵德县	2622	E：101°　22’ 07”，N：35°　56’ 60”	2020 年 7 月
T2020-12	青海省互助土族自治县	3662	E：102°　14’ 53”，N：36°　49’ 44”	2021 年 7 月
T2020-13	青海省化隆回族自治县	3057	E：102°　10’ 58”，N：36°　03’ 09”	2019 年 8 月
T2020-14	青海省互助县南门峡水库边	2752	E：101°　53’ 38.86”，N：36°　58’ 17.75”	2020 年 8 月
T2020-15	青海省互助县北山花石山	2948	E：102°　5’ 41.22”，N：36°　59’ 44.45”	2021 年 7 月
T2020-16	青海省湟中区蚂蚁沟水库	2663	E：101°　35’ 59.25”，N：36°　29’ 24.36”	2019 年 7 月
T2020-17	青海省湟中区盘道村	2863	E：101°　21’ 59.81”，N：36°　36’ 6.38”	2020 年 8 月
T2020-18	青海省循化县土庄廊	3115	E：101°　57’ 6.47”，N：35°　16’ 3”	2021 年 7 月
T2020-19	青海省乐都区南大山	1849	E：102°　41’ 31.15”，N：36°　22’ 35.84”	2021 年 8 月

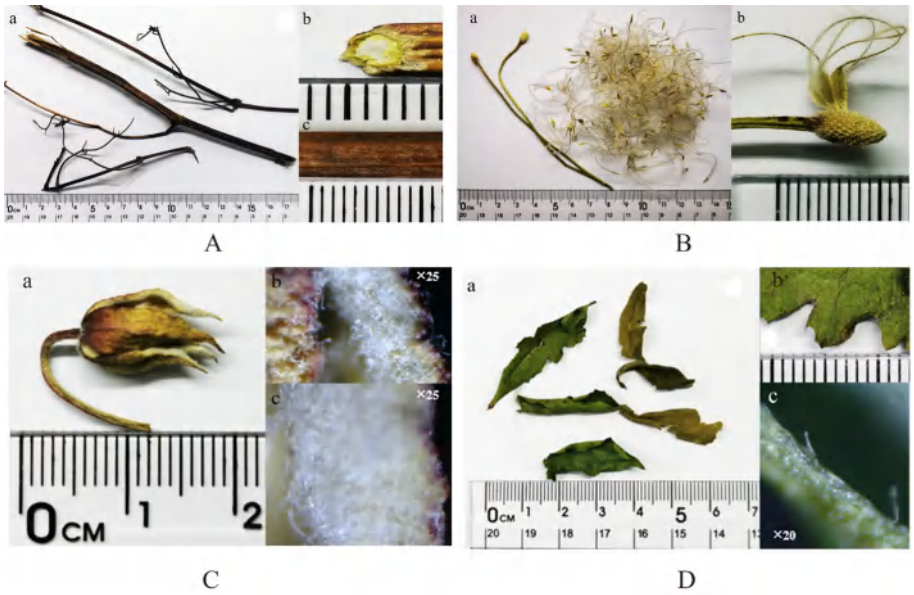


图 1　唐古特铁线莲干燥药材

Fig 1　Dry medicinal material of *Clematis tangutica*（Maxim.）Korsh.

A. 茎部位（stem）：a. 茎全图（full view of the stem），b. 茎斜断面图（oblique section of the stem），c. 茎放大图（enlarged view of the stem）；B. 果实部位（fruit）：a. 果实全图（full view of the fruit），b. 瘦果与果序放大图（enlarged view of achene and infructescence）；C. 花部位（flower）：a. 花全图（full view of flower），b，c. 被柔毛放大图（enlarged view of pilose hairs）；D. 叶部位（leaves）：a. 叶全图（full view of leaves），b. 叶边缘放大图（enlarged view of leaf edge），c. 叶背面被疏毛放大图（enlarged view of abaxially sparsely hairy leaf）

中部有双韧维管束，类卵形，长径约占横切面宽度的 1/3，韧皮部细胞紧密排 3 ～ 5 列（见图 4）。

2.2.4　生药粉末　非腺毛多细胞多碎断，细胞连接处常有细胞缢缩，顶端细胞呈类椭圆形；叶表皮细胞表面观为呈类多角形，气孔为不定式，散在草酸钙结晶，呈多面体形，表面观呈多角形[12]；纤维成束，导管多为具缘纹孔导管、螺纹导管和环纹导管，直径 14.09 ～ 68.46 μm；种毛多见，透明，多断裂（见图 5）。

2.3　薄层鉴别

2.3.1　对照品、供试品溶液制备　称取常春藤皂苷元对照品适量，加甲醇溶解制成质量浓度为 1 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。供试品溶液按照“2.7.3”项下方法制备。

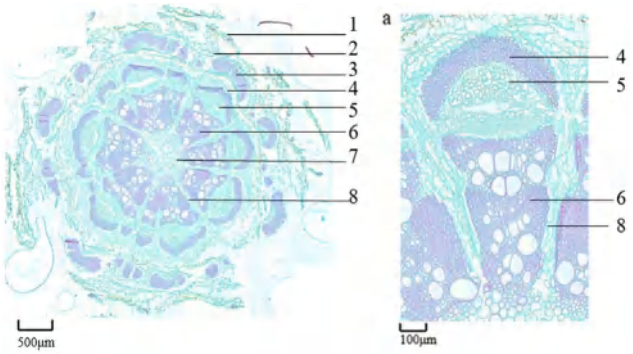


图 2　靠近根的茎横切面

Fig 2　Cross section of the stem near the root

1. 表皮（epidermis）；2. 皮层（cortex）；3，4. 纤维束（fiber tracts）；5. 韧皮部（phloem）；6. 木质部（xylem）；7. 髓部（pulp）；8. 髓射线（pith ray）；a. 韧皮部与木质部放大图（enlarged view of phloem and xylem）

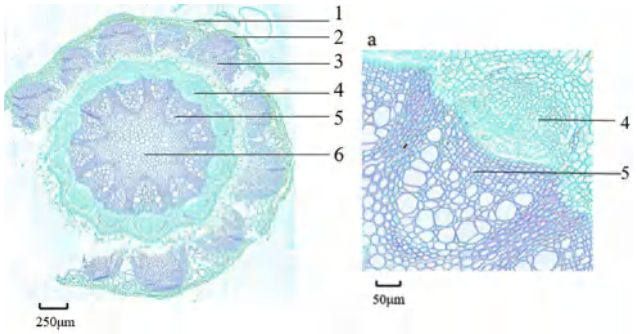


图 3　茎横切面

Fig 3　Cross section of the stem

1. 表皮（epidermis）；2. 皮层（cortex）；3. 纤维束（fiber tracts）；4. 韧皮部（phloem）；5. 木质部（xylem）；6. 髓部（pulp）；a. 韧皮部与木质部放大图（enlarged view of phloem and xylem）

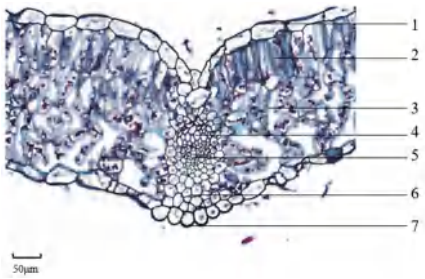


图 4　主叶脉横切面

Fig 4　Cross section of the main vein

1. 上表皮（upper epidermis）；2. 栅栏组织（palisade tissue）；3. 海绵组织（sponge tissue）；4. 木质部（xylem）；5. 韧皮部（phloem）；6. 薄壁组织（parenchymatous tissue）；7. 下表皮（lower epidermis）

2.3.2　方法　照薄层色谱法（通则 0502），吸取上述对照品溶液 2 μL，供试品溶液 2 ～ 3 μL，点于同一硅胶 G 薄层板，以环己烷 - 乙酸乙酯 - 冰醋酸（6∶4∶0.25）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸 - 乙醇溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，可在样品及对照品相应位置上观察到相同的紫红色斑点 [14]（见图 6）。

图 5　生药粉末

Fig 5　Crude drug powder

1. 非腺毛（nonglandular hair）；2. 叶表皮细胞（leaf epidermal cell）；3. 草酸钙晶体（calcium oxalate crystal）；4. 纤维（fiber）；5. 导管（vessel）；6. 种毛（seedhai）

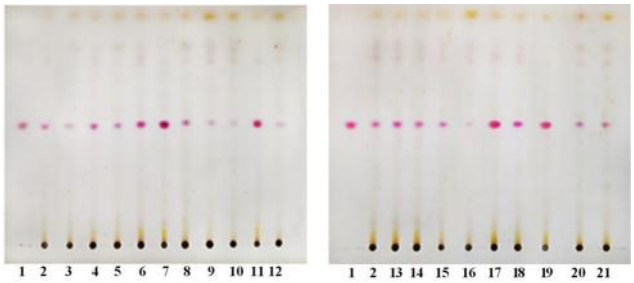


图 6　唐古特铁线莲 TLC 图

Fig 6　TLC of *Clematis tangutica*（Maxim.）Korsh.

1. 常春藤皂苷元（hederagenin）；2. 暂定 T2020-02 为对照药材（T2020-02 was tentatively designated as a control medicinal material）；3 ～ 21. 样品 T2020-01 ～ T2020-19 [T2020-01 ～ T2020-19 samples]

2.4　水分测定

不同产地的唐古特铁线莲药材水分含量 7.51% ～ 12.55%，平均值含量为 9.8%。以平均值上浮 30% 为上限，暂定本品水分不得过 13.0%[15]。19 批药材水分合格率为 100%，结果见表 2。

2.5　灰分、酸不溶性灰分测定

不同产地的唐古特铁线莲药材总灰分含量为 4.54% ～ 7.68%，平均值为 5.9%，以平均值上浮 30% 为上限，暂定本品总灰分含量不得过 8.0%。酸不溶性灰分含量为 0.10% ～ 1.06%，平均值为 0.36%，但批次 T2020-01、T2020-10 酸不溶性灰分含量分别为 0.95%、1.06%，考虑到唐古特铁线莲药材虽为地上部分入药，但在采收集过程中难免掺入泥沙，故建议将酸不溶性灰分含量限量暂定为不得过 1.00%[16]。药材总灰分合格率约为 100%，酸不溶性灰分合格率约为 95%。结果见表 2。

2.6　浸出物测定

随机选取一批药材为代表（批号：T2020-02），对浸出物提取方法和提取溶剂进行考察。结果表明，热浸法以纯水作为溶剂时得到浸出物含

表 2　水分、总灰分、酸不溶性灰分的测定结果 (n = 2)

Tab 2　Water，total ash and acid insoluble ash (n = 2)

批号	水分含量 /%	总灰分含量 /%	酸不溶性灰分含量 /%
T2020-01	10.14	7.68	0.95
T2020-02	12.47	6.41	0.28
T2020-03	12.55	5.64	0.15
T2020-04	11.67	5.70	0.10
T2020-05	11.62	6.63	0.18
T2020-06	10.85	4.86	0.31
T2020-07	10.12	4.54	0.33
T2020-08	11.90	5.56	0.26
T2020-09	8.51	6.33	0.31
T2020-10	8.38	5.43	1.06
T2020-11	8.02	7.36	0.25
T2020-12	7.79	6.40	0.10
T2020-13	7.51	6.44	0.44
T2020-14	9.47	6.16	0.41
T2020-15	8.81	6.06	0.32
T2020-16	8.21	5.40	0.24
T2020-17	10.57	6.08	0.40
T2020-18	8.71	5.17	0.62
T2020-19	8.34	5.09	0.18

量最高，结果见表 3。以热浸法水提 19 批不同产地唐古特铁线莲药材，结果水溶性浸出物含量为 21.16% ～ 40.32%，平均值为 30.6%，以药材干燥品平均值 70% 为下限，暂定本品水溶性浸出物不得少于 20.0%。药材浸出物合格率为 100%。结果见表 4。

表 3　浸出物提取方法的考察 (n = 2)

Tab 3　Extraction method(n = 2)

方法	溶剂	浸出物平均含量 /%
冷浸法	水	24.94
	稀乙醇	26.67
	乙醇	7.53
热浸法	水	31.04
	稀乙醇	30.00
	乙醇	12.93

2.7　常春藤皂苷元含量测定

2.7.1　色谱条件　色谱柱：纳谱分析 Chrom Core C_{18}（Ⅱ）(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇 -0.1% 磷酸水 = 85∶15；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 210 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

表 4　水溶性浸出物含量 (n = 2)

Tab 4　Content of water-soluble extract (n = 2)

批号	浸出物含量 /%	批号	浸出物含量 /%
T2020-01	30.60	T2020-11	40.32
T2020-02	31.04	T2020-12	36.41
T2020-03	34.99	T2020-13	26.23
T2020-04	30.07	T2020-14	29.14
T2020-05	37.47	T2020-15	32.05
T2020-06	25.69	T2020-16	28.85
T2020-07	23.48	T2020-17	24.18
T2020-08	35.09	T2020-18	28.94
T2020-09	35.19	T2020-19	30.13
T2020-10	21.16		

2.7.2　对照品溶液的制备　精密称取常春藤皂苷元对照品适量，用甲醇稀释得到 1005.5 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2 mL，用甲醇定容到 10 mL 量瓶中，得到 201.1 μg • mL^{-1} 的对照品溶液。

2.7.3　供试品溶液的制备　精密称取唐古特铁线莲药材粉末（过 2 号筛）1.0 g，精密加入 75% 乙醇 50 mL，称量。常温超声（200 W，53 kHz）30 min，放置室温，称量，用 75% 乙醇补足减失的重量；摇匀，过滤，精密量取续滤液 25 mL，加入浓盐酸 3 mL 水浴回流 4 h，静置，冷却，转移至分液漏斗，二氯甲烷萃取 6 次，每次 20 mL，合并提取液，旋干，残渣加适量甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中，随后用甲醇定容，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，续滤液作为供试品溶液 [17]。

2.7.4　系统适用性试验　精密吸取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液（甲醇）进行测定。结果显示，常春藤皂苷元与相邻色谱峰的分离度均＞1.5，与其他组分可以达到完全分离，对称因子在 0.95 ～ 1.05，峰形对称，理论塔板数≥ 7000，结果见图 7。

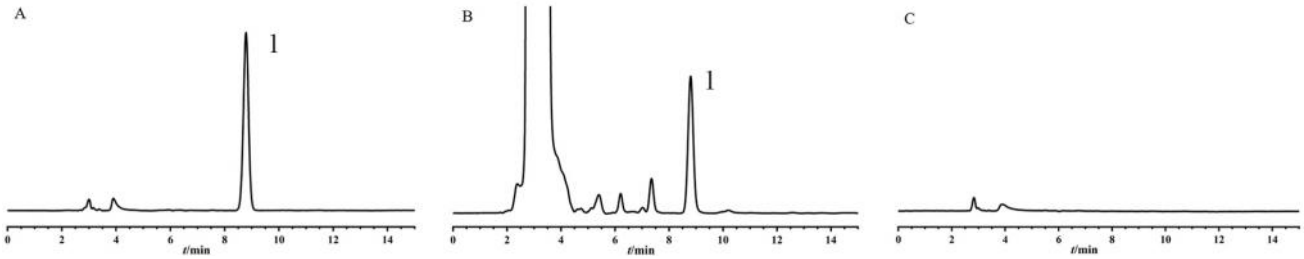


图 7　常春藤皂苷元 HPLC 色谱图

Fig 7　HPLC chromatogram of hederagenin

A. 对照品溶液（reference solution）；B. 供试品溶液（sample solution）；C. 空白溶液（blank solution）；1. 常春藤皂苷元（hederagenin）

2.7.5　线性关系考察　精密量取“2.7.2”项下对照品储备液 0.025、0.05、0.1、0.5、1、2、3、5、10 mL 置 10 mL 量瓶中，制成常春藤皂苷元对照品系列溶液；以对照品质量浓度（X，μg•mL^{-1}）为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，进行线性回归[18]，得回归方程为 $Y = 9.473\times10^3X + 4.652\times10^4$（$r = 0.9999$），结果表明，常春藤皂苷元在 2.5137 ～ 1005.5 μg•mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.7.6　定量限与检测限考察　精密量取“2.7.2”项下对照品储备液逐步稀释，进样测定，按照信噪比（*S/N*）约为 10∶1 计算，得到常春藤皂苷元定量限为 25.14 ng；按 *S/N* 约为 3∶1 计算，得到常春藤皂苷元检测限为 7.54 ng。

2.7.7　仪器精密度考察　对照品溶液连续进样 6 次，记录峰面积。结果常春藤皂苷元峰面积的 *RSD* 为 0.60%，表明该仪器精密度良好。

2.7.8　重复性考察　取同一批药材（批号：T2020-02）平行进行 6 次试验，结果显示，常春藤皂苷元含量的 *RSD* 为 1.7%，表明该方法重复性良好。

2.7.9　稳定性考察　取药材（批号：T2020-02）制样后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样，记录峰面积。结果常春藤皂苷元的峰面积 *RSD* 为 0.72%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7.10　加样回收率考察　精密称取已知含量的唐古特铁线莲药材（批号：T2020-02）9 份，每份约 0.5 g，按待测成分含量的 80%、100%、120% 精密加入质量浓度为 0.042 72、0.052 24、0.062 70 mg•mL^{-1} 的常春藤皂苷元溶液 50 mL，按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算回收率。结果显示，常春藤皂苷元低、中、高质量浓度平均加样回收率分别为 99.25%、98.02%、98.89%，*RSD* 分别为 0.85%、1.6%、1.2%，表明方法准确度良好。

2.7.11　样品测定　分别取青海、西藏各不同产地的唐古特铁线莲药材，按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算常春藤皂苷元的含量。结果表明，19 批唐古特铁线莲样品常春藤皂苷元含量差别很大，在 0.074% ～ 1.667%，平均含量为 0.591%，结果见表 5。

2.7.12　样品中常春藤皂苷元含量限量规定　由“2.7.11”项下测定结果可知，19 批唐古特铁线莲样品中常春藤皂苷元最高含量约为最低含量的 23 倍，变异系数为 129%，若按照平均值的 80% 为限量，则含量不得低于 0.473%，此时合格率为 53%，这一结果表明常春藤皂苷元限量的制订不能采用简单的平均法[19]。本研究采用一种新的思路来制订常春藤皂苷元限量以供参考。其核心思想是认为在采样范围内有一部分唐古特铁线莲药材中常春藤皂苷元的含量达不到设定的含量限度，例如当有 10% 的样品中常春藤皂苷元含量达不到定量限度时（即有 90% 的样品可以达到含量限度，合格率为 90%），把此部分样品中含量最高值定为该品种药材最低限量。

表 5　常春藤皂苷元含量测定结果 ($n = 3$)

Tab 5　Content determination of hederagenin ($n = 3$)

批号	含量 /%	批号	含量 /%
T2020-01	0.201	T2020-11	0.978
T2020-02	0.506	T2020-12	0.519
T2020-03	0.232	T2020-13	0.405
T2020-04	0.645	T2020-14	0.138
T2020-05	1.373	T2020-15	1.667
T2020-06	0.216	T2020-16	0.502
T2020-07	0.112	T2020-17	1.361
T2020-08	0.074	T2020-18	0.286
T2020-09	1.073	T2020-19	0.345
T2020-10	0.180		

首先通过 Cubic 插值法结合统计学原理，由现有离散含量数据推算出总体药材（采样范围内所有该种药材）中常春藤皂苷元含量的向上累计频率分布数据，如图 8 所示。图中横坐标表示药材中常春藤皂苷元含量，图中记作“常春藤皂苷元含量 x”；纵坐标表示常春藤皂苷元含量低于某一值的所有药材在全部药材中所占比重，即统计学上的“累计频率”，图中记作“累计频率 P”。通过四次多项式拟合得出如下回归方程：

$$P = -0.1266 + 2.3369x - 2.3012x^2 + 1.0480x^3 - 0.1608x^4 \quad (\text{Adj. } R^2 = 0.9864)$$

据此回归方程可知，当 $P = 0.1$ 时，含量 x 为 0.108%，按干燥品计算，暂定唐古特铁线莲样品中常春藤皂苷元含量不得低于 0.10%，最终样品合格率为 95%。需要指出的是由于拟合数据源的 x 在 0.074% ～ 1.667%，出于严谨性，本公式仅能够在上述范围内进行有效的计算。

3　讨论

3.1　对照物质的选择

青海产唐古特铁线莲的质量标准研究有以齐墩果酸[20]、芦丁[21]、槲皮素、山柰酚、异鼠李素[22]为对照物质进行含量测定的，但尚未收录至药品标准当中。前期寻找不同产地唐古特铁线莲药材共同对照物质较为困难，而文献所报道的相关对照品均未在西藏产唐古特铁线莲药材中发现。常春藤皂苷元型三萜皂苷是唐古特铁线莲药材的主要化学成分及活性成分，但常春藤皂苷类成分在紫外可见光区无吸收，且以其中一种常春藤皂

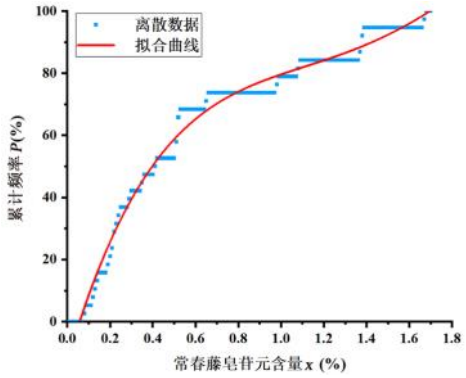


图 8　常春藤皂苷元含量上限与低于该限量药材所占比重（累计频率 *P*）拟合曲线图

Fig 8　Fitting curve between the upper limit of Hederagenin content and the proportion of medicinal materials lower than the limit value（cumulative frequency *P*）

苷类成分作为对照物质，往往含量太低，达不到定量要求。故本试验将各种常春藤皂苷类成分水解后得到常春藤苷元，其在紫外末端有吸收且可以达到定量的要求，从而间接对唐古特铁线莲药材药效组分进行控制。药理活性研究表明，常春藤皂苷元具有抗肿瘤、抗抑郁、抗菌抗炎、抗糖尿病等多种药理作用[23]。因此，考虑临床功效、含量高低、特征性等因素，本课题将常春藤皂苷元作为对照物质，制订关于药材中药效活性组分的质量控制方法。

3.2　含量测定

3.2.1　供试品溶液制备方法的考察　对供试品制备方法进行考察，采用不同浓度的甲醇、乙醇溶液（50%、75%、100%）作为提取溶剂，发现当提取溶液在 75% 乙醇时，得到常春藤皂苷元含量最高。在此基础上，考察超声、回流两种提取方式对常春藤皂苷元含量的影响，两种方式下提取含量接近，考虑到节约提取时间，最终确定提取方式为超声 30 min。萃取溶剂考察了石油醚、二氯甲烷、三氯甲烷的萃取效果，结果发现使用三氯甲烷为萃取溶剂时所得常春藤皂苷元含量是二氯甲烷作为萃取溶剂的 1.1 倍，但是三氯甲烷毒性较大，为管制化学试剂，最终选择二氯甲烷作为萃取溶剂。考察二氯甲烷萃取 4 次、6 次、8 次，结果萃取 6 次可保证常春藤皂苷元提取完全。对比硫酸、盐酸以及不加酸提取 4 h 常春藤皂苷元含量，结果使用盐酸水解 4 h 时提取率较高，确定盐酸作为水解溶剂。

3.2.2　色谱条件考察　考察了甲醇 - 冰醋酸（0.2%、0.4%）、甲醇 - 磷酸水（0.1%、0.2%）、甲醇 - 水 - 冰醋酸 - 三乙胺（87∶13∶0.04∶0.02）、乙腈 -0.1% 磷酸水等流动相体系，综合考虑压力、峰形以及样品分离效果等因素，最终确定流动相为甲醇 -0.1% 磷酸水＝ 85∶15。

3.2.3　不同产地质量标准理化测定结果差异性分析　为了比较青海、西藏产地（藏医院及藏药厂收集药材均来自西藏地区）唐古特铁线莲品质的差异，利用统计学软件 SPSS 19.0 对 19 批唐古特铁线莲样品中水分、灰分、酸不溶性灰分、浸出物及常春藤皂苷元含量进行独立样本 *t* 检验[24]。

结果西藏产地药材水分含量显著高于青海，推测是因为西藏药材收集时间在雨季，所以西藏产唐古特铁线莲药材在产地加工、储运及使用过程中要加强对水分的管理，防止药材霉变现象的发生；青海、西藏两产地间灰分、酸不溶性灰分、水溶性浸出物及常春藤皂苷元含量无明显差异，但是西藏地区 8 批次药材中常春藤皂苷元含量变异系数约为 137%，青海地区 11 批次药材中常春藤皂苷元含量变异系数约为 76%，显然西藏地区药材中常春藤皂苷元含量范围跨度较大，因此以常春藤皂苷元作为对照物质来体现药材的品质，青海产唐古特铁线莲药材整体上要优于西藏产唐古特铁线莲药材。

3.3　小结

本研究通过对多产地唐古特铁线莲药材性状描述、显微鉴别及薄层鉴别，可知该植物鉴别特征明显，可作为唐古特铁线莲药材的鉴别依据；通过对唐古特铁线莲药材各检查项及浸出物测定，初步确定各常规检测项限量；通过建立常春藤皂苷元对照品的含量测定方法，初步确定唐古特铁线莲药材质控指标性化学成分及限量，为其品种鉴别、药材质量标准的完善及进一步开发利用提供依据；首次采用 Cubic 插值法结合统计学原理拟合曲线法制订对照物质限量，为目前质量标准研究中含量限度制订方法提供新的参考。

参考文献

[1]　中国科学院西北高原生物研究所 . 青海经济植物志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1987：159-160.

[2]　蒂玛尔 • 丹增彭措 . 晶珠本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1986：75-76.

[3]　中国科学院西北高原生物研究所 . 藏药志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1991：249-250.

[4]　国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1998：1814-1815.

[5]　宗玉英 . 益欣康泰胶囊质量标准的研究 [J]. 高原医学杂志，1999，9（2）：16-18.

[6]　Zhong HM，Chen CX，Tian X，et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* [J]. Planta Med，2001，67（5）：484-488.

[7]　Du ZZ，Zhu N，Shen YM. Two novel antifungal saponins from Tibetan herbal medicine *Clematis tangutica* [J]. Chin Chem Lett，2003，14（7）：707-710.

[8] Zhao M，Da-Wa ZM，Guo DL，et al. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* [J]. Phytochemistry，2016，130：228-237.
[9] Zhang W，Yao MN，Tang HF，et al. Triterpenoid saponins with anti-myocardial ischemia activity from the whole plants of *Clematis tangutica* [J]. Planta Med，2013，79（8）：673-679.
[10] Zhang W，Wang XY，Tang HF，et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* and their cardioprotective activities [J]. Fitoterapia，2013，84：326-331.
[11] Wei Y，Chen T，Wang S，et al. Separation of a new triterpenoid saponin together with six known ones from *Clematis tangutica*（Maxim.）Korsh. and evaluation of their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res，2021. Doi: 10.1080/14786419.2021.1984468.
[12] 中华人民共和国卫生部 . 中华人民共和国卫生部药品标准 • 藏药（第一册）[S]. 北京：人民卫生出版社，1995：86.
[13] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：230-410，59.
[14] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：360.
[15] 刘勇，刘雅琳，江雪，等 . 颠茄草的质量标准提升 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（2）：175-181.
[16] 袁小红，庞克坚，唐辉，等 . 蒙药哈日 - 沙布嘎（铁杆蒿）的质量标准提升 [J]. 中国药房，2021，32（5）：536-541.
[17] 黄蕾，刘新国，程璐，等 . 黄连降脂合剂的质量标准研究 [J]. 医药导报，2020，39（10）：1390-1393.
[18] 孙健，诸艳蓉，胡青，等 . 苏合香质量标准的研究 [J]. 中成药，2021，43（4）：871-876.
[19] 万玉莹，周燕，达娃卓玛 . 藏藁吾药材质量标准研究 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2397-2402.
[20] 苏旭，刘玉萍，杨淳彬，等 . 青海省唐古特铁线莲中齐墩果酸含量的测定 [J]. 分析试验室，2012，31（5）：18-21.
[21] 张兴旺，牛迎凤，陶燕铎，等 . RP-HPLC 法测定唐古特铁线莲中芦丁的含量 [J]. 分析试验室，2009，28（S1）：64-66.
[22] 张兴旺，于瑞涛，陶燕铎，等 . 唐古特铁线莲花中黄酮含量的反相高效液相色谱测定 [J]. 时珍国医国药，2010，21（12）：16-17.
[23] 邢颖，南敏伦，王雪，等 . 常春藤皂苷元的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（22）：226-234.
[24] 郭杰，张琴，孙成忠，等 . 人参药材中人参皂苷的空间变异性及影响因子 [J]. 植物生态学报，2017，41（9）：995-1002.

（收稿日期：2021-12-30；修回日期：2022-03-15）

高效液相色谱法测定尿素的有关物质

李颖[1, 2, 3]，谢莹莹[1, 3*]，郑金凤[1, 3]，张悦[1, 3]，赵勇[1, 3]，刘杨[1, 3]，蒋赟[1, 3]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 湖南省药品审查核验中心，长沙　410001；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　建立高效液相色谱法测定尿素的有关物质。**方法**　采用 Waters XBridge Amide（4.6 mm×250 mm，3.5 μm）色谱柱，以乙腈 - 水（94∶6）为流动相，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 195 nm，进样量 10 μL。**结果**　在该色谱条件下，缩二脲、缩三脲、三聚氰酸和尿素之间能完全分离；尿素中缩二脲、缩三脲、三聚氰酸分别在 0.4966 ～ 19.8665 μg • mL^{-1}、0.5375 ～ 21.5028 μg • mL^{-1} 和 0.5842 ～ 23.3710 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，相关系数分别为 1.000、0.9999 和 0.9998，平均回收率分别为 100.1%、100.3%、86.59%，*RSD* 分别为 1.4%、0.44%、3.3%（n = 6），供试品溶液在 12 h 内稳定。**结论**　本方法准确度高、重现性好，可用于尿素中有关物质的测定，为建立尿素的质量标准提供参考。

关键词：尿素；高效液相色谱法；缩二脲；缩三脲；三聚氰酸
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1902-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.032

Determination of related substances in the urea by HPLC

LI Ying[1, 2, 3], XIE Ying-ying[1, 3*], ZHENG Jin-feng[1, 3], ZHANG Yue[1, 3], ZHAO Yong[1, 3], LIU Yang[1, 3], JIANG Yun[1, 3] (1. *Hunan Institute of Drug Control, Changsha* 410001; 2. *Hunan Drug Inspection Center, Changsha* 410001; 3. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ80034）。
作者简介：李颖，女，主管药师，主要从事药用辅料检验与研究，email：328881879@qq.com　*__通信作者：__谢莹莹，女，工程师，主要从事药用辅料检验检测，email：276468687@qq.com

Abstract: Objective To determine the related substances in the urea by HPLC. **Methods** Waters XBridge Amide (4.6 mm×250 mm, 3.5 μm) chromatographic column was used, with acetonitrile-water (94∶6) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the column temperature was 30 ℃ , the detection wavelength was 195 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** Under this chromatographic condition, biuret, triuret, cyanuric acid and urea were completely separated. Biuret, triuret, and cyanuric acid in the urea showed good linearity at 0.4966 ～ 19.8665 μg • mL^{-1}, 0.5375 ～ 21.5028 μg • mL^{-1} and 0.5842 ～ 23.3710 μg • mL^{-1} respectively, with the correlation coefficients of 1.000, 0.9999 and 0.9998 respectively. The average recovery was 100.1%, 100.3%, and 86.59%, and the *RSD* was 1.4%, 0.44%, and 3.3% (n ＝ 6) , respectively. The test solution was stable within 12 h. **Conclusion** This method has high accuracy and good reproducibility, which can be used for the determination of related substances in the urea, and provide a reference for the quality standard of urea.

Key words: urea; high performance liquid chromatography; biuret; triuret; cyanuric acid

尿素又称碳酰胺、脲，为药辅同源类，是临床上应用较早的强效利尿脱水药。本品具有抗菌，使蛋白质溶解、变性，增加蛋白质水合、皮肤通透性等作用，可用作透皮促进剂和助溶剂[1-2]。尿素对热不稳定，加热至 150 ～ 160 ℃将脱氨成缩二脲，若迅速加热将脱氨而三聚成六元环化合物三聚氰酸。尿素在《中国药典》（ChP2020）、欧洲药典（EP10.0）、美国药典（USP2021）及日本药典（JP17）中均有收载[3-7]，其中 USP2021 对缩二脲杂质、其他单个杂质及总杂量进行了控制，EP10.0 采用与标准缩二脲溶液制成的对照液进行颜色比对对缩二脲杂质进行了控制，而目前 ChP2020 并未对其有关物质进行控制。本研究通过高效液相色谱建立有关物质的检测方法，为药辅同源尿素的质量研究提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC-20A 高效液相色谱仪（岛津公司）；e2695 高效液相色谱仪（Waters 公司）；MS105DU 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

1.2　试药

尿素对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100288-201903，纯度：99.8%）；缩二脲（麦克林，批号：C10871148，纯度：98%）；三聚氰酸（麦克林，批号：C10691090，纯度：98%）；缩三脲（上海旭东海普南通药业有限公司，批号：190601，纯度：99.0%）；乙腈（Merck 公司，批号：JA079030，色谱级）；尿素样品信息见表 1；水为自制超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Waters XBridge Amide（4.6 mm×250 mm，3.5 μm）；流动相：乙腈 - 水（94∶6）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：195 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2　溶液的制备

2.2.1　系统适用性溶液　精密称取缩二脲、缩三脲、三聚氰酸和尿素对照品适量，用 75% 乙腈溶解并稀释成质量浓度分别为 0.005、0.005、0.005（约相当于 0.1% 的浓度）和 5.0 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，即得。

2.2.2　供试品溶液　取供试品适量，加 75% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含 5 mg 的溶液，即得。

2.2.3　对照溶液　取“2.2.2”项下供试品溶液，加 75% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含 50 μg 的溶液，即得。

2.2.4　杂质混合对照品溶液　精密称取缩二脲对照品约 50 mg，置 100 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液（1）；精密称取三聚氰酸对照品约 50 mg，置 100 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液（2）；精密称取缩三脲对照品约 10 mg，置 50 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液（3）。精密量取上述对照品储备液（1）～（3）适量，用 75% 乙腈稀释制成含缩二脲、缩三脲及三聚氰酸为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μg • mL^{-1} 的系列溶液①～⑥，待用。

2.3　方法学验证

2.3.1　系统适用性试验　取“2.2”项下系统适用性溶液、供试品溶液、对照溶液、杂质混合对照品溶液及空白溶液分别进样，典型色谱图见图 1。

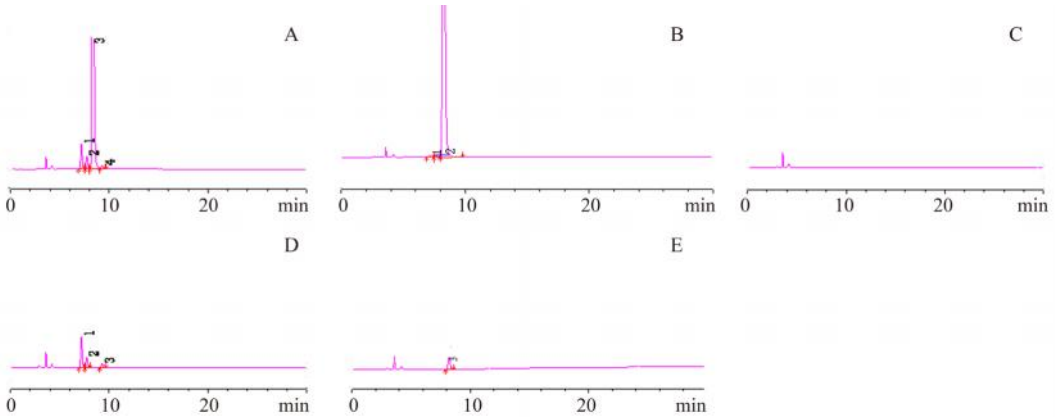


图 1　HPLC 典型色谱图

Fig 1　Typical chromatogram of HPLC

A. 系统适用性溶液（system suitability solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 空白溶液（blank solution）；D. 杂质混合对照品溶液（impurity mixed reference solution）；E. 对照溶液（control solution）；1. 缩三脲（triuret）；2. 缩二脲（biuret）；3. 尿素（urea）；4. 三聚氰酸（cyanuric acid）

2.3.2　专属性试验　精密称取本品（N1）0.25 g 6 份，置 50 mL 量瓶中，分别进行以下处理：

① 未破坏：按“2.2.2”项下方法处理；② 酸破坏：加 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 2 mL，摇匀，室温放置 24 h，用 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液中和，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得；③ 碱破坏：加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 2 mL，摇匀，室温放置 24 h，用 1 mol•L^{-1} 盐酸溶液中和，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得；④ 氧化破坏：加 30% 双氧水 2 mL，室温放置 20 h，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得；⑤ 高温破坏：加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，放于 120 ℃ 的烤箱中，加热 8 h，即得；⑥ 加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，放于（4500±500）lx 光照强度下 48 h（光照破坏），即得。以上样品按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明，经酸、碱、氧化、高温、光照破坏条件破坏后，氧化破坏试验中新增 1 个杂质峰，按面积归一化法计算，总杂质增加 6.7%；高温破坏试验中缩二脲显著增加，按面积归一化法计算，总杂质增加 2.75%，且各降解产物均能与主峰完全分离，均符合要求，见图 2。

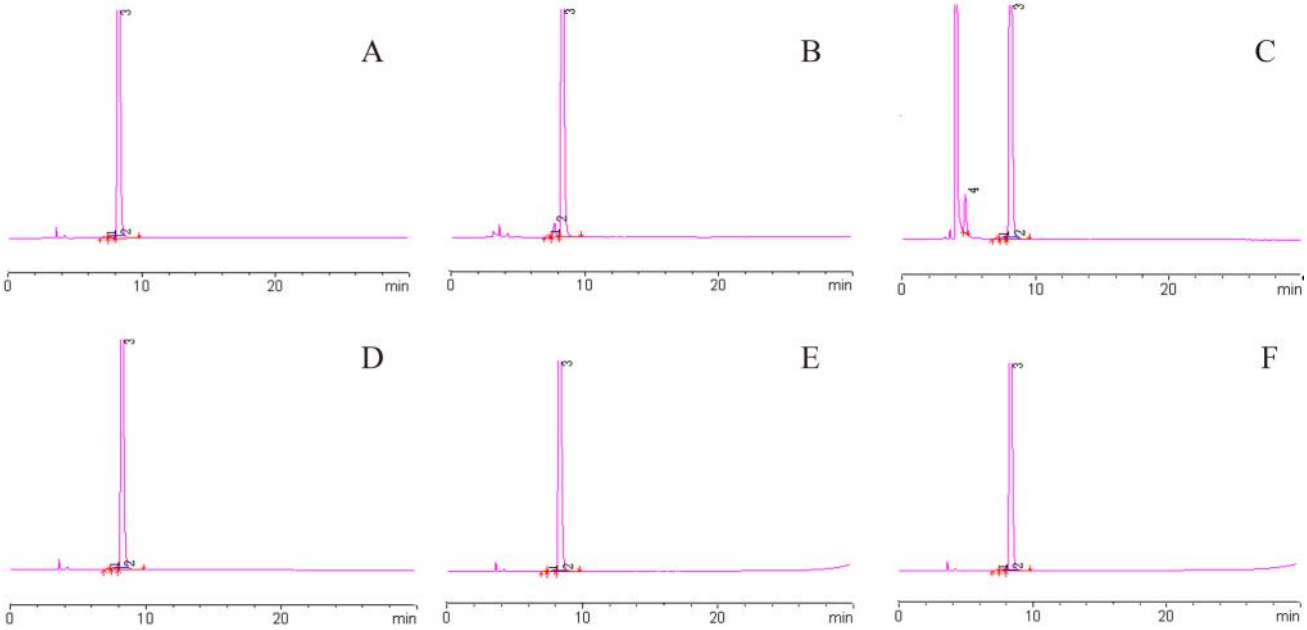


图 2　专属性试验 HPLC 图谱

Fig 2　HPLC chromatogram of specificity test

A. 未破坏（not destructed）；B. 高温破坏（destructed by high temperature）；C. 氧化破坏（destructed by oxidation）；D. 光破坏（destructed by light）；E. 酸破坏（destructed by acid）；F. 碱破坏（destructed by alkali）；1. 缩三脲（triuret）；2. 缩二脲（biuret）；3. 尿素（urea）；4. 未知杂质（unknown impurity）

2.3.3 线性关系考察　分别精密量取“2.2.4”项下的系列溶液①～⑥各 10 μL 注入液相色谱仪，以质量浓度为横坐标（x，μg·mL^{-1}），以峰面积（y）为纵坐标，结果各组分的回归方程分别为：$y_{缩二脲} = 2.365\times10^5x - 66.91$，$r^2 = 1.000$；$y_{缩三脲} = 3.165\times10^5x - 484.6$，$r^2 = 1.000$；$y_{三聚氰酸} = 1.393\times10^5x + 307.6$，$r^2 = 0.9995$。缩二脲在 0.4966 ～ 19.8665 μg·mL^{-1}，缩三脲在 0.5375 ～ 21.5028 μg·mL^{-1}，三聚氰酸在 0.5842～23.3710 μg•mL^{-1}与峰面积线性关系良好。

2.3.4 检出限和定量限　精密量取“2.2.4”项下各对照品储备液适量，分别逐级稀释，精密量取 10 μL，进样测定。设定量限 $S/N = 10$，检出限 $S/N = 3$，结果缩二脲、缩三脲、三聚氰酸的定量限分别为 0.020、0.0036、0.032 μg·mL^{-1}；检出限分别为 0.0061、0.0011、0.0098 μg·mL^{-1}。

2.3.5 精密度试验　取“2.2.4”项下溶液①，精密量取 10 μL，注入液相色谱仪，连续进样 6 次，结果缩二脲、缩三脲、三聚氰酸的峰面积 *RSD* 分别为 0.24%、0.11%、0.58%（$n = 6$），说明本仪器的进样精密度良好。

2.3.6 重复性试验　取样品 N1 1.0 g，精密称定，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.3”项下方法制备 6 份对照溶液，另取“2.2.4”项下溶液④，作为对照品溶液。取上述溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，缩二脲、缩三脲和三聚氰酸按外标法以峰面积计算，其他杂质按自身对照法计算，结果缩二脲、缩三脲含量的 *RSD* 分别为 1.5%、1.2%，未检出三聚氰酸和其他单个杂质，说明本方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验　取同一加样回收试验的溶液，分别在 0、2、4、8、12 h 进样测定，记录各共有色谱峰峰面积，结果缩二脲、缩三脲、三聚氰酸峰面积 *RSD* 分别为 0.18%、0.23%、3.2%，表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.8 回收试验　取样品（N1，缩二脲含量为 0.0305%，缩三脲含量为 0.0055%，三聚氰酸未检出），分别精密加入“2.2.4”项下对照品储备液① 0.5 mL、对照品储备液② 0.5 mL、对照品储备液③ 1.25 mL，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份溶液。另取溶液④作为对照品溶液。取上述溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，计算回收率。结果缩二脲的回收率为 100.1%（*RSD* = 1.4%）；缩三脲的回收率为 100.3%（*RSD* = 0.44%）；三聚氰酸的回收率为 86.59%（*RSD* = 3.3%）（$n = 6$）。

2.3.9 耐用性试验　取“2.2.1”项下系统适用性试验溶液及“2.3.6”项下重复性试验溶液，在“2.1”项色谱条件下，通过改变有机相的初始比例（±30%）、柱温（±5 ℃）、流速（±0.2 mL·min^{-1}）以及更换不同品牌的液相色谱仪（岛津 LC-20A 和 Waterse2695）来考察耐用性，观察各组分之间的分离情况以及有关物质含量的变化。结果系统适用性试验溶液在各个条件下各组分之间均能达到基线分离，重复性试验溶液中的有关物质含量无明显变化，表明方法的耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取 20 批尿素样品，分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液、对照溶液和对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算杂质含量，结果见表 1。

表 1　样品有关物质测定结果 (%)

Tab 1　Related substances of samples (%)

企业编号		批号	缩二脲	缩三脲	三聚氰酸	其他最大单杂	总杂
A	N1	20180301	0.0305	0.0055	未检出	未检出	0.0360
	N2	20180302	0.0351	0.0076	未检出	未检出	0.0427
	N3	20180801	0.0290	0.0055	未检出	未检出	0.0345
	N4	20191101	0.0344	0.0068	未检出	未检出	0.0412
	N5	20191102	0.0359	0.0072	未检出	未检出	0.0431
	N6	20200301	0.0359	0.0070	未检出	未检出	0.0429
B	N7	20190521	0.0320	0.0030	未检出	未检出	0.0350
C	N8	20190316	0.0162	0.0009	未检出	未检出	0.0171
D	N9	5003M109	0.1148	0.0342	未检出	未检出	0.1490
E	N10	004120201201	0.0884	0.0067	未检出	未检出	0.0951
	N11	004120210109	0.0899	0.0062	未检出	未检出	0.0961
	N12	004120210204	0.1298	0.0064	0.0048	0.0176	0.1538
F	N13	20190101	0.3614	0.0511	0.0192	0.0703	0.4828
G	N14	20200512	0.0846	0.0426	未检出	未检出	0.1272
H	N15	210115	0.3511	0.0516	0.0204	0.0748	0.4775
	N16	210116	0.3511	0.0519	0.0214	0.0789	0.4819
	N17	210117	0.3613	0.0538	0.0220	0.0791	0.4942
G	N18	20201001	0.0693	0.0202	未检出	0.2351	0.3246
	N19	20201002	0.0827	0.0233	未检出	0.2943	0.4003
	N20	20201003	0.0343	0.0030	未检出	0.1109	0.1482

3 讨论

3.1 检测波长的选择

尿素合成过程中易发生脱氨缩合或聚合反应生成缩二脲、缩三脲和三聚氰酸等副产物[8-9]，在国内外药典中，仅 USP2021 收载了有关物质项，且单独控制了缩二脲单杂；EP10.0 仅对“缩二脲”进行了控制。用二极管阵列检测器（PDA）进行全波长扫描分析，缩二脲、缩三脲、三聚氰

酸、尿素及破坏后形成新杂质的最大吸收波长都在 195 nm 附近，综合考虑，选用 195 nm 作为尿素有关物质的检测波长。

3.2　流动相的选择

USP2021 中采用甲酸溶液（1 mL 甲酸→ 1000 mL 水）- 乙腈梯度洗脱流动相体系，使用该体系进行操作时，因均在梯度上出峰，重现性不佳；另有文献报道采用乙腈 - 水（88∶12）作为流动相[10-13]体系，经预试验，各色谱峰分离效果不佳。课题组研究发现，采用乙腈 - 水（94∶6）作为流动相体系时，尿素及其特定杂质色谱峰峰形较好，且各组分间分离效果最佳，故最终选用乙腈 - 水（94∶6）体系。

3.3　计算方法考察

USP2021 中对缩二脲采用特定杂质对照品按外标法计算，其他单个杂质采用尿素对照品按外标法计算。本研究对收集到的 20 批样品，以缩二脲、缩三脲、三聚氰酸为特定杂质，分别采用外标法和自身对照法（按校正因子计算）计算，结果显示外标法计算缩二脲结果高于自身对照法，缩三脲低于自身对照法，三聚氰酸高于自身对照法。在相同色谱条件下，尿素、缩二脲、缩三脲、三聚氰酸的响应相差较大（尿素 / 缩二脲＝ 0.144；尿素 / 缩三脲＝ 0.108；尿素 / 三聚氰酸＝ 0.246），用自身对照法计算结果偏差较大，结果不准确。为更好地控制本品的质量，建议缩二脲、缩三脲、三聚氰酸采用外标法进行定量，其他未知杂质采用自身对照法进行计算。

4　小结

本研究建立了高效液相色谱测定尿素的有关物质方法，方法学考察表明该方法结果准确，重复性好，主成分与各个杂质分离度较好，能准确测定特定杂质缩二脲、缩三脲、三聚氰酸的含量，为药用辅料尿素质量控制提供依据。样品测定结果显示，20 批样品均检出缩二脲和缩三脲，5 批样品检出三聚氰酸。其中缩二脲含量相对较高，有 4 批样品中缩二脲的含量均已超出了 USP2021 中对缩二脲的控制限度（不得过 0.1%），应加强质量控制。

参考文献

[1] 罗明生，高天惠 . 药剂辅料大全 [M]. 成都：四川科学技术出版社，2006：1068.
[2] 萧三贯 . 最新国家药用辅料标准手册 [M]. 中国医药科技出版社，2006：595.
[3] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：675.
[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：652.
[5] USP2021 [S]. 2021：4555.
[6] JPXVII [S]. 2017：1747.
[7] EP10.0 [S]. 2017：4149.
[8] 吕洪坤，杨卫娟，周俊虎，等 . 尿素溶液高温热分解特性的实验研究 [J]. 中国电机工业学报，2010，30（17）：35-40.
[9] 李才虹 . 尿素系统中缩二脲含量的测定 [J]. 河北化工，2008，31（6）：72-73.
[10] 赵恂，范青峰，陈雷，等 . 尿素及其有关物质含量的 HPLC-CAD 分析研究 [J]. 中国药品标准，2018，19（6）：453-458.
[11] 刘志刚，赵庆良，孙丽欣，等 . PDAB 比色法直接测定液相中的常量尿素 [J]. 哈尔滨工业大学学报，2008，40（8）：1214-1217.
[12] 汪建飞，谭志静，翟海燕 . 土壤中尿素的高效液相色谱分析 [J]. 安徽技术师范学报，2005，19（5）：1-3.
[13] 张大为，张瑶瑶 . 一种新型的采用 HILIC 色谱柱与电雾式检测器测定水体中尿素的方法 [J]. 广东化工，2016，12（43）：231-232，228.

（收稿日期：2022-02-11；修回日期：2022-04-06）

ICP-AES 法测定功效型牙膏中多种元素的含量

吴莉，张再平*，方方，冯有龙，曹玲（江苏省食品药品监督检验研究院，南京　210019）

摘要：目的　建立电感耦合等离子体发射光谱（ICP-AES）法同时测定牙膏中多种元素的含量。**方法**　采用微波溶解法进行样品前处理，ICP-AES 法同时测定牙膏中 Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni、Sr、Ti、Zn 等 13 种元素的含量，以外标法计算。**结果**　对于所测元素，在一定浓度内线性关系良好，标准曲线相关系数 $r \geqslant 0.9955$；重复性试验的 *RSD* 在 2.5%～8.5%（$n = 6$）；低、中、高浓度加样回收率（$n = 3$）在 86.4%～108.9%；方法检测限在 0.02～5 mg・kg^{-1}。**结论**　该方法灵敏度高、专属性强、简便、快速、准确，适用于牙膏中多种元素的含量测定。

关键词：电感耦合等离子体发射光谱法；微波消解法；牙膏；元素
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1907-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.033

Determination of multiple elements in efficacy toothpaste by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer

WU Li, ZHANG Zai-ping*, FANG Fang, FENG You-long, CAO Ling (*Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019)

Abstract: Objective To establish an ICP-AES method for the quantitative analysis of multiple elements in efficacy toothpaste. **Methods** Microwave digestion was used for the sample pre-treatment. The contents of 13 elements in the toothpaste, including Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr, Ti, and Zn were determined by ICP-AES. The external standard method was used for the quantitative analysis. **Results** The linear relationship was good at a certain concentration range and the correlation coefficient of the calibration curve was over 0.9955 for all the analyzed elements. The *RSD* of the repeatability test ranged from 2.5% to 8.5% ($n = 6$). The recovery of low, medium and high concentration ($n = 3$) ranged from 86.4% to 108.9%. The detection limit of the method ranged from 0.02 to 5 mg・kg^{-1}. **Conclusion** The method is rapid, specific, simple, sensitive and accurate. It is suitable for the determination of multiple elements in toothpaste.

Key words: inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer; microwave digestion; toothpaste; element

牙膏是消费者日常生活中必用的清洁用品，其质量安全与消费者特别是儿童的健康和安全密切相关[1-2]。宣称有功效作用的牙膏已占市场份额的 90% 以上[3]，有防龋齿，治疗牙周痛、牙结石，消炎止血，抗过敏，增白等功能疗效[4-6]。牙膏里添加的功效成分硝酸钾、氯化锶可直接作用于感觉神经细胞来缓解牙齿疼痛；柠檬酸锌是常见的锌强化剂，且具有抗黏结剂功能性；磷硅酸钠钙有脱敏、预防牙釉质脱矿及促进再矿化修复作用；碳酸钙、氢氧化铝是牙膏中常用的摩擦剂；氟化钠、单氟磷酸钠有一定的防龋效果，对口腔多种酶有抑制作用，可以抑菌，减少牙菌斑，还可以增进釉质的完整性，增加釉质的硬度[7-12]。这些功效成分含量的高低同样会影响人体机能，现有标准功效型牙膏 QB/T 2966-2014[13] 仅涉及氟、钾和锶三种元素，采用原子吸收光谱法测钾和锶；标准 GB/T 8372-2017[14] 采用原子吸收法测定铅，采用砷斑法测定砷；标准 QB/T 5406-

作者简介：吴莉，女，硕士，副主任药师，主要从事药品、保健食品和化妆品检验研究工作，email：wulienglish@sohu.com
*通信作者：张再平，女，硕士，主管药师，主要从事药品、保健食品和化妆品检验研究工作，email：1733759950@qq.com

2019[15] 和 QB/T 2968-2008[16] 采用原子吸收分光光度法测定牙膏中酸可溶性锌和氯化锶含量。但这些方法无法同时测定多种元素，分析速度慢。本试验采用电感耦合等离子体发射光谱法（ICP-AES）同时测定牙膏中 Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni、Sr、Ti、Zn 13 种元素的含量，操作简单，专属性强，灵敏度高，利于牙膏产品多元素、大批量的同时检验检测，适用于牙膏产品质量标准的提高。

1　仪器与试药

1.1　仪器

电感耦合等离子体原子发射光谱仪（美国 Agilent 公司）；MARS6 微波消解仪（美国 CEM 公司）；Milli-QIQ 7000 超纯水仪（美国 Merck 公司）；MSE125P-000-DU 电子天平（德国 Sartorius 公司，精度：0.1 mg）。

1.2　试药

Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni、Sr、Ti、Zn 单元素标准溶液（质量浓度均为 1000 mg • L^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心，批号分别为 196047-6、199107、203049-1、198032-4、201039-6、197004-2、197011-3、197014-3、207009-7、197009-5、18B042-2、191091、199018-2）；65% 硝酸（美国 Merk 公司）；氢氟酸、高氯酸（优级纯，国药集团化学试剂有限公司）；去离子水（电阻率≥ 18.2 MΩ • cm）。国家标准物质芹菜 GBW10048（GSB-26），地球物理地球化学勘查研究所（IGGE）制备。30 批市售不同品牌功效型牙膏。

2　方法与结果

2.1　混合标准储备液的制备

分别精密量取不同体积各单元素标准溶液，用 5%HNO_3 稀释定容，制成含 Ba、Cu、Mn、Ni 1 mg • L^{-1}，Al、Fe、Na、Sr、Ti、Zn 10 mg • L^{-1} 以及 Ca、K、Mg 100 mg • L^{-1} 的混合标准储备液。

2.2　样品前处理

弃去牙膏前端，取样约 0.2 g，精密称定，置聚四氟乙烯消化管中，加入硝酸 6 mL，浸泡过夜，先 100 ℃预消化 1 h，再加入氢氟酸 1 mL 和硝酸 1 mL，100 ℃预消化 1 h，放冷至室温，置微波消解仪中消解完全，取出，加入高氯酸 0.5 mL，于 150 ℃加热赶酸，当溶液变为清亮无色并伴有白烟产生时，再继续加热至近干，冷却后将消解液转移至 20 mL 比色管中，用水少量多次洗涤消化管内壁，合并洗涤液，用水稀释定容至刻度，摇匀。用 0.45 μm 滤膜过滤，弃去初滤液 2 mL，取续滤液待测。同时做空白试验。

2.3　ICP-AES 仪器工作参数

等离子气流量 15.0 L•min^{-1}，辅助气流量 1.5 L • min^{-1}，功率 1150 W，雾化器压力 205 kPa，泵速 35 r • min^{-1}，进样延迟时间 2 s，仪器稳定延时 35 s，一次读数时间 3 s，读数 3 次，载气为高纯氩气，水平观测方式。

2.4　方法学考察

2.4.1　线性关系考察　使用 5%HNO_3 溶液稀释 Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni、Sr、Ti、Zn 混合标准储备液，制成 Ba、Cu、Mn、Ni 质量浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、0.8 mg•L^{-1}，Al、Fe、Na、Sr、Ti、Zn 质量浓度为 0、0.5、1、2、5、8 mg • L^{-1} 和 Ca、K、Mg 质量浓度为 0、5、10、20、50、80 mg • L^{-1} 的标准系列工作溶液。待测元素的分析谱线波长见表 1。

表 1　待测元素的分析谱线波长

Tab 1　Analytical spectral lines of elements

序号	元素	谱线波长 /nm
1	Al	396.152
2	Ba	455.403
3	Ca	315.887/317.933
4	Cu	327.395
5	Fe	238.204
6	K	766.491
7	Mg	279.078
8	Mn	257.610/259.372
9	Na	589.592
10	Ni	231.604
11	Sr	407.771/421.552
12	Ti	323.452/336.122
13	Zn	206.200/213.857

按“2.3”项下条件，以待测元素的质量浓度为横坐标，其分析谱线的强度信号响应值为纵坐标，进行线性回归，结果如表 2 所示。13 种元素在各自线性范围内与响应值线性关系良好，相关系数均≥ 0.9955。

2.4.2　回收试验　取已知含量的样品（23 号）9 份，分别精密加入 13 种元素的混合标准储备液 1 mL、2 mL 和 4 mL 各 3 份，测定，计算低、中、高浓度的加样回收率，结果见表 3，所有元素低、中、高浓度加样回收率在 86.4% ～ 108.9%（n = 3）。

2.4.3　检测限和定量限试验　取空白试验溶液连续进样 11 次，计算标准偏差（SD），3SD 得出各

表 2　回归方程、相关系数及线性范围

Tab 2　Regression equation，correlation coefficient and linear range

元素	回归方程	相关系数	线性范围 /（mg·L^{-1}）
Al	$y = 2.212\times10^4x + 4.606\times10^3$	0.9985	0 ～ 8
Ba	$y = 4.986\times10^5x + 9.280\times10^3$	0.9970	0 ～ 0.8
Ca	$y = 4.416\times10^3x + 5.559\times10^3$	0.9989	0 ～ 80
Cu	$y = 4.065\times10^4x + 505.4$	0.9994	0 ～ 0.8
Fe	$y = 1.875\times10^4x + 2.274\times10^3$	0.9990	0 ～ 8
K	$y = 6.272\times10^4x + 1.396\times10^5$	0.9955	0 ～ 80
Mg	$y = 2.474\times10^3x + 2.997\times10^3$	0.9989	0 ～ 80
Mn	$y = 1.482\times10^5x + 1.929\times10^3$	0.9989	0 ～ 0.8
Na	$y = 7.515\times10^5x + 2.543\times10^5$	0.9993	0 ～ 8
Ni	$y = 4.188\times10^3x + 70.0$	0.9986	0 ～ 0.8
Sr	$y = 2.761\times10^6x + 6.401\times10^5$	0.9977	0 ～ 8
Ti	$y = 1.148\times10^4x + 1.744\times10^3$	0.9988	0 ～ 8
Zn	$y = 1.982\times10^3x + 227.6$	0.9987	0 ～ 8

元素检测限，10SD 得出各元素定量限，结果见表 3。

表 3　各元素回收率范围、检测限及定量限

Tab 3　Recovery，detection limit and quantitative limit of elements

元素	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%	检测限 /（mg·kg^{-1}）	定量限 /（mg·kg^{-1}）
Al	96.9 ～ 104.1	102.3	4.3	0.5	1.7
Ba	86.4 ～ 94.8	90.5	0.6	0.1	0.3
Ca	93.7 ～ 105.0	96.8	1.4	5	17
Cu	92.5 ～ 101.9	96.7	0.4	0.2	0.7
Fe	103.9 ～ 108.8	104.9	0.2	1	3.3
K	88.1 ～ 105.4	102.3	0.8	1	3.3
Mg	89.0 ～ 99.9	98.4	0.8	3	10
Mn	92.4 ～ 108.9	100.3	0.4	0.1	0.33
Na	93.5 ～ 106.8	100.1	1.1	3	10
Ni	91.3 ～ 100.9	98.1	0.8	0.5	1.7
Sr	87.9 ～ 105.1	98.3	0.5	0.02	0.1
Ti	92.3 ～ 108.5	102.6	0.5	0.2	0.7
Zn	96.1 ～ 100.1	99.3	1.2	0.2	0.7

2.4.4　重复性试验　精密称取同一批样品共 6 份，按“2.2”项下方法处理，进样测定，结果各元素含量 *RSD* 在 2.5% ～ 8.5%，表明方法重复性良好。

2.4.5　准确性试验　将标准样品芹菜 GBW10048（GSB-26）烘干、取样，进样测定，其测定值见表 4。

2.4.6　市售牙膏检测结果　按照试验方法对 30 批牙膏样品进行检测，结果见表 5。

3　讨论

3.1　酸体系的选择

牙膏成分复杂，一般的酸体系难以消解完全；硝酸和氟化氢的混合酸作为消解酸，消解后溶液澄清透明，样品被完全消化破坏，利于分析测定。

表 4　标准样品测定结果

Tab 4　Content determination of standard samples

元素	芹菜（GSB-26）	
	真实值	测定值
Al	0.14×10^{-2}	0.11×10^{-2}
Ba	$(17.3\pm2.3)\times10^{-6}$	16.0×10^{-6}
Ca	$(1.66\pm0.06)\times10^{-2}$	1.61×10^{-2}
Cu	$(8.2\pm0.4)\times10^{-6}$	7.9×10^{-6}
Fe	$(597\pm34)\times10^{-6}$	584×10^{-6}
K	$(2.7\pm0.2)\times10^{-2}$	2.5×10^{-2}
Mg	$(0.53\pm0.03)\times10^{-2}$	0.51×10^{-2}
Mn	$(45\pm2)\times10^{-6}$	44×10^{-6}
Na	$(2.17\pm0.23)\times10^{-2}$	1.92×10^{-2}
Ni	$(1.8\pm0.4)\times10^{-6}$	1.3×10^{-6}
Sr	$(213\pm19)\times10^{-6}$	195×10^{-6}
Ti	45×10^{-6}	45×10^{-6}
Zn	$(26\pm2)\times10^{-6}$	25×10^{-6}

在样品前处理过程中，微波消解后在消化管中加入 0.5 mL 高氯酸，并在恒温控制器上 150 ℃加热赶酸至近干，此操作可以将氟化氢赶尽，尽量避免氟化氢给试验结果带来的影响。因使用氟化氢作消解酸，所使用容器均是塑料材质。

3.2　检测波长的选择

元素分析谱线的选择应以灵敏度高、干扰少、信号强度合适、线性良好为原则。试验中，先选择合适的多条波长同时测定，再以光谱图上分析峰的峰形来确认光谱的干扰，避免干扰波长以及该干扰波长对目标波长造成的干扰，从而避免目标元素结果误差。如 Ca 的分析谱线在 315.887/317.933 nm 处峰形对称、定量准确；Al 的分析谱线在 396.152 nm 下测定结果的回收率更佳；Cu 的分析谱线为 327.395 nm，因为该谱线下标准样品芹菜 GBW10048（GSB-26）测定值更靠近真值。本试验目标元素所选择的检测波长之间互不干扰，光谱分析峰形对称，且信号响应强度大，灵敏度高，检测限和定量限均能满足试验要求。

3.3　基质效应的影响

在检测标准样品芹菜 GBW10048（GSB-26）时，Al 元素测定值和真实值相比较，结果略微偏低。分析原因，可能是标准样品中含有高浓度的 Ca、Mg 等，这些物质量大时，降低了等离子体的能量，造成被测元素 Al 不能被完全离子化，使测定结果偏低。本试验首先优化了仪器测定参数，提高功率，改变载气流量，结果改善不明显。又采用另一方法稀释样品，将样品稀释 10 倍后再测 Al，Al 响应值明显提高，说明 Al 的测定受基质效应干扰明显。在样品测定时，也需注

表 5　样品中各元素的测定结果 (mg・kg^{-1})

Tab 5　Determination of elements in different batches of samples (mg・kg^{-1})

样品	Al	Ba	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Sr	Ti	Zn
1	174	0	0	0	30	0	0	0	3401	0	0	9	0
2	62	0	83 721	0	11	0	397	2	3682	0	19	139	0
3	109	0	16 095	0	15	47	0	1	3951	0	0	1561	810
4	0	1	83 087	0	6	337	470	16	3410	0	1213	2296	2
5	1727	1	0	0	30	369	0	0	3462	0	0	28	0
6	87	2	0	0	19	0	0	0	3775	0	0	813	0
7	85	2	95	0	13	0	0	0	3678	0	0	1550	0
8	13	0	72 508	0	0	0	1519	3	3456	0	59	0	0
9	198	0	101 390	0	91	0	2547	11	4056	0	42	8	0
10	92	0	0	0	7	0	0	0	3874	0	0	34	0
11	297	0	190	0	32	0	228	0	3079	0	0	25	0
12	52	0	0	0	0	0	0	0	3264	0	0	0	0
13	243	0	0	0	1	0	47	0	3726	0	0	11	0
14	52	0	0	0	145	0	0	0	3652	0	0	6	0
15	125	0	195	0	8	0	0	0	3894	0	0	10	0
16	120	0	0	0	12	0	0	0	3540	0	0	44	0
17	144	0	61	0	21	0	0	0	3568	0	0	27	696
18	125	7	0	0	14	0	0	0	3157	0	24	39	0
19	562	0	0	0	59	0	64	0	3558	0	0	97	0
20	68	0	0	0	2	0	0	0	3005	0	0	12	0
21	63	0	0	0	40	0	0	0	3476	0	0	21	0
22	59	0	51	0	0	0	0	0	3326	0	0	15	0
23	54	0	0	0	0	0	0	0	3963	0	0	17	0
24	49	0	0	0	13	0	0	0	3089	0	0	21	0
25	120	0	0	0	24	0	0	0	3256	0	0	51	0
26	40	0	0	0	50	0	0	0	3653	0	200	1000	0
27	36	0	0	0	23	0	0	0	3279	0	0	623	0
28	31	0	0	0	61	0	0	0	3563	0	0	0	0
29	300	0	0	0	13	0	0	0	3912	0	12	300	0
30	24	0	0	0	81	0	0	0	3657	0	0	150	0

意基质效应的影响，否则测定值与真实值可能会相差很大。

3.4　实际样品的测定

用所建立的方法对 30 批牙膏样品进行检测，将测定结果与产品标签标识进行比对，结果显示：所有批次检出元素与产品标签标识一致，表明所检产品质量稳定性良好，厂家基本按照配方生产。所有批次均检出 Na，说明氟化钠等组分在牙膏中已普遍存在；除了 Na，其余元素均有未检出批次，且 Ba、Ca、Cu、K、Mg、Mn、Ni、Sr、Zn 未检出批次比例高达 67% 以上；部分批次 Al、Ca、Mg、K、Na、Sr、Ti、Zn 含量相对比较高，应该与添加的氢氧化铝、磷硅酸钠钙、碳酸钙、氧化镁、硝酸钾、氟化钠、氯化锶、二氧化钛、柠檬酸锌等功效成分有关；同一元素不同批次之间含量相差较大，说明各厂家配方不同，对于这些功效成分的限值，国家目前尚未出台统一的标准，后续需进一步研究，加强对牙膏产品标准的制订和质量的监管。

4　结论

本研究利用 ICP-AES 建立同时检测 13 种元素的方法，并对样品的前处理和检测参数进行优化，克服了已有标准检测方法无法同时测定多种元素、分析速度慢的缺点，提高了检测效率。该方法准确度高、重复性好，可同时测定牙膏中多种元素含量，适用于牙膏产品的快速检验检测，为监管产品质量提供技术支持。

参考文献

[1]　汪发文，康春生，范雨石，等 . 儿童牙膏产品的发展现状及未来展望 [J]. 口腔护理用品工业，2018，28（2）：24-26.

[2]　徐春生 . 儿童牙膏市场发展分析与建议 [J]. 日用化学品

科学，2016，39（10）：1-3.
[3] 相建强，郭强，徐春生 . 规范中实现稳步增长——中国牙膏行业的发展现状与趋势 [J]. 口腔护理用品工业，2021，31（4）：58-59.
[4] 李强 . 牙膏市场的发展及趋势 [J]. 口腔护理用品工业，2011，21（2）：53-55.
[5] 刘婧曦，郝二伟，杜正彩，等 . 传统茶和别样茶在牙膏中的应用研究进展 [J]. 日用化学工业，2021，51（3）：227-234.
[6] 李刚，付莹莹，钟亦思，等 . 抗敏感牙膏功效成分的研究进展 [J]. 口腔护理用品工业，2012，22（6）：44-52.
[7] 朱顶贵，李姮，俞少玲 . 磷硅酸钠钙对乳牙釉质再矿化作用的研究 [J]. 实用口腔医学杂志，2016，32（1）：104-107.
[8] 朱敏 . 锌的抗菌斑机理及临床作用特性 [J]. 国外医学（口腔医学分册），1995，22（3）：135-137.
[9] 丁观军，程吉平，晏明，等 . 柠檬酸锌在口腔护理用品中的应用研究进展 [J]. 口腔护理用品工业，2020，30（4）：44-52.
[10] 李娜，崔兴萌，李佳男，等 . 右旋糖酐酶、月桂醇硫酸钠和柠檬酸锌抑制牙齿色斑附着效果的初步观察 [J]. 中国处方药，2018，16（7）：160-161.
[11] 李行懿，杨泓，陈娜 . 磷硅酸钙钠治疗老年人根面牙本质敏感的临床观察 [J]. 中华老年医学杂志，2013，32（4）：430-432.
[12] 李行懿，陈娜，张廷发 . 牙周基础治疗后根面用磷硅酸钙钠脱敏的疗效观察 [J]. 中国医刊，2012，47（6）：47-49.
[13] 中华人民共和国工业和信息化部 . 功效型牙膏 [S]. QB/T 2966-2014.
[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 . 牙膏 [S]. GB/T 8372-2017.
[15] 中华人民共和国工业和信息化部 . 口腔清洁护理用品牙膏和漱口水中酸可溶性锌的检测 [S]. QB/T 5406-2019.
[16] 中华人民共和国国家发展和改革委员会 . 牙膏中氯化锶含量的测定方法 [S]. QB/T 2968-2008.

（收稿日期：2021-12-27；修回日期：2022-01-28）

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定柴胡中 4 种成分的含量

郭宇鸽[1]，柏玉冰[1]，李洪权[2]，胡冠羽[3]，黎旭[1*]（1. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙　410007；2. 长沙市第三医院，长沙　410035；3. 株洲市食品药品检验所，湖南　株洲　412000）

摘要：目的　建立超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定柴胡中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁 4 种成分的含量。**方法**　以 70% 甲醇超声提取；采用 Welch Utimate AQ-C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱，以水（A）- 乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱，流速 0.5 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃。采用电喷雾离子源，进行负离子扫描。**结果**　柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁分别在 100.940 ～ 5047.00、103.880 ～ 5194.00、4.918 70 ～ 245.935、122.175 ～ 6108.75 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，平均回收率分别为 98.74%、97.96%、97.97% 和 98.41%，所测柴胡样品中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁含量分别为 699.6 ～ 2351、342.5 ～ 1594、4.797 ～ 67.72、32.44 ～ 277.3 μg • g^{-1}。**结论**　该方法高效、选择性强，可用于柴胡中有效成分含量的测定。

关键词：超高效液相色谱 - 串联质谱法；柴胡；柴胡皂苷 a；柴胡皂苷 d；槲皮素；芦丁
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1911-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.034

Simultaneous determination of 4 components in *Bupleurum chinense* DC. by UPLC-MS/MS

GUO Yu-ge[1], BAI Yu-bing[1], LI Hong-quan[2], HU Guan-yu[3], LI Xu[1*] (1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410007; 2. *The Third Hospital of Changsha*, *Changsha* 410035; 3. *Zhuzhou Institute for Food and Drug Control*, *Zhuzhou Hunan* 412000)

基金项目：《湖南省中药饮片炮制规范》（2010 年版）修订。
作者简介：郭宇鸽，女，主管药师，硕士研究生，主要从事药物分析与临床药学研究，email：guoyuge888888@163.com　*通信作者：黎旭，女，主管中药师，硕士研究生，主要从事天然药物研究，email：lixu88888888888888@163.com

Abstract: Objective To establish a ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method to determine the content of 4 components (saikosaponin a, saikosaponin d, quercetin, and rutin) in *Bupleurum chinense* DC.. **Methods** *Bupleurum chinense* DC. was extracted by ultrasound with 70% methanol. Chromatographic separation was performed on a C_{18} column (Welch Utimate AQ, 4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) with gradient elution. The flow rate was 0.5 mL • min $^{-1}$. The column temperature was 30 ℃ . The mass spectra was obtained by electrospray ionization under negative ion mode. **Results** Saikosaponin a, saikosaponin d, quercetin and rutin showed good linearity at 100.940 － 5047.00, 103.880 － 5194.00, 4.918 70 － 245.935 and 122.175 － 6108.75 ng • mL^{-1}. The average recovery of saikosaponin a, saikosaponin d, quercetin and rutin was 98.74%, 97.96%, 97.97% and 98.41%, respectively. The content of saikosaponin a, saikosaponin d, quercetin and rutin was 699.6 － 2351, 342.5 － 1594, 4.797 － 67.72, and 32.44 － 277.3 μg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** This method is highly efficient and accurate, which can be used for the determination of 4 components in *Bupleurum chinense* DC..

Key words: ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Bupleurum chinense* DC.; saikosaponin a; saikosaponin d; quercetin; rutin

柴胡是伞形科（*Apiaceae*）植物北柴胡（*Bupleurum chinense* DC.）的干燥根。其性味辛、苦，微寒，归肝、胆、肺经，具有疏散退热，疏肝升阳，升举阳气等功效[1]。柴胡主要含有皂苷[2]、挥发油[3]、黄酮[4]、多糖[5]、香豆素、多炔[6]等成分，具有解热、调节免疫[7]、抗抑郁[8]、保肝[9]、抗肿瘤[10]、抗炎[11]等作用。

目前，柴胡所有药理作用中，研究最典型的是解热作用。有研究认为，其作用成分主要为直接产生解热作用的柴胡皂苷和挥发油以及通过抑制热源而间接产生解热作用的黄酮[12-13]。也有研究者认为，柴胡的传统用药方式为煎煮，此时，挥发油含量不足以达到解热效果[14]，因此，柴胡发挥解热作用的成分应该以柴胡皂苷和黄酮为主。而柴胡中各种柴胡皂苷和黄酮含量有差异，含量较高者为柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芦丁以及槲皮素[15-17]。目前，关于同时测定含这 4 种成分含量的方法，只有液相色谱法[18]。而相对液相色谱法，具有信号采集时间短，选择性强等优势[19]的液相色谱 - 串联质谱法尚未见报道。

本文基于超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法建立柴胡中 4 种成分的含量测定方法，以期更好地控制其质量。

1　材料

1.1　试药

柴胡样品源自于药店、网商和药材市场，信息见表 1。所有批次药材经株洲市食品药品检验所胡冠羽主管药师鉴定均为伞形科（*Apiaceae*）植物北柴胡（*Bupleurum chinense* DC.）的段根。柴胡皂苷 a（批号：110777-201711，纯度：98.0%）、柴胡皂苷 d（批号：110778-201711，纯度：98.0%）、槲皮素（批号：100081-200907，纯度：97.4%）和芦丁（批号：10080-200707，纯度：90.5%）对照品（中国食品药品检定研究院）。

甲酸、乙酸铵（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，霍尼韦尔有限公司）。

表 1　样品信息

Tab 1　Sample information

批号	来源	采集时间
CH20210216	千金大药房	2021-02-16
CH20210314-1	泽信堂官方旗舰店	2021-03-14
CH20210314-2	徽京华尊官方旗舰店	2021-03-14
CH20210422	河北安国	2021-04-22
CH20210513	湖南廉桥	2021-05-13
CH20210523	安徽亳州	2021-05-23

1.2　仪器

XSE 205DV 型电子天平（精度：0.01 mg，梅特勒托利多仪器有限公司）；HNS-SY-150 型超声波仪（北京恒奥德仪器仪表有限公司）；Agilent 1290 Infinity Ⅱ型超高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；QTRAP 4500 型三重四极杆质谱（上海爱博才思分析仪器有限公司）等。

2　方法与结果

2.1　色谱 - 质谱条件

2.1.1　色谱条件　采用 Welch Utimate AQ-C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱，以水（A）- 乙腈（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 5 min，90%→55%A；5 ～ 10 min，55%→30%A；10 ～ 12 min，30%→10%A；12 ～ 12.5 min，10%→90%A；12.5 ～ 15 min，90%A），流速 0.5 mL • min^{-1}，采集时间 15 min，柱温 30 ℃，进样量 5 μL。

2.1.2　质谱条件　质谱：电喷雾电离源（ESI），负离子扫描，多反应监测（MRM），离子源温度：550 ℃，电喷雾电压：－4500 V，气帘气：35.0 psi，离子源气 1：55 psi，离子源气 2：55 psi，碰撞气：氩气。各成分的质谱参数见表2，准分子离子见图1。

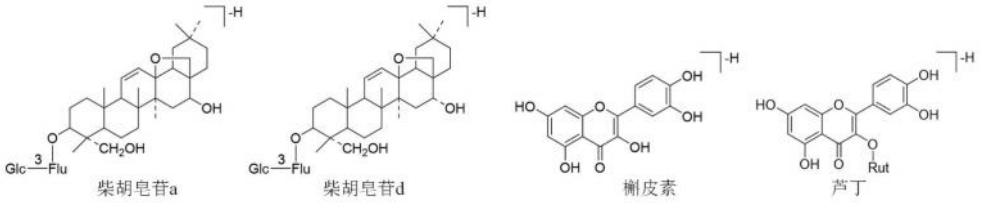


图 1　4 种成分的准分子离子图

Fig 1　Excimer ion of 4 components

表 2　4 种成分的保留时间及质谱参数

Tab 2　Retention time and UPLC-MS/MS parameters of the 4 components

成分	离子模式	母离子	定量子离子	DP（去簇电压）/V	CE（碰撞能量）/V	分子式
柴胡皂苷 a	－	779.4	617.3	－190	－48	$C_{42}H_{68}O_{13}$
柴胡皂苷 d	－	779.4	617.3	－190	－48	$C_{42}H_{68}O_{13}$
槲皮素	－	301.1	105.9	－114	－26	$C_{15}H_{10}O_7$
芦丁	－	609.3	299.9	－160	－48	$C_{27}H_{30}O_{16}$

2.2　溶液的制备

2.2.1　混合对照品储备液　精密称取柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁对照品适量，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得。经含量折算后，上述各对照品的质量浓度分别为 1.0094、1.0388、0.983 74、0.977 40 mg • mL^{-1}。对照品提取离子色谱图见图 2A。

2.2.2　供试品溶液　取柴胡粉末（粉碎后过 4 号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 30 mL，称量，超声（400 W，40 kHz）提取 30 min，静置至室温，再称量，用 70% 甲醇补足减失的量，摇匀，精密量取 1 mL 摇匀后的溶液，置于 10 mL 量瓶中，加入 70% 甲醇定容至刻度线，再次摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液，注入质谱仪进行分析。柴胡样品提取离子色谱图见图 2B。

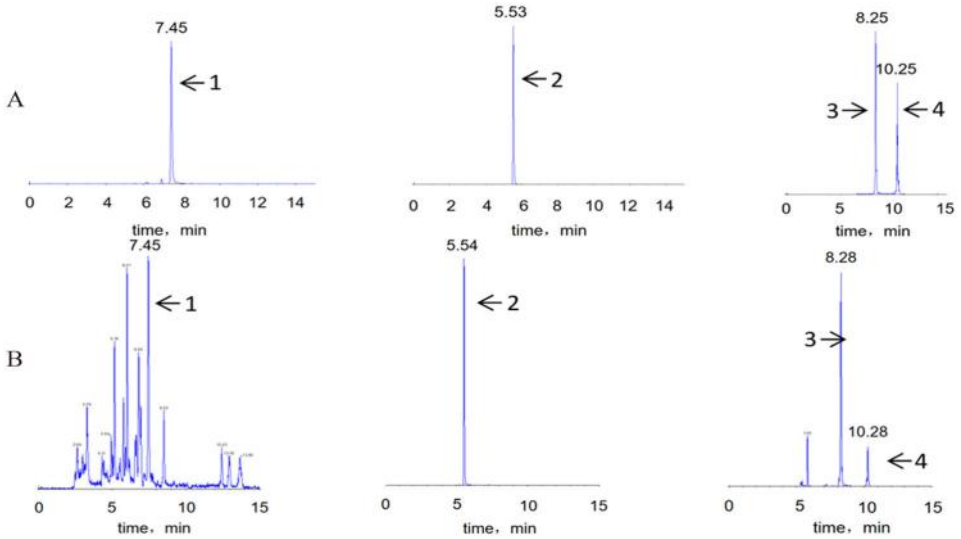


图 2　柴胡混合对照品和样品中分析物提取离子色谱图

Fig 2　Extracted ion chromatogram of *Bupleurum chinense* DC. mixture reference and sample

A. 对照品（reference）；B. 样品（sample）

注（Note）：1. 槲皮素（quercetin）；2. 芦丁（rutin）；3. 柴胡皂苷 a（saikosaponin a）；4. 柴胡皂苷 d（saikosaponin d）。

2.3　方法学考察

2.3.1　线性关系考察　精密量取混合对照品储备液适量，用 70% 甲醇稀释得系列混合对照品溶液（柴胡皂苷 a：100.940、504.700、1009.40、2018.80、4037.60、5047.00 ng • mL^{-1}；柴胡皂苷 d：103.880、519.400、1038.80、2077.60、4155.20、

5194.00 ng • mL^{-1}；槲皮素：4.918 70、24.5935、49.1870、98.3740、196.748、245.935 ng • mL^{-1}；芦丁：122.175、610.875、122 1.75、244 3.50、488 7.00、610 8.75 ng • mL^{-1}），进样测定，以质量浓度 X（ng • mL^{-1}）为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，计算 4 种成分的线性回归方程，结果见表 3，4 种成分在各自线性范围内呈良好的线性关系。

表 3　线性关系结果 (n = 6)

Tab 3　Linear regression (n = 6)

成分	回归方程	相关系数	线性范围 /（ng • mL^{-1}）
柴胡皂苷 a	$Y = 2.766\times10^6X - 7.009\times10^4$	0.9992	100.940 ～ 5047.00
柴胡皂苷 d	$Y = 1.507\times10^6X + 1.042\times10^4$	0.9997	103.880 ～ 5194.00
槲皮素	$Y = 1.339\times10^3X - 3.409\times10^2$	0.9996	4.918 70 ～ 245.935
芦丁	$Y = 3.705\times10^6X + 9.334\times10^4$	0.9992	122.175 ～ 6108.75

2.3.2　精密度试验　取混合对照品溶液，按照“2.1”项下条件连续进样 6 次，记录各成分峰面积并计算 *RSD*。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 0.96%、0.79%、1.1% 和 1.2%，表明仪器精密度良好。

2.3.3　重复性试验　取同一批样品（批号：CH20210314-1）6 份，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录各成分峰面积并计算 *RSD*。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 1.3%、1.3%、1.4% 和 1.2%，表明该方法重复性良好。

2.3.4　稳定性试验　取同一批样品供试品溶液（批号：CH20210314-1），分别于 0、2、4、8 和 12 h 进样分析，记录各成分峰面积并计算 *RSD*。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 1.7%、2.0%、1.5% 和 1.7%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.5　加样回收试验　取已知含量的样品（批号：CH20210314-1）6 份，每份约 0.25 g，精密称定，分别加入绝对含量接近 0.25 g 药材所含量的对照品溶液后，按“2.2.2”项下方法制备，进样分析，计算加样回收率，结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁的平均加样回收率为 98.74%、97.96%、97.97% 和 98.41%，*RSD* 均小于 1.5%，表明本方法回收率良好。

2.4　样品测定

精密称取 6 批次不同批号的柴胡各 2 份，分别按照“2.2.2”项下方法制备，按照“2.1”项下条件进样测定，代入线性回归方程，计算 4 种成分的含量，结果见表 4。

表 4　6 批次样品的 4 种成分的含量 (μg • g^{-1}，n = 2)

Tab 4　Contents of 4 components in 6 batches of samples (μg • g^{-1}，n = 2)

批号	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	槲皮素	芦丁
CH20210216	699.6	342.5	6.775	32.44
CH20210314-1	1233.0	573.5	11.26	154.4
CH20210314-2	1720.0	568.8	4.797	72.40
CH20210422	2351.0	159 4	67.72	277.3
CH20210513	1012.0	833.3	36.22	75.67
CH20210523	2311.0	788.9	9.446	100.7

3　讨论

3.1　供试品溶液制备条件优化

本研究比较了不同提取溶剂（30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇和 90% 甲醇），不同提取体积（20、30、40 和 50 mL），不同提取时间（10、20、30 和 40 min）对供试品溶液制备的影响，以 4 种成分的峰面积大小为判断依据，确定最佳条件。结果，当甲醇浓度为 70%，提取体积为 30 mL，提取时间为 30 min 时，各成分峰面积均为最大值，因此选为最佳制备条件。

3.2　色谱条件优化

本研究比较了 4 种流动相组成（甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 甲酸水溶液和乙腈 - 含 5 mmol • L^{-1} 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液），4 种 C_{18} 色谱柱（Agilent Eclipse XDB、Thermo Acclaim 120、Welch Xtimate 和 Welch Utimate AQ，规格：4.6 mm×150 mm，5 μm），2 种洗脱程序 [乙腈 - 水（40：60）等度洗脱和梯度洗脱（详见本文色谱条件）]，3 种流速（0.3、0.5 和 0.7 mL • min^{-1}）。结果，流动相组成为甲醇 - 水溶液时，各成分的峰稍有拖尾现象，水相加入乙酸铵各成峰面积被抑制；加入乙腈 - 水，拖尾得到改善，峰宽较窄；加入甲酸，无明显变化，因此，乙腈 - 水为最佳流动相组成。4 种色谱柱均得到良好的峰形和分离度，但是 Welch Utimate AQ 柱相对其他色谱柱，各成分峰宽更窄，峰形更为尖锐，保留性更好，因此选为最合适色谱柱。洗脱程序中，等度洗脱时各成分峰形均有拖尾，换成梯度洗脱，峰形得到改善，因此选为最佳洗脱程序。流速为 0.3 和 0.5 mL • min^{-1} 时，各成分峰形、峰面积相当；但是当流速为 0.3 mL • min^{-1} 时出峰慢，不利于

提高分析效率；当流速为 0.7 mL • min^{-1} 时，各成分离子化不充分，峰面积变小，因此，选择 0.5 mL • min^{-1} 为最佳流速。

3.3 质谱参数的建立

通过比较正、负离子模式下各成分分子离子峰信号强度，选择负离子模式；根据信号强度曲线，选择各成分分子离子峰信号最强时所显示数值；离子源温度、电喷雾电压、气帘气及离子源气等参数则选择仪器默认参数。

3.4 方法优劣比较

目前对柴胡中皂苷和黄酮成分进行定量分析的方法有多种，如 HPLC-DAD（二极管阵列检测器）、HPLC-ELSD（蒸发光散射检测器）等。相对而言，本法优势明显，主要体现在快速、选择性强等方面。如郭司群等 [20] 测定柴胡皂苷 d 的时长达到 60 min，韦英杰等 [18] 同时测定柴胡中皂苷和黄酮成分的时长更是达到 70 min，而本法只需 15 min。另外，李卫斌等 [21] 测定柴胡皂苷含量时，柴胡皂苷 c 与杂峰分离不彻底，有部分重叠。韦杰英等 [18] 采用的方法中，柴胡皂苷 a 峰也与杂峰有重叠，影响到皂苷成分定性定量的准确性，而本法除色谱柱的分离功能，还可根据分析物的不同质荷比具有二次分离功能，专属性强，干扰少。但是，本法设备比较昂贵，可能在前期投入和方法推广方面不如上述方法。

3.5 总结

本研究建立了柴胡中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、槲皮素和芦丁 4 种成分的超高效液相 - 串联质谱含量测定方法，为基于这 4 种成分对柴胡进行解热的量效关系评价提供了研究基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：377.

[2] 周丽娟，孙欣光，王雅芝，等 . 基于 UPLC 多指标成分含量测定的柴胡不同部位质量评价研究 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1170-1177.

[3] 胡倩，金司仪，李丹清，等 . 柴胡挥发油的研究进展 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1499-1503.

[4] 杨林林，赵钰，韩梅，等 . 北柴胡和狭叶柴胡中黄酮类成分及其关键酶基因表达的组织差异分析 [J]. 中草药，2019，50（1）：188-194.

[5] Zhang ZD，Li H，Wan F，et al. Polysaccharides extracted from the roots of *Bupleurum chinense* DC. modulates macrophage functions [J]. Chin J Nat Medicines，2017，15（12）：889-898.

[6] 欧小龙，黄涛阳 . 柴胡属植物化学成分研究进展 [J]. 中药材，2021，44（3）：751-757.

[7] Li XQ，Song YN，Wang SJ，et al. Saikosaponins：a review of pharmacological effects [J]. J Asian Nat Prod Res，2018，20（5）：1-13.

[8] Zhao H，Wang X，Zhang Y，et al. Quantitative 1H NMR for the direct quantification of saikosaponins in *Bupleurum chinense* DC. [J]. Anal Sci，2021，37（10）：1413-1418.

[9] 夏青，韩利文，张云，等 . 基于斑马鱼模型的柴胡皂苷 a 保肝作用与肝毒性研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（13）：2662-2666.

[10] Li DQ，Wu J，Liu LY，et al. Cytotoxic triterpenoid glycosides（saikosaponins）from the roots of *Bupleurum chinense* DC. [J]. Bioorg Med Chem Lett，2015，25（18）：3887-3892.

[11] Xie JY，Di HY，Li H，et al. *Bupleurum chinense* DC. polysaccharides attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Phytomedicine，2012，19（2）：130-137.

[12] 金国泰，李博，王树荣 . 中药柴胡解热的物质基础、药效及机制的实验研究 [J]. 成都中医药大学学报，2013，36（4）：28-30.

[13] 王旭红，李耀辉，张军城，等 . 基于网络药理学的柴胡在小柴胡汤中治疗发热的作用分析 [J]. 海南医学院学报，2021，27（16）：1262-1267.

[14] 薛燕 . 柴胡的解热作用药效学研究 [J]. 中医药学刊，2003，21（11）：1897，1959.

[15] 海霞，王书林，王砚，等 . HPLC 测定竹叶柴胡中黄酮类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（15）：76-79.

[16] 郭泰麟，康廷国，张慧 . 不同产地南北柴胡中柴胡皂苷的含量测定 [J]. 天津中医药大学学报，2020，39（2）：221-225.

[17] 马守芳，孙江伟，高晓洁，等 . HPLC-ELSD 同时测定北柴胡中柴胡皂苷 A、C、D、B_1、B_2 及山奈苷含量 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（8）：821-826.

[18] 韦英杰，王茉，宁青，等 . HPLC 法同时测定柴胡与春柴胡中皂苷类及黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2011，31（5）：879-883.

[19] 胡明珠，孟宪双，王春，等 . 质谱在高通量快速检测技术的应用研究进展 [J]. 分析测试学报，2018，37（2）：127-138.

[20] 郭司群，迟晓雪，白雅静，等 . HPLC 法测定兴安柴胡中柴胡皂苷 d 的含量 [J]. 中国民族民间医药，2020，29（16）：48-51.

[21] 李卫斌，胡宝平，项炫萌 . HPLC 法测定不同产地柴胡中柴胡皂苷 a、c、d 的含量 [J]. 甘肃医药，2019，38（1）：66-67，86.

（收稿日期：2021-12-08；修回日期：2022-04-16）

GC-MS/MS 法测定不同级别乳酸中残留溶剂的含量

张悦[1, 2]，赵勇[1, 2]，郑金凤[1, 2]，刘雁鸣[1, 2]，谢莹莹[1, 2*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　建立气相色谱 - 串联质谱（GC-MS/MS）法测定乳酸中甲醇、乙醇的含量，为乳酸质量控制提供依据。**方法**　采用 VF-WAXms 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）程序升温进行分离；选择电子轰击离子源（EI），多重反应监测模式（MRM）扫描，甲醇定量离子对为 *m/z* 32.1 ＞ 30.1，定性离子对为 *m/z* 32.1 ＞ 28.1；乙醇定量离子对为 *m/z* 46.1 ＞ 45.1，定性离子对为 *m/z* 46.1 ＞ 31.1，进行检测，外标法计算含量。**结果**　各成分之间能完全分离；甲醇、乙醇在 0 ～ 150 μg • mL^{-1} 的浓度内与峰面积线性关系良好（$r \geqslant 0.9997$），平均回收率分别为 93.5%（*RSD* ＝ 4.0%）、89.8%（*RSD* ＝ 4.3%）。**结论**　本方法准确度高、重现性好，可用于乳酸中残留溶剂的测定。

关键词：乳酸；甲醇；乙醇；残留溶剂；气相色谱 - 串联质谱法
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1916-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.035

Determination of residual solvents in different grades of lactic acid by GC-MS/MS method

ZHANG Yue[1, 2], ZHAO Yong[1, 2], ZHENG Jin-feng[1, 2], LIU Yan-ming[1, 2], XIE Ying-ying[1, 2*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method to determine the content of methanol and ethanol in lactic acid and to provide a basis for the quality control of lactic acid. **Methods** VF-WAXms capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) was used for the separation at programmed temperature. Electron impact ion source (EI) and multiple reaction monitoring mode (MRM) were used for the scanning. The quantitative ionion pair *m/z* 32.1 ＞ 30.1 and the qualitative ion pair *m/z* 32.1 ＞ 28.1 were selected for the detection of methanol. The quantitative ionion pair *m/z* 46.1 ＞ 45.1 and the qualitative ion pair *m/z* 46.1 ＞ 31.1 were selected for the detection of ethanol. The content was calculated with external standard method. **Results** Under the chromatographic condition, the residual solvents were completely separated. The linearity of methanol and ethanol was good at 0 － 150 μg•mL^{-1} ($r \geqslant 0.9997$), and the average recovery was 93.5% (*RSD* ＝ 4.0%) and 89.8% (*RSD* ＝ 4.3%), respectively. **Conclusion** The method is accurate and reproducible, which can be used for the determination of residual solvents in lactic acid.

Key words: lactic acid; methanol; ethanol; residual solvent; gas chromatography-tandem mass spectrometry

乳酸（lactic acid）又名 2- 羟基丙酸，是一种天然存在的重要有机酸，作为消毒防腐剂、pH 调节剂、助溶剂等，可用于肌内注射、静脉注射、皮下注射、口服糖浆、片剂、外用和阴道用制剂[1-2]。

乳酸的微生物发酵生产过程中可能产生甲醇、乙醇等有机副产物，采用酯化水解法也可能

基金项目：湖南省自然科学基金—科药联合基金项目（No.2022JJ80014）。
作者简介：张悦，女，硕士，主管药师，主要从事药用辅料检验检测，email：873813723@qq.com　*通信作者：谢莹莹，女，主管药师，主要从事药用辅料检验检测，email：276468687@qq.com

使用甲醇和乙醇与乳酸成酯[3-4]。这些溶剂的残留会对人体健康造成危害，控制其残留量对保证药品质量和用药安全有重要意义。目前欧洲药典（EP10.0）[5]规定了注射用乳酸中甲醇的限度（不得过 50 μg • g^{-1}），而我国尚未见乳酸中残留溶剂检测方面的相关报道。为考察国内乳酸中甲醇、乙醇残留的整体情况，本研究根据《人用药品注册技术要求国际协调会质量部分》（ICH）[6]的指导原则（甲醇每日允许暴露量 30.0 μg • g^{-1}，乙醇每日允许暴露量 50.0 μg • g^{-1}）和《中国药典》2020 年版四部[7]中的相关规定，并参考相关文献报道[8-10]，拟建立 GC-MS/MS 法测定乳酸中甲醇、乙醇的含量，并评价国内市场收集的 33 批乳酸的总体质量。

1　仪器与试药

1.1　仪器

8890-7010B GC-MS/MS 色谱仪（美国安捷伦公司）；MS105DU 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司，精度为十万分之一）；VF-WAX ms 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）(美国安捷伦公司)；固定液为聚乙二醇（PEG-20 M）。

1.2　试药

甲醇（纯度≥ 99.99%，美国霍尼韦尔公司，批号：12G1H）；乙醇（纯度≥ 99.9%，德国 CNW Technologies GmbH 公司，批号：E5450210）。33 批乳酸样品包括 12 批原料药级、13 批药用辅料、5 批食品级、2 批工业级及 1 批进口高纯级，详细信息见表 1。

表 1　乳酸样品信息

Tab 1　Lactic acid sample information

生产企业	批号	级别
无锡福祈制药有限公司	CD190602C、CD190603C、CD200404C、CD190502C、CD190604C、CD190603C、CD190602C、CD190605C、CD200403C	原料药
四川金山制药有限公司	201201、200801、200801、201201、210201、200401	药用辅料
洛阳龙门医药股份有限公司医药股份有限公司	20050588	原料药
河南金丹乳酸科技股份有限公司	L20032385J、L200912J	食品级
武汉三江航天固德生物科技有限公司	2021032931	食品级
湖南尔康制药股份有限公司	105920201201、105920180501、105920210201、105920210301	食品级
	X210401、X210402、X210403	药用辅料
湖北葛店人福制药有限公司	乳酸（原料药）样品 1	药用辅料
武汉三江航天固德生物科技有限公司	乳酸（原料药）样品 2	药用辅料
	食品级乳酸 85% 样品 1	食品级
	食品级乳酸 85% 样品 2	食品级
	乳酸（工业级）80% 样品 1	工业级
	乳酸（工业级）80% 样品 2	工业级
武藏野化学（中国）有限公司	/	进口高纯级

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

2.1.1　对照品溶液的制备　分别取甲醇、乙醇适量，精密称定，用水溶解并稀释成 10 mg • mL^{-1} 的溶液，作为标准储备液。再分别量取适量标准储备液，用水配制成质量浓度为 0、5、10、50、100、150 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。

2.1.2　供试品溶液的制备　取乳酸 0.5 g，精密称定，置 20 mL 顶空瓶中，精密加入 5 mL 水溶解，即得。

2.2　色谱条件

程序升温：初温 50 ℃，保持 4 min，以 30 ℃ • min^{-1} 的升温速率升至 200 ℃，保持 2 min；进样口温度 220 ℃；载气为高纯 He（纯度＞ 99.999%）；流速 2.0 mL • min^{-1}，分流进样，分流比 5∶1；进样量 1.0 mL；顶空瓶平衡温度 80 ℃，平衡时间 30 min，定量环温度 90 ℃，传输线温度 100 ℃。

2.3　质谱条件

采用电子轰击离子源（EI），电子能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，溶剂延迟 0.5 min，采用多重反应监测模式（MRM）扫描。甲醇：定量离子对为 *m/z* 32.1 ＞ 30.1，碰撞能量（CE）5 eV；定性离子对为 *m/z* 32.1 ＞ 28.1，碰撞能量 5 eV。乙醇：定量离子对为 *m/z* 46.1 ＞ 45.1，碰撞能量 5 eV；定性离子对为 *m/z* 46.1 ＞ 31.1，碰撞能量 5 eV。

2.4　系统适用性试验

精密量取“2.1”项下空白溶液（水）、对照品溶液和供试品溶液各 5 mL，注入 GC-MS/MS 仪，记录色谱图，结果见图 1，空白溶液无干扰，各杂质能有效分离。

2.5　线性关系、检出限与定量限

精密量取甲醇、乙醇标准储备液，用水定量稀释制成 0、5、10、50、100、150 μg • mL^{-1} 系列对照品溶液，分别进样，记录峰面积。以质量浓度（x，μg • mL^{-1}）为横坐标，以峰面积（y）为纵坐标，进行线性回归，得回归方程：$y_{甲醇} = 1.82x + 0.65$，$r = 0.9999$；$y_{乙醇} = 3.99x - 0.27$，$r = 0.9997$。甲醇、乙醇在 0 ～ 150 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。采用信噪比 $S/N \approx 3$ 计算检出限，得甲醇、乙醇的检出限分别为 9.85、11.60 ng • mL^{-1}；$S/N \approx 10$ 计算定量限，得甲醇、

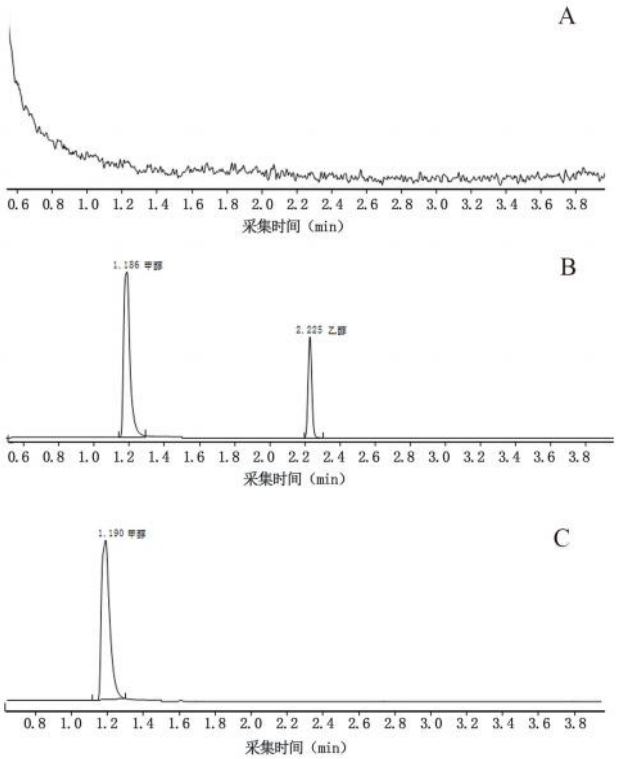


图 1　系统适用性色谱图

Fig 1　Chromatogram of specificity test

A. 空白溶液（blank solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）

乙醇的定量限分别为 32.83、38.67 ng • mL^{-1}。

2.6　重复性试验

取样品（批号：CD190602C）0.5 g，置顶空瓶中，加入“2.1.1”项下对照品溶液（甲醇 49.2 μg • mL^{-1}，乙醇 50.1 μg • mL^{-1}）5 mL，平行制备 6 份，进样测定，记录色谱峰面积，计算甲醇、乙醇含量。结果甲醇平均含量为 45.7 μg • mL^{-1}，*RSD* 为 4.6%；乙醇平均含量为 45.2 μg • mL^{-1}，*RSD* 为 5.7%。说明本方法重复性好。

2.7　稳定性试验

取样品（批号：CD190602C）5 g，置 50 mL 量瓶中，加对照品溶液（甲醇、乙醇：50 μg • mL^{-1}）50 mL 稀释并定容至刻度，再精密量取 5 mL，置顶空瓶中，于 0、2、4、8、12、20 h 进样，记录峰面积。结果供试品溶液在 20 h 内甲醇、乙醇峰面积的 *RSD* 分别为 4.5%、5.3%（n = 6），表明方法稳定性良好。

2.8　回收试验

取样品（批号：CD190602C）约 0.5 g，共 6 份，置顶空瓶中，精密加入对照品溶液（甲醇 4.987 μg • mL^{-1}，乙醇 5.132 μg • mL^{-1}）5 mL，进样测定。结果甲醇、乙醇平均回收率分别为 93.5%（*RSD* = 4.0%）、89.8%（*RSD* = 4.3%），说明本法准确度好。

2.9　样品测定

取 33 批乳酸样品，按“2.1”项下方法制备，平行制备两份，进样测定，计算样品中甲醇、乙醇含量，结果有 2 批次检测出残留溶剂，四川金川制药有限公司 200801 批次的样品检出乙醇 9.4 μg • mL^{-1}，武藏野化学（中国）有限公司的样品检出甲醇 8.7 μg • mL^{-1}。

3　讨论

3.1　色谱柱的选择

选择质谱专用毛细管色谱柱 DB-1 ms、HP-5 ms、DB-624 ms 和 VF-WAX ms 进行试验。结果显示 VF-WAX ms 毛细管柱进行分离时，分离效果最好，且灵敏度较高，峰形最尖锐、对称，故选用 VF-WAX ms 毛细管柱为色谱柱。

3.2　质谱条件的选择

取 10 μg • mL^{-1} 的甲醇、乙醇溶液进行 MS1 Scan 模式全扫描，扫描范围 10 ～ 200 amu，通过谱库检索确定各成分，并选择丰度最高的离子作为母离子（*m/z* 32.1 作为甲醇母离子，*m/z* 46.1 作为乙醇母离子）。再对母离子进行 Product ion 扫描，确定各产物离子的时间片断和驻留时间，选择丰度最高的特征碎片离子作为子离子。设定不同碰撞池电压的运行序列（CE：3、5、8、10 V），优化子离子的最佳碰撞能量，建立 MRM 方法。

3.3　平衡温度和平衡时间的考察

顶空气体的浓度随着平衡温度的升高而升高，当瓶内处于气液平衡后，各组分响应值趋于稳定[11-13]。本研究考察了不同温度 80、90、100、110 ℃下各组分的响应情况。发现甲醇、乙醇响应值随平衡温度升高而增大，但温度升至 90 ℃以后，响应值变化不明显。考虑到平衡温度太高，顶空瓶气密性变差，会影响测定结果的稳定性，故选择 90 ℃作为最佳的平衡温度。在平衡温度 90 ℃条件下，对不同平衡时间 20、30、40、50 min 的平衡效果进行考察，发现甲醇、乙醇响应值随着时间的增加而增加，当时间超过 30 min 后，响应值变化较小，故最终选择 30 min 作为最佳的平衡时间。

3.4　国内市场中不同级别乳酸质量情况

本研究结果显示，33 批乳酸样品中，仅 1 批样品检出乙醇（为药用辅料级），1 批样品检出甲醇（为进口高纯级），其他样品均未检出残留溶剂。《中国药典》2020 年版四部通则 0861 残留溶剂测定法规定乙醇限度为 0.5%，甲醇限度为 0.3%；EP10.0 规定注射用乳酸控制甲醇不得过 50 μg • g^{-1}。本研究 33 批次乳酸中的乙醇和甲醇

残留量均远低于上述限度。说明国内市场中原料药、药用辅料、食品级、工业级、进口高纯级等不同级别乳酸整体工艺控制良好，甲醇、乙醇残留量较低。

甲醇是 ICH 中第二类溶剂，是非遗传毒性动物致癌或可能导致其他不可逆毒性神经毒性或致畸形的试剂，为应限制的溶剂。本次研究收集到 1 批进口高纯级样品，且在这批样品中检出少量甲醇，故应多关注高纯级样品的溶剂残留情况。另外研究中还发现，有药品生产企业混用不同级别乳酸的情况，如将食品级（2021032931）乳酸当作药用辅料级用于药品生产中。故监管部门应多关注乳酸的混用情况，特别注意高纯级乳酸用于药品或食品市场中的溶剂残留情况。

参考文献

[1] 孔璇，吴燕，李华龙 . HPLC 法测定药用辅料乳酸中乳酸 [J]. 现代药物与临床，2020，35（8）：3-10.

[2] 王洪记 . 我国乳酸用途扩大市场趋紧 [J]. 精细与专用化学品，1997（1）：2-8.

[3] 黄靖华，孙靓，吴军华，等 . 甘蔗糖蜜发酵生产 L- 乳酸工艺条件研究 [J]. 广西科学，2011，18（3）：273-277.

[4] 赵龙，蒋雪薇，盛灿梅，等 . 玉米芯载体固定化米根霉发酵 L- 乳酸工艺的研究 [J]. 食品与机械，2012，28（3）：226-229，239.

[5] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia [S]. 10.0 edition. Strasbourg. European Directorate for Quality Medicines，2019：68-97.

[6] 李敏，杨文智，黄晓龙，等 . 国际人用药品注册技术协调会仿制药国际协调进展 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（16）：4-10.

[7] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：116-120.

[8] 张文锦，后小龙，付宁 . 加速溶剂萃取 -GC-MS/MS 法检测土壤中 5 种有机氯农药残留 [J]. 食品工业，2020，41（7）：4-11.

[9] 黄斌，史群志，李景，等 . 顶空毛细管气相色谱法测定伏立诺他原料药中有机溶剂残留量 [J]. 中南药学，2018，16（1）：4-10.

[10] 朱克旭，张海波 . 顶空毛细管气相色谱法测定索非布韦原料药中有机溶剂残留量 [J]. 中南药学，2019，17（7）：3-8.

[11] 宁亚维，侯琳琳，于同月，等 . UPLC-MS/MS 法快速测定乳酸菌发酵食品中的苯乳酸 [J]. 食品与发酵工业，2021，47：174-179.

[12] 洪宗超，吴和珍，杨艳芳，等 . 基于 GC-MS 及 GC 技术对片姜黄挥发油成分的定性定量分析 [J]. 中南药学，2019，17（3）：9-14.

[13] 柳华春，梁文耀，王继才，等 . 顶空气相色谱 - 质谱联用法测定化妆品中 α- 氯甲苯 [J]. 分析测试学报，2021，40（8）：5-11.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-03-08）

高效液相色谱法同时测定华北獐牙菜中 5 种有效成分的含量

刘学良[1]，刘安平[2]，李维业[2]，石春兰[1]，问静[1]，王永晶[1]，祁彦凯[1]，王开祥[2]，陈鹏[1]，韩达斌[1]，刘海青[1*]（1. 青海省药品审评核查中心，西宁　810007；2. 西宁市食品药品检验检测中心，西宁　810007）

摘要：目的　建立高效液相色谱法同时测定华北獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素的含量。**方法**　采用 Waters SunFire C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），甲醇 -0.05% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱，流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 254 nm，进样量 10 μL，柱温 30 ℃。**结果**　獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素进样量分别在 0.0546 ～ 1.0930 μg（r = 0.9993）、0.1910 ～ 3.8200 μg（r = 0.9996）、0.1089 ～ 2.1780 μg（r = 0.9995）、0.0584 ～ 1.1690 μg（r = 0.9999）、0.0528 ～ 1.0570 μg（r = 0.9992）与峰面积呈良好的线性关系，加样回收率分别为 97.62%、97.04%、97.68%、95.66%、96.75%，*RSD* 分别为 1.3%、0.79%、0.53%、0.79%、0.92%（n = 6）；3 批样品中龙胆苦苷含量最高。**结论**　该方法简便可行，精密度高，重复性好，可用于华北獐牙菜的质量控制。

关键词：华北獐牙菜；獐牙菜苦苷；龙胆苦苷；当药苷；芒果苷；异荭草素；高效液相色谱法
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1919-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.036

基金项目：青海省基础研究项目（No.2020-ZJ747）。

作者简介：刘学良，男，副主任药师，主要从事药品审评工作，email：93684218@qq.com　*__通信作者：__刘海青，男，主任药师，主要从事中藏药研究工作，email：QHDC1958@aliyun.com

Simultaneous determination of five active ingredients in *Swertia wolfangiana* Grun. by HPLC

LIU Xue-liang[1], LIU An-ping[2], LI Wei-ye[2], SHI Chun-lan[1], WEN Jing[1], WANG Yong-jing[1], QI Yan-kai[1], WANG Kai-xiang[2], CHEN Peng[1], HAN Da-bin[1], LIU Hai-qing[1*] (1. *Qinghai Center for Drug Evaluation and Inspection*, *Xining* 810007; 2. *Centre for Food and Drug Control of Xining*, *Xining* 810007)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, mangiferin and isoorientin in *Swertia wolfangiana Grun.* **Methods** Waters SunFire C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase at 1.0 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 254 nm, the sample volume was 10 μL, and the column temperature was 30 ℃ . **Results** The linearity for swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, mangiferin and isoorientin were 0.0546 ～ 1.0930 μg (r = 0.9993), 0.1910 ～ 3.8200 μg (r = 0.9996), 0.1089 ～ 2.1780 μg (r = 0.9995), 0.0584 ～ 1.1690 μg (r = 0.9999), and 0.0528 ～ 1.0570 μg (r = 0.9992). The recoveries were 97.62%, 97.04%, 97.68%, 95.66%, and 96.75%. *RSD*s were 1.3%, 0.79%, 0.53%, 0.79%, and 0.92% (n = 6). Gentiopicroside had the highest content among the 3 samples batches. **Conclusion** The method is simple, feasible, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of *Swertia wolfangiana* Grun..

Key words: *Swertia wolfangiana* Grun.; swertiamarin; gentiopicroside; sweroside; mangiferin; isoorientin; HPLC

华北獐牙菜别称“乌氏当药”，在《中国植物志》[1]、《中国高等植物图鉴》[2]、《藏药志》[3]均有记载，为龙胆科植物獐牙菜属华北獐牙菜 *Swertia wolfangiana* Grun. 的干燥花 [4]。华北獐牙菜藏语名“代哇”，藏医将其作为治疗肝胆类疾病的藏药材“桑蒂”的来源之一，通常在 7 ～ 8 月采其花，以纸遮蔽，晒干后使用，味苦、性寒，具有清热利胆之功效，也用于治疗流行性感冒 [3-4]。华北獐牙菜生于海拔 1500 ～ 5260 m 的河谷阶地、高山草甸、沼泽草甸、灌丛中及潮湿地，在西藏东部、四川、青海、甘肃南部、山西、湖北西部均有分布 [5-6]。

目前，关于华北獐牙菜研究方面的研究文献较少，主要集中在药材资源整理、调查等方面 [7-12]，未查到其有效成分分离鉴定、质量控制等方面的文献。本研究首次采用高效液相色谱法测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素 5 种有效成分的含量，方法操作简便、有效，可为今后进一步研究华北獐牙菜提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪，紫外检测器（2489），Waters 2695 型 Empower 化学工作站（美国 Waters 公司）；十万分之一电子天平（METTLER TOLEDO），紫外可见分光光度计（PE Lambda 35，PE 公司）。

1.2 试药

对照品獐牙菜苦苷（批号：110785-201404，纯度：98.3%），龙胆苦苷（批号：110770-201918，纯度：97.1%），当药苷（批号：111742-200501，纯度：99.2%），芒果苷（批号：111607-200704，纯度：98.1%），异荭草素（批号：111974-200401，纯度：94%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇为色谱纯，磷酸为优级纯，其余试剂为分析纯；水为超纯水。华北獐牙菜药材均由项目组人员分别从青海玉树市、同德县、同仁县采集，经青海省药品审评核查中心刘海青主任药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 [13-17]

Waters SunFire C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），甲醇（A）-0.05% 磷酸溶液（B）为流动相，进行梯度洗脱（0 ～ 5 min，10% ～ 25%A；5 ～ 11 min，25% ～ 45%A；11 ～ 25 min，45% ～ 70%A；25 ～ 35 min，70% ～ 80%A）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 254 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。在此色谱条件下，獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素与样品中其他成分分离度均大于 1.5，理论板数龙胆苦苷峰计算不低于 3000，见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品獐牙菜苦苷 9.72 mg、龙胆

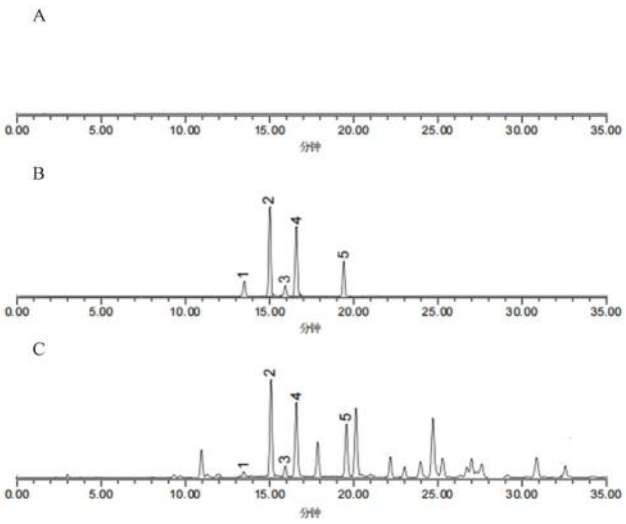


图 1　华北獐牙菜 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of *Swertia wolfangiana* Grun.

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 混合对照品（mixed reference solution）；C. 供试品（test solution）；1. 獐牙菜苦苷（swertiamarin）；2. 龙胆苦苷（gentiopicroside）；3. 当药苷（sweroside）；4. 芒果苷（mangiferin）；5. 异荭草素（isoorientin）

苦苷 9.03 mg、当药苷 8.78 mg、芒果苷 7.11 mg、异荭草素 8.28 mg，分别置 25、10、25、10、25 mL 量瓶中，加甲醇超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。依次精密量取上述对照品储备液 3、6、8、2、4 mL 置 25 mL 量瓶中，加甲醇超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，即得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素对照品质量浓度分别为 0.0459、0.2104、0.1116、0.0558、0.0498 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

取本品粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，超声处理 30 min（功率 250 W，频率 50 kHz），取出，放至室温，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4　线性关系考察

精密称取獐牙菜苦苷对照品 5.56 mg、龙胆苦苷对照品 19.67 mg、当药苷对照品 10.98 mg、芒果苷对照品 5.96 mg、异荭草素对照品 5.62 mg，置 50 mL 量瓶中，加甲醇超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品混合溶液。精密量取上述对照品混合溶液 0.5、1、2.5、5、7.5 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，取上述溶液及对照品混合溶液分别注入液相色谱仪，测得峰面积。以对照品峰面积（Y）对数值为纵坐标，进样量（X）为横坐标，用外标两点法计算并绘制标准曲线，得回归方程分别为 $Y_{獐牙菜苦苷} = 9.409\times10^5X + 1.760\times10^3$（$r = 0.9993$）、$Y_{龙胆苦苷} = 1.380\times10^6X - 4.007\times10^3$（$r = 0.9996$）、$Y_{当药苷} = 2.751\times10^5X + 3.399\times10^3$（$r = 0.9995$）、$Y_{芒果苷} = 3.830\times10^6X - 2.903\times10^4$（$r = 0.9999$）、$Y_{异荭草素} = 2.440\times10^6X - 3.947\times10^3$（$r = 0.9992$）。进样量分别在 0.0546 ～ 1.0930 μg、0.1910 ～ 3.8200 μg、0.1089 ～ 2.1780 μg、0.0584 ～ 1.1690 μg、0.0528 ～ 1.0570 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5　精密度试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素峰面积 *RSD* 分别为 0.74%、0.61%、0.77%、0.85%、0.62%，表明仪器精密度良好。

2.6　稳定性试验

取同一供试品溶液（编号：HBZYC01），分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定，记录峰面积，结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素峰面积 *RSD* 分别为 0.85%、0.64%、0.77%、1.1%、0.69%，结果表明供试品中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素在 24 h 内稳定性良好。

2.7　重复性试验

取华北獐牙菜样品（编号：HBZYC01）6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定，结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素平均含量分别为 0.21%、2.54%、1.41%、0.73%、0.85%，*RSD* 分别为 0.62%、0.77%、0.64%、0.84%、0.60%，表明该方法重复性良好。

2.8　加样回收试验

称取华北獐牙菜样品（编号：HBZYC01）6 份，每份 0.1 g，精密称定，置锥形瓶中，在每组中分别加入适量獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素对照品，按“2.3”项下方法制备，进样测定各成分的含量，计算回收率，结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素的平均回收率分别为 97.62%、97.04%、97.68%、95.66%、96.75%，*RSD* 分别为 1.3%、0.79%、0.53%、0.79%、0.92%（$n = 6$），表明该方法的回收率良好。

2.9　样品含量测定

3 批次华北獐牙菜药材粉末各取约 0.2 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备，进样测定，计算各批次华北獐牙菜中各成分的含量。结果按干燥品算，3 批次华北獐牙菜药材中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素含量分别在 0.18% ～ 0.24%、2.18% ～ 2.99%、1.21% ～ 1.55%、0.62% ～ 0.81%、0.70% ～ 0.91%，见表 1。

表 1　样品含量测定结果 (n = 3，%)

Tab 1　Content determination (n = 3，%)

编号	水分	含量				
		獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药苷	芒果苷	异荭草素
HBZYC01	6.63	0.21	2.54	1.41	0.73	0.85
HBZYC02	7.09	0.18	2.18	1.21	0.62	0.70
HBZYC03	6.25	0.24	2.99	1.55	0.81	0.91
平均值	6.65	0.21	2.57	1.39	0.72	0.82

3　讨论

3.1　检测波长的确定

通过对 5 种化合物甲醇溶液进行全波长扫描，獐牙菜苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草苷的最大吸收波长分别为 250、275 nm，240 nm，255、350 nm，258、317 nm，270、348 nm。选择 254 nm 为检测波长时测定可兼顾 5 个成分最大吸收，且色谱图基线平稳，色谱峰峰形较好。故确定 254 nm 作为本试验的检测波长。

3.2　提取方法和色谱条件的优化

通过对不同极性溶剂、提取方法、提取时间等因素进行考察，确定样品提取以甲醇为溶剂、超声处理效率最高，提取时间确定为 30 min。分别对甲醇 -0.05% 磷酸溶液、乙腈 - 水、甲醇 - 水、乙腈 -0.1% 磷酸溶液等流动相进行考察，从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性及分析时间等方面综合分析，最终选择以甲醇 -0.05% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱较为合适。

3.3　结果分析

华北獐牙菜中 5 种被测成分中龙胆苦苷的含量最高，在 3 批次样品中的平均含量为 2.57%，占 5 种被测成分质量分数总和的 45.01%。獐牙菜苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草苷分别占 3.68%、24.34%、12.61% 和 14.36%。另外，试验过程中还尝试开展了华北獐牙菜中其他成分的含量测定试验，但由于含量较低、分离不好等原因，未进行定量检测。可见，华北獐牙菜中的环烯醚萜类及黄酮类化合物为其主要成分，而此类化合物的药理活性颇为丰富，龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、当药苷、芒果苷及异荭草素等化学成分，具有镇痛、保肝利胆、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、降糖、镇咳、祛痰、平喘、抗氧化等广泛药理活性 [18-22]，能与该药材具有的清热利胆、治疗流行性感冒等功效相对应。

本研究建立了华北獐牙菜中 5 种有效成分的 HPLC 测定方法，该方法简便、高效、准确，可用于华北獐牙菜的质量控制，为该药材的综合利用开发提供了参考依据。

参考文献

[1] 中科院中国植物志编委会 . 中国植物志 [M]. 62 卷 . 北京：科学出版社，1988：344.

[2] 中科院北京植物研究所 . 中国高等植物图鉴 [M]. 第三册 . 北京：科学出版社，1974：409.

[3] 中国科学院西北高原生物研究所 . 藏药志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1991：110.

[4] 青海省生物研究所，同仁县隆务诊疗所 . 青藏高原药物图鉴 [M]. 西宁：青海人民出版社，1972：126.

[5] 中科院西北高原生物研究所 . 青海经济植物志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1987：460-465.

[6] 青海省农业资源区划办公室，中科院西北高原生物研究所 . 青海植物名录 [M]. 西宁：青海人民出版社，1997：225-226.

[7] 刘海青，刘亚蓉，朱志强 . 青海獐牙菜属药用植物资源开发与保护 [J]. 中草药，1996，27（2）：112-114.

[8] 方清茂，李江陵，肖小河 . 四川省獐牙菜属药用植物资源 [J]. 中国中药杂志，1997，22（3）：135-137.

[9] 魏卫东 . 资源植物藏茵陈的研究进展 [J]. 四川草原，2005，26（10）：33-36.

[10] 李彪，李宗菊，巩红冬 . 青藏高原甘南地区龙胆科藏药植物资源调查研究 [J]. 曲靖师范学院学报，2017，36（3）：40-43.

[11] 马晓辉，晋玲，吕培霖，等 . 甘肃省甘南地区龙胆科藏药种类与品种整理 [J]. 中兽医医药杂志，2018，37（2）：86-88.

[12] 林茂祥，韩如刚，王黎，等 . 青海省甘德县中藏药资源调查 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（9）：4-13.

[13] 张小龙，张海涛，纪兰菊 . RP-HPLC 测定青海地区野生藏药线叶龙胆中 4 种主要活性成分的含量 [J]. 中国中药杂志，2009，34（22）：2884-2886.

[14] 谭亮，胡风祖，董琦 . UPLC 法同时测定青海川西獐牙菜中 3 个苦苷类成分和 3 个黄酮类成分含量 [J]. 药物分析杂志，2017，37（8）：1469-1475.

[15] 杨红霞，肖远灿，李岑，等 . 藏药材印度獐牙菜 5 种成分含量测定及药效学初步研究 [J]. 青海科技，2019，26（2）：9-14.

[16] 李天佑，薛朝金，何羽，等 . 黔产大籽獐牙菜的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国处方药，2021，19（12）：25-27.

[17] 覃芳，李广胜，郭兴辉 . HPLC 法测定痛风定胶囊中龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、杯苋甾酮、泽泻醇 F、泽泻醇 A、24- 乙酰泽泻醇 A、23- 乙酰泽泻醇 B [J]. 现代药物与临床，2021，36（2）：240-244.

[18] 王焱，曾文雪，宋小玲，等 . 龙胆苦苷药学研究进展及其临床配伍应用 [J]. 西北药学杂志，2012，27（5）：502-505.

[19] 李宏亮，白敏，宋秋艳，等 . 天然活性成分獐芽菜苦苷的研究进展 [J]. 云南中医学院学报，2011，34（4）：66-70.

[20] 刘杜霞，高小敏，仝敏，等 . 獐牙菜苷的药理作用及其机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（2）：115-119.

[21] 关丽，杨翠倩，李瑞佳，等 . 芒果苷的研究进展 [J]. 当代化工，2021，50（2）：478-481，486.

[22] 罗成，李艳龙，建纲，等 . 异荭草素的药理作用 [J]. 航天医学与医学工程，2016，29（5）：381-384.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-06-07）

药物与临床

西罗莫司四联免疫抑制治疗方案在肾移植术后初期的疗效及不良反应研究

钱卿[1]，范敏[2]，薛冬[2]，陈荣[1]，邹素兰[1]，王莉英[1]，胡楠[1*]（常州市第一人民医院，1. 药学部，2. 泌尿外科，江苏　常州　213003）

摘要：目的　研究肾移植受者采用西罗莫司四联免疫抑制治疗在术后初期的疗效和不良反应。**方法**　前瞻性收集本院泌尿外科行同种异体肾移植术受者共计 69 例，随机分为试验组（西罗莫司＋他克莫司＋吗替麦考酚酯 / 麦考酚钠＋糖皮质激素）、对照组（他克莫司＋吗替麦考酚酯 / 麦考酚钠＋糖皮质激素）。考察移植术后 1、2、3 个月时的血常规、肝肾功能、血糖、估算肾小球滤过率、他克莫司谷浓度及新发糖尿病、感染等不良反应发生情况。**结果**　移植术后 1 个月时，试验组的血红蛋白、红细胞压积、估算肾小球滤过率均显著低于对照组（$P = 0.017$，$P = 0.014$，$P = 0.040$），血清肌酐显著高于对照组（$P = 0.014$），但以上指标在移植术后 2、3 个月时未表现出显著差异。试验组的他克莫司血药谷浓度在移植术后 1、2、3 个月时均显著低于对照组。试验组和对照组在术后 3 个月内新发糖尿病的发生率分别为 14.7% 和 11.4%，感染性疾病的发生率分别为 29.4% 和 37.1%，两组间无明显差异。**结论**　西罗莫司联合小剂量他克莫司、霉酚酸类药物和糖皮质激素的四联免疫抑制方案较传统经典方案，在移植术后短期内具有相似的疗效和不良反应发生率，但仍需随访期更长的大样本对照研究来进一步验证。

关键词：肾移植；西罗莫司；免疫抑制方案；疗效；不良反应
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1923-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.037

Efficacy and adverse reactions of quadruple immunosuppressive therapy with sirolimus in the first 3 months after kidney transplantation

QIAN Qing[1], FAN Min[2], XUE Dong[2], CHEN Rong[1], ZOU Su-lan[1], WANG Li-ying[1], HU Nan[1*] (1. *Department of Pharmacy*; 2. *Department of Urology*, *The First People's Hospital of Changzhou*, *Changzhou Jiangsu* 213003)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of quadruple immunosuppressive regimen with sirolimus in renal transplant recipients in the early period after the transplantation. **Methods** We prospectively collected the data of 69 recipients who underwent allograft renal transplant in the urology department of our hospital. These recipients were randomized to a test group and a control group. The regimen of the test group comprised 4 agents: sirolimus, tacrolimus, mycophenolate mofetil/mycophenolate sodium and glucocorticoids. The control group received a conventional regimen of the other three but without sirolimus. Laboratory characteristics, trough concentration of tacrolimus and adverse reactions were assessed 1, 2 and 3 months after the transplantation. **Results** Hemoglobin, hematocrit and estimated glomerular filtration rate were significantly lower in the test group 1 month after the transplantation than in the control group ($P = 0.017$; $P = 0.014$; $P = 0.040$). In addition, the

基金项目：常州市科技计划（应用基础研究指导性）项目（No. CJ20199010）；常州市卫生拔尖人才（No. 2016CZBJ010）。
作者简介：钱卿，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学（免疫系统药物方向）工作，email：april_qing@163.com　*通信作者：胡楠，女，博士，副主任药师，主要从事药物代谢动力学与临床药学的工作，email：hn_324@163.com

serum creatinine was significantly higher in the test group (P ＝ 0.014). But the above parameters did not significantly differ 2 and 3 months after the transplantation. The trough concentration of tacrolimus in the test group was much lower than that in the control group 1, 2 and 3 months after the transplantation. The incidence of new-onset diabetes in the test group and the control group 3 months after the transplantation was 14.7% and 11.4%, and the incidence of infectious diseases was 29.4% and 37.1%, respectively. There was no significant difference in the incidence of adverse reactions in both groups. **Conclusion** Compared with the conventional regimen, quadruple immunosuppressive regimen with sirolimus and low-dose tacrolimus has similar efficacy and incidence of adverse reactions in the short-term after the transplantation, which still needs to be further confirmed by large-scale controlled studies with longer follow-up.

Key words: renal transplantation; sirolimus; immunosuppressive regimen; efficacy; adverse reaction

肾移植是终末期肾脏病（end stage renal disease，ESRD）患者重要的治疗手段之一，而移植术后的免疫抑制治疗方案是影响移植物存活和患者生存率的关键[1]。标准的免疫抑制治疗方案包括诱导治疗、维持治疗的初始方案和长期方案，目前最常用的维持治疗方案主要包括三类药物：钙调磷酸酶抑制剂（CNI）、抗增殖类药物吗替麦考酚酯（MMF）或麦考酚钠（MPS）以及糖皮质激素类药物。西罗莫司（sirolimus）是一种哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂（mTORi），其作用机制不同于上述常用的免疫抑制剂，西罗莫司首先与细胞内受体 FK 结合蛋白 -12（FKBP-12）结合，但该复合物不抑制钙调磷酸酶，而是进一步与雷帕霉素靶蛋白（mTOR）结合，导致丝氨酸 - 苏氨酸激酶受到抑制，阻止 DNA 和蛋白质的合成，最终使细胞周期停滞[2]。研究显示，以西罗莫司为基础的免疫抑制方案的潜在肾毒性、心血管事件、CNI 方案相关的感染风险更低，且在降低肿瘤发生率和病毒感染方面也更具优势[3]。虽然已有大量的临床研究评价了西罗莫司在不同抗排异方案中的疗效和不良反应，但是最佳方案仍未明确。本研究的目的是考察包含西罗莫司的四联免疫抑制治疗在肾移植后初期的临床疗效，并观察以糖尿病和感染为主的不良反应发生风险。

1　资料与方法

1.1　一般资料

前瞻性收集 2018 年 1 月—2019 年 3 月于常州市第一人民医院泌尿外科行同种异体肾移植术受者共计 69 例，所有供体均为公民逝世后器官捐献，采用简单随机化分组方法分为试验组（西罗莫司＋他克莫司＋ MMF/MPS ＋糖皮质激素）和对照组（他克莫司＋ MMF/MPS ＋糖皮质激素）。其中，试验组男 30 例，女 4 例，平均年龄（39.47±10.19）岁，HLA-Ⅰ类抗体阳性 16 例，HLA-Ⅱ类抗体阳性 12 例，淋巴细胞毒性试验淋巴细胞毒＜ 5%；对照组男 25 例，女 10 例，平均年龄（40.60±10.77）岁，HLA-Ⅰ类抗体阳性 16 例，HLA-Ⅱ类抗体阳性 9 例，淋巴细胞毒性试验淋巴细胞毒＜ 5%。所有供肾的热缺血时间均为 10 ～ 15 min，冷缺血时间均小于 24 h。本研究经医院伦理委员会审查通过（文件批号：2017 技第 76 号），所有患者均签署知情同意书。

1.2　入排标准

纳入标准：① 终末期肾脏病患者且首次行肾移植手术；② 无糖尿病、心脏病、呼吸系统疾病、肿瘤等病史；③ 年龄＞ 14 岁且≤ 65 岁。排除标准：① 多器官移植或曾接受除肾以外的其他器官移植的受者；② 移植术前血白细胞计数＜ $3.5\times10^{9}\cdot L^{-1}$；③ 移植术前体质量指数＞ 32 $kg\cdot m^{-2}$；④ 移植术后出现严重感染者；⑤ 在观察期内因各种原因调整免疫抑制治疗方案的受者，如改用环孢素等；⑥ 移植术后未在本院规律随访者。

1.3　免疫抑制治疗方案

所有受者诱导治疗均采用兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白（规格：25 mg/ 瓶，赛诺菲制药有限公司）。维持治疗中，吗替麦考酚酯胶囊（规格：0.25 g，上海罗氏制药有限公司）的剂量为每次 750 ～ 1000 mg bid；麦考酚钠肠溶片（规格：0.18 g，Novartis Pharma Schweiz AG）的剂量为每次 540 ～ 720 mg bid。注射用甲泼尼龙琥珀酸钠于手术当日及术后第 1 日、第 2 日分别给予 500 $mg\cdot d^{-1}$ 冲击治疗，之后逐渐递减至醋酸泼尼松片 20 $mg\cdot d^{-1}$ 维持治疗。对照组中他克莫司胶囊（规格：0.5 mg/1 mg，杭州中美华东制药有限公司）的起始剂量为 0.15 mg/（kg・d），分 2 次服用，目标浓度为 6 ～ 15 $\mu g\cdot L^{-1}$。试验组中西罗莫司片（规格：1 mg，Pfizer Ireland Pharmaceuticals）的剂量为 1 ～ 2 $mg\cdot d^{-1}$ 顿服，

加用西罗莫司片的平均时间为术后（9.4±4.5）d；他克莫司胶囊的起始剂量同对照组，加用西罗莫司片后剂量较对照组中减少约 25%。

1.4　观察指标

比较试验组和对照组受者在肾移植术前以及术后第 1 个月、第 2 个月、第 3 个月的各项实验室指标和临床资料，包括血红蛋白（HB）、红细胞压积（HCT）、血小板计数（PLT）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、血浆白蛋白（ALB）、空腹血糖（FPG）、血清肌酐（SCR）、估算的肾小球滤过率（eGFR）、血尿酸（UA）、他克莫司血药谷浓度（C_{trough}）、新发糖尿病（NODAT）及感染性疾病的发生情况。eGFR 采用 CKD-EPI 公式计算。

1.5　统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行简单随机化分组和数据分析，分类变量比较采用 χ^2 检验，连续变量比较首先考察数据分布的正态性和方差齐性，两者均满足者采用 t 检验；正态分布但方差不齐，则采用 t' 检验；非正态分布数据采用非参数检验（Mann-Whitney 检验）；$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　术前人口学资料及各项实验室指标对比

在肾移植术前，两组受者在年龄、性别、HLA 抗体阳性率以及各项实验室指标方面均无显著差异，见表 1。

表 1　术前人口学资料和各项实验室指标两组对比情况

Tab 1　Patient demographics and clinical parameters before the kidney transplantation

项目		试验组	对照组	卡方 /t/Z	P
年龄 / 岁		39.47±10.19	40.60±10.77	－0.447	0.656
性别	男	30	25	3.012	0.083
	女	4	10		
HLA- Ⅰ类抗体	（＋）	16	16	0.013	0.911
	（－）	18	19		
HLA- Ⅱ类抗体	（＋）	12	9	0.748	0.387
	（－）	22	26		
HB/（$\times 10^9 \cdot L^{-1}$）		118.35±17.29	110.46±24.08	1.561	0.123
HCT		0.359±0.055	0.335±0.073	1.550	0.126
PLT#/（$\times 10^9 \cdot L^{-1}$）		179.50（144.75 ～ 224.00）	211.00（160.00 ～ 234.00）	－1.272	0.203
ALT#/（$U \cdot L^{-1}$）		12.00（8.75 ～ 17.00）	14.00（10.00 ～ 18.00）	－1.125	0.261
AST#/（$U \cdot L^{-1}$）		15.00（11.75 ～ 20.00）	16.00（12.00 ～ 23.00）	－1.125	0.261
ALB/（$g \cdot L^{-1}$）		39.29±5.06	39.76±5.39	－0.372	0.711
FPG #/（$mmol \cdot L^{-1}$）		4.75（4.38 ～ 5.49）	4.98（4.55 ～ 5.50）	－0.979	0.328
SCR/（$\mu mol \cdot L^{-1}$）		914.62±203.37	868.29±268.18	0.807	0.423
UA#/（$\mu mol \cdot L^{-1}$）		351.60（305.40 ～ 448.55）	376.30（309.80 ～ 416.90）	－0.144	0.885

注：#表示经过 SK 正态性检验得出非正态分布。

Note：#Indicates that SK distribution is obtained through SK normality test.

2.2　术后各项实验室指标比较

移植术后 1 个月时，试验组的 HB、HCT 显著低于对照组（$P = 0.017$，$P = 0.014$），SCR 显著高于对照组（$P = 0.014$），eGFR、C_{trough} 显著低于对照组（$P = 0.040$，$P = 0.007$），其余指标两组间无明显差异，具体结果见表 2。

然而，试验组和对照组在移植术后 2、3 个月时，HB、HCT、SCR、eGFR 在两组间未再表现出显著差异，仅 C_{trough} 的差异仍具有统计学意义（$P = 0.004$），见表 2。

2.3　术后 3 个月内的新发糖尿病和感染性疾病的发生率情况比较

两组患者术前均无糖尿病病史，试验组术后 3 个月内发生移植后 NODAT 的患者有 5 例（14.7%），对照组术后 3 个月内发生移植后 NODAT 患者有 4 例（11.4%），两组间差异无统计学意义（$P = 0.963$）。

试验组术后 3 个月内发生感染性疾病的患者共计 10 例（29.4%），分别为泌尿系感染合并血流感染 1 例、单纯泌尿系感染 3 例、肺部感染 1 例、腹腔感染 1 例、感染原因不明 4 例。对照组术后 3 个月内发生感染性疾病的患者共计 13 例（37.1%），分别为泌尿系感染合并肺部感染 2 例、单纯泌尿系感染 5 例、单纯肺部感染 1 例、血流感染 1 例、腹腔感染 1 例、感染原因不明 3 例。两组在感染性疾病发生率上亦无显著性差异（$P = 0.496$）。

3　讨论

目前为止，肾移植指南中还没有推荐统一、

表 2　术后 1 ～ 3 个月各项实验室指标两组对比情况

Tab 2　Clinical parameters of the patients in both groups 1 ～ 3 months after the kidney transplantation

术后时间	指标	试验组	对照组	*t*/*Z*	*P*
1 个月	HB/（$\times10^9$ • L^{-1}）	114.56±14.62	123.31±15.05	－2.450	0.017
	HCT	0.355±0.044	0.383±0.046	－2.515	0.014
	PLT#/（$\times10^9$ • L^{-1}）	218.00（155.00 ～ 262.50）	182.00（153.00 ～ 231.00）	－0.534	0.593
	ALT#/（U • L^{-1}）	13.50（10.75 ～ 25.25）	15.00（11.00 ～ 28.00）	－0.685	0.493
	AST#/（U • L^{-1}）	13.50（11.00 ～ 18.25）	14.00（11.00 ～ 21.00）	－0.734	0.463
	ALB/（g • L^{-1}）	43.28±4.33	44.30±3.52	－1.076	0.286
	FPG #/（mmol • L^{-1}）	5.06（4.72 ～ 6.06）	5.14（4.75 ～ 5.61）	－0.048	0.962
	SCR#/（μmol • L^{-1}）	163.50（128.75 ～ 193.00）	134.00（97.00 ～ 164.00）	－2.461	0.014
	eGFR/[mL/（min • 1.73 m^2）]	47.01±18.22	56.21±18.24	－2.095	0.040
	UA/（μmol • L^{-1}）	309.34±109.40	332.37±84.30	－0.981	0.330
	C_{trough}/（ng • mL^{-1}）	7.67±2.26	9.14±2.13	－2.786	0.007
2 个月	HB/（$\times10^9$ • L^{-1}）	131.29±16.59	127.26±15.37	1.049	0.298
	HCT#	0.397（0.369 ～ 0.437）	0.390（0.366 ～ 0.416）	－0.702	0.482
	PLT#/（$\times10^9$ • L^{-1}）	186.50（140.00 ～ 212.75）	208.00（151.00 ～ 256.00）	－1.573	0.116
	ALT#/（U • L^{-1}）	16.50（13.75 ～ 30.00）	18.00（13.00 ～ 33.00）	－0.228	0.819
	AST#/（U • L^{-1}）	19.00（15.00 ～ 24.25）	19.00（15.00 ～ 24.00）	－0.066	0.947
	ALB/（g • L^{-1}）	44.24±3.41	45.03±2.85	－1.051	0.297
	FPG #/（mmol • L^{-1}）	5.27（4.77 ～ 6.38）	5.22（4.85 ～ 5.71）	－0.714	0.475
	SCR/（μmol • L^{-1}）	135.24±37.73	121.77±30.22	1.638	0.106
	eGFR/[mL/（min • 1.73 m^2）]	59.42±17.49	62.10±14.61	－0.692	0.492
	UA/（μmol • L^{-1}）	367.07±84.47	352.07±83.42	0.742	0.461
	C_{trough}/（ng • mL^{-1}）	7.39±1.76	8.67±1.78	－2.988	0.004
3 个月	HB/（$\times10^9$ • L^{-1}）	135.44±16.23	134.40±14.76	0.279	0.781
	HCT	0.419±0.048	0.412±0.044	0.619	0.538
	PLT#/（$\times10^9$ • L^{-1}）	187.00（151.00 ～ 214.50）	200.00（146.00 ～ 266.00）	－0.864	0.387
	ALT#/（U • L^{-1}）	16.00（13.75 ～ 23.25）	19.00（13.00 ～ 25.00）	－0.481	0.631
	AST#/（U • L^{-1}）	18.00（14.00 ～ 22.00）	20.00（16.00 ～ 25.00）	－1.523	0.128
	ALB/（g • L^{-1}）	45.26±3.16	46.19±2.38	－1.373	0.174
	FPG #/（mmol • L^{-1}）	5.38（4.73 ～ 6.07）	4.98（4.56 ～ 5.56）	－1.506	0.132
	SCR/（μmol • L^{-1}）	130.76±31.54	118.17±33.24	1.615	0.111
	eGFR/[mL/（min • 1.73 m^2）]	61.21±18.11	65.49±17.79	－0.991	0.325
	UA/（μmol • L^{-1}）	373.67±72.98	376.35±102.31	－0.125	0.901
	C_{trough}/（ng • mL^{-1}）	7.21±1.88	8.27±1.76	－2.416	0.018

注：# 表示经过 SK 正态性检验得出非正态分布。

Note：# Indicates that the non normal distribution is obtained through SK normality test.

标准的包含西罗莫司的免疫抑制治疗方案，西罗莫司可以作为肾移植受者的初始给药方案，也可以作为转换方案；其中转换方案又可分为早期转换和晚期转换 [4]。

多项研究显示 mTORi 联合低剂量 CNI 类药物方案的排斥反应发生率在可接受的范围内，同时能够改善移植肾功能。Yamanaka 等 [5] 研究了 5 种免疫抑制药联用方案（依维莫司组，包括依维莫司、低剂量的他克莫司缓释剂型、吗替麦考酚酯、糖皮质激素和巴利昔单抗），对比传统方案组（包括标准剂量的他克莫司缓释剂型、吗替麦考酚酯、糖皮质激素和巴利昔单抗），结果表明，依维莫司组在移植术后 3 个月及 1 年时，eGFR 均明显高于传统方案组；但是，移植肾脏病理显示依维莫司组在移植术后 3 个月时有更多的病例出现亚临床排斥反应。Traitanon 等 [6] 将 40 例成人肾移植受者随机分为两组：一组为低剂量他克莫司联合依维莫司（LTAC ＋ EVR），另一组为标准剂量他克莫司联合吗替麦考酚酯（STAC ＋ MMF），两组在患者和移植物生存率以及移植后 3、6、12、18 个月时的肾小球滤过率方面均无明显差异，不良反应包括机会性感染、高脂血症、中性粒细胞减少症的发生率也较为相似；但是，STAC ＋ MMF 组有 4 例患者出现排斥反应，而 LTAC ＋ EVR 组在随访期间内未出现排斥反应。而另一项设计相似的多中心、大样本、开放标签的随机研究显示：移植后 12 个月时，与 STAC ＋ MMF 组相比，LTAC ＋ EVR 组的经病理证实的急性排斥反应发生率更高（19.1% *vs* 11.2%，$P < 0.05$），但移植物失功发生率较低（1.3% *vs*

3.9%，$P < 0.05$），eGFR 在两组间相似[7]。本研究结果显示，移植术后 1 个月时试验组的 eGFR 明显低于对照组，可能为移植术后 1 个月时试验组 C_{trough} 明显低于对照组，而移植术后早期（如第 1 个月）需要维持更高的他克莫司浓度来预防排斥反应[4]，但在术后 2 个月和 3 个月时两组间 eGFR 的差异并不显著，与文献[6-8]报道相似。此外，试验组的 C_{trough} 在本次随访期内的各时间点均显著低于对照组。

肾移植受者发生 NODAT 会引起很多短期和长期并发症，相比无糖尿病受者，其心血管事件发生风险更高，移植物存活率和患者生存率则更低。NODAT 的高危因素中的可调整因素包括肥胖、生活方式、代谢综合征、病毒感染、糖皮质激素、CNI 类、西罗莫司、急性排斥等[9]。西罗莫司和低剂量他克莫司联用是否会增加 NODAT 风险尚无定论。本研究结果表明：试验组和对照组在 NODAT 发生率上无明显差异，发病率分别为 14.7% 和 11.4%。Santos 等[8]也研究了依维莫司联合低剂量他克莫司与霉酚酸类药物联合标准剂量他克莫司的 NODAT 发病率，分别为 15.4% 和 17.6%，且两组间同样差异无统计学意义，与本研究结果较为接近。

本研究显示：试验组和对照组术后 3 个月内发生感染性疾病的患者比例分别为 29.4%、37.1%，两组间无明显差异。Gao 等[10]比较了西罗莫司联合他克莫司与 MMF 联合他克莫司在肾移植受者中的疗效和不良反应，Meta 分析结果显示两组在感染并发症发生率上差异无统计学意义（*OR*：1.16；95%*CI* 0.82 ～ 1.66）。感染性疾病中，泌尿道感染比例最高，与文献[11-12]报道结果较为相似。值得注意的是，试验组和对照组中各有 1 例患者尿培养结果为耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌肺炎亚种，均经头孢他啶阿维巴坦钠治疗后尿培养转阴。近年来，由多重耐药（MDR）革兰氏阴性菌诱发的移植后感染呈现逐年上升的趋势，其危险因素包括长期或频繁住院、侵入性操作或留置导管以及广谱抗菌药物的长疗程使用[13]，MDR 细菌感染后治疗较为困难，严重影响了患者的预后和生存率，需引起临床的高度重视。

4 结论

本研究结果表明西罗莫司联合小剂量他克莫司、霉酚酸类药物和糖皮质激素的方案与传统经典方案在移植术后短期内具有相似的疗效和不良反应发生率，在 eGFR、肝功能、肾功能、HB 等指标以及 NODAT、感染性疾病的发生率上两组间差异均无统计学意义。但是，该结论仍需随访期更长的大样本对照研究来进一步验证。

参考文献

[1] Lim MA，Kohli J，Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation：where are we now and where are we going? [J] Transplant Rev（Orlando），2017，31（1）：10-17.

[2] Hahn D，Hodson EM，Hamiwka LA，et al. Target of rapamycin inhibitors（TOR-I；sirolimus and everolimus）for primary immunosuppression in kidney transplant recipients [J]. Cochrane Database Syst Rev，2019，12（12）：CD004290.

[3] Tedesco-Silva H，Del Carmen Rial M，Cruz Santiago J，et al. Optimizing the clinical utility of sirolimus-based immunosuppression for kidney transplantation [J]. Clin Transplant，2019，33（2）：e13464.

[4] 杨婧，崔向丽，杨辉，等. 肾移植术后使用哺乳动物西罗莫司靶蛋白抑制药的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（17）：1721-1724.

[5] Yamanaka K，Kakuta Y，Nakazawa S，et al. Induction immunosuppressive therapy with everolimus and low-dose tacrolimus extended-release preserves good renal function at 1 year after kidney transplantation [J]. Transplant Proc，2016，48（3）：781-785.

[6] Traitanon O，Mathew JM，Shetty A，et al. Mechanistic analyses in kidney transplant recipients prospectively randomized to two steroid free regimen-low dose tacrolimus with Everolimus versus standard dose tacrolimus with mycophenolate mofetil [J]. PLoS One，2019，14（5）：e0216300.

[7] Qazi Y，Shaffer D，Kaplan B，et al. Efficacy and safety of everolimus plus low-dose tacrolimus versus mycophenolate mofetil plus standard-dose tacrolimus in de novo renal transplant recipients：12-month data [J]. Am J Transplant，2017，17（5）：1358-1369.

[8] Santos T，Santos L，Macário F，et al. New recipes with known ingredients：combined therapy of everolimus and low-dose tacrolimus in de novo renal allograft recipients [J]. Transplant Proc，2015，47（4）：906-910.

[9] Palepu S，Prasad GV. New-onset diabetes mellitus after kidney transplantation：current status and future directions [J]. World J Diabetes，2015，6（3）：445-455.

[10] Gao L，Xu F，Cheng H，et al. Comparison of sirolimus combined with tacrolimus and mycophenolate mofetil combined with tacrolimus in kidney transplantation recipients：a meta-analysis [J]. Transplant Proc，2018，50（10）：3306-3313.

[11] Hemmersbach-Miller M，Alexander BD，Sudan DL，et al. Single-center analysis of infectious complications in older adults during the first year after kidney transplantation [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2019，38（1）：141-148.

[12] Yalci A，Celebi ZK，Ozbas B，et al. Evaluation of infectious complications in the first year after kidney transplantation [J]. Transplant Proc，2015，47（5）：1429-1432.

[13] Pouch SM，Patel G，AST Infectious Diseases Community of Practice. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in solid organ transplant recipients-guidelines from the Aerican society of transplantation infectious diseases community of practice [J]. Clin Transplant，2019，33（9）：e13594.

（收稿日期：2021-09-07；修回日期：2021-11-19）

药事管理

患者自主报告医疗机构制剂疗效与不良反应系统的设计思路与初步实践

钟露苗[1]，曾令贵[2*]（1.湖南省药品审评与不良反应监测中心，长沙　410013；2.湖南省药品监督管理局，长沙　410013）

摘要：目的　探索患者自主报告疗效与不良反应的新途径，提高医疗机构制剂警戒工作质量。**方法**　从医疗机构制剂不良反应监测和再评价监管现状入手，针对公众面临的用药风险，提高监管效能，设计并初步实践了患者自主报告医疗机构制剂不良反应与疗效信息系统。**结果**　经试点及在全省推广，证明该系统稳定、具有可操作性。**结论**　该系统作为药品监管部门收集医疗机构制剂疗效和不良反应报告的新渠道，将为医疗机构制剂优化临床服务、淘汰或向新药转化提供真实世界的证据。同时期望通过监管力量推广该系统、医护药专业人士的加入提升系统报告的质量，也为我国患者直接报告药品不良反应提供借鉴。

关键词：患者；自主报告；疗效与不良反应系统；设计；实践
中图分类号：R951　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1928-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.038

Design and patient's spontaneous reporting of efficacy and adverse drug reactions of hospital preparations

ZHONG Lu-miao[1], ZENG Ling-gui[2*] (1. *Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Drug Reactions Monitoring*, *Changsha* 410013; 2. *Hunan Medical Products Administration*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To find a new channel for patients to spontaneously report the efficacy and adverse drug reactions (ADR) of hospital preparations, and to improve the quality of preparation vigilance. **Methods** Starting with the current situation of ADR monitoring and reassessment supervision on hospital preparations, aiming at the risks faced by the public and improving the supervision efficiency, the authors designed and implemented the imformation technology system for patients to spontaneously report the ADRs and efficacy of hospital preparations, and put forward suggestions to achieve the objectives of the system. **Results** The system proved stable and operable by pilot and promotion in the Hunan province. **Conclusion** As a new channel for the regulatory authorities to collect the efficacy and ADR reports of hospital preparations, the system will provide real-world evidence for the optimization of clinical services, elimination or transformation to new drugs. It is also expected through supervision and participation of medical and pharmaceutical professionals to improve the quality of reports, and provide reference for patients ADR spontaneous reporting.

Key words: patient; spontaneous reporting; system for efficacy and ADR; design; practice

医疗机构制剂是指医疗机构根据本单位临床需要经批准而配制、自用的固定处方制剂[1]。2005 年国家食品药品监督管理局出台了《医疗机构制剂注册管理办法（试行），对医疗机构制剂注册实行审评审批管理。2017 年 7 月 1 日起《中医药法》将医疗机构中药制剂实行审批和备案分

基金项目：湖南省自然基金——科药联合基金项目（No.2020JJ9039）。
作者简介：钟露苗，女，博士，主任药师，主要从事药物警戒工作，email：373037526@qq.com　*通信作者：曾令贵，男，博士，主任药师，主要从事药品监管工作，email：840619189@qq.com

类管理[2-3]，对仅应用传统工艺配制的医疗机构中药制剂报省级药品监管部门备案即可。2018年2月，国家食品药品监督管理总局发布《关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告》[4]，对传统中药制剂定义及备案等事宜进行了规定，全国启动了传统中药制剂备案工作，由此也迎来了医疗机构制剂开发的又一轮高潮，推动了中医药的传承和创新。但是随着越来越多的医疗机构制剂问世，加之备案制没有了审评技术把关环节，监管也面临着新的挑战。笔者从医疗机构不良反应监测和再评价监管现状入手，针对公众面临的用药风险，着力提高监管效能，在国内首次设计并初步实践了患者自主报告医疗机构制剂不良反应与疗效信息系统（以下简称“系统”），并提出实现系统设计预期目标的展望与建议，以期为我国患者直接报告药品不良反应提供借鉴。

1 医疗机构制剂警戒相关法规

医疗机构配制的制剂在临床防病治病、填补用药空缺、提高人们健康水平中发挥着不可或缺的作用，尤其是一些特色医院制剂，能够有效满足患者临床特殊用药需求，是市场上没有供应的品种，也是上市药品无法替代的[5]，但其实质也是医疗机构为了满足临床需要、用于防病治病的药品，其安全有效性是保障患者用药合法权益的基本前提。据此，国家对其安全性的监管也出台了相关的要求，涉及到与医疗机构制剂不良反应监测与再评价相关的法律法规规章文件主要有以下五个：

1.1 《药品管理法》[6]

该法 2019 年修订版首次提出国家建立药物警戒制度，要求对药品不良反应和其他与用药有关的有害反应进行主动监测、科学识别、专业评估和及时控制。要求对医疗机构制剂发现疑似不良反应的应当及时报告。

1.2 《中医药法》[2-3]

该法要求医疗机构应当加强对备案的中药制剂品种的不良反应监测，并按照国家有关规定进行报告。药监部门应当加强对备案的中药制剂品种配制、使用的监督检查。

1.3 《医疗机构制剂注册管理办法（试行）》[1]

该规章要求配制和使用制剂的医疗机构应当注意观察制剂不良反应，并按照国家药监部门的有关规定报告和处理；省级药监部门对质量不稳定、疗效不确切、不良反应大或者其他原因危害人体健康的，应当责令医疗机构停止配制，并撤销其批准文号，同时规定在再注册时须提供 3 年内制剂临床使用情况及不良反应情况总结。

1.4 《关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告》[4]

该公告要求医疗机构应当进一步积累临床使用中的有效性数据，严格履行不良反应报告责任，建立不良反应监测及风险控制体系；省级药监部门发现质量不稳定、疗效不确切、不良反应严重或者风险大于效益的制剂，应当取消医疗机构该制剂品种的备案，并公开相关信息。

1.5 《药品不良反应报告和监测管理办法》[7]

该规章规定个人发现新的或者严重的药品不良反应时，可以向医师、生产企业、经营企业或者药品不良反应监测机构报告，必要时提供病历资料;对于监测过程中获取的商业秘密、个人隐私、患者和报告者信息应当予以保密；同时规定医疗机构制剂的不良反应报告和监测管理办法由各省级药品监管部门会同同级卫生行政部门制定。

2 医疗机构制剂监管瓶颈

2.1 缺乏医疗机构制剂不良反应报告实施的指导文件

尽管相关法规明确了医疗机构应履行不良反应监测与报告责任，省级药监部门应会同同级卫生行政部门制定医疗机构不良反应报告和监测管理办法，但是目前各省未见出台相关文件，地方法规未给予支持。

2.2 缺乏医疗机构制剂不良反应上报的日常渠道

国家药品不良反应监测系统仅针对上市后的药品，医疗机构制剂发生的不良反应没有日常监测报告渠道。医疗机构仅在医疗机构制剂再注册时提交不良反应总结外，没有常规渠道向监管部门报告不良反应，导致监管部门对医疗机构制剂安全性信息掌握有限，加大了监管难度。

2.3 医疗机构制剂不良反应产生原因多种

制剂处方筛选不合理、工艺生产不规范、交叉污染、使用不合理和个体差异均是导致不良反应发生的原因。大部分患者为门诊或者出院带药，离院未及时跟踪制剂的不良反应，患者没有意识、也没有途径上报，因此，造成医院制剂的不良反应未被注意并缺少警示[8]。大部分说明书上无不良反应、注意事项和禁忌证的提醒[9]。

2.4 医疗机构制剂上市前监管弱化导致风险增加

审批制下的医疗机构制剂在获批之前必须经过技术审评，而备案制只是形式审查，对备案资料的完整性和真实性进行核查，并不对其进行实质性审

查，去掉了为制剂安全有效性把关的技术审评环节，降低了医疗机构中药制剂的准入门槛。医疗机构制剂临床前研究基础薄弱，使用范围局限，病例少，尽管备案要求提供的资料与申请注册时的资料相同，但技术资料的质量缺乏保障。备案制实施后，品种数量的激增，适用人群也迅速扩大，医疗机构制剂临床使用中存在着较大的安全隐患，对监管部门提出了更高的要求，也增加了监管难度。

3 系统设计思路

3.1 系统开发背景

鉴于医疗机构制剂在临床应用的风险，对其在实际临床应用情况的监督、对其安全有效性进行持续性的监测并适时开展再评价是保证患者用药安全的必要手段。冯爽等[5]建议监管部门针对医疗机构制剂开发出相关不良反应监测系统。王晓曦等[10]通过调研发现，医疗机构中药制剂再注册中对制剂不良反应情况的总结分析难以真实反映制剂实际使用中存在的安全风险，认为有必要完善制剂不良反应监测体系，加强制剂不良反应监测，及时发现风险信号乃至药材的未知毒性，应建立临床疗效跟踪监测体系。Basch[11]认为患者是承担药品治疗风险和成本的主体，其用药过程中早期的症状比专业人员更敏感，患者直接报告药品不良反应可以为药品风险评估增加有价值的信息。边蕾等[12]认为患者直接报告的有定性描述较为详细，可增加不良反应报告数量和新的不良反应症状，有助于早期发现不良反应等方面的优点，作为报告系统的重要补充为监管决策提供了依据。国际上已有很多发达国家建立了药品不良反应公众报告途径，包括美国、加拿大、澳大利亚、英国、瑞典、丹麦、荷兰等发达国家[12-15]，在瑞典国内就形成了以医疗机构报告为主、患者报告为辅的药物警戒体系[14]。本系统的设计遵循了《药品管理法》提出的“以人民健康为中心，坚持风险管理、全程管控、社会共治”的原则，顺应了《药品管理法》对医疗机构制剂不良反应报告要求更为严格的要求，应报告的范围由“严重”改为“疑似”[16]。

作为创新监管方式、提高监管效能的有效举措之一，系统运行有以下优点：

一是有利于强化监管：通过建立患者直接报告制剂疗效和不良反应的方式，便于监管部门采集到更多的制剂使用过程的反馈信息，全面及时掌握医院制剂的安全性和有效性，推进医疗机构制剂上市后再评价工作和高质量发展，为省药监局开展针对医疗机构制剂的行政监管提供技术支撑，同时也保障了制剂品种使用过程的质量与安全，强化了医疗机构制剂单位自主管理诚信与自律。

二是有利于产品创新：通过患者直接报告的途径，以患者为中心对制剂的安全性、有效性进行评价，能更客观地反映制剂临床实际情况，可以逐步积累形成制剂疗效和不良反应的海量信息，帮助医疗机构发现自身制剂产品存在的不足，提供改进的方向，也为成熟制剂转化为新药提供真实世界数据。

三是有利于社会共治：通过推动该系统的广泛应用，鼓励更多患者根据自身用药后的感受自主报告，还能进一步提升社会舆论的关注程度，普及药品监管政策和用药安全知识，推动社会公众共同参与治理意识的提高。

3.2 系统设计关键点

系统定位供患者使用医疗机构制剂后填报相关制剂的疗效和不良反应，其重点在于实现方便患者填报，核心在于可获取疗效和不良反应信息。系统功能的实现要注意影响疗效和不良反应的干扰因素的排除：如恶意填报、多种药合用的影响、疾病本身的影响等。同时关注系统本身的安全性问题并注意对患者的隐私保护。

系统主要分为三个部分：手机端、电脑端和电脑手机互动（见图 1）。患者通过手机微信小程序扫描监管部门赋予的二维码，报告使用医疗机构制剂后的疗效与不良反应，实现数据收集目标。监测人员利用计算机对收到的信息进行审核、统计、分析、评价。电脑端配备医疗机构制剂配制单位与医疗机构制批准或备案品种的基础数据库，实现数据审核、风险发现评价与报告目标。同时电脑端设计预警规则，将风险预警同步以短信形式发送给监测人员，实现督促监测人员及时审核、及时发现风险目标。

3.3 系统功能分区

系统主要实现有四大功能模块：一是数据收集，二是数据监测与审核，三是风险评价与报告，四是系统运行支撑。

3.3.1 数据收集 省药监局在对医疗机构制剂进行审批或备案时，赋予二维码，每个码对应一个批准文号或备案号，要求医疗机构在制剂说明书、标签或内外包装的显著位置上印刷该二维码。

患者利用手机扫描二维码后出现两部分信息，一部分是基本信息，至少包括制剂名称、成分、规格、功能主治、用法用量、禁忌、不良反应、注意事项、批准文号 / 备案号、配制单位 / 委托配制单位等，其内容与注册审批或备案信息一

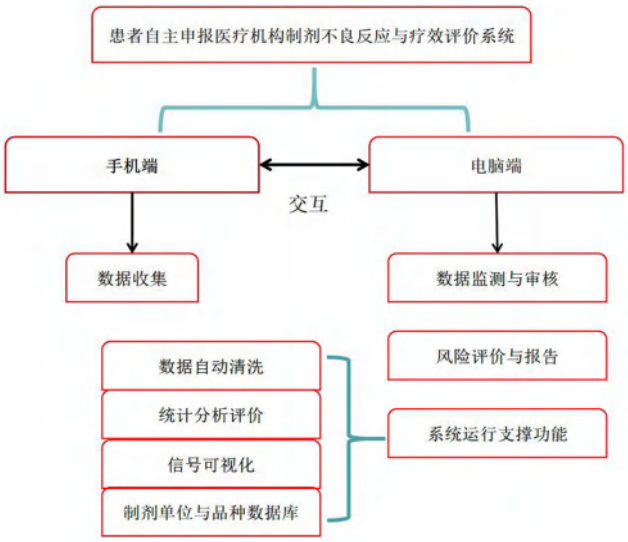


图 1　患者自主申报医疗机构制剂不良反应与疗效评价系统设计与功能模块图

Fig 1　Design and functional module of adverse drug reactions and efficacy evaluation system for medical institutions from patients' self declaration

致，无需填写；一部分是患者对制剂的评价信息。

患者扫描后首先出现“知情同意页”，告知患者填报的信息仅用于为评价医疗机构制剂的安全有效、保障公众健康服务、要求患者真实填报。患者可以选择同意或不同意，充分尊重患者个人填报意愿。设置了必填项与选填项[16]，愿意填报的将完成以下信息：制剂批号、患者姓名、性别、年龄、原患疾病、过敏史、用药周期、疗效评价（“疗效好”“疗效一般”“无效”）、合并用药、曾使用该制剂情况、不良反应、采取措施（“看医师”“停止服药”“未采取措施”）、转归（“已好转”“未好转”“死亡”），其中将不良反应采取通俗易懂、大众易理解的述语，对常见的不良反应（见表 1）采取勾选方式，其他采取手动填写方式。必要时，患者可以在附件上传相关的佐证资料，如患者生化检验单、B 超检测结果、病历等。

表 1　常见不良反应目录设置

Tab 1　Common adverse reaction directory settings

一级目录项	二级目录项
皮肤	瘙痒、皮疹、溃烂、皮肤发黄、其他（手动填写）
消化 / 胃肠	恶心、呕吐、腹痛、腹泻、其他（手动填写）
神经 / 精神	头晕、头痛、失眠、其他（手动填写）
心血管	心慌、心痛、胸闷、其他（手动填写）
呼吸	咳嗽、气喘、呼吸困难、其他（手动填写）
泌尿 / 生殖	排尿困难、尿频尿急、尿痛、尿血、月经不调、其他（手动填写）
五官	视力模糊、听力损害、其他（手动填写）
其他	手动填写

3.3.2　数据监测与审核　监测人员审核收到报告的有效性，剔除不符合常规的报告。通过规则设定，系统自动排除重复报告，监测人员同时按一定的比例抽查报告。关注发生严重不良反应、死亡以及不良反应聚集的品种，设定动态化可调整的预警规则，将发生不良反应后选择“看医师”默认为严重不良反应，以短信方式将预警同步通知监测人员，监测人员及时审核预警，参照药品聚集性药品不良反应事件审核技术标准出具审核意见（信号关闭、继续监测、关注、其他）。审核认为有风险的逐级报告，并采取相应处理措施。

3.3.3　风险评价与报告　监测部门定期对收集的报告汇总分析，挖掘风险信号，对信号进行评价，确认是否存在安全风险。如有风险，及时报告省药监局。省药监部门可根据监测部门提交的风险情况，与医疗机构进行沟通，要求医疗机构分析风险、提供处理意见；必要时，省药监部门可组织现场检查、抽检、专家论证，评估获益与风险比，评价品种的安全有效性。省药监部门可根据监测、现场检查、检验和专家论证的情况，对涉及配制质量问题的，责令暂停配制，医疗机构整改符合要求后方可继续配制；对制剂存在安全隐患且风险大于获益的制剂，更新制剂使用说明书，发布制剂使用风险预警信息，甚至撤销其备案号或制剂批准文号，停止其在临床使用等，主动控制安全性风险[10]。

3.3.4　系统支撑功能　系统配备数据自动清洗功能，设置规则限制重复填报，如一周内同患者、同制剂、同不良反应的报告自动识别，并给予标记，提醒清理，设置回收站功能，清理的数据进入回收站，不允许直接删除报告数据。系统可以可视化提示风险与有临床价值的信号，主页显示不良反应报告数、无效报告数、疗效好的报告数累计排名前 20 位的医疗机构制剂。系统具有检索、统计、查询、导出功能，手机端上报的所有字段均可作为检索条件，能支持查询结果数据导出 Excel 文件；实现对医疗机构、医疗机构制剂、患者性别、患者年龄、原患疾病、疗效、不良反应损害系统分类、不良反应严重情况等的统计分析。系统配备全省医疗机构制剂单位与制剂品种数据库支撑模块，方便在监测审核与风险评价中查找与制剂相关信息的获取，结合其审批或备案时的资料进一步评估其风险。

4　系统初步实践

该系统于 2021 年 9 月 1 日起选取了具有代

表性的 8 家医疗机构 56 个制剂品种试用 3 个月，现已由湖南省药监局、省卫健委和省中医药管理局联合发文于 5 月 1 日正式启用。目前，系统共收到 1515 份报告，其中无效报告 63 份，有效报告 1452 份。有效报告涉及医疗机构 20 家，涉及品种 59 个。有效报告中评价为“疗效好”的 1305 份、“疗效一般”的 138 份、“无效”的 9 份。有效报告中没有不良反应的 1427 份，有不良反应的 25 份，不良反应上报占比 1.75%，发生不良反应选择“看医师”的 2 份。

25 份不良反应报告中，有 3 份提示曾经对其他物质过敏；有 18 项涉及合并用药；“疗效好”的 10 份，“疗效一般”的 13 份，“无效”的 2 份；停止服药后好转的 11 份，未采取措施的 12 份，选择“看医师”的 2 份。

通过检索与分析，重点评价了不良反应报告数量排名较前且涉及到了“看医师”的病例，结合其原患疾病、合并用药、不良反应表现、治疗与转归情况，认为风险仍在可接受范围内，但对不良反应报告数量较多的制剂提醒医疗机构加强监测，关注其风险与获益平衡情况，系统的内在应用价值正在逐步体现出来。

5 困难与建议

5.1 参与患者较少

系统运行至今收到有效报告 1452 份，仅涉及 20 家医疗机构的 59 个品种。建议省药监部门加大对医疗机构的督促和检查力度，确保医疗机构按要求在制剂包装上印刷患者报告所需的二维码，严禁其干涉患者自主上报；加大对社会公众的宣传力度，让更多的人了解自主报告渠道，掌握报告操作方法，鼓励患者使用医疗机构制剂后，自主参与制剂的评价，如实客观地填报相关信息，不得任何恶意造假；同时医疗机构应主动宣传自主报告系统，告知患者填报方法。医疗机构应采取人工或医院公众号、微信小程序、手机 APP 等信息化方式对使用制剂的患者进行回访，尤其针对出院带药的情况，提升对患者的宣传，加强不良反应的上报意识，提醒患者通过扫描二维码对制剂进行评价并填报其不良反应。

5.2 收集信息有限

该系统主要针对患者，考虑患者的受教育程度与专业水平，系统设计的必填项只涉及了一份符合上报基本要求的不良反应报告的四要素，因此所获得的能用于评价的信息非常有限，收集到的信息只能作为信号源。建议随着系统后续的应用推广，鼓励医师、护士和药学工作者参与填报，如杨琳等 [17] 探索了医院药品不良事件收集方法，将被动监测改为主动监测，明确人员责任划分，加大奖惩力度，调动工作积极性，规范报告流程，使新的、严重报告比例都有很大提高，护士及医师上报的数量均显著升高，专业人士的参与将大大提高报告的质量和价值 [16-17]。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局 . 2005 年第 20 号医疗机构注册管理办法 [S]. 2005.

[2] 全国人民代表大会常务委员会 . 中国人民共和国中医药法 [S]. 2016.

[3] 宋大涵 . 中华人民共和国中医药法释义 [M]. 北京：中国民主法制出版社，2017.

[4] 国家食品药品监督管理总局 . 2018 年第 19 号关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告 [S]. 2018.

[5] 冯爽，刘影，耿胜男，等 . 备案制背景下医疗机构中药制剂存在的问题与建议 [J]. 中国药事，2021，35（5）：581-585.

[6] 全国人民代表大会常务委员会 . 中国人民共和国药品管理法 [S]. 2019.

[7] 中华人民共和国卫生部 . 2011 年第 81 号药品不良反应报告和检测管理办法 [S]. 2011.

[8] 于红，张虹 . 医疗机构制剂的不良反应监测与安全性研究 [J]. 中国卫生产业，2020，17（14）：164-166.

[9] 凌俐，王东 . 医疗机构加强制剂管理预防风险的思考 [J]. 齐鲁药事，2012，31（1）：29-30.

[10] 王晓曦，高静，高敏洁 . 传统医疗机构中药制剂实施备案管理后的监管重点探讨 [J]. 中国食品药品监管，2019（8）：58-63.

[11] Basch E. The missing voice of patients in drug-safety reporting [J]. New Eng J Med，2010，362（10）：865-869.

[12] 边蕾，赵频，杨悦 . 药物警戒中患者直接报告情况研究 [J]. 中国药物警戒，2013，10（10）：609-613.

[13] Margraff F，Bertram D. Adverse drug reaction reporting by patients：an overview of fifty countries [J]. Drug Safety，2014，37（6）：409-419.

[14] 乌兰其其格，杨悦 . 瑞典医疗机构不良反应报告和监测研究 [J]. 中国药物评价，2021，38（3）：255-258.

[15] 常虹，田月洁，刘红亮，等 . 国际药品不良反应公众报告现状的分析与思考 [J]. 中国药物警戒，2017，14（7）：419-423，429.

[16] 霍增辉 . 药品管理法修订背景下医疗机构制剂监管创新与完善 [J]. 中国药事，2020，34（5）：514-519.

[17] 杨琳，樊颖，张缓 . 医院药品不良事件收集方法探索 [J]. 北方药学，2018，15（3）：171-172.

（收稿日期：2022-06-17；修回日期：2022-07-05）

新型药学服务模式下医院药学教学培养体系建设初探

夏天一，陈孟莉*（解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京　100853）

摘要：目的　在新医改背景下，以药学服务转型为切入点，建立具有我院特色的药学人才分类、分层教学培养体系。**方法**　对我院药学人才多类别、多层次教学现状进行全流程梳理与全方位评价，探索集约管理、分散带教的药学人才培养模式。**结果**　形成了由契合目标管理方向、搭建目标管理框架、发掘人员教学能动、提升方法管理水平、优化考核管理流程等模块组成的循环管理模式，我院药学人才教学培养向同质、优质发展。**结论**　搭建人才培养框架有助于疏通药学人才培养的关键节点、要点、盲点，形成科学有效的药学人才培养模式，促进我院药学学科质量持续向好发展。

关键词：医改；医院药学；人才培养；体系；药学服务

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1933-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.039

Training and teaching of hospital pharmacy program under new model of pharmacy service

XIA Tian-yi, CHEN Meng-li* (*Department of Pharmacy*, *Medical Supplies Center*, *Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100853)

Abstract: Objective To establish a classified and hierarchical training and teaching program for pharmaceutical talents in our hospital in the context of new medical reform and transformation of pharmacy service. **Methods** Through sorting out the training and teaching process and evaluating the current situation for the classified and hierarchical pharmaceutical talents, a program of intensive management and decentralized education was established. **Results** Effective closed-loop management was achieved through clarifying objectives and framework, driving talent innovation, improving method management and optimizing assessment process, and therefore the program developed towards homogeneity and high quality. **Conclusion** A well-established framework can help clear the key nodes and blind spots in talent training, and a scientific and effective training program in hospital pharmacy contributes to the continuous quality improvement.

Key words: medical reform; hospital pharmacy; talent training; program; pharmacy service

随着我国医药卫生体制改革的逐步深入，推进“以病人为中心”的新型药学服务模式，建立以优化药学服务为导向的药学人才教学培养体系，是提升药学学科水平的重要举措[1-2]。近年来在完善医院药学教育的持续探索中，药学管理者运用“问题教学法”“案例教学法”“角色互换教学法”实现有效引导[3-5]，设计“翻转课堂”“线上/远程课堂”等新型课程促进互动交流[6]，引入优化改良的“客观结构化临床考核（objective structured clinical examination，OSCE）”“迷你临床演练评估（mini-clinical evaluation exercise，Mini-CEX）”等临床导向的教学评价模式[7-8]。这一系列探索为实现特色人才培养，提升医院药师岗位胜任力提供了新的思路。经过前期调整改革，我院药剂科现行“一体多位”的派驻式药学服务模式，统筹“四生一师”（实习生、研究生、进修生、规培生、临床药师）教学培养工作[9-10]。在医院办学的背景下，实现高素质人才培养的顺利落地，药学部门面临前所未有的机遇和挑战。因此，我院药学管理者总结学科建设经验，梳理多类别、多层次药学人

基金项目：国家重点研发项目（No.2020YFC2005005）。

作者简介：夏天一，女，博士，主要从事临床药学工作，email：xiatianyi9906@163.com　*__通信作者：__陈孟莉，女，博士，副研究员，主要从事药事管理工作，email：hellolily301cn@126.com

才教学培养脉络，立足现况探索出一套基于平台优势的集约管理、分散带教式人才培养框架体系，以期为助力药学服务模式转型、推进医院药学高质量发展提供参考。

1　药学人才教学培养体系搭建背景

1.1　新型药学服务模式下药学人才培养需求

由于高强度事务性工作和业务能力提升需求不匹配，医院药学人才培养沿袭了传统的知识灌输型培养模式；同时，由于师资力量有限，面对高通量带教需求通常采用扁平化带教方式，也造成带教效率不高、缺乏师生沟通等问题[11-12]。如何利用有限的资源提升教学质量与效率，是近年来医院药学管理者持续关注的重点。从医院药学人才培养的经验分享来看，无论是打造针对不同类型学员的带教模式，还是引入更加科学有效的培训方法和评价指标，抑或是搭建日益成熟完善的信息管理平台，其中的重要前提是剖析医疗机构带教特点，对人才培养的重点和难点进行梳理，系统化贯通教学流程，有效区分学员带教中的关键个性问题和共性问题。

随着药师工作职能和使命的不断转型发展，我院药学已经逐步从药品供应向兼顾药事管理职能和药学专业技术服务的学科定位转变。其中，人才队伍建设是推进医院药学服务模式向“以病人为中心”转变、实现医院药学创新发展的加速器。学科发展方向在更新，人才教学培养模式也要随之优化。在各个阶段探索教学培养规律，发掘学员特色，迎合优势、精细带教、创新突破[13]，方可准确把握药学人才体系建设发展方向，助力我院药学人才顺利出圈。

1.2　我院药学人才培养探索历程

我院积累数十年的医院办学人才培养经验，通过几代药学教育工作者不断总结提高，已经初步具备了医院药学人才培养的系统思路[9-10，14-18]（见表 1）。对于北京市规范化培训住院药师、临床药师、医院研究生学员等，均已摸索出适应医院特色的学员带教要点，同时拓展开发了教学管理信息系统并初步实现了药学教学培训信息化。

表 1　我院药学人才教学培养探索路径

Tab 1　Exploration of the cultivation of pharmaceutical talents in our hospital

年份	研究要点	研究对象
2013	系统化医院药学教学培训初步探索	临床药师、规培生、研究生、实习生、进修生、药学工作人员
2015	药学学位研究生培养特色模式	研究生
2015	以临床用药实践为重点的临床药师带教模式	临床药师师资、临床药师学员
2015	教学方法应用及信息化工具的开发	全体药师
2015	高等教育与职业教育衔接的医院药学一体化教学培训模式	临床药师、规培生、研究生、实习生、进修生、药学工作人员
2015	住院药师规范化培训质量管理体系	住院药师

1.3　我院药学人才培养现况

医院调整改革之初，种种关键矛盾如教学目标更新调整滞后、学员教育背景和教学需求分层明显、教学方法和考核流程僵化、多个教学点位尚未实现信息联动等问题日益突出。在新环境下面对更加明确的服务定位、更加庞大的学员队伍、更加分散的科室分布、更加精细的知识需求，精准契合医院药学教学培养特点，突破固有模式、创新管理方法是现阶段拟解决的关键问题。

我院药学管理者通过对 2019 年医院调整改革后人才教学培养模式进行梳理，总结出管理中的难点、重点问题：

首先，药学人才的目标管理方向需要校准。传统教学模式难以满足整合后高通量人才培养需求，亟需更新目标管理方向并适应性调整教学培养方法。

其次，管理过程中人员分层、分类定位不明确，尚未形成清晰的循环式管理框架。

再次，宜将升级后的医院信息系统、处方前置审核系统、合理用药系统整合、拓展，通过统筹的信息化平台拓宽教学培养维度。

最后，考核流程有待完善。既往模式化的考核流程既需要大量的人力和时间成本，也缺乏实质上的检验效能。

2　药学人才教学培养体系搭建方案

我院药学管理者通过分析学科建设特色、梳理人才培养脉络，搭建形成“准确契合目标管理方向、严密搭建目标管理框架、聚焦发掘人员教学能动、跟进提升方法管理水平、深入优化考核管理流程”五步循环管理模式，有效识别反馈重点、难点问题[19-21]（见图 1）。

2.1　准确契合目标管理方向

对药学人才教学目标的准确把握是实现有效管理的重要前提[22]。我院药学管理者转变教学思路，将“以病人为中心”的服务理念渗透入教学实际，通过教学实践解决临床问题。建立毕业学员动态随访机制，收集教学方式、学习体验、学习效果和职业选择等反馈信息，对教学目标进行针对性调整。

2.2　严密搭建目标管理框架

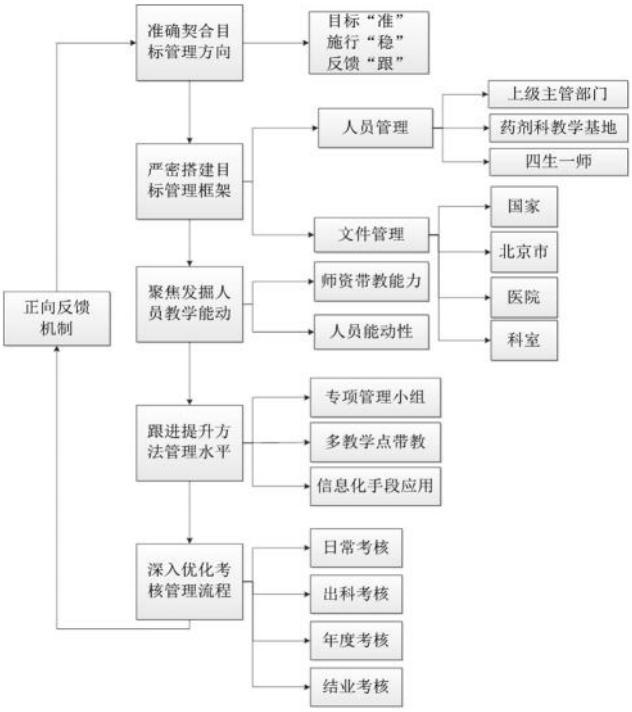


图 1　我院药学人才教学培养体系

Fig 1　Teaching and training program for pharmaceutical talents in our hospital

为解决前期药学教学管理互有交错、存在盲区的情况，药学部门整合资源，搭建了由科室主任、教学主任总体决策，多个教学点位实施监管，教学秘书具体协调的教学管理框架体系[23]。从师资力量上看，我院药剂科现已形成由三级教授、硕士研究生导师、百余名中高级职称师资组成的教学团队；从文件制度上看，根据《临床药师规范化培训办法》《临床药师培训基地管理细则》《北京地区专科医师培训细则》等国家、地区政策规定，制订形成标准化学员带教管理流程。

2.3　聚焦发掘人员教学能动

进行师资、学员双向考核可增进师生交流，提升教学能动[24-26]。由科室定期组织师资命题能力和带教能力考核，通过命题评价（含思路、要点、形式等）和带教评价（含方法、仪态、效果等）以提高师资的岗位胜任力[27-29]，同时对其带教能力的持续更新提出了更高层次的要求。

学员培养需入院即摸底，因材施教。实习学员按照派送学校教学目标区分为供应保障、基础科研和临床药学方向，在完成药学部门轮转后由师资进行专项带教；研究生学员按照我院研究生培养方案由导师进行引导并把关；规培学员以教育背景、工作经历和岗位需求进行区分，对标规培考核目标要求，把握带教重点；对于临床药师和进修学员，根据医院需求结合其所从事工作岗位，主要配备高级职称师资完成管理方法的指引型带教。

2.4　跟进提升方法管理水平

我院药学部门根据既定人员管理框架和文件管理制度，打造系列临床服务型药学精品课程[5，24]：在药品供应保障领域，梳理麻精药品规范管理流程，对药品作用机制、临床应用规范等进行系统讲解；在临床药学方向，利用平台优势解读相关政策规定、药物临床应用现况和前景，明确临床关注的重点问题。此外，依托我院集成的信息化平台，上线课程计划、要点强化、测试考核等功能模块[30]，依据政策规定、临床指南定期进行知识库更新，实现药学管理、临床需求和药学教学的有效联动。

2.5　深入优化考核管理流程

教学考核是检验教学培训效果的有效途径[25，27]。对于不同类型学员需根据教学方式和目的确定考核模式。从考核方式来看，实习生和研究生宜进行理论考核，考察学员对药学理论知识掌握情况；规培生宜进行理论结合实践考核，考察学员理论知识运用能力；进修生与临床药师宜进行管理能力和实践经验考核。从考核内容来看，参考北京市住院药师规范化培训学员评价方法开展结构化考核，对学员理论知识、服务态度、应变能力等方面进行考察。此外，为创新考核方法，我院参与首都地区 Mini-CEX 教学评价考核工具开发项目，设计、使用更加科学、合理的考核量表检验教学效能，引导药学人才教学培养创新突破。

3　药学人才教学培养体系搭建初步成效

自 2019 年调整改革以来，我院已探索搭建了契合学科特色的药学教学培养体系与循环管理模式。随着学科建设发展和信息化平台建设推进，我院药学部门先后整合精准用药平台，引进处方前置审核系统，开设药学门诊，不断规范药物重整、用药教育、药学监护等药学服务举措，同时强化处方审核、处方点评等合理用药工作内涵。在此契机下，教学管理者充分利用“处方前置审核”系统知识库和“处方点评”工作规则库强化学员基础知识，结合“药学门诊服务”场景引导学员知识灵活运用，并通过“治疗药物监测”平台解决临床实际问题，创新实现“临床基础知识＋药物治疗＋案例分析”立体培训模式。

与此同时，我院适应性采用“理论考核”“量化评估”“病例汇报”相结合方式定期开展出科考核，及时进行问题反馈，针对薄弱环节随时改进。2019 年以来年均带教“四生一师”学员近百人，学员更高质、高效地完成国家、地区以及培养单位结业考核，岗位胜任力和职业认可度有所提升。

4　讨论

适应时代发展需求和学科定位更新调整，实现高质量药学人才培养，是本研究在改革背景下关注的重点。在改革发展新阶段，我院药学教学培养体系建设着眼于整合资源进行内外协同探索，不断提升学科内涵，积极拓展辐射效能。近两年来，为拓宽学科平台，促进思维碰撞，我院已申报成为中国医院药学联合体成员单位、国家卫健委紧缺人才培训基地，并开设系列国家级继续教育课程。下一步，在多院区同质化管理驱动下实现不同教学点位学员同质、优质带教，是我院药学管理者拟统筹解决的关键问题。

综上，我院药学管理者从传统的教学模式中树立破圈思维，重新定位把握药学学科发展方向，探索搭建学科教学培养框架。综合运用打造精品课程、引导评价反馈等方式，促进教学相长，同时突破学科管理固有思维，加强人才交流合作，增强学科辐射效能，有效实现教学管理质量闭环。此次探索不仅推动了我院药学人才教学培养模式转型，而且能够有效助力药学学科的优势、长足发展。

参考文献

[1] 朱敏丽，姜娜，肖秀漫，等 . 新生儿科住院医师规范化培训教学模式探讨 [J]. 继续医学教育，2020，34（4）：33-35.

[2] 任爽，卞婧，武丹威，等 . 北京市住院药师规范化培训模式的优化探讨 [J]. 中国药房，2020，31（6）：755-758.

[3] 郑文灿，黄梅芬，法艳梅，等 . PBL 结合 CBL 教学法在药学实习教学中的探索与实践 [J]. 中国继续医学教育，2018，10（25）：19-21.

[4] 张冬林，任秀华，刘东，等 . PBL 教学法在医院药学继续教育中的应用 [J]. 中国药师，2011，14（8）：1189-1190.

[5] 曾艳，王淑洁，褚燕琦，等 . 住院药师规范化培训临床药学教学案例库的构建 [J]. 中华医学教育探索杂志，2018，17（10）：1072-1076.

[6] 任爽，卞婧，张威，等 . 新冠疫情防控常态化下临床药师培训线上 / 远程教学课堂构建 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（15）：1569-1572，1594.

[7] 李嘉琪，杨长青，于锋，等 . 国外客观结构化临床考试在药学临床技能评估中的应用及对我国的启示 [J]. 中国药房，2015，26（27）：3875-3877，3878.

[8] 周冉，方玉婷，冯晓俊，等 . 临床药师规范化培训中改良式迷你临床演练评估教学法效果评价 [J]. 中国药业，2021，30（18）：13-16.

[9] 徐元杰，郭代红，孙艳，等 . 住院药师规范化培训质量管理体系的构建 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（9）：769-772.

[10] 郭代红，孙艳，徐元杰，等 . 融合职教高教资源，构建医院药学一体化培训模式 [J]. 中国药物应用与监测，2015，12（1）：43-46.

[11] 杨大勇，程梅 . 新形势下医院药学发展和临床药师培养模式探讨 [J]. 临床医药文献电子杂志，2016，3（47）：9458-9459.

[12] 田怀平，过晓雯，姚慧娟，等 . 教学医院药学部教学培训信息化管理平台建设与实践 [J]. 中国药业，2021，30（14）：11-14.

[13] 张兰芳，周金娜，张继伟 . 专业认证背景下临床实践教学体系的优化管理 [J]. 中国继续医学教育，2021，13（6）：82-85.

[14] 徐元杰，郭代红，陈超，等 . 系统化医院药学教学培训模式的探索实践 [J]. 中国药师，2013，16（12）：1882-1885.

[15] 徐元杰，郭代红，孙艳，等 . 医院药师培训考核中多种教学方法应用及信息化工具研发 [J]. 中国药物应用与监测，2015，12（1）：56-58，59.

[16] 朱曼，郭代红，孙艳，等 . 临床药师培训基地带教模式和方法的探索与思考 [J]. 中国药物应用与监测，2015，12（1）：53-55，56.

[17] 刘屏，郭代红，胡园，等 . 医院药学科学学位研究生培养教育模式初探 [J]. 中国药物应用与监测，2015，12（1）：47-49.

[18] 朱曼，郭代红，裴斐，等 . 临床药师量化考核指标体系的建立与实践 [A]. 2011 年中国药学大会暨第 11 届中国药师周论文集 [C]//2011.

[19] 唐冰 . 基于 PDCA 循环理论混合式教学模式在外科学实训教学中的应用研究 [J]. 中国中医药现代远程教育，2019，17（16）：5-7.

[20] 康怡，周萍，张东肃，等 . PDCA 循环法在医院药学教学中的应用 [J]. 基础医学与临床，2020，40（5）：723-726.

[21] 基于 PDCA 循环的 ADR 教学及其效果研究 [J]. 临床药物治疗杂志，2017，15（9）：24-28.

[22] 吴园园，叶伟峰，沈月芳，等 . 住院药房药学专业实习带教中目标管理法的构建与探讨 [J]. 中华医院管理杂志，2017，33（9）：718-720.

[23] 李小玲，张燕青，何素玲，等 . 综合性医院药学科设置专职秘书的实践与探索 [J]. 药学服务与研究，2016，16（5）：345，354.

[24] 陈韶华，张文欣，耿晓北，等 . 以临床教学实践为主的”模块化，小组化，专业化”高级师资培训项目探索与实践 [J]. 中国高等医学教育，2019（3）：67-68.

[25] 李晓玲，唐静，闫素英，等 . 住院药师师资实践教学能力培训与考核体系构建 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（11）：873-877.

[26] 沈江华，王淑洁，曾艳，等 . 北京地区住院药师规范化培训基地师资带教水平现状探讨 [J]. 中国药房，2015，26（36）：5170-5173.

[27] 李丽莉，鄢丹，王琨，等 . 住院药师出组考核体系的建立与实施 [J]. 中国医院用药评价与分析，2019，19（5）：616-618，621.

[28] 林平，陈宁，梁健华，等 . 某院培训门诊住院药师处方审核技能的实践 [J]. 中南药学，2017，15（8）：1174-1178.

[29] 王海莲 . 我院住院药师药物咨询培训的实践与探索 [J]. 中国药房，2015，26（21）：3013-3014，3015.

[30] 王淑梅，孙路路，李丽莉，等 . 浅谈住院药师规范化培训中的信息素养教育 [J]. 中国临床药理学杂志，2016，32（8）：759-761.

（收稿日期：2022-02-14；修回日期：2022-05-30）

药用辅料监管法规、质量标准现状分析及应对措施

王贺，钱利武*，阚红卫（安徽省药品审评查验中心，合肥　230051）

摘要：药用辅料是在制剂处方中加入的除主要活性成分外的其他所有物质，是药物制剂的基础材料和重要组成部分，其在药物制剂中具有成型、增溶、助溶、缓控释、充当载体及提高制剂稳定性等功能，也是药物成型发挥治疗、预防和诊断作用的前提和基础。自 2017 年起，我国的药用辅料在完善制度和加强监管的基础上，借鉴欧美发达国家先进的管理经验，由注册审批改为登记备案，顺应了药用辅料行业的呼声，促进了药用辅料的研发和生产。本文对我国药用辅料监管法规的历史沿革进行了回顾，分析了药用辅料的生产现状和质量标准中存在的常见问题，为加强药用辅料的监管和质量提升提供意见和建议。

关键词：药用辅料；监管法规；质量标准

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1937-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.040

Current situation and countermeasures of regulations and quality standards for pharmaceutical excipients

WANG He, QIAN Li-wu*, KAN Hong-wei (*Anhui Center for Drug Evaluation & Inspection*, *Hefei* 230051)

Abstract: Pharmaceutical excipients are all substances that are added into the formulation other than the main active ingredients. They are the basic materials and important components of pharmaceutical preparations. They have the functions of molding, solubility enhancement, sustanined release, acting as the carrier and improving the stability of the preparations. They are also the premise and basis for drug molding in the treatment, prevention and diagnosis. Since 2017, on the basis of improving the system and strengthening the supervision, our pharmaceutical excipients we have learned advanced management experience from developed countries in Europe and America and changed from registration and approval to registration and filing, which has met the needs of the industry and promoted the research and development of pharmaceutical excipients. This paper reviewed the historical evolution of regulations on the supervision of pharmaceutical excipients in China, analyzes the production status and common problems in the quality standards of pharmaceutical excipients, and provided suggestions for strengthening the supervision and quality improvement of pharmaceutical excipients.

Key words: pharmaceutical excipient; regulation; quality standard

药用辅料指生产药品和调配处方时使用的赋形剂和附加剂[1-2]，药物的剂型与其给药途径和方法相适应，药用辅料赋予了药物制剂必要的物理、化学或生物学性质，确保药物中的活性成分选择性地运送到患者的特定部位，以一定的速度和时间释放，从而保证药物的治疗效果[3]。药剂学在我国的发展源远流长，自先秦以来历代医学典籍中有汤、丹、丸、散、酒、醴、饮、膏等剂型的记载，古代中药药剂主要有液体和固体两大类，丸、汤、饮、散等为内服，敷、浴、蒸、熨、膏等为外用。

随着药剂学的快速发展，国内外先后开发出不同类型的新剂型、新系统，如靶向技术（包括脂质体制剂、纳米制剂、微球微囊制剂及缓控释制剂等），对药用辅料的种类和质量提出了新的要求，尤其是在药物传递和渗透过程中起重要作用的高分子药用辅料。监管部门及药用辅料的生产企业对辅料在药物开发和生产中的重要性不断加

作者简介：王贺，男，实验师，主要从事技术审评核查、药物研发、工艺研究，email：kju8@163.com　*通信作者：钱利武，男，博士，副研究员，主要从事药品审评检查工作，email：qianlw@163.com

深，我国的药用辅料迎来了高速发展的良机。

1　药用辅料监管相关法规

《中华人民共和国药品管理法》制定于 1984 年，在 2001 年和 2019 年进行了修订，在 2013 年和 2015 年就部分条款进行了修正。1985 年施行的《中华人民共和国药品管理法》第七条规定“生产药品所需的原料、辅料以及直接接触药品的容器和包装材料，必须符合药用要求”。1986 年卫生部发布的《药品卫生标准》规定，不符合中药、化学药制剂的有关卫生标准的药用原料、辅料不能使用。从广义上说辅料符合药用要求指生产药品所需辅料应与国家药品监督管理局批准的产品注册申报资料一致，并且符合辅料国家药品标准。

1988 年卫生部颁布的《关于新药审批管理的若干补充规定》，规定了新辅料的分类，对新辅料实施审批管理。2004 年，在《国务院对确需保留的行政审批项目设定行政许可的决定》的文件中，保留了药用辅料注册的行政许可项目，明确了药用辅料注册审批的合法性。

2005 年，在原国家食品药品监督管理局发布的《关于印发药用辅料注册申报资料要求的函》中，要求对药用辅料实施批准文号管理，其中省级药品监管部门负责已有国家标准辅料的审批，国家药品监管部门负责新辅料及进口药用辅料的审批，并对申报资料作出明确要求。香精、添加剂、色素和试剂类等辅料允许使用食品级或者按国家、行业标准，与产品注册一起审批。

2006 年原国家食品药品监督管理局发布《药用辅料生产质量管理规范》，对于药用辅料生产企业的机构、厂房、设施、人员等方面进行明确规范，要求各省结合本地实际情况参照执行。

2012 年原国家食品药品监督管理局出台《加强药用辅料监督管理有关规定》，要求严格药用辅料的使用管理，药品生产企业应按照药品监管部门核准的处方工艺，使用符合要求的药用辅料生产药品。药用辅料生产企业对未取得批准文号且历史沿用的药用辅料应按照与药品制剂生产企业合同约定的质量协议组织生产。

2015 年国务院出台了《关于改革药品医疗器械审评审批制度的意见》，明确药用辅料由单独审批改为关联审评审批，2017 年中共中央办公厅办和国务院办公室发布了《关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械创新的意见》，规定了经关联审评审批的药用辅料在指定平台公示，供相关企业选择。为贯彻落实国家关于药品审评审批相关制度，2017 年原国家食品药品监督管理总局发布了《关于调整原料药、药用辅料和药包材审评审批事项的公告》，规定已上市药品中历史沿用的其他符合药用要求的药用辅料，可继续在原药品中沿用，各级药品监管部门不再单独受理药用辅料的注册申请，不再单独核发相关注册批准证明文件。药品关联审评审批制度的实施，有利于建立以药品上市许可持有人为责任主体的现代化药品质量管理体系，强化上市许可持有人对原辅料的审计和质量管理，有助于推动药品质量向更高水平发展。

2019 年国家药品监督管理局出台了《关于进一步完善药品关联审评审批和监管工作有关事宜的公告》，要求原辅包的质量、安全及功能应该满足药品制剂的需要。原辅包登记人按登记技术要求在国家药品监督管理局药品审评中心的登记平台进行登记，制剂注册申请人提交注册申请时与平台登记资料进行关联。药品制剂获得批准时，即表明其关联的原辅包通过了技术审评，登记平台标识为“A”。

2　国内药用辅料质量标准现状

随着药品审评审批制度改革不断深入，市场对高质量药用辅料的需求越来越迫切。辅料质量水平的提高与制定的标准密切相关。目前，国内药用辅料存在多种质量标准，如药典标准、注册标准、行业标准、食品卫生标准、食品添加剂标准和企业登记标准等。在高端药用辅料、注射用及生物制品等高风险品种的药用辅料标准制定方面，现标准难以满足行业发展需求 [4]，存在较多问题。

2.1　《中国药典》收载的品种有待提升

《中国药典》自 1977 年开始收载，2010 年版收载了 132 种，2015 年版和 2020 年版分别收载了 270 种和 335 种，而美国药典和欧洲药典收录的药用辅料标准分别约为 750 种和 1500 种。《中国药典》收载的品种多为传统的药用辅料，新型辅料如脂质体、固体分散体、前体药物载体材料、抛射剂等很少涉及，与原料药及制剂标准相比，药用辅料标准难以满足制药工业的需求，从而直接影响了产品及市场竞争能力 [5]。

2.2　《中国药典》收载的同品种的不同来源或规格有待细分

《中国药典》2020 年版四部中部分辅料在标示项下要求标示辅料的不同来源、类型或型号等信息，如可溶性淀粉存在不同的来源（玉米、木薯或马铃薯）、卡波姆共聚物具有不同的黏度类型（A 型、B 型或 C 型）、硅酸镁铝包括多种不同的型号（ⅠA、ⅠB、ⅠC或ⅡA）。同品种存在的多类型、多来源及多型号现象，与近年来辅料向系列化、精细化发展不相协调 [6]，如在口服固体仿制药质量和疗效一致性评价研究时，发现药用

辅料聚乙二醇 6000 的不同来源与主药相容性差异较大[7]，微晶纤维素型号对制剂的溶出影响较大等，影响制药企业选用合适的辅料。

2.3 标准收载项目内容有待完善

在《中国药典》中，辅料品种项下一般包括分子式、性状、鉴别、检查、含量测定、类别和贮藏等，未纳入配伍禁忌、相互作用等内容，实际生产中，原料药与辅料、辅料与辅料之间可能存在相互作用，如低取代羟丙纤维素与碱物质可发生反应；硬脂酸镁作为润滑剂缺乏比容指标，且可与强酸、可溶性铁盐等气体金属发生反应；羟丙甲纤维素和一些氧化剂有配伍禁忌。部分辅料可在标示项下，增加辅料配伍禁忌及相互作用。

3 药用辅料面临的主要问题

安徽省依据国家药用辅料的分级注册、分类管理，自 2011 年起共有 13 家企业申报注册了已有国家标准的药用辅料，涉及 59 个品种。安徽省是药用辅料生产大省，在国内药用辅料供应市场中拥有举足轻重的地位，但也存在一些共性问题。

3.1 与《药用辅料生产质量管理规范》存在一定距离

尽管《药用辅料生产质量管理规范》颁布实施较早，但辅料生产企业对规范的理解不够透彻，与规范的要求存在一定的差距，现场检查中发现的主要问题有：设备方面，如检验设备和器具未及时进行检定或标定；物料方面，如未说明使用的物料级别及执行标准；生产管理方面，如生产现场未见生产指令和设备状态标识，批生产记录中未注明设备编号、起始物料批号，工艺步骤未记录所用的钛棒过滤器等；质量保证和质量控制方面，如试液配制所用的样品称量和配制过程无详细记录等。

3.2 内控标准和质量研究存在的问题

对原始物料未制定内控标准；工艺研究样品设定的检验指标不合理；质量研究未对检验指标进行方法学验证，产品质量研究中内控检测指标的选择依据不充分，重金属的检测方法不合理，与药物相关的配伍试验及文献资料不充分等。

3.3 国内外药用辅料的生产现状

国外药用辅料发展迅速，尤其是发达国家，从地域分布来看，北美市场占据全球药品市场近 40%，美国为第一大市场[8]。中国药用辅料发展速度落后于中国制药工业的发展速度，药用辅料产业的落后在很大程度上导致制剂研发能力与国际产生差距，如总体规模、市场份额、生产技术与国外辅料生产企业相比，其精细化程度不高，规模小，新品种少，生产时没有严格执行药用辅料生产质量管理规范等[9-10]。随着药品辅料标准体系和制度体系的逐渐完善，行业的规模化程度、专业化程度逐渐提升，未来我国药用辅料行业将逐渐迈入成熟阶段。

4 应对的策略措施

4.1 加强培训，提高产品质量管理控制意识

监管部门可对相关人员进行有针对性的培训，同时企业自身需要加强内部质量管理体系与生产质量控制培训考核；在药用辅料备案及与制剂关联审评之前，药用辅料生产企业应该主动改变落后的生产工艺，加强自身质量控制体系建设，提高企业内控标准，督促原材料供应商提高产品质量，完善物料质量控制的手段和方法，提高质量管理水平[11]。

4.2 提高《中国药典》收载标准的数量、规格和检测项目

4.2.1 提高《中国药典》收载标准 针对国内药用辅料《中国药典》标准收载滞后的现状，建议对符合其他标准层级的品种，组织相关专家进行评估，经确认后补充进入《中国药典》；对已在药品中使用但未列入任何标准的辅料，应尽快对其质量安全进行合理评估，经确认后补充进入《中国药典》；对未在药品中使用过的新辅料，企业可根据与制剂关联审评的情况自行提出申请，监管部门可组织专家进行审评，经论证审核后补充进入《中国药典》[12]；同时增加新型辅料（如微囊、脂质体载体材料、成膜材料等）的收载力度[13]。

4.2.2 加深药用辅料质量标准的研究 企业需对登记备案的辅料进行广泛、充分、深入的研究，向精细化、专业化方向发展，以便给审评专家在关联审评时提供更多的参考依据[14]，如参考外国药典收载和文献中提到的药用辅料质量标准，检测项目、检测方法、限度范围等，对辅料的一些功能性相关指标如比表面积、粉体流动性、堆密度与振实密度、膨胀率或膨胀指数等作进一步深入的研究，对于一些高分子化合物需要根据分子量和分子量分布、黏度等进行系列化研究[15]，在药用辅料的标准研究中，落实好“最严谨的标准”要求，确保药用辅料质量标准的严谨性。

4.2.3 探索性研究实例 结合安徽省目前的实际情况，可以选择一些典型的品种进行相关调研和探索性研究，以便给监管部门提供更多的参考依据。如阿奇霉素分散片中常用的崩解剂有交联聚乙烯吡咯烷酮、低取代羟丙纤维素、羧甲淀粉钠等，其中羧甲淀粉钠在安徽省有多家企业生产，且各家处方、生产工艺不同，目前各家生产的阿奇霉素分散片的崩解时限和溶出度差异较大，可能与羧甲淀粉钠的膨胀率或膨胀指数、水吸收速

率、粉体流动性、粒度和粒度分布等相关[16]，该品种的标示项下，规定应标明原料淀粉的来源及型号、粒度和粒度分布，不同型号品种还应标明膨胀体积的标示值或范围。部分仿制药与原研药存在一定的差距，质量参差不齐，主要体现在体内生物等效性和体外溶出度上的差异[17-18]，药用辅料生产企业可以从羧甲淀粉钠的生产工艺、物料来源、质量标准中的黏度、粒度和粒度分布及与其关联的制剂生产工艺、体外溶出度、体内生物等效性、制剂中使用方法和使用量等方面开展深入研究，为将来羧甲淀粉钠质量标准的提高及品种的细分提供更多的理论参考依据。

4.3　完善企业内控质量标准

辅料生产企业制订内控质量标准时，首先应明确法定标准是定内控标准的基础，内控标准的检验项目和指标应不少于或不低于法定标准，其次要考虑药用辅料的功能与其物理、化学性质及对应制剂的生产工艺、辅料的使用量等因素，评估辅料需增加或提高的检验项目，同时结合制剂进行相关方法学验证，内控标准必须更高、更具有前瞻性[19-20]，如聚山梨酯 80 的使用限量和配伍禁忌等[21-22]。因此制剂企业应同辅料供应商一起对影响制剂的安全性和有效性的项目进行深入研究以确保制剂的安全性、有效性和质量可控性。

4.4　加强检验方法研究

为加强药用辅料的质量控制，许多文献在药典收载方法的基础上，探讨了其他的检验方法，如采用电感耦合等离子体发射光谱法和原子吸收分光光度法等[23-24]对铅、汞、铬、砷及镉等金属杂质进行检验，操作方法简便、快速、灵敏、适用性好。对于药用辅料中有关物质的研究，应科学地认识有关物质的来源、数量和性质，考虑到有关物质的特点，应选择一些灵敏度高、专属性强的检测方法对有关物质进行定性和定量分析[25-27]。药用辅料检验方法的开发还应考虑到质控项目与质控限度的合理性、分析方法的可操作性及检验成本等问题，确保药用辅料质量标准的可执行性。

5　小结

药品新剂型、新技术和新设备的不断涌现及药用辅料种类的增多[28]，极大地促进了医药产业的快速发展，药用辅料因其在制剂中的重要作用，越来越受到药品科研单位、生产企业和机构的关注。当前，药用辅料监管法规和质量标准体系建设正不断健全和完善，药用辅料迎来了发展的良机。同时，随着新分子新材料的不断开发与应用，开发出新辅料将对药用辅料的产业升级和高质量发展起到积极地推动作用。药用辅料的监管法规和质量标准将会得到进一步提高和完善[29]，更好地服务于社会，保障人们的身体健康。

参考文献

[1] 全国人大常委会 . 中华人民共和国药品管理法（2019 年修 订）[EB/OL].（2019-08-26）[2020-02-26]. http//www.npc. gov.cn/npc/c30834/201908/26a6b28dd83546d79d17f90c62e59461. shtml.

[2] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020.

[3] 张志芬 . 从现代药剂学看药用辅料的发展 [J]. 药物分析杂质，2005，25（12）：1576-1580.

[4] 涂家生 . 药用辅料标准的制定及其意义 [J]. 中国食品药品监管，2018，176（9）：31-35.

[5] 董鹏，刘立军，王志豪 . 国内药用辅料的困境与创新 [J]. 张江科技评论，2019，16（5）：61-63.

[6] 陈蕾，张阳洋，郑爱萍，等 . 我国药用辅料产业高质量发展的思考 [J]. 中国药事，2021，35（9）：972-977.

[7] 熊皓舒，张凯旋，李瑶瑶，等 . 基于多元统计分析的药用辅料聚乙二醇 6000 质量控制方法研究 [J]. 药物分析杂志，2021，41（2）：329-337.

[8] Market overview of pharmaceutical excipient research and detailed forecast 2022 [J]. M2 presswire，2018.

[9] 郑希元，张英 . 中美两国药用辅料创造性评判的差异分析 [J]. 中国新药杂志，2018，27（22）：2593-2597.

[10] 冯巧巧，谢纪珍，孙利民，等 . 药用辅料行业发展现状分析与思考 [J]. 中国药事，2018，32（1）：54-58.

[11] 邹宜諠，陈云，邵蓉，等 . 共同审评审批制度下药用辅料质量监管的思考 [J]. 中国新药杂志，2019，28（4）：390-394.

[12] 谭燕美，由春娜，董敏 . 我国药用辅料关联审评审批政策的剖析与建议 [J]. 中国医药工业杂志，2017，48（8）：1208-1214.

[13] Katarzyna W，Katarzyna W. Ethylcellulose-apharmaceutical excipient with multidirectional application in drug dosage forms development [J]. Materials，2019，12（20）：3386.

[14] 任连杰，马玉楠，蒋煜，等 . 对药用辅料与药品关联审评审批申报资料要求的解读与思考 [J]. 中国新药杂志，2017，26（18）：2128-2135.

[15] 张婷，彭红，肖飞，等 . 药用辅料与药物活性成分相互作用及其分析技术研究进展 [J]. 中国新药杂志，2018，27（3）：322-328.

[16] 张孝娜，孙会敏，杨锐，等 . 药用辅料羧甲基纤维素钠物理表征参数研究 [J]. 中国药事，2020，34（8）：925-933.

[17] 何仲贵 . 药用辅料在仿制药质量和疗效一致性评价中的作用 [J]. 中国食品药品监管，2018（9）：44-46.

[18] 周永标，潘卫松 . 从葛根素的异常毒性实验看药用辅料的重要性 [J]. 中国医药导报，2010，7（13）：47-48.

[19] 王刚，郑琦，吴言言，等 . 浅谈药用辅料企业实验室管理体系的建立 [J]. 化学试剂，2021，43（4）：484-487.

[20] 陈蕾，康笑博，宋宗华，等 .《中国药典》2020 年版第四部药用辅料和药包材标准体系概述 [J]. 中国药品标准，2020，21（4）：307-312.

[21] 伊宸辰，沙瑞霖，陈沁颖，等 . 药用辅料聚山梨酯 80 的质量研究 [J]. 中国药科大学学报，2020，51（2）：168-174.
[22] 乔培，杨凌宇，吴春花，等 . 不同药用辅料流化床制粒的物性质量分析研究 [J]. 现代中药研究与实践，2020，34（1）：49-53.
[23] 朱鸭梅，董耀，胡蓉，等 . 电感耦合等离子体质谱法同时测定药用辅料山梨醇中的铅和镍 [J]. 化学分析计量，2019，28（6）：39-42.
[24] 李颖，刘雁鸣，谭必琴 . 采用原子吸收分光光度法测定药用辅料硬脂富马酸钠中的重金属铅含量 [J]. 中南药学，2017，15（7）：978-980.
[25] 李闻新，周娜，律涛，等 . LC-MS/MS 法测定药用辅料磺丁基醚 -β- 环糊精中 2 个杂质 [J]. 药物分析杂志，2018，38（3）：495-499.
[26] 靳贵英，王淼，王彩媚 . 离子色谱法测定药用辅料 β- 环糊精的有关物质 [J]. 安徽医药，2017，21（8）：1388-1391.
[27] 张悦，赵勇，谢莹莹 . 药用辅料二甲亚砜有关物质测定方法改进 [J]. 中国药师，2019，22（12）：2358-2361.
[28] 熊亚群，刘雁鸣 . 高效液相色谱技术在药用辅料检测中的应用新进展 [J]. 中南药学，2015，13（1）：61-64.
[29] 向星萍，陈永法 . MAH 制度下我国药用辅料审评审批制度改革研究 [J]. 现代商贸工业，2018，39（19）：161-163.

（收稿日期：2022-01-14；修回日期：2022-04-28）

抗肿瘤药物临床试验方案违背的现状及预防策略

唐琪，谭英红，衡建福，李坤艳*（湖南省肿瘤医院药物临床试验机构，长沙　410013）

摘要：目的　对抗肿瘤药物临床试验方案违背进行分析，了解方案违背的整体情况及存在的问题并提出解决措施，减少临床试验过程中方案违背的发生，保证临床试验的质量。**方法**　对 2019 年 1 月至 2020 年 12 月本院伦理委员会审查的方案违背报告进行回顾性分析，包括方案偏离的类别、例数以及导致方案违背发生的责任主体；并比较国内外申办方的项目方案违背发生情况的差异，分析方案违背的上报过程中存在的问题，提出相应的解决措施，加强方案违背的管理。**结果**　共 245 个项目发生 2768 例次方案违背。最常见的方案违背类型为检查 / 生命体征 / 体格检查漏查（534 例次，占 19.3%），少服 / 多服 / 漏服药物（378 例次，占 13.7%）。38.8% 的方案违背由受试者造成，其次为研究者（29.5%）。国内申办方的项目发生的方案违背较国外申办方的项目发生率高，方案违背发生时间与发现时间间隔 0 ～ 648 d，均值为 63 d，中位数为 31 d；发现时间与上报时间间隔 0 ～ 668 d，均值为 225 d，中位数为 127 d。**结论**　在抗肿瘤药物临床试验过程中，通过加强培训和沟通提高受试者依从性，通过管理部门监管及激励措施提高研究者的积极性和依从性，伦理委员会采取措施加强对方案违背上报的监管，使用信息化等手段提高抗肿瘤药物临床试验的方案依从性，不断完善对方案违背的规范管理以减少方案违背的发生，提高临床试验质量。

关键词：方案违背；临床试验；抗肿瘤药物
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1941-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.041

Current situation and prevention strategies of protocol deviation in antitumor drug clinical trials

TANG Qi, TAN Ying-hong, HENG Jian-fu, LI Kun-yan* (*Department of Clinical Pharmaceuticals Research Institution*, *Hunan Cancer Hospital*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To analyze the protocol deviation (PD) in clinical trial of antitumor drugs, understand the overall situation and existing problems of PD reduce the occurrence of PD, and

基金项目：湖南省自然科学基金资助项目（No.2021JJ80008）。
作者简介：唐琪，女，硕士，主管药师，主要从事药物临床试验管理方向，email：348826116@qq.com　*通信作者：李坤艳，女，博士，主任药师，主要从事药物临床试验研究，email：lkunyan@163.com

ensure the quality of clinical trial. **Methods** We retrospectively studied PD reports reviewed by the ethics committee of our hospital from January 2019 to December 2020. The categories and number of PD cases and the responsible subjects for PD were analyzed. We also compared the differences in PD before and after the use of Hospital Information System-Good Clinical Practice (HIS-GCP), and domestic and foreign projects, analyzed problems in the reporting process of PD, and suggest corresponding measures to PD. **Results** Totally 2768 PD cases were found in 245 projects. The most common type of PD included missing laboratory examination/vital signs/physical examination (534 cases, 19.3%), followed by under dose/over dose/missing dose (378 cases, 13.7%). About 38.8% of the PD cases were caused by the experiment subjects, and 29.5% by investigators. The occurrence rate of PD in domestic projects was higher than that of foreign ones. The interval between the occurrence and detection of PD was 0 ～ 648 d (AVG 63 d, M 31 d); while the interval between detection and reporting was 0 ～ 668 d (AVG 225 d, M 127 d). **Conclusion** In clinical trials of antitumor drugs, we can improve the compliance of subjects through training and communication, to improve the enthusiasm and compliance of investigators through the supervision and incentive measures of the management department. The ethics committees should take measures to strengthen the supervision of PD via information technology to reduce the occurrence of PD in clinical trials.

Key words: protocol deviation; clinical trial; antitumor drug

临床试验是药物研发的关键环节，也是新药获取上市资格的必经之路。方案违背（protocol deviation，PD）是指对伦理委员会审议批准的临床试验研究方案的所有偏离，并且这种偏离没有获得伦理委员会的事先批准，或者不依从 / 违背人体受试者保护规定和伦理委员会要求的情况 [1]。方案违背是不规范的临床试验，导致数据不可靠，影响药物上市，因此，减少临床试验的方案违背和加强对临床试验方案违背的管理至关重要。

抗肿瘤药物临床试验不同于一般药物临床试验研究，其项目周期长、病程复杂、肿瘤合并用药多、不良事件（AE）及严重不良事件（SAE）发生频率和疗效访视较多、受试者预后差、受试者耐受性差、试验设计和风险控制参差不齐等 [2]，并且数据核查中发现的问题也相应最多，故应对临床试验的各参与方提出更高的要求。方案违背可能影响受试者的受益或增加受试者的风险，造成非预期的不良事件，乃至严重不良事件，并且可能对受试者造成损害 [3]。有意的或无意的方案违背都有可能使数据变得不准确、不可靠或不可信 [4]。当临床试验出现大量方案偏离时，试验各参与方的利益会受到影响，试验的质量可能下降，甚至影响整个临床试验的结论，导致临床试验的失败 [5]。2017 年 7 月，原国家食品药品监督管理总局发布了数据核查阶段性报告 [6]，报告显示：临床研究数据现场核查发现的问题复杂多样，方案违背在临床部分常见问题中排第二位，占比约 12.0%。本文通过对本院方案违背报告进行归纳和分析，以期减少临床试验过程中方案违背的发生，保证试验数据的质量。

1 材料

收集 2019 年 1 月至 2020 年 12 月本院伦理委员会审查的方案违背报告资料，涉及抗肿瘤药物临床试验项目 245 项，其中生物等效性试验 2 项、Ⅰ期 34 项、Ⅰ/Ⅱ期 8 项、Ⅱ期 74 项、Ⅲ期 121 项、Ⅳ期 2 项、ⅡT 项目 3 项，医疗器械 1 项。

2 方法

将收集到的数据整理并录入 Excel 表中，根据方案违背的类型进行分类，分析相应责任主体，比较国内外项目方案违背情况及方案违背上报过程中存在的问题。

3 结果

3.1 方案违背报告的基本情况

共审查涉及方案违背 2768 例次，主要由受试者造成（38.8%），其次为研究者（29.5%）。最常见的方案违背类型为检查 / 访视相关违背（878 例次，占 31.7%），用药相关违背（735 例次，占 26.6%），超窗（598 例次，占 21.6%）和生物样本相关违背（255 例次，9.2%），见表 1。其中检查 / 生命体征 / 体格检查漏查（534 例次，占 19.3%），少服 / 多服 / 漏服药物（378 例次，占 13.7%），访视超窗（216 例次，占 7.8%），具体见表 2。

3.2 国内外项目方案违背报告对比分析

表 1　2768 例次方案违背报告基本情况

Tab 1　Basic information of 2768 cases of protocol deviation

方案违背类型	责任主体（例次）										合计
	受试者因素	研究医师因素	研究护士因素	不可抗力因素	假期	CRC 因素	检查科室因素	第三方其他因素	方案本身因素	CRA 因素	
检查 / 访视相关违背	292	362	27	77	1	2	87	9	9	12	878
用药相关违背	531	123	40	16	1	13	1	8	2	0	735
超窗	128	205	51	57	120	9	12	11	5	0	598
生物样本相关违背	34	10	73	4	6	80	4	41	1	2	255
违背入排	4	31	0	0	0	0	0	1	0	0	36
知情同意	2	5	0	0	0	0	0	1	0	0	8
*其他类型	82	81	1	32	1	15	5	31	5	5	258
总计	1073（38.8%）	817（29.5%）	192（6.9%）	186（6.7%）	129（4.7%）	119（4.3%）	109（3.9%）	102（3.7%）	22（0.8%）	19（0.7%）	2768（100%）

注：*其他类型包括严重不良事件上报超时、药物超温超湿、受试者问卷未完成等。

Note：* Includes serious adverse event reporting timeout，excessive of drug storage temperature and humidity，incomplete subject questionnaire and other violations.

表 2　主要方案违背详细分类

Tab 2　Detailed classification of major protocol deviation

方案违背类型	细分类型	总例次	责任主体（例次）		
			受试者	研究医师	其他责任主体
检查 / 访视相关违背	访视 / 访视数据缺失	207	104	53	50
	检查 / 生命体征 / 体格检查漏查	534	119	258	157
	停止治疗访视未做	61	54	3	4
	肿瘤评估数据缺失	28	15	12	1
	其他	48	0	36	12
用药相关违背	少服 / 多服 / 漏服药物	378	355	7	16
	违背方案合并用药	68	22	43	3
	未按要求调整剂量	55	16	36	3
	未按要求暂停 / 中止给药	35	9	25	1
	药物或包装丢失	55	54	0	1
	给药时间不符合要求	128	73	10	45
	其他	16	2	2	12
超窗	访视超窗	216	48	48	120
	给药超窗	118	38	24	56
	检查超窗	197	33	94	70
	影像评估超窗	67	9	39	19
生物样本相关违背	样本采集超窗	81	8	5	68
	样本超温	30	0	0	30
	样本处理不符合要求	63	0	0	63
	无法检测	24	16	0	8
	其他	57	10	5	42

245 项药物临床试验项目方案违背报告中有 37 项申办方为国外企业项目，包括阿斯利康、默沙东、百时美施贵宝、罗氏、默克、礼来、拜耳等。与国内申办方项目进行对比分析，基本情况见表 3，国际多中心研究发生方案违背例次显著低于国内例次。

3.3　方案违背发生时间与发现时间及上报时间间隔分析

分析方案违背发生时间与发现的时间，其间隔时间为 0 ～ 648 d，均值为 63 d，中位数为 31 d；发生时间距离上报时间，其间隔时间为 0 ～ 668 d，均值为 225 d，中位数为 127 d。严重违背方案间隔时间范围为 0 ～ 581 d，均值为 141.6 d，中位数为 118 d（见表 4）。

4　讨论与建议

4.1　方案违背责任主体方面问题

从曹伟等[7]的研究发现，某医院 2014 年至 2018 年方案违背责任主体主要由研究者（60.1%）、受试者（38.9%）构成。而从本院数据的统计情况来看，方案违背的原因主要因素同样由研究者（29.5%）和受试者（38.8%）两个方面所致，常见的不合格项目主要包括超窗、检查 / 生命体征 / 体格检查漏查、少服 / 多服 / 漏服药物。

表 3　国内外方案违背情况

Tab 3　Protocol deviation home and abroad

申办方	项目数	方案违背总数	违背检查 / 访视相关类型	违背用药相关类型	违背超窗类型	违背生物样本 / 耗材相关类型	其他违背	违背知情同意类型	违反入排
国外	37	331（8.95）	88（0.27）	59（0.67）	66（1.12）	24（0.36）	90（3.75）	2（0.02）	2（0.02）
国内	208	2437（11.72）	790（0.32）	676（0.86）	532（0.79）	231（0.43）	168（0.73）	6（0.04）	34（0.16）

4.1.1　受试者依从性　受试者作为临床试验的重要参与方，试验中受试者的依从性是影响试验结果可靠性的重要因素。新药临床试验中受试者不依从现象是非常普遍的。据文献报道，仅有约 1/3 的受试者是全依从的，1/3 的受试者依从性较差，还有 1/3 的受试者则完全不依从[8]。本研究发现受试者方面的违背通常有少服少服 / 多服 / 漏服

表 4　发生时间距离发现及上报时间间隔

Tab 4　Interval between occurrence and discovery，and interval between discovery and reporting

统计指标	发生时间距离发现时间 /d	发现时间距离上报时间 /d	严重方案违背发现时间距离上报时间 /d
其间隔时间范围	0 ～ 648	0 ～ 668	0 ～ 581
均值	63	225	141.6
中位数	31	127	118

药物、检查 / 生命体征 / 体格检查漏查、未按要求完成访视或拒绝访视、访视 / 检查 / 给药超窗、违背方案合并用药等，这与文献报道的结论一致 [9]，其中少服 / 多服 / 漏服药物的发生率最高。徐永素等 [10] 对受试者的服药依从性调查研究发现影响最大的因素是药物不良反应过大，患者不能耐受而减少药物的服用。在研究期间受试者出现不良事件，不管严重程度、不管与临床试验是否有关，研究者都应给予及时救治，保障受试者安全，同时对受试者进行详细解释，缓解受试者的不良情绪 [11]。知情不充分导致受试者对临床试验缺乏正确认识，进而导致依从性差 [3]，因此研究者在受试者签署知情的时候应充分告知受试者应履行的义务、试验流程和日记卡填写培训，使受试者了解临床试验及参与临床研究可能的受益和风险，同时给予受试者充分的关怀，加强沟通和指导，对受试者的不良事件及时处理等方面提高其在试验过程中的依从性。

4.1.2　研究者依从性　本研究结果显示由研究者导致的方案违背主要有检查 / 生命体征 / 体格检查漏查、访视 / 检查 / 给药 / 影像评估超窗、未做访视、违背方案合并用药、未按要求调整剂量 / 暂停 / 中止给药。研究者作为临床试验的关键主体，是临床试验质量保障的核心。研究者的积极性、参与度在一定程度上会影响临床试验的质量 [12]。研究者平常临床常规诊疗工作繁忙，对临床试验方案掌握程度不够熟悉 [13]。这使得研究者在执行方案时中容易发生检查漏查、检查或访视超窗、违背方案合并用药等方案违背。研究者未及时关注到受试者实验室检查指标的变化，未按照受试者病情的变化调整治疗方案，从而导致未按方案要求及时调整剂量、暂停或中止给药等方案违背的发生。研究者应加强对方案的依从性，尤其在高风险容易发生方案偏离处要及时做好预防。同时伦理委员会及医院管理部门加强对研究者的监管，还要采取措施避免类似情况再次发生。医疗机构应在绩效考核、职称评审等方面体现出药物临床试验应有的权重，提高研究者积极性，推动临床研究规范开展 [12-14]。

另外，研究者还可借助临床试验系统（GCP）或者医院信息系统（HIS）等系统，对入组的受试者再次就诊或开药时给予提醒，避免或减少违背方案的合并用药或治疗，针对项目将每个访视需要进行的实验室检验检查做成模板并根据访视次数命名，为受试者开具访视相关检查时只需选择相应的模板，可避免遗漏某些检查项目，在一定程度上解决漏查检验检查、禁用药物使用的问题 [7，9]。本院于 2019 年 3 月开始启动 HIS-GCP 系统，通过录入受试者信息、根据方案流程事先设定各个访视提醒、访视模版对试验项目进行管理，同时设置合并用药的预警提示防止违背方案的合并用药，研究者能快速准确及时完成每次访视各项检查医嘱的开具、预防检查漏项、访视超窗、违禁用药等方案违背情况。并于 2019 年 11 月份开始上线使用临床试验管理系统（CTMS），从知情到出组的全流程管理，访视计划自动生成，随访任务自动提醒等都能在一定程度上提高方案的依从性，减少访视相关违背的发生。通过 CTMS 系统对生物样本进行条码管理，并在系统中制订生物样本采集计划，设置采集提醒功能，防止生物样本的漏采和超窗等违背，对生物样本从采集到处理到保存的全流程记录及管理，对生物样本处理及保存过程的违背也起到一定的预防作用。

4.2　国内外临床试验质量的差距

随着《药品管理法》《药品注册管理办法》《药物临床试验质量管理规范》《国家药品监督管理局关于调整药物临床试验审评审批程序的公告》等一系列药品管理法律文件相继出台，创新药物临床试验法律政策环境发生了较大的变化。同时，国家药品审评中心等对临床试验的质量提出了更高、更严的要求，更加注重创新药物临床试验过程的规范性以及数据和结果的科学性、真实性、可靠性，创新药物临床试验面临重要的发展机遇与挑战。

通过对比本中心国内外方案违背情况，发现国外项目方案违背项目数明显低于国内项目，由此可见与国际水平相比，国内临床研究的水平及质量仍存在诸多不足。严谨科学的试验方案设计，规范合理的试验操作是方案偏离发生率低的前提与保障，国际多中心项目对整个团队的要求和方案设计更加严谨，对试验组织实施有较强的把控与调节能力。国内项目注重项目进度而对项目质量要求不如国外申办方，且对临床监查员（CRA）要求不高，CRA 业务水平良莠不齐，对试验中的方案偏离不能及时发现和弥补，对引起方案偏离发生的行为不能及时纠正，从而影响临床试验的

质量。从申办者的角度建立药物临床试验质量管理体系，无论对提高药物临床试验的数据可靠性，还是保障受试者的安全，都是必要和必需的[15]。

4.3 方案违背报告不及时问题

通过分析方案违背从发生到发现再到上报伦理的时间，发现方案违背报告上报时间存在不及时性，尤其是严重的方案违背上报时间过长，影响受试者权益及安全。2020 版 GCP[16] 规定伦理委员会应当关注并明确要求研究者及时报告：临床试验实施中为消除对受试者紧急危害的试验方案的偏离或者修改；增加受试者风险或者显著影响临床试验实施的改变；所有可疑且非预期的严重不良反应；可能对受试者的安全或者临床试验的实施产生不利影响的新信息。中国临床研究能力提升与受试者保护高峰论坛于 2020 年 9 月 30 日发布的“方案偏离的处理与报告工作指引”也提出严重影响受试者权益、安全和健康，或研究数据的完整性、精确性、可靠性的重要方案偏离和为避免研究者对受试者的危险的方案偏离，应该及时报告伦理委员会。伦理委员会未对其上报时间作出明确规定，从而导致方案违背发生后未能及时上报至伦理，延迟半年或一年上报的情况比较普遍，甚至有些研究在结题时才对方案违背进行整理上报。因此，为了及时发现方案违背，抓住有效控制方案违背的时机，伦理委员会有必要对方案违背的上报时限作出明确的要求，督促方案违背及时上报尤其是严重的方案违背。

综上，方案违背涉及临床研究的各个阶段、各项环节，有时难以避免，为了尽量减少方案违背的发生，研究者、申办方、机构以及伦理委员会都应有针对性地加强培训，既要做到各司其职，又要进行及时沟通，彼此之间通力协作，有效地运用信息化手段等方式以提高临床试验的方案依从性，保障受试者的权益及临床试验的质量。

参考文献

[1] 国家食品和药品监督管理局 . 药物临床试验伦理审查工作指导原则 [S]. 2010.

[2] 高荣，李萌，宋福鱼，等 . 抗肿瘤药临床试验特点及数据核查的常见问题讨论 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（22）：2943-2947.

[3] 訾明杰，李晓玲，母双，等 . 方案违背的伦理审查与管理 [J]. 中国医学伦理学，2020，3（2）：165-168.

[4] Ghooi RB ，Bhosale N ，Wadhwani R，et al. Assessment and classification of protocol deviations [J]. Perspect Clin Res，2016，7（3）：132-136.

[5] 吉萍 . 中国药物临床试验的质量管理 [J]. 中国新药杂志，2013，22（1）：13-16.

[6] 国家食品药品监督管理总局食品药品审核查验中心 . 药物临床试验数据核查阶段性报告（2015 年 7 月至 2017 年 6 月）[EB/OL].（2017-07-21）[2018-10-25]. http：//www. cfdi. org. cn/resource/news/9137. html.

[7] 曹伟，王丹平 . 药物临床试验中方案违背的伦理审查情况分析 [J]. 中国新药杂志，2019，28（11）：1355-1359.

[8] Chesney MA. Factors affecting adherence to antiretroviral therapy [J]. Clin Infect Dis，2000，30（Suppl 2）：S171-S176.

[9] 肖爽，程金莲，朱雪琦，等 . 关于临床试验不依从方案问题的探讨 [J]. 中药新药与临床药理，2018，29（6）：832-835.

[10] 徐永素，苏薇，曾尤超，等 . 药物临床试验中受试者服药依从性影响因素调查及护理对策 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2018，3（33）：29-30.

[11] 郑小敏，冯惠平，翁小香，等 . 临床试验中受试者依从性的影响因素及对策 [J]. 海峡药学，2021，33（6）：208-210.

[12] 杨玥，蔡名敏，张如梦，等 . 药物临床试验激励机制的实施与探讨 [J]. 中国新药与临床杂志，2021，40（1）：30-33.

[13] 李树，赵氚，成程，等 . 临床试验中违背方案问题的分析与建议 [J]. 中国医学伦理学，2021，34（2）：211-215.

[14] 谢振伟，范华莹，王璨珏，等 . 药物临床试验数据核查常见问题与对策建议 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（22）：2299-2302，2307.

[15] 罗嵇宁，陈一飞，徐瑛 . 关于申办者的药物临床试验质量管理体系建设的探讨 [J]. 上海医药，2021，42（13）：6-9.

[16] 国家药品监督管理局，国家卫生健康委员会 . 药物临床试验质量管理规范 [EB/OL].（2020-04-23）[2021-11-04]. https：//www. nmpa. gov. cn/zhuanti/ypzhcglbf/ ypzhcglbfzhcwj/20200426162401243. html.

（收稿日期：2021-07-27；修回日期：2022-03-30）

儿科 24 小时静脉用药集中调配管理体系的构建与探讨

蒋志平[1]，彭骞[1]，罗芳梅[1]，王方杰[1]，何莉梅[1]，刘世坤[2*]（1. 湖南省儿童医院，长沙　410007；2. 中南大学湘雅三医院，长沙　410013）

摘要：目的　探讨构建儿科 24 h 静脉用药集中调配管理体系，为儿童患者提供 24 h 同质化、高标准的静脉用药调配服务，保障儿童群体静脉用药安全。**方法**　通过前期项目建设设计、信息系统支持设计、工作流程设计和人力资源统筹安排等举措，构建一套合理、完善的儿科 24 h 静脉用药集中调配管理体系。**结果**　构建了一套基本符合儿童静脉用药特点、能满足儿科临床静脉药物治疗需求、24 h 不间断工作的静脉用药集中调配管理体系，涵盖了项目设计、建设、运营、质控和管理多个环节。**结论**　该体系将同质化和精细化的管理理念贯穿儿科静脉用药调配的全过程，全方位提高儿童静脉用药质量，降低药物不良反应和医疗风险，可为同行开展儿科静脉用药调配工作提供参考。

关键词：静脉用药集中调配；儿童；医疗安全
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1946-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.042

Construction of 24 h pharmacy intravenous admixture service management system for pediatric patients

JIANG Zhi-ping[1], PENG Qian[1], LUO Fang-mei[1], WANG Fang-jie[1], HE Li-mei[1], LIU Shi-kun[2*] (1. *Hunan Children's Hospital*, *Changsha* 410007; 2. *Third Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To provide 24 h homogeneous and high-standard pharmacy intravenous admixture service for pediatric patients, and to ensure the safety of intravenous drug use in children. **Methods** Through the project construction design, information system support, workflow design and overall arrangement of human resources, a reasonable and complete set of 24 h pharmacy intravenous admixture service management system was expected for pediatric patients. **Results** A management system for pharmacy intravenous admixture services that conformd to the characteristics of intravenous drugs for children was established met the needs of pediatric clinical intravenous drug treatment, working 24 h a day. **Conclusion** The system applies the management concepts of homogeneity and refinement throughout the process of pharmacy intravenous admixture services for pediatric patients, improves the quality of children's intravenous drug use and reduces adverse drug reactions.

Key words: pharmacy intravenous admixture service; child; medical safety

2021 年 12 月 20 日，国家卫生健康委员会发布了《静脉用药调配中心建设与管理指南（试行）》[1]（国卫办医函〔2021〕598 号）（以下简称《指南》），其中对加强静脉用药调配中心（pharmacy intravenous admixture services，PIVAS）的建设与管理，保障用药安全和促进合理用药做出了明确要求。为贯彻执行国家政策，推进儿科 PIVAS 管理规范化，本研究通过集成构建一套儿科 24 h 静脉用药集中调配管理体系，将同质化和精细化的管理理念贯穿儿科静脉用药调配的全过程，全方位提高儿童静脉用药质量，为同行开展儿科静脉用药调配提供参考。

基金项目：湖南省药学会医院药学研究基金 2020 年重点项目（No.2020YXH003）；湖南省卫生健康委员会 2022 年度科研立项课题（No.202213043925）。
作者简介：蒋志平，男，硕士，副主任药师，主要从事儿科 PIVAS 管理与儿童合理用药研究，email：27672357@qq.com　*通信作者：刘世坤，男，博士研究生导师，主任药师，主要从事医院药事管理与临床药学研究，email：L8618496@126.com

1　一般资料

我院是一家集医疗、教学、科研于一体的大型三甲儿童医院，也是国家儿童区域医疗中心的委省共建单位。我院 PIVAS 于 2011 年底完成基本建设，2012 年 5 月通过省卫生主管部门验收并投入运营，至今已稳定运行近 10 年。2013 年 1 月，医院通过国际医院认证联合委员会（JCI）认证。根据 JCI 标准和儿童群体的疾病治疗特点，我院 PIVAS 从 2012 年 12 月起就开始为临床科室提供 24 h 静脉用药调配服务 [2]。目前日均调配量为 4000 ～ 4500 组，为全院 35 个临床住院病区调配长期和临时静脉用药医嘱，包含静脉滴注、静脉注射、微电脑泵入、脊髓腔内注射（化疗）等多种给药方式的医嘱，是迄今为止国内少数几家为患者提供 24 h 全静脉用药调配服务的 PIVAS 之一。

2　24 h 儿科 PIVAS 管理体系的设计与构建

2.1　项目设计与建设

PIVAS 的建设流程、建筑装修与设施设备等基本要求，参照《指南》相关标准实施。如果要实现 24 h 不间断工作的需求，则应在 PIVAS 项目设计启动之初，新增一个临时调配间及配套的小型净化系统、生物安全柜等设备设施，用来开展当日第 5 批次至第 2 日第 1^{+} 批次之前（当日 14：30 ～第 2 日 7：00 的时间段）的临时或长期医嘱的静脉用药调配工作。新增临时调配间，不但可以让 PIVAS 实现 24 h 不间断工作，全时段、同质化地为患者提供高质量静脉用药，还能充分降低 PIVAS 能源消耗，控制运行成本，并给抗感染药物调配间、普通药品和静脉营养液调配间两套大型净化系统及设备充足的维护保养时间，延长设备使用寿命（见表 1）。

表 1　PIVAS 临时调配间设计基本要素

Tab 1　Basic elements of PIVAS temporary deployment

PIVAS 功能区域	临时调配间
面积要求	20 ～ 30 m^2
内部布局设计要求	含调配操作间、一次更衣室、二次更衣室以及洗衣洁具间
净化系统设计要求	全新风（直流式）空调系统。设备功率根据洁净间的面积调整
调配操作台设计要求	国标Ⅱ级 A2 或 B2 型生物安全柜，2 ～ 3 台
其他要求	净化系统的洁净级别、换气次数、静压差等参照《指南》

2.2　信息系统设计与支持

信息系统（软件）是 PIVAS 的大脑和控制中枢，PIVAS 的稳定运营离不开信息系统的支持。《指南》规定，建设 PIVAS 信息系统时要按照《全国医院信息化建设标准与规范》的要求，实现与 HIS 系统信息以及医师、护士工作站信息交互传递与合理处置。所以，根据 PIVAS 的基本工作流程，选择 PIVAS 信息系统时应具备处方审核（含合理用药数据库）、批次安排、标签设计与打印、成品输液扫描、退药等基本模块或基础功能。同时还应积极开发新模块，拓展新功能，如工作量统计、人员绩效核算管理、派班和考勤管理、药品和处方数据管理、兼容各类智能化设备等，满足部分 PIVAS 个性化需求。总的来说，一个适宜的 PIVAS 信息系统应该具备与医院 HIS/LIS/PACS 系统兼容性好、数据传输快、运行稳定的特点，能进行信息整合、业务协同和互联互通。通过扫描输液标签上的二维码，记录相应节点信息，实现从用药处方开具到处方审核，从加药调配到成品扫描配送、从护士执行医嘱到患者用药在内的多个信息交互闭环，保证静脉用药成品的可控性和可追溯性。

2.3　24 h 儿科 PIVAS 工作流程设计与管理

2.3.1　临时医嘱审核管理　为确保儿童静脉用药安全，我院 PIVAS 医嘱审核由专职药师负责，工作日 8：00 ～ 18：00 由临床药学咨询室的临床药师与 PIVAS 的审方药师进行双重审核，工作日 18：00 ～次日 8：00 和节假日的医嘱由 PIVAS 审方药师审核。目前我院的医嘱审核采用合理用药辅助信息系统（软件）进行初筛，有疑问的医嘱则交由审方药师判断和确认。我院临床药师团队经过几年的不懈努力，独立设计和建立了两个基于儿科药品属性和儿童疾病特点的合理用药知识库及规则库 [3]，并将其作为核心数据库嵌入合理用药信息系统，收到了很好的效果。

2.3.2　24 h 调配批次设计　我院将全天调配任务按时间段划分为 14 个调配批次，2 个打包批次。临时医嘱（含当日长期医嘱）的调配批次和送达时间见表 2。临时医嘱批次安排的总体原则是优先调配紧急用药，保证患者序贯治疗不中断和成品输液不积压。一般安排有经验的 PIVAS 药师开展批次安排工作，要综合考虑患者的所有静脉用药情况，根据医嘱信息、药物性质、输液速度和输液时间合理安排新开临时医嘱的调配批次。尽量安排新开临时医嘱随最近的批次调配和运送，若当前批次安排的药品已能满足患者的治疗需求，剩下的药品则进入下一个批次调配。长期医嘱则根据医嘱频次对应的执行时间点，确定调配批次和配送时间，见表 3。

2.3.3　临时医嘱摆药、贴签与配置管理　长期医嘱按规定时间提前摆药，临时医嘱按批次顺序进行即时摆药。我院实行分类摆药、定位存放和批次间的色标管理，不仅实现了药品按批次、按种类集中摆放，批

表 2　临时医嘱的调配批次和配送时间安排

Tab 2　Dispensing batches and delivery schedule of temporary medical orders

医嘱新开时间	批次	调配时间	送达时间	医嘱新开时间	批次	调配时间	送达时间
6：30 之前	1^+	6：50 ～ 7：45	8：00 ～ 8：20	17：31 ～ 19：30	7	19：00 ～ 20：00	20：30 ～ 20：50
6：31 ～ 7：30	1	7：50 ～ 8：45	9：00 ～ 9：20	19：31 ～ 21：30	8	21：15 ～ 22：30	22：45 ～ 23：00
7：31 ～ 9：30	2	9：00 ～ 10：15	10：30 ～ 10：50	21：31 ～ 23：59	9	0：00 ～次日 0：30	0：45 ～ 1：00
9：31 ～ 11：30	3	10：30 ～ 11：45	12：00 ～ 12：20	0：00 ～ 2：00	10	2：00 ～ 2：30	2：45 ～ 3：00
11：31 ～ 13：00	4	13：00 ～ 14：15	14：30 ～ 14：50	2：01 ～ 4：00	11	4：00 ～ 4：30	4：45 － 5：00
13：01 ～ 15：00	5	14：30 ～ 15：45	16：00 ～ 16：15	4：01 － 6：30	12	6：30 ～ 7：00	7：15 ～ 7：30
15：01 ～ 16：30	6	16：00 ～ 17：15	17：30 ～ 17：45	术前（0.5 ～ 1 h）抗菌药物	13	打包送手术室	20：30 ～ 20：50
16：31 ～ 17：30	6^+	17：20 ～ 17：50	18：00 ～ 18：15	术前 / 术后 / 打包 /ST	0	打包送病区	随当前批次

表 3　长期医嘱频次和对应调配批次

Tab 3　Frequency of long-term medical orders and corresponding deployment batches

频次	执行时间	对应调配批次
QD10	10：00	1，2，3
BID	9：00-15：00	1-4，2-5，3-6
Q12H	9：00-21：00	1-7，2-8，3-9
Q8H	8：30-16：00-23：30	1^+-4-8，2-5-9
Q6H	9：00-15：00-21：00-3：00	1^+-4-7-10

次间易于区分，还方便退药的查找。除静脉滴注外，静脉注射和微电脑泵入也是儿童静脉用药的主要给药方式，两者占比≥ 50%。另外，儿童血液肿瘤患者多，很多化疗药品采取脊髓腔内注射和肌内注射给药，为保证这类患者的用药安全，我院 PIVAS 也接收了这类非静脉用危害药品的调配工作。而这几类药品的调配，需要使用注射器来装载、运输和使用。所以，我们根据输液袋尺寸和注射器周径，因地制宜地开发设计了静脉滴注类标签（大标签，尺寸 7.5 cm×7.5 cm）和静脉推注类标签（小标签，尺寸 5 cm×7.5 cm）两种输液标签。大标签粘贴于大输液袋上，使用大输液袋直接加药冲配；小标签粘贴于注射器筒周，不遮挡注射器刻度，采用注射器进行加药配置，配置完成后使用制订的专用无菌帽密封注射器乳头，可有效防止因注射器活塞移动导致漏液或药液污染，便于成品输液的保护、扫描与运输。需要避光且采用微电脑泵入的药物如硝普钠、核黄素注射液等，则使用避光注射器进行加药配置。同时，我们设计了儿童特殊剂量核对单，建立儿童静脉药物使用信息表，统计儿童常用药物的溶媒、标准剂量、允许使用的最大和最小剂量、终浓度、输液速度、稳定性、特殊说明等信息，供全体调配人员培训并考核掌握 [4]。另外，各批次的药品进入调配间后，不论长期医嘱或临时医嘱，均按药品类别和品种精确分配到指定的操作台，实现了按药品品种进行集中调配，提高工作效率，减少调配差错。调配同一批次药品时，将稳定性差、需避光保存等药品安排在该批次的最后时间段进行加药调配。

2.3.4　调配间的合理交替安排　对于一家 24 h 不间断工作的 PIVAS 来说，各调配间的工作时间段安排也很重要。我院第 1^+ 批次的临时和长期医嘱主要为抗菌药物，安排在抗感染药物调配间调配；第 1 ～ 4 批次的临时和长期医嘱药品品类多、数量大，根据药物性质分别安排在普通药品和静脉营养液调配间、抗感染药物调配间、危害药品调配间进行调配；第 5 批次及之后批次的药品品类少、数量少，则安排在临时药品调配间进行调配，在第 2 日的第 1^+ 批次药品调配之前（7：00）关闭临时调配间及配套设备。PIVAS 各调配间的合理交替安排，不但能实现全时段、同质化地为临床提供高质量的静脉输液，还能充分降低 PIVAS 能耗和运行成本。

2.4　24 h 人力资源统筹安排

为临床提供 24 h 静脉用药调配工作，对 PIVAS 的人力资源调配和管理提出了更高的要求。我院 PIVAS 从建立至今，一直实行药师和护师相结合的工作模式。药师主要负责医嘱审核、批次安排、摆药贴签、成品复核与扫描、退药处理与其他药学服务工作，护师主要负责仓内药品调配及环境质量监测等工作。药师、护师两种不同职业的精细分工与精诚合作，能发挥各自专业领域的独特优势，提高工作效率和质量。我院 PIVAS 共有药师 22 名（含专职管理岗 1 名、专职库房岗 1 名），护师 24 名（含专职管理岗 1 名）。目前 PIVAS 日均调配静脉用药 4000 ～ 4500 组，在保证全员法定休息时间的基础上，根据我院工作时间段和工作量的不同采取全弹性排班制。24 h PIVAS 所有调配批次的在岗药师和护师人数见表 4。

3　讨论

通过静脉输液，药物可避开吸收环节直接进入血液循环，在较短时间内发挥作用，并可维持治疗所需的稳定药物浓度 [5]。因此，危重急症患者、大部分外科手术患者、消化功能障碍患者以及儿童群体，特别是低年龄段儿童通常采取静脉给药治疗。《2016 年儿童用药安全调查报告白皮书》显示，我

表 4　24 h PIVAS 所有调配批次的在岗药师和护师人数表

Tab 4　Number of on-the-job pharmacists and nurses for all dispensing batches of PIVAS in 24 h

批次	调配时间	药师在岗人数	护师在岗人数	批次	调配时间	药师在岗人数	护师在岗人数
1+	6：50 ～ 7：45	2	16	6+	17：20 ～ 17：50	4	2
1	7：50 ～ 8：45	8	16	7	19：00 ～ 20：00	2	2
2	9：00 ～ 10：15	8	16	8	21：15 ～ 22：30	1	1
3	10：30 ～ 11：45	10	16	9	0：00 ～次日 0：30	1	1
4	13：00 ～ 14：15	5	14	10	2：00 ～ 2：30	1	1
5	14：30 ～ 15：45	10	4	11	4：00 ～ 4：30	1	1
6	16：00 ～ 17：15	10	4	12	6：30 ～ 7：00	1	1

国儿童不合理用药比率高达 12% ～ 32%，儿童用药不良反应发生率约为 12.9%，新生儿用药不良反应发生率更是高达 24.4%，分别是成人的 2 倍和 4 倍。所以，如何降低患儿静脉输液中不良反应发生率，提高静脉输液治疗的安全性和合理性，成为儿科临床面临的重要课题。PIVAS 的建立，在原有诊疗流程中新增了临床药师对静脉用药医嘱的合理性审核，优化了静脉药物组方的合理配比，增加了制药级别洁净度的调配间（万级）和操作台（百级），新建了多项规范的标准操作规程和严格的多重复核程序，各步骤层层把关，保证了 PIVAS 每一组静脉用药（输液）的高质量。同时，PIVAS 的建立，实现了药品和医用耗材集中管理、合理共享，整合优化了原有分散在各病区的人力、物力和财力资源，从根本上解决了危害药品调配的职业防护难题。

据初步统计，在国内已建立 PIVAS 的医疗机构中，70% 以上的医疗机构尚未全面开展儿科患者的静脉用药调配服务。已开展儿科患者静脉用药调配服务的，其 PIVAS 也只是简单套用成人模式运行和管理，不符合儿童疾病变化的特点和儿科静脉用药的实际需求，无法有效保障儿科临床静脉用药的安全 [6]。笔者认为，儿科静脉用药集中调配的门槛和标准相比成人更为严格，实际开展起来存在较大难度和局限性，突出表现在四个方面：① 儿科静脉用药医嘱审核的难度比成人大；② 儿科患者长期医嘱变化快；③ 儿科患者临时医嘱多；④ 儿科医嘱加药混合调配操作的难度远大于成人。这些因素决定了综合医院要开展儿科静脉用药集中调配，需要付出比开展成人静脉用药集中调配更多的成本与更大的努力。如果要开展 24 h 静脉用药集中调配服务，还需要克服场地、人力、流程、配送等诸多困难。

目前，国内绝大部分的 PIVAS 只接收了次日长期医嘱的调配任务，要做到 24 h 为临床提供静脉用药集中调配服务，建议：首先，要做好建设项目设计和规划，新增临时调配间及配套净化设备，选择一套适宜的 PIVAS 信息（软件）系统；其次，要着力解决 PIVAS 工作流程如临时医嘱审核、调配批次安排等顶层设计问题 [7]；再次，前期要做好 24 h 内不同时间段的工作量调查统计，妥善解决不同时间段的人力资源安排问题，做好人员弹性派班规划；最后，要根据 PIVAS 运行过程中发现的新问题，研究和分析原因，充分利用好 PDCA 循环 [8]、品管圈 [9]、精益管理法 [10] 等工具，制订科学、有效的对策，妥善解决各类实际运营问题。期望本文能为各医疗机构 PIVAS 大力开展儿科静脉用药集中调配工作和保护儿童群体静脉用药安全提供参考。

参考文献

[1] 国家卫生健康委员会 . 静脉用药调配中心建设与管理指南（试行）[EB/OL]. 2021-12-20. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202112/6fc8ae699c1f4fefb9e80a80d4f4fa55. shtml.

[2] 王婷，曹靖，罗芳梅，等 . JCI 标准下我院静脉药物调配中心 24 小时工作模式探讨 [J]. 儿科药学杂志，2016，22（7）：41-43.

[3] 蒋志平，彭骞，何莉梅，等 . 儿科药品知识库和合理用药规则库的建立与探讨 [J]. 中南药学，2020，18（6）：1076-1080.

[4] 王灿，符瑞玲，陈志敏 . 儿童医疗机构静脉用药集中调配用药安全分析 [J]. 继续医学教育，2016，30（10）：147-148.

[5] 儿童静脉输液治疗临床实践循证指南工作组 . 儿童静脉输液治疗临床实践循证指南 [J]. 中国循证儿科杂志，2021，16（1）：1-42.

[6] 卢智 . 医疗机构静脉用药集中调配模式的建设与管理实践研究 [D]. 广州：南方医科大学，2013.

[7] 罗芳梅，田静，王婷，等 . 静脉用药调配中心 24 小时全医嘱下临时医嘱的运行模式 [J]. 儿科药学杂志，2020，26（7）：43-46.

[8] 蒋志平，彭骞，汤尘尘，等 . PDCA 循环管理法在降低住院病区静脉输液退药率中的应用 [J]. 儿科药学杂志，2015，21（2）：48-50.

[9] 王方杰，蒋志平，彭骞，等 . 品管圈在儿童医院静脉用药调配中心质量持续改进中的实践与成效 [J]. 中南药学，2016，14（2）：213-217.

[10] 罗芳梅，田静，刘辉，等 . 10S 精益管理提升静脉用药调配中心服务质量的实践与应用 [J]. 儿科药学杂志，2021，21（11）：48-51.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-03-21）

临床药师在临床

1 例进展性脑梗死患者抗血小板药物个体化用药方案分析

阳巍，黄海花，范秀珍（邵阳学院附属第一医院临床药学中心，湖南　邵阳　422000）

摘要：1 例 45 岁男性患者，因“言语含糊、右侧肢体力弱 11 h 余”入院。入院后诊断为急性脑梗死、高血压 3 级（很高危组）。入院后予以双联抗血小板、降脂及改善微循环等治疗。入院第 2 日下午出现胸闷、气促，言语含糊症状较前加重，考虑卒中进展。临床药师评估治疗方案后，积极寻找循证学依据，与医师一起制订个体化用药方案，经积极治疗及加强药学监护后，该患者言语含糊、肢体肌力症状得到明显改善，且无相关并发症发生，14 d 后患者好转予以出院，出院后为期 3 个月随访未发现脑梗死复发及出血事件发生。

关键词：进展性脑梗死；阿司匹林；氯吡格雷；替罗非班；替格瑞洛；药物基因组学

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1950-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.043

进展性脑梗死（progressing stroke，PIS）是指脑梗死引发的轻微神经功能损伤，并在 2 ～ 3 d 内出现神经功能缺损症状阶梯式或渐进式加重[1]。进展性脑梗死发病率为 9.8% ～ 37%，且具有较高致残性和致死率[2]。目前临床治疗进展性脑梗死缺乏特效手段，虽然抗血小板药物是临床治疗脑梗死及预防其进展或复发的基石，但口服抗血小板药物无法完全覆盖血栓形成的全部环节，特别是对阿司匹林或氯吡格雷抵抗者而言，合理选取抗血小板药物对预防脑梗死进展及复发非常关键。本研究对 1 例进展性脑梗死患者抗血小板药物治疗过程进行分析和探讨，旨在为临床治疗进展性脑梗死提供参考。

1　病例资料

患者，男性，45 岁，因“言语含糊、右侧肢体力弱 11 h 余”于 2021 年 3 月 9 日入院。查体：体温 36.7 ℃，脉搏 72 次 • min^{-1}，呼吸 20 次 • min^{-1}，血压 171/86 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。神志清、精神较差、言语含糊，右侧肢体肌力 4 级，闭目难立征阳性，右侧指鼻试验睁眼可疑阳性，走一字步不稳，饮水试验阴性。美国国立卫生研究院卒中量表（NIHSS）评分 2 分。辅助检查：急诊头颅 CT 未异常，右肺中叶纤维灶。头颅磁共振检查示：左侧基底节区急性期脑梗死，轻微脑白质变性；右侧上颌窦黏膜下囊肿；右侧大脑前动脉 A1 段无异常；右侧胚胎型大脑后动脉；左侧优势型椎动脉。入院诊断：① 急性脑梗死；② 高血压 3 级（很高危组）。

2　治疗过程

患者入院诊断为急性脑梗死，结合患者病情予以阿司匹林肠溶片 100 mg po qd 联合氯吡格雷片 75 mg po qd 抗血小板聚集，同时予以降脂、改善微循环及脑功能代谢等常规治疗。入院第 2 日 16：25 患者诉出现胸闷、气促，言语含糊症状较前加重，考虑卒中进展，暂停使用阿司匹林、氯吡格雷，改用盐酸替罗非班氯化钠注射液持续泵入，并行阿司匹林、氯吡格雷相关药物基因组学检测。入院第 10 日，基因检测结果回报：阿司匹林 *GP1BA*、*PTGS1*、*LTC4S* 检测结果提示抵抗风险低；氯吡格雷 *CYP2C19* 检测结果提示中间代谢，血小板抑制作用降低，残余血小板聚集率较高，心血管不良事件风险较高。临床药师根据基因检测结果建议药物改为阿司匹林肠溶片 100 mg po qd 联合替格瑞洛 90 mg po bid。经过 14 d 治疗，患者言语含糊显著改善、未有明显左侧肢体活动障碍，病情好转出院。出院后继续予以阿司匹林肠溶片 100 mg po qd 联合替格瑞洛片 90 mg po qd 治疗，共用 21 d（加上住院用药时间），随后改为阿司匹林 100 mg po qd 长期抗血小板。

3　抗血小板药物治疗方案分析及药学监护

基金项目：湖南省医学会医学科研基金——临床药学项目（No. HMA202001017）。

作者简介：阳巍，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：36828972@qq.com

根据患者临床症状和辅助检查结果，急性脑梗死诊断明确，患者既往未有风湿性心脏病史、心房纤颤等心源性疾病，且根据 TOAST 分型，需考虑为大动脉粥样硬化型。国内外指南[3-4]推荐，对未接受溶栓治疗的急性脑梗死患者，应尽早予以抗血小板聚集药物治疗，有表 1 中适应证的可予以阿司匹林联合氯吡格雷治疗。临床药师认为患者为急性脑梗死患者，NIHSS 评分 2 分，且未接受溶栓治疗，予以阿司匹林、氯吡格雷联合治疗合理。同时临床药师为患者制订抗血小板药物治疗监护计划：患者诊断为急性脑梗死，具有诱发应激性溃疡的应激源，同时有抗血小板治疗的危险因素，因此临床药师告知患者服用双联抗血小板治疗的益处和风险，并密切监测患者是否有皮肤瘀斑、牙龈出血和胃肠道出血等不良反应。

表 1　非心源性脑梗死患者短期双联抗血小板药物指征

患者类型	2018 年国内指南[3]推荐	2021AHA/ASA 指南[4]推荐	长期治疗
发病在 24 h 内，具有脑卒中高复发风险（ABCD2 评分≥ 4 分）的急性非心源性短暂性脑缺血发作或未接受静脉溶栓的轻型缺血性脑卒中患者（NIHSS 评分≤ 3 分）	阿司匹林联合氯吡格雷 21 d（Ⅰ，A）	阿司匹林联合氯吡格雷 21 ～ 90 d（Ⅱ b，C）	此后单用阿司匹林或氯吡格雷作为长期二级预防（Ⅰ，A）
发病 30 d 内，有症状性颅内动脉严重狭窄（狭窄率 70% ～ 99%）	阿司匹林联合氯吡格雷 21 d（Ⅱ，B）	阿司匹林联合氯吡格雷 90 d（Ⅱ b，C）	此后单用阿司匹林或氯吡格雷作为长期二级预防（Ⅰ，A）
支架置入术	术前：负荷剂量阿司匹林 300 mg ＋氯吡格雷 300 mg； 术后：阿司匹林＋氯吡格雷至少 1 个月（裸支架）		此后单用阿司匹林或氯吡格雷作为长期二级预防

患者入院第 2 日下午，出现胸闷、气促，言语含糊症状较前加重，考虑为进展性脑梗死。虽然抗血小板治疗是目前临床治疗脑梗死的基本策略，然而有部分患者在使用抗血小板药物后仍可见病情进展或复发。上述现象需考虑两方面，一方面是现有抗血小板药物，如阿司匹林及噻吩吡啶类（氯吡格雷）未完全作用于血小板聚集的所有信号通路[5]；另一方面，患者对阿司匹林或氯吡格雷存在药物抵抗。而血小板糖蛋白（glycoprotein，GP）Ⅱb/Ⅲa 受体是血小板聚集及血栓形成的最终通路，其通过占据受体位点，使之不能与黏附蛋白结合，从而特异且快速抑制血小板聚集，其中替罗非班是国内应用最广泛的 GPⅡb/Ⅲa 受体拮抗剂[6]。《替罗非班在动脉粥样硬化性脑血管疾病中临床应用专家共识》[5]建议，对于动脉闭塞型的进展性缺血性脑卒中患者，替罗非班可有效改善其神经功能状态。该患者使用阿司匹林、氯吡格雷抗血小板治疗，仍发生进展性卒中，考虑可能存在阿司匹林、氯吡格雷抵抗，故临床药师建议暂停硫酸氢氯吡格雷片、阿司匹林肠溶片，加用盐酸替罗非班氯化钠注射液持续泵入，并行阿司匹林、氯吡格雷药物基因组学检测，临床医师采纳。

入院 9 d 以来患者神经功能受损得到改善，疾病未再进展。入院第 10 日，药物基因组学检测结果回报：阿司匹林 *GP1BA*、*PTGS1*、*LTC4S* 检测结果提示抵抗风险低；氯吡格雷 *CYP2C19* 检测结果提示中间代谢，血小板抑制作用降低，残余血小板聚集率较高，心血管不良事件风险较高。研究报道提示，替格瑞洛自身具有活性，无需经肝脏代谢即可直接发挥疗效，同时该药受基因多态性的影响较小，其代谢产物活性与替格瑞洛相近，使其临床疗效进一步增强[7]。周丽娟等[8]研究发现，对氯吡格雷抵抗患者而言，替格瑞洛能明显降低血小板聚集率。Wang 等[9]研究发现，予氯吡格雷 75 mg • d^{-1}（负荷剂量 300 mg）联合阿司匹林 100 mg • d^{-1}（负荷剂量 100 ～ 300 mg）治疗 21 d 后改为氯吡格雷 75 mg • d^{-1}（60 d）相比，替格瑞洛 90 mg bid（负荷剂量 180 mg）联合阿司匹林 100 mg • d^{-1}（负荷剂量 100 ～ 300 mg）21 d 后改为替格瑞洛 90 mg bid（60 d），可显著降低非致残性缺血性脑血管事件患者的血小板高反应性（*RR* 0.4，95%*CI* 0.28 ～ 0.56，$P < 0.001$）。多项高质量临床研究均证实，替格瑞洛联合阿司匹林能减少急性缺血性脑卒中患者 90 d 内卒中再发及死亡风险[10-14]。《2021 AHA/ASA 指南：卒中和短暂性脑缺血发作患者的卒中预防》[4]推荐，24 h 内发生小卒中或短暂性脑缺血发作或合并同侧颅内大动脉有＞30% 的狭窄的患者，阿司匹林联合替格瑞洛 30 d

可降低卒中复发风险。临床药师根据患者药物基因组学检测结果及相关循证学依据，并鉴于双抗30 d会增加患者出血风险，建议抗血小板治疗方案改为阿司匹林肠溶片 100 mg po qd联合替格瑞洛 90 mg po bid，继续服用 10 d后改为阿司匹林肠溶片 100 mg po qd长期二级预防治疗，临床医师采纳。后临床药师对患者进行 3 个月随访，未发现有脑梗死复发及出血事件。

4　小结

国内外指南推荐，发病在 24 h内的轻型缺血性脑卒中患者（NIHSS评分≤ 3 分），可予阿司匹林与氯吡格雷联合治疗，疗程 21 ～ 90 d，后改为阿司匹林或氯吡格雷进行二级预防。小动脉硬化进展性脑梗死患者可选用静脉输注替罗非班，但其疗程仍需进一步探讨。对于氯吡格雷中代谢或慢代谢者，替格瑞洛可作为替代用药。临床药师通过分析阿司匹林、氯吡格雷使用指征、双抗后仍发生进展性脑梗死的原因、结合循证学依据及药物基因组学，协助医师制订个体化治疗方案，并做好药学监护，有助于实现患者个体化用药，提高其用药合理性及安全性。

参考文献

[1] Hart RG，Pearce LA，Bakheet MF，et al. Predictors of stroke recurrence in patients with recent lacunar stroke and response to interventions according to risk status：secondary prevention of small subcortical strokes trial [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis，2014，23（4）：618-624.

[2] Wang Yl，Wang X，Zhou X，et al. Temporal expression of apelin/apelin receptor in ischemic stroke and its therapeutic potential [J]. Front Mol Neurosci，2017，10（1）：1062-1068.

[3] 彭斌，吴波 . 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志，2018，51（9）：666-682.

[4] Kleindorfer DO，Towfighi A，Chaturvedi S，et al. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients with Stroke and Transient Ischemic Attack：a Guideline from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. Stroke，2021，52（7）：e364-e467.

[5] 中国卒中学会，中国卒中学会神经介入分会，中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学组 . 替罗非班在动脉粥样硬化性脑血管疾病中的临床应用专家共识 [J]. 中国卒中杂志，2019，14（10）：1034-1044.

[6] 田雨，胡晓 . 替罗非班在急性脑梗死中应用的研究进展 [J]. 中国医药，2021，16（5）：763-767.

[7] 吴琼，张忠玲 . P2Y12 受体拮抗剂在缺血性脑卒中及短暂性脑缺血发作防治中的应用 [J]. 中国临床神经科学，2018，26（1）：70-73.

[8] 周丽娟，曹巍，詹峰，等 . 基因导向的氯吡格雷和替格瑞洛对急性冠脉综合征患者 PCI 术后炎症因子、血小板聚集和预后的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（4）：383-389.

[9] Wang YL，Chen WQ，Li Y，et al. Ticagrelor plus aspirin versus clopidogrel plus aspirin for platelet reactivity in patients with minor stroke or transient ischaemic attack：open label，blinded endpoint，randomised controlled phase Ⅱ trial [J]. BMJ，2019，365：12211.

[10] Kaushik A，Deora S，Choudhary R. Ticagrelor and aspirin or aspirin alone in acute ischemic stroke or TIA [J]. N Engl J Med，2020，383（17）：1692-1693.

[11] Amarenco P，Denison H，Evans SR，et al. Ticagrelor added to aspirin in acute nonsevere ischemic stroke or transient ischemic attack of atherosclerotic origin [J]. Stroke，2020，51（12）：3504-3513.

[12] Amarenco P，Denison H，Evans SR，et al. Ticagrelor added to aspirin in acute ischemic stroke or transient ischemic attack in prevention of disabling stroke：a randomized clinical trial [J]. JAMA Neurol，2020，78（2）：1-9.

[13] Amarenco P，Albers GW，Denison H，et al. Efficacy and safety of ticagrelor versus aspirin in acute stroke or transient ischaemic attack of atherosclerotic origin：a subgroup analysis of SOCRATES，a randomised，double-blind，controlled trial [J]. Lancet Neurol，2017，16（4）：301-310.

[14] Johnston SC，Amarenco P，Denison H，et al. Ticagrelor and aspirin or aspirin alone in acute ischemic stroke or TIA [J]. N Engl J Med，2020，383（3）：207-217.

（收稿日期：2021-12-29；修回日期：2022-03-11）

药品不良反应

卡培他滨致皮肤色素沉着伴黑素细胞痣 1 例并文献复习

管玉瑶[1]，邹文[2*]（1. 山东省立第三医院药学部，济南　250031；2.山东大学第二医院，济南　250033）

关键词：卡培他滨；皮肤色素沉着；黑素细胞痣；用药教育
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1953-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.044

药物诱导的色素沉着占所有获得性色素沉着病例的 10% ～ 20%[1-2]，常见的药物包括细胞毒性药物、镇痛药、抗心律失常药、抗凝血药、抗癫痫药、抗疟药、抗菌药物、抗逆转录病毒药物、前列腺素类似物和精神药物等。细胞毒性药物特别是烷化剂和抗肿瘤、抗菌药物导致的色素沉着常发生皮肤、指（趾）甲及黏膜色素改变[3-9]。

卡培他滨是口服化疗药物，在局部晚期或转移性乳腺癌、结直肠癌的治疗中有重要地位，因口服制剂应用方便，临床应用日益增多，与之相关的皮肤不良反应发生比例也逐渐增加。卡培他滨导致皮肤色素沉着的发生率约为 3%[10]，而黑素细胞痣是其说明书中未记载的新的不良反应。现报道 1 例卡培他滨致皮肤色素沉着伴黑素细胞痣的病例，并查阅相关文献，以加强临床对此类不良反应的重视。

1　病例概况

患者，男，58 岁，因“确诊乙状结肠癌伴多发转移 1 月余、化疗并靶向治疗 2 周期后”于 2020 年 12 月 24 日入院。入院诊断：乙状结肠癌（中分化腺癌Ⅳ期）[① 多发腹腔淋巴结转移；② 弥漫性肝转移；③ 肺转移]、高血压病 2 级（高危）。入院后给予贝伐珠单抗注射液、注射用奥沙利铂、卡培他滨片（齐鲁制药有限公司，规格：0.5 g/ 片；批号：0J1203DE3、0J1093DE3）、盐酸苯海拉明注射液、盐酸甲氧氯普胺注射液、维生素 B_6 注射液、盐酸帕洛诺司琼注射液等对症支持治疗，卡培他滨片早 1.5 g、晚 2.0 g，治疗 2 周后停药 1 周，3 周为一个疗程。

患者入院完善相关检查，体格检查：体温 36.4 ℃，脉搏 85 次 • min^{-1}，呼吸 16 次 • min^{-1}，血压 123/85 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。手脚皮肤色素沉着，伴有多发棕黑色斑点。斑点经皮肤镜检查显示为平行脊型，为黑色素细胞痣。心律齐，各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。辅助检查：白细胞计数 6.71×10^{9} • L^{-1}，中性粒细胞百分比 61.3%，淋巴细胞百分比 27.6%，红细胞计数 3.4×10^{12} • L^{-1}，血小板计数 13×10^{9} • L^{-1}，D- 二聚体 641.00 ng • mL^{-1}，血钾 4.75 mmol • L^{-1}，血钠 141 mmol • L^{-1}，血氯 107 mmol • L^{-1}，丙氨酸氨基转移酶 30 U • L^{-1}，天冬氨酸氨基转移酶 47 U • L^{-1}，谷氨酰转肽酶 173 U • L^{-1}，碱性磷脂酶 145 U • L^{-1}，总胆红素 24.8 μmol • L^{-1}，直接胆红素 10.7 μmol • L^{-1}，糖类抗原 72-4 275.00 U • mL^{-1}，降钙素原 0.076 ng • mL^{-1}，糖类抗原 19-9 14 992.00 U • mL^{-1}，癌胚抗原 2101.00 ng • mL^{-1}，粪便常规＋隐血示隐血实验阳性。胸腹 CT 示病情较前减轻。

患者 2021 年 1 月 17 日、2 月 6 日行第 4、5 周期该方案化疗，皮肤色素沉着以及黑色素细胞痣均未减轻消退。因复查肿瘤标志物和胸腹 CT 考虑疾病进展，2 月 27 日以后调整方案为伊立替康、雷替曲塞化疗联合贝伐珠单抗靶向治疗，未再使用卡培他滨。3 月 19 日入院时皮肤色素沉着变浅，5 月药师电话随访，患者皮肤色素沉着以及黑色素细胞痣进一步变浅但仍未消失。8 月药师电话随访，患者皮肤色素沉着以及黑色素细胞痣已消退。

2　国内外文献分析

检索发现，国外有卡培他滨致皮肤色素沉着伴黑色素细胞痣的报道 5 例（见表 1）[11-14]，潜伏期最短 3 d，最长达 9 周，消退时间 8 d 到 6 个月。年龄分布 37 ～ 58 岁，均为女性。国内未有相关报道。

基金项目：山东省医药卫生科技发展计划项目（No.2017WS473）；山东省中医药科技发展计划项目（No.2017-284）；山东省医学会 - 临床科研专项资金项目（No.YXH2019ZX016）。
作者简介：管玉瑶，女，博士，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：guanxiaoyao0815@163.com　*通信作者：邹文，女，硕士，主管药师，主要从事抗肿瘤临床药学工作，email：zouzougz@126.com

表 1　卡培他滨致色素沉着伴黑素细胞痣 5 例临床资料

文献	性别	年龄 / 岁	诊断	用药剂量	ADR 发生时间	症状	采取措施	预后	再暴露
[9]	女	58	转移性乳腺癌	2500 mg/（m^2•d）	9 周	面部、手、手掌、脚底和舌头散在的黑素细胞痣（1 ～ 5 mm）	未说明停药，皮肤镜检查，随访 18 个月	6 个月后自行消退	未说明
[10]	女	41	卵巢癌	未说明	2 周	手掌、脚底、口腔黏膜色素沉着，舌色素沉着伴黑素细胞痣	未说明	8 ～ 10 d 后自行消退	再次使用，激发 ADR
[11]	女	50	胃癌	未说明	2 周	双侧足底黑素细胞痣	皮肤镜检查	5 个月后自行消退	未说明
[11]	女	40	乳腺癌	未说明	3 d	足底黑素细胞痣	皮肤镜检查	未说明	未说明
[12]	女	37	复发性乳腺癌	2500 mg/（m^2•d）	6 周	足底黑素细胞痣	皮肤镜检查	未说明	未说明

3　讨论

根据国家药品不良反应监测中心 2005 版《药品不良反应 / 事件报告表》中药品不良反应 / 事件（ADR/AE）原则分析项进行关联性分析：

① 患者 2020 年 11 月 13 日开始使用卡培他滨治疗，全身皮肤完好；治疗 2 周期后出现手足皮肤色素沉着伴黑素细胞痣，用药与皮肤损害的出现有合理的时间关系。② 卡培他滨说明书中有皮肤色素沉着的不良反应，该患者出现的皮肤色素沉着的不良反应是已知的，而黑色素细胞痣是说明书中未记载的不良反应。③ 该患者 2021 年 2 月 20 日停用卡培他滨片，3 月 19 日入院时皮肤色素沉着及黑素细胞痣变浅，符合停药后反应减轻。④ 患者 2021 年 1 月 17 日第 4 周期、2 月 6 日第 5 周期应用卡培他滨片前后均存在皮肤色素沉着和黑素细胞痣，不能判断是否是再次使用卡培他滨后激发。⑤ 患者出现皮肤损害的症状不能用原发疾病乙状结肠癌以及转移本身或其他短暂使用的药品解释（其他药品说明书中未有相关不良反应的报道）。故皮肤色素沉着关联性评价结果为很可能，黑色素细胞痣评价结果为可能。

皮肤不良反应是卡培他滨常见的不良反应，目前机制不明确。可能通过线粒体功能障碍引起角质细胞凋亡而导致，或与日常活动机械压力引起的小血管局部损伤有关。其他潜在的原因可能与卡培他滨主要通过位于手掌和脚底的汗腺消除有关 [15-16]。有研究认为皮肤色素沉着是独立于手足综合征的单独症状，有不同的作用机制，也有研究认为皮肤色素沉着通常与早期手足综合征有关，可视为 1 级手足综合征的初始症状的一种 [17]。

卡培他滨引起黑素细胞痣的机制尚不明确。可能与表皮损伤后局部生长因子的失调有关 [18]。也可能是因为卡培他滨导致肿瘤特异性淋巴细胞的破坏或功能丧失导致黑素细胞痣的发生 [19]。还有研究报道因为黑素细胞中黑色素瘤生长刺激活性（melanoma growth stimulatory activity，MGSA）基因的异常，导致 MGSA、MGSA 信使 RNA 或 MGSA 蛋白的表达，从而刺激黑色素细胞向正常或非典型痣的分化、生长和发育 [20]。Vena 等 [21] 指出免疫抑制剂、免疫调节剂、化疗药物、靶向药物、胰岛素、甲状腺素等药物可引起爆发性黑素细胞痣，发病机制和临床意义尚不清楚，爆发性黑素细胞痣患者患黑色素瘤的风险尚未被阐明。需要关注激素因素、局部创伤或紫外线 / 阳光对药物刺激黑素细胞和促进痣活性的影响，建议采取光保护措施。为了排除恶性病变的存在，必须定期随访和皮肤镜检查，并对新出现的病变或最近发生变化的病变进行彻底评估。

卡培他滨作为治疗癌症的重要药物，在出现色素沉着和黑素细胞痣不良反应时，权衡利弊，一般不会停用或减少剂量，除非黑素细胞痣有癌变的倾向 [2]。预防卡培他滨诱导色素沉着及黑素细胞痣的方法是尽量减少日晒，采用温水洗浴，使用温性保湿、不添加香料和乙醇、非类固醇类的洗浴和护肤用品；清洁家居和餐具、洗衣时，需戴防水、保护性手套；避免频繁洗手、洗浴；避免接触过冷或过热的物体；避免极端的温度、压力和皮肤的摩擦；穿防护服、戴防护帽以及定期使用防晒霜 [22]。激光治疗将来有可能应用于皮肤色素沉着的治疗，但目前仍需要进一步的评估。

卡培他滨是化疗药物中较常引起皮肤色素沉着的一类药物，其潜伏期长、消退缓慢。目前仍未有有效的治疗手段，可通过减少日晒预防。卡培他滨诱导正常和发育不良的黑素细胞痣的生长，以及小细胞性黑素细胞增生。黑素细胞痣发展成为黑色素瘤的风险不定，对出现黑素细胞痣的患者需要定期检查和加强随访，直至消退。对卡培他滨导致的皮肤不良反应，应引起临床医师重视，在使用过程中应加强对患者的宣教并积极做好防护措施。

参考文献

[1] Nahhas AF，Braunberger TL，Hamzavi IH，et al. An update on drug-induced hyperpigmentation [J]. Am J Clin Dermatol，2019，20（1）：75-96.

[2] Dereure O. Drug-induced skin hyperpigmentation. Epidemiology，diagnosis and treatment [J]. Am J Clin Dermatol，2001，2（4）：253-262.

[3] Singal R，Tunnessen WW，Wiley JM，et al. Discrete hyperpigmentation after chemotherapy [J]. Pediatr Dermatol，1991，8（3）：231-235.

[4] Pinto C，Lorca-Garcia C，Berenguer B，et al. Bleomycin-induced fagellate erythema after venous malformation sclerosis-case report and brief review [J]. Pediatr Dermatol，2018，35：e5-8.

[5] Nguyen AL，Korver JE，Theunissen CC. Longitudinal melanonychia on multiple nails induced by hydroxyurea [J]. BMJ Case Rep，2017，2017：bcr2016218644.

[6] Singh O，Agrawal P，Agarwal A，et al. Imatinib-induced dental hyperhyperpigmentation in chronic myeloid leukemia in adult female [J]. J Assoc Physicians India，2016，64：138.

[7] Bombeccari GP，Garagiola U，Pallotti F，et al. Hyperhyperpigmentation of the hard palate mucosa in a patient with chronic myeloid leukaemia taking imatinib [J]. Maxillofac Plast Reconstr Surg，2017，39：37.

[8] Tullio FD，Mandel VD，Scotti R，et al. Imatinib-induced difuse hyperhyperpigmentation of the oral mucosa，the skin，and the nails in a patient afected by chronic myeloid leukemia：report of a case and review of the literature [J]. Int J Der matol，2018，57：784-790.

[9] 吴秀凤，曹兆流，张文静，等 . 培美曲塞致全身皮肤色素沉着、脱皮 1 例 [J]. 中南药学，2017，15（6）：859-860.

[10] Vázquez-Bayo C，Rodríguez-Bujaldón AL，Jiménez-Puya R，et al. Capecitabine induced hyperpigmentation [J]. Actas Dermosifiliogr，2007，98（7）：491-493.

[11] Villalón G，Martín JM，Pinazo MI，et al. Focal acral hyperpigmentation in a patient undergoing chemotherapy with capecitabine [J]. Clin Dermatol，2009，10（4）：261-263.

[12] Verma P. Capecitabine-induced acral and mucosal hyperpigmentation [J]. Indian J Dermatol Ve，2017，83（5）：583.

[13] Peccerillo F，Riccardo PR，Giannetti L，et al. Capecitabine-induced eruptive acral hyperpigmentation：clinical and dermoscopic evaluation of two cases [J]. Dermatol Ther，2019，32（3）：e12853.

[14] Tognetti L，Fimiani M，Rubegni P. Benign dermoscopic parallel ridge pattern in plantar hyperpigmentation due to capecitabine [J]. Dermatol Pract Concept，2015，5（2）：79-81.

[15] Caprez J，Rahim U，Ansari A，et al. Hyperpigmentation with capecitabine：part of hand-foot syndrome or a separate entity [J]. Cureus，2018，10：e2397.

[16] van Doorn L，Veelenturf S，Binkhorst L，et al. Capecitabine and the risk of fingerprint loss [J]. JAMA Oncol，2017，3：122-123.

[17] Lallas A，Kyrgidis A，Koga H，et al. The BRAAFF checklist：a newdermoscopic algorithm for diagnosing acral melanoma [J]. Br J Dermatol，2015，173：1041-1049.

[18] Halaban R. Growth factors regulating normal and malignant melanocytes [J]. Cancer Treat Res，1991，54：19-40.

[19] Bovenschen HJ，Tjioe M，Vermaat H，el al. Induction of eruptive benign melanocytic naevi by immune suppressive agents，including biologicals [J]. Br J Dermaiol，2006，154：880-884.

[20] Bordoni R，Fine R，Murray D，et al. Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity（MGSA）in the growth of normal melanocytes，nevocytes. and malignant melanocytes [J]. J Cell Biochem，1990，44：207-219.

[21] Vena GA，Fargnoli MC，Cassano N，et al. Drug-induced eruptive melanocytic nevi [J]. Expert Opin Drug Met，2017，13（3）：293-300.

[22] 中国抗癌协会肿瘤护理专业委员会 . 中国癌症症状管理实践指南——皮肤反应 [J]. 护士进修杂志，2019，34（22）：2017-2024.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-08）

帕博利珠单抗致免疫性肝损伤

孙丽丹[1，2]，嵇书霞[3]，张丹[1]，訾晨晨[1]，王慧[1]，张文静[2*]（1. 海军军医大学第三附属医院药剂科，上海 200438；2. 海军军医大学长海医院药学部，上海 200433；3. 上海市宝山区罗店医院药剂科，上海 201908）

关键词：免疫检查点抑制剂；免疫性肝炎；糖皮质激素；帕博利珠单抗

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2022)08-1955-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.045

作者简介：孙丽丹，女，主要从事临床药学工作，email：du_du2022@163.com *通信作者：张文静，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：zhangwenjingahmu@163.com

免疫检查点抑制剂（ICIs）是目前临床肿瘤治疗中应用最多的，其治疗效果给肿瘤患者带来了更多获益。ICIs 在增强细胞免疫抗肿瘤效应的同时，也可能增强机体正常的免疫反应，导致免疫耐受失衡，出现免疫相关不良反应（irAEs）。本文报道使用帕博利珠单抗出现 G3 级免疫性肝损伤的案例，对该药所致的免疫性肝损伤的治疗和预防进行探讨。

1　病例资料

患者女，60 岁，体质量 62 kg，确诊肺腺癌 11 月余，2019 年无明显诱因出现刺激性咳嗽，胸部 CT 可见肺占位，2020 年 1 月 20 日在全麻下行腹腔镜肺癌根治术，术后活检病理示左肺下叶低分化腺癌。术后于 2020 年 3 月 5 日、3 月 26 日、4 月 23 日、5 月 17 日行 4 次 AC 方案（培美曲塞 800 mg ＋卡铂 400 mg）化疗；9 月 14 日评估进展，更换治疗方案：9 月 14 日、10 月 6 日、10 月 26 日、11 月 16 日予紫杉醇（白蛋白结合型）200 mg ＋帕博利珠单抗 200 mg 静脉滴注治疗 4 次，用药后无明显不良反应，用药期间监测各项指标，谷草转氨酶（AST）36.7 U • L^{-1}、谷丙转氨酶（ALT）43.5 U • L^{-1}；患者 11 月 25 日开始感到恶心并伴有干呕症状，随后于 12 月 1 日复查肝功能：AST 747.9 U • L^{-1}↑、ALT 174.3 U • L^{-1}↑，并伴左下腹疼痛，小便颜色加深；12 月 1 日至 12 月 7 日患者自服护肝片（规格：0.35 g/ 片，黑龙江葵花药业，批号：201902004），每次 4 片 tid；为进一步治疗，于 12 月 7 日入院治疗。入院检查肝功能结果示：AST 566 U • L^{-1}↑、ALT 231 U • L^{-1}↑，结合病理检查结果，同时排除病毒性肝炎，综合近期抗肿瘤治疗前后肝功能异常情况和用药情况，推测可能为帕博利珠单抗导致的免疫性肝损伤，遂停用帕博利珠单抗，给予异甘草酸镁注射液、注射用谷胱甘肽进行护肝治疗，逐渐好转；后于 12 月 9 日更改化疗方案，给予紫杉醇（白蛋白结合型）200 mg ＋卡铂 500 mg ＋贝伐珠单抗 400 mg 化疗后，未再出现肝功能损伤，无特殊不适，予以出院。2021 年 1 月 1 日患者再次入院化疗，复查肝功能：AST 44 U • L^{-1}，ALT 77 U • L^{-1}，其血常规、凝血功能、生化八项等未见明显异常。

2　讨论

该患者既往无食物和药物的过敏史，同时排除病毒性肝炎、自身免疫性肝炎、严重脂肪肝和酒精肝病史，在使用紫杉醇（白蛋白结合型）＋帕博利珠单抗治疗前肝功能无异常，首次输注紫杉醇（白蛋白结合型）＋帕博利珠单抗治疗 4 周期后，癌灶密度逐渐变淡，疗效较好。而第 4 次化疗结束一星期左右，患者开始出现恶心干呕等消化道症状，下腹伴疼痛，尿液颜色加深，复查实验室指标异常（AST、ALT 均升高），腹部 CT 未见肝转移，排除其他肝损伤药物服用史。紫杉醇（白蛋白结合型）在临床应用不断增加，其主要不良反应是中性粒细胞减少、血小板减少、感觉神经病变、疲劳、腹泻，严重肝损伤的报告比较少见；结合病史及用药情况，推测该患者肝功能异常可能是帕博利珠单抗导致，予以停用，立即进行保肝治疗，肝功能逐渐好转，后续更改化疗方案后未再出现肝功能损伤，根据药品不良反应 Naranjo 评分量表（见表 1），对紫杉醇（白蛋白结合型）、帕博利珠单抗导致肝损伤的相关性进行评分，结果帕博利珠单抗评分为 5 分（很可能），紫杉醇（白蛋白结合型）评分为 3 分（可能）。患者此次肝功能异常很可能是帕博利珠单抗引起的。

表 1　药品不良反应 Naranjo 评分量表 (分)

相关问题	是	否	未知	肝损伤得分	
				紫杉醇（白蛋白结合型）	帕博利珠单抗
该不良反应之前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1	＋1
该不良反应是否在使用可疑药物后发生	＋2	－1	0	＋2	＋2
该不良反应是否在停药或使用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	0	＋1
该不良反应是否再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	－1	0
是否存在除药物以外的其他原因能单独引起该不良反应	－1	＋2	0	0	0
该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0	0
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0	0
该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0	0
该患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0	0
是否存在任何客观证据证实该不良反应	＋1	0	0	＋1	＋1
总分				3	5

帕博利珠单抗是一种人源化抗程序性死亡受体 1（抗 PD-1）单克隆抗体，是 ICIs 的一种。ICIs 是通过抑制肿瘤细胞的免疫逃逸，增强 T 细胞的免疫应答来消除肿瘤 [1]，常见 irAEs 累及消化道、肺、皮肤、内分泌等器官 [2]。irAEs 肝炎的诊断在临床上无特定的生物标志物，需排除其他慢性肝脏疾病病因 [3]，且 irAEs 肝炎严重病例不多，发生率在 2% ～ 30%，可发生在首次用药后任何时间，常见在 8 ～ 12 周发生，一般表现是肝脏生化指标升高，如 ALT、AST、胆红素（TBIL）等 [4-6]；目前推测肝损伤是由于肝脏中活化的 T 细胞导致 CD4 细胞因子分泌和 CD8 细胞浸润组织引起的 [7]。

对于抗肿瘤药物相关性肝损伤，首要治疗措施是及时停用可疑药物，再根据患者情况选择治疗药物。ICIs 导致的肝损伤在临床治疗上需根据肝损伤不良反应分级水平来判断是否需要使用糖皮质激素以及使用的剂型和剂量 [2]。参考美国国立癌症研究所常见不良反应术语评定标准（NCI-CTCAE）5.0 版 [8] 中肝损伤分级，判断该患者为 G3 级水平的肝损伤；G3 级或 G4 级需考虑永久性停药，治疗上选用静脉糖皮质激素，待肝功能损伤降至 G2 级水平时，可由静脉甲泼尼龙琥珀酸钠转换为口服泼尼松龙，待情况好转，约 4 周逐渐减停 [9]。

本案例患者治疗上并未使用糖皮质激素，而是使用了抗炎药物异甘草酸镁注射液和解毒抗氧化药物注射用谷胱甘肽进行保肝治疗，效果良好；有回顾性研究 [5，10-11] 表明接受 ICIs 治疗致 G3 级肝损伤，接受与未接受糖皮质激素治疗患者的发病时间、胆红素、细胞溶血率及胆汁淤积率没有显著差异。因此，在使用 ICIs 所致的免疫性肝损伤，是否给予糖皮质激素治疗还需进一步论证，且目前并没有相关的临床试验提供治疗 irAEs 相关肝炎所需的糖皮质激素具体剂量，其治疗方案主要来自于其他 irAEs 的治疗方案和自身免疫性肝炎的治疗方案 [12]。

3　小结

ICIs 导致的不良反应，大部分是可逆的，只要及时进行针对性处理，即可恢复正常，但少数严重不良反应有致命危险。本案例是 ICIs 导致的 G3 级免疫性肝损伤，通过基础保肝治疗，得以好转；针对免疫介导的 G3 级肝损伤是否必须使用糖皮质激素进行治疗，还有待更多相关临床数据予以证实。因此早期识别、报告和治疗对 ICIs 不良反应管理十分重要，临床使用在治疗前与用药期间及治疗后，需遵循全程化评估与密切监测 irAEs 原则。

参考文献

[1] Sharma P，Wagner K，Wolchok JD，et al. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit：recent successes and next steps [J]. Nat Rev Cancer，2011，11（11）：805-812.

[2] 周彩存，王洁，王宝成，等 . 中国非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗专家共识（2020 年版）[J]. 中国肺癌杂志，2021，24（4）：217-235.

[3] 王绮夏，蒋翔，连敏，等 . 2015 年欧洲肝病学会临床实践指南：自身免疫性肝炎 [J]. 临床肝胆病杂志，2015，31（12）：2000-2019.

[4] Jennings JJ，Mandaliya R，Nakshabandi A，et al. Hepatotoxicity induced by immune checkpoint inhibitors：a comprehensive review including current and alternative management strategies [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2019，15（3）：231-244.

[5] Romanski NA，Holmstroem RB，Ellebaek E，et al. Characterization of risk factors and efficacy of medical management of immune-related hepatotoxicity in real-world patients with metastatic melanoma treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Eur J Cancer，2020，130：211-218.

[6] 雷晓红，唐颖悦，李静，等 . 肿瘤免疫检查点抑制剂相关的肝毒性 [J]. 中华肝脏病杂志，2020，28（2）：175-178.

[7] Lleo A，Rimassa L，Colombo M. Hepatotoxicity of immune check point inhibitors：approach and management [J]. Dig Liver Dis，2019，51（8）：1074-1078.

[8] Freites-Martinez A，Santana N，Arias-Santiago S，et al. Using the Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE-Version 5.0）to Evaluate the Severity of Adverse Events of Anticancer Therapies [J]. Actas Dermosifiliogr（Engl Ed），2021，112（1）：90-92.

[9] 李玥，王汉萍，郭潇潇，等 . 免疫检查点抑制剂相关消化系统不良反应的临床诊治建议 [J]. 中国肺癌杂志，2019，22（10）：661-665.

[10] De Martin E，Michot JM，Papouin B，et al. Characterization of liver injury induced by cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors [J]. J Hepatol，2018，68（6）：1181-1190.

[11] De Martin E，Michot JM，Champiat S，et al. Reply to：“Immune-related hepatitis with immunotherapy：are corticosteroids always needed?”[J]. J Hepatol，2018，69（2）：550-551.

[12] Reynolds K，Thomas M，Dougan M. Diagnosis and management of hepatitis in patients on checkpoint blockade [J]. Oncologist，2018，23（9）：991-997.

（收稿日期：2021-12-30；修回日期：2022-02-23）

长时间停用奥沙利铂再次使用致过敏性休克 1 例

吴玉佩[1]，张丽娜[2]，尹岳松[3*]（河北省人民医院，1. 药学部；2. 心血管内科；3. 肿瘤科，石家庄　050051）

关键词：奥沙利铂；不良反应；过敏性休克
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1958-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.046

1　病例资料

患者男性，55 岁，否认药物、食物及花粉过敏史，2017 年 10 月主因“间断腹泻、便中带血”于本院就诊，诊断为结肠癌肝转移。于 2018 年 2 月 9 日至 7 月 9 日行 XELOX 方案（奥沙利铂 150 mg ivgtt，d1 ＋卡培他滨片 1.5 g po bid，d1 ～ d14）规律化疗 7 个周期，化疗过程顺利。后因血小板减少，改为卡培他滨（1.5 g po bid，d1 ～ d14）单药化疗 3 个周期；2018 年 10 月复查提示病情进展，10 月 31 日继续行 XELOX 方案化疗，给予注射用奥沙利铂（江苏恒瑞，批号：180807AG，规格：50 mg）150 mg ivgtt，输注奥沙利铂 10 min 后出现胸闷、呼吸困难轻度过敏症状，立即停止输注，吸氧对症处理后不适症状缓解，后未再输注剩余奥沙利铂。

患者为进一步治疗于 2018 年 12 月至 2020 年 7 月先后行卡培他滨单药化疗、卡培他滨化疗联合贝伐珠单抗靶向治疗、伊立替康＋卡培他滨化疗联合贝伐珠单抗靶向治疗，过程均顺利。2020 年 7 月复查病情仍进展，出现肺转移、腹膜后淋巴结转移，考虑既往 XELOX 方案有效，再次更换为贝伐珠单抗靶向治疗联合 XELOX 方案化疗，于 2020 年 7 月 15 日给予贝伐珠单抗 0.4 g ivgtt，7 月 16 日给予注射用奥沙利铂（齐鲁制药，批号：FA1E0001B，规格：50 mg）150 mg ivgtt，考虑既往奥沙利铂化疗发生过轻度过敏，本次化疗前给予苯海拉明 20 mg im、甲泼尼龙 40 mg iv 预防过敏，输注过程顺利，无不适。

2020 年 8 月 4 日为行再程化疗入院，入院体检：体温 37.3 ℃，脉搏 92 次•min^{-1}，呼吸 24 次•min^{-1}，血压 157/91 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。8 月 9 日患者一般状况尚可，先后给予贝伐珠单抗 0.4 g ivgtt、雷替曲塞 4 mg ivgtt，输注过程顺利，无不适，12：37 给予注射用奥沙利铂（齐鲁制药，批号：FA1E0001B，规格：50 mg）150 mg ivgtt，化疗前给予苯海拉明 20 mg im、甲泼尼龙 40 mg iv 预防过敏，奥沙利铂输注 3 min 后出现全身不适、呼吸困难、全身皮肤潮红，伴大汗淋漓、四肢末梢发凉、口唇紫绀、末梢皮肤为灰色，患者意识不清，心电监测示心率、血压、血氧饱和度测不出，查血糖 11 mmol • L^{-1}，考虑为奥沙利铂所致的过敏性休克。立即停止输注奥沙利铂，更换蓄氧面罩吸氧，给予肾上腺素 1 mg iv 升压，尼可刹米 0.375 g iv 兴奋呼吸，甲泼尼龙 40 mg iv、苯海拉明 20 mg im 抗过敏等措施抢救。约 35 min 后患者一般情况好转，意识逐渐恢复，无寒颤发热，全身皮肤转为正常，出汗较前减少，心电监护生命体征相对平稳。患者后续未再使用奥沙利铂，接受雷替曲塞联合贝伐珠单抗抗肿瘤治疗 2 周期，过程均顺利，未发生过敏反应。

2　讨论

近年来，奥沙利铂致过敏反应有增多的趋势，多次使用可增加致敏的风险[1]，文献报道，奥沙利铂首次化疗的过敏反应发生率为 15.2%，而有奥沙利铂化疗史或过敏史的患者过敏反应发生率分别为 31.9% 和 75.0%[2]。奥沙利铂过敏反应的机制尚不清楚，铂类引起的变态反应多为 IgE 介导的经典Ⅰ型变态反应，少数为 IgG/IgM 介导的Ⅱ型超敏反应[3-4]。该患者接受雷替曲塞联合贝伐珠单抗抗肿瘤治疗时，过程均顺利，未发生过敏反应，且两药均未见引起过敏性休克的报道，考虑此次过敏性休克与贝伐珠单抗、雷替曲塞无关。患者前后两次不同程度的过敏反应中使用了不同厂家的奥沙利铂，但辅料均为乳糖，乳糖不耐受者服用后可能会出现消化系统不良反应[5]，但尚无乳糖引起过敏反应的报道，该患者的过敏反应来源于奥沙利铂本身可能性大。按照诺氏药品不良反应因果关系评分量表[6]进行评价，注射用奥沙利铂得分 8 分，见表 1，提示该患者过敏性休克与注射用奥沙利铂为很可能相关。

基金项目：河北省重点研发计划项目（No. 20377769D）。
作者简介：吴玉佩，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：782673591@qq.com　*通信作者：尹岳松，男，硕士，主治医师，主要从事肿瘤学工作，email：yinyuesong1990@163.com

表 1　诺氏药品不良反应评估量表结果 (分)

相关问题	是	否	未知	评分理由
1. 该不良反应此前是否有结论性报告	＋1			有相关报道
2. 该不良反应是否在使用可疑药物后发生	＋2			用药过程中发生
3. 该不良反应是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1			停药、抗过敏后缓解
4. 该不良反应是否再次使用可疑药物后重复出现			0	未再次使用
5. 是否存在其他原因能单独引起该不良反应		＋2		排除贝伐珠单抗、雷替曲塞引起该 ADR
6. 该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现			0	未使用安慰剂
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度			0	未测
8. 该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解			0	未调整剂量
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1		0	曾暴露于奥沙利铂并出现过敏反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1			在奥沙利铂用药过程中出现休克
总分				8

注：总分值≥ 9 分，确定；5 ～ 8 分，很可能；1 ～ 4 分，可能；≤ 0 分，可疑。

本例患者奥沙利铂静脉滴注 3 min 后出现全身不适、呼吸困难、全身皮肤潮红伴大汗淋漓，心电监测示心率、血压、血氧饱和度测不出等过敏性休克症状，立即停药并行抗过敏、升压等抢救后逐渐好转，临床表现与 lgE 介导的Ⅰ型过敏反应相符 [7-8]。文献报道，奥沙利铂引起的Ⅰ型过敏反应多数患者在静脉滴注奥沙利铂 2 ～ 30 min 内出现，既往奥沙利铂多次使用和长时间的奥沙利铂化疗间断也是诱导过敏反应的独立危险因素 [9-10]。奥沙利铂用药的每个周期都可能会发生过敏反应，多发生在化疗 6 ～ 7 个周期以后 [11-13]，平均累积剂量为（540±157）～（863±180）$mg \cdot m^{-2}$[14]。国内有研究报道显示，严重过敏反应第 2 周期和第 8 周期中占比最多，有化疗间断的发生于间断后第 2 周期的最多 [8]。国外的研究结果也提示，当奥沙利铂化疗间断一段时间再接受奥沙利铂化疗的第 2 和第 3 周期需特别警惕 [10]。

本例患者曾规律行 XELOX 方案化疗 7 个周期，奥沙利铂化疗间断 4 个月后使用时出现轻度过敏停药，间断 24 个月再次使用 XELOX 方案的第 2 个周期出现过敏性休克，比初次过敏症状更严重，与文献报道相符 [10]。这可能是因为上次化疗结束后，免疫反应在一段较长时间的化疗间断中减弱，再次暴露于奥沙利铂迅速激活记忆反应，立即出现过敏反应，并且既往奥沙利铂过敏诱导免疫产生的特异性 lgE 可通过上调 FcεRI（肥大细胞和嗜碱性粒细胞上表达的 lgE 受体）来增强再次过敏反应的强度 [2，15]。Sohn 等 [2] 研究证实了过敏反应的发生风险随着奥沙利铂化疗间断时间的延长而增加，尤其是奥沙利铂化疗间断 36 个月以上的患者发生过敏反应的风险最高；既往有奥沙利铂化疗史或过敏史的患者，再次使用奥沙利铂，过敏反应发生在较早周期并且有更严重的症状。

过敏性休克是奥沙利铂罕见的严重不良反应，国内外奥沙利铂引起过敏性休克的个案报道中很少强调长时间停用后再次使用奥沙利铂导致过敏性休克。本例病历提醒医师应先了解患者既往奥沙利铂的用药史，识别高危人群，尤其警惕既往有奥沙利铂过敏史或化疗间隔很长时间再接受奥沙利铂化疗的患者。由于奥沙利铂过敏反应发生的不确定性，糖皮质激素和抗组胺药预处理并不能完全避免过敏性休克的发生，预防有一定的难度。因此，2021 年国家药监局修订了奥沙利铂制剂说明书，统一增加黑框警告：发生过敏反应的患者禁止再次使用奥沙利铂。

参考文献

[1] Bano N，Najam R，Qazi F，et al. Clinical features of oxaliplatin induced hypersensitivity reactions and therapeutic approaches [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2016，17（4）：1637-1641.

[2] Sohn KH，Kang DY，Kim JY，et al. Incidence and risk of oxaliplatin-induced hypersensitivity in patients with asymptomatic prior exposure：a prospective observational study [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2018，6（5）：1642-1648.

[3] Brandi G，Pantaleo MA，Galli C，et al. Hypersensitivity reactions related to oxaliplatin（OHP）[J]. Br J Cancer，2003，89（3）：477-481.

[4] Bencardino K，Mauri G，Amatu A，et al. Oxaliplatin immune-induced syndrome occurs with cumulative administration and rechallenge：single institution series and systematic review study [J]. Clin Colorectal Cancer，2016，15（3）：213-221.

[5] 吕秋军，曹萍 . 药用辅料的不良反应及其安全性管理 [J]. 药物不良反应杂志，2010，12（6）：410-414.

[6] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30（2）：239-245.

[7] Polyzos A，Tsavaris N，Gogas H，et al. Clinical features of hypersensitivity reactions to oxaliplatin：a 10-year expe-

rience [J]. Oncology，2009，76（1）：36-41.
[8] 刘思源，郭代红，孔祥豪，等 . 12073 例奥沙利铂用药患者相关变态反应的发生特征及风险因素分析 [J]. 医药导报，2021，40（12）：1740-1747.
[9] 沈玉萍，刘希，钱红，等 . 奥沙利铂致过敏危险因素分析 [J]. 世界临床药物，2013，34（12）：738-741.
[10] Mori Y，Nishimura T，Kitano T，et al. Oxaliplatin-free interval as a risk factor for hypersensitivity reaction among colorectal cancer patients treated with FOLFOX [J]. Oncology，2010，79（1-2）：136-143.
[11] Nishihara M，Nishikura K，Morikawa N，et al. Factors influencing the appearance of oxaliplatin-induced allergy [J]. Biol Pharm Bull，2017，40（12）：2105-2109.
[12] 桑蝶，张育荣，张金涛 . 30 例奥沙利铂致严重过敏反应的临床资料分析 [J]. 中国药事，2019，33（1）：95-99.
[13] Maindrault-Goebel F，André T，Tournigand C，et al. Allergic-type reactions to oxaliplatin：retrospective analysis of 42 patients [J]. Eur J Cancer，2005，41（15）：2262-2267.
[14] 王倩，方英立，衣翠华，等 . 1 例奥沙利铂致过敏反应分析并文献复习 [J]. 中南药学，2015，13（2）：218-221.
[15] Schwartz JR，Bandera C，Bradley A，et al. Does the platinum-free interval predict the incidence or severity of hypersensitivity reactions to carboplatin? The experience from Women and Infants' Hospital [J]. Gynecol Oncol，2007，105（1）：81-83.

（收稿日期：2021-12-09；修回日期：2022-02-01）

尼达尼布致 1 例严重全身皮肤损害的病例分析及文献报告

谈心（苏北人民医院药学部，江苏　扬州　225001）

关键词：尼达尼布；药品不良反应；皮疹
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)08-1960-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.047

间质性肺病（ILD）是结缔组织病（CTD）常见的并发症。患者除了需要使用免疫抑制剂治疗 CTD，还需要适时使用抗纤维化药物治疗 ILD。目前全球已有吡非尼酮和尼达尼布 2 个 ILD 治疗药物被批准上市。2020 年 6 月，尼达尼布得到了国家药品监督管理局（NMPA）的批准用于治疗系统性硬化病相关间质性肺疾病（SSc-ILD），这也是唯一获批治疗 SSc-ILD 的药物，可见，此类抗纤维化药物在风湿免疫科运用越来越广泛，但因为上市时间较短，药物相关的严重不良也应引起重视。本文介绍了 1 例 SSc-ILD 患者使用尼达尼布后出现的全身皮肤不良反应，并进行相关文献分析。

1　病历资料

1.1　基本信息

患者，女，42 岁，身高 168 cm，体质量 60 kg，体质量指数 21.26 kg • m^{-2}，体表面积 1.69 m^2。因“双手遇冷发白发紫 1 年”于 2021 年 4 月 29 日入住本院。胸部 CT 示：双肺下叶多发条索影。肺功能示：轻度混合性通气功能障碍，最大通气量中度下降。出院诊断为进行性系统性硬化症、自身免疫性肝病、间质性肺炎。患者 Child-Pugh 评分：A 级（总胆红素：23.7 μmol • L^{-1}↑，白蛋白：35 g • L^{-1}↓，丙氨酸氨基转移酶：74 u • L^{-1}↑，天门冬氨酸氨基转移酶：60 u • L^{-1}↑，凝血酶原时间正常，无腹水，无肝性脑病），于 5 月 12 日出院，加用乙磺酸尼达尼布软胶囊（Catalent Germany Eberbach GmbH，规格：150 mg/ 粒，批号：903555U）150 mg qd po（与食物同服）治疗 ILD。同时口服的药物有（皆为延续住院期间方案）：泼尼松龙片 50 mg qd（一周减 5 mg），羟氯喹片 0.2 g bid，硫唑嘌呤片 50 mg qd，白芍总苷胶囊 0.6 g bid，阿司匹林肠溶片 100 mg qd，熊去氧胆酸胶囊 500 mg bid，奥美拉唑肠溶胶囊 20 mg qd。

5 月 26 日门诊复查，示肝功能异常指标较前升高，总胆红素：27 μmol • L^{-1}↑，丙氨酸氨基转移酶：130 u • L^{-1}↑，天门冬氨酸氨基转移酶：84 u • L^{-1}↑。医嘱停用乙磺酸尼达尼布软胶囊，予甘草酸二铵肠溶胶囊 150 mg tid 进行保肝治疗。5 月 30 日，患者突发面部皮疹，呈红肿、破溃、瘙痒，皮疹逐渐向全身蔓延。于皮肤科诊断：多

作者简介：谈心，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：frances370@163.com

形性红斑。考虑患者已用激素控制基础病，予卢帕他定片 10 mg qd po 联合注射用甲泼尼龙 60 mg qd ivgtt 治疗 2 d，皮肤症状未见缓解，予风湿免疫科收治入院。

1.2　治疗经过

入院后查体：患者颜面部水肿，全身可见大面积风团，按压褪色，伴破溃，触之有灼热感。停用所有口服药物，予地塞米松磷酸钠 5 mg bid ivgtt，枸地氯雷他定片 8.8 mg qd po，炉甘石洗剂外用。6 月 2 日，患者躯干皮疹较前加重，蔓延至双上肢并伴有瘙痒难耐，临时予氯苯那敏注射液 10 mg im。6 月 6 日，患者颜面部水肿逐渐缓解，皮肤开始出现明显脱屑，腹部及双下肢皮疹加重，予多磺酸黏多糖乳膏外用。6 月 18 日，患者皮疹逐渐消退，地塞米松磷酸钠减量至 5 mg qd ivgtt。6 月 21 日，患者周身皮疹基本消退，复查肺功能：轻度混合性通气功能障碍，最大通气量轻度下降。医嘱予出院，考虑肺功能轻度下降未加用尼达尼布，仍延用上回出院的治疗方案，门诊随访至今，无新发皮疹出现。

2　讨论

2.1　尼达尼布导致皮损的关联性评价

该患者因肝功能受损停用尼达尼布，予甘草酸二铵肠溶胶囊保肝治疗 4 d 后出现了全身皮肤损害。需要排除甘草酸二铵致皮肤损害的可能性。查阅患者既往病历，得知患者于 2020 年 4 月因肝功能指标异常，曾门诊口服过甘草酸二铵肠溶胶囊 150 mg tid，未出现皮疹。且患者 2021 年 5 月住院期间，使用过同为甘草酸制剂的异甘草酸镁注射液保肝治疗，也未出现皮疹。所以，排除甘草酸二铵肠溶胶囊致皮疹的可能性，考虑严重的皮肤损害可能由尼达尼布导致。查阅尼达尼布说明书，皮肤及皮下组织疾病相关不良反应中：皮疹常见、瘙痒偶见，但未提及使用尼达尼布造成皮肤损害的严重性。对照诺氏评估量表（见表 1），表明尼达尼布与严重的皮肤损害关联性为很可能。依据美国国立癌症研究所常见不良反应事件评价标准（National Cancer Insititute-Common Terminology Criteria for Adverse Events，NCI-CTCAE）5.0 版分级标准 [1]，归为 3 级皮疹。

表 1　诺氏药物不良反应评估量表 (分)

相关问题	问题分值			得分
	是	否	未知	
1. 该不良反应此前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
2. 该不良反应是否在使用可疑药物后发生	＋2	－1	0	＋2
3. 该不良反应是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1	0	0	0
4. 该不良反应是否再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该不良反应	－1	＋2	0	＋2
6. 该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
8. 该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分		6		

注：总分≥ 9 分肯定；5 ～ 8 分很可能；1 ～ 4 分可能；≤ 0 分可疑。

2.2　尼达尼布皮肤不良反应的文献检索

2018 年 3 月 9 日尼达尼布（商品名：维加特）在中国上市，陆续批准用于治疗特发性肺纤维化、SSc-ILD、具有进行性表型的慢性纤维化间质性肺疾病。在国外，除上述适应证外，2014 年 11 月 28 日欧洲药品管理局（EMA）批准尼达尼布（商品名：VARGATEF）与多西他赛联合使用用于治疗非小细胞肺癌。

尼达尼布是一种三重抗血管生成酪氨酸酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors，TKIs），能同时阻断血管内皮生长因子受体（VEGFR）、血小板衍生生长因子受体（PDGFR）和成纤维细胞生长因子受体（FGFR）通路。而皮肤不良反应是表皮生长因子 - 酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKIs）最常见的毒性反应，皮疹多于治疗后 7 ～ 10 d 出现，35% 的患者会先出现皮肤干燥和瘙痒的症状，随后发展为更典型的湿疹和继发并发症 [2-3]。

笔者检索了尼达尼布致皮肤不良反应的报道，发现美国 2019 年报道了 1 例特发性肺纤维化患者使用尼达尼布 150 mg bid 治疗，最初几周至一个月即出现了伴瘙痒的痤疮样皮疹，为控制基础病继续服药，6 个月后前额、膝盖出现了散在的丘疹、硬

结、红斑，予皮肤活检，确诊为大疱性类天疱疮[4]。除此以外，一项尼达尼布用于治疗难治性转移性结直肠癌患者Ⅲ期随机对照研究中，8.3%（32/384）的患者出现了皮疹，其中出现 3 级皮疹的患者占 0.3%（1/32）[5]。尼达尼布用于治疗肝细胞癌症患者的一项研究中，38.1%（24/63）的患者出现皮肤和皮下组织方面的不良反应，15.9%（10/63）的患者出现了皮疹。其中 3 级皮肤不良反应的患者占 1.6%（1/63）[6]。

2.3　尼达尼布引发皮疹的机制讨论

有研究表明表皮生长因子抑制剂可能使皮肤角质形成细胞异常、皮肤屏障受到破坏、皮肤炎症反应增强及皮肤光敏性增加[7]。目前，尼达尼布引发皮疹的机制尚不清楚，可能是通过阻断多种酪氨酸激酶受体（血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子和血小板源性生长因子）以某种方式改变表皮基底膜的抗原性质而引发皮疹。

2.4　尼达尼布引发皮疹的危险因素

有研究发现雄激素介导了 EGFR 抑制剂引起的皮肤不良反应，男性和高体质量患者更易发生皮肤毒性[8]。而皮脂腺活动和皮脂分泌高的患者对 EGFR 抑制剂更敏感[9]。发生致命的皮肤毒性还可能跟种族相关，亚洲人种更易发生 EGFR-TKI 相关的皮肤毒性[10]。

2.5　肝功能受损的患者如何使用尼达尼布

尼达尼布主要通过胆汁 / 粪便排泄（＞ 90%），其暴露量在肝损伤患者（Child Pugh A、Child Pugh B）中有所增加。轻度肝损伤（Child Pugh A）患者应慎用，建议尼达尼布调整剂量为 100 mg q12 h。当轻度肝损伤患者出现不良反应时，应考虑中断或停止治疗。而目前为止，尚未在分类为 Child Pugh B 和 C 级的肝损伤患者中进行尼达尼布的安全性和有效性的研究[11]。因本院仅有 150 mg 规格的乙磺酸尼达尼布软胶囊，结合医保等经济效益，综合考量，本例患者起始剂量使用 150 mg qd po，门诊随访。目前，尚未知该患者的皮肤损害与尼达尼布血药浓度的相关性。所以，对于此类合并肝功能受损的 ILD 患者使用尼达尼布需格外谨慎，建议从小剂量开始，密切监测不良反应。

参考文献

[1] National Institutes of Health，National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）v5.0 [S]. 2015.

[2] 黄烽如，刘连科，钱依，等 . 酪氨酸激酶抑制剂的不良反应 [J]. 药学与临床研究，2019，27（2）：108-112.

[3] 王碧芸，葛睿，江泽飞 . 中国临床肿瘤学会乳腺癌专委会共识专家组 . 乳腺癌靶向人表皮生长因子受体 2 酪氨酸激酶抑制剂不良反应管理共识 [J]. 中华肿瘤杂志，2020，42（10）：798-806.

[4] Hasson AM，Cheeney G，Ho LA，et al. Bullous pemphigoid associated with nintedanib [J]. JAAD Case Rep，2019，5（9）：821-823.

[5] Van Cutsem E，Yoshino T，Lenz HJ，et al. Nintedanib for the treatment of patients with refractory metastatic colorectal cancer（LUME-Colon 1）：a phase Ⅲ，international，randomized，placebo-controlled study [J]. Ann Oncol，2018，29（9）：1955-1963.

[6] Yen CJ，Kim TY，Feng YH，et al. A phase Ⅰ/randomized phase Ⅱ study to evaluate the safety，pharmacokinetics，and efficacy of nintedanib versus sorafenib in Asian patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. Liver Cancer，2018，7（2）：165-178.

[7] 笪美红，陈梅，王飞 . 表皮生长因子受体抑制剂的皮肤不良反应发生机制 [J]. 中国皮肤性病学杂志，2018，32（9）：1087-1090.

[8] Le-Rademacher JG，Rowland K，Atherton PJ，et al. Androgen mediation and antiandrogens mitigation of the epidermal growth factor receptor（EGFR）inhibitor induced rash：results from a pilot randomized trial and small translational case series [J]. Am J Hosp Palliat Care，2019，36（6）：519-525.

[9] Nakahara T，Moroi Y，Takayama K，et al. Changes in sebum levels and the development of acneiform rash in patients with non-small cell lung cancer after treatment with EGFR inhibitors [J]. Oncol Targets Ther，2015，8：259-263.

[10] Sato I，Mizuno H，Kataoka N，et al. Osimertinib-associated toxic epidermal necrolysis in a lung cancer patient harboring an EGFR mutation——a case report and a review of the literature [J]. Medicina（Kaunas），2020，56（8）：403-409.

[11] 尼达尼布说明书 [Z]. 勃林格殷格翰（中国）投资有限公司，2020.

（收稿日期：2022-03-02；修回日期：2022-04-12）

致 谢

中南大学湘雅二医院
江苏恒瑞医药股份有限公司
长沙市中心医院

副理事长及单位

曾春辉　湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠　湖南一格制药有限公司总经理

常务理事及单位

刘若辉　湖南千金湘江药业股份有限公司总经理
欧阳荣　湖南中医药大学第一附属医院药学部主任
雷艳青　湖南省脑科医院药学部主任
周玉生　南华大学附属第二医院副院长
李　专　长沙市第三医院副院长
田其学　湖南省中医药研究院附属医院药剂科主任
袁群莉　华润湖南瑞格医药有限公司副总经理
阳　波　南华大学附属第一医院药学部主任

理事及单位

周运奇　湖南五洲通药业有限责任公司董事长
杨贞皓　湖南省湘中制药有限公司总经理
刘　湘　湘潭市中心医院药学部
曾　强　岳阳市一人民医院党委书记
吴吉明　常德市第一人民医院副院长
谭东辉　湘南学院附属医院院长
肖政辉　湖南省儿童医院副院长
李　勇　南华大学附属南华医院临床药学科主任
林承雄　湖南怀仁大健康产业发展有限公司董事长
何　毅　株洲市中心医院副院长
彭　宏　新邵县人民医院院长
郭建军　湖南恒兴医药科技有限公司总经理

2020 STM WJCI

WORLD JOURNAL CLOUT INDEX REPORT

世界期刊影响力指数（WJCI）报告（2020科技版）

收录证书

This is certificate for

中南药学

（ISSNS：1672-2981）

to be indexed in

World Journal Clout Index Report(2020 STM)

项目联合研发单位 Project research units：

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

国内统一刊号：CN43-1408/R　广告经营许可证：4300004000764　邮发代号：42-290　定价：25.00元/册