中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 11 期（总第 202 期）　2022 年 11 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

透皮给药系统临床研究设计专题

（2455）贴剂与贴膏剂生物等效性研究方案设计及关键点 ……李艳，李晓洁，王秀英，等

cGAS-STING 信号通路在重大疾病中的研究进展专题

（2463）cGAS-STING 通路在肠道屏障中的作用研究进展 ……吕梦婷，章越凡

（2470）cGAS-STING 通路在调节肿瘤微环境中的研究进展 ……王飘飘，董婧，刘艳辉，等

研究论文

（2476）红鬼笔化学成分及其细胞毒性研究 ……吴光栩，李雷，李馨蕊，等

（2480）酸橙花和甜橙花的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析及 HPLC 含量测定 ……张忠立，李淑琪，左月明

（2490）利用连续流动化学技术合成抗结核新药贝达喹啉 ……裴广庆，王春超，苏睿，等

（2495）探讨阳离子牛血清蛋白制备纯化工艺及大鼠动物模型验证 ……高青青，纪越，国大亮，等

（2501）单硝酸异山梨酯缓释片分割后的体内外评价 ……寻明金，郭辉，冯中，等

（2506）肾损伤对大鼠白消安尿排泄清除率的影响 ……李广路，王福润，朱芳媚，等

（2514）LC-MS/MS 法测定人全血中他克莫司和西罗莫司浓度及临床应用 ……杨旭萍，蒋振伟，蒋艳，等

（2520）孟鲁司特钠咀嚼片的处方工艺研究 ……李宛择，陈永，刘芳洁，等

（2527）采用 SMRT 测序技术考察莲子的真菌群落多样性 ……张寅，陈恒文，何轩辉

（2533）水葱化学成分研究 ……彭电，周碧兰，帅劲节，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
睢大筵　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（2537）摘蕾对三七中皂苷类成分的影响 …… 张诗焉，潘建英，郭宜欣，等

（2542）面向抗乳腺癌候选药物拮抗雌激素受体 α 生物活性的定量构效关系模型构建 …… 吕婷婷，禹文韬，张慧琳

（2548）清热消炎宁颗粒一步制粒工艺研究 …… 江涛，彭红英，曾晨，等

（2553）响应面法优化板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取工艺 …… 崔晓，薛淑一，孟向尚，等

（2559）毛花苷丙体外抑制单纯疱疹病毒Ⅰ型及对病毒合成基因表达的影响 …… 叶凌风，吴松斌，熊东林，等

（2565）环孢多肽 A 透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透试验研究 …… 刘鑫鑫，李鑫，崔闻宇，等

（2571）基于多成分结合外观性状的山茱萸加工方法研究 …… 范天慈，毛睿，窦志英，等

（2580）UPLC-Q-TOF-MS 法分析椿乳凝胶中的化学成分 …… 张逢雨，彭静，王雨馨，等

（2587）基于 Q-TOF-MS 技术的姜半夏及其掺伪品姜虎掌的成分鉴定与差异分析 …… 谢浙裕，吕林锋，邓俊杰，等

（2593）地西泮胶束溶液的制备及其释放性能评价 …… 徐桂林，刘新国，徐辉甫，等

（2598）黄芪 - 红花预防大鼠脑缺血再灌注损伤的药对、配伍、给药剂量研究 …… 乔逸，雷露，曹金一，等

药物分析与检验

（2606）196 批麝香壮骨膏中挥发性成分的含量测定及特征峰鉴别 …… 许苗苗，张楠，谢志民

（2611）盐酸艾司洛尔注射液的有关物质及其质量评价研究 …… 章为，蒋涛，刘雁鸣，等

（2616）基于国家药品评价性抽验的盐酸奈福泮注射液质量分析及研究 …… 刘慧颖，马惠钟，陈默

（2621）UPLC-MS/MS 测定叶下珠中氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺的残留量 …… 李洪权，柏玉冰，鲁翠香，等

（2626）一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种成分的含量 …… 陈江平，余欣彤，黎桃敏，等

（2631）高效液相色谱法测定米拉贝隆中对映异构体 …… 陈秋，樊梦妮，李国柱，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。

综述

（2635）人工泪液成分的最新研究及进展 …… 陆菁，刘辰，吴晋晖，等

（2642）急性脑卒中后肠道菌群变化对免疫及预后影响的研究进展 …… 李丁然，韩丹，李伏超，等

（2648）木姜叶柯化学成分与药理作用及质量评价研究进展 …… 何维维，黄傲，唐雪阳，等

（2658）注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注后脑功能保护作用的研究进展 …… 李汶泽，李智，万梅绪，等

医院药学

（2665）氨基酸肠外营养支持对肝硬化患者营养和预后影响的 meta 分析 …… 陆素芳，丁玉珍，王丹丹，等

（2671）专利竞争视角下的溶瘤病毒药物发展状况研究 …… 尤瑾，乔志伟，邹玥，等

（2678）药品集中带量采购后某院抗菌药物使用及细菌耐药率变迁情况 …… 向左娟，陈小娟，胡晓杰，等

（2683）引入 PCNE 分类系统对消化内科药物相关问题进行探索与实践 …… 彭苗苗，张桂凡

（2689）医药护协作的全院血糖管理模式在骨科糖尿病患者围术期应用效果及经济学评价 …… 代晶，李林通，张宁，等

药品不良反应

（2695）甲硝唑致罕见重度肝损伤 1 例 …… 王维娜，杨鸿鸽，侯文婧，等

（2698）比阿培南致中毒性表皮坏死松解症不良反应分析 …… 兰艳，付琳，舒成仁，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*252*zh*P*25.0*41*2022-11

本期责任编辑：李科，陆窈窈，彭金飞，邬志娟

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 11 November 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

(2455)Design and key points of bioequivalence of patches and cataplasms ····· *LI Yan, LI Xiao-jie, WANG Xiu-ying, et al*

(2463)Advances in the role of cGAS-STING pathway in the intestinal barriers ····· *LYU Meng-ting, ZHANG Yue-fan*

(2470)Advances in the regulation of tumor microenvironment by cGAS-STING pathway ····· *WANG Piao-piao, DONG Jing, LIU Yan-hui, et al*

(2476)Chemical constituents and cytotoxic effect of *Phallus rubicundus* ····· *WU Guang-xu, LI Lei, LI Xin-rui, et al*

(2480)Qualitative and quantitative analysis of flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by UPLC-Q-TOF-MS/MS and content determination by HPLC ····· *ZHANG Zhong-Li, LI shu-qi, ZUO Yue-ming*

(2490)Synthesis of a new antituberculosis drug bedaquiline by continuous flow chemistry technique ····· *PEI Guang-qing, WANG Chun-chao, SU Rui, et al*

(2495)Preparation of cationic bovine serum albumin and establishment of rats model of membranous nephropathy ····· *GAO Qing-qing, JI Yue, GUO Da-liang, et al*

(2501)In vivo and in vitro evaluation of isosorbate mononitrate sustained release tablets after segmentation ····· *XUN Ming-jin, GUO Hui, FENG Zhong, et al*

(2506)Effect of renal injury on urinary excretion clearance of busulfan in rats ····· *LI Guang-lu, WANG Fu-run, ZHU Fang-mei, et al*

(2514)Simultaneous determination of tacrolimus and sirolimus in human blood by LC-MS/MS and its clinical application ····· *YANG Xu-ping, JIANG Zhen-wei, JIANG Yan, et al*

(2520)Prescription and preparation of montelukast sodium chewable tablets ····· *LI Wan-ze, CHEN Yong, LIU Fang-jie, et al*

(2527)Fungal community diversity in Lotus seeds by single molecule real-time sequencing technology ····· *ZHANG Yin, CHEN Heng-wen, HE Xuan-hui*

Postal code
42-290

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.

(2533)Chemical constituents of *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla ····· *PENG Dian, ZHOU Bi-lan, SHUAI Jin-jie, et al*

(2537)Effect of inflorescence removal on saponins in notoginseng radix et Rhizome ····· *ZHANG Shi-yan, PAN Jian-ying, GUO Yi-xin, et al*

(2542)Construction of quantitative structure-activity relationship model of biological of activity anti-breast cancer drug candidate estrogen receptor *α* ····· LYU Ting-ting, YU Wen-tao, ZHANG Hui-lin

(2548)One-step granulation technology for Qingre Xiaoyanning granules ····· *JIANG Tao, PENG Hong-ying, ZENG Chen, et al*

(2553)Optimization of extraction process of (*R, S*)-epigoitrin and nucleoside from *Radix isatidis* by response surface methodology ····· *CUI Xiao, XUE Shu-yi, MENG Xiang-shang, et al*

(2559)In vitro inhibition of herpes simplex virus type Ⅰ by lanatoside C and its effect on gene expression of virus synthesis ····· *YE Ling-feng, WU Song-bin, XIONG Dong-lin, et al*

(2565)Preparation of transdermal patch of cyclosporine A and its in vitro transdermal penetration ····· *LIU Xin-xin, LI Xin, CUI Wen-yu, et al*

(2571)Process of *Cornus officinalis* based on combination of multi-components and appearance characters ····· *FAN Tian-ci, MAO Rui, DOU Zhi-ying, et al*

(2580)Chemical constituents in Chunru gel by UPLC-Q-TOF-MS ····· *ZHANG Feng-yu, PENG Jing, WANG Yu-xin, et al*

(2587)Component identification and difference analysis of ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott based on Q-TOF-MS ····· *XIE Zhe-yu, LYU Lin-feng, DENG Jun-jie, et al*

(2593)Preparation and release performance of diazepam micellar solution ····· *XU Gui-lin, LIU Xin-guo, XU Hui-pu, et al*

(2598)Combination, compatibility and dosage of Huangqi-Honghua for preventing cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ····· *QIAO Yi, LEI Lu, CAO Jin-yi, et al*

(2606)Determination of volatile components in 196 batches of Shexiang Zhuanggu plaster and identification of characteristic peaks ····· *XU Miao-miao, ZHANG Nan, XIE Zhi-min*

(2611)Related substances and quality evaluation of esmolol hydrochloride injection ····· *ZHANG Wei, JIANG Tao, LIU Yan-ming, et al*

(2616)Quality analysis of nefopam hydrochloride injection based on national drug evaluation sampling inspection ····· *LIU Hui-ying, MA Hui-zhong, CHEN Mo*

(2621)Determination of chlorantraniliprole and flubendiamide residues in *Phyllanthus urinaria* L. by UPLC-MS/MS ····· *LI Hong-quan, BAI Yu-bing, LU Cui-xiang, et al*

(2626) Simultaneous determination of 6 components in Angelicae dahurica Radix formula granules by quantitative analysis of multi-components by single marker method
…… *CHEN Jiang-ping, YU Xin-tong, LI Tao-min, et al*

(2631)Determination of enantiomer in mirabegron by HPLC
…… *CHEN Qiu, FAN Meng-ni, LI Guo-zhu, et al*

(2635)Research and progress in the components of artificial tears
…… *LU Jing, LIU Chen, WU Jin-hui, et al*

(2642)Research progress in gut microbiota changes affecting the immunity after acute stroke and prognosis
……*LI Ding-ran, HAN Dan, LI Fu-chao, et al*

(2648)Research progress in chemical constituents and pharmacological effect of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) chun and its quality evaluation
……*HE Wei-wei, HUANG Ao, TANG Xue-yang, et al*

(2658)Research progress in the protective effect of salvianolic acid for injection on cerebral function after the cerebral ischemia-reperfusion
…… *LI Wen-ze, LI Zhi, WAN Mei-xu, et al*

(2665)Effect of amino acid-containing parenteral nutrition on the nutrition and prognosis in patients with liver cirrhosis: a meta-analysis
…… *LU SU-fang, DING Yu-zhen, WANG Dan-dan, et al*

(2671)Current development of oncolytic virus drug in the light of patent competition…… *YOU Jin, QIAO Zhi-wei, ZOU Yue, et al*

(2678)Antibacterial drug use and drug resistance rate in a hospital after drug centralized volume-based procurement
…… *XIANG Zuo-juan, CHEN Xiao-juan, HU Xiao-jie, et al*

(2683)PCNE classification system for drug-related problems in the Department of Gastroenterology…… *PENG Miao-miao, ZHANG Gui-fan*

透皮给药系统临床研究设计专题

【编者按】

透皮给药系统有其特有的临床优势和较好的市场价值，成为了仿制药研究热点；在全球开发新靶点越来越难的情况下，透皮贴剂作为新药改良剂型的一种，也成为了全球新药研发的最佳选择之一。透皮给药系统的处方组成可影响透皮贴剂的安全性和有效性，给临床研究带来了诸多挑战，除了有效性外，皮肤的黏附力、刺激性与致敏性等均需要考察，目前国内尚无指南参考。本专题分析了 FDA 现行的 28 个贴剂与贴膏剂的生物等效性研究方法和相关规定，以期为我国的透皮给药系统开发评价以及制定国内相关指导原则提供参考。

【特邀专家简介】

刘亚利，女，医学博士及博士后，执业医师，主任药师，汕头大学医学院第一附属医院机构副主任、Ⅰ期病房主任，特聘教授。中国医药教育协会药物创新研发临床评价分会副主任委员，科技部及北京市科技项目审评专家，广东省 GCP 核查专家。湖南省肿瘤医院药物临床试验机构创始人，中国 CSCO 两届执行委员、国家首批 GCP 核查专家，曾在医院、企业工作多年，有短期 CDE 工作经验，组织和完成 140 多项临床试验研究，近几年主持超 30 个药物的Ⅰ期研究（包括新药耐受性、PK/PD、食物的影响、心肌毒性试验），有诸多特殊制剂（如栓剂、凝胶剂、贴剂和鼻喷剂等）项目经验和多项中美双报临床试验的经验。在国际国内的学术会议上作药物临床研究和 GCP 知识等讲座 30 多次，主持国家十二五重大专项及省部级项目 15 项，发表 SCI 文章 30 多篇。

贴剂与贴膏剂生物等效性研究方案设计及关键点

李艳[1]，李晓洁[2]，王秀英[2]，汤博凯[1]，安雅翾[1]，刘亚利[2*]（1. 北京科林臻和医药科技有限公司，北京 100011；2. 汕头大学医学院第一附属医院，广东　汕头　515041）

摘要：贴剂与贴膏剂，尤其是透皮贴剂已成为国内产品研发或引进的新热点，但国家药品监督管理局（NMPA）对贴剂与贴膏剂没有发布具体的生物等效性（BE）试验指导原则。美国食品药品监督管理局（FDA）发布了 28 个贴剂与贴膏剂的特定药物 BE 指南，通过分析相关指南，贴剂与贴膏剂均需开展黏附性研究、皮肤刺激性与致敏性研究，透皮贴剂与贴膏剂需开展以药代动力学为终点的 BE 研究，局部作用贴剂应开展以临床为终点的 BE 研究。本文根据 FDA 相关指南，对贴剂与贴膏剂仿制药 BE 研究的方案设计、试验实施的关键点进行分析总结，以期为部分贴剂与贴膏剂仿制药的临床研究的规范性、科学性提供参考。

关键词：贴剂；贴膏剂；生物等效性研究；药代动力学

中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2455-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.001

Design and key points of bioequivalence of patches and cataplasms

LI Yan[1], LI Xiao-jie[2], WANG Xiu-ying[2], TANG Bo-kai[1], AN Ya-xuan[1], LIU Ya-li[2*] (1. *Beijing Kelin Zhenhe Co., Ltd., Beijing* 100011; 2. *The First Affiliated Hospital of Medical College of Shantou University, Shantou Guangdong* 515041)

作者简介：李艳，女，硕士，主要从事药物临床试验方案设计研究，email：leeloveit@163.com　[*]**通信作者：**刘亚利，女，博士后导师，主要从事药物临床研究，email：lydialyl@126.com

Abstract: Patches and cataplasms, especially transdermal patches, have become new research and import hotspots in China, but NMPA has not provided specific guidelines on the bioequivalence of patches and cataphasms. We analyzed 28 FDA bioequivalence recommendations for specific products of patches and cataplasms in this article. Adhesion study, skin irritation and sensitization study were required in the bioequivalence studies of all patches and cataplasms. Pharmacokinetic study was an important part in the bioequivalence of transdermal patches and cataplasms. Topical patches should use equivalence studies with clinical endpoint. In this paper, we analyzed and summarized the key points of clinical trial protocol design and operation of patches and cataplasms according to FDA guidance and hope to provide reference for their standardization of domestic clinical research.

Key words: patch; cataplasm; bioequivalence study; pharmacokinetics

美国食品药品监督管理局（FDA）于 2019 年 11 月发布了《透皮和局部递药系统 - 产品研发和质量考量》指南草案，以帮助推进经透皮给药或局部传输系统（topical delivery system，TDS）新药和仿制药的开发。透皮给药系统是指药物以一定速率通过完整的皮肤表面，经毛细血管吸收进入体循环而产生疗效的一类给药系统，常见剂型包括凝胶贴膏（原巴布膏剂）、透皮贴剂、液体类制剂（洗剂、搽剂、酊剂等）、软膏和乳膏剂、凝胶剂、涂膜剂等 [1-2]；皮肤局部给药系统主要作用于皮肤局部或者局部皮肤下的各层组织，主要在局部发挥作用，常见制剂种类包括贴剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、涂剂、气雾剂、泡沫剂和散剂等 [2-3]。

《中国药典》与《美国药典》对于贴剂与贴膏剂的分类和归属略有不同。《中国药典》2020 年版中规定贴剂包括产生全身作用的透皮贴剂和局部作用的贴剂，贴膏剂包括可产生全身性或局部作用的凝胶贴膏与橡胶贴膏 [4]。《美国药典》把使药物均匀释放或靶向到身体的贴剂、贴膏剂等制剂则都归属于递送系统，药物通过皮肤输送到全身循环而发挥作用的称为透皮给药系统 [5]。

经过半个世纪的发展，透皮给药系统以其能够克服口服给药带来的肝脏首过消除、服药量大、较难保持血药浓度、对胃黏膜的刺激等缺点的优势，成为国内产品研发或引进的新热点 [6-8]。国内外获批上市的透皮给药系统以透皮贴剂为主，主要用于戒烟、缓解疼痛、骨质疏松症、避孕、晕动病、心绞痛和心脏疾病等 [8]。另外，凝胶贴膏具有载药量大，给药剂量准确，吸收面积小，血药浓度稳定，应用方便舒适等优点 [9]，在临床已应用于外伤所致肿胀及疼痛、关节炎、肌肉痛、风湿痛和神经痛等疾病。

本文根据 FDA 相关指南，对贴剂与贴膏剂仿制药的生物等效性（bioequivalence，BE）研究的方案设计、试验操作中的关键点进行分析与总结，以期为其 BE 研究的规范性、科学性提供参考。

1 国内贴剂与贴膏剂 BE 研究相关法规概况

我国已发布的《化学仿制药参比制剂目录》中，对贴剂与贴膏剂的参比制剂进行了明确规定，《化学仿制药参比制剂目录》（第五十二批）共公布了 13 个有效成分的贴剂与贴膏剂参比制剂。透皮贴剂包括芬太尼、丁丙诺啡、利斯的明、奥布西宁；凝胶贴膏包括吲哚美辛、氟比洛芬、利多卡因、酮洛芬；贴剂包括妥洛特罗、洛索洛芬钠、双氯芬酸钠、酮洛芬、氟比洛芬。

国家药品监督管理局药品审评中心于 2021 年 3 月发布的《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》中，BE 评价部分明确对于局部作用的药物可能会导致全身暴露，且存在一定的全身不良反应风险时（如皮质类固醇激素类产品等），应首先开展仿制药与参比制剂之间人体药代动力学（PK）对比试验，比较两者在系统暴露方面的一致性，以支持其系统吸收相关的安全性评价 [10]，但是尚未对透皮贴剂、贴膏剂以及局部作用贴剂的 BE 研究提供具体指导。

分析近 5 年药物临床试验登记与信息公示平台的备案信息显示，透皮贴剂和凝胶贴膏 BE 试验共有 31 个备案，其中 15 个备案信息在开展以 PK 为终点的 BE 研究（PK-BE）的同时观察了黏附性，5 个备案信息为 PK-BE、黏附性和皮肤刺激性合并开展，未见单独的皮肤刺激和致敏性试验备案，其余 11 个仅做 PK-BE。总体来看，透皮贴剂与贴膏剂仿制药的黏附性、刺激性与致敏性研究并未受到重视。已备案的信息中黏附性研究的受试者例数，评估标准等是否合理仍需关

注，而 PK-BE 试验与皮肤刺激性研究合并开展，单次给药与给药时间是否满足观察制剂的长期或多次给药后的皮肤刺激性仍需规范。

2 FDA 贴剂与贴膏剂 BE 研究概况

2.1 FDA 贴剂与贴膏剂《特定药物的生物等效性指导原则》概况

截止至 2022 年 2 月，FDA 已发布 28 个贴剂和贴膏剂，涉及 22 个产品的《特定药物的生物等效性指导原则》，指南涉及 22 个透皮贴剂、1 个透皮系统（乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮透皮系统）、5 个局部作用贴剂（辣椒素贴剂、双氯芬酸依泊胺贴剂、薄荷醇 / 水杨酸甲酯贴膏、1.8% 利多卡因凝胶贴膏、5% 利多卡因凝胶贴膏），具体药品的通用名及商品名见表 1。其中，睾酮、雌二醇、雌二醇 / 醋酸炔诺酮、硝酸甘油、可乐定、东莨菪碱透皮贴剂，利多卡因凝胶贴膏 7 个产品在我国已仿制上市，罗替高汀透皮贴剂与薄荷醇 / 水杨酸甲酯贴膏的参比制剂已在我国进口上市。

表 1 FDA 已发布《特定药物的生物等效性指导原则》的贴剂与贴膏剂

Tab 1 Guidance for bioequivalence study of patches and cataplasms released by FDA

分类	通用名（商品名）
性激素	睾酮（ANDRODERM）、雌二醇（CLIMARA）、雌二醇 / 醋酸炔诺酮（COMBIPATCH）、乙炔雌二醇 / 诺孕曲明（ORTHO EVRA；XULANE）、雌二醇 / 左炔诺孕酮（CLIMARA PRO）、乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮（TWIRLA）
精神神经系统	哌甲酯（DAYTRANA）、司来吉兰（EMSAM）、尼古丁（HABITROL；NICODERM CQ）、利斯的明（EXELON）、罗替高汀（NEUPRO）、芬太尼（DURAGESIC-100）、丁丙诺啡（BUTRANS）、奥昔布宁（OXYTROL）
心血管	硝酸甘油（NITRO-DUR；TRANSDERM-NITRO）、可乐定（CATAPRES-TTS-1）
解痉	东莨菪碱（TRANSDERM SCOP）
消炎镇痛	双氯芬酸依泊胺（FLECTOR）、薄荷醇；水杨酸甲酯（SALONPAS）、辣椒素（QUTENZA）
麻醉	利多卡因（LIDODERM）
其他	格拉司琼（SANCUSO）

2.2 FDA 贴剂与贴膏剂的 BE 评估方法

FDA 在《特定药物的生物等效性指导原则》（BE 指南）中，要求贴剂与贴膏剂需开展：① PK-BE 研究和 / 或临床终点 BE 研究；② 黏附性研究；③ 皮肤刺激与致敏性研究（简称 I/S 研究）。本文将分别详述 FDA 贴剂与贴膏剂 BE 评估方法的设计及关键点。

从 FDA 已发布的 28 个贴剂与贴膏剂的 BE 指南可以看出，透皮制剂和贴膏剂均采用 PK-BE 方法，局部作用贴剂双氯芬酸依泊胺与辣椒素采用的是以临床为终点的生物等效性研究，此外，双氯芬酸依泊胺贴因在应用中可能发生严重的心血管血栓或胃肠道的不良反应，还采用了 PK-BE 推测和衡量可能发生的不良反应。贴剂的黏附性、皮肤刺激性及致敏性均影响制剂的使用，进一步影响制剂中药物的吸收和制剂的安全性 [11-12]。根据 BE 指南，贴剂与贴膏均需按照《ANDA：评价经皮和局部给药系统的黏附力（草案）》（以下简称黏附性指南）开展黏附性研究，按照《ANDA：评价经皮和局部给药系统的刺激性和致敏可能性（草案）》（以下简称 I/S 指南）开展 I/S 研究，见表 2。

表 2 FDA 指南涉及的贴剂与贴膏剂开展 BE 评估时需开展的研究

Tab 2 Research needed for bioequivalence assessment of patches and cataplasms in FDA draft guidance

通用名	给药途径	以 PK 为终点	以临床为终点	黏附性研究	刺激性与过敏性研究
18*	透皮	＋	－	＋	＋
辣椒素	局部	－	＋	＋	＋
双氯芬酸依泊胺	局部	＋	＋	＋	＋
利多卡因	局部	＋	－	＋	＋
薄荷醇 / 水杨酸甲酯	局部	＋	－	＋	＋

注（Note）：18*. 代表丁丙诺啡（BUTRANS）、可乐定（CATAPRES-TTS-1）、雌二醇 / 左炔诺孕酮（CLIMARA PRO）、雌二醇 / 醋酸炔诺酮（COMBIPATCH）、雌二醇（CLIMARA）、乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮（TWIRLA）、乙炔雌二醇 / 诺孕曲明（ORTHO EVRA；XULANE）、芬太尼（DURAGESIC-100）、格拉司琼（SANCUSO）、哌甲酯（DAYTRANA）、尼古丁（HABITROL；NICODERM CQ）、硝酸甘油（NITRO-DUR；TRANSDERM-NITRO）、奥昔布宁（OXYTROL）、利斯的明（EXELON）、罗替高汀（NEUPRO）、东莨菪碱（TRANSDERM SCOP）、司来吉兰（EMSAM）、睾酮（ANDRODERM）。

3 以 PK-BE 研究

3.1 试验设计

研究设计为单剂量、两治疗、两周期、体内交叉。具体的设计和实施参考 FDA《ANDA 提交的药物以药代动力学为终点评价指标的生物等效性研究》修订指南草案。在整个 PK-BE 研究过程中，应监测并记录每个贴剂的黏附情况。

3.2 受试者的选择

受试者选择一般为健康男性及非孕、非哺乳期女性，部分制剂需根据其药物特点进行受试者选择，例如雌二醇的受试者选择没有雌激素治疗禁忌的绝经后妇女，雌二醇 / 左炔诺孕酮和雌二醇 / 醋酸炔诺酮选择没有雌激素治疗禁忌的不吸

烟的绝经后妇女，尼古丁应选择健康吸烟者，睾酮选择睾酮缺乏（性腺机能减退型）的 18 ～ 65 岁的男性受试者。需要注意的是，此类制剂的 PK-BE 研究需排除拟用药部位及对称部位存在肤色差异明显、毛发过多、疤痕组织、纹身、开放性溃疡、晒伤或身体穿孔等影响药物吸收的情况的受试者。此外，FDA 建议申请人也可根据具体研究附加受试者纳入标准和排除标准。

3.3 样本量

交叉设计的样本量需考虑的因素包括：① 检验水准 α，通常为双侧 0.1（双单侧 0.05）；② 检验效能 $1-\beta$，通常至少为 80%；③ 个体内变异系数（within-subject coefficient of variation，CVw%），可基于文献报道或预试验结果进行估计；④ 几何均值比（geometric mean ratio，GMR）；⑤ 等效性界值 [11]。

3.4 给药

3.4.1 药物规格 由于贴剂与贴膏剂的吸收机制不同于口服和静脉注射药物，对于规格的考量需要引起足够的重视。FDA 对透皮贴剂的规格通常用递送量 / 释放时间表示。FDA 已批准的透皮贴剂均以释药速率（$mg \cdot h^{-1}$ 或 mg/24 h 等）为规格，国内已上市透皮贴剂的规格表示有载药量、载药量 / 贴剂面积、递送速率等多种表达方式，透皮贴剂中载药量通常高于递送剂量，因此在选择参比制剂时需统一规格，避免因此造成的不等效。FDA 已批准的局部作用贴剂和贴膏的规格为基质中含有原料药的百分比，国内已上市的凝胶贴膏的规格为原料药含量及含膏量，局部贴剂多为原料药含量，与之相同。

BE 指南对贴剂与贴膏剂 PK-BE 研究中的剂量与规格都作了明确规定。薄荷醇 / 水杨酸甲酯的给药剂量为 7 cm×10 cm（4 个 TDS）或 10 cm×14 cm（2 个 TDS），5% 利多卡因与 1.8% 利多卡因的给药剂量均需 3 个 TDS，其他制剂的给药剂量均无特殊要求，具体给药规格及剂量见表 3。

3.4.2 给药时间 不同制剂在 PK-BE 研究中的给药时间有不同要求，丁丙诺啡、可乐定、雌二醇 / 左炔诺孕酮、乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮、乙炔雌二醇 / 诺孕曲明、格拉司琼佩戴 7 d，雌二醇、雌二醇 / 醋酸炔诺酮佩戴 84 h，芬太尼、东莨菪碱佩戴 72 h，尼古丁、利斯的明、罗替高汀、司来吉兰、睾酮佩戴 24 h，利多卡因、硝酸甘油、双氯芬酸依泊安佩戴 12 h，薄荷醇 / 水杨酸甲酯佩戴 8 h，哌甲酯佩戴 9 h。

3.4.3 给药部位 给药部位的选择需参考参比制剂说明书中的用法，交叉试验中受试制剂与参比制剂的用药部位应为同一解剖部位的对侧。整个研究期间，避免按压或加固制剂，已脱离的制剂部分不可再次黏附于皮肤。

3.5 评价指标

与普通口服制剂的 BE 评价指标相同，以 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim inf}$ 为评价指标。

4 黏附性研究

贴剂与贴膏剂需按照黏附性指南开展黏附性研究。黏附性指南关注贴剂或贴膏剂在人体黏附的实际情况，当制剂失去对皮肤的黏附时，皮肤对经皮给药系统中药物的吸收发生改变，PK 结果随之改变。另外，随着制剂完全脱离的可能性增加，药品对非计划用药人群的意外暴露风险同样增加，因此贴剂或贴膏剂的黏附性评估对于评价其安全性和有效性至关重要 [10]。

4.1 试验设计

研究设计为单剂量、两治疗、两周期、体内交叉。黏附性研究可以单独开展，也可以与 PK-BE 研究合并开展。

4.2 受试者的选择

同一制剂开展 PK-BE 研究受试者的选择标准基本一致。

4.3 样本量

黏附性试验为非劣效研究，样本量需考虑的因素包括：① 检验水准 α，通常为双侧 0.1（双单侧 0.05）；② 检验效能 $1-\beta$，通常至少为 80%；③ 非劣界值为 0.15。由于黏附性量表的离散性质，建议采用比标准假设计算出的值更大的样本量。PK-BE 研究与黏附性研究如果设计合并开展，需适当增加样本量，以保证 PK-BE 终点与黏附性终点 2 个独立的观察指标均有足够的把握度。

4.4 给药

黏附性研究的给药部位、给药规格及给药时间与 PK-BE 研究方案一致，不同药品的黏附性研究的给药规格见表 3 。如有不同规格时，如安全性允许，尽量选择最大尺寸（或最高规格）的受试制剂进行黏附性试验。

4.5 黏附性研究评分标准

FDA 黏附性指南提供了黏附性评分量表（0 ～ 4 分量表，见表 4），每一个受试者在给药后的不同时间点观察制剂与皮肤的黏附情况并根据量表评分。

4.6 黏附性评估时间

为使受试制剂和参比制剂的黏附性在整个用药期内进行合理的比较，应在制剂应用后的多个

表 3　FDA 指南涉及的贴剂与贴膏剂开展生物等效性评估的给药规格和给药剂量

Tab 3　Specification and dose of patches and cataplasms for bioequivalence assessment in FDA draft guidance

通用名		给药规格及给药剂量				
		参比制剂或标准制剂新药申请编号	PK-BE	黏附性研究	皮肤刺激性与致敏性研究	临床终点的 BE 研究
透皮贴剂	丁丙诺啡	21306	20 μg・h^{-1}	20 μg・h^{-1}	TDS 载体和阳性对照	—
	芬太尼	019813	25 μg・h^{-1}	25 μg・h^{-1}	TDS 载体和相当于 25 μg/24 h 或更高规格的阳性对照	—
	东莨菪碱	017874	1 mg/72 h	1 mg/72 h	TDS 载体和阳性对照	—
	可乐定	18891	0.3 mg/24 h	0.3 mg/24 h	0.1 mg/24 h	—
	雌二醇	203752；020375/021674；020538	0.1 mg/24 h	0.1 mg/24 h	0.025 mg/24 h	—
	雌二醇	019081	0.1 mg/24 h	0.1 mg/24 h	0.05 mg/24 h	—
	哌甲酯	021514	30 mg/9 h	30 mg/9 h	10 mg/9 h	—
	尼古丁	020076	21 mg/24 h	21 mg/24 h	7 mg/24 h	—
	硝酸甘油	020145；020144	0.4 mg・h^{-1}	0.4 mg・h^{-1}	0.1 mg・h^{-1}（或 1/2 的 0.2 mg・h^{-1} TDS）	—
	利斯的明	022083	9.5 mg/24 h	9.5 mg/24 h	4.6 mg/24 h（剂量：1/2 的 4.6 mg/24 h TDS）	—
	睾酮	020489	4 mg/24 h	4 mg/24 h	2 mg/24 h	—
	罗替高汀	021829	2 mg/24 h	2 mg/24 h	1 mg/24 h，2 mg/24 h（剂量：0.5 mg/24 h，使用 1/2 的 1 mg/24 h TDS 或 1/4 的 2 mg/24 h TDS 给药）	—
	雌二醇 / 左炔诺孕酮	021258	0.045 mg/24 h；0.015 mg/24 h	0.045 mg/24 h；0.015 mg/24 h	0.045 mg/24 h；0.015 mg/24 h（剂量：1/2 的 0.045 mg/24 h 或 0.015 mg/24 h TDS）	—
	雌二醇 / 醋酸炔诺酮	020870	0.05 mg/24 h；0.14 mg/24 h 或 0.05 mg/24 h；0.25 mg/24 h	0.05 mg/24 h；0.14 mg/24 h 或 0.05 mg/24 h；0.25 mg/24 h	0.05 mg/24 h；0.14 mg/24 h（剂量：1/2 的 TDS）或 0.05 mg/24 h；0.25 mg/24 h（剂量：1/2 的 TDS）	—
	乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮 *	204017	0.03 mg/24 h；0.12 mg/24 h	0.03 mg/24 h；0.12 mg/24 h	0.03 mg/24 h；0.12 mg/24 h（使用 1/2 的受试制剂和 1/2 的参比制剂给药）	—
	乙炔雌二醇 / 诺孕曲明	021180	0.035 mg/24 h；0.15 mg/24 h	0.035 mg/24 h；0.15 mg/24 h	0.035 mg/24 h；0.15 mg/24 h（剂量：1/2 的 0.035 mg/24 h；0.15 mg/24 h TDS）	—
	格拉司琼	022198	3.1 mg/24 h	3.1 mg/24 h	3.1 mg/24 h（剂量：1/2 的 3.1 mg/24 h TDS）	—
	奥昔布宁	202211；021351	3.9 mg/24 h	3.9 mg/24 h	3.9 mg/24 h（剂量：1/2 的 3.9 mg/24 h TDS）	—
	司来吉兰	021336	6 mg/24 h	6 mg/24 h	6 mg/24 h	—
局部作用贴剂	利多卡因	207962	1.8%	1.8%	1.8%（使用 1/4 的受试制剂和 1/4 的参比制剂给药）	—
	利多卡因	020612	5%	5%	5%（使用 1/4 的受试制剂和 1/4 的参比制剂给药）	—
	薄荷醇 / 水杨酸甲酯	022029	3%；10%（剂量：4 个 7 cm×10 cm TDS	3%；10%（剂量：1 个 10 cm×14 cm TDS 应用 8 h）	3%；10%（剂量：1/4 的 7 cm×10 cm TDS）	—
	辣椒素	022395	—	8%	TDS 载体和阳性对照	8%
	双氯芬酸依泊胺	021234	1.3%	1.3%	1.3%（剂量：1/4 的 1.3% TDS）	1.3%

表 4　黏附性评分量表

Tab 4　Adhesion scale

黏附情况	分数
≥ 90% 附着（基本没有翘离皮肤）	0
≥ 75% 至＜ 90% 附着（仅有一些边缘翘离皮肤）	1
≥ 50% 至＜ 75% 附着（不多于一半翘离皮肤）	2
＞ 0% 至＜ 50% 附着（多于一半翘离皮肤，但没有脱落）	3
0% 附着（贴片完全脱离皮肤）	4

时间点对受试制剂组和参比制剂组的每个制剂的黏附性进行评价。评估时间点的设计应等距分布，例如连续或累计使用 7 d 的制剂应至少每日一次并在等距时间点评估一次；连续或累计使用 72 h 的制剂应至少每 12 h 评估一次；连续或累计使用介于 12 h 和 24 h 的制剂应至少每 4 h 评估一次；连续或累计使用 9 h 的制剂应至少 1 h 评估一次。

4.7　评价标准或评价指标

4.7.1　主要终点指标　按黏附性评分系统进行评分后，在所有等距时间点（除外基线和时间 0）内每

个评估时间点取平均值得出的各个黏附性得分得出的平均黏附性得分（$\bar{x}=\sum_{i=1}^{n} x_i/n$），受试制剂与参比制剂相比应呈统计学非劣效性，非劣界值为 0.15。

4.7.2 次要终点指标 ① 比较受试制剂组与参比制剂组在任何时间点黏附性得分大于 2 的受试者的比例；② 计算并比较受试制剂组平均黏附性得分大于相应参比制剂组平均黏附性得分≥ 1 的受试者的比例与参比制剂组平均黏附性得分大于相应受试制剂组平均黏附性得分≥ 1 的受试者的比例；③ 比较受试制剂与参比制剂从开始使用到黏附性评分≥ 2 的时间。

4.8 注意事项

① 黏附性评分需由经过培训的研究者，对每个时间点独立评分；② 黏附性研究与 PK-BE 研究合并开展时，黏附性研究的样本量可能大于 PK-BE 研究的样本量，应在方案中预先规定 PK-BE 研究的受试者的随机方法；③ 用药部位不可使用化妆品、面霜、乳液、粉或其他外用产品，用药前剪去多余毛发；④ 试验制剂的表面不可使用覆盖物或封盖物进行遮盖，防止按压或加固试验制剂，试验中已脱离的制剂不可重新黏附于皮肤；⑤ 整个研究期间，受试者的活动一般不应受到限制，用药时间大于 24 h 不应限制受试者淋浴，但需避免剧烈活动；⑥ 在黏附性试验结束（或期间脱离）时取下的所有制剂应予以保留，进行残留药物含量分析。

5 皮肤刺激性和致敏性研究

贴剂与贴膏剂的配方或材质会阻止皮肤水蒸气传输的程度，或者由于其他因素也可能会对皮肤产生刺激或导致过敏反应。此类反应引起患者的不适，从而影响患者用药的依从性、皮肤渗透性以及制剂与皮肤的黏附性，最终可能会影响皮肤对制剂中药物的吸收，较严重的皮肤刺激还可能会影响制剂的安全性 [13-14]，因此贴剂与贴膏剂的刺激性与致敏性研究是其 BE 评价不可缺少的一部分。刺激性研究可与致敏性研究合并开展，也可以单独开展。

5.1 试验设计

研究设计为随机、评估者盲、受试者体内重复。一般皮肤刺激性与致敏性研究设计为受试制剂与参比制剂的对比研究，如由于有效成分的安全性问题，也可设计为 TDS 载体与阳性对照研究，如辣椒素、丁丙诺菲。整个研究期间需同时进行黏附性评估。

5.2 受试者选择

I/S 指南中强调了 I/S 研究中受试者的排除标准：

① 怀孕或哺乳期受试者；② 有重大皮肤病或病症的病史，如过敏、牛皮癣、白癜风，或已知改变皮肤外观或生理反应的病症（如糖尿病或卟啉病）；③ 有显著影响免疫反应的疾病病史 [原发性或获得性免疫缺陷 [如获得性免疫缺陷综合征（AIDS）]，过敏性疾病（如过敏反应、哮喘或全身药物反应），肿瘤（如淋巴瘤或白血病），类风湿关节炎]；④ 有皮肤癌病史（如黑色素瘤或鳞状细胞癌），基底细胞癌除外，基底细胞癌为浅表性且不涉及经皮给药系统应用部位；⑤ 试验前 3 周内使用过显著影响试验制剂反应或改变对试验制剂的炎症或免疫反应的药物或治疗（例如环孢素、他克莫司、全身或局部皮质类固醇、细胞毒性药物、免疫球蛋白、卡介苗、单克隆抗体或放射疗法）；⑥ 试验开始后 72 h 内在用药部位使用抗组胺药或外用药物。

5.3 样本量

I/S 试验为非劣效试验，样本量需考虑的因素包括：① 检验水准 α，通常为双侧 0.1（双单侧 0.05）；② 检验效能 1 －β，通常至少为 80%；③ 非劣界值为 0.20。致敏性试验单独开展或其与刺激性试验合并开展，需要至少 200 例受试者。

5.4 给药

5.4.1 透皮贴剂 I/S 研究为个体内重复试验，在连续给药周期内，受试者需在身体对称部位同时应用受试制剂和参比制剂，因此选择合适的规格和剂量，对研究的可实施及受试者的安全至关重要。不同药物制剂，BE 指南中明确了 I/S 研究的给药规格与给药剂量。雌二醇 / 左炔诺孕酮、雌二醇 / 醋酸炔诺酮、乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮、乙炔雌二醇 / 诺孕曲明、格拉司琼、奥昔布宁以及司来吉兰的给药规格同 PK-BE 和黏附性研究；可乐定、雌二醇、哌甲酯、尼古丁、硝酸甘油、利斯的明、罗替高汀以及睾酮的给药规格小于 PK-BE 和黏附性研究；丁丙诺啡、芬太尼及东莨菪碱需使用 TDS 载体和阳性对照来进行 I/S 评价。另外中利斯的明、雌二醇 / 左炔诺孕酮、雌二醇 / 醋酸炔诺酮、乙炔雌二醇 / 左炔诺孕酮、格拉司琼、奥布西宁的 I/S 研究给药规格为 PK-BE 和黏附性研究的 1/2 TDS，利多卡因、薄荷醇 / 水杨酸甲酯、双氯芬酸依泊安 I/S 研究的给药规格为 PK-BE 和黏附性研究给药规格的 1/4 TDS，不同制剂的具体给药规格见表 3。

5.4.2 贴膏剂 利多卡因与薄荷醇 / 水杨酸甲酯的 I/S 研究的给药规格与 PK-BE 及黏附性研究相同，给药剂量与其他两个研究相比较小，为规格的 1/4 TDS。

5.4.3　局部贴剂　由于安全性考虑，辣椒素的 I/S 研究需使用 TDS 载体和阳性对照进行评估；双氯芬酸依泊安在 PK-BE 研究、黏附性研究、临床终点的 BE 研究及 I/S 研究中的规格一致，但 I/S 研究的给药剂量小于其他研究，为规格的 1/4 TDS。

5.5　评分系统

I/S 指南中给出皮肤反应量表与其他反应量表，研究中需记录受试者的皮肤反应分数、其他反应分数以及总分（见表 5 和表 6）。

表 5　皮肤反应量表

Tab 5　Dermal response scale

皮肤反应	分数
无刺激性	0
刚刚可以观察到轻微红斑	1
明显的红斑（肉眼可见的轻微水肿或轻微丘疹反应）	2
红斑和丘疹	3
水肿明显	4
红斑、水肿和丘疹	5
水疱	6
强烈反应（蔓延到超出皮肤贴敷区域）	7

表 6　其他反应量表

Tab 6　Other effects scale

可观察到的反应	分级（等值数字）
皮肤表面轻微发亮	A（0）
皮肤表面明显发亮	B（1）
皮肤表面发亮并伴有脱皮和皲裂	C（2）
皮肤表面发亮并伴有明显裂缝	F（3）
整个或部分贴敷部位被覆一层渗出物干膜	G（3）
出现小斑点性糜烂和 / 或疮痂	H（3）

5.6　试验过程

致敏性研究的试验过程可分为 21 d 诱导试验，14 ～ 17 d 休息期，48 h 激发试验。皮肤刺激性研究在 21 d 诱导阶段完成。

5.6.1　诱导试验　每位受试者同时使用受试制剂和参比制剂，连续使用 21 d。用药时间和用药部位参考参比制剂制剂说明书的用法用量进行设定，受试制剂和参比制剂应用于同一解剖部位的对侧。试验实施中，由经过培训的研究者对每个时间点独立评分。如果用药部位出现严重的皮肤刺激反应，应停止在该部位使用受试贴剂，可将制剂应用于新的部位。

5.6.2　激发试验　每位受试者同时使用受试制剂和参比制剂，连续使用 48 h。激发试验的用药部位需为诱导试验没有使用过药物的新的皮肤部位。在移除制剂后的 30 min、24 h、48 h 和 72 h，由研究者使用空白量表独立评分，并记录所有皮肤反应，研究者根据受试者发生的皮肤反应判定是否为致敏反应。对于所有表现出致敏反应的受试者，应在激发试验的 4 ～ 8 周后再次进行激发试验。

5.7　评价标准

5.7.1　皮肤刺激性试验　刺激性试验评价的主要终点为：① 计算每贴制剂的平均累计刺激性积分和总刺激性累计积分；② 受试制剂与参比制剂相比应呈统计学非劣效性 [非劣效性（NI）边际：0.2]。次要终点为：① 产生过度刺激反应的受试者比例；② 受试制剂组产生过度刺激反应的受试者比例不应高于参比制剂组；③ 在用药期间，受试制剂组产生的刺激反应不应早于参比制剂组。

5.7.2　致敏性试验　除了对诱导试验进行上述相同评估外，还需在激发试验的评估时间点评估受试者的皮肤反应。致敏性的判定需满足以下所有标准：① 受试者至少有一个评估时间点出现在激发期制剂移除后 24 h 以上（例如 48 或 72 h）；② 受试者在激发期的最后一次评估中的综合刺激评分至少为 2 分；③ 如果受试者完成了两次激发期试验，两次试验结果需都满足上述两条标准。

5.8　试验豁免

对于已知为皮肤致敏剂的贴剂或贴膏剂（例如哌醋甲酯透皮贴剂），如从有效成分和制剂组成方面可证明受试制剂的致敏性低于参比制剂，可考虑不进行致敏性研究。

5.9　注意事项

① 整个研究期间，受试者应避免用药部位暴露于加热垫、电热毯、加热灯、桑拿浴室、热水浴缸、热水床以及长时间的阳光直射等外部热源。

② I/S 研究可考虑使用胶带或其他覆盖物固定试验制剂，因胶带或其他覆盖物产生的皮肤刺激反应需单独记录。

③ 如试验制剂完全脱落，受试者需在 24 h 内更换新的制剂继续试验，试验制剂脱落超过 24 h 未能更换制剂的受试者应按照排除脱落处理。

6　讨论

近年来，国内上市的贴剂仿制药产品 40 多个，近 30 个为透皮贴剂产品。由我国自主研发的二类新药利多卡因、洛索洛芬钠、酮洛芬等凝胶贴膏陆续上市，国内对于贴剂及贴膏剂的研发热度不断升温。

国内还没有发布具体关于透皮贴剂、贴膏剂以及局部作用贴剂的 BE 研究的指导原则，已备案的在研贴剂与贴膏剂仿制药的 BE 研究仅部分参考了国外相关指南，具体试验设计是否能够合理且全面地评估其有效性和安全性仍存在疑问，

贴剂与贴膏剂仿制药 BE 研究的科学性及合理性仍需关注和完善。

另外，日本和南非认同的贴剂 BE 研究还包括皮肤药代动力学（DPK）方法，由于角质层的药物浓度并不足以与疗效建立固定联系，DPK 指南于 2002 年被废除[14]。笔者认为，新的医药用高分子材料的出现为透皮贴剂的研发提供了物质基础，加上检测手段的提高及药代动力学的发展，可以确定体内外的相关性，一些曾经采用 DPK 方法研究的药物，体内浓度足以被检测的情况下可以考虑采用 PK-BE 的方法替代，例如洛索洛芬。

另外，在 FDA 的指南中，所有评分需采取独立盲法评估，即由经过培训、处于盲态的研究者对每个时间点独立评分。指南中提到 PK-BE 及黏附性研究中贴剂在使用过程中不能按压、加固、遮盖制剂，试验中已脱离的制剂不可重新黏附于皮肤；而 I/S 研究则可以加固制剂，需特别注意。在全球新药研发失败率越来越高，开发新靶点越来越难的情况下，改良型新药具有成功率高、回报高、风险低、生命周期长等特点，已成为全球新药研发的最佳选择。透皮给药系统在改良型新药的开发中有其特有的临床优势，且显示了较好的市场价值，本文也为改良型透皮贴剂的开发及临床研究提供了思路。

中国已经成为了 ICH 成员国和 ICH 管理委员会委员，在国家药品监督管理局对标国际标准，大力推进国内指导原则体系建设的同时，企业需根据制剂本身有效性与安全性的要求，参考国外相关指导原则要求开展贴剂与贴膏剂的临床研究。

参考文献

[1] 白毅，杜丽娜，冯雪，等 . 天然药物经皮给药系统研究进展 [J]. 中国药学杂志，2014，49（16）：1377-1381.

[2] 刘孟斯，姜典卓，岳志华，等 . 国内外透皮贴剂申报上市进展及药学研究探讨 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，8（38）：866-869.

[3] 朱凤昌，江翊国，郑稳生，等 . FDA 化学仿制药透皮贴剂生物等效性指导原则研究与分析 [J]. 中国药学杂志，2021，56（15）：1265-1272.

[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：21-22.

[5] FDA. Transdermal and topical delivery systems-product development and quality considerations guidance for industry [EB/OL].（2020-5-6）（2022-8-22）https：//www.fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/transdermal-and-topical-delivery systems-product-development-and-quality-considerations.

[6] 董王明，江昌照，叶金翠，等 . 经皮给药制剂促透方法研究进展 [J]. 中国新药杂志，2020，29（18）：2089-2097.

[7] Wen X，Xin Y，Michael RH，et al. Applications of cold atmospheric plasma for transdermal drug delivery：a review [J]. Drug Deliv Transl Res，2020，11（3）：741-747.

[8] Othman A，Haji MSK，Muhammad S，et al. Transdermal patches：design and current approaches to painless drug delivery [J]. Acta Pharm，2019，69（2）：197-215.

[9] 贾伟，高文远，王涛，等 . 中药巴布剂的研究现状 [J]. 中国中药杂志，2003，28（1）：7-11.

[10] U. S. FDA. Guidance for industry：assessing adhesion with transdermal delivery systems and Topical Patches for ANDAs Draft [EB/OL].（2018-10）（2022-8-22）. https：//www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/assessing-adhesion-transdermal-delivery-systems-and-topical-patches-andas-draft-guidance-industry.

[11] 国家药品监督管理局 . 皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）[EB/OL].（2021-3-16）（2022-8-22）https：//www. cde. org. cn/main/att/download/06ef2eda428339ee3a206bc61664fcf2.

[12] 国家药品监督管理局 . 生物等效性研究的统计学指导原则 [EB/OL].（2018-6）（2022-8-22）https：//www. cde. org. cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE ＝ 04af995337832a507fe27bde66f03eda.

[13] U. S. FDA. Guidance for industry：assessing the irritation and sensitization potential of transdermal and topical delivery systems for ANDAs [EB/OL].（2018-10）（2022-8-22）. https：//www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/assessing-irritation-and-sensitization-potential-transdermal-and-topical-delivery-systems-andas.

[14] 孙华，梁大虎，李相鸿，等 . 透皮贴剂生物等效性研究的评价方法与实施要点 [J]. 中国新药杂志，2021，30（24）：2276-2282.

（收稿日期：2022-06-27；修回日期：2022-08-19）

cGAS-STING 信号通路在重大疾病中的研究进展专题

【编者按】

天然免疫系统是人体免疫系统的第一道防线，在防御病毒、细菌、寄生虫入侵，控制感染方面发挥重要作用。在过去的十多年研究中，人们逐渐认识到天然免疫系统与人类的重大疾病密切相关，而 cGAS-STING 信号通路在其中发挥着重要作用，但是该领域的研究才刚起步，cGAS-STING 信号通路在人体的重大疾病中的作用有待进一步被发现。本专栏综述该通路在神经系统、心血管、消化系统、肿瘤等方面的研究进展，旨在为国内从事相关基础和临床研究的医药工作者了解该领域的最新动态，提供新的科研思路。

【专题主持人】

章越凡，男，药理学博士，上海大学医学院副教授，中国卒中学会新药研发与评价分会委员，中国老年学和老年医学学会营养食品分会委员，中国药理学会会员，上海市药理学会心血管专业委员会委员，主要从事心脑血管相关疾病的创新药物研发及相关机制研究，先后发表研究论文 40 余篇，其中 SCI 论文 20 余篇，获得专利授权 10 余项，完成 973 课题、国家科技重大新药创制、国家自然科学基金、上海市基金等科研项目 10 余项，获得上海市药学会二等奖、上海市浦东新区科技进步奖三等奖等多项学术奖励。

cGAS-STING 通路在肠道屏障中的作用研究进展

吕梦婷，章越凡*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：干扰素基因刺激因子（STING）是一种内质网内的衔接蛋白，可通过其上游的 DNA 感受器环鸟苷酸腺苷酸合成酶（cGAS）识别胞质中异常存在的双链 DNA（dsDNA），诱导Ⅰ型干扰素（IFN-I）的产生，参与机体的天然免疫过程。肠道是一个高度复杂的微环境，与潜在的有害病原体不断相互作用，目前已有大量研究表明 cGAS-STING 通路可影响肠道屏障功能，但它在肠道稳态中的作用是相互矛盾的。为进一步深入探究 cGAS-STING 通路在肠道相关疾病中的作用，本文就 cGAS-STING 通路在调控肠道机械屏障、生物屏障、免疫屏障、化学屏障的正常生理功能中的具体机制进行综述，为针对 cGAS-STING 通路的胃肠道前瞻性治疗策略提供新思路。

关键词：cGAS-STING；肠道屏障；微生物菌群；肠道免疫；炎症

中图分类号：R96，R574　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2463-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.002

Advances in the role of cGAS-STING pathway in the intestinal barriers

LYU Meng-ting, ZHANG Yue-fan* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: Stimulator interferon gene (STING) is an endoplasmic reticulum bridging protein that

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81971017）。

作者简介：吕梦婷，女，硕士研究生，主要从事药物作用机制研究，email：18305542735@163.com　*通信作者：章越凡，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物作用机制及靶点研究，email：zhangyuefan@126.com

recognises the abnormal double-stranded DNA (dsDNA) in the cytoplasm through its upstream DNA receptor cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) and induces the production of type I immunoreactive fibronectin (IFN-I), which is involved in the innate immune process of the body. The gut is a highly complex microenvironment with constant interactions with potentially harmful pathogens. cGAS-STING pathway has been shown in many studies to be able to influence the intestinal barriers, but its role in the intestinal homeostasis is controversial. To further determine the role of cGAS-STING pathway in gut-related diseases, this paper reviewed the specific mechanisms of cGAS-STING pathway in regulating the normal physiological functions of the intestine as mechanical, biological, immune and chemical barriers, hoping to provide new ideas for prospective therapeutic strategies targeting the cGAS-STING pathway in the gastrointestinal tract.

Key words: cGAS-STING; intestinal barrier; microflora; intestinal immunity; inflammation

肠道是人体营养物质和水分吸收的最大组织器官，不仅具有消化、吸收的功能，其内表面约 400 m^2 的肠道屏障为机体免受环境中有害物质和病原菌的入侵提供了有效保障 [1]。肠道屏障作为一个有机整体，由机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障共同构成（见图 1）。四大屏障共同守护肠道健康，有效防止肠内的有害物质入侵，在预防和治疗肠道及全身相关疾病中发挥着重要作用。

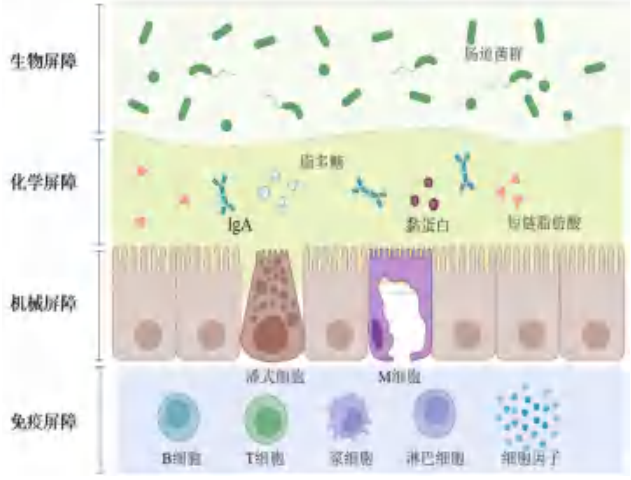


图 1 肠道屏障的结构

Fig 1 Structure of the intestinal barrier

cGAS-STING 通路可识别胞质中异常存在的双链 DNA（double-stranded DNA，dsDNA），是天然免疫反应的重要组成部分 [2]。cGAS-STING 通路与免疫反应、细胞自噬、细胞坏死等过程密切相关 [3]，这与导致肠道屏障病理生理学改变的分子机制有很大的相似性，提示 cGAS-STING 通路在肠道屏障病理性改变过程中发挥重要作用。但 cGAS-STING 通路在肠道屏障中的作用是相互矛盾的。研究表明，*STING* 敲除小鼠对结肠炎相关结肠直肠癌 [4] 和急性肠组织损伤 [5] 高度易感，但激活 cGAS-STING 通路亦会导致小鼠结肠炎的恶化 [6]。鉴于以上报道，cGAS-STING 通路在肠道相关疾病中的作用仍不清楚。本文就 cGAS-STING 通路与肠道四大屏障功能相关性研究的最新进展进行综述，以探讨 cGAS-STING 通路在肠道疾病中的具体作用。

1 cGAS-STING 通路

cGAS-STING 通路是能够识别胞质中异常 dsDNA 的天然免疫通路，可迅速对外来入侵的病原体以及自身坏死、凋亡或受损组织产生免疫应答，筑起保护机体的第一道防线 [7-8]。cGAS-STING 通路的信号传递过程，主要分为 dsDNA 的感知、胞内信号转导和免疫应答激活 3 个阶段。cGAS-STING 通路最早在感染相关机制研究中被发现。当病原微生物感染人体时，病原体的 DNA 进入细胞并被机体胞质核酸受体环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）识别，利用细胞内的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）和三磷酸鸟苷（guanosine triphosphate，GTP）生成第二信使环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸（cyclic GMP-AMP，cGAMP）。cGAMP 能够和内质网定位蛋白干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon gene，STING）相互作用，导致 STING 构象变化，从而招募并磷酸化激活 TANK 结合激酶 1（TANK-binding kinase 1，TBK1），继而分别激活干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor 3，IRF3）和核因子 -*κ*B（nuclear factor-kappa B，NF-*κ*B）。激活的 IRF3 进入细胞核，促进Ⅰ型干扰素（type Ⅰ immunoreactive fibronectin，IFN-I）表达，启动天然免疫反应抵御病原体入侵 [9]。研究表明，cGAS

除了识别病原体 DNA、肿瘤 DNA 等外源 DNA，还可辨别细胞质内自身 DNA 的异常累积，从而持续性激活 cGAS-STING 通路，导致机体自身免疫性疾病（autoimmune disease，AID）的发生[10]。

2 cGAS-STING 通路与肠道屏障

2.1 cGAS-STING 通路与肠道机械屏障

肠道机械屏障由肠道上皮细胞（intestinal epithelial cells，IECs）和紧密连接构成，在营养物、电解质和水的吸收及维持内环境稳态中起重要作用[11]。现有研究已证实，IECs 凋亡及坏死的增加与肠道相关疾病的严重程度密切相关[12]。另外，已有多项研究表明 cGAS-STING 通路可通过影响肠道上皮细胞的死亡来影响肠道机械屏障的完整性，调控相关疾病的发生发展[13-14]。缺血再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）损伤是急性肠屏障损伤的重要发病机制。Zhang 等[13] 发现在肠道 I/R 过程中释放的线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）会通过 cGAS-STING 通路诱导 IECs 坏死性凋亡，从而破坏肠道屏障的完整性。而 *STING* 的敲除可改善肠道 I/R 模型中 mtDNA 诱导的坏死性损伤和肠紧密连接蛋白的病理性改变。此外，STING 依赖性 IFN-I 和肿瘤坏死因子 -*α*（tumor necrosis factor-*α*，TNF-*α*）的产生是诱导肠道坏死性凋亡所必需的。同样，Hu 等[14] 通过对腹部脓毒症患者进行肠活检发现，与健康对照组相比，腹部脓毒症患者体内的 STING 表达明显升高，并且在腹部脓毒症小鼠模型中，脓毒症过程中释放的 mtDNA 可通过激活 cGAS-STING 通路导致 IECs 凋亡和肠道屏障的破坏，促进致死性败血症。有研究发现编码 STING 的基因 *TMEM173* 在炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）儿科患者的 IECs 中会发生低甲基化，而 *TMEM173* 高甲基化与 STING 表达降低相关[15]，提示在 IBD 患者中 STING 信号可能被过度传递。Aden 等[16] 研究发现，在慢性肠道炎症条件下，IECs 中白细胞介素 -22（interleukin 22，IL-22）刺激可导致胞质 dsDNA 的释放以及 cGAS-STING-IFN-I 途径的连续自我激活和组织坏死，且自噬和内质网应激缺乏症会加重这一过程。另外，在 Wang 等[17] 的研究中发现，由化疗药物伊立替康（irinotecan）引起在细胞质基质中积聚并释放到细胞外空间的 dsDNA，可被肠上皮细胞中的 cGAS 感知，导致 IRF3 的激活和炎症细胞因子的上调，造成小鼠肠道炎症，而穿心莲内酯可促进同源重组（homologous recombination，HR）修复并下调 dsDNA-cGAS-STING 信号传导，有助于改善伊立替康诱导的胃肠道黏膜炎，减轻肠道屏障损伤。综上，cGAS-STING 通路可通过影响 IECs 的死亡及炎症反应，破坏肠道的机械屏障，促进肠道相关疾病的进展。但目前关于 cGAS-STING 通路对肠道细胞之间的连接蛋白的作用研究还相对较少。

2.2 cGAS-STING 通路与肠道生物屏障

肠道生物屏障由肠道共生菌群组成。肠道菌群对于正常免疫系统的建立至关重要，正常肠道微生物群可通过诱导肠道免疫反应来防止相关疾病的发生发展[18-19]。反之，为了维持肠道健康，免疫系统必须对来自致病微生物的抗原做出反应，同时保持对共生菌群和食物抗原的耐受状态[20]。在 IECs 和免疫细胞中表达的各种模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）[如 Toll 样受体（Toll-like receptors，TLRs）、AIM2 样受体（AIM2-like receptors，ALRs）]、cGAS 和其他细胞内 DNA 传感器可维持对病原体相关分子模式的监视，并触发稳态免疫反应，使肠道共生微生物群与完整的肠黏膜组织共存[21]。

已有多项研究表明，cGAS-STING 通路可识别多种细菌（包括肠道微生物）产生的环状二核苷酸[22-23]。Barber 等[22] 的研究证实，*STING* 敲除小鼠在葡聚糖硫酸钠（dextran sulfate sodium salt，DSS）刺激下容易形成息肉和肠道炎症，认为 STING 信号传导对于伤口愈合和抗菌过程至关重要，因为它可以防止微生物侵入固有层诱导过度的炎症反应。Gutierrez-Merino 等[23] 研究表明，肠道内主要的益生菌乳酸菌（*Lactic acid bacteria*，LAB）可通过 cGAS-STING 通路激活 IFN-I 的表达，诱导巨噬细胞产生特定的免疫反应，促进免疫保护反应并防止肠道中 NF-*κ*B 依赖性的过度炎症反应，维持肠道内环境稳态。Canesso 等[4] 研究表明，当用 dsDNA、粪便内容物或从粪便中提取的微生物群 DNA 刺激小鼠胚胎成纤维细胞（murine embryonic fibroblasts，MEFs）时，STING 会发生迁移并在细胞的核周区域形成聚集体，并促进 IFN-I 的产生，维持肠道稳态。而 *STING* 敲除后小鼠肠道菌群的组成会发生变化，其中异杆菌群（*Allobacolum*）和双歧杆菌群（*Bifidobacterium*）减少，双硫菌群（*Disulfovibrio*）增加，小鼠更容易发生 T 细胞和 DSS 诱导的结肠炎以及肠道感染。在 Canesso 等[4] 的研究中，*STING* 敲除小鼠和野生型小鼠在开始 DSS 处理前共住 4 周，4 周的同居可导致微

生物群转移，使 *STING* 敲除小鼠的疾病易感性降低，推测产生此结果的原因可能是肠道菌群组成的改变反过来影响 cGAS-STING 通路介导的相关免疫反应 [24]。以上研究提示 cGAS-STING 通路可被肠道微生物的 DNA 激活，肠道益生菌群和 cGAS-STING 通路的相互作用有利于维持肠道稳态，而 STING 通过对致病菌的识别，可以防止其入侵，保护肠道免受损伤。反过来 STING 缺乏会导致肠道微生物群改变及炎症的易感性增加，提示 cGAS-STING 通路在维持肠道生物屏障正常功能中的重要保护作用。

与 Canesso 等 [4] 研究结果不同，Hu 等 [14] 利用肠损伤诱导的败血症模型研究了 cGAS-STING 通路在促炎作用中的影响。该研究表明，STING 激活促进了微生物移位、肠道通透性增加、肠上皮细胞死亡及脓毒症病程进展。而 *STING* 敲除鼠的脓毒症症状较轻，使用 STING 激动剂刺激会进一步加重炎症反应，这说明 cGAS-STING 通路参与了微生物感应和促炎症信号的传递，促进而不是限制肠道的炎症反应。

综上，研究表明 cGAS-STING 通路介导的正常微生物信号传递是保证肠道正常生理功能的关键，而 STING 缺乏会导致肠道生物屏障的破坏；在疾病状态下，黏膜中过度的 STING 信号会导致肠道生物屏障损伤，引起微生物组成变化、移位，导致疾病恶化和组织破坏。

2.3 cGAS-STING 通路与肠道免疫屏障

肠道免疫屏障由肠道淋巴组织（gut-associated lymphoid tissue，GALT）和肠道内细胞分泌的炎症介质构成。消化道免疫系统是机体内淋巴组织含量最多的部位，每克组织约有 1×10^6 个淋巴细胞，几乎所有的肠道相关损伤都与肠道淋巴组织的异常有关 [25-26]。STING 蛋白主要表达在巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞等细胞的内质网中，是异常胞质 DNA 诱导非特异性免疫的重要组成部分 [13]。因此，cGAS-STING 通路的异常激活可能会影响肠道的免疫屏障功能，造成肠道相关损伤。

Shmuel-Galia 等 [27] 研究结果表明，STING 在肠道巨噬细胞和单核细胞中的累积是肠道炎症的最初驱动因素。小鼠的肠道内 STING 被激活后表现出自发性结肠炎和生态失调以及进行性慢性肠道炎症和纤维化。Ma 等 [28] 利用流式分选出肠炎小鼠的肠道巨噬细胞，结合高通量测序研究，通过基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）和通路分析（ingenuity pathway analysis，IPA）发现结肠炎发生后抑制肠道巨噬细胞内 cGAS-STING 信号传递可减轻炎症反应，显著缓解小鼠结肠炎症状。Martin 等 [29] 观察到巨噬细胞活化标志物 Iba-1 在 *STING* 敲除小鼠中的表达较低，而 STING 激动剂或 STING 配体可激活小鼠的 STING 通路，使巨噬细胞活化，并促进 M2 型巨噬细胞重新极化为促炎的 M1 型巨噬细胞，显著加重结肠炎的病理症状。以上研究均提示 STING 通过活化巨噬细胞发挥促炎作用，破坏肠道屏障稳态，促进疾病进展。而与以上研究结果不同的是，Liu 等 [30] 研究发现黏膜经典树突状细胞（classical dendritic cell，cDC）通过对微生物来源的环二核苷酸的 STING 依赖性识别可诱导辅助性 T 细胞 17（T helper cell 17，Th17）的产生，引发黏膜的 Th17 反应，可以防止肠道侵袭性病原体的免疫逃避，对肠道中的宿主抗菌防御至关重要。Liu 等 [30] 研究表明，cGAS-STING 通路的激活可诱导相应免疫反应对肠道起保护作用。

研究表明 STING 表达越高，结直肠癌患者的存活率越高 [31]。适应性 T 细胞反应是控制肿瘤细胞的基础。树突状细胞（dendritic cells，DC）和 IFN-I 对于诱导适应性 T 细胞应答至关重要 [32]。DC 可以吞噬坏死性肿瘤细胞，诱发肿瘤相关的 DNA 激活 cGAS-STING 信号传导，并以自分泌或旁分泌模式促进 DC 中 IFN-I 的产生 [22]，激活 DC 内相关蛋白质的表达以诱导 T 细胞活化。研究表明，早期结直肠癌患者表现出更高的 STING 表达，肿瘤内 $CD8^+$ T 细胞浸润增加，淋巴血管浸润较少。肿瘤内 STING 的激活，可能通过增强 $CD8^+$ T 细胞的功能，抑制结肠癌的进展 [33]。研究还表明，肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）中的 STING 激活可以抑制免疫抑制性细胞（调节性 T 细胞）的功能，并诱导自然杀伤细胞（natural killer cell，NK）的活化，从而促进肿瘤细胞的死亡 [32]（见图 2）。

炎症细胞因子从性质上可分类为促炎细胞因子和抗炎细胞因子两类。促炎细胞因子和抗炎细胞因子之间的平衡决定了肠道黏膜损伤的程度与转归，cGAS-STING 通路对炎症细胞因子的分泌有重要促进作用。Zhu 等 [5] 研究证实，缺乏 STING 的小鼠容易在结肠炎相关的结直肠癌模型中形成肿瘤。在肿瘤发展的早期阶段，*STING* 敲除小鼠不能限制 NF-κB 和 STAT3 信号通路的激活，会导致过度的结肠炎症，其特征在于结肠和循环中促炎细

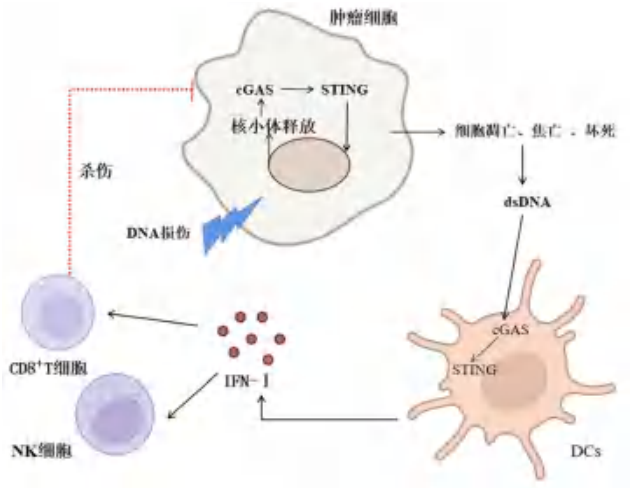


图 2　cGAS-STING 通路在肠道肿瘤中的作用

Fig 2　Role of the cGAS-STING pathway in intestinal tumours

胞因子白细胞介素（interleukin）-6（IL-6）水平升高以及增殖性肠上皮细胞数量增加。另外，STING 激活能够诱导细胞修复因子 IL-1 和 IL-18 的产生，而在 *STING* 敲除小鼠的结肠组织中观察到 IL-1β 和前半胱天冬酶 -1 的表达降低 [5]。与野生型小鼠相比，偶氮甲烷（azoxymethane，AOM）/DSS 处理的 *STING* 敲除小鼠的结肠肿瘤中 IL-18 和 IL-22 结合蛋白（interleukin-22 binding protein，IL-22BP）表达均降低 [34]。但与以上研究提示的 STING 保护作用不同，Ahn 等 [6] 研究表明共生菌主要影响单核巨噬细胞中 STING 信号传导，调节炎性细胞因子以及抗炎性 IL-10 的表达，在缺乏 *STING* 的情况下，可以预防由于 IL-10 的表达下降而导致的结肠炎。除此之外，STING 信号传导可以诱导 lgA、抗菌肽的分泌，发挥肠道保护作用，而 STING 激活所诱导的强烈的 TNF-α 和干扰素刺激的炎症反应会导致过度的回肠炎症 [4，16，20]。

综上，cGAS-STING 在肠道黏膜免疫中起重要作用。cGAS-STING 通路激活的效果和机制因不同的细胞和疾病模型而异。cGAS-STING 通路可激活免疫细胞，促进炎症相关细胞因子的正常分泌，在肠道维持正常免疫功能中发挥着重要作用，而 STING 过度累积反而会损害肠黏膜的免疫屏障功能，导致肠道相关疾病进展。

2.4　cGAS-STING 通路与肠道化学屏障

化学屏障即黏液层，其覆盖了肠道的整个肠腔表面。黏液层主要由大分子量的糖蛋白、黏蛋白组成。在健康的动物中，黏液层处于动态平衡状态。肠腔壁的黏液通过分布在上皮细胞中的杯状细胞合成和分泌 [35]。Canesso 等 [4] 在苏木精和伊红染色切片中观察到与野生型小鼠相比，*STING* 敲除小鼠小肠结构发生改变，类似于无菌小鼠的未成熟表型，微绒毛形成模式改变，细胞转化率下降。通过过碘酸希夫染色（periodic acid-Schiff，PAS）发现 *STING* 敲除小鼠负责产生黏蛋白的杯状细胞数量减少。黏蛋白对保护肠道黏膜免受肠道细菌和其他可能导致组织损伤和炎症的应激源的侵袭至关重要。通过对结肠切片进行免疫组化染色，发现结肠黏液的主要成分 MUC1 和 MUC2 减少，表明在缺乏 STING 的情况下，黏液层的生成受到影响。

研究表明，杯状细胞在维持肠道免疫和黏膜稳态方面发挥积极作用 [36]。除产生黏蛋白外，杯状细胞可以获得腔内抗原，将它们呈现给潜在的抗原呈递细胞（antigen-presenting cells，APC），从而诱导适应性免疫反应 [36]。另外，各种免疫调节因子、免疫细胞、饮食习惯、细菌感染和活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生等，均会影响杯状细胞分化成熟及肠道黏液的合成分泌过程 [37]。虽然，目前关于 cGAS-STING 通路在肠道化学屏障的作用仍然相对较少，但鉴于 cGAS-STING 通路在机体免疫系统中的作用及其与自噬的密切关系 [38]，推测 cGAS-STING 通路可能会通过影响相应免疫细胞及免疫调节因子的分泌或细胞自噬过程来影响杯状细胞的成熟分化及相关黏蛋白的分泌，进而影响肠道化学屏障功能。

3　总结

综上所述，cGAS-STING 通路状态的变化会对肠道的通透性、免疫系统、肠道菌群稳态及肠道黏液层产生影响，在维持肠道屏障正常功能中起着重要作用。四个屏障之间可通过 cGAS-STING 通路相互作用，肠道菌群的 dsDNA 可以激活上皮细胞中的 cGAS-STING 通路，产生相应的炎症保护因子 IL-1、IL-18，促进伤口愈合。而 cGAS-STING 通路的过度或异常激活则造成上皮细胞广泛的炎症反应，损伤肠道屏障。另外，损伤的上皮细胞产生的 dsDNA 会激活肠道相应免疫细胞的 cGAS-STING 通路，产生 IFN-I、TNF-α 等炎性细胞因子（见图 3）。

在机体正常生理情况下，cGAS-STING 通路主要通过调节免疫反应起到保护作用，但当机体的 cGAS-STING 通路被异常激活时，则会对肠道屏障产生损伤，反而促进疾病的发生发展。cGAS-STING 通路的功能在不同疾病背景下有所不同。研究表明，使用 STING 激动剂可增强抗肿瘤治疗的疗效 [31]。然而，抑制 cGAS-STING 通

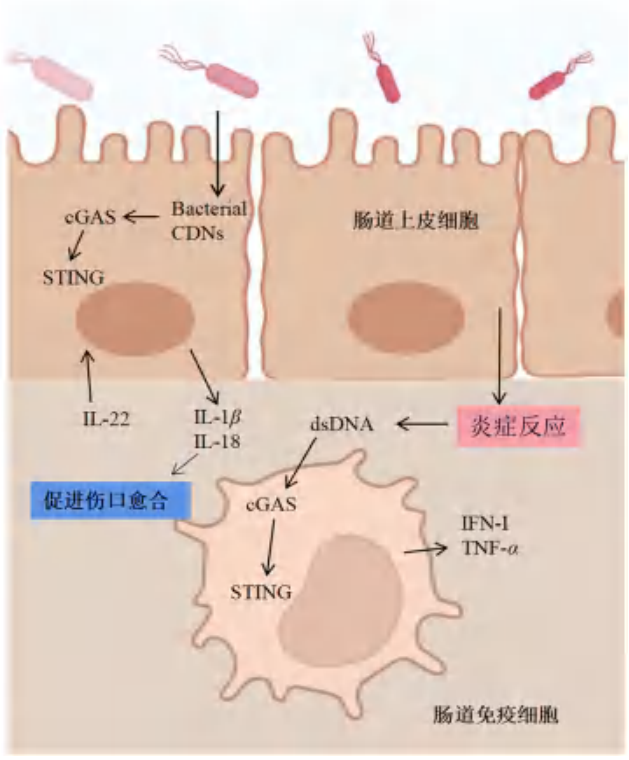


图 3 cGAS-STING 通路在肠道屏障中的作用

Fig 3 Role of the cGAS-STING pathway in the intestinal barrier

路可能有益于 IBD 的治疗[16]。另外，虽然有研究表明激活的 STING 信号有利于抗菌作用并促进黏膜愈合，但它在黏膜免疫和肠道稳态中的作用是矛盾的[22]。目前，仍需要进一步研究以阐明 cGAS-STING 通路损伤肠道屏障功能的机制，以提高我们对 cGAS-STING 通路的理解。此外，肠道的屏障功能与多种疾病相关，如脑卒中、糖尿病、脓毒症等，cGAS-STING 通路有可能通过调节肠道微环境，影响相关疾病的发生和发展。通过相关的小分子化合物调控 STING 的表达有可能对这些相关疾病起到治疗作用。

参考文献

[1] Bischoff SC，Barbara G，Buurman W，et al. Intestinal permeability——a new target for disease prevention and therapy [J]. BMC Gastroenterol，2014，14（1）：189.

[2] Yue J，Lopez JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. Int J Mol Sci，2020，21（7）：2346.

[3] Moretti J，Roy S，Bozec D，et al. STING senses microbial viability to orchestrate stress-mediated autophagy of the endoplasmic reticulum [J]. Cell，2017，171（4）：809-823.

[4] Canesso MCC，Lemos L，Neves TC，et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation [J]. Mucosal Immunol，2018，11（3）：820-834.

[5] Zhu Q，Man SM，Gurung P，et al. Cutting edge：STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation [J]. J Immunol，2014，193（10）：4779-4782.

[6] Ahn J，Son S，Oliveira SC，et al. STING-dependent signaling underlies IL-10 controlled inflammatory colitis [J]. Cell Rep，2017，21（13）：3873-3884.

[7] Paludan SR，Bowie AG. Immune sensing of DNA [J]. Immunity，2013，38（5）：870-880.

[8] Zhang Y，Liang C. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation [J]. Sci China Life Sci，2016，59（12）：1210-1217.

[9] Chen Q，Sun L，Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. Nat Immunol，2016，17（10）：1142-1149.

[10] Ahn J，Gutman D，Saijo S，et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（47）：19386-19391.

[11] 孔静，王猛，张玉华，等 . 肠黏膜机械屏障的中西医结合研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志，2020，26（5）：1001-1004.

[12] Patankar JV，Becker C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2020，17（9）：543-556.

[13] Zhang X，Wu J，Liu Q，et al. mtDNA-STING pathway promotes necroptosis-dependent enterocyte injury in intestinal ischemia reperfusion [J]. Cell Death Dis，2020，11（12）：1050.

[14] Hu Q，Ren H，Li G，et al. STING-mediated intestinal barrier dysfunction contributes to lethal sepsis [J]. EBioMedicine，2019，41：497-508.

[15] Howell KJ，Kraiczy J，Nayak KM，et al. DNA methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome [J]. Gastroenterology，2018，154（3）：585-598.

[16] Aden K，Tran F，Ito G，et al. ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING [J]. J Exp Med，2018，215（11）：2868-2886.

[17] Wang Y，Wei B，Wang D，et al. DNA damage repair promotion in colonic epithelial cells by andrographolide down-regulated cGAS-STING pathway activation and contributed to the relief of CPT-11-induced intestinal mucositis [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（1）：262-273.

[18] Hu S，Peng L，Kwak YT，et al. The DNA sensor AIM2 maintains intestinal homeostasis via regulation of epithelial antimicrobial host defense [J]. Cell Rep，2015，13（9）：1922-1936.

[19] 刘靖伟，殷云勤 . 炎症性肠病相关肠道菌群失调的机制及治疗的研究进展 [J]. 中华老年多器官疾病杂志，2022，21（5）：397-400.

[20] Pabst O，Mowat AM. Oral tolerance to food protein [J]. Mucosal Immunol，2012，5（3）：232-239.

[21] Umesaki Y，Setoyama H，Matsumoto S，et al. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus [J]. Immunology，1993，79（1）：32-37.

[22] Barber GN. STING：infection，inflammation and cancer [J]. Nat Rev Immunol，2015，15（12）：760-770.

[23] Gutierrez-Merino J，Isla B，Combes T，et al. Beneficial bacteria activate type-I interferon production via the intracellular cytosolic sensors STING and MAVS [J]. Gut Microbes，2020，11（4）：771-788.

[24] Laukens D，Brinkman BM，Raes J，et al. Heterogeneity of the gut microbiome in mice：guidelines for optimizing experimental design [J]. FEMS Microbiol Rev，2016，40（1）：117-132.

[25] Kuhn KA，Pedraza I，Demoruelle MK. Mucosal immune responses to microbiota in the development of autoimmune disease [J]. Rheum Dis Clin North Am，2014，40（4）：711-725.

[26] 郭雪坤，胡小玉 . 炎症性肠病的发病机理与免疫治疗的研究进展 [J]. 生命科学，2017，29（9）：873-882.

[27] Shmuel-Galia L，Humphries F，Lei X，et al. Dysbiosis exacerbates colitis by promoting ubiquitination and accumulation of the innate immune adaptor STING in myeloid cells [J]. Immunity，2021，54（6）：1137-1153.

[28] Ma C，Yang D，Wang B，et al. Gasdermin D in macrophages restrains colitis by controlling cGAS-mediated inflammation [J]. Sci Adv，2020，6（21）：eaaz6717.

[29] Martin GR，Blomquist CM，Henare KL，et al. Stimulator of interferon genes（STING）activation exacerbates experimental colitis in mice [J]. Sci Rep，2019，9（1）：14281.

[30] Liu S，Xia Q，Wu X，et al. Stimulator of interferon genes in classical dendritic cells controls mucosal Th17 responses to cyclic dinucleotides for host defenses against microbial infections in gut [J]. Front Immunol，2018，9：1085.

[31] Tian J，Zhang D，Kurbatov V，et al. 5-fluorouracil efficacy requires anti-tumor immunity triggered by cancer-cell-intrinsic STING [J]. EMBO J，2021，40（7）：e106065.

[32] McWhirter SM，Jefferies CA. Nucleic acid sensors as therapeutic targets for human disease [J]. Immunity，2020，53（1）：78-97.

[33] Kuse N，Sun X，Akahoshi T，et al. Priming of HIV-1-specific $CD8^+$ T cells with strong functional properties from naive T cells [J]. EBioMedicine，2019，42：109-119.

[34] Ahn J，Konno H，Barber GN. Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer [J]. Oncogene，2015，34（41）：5302-5308.

[35] Seo K，Seo J，Yeun J，et al. The role of mucosal barriers in human gut health [J]. Arch Pharm Res，2021，44（4）：325-341.

[36] Li JD，Feng W，Gallup M，et al. Activation of NF-B via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1998，95（10）：5718-5723.

[37] He W，Wang ML，Jiang HQ，et al. Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELMbeta/FIZZ2，a novel goblet cell-specific protein [J]. Gastroenterology，2003，125（5）：1388-1397.

[38] Zhang X，Bai XC，Chen ZJ. Structures and mechanisms in the cGAS-STING innate immunity pathway [J]. Immunity，2020，53（1）：43-53.

（收稿日期：2022-06-16；修回日期：2022-08-29）

cGAS-STING 通路在调节肿瘤微环境中的研究进展

王飘飘，董婧，刘艳辉，姚佳晨，谢凡，李文艳*（上海市浦东新区公利医院药剂科，上海 200135）

摘要：近年来，许多研究表明，激活 cGAS-STING-IRF3 信号通路可以在体内外产生较强的抗肿瘤作用。利用 STING 激动剂可以激活 cGAS-STING-IRF3 信号通路，诱导产生Ⅰ型干扰素，Ⅰ型干扰素可以促进树突状细胞活化，进而激活 $CD8^+$ T 细胞发挥抗肿瘤作用。活化 STING 通路，可以调节肿瘤微环境中的各种免疫细胞，并且药物递送系统可以显著提升 STING 激动剂的抗肿瘤效果。此外，微生物以及机体自身的 DNA 损伤参与调节 cGAS-STING 信号通路影响肿瘤免疫的效果。本文将对 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中的作用进行综述。

关键词：cGAMP；STING；肿瘤微环境；免疫系统；免疫疗法

中图分类号：R96，R730.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2470-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.003

Advances in the regulation of tumor microenvironment by cGAS-STING pathway

WANG Piao-piao, DONG Jing, LIU Yan-hui, YAO Jia-chen, XIE Fan, LI Wen-yan* (*Department of Pharmacy, Gongli Hospital of Pudong New Area in Shanghai, Shanghai* 200135)

Abstract: Recent research has shown that cGAS-STING-IRF3 signaling pathway can be activated to produce potent anti-tumor effect both in vitro and in vivo. The cGAS-STING-IRF3 signaling pathway can be activated by STING agonists, which results in the production of type I interferon. This type of interferon can increase the activation of dendritic cells, and in turn, stimulate $CD8^+$ T lymphocytes to have anti-tumor effect. By turning on the STING pathway, different immune cells in the tumor microenvironment may be affected, and the drug delivery system can significantly boost the anti-tumor effect of STING agonists. Additionally, cGAS-STING pathway is modulated by microorganisms and DNA damage in order to modify anti-tumor immunotherapy. This paper discussed the role of cGAS-STING pathway in the tumor microenvironment.

Key words: cGAMP; STING; tumor microenvironment; immune system; immunotherapy

肿瘤微环境是指肿瘤细胞所处的内外环境，与肿瘤的发生、生长及转移有密切关系。在过去的 20 年中，一系列研究揭示了肿瘤微环境在调节肿瘤进展中的关键作用[1]。环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）是一种细胞质 DNA 传感器，可以激活干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon gene，STING）蛋白，随后诱发对各种含 DNA 病原体的保护性免疫防御，促进抗肿瘤免疫作用[2]。目前已经有科学家对 cGAS-STING 通路进行相关研究[3]，但该通路在肿瘤微环境中的系统性综述甚少，本文将对该通路在肿瘤微环境中的最新研究进行系统的梳理概括。

1 cGAMP-STING 通路简介

先天免疫系统是人类免疫系统的重要组成部分，为防御病原微生物提供了第一道防线。细胞质 DNA 或线粒体 DNA 作为免疫原性分子可以刺激免疫系统。最近，科学家发现一种新的 DNA 传感器 cGAS，它在细胞内广泛表达[4]。cGAS 催化三磷酸鸟苷（guanosine triphosphate，GTP）和三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）形成环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸（cGAMP），cGAMP

基金项目：上海市浦东新区卫健委领先人才（No. PWRI2021-11）。

作者简介：王飘飘，女，硕士，药师，主要从事药剂学与临床药学研究，email：wpp991295046@126.com *通信作者：李文艳，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事中药新药和临床药学研究，email：liwenyan_linda@163.com

进一步激活 STING，磷酸化干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor 3，IRF3），磷酸化的 IRF3 进入细胞核后增强Ⅰ型干扰素的转录，促进Ⅰ型干扰素的释放。cGAS-STING-IRF3 通路作为重要的免疫调节器，参与了病毒感染、肿瘤和炎症等病理过程。STING 通路在宿主对微生物感染的防御中起着关键作用，同时也参与了抗肿瘤免疫反应。大量的研究证明，通过激活 STING 通路抗肿瘤是一个很好的策略[5]。STING 通路激动剂在体内具有很好的抗肿瘤作用，已经有相关化合物进入临床试验。本文将重点讨论 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中的功能和机制。

2 cGAS-STING 通路通过调节免疫系统重塑肿瘤微环境

由于环境的影响，人体内的细胞随时都在发生 DNA 损伤。DNA 损伤导致 DNA 单链和双链断裂，单链 DNA 和双链 DNA 的积累可以被 DNA 感受器 cGAS 识别。cGAS 催化 ATP 与 GTP 合成 cGAMP，cGAMP 激活 STING 通路促进Ⅰ型干扰素的产生。越来越多的研究发现，$CD8^+$ T 细胞由 STING 和Ⅰ型干扰素激活，STING 活化后可以诱导肿瘤细胞死亡并积累更多的抗原[5]。

2.1 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中激活树突状细胞（dendritic cells，DCs）

DCs 是一种抗原呈递细胞，它可以识别肿瘤细胞并激活 T 细胞。研究发现 cGAMP 或其他 STING 激动剂在体外可以直接激活 DCs，并促进 $CD8^+$ T 细胞对肿瘤细胞抗原的识别；另外，该研究还发现，STING 激动剂在 CT26 荷瘤小鼠体内可以激活 DCs，DCs 标志物在脾脏和肿瘤组织中表达升高，而在体内缺乏 STING 的情况下，cGAMP 不能抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长，也不能诱导 DCs 活化[6]。不仅如此，cGAMP 也可以通过激活 STING 通路，增强辐射诱导的抗肿瘤作用[7]。Dai 等[8]研究发现，在结肠癌和黑色素瘤小鼠体内注射免疫治疗剂能够产生免疫反应，但免疫治疗剂在 STING 缺失的小鼠体内的抗肿瘤效果较差，这表明 STING 是免疫治疗剂抗肿瘤效果的重要条件。肿瘤微环境中的双链 DNA 可以刺激 cGAS-STING-IRF3 信号通路，诱导 DCs 激活并向肿瘤组织中浸润[9]。

2.2 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中激活 T 细胞

在肿瘤微环境中，$CD8^+$ T 细胞是发挥抗肿瘤作用的关键免疫细胞，被激活的 $CD8^+$ T 细胞可以产生干扰素 g（IFN-g）和颗粒酶 B。干扰素可以激活 DCs 并促进抗原呈递，进而刺激肿瘤微环境中的 $CD8^+$ T 细胞。研究显示，化疗引起肿瘤细胞 DNA 损伤，产生的单链 DNA 和双链 DNA 可以激活 cGAS-STING 通路，STING 通路的激活增加了趋化因子 CXCL10 和 CCL5 的表达，进一步促进了 $CD8^+$ T 细胞发挥抗肿瘤作用[10]，并且 $CD8^+$ T 细胞的交叉刺激作用在 STING 缺失的小鼠中是无效的[11]，而瘤内注射 cGAMP 可以通过 STING 依赖方式增强 $CD8^+$ T 细胞的抗肿瘤作用[12]。在结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌及黑色素瘤小鼠肿瘤模型中，瘤内注射 STING 激动剂可以抑制肿瘤的增殖[13]，肿瘤微环境中的 DCs 通过 STING 途径激活 $CD8^+$ T 细胞，促进 CXCL9 和 CXCL10 的释放而激活免疫系统[14]。在 B16 黑色素瘤肿瘤组织中，不同的 STING 激动剂可以诱导 $CD8^+$ T 细胞的增殖[15]。另外，激活内皮细胞中 STING 的表达也可以诱导肿瘤微环境中 $CD8^+$ T 细胞的活化[12, 16]。在小鼠黑色素瘤模型中，用 cGAMP 处理小鼠后，小鼠肿瘤微环境中的 DCs 和 $CD8^+$ T 细胞的数量与体内的抗肿瘤效果成正相关[15]。在肿瘤微环境中，STING 的细胞膜 DNA 感应介导了肿瘤的内源性免疫识别，促进 β 型干扰素的产生[11]。死亡相关蛋白激酶 3（death-associated protein kinase 3，DAPK3），可以通过 STING-IFN-β 通路驱动肿瘤内源性免疫识别。当 DAPK3 表达降低或 DAPK3 酶活性丧失时，肿瘤微环境中的 STING 通路的表达会受到抑制并且降低 β 型干扰素的产生。DAPK3 缺乏导致 $CD103^+$ $CD8\alpha^+$ 树突状细胞和细胞毒性淋巴细胞向肿瘤内部的浸润减少，减弱抗肿瘤免疫反应[17]。cGAS-STING 通路可以通过维持 $CD8^+$ T 细胞的干性，增强 $CD8^+$ T 细胞的治疗效果。研究发现 STING 可以通过调节 $CD8^+$ T 细胞转录因子 TCF1 的表达，维持细胞（如 $CD8^+$ T 细胞）的干性。自分泌型的 cGAS-STING 通路介导Ⅰ型干扰素信号，通过抑制 AKT 活性来增强干细胞样 $CD8^+$ T 细胞分化程序[18]。在荷瘤小鼠瘤内注射 cGAMP 可以激活 STING 通路，有效的增强抗肿瘤 $CD8^+$ T 细胞反应，并且与抗程序性死亡受体 1（PD-1）抗体和抗 CTLA4 抗体协同发挥抗肿瘤作用[12]。研究发现，在 *BRCA* 缺陷的三阴性乳腺癌模型中，多聚 ADP 核糖聚合酶（poly ADP-ribose polymerase，PARP）PARP 抑制剂可以通过 cGAS/STING 通路诱导的 $CD8^+$ T 细胞募集，敲除肿瘤细胞中的 *STING*，消除促炎症细胞因子的产生，并降低奥

拉帕利诱导的 $CD8^+$ T 细胞浸润 [19]。

嵌合抗原受体 T 细胞（chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy，CAR-T）疗法在治疗肿瘤中取得了巨大成功。研究显示，CAR-T 细胞通过靶向 DNA 损伤反应，激活 cGAS-STING 通路增强 CD70 CAR-T 细胞治疗肾癌 [20]。但是 CAR-T 细胞在肿瘤微环境中的渗透和耐受性有限，PARP 抑制剂通过激活 cGAS-STING 通路来调节肿瘤微环境，从而改变免疫刺激信号的平衡，并使低剂量 CAR-T 细胞治疗能够诱导有效的抗肿瘤作用 [20]。另外，由 Th/Tc17 细胞产生的 CAR-T 细胞在 STING 激活剂 DMXAA 或 cGAMP 的作用下抗肿瘤作用增强，DMXAA 通过趋化因子促进了 CAR-T 细胞在体内的循环和存活，并通过改变免疫刺激和抑制性髓性细胞的平衡促进了 CAR-T 细胞的募集和免疫抑制性肿瘤微环境的调节 [21]。

2.3 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中激活自然杀伤细胞（natural killer cell，NK cell）

NK 细胞是可以直接杀死肿瘤细胞的细胞毒性淋巴细胞，并分泌抗肿瘤细胞因子增强免疫反应。STING 可以诱导 NK 细胞介导抗肿瘤免疫反应，肿瘤细胞来源的 cGAMP 可以触发非肿瘤细胞中的 STING 通路，促进干扰素的释放，最终激活 NK 细胞 [22]。研究通过使用 B16 黑色素瘤和 MC38 结肠癌模型，发现 STING 的激活诱导了 CXCL10、CCL5 和 IL-33 的表达，并且这与荷瘤小鼠肿瘤微环境中的 NK 细胞浸润增强有关 [23]。同时，NK 细胞可以抑制对 $CD8^+$ T 细胞有抵抗的肿瘤细胞，这增强了 STING 激动剂的抗肿瘤效果 [24]，并且 STING 激活可以增强西妥昔单抗诱导的 NK 细胞的活性 [25]。这些都表明，肿瘤细胞衍生的 cGAMP 可以激活 NK 细胞以发挥抗肿瘤作用。

2.4 cGAS-STING 通路在肿瘤微环境中抑制髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cells，MDSCs）

MDSCs 是在骨髓中产生的免疫抑制细胞，这种细胞可以抑制 T 细胞的增殖与活化。有研究报道，野生型小鼠经放射治疗后，单核细胞来源的 MDSC（monocytic-MDSCs，M-MDSCs），在肿瘤组织中积累，随着体内 $CCR2^+$ MDSCs 的耗尽，T 细胞被激活 [26]。荷瘤小鼠经辐射或 STING 激动剂治疗后，肿瘤微环境中的 M-MDSCs 的数量取决于 STING 和Ⅰ型干扰素的水平 [26]。STING 激动剂通过抑制 STAT3 信号通路，抑制 MDSCs 的增殖分化，对 Epstein-Barr 病毒（EBV）诱导的鼻咽癌产生抗肿瘤作用 [27]。cGAMP 在荷瘤小鼠体内可以增强 STING 信号通路，激活 $CD8^+$ T 细胞产生 γ 型干扰素，并减少肿瘤微环境中 MDSCs 的数量，降低 MDSCs 对 $CD8^+$ T 细胞的免疫抑制功能 [28]。研究显示，半乳糖凝集素 -9（Gal-9）可以通过 E3 泛素连接酶 TRIM29 介导的 STING 依赖的 K48 连接泛素化，加速 STING 蛋白降解，上调多种促炎细胞因子的表达，这些细胞因子对 MDSCs 分化至关重要，包括 IL-1β 和 IL-6。在肿瘤微环境中，Gal-9 通过抑制 STING，诱导 MDSCs 介导的免疫抑制作用 [29]。

3 STING 激动剂参与调节肿瘤微环境

在肿瘤治疗方面，STING 激动剂与化疗药物或免疫治疗药物的联合使用在抗肿瘤研究中显示出更好的治疗效果。

研究显示，cGAMP 与 5- 氟尿嘧啶（5-FU）在荷瘤小鼠体内联合使用可以增强抗肿瘤效果，并降低 5-FU 对小鼠小肠的毒性作用，提高小鼠的生存率 [6]。免疫检查点抑制剂可以阻断检查点蛋白对肿瘤细胞的识别和攻击。研究证实，黑色素瘤小鼠肌内注射 cGAMP 可以抑制肿瘤的生长，提高肿瘤小鼠的存活率，并且与抗 PD-L1 抗体联合使用具有更好的抗肿瘤效果 [30]，肿瘤内注射 cGAMP 及其类似物也有更好的抗肿瘤效果 [12，14]。另外，血管内皮生长因子受体 2（VEGFR2）抑制剂与 STING 激动剂联合使用时，肿瘤微环境中产生更多有效的 $CD8^+$ T 细胞 [16]。研究人员设计出两种高效的新型 STING 激动剂——IACS-8803 与 IACS-8779，它们在体外可以有效的激活 STING 通路，并且在 B16 小鼠黑色素瘤模型中显示出很好的抗肿瘤效果 [31]。不仅如此，研究人员通过高通量筛选确定了一种口服的 STING 激动剂 MSA-2，MSA-2 单独使用时可以激活机体的先天性免疫反应，当其与抗 PD-1 抗体联合使用时，效果优于单一疗法 [32]。外核苷酸酶 ENPP1 可以通过选择性降解细胞外 cGAMP 促进肿瘤转移，ENPP1 缺失可以抑制肿瘤转移，促进肿瘤组织内的免疫细胞浸润 [33]。除此之外，STING 激动剂可以促进黑色素瘤肿瘤微环境中的血管正常化和三级淋巴结构新生，增强 $CD8^+$ T 细胞和 $CD11c^+$ DCs 在肿瘤微环境中的浸润，这种肿瘤微环境的重塑都依赖于 STING 在宿主表达 [34]。STING 激动剂也可以通过增强胰腺癌肿瘤免疫微环境中炎症因子的表达重塑肿瘤微环境，增强肿瘤内细胞毒性 T 细胞的数量和活性，降低调节性 T 细胞的水平，提高

荷瘤小鼠的存活率[35]。

4 药物递送系统提升 STING 激动剂抗肿瘤效果

药物递送系统是指用于定向给药和/或控制释放治疗剂的工程技术。研究人员设计了一种脂质体纳米颗粒递送的 cGAMP（cGAMP-NPs），该脂质体纳米颗粒在三阴乳腺癌小鼠体内激活先天免疫系统，将小鼠和人巨噬细胞中的 M2 型巨噬细胞逆转为 M1 型巨噬细胞，并增加了细胞毒性 $CD8^+$ T 细胞的浸润[36]。另一种用于癌症免疫治疗的长期、脉冲式释放 STING 激动剂的工程化微粒子，单次瘤内注射可触发有效的局部和全身抗肿瘤免疫反应，抑制肿瘤生长，延长生存期[37]。另有研究设计出 STING 激活纳米颗粒（STING-activating nanoparticles，STING-NPs），可增强肿瘤微环境和前哨淋巴结中的 STING 信号，提高肿瘤微环境的免疫原性，增强抗肿瘤作用[38]。另外，研究发现 Mn^{2+} 与 CDN-STING 激动剂可协同自组装成纳米颗粒（CDN-Mn^{2+} 颗粒，CMP），有效地将 STING 激动剂传递给免疫细胞，局部瘤内注射或全身静脉注射给予 CMP 可启动强大的抗肿瘤免疫反应，并且在结直肠癌和黑色素瘤小鼠肿瘤模型中使用小剂量的纳米颗粒即可获得显著的治疗效果[39]。除此之外，研究人员研发出一种用于癌症免疫治疗的 STING 激活纳米疫苗，PC7A 纳米疫苗，由聚合物纳米颗粒包裹肿瘤抗原而成，可产生强烈的细胞毒性 T 细胞反应，该疫苗在引流淋巴结中实现了肿瘤抗原的高效胞质递送，同时通过 STING 通路促进Ⅰ型干扰素的释放[40]。也有研究人员采用一种可吸入的 STING 激动剂纳米颗粒与放疗同时使用，可以使肺部转移的肿瘤得到长期控制，STING 激动剂纳米颗粒可以增强 cGAMP 在胞浆中的释放，从而在肺脏中形成促炎性肿瘤微环境[41]，当设计成多聚体介导的 STING 激动剂，可以实现胞浆内递送，增强肿瘤免疫治疗的效果[42]。

5 微生物参与调节 cGAS-STING 信号通路

最近的研究显示，肠道微生物群可以通过激活肠道免疫系统影响肿瘤治疗效果。研究显示，肠道微生物群在肿瘤内聚集后，可以通过 STING 信号通路促进基于 CD47 的免疫治疗。进一步研究结果显示，双歧杆菌在肿瘤微环境中的积累可以促进肿瘤组织的局部抗 CD47 免疫治疗的效果；双歧杆菌在肿瘤内积聚，可以促进 STING 通路的活化，增加 DCs 的抗原呈递，并提高免疫治疗的效果；该研究还确定了肠道菌群可以定植于肿瘤部位，并通过 STING 信号促进免疫治疗的机制[43]。另一项研究显示，肠道微生物通过 STING 及Ⅰ型干扰素依赖性机制调节肿瘤微环境，促进肿瘤内单核吞噬细胞增强抗肿瘤效果[44]。

6 DNA 损伤增强 cGAS-STING 信号通路

研究显示，缺少 DNA 错配修复的癌症患者对免疫疗法有较好的反应。除了新抗原之外，研究人员发现，DNA 错配修复细胞可以通过 cGAS-STING 通路在治疗中获益[45]。MLH1（MutL Homolog 1，MLH1）是 DNA 错位修复系统中的关键蛋白，研究人员在 MLH1 缺陷的肿瘤模型中发现肿瘤细胞可以积累胞浆 DNA，并以 cGAS-STING 依赖的方式产生β型干扰素，进而抑制肿瘤增殖。当给予免疫检查点抑制剂治疗后，可以提高抗肿瘤效果[46]。同时，肿瘤细胞 MLH1 缺失可触发外切酶 1 的 DNA 超切割，导致染色体异常，促进核 DNA 释放到细胞质中，激活 cGAS-STING 通路重塑肿瘤微环境[47]。不仅如此，抑制共济失调症突变蛋白 ATM（ataxia telangiectasia mutated，ATM）可以促进线粒体 DNA 的细胞质向胞浆中释放激活 cGAS/STING 通路，增强肿瘤免疫治疗的效果[48]。

7 总结和展望

cGAS-STING 信号通路在癌症生物治疗中显示出宝贵的潜力。激活 cGAS-STING 信号通路可以重塑肿瘤微环境，达到肿瘤治疗的目的[49]。同时，通过适当的递送系统递送相应的激动剂来增强抗肿瘤免疫的能力，可以极大地促进肿瘤生物治疗的综合疗效。综上，调节 cGAS-STING 通路有望成为肿瘤免疫疗法中一种有前途的策略。

参考文献

[1] Walker C，Mojares E，Del Rio Hernandez A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression [J]. Int J Mol Sci，2018，19（10）：3028.

[2] Chen Q，Sun L，Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. Nat Immunol，2016，17（10）：1142-1149.

[3] Decout A，Katz JD，Venkatraman S，et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Immuno，2021，21（9）：548-569.

[4] Motwani M，Pesiridis S，Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease [J]. Nat Rev Genet，2019，20（11）：657-674.

[5] Zhu Y，An X，Zhang X，et al. STING：a master regulator in the cancer-immunity cycle [J]. Mol Cancer，2019，18（1）：152.

[6] Li T，Cheng H，Yuan H，et al. Antitumor activity of cGAMP via stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 mediated innate immune response [J]. Sci Rep，2016，6：19049.

[7] Deng L，Liang H，Xu M，et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type i interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors [J]. Immunity，2014，41（5）：843-852.

[8] Dai P，Wang W，Yang N，et al. Intratumoral delivery of inactivated modified vaccinia virus Ankara（iMVA）induces systemic antitumor immunity via STING and Batf3-dependent dendritic cells [J]. Sci Immunol，2017，2（11）：eaal1713.

[9] Diamond JM，Vanpouille-Box C，Spada S，et al. Exosomes shuttle TREX1-sensitive IFN-stimulatory dsDNA from irradiated cancer cells to DCs [J]. Cancer Immunol Res，2018，6（8）：910-920.

[10] Sen T，Rodriguez BL，Chen L，et al. Targeting DNA damage response promotes antitumor immunity through STING-mediated T-cell activation in small cell lung cancer [J]. Cancer Discov，2019，9（5）：646-661.

[11] Woo SR，Fuertes MB，Corrales L，et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors [J]. Immunity，2014，41（5）：830-842.

[12] Demaria O，De Gassart A，Coso S，et al. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112（50）：15408-15413.

[13] Corrales L，Gajewski TF. Molecular pathways：targeting the stimulator of interferon genes（STING）in the immunotherapy of cancer [J]. Clin Cancer Res，2015，21（21）：4774-4779.

[14] Corrales L，Glickman LH，McWhirter SM，et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity [J]. Cell Rep，2015，11（7）：1018-1030.

[15] Fu J，Kanne DB，Leong M，et al. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade [J]. Sci Transl Med，2015，7（283）：283ra252.

[16] Yang H，Lee WS，Kong SJ，et al. STING activation reprograms tumor vasculatures and synergizes with VEGFR2 blockade [J]. J Clin Invest，2019，129（10）：4350-4364.

[17] Takahashi M，Lio CJ，Campeau A，et al. The tumor suppressor kinase DAPK3 drives tumor-intrinsic immunity through the STING-IFN-beta pathway [J]. Nat Immunol，2021，22（4）：485-496.

[18] Li W，Lu L，Lu J，et al. cGAS-STING-mediated DNA sensing maintains $CD8^+$ T cell stemness and promotes antitumor T cell therapy [J]. Sci Transl Med，2020，12（549）：eaay9013.

[19] Pantelidou C，Sonzogni O，De Oliveria Taveira M，et al. PARP inhibitor efficacy depends on $CD8^+$ T-cell recruitment via intratumoral STING pathway activation in BRCA-deficient models of triple-negative breast cancer [J]. Cancer Discov，2019，9（6）：722-737.

[20] Ji F，Zhang F，Zhang M，et al. Targeting the DNA damage response enhances CD70 CAR-T cell therapy for renal carcinoma by activating the cGAS-STING pathway [J]. J Hematol Oncol，2021，14（1）：152.

[21] Xu N，Palmer DC，Robeson AC，et al. STING agonist promotes CAR T cell trafficking and persistence in breast cancer [J]. J Exp Med，2021，218（2）：e20200844.

[22] Marcus A，Mao AJ，Lensink-Vasan M，et al. Tumor-derived cGAMP triggers a STING-mediated interferon response in non-tumor cells to activate the NK cell response [J]. Immunity，2018，49（4）：754-763 e754.

[23] Takashima K，Takeda Y，Oshiumi H，et al. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation [J]. Biochem Biophys Res Commun，2016，478（4）：1764-1771.

[24] Nicolai CJ，Wolf N，Chang IC，et al. NK cells mediate clearance of $CD8^+$ T cell-resistant tumors in response to STING agonists [J]. Sci Immunol，2020，5（45）：eaaz2738.

[25] Lu S，Concha-Benavente F，Shayan G，et al. STING activation enhances cetuximab-mediated NK cell activation and DC maturation and correlates with HPV（+）status in head and neck cancer [J]. Oral Oncol，2018，78：186-193.

[26] Liang H，Deng L，Hou Y，et al. Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance [J]. Nat Commun，2017，8（1）：1736.

[27] Zhang CX，Ye SB，Ni JJ，et al. STING signaling remodels the tumor microenvironment by antagonizing myeloid-derived suppressor cell expansion [J]. Cell Death Differ，2019，26（11）：2314-2328.

[28] Cheng H，Xu Q，Lu X，et al. Activation of STING by cGAMP regulates MDSCs to suppress tumor metastasis via reversing epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Oncol，2020，10：896.

[29] Zhang CX，Huang DJ，Baloche V，et al. Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation [J]. Oncogenesis，2020，9（7）：65.

[30] Wang H，Hu S，Chen X，et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2017，114（7）：1637-1642.

[31] Ager CR，Zhang H，Wei Z，et al. Discovery of IACS-8803 and IACS-8779，potent agonists of stimulator of interferon genes（STING）with robust systemic antitumor efficacy [J]. Bioorg Med Chem Lett，2019，29（20）：126640.

[32] Pan BS，Perera SA，Piesvaux JA，et al. An orally available non-nucleotide STING agonist with antitumor activity [J]. Science，2020，369（6506）：eaba6098.

[33] Li J，Duran MA，Dhanota N，et al. Metastasis and immune evasion from extracellular cGAMP hydrolysis [J]. Cancer Discov，2021，11（5）：1212-1227.

[34] Chelvanambi M，Fecek RJ，Taylor JL，et al. STING agonist-based treatment promotes vascular normalization and tertiary lymphoid structure formation in the therapeutic melanoma microenvironment [J]. J Immunother Cancer，2021，9（2）：e001906.

[35] Jing W，McAllister D，Vonderhaar EP，et al. STING agonist inflames the pancreatic cancer immune microenvironment and reduces tumor burden in mouse models [J]. J Immunother Cancer，2019，7（1）：115.

[36] Cheng N，Watkins-Schulz R，Junkins RD，et al. A nanoparticle-incorporated STING activator enhances antitumor immunity in PD-L1-insensitive models of triple-negative breast cancer [J]. JCI Insight，2018，3（22）：e120638.

[37] Lu X，Miao L，Gao W，et al. Engineered PLGA microparticles for long-term，pulsatile release of STING agonist for cancer immunotherapy [J]. Sci Transl Med，2020，12（556）：eaaz6606.

[38] Shae D，Becker KW，Christov P，et al. Endosomolytic polymersomes increase the activity of cyclic dinucleotide STING agonists to enhance cancer immunotherapy [J]. Nat Nanotechnol，2019，14（3）：269-278.

[39] Sun X，Zhang Y，Li J，et al. Amplifying STING activation by cyclic dinucleotide-manganese particles for local and systemic cancer metalloimmunotherapy [J]. Nat Nanotechnol，2021，16（11）：1260-1270.

[40] Luo M，Wang H，Wang Z，et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy [J]. Nat Nanotechnol，2017，12（7）：648-654.

[41] Liu Y，Crowe WN，Wang L，et al. An inhalable nanoparticulate STING agonist synergizes with radiotherapy to confer long-term control of lung metastases [J]. Nat Commun，2019，10（1）：5108.

[42] Zheng H，Guo B，Qiu X，et al. Polymersome-mediated cytosolic delivery of cyclic dinucleotide STING agonist enhances tumor immunotherapy [J]. Bioact Mater，2022，16：1-11.

[43] Shi Y，Zheng W，Yang K，et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling [J]. J Exp Med，2020，217（5）：e20192282.

[44] Lam KC，Araya RE，Huang A，et al. Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment [J]. Cell，2021，184（21）：5338-5356 e5321.

[45] Kaneta A，Nakajima S，Okayama H，et al. Role of the cGAS-STING pathway in regulating the tumor-immune microenvironment in dMMR/MSI colorectal cancer [J]. Cancer Immunol Immunother，2022.

[46] Lu C，Guan J，Lu S，et al. DNA sensing in mismatch repair-deficient tumor cells is essential for anti-tumor immunity [J]. Cancer Cell，2021，39（1）：96-108 e106.

[47] Guan J，Lu C，Jin Q，et al. MLH1 deficiency-triggered DNA hyperexcision by exonuclease 1 activates the cGAS-STING pathway [J]. Cancer Cell，2021，39（1）：109-121 e105.

[48] Hu M，Zhou M，Bao X，et al. ATM inhibition enhances cancer immunotherapy by promoting mtDNA leakage and cGAS/STING activation [J]. J Clin Invest，2021，131（3）：e193333.

[49] Duan Q，Zhang H，Zheng J，et al. Turning cold into hot：firing up the tumor microenvironment [J]. Trends Cancer，2020，6（7）：605-618.

（收稿日期：2022-06-20；修回日期：2022-09-24）

研究论文

红鬼笔化学成分及其细胞毒性研究

吴光栩[1, 2]，李雷[1, 2]，李馨蕊[1, 2]，蒙春旺[1, 2]，彭成[1]，刘娟[1, 2*]，熊亮[1, 2*]（1. 成都中医药大学药学院 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室，成都 611137；2. 成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所，成都 611137）

摘要：目的 研究红鬼笔 *Phallus rubicundus*（Bosc.）Fr. 的化学成分及其对非小细胞肺癌 A549 细胞的毒性作用。**方法** 采用硅胶和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱、制备薄层色谱以及半制备高效液相色谱等分离技术，对红鬼笔的 95% 乙醇提取物进行分离纯化，运用现代波谱学手段对分离的化学成分进行结构鉴定，结合 MTT 法评价化合物对非小细胞肺癌 A549 细胞的毒性作用。**结果** 从红鬼笔中共分离得到 8 个化合物，分别鉴定为（22*E*，24*R*）-麦角甾 -7，22-二烯 -3*β*，5*α*- 二醇 -6，5- 内酯（**1**）、（22*E*，24*R*）- 麦角甾 -7，22- 二烯 -3*β*，5*α*，6*α*，9*α*- 四醇（**2**）、1*H*- 吲哚 -3- 甲醛（**3**）、吲唑（**4**）、壬二酸（**5**）、4，4- 二甲基 -1，7- 庚二酸（**6**）、对羟基苯乙酸甲酯（**7**）、*D*- 甘露醇（**8**）。细胞毒性测试发现化合物 **2** 对非小细胞肺癌 A549 细胞具有毒性作用，IC_{50} 值为 46.4 μmol • L^{-1}。**结论** 化合物 **1** ～ **8** 均为首次从鬼笔属真菌中分离得到。

关键词：红鬼笔；化学成分；A549 细胞；细胞毒性

中图分类号：R284.1，R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2476-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.004

Chemical constituents and cytotoxic effect of *Phallus rubicundus*

WU Guang-xu[1, 2], LI Lei[1, 2], LI Xin-rui[1, 2], MENG Chun-wang[1, 2], PENG Cheng[1], LIU Juan[1, 2*], XIONG Liang[1, 2*] (1. *State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137; 2. *Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from *Phallus rubicundus* and their cytotoxic effects on A549 cells. **Methods** The 95% ethanolic extraction of the fruiting bodies of *Phallus rubicundus* was isolated and purified by column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, preparative TLC, and semi-preparative RP-HPLC. The structures of the isolates were elucidated by spectroscopic methods. The cytotoxic effect of the compounds was evaluated by an MTT assay using A549 cells. **Results** Eight compounds were isolated from *Phallus rubicundus*, and their structures were identified as (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-dien-3*β*, 5*α*-diol-6, 5-olide (**1**), (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3*β*, 5*α*, 6*α*, 9*α*-tetraol (**2**), 1*H*-indole-3-carbaldehyde (**3**), indazole (**4**), azelaic acid (**5**), 4, 4-dimethyl-1, 7-pimelic acid (**6**), *p*-hydroxyphenylacetic acid methyl ester (**7**), and *D*-mannitol (**8**). Compound **2** has cytotoxicity against A549 cells with the IC_{50} value of 46.4 μmol • L^{-1}. **Conclusion** Compounds **1** ～ **8** have been isolated from the genus *Phallus* for the first time.

Key words: *Phallus rubicundus*; chemical constituent; A549 cell; cytotoxicity

基金项目：国家自然科学基金区域创新发展联合基金（No. U19A2010）；成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划（No. BSH2019028）。

作者简介：吴光栩，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：790791706@qq.com *通信作者：熊亮，男，研究员，主要从事中药药效物质基础及开发应用研究，email：xiling0505@126.com；刘娟，女，讲师，主要从事中药药效物质基础及开发应用研究，email：liuj02022@163.com

真菌在自然界中分布广泛，尤其以营养丰富、味道鲜美的药食两用菌备受人们喜爱。目前，国内外共归属了 70 余种鬼笔科真菌，包括竹荪、白鬼笔、红鬼笔等，但现代研究以竹荪和白鬼笔居多，均有提高免疫力、抗炎抑菌、抑制肿瘤细胞生长等作用[1-3]。鬼笔菌科真菌红鬼笔 *Phallus rubicundus*（Bosc.）Fr. 作为同科中分布广泛且具有药用价值的真菌子实体，研究价值颇高。《本草纲目》记载红鬼笔具有“清热解毒，消肿生肌”的功效，可用于治疗恶疮、痈疽、喉痹、刀伤、烫火伤等，但是目前针对红鬼笔的基础研究十分缺乏。课题组前期从红鬼笔中分离鉴定了 10 个麦角甾类成分[4]，该类成分广泛分布于药食两用真菌中，且具有调节免疫和抑制肿瘤细胞生长的作用[5-6]。为进一步明确红鬼笔的物质基础，本研究利用多种色谱方法和波谱技术对红鬼笔醇提物进行化学成分研究，从中共分离得到 8 个化合物（结构式见图 1），均为首次从鬼笔属真菌中分离得到。此外，对分离得到的化合物进行了细胞毒活性评价。

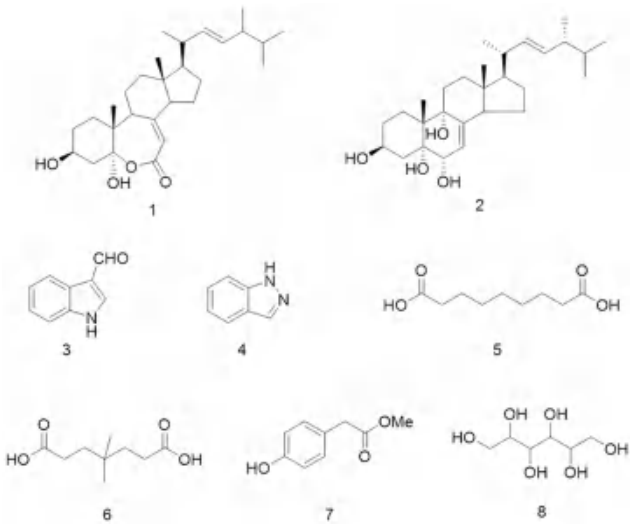


图 1　化合物 **1** ～ **8** 的化学结构

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

1　材料

Thermo LTQ 质谱仪、Multiskan MK3 酶标仪（美国 Thermo 公司）；Bruker-600 MHz、Bruker-500 MHz 核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；Micro-TOF-Q Ⅱ型质谱仪、Agilent 1220 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；AL 104 电子天平（上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；Allegra X-12R 离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；Series II Water Jacket CO_2 孵箱（Thermo Scientific 公司）；AE 2000 电子显微镜（Motic 公司）。

200 ～ 300 目柱色谱硅胶（青岛海洋化工厂）；Sephadex LH-20（瑞典 Amershan Pharmacia 公司）；GF254 硅胶薄层板（烟台江友硅胶开发有限公司）；色谱甲醇（美国 Sigma 公司）；其他试剂均为分析纯（成都市科隆化学品有限公司）；细胞培养板（美国 Costar 公司）；RPMI-1640（美国 Gibico 公司，批号：8120480）；新生牛血清（浙江天杭生物科技股份有限公司，批号：20100201）；胰蛋白酶（Solarbio 公司，批号：910O041）；MTT（北京金泰宏达生物科技有限公司，CAS：298-93-1）；二甲基亚砜（DMSO，成都科龙化工试剂厂）；A549 细胞株（南京凯基生物科技发展有限公司）。

红鬼笔药材于 2015 年 8 月购自成都荷花池中药材专业市场，经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为鬼笔菌科真菌红鬼笔 *Phallus rubicundus*（Bosc.）Fr. 的子实体。标本（PR20150825）现存于成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所。

2　提取与分离

取红鬼笔子实体 6 kg，加入 8 倍量 95% 乙醇浸泡过夜，加热回流提取 3 次，每次 3 h，将 3 次所得药液合并，减压浓缩，得红鬼笔乙醇提取物。乙醇提取物中析出无色针状结晶，经甲醇反复重结晶，得化合物 **8**（50 mg）。将红鬼笔乙醇提取物加热水分散，用乙酸乙酯萃取，减压浓缩，得乙酸乙酯萃取物（184 g）。乙酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱分离，石油醚 - 乙酸乙酯（100∶0 → 0∶100）梯度洗脱，得到 19 个组分 Fr. 1 ～ 19。Fr. 10（7 g）经甲醇反复溶解，得到不溶部分 Fr. 10-1 和溶液部分 Fr. 10-2。Fr. 10-2 经反相硅胶柱色谱分离，甲醇 - 水（30∶70 → 0∶100）梯度洗脱得到 5 个组分 Fr. 10-2-1 ～ Fr. 10-2-5。Fr. 10-2-3（1.2 g）经 Sephadex LH-20 柱色谱，石油醚 - 二氯甲烷 - 甲醇（5∶5∶1）洗脱，得到 8 个组分 Fr. 10-2-3-1 ～ Fr. 10-2-3-8。Fr. 10-2-3-6 经制备薄层色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 6∶1）和反相半制备 HPLC 色谱（88% 甲醇水）分离，得到化合物 **1**（2.5 mg）和 **2**（2.0 mg）。Fr. 13（5 g）经 Sephadex LH-20 柱色谱，二氯甲烷 - 甲醇（1∶1）洗脱，得到 7 个组分 Fr. 13-1 ～ Fr. 13-7。Fr. 13-4 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱，石油醚 - 二氯甲烷 - 甲醇（5∶5∶1）洗脱得到 5 个组分 Fr. 13-4-1 ～ Fr. 13-4-5。Fr. 13-4-3 进一步经反复硅胶柱色谱分离后，以反相半制备 HPLC 色谱（80% 甲醇水）纯化，得到化合物 **7**（2.3 mg）。Fr. 13-5 经制备薄层色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 15∶1）及反相半制备 HPLC 色谱（55% 甲醇水）分离纯化得到化合物 **5**（2.1 mg）和 **6**（1.8 mg）。Fr. 13-6 经反复

硅胶柱色谱、制备薄层色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝15∶1）和反相半制备 HPLC 色谱（60% 甲醇水）分离，得到化合物 **3**（2.3 mg）和 **4**（1.8 mg）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色无定形粉末，ESI-MS *m/z* 467.5 $[M + Na]^+$；^{1}H NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：5.72（1H，s，H-7），5.24（1H，dd，J ＝ 15.5，8.0 Hz，H-23），5.15（1H，dd，J ＝ 15.5，8.5 Hz，H-22），3.80（1H，m，H-3），2.27 ～ 2.11（3H，m，H-4，9），2.10 ～ 2.00（3H，m，H-12a，14），1.95（1H，m，H-20），1.90 ～ 1.70（4H，m，H-1a，2a，11a，24），1.66（1H，m，H-16a），1.52 ～ 1.43（4H，m，H-11b，15，25），1.43 ～ 1.33（5H，m，H-1b，2b，12b，16b，17），1.07（3H，s，H-19），1.02（3H，d，J ＝ 6.5 Hz，H-21），0.92（3H，d，J ＝ 7.0 Hz，H-28），0.84（3H，d，J ＝ 7.0 Hz，H-26），0.82（3H，d，J ＝ 7.0 Hz，H-27），0.63（3H，s，H-18）；^{13}C NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：166.3（C-6），159.1（C-8），135.1（C-22），132.8（C-23），115.5（C-7），104.2（C-5），67.7（C-3），58.2（C-14），56.5（C-17），51.9（C-9），46.8（C-13），46.5（C-4），43.0（C-10），43.0（C-24），40.5（C-20），40.1（C-12），36.0（C-1），33.2（C-25），30.6（C-2），27.9（C-16），25.5（C-11），23.2（C-15），21.2（C-21），20.1（C-26），19.8（C-27），17.9（C-19），17.8（C-28），12.6（C-18）。以上数据与文献报道基本一致[7]，故鉴定化合物 **1** 为（22*E*，24*R*）- 麦角甾 -7，22- 二烯 -3*β*，5*α*- 二醇 -6，5- 内酯。

化合物 **2**：白色无定形粉末，ESI-MS *m/z* 447.4 $[M + H]^+$；^{1}H NMR（600 MHz，C_5D_5N）δ：5.19（1H，m，H-23），5.18（1H，m，H-22），5.17（1H，brs，H-7），4.64（1H，m，H-3），4.34（1H，brs，H-6），3.70（1H，s，OH-5），3.47（1H，s，OH-9），2.48（1H，m，H-14），2.05（2H，m，H-1），1.94（1H，m，H-20），1.85（2H，m，H-2），1.17（3H，s，H-19），1.05（3H，d，J ＝ 6.0 Hz，H-21），0.94（3H，d，J ＝ 5.4 Hz，H-28），0.85（3H，d，J ＝ 6.0 Hz，H-27），0.83（3H，d，J ＝ 5.4 Hz，H-26），0.66（3H，s，H-18）；^{13}C NMR（150 MHz，C_5D_5N）δ：142.8（C-8），136.4（C-22），132.3（C-23），122.1（C-7），78.6（C-5），74.8（C-9），70.8（C-6），67.2（C-3），56.2（C-17），51.1（C-14），44.3（C-13），43.3（C-24），41.8（C-10），41.7（C-20），41.1（C-4），36.0（C-12），33.6（C-25），32.0（C-2），28.9（C-16），28.1（C-11），27.9（C-1），23.4（C-15），21.6（C-21），20.9（C-19），20.4（C-27），20.1（C-26），18.1（C-28），12.2（C-18）。以上数据与文献报道基本一致[8]，故鉴定化合物 **2** 为（22*E*，24*R*）- 麦角甾 -7，22- 二烯 -3*β*，5*α*，6*α*，9*α*- 四醇。

化合物 **3**：黄色粉末。ESI-MS *m/z* 146.1 $[M + H]^+$；^{1}H NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：9.89（1H，s，CHO），8.16（1H，dd，J ＝ 7.8，1.2 Hz，H-4），8.10（1H，s，H-2），7.48（1H，dd，J ＝ 7.8，1.2 Hz，H-7），7.28（1H，td，J ＝ 7.8，1.2 Hz，H-6），7.24（1H，td，J ＝ 7.8，1.2 Hz，H-5）；^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：187.4（CHO），139.7（C-2），138.9（C-8），125.7（C-9），125.0（C-4），123.6（C-6），122.4（C-5），120.1（C-3），113.1（C-7）。以上数据与文献报道基本一致[9]，故鉴定化合物 **3** 为 1*H*- 吲哚 -3- 甲醛。

化合物 **4**：黄色粉末。ESI-MS *m/z* 141.1 $[M + Na]^+$；^{1}H NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：8.11（1H，dd，J ＝ 8.4，1.2 Hz，H-4），7.91（1H，s，H-3），7.41（1H，dd，J ＝ 8.4，1.2 Hz，H-7），7.18（1H，td，J ＝ 8.4，1.2 Hz，H-6），7.16（1H，td，J ＝ 8.4，1.2 Hz，H-5）；^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：138.2（C-8），132.9（C-3），127.7（C-6），123.4（C-9），122.2（C-4），122.1（C-5），112.7（C-7）。以上数据与文献报道基本一致[10]，故鉴定化合物 **4** 为吲唑。

化合物 **5**：无色针晶。ESI-MS *m/z* 211.1 $[M + Na]^+$；^{1}H NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：2.28（4H，t，J ＝ 7.2 Hz，H-2，8），1.61（4H，m，H-3，7），1.35（6H，m，H-4，5，6）；^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：177.7（C-1，9），34.9（C-2，8），30.1（C-4，5，6），26.0（C-3，7）。以上数据与文献报道基本一致[11]，故鉴定化合物 **5** 为壬二酸。

化合物 **6**：白色粉末。ESI-MS *m/z* 211.1 $[M + Na]^+$；^{1}H NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：2.28（4H，t，J ＝ 7.2 Hz，H-2，6），1.61（4H，m，H-3，5），1.36（6H，brs，CH_3）；^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：177.8（C-1，7），35.0（C-2，6），30.1（C-3，5），26.1（C-4，8，9）。以上数据与文献报道基本一致[12]，故鉴定化合物 **6** 为 4，4- 二甲基 -1，7- 庚二酸。

化合物 **7**：白色粉末。ESI-MS *m/z* 189.1 $[M + Na]^+$；^{1}H NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.07（2H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-2，6），6.72（2H，d，J ＝ 8.5

Hz，H-3，5），3.66（3H，s，OCH_3），3.52（2H，s，H-7）。^{13}C NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：174.6（C-8），157.5（C-4），131.1（C-2，6），126.2（C-1），116.3（C-3，5），52.4（OCH_3-8），40.8（C-7）。以上数据与文献报道基本一致[13]，故鉴定化合物 **7** 为对羟基苯乙酸甲酯。

化合物 **8**：无色针晶。ESI-MS *m/z* 205.1 [M＋Na]$^+$。^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：4.37（2H，brs，OH-2，5），4.29（2H，brs，OH-1，6），4.10（2H，brs，OH-3，4），3.58～3.46（4H，m，H-1，6），3.39（4H，m，H-2，3，4，5）。^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：71.4（C-3，4），69.7（C-2，5），63.9（C-1，6）。以上数据与文献报道基本一致[14]，故鉴定化合物 **8** 为 *D*-甘露醇。

4 细胞毒性作用研究

将 A549 细胞置于完全培养基（含 10%PBS、1% 青霉素 - 链霉素溶液的 RPMI 1640 培养基）中，并于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养，选取处于对数生长期的 A549 细胞进行实验。以每孔 5.0×10^3 个细胞接种于 96 孔板上，放入培养箱培养 24 h 后，将细胞分为 3 个组，加入 RPMI 1640 培养基作为对照组，加入不同浓度的紫杉醇（7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 nmol • L^{-1}）作为阳性组，加入不同浓度的化合物 **1** ～ **8**（3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol • L^{-1}）作为药物组，于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养 48 h。取出，向每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液（5 mg • mL^{-1}），继续孵育 4 h，移去上清液，每孔加入 150 μL DMSO，置于水平摇床上震荡，使甲瓒完全溶解于 DMSO。在 570 nm 波长下测定每孔的 *OD* 值，并计算半数抑制浓度值（IC_{50}）。

结果显示紫杉醇的 IC_{50} 是（15.22±0.21）nmol • L^{-1}；在 3.125 ～ 100 μmol • L^{-1}，化合物 **2** 对 A549 细胞表现出一定的毒性作用，IC_{50} 值为 46.4 μmol • L^{-1}，其他化合物在 100 μmol • L^{-1} 浓度下对 A549 细胞无明显毒性作用。

5 讨论

本研究从红鬼笔的 95% 乙醇提取物中分离得到 8 个化合物，其中化合物 **1** 和 **2** 为麦角甾类化合物，进一步结构分析发现化合物 **1** 是麦角甾烷经裂环、酯化一系列转化而形成的特殊内酯化合物，此化合物仅在灵芝这种真菌中有报道[7]，推测这种次级代谢产物的产生可能与真菌独特的环境或特殊的酶催化有关。化合物 **1**～**8** 均为首次从鬼笔属真菌中分离得到，且细胞毒性结果显示红鬼笔中的麦角甾类成分对非小细胞肺癌 A549 细胞株有一定的细胞毒性作用。现代研究表明，鬼笔科真菌具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等作用[1, 15-16]，但其研究对象主要集中于提取物和多糖类成分，对于单体成分及其药理活性研究十分缺乏。本研究丰富了红鬼笔的化学成分类型，发现了红鬼笔麦角甾类成分具有抑制肺癌 A549 细胞增殖的作用，可为红鬼笔的后续研究提供一定的参考。

参考文献

[1] Vyacheslav B，Alexey B，Aliaksandr A，et al. Polysaccharides of mushroom phallus impudicus mycelium：immunomodulating and wound healing properties [J]. Modern Food Sci Technol，2019，35（9）：30-37.

[2] 王彩云，侯俊，王永，等 . 白鬼笔研究进展 [J]. 贵州农业科学，2019，47（9）：44-48.

[3] 李文力，黎璐，汤洪敏 . 黔产白鬼笔不同部位提取物的成分分析 [J]. 食品科学，2016，37（2）：72-76.

[4] 蒙春旺，周勤梅，王月，等 . 红鬼笔的麦角甾类成分研究 [J]. 中药材，2018，41（12）：2827-2831.

[5] Borg-Karlson AK，Englund OF，Unelius CR. Dimethyl oligosulphides，major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus* [J]. Phytochemistry，1994，35（2）：321-323.

[6] Wang JT，Xu XJ，Zheng H，et al. Structural characterization，chain conformation，and morphology of a *β*-（1-3）-*D*-glucan isolated form the fruiting body of *Dictyophora indusiata* [J]. J Agric Food Chem，2009，57：5918-5924.

[7] Shi QQ，Huang YJ，Su HG，et al. C_{28} steroids from the fruiting bodies of *Ganoderma resinaceum* with potential anti-inflammatory activity [J]. Phytochemistry，2019，168：112109.

[8] Yaoita Y，Amemiya K，Ohnuma H，et al. Sterol constituents from five edible mushrooms [J]. Chem Pharm Bull，1998，46（6）：944-950.

[9] 孙国太，胡旭佳 . 马槟榔种仁的化学成分研究 [J]. 昆明理工大学学报（自然科学版），2017，42（5）：85-89.

[10] 袁谱龙，王雪萍，陈凯先，等 . 水茄茎化学成分的研究 [J]. 中成药，2016，38（1）：104-107.

[11] 吕镇城，陈康，彭永宏 . 五指毛桃抗炎活性成分的分离及鉴定 [J]. 热带作物学报，2017，38（6）：1134-1137.

[12] 崔晓东，梁侨丽，孔丽娟，等 . 荆三棱块茎的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2012，47（24）：1987-1989.

[13] 张璐，向伦理，杨琳垚，等 . 苗药大黄药的化学成分研究 [J]. 中药材，2019，42（4）：785-789.

[14] 蒋海强，王建平，刘玉红，等 . 鬼针草化学成分的分离和鉴定 [J]. 食品与药品，2008，10（9）：15-17.

[15] 杨茜，卢海洋 . 红托竹荪多糖提取及药理学活性的研究进展 [J]. 东方药膳，2021（8）：289-290.

[16] 宋笛 . 响应面优化微波辅助提取白鬼笔多糖及其抗氧化和抗糖化能力 [J]. 食品研究与开发，2021，42（20）：130-136.

（收稿日期：2022-04-08；修回日期：2022-05-20）

酸橙花和甜橙花的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析及 HPLC 含量测定

张忠立，李淑琪，左月明*（江西中医药大学药学院，南昌 330004）

摘要：目的 对酸橙花和甜橙花的化学成分进行定性分析与差异性比较，并对不同产地酸橙花和甜橙花中黄酮类成分进行定量分析。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对酸橙花和甜橙花负离子模式质谱信息进行采集，Peakview 质谱分析软件分析数据，通过数据库匹配、质谱峰的裂解规律并结合文献对其成分进行定性分析。质谱数据经 MarkerView 1.2.1 归一化处理后进行主成分分析与正交偏最小二乘法 - 判别分析，筛选得到差异性成分。运用 HPLC 法，采用聚类分析，比较 27 个不同产地酸橙花和甜橙花中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷黄酮类成分含量的差异。**结果** 不同产地酸橙花与甜橙花样品的化学组成差异明显，共鉴定出 72 个化学成分，47 个共有成分中共筛选出 9 个差异性成分，其中 5 个黄酮类差异性成分的响应信号表现酸橙花明显高于甜橙花。聚类分析可将 27 批酸橙花与甜橙花样品按不同产地聚成五类。**结论** 该研究比较了酸橙花与甜橙花的化学成分组成和指标成分的含量，为江西道地植物酸橙和甜橙资源的综合开发利用提供参考依据。

关键词：酸橙花；甜橙花；UPLC-Q-TOF-MS/MS；定性分析；含量测定
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2480-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.005

Qualitative and quantitative analysis of flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by UPLC-Q-TOF-MS/MS and content determination by HPLC

ZHANG Zhong-Li, LI shu-qi, ZUO Yue-ming* (*Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical components in the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, and quantitatize their flavonoids from different producing areas. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS/MS was used to collect the mass spectrum information of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in the negative ion mode. The data were analyzed by Peakview mass spectrometry analysis software. The components were qualitatively analyzed by database, the fragmentation law of mass spectrometry peaks and literature combination. After the mass spectrum data were normalized by Markerview 1.2.1, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were conducted out, and the differential components were screened. The content of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin in the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from 27 different areas were compared by HPLC and cluster analysis. **Results** There were significant differences in the chemical compositions in the samples of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from different areas. Totally 72 chemical components were identified. Nine differential components were screened out from the 47 common components. The signals of 5 flavonoid differential components showed more significant responses in the flower of *Citrus aurantium* L. than that of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160928）。
作者简介：张忠立，男，副教授，主要从事天然药物的药效物质基础研究工作，email：zzl51518@163.com *通信作者：左月明，女，教授，主要从事天然药物资源的药效物质基础与分子机制研究，email：zuo_yueming@163.com

Cluster analysis clearly clustered 27 batches of flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck patterns into 5 categories according to producing areas. **Conclusion** This study compares the chemical compositions and content of the index components of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, which provides a reference basis for the comprehensive development and utilization *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in Jiangxi.

Key words: flower of *Citrus aurantium* L; flower of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; UPLC-Q-TOF-MS/MS; qualitative analysis; content determination

酸橙花是芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥花蕾 [1]，具有疏肝理气、消食祛痰和解郁等功效 [2]，可药食两用。甜橙花是芸香科植物甜橙 *Citrus sinensis*（L.）Osbeck 的干燥花蕾，具有顺气提神、缓解疲劳之功效 [3]，可食用。江西省为中药枳实、枳壳的道地产区，约有 20 万亩酸橙和 180 万亩甜橙（赣南脐橙）种植地，在不影响坐果率的情况下，每年可产 4 万吨不育酸橙花和 40 万吨不育甜橙花。将废弃的橙花资源变废为宝，是扩大江西酸橙、甜橙产业价值链的重要途径。因甜橙花与酸橙花有广泛的共同分布区，甜橙花是市面上酸橙花的主要混伪品来源，探究酸橙花和甜橙花的内在成分差异对于酸橙花药材的应用及提高利用率具有重大意义。现代药理研究证实橙花中的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等黄酮类成分具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护心脑血管和神经系统等药理活性 [4-6]。本课题组前期研究表明橙花中总黄酮可用作防治心脑血管系统缺血性疾病药物或即购即饮即食保健品的开发 [7-8]。目前，对橙花成分的研究主要有以 GC-MS 技术为主的精油成分分析和以 HPLC 法为主的黄酮类、生物碱类等成分的含量分析。研究发现江西省酸橙花和甜橙花精油的成分种类大体相同，两者差异主要体现为酸橙花精油中单萜烯醇类成分芳樟醇含量较高，而甜橙花精油中单萜烯类成分桧烯含量较高 [9]。不同年份下酸橙花中的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷以及辛弗林等活性成分的含量相对稳定，可用作酸橙花质量控制的指标 [10]。本研究采用液质联用技术，对酸橙花和甜橙花的化学成分进行定性分析与差异性比较，并对不同产地酸橙花与甜橙花中黄酮类成分进行定量分析，为获得品质较优的橙花总黄酮原料药来源（基原）及酸橙花和甜橙花质量控制与应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Nexera X2 LC-30A 型超高效液相色谱仪（日本岛津公司），Triple TOF 5600 ＋型高分辨质谱（美国 ABSCIEX 公司），CP225D 十万分之一分析天平（Sartorius 公司），KQ-700DE 超声清洗机（昆山超声仪器有限公司）。

1.2 试药

酸橙花（S1 ～ S21）为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥花蕾，甜橙花（S22 ～ S27）为芸香科植物甜橙 *Citrus sinensis*（L.）Osbeck 的干燥花蕾，产地信息见表 1，以上样品均经江西中医药大学药学院左月明教授进行来源鉴定。乙腈、甲醇均为色谱纯（德国 Merck 公司），蒸馏水（屈臣氏集团有限公司），其他试剂为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。芦丁（批号：AB640R）、芸香柚皮苷（批号：PS011543）、柚皮苷（批号：PS001113）、橙皮苷（批号：PS010632）、新橙皮苷（批号：PS010413）对照品（成都普思生物科技有限公司，纯度均大于 98%）。

2 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取适量芦丁、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品，加甲醇溶解得各对照品储备液。吸取各对照品储备液适量，加入甲醇稀释，得质量浓度均为 0.5 mg·mL^{-1} 的对照品溶液，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液备用。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取酸橙花（S2）与甜橙花（S25）样品粉末（过 5 号筛）1.0 g，加入 70% 乙醇溶液 45 mL，回流提取 2 次，每次 90 min，提取液合并过滤，蒸干溶剂，用甲醇溶解并定容至 50 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液备用。

2.3 检测条件

色谱条件：Welchrom HPLC-C_{18} 色谱柱（2.1 mm×150 mm，3 μm），流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 6 min，5%B；6 ～ 10 min，5% ～ 10%B；10 ～ 20 min，10% ～ 20%B；20 ～ 30 min，20% ～ 28%B；30 ～ 45 min，28% ～ 70%B；45 ～ 50 min，70%B；

表 1 酸橙花和甜橙花产地来源信息

Tab 1 Sample sources of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

编号	采收地点	来源种别	编号	采收地点	来源种别
S1	江西省南昌市湾里区梅岭镇	酸橙（*Citrus aurantium*）	S15	浙江省杭州市 2	酸橙（*Citrus aurantium*）
S2	江西省南昌市湾里区植物园 1	酸橙（*Citrus aurantium*）	S16	浙江省杭州市 3	酸橙（*Citrus aurantium*）
S3	江西省抚州市	酸橙（*Citrus aurantium*）	S17	浙江省杭州市 4	酸橙（*Citrus aurantium*）
S4	江西省南昌市南昌县	酸橙（*Citrus aurantium*）	S18	湖南省益阳市	酸橙（*Citrus aurantium*）
S5	江西省宜春市	酸橙（*Citrus aurantium*）	S19	湖南省衡阳市	酸橙（*Citrus aurantium*）
S6	江西省吉安市吉水县双村镇	酸橙（*Citrus aurantium*）	S20	四川省泸州市	酸橙（*Citrus aurantium*）
S7	江西省宜春市樟树	酸橙（*Citrus aurantium*）	S21	四川省乐山市	酸橙（*Citrus aurantium*）
S8	江西省新干县神政桥	酸橙（*Citrus aurantium*）	S22	江西省赣州市信丰县 1	甜橙（*Citrus sinensis*）
S9	江西省南昌市湾里区植物园 2	酸橙（*Citrus aurantium*）	S23	江西省赣州市龙南县	甜橙（*Citrus sinensis*）
S10	浙江省嘉兴市	酸橙（*Citrus aurantium*）	S24	江西省赣州市定南县	甜橙（*Citrus sinensis*）
S11	浙江省金华市	酸橙（*Citrus aurantium*）	S25	江西省赣州市南康区	甜橙（*Citrus sinensis*）
S12	浙江省杭州市 1	酸橙（*Citrus aurantium*）	S26	江西省赣州市赣县区	甜橙（*Citrus sinensis*）
S13	浙江省绍兴市	酸橙（*Citrus aurantium*）	S27	江西省赣州市信丰县 2	甜橙（*Citrus sinensis*）
S14	浙江省湖州市	酸橙（*Citrus aurantium*）			

50 ～ 55 min，70% ～ 95%B；55 ～ 57 min，95%B；57 ～ 60 min，95% ～ 5%B），柱温 35 ℃，流速 0.25 mL • min^{-1}，检测波长 190 ～ 400 nm。质谱条件：电喷雾离子源，负离子模式扫描，离子源温 550 ℃，雾化气为 N_2，质量扫描范围 *m/z* 50 ～ 1200，喷雾电压 5.5 kV，去簇电压 100 V，碰撞能量 35 eV，数据采集时间 60 min。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS/MS 数据处理及成分鉴定

查询 CNKI、SciFinder、PubChem、ChemSpider 等数据库，建立酸橙花与甜橙花化学成分的质谱信息表，包含化合物名称、分子式、相对分子质量、结构式等信息。将供试品溶液按“2.3”项下条件检测，得总离子流图见图 1。结果发现酸橙花与甜橙花的色谱图具有显著差异。采用 PeakView1.2.0 软件中的 XICManager 功能进行化合物初步筛选，得到化合物的分子离子峰、二级碎片离子及保留时间等信息，结合化合物分子式匹配结果、对照品比对、文献资料和质谱裂解规律，进行化合物的鉴定及其裂解途径的推导。最终从酸橙花与甜橙花中共鉴定出 72 个化学成分，包括黄酮类 36 个、有机酸类 17 个、萜类 4 个、氨基酸类 4 个、香豆素类 4 个、核苷类 3 个、其他类 4 个。其中，有 58 个成分来自酸橙花，有 61 个成分来自甜橙花，两者共有成分 47 个（见表 2）。

2.5 化学成分的质谱解析

2.5.1 黄酮类 在酸橙花和甜橙花中共鉴定出 36 个黄酮类化合物，包括黄酮 26 个、二氢黄酮 8 个、异黄酮 2 个。黄酮类成分断裂方式主要为中性离子 -CO、$-CO_2$、$-H_2O$、$-CH_3$ 的丢失，糖苷键的裂解以及 C 环发生逆狄尔斯 - 阿尔德（RDA）裂解反应等。以化合物 **49** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 609.1838$[M-H]^-$，初步推测分子式为 $C_{28}H_{34}O_{15}$。二级质谱中丢去一分子的鼠李糖和一分子的葡萄糖，形成碎片离子 *m/z* 301.0726$[M-H-Rha-Glc]^-$；丢失 $-C_4H_8O_4$ 形成碎片离子 *m/z* 489.1408$[M-H-C_4H_8O_4]^-$；丢失 $-C_{10}H_{18}O_8$ 形成碎片离子 *m/z* 343.0827$[M-H-C_{10}H_{18}O_8]^-$。结合对照品及相关文献比对 [28]，鉴定化合物 **49** 为新橙皮苷。裂解方式见图 2。

2.5.2 有机酸类 在酸橙花和甜橙花中共鉴定出 17 个有机酸类化合物，包括芳香族有机酸 12 个、脂肪族有机酸 4 个、萜类有机酸 1 个。有机酸类成分的断裂通常为酰基的丢失以及中性分子 -COOH、$-H_2O$、-CO、$-CO_2$ 的丢失等。以化合物 **47** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 515.1202 $[M-H]^-$，初步推测分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$。二级质谱中丢去一分子咖啡酰氧基，形成碎片离子 *m/z* 353.0899$[M-H-C_9H_6O_3]^-$，又丢去一分子咖啡酰氧基，形成碎片离子 *m/z* 191.0203 $[M-H-2C_9H_6O_3]^-$，随后又丢失一分子 H_2O，形成碎片离子 *m/z* 173.0407$[M-H-2C_9H_6O_3-H_2O]^-$；丢去一分子奎宁酸基团后丢失一分子 CO_2，形成碎片离子 *m/z* 135.0452$[M-H-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$。结合文献比对 [14, 27]，鉴定化合物 **47** 为 4，5- 二咖啡酰奎宁酸。裂解方式见图 3。

2.5.3 萜类 在酸橙花和甜橙花共鉴定出 4 个萜类化合物。以化合物 **16** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 403.1250$[M-H]^-$，初步推测分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$。二级质谱中丢去一分子 $C_6H_{10}O_5$ 和

表 2 酸橙花与甜橙花中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定

Tab 2 Identification of chemical constituents from flowers of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by UPLC-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R/min	分子式	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	δ/（×10⁻⁶）	二级碎片离子	名称	类型	来源*	文献
1	1.57	$C_6H_{14}N_4O_2$	173.1044	173.1045	0.4	131.0843	*L*-精氨酸	氨基酸	1，2	[11]
2	1.63	$C_{12}H_{23}NO_{10}$	340.1249	340.1252	0.7	202.0732，184.0657，160.0622，142.0542，112.0443	*α-D*-吡喃葡萄糖基-（1→1'）-3'-氨基-3'-去氧-*β-D*-吡喃葡萄糖苷	糖苷	1，2	[12]
3	1.73	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	266.0895	266.0887	−2.8	104.0353，101.0238，74.0242	腺苷	核苷	1，2	[13]
4	1.74	$C_6H_{11}NO_4$	160.0615	160.0616	0.6	160.0576，118.0524，98.0221，58.0479，58.0365	3，4-二羟基哌啶酸	氨基酸	2	—
5	1.88	$C_7H_{12}O_6$	191.0561	191.0561	−0.3	93.0349，85.0299	奎宁酸	有机酸	1，2	[14]
6	1.95	$C_{21}H_{26}O_{13}$	485.1301	485.1284	−3.5	317.0548，293.1012，203.0680，191.0202，131.0466，85.0287	法笼枝苷或其异构体	香豆素	2	[13]
7	2.24	$C_9H_{11}NO_3$	180.0666	180.0667	0.7	163.0393，119.0507，93.0359，78.9858，72.0072	*L*-酪氨酸	氨基酸	1	[15]
8	2.68	$C_5H_5N_5$	134.0472	134.0471	−0.7	132.0323，106.0257	腺嘌呤	嘌呤	1，2	[16]
9	2.68	$C_9H_{12}N_2O_6$	243.0623	243.0624	0.6	200.0525，152.0352，110.0238，82.0284，66.0352	尿苷	核苷	1，2	[17]
10	3.40	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	282.0844	282.0844	−0.1	150.0417，150.0401，133.0418，108.0192	鸟苷	核苷	1，2	[18]
11	4.89	$C_9H_{11}NO_2$	164.0717	164.0714	−2.0	147.0449，103.0542，72.0082	*L*-苯丙氨酸	氨基酸	1，2	[17]
12	6.41	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.1089	389.1091	0.5	343.0682，163.0040，137.0230	去乙酰车叶草苷酸	萜类	2	[19]
13	12.60	$C_7H_6O_3$	137.0244	137.0245	0.5	108.0210，93.0338，65.0488	邻羟基苯甲酸	有机酸	1，2	[20]
14	13.71	$C_{13}H_{12}O_9$	311.0409	311.0413	1.5	264.8715，220.8858，85.0290	咖啡酰基酒石酸	有机酸	2	[12]
15	13.83	$C_{13}H_{14}N_2O_2$	229.0983	229.0995	4.9	211.1291，185.1073，168.0899，142.0642，116.0483	1，2，3，4-四氢-1-甲基-*β*-咔啉-3-羧酸	有机酸	1	[12]
16	14.83	$C_{17}H_{24}O_{11}$	403.1246	403.1250	1.1	209.0430，165.0550	去乙酰车叶草苷酸甲酯	萜类	2	[21]
17	14.89	$C_{16}H_{18}O_{10}$	369.0827	369.0835	2.1	223.0458，163.0407，111.0072，85.0300	白蜡树苷（秦皮苷）	香豆素	1	[22]
18	15.70	$C_{18}H_{16}O_8$	359.0772	359.0774	0.5	271.0973，243.0679，179.0386，135.0471	5，7，3'-三羟基-8，4'，5'-三甲氧基黄酮	黄酮	2	[13]
19	15.76	$C_{21}H_{26}O_{13}$	485.1301	485.1315	3.0	177.021	法笼枝苷或其同分异构体	香豆素	1	[13]
20	15.81	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0878	353.0880	0.5	191.0563，102.9474，85.0270	绿原酸	有机酸	1，2	[11]
21	16.14	$C_9H_6O_4$	177.0193	177.0192	−0.9	149.0317，133.0295，105.0328，89.0383，77.0415	秦皮乙素	香豆素	1，2	[23]
22	16.62	$C_7H_6O_2$	121.0295	121.0293	−2.0	92.0265，65.0378	安息香酸	有机酸	1，2	—
23	16.93	$C_9H_8O_4$	179.0350	179.0352	1.2	135.046	咖啡酸	有机酸	1，2	[11]
24	17.03	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1461	609.1482	3.4	435.0781，298.0480	木犀草素-3'，7-二-*O*-葡萄糖苷	黄酮	1，2	[24]
25	18.52	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1512	593.1533	3.6	473.1120，353.0692	山柰酚-3-*O-β-D*-半乳糖基-7-*O-α-L*-鼠李糖苷	黄酮	1，2	[12]
26	19.32	$C_{18}H_{16}O_7$	343.0823	343.0832	2.5	227.0707，179.0383，135.0452，119.0509	5，7-二羟基-3'，4'，5'-三甲氧基黄酮	黄酮	1，2	[13]
27	20.29	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0933	447.0938	1.2	399.0939，327.0731，61.9881	异荭草苷	黄酮	1，2	[25]
28	20.73	$C_{18}H_{16}O_7$	343.0823	343.0828	1.4	328.0597，313.0369，298.0116，270.0174，241.0418，182.0352，132.0234	5，4'-二羟基-7，3'，5'-三甲氧基黄酮或（5，3'-二羟基-7，4'，5'-三甲氧基黄酮）	黄酮	1，2	[13]
29	21.10	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0933	447.0938	1.2	285.0419，256.0402，227.0346	槲皮苷	黄酮	1，2	[22]
30	21.32	$C_{33}H_{42}O_{19}$	741.2248	741.2281	4.5	605.1766	theaflavanoside Ⅲ	黄酮	1	[12]
31	22.08	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1406	563.1424	3.1	413.0882，293.0456	异夏佛塔苷	黄酮	1，2	[24]
32	22.50	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1461	609.1482	3.4	563.1443，284.0340	木犀草素-3-*O-β-D*-龙胆二糖苷	黄酮	1，2	[24]

续表 2

No.	t_R/min	分子式	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	δ/（×10⁻⁶）	二级碎片离子	名称	类型	来源*	文献
33	22.75	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.0984	431.0986	0.6	311.0572，283.0619	野黄芩素 -7-*O*- 鼠李糖苷	黄酮	1，2	[12]
34	22.80	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1461	609.1482	3.4	300.0299	芦丁	黄酮	1，2	[11]
35	23.17	$C_{27}H_{32}O_{15}$	595.1668	595.1681	2.1	595.1674，459.1157，287.0576，151.0044	柚皮素 -7-*O*-*β*-*D*- 龙胆二糖苷	黄酮	1，2	[26]
36	23.94	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0882	463.0891	1.9	463.0898，300.0292，271.0267，151.0034	槲皮素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷	黄酮	1，2	[22]
37	24.78	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1512	593.1533	3.6	285.0426	山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 芸香糖苷	黄酮	1，2	[12]
38	24.96	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.1618	623.1642	3.9	577.1592，315.0528，269.0469	异鼠李素 -3-*O*-*β*-*D*- 芸香糖苷	黄酮	1，2	[24]
39	25.43	$C_{22}H_{20}O_{12}$	475.0882	475.0895	2.7	313.0581，295.0524，191.0214，147.0296，129.0203，85.0203	木犀草素 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸	黄酮	1，2	[22]
40	25.54	$C_{27}H_{30}O_{14}$	577.1563	577.1578	2.6	269.0475	野漆树苷	黄酮	1，2	[14]
41	25.65	$C_{15}H_{12}O_6$	287.0561	287.0572	3.6	151.0035，135.0454，134.0380，107.0133，65.0019	圣草酚	黄酮	1	[22]
42	25.83	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579.1719	579.1738	3.2	459.1168，313.0279，271.0623，235.0256，151.0040	芸香柚皮苷	黄酮	1，2	[14]
43	25.95	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579.1719	579.1729	1.7	313.0275，271.0606，235.0236，151.0037	柚皮苷	黄酮	1	[14]
44	26.02	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0933	447.0938	1.2	285.0426，255.0314，227.0357	木犀草素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷	黄酮	1，2	[24]
45	26.08	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.1039	477.1035	− 0.7	314.0448，285.0426，243.0290，151.0052	4'- 甲氧基 - 异槲皮苷	黄酮	1，2	[26]
46	27.01	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.1825	609.1845	3.2	489.1409，301.0716	橙皮苷	黄酮	1，2	[14]
47	27.19	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1195	515.1202	1.3	353.0899，191.0203，173.0407，135.0452	4，5- 二咖啡酰奎宁酸	有机酸	2	[27]
48	27.26	$C_{22}H_{18}O_{12}$	473.0726	473.0742	3.6	295.0507，251.0583，177.0182，129.0198，85.0274	菊苣酸	有机酸	1	[24]
49	27.81	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.1825	609.1838	2.2	489.1408，343.0827，301.0726	新橙皮苷	黄酮	1，2	[28]
50	28.45	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1195	515.1203	1.6	191.0301，173.0525，135.0344	3，5- 二咖啡酰奎宁酸	有机酸	2	[27]
51	29.98	$C_9H_8O_3$	163.0401	163.0402	0.8	119.0502，93.0334	4- 香豆素酸	有机酸	1，2	[29]
52	30.50	$C_{15}H_{12}O_6$	287.0561	287.0572	3.6	151.0034，135.0437，117.0382，79.0388	黄颜木素	黄酮	1	[30]
53	32.25	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1195	515.1206	2.1	191.0207，173.0523，135.0422	3，4- 二咖啡酰奎宁酸	有机酸	2	[27]
54	33.02	$C_{11}H_{12}O_4$	207.0663	207.0664	0.6	179.0363，161.0244，135.0453，107.0494，75.0042	阿魏酸甲酯	苯丙素	2	[12]
55	33.22	$C_{28}H_{34}O_{14}$	593.1876	593.1889	2.2	309.0759，285.0782	枸橘苷	黄酮	2	[14]
56	33.66	$C_{15}H_{10}O_6$	285.0405	285.0412	2.4	301.0361，174.9562，229.0546	山柰酚	黄酮	1，2	[22]
57	33.89	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0354	301.0357	1.2	273.0409，178.9974，151.0038，121.0299，65.0026	槲皮素	黄酮	1，2	[30]
58	35.13	$C_{17}H_{14}O_7$	329.0667	329.0678	3.4	314.0454，299.0213，271.0272，227.0369，199.0438	5，7，4'- 三羟基 -3'，5'- 二甲氧基黄酮	黄酮	1	[13]
59	36.36	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0456	269.0460	1.5	225.0562，201.0607，183.0438，151.0024，117.0347，93.0477，65.0018	芹菜素	黄酮	1，2	[11]
60	36.76	$C_{17}H_{14}O_8$	345.0616	345.0623	2.1	330.0394，289.0207，259.0227，215.0333，165.9917，136.9853	3，5，6，4'- 四羟基 -3'，5'- 二甲氧基黄酮或（5，7，3'，5'- 四羟基 -6，4'- 二甲氧基黄酮）	黄酮	1，2	[12]
61	36.82	$C_{17}H_{14}O_8$	345.0616	345.0625	2.6	330.0385，289.0202，259.0227，231.0282，215.0340，165.9916，	3，5，6，4'- 四羟基 -3'，5'- 二甲氧基黄酮或（5，7，3'，5'- 四羟基 -6，4'- 二甲氧基黄酮）	黄酮	1，2	[12]

续表 2

No.	t_R/min	分子式	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	δ/（×10⁻⁶）	二级碎片离子	名称	类型	来源*	文献
62	36.89	$C_{15}H_{10}O_6$	285.0405	285.0412	2.4	229.0490，187.0396，159.0452，135.0068	木犀草素	黄酮	1，2	[22]
63	38.04	$C_{22}H_{22}O_{10}$	445.1140	445.1152	2.7	259.0232，187.0403，157.0512，121.0294	sissotrine	黄酮	2	[22]
64	38.97	$C_{18}H_{16}O_7$	343.0823	343.0829	1.7	313.0373，298.0115，270.0174，241.0409，182.0351，132.0239	5，4'-二羟基-7，3'，5'-三甲氧基黄酮或（5，3'-二羟基-7，4'，5'-三甲氧基黄酮）	黄酮	1，2	[13]
65	40.38	$C_{26}H_{30}O_8$	469.1868	469.1875	1.6	381.2079，306.1318，229.1246，199.1152	柠檬苦素	萜类	1，2	[26]
66	41.52	$C_{28}H_{34}O_9$	513.2130	513.2151	4.1	473.2366	诺米林	萜类	2	[26]
67	41.86	$C_{30}H_{48}O_2$	439.3582	439.3564	－4.0	395.1419，325.8708，199.8507，116.9267	3-羟基-乌苏-12-烯-11-酮	烯酮	1	—
68	42.84	$C_{18}H_{30}O_3$	293.2122	293.2135	4.3	235.1722，183.1039，155.1090	科里奥利酸	有机酸	1，2	[22]
69	46.47	$C_{30}H_{48}O_4$	471.3480	471.3495	3.3	425.2831，279.2401，85.0382	常春藤皂苷元	萜类	2	[31]
70	51.10	$C_{18}H_{32}O_2$	279.2330	279.2335	1.9	233.1208，214.8762，136.8890，96.9579	亚油酸	有机酸	1，2	[15]
71	52.84	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2330	255.2333	1.5	201.8357，166.8664	棕榈酸	有机酸	1，2	[32]
72	53.74	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2486	281.2491	1.6	178.8791，136.8930，78.9645	油酸	有机酸	1，2	[33]

注：*1. 酸橙；2. 甜橙。

Note：*1. *Citrus aurantium* L.；2. *Citrus sinensis*（L.）Osbeck.

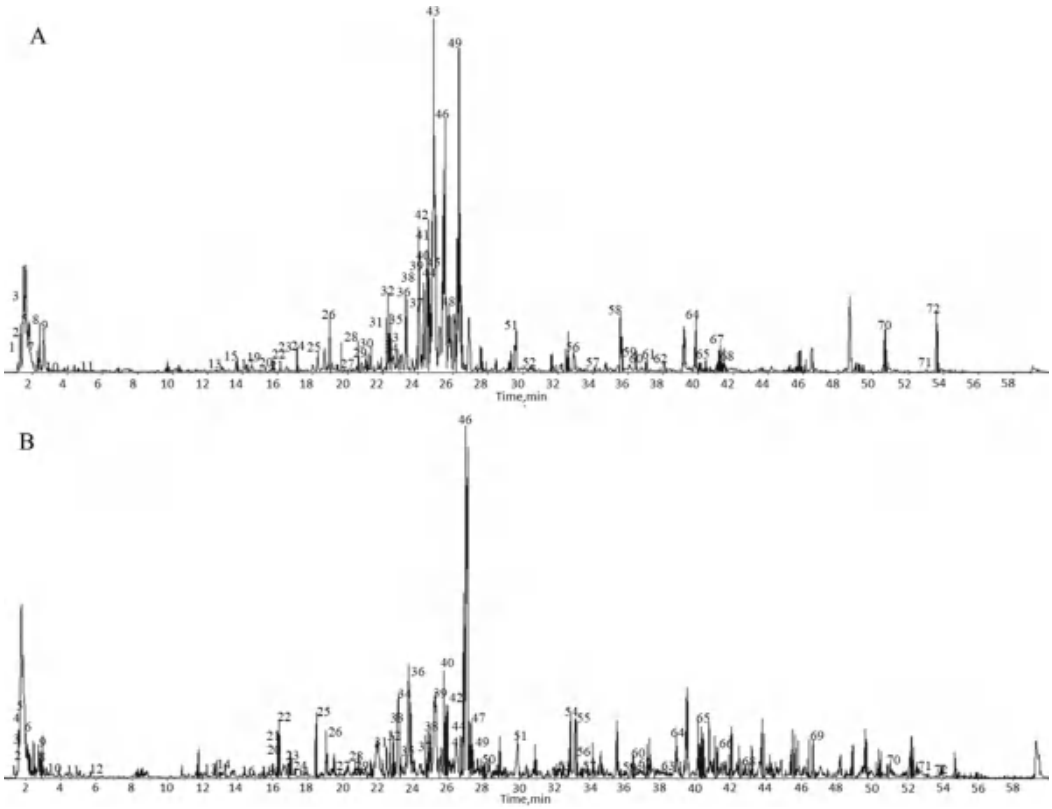


图 1　负离子模式下酸橙花（A）与甜橙花（B）基峰色谱图（BPI）

Fig 1　Base peak intensity（BPI）chromatograms of flowers of *Citrus aurantium* L.（A）and *Citrus sinensis*（L.）Osbeck（B）in a negative mode

一分子甲氧基，形成碎片离子 *m/z* 209.0430[M-H-$C_6H_{10}O_5$-OCH_3]⁻，再丢去一分子 CO_2，形成碎片离子 *m/z* 165.0550[M-H-$C_6H_{10}O_5$-OCH_3-CO_2]⁻。结合文献比对[21]，鉴定化合物 **16** 为去乙酰车叶草苷酸甲酯。裂解方式见图 4。

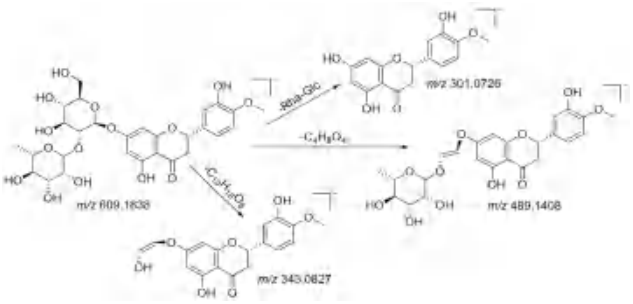


图 2 新橙皮苷可能的裂解途径

Fig 2 Proposed fragmentation pathways of neohesperidin

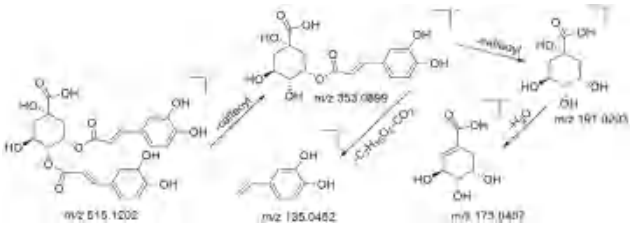


图 3 4，5- 二咖啡酰奎宁酸可能的裂解途径

Fig 3 Proposed fragmentation pathways of isochlorogenic acid C

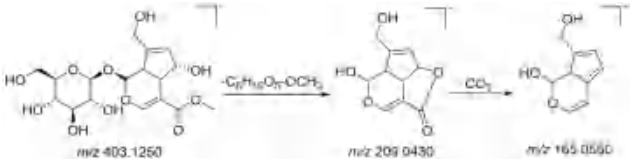


图 4 去乙酰车叶草苷酸甲酯可能的裂解途径

Fig 4 Proposed fragmentation pathways of deacetylasperulosidic acid methyl ester

2.5.4 氨基酸类 在酸橙花和甜橙花共鉴定出 4 个氨基酸类化合物。以化合物 **11** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 164.0714[M-H]$^-$，初步推测分子式为 $C_9H_{11}NO_2$。二级质谱中丢去一分子 NH_2，形成碎片离子 *m/z* 147.0449[M-H-NH_2]$^-$，再丢去一分子 COOH，形成碎片离子 *m/z* 103.0542 [M-H-NH_2-COOH]$^-$。结合文献比对 [17]，鉴定化合物 **11** 为 *L*- 苯丙氨酸。裂解方式见图 5。

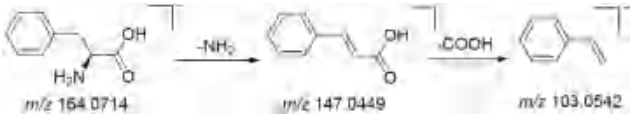


图 5 *L*- 苯丙氨酸可能的裂解途径

Fig 5 Proposed fragmentation pathways of *L*-phenylalanine

2.5.5 香豆素类 在酸橙花和甜橙花共鉴定出 4 个香豆素类化合物。以化合物 **21** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 177.0192 [M-H]$^-$，初步推测分子式为 $C_9H_6O_4$，二级质谱中丢去一分子 CO，形成碎片离子 *m/z* 149.0317[M-H-CO]$^-$。结合文献比对 [23]，鉴定化合物 **21** 为秦皮乙素。裂解方式见图 6。

2.5.6 其他成分 在酸橙花和甜橙花中还鉴定出 7 个其他类成分，包括 3 个核苷、1 个嘌呤、1 个糖苷、1 个烯酮和 1 个苯丙素类化合物。以化合物 **10** 为例，负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 282.0844[M-H]$^-$，初步推测分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_5$。二级质谱中丢去一分子核糖基，形成碎片离子 *m/z* 150.0417[M-H-$C_5H_8O_4$]$^-$，再丢去一分子 NH_3，形成碎片离子 *m/z* 133.0418 [M-H-$C_5H_8O_4$-NH_3]$^-$；丢去一分子核糖基后再丢失一分子 NH_2CN 形成碎片离子 *m/z* 108.0192 [M-H-$C_5H_8O_4$-NH_2CN]$^-$，结合文献比对 [18]，鉴定化合物 **10** 为鸟苷。

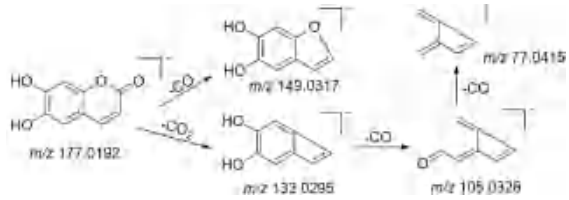


图 6 秦皮乙素可能的裂解途径

Fig 6 Proposed fragmentation pathways of esculetin

2.6 酸橙花与甜橙花的化学成分差异分析

2.6.1 主成分分析（PCA） 从图 1、表 2 初步分析，酸橙花与甜橙花的化学成分存在差异，为明确两者的差异性成分，将 MS 原始数据导入软件 MarkerView 1.2.1 中进行峰提取、去除同位素离子峰等处理，将处理所得数据集矩阵导入 Simca-p 14.0 软件中，进行无监督 PCA，得到 PCA 得分图，见图 7。模型验证结果（R^2X = 0.969，Q^2 = 0.898，P < 0.05），说明模型拟合能力较好，预测能力良好。酸橙花与甜橙花被分为两大类，说明两组具有明显的差异性。

2.6.2 正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）

OPLS-DA 模型在为样品组间的差异提供最相关变量方面具有更大的可靠性，能够在 PCA 基础上增强组间分离情况，减小组内差异，故本研究在 PCA 的基础上进行有监督的 OPLS-DA，以减小酸橙花与甜橙花组内差异。OPLS-DA 模型验证结果（R^2X = 0.691，R^2Y = 0.998，Q^2 = 0.982，P < 0.05），说明模型拟合能力较好，预测能力较强。酸橙花与甜橙花 OPLS-DA 得分图见图 7。结果发现每组样本点之间离散型较小，表示样品组内均一性良好，两组样品区分依旧明显。运用 MarkerViewTM 1.2.1 软件，将酸橙花与甜橙花的 MS 数据进行 *t* 检验，同时在 OPLS-DA 基础上进行变量重要性投影（VIP）值＞ 1 筛选，结合已鉴定成分明确 9 个 *t* 检验 P < 0.05 且 VIP ＞ 1 的含量差异成分，见表 3。9 个差异成分分别为黄酮（峰 39、36、25、37）、二氢黄酮（峰 49、46、42）、核苷（峰 9）、有机酸（峰 68）。由此可知，

酸橙花中新橙皮苷、橤皮素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷、山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 半乳糖基 -7-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷、芸香柚皮苷、山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 芸香糖苷等黄酮类成分的含量要明显高于甜橙花，提示酸橙花中黄酮类成分具有更好的开发和利用前景。

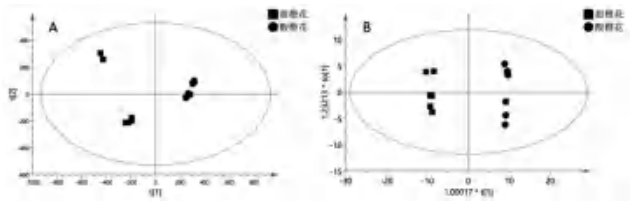


图 7　酸橙花、甜橙花的 PCA 得分（A）和 OPLS-DA 得分（B）

Fig 7　PCA scores（A）and PLS-DA scores（B）of flowers of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis*（L.）Osbeck

表 3　酸橙花和甜橙花存在差异的化合物信息

Tab 3　Information of differential compounds in the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

No.	化合物名称	VIP 值	含量较高药材
39	木犀草素 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖醛酸	1.3574	甜橙花
9	尿苷	1.2828	酸橙花
49	新橙皮苷	1.2172	酸橙花
46	橙皮苷	1.1784	甜橙花
36	橤皮素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷	1.1689	酸橙花
25	山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 半乳糖基 -7-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷	1.0383	酸橙花
42	芸香柚皮苷	1.0249	酸橙花
37	山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 芸香糖苷	1.0158	酸橙花
68	科里奥利酸	1.0118	甜橙花

3　HPLC 含量测定方法与结果

3.1　色谱条件

色谱柱 Diamonsil（2）C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相乙腈 -0.1% 磷酸水＝20∶80，柱温 25 ℃，流速 1.0 mL·min^{-1}，进样量 10 μL。对照品与样品的色谱图如图 8。

3.2　对照品溶液的制备

精密称取对照品芸香柚皮苷 1.30 mg、柚皮苷 8.99 mg、橙皮苷 5.12 mg、新橙皮苷 6.63 mg，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解定容至刻度，作为对照品储备液。

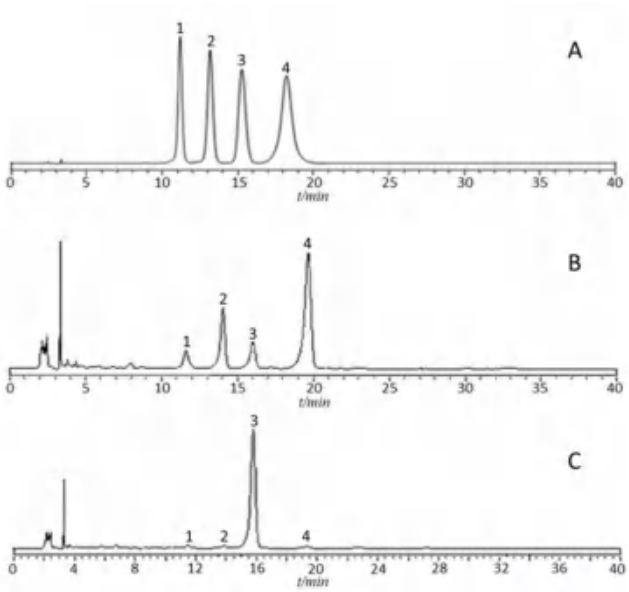


图 8　对照品（A）、酸橙花（B）和甜橙花（C）的 HPLC 色谱图

Fig 8　Chromatogram of reference substance（A）and the flower of *Citrus aurantium* L.（B）and *Citrus sinensis*（L.）Osbeck（C）

1. 芸香柚皮苷（narirutin）；2. 柚皮苷（naringin）；3. 橙皮苷（hesperidin）；4. 新橙皮苷（neohesperidin）

3.3　供试品溶液的制备

酸橙花和甜橙花药材粉碎过 80 目筛，精密称取 0.2 g，置 500 mL 圆底烧瓶中，加 50 mL 甲醇回流提取 1.5 h，放冷，称重，用甲醇补足减失重量，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液备用。

3.4　方法学考察

3.4.1　线性关系考察　分别精密吸取对照品储备液 800、600、400、200、4 μL，加甲醇定容至 1000 μL，混匀，得系列浓度的对照品溶液。以对照品质量浓度 X（μg·mL^{-1}）为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 4。

表 4　酸橙花与甜橙花含量测定的线性关系

Tab 4　Linear equations for the content determination of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

化合物	回归方程	R^2	线性范围 /（μg·mL^{-1}）
芸香柚皮苷	$Y=1.8446\times10^4X+8.4082\times10^4$	0.9996	1.04 ～ 260.00
柚皮苷	$Y=1.6479\times10^4X-6.1712\times10^4$	0.9999	7.19 ～ 1798.00
橙皮苷	$Y=1.8878\times10^4X-7.0818\times10^4$	0.9997	4.09 ～ 1024.00
新橙皮苷	$Y=1.9144\times10^4X-2.0687\times10^4$	0.9999	5.30 ～ 1326.00

3.4.2　精密度试验　取同一份供试品溶液（S14），连续进样 6 次，测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的平均 *RSD* 值分别为 0.94%、1.6%、0.98%、0.66%，表明仪器精密度良好。

3.4.3　稳定性试验　取同一份供试品溶液（S14），分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的平均 *RSD* 值分别为 0.85%、1.7%、1.5%、1.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.4.4　重复性试验　取同一批样品（S14）6 份，

按“3.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，测得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量的平均 *RSD* 值分别为 2.6%、0.72%、1.7%、1.0%，表明方法重复性良好。

3.4.5 加样回收试验　称取已知含量的样品（S14）6 份，每份约 0.1 g，加入与样品含量相近的芸香柚皮苷 0.11 mg，柚皮苷 4.80 mg，橙皮苷 0.77 mg，新橙皮苷 9.35 mg，按“3.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，结果显示芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均加样回收率分别 为 102.4%、97.6%、101.8%、102.6%，*RSD* 值分别为 2.9%、1.4%、2.8%、2.5%，符合药典要求。

3.5 含量测定

27 批样品按“3.3”项下方法制备供试品溶液，每个样品平行 3 次，进样测定，计算各成分含量，结果见表 5。

表 5　酸橙花与甜橙花的含量测定结果

Tab 5　Content determination of the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis*（L.）Osbeck from different producing areas

编号	含量 /（mg • g^{-1}）				
	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	总黄酮
S1	5.37	23.94	10.98	52.41	92.70
S2	5.62	26.93	11.64	60.44	104.63
S3	5.67	25.74	11.70	56.88	99.99
S4	8.75	33.87	16.28	62.68	121.58
S5	6.10	31.79	12.80	64.77	115.46
S6	8.19	35.80	12.73	53.52	110.24
S7	7.81	27.55	14.57	49.93	99.86
S8	1.35	8.01	7.12	53.48	69.96
S9	8.64	39.13	14.72	67.62	130.11
S10	1.09	31.90	7.62	83.13	123.74
S11	1.11	36.58	6.75	88.45	132.89
S12	1.46	44.51	7.24	87.93	141.14
S13	1.65	45.02	7.90	88.96	143.53
S14	1.11	48.78	7.69	93.46	151.04
S15	1.26	42.52	7.31	84.95	136.04
S16	1.17	43.90	6.97	89.12	141.16
S17	0.92	38.28	6.08	90.80	136.08
S18	0.97	37.28	5.61	89.61	133.47
S19	1.15	39.56	5.85	89.09	135.65
S20	0.66	12.79	95.39	19.74	128.58
S21	4.15	17.82	48.07	38.32	108.36
S22	0.97	0.00	85.33	0.00	86.30
S23	0.74	0.00	78.69	0.00	79.43
S24	0.93	0.00	79.08	0.00	80.01
S25	0.97	2.38	94.83	1.53	99.71
S26	0.30	0.00	68.77	0.00	69.07
S27	0.27	0.00	57.24	0.00	57.51

3.6 聚类分析

以 27 批酸橙花与甜橙花样品中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量为变量，运用 SPSS 19.0 软件进行聚类分析，结果见图 9，27 批酸橙花与甜橙花样品清晰地聚成五类。江西省酸橙花归为一类（S1 ～ S9），浙江省和湖南省酸橙花归为一类（S10 ～ S19），四川省泸州市和乐山市的酸橙花单独归为一类（S20、S21），江西省甜橙花归为一类（S22 ～ S27）。不同品种的酸橙花与甜橙花黄酮类成分的含量具有明显差异，而不同产地的酸橙花黄酮类成分含量差异较小。

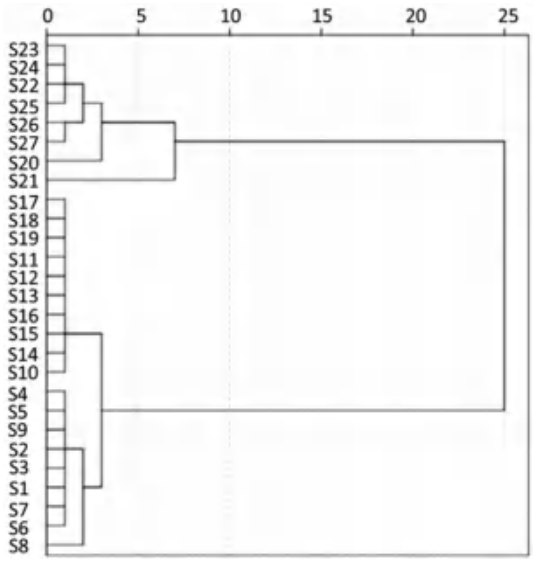


图 9　酸橙花与甜橙花黄酮含量聚类分析图

Fig 9　Cluster analysis of total flavonoids content in the flower of *Citrus aurantium* L. and *Citrus sinensis*（L.）Osbeck from different producing areas

4 讨论

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合 HPLC 含量测定的分析方法，对不同产地酸橙花和甜橙花在负离子模式下进行分析，发现酸橙花和甜橙花在成分组成上较为相似，但部分主要成分含量存在显著差异。酸橙花和甜橙花中共鉴定出 72 个化学成分，其中，有 58 个成分来自酸橙花，有 61 个成分来自甜橙花，非共有成分以酸橙花中黄酮类成分较多，而甜橙花中有机酸类等成分较丰富，这与酸橙花以药用为主而甜橙花可食用相一致。从两者共有的 47 个成分中共筛选得到 9 个差异化合物，其中酸橙花中 5 个黄酮类成分的响应信号明显高于甜橙花，而 HPLC 法分析显示酸橙花中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷总黄酮含量明显高于甜橙花，提示酸橙花中的黄酮类成分具有更好的开发和利用前景，值得深入开发和利用。

甜橙花在江西有近 180 万亩种植基地，每年可产 40 万吨不育甜橙花资源，橙花精油的研究近年来备受人们关注[3]，因其含有与酸橙花相似的成分类型，经过提取纯化处理仍可获得品质较优的橙花总黄酮原料药资源，所以本研究也可为甜橙花资源的深入开发和应用提供科学依据。

参考文献

[1] 国家中医药管理局,《中华本草》编委会 . 中华本草 [M]. 第 18 卷 . 上海：上海科学技术出版社，1999：884.

[2] 王庆颖，张志锋，吕露阳，等 . 花类药食同源中药安全性评价的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（3）：864-872.

[3] 林燕，王科军，罗国添，等 . 赣南脐橙花挥发油的化学成分分析 [J]. 精细化工，2006，23（9）：900-902，906.

[4] Rivoira MA，Rodriguez V，Talamoni G，et al. New perspectives in the pharmacological potential of naringin in medicine [J]. Curr Med Chem，2021，28（10）：1987-2007.

[5] 朱泰霖，王慧心，陈杰标，等 . 不同品种柑橘果实的类黄酮分离纯化及其抗氧化活性研究 [J]. 浙江大学学报（农业与生命科学版），2021，47（6）：704-718.

[6] Jia S，Hu Y，Zhang WN，et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from *Citrus aurantium* L. in diabetic KK-A^{y} mice [J]. Food Funct，2015，6（3）：878-886.

[7] 张忠立，左月明 . 橙花及枝叶有效部位或成分在制备改善睡眠或抗抑郁或改善记忆力减退药物或食品中的应用：中国，CN201910377552.7 [P]. 2019-07-30.

[8] 张忠立，左月明 . 代代花有效部位或有效成分在制备治疗心脑血管系统缺血性疾病药物中的应用及其制备方法：中国，CN201910233779.4 [P]. 2019-05-14.

[9] 解卫星，蔡东明，张忠立，等 . 中国江西赣南甜橙花精油和摩洛哥苦橙花精油组分对比研究 [J]. 江西中医药，2020，51（3）：65-70.

[10] 承晨，李莉 . HPLC 法同时测定代代花中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林的含量 [J]. 药学与临床研究，2020，28（4）：263-265，269.

[11] 闫旭，张楠，冀召帅，等 . 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的参坤养血颗粒化学成分研究 [J]. 中草药，2018，49（18）：4231-4240.

[12] 刘倩 . 栀子花和代代花胶囊的研制及治疗睡眠障碍阿尔茨海默病药效学研究 [D]. 南昌：江西中医药大学，2021.

[13] 严欢，左月明，张忠立 . 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术分析代代花中的化学成分 [J]. 中药材，2018，41（10）：2343-2348.

[14] 张雯霞，冯敏，苗雨露，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的还贝止咳方化学成分分析 [J]. 中国中药杂志，2019，44（14）：3022-3034.

[15] 蒋鹏娜，李竹英，孙国东，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的平喘颗粒化学成分分析 [J]. 广东药科大学学报，2021，37（5）：42-53.

[16] 陈嘉慧，张雅心，刘孟华，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析 [J]. 广东药科大学学报，2020，36（1）：1-9.

[17] 秦伟瀚，刘飞，刘翔，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析亚香棒虫草化学成分 [J]. 北京中医药大学学报，2017，40（2）：159-165.

[18] 陈两绵，刘晓谦，张永欣，等 . 茶薇子叶状层菌中核苷类成分的 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析和 HPLC 含量测定 [J]. 中国中药杂志，2021，46（12）：2912-2922.

[19] 高雅，王云，郑颖豪，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学方法探讨栀子治疗缺血性脑中风的潜在药效物质及作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（14）：119-128.

[20] 任慧，崔小敏，胡静，等 . 秦岭岩白菜根茎化学成分的 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（9）：118-128.

[21] 严颖，赵慧，邹立思，等 . 杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析 [J]. 质谱学报，2017，38（1）：146-156.

[22] 饶颖，黄文平，冯育林，等 . 基于 UHPLC-QTOF-MS/MS 法分析玳玳花化学成分 [J]. 中成药，2019，41（6）：1455-1462.

[23] 刘小妹，杨媛媛，胡静，等 . 冯了性风湿跌打药酒的化学成分鉴定 [J]. 中国药房，2020，31（20）：2473-2480.

[24] 杨丽，袁丰瑞，曹岚，等 . 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术快速鉴定柴石退热颗粒的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（17）：152-159.

[25] 林裕英，郑志华，李明慧，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析广金钱草水提物灌胃大鼠后肾组织中的化学成分及其代谢产物 [J]. 今日药学，2021，31（6）：433-437.

[26] 吴美琪，刘建庭，许浚，等 . 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的小儿消积止咳口服液化学物质组快速辨识研究 [J]. 中草药，2021，52（23）：7117-7127.

[27] 程晓叶，张霞，廖曼，等 . UPLC-Q-TOF-MS 法分析款冬花的化学成分 [J]. 中草药，2017，48（12）：2390-2400.

[28] 魏飞亭 . 枳壳的成分分析与多组分药动学研究 [D]. 南昌：江西中医药大学，2020.

[29] 王小双 . 橘皮竹茹汤成分分析及质量标准研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江省中医药科学院，2021.

[30] 常冠华，薄颖异，崔洁，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析甘草地上部分主要化学成分 [J]. 中国中药杂志，2021，46（6）：1449-1459.

[31] 杨林军，谢彦云，李志锋，等 . UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析中华常春藤中的化学成分 [J]. 中草药，2016，47（4）：566-572.

[32] 赵利娟，高文雅，顾欣如，等 . 蒲地蓝消炎口服液化学成分鉴定及归属研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（8）：1573-1587.

[33] 张玉，董文婷，霍金海，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药，2017，48（2）：252-262.

（收稿日期：2022-04-24；修回日期：2022-06-13）

利用连续流动化学技术合成抗结核新药贝达喹啉

裴广庆[2]，王春超[1]，苏睿[1]，吴成军[1*]，孙铁民[1*]（1. 沈阳药科大学基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室 制药工程学院，沈阳 110016；2. 山东新时代药业有限公司，山东 临沂 273400）

摘要：目的 利用连续流动化学技术合成贝达喹啉。**方法** 在中间体 **6** 和中间体 **9** 的对接反应过程中，用连续流动化学技术代替常规的间歇式反应，并对反应流速和反应温度进行研究，确定最优的反应条件。**结果** 提高了有机金属试剂二异丙基氨基锂使用的安全性，反应温度由原来－ 78 ℃提高到－ 45 ℃，反应时长由 4.5 h 降为 4 min，工艺的生产效率得到极大的提高；对所得产品进结构确证，并通过高效液相色谱检测产品纯度为 99.4%，所有杂质都控制在 0.1% 以下。**结论** 该合成路线操作简单、安全性较高、绿色环保，适用于工业化生产。

关键词：贝达喹啉；连续流动化学；合成
中图分类号：R914 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2490-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.006

Synthesis of a new antituberculosis drug bedaquiline by continuous flow chemistry technique

PEI Guang-qing[2], WANG Chun-chao[1], SU Rui[1], WU Cheng-jun[1*], SUN Tie-min[1*] (1. *Innovation Laboratory of Drug Research and Design*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Ministry of Education*, *Shenyang* 110016; 2. *Shandong New Times Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective To synthesize bedaquiline by continuous flow chemistry technology. **Methods** In the docking of intermediate **6** and intermediate **9**, the conventional batch reaction was replaced by continuous flow chemistry technology, and the reaction flow rate and reaction temperature were measured to determine the optimal reaction conditions. **Results** The safety of the organometallic reagent lithium diisopropylamide was improved. The reaction temperature was increased from － 78 ℃ to － 45 ℃ , and the reaction time was reduced from 4.5 h to 4 min. The efficiency of the process was greatly improved. The structure of the obtained product was confirmed by HPLC. The purity of the product was 99.4%, and all impurities were under 0.1%. **Conclusion** The synthetic route has simple operation, high safety, environment friendly and suitability for industrial production.

Key words: bedaquiline; continuous flow chemistry; synthesis

贝达喹啉（**1**），又名 TMC207，化学名为（1*R*，2*S*）-1-（6-溴-2-甲氧基-3-喹啉基）-4-二甲胺基-2-萘基-1-苯基-2-丁醇，是新型二芳基喹啉类抗结核药物。贝达喹啉分子结构中含有两个相邻的手性中心，共有四个立体化学异构体，其药用构型为（*R*，*S*）构型[1-4]。该药由美国强生公司研制，2012 年被美国 FDA 批准上市。贝达喹啉通过作用于结核分枝杆菌 ATP 合成酶的质子泵，从而有效抑制 ATP 的合成，使细菌能量代谢紊乱或中断而达到抑菌和杀菌的效果。贝达喹啉对结核分枝杆菌具有非常高的选择性，特别是对敏感性分枝杆菌及耐药性分枝杆菌都显示出较高的抑制活性，其最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，*MIC*）为 0.003 ～ 0.5 μg • mL^{-1}，半衰期为 24 h[5-7]。此外，

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81573348，No. 82073700）；辽宁省博士科研启动基金项目（No. 2020-BS-124）。
作者简介：裴广庆，男，硕士研究生，主要从事药物合成、药事管理工作，email：arpe0620@163.com *通信作者：吴成军，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事基于靶点的新型小分子药物研究，email：chengjun871@163.com；孙铁民，男，教授，博士研究生导师，主要从事天然产物合成和半合成、手性药物合成以及抗病毒药物的合成研究，email：suntiemin@126.com

临床经研究发现，贝达喹啉联合其他抗结核药物用药，能够达到更好的效果并且对患者几乎没有毒副作用[8-10]。因此，贝达喹啉是一个具有开发和应用前景的抗结核药物，对其合成工艺研究具有重要的经济效益和社会效益。

1　反应路线的选择和优化

由于贝达喹啉具有两个手性中心，而且这两个手性碳原子相邻且被多重取代，具有较大的空间位阻，因此合成难度较大。对文献报道的合成路线进行分析[11-16]，发现这些方法主要存在以下缺点：① 采用拆分法，通过原研路线合成四个光学异构体，利用手性柱拆分或者采用手性试剂诱导分离，得到目标化合物 **1**，操作烦琐，收率较低；② 通过不对称合成法合成时，需要用到昂贵的试剂、手性配体、贵重的金属催化剂，生产成本大大提高；③ 手性中心的构建，反应条件较为苛刻，难以进行工业化生产。目前合成路线 1（见图 1）是工业化普遍采用的合成路线，该合成路线首先合成两个关键中间体 **6** 和中间体 **9**，然后在二异丙基氨基锂（LDA）的存在下，两个关键中间体通过亲核加成反应，得到贝达喹啉四个光学异构体的混旋体 10A 和 10B，利用柱层析获得 10A 的两个非对映异构体，最后通过手性拆分剂（*R*）-（－）- 联萘酚磷酸酯进行手性拆分，得到贝达喹啉。

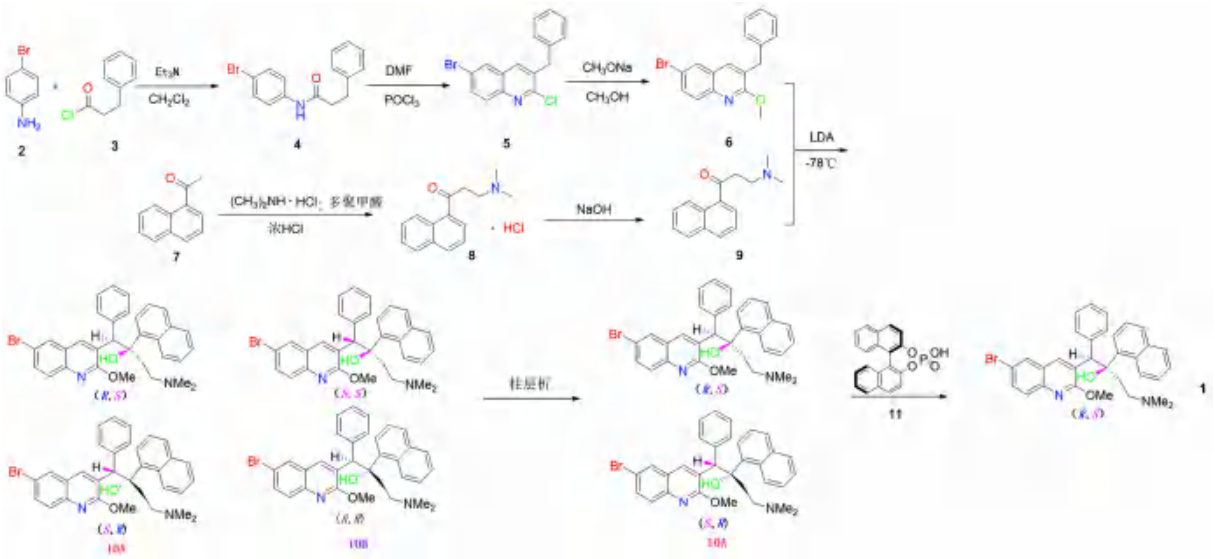


图 1　贝达喹啉的合成路线

Fig 1　Synthetic route of bedaquiline

尽管该路线所用物料易得、价格低廉，但是在关键中间体 **6** 和中间体 **9** 的对接反应过程，反应条件比较苛刻：① 有机锂试剂在使用过程中放出大量的热，安全性较低；② 该反应温度需要在－ 78 ℃条件下进行，难以适用于工业化生产；③ 反应时间较长，且反应过程会生成大量的杂质。因此，设计一条收率较高、操作简单、绿色环保，并适合于工业化生产的合成路线至关重要。

为了开发更好的药物合成工艺，越来越多的新技术应用其中，而连续流动生产作为目前工业生产中最火热的研究领域，已经广泛应用于众多药品的生产开发中。连续流动化学是指利用泵将物料连续不断地输入微反应器中发生化学反应的技术，依赖于连续流动化学的诸多优势，例如高效的传热效率与混合能力、高选择性与重现性、可在线分析和纯化、易于工业放大生产等，使其成为高效、清洁、节能、安全的化学生产方式，更符合绿色与可持续的发展目标。由于在中间体 **6** 和中间体 **9** 的反应过程中，需要使用金属试剂以及严格的低温无水无氧条件，收率、纯度和可扩展性不稳定，因此为了进一步增加该方法的工业适用性，借助连续流动化学技术，将该反应由批次间歇试验转为连续流动进行。

基于连续流动化技术，在该反应过程中，对反应物的浓度、液体的流速以及反应的温度进行深入考察。首先根据间歇式反应时投料比进行考察，中间体 **6**- 碱 - 中间体 **9** 比例为 1∶1.2∶1.2，由于反应物浓度过高，从而导致反应时放热剧烈产生大量杂质。随后将反应物浓度降为间歇式反应时浓度的 0.1 倍（中间体 **6** 为 0.09 mol•L^{-1}、中间体 **9** 为 0.108 mol • L^{-1}、二异丙基氨基锂为 0.108 mol • L^{-1}），

流速对反应结果的影响如表 1 所示。

表 1　反应流速对反应收率的影响

Tab 1　Effect of flow rate on the reaction yield

批号	碱	流速 /（mL•min^{-1}）	温度 /℃	停留时间 /min	收率（四个异构体）/%
1	二异丙基氨基锂	1	－ 78	20	42.7
2	二异丙基氨基锂	3	－ 78	6.66	42.9
3	二异丙基氨基锂	5	－ 78	4.0	42.3
4	二异丙基氨基锂	7	－ 78	2.86	35.7
5	二异丙基氨基锂	9	－ 78	2.22	30.3

通过试验研究发现，当流速为 1 mL•min^{-1} 时，保留时间为 20 min，收率为 42.7%；当流速为 5 mL • min^{-1} 时，保留时间为 4 min，收率为 42.3%，收率与流速 1 mL • min^{-1} 时相当；随着流速的增加，当流速为 7 mL • min^{-1} 和 9 mL • min^{-1} 时，由于流速过快，反应无法充分进行，导致收率较低，综上分析，最终确定反应的流速为 5 mL • min^{-1}。

在常规反应中，该反应需要在－ 78 ℃条件下进行，对能源消耗很大。基于连续流动化学高表面积、散热快的优势，为了提高反应温度、减少能源消耗及降低生产成本，以二异丙基氨基锂为碱，对该反应温度进行考察，结果见表 2。

表 2　反应温度对反应收率的影响

Tab 2　Effect of reaction temperature on the reaction yield

批号	流速 /（mL • min^{-1}）	温度 /℃	收率（四个异构体）/%
1	5	－ 78	42.3
2	5	－ 60	42.7
3	5	－ 45	42.6
4	5	－ 40	36.9
5	5	－ 35	30.1
6	5	－ 30	26.7
7	5	－ 15	10.6

当反应温度由－ 78 ℃升至－ 45 ℃时，反应收率变化较小；随着反应温度的继续升高，反应收率随之降低；当反应温度为－ 15 ℃时，收率仅为 10.6%。综上分析，最终确定反应的最佳温度为－ 45 ℃，反应流程如图 2 所示。

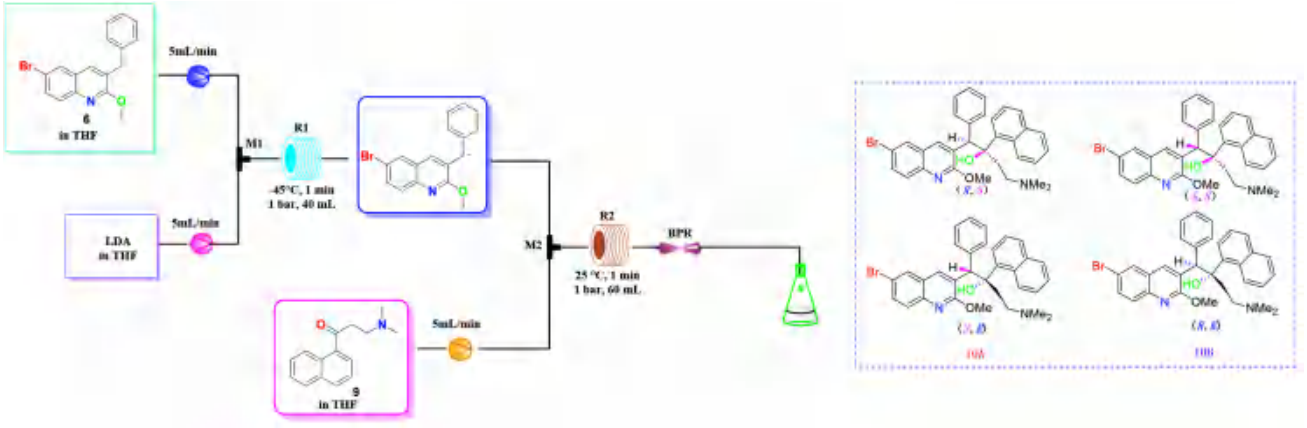


图 2　利用连续流动化学合成化合物 **10**

Fig 2　Continuous flow process for the synthesis of compound **10**

2　合成过程

2.1　试药与仪器

化学原料（上海毕得医药）；试剂（沈阳莱博科贸有限公司，无需进一步纯化即可使用）；X-4 型显微数字熔点仪测定（温度计未校正，上海贝仑仪器设备有限公司）；薄层色谱用硅胶 GF254 型号（青岛海洋化工有限公司）；Bruker ARX-400NMR 型核磁共振仪（CDC_{13} 和 DMSO-d_6 为溶剂，TMS 为内标）（瑞士 Bruker）；Agient6120 四级杆液质联用仪（麦谱科技有限公司）；流动化学设备 [欧世盛（北京）科技有限公司]。

2.2　*N*-（对 - 溴苯基）-3- 苯基丙酰胺（**4**）的合成

在 500 mL 的三口反应瓶中，加入 3- 苯基丙酸（39.2 g，0.26 mol）和二氯甲烷溶液（200 mL），室温条件下搅拌溶解，将反应液降温至 0 ℃左右，滴加二氯亚砜（29.6 mL），滴毕，升温加热回流 2 h。将反应液减压浓缩，得到浅黄色油状物（44.0 g，收率 98.1%），向上述浓缩液中加入二氯甲烷溶液（100 mL），备用；在 500 mL 的三口反应瓶中加入二氯甲烷溶液（100 mL）以及对溴苯胺（43.0 g，0.25 mol），搅拌溶解，向反应液中滴加三乙胺溶液（44 mL），降温到 0 ℃左右，向反应液中滴加用上述备用溶液，控制反应液温度不超过 5 ℃。滴毕，将反应液升至室温，搅拌反应 8 h。反应完毕，向反应液中滴加适量的氨水溶液，搅拌至大量固体析出，减压抽滤，55 ℃条件下真空干燥 8 h 得白色固体（**4**，68.0 g，收率 85.6%）。m.p. 102 ～ 105 ℃；MS [ESI$^+$] *m/z* 305.2 [M ＋

H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：10.39（s，1H），7.68 ～ 7.60（m，2H），7.50 ～ 7.42（m，2H），7.32 ～ 7.23（m，4H），7.18（dq，J = 8.9，3.4，2.8 Hz，1H），3.04（q，J = 7.3 Hz，7H），2.91（dd，J = 8.8，6.7 Hz，2H），2.67（dd，J = 8.7，6.8 Hz，2H），1.20（t，J = 7.3 Hz，11H）。

2.3 3-苯甲基-2-氯6-溴-喹啉（**5**）的合成

在250 mL三口瓶中，加入DMF（13.6 mL）和中间体（**4**，17.2 g，0.055 mol），搅拌20 min，将反应液降温至5 ℃以下，向反应液中逐滴加入三氯氧磷（35.7 mL）。滴毕，将反应液升温加热至85 ℃，保温反应8 h。反应完毕，将溶液倒入冰水混合物中（500 mL）。用二氯甲烷（100 mL×3）萃取，合并有机相，干燥（$MgSO_4$），抽滤，将滤液减压浓缩，经甲醇重结晶，得白色固体（**5**，11.8 g，收率59%）。m.p. 111 ～ 113 ℃；MS（ESI$^+$）*m/z* 331.8 [M + H]$^+$。^{1}H NMR（500 MHz，Chloroform-*d*）δ：7.92 ～ 7.85（m，3H），7.69（dd，J = 7.5，1.5 Hz，1H），7.29 ～ 7.21（m，2H），7.18（m，3H），3.99（t，J = 0.9 Hz，2H）。

2.4 3-苯甲基-2-甲氧基-6-溴喹啉（**6**）的合成

在500 mL的三口反应瓶中加入上述得到的中间体（**5**，11.5 g，0.034 mol）和无水甲醇（200 mL），搅拌条件下向反应液中缓慢加入甲醇钠固体（2.05 g，0.51 mol），66 ℃条件下，保温反应8 h。反应完毕将反应液倒入冰水混合物中（500 mL），用二氯甲烷（100 mL×3）萃取，干燥（$MgSO_4$），抽滤，将滤液减压浓缩，得棕红色固体。经甲醇重结晶得到白色固体（**6**，10.1 g，收率90.7%）。m.p. 83 ～ 84 ℃；MS（ESI$^+$）*m/z* 329.2 [M + H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.05（s，1H），7.95（s，1H），7.68（d，J = 8.9 Hz，2H），7.35 ～ 7.15（m，5H），4.01（d，J = 8.3 Hz，5H）。

2.5 3-二甲基氨基-1-萘基-1-丙酮（**9**）的合成

于250 mL单口瓶中加入1-乙酰基萘（8.05 g）、多聚甲醛（1.6 g）、二甲胺盐酸盐（5.3 g），加入乙醇15 mL和浓盐酸0.6 mL，80 ℃加热回流反应12 h；反应完毕，将反应液慢慢冷却至室温，析出白色固体，过滤，得到3-二甲基氨基-1-萘基-1-丙酮盐酸盐10.1 g。将其溶于10 mL水中，在冰浴下，加入1 mol·L^{-1}的氢氧化钠溶液调pH至10，搅拌10 min，加入乙酸乙酯（20 mL×3）萃取，合并有机层，水洗（15 mL×2），饱和食盐水洗（15 mL×2），干燥（$MgSO_4$），抽滤，将滤液减压浓缩，得到7.96 g油状物3-二甲基氨基-1-萘基-1-丙酮。收率74.6%。MS（ESI$^+$）*m/z*：228.15 [M + H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.21（dq，J = 8.6，1.2 Hz，1H），7.77 ～ 7.50（m，3H），7.41 ～ 7.08（m，3H），4.69（s，2H），3.30 ～ 3.08（m，3H），2.74（s，6H）。

2.6 1-（6-溴-2-甲氧基喹啉-3-基）-4-二甲胺基-2-萘基-1-苯基-2-丁醇的合成

将流动化学反应装置三个注射泵（a、b、c）与两个反应器线圈连接好，取3-二甲基氨基-1-萘基-1-丙酮9.97 g、3-苄基-6-溴-2-甲氧基喹啉12.0 g，用四氢呋喃配成0.09 mol·L^{-1}的3-苄基-6-溴-2-甲氧基喹啉四氢呋喃溶液、0.108 mol·L^{-1}的3-二甲基氨基-1-萘基-1-丙酮四氢呋喃溶液和0.108 mol·L^{-1}的二异丙基氨基锂四氢呋喃溶液。打开三个注射泵，分别用无水四氢呋喃流动液清洗一段时间5 min。调节流速至5 mL·min^{-1}，分别向三个泵中泵入三种反应溶液。出口处放置饱和氯化铵水溶液，用来接收流出的反应液和淬灭反应液。80 min后流动结束，用无水四氢呋喃清洗注射泵和反应器线圈。

减压旋蒸除去四氢呋喃，加入100 mL水，用乙酸乙酯萃（100 mL×2），合并有机层。有机层用水洗涤（50 mL×2），饱和食盐水洗涤（100 mL×2），无水硫酸钠干燥4 h。过滤除去无水硫酸钠，滤液减压旋干得粗品，经柱层析（展开剂为二氯甲烷-甲醇-氨水＝200∶1∶0.1）先后分离得到两个组分分别用异丙醚重结晶得10 A组分（包含贝达喹啉）3.1 g和10 B组分5.3 g。

将组分10A（1.0 g）悬浮在丙酮中，向此悬浮液中加入（*R*）-（－）联萘酚磷酸酯（1当量）得二甲基亚砜溶液，将形成的悬浮液加热回流1 h，逐渐降至室温，室温下继续搅拌1 h，滤出形成的固体，用少量丙酮洗，用乙醇和水重结晶，得到得固体悬浮于甲苯中，用10%得碳酸钾溶液处理，混合物80 ℃反应0.5 h，分离出水层。有机层用水洗，饱和食盐水洗。减压浓缩，用乙醇处理，低温静置，滤出形成的固体，真空干燥得贝达喹啉0.35 g，经高效液相色谱法检测纯度达99.40%（流动相为乙腈-水-三乙胺＝40∶60∶0.1）。HR-MS：Calcd for $C_{32}H_{31}BrN_2O_2$ 554.1438，found 554.1445。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.83（s，1H），8.66 ～ 8.60（m，1H），8.26（d，J = 1.5 Hz，1H），7.92（d，J＝7.9 Hz，2H），7.79～7.68（m，5H），7.52（t，J = 7.4 Hz，1H），7.35（t，J = 7.7 Hz，1H），7.25 ～ 7.18（m，2H），6.93 ～ 6.82

（m，3H），5.85（s，1H），4.22（s，3H），2.55（s，1H），1.93 ～ 1.86（m，2H），1.86（s，6H），1.78（d，J = 7.6 Hz，1H）。^{13}C NMR（101 MHz，DMSO-d_6）δ：161.35，143.60，141.78，141.50，139.24，134.67，132.48，130.32，130.10，129.86，128.98，128.50，128.13，127.75，127.29，127.05，126.21，125.25，125.19，124.99，116.98，81.79，55.96，54.79，49.77，44.87，34.14。

3 结论

从实验室研究到工业化大生产，设计一条操作简单、收率较高、绿色环保、产品质量合格的药物合成工艺路线至关重要。本研究通过对文献报道的贝达喹啉的合成路线进行分析，将连续流动化学技术应用于贝达喹啉的合成过程中，提高了有机金属试剂二异丙基氨基锂使用的安全性，关健步骤的反应温度由原来－ 78 ℃提高到－ 45 ℃，该步反应时长由 4.5 h 降为 4 min，工艺的生产效率极大提高，操作更简便，更适合工业放大生产，产品纯度高于 99.4%，所有杂质都控制在 0.1% 以下，充分证明了该工艺的可行性。

参考文献

[1] Geng Y，Li L，Wu C，et al. Design and stereochemical research（DFT，ECD and crystal structure）of novel bedaquiline analogs as potent antituberculosis agents [J]. Molecules，2016，21（7）：875-890.

[2] Wang Z，Li L，Zhou Z，et al. Design，synthesis，configuration research，and in vitro antituberculosis activities of two chiral naphthylamine substituted analogs of bedaquiline [J]. J Heterocyclic Chem，2017，54（2）：1024-1030.

[3] Jiang S，Wu C，Yu J，et al. Separation of eight bedaquiline analogue diastereomers by HPLC on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase [J]. Chirality，2019，31（1）：72-78.

[4] Chahine EB，Karaoui LR，Mansour H. Bedaquiline：a novel diarylquinoline for multidrug-resistant tuberculosis [J]. Ann Pharmacother，2014，48（1）：107-115.

[5] Fox GJ，Menzies D. A review of the evidence for using bedaquiline（TMC207）to treat multi-drug resistant tuberculosis [J]. Infect Dis Ther，2013，2（2）：123-144.

[6] Chan B，Khadem TM，Brown J. A review of tuberculosis：focus on bedaquiline [J]. Am J Health-Syst Ph，2013，70（22）：1984-1994.

[7] Van Heeswijk RPG，Dannemann B，Hoetelmans RMW. Bedaquiline：a review of human pharmacokinetics and drug–drug interactions [J]. J Antimicrob Chemoth，2014，69（9）：2310-2318.

[8] Liu B，Li F，Zhou T，et al. Quinoline derivatives with potential activity against multidrug-resistant tuberculosis [J]. J Heterocyclic Chem，2018，55（8）：1863-1873.

[9] Wu C，Luo J，Wu M，et al. Design，Synthesis and biological evaluation of anti-tuberculosis agents based on bedaquiline structure [J]. Med Chem，2020，16（5）：703-714.

[10] Parvathaneni V，Elbatanony RS，Goyal M，et al. Repurposing bedaquiline for effective non-small cell lung cancer（NSCLC）therapy as inhalable cyclodextrin-based molecular inclusion complexes [J]. Int J Mol Sci，2021，22（9）：4783-4801.

[11] Segala E，Sougakoff W，Nevejans-Chauffour A，et al. New mutations in the mycobacterial ATP synthase：new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure [J]. Antimicrob Agents Ch，2012，56（5）：2326-2334.

[12] Preiss L，Langer JD，Yildiz Ö，et al. Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline [J]. Sci Adv，2015，1（4）：e1500106.

[13] Cholo MC，Mothiba MT，Fourie B，et al. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline [J]. J Antimicrob Chemoth，2017，72（2），338-353.

[14] Narang R，Kumar R，Kalra S，et al. Recent advancements in mechanistic studies and structure activity relationship of FoF1 ATP synthase inhibitor as antimicrobial agent [J]. Eur J Med Chem，2019，182：111644.

[15] World Health Organization. Report of the WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines; 2019（including the 21st WHO Model List of Essential Medicines and the 7th WHO Model List of Essential Medicines for Children）[M]. WHO/MVP/EMP/IAU/2019.10. WHO Technical Report Series 248. https://www. who. int/medicines/publications/essentialmedicines/UNEDITED_TRS_2019_EC22_Sept. pdf.

[16] Khan SR，Singh S，Roy KK，et al. Biological evaluation of novel substituted chloroquinolines targeting mycobacterial ATP synthase [J]. Int J Antimicrob Ag，2013，41（1）：41-46.

（收稿日期：2022-08-05；修回日期：2022-09-06）

探讨阳离子牛血清蛋白制备纯化工艺及大鼠动物模型验证

高青青[1]，纪越[2]，国大亮[1]，戴智强[1]，贾丽娟[1]，杨洪涛[2*]，刘玉璇[1*]（1. 天津中医药大学，天津　301617；2. 天津中医药大学第一附属医院，天津　300193）

摘要：目的　探讨阳离子牛血清蛋白（C-BSA）制备提纯技术并构建其膜性肾病大鼠模型效应平台。**方法**　采用改良 Border 法制备 C-BSA，采用十二烷基硫酸钠毛细管电泳法测定 C-BSA 纯度，毛细管电聚焦电泳法测定 C-BSA 的等电点；用 C-BSA 混合弗氏佐剂对 SD 大鼠预免疫 1 周后，尾静脉注射连续造模 4 周后进行生化指标检查和病理组织学检查。**结果**　C-BSA 制备产率可达 99.1%，纯度为 84.56%，等电点为 9 ～ 10；4 周后模型大鼠尿蛋白明显高于对照组（$P < 0.05$），血浆白蛋白含量明显低于对照组（$P < 0.05$）；三酰甘油与总胆固醇含量与对照组相比均有明显增加（$P < 0.05$），PASM、HE 组织染色显示出类似于早期膜性肾病的病理特征，IgG 免疫荧光染色则显示出沿毛细血管壁有大量颗粒状物沉积，足细胞的特异性分子 CD2AP、Podocin 和 Nephrin 荧光表达均减弱，透射电镜下显示造模组有明显的足突广泛融合、基底膜增厚免疫复合物团块状沉积。**结论**　在改良 Border 法的基础上增加小剂量乙二胺、增加透析频率容易获取高产率纯度及等电点更高的 C-BSA，大鼠动物实验造模成功率及稳定性更佳。

关键词：阳离子牛血清蛋白；制备纯化；膜性肾病；大鼠模型
中图分类号：R96，O641.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2495-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.007

Preparation of cationic bovine serum albumin and establishment of rats model of membranous nephropathy

GAO Qing-qing[1], JI Yue[2], GUO Da-liang[1], DAI Zhi-qiang[1], JIA Li-juan[1], YANG Hong-tao[2*], LIU Yu-xuan[1*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin*　301617; 2. *The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin*　300193)

Abstract: Objective　To prepare cationic bovine serum albumin (C-BSA) and verify the success of C-BSA in constructing the rat model of membranous nephropathy. **Methods**　C-BSA was prepared by modified Border method. Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis was used to determine the purity of C-BSA. The isoelectric point of C-BSA was determined by capillary isoelectric focusing electrophoresis. SD rats were pre-immunized for one week, followed by tail vein injection for 4 weeks before clinical index examination and histopathological examination. **Results**　The yield of C-BSA reached 99.1%, the purity of C-BSA was 84.56%, and the isoelectric point was 9 ～ 10. After four weeks, the urine protein of the model rats was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), and the plasma albumin content was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). Both the triglyceride and total cholesterol content were both significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). PASM and HE tissue staining showed features similar to early membranous nephropathy. IgG immunofluorescence staining showed a large amount of granular deposit along the capillary wall. Particular matter was deposited. The mRNA expressions of podocin, CD2AP

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 81873151）；国家科技重大专项课题（No. 2019YFC1709400）；天津市卫健委中医中西医结合课题（No. 2021012）；天津市研究生科研创新项目（No. YJSKC-20211003）。
作者简介：高青青，女，硕士研究生，主要从事中药学研究，email：284402940@qq.com　*通信作者：刘玉璇，男，教授，主要从事中医学、中医中药学研究，email：LsrLyx2008@162.com；杨洪涛，男，主任医师，教授，博士研究生导师，主要从事中西医结合防治慢性肾脏病的临床与基础研究，email：tjtcmht@163.com

and nephrin in the model group were lower than those in the control group. The transmission electron microscope showed obvious fusion and effacement of podocyte foot processes and the deposits in the basement membrance. **Conclusion** The Border method can be used to prepare cationic bovine serum albumin with high yield, and could successfully construct a rat model of membranous nephropathy.

Key words: cationic bovine serum protein; preparation and purification; membranous nephropathy; rat model

原发性膜性肾病（primary membranous nephropathy，PMN）是一种自身免疫性肾小球足细胞病[1]，亦是我国成人难治性肾病综合征的常见病理类型，其病理特点为肾小球基底膜弥漫性增厚，免疫球蛋白 IgG 和补体 C3 沿肾小球毛细血管广泛颗粒样沉积，肾小球基底膜脏层上皮细胞下 / 膜内可见电子致密物沉积，临床主要表现为隐匿起病的蛋白尿或肾病综合征。随着分子生物学研究及多学科交叉技术的不断拓深，愈来愈多的临床及科研学者对该病的发病机制及预后因素兴趣浓厚，亦提出了诸多全新的见解[2-3]。膜性肾病动物模型的构建主要分为 Heymann 肾炎模型、阳离子化牛血清白蛋白（C-BSA）肾炎模型、胶原蛋白片段（*α3NC1*）小鼠膜性肾病模型、抗足细胞抗体诱导的膜性肾病模型以及 1 型血小板反应蛋白 7A 域（THSD-7A）模型和抗人足细胞蛋白抗体大鼠膜性肾病模型[4]。其中 C-BSA 诱导的肾病模型与临床病症相似性最高，该模型具有病变稳定典型，接近或模拟临床患者实际症状，可操作性强，死亡率较低的优势，对本病的药理学研究有很大的推动作用，因此有关膜性肾病的动物模型效应平台的建立及稳定性验证对于后期的药物干预机制研究有重要的作用。

1 材料

1.1 试药

天然牛血清蛋白（北京博奥森生物技术有限公司，批号：bs-0292P）；体质量约 200 g 的健康成年 SD 雄性大鼠 [北京华阜康生物科技股份有限公司，动物许可证号：SCXK（京）2019-0008]；无水乙二胺（EDA，天津市大茂化学试剂厂，批号：20210103）；碳化二亚胺盐酸盐（EDC，麦克林，批号：N808856），弗氏不完全佐剂（Sigma，批号：F5506）；CE-SDS Gel Buffer（北京博思雅生化技术研究院）；CE-SDS Sample Buffer（自制 pH 6.5）；毛细管（Beckman）；cIEF 胶、pI marker（BioCEart）；二甲苯、无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司）；TritonX-100（北京博奥森生物技术有限公司，批号：P0096）；PBS（北京索莱宝科技有限公司，批号：P1022）；尿蛋白定量试剂盒（南京建成，C035-2-1，CBB 法）；PASM 染色试剂盒、HE 染色试剂盒（BASO 公司试剂盒）；IgG（碧云天，A7013，1∶200）；CD2AP（bs-0512R，1∶200）、Podocin（bs-6597R，1∶200）、Nephrin（bs-4866R，1∶200）抗体（北京博奥森生物技术有限公司）。

1.2 仪器

FE-28 型 PH 酸度计（梅特勒 - 托利公司）；LGJ-12 冷冻干燥机（北京松源华兴科技发展有限公司）；CE 7100 毛细管电泳仪（Agilent）；BS-240VET 全自动生化检测分析仪（Mindray）；HT7800 透射电子显微镜（Hitachi）；LEiCA RM2016 病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；JT-12J 脱水机、JB-L5 包埋机、JB-L8 冻台、JK-6 组织摊片机（武汉俊杰电子有限公司）；QL-866 涡旋混合器（Kylin-Bell）；YE193AL0293070 移液枪（Dragon）；BX51 荧光显微镜（OLYMPUS）；101-1B 烤箱（绍兴市上虞区沪越仪器设备厂）。

2 方法

2.1 C-BSA 的制备

实验采用改良的 Border 法[5] 进行 C-BSA 的制备，取 70 mL EDA，先加 500 mL 重蒸馏水，再加 6 mol•L^{-1} 盐酸 350 mL，调整 pH 值至 4.75。使温度冷却至 25 ℃，随后加入 5 g 天然牛血清白蛋白，搅拌均匀后加入 1.8 g EDC，保持温度为 25 ℃，在磁力搅拌器上持续搅拌反应 2 h；最后加入 pH 4.75 的醋酸缓冲液 30 mL，终止反应。将上述制备溶液在 4 ℃重蒸馏水中透析，每隔 3 h 换一次水，连续透析 96 h 后，冷冻干燥成粉即得 C-BSA。

2.2 C-BSA 纯度及等电点（PI）的测定

采用 CE-SDS 非还原纯度检测方法测定样品纯度。称取样品适量，用超纯水溶解至 4 mg•mL^{-1}，取 25 μL 于 EP 管中，加 CE-SDS 样品稀释液（Sample Buffer）70 μL 和 0.8 mmol•L^{-1} 碘乙酰胺 5 μL，混匀 65 ℃水浴 4 min，转移至样品瓶中待测。取超纯水 25 μL，同供试液处理得空白溶液对照，并设置毛细管电泳系统参数，进行纯度检验操作。

采用聚焦电泳（IEF）进行样品 PI 的测定。取样品 10 μL（14 mg·mL^{-1}），采用多种 pH 在 3 ～ 10 的两性电解质混合物建立 pH 梯度，选取 PI 为 9.5、8.0、7.0、5.5 进行梯度分离，设置检测波长和参比波长分别设为 280 nm、550 nm；带宽和参比带宽为 4 nm、50 nm。

2.3　膜性肾病大鼠的构建

选取 20 只雄性 SD 大鼠，大鼠的饲养与处理符合科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》[6]（伦理批件编号：TMUaMEC2016008）。在实验开始前，将大鼠适应性饲养 1 周并置于代谢笼内留尿，采用尿蛋白试纸测定每只大鼠的尿蛋白含量，结果均处于正常值范围（＜ 5 mg）。随机选取其中 5 只大鼠作为对照组，剩余的 15 只大鼠进行造模。参照改良 Border 法对大鼠进行预免疫。称取 C-BSA 100 mg 溶于 3.75 mL 生理盐水中，与弗氏不完全佐剂 26.25 mL 混匀，超声乳化，得到乳化液。于大鼠腋窝、腹股沟等处多点皮下注射，每只注射 0.3 mL 的超声乳化液，每点注射不得超过 0.05 mL，每日 1 次，总计进行预免疫 7 d。对照组仅以等体积的生理盐水与弗氏不完全佐剂按照上述比例乳化后进行皮下注射。正式免疫大鼠在预免疫 1 周后，隔日 1 次在大鼠的尾静脉注射 C-BSA，每只 10 mg，每周 3 次，2 周后逐渐累积剂量到 16 mg，每只共计注射 12 次。对照组仅以等体积的生理盐水进行尾静脉注射。第 4 周尾静脉免疫结束后，测得造模组大鼠 24 h 蛋白尿（24 h-UTP）＞ 20 mg，并随机取造模大鼠 2 只，处死后观察肾小球基底膜病理学变化，确认造模成功。

2.4　大鼠模型的临床症状与生化指标检测

大鼠干预 5 周后处死，观察其行为状态、精神状态以及体质量的变化。动态收集正式免疫 3 次、6 次与 12 次造模次数时的 24 h 尿液。4 周后，取腹主动脉血液，3500 r·min^{-1} 10 min，血清以－ 80 ℃保存，采用全自动生化检测分析仪分别检测检测其总蛋白（TP）、血清总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、血肌酐（SCR）、血浆白蛋白（ALB）与尿素氮（BUN）含量的变化。

2.5　大鼠模型的病理形态学观察

2.5.1　光镜下肾小球结构的观察　大鼠处死后迅速摘取双肾并剥离包膜，浸泡于 4% 多聚甲醇固定液中，改刀后置于包埋盒，于 4% 多聚甲醛固定液中 6 h 以上，脱水包埋后进行石蜡切片，标记，60 ～ 70 ℃烘烤 2 h。冷却的载玻片分别进行 HE 染色、PASM 染色处理，采用中性树胶封片，用光学显微镜摄片并分析图像。

2.5.2　电镜下足细胞结构的观察　大鼠采血后，迅速摘取肾脏，置于冰生理盐水中洗去血液。从肾门纵剖，取皮质边缘取 1 mm 大小的组织块，立即放入戊二醛固定液中固定标本，制片后进行电镜观察。观察指标为基底膜厚度及足突数量变化、足突融合情况。

2.5.3　间接荧光染色法检测肾小球内 IgG、CD2AP、Podocin、Nephrin 表达量　石蜡切片后常规脱蜡至水，用二甲苯、无水乙醇、85% 酒精依次浸泡 15 min，最后用蒸馏水清洗，加入柠檬酸抗原修复液进行微波炉高温修复，自然冷却后于 PBS 浸泡洗涤 3 次，每次 5 min，切片甩干后用画圈自发荧光淬灭，并用 TritonX-100 浸润 30 min，圈内滴加 1% 牛血清蛋白进行孵育封闭 30 min，滴加 IgG（碧云天，A7013，1∶200）、CD2AP（1∶200）、Podocin（1∶200）、Nephrin（1∶200）一抗抗体，于冰箱 4 ℃孵育过夜。将切片室温孵育 20 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，滴加 IgG 二抗（1∶1000）覆盖组织避光室温孵育 50 min；后用 DAPI 复染细胞核，封片，检测，摄片。

2.6　统计分析

利用 SPSS 26.0 进行数据分析，表示为平均值 ± 标准差（Mean±SD），两组对比采用 t 检验，多组之间比较采用单因素方差分析。P ＜ 0.05 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　C-BSA 产率、纯度及 PI 的测定

按照 “2.1” 项下方法制作 C-BSA，最终冻干成品产率高达 99.1%。如图 1 所示，纯度的测定显示其空白溶液无干扰样品峰，样品主峰（2）出峰时间为 10.36 min，所得样品纯度为 84.56%。图 2 中，2、3、4、5 号峰代表 PI 分别为 9.584、7.848、7.006、5.561 时出现的标志峰。样品和 PI marker 在波长 280 nm 都有明显吸收。因为 PI 最大值为 10.0，与样品峰重叠，而样品 a 图中显示的主峰 1 号峰在所选的 PI 值范围外，根据线性回归得出样品主峰 PI 值为 10.0，可以得出样品 PI 在 9 ～ 10。

产率（%）＝C-BSA 实际产出量（W_2）/C-BSA 理论产出量（W_1）×100%

3.2　C-BSA 大鼠膜性肾病造模效应平台验证

3.2.1　大鼠基础情况观察　从预免疫起至第 4 周正式免疫结束，对照组的大鼠精神状态保持良好，进食情况正常，大便成形，小便颜色正常，身体活动度良好，皮毛光泽度好。造模组大鼠第 1 周同对照组无差异，第 2 周干预开始后，陆续有大鼠出现进

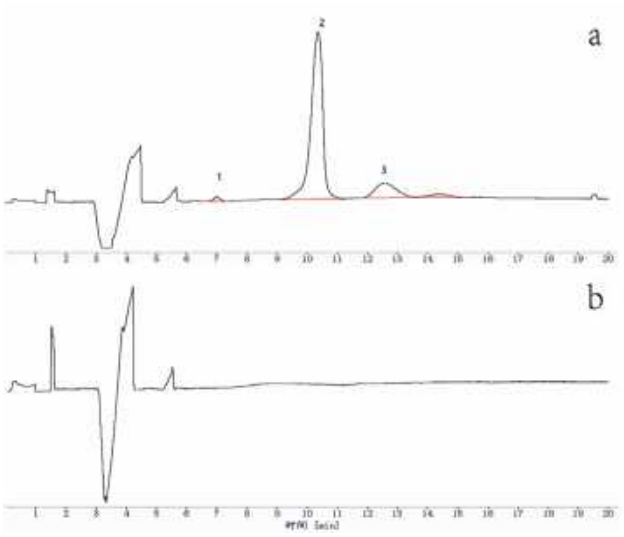


图 1　C-BSA 纯度测定对照图

Fig 1　Purity determination control diagram of C-BSA

a. 样品（sample）；b. 空白溶液（blank solution）

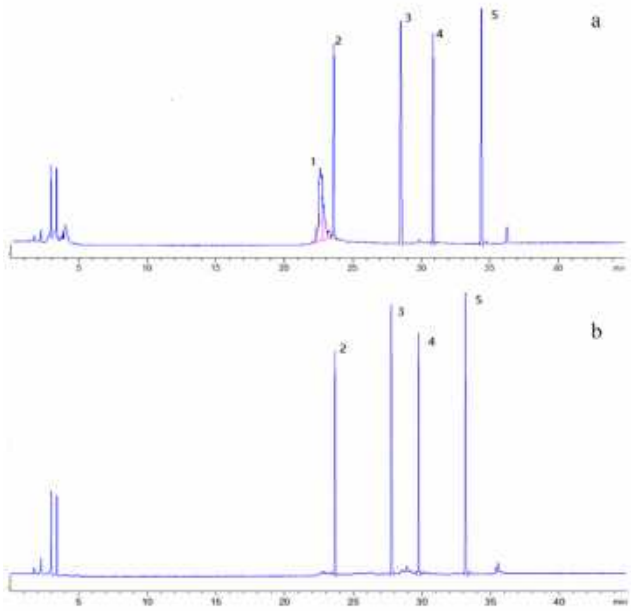


图 2　C-BSA 等电点测定对照图

Fig 2　Determination control diagram of the isoelectric point of C-BSA

a. 样品（sample）；b. PI marker

食进水偏少，大便不成形且小便颜色偏深，躯体活动度变差。自第 2 周起，模型组大鼠体质量增长缓慢，有个别体质量出现下降，随着造模时间延长，大鼠出现消瘦，精神萎靡，反应迟钝，耸毛的现象逐渐加重。图 3 为两组大鼠的体质量变化趋势，模型组大鼠的体质量增长率明显低于对照组。实验过程中有 4 只死亡，可能是由于 C-BSA 引发大鼠机体快速超敏反应致死，C-BSA 与靶细胞表面抗原结合后，引起抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用。解剖发现 4 只大鼠均有肺部出血症状，符合肾炎综合征超敏反应的特点。

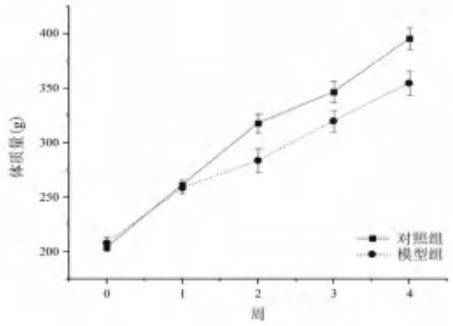


图 3　4 周体质量变化图

Fig 3　Weight change in 4 weeks

3.2.2　血液生化指标检测结果　4 周干预结束后，所有模型大鼠均出现不同程度的高蛋白尿、高脂血症与低蛋白血症等临床症状。其中模型组的 TP、ALB 含量相比对照组有明显下降（$P < 0.05$），TG、TC 含量相比对照组均有明显升高（$P < 0.05$），但两组 SCR 与 BUN 的含量差异无统计学意义。结果见表 1。

3.2.3　模型大鼠 24 h 蛋白尿检测　正式干预之前，所有模型组大鼠的尿蛋白含量均在正常范围内（< 5 mg），在干预 3、6、12 次后，其模型组大鼠的尿蛋白含量都相比前一阶段有显著增长（$P < 0.05$）（见图 4）。

表 1　两组血生化指标变化

Tab 1　Changes of blood biochemical indicators in the two groups

组别	TP/（g・mL^{-1}）	ALB/（g・mL^{-1}）	TG/（mmol・L^{-1}）	TC/（mmol・L^{-1}）	SCR/（μmol・L^{-1}）	BUN/（mmol・L^{-1}）
对照组（n = 5）	76.38±2.222	36.92±0.876	1.162±0.221	1.946±0.117	35.398±2.835	5.784±0.396
模型组（n = 11）	58.185±5.215*	28.038±2.668*	4.6164±1.763*	5.156±1.949*	44±2.001	6.444±0.78

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

3.3　大鼠模型病理组织学检查

3.3.1　肾组织病理学观察　如图 5 所示，模型组大鼠的 PASM 染色可见肾小球基底膜有明显的膜增厚及细胞增生现象，部分基底膜产生空泡性变，HE 染色可见肾小球基底膜不规则增厚，肾小管有明显扩张。透射电镜显示对照组大鼠足细胞呈“齿梳样排列”，模型组大鼠足细胞排列紊乱，足突数量明显减少并且部分足突融合、基底膜增厚免疫复合团块样沉积物。

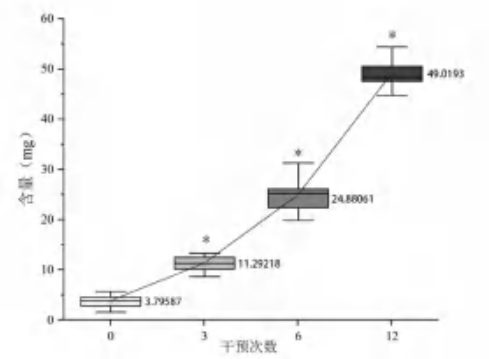


图 4　模型组大鼠尿蛋白定量变化图

Fig 4　Quantitative changes of urine protein in the model group

注：与干预前比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with before the intervention，$^{*}P < 0.05$.

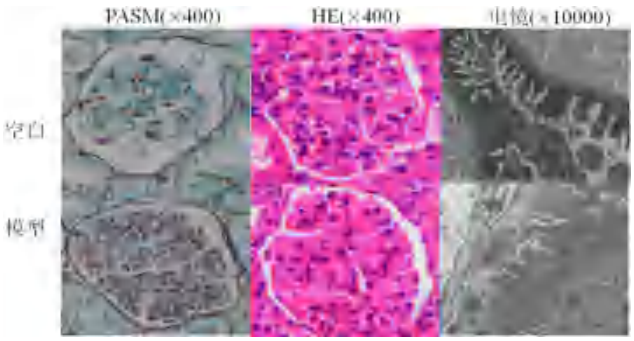


图 5　两组大鼠肾病理学形态观察

Fig 5　Pathological morphology of the kidneys in the two groups of rats

3.3.2　足细胞中的相关分子蛋白 CD2AP、Podocin、Nephrin 的表达情况　根据肾小球免疫荧光图像分析，对照组大鼠的肾小球 IgG 没有明显沉积，而模型组大鼠的肾小球内有明显的 IgG 颗粒状沉积；模型组大鼠的足细胞上的特征性表达分子 CD2AP、Podocin、Nephrin 的荧光强度明显弱于对照组，而且其表达情况呈现不连续颗粒分布，表达量明显弱于对照组，可见 C-BSA 构建的膜性肾病模型，可以使基底膜大量沉积在基底膜上，并造成足细胞的损伤（见图 6）。

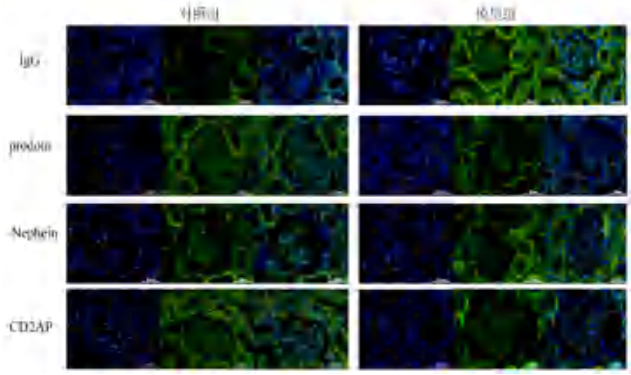


图 6　两组大鼠的相关表达蛋白的免疫荧光对比（×400）

Fig 6　Immunofluorescence of related expressed proteins between the two groups of rats（×400）

4　总结与讨论

膜性肾病的病理表现主要为上皮下免疫复合物的沉积和肾小球滤过屏障的损伤 [7]。目前此病发病机制尚未完全阐明揭示，以 M 型磷酸酯酶 A2 受体 [8]（M-type phospholipase A2 receptor，PLA2R）为首的包括 1 型血小板反应蛋白 7A 域（thrombospondin type-1 domain-containing，THSD7A）[9] 在内的原位靶抗原的发现成为探索膜性肾病致病机制及预后因素的主要方向。2020 年 KDIGO 指南 [10] 推荐用药如利妥昔单抗、烷化剂、钙调神经酶抑制剂和类固醇在不同程度上对膜性肾病起到了治疗作用，但相应的生物制剂及小剂量激素联合免疫抑制剂治疗方案产生的不良反应、较高复发率与经济负担亦不容忽视，因此 PMN 亟需疗效可靠、安全性高的治疗方案。

C-BSA 是将天然牛血清蛋白通过 EDA 进行正电荷修饰，在 EDC 的活化作用下，EDA 上的氨基与天然牛血清蛋白上的氨基酸残基上的羟基或者羧基发生取代反应，使牛血清蛋白上带上氮原子，并促使阳离子电荷密度增加 [11]。电荷是影响肾小球定位的重要因素，给药抗原的电荷对肾脏病变的性质和严重程度有深远的影响，并且它在上皮下免疫沉积物的形成和膜性肾病的产生中起着决定性的作用，大分子穿透肾小球壁的程度也取决于电荷 [4]。在制药的过中，PI 越大的阳离子化衍生物，渗透过滤器的量也越大，造模效果就会越好 [12]。所以在制药过程中需注意 PI 值的把控，比如，实验过程中需要加入过量的乙二胺，目的是将天然牛血清上的阴离子全部覆盖，使阳离子化达到最大程度，再加入激活剂 EDC 后，需充分搅拌反应，创造活化条件；在反应中会引入大量的小分子，为了提高纯度，还要增加其透析换水的频率与时间，只要保证反应体系能最大化，其得率与纯度就会高，用于实验用量就会更准确，从而增加实验结果的可靠性。本实验所制备的 C-BSA 经过多次重复制备，其结果稳定统一，可用于实验室自产及更深一步的批量生产。

肾小球基底膜和内皮细胞膜是带负电荷的结构，带有大量的正电荷牛血清蛋白，能够轻易地穿过基底膜而成为外源性种植抗原，从而引起机体的免疫反应，诱导相应的抗体聚集于此形成原位的免疫复合物，并沉积在肾小球的基膜的上皮细胞，使肾小球周围脉细血管壁上呈现弥漫性的电子致密沉积物 [13-14]，在膜性肾病疾病中，肾小球细胞以足细胞损伤为主，足细胞为肾小球滤过膜屏障的最外层，其损伤与蛋白尿的形成密切相

关。在肾脏出现病变时，足细胞也会发生的一系列病理变化[15-19]。由于终末分化，足细胞一旦遭到破坏就不能再生。肾脏足细胞裂孔膜蛋白具有离子通道、信号转导功能，维持裂孔膜的结构和功能的作用，且能通过内吞，收缩（通过细胞骨架肌动蛋白）呈递抗原细胞与肾小球基底膜的黏附，根据分子的电荷和大小选择性地过滤裂隙隔膜上的分子（分子量大于 65 000 道尔顿）[20]。足细胞上的特异性表达分子 CD2AP、Podocin、Nephrin 的表达情况可以反映出足细胞是否发生损伤，如果这些裂孔膜蛋白受到表达抑制或者破坏，肾小球的滤过屏障就会出现问题，从而导致蛋白尿的出现。

本研究将自制的 C-BSA（PI ＝ 10）予 SD 大鼠进行造模干预，4 周干预结束后，模型组大鼠均表现出尿量减少，24 h-UTP 含量异常增加，其 TP、ALB、TG 和 TC 的含量相比对照组差异均具有统计学意义，其临床指标完全符合膜性肾病膜性的标准，在病理组织方面的变化，模型组大鼠的免疫球蛋白 G 在基底膜上呈现颗粒状致密沉积，肾小球上皮细胞足细胞上的特异性表达分子 CD2AP、Podocin、Nephrin 相比对照组，表达量显著减少，且足细胞电镜图像呈现出广泛的足突融合，表明足细胞已经受到严重损伤，足细胞的病变损伤可导致肾小球的屏障受损与肾组织损伤，并产生蛋白尿[21]。这些表征均能充分说明采用此 C-BSA 构建膜性肾病模型的成功率与相似性非常之高。

参考文献

[1] 左俊荣 . 特发性膜性肾病的诊断及治疗研究 [J]. 医学信息，2021，34（11）：54-56.

[2] 刘宝利，钟逸斐，刘伟敬，等 . 中医药临床优势病种探讨——膜性肾病 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（16）：185-190.

[3] Liu WB，Gao C，Dai HR，et al. Immunological pathogenesis of membranous nephropathy：focus on PLA2R1 and its role [J]. Front Immunol，2019，10：1809.

[4] 刘旺意，邓跃毅，蔡小凡，等 . 特发性膜性肾病动物模型的研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2019，20（5）：465-467.

[5] Border WA，Ward HJ，Kamil ES，et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen [J]. J Clin Invest，1982，69：451-461.

[6] 史晓萍，宗阿南，陶钧，等 .《关于善待实验动物的指导性意见》的研究 [J]. 中国医科大学学报，2007，36（4）：493.

[7] 王慧，江嫚，张迪，等 . M 型磷脂酶 A2 受体与膜性肾病的临床诊治：进展与争议 [J]. 临床肾脏病杂志，2021，21（1）：68-73.

[8] Liu XG，Xu WX，Yu CY，et al. Associations between m-type phospholipase A2 receptor，human leukocyte antigen gene polymorphisms and idiopathic membranous nephropathy [J]. Bioengineered，2021，12（1）：8833-8844.

[9] Antoine M，David B，Jean-Michel G，et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A-related membranous nepHropathy associated with glomerular AL amyloidosis [J]. Pathology，2022，54（5）：654-657.

[10] 李晓敏，王桂花，邵华，等 . 对 2020 年版 KDIGO 指南草案中关于膜性肾病患者预防性抗凝策略的看法和思考 [J]. 中华肾脏病杂志，2021，37（10）：785-788.

[11] 胡献丽，朱琳嶺，李苓菱，等 . 阳离子化荧光金纳米簇的合成及 siRNA 递送研究 [J]. 分析化学，2020，48（6）：712-720.

[12] Rennke HG，Venkatachalam MA. Glomerular permeability：in vivo tracer studies with polyanionic and polycationic ferritins [J]. Kidney Int，1977，11（1）：44-53.

[13] 梁静，张渊，赵玉容，等 . 阳离子化牛血清白蛋白诱导膜性肾病模型大鼠足细胞相关蛋白的表达 [J]. 中国组织工程研究，2016，20（40）：6028-6033.

[14] Akiyama S，Imai E，Maruyama S. Immunology of membranous nephropathy [J]. F1000 Res，2019，8：F1000 Facultg 734.

[15] Raming R，Cordasic N，Kirchner P，et al. Neonatal nepHron loss during active nephrogenesis results in altered expression of renal developmental genes and markers of kidney injury [J]. Physiol Genomics，2021，53（12）：509-517.

[16] Zeng LF，Szeto CC. Urinary podocyte markers in kidney diseases [J]. Clin Chim Acta，2021，523：315-324.

[17] Basgen JM，Wong JS，Ray J，et al. Podocyte foot process effacement precedes albuminuria and glomerular hypertrophy in CD2-associated protein deficient mice [J]. Front Med（Lausanne），2021，8：745319.

[18] Akankwasa G，An C，Cheng GX，et al. Urinary matrix metalloproteinase-9 and nephrin in idiopathic membranous nepHropathy：a cross-sectional study [J]. Dis Markers，2021，2021：1620545.

[19] 郭小云，李洪钧，李荣 . 丹红注射液对膜性肾病模型大鼠足细胞跨膜蛋白表达的影响 [J]. 国际中医中药杂志，2019，41（8）：836-842.

[20] Hans-Kristian L，Jean-Jacques C. Idiopathic nephrotic syndrome：une Arlésienne [J]. Med Sci（Paris），2019，35：659-666.

[21] Martin CE，Petersen KA，Aoudjit L，et al. ShcA adaptor protein promotes nephrin endocytosis and is upregulated in proteinuric nephropathies [J]. J Am Soc Nephrol，2018，29：92-103.

（收稿日期：2021-12-10；修回日期：2022-03-15）

单硝酸异山梨酯缓释片分割后的体内外评价

寻明金[1, 2]，郭辉[1, 2]，冯中[1, 2]，能婷[1]，李文芳[1, 2]，张贵民[1, 2*]（1.山东新时代药业有限公司，山东省药物国际化工程实验室，山东　临沂　273400；2.鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东　临沂　276000）

摘要：目的　观察单硝酸异山梨酯缓释片整片和半片在体外溶出和体内药动学的情况。**方法**　采用 f_2 相似因子法比较原研制剂及自制单硝酸异山梨酯缓释片整片和半片在 4 种溶出介质中溶出曲线的相似性。同时比较两者在比格犬体内的药动学特征。**结果**　单硝酸异山梨酯缓释片整片和半片在体外的溶出行为相似，f_2 均大于 50%，且整片和半片在长期和加速条件下质量符合要求。单硝酸异山梨酯缓释片整片和半片在比格犬体内的药代动力学参数 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 差异无统计学意义，*AUC* 半片大约是整片的一半。**结论**　单硝酸异山梨酯缓释片整片和半片在体外溶出和体内的药代动力学情况相似且质量稳定。

关键词：单硝酸异山梨酯缓释片；整片；半片；体外溶出；药动学

中图分类号：R96，R927.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2501-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.008

In vivo and in vitro evaluation of isosorbate mononitrate sustained release tablets after segmentation

XUN Ming-jin[1, 2], GUO Hui[1, 2], FENG Zhong[1, 2], NENG Ting[1], LI Wen-fang[1, 2], ZHANG Gui-min[1, 2*] (1. *International Pharmaceutical Engineering Lab in Shandong*, *Shandong New Times Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400; 2. *National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical*, *Lunan Pharmaceutics Group Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 276000)

Abstract: Objective　To determine the in vitro dissolution and in vivo pharmacokinetics of the whole and half isosorbide mononitrate sustained release tablets. **Methods**　f_2 similarity factor method was used to compare the dissolution curves of the original preparation and isosorbide mononitrate sustained release tablets in 4 dissolution media. The pharmacokinetic characteristics in Beagles were compared. **Results**　The in vitro dissolution behavior of the whole and half isosorbide mononitrate sustained release tablets was similar, and f_2 was more than 50%. The quality of both whole and half tablets met the requirements under long term and accelerated conditions. There was no significant difference in the pharmacokinetic parameters t_{max} and $t_{1/2}$ of the whole and half tablets in Beagles. The *AUC* of the half tablets was about half of that of the whole tablets. **Conclusion**　The pharmacokinetics of whole and half isosorbide mononitrate sustained release tablets in vitro and in vivo are similar and the quality is stable.

Key words: isosorbide mononitrate sustained release tablet; whole tablet; half tablet; dissolution in vitro; pharmacokinetics

单硝酸异山梨酯（isosorbide mononitrate，ISMN）为硝酸异山梨酯的主要生物活性代谢物，用于冠心病的长期治疗及血管痉挛型和混合型心绞痛的预防，也适用于心肌梗死后的治疗及慢性心力衰竭的长期治疗。原研厂家为美国 Kremers Urban 制药公司，规格分别为 30 mg、60 mg、

基金项目：“重大新药创制”科技重大专项（No. 2018ZX09303-012）。

作者简介：寻明金，男，硕士，高级工程师，主要从事制剂研究与开发，email：xunmingjin@lunan.com.cn　*通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事新药研究与开发，email：lunanzhangguimin@163.com

120 mg，其中 60 mg 为功能性刻痕片。2013 年美国 FDA 发布关于片剂刻痕的指导原则，提到对于可分割的片剂，分割后的溶出行为应与整片比较，同时应符合规定。为提高自制制剂与原研制剂的相似性，及豁免半片的临床生物等效性（BE），本次实验以有刻痕的单硝酸异山梨酯缓释片（60 mg）为例，分别研究原研制剂和自制制剂整片和半片的脆碎度、溶出行为等体外指标、体内药动学特征以及稳定性研究，比较两者的体内外释药特性，为临床用药提供指导[1-2]。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo-Fisher 公司）；Trace1300 型气相色谱仪（美国 Thermo 公司）；Xcalibur 3.0 工作站（美国 Thermo-Fisher 公司）；AT70 smart 系列自动溶出度仪（SOTAX）；CS-2A 型脆碎度仪（Logan）；EX4202 型电子天平（METTER，精度：万分之一）。

1.2 试药

单硝酸异山梨酯对照品（含量：99.7%，批号：100694-201302）、2- 单硝酸异山梨酯对照品（含量：99.8%，批号：100695-201202）（中国食品药品检定研究院）；单硝酸异山梨酯原研制剂（批号：170978P1，美国 Kremers Urban 制药公司，规格：60 mg）；单硝酸异山梨酯自制制剂（批号：20191001，自制，规格：60 mg）；甲醇（赛默飞世尔科技有限公司）。

1.3 动物

健康比格犬 8 只，普通级，体质量（7.5±0.7）kg [北京玛斯生物技术有限公司，动物生产许可证编号 SCXK（京）2017-0007]。

2 方法与结果

2.1 片剂的分割操作[3]

分别取原研制剂和自制制剂单硝酸异山梨酯缓释片各 1 片，沿片中的刻痕，用手将其分割成 2 个半片，考察分割所致的质量损失、脆碎度和释放度等参数的变化。

2.2 质量损失的检测

随机选取原研制剂和自制制剂各 20 片进行考察。精密称定并记录各单片片重 W_n，用手掰的方式分别对 20 片进行分割，弃去药片碎屑后，分别精密称定并记录分割后每个半片的质量，记作 W_{n-1} 和 W_{n-2}，计算质量损失，质量损失（%）= $[W_n -（W_{n-1} + W_{n-2}）]/W_n \times 100\%$。

手掰后原研制剂和自研制剂的质量损失分别为（0.22±2.65）%、（0.65±2.51）%，用手掰的方式进行分割所造成的原研制剂和自制制剂的质量损失均小于 3%，符合刻痕片有关指导原则的要求。

2.3 脆碎度

掰片后，药片分割面不规整，与整片相比，容易发生质量损失，并且在贮存、运输过程中药片容易发生损坏。因此有必要对手掰方式分割后的半片进行脆碎度检查。随机称取原研制剂及自制制剂整片以及用手掰方式分割的半片各约 7.0 g，弃去粉末后置脆碎度测试仪中以 25 r • min^{-1} 的速度转动 4 min，结束后吹去粉末，精密称定总重，计算整片与半片的脆碎度，脆碎度（%）=（初始质量－结束质量）/ 初始质量 ×100%。

原研制剂整片和半片的脆碎度分别为 0.14%、0.28%，自制制剂整片和半片的脆碎度分别为 0.14%、0.42%。测试过程原研制剂及自制制剂均无裂片、碎片等现象，脆碎度均小于 1.0%，符合要求。

2.4 释放度测定方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C8（4.6 mm×250 mm，5 μm）；检测波长 210 nm；流动相：将 1.5 L 的甲醇溶于 3.5 L 的纯化水中；柱温 30.0 ℃；流速 1.0 mL • min^{-1}；进样体积 10 μL。

2.4.2 溶液制备

① 对照品溶液制备：精密称取单硝酸异山梨酯对照品 20 mg，溶于 50 mL 的溶出介质中，即得。

② 供试品溶液制备：取原研制剂整片和半片、自制制剂整片和半片各 6 片，分别采用 0.1 mol • L^{-} 盐酸、pH 4.5 乙酸缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水 4 种溶媒作为溶出介质，转速为 50 r • min^{-1}，分别在 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、16、20 和 24 h 时取样 10 mL，取续滤液进样测定。参照处方制备不含单硝酸异山梨酯的片剂，并按照上述方法制备空白辅料溶液。

2.4.3 方法学考察 在本色谱条件下空白辅料溶液对单硝酸异山梨酯检测无干扰，对照品溶液和供试品溶液中主峰保留时间一致，表明该方法专属性良好（见图 1）。单硝酸异山梨酯在 0.01 ～ 0.4 mg • mL^{-1} 内的回归方程为 $A = 14.34C + 1.357$，$r = 0.9998$。取供试品溶液和对照品溶液分别在室温下放置 24 h 后取样检测，*RSD* 分别为 0.19%、0.21%，说明单硝酸异山梨酯在 24 h 内稳定性良好。低、中、高质量浓度（0.1、0.2 和 0.3 mg • mL^{-1}）对照品溶液测定结果的 *RSD* 分别为 0.45%、0.37% 和 0.35%（$n = 3$）；由不同实验员使用不同仪器测

定，*RSD* 分别为 0.45%、0.47% 和 0.42%，说明本方法重现性良好。低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 99.96%、99.90%、99.84%，*RSD* 分别为 0.24%、0.31%、0.35%（n = 3）。

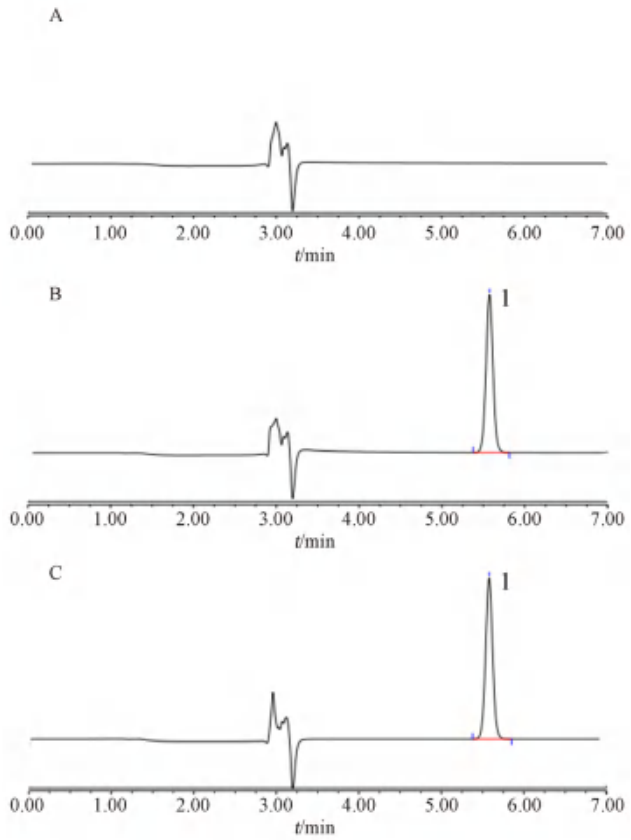


图 1　pH 6.8 磷酸盐缓冲液为介质的代表性图谱

Fig 1　Representative chromatogram of pH 6.8 phosphate buffer medium

A. 空白辅料溶液（blank accessory solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 单硝酸异山梨酯（isosorbide mononitrate，ISMN）

2.4.4　滤膜吸附性试验　将溶出液分成 2 份，一份离心取上清液，另一份过滤后取续滤液，分别依法测定。结果两者的峰面积 *RSD* 为 0.25%，说明滤膜对本品无吸附作用。

2.4.5　原研制剂与自制制剂释放度考察[4-5]　原研制剂整片与半片在上述 4 种介质中的释放度见图 2，自制制剂整片与半片在上述 4 种介质中的释放度见图 3。

按释放行为相似因子 f_2 法进行判断[6]，f_2 > 50 即可认定为释放行为相似，原研制剂与自制制剂整片与半片的相似因子结果见表 1，自制制剂整片与原研制剂整片的相似因子结果见表 2。

由表 1 可知，原研制剂和自制制剂整片与半片的 4 种溶出介质中释放曲线的 f_2 均大于 50，其中在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的相似因子数值最高。由此判断，整片与半片在 4 种溶出介质中的释放行为相似。由表 2 可知，自制制剂整片和原研制剂整片在 4 种溶出介质中释放度曲线的 f_2 值均大于 50，由此可知两者释放行为相似。

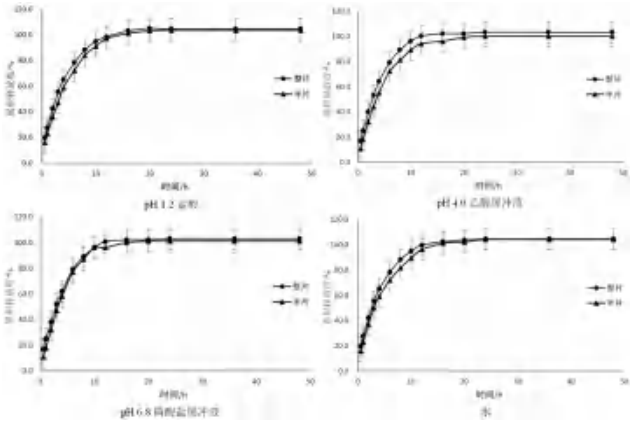


图 2　原研制剂整片与半片的体外释放曲线（n = 6）

Fig 2　Release profile on the whole and half tablets of original preparation（n = 6）

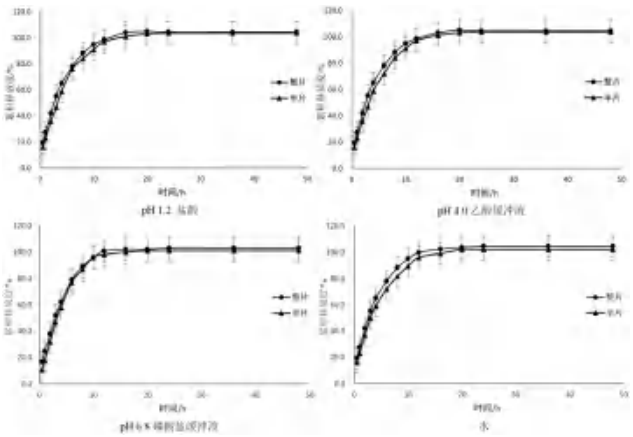


图 3　自制制剂整片与半片的体外释放曲线（n = 6）

Fig 3　Release profile on the whole and half tablets of self-made products（n = 6）

表 1　原研制剂和自制制剂整片与半片释放度曲线相似因子评价结果

Tab 1　Release profile f_2 valus between the whole and half tablets of original preparation and self-made products

制剂	f_2			
	pH 1.2 盐酸	pH 4.0 乙酸缓冲液	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	水
原研制剂	55	55	62	54
自制制剂	56	53	60	56

2.5　稳定性研究

将原研制剂与自制制剂整片和半片分别放置在温度（25±2）℃ /（60±5）%RH、温度（40±2）℃ /（75±5）%RH 条件下，于 6 个月后取样，分别考察片剂含量、有关物质及水分。结果见表 3。原研制剂的整片和半片及自制制剂整片及半片水分、有关物质、含量均符合质量要求。

表 2 整片自制制剂与原研制剂在不同介质中释放曲线相似因子评价结果

Tab 2 Release profile f_2 valus between the whole tablet of original preparation and self-made products in different mediums

批次	f_2			
	pH 1.2 盐酸	pH 4.0 乙酸缓冲液	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	水
1	58	56	65	57
2	56	58	68	53
3	54	52	65	54

表 3 稳定性实验结果

Tab 3 Stability test

分割方式	温度 /℃	湿度 /%	水分 /%	有关物质 /%		单硝酸异山梨酯含量 /%	取样时间
				2- 单硝酸异山梨酯	硝酸异山梨酯		
原研整片	25±2	60±5	2.1	0.120	0.025	99.40	0 d
			2.3	0.132	0.035	98.60	6 个月
	40±2	75±5	2.3	0.125	0.029	98.99	0 d
			2.5	0.133	0.037	97.56	6 个月
原研半片	25±2	60±5	2.0	0.121	0.020	98.48	0 d
			2.1	0.135	0.029	98.10	6 个月
	40±2	75±5	2.3	0.126	0.025	97.58	0 d
			2.6	0.141	0.038	96.89	6 个月
自制整片	25±2	60±5	1.9	0.121	0.021	99.10	0 d
			2.1	0.133	0.029	99.00	6 个月
	40±2	75±5	2.2	0.129	0.032	98.86	0 d
			2.6	0.137	0.038	97.30	6 个月
自制半片	25±2	60±5	2.0	0.123	0.025	98.72	0 d
			2.3	0.139	0.030	98.13	6 个月
	40±2	75±5	2.4	0.129	0.028	97.77	0 d
			2.6	0.140	0.036	97.01	6 个月

2.6 体内药动学研究

2.6.1 给药方法与血样采集[7] 采用单剂量双周期交叉给药方式，将 8 只比格犬随机分为 A、B 两组，每组 4 只，实验前禁食 12 h。A 组比格犬口服单硝酸异山梨酯缓释片整片，B 组比格犬口服单硝酸异山梨酯缓释片半片，给药 2 h 后可自由进食，采集样品结束后，经 1 周洗脱期，交叉服药。分别在给药 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、8、10、12、24 h 后，于比格犬的前肢静脉取血 2 mL，置 1% 肝素抗凝的离心管中，在转速 3000 r • min^{-1} 下离心 10 min 后，取上清液并置于－ 20 ℃冰箱中保存，待用。

2.6.2 血浆样品测定方法

① 色谱条件：色谱柱 Agilent HP-5 毛细管柱（30 mm×0.32 mm×0.25 μm）；气化室 180 ℃；柱温 170 ℃；检测室 180 ℃；检测器为电子捕获检测器（ECD）；载气 N_2，纯度 99.99%；流速 2.0 mL • min^{-1}，不分流；进样量 2 μL。

② 血浆样品的处理：精密吸取上清液 1 mL 置于 EP 管中，加入质量浓度为 2.0 μg • mL^{-1} 的内标（2- 单硝酸异山梨酯）50 μL，加入高氯酸溶液 2 mL，涡旋混匀，4 ℃离心（2655×g）10 min，取上清液置离心管中，使用氮气吹干仪吹干，用流动相复溶，涡旋 3 min，离心（2655×g）10 min，取上清液待测。

2.6.3 血浆测定方法学验证 单硝酸异山梨酯在 1 ～ 2000 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，回归方程为 $A = 0.1216C - 0.1210$，$r = 0.9996$。分别平行配制低、中、高质量浓度（10、1000 和 2000 ng • mL^{-1}）的单硝酸异山梨酯样品各 3 份，进样测定并计算回收率，所得回收率分别为 100.1%、100.3% 和 99.6%，*RSD* 分别为 3.8%、3.1% 和 3.1%。将上述低、中、高质量浓度（10、1000 和 2000 ng • mL^{-1}）的样品在室温下放置 8 h 后继续测定，结果分别为 100.2%、99.8% 和 99.5%，*RSD* 分别为 3.7%、3.9% 和 3.1%，表明该样品在室温下放置 8 h 稳定。经过 3 次冻融循环后，测得血浆中单硝酸异山梨酯的回收率分别为 98.19%、98.25% 和 98.56%，*RSD* 分别为 2.6%、3.7% 和 3.6%。

2.6.4 检测结果 单硝酸异山梨酯缓释片原研制剂和自制制剂整片和半片的平均血药浓度 - 时间曲线分别见图 4。

将不同时间点的血药浓度，用 DAS 2.0 软件处理，结果见表 4。对单硝酸异山梨酯缓释片原研制剂和自制制剂整片和半片口服给药的药动学参数分别进行配对 *t* 检验分析，结果 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 差异无统计学意义（$P > 0.05$），表明两个制剂在体内释药及代谢无明显差异。*AUC* 半片大约是整片的一半。

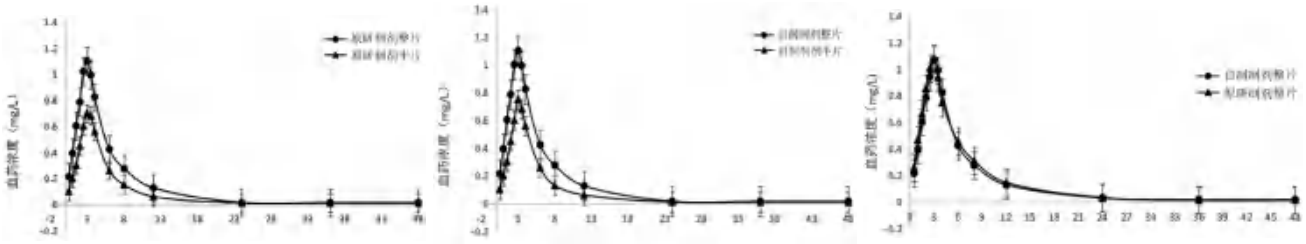


图 4　原研制剂和自制制剂给药后平均血药浓度 - 时间曲线（n = 8）

Fig 4　Mean drug plasma concentration-time curves of original preparation and self-made drug after the oral administration（n = 8）

表 4　原研制剂及自制制剂给药后整片和半片的药动学参数 (n = 8)

Tab 4　Pharmacokinetic parameters of original preparation and self-made preparation after the oral administration (n = 8)

参数		$AUC_{0\to 24\,h}$/（h·g·L^{-1}）	$AUC_{0\to\infty}$/（h·g·L^{-1}）	t_{max}/h	C_{max}/（g·L^{-1}）	$t_{1/2}$/h
原研制剂	整片	6.28±0.49	5.95±0.48	2.99±0.29	1.64±0.45	2.44±0.31
	半片	3.17±0.24	2.73±0.51	2.96±0.44	1.31±0.49	2.41±0.28
自制制剂	整片	6.35±0.36	6.10±0.48	2.98±0.35	1.62±0.29	2.51±0.44
	半片	3.22±0.29	3.00±0.51	2.95±0.62	1.38±0.41	2.48±0.52

3　讨论

单硝酸异山梨酯缓释片 120 mg 的规格虽有刻痕，但是未有半片服用剂量，30 mg 的规格没有刻痕，因此本次主要考察 60 mg 的刻痕片。单硝酸异山梨酯缓释片原研制剂和自制制剂整片和半片在 4 种溶出介质中的 f_2 均大于 50%，说明自制制剂与原研制剂在体外释放相似。原研制剂与自制制剂整片与半片在体外释放行为相似。

在体内药动学研究中，单硝酸异山梨酯缓释片半片与整片相比，其 *AUC* 约为整片 *AUC* 的一半。自制制剂整片与半片的 t_{max} 分别为（2.98±0.35）h 和（2.95±0.62）h，半片 t_{max} 略快于整片，推测 t_{max} 产生差异的原因可能与样品比表面积有关，半片比表面积大于整片，与胃肠道接触面积大，有利于促进药物的释放和吸收 [8-9]。

稳定性研究中发现自制制剂整片和半片，原研制剂整片和半片在长期和加速条件下放置 6 个月稳定。综上可见，此制剂在实际使用中可以服用整片或半片，对于实施个体化给药和青少年给药有更积极的意义。

参考文献

[1] 李江华，曾佳，杨煊，等 . 药师配发的分劈药片缺乏剂量一致性 [J]. 中国医院药学杂志，2007，27（3）：408-409.

[2] 付宝莲 . 单硝酸异山梨酯缓释片治疗心绞痛的疗效分析 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（3）：93-95.

[3] 林艳，黄云，蔡志波，等 . 分劈药片的剂量准确性考察 [J]. 中国药学杂志，2013，48（18）：1598-1601.

[4] 尹山，姜孟寅，阮舒恬，等 . 坎地沙坦酯片沿刻痕分割后的药学质量评价 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（3）：359-363.

[5] 寻明金，Peter Y，谷升盼，等 . 基于单池药物溶出 / 吸收仿生系统评价格列吡嗪不同制剂的释药特征及其体内外相关性 [J]. 天津中医药，2014，31（2）：102-109.

[6] 寻明金，冯中，张贵民 . 单硝酸异山梨酯缓释片的体内外相关性评价 [J]. 中国医药工业杂志，2018，49（4）：479-484.

[7] 贾俊伟，冯中，张贵民，等 . 单硝酸异山梨酯微丸型缓释包衣片的制备及其在 Beagle 犬体内的药动学 [J]. 中国医药工业杂志，2020，51（11）：1402-1409.

[8] 赵振梅，闫巍 . 单硝酸异山梨酯缓释片和酒石酸美托洛尔平片治疗慢性收缩性左心功能衰竭的疗效及安全性对比 [J]. 中国医药指南，2017，15（2）：113-114.

[9] Wang YB，Needleman J. Bias in the Wagner-Nelson estimate of the fraction of drug absorbed [J]. Pharm Res，2002，19（4）：470-476.

（收稿日期：2022-02-04；修回日期：2022-06-02）

肾损伤对大鼠白消安尿排泄清除率的影响

李广路，王福润，朱芳媚，沃茹烨，庄笑梅，张文鹏*，张天宏*，王全军*（军事医学研究院毒物药物研究所，抗毒物药物与毒理学国家重点实验室，国家北京药物安全评价研究中心，北京 100850）

摘要：目的 评估不同肾损伤模型对大鼠白消安药代动力学和尿排泄清除率的影响，并探讨血/尿动力学关系。**方法** 分别建立阿霉素肾病（ARN）和马兜铃酸肾病（AAN）模型，研究肾病大鼠静脉注射白消安 1 mg·kg^{-1} 后的药代动力学和肾排泄清除率变化。以一房室模型对血/尿数据拟合，以肾排泄清除率桥接血/尿动力学曲线。**结果** 肾损伤未导致白消安尿排泄率显著变化，但 ARN 大鼠中白消安的 $AUC_{0\sim t}$ 显著升高（$P<0.05$），总清除率显著降低（$P<0.05$），而在 AAN 大鼠中药代动力学参数未发生显著变化。与总体法计算的 $CL_{r,T}$ 相比，单点法计算的 $CL_{r,t}$ 变异较大，且存在前低后高的时间依赖性。**结论** 本研究结果显示白消安的肾排泄清除率没有受到肾损伤的影响。尿液替代血浆的药代动力学研究策略的关键指标——单点法的 $CL_{r,t}$ 表现出较大变异，原因为尿排泄曲线拟合所获得的斜率和截距参数被低估，因此，该策略还需进行深入优化并对拟合结果进行综合验证。

关键词：白消安；肾损伤；肾排泄清除率；药代动力学；阿霉素；马兜铃酸Ⅰ
中图分类号：R969.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2506-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.009

Effect of renal injury on urinary excretion clearance of busulfan in rats

LI Guang-lu, WANG Fu-run, ZHU Fang-mei, WO Ru-ye, ZHUANG Xiao-mei, ZHANG Wen-peng*, ZHANG Tian-hong*, WANG Quan-jun* (*State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology*, *Institute of Pharmacology and Toxicology*, *National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research*, *Academy of Military Sciences*, *Beijing* 100850)

Abstract: Objective To evaluate the effect of different renal injury models on the pharmacokinetics and renal clearance (CL_r) of busulfan in rats, and to determine the relationship between blood and urodynamics. **Methods** Adriamycin nephropathy (ARN) and aristolochic acid nephropathy (AAN) models were established respectively to determine the pharmacokinetics and CL_r of rats after intravenous injection of busulfan (1 mg·kg^{-1}). The plasma/urine data were fitted by one-compartment model, and the renal clearance was used to bridge the plasma/urine dynamic curve. **Results** Nephropathy did not cause obvious changes in the urinary excretion rate of busulfan. In ARN rats, $AUC_{0\sim t}$ of busulfan increased significantly ($P<0.05$) and the CL decreased significantly ($P<0.05$), but its pharmacokinetics did not change much in AAN rats. Compared with the $CL_{r,T}$ calculated by totality method, the $CL_{r,t}$ calculated by the single-point method had a greater variation, with a time dependence from low to high. **Conclusion** The CL_r of busulfan is not affected by nephropathy. As the key index of pharmacokinetics research strategy of plasma replaced urine, $CL_{r,t}$ of single point method showed great variation because that the slope and intercept parameters obtained by urine excretion curve fitting are underestimated. This strategy needs further optimization and the fitting results should be comprehensively verified.

Key words: busulfan; nephropathy; renal clearance; pharmacokinetics; adriamycin; aristolochic acid I

基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目（No.2018ZX09721003-001-005）。
作者简介：李广路，男，硕士研究生，主要从事毒物药物分析研究，email：LiguangluJSYX@163.com *通信作者：张文鹏，男，助理研究员，主要从事药代动力学研究，email：wpzhang@bmi.ac.cn；张天宏，男，副研究员，主要从事药代动力学研究，email：wdzth@sina.com；王全军，男，研究员，博士研究生导师，主要从事药物毒理学与药物临床前安全评价，email：wangquanjunbeijing@163.com

肾脏是维持机体内环境平衡的重要器官，其基本功能是生成尿液，以处置体内多种内源性或外源性物质。肾脏中存在着多种转运体，如有机阴离子转运体（organic anion transporters，OATs）、有机阳离子转运体（organic cation transporters，OCTs）等，在药物肾脏排泄过程中起着重要作用。当发生肾脏疾病（或肾损伤）时，转运体功能与表达的变化会对其底物的清除产生巨大影响，并导致体内药代动力学的改变[1]。在临床前研究中，阿霉素肾病模型是目前公认能够较好模拟人类慢性肾病的模型之一，其动物模型的表现类似于人类的肾病综合征[2-5]，其致病机制与马兜铃酸Ⅰ类似，但具有不同的代谢酶和转运体诱导作用[6]。

白消安主要应用于儿童和成人造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplantation，HSCT）预处理[7]。白消安给药后在血浆中的分布符合一房室模型，一级消除动力学过程，清除率中位数为 0.22 L/（h • kg），中央室分布容积中位数为 0.7 L • kg^{-1}[8]，主要被谷胱甘肽转移酶代谢消除，约 30% 给药剂量的药物以代谢产物形式随尿液排泄[9]。白消安治疗窗窄，个体差异大，高曲线下面积（*AUC*）会增加不良事件发生的风险，如窦梗阻综合征 / 肝静脉闭塞症；而低 *AUC* 则会提高移植失败或复发的概率[10-11]。为降低以上风险并指导个性化用药，临床需要对 HSCT 患者进行白消安治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）。

尿液作为给药后体内的一个特殊的房室（排泄室，药物从血液向尿液单向流动），理论上尿药动力学过程与血药一致，实际上，尿液提供了一个反映体内药量变化过程的窗口。如果能够利用尿液进行白消安的 TDM，将简化操作，减少患者采血负担，且不涉及伦理限制。但尿液仅提供药物排泄量数据，并不包含分布容积的参数，因此只能反映中央室药量，不能反映中央室浓度。为建立尿排泄与血浆浓度 - 时间曲线的关系，必须利用肾排泄清除率（renal clearance，CL_r）参数进行桥接。而 CL_r 值受到多种因素影响，如个体生理因素、疾病状态、肾功能、药物浓度等。

本研究利用阿霉素和马兜铃酸Ⅰ成功建立肾病大鼠模型，考察了肾损伤对白消安药代动力学和排泄的影响，探讨了不同肾功能下各观察时间点的肾排泄清除率，为实现临床利用尿液进行白消安的 TDM 提供数据依据，最终为尿排泄数据拟合血药暴露曲线的临床药代动力学研究策略奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量（200±20）g [北京维通利华公司，实验动物许可证号：SCXK（京）2016-0006]，饲养于国家北京药物安全评价研究中心动物实验室（屏障 SPF 级）。提供 ^{60}Co 放射灭菌鼠全价颗粒饲料，自由食水。饲养环境保持温度 20 ～ 26 ℃，湿度 40% ～ 70%，每小时换气 15 次以上，照明时间每日 12 h。研究方案通过军事科学院实验动物中心实验动物福利伦理委员会的伦理审查。

1.2 试药与仪器

白消安（纯度：98%）、马兜铃酸Ⅰ（AAI，纯度：95%）和阿霉素（纯度：95%）（百灵威公司）；肌酐检测试剂盒（美国 Sigma 公司）；尿微量白蛋白检测试剂盒（美国 Abcam 公司）。

LC-MS/MS 8060 三重四极杆液质联用仪（日本 SHIMADZU 公司）；Variosk LUX 型酶标仪（美国 Thermo 公司）；SPECTROstar Nano 型紫外分光光度计（德国 BMG 公司）；FRESCO21 型高速冷冻离心机（美国 Thermo 公司）；RM2016 型病理切片机（德国徕卡公司）；KD-BM 型包埋机和 KD-P 型组织摊片机（金华科迪公司）；Nikon Ci-S 型显微镜和 DS-FI2 型成像系统（日本尼康公司）。

2 方法

2.1 肾病模型组和对照组

2.1.1 阿霉素肾病（ARN）模型　12 只雄性 SD 大鼠，随机分为两组（A、B）并编号，两组大鼠均于第 1 日静脉注射 4 mg • kg^{-1} 阿霉素，第 7 日静脉注射 2.5 mg • kg^{-1} 阿霉素造模，于第 21 日建模结束。A 组于第 0（给药前）、7、14、21 日记录体质量，采集 12 h 过夜尿，并观察大鼠精神状态、毛色、大小便、水肿、摄食量等情况；建模完成后，将 A 组大鼠安乐死并心脏穿刺采血，采集心、肝、脾、肺、肾脏组织样本，生理盐水清洗干净后置于 10% 福尔马林固定液中待检。B 组于建模完成后静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1}，开展药代动力学和排泄实验。

2.1.2 马兜铃酸肾病（AAN）模型　预实验结果表明，腹腔注射 AAI 80 mg/（kg • d）时，模型组第 1 日出现全身颤抖、状态萎靡、鼻腔出血等现象，第 3 日出现个例死亡，第 4 日全部死亡。因此，本文选择 12 只 SD 大鼠，随机分为两组（C、D）并编号，马兜铃酸剂量为 20 mg/（kg • d），连续 3 日腹腔注射，建模周期为 1 周。C 组于第 0（给药前）、3、5、7 日记录体质量，过夜尿收集、

状态观察与组织采集同“2.1.1”项下。D 组于建模完成后静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1}，开展药代动力学和排泄实验。

2.1.3　对照组　两种模型组采用同一空白对照组（G），选择 6 只 SD 大鼠，随机编号，单笼饲养，未予特殊给药处理。于第 0（给药前）、3、5、7、14、21 日记录体质量，并采集 12 h 过夜尿。过夜尿收集、状态观察与组织采集同“2.1.1”项下。另取 6 只 SD 大鼠静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1}，开展药代动力学和排泄实验。

2.2　*药代动力学与排泄实验方法*

按 1 mg • kg^{-1} 剂量尾静脉注射给药，给药体积为 5 mL • kg^{-1}。分别于给药前采空白血样和给药后 2、5、15、30 min 及 1、2、4、8、12、24 h 经颈静脉采血 0.15 mL 置于含肝素的 EP 管中。给药后将大鼠置于代谢笼，分别采集给药后 0 ～ 2、2 ～ 4、4 ～ 8、8 ～ 12、12 ～ 24 h 时段的尿液和粪便并同时采集血样，记录不同时段采集的尿液体积和粪便重量。使用 50% 甲醇冲洗代谢笼至尿液总体积约 70 mL，混匀后置－ 20 ℃冷冻待测；粪便样品称重后置－ 20 ℃冷冻待测。全血离心 10 min（2500×g，4 ℃）分离血浆，置于－ 20 ℃冰箱冻存待测。

2.3　*样品前处理方法*

2.3.1　血浆样品前处理和标准曲线制备　取 50 μL 空白大鼠血浆加入 50 μL 不同质量浓度的白消安标准工作液，使白消安在大鼠血浆中的质量浓度为 1、2、10、20、100、200、1000、2000 ng • mL^{-1}。配制双空白血浆样品（DB）、仅含内标血浆样品（CB）以及质控样品工作液（质量浓度为 1.6、16、160、1600 ng • mL^{-1}）。取 50 μL 大鼠血浆样品，加入 50 μL 甲醇后，再加入 200 μL 含内标普萘洛尔（20 ng • mL^{-1}）的甲醇，涡旋混匀 1 min，18 800×g 离心 10 min，定量取上清液 100 μL 后进样分析。

2.3.2　尿便样品前处理和标准曲线制备　取 2 mL 空白大鼠尿液加入 18 mL 50% 甲醇配制空白基质。取 1 mL 空白基质加入 50 μL 不同质量浓度的白消安标准工作液和 50 μL 含内标普萘洛尔（20 ng • mL^{-1}）的甲醇溶液，使样品中的白消安质量浓度分别为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、1、25、50、100 ng•mL^{-1}。配制双空白尿样品（DB）、仅含内标尿样品（CB）以及质控样品工作液（质量浓度为 0.08、0.8、8、80 ng • mL^{-1}）。取 1 mL 尿样品加入 50 μL 含内标普萘洛尔（20 ng•mL^{-1}）的甲醇溶液，放入离心浓缩仪挥干后加入 1 mL 水复溶。所有样品振荡混匀后加入 1 mL 叔丁基甲醚萃取。取有机层 900 μL 于 1.5 mL EP 管，置于浓缩挥发仪中挥干。每个样品加入 100 μL 50% 甲醇复溶，涡旋混匀，18 800×g 离心 10 min，定量取上清液 90 μL 后进样分析。

粪便样品于室温下解冻并加 50% 甲醇至 20 mL，匀浆，离心后取 1 mL 上清液挥干，步骤与尿样品处理步骤相同。

2.4　*液质检测方法*

2.4.1　色谱条件　SHIMADZU SIL-30AC 高效液相系统。色谱柱：phenomenex C_{18} column（3.0 mm×50 mm，2.6 μm）；流动相：水（A）- 甲醇（B），含 0.1% 甲酸和 2 mmol•L^{-1} 乙酸铵；流速 0.6 mL•min^{-1}；梯度洗脱（0.0 ～ 0.5 min，5%B；0.5 ～ 2 min，5% ～ 95%B；2 ～ 2.5 min，95%B；2.5 ～ 2.6 min，5%B；2.6 ～ 4 min，0%B）。柱温 40 ℃，进样量 5 μL。

2.4.2　质谱条件　采用 LC-MS/MS 8060 电喷雾（ESI）离子源，多反应监测（MRM）模式，正离子模式扫描。干燥气 10 L • min^{-1}，加热气 10 L • min^{-1}，碰撞气 270 kPa，离子源温度 300 ℃，脱溶剂管温度 250 ℃，加热模块温度 400 ℃（见表 1）。

表 1　白消安及其内标的质谱检测条件

Tab 1　Mass spectrometry detection conditions of busulfan and its internal standard

检测物	*m/z*		CE/V	Q1/V	Q3/V
	母离子	子离子			
白消安	264.10	151.10	－ 11	－ 14	－ 16
普萘洛尔	260.10	116.00	－ 19	－ 14	－ 13

2.5　*组织染色方法*

（1）取材：组织样本取材厚度约 3 mm。（2）脱水：梯度酒精脱水 70%、80%、95%、100% 各 30 min，二甲苯两瓶各 20 min，石蜡浸蜡两缸各 12 min。（3）包埋：石蜡包埋。（4）切片：切片厚度约 4 μm。（5）苏木素伊红（HE）染色：① 脱蜡，三瓶二甲苯每瓶脱蜡 8 min；两瓶 100% 酒精每瓶脱蜡 8 min；90% 酒精、80% 酒精、60% 酒精各脱蜡 8 min；② 苏木素染色 4 min，流水清洗；③ 盐酸酒精分化 2 ～ 3 s，流水清洗；④ 0.5% 氨水 20 s，流水清洗，上镜观察；⑤ 0.5% 伊红染色 1 min；⑥ 80% 酒精、90% 酒精各分化 3 ～ 5 s，95% 酒精分化 5 min，三瓶 100% 酒精各分化 5 min，两瓶二甲苯各分化 5 min；⑦ 中性树脂胶封固。（6）光镜观察并显微照相。

2.6　*数据处理和统计分析*

假设大鼠血浆白消安暴露曲线符合静脉注射一房室模型，α 其中央室药量符合方程 1。

$X = Ae^{-\alpha t}$　（方程 1）

其中，X 表示中央室药量（mg）；A 表示给药药量（mg）；α 为消除速率常数（h^{-1}）。将方程 1 中添加中央室变形为方程 2。

$C = (k_e A/k_e V) \times e^{-\alpha t} = (k_e A/CL_r) \times e^{-\alpha t}$（方程 2）

尿液排泄速率符合方程 3。

$dX_u/dt = k_e X = k_e Ae^{-\alpha t}$　（方程 3）

其中，X_u 表示尿液排泄药量（mg）；k_e 表示尿排泄速率常数（h^{-1}）。解微分方程 3，获得尿累积排泄曲线方程 4。

$X_u = k_e A/\alpha \times (1 - e^{-\alpha t})$　（方程 4）

因此，总尿药排泄量以方程 5 计算。

$X_{u,\ inf} = k_e A/\alpha$　（方程 5）

总体法求尿排泄清除率（$CL_{r,\ T}$），由总尿药排泄量与 AUC_{inf} 的比值求得，见方程 6。

$CL_{r,\ T} = X_{u,\ inf}/AUC_{inf}$　（方程 6）

单点法求各时刻尿排泄清除率（$CL_{r,\ t}$），根据定义由 t 时刻尿药排泄速率与血药浓度的比值求得，见方程 7。

$CL_{r,\ t} = dX_u/dt/C_t = k_e Ae^{-\alpha t}/C_t$　（方程 7）

拟合误差（SD）和绝对平均百分误差（mean absolute percentage error，MAPE）计算方法见公式 8 和公式 9。

$SD = (Cpre - Cobs)/Cobs \times 100\%$　（公式 8）

$MAPE = \Sigma|SD|/n \times 100\%$　（公式 9）

数据结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，经 Excel 2013 软件统计分析。使用 Winnonlin 8.3 软件 NCA 模块和 PK 模块计算药代动力学参数。将对照组药代动力学参数与模型组进行独立样本 t 检验；模型组在建模期间的体质量、尿量、尿肌酐、尿微量白蛋白、尿白蛋白肝酐比值（ACR）与对照组进行组间独立样本 t 检验和组内配对 t 检验；各组药 - 时曲线和尿排泄曲线的各相斜率进行组间独立样本 t 检验和组内配对 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

3　结果

3.1　模型组与对照组生理生化

在造模期间，对照组大鼠生长发育良好，体质量、精神状态、摄食量、大小便等均正常；ARN 模型组第 1 周出现腹胀、毛发凌乱、食欲减退等症状，第 2 周出现腹泻，建模完成时毛发易脱落，精神萎靡；AAN 模型组在 7 日内出现腹泻、脱毛、精神萎靡等症状。两个模型组大鼠均未出现死亡。

AAN 模型组在建模期间体质量增长缓慢，建模结束时体质量较对照组偏低（$P < 0.05$）；ARN 模型组建模 14 日内体质量增长缓慢（$P < 0.05$），第 21 日与对照组无显著差异（见图 1A）。模型组与对照组建模前尿量个体差异较大，建模期间模型组尿量均显著降低（见图 1B）。模型组在建模期间尿肌酐水平显著升高，该变化趋势与尿微量白蛋白类似（见图 1C 和图 1D）。对照组 ACR 保持稳定，而模型组显著升高，其中 AAN 组升高更为急剧（见图 2）。

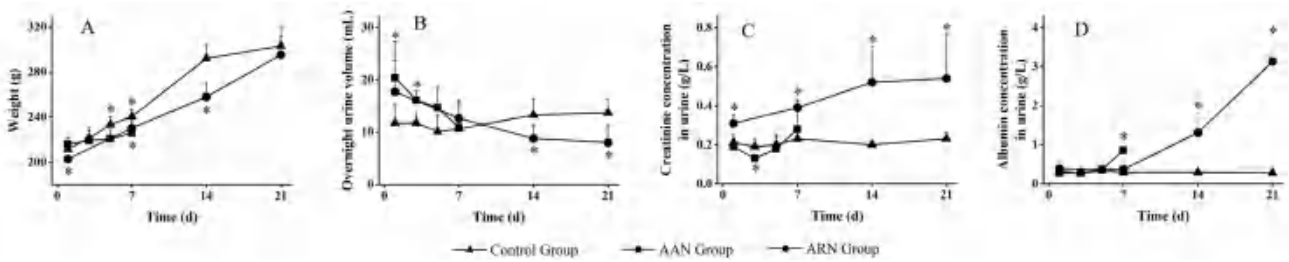


图 1　对照组与模型组生理指标变化（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig 1　Changes of physiological indexes in the control and the model groups（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

注：与对照组比较，$^*P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^*P < 0.05$.

病理检测结果显示，ARN 模型组动物病变主要累及肾小球和肾小管，包括肾小球囊内蛋白渗出、系膜基质增多、肾小囊壁增厚；肾小管透明小滴蓄、上皮细胞肿胀、再生、透明管型等，其他器官组织未发现与实验相关病理变化。AAN 模型组动物病变涉及肾小球、肾小管及肝脏，包括近曲小管上皮细胞脱落、刷状缘破坏、髓质内肾小管变性坏死、肾小管扩张、透明管型、内髓质集合管变性坏死等病变，其他器官组织未发现与实验相关病理变化。模型组肾脏均达到轻微肾损伤程度（见图 3）。

3.2　中央室暴露曲线

各组大鼠静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1} 后，体内药时曲线按一房室分布模型拟合曲线见图 4，表 2 列出了所拟合的各动物药时曲线的参数，各时刻 SD 和 MAPE，提示一房室模型对血浆暴

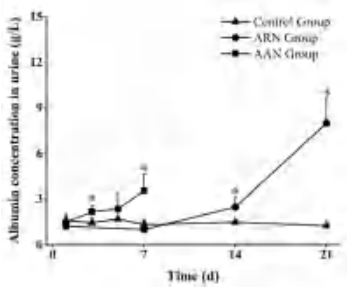


图 2　对照组与模型组 ACR 变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 2　Changes of ACR in the control and the model groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P<0.05$.

（×40）　（×10）　（×40）

图 3　对照组和模型组 SD 大鼠肾脏组织病理学检查结果

Fig 3　Renal histopathology of SD rats in the control and the model groups

露浓度曲线拟合良好。各组非房室模型（NCA）药代参数结果显示，与对照组相比，ARN 模型组的 *AUC* 显著升高（$P<0.05$），*CL* 显著降低（$P<0.05$），分别为对照组的 1.18 倍和 0.84 倍，$t_{1/2}$、C_0、V_z、$MRT_{0\sim t}$ 等其他参数差异无统计学意义；AAN 模型组 PK 参数与对照组较接近，差异无统计学意义（见表 3）。

3.3　尿便累积排泄曲线

对照组和模型组大鼠静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1} 后，原形在给药后 24 h 内尿累积排泄曲线的拟合结果见图 5。各组原形药物经尿便累积排泄率统计结果见表 4，显示对照组为 12.62%，与 ARN 组（9.31%）和 AAN 组（13.44%）无显著差异（$P>0.05$）。各组中原形药物经粪便累积排泄率极低，分别为 1.12%、0.79% 和 0.15%，其中 AAN 组显著低于对照组（$P<0.05$），可能与马兜铃酸肝毒性有关。以上结果提示 ARN 组总清除率降低可能不是肾排泄清除率原因，而主要是代谢消除率降低所引起的。

表 2　一房室模型血浆动力学参数和各时刻与实测值的偏差

Tab 2　Plasma kinetic parameters of the one-compartment model and SD values from measured and predicted plasma concentrations

组别	大鼠编号	血浆动力学拟合参数		标准差 /%										MAPE
		k_eA/CL_r /（ng • mL^{-1}）	α/h^{-1}	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	
对照组	1	1303.91	0.35	− 4.28	3.12	0.52	3.99	− 1.07	− 0.51	8.54	− 8.42	− 10.75	5.51	4.67
	2	1276.77	0.37	− 8.63	− 0.85	8.19	1.08	− 1.94	− 0.20	18.31	− 15.39	− 21.38	8.39	8.43
	3	1176.18	0.28	− 5.73	3.32	3.91	2.08	0.16	4.32	2.82	− 9.97	− 10.81	6.44	4.96
	4	1050.14	0.31	− 5.36	− 4.41	− 7.26	− 6.53	− 9.35	− 7.18	5.13	18.58	26.37	− 38.84	12.90
	5	1214.97	0.34	16.59	− 5.37	6.04	1.68	− 4.03	− 7.56	− 1.42	− 3.15	− 22.85	9.67	7.84
	6	1192.64	0.30	− 6.00	− 1.79	3.40	3.29	− 0.42	11.48	− 7.10	− 3.15	− 6.69	3.98	4.73
ARN 组	1	1170.29	0.30	− 7.07	− 2.58	4.27	2.34	− 1.41	− 4.50	5.47	2.70	2.15	− 2.70	3.52
	2	1287.70	0.28	− 6.43	0.54	3.41	3.47	3.83	− 3.83	9.57	− 6.35	− 15.89	6.53	5.98
	3	1371.13	0.33	1.21	4.21	7.34	− 2.28	− 1.17	− 6.44	10.84	− 13.17	− 16.15	8.38	7.12
	4	1267.53	0.28	1.65	2.37	4.12	6.08	− 0.56	− 0.45	2.82	− 14.75	− 19.14	10.19	6.21
	5	1278.10	0.28	− 9.18	− 2.11	5.73	3.59	0.97	− 2.06	9.23	− 3.89	− 8.96	3.52	4.93
	6	1250.52	0.28	− 6.41	2.09	2.87	0.57	1.69	− 6.40	9.02	0.68	− 9.44	2.71	4.19
AAN 组	1	1164.44	0.33	− 6.55	5.33	11.80	2.02	− 2.28	− 4.95	− 25.81	13.13	− 2.99	/	8.32
	2	1279.09	0.36	− 1.12	7.93	6.93	6.26	4.60	− 4.29	− 13.72	− 8.90	− 15.37	10.00	7.91
	3	1229.60	0.32	− 6.69	5.98	4.20	1.47	0.22	− 4.28	− 8.04	6.76	− 1.90	/	4.39
	4	1221.39	0.32	− 4.72	0.39	6.13	3.85	− 1.99	− 0.07	− 6.88	1.47	0.25	0.38	2.61
	5	1139.12	0.35	− 5.81	8.42	4.09	1.70	− 0.49	− 6.44	− 6.01	− 0.47	2.94	/	4.04
	6	1154.78	0.32	− 3.71	− 3.11	5.41	12.08	− 2.87	− 6.88	− 4.99	− 2.57	3.74	/	5.04

注：“/” 表示由于血药浓度低于定量下限导致的数据缺失；k_eA/CL_r 和 α 值由 Winnonlin 8.3 一房室模型拟合获得。

Note：“/” means data missing due to blood drug concentration exceeding the quantitative lower limit. The values of k_eA/CL_r and α are obtained by fitting the one-compartment model in Winnonlin 8.3.

3.4　尿排泄清除率

由 “2.6” 项下所列方程可知，一房室模型中尿排泄曲线与血浆暴露曲线之间的桥梁是尿排泄清除率。各组动物尿排泄拟合参数（k_eA，α，$X_{u,\,inf}$）见表 5，参考血浆实测 AUC_{inf} 和各时刻血浆浓度，分别通过方程 6（总体法）和方程 7（单点法），分别计算 $CL_{r,\,T}$ 和 $CL_{r,\,t}$。结果显示与 $CL_{r,\,T}$ 比较，各时刻计算获得的 $CL_{r,\,t}$ 变异较大，且表现出前低后高的时间依赖的变化趋势。这一偏差主要来源于尿液数据拟合所获得的参数 α 和 k_eA。如图 6 所

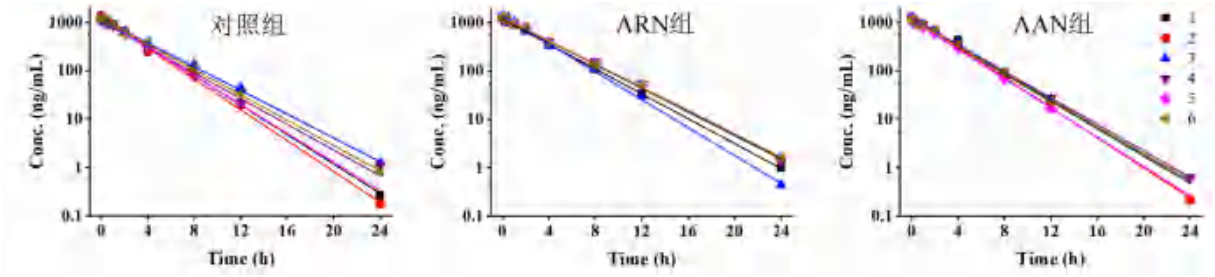


图 4　对照组和模型组静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1} 后的一房室药时曲线（n = 6）

Fig 4　One-compartment *C-t* curve of the control and the model groups after iv injection of 1 mg • kg^{-1} busulfan（n = 6）

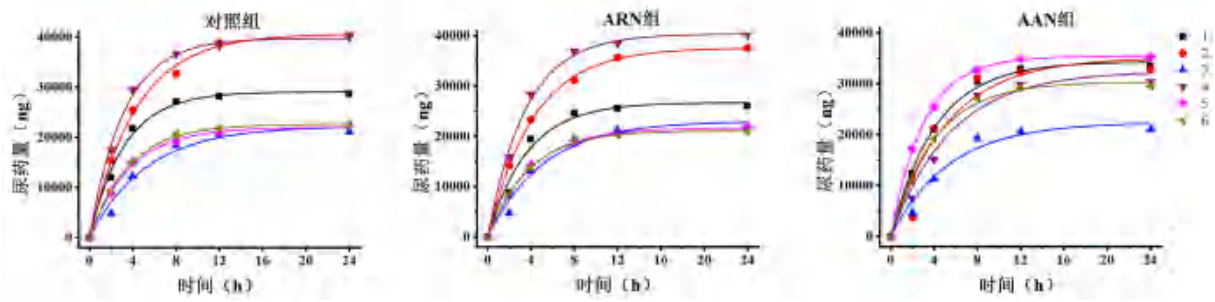


图 5　对照组和模型组大鼠静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1} 后的尿药累积排泄曲线（方程 4）拟合结果

Fig 5　Fitting results of urine cumulative excretion curve（equation 4）of rats in the control and the model groups after iv injection of 1 mg • kg^{-1} busulfan

表 3　对照组和模型组静脉注射白消安 1 mg • kg^{-1} 后的主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

Tab 3　Main pharmacokinetic parameters after iv injection of 1 mg • kg^{-1} busulfan in the control and the model groups（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

参数	对照组	ARN 组	AAN 组
$t_{1/2}$/h	2.15±0.38	2.30±0.17	2.13±0.13
C_0/（ng • mL^{-1}）	1280.70±174.52	1378.32±86.73	1335.02±75.29
$AUC_{0\sim t}$/（h • ng • mL^{-1}）	3666.79±257.60	4385.68±272.90*	3688.57±215.05
$AUC_{0\sim\infty}$/（h • ng • mL^{-1}）	3669.00±258.28	4389.86±274.03*	3736.50±212.64
V_z/（mL • kg^{-1}）	849.09±163.21	758.57±65.89	823.64±25.42
V_{ss}/（mL • kg^{-1}）	864.21±78.82	802.61±35.44	822.36±25.56
CL/[mL/（h • kg）]	273.61±17.98	228.58±15.07*	268.40±16.27
$MRT_{0\sim t}$/h	3.16±0.36	3.50±0.25	2.91±0.16

注：与对照组比较，*P < 0.05。

Note：Compared with the control group，*P < 0.05.

表 4　静脉注射白消安后不同时间对照组和模型组的原形尿便累积排泄率（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

Tab 4　Cumulative excretion rate of prototype drug in the urine and feces in the control and the model groups at different time after intravenous injection of busulfan（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

时间 /h	尿累积排泄率 /%			便累积排泄率 /%		
	对照组	ARN 组	AAN 组	对照组	ARN 组	AAN 组
2	4.88±1.81	3.33±1.18	4.10±1.92	0.60±0.20	0.37±0.28	0.07±0.05*
4	8.58±2.70	6.22±1.80	8.32±1.83	0.90±0.31	0.67±0.23	0.11±0.04*
8	11.15±3.02	8.30±2.20	12.40±1.81	1.08±0.29	0.76±0.21	0.14±0.05*
12	12.15±3.37	8.95±2.34	13.25±1.89	1.11±0.30	0.79±0.22	0.14±0.05*
24	12.62±3.55	9.31±2.47	13.44±1.90	1.12±0.31	0.79±0.22	0.15±0.05*

注：与对照组比较，*P < 0.05。

Note：Compared with the control group，*P < 0.05.

示，尿液数据拟合所获得的参数 α 和 k_eA，与实测值（对给药后血浆各时刻实测值以 Winnonlin 一房室模型拟合所获得的）相比，显著低估。

4　讨论

根据文献报道，阿霉素经尾静脉注射造模的有效剂量在 1.5 ～ 7.5 mg • kg^{-1}，当采用一次性尾静脉注射 7.5 mg • kg^{-1} 时，大鼠死亡率较高，影响造模成功率，宜采用两次注射法[12]。AAN

表 5 各组总体尿排泄清除率和尿排泄动力学参数拟合值及各时刻尿排泄清除率计算值

Tab 5 Measured and calculated values at each time point of CL_r

组别	大鼠编号	尿排泄动力学参数					$CL_{r,t}$/（mL·h^{-1}）									
		k_eA/（ng·h^{-1}）	α/h^{-1}	$X_{u,inf}$/ng	AUC_{inf}/（h·ng·mL^{-1}）	$CL_{r,T}$/（mL·h^{-1}）	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
对照组	1	9004.5	0.31	29 049.6	3669.7	7.92	6.62	7.15	7.02	7.34	7.13	7.48	8.90	8.91	10.30	20.35
	2	9470.1	0.23	40 619.6	3437.5	11.07	6.81	7.44	8.30	8.02	8.31	9.67	14.98	18.28	29.00	198.77
	3	4230.9	0.19	22 198.9	4154.5	5.34	3.40	3.75	3.83	3.85	3.95	4.52	5.36	6.79	9.74	35.31
	4	12 446.5	0.31	39 722.6	3468.8	11.45	11.21	11.32	10.97	11.04	10.67	10.85	12.12	13.29	13.77	6.13
	5	5912.0	0.27	21 965.4	3678.1	5.97	5.69	4.63	5.25	5.13	5.02	5.20	6.42	8.44	9.00	30.64
	6	6240.4	0.28	22 606.8	3605.5	6.27	4.92	5.15	5.44	5.47	5.35	6.14	5.39	6.23	6.65	10.09
ARN 组	1	7330.0	0.27	26 707.8	3929.0	6.80	5.82	6.11	6.57	6.48	6.31	6.25	7.20	7.65	8.30	10.25
	2	8879.7	0.24	37 590.8	4574.9	8.22	6.46	6.96	7.21	7.29	7.48	7.24	9.01	9.19	9.85	21.17
	3	4511.3	0.20	23 006.5	4180.0	5.50	3.34	3.47	3.65	3.44	3.73	4.04	6.29	8.49	14.15	93.75
	4	11 382.8	0.28	40 370.3	4603.5	8.77	9.13	9.19	9.35	9.52	8.92	8.92	9.20	7.60	7.18	9.67
	5	5491.5	0.25	21 699.5	4558.4	4.76	3.91	4.21	4.57	4.51	4.44	4.42	5.17	5.01	5.23	7.96
	6	5622.8	0.27	21 175.1	4 493.3	4.71	4.21	4.59	4.64	4.55	4.62	4.31	5.13	4.96	4.67	6.08
AAN 组	1	8291.9	0.24	34 301.1	3844.2	8.92	6.67	7.55	8.13	7.57	7.56	8.00	7.37	15.69	18.78	/
	2	6810.3	0.19	35 129.9	3714.0	9.46	5.29	5.83	5.93	6.14	6.56	7.07	8.85	18.00	32.21	299.29
	3	4164.5	0.19	22 393.3	3889.8	5.76	3.17	3.63	3.65	3.68	3.89	4.26	5.38	10.78	17.11	/
	4	5869.0	0.18	32 484.6	3923.6	8.28	4.60	4.88	5.27	5.34	5.39	6.28	7.66	14.30	24.20	121.73
	5	11 476.8	0.32	35 387.2	3343.5	10.58	9.50	10.95	10.55	10.38	10.28	9.91	10.46	12.24	13.99	/
	6	7539.1	0.25	30 345.8	3704.0	8.19	6.30	6.36	7.00	7.58	6.80	7.00	8.22	11.17	15.76	/

注：“/”表示由于血药浓度低于定量下限导致的数据缺失。

Note：“/” meant data missing due to blood drug concentration exceeding the quantitative lower limit.

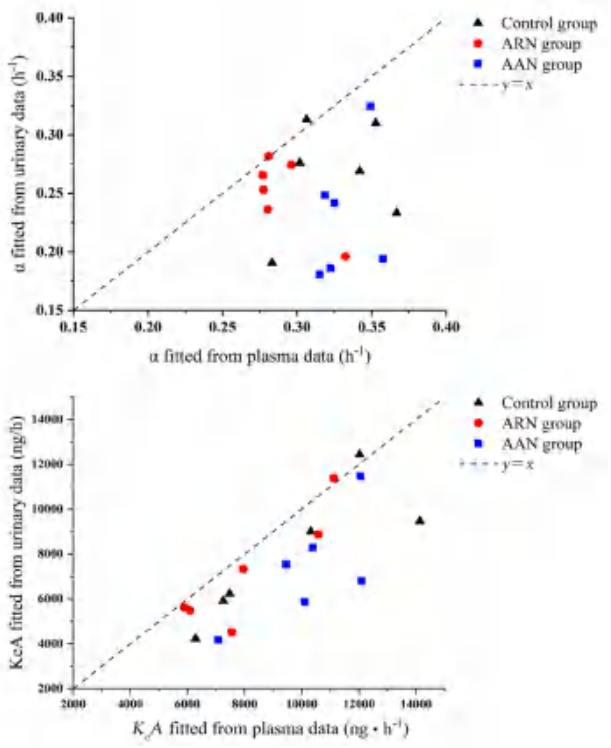


图 6 尿拟合参数和血浆拟合参数偏差

Fig 6 Deviation between urine fitting parameters and plasma fitting parameters

注：血浆数据拟合参数 k_eA 由表 2 中的 k_eA/CL_r 与表 5 中的 $CL_{r,t}$ 的乘积求得。

Note：The fitting parameter k_eA of plasma data is obtained by the product of k_eA/CL_r in Tab 2 to $CL_{r,t}$ in Tab 5.

模型建模方法以口服和腹腔注射最多，剂量范围 20 ～ 200 mg/（kg·d）[13-15]。本研究分别建立 ARN 和 AAN 模型，引用 ACR 来反映白蛋白的排泄情况。综合考虑肾损伤建模期间模型组生理生化指标和病理变化，模型大鼠均达到轻微肾损伤程度。

ARN 会导致大鼠体内白消安血液暴露显著升高，清除率显著降低，尿便原形累积排泄率均有所降低。在 AAN 大鼠中，白消安的药代动力学特征、尿排泄未受到显著影响，而粪便排泄显著降低。分析原因如下：白消安通过自由扩散或 ABC 转运体进出细胞，而肾小球滤过率降低时会减少尿液形成和原形药物排泄；其代谢产物四氢噻吩可能通过 ABC 转运体进入肝脏细胞并被 CYP2C9、CYP2C19 代谢，而阿霉素诱导 ABC 家族成员（MDR1、MRP、BCRP）表达上调，CYPs（CYP1A2、CYP3A4、CYP2C9）的表达下调 [16]，因此 ARN 导致白消安清除率降低，血液暴露升高。AAN 导致大鼠肾小管上皮细胞凋亡、肾小管间质纤维化及尿路上皮癌 [17-18]，同时可能伴随 OAT1/3、OCT1/2、OCTN1/2 表达下调 [19]，但由于白消安的代谢酶表型和跨膜特性，AAN 并未导致白消安血液暴露和尿排泄的显著变化，其粪便累积排泄率显著降低考虑为相关肝损伤引起 [20]。

本研究显示，对照组与模型组大鼠静脉注射

白消安后的药 - 时曲线和尿药排泄曲线均符合一房室分布模型。为减少白消安临床 TDM 时患者的采血负担，本研究试图探索以尿排泄数据替代血液的研究策略。为实现 CL_r 的准确标定，尿排泄过程必须符合一级动力学的前提假设，且确保尿排泄数据的准确测定和拟合。本实验的结果显示，尿排泄数据对方程 4 拟合所获得的参数 α 和 K_eA，均低于实测值。这意味着，尿排泄曲线的斜率和截距均比血浆暴露曲线的（或理论值）小，即尿排泄曲线和血浆药时曲线的平行性差，表现为各时刻计算的 $CL_{r,\ t}$ 变异大和前低后高的时间依赖趋势。这极大影响了尿排泄数据对药代动力学研究的代表性和应用前景。

可以从一级尿排泄动力学的前提假设和尿排泄数据的准确测定拟合两方面分析原因。虽然白消安大鼠血浆暴露曲线完美符合一房室分布一级消除动力学模型，但白消安在体内以代谢消除为主，不能确保其尿排泄符合一级动力学的前提假设。另外，与血浆浓度测定不同，尿排泄量数据测定需要考虑多种因素，如膀胱潴留、收集损失、体积计量、定量基质差异大等。这些因素都将影响尿排泄数据的准确性，需要在实验设计和操作中重点关注。因此，未来仍需深入探讨尿排泄机制，判定是否可以简化为一级尿排泄动力学，同时优化尿排泄实验过程和规范尿排泄数据拟合的标准化（例如收集间隔设置，各时刻数据的权重，$X_{u,\ inf}$ 的判定），以提高尿排泄数据拟合的准确性。

综上所述，本研究的结果显示 ARN 和 AAN 肾损伤大鼠对白消安的肾排泄清除率无显著影响，但 ARN 模型可显著降低白消安的总清除率。尿液替代血浆的药代动力学研究策略的关键指标——单点法的 $CL_{r,\ t}$ 表现出较大变异，且存在时间依赖性，因此，该策略还需进行深入优化并对拟合结果进行综合验证。

参考文献

[1] 戴永国，陈李杰，王崴，等 . 肾脏有机阳离子转运体 2 在急性肾损伤中病理生理调控的研究进展 [J]. 生命科学，2018，30（7）：790-797.

[2] Dong Y，Gong L，Lu X，et al. Changes of transporters and drug-metabolizing enzymes in nephrotic syndrome [J]. Curr Drug Metab，2020，21（5）：368-378.

[3] Lee VW，Harris DCH. Adriamycin nephropathy：a model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. Nephrology（Carlton），2011，16（1）：30-38.

[4] Wang YM，Wang YP，Harris DCH，et al. Adriamycin nephropathy in BALB/c mice [J]. Curr Protoc Immunol，2015，https：//doi.org/10.1002/0471142735.im1528s108.

[5] 贺升升，李爱平，张王宁，等 . 阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展 [J]. 中草药，2018，49（22）：5426-5434.

[6] 刘斯，郭旭，姜晓文，等 . 马兜铃酸 A 致大鼠肾病的肾毒性作用机理研究 [J]. 中兽医医药杂志，2021，40（1）：5-11.

[7] Moon SY，Lim MK，Hong S，et al. Quantification of human plasma-busulfan concentration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Ann Lab Med，2014，34（1）：7-14.

[8] Lawson R，Staatz CE，Fraser CJ，et al. Review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous busulfan in paediatric patients [J]. Clin Pharmacokinet，2021，60（1）：17-51.

[9] Hassan M，Öberg G，Ehrsson H，et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults [J]. Eur J Clin Pharmacol，1989，36（5）：525-530.

[10] Hassan M，Ehrsson H，Ljungman P. Aspects concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability [J]. Leuk Lymphoma，1996，22（5-6）：395-407.

[11] 冯新颖，吴云娇，李佳朋，等 . 白消安个体化给药的群体药代动力学研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2018，34（24）：2884-2888.

[12] 唐桂毅，温和，王晶晶，等 . 阿霉素肾病大鼠模型的评价研究 [J]. 药物评价研究，2020，43（1）：66-71.

[13] Pu XY，Shen JY，Deng ZP，et al. Oral exposure to aristolochic acid Ⅰ induces gastric histological lesions with non-specific renal injury in rat [J]. Exp Toxicol Pathol，2016，68（6）：315-320.

[14] 黄仁发，梁群卿，程新，等 . 发酵虫草菌粉和泼尼松对急性马兜铃酸肾病大鼠肾小管 Notch2/hes-1 信号通路活化的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2013，33（8）：1116-1121.

[15] 李恒，刘志红，裘奇，等 . 马兜铃酸 - Ⅰ所致大鼠急性肾损伤的实验研究 [J]. 中华肾脏病杂志，2002，18（1）：53-55.

[16] 王倩涵 . 阿霉素肾病大鼠 MDR1 及 P-gp170 的表达与意义 [D]. 苏州：苏州大学，2013.

[17] Debelle FD，Vanherweghem JL，Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy：a worldwide problem [J]. Kidney Int，2008，74（2）：158-169.

[18] Li J，Zhang L，Jiang Z，et al. Toxicities of aristolochic acid Ⅰ and aristololactam I in cultured renal epithelial cells [J]. Toxicol In Vitro，2010，24（4）：1092-1097.

[19] Lou Y，Li J，Lu Y，et al. Aristolochic acid-induced destruction of organic ion transporters and fatty acid metabolic disorder in the kidney of rats [J]. Toxicol Lett，2011，201（1）：72-79.

[20] Yeh YH，Lee YT，Hsieh HS，et al. Short-term toxicity of aristolochic acid，aristolochic acid-Ⅰ and aristolochic acid-Ⅱ in rats [J]. Food Chem Toxicol，2008，46（3）：1157-1163.

（收稿日期：2022-04-24；修回日期：2022-05-19）

LC-MS/MS 法测定人全血中他克莫司和西罗莫司浓度及临床应用

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

摘要：目的 建立同时测定全血中他克莫司（FK506）和西罗莫司（SRL）浓度的液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）法，检测使用四联免疫抑制方案的肾移植患者体内两种药物的浓度。**方法** 50 μL 全血样品用甲醇 - 乙腈（90∶10）沉淀蛋白，上清液用纯水（1∶1）稀释后进样分析。色谱柱为 Kinetex C18（3 mm×100 mm，2.6 μm），流动相为 0.1% 甲酸 - 水（含 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵）和 0.1% 甲酸 - 甲醇，梯度洗脱，流速 0.55 mL • min^{-1}，进样量 5 μL，分析时间 5 min。采用电喷雾离子源，正离子多反应监测模式扫描，用于定量分析的离子对分别为：*m/z* 821.2 → 768.6（FK506）、*m/z* 936.4 → 409.3（SRL）。**结果** FK506 和 SRL 在 1 ～ 40 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（*r* 均＞ 0.99），准确度在 92.60% ～ 114.41%，精密度 *RSD* 均≤ 15%，提取回收率为 71.48% ～ 94.88%，基质效应为 72.36% ～ 102.80%，稳定性均符合方法学要求。应用本方法测定 37 例接受四联免疫抑制方案的肾移植患者的血药浓度，FK506 血药谷浓度（5.57±3.07）ng • mL^{-1}，SRL 血药谷浓度（4.41±2.36）ng • mL^{-1}。**结论** 本方法同时测定人全血中 FK506 和 SRL 浓度，操作简单快捷，准确度和灵敏度高，稳定性良好，可用于肾移植患者的临床血药浓度监测。

关键词：肾移植；四联免疫抑制方案；他克莫司；西罗莫司；血药浓度；液相色谱 - 串联质谱
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2514-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.010

Simultaneous determination of tacrolimus and sirolimus in human blood by LC-MS/MS and its clinical application

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

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of tacrolimus (FK506) and sirolimus (SRL) in the blood of renal transplant patients with quadruple immunosuppressive therapy. **Methods** The blood samples (50 μL) were precipitated with methanol-acetonitrile (90∶10, *V/V*). The supernatant was diluted with water (1∶1, *V/V*) and then injected for detection. The chromatographic separation was performed on a Kinetex C18 column (3 mm×100 mm, 2.6 μm) with the mobile phase of 10 mmol • L^{-1} ammonium acetate solution and methanol, both containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 0.55 mL • min^{-1}. The injection volume was 5 μL and the total run time was 5 min. The detection of the analytes was performed by electrospray ionization in positive mode by multiple monitoring with the transition of *m/z* 821.2 → 768.6 (FK506), *m/z* 936.4 → 409.3 (SRL). **Results** The calibration curves for FK506 and SRL had good linearity at 1 ～ 40 ng • mL^{-1}. The accuracy was 92.60% ～ 114.41%. The intra

基金项目：江苏省卫生健康委员会 2020 年高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才科研项目（No.LGY2020033）；常州市科技计划（应用基础研究）指导性项目（No.CJ20190910，No.CJ20209011）；江苏省研究型医院学会精益化用药 - 石药专项科研基金项目（No.JY202043）。

作者简介：杨旭萍，女，硕士，药师，主要从事治疗药物监测与临床药学研究，email：1006363193@qq.com *__通信作者__：胡楠，女，博士，副主任药师，主要从事药代动力学与临床药学研究，email：hn_324@163.com

and inter-day *RSD* did not exceed 15%. The recoveries were 71.48% ～ 94.88% and the matrix effect was 72.36% ～ 102.80%. The stability met the requirements. The blood concentrations of FK506 and SRL in 37 renal transplant patients were determined by this method. Trough concentration of FK506 was (5.57±3.07) ng • mL^{-1}, and that of SRL was (4.41±2.36) ng • mL^{-1}. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and stable, which is suitable for clinical therapeutic drug monitoring.

Key words: renal transplantation; quadruple immunosuppressive therapy; tacrolimus; sirolimus; blood concentration; LC-MS/MS

肾移植是终末期肾衰竭最主要和最理想的治疗方法，有利于提高患者的生活质量，延长其生存时间。实施肾移植术后，为控制排斥反应的发生，保持移植肾的长期存活，患者需终身接受免疫抑制维持治疗。目前临床主要采用三联免疫抑制方案，即钙调磷酸酶抑制剂（calcineurin inhibitors，CNI）＋霉酚酸＋皮质类固醇[1]，但作为核心药物的CNI，他克莫司（tacrolimus，FK506）和环孢霉素 A（cyclosprine A，CsA）治疗窗窄，血药浓度过高会引起肾毒性，不利于移植肾的长期存活，而减少药物的用量则存在诱发急性排斥反应的风险。以西罗莫司（sirolimus，SRL）为代表的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂（mammalian target of rapamycin inhibitors，mTORi），不具有肾毒性，可作为替代药物以降低CNI的剂量，从而达到减轻CNI毒副反应的作用[2]。有文献报道[3-4]，相较于传统的三联免疫抑制方案，FK506 ＋ SRL ＋霉酚酸＋皮质类固醇所组成的四联低剂量免疫抑制方案不仅可以有效抑制排斥反应，而且能够改善移植肾功能。然而，与CNI相类似，mTORi同样具有治疗范围窄，药动学个体差异大，药物间存在相互作用的特点，其血药浓度与疗效和毒性密切相关[5]。通过对接受四联低剂量免疫抑制方案患者的FK506和SRL同时进行监测，充分了解患者体内的药物暴露情况，优化给药剂量，维持稳定的血药浓度，对确保用药的有效性和安全性具有重要意义。因此，本研究建立了一种基于液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）技术同时检测全血中FK506和SRL浓度的方法，用于肾移植患者FK506和SRL的治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM），指导临床用药。

1　材料

1.1　仪器

Jasper HPLC液相色谱仪，Triple Quad 4500MD三重四极杆串联质谱仪（美国AB SCIEX公司），Vortex-Genie 2涡旋混合器（美国Scientific industries公司），5417R低温高速离心机（德国Eppendorf公司），Direct-Q纯水仪（美国Millipore公司），BT25S型十万分之一电子天平（德国Sartorius公司）。

1.2　试药

FK506（批号：12-MWC-10-1，纯度：98%）、SRL（批号：15-ABY-149-1，纯度：95%）、内标子囊霉素（ascomycin，ASCO，批号：1-OBI-122-1，纯度：95%）对照品（加拿大Toronto Research Chemicals公司）。色谱纯甲醇、乙腈（德国Merck公司）；分析纯甲酸、乙酸铵（美国Sigma-Aldrich公司）；实验用水为超纯水。

2　方法

2.1　色谱条件

采用Kinetex C_{18}（3 mm×100 mm，2.6 μm，Phenomenex，美国）色谱柱；柱温为40 ℃；流动相A为0.1%甲酸-水（含10 mmol • L^{-1}乙酸铵），B为0.1%甲酸-甲醇，梯度洗脱：0.01 ～ 0.80 min，40%B；0.80 ～ 2.00 min，40% ～ 100%B；2.00 ～ 3.80 min，100%B；3.80 ～ 4.00 min，100%～40%B；4.00～5.00 min，40%B。流速为0.55 mL • min^{-1}；进样量为5 μL；分析时间为5 min。

2.2　质谱条件

采用电喷雾离子源（electrospray ionization，ESI），多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式扫描，正离子方式检测；毛细管电压为5500 V；离子源温度为550 ℃；雾化气为50 psi；辅助气为50 psi；气帘气为30 psi；碰撞气为8 psi；用于定量分析的离子对分别为*m/z* 821.2→768.6（FK506）、*m/z* 936.4→409.3（SRL）、*m/z* 809.5→756.6（ASCO）；碰撞电压分别为29、75、30 V，去簇电压分别为100、220、100 V。待测物结构如图1所示。

2.3　溶液配制

精密称取FK506、SRL对照品适量，分别用甲醇定量配制成5 mg • mL^{-1}的对照品储备液。对照品储备液于－20 ℃冰箱中保存，临用前混合并用甲醇定量稀释成10、20、40、100、200、

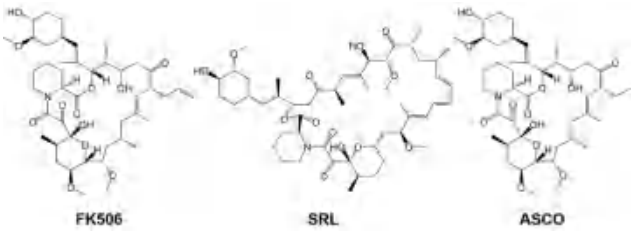


图 1 待测物的结构

Fig 1 Structure of compounds

400 ng • mL^{-1} 的标准工作液和 30、60、300 ng • mL^{-1} 的质控工作液。

精密称取 ASCO 对照品适量，用甲醇定量配制成 2.5 mg • mL^{-1} 的内标储备液。内标储备液于－ 20 ℃冰箱中保存，临用前用甲醇稀释成 20 ng • mL^{-1} 内标工作液。

2.4 样品前处理

精密吸取全血样品 50 μL，置于 1.5 mL 离心管中，加入内标工作液 5 μL、甲醇 - 乙腈（90∶10）100 μL 后涡旋 3 min，16 400 r • min^{-1} 离心 10 min，精密吸取上清液 50 μL 转移到另一离心管中，加入 50 μL 纯水稀释，再次离心后置于进样小瓶中，进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 方法学考察

参考 FDA 和 CFDA 生物样品定量分析方法验证指导原则，选取待测物低、中、高 3 个质量浓度水平（FK506 和 SRL：3，6，30 ng • mL^{-1}）的质控样品，对所建立分析方法的专属性、线性、准确度、精密度、提取回收率、基质效应、残留效应和稳定性进行验证。

2.6 临床血样采集

37 例肾移植患者接受 FK506 ＋ SRL ＋霉酚酸＋皮质类固醇四联免疫抑制治疗方案，采用本文所建立的方法进行治疗药物监测。FK506 的给药方案为每日口服 1 ～ 5.5 mg，分早晚两剂，SRL 口服 1 ～ 2 mg qd。于服药前 0.5 h 使用 EDTA 抗凝管采集外周静脉血 2 mL，全血样品于－ 80 ℃冰箱冷冻保存。同时收集患者基本信息，包括性别、年龄、肝肾功能指标等，详见表 1。

3 结果

3.1 专属性

取 6 份不同个体的空白全血，分别加入“2.3”项下的质控工作液，配制成低、中、高 3 个质量浓度水平（FK506 和 SRL：3，6，30 ng • mL^{-1}）的质控样品。将上述样品按“2.4”项下方法处理后进样分析。结果显示，不同来源的空白基质中，相应色谱峰保留时间内均无内源性组分的干扰，说明该分析方法专属性良好。样品中 3 种化合物的典型提取离子色谱图如图 2 所示。

表 1 患者基本信息

Tab 1 Clinical characteristics of patients

临床参数	中位值（范围）
性别（男 / 女）	9/28
年龄 / 岁	52（17 ～ 66）
体质量指数（BMI）/（kg • m^{-2}）	21.5（16.4 ～ 25.9）
移植后时间 / 月	21（1 ～ 84）
谷丙转氨酶（ALT）/（U • L^{-1}）	24.4（3.0 ～ 78.4）
谷草转氨酶（AST）/（U • L^{-1}）	28.6（8.8 ～ 38.2）
白蛋白（ALB）/（g • L^{-1}）	43.2（38.1 ～ 51.6）
总蛋白（TP）/（g • L^{-1}）	70.7（60.2 ～ 110.4）
总胆红素（TBIL）/（μmol • L^{-1}）	7.0（4.9 ～ 30.0）
尿素（UREA）/（mmol • L^{-1}）	8.4（2.1 ～ 33.2）
肌酐（CREA）/（μmol • L^{-1}）	126（44 ～ 462）
尿酸（UA）/（μmol • L^{-1}）	303.6（72.5 ～ 683.0）

3.2 标准曲线

以人空白全血为基质，分别加入“2.3”项下的标准工作液，配制成系列质量浓度（FK506 和 SRL：1、2、4、10、20、40 ng • mL^{-1}）的校正标样，按“2.4”项下方法处理后进样分析。以待测物与相应内标峰面积比值（Y）对待测物浓度（X）作回归分析，权重系数 $W = 1/X^2$，建立各待测物的线性回归方程。FK506 和 SRL 标准曲线分别为 $Y = 0.0493X + 0.0019$（$r = 0.9902$）和 $Y = 0.0287X + 0.0024$（$r = 0.9941$），线性范围在 1 ～ 40 ng • mL^{-1}。

3.3 准确度和精密度

以人空白全血为基质，分别加入“2.3”项下的质控工作液，配制成低、中、高 3 个水平的质控样品，另配制定量下限（lower limit of quantification，LLOQ，1 ng • mL^{-1}）样品，每个浓度水平 6 份，并将其列为一个分析批，分别于不同日制备并测定 3 个分析批，按“2.4”项下方法处理后进样分析，计算批内、批间准确度和精密度。结果如表 2 所示，他克莫司和西罗莫司的准确度分别为 96.77% ～ 110.45% 和 92.60% ～ 114.41%，批内和批间精密度 *RSD* 均≤ 15%。该分析方法的准确度和精密度符合生物样品的定量分析要求。

3.4 提取回收率和基质效应

以空白全血为基质的低、中、高 3 个水平的质控样品各 6 份，按“2.4”项下方法处理后进样分析，得到待测物的峰面积 A_1；另取 6 份不同个体的空白全血，按“2.4”项下方法操作至蛋白沉淀后，向上清液中加入质控工作液及内标工作液，配制成各水平样品各 6 份，纯水稀释后进样分析得到峰面积 A_2。根据内标归一化后峰面积的比值计算提取回收率。另以纯水代替空白全血作为基

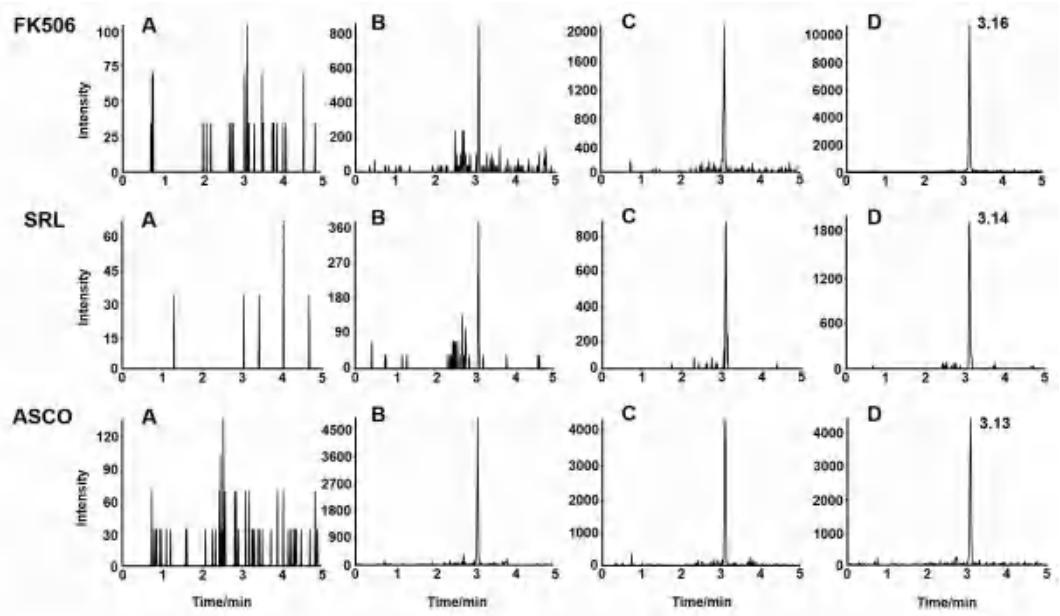


图 2　待测物的提取离子色谱图

Fig 2　Chromatograms of compounds

A. 空白全血（blank blood）；B. 空白全血添加对照品（定量下限，1 ng • mL^{-1}）[blank blood spiked with standards（LLOQ，1 ng • mL^{-1}）]；C. 空白全血添加对照品（3 ng • mL^{-1}）[blank blood spiked with standards（3 ng • mL^{-1}）]；D. 临床样品（clinical sample）

表 2　待测物准确度和精密度结果

Tab 2　Accuracy and precision of compounds

化合物	理论值 /（ng • mL^{-1}）	批内（n = 6）		批间（n = 18）	
		准确度 /%	精密度 /%	准确度 /%	精密度 /%
他克莫司	1	96.77	8.0	105.14	11
	3	100.80	7.2	103.26	12
	6	98.52	11	106.32	11
	30	106.21	9.7	110.45	12
西罗莫司	1	111.44	5.6	114.41	9.1
	3	99.73	7.0	108.33	9.7
	6	109.53	4.7	112.53	7.8
	30	92.60	15	95.57	13

表 3　待测物提取回收率和基质效应结果

Tab 3　Recovery and matrix effect of compounds

化合物	理论值 /（ng • mL^{-1}）	提取回收率（n = 6）		基质效应（n = 6）	
		平均值 /%	*RSD*/%	平均值 /%	*RSD*/%
他克莫司	3	73.59	3.4	102.80	9.2
	6	71.48	7.8	101.09	6.3
	30	77.52	7.0	92.61	9.5
西罗莫司	3	94.88	14	73.65	12
	6	87.67	15	76.40	7.7
	30	83.20	14	72.36	11

质，配制成低、中、高 3 个水平质控样品各 6 份，按 “2.4” 项下方法处理后进样分析，得到峰面积 A_3。根据 A_2 与 A_3 的比值计算基质因子，经内标归一化后得基质效应（见表 3），结果表明样品前处理方法适用于待测物的提取分析，且基质中内源性物质对待测物的影响稳定。

3.5　残留效应

测定定量上限（upper limit of quantification，ULOQ，40 ng • mL^{-1}）校正样品后，立即注入空白溶剂甲醇考察残留效应。如图 3 所示，各待测物和内标的保留时间处均无明显的质谱响应，表明待测物在该测定条件下无残留效应。

3.6　稳定性

低、中、高 3 个水平的质控样品分别室温放置 24 h，4 ℃冰箱放置 72 h，－ 80 ℃冰箱放置 7 d 以及冻融循环 3 次，处理后进样分析，每个条件下各浓度水平各 6 份，考察样品在上述条件下的稳定性。另取各水平质控样品各 6 份，将处理后的样品于自动进样器（15 ℃）中放置 6 h 后进样分析，考察处理后样品在自动进样器中的稳定性。在不同条件下，两种化合物各浓度水平的测定值与理论值的平均偏差均在 ±15% 范围内，详见表 4，表明生物样品在实验涉及条件下保持稳定。

3.7　方法学应用

精密吸取 37 例肾移植患者全血样品 50 μL，按 “2.4” 项下方法处理后进样分析。测得 FK506 血药谷浓度最大值为 15.90 ng • mL^{-1}，最小值为 2.20 ng•mL^{-1}，平均值为（5.57±3.07）ng•mL^{-1}，其中 59.4% 的患者 FK506 ＜ 5 ng • mL^{-1}，32.4% 介 于 5 ～ 10 ng • mL^{-1}，3 例 ＞ 10 ng • mL^{-1}。测得 SRL 血药谷浓度最大值为 11.51 ng • mL^{-1}，最小值为 1.18 ng • mL^{-1}，两者相差近 10 倍，平均值为（4.41±2.36）ng • mL^{-1}，其中 64.9% 患者 SRL ＜ 5 ng•mL^{-1}，32.4% 介于 5 ～ 10 ng•mL^{-1}，

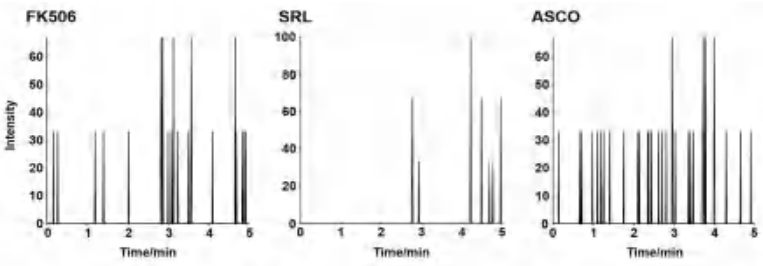


图 3 定量上限后注入空白溶剂待测物的提取离子色谱图

Fig 3 Chromatogram of compounds in blank standard solution following the upper limit of quantification

表 4 待测物稳定性结果

Tab 4 Stability of compounds

化合物	理论值 / （ng • mL^{-1}）	准确度（%，$\bar{x}\pm s$）（$n=6$）				
		室温 24 h	4 ℃ 72 h	− 80 ℃ 7 d	冻融循环 3 次	自动进样器 6 h
他克莫司	3	95.42±10.14	100.67±2.52	96.47±4.66	92.98±2.17	87.38±1.47
	6	107.42±7.08	97.90±2.93	108.20±6.32	94.50±1.36	98.59±6.06
	30	105.19±1.64	112.07±2.77	102.88±3.17	104.40±3.82	97.59±5.37
西罗莫司	3	109.97±2.86	110.55±3.66	106.78±3.79	104.39±1.86	97.72±2.90
	6	101.26±3.02	94.93±3.14	103.83±3.94	101.76±3.48	89.36±2.32
	30	98.24±5.91	111.81±2.82	99.98±2.32	99.82±3.71	87.11±1.00

有 1 例＞ 10 ng • mL^{-1}，个体间差异较大。

4 讨论

研究表明，FK506 与 SRL 组成的四联免疫抑制方案用于肾移植受者的维持治疗，既可有效降低 CNI 的肾毒性，又能在一定程度上缓解术后慢性移植肾肾病，在器官移植术后的免疫抑制治疗中具有重要的优势[4, 6]。然而，FK506 和 SRL 治疗窗窄，药动学个体差异大，血药浓度与其免疫抑制强度和不良反应发生密切相关，因此治疗过程中需通过 TDM 监测其体内暴露水平[1]。

目前 LC-MS/MS 法在 TDM 中应用日益广泛。相较于传统的免疫分析法[7]和高效液相色谱法（HPLC）[8]，LC-MS/MS 法专属性好，精密度高，避免了代谢物交叉反应，能够实现多种药物的同时检测，缩短分析时间的同时提高分析效率，而且灵敏度高，仅需少量样品，就可以完成对体内化合物的准确定量。FK506 和 SRL 体内浓度低、代谢物存在干扰，LC-MS/MS 在其 TDM 中表现出了明显优势，可以满足临床检测要求。

FK506 和 SRL 口服吸收后，主要分布于红细胞中，且与血浆蛋白广泛结合，结合率均大于 90%[9-10]，故选择测定全血中的血药浓度。相较于液液萃取[11]和固相萃取[12]的前处理方法，蛋白沉淀操作简便，成本较低。本研究综合考虑红细胞中 FK506 和 SRL 的提取效率，避免长期使用中性盐对仪器的损伤，简化前处理操作流程，选择添加有机溶剂后高速振荡离心的方法进行 FK506 和 SRL 的提取，考察不同的沉淀试剂和沉淀比例后，最终确定甲醇 - 乙腈（90∶10）混合溶剂作为蛋白沉淀剂，可达到理想的沉淀效果，同时满足检测灵敏度要求。FK506 和 SRL 均属于大环内酯类药物，可在 C_{18} 色谱柱上保留。进一步优化流动相组成和梯度洗脱程序，结果显示，在有机相的选择中，甲醇的洗脱能力虽不如乙腈，但可以提高待测物的电离效能，在较高浓度下对缓冲盐和样品也具有更好的溶解性能，可有效改善峰拖尾的现象。此外，流动相中加入挥发性铵盐和甲酸，也可以在提高响应的同时改善峰形。最终确定流动相为含 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸甲醇溶液，该条件下待测物可在约 3.1 min 出峰，且峰形良好。分析时间为 5 min，有效提高了分析效率，可实现高通量检测。

本研究分析采用 FK506 ＋ SRL ＋霉酚酸＋皮质类固醇四联免疫抑制方案患者体内的药物浓度水平，其中 FK506 的平均谷浓度为（5.57±3.07）ng • mL^{-1}，低于文献报道的三联方案下的（6.4±2.6）ng • mL^{-1}[13]。虽然目前对于四联方案中 FK506 和 SRL 的目标血药浓度尚未有明确的推荐意见，但是参照《中国肾移植受者免疫抑制治疗指南（2016 版）》[14]建议，三联方案中肾移植术后 1 年以上 FK506 的目标谷浓度参考值为 5 ～ 10 ng • mL^{-1}，本研究中 32.4% 患者的 FK506 质量浓度介于 5 ～ 10 ng • mL^{-1}，而 59.4% 的 FK506 质量浓度＜ 5 ng • mL^{-1}，显示四联方案中 FK506 体内暴露量降低，有效避免了 CNI 的体内蓄积。

对于肾移植受者，FK506 是术后免疫抑制治疗的一线用药，为提高移植物和受者长期存活率提供重要保障[15]。但是 FK506 本身具有一定的

肾毒性，会导致肾功能异常、肾组织受损、肾衰竭等，且具有剂量依赖性，因此降低 FK506 的用量是减轻其慢性肾毒性的有效方法之一[16]。SRL 作为一种 mTORi，可有效抑制器官排斥反应，且没有肾毒性。其与 FK506 的联合，一方面通过作用于 T 淋巴细胞激活的不同阶段而发挥良好的协同作用，增强整体的免疫抑制效果，另一方面可减少 FK506 的用量以达到减轻其慢性肾毒性的目的[1]。王泳等[17]对 59 例接受三联免疫抑制方案治疗且患有移植肾功能不全的患者进行药物治疗方案的转换，在减少 CNI 用量的同时加用 SRL。结果显示，调整方案后，患者 CNI 血药浓度显著降低，血肌酐水平也得到了有效控制。进一步分析发现，术后尽早进行药物转换，可以更快、更显著地改善移植肾的功能。

本研究测得四联免疫抑制方案患者体内 SRL 平均谷浓度为（4.41±2.36）ng • mL^{-1}，与文献报道相一致[18-19]，但是采用同样的给药剂量，浓度最大值与最小值之间相差近 10 倍，反映出 SRL 浓度在个体间的差异较大。与其他免疫抑制剂相同，维持肾移植患者稳定的 SRL 血药浓度，对于发挥临床疗效和减少不良反应具有重要意义。一方面受者状态、移植术后时间、用药方案特别是增加或减少其他免疫抑制剂等因素均对其目标治疗窗有着不同的要求，另一方面饮食情况、胃肠道功能、贫血状态、药物相互作用尤其是 CYP3A4 代谢酶相关药物等也会影响其药动学行为，因此常规进行 TDM 很有必要[20]。

综上所述，本研究所建立的同时测定肾移植患者全血中 FK506 和 SRL 的 LC-MS/MS 法准确、灵敏、简便和稳定，可用于监测四联免疫抑制方案下患者体内的药物暴露情况，指导临床合理用药，提高免疫抑制治疗的安全性和有效性。

参考文献

[1] 田普训，敖建华，李宁，等 . 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范（2019 版）[J]. 器官移植，2019，10（3）：213-226.

[2] 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.

[3] 黄赤兵，许晓婷，范明齐，等 . 低剂量他克莫司为基础四联免疫抑制方案在肾移植中的应用：4 年随访结果 [J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011，15（44）：8217-8220.

[4] 费爽，王子杰，陈浩，等 . 四联低剂量免疫抑制方案在肾移植术后早期应用研究 [J]. 中华器官移植杂志，2020，41（3）：174-179.

[5] Ekbal NJ，Holt DW，Macphee IA. Pharmacogenetics of immunosuppressive drugs：prospect of individual therapy for transplant patients [J]. Pharmacogenomics，2008，9（5）：585-596.

[6] 赵德威，周伊娜，高小民，等 . 西罗莫司联合常规免疫抑制方案治疗慢性移植物肾病的近期疗效 [J]. 中华移植杂志（电子版），2016，10（4）：178-181.

[7] 宋爱凤，胡萍，杨大伟 . 他克莫司血药浓度检测方法的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2019，34（11）：3497-3500.

[8] 赵碎巧 . 他克莫司血药浓度的方法学评价 [J]. 中国医药导刊，2012，14（2）：342-343.

[9] 秦伟，王晓雪，张相林，等 . 他克莫司浓度在移植患者全血、血浆与血细胞中的相关性研究 [J]. 中国药房，2019，30（15）：2105-2110.

[10] 丁晴，冯端浩 . LC-MS/MS 法测定人全血中西罗莫司的浓度研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2016，32（3）：254-256.

[11] 李力，关业勋，李贺，等 . LC-MS/MS 法同时测定人全血中四种免疫抑制剂类药物浓度 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2015，20（10）：1126-1130.

[12] 黎曙霞，任斌，王长希，等 . 固相萃取 -HPLC 法测定西罗莫司的血药浓度及其临床应用研究 [J]. 中国药房，2008，19（20）：1540-1542.

[13] 胡楠，赵金飞，蒋艳，等 . 180 例肾移植患者他克莫司血药浓度监测 [J]. 医药导报，2018，37（12）：1500-1505.

[14] 中华医学会器官移植学分会，中国医师协会器官移植医师分会 . 中国肾移植受者免疫抑制治疗指南（2016 版）[J]. 器官移植，2016，7（5）：327-331.

[15] 陈文倩，张雷，张弋，等 . 实体器官移植他克莫司个体化治疗专家共识 [J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21（12）：1409-1424.

[16] 郭慧蕾，徐进，张永，等 . 钙调蛋白抑制剂致肾损伤 45 例文献分析 [J]. 中南药学，2015，13（10）：1100-1104.

[17] 王泳，张如霖，邱建新 . 含小剂量西罗莫司的四联免疫抑制方案治疗移植肾功能不全 [J]. 第二军医大学学报，2021，42（9）：1015-1020.

[18] Stallone G，Infante B，Grandaliano G，et al. Management of side effects of sirolimus therapy [J]. Transplantation，2009，87（8 Supplement）：S23-24.

[19] 郭君其，谭建明，胡鹤一，等 . 西罗莫司与钙调磷酸酶抑制剂联合方案在慢性移植肾肾病中的应用 [J]. 中华器官移植杂志，2012，33（1）：22-24.

[20] 中华医学会器官移植学分会 . 中国肾移植受者哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂临床应用专家共识 [J]. 中华器官移植杂志，2017，38（7）：430-435.

（收稿日期：2022-04-12；修回日期：2022-05-23）

孟鲁司特钠咀嚼片的处方工艺研究

李宛择[1]，陈永[2*]，刘芳洁[2]，郭丹峰[2]，康婷[2]，高翔[2]，袁金桥[2]（1. 湖南省中医药研究院，长沙 410006；2.嘉实（湖南）医药科技有限公司，长沙 410217）

摘要：目的 研究孟鲁司特钠咀嚼片的处方工艺。**方法** 采用单因素控制变量法逐一考察可能影响孟鲁司特钠咀嚼片溶出曲线和有关物质的因素，如原料药粒径、填充剂比例、崩解剂用量、遮光剂用量、矫味剂芳香剂用量、压片硬度等。**结果** 优选所得处方：微晶纤维素 / 甘露醇 1∶3、交联羧甲纤维素钠 3%、红氧化铁 0.30%、樱桃香精 0.5%、阿司帕坦 0.5%；处方所制得样品相似因子 f_2 值均大于 50，溶出曲线与参比制剂基本相似，有关物质的量低于参比制剂。**结论** 自研孟鲁司特钠咀嚼片处方合理，制备工艺可行，所制备的孟鲁司特钠片质量符合要求。

关键词： 孟鲁司特钠咀嚼片；溶出曲线；处方工艺筛选；相似因子
中图分类号： R943 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)11-2520-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.011

Prescription and preparation of montelukast sodium chewable tablets

LI Wan-ze[1], CHEN Yong[2*], LIU Fang-jie[2], GUO Dan-feng[2], KANG Ting[2], GAO Xiang[2], YUAN Jin-qiao[2] (1. *Hunan Academy of Chinese Medicine*, *Changsha* 410006; 2. *Harvest* (*Hunan*) *Pharmaceuticals Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410217)

Abstract: Objective To determine the formulation and preparation of montelukast sodium chewable tablets. **Methods** The formulation and preparation of montelukast sodium chewable tablets were screened by single-factor test. Factors such as particle size, proportion of fillers, dosage of disintegrating agents, sunscreen, flavoring agents and aromatics, and hardness of the tablets were studied. The disolution profiles and impurities were tested. **Results** The optimized formulation was as follows: microcrystalline cellulose/mannitol 1∶3, 3% croscarmellose sodium, 0.30% red iron oxide, 0.5% cherry flavor and 0.5% aspartame. The f_2 was over 50. The dissolution curve was similar to the reference tablets. The related substance was less than reference tablets. **Conclusion** The formulation of montelukast sodium chewable tablets is reasonable, the preparation is feasible, and the quality of montelukast sodium meets the related standards.

Key words: montelukast sodium chewable tablet; dissolution curve; screening of prescription and preparation; f_2

据统计，全球约有 3 亿人患有哮喘[1]，儿童哮喘更是一种严重影响小儿身心健康的最常见呼吸道疾病，近年来儿童哮喘的患病率及病死率均有上升趋势，孟鲁司特钠咀嚼片是一款选择性白三烯受体拮抗剂，由美国默沙东 Merck Sharp&Dohme Ltd. 于 1998 年首次在美国申请上市，主要用于 2 岁至 14 岁儿童哮喘的预防和长期治疗，本品在我国已获批上市。孟鲁司特钠在人体内易吸收，口服生物利用度约 58% ～ 66%[2]。根据我国《支气管哮喘防治指南》推荐，白三烯调节剂是除吸入激素外，唯一可单独应用的长期控制药，可作为轻度哮喘的替代治疗药物和中重度哮喘的联合治疗用药[3]，因此开发孟鲁司特钠咀嚼片用于儿童轻度哮喘的预防和治疗的意义重大。

本文旨在对孟鲁司特钠制剂的关键质量属性及影响程度进行研究，明确孟鲁司特钠咀嚼片生

基金项目： 湖南省自然科学基金项目（No. 2020JJ9018）。
作者简介： 李宛择，女，主要从事中医骨科方面的研究，email：184892951@qq.com *__通信作者__：陈永，男，硕士，中级工程师，主要从事仿制药开发，email：cheny@harvestpharm.com

产的关键工艺参数，为将来进行本品或者类似项目的一致性评价研究方法提供参考。

1　材料

1.1　仪器

YP10002 电子天平（上海光正医疗仪器有限公司），FA124 电子天平（上海力辰邦西仪器有限公司），GMP-01 气流粉碎机（青岛密克朗粉体机械有限公司），G6 湿法混合制粒机（深圳市信宜特科技有限公司），SBH 三维混合机（泰州市天泰制药机械厂），LHS16-HR 烘干法水分测定仪（上海天美天平仪器有限公司），ZPS8 旋转式压片机（上海信源制药机械有限公司），YD-35 智能硬度测试仪、ZB-1E 智能崩解仪（天大天发科技有限公司），1260Ⅱ高效液相色谱仪、708-850DS 智能溶出仪（美国 Agilent 公司）。

1.2　试药

孟鲁司特钠（台湾台耀化学股份有限公司，批号：11001-191002-01，含量：99.6%）；孟鲁司特钠咀嚼片（参比制剂，商品名：顺尔宁，杭州默沙东制药有限公司，规格：5 mg，批号：R023755，R010416，S034791）；孟鲁司特钠对照品（EDTM，含量：99.5%）；微晶纤维素 SH-102（MCC）、交联羧甲纤维素钠（CCNa）、硬脂酸镁（安徽山河药用辅料股份有限公司）；甘露醇（法国 Roquette 公司）；羟丙纤维素（美国 Ashland 公司）；红氧化铁（宁波一品生物技术有限公司）；樱桃香精（广州市名花香料有限公司）；阿司帕坦（湖南九典制药股份有限公司）；十二烷基硫酸钠（SDS，分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2　方法及结果

2.1　溶出曲线方法建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱：C18 硅胶柱（4.6 mm×100 mm，3 μm）；以 0.2% 三氟乙酸水溶液 -0.2% 三氟乙酸乙腈溶液（45∶55）为流动相，柱温 50 ℃；流速 0.9 mL·min^{-1}，进样量 20 μL；检测波长 389 nm；运行时间 10 min[4]。

2.1.2　溶出方法和溶出介质　根据普通口服固体制剂的溶出曲线测定与比较原则[5]，重点关注本品在 pH 1.0 介质中的溶出曲线。由于孟鲁司特钠在 pH 1.0 介质中溶解性较差，为保证拟考察介质具有较好的区分力，在溶出介质中添加 0.25% 的 SDS。自研制剂溶出曲线方法参考原研制剂进口标准中的溶出度方法，即方法类型为桨法，转速为 50 r·min^{-1}，介质体积为 900 mL，介质温度 37 ℃。此外拟定取样体积为 8 mL，取样时间点为 5、10、15、30、45、60 min。

2.1.3　专属性试验　精密称取孟鲁司特钠对照品 10 mg，置于 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 5 mL 置于 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，即得对照品溶液。按处方组成称取空白辅料混合物约 33 mg 置于 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，摇匀，滤过，得空白辅料溶液。取本品一片投入溶出杯中，按溶出曲线测定法进行试验，待达到溶出终点时取样，滤过，取续滤液作为供试品溶液。取空白辅料溶液、对照品溶液和供试品溶液分别进样 20 μL 测定，结果显示，对照品溶液中主成分峰保留时间约为 3.9 min，空白辅料不干扰主成分峰检测，供试品溶液色谱图中除主成分峰外，还于约 8.1 min 有一较大的降解杂质峰，其与主成分峰有效分离，如图 1 所示。

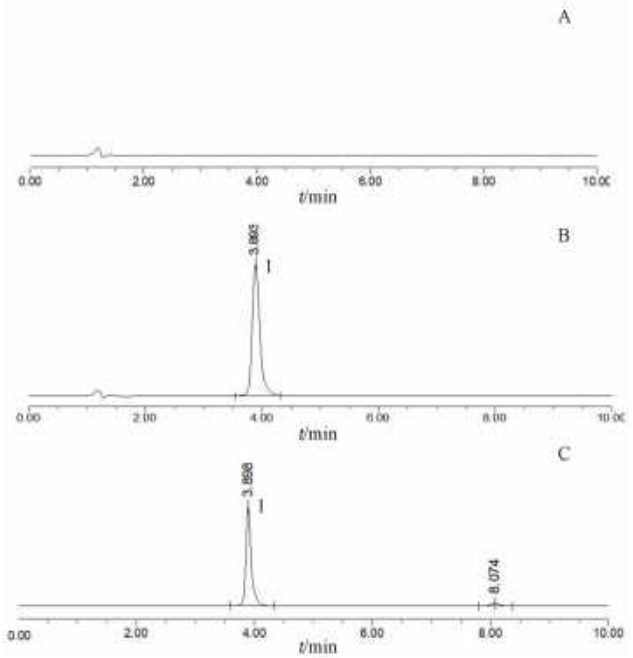


图 1　孟鲁司特钠咀嚼片的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of montelukast sodium chewable tablet

A. 空白辅料溶液（blank excipient solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）；1. 孟鲁司特钠（montelukast sodium）

2.1.4　标准曲线的制备　精密量取“2.1.3”项下的对照品储备液适量，用 0.25% SDS 水溶液分别稀释成 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10 μg·mL^{-1} 的系列对照品溶液，进样测定，以峰面积（Y）对质量浓度（X）进行线性回归，得到回归方程为 $Y = 2.357\times10^{3}X + 96.77$（$r = 0.9999$），本品在 1.0 ～ 10.0 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5　回收试验　精密称取孟鲁司特钠对照品 10 mg 置于 200 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻

度，摇匀，作为对照品储备液，平行配制 3 份。分别精密量取对照品储备液 5、10 和 15 mL 置于 100 mL 量瓶中，加入处方量空白辅料，用 0.25% SDS 水溶液稀释至刻度，超声使完全溶解，放冷至室温，滤过，分别作为孟鲁司特钠咀嚼片回收率 50%、100%、150% 的供试品溶液。取“2.1.3”项下的对照品溶液和本次配制的供试品溶液，进样测定，记录色谱图，按外标法以峰面积计算回收率。结果各浓度回收率均在 98.5% ～ 101.5%，*RSD* ＜ 2.0%，表明回收率良好。

2.1.6　溶液稳定性　取“2.1.3”项下的对照品溶液和供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 精密量取 20 μL 进样测定，结果对照品溶液和供试品溶液主成分在不同时间的峰面积 *RSD* 分别为 8.6% 和 7.8%，主成分和降解杂质峰峰面积之和的 *RSD* 分别为 0.59% 和 0.71%，表明对照品和供试品在介质中稳定性差，但总峰面积 24 h 内基本稳定，因此累积溶出度以主成分峰和降解杂质峰面积之和计算。

2.2　参比制剂解析

药品处方工艺研究前，对参比制剂进行充分的剖析可帮助我们了解药品的目标质量属性，为药品研发提供质量目标和实验依据。笔者对参比制剂性状、硬度等指标按照现行药典方法进行了检测，发现参比制剂的批间差异很小，结果见表 1。

表 1　参比制剂关键质量属性

Tab 1　CQAs of the reference preparation

批号	性状	硬度 /N（n = 10）	崩解时限 /s（n = 6）	崩解现象	在 0.25%SDS-pH 1.0 盐酸中的溶出度（30 min）/%
R010416	粉红色圆形片	30 ～ 50	42 ～ 43	崩解较快，片面溶胀成球，随后快速崩散呈细粉状，杯底液面均出现不溶物	92
R023755	粉红色圆形片	30 ～ 50	38 ～ 41	崩解较快，片面溶胀成球，随后快速崩散呈细粉状，杯底液面均出现不溶物	94
S034791	粉红色圆形片	30 ～ 50	40 ～ 42	崩解较快，片面溶胀成球，随后快速崩散呈细粉状，杯底液面均出现不溶物	95

2.3　工艺

孟鲁司特钠咀嚼片初始处方见表 2。选用粉末直接压片工艺：设置湿法混合制粒机的搅拌 3 $r \cdot s^{-1}$，剪切 30 $r \cdot s^{-1}$。称取处方量孟鲁司特钠、甘露醇、红氧化铁加入湿法制粒机中，预混 5 min；再加入微晶纤维素 MCC、羟丙纤维素、交联羧甲纤维素钠、樱桃香精、阿司帕坦，混合 5 min；最后加入硬脂酸镁总混 5 min；采用 9.5 mm 圆形冲压片，片重 300 mg，素片硬度 30 ～ 50 N。

表 2　初始处方

Tab 2　Initial formulation

成分	每片用量 /mg	处方占比 /%	作用
孟鲁司特钠	5.2	1.73	活性成分
甘露醇	201.35	67.12	填充剂
微晶纤维素	66.0	22.00	填充剂
羟丙纤维素	9.0	3.00	黏合剂
交联羧甲纤维素钠	9.0	3.00	崩解剂
红氧化铁	0.45	0.15	遮光剂
樱桃香精	4.5	1.50	芳香剂
阿司帕坦	1.5	0.50	矫味剂
硬脂酸镁	3.0	1.00	润滑剂

2.4　处方研究

2.4.1　原料药粒径考察　孟鲁司特钠属于 BCS 分类系统Ⅰ/Ⅱ类药物[6-7]，BCSⅡ药物粒径可能会影响药物的溶出。实验采用了粒径 D90 分别为 7、23、45 μm 的孟鲁司特钠，按照“2.3”项下处方工艺制备孟鲁司特钠咀嚼片，以平均硬度、崩解时限、溶出曲线作为评价指标，结果见表 3，不同原料药粒径自制片剂平均硬度、崩解时限均无明显差异，但 pH 1.0 介质溶出曲线有比较显著的差异，粒径 D90 为 7 μm 原料药自制剂 f_2 为 92，粒径 D90 为 23、45 μm 自制片剂 f_2 均小于 50，原料药粒径以控制在 7 μm 以下最优。

2.4.2　填充剂比例考察　本品中以 MCC 和甘露醇作为填充剂，两者的用量影响可溶物与不可溶物比例，因而可能影响药物的崩解和溶出。实验考察了 MCC 和甘露醇比例分别为 1∶2、1∶3、1∶4。结果见表 4，自制片剂与参比的相似因子 f_2 依次为 44、82、51，随甘露醇占比增加片剂溶出速率变快，MCC 和甘露醇比例为 1∶3 时与参比制剂最相似，因此 MCC 和甘露醇用量比例定为 1∶3。

2.4.3　崩解剂用量考察　本品崩解剂为 CCNa，其用量会影响片剂的崩解速度，从而影响药物溶出。考察 CCNa 用量 3 ～ 12 mg 对孟鲁司特钠咀嚼片溶出曲线的影响。结果见表 5，随着 CCNa 用量增加，溶出速度变快，其相似因子 f_2 分别为 62、90、66、63，综合考虑功能性辅料用量及崩散现象与参比制剂一致，优选 CCNa 用量为 9 mg/ 片（3%）。

2.4.4　遮光剂用量考察　孟鲁司特钠的光稳定性差，光照下可分解为其顺式异构体杂质 [图 2B 所

表 3　粒径考察 (0.25% SDS-pH 1.0 盐酸)

Tab 3　Particle size (0.25% SDS-pH 1.0 hydrochloric acid)

制剂	平均硬度 /N	崩解时限 /s	累积溶出度 /%					f_2
			5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
D90 ＝ 7 μm	47.2	38 ～ 40	60	76	82	90	95	92
D90 ＝ 23 μm	48.7	37 ～ 41	39	50	55	62	65	24
D90 ＝ 45 μm	43.1	39 ～ 40	35	44	49	55	59	28
参比制剂	39.3	38 ～ 43	61	77	83	91	94	—

表 4　填充剂比例考察 (0.25% SDS-pH 1.0 盐酸)

Tab 4　Filler ratio (0.25% SDS-pH 1.0 hydrochloric acid)

制剂	累积溶出度 /%					f_2
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
MCC ∶甘露醇（1 ∶ 2）	52	67	74	82	87	44
MCC ∶甘露醇（1 ∶ 3）	63	78	85	92	95	82
MCC ∶甘露醇（1 ∶ 4）	72	88	92	95	97	51
参比制剂	61	77	83	91	94	—

表 5　崩解剂用量考察 (0.25% SDS-pH 1.0 盐酸)

Tab 5　Disintegrant dosage (0.25% SDS-pH 1.0 hydrochloric acid)

制剂	累积溶出度 /%					f_2
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
1%CCNa	53	72	79	87	88	62
2%CCNa	60	77	84	93	92	90
3%CCNa	63	81	89	97	97	66
4%CCNa	62	81	90	98	99	63
参比制剂	61	77	83	91	94	—

示相对保留时间为 1.77（16.256 min）的峰]，可能影响产品的疗效和安全性。本品中添加了红氧化铁作为遮光剂，对原料药进行遮光保护，增强本品的光稳定性。实验考察了红氧化铁 0.15% ～ 0.45% 用量对制剂性状和稳定性的影响，如表 6 显示，红氧化铁用量为 0.3% 时，片剂的颜色和参比制剂颜色一致。光照 10 d，不同红氧化铁自制片剂杂质增长幅度均小于参比制剂；高温 10 d 不同红氧化铁自制片剂和参比制剂杂质增长无差别。优选红氧化铁用量 0.30%，其性状和参比制剂一致。

表 6　遮光剂用量考察 (%)

Tab 6　Sunscreen dosage (%)

制剂	性状	0 d	光照下杂质含量		高温下杂质含量	
			10 d	增长幅度	10 d	增长幅度
0.15% 红氧化铁	浅粉红色椭圆形片	0.43	2.61	2.18	1.16	0.73
0.20% 红氧化铁	浅粉红色椭圆形片	0.50	3.09	2.59	1.13	0.63
0.30% 红氧化铁	粉红色椭圆形片	0.42	2.91	2.49	1.08	0.66
0.45% 红氧化铁	粉红色椭圆形片（颜色偏深）	0.48	1.85	1.37	1.08	0.60
参比制剂	粉红色椭圆形片	0.76	4.95	4.19	1.36	0.70

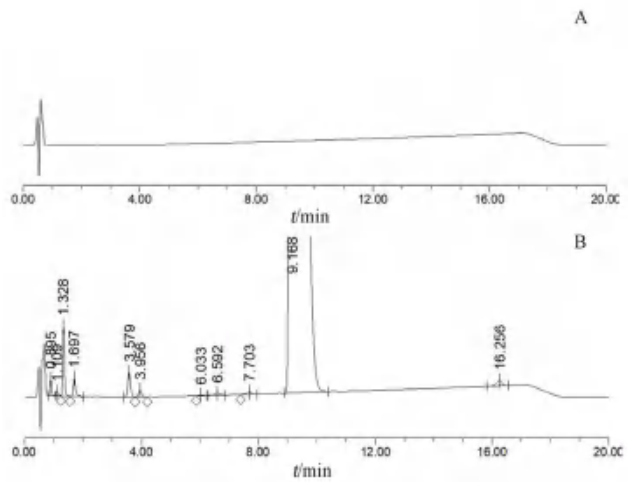


图 2　有关物质色谱图

Fig 2　Chromatogram of relevant substance

A. 空白溶剂（blank excipients solution）；B. 供试品溶液（sample solution）

2.4.5　矫味剂和芳香剂用量考察　对于咀嚼片，良好的口感可以极大地提高儿童用药的依从性。咀嚼片常用矫味剂和芳香剂来遮掩药物本身的苦味，进而提升用药依从性。本次考察选取三名志愿者进行本品口感的评价 [8-9]，尝试前先用温水漱口，将片剂置于口腔中嚼碎，记录不同片剂的口感评价。表 7 结果显示，当阿司帕坦用量为 0.5% 时，自制片剂口感清甜，甜度适中，和参比片剂接近；表 8 结果显示，当樱桃香精用量为 0.5% 时香味清淡和参比片剂一致，综上阿司帕坦用量、樱桃香精用量为 0.5% 时口感和参比一致。

2.4.6　原料药水分考察　孟鲁司特钠具有引湿性，不同含水量的孟鲁司特钠 [10] 原料药可能会产生结团，对片剂的溶出产生影响。实验分别使用水分为 1.09%、1.56%、2.07% 的孟鲁司特钠，考察了原料水分对片剂溶出度的影响。结果见表 9，当原料药含水量大于 1.56% 时片剂溶出度明显降低，

表 7 阿司帕坦用量考察

Tab 7 Aspartan dosage

制剂	志愿者 1	志愿者 2	志愿者 3
参比制剂	口感清甜	口感清甜	口感清甜
0.30% 阿司帕坦	甜味较淡	甜味较淡	甜味较淡
0.50% 阿司帕坦	口感清甜，甜度适中	口感清甜，甜度适中	口感清甜，甜度适中
0.70% 阿司帕坦	甜味浓郁，偏甜	甜味稍浓，适中	甜味浓郁，偏甜

表 8 樱桃香精用量考察

Tab 8 Cherry flavor dosage

制剂	志愿者 1	志愿者 2	志愿者 3
参比制剂	香味清淡	香味清淡	香味清淡
0.50% 樱桃香精	香味清淡	香味清淡	香味清淡
1.00% 樱桃香精	香味略浓	香味一般	香味略浓
1.50% 樱桃香精	香味较浓	香味较浓	香味较浓
2.50% 樱桃香精	香味浓郁	香味浓郁	香味浓郁

表 9 原料药水分考察 (0.25% SDS-pH1.0 盐酸)

Tab 9 API moisture (0.25% SDS-pH 1.0 hydrochloric acid)

制剂	累积溶出度 /%					f_2
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
1.09% 原料水分	64	82	88	96	97	66
1.56% 原料水分	62	72	76	82	85	60
2.07% 原料水分	52	67	74	80	81	50
参比制剂	61	77	83	91	94	—

与参比制剂相似度降低，而孟鲁司特钠水分为 1.09% 的自制片剂和参比制剂 f_2 为 66，相似度较高，故需将孟鲁司特钠水分控制在 1.1% 以内。

2.4.7 片剂硬度考察 片剂的硬度大小会影响药物的溶出速度和运输贮存，实验考察了 10 ～ 60 N 范围的片剂硬度。各硬度条件下压片均较顺利，无黏冲涩冲，片重稳定，片面光洁。结果见表 10，30 ～ 60 N 硬度片剂脆碎度小，崩解时间及现象也和参比制剂无差异，60 N 自制片剂硬度过大导致溶出变慢，20 N 自制片剂硬度过小导致溶出偏快，计算得与参比制剂相似因子 f_2 为 48，小于 50；30 ～ 50 N 自制片剂和参比制剂 f_2 分别为 73、87、82，均大于 50，与参比制剂溶出相似。综上应控制本品的硬度控制在 30 ～ 50 N 内最优。

表 10 不同压片硬度的崩解时限及脆碎度

Tab 10 Disintegration time and friability of different tablet hardness

制剂	崩解时间 /s	崩解现象	脆碎度 /%	f_2
10 N	22 ～ 23	片子迅速溶胀成球状，崩解极快	3.01	未测定
20 N	27 ～ 30	片子迅速溶胀成球状，崩解极快	0.87	48
30 N	37 ～ 39	片子溶胀成球状，崩解较快	0.28	73
40 N	40 ～ 42	片子溶胀成球状，崩解较快	0.04	87
50 N	42 ～ 43	片子溶胀成球状，崩解较快	0.05	82
60 N	47 ～ 48	片子溶胀成球状，崩解较快	0	49
参比制剂 (39.3 N)	38 ～ 43	片子溶胀成球状，崩解较快	未测定	/

2.5 处方工艺放大

粉末直压工艺总混物料的混合均匀性和压片时可能的分层是关注重点。根据小试确定的处方，（见表 11），放大制备一批孟鲁司特钠咀嚼片，批量：5 万片（总重量 15 kg)。得到的成品见图 3。

表 11 确定的处方

Tab 11 Definited formulation

成分	单片用量 /mg	处方占比 /%	作用
孟鲁司特钠	5.2	1.7	活性成分
甘露醇	203.9	68.0	填充剂
微晶纤维素	66	22.0	填充剂
羟丙纤维素	9	3.0	黏合剂
交联羧甲纤维素钠	9	3.0	崩解剂
红氧化铁	0.9	0.3	遮光剂
樱桃香精	1.5	0.5	芳香剂
阿司帕坦	1.5	0.5	矫味剂
硬脂酸镁	3	1.0	润滑剂

图 3 孟鲁司特钠咀嚼片

Fig 3 Montelukast sodium chewable tablets

注（Note)：左 . 参比制剂正面（left：front of reference preparation)；中 . 参比制剂背面（middle；back of reference preparation)；右 . 自研制剂（right：self-made preparation)。

2.5.1 总混颗粒混合均匀度 按照指导原则对批量放大生产时不同混合时间不同位置取样，检测总混颗粒的混合均匀度，结果不同混合时间（5、10、20 min ）含量均匀度 *RSD* 均小于 5%，混合均匀度良好。

2.5.2 压片分层考察 粉末直接压片不经制粒，会存在压片分层的风险。对放大批压片前期、中

期、后期取样检测含量、含量均匀度。压片前、中、后期片剂含量均一，未出现压片分层现象，结果见表 12。

表 12　压片分层研究

Tab 12　Tablet laying

取样时间点	平均含量 /%	含量均匀度（A ＋ 2.2S）
压片前期	99.7	2.3
压片中期	100.4	2.4
压片后期	99.8	2.1

2.5.3　溶出曲线研究　对放大批自制片剂和参比制剂在 0.25%SDS-pH1.0、0.25%SDS-pH4.0 和 0.25%SDS-pH6.8 介质中的溶出进行了考察，自制片剂和参比制剂 f_2 分别为 72、66、81，相似度较好，自制片剂和参比制剂在 0.25% SDS 水介质中 15 min 溶出度分别为 92% 和 90%，均满足 15 min 溶出 85%，自制片剂和参比制剂体外溶出相似。放大自制片剂质量均一，处方工艺放大可行性好。

2.5.4　稳定性研究　将处方工艺放大确认的自制片剂和参比制剂放置稳定性条件实验，对比两种制剂的稳定性。表 13 结果显示，加速条件下自制片剂的杂质增长幅度约为 1%，低于参比制剂的涨幅 2.0% 以上；自制片剂在高温、高湿、光照条件下杂质增长幅度也均低于参比制剂。自制片剂与参比制剂的有关物质图谱见图 4，降解杂质 B 的相对保留时间约 1.8。按照既定处方工艺制备的自制片剂稳定性良好，质量可控。

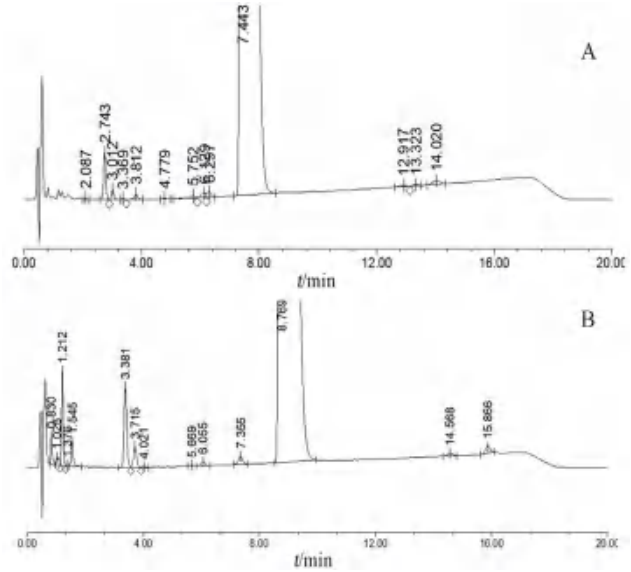


图 4　自制片剂与参比制剂的有关物质图谱

Fig 4　Relevant substance chromatogram of self-made and reference preparation

A. 自制片剂（self-made preparation）；B. 参比制剂（reference preparation）

表 13　稳定性研究 (%)

Tab 13　Stability (%)

批次	0 d	加速试验（40 ℃＋ RH75%）				影响因素试验（10 d）		
		1 个月	2 个月	3 个月	6 个月	高温（60 ℃）	高湿（RH92.5%）	光照
放大批 1	0.50	0.65	0.78	0.96	1.54	0.84	0.72	3.02
放大批 2	0.51	0.67	0.81	0.94	1.50	0.86	0.71	3.16
放大批 3	0.50	0.68	0.80	0.99	1.61	0.82	0.76	2.99
参比制剂	0.76	1.01	1.36	1.53	3.47	1.76	1.13	4.76

3　总结与展望

本文以 QbD 的研发理念为根本，首先根据参比制剂的关键质量属性 CQA，确定了目标产品质量概况 QTPP，选择与参比制剂处方组成一致的辅料，进行单因素处方筛选。基于处方变动因素对产品质量属性的影响因素进行风险评估。针对高风险因素，在处方设计中进行考察。以自制孟鲁司特钠咀嚼片与参比制剂非模型依赖性的 f_2 为指标，对产品处方和工艺进行考察筛选，确定制剂的关键质量属性。可以为孟鲁司特钠咀嚼片的开发提供参考。

本次研究的孟鲁司特钠咀嚼片，与参比制剂处方组成相同 [11]，但比例存在微小差异：① 樱桃香精的用量由 1.5% 减少至 0.5%，因为使用的为水溶性香精，一般不对药物溶出产生明显影响，主要用于调节口味，增加患者的顺应性；② 红氧化铁的用量由 0.15% 增至 0.3%，可能由于不同来源氧化铁的粒径不同，导致颜色与用量不成正比，但可保证自制片剂与参比制剂的有关物质具有一致的稳定性；③ 甘露醇为稀释剂，作为调节量，与微晶纤维素的比例维持在约 3∶1，保证自制片剂与参比制剂均具有快速崩解的特性，体外溶出一致。自制片剂与参比制剂具有一致的理化特性与稳定性。

普通口服固体制剂可采用比较仿制制剂与参比制剂体外多条溶出曲线相似性的方法，评价仿制制剂的质量。溶出曲线的相似并不意味着两者一定生物等效，但溶出曲线与粒径相近

可降低出现临床不等效的风险[12]。以国外原研制剂的处方为起点，本研究对孟鲁司特钠咀嚼片进行处方优化和工艺研究，得到的处方合理，放大工艺稳定可控，自制片剂和参比制剂的多条体外溶出曲线 f_2 达 50 以上，体外结果表明两者的相似性良好，提高了仿制药一致性评价预生物等效性和正式生物等效性的成功率，可在一定程度上确保自制片剂和参比制剂的有效性和安全性等同。期望早日完成孟鲁司特钠咀嚼片的注册临床批次生产，通过临床试验研究对比自制片剂和参比制剂的体内行为，为本品的处方和工艺开发提供最有力的证明。

参考文献

[1] 常爱玲 . 全球约 3 亿人患有哮喘病 [J]. 首都医药，2004，5：28-28.

[2] Cheng H，Leff JA，Amin R，et al. Pharmacokinetics，bioavailability，and safety of montelukast sodium（MK-0476）in healthy males and females [J]. Pharma Res，1996，13（3）：445-448.

[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组 . 支气管哮喘防治指南（支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案）[J]. 中华内科杂志，2003，42（11）：817-822.

[4] JX20010357. 孟鲁司特钠咀嚼片进口药品注册标准 [S]. 进口药品复核标准汇编 . 2002：957.

[5] 国家药品监督管理局 . 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则（2015 年第 3 号）[EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/directory/web/nmpa/images/MjAxNcTqtdozusXNqLjmILi9vP4xLmRvY3g=. docx. 2015-02-05/2022-08-31.

[6] NICHD，FDA. Intra-agency Agreement Between the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development（NICHD）and the U. S. Food and Drug Administration（FDA）Oral Formulations Platform-report 1. [EB/OL]. https：//bpca. nichd. nih. gov/collaborativeefforts/initiatives/Documents/Formulations_Platform_Report. pdf. 2011/2022-08/31.

[7] Benet LZ，Broccatelli F，Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs [J]. The AAPS Journal，2011，13（4）：519-547.

[8] 孙钦勇，冯中，高帆俐，等 . 孟鲁司特钠口腔崩解片的制备和质量评价研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1552-1558.

[9] 国家药品监督管理局药品评审中心 . 儿童用药口感设计与评价的技术指导原则（公开征求意见稿）[EB/OL]. https：//www. cde. org. cn/main/att/download/dbad09c0ac7a48153b35ebeec66d002c. 2022-06-07/2022-08-31.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：114.

[11] FDA. Label（singulair）[EB/OL]. https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2021/020829s074，020830s0760，021409s052lbl. pdf2021-02-22/2022-08-31.

[12] 国家药品监督管理局 . 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（2016 年 第 61 号）[EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/directory/web/nmpa/images/MjAxNsTqtdo2MbrFzai45ri9vP4zLmRvY3g ＝ . docx 2016-03-18/ 2022-08-31.

（收稿日期：2022-07-08；修回日期：2022-09-01）

采用 SMRT 测序技术考察莲子的真菌群落多样性

张寅，陈恒文，何轩辉*（中国中医科学院广安门医院，北京　100053）

摘要：目的　考察莲子中真菌群落的多样性。**方法**　采用单分子实时（SMRT）测序技术对莲子（红莲和白莲）中真菌的 ITS 全长扩增片段进行测序分析。通过评估测序数据、分析其 α 和 β 多样性，剖析真菌的组成、考察组间差异及菌属间的相关关系，剖析莲子的真菌群落结构。**结果**　共检测到 1 界、10 门、30 纲、75 目、158 科、247 属和 342 种真菌，优势菌为 *Botryosphaeria wangensis*（0 ～ 79.57%）、*Lasiodiplodia laeliocattleyae*（0.32% ～ 49.18%）和 *Colletotrichum aenigma*（0 ～ 31.76%）和 *Wallemia canadensis*（0 ～ 22.86%）。有潜在致病风险的真菌为 *Colletotrichum aenigma*、*Aspergillus vitricola*、*Rhizomucor pusillus*，存在产毒风险的真菌为 *Fusarium pernambucanum*。红莲和白莲样品的真菌组成在组间存在显著性差异，差异菌主要是 *Botryosphaeria wangensis* 和 *Wallemia canadensis*。**结论**　SMRT 测序技术对研究莲子中真菌的多样性具有较好的适用性，并可通过分析产毒真菌的种类为莲子的安全使用提供风险预警。

关键词：莲子；单分子实时测序（SMRT）技术；ITS 全长序列；真菌群落；多样性
中图分类号：TS219　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2527-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.012

Fungal community diversity in Lotus seeds by single molecule real-time sequencing technology

ZHANG Yin, CHEN Heng-wen, HE Xuan-hui* (*Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100053)

Abstract: Objective　To determine the fungal community diversity in Lotus seeds. **Methods**　Single molecule real-time (SMRT) sequencing technology was used to analyze the full-length amplified ITS reads of fungi in Lotus seeds (red and white Lotus seeds). Through evaluating the sequencing data and analyzing the α and β diversity of the fungal composition, the differences between groups, and correlation between fungal genera, and the fungal community structure of Lotus seeds were obtained. **Results**　One kingdom, 10 phyla, 30 classes, 75 orders, 158 families, 247 genera and 342 species of fungi were detected. The dominant species included *Botryosphaeria wangensis* (0 ～ 79.57%), *Lasiodiplodia laeliocattleyae* (0.32% ～ 49.18%), *Colletotrichum aenigma* (0 ～ 31.76%), and *Wallemia canadensis* (0 ～ 22.86%). The fungi with potential pathogenic risks included *Colletotrichum aenigma*, *Aspergillus vitricola*, *Rhizomucor pusillus*, while *Fusarium pernambucanum* had toxigenic risk. The fungal compositions of red Lotus seed and white Lotus seeds were significantly different between groups. The mainly differential fungi were *Botryosphaeria wangensis* and *Wallemia canadensis*. **Conclusion**　SMRT sequencing technology is suitable for studying the diversity of fungi in Lotus seeds to provide a risk warning for the safe use of them by analyzing toxigenic fungi.

Key words: Lotus seed; SMRT sequencing; full-length ITS; fungal community; diversity

莲子（Lotus seed）是睡莲科植物莲（*Nelumbo nucifera* Gaertn.）的干燥成熟种子[1]，为“药食同源”产品[2]。其营养丰富、口感极佳，具有较高的食用价值[3]；同时，作为一味中药，它还具有

基金项目：中国中医科学院科技创新工程（No. CI2021A05011；No. CI2021A04619）。
作者简介：张寅，男，经济师，主要从事药学研究及医疗设备试剂等管理工作，email：shezhangyin@sina.com　*通信作者：何轩辉，女，助理研究员，主要从事药学及免疫学研究，email：hexuanzi1646@sina.com

补脾止泻、止带、益肾涩精和养心安神之功效[1]。莲子主产于我国南方地区，其中湖南的湘莲、江西的赣莲、福建的建莲及浙江的宣莲最负盛名。同时，在朝鲜、日本、印度、越南、亚洲南部和大洋洲等国家和地区也有分布。目前市售莲子主要有红莲和白莲两种。秋季莲的果实成熟时割取莲房，取出果实，除去果皮，干燥后即得到红莲。红莲子经过加工去皮后即可制得白莲[4]。莲子凭借其优异的药用和食用功能，具有巨大的经济效益和社会价值。然而，若处置不当，莲子容易遭受真菌及真菌毒素的侵染，进而可能产生具有较强毒性的真菌毒素，对消费者的身心健康和安全造成潜在威胁[5-7]。

莲子富含淀粉、脂质等营养物质，带来食用及药用价值的同时，也为真菌提供了适宜的生长条件，尤其是一些有害的外源真菌（致病菌及产毒真菌）。而这些外源真菌的污染常常会在莲子的种植、采收、加工、运输及贮存过程中引入[5]。在莲子中常见的真菌毒素包括黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素等[6]。其中黄曲霉毒素的毒性最强。为了控制莲子的质量，保证其安全使用，《中国药典》（2020 年版）对莲子中黄曲霉毒素的限量作了明确规定[1]。据报道，莲子中黄曲霉毒素 B_1（AFB_1）的检出率高达 67%，超标率高达 58.21%[8]。莲子中黄曲霉毒素等真菌毒素一旦超标，很难通过低成本的方法将其降解。因此，为了从源头上监测和控制真菌毒素的产生，很有必要考察莲子中真菌群落（尤其是产毒真菌和致病菌）的分布及多样性。

近年来，随着测序技术的发展，基于 PicBio 平台的单分子实时（Single Molecule Real Time，SMRT）测序技术已被用于研究环境中微生物的多样性[9-10]。与二代测序技术相比，第三代 SMRT 测序技术具有读长长和种分辨率高的特点，能够更准确地还原环境及食品等基质中微生物群落的分布情况[11]。为此，本研究采用 SMRT 测序技术对 12 批市售常见规格莲子（白莲和红莲）的菌群结构进行剖析，并对其污染真菌进行鉴定和研究，旨在为莲子的安全使用提供参考。

1 材料

从产地和药店共收集了 12 批莲子样品，并根据其商品种类将其分为红莲组（R）和白莲组（W），其产地涵盖了我国江西、湖南、湖北、福建、山东 5 个省份。详细信息见表 1。

表 1 莲子样品信息表

Tab 1 Sample information of Lotus seeds

样品编号	产地	种类	分组	收集日期	优化序列数
W1	江西石城	白莲	W	2018-02-28	13 125
W2	福建宁德	白莲	W	2018-04-08	13 714
W3	湖南湘潭	白莲	W	2018-04-03	11 989
W4	福建建宁	白莲	W	2022-03-15	14 911
W5	福建建宁	白莲	W	2022-03-15	13 965
W6	福建建宁	白莲	W	2022-03-17	14 077
R1	湖北荆州	红莲	R	2022-01-08	13 448
R2	湖南湘潭	红莲	R	2022-03-11	14 707
R3	江西赣州	红莲	R	2022-02-13	12 732
R4	湖南湘潭	红莲	R	2022-03-28	14 729
R5	湖南湘潭	红莲	R	2022-04-06	12 677
R6	山东微山湖	红莲	R	2022-04-06	13 188

2 方法

2.1 菌群富集和 DNA 提取

称取 5 g 粉碎后的莲子粉末置于 50 mL 无菌离心管中，加入 25 mL 灭菌后的 PBS 缓冲液（0.01 mol • L^{-1}，pH 7.2 ～ 7.4），置于摇床中于 300 r • min^{-1} 震荡 2 h，瞬离后取上清液置于 10 mL 无菌离心管中，11 000 r • min^{-1} 离心 10 min，弃去上清液，将沉淀转移至 2 mL 无菌离心管中，液氮速冻后－ 80 ℃储存备用。根据中药材 DNA 提取试剂盒（北京氾胜）的说明书完成所富集真菌的 DNA 提取，应用 synergy HTX 型酶标仪（Gene Company Limited 公司）对其进行核酸浓度检测。

2.2 ITS 全长扩增与 SMRT 测序

提取后的 DNA 经检测合格后，扩增真菌的 ITS（internal transcribed spacer，内转录间隔区）全长序列，引物为 ITS1F（5'-CTTGGTCATTTA-GAGGAAGTAA-3'）和 ITS4R（5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3'）[12]。PCR 扩增程序如下：95 ℃预变性 5 min，进行 8 个循环（95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s），再进行 24 个循环（95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s），于 72 ℃延伸 5 min 后 4 ℃保存。用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。再根据 Monarch DNA 胶回收试剂盒（京鸿跃创新科技有限公司）的操作说明回收 PCR 产物，用 1.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。后续基于 PicBioSequel Ⅱ（Pacbio，USA）测序平台的 SMRT 测序内容由北京百迈客生物科技有限公司完成。

2.3 数据处理及生信分析

完成测序后，使用 Pacbio 提供的 SMRT Link 8.0 工具获取 CCS（Circular consensus sequence）

序列。使用 lima v1.7.0 软件，通过 barcode 对 CCS 进行识别，得到 Raw-CCS 序列数据；再使用软件 cutadapt 1.9.1 对引物序列进行识别、去除及长度过滤，得到不包含引物序列的 Clean-CCS 序列；然后，使用 UCHIME v4.2 软件去除嵌合体序列，得到 Effective-CCS 序列。最后，使用 Usearch 软件对 Effective-CCS 序列于 97.0% 相似度水平下进行聚类从而获得分类操作单元（operational taxonomic unit，OTU）。 以 UNITE 数据库为参考，使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对特征序列进行各水平上的分类学注释（包括门、纲、目、科、属、种），并统计各样品的群落组成，利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表，再利用 R 语言工具绘制样品各分类学水平下的群落分布结构图。基于 OTU 聚类结果利用 Mothur 软件和 R 语言工具绘制稀释性曲线，评价测序深度。利用 α 多样性（Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Coverage 参数）和 β 多样性（PCoA）分析评价莲子样品中真菌和真菌群落的多样性。使用 R 工具绘制 Venn 图。引入 LEfSe [line discriminant analysis（LDA）effect size] 分析两组样品（红莲组和白莲组）之间的具体物种差异。最后，根据各个物种在每个样品中的丰度及变化情况，进行斯皮尔曼（Spearman）秩相关分析并筛选相关性大于 0.1 且 P 值小于 0.05 的数据构建相关性网络，利用 python 绘制物种相关性网络图（相关性最高的前 50 个属）。

3　结果

3.1　测序数据质量评估

12 个样品测序后通过 Barcode 识别后共获得 163 953 条 CCS 序列，每个样品至少可产生 12 255 条 CCS 序列，平均产生 13 663 条 CCS 序列。经质控过滤后，各样品中所获得的优化序列长度均在 350 ～ 750 bp，平均长度为 580 bp，较基于 ITS1 或 ITS2 的二代测序更长（一般在 250 ～ 400 bp）。这表明 ITS 的全长 SMRT 测序得到了更长的序列，意味着更高的“种”分辨率和更低的死亡真菌扩增 [11]。经 OTU 聚类和注释后，共检测到 1 界、10 门、30 纲、75 目、158 科、247 属、342 种 和 656 个 OTU。图 1 为稀释性曲线，该曲线是将序列数及其对应的 OTU 数随机抽样构建，以反映样品中实际观察到的物种数量。

由图 1 可以看出，所有样品的 OTU 数量在开始时会随着序列数的增加迅速增加，而当测序量达到 8000 时，上升的趋势趋于平缓；当测序量达到 10 000 时，所有样品的稀释性曲线几乎与 x（横）轴平行。结合表 1 中 12 个样品的优化序列数分析可知，每个样品的测序量都超过 10 000，表明测序深度合理，获得的序列数量足以代表样品中总体真菌群落的多样性，可以进行后续的数据分析。

3.2　莲子中真菌多样性分析

真菌的多样性通常可用 α 多样性和 β 多样性评估。α 多样性分析可以反映单个样品物种丰度及物种多样性，可以采用 Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Coverage 等指标进行衡量。Chao1 和 ACE 指数可以衡量物种丰度即物种数量的多少；而 Shannon 和 Simpson 指数则用于衡量物种多样性，受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响。另外，覆盖率（Coverage）通常被用来衡量样本中物种被测出的概率。

从表 2 可以看出，白莲 W3 样品的 ACE 指数和 Chao1 指数最高，具有最高的物种丰度；白莲 W5 样品的 Shannon 和 Simpson 指数最高，说明其物种多样性最高。此外，所有样品的 Coverage 均大于 0.996（接近于 1），表明样本中物种被测出的概率高，说明本次测序结果能代表样本中微生物的真实情况。

表 2　各样品的 α 多样性指数

Tab 2　α diversity index of each sample

样品编号	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
W1	122.9914	120.5	0.9407	5.5095	0.9996
W2	130.2266	111.5	0.9269	5.0312	0.9991
W3	245.5575	241	0.8636	4.8177	0.9981
W4	129.7489	128	0.9288	5.4122	0.9997
W5	233.1459	202.6	0.9760	6.2353	0.9987
W6	122.9456	115.3333	0.9609	5.6172	0.9992
R1	142.0488	144	0.7727	3.4460	0.9991
R2	172.4695	169.5357	0.7187	3.0089	0.9980
R3	97.1905	103	0.8164	3.1297	0.9993
R4	146.1432	145.5	0.8880	4.0767	0.9995
R5	150.2869	69	0.3586	1.4787	0.9970
R6	65.2502	120.5	0.5297	1.5438	0.9992

β 多样性被用来比较不同样品在物种多样性方面的相似程度。首先，我们对红莲组及白莲组的物种多样性进行比较，基于 bray curtis 的 PCoA 分析表明（见图 2a），红莲组与白莲组样品在物种多样性组成上具有显著差异。第一主成分（PC1）和第二主成分（PC2）分别占全部原始信息的 30.98% 和 16.46%，两者之和为 47.44%，说明两个主轴对样品真菌组成的差异具有很高的解释程度。因此，随后的分析是基于这两个主轴。

两个组的样本在各自的置信椭圆中聚类良好，呈现出红莲组和白莲组内相对相似的 OTU 组成，且红莲组较白莲组的组内差异更大。这说明红莲在真菌的组成差异上比白莲更大。其次，我们还考察了收集年限（2018 年及 2022 年）对物种多样性的影响。结果表明（见图 2b），这两年收集的样品在各自的置信椭圆中聚类良好，在物种多样性组成上存在差异。且 2018 年收集的 3 个白莲样品（W1、W2 和 W3）的间距大，说明其真菌多样性差异较大；而 2022 年收集的 3 个白莲样品（W4、W5 和 W6）的间距较小，则说明其真菌多样性差异较 2018 年小。

3.3 群落组成分析

本次测序检测到的真菌在各个分类单元上共计 1 界、10 门、30 纲、75 目、158 科、247 属和 342 种。在门水平上（见图 3a），子囊菌门 *Ascomycota* 和担子菌门 *Basidiomycota* 是最优势菌门，相对丰度分别为 99.12% ～ 46.51% 和 40.16% ～ 0.44%。在属水平上（见图 3b），优势属为葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*（0 ～ 79.57%）、曲霉属 *Aspergillus*（0.56% ～ 51.04%）和毛双孢属 *Lasiodiplodia*（0.32% ～ 49.18%）。曲霉属在大部分莲子样品中为优势菌属，葡萄座腔菌属主要分布在红莲 R1、R5 和 R6 等 3 个样品中。曲霉属在莲子样品中的相对丰度高、分布广，均说明莲子是该菌群的适宜宿主，也可解释莲子中 AF B_1 污染率较高。然而，真菌毒素的产生不是系统发生的，检测到产毒真菌并不意味着一定会产生真菌毒素，其原因在于在真菌群落中，真菌间的作用是复杂的。即使产毒真菌产生了真菌毒素，也可能会被其他能降解真菌毒素的真菌所降解 [5]。因此，我们不能仅关注单一的产毒真菌，而需要关注整个真菌群落。另外，葡萄座腔菌属主要在红莲样品中被检测到，而在白莲中几乎未检测到。而在种水平上（见图 3c），检测到的优势种有 *Botryosphaeria wangensis*（0 ～ 79.57%）、*Lasiodiplodia laeliocattleyae*（0.32% ～ 49.18%）、*Colletotrichum aenigma*（0 ～ 31.76%）和 *Wallemia canadensis*（0 ～ 22.86%）。此外，在鉴定到的真菌中，*Botryosphaeria wangensis* 和 *Lasiodiplodia laeliocattleyae* 为植物病害菌，*Colletotrichum aenigma*、*Aspergillus vitricola* 和 *Rhizomucor pusillus* 为对人有潜在致病风险的真菌，*Fusarium pernambucanumw* 为存在产毒风险的真菌。

3.4 组间差异分析

组间差异分析结果如图 4 所示，R ＝ 0.706，P ＝ 0.004。R 值接近于 1，表明组间差异大于组内差异，P 值小于 0.01 说明检验的可信度高。因此，可以认为红莲组和白莲组莲子样品差异有统计学意义。组间箱式图的中位线高于组内，且红莲组的组内差异大于白莲组，表明这些莲子在真菌组成上的组间差异大于组内差异，分组是有意义的。

进一步采用 LEfSe 分析发现，在不同组间具有统计学差异的 Biomarker 在白莲组主要有 1 个属、2 个种，而在红莲组主要有 6 个属、4 个种，见图 5。影响最大的差异物种在白莲组为 *Botryosphaeria wangensis*，而在红莲组为 *Wallemia canadensis*，表明这些菌属和菌种是影响组间差异的关键因素。

3.5 物种关联分析

由相对丰度前 50 个属相关性网络图（见图 6）可以看出，整体上存在正相关的菌属远远高于存在负相关的菌属。*Botryosphaeria* 作为丰度最高的属与其他大多数菌属间存在负相关，这很可能是因为其相对丰度高，与其他菌群存在竞争关系。此外，具有潜在产毒风险的菌属曲霉属 *Aspergillus*（47）和镰刀菌属 *Fusarium*（37）分别只有一个与其成正相关的菌属：即 *Aspergillus* 与 *Trichocladium*、*Fusarium* 与 *Lasiodiplodia*。由于曲霉属和镰刀菌属为具有潜在产毒风险的真菌菌属，因此，在整个菌群中，除了要关注这两个菌属外，还需要关注与它们存在相关关系的菌属真菌。

4 讨论

以莲子为代表的种子类中药材易受真菌及真菌毒素的污染，为其安全使用带来巨大的威胁。近年来，随着测序技术的进步和发展，SMRT 测序技术开始被用来研究环境中微生物的多样性。α 多样性结果表明各样品均具有一定的物种丰度和物种多样性。其中白莲 W3 样品具有最高的物种丰度，白莲 W5 样品的物种多样性最高。此外，所有样品的 Coverage 均接近 1，说明本次测序结果能代表样本中微生物的真实情况。β 多样性结果表明红莲组和白莲组在真菌组成上具有差异。组间差异结果表明红莲组与白莲组在统计学上存在显著差异，且造成这种差异的物种为 *Botryosphaeria wangensis*、*Wallemia canadensis* 等。白莲子为红莲子去皮所得，因此，这些差异物种很可能是寄生于莲子皮的真菌，也可能是在去皮的加工过程中引入的外源真菌。

莲子富含淀粉、脂质、蛋白质等营养物质，为真菌的寄生提供了绝佳的环境，除了其自身的

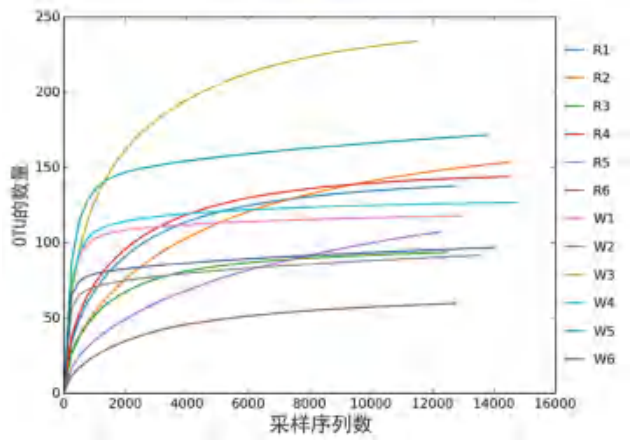


图 1　样品中观测物种数量的稀释性曲线

Fig 1　Rarefaction curves of the observed species in the tested samples

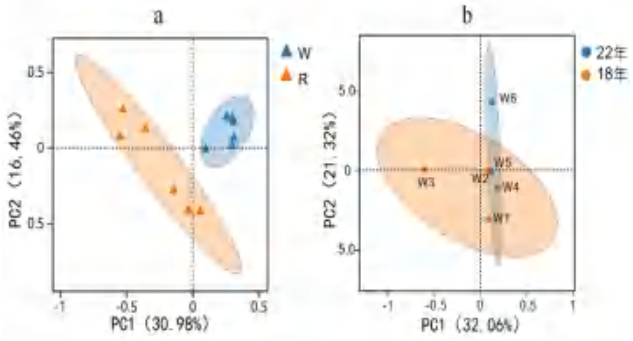


图 2　基于不同分组的 PCoA 分析（OTU 水平）

Fig 2　PCoA graphs based on different grouping methods（OTU level）

a. 红莲与白莲样本的比较分析（the red and the white Lotus seed samples）；b. 2018 年与 2022 年收集的白莲样本比较分析（the white Lotus seed samples collected in 2018 and 2022）

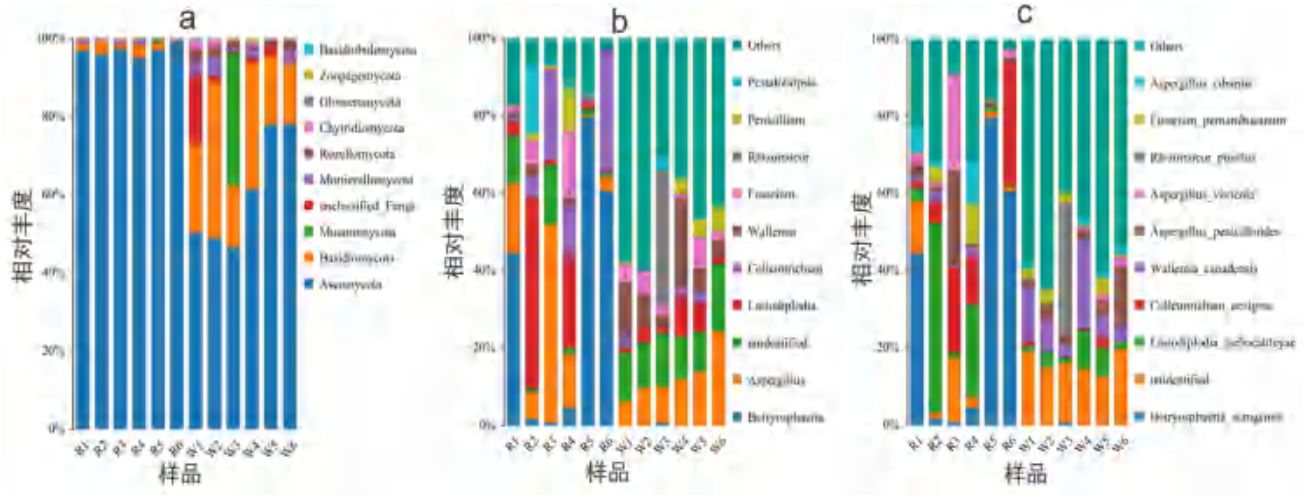


图 3　基于门水平（a）、属水平（b）和种水平（c）的莲子中真菌群落的组成分析

Fig 3　Fungal community composition in Lotus seeds at the phylum（a），genus（b）and species levels（c）

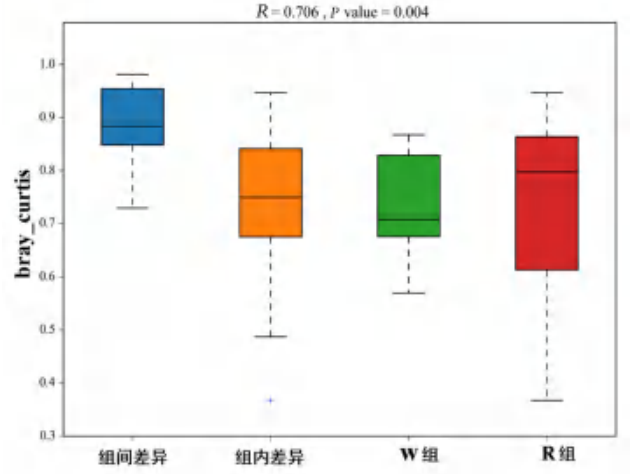


图 4　基于 OTU 的 Anosim 分析箱式图

Fig 4　Box graph of Anosim analysis based on OTU

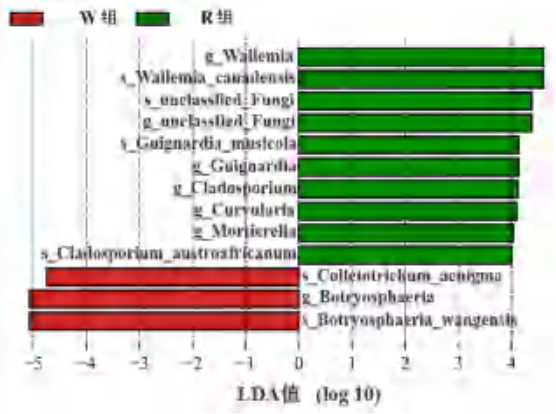


图 5　LDA 值分布柱状图（阈值 4.0）

Fig 5　Bar chart of LDA values（threshold value is 4.0）

内生真菌外，还容易被外来真菌浸染。值得注意的是，本研究中检测到了曲霉属 *Aspergillus* 和镰刀菌属 *Fusarium*，而这两个菌属为具有潜在产毒风险的菌属，也是中药材中常见的污染真菌[13]。因此，在整个菌群中，需要特别关注这两个菌属及其相关的菌属。物种相关性结果表明，曲霉属 *Aspergillus* 与 *Trichocladium*、镰刀菌属 *Fusarium* 与 *Lasiodiplodia* 分别成正相关，将为从源头上监测和控制真菌毒素的产生，保证莲子及其相关产

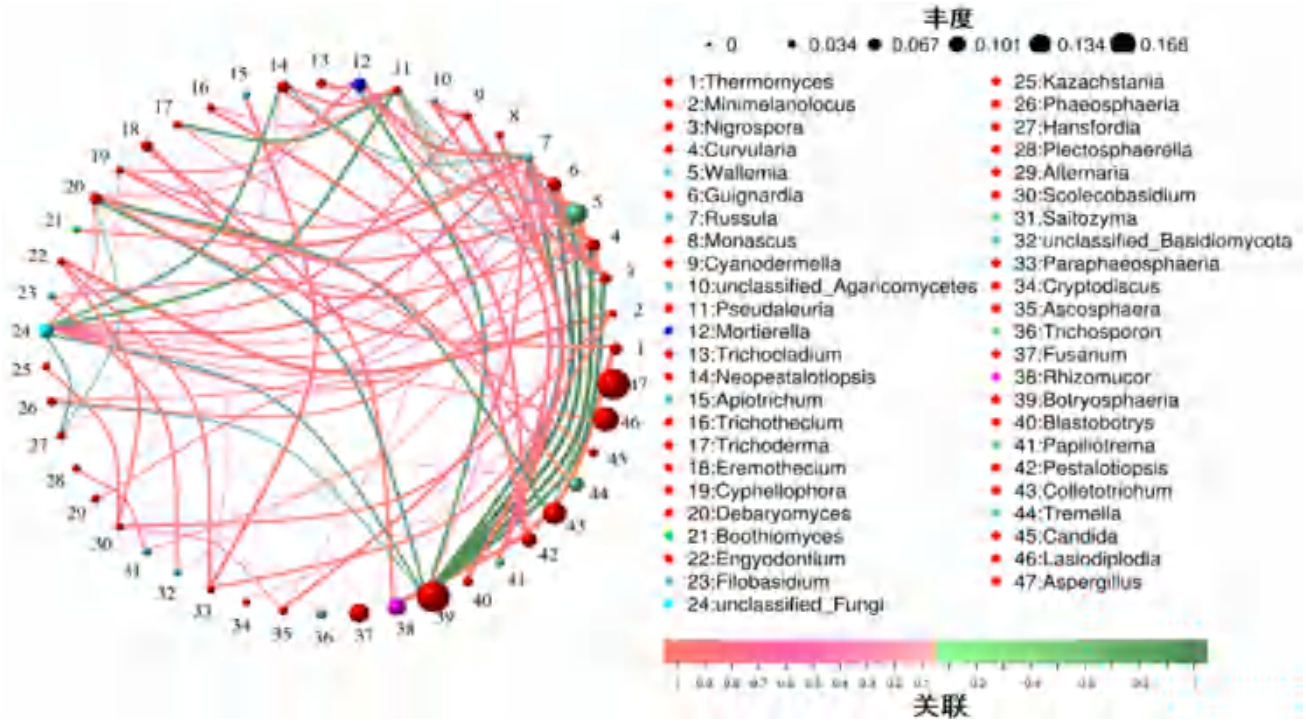


图 6 属水平物种相关性网络图

Fig 6 Correlation network at the species level

注：圆圈代表物种，圆圈大小代表物种平均丰度的高低程度；线条代表两物种间相关，线条粗细代表相关性的强弱，线条颜色：红色代表正相关，绿色代表负相关。

Note：The spot represents a fungal genus，and the circle size represents the average abundance. The line represents the correlation between two genera，the line thickness represents the strength of the correlation，and the line color：red represents the positive correlation，green represents the negative correlation.

品的质量和安全提供重要参考。此外，该研究也验证了基于 PicBio 平台的 SMRT 测序技术的表征复杂基质的真菌毒素群落多样性的可靠性和适用性，为环境及食品等基质中微生物群落的分布情况分析提供了可靠的方法和技术手段。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：285.

[2] 林春波，周阿容，朱亨银，等 . 福建莲子加工产业的现状及发展策略 [J]. 福建轻纺，2018（12）：23-28.

[3] 蒋露 . 我国主要莲子品种营养成分研究 [J]. 食品安全导刊，2019（9）：127-127.

[4] 中国中医药报 . 红莲子、白莲子和石莲子的关系 [J]. 中国中医药现代远程教育，2014，12（4）：58.

[5] Long N，Liu JX，Liao XF，et al. Fungal communities in *Nelumbinis semen* characterized by high-throughput sequencing [J]. Int J Food Microbiol，2021，359：109428.

[6] Wei F，Liu X，Liao XF，et al. Simultaneous determination of 19 mycotoxins in lotus seed using a multimycotoxin UFLC-MS/MS method [J]. J Pharm Pharmacol，2019，71（7）：1172-1183.

[7] Sun CN，Liao XF，Jia BY，et al. Development of a ZnCdS@ZnS quantum dots-based label-free electrochemiluminescence immunosensor for sensitive determination of aflatoxin B_1 in lotus seed [J]. Microchim Acta，2020，187：236.

[8] 赵祥升，应光耀，魏建和，等 . 中药中黄曲霉毒素 B_1 污染概况 [J]. 中国药物警戒，2018，15（10）：608-616，622.

[9] Tedersoo L，Tooming-Klunderud A，Anslan S. PacBio metabarcoding of fungi and other eukaryotes：errors，biases and perspectives [J]. New Phytol，2018，217：1370-1385.

[10] Purahong W，Mapook A，Wu YT，et al. Characterization of the *Castanopsis carlesii* deadwood mycobiome by pacbio sequencing of the full-length fungal nuclear ribosomal internal transcribed spacer（ITS）[J]. Front Microbiol，2019，10：983.

[11] Nilsson RH，Anslan S，Bahram M，et al. Mycobiome diversity：high-throughput sequencing and identification of fungi [J]. Nat Rev Microbiol，2019，17：95-109.

[12] Shi XL，Zhao XH，Ren JY，et al. Influence of peanut，sorghum，and soil salinity on microbial community composition in interspecific interaction zone [J]. Front Microbiol，2021，12：678250.

[13] Zheng RS，Wang WL，Tan J，et al. An investigation of fungal contamination on the surface of medicinal herbs in China [J]. Chin Med，2017，12：2.

（收稿日期：2022-07-16；修回日期：2022-08-23）

水葱化学成分研究

彭电[1]，周碧兰[1]，帅劲节[1]，唐芳[1]，周应军[2]，丑安[1*]（1. 长沙卫生职业学院，长沙 410600；2. 中南大学湘雅药学院，长沙 410013）

摘要：目的 研究水葱 *Schoenoplectus tabernaemontani*（Gmel.）Palla 根茎的化学成分。**方法** 采用硅胶、聚酰胺、Sephadex LH-20 等柱色谱进行分离纯化，根据理化性质、核磁共振波谱和质谱数据鉴定化合物的结构。**结果** 从水葱根茎水提取物中分离得到 12 个化合物，分别鉴定为 4- 羟基 -6- 甲基 -2H- 吡喃 -2- 酮（**1**）、4- 乙烯基苯酚（**2**）、香叶木素（**3**）、5- 羟基 -7，4'- 二甲氧基黄酮（**4**）、5- 羟基 -3，7，4'- 三甲氧基黄酮（**5**）、5，7，3'，4'- 四甲氧基黄酮（**6**）、7，3'，4'- 三羟基二氢黄酮（**7**）、熊果酸（**8**）、*β*- 谷甾醇（**9**）、胡萝卜苷（**10**）、葡萄糖（**11**）和蔗糖（**12**）。**结论** 化合物 **1** 为新天然产物，化合物 **2** ～ **8** 为首次从莎草科植物中分离得到，化合物 **9** ～ **12** 为首次从水葱中分离得到。

关键词：水葱；莎草科；4- 羟基 -6- 甲基 -2H- 吡喃 -2- 酮；化学成分
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2533-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.013

Chemical constituents of *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla

PENG Dian[1], ZHOU Bi-lan[1], SHUAI Jin-jie[1], TANG Fang[1], ZHOU Ying-jun[2], CHOU An[1*] (1. *Changsha Health Vocational College, Changsha* 410600; 2. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of rhizome of *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla. **Methods** Compounds were isolated and purified by a combination of column chromatographies including silica gel, polyamide and Sephadex LH-20. Their structures were elucidated by physiochemical properties, NMR and MS analysis. **Results** Totally 12 compounds were obtained from the water extract of rhizome of *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla and identified as 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (**1**), 4-vinylphenol (**2**), diosmetin (**3**), 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone (**4**), 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone (**5**), 5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavanone (**6**), 7, 3', 4'-trihydroxyflavanone (**7**), ursolic acid (**8**), *β*-sitosterol (**9**), daucosterol (**10**), glucose (**11**) and sucrose (**12**), respectively. **Conclusion** Compound **1** is a new natural product. Compounds **2** ～ **8** have been isolated from Cyperaceae family for the first time. Compounds **9** ～ **12** have been firstly isolated from *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla.

Key words: *Schoenoplectus tabernaemontani* (Gmel.) Palla; cyperaceae; 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one; chemical constituent

水葱 *Schoenoplectus tabernaemontani*（Gmel.）Palla 为莎草科藨草属多年生宿根挺水草本植物。分布范围较广，是湿地挺水植物的典型代表[1]，在我国大部分省份有分布。水葱是重要的水体景观要素，能有效净化和维持景观水体的水质，在环境绿色修复方面发挥重要作用[2]。《全国中草药汇编》《宁夏中草药手册》等书籍记载水葱性平、味淡，归膀胱经，可治疗水肿胀满、小便不利等症，有关其成分、药理和临床用途的研究报道目前还比较少[3-6]。因此，为进一步明确水葱

基金项目：湖南省教育厅科学研究项目（No.18C1855）；长沙市自然科学基金（No.kq2014030）；湖南省自然科学基金（No.2020JJ7096）。
作者简介：彭电，男，博士研究生，副教授，副主任药师，主要从事中药活性成分的发现和新药研究，email：154514812@qq.com
*通信作者：丑安，女，讲师，主管中药师，主要从事中药研究与开发，email：406688120@qq.com

的药效成分，更好地开发利用该植物资源，本实验对水葱的化学成分进行了研究。采用多种色谱技术从水葱的根茎分离得到了 12 个化合物，分别鉴定为 4- 羟基 -6- 甲基 -2H- 吡喃 -2- 酮（4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one，**1**）、4- 乙烯基苯酚（4-vinylphenol，**2**）、香叶木素（diosmetin，**3**）、5- 羟基 -7，4'- 二甲氧基黄酮（5-hydroxy-7，4'-dimethoxyflavone，**4**）、5- 羟基 -3，7，4'- 三甲氧基黄酮（5-hydroxy-3，7，4'-trimethoxyflavone，**5**）、5，7，3'，4'- 四甲氧基黄酮（5，7，3'，4'-tetramethoxyflavanone，**6**）、7，3'，4'- 三羟基二氢黄酮（7，3'，4'-trihydroxyflavanone，**7**）、熊果酸（ursolic acid，**8**）、*β*- 谷甾醇（*β*-sitosterol，**9**）、胡萝卜苷（daucosterol，**10**）、葡萄糖（glucose，**11**）、蔗糖（sucrose，**12**）。

1 材料

Bruker AV-400/500 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司），液相色谱质谱联用仪 QDa（美国 Waters 公司），柱色谱硅胶（青岛海洋化工厂），Sephadex LH-20 型凝胶（GE 公司），聚酰胺 80 ～ 100 目、100 ～ 200 目（国药集团），硅胶薄层色谱板（烟台化学工业研究所），氘代二甲基亚砜、氘代氯仿、氘代甲醇和重水（Cambridge Isotope Laboratories，Inc），乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醇、正丁醇（国药集团，分析纯）。

植物样品于 2016 年 7 月采自湖北省天门市佛子山镇，由湖南中医药大学王智老师鉴定为莎草科藨草属植物水葱 *Schoenoplectus tabernaemontani*（Gmel.）Palla 的根茎。样品标本（SC20160701）存放于中南大学湘雅药学院天然药物化学教研室。

2 提取与分离

水葱根茎（20 kg）干药材切成 2 ～ 3 cm 小段，水回流提取 2 次，每次提取 1.5 h，第 1 次加水 200 L，第 2 次加水 150 L。两次水提取液合并浓缩至约 35 L。依次用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取，萃取的次数以新加入的乙酸乙酯和正丁醇溶剂在分液漏斗中与水葱粗提液萃取待静置平衡后乙酸乙酯和正丁醇层没有明显颜色变化来计算。得到乙酸乙酯萃取部位 155 g、正丁醇萃取部位 205 g。

乙酸乙酯部位用甲醇溶解后硅胶（100 ～ 200 目）拌样，经硅胶柱色谱（300 ～ 400 目），以二氯甲烷 - 甲醇（100∶0、100∶6、100∶12、100∶15、100∶20、0∶100）梯度洗脱，得到 6 个流分（Fr. A ～ F）。Fr. B 经硅胶柱色谱分离，依次用二氯甲烷 - 甲醇（60∶1、30∶1、10∶1）梯度洗脱，合并相同流分得 3 个组分（Fr. B-1 ～ B-3），Fr. B-1 ～ B-3 分别进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，二氯甲烷 - 甲醇（1∶1）洗脱，得到化合物 **1**（5 mg）、**3**（25 mg）、**4**（7 mg）、**5**（11 mg）、**6**（15 mg）和 **7**（2 mg）。

Fr. C 经硅胶柱色谱分离，用二氯甲烷 - 甲醇（60∶1、50∶1、40∶1、30∶1、20∶1、10∶1、5∶1）梯度洗脱，合并相同流分，得到 7 个组分（Fr. C-1 ～ C-7），Fr. C-1 ～ C-7 分别进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，二氯甲烷 - 甲醇（1∶1）洗脱，得到化合物 **8**（45 mg）和 **9**（60 mg）。

Fr. D 经硅胶柱色谱分离，用二氯甲烷 - 甲醇（80∶1、60∶1、40∶1、20∶1）梯度洗脱，合并相同流分得到 4 个组分（Fr. D-1 ～ D-4），Fr. D-1 ～ D-4 分别进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，二氯甲烷 - 甲醇（1∶1）洗脱，得到化合物 **2**（3 mg）和 **10**（15 mg）。

正丁醇部位用甲醇溶解后聚酰胺（80 ～ 100 目）拌样，经聚酰胺柱色谱（100 ～ 200 目）分离，用水 - 乙醇（100∶0、80∶20、50∶50、0∶100）梯度洗脱，得到 4 个流分（Fr. K ～ N），Fr.K 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离，甲醇洗脱，得到化合物 **11**（2 g）和 **12**（0.5 g）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色针晶。ESI-MS *m/z*：127.0 [M ＋ H] $^+$。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：11.63（1H，s，4-OH），5.96（1H，d，J＝2.0 Hz，H-5），5.21（1H，d，J ＝ 2.0 Hz，H-3），2.16（3H，s，7-CH_3）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：173.5（C-2），168.5（C-4），165.2（C-6），102.1（C-5），89.3（C-3），19.8（C-7）。以上数据与文献报道一致[7]，故鉴定化合物 **1** 为 4- 羟基 -6- 甲基 -2H- 吡喃 -2- 酮。

化合物 **2**：无色液体。ESI-MS *m/z*：121.1 [M ＋ H] $^+$。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：7.28（2H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-3/5），6.73（2H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-2/6），6.61（1H，dd，J ＝ 17.7，10.9 Hz，H-7），5.58（d，J ＝ 17.7 Hz，1H，H-8a），5.04（1H，d，J ＝ 10.9 Hz，H-8b）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：157.8（C-4），136.9（C-7），128.7（C-8），127.9（C-2/6），115.8（C-3/5），111.1（C-1）。以上数据与文献报道一致[8]，故鉴定化合物 **2** 为 4- 乙烯基苯酚。

化合物 **3**：黄色粉末。ESI-MS *m/z*：301.0 [M ＋ H] $^+$。^{1}H NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.39（2H，m，H-2'/6'），6.90（1H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-5'），6.55（1H，s，H-3），6.45（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-8），6.21（1H，d，J ＝ 2.1 Hz，H-6），4.60（3H，s，4'-OCH_3）。^{13}C NMR（100 MHz，

CD_3OD）δ：182.2（C-4），164.6（C-2），164.1（C-7），161.9（C-5），157.8（C-9），151.2（C-4'），148.3（C-3'），122.9（C-1'），120.9（C-6'），116.3（C-5'），110.9（C-2'），104.2（C-10），103.8（C-3），99.3（C-6），94.5（C-8），56.5（4'-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[9]，故鉴定化合物 **3** 为香叶木素。

化合物 **4**：黄色粉末。ESI-MS *m/z*：299.1 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：12.83（1H，s，5-OH），7.85（2H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-3'/5'），7.02（2H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-2'/6'），6.59（1H，s，H-3），6.49（1H，d，J ＝ 2.2 Hz，H-6），6.37（1H，d，J ＝ 2.2 Hz，H-8），3.90（3H，s，7-OCH_3），3.89（3H，s，4'-OCH_3）。^{13}C NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：182.5（C-4），165.5（C-7），164.1（C-2），162.6（C-5），162.2（C-4'），157.8（C-9），128.1（C-2'/6'），123.7（C-1'），114.7（C-3'/5'），105.2（C-10），104.5（C-3），98.1（C-6），92.8（C-8），55.9（7-OCH_3），55.7（4'-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[10]，故鉴定化合物 **4** 为 5-羟基 -7，4'- 二甲氧基黄酮。

化合物 **5**：黄色粉末。ESI-MS *m/z*：329.1 [M＋H]$^+$。H NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：12.78（s，5-OH），7.85（2H，d，J ＝ 8.9 Hz，H-3'/5'），7.02（2H，d，J ＝ 8.9 Hz，H-2'/6'），6.60（1H，br s，H-8），6.55（1H，br s，H-6），3.98（3H，s，7-OCH_3），3.93（3H，s，3-OCH_3），3.90（3H，s，4'-OCH_3）。^{13}C NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：178.9（C-4），165.4（C-7），155.9（C-2），162.0（C-5），161.6（C-4'），156.8（C-9），155.9（C-2），138.9（C-3），130.1（C-2'/6'），122.9（C-1'），114.0（C-3'/5'），106.2（C-10），138.9（C-3），97.8（C-6），92.2（C-8），60.2（3-OCH_3），55.8（7-OCH_3），55.5（4'-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[11]，故鉴定化合物 **5** 为 5- 羟基 -3，7，4'- 三甲氧基黄酮。

化合物 **6**：无色粉末。ESI-MS *m/z*：345.1 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.92（1H，br s，H-2'），6.79（2H，m，H-5'/6'），5.90（d，J ＝ 2.2 Hz，1H，H-8），5.88（1H，d，J ＝ 2.2 Hz，H-6），5.28（1H，dd，J ＝ 12.7，3.0 Hz，H-2），4.62（12H，s，OCH_3-5/7/3'/4'），3.07（1H，dd，J ＝ 17.2，12.7 Hz，H-3a），2.70（1H，dd，J ＝ 17.2，3.0 Hz，H-3b）。^{13}C NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：188.0（C-4），165.4（C-7），164.4（C-9），161.7（C-5），149.1（C-4'），148.8（C-3'），131.1（C-1'），119.2（C-6'），111.4（C-5'），110.5（C-2'），105.5（C-10），93.6（C-8），92.8（C-6），78.6（C-2），55.5（OCH3），44.8（C-3）。以上数据与文献报道一致[12]，故鉴定化合物 **6** 为 5，7，3'，4'- 四甲氧基黄酮。

化合物 **7**：无色粉末。ESI-MS *m/z*：273.1 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.48（1H，d，J ＝ 8.7 Hz，H-5），6.93（1H，d，J ＝ 1.9 Hz，H-2'），6.81（1H，dd，J ＝ 8.7，2.3 Hz，H-6），6.75（1H，d，J ＝ 2.3 Hz，H-8），6.00（2H，d，J ＝ 8.2 Hz，H-5'），6.02（2H，dd，J ＝ 8.2，1.9 Hz，H-6'），5.30（1H，dd，J ＝ 12.7，2.8 Hz，H-2），3.14（1H，dd，J ＝ 17.1，12.7 Hz，H-3a），2.72（1H，dd，J ＝ 17.1，2.8 Hz，H-3b）。^{13}C NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：190.6（C-4），165.2（C-7），164.6（C-9），146.2（C-4'），146.2（C-3'），132.3（C-1'），129.5（C-5），119.3（C-6'），116.1（C-5'），115.3（C-10），114.3（C-2'），115.3（C-10），111.3（C-6），103.7（C-8），80.5（C-2），44.7（C-3）。以上数据与文献报道一致[13]，故鉴定化合物 **7** 为 7，3'，4'- 三羟基二氢黄酮。

化合物 **8**：白色结晶。ESI-MS *m/z*：457.4 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：5.22（1H，t，J ＝ 3.6 Hz，H-12），3.15（1H，dd，J ＝ 11.3，4.6 Hz，H-3），1.12（3H，s，H-27），0.98（3H，s，H-23），0.97（3H，s，H-29），0.95（3H，s，H-25），0.88（3H，d，J ＝ 6.5 Hz，H-30），0.84（3H，s，H-26），0.77（3H，s，H-24）。^{13}C NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：178.7（C-28），138.6（C-13），125.1（C-12），77.4（C-3），55.1（C-5），52.9（C-18），47.6（C-17），47.1（C-9），40.0（C-14），39.7（C-19），39.4（C-4），39.3（C-8），38.5（C-1），38.3（C-20），38.5（C-1），37.5（C-22），36.9（C-10），33.2（C-7），30.8（C-21），28.4（C-15），27.5（C-23），27.4（C-2），24.7（C-16），23.5（C-11），23.3（C-27），21.5（C-29），18.4（C-6），16.8（C-26），16.1（C-30），15.5（C-24），14.9（C-25），16.8（C-26），16.1（C-30）。以上数据与文献报道一致[14]，故鉴定化合物 **8** 为熊果酸。

化合物 **9**：白色粉末。ESI-MS *m/z*：417.4 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：5.35（1H，d，J ＝ 5.2 Hz，H-6），3.58（1H，m，H-3），1.01（3H，s，CH_3-18），0.92（3H，d，J ＝ 6.5 Hz，CH_3-21），0.80（9H，m，CH_3-26/27/29），0.68（3H，s，CH_3-19）。^{13}C NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：140.8（C-5），122.0（C-6），72.1（C-3），56.8（C-14），56.1（C-17），50.5（C-9），46.2（C-24），42.6（C-13），42.4（C-4），40.2（C-12），37.3（C-1），36.7（C-10），36.2（C-20），34.0（C-7），32.1

（C-22），31.7（C-8），29.3（C-25），29.3（C-16），28.4（C-23），26.3（C-2），24.6（C-15），23.5（C-28），21.5（C-11），19.7（C-27），19.2（C-29），19.2（C-18），18.4（C-21），12.2（C-26），12.0（C-19）。以上数据与文献报道一致[15]，故鉴定化合物 **9** 为 *β*-谷甾醇。

化合物 **10**：白色粉末。ESI-MS *m/z*：579.5 [M＋H]$^+$。^{1}H NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：5.37（1H，d，J ＝ 5.3 Hz，H-6），4.38（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.13（1H，dd，J ＝ 9.1，7.8 Hz，H-3），1.03（3H，s，CH_3-18），0.95（3H，d，J ＝ 6.5 Hz，CH_3-21），0.86（3H，d，J ＝ 2.0 Hz，CH_3-26），0.85（3H，d，J ＝ 3.5 Hz，CH_3-27），0.72（3H，s，CH_3-19）。^{13}C NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：140.3（C-5），121.1（C-6），100.5（C-1'），76.9（C-5'），76.8（C-3），76.5（C-3'），73.5（C-2'），70.2（C-4'），61.2（C-6'），56.1（C-14），55.3（C-17），49.5（C-9），45.2（C-24），41.9（C-4），41.8（C-13），38.0（C-12），36.9（C-1），36.0（C-10），35.5（C-20），33.5（C-22），31.3（C-8），31.0（C-7），29.2（C-2），28.7（C-25），27.7（C-16），25.5（C-23），24.0（C-15），22.5（C-28），20.5（C-11），19.8（C-26），19.2（C-19），18.9（C-21），18.8（C-27），11.9（C-29），11.8（C-18）。以上数据与文献报道一致[16]，故鉴定化合物 **10** 为胡萝卜苷。

化合物 **11**：白色晶体。ESI-MS *m/z*：179.1 [M－H]$^-$。^{1}H NMR（500 MHz，D_2O）δ：5.10（1H，d，J ＝ 3.7 Hz，*α*-form），4.51（1H，d，J ＝ 8.0 Hz，*β*-form）。^{13}C NMR（125 MHz，D_2O）*α*-form：δ：95.9（C-1），75.9（C-5），75.7（C-3），74.1（C-2），69.6（C-4），60.7（C-6）。*β*-form δ：92.0（C-1），72.7（C-3），71.4（C-2），71.4（C-5），69.6（C-4），60.6（C-6）。以上数据与文献报道一致[17]，故鉴定化合物 **11** 为葡萄糖。

化合物 **12**：无色结晶。ESI-MS *m/z*：341.1 [M－H]$^-$。^{1}H NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ：5.15（1H，d，J ＝ 3.6 Hz，H-1）。^{13}C NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：104.4（C-1），92.2（C-1'），82.9（C-2），77.4（C-3），74.6（C-4），73.3（C-3'），73.2（C-5'），72.0（C-2'），70.2（C-4'），62.5（C-6），62.4（C-6'），60.9（C-5）。以上数据与文献报道一致[18]，故鉴定化合物 **12** 为蔗糖。

4 讨论

植物次生代谢物是天然产物的重要来源，包含各种类型的化合物。本课题组长期致力于研究莎草科植物——水葱，从水葱中主要分离得到了黄酮类、有机酸类、大环酚苷类、糖类、帖类、甾类等化合物[3-5]。本文是第一次对水葱的化学成分进行系统研究，为水葱后续的药用开发提供了物质基础和科学依据。后续我们将对水葱的生物活性实验及其药理作用机制进行研究。

参考文献

[1] 张群，朱义，崔心红 . 不同种植方式对黄菖蒲、水葱和菖蒲 3 种挺水植物生长的影响 [J]. 中国农学通报，2014，30（28）：210-216.

[2] 鲍永喆，王维俊，范敬龙，等 . 水葱与香蒲对微咸水中 TN、TP、Pb 及 Cd 的去除率研究 [J]. 环境保护科学，2020，46（5）：81-86.

[3] Peng D，Lin X，Jiang L，et al. Five macrocyclic glycosides from Schoenoplectus tabernaemontani [J]. Nat Prod Res，2019，33（3）：427-434.

[4] 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.

[5] 彭谷，黄娟，周应军，等 . 水葱化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（19）：4902-4906.

[6] Gong J，Xu W，Ma Y，et al. Overview of pharmacological & ecological research of Scirpus tabernaemontani Gmel [J]. ASTI，2015，16（3）：493-496.

[7] Jacinto Demuner A，Moreira Valente VM，Almeida Barbosa LC，et al. Synthesis and phytotoxic activity of new pyridones derived from 4-hydroxy-6-methylpyridin-2（1H）-one [J]. Molecules，2009，14（12）：4973-4986.

[8] Ayer WA，Muir DJ，Priyotosh C. Phenolic and other metabolites of Phellinus pini，a fungus pathogenic to pine [J]. Phytochemistry，1996，42（5）：1321-1324.

[9] 刘伟，白素平，梁会娟，等 . 小叶忍冬藤的化学成分研究 [J]. 中草药，2010，41（7）：1065-1068.

[10] 王锦越，陈东，梁丽娟，等 . 野菊花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2010，35（6）：718-721.

[11] 杨国恩，宝丽，张晓琦，等 . 黄花蒿中的黄酮化合物及其抗氧化活性研究 [J]. 中药材，2009，32（11）：1683-1686.

[12] 王亚芸，马国需，黄真，等 . 外来入侵植物飞机草的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2016，51（9）：698-702.

[13] Phu DH，Tho LH，Nhan NT. Flavonoids from the stem barks of Swintonia griffithii Kurz（Anacadiaceae）and their tyrosinase inhibitory activities [J]. Vietnam J Chem，2019，57（5）：581-584.

[14] 张健，殷志琦，梁敬钰，等 . 络石藤石油醚萃取部位化学成分的研究 [J]. 中成药，2012，34（10）：1939-1942.

[15] 白丽明，高鸿悦，马玉坤，等 . 鼠曲草化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药，2016，47（4）：549-553.

[16] 卢静，杨丰庆，夏之宁 . 尖嘴林檎叶的化学成分 [J]. 中成药，2014，36（8）：1692-1696.

[17] 肖洪明，祖灵博，李石平，等 . 掌叶覆盆子化学成分的研究 [J]. 中国药物化学杂志，2011，21（3）：220-226.

[18] 赵军，常军民，堵年生 . 枝穗大黄化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2002（4）：44-45.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-03-05）

摘蕾对三七中皂苷类成分的影响

张诗焉，潘建英，郭宜欣，唐诗成，孙志蓉，张子龙*（北京中医药大学中药学院，北京　102488）

摘要：目的　研究摘蕾对三七药材中皂苷含量的影响。**方法**　采用 HPLC 法测定建水、文山两产地摘蕾、留籽三七中 5 种皂苷成分（三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd）的含量，分析摘蕾对各成分含量的影响。**结果**　摘蕾对三七皂苷 R_1（$P < 0.01$），人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1（$P < 0.05$）的含量有显著影响，留籽三七中三七皂苷 R_1，人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 的含量分别比摘蕾三七提高 96.37%、42.29%、24.62%、7.47%，摘蕾和留籽三七中 5 种单体皂苷所占比例分别为 7∶48∶5∶34∶6、10∶50∶3∶32∶5；两产地三七中各单体皂苷成分含量及占比也存在差异；摘蕾与产地的交互作用对三七皂苷 R_1（$P < 0.05$），人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd（$P < 0.01$）的含量有显著影响。**结论**　产地与摘蕾显著影响三七皂苷类成分；与摘蕾相比，留籽三七中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 含量显著提高；摘蕾后 5 种单体皂苷成分占比发生明显改变。

关键词：三七；摘蕾；高效液相色谱法；皂苷
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2537-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.014

Effect of inflorescence removal on saponins in notoginseng radix et Rhizome

ZHANG Shi-yan, PAN Jian-ying, GUO Yi-xin, TANG Shi-cheng, SUN Zhi-rong, ZHANG Zi-long*
(*College of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To determine the effect of inflorescence removal on the content of saponins in notoginseng radix et Rhizome. **Methods**　The content of 5 saponins (notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Re, ginsenoside Rb_1, and ginsenoside Rd) undergoing inflorescence removal and seed retention in Jianshui and Wenshan was determined by HPLC. The effect of inflorescence removal on different components was analyzed. **Results**　Inflorescence removal had significant differences on the content of notoginsenoside R_1 ($P < 0.01$), ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Rb_1 ($P < 0.05$). The content of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1 and ginsenoside Rd in the seed retained notoginseng radix et Rhizome increased by 96.37%, 42.29%, 24.62% and 7.47% respectively, as compared with inflorescence removed notoginseng radix et Rhizome. The proportions of 5 major monomer saponins in inflorescence removed and seed retained notoginseng radix et Rhizome were 7∶48∶5∶34∶6 and 10∶50∶3∶32∶5 respectively. The content and proportion of saponins in notoginseng radix et Rhizome from the two areas were different. The interaction between producing region and inflorescence removal had significant influence on the content of notoginsenoside R_1 ($P < 0.05$), ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1 and ginsenoside Rd ($P < 0.01$). **Conclusion**　Producing region and inflorescence removal have significant effect on the content of saponins in notoginseng radix et Rhizome. Seed retention can greatly increase the content of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Rb_1 as compared with that of inflorescence removal, and the proportion of 5 monomer saponins changes obviously.

Key words: notoginseng radix et Rhizome; inflorescence removal; HPLC; saponin

基金项目：财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目（No.CARS-21）。
作者简介：张诗焉，女，在读硕士研究生，主要从事中药资源质量评价，email：17864191186@163.com　*通信作者：张子龙，男，副研究员，主要从事中药材质量调控研究，email：zhangzilong76@163.com

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen 的干燥根和根茎，性味甘、微苦、温，归肝、胃经，具有散瘀止血、消肿定痛的功效[1]。目前从三七中发现的皂苷成分包括三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 等 70 余种[2]，具有活血、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用[3-6]。《中国药典》2020 年版将人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 及三七皂苷 R_1 总量（不少于 5%）作为三七质量控制的重要指标[1]。

摘蕾是三七栽培过程中的重要农艺措施。诸多研究表明，药用植物栽培过程中，摘除花部可以促进植物的营养生长，有助于药用部位活性成分的积累[7-8]。我国《七十六种药材商品规格标准》按照“摘蕾结籽与否”将商品三七分为“春七”和“冬七”两类，“春七”在秋季摘蕾后采挖，质地坚实、质量较优；“冬七”在冬季结籽后采挖，多干瘪质松[9]。摘蕾有利于减少养分损失，提高三七中皂苷类成分含量及块根产量[10]。但也有研究发现，“春七”中部分皂苷含量低于“冬七”[11]，目前尚未建立科学、规范的三七栽培管理措施。本研究采用 HPLC 法测定同一种植条件及采收时间下，在云南建水、文山两产地种植的摘蕾、留籽三七中 5 种皂苷成分（三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd）的含量，分析摘蕾、留籽对三七中皂苷成分的影响，为三七栽培管理措施的优化提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

以同一种源、同期移栽的三七植株为供试药材，经北京中医药大学张子龙副研究员鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen 3 年生植株。采用两因素两水平析因设计，在云南建水、文山两地均设置摘蕾和留籽处理，3 次重复，统一进行施肥及田间管理。摘蕾处理于每年花蕾生长至 5 cm 左右时将其摘除，以留籽处理为对照。2019 年 11 月 24 日采挖，将三七主根用清水冲洗干净，于烘箱中 105 ℃杀青 30 min，50 ℃烘干至恒重，存放于北京中医药大学中药资源室样品库备用。

1.2 仪器与试药

e2695 型 Waters 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），包括四元泵、2489 型紫外 / 可见分光检测器、在线脱气机、Empower 工作站；BSA124S 型电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；电热恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；200T 型高速多功能粉碎机（广州市渲龙厨具有限公司）；电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

对照品三七皂苷 R_1（批号：110745-201921，质量分数：90.4%）、人参皂苷 Rg_1（批号：110703-202034，质量分数：94.0%）、人参皂苷 Re（批号：110754-202028，质量分数：93.9%）、人参皂苷 Rb_1（批号：110704-202028，质量分数：93.1%）、人参皂苷 Rd（批号：111818-201603，质量分数：92.1%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈（色谱纯，Thermo Fisher Scientific 公司），其余试剂均为分析纯；水为纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 适量，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容，配制成 0.5000 mg·mL^{-1} 的混合对照品储备液。将混合对照品储备液加入甲醇梯度稀释，分别配成质量浓度为 0.3000、0.1800、0.1080、0.0648、0.0389 mg·mL^{-1} 的线性检测溶液。

2.2 供试品溶液的制备

三七样品粉碎，过 100 目筛，精密称取 0.6000 g，置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇，密塞，称重，放置过夜。于 80 ℃水浴加热回流 2 h，放冷，再次称重，甲醇补足失重，摇匀，取续滤液，过 0.45 μm 微孔滤膜于液相小瓶中，即得。

2.3 色谱条件[11-12]

色谱柱为 XBridge C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）。流动相为乙腈 - 水，梯度洗脱：0 ～ 20 min，20% 乙腈；20 ～ 45 min，20% ～ 45% 乙腈；45 ～ 55 min，45% ～ 55% 乙腈；55 ～ 60 min，55% 乙腈；60 ～ 70 min，55% ～ 20% 乙腈。流速 1 mL·min^{-1}；检测波长 203 nm；进样量 20 μL；柱温 25 ℃。在此条件下，混合对照品溶液及三七供试品溶液色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.1”项下的线性检测溶液进样测定，以峰面积为纵坐标（*Y*），质量浓度为横坐标（*X*），绘制标准曲线，计算回归方程及相关系数，见表 1。结果显示三七中的 5 种成分在各自线性范围与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液，连续进样 6 次，测得 5 种成分峰面积的 *RSD* 均为 1.1%，表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批建水摘蕾

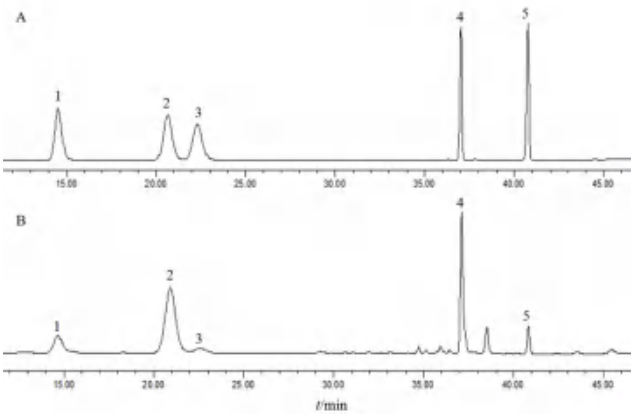


图 1　混合对照品溶液（A）与供试品溶液（B）的 HPLC 图

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

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

表 1　皂苷成分的线性回归方程

Tab 1　Linear regression equation of saponin components

化合物	回归方程	线性范围 /（mg・mL^{-1}）	r
三七皂苷 R_1	$Y=6\times10^6X-7.83\times10^4$	0.5040 ～ 0.0392	1.0000
人参皂苷 Rg_1	$Y=7\times10^6X-7.89\times10^4$	0.5000 ～ 0.0389	0.9999
人参皂苷 Re	$Y=6\times10^6X-1.53\times10^4$	0.5010 ～ 0.0390	0.9999
人参皂苷 Rb_1	$Y=5\times10^6X+4.29\times10^4$	0.5030 ～ 0.0391	0.9999
人参皂苷 Rd	$Y=6\times10^6X+5.98\times10^4$	0.4970 ～ 0.0386	0.9999

三七药材粉末 6 份，按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 峰面积的 *RSD* 分别为 1.1%、1.2%、1.2%、1.1%、1.1%，表明该方法重复性较好。

2.4.4　稳定性试验　取同一份建水摘蕾三七样品，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于样品制备后的 0、3、6、9、12、24 h 进行测定。结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 峰面积的 *RSD* 值分别为 1.5%、0.33%、2.0%、0.21%、1.5%，表明供试品溶液中的 5 个成分在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5　加样回收试验　精密称取已知含量的建水摘蕾三七样品 0.1 g，平行精密称定 6 份，置于具塞锥形瓶中。分别精密加入对照品三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算得到 5 种成分平均加样回收率在 95.12% ～ 103.57%，*RSD* 在 0.090% ～ 1.5%，满足回收率的限度，表明方法准确度较好。

2.5　样品含量测定

三七样品按“2.2”项下方法制备成供试品溶液，进样测定，计算样品中 5 种成分的含量。

2.6　数据处理

数据采用 Microsoft Excel software 2007 录入数据，以 SPSS 20.0 进行方差分析。

3　结果与分析

3.1　三七药材中皂苷类成分含量变化

对不同处理下三七中皂苷含量的变幅、极差及 *RSD* 等（见表 2）进行分析发现，三七中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 百分含量的平均值分别为 1.07%、6.38%、0.57%、4.23%、0.73%，*RSD* 值均超过 34.33%，其中，人参皂苷 Re 的 *RSD* 最大，为 56.41%。三七中人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 变幅较大，极差分别达到 7.99%、4.56%。三七皂苷 R_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd 的变幅较小，相应的极差依次为 1.59%、1.11%、0.90%。3 种皂苷（R_1 ＋ Rg_1 ＋ Rb_1）、5 种皂苷（R_1 ＋ Rg_1 ＋ Re ＋ Rb_1 ＋ Rd）的变幅较单种皂苷增大，分别为 6.26% ～ 19.34%、6.92% ～ 21.09%，极差分别为 13.08%、14.17%。可见产地及摘蕾对皂苷含量的影响较大。

表 2　三七药材中皂苷成分含量的分析结果 (%)

Tab 2　Content of saponins in notoginseng radix et Rhizome (%)

成分	平均值	变幅	极差	*RSD*
三七皂苷 R_1	1.07	0.46 ～ 2.05	1.59	44.36
人参皂苷 Rg_1	6.38	3.14 ～ 11.13	7.99	38.72
人参皂苷 Re	0.57	0.27 ～ 1.38	1.11	56.41
人参皂苷 Rb_1	4.23	1.89 ～ 6.45	4.56	34.72
人参皂苷 Rd	0.73	0.35 ～ 1.25	0.90	41.19
R_1 ＋ Rg_1 ＋ Rb_1	11.69	6.26 ～ 19.34	13.08	34.45
R_1 ＋ Rg_1 ＋ Re ＋ Rb_1 ＋ Rd	12.98	6.92 ～ 21.09	14.17	34.33

3.2　摘蕾对三七药材中皂苷类成分影响

采用 SPSS 软件分别对三七皂苷 R_1 及人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 含量进行方差分析（见表 3），结果发现产地对三七中 5 种皂苷成分含量差异无统计学意义（$P>0.05$）。摘蕾对三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 含量的影响显著（$P<0.05$）。产地和摘蕾的交互作用对三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 含量影响显著（$P<0.05$），对人参皂苷 Re 影响不显著。

分析摘蕾对三七中皂苷成分含量的影响发现，除人参皂苷 Re 外，留籽三七中其余 4 种单体皂苷含量及 R_1 ＋ Rg_1 ＋ Rb_1 总量、R_1 ＋ Rg_1 ＋ Re ＋ Rb_1 ＋ Rd 总量均高于摘蕾三七，且三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 含量显著提高（$P<0.05$，$P<0.01$）。摘蕾与留籽处理三七中 3

种皂苷总量（R_1 + Rg_1 + Rb_1）均不少于 5%，符合《中国药典》2020 年版规定，且留籽三七中 3 种皂苷总量高于摘蕾三七，R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 总量高于摘蕾三七，结果详见表 4。摘蕾三七 5 种单体皂苷所占比例大致为 7∶48∶5∶34∶6，留籽三七 5 种皂苷比例 10∶50∶3∶32∶5。

表 3　三七中 5 种皂苷含量的方差分析

Tab 3　Variance analysis of 5 saponins in notoginseng radix et Rhizome

成分	产地		摘蕾		产地 * 摘蕾	
	F 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值
三七皂苷 R_1	1.747	0.223	20.799	0.002	8.161	0.021
人参皂苷 Rg_1	0.737	0.415	5.611	0.045	13.272	0.007
人参皂苷 Re	1.408	0.269	0.178	0.684	4.194	0.075
人参皂苷 Rb_1	4.181	0.075	6.014	0.040	42.163	0.000
人参皂苷 Rd	2.470	0.155	0.213	0.656	17.208	0.003

表 4　摘蕾对三七中皂苷含量的影响 (%，$\bar{x}\pm s$，$n = 6$)

Tab 4　Effect of inflorescence removal on content of saponins in notoginseng radix et Rhizome (%，$\bar{x}\pm s$，$n = 6$)

成分	摘蕾	留籽
三七皂苷 R_1	0.73±0.26	1.42±0.43**
人参皂苷 Rg_1	5.27±1.99	7.50±2.78*
人参皂苷 Re	0.60±0.45	0.53±0.19
人参皂苷 Rb_1	3.77±1.80	4.70±1.19*
人参皂苷 Rd	0.70±0.39	0.75±0.25
R_1 + Rg_1 + Rb_1	9.76±3.66	13.62±4.07
R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd	11.06±4.40	14.90±4.42

注：与摘蕾比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

Note：Compared with inflorescence removal，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$.

3.3　摘蕾对不同产地三七皂苷类成分的影响

3.3.1　摘蕾对建水三七皂苷类成分影响　在建水采集的三七中（见图 2），与摘蕾相比，留籽三七中 5 种单体皂苷及 R_1 + Rg_1 + Rb_1、R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 的含量呈现不同程度的升高，三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd、R_1 + Rg_1 + Rb_1、R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 含量分别高于摘蕾三七 187.08%、142.82%、86.32%、157.12%、138.83%、151.40%、147.93%。其中，对人参皂苷 Rg_1、R_1 + Rg_1 + Rb_1、R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 含量有显著影响（$P < 0.01$），对三七皂苷 R_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 含量无显著影响（$P > 0.05$）。摘蕾三七 5 种皂苷比例 8∶53∶5∶29∶5，留籽三七 5 种皂苷比例 10∶52∶3∶30∶5。

3.3.2　摘蕾对文山三七皂苷类成分影响　在文山采集的三七中（见图 2），留籽与摘蕾相比，除三七皂苷 R_1 含量提高 30.98% 外，其余 4 种皂苷成分及 R_1 + Rg_1 + Rb_1、R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 的含量均有不同程度的降低，其中，摘蕾三七中人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd、R_1 + Rg_1 + Rb_1、R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 含量分别高于留籽三七 18.22%、48.25%、28.39%、40.78%、19.26%、22.49%。仅对 R_1 + Rg_1 + Re + Rb_1 + Rd 含量有显著影响（$P < 0.05$），三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rd 及 R_1 + Rg_1 + Rb_1 含量差异无统计学意义。摘蕾三七 5 种皂苷比例 6∶45∶6∶36∶7，留籽三七 5 种皂苷比例 10∶47∶4∶34∶5。

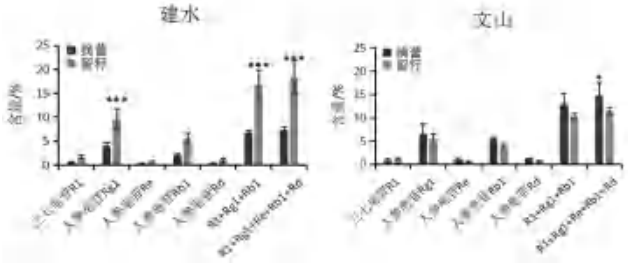


图 2　摘蕾对建水、文山三七中皂苷含量的影响

Fig 2　Effect of inflorescence removal on the content of saponins in notoginseng radix et Rhizome in Jianshui and Wenshan

注：与摘蕾比较，***$P < 0.001$。

Note：Compared with inflorescence removal，***$P < 0.001$.

4　讨论与结论

摘蕾是药用植物生长过程中常用的植株调整措施，如多花黄精、桔梗、人参等[7-11，13]，常通过抑制生殖生长促进植物生长发育及提高药材质量。传统认为，三七种子成熟阶段会从根部消耗能量，因此，2 ～ 3 年生三七常在花蕾生长到 3 ～ 5 cm 时进行摘除，以促进三七光合产物向根部储藏，提高根茎的产量、质量及增强抗病能力[14-15]。但是，诸多研究发现摘蕾处理不利于有效成分的积累，例如，研究打花处理的“春七”和留种处理的“冬七”发现，同一产地同一采收时间下的冬七皂苷含量要高于春七，不同规格冬七中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd 等单体皂苷及 Rg_1 + Rb_1 + R_1 皂苷总量均大于春七[16]；在摘蕾处理后，10 年生和 15 年生上坡位和中坡位的桓仁山参总皂苷含量略有降低[17]。除此之外，不同产地对根茎类中药材的质量存在较大影响[16]。基于此，本研究采用二因素二水平析因设计，比较两产区摘蕾及留籽处理三七的品质，通过科学的方法较好地控制实验误差。

本研究结果表明，摘蕾显著降低三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 的含量，留籽三七中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷

Rb_1、人参皂苷 Rd 分别高于摘蕾三七 96.37%、42.29%、24.62%、7.47%。与留籽相比，摘蕾三七中的三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rg_1 含量在 5 种皂苷总量中的占比有所降低，其余 3 种皂苷含量在 5 种皂苷总量中的占比有所提高。有研究发现云南文山冬七、春七中 5 种单体皂苷所占比例类似[11]，与本实验结果不一致。可见，摘蕾可能通过调控植株生长使物质分配关系发生了改变。而植物的生长调控行为是基因表达的结果，例如，通过抑制 CAS 的表达，可以抑制植物甾醇分支的合成代谢通路，促进三七中皂苷合成[18]。结合前期研究结果，摘蕾处理下，三七根、根茎、叶中与皂苷生物合成相关的甲羟戊酸途径（MVA）和 2-C- 甲基 -*D*- 赤癣糖醇 -4- 磷酸途径（MEP）的基因被激活，显著影响根部基因表达[19]。因此，在三七生长过程中，摘蕾可能促进或抑制了皂苷合成相关基因的表达，进而引起皂苷含量的变化，其潜在调控机制尚有待进一步研究。

不同产地的土壤成分、降水、温度、地形等有差异，均会对三七产量和质量产生影响[20]。例如，刘大会等[16]通过对红河州泸西县、建水县和文山州砚山县 3 个产地的 3 年生春七进行分析发现，产地间皂苷成分差异较大，可能与产地之间的种植地域气候、土壤类型和田间管理水平有关。但本研究的方差分析结果表明产地对三七中 5 种皂苷成分含量均无显著影响，而产地和摘蕾却存在交互作用。两产区不同处理三七中各皂苷含量具有差异性，其中，建水留籽三七中各皂苷成分含量较摘蕾三七提升约 86.32% ～ 187.08%；而文山三七中，除三七皂苷 R_1 外，摘蕾三七的其余 4 种皂苷含量较留籽三七提升 18.22% ～ 48.25%。此差异可能与两产地三七的生长环境有关，且由于实验条件限制，本实验产地数量选取不足对实验结果也有一定的影响，在今后的工作中将进一步深入探索。

综上所述，产地与摘蕾均为影响三七皂苷类成分的重要因素；除人参皂苷 Re 外，留籽三七中的三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 含量分别比摘蕾三七显著提高 97.01%、42.32% 和 24.64%；摘蕾引起 5 种主要单体皂苷成分比例的改变。上述结论初步揭示了摘蕾对三七皂苷类成分的影响，可为三七药材质量调控提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：12.

[2] 王莹，褚扬，李伟，等 . 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2015，46（9）：1381-1392.

[3] Wang PW，Du XY，Xiong MQ，et al. Ginsenoside Rd attenuates breast cancer metastasis implicating derepressing microRNA-18a-regulated Smad2 expression [J]. Sci Rep，2016，6：33709.

[4] 曾江，崔秀明，周家明，等 . 三七根茎的化学成分研究 [J]. 中药材，2007，30（11）：1388-1391.

[5] 张静静，刘桂芹，王庆鹏，等 . 植物三七中皂苷类化学成分的研究进展 [J]. 聊城大学学报（自然科学版），2018，31（2），43-52，59.

[6] 宋建平，曾江，崔秀明，等 . 三七根茎的化学成分研究（Ⅱ）[J]. 云南大学学报（自然科学版），2007，29（3）：287-290，296.

[7] 杨清平，陈双林，郭子武，等 . 摘花和打顶措施对毛竹林下多花黄精块茎生物量积累特征的影响 [J]. 南京林业大学学报（自然科学版），2021，45（2）：165-170.

[8] 万群芳，赵光磊，信小娟，等 . 人工摘花对大兴安岭地区桔梗产量和品质的影响 [J]. 安徽农业科学，2016，44（23）：114-115，150.

[9] 国家医药管理局，卫生部 . 七十六种药材商品规格标准 [S]. 1984：15.

[10] 龙扬 . HPLC 法测定不同采收期三七中有效成分含量 [J]. 亚太传统医药，2015，11（7）：24-25.

[11] 刘格，逄晓阳，芦晶，等 . 云南文山春七和冬七中皂苷类成分的 UPLC-MS/MS 及 HPLC 分析 [J]. 中南药学，2020，18（5）：838-843.

[12] 黄健，梁云飞，林双 . RP-HPLC 法测定三七养血胶囊中人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1、Rd 及三七皂苷 R_1 的含量 [J]. 轻工科技，2013，29（1）：104-105，109.

[13] 王英平，孔祥义，张连学，等 . 人参摘蕾对同化产物在植株体内及皂苷中分配的影响 [J]. 特产研究，1996（4）：16-18.

[14] Dong TTX，Cui XM，Song ZH，et al. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China：regional and seasonal variations in its active constituents [J]. J Agric Food Chem，2003，51（16）：4617-4623.

[15] 孙大雨，王德民，王彦波 . 不同季节及用药部位三七药材的质量分析 [J]. 黑龙江医药，2014，27（3）：634-635.

[16] 刘大会，徐娜，郭兰萍，等 . 三七药材质量特征和商品规格等级标准研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（5）：776-785.

[17] 田景鑫，蔡明，原庆贺 . 摘蕾和采收期对桓仁山参品质的影响研究 [J]. 中国林副特产，2021（4）：22-24.

[18] Yang Y，Ge F，Sun Y，et al. Strengthening triterpene saponins biosynthesis by over-expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene and RNA interference of cycloartenol synthase gene in *Panax notoginseng* cells [J]. Molecules，2017，22：581.

[19] Bai Y，Liu HJ，Pan JY，et al. Transcriptomics and metabolomics changes triggered by inflorescence removal in Panax notoginseng（Burk.）[J]. Front Plant Sci，2021，12：761821.

[20] 周建松，胡展育，赵芳，等 . 三七生境研究进展 [J]. 黑龙江农业科学，2019（2）：149-153.

（收稿日期：2022-04-14；修回日期：2022-06-05）

面向抗乳腺癌候选药物拮抗雌激素受体 α 生物活性的定量构效关系模型构建

吕婷婷[1，2]，禹文韬[3]，张慧琳[2*]（1.湖南中医药大学护理学院，长沙 410208；2.中南大学湘雅二医院，长沙 410011；3. 中南大学自动化学院，长沙 410000）

摘要：目的 建立抗乳腺癌候选药物的分子描述符与该药物拮抗雌激素受体 α（ERα）活性的定量构效关系（QSAR）预测模型，预测具有更好拮抗 ERα 活性的新药物分子或指导已有候选药物的结构优化。**方法** 使用某药物企业提供的乳腺癌 ERα 拮抗剂数据，首先通过改进的随机森林对化合物的分子结构描述符进行变量选择，选取前 20 个对生物活性具有显著影响的分子描述符；然后利用支持向量回归构建 20 个分子描述符对药物拮抗 ERα 活性的 QSAR 模型，再采用差分进化算法来优化模型的超参数。**结果** 数据经随机森林进行变量选择后从 729 个变量变为 20 个变量；对于药物拮抗 ERα 活性的基于支持向量回归的 QSAR 模型的拟合优度（R^2）为 0.7407，均方误差（*MSE*）为 0.7034；而经过差分进化算法优化的 QSAR 模型对于药物拮抗 ERα 活性的 R^2 为 0.935，*MSE* 为 0.1762。通过 R^2 和 *MSE* 的检验，优化后的模型具有较好的稳健性与较高的预测精度。**结论** 通过建立化合物分子描述符与其拮抗 ERα 活性的 QSAR 模型，找到对乳腺癌治疗药物的药物活性有重要影响的描述符，可用来指导乳腺癌新型治疗药物的设计。

关键词：乳腺癌；药物结构；定量构效关系；支持向量回归；差分进化算法；雌激素受体 α
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2542-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.015

Construction of quantitative structure-activity relationship model of biological of activity anti-breast cancer drug candidate estrogen receptor α

LYU Ting-ting[1,2], YU Wen-tao[3], ZHANG Hui-lin[2*](1. *School of Nursing, Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011; 3. *School of Automation, Central South University, Changsha* 410000)

Abstract: Objective To establish a quantitative structure-activity relationship (QSAR) prediction model of the molecular descriptor of anti-breast cancer drug candidate and the activity of the drug antagonistic estrogen receptor α (ERα), to predict new drug molecules with better ERα antagonistic activity or to optimize the structural of existing candidate drugs. **Methods** The ERα antagonistic data of breast cancer provided by a pharmaceutical company were used. The first 20 molecular descriptors with the most significant influence on the biological activity were selected by improved random forest, and then the QSAR model of 20 molecular descriptors of drug antagonism was constructed by support vector regression. A differential evolution algorithm was used to optimize the hyperparameters of the model. **Results** The data were changed from 729 variables to 20 variables after variable selection by random forest. The goodness of fit (R^2) and the mean square error (*MSE*) of the QSAR model based on support vector regression for drug antagonism ERα activity were 0.7407 and 0.7034. The QSAR model optimized by differential evolutionary algorithm had an R^2 of 0.935 and *MSE* of 0.1762 for drug antagonistic ERα activity. Through the test of R^2 and *MSE*, the optimized model was more robust and predicted accurately. **Conclusion** By establishing an QSAR model of compound molecular

基金项目：湖南省卫生健康委 2020 年科研立项课题（No.20201035）；2021 年度创新型省份建设专项科普专题立项项目（No. 2021ZK4180）。
作者简介：吕婷婷，女，硕士研究生，主要从事急危重症护理与数据分析，email：1067589583@qq.com *通信作者：张慧琳，女，主任护师，硕士研究生导师，主要从事临床医学与护理教育，email：zhanghuilin3477@csu.edu.cn

descriptors and their antagonistic ERα activity, we find the descriptors with important impact on the drug activity of breast cancer therapeutics, which can be used to guide the design of new breast cancer therapeutics.

Key words: breast cancer; drug structure; quantitative structure activity relationship; support vector regression; differential evolutionary algorithm; estrogen receptor α

乳腺癌已成为女性发病率和病死率最高的癌症[1]。乳腺癌的发展与雌激素受体（ER）密切相关，研究表明，雌激素受体α（estrogen receptors，ERα）是75%的乳腺癌的主要驱动因素[2]。目前，抗激素治疗常用于ERα表达的乳腺癌患者，其通过调节雌激素受体活性来控制体内雌激素水平[3]。因此，ERα被认为是治疗乳腺癌的重要靶标，能够拮抗ERα活性的化合物可能是治疗乳腺癌的候选药物。目前，在药物研发中，为了节约时间和成本，通常采用建立药物的定量构效关系（quantitative structure activity relationship，QSAR）[4-5]模型来筛选潜在活性药物。QSAR指针对与疾病相关的某个靶标，收集一系列作用于该靶标的药物及其生物活性数据，然后以一系列分子结构描述符作为自变量，化合物的生物活性值作为因变量，构建定量分析模型。在分子水平上阐明分子结构与药物的生物学及物理化学特性之间的关系[6]，为设计具有更好生物活性的新药物分子，以及指导已有活性药物的结构优化奠定基础。

化合物的分子结构描述符是指从分子结构中得到各种描述参数来表达物质的结构特征，主要包括经验参数与理论计算描述符两类[7]。其中经验参数包括油水分配系数、熔沸点等。理论计算描述符包括组成描述符、拓扑描述符、量子化学描述符、几何描述符等[8]。通常，抗乳腺癌候选药物的每个分子会含有几千个分子描述符。因此，为了降低模型复杂度、避免维度灾难，需要在QSAR建模前对描述符进行筛选，选择出对生物活性最具有影响的描述符。目前，常用的变量选择方法主要包括过滤法、包装法以及集成法三类[9]。过滤法主要通过计算自变量与目标变量之间的相关性来过滤不相关变量，代表方法为皮尔逊相关系数法、斯皮尔曼相关系数法等。包装法是基于机器学习的方法，将变量选择与分类或回归过程有机结合，通过计算变量与目标变量之间的重要性得分来进行筛选，代表方法有遗传算法（genetic algorithm，GA）、支持向量机（support vector machine，SVM）、随机森林（random forest，RF）等[10]。集成法是过滤法与包装法两者的结合，先用过滤法去除大量无关变量，再用包装法优化变量选择，常见的方法为Lasso方法。

QSAR自引入以来，经过50多年的发展，已经成为了最广泛使用的药物设计方法。QSAR通过函数或映射关系将分子结构描述符和预测终点联系起来[11]，近年来，各种机器学习算法被用于QSAR模型的构建[12-13]。Sanyal等[14]查找72个金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）抑制剂的分子活性，并使用PaDEL描述符、逐步多元线性回归和偏最小二乘法建立了QSAR模型，从而进行相关药物设计。Hdoufane等[15]使用合适的分子描述符建立了吲哚的QSAR模型，从而研发了128种吲哚附着抑制剂。已有研究表明，大多数非线性QSAR模型（如RF、SVM等）对药物活性的预测效果要优于线性模型（如最小二乘回归、偏最小二乘回归和岭回归）。

在现有QSAR方法研究的基础上，本文基于乳腺癌候选药物的数据特征改进的RF（improved random forest，IRF）方法来选择对拮抗ERα生物活性影响重要的分子描述符，然后基于SVM建立优化选择的分子描述符与ERα生物活性间的QSAR预测模型，以探讨影响药物拮抗ERα活性的结构因素，为已有候选药物的结构优化以及研发具有更好抗ERα活性的新药物提供依据。

1 资料与方法

1.1 数据

使用某药物研发企业提供的1974个化合物对ERα的生物活性数据集，包含1974个化合物的结构式，化合物对ERα的生物活性值（用IC_{50}表示，为实验测定值，单位是nmol·L^{-1}，其值越小，则生物活性越大，即抑制ERα活性越高），以及由IC_{50}值转化而得的pIC_{50}（即IC_{50}值的负对数，pIC_{50}值越大表明生物活性越高；实际QSAR建模中，本文采用pIC_{50}来表示生物活性值）。此外，该企业还提供了上述1974个化合物的729个分子描述符信息。

1.2 原理与方法

1.2.1 RF算法 RF基于集成学习的思想，将多

棵决策树进行集成，是筛选乳腺癌风险因素和抗乳腺癌药物结构的常用方法。RF 进行特征选择的优势在于其随机选择样本和特征，降低了决策树之间的相关性。

1.2.2 IRF 由于各分子描述符并非独立的，它们之间存在耦合，导致 RF 算法选择的特征存在共线性。为此，需要对 RF 算法进行改进。本文提出了基于数据规则的 IRF 算法，根据 729 个分子描述符的原始数据特点与分布情况，建立了单一值、相关性、零重要度这 3 个规则来约束 RF 搜索重要性高的分子描述符，并按照重要性对各个分子描述符进行排序。

① 单一值：当一个特征向量的值都为同一个值时，称该向量拥有单一值。显然，单一值在特征选择的问题上没有参考意义，因此，本文对该部分数据进行了清洗。

② 相关性：即考察变量与变量之间的关联程度。相关系数高的变量可能会引起共线性的问题，从而降低特征选择的精度。因此，本文中会删除一些相关系数值高于 0.7 的变量。

③ 零重要度：重要度衡量的是特征变量在预测分类变量时的作用大小。本文利用 IRF 算法，将特征变量作为输入数据。当该评分为零时，定义为零重要度，即模型判断该变量对分类和预测结果没有影响。

1.2.3 SVM 算法 SVM 将低维特征空间中非线性的高维数据映射到高维特征空间中，使得高维数据线性可分，从而利用常见的线性问题处理低维特征空间中的高度非线性分类、回归问题。本研究中，由于 IRF 筛选出的分子描述符与生物活性是非线性相关的，因此本文使用非线性映射能力强的 sigmoid 核函数构建基于 SVR 的 QSAR 预测模型。

1.2.4 变量重要性 变量重要性就是每个变量对回归结果的影响，计算各变量的重要性以评价预测变量对目标变量的影响程度。本文采用 Gini 系数来计算 RF 及 IRF 模型所选变量的重要性。

1.2.5 差分进化（differential evolution，DE）算法 尽管构建的 SVR 预测模型可以在理论上有效解决上述模型，但是在实际应用上 SVR 模型的效果很大程度取决于超参数的选择，合适的超参数是 SVR 模型具有良好学习能力和泛化性能的基础。采用启发式算法进行超参数优化，在启发式算法中，DE 算法因其简单易使用，鲁棒性强，搜索能力强，优化结果稳健等优势而受到广泛使用。影响 SVR 预测模型的参数主要有惩罚参数 c 和核函数参数 γ，所以将 c 和 γ 作为决策变量进行编码操作。

2 结果

2.1 IRF 筛选描述符

本文采用 IRF 算法来筛选抗乳腺癌化合物的描述符，以减少冗余和无用的信息。对于不满足 IRF 3 个规则的异常数据，本文将其删除。在此基础上，利用 RF 算法进行重要特征变量的选择。最终，去除了 709 个描述符，保留了对抗乳腺癌活性具有重要影响的 20 个描述符，将其作为 QSAR 模型的输入变量，见表 1。

2.2 基于 MLR 的 QSAR 模型及其验证

通过 IRF 算法挑选出的 20 个描述符与生物活性的相关性如图 1 所示，利用所选的 20 个描述符来建立基于 MLR 的候选药物的抗乳腺癌活性的 QSAR 模型。该模型的预测结果如图 2 所示。由图 2 可知基于 IRF 筛选出的特征变量之间的相关性得到了有效的降低，基于 IRF 的描述符筛选与 MLR 的 QSAR 型中的一些变量与 ERα 生物活性没有显著关系，因此本文使用非线性建模方法来建立更精确的 QSAR 模型。

2.3 基于 DE-SVR 的 QSAR 预测模型及其验证

2.3.1 模型建立 SVR 模型是经典的非线性回归模型，能有效预测生物活性。但是，在实际应用上 SVR 模型的效果很大程度取决于超参数的选择，合适的超参数是 SVR 模型具有良好学习能力和泛化性能的基础。传统的优化 SVR 超参数方法有随机搜索（random search，RAND）算法、梯度下降（stochastic gradient descent，SGD）算法等。以 RAND 算法为例，其迭代搜索超参数的步长随机，但是由于参数搜索空间较大，容易导致计算量庞大，进而耗费大量时间。针对此类典型的 NP-hard 问题，我们采用启发式算法进行超参数优化，以 SVR 模型为基础，使用 DE 算法来优化 SVR 模型的超参数，进而建立高精度的生物活性的 QSAR 模型。

本文选择均方误差（mean-square error，*MSE*）和拟合优度（R^2）作为模型预测性能的评价指标。为了减少计算时间和计算复杂度，以 *MSE* 作为目标函数进行超参数寻优，并将 R^2 作为一个约束条件，并且当 R^2 大于一个接受阈值 φ 时就停止寻优。

通过以上操作实现了基于 DE 算法对 SVR 预测模型超参数的优化，搜索到了最优的 c 和 γ，将其代入 SVR 预测模型进行训练，训练好的模型即可对候选药物的测试集样本数据进行预测。基于 DE-SVR 的 QSAR 模型伪代码如表 2 所示。

表 1　排名前 20 的分子描述符及重要程度评分

Tab 1　Top 20 molecular descriptors and importance scores

序号	分子描述符名称	描述符解释	重要性评分
1	minsssN	minimum atom-type E-State：＞N-	0.0981
2	LipoaffinityIndex	lipoaffinity index	0.0943
3	MDEC-23	molecular distance edge between all secondary and tertiary carbons	0.0756
4	maxHsOH	maximum atom-type H E-State：-OH	0.0533
5	MLogP	mannhold LogP	0.0257
6	minHsOH	minimum atom-type H E-State：-OH	0.0256
7	MLFER_A	overall or summation solute hydrogen bond acidity	0.0242
8	C1SP2	doubly hound carbon bound to one other carbon	0.0240
9	BCUTc-11	nhigh lowest partial charge weighted BCUTS	0.0238
10	maxssO	maximum atom-type E-State：-O-	0.0164
11	VC-5	valence cluster，order 5	0.0163
12	nHBAcc	number of hydrogen bond acceptors（using CDK Hbond Acceptor Count Descriptor algorithm）	0.0141
13	minHBint5	minimum E-State descriptors of strength for potential Hydrogen Bonds of path length 5	0.0112
14	minsOH	minimum atom-type E-State：-OH	0.0105
15	hmin	minimum H E-State	0.0092
16	ATSc2	ATS autocorrelation descriptor，weighted by charges	0.0072
17	BCUTp-1h	nlow highest polarizability weighted BCUTS	0.0066
18	TopoPSA	topological polar surface area	0.0065
19	WTPT-5	sum of path lengths starting from nitrogens	0.0065
20	XLogP	XLogP	0.0064

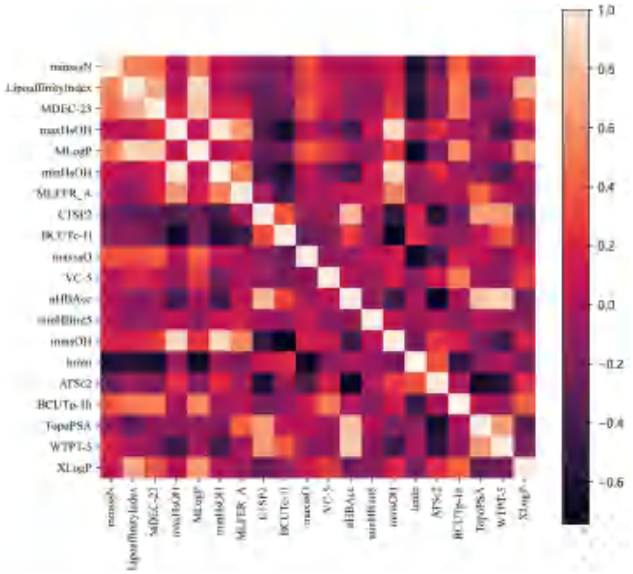


图 1　20 个描述符之间的相关性热力图

Fig 1　Heatmap of correlations among 20 descriptors

2.3.2　模型效果验证　本文使用 DE、RAND 以及 SGD 算法分别优化 SVR 模型的 2 个超参数，对 3 种优化算法的收敛速度进行对比，结果如图 3 所示。由图 3 可知，在 150 次迭代后，DE 算法所得出的 *MSE* 是最小的，达到了 0.1752，并且其在 75 次迭代时已经收敛稳定，证明了 DE 算法能够快速准确地寻找到全局近似最优的 SVR 模型的 c 和 γ，节省计算时间并提高后续预测模型的预测性能。

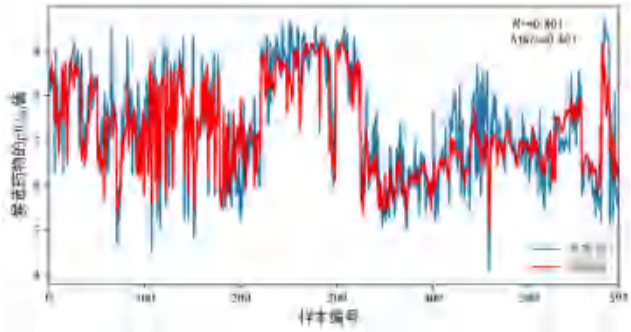


图 2　基于多元线性回归的 QSAR 模型对验证集 pIC_{50} 的生物活性预测

Fig 2　Prediction of bioactivity of validation set pIC_{50} by QSAR model based on multiple linear regression

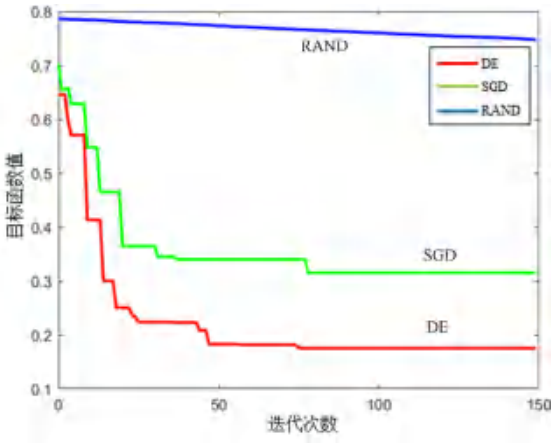


图 3　不同优化算法的收敛速度

Fig 3　Convergence speed of different optimization algorithms

表 2 基于 DE-SVR 的 QSAR 预测模型算法伪代码

Tab 2 Pseudo code of QSAR prediction model algorithm based on DE-SVR

基于 DE-SVR 的 QSAR 预测模型算法
输入：P，C_{min}，C_{max}，γ_{min}，γ_{max}
输出：C_{best}，γ_{best} 和 pIC_{50} 预测值
1. 种群初始化
2. 计算适应度函数值
3. while（$g > g_{max}$）do
4. for $p = 1$：P do
5. 基于 $\omega_{p,1}^{g}$，$\omega_{p,2}^{g}$，$\omega_{p,3}^{g}$，选择变异策略和执行变异得到 v_p^g
6. 执行交叉操作得到 u_g^p
7. 计算 u_g^p 的适应度函数
8. 执行选择得到 Z_p^{g+1}
9. 更新选择变异策略的权重
10. end for
11. 更新 $g = g + 1$
12. end while
13. 得到 Z_{best}
14. 执行 SVR 得到训练集和去优化 SVR 模型超参数
15. 基于得到的 SVR 模型去预测测试集中 pIC_{50} 的值

将 90% 的候选药物数据作为训练集，10% 的候选药物数据作为测试集，来测试所建立的 QSAR 模型的预测精度。为了更客观地评估预测模型的准确性与合理性，我们采用 *MSE*、R^2 对模型的预测性能进行评价。结果如图 4 所示，基于 SVR 的 QSAR 模型的 *MSE* 与 R^2 分别为 0.7034、0.7407，表明该模型具有一定的拟合优度，且在一定程度上该模型具有可解释性，但是其模型精度较低。从图 5 可知，基于 DE-SVR 的 QSAR 模型的 *MSE* 与 R^2 分别为 0.1762、0.935，相比于未优化的 SVR 模型与 MLR 模型，其预测精度与泛化能力得到了显著提高，能够准确、快速地基于筛选出的 20 个分子描述符预测该药物拮抗 ERα 的生物活性。基于 DE-SVR 的 QSAR 模型对 184 号和 188 号化合物预测精度较差，这在基于配体和基于受体的模型的应用中被认为是异常值。分析异常值的由来可以提供关于其特性的额外信息，通过查阅文献并分析得出，在本研究中，异常值出现的可能原因为在 184 号、188 号化合物的环氧原子两端通过两个亚甲基桥连增大了空间位阻，结构与其他化合物存在较大差别，与模型不相符导致活性异常。

由图 5 所示，63 号化合物是整个测试集中的活性最高的化合物（$pIC_{50} = 10.32$ nmol • L^{-1}）。因此，使用比较分子力场分析（comparative molecular force field analysis，CoMFA）技术对 1974 个候选药物的分子结构进行深入解析，以探索化合物拮抗 ERα 生物活性的有效基团。图 6 显示了所有候选药物的分子叠合后的公共骨架、取代基位置以及 63 号化合物的分子结构。由图 6（a）可知，R_1、R_2、R_3 基团为候选药物的取代基，不同候选药物的分子结构不同表现为其取代基团不一致。由图 6（b）可知，63 号化合物与图 6（a）中的公共骨架在 R_1、R_2 位置的基团不相同，该化合物 R_1 位置引入亲水性的基团羟基（-OH）取代了骨架的 R_1 基团，减小了基团的位阻；R_2 位置在骨架的基础上引入了疏水性基团（-Cl），增加了基团的负电荷；R_3 位置与公共骨架基团一致。63 号化合物的取代基发生了上述变化，使得其拮抗 ERα 活性有了明显提高。因此，63 号化合物的分子结构可以为设计具有更高活性的抗乳腺癌药物提供模板参考。

3 讨论

罹患乳腺癌不仅会造成女性身心痛苦，还会给患者家庭、社会带来巨大的经济负担。乳腺癌细胞表面受体表达情况的差异是影响预后的重要因素。超过 70% 的患者乳腺癌细胞表达 ER，因此，寻求安全、经济、有效的抗乳腺癌药物（如拮抗 ERα 活性类抑制剂）治疗方法，已成为医学界及乳腺癌患者非常关心的问题。

为指导已有抗乳腺癌候选药物的结构优化，本研究基于 IRF 与 DE-SVR 模型对拮抗 ERα 活性的抑制剂开展 QSAR 研究。结果显示，建立的 QSAR 模型具有良好的稳定性与可信度。RF 与 IRF 均可用于重要分子描述符的筛选，但 IRF 算法在稳定性、筛选准确度等各方面均较优，可推荐作为化合物的分子描述符优化选择算法。通过 IRF 从 729 个分子描述符中筛选出了 20 个对候选药物拮抗 ERα 生物活性有重要影响的分子描述符，其中最重要的描述符为 Minimum atom-type E-State，其次是 Lipoaffinity index、Maximum atom-type H E-State。通过检索发现本研究中排序靠前的药物描述符大部分已有基础研究 [16-18]，并且与拮抗 ERα 生物活性密切相关。

在 1974 个候选药物的结构及活性数据的基础上，建立了基于 SVR 的 QSAR 模型与基于 DE-SVR 的 QSAR 模型，将两个模型所预测的活性值与候选药物的真实活性值进行回归。与基于 SVR 的 QSAR 模型相比，基于 DE-SVR 的 QSAR 模型的真实值与预测值具有更好的拟合优度，模型的预测精度更为理想。这是因为基于 SVR 的 QSAR 模型对于候选药物的活性预测方面可能存在过拟合的问题，对此，本研究采用 DE 算法来优化

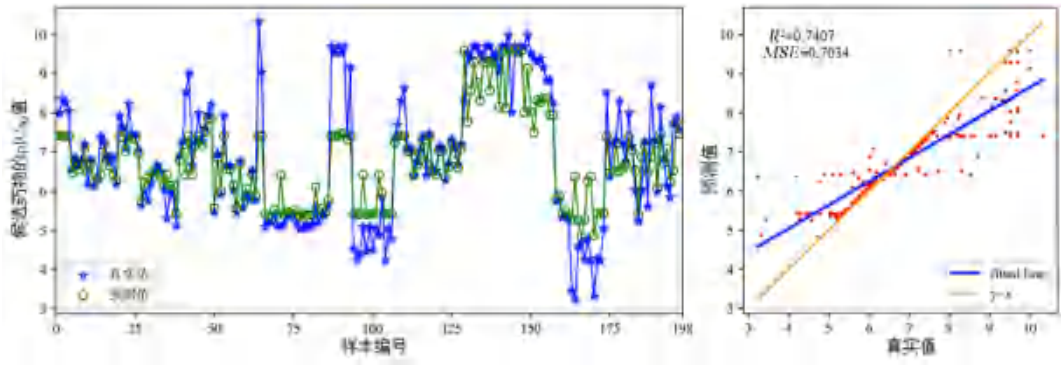


图 4　基于 SVR 的 QSAR 模型对测试集 pIC_{50} 的生物活性预测

Fig 4　Prediction of bioactivity of test set pIC_{50} by QSAR model based on SVR

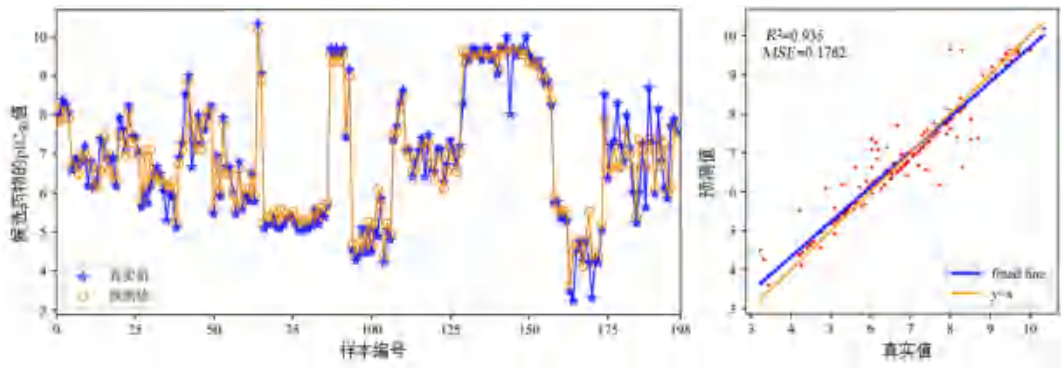


图 5　基于 DE-SVR 的 QSAR 模型对测试集 pIC_{50} 的生物活性预测

Fig 5　Prediction of bioactivity of test set pIC_{50} by QSAR model based on DE-SVR

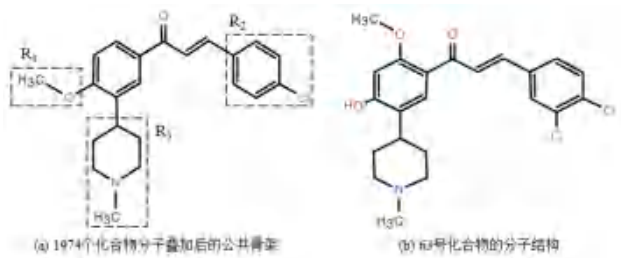


图 6　CoMFA 技术的候选药物分子叠合图与分子结构

Fig 6　Molecular overlay and molecular structure of drug candidates by CoMFA

SVR 模型的超参数，有效避免了过拟合问题，并显著提高了 QSAR 模型的预测能力。根据所建立的 QSAR 模型，本研究进一步发现，63 号化合物拮抗 ERα 活性值最高，因此选择 63 号化合物作为抗乳腺癌候选药物的结构优化的模板药物。后续可以进一步对 63 号化合物的分子对接及分子动力学模拟研究，并结合建立的 QSAR 模型来设计生物活性优于 63 号化合物的候选药物。

综上，本研究基于拮抗 ERα 生物活性抑制剂进行的基于 DE-SVR 的定量构效关系分析和 IRF 特征选择方法可用于抗乳腺癌药物的分子设计研究，为化合物的分子描述符优化选择提供参考，为小分子药物活性的提高、优质化合物结构的改造与设计提供新的思路。

参考文献

[1] 田艳涛，康文哲 . 全球癌症发病情况研究新进展 [J]. 中国医药，2021，16（10）：1446-1447.

[2] Scherbakov AM，Shestakova EA，Galeeva KE，et al. BRCA1 and estrogen receptor α expression regulation in breast cancer cells [J]. Mol Biol（Mosk），2019，53（3）：502-512.

[3] 汤晟，孙鑫，陈铮，等 . 吲哚类抗癌药物的研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（1）：121-128.

[4] 陈硕，李非凡，孙国辉，等 . QSAR 建模及其在抗病毒药物设计与筛选中的研究进展 [J]. 化学试剂，2021，43（7）：895-905.

[5] Abd EE，Naglah AM，Moustafa GO，et al. Novel benzothiazole-based dual VEGFR-2/EGFR inhibitors targeting breast and liver cancers：synthesis，cytotoxic activity，QSAR and molecular docking studies [J]. Bioorg Med Chem Lett，2022，58：128529.

[6] Wang C，Feng CJ. QSAR studies on the inhibitory activity of levofloxacin-thiadiazole HDACi conjugates to histone deacetylases [J]. Chinese Journal of Structural Chemistry，2018，37（11）：1679-1688.

[7] Yang H，Du Z，Lv WJ，et al. In silico toxicity evaluation of dioxins using structure-activity relationship（SAR）and two-dimensional quantitative structure-activity relationship（2D-QSAR）[J]. Arch Toxicol，2019，93（11）：3207-3218.

[8] 陈景文，王中钰，傅志强 . 环境计算化学与毒理学 [M].

北京：科学出版社，2018.
[9] 宋相中，唐果，张录达，等 . 近红外光谱分析中的变量选择算法研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析，2017，37（4）：1048-1052.
[10] 赵杰，曾晓萍，孟雪玲，等 . 一种黄酮糖苷类化合物的快速合成及其活性研究 [J]. 中南药学，2020，18（4）：531-535.
[11] Ai H，Wu X，Zhang L，et al. QSAR modelling study of the bioconcentration factor and toxicity of organic compounds to aquatic organisms using machine learning and ensemble methods [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2019，179：71-78.
[12] 秦璞，郭志旺，郭维恒，等 . 应用随机森林和支持向量机对三阴性乳腺癌基因数据的降维和筛选 [J]. 中国卫生统计，2020，37（3）：389-394.
[13] 丁青锋，尹晓宇 . 差分进化算法综述 [J]. 智能系统学报，2017，12（4）：431-442.
[14] Sanyal S，Amin SA，Adhikari N，et al. QSAR modelling on a series of arylsulfonamide-based hydroxamates as potent MMP-2 inhibitors [J]. SAR QSAR Environ Res，2019，30（4）：247-263.
[15] Hdoufane I，Stoycheva J，Tadjer A，et al. QSAR and molecular docking studies of indole-based analogs as HIV-1 attachment inhibitors [J]. J MolStruct，2019，1193：429-443.
[16] 李月，周永，张芸绮，等 . 蛇葡萄素抗乳腺癌的网络药理学分析及细胞试验研究 [J]. 中国药业，2021，30（10）：23-28.
[17] 杨亮，姚烨，冯瑶瑶，等 . 多巴胺 D1 激动剂治疗乳腺癌肺转移的药效动力学模型 [J]. 中国药学（英文版），2020，29（1）：45-54.
[18] 薛雪，朱龙平，杨得坡，等 . 基于中药整体性的红豆杉抗乳腺癌活性成分筛选方法研究 [J]. 中草药，2020，51（24）：6278-6285.

（收稿日期：2022-04-10；修回日期：2022-05-17）

清热消炎宁颗粒一步制粒工艺研究

江涛，彭红英*，曾晨，汤迎湛，陈丽斯，苏锐辉，曾利杰（1. 广州白云山敬修堂药业股份有限公司，广州 510130；2. 广东省风湿病药物工程技术研究中心，广州 510130）

摘要：目的 对清热消炎宁颗粒的一步制粒工艺进行研究。**方法** 以颗粒合格率和水分为评价指标，采用单因素结合正交试验法对影响清热消炎宁颗粒一步制粒过程的因素进行考察。**结果** 最佳制粒工艺参数为：喷雾速度为 15 r • min^{-1}，雾化压力为 0.15 MPa，进风温度为 85 ℃。**结论** 该制粒工艺合理、可行，稳定性好，可为清热消炎宁颗粒后续的生产工艺研究提供试验依据。

关键词：清热消炎宁颗粒；一步制粒；工艺研究；单因素；正交试验
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2548-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.016

One-step granulation technology for Qingre Xiaoyanning granules

JIANG Tao, PENG Hong-ying*, ZENG Chen, TANG Ying-zhan, CHEN Li-si, SU Rui-hui, ZENG Li-jie (1. *Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou* 510130; 2. *Guangdong Engineering Research Center for Rheumatic Drugs, Guangzhou* 510130)

Abstract: Objective To determine the one-step granulation technology for Qingre Xiaoyanning granules. **Methods** Granule qualification rate and moisture were used as evaluation indexes. Single factor and orthogonal test were used to determine the influencing factors of one-step granulation of Qingre Xiaoyanning granules. **Results** The optimum granulating parameters were as follows: the spray velocity was 15 r • min^{-1}, the atomization pressure was 0.15 MPa, and the air inlet temperature was 85 ℃. **Conclusion** The granulating process for Qingre Xiaoyanning granules is reasonable, feasible and

基金项目：国家科技重大专项“重大新药创制”专项资金项目（No.2011ZX09401-404-01）。
作者简介：江涛，男，硕士，制药高级工程师，主要从事中药新药研究，email：jiangtao1609@163.com *通信作者：彭红英，女，教授级高级工程师，主要从事中药新药研究，email：jxtyjs1790@163.com

stable, which provides experimental basis for the follow-up study of the production.

Key words: Qingre Xiaoyanning granule; one-step granulation; technology study; single factor; orthogonal test

清热消炎宁颗粒是由广州白云山敬修堂药业股份有限公司现有品种清热消炎宁胶囊经工艺和剂型改革而来，原胶囊剂内容物易吸潮，且吞咽较为困难的患者、儿童和年老患者服用不方便。因此在原胶囊剂的基础上开发颗粒剂，既继承了传统中药汤剂的优点，又能在保证疗效的基础上提高患者的临床顺应性，扩大适用人群。清热消炎宁颗粒主要成分为九节茶，具有清热解毒、消炎止痛等功效，临床上可用于治疗感冒、咽喉炎等疾病[1-2]。在制剂工艺研究方面，前期考察了湿法制粒中传统的挤压制粒工艺，制粒前需对物料进行混合、制软材等，制粒后还需对颗粒进行干燥，程序环节多、劳动强度大。此外，在制软材过程中选择适宜黏合剂及适宜用量往往要靠熟练操作人员的经验来控制，可靠性与重现性较差，导致制出的颗粒质量不稳定[3-4]。与传统湿法制粒工艺相比，一步制粒工艺可在一台设备内一步完成混合、制粒、干燥等步骤，自动化程度高，生产重现性好，保证了颗粒的质量稳定性。整个过程都是在密闭状态下操作，可有效避免粉尘飞扬和交叉污染，符合 GMP 要求[5-7]。本文以颗粒合格率和水分为评价指标，采用单因素结合正交试验法对影响清热消炎宁颗粒一步制粒过程的进风温度、雾化压力、喷雾速度等影响因素进行考察，优化并确定产品一步制粒的工艺参数，在保证批间产品质量稳定性的前提下提高生产效率。

1 仪器与试药

1.1 仪器

FLP-5 型流化床造粒包衣机（常州市佳发制粒干燥设备有限公司）；BT-300 型蠕动泵（重庆杰恒蠕动泵有限公司）；MA-100 型快速水分测定仪（德国 SARTORIUS 公司）；XZS-400 型旋振筛（江阴市马镇制药设备厂）。

1.2 试药

清热消炎宁浸膏 [广州白云山敬修堂药业股份有限公司自制，批号：170624；干浸膏以含九节茶以异嗪皮啶（$C_{11}H_{10}O_5$）计，不得少于 0.28 mg·g^{-1}；以迷迭香酸（$C_{18}H_{16}O_8$）计，不得少于 0.31 mg·g^{-1}]；乳糖（药用级，上海华茂药业有限公司，批号：170501）。

2 方法与结果

2.1 清热消炎宁浸膏制备

取九节茶药材，切碎，加水煎煮 2 次，每次加 10 倍量水煎煮 2 h，煎液滤过，滤液合并，减压浓缩（80 ℃以下）至相对密度为 1.18 ～ 1.22（80 ℃），放冷（40 ℃以下），在搅拌中加乙醇至含醇量达 70%，静置 12 h 以上，取上清液，回收乙醇并浓缩成一定相对密度的浸膏，即得。

2.2 单因素试验考察

影响中药颗粒剂一步制粒的主要因素有浸膏相对密度、进风温度、引风机频率、雾化压力、喷雾速度等，不同工艺参数对颗粒的成型性和水分影响较大[8-9]。因此，先采用单因素试验考察清热消炎宁颗粒一步制粒工艺的各关键参数。

2.2.1 流化床及喷雾方式考察 考察标准床结合顶喷和旋流床结合切线喷两种制粒工艺。按处方量称取乳糖粉，混匀置于流化床中，将清热消炎宁浸膏（相对密度为 1.15，80 ℃）喷于乳糖上进行一步制粒，初步设置进风温度为 90 ℃，雾化压力为 0.20 MPa，喷雾速度为 15 r·min^{-1}，引风机初始频率为 20 Hz，制粒过程随着颗粒的增大调高引风机频率使物料保持沸腾状态，以标准筛 20 ～ 50 目的颗粒为合格颗粒。结果显示，标准床结合顶喷方式制粒效果较好，颗粒合格率较高且颗粒粒度均匀，结果见表 1。颗粒合格率（%）＝[合格颗粒量 /（干浸膏量＋乳糖粉量）]×100%。制粒过程中发现，侧喷容易导致辅料结块，造成粉体流动性差，因此选择合格颗粒收率高的顶喷方式为清热消炎宁颗粒制备工艺。

表 1 流化床及喷雾方式对清热消炎宁颗粒的影响

Tab 1 Influence of the fluidized bed and spray way on Qingre Xiaoyanning granule

流化床	喷雾方式	合格颗粒量 /kg	颗粒合格率 /%	成型性	水分 /%
标准床	顶喷	2.42	80.67	颗粒粒度均匀	1.58
旋流床	切线喷	1.91	63.67	颗粒粒度不均匀，粗颗粒较多，较易粘结成块	1.61

2.2.2 浸膏相对密度考察 考察浸膏相对密度分别为 1.05、1.10、1.15、1.20（80 ℃）时的制粒情况。采用标准床结合顶喷制粒方式，按处方量称取乳糖粉，混匀置于流化床中，将清热消炎宁浸膏喷于乳糖上进行一步制粒，初步设置进风温度为 90 ℃，雾化压

力为 0.20 MPa，喷雾速度为 15 r • min^{-1}，引风机初始频率为 20 Hz，制粒过程随着颗粒的增大调高引风机频率使物料保持沸腾状态，以标准筛 20 ～ 50 目的颗粒为合格颗粒。结果显示，当清热消炎宁浸膏相对密度为 1.10 时，制粒过程更流畅，颗粒合格率较高且颗粒粒度均匀，硬度适中，结果见表 2。

表 2　浸膏相对密度对清热消炎宁颗粒的影响

Tab 2　Influence of the relative density of the extract on Qingre Xiaoyanning granule

相对密度（80 ℃）	合格颗粒量 /kg	颗粒合格率 /%	成型性	水分 /%
1.05	2.28	76.00	颗粒过于疏松，细粉稍多	1.65
1.10	2.55	85.00	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.55
1.15	2.42	80.67	颗粒粒度均匀，颗粒稍硬	1.58
1.20	2.10	70.00	颗粒粒度不均匀，较易粘结成块	1.73

2.2.3　进风温度考察　考察进风温度分别为 70、80、90 和 100 ℃时的制粒情况。采用标准床结合顶喷制粒方式，按处方量称取乳糖粉，混匀置于流化床中，将清热消炎宁浸膏（相对密度为 1.10，80 ℃）喷于乳糖上进行一步制粒，设置雾化压力为 0.20 MPa，喷雾速度为 15 r • min^{-1}，引风机初始频率为 20 Hz，制粒过程随着颗粒的增大调高引风机频率使物料保持沸腾状态，以标准筛 20 ～ 50 目的颗粒为合格颗粒。结果显示，进风温度在 80 ～ 90 ℃制粒效果较好，颗粒合格率较高且颗粒粒度均匀，结果见表 3。

表 3　进风温度对清热消炎宁颗粒的影响

Tab 3　Influence of the air inlet temperature on Qingre Xiaoyanning granule

进风温度 /℃	合格颗粒量 /kg	颗粒合格率 /%	成型性	水分 /%
100	2.26	75.33	颗粒过于疏松，细粉稍多	1.45
90	2.55	85.00	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.55
80	2.54	84.67	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.61
70	1.95	65.00	颗粒粒度不均匀，较易粘结成块	2.15

2.2.4　雾化压力考察　考察雾化压力分别为 0.03、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 MPa 时的制粒情况。采用标准床结合顶喷制粒方式，按处方量称取乳糖粉，混匀置于流化床中，将清热消炎宁浸膏（相对密度为 1.10，80 ℃）喷于乳糖上进行一步制粒，设置进风温度为 85 ℃，喷雾速度为 15 r • min^{-1}，引风机初始频率为 20 Hz，制粒过程随着颗粒的增大调高引风机频率使物料保持沸腾状态，以标准筛 20 ～ 50 目的颗粒为合格颗粒。结果显示，雾化压力在 0.10 ～ 0.20 MPa 制粒效果较好，制得颗粒粒度均匀，外形圆整，合格率较高，结果见表 4。

表 4　雾化压力对清热消炎宁颗粒的影响

Tab 4　Influence of the atomization pressure on Qingre Xiaoyanning granule

雾化压力 /MPa	合格颗粒量 /kg	颗粒合格率 /%	成型性	水分 /%
0.25	2.29	76.33	颗粒粒径小，细粉稍多	1.94
0.20	2.57	85.67	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.62
0.15	2.58	86.00	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.60
0.10	2.53	84.33	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.59
0.05	1.90	63.33	颗粒粒度不均匀，粗颗粒多	1.54
0.03	1.85	61.67	颗粒粒度不均匀，粗颗粒多	1.57

2.2.5　喷雾速度考察　考察喷雾速度分别为 10、12、14、16、18 r • min^{-1} 时的制粒情况。采用标准床结合顶喷制粒方式，按处方量称取乳糖粉，混匀置于流化床中，将清热消炎宁浸膏（相对密度为 1.10，80 ℃）喷于乳糖上进行一步制粒，设置进风温度为 85 ℃，雾化压力为 0.15 MPa，引风机初始频率为 20 Hz，制粒过程随着颗粒的增大调高引风机频率使物料保持沸腾状态，以标准筛 20 ～ 50 目的颗粒为合格颗粒。结果显示，喷雾速度在 14 ～ 16 r • min^{-1} 制粒效果较好，颗粒合格率较高且颗粒粒度均匀，结果见表 5。

表 5　喷雾速度对清热消炎宁颗粒的影响

Tab 5　Influence of the spray velocity on Qingre Xiaoyanning granule

喷雾速度 /（r • min^{-1}）	合格颗粒量 /kg	颗粒合格率 /%	成型性	水分 /%
10	2.25	75.00	颗粒粒径小，细粉多	1.53
12	2.39	79.67	颗粒粒度均匀，粒径偏小，细粉稍多	1.55
14	2.57	85.67	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.56
16	2.55	85.00	易制粒，颗粒粒度均匀，硬度适中	1.57
18	2.33	77.67	颗粒粒度不均匀，粗颗粒多	1.66

通过单因素试验结果可知，当采用标准床结合顶喷方式，选择相对密度为 1.10 的清热消炎宁浸膏，进风温度控制在 80 ～ 90 ℃，雾化压力为 0.10 ～ 0.20 MPa，喷雾速度为 14 ～ 16 r • min^{-1} 制备颗粒时，制粒过程流畅，所得颗粒粒度均匀，硬度适中，颗粒合格率较高。为确定清热消炎宁颗粒制备的最优工艺，拟选取进风温度、雾化压力、喷雾速度为考察因素，每个因素下设 3 个水平进行正交试验。

2.3　正交试验优化制粒工艺

2.3.1　正交试验结果评价指标　以颗粒合格率和水分为评价指标。采用综合评分法，将颗粒合格率最高的计为 10 分，其他各项依次与之对比评分；将颗粒水分最低的计为 10 分，其他各项

依次与之对比评分；将主要评价指标颗粒合格率（a）的权重系数定为 0.7，次要评价指标颗粒水分（b）的权重系数定为 0.3，综合评分＝ 0.7a ＋ 0.3b，以综合评分对制粒结果进行综合评价。

照颗粒剂粒度和粒度分布测定法（《中国药典》2020 年版四部通则 0982 第二法双筛分法）测定 [10]。药典对颗粒剂粒度规定为不能通过一号筛（10 目）与能通过五号筛（80 目）的总和不得超过 15%，为使制得的颗粒粒度更为均匀，本试验将标准筛 20 ～ 50 目的颗粒规定为合格颗粒，高于药典标准。颗粒水分采用快速水分测定仪测定。

2.3.2　正交试验设计及结果　在单因素试验考察的基础上，选取进风温度（A）、雾化压力（B）、喷雾速度（C）为考察因素，每个因素各取 3 个水平，采用正交设计表 L_9（3^4）进行试验，因素水平及试验结果见表 6 ～ 8。

表 6　因素与水平

Tab 6　Factor and level

水平	因素		
	A. 进风温度 /℃	B. 雾化压力 /MPa	C. 喷雾速度 /（r • min $^{-1}$）
1	80	0.10	14
2	85	0.15	15
3	90	0.20	16

由正交试验的方差分析结果可见，3 个因素对制粒结果的影响程度由大到小依次为喷雾速度（C）＞进风温度（A）＞雾化压力（B），且 3 个因素均对综合评分无显著性影响（P ＞ 0.05）。结合正交试验结果，最优工艺为 $A_2B_2C_2$，即进风温度为 85 ℃，雾化压力为 0.15 MPa，喷雾速度为 15 r • min $^{-1}$。

表 7　正交试验设计与结果

Tab 7　Design and result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	颗粒合格率 /%	颗粒水分 /%	综合评分
1	1	1	1	1	81.52	1.89	9.02
2	1	2	2	2	85.36	1.55	9.87
3	1	3	3	3	82.18	1.66	9.42
4	2	1	2	3	86.94	1.58	9.94
5	2	2	3	1	85.66	1.57	9.86
6	2	3	1	2	83.44	1.72	9.42
7	3	1	3	2	84.92	1.58	9.78
8	3	2	1	3	84.26	1.67	9.57
9	3	3	2	1	85.51	1.59	9.81
K_1	9.437	9.580	9.337	9.563			
K_2	9.740	9.767	9.873	9.690			
K_3	9.720	9.550	9.687	9.643			
R	0.303	0.217	0.536	0.127			

表 8　方差分析结果

Tab 8　Variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	0.173	2	6.920	＞ 0.05
B	0.083	2	3.320	＞ 0.05
C	0.445	2	17.800	＞ 0.05
D（误差）	0.03	2		

2.4　验证试验

取清热消炎宁浸膏（相对密度为 1.10，80 ℃），按正交试验优选条件进行一步制粒，制备 3 批样品进行验证，测定颗粒合格率、颗粒水分、休止角和堆密度。结果显示，制得颗粒的合格率和水分优于或接近于以上单因素试验和正交试验表中的各组数据，且颗粒堆密度较稳定，休止角小于 45°，表明生产出的颗粒均匀性和流动性均良好，颗粒外形圆整，色泽、粒度均匀，松实适宜，优选出的制粒工艺稳定可行，重复性好，结果见表 9。

表 9　验证试验结果

Tab 9　Verification test

样品	颗粒合格率 /%	颗粒水分 /%	休止角 /°	堆密度 /（g • mL $^{-1}$）
1	85.83	1.58	25.6	0.62
2	86.49	1.55	27.0	0.65
3	86.22	1.54	25.5	0.61
均值	86.18	1.56	26.0	0.63

3　讨论

清热消炎宁颗粒的制备参照《中国药典》2020 年版四部相关要求，并根据清热消炎宁浸膏的性质，选用与浸膏无配伍禁忌，且不影响制剂检测、成型较好、口感适宜的辅料。在辅料选择上，蔗糖作为中药颗粒剂最常用的辅料，但采用其作为辅料制成的清热消炎宁颗粒有明显的引湿性，含蔗糖颗粒亦不方便糖尿病患者、肥胖者、小儿龋齿者、年老患者等一些不宜摄入过多糖量的人群服用 [11]。此外，乳糖、糊精、甘露醇、可溶性淀粉等辅料可一定程度上降低中药浸膏的吸湿性，提高制粒的成型性、稳定性 [12-13]，故制剂制备过程中还考察了这些辅料，其中甘露醇价格昂贵且容易导致肠胃不适，含糊精的颗粒口感不佳，而含可溶性淀粉的颗粒虽然口感适中，但颗粒溶化后溶液轻微浑浊。采用乳糖作为辅料制得的颗粒粒度均匀，溶化性好，溶化后所得的溶液澄清且口感较好，因此确定清热消炎宁颗粒的辅料为乳糖。本制粒工艺研究以乳糖为辅料，以浸膏（相对密度为 1.10，80 ℃）为黏合剂，采用顶喷方式直接将清热消炎宁浸膏喷于辅料上，采用

流化一步制粒方法，在密闭的标准流化床中将混合、制粒、干燥等工序一步制备清热消炎宁颗粒。

中药制粒过程是现代中药制剂成型的关键过程，颗粒质量直接影响后续产品加工的生产效率和产品质量。中药流化一步制粒工艺由物料混合、喷雾制粒、干燥、冷却、总混、过筛、整粒等工序构成。其中物料混合、喷雾制粒、干燥、冷却工序是在流化床设备中完成，是整个生产过程的关键工序[14]。本文采用单因素结合正交试验法，以颗粒合格率和颗粒水分为评价指标，考察了进风温度、雾化压力、喷雾速度对一步制粒影响较大的因素，最终优选出清热消炎宁颗粒一步制粒的工艺参数：进风温度为 85 ℃，雾化压力为 0.15 MPa，喷雾速度为 15 r • min^{-1}。优选工艺制得的颗粒合格率较高，含水量少，外形圆整，大小均匀，硬度适中，溶化性和流动性均良好。

在清热消炎宁颗粒流化一步制粒工艺研究过程中发现，在制粒阶段，随着颗粒的不断增大，需逐渐调高引风机频率使物料保持沸腾状态；干燥阶段，随着物料逐渐干燥，物料变轻，应适当调低引风机频率，以免风力太大使颗粒受到猛烈撞击，整体以颗粒能保持适度流化状态为宜。本试验清热消炎宁颗粒的一步制粒工艺生产效率高，操作简单便于自动化控制，符合当代中药制剂技术发展的要求，适合于工业化生产，为产品今后产业化生产提供科学依据。

参考文献

[1] 陈雪华，江涛，彭红英，等 . HPLC 法测定清热消炎宁颗粒中异嗪皮啶和迷迭香酸的含量 [J]. 今日药学，2012，22（11）：653-655.
[2] 陈雪华，江涛，彭红英，等 . 清热消炎宁颗粒中鞣质的含量测定 [J]. 海峡药学，2013，25（9）：97-99.
[3] 岳国超，严霞，赵映波，等 . 湿法制粒工艺参数对颗粒成型性的影响 [J]. 中南药学，2015，13（6）：587-590.
[4] 把挹，徐玲玲，年华 . 中药颗粒剂制粒技术综述 [J]. 中国药师，2010，13（5）：733-736.
[5] 郑如文，胡卫林，杨建锐，等 . 莲芝消炎胶囊一步制粒工艺研究 [J]. 中国药业，2017，26（15）：10-12.
[6] 李剑欣，张曦，魏桂蓉 . 六味补血颗粒的喷雾制粒工艺研究 [J]. 中南药学，2011，9（11）：841-844.
[7] 查付琼，董自亮，蒋燕霞，等 . 青蒿鳖甲颗粒一步制粒工艺的优化 [J]. 中成药，2018，40（4）：974-975.
[8] 樊如强，夏立武，李进飞 . 陈皮配方颗粒一步制粒工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2017，28（9）：2149-2151.
[9] 郭小红，冷静，李杰，等 . 正交试验法优选柔肝宝颗粒一步制粒工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2018，25（6）：95-98.
[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：145-146.
[11] 宋开蓉，刘雄，高建德，等 . 中药颗粒剂研究现状及展望 [J]. 甘肃中医药大学学报，2017，34（3）：79-82.
[12] 吴玉琼，金永新，张红梅，等 . 健脾通气无糖颗粒制备工艺的优化及质量控制 [J]. 中成药，2021，43（10）：2788-2793.
[13] 刘勇，吕慧锋，张琼，等 . Design-Expert 响应面法优选无糖型乳康颗粒成型工艺 [J]. 中国药业，2021，30（17）：50-53.
[14] 张大玮，田埂，熊皓舒，等 . 基于近红外光谱技术的养血清脑颗粒流化床制粒过程检测研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47（14）：3806-3815.

（收稿日期：2022-06-28；修回日期：2022-08-17）

响应面法优化板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取工艺

崔晓[1, 2]，薛淑一[1]，孟向尚[1]，李欠[2*]（1.青岛市中心医院药学部，青岛　266042；2.甘肃农业大学农学院，兰州 730070）

摘要：目的　优选板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取工艺。**方法**　以尿苷、腺嘌呤、（*R*，*S*）-告依春、鸟苷、腺苷提取率为评价指标，采用多指标综合评分法，以液料比、超声功率、超声时间、酶反应时间、酶反应温度为影响因素，采用 Box-Behnken 响应面法优化板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取工艺。**结果**　最佳提取条件为：液料比 75∶1，超声功率 400 W，超声时间 50 min，酶反应时间 8 h 40 min，酶反应温度 50 ℃。在此条件下提取综合评分为 97.137。**结论**　优化后的提取工艺操作简便，具有较高的推广价值。

关键词：板蓝根；（*R*，*S*）-告依春；核苷；响应面法；黑芥子酶；提取工艺
中图分类号：R284.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2553-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.017

Optimization of extraction process of (*R, S*)-epigoitrin and nucleoside from *Radix isatidis* by response surface methodology

CUI Xiao[1, 2], XUE Shu-yi[1], MENG Xiang-shang[1], LI Qian[2*] (1. *Department of Pharmacy, Qingdao Central Hospital, Qingdao* 266042; 2. *College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou* 730070)

Abstract: Objective　To optimize the extraction process of (*R, S*)-epigoitrin and nucleoside from *Radix isatidis*. **Methods**　The extraction rates of uridine, adenine, (*R, S*)-epigoitrin, guanosine and adenosine were used as the evaluation index. The multi-index comprehensive scoring method was used to determine the liquid-solid ratio, ultrasonic power, ultrasonic time, enzyme reaction time, and enzyme reaction temperature (the influencing factors). The Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process of (*R, S*)-epigoitrin and nucleoside from *Radix isatidis*. **Results**　The optimal extraction condition included: liquid-solid ratio at 75∶1, ultrasonic power 400 W, ultrasonic time 50 min, enzyme reaction time 8 h 40 min, and enzyme reaction temperature 50 ℃. The multi-index score was 97.137. **Conclusion**　The optimized extraction process is simple with high promotion value.

Key words: *Radix isatidis*; (*R, S*)-epigoitrin; nucleoside; response surface methodology; myrosinase; extraction process

板蓝根是十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根，其性味苦寒，归心、胃经，传统中医认为板蓝根具有清热解毒、凉血利咽的作用[1]。现代药理学研究认为，板蓝根中的（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物具有抗病毒活性[2-5]。研究发现板蓝根中的硫代葡萄糖苷类物质表原告依春、原告依春在内源性黑芥子酶作用下能够水解生成（*R*，*S*）-告依春[6]，与板蓝根的低温水提取液放置一定时间内（*R*，*S*）-告依春的含量不断增加相吻合[7-8]。前期试验及文献报道中还发现

基金项目：国家自然科学基金项目（No.31860102）。
作者简介：崔晓，男，硕士，药师，主要从事中药质量评价及医院药学研究，email：qdzxcx@126.com　*通信作者：李欠，男，博士，副教授，主要从事中药分析及质量评价研究，email：liqian1984@gsau.edu.cn

板蓝根中核苷类物质也有类似现象，但机制目前尚未阐明。池絮影等[9]研究发现，板蓝根的超声提取液抗流感病毒神经氨酸酶活性强于煎煮法提取液，表明（*R*，*S*）-告依春的抗病毒活性优于其前体物质。综合上述研究认为，若使板蓝根中的硫代葡萄糖苷水解完全，增加（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取率后可能增强其提取液的抗病毒作用。

本研究利用板蓝根中的内源性黑芥子酶，通过响应面法优化板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取方法，从而找到最佳提取条件，以期增加药材中有效成分的提取率，提高药材的利用率，为后期的研究和生产应用提供依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；CP255D 型电子分析天平（十万分之一，德国赛多利斯公司）；AX124ZH 型电子分析天平（万分之一，奥豪斯仪器常州有限公司）；Direct-Q 型纯水机（美国 Millipore 公司）；TG16-WS 型台式高速离心机（长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司）；SCQ-7207C 数控功率可调加热超声波清洗机（上海声彦超声波仪器有限公司）；HH-2 数显恒温水浴锅（国华电器有限公司）；BS-2E 型振荡培养箱（常州金坛良友仪器有限公司）

1.2　试药

对照品腺苷（批号：Z23S7J21814；纯度≥ 99%）、尿苷（批号：TM0313XA13；纯度≥ 99.8%）、鸟苷（批号：AJ0609NA14；纯度≥ 98.8%）、（*R*，*S*）-告依春（批号：Y17N9H75488；纯度≥ 99.9%）、腺嘌呤（批号：T14N9Y74844；纯度≥ 99.9%）（上海源叶生物科技有限公司）。

甲醇为色谱纯，水为实验室自制超纯水。板蓝根饮片购自青岛国风大药房连锁有限公司，产地为安徽，批号为 171202。经甘肃农业大学李欠副教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱（100 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）-水（B），洗脱梯度（0 ～ 2 min，0.5%A；2 ～ 3 min，0.5% ～ 1%A；3 ～ 7 min，1% ～ 2%A；7 ～ 8 min，2% ～ 5%A；8 ～ 10 min，5% ～ 10%A；10 ～ 17 min，10% ～ 17%A）；检测器波长：254 nm；柱温：15 ℃；进样量：20 μL；流速：1 mL • min^{-1}，采集时间：17 min。色谱图见图 1。

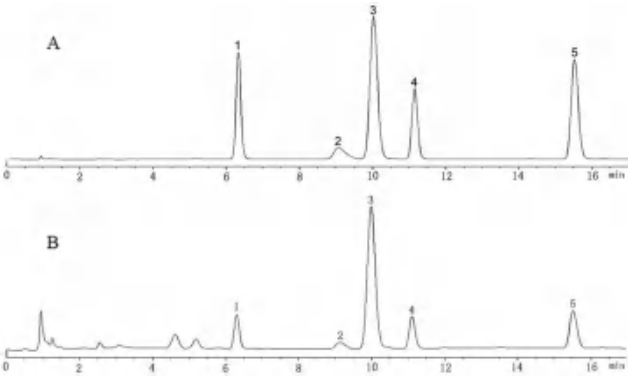


图 1　对照品（A）和供试品（B）高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of reference substances（A）and testing sample（B）

1. 尿苷（uridine）；2. 腺嘌呤（adenine）；3.（*R*，*S*）-告依春 [（R，S）-epigoitrin]；4. 鸟苷（guanosine）；5. 腺苷（adenosine）

2.2　对照品溶液制备

精密称取尿苷、腺嘌呤、（*R*，*S*）-告依春、鸟苷、腺苷对照品适量，置量瓶中，加超纯水稀释至刻度，混合均匀，定容至质量浓度分别为 0.24、0.04、0.64、0.24、0.32 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液制备

精密称取板蓝根饮片干燥粉末 0.5 g 置 50 mL 锥形瓶中，按液料比精密量取一定量超纯水后称重，盖橡胶塞，置振荡培养箱（100 r • min^{-1}）中在反应温度下提取一定时间，取出锥形瓶置超声波清洗仪按规定功率超声提取一定时间，提取液置 100 ℃水浴中加热 10 min 灭活酶，放冷后称重，用超纯水补足减失的重量。将提取液转移至离心管中，10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜即得。

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性试验　分别取混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂（超纯水）进样测定，色谱图显示供试品与对照品在相同的保留时间处有对应色谱峰出现，而空白溶剂在相同保留时间处无对应的色谱峰，表明方法专属性良好。

2.4.2　线性关系考察　分别取“2.2”项下对照品溶液 50、125、250、500、750、1000 μL，置 5 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，混合均匀。进样测定，记录峰面积取平均值。以对照品溶液的质量浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标进行线性回归，结果见表 1。结果表明各成分对照品在线性范围内与峰面积的线性关系良好。

表 1　板蓝根中 5 种成分的线性关系考察结果 (n = 3)

Tab 1　Linearity of 5 components in *Radix isatidis* (n = 3)

成分	回归方程	线性范围 /（mg·mL^{-1}）	R^2
尿苷	$Y = 5.19\times10^4X + 0.3479$	0.0024 ～ 0.048	1.000
腺嘌呤	$Y = 1.10\times10^5X - 0.7011$	0.0004 ～ 0.008	0.9999
（R，S）-告依春	$Y = 4.73\times10^4X - 7.211$	0.0064 ～ 0.128	0.9994
鸟苷	$Y = 5.33\times10^4X + 0.8099$	0.0024 ～ 0.048	1.000
腺苷	$Y = 6.68\times10^4X + 0.9079$	0.0032 ～ 0.064	1.000

2.4.3　进样精密度试验　取混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录各待测物质的峰面积。结果显示尿苷、腺嘌呤、（R，S）-告依春、鸟苷、腺苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.48%、1.0%、0.44%、0.54%、0.50%，表明仪器精密度良好。

2.4.4　重复性试验　精密称取供试品粉末 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录各待测物的峰面积。结果显示尿苷、腺嘌呤、（R，S）-告依春、鸟苷、腺苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.49%、1.2%、0.32%、1.0%、0.67%，表明方法的重复性良好。

2.4.5　稳定性试验　取一供试品溶液，分别在室温下放置 0、2、6、10、24 h 后进样测定，记录各待测物的峰面积。结果显示尿苷、腺嘌呤、（R，S）-告依春、鸟苷、腺苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.76%、0.94%、0.43%、1.4%、0.85%，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.5　提取率的计算

提取率（%）＝提取物含量 / 药材重量 ×100%。

2.6　提取综合评分的计算

提取综合评分＝（$W_{尿苷}/W_{max\,尿苷} + W_{腺嘌呤}/W_{max\,腺嘌呤} + W_{(R,S)\text{-}告依春}/W_{max\,(R,S)\text{-}告依春} + W_{鸟苷}/W_{max\,鸟苷} + W_{腺苷}/W_{max\,腺苷}$）×20%，式中 W 代表含量（mg·g^{-1}）。

2.7　单因素试验

2.7.1　酶反应温度对提取综合评分的影响　固定液料比为 70∶1，超声功率为 320 W，超声时间为 30 min，酶反应时间为 2 h，考察不同酶反应温度（30、40、50、60、70 ℃）对提取综合评分的影响。结果当反应温度在 50 ～ 60 ℃时提取综合评分最高且平稳，结果见图 2。分析不同成分的提取率，在 50 ℃时尿苷、腺嘌呤、鸟苷、腺苷的提取率均高于 60 ℃，而在 60 ℃时（R，S）-告依春的提取率高于 50 ℃。故选择 50 ℃作为酶反应温度。

2.7.2　液料比对提取综合评分的影响　固定超声功率为 320 W，超声时间为 30 min，酶反应时间为 2 h，酶反应温度为 50 ℃，考察不同液料比（50∶1、60∶1、70∶1、80∶1、90∶1）对提取综合评分的影响。结果提取综合评分首先随液料比的增加而提高，在 70∶1 时达到最高，进一步提高液料比后提取综合评分反而降低，结果见图 3。可能是由于液料比过大使酶的浓度相对降低，从而降低了反应的发生。因此选择液料比 60∶1、70∶1、80∶1 进行响应面优化。

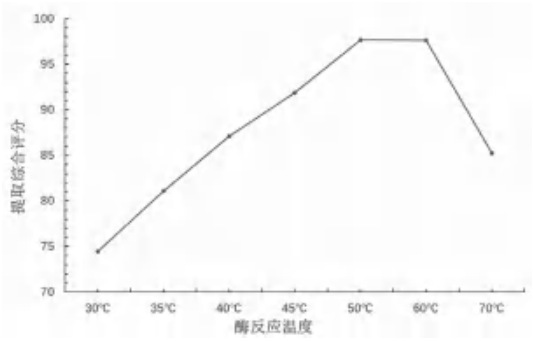


图 2　酶反应温度对提取综合评分的影响

Fig 2　Effect of enzyme reaction temperature on the comprehensive extraction score

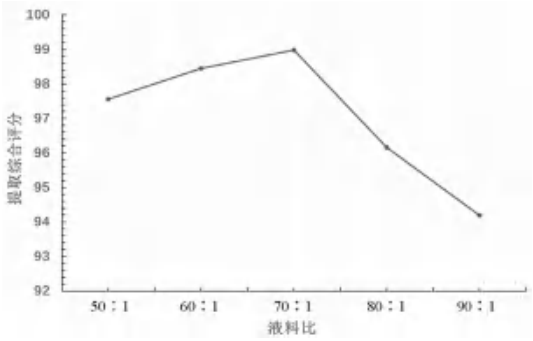


图 3　液料比对提取综合评分的影响

Fig 3　Effect of liquid-solid ratio on the extraction comprehensive score

2.7.3　超声功率对提取综合评分的影响　固定液料比为 70∶1，超声时间为 30 min，酶反应时间为 2 h，酶反应温度为 50 ℃，考察不同超声功率（80、160、240、320、400 W）对提取综合评分的影响。结果提取综合评分随超声功率增大而提高，结果见图 4。由于试验所用超声波清洗仪最大功率为 400 W，因此选择 400 W 作为超声提取功率。

2.7.4　超声时间对提取综合评分的影响　固定液料比为 70∶1，超声功率为 400 W，酶反应时间为 2 h，酶反应温度为 50 ℃，考察不同超声时间（15、30、45、60、75 min）对提取综合评分的影响。结果见图 5，提取综合评分随超声时间的增加而升高，30 ～ 45 min 提取综合评分的提高幅度最大。超声

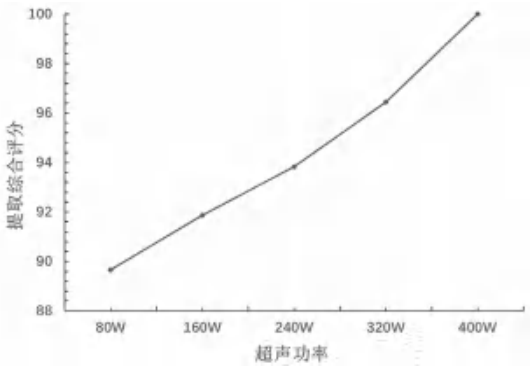


图 4 超声功率对提取综合评分的影响

Fig 4 Effect of ultrasonic power on the extraction comprehensive score

时间对提取影响的原因既有随超声时间增加使更多的酶和目标物被提取出，也有在超声提取时其酶促反应也同时发生。超声波清洗仪的水温随着超声时间的增加而升高，当超声时间超过 45 min 后水温在 50 ℃以上，此温度适宜酶水解反应的发生。由于对超声时间考察时选择的酶反应时间为 2 h，此时提取液中的酶与底物未反应完全，导致出现提取综合评分在较长时间内随着超声时间的增加而提高。因此超声时间对提取综合评分的影响是由多个因素共同作用叠加的结果。为尽可能平衡各因素的影响，并节约能源和缩短提取时间，选择超声时间 30、45、60 min 进行响应面优化。

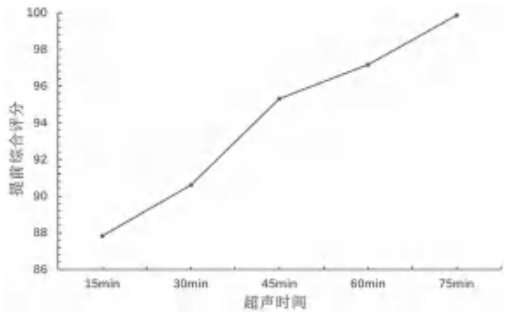


图 5 超声时间对提取综合评分的影响

Fig 5 Effect of ultrasonic time on the comprehensive score

2.7.5 酶反应时间对提取综合评分的影响 固定液料比为 70∶1，超声功率为 400 W，超声时间为 45 min，酶反应温度为 50 ℃，考察不同酶反应时间（1、2、3、4、5、6、7、8、9 h）对提取综合评分的影响。结果提取综合评分在 9 h 内随酶反应时间的增加而提高，但当酶反应时间高于 8 h 时提取综合评分增幅较小，提取综合评分趋于平稳，结果见图 6。故选择酶反应时间 7、8、9 h 进行响应面优化。

2.8 响应面试验设计

结合单因素试验结果，使用 Box-Behnken 设计法，固定酶反应温度为 50 ℃、超声功率为 400 W，选择对提取工艺影响较大的液料比（A）、酶反应时间（B）、超声时间（C）作为自变量，以－1、0、1 表示各自变量的水平，设计三因素三水平的响应面试验，设定因素和水平见表 2。

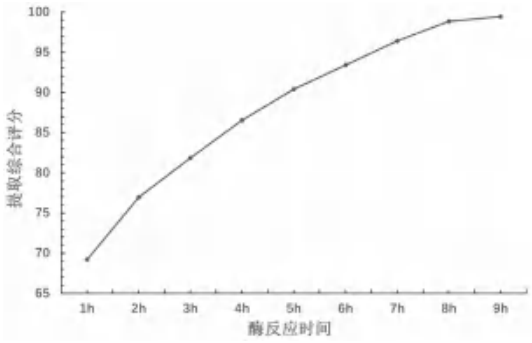


图 6 酶反应时间对提取综合评分的影响

Fig 6 Effect of enzyme reaction time on the extraction comprehensive score

表 2 响应面试验因素与水平

Tab 2 Factor and level of response surface methodology

水平	因素		
	A. 液料比	B. 酶反应时间 /min	C. 超声时间 /h
－1	60∶1	7	30
0	70∶1	8	45
1	80∶1	9	60

2.9 响应面试验结果与分析

2.9.1 响应面试验设计方案及结果 采用 Design-Expert10.0.3 进行响应面试验方案设计，试验方案及结果见表 3，方差分析结果见表 4。通过软件分析得到回归方程：$Y = 96.86 + 0.086A + 1.63B - 0.081C + 0.016AB + 0.15AC + 0.89BC - 0.36A^2 - 1.56B^2 - 0.64C^2$。

由表 4 可知，模型 $P < 0.01$，失拟项 $P > 0.05$，相关系数 $R^2 = 0.9236$，说明该模型拟合度良好，试验误差较小，试验设计方案可靠，能够准确预测试验值。其中酶反应时间对提取综合评分的影响极显著（$P < 0.01$），液料比对提取综合评分的影响不显著（$P > 0.05$），各因素影响排序依次为酶反应时间（B）＞超声时间（C）＞液料比（A），表明利用该方法所得核苷与（*R*，*S*）-告依春主要与药材自身的酶水解反应有关，证实了前期结论的正确性。因素交互项 BC 对提取综合评分影响显著（$P < 0.05$），AB、AC 对提取综合评分影响不显著。二次项 B^2 对提取综合评分影响极显著（$P < 0.01$），A^2、C^2 对提取综合评分影响不显著。

2.9.2 响应面分析 由图 7 可知，提取综合评分随各因素水平的升高先增加后减少，酶反应时间

表 3　响应面试验方案与结果

Tab 3　Design and results of response surface methodology

编号	液料比	酶反应时间 /h	超声时间 /min	尿苷含量 /（mg·g^{-1}）	腺嘌呤含量 /（mg·g^{-1}）	（*R*，*S*）-告依春含量 /（mg·g^{-1}）	鸟苷含量 /（mg·g^{-1}）	腺苷含量 /（mg·g^{-1}）	提取综合评分
1	60∶1	8	30	0.6858	0.1267	5.6816	0.7968	0.8216	95.7039
2	80∶1	8	30	0.6932	0.1288	5.4875	0.7694	0.8411	95.3077
3	60∶1	8	60	0.6864	0.1248	5.6983	0.8167	0.8293	96.1747
4	80∶1	8	60	0.6987	0.1354	5.5329	0.7701	0.8323	96.3781
5	70∶1	8	45	0.6884	0.1303	5.7058	0.7931	0.8268	96.4063
6	70∶1	8	45	0.6931	0.1301	5.7047	0.7979	0.8369	96.8487
7	70∶1	7	60	0.6681	0.1203	5.1385	0.7474	0.8273	91.3199
8	60∶1	9	45	0.6818	0.1420	5.6081	0.7606	0.7995	96.1025
9	70∶1	8	45	0.6870	0.1291	5.7023	0.8154	0.8373	96.9608
10	80∶1	9	45	0.6889	0.1389	5.7377	0.7546	0.8142	96.5013
11	70∶1	8	45	0.6931	0.1333	5.7299	0.8092	0.8282	97.4652
12	60∶1	7	45	0.6775	0.1243	5.4176	0.7574	0.8311	93.4668
13	70∶1	9	30	0.6879	0.1396	5.6808	0.7492	0.8159	96.2779
14	80∶1	7	45	0.6865	0.1260	5.1156	0.7587	0.8686	93.8021
15	70∶1	8	45	0.6851	0.1292	5.6748	0.8106	0.8391	96.7594
16	70∶1	9	60	0.6885	0.1392	5.7117	0.7699	0.8199	96.9577
17	70∶1	7	30	0.6922	0.1266	5.1885	0.7622	0.8598	94.1906

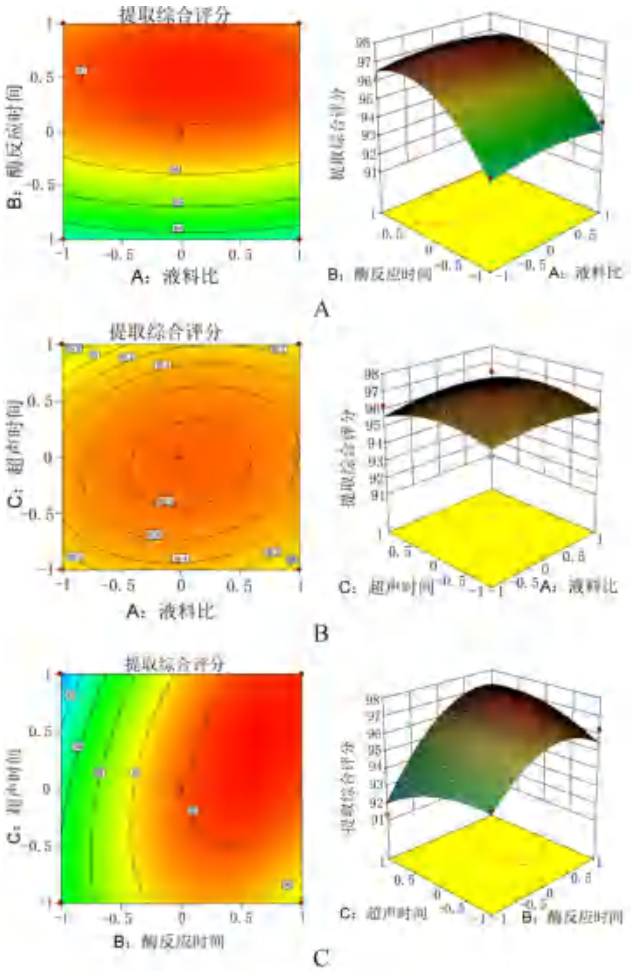


图 7　各因素交互作用响应面图和等高线图

Fig 7　Response surface and contour plots for interaction between factors

表 4　方差分析结果

Tab 4　Variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	38.1024	9	4.2336	9.4049	0.0037
A	0.0366	1	0.0366	0.0813	0.7838
B	21.3207	1	21.3207	47.3638	0.0002
C	0.0528	1	0.0528	0.1172	0.7421
AB	0.0010	1	0.0010	0.0022	0.9636
AC	0.0899	1	0.0899	0.1997	0.6685
BC	3.1516	1	3.1516	7.0014	0.0331
A^2	0.5386	1	0.5386	1.1965	0.3102
B^2	10.2761	1	10.2761	22.8283	0.0020
C^2	1.7209	1	1.7209	3.8229	0.0915
残差	3.1510	7	0.4501		
失拟项	2.5625	3	0.8542	5.8056	0.0612
纯误差	0.5885	4	0.1471		
总和	41.2535	16			
R^2	0.9236				

坡度最为陡峭。等高线呈椭圆形，表明各因素间交互作用明显，等高线沿着酶反应时间方向的变化较为密集，而沿液料比和超声时间方向较为疏松。可知酶反应时间对提取综合评分的影响大于液料比和超声时间。

2.9.3　最佳提取工艺的确定与验证　通过软件分析优化得知，板蓝根中核苷类成分和（*R*，*S*）-告依春的提取最佳工艺条件为酶反应温度 50 ℃、超声功率 400 W、液料比 71.919∶1、酶反应时间 8.638 h、超声时间 51.034 min，在此条件下提

取综合评分的预测值为 97.399。考虑到试验的可操作性，将液料比设定为 75∶1、酶反应时间设定为 8 h 40 min、超声时间设定为 50 min。为验证该模型预测值的准确性，在上述条件下进行 3 次平行提取试验，所得提取综合评分的平均值为 97.137，与预测值的相对误差为 0.27%，实测值与模型预测值接近，结果表明本试验优化模型结果真实可靠，方法可行性强，有较高的实际应用价值。

3 讨论

本研究建立的色谱条件除可以测定尿苷、腺嘌呤、（*R*，*S*）-告依春、鸟苷、腺苷的含量外，还能够测定尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤的含量。但考虑到提取出的成分含量相差悬殊，为保证最终结果和结论的准确性，故选定尿苷、腺嘌呤、（*R*，*S*）-告依春、鸟苷、腺苷 5 种含量较高的物质计算提取综合评分，用于评价提取结果。

将优化后各物质提取率与煎煮法进行比较，结果显示（*R*，*S*）-告依春提取率较煎煮法增加了 15 倍以上；尿苷、腺嘌呤提取率增加了 3 倍以上；鸟苷提取率增加近 3 倍、腺苷提取率增加 2 倍以上。

硫代葡萄糖苷和黑芥子酶广泛存在于十字花科植物当中。在植物细胞内，硫代葡萄糖苷和黑芥子酶彼此分离，当植物细胞组织被破坏时，黑芥子酶被释放出来，从而将硫代葡萄糖苷水解[10-12]。虽然目前对于板蓝根中核苷类物质含量增多的机制尚未阐明，但综合试验结果认为其与板蓝根中的内源性黑芥子酶催化的水解反应可能具有一定相关性。研究利用板蓝根中内源性黑芥子酶，给予适当的反应条件并结合超声波辅助提取，使（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取率大幅度提高。该方法操作简便、成本低、经济性强，在不添加外源性物质的情况下即可显著提高板蓝根中（*R*，*S*）-告依春和核苷类化合物的提取率，可为进一步优化板蓝根有效成分的提取工艺，降低药物生产成本，增强药物疗效等方面的研究提供基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S].2020：214-215.
[2] 王建敏，李伟 . 板蓝根颗粒中有效成分的测定及药理作用研究进展 [J]. 中国医药导报，2019，16（18）：49-52.
[3] 黄远，李菁，徐科一，等 . 板蓝根抗流感病毒有效成分研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（20）：2618-2623.
[4] 杨建昕，李峰，李娜，等 . 板蓝根抗病毒活性成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2016，18（7）：141-143.
[5] 赵美雪，马丽，盛钰，等 . 脂质体仿生膜联合 LC-MS 筛选板蓝根有效成分 [J]. 中南药学，2015，11（11）：1168-1171.
[6] Xie Z，Shi Y，Wang Z，et al. Biotransformation of glucosinolates epiprogoitrin and progoitrin to（*R*）-and（*S*）-goitrin in *Radix isatidis* [J]. J Agric Food Chem，2011，59（23）：12467-12472.
[7] 江晓倩，肖建平，张秋勤 . 不同提取方式对板蓝根水提液中（*R*，*S*）-告依春稳定性的影响 [J]. 临床合理用药杂志，2020，13（32）：81-83.
[8] 任国萍，李铮，傅欣彤 . HPLC 法同时测定板蓝根药材中尿苷、鸟苷、（*R*，*S*）-告依春和腺苷 [J]. 中国新药杂志，2012，21（19）：2330-2334.
[9] 池絮影，傅咏梅，崔曰新，等 . 板蓝根化学成分与抗流感病毒神经氨酸酶活性相关性的探讨 [J]. 中草药，2016，47（22）：3982-3989.
[10] 孙艳伟，张泽生，王田心，等 . 十字花科植物中黑芥子酶的研究进展 [J]. 食品研究与开发，2017，38（11）：216-220.
[11] 李鲜，陈昆松，张明方，等 . 十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究进展 [J]. 园艺学报，2006，33（3）：675-679.
[12] 修丽丽，钮昆亮 . 十字花科植物中的硫代葡萄糖苷及其降解产物 [J]. 浙江科技学院学报，2004，16（3）：187-189，211.

（收稿日期：2022-04-13；修回日期：2022-05-31）

毛花苷丙体外抑制单纯疱疹病毒Ⅰ型及对病毒合成基因表达的影响

叶凌凤，吴松斌，熊东林，李容珍*（华中科技大学协和深圳医院，广东　深圳　518000）

摘要：目的　探讨毛花苷丙体外抗单纯疱疹病毒Ⅰ型（HSV-1）的作用。**方法**　采用 CCK8 法计算毛花苷丙的半数有毒浓度（TC_{50}）。细胞病变效应（CPE）和病毒滴度评价毛花苷丙的抗 HSV-1 作用。实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）和蛋白免疫印迹法探究毛花苷丙对 HSV-1 基因组转录、蛋白质合成的作用。**结果**　0.1 μmol·L^{-1}（TC_{50} = 0.32 μmol·L^{-1}）毛花苷丙可显著抑制 HSV-1 诱导的 CPE。病毒滴度随着毛花苷丙处理浓度的增加显著下降（$P < 0.05$），与 CPE 趋势一致。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示，HSV-1 即刻早期基因（*IE*）*ICP0*、早期基因（*E*）*UL23*、潜伏相关基因 *LAT*、糖蛋白 G 编码基因 *US4* 和病毒蛋白 ICP0 的表达均能被毛花苷丙抑制（$P < 0.05$），且抑制呈剂量依赖性。毛花苷丙预处理可以抑制 HSV-1 诱导的 CPE，且抑制呈剂量依赖性。**结论**　毛花苷丙通过抑制 HSV-1 基因组转录和蛋白质合成抵抗 HSV-1 感染，可以作为抗 HSV-1 的新型候选药物。

关键词：毛花苷丙；单纯疱疹病毒Ⅰ型；抗病毒；病毒滴度
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2559-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.018

In vitro inhibition of herpes simplex virus type Ⅰ by lanatoside C and its effect on gene expression of virus synthesis

YE Ling-feng, WU Song-bin, XIONG Dong-lin, LI Rong-zhen* (*Union Shenzhen Hospital*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Shenzhen*　*Guangdong*　518000)

Abstract: Objective　To determine the anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of lanatoside C in vitro. **Methods**　The median toxic concentration (TC_{50}) was assessed by CCK8 assay. The cytopathic effect (CPE) and viral titers were used to evaluate the anti-HSV-1 effect of lanatoside C. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to determine the effect of lanatoside C on HSV-1 genome transcription and protein synthesis. **Results**　Lanatoside C (0.1 μmol·L^{-1}, TC_{50} = 0.32 μmol·L^{-1}) significantly inhibited HSV-1-induced CPE. The virus titer decreased significantly with the increase of lanatoside C ($P < 0.05$), which was consistent with the CPE degree. RT-qPCR and Western blot showed that the expression of HSV-1 immediate early genes *ICP0*, early genes *UL23*, latency-associated gene *LAT*, glycoprotein G-encoding gene *US4* and viral protein ICP0 were inhibited by lanatoside C in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Pre-addition of lanatoside C inhibited HSV-1-induced CPE in a dose-dependent manner. **Conclusion**　Lanatoside C resists HSV-1 infection by inhibiting HSV-1 genome transcription and protein synthesis, and can be used as a new candidate drug against HSV-1.

Key words: lanatoside C; herpes simplex virus type 1; antivirus; viral titers

单纯疱疹病毒Ⅰ型（herpes simplex virus type 1，HSV-1）是一种常见的人类双链 DNA 病毒，属于疱疹病毒科 α 病毒亚科，可在受感染个体的神经元中潜伏终生。HSV-1 感染引起的角膜炎

基金项目：深圳市南山区技术研发和创意设计项目（No.NS2021020）。
作者简介：叶凌凤，女，主管护师，主要从事疱疹神经痛临床研究，email：150588088@qq.com　*通信作者：李容珍，女，硕士，主要从事疱疹神经痛和肿瘤耐药研究，email：13129367252@163.com

致盲率居各种角膜病之首，中枢神经系统感染HSV-1可导致急性病毒性脑炎或复发性淋巴细胞性脑膜炎，致死率和致残率较高[1-7]。目前临床上批准用于治疗HSV感染的药物主要有核苷类似物，包括阿昔洛韦及其衍生物（喷昔洛韦、泛昔洛韦和伐昔洛韦）[8]，但是长期使用这些药物容易产生耐药性，因此开发抗HSV-1的新药至关重要。毛花苷丙是美国食品药品监督管理局（FDA）批准的一个强心苷，广泛用于治疗心力衰竭和心律失常。近年来，有研究报道毛花苷丙有抗肿瘤和抑制RNA病毒（登革热病毒、黄病毒等）的作用[9-11]，但是关于毛花苷丙抑制HSV-1的研究未见报道。本研究从体外细胞实验初步探讨毛花苷丙的抗HSV-1的作用，为筛选新型抗HSV-1药物提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

细胞培养箱（美国Thermo公司）；生物安全柜（新加坡ESCO公司）；酶标仪（美国BioTek公司）；倒置显微镜（日本OLYMPUS公司）；低速台式离心机（德国Eppendorf公司）；细胞培养板（美国Corning公司）；全自动酶标仪、荧光定量PCR仪（美国Bio-Rad公司）等。

1.2 试药

毛花苷丙（纯度：99.81%，美国Selleck公司）；阿昔洛韦（ACV，纯度：99.34%，浙江亚太药业股份有限公司）；胎牛血清（FBS，Newzerum，货号：FBS-S500）；DMEM培养基（武汉普诺赛公司，货号：SH30022.01）；胰酶（美国Gibco公司，货号：25200-072）；CCK8（广州贝博生物科技有限公司，货号：BB-4202-4000T）；Trizon（美国Life公司，货号：15596-026）；反转录试剂盒（日本Takara公司，货号：RR047A-2）；ICP0抗体（美国CST公司，号：ab6513）；GAPDH抗体（美国Proteintech公司，货号：60004-1-Ig）；Anti-mouse IgG（美国CST公司，7076S）；RealStar Green Master Mix（中国康润生物，A304-101）。

1.3 细胞和病毒株

Vero细胞购自美国ATCC细胞库；实验用Herpes simplex virus type Ⅰ KOS株购自ATCC（https://www.atcc.org/products/vr-1493，货号：VR-1493™）。

2 方法

2.1 病毒半数感染量（$TCID_{50}$）测定

用DMEM细胞完全培养液（含10%FBS和双抗）将病毒连续梯度稀释（10^{-1}～10^{-10}），将稀释的病毒接种到经24 h培养长满单层Vero细胞的96孔板中，每一稀释度重复8个孔，每孔接种100 μL病毒，设不加病毒液的正常细胞作为对照，37 ℃、5%CO_2培养箱中培养2 h后更换新鲜培养基。观察细胞病变程度（cytopathic effect，CPE），连续观察6 d。按Reed-Muench，计算$TCID_{50}$。距离比＝高于50%病变率－50%/（高于50%病变率－低于50%病变率）；lg$TCID_{50}$＝距离比×稀释度对数之差＋高于50%病变率的稀释度的对数。

2.2 毛花苷丙细胞毒性测定

取生长状态良好的Vero细胞按每孔1×10^4铺入96孔板中，过夜培养后加入不同稀释浓度的毛花苷丙（0.001、0.01、0.1、1和10 μmol•L^{-1}），每个浓度设3个复孔，重复3次，对照组不加药，空白组只加等体积培养基，48 h后加入CCK8孵育2 h，用酶标仪测定450 nm处的吸光度，根据各浓度下的细胞存活率计算毛花苷丙的半数有毒浓度（TC_{50}）。细胞存活率（%）＝（药物组平均*OD*值－空白组平均*OD*值）/（对照组平均*OD*值－空白组平均*OD*值）×100%。

2.3 CPE检测

取生长状态良好的Vero细胞按每孔2×10^5铺入6孔板中，采用治疗给药和预防给药两种方式探究毛花苷丙抵抗HSV-1病毒感染的作用。

2.3.1 治疗给药 对照组加等体积毛花苷丙溶解液；HSV-1组加100 $TCID_{50}$的HSV-1病毒液吸附2 h后更换新鲜培养液；毛花苷丙微毒组加入含0.1 μmol•L^{-1}毛花苷丙的培养液；毛花苷丙毒性组加入含0.5 μmol•L^{-1}毛花苷丙的培养液；毛花苷丙抑制HSV-1作用组加100 $TCID_{50}$的HSV-1病毒液吸附2 h后更换成含0.1 μmol•L^{-1}毛花苷丙的培养液；阳性对照组加100 $TCID_{50}$的HSV-1病毒液吸附2 h后更换成含10 μmol•L^{-1} ACV的培养液；培养72 h后观察细胞病变情况并拍照。

2.3.2 预防给药 对照组加入等体积毛花苷丙溶解液；HSV-1组加100 $TCID_{50}$的HSV-1病毒液吸附2 h后更换新鲜培养液；毛花苷丙抑制HSV-1作用组先加入含不同浓度梯度（0.05、0.075和0.1 μmol•L^{-1}）毛花苷丙的培养液孵育2 h，再加入100 $TCID_{50}$ HSV-1病毒液共同孵育2 h后更换新鲜培养液；阳性对照组先加入含10 μmol•L^{-1} ACV培养液孵育2 h，再加入100 $TCID_{50}$ HSV-1病毒液共同孵育2 h后更换新鲜培养液；培养72 h后观察细胞病变情况并拍照。

2.4 病毒空斑实验

取生长状态良好的 Vero 细胞按每孔 2×10^5 个铺入 6 孔板中，37 ℃、5%CO_2 培养 24 h，加 100 $TCID_{50}$ 的 HSV-1 病毒液吸附 2 h 后弃病毒上清液。根据细胞毒性实验结果加入含不同浓度毛花苷丙（0.05、0.075 和 0.1 μmol • L^{-1}）或 10 μmol•L^{-1}ACV 的培养基继续培养，37 ℃、5%CO_2 培养箱培养 72 h 拍照并收集病毒上清液，收集的 Vero 细胞进行超声破碎释放病毒。将收集的病毒液（包含上清和细胞沉淀裂解液）梯度稀释（10^{-1} ～ 10^{-6}），每个稀释度 3 孔，重复 3 次。不同稀释梯度的病毒液加入长满单层的 Vero 细胞中，37 ℃吸附 2 h 后弃病毒液，PBS 轻轻洗涤细胞两遍，加入甲基纤维 -DMEM 混合物，48 h 后，4%PFA 固定 20 min，1% 结晶紫染色 30 min，拍照并计数空斑。病毒滴度按以下公式计算：病毒滴度＝（x_1 ＋ x_2 ＋ ... ＋ x_n）/（$n\times v$）$\times d$，单位为 PFU • mL^{-1}。其中 n 表示复孔个数；v 表示病毒量（mL），d 表示稀释倍数。x_1，x_2，x_n 表示同一稀释度在不同培养孔板中获得的空斑数。

2.5　RT-qPCR检测 HSV-1 mRNA 表达

用毛花苷丙（0.05、0.075 和 0.1 μmol • L^{-1}）或 10 μmol • L^{-1}ACV 处理 HSV-1（100 $TCID_{50}$）感染的 Vero 细胞 24 h。总 RNA 用 Trizon 体系提取，通过 Takara 反转录试剂盒得到 cDNAs。RT-qPCR 检测 HSV-1 即刻早期（*IE*）基因 *ICP0*，早期基因 *TK/UL23*，潜伏相关基因 *LAT*，包膜糖蛋白 G 编码基因 *US4*。本研究所用引物序列（5'-3'）：*ICP0_F*：GGTCGCCCTGTCGCCTTA，*ICP0_R*：GGTCGCCATGTTTCCCGT；*UL23_F*：AGCAAAAAGCCACGGAAGTC，*UL23_R*：AACACCCGCCAGTAAGTCATC；*LAT_F*：CGCCTTTCCTGTTCTCGCT，*LAT_R*：ACGCGGCGTCTTTGTTGA；*US4_F*：TGGACACCCTCTTCG，*US4_R*：CAGGCACACGTAACG；*GAPDH_F* TGGCCTTCCGTGTTCCTAC，*GAPDH_R*：GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA。

2.6　Western blot 检测 HSV-1 蛋白 ICP0 表达

用毛花苷丙（0.05、0.075 和 0.1 μmol • L^{-1}）或 10 μmol • L^{-1}ACV 处理 HSV-1（100 $TCID_{50}$）感染的 Vero 细胞 24 h。细胞用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min，12 000 r • min^{-1}离心 15 min 收集上清液，并使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液中的总蛋白浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，一抗孵育过夜，加二抗室温孵育 1 h，显影。

2.7　统计学方法

由 GraphPad Prism 8.0 软件计算得药物半数有毒浓度（TC_{50}）。数据统计采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　HSV-1 病毒的 $TCID_{50}$

HSV-1 经培养后，由 Reed-Muench 计算得其 $TCID_{50}$ 为 10^{-5}/0.1 mL，即病毒悬液作 10^{-5} 稀释后，每瓶（孔）细胞接种 0.1 mL 可使 50% 的 Vero 细胞产生病变，实验用病毒为 100 $TCID_{50}$。

3.2　毛花苷丙对 Vero 细胞的毒性作用

采用 CCK8 法检测出毛花苷丙对 Vero 细胞的 TC_{50} 为 0.32 μmol • L^{-1}，毛花苷丙 ≤ 0.1 μmol • L^{-1} 时，细胞存活率＞ 85%，后续实验用毛花苷丙浓度控制在≤ 0.1 μmol • L^{-1}，在所用毛花苷丙浓度范围内未见其对 Vero 细胞有增殖抑制作用（见图 1）。

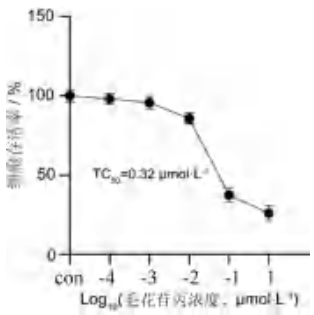


图 1　毛花苷丙对 Vero 细胞增殖的影响

Fig 1　Effect of lanatoside C on the cell proliferation of Vero cell

3.3　毛花苷丙对 HSV-1 感染 Vero 细胞的保护作用

镜下观察细胞病变情况（见图 2），正常细胞对照组和 ACV 阳性对照组细胞生长良好，细胞呈梭形，透光度较低，基本不见脱落细胞。病毒对照组细胞病变明显，镜下可见细胞明显变圆、脱落，透光度增加。0.1 μmol • L^{-1} 毛花苷丙对 Vero 细胞毒性较小，可明显抑制 HSV-1 诱导的 Vero 细胞病变，细胞呈梭形，脱落状态和透光度与对照组比差异不大。

3.4　毛花苷丙对 HSV-1 病毒抑制作用

病毒空斑实验观察到，随着毛花苷丙处理浓度的增大，病毒空斑数逐渐减少，与药物对感染细胞保护作用结果一致（见图 3）。病毒对照组与各药物组病毒空斑数差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。提示毛花苷丙有抑制 HSV-1 病毒作用。

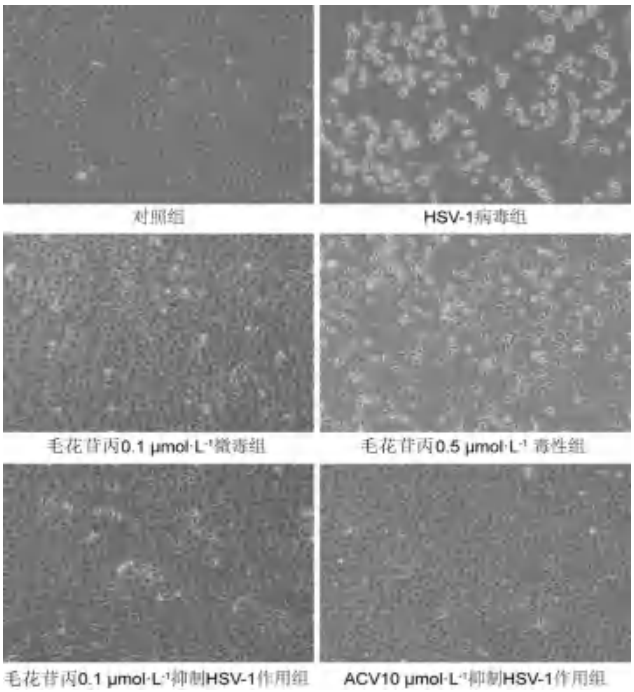


图 2　毛花苷丙对 HSV-1 诱导的 Vero 细胞病变的抑制作用（×100）

Fig 2　Inhibition of lanatoside C on HSV-1-induced CPE of Vero cells（×100）

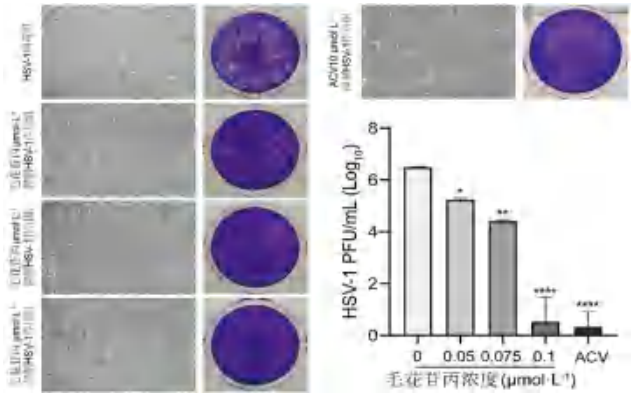


图 3　毛花苷丙对 HSV-1 病毒的抑制作用

Fig 3　Inhibition of lanatoside C on HSV-1 virus production

注：与 HSV-1 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the HSV-1 group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{****}P < 0.0001$.

3.5　毛花苷丙抑制 HSV-1 相关基因转录

为了探究毛花苷丙是否通过抑制病毒基因转录发挥抗感染作用，用毛花苷丙 0.05、0.075 和 0.1 μmol • L^{-1} 剂量分别处理感染 HSV-1（100 $TCID_{50}$）的 Vero 细胞 24 h 后收集细胞进行 RT-qPCR 实验，结果显示 HSV-1 即刻早期（*IE*）基因 *ICP0*、早期基因 *TK/UL23*、潜伏相关基因 *LAT*、包膜糖蛋白 G 编码基因 *US4* 均被毛花苷丙抑制，且抑制呈剂量依赖性（见图 4），表明毛花苷丙能够抑制 HSV-1 病毒基因转录。

3.6　毛花苷丙抑制 HSV-1 相关蛋白表达

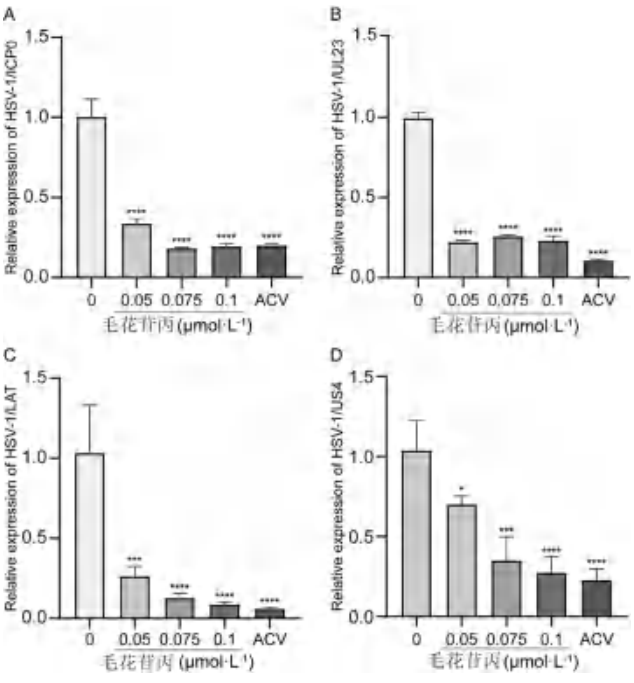


图 4　毛花苷丙对 HSV-1 基因转录的抑制作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig 4　Inhibition of lanatoside C on the transcription of HSV-1 gene（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

注：与 HSV-1 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the HSV-1 group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{****}P < 0.0001$）.

不同浓度的毛花苷丙（0.05、0.075 和 0.1 μmol • L^{-1}）处理感染 HSV-1（100 $TCID_{50}$）的 Vero 细胞 24 h，收集细胞并用 Western blot 检测 HSV-1 蛋白 ICP0 的表达。结果见图 5，与病毒对照组比较，随着毛花苷丙浓度增加，HSV-1 蛋白 ICP0 的表达呈剂量依赖性降低（$P < 0.0001$），表明毛花苷丙可抑制 HSV-1 蛋白表达。

3.7　毛花苷丙预防给药抑制 HSV-1 病毒感染 Vero 细胞

为了探究毛花苷丙预防给药能否促进宿主细胞抵抗 HSV-1 病毒感染，我们预先加入不同浓度的毛花苷丙，在病毒吸附 2 h 后撤除，继续培养 72 h 后镜下观细胞病变情况。从图 6 可以观察到对照组细胞生长良好，病毒组细胞明显病变，而毛花苷丙作用组随着药物浓度的增加细胞病变逐渐减弱。此外，预先加入 ACV 也能减轻细胞病变程度。以上结果表明毛花苷丙在预防给药的方式下也能发挥一定程度的抗 HSV-1 病毒效应。

4　讨论

临床长期大量使用 ACV 等核苷类作为抗单纯疱疹病毒主要治疗药物，导致耐药病毒株的产生[12]，因此开发新型抗病毒药物迫在眉睫。近年来，随着对传统中药及中药提取物的研究探

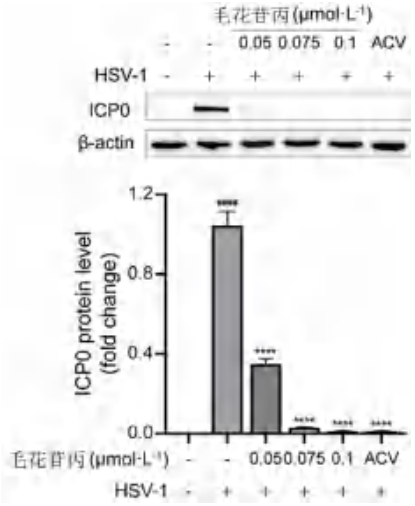


图 5　毛花苷丙对 HSV-1 蛋白 ICP0 表达的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 5　Inhibition of lanatoside C on the expression of HSV-1 protein ICP0（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与正常对照组比较，$^{\#\#\#\#}P<0.0001$；与 HSV-1 组比较，$^{****}P<0.0001$。

Note：Compared with the NC group，$^{\#\#\#\#}P<0.0001$；compared with the HSV-1 group，$^{****}P<0.0001$.

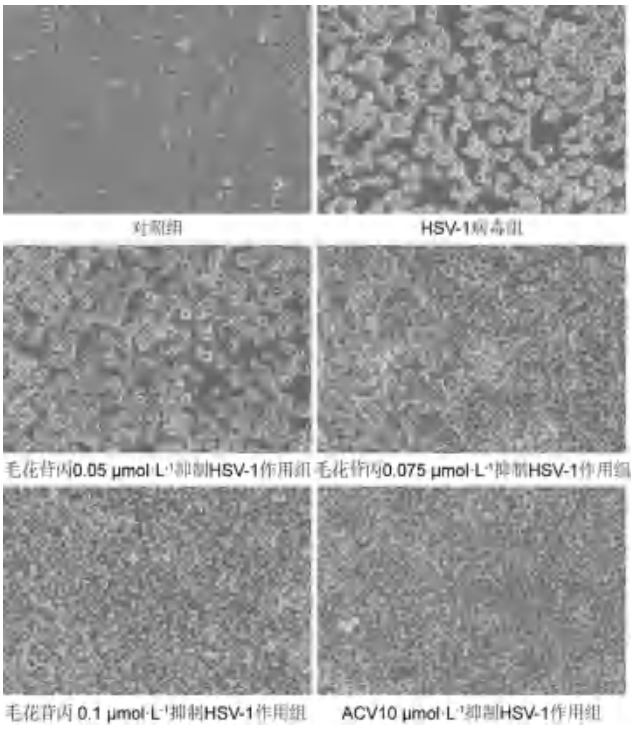


图 6　毛花苷丙预处理对 HSV-1 诱导的 Vero 细胞病变的抑制作用（×100）

Fig 6　Inhibition of lanatoside C pretreatment on HSV-1-induced CPE（×100）

索，关于植物提取物和中药抗病毒的研究越来越多[13-16]，但老药新用仍是一个药物研发的有效策略。与全新的药物研发比较，老药新用具有安全性较好，研究资料和临床数据较为丰富，药物研发周期较短、成本低、产出高等优势。毛花苷丙是一种经 FDA 批准的治疗心力衰竭和心律失常的强心苷，其在治疗癌症方面有很大的潜力[17-18]，但对其抗病毒活性的研究仍然有限。近年来，随着新型冠状病毒（SARS-CoV-2）大流行的持续，毛花苷丙的抗病毒潜力得到了广泛的关注[10]。本研究以 HSV-1 感染 Vero 细胞为模型，初步探讨毛花苷丙抗 HSV-1 的作用。

HSV-1 病毒感染是一个复杂的过程，包括病毒吸附细胞、穿入细胞、细胞内脱壳、病毒基因组的复制和转录、病毒蛋白质的合成、病毒组装和释放[10]过程。抗病毒药物主要通过阻碍这些过程而发挥作用。我们首先通过细胞病变和空斑减少实验证实毛花苷丙对 HSV-1 病毒有显著的抑制作用。接下来采用 RT-qPCR 和 Western blot 探究毛花苷丙是否通过抑制 HSV-1 病毒基因转录和病毒蛋白合成来抵抗病毒感染。HSV-1 在感染过程中以严格调控的级联方式表达其基因，包括即刻早期基因（*IE*）、早期基因（*E*）和晚期基因（*Late genes*，*L*）的顺序表达[19]。本研究发现 HSV-1 即刻早期（*IE*）基因 *ICP0*[20-21]、早期基因 *TK/UL23*[21]、潜伏相关基因 *LAT*[22]、晚期基因包膜糖蛋白 G 编码基因 *US4*[23] 和即刻早期调控蛋白 ICP0 均能被毛花苷丙抑制。表明毛花苷丙通过抑制 HSV-1 基因复制来抵抗病毒感染。

进一步探究毛花苷丙能否通过预防给药的方式发挥抗 HSV-1 作用。我们在 HSV-1 吸附前加入不同浓度毛花苷丙，并在病毒孵育结束后撤除，可以观察到 HSV-1 诱导的细胞毒性被毛花苷丙显著抑制。考虑到目前尚无研究认为强心苷类药物可以通过影响病毒附着抵抗病毒感染[10]，我们推测毛花苷丙预处理可能是通过影响病毒附着之外的其他途径发挥抗病毒效应的。毛花苷丙是一种天然类固醇化合物，可以直接浸入细胞质膜并与细胞区室中的脂质相互作用[10]。HSV-1 属于包膜病毒，可以通过其膜与宿主细胞的质膜融合直接进入细胞，称为直接融合。提示毛花苷丙可能通过浸入宿主细胞质膜后改变质膜的流动性，进而影响 HSV-1 以质膜融合的方式进入宿主细胞。毛花苷丙另一种抑制病毒进入的机制可能与触发非受体酪氨酸激酶（non-receptor tyrosine kinase，c-Src）进而促进细胞凋亡、自噬相关[10，24]。

综上所述，毛花苷丙在治疗给药和预防给药两种方式下均可发挥不同程度的体外抗病毒活性，这可能是药物通过抑制 HSV-1 复制和阻碍 HSV-1 进入宿主细胞而实现的，其机制还需进一步研究。

参考文献

[1] Berkhout A，Kapoor V，Heney C，et al. Epidemiology and long-term neurological sequelae of childhood herpes simplex CNS infection [J]. J Paediatr Child Health，2022. doi: 10.1111/jpc.15992.

[2] Suzich JB，Cliffe AR. Strength in diversity：understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation [J]. Virology，2018，522：81-91.

[3] Krzyzowska M，Jarneborn A，Thorn K，et al. Tofacitinib treatment in primary herpes simplex encephalitis interferes with antiviral response [J]. J Infect Dis，2022，225（9）：1545-1553.

[4] Haghnegahdar M，Pennipede D，Massey B，et al. Uveo-meningeal syndrome secondary to herpes simplex virus related acute retinal necrosis [J]. Am J Ophthalmol Case Rep，2022，25：101409.

[5] Lee GH，Kim J，Kim HW，et al. Herpes simplex viruses（1 and 2）and varicella-zoster virus infections in an adult population with aseptic meningitis or encephalitis：a nine-year retrospective clinical study [J]. Medicine（Baltimore），2021，100（46）：e27856.

[6] Sehgal A，Pokhrel E，Castro WR，et al. Mollaret's meningitis：a rare entity [J]. Cureus，2021，13（5）：e15264.

[7] Rozenberg F. Herpes simplex virus and central nervous system infections：encephalitis，meningitis，myelitis [J]. Virologie（Montrouge），2020，24（5）：283-294.

[8] Annunziata G，Maisto M，Schisano C，et al. Resveratrol as a novel anti-herpes simplex virus nutraceutical agent：an overview [J]. Viruses，2018，10（9）：473.

[9] Cheung YY，Chen KC，Chen H，et al. Antiviral activity of lanatoside C against dengue virus infection [J]. Antiviral Res，2014，111：93-99.

[10] Škubník J，Bejček J，Pavlíčková VS，et al. Repurposing cardiac glycosides：drugs for heart failure surmounting viruses [J]. Molecules，2021，26（18）：5627.

[11] Reddy D，Kumavath R，Ghosh P，et al. Lanatoside C induces G_2/M cell cycle arrest and suppresses cancer cell growth by attenuating MAPK，Wnt，JAK-STAT，and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways [J]. Biomolecules，2019，9（12）：792.

[12] 高秋琳，张海萍 . 阿昔洛韦耐药机制及相关流行病学研究 [J]. 实用皮肤病学杂志，2015，8（4）：269.

[13] 林英姿 . 红树林淡紫拟青霉胞外多糖抗 HSV-1 作用机制实验研究 [M]. 海南：海南省热带医学研究会，2017.

[14] 王永霞，王娇娇，黄燕妮，等 . 海南红树林淡紫拟青霉胞外多糖抗 HSV-1 作用研究 [J]. 解放军医药杂志，2020，32（8）：1-5.

[15] 张群铄，谭红胜，付文卫，等 . 夏枯草酶解水提液分级醇沉及其抗 HSV-1 活性 [J]. 中成药，2021，43（7）：1947-1949.

[16] 李浩，刘伟，侯贺祥，等 . 中药防治新型冠状病毒肺炎专利复方用药规律分析 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2426-2431.

[17] Duan Y，Chen L，Shao J，et al. Lanatoside C inhibits human cervical cancer cell proliferation and induces cell apoptosis by a reduction of the JAK2/STAT6/SOCS2 signaling pathway [J]. Oncol Lett，2021，22（4）：740.

[18] Hu Y，Yu K，Wang G，et al. Lanatoside C inhibits cell proliferation and induces apoptosis through attenuating Wnt/β-catenin/c-Myc signaling pathway in human gastric cancer cell [J]. Biochem Pharmacol，2018，150：280-292.

[19] Zhu S，Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus [J]. Virulence，2021，12（1）：2670-2702.

[20] Hou F，Sun Z，Deng Y，et al. Interactome and ubiquitinome analyses identify functional targets of herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 [J]. Front Microbiol，2022，13：856471.

[21] Liu Y，Chen L，Liu W，et al. Cepharanthine suppresses herpes simplex virus type 1 replication through the down-regulation of the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways [J]. Front Microbiol，2021，12：795756.

[22] Tormanen K，Matundan HH，Wang S，et al. Small non-coding RNA（sncRNA1）within the latency-associated transcript modulates herpes simplex virus 1 virulence and the host immune response during acute but not latent infection [J]. J Virol，2022，96（7）：e0005422.

[23] Pfaff F，Groth M，Sauerbrei A，et al. Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing [J]. J Gen Virol，2016，97（10）：2732-2741.

[24] Burkard C，Verheije MH，Haagmans BL，et al. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells [J]. J Virol，2015，89（8）：4434-448.

（收稿日期：2022-05-06；修回日期：2022-06-02）

环孢多肽 A 透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透试验研究

刘鑫鑫，李鑫，崔闻宇*，王瑾，吴廷影（哈尔滨商业大学药学院国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心，哈尔滨　150076）

摘要：目的　制备环孢多肽 A 透皮贴剂。**方法**　通过单因素试验和正交试验，以累计透过量、促渗倍数、黏附性、外观等为指标，对制备工艺进行优化，得出透皮制剂的最优工艺。**结果**　贴剂最优处方为 Eudragit E100（1.5 g）、柠檬酸三丁酯（1.5 mL）、薄荷醇（8%）、载药量（1%）。**结论**　最佳处方下制备的透皮贴剂黏附性适宜，工艺简便，且稳定可行；8% 薄荷醇与电致孔技术的联合应用可显著提高环孢多肽 A 透皮贴剂的累计透过量，具有较好的促渗作用。

关键词：环孢多肽 A；透皮贴剂；经皮渗透；促渗剂
中图分类号：R943.43　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2565-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.019

Preparation of transdermal patch of cyclosporine A and its in vitro transdermal penetration

LIU Xin-xin, LI Xin, CUI Wen-yu*, WANG Jin, WU Ting-ying (*Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs*, *Ministry of Education*, *School of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076)

Abstract: Objective　To prepare the transdermal patch of cyclosporine A. **Methods**　Through single factor test and orthogonal test, the preparation process was optimized by taking accumulative penetration, penetration multiple, adhesion and appearance as indexes. The optimal process of transdermal preparation was obtained. **Results**　The best prescription patch was Eudragit E100 (1.5 g), tributyl citrate (1.5 mL), menthol (8%) and drug loading (1%). **Conclusion**　The optimized transdermal patches have suitable adhesion, and are stable and feasible. The combination of 8% menthol and the electroporation technique obviously increases the cumulative permeation of cyclosporine A transdermal patches, with a good permeation promotion effect.

Key words: cyclosporine A; transdermal patch; transdermal permeation; permeation promoter

环孢多肽 A（cyclosporine A，CsA）为一种强效免疫抑制剂，是从真菌代谢物中提取出来的[1]，由 11 个氨基酸组成的环状多肽类化合物[2]。分子式为 $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$，相对分子质量为 1202.61。环孢多肽 A 通常呈白色粉末状，难溶于水，可溶于丙酮和乙醚，极易溶于甲醇、乙醇和乙腈。环孢多肽 A 可通过对免疫应答过程多环节发挥作用，选择性抑制辅助性 T 淋巴细胞（TH）的增殖及功能[3]，产生免疫调节作用，用于器官移植后的抗排斥反应及多种自身免疫性疾病的治疗。由于环孢多肽 A 口服制剂生物利用度低，个体差异大，且环孢多肽 A 的治疗窗很窄，血药浓度波动大，使用过程中极易产生潜在的健康问题[4]。经皮给药可以维持稳定的血药浓度，避免药物口服经胃肠循环及肝的首过效应[5]，可自主用药随时中断或恢复治疗，可避免或降低对全身的毒副作用，提高用药的安全性，使药效更持久[6]。但是由于皮肤角质层的屏障作用以及药物的理化性质的影响，药物递送效率降低，达不到有效血药浓度，因而利用电致孔技术联合中药促渗剂来提高药物的递送效率成为经皮给药研究的关键。本研究尝试将环孢多肽 A 制成透皮贴剂，对其制备工艺进

基金项目：黑龙江省博士后科研启动金（No.LBH-Q20102）；哈尔滨商业大学青年创新人才项目成果转化培育专项（No.2020CX53）；黑龙江省教育厅青年后备人才专项计划项目（No.2019CX41）；黑龙江省教育科学规划课题（No.GJB1421434）。
作者简介：刘鑫鑫，女，硕士，主要从事新型药物传输系统的研究，email：2243768839@qq.com　*通信作者：崔闻宇，女，副教授，博士，主要从事电化学传感器与药物新制剂的研究，email：cuiwenyu0603@163.com

行优化，为后期与不同途径给药的药动学作比较，研制环孢多肽 A 经皮给药制剂提供依据。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪（美国 Dionex 公司）；离心机（赛默飞世尔科技有限公司）；AS3120A 超声波清洗机（深圳市洁盟清洗设备有限公司）；透皮扩散池（泰兴市沪可玻璃制品有限公司）；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）；FA22048 电子天平（精度：0.0001g，上海精科天美科学仪器有限公司）；电致孔仪（迈胜设备有限公司）。

1.2 试药

环孢多肽 A 对照品、原料药（纯度均为 98%，南京都莱生物技术有限公司）；甲醇（Merck 公司）；无水乙醇（天津市天力化学试剂有限公司）；Eudragit E100、Eudragit RL00、Eudragit L100（德国罗姆公司）；丙烯酸树脂Ⅱ、丙烯酸树脂Ⅳ（上海源叶生物科技有限公司）；聚乙二醇 6000、邻苯二甲酸二乙酯（天津市博迪化工有限公司）；柠檬酸三丁酯、薄荷醇、肉豆蔻酸异丙酯（上海麦克林生化科技有限公司）；癸二酸二丁酯、氮酮（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；油酸（天津富宇精细化工有限公司）；除甲醇外，其余试剂均为分析纯。

1.3 试验动物

雄性 SD 大鼠，鼠龄 7 周，体质量 190 ～ 220 g[长春忆斯动物公司，许可证号：SCXK-2011-0004]。

2 方法与结果

2.1 环孢多肽 A 透皮贴剂的制备工艺

称取适量压敏胶黏剂置于烧杯中，加入适量复合溶媒（丙酮 - 异丙醇 1∶1），待其溶解后，依次加入环孢多肽 A（用适量乙醇搅拌使完全溶解）、增塑剂、促渗剂后，混合均匀超声脱气泡，采用自然流涎法均匀涂布于 3 cm×5 cm 的无纺布空贴上，室温下放置，待其固化 12 h 后，用硅油纸将其压覆防黏层，即得。

2.2 透皮贴体外经皮渗透试验

2.2.1 离体大鼠皮肤的制备 采用 10% 水合氯醛将大鼠麻醉，固定好，用电动剃毛推将大鼠腹部的毛发剔除干净，采用颈椎脱臼法处死后，立即剪下腹部的皮肤，将皮肤置于托盘上，仔细去除其皮下脂肪及黏液组织，用生理盐水反复冲洗干净后，保存于生理盐水中，于－ 20 ℃冻存备用。

2.2.2 体外渗透试验方法 将备用的鼠皮取出解冻，生理盐水冲洗干净后，将鼠皮放置在绝缘板上，连接好电致孔仪，调节到所需的电学参数（电压为 250 V、脉冲时间为 200 ms、脉冲个数为 80 个、脉冲频率为 40 pulses • min^{-1}），将正负电极接到鼠皮上，正负电极间距为 1 cm，电致孔结束后将电极移除，鼠皮立即放置在立式 Franz 扩散池上，皮肤角质层面朝向上方，再将制备好的透皮贴剂贴于皮肤角质层一侧，并用夹子固定，于接收室中注入 25 mL 经超声脱气的接收液（30% 的乙醇 - 生理盐水），盖上封口膜，水浴温度为（37±1）℃，磁转子搅拌速度 200 r • min^{-1}，透皮面积 3.14 cm^2。分别于 0、1、2、3、4、6、8 h 吸取 1 mL 透皮接收液后，立即补加等温、等体积的接收液，接收液经 0.45 μm 滤膜滤过后，取续滤液进样测定其峰面积，按式（1）计算透皮累计透过量，依据公式（2）计算透皮吸收促进效率。

$$Q_n = [C_n \times 1 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1]/3.14 \qquad 式（1）$$

式中 Q_n 为单位面积累计透过量（μg•cm^{-2}）；C_n 为第 n 个取样点的药物质量浓度（μg • mL^{-1}）；C_i 为第 i（$i \leqslant n-1$）个取样点的药物质量浓度（μg • mL^{-1}）。

$$ER = J_{SS+}/J_{SS-} \qquad 式（2）$$

稳态透皮速率 J_{ss}[μg/（cm^2 • h）] 表示在 t 时间内累计透过量对时间作线性回归曲线的斜率，J_{SS+} 是运用促透技术的稳态透皮速率，J_{SS-} 是被动扩散的稳态透皮速率。

2.3 HPLC 方法学考察

2.3.1 溶液的制备

① 对照品溶液：精密称取 5.06 mg 的环孢多肽 A 对照品，置于 25 mL 的量瓶中，将其用甲醇配制成 202.24 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，冷藏备用。

② 供试品溶液的制备：精密吸取 5 mL 的经皮给药试验后的接收液样品，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后即得。

③ 阴性样品溶液的制备：精密吸取 1.5 mL 的空白接收液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后即得。

2.3.2 色谱条件 色谱柱：Welchrom C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μL）；流动相：甲醇 - 水（90∶10）；流速：1 mL • min^{-1}；检测波长：210 nm；柱温：45 ℃；进样量：20 μL。

2.3.3 专属性试验 取“2.3.1”项下各溶液按“2.3.2”项下条件测定，结果环孢多肽 A 的出峰时间为 8.6 min 左右，峰形良好，供试品与对照品在相应位置上存在相同峰，且阴性样品溶液对测定结果不产生干扰，色谱图见图 1。

2.3.4 标准曲线绘制 精密称取 5.06 mg 的环孢多肽 A 对照品，置于 25 mL 的量瓶中，将其用甲

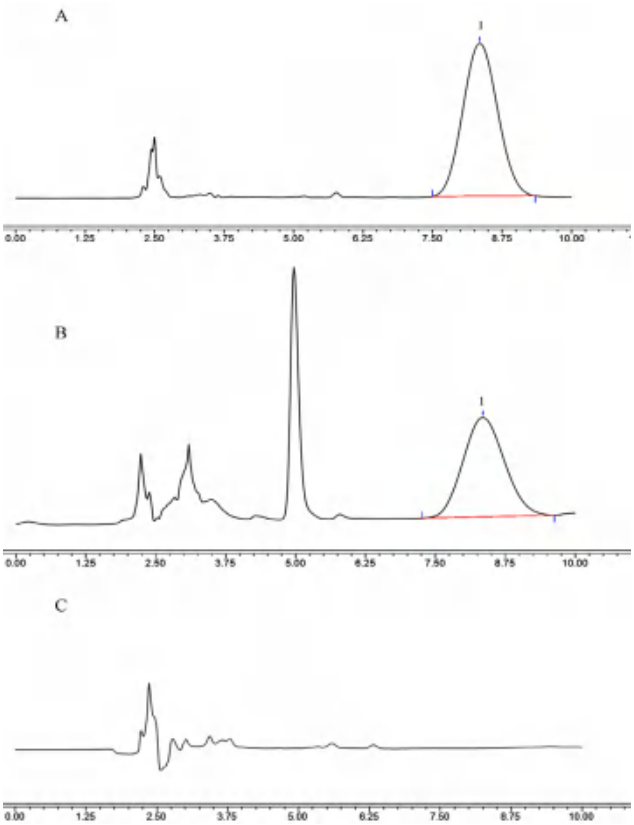


图 1　环孢多肽 A 的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of cyclosporine A

A. 对照品（reference）；B. 供试品（sample）；C. 阴性样品（negative sample）；1. 环孢多肽 A（cyclosporine A）

醇配制成 202.24 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。精密移取对照品储备液 0.1、1、2.5、3.5、5 mL 置于 10 mL 量瓶，加甲醇稀释至刻度，摇匀，配制成质量浓度分别为 2.02、20.22、50.56、70.78、101.12 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，进样测定。以质量浓度（C）为横坐标，峰面积（A）为纵坐标进行线性回归，得到环孢多肽 A 的回归方程：$A = 0.8625C - 0.3682$，$R^2 = 0.9999$。结果表明，在 2.02 ～ 101.12 μg • mL^{-1} 内，环孢多肽 A 的质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5　精密度　取低、中、高质量浓度的环孢多肽 A 对照品溶液（5.0、10.0、20.0 μg • mL^{-1}，临用新配），分别于同 1 d 之内连续进样测定 3 次，并在 3 d 之内连续进样测定，记录峰面积，结果显示，低、中、高浓度的对照品溶液日内精密度的 *RSD* 分别为 0.38%、1.2%、0.45%，低、中、高浓度的对照品溶液日间精密度的 *RSD* 分别为 0.68%、1.1%、1.7%。

2.3.6　稳定性　取同一环孢多肽 A 贴剂透过液 5 mL，分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定，测定其稳定性，结果显示，*RSD* 为 1.3%，表明环孢多肽 A 透过液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7　重复性　取同一批环孢多肽 A 贴剂进行体外透皮试验，平行制备 6 份 8 h 时的样品透过液，分别进样 20 μL，结果其峰面积 *RSD* 为 0.87%，表明此方法重复性良好。

2.3.8　加样回收试验　在已知浓度的低、中、高 3 个浓度的样品透过液中加入低、中、高 3 个浓度的环孢多肽 A 对照品溶液，每个浓度制备 3 份样品，进样分析，测定峰面积，计算回收率。结果显示，环孢多肽 A 低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 98.54%、99.65%、101.43%，*RSD* 分别为 0.54%、1.0%、1.1%。

2.4　*环孢多肽 A 贴剂的制备工艺的单因素考察*

2.4.1　压敏胶黏剂型号考察　称取 Eudragit E100、Eudragit RL100、Eudragit L 100、聚丙烯酸树脂Ⅱ、聚丙烯酸树脂Ⅳ 5 种类型的压敏胶黏剂各 1.5 g，分别加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，载药量为 1%、促渗剂（肉豆蔻酸异丙酯）用量 4%、增塑剂（柠檬酸三丁酯）用量为 1.5 mL，制备透皮贴剂，考察压敏胶黏剂型号对透皮贴剂的影响，以确定合适压敏胶黏剂的型号，结果见表 1。Eudragit L100 和聚丙烯酸树脂Ⅱ的初黏力相对较差；Eudragit L100 和 Eudragit RL100 持黏力较弱，综合外观性状的整体评价的结果，压敏胶黏剂型号确定为 Eudragit E100。

表 1　压敏胶黏剂型号单因素试验结果

Tab 1　Single factor test for pressure sensitive adhesive type

组别	初黏力 / 球号	持黏力 /min	剥离强度 /（N • cm^{-1}）	外观性状
Eudragit E100 组	8	44	3.58	浅黄色透明胶体，表面无气泡，触摸无残留整体性好
Eudragit RL100 组	6	35	1.61	乳白色透明胶体，表面无气泡，触摸无残留整体性好
Eudragit L100 组	4	26	1.19	乳白色胶体，黏度差，表面无气泡，触摸有残留整体性较差
聚丙烯酸树脂Ⅱ组	5	41	1.87	乳白色胶体，黏度较差，表面存稍有气泡，触摸有残留整体性一般
聚丙烯酸树脂Ⅳ组	6	47	3.32	浅黄色透明胶体，胶质较硬，表面平整度较差，有气泡存在，触摸有残留

2.4.2　压敏胶黏剂用量考察　分别称取质量为 1、1.5、2、2.5 g 的 Eudragit E100 压敏胶黏剂后，加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，载药量为 1%、促渗剂（肉豆蔻酸异丙酯）用量为 4%、增塑剂（柠檬酸三丁酯）用量为 1.5 mL，制备 4 种不同压敏胶黏剂类型的透皮贴剂，在相同电致孔参数作用下，以贴剂中环孢多肽 A 的累计透过量和透皮吸收效率为指标，考察不同用量压敏胶黏剂对透皮贴指标成分透过量的影响，结果见表 2。随着 Eudragit E100 压敏胶黏剂用量的增加，

环孢多肽 A 透皮贴剂的 Q_{8h} 和 J_{ss} 逐渐降低，其中 Eudragit E100 为 2.5 g 用量时的 Q_{8h} [（36.46±4.87）μg·cm^{-2}] 和 J_{ss} [（4.44±0.19）μg/（cm^2·h）] 明显低于 1 g 用量时的 Q_{8h} 和 J_{ss}。考虑到压敏胶黏剂的黏附性（Eudragit E100 用量低于 1 g 时透皮贴剂的黏附性较差），因此选择 Eudragit E100 1、1.5、2 g 这 3 个水平的浓度进行正交试验。

表 2 电致孔作用下不同用量压敏胶黏剂的药物释药性能

Tab 2 Drug release performance of different dosages of pressure sensitive adhesive under electroporation

组别	累计透过量 /（μg·cm^{-2}）	累计渗透曲线方程	稳态透皮速率 /[μg/（cm^2·h）]	r	ER_1	ER_2
Eudragit E100 1 g 组	56.88±6.93	$Q=7.39t-0.05$	7.39±0.84	0.9936	2.16	7.31
Eudragit E100 1.5 g 组	45.94±5.68	$Q=6.01t+0.39$	6.01±0.12	0.9852	1.76	5.95
Eudragit E100 2 g 组	41.40±4.67	$Q=5.15t+0.58$	5.15±0.03	0.9833	1.51	5.10
Eudragit E100 2.5 g 组	36.46±4.87	$Q=4.44t+0.44$	4.44±0.19	0.9806	1.30	4.40
只电致孔组	25.94±2.35	$Q=3.42t+2.00$	3.42±0.07	0.9305	—	3.39
空白组	8.85±1.34	$Q=1.01t+1.04$	1.01±0.43	0.9560	0.30	—

2.4.3 载药量考察 称取 Eudragit E100 各 1.5 g，加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，载药量分别为 1%、1.5%、2%、2.5%，促渗剂（肉豆蔻酸异丙酯）用量为 4%、增塑剂（柠檬酸三丁酯）用量为 1.5 mL，制备透皮贴，考察不同载药量对透皮贴剂的影响，试验结果见表 3。当载药量为 2.5% 时，贴剂的黏附性较差，且表面有细小的气泡产生；而当在载药量为 1%、1.5%、2% 时，其各项黏附性指标都较好，因此选择 1%、1.5%、2% 进行正交试验。

表 3 载药量单因素试验结果

Tab 3 Single factor test of drug loading

载药量 /%	初黏力 / 球号	持黏力 /min	剥离强度 /（N·cm^{-1}）	外观性状
1	8	47	3.39	浅黄色透明胶体，气味淡，表面光滑无气泡
1.5	7	39	2.65	浅黄色透明胶体，气味淡，表面光滑无气泡
2	7	36	3.27	浅黄色透明胶体，气味淡，表面光滑无气泡
2.5	5	27	1.94	浅黄色透明胶体，气味淡，表面有细小无气泡

2.4.4 增塑剂种类考察 称取 Eudragit E100 各 1.5 g，分别加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，增塑剂为聚乙二醇 6000、癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二乙酯或柠檬酸三丁酯各 1.5 mL，载药量为 1%、促渗剂（肉豆蔻酸异丙酯）用量为 4%，制备 4 种不同增塑剂的透皮贴，考察不同增塑剂对透皮贴剂的影响，结果见表 4。癸二酸二丁酯和邻苯二甲酸二乙酯的初黏力较差；聚乙二醇 6000 的持黏力结果和剥离强度结果较差，综合透皮贴剂的外观性状的整体评价，癸二酸二丁酯和邻苯二甲酸二乙酯触摸有黏感和残留，因此，选择柠檬酸三丁酯为透皮贴剂的最适增塑剂。

表 4 增塑剂种类单因素试验结果

Tab 4 Single factor test for plasticizers

增塑剂种类	初黏力 / 球号	持黏力 /min	剥离强度 /（N·cm^{-1}）	外观性状
柠檬酸三丁酯	8	51	3.21	浅黄色胶体，黏性强，整体性好，触摸无黏感、无残留
聚乙二醇 6000	8	24	1.07	浅黄色胶体，黏性强，整体性好，触摸无黏感、无残留
癸二酸二丁酯	6	28	2.96	浅黄色胶体，黏性强，整体性好，触摸稍微有黏感和残留
邻苯二甲酸二乙酯	6	32	6.53	浅黄色胶体，黏性强，整体性好，触摸有黏感和残留

2.4.5 增塑剂用量考察 称取 Eudragit E100 各 1.5 g，分别加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，增塑剂柠檬酸三丁酯用量分别为 0.5、1、1.5、2 mL，载药量为 1%、促渗剂（肉豆蔻酸异丙酯）用量为 4%，制备 4 种不同的透皮贴剂，考察不同增塑剂用量对透皮贴剂的影响，结果见表 5。当增塑剂用量为 2 mL 时，剥离有残留；当增塑剂用量为 0.5 mL 时，持黏力，剥离强度较差，且胶体较硬；虽然增塑剂的用量为 1 mL 和 1.5 mL 时透皮贴剂都有较好的外观性状，但综合评价黏附性试验结果用量为 1 mL 时黏附性结果相对更佳，因此，选择柠檬酸三丁酯 1 mL 为透皮贴剂的最适增塑剂用量。

2.4.6 促渗剂种类考察 称取 Eudragit E100 各 1.5 g，分别加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，分别加入薄荷醇、氮酮、肉豆蔻酸异丙酯、油酸含量为 4% 的促渗剂，载药量为 1%，增塑剂（柠檬酸三丁酯）用量为 1.5 mL，制备 5 种不同的透皮贴剂，在相同电致孔参数作用下，以贴剂中环孢多肽 A 的累计透过量和透皮吸收效率为指

表 5　增塑剂用量单因素试验结果

Tab 5　Single factor test for plasticizer dosage

增塑剂用量 /mL	初黏力 / 球号	持黏力 /min	剥离强度 /（N・cm^{-1}）	外观性状
0.5	4	17	1.84	浅黄色胶体，胶体较硬，剥离无残留
1	9	56	4.32	浅黄色胶体，胶体软硬适中，剥离无残留
1.5	8	48	3.74	浅黄色胶体，胶体软硬适中，剥离无残留
2	7	33	2.96	浅黄色胶体，胶体较软，剥离有残留

标，考察不同种类的促渗剂对透皮贴剂指标成分透过量的影响，结果见表 6。几种促渗剂联合电致孔的应用，与空白组和单纯电致孔组相比，对药物都有促渗作用，其促渗显著作用顺序为：4% 薄荷醇＞ 4% 氮酮＞ 4% 油酸＞ 4% 肉豆蔻酸异丙酯＞只电致孔组＞空白组，4% 薄荷醇对环孢多肽 A 的促渗作用最显著，其 Q_{8h} 为（100.71±9.87）μg・cm^{-2}，促渗倍数是只电致孔的 3.75 倍，是空白组（被动扩散）的 12.71 倍，因此，故选择 4% 薄荷醇为透皮贴剂最适促渗剂种类。

表 6　电致孔作用下不同种类促渗剂的药物释药性能

Tab 6　Drug release performance of proagent under electroporation

组别	Q_{8h}/（μg・cm^{-2}）	累计渗透曲线方程	稳态透皮速率 /[μg/（cm^2・h）]	r	ER_1	ER_2
4% 薄荷醇组	100.71±9.87	$Q = 12.84t - 0.43$	12.84±0.38	0.9930	3.75	12.71
4% 氮酮组	72.94±7.33	$Q = 9.71t - 1.18$	9.71±1.67	0.9886	2.84	9.61
4% 油酸组	61.84±6.34	$Q = 8.06t + 0.46$	8.06±0.25	0.9911	2.36	7.98
4% 肉豆蔻酸异丙酯组	45.93±5.67	$Q = 5.96t + 0.30$	5.96±0.34	0.9825	1.74	5.90
只电致孔组	25.94±2.35	$Q = 3.42t + 2.00$	3.42±0.07	0.9305	—	3.39
空白组	8.85±1.34	$Q = 1.01t + 1.04$	1.01±0.43	0.9560	0.30	—

2.4.7　促渗剂用量考察　称取 Eudragit E100 各 1.5 g，分别加入一定量的复合溶媒，溶解后搅拌均匀，加入促渗剂量分别为 2%、4%、6%、8%、10%，载药量为 1%，增塑剂（柠檬酸三丁酯）用量为 1.5 mL，制备 5 种不同的透皮贴剂，在相同电致参数孔作用下，以贴剂中环孢多肽 A 的累计透过量和透皮吸收效率为指标，考察不同用量的促渗剂对透皮贴剂指标成分透过量的影响，结果见表 7。促渗剂浓度为 8% 和 6% 的薄荷醇时对药物的促渗作用较为显著，当促渗剂浓度为 8% 时，药物的 Q_{8h} 达到最高为（134.29±12.23）μg・cm^{-2}，促渗倍数是只电致孔的 5 倍，是空白组（被动扩散）的 16.94 倍，因此，选择 4%、6%、8% 这 3 个水平的促渗剂浓度进行正交试验。

表 7　电致孔作用下不同用量促渗剂的药物释药性能

Tab 7　Drug release performance of proagent without the action of electroporosity

组别	Q_{8h}/（μg・cm^{-2}）	累计渗透曲线方程	稳态透皮速率 /[μg/（cm^2・h）]	r	ER_1	ER_2
2% 薄荷醇组	59.67±6.46	$Q = 7.15t + 0.42$	7.15±0.46	0.9937	2.09	7.08
4% 薄荷醇组	100.71±9.87	$Q = 12.84t - 0.43$	12.84±1.50	0.9930	3.75	12.71
6% 薄荷醇组	127.28±10.32	$Q = 16.52t - 1.89$	16.52±0.83	0.9958	4.83	16.36
8% 薄荷醇组	134.29±12.23	$Q = 17.11t + 2.11$	17.11±1.34	0.9899	5.00	16.94
10% 薄荷醇组	89.20±8.36	$Q = 11.76t - 2.52$	11.76±2.14	0.9898	3.44	11.64
只电致孔组	25.94±2.35	$Q = 3.42t + 2.00$	3.42±0.07	0.9305	—	3.39
空白组	8.85±1.34	$Q = 1.01t + 1.04$	1.01±0.43	0.9560	0.30	—

2.5　正交试验

前期的单因素试验结果表明，压敏胶黏剂用量、增塑剂用量、薄荷醇用量、载药量对透皮贴的指标成分影响较大，为了进一步得到透皮贴剂的最佳工艺，在单因素试验的基础上，采用正交的试验方法，按照 L_9（3^4）的正交试验表，进行四因素三水平的正交试验，以透皮贴剂中环孢多肽 A 的累计透过量为指标对工艺进行优化，见表 8 ～ 10。由方差分析结果可知，影响药物累计透过量较为显著的因素为压敏胶黏用量，柠檬酸三丁酯用量，薄荷醇用量，确定影响累计透过量变化的因素顺序为压敏胶黏剂量＞薄荷醇＞柠檬酸三丁酯＞载药量，透皮贴剂的最佳制备工艺为 $A_2B_3C_3D_1$，即 1.5 g 压敏胶黏剂、柠檬酸三丁酯用量为 1.5 mL、8% 薄荷醇、1% 载药量。

2.6　验证试验

按照正交试验所得的处方制备 3 批贴剂，参照 2020 年版《中国药典》第四部通则贴剂黏附力测定法通过对不同批次制备的环孢多肽 A 贴剂黏附性（初黏力、持黏力、剥离强度）进行评价。初黏力试验结果表明，3 批透皮贴剂都可黏住 10 号钢球，且钢球黏住后，于贴剂表面停留时间均超

表 8 因素及水平

Tab 8 Factor and level

水平	因素			
	A 压敏胶用量 /g	B 柠檬酸三丁酯用量 /mL	C 薄荷醇用量 /%	D 载药量 /%
1	1	0.5	4	1
2	1.5	1	6	1.5
3	2	1.5	8	2

表 9 正交试验设计与结果

Tab 9 Orthogonal test and result

试验号	因素				累计透过量 Q_n /（μg·cm^{-2}）
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	86.38
2	1	2	2	2	104.39
3	1	3	3	3	116.75
4	2	1	2	3	122.64
5	2	2	3	1	148.44
6	2	3	1	2	127.63
7	3	1	3	2	109.07
8	3	2	1	3	93.94
9	3	3	2	1	126.63
K_1	918.52	998.59	922.25	1083.45	
K_2	1196.49	1043.86	1061.84	1069.08	
K_3	1037.79	1110.35	1168.71	1000.27	
R	30.88	12.41	27.38	9.24	

表 10 方差分析表

Tab 10 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F	P
A	4321.42	2	540.17	92.93	＜ 0.05
B	702.24	2	87.78	15.10	＜ 0.05
C	3394.41	2	424.30	72.99	＜ 0.05
D	439.26	2	54.90	9.44	＞ 0.05

过 7 s，初黏力试验结果符合药典规定；持黏力试验结果表明，3 批透皮贴剂的持黏力脱落时间较为接近，且脱落时间均值为（58.66±2.58）min（56 ～ 62 min），符合药典规定；剥离强度试验结果表明，3 批透皮贴剂剥离强度的脱落时间较为接近，脱落时间均值在（6.24±1.15）min，且 3 批制剂的剥离强度也较为接近，均在（3.50±0.28）N·cm^{-1}，符合药典规定，贴剂的制备工艺稳定可行。累计透过量验证结果见表 11，由表可知，3 批透皮贴的 Q_{8h} 和经皮渗透的速率都较为稳定且保持基本一致，透皮渗透效果较为稳定。

表 11 累计透过量结果

Tab 11 Cumulative pass result

批次	Q_{8h}/（μg·cm^{-2}）	线性方程	稳态透皮速率 /[μg/（cm^2·h）]	r
第一批	147.66±6.54	Q = 20.14t − 2.28	20.14±0.14	0.9760
第二批	152.65±4.63	Q = 20.61t + 1.52	20.61±0.02	0.9731
第三批	156.93±7.52	Q = 20.18t − 0.34	20.18±0.03	0.9674

3 讨论

EudragitE 100 作为压敏胶黏剂，除具有较好的外观性状外，还具有载药量大、无毒无异味、对药物有缓控释作用等优点 [7]，其用量多少对贴剂的累计透过量有显著影响；本研究中柠檬酸三丁酯作为增塑剂，在一定范围内，随着柠檬酸三丁酯用量的增加黏附力逐渐增大，当达到一定量时，贴剂的黏附力随之下降，柠檬酸三丁酯除增塑效能较好外，还具有无毒无味、挥发性小、耐热、无刺激性等优点 [8]；薄荷醇属于唇形科中药挥发油 [9]，属于天然物质，其毒性弱于人工合成品，对亲水性和亲脂性药物的促渗效果均较好 [10]，促透机制可能为其作用于表皮的角质层，破坏角化细胞间质，造成角质层裂解剥脱，促使表皮细胞间裂隙增大，从而降低皮肤对药物的阻滞作用，利于药物经表皮细胞间隙透皮扩散 [11-12]，本研究还发现薄荷醇做为促渗剂与电致孔联合应用表现出较为显著的促渗效果。

参考文献

[1] 葛梦迪，赵小萱，赵颜，等 . 环孢素 A 治疗复发性流产的研究进展 [J]. 国际生殖健康 / 计划生育杂志，2021，40（6）：514-518

[2] 彭颖，黄桦，聂波，等 . 基于群体药动学的环孢素 A 个体化给药研究进展 [J]. 药学进展，2020，44（6）：426-432.

[3] 杨燕宁，朱伽月，宋秀胜，等 . 环孢素 A 临床应用的研究进展 [J]. 国际眼科杂志，2017，17（3）：463-466.

[4] 王磊，孙文利，陈佳琦，等 . 环孢素 A 血药浓度监测相关试验室检测研究进展 [J]. 中华临床试验室管理电子杂志，2019，7（2）：65-70.

[5] 王锐，张贝贝，杨婧，等 . 经皮给药系统中促渗方法的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（5）：2855-2858.

[6] 邹海娟，李朋梅，樊碧发，等 . 利多卡因外用贴剂在疼痛治疗中的应用 [J]. 中国疼痛医学杂志，2021，27（11）：845-850.

[7] 刘孟斯，姜典卓，罗华菲，等 . 压敏胶在透皮贴剂中的应用及其药学研究探讨 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（7）：863-870.

[8] 邹训重，陈金伟，冯安生，等 . 环保型塑化剂柠檬酸正丁酯的合成工艺探讨 [J]. 塑料科技，2019，47（12）：152-155.

[9] 张健，董艳艳，李瑞珂，等 . 不同促渗剂对痛痹舒自乳化软膏体外透皮吸收的研究 [J]. 时珍国医国药，2020，31（10）：2390-2395.

[10] 庞晓晨，成睿珍，赵静，等 . 中药透皮给药系统研究进展及其新剂型的应用 [J]. 中国新药杂志，2019，28（3）：286-291.

[11] 张建林，陶玲，管咏梅，等 . 中药挥发油的促透皮吸收作用及在外用制剂研究中的问题分析 [J]. 中草药，2017，48（24）：5263-5269.

[12] 冯鑫 . 挥发油促透作用适用性研究进展 [J]. 中成药，2013，35（1）：157-161，164.

（收稿日期：2022-04-12；修回日期：2022-06-15）

基于多成分结合外观性状的山茱萸加工方法研究

范天慈，毛睿，窦志英*，刘亚男，董妍玉，孙佳惠，崔岩（天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室 中药炮制技术传承基地（天津），天津　301617）

摘要：目的　考察不同加工方法对山茱萸成分和外观性状的影响，为山茱萸加工方法筛选提供更多依据。**方法**　山茱萸鲜果采用不同软化方法（水煮、水蒸、烘法）和不同干燥方法（烘干、晒干、阴干）加工制成山萸肉饮片。采用 HPLC 法测定没食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷和总黄酮的含量，综合评价加工方法对饮片成分的影响，优选最佳工艺；通过电子眼和电子舌技术分别检测其颜色、滋味，实现基于外观性状的快速识别，探究其外观性状与内在成分的关联。**结果**　80 ℃烘 10 min 软化去核后阴干样品综合评分最高；色号 1315、1604 与没食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷等多种成分均具有显著性相关；酸味、咸味等与多种成分含量具有显著或极显著性相关。**结论**　从成分角度评价，山茱萸加工宜选用 80 ℃烘 10 min 软化去核后阴干，生产中若考虑效率问题可采用 80 ℃烘 5 min 软化后烘干或晒干。山萸肉颜色、滋味与内在成分存在关联性。

关键词：山茱萸；加工；软化；干燥；成分；性状；电子眼；电子舌
中图分类号：R285.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2571-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.020

Process of *Cornus officinalis* based on combination of multi-components and appearance characters

FAN Tian-ci, MAO Rui, DOU Zhi-ying*, LIU Ya-nan, DONG Yan-yu, SUN Jia-hui, CUI Yan (*Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicinal Chemistry and Analytical Chemistry Inheritance Base of Traditional Chinese Medicine Processing Technology* (*Tianjin*), *Tianjin*　301617)

Abstract: Objective　To determine the effect of different process methods on the compositions and appearance characters of *Cornus officinalis*, and to provide reference for the screening of *Cornus officinalis*. **Methods**　The fresh fruits of *Cornus officinalis* were made into Corni Fructus by different softening methods (boiling, steaming, and baking) and different drying methods (oven drying, sun drying, and shade drying). The content of gallic acid, morroniside, loganin, cornuside and total flavonoids was measured by HPLC. The effect of processing methods on the compositions of prepared pieces was comprehensively evaluated, and the technology was optimized. The color and taste were detected by electronic eyes and electronic tongue for the rapid identification based on appearance characters, and further explored the relationship between appearance characters and components. **Results**　The comprehensive score of shade-dried samples was highest afer baking for 10 min at 80 ℃ and enucleating. Color number 1315 and 1604 were significantly correlated with such components as gallic acid, loganin, mononoside, cornuside and so on. There existed extremely correlation between sour taste, salty taste and the content of many components. **Conclusion**　For the components, baking for 10 min at 80 ℃ and shade drying are the suitable processing of *Cornus officinalis*. If efficiency needs improvement baking for 5 min at 80 ℃ and oven drying or sun drying will do. There is a correlation between the color, taste and components of Corni Fructus.

基金项目：国家科技基础性工作专项（No.2014FY111100）。
作者简介：范天慈，男，在读硕士研究生，主要从事中药炮制与质量控制，email：Ftc01910@163.com　*通信作者：窦志英，女，教授，主要从事中药炮制与质量控制研究，email：zhiyingdou@163.com

Key words: *Cornus officinalis*; processing; softening; drying; composition; character; electronic eye; electronic tongue

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉，具有补益肝肾、收涩固脱的功效，常用于治疗眩晕耳鸣、腰膝酸痛等症状[1]。山茱萸为药食同源的大宗中药，在食品、保健品领域也得到开发应用[2-3]，需求量大。

山茱萸鲜果成熟采摘后经过净选、软化、去核、干燥等步骤处理得到山萸肉饮片。其中，以软化和干燥步骤对外观性状和内在成分影响较大。2020 年版《中国药典》中对山茱萸加工方法描述为：秋末冬初果皮变红时采收果实，用文火烘或置沸水中略烫后，及时除去果核，干燥，并未对软化去核和干燥的具体方式、工艺参数进行定量规定。目前，山萸肉主要是产地药农依靠各自经验加工，导致山萸肉饮片质量参差不齐[4]，影响临床疗效。软化方法主要有水煮、水蒸和火烘法[5]。考虑简便和效率等因素，火烘法由鼓风干燥箱烘法代替。软化时间过短，去核效果差；时间过长易造成药效成分流失。山萸肉饮片去核后需及时干燥，否则易腐败变质。不同软化方法和干燥方法均会影响药材质量，因此，有必要对山茱萸的加工方式进行考察，探究适宜工艺。

颜色、滋味等外观性状是中药质量的重要组成部分[6]。自古“辨状论质”就是具有中医药特色的质量评价体系[7]，但其机制尚不明确，缺乏科学解释；而传统鉴别依靠人工眼观、口尝，具有主观性，缺少统一的客观标准，存在依赖生产经验、效率低等问题[8]。电子眼、电子舌等电子感官仿生技术[9-10]的问世为解决传统经验鉴别的问题带来了新思路。现代科学技术可以更好地构建色、味与质量的关联性，色、味等指标的量化能更准确地体现其内在质量。

本实验通过测定没食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷和总黄酮的含量，结合颜色、滋味等外观性状评价药材质量，探究不同加工方法对饮片内部成分与外观性状（颜色、滋味）的影响，优选最佳工艺，并寻找外观性状与内在成分的关联。

1 材料

1.1 仪器

DHG-9245A 型鼓风干燥箱（上海跃进器械公司），1260 型 HPLC 高效液相色谱仪（安捷伦科技公司），IRIS VA400 型电子眼、ASTREE II 型电子舌（法国 Alpha MOS 公司），超声波清洗器 SB-3200DTN（宁波新芝生物科技公司），FA2004 电子分析天平（上海舜宇恒平仪器公司），FW100 高速粉碎机（天津市泰斯特公司）。

1.2 试药

没食子酸（批号：YA0505YA14）、5-羟甲基糠醛（批号：H12M9Z61023）、马钱苷（批号：P22F10F81444）、莫诺苷（批号：P11M11F112846）、山茱萸新苷（批号：Y07A7H12648）（纯度≥ 98%，上海源叶生物科技公司），芦丁（批号：L-001-160520，纯度＞98%，瑞芬思科技公司），乙腈（色谱纯，Sigma 公司），甲醇、磷酸（均为分析纯，天津渤化试剂公司），娃哈哈饮用纯净水

山萸肉饮片（浙江淳安产鲜果加工而成），酒萸肉饮片（批号：170911，四川省中药饮片公司，经天津中医药大学李天祥教授鉴定分别为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的成熟果实和果肉酒蒸品）。

2 方法

2.1 山萸肉样品的制备

采用水煮、水蒸、烘法（60 ℃、80 ℃）4 种软化方法，烘干法（75 ℃）、晒干法、阴干法 3 种去核后干燥方法。水煮法和水蒸法设置生产中常采用的 5、8、10 min 3 个时间点；烘箱烘法温度不及水煮法和水蒸法，时间稍微延长，设置 5、10、15 min 3 个时间点。鲜果净选后，采用不同方法软化去核，分别置于 75 ℃电热鼓风干燥箱（烘干法）、日光下（晒干法）、阴凉通风处（阴干法）进行干燥至恒重。干燥完成后，将药材粉碎过三号筛，备用。样品信息见表 1。

2.2 成分含量测定

2.2.1 HPLC 色谱条件：色谱柱为 Kromasil 100-5-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），柱温 30 ℃，流速 1 mL·min^{-1}，进样量 10 μL，检测波长 240 nm，流动相为 0.3% 磷酸水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 10 min，7%B；10 ～ 35 min，7% ～ 15%B；35 ～ 50 min，15% ～ 30%B；50 ～ 55 min，30% ～ 7%B；55 ～ 60 min，7%B），色谱图见图 1。

总黄酮检测条件：采用 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 显色法测量。取样品液 1 mL，加入 0.5 mL 5% $NaNO_2$ 溶液，反应 6 min。再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.5 mL，摇匀后反应 6 min。加入 1 mLNaOH 溶液混匀，静置 15 min，于 510 nm 处测定吸光度值。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷对照

表 1　山萸肉样品信息

Tab 1　Sample information of Corni Fructus

编号	加工方法		编号	加工方法	
	软化	干燥		软化	干燥
A1	水煮 5 min	烘干法	B7	60 ℃烘 5 min	晒干法
A2	水煮 8 min	烘干法	B8	60 ℃烘 10 min	晒干法
A3	水煮 10 min	烘干法	B9	60 ℃烘 15 min	晒干法
A4	水蒸 5 min	烘干法	B10	80 ℃烘 5 min	晒干法
A5	水蒸 8 min	烘干法	B11	80 ℃烘 10 min	晒干法
A6	水蒸 10 min	烘干法	B12	80 ℃烘 15 min	晒干法
A7	60 ℃烘 5 min	烘干法	C1	水煮 5 min	阴干法
A8	60 ℃烘 10 min	烘干法	C2	水煮 8 min	阴干法
A9	60 ℃烘 15 min	烘干法	C3	水煮 10 min	阴干法
A10	80 ℃烘 5 min	烘干法	C4	水蒸 5 min	阴干法
A11	80 ℃烘 10 min	烘干法	C5	水蒸 8 min	阴干法
A12	80 ℃烘 15 min	烘干法	C6	水蒸 10 min	阴干法
B1	水煮 5 min	晒干法	C7	60 ℃烘 5 min	阴干法
B2	水煮 8 min	晒干法	C8	60 ℃烘 10 min	阴干法
B3	水煮 10 min	晒干法	C9	60 ℃烘 15 min	阴干法
B4	水蒸 5 min	晒干法	C10	80 ℃烘 5 min	阴干法
B5	水蒸 8 min	晒干法	C11	80 ℃烘 10 min	阴干法
B6	水蒸 10 min	晒干法	C12	80 ℃烘 15 min	阴干法

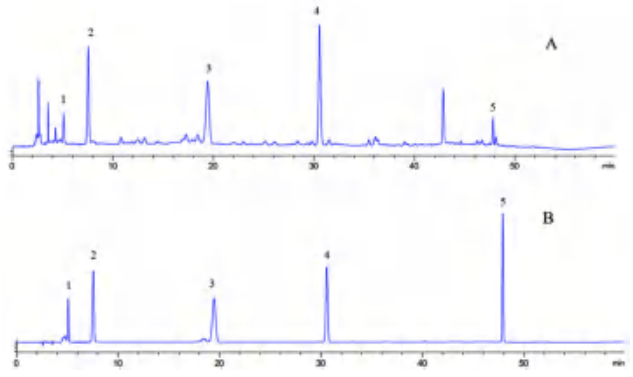


图 1　山茱萸样品及混合对照品色谱图

Fig 1　Chromatogram of *Cornus officinalis* sample and mixed reference

A. 样品（sample）；B. 混合对照品（mixed reference）；1. 没食子酸（gallic acid）；2. 5- 羟甲基糠醛（5-hydroxymethyl furfural）；3. 莫诺苷（morroniside）；4. 马钱苷（loganin）；5. 山茱萸新苷（cornuside）

品 1.013、1.531、1.085、1.002、1.013 mg，置于 10 mL 量瓶中，用 80% 甲醇溶液溶解并定容至刻度，摇匀，配制成质量浓度分别为 100.5、153.1、108.5、102.2、101.3 μg•mL^{-1} 的混合对照品溶液。称取 9.80 mg 芦丁对照品，置于 10 mL 量瓶中，加入 80% 乙醇溶解并定容，得芦丁对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备

指标成分：称定样品粉末（过三号筛）约 0.2 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 80% 甲醇 25 mL，超声处理 40 min（功率 180 W，频率 40 kHz）。室温中放至冷却，补足失重，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

总黄酮：精密称取 0.2 g 样品粉末（过三号筛），加入 45% 乙醇 25 mL，超声处理 20 min。冷却，补足失重，滤过，取续滤液，即得。

2.2.4　线性关系考察　取“2.2.2”项下混合对照品溶液，稀释成一系列不同质量浓度的溶液，进样测定。以对照品溶液的质量浓度（μg•mL^{-1}）为横坐标（*X*），以峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归分析。回归方程、相关系数及线性范围见表 2。

2.2.5　方法学考察　考察检测方法的方法学，结果见表 2，结果表明方法均符合含量测定要求。

2.2.6　含量测定结果　按照“2.2.1”项下方法测定成分含量，结果见表 3，含量累积见图 2。36 批山萸肉饮片中均未检测出 5- 羟甲基糠醛。不同加工方法对山萸肉中多成分的影响有差异。所有山茱萸样品中马钱苷与莫诺苷含量之和均大于 1.2%，符合 2020 年版《中国药典》规定要求。研究发现，软化方法中，水蒸法和烘法制备样品整体含量较高；干燥方法中，阴干法、晒干法、烘干法整体含量依次递减。C11 样品即 80 ℃烘 10 min 软化去核后阴干制得饮片中马钱苷与莫诺苷含量之和最高。

表 2　线性关系考察及方法学考察结果

Tab 2　Linearity and methodological evaluation

成分	回归方程	相关系数（*r*）	线性范围 /（μg•mL^{-1}）	精密度 *RSD*/%	重复性 *RSD*/%	稳定性 *RSD*/%	平均加样回收率 /%	回收率 *RSD*/%
没食子酸	$Y = 5.085X - 2.704$	0.9996	5.065 ～ 101.3	0.24	0.81	1.60	101.58	1.11
5- 羟甲基糠醛	$Y = 8.161X - 1.771$	0.9998	7.655 ～ 153.1	0.13	2.16	0.83	100.03	1.78
莫诺苷	$Y = 14.79X - 3.987$	0.9995	5.425 ～ 108.5	0.30	1.87	1.37	101.84	1.63
马钱苷	$Y = 15.54X - 2.191$	0.9998	5.110 ～ 102.2	0.19	1.03	1.32	101.32	2.31
山茱萸新苷	$Y = 14.02X - 2.444$	0.9998	5.065 ～ 101.3	0.22	0.89	1.21	98.72	2.04
芦丁	$Y = 5.054X + 0.016$	0.9993	5.750 ～ 326.7	1.36	1.20	2.36	97.44	2.30

中药药效是多指标成分作用的结果[11-12]。因此，有必要采用多指标综合评价、优选加工方法。根据文献研究[13-14]，采用层次分析法确定各指标权重系数。马钱苷和莫诺苷为《中国药典》确定的指标性成分，权重最大。山茱萸新苷为山茱萸中重要的环烯醚萜类药效成分。确定优先顺序[15]：马钱苷＞莫诺苷＞山茱萸新苷＞没食子酸＞黄酮，构建优先矩阵，见表 4。

表 3 不同加工方法的山萸肉饮片含量测定结果 (mg·g^{-1})

Tab 3 Content determination of Corni Fructus by different processing methods (mg·g^{-1})

编号	没食子酸	莫诺苷	马钱苷	山茱萸新苷	总黄酮
A1	0.2527	13.5942	7.6771	1.4255	33.0815
A2	0.2675	13.3441	7.7849	1.3729	30.8802
A3	0.2527	13.1226	7.5160	1.3352	27.2691
A4	0.2913	13.3073	7.5570	1.4345	41.0458
A5	0.3397	12.8281	7.5205	1.3298	35.4560
A6	0.3504	13.1384	7.5039	1.3652	31.3007
A7	0.4005	13.3557	7.7492	1.3830	41.8126
A8	0.4170	12.4520	7.2905	1.3768	40.9964
A9	0.4950	12.5277	7.9517	1.3132	43.8160
A10	0.4917	13.3906	8.3129	1.3221	43.9892
A11	0.3471	12.9969	7.7814	1.3295	41.6147
A12	0.3948	13.2591	8.1584	1.3661	39.9823
B1	0.2543	15.6898	7.7844	1.3040	41.0211
B2	0.2199	15.7153	7.9404	1.3251	39.5123
B3	0.2223	14.9657	7.7077	1.2499	37.0884
B4	0.2420	15.2193	7.5409	1.2350	42.4062
B5	0.2847	14.4768	7.5629	1.1871	45.5721
B6	0.2954	14.4263	7.1757	1.2469	40.4275
B7	0.5804	18.0657	8.9586	1.4080	48.7875
B8	0.4737	16.0474	8.0938	1.3515	52.7944
B9	0.4219	17.1967	8.6768	1.4255	47.6498
B10	0.4843	18.1391	9.1774	1.4484	48.0455
B11	0.6281	17.4261	9.1152	1.4041	45.9679
B12	0.4375	17.1909	8.6856	1.3572	37.3358
C1	0.2839	16.5879	8.3595	1.3637	44.8301
C2	0.1804	15.2014	7.7380	1.2053	48.9112
C3	0.2757	15.4023	7.7710	1.1818	46.9078
C4	0.3315	16.8086	7.8270	1.3280	54.5258
C5	0.3636	15.2398	7.6079	1.2692	54.6742
C6	0.3644	15.2048	7.6028	1.2365	47.6745
C7	0.7185	19.5261	9.4686	1.4526	50.7663
C8	0.5829	19.3799	9.5418	1.4654	43.4450
C9	0.5344	19.3149	9.6756	1.5070	44.9043
C10	0.8294	20.1791	9.9351	1.4368	55.5399
C11	0.7748	21.8223	10.3462	1.5608	43.9397
C12	0.6749	21.6369	10.1751	1.5879	43.2224

根据评分结果，采用层次分析（AHP）法计算得到没食子酸、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷、黄酮权重系数分别为 0.0975、0.2634、0.4174、0.1602、0.0615。一致性比例因子（CR）= 0.0152 < 0.10，说明该判断优先矩阵符合一致性检验，权重系数合理有效。为了便于分析计算，将数据进行无量纲化处理[16]，公式为：$Y = (X - X_{最小值}) / (X_{最大值} - X_{最小值})$。标准化后的数据再结合权重系数，计算综合得分。综合评分 = $0.0975Y_1 + 0.2634Y_3 + 0.4174Y_4 + 0.1602Y_5 + 0.0615Y_6$。

综合评分结果显示，C11 质量最好，即 80 ℃烘 10 min 软化去核后阴干为最佳的加工方式（见表 5）。

表 4 各指标成分对比判断优先矩阵

Tab 4 Comparative judgment priority matrix of each index component

指标	马钱苷	莫诺苷	山茱萸新苷	没食子酸	黄酮
马钱苷	1	2	3	4	5
莫诺苷	1/2	1	2	3	4
山茱萸新苷	1/3	1/2	1	2	3
没食子酸	1/4	1/3	1/2	1	2
黄酮	1/5	1/4	1/3	1/2	1

2.3 样品颜色测定

2.3.1 检测条件 电子眼开机后稳定 15 min，待仪器显示指示绿灯后即光照稳定时开始测试。调整镜头曝光度和焦距，并使用 24 色色彩校正板进行校正，使用 5 mm 光圈，光源 D65，同时打开顶部及底部背光灯，消除背景，单一快照模式。

2.3.2 样品检测方法 将样品饮片置于无色平皿中，厚度保持一致，置于背景板（黑色）上。经校正后，逐个采集样品图像，每个采集 3 次，采用 Alpha MOS 工作站对样品的颜色信息进行提炼、分析。

2.3.3 颜色测定结果 样品颜色以系列色号的形式展现。根据色号以及所占比例的差异，来表达样品的颜色特征。山茱萸生品饮片主要色号为 1331、1332、1604、1059、1076、1587、1860 等，以 A1 为例，各色号占比如图 3。

将不同样品颜色色号响应值信息结合化学计量学进行深入分析，建立的主成分分析（PCA）模型见图 4。因存在软化方法和干燥方法两个因素的影响，样品整体差异分布略显杂乱，但存在一定的规律性。除 A8 外的烘干样品主要集中在第三象限，与晒干、阴干区分明显，表明烘干法与晒干、阴干等自然干燥方式对饮片颜色影响有差异。晒干样品中 B3、B4 等一部分聚为一类，部分与阴干未得到区分，说明晒干与阴干对饮片外观颜色影响差异不明显。阴干样品分布较散。除 C7 外，蒸法和煮法的 C1 ～ C6 样品主要分布在第四象限，烘法（60 ℃和 80 ℃）主要分布在第二象限。经水或水蒸气处理的煮法、蒸法与烘法样品颜色有差异。干燥方法和软化方法对颜色信息的差异分类均有一定的影响，干燥方法影响大于软化方法。

为便于寻找影响差异，分别控制变量，分别考察相同干燥方式下不同软化方法和相同软化方法不同干燥方式的气味特征差异。结果见图 5，在不同软化方法处理后阴干样品中，水煮、水蒸

表 5　山茱萸加工方法综合评分结果

Tab 5　Comprehensive scores of processing methods for *Cornus officinalis*

编号	没食子酸（Y_1）	莫诺苷（Y_3）	马钱苷（Y_4）	山茱萸新苷（Y_5）	黄酮（Y_6）	综合得分	排名
A1	0.1114	0.1219	0.1582	0.6003	0.2056	21.7124	25
A2	0.1342	0.0952	0.1922	0.4707	0.1277	20.0822	28
A3	0.1114	0.0716	0.1073	0.3777	0.0000	13.4356	35
A4	0.1709	0.0913	0.1203	0.6223	0.4873	21.9531	23
A5	0.2456	0.0401	0.1088	0.3646	0.2896	15.4652	34
A6	0.2620	0.0733	0.1035	0.4517	0.1426	16.7609	31
A7	0.3392	0.0964	0.1809	0.4956	0.5145	24.2985	20
A8	0.3646	0.0000	0.0362	0.4802	0.4856	15.5261	33
A9	0.4848	0.0081	0.2448	0.3236	0.5853	23.6483	21
A10	0.4797	0.1002	0.3587	0.3455	0.5914	31.1721	15
A11	0.2570	0.0582	0.1911	0.3638	0.5075	20.8069	26
A12	0.3304	0.0861	0.3100	0.4539	0.4497	28.2664	16
B1	0.1139	0.3455	0.1920	0.3009	0.4865	25.9688	18
B2	0.0609	0.3483	0.2412	0.3529	0.4331	28.1141	17
B3	0.0646	0.2683	0.1678	0.1676	0.3473	19.4822	29
B4	0.0949	0.2953	0.1152	0.1310	0.5354	18.8476	30
B5	0.1608	0.2161	0.1221	0.0132	0.6474	16.4529	32
B6	0.1772	0.2107	0.0000	0.1603	0.4655	12.6022	36
B7	0.6165	0.5991	0.5623	0.5571	0.7612	58.4982	9
B8	0.4519	0.3837	0.2896	0.4180	0.9029	38.5780	13
B9	0.3722	0.5064	0.4734	0.6003	0.7209	50.5545	10
B10	0.4684	0.6069	0.6313	0.6567	0.7349	61.6634	7
B11	0.6899	0.5308	0.6117	0.5476	0.6614	58.6677	8
B12	0.3962	0.5057	0.4762	0.4319	0.3561	45.9337	11
C1	0.1595	0.4414	0.3734	0.4480	0.6212	39.6683	12
C2	0.0000	0.2934	0.1774	0.0578	0.7656	20.7656	27
C3	0.1468	0.3149	0.1878	0.0000	0.6947	21.7459	24
C4	0.2329	0.4649	0.2054	0.3602	0.9642	34.6514	14
C5	0.2823	0.2975	0.1363	0.2152	0.9694	25.5194	19
C6	0.2835	0.2938	0.1347	0.1347	0.7218	22.5529	22
C7	0.8291	0.7549	0.7232	0.6669	0.8312	73.4531	5
C8	0.6203	0.7393	0.7463	0.6984	0.5722	71.0066	6
C9	0.5456	0.7324	0.7885	0.8009	0.6238	73.8612	4
C10	1.0000	0.8246	0.8703	0.6281	1.0000	83.4116	3
C11	0.9159	1.0000	1.0000	0.9334	0.5897	95.0402	1
C12	0.7620	0.9802	0.9460	1.0000	0.5643	91.7696	2

和烘法有差异，各自聚为一组。水煮、水蒸法分别分布第一、四象限，烘法分布在二、三象限。烘法样品中，C11（80 ℃烘 10 min）、C12（80 ℃烘 15 min）与其他烘法样品有区分。在水蒸软化处理后的不同干燥样品中，烘干、晒干、阴干三种干燥方法聚为三类，区分明显。烘干法分布在右侧，晒干法聚集在第二象限。烘干样品与晒干、阴干的差异大于晒干、阴干两者之间差异。

为了更好地区分不同干燥方法和软化方法的样品，寻找差异信息，建立 OPLS-DA 模型。R^2 和 Q^2 均大于 0.5，模型可靠。得分图和 VIP 值总表见图 6，在 OPLS-DA 模型下，三种干燥方法区分效果良好。烘干、晒干、阴干三者之间差异明显。由图 7 可见，软化方法可以基本得到区分，但效果不及干燥方法。其中烘法 60 ℃和 80 ℃较接近。不同软化方式颜色特征存在差异，但同一方式中的不同条件难以区分。为了更好地寻找颜色色号变量在分类中的重要性，选取 VIP ＞ 1 的色号作为差异变量，结果见表 6。结果发现，1331、1332、1604、1059、1076、1587、1860 等既是占比较高的主要色号，又是山茱萸饮片外观颜色特征差异性因素。

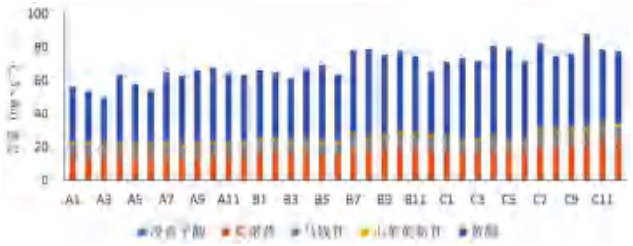


图 2　不同加工方法的山萸肉成分含量累积图

Fig 2　Cumulation of component content in Corni Fructus with different processing methods

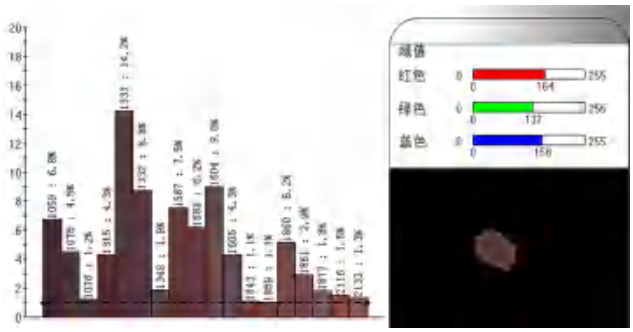


图 3　山萸肉样品主要颜色色号及占比图

Fig 3　Main color number and proportion diagram of Corni Fructus sample

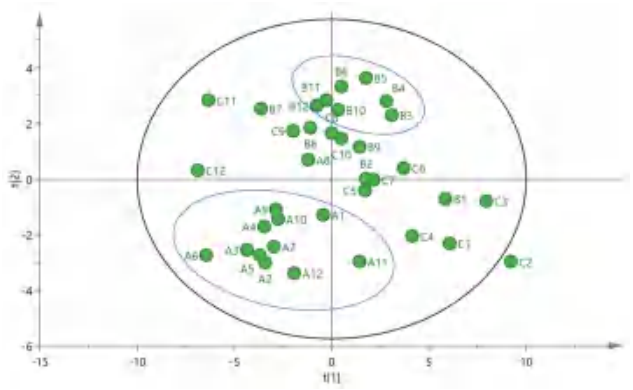


图 4　不同加工方法山萸肉样品 PCA 得分图

Fig 4　PCA score of Corni Fructus samples with different processing methods

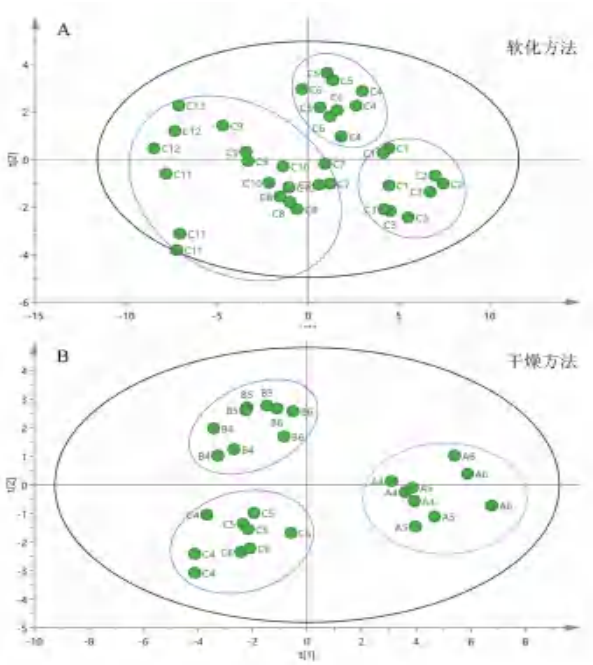


图 5 不同软化（A）和干燥（B）方法样品 PCA 得分图

Fig 5 PCA scores of samples with different softening（A）and drying（B）methods

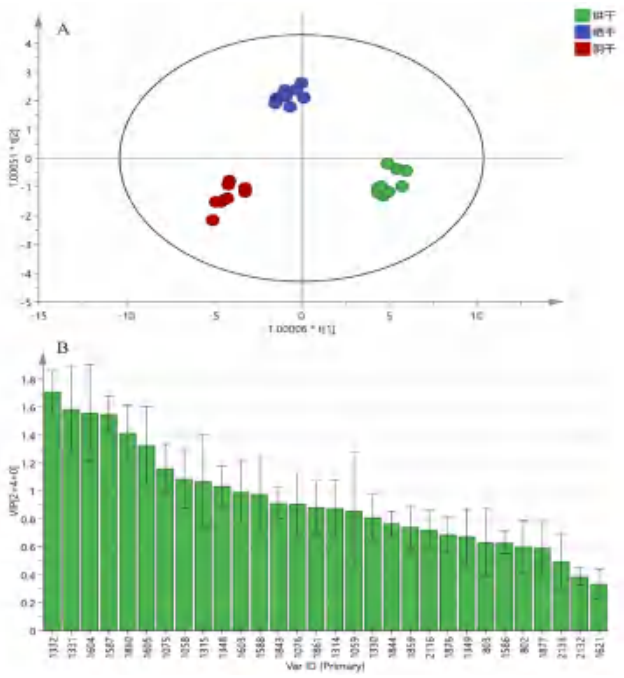


图 6 不同干燥方法的山萸肉样品颜色 OPLS-DA 得分图（A）和 VIP 图（B）

Fig 6 Color OPLS-DA scores（A）and VIP（B）diagram of Corni Fructus samples with different drying methods

表 6 不同加工方法山萸肉样品颜色特征差异性色号

Tab 6 Differences in color characteristics of Corni Fructus samples by different processing methods

方法	特征差异性色号（VIP ＞ 1）	共有差异色号
干燥	1587、1332、1604、1860、1059、1588、1075、1063、1348、1605、1315、1076、1331	1348、1587、1860、1315、1332、1331
软化	1348、1587、1075、1588、1860、1604、1315、1332、1331、803	

2.4 电子舌测定

2.4.1 检测条件 电子舌（ASTREE II）系统包含 AHS、PKS、CTS、NMS、CPS、ANS 和 SCS 共 7 根传感器，选择 Ag/AgCl 作为参比电极。传感器校正、预平衡后测样，设置数据采集时间为 120 s，采集周期为 1.00 s。

2.4.2 样品检测方法 取样品粉末（过三号筛）2.0 g，精密称定，加入纯净水 50 mL 混合均匀，浸泡 20 min，50 ℃下超声 30 min，冷却静置。取上清液滤过后，放置于仪器专用烧杯（25 mL）中测试，每份样品采集 4 次，为保证电子舌系统的稳定性和数据准确性，取后 3 次结果用于滋味分析。

2.4.3 滋味测定结果 AHS、CTS、NMS、ANS、SCS 分别代表酸味、咸味、鲜味、甜味、苦味，PKS（整体）、CPS 测试整体滋味响应[17]。传感器原始数据见表 7，进行归一化后绘制热图，结果见图 8。如图所示，红、白、蓝分别表示程度高、中、低，即数值依次降低。软化方法和干燥方法对滋味影响明显。烘干、晒干、阴干样品的整体 AHS

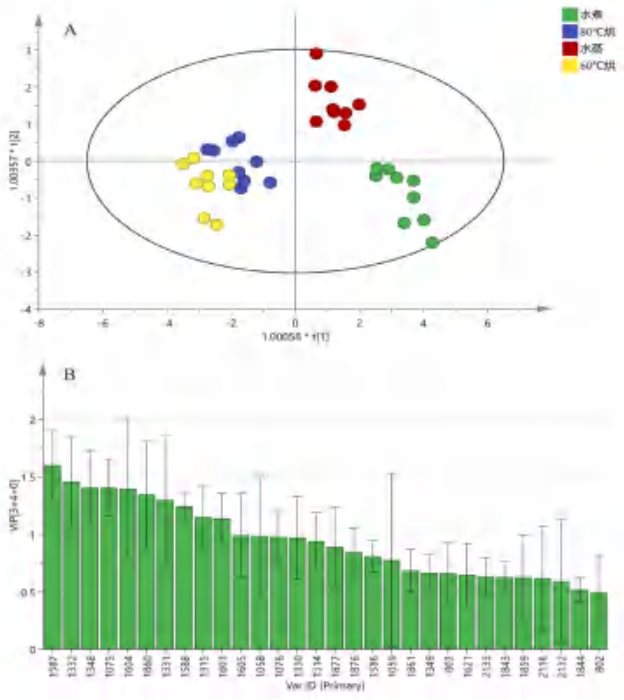


图 7 不同软化方法的山萸肉样品颜色间 OPLS-DA 得分图（A）和 VIP 图（B）

Fig 7 Color OPLS-DA scores（A）and VIP（B）diagram of Corni Fructus samples with different softening methods

依次降低，CTS 整体呈升高。ANS 和 SCS 呈先下降后上升趋势，即阴干＞烘干＞晒干。通用型传感器 PKS 和 CPS 规律不明显。在同一干燥方法中，AHS、NMS、ANS 整体趋势为水煮法＞水蒸法＞

烘法，CTS 为水煮法＜水蒸法＜烘法。SCS 规律不明显。相同干燥方式中，通用型传感器 PKS 和 CPS 大体呈从左到右的降低趋势，即水煮法＞水蒸法＞烘法。

表 7　电子舌分析不同加工方法山萸肉样品传感器响应值

Tab 7　Sensor response values of Corni Fructus samples by different processing methods with electronic tongue

样品	AHS	PKS	CTS	NMS	CPS	ANS	SCS
A1	1152.82	434.05	1145.26	629.42	906.38	1127.91	796.46
A2	1053.54	304.74	1143.62	536.20	886.13	1050.00	796.74
A3	993.40	235.38	1144.02	497.68	871.49	982.64	797.00
A4	937.90	184.11	1162.17	468.75	873.28	947.48	797.06
A5	890.32	149.04	1169.74	450.51	863.31	908.21	796.68
A6	842.95	123.15	1182.38	432.64	867.63	891.09	798.15
A7	796.15	86.39	1200.90	412.28	863.17	877.86	798.47
A8	770.92	89.18	1203.16	426.59	877.95	878.64	799.82
A9	735.10	61.84	1235.03	401.65	880.54	887.02	794.51
A10	698.14	47.06	1224.35	390.68	868.35	861.66	789.94
A11	674.77	25.46	1235.79	357.95	859.09	843.47	787.88
A12	648.49	5.58	1216.49	351.52	860.75	817.25	785.52
B1	623.09	－33.33	1231.45	294.45	814.80	758.72	783.14
B2	596.03	－47.03	1235.49	273.55	807.02	759.44	782.55
B3	574.45	－53.45	1231.03	277.77	806.30	750.70	782.35
B4	550.92	－76.47	1230.31	249.16	779.60	719.49	783.27
B5	512.50	－91.67	1227.28	225.23	773.12	711.22	785.63
B6	510.08	－117.20	1225.11	190.81	756.43	694.85	786.08
B7	524.24	－128.10	1263.42	171.46	779.05	754.71	786.63
B8	519.18	－119.97	1256.84	193.80	790.64	751.82	786.60
B9	521.20	－132.44	1265.24	178.41	791.10	755.48	787.98
B10	512.77	－138.69	1276.76	181.66	803.11	771.42	790.24
B11	518.46	－146.46	1241.78	185.96	780.48	765.59	791.68
B12	506.97	－131.85	1239.73	197.69	796.85	776.40	792.29
C1	496.31	725.64	1283.46	711.39	1137.02	1522.09	827.12
C2	488.11	616.26	1248.15	644.61	1040.02	1408.38	820.90
C3	471.80	518.83	1243.42	544.94	976.41	1345.96	817.07
C4	477.72	399.23	1250.54	435.57	891.99	1284.66	812.42
C5	479.65	314.06	1254.16	353.72	825.64	1226.94	810.06
C6	480.53	302.19	1186.91	279.13	764.59	1116.48	818.97
C7	474.23	111.78	1260.46	158.02	686.19	1113.37	812.98
C8	477.86	72.71	1267.22	118.54	660.49	1083.59	809.58
C9	474.63	57.00	1255.16	110.48	648.61	1073.59	811.26
C10	473.62	15.26	1277.07	95.18	628.80	1075.86	813.84
C11	485.84	－15.00	1298.58	75.56	612.15	1076.15	814.83
C12	487.75	－6.54	1295.08	90.82	621.83	1071.52	815.30

以滋味传感器响应值为变量，进行化学计量学分析，建立 PCA 模型，结果见图 9。不同加工方法的山萸肉饮片被分为 3 大类。阴干样品分布在一、二象限，晒干、烘干样品分别集中在三、四象限。表明不同干燥方法对山萸肉滋味有影响，且影响大于软化方法。在同一干燥方法中，根据不同软化方法，每类样品可进一步分为 3 类：水

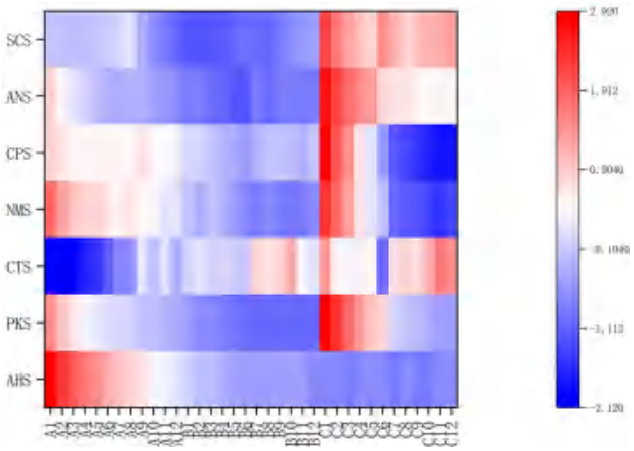


图 8　电子舌分析不同加工方法山萸肉样品传感器响应值热图

Fig 8　Sensor response thermograms of Corni Fructus samples from different processing methods with electronic tongue

煮法、水蒸法、烘法。其中，晒干样品中不同软化方法样品区分效果不及阴干法和烘干法。在阴干和烘干样品中，烘法 60 ℃与 80 ℃也具有一定差异，表明不同干燥、软化方法对山茱萸滋味影响较显著。

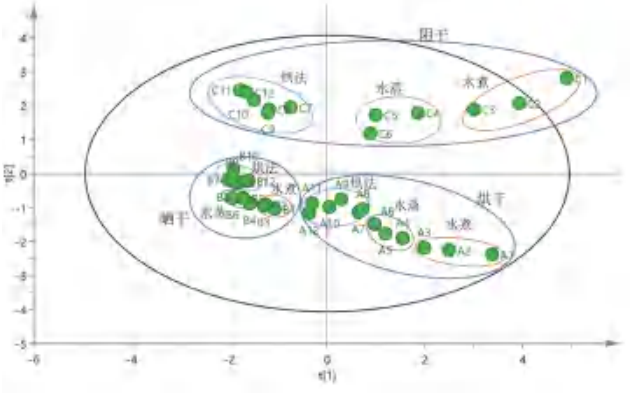


图 9　不同加工方法山萸肉样品滋味分析 PCA 得分图

Fig 9　PCA scores for taste of Corni Fructus samples by different processing methods

在 PCA 分析的基础上，根据干燥方法和软化方法的不同，以滋味信息为变量，建立有监督的 OPLS-DA 模型。R^2 和 Q^2 均大于 0.5，模型可靠。不同干燥方法区分效果良好。阴干与烘干、晒干差异最明显。烘干法部分样品滋味特征与晒干法接近。AHS、PKS、ANS 对不同干燥方法样品分类影响较大。这与阴干样品易产生酸腐味的实际情况一致。PKS、NMS、CTS 对不同软化方法样品分类影响较大。

2.5　酒萸肉样品成分与性状关联性

采用 SPSS23.0 统计软件对酒萸肉的主要色号（占比＞ 1%）、特征差异色号（VIP ＞ 1）、滋味传感器响应值与主要化学成分没食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷、总黄酮含量进行 Pearson 相

关性分析，探究颜色、滋味与成分的联系，为辨色论质提供更多科学依据。结果见表 8、9。其中，莫诺苷与色号 1059、1315、1604 存在显著或极显著性相关，马钱苷与色号 1059、1315、1348、1604 存在显著或极显著性相关。色号 1315 与食子酸、马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷 4 种成分均具有显著性或极显著性负相关，色号 1604 与之成显著性正相关。这提示色号 1315、1604 可能为经验判别中颜色反映内在质量的主要依据之一。此外，除了色号 803、1331、1861、2166、2133 外，选取的主要色号和特征差异色号均各与某成分存在显著性或极显著性差异。表明颜色与成分存在一定程度的关联，可以反映饮片质量。

表 8 山萸肉样品色号与成分关联性

Tab 8 Correlation between color and composition of Corni Fructus samples

指标	没食子酸	莫诺苷	马钱苷	山茱萸新苷	黄酮
803	0.048	− 0.154	− 0.017	0.124	− 0.137
1059	− 0.316	− 0.575**	− 0.416*	− 0.136	− 0.321
1075	0.464**	0.105	0.324	0.577**	− 0.280
1076	0.212	− 0.295	− 0.004	0.39*	− 0.468**
1315	− 0.594**	− 0.391*	− 0.490**	− 0.529**	0.100
1331	0.139	0.294	0.192	0.153	0.130
1332	0.321	− 0.051	0.192	0.582**	− 0.479**
1348	0.618**	0.188	0.451**	0.678**	− 0.189
1587	− 0.470**	− 0.033	− 0.297	-0.609**	0.358*
1588	− 0.459**	− 0.093	− 0.291	-0.460**	0.142
1604	0.400*	0.423*	0.417*	0.421*	− 0.171
1605	0.251	− 0.108	0.136	0.509**	− 0.512**
1859	− 0.221	0.076	− 0.158	− 0.490**	0.488**
1860	− 0.288	0.079	− 0.167	0.509**	0.441**
1861	− 0.237	− 0.179	− 0.191	− 0.109	− 0.102
1877	0.358*	0.281	0.311	0.331*	− 0.192
2116	0.050	0.157	0.087	− 0.008	− 0.098
2133	0.028	0.295	0.209	− 0.061	− 0.003

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

表 9 山萸肉样品滋味与成分关联性

Tab 9 Correlation between taste and composition of Corni Fructus samples

指标	没食子酸	莫诺苷	马钱苷	山茱萸新苷	黄酮
AHS	− 0.377*	− 0.662**	− 0.467**	0.046	− 0.752**
PKS	− 0.388*	− 0.215	− 0.287	− 0.242	− 0.004
CTS	0.560**	0.775**	0.685**	0.282	0.708**
NMS	− 0.678**	− 0.678**	− 0.650**	− 0.416*	− 0.349*
CPS	− 0.695**	− 0.649**	− 0.649**	− 0.517**	− 0.201
ANS	− 0.006	0.201	0.124	0.038	0.250
SCS	0.275	0.410*	0.341*	0.208	0.347*

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

NMS 与 5 种成分均具有显著或极显著负相关。AHS、CTS 与没食子酸、莫诺苷、马钱苷、黄酮含量具有显著或极显著负相关。SCS 与莫诺苷、马钱苷、黄酮含量成显著性正相关。未发现 ANS 与 5 种成分具有与相关性。整体滋味 CPS 值与没食子酸、莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷成极显著性负相关，PKS 值与没食子酸成显著性负相关。表明滋味与内在成分存在一定程度的关联，可以反映饮片质量。

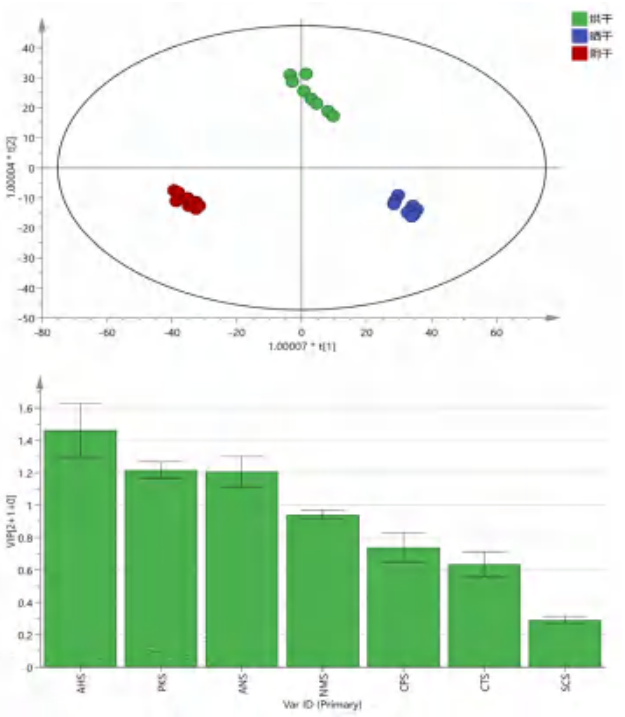


图 10 不同干燥方法的山萸肉样品滋味间 OPLS-DA 得分图和 VIP 图

Fig 10 OPLS-DA scores of taste and VIP diagram of Corni Fructus samples with different drying methods

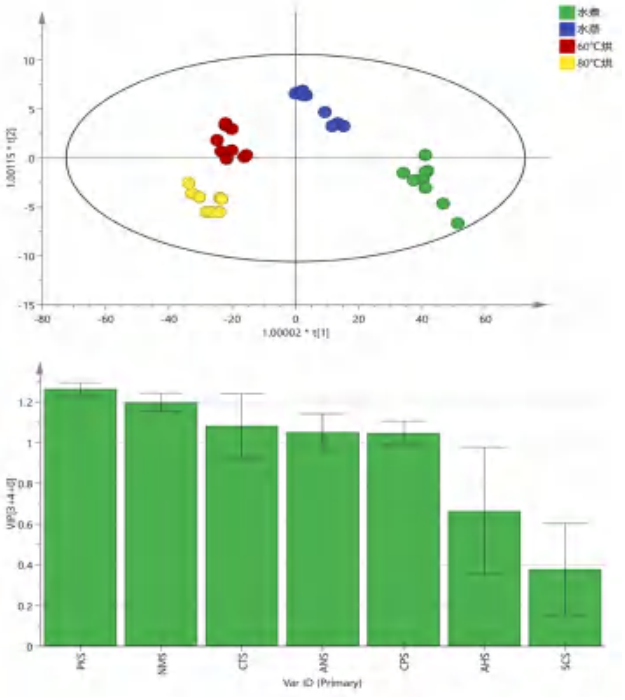


图 11 不同软化方法的山萸肉样品滋味间 OPLS-DA 得分图和 VIP 图

Fig 11 OPLS-DA scores of taste and VIP diagram of Corni Fructus samples with different softening methods

3 讨论

软化方法中，水蒸法温度最高，脱核效果好，但可能造成成分破坏分解等。水煮法温度≤100 ℃，同时易导致成分溶出，样品综合评分结果中整体排名靠后。烘法（60 ℃和 80 ℃）样品相对温度较低，且未与水接触，因此成分含量损失少。但样品果肉较黏软，去核时易残留损失，外观塑形差。这可能与烘法温度有关，有待后期进行更多温度考察。

干燥方法中，阴干法条件温和，但周期较长 [18]，当翻晾不及时、堆积厚度大时易发生腐败变质现象。晒干法同样操作简便且但严重依赖自然条件。阴干法和晒干法可控性均较差，质量不稳定，在药农产地加工中有所应用，但不利于中药标准化中规模生产。烘干法温度可控，干燥速率快，但对成分影响大。不同干燥温度对成分影响效果也有所不同。本实验中仅采用生产中常用的中温 75 ℃干燥，后期有待探究其他烘干温度。

5-羟甲基糠醛为高温或酸性环境下产生的醛类化合物，一般产生于炮制过程，多见于炮制品中 [19]。因此，本次生品加工中未检测出 5-羟甲基糠醛。多指标综合评分结果显示，烘法 80 ℃烘 10 min 软化去核后阴干制得饮片质量最佳。生产中若需要综合考虑效率等实际因素，烘干法和晒干法最佳样品分别为 A10、B10，即 80 ℃烘 5 min 软化去核后烘干、80 ℃烘 5 min 软化去核后晒干。实验组后期将对工艺进一步验证。

在外观性状研究中，烘法温度低，颜色最接近鲜果。此外，水煮、水蒸过程可能导致部分色素破坏、流失等而使局部表皮变白。因此，水煮、水蒸与烘法样品颜色、滋味上有差异。60 ℃烘法与 80 ℃烘法方式相同，温度接近，颜色特征差异微弱，难以采用外观性状实现区分。晒干法与阴干法同属自然干燥，样品颜色差异相对于烘干较小。阴干法因周期较长会出现变质、腐味，滋味上与烘干、晒干样品差异较大。烘干样品速率快，对颜色、滋味保留程度高，酸味值较大。

电子眼、电子舌等电子感官仿生技术可对颜色、滋味进行数据量化，实现了性状的客观表达，丰富了中药质量评价体系。其具有检测快速、前处理简单等优势 [20]，可用于山茱萸不同加工方法的饮片的快速识别与区分。此外，为探究外观性状与内在成分的关联提供了仪器支持，有助于寻找古人经验鉴别中“辨状论质”的科学内涵。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：29.

[2] 李少华，李申，李翠翠 . 山茱萸黄酒发酵工艺的优化研究 [J]. 食品研究与开发，2021，42（22）：125-130.

[3] 金磊，朱景超，张泽宇，等 . 中心复合设计响应面法优化山茱萸山药果冻制备工艺的研究 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（4）：385-390.

[4] 黄潇，李敏，刘聪，等 . 不同加工方法对川产道地药材山茱萸质量的影响 [J]. 中药与临床，2015，6（2）：4-7.

[5] 姜保本，朱小强，许君莉 . 山茱萸采收、加工与贮藏技术 [J]. 陕西农业科学，2006（3）：152-153.

[6] 谢宗万 . 中药品种传统经验鉴别“辨状论质”论 [J]. 时珍国药研究，1994，5（3）：19-21.

[7] 刘天睿，金艳，孟虎彪 . 论中药“辨状论质”之辨色泽与品质评价的生物学内涵研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（19）：4545-4554.

[8] 刘瑞新，郝小佳，张慧杰，等 . 基于电子眼技术的中药川贝母真伪及规格的快速辨识研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（14）：3441-3451.

[9] Calvini R，Pigani L. Toward the development of combined artificial sensing systems for food quality evaluation：a review on the application of data fusion of electronic noses，electronic tongues and electronic eyes [J]. Sensors（Basel），2022，22（2）：577-594.

[10] Lu B，Han F，Aheto JH，et al. Artificial bionic taste sensors coupled with chemometrics for rapid detection of beef adulteration [J]. Food Sci Nutr，2021，29（9）：5220-5228.

[11] Bao H，Yang H，Li J，et al. Establishment and development of a quality evaluation method for sangbaipi decoction [J]. J Aoac Int，2022，105（2）：558-566.

[12] Wei M，Tuo Y，Zhang Y，et al. Evaluation of two parts of lithocarpus polystachyus rehd from different Chinese areas by multicomponent content determination and pattern recognition [J]. J Anal Methods Chem，2020，2020（5）：1-10.

[13] 周迎春，张廉洁，张燕丽 . 山茱萸化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 中医药信息，2020，37（1）：114-120.

[14] 钱怡洁，皮文霞，朱广飞，等 . 基于熵权法结合层次分析法和反向传播神经网络优选酒萸肉蒸制工艺 [J]. 中草药，2021，52（22）：6816-6824.

[15] 任爱农，卢爱玲，田耀洲，等 . 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究 [J]. 中国中药杂志，2008，31（4）：372-374.

[16] 肖日传，匡艳辉，张传平，等 . 基于熵权法和灰色关联度法的人参质量综合评价 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（7）：4243-4248.

[17] 柴冲冲，曹妍，毛民，等 . 基于电子舌技术评价黄芩酒炙前后滋味变化及其在黄芩饮片鉴别中的应用研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（11）：2552-2559.

[18] 张润，陈千良，胡河荷，等 . 干燥方法对秦艽药材中有效成分含量的影响 [J]. 时珍国医国药，2019，30（6）：1348-1351.

[19] Cao G，Cai H，Cai B，et al. Effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed Cornus officinalis on the prevention of high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and its mechanism [J]. Food Chem，2013，140（1-2）：273-279.

[20] 张晓，吴宏伟，于现阔，等 . 基于电子眼技术的穿心莲质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（1）：189-195.

（收稿日期：2022-04-19；修回日期：2022-06-17）

UPLC-Q-TOF-MS 法分析椿乳凝胶中的化学成分

张逢雨[1, 2]，彭静[1, 2]，王雨馨[1, 2]，蒋跃平[1, 2]，姚亮元[3]，袁红波[3]，刘韶[1, 2*]（1. 中南大学湘雅医院药学部，长沙 410000；2. 中南大学湘雅医院 国家老年疾病临床医学研究中心-老年合理用药与安全用药研究室，长沙 410000；3. 株洲千金药业股份有限公司，湖南 株洲 412000）

摘要：目的 基于 UPLC-Q-TOF-MS 建立椿乳凝胶化学成分快速分析方法。**方法** 采用 Agilent C clipsePlus C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水 - 乙腈，梯度洗脱；流速 0.30 mL·min^{-1}。正负离子采集模式下进行全扫描质谱。通过 MassBank、NIST 等数据库和 Qualitative Workflows B.08.00，并结合相关文献检索以及质谱裂解规律分析椿乳凝胶中的化学成分，使用 GC-MS 法分析制剂中的挥发性成分。**结果** 共鉴定出 106 个化合物，其中 57 个化合物来自椿皮（2 个与苦参共有，2 个与牡丹皮共有，2 个与乳香共有），44 个化合物来自苦参（2 个与椿皮共有），4 个化合物来自牡丹皮（2 个与椿皮共有），5 个化合物来自乳香（2 个与牡丹皮共有），2 个化合物来自冰片。**结论** 本研究快速、准确地阐明了椿乳凝胶的活性成分，为进一步研究椿乳凝胶及其临床合理应用提供参考。

关键词：椿乳凝胶；超高效液相色谱 - 质谱；化学成分
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2580-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.021

Chemical constituents in Chunru gel by UPLC-Q-TOF-MS

ZHANG Feng-yu[1, 2], PENG Jing[1, 2], WANG Yu-xin[1, 2], JIANG Yue-ping[1, 2], YAO Liang-yuan[3], YUAN Hong-bo[3], LIU Shao[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410000; 2. *National Clinical Research Center for Geriatric Diseases*, *Xiangya Hospital of Central South University-Laboratory of Rational and Safe Drug Use for Geriatrics Diseases*, *Changsha* 410000; 3. *Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Zhuzhou Hunan* 412000)

Abstract: Objective To establish a method for the rapid analysis of chemical constituents in Chunru gel by UPLC-Q-TOF-MS. **Methods** Agilent C clipsePlus C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used to identify the chemical constituents in Chunru gel. The mobile phase was 0.1% formic acid water-acetonitrile with gradient elution at 0.30 mL•min^{-1}. Full scan mass spectrometry was performed in positive and negative ion acquisition mode. With MassBank, NIST and other databases and Qualitative Workflows B.08.00 combined with relevant literature search and mass spectrometry fragmentation rules, the chemical components in Chunru gel were analyzed. GC-MS technology was used to analyze the volatile components in the preparation. **Results** Totally 106 compounds were identified by UPLC-Q-TOF-MS. Among them, 57 compounds were from *Ailanthus altissima* Swingle (2 shared with *Sophora flavescens*, 2 shared with Chinese moutan cortex, and 2 shared with Frankincense); 44 compounds were from *Sophora flavescens* (2 shared with *Ailanthus altissima* Swingle); 4 compounds were from Chinese moutan cortex (2 shared with *Ailanthus altissima* Swingle); 5 compounds were from Frankincense (2 shared with *Ailanthus altissima* Swingle); and 2 compounds were from borneol. **Conclusion** This method can quickly and accurately elucidate the active components in Chunru gel, and provide a reference for its further research and its rational clinical application.

Key words: Chunru gel; UPLC-Q-TOF-MS; chemical constituent

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ6100）。

作者简介：张逢雨，女，硕士研究生，主要从事网络药理学研究，email：zfylcc@163.com *通信作者：刘韶，男，博士，博士研究生导师，主要从事药事管理和新药开发，email：liushao999@csu.edu.cn

椿乳凝胶是由名老中医 30 多年临床治疗经验方转化而来的中药制剂，功能主治为清热燥湿、祛瘀生肌[1]，对于中医诊治为湿热淤阻型的慢性宫颈炎疗效显著[1]，能显著改善慢性宫颈炎患者宫颈局部炎症以及相关临床症状[2]。该复方由椿皮、苦参、牡丹皮、乳香和冰片 5 味中药组成，化学成分包括生物碱、黄酮、萜类、酚及酚苷、挥发油和五环三萜类等多种成分，组成十分复杂，给椿乳凝胶的化学成分表征带来了极大的难度。目前椿乳凝胶还存在药效物质基础不明确、作用机制不清等问题，不利于椿乳凝胶在临床上安全、合理的应用。因此，确定其治疗慢性宫颈炎的药效物质基础和作用机制，对促进该药的合理应用和推进该药的现代化、国际化进程有十分重要的意义。

超高效液相色谱飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS）技术有着极高的精度和灵敏度，是一种可以在较短时间内快速表征已知或未知成分的强大技术，现已广泛应用于复杂样品的分析[3]。为中药复方化学成分分析提供了一种方便快速而准确的方法，是中药成分定性研究的重要工具。本课题组采用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定椿乳凝胶的化学成分并进行分析，为其药效物质基础研究和临床合理运用提供依据。

1 材料

椿乳凝胶（规格：4 g/ 支，批号：20190807，株洲千金药业股份有限公司）；超声波清洗机（上海易净超声波仪器公司）；AG285 电子天平（瑞士 METILE-TOLEDO 公司，规格：MS205DU）；AglientG6545B UPLC-MS 仪、安捷伦气质联用仪（配有 Agilent 7890 气相色谱仪、5975 质谱仪）（美国 Agilent 公司）；乙腈（分析醇，美国 Fisher 公司）；99.5% 甲醇、80% 乙醇（分析纯，成都科隆化学品有限公司）；有机滤膜（孔径 0.2 μm，天津市亿科隆实验设备有限公司）。

2 方法与结果

2.1 椿乳凝胶样品的前处理

取 1.0347 g 椿乳凝胶制剂，加入蒸馏水 30 mL 超声提取 3 min 溶解。将提取液液旋干后用色谱级甲醇复溶后使用 0.2 μm 有机滤膜过滤，滤液转移到 10 mL 量瓶中，定容，将溶液进质谱分析。

2.2 色谱条件与质谱条件

① 液相色谱条件：色谱柱为 Agilent C clipsePlus C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；柱温 30 ℃；流速 0.30 mL·min^{-1}；进样量 4 μL；流动相：0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 4 min，2%B；4 ～ 5 min，2% ～ 10%B；5 ～ 20 min，10% ～ 30%B；20 ～ 23 min，30% ～ 50%B；23 ～ 25 min，50% ～ 60%B；25 ～ 30 min，60% ～ 80%B；30 ～ 35 min，80% ～ 95%B）。

② 质谱条件：ESI 电离源，正负离子模式。分别设定一级和二级检测参数。载气为干燥 N_2，温度 325 ℃，载气流量 8 L·min^{-1}，雾化器压力 35 psi，鞘气温度 350 ℃，鞘气流量 11 L·min^{-1}，毛细管电压 4000 V。质谱数据记录 50 ～ 1100 *m/z* 的碎片离子，固定碰撞能量（10.00 V、20.00 V、40.00 V），扫描速率选择 4 张·s^{-1}，使用自动 MS/MS 数据采集和中等 MS/MS 分离宽度，选取每个循环中强度最大的 5 个离子打二级。

③ 气相色谱条件：色谱柱为 HP-5MS（30 m×0.25 mm×0.25 μm）弹性石英毛细管柱；载气为高纯氦气（99.999%），载气流量 1 mL·min^{-1}，分流比 20∶1，进样口温度 260 ℃，起始柱温度 60 ℃，维持 3 min，后以 5 ℃·min^{-1} 升到 220 ℃。质谱条件：离子源为 EI 源，电子能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，传输线温度 150 ℃，扫描范围为 20 ～ 500 amu。

2.3 化合物的鉴定

共鉴定出 106 个化合物（见表 1），其中通过 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定出 102 个化合物；通过气质联用确定了 4 个化合物。有 57 个化合物来自椿皮（其中 2 个与苦参共有，2 个与牡丹皮共有，2 个与乳香共有）[4-6]；有 44 个化合物来自苦参（其中 2 个与椿皮共有）[7-9]；有 4 个化合物来自牡丹皮（其中 2 个与椿皮共有）[10-11]；有 5 个化合物来自乳香（其中 2 个与牡丹皮共有）[12]；有 2 个化合物来自冰片。

2.3.1 生物碱类化合物 生物碱成分主要来自制剂中的苦参和椿皮，乳香中也有发现。在正负离子模式下共鉴定出 23 个生物碱类化合物，主要包括苦参碱型[8]（**2**、**3**、**5**、**7**、**8**、**10**、**11**、**14**、**22**、**23**、**24**），金雀花碱型（**16**、**17**），吲哚生物碱型[4]（**12**、**13**、**32**、**39**、**48**、**52**），臭豆碱（**9**），羽扇豆碱（**6**），苦木碱（**36**）和 Sophojaponicin（**56**）。选取苦参碱型苦参碱（**11**，见图 1A）、吲哚生物碱型 1- 甲酸 -*β*- 咔巴啉（**32**，见图 1B）分析生物碱类化合物的裂解规律。苦参碱型生物碱属于喹诺里西啶类生物碱，该类化合物存在 13/14 位双键或者 5/7 位存在羟基时，该化合物易在 11/12 位和 15/16 位发生 RDA 裂解，形成特征离子峰 *m/z* 136/148/150/176。在正离子模式下，1- 甲酸 -*β*- 咔巴啉形成 *m/z* 213 的准分子离子峰，随后丢失 1 分子羟基（OH）形成 *m/z* 195 的碎片离子峰，*m/z* 195 进一步脱醛基（CO）形成碎片离

表 1 椿乳凝胶所表征化合物的保留时间、分子式、化合物名称等信息

Tab 1 Retention time，molecular formula，compound name and other information of characteristic compounds in Chunru gel

序号	t_R	*m/z*	MS^2	化合物名称	分子式	来源
正离子模式						
1	1.068	381.1908	191.1203/148.0762	臭椿内酯	$C_{20}H_{28}O_7$	椿皮
2	1.093	281.1860	281.1864/264.1742/263.1736/97.0827/56.0490	氧化槐醇	$C_{15}H_{24}N_2O_3$	苦参
3	1.595	265.1911	150.1281/148.1128/247.1798/168.1368/136.0623/122.0965/112.0767/98.0610	氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	苦参
4	1.756	171.0288	125.0227/51.0263/68.9997/95.0128	没食子酸	$C_7H_6O_5$	苦参 / 椿皮
5	1.761	265.1911	148.1126/247.1809/265.1895/98.0970/112.0971/182.1176/188.1449/176.1065	氧化槐定碱	$C_7H_6O_5$	苦参
6	2.344	265.1911	166.1221/136.1130/148.1123/110.0973/122.0964/176.1065/55.0185/96.0810	羽扇豆碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	苦参
7	2.351	249.1961	249.1983/247.1782/150.1267/148.1118/190.1587//176.1077	槐定碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参
8	2.871	249.1961	179.1540/150.1276/136.1126	槐果碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参
9	4.079	245.1648	148.1136/98.0607/176.1086/120.0821	臭豆碱	$C_{15}H_{20}N_2O$	苦参
10	4.079	247.1805	112.0746/136.1107/148.1105/150.1263/152.1418/176.1045/96.0802/98.0593/84.0810/70.0650	7，11- 去氢苦参碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	苦参
11	4.160	249.1961	176.1082/150.1295/148.1124/136.1109/112.0744/110.0964/98.0609	苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参
12	6.165	241.0972	170.0941/213.1407/241.1385	1-acetyl-4-methoxy-*β*-carboline	$C_{14}H_{12}N_2O_2$	椿皮
13	6.165	241.0972	223.0558/195.0610/181.0048/115.0429	*β*-carboline-1-propionic acid	$C_{14}H_{12}N_2O_2$	椿皮
14	6.670	245.1648	245.1643/148.1136/176.1086/98.0607/122.0766/58.0665	槐胺碱	$C_{15}H_{20}N_2O$	苦参
15	6.680	419.1700	183.0624/419.1405	syringaresinol	$C_{22}H_{26}O_8$	苦参
16	7.262	191.1179	148.0732/133.0501/122.0812/118.0631	（＋）金雀花碱	$C_{11}H_{14}N_2O$	苦参
17	7.262	191.1179	191.1176/148.0751	（－）金雀花碱	$C_{11}H_{14}N_2O$	苦参
18	7.382	375.1438	70.0654/164.1060/247.1504/335.1786	臭椿内酯 F	$C_{20}H_{22}O_7$	椿皮
19	7.449	195.0652	134.0343/92.0570	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	椿皮
20	7.553	375.1438	152.0797/357.1341/375.1871	臭椿内酯 C	$C_{20}H_{22}O_7$	椿皮
21	7.677	395.1700	377.1621/395.1317	臭椿内酯 N	$C_{20}H_{26}O_8$	椿皮
22	7.897	263.1754	245.1639/150.0887	氧化槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	苦参
23	7.897	263.1754	245.1652/175.1241/176.1316/186.1285/187.1357/189.1394/190.1452/203.1557/148.1031/134.0971/120.0795/96.0821	9*α*- 羟基槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	苦参
24	7.993	281.1860	263.1713/221.0797/150.1271/146.1033	5*α*，9*α*- 二羟基苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_3$	苦参
25	8.014	197.0808	152.0407/179.0692/197.0795	*β*-hydroxypropiovanillone	$C_{10}H_{12}O_4$	椿皮
26	8.500	463.1810	468.0856/485.1625	methyl 3-（2-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-3，4，5，6-tetramethoxyphenyl）-propanoate	$C_{20}H_{30}O_{12}$	椿皮
27	8.587	377.1595	341/311/283.1290/267.1372/239/209.1234/171.0745	臭椿苦酮	$C_{20}H_{24}O_7$	椿皮
28	8.587	377.1595	289.1462/304.1252/359.1477/377.1584	臭椿双内酯	$C_{20}H_{24}O_7$	椿皮
29	9.164	363.1438	236.1069/266.1253/345.1336/363.1426	臭椿内酯 B	$C_{19}H_{22}O_7$	椿皮
30	9.177	358.259	70.0657/299.2131/200.1440/162.0916	ailanquassin A	$C_{19}H_{22}O_7$	椿皮
31	9.223	393.1544	119.0845/183.0827/199.0759/209.1297/281.1681	（*α*/*β*-epoxide）ailanthone	$C_{20}H_{24}O_8$	椿皮
32	9.581	213.0659	195.0951/167.0651/140.0510/114.9848/77.0372/51.9351	1- 甲酸 -*β*- 咔巴啉	$C_{12}H_8N_2O_2$	椿皮
33	9.680	307.1176	307.1168/308.1210/309.0870	altissimacoumarin N	$C_{16}H_{18}O_6$	椿皮
34	9.996	193.0495	178.0267/150.0565	东莨菪内酯	$C_{10}H_8O_4$	苦参 / 椿皮
35	11.021	399.1414	159.0794/86.0794/67.0543/195.1441/279.0782/354.2531/399.2559	isoailanthone	$C_{20}H_{24}O_7$	椿皮
36	11.246	227.0815	213.0743/167.0733	苦木碱 B	$C_{13}H_{10}N_2O_2$	椿皮
37	11.300	609.3034	609.3116/193.0853/177.0513	ailanaltiolide F	$C_{33}H_{46}O_9$	椿皮
38	11.337	401.1571	204.0747/189.0530/353.0947/327.1205/232.1380/147.1036/161.0596/72.0806	臭椿内酯 A	$C_{20}H_{26}O_7$	椿皮
39	11.412	531.1609	237.0672/371.1440/353.1422	canthin-6-one-1-*O*-*β*-*D*-apiofuranosyl-（1→2）-*β*-*D*-glucopy-ranoside	$C_{25}H_{26}N_2O_{11}$	椿皮
40	11.412	531.1609	237.0673	ailantcanthinoside A or B	$C_{25}H_{26}N_2O_{11}$	苦参
41	12.264	387.1438	137.0599/153.0553/192.0734	kenusanone F	$C_{21}H_{22}O_7$	苦参
42	12.305	581.1501		luteolin 7-apiosyl-（1-＞2）-glucoside	$C_{26}H_{28}O_{15}$	苦参
43	12.368	359.1489	359.1518/328.1294/206.0617/152.0479/132.0515/125.0612	（＋）-pinoresinol	$C_{20}H_{22}O_6$	椿皮

续表 1

序号	t_R	m/z	MS^2	化合物名称	分子式	来源
44	12.770	443.1676	228.8181/240.9229/275.1254/425.2383	polystachyol	$C_{22}H_{28}O_8$	椿皮
45	12.787	421.1857	329.2629	（－）-lyoniresinol	$C_{22}H_{28}O_8$	椿皮
46	13.713	563.1759		苦参醇 O	$C_{27}H_{30}O_{13}$	苦参
47	14.002	607.2150	607.2046/437.2143/412.1349/203.0651/190.9934	ficusesquilignan B	$C_{31}H_{36}O_{11}$	椿皮
48	14.424	675.2032	675.0962/237.0630/109.0286	canthin-6-one-1-*O*-[2-*β*-*D*-apiofuranosyl-6-*O*-（3-hydroxy-3-methylglutaryl）]-*β*-*D*-glucopyranoside	$C_{31}H_{34}N_2O_{15}$	椿皮
49	14.673	431.1337	213.0888/226.0611/254.0565/269.0805/270.0841	formononetin 7-*O*-glucoside	$C_{22}H_{22}O_9$	椿皮
50	14.769	413.1571	397.1568/413.1566/415.1304	（＋）-7*S*，8*S*-4，7，9-trihydroxy-3，3'，9'-trimethoxy-1'-allyl-8，4'-oxyneolignan	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
51	14.769	413.1571	436.4201	altissimacoumarin J	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
52	14.802	543.1609	237.0660/393.2059/217.1050/149.1187/111.0428/89.0594	canthin-6-one-1-*O*-[6-*O*-（3-hydroxy-3-methylglutaryl）]-*β*-*D*-glucopyranoside	$C_{26}H_{26}N_2O_{11}$	椿皮
53	14.918	383.2064	364.2443/382.1902	臭椿内酯 D	$C_{20}H_{30}O_7$	椿皮
54	15.928	439.2115	267.0430/409.1833	异苦参酮	$C_{26}H_{30}O_6$	苦参
55	16.443	123.0441	77.0386	苯甲酸	$C_7H_6O_2$	牡丹皮 / 椿皮
56	16.443	447.1286		sophojaponicin	$C_{22}H_{22}O_{10}$	苦参
57	16.821	667.3817	677.3618/89.0598	ailanaltiolide A/B	$C_{37}H_{56}O_9$	椿皮
58	16.908	429.1884	369.1657/429.1849	臭椿内酯 L	$C_{22}H_{30}O_7$	椿皮
59	16.983	391.1751	373.1928/391.2028	altissimacoumarin L	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
60	17.332	433.1469	415.2593/433.182	臭椿内酯 M	$C_{20}H_{26}O_9$	椿皮
61	17.980	391.1751	108.0536/151.1119/208.0351/223.0615/373.1626/391.1732	altissimacoumarin A	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
62	18.217	167.0703	167.0697/149.0575	丹皮酚	$C_9H_{10}O_3$	牡丹皮
63	18.549	365.1959	365.1921/319.1658	臭椿内酯	$C_{20}H_{28}O_6$	椿皮
64	18.624	667.2361	177.0471/203.0664/204.1187/233.0780/249.0752/441.1519/619.2200/667.2375	buddlenol D	$C_{33}H_{40}O_{13}$	椿皮
65	18.690	417.1180	255.1214	大豆苷	$C_{21}H_{20}O_9$	苦参
66	18.919	637.2255	203.0385/589.2193/637.2262	buddlenol C	$C_{32}H_{38}O_{12}$	椿皮
67	19.160	607.2150	213.1565/411.1366/607.2144	buddlenol E	$C_{31}H_{36}O_{11}$	椿皮
68	19.762	407.1700		臭椿醇 A	$C_{21}H_{26}O_8$	椿皮
69	19.812	391.1751	391.172/223.0602/208.035/152.1118	altissimacoumarin F/M/J	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
70	22.313	417.1520	93.0707/60.0425/357.2385/109.1011/209.1547	ailanaltiolide K	$C_{20}H_{26}O_8$	椿皮
71	22.500	137.1325	137.1334/93.0694/79.0540	*α*-松油烯	$C_{10}H_{16}$	乳香 / 椿皮
72	23.144	413.1571	251.1774/413.1581/414.1617/415.1667	7'*S**-methoxy-7-epi-lariciresinol	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
73	23.680	137.1325	55.0409/95.0822/69.0699/70.0647	*β*-蒎烯	$C_{10}H_{16}$	乳香 / 椿皮
74	24.897	413.1571	397.1963/413.1566/415.2053	（－）-7*R*，8*R*-4，7，9-trihydroxy-3，3'，9'-trimethoxy-1'-allyl-8，4'-oxyneolignan	$C_{21}H_{26}O_7$	椿皮
75	25.352	371.1489	161.0248/133.0304/207.0769	2'-羟基异黄腐醇	$C_{21}H_{22}O_6$	苦参
76	26.675	319.2268	286.1748	picrasane-1，12-dione	$C_{20}H_{30}O_3$	椿皮
负离子模式						
77	0.775	191.0561	85.0301/191.0197	奎宁酸	$C_7H_{12}O_6$	苦参
78	1.079	138.0197	94.0305/138.0205	2-羟基烟酸	$C_6H_5NO_3$	苦参
79	1.228	180.0666	72.0102/93.0024/163.0386/180.0649	酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	椿皮
19	3.538	193.0506	59.0051/133.0190/149.0495/193.0396	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	椿皮
80	7.472	167.0350	151.3100/152.0099/157.0345	香草酸	$C_8H_8O_4$	牡丹皮 / 椿皮
81	7.771	159.0663	59.0145/95.0486/96.9375/97.0668/115.077/141.0560/159.0681	庚二酸	$C_7H_{12}O_4$	乳香
82	7.879	411.1661	393.1524/375.1455/319.1488	臭椿内酯 O	$C_{20}H_{28}O_9$	椿皮
83	8.020	197.0455	197.0441/179.0688/153.0569	丹参素	$C_9H_{10}O_5$	苦参
38	8.750	377.1606	135.0458/105.0370//303.1587/275.1637/61.9895	臭椿内酯 A	$C_{20}H_{26}O_7$	椿皮
29	9.047	361.1293	189.0806/234.0753/264.0862/331.1053/343.1074/361.1162	臭椿内酯 B	$C_{19}H_{22}O_7$	椿皮
84	9.636	129.0921		2-methylbutyl acetate	$C_7H_{14}O_2$	牡丹皮
85	10.455	221.0455	162.0304/177.9886/206.0222	异秦皮啶	$C_{11}H_{10}O_5$	椿皮
86	11.041	521.2028	521.2025/359.1501	seco-dehydrodiconiferyl alcohol-4-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside	$C_{26}H_{34}O_{11}$	椿皮

续表 1

序号	t_R	*m/z*	MS^2	化合物名称	分子式	来源
87	11.747	391.1398	374.1290/392.1449	臭椿内酯 E	$C_{20}H_{24}O_8$	椿皮
88	11.788	441.1919	161.0423/331.0870	苦醇 Q	$C_{25}H_{30}O_7$	苦参
89	13.608	579.1355		luteolin 7-primeveroside	$C_{26}H_{28}O_{15}$	苦参
90	15.448	421.2020	149.0461/421.2087/289.1685//89.0253/101.0255/71.0143/113.0255	8-lavandulylkaempferol	$C_{26}H_{30}O_5$	苦参
91	15.448	421.202	89.0253/101.0255/289.1685/71.0143/421.2087/131.0348/149.0461	苦醇 R/U	$C_{26}H_{30}O_5$	苦参
62	15.531	165.0557		丹皮酚	$C_9H_{10}O_3$	牡丹皮
92	15.548	137.0244	65.0402/75.0267/92.7835	4-hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	苦参
93	15.548	137.0244	137.0237	2，5-dihydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_3$	苦参
94	24.584	437.1970	161.0253/151.0393/（135.0450）/275.1682/301.1454/177.1246/191.0697	苦参啶	$C_{26}H_{30}O_6$	苦参
95	25.352	369.1344	161.0248/207.0769/192.0807/133.0304	（2*R*，3*R*）-3，7，4'-trihydroxy-5-methoxy-8-prenylflavanone	$C_{21}H_{22}O_6$	苦参
96	25.706	423.1813	261.1500/161.0249/137.0246/124.0161/243.1365/192.0781/125.0245	降苦参酮	$C_{25}H_{28}O_6$	苦参
97	26.578	353.1394	119.0500/233.0813/353.1386/218.0574/189.0899/165.0922/295.0569	黄腐醇 / 异黄腐醇	$C_{21}H_{22}O_5$	苦参
98	26.578	353.1394	119.0500/233.0813/353.1386/218.0574/189.0899/165.0922/133.0660/295.0569	黄腐醇 / 异黄腐醇	$C_{21}H_{22}O_5$	苦参
99	27.405	423.1813	261.1479/161.0239//50.1316/103.1562/146.9634/243.9833/287.1229/357.8793	苦参醇 E	$C_{25}H_{28}O_6$	苦参
100	27.405	423.1813	261.1500/161.0249/137.0246/124.0161/192.0806/287.1280/243.1365/109.0294/192.0781	苦参醇 F	$C_{25}H_{28}O_6$	苦参
101	27.467	437.1970	161.0246/135.0443/151.0395/191.0737/275.1657	异苦参啶	$C_{26}H_{30}O_6$	苦参
102	27.467	437.1970	419.1802/367.2291/275.1651/161.0242/135.0432	苦参酮	$C_{26}H_{30}O_6$	苦参
气质联用						
103	/	/	/	辛醇	$C_8H_{18}O$	乳香
104	/	/	/	异龙脑	$C_{10}H_{18}O$	冰片
105	/	/	/	龙脑	$C_{10}H_{18}O$	冰片
106	/	/	/	乙酸辛酯	$C_{10}H_{20}O_2$	乳香

子 *m/z* 167，*m/z* 167 可断裂 C-N 键脱去 CH_2N 片段形成 *m/z* 140 碎片离子，*m/z* 140 碎片离子连续裂环形成碎片离子 *m/z* 114、*m/z* 77，最后 *m/z* 77 缩环形成 *m/z* 51 碎片离子，裂解途径见图 1。

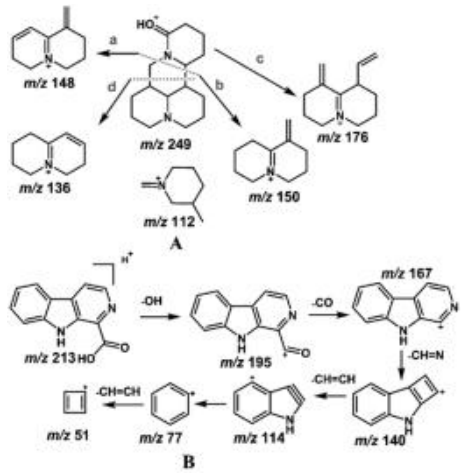


图 1 苦参碱（A）和 1-甲酸 -*β*- 咔巴啉（B）的质谱裂解

Fig 1 Mass spectrometry fragmentation of matrine（A）and 1-formic acid-*β*-carbaline（B）

2.3.2 黄酮类化合物 黄酮类成分主要来自苦参和椿皮，在正负离子模式下共鉴定出 17 个黄酮类化合物，主要包括异黄酮类（**46**、**49**、**65**），二氢黄酮类（**54**、**75**、**88**、**90**、**91**、**94**、**95**、**96**、**97**、**98**、**99**、**100**、**101**、**102**）。选取二氢黄酮类降苦参酮（**96**，见图 2A）、异黄酮类大豆苷（**65**，见图 2B）分析黄酮类化合物的裂解规律。在负离子模式下，降苦参酮生成 *m/z* 423 的准分子离子峰，*m/z* 423 发生 a 裂解可形成 *m/z* 161 和 *m/z* 261 碎片离子，后者可进一步发生 b 裂解形成 *m/z* 124、*m/z* 125，或者失去 1 分子 $CH_2CHC(CH_3)_2$ 形成 *m/z* 192 碎片离子。大豆苷在正离子模式下生成 *m/z* 417 的准分子离子峰，接着糖苷键水解生成 *m/z* 255 的碎片离子，裂解途径见图 2。

2.3.3 苦木苦味素类化合物 苦木苦味素类化合物主要来自制剂中的椿皮，共鉴定出 22 种（**1**、**18**、**20**、**21**、**27**、**28**、**29**、**31**、**35**、**37**、**38**、**40**、**53**、**57**、**58**、**60**、**63**、**68**、**70**、**76**、**82**、**87**），且多为四环二萜类及五环二萜类内酯。选取臭椿苦酮（**27**）

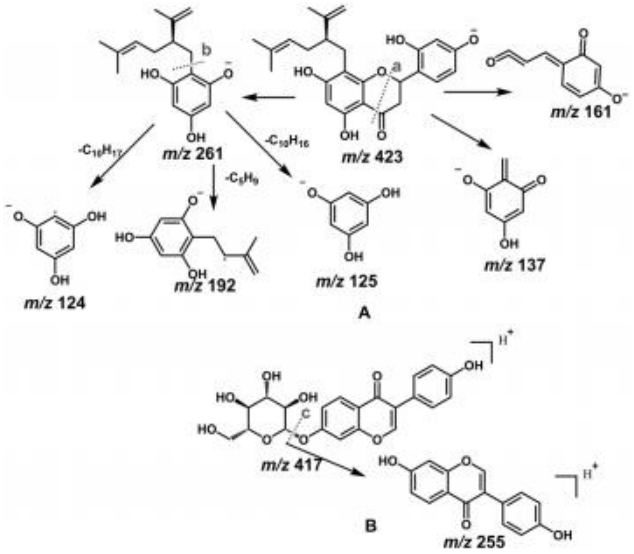


图 2　降苦参酮（A）和大豆苷（B）的质谱裂解

Fig 2　Mass spectrometry fragmentation of normatrine（A）and daidzein（B）

分析苦木苦味素类裂解规律。臭椿苦酮在正离子模式下易形成 *m/z* 377 的准分子离子峰，随后，由 A，B，C，D，E 各个环分别发生不同程度的开裂和 / 或脱水形成 *m/z* 239、*m/z* 341、*m/z* 267、*m/z* 209、*m/z* 171 的碎片离子峰。裂解途径见图 3。

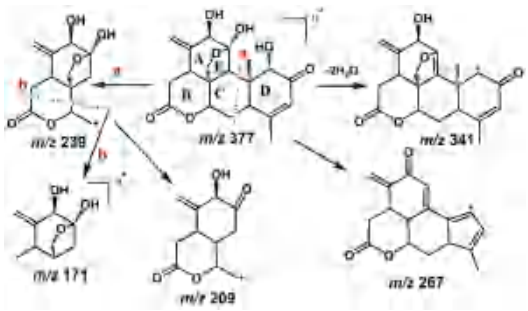


图 3　臭椿苦酮的质谱裂解

Fig 3　Mass spectrometry fragmentation of ailanthone

2.3.4　香豆素类化合物　香豆素类化合物来自椿皮和苦参，包括 **34**、**51**、**59**、**61**、**69**。选取东莨菪内酯（**34**）分析黄酮类化合物的裂解规律。在正离子模式下，东莨菪内酯产生质子化的准分子离子峰 *m/z* 193，准分子离子峰丢失 1 分子甲基（CH_3）形成 *m/z* 178 碎片离子，*m/z* 178 继续丢失 1 分子醛基（CO）中性分子形成 *m/z* 150 碎片离子，裂解途径见图 4。

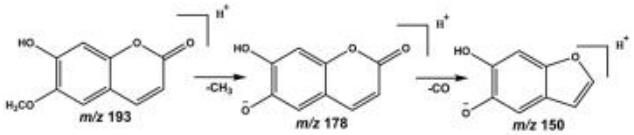


图 4　东莨菪内酯的质谱裂解

Fig 4　Mass spectrometry fragmentation of scopoletin

2.3.5　木脂素类化合物　木脂素类化合物主要来自椿皮和苦参，在正负离子模式下共鉴定出 5 种（**43**、**45**、**64**、**66**、**67**），选取 buddlenol C（**66**）分析木脂素类裂解规律。Buddlenol C 首先与 Na^+ 结合形成 $[M + Na]^+$ 峰，接着在 a 处发生裂解并脱去 1 分子水（H_2O）形成 *m/z* 203；$[M + Na]^+$ 峰也可直接失去 1 分子甲醇基（CH_2OH）和 1 分子羟基（OH）形成 *m/z* 589，裂解途径见图 5。

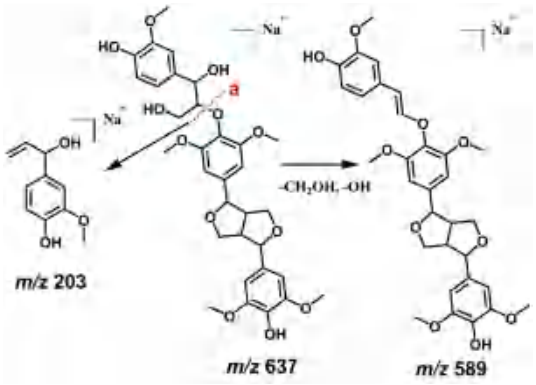


图 5　Buddlenol C 的质谱裂解

Fig 5　Mass spectrometry fragmentation of buddlenol C

2.3.6　萜类及甾醇类化合物　萜类及甾醇类化合物主要来自乳香、牡丹皮和冰片，本研究鉴定出 4 个萜类及甾醇类化合物（**71**、**73**、**104**、**105**）。选取 *β*- 蒎烯（**73**）分析萜类及甾醇类裂解规律。*β*- 蒎烯在正离子模式下准分子离子峰为 *m/z* 137，准分子离子峰可发生环开裂生成 *m/z* 55、*m/z* 69 和 *m/z* 95。裂解途径见图 6。

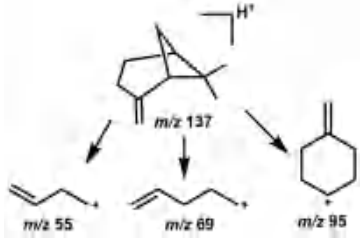


图 6　*β*- 蒎烯的质谱裂解

Fig 6　Mass spectrometry fragmentation of *β*-pinene

3　讨论

椿乳凝胶中化学成分复杂多样，为了全面研究制剂中的成分，本研究对提取溶剂、溶剂体积、超声时间和梯度洗脱条件分别进行了优化，结果表明最佳的提取条件为 30 mL 水超声 3 min。流动相选用 0.1% 甲酸水 - 乙腈，使化合物峰形得到改善。为了全面地鉴定凝胶中的成分，采用正负离子模式进行分析，并结合 GC-MS 收集挥发性成分。最终鉴定出 106 个化合物，其中有 57 个化合物来自椿皮（其中 2 个与苦参共有，2 个与牡丹皮共有，2 个与乳香共有），有 44 个化合物来自苦参（其中 2 个与椿皮共有），有 4 个化合物

来自牡丹皮（其中有 2 个与椿皮共有），有 5 个化合物来自乳香（其中 2 个与牡丹皮共有），有 2 个化合物来自冰片。

生物碱类化合物主要来自苦参和椿皮，有抗炎、抗菌、抗病毒的作用。药理实验和临床观察证明，苦参能抑制或杀灭阿米巴原虫，在体外其醇浸膏有抗滴虫作用。对大肠埃希菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌和乙型链球菌有明显抑制作用[7，13]。黄酮类化合物主要来自苦参和椿皮，主要是发挥抗炎、抗菌的作用[13-14]。苦木苦味素类成分是椿皮的特征性成分，其中臭椿内酯 A、臭椿苦酮、臭椿双内酯有很强的抗炎、抗菌和抗病毒作用[15-16]。臭椿苦酮还有诱导细胞周期阻滞，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡的作用，但体外研究表明，臭椿苦酮具有潜在的肝脏和胃肠道损伤，可导致脂肪性肝炎、脾肿大、胃肠黏膜损伤和生殖系统异常的毒性，推测是制剂中的毒性成分，臭椿内酯 A 和臭椿苦酮对人癌细胞系具有明显的细胞毒性[17-20]。这些作用与椿乳凝胶治疗慢性宫颈炎的作用一致，推测是制剂中比较重要的成分。

本研究对椿乳凝胶的主要化学成分进行了分析，阐明了椿乳凝胶发挥作用的药效学物质基础，为其临床合理应用提供了可靠的数据支持和探索方向。研究鉴定出的化学成分大多来自椿皮和苦参，值得注意的是，凝胶中一些含量较低的成分并不能被完全辨识出，需进一步改进分析方法，提升检测技术。

参考文献

[1] 钟晓枫 . 椿乳凝胶治疗宫颈 HPV 高危型感染（湿热瘀阻证）的临床观察 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2019.

[2] 尹胜，张素英，尤昭玲 . 椿乳凝胶治疗慢性宫颈炎的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2011，20（35）：4512-4513.

[3] Qi H，Zhang FY，Liu S，et al. Systematic investigation of the pharmacological mechanism for renal protection by the leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver using UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology analysis [J]. Biomed Pharmacother，2021，140：111735.

[4] 赖正权 . 苦木化学成分及质量研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2011.

[5] 齐鑫，陈智华，高璐，等 . 椿根皮中生物碱及苦木素类化合物的分离与鉴定 [J]. 中草药，2011，42（6）：1057-1060.

[6] 麦景标 . 椿皮的化学成分研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2012.

[7] 王圳伊，王露露，张晶 . 苦参的化学成分，药理作用及炮制方法的研究进展 [J]. 中国兽药杂志，2019，53（10）：9.

[8] 宿美凤，雒晓梅，王小明，等 . 基于 UHPLC-MS/MS 苦参实定性定量及其入血成分分析 [J]. 中草药，2019，50（9）：2041-2048.

[9] 李晓娜，董馨，包保全，等 . 基于 Q-Exactive 高分辨质谱的蒙中药材苦参化学成分的快速分析鉴定 [J]. 中药材，2019，42（1）：103-109.

[10] 曹春泉 . 牡丹皮的化学成分研究进展 [J]. 广州化工，2013，41（12）：44-45.

[11] 胡云飞，裴月梅，吴虹，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地牡丹皮药材化学成分的差异 [J]. 中草药，2016，47（17）：2984-2992.

[12] 常允平，韩英梅，张俊艳 . 乳香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床，2012，27（1）：52-59.

[13] 赵慧娟 . 苦参中黄酮类成分的研究 [D]. 西安：西北大学，2005.

[14] 赵平，张颖君，山本浩文，等 . 苦参异戊烯基黄酮类化合物的化学，活性及其生物合成研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2004，16（2）：7.

[15] Xiang L，Li Y，Ma SB，et al. Traditional uses，phytochemistry，and pharmacology of *Ailanthus altissima*（Mill.）Swingle bark：a comprehensive review [J]. J Ethnopharmacol，2021，275：114121.

[16] Kim HM，Kim SJ，Kim HY，et al. Constituents of the stem barks of *Ailanthus altissima* and their potential to inhibit LPS-induced nitric oxide production [J]. Bioorg Med Chem Lett，2015，25（5）：1017-1020.

[17] Wang Y，Wang WJ，Su C，et al. Cytotoxic quassinoids from *Ailanthus altissima* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2013，23（3）：654-657.

[18] Wang RX，Mao XX，Zhou J，et al. Antitumor activities of six quassinoids from *Ailanthus altissima* [J]. Chem Nat Compd，2017，53（1）：28-32.

[19] Hou SZ，Cheng ZM，Wang WL，et al. Ailanthone exerts an antitumor function on the development of human lung cancer by upregulating microRNA-195 [J]. J Cell Biochem，2019，120（6）：10444-10451.

[20] Liu WJ，Liu XN，Pan ZH，et al. Ailanthone induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma B16 and A375 cells [J]. Biomolecules，2019，9（7）：275.

（收稿日期：2022-04-11；修回日期：2022-06-20）

基于 Q-TOF-MS 技术的姜半夏及其掺伪品姜虎掌的成分鉴定与差异分析

谢浙裕[1]，吕林锋[1*]，邓俊杰[1]，毛威[1]，劳丽莉[2]（1. 绍兴市食品药品检验研究院，浙江　绍兴　312071；2. 绍兴震元中药饮片有限公司，浙江　绍兴　312000）

摘要：目的　采用高效液色谱相串联飞行时间质谱对姜半夏和姜虎掌进行化合物分析，用 Mass Profiler Professional（MPP）统计软件查找特征化合物并建立数据模型。**方法**　采用 Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C_{18}（4.6 mm×150 mm，3 μm）色谱柱，以甲醇 -5 mmol 乙酸铵梯度洗脱，流速 0.4 mL·min^{-1}；采用电喷雾离子化源，正离子扫描；Profinder 软件以 MFE 算法寻找化合物，MPP 软件根据姜半夏和姜虎掌各自化合物出现的频率、响应值、可变性、特征性等进行过滤分析，设定阈值为 $P < 0.01$，最小倍数变化值 FC ＜ 2.0，寻找姜半夏和姜虎掌的差异化合物，并建立两者的模型。**结果**　初步鉴定到姜半夏特有成分 12 个，姜虎掌特有成分 99 个，建立了姜半夏和姜虎掌数据模型，在掺入一定比例姜虎掌时，模型能预测样品偏离，具有一定的预测性。**结论**　通过高分辨液质联用仪和 MPP 统计软件对半夏及其伪品虎掌的姜制炮制品的化学成分进行分析，找到了姜虎掌特有的成分，选择含量较高的作为姜半夏掺姜虎掌的鉴别成分，同时建立的数据模型具有一定的预测性，为半夏炮制品中掺伪检查提供一定的思路。

关键词：四极杆 - 飞行时间串联质谱；姜半夏；姜虎掌
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2587-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.022

Component identification and difference analysis of ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott based on Q-TOF-MS

XIE Zhe-yu[1], LYU Lin-feng[1*], DENG Jun-jie[1], MAO Wei[1], LAO Li-li[2] (1. *Shaoxing Institute for Food and Drug Control*, *Shaoxing Zhejiang* 312071; 2. *Shaoxing Zhenyuan Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Co.*, *Ltd*, *Shaoxing Zhejiang* 312000)

Abstract: Objective　To analyse the components of ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott by Q-TOF-MS, and find the characteristic compounds and establish the data model by Mass Profiler Professional (MPP). **Methods**　Chromatograpic separation was performed on Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C_{18} (4.6 mm×150 mm, 3 μm) column with a gradient elution program with mixtures of methanol and 5 mmol ammonium acetate solution as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL·min^{-1}. Q-TOF-MS was developed for throughput screening of the preliminary chemical profile of ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott in the positive ion mode. Profinder software found the compounds through MFE algorithm. Different compounds in *Pinellia ternata* and *Pinellia pedatisecta* Schott were determined, with the threshold $P < 0.01$ and the minimum multiple change value FC ＜ 2.0, and the models were established. **Results**　Totally 12 compounds specific to ginger *Pinellia ternata* and 99 components specific to ginger *Pinellia pedatisecta* Schott were found. The data models of ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott were established. The model could predict the sample deviation when some ginger *Pinellia pedatisecta* Schott palm was added. **Conclusion**　The unique components of ginger *Pinellia*

基金项目：浙江省绍兴市科技计划专项（No.2020B23005）。
作者简介：谢浙裕，男，副主任中药师，主要从事药品检验工作，email：crab_xzy@126.com　*通信作者：吕林锋，男，副主任中药师，主要从事中药检验工作，email：157070301@qq.com

pedatisecta Schott can be determined by Q-TOF-M and MPP, the high content of which can be used to establish data model with certain predictability, providing ideas for the detection of adulteration in ginger *Pinellia ternata*.

Key words: Q-TOF-MS; ginger *Pinellia ternata*; ginger *Pinellia pedatisecta* Schott

半夏为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata*（Thunb.）Breit. 的干燥块茎，具有燥湿化痰，降逆止呕，消痞散结的功效；用于湿痰寒痰，呕吐反胃，梅核气等。虎掌作为最常见的半夏伪品，又名掌叶半夏，为天南星科半夏属植物掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott 的干燥块茎，个小者常冒充半夏使用，两者外观极为相似，经加工炮制后更加难以鉴别，如图 1 所示。

图 1 姜半夏和姜虎掌性状比较

Fig 1 Ginger *Pinellia ternata* and ginger *Pinellia pedatisecta* Schott

半夏和虎掌为同科同属植物，因此所含化学成分的种类极其相近，已有文献报道通过显微鉴别 [1-2]、光谱色谱分析 [3-13]、PCR 技术 [14-16] 并结合统计学分析，建立半夏及其伪品的指纹图谱，寻找 DNA 特征片段等方法加以区别，但均专属性不强，且不能就掺伪进行定量检测。有研究报道水麦冬酸是虎掌具有而半夏不含的特征性成分 [17]，可以采用液相色谱法加以鉴别，可是聂黎行等 [18] 采用液相 - 三重四极杆质谱联用仪对 11 批半夏和 7 批虎掌研究证实，半夏中也含有少量水麦冬酸，水麦冬酸并非虎掌的特征性成分，且炮制后虎掌的水麦冬酸也会消失。因此只研究药材的成分差异而不研究其炮制品，存在一定的局限性。

近年来，四极杆 - 飞行时间质谱（Q-TOF-MS）逐步开始被应用在中药复杂体系的定性和定量分析中 [19-20]。MPP 软件（Mass Profiler Professional）是一个强大的化学计量学平台软件，它利用大量的质谱数据信息进行差异分析，以确定两个或多个样品组和变量之间的关系，并可进行化合物鉴定 / 标注，在植物产地鉴别 [21-22] 中有广泛的应用。本文基于 Q-TOF 采集质谱数据，通过 MPP 软件对炮制后的半夏和虎掌的差异成分进行研究，为半夏炮制品的掺伪检测提供可靠的依据，为中药质量评价提供有力保障。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱（配有在线脱气系统、二元泵、自动进样器、柱温箱）、Agilent 6530 型飞行时间质谱仪（配有 ESI 电喷雾电离源）、Agilent Masshunter Workstation Data Acquisition B.09.00 数据采集软件、Qualitative Workflows B.08.00 软件、Profinder 10.0 软件、Mass Profiler Professional 15.1 软件（美国安捷伦公司）；XS206 十万分之一电子天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；超声清洗仪（上海汉克科学仪器有限公司，SK3310HP）。

1.2 试药

甲醇（质谱级，Merck 公司）；甲醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；乙酸铵（质谱级，CNW）；水由 Milli-Q 系统纯化制得。生半夏 [*Pinellia ternata*（Thunb.）Breit.] 委托浙江震元中药饮片有限公司从甘肃、山西、浙江、河北、贵州等地购买，并由该公司加工成姜半夏；虎掌（*Pinellia pedatisecta* Schott）主要从河北购买，并委托浙江震元中药饮片有限公司按照姜半夏方法加工制成姜虎掌，样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

名称	产地	加工时间	名称	产地	加工时间
姜半夏	贵州赫章	2019-02-20	姜虎掌	河南灵宝	2019-02-22
	浙江慈溪	2019-02-15		河北石家庄	2019-02-16
	山西运城	2019-01-22		河北保定	2019-03-25
	山西运城	2019-01-15		河北保定	2019-04-05
	山西运城	2019-02-16		河北安国	2019-01-22
	山西运城	2019-03-05		河北安国	2019-01-30
	甘肃西和	2019-03-08		河北安国	2019-03-11
	甘肃西和	2019-03-10		河北安国	2019-04-20
	甘肃天水	2019-03-15		河北安国	2019-04-15
	河北安国	2019-03-20		河北安国	2019-05-10

2 方法

2.1 仪器条件

2.1.1　液相条件　色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C_{18}（4.6 mm×150 mm，3 μm）；流动相为甲醇 -5 mmol 乙酸铵梯度洗脱（见表 2）；流速为 0.4 mL·min^{-1}；柱温为 40 ℃，进样体积为 3 μL。

表 2　流动相梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution program of mobile phase

时间 /min	甲醇 /%	5 mmol 乙酸铵 /%
0	35	65
5	90	10
10	95	5
15	100	0
24	100	0

2.1.2　质谱条件　电喷雾离子化（ESI）；以氮气为载气，载气流速 8 L·min^{-1}，载气温度 300 ℃，鞘气流速 11 L·min^{-1}，鞘气温度 350 ℃，Fragmentor 135 V；离子模式为正离子。

2.2　样品溶液制备

称取姜半夏、姜虎掌样品 0.5 g，加入 75% 甲醇 20 mL，浸渍 30 min，超声处理 30 min，放冷至室温，经 5000 r·min^{-1} 离心 10 min，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液作为样品溶液。

2.3　提取分子特征（molecular feature extractor，MFE）算法寻找化合物

采用液相色谱 - 飞行时间质谱联用仪对“2.2”项下制得的样品溶液进样，采集总离子流数据。通过 Profinder 软件对总离子流数据进行处理，设置化合物寻找条件，最小绝对响应值≥ 5000 counts，化合物保留时间偏差 ±0.3 min，质量偏差 ±（1.5×10^{-5} + 2.0）mDa，化合物元素组成为 C、H、O、N、S、Cl 等，通过离子精确质量数、同位素簇峰、同位素簇峰间隔与理论值比较的方法，寻找样品中化合物，并将结果生成含有化合物信息（包括质荷比、保留时间、精确分子量、同位素簇峰、价态数等）的“.CEF”格式文件。

2.4　特征化合物分析及建模

将生成的“.CEF”格式文件导入 MPP 软件，进行统计分析。首先根据采集数据信息将文件分成姜半夏和姜虎掌两组（每组有 10 个样本），再次对样品中寻找到的化合物进行过滤，设置离子最小绝对响应值≥ 500 000 counts，保留时间偏差≤ 0.15 min，质量偏差 ±（1.5×10^{-5} + 2.0）mDa，化合物归一化百分偏移值为 75%，选择中位值加权各化合物来表示样品偏离程度。然后对过滤后的数据根据化合物出现的频率、响应值、可变性、特征性等进行差异分析，软件设置参数为：化合物至少在 9 个样品有可接受的值，显著性分析中，选择 T- 检验最大 P < 0.01，最小倍数变化值 FC < 2.0[23-24]，从而建立统计分析数据。通过 MPP 软件的主成分分析（principal component analysis，PCA）方法，建立基于化合物差异的两组数据的差异性，并寻找两组之间的差异化合物。

基于上述对姜半夏和姜虎掌差异化合物统计分析结果，创建最小二乘判别分析（PLS-DA）模型，并检查 PLS-DA 模型图和分组的拟合度 R^2 预测能力 Q^2，从而建立 MPP 模型。

3　结果

通过 Profinder 软件的 MFE 算法在每个样品中找到 2000 余个化合物，姜半夏和姜虎掌中找到的化合物如图 2、3 所示。

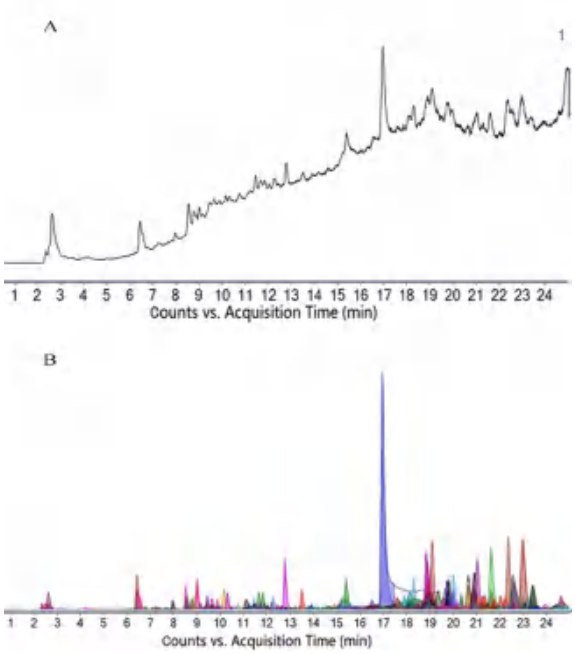


图 2　姜半夏的总离子流图（A）及 MFE 寻找到化合物叠加图（B）

Fig 2　TIC of ginger *Pinellia ternate*（A）and compound superposition diagram by MFE（B）

通过 MPP 软件 Find Unique Entities 分析，同时满足 P < 0.01，FC < 2.0 寻找到的特征化合物为 121 个，其中姜半夏特有的化合物 12 个，姜虎掌特有的化合物 99 个。

通过 PCA 可见姜半夏和姜虎掌两组样本差异明显，见图 4，从图中可以看出，PC1 权重 78.5%，PC2 权重 4.89%。

结合 Profinder 软件分析结果，通过安捷伦公司提供的 TCM-database 化合物数据库，并结合文献 [25-26]，初步对化合物进行鉴定，结果见表 3。

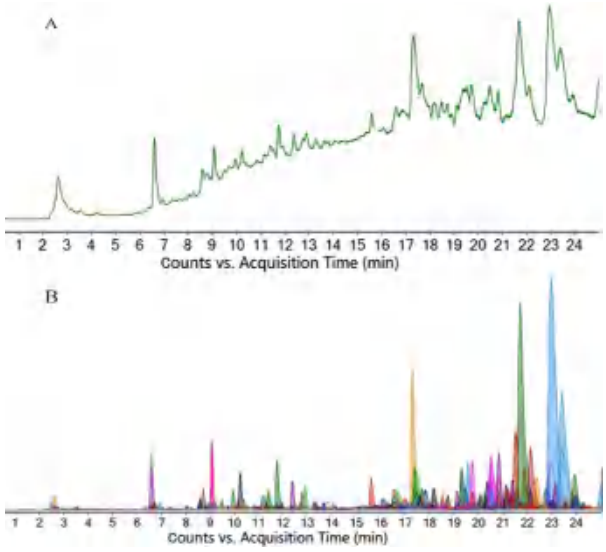


图 3 姜虎掌的总离子流图（A）及 MFE 寻找到化合物叠加图（B）

Fig 3 TIC of ginger *Pinellia pedatisecta* Schott（A）and compound superposition diagram by MFE（B）

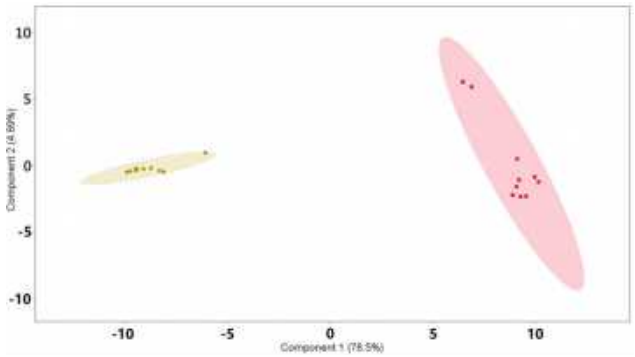


图 4 两组样品 PCA 分析结果（红色代表姜半夏，黄色代表姜虎掌）

Fig 4 PCA of two samples group（red for ginger *Pinellia ternata* and yellow for ginger *Pinellia pedatisecta* Schott）

通过对已知的姜半夏、姜虎掌，以及姜半夏中掺入一定比例（20%、50%）姜虎掌对模型的预测能力进行预测，结果显示图 5A 为 100% 姜半夏，样品（黑色点）预测显示在姜半夏的模型范围内；图 5B 为 100% 姜虎掌，样品（黑色点）预测显示在姜虎掌的模型范围内；而图 6 为掺 20% 姜虎掌的姜半夏，样品（黑色点）预测偏离姜半夏的模型范围，说明掺入一定姜虎掌的样品偏离数据库模型，说明所建立的姜半夏模型有一定的代表性；图 7 为掺 50% 姜虎掌的姜半夏，可以看到样品（黑色点）有较大偏离。综上所述所建立的姜半夏和姜虎掌的模型有一定的代表性，也说明通过建立模型预测样品的掺伪有一定可操作性，但是更低掺伪比例，模型难以准确预测，也有一定的局限性。同时由于模型样本量的有限，其代表性有待商榷。为得到准确且有代表性的数据库模型，需要收集更多的样本。但此种方法可以作为掺伪鉴别的手段参考。

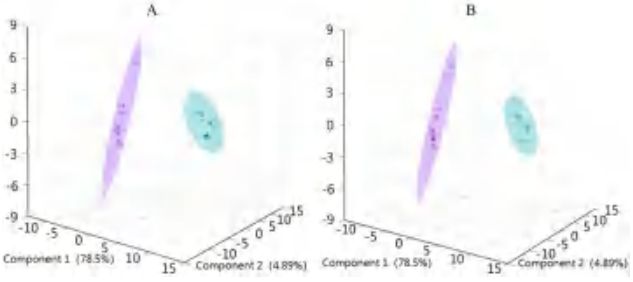


图 5 100% 姜半夏（A）及 100% 姜虎掌（B）模型预测

Fig 5 Model prediction of 100% ginger *Pinellia ternata*（A）and 100% ginger *Pinellia pedatisecta* Schott（B）

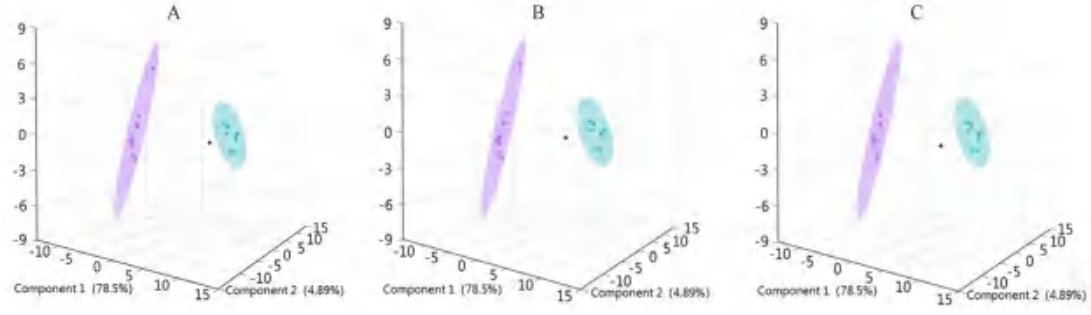


图 6 掺 20% 姜虎掌的姜半夏模型预测（A、B、C 分别代表不同样品）

Fig 6 Model prediction of ginger *Pinellia ternata* mixed with 20% ginger *Pinellia pedatisecta* Schott（A，B，C mean different samples）

4 讨论

4.1 提取溶剂及方式选择

考察了超声处理和回流处理方式，发现超声和回流效果相当，为了方便选择了超声处理方式；同时考察了超声处理时间，分别考察了 30、60、120 min，结果 30 min 处理基本可以提取完全；考察了提取溶剂，采用甲醇、乙醇与水不同比例进行提取，结果 75% 甲醇作为提取溶剂效率更高。

4.2 流动相选择

考察了甲醇 - 水、乙腈 - 水、甲醇 -0.1% 甲酸溶液、甲醇 -5 mmoL 乙酸铵等系统，按照不同比例梯度洗脱，结果甲醇 -5 mmoL 乙酸铵流动相系统得到的化合物较多，色谱峰峰形也较好。

4.3 质谱条件的优化

表 3　部分响应值较高的差异化合物信息

Tab 3　Some differential compounds with higher responses

序号	样品	化合物名称	分子式	分子量
1	姜半夏	7-methoxy-8-（2'-methyl-2'-formylpropyl）coumarin	$C_{15}H_{16}O_4$	260.1049
2		（5*S*）-3-[（3*S*，15*R*）-3，15-dihydroxy-15-{（2*R*，5*R*）-5-[（1*R*）-1-hydroxytridecyl]tetrahydro-2-furanyl}pentadecyl]-5-methyl-2（5H）-furanone	$C_{37}H_{68}O_6$	608.5013
3		/	$C_{44}H_{70}N_7O_5$	776.5446
4		2-[2-ethyl-2-methyl-4-（3-methylbutyl）tetrahydro-2H-pyran-4-yl]-*N*-（4-methoxybenzyl）ethanamine	$C_{23}H_{39}NO_2$	361.2981
5		/	$C_{41}H_{74}N_3O_9$	752.5425
6		/	$C_{25}H_{44}N_3O_8$	514.3124
7		*N*-{2-[2，2-dimethyl-4-（3-methylbutyl）tetrahydro-2H-pyran-4-yl]ethyl}-1-phenylethanamine	$C_{22}H_{37}NO$	331.2870
8		1-[（3，3，5-trimethylcyclohexyl）oxy]-3-[（2，4，4-trimethyl-2-pentanyl）amino]-2-propanol	$C_{20}H_{41}NO_2$	327.3138
9		2-（*N*-methyldodecanamido）acetic acid	$C_{15}H_{29}NO_3$	271.2147
10	姜虎掌	isopropyl-5-{[5-（methoxycarbonyl）-2-methyl-3-furyl]methoxy}-2-methyl-1-benzofuran-3-carboxylate	$C_{21}H_{22}O_7$	386.1369
11		7-methoxy-8-（2'-methyl-2'-formylpropyl）coumarin	$C_{15}H_{16}O_4$	260.1052
12		ethyl-2-[[（*E*）-3-phenylprop-2-enoyl]amino]-1-prop-2-enylpyrrolo[3，2-b]quinoxaline-3-carboxylate	$C_{25}H_{22}N_4O_3$	426.1685
13		（1*S*，2*S*，3*R*，4*R*）-3-{[5-chloro-2-（{1-[（3*R*）-3-piperidinyl]-1H-pyrazol-4-yl}amino）-4-pyrimidinyl]amino}bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxamide	$C_{20}H_{25}ClN_8O$	428.1840
14		3-（4-methyl-2-oxo-6，7，8，9-tetrahydro-2H-benzofuro[3，2-g]chromen-3-yl）propanoic acid	$C_{19}H_{18}O_5$	326.1158
15		焦谷氨酸（pyroglutamic acid）	$C_5H_7NO_3$	129.0428
16		羟基杯苋甾酮（sengosterone）	$C_{29}H_{44}O_9$	536.2985
17		飞燕草素（delphicrispuline）	$C_{30}H_{42}N_2O_6$	526.3044
18		丝胶树碱（funtumine）	$C_{21}H_{35}NO$	317.2719
19		肉桂酸乙酯（ethylcinnamate）	$C_{11}H_{12}O_2$	176.0837
20		腰果酚（cardanol）	$C_{21}H_{34}O$	302.2610
21		*α*，*β*-digalactosyl-*α*'-linolenic-glyceride	$C_{33}H_{56}O_{14}$	676.3665
22		柔毛地胆素（phantomolin）	$C_{21}H_{26}O_6$	374.1729
23		lungshengenin G	$C_{26}H_{34}O_9$	490.2203
24		6-acetylfuranofunol	$C_{17}H_{24}O_4$	292.1675
25		5-*O*-methylembelin	$C_{18}H_{28}O_4$	308.1988
26		松二糖（turanose）	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.1162
27		paniculidine C	$C_{15}H_{18}O_5$	278.1154
28		高加蓝花楹三萜酸（jacoumaric acid）	$C_{39}H_{54}O_6$	618.3920
29		10*β*-hydroxyfuranoeremophilan-6*β*-yl-2'xi-methylbutanoate	$C_{20}H_{30}O_4$	334.2144

注：“/”：数据库或文献未匹配化合物；序号 10 ～ 14：姜虎掌特有且信号较高的。

Note：“/”：Database or literature does not match compounds；No.10 ～ 14：the unique compounds of ginger *Pinellia pedatisecta* Schott with specific response.

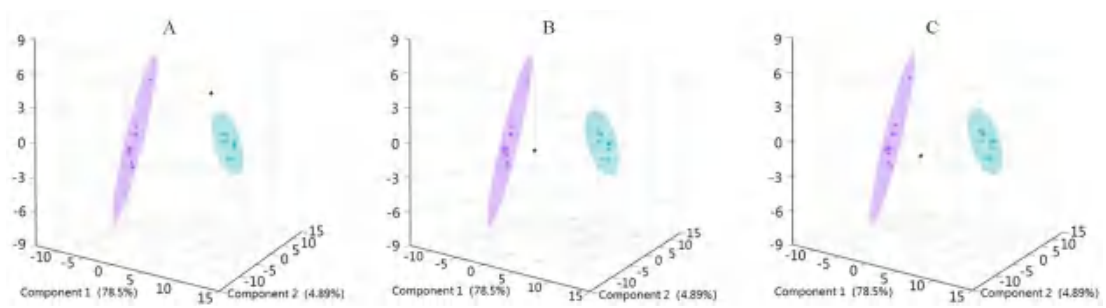


图 7　掺 50% 姜虎掌的姜半夏模型预测（A、B、C 分别代表不同样品）

Fig 7　Model Prediction for ginger *Pinellia ternata* mixed with 50% ginger *Pinellia pedatisecta* Schott（A，B，C mean different sample）

通过正负离子监测模式比较，正离子得到的化合物较多，故采用正离子模式。考虑到半夏中小分子化合物会比较多，考察了毛细管电压（Fragmentor）175、150、135 V，结果 135 V 得到化合物信号较高，因此选择 135 V。

4.4 小结

寻找姜虎掌中特有的成分是检测是否掺伪的有效手段，同时还能根据色谱峰的大小确定大致的掺伪比例。本试验中收集了 20 个样本以 Q-TOF 采集数据，通过 PCA 分析，找到了姜半夏和姜虎掌的差异成分，并通过 Profinder 软件筛查响应值高的 5 个化合物（见表 3 序号 **10** ～ **14**），可以作为下一步提取制备参考，从而更加有效地对姜半夏中掺姜虎掌情况进行检测。

本文建立的真伪鉴别模型，由于样本量有限，其真伪鉴别存在一定的局限性，但作为仪器鉴别的手段值得进一步探索，可以作为性状鉴别、显微鉴别的有效补充，也可为中药掺伪研究提供一种思路。

参考文献

[1] 黄雍，刘梦娇，张琴，等 . 半夏与虎掌、天南星的鉴别研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2018，38（4）：406-409.

[2] 朱艳华，项凤莲，任悦，等 . 半夏与其混淆品的鉴别及用药安全 [J]. 甘肃医药，2016，35（12）：943-945.

[3] 魏淑红，彭正松，夏玲 . 半夏类药材紫外光谱聚类分析 [J]. 生物技术，2004，14（1）：38-40.

[4] 黄涛，甫志锦，陈后江，等 . 半夏药材紫外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析 [J]. 大理学院学报，2014，13（2）：20-25.

[5] 陶文婷，吴皓，郁红礼，等 . 姜半夏饮片 H PLC 指纹图谱研究 [J]. 南京中医药大学学报，2012，28（1）：34-37.

[6] 王学军，徐文芬，冉懋雄，等 . 贵州地道药材半夏的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 贵州农业科学，2010，38（6）：13-15.

[7] 邹菊莫，陈胜璜，雷昌，等 . 半夏炮制前后 HPLC 图谱的比较 [J]. 湖南中医药大学学报，2010，30（9）：127-129.

[8] 李斌，程秀民，周永妍，等 . 山东产半夏药材的高效液相指纹图谱分析 [J]. 山东大学学报（医学版），2010，48（8）：120-123.

[9] 孙素琴，周群，刘军，等 . 真伪半夏二维相关红外光谱法的鉴别研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2004，24（4）：427-433.

[10] 夏爱萍 . 近红外光谱法用于半夏伪品鉴别 [J]. 实用药物与临床，2018，21（4）：424-427.

[11] 冯永辉，杨世颖，王树春，等 . 中药材半夏的 X 射线衍射 Fourier 指纹图谱分析 [J]. 安徽农业科学，2011，39（29）：17874-17876，17901.

[12] 赵微微，索建兰，秦蓓 . 四种草药的振荡指纹图谱 [J]. 陕西中医，2010，31（7）：899-901.

[13] 邹桂华，李守君，沈广志，等 . 半夏的电化学指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（17）：100-102.

[14] 张雅琴，宋明，孙伟，等 . 中药材半夏及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2014，16（8）：1725-1729.

[15] 崔光红，唐晓晶，黄璐琦，等 . 利用等位基因特异 PCR 鉴别虎掌及其部分混淆品 [J]. 中国中药杂志，2008，33（10）：1109-1111.

[16] 陈蓉，吴成丽，邓赟，等 . 适用于不同产地半夏药材的特异性引物 PCR 鉴定分析方法 [J]. 中药与临床，2015，6（6）：14-15.

[17] 李敏，敬勇，陈辉，等 . 一种水麦冬酸的提取分离纯化方法：CNl06831404A [P]. 2017-06-13.

[18] 聂黎行，康帅，张南平，等 . 高分离度快速液相色谱 - 三重串联四极杆质谱快速检查半夏和虎掌中水麦冬酸 [J]. 药物评价研究，2018，41（9）：1640-1643.

[19] 黄玉，谷彩云，吴翰钟，等 . 基于超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱的缺血性脑卒中的代谢组学研究 [J]. 高等学校化学学报，2017，38（10）：1742-1750.

[20] 洪晓愉，王浩，徐金玲，等 . 高分辨飞行时间质谱在蛋白质组学相对定量分析中的应用 [J]. 分析化学，2016，44（3）：403-408.

[21] 张丹丹，韦航，邱晓红，等 . 基于质子转移反应 - 飞行时间质谱快速鉴别不同产地闽北水仙茶 [J]. 分析化学，2017，45（6）：914-921.

[22] 吴蓓，彭春燕，李军茂，等 . 基于 UFLC-Q-TOF-MS/MS 技术及 PCA 分析的不同产地杏香兔耳风药材差异研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（21）：4165-4171.

[23] 肖观林，江洁怡，胥爱丽，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合多元统计分析不同产地布渣叶化学成分的差异 [J]. 湖南中医杂志，2021，37（12）：171-177.

[24] 李忆红，梁雨露，张洁，等 . 基于 UHPLC-MS 及多元统计分析识别栀子果实不同部位差异化学成分 [J]. 中南药学，2022，20（4）：833-840.

[25] 翟兴英，张凌，李冰涛，等 . 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析半夏药材中的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（7）：173-183.

[26] 弓建红，王俊敏，张振凌，等 . 虎掌（掌叶半夏）的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 河南科学，2020，38（3）：386-396.

（收稿日期：2022-04-20；修回日期：2022-06-20）

地西泮胶束溶液的制备及其释放性能评价

徐桂林，刘新国，徐辉甫，彭倩倩（武汉市第一医院，武汉　430022）

摘要：目的　制备载地西泮泊洛沙姆 188 胶束，以改善地西泮水溶性，考察该纳米胶束的理化性质及体外释放。**方法**　采用薄膜水化法制备地西泮的泊洛沙姆 188 胶束溶液。通过透射电镜、激光粒径分析、凝胶柱分离、高相液相色谱等方法考察地西泮胶束的粒子形态、大小、粒径分布、表面ζ电位、药物包封率及载药量等指标，以及在 pH 7.2 ～ 7.4 生理性环境中的体外释药行为，据此对其质量与释药特征进行评价。**结果**　所制备的地西泮胶束粒子成形良好，外形呈球形或近球形，分布均匀，平均粒径为（6.53±0.81）nm，表面ζ电位平均值为（－ 2.88±1.03）mV，无聚集现象，平均包封率为（74.8±1.51）%，平均载药量为（2.32±0.05）%。体外释放试验显示地西泮胶束在 PBS 溶液（pH 7.2 ～ 7.4）前段释药较快，6 min 累积释药率为 32%，此后稳定持续释放，3 h 累积释药量接近药物总量 85%，累积释放曲线的动力学方程拟合结果表明胶束包封对地西泮释放具有一定缓释作用。**结论**　胶束包封能有效解决地西泮水溶性问题，同时药物释放相较注射剂更加平稳，为解决地西泮溶解性问题提供了一种行之有效的技术方案。

关键词：地西泮；溶解性；胶束；药物释放
中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2593-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.023

Preparation and release performance of diazepam micellar solution

XU Gui-lin, LIU Xin-guo, XU Hui-pu, PENG Qian-qian (*The First Hospital of Wuhan*, *Wuhan* 430022)

Abstract: Objective　To prepare diazepam-loaded poloxamer 188 micelles to improve its poor water solubility and determine the physicochemical properties and in vitro release of the nanomicelles. **Methods**　Peloxam 188 micelle solution of diazepam was prepared by the thin-film hydration method. The morphology, size, particle size distribution, surface ζ-potential, encapsulation rate, and drug loading capacity of diazepam micelles were determined by transmission electron microscopy, laser particle size analysis, gel column separation, and HPLC. The in vitro drug release behavior in the physiological environment of pH 7.2 ～ 7.4 was analyzed, and its quality and drug release characteristics were evaluated based on the above-examined indexes. **Results**　The diazepam micelle particles prepared in this experiment were well-formed and spherical or subspherical. The average particle size was (6.53±0.81) nm, the average surface ζ potential was (－ 2.88±1.03) mV, and the average encapsulation rate was (74.8±1.51)%. There was no aggregation of the micellar solution, and the average drug loading of micellar particles was (2.32±0.05)%. The in vitro release test showed that diazepam micelles released faster in the first part of PBS solution (pH 7.2 ～ 7.4), with a cumulative release rate of 32% at 6 min. Thereafter, the release became stable and continuous, and the 3 h cumulative release amount was close to 85% of the total encapsulated drug. The fitting of the kinetic equation of the cumulative release profile indicated that micelle encapsulation caused the sustained release of diazepam. **Conclusion**　Micelle encapsulation can effectively improve the poor water solubility of diazepam, and the drug release in micellar solution is more stable than that of injection. Therefore, the research provides an effective way to improve of diazepam solubility.

Key words: diazepam; solubility; micelle; drug release

基金项目：武汉市第一医院院内课题（No.2019Y28）。
作者简介：徐桂林，女，主管护师，主要从事儿科临床护理工作，email：285255169@qq.com

地西泮（diazepam），俗称安定，是苯二氮䓬类药物，具有镇静、抗惊厥、松弛横纹肌等药理作用，适用于精神抑郁性焦虑、紧张、不安、失眠等症，对抗惊厥和顽固性癫痫抑制作用明显[1]，地西泮（静脉推注）亦是治疗癫痫持续状态的首选药物[2-3]。在儿科临床工作中，地西泮注射液常用于小儿热性惊厥、癫痫持续状态等急症抢救。热性惊厥是小儿惊厥最常见类型[4-5]，惊厥产生与反复发作极易造成脑组织损伤，临床应尽快进行治疗以控制病情，避免恶化及反复发作。最新小儿热性惊厥诊疗指南推荐止惊药物首选为苯二氮䓬类静脉注射[6-8]，其中地西泮最为常用。但相关研究报道，地西泮注射液推注过快，会引起呼吸中枢抑制导致呼吸骤停，建议临床使用时严格控制注射速度[9]。对于幼儿，应控制速度 1 mg 注射时间不得少于 1 min，新生儿则应控制在 0.1 ～ 0.2 mg • min^{-1}。实际操作中使用最小刻度为 1 mL 的注射器仍难以做到 1 min 内推注不超过 0.2 mL 的剂量，即使使用微量注射泵也难以满足新生儿对地西泮注射液的使用要求。地西泮微溶于水，溶解度为 1∶400[10]，常规水性溶剂难以对其进行溶解和稀释，丙二醇、乙醇、苯甲醇等成分虽然可以增加地西泮溶解性，但过量使用可引起一系列不良反应，如注射疼痛、乳酸性酸中毒和血栓性静脉炎等，因此溶解性问题是限制地西泮剂型规格的一大原因，如何提高地西泮水溶性，实现药物快速起效并维持一段作用时间是亟需研究解决的问题。

聚合物胶束是两亲性嵌段共聚物在水溶液中自发形成的新型纳米递药系统，因其具有良好的水溶性、生物相容性、分子量可控、毒副作用低等优点受到广泛关注[11-12]。聚合物胶束由疏水性内核以及亲水性外壳组成，亲水性外壳能有效减少血浆蛋白质对胶束的吸附，同时避免网状内皮系统的识别和吞噬，使胶束在血液中长时间循环并保持稳定。而疏水性内核充当疏水性药物的贮存区，显著提高难溶性药物的溶解性和稳定性。在两亲性嵌段共聚物体系中，常用的亲水嵌段为聚乙二醇（PEG）、聚氧乙烯（PEO）等；疏水端嵌段主要包括聚酯类，如聚乳酸（PLA）、聚己内酯（PCL）、聚氧丙烯（PPO）和聚氨基酸类。聚氧乙烯 - 聚氧丙烯 - 聚氧乙烯三嵌段共聚物 [PEO-b-PPO-b-PEO，商品名为泊洛沙姆 Poloxamers（ICI 公司）] 是一类两亲性高分子聚合物，PEO 为亲水性嵌段，PPO 是疏水性嵌段，通过调节 EO/PO 的比例，合成不同构成的共聚物，以满足不同应用的特殊需求。为了改善地西泮溶解性，本研究用泊洛沙姆 188 包载药物，尝试制备高包封率、高载药量的地西泮聚合物胶束溶液，并利用建立的地西泮含量与体外释放度测定方法对药物体外释放规律进行考察，以期为地西泮的开发利用提供新的思路与方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JEOL JEM-2100 型透射电子显微镜（日本电子公司）；Zetasizer Nano ZSP 激光粒度分析仪（Malvern 公司）；ME215S 电子分析天平（Sartorius 公司）；Essentia LC-16 型高效液相色谱仪（岛津公司）；ZRS-8C 型智能溶出试验仪（天津大学无线电厂）；RV8 FLEX 型旋转蒸发仪（德国 IKA 公司）；Biosafer900-92 型超声波细胞粉碎机 [赛飞（中国）有限公司]；KQ-300DE 型医用数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；AMM-6 型恒温磁力搅拌器（Auto science 公司）；PB-21 型全自动酸度计（Sartorius 公司）；SK-1 型快速混匀器（金坛市富华仪器有限公司）；NPTK-4G 型超纯水仪（西安优普仪器设备有限公司）；微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）。

1.2 材料

地西泮对照品（批号：171225-201502，中国食品药品检定研究院）；地西泮注射液（批号：18092901，天津金耀药业有限公司）；泊洛沙姆 188（西安晋湘药用辅料有限公司）；PBS 缓冲盐（批号：70072000，Biosharp 白鲨生物科技）；三氯甲烷（分析纯，批号：20190502，天津市科密欧化学试剂有限公司）；甲醇（色谱纯，批号：20190303，天津市科密欧化学试剂有限公司）；其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 地西泮胶束溶液的制备

采用薄膜水化法制备地西泮胶束溶液。将 10 mg 地西泮与 300 mg 泊洛沙姆 188 固体粉末组成混合物共同溶解于 10 mL 三氯甲烷，将所得共溶混合物溶液全部注入 50 mL 茄型瓶中，在旋转蒸发仪上以 40 ℃水浴温度，100 r • min^{-1} 转速蒸干，茄型瓶内壁形成混合物透明薄膜。在超声及适当振荡作用下，使用 10 mL PBS 溶液（pH 7.2 ～ 7.4）溶解茄型瓶内壁混合物薄膜，洗膜液使用 0.22 μm 水系微孔滤膜滤过，即得无色透明地西泮胶束溶液。

2.2 地西泮含量测定方法建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱 C18 分析柱（250 mm×

4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（70∶30）；流速 1.0 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；柱温 30 ℃；检测波长 254 nm。

2.2.2　溶液制备

① 对照品溶液：精密称取地西泮对照品 12.5 mg，置于 25 mL 棕色量瓶中，加 70% 甲醇使之溶解，并定容至刻度，置 8 ℃冰箱中保存备用。

② 地西泮胶束溶液：精密量取地西泮胶束溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶中，并加入 70% 甲醇定容至刻度，进样前 0.45 μm 有机系微孔滤器滤过。

③ 空白胶束溶液：除不加入地西泮外，按照地西泮胶束制备方法制得空白胶束溶液。精密吸取 1 mL 用 70% 甲醇定量稀释 10 倍，进样前 0.45 μm 有机系微孔滤器滤过。

2.2.3　方法专属性考察　分别取对照品溶液、供试品溶液、空白胶束溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，分别进样 10 μL，记录高效液相色谱图（见图 1）。结果显示地西泮保留时间约为 10.38 min，各组分间分离良好，分离度均大于 1.5，理论塔板数大于 3500，表明方法专属性较好。

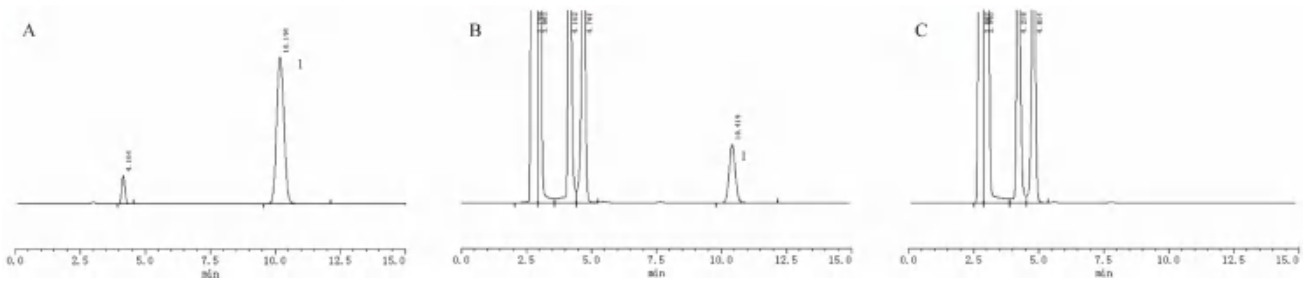


图 1　方法专属性考察的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of method specificity

A. 对照品（control）；B. 地西泮胶束供试品溶液（diazepam micelles solution）；C. 空白胶束溶液（blank micelle solution）；1. 地西泮（diazepam）

2.2.4　线性关系考察　分别精密量取对照品溶液 5.0、3.0、2.0、1.0、0.5 mL 于棕色量瓶中，分别用 70% 甲醇定容至 10 mL，制得 5 个质量浓度梯度对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。将质量浓度作为横坐标（X），将峰面积作为纵坐标（Y），计算地西泮线性回归方程为：$Y = 1.715\times10^5X - 2.279\times10^4$，$R^2 = 1.0000$，其线性范围为 25 ～ 500 μg • mL^{-1}。

2.2.5　精密度考察　取 500 μg • mL^{-1} 对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，计算地西泮色谱峰峰面积 *RSD* 为 0.35%，表明仪器精密度良好。

2.2.6　加样回收试验　取供试品溶液适量，精密量取 6 份，每 1 份 0.5 mL，放置在 10 mL 量瓶里，按待测定组分含量之比为 1∶1 精密添加对照品溶液，再依照供试液配制操作制成加样回收液，按“2.2.1”项下色谱条件检测含量并计算加样回收率。结果平均加样回收率为 97.10%（$n = 6$），*RSD* 为 1.3%，说明该含量测定方法符合定量要求，可用于测定胶束溶液中地西泮含量的测定。

2.3　包封率（*EE*%）与载药量测定（*DL*%）

取经洗脱溶剂溶胀 12 h 以上的 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶装柱，凝胶柱径高比为 1∶25，由柱上方精密加入地西泮胶束溶液 0.5 mL，待柱顶部的液体消失后，放置 2 min，用 PBS 洗脱，流速为 1.5 mL • min^{-1}，接取 15 ～ 25 mL 部分洗脱液，将所收集的洗脱液用 70% 甲醇溶解定容，按“2.2”项下方法测定游离地西泮含量 $W_{游}$。另一份胶束溶液加等量的 PBS 溶液，用 70% 甲醇溶解后定容，测定 $W_{药}$。用以下公式计算包封率和载药量。

$$EE\% = (W_{药} - W_{游})/W_{药}\times100\%$$

$$DL\% = (W_{药} - W_{游})/W_{总}\times100\%$$

公式中 $W_{总}$ 表示胶束包封药物和辅料质量的总和，$W_{药}$ 表示药物投放的质量，$W_{游}$ 表示未被胶束包封的游离药物的质量。

采用凝胶柱分离 - 高效液相色谱法测定胶束中游离药物，计算地西泮胶束包封率为（74.8±1.51）%，此时载药量为（2.32±0.05）%。上述试验结果显示，Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱对地西泮胶束保留体积在 15 mL 左右，凝胶柱层析法分离胶束效果良好，可用于地西泮胶束包封率测定。

2.4　地西泮胶束理化性质表征

2.4.1　胶束溶液外观（见图 2）及透射电镜（TEM）图　取敷有支撑膜的铜网，分别沾取少量胶束溶液，使其在铜网上停留 2 ～ 3 min，用滤纸吸走多余的液体，经 2% 磷钨酸染色 2 ～ 3 min，再用滤纸吸走多余的液体，自然干燥，置透射电镜下观察，拍照。透射电子显微镜观察结果显示，地西泮胶束粒子具有超小的胶束尺寸，外形呈球形和近球形，粒度分散均匀，见图 3。

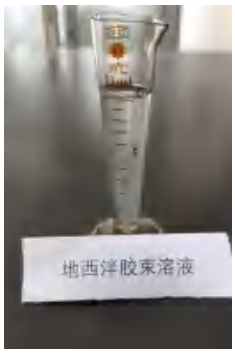


图 2 地西泮胶束溶液外观

Fig 2 Appearance of diazepam micelles solution

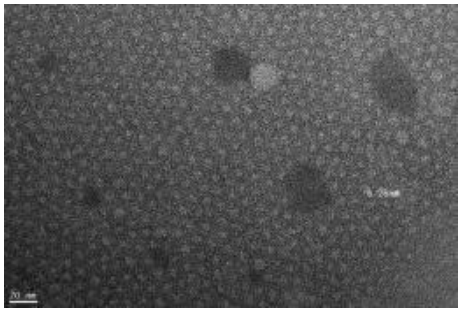


图 3 地西泮胶束透射电镜图像

Fig 3 TEM image of diazepam micelles

2.4.3 电位、粒径与多分散系数 取所制备胶束溶液 0.3 mL，用水稀释至 15 mL。用激光散射法测定粒径和粒度分布，微观电泳法测定胶束表面 Zeta 电位。结果显示地西泮胶束粒子直径约为（6.53±0.81）nm，PDI 为 0.364，表面 ζ 电位平均值为（－ 2.88±1.03）mV，见图 4。

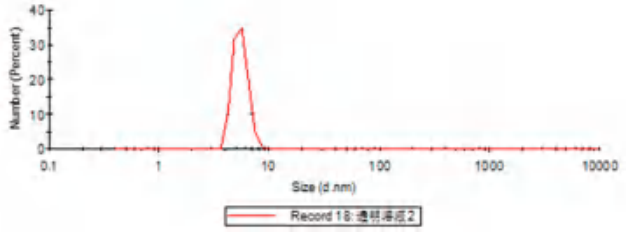


图 4 地西泮胶束粒径分布图

Fig 4 Size distribution of diazepam micelles

2.5 地西泮胶束溶液的体外释放

采用透析法考察样品中地西泮的释放速度。将适量地西泮注射液和地西泮胶束溶液以 PBS 溶液（pH 7.2 ～ 7.4）稀释至等体积后注入纤维素透析袋（截留分子量为 2500 Da）中密封，置于 37 ℃恒温水浴溶出仪中，以 PBS 溶液为接收液，100 r•min^{-1} 搅拌。于 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 h，分别取接收液 2 mL，同时补充空白接收液 2 mL。接收液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液进样分析，以药物累积释放量对时间作图，进而得到各时间点药物释放百分比。

$$Q(\%) = (C_n \times 300 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 2)/D \times 100\%$$

式中，C_n：第 n 个取样点测得的药物浓度（μg • mL^{-1}）；C_i：第 i（$i = n - 1$）个取样点测得的药物质量浓度（μg • mL^{-1}）；D：受试制剂药物总量（μg）。

地西泮胶束溶液的累积释放率曲线结果见图 5。地西泮胶束在 PBS 溶液（pH 7.2 ～ 7.4）中前段释药较快，前 6 min 累积释药率约为 32%，此后缓慢持续释放，3 h 累积释药量接近药物总量 85%。分别用零级动力学、一级动力学及 Higuchi 方程对 6 min 到 3.0 h 地西泮胶束溶液体外释放曲线进行模型拟合，结果见表 1。

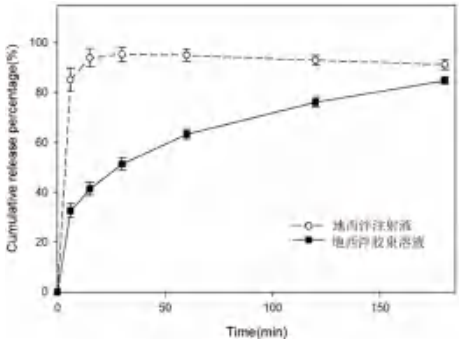


图 5 地西泮胶束溶液体外累积释放曲线

Fig 5 Cumulative release curve of diazepam micellar solution in vitro

表 1 地西泮胶束溶液体外释药的模型拟合

Tab 1 Model fitting for release of diazepam micelles in vitro

动力学模型	方程	R^2
零级动力学	$Q = 1.727t + 3.8117$	0.9205
一级动力学	$\ln Q = 0.3006t + 1.3555$	0.9838
Higuchi 方程	$Q = 0.2648t^{1/2} - 0.5865$	0.9897

由方程的 R 值可知，6 min 到 3.0 h 内地西泮胶束溶液的药物释放曲线与 Higuchi 动力学方程拟合较好，说明胶束包封对地西泮释放具有一定的缓释效果。

3 讨论

在药物研制过程中，由于溶解性问题导致药物难以开发利用的情况屡见不鲜，据统计有超过 70% 的新化合物难溶于水，甚至难以找到合适的溶媒 [13-14]。目前增加难溶性药物溶解度的方法主要有 [15]：改变难溶药物的化学结构，引入极性或亲水性基团；将药物制备成可溶性盐；加入增溶剂、助溶剂、潜溶剂或表面活性剂等。根据 Noyes-Whitney 方程，减小粒径亦可显著增加难溶性药物的溶解度，疏水药物纳米化常见的剂型包括聚合物胶束、纳米乳剂以及采用化学沉淀和高压均质化制备而成的纳米晶体。

聚合物胶束作为一种新型的纳米药物载体，已成功开发为多种药物的给药载体。其制备主要分为两种方法[16-17]：一种是直接溶解法，水溶性较好的药物和聚合物适用此种方法；另一种是通过移除药物及聚合物中有机相来制备胶束，适用于溶于脂溶性药物及聚合物，又具体分为透析法、乳化 - 溶剂挥发法与薄膜分散制备方法。前期试验对三种方法的制备效果进行了比较，乳化 - 溶剂挥发法与薄膜分散法制备的胶束包封率与载药量较透析法为高，但两者的差异不具有显著性。而乳化 - 溶剂挥发法需严格控制搅拌时间与蒸发程度，因此本研究选用工艺操作简便、用时短的薄膜分散法制备胶束溶液，并选用氯仿作为有机溶媒。

包封率是反映聚合物胶束质量的重要指标，常见的检测方法包括凝胶柱分离法、透析法和离心法[18]。凝胶柱分离法是实验室最常用的分离纳米粒子与游离药物的方法，该法快速、有效，不影响所测药物的活性。因此本文采用葡聚糖凝胶柱层析法（分子筛法）分离纳米胶束与游离药物，用 HPLC 法测定载药胶束包封率。

聚合物胶束的外观可评估药物递送过程中组织分布和摄取的程度[19]。粒径可评估胶束稳定性以及在组织中的分布情况[20]，本试验制备的混合胶束外观呈类圆形核 - 壳结构，无聚集现象，粒径＜ 10 nm，泊洛沙姆 188 表现出良好的表面活性，由其制备的地西泮胶束粒子具有粒径小、粒度分布窄、载药量高的特征，泊洛沙姆 188 还具有抑制脑内药物排外转运蛋白的效果，由泊洛沙姆 188 胶束包封地西泮可能是改善药物溶解性，增强药物向脑内递送的一种有效手段。

参考文献

[1] 卫有巧，卫有茹，卢智慧 . 地西泮联合醒脑静治疗癫痫持续状态的疗效观察 [J]. 中医药导报，2015，21（24）：64-66.

[2] Barghout MS，Al-Shahawy AK，El Amrousy DM，et al. Comparison between efficacy of melatonin and diazepam for prevention of recurrent simple febrile seizures：a randomized clinical trial [J]. Pediatr Neurol，2019，101：33-38.

[3] 张婷婷，尹安春，张端凤 . 地西泮注射液与多种注射液存在配伍禁忌的分析与思考 [J]. 护理实践与研究，2015，12（11）：27-28.

[4] 陈春荣，李顺斌 . 苯巴比妥对小儿热性惊厥的治疗效果及复发惊厥的危险因素分析 [J]. 中国妇幼保健，2019，34（13）：3009-3012.

[5] 伍红健，谭志伟，伍立明，等 . 小儿热性惊厥复发的相关因素分析 [J]. 临床合理用药杂志，2014，7（21）：76-77.

[6] 苏长春 . 新生儿惊厥的病因及护理干预措施 [J]. 临床合理用药杂志，2014，7（12）：159-160.

[7] 薛嘉欣 . 小儿热性惊厥的急救护理 [J]. 吉林医学，2014，35（30）：6827-6828.

[8] 李清华，贾丽芳 . 小儿高热惊厥的危险因素及护理对策 [J]. 中国民族民间医药，2011，20（15）：75.

[9] 张芷铭，陈海燕 . 患儿静脉注射安定导致呼吸骤停三例报告 [J]. 黄石高等专科学校学报，2004（2）：67-68.

[10] 卢佳燕 . 地西泮注射液与生理盐水及 5% 葡萄糖注射液之间的配伍禁忌 [J]. 医学信息（中旬刊），2011，24（7）：3313.

[11] Aziz ZABA，Ahmad A，Mohd-Setapar SH，et al. Recent advances in drug delivery of polymeric nano-micelles [J]. Curr Drug Metab，2017，18（1）：16-29.

[12] Yao H，Song S，Miao X，et al. mPEG-PLA Micelle for delivery of effective parts of andrographis paniculata [J]. Curr Drug Deliv，2018，15（4）：532-540.

[13] Wang Xf，Wang J. Icaritin suppresses the proliferation of human osteosarcoma cells in vitro by increasing apoptosis and decreasing MMP expression [J]. Acta Pharm Sin，2014，35（4）：531-539.

[14] Zhang ZK，Li J，Yan DX，et al. Icaritin inhibits collagen degradation-related factors and facilitates collagen accumulation in atherosclerotic lesions：a potential action for plaque stabilization [J]. Int J Mol Sci，2016，17（2）：169-185.

[15] 单士兵 . 阿可拉定载药胶束的制备以及对脑缺血再灌注损伤小鼠神经保护作用的评价 [D]. 青岛：青岛大学，2019，46.

[16] Drbohlavova J，Chomoucka J，Adam V，et al. Nanocarriers for anticancer drugs-new trends in nanomedicine [J]. Curr Drug Metab，2013，14（5）：547-564.

[17] Fournier E，Dufresne MH，Smith DC，et al. A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers [J]. Pharm Res，2004，21（6）：962-968.

[18] 杨红梅，郑博，赵旻，等 . 丝裂霉素 C 纳米胶束的制备、表征及体外抗肿瘤活性评价 [J]. 沈阳药科大学学报，2020，37（4）：289-295，343.

[19] 王领，孙茹茹，汤湛，等 . 西罗莫司眼用胶束的制备与体内外评价 [J]. 中国药学杂志，2019，54（8）：638-645.

[20] Chiappetta DA，Sosnik A. Poly（ethylene oxide）-poly（propylene oxide）block copolymer micelles as drug delivery agent：improved hydrosolubility，stability and bioavailability of drugs [J]. Eur J Pharm Biopharm，2007，66（3）：303-317.

（收稿日期：2022-04-21；修回日期：2022-06-18）

黄芪 - 红花预防大鼠脑缺血再灌注损伤的药对、配伍、给药剂量研究

乔逸[1, 2]，雷露[3]，曹金一[2]，刘明义[2]，刘俊田[1*]，杨志福[2*]（1. 西安交通大学医学部药理系，西安 710061；2. 空军军医大学西京医院药剂科，西安 710032；3. 西安市中心医院药剂科，西安 710003）

摘要：目的 研究黄芪 - 红花配伍预防大鼠脑缺血再灌注损伤（CI/RI）药对、配伍、给药剂量的作用。**方法** 实验分为三部分，第一部分研究黄芪、红花单用，黄芪 - 红花配伍与补阳还五汤预防大鼠 CI/RI 疗效对比；第二部分研究黄芪 - 红花 5∶1 组、20∶1 组、40∶1 组预防大鼠 CI/RI 疗效对比；第三部分研究黄芪 - 红花剂量 0.5 倍组、1 倍组和 2 倍组预防大鼠 CI/RI 疗效对比。**结果** 第一部分研究表明黄芪 - 红花配伍效果优于黄芪、红花单用；第二部分研究表明黄芪 - 红花 5∶1 组优于 20∶1 组、40∶1 组；第三部分研究表明黄芪 - 红花剂量 1 倍组优于 0.5 倍组、2 倍组。**结论** 确定黄芪 - 红花预防 CI/RI 配伍最佳比例是 5∶1，最佳给药剂量是 1 倍，为其研究药效物质奠定基础。

关键词：黄芪；红花；脑缺血再灌注损伤；筛选研究
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2598-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.024

Combination, compatibility and dosage of milkvetch root-safflower for preventing cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

QIAO Yi[1, 2], LEI Lu[3], CAO Jin-yi[2], LIU Ming-yi[2], LIU Jun-tian[1*], YANG Zhi-fu[2*] (1. *Department of Pharmacology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an* 710061; 2. *Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Medical University of the Air Force, Xi'an* 710032; 3. *Department of Pharmacy, Xi'an Central Hospital, Xi'an* 710003)

Abstract: Objective To determine the protective effect including combination, compatibility and dose of milkvetch root-safflower in preventing cerebral ischemia-reperfusion injury (CI/RI) in rats. **Methods** The experiment was divided into three parts. In the first part we compared milkvetch root and safflower used alone and in combination with Buyang Huanwu decoction in preventing CI/RI in rats. The second part the compared the effect of milkvetch root-safflower combinations at 5∶1, 20∶1 and 40: 1 in preventing CI/RI in rats. The third part compared the effect of 0.5 multiples group, 1 multiples group and 2 multiples of milkvetch root-safflower in preventing CI/RI in rats. **Results** The effect of milkvetch root-safflower combination was better than being used alone; milkvetch root-safflower at 5∶1 had better effect than at 20∶1 and at 40∶1. In the third experiment milkvetch root-safflower at 1 multipleshad the best effect. **Conclusion** The optimal ratio of milkvetch root-safflower to prevent CI/RI is 5∶1 in this experiment.
Key words: Huangqi; Honghua; CI/RI; screening

缺血性脑卒中占卒中比例的 80%[1]，具有发病率高、致残率高、病死率高的特点，严重危害人类健康。血管成形术、支架置入术、机械血栓切除术等是目前临床采取的有效治疗措施，但血流再通引起的缺血再灌注损伤（CI/RI）导致近 40% 患者出现残疾[2]，严重影响预后。CI/RI 是多

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81573549）；陕西省重点研发计划（No.2022ZDLSF05-04）。
作者简介：乔逸，男，博士研究生，副主任药师，主要从事中药药效物质基础研究，email：694305040@qq.com *通信作者：刘俊田，男，教授，博士研究生导师，主要从事心脑血管药理学研究，email：ljt@mail.xjtu.edu.cn；杨志福，男，博士，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事新药设计与制剂研发，email：13572931173@163.com

种机制参与的一种复杂病理生理过程[3]，中医学上归属于“中风”的范畴。中医理论认为，血瘀是缺血性中风的病理核心，而气虚为根源，因此治疗常以益气活血为主[4-6]。黄芪 - 红花药对常见于治疗气虚血瘀证的方剂中，其中以清代名医王清任创制的补阳还五汤（生黄芪 120 g、当归尾 3 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g）最具代表性。该方中黄芪是补气药，红花是活血化瘀药，完全契合治疗缺血性脑卒中气虚血瘀的病理机制，临床使用也较为广泛[7-9]。黄芪 - 红花组成治疗 CI/RI 的中药药对，黄芪重用使气旺血行，以达治本功效；红花巧用令络通瘀祛，以达治标目的，两者配伍，共奏补气、活血、通络之功[10-11]。本文通过黄芪 - 红花药对单用与合用、不同比例配伍、不同给药剂量进行筛选，为研究黄芪 - 红花药对预防 CI/RI 的药效物质奠定基础。

1 材料

1.1 试药

黄芪提取物、红花提取物、黄芪 - 红花提取物、补阳还五颗粒、黄芪 - 红花 5∶1 提取物、黄芪 - 红花 20∶1 提取物、黄芪 - 红花 40∶1 提取物均来自广东一方制药有限公司。盐酸肾上腺素注射液（批号：天津金耀药业有限公司）；水合氯醛（天津市科密欧化学试剂有限公司）；苏木精 - 伊红（HE）染色试剂盒（碧云天生物技术有限公司），2，3，5- 氯化三苯基四氮唑（Sigma-Aldrich 公司）。

1.2 仪器

MCAO 栓线（型号：3040-A3，北京西浓科技有限公司）；全自动血液黏度测试仪（型号：ZL9000C）；全自动生化分析仪（型号：7180，日本日立）；日本全自动血凝分析仪（型号：CS-5100，希森美康）。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠共 90 只，体质量 250 ～ 280 g [空军军医大学动物实验中心，动物生产许可证号为 SCXK（陕）字第 -2019-001]。

2 方法与结果

2.1 黄芪、红花单用与合用对 CI/RI 的研究

2.1.1 分组及给药 大鼠随机分为假手术组（Sham）、模型组（Model）、黄芪提取物组（HQ 组）、红花提取物组（HH 组）、黄芪 - 红花提取物组（HQ-HH 组）、补阳还五颗粒组（BYHW 组），每组 15 只，灌胃给药。HQ 组：黄芪提取物 1 g 相当于 2.86 g 药材，按照补阳还五汤中黄芪 120 g，折算大鼠给药剂量 4.37 g/（kg • d）；HH 组：红花提取物 1 g 相当于 2.22 g 药材，按照补阳还五汤中红花 3 g，折算大鼠给药剂量 0.14 g/（kg • d）；HQ-HH 组：HQ 4.37 g/（kg • d） ＋ HH 0.14 g/（kg • d）；BYHW 组：按照补阳还五汤进行颗粒剂与大鼠剂量折算给药 [黄芪颗粒 2.5 g/（kg•d）＋当归颗粒 0.093 g/（kg • d）＋赤芍颗粒 0.104 g/（kg • d）＋地龙颗粒 0.031 g/（kg • d）＋川芎颗粒 0.067 g/（kg • d）＋红花颗粒 0.05 g/（kg • d）＋桃仁颗粒 0.062 g/（kg • d）]。假手术组和模型组大鼠每日灌胃同体积纯净水。大鼠连续给药 9 d，第 9 日给药 2 h 后收集样本后处死大鼠。

2.1.2 大鼠气虚血瘀证模型＋ CI/RI 模型建立 气虚血瘀证模型：除假手术组正常饲养外，其余各组大鼠分批放入内径 100 cm、水深 35 cm 的圆桶，水温控制在（16±2）℃，强迫其不停游泳，当全组 50% 大鼠出现自然沉降时全组停止游泳，连续 7 d[12-13]。第 7 日游泳后实验组大鼠皮下注射肾上腺素 0.7 mg • kg^{-1}，连续两次间隔 4 h，中间进行一次寒冷刺激，大鼠在冰水浴中（0 ～ 2 ℃）浸泡 5 min[14]。CI/RI 模型：第 8 日给药后用 10% 水合氯醛（350 mg • kg^{-1}），腹腔注射麻醉大鼠，用恒温电热毯使其体温维持在（37±0.5）℃，采用改良 Longa 法[10, 15]制作大脑缺血模型（MCAO 模型）。颈部正中切口约 1.5 cm，分离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。用微型夹夹闭颈总动脉近心端，结扎右侧颈外动脉远心端，在颈外动脉剪一微小切口，将颈外动脉拉到颈内动脉的反向延长线处，将长度 45 mm、头端直径（0.36±0.02）mm 栓线，轻柔缓慢推进，根据线栓上的标记，线栓抵达大脑中动脉开口有轻微阻力感时停止推送，插入深度为 18 ～ 20 mm，结扎套线，缝合皮肤。将大鼠放置保温笼中取暖保温。缺血 2 h 麻醉后，剪开之前缝合切口。将线栓拔出，实现再灌注，缝合切口。大鼠苏醒后，放回鼠笼中，提供食物和水。

2.1.3 评价指标

① 神经功能评分：CI/RI 后 24 h，参照 Bederson 等[16]进行神经功能评分。采用 5 级 4 分评分法，神经受损越严重则得分越高。标准如下，0 级：无神经功能缺损；1 级：（未能完全伸展左前爪）轻度局灶性神经功能缺损；2 级：（盘旋至左）中度局灶性神经功能缺损；3 级：（左降）严重局灶性缺损；4 级：大鼠不能自发行走意识低落。

② 脑梗死体积检测：采用 2，3，5- 三苯基四氮唑处理氯化物（TTC）染色方法[17]，步骤如下：大鼠断头取脑，鼠脑置于脑槽中切片，从大鼠中提取，并在 － 20 ℃下冷冻 10 min。然后将

脑组织放置在脑沟中，切成五片冠状动脉切片。脑组织放置在 2% TTC 溶液中避光孵育 30 min。玻璃器皿每 10 min 摇晃一次，以确保组织染色均匀。脑切片用 4% 多聚甲醛固定并使用数码相机拍摄。Image Pro Plus 使用软件测量脑梗死面积。脑梗死体积（%）=（正常半球体积－缺血侧非缺血体积）/ 正常半球体积 ×100%。

③ 脑组织病理形态观察：麻醉后向大鼠心脏依次灌注 0.9% 生理盐水及 4% 多聚甲醛固定液，待脑组织固定结束后断头取脑。固定的脑组织以梯度乙醇依次脱水后用二甲苯置换，液状石蜡包埋，切片后进行脱蜡、染色、脱水及封片等操作后即可观察病理形态。

④ 血流变学指标检测：采用全自动血流变测试仪电检测在各切变率下（$1 \cdot s^{-1}$、$5 \cdot s^{-1}$、$30 \cdot s^{-1}$、$200 \cdot s^{-1}$）大鼠的全血黏度。

⑤ 凝血指标检测：采用全自动凝血分析仪测定凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶时间（TT）、纤维蛋白原含量（FIB）及国际标准化比值（INR）。

2.1.4　结果

① 神经功能评分比较：与假手术组相比，模型组大鼠神经功能评分显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，各给药组神经功能评分显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；黄芪 - 红花组优于黄芪组、红花组，结果见表 1。

② 脑梗死体积比例测定：与假手术组相比，模型组的脑梗死体积显著增加（$P < 0.01$）；与模型组相比，给药组脑梗死体积缩小（$P < 0.01$）；与黄芪组、红花组和黄芪 - 红花组相比，补阳还五颗粒组在降低大鼠脑梗死体积上差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；其中黄芪 - 红花组优于黄芪组、红花组，结果见图 1。

③ 脑组织病理形态测定：由 HE 染色结果可见，假手术组大脑皮层神经元细胞数量较多，排列整齐，形态正常，核仁清晰，边界可辨；模型组细胞数量明显减少，细胞间空隙变大，神经元细胞散乱分布，细胞核固缩深染，核仁不明显，细胞边界不清；与模型组相比，黄芪组、红花组、黄芪 - 红花组大鼠脑皮层神经元细胞形态有所改善，神经元细胞数量略微减少，但仍有部分神经元形态异常，出现胞核固缩颜色加深和核周间隙变大的现象，黄芪 - 红花组形态较黄芪组、红花组有明显改善；补阳还五颗粒组大部分神经元细胞结构存在，细胞间隙明显变小，其形态清晰可辨，死亡神经元数量明显减少。结果见图 2。

表 1　黄芪 - 红花配伍对 CI/RI 大鼠运动神经功能评分的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Tab 1　Effect of HQ-HH on the neurological scores after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

分组	神经功能学评分
假手术组	0.00±0.00
模型组	3.38±0.52$^{\#\#}$
黄芪组	2.75±0.46*
红花组	2.50±0.53**
黄芪 - 红花组	2.38±0.52**
补阳还五颗粒组	1.88±0.35**

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

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

④ 血流变指标测定：与假手术组相比，模型组大鼠在不同切变率下（$1 \cdot s^{-1}$、$5 \cdot s^{-1}$、$30 \cdot s^{-1}$、$200 \cdot s^{-1}$）的全血黏度均显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，红花组、黄芪 - 红花组、补阳还五颗粒组全血黏度不同程度显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；补阳还五颗粒组优于红花组和黄芪 - 红花组，结果见表 2。

表 2　黄芪 - 红花配伍对 CI/RI 大鼠全血黏度的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Tab 2　Effect of HQ-HH on whole blood viscosity at different shear rates after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

组别	不同切变率的全血黏度			
	$1 \cdot s^{-1}$	$5 \cdot s^{-1}$	$30 \cdot s^{-1}$	$200 \cdot s^{-1}$
假手术组	20.50±1.68	9.00±0.72	5.15±0.44	3.84±0.34
模型组	27.60±2.64$^{\#\#}$	11.95±0.81$^{\#\#}$	6.75±0.49$^{\#\#}$	5.00±0.46$^{\#\#}$
黄芪组	25.12±2.45	11.60±1.21	6.96±0.79	5.35±0.66
红花组	22.53±1.05**	10.04±0.72*	5.84±0.68	4.40±0.65
黄芪 - 红花组	23.31±2.28*	11.15±1.23	6.59±0.80	5.03±0.74
补阳还五颗粒组	20.19±3.45**	9.20±1.59**	5.45±0.97**	4.16±0.76

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

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

⑤ 凝血指标测定：与假手术组相比，模型组 TT 显著降低，FIB 显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，黄芪组、红花组 PT、凝血酶原活动度、INR 差异具有统计学意义（$P < 0.01$），结果见表 3。

2.1.5　结论　通过神经功能评分、脑梗死体积检测、脑组织病理形态观察、血流变学指标检测、凝血指标检测 5 个指标观察黄芪组、红花组单用和黄芪 - 红花组与补阳还五颗粒组对 CI/RI 大鼠影响。从实验结果明确给药组均在不同程度上可以预防 CI/RI；补阳还五颗粒组疗效最佳；黄芪 - 红花组效果优于单用，因此确定黄芪 - 红花药对为研究对象，为下一步确定配伍比例奠定基础。

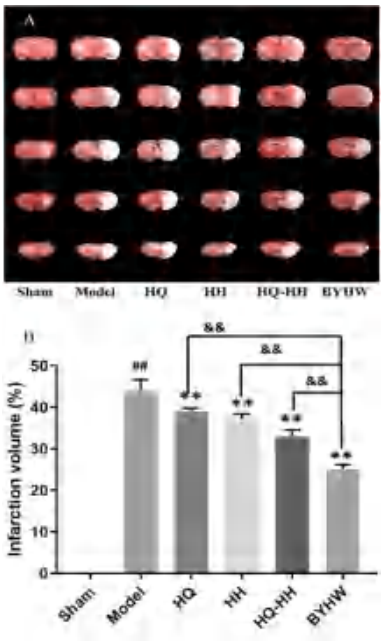


图 1　黄芪 - 红花配伍对 CI/RI 大鼠脑梗死体积的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig 1　Effect of HQ-HH on the infarct volume after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$；与补阳还五颗粒组比较，$^{\&\&}P<0.01$。

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

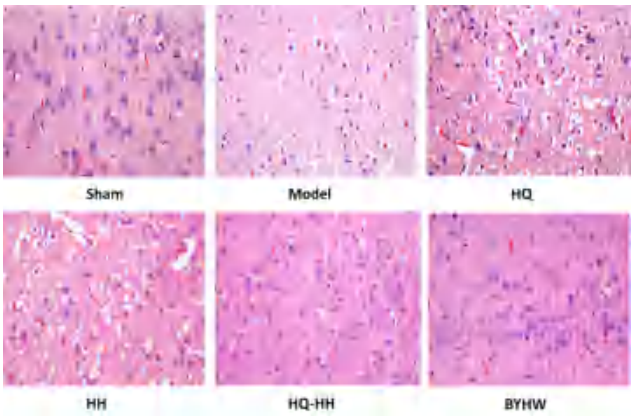


图 2　黄芪 - 红花配伍对 CI/RI 大鼠病理的影响（×400）

Fig 2　Effect of HQ-HH on the morphological changes after MCAO with CI/RI in rats（×400）

2.2　黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 的研究

2.2.1　分组及给药　大鼠随机分为假手术组（Sham）、模型组（Model）、黄芪 - 红花提取物 5∶1 组（5∶1 组）、黄芪 - 红花提取物 20∶1 组（20∶1 组）、黄芪 - 红花提取物 40∶1 组（40∶1 组），每组 15 只，灌胃给药。5∶1 组 1 g 提取物相当于 2.67 g 药材，按照黄芪 120 g，红花 24 g 剂量，折算大鼠给药剂量 5.62 g/（kg • d）；20∶1 组 1 g 提取物相当于 2.57 g 药材，按照黄芪 120 g，红花 6 g 剂量，折算大鼠给药剂量 5.11 g/（kg • d）；40∶1 组 1 g 提取物相当于 2.38 g 药材，按照黄芪 120 g，红花 3 g 剂量，折算大鼠给药剂量 5.38 g/（kg • d）；假手术组和模型组大鼠每日灌胃同体积纯净水。大鼠连续给药 9 d，第 9 日给药 2 h 后收集样本后处死大鼠。按“2.1”项下方法进行评价。

2.2.2　结果

① 神经功能评分：与假手术组相比，模型组大鼠神经功能评分显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，各给药组神经功能评分显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），5∶1 组优于 20∶1 组和 40∶1 组，结果见表 4。

② 脑梗死体积比例测定：与假手术组相比，模型组的脑梗死体积显著增加（$P<0.01$）；与模型组相比，给药组脑梗死体积缩小（$P<0.01$）；5∶1 组优于 20∶1 组、40∶1 组（$P<0.01$），结果见图 3。

③ 脑组织病理形态测定：由 HE 染色结果可见，假手术组大脑皮层神经元细胞数量较多，排列整齐，形态正常，核仁清晰，边界可辨；模型组细胞数量明显减少，细胞间空隙变大，神经元细胞散乱分布，细胞核固缩深染，核仁不明显，细胞边界不清。与模型组相比，20∶1 组、40∶1 组大鼠脑皮层神经元细胞形态改善，但仍有部分神经元形态异常，可见细胞间隙变大，出现胞核固缩颜色加深

表 3　黄芪 - 红花配伍对 CI/RI 大鼠凝血指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 3　Effect of HQ-HH on the coagulation indexes after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	PT/s	APTT/s	FIB/（g • L^{-1}）	TT/s	凝血酶原活动度 /%	INR
假手术组	10.09±0.26	15.7±0.38	1.93±0.18	49.83±1.71	105.41±4.22	0.89±0.02
模型组	9.65±0.82	17.41±1.5	3.87±1.10$^{\#\#}$	35.40±0.98$^{\#\#}$	117.84±16.04	0.85±0.07
黄芪组	8.45±0.48**	16.76±1.77	4.27±0.89	35.05±1.84	140.96±12.00**	0.74±0.04**
红花组	8.45±0.49**	15.74±1.13	3.19±0.48	35.96±5.11	141.18±12.90**	0.74±0.04**
黄芪 - 红花组	8.89±0.64	17.23±2.72	3.94±0.75	35.94±2.00	133.54±15.29	0.78±0.06
补阳还五颗粒组	9.15±0.50	18.40±1.42	4.49±0.88	35.84±2.40	127.10±10.27	0.80±0.04

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

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

表 4 黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 大鼠运动神经功能评分的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 4 Effect of HQ-HH with different proportions on the neurological scores after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	神经功能学评分
假手术组	0.00±0.00
模型组	3.38±0.52$^{\#\#}$
5∶1 组	2.25±0.46**
20∶1 组	2.50±0.53**
40∶1 组	2.75±0.46*

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

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

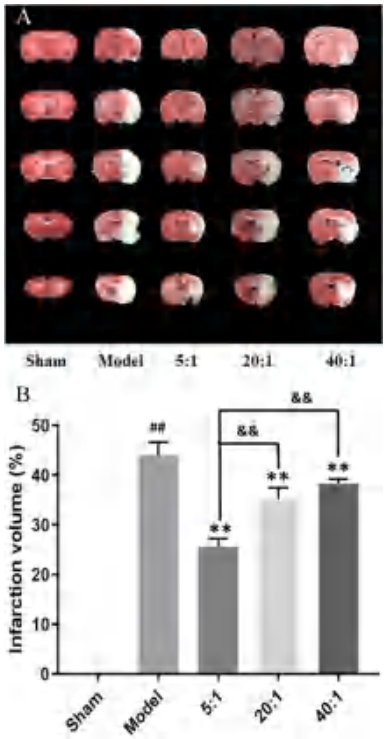


图 3 黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 大鼠脑梗死体积的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig 3 Effect of HQ-HH with different proportions on infarct volume after MCAO with CI/RI（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

注：与假手术比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$；与 5∶1 组比较，$^{\&\&}P<0.01$。

Note：Compared with the sham group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{**}P<0.01$；compared with the 5∶1 group，$^{\&\&}P<0.01$.

现象；与模型组相比，5∶1 组细胞间隙明显变小，其形态清晰可辨，死亡神经元数量明显减少；表明 5∶1 组使用对改善大鼠 CI/RI 后大脑皮层神经元细胞的病理形态有积极作用。结果见图 4。

④ 血流变指标测定：与假手术组相比，模型组大鼠在不同切变率下（1·s^{-1}、5·s^{-1}、30·s^{-1}、200·s^{-1}）的全血黏度均显著升高（$P<0.01$）；

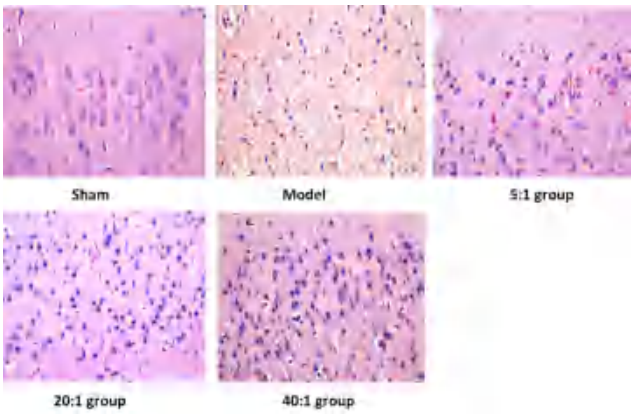


图 4 黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 大鼠病理的影响（×400）

Fig 4 Effect of HQ-HH with different proportions on morphological changes after MCAO with CI/RI（×400）

与模型组相比，各给药组全血黏度不同程度显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；5∶1 组优于 20∶1 组和 40∶1 组，结果见表 5。

表 5 黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 大鼠全血黏度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 5 Effect of HQ-HH with different proportions on whole blood viscosity at different shear rates after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	不同切变率的全血黏度			
	1·s^{-1}	5·s^{-1}	30·s^{-1}	200·s^{-1}
假手术组	20.50±1.68	9.00±0.72	5.15±0.44	3.84±0.34
模型组	27.60±2.64$^{\#\#}$	11.95±0.81$^{\#\#}$	6.75±0.49$^{\#\#}$	5.00±0.46$^{\#\#}$
5∶1 组	19.41±1.51**	9.25±0.91**	5.70±0.72*	4.46±0.65
20∶1 组	20.91±3.12**	9.92±1.32**	6.09±0.75	4.75±0.56
40∶1 组	22.93±3.07**	10.84±1.46	6.65±1.04	5.18±0.91

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

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

⑤ 凝血指标测定：与假手术组相比，模型组 TT 显著降低，FIB 显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，5∶1 组 PT、凝血酶原活动度、INR 差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）；从总体趋势来看，5∶1 组改善凝血优于 20∶1 组和 40∶1 组，结果见表 6。

2.2.3 结论 通过神经功能评分、脑梗死体积检测、脑组织病理形态观察、血流变学指标检测、凝血指标检测 5 个指标观察黄芪 - 红花药对 5∶1 组、20∶1 组和 40∶1 组对 CI/RI 大鼠影响。从实验结果明确给药组均在不同程度上可以预防 CI/RI；5∶1 组疗效最佳，效果优于 20∶1 组和 40∶1 组，为下一步确定最佳给药剂量奠定基础。

2.3 黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 的研究

表 6　黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 大鼠凝血指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 6　Effect of HQ-HH with different proportions on the coagulation indexes after MCAO with CI/RI（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	PT/s	APTT/s	FIB/（g·L^{-1}）	TT/s	凝血酶原活动度 /%	INR
假手术组	10.09±0.26	15.7±0.38	1.93±0.18	49.83±1.71	105.41±4.22	0.89±0.02
模型组	9.65±0.82	17.41±1.5	3.87±1.10$^{\#\#}$	35.40±0.98$^{\#\#}$	117.84±16.04	0.85±0.07
5∶1 组	11.15±1.41**	19.91±2.38	4.87±0.90	34.70±5.81	95.13±18.94*	0.98±0.12**
20∶1 组	10.13±0.69	18.66±2.10	4.32±1.05	35.50±5.64	104.58±11.23	0.89±0.06
40∶1 组	9.98±0.58	19.26±1.81	4.35±1.00	36.70±2.40	107.75±8.71	0.88±0.05

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

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

2.3.1　分组及给药　大鼠随机分为假手术组（Sham）、模型组（Model）、黄芪 - 红花提取物 5∶1（0.5 倍组）、黄芪 - 红花提取物 5∶1（1 倍组）、黄芪 - 红花提取物 5∶1（2 倍组），每组 15 只，灌胃给药。按照“2.2.1”项下方法 5∶1 组给药折算大鼠给药剂量 5.62 g/（kg·d）；确定 0.5 倍组给药剂量 2.81 g/（kg·d）、1 倍组给药剂量 5.62 g/（kg·d）、2 倍组给药剂量 11.24 g/（kg·d）；假手术组和模型组大鼠每日灌胃同体积纯净水。大鼠连续给药 9 d，第 9 日给药 2 h 后收集样本后处死大鼠。按“2.1”项下方法进行评价。

2.3.2　结果

① 神经功能评分：与假手术组相比，模型组大鼠神经功能评分显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，各给药组神经功能评分显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），1 倍组优于 0.5 倍组和 2 倍组，结果见表 7。

表 7　黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 大鼠运动神经功能评分的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 7　Effect of HQ-HH at different doses on the neurological scores after MCAO with CI/RI in rats（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	神经功能学评分
假手术组	0.00±0.00
模型组	3.38±0.52$^{\#\#}$
0.5 倍组	2.50±0.53**
1 倍组	2.25±0.46**
2 倍组	2.75±0.46*

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

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

② 脑梗死体积比例测定：与假手术组相比，模型组的脑梗死体积显著增加（$P<0.01$）；与模型组相比，给药组脑梗死体积缩小（$P<0.01$）；1 倍组优于 0.5 倍组和 2 倍组（$P<0.01$），结果见图 5。

③ 脑组织病理形态测定：由 HE 染色结果可见，假手术组大脑皮层神经元细胞数量较多，排列整齐，形态正常，核仁清晰，边界可辨；模型组细胞数量明显减少，细胞间空隙变大，神经元细胞散乱分布，细胞核固缩深染，核仁不明显，细胞边界不清；与模型组相比，0.5 倍组、2 倍组的大鼠脑皮层神经元细胞形态改善，但仍有部分神经元形态异常，出现胞核固缩颜色加深现象；与模型组相比，1 倍组细胞间隙明显变小，其形态清晰可辨，死亡神经元数量明显减少；表明黄芪红花配伍 5∶1 使用对改善大鼠 CI/RI 后大脑皮层神经元细胞的病理形态有积极作用。结果见图 6。

④ 血流变指标测定：与假手术组相比，模型组大鼠在不同切变率下（1·s^{-1}、5·s^{-1}、30·s^{-1}、200·s^{-1}）的全血黏度均显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，1 倍组和 2 倍组全血黏度不同程度显著降低（$P<0.01$）；1 倍组优于 0.5 倍组和 2 倍组，结果见表 8。

表 8　黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 大鼠全血黏度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 8　Effect of HQ-HH on whole blood viscosity at different shear rates after MCAO with CI/RI（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	不同切变率的全血黏度			
	1·s^{-1}	5·s^{-1}	30·s^{-1}	200·s^{-1}
假手术组	20.50±1.68	9.00±0.72	5.15±0.44	3.84±0.34
模型组	27.60±2.64$^{\#\#}$	11.95±0.81$^{\#\#}$	6.75±0.49$^{\#\#}$	5.00±0.46$^{\#\#}$
0.5 倍组	20.15±1.04**	9.69±0.55**	6.02±0.50	4.74±0.48
1 倍组	16.94±1.64**	8.19±0.66**	5.11±0.40**	4.03±0.32**
2 倍组	22.83±3.78**	9.99±1.44**	5.71±0.72**	4.25±0.49**

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

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

⑤ 凝血指标测定：与假手术组相比，模型组 TT 显著降低，FIB 显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，各给药组凝血指标均有所改善；从总体趋势来看，1 倍组优于 0.5 组和 2 倍组，结果见表 9。

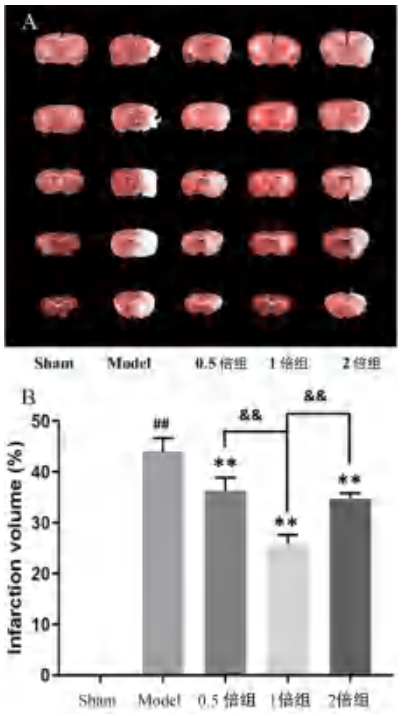


图 5 黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 大鼠脑梗死体积的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig 5 Effect of HQ-HH at different doses on infarct volume after MCAO with CI/RI（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$；与 1 倍组比较，$^{\&\&}P<0.01$。

Note：Compared with the sham group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{**}P<0.01$；compared with the 5∶1 group，$^{\&\&}P<0.01$.

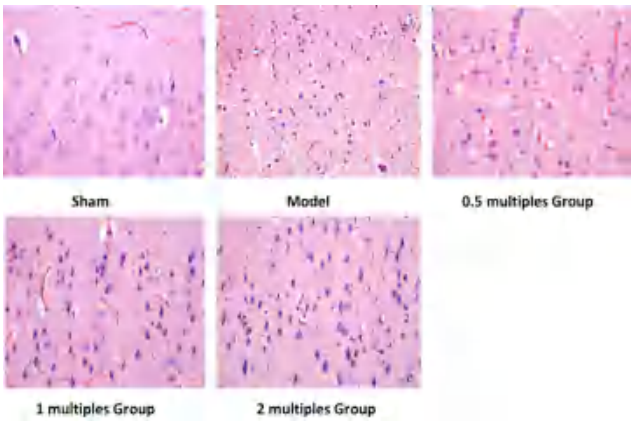


图 6 黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 大鼠病理的影响（×400）

Fig 6 Effect of HQ-HH at different doses on morphological changes after MCAO with CI/RI（×400）

2.3.4 结论 通过神经功能评分、脑梗死体积检测、脑组织病理形态观察、血流变学指标检测、凝血指标检测 5 个指标观察 0.5 倍组、1 倍组和 2 倍组对 CI/RI 大鼠影响。从实验结果明确给药组均在不同程度上可以预防 CI/RI；1 倍组疗效最佳，效果优于 0.5 倍组、2 倍组，为下一步确定最佳药效时间和药效物质基础奠定基础。

2.4 统计学方法

计量资料表示形式为均数 ± 标准差，使用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验，当 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

表 9 黄芪 - 红花药对不同剂量对 CI/RI 大鼠凝血指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 9 Effect of HQ-HH on coagulation indexes after MCAO with CI/RI（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	PT/s	APTT/s	FIB/（g·L^{-1}）	TT/s	凝血酶原活动度 /%	INR
假手术组	10.09±0.26	15.7±0.38	1.93±0.18	49.83±1.71	105.41±4.22	0.89±0.02
模型组	9.65±0.82	17.41±1.5	3.87±1.10$^{\#\#}$	35.40±0.98$^{\#\#}$	117.84±16.04	0.85±0.07
0.5 倍组	11.53±1.40**	18.54±2.17	3.54±0.59	35.39±1.45	86.91±17.45**	1.01±0.12**
1 倍组	11.68±1.34**	20.24±2.10*	4.86±0.90	34.73±5.84	87.13±15.96**	1.03±0.12**
2 倍组	10.01±0.81	15.43±1.90	3.69±0.86	43.73±3.25**	107.50±12.34	0.88±0.07

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

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

3 讨论

3.1 黄芪 - 红花药对选择的意义

补阳还五汤是治疗气虚血瘀证的代表方，常用于脑卒中气虚血瘀证[7-9]，其中黄芪大补脾胃之气，令气旺血行，瘀去络通，为君药；当归、红花、赤芍、地龙、川芎、桃仁活血祛瘀，全方配伍使气旺则血行、活血而不伤证。课题组前期使用“药效差示血清色谱法”[18]，研究了红花的药效物质基础[19]，因此在红花研究的基础上，课题组再次提出“多维谱效网络差示捕获”新策略，并将黄芪 - 红花药对作为研究对象。本文从确定黄芪 - 红花药对、到药对最佳配比以及药对最佳剂量，都是研究黄芪 - 红花药效物质基础的前提。后续实验中使用“多维谱效网络差示捕获”方法研究黄芪 - 红花药对预防气虚血瘀证的药效物质基础。

3.2 黄芪 - 红花药对比例确定依据

补阳还五汤中黄芪作为君药用量 120 g，其余 6 味中药剂量均是 3 g，黄芪红花用量比例 40∶1；经典名方当归补血汤由黄芪 30 g、当归 6 g 两味药用量比例是 5∶1[20]；因此我们将黄芪 - 红花配比确定为 5∶1 组（黄芪 120 g，红花 24 g）、20∶1

组（黄芪 120 g，红花 6 g）、40∶1 组（黄芪 120 g，红花 3 g）。最终通过黄芪 - 红花药对不同比例对 CI/RI 的研究，发现 5∶1 组在预防 CI/RI 优于 20∶1 组和 40∶1 组。以上三组药对中黄芪基础剂量都是 120 g，5∶1 组红花剂量最大，令气旺血行，瘀祛络通，在预防气虚血瘀证 CI/RI 大鼠中发挥最好的效果。

3.3 黄芪 - 红花药对最佳给药剂量确定

黄芪 - 红花 5∶1 组大鼠给药剂量是正常人体剂量折算而来。在最佳剂量确定时，我们设置了正常人体剂量的 0.5 倍、1 倍、2 倍。从实验结果来看正常人体 1 倍组疗效最佳，效果优于 0.5 倍组、2 倍组。这个结果不太符合常规实验结果，主要原因是实验中黄芪 - 红花 5∶1 组不同剂量均给予提取物，提取物为粉末状，为了确保各实验组大鼠灌胃容积相同，溶解药物所用溶剂体积相同，2 倍组药物溶解度较差，呈黏稠状，因此在大鼠灌胃后可能导致药物吸收不佳，影响药物疗效。因此最终确定的最佳给药剂量是 1 倍剂量组，这也是跟人体给药剂量最接近的实验结果。

3.4 实验标本数量确定

本文中所有实验组大鼠均为 15 只，除假手术组外，其余各组大鼠均要经历游泳、注射肾上腺素、寒冷刺激和 MCAO 模型制作 3 个步骤，在各个步骤中均有损耗，模型最终成功大鼠 8～9 只。为了缩小组间差异，统计时将各组标本数量确定为 8 个。

综上所述，黄芪 - 红花配伍预防 CI/RI 具有明显的保护作用，可改善大鼠神经功能、缩小梗死体积，改善脑组织病理形态，对全血黏度、凝血指标。通过实验确定了黄芪 - 红花配伍最佳比例是 5∶1 组，最佳给药剂量是 1 倍组，为研究黄芪 - 红花药对预防气虚血瘀证的药效物质奠定基础。

参考文献

[1] Lee HK，Koh S，Lo DC，et al. Neuronal IL-4R*α* modulates neuronal apoptosis and cell viability during the acute phases of cerebral ischemia [J]. FEBS J，2018，285（15）：2785-2798.

[2] Hankey GJ. Stroke [J]. Lancet，2017，389（10069）：641-654.

[3] 李亮，陈立峰 . 中药对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究进展 [J]. 中南药学，2012，10（6）：459-462.

[4] 邓常清，黄小平 . 中药有效组（成）分配伍的研究进展与述评 [J]. 世界中医药，2016，11（4）：565-569.

[5] 姜超，徐中菊，王婷 . 益气活血法在急性缺血性脑卒中治疗的应用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2017，15（18）：2271-2273.

[6] 方马一佳，万海同，潘璐佳，等 . 基于网络药理学研究黄芪 - 红花药对抗脑缺血作用机制 [J]. 中成药，2020，42（1）：222-226.

[7] 曹国琼，胡正平，马奋刚，等 . 治疗缺血性中风常用中药研究进展 [J]. 辽宁中医杂志，2019，46（12）：2666-2671.

[8] 赵正泰，唐仕欢，马月香 . 补阳还五汤治疗气虚血瘀型脑卒中研究进展 [J]. 山东中医杂志，2017，36（1）：71-73.

[9] 王凯，雷露，曹金一，等 . 中药红花和黄芪对脑缺血损伤保护作用的研究进展 [J]. 中国医药导报，2020，17（3）：22-25.

[10] 曹金一，雷露，段佳林，等 . 黄芪红花配伍对大鼠脑缺血后血管新生及 Cav-1/VEGF 信号通路的影响 [J]. 现代生物医学进展，2019，19（6）：1016-1019.

[11] 叶晓滨 . 黄芪配伍益气活血补血药对研究进展 [J]. 河南中医，2021，41（8）：1285-1290.

[12] 张锦，张允岭，李秀，等 . 缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠模型的研究 [J]. 北京中医药大学学报，2008，31（9）：590-592.

[13] 白雪松，蔡光先，佘颜，等 . 超微补阳还五汤对气虚血瘀模型大鼠血栓前状态的影响 [J]. 中华中医药学刊，2008，26（2）：413-414.

[14] 乔逸，杨志福，奚苗苗，等 . 红花提取物、羟基红花黄色素 A 在血瘀大鼠体内的药动学特征 [J]. 中国临床药学杂志，2010，19（1）：22-25.

[15] Longa EZ，Weinstein PR，Carlson S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke，1989，20（1）：84-91.

[16] Bederson JB，Pitts LH，Tsuji M，et al. Rat middle cerebral artery occlusion：evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke，1986，17（3）：472-476.

[17] Chen Y，Lei L，Wang K，et al. Huangqi-Honghua combination prevents cerebral infarction with Qi deficiency and blood stasis syndromein rats by the autophagy pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2022，2022：9496926.

[18] 乔逸，文爱东，杨志福，等 . 方剂药效物质基础研究新方法："药效差示血清色谱法" [J]. 第四军医大学学报，2008，29（8）：324-333.

[19] 乔逸，杨志福，田云，等 . 药效差示血清色谱法研究红花的药效物质基础 [J]. 中国药师，2010，13（5）：624-626.

[20] 庄欣雅，张倩，亓雅丽，等 . 经典名方当归补血汤物质基准量值传递分析 [J]. 中国中药杂志，2022，47（2）：673-675.

（收稿日期：2022-08-03；修回日期：2022-10-10）

药物分析与检验

196 批麝香壮骨膏中挥发性成分的含量测定及特征峰鉴别

许苗苗，张楠，谢志民（西安市食品药品检验所，西安 710054）

摘要：目的 建立樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑及水杨酸甲酯的气相含量测定方法及八角茴香、干姜、苍术、当归和山柰等药材的气相鉴别方法，并采用该方法对麝香壮骨膏进行质量分析。**方法** 色谱柱：DB-WAX、HP-5（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；分流比为 10∶1 和 5∶1；载气流速均为 1.0 mL·min^{-1}；进样口温度 220 ℃、检测器温度 250 ℃，程序升温，进样量 1 μL。**结果** 樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑和水杨酸甲酯的线性范围分别为 98.3 ～ 2840 ng、145.9 ～ 4216 ng、43.8 ～ 1267 ng、64.5 ～ 1863 ng、84.0 ～ 2427 ng（r = 0.9999）；精密度、重复性、稳定性的 *RSD* 均小于 1.6%；平均加样回收率在 94.52% ～ 101.43%（*RSD* < 2.6%）。196 批样品中樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑和水杨酸甲酯含量分别为 0.420 ～ 60.786、4.251 ～ 89.129、0.717 ～ 25.876、1.664 ～ 36.014、1.536 ～ 40.452 mg/100 cm^2。196 批麝香壮骨膏中，含量测定项 47 批不合格，气相鉴别项 33 批不合格。**结论** 本文建立的麝香壮骨膏气相色谱定量定性分析方法专属性及特征性强，且简便、快速、准确，为全面控制麝香壮骨膏质量提供了依据。

关键词：气相色谱法；麝香壮骨膏；樟脑；薄荷脑；冰片

中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2606-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.025

Determination of volatile components in 196 batches of Shexiang Zhuanggu plaster and identification of characteristic peaks

XU Miao-miao, ZHANG Nan, XIE Zhi-min (*Xi'an Municipal Institute for Food and Drug Control*, *Xi'an* 710054)

Abstract: Objective To determine the content of camphor, menthol, isoborneol, borneol and methyl salicylate by gas chromatograph method and identify Anise stellati Fructus, Crude Zingber Officinale, Rhizoma Atractylodis, Angelica Sinensis and Kaempferia Galanga Linn. **Methods** The chromatographic separation was conducted on DB-WAX and HP-5 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm) column with temperature programming, at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The split ratio was 10∶1 and 5∶1, the inlet temperature was set at 220 ℃, the detector temperature was set at 250 ℃, and the volume of sample injection was 1 μL. **Results** The linearity of camphor, menthol, isoborneol, borneol and methyl salicylate were 98.3 ～ 2840 ng, 145.9 ～ 4216 ng, 43.8 ～ 1267 ng, 64.5 ～ 1863 ng, 84.0 ～ 2427 ng (r = 0.9999), respectively. The *RSD*s of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.6%. The average recoveries were 94.52% ～ 101.43% (*RSD* < 2.6%). The contents of 196 batches of camphor, menthol, isoborneol, borneol and methyl salicylate ranged 0.420 ～ 60.786, 4.251 ～ 89.129, 0.717 ～ 25.876, 1.664 ～ 36.014, and 1.536 ～ 40.452 mg/100 cm^2. In the 196 batches of Shexiang Zhuanggu plaster, content determination items in 47 batches were unqualified, and those in 33 batches of GC identification were unqualified. **Conclusion** The proposed method of content determination and chromatogram analysis has specificity and strong characterstics. This method is easy, fast and reliable, and

基金项目：2021 年国家药品评价性抽验中央补助地方经费项目（No.111）。

作者简介：许苗苗，女，硕士，主管药师，主要从事药品检验及标准研究工作，email：459750487@qq.com

can be used for the quality control of the preparation.

Key words: gas chromatograph; Shexiang Zhuanggu plaster; camphor; menthol; borneol

麝香壮骨膏（Shexiang Zhuanggu plaster）是以人工麝香与生川乌、生草乌、干姜、当归、苍术、白芷、麻黄、山柰、八角茴香等九味药材浸膏为主，辅以樟脑、薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯、硫酸软骨素和盐酸苯海拉明等化学药物，组成的一种具有镇痛、消炎功效的外用橡膏剂[1]。临床常用于风湿痛、腰痛、关节痛、神经痛、肌肉酸痛、扭伤和挫伤等病症。处方中人工麝香味辛性温，具有走窜开窍、活血通经、消肿止痛作用，为方中君药。中药浸膏中各药材均味辛，性温、热，具有祛风除湿、温经散寒、理气止痛功效，同为方中臣药。方中樟脑、薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯等四味均为皮肤刺激药物[2]，可促进局部血液循环，具有辛凉开窍、清热止痛的作用，能够引药入内，共同协助人工麝香和中药浸膏发挥疗效。

2021 年麝香壮骨膏国家评价性抽验项目共抽样 196 批次，涉及 43 个批准文号和 41 家生产企业，现行检验标准分别为《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第十一册、国家食品药品监督管理总局国家药品标准[3]WS_3-B-2268-96、WS_3-B-2268-96-1、WS_3-B-2268-96-2 等 4 个。仅有 WS_3-B-2268-96-2 标准收载了樟脑、薄荷脑、冰片和水杨酸甲酯气相色谱（GC）法鉴别及樟脑、水杨酸甲酯 GC 法含量测定项目，其他标准均无有效质量控制项目。

麝香壮骨膏中 4 种挥发性成分，均具有刺激性，如含量过低会影响药物的疗效，含量过高则影响药物使用的安全性[4]。工艺中涂膏方法不明确，主要有热压法[5]和溶剂法[6]，不同涂膏方法制备的样品中挥发性成分含量不同。另外，处方中未规定药材浸膏的制备工艺，也未进行质量控制，容易出现使用伪劣饮片投料或者不按工艺投料的现象，影响药品疗效。为确保麝香壮骨膏安全有效，本文建立了麝香壮骨膏[7-9]中薄荷脑、龙脑、异龙脑、樟脑、水杨酸甲酯[7-8]的 GC 含量测定方法及八角茴香[10]、苍术[11]、干姜[12]、当归[13]和山柰[14]等药材的特征峰 GC 鉴别方法。该方法简便、快速、准确，为麝香壮骨膏的安全性和有效性评价提供参考。

1　材料

安捷伦 7890A 型气相色谱仪，7890A/GC 色谱工作站，氢火焰离子化检测器（FID）；安捷伦 DB-WAX 和 HP-5 色谱柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）。Milli-Q Academic 超纯水系统（美国默克密理博公司）；BT124S、BT25S 型电子天平（德国赛多利斯公司）。

对照品：樟脑（批号：110747-202011，纯度：98.8%）、薄荷脑（批号：110728-201707，纯度：99.8%）、龙脑（批号：110881-201709，纯度：99.6%）、异龙脑（批号：111512-200802，纯度：97.5%）、水杨酸甲酯（批号:110707-201413，纯度：99.7%）、反式茴香脑（批号:111835-201503，纯度：99.7%）、对甲氧基桂皮酸乙酯（批号：110835-202005，纯度：99.4%）及对照药材：八角茴香（批号：120999-202107）、干姜（批号：120942-201911）、苍术（批号:120932-201708）、当归（批号：120927-201617）、山柰（批号：121504-201203）等均由中国食品药品检定研究院提供。麝香壮骨膏（41 厂家共计 196 批次）。乙酸乙酯（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2　方法与结果

2.1　麝香壮骨膏中樟脑、薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯的含量测定

2.1.1　色谱条件　采用安捷伦 DB-WAX 柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；进样口温度 220 ℃；检测器温度 250 ℃；柱温起始 100 ℃，保持 5 min，以速率 2 ℃·min^{-1} 升至 120 ℃，再保持 5 min；载气流速 1.0 mL·min^{-1}；分流比 10∶1；进样量 1 μL。

2.1.2　混合对照品溶液的制备　分别精密称各对照品适量，置同一量瓶中，加乙酸乙酯溶解并定容，作为混合对照品溶液，樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯质量浓度分别为 2.840、4.216、1.267、1.863、2.427 mg·mL^{-1}。

2.1.3　供试品溶液的制备　取本品 70 cm^2，剪成条状，除去盖衬，置 500 mL 圆底烧瓶中，加水 200 mL，连接挥发油测定器，自测定器上端加水使充满刻度部分，并溢流入烧瓶为止，再加乙酸乙酯 5 mL，加热回流 1 h，放冷，分取乙酸乙酯层，用铺有无水硫酸钠（1.0 g）的漏斗滤过；水液再用洗涤过冷凝管和挥发油测定器的乙酸乙酯液提取 3 次，每次 5 mL，提取液分别通过相同的漏斗滤过，滤液置相同的 25 mL 量瓶中，加乙酸乙酯至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.1.4　空白溶液的制备　精密称取模拟空白样品 1.71 g，按照“2.1.3”项下样品制备方法操作，制成空白溶液。

2.1.5　专属性试验　取混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液，进样测定，结果见图 1，供试品溶液所测成分均无干扰。

2.1.6　线性关系考察　取“2.1.2”项下混合对照品溶液，用乙酸乙酯稀释至 60%、36%、21.6%、8.64%、3.46%，依次得到系列浓度对照品溶液Ⅴ、Ⅳ、Ⅲ、Ⅱ、Ⅰ，进样测定，以进样量为横坐标（*X*），测得峰面积为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线，计算得线性回归方程、相关系数（*r*）、线性范围、定量限和检测限，结果见表 1。

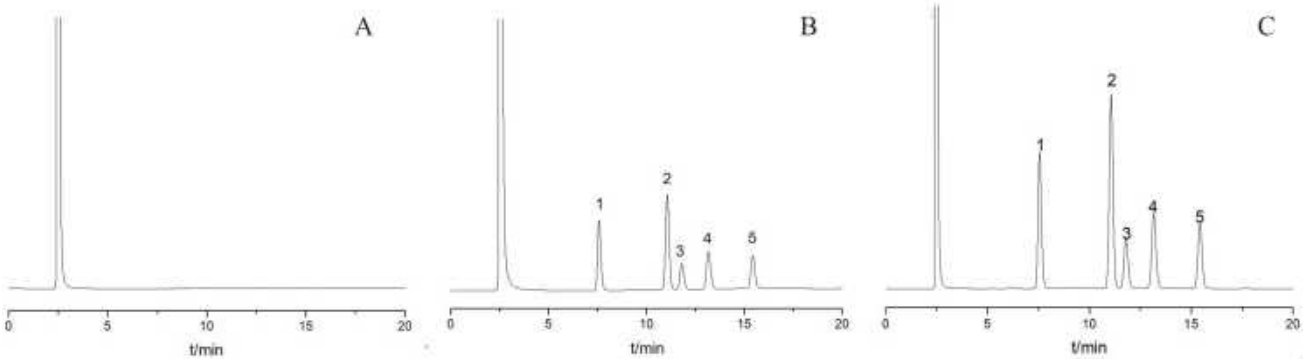


图 1　空白溶液（A）、混合对照品溶液（B）、麝香壮骨膏样品溶液（C）气相色谱图

Fig 1　GC of blank solution（A），mixed reference substance（B）and sample（C）

1. 樟脑（camphor）；2. 薄荷脑（menthol）；3. 异龙脑（isoborneol）；4. 龙脑（borneol）；5. 水杨酸甲酯（methyl salicylate）

表 1　各化合物回归方程及线性范围

Tab 1　Regression equation and linearity components

化合物	回归方程	*r*	线性范围 /ng	定量限 /μg	检测限 /μg
樟脑	$Y = 1.6457X - 4.8201$	0.9999	98.3 ～ 2840	0.72	0.38
薄荷脑	$Y = 1.6043X - 6.7346$	0.9999	145.9 ～ 4216	0.91	0.24
异龙脑	$Y = 1.6953X - 2.8905$	0.9999	43.8 ～ 1267	0.63	0.37
龙脑	$Y = 1.0781X - 3.2321$	0.9999	64.5 ～ 1863	0.68	0.52
水杨酸甲酯	$Y = 6.2171X - 2.3023$	0.9999	84.0 ～ 2427	1.14	0.21

2.1.7　精密度试验　精密吸取“2.1.6”项下的Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ号对照品溶液，连续进样 6 次，测定峰面积，结果樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯的 *RSD* 分别为 1.2% ～ 0.47%、1.2% ～ 0.48%、0.59% ～ 1.2%、1.2% ～ 0.46%、1.2% ～ 0.50%。

2.1.8　重复性试验　取同一厂家（修正药业集团股份有限公司，批号：201015）麝香壮骨膏样品 6 份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯峰面积的 *RSD* 分别为 1.1%、1.4%、1.3%、1.2%、1.6%。

2.1.9　稳定性试验　取麝香壮骨膏样品（批号：201015），按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在室温下于 0、1、2、4、8、12、20、24 h 进样测定，结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定，樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯峰面积的 *RSD* 均为 1.4%。

2.1.10　加样回收试验　取麝香壮骨膏（批号：201015）样品适量，精密剪成 1 cm×7 cm 的相等条状，混匀，取 9 份，每份 35 cm^2，除去盖衬，置 500 mL 圆底烧瓶中，加不同量的对照品，按“2.1.3”项下方法分别制备低、中、高浓度样品溶液，并依次进样测定，计算加样回收率。结果樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯低、中、高浓度的平均回收率及 *RSD* 值分别为 97.98%（1.1%）、95.89%（1.3%）、94.75%（0.050%）；99.51%（0.34%）、98.06%（0.88%）、98.54%（0.48%）；100.85%（1.1%）、101.43%（0.83%）、99.34%（2.6%）；100.76%（2.2%）、97.84%（0.98%）、96.55%（2.0%）；94.52%（0.92%）、94.64%（1.1%）、94.80%（0.48%）。

2.1.11　样品定量测定　取 196 批次麝香壮骨膏样品，每批 2 份，按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液，依法进样测定，计算含量。结果 196 批样品中樟脑、薄荷脑、异龙脑、龙脑、水杨酸甲酯含量分别为 0.420 ～ 60.786、4.251 ～ 89.129、0.717 ～ 25.876、

1.664 ～ 36.014、1.536 ～ 40.452 mg/100 cm^2。

WS_3-B-2268-96-2 质量标准中收载了樟脑和水杨酸甲酯 GC 含量测定项目，规定本品每 100 cm^2 含樟脑（$C_{10}H_{16}O$）不得少于 12.0 mg，含水杨酸甲酯（$C_8H_3O_3$）不得少于 9.0 mg。按处方量和制法项计算，樟脑转移率约为 40%、水杨酸甲酯转移率约为 35%。参照已有标准的限度要求，本研究将水杨酸甲酯转移率按 35% ～ 120% 计算，樟脑、薄荷脑和冰片的转移率按 40% ～ 120% 计算，规定本品每 100 cm^2 含樟脑（$C_{10}H_{16}O$）应为 12.0 ～ 36.0 mg，含薄荷脑（$C_{10}H_{20}O$）应为 16.0 ～ 48.0 mg，含水杨酸甲酯（$C_8H_3O_3$）应为 9.0 ～ 30.6 mg，含冰片以龙脑（$C_{10}H_{18}O$）与异龙脑（$C_{10}H_{18}O$）的总量计，应为 12.0 ～ 36.0 mg。结果 196 批次中 149 批合格，47 批不合格（涉及 16 个厂家）。

2.2 麝香壮骨膏中八角茴香、干姜、苍术、当归和山柰等药材特征峰的鉴别

2.2.1 色谱条件　采用安捷伦 HP-5 柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；进样口温度 220 ℃；检测器温度 250 ℃；程序升温起始 60 ℃，保持 2 min；以速率 2 ℃ • min^{-1} 升至 110 ℃；以速率 2 ℃ • min^{-1} 升至 180 ℃，保持 2 min；以速率 5 ℃ • min^{-1} 升至 200 ℃，保持 5 min；再以速率 50 ℃ • min^{-1} 升至 250 ℃，保持 6 min；载气流速 1.0 mL • min^{-1}；分流比 5∶1；进样量 1 μL。

2.2.2 混合对照品及供试品溶液的制备　分别精密称取反式茴香脑、对甲氧基桂皮酸乙酯对照品，置同一量瓶中，加乙酸乙酯溶解并定容，作为混合对照品溶液，质量浓度分别为 10、20 μg • mL^{-1}。

取麝香壮骨膏样品（河南羚锐制药股份有限公司，批号：210303）70 cm^2，剪成条状，除去盖衬；取八角茴香 0.81 g、干姜 3.44 g、苍术 2.40 g、当归 2.42 g、山柰 1.01 g；取空白样品 1.70 g，分别置 500 mL 圆底烧瓶中，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液、各对照药材溶液和空白样品溶液。对照品、供试品、空白及对照药材溶液图谱见图 2。

2.2.3 干扰试验和特征峰的归属识别　通过将各单味药材溶液、空白溶液和样品色谱图进行比较，对共有峰进行药材归属，见图 2。1 号峰（反式茴香脑）来源于八角茴香；2、3、6 号峰来源于苍术；4、5 号峰来源于干姜；7 号峰来源于当归；8 号峰（对甲氧基桂皮酸乙酯）来源于山柰。

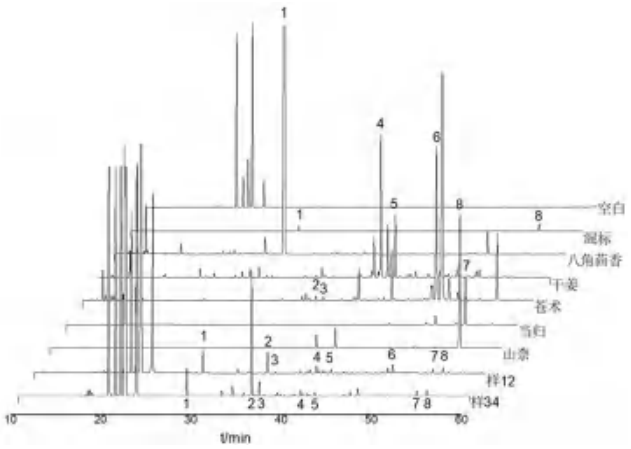


图 2　麝香壮骨膏的气相色谱图

Fig 2　GC chromatograms of Shexiang Zhuanggu plaster

2.2.4 GC 鉴别结果　取 196 批次麝香壮骨膏样品，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依法进样测定，以对甲氧基桂皮酸乙酯为参照峰，应出现与参照峰相对保留时间分别为 0.519（峰 1）；0.647（峰 2）、0.664（峰 3）或 0.899（峰 6）；0.747（峰 4）或 0.776（峰 5）；0.980（峰 7）；1.000 [（峰 8）S 峰] 的色谱峰，且误差不得超过 5%。结果 196 批次中 163 批合格，33 批不合格。

3　分析与讨论

3.1 含量测定结果分析

将 196 批样品中樟脑、薄荷脑、冰片和水杨酸甲酯的含量分别按不同转移率进行分类，分类组数及每组数量见图 3。结果 47 批不合格样品中，樟脑含量不合格的有 26 批，其中 8 批超出高限，1 批未投料；薄荷脑含量不合格的有 31 批，其中 15 批超出高限；冰片含量不合格的有 18 批，其中 7 批超出高限；水杨酸甲酯含量不合格的有 32 批，其中 5 批超出高限。

根据分析结果可知，有 1 批样品中樟脑的含量仅为 0.42 mg/100 cm^2，而冰片含量高达 61.892 mg/100 cm^2，约为处方量的 2 倍，因商品冰片中含有一定量樟脑（约 0.5%），推测样品中的樟脑为冰片中所含。可见，该批样品可能误将冰片作为樟脑重复投料。结果还发现某厂家的所有样品中樟脑、薄荷脑、水杨酸甲酯含量均明显高于处方量，分别为 1.6 ～ 2.0 倍、1.7 ～ 2.2 倍、1.2 ～ 1.6 倍。

3.2 鉴别结果分析

33 批不合格的样品中，5 批未检出八角茴香，6 批未检出当归，15 批未检出干姜、苍术，19 批未检出山柰，共涉及 13 个厂家，对各厂家提供的原料药进行鉴别，结果仅 1 个厂家提供的山柰原料品种有误，性状不符合规定，经鉴定为苦山

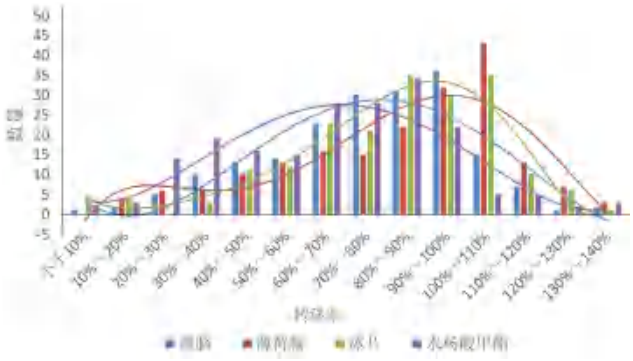


图 3 转移率的频数分布图

Fig 3 Frequency of transfer rates

柰，继而按照 2020 年版《中国药典》[15] 中山柰项下规定的薄层色谱法进行鉴别，发现所投原料没有与山柰对照药材及对甲氧基桂皮酸乙酯一致的斑点；并进一步用本文建立的 GC 法进行验证，结果苦山柰中对甲氧基桂皮酸乙酯含量很低，与相关文献报道 [16] 一致（见图 4）。该厂家生产的 9 批麝香壮骨膏样品中 5 批未检出山柰，均因山柰错误投料所致。

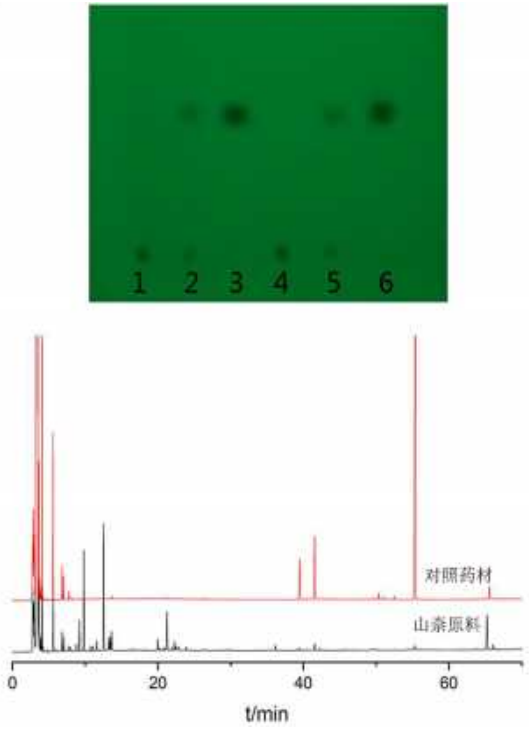


图 4 山柰薄层色谱及气相色谱图

Fig 4 TLC and GC of kaempferia

1、4. 厂家山柰原料（kaempferia galanga linn of manufacturer 39）；2、5. 山柰对照药材（kaempferia galanga linn）；3、6. 对甲氧基桂皮酸乙酯（ethyl *p*-methoxy cinnamic acid）

3.3 综合分析

通过本次研究发现多数企业成型工艺和中药浸膏的制备工艺控制不够，造成挥发性成分和中药浸膏转移率低下，直接影响产品的有效性；混合工艺控制不够，造成化学成分含量均匀性较差，影响产品疗效的稳定性。建议全面修订产品质量标准，提高产品质量的可控性；对涉嫌不按处方投料企业、投料错误企业进行检查，控制问题产品货源；促使企业重视原料质量和生产过程的控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会 . 中华人民共和国卫生部药品标准 - 中药成方制剂（第十一册）[S]. 1996：214.

[2] 许艳茹，石菊，展月，等 . 麝香壮骨膏局部皮肤刺激性及过敏性实验研究 [J]. 亚太传统医药，2019，19（3）：18-20.

[3] 国家食品药品监督管理总局国家药品标准 [S]. WS3-B-2268-96-2.

[4] 刘芳，王瑞涛，周萌萌 . 麝香壮骨膏生产过程质量控制研究 [J]. 保健文汇，2020（26）：229-230.

[5] 王永刚 . 热压法生产橡胶膏剂Ⅰ艺探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（21）：222-226.

[6] 王永刚 . 橡胶贴膏剂制备方法的应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（13）：231-234.

[7] 王艳伟，李桂本，代雪平 . 气相色谱法测定活血消痛酊中樟脑、薄荷脑、龙脑和异龙脑含量 [J]. 西北药学杂志，2019，34（5）：612-614.

[8] 周征，魏京京 . 毛细管气相色谱法测定无极膏中薄荷脑、樟脑、水杨酸甲酯、冰片及麝香草酚的含量 [J]. 药物分析杂志，2007，27（7）：1072-1074.

[9] 彭善贵，许莉，曾桢，等 . 八角茴香中挥发油的 GC 特征图谱研究 [J]. 中国药师，2018，21（7）：1159-1161.

[10] 王发英，吴查青，陈张金，等 . 市售麝香壮骨膏的质量评价 [J]. 现代中医药，2021，41（9）：41-47.

[11] 杨栋，陈悦梅，吴晓磊，等 . 苍术炮制前后指纹图谱及主要成分含量变化研究 [J]. 中国药师，2020，23（12）：2398-2402.

[12] 林华坚，张梓豪，孟江，等 . 干姜及其炮制品色差值与活性成分含量的相关性研究 [J]. 中国药房，2020，31（10）：1197-1202.

[13] 刘洁丽，邓淑芳，孙宇靖，等 . 基于 GC-MS 方法比较当归不同生长部位挥发油的化学成分 [J]. 化学世界，2020，61（6）：426-432.

[14] 黎强，余凡 . HS-SPME-GC-MS 联用分析不同产地山柰挥发性成分 [J]. 中国药师，2018，21（5）：840-846.

[15] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：30.

[16] 张桂芝 . 山柰与苦山柰挥发油的气相色谱 - 质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药，2008，19（5）：1124-1126.

（收稿日期：2022-03-05；修回日期：2022-05-06）

盐酸艾司洛尔注射液的有关物质及其质量评价研究

章为[1, 2]，蒋涛[1]，刘雁鸣[1]，黄海萍[1]，殷帅[1]，李文波[3*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 中南大学湘雅药学院，长沙　410013；3. 中南大学湘雅二医院，长沙　410011）

摘要：目的　通过制备盐酸艾司洛尔的水解杂质并建立其有关物质测定方法，对不同生产企业的样品进行质量评价研究。**方法**　采用 CAPCELL PAK C18 MG Ⅲ柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈 - 甲醇 - 磷酸盐缓冲液（取磷酸二氢钾 4.6 g，加水 1000 mL 使溶解，用稀磷酸调节 pH 至 4.0）（12∶20∶68）为流动相 A，甲醇为流动相 B，梯度洗脱，检测波长为 222 nm，进样量 20 μL。**结果**　对不同生产企业样品的有关物质进行检查。经结构确证，所制备杂质为艾司洛尔的主要水解产物杂质Ⅰ。主峰、杂质Ⅰ、杂质Ⅱ与相邻峰之间分离度良好，杂质Ⅰ在 0.8380 ～ 209.50 mg • L^{-1} 质量浓度内与峰面积线性关系良好，回收率在 97.69% ～ 100.05%，*RSD* ＜ 2.5%；杂质Ⅱ在 0.0901 ～ 18.016 mg • L^{-1} 质量浓度内与峰面积线性关系良好，回收率在 95.49% ～ 101.37%，*RSD* ＜ 1.5%。共检测 82 批次盐酸艾司洛尔注射样品，杂质Ⅰ含量为 0.6% ～ 7.1%，杂质Ⅱ含量为 0.1% ～ 0.3%，杂质总量为 0.8% ～ 8.5%。**结论**　本方法可用于盐酸艾司洛尔注射液有关物质的测定及质量控制，为该品种质量标准的修订提供数据参考。

关键词：盐酸艾司洛尔注射液；杂质制备；有关物质；质量评价

中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2611-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.026

Related substances and quality evaluation of esmolol hydrochloride injection

ZHANG Wei[1, 2], JIANG Tao[1], LIU Yan-ming[1], HUANG Hai-ping[1], YIN Shuai[1], LI Wen-bo[3*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Changsha* 410013; 3. *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objection　To prepared the hydrolysate of esmolol hydrochloride and establish a method to determine related substances in esmolol hydrochloride injection and evaluate its quality. **Methods** CAPCELL PAK C18 MG Ⅲ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used, with gradient elution. Acetonitrile-methanol-phosphate buffer (4.6 g potassium dihydrogen phosphate, dissolved in 1000 mL water, adjusted to pH 4.0 with dilute phosphoric acid) (12∶20∶68) was used as mobile phase A and methanol as mobile phase B. The detection wavelength was 222 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The related substances in esmolol hydrochloride injection from different manufacturers were measured. The structure of impurity Ⅰ was proved to be the hydrolysate of esmolol. The chromatographic conditions established in this paper showed good separation between the main peaks, impurity Ⅰ peak, impurity Ⅱ peak and their adjacent peaks. The linear calibration curves of impurity Ⅰ and impurity Ⅱ were obtained at 0.8380 ～ 209.50 mg • L^{-1} and 0.0901 ～ 18.016 mg • L^{-1}, respectively. The recovery was 97.69% ～ 100.05% with *RSD* less than 2.5% for impurity Ⅰ and 95.49% ～ 101.37% with *RSD* less than 1.5% for impurity Ⅱ. Totally 82 batches of samples were measured: the content of impurity Ⅰ was 0.6% ～ 7.1%, the content of impurity Ⅱ was 0.1% ～ 0.3%, and the total amount of impurity was 0.8% ～ 8.5%. **Conclusion**　The method can be used for the determination and quality control of related substances in esmolol hydrochloride injection and provid reference for the revision of the quality

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ9003）。

作者简介：章为，女，副主任药师，主要从事药物分析与质量标准研究，email：zw5890@qq.com　*通信作者：李文波，男，博士，主要从事临床研究，email：liwenbogogogo@csu.edu.com

standards and technical support for the scientific supervision of drugs.

Key words: esmolol hydrochloride injection; preparation of impurity; related substance; quality evaluation

盐酸艾司洛尔注射液（esmolol hydrochloride injection）为超短效的选择性β_1受体阻滞剂，在临床上用于心房颤动、心房扑动时控制心室率，围手术期高血压和窦性心动过速[1-3]。《中国药典》2020 年版二部等现行各国药典均未收载该制剂[4]。该品种的现行检验标准为《新药转正标准》第 42 册 WS1-（X-272）-2003Z[5]，无有关物质检查项。本文采用 HPLC 技术，首次建立了盐酸艾司洛尔注射液有关物质检查方法，并应用该方法对 82 批次盐酸艾司洛尔注射液进行有关物质考察和质量评价，为保障临床用药安全和科学监管提供技术支撑，对注射剂仿制药质量一致性评价的推进起到积极作用。

1 仪器与试药

UHPLC-Q Exactive Focus 液相色谱 / 质谱联用仪，配备轨道阱高分辨质谱检测器（美国赛默飞公司）；AVANCE Ⅲ 500MHz 核磁共振波谱仪（瑞士布鲁克公司）；UltiMate 3000 高效液相色谱仪，配备二极管阵列检测器（美国戴安公司）；LC-20AT 高效液相色谱仪，配备 PDA 检测器（日本岛津公司）；XP205 十万分之一电子分析（瑞士梅特勒托利多公司）；MILLI-Q 纯水器（美国 Millipore 公司）；GX-271 制备液相色谱仪（美国吉尔森）；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）；旋转蒸发器 RV10（德国艾卡）。

盐酸艾司洛尔对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100749-201802，含量：98.9%）；艾司洛尔二聚体杂质（杂质Ⅱ，TLC，批号：3389-013A4，含量：97.7%）；乙腈、甲醇均为色谱纯（德国 Merck 公司）；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。82 批次盐酸艾司洛尔注射液样品来源于 4 家不同的生产企业。

2 水解杂质的制备及其结构确证[6-7]

2.1 制备液相色谱条件

色谱柱：Venusll PrepG-C18 柱（250 mm×21.2 mm，10 μm），流动相：甲酸溶液（pH 2.0）-甲醇（体积比为 70∶30），波长：222 nm，流速：4.0 mL·min^{-1}，柱温：25 ℃，进样量：2.0 mL。

2.2 水解杂质的制备

盐酸艾司洛尔（3.17 g，10 mmol）溶于甲醇（100 mL），加入 2 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液（15 mL，30 mmol，3 eq），加热回流，3 h 反应完全，浓缩至干。加入 100 mL 甲醇超声，滤过，滤液滴至 30 mL 浓盐酸溶液中，搅拌过夜，次日浓缩后经制备液相制得杂质Ⅰ——盐酸艾司洛尔酸，纯度（HPLC 归一化法）：98.2%。

2.3 水解杂质的结构确证

杂质Ⅰ，高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z*：282.16992 [M + H]$^+$（calcd for $C_{15}H_{23}NO_4$，281.16216），见图 1。^{1}H-NMR（D_2O，500 MHz）δ：7.10（2H，d，H_2，H_6），6.86（2H，d，H_3，H_5），4.13 ～ 4.21（1H，m，H_8），3.90 ～ 4.00（2H，m，H_7），3.32 ～ 3.40（1H，m，H_{10}），3.05 ～ 3.21（2H，m，H_9），2.73（2H，t，H_{13}），2.51（2H，m，H_{14}），1.23（6H，q，H_{11}，H_{12}）。^{13}C-NMR（D_2O，125 MHz）δ：177.90（C-15）和 156.36（C-4），133.70（C-1），129.49（C-2，C-6），114.77（C-3，C-5），69.53（C-7），65.59（C-8），51.02（C-10），46.67（C-9），35.50（C-14），29.33（C-13），18.26（C-11），17.83（C-12）。

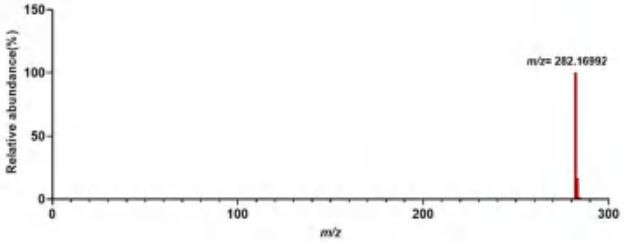


图 1 杂质Ⅰ质谱图

Fig 1 Mass spectrometry of impurity Ⅰ

综合分析高分辨质谱、^{1}H NMR 及 ^{13}C NMR，与文献[8]对照确定杂质Ⅰ为 3-{4-[2- 羟基 -3-（异丙胺基）丙氧基] 苯基 } 丙酸，结构如图 2 所示。

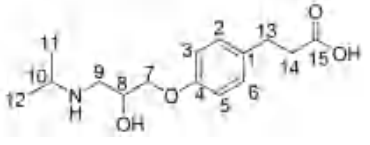


图 2 杂质Ⅰ结构式

Fig 2 Chemical structure of impurity Ⅰ

3 有关物质方法学考察

3.1 液相色谱条件[4, 9]

采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 [CAPCELL PAK C18 MG Ⅲ柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）或效能相当的色谱柱]。以乙腈 - 甲醇 - 磷酸盐缓冲液（取

磷酸二氢钾 4.6 g，加水 1000 mL 使溶解，用稀磷酸调节 pH 至 4.0）（12∶20∶68）为流动相 A，以甲醇为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 15 min，100%A；15 ～ 30 min，100% → 65%A；30 ～ 50 min，65%A；50 ～ 51 min，65% → 100%A；51 ～ 60 min，100%A），流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 20 μL。

3.2　溶液的制备

3.2.1　对照品溶液

① 取盐酸艾司洛尔 20.40 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相 A 溶解并稀释至刻度，摇匀，作为盐酸艾司洛尔对照品储备液。

② 取杂质Ⅰ盐酸盐（纯度按不含盐酸盐杂质Ⅰ折算：86.93%）12.05 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相 A 溶解并稀释至刻度，摇匀，作为杂质Ⅰ对照品储备液。

③ 取杂质Ⅱ 9.22 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相 A 溶解并稀释至刻度，摇匀，作为杂质Ⅱ对照品储备液。

3.2.2　供试品溶液　取本品，加流动相 A 溶解并稀释成约含盐酸艾司洛尔 1.0 mg • mL^{-1} 的溶液，即得。

3.2.3　对照溶液　精密量取供试品溶液适量，用流动相 A 定量稀释成约 10 μg • mL^{-1} 的溶液，即得。

3.2.4　系统适用性溶液　取盐酸艾司洛尔对照品约 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 1 mL，放置 30 min，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL 中和，用流动相 A 稀释至刻度，摇匀。

3.3　专属性试验

3.3.1　系统适用性试验和干扰试验　取收集到的各生产企业处方中除盐酸艾司洛尔外各成分的最大量制成混合空白辅料溶液。分别取系统适用性溶液、各生产企业有关物质供试品溶液、空白辅料溶液和空白溶剂，照“3.1”项下色谱条件分析，色谱图见图 3。结果表明：主峰与相邻峰、杂质Ⅰ峰与相邻峰之间分离度均符合规定；空白辅料和空白溶剂均无干扰。

3.3.2　破坏性试验　酸破坏：精密量取样品 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 的盐酸溶液 1 mL，摇匀，室温放置 20 min，加 1 mol • L^{-1} 的氢氧化钠溶液调 pH 至中性，加流动相 A 稀释至刻度，滤过，取续滤液注入液相色谱仪，记录色谱图；碱破坏：精密量取样品 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 0.1 mol • L^{-1} 的氢氧化钠溶液 1 mL，摇匀，室温放置 2 min，加 0.1 mol • L^{-1} 的盐酸溶液调 pH 至中性，加流动相 A 稀释至刻度，滤过，取续滤液注入液相色谱仪，记录色谱图；高温破坏：取未开封样品，水浴加热 5 h，放冷至室温，按“3.2.2”项下方法操作，注入液相色谱仪，记录色谱图；光照破坏：取未开封样品，置（5000±500）lx 光照下 5 d，按“3.2.2”项下方法操作，注入液相色谱仪，记录色谱图；氧化破坏：精密量取样品 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 30% 双氧水溶液 1 mL，65 ℃水浴加热 30 min，放冷至室温，加流动相 A 稀释至刻度，滤过，取续滤液注入液相色谱仪，记录色谱图。经酸、碱、高温、光照和氧化破坏后（见图 4），各破坏条件下相邻杂质与主峰分离度均符合要求，主峰纯度因子均大于 999，说明系统具有良好的专属性。

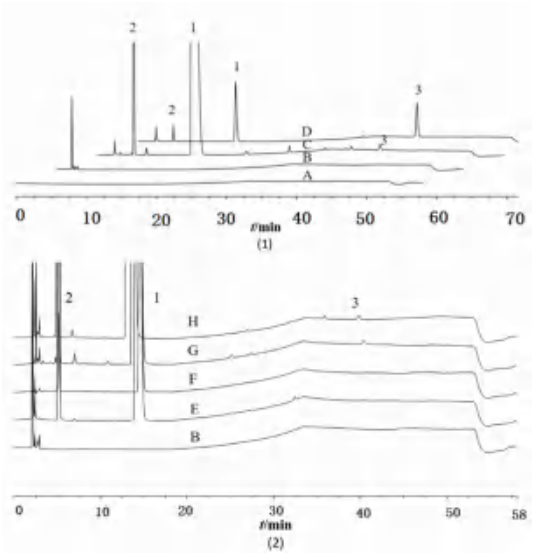


图 3　系统适用性、空白辅料溶液和供试品溶液的色谱图

Fig 3　HPLC chromatogram of the system applicability, the blank excipient solution and the reference samples

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 空白辅料溶液（blank excipient solution）；C. 系统适用性溶液（system applicability solution）；D. 对照品溶液（reference solution）；E ～ H. 生产企业 a ～ d 有关物质供试品溶液（related substances solution of company a to d）；1. 艾司洛尔（esmolol）；2. 杂质Ⅰ（impurity Ⅰ）；3. 杂质Ⅱ（impurity Ⅱ）

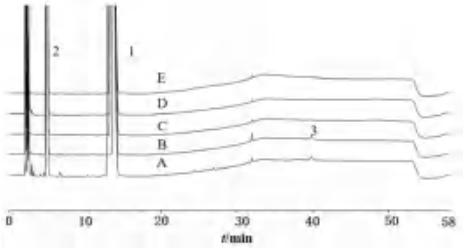


图 4　强酸（A）、强碱（B）、高温（C）、光照（D）和氧化（E）条件下的色谱图

Fig 4　Chromatograms under strong acid（A）, alkali（B）, heating（C）, light（D）and oxidation（E）conditions

1. 艾司洛尔（esmolol）；2. 杂质Ⅰ（impurity Ⅰ）；3. 杂质Ⅱ（impurity Ⅱ）

3.4 线性关系考察

3.4.1 盐酸艾司洛尔 分别精密量取盐酸艾司洛尔对照品储备液 0.05、0.25、0.50、2.50、5.00、10.00 mL 于 20 mL 量瓶中，加流动相 A 稀释至刻度，作为盐酸艾司洛尔线性系列溶液，分别按照“3.1”项下色谱条件进样，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归计算。结果显示，盐酸艾司洛尔在 1.0088 ～ 201.76 mg • L^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程：$Y = 439.1X - 51.86$（$r = 0.9999$）。

3.4.2 杂质Ⅰ 分别精密量取杂质Ⅰ对照品储备液 0.08、0.40、0.80、4.00、12.00、20.00 mL 于 20 mL 量瓶中，加流动相 A 稀释至刻度，作为杂质Ⅰ线性系列溶液，按照“3.1”项下条件依次进样，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归计算。结果显示，杂质Ⅰ在 0.8380 ～ 209.50 mg • L^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程：$Y = 503.9X + 70.24$（$r = 0.9999$）。

3.4.3 杂质Ⅱ 分别精密量取杂质Ⅱ对照品储备液 0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 mL 于 200 mL 量瓶中，加流动相 A 稀释至刻度，作为杂质Ⅱ线性系列溶液，按照“3.1”项下条件进样，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归计算。结果显示，杂质Ⅱ在 0.0901 ～ 18.016 mg • L^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程：$Y = 520.7X - 24.03$（$r = 1.0000$）。

3.5 检测限和定量限

取“3.4”项下线性溶液适量，逐级稀释后进样，按信噪比约为 3 折算方法的检测限为 0.10 mg•L^{-1}（盐酸艾司洛尔）、0.04 mg•L^{-1}（杂质Ⅰ）和 0.03 mg • L^{-1}（杂质Ⅱ），按信噪比约为 10 折算方法的定量限为 0.31 mg•L^{-1}（盐酸艾司洛尔）、0.12 mg•L^{-1}（杂质Ⅰ）和 0.08 mg•L^{-1}（杂质Ⅱ），说明该方法的检测灵敏度高。

3.6 精密度试验

取“3.4”项下线性溶液 10.087 mg • L^{-1} 盐酸艾司洛尔、8.3800 mg • L^{-1} 杂质Ⅰ和 9.008 mg • L^{-1} 杂质Ⅱ，连续重复进样 6 次，结果 *RSD* 均为 0.3%，表明仪器精密度良好。

3.7 重复性试验

取 a 生产企业的一批次样品，按“3.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，依法测定，计算杂质Ⅰ的含量平均值为 2.16%，*RSD* 为 3.3%；杂质Ⅱ的含量平均值为 0.18%，*RSD* 为 3.0%；杂质总量平均值为 2.49%，*RSD* 为 3.3%，表明本方法重复性良好。

3.8 稳定性试验

取“3.7”项下供试品溶液于室温放置 0、2、8、12 和 24 h 后，分别进样 20 μL，记录色谱图，结果杂质Ⅰ峰面积的 *RSD* 为 0.2%，杂质Ⅱ峰面积的 *RSD* 为 1.0%；杂质检出数量无显著变化，各杂质峰面积基本保持不变，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

3.9 回收试验

取“3.3.1”项下混合空白辅料溶液 1 mL 和盐酸艾司洛尔对照品约 10 mg，各 9 份，分别置 10 mL 量瓶中。依次精密加入杂质Ⅰ线性溶液（209.50 mg • L^{-1}）和杂质Ⅱ线性溶液（4.5040 mg • L^{-1}）4、5 和 6 mL 各 3 份，用流动相 A 稀释至刻度，摇匀，即得高、中、低 3 个质量浓度的供试品溶液，按“3.1”项下色谱条件测定，计算回收率。结果杂质Ⅰ和杂质Ⅱ的低浓度平均加样回收率分别为 100.05% 和 98.37%，*RSD* 分别为 0.9% 和 1.4%（$n = 3$），中浓度平均加样回收率分别为 99.10% 和 101.37%，*RSD* 分别为 1.0% 和 0.9%（$n = 3$），高浓度平均加样回收率分别为 97.69% 和 95.49%，*RSD* 分别为 2.3% 和 0.9%（$n = 3$），表明该方法的回收率良好。

3.10 耐用性试验

取“3.7”项下供试品溶液，通过改变液相色谱仪品牌（Ultimate 3000、LC-20AT）、色谱柱型号 [CAPCELL TYPE MGⅢ（250 mm×4.6 mm，5 μm）、WandaSil C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Welch Xltimate X-C18（250 mm×4.6 mm，5 μm]、柱温（25、30、35 ℃）和流速（0.8、1.0、1.2 mL•min^{-1}），依次考察方法的耐用性，结果均可满足系统适用性试验要求。

4 样品含量测定及质量评价

采用新建的有关物质测定方法对 4 家生产企业的 82 批次样品进行有关物质项目的检查，结果显示单个最大杂质均为杂质Ⅰ，含量为 0.6% ～ 7.1%；杂质Ⅱ含量为 0.1% ～ 0.3%；杂质总量为 0.8% ～ 8.5%。按储存时间将 82 批次样品结果排序并绘制趋势图，结果见图 5：杂质Ⅰ的变化随样品储存时间延长而显著增加，杂质Ⅱ的变化受储存时间影响较小，杂质总量随储存时间延长呈上升趋势。分析其原因可能为艾司洛尔化学结构中含酯基团，受剂型因素影响，随着储存时间增加，水解程度增加，故杂质Ⅰ含量增加。另艾司洛尔水解后还会产生甲醇，从安全性角度出发，甲醇量也应予以监测和控

制。本研究采用气相色谱法[10]测定 82 批次样品中的甲醇量，并对杂质Ⅰ和甲醇量进行相关性分析，结果 6 批次样品的甲醇量＞ 0.3%[11-12]（《中国药典》2020 年版四部残留溶剂项下规定：甲醇量不得过 0.3%）。逐一将 82 批次样品的杂质Ⅰ含量与甲醇量含量折算成摩尔数比，结果在 0.8 ～ 1.1。综合以上分析，笔者认为可以通过有关物质检查项中控制杂质Ⅰ的限量来控制甲醇量，同时也提示生产企业应科学优化生产工艺和贮藏条件，现行贮藏条件为“遮光，密封保存”，因水解反应与温度成正相关，故可适当增加对贮藏条件中温度的规定，合理控制该品种中杂质Ⅰ的生成。

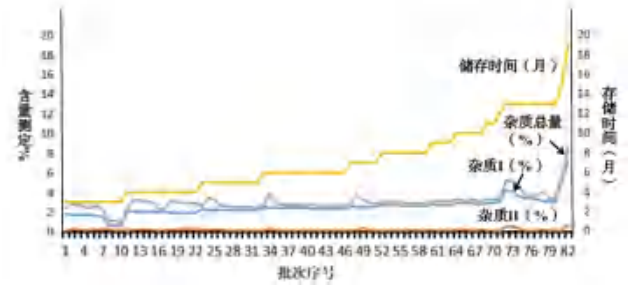


图 5　有关物质变化趋势图

Fig 5　Trend of changes in the related substances

5　讨论[13-14]

5.1　辅料峰的去除

在进行有关物质检查中均扣除辅料峰，耐用性试验中艾司洛尔主峰相对保留时间约 0.30 以前的峰为辅料峰，不同仪器和不同色谱柱会略有变化。

5.2　杂质限度的探讨

盐酸艾司洛尔原料药和注射用盐酸艾司洛尔中杂质Ⅰ的限度均为“不得过 0.2%”，本次研究结果显示盐酸艾司洛尔注射液中杂质Ⅰ含量偏高（0.6% ～ 7.1%）。有研究表明杂质Ⅰ即为盐酸艾司洛尔体内首要代谢产物，参考 ICH 中代谢杂质的相关规定，笔者建议杂质Ⅰ限度可适当放宽，依据不同生产企业产品稳定性考察结果、超货架期样品有关物质测定结果、多批次制剂有关物质测定统计结果以及原研药和原料药测定结果综合考虑，并经相关专家科学论证后确定杂质Ⅰ和杂质总量的具体限度。杂质Ⅱ限度建议制订为“不得过 0.3%”。

5.3　波长的选择

综合分析供试品溶液主要杂质峰和破坏试验主要杂质峰的 DAD 紫外光谱图。结果艾司洛尔峰、杂质Ⅰ峰和杂质Ⅱ峰均在（222±2）nm 和（274±2）nm 波长处有最大吸收，又因供试品溶液色谱图强度在 222 nm 波长下显著强于 274 nm，各色谱峰的灵敏度更高，有利于更多杂质峰的检出，故选择 222 nm 作为该品种有关物质的检测波长。

5.4　小结

本方法灵敏、准确，操作简便，可有效检出盐酸艾司洛尔注射液的有关物质，对提升国产仿制药品质量，推进一致性评价工作，保障科学监管等方面均具有十分积极作用。

参考文献

[1] 徐博 . 盐酸艾司洛尔联合盐酸胺碘酮治疗急性快速房颤患者的临床研究 [J]. 中国现代药物用，2021，15（13）：170-172.
[2] 张振祥 . 盐酸艾司洛尔并氨氯地平治疗高血压并主动脉夹层的疗效观察 [J]. 智慧健康，2021，7（7）：100-102.
[3] 丛中华 . 艾司洛尔在冠心病心肌缺血治疗中的临床效果观察 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（22）：128-130.
[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：11.
[5] 中国药典委员会 .《国家药品标准》新药转正 42 册 [S]. 北京：中国科技出版社，2004：149-151.
[6] 潘继成 . 盐酸艾司洛尔异丙酰胺化合物杂质的合成 [J]. 中国现代药物应用，2014，8（9）：231-232.
[7] 贺正国，蒋琳，江登榜，等 . 艾司洛尔盐酸盐的新合成方法 [J]. 云南大学学报（自然科学版），2021，43（5）：985-989.
[8] Erhardt PW，Woo CM，Gorczynski RJ，et al. Ultra-short-acting beta-adrenergic receptor blocking agents. 1.（aryloxy）propanolamines containing esters in the nitrogen substituent [J]. J Med Chem，1982，25（12）：1402-1407.
[9] 刘健，章为 . HPLC 法测定盐酸艾司洛尔注射液含量的改进 [J]. 中国药师，2018，21（1）：180-182.
[10] 何媛媛 . 气相色谱法测定盐酸艾司洛尔注射液中的甲醇含量 [J]. 北方药学，2015，12（11）：8-9.
[11] 朱凤昌，崇小萌，杨青，等 . ICH Q3C 残留溶剂指导原则与中国药典残留溶剂控制策略 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（9）：1259-1262.
[12] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：116-121.
[13] 姜金生，石笑弋，刘轶，等 . 高效液相色谱法测定拉莫三嗪片中的有关物质 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1637-1643.
[14] 胡昌勤，张夏 . 化学药品杂质谱控制的现状与展望 [J]. 药学学报，2019，54（12）：2214-2231.

（收稿日期：2022-06-05；修回日期：2022-08-03）

基于国家药品评价性抽验的盐酸奈福泮注射液质量分析及研究

刘慧颖[1]，马惠钟[2]，陈默[1]（1.辽宁省药品检验检测院，辽宁省检验检测认证中心，化学药品质量研究与评价国家重点实验室，沈阳 110036；2.辽宁大学药学院，沈阳 110036）

摘要：目的 对全国盐酸奈福泮注射液的质量现状和问题进行分析，为盐酸奈福泮注射液质量标准的提高提供科学依据，为药品监管部门提供技术支撑。**方法** 依据法定标准对国家药品评价性抽验的 60 批盐酸奈福泮注射液进行检验，并对结果进行统计分析，从质量标准、产品安全性等方面开展探索性研究。**结果** 按法定标准检验的合格率为 100%，探索性研究发现产品渗透压存在风险隐患，检验标准尚需完善。**结论** 盐酸奈福泮注射液整体质量良好，生产企业需考察处方的合理性，产品的质量标准需要统一和完善。

关键词：盐酸奈福泮注射液；评价性抽验；质量分析；探索性研究
中图分类号：R927.11 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2616-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.027

Quality analysis of nefopam hydrochloride injection based on national drug evaluation sampling inspection

LIU Hui-ying[1], MA Hui-zhong[2], CHEN Mo[1] (1.*Liaoning Institute for Drug Control, Liaoning Inspection, Testing and Certification Center, State Key Laboratory of Chemical Drug Quality Research and Evaluation, Shenyang* 110036; 2.*College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang* 110036)

Abstract: Objective To analyze the quality status and problems of nefopam hydrochloride injection in China, and to provide scientific basis for the quality standard improvement and technical support for drug regulatory departments. **Methods** According to the legal standards, 60 batches of nefopam hydrochloride injection were tested, the results were analyzed, and exploratory research was conducted concerning the aspects of quality standards and product safety. **Results** The qualified rate of the inspection according to the legal standard was 100%. The exploratory study found that the osmotic pressure had potential risks and dangers, and the inspection standard needed to be improved. **Conclusion** The overall quality of nefopam hydrochloride injection is good. Manufacturers need to investigate the rationality of the prescription, and the quality standard of the product needs improvement.

Key words: nefopam hydrochloride injection; evaluative sampling inspection; quality analysis; exploratory study

盐酸奈福泮为非麻醉性、非成瘾性强力镇痛药，兼有轻度的解热和肌松作用，于 1968 年首先在美国合成，20 世纪 70 年代开始应用于临床[1]。因其疗效确切，副作用小，且有强效、速效和作用持久等特点，在临床中、重度疼痛病症中广泛使用。盐酸奈福泮亦可作为局部麻醉、针麻等麻醉辅助用药，其不良反应多为出汗、眩晕、震颤、血管性水肿、过敏反应及心动过速等[2]。目前，已获国家批准上市的国产盐酸奈福泮制剂共 161 个批准文号，剂型包括片剂、胶囊剂和注射剂等。本次评价的品种为盐酸奈福泮注射液，目前全国获准生产的生产企业有 41 个，批准文号 43 个，共 2 个规格，分别为 1 mL/20 mg 和 2 mL/20 mg[3]。本次抽验共 60 批，涉及 4 个生产企业和 4 个批准文号，全部为透明低硼硅玻璃安瓿瓶及纸盒包装。抽样涉及全国 22 个省（直辖市、自治区），生产企业、经营单位、医疗机构的抽样批数分别占抽样总数的 6.7%、81.7% 和 11.7%。未抽到样品的生产企业均声明表示近几年未生产。

盐酸奈福泮注射液的执行标准为《中国药

作者简介：刘慧颖，女，硕士，副主任药师，主要从事化学药品质量控制和标准研究工作，email：wzmlhy@163.com

典》[4]，国外药典均未收载。本次试验按照该标准对全部样品进行检验，并进行了多项探索性研究，以此对该制剂的质量进行综合评价。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2696 型高效液相色谱仪，配备 2489 型 UV/Vis 检测器和 2998 型 PDA 检测器（美国沃特世公司），2010 plus 型气相色谱仪，配备 FID 检测器（日本岛津公司），7700X 型电感耦合等离子体质谱仪（美国安捷伦公司），SMC 30C 型渗透压摩尔浓度测定仪（天津天河医疗仪器有限公司），SX-700 型高压灭菌器（日本 Tomy Kogyo 公司），XP205 型十万分之一电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2 试药

盐酸奈福泮注射液共 60 批（国家评价性抽验样品，简称“国抽样品”，其中 A 企业 40 批，B 企业 18 批，C 企业 1 批，D 企业 1 批），原料药盐酸奈福泮（批号：N160808，E 企业），盐酸奈福泮对照品（纯度：99.9%，批号：100168-200602）、丙二醇对照品（纯度：99.8%，批号：190001-201202）（中国食品药品检定研究院），渗透压校正标准液（100、400、1000、2000 mOsmol • kg^{-1}，爱尔兰 Reagecon 公司），锂（Li）、硼（B）、铝（Al）、硅（Si）、钾（K）、钙（Ca）、钪（Sc）、钛（Ti）、钒（V）、铬（Cr）、铁（Fe）、钴（Co）、镍（Ni）、铜（Cu）、锌（Zn）、砷（As）、钇（Y）、镉（Cd）、铟（In）、锑（Sb）、钡（Ba）、汞（Hg）、铅（Pb）、铋（Bi）元素标准液（均为 1000 μg • mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心）。

乙腈（色谱纯，批号：17075029，美国天地有限公司），甲醇（色谱纯，批号：170413）、无水乙醇（分析纯，批号：151222）（天津市康科德科技有限公司），1，3-丙二醇（纯度：98%，批号：c10084867，上海麦克林生化科技有限公司），二甘醇（分析纯，批号：160616）、乙二醇（分析纯，批号：20141110）、庚烷磺酸钠（分析纯，批号：160616）（国药集团化学试剂有限公司），硝酸（BV-Ⅲ级，北京化学试剂研究所），其他试剂试药均为分析纯，水为纯化水。

2 方法

2.1 法定检验

按《中国药典》2020 年版二部盐酸奈福泮注射液的标准进行法定检验。检验项目包括性状、鉴别、pH 值、有关物质、装量、可见异物、不溶性微粒、无菌和含量测定等。

2.2 探索性研究

2.2.1 有关物质检测方法的考察 在盐酸奈福泮原料的破坏试验中，结果显示氧化破坏样品的杂质数量较多，且基本涵盖了其他破坏条件下产生的杂质，故在方法考察过程中采用氧化破坏的样品进行。参照《中国药典》盐酸奈福泮有关物质测定方法（方法 1）和盐酸奈福泮注射液有关物质测定方法（方法 2），分别考察了样品在不同流动相（庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈系统和甲醇 - 水 - 三乙胺系统）和不同检测波长（215 nm 和 267 nm）下的样品杂质的检出情况。两种有关物质测定方法见表 1。

表 1 两种有关物质检测方法的比较

Tab 1 Comparison of the two related substance detection methods

项目	色谱柱	流动相	检测波长	溶剂	供试液质量浓度	记录时间	限度
方法 1：盐酸奈福泮	C18	庚烷磺酸钠溶液（取庚烷磺酸钠 2.02 g，加水 900 mL 使溶解，加三乙胺 2 mL，用稀磷酸调节 pH 值至 3.0，加水至 1000 mL）- 乙腈（70 ∶ 30）	215 nm	水	0.5 mg • mL^{-1}	主成分峰 2 倍保留时间	杂质和不得大于 1.0%
方法 2：盐酸奈福泮注射液	C18	甲醇 - 水 - 三乙胺（38 ∶ 62 ∶ 0.5），用冰醋酸调节 pH 值至 4.2	267 nm	流动相	1 mg • mL^{-1}	主成分峰 2 倍保留时间	杂质和不得大于 1.0%

2.2.2 渗透压摩尔浓度 现行标准中，未对渗透压摩尔浓度进行控制，为了评价该品种在临床用药的安全性，对该项目进行了考察和研究。

为了考察企业是否按处方投料，根据 4 家企业提供的处方分别配制参比样品，具体操作如下：

① A 企业：取盐酸奈福泮约 1 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加枸橼酸盐缓冲液（pH 6.2）3 mL，加注射用水适量使溶解并稀释至刻度，摇匀即得；② B 企业：称取盐酸奈福泮约 2 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加丙二醇 10.0 g，加注射用水适量使溶解并稀释至刻度，摇匀即得；③ C 企业：称取盐酸奈福泮约 1 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加 EDTA-2Na 0.01 g，丙二醇 3.0 g，加注射用水适量使溶解并稀释至刻度，摇匀即得；④ D 企业：称取盐酸奈福泮约 2 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加丙二醇 6.0 g，加注射用水适量使溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

采用冰点下降法直接测定 60 批国抽样品和参比样品的渗透压摩尔浓度。精密量取 50 μL，每份样品平行测定 3 次，取平均值。

2.2.3　灭菌工艺与药品质量关系的考察　根据生产企业提供的工艺资料，该品种的最终灭菌方法均为湿热灭菌法，其中大多数采用流通蒸汽灭菌，也有的企业采用煮沸法灭菌。

本研究按“2.2.2”项下处方比例配制 4 家企业的样品，密封后置 100 ℃流通蒸汽中分别灭菌 15、20、30、60 min，即得流通蒸汽待测样品。选取 4 家企业的盐酸奈福泮注射液各 1 批，置于 121 ℃高压灭菌 15 和 30 min，即得热压待测样品。依照法定标准分别检查样品性状、pH、有关物质的变化，考察灭菌条件对药品质量的影响。

2.2.4　丙二醇的质量及风险检测　在本次抽样的 4 家企业中，B、C、D 企业在盐酸奈福泮注射液的处方中都添加了丙二醇。照《中国药典》2020 年版四部丙二醇（供注射用）的检验方法 [5] 对 3 家企业制剂中丙二醇的含量进行测定，同时，按此标准对高风险溶剂二甘醇、乙二醇进行检测，考察是否有替用的情况发生；建立了 GC 法测定 1，3- 丙二醇，检查制剂中是否有 1，2- 丙二醇和 1，3- 丙二醇混用的行为存在。

检测 1，3- 丙二醇的色谱条件为：选用 DB WAXETR（30 m×0.32 mm，0.25 μm）色谱柱；检测器为 FID；柱温：100 ℃，保持 4 min，以 50 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 200 ℃，保持 8 min；进样口温度 240 ℃；检测器温度 280 ℃；载气 N_2，流速 3 mL • min^{-1}；氢气 50 mL • min^{-1}；空气 400 mL • min^{-1}。精密称取 1，2- 丙二醇和 1，3- 丙二醇适量，加无水乙醇稀释至质量浓度各约为 1 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，同法制成丙二醇质量浓度约为 1 mg • mL^{-1} 的样品溶液，分别进样 1 μL 测定。

2.2.5　药用玻璃金属元素浸出量　建立 ICP-MS 方法，选取 Sc、Y、In、Bi 元素为内标，以标准曲线法测定盐酸奈福泮注射液安瓿玻璃瓶中的 Li、B、Al、Si、K、Ca、Ti、V、Cr、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Cd、Sb、Ba、Hg、Pb，共 20 种元素杂质。

检测条件：真空度为 1.41×10^{-5} Pa；检测器模拟级电压：1626 V；脉冲级电压：990 V；射频功率：1550 W；雾化室温度：23.8 ℃。

2.3　统计学处理

应用 Graphpad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果与讨论

3.1　法定检验结果

依据现行质量标准检验，60 批次样品全部合格，合格率为 100%，各企业样品的 pH 值、有关物质、含量测定结果见表 2。其中，A 企业的样品中有 3 批有关物质的最大单杂达到了 0.15% ～ 0.20%，与酸和氧化破坏试验中相对保留时间为 0.9 和 1.1 的杂质一致。

表 2　国抽样品法定检验结果

Tab 2　Legal inspection of national evaluation samples

企业名称	pH 值	有关物质杂质总量 /%	含量 /%
A	5.6±0.1	0.05±0.1	100.4±0.8
B	5.5±0.1	0.03±0.02	100.3±0.4
C	5.2	0.08	103.2
D	5.3	0.10	100.6

分别对 A 企业和 B 企业样品上述 3 项结果进行统计分析，结果两家企业有关物质中测得的杂质总量无统计学差异，而 pH 值、含量结果的差异有统计学意义（$P<0.001$）（见图 1）。因 C、D 两家生产企业抽取批次太少，故未进行统计。相关性研究结果表明，本品 pH 值与有关物质（杂质总量）无相关性。

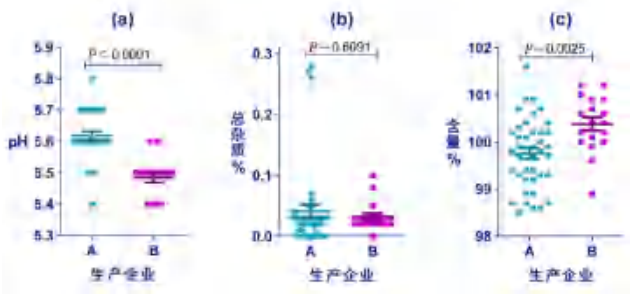


图 1　2 个企业样品法定检验结果统计分析

Fig 1　Statistical analysis of legal inspection of samples from the two enterprises

3.2　探索性研究

3.2.1　有关物质检测方法的考察　《中国药典》收载的盐酸奈福泮和盐酸奈福泮注射液的有关物质检测方法均为 HPLC 法，但色谱条件不尽相同。本研究通过考察两种测定方法的差异，拟选择或者建立更适合测定有关物质的方法，为日后药典方法的统一提供参考。

因有关物质采用不加校正因子的主成分对照法定量，所以需要对盐酸奈福泮和杂质分别考察。以 PDA 为检测器，研究二者在两个方法流动相中的色谱行为，结果显示，盐酸奈福泮的最大吸收波长不尽相同：方法 1 中为 215 nm 和 267 nm，方法 2 中为 230 nm 和 267 nm；杂质均在 230 nm 和 260 ～ 280 nm 内有最大吸收，杂质的检出数量基本相当，但峰纯度结果显示，方法 1 流动相中主峰包含杂质，条件需进一步优化，因此，选定方法 2 的流动相（甲醇 - 水 - 三乙胺）做进一步研究。

选定方法 2 流动相，考察检测波长为 215、230 和 267 nm 时的杂质检出量。结果在 230 nm 下，色谱图基线波动明显，不利于杂质的定量；267 nm 波长下检出的杂质总量较 215 nm 下的结果大 10% 以上（见表 3）。

综上，方法 1 和方法 2 测定有关物质结果有较大差异，方法 2 测得的结果更大，从某种意义上讲，该标准（即盐酸奈福泮注射液的法定检验方法）更为严格，该方法也更为合理。基于质量源于设计（QbD）的理念，“下游产品质量水平的上限是上游产品质量水平的下限”，即制剂产品质量所能达到的最高水平受其所用原料药质量水平的限制，那么，原料与制剂产品也应统一至同一个评判标准。《中国药典》在起草该品种时，盐酸奈福泮原料和制剂的起草单位不同，建立的方法也不一致。因此，在后续的标准统一工作中，建议药典委员会能协调两种方法，以便能指导生产企业更有效地控制药物的质量，便于药监部门对该品种进行统一的评价和监督。

表 3　不同波长下有关物质杂质总量的测定结果 (%)

Tab 3　Determination of total impurities of related substances at different wavelengths (%)

波长 /nm	自身对照法	归一化法
215	13.07	12.47
267	28.39	22.25

3.2.2　渗透压摩尔浓度　参比样品渗透压测定值与市售样品测定值基本相当，从一个侧面说明了国抽样品未添加处方外成分。国抽样品测定结果显示，A 企业的样品渗透压最低，40 批次样品的渗透压均值为 56；渗透压最高的样品为 B 企业的产品，测定均值为 1795，是 A 企业样品的 30 倍（见图 2）。以静脉滴注使用的氯化钠注射液的最小包装量（即 50 mL/0.45 g）对样品进行稀释后，则渗透压结果均在人体耐受范围内，符合临床用药的安全要求。

分析造成渗透压相差较大的原因，可能与处方中加入的丙二醇量的不同有关。为考察丙二醇与渗透压的相关性，将 4 家企业处方丙二醇的百分含量对其渗透压测定的结果进行线性回归，结果两者成正相关，相关系数为 0.998。为佐证该结果，分别配制 3%、6% 和 10% 的丙二醇溶液，依法测定渗透压，结果 3 个溶液的渗透压分别为 396、894、1603 mOsmol•kg^{-1}，相关系数为 0.9997，与样品的相关性一致，由此可见，丙二醇在增大盐酸奈福泮注射液渗透压上起了重要的作用。

渗透压是注射液安全性的重要指标之一，《中国药典》2020 年版四部通则 0632 中规定 [5] “在制备注射液、眼用液体制剂等药物制剂时，必须关注其渗透压。处方中添加了渗透压调节剂的制剂，均应控制其渗透压摩尔浓度”。现行的质量标准中未对渗透压摩尔浓度进行测定和限定，故大部分生产企业在生产过程中未对该项目进行控制。该品种说明书中表述的使用方法为“肌（内）注（射）或静（脉）注（射）：一次 20 mg”，即 1 ～ 2 mL。肌内注射可耐受 0.45% ～ 2.7% 的氯化钠溶液（相当于 0.5 ～ 3 个等渗度的溶液，即渗透压在 143 ～ 858 mOsmol•kg^{-1}），检验结果显示只有 C 企业的 1 批样品在此范围，按此限度，国抽样品的合格率为 2%。静脉注射低渗溶液有溶血的潜在危险；高渗溶液可使人体产生不适 [6]。因此，生产企业应关注处方对渗透压的影响，对于低渗企业，应考察是否有必要增加渗透压调节剂；对于使用丙二醇作为助溶剂的企业，则应考察丙二醇的增渗影响，调整该溶剂的添加量至合适的百分比，以减少人体的不适感和潜在危险 [7]。

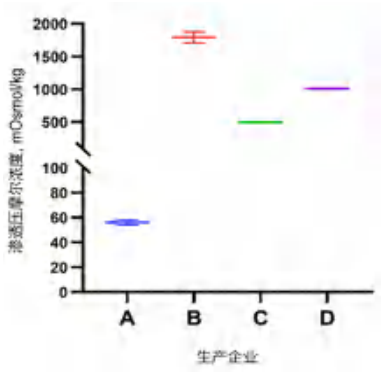


图 2　盐酸奈福泮注射液渗透压结果分布趋势图

Fig 2　Distribution trend of osmotic pressure results of nefopam hydrochloride injection

3.2.3　灭菌工艺与药品质量关系的考察　灭菌与保持药物稳定性是矛盾的两个方面，灭菌温度高、时间长，容易将微生物杀灭，但却可能对药物的稳定性不利。通过考察，盐酸奈福泮注射液在 100 ℃蒸汽灭菌前后的性状和有关物质没有明显变化，而 pH 值随着灭菌时间的延长，B、C、D 企业样品均有上升趋势，灭菌 30 min 以上时，pH 值上升速度变快。121 ℃高压灭菌前后样品的性状和有关物质也没有明显变化，但 4 家企业产品的 pH 值均有不同程度上升，灭菌 30 min 时，C 企业样品的含量降低了 2.5%，其他企业的含量没有明显的变化。结果见图 3。

本项研究结果表明，盐酸奈福泮注射液采用 100 ℃湿热灭菌时，灭菌时间不超过 30 min 为宜。对于质量稳定的生产企业，可以考虑采用灭菌效果更好的高压灭菌。

3.2.4　丙二醇的质量及风险检测　B、C、D 企业测得的丙二醇含量分别为 10.3%、3.1% 和 6.0%，与处方量一致，说明生产企业能够严格按照处方

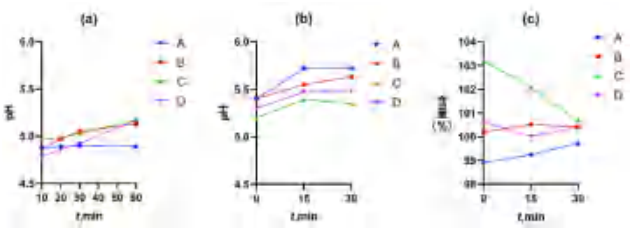


图 3 盐酸奈福泮注射液在不同灭菌工艺下的稳定性

Fig 3 Stability of nefopam hydrochloride injection under different sterilization processes

（a）. 100 ℃蒸汽灭菌 pH 的变化（change of pH under steam sterilization at 100 ℃）；（b）. 121 ℃高压灭菌 pH 的变化（change of pH under 121 ℃ autoclave）；（c）. 121 ℃高压灭菌含量的变化（change of content under 121 ℃ autoclave）

投料，工艺过程控制较好。

1，3-丙二醇的外观与 1，2-丙二醇相似，但是不被允许用于注射剂。3 个生产企业的产品中均未检出 1，3-丙二醇，不存在 1，2-丙二醇和 1，3-丙二醇混用或错用的现象，符合药品质量管理要求。

二甘醇对人类及动物均具毒性，因售价较外观近似的丙二醇便宜，因此曾有人以二甘醇冒充丙二醇出售，发生了诸如“磺胺酏剂”“齐二药”事故。乙二醇为无色无臭的黏稠液体，属低毒类试剂。检测结果显示，样品中均未检出二甘醇和乙二醇，说明各生产企业能严把辅料质量关，保证产品安全可控、用药安全。

3.2.5 药用玻璃金属元素浸出量 注射液是直接接触人体组织或进入血液系统的制剂，按照药品的给药途径及其与包装材料发生相互作用的可能性分级，被列为可能与包装材料发生相互作用风险程度较高的制剂[8]。试验依据《化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则（试行）》[9]（以下简称“指导原则”），建立了测定盐酸奈福泮注射液药用玻璃的金属元素浸出量的方法，结果见表 4。

表 4 盐酸奈福泮注射液中的 20 种元素含量试验结果 (μg/ 支)

Tab 4 Content of 20 elements in nefopam hydrochloride injection (μg/piece)

企业（批号）	Li	B	Al	Si	K	Ca	Ti	V	Cr	Fe
A（1509147）	＜ DL*	1.73	0.60	6.80	0.95	2.91	0.18	＜ DL*	0.12	0.90
B（1604344）	＜ DL*	1.32	0.18	11.90	0.37	2.75	0.06	＜ DL*	0.60	0.44
C（160818）	＜ DL*	1.74	0.65	10.40	0.89	3.00	0.12	＜ DL*	0.38	0.95
D（1611012）	＜ DL*	0.53	0.14	7.90	0.39	2.27	0.05	＜ DL*	0.40	0.44

企业（批号）	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Sb	Ba	Hg	Pb
A（1509147）	＜ DL*	0.02	＜ DL*	0.54	0.10	0.02	0.03	0.38	0.01	0.02
B（1604344）	＜ DL*	0.01	＜ DL*	0.10	0.11	0.01	0.01	0.11	0.01	0.01
C（160818）	＜ DL*	0.02	＜ DL*	0.27	0.07	0.02	0.03	0.26	0.01	0.03
D（1611012）	＜ DL*	0.01	＜ DL*	0.52	0.04	0.01	0.01	0.09	0.01	0.01

注（Note）：*检测限 DL（pb）相当于 0.15 ng/ 支 [*Detection limit DL（pb）is equivalent to 0.15 ng/ piece]。

本制剂规格为每支 20 mg，用法为：“一次 1 支，必要时每 3 ～ 4 h 一次。”最大日剂量为每日 8 支，根据玻璃容器中金属元素的人每日允许暴露量（PDE），计算分析评价阈值（AET），AET ＝ PDE/ 每日最大用量[9-10]，结果表明除 Si、Ti 外，其余元素杂质的含量均远小于其 AET，各企业产品均在安全限度范围内（见表 5）。

表 5 盐酸奈福泮注射液 20 种元素分析评价阈值 (AET) 结果

Tab 5 AET of 20 elements in nefopam hydrochloride injection

金属元素	PDE/（μg・d^{-1}）	AET/（μg/ 支）	金属元素	PDE/（μg・d^{-1}）	AET/（μg/ 支）	金属元素	PDE/（μg・d^{-1}）	AET/（μg/ 支）
Pb[9]	5	0.6	Sb[9]	90	11.2	V[10]	10	1.2
Co[9]	5	0.6	Ba[9]	700	87.5	K*	1300	162.5
Cd[9]	2	0.2	Fe[9]	1300	162.5	Ca*	1300	162.5
As[9]	15	1.9	Zn[9]	1300	162.5	Cu[10]	300	37.5
Li[9]	250	31.2	Cr[9]	1100	137.5	B*	1300	162.5
Hg[10]	3	0.4	Ni[10]	20	2.5	Al*	1300	162.5
Si	/		Ti	/				

注（Note）：*表示此元素在 ICH 中分类为其他元素，未建立 PDE，参考同类元素 Fe、Zn 在指导原则中的限度，“/” 表示相关标准中未规定 PDE，故无 AET 结果（Means this element is classified as other elements in ICH，the PDE has not been established. Please refer to the limits of Fe and Zn in the Technical Guidelines，“/” indicates that PDE is not specified in relevant standards，so there is no AET result）。

4 结论

本次盐酸奈福泮注射液抽验，采取法定检验和探索性研究相结合的方式，从质量标准、影响产品质量和安全的重要因素方面进行综合分析和评价。结果显示，产品整体质量良好，现行质量标准基本可以控制产品质量，未发现违规生产和

非法添加的情况，制剂的处方是否合理是本品质量的主要因素。建议生产企业关注处方的合理性，保证产品的渗透压在人体的耐受范围内，以便降低安全风险；同时，药监部门应统一盐酸奈福泮原料与制剂的有关物质方法，使原料与注射液的杂质控制方法相协调，限度相匹配。

参考文献

[1] 邹晓红，冯顺，冷艳平 . 盐酸奈福泮合成工艺的改进 [J]. 中国现代应用药学，2006，23（5）：367-368.

[2] 赵煜毅，田新民，夏建光 . 盐酸奈福泮在硬膜外术后镇痛中的应用 [J]. 临床麻醉学杂志，2004，20（5）：306.

[3] 国家食品药品监督管理局 . 国产药品 [EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/datasearch/search-result. html.

[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1207.

[5] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：638.

[6] 崔福德 . 药剂学 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2002：79.

[7] 张顺芝，袁立，何鸽飞，等 . 我院药品质量问题分析及药品质量问题报告系统的探索 [J]. 中南药学，2018，16（2）：242-246.

[8] 马玉楠，马磊，蒋煜 . 药品与包装材料相容性研究相关指导原则解读——试验结果的评估 [J]. 中国新药杂志，2014，23（8）：940-943.

[9] 国家药品监督管理局 . 化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则（试行）[EB/OL]. https：//www. cnppa. org/uploadfile/2015/0806/20150806081125705. pdf.

[10] 国际人用药品注册技术协调会 . ICH Q3D R1 version guideline for elemental impurities [EB/OL]. https：//database. ich. org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322. pdf.

（收稿日期：2022-04-05；修回日期：2022-07-10）

UPLC-MS/MS 测定叶下珠中氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺的残留量

李洪权[1]，柏玉冰[2]，鲁翠香[1]，赵东鲲[1]，陈珉珉[3]，陈晓燕[1*]（1. 长沙市第三医院药学部，长沙　410035；2. 湖南中医药大学第一附属医院药学部，长沙　410007；3. 株洲市食品药品检验所 食品分析检验研究室，湖南　株洲　412000）

摘要：目的　建立起高效液相色谱 - 串联质谱法测定叶下珠中氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺的残留量。**方法**　叶下珠粉末经乙腈超声提取，采用 Welch Xtimate C18（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈 - 水为流动相等度洗脱，流速 0.5 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，进样体积 5 μL。采用电喷雾离子源进行正离子模式扫描。**结果**　氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺均在 1 ～ 100 ng•mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，检测限分别为 0.3 μg•kg^{-1} 和 1.0 μg•kg^{-1}，定量限分别为 1.0 μg•kg^{-1} 和 3.0 μg•kg^{-1}。氯虫苯甲酰胺的含量范围为 1.1 ～ 4.4 μg•kg^{-1}，氟虫双酰胺未检出。**结论**　该方法高效、准确，可用于叶下珠中氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺残留量的测定。

关键词：叶下珠；氯虫苯甲酰胺；氟虫双酰胺；高效液相色谱 - 串联质谱法

中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2621-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.028

Determination of chlorantraniliprole and flubendiamide residues in *Phyllanthus urinaria* L. by UPLC-MS/MS

LI Hong-quan[1], BAI Yu-bing[2], LU Cui-xiang[1], ZHAO Dong-kun[1], CHEN Min-min[3], CHEN Xiao-yan[1*] (1. *Department of Pharmacy, The Third Hospital of Changsha, Changsha* 410035; 2. *Department of Pharmacy, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410007; 3. *Laboratory of Food Testing & Analysis, Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou Hunan* 412000)

基金项目：湖南省市场监督管理局科技计划项目（No. 2020KJJH42）；《湖南省中药饮片炮制规范》（2010 年版）修订。

作者简介：李洪权，男，硕士，主要从事食品药品质量安全研究，email：1024495239@qq.com　*通信作者：陈晓燕，女，硕士，主任药师，主要从事药物合理应用研究，email：584523103@ qq.com

Abstract: Objective To determine chlorantraniliprole and flubendiamide residues in *Phyllanthus urinaria* L. by UPLC-MS/MS. **Methods** *Phyllanthus urinaria* L. powders were extracted by ultrasound with acetonitrile. Chromatographic separation was performed on a Welch Xtimate C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) with isocratic elution. The flow rate was 0.5 mL • min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ , and the injection volume was 5 μL. The mass spectrum was obtained by electrospray ionization under the positive ion mode. **Results** Chlorantraniliprole and flubendiamide showed good linearity at 1 ～ 100 ng • mL^{-1}. The limit of detection was 0.3 μg • kg^{-1} and 1.0 μg • kg^{-1}, respectively. The limit of quantitation was 1.0 μg • kg^{-1} and 3.0 μg • kg^{-1}. The content of chlorantraniliprole was 1.1 ～ 4.4 μg • kg^{-1}, while that of flubendiamide was not detected. **Conclusion** This method is highly efficient and accurate, which can be used for the determination of chlorantraniliprole and flubendiamide residues in *Phyllanthus urinaria* L..

Key words: *Phyllanthus urinaria* L.; chlorantraniliprole; flubendiamide; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

叶下珠为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草，性微苦，凉，归肝、脾经，具有清热、利湿、消肿等功效[1]。其主含成分为黄酮、鞣质、木质素及生物碱等，药理活性有护肝、抗肿瘤、抗菌、抗血栓等作用[2-3]。进一步对其研究领域进行分类，发现主要为化学成分[4-5]、药理活性[6-8]、质量控制[9-12]等方面，关乎其质量的农残检测未见报道。

氯虫苯甲酰胺（chlorantraniliprole，CAP）和氟虫双酰胺（flubendiamide，FLU），属酰胺型农药，对鳞翅目害虫的灭杀效果好、效期长[13-14]，但两者可在农作物、动物等人类食物来源中残留[15-17]，对人类健康产生潜在威胁。且两者的使用已经从蔬果向中药材原植物扩散，如铁皮石斛[18]、山楂[19]等。叶下珠作为全草类中药，在种植过程中易生鳞翅目虫害，使用 CAP、FLU 可能性较大，因此有必要对其进行检测。

目前，关于植物源性基质中 CAP、FLU 的检测方法主要有液相色谱法、液相色谱 - 串联质谱法等[20]，鉴于其残留量多为 10^{-9} 数量级[15-17]，需要高灵敏度检测器，本研究选择液相色谱 - 串联质谱法[21]测定叶下珠中 CAP 和 FLU 的残留量，为后期叶下珠质量控制奠定研究基础。

1 材料

1.1 仪器

电子天平（XSE 205DV，梅特勒托利多仪器有限公司），离心机（ST16R，赛默飞世尔科技有限公司），超声波仪（HNS-SY-150，北京恒奥德仪器仪表有限公司），三重四极杆质谱（QTRAP 4500，上海爱博才思分析仪器有限公司）。

1.2 试药

氯虫苯甲酰胺对照品（100 μg • mL^{-1}，批号：130555-201203）、氟虫双酰胺对照品（100 μg • mL^{-1}，批号：C13665000）（农业部环境保护科研监测所）。甲醇、乙腈（色谱纯，霍尼韦尔有限公司），丙酮、乙酸乙酯（分析纯，国药集团有限公司）。*N*-丙基乙二胺（PSA）、石墨化炭黑（GCB）、C18（分析纯，迪马科技有限公司）。

1.3 样品

从不同生产企业和事业单位收集叶下珠饮片 17 批，信息如表 1 所示。所有批次药材经株洲市食品药品检验所吴泽君主任药师鉴定为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草。样品存放于株洲市食品药品检验所中药材样品室。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS 方法建立

色谱条件：Welch Xtimate C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），流动相水 - 乙腈（65∶35），流速 0.5 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 5 μL。

质谱条件：电喷雾电离源，负离子扫描，多反应监测，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。其他质谱参数见表 2。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密量取质量浓度均为 100 μg • mL^{-1} 的 CAP 和 FLU 各 100 μL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇制成质量浓度均为 1 μg • mL^{-1} 的混合对照品储备液，并逐级稀释成质量浓度均为 1、5、10、20、50、100 ng • mL^{-1} 的混合对照品溶液。进

表 1　叶下珠样品信息

Tab 1　Samples information of *Phyllanthus urinaria* L.

序号	批号	产地	公司
1	20191001	河南	湖南馨恒堂中药科技有限公司
2	20191002	河南	湖南馨恒堂中药科技有限公司
3	20191003	河南	湖南馨恒堂中药科技有限公司
4	190901	湖南	湖南省弘华中药饮片有限公司
5	190902	湖南	湖南省弘华中药饮片有限公司
6	190903	湖南	湖南省弘华中药饮片有限公司
7	2019102604	四川	湖南然润堂中药有限公司
8	2019102605	四川	湖南然润堂中药有限公司
9	2019102606	四川	湖南然润堂中药有限公司
10	18051102	湖南	湖南中医药研究院
11	1808060462	湖南	湖南中医药大学第一附属医院
12	201912007	广西	湖南省博世康中医药有限公司
13	201912008	广西	湖南省博世康中医药有限公司
14	201912009	广西	湖南省博世康中医药有限公司
15	20042329-1	广西	湖南衡岳中药饮片有限公司
16	20042329-2	广西	湖南衡岳中药饮片有限公司
17	20042329-3	广西	湖南衡岳中药饮片有限公司

表 2　分析物质谱优化参数

Tab 2　Optimized mass parameters of analytes

化合物	离子对（*m/z*）（母离子 / 子离子）	碰撞能量 / V	去簇电压 / V	保留时间 / min
CAP	484.1/453.1	22	68	6.06
FLU	683.3/408.0	24	67	6.47

样测定的离子流色谱图如图 1A 所示。

2.2.2　供试品溶液　取试样 1.0 g（过四号筛），精密称定，置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈，加入 50 mg PSA-50 mg C18 净化剂，涡旋 10 s，超声 10 min，离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 有机滤膜，滤液转移至 15 mL 离心管，N_2 吹至近干，甲醇定容至 1 mL，待测。进样测定的离子流色谱图见图 1B。

2.3　线性关系考察

取“2.2.1”项下各浓度对照品溶液 5 μL 进样分析。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法计算标准曲线，得 CAP 方程为 $Y=1.076\times10^4X+430.59$，$r=0.9996$，线性范围为 1 ～ 100.0 ng•mL^{-1}，得 FLU 方程为 $Y=6330.5X-936.72$，$r=0.9999$，线性范围为 1 ～ 100.0 ng • mL^{-1}。

2.4　方法学验证

2.4.1　精密度试验　取同一对照品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，重复 6 次，记录 CAP 和 FLU 峰面积，计算两者峰面积 *RSD*。结果 CAP 和 FLU 峰面积 *RSD* 分别为 2.0%、2.3%，均小于 5%，表明仪器精密度良好。

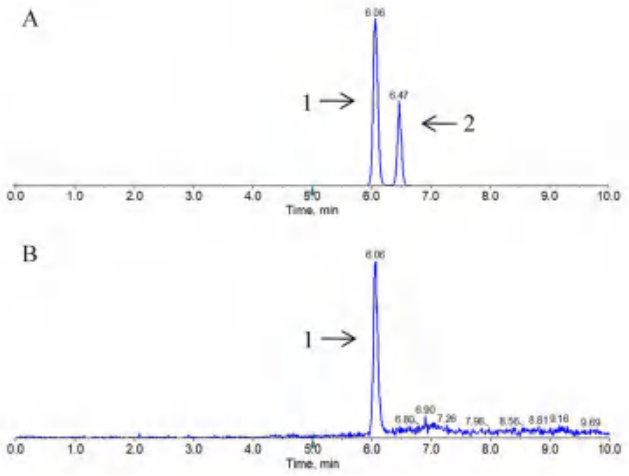


图 1　叶下珠混合对照品和样品中分析物离子流色谱图

Fig 1　Ion current chromatogram of *Phyllanthus urinaria* L. mixture reference and sample

A. 对照品（reference）；B. 样品（sample）；1. 氯虫苯甲酰胺（chlorantraniliprole）；2. 氟虫双酰胺（flubendiamide）

2.4.2　稳定性试验　取对照品溶液及供试品溶液（批号：18051102，各加入绝对量 5 ng 的 CAP 和 FLU，按“2.2.2”项下方法处理制得），于室温分别放置 0、2、4、8、12 h，进样测定，分别计算两者峰面积 *RSD*。对照品中两者峰面积 *RSD* 分别为 2.6%、2.8%，供试品中两者峰面积 *RSD* 分别为 2.7%、2.8%，均小于 5%，表明对照品及供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.3　重复性试验　精密称取样品 6 份（批号：18051102），加入绝对量 5 ng 的 CAP 和 FLU，按“2.2.2”项下方法处理，进样测定 CAP 和 FLU 峰面积，并分别计算两者 *RSD*。CAP 和 FLU 峰面积 *RSD* 分别为 3.2%、3.7%，均小于 5%，表明本试验方法重复性良好。

2.4.4　检测限和定量限　根据限量要求，对叶下珠进行加标回收试验，当添加 CAP 为某一浓度，定量离子信噪比 *S/N* ≈ 3，此时检出量为检测限；当添加 CAP 为某一浓度，定量离子信噪比 S/*N* ≈ 10，此时检出量为定量限。结果，CAP 的检测限和定量限分别为 0.3 μg • kg^{-1} 和 1.0 μg • kg^{-1}，FLU 的检测限和定量限分别为 1.0 μg • kg^{-1} 和 3.0 μg • kg^{-1}。

2.4.5　加样回收试验　取阴性样品 9 份（批号：18051102），约 1.0 g，精密称定，精密加入 CAP 和 FLU 混合对照品溶液，加入量分别为 2、5、10 ng，各 3 份。按“2.2.2”项下方法处理后进样测定，计算加样回收率。结果 CAP 平均回收率在 83.2% ～ 92.2%，*RSD* 在 1.2% ～ 1.9%；FLU 平均回收率在 83.8% ～ 92.9%，*RSD* 在 0.84% ～ 2.4%。

2.5 残留量测定结果

试验数据采用 multiquant 软件按外标法计算 CAP 和 FLU 的残留量，采用 Excel 2010 对数据进行整理，结果如表 4 所示。

表 4 样品中分析物检测结果 (n = 2，μg • kg^{-1})

Tab 4 Analytes in samples (n = 2，μg • kg^{-1})

批号	CAP	FLU	批号	CAP	FLU
20191001	2.5	未检出	18051102	未检出	未检出
20191002	2.2	未检出	1808060462	1.6	未检出
20191003	1.1	未检出	201912007	2.0	未检出
190901	2.6	未检出	201912008	1.8	未检出
190902	1.3	未检出	201912009	1.4	未检出
190903	1.8	未检出	20042329-1	1.8	未检出
2019102604	4.4	未检出	20042329-2	2.6	未检出
2019102605	1.9	未检出	20042329-3	1.7	未检出
2019102606	2.4	未检出			

3 讨论与结论

3.1 供试品最佳制备条件考察

目前在植物源性基质中，CAP 和 FLU 常用提取方式有涡旋震荡提取和超声提取 [22-24]，常用提取溶剂有乙腈、甲醇、丙酮、乙酸乙酯等 [23，25-26]，常用净化剂有 PSA、C18、GCB 等 [27-28]。因此，本研究基于以往报道，以 CAP 和 FLU 分子离子峰峰面积、回收率等因素为评价指标，对涡旋震荡、超声提取两种方式，乙腈、甲醇、乙酸乙酯、丙酮四种溶剂，50 mg PSA-50 mg C18、100 mg PSA、100 mg C18、10 mg GCB 四种净化剂，进行比较。结果，超声提取时 CAP 和 FLU 峰面积更快达到极值，为最佳提取方法；乙腈提取时，CAP 和 FLU 峰面积值更大，为最佳提取溶剂；采用 50 mg PSA-50 mg C18 净化时，CAP 和 FLU 回收率高，提取液颜色浅，净化后离心管壁上杂质少，净化效果更佳，为最佳净化剂。

另外，本研究还比较了不同提取时间（5、10、20、30 min），不同提取体积（5、10、20 mL）对提取效果的影响，结果发现，CAP 和 FLU 峰面积均在提取 10 min 时达到极值，为最佳提取时间；在加入 10 mL 乙腈时，CAP 和 FLU 峰面积值均达到上限，为最佳提取体积。

3.2 最佳色谱条件考察

本研究以 CAP 和 FLU 的分子离子峰的保留性和峰形、峰面积等因素为评价指标，比较了两种不同型号 C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）（Welch Xtimate 和 Welch Utimate AQ）、两种不同流动相组成（甲醇 - 水和乙腈 - 水）、两种不同的洗脱模式（等度和梯度）、三种不同的流速（3、5、7 μL • min^{-1}）对色谱峰的影响。以确定最佳色谱条件。

结果，相对于 Welch Utimate AQ 柱，Welch Xtimate 柱保留性强，峰形对称，为最佳色谱柱；流速为 5 μL • min^{-1} 时比 7 μL • min^{-1}，CAP 和 FLU 离子化均更充分、峰面积更大，比 3 μL•min^{-1}，程序时间短、效率高；相对于甲醇 - 水，流动相组成为乙腈 - 水时，CAP 和 FLU 峰宽均更窄，为最佳组成；另外，洗脱模式影响程度低，为操作简便，本研究选择等度洗脱。

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，选择正离子模式；去簇电压和碰撞能量根据信号强度曲线，选择各成分分子离子峰信号最强时所示数值；离子源温度、电喷雾电压、气帘气及离子源气等参数为仪器默认值。

3.4 结果分析及评价

本研究共收集样品 17 批次，其中 CAP 检出 16 批次，检出率为 94.1%，检出值范围为 1.1 ～ 4.4 μg • kg^{-1}，平均值为 2.07 μg • kg^{-1}；FLU 均未检出。以含 CAP 最高值批次叶下珠为例，当服用最大剂量为 30 g 时 [1]，CAP 的日摄入量为 0.132 μg，仍远小于限值 2.34 mg（根据 GB 2763-2021 所规定限量值及我国人均体质量 63 kg 推算 [29]），理论上，未达至毒剂量。综上，虽然 FLU 未检出，且 CAP 残留量低，但 CAP 残留率高，情况仍不容忽视。

4 总结

本研究首次建立了测定叶下珠中 CAP 和 FLU 的 UPLC-MS/MS 法，可为后期叶下珠质量控制提供参考。

参考文献

[1] 湖南省市场监督管理局 . 湖南省中药饮片炮制规范 [M]. 长沙：湖南科学技术出版社，2010：377.

[2] 林环环 . 叶下珠的现代研究及临床应用 [J]. 海峡药学，2019，31（7）：246-247.

[3] 程艳刚，裴妙荣，孔祥鹏，等 . 叶下珠化学成分和药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2016，18（4）：238-242.

[4] Du G，Man X，Yu S，et al. *Phyllanthus urinaria*：a potential phytopharmacological source of natural medicine [J]. Int J Clin Exp Med，2018，11（7）：6509-6520.

[5] 杨孟妮，张慧，刘娟，等 . 叶下珠化学成分研究 [J]. 中草药，2016，47（20）：3573-3577.

[6] Liu Y，Li SM. Extraction optimization and antioxidant activity of *Phyllanthus urinaria* polysaccharides [J]. Food Sci Technol，2020，41（1）：91-97.

[7] 闫世玉，许立伟，黄彩图，等 . 叶下珠水提物通过 NF-κB 信号通路改善脂多糖诱导的大鼠神经炎症模型的认知功能障碍 [J]. 中南药学，2021，19（4）：627-631.
[8] 杜欣芸，李常青，陈滨，等 . 叶下珠复方Ⅱ号对肝癌 huh7 细胞增殖、凋亡与自噬的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（2）：48-54.
[9] Qin OY，Yang HL，Zhu W. Optimization of corilagin and geraniin extraction from *Phyllanthus urinaria* L. by response surface methodology [J]. Chiang Mai J Sci，2020，47（3）：513-529.
[10] Zhang Z，Sun Z，Ye Y，et al. Determination of main compositions in *Phyllanthus urinaria* and its effects on CYP450 in rats [J]. Curr Pharm Anal，2019，16（5）：520-528.
[11] Xiao J，Xu X，Wang F，et al. Analysis of exposure to pesticide residues from traditional Chinese medicine [J]. J Hazard Mater，2019，365（5）：857-867.
[12] 杨婉珍，康传志，纪瑞锋，等 . 中药材残留农药情况分析及其标准研制的思考 [J]. 中国中药杂志，2017，42（12）：2284-2290.
[13] 于居龙，束兆林，张国，等 . 氯虫苯甲酰胺拌种对稻纵卷叶螟的防治效果及安全性评价 [J]. 农药学学报，2019，21（3）：300-308.
[14] 王嘉冰，徐智文，薛羿，等 . 3 种内吸性杀虫剂对光肩星天牛幼虫的林间防治效果 [J]. 北京林业大学学报，2017，39（7）：62-68.
[15] Zhang JM，Chai WG，Wu YL. Residues of chlorantraniliprole in rice field ecosystem [J]. Chemosphere，2012，87（2）：132-136.
[16] 刘伶俐，徐飞良，黄向荣，等 . 高效液相色谱法同时测定水产品中 4 种酰胺类农药残留 [J]. 湖南师范大学自然科学学报，2021，44（3）：68-73.
[17] Malhat FM. Determination of chlorantraniliprole residues in grape by high-performance liquid chromatography [J]. Food Anal Method，2012，5（6）：1492-1496.
[18] 许振岚，陈丽萍，徐明飞，等 . 氯虫苯甲酰胺和吡唑醚菌酯在铁皮石斛中的残留及消解动态 [J]. 农药学学报，2018，20（2）：223-231.
[19] 付岩，王全胜，张亮，等 . 氯虫苯甲酰胺在山楂中的残留行为及膳食暴露风险评估 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（12）：4735-4741.
[20] 丁惠，刘田园，程素盼，等 . 中药材中农药残留及其分析检测研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（10）：168-172.
[21] 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.
[22] 马婧玮，马欢，安莉，等 . QuEChERS- 高效液相色谱 - 串联质谱法测定主要谷物和油料作物中氯虫苯甲酰胺的残留 [J]. 农药学学报，2018，20（1）：129-134.
[23] 朱建华，赵莉 . 液相色谱串联质谱法测定果蔬中的唑虫酰胺、氟啶虫酰胺、氯虫苯甲酰胺及氟虫双酰胺残留 [J]. 分析测试学报，2011，30（6）：646-650.
[24] 林毅楠，黄美玲，王海鸣，等 . 液相色谱串联质谱法测定茶叶中氯虫苯甲酰胺残留量 [J]. 食品安全质量检测学报，2019，10（20）：7024-7030.
[25] 王点点，陈源，宋宁慧，等 . 超高效液相色谱法测定稻田土壤及水中的噻虫啉与氟虫双酰胺残留 [J]. 分析测试学报，2013，32（1）：138-142.
[26] 段劲生，王梅，董旭，等 . 氯虫苯甲酰胺在水稻及稻田环境中的残留动态 [J]. 植物保护，2016，42（1）：93-98.
[27] 黄学者，崔宗岩，葛娜，等 . QuEChERS- 气相色谱 - 串联质谱法高通量筛查植物源中药材中 460 种农药残留 [J]. 农药学学报，2021，23（4）：754-770.
[28] 李家春，伍静玲，秦建平，等 . 基于 QuEChERS 法 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法的 5 种中药材中 35 种有机磷农药残留量的快速分析 [J]. 药物分析杂志，2016，36（1）：122-128.
[29] 付岩，王全胜，张亮，等 . 氯虫苯甲酰胺在山楂中的残留行为及膳食暴露风险评估 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（12）：4735-4741.

（收稿日期：2022-04-09；修回日期：2022-06-22）

一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种成分的含量

陈江平，余欣彤，黎桃敏，罗毓，张兰兰，林嘉明，孙冬梅*（广东一方制药有限公司，广东省中药配方颗粒企业重点实验室，广东 佛山 528244）

摘要：目的 建立一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种香豆素类成分的含量。**方法** 采用 UPLC 法，色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以乙腈 -0.1% 乙酸为流动相，梯度洗脱，检测波长为 300 nm，流速为 0.35 mL·min^{-1}，柱温为 35 ℃。以欧前胡素为内参物，建立其与水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素的相对校正因子，考察其耐用性，计算 6 种成分含量，并与外标法的含量测定结果比较。**结果** 在各自线性范围内，水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素的相对校正因子分别为 1.22、1.52、0.79、3.20、1.05；在不同实验条件下相对校正因子耐用性良好，14 批白芷配方颗粒的一测多评法与外标法测定结果无显著差异。**结论** 建立的一测多评法准确可行，可为白芷配方颗粒多指标成分质量评价提供参考。

关键词：白芷配方颗粒；一测多评；香豆素；相对校正因子；欧前胡素；含量测定；外标法
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2626-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.029

Simultaneous determination of 6 components in Angelicae dahurica Radix formula granules by quantitative analysis of multi-components by single marker method

CHEN Jiang-ping, YU Xin-tong, LI Tao-min, LUO Yu, ZHANG Lan-lan, LIN Jia-ming, SUN Dong-mei* (*Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd, Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective To determine 6 components in Angelicae dahurica Radix formula granule by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method. **Methods** HPLC was performed on an Agilent ZORBAX SB-C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.1% acetic acid as the mobile phase by gradient elution. The detection wavelength was 300 nm, the flow rate was 0.35 mL·min^{-1}, and the column temperature was 35 ℃. Imperatorin was used as the internal standard, the relative correction factors (RCFs) of oxypeucedanin, byakangelicin, bergapten, phellopterin, and isoimperatorin were established, and the durability was determined. The contents of 6 components were calculated and compared with those determined by the external standard method. **Results** The RCFs of oxypeucedanin, byakangelicin, bergapten, phellopterin, and isoimperatorin were 1.22, 1.52, 0.79, 3.20 and 1.05. The repeatability and durability of RCFs were good under different experimental conditions, and the determination results of 14 batches of Angelicae dahurica Radix formula granule samples by QAMS method and external standard method were not significantly different. **Conclusion** The method is accurate and feasible, which can provide reference for the quality evaluation of multi-index components of Angelicae dahurica Radix formula granule.

Key words: Angelicae dahurica Radix formula granule; quantitative analysis of multi-components by single marker; coumarin; relative correlation factor; imperatorin; content determination; external standard method

基金项目：佛山市“新型冠状病毒感染的肺炎”应急科技公关专项（No.2020001000206）。
作者简介：陈江平，男，主要从事中药制剂工艺与质量控制研究，email：952525676@qq.com *通信作者：孙冬梅，女，硕士，主任中药师，主要从事中药新药工艺开发及质量研究，email：1471237855@qq.com

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *Angelica dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. var. *formosana*（Boiss.）Shan et Yuan 的干燥根，味辛，性温，归胃、大肠、肺经[1]。白芷始载于《神农本草经》，列为中品，具有解表散寒、祛风止痛、通宣鼻窍、燥湿止带、消肿排脓的功效[2-3]。白芷中的主要药效成分为香豆素类和挥发油类等，临床应用广泛，主要用于治疗风寒感冒、鼻塞流涕、眉棱骨痛、赤白带下、痈疽疮疡、湿盛久泻等病症[4-6]。

白芷配方颗粒由白芷药材炮制成饮片后，经现代制药技术提取、浓缩、干燥、制粒、包装等工艺精制而成，具有药性强、药效好、免煎煮、服用方便等优势，临床应用广泛。有关白芷药材或饮片中欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯等一种或多种香豆素类成分含量测定的报道较多，且主要采用外标法进行测定[7]。采用外标法（ESM）进行多指标含量测定时，往往需要较多成分作为对照品，而水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素分离纯度难度较大，对照品不易获得，且价格相对昂贵，因此限制了外标法在白芷配方颗粒多指标质量控制和评价中的应用。一测多评法（QAMS）是利用中药有效成分内在函数关系和比例关系，以样品中对照品廉价易得的常见成分为内参物，计算出其他待测成分间的相对校正因子，实现多个待测成分的同步测定，具有检测成本低、分析效率高等优点[8-9]。本研究以欧前胡素为内参物，建立同时测定白芷配方颗粒中 6 种化学成分的 QAMS，为白芷配方颗粒全面质量控制与评价提供新的分析模式，对白芷配方颗粒的质量控制及后续研究具有一定的现实意义。

1 仪器与试药

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪（美国沃特世公司）；Agilent 1290 型超高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）；Thermo Vanquish 型超高效液相色谱仪（美国赛默飞世尔科技公司）；XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平（瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；Milli-Q Direct 型超纯水系统（德国默克股份有限公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

水合氧化前胡素对照品（批号：CFS201902，纯度≥ 98.0%）、珊瑚菜素对照品（批号：CFS201901，纯度≥ 98.0%）（武汉天植生物技术有限公司），白当归素（批号：wkq160314014，纯度≥ 98.0%，四川省维克奇生物科技有限公司）；佛手柑内酯（批号：DST210409-012，纯度≥ 99.87%，成都德思特生物技术有限公司）；欧前胡素（批号：110826-201918，纯度：99.0%）、异欧前胡素（批号：110827-201802，纯度：99.6%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈、乙酸（色谱级，德国默克股份有限公司）；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。14 批白芷配方颗粒（编号 S1 ～ S14）均由广东一方制药有限公司制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[10]

采用 Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），流动相为乙腈（A）-0.1% 乙酸溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5.5 min，15% → 28%A；5.5 ～ 7.0 min，28% → 80%A；7.0 ～ 9.5 min，40%A；9.5 ～ 15.5 min，40% → 65%A；15.5 ～ 15.51 min，65% → 15%A；15.51 ～ 18.00 min，15%A）；流速 0.35 mL•min^{-1}；柱温 35 ℃；检测波长 300 nm；进样量 1 μL。

2.2 对照品溶液制备

分别精密称取水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解并定容至刻度，配制成质量浓度分别为 51.06、32.24、10.19、29.75、34.45、6.67 μg • mL^{-1} 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备

取白芷配方颗粒适量，研细，取约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 20 mL，称重，超声处理（功率 300 W，频率 50 kHz）20 min，放冷，再称重，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别精密吸取混合对照品溶液、空白溶剂与供试品溶液（编号：S5），进样测定，色谱图见图 1。结果色谱图基线稳定，峰形对称，分离度较好，供试品溶液与混合对照品溶液在相同保留时间处有相应色谱峰，空白溶剂无明显干扰，表明该方法专属性良好。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品储备液 0.5、1.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，分别置于 10、10、5、5、5、5、5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成系列质量浓度的混合对照品溶液，进样测定，记录色谱图，以对照品质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标（X），以峰面积为纵坐标（Y），作线性回归，结果见表 1。可知 6 种成分在相应浓度范围内与峰面积线性关系良好。

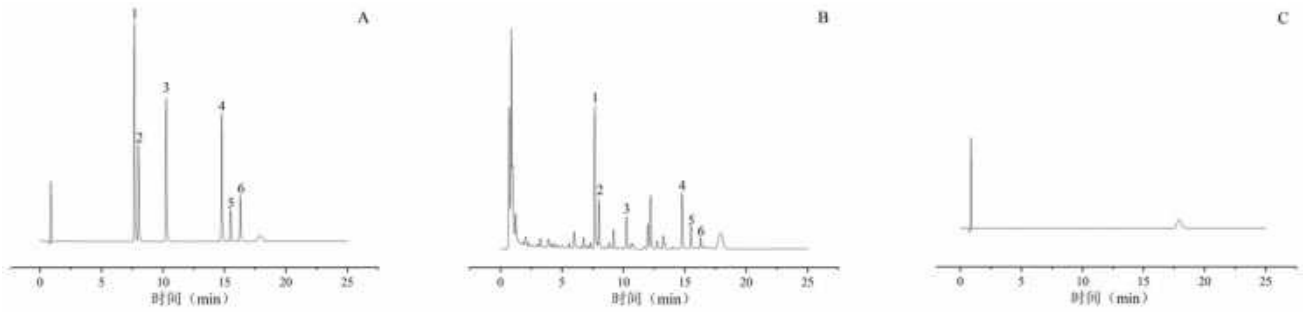


图 1 专属性考察 UPLC 图

Fig 1 UPLC chromatogram of specific investigation

A. 混合对照品（mixed reference）；B. 供试品（sample）；C. 空白溶剂（blank solvent）；1. 水合氧化前胡素（oxypeucedanin）；2. 白当归素（byakangelicin）；3. 佛手柑内酯（bergapten）；4. 欧前胡素（imperatorin）；5. 珊瑚菜素（phellopterin）；6. 异欧前胡素（isoimperatorin）

表 1 6 种成分线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 6 components

组分	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
水合氧化前胡素	$Y = 5840.5X + 975.65$	0.9994	2.55 ～ 51.06
白当归素	$Y = 4538.6X + 345.33$	0.9994	1.61 ～ 32.24
佛手柑内酯	$Y = 8307.0X + 159.24$	0.9992	0.51 ～ 10.19
欧前胡素	$Y = 6444.3X + 813.93$	0.9998	1.48 ～ 29.75
珊瑚菜素	$Y = 4424.1X + 684.30$	0.9997	1.72 ～ 34.45
异欧前胡素	$Y = 5996.6X + 124.86$	0.9997	0.33 ～ 6.67

2.4.3 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，计算水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素峰面积的 *RSD*，结果分别为 0.48%、0.44%、0.44%、0.44%、0.43%、0.46%，均小于 3.0%，6 种化学成分相对于欧前胡素的相对保留时间（RRT）*RSD* 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取白芷配方颗粒（编号：S5）6 份，每份约 0.2 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素含量的 *RSD*，结果分别为 2.0%、2.1%、2.1%、1.9%、2.1%、2.4%，均小于 3.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取白芷配方颗粒（编号：S5）约 0.2 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素峰面积的 *RSD*，结果分别为 1.4%、1.5%、1.5%、1.3%、1.8%、1.9%，均小于 3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收试验 取已知含量的白芷配方颗粒（编号：S5）适量，研细，每份约 0.1 g，共 9 份，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别按已知含量的 50%、100%、150% 精密加入混合对照品溶液（水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素质量浓度分别为 91.63、37.73、19.87、54.95、51.55、5.88 μg • mL^{-1}），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果 6 种成分的平均加样回收率在 96.45% ～ 103.36%，*RSD* 均小于 3.0%，表明该方法的准确性较好。

2.5 相对校正因子的确定

取“2.2”项下混合对照品溶液，进样测定，计算各相对校正因子（RCT）。公式为 $f_{s/i} = f_i/f_s = (C_i/A_i)/(C_s/A_s) = (C_i \times A_s)/(C_s \times A_i)$ [11-13]，式中 A_s 为内参物 S 峰面积，C_s 为内参物 S 浓度，A_i 为某待测成分 *i* 峰面积，C_i 为某待测成分 *i* 浓度。以欧前胡素（d）为内参物，根据公式分别计算水合氧化前胡素（a）、白当归素（b）、佛手柑内酯（c）、珊瑚菜素（e）、异欧前胡素（g）的相对校正因子，结果见表 2。

表 2 6 种成分的相对校正因子

Tab 2 Relative correction factors of 6 components

线性溶液	f（a/d）	f（b/d）	f（c/d）	f（e/d）	f（g/d）
1	1.25	1.54	0.79	3.24	1.04
2	1.18	1.44	0.78	3.08	0.99
3	1.21	1.52	0.76	3.15	1.05
4	1.24	1.54	0.78	3.20	1.09
5	1.21	1.54	0.81	3.21	1.05
6	1.21	1.54	0.82	3.25	1.06
7	1.22	1.54	0.80	3.25	1.06
平均值	1.22	1.52	0.79	3.20	1.05
RSD/%	1.9	2.5	2.6	2.0	2.9

2.6 相对校正因子耐用性考察

2.6.1 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响 分别考察 Agilent 1290 型、Waters H-Class 型、Thermo Vanquish 型 3 种超高效液相色谱仪及

Agilent ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Waters CORTECS T3（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）、Waters HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）3 种色谱柱对相对校正因子的影响，结果 *RSD* 均＜ 3.0%，表明不同仪器和色谱柱对相对校正因子无明显影响。

2.6.2　不同流速对相对校正因子的影响　采用 Waters H-Class 型超高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，分别考察流速 0.30、0.33、0.35、0.37、0.40 mL·min^{-1} 对相对校正因子的影响，结果 *RSD* 均＜ 3.0%，表明不同流速对相对校正因子无明显影响。

2.6.3　不同柱温对相对校正因子的影响　采用 Waters H-Class 型超高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，分别考察柱温 30、33、35、37、40 ℃对相对校正因子的影响，结果 *RSD* ＜ 3.0%，表明不同柱温对相对校正因子无明显影响。

2.6.4　不同进样体积对相对校正因子的影响　采用 Waters H-Class 型超高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，分别考察进样体积 0.3、0.5、0.8、1.0、2.0、3.0 μL 对相对校正因子的影响，结果 *RSD* 均＜ 3.0%，表明不同进样体积对相对校正因子无明显影响。

2.7　待测色谱峰的定位

在 QAMS 的运用中，色谱峰定位一般可采用相对保留时间法、保留时间差法、时间校正法、对照提取物法 [14-16]。本研究采用相对保留时间作为色谱峰定位的方法。根据“2.6”项下耐用性考察结果，以欧前胡素为内参物，计算水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素相对于参照峰的相对保留时间，结果见表 3。*RSD* 均＜ 3.0%，表明利用相对保留时间进行待测色谱峰定位是可行的。

2.8　QAMS 与 ESM 测定结果的比较

取白芷配方颗粒样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以 ESM 计算样品中欧前胡素的含量，再分别采用 ESM 和 QAMS 计算 14 批白芷配方颗粒中水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、欧前胡素、珊瑚菜素、异欧前胡素的含量，结果见表 4。水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素含量的 *RSD* 分别为 1.3% ～ 2.0%、1.2% ～ 2.1%、1.1% ～ 2.6%、1.8% ～ 2.7%、1.8% ～ 3.4%，均小于 4.0%。配对 *t* 检验结果显示，两种方法所得白芷配方颗粒含量之间的差异无统计学意义（P ＞ 0.05）。

表 3　不同条件对相对保留时间的影响

Tab 3　Influence of different conditions on relative retention time

条件		水合氧化前胡素	白当归素	佛手柑内酯	珊瑚菜素	异欧前胡素
Agilent 1290	Agilent ZORBAX SB-C_{18}	1.22	1.57	0.79	3.09	1.01
	Waters CORTECS T3	1.23	1.57	0.77	3.08	1.03
	Waters HSS T3	1.22	1.56	0.76	2.96	1.02
Waters H-Class	Agilent ZORBAX SB-C_{18}	1.22	1.56	0.78	3.17	1.02
	Waters CORTECS T3	1.23	1.53	0.76	3.08	1.02
	Waters HSS T3	1.21	1.53	0.76	3.19	1.02
Thermo Vanquish	Agilent ZORBAX SB-C_{18}	1.21	1.51	0.75	3.12	1.01
	Waters CORTECS T3	1.18	1.50	0.75	3.03	0.99
	Waters HSS T3	1.20	1.51	0.73	3.13	1.01
流速 /（mL·min^{-1}）	0.30	1.21	1.54	0.76	3.23	1.01
	0.33	1.25	1.51	0.79	3.30	1.03
	0.35	1.22	1.56	0.78	3.17	1.02
	0.37	1.22	1.55	0.76	3.18	1.03
	0.40	1.23	1.54	0.77	3.29	1.03
柱温 /℃	30	1.22	1.50	0.78	3.22	1.03
	33	1.22	1.51	0.78	3.22	1.04
	35	1.22	1.56	0.78	3.17	1.02
	37	1.20	1.47	0.77	3.16	1.03
	40	1.22	1.50	0.77	3.16	1.03
进样体积 /μL	0.3	1.19	1.54	0.76	3.01	0.99
	0.5	1.27	1.6	0.82	2.99	0.99
	0.8	1.20	1.54	0.79	2.99	1.02
	1.0	1.22	1.56	0.78	3.17	1.02
	2.0	1.21	1.54	0.76	3.07	1.01
	3.0	1.22	1.56	0.77	3.10	1.03
平均值		1.22	1.54	0.77	3.13	1.02
RSD/%		1.5	1.9	2.3	2.9	1.3

说明建立的 QAMS 法具有较好的可信度，可用于白芷配方颗粒的多成分质量评价。

3　讨论

本研究对色谱条件进行了考察，比较甲醇、乙腈与不同质量浓度的乙酸、磷酸溶液的流动相系统组成，发现乙腈 -0.1% 乙酸溶液梯度洗脱下各色谱峰的分离效果最佳；比较检测波长为 200 ～ 400 nm 内的各色谱峰情况，300 nm 波长下基线平稳、噪声小，各组分的灵敏度较高；比较不同提取方式（超声、回流）、不同提取时间（15、30、45 min）、不同提取溶媒（50%甲醇、70%甲醇、甲醇）对色谱图的影响，结果发现采用“2.3”项下方法制备的供试品溶液各色谱峰分离度较好、组分含量较高。

白芷的化学成分主要有香豆素类、挥发油和微量元素等，其中欧前胡素、水合氧化前胡素、白当归素等化学成分的含量在白芷中较高，易于检测，是发挥抗炎、镇痛、抗肿瘤等多种药理作用的重要物质基础，因此本研究将 6 种香豆素类

表 4 14 批白芷配方颗粒中 6 种成分含量测定结果 (%，n = 3)

Tab 4 Content determination of 6 components in 14 batches of Angelicae dahurica Radix formula granule (%，n = 3)

编号	欧前胡素	水合氧化前胡素		白当归素		佛手柑内酯		珊瑚菜素		异欧前胡素	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.0284	0.1601	0.1558	0.0704	0.0691	0.0178	0.0183	0.0291	0.0301	0.0035	0.0036
S2	0.0380	0.1458	0.1420	0.0646	0.0634	0.0174	0.0179	0.0479	0.0496	0.0073	0.0076
S3	0.0418	0.1609	0.1569	0.0718	0.0705	0.0195	0.0200	0.0514	0.0534	0.0078	0.0080
S4	0.0458	0.1781	0.1736	0.0798	0.0784	0.0217	0.0223	0.0566	0.0586	0.0087	0.0090
S5	0.0526	0.1211	0.1233	0.0516	0.0501	0.0250	0.0241	0.0528	0.0515	0.0069	0.0071
S6	0.0395	0.1143	0.1114	0.0469	0.0460	0.0182	0.0187	0.0476	0.0494	0.0070	0.0073
S7	0.0297	0.1275	0.1243	0.0493	0.0484	0.0187	0.0191	0.0423	0.0438	0.0050	0.0052
S8	0.0321	0.1104	0.1076	0.0436	0.0428	0.0182	0.0187	0.0412	0.0427	0.0048	0.0050
S9	0.0270	0.1396	0.1358	0.0702	0.0688	0.0152	0.0155	0.0530	0.0549	0.0081	0.0084
S10	0.0271	0.1325	0.1290	0.0673	0.0660	0.0147	0.0151	0.0521	0.0540	0.0080	0.0083
S11	0.0302	0.1175	0.1144	0.0586	0.0575	0.0134	0.0138	0.0522	0.0541	0.0086	0.0089
S12	0.0298	0.1128	0.1098	0.0568	0.0557	0.0127	0.0129	0.0520	0.0539	0.0089	0.0092
S13	0.0289	0.1158	0.1127	0.0570	0.0559	0.0132	0.0135	0.0504	0.0522	0.0084	0.0087
S14	0.0400	0.1448	0.1412	0.0825	0.0812	0.0174	0.0178	0.0402	0.0417	0.0061	0.0064
P	/	0.687		0.812		0.771		0.638		0.731	

成分作为白芷配方颗粒质量控制的指标。考虑到欧前胡素化学性质稳定且价格适中易得，在色谱图中处于居中位置，易于对其他成分进行定位，故选其为内参物。建立其与水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、珊瑚菜素、异欧前胡素的相对校正因子，在不同仪器、色谱柱、流速、柱温和进样体积条件下均具有良好的重现性。同时考察了待测成分与内参物保留时间差值、相对保留时间值，结果显示用相对保留时间值定位色谱峰波动更小。本研究采用 QAMS 法与 ESM 法测定白芷配方颗粒中 6 种香豆素类成分，两种方法计算值差异无统计学意义，说明该方法能够准确、高效地实现采用 1 个对照品同时测定 6 种香豆素类成分的同步检测与定量分析，不仅节约成本，而且更符合中药现代化质量控制，可全面、综合实现对白芷配方颗粒的质量控制和评价。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：109-110.

[2] 任星宇，罗敏，邓才富，等 . 白芷挥发油提取方法及药理作用的研究进展 [J]. 中国药房，2017，28（29）：4167-4170.

[3] 朱艺欣，李宝莉，马宏胜，等 . 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国医药导报，2014，11（31）：159-162，166.

[4] 杨兰，李欠，冯彦梅，等 . 一测多评法测定川白芷药材中 5 种指标成分的含量 [J]. 江苏农业学报，2020，36（1）：199-205.

[5] 张平，马潇，李冬华，等 . 白芷饮片全国评价性抽验结果分析与多指标成分—测多评法研究 [J]. 中草药，2019，50（14）：3329-3336.

[6] 王蕊，刘军，杨大宇，等 . 白芷化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中医药信息，2020，37（2）：123-128.

[7] 李乾，刘洁，李月婷，等 . UPLC-FLD 法同时测定不同产地白芷中 5 种香豆素 [J]. 中成药，2020，42（9）：2357-2362.

[8] 王智民，高慧敏，付雪涛，等 . “一测多评” 法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志，2006，31（23）：1925-1928.

[9] Qin KM，Yang B，Hu J，et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs，2018，49：725-731.

[10] 国家药典委员会 . 关于执行中药配方颗粒国家药品标准有关事项的通知 [EB/OL]. https：//www. chp. org. cn/gjyjw/tz/15980. jhtml.（2021-04-29）.

[11] 李国卫，吴文平，何民友，等 . 一测多评法用于梅花多成分含量测定的适用性研究 [J]. 中医药导报，2020，26（11）：42-45.

[12] 麻景梅，麻朝朝，高乐，等 . 一测多评法用于茵栀黄传统汤剂 12 种成分含量测定的适用性研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2021，28（6）：75-82.

[13] 吴文平，何民友，吴淑珍，等 . 梅花配方颗粒超高效液相色谱指纹图谱及一测多评法研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（8）：86-91.

[14] 侯文文，石燕红，宋嬿，等 . 一测多评法同步测定何首乌中 4 种蒽醌类成分的含量 [J]. 中国中药杂志，2020，45（1）：133-141.

[15] 裴玉琼，石海培，严辉，等 . 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究 [J]. 中草药，2019，50（18）：4293-4304.

[16] 徐文武，谢涛，吕东峰，等 . 一测多评法同时测定红参中 11 种人参皂苷的含量 [J]. 中草药，2021，52（7）：2099-2105.

（收稿日期：2021-07-08；修回日期：2021-09-20）

高效液相色谱法测定米拉贝隆中对映异构体

陈秋，樊梦妮，李国柱，兰公剑*（南京正大天晴制药有限公司，南京 210046）

摘要：目的 建立手性高效液相色谱方法测定米拉贝隆中的对映异构体。**方法** 采用对照品法进行定性定量分析，使用 Daicel Chiralpak AY-H（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，流动相为正己烷 - 乙醇 - 二乙胺（650∶350∶1），流速为 1.0 mL • min^{-1}，检测波长为 240 nm，柱温为 35 ℃，进样体积为 10 μL。**结果** 米拉贝隆与其对映异构体能有效分离，分离度大于 1.5；米拉贝隆在 0.461 ～ 5.975 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 0.9998）；低、中、高质量浓度平均加样回收率分别为 89.5%、94.8% 和 92.8%，*RSD* 分别为 2.9%、2.9% 和 1.6%（n = 3）；供试品溶液在室温条件下 24 h 内基本稳定。经检测，6 批米拉贝隆中均未检出对映异构体。**结论** 本方法经方法学验证，可用于米拉贝隆中对映异构体的测定。

关键词：米拉贝隆；对映异构体；手性药物检测；高效液相色谱法
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2631-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.030

Determination of enantiomer in mirabegron by HPLC

CHEN Qiu, FAN Meng-ni, LI Guo-zhu, LAN Gong-jian* (*Nanjing Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Co., Ltd, Nanjing* 210046)

Abstract: Objective To develop an HPLC method to determine enantiomer in mirabegron. **Methods** Reference substance was used for the qualitative and quantitative determination. The separation was performed on a Daicel Chiralpak AY-H column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of hexane-ethanol-diethylamine (650∶350∶1) at 1.0 mL • min^{-1}, the detective wavelength was 240 nm, the column temperature was 35 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** Mirabegron and enantiomer were effectively separated under the above conditions with the resolution higher than 1.5. The calibration curves were linear at 0.461 ～ 5.975 μg • mL^{-1} (r = 0.9998). The recoveries were 89.5%, 94.8%, and 92.8% at low, medium and high concentrations with the *RSD* of 2.9%, 2.9% and 1.6%, respectively (n = 3) . The test solution was basically stable within 24 h at room temperature. No enantiomers were detected in the 6 batches of mirabegron. **Conclusion** The method is suitable for the determination of enantiomer in mirabegron by methodology validation.

Key words: mirabegron; enantiomer; chiral drug detection; high performance liquid chromatography

米拉贝隆（mirabegron）化学名为 2-（2- 氨基 -1，3- 噻唑 -4- 基）-*N*-[4-（2-{[（2*R*）-2- 羟基 -2- 苯基乙基] 氨基 } 乙基）苯基] 乙酰胺，为选择性 β_3- 肾上腺素受体激动剂，由日本安斯泰来公司开发，用于成人膀胱过度活动症（OAB）患者尿急、尿频和 / 或急迫性尿失禁 [1-2]。本品于 2011 年 9 月在日本首次上市，2012 年 6 月美国食品药品监督管理局（FDA）批准上市 [3-5]。关于米拉贝隆的文献较少，主要是合成与临床方面的 [6-10]。本文采用的合成工艺是以 *R*- 扁桃酸、对硝基苯乙胺盐酸盐和 2- 氨基噻唑 -4- 乙酸为起始物料，经缩合、还原、缩合等反应生成。

R- 扁桃酸含一个手性中心，存在对映异构体参与后续反应，可生成米拉贝隆对映异构体。因对映异构体在受体配基相互作用和生物学功能等方面存在差异，因此对映异构体通常会在药理学、药代动力学甚至毒理学方面对药效产生一定影响 [11-12]，因此需要对对映异构体的含量进行严格的控制。关于米拉贝隆原料药中对映异构体的相关文献报道很少，本文基于文献方法 [13] 对流

作者简介：陈秋，女，硕士，主要从事药物分析研究，email：527947291@qq.com *通信作者：兰公剑，男，硕士，工程师，主要从事药物分析研究，email：mmchen008@126.com

动相比例进行优化，现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津）；ME36S 电子天平（精度：百万分之一，赛多利斯）；XP205DR 电子天平（精度：十万分之一，梅特勒托利多）。

1.2 试药

米拉贝隆（批号：144190601、144190602、144190603、144200601、144200602、144200603）、米拉贝隆（批号：MB19070101，纯度：99.8%）、对映异构体（批号：MB19060304，纯度：99.1%）、杂质 MB400-FP-B（批号：MB19060305，纯度：98.2%）、杂质 MB400-FP-C（批号：MB1906030，纯度：97.7%）、杂质 MB400-FP-M（批号：MB19060311，纯度：88.0%）、杂质 MB400-IM3（批号：MB19060303，纯度：99.8%）（南京正大天晴制药有限公司）；正己烷、乙醇和甲醇均为色谱纯，二乙胺为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 供试品溶液的制备 取米拉贝隆适量，加甲醇适量使溶解，再加甲醇稀释制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，即得。

2.1.2 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液适量，加甲醇稀释制成每 1 mL 含米拉贝隆 2 μg 的溶液，即得。

2.1.3 已知杂质的定位及分离试验 杂质定位溶液：分别称取对映异构体、杂质 MB400-FP-B、杂质 MB400-FP-C、杂质 MB400-FP-M 和杂质 MB400-IM3 对照品各适量，用甲醇稀释制成每 1 mL 中约含杂质 MB400-FP-B 10 μg，其他各杂质均为 5 μg 的溶液，作为各杂质的定位溶液。

2.1.4 混合溶液 取米拉贝隆对照品适量，加入各杂质对照品储备液适量，加甲醇稀释制成每 1 mL 中约含米拉贝隆 1 mg，各杂质均为 5 μg 的溶液，作为混合溶液。

2.1.5 系统适用性溶液的制备

① 对映异构体对照品储备液的制备：取对映异构体对照品适量，精密称定，加甲醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 0.1 mg 的溶液，即得。

② 系统适用性溶液的制备：取米拉贝隆对照品适量，加入对映异构体对照品储备液适量，加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中约含米拉贝隆 1 mg，对映异构体 5 μg 的溶液，即得。

2.2 色谱条件

色谱柱：Daicel Chialpak AY-H（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：正己烷 - 乙醇 - 二乙胺（650∶350∶1）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：240 nm；柱温：35 ℃；进样量：10 μL。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 精密量取空白溶剂甲醇、杂质定位溶液、混合溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，见图 1。结果显示，混合溶液中各组分之间的分离度均大于 1.5，均不干扰对映异构体测定。结果表明，本方法专属性良好，适用于米拉贝隆中对映异构体的含量测定。

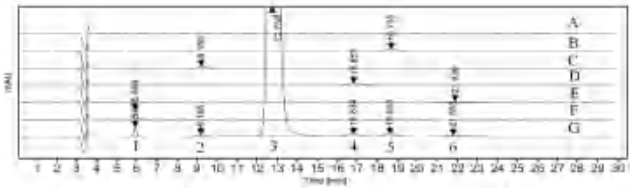


图 1 定位及分离试验色谱图

Fig 1 Chromatogram of separation test and location

A. 空白溶液（blank solution）；B. 对映异构体（enantiomer）；C. 杂质 MB400-FP-B（impurity MB400-FP-B）；D. 杂质 MB400-FP-C（impurity MB400-FP-C）；E. 杂质 MB400-FP-M（impurity MB400-FP-M）；F. 杂质 MB400-IM3（impurity MB400-IM3）；G. 混合溶液（mixture solution）；1. 杂质 MB400-IM3（impurity MB400-IM3）；2. 杂质 MB400-FP-B（impurity MB400-FP-B）；3. 米拉贝隆（mirabegron）；4. 杂质 MB400-FP-C（impurity MB400-FP-C）；5. 对映异构体（enantiomer）；6. 杂质 MB400-FP-M（impurity MB400-FP-M）

2.3.2 强制降解试验 取米拉贝隆适量，分别进行高温（60 ℃，14 d）、高湿（40 ℃，75% RH，14 d）、光照（4500 lx，10 d）破坏。取各强制降解试验条件下的样品适量，加甲醇适量使溶解，再加甲醇稀释制成每 1 mL 含米拉贝隆 1 mg 的溶液，按“2.2”项下色谱条件测定。强制降解试验结果表明，未破坏供试品和各强制降解试验条件下供试品在对映异构体出峰位置均未检测到色谱峰，说明均未产生干扰对映异构体测定的杂质，且均未降解产生对映异构体，见图 2。

2.3.3 系统适用性考察 取系统适用性溶液进样，记录色谱图。米拉贝隆与对映异构体分离度为 5.8，米拉贝隆的理论塔板数为 4418，见图 3。

2.3.4 检测限与定量限考察 取米拉贝隆对映异构体对照品适量，按信噪比≥ 10 配制成定量限溶液；按信噪比≥ 3 配制成检测限溶液。进样分析，对映异构体定量限质量浓度为 0.461 μg·mL^{-1}（定量限为 4.61 ng），相当于供试品浓度的 0.05%；对映异构体检测限质量浓度为 0.138 μg·mL^{-1}（检测限为 1.38 ng），相当于供试品浓度的 0.01%。结果表明，检测限与定量限均未超过供试品浓度的 0.05%，本分析方法灵敏度良好，可满足米拉贝隆中对映异构体的检测要求。

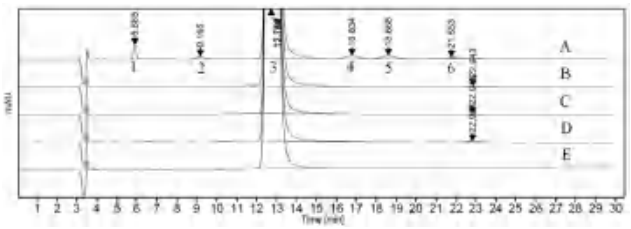


图 2 强制降解试验各溶液色谱图重叠图

Fig 2 Overlay chromatogram of the solution in the forced degradation test

A. 混合溶液（mixture solution）；B. 未破坏（undestroy）；C. 高温破坏（high temperature destroy）；D. 高湿破坏（high humidity destroy）；E. 光照破坏（illumination destroy）；1. 杂质 MB400-IM3（impurity MB400-IM3）；2. 杂质 MB400-FP-B（impurity MB400-FP-B）；3. 米拉贝隆（mirabegron）；4. 杂质 MB400-FP-C（impurity MB400-FP-C）；5. 对映异构体（enantiomer）；6. 杂质 MB400-FP-M（impurity MB400-FP-M）

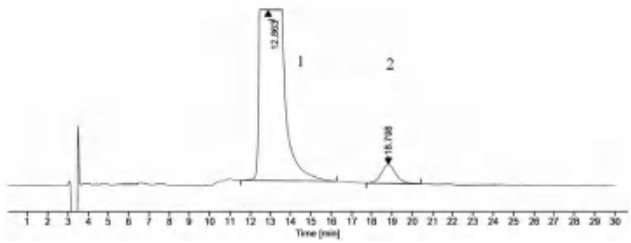


图 3 系统适用性溶液色谱图

Fig 3 Chromatogram of the system suitability solution

1. 米拉贝隆（mirabegron）；2. 对映异构体（enantiomer）

2.3.5 线性关系考察 精密称取对映异构体对照品适量，分别配制成 0.5、1.5、2.4、3.0、4.5 及 6.0 μg • mL^{-1} 的溶液，按“2.2”项下色谱条件进样分析，以质量浓度 X（μg • mL^{-1}）对峰面积 Y 进行线性回归，对映异构体的回归方程为：$Y = 2.398\times10^{4}X - 1.699\times10^{3}$，$r = 0.9998$。结果表明，对映异构体质量浓度在 0.461 ～ 5.975 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.6 稳定性试验 取对照溶液和供试品溶液，在室温条件下分别在 0、1、2、4、8、12、18、24 h 后进样测定。对照溶液在室温条件下各个时间点米拉贝隆峰面积与 0 h 峰面积比值在 101.0% ～ 103.4%，表明对照溶液在室温条件下 24 h 内基本稳定。供试品溶液在室温条件下各个时间点均未检出对映异构体，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内基本稳定。

2.3.7 重复性试验 取米拉贝隆约 20 mg（批号：144190601），共 6 份，精密称定，分别置 20 mL 量瓶中，精密加入对映异构体对照品溶液（30 μg•mL^{-1}）2 mL，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得供试品溶液。精密量取供试品溶液适量，加甲醇稀释制成每 1 mL 含米拉贝隆 2 μg 的溶液，作为对照溶液。按自身对照法计算对映异构体含量平均值为 0.3%，*RSD* 为 5.3%，表明本方法重复性良好。

2.3.8 中间精密度试验 不同的分析人员在不同日期，使用不同的仪器进行重复性试验。按自身对照法计算 12 次的检验结果，对映异构体含量平均值为 0.3%，*RSD* 为 5.1%，表明本方法中间精密度良好。

2.3.9 耐用性考察 考察不同柱温（±5 ℃）、流速（±0.1 mL • min^{-1}）、流动相比例（±2%）以及不同批次色谱柱对检测结果的影响，发现对映异构体与米拉贝隆色谱峰的分离度均符合规定，不同条件下对映异构体均未检出，结果表明方法的耐用性良好。

2.3.10 加样回收试验 取米拉贝隆约 20 mg，共 9 份，精密称定，分别置 20 mL 量瓶中，精密加入对映异构体对照品溶液（30 μg • mL^{-1}）1、2、3 mL 各 3 份，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得回收率供试品溶液。精密量取回收率供试品溶液适量，加甲醇稀释制成每 1 mL 含米拉贝隆 2 μg 的溶液，作为回收率对照溶液。取回收率供试品溶液、回收率对照溶液、供试品溶液，进样测定，按自身对照法计算回收率，结果显示，低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 89.5%、94.8% 和 92.8%，*RSD* 分别为 2.9%、2.9% 和 1.6%（$n = 3$）。结果表明本方法准确度良好。

2.4 样品含量的测定

按本文方法测定 6 批米拉贝隆中对映异构体含量，结果 6 批米拉贝隆中均未检出对映异构体。

3 讨论

米拉贝隆在无水乙醇中略溶，在甲醇中溶解，因此选择甲醇作为溶剂。米拉贝隆质量标准在各国药典中均未收载，根据本公司的合成工艺步骤，起始原料 *R*- 扁桃酸中如存在对映异构体，杂质会沿工艺路线传导至成品中，生成米拉贝隆对映异构体，为严格控制米拉贝隆原料药质量，将对映异构体检查项列入质量标准，限度为不得过 0.3%。因用于样品生产的起始原料 *R*- 扁桃酸中未检出对映异构体杂质，故生产的 6 批米拉贝隆原料药中均未检出米拉贝隆对映异构体，且稳定性试验研究结果亦显示对映异构体均未检出。

另外本项目还进行了添杂试验，在米拉贝隆粗品中添加 0.3% 的对映异构体，所制得精制品中对映异构体的检出量为 0.14%，表明本品的合成工艺对对映异构体亦有一定的去除作用。

参考国家药品监督管理局药品审评中心电子刊物摘要（284）《关于手性药物药学研究的几点看法》[14]，结合本品的产品质量研究、稳定性考察结果及相关指导原则要求，暂订本品对映异构体

限度为不得过 0.3%。

米拉贝隆原料药中对映异构体的相关文献很少，笔者前期参照参考文献[13]分析方法，对方法进行确认试验，结果杂质 MB400-FP-C 与对映异构体分离度较差，干扰对映异构体测定，故对流动相比例进行优化后，确定了本文方法，经过方法学验证，本方法结果准确、可靠，可用于米拉贝隆中对映异构体的测定。

参考文献

[1] 李海元，周逢海，马玉磊，等 . 膀胱过度活动症治疗新药米拉贝隆 [J]. 中国新药杂志，2014，23（19）：2215-2218.

[2] Takasu T，Ukai M，Sato S，et al. Effect of（*R*）-2-（2-aminothiazol-4-yl）-4'-{2-[（2-hydroxy-2-phenylethyl）amino]ethyl acetanilide（YM178），a novel selective beta3-adrenoceptor agonist，on bladder function [J]. J Pharmacol Exp Ther，2007，321（2）：642-647.

[3] 唐启东，宫平 . 米拉贝隆 [J]. 中国药物化学杂志，2012，22（6）：544-544.

[4] 范鸣 . 膀胱过度活动症治疗药 mirabegron [J]. 药学进展，2012，36（3）：133-135.

[5] 章磊，谭支敏，焦慧荣，等 . 米拉贝隆有关物质的合成 [J]. 中国医药工业杂志，2014，45（1）：9-12.

[6] 胡凡，王伸勇，贾新赞，等 . 一种米拉贝隆的合成方法：中国，103193730 [P]. 2013-04-17.

[7] 丸山龙也，铃木贵之，恩田健一，等 . 酰胺衍生物或其盐类：中国，1218045 [P]. 1998-10-16.

[8] Kawazoe S，Sakamoto K，Awamura Y，et al. Alpha-formorbeta-form crystal of acetanilide derivative：EP，1440969 [P]. 2002-10-29.

[9] 李杨 . 米拉贝隆的合成及工艺优化 [D]. 哈尔滨：黑龙江大学，2014.

[10] 周鑫，崔元善，闰慧磊，等 . 米拉贝隆治疗膀胱活动过度症的荟萃分析 [J]. 现代泌尿外科杂志，2015，20（7）：498-503.

[11] He BL，Shi Y，Kleintop B，et al. Direct and indirect separations of five isomers of brivanib alaninate using chiral high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B，2008，875（1）：122-135.

[12] Khan M，Viswanathan B，Rao DS，et al. Chiral separation of frovatriptan isomers by HPLC using amylose based chiral stationary phase [J]. J Chromatogr B，2007，846（1-2）：119-123.

[13] Zhou F，Zhou YX，Zou QG. Liquid chromatographic separation and thermodynamic investigation of mirabegron enantiomers on a Chiralpak AY-H column [J]. JCS，2015，53（8）：1361-1365.

[14] 审评三部药学组 . 关于手性药物药学研究的几点看法 [EB/OL]. https：//www. docin. com/p-1495042076. html. 2002-06-03.

（收稿日期：2022-03-01；修回日期：2022-06-17）

《中南药学》2023 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流，我刊现在开始启动 2023 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药学硕、博毕业研究生的研究论文、综述，一经录用，即可在我刊 2023 年 1 — 6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊，被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录，被中国核心期刊（遴选）数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体要求及处理如下：

1. 与药学相关的研究论文或综述；
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”；
3. 全日制硕士、博士毕业研究生；
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版；
5. 投稿时间：即日起至 2023 年 2 月底；
6. 出刊时间：2023 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日，共 6 期，请至少提前 3 个月投稿，带基金项目的文章优先刊登；
7. 投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net，请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们：

Tel：0731-82258487，0731-84895602

email：znyxzz2003@vip.163.com

综述

人工泪液成分的最新研究及进展

陆菁[1]，刘辰[2]，吴晋晖[2]，逯再峰[1*]（1. 上海大学附属仁和医院（上海市宝山区仁和医院）药剂科，上海 200431；2. 海军军医大学第三附属医院 眼科，上海 200433）

摘要：干眼症是最常见的慢性眼表病之一，其特征是眼泪膜稳态失衡并伴有眼部症状。人工泪液治疗通常是干眼症的一线治疗方法。目前市场上人工泪液种类繁多，但对其具体成分以及功能的研究较少。临床医师和药师都需要更好地理解其中不同成分的具体药理作用。本文主要描述了人工泪液中主要成分的类别及其对眼表的作用，并介绍了可能的作用机制，以期让临床医师能根据干眼的病因选择最合适的人工泪液。

关键词：干眼症；人工泪液；泪膜；成分分析

中图分类号：R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2635-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.031

Research and progress in the components of artificial tears

LU Jing[1], LIU Chen[2], WU Jin-hui[2], LU Zai-feng[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Renhe Hospital*, *Shanghai University* (*Shanghai Baoshan District Renhe Hospital*), *Shanghai* 200431; 2. *Department of Ophthalmology*, *the Third Affiliated Hospital*, *Navy Military Medical University*, *Shanghai* 200433)

Abstract: Dry eye disease is a common chronic ocular surface disease characterized by imbalance of tear film homeostasis with ocular symptoms. Artificial tears are usually the first-line treatment for dry eye disease. There are many types of artificial tears on the market, few studies focus on their components and functions. Both clinicians and pharmacists need to better understand the pharmacological effect of different components. This article mainly described the main components of artificial tears and their effect on the ocular surface. Their possible mechanism was introduced so that clinicians might choose the most suitable artificial tears.

Key words: dry eye disease; artificial tear; tear film; component analysis

干眼症（dry eye disease）是一种以泪膜稳态丧失为特征的多因素疾病，病因可能包括泪膜高渗透压、眼表炎症和损伤以及神经感觉异常等，且可导致眼部不适，甚至视力受损，严重影响患者的生活质量。现如今，干眼症约影响全世界人口的 30%，已成为全球最常见的眼表疾病，给社会造成了巨大的经济负担[1]。同时，新型冠状病毒肺炎疫情大流行期间，由于人们工作生活方式改变、佩戴口罩等都可能导致干眼症发病率增高[2-3]。目前治疗干眼症的方法主要有药物治疗、物理治疗、手术治疗等。在所有治疗策略中，局部使用人工泪液（artificial tears）是首选的安全方法，但尚未有一种人工泪液能够完全替代眼泪。目前市场上有多种泪液替代产品，其成分种类繁多。人工泪液成分主要可分为三类：湿润剂、多功能泪液替代物和眼表调节剂[4]。人工泪液可通过模仿眼泪湿润眼表、改善泪膜稳定性、修复眼表损伤等功能改善患者眼部不适症状。本文首先讨论干眼的病理机制及原因，并描述人工泪液不同成分作用效果及其可能机制的最新研究结果，

基金项目：上海中医药管理局 2020 年度综合医院中西医结合专项（No.ZHYY-ZXYJHZX-202024）。

作者简介：陆菁，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：1003911104@qq.com *通信作者：逯再峰，男，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：luzaifeng01@163.com

为人工泪液的选择提供更为明确的指导。

1 干眼症的病理生理

泪膜主要由三层组成，即外层脂质层、中间水液层和内层黏蛋白层，每一层都有不同的功能。中间的水液层主要由水、电解质、代谢产物、蛋白质构成，能够润滑眼球并维持泪液正常的渗透压，是构成泪液功能的主要成分。最外层的脂质层由睑板腺产生，分为内部的极性层（可与水液层相接触并降低表面张力）以及外部的非极性层。脂质层在抑制泪膜蒸发方面起着重要作用[5]。最内层是黏蛋白层，由三类黏蛋白组成，即跨膜黏蛋白、可溶性黏蛋白和凝胶形成黏蛋白。跨膜黏蛋白存在于上皮细胞表面并形成糖萼，有助于将泪膜的水液部分固定在眼表，可溶性黏蛋白和凝胶形成黏蛋白位于泪膜的水液层中，在泪膜假塑性中起重要作用。泪膜蒸发增多或水液分泌不足导致泪膜高渗，这是干眼症发病机制的标志。泪膜高渗可以直接损伤眼表并诱发炎症级联反应，导致泪液分泌受到抑制，并对上皮细胞、眼表微绒毛、屏障功能、糖萼和杯状细胞造成损伤。上皮细胞损伤、脂质层缺乏、眨眼异常、糖萼缺陷、黏蛋白丢失又导致眼表湿润性降低，泪膜破裂、渗透压增高，形成恶性循环[6]（见图 1）。最终导致眼表失去润滑，摩擦增加，产生一系列症状，甚至导致点状角膜上皮炎、丝状角膜炎等。同时，根据病因干眼症可被分为两个主要亚型：蒸发过强型干眼和水液缺乏型干眼[7]。前者主要是脂质层缺乏或黏蛋白功能障碍引起的，后者主要是由于水液产量不足导致的。因此在选择泪液替代品时应根据病因而有所差别。

图 1 干眼发病机制

Fig 1 Pathogenesis of dry eye disease

2 人工泪液成分分析

人工泪液中的主要成分包括电解质、增黏剂、油性剂、渗透保护剂、抗氧化剂和防腐剂等，每种成分都有各自的特点和作用，且功能相互补充（见表 1）。

表 1 人工泪液成分分类

Tab 1 Classification of components in artificial tears

分类	成分
电解质	氯化钠、氯化钙、氯化镁、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、硼酸等
增黏剂	羧甲基纤维素钠、羟丙甲纤维素、卡波姆、透明质酸、右旋糖酐、羟丙基瓜尔胶、聚乙烯醇、聚维酮等
油性剂	甘油、矿物油、十六烷基氯化铵、亚麻籽油、蓖麻油等
渗透保护剂	左旋肉碱、赤藓糖醇、甜菜碱、山梨醇、牛磺酸、海藻糖等
抗氧化剂	维生素 A、E、B_6、B_{12}、辅酶 Q_{10}、硫辛酸等
防腐剂	苯扎氯铵、聚季铵盐 -1、依地酸二钠、亚氯酸钠等
其他	神经肽 Y、降钙素基因相关肽、血管活性肠肽、T-LysYal 系统、地夸磷索钠、Reproxalap 等

2.1 电解质

泪膜中的电解质（钠、钾、氯、镁等）用于维持渗透压平衡，因此电解质等渗透剂大量用于人工泪液中[8]。正常状态下泪腺是泪液中液体、电解质和蛋白质的主要来源，离子和水液分泌不足会导致水液缺乏型干眼，严重影响泪膜的完整性[9]。泪腺腺泡细胞或导管细胞功能障碍导致水液分泌减少，泪膜渗透压随之升高，是干眼症发病的重要机制。有研究表明，添加电解质如氯化钠、氯化钙、氯化镁、碳酸氢钠和磷酸二氢钠等可以提高人工泪液的催泪能力，改善 Schirmer 测试和泪液破裂时间测试的结果，减少角膜荧光素钠染色，缓解患者症状[10]。这些结果可能是由于电解质降低了泪膜渗透压导致的。其他一些电解质如硼酸，可以作为 pH 调节剂来中和泪液 pH 值，或与山梨醇、丙二醇等结合作为防腐剂。因此电解质在维持泪膜渗透压方面起着重要作用。

2.2 增黏剂

增黏剂也叫润滑剂，是人工泪液的主要成分之一。目前获批上市的人工泪液中含有的增黏剂成分主要为羧甲基纤维素钠、羟丙甲纤维素、卡波姆、透明质酸、右旋糖酐、羟丙基瓜尔胶、聚乙烯醇和聚维酮等。这些药物可以增加泪膜厚度并且延长人工泪液在眼表的停留时间，可减少眼睑和角膜之间的摩擦，从而减少刺激和炎症，并保持水分，提高患者舒适感。羧甲基纤维素钠是一种具有黏液黏附特性的多糖，在人工泪液中使用频率最高，且已被证明可与角膜上皮细胞结合，当 1% 的羧甲基纤维素钠就能提高泪液黏度，增加人工泪液在角膜前的停留时间，保持角膜湿度和泪膜完整，对干眼患者有效[11]。透明质酸是一种天然润滑剂，具有独特的黏弹性，又因为它具有

吸水性和黏附性，浓度越高，在眼部停留时间越长，患者舒适度改善的时间越长；同时其还能下调炎性细胞因子的表达，促进眼表损伤的修复[12]。羟丙基瓜尔胶可通过加强水液层与黏蛋白的附着，模拟黏蛋白层的性质，保护眼表，缓解症状和改善体征[13]。其他如羟丙甲纤维素（一种由纤维素产生的多糖聚合物）有助于湿润和润滑眼表[14]；卡波姆通过与黏蛋白结合来延长人工泪液的黏附性，从而使其具有更长的停留时间[15]。上述这些药物的分支结构类似于黏蛋白 -1，黏蛋白 -1 是由结膜杯状细胞分泌的一种黏蛋白，在眼表发挥保护作用，因此还可以使用增黏剂来补充和维持黏蛋白层，以防黏蛋白缺乏引起的干眼。这些结果表明，增黏剂有助于增加人工泪液在眼表的停留时间，并可少部分补偿黏蛋白层（见表 2）。此外，这些药物的组合可以更好地改善人工泪液的性能，与单独使用羧甲基纤维素钠或透明质酸相比，羧甲基纤维素钠和透明质酸的组合更好地改善了干眼的体征[16]。

表 2　增黏剂分类

Tab 2　Classification of viscosity-enhancing agents

名称	种类	特点	功能
羧甲基纤维素钠	植物纤维素衍生物	应用最为广泛，有良好的剪切变稀特性	具有吸水性和黏附性，可以提高泪液黏度，增加人工泪液在角膜前的停留时间，保持角膜湿度和泪膜完整，还可少部分补偿黏蛋白层
羟丙甲纤维素	植物纤维素衍生物	低黏度也能有持久的眼表湿润作用	
卡波姆	人工合成聚合物	阴离子聚合物，与黏蛋白层有很强吸附性	
透明质酸	细菌发酵产物	既有黏性又有弹性，在睁眼和眨眼时黏度改变，重现眼泪的天然特性	
右旋糖酐	葡萄糖衍生物	—	
羟丙基瓜尔胶	瓜尔豆胶衍生物	黏度可随泪液 pH 变化而改变，延长眼表停留时间	
聚乙烯醇	人工合成聚合物	具有亲水性和成膜性	
聚维酮	人工合成聚合物	—	

2.3　油性剂

以脂质缺乏为特征的蒸发过强型干眼，是最常见的干眼症类型。生理情况下脂质层几乎完全来源于睑板腺分泌物，睑板腺功能障碍严重影响脂质层功能，也是蒸发型干眼的主要病因之一。脂质层中脂质和蛋白质的存在，对泪膜空气界面的表面张力和眼表的湿润起着关键作用。脂质层功能障碍会导致患者泪液蒸发增加，脂质层的任何改善都会抑制干眼症的恶性循环，从而改善上皮细胞功能以及角膜的润湿性。因此，在人工泪液的配方中使用了油性剂作为补充。油性剂主要以脂质体和纳米油滴的形式存在[17]。脂质体由磷脂构成，形成球形囊泡，有一个或多个同心的脂质双层，且内部具有相同数量的水室，可有效降低泪膜蒸发。因此脂质喷雾可以明显改善脂质层厚度和泪膜稳定性，并提高患者舒适度，作为一种有效的治疗选择。人工泪液中另一种含有油性的成分是水油混合乳液，乳液可以是非离子型、阴离子型或阳离子型。带正电的油滴可以与带负电的泪膜黏蛋白层相互作用，有助于稳定泪膜；还可能通过抑制蛋白激酶 C 途径，减少促炎因子的表达和分泌。研究证明水油混合乳液可以改善干眼患者临床症状和体征[18]。脂质层由一层较薄的极性表面活性分子层和一层较厚的非极性亲油分子层构成，已经证明极性脂质分子层异常可能与干眼有关。因此，一些人工泪液配方包括极性类脂表面活性剂，如十六烷基氯化铵等[19]。其他如亚麻籽油、蓖麻油和矿物油模拟泪膜的脂质层，能够增加脂质层厚度，稳定泪膜，减少蒸发，也被作为油性剂而添加于人工泪液中[20]（见表 3）。综上所述，油性剂在人工泪液中起重要作用，尤其是针对睑板腺功能障碍导致的蒸发过强型干眼。

表 3　油性剂分类

Tab 3　Classification of oily agents

名称	种类	特点	功能
甘油	生物油脂提炼物	有助于维持正常渗透平衡，应用最广泛	补充脂质，维持泪膜表面张力，稳定泪膜，减少蒸发
矿物油	矿物来源高级烷烃	可以溶解堵塞腺孔的睑脂	
十六烷基氯化铵	人工合成铵盐	较强的抗炎症介质和趋化因子作用	
亚麻籽油 / 蓖麻油	天然植物提取物	促进睑板腺分泌，抑制睑缘炎症反应	

2.4　渗透保护剂

高渗透压可以引发一系列炎症反应以及诱导眼表上皮细胞凋亡，导致眼表损伤和患者不适。人工泪液中添加渗透保护剂如左旋肉碱、赤藓糖

醇、甜菜碱、山梨醇、牛磺酸和海藻糖等，可以维持细胞体积，抑制由高渗透压引起的炎症反应和细胞凋亡。如左旋肉碱可以调节眼表细胞的凋亡、炎症反应和渗透压，还有报道称其可在氧化反应中阻断眼表活性氧的产生和抑制一些炎症途径如瞬时受体电位阳离子通道（TRPV1），通过降低 JNK、MAP 激酶水平来保护角膜上皮细胞免受应激激活 [21]。此外，牛磺酸是一种抗氧化剂和渗透保护剂，能够维持眼表上皮细胞形态，促进细胞存活，防止眼表损伤 [22]。有研究表明，左旋肉碱、牛磺酸和甜菜碱联合使用，在体外实验中可以保护暴露于高渗应激的上皮细胞 [23]。赤藓糖醇是一种多元醇，被用作低热量甜味剂。在体外实验中，脱水的人角膜上皮细胞吸收赤藓糖醇，能够恢复体积且未发生蛋白变性 [24]。海藻糖是一种天然二糖，可以减轻干燥对角膜上皮细胞的影响，并抑制细胞凋亡，减少基质金属蛋白酶的合成和氧化应激对眼表细胞的损伤。有研究证明，与生理盐水相比，中至重度干眼患者使用海藻糖治疗时，症状改善，且在干眼小鼠模型中，海藻糖可抑制角膜和结膜细胞（包括杯状细胞）的凋亡 [25-26]。人工泪液中的渗透保护剂能维持细胞渗透压，并抑制炎症反应和凋亡等，起着重要作用（见表 4）。

表 4 渗透保护剂分类

Tab 4 Classification of osmoprotectants

名称	种类	特点	功能
左旋肉碱	生物蛋白提取物	左旋肉碱、赤藓糖醇、甜菜碱通过降低 JNK、MAP 激酶水平来保护角膜上皮细胞免受应激激活，其中左旋肉碱保护作用最强	维持细胞形态，调节眼表细胞的凋亡、炎症反应和渗透压
赤藓糖醇	糖类发酵物		
甜菜碱	天然植物提取物		
牛磺酸	生物代谢物	激活抗氧化反应、调节生长因子、具有细胞保护作用	
山梨醇	葡萄糖提取物	—	
海藻糖	生物代谢物	诱导细胞自噬，稳定脂质双层，提高细胞在干燥环境下的生存能力	

2.5 抗氧化剂

眼表长期暴露在阳光下，紫外线是公认的氧化应激的诱因。生理情况下，氧化应激反应在体内受到调控，产生的活性氧会被及时清除，但在病理情况下，如炎症因子表达过多，这种平衡就会被打破。干眼症与氧化应激密切相关，在干眼患者中检测到的氧化产物表达增加，同时抗氧化物减少。因此，抗氧化剂已用于人工泪液的配方中，包括维生素 A、维生素 E、辅酶 Q_{10} 和硫辛酸等。如日本的许多人工泪液中都配有维生素 E、维生素 B_6、维生素 B_{12}[27]。维生素 A 参与了眼表上皮细胞的代谢、生长和分化。有研究表明，维生素 A 可以抑制眼表上皮细胞的凋亡，且人工泪液中添加维生素 A 可以提高患者泪膜质量，改善干眼症状 [28]。辅酶 Q_{10} 和维生素 E，能给眼表细胞提供能量，防止氧化应激，并有助于修复干眼造成的组织损伤 [29]。维生素 B_{12} 是维持神经系统代谢所必需的，且维生素 B_{12} 具有抗氧化作用，可以增强角膜上皮细胞的再生能力。局部应用维生素 B_{12} 能显著改善干眼相关的体征 [30]。有实验使用硫辛酸作为抗氧化剂治疗干眼症，结果发现硫辛酸可以提高泪膜稳定性，改善患者症状 [31]（见表 5）。

表 5 抗氧化剂分类

Tab 5 Classification of antioxidants

名称	种类	特点	功能
维生素 A	天然有机化合物	调节眼表上皮细胞的代谢、生长和分化，提高泪膜质量	抑制氧化应激反应，减少产生的炎症因子和组织损伤
维生素 B_6/B_{12}	天然有机化合物	增强角膜上皮细胞再生能力，调节局部神经感觉异常	
维生素 E	天然有机化合物	给细胞提供能量，加速组织损伤的修复	
辅酶 Q_{10}/ 硫辛酸	生物代谢物	增加泪腺过氧化物酶的活性并修复泪腺损伤，增加泪腺产物	

2.6 防腐剂

眼科制剂通常需要无菌，因此，一些多成分的人工泪液通常含有防腐剂，用以防止微生物繁殖和延长保质期。如苯扎氯铵、聚季铵盐 -1、依地酸二钠、亚氯酸钠等都是人工眼液中最常用的防腐剂。苯扎氯铵作为最常用的防腐剂，添加在很多人工泪液中。有研究证明，0.01% 的苯扎氯铵即可减少角膜的泪液产生和神经纤维密度，增加炎症细胞的浸润，导致泪膜稳定性破坏，且有上皮毒性 [32]。研究结果表明，聚季铵盐 -1 对细胞膜完整性有影响，且有眼表细胞毒性，可降低泪膜稳定性 [33]。亚氯酸钠在体外实验中可以降低细胞活性，并导致长期外用滴眼液患者的干眼发病率增高 [34-35]。依地酸二钠也具有一定的细胞毒

性，但相对于其他防腐剂而言较低（见表 6）。除了单只装人工泪液，可以用完即弃，其他人工泪液都需要添加防腐剂以避免微生物污染，尽管现在使用的防腐剂的毒性在可控范围内，但长期使用，都可能会对眼表造成损伤。而单只装人工泪液又带来了成本上升、携带不便等不足。因此需要更多实验来评估防腐剂的安全性，并在其中寻找一个平衡点。

表 6 防腐剂分类

Tab 6 Classification of preservative

名称	毒性	作用
苯扎氯铵	较高	抑制微生物繁殖生长，但有细胞毒性，可破坏细胞膜完整，降低细胞活性，破坏泪膜稳定性
聚季铵盐 -1	中	
亚氯酸钠	中	
依地酸二钠	较低	

2.7 其他

地夸磷索钠作为一种 P2Y2 受体激动剂类人工泪液，已在日韩上市。地夸磷索钠可激动结膜上皮及杯状细胞上的 P2Y2 受体，通过提高细胞内钙离子浓度并诱导多种生理反应，最终可促进水分及黏蛋白的分泌，增强泪膜稳定性。有动物实验证明，地夸磷索钠可促进泪液和黏蛋白分泌，改善角膜上皮屏障功能，并抑制眼表干燥引起的角膜上皮损伤 [36-37]。国际干眼研讨会定义了神经感觉异常是导致干眼的病因之一。眼表神经元在维持眼表内环境稳定，以及感官辨别方面发挥了重要作用，神经元末梢的缺失可能导致干眼。有研究显示，神经肽 Y、降钙素基因相关肽和血管活性肠肽等可在干眼患者中抑制神经源性的炎症反应，保护眼表上皮细胞 [38]。T-LysYal 是一种由赖氨酸透明质酸、胸腺嘧啶和氯化钠组成的超分子系统，在体外实验中显示其具有抗炎活性，且可以在干眼患者中改善受损的眼表上皮细胞 [39]，表明 T-LysYal 是一种有效的眼表调节剂。丙二醛是属于促炎性活性醛类物质（RASP）的一种炎症介质，干眼患者眼泪中的丙二醛水平明显升高，且与干眼严重程度成正相关，Reproxalap 是一种新型的小分子 RASP 抑制剂，可以有效抑制炎症反应，缓解干眼症状，目前已通过临床Ⅲ期试验 [40]。目前临床常用人工泪液总结见表 7。

表 7 临床常用人工泪液

Tab 7 Common artificial tears in clinics

名称	成分	适应证	副作用	其他	参考文献
爱丽（玻璃酸钠滴眼液，Santen）	增黏剂：0.1% 玻璃酸钠 电解质：氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、稀盐酸 抗氧化剂：ε- 氨基己酸 防腐剂：苯扎氯铵	缓解干眼症状	未见明显眼刺激性及毒性		[41]
潇莱威（羧甲基纤维素钠滴眼液，Refresh）	增黏剂：1% 羧甲基纤维素钠 电解质：氯化钠、乳酸钠、氯化钾、氯化钙	缓解眼部干燥或因暴露于阳光或风沙所引起的眼部不适感	未见明显不良反应	无防腐剂	[42]
思然（聚乙二醇滴眼液，Systane）	增黏剂：0.4% 聚乙二醇 400、0.3% 丙二醇 防腐剂：0.001% 聚季铵盐 -1	用于缓解因为眼睛干涩引起的灼热和刺痛症状	眼痛、眼痒、眼部刺激、眼感觉异常、充血		[43]
瑞珠（聚乙烯醇眼液）	增黏剂：11.2 mg 聚乙烯醇 电解质：氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 油性剂：甘油	预防或治疗眼部干涩、异物感、眼疲劳等刺激症状	偶有眼部刺激症状和过敏反应	无防腐剂	
泪然（右旋糖酐羟丙甲纤维素滴眼液，Bion Tears）	增黏剂：0.1% 右旋糖酐 70、0.3% 羟丙甲纤维素 2910 电解质：氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、硼酸钠 防腐剂：0.0011% 聚季铵盐 -1	减轻眼部干燥引起的不适感，保护眼球免受刺激	未见明显不良反应	运动员慎用	[44]
唯地息（卡波姆滴眼液，Vidisic）	增黏剂：0.2% 卡波姆 防腐剂：0.01% 西曲溴铵	用于泪液分泌减少的替代治疗	可能引起短暂视力模糊	开车或操作机器时慎用	
丽爱思（地夸磷索钠滴眼液，Diquas）	P2Y2 激动剂：3% 地夸磷索钠 电解质：磷酸氢钠、氯化钠、氯化钾、稀盐酸、氢氧化钠 防腐剂：苯扎氯铵	用于伴随泪液异常的角结膜上皮损伤的干眼患者	眼刺激感、眼分泌物、结膜充血、眼痒、异物感等	可有其他不良事件	[45]

3 问题与展望

干眼症作为临床最常见的眼表疾病，不仅影响患者的生活质量，长期的治疗还可能造成巨大的经济负担。人工泪液是治疗干眼症最常见的药品，本文通过筛选市场上销售的人工泪液配方，并根据其活性成分和生物活性赋形剂进行分类，

证明了人工泪液中的成分不仅对缓解干眼症状有显著作用，而且在干眼症的发病机制中也能发挥重要的治疗作用。但是，目前市面上所有的人工泪液都很难达到理想状态，如难以完全替代眼泪中的活性蛋白和细胞因子的功能，防腐剂的使用会对眼表造成的损伤等。目前临床主要将研究重点放在调节人工泪液表面张力、黏度、密度等特性以控制计量体积，减少浪费和降低全身毒性风险；降低折射率导致的短暂视力模糊；赋形剂导致的刺痛、灼烧感等局部副作用；因长期频繁使用而导致的眼表毒性和患者依从性等方面。

未来发展趋势可能是使用组合制剂，例如在其中添加更多活性因子如生长因子、溶菌酶等，同时通过减少赋形剂以及使用特殊配药器，来防止微生物污染以期替代防腐剂。最终使其起效更快，并降低治疗成本，从而获得更好的患者依从性和治疗效果。

参考文献

[1] Li S，Lu Z，Huang Y，et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory micelles：break the dry eye vicious cycle [J]. Adv Sci（Weinh），2022：e2200435.

[2] Krolo I，Blazeka M，Merdzo I，et al. Mask-associated dry eye during COVID-19 pandemic-how face masks contribute to dry eye disease symptoms [J]. Med Arch，2021，75（2）：144-148.

[3] Saldanha IJ，Petris R，Makara M，et al. Impact of the COVID-19 pandemic on eye strain and dry eye symptoms [J]. Ocul Surf，2021，22：38-46.

[4] Barabino S，Benitez-Del-Castillo JM，Fuchsluger T，et al. Dry eye disease treatment：the role of tear substitutes，their future，and an updated classification [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2020，24（17）：8642-8652.

[5] Pult H，Khatum FS，Trave-Huarte S，et al. Effect of eye spray phospholipid concentration on the tear film and ocular comfort [J]. Eye Contact Lens，2021，47（8）：445-448.

[6] Bron AJ，de Paiva CS，Chauhan SK，et al. TFOS DEWS Ⅱ pathophysiology report [J]. Ocul Surf，2017，15（3）：438-510.

[7] Nelson JD，Craig JP，Akpek EK，et al. TFOS DEWS Ⅱ introduction [J]. Ocul Surf，2017，15（3）：269-275.

[8] Alanazi MA，El-Hiti GA，Alshehri JA，et al. The effect of the addition of electrolyte solutions on the ferning patterns of tears collected from normal eye subjects [J]. Optom Vis Sci，2022，99（5）：463-469.

[9] Toth-Molnar E，Ding C. New insight into lacrimal gland function：role of the duct epithelium in tear secretion [J]. Ocul Surf，2020，18（4）：595-603.

[10] Masmali AM. Improvement of ferning patterns of lubricant eye drops mixed with various electrolytes and carboxymethylcellulose [J]. Cont Lens Anterior Eye，2019，42（6）：633-639.

[11] Rajendraprasad RM，Kwatra G，Batra N. Carboxymethyl cellulose versus hydroxypropyl methylcellulose tear substitutes for dry eye due to computer vision syndrome：comparison of efficacy and safety [J]. Int J Appl Basic Med Res，2021，11（1）：4-8.

[12] Karaca EE，Ozek D，Kemer EO. Comparison study of two different topical lubricants on tear meniscus and tear osmolarity in dry eye [J]. Cont Lens Anterior Eye，2020，43（4）：373-377.

[13] Srinivasan S，Manoj V. A decade of effective dry eye disease management with Systane Ultra（polyethylene glycol/propylene glycol with hydroxypropyl guar）lubricant eye drops [J]. Clin Ophthalmol，2021，15：2421-2435.

[14] Olivieri M，Cristaldi M，Pezzino S，et al. Poly 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine protects corneal cells and contact lenses from desiccation damage [J]. Optom Vis Sci，2021，98（2）：159-169.

[15] Caretti L，La Gloria VA，Piermarocchi R，et al. Efficacy of carbomer sodium hyaluronate trehalose vs hyaluronic acid to improve tear film instability and ocular surface discomfort after cataract surgery [J]. Clin Ophthalmol，2019，13：1157-1163.

[16] Carlson E，Kao WWY，Ogundele A. Impact of hyaluronic acid-containing artificial tear products on reepithelialization in an in vivo corneal wound model [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2018，34（4）：360-364.

[17] Lopez-Cano JJ，Gonzalez-Cela-Casamayor MA，Andres-Guerrero V，et al. Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection [J]. Expert Opin Drug Deliv，2021，18（7）：819-847.

[18] Eftimov P，Olzynska A，Melcrova A，et al. Improving stability of tear film lipid layer via concerted action of two drug molecules：a biophysical view [J]. Int J Mol Sci，2020，21（24）：9490.

[19] Dutescu RM，Uthoff D，Panfil C，et al. High-frequency application of cationic agents containing lubricant eye drops causes cumulative corneal toxicity in an ex vivo eye irritation test model [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2020，36（10）：725-731.

[20] Kathuria A，Shamloo K，Jhanji V，et al. Categorization of marketed artificial tear formulations based on their ingredients：a rational approach for their use [J]. J Clin Med，2021，10（6）：1289.

[21] Hazarbassanov RM，Queiroz-Hazarbassanov NGT，Barros JN，et al. Topical osmoprotectant for the management of postrefractive surgery-induced dry eye symptoms：a randomised controlled double-blind trial [J]. J Ophthalmol，2018，2018：1-6.

[22] Bucolo C，Fidilio A，Platania CBM，et al. Antioxidant and osmoprotecting activity of taurine in dry eye models [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2018，34（1-2）：188-194.

[23] Lopez-Cano JJ，Gonzalez-Cela-Casamayor MA，Andres-Guerrero V，et al. Combined hyperosmolarity and inflammatory conditions in stressed human corneal epithelial cells and macrophages to evaluate osmoprotective agents as potential DED treatments [J]. Exp Eye Res，2021，211：108723.

[24] Downie LE，Hom MM，Berdy GJ，et al. An artificial tear containing flaxseed oil for treating dry eye disease：a randomized controlled trial [J]. Ocul Surf，2020，18（1）：148-157.

[25] Hernandez E，Taisne C，Lussignol M，et al. Commercially available eye drops containing trehalose protect against dry conditions via autophagy induction [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2021，37（7）：386-393.

[26] Liu Z，Chen D，Chen X，et al. Trehalose induces autophagy against inflammation by activating TFEB signaling pathway in human corneal epithelial cells exposed to hyperosmotic stress [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2020，61（10）：26.

[27] Fogagnolo P，De Cilla S，Alkabes M，et al. A review of topical and systemic vitamin supplementation in ocular surface diseases [J]. Nutrients，2021，13（6）：1998.

[28] Alanazi SA，El-Hiti GA，Al-Baloud AA，et al. Effects of short-term oral Vitamin A supplementation on the ocular tear film in patients with dry eye [J]. Clin Ophthalmol，2019，13：599-604.

[29] Serrano-Morales JM，De-Hita-Cantalejo C，Sanchez-Gonzalez MC，et al. Efficacy of 0.1% crosslinked hyaluronic acid，coenzyme Q_{10} and vitamin E in the management of dry eye disease in menopause patients receiving antidepressants [J]. Eur J Ophthalmol，2022，32（1）：658-663.

[30] Mohamad SA，Alaaeldin E，Abdallah RMA，et al. A new approach for dry eye management by mucoadhesive in situ gel of vitamin B_{12}：formulation，in vitro and in vivo assessment [J]. AAPS PharmSciTech，2021，22（3）：87.

[31] Ajith TA. Alpha-lipoic acid：A possible pharmacological agent for treating dry eye disease and retinopathy in diabetes [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol，2020，47（12）：1883-1890.

[32] Su CC，Lee YC，Lee PRC. Assessment of ocular surface disease in glaucoma patients with benzalkonium chloride-preserved latanoprost eye drops：a short-term longitudinal study [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol，2021，259（5）：1243-1251.

[33] Cristaldi M，Olivieri M，Lupo G，et al. *N*-hydroxymethylglycinate with EDTA is an efficient eye drop preservative with very low toxicity：an in vitro comparative study [J]. Cutan Ocul Toxicol，2018，37（1）：71-76.

[34] Kobia-Acquah E，Gyekye GA，Antwi-Adjei EK，et al. Assessment of ocular surface disease in glaucoma patients in ghana [J]. J Glaucoma，2021，30（2）：180-186.

[35] Inaba K，Minami M，Yamaguchi M，et al. Effects of the ophthalmic additive mannitol on antimicrobial activity and corneal toxicity of various preservatives [J]. Chem Pharm Bull（Tokyo），2020，68（11）：1069-1073.

[36] Koh S. Clinical utility of 3% diquafosol ophthalmic solution in the treatment of dry eyes [J]. Clin Ophthalmol，2015，9：865-872.

[37] Hori Y. Secreted mucins on the ocular surface [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2018，59（14）：DES151-DES6.

[38] Lee HK，Kim KW，Ryu JS，et al. Bilateral effect of the unilateral corneal nerve cut on both ocular surface and lacrimal gland [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2019，60（1）：430-441.

[39] Barabino S，De Servi B，Aragona S，et al. Efficacy of a new ocular surface modulator in restoring epithelial changes in an in vitro model of dry eye syndrome [J]. Curr Eye Res，2017，42（3）：358-363.

[40] Clark D，Sheppard J，Brady TC. A randomized double-masked phase 2a trial to evaluate activity and safety of topical ocular Reproxalap，a novel RASP inhibitor，in dry eye disease [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2021，37（4）：193-199.

[41] Mohamed YH，Uematsu M，Ueki R，et al. Safety of sodium hyaluronate eye drop with C12-benzalkonium chloride [J]. Cutan Ocul Toxicol，2019，38（2）：156-160.

[42] Alanazi SA，Badawood YS，Aldawood MA，et al. Effect of Refresh Plus（R）preservative-free lubricant eyedrops on tear ferning patterns in dry eye and normal eye subjects [J]. Clin Ophthalmol，2019，13：1011-1017.

[43] Aguilar A，Berra M，Tredicce J，et al. Efficacy of polyethylene glycol-propylene glycol-based lubricant eye drops in reducing squamous metaplasia in patients with dry eye disease [J]. Clin Ophthalmol，2018，12：1237-1243.

[44] Albietz JM，Lenton LM，McLennan SG，et al. A comparison of the effect of refresh plus and bion tears on dry eye symptoms and ocular surface health in myopic LASIK patients [J]. CLAO J，2002，28（2）：96-100.

[45] Jacobson KA，Civan MM. Ocular purine receptors as drug targets in the eye [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2016，32（8）：534-547.

（收稿日期：2022-05-19；修回日期：2022-07-07）

急性脑卒中后肠道菌群变化对免疫及预后影响的研究进展

李丁然[1]，韩丹[2]，李伏超[2]，彭宇竹[3*]（1.中国药科大学南京鼓楼医院，南京 210003；2.南京鼓楼医院，南京 210003；3.南京市人大常委会教育科学文化卫生委员会，南京 210008）

摘要：急性脑卒中后免疫的变化可以影响疾病预后，肠道菌群与免疫间存在极强的相互作用。基于这三者间的关联，肠道菌群和免疫反应在急性脑卒中的发生和治疗中有着重要的地位。大量研究表明调控肠道菌群的组成，可以影响炎症因子的表达，从而调控机体和卒中病灶的炎症水平，影响急性脑卒中的预后。本文描述有关肠道菌群调控炎症水平从而促进急性脑卒中预后的研究进展。

关键词：急性脑卒中；肠道菌群；免疫；炎症
中图分类号：R743.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2642-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.032

Research progress in gut microbiota changes affecting the immunity after acute stroke and prognosis

LI Ding-ran[1], HAN Dan[2], LI Fu-chao[2], PENG Yu-zhu[3*] (1. *China Pharmaceutical University Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210003; 2. *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210003; 3. *People's Congress Standing Committee of Education*, *Science*, *Culture and Health of Nanjing*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Acute stroke immune alterations contribute to the progression of ischemic brain injury. There is a strong interaction between gut microbiota and immunity changes. Based on these associations, gut microbiota and immune response play an important role in the occurrence and treatment of acute stroke. Many reports indicated that regulating the gut microbiota might affect the expression of inflammatory factors, thus changing the inflammation level of the body and stroke lesions, and improving in the prognosis of acute stroke. This article reviewed recent research on acute stroke and gut microbiota regulating inflammation.

Key words: acute stroke; gut microbiota; immunity; inflammation

急性脑卒中发生后，大脑发生神经炎症、氧化应激和兴奋性毒性。神经炎症是继发脑损伤的核心，会持续数天乃至数周，对急性脑卒中预后产生重要影响[1]。除脑内病变外，机体还会发生广泛的脑外病变，包括明显的肠道菌群及全身免疫失调，这会反作用于中枢神经系统，加剧脑损伤[2]，这种脑与肠道菌群的相互作用被称为脑 - 肠轴（gut-brain axis）。脑 - 肠轴是一种中枢神经系统、胃肠道、肠道菌群间的双向通路，可由肠道菌群及其代谢物介导，在内分泌系统和神经系统水平产生作用[3]。多种中枢疾病与肠道菌群间存在相互作用，疾病的发生和预后也可通过脑 - 肠轴原理进行调节[4-5]。因此，干预免疫系统通路可以影响中枢神经功能，改善急性脑卒中预后[6-7]。本文将阐述急性脑卒中后肠道菌群及其代谢物水平变化，同时从不同的免疫反应角度出发，阐明肠道菌群对急性脑卒中预后的影响，为临床治疗提供基础。

1 急性脑卒中后的肠道菌群变化

健康机体的肠道细菌大致包含 8 门 18 科 23 纲 38 目 59 属 109 种。丰度最高的 4 门依次为厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和变形菌门。而丰

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81803525）。

作者简介：李丁然，女，在读硕士研究生，主要从事急性脑卒中炎症反应研究，email：544125100@qq.com *通信作者：彭宇竹，女，主任医师，副教授，博士研究生导师，主要从事心脑血管疾病研究，email：pyz1131@163.com

度最高的科为拟杆菌科，其次是毛螺旋菌科、瘤胃球菌科、嗅杆菌科、理研菌科、双歧杆菌科、肠杆菌科、单宁杆菌科等，再次是拟杆菌目、双歧杆菌目、肠杆菌目和乳杆菌目。肠道环境处于稳态时会提供屏障保护功能，但有益菌减少或被有害菌取代时，机体就会发生疾病[8]。急性脑卒中发生后，肠道菌群种类及丰度发生变化[9]，这种变化会明显改变代谢物和炎症水平，导致稳态和屏障破坏，影响急性脑卒中预后。

1.1 *肠道有害菌丰度及有害代谢物水平上升加重神经损伤*

肠杆菌科丰度上升是急性脑卒中后肠道菌群变化的特征之一。肠杆菌科为常见致病菌，可导致血液炎症因子水平上升，激活后续免疫反应[10]。高危的急性脑卒中患者肠道中肠杆菌丰度可达到菌群总数的 38.23%。而肠道菌群变化的另一特征是韦荣球菌科（包括巨球菌属、萨特菌属、韦荣球菌）占比上升至约 4.57%，其介导产生的琥珀酸盐，会对心脑血管疾病产生不利影响，而心脑血管事件又与急性脑卒中具有强关联[11]。食物来源的胆碱经厚壁菌门丹毒纲细菌转化为三甲胺，又经肝脏代谢为氧化三甲胺，是受到广泛研究的有害代谢物，可穿过肠道屏障进入循环，加重机体损伤[12]。

1.2 *肠道有益菌及其有益代谢物改善急性脑卒中预后*

短链脂肪酸虽然参与肝脏中三酰甘油生成[13]，但研究普遍认为它可以降低机体炎症水平，对急性脑卒中的预后有积极作用。肠源短链脂肪酸主要由瘤胃球菌科、柔嫩梭菌科、毛螺旋菌科产生，或由乳酸经乳杆菌代谢产生。急性脑卒中发生后，患者体内的上述有益菌丰度下降，如乳杆菌的占比较正常人群下降约 6%[11]。同时，卒中后肠道的双歧杆菌丰度下降，有益作用受到限制[14]。临床使用双歧杆菌四联活菌片补充有益菌可以明显促进肠道菌群恢复正常，降低机体内多种炎症因子的水平，体现了双歧杆菌的有益作用[15]。由此可见，通过补充有益菌及其代谢物，可以降低机体炎症水平，促进卒中后恢复。

2 急性脑卒中后受肠道菌群影响产生的免疫反应

肠道内包含机体约 70% 的炎症相关细胞，急性脑卒中后肠道菌群及其代谢物的变化会导致炎症因子水平显著变化[16]。由于炎症因子削弱了肠道上皮细胞的屏障功能，菌群移位和毒素入血的过程会加重机体炎症反应，并可经循环直接作用于急性脑卒中病灶，影响患者预后和康复[17]。

2.1 *中枢小胶质细胞激活*

小胶质细胞是一种常驻于中枢神经系统的免疫细胞，负责脑内环境的监测调控，在急性脑卒中后的炎症反应中起关键作用。急性脑卒中后损伤的神经细胞释放损伤相关模式分子（damage-associated molecular patterns，DAMPs），引发神经胶质细胞激活和外周免疫细胞浸润。炎症因子进入循环到达梗死病灶，导致神经功能不可逆的丧失。M1 型小胶质激活受到 DAMPs 调控，增加肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6（IL-6）、IL-1β、干扰素 -γ（IFN-γ）等炎症因子的生成，使紧密连接蛋白表达减少，进而破坏血脑屏障完整性，引起继发性神经损伤，如 TNF-α 促进内皮细胞坏死，IL-1β 下调紧密连接蛋白 ZO-1 表达等[18]。而 M2 型小胶质细胞激活则能产生抗炎作用因子，如 IL-10、转化生长因子 -β_1（TGF-β_1）、血管内皮生长因子（VEGF）和胰岛素样生长因子（IGF），通过改善血脑屏障的完整及血管组织修复改善急性脑卒中预后[19]。

除卒中病灶的炎症反应造成血脑屏障破坏外，氧化应激可造成肠黏膜缺血缺氧，再灌注后自由基使组织细胞产生过氧化损伤。同时，机体产生的 TNF-α、IL 等物质也可加重肠黏膜损伤，降低肠上皮的 ZO-1 表达，增加肠道通透性。多种机制导致了肠道屏障的削弱[20-21]。

综上，肠源炎症因子由肠道菌群及其代谢物的变化产生，可穿过受到破坏的肠道屏障和血脑屏障，对急性脑卒中病灶产生作用。与此过程有关的肠道菌群代谢物包括三甲胺 -*N*- 氧化物（TMAO）、脂多糖（LPS）和短链脂肪酸（SCFA）。

2.1.1 肠源 TMAO 穿过屏障作用于梗死病灶 饮食中肉碱 / 磷脂酰胆碱可经肠道中部分杆菌（如厚壁菌门丹毒纲）转化为三甲胺（TMA），后经肝脏转化为 TMAO。以往研究认为 TMAO 是一种易引发动脉粥样硬化的物质，与动脉粥样硬化病变的严重程度具有显著相关性[22]。TMAO 促进胆固醇进入血管壁，增加泡沫细胞形成，以加快动脉粥样硬化进程[23-24]。此外，TMAO 水平也可作为急性脑卒中后神经功能结局和患者死亡率的独立预测因子，提高 NIHSS 评分的准确性[25]。TMAO 对急性脑卒中预后的作用在于其可以首先通过因菌群失调而破坏的肠道屏障，后穿过小胶质细胞激活所破坏的血脑屏障，加重机体的炎症反应。肠源 TMAO 不仅提高血浆总胆固醇水平，还提高了 IL-6 和 TNF-α 水平，但对单核细胞趋化蛋白 1

（MCP-1）、IL-1β 和 IL-10 不产生影响，总体上加重了脑部炎症 [26]。肠源 TMAO 的作用带来屏障破坏和炎症激活的恶性循环。

2.1.2 肠源 LPS 对急性脑卒中产生双重作用 内毒素是革兰氏阴性菌（如肠杆菌科和大肠埃希菌）外膜的组成部分，由蛋白质、脂质和 LPS 组成。细菌内毒素的大部分生物学特性由 LPS 决定 [27]。小胶质细胞表达 Toll 样受体（TLR）与急性脑卒中有紧密的联系，TLR2 和 TLR4 在急性脑卒中后缺血区的脑组织中显著上调。急性脑卒中后肠杆菌丰度上升使机体 LPS 水平上升，通过刺激 TLR2 和 TLR4，使小胶质细胞向 M1 型转化，诱导前炎症因子表达、促进树突状细胞抗原呈递，启动下游炎症反应。短时间内大量炎症因子聚集到梗死病灶，导致颅内压上升，进一步破坏神经功能 [28]。同时，LPS 也可产生神经保护作用。在小鼠卒中造模前使用小剂量的 LPS 预处理，可以激活 TRIF/IRF3 信号通路，促进保护性介质的产生，同时抑制 NF-κB 通路，减轻小鼠的神经损伤 [29]。LPS 刺激巨噬细胞 RAW264 产生外泌体，可以增强小胶质细胞从 M1 型向 M2 型转化，从而减轻炎症反应，起到保护血脑屏障的作用 [30]。

2.1.3 肠源 SCFA 对急性脑卒中后恢复产生双重作用 肠道微生物衍生的 SCFA 是包含 2 ～ 5 个碳的单羧酸，由宿主肠道细菌产生的膳食纤维和抗性淀粉等不可消化多糖厌氧发酵产生。膳食中的纤维含量和肠道菌群结构共同决定了乙酸（C2）、丙酸（C3）和丁酸（C4）在人体肠道中生成的速率，约为 60∶20∶20[31]。SCFA 改善急性脑卒中预后的机制尚不明确，多数研究认为与免疫系统有关 [19]。有研究指出 SCFA 通过游离脂肪酸受体 2（FFAR2）参与小胶质细胞和肠道间的通信 [32]。SCFAs 可促进小胶质细胞活化，虽然使 M1 型和 M2 型小胶质细胞的数量和比例同时上调，但是增加了 IL-10、IL-4 等抑炎因子的分泌。体外 SCFA 和 LPS 共同刺激可诱导神经干细胞再生。但高剂量 SCFA（≥ 20 mmol • L^{-1}）则会通过 TLR2 和 TLR7 引起促炎因子 IL-1β、IL-6、IL-8 的释放，并通过 TLR4 使 TNF-α 分泌水平升高，反而会加重炎症 [33]。

2.2 *外周细胞免疫反应*

肠道菌群调控的炎症反应通过神经元和 / 或神经胶质细胞及外周炎症细胞的迁移和浸润对急性脑卒中病灶产生作用。研究表明急性脑卒中造模小鼠的粪便样本移植到无菌（GF）小鼠体内可致其后续造模的脑梗死体积增加，伴随 T 细胞及相关促炎因子水平增加、病变和浸润，表明了急性脑卒中病变可能存在 T 细胞相关的免疫机制 [34]。

2.2.1 调节性 T 细胞（Tregs）的免疫抑制作用 急性脑卒中后，肠源 T 细胞可迁移至梗死病灶，并促进非肠源 T 细胞进入大脑并浸润皮层，梗死发生后 1 d 内就可明显浸润，3 d 内达到峰值，此过程伴随促炎因子 Th1 的上调，从而加重脑组织损伤。Th2 与 Th1 作用相反，具有潜在治疗价值。IL-33 是 Th2 相关的细胞因子，可以促进 Tregs 增殖表达 IL-10，可以减轻脑组织损伤 [35]。已有研究认为 IL-17 可加剧损伤 [36]，而 Tregs 能抑制产生 IL-17 的辅助性 T 细胞 17（Th17）分化，维持肠道中的抗炎环境 [37]。

Tregs 分为胸腺源调节性 T 细胞（tTregs）和外周源调节性 T 细胞（pTregs），在体外可由 TGF-β 诱导常规 T 细胞转化产生，pTregs 可由肠源 SCFA 调控以维持肠道免疫。卒中早期，Tregs 通过增强免疫和清除碎片以保护神经元免受炎症影响而死亡。卒中后期，Tregs 也在抗炎和大脑功能恢复中占据主导地位。研究认为 Tregs 能促进抑炎因子（IL-10、TGF-β、IL-35）产生，抑制促炎因子（IL-6、TNF-α）水平上升，从而抑制外周 T 效应细胞（Teffs）激活和全身免疫反应；或分泌颗粒酶、穿孔素，直接杀伤 Teffs（Th1、Th17）[38]。

2.2.2 B 细胞源免疫球蛋白 A（IgA）的抗原结合作用 Zbesko 等 [39] 的研究表明，B 淋巴细胞在急性脑卒中后的认知衰退发展中起重要作用，除早期发挥抗炎作用外，还能在慢性期对未知抗原产生反应。激活的 B 淋巴细胞可转化为 IgA^+ 的成熟浆细胞（PC），并从肠道向大脑转移。IgA 可通过 T 淋巴细胞依赖性和 / 或非依赖性途径产生，是具有多反应性的抗体，能与 LPS 等多种抗原结合，并且可以识别慢性卒中梗死中存在的细胞碎片。因此，B 淋巴细胞参与中和肠道中的有害菌，促进急性脑卒中后的菌群恢复和长期恢复。

选择性清除 Tregs 会减少急性脑卒中后的少突胶质细胞形成、白质修复和神经功能恢复。同时，小胶质细胞减少会减轻 Tregs 对白质再生的有益作用。这种相互作用源于 Tregs 表达的骨桥蛋白对整合素受体的作用，可以增强小胶质细胞的修复活性 [40]。这提示急性脑卒中后各炎症机制间存在相互作用。

3 基于肠道菌群作用的急性脑卒中后的治疗方法

肠道菌群与急性脑卒中的相互作用及机制探究，为急性脑卒中后的治疗提供了基础，调节菌

群结构及代谢物，均能对急性脑卒中预后产生有益作用。

3.1 *粪菌移植*

粪菌移植（fecal microbiota transplants，FMT）2013 年进入艰难梭菌感染（CDI）临床选择指南后，人们逐渐发现 FMT 对多种疾病的治疗作用。通过选择合适的移植途径和菌液组成，可以达到较为理想的临床疗效[41]。内毒素性急性肺损伤大鼠经过 FMT 处理后，肠道微生物群落有所改善，机体出现 TLR4、p-NF-κB-p65 下调和抗炎因子 IL-10 分泌增加，且血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平明显下降[42]。Lee 等[43]探究 SCFA 对小鼠急性脑卒中后行为能力的改善作用，对老年急性卒中造模小鼠（18 ～ 20 月龄）分别移植幼年小鼠（2 ～ 3 月龄）和老年小鼠的粪便细菌，结果接受幼年小鼠 FMT 的受体小鼠表现出明显的运动能力改善。使用筛选出的 4 种产 SCFA 菌——双歧杆菌、共生梭菌、普氏粪杆菌和发酵乳杆菌进行 FMT 可以明显提高急性脑卒中小鼠肠道、大脑及血浆内的 SCFA 浓度，降低急性脑卒中后的炎症水平，改善神经功能。此研究中同样提到，对急性脑卒中造模的老年小鼠（18 ～ 20 月龄）进行年轻小鼠（2 ～ 3 月龄）的粪便菌群移植，可以提高受体小鼠的肠道菌群完整性，并表现更完整的神经功能，这主要与 Treg 细胞数量的增加，IL-17 水平及 Th17 细胞数量的降低有关。

3.2 *有益菌补充*

单次剂量腹腔注射 LPS 使小鼠表现出明显的神经炎症和疾病状态，而使用多菌株制剂（包含短双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、副干酪乳杆菌、嗜热链球菌等 8 种菌株的混合物）可以减弱 LPS 注射后的炎症水平，降低 IL-1β 表达，提高肠道中 IL-10 水平和闭合蛋白（occludin）表达，对急性脑卒中破坏的肠道屏障起到修复作用，可以明显缓和 / 抵消炎症相关的大脑缺损和神经功能障碍[44]。

3.3 *药物治疗*

除了使用粪菌移植，还可以补充有益菌，直接干预肠道菌群的组成，临床上一些常用药物也可针对肠道菌群组分或代谢物产生作用。

3.3.1 抗菌药物治疗 抗菌药物治疗可以影响肠道微生物多样性及组成，这可能与其对有害菌的直接杀伤相关。抗菌药物治疗可以显著增加乙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸的水平，有利于减少急性脑卒中后梗死体积并缓解脑水肿，且可一定程度上修复肠漏[45]。Benakis 等[46]对两组健康小鼠分别给予混合抗菌药物（包括氨苄西林、甲硝唑、硫酸新霉素、万古霉素）和单一抗菌药物（氨苄西林或万古霉素）治疗。急性脑卒中造模后，混合抗菌药物组小鼠的肠道菌群总数较单一抗菌药物组下降 10^5 的数量级，脑梗死体积更小，并表现出更轻微的神经功能损伤。氨苄西林产生的神经保护作用与变形菌门丰度下降有关，而变形菌门丰度上升常导致抵抗力的削弱与炎症的发生[11]。

虽然抗菌药物对肠道菌群有一定的调节作用，但同时可能导致其失调，如关键菌群的缺失、致病菌增加、多样性降低和代谢技能的改变。有研究显示，使用氨苄西林、头孢克肟、克林霉素导致肠道菌群紊乱。而使用乳杆菌单菌株可以缓解这种抗菌药物诱导导致的肠道生态失调，并增加 ZO-1、occludin 的相对表达量[47]。这不仅提示针对肠道菌群的抗菌药物使用应当根据实际情况进行权衡，也表明了同时补充有益菌可以更加有效地恢复代谢物的整体结构。

3.3.2 中药成分及制剂治疗 Chen 等[48]研究发现，使用葛根联合川芎嗪可以重塑大脑中动脉闭塞（MCAO）模型小鼠的肠道菌群，提高瘤胃球菌科、示波螺旋藻属、拉克曼菌科等有益菌丰度，使治疗组小鼠较对照组表现更好的行为学功能。

薯蓣粥可以增加小鼠肠道内的产 SCFA 菌丰度、抑制有害菌生长，降低厚壁菌门 / 拟杆菌门比率 [厚壁菌门 / 拟杆菌门（F ： B）比率的增加表明生物失调]，通过 TLR4 通路发挥抗炎作用[49]。基于 SCFA 对小胶质细胞激活相关炎症反应的影响，一些中药制剂或提取物可以增加肠道内的 SCFA 产生菌，改善急性脑卒中后的神经功能和行为能力。

中药制剂痰火汤，可以介导产 SCFA 菌的增加，减少产 LPS 细菌，减少 LPS 的生物合成，还可降低 TMA 合成的潜力，特别是增加了三甲胺类 corrinoid 蛋白共甲基转移酶（mttB），可以将 TMA 分解为甲烷。多重作用下，痰火汤明显改善了卒中患者预后[50]。中药制剂成分复杂，已有的研究聚焦于制剂整体对肠道菌群的作用，其机制有待进一步的研究。

3.3.3 其他药物治疗 阿托伐他汀为临床常用的降脂药物，也可作为改善脑卒中患者预后的治疗药物。除了发挥降脂作用外，阿托伐他汀也可以对肠道菌群产生调控作用。Zhang 等[51]研究阿托伐他汀对急性脑卒中造模后的小鼠作用，发现阿托伐他汀可以介导肠道微生物群的改变，部分参与了中风后小胶质细胞介导的神经炎症，逆转了 IL-6、TNF-α 的表达，降低循环中的内毒素水平，

以恢复紧密连接蛋白水平，从而增加肠道屏障完整性。阿托伐他汀治疗的永久性大脑中动脉闭塞（PMCAO）小鼠在神经行为测试中表现出更完整的神经功能，这提示具有降低炎症水平，恢复肠道正常功能的药物，可以对急性脑卒中预后产生有益作用。

3.4 饮食管理

高脂饮食中富含胆碱，长期高脂饮食增加肠道中厌氧肠杆菌科（主要为大肠杆菌）的丰度，改变肠上皮生理，增加肠腔内的氧和硝酸盐浓度，增强大肠埃希菌呼吸依赖性胆碱的分解代谢[52]。控制日常脂肪摄入，能有效降低 TMAO 水平，减轻机体炎症，从而降低急性脑卒中发作概率并改善预后[53-55]。

4 结论

急性脑卒中预后的影响因素不局限于脑部，除了传统的降压、降脂、营养神经等治疗外，越来越多的研究着眼于肠道菌群对中枢神经系统疾病预后的影响。大量动物实验和临床研究表明，肠道菌群及其代谢物有关的炎症反应，对急性脑卒中预后有极大的影响，这也给予临床治疗新的思路，有利于提出更加有效的临床干预措施，如在传统的急性脑卒中药物治疗的基础上联用有益菌制剂等具有调节肠道菌群功能的制剂，可以起到辅助治疗的作用，有益于改善预后。

然而，基于肠道菌群的治疗对急性脑卒中预后的作用是有限的，调节肠道菌群的结构和代谢物水平只能发挥一部分的改善预后作用，并不能直接修复病灶，合并用药也具有一定的风险，临床上应当慎重权衡。

参考文献

[1] Levard D，Buendia I，Lanquetin A，et al. Filling the gaps on stroke research：focus on inflammation and immunity [J]. Brain Behav Immun，2021，91：649-667.

[2] Cui P，McCullough LD，Hao J. Brain to periphery in acute ischemic stroke：mechanisms and clinical significance [J]. Front Neuroendocrinol，2021，63：100932.

[3] Agirman G，Hsiao EY. SnapShot：the microbiota-gut-brain axis [J]. Cell，2021，184（9）：2524-2524.

[4] Castillo-Álvarez F，Marzo-Sola ME. Role of the gut microbiota in the development of various neurological diseases [J]. Neurologia（Engl Ed），2022，37（6）：492-498.

[5] Socała K，Doboszewska U，Szopa A，et al. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders [J]. Pharmacol Res，2021，172：105840.

[6] 朱锡群，易伟 . 微生物群—脑—肠轴和中枢神经系统研究进展 [J]. 疑难病杂志，2018，17（7）：748-752.

[7] 宋欣娜，张铭思，尹恕 . 脑卒中后认知功能障碍与肠道菌群紊乱研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志，2021，21（1）：34-40.

[8] Dixit K，Chaudhari D，Dhotre D，et al. Restoration of dysbiotic human gut microbiome for homeostasis [J]. Life Sci，2021，278：119622.

[9] 游超，尹恕 . 缺血性卒中与肠道菌群研究进展 [J]. 临床荟萃，2018，33（3）：194-198.

[10] 王新新，李金星 . 脑卒中长期卧床患者肠道微生物群落分析 [J]. 现代消化及介入诊疗，2021，26（2）：246-249.

[11] 梁菊萍，董继存，杨旸 . 不同脑卒中风险中老年人群肠道菌群的差异 [J]. 中国微生态学杂志，2021，33（7）：813-817.

[12] 刘赫，张梦轩，蒋本春，等 . 氧化三甲胺在动脉粥样硬化性缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 中国老年学杂志，2021，41（14）：3137-3141.

[13] 陈煜阳，裘涛 . 缺血性卒中和肠道菌群失调相互作用的研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志，2021，31（1）：92-95.

[14] 王展强，徐开宇，周宏伟 . 卒中患者肠道宏病毒组的组成和菌群特征 [J]. 南方医科大学学报，2021，41（6）：862-869.

[15] 张予青，徐慧玲，李一帆 . 双歧杆菌四联活菌片联合早期肠内营养支持治疗重症缺血性脑卒中患者的效果 [J]. 河南医学研究，2021，30（14）：2570-2573.

[16] 韦潋滟，徐冬娟 . 肠道微生物与缺血性脑卒中的相关性研究 [J]. 医学信息，2021，34（11）：40-42，46.

[17] 李蒙蒙，朱明肃，李轩，等 . 脑梗死患者肠道屏障功能与神经功能缺损程度的相关性 [J]. 中国老年学杂志，2019，39（13）：3106-3108.

[18] 程明星，李晨辉，孟卫，等 . 小胶质细胞在缺血性脑卒中中的双重作用及机制 [J/OL]. 生理学报，2021，73（6）：963-972.

[19] Rahman Z，Dandekar MP. Crosstalk between gut microbiome and immunology in the management of ischemic brain injury [J]. J Neuroimmunol，2021，353：577498.

[20] 李蒙蒙，王佩 . 缺血性脑卒中与肠道菌群失调的关系研究进展 [J]. 新乡医学院学报，2019，36（2）：95-98.

[21] 王惠凌，李同凯，李强，等 . 急性脑损伤患者肠道屏障功能检测研究进展 [J]. 医学研究与教育，2013，30（4）：72-74，88.

[22] 赵小辉，宋志军，杨晶，等 . 外周血 TMAO、CD62P 对老年急性缺血性脑卒中患者预后的预测价值 [J]. 标记免疫分析与临床，2021，28（7）：1217-1221.

[23] Skagen K，Trøseid M，Ueland T，et al. The Carnitine-butyrobetaine-trimethylamine-*N*-oxide pathway and its association with cardiovascular mortality in patients with carotid atherosclerosis [J]. Atherosclerosis，2016，247：64-69.

[24] Haghikia A，Li XS，Liman T，et al. Gut microbiota-dependent TMAO，aortic atherosclerosis and risk of cardiovascular events in patients with stroke [J]. Atherosclerosis，2018，275：56.

[25] Zhang J，Wang L，Cai J，et al. Gut microbial metabolite

TMAO portends prognosis in acute ischemic stroke [J]. J Neuroimmunol，2021，354：577526.
[26] He Z，Lei L，Kwek E，et al. Ginger attenuates trimethylamine-*N*-oxide（TMAO）-exacerbated disturbance in cholesterol metabolism and vascular inflammation [J]. J Funct Foods，2019，52：25-33.
[27] Bengmark S. Gut microbiota，immune development and function [J]. Pharmacol Res，2013，69（1）：87-113.
[28] 郑天洋，姜宏，金日华，等 . 缺血性卒中后的炎症与免疫反应 [J]. 中风与神经疾病杂志，2018，35（3）：282-284.
[29] 王增丽，韩辉 . 脂多糖预处理对脑缺血的神经保护作用及其机制 [J]. 国际脑血管病杂志，2018，26（11）：865-869.
[30] Zheng Y，He R，Wang P，et al. Exosomes from LPS-stimulated macrophages induce neuroprotection and functional improvement after ischemic stroke by modulating microglial polarization [J]. Biomater Sci，2019，7（5）：2037-2049.
[31] Mirzaei R，Bouzari B，Hosseini-Fard SR，et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders [J]. Biomed Pharmacother，2021，139（9）：111661.
[32] Leyrolle Q，Laye S，Nadjar A. Direct and indirect effects of lipids on microglia function [J]. Neurosci Lett，2019，708：134348.
[33] 程希 . 高膳食纤维饮食对小胶质细胞的调节作用影响脑缺血后神经再生机制研究 [D]. 沈阳：中国医科大学，2020.
[34] Wekerle H. Brain autoimmunity and intestinal microbiota：100 trillion game changers [J]. Trends Immunol，2017，38（7）：483-497.
[35] Zhang SR，Phan TG，Sobey CG. Targeting the immune system for ischemic stroke [J]. Trends Pharmacol Sci，2021，42（2）：96-105.
[36] 余青龙，刘玉鹏，任娟 . 急性脑梗死血清 Omentin-1、IL-17、IMA 水平变化与预后的相关性 [J]. 中国病案，2021，22（6）：97-101.
[37] Feng Y，He X，Luo S，et al. Chronic colitis induces meninges traffic of gut-derived T cells，unbalances M1 and M2 microglia/macrophage and increases ischemic brain injury in mice [J]. Brain Res，2019，1707：8-17.
[38] Wu YJ，Li JX，Shou JY，et al. Diverse functions and mechanisms of regulatory T cell in ischemic stroke [J]. Exp Neurol，2021，343：113782.
[39] Zbesko JC，Frye JB，Becktel DA，et al. IgA natural antibodies are produced following T-cell independent B-cell activation following stroke [J]. Brain Behav Immun，2021，91：578-586.
[40] Shi L，Sun Z，Su W，et al. Treg cell-derived osteopontin promotes microglia-mediated white matter repair after ischemic stroke [J]. Immunity，2021，54（7）：1527-1542.
[41] 周小珏，冯婧，张安仁，等 . 粪菌移植途径的临床应用现状 [J]. 中国微生态学杂志，2021，33（9）：1104-1108.
[42] 汪玉磊，谭乂珉，李波，等 . 粪菌移植通过调节 TLR4/NF-κB 信号通路改善内毒素性急性肺损伤 [J]. 中国免疫学杂志，2021，37（23）：2817-2821.
[43] Lee J，d’Aigle J，Atadja L，et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids promote post-stroke recovery in aged mice [J]. Circ Res，2020，127（4）：453-465.
[44] Carla P，Georgios S，Alessio T，et al. Proneurogenic and neuroprotective effect of a multi strain probiotic mixture in a mouse model of acute inflammation：involvement of the gut-brain axis [J]. Pharmacol Res，2021，172：105795.
[45] Chen R，Xu Y，Wu P，et al. Transplantation of fecal microbiota rich in short chain fatty acids and butyric acid treat cerebral ischemic stroke by regulating gut microbiota [J]. Pharmacol Res，2019，148：104403.
[46] Benakis C，Poon C，Lane D，et al. Distinct commensal bacterial signature in the gut is associated with acute and long-term protection from ischemic stroke [J]. Stroke，2020，51（6）：1844-1854.
[47] 史瑛 . 具有修复抗菌药物导致肠道生态失调功能的乳杆菌筛选及其机制研究 [D]. 无锡：江南大学，2019.
[48] Chen R，Wu P，Cai Z，et al. Puerariae Lobatae Radix with chuanxiong Rhizoma for treatment of cerebral ischemic stroke by remodeling gut microbiota to regulate the brain-gut barriers [J]. J Nutr Biochem，2019，65：101-114.
[49] 洪雪珮，庞书勤，罗宗婷，等 . 从肠道菌群 -SCFAs 探讨薯蓣粥对糖尿病合并脑卒中大鼠糖脂代谢的影响 [J]. 湖南中医杂志，2020，36（11）：179-183.
[50] Guo Q，Jiang X，Ni C，et al. Gut microbiota-related effects of tanhuo decoction in acute ischemic stroke [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：5596924.
[51] Zhang P，Zhang X，Huang Y，et al. Atorvastatin alleviates microglia-mediated neuroinflammation via modulating the microbial composition and the intestinal barrier function in ischemic stroke mice [J]. Free Radic Biol Med，2021，162：104-117.
[52] Yoo W，Zieba JK，Foegeding NJ，et al. High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine *N*-oxide [J]. Science，2021，373（6556）：813-818.
[53] 叶佳美，钟冬灵，李涓，等 . 热量限制对健康、衰老和疾病机体肠道菌群影响的研究进展 [J]. 中国全科医学，2021，24（7）：895-900.
[54] Zheng X，Wang S，Jia W. Calorie restriction and its impact on gut microbial composition and global metabolism [J]. Front Med，2018，12（6）：634-644.
[55] Huang JT，Mao Q，Han B，et al. Calorie restriction conferred improvement effect on long-term rehabilitation of ischemic stroke via gut microbiota [J]. Pharmacol Res，2021，170：105726.

（收稿日期：2022-04-08；修回日期：2022-06-22）

木姜叶柯化学成分与药理作用及质量评价研究进展

何维维[1, 2]，黄傲[1, 2]，唐雪阳[2]，文馨月[1, 2]，周融融[3]，李勇敏[3]，徐琳本[2]，张水寒[2]，蔡萍[1, 2]，曾宏亮[1, 2*]（1. 湖南中医药大学，长沙 410208；2. 湖南省中医药研究院中药研究所，长沙 410013；3. 湖南省中医药研究院附属医院，长沙 410006）

摘要：木姜叶柯主要分布于秦岭南坡以南各省，被誉为“树上虫草”。木姜叶柯叶（嫩叶和老叶）主要含有黄酮类、三萜类和其他成分，这些成分具有良好的降血糖、调血脂、抗氧化、抗炎及抗肿瘤等药理活性。本文对木姜叶柯化学成分、药理作用和质量评价的研究进展进行综述，以期为木姜叶柯的进一步研究和开发利用提供理论依据。

关键词：木姜叶柯；化学成分；药理作用；质量评价

中图分类号：R284，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2648-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.033

Research progress in chemical constituents and pharmacological effect of *Lithocarpus litseifolius* (Hance) chun and its quality evaluation

HE Wei-wei[1, 2], HUANG Ao[1, 2], TANG Xue-yang[2], WEN Xin-yue[1, 2], ZHOU Rong-rong[3], LI Yong-min[3], XU Lin-ben[2], ZHANG Shui-han[2], CAI Ping[1, 2], ZENG Hong-liang[1, 2*] (1. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 2. *Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha* 410013; 3. *The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha* 410006)

Abstract: *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun is a medicinal plant of the family Fagaceae of the order Fagales, mainly distributed in the southern provinces of the Southern slope of the Qinling Mountains. It is known as “Cordyceps sinensis on trees”. *Lithocarpus litseifolius* leaves (young leaves and old leaves) mainly contain flavonoids, triterpenoids and other ingredients, which show good pharmacological activities such as hypoglycemic, blood lipid regulation, anti-oxidation, anti-inflammatory, anti-tumor, etc. This review summarized the research progress in the chemical constituents and pharmacological effects of *Lithocarpus litseifolius* and its quality evaluation, which can provide theoretical basis for further study and utilization of *Lithocarpus litseifolius*.

Key words: *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun; chemical constituent; pharmacological effect; quality evaluation

木姜叶柯 [*Lithocarpus litseifolius*（Hance）Chun]，又名多穗柯、甜茶、多穗石柯等，系山毛榉目（*Fagales*）壳斗科（*Fagaceae*）石柯属药用植物，主要分布于秦岭南坡以南各省，为山地常绿林的常见树种，具有“树上虫草”的美誉[1-2]。《本草纲目》载“气味甘、平，无毒，活血、疗痔、止渴、利小便”；《中华中药志》载“能防治高血压，治疗湿热痢疾、皮肤瘙痒、痈疽恶疮等症，并具有滋养肝肾、和胃降逆、润肺止咳、解困醒酒等作用”。此外，《全国中草药汇编》载“木姜叶柯根具有补肾益气的功效，可治疗阳痿早泄、月经不调等症；皮具有和胃降逆的功效，主治呕逆、噎膈”。木姜叶柯兼有茶、糖、药三种功能，2017 年被原国家卫生部批准为新食品原料，开启

基金项目：长沙市自然科学基金项目（No.kq2007063）；湖南省中医药研究院重点课题（No.201906）；湖南省中医药科研计划项目（No.202023）；湖南省重点领域研发计划（No.2020SK2141）；湖南省政策性项目 - 科技援疆、科技援藏（No.2020WK4003）。

作者简介：何维维，男，在读硕士研究生，主要从事中药药理研究，email：807650466@qq.com *__通信作者__：曾宏亮，男，副研究员，主要从事抗代谢性疾病药物发现与机制研究，email：zenghl155@163.com

了其在保健食品及普通食品中的应用。本文结合国内外研究报道，系统综述木姜叶柯的主要化学成分与药理作用，以期为木姜叶柯的深入研究和开发利用提供参考。

1 化学成分

木姜叶柯含有多种类型的化合物，包括多酚类、黄酮类、三萜类、棕色素及其他成分，其中主要成分为黄酮类和三萜类。

1.1 黄酮类

黄酮类是木姜叶柯目前研究得最多的一类化学成分，也是发挥药理作用的主要活性成分，主要分布于木姜叶柯的叶部位。从木姜叶柯中已分离、鉴定的黄酮类化合物[3-8]共计 71 个（见表 1 和图 1），其中三叶苷、根皮苷和 3- 羟基根皮苷 3 种二氢查尔酮葡萄糖苷为木姜叶柯主要甜味成分[9]。

表 1 木姜叶柯黄酮类成分

Tab 1 Flavonoids in *Lithocarpus litseifolius*

编号	化合物	化学式	文献
1	三叶苷（trilobatin）	$C_{21}H_{24}O_{10}$	[3]
2	根皮苷（phlorizin）	$C_{21}H_{24}O_{10}$	[3]
3	3- 羟基根皮素（3-hydroxy phloretin）	$C_{15}H_{14}O_6$	[3]
4	根皮素（phloretin）	$C_{15}H_{14}O_5$	[3]
5	柚皮苷（naringin）	$C_{27}H_{32}O_{14}$	[6]
6	6"-*O*- 乙酰基三叶苷（6"-*O*-acetyl trilobatin）	$C_{23}H_{26}O_{11}$	[3]
7	3"-*O*- 乙酰基根皮苷（3"-*O*-acetyl phloridzin）	$C_{23}H_{26}O_{11}$	[3]
8	槲皮苷（quercitrin）	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[3]
9	异槲皮苷（isoquercitrin）	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[3]
10	槲皮素（quercetin）	$C_{15}H_{10}O_7$	[3]
11	槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 半乳糖苷（quercetin-3-*O*-*β*-*D*-galactopyranoside）	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[3]
12	槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 阿拉伯糖苷（quercetin-3-*O*-*α*-*L*-arabinoside）	$C_{20}H_{18}O_{11}$	[3]
13	木犀草素（luteolin）	$C_{15}H_{10}O_6$	[3]
14	木犀草素 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（luteolin-7-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside）	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[3]
15	柚皮素（naringenin）	$C_{15}H_{12}O_5$	[6]
16	山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-glucoside）	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[5]
17	毛莨酢浆草苷（cernuoside）	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[3]
18	阿福豆苷（afzelin）	$C_{21}H_{20}O_{10}$	[3]
19	5- 羟基 -7- 甲氧基二氢黄酮（5-hydroxy-7-methoxyl-dihydroflavone）	$C_{16}H_{14}O_4$	[3]
20	2'，6'- 二羟基 -4'- 甲氧基 - 二氢查耳酮（2'，6'-dihydroxy-4'-methoxyl-dihydrocharcone）	$C_{16}H_{16}O_4$	[3]
21	2"- 对羟基肉桂酰氧基黄芪苷（2"-*P*-coumarylastragalin）	$C_{30}H_{26}O_{13}$	[3]
22	6"-*O*- 香草酰根皮苷（6"-*O*-vanilloylphlorizin）	$C_{29}H_{30}O_{13}$	[4]
23	6"-*O*-（4- 羟基苯甲酰基）根皮苷 [6"-*O*-（4-hydroxybenzoyl）-phlorizin]	$C_{28}H_{28}O_{12}$	[4]
24	6"-*O*- 阿魏酰根皮苷（6"-*O*-feruloyl phlorizin）	$C_{31}H_{32}O_{13}$	[4]
25	儿茶素（catechin）	$C_{15}H_{14}O_6$	[6]
26	圣草酚（eriodictyol）	$C_{15}H_{12}O_6$	[6]
27	eriodictyol hexoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[6]
28	木犀草素 -4'-*O*- 葡萄糖苷（luteolin-4'-*O*-hexoside）	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[6]
29	3-hydroxy phloretin-2-*O*-acetyl hexoside	$C_{23}H_{26}O_{12}$	[6]
30	3-hydroxy phloretin-4-*O*-acetyl hexoside	$C_{23}H_{26}O_{12}$	[6]
31	phloretin-2-*O*-feruloyl hexoside	$C_{31}H_{32}O_{13}$	[6]
32	phloretin-2-*O*-acetyl hexoside	$C_{23}H_{26}O_{11}$	[6]
33	phloretin-2-*O*-coumaroyl hexoside	$C_{30}H_{30}O_{12}$	[6]
34	phloretin-2-*O*-malonyl hexoside	$C_{24}H_{26}O_{13}$	[6]
35	phloretin-2-*O*-sinapoyl hexoside	$C_{32}H_{34}O_{14}$	[6]
36	phloretin-4-*O*-feruloyl hexoside	$C_{31}H_{32}O_{13}$	[6]
37	phloretin-4-*O*-acetyl hexoside	$C_{23}H_{26}O_{11}$	[6]
38	phloretin-4-*O*-coumaroyl hexoside	$C_{30}H_{30}O_{12}$	[6]
39	phloretin-4-*O*-malonyl hexoside	$C_{24}H_{26}O_{13}$	[6]
40	phloretin-4-*O*-sinapoyl hexoside	$C_{32}H_{34}O_{14}$	[6]
41	quercetin-3-*O*-arabinpyranoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	[6]
42	槲皮素 -7-*O*-*β*- 葡萄糖苷（quercetin-7-*O*-*β*-glucoside）	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[6]

续表 1

编号	化合物	化学式	文献
43	quercetin7-*O*-hexoside-3-*O*-rhamnoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[6]
44	luteolin-4'-*O*-rhamnosyl（1 → 2）glycoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[6]
45	phloretin-4-*O*-glucoside（1 → 6）glucoside	$C_{27}H_{34}O_{15}$	[6]
46	phloretin-2-*O*-glucoside（1 → 6）glucoside	$C_{27}H_{34}O_{15}$	[6]
47	phloretin-2-*O*-[apiofuranosyl（1 → 6）glucopyranoside]	$C_{26}H_{32}O_{14}$	[6]
48	flavanonol-7-*O*-hexoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[6]
49	表阿夫儿茶精 [（－）-epiafzelechin]	$C_{15}H_{14}O_5$	[7]
50	（－）-epicatechin 6-C-glucoside	$C_{21}H_{24}O_{11}$	[7]
51	3，5，7，3'，4'-pentahydroxy-6-methoxy flavanone 3-acetate	$C_{18}H_{16}O_9$	[7]
52	apigenin-7-*O*-（6"-*O*-acetylglucoside）	$C_{23}H_{22}O_{11}$	[7]
53	apigenin-7-（6"-crotonylglucoside）	$C_{25}H_{24}O_{11}$	[7]
54	apigenin-7-glucuronide-4'-rhamnoside	$C_{27}H_{28}O_{15}$	[7]
55	kaempferol 3-（6-acetylgalactoside）	$C_{23}H_{22}O_{12}$	[7]
56	kaempferol 3，4'-di-*O*-methyl ether	$C_{17}H_{14}O_6$	[7]
57	kaempferol 3，4'-di xyloside	$C_{25}H_{26}O_{14}$	[7]
58	7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone	$C_{16}H_{12}O_4$	[7]
59	catechin 7-glucoside	$C_{21}H_{24}O_{11}$	[7]
60	phloretin 3'，5'-di-C-glucoside	$C_{27}H_{34}O_{15}$	[7]
61	3，4，2'，4'，6'-pentahydroxychalcone-4'-glucoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[7]
62	6'-malonylcosmosiin	$C_{24}H_{22}O_{13}$	[7]
63	apigenin 7-[rhamnosyl-（1 → 2）-galacturonide]	$C_{27}H_{28}O_{15}$	[7]
64	phloretin xylosyl-galactoside	$C_{26}H_{32}O_{14}$	[7]
65	芦丁（rutin）	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[8]
66	3-羟基根皮苷（3-hydroxy phlorizin）	$C_{21}H_{24}O_{11}$	[8]
67	二氢黄酮苷（hesperidin）	$C_{28}H_{34}O_{15}$	[8]
68	柚皮素 -7-*O*- 葡萄糖苷（naringenin-7-*O*-hexoside）	$C_{21}H_{22}O_{10}$	[8]
69	山柰酚（kaempferol）	$C_{15}H_{10}O_6$	[8]
70	异鼠李素（isorhamnetin）	$C_{16}H_{12}O_7$	[8]
71	黄芩素（baicalein）	$C_{15}H_{10}O_5$	[8]

1.2 三萜类

三萜类成分在木姜叶柯的茎、叶中均有分布，从木姜叶柯分离、鉴定的三萜类化合物共计 36 个[3，10-11]（见表 2 和图 2），其中 lithocarpic acid A、F、H、K、O 和 Q 成分对人和鼠的 11β- 羟基固醇脱氢酶（11β-hydroxysteroid dehydrogenase，11β-HSD）均有抑制作用[10-11]。

1.3 其他成分

木姜叶柯含有一种优良的天然色素——棕色素，其着色能力强，溶解性好，有较大的 pH 值范围（3.0 ～ 12.0），对光、热、弱酸、弱碱及常见金属离子均具有较高稳定性，且无毒副作用，已被批准作为食品添加剂使用[12]。木姜叶柯浸提液富含 16 种以上的氨基酸，其中谷氨酸含量最高，缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、色氨酸、苏氨酸、赖氨酸等人体必需氨基酸的含量也较高[13]。此外，木姜叶柯富含维生素 C、维生素 E、叶酸、茶多酚和咖啡碱等活性物质[14]，同时还含有钾、钠、钙、镁等常量元素及铁、锌、硒等微量元素[15]。其中锌的含量约为 10.0 mg • mL^{-1}，含量超过一般茶叶的标准；硒的含量可达到 0.4 mg • mL^{-1}，远高于其他一般植物和食品（0.004 ～ 0.200 mg • mL^{-1}）中的含量[16]。

2 药理作用

现代药理学研究表明，木姜叶柯及其成分具有多种药理活性，主要涉及降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抑菌等。目前，国内外的研究主要集中在黄酮类成分的药理作用研究，而对其三萜类成分的研究较少。

2.1 降血糖、降血脂作用

2.1.1 提取物 作为脂肪生成和转录的关键调节因子，CCAAT 增强子结合蛋白α（CCAAT/enhancer binding proteins alpha，C/EBPα）和过氧化物酶体增殖物激活受体γ（peroxisome proliferator-activated receptor γ，PPARγ）可调节脂肪细胞分化[17]，研究表明木姜叶柯水提物能下调 C/EBPα 和 PPARγ 的表达，降低高脂诱导肥胖大鼠的血糖、血脂水平，提高胰岛素敏感性，改善胰岛素抵抗[18]。木姜叶柯乙酸乙酯提取物能降低链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠血糖水平，且降血糖

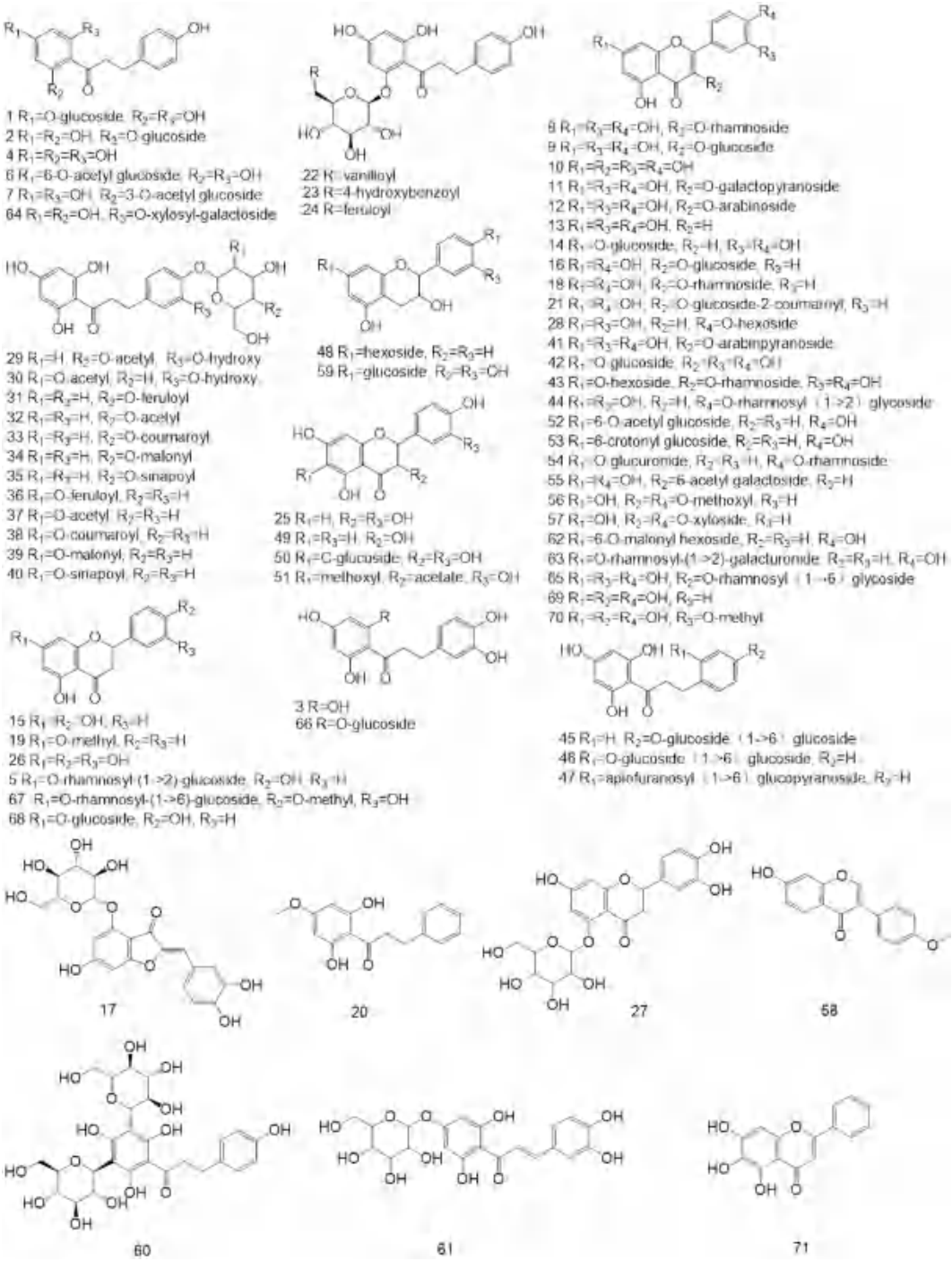


图 1　木姜叶柯黄酮类化合物结构

Fig 1　Structures of flavonoids in *Lithocarpus litseifolius*

效果比水提物更显著[19]。此外，木姜叶柯乙醇提取物的不同萃取部位（石油醚层、正丁醇层、水层）均能改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗，增加葡萄糖消耗，降低血糖水平[20]。木姜叶柯总黄酮部位对遗传性高血糖小鼠（*db/db* 小鼠）、四氧嘧啶诱发的高血糖小鼠和链脲佐菌素诱发的高血糖大鼠均有明显降血糖作用，同时能改善葡萄糖耐量[21-22]，且降血糖效果优于水提物和乙醇提取物[23]，但具体差异活性成分尚未见相关报道。

2.1.2　单体化合物　根皮苷和三叶苷是木姜叶柯主要甜味成分，也是其目前研究报道最多的单体活性成分。研究表明根皮苷对糖尿病大鼠的高脂血症和高糖血症具有治疗和预防作用[24]，可以降低肥胖模型小鼠血脂水平，减轻肝脏脂质沉积，其作用机制可能与抑制雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）/ 固 醇调节元件结合蛋白 -1c（sterol regulatory element binding protein-1c，SREBP-1c）信号通路的表达

表 2 木姜叶柯三萜类成分

Tab 2 Triterpenoids in *Lithocarpus litseifolius*

编号	化合物	化学式	文献
72	齐墩果酸（oleanolic acid）	$C_{30}H_{48}O_3$	[3]
73	20- 羟基 -3- 酮 - 羽扇豆烷（20-hydroxylupan-3-one）	$C_{30}H_{50}O_2$	[3]
74	3*β*- 乙酰羽扇豆烷 -29- 甲酰（3*β*-acetoxylupan-29-al）	$C_{32}H_{52}O_3$	[3]
75	无羁萜（friedelin）	$C_{30}H_{50}O$	[3]
76	无羁萜 -3*β*- 醇（friedelan-3-*β*-ol）	$C_{30}H_{52}O$	[3]
77	粘霉醇（glutinol）	$C_{30}H_{50}O$	[3]
78	*β*- 香树脂醇（*β*-amyrin）	$C_{30}H_{50}O$	[3]
79	蒲公英赛醇（taraxerol）	$C_{30}H_{52}O$	[3]
80	羽扇豆醇（lupeol）	$C_{30}H_{50}O$	[3]
81	白桦脂酸（betulinic acid）	$C_{30}H_{48}O_3$	[3]
82	白桦脂醇（betulin）	$C_{30}H_{50}O_2$	[3]
83	白桦酸甲酯（methyl betulinate）	$C_{31}H_{50}O_3$	[3]
84	齐墩果酸甲酯（methyl oleanolate）	$C_{31}H_{50}O_3$	[3]
85	3*β*，29- 二羟基羽扇豆（3*β*，29-dihydroxylupane）	$C_{30}H_{52}O_2$	[3]
86	24- 亚甲基环菠萝烷 -3*β*-21- 二醇（24-methylenecycloartan-3*β*-21-diol）	$C_{31}H_{52}O_2$	[3]
87	石柯二醇（lithocarpdiol）	$C_{31}H_{52}O_3$	[3]
88	石柯酮（lithocarpolone）	$C_{31}H_{50}O_3$	[3]
89	lithocarpicacid A	$C_{30}H_{48}O_4$	[9]
90	lithocarpicacid B	$C_{30}H_{48}O_4$	[9]
91	lithocarpicacid C	$C_{30}H_{48}O_5$	[9]
92	lithocarpicacid D	$C_{30}H_{50}O_4$	[9]
93	lithocarpicacid E	$C_{32}H_{48}O_5$	[9]
94	lithocarpicacid F	$C_{32}H_{50}O_5$	[9]
95	lithocarpicacid G	$C_{29}H_{46}O_4$	[9]
96	lithocarpicacid H	$C_{29}H_{44}O_6$	[9]
97	lithocarpicacid I	$C_{32}H_{50}O_5$	[9]
98	lithocarpicacid J	$C_{32}H_{50}O_5$	[9]
99	lithocarpicacid K	$C_{30}H_{48}O_4$	[9]
100	lithocarpicacid L	$C_{30}H_{48}O_4$	[9]
101	lithocarpicacid M	$C_{32}H_{50}O_4$	[9]
102	lithocarpicacid N	$C_{30}H_{48}O_3$	[9]
103	lithocarpicacid O	$C_{31}H_{50}O_3$	[10]
104	lithocarpicacid P	$C_{31}H_{48}O_4$	[10]
105	lithocarpicacid Q	$C_{32}H_{50}O_5$	[10]
106	lithocarpicacid R	$C_{33}H_{54}O_6$	[10]
107	lithocarpicacid S	$C_{31}H_{48}O_3$	[10]

有关[25]。三叶苷通过非竞争性抑制小肠 *α*- 葡萄糖苷酶和胰腺 *α*- 淀粉酶活性改善血糖水平，对 *α*- 葡萄糖苷酶的抑制作用与阿卡波糖相当，但对 *α*- 淀粉酶的抑制作用弱于阿卡波糖[26]；此外，三叶苷可促进胰岛素介导的胰岛素受体底物 1（insulin receptor substrate1，IRS1）的活化和蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt/PKB）的磷酸化，促进 *ob/ob* 小鼠中葡萄糖转运蛋白 4（glucose transporter 4，GLUT4）的表达和转运，从而改善 *ob/ob* 小鼠的胰岛素抵抗，降低血糖水平[27]。

综上，木姜叶柯提取物和单体成分均有明显的降血糖、降血脂作用，但提取物中该作用是否主要由根皮苷和三叶苷所致，目前尚不清楚。

2.2 抗氧化作用

2.2.1 提取物 木姜叶柯水提物具有抗氧化作用[17]，能减少细胞内和线粒体中活性氧簇（reactive oxygen species，ROS）的聚集，减少丙二醛（malondialdehyde，MDA）的产生，提高抗氧化酶活性，并能通过线粒体沉默调节蛋白 3（sirtuin 3，SIRT3）信号通路发挥抗氧化作用，拮抗 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤[28]。木姜叶柯乙酸乙酯提取物能降低糖尿病小鼠的 MDA 水平，提高过氧化氢酶（catalase，CAT）活性，且抗氧化作用优于水提物[19]。木姜叶柯乙醇提取物的抗氧化作用亦优于其水提物，其中 70% 乙醇提取物抗氧化作用最强[29]。通过 DPPH、ABTS 和还原铁抗氧化实验等，发现木姜叶柯总黄酮部位具有明显的抗氧化作用，能明显改善 CCl_4 对大、小鼠的肝肾功能损伤，提高肝、肾组织中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、CAT 活力和谷胱甘肽含量，同时降低 MDA 的含量，保护肝脏损伤[30-31]；有研究进一步发现其保护机制可能与调控 ROS/ 含 NLR 家族 pyrin 域蛋白 3（NLR family pyrin domain containing 3，NLRP3）/IL-1*β* 信号通路，减轻氧化应激、降低炎症因子水平有关[32]。

2.2.2 单体化合物 木姜叶柯根皮苷成分具有抗氧化作用，能提高糖尿病小鼠血清 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）活性，降低 MDA 水平[33]。通过 DPPH 自由基清除率实验发现，木姜叶柯中三叶苷（IC_{50} = 20.16 μg·mL^{-1}）具有比根皮苷（IC_{50} = 866.80 μg·mL^{-1}）更显著的抗氧化作用，且对自由基的清除率明显强于芦丁，与维生素 C 相近[34]。三叶苷能通过激活核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf-2）/ 抗氧化反应原件（antioxidant response element，ARE）途径，降低氧化应激，对异氟烷诱导的海马神经元细胞 HT22 的神经毒性具有保护作用[35]。此外，三叶苷还能通过腺苷酸活化蛋白激酶（Amp activated protein kinase，AMPK）/Nrf2/Sirt3 信号通路，降低氧化应激反应，减少 ROS 产生，提高抗氧化酶活性，改善 H_2O_2 对 PC12 神经细胞的氧化应激损伤[36]。

2.3 抗炎作用

木姜叶柯总黄酮部位可通过降低肝组织中炎症因子白细胞介素 -1*β*（interleukin-1*β*，IL-1*β*）、白细胞介素 -6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因

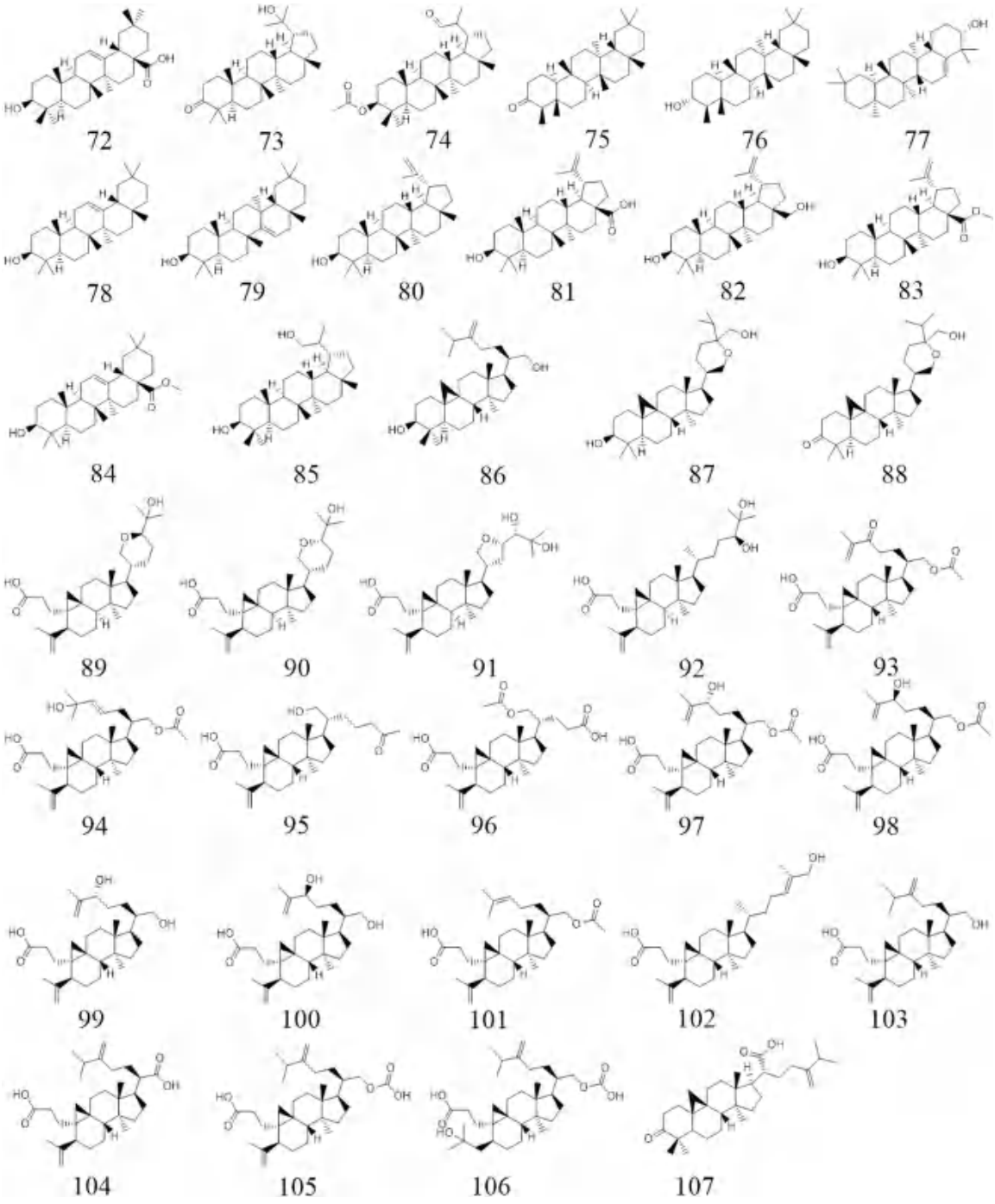


图 2　木姜叶柯三萜类化合物结构

Fig 2　Structures of triterpenoids in *Lithocarpus litseifolius*

子 *α*（tumor necrosis factor-*α*，TNF-*α*）水平、下调 NLRP3 炎症小体的表达，拮抗 CCl_4 对小鼠肝细胞的损伤 [30]。三叶苷可以显著抑制脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的小鼠血清和肝组织中的 TNF-*α* 和 IL-6 炎症因子的分泌 [37]；其抗炎机制可能是通过抑制核因子 *κ*B（nuclear factor kappa-B，NF-*κ*B）抑制蛋白 I*κ*B*α* 的解离以及 NF-*κ*B p65 的磷酸化，下调 NF-*κ*B 炎症信号通路，从而抑制 LPS 诱导的炎症反应 [38]。三叶苷还可以拮抗巨噬细胞及脂肪细胞的炎症反应，减少炎症因子 TNF-*α*、IL-6、IL-1*β* 分泌；在巨噬细胞中，三叶苷可通过下调诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、CXC 趋化因子配体 10（CXC chemokine ligand-10，CXCL10）的表达，并抑制脂肪酸结合蛋白 4（fatty acid binding protein 4，FABP4）的 mRNA 和蛋白表达水平，改善 LPS 诱导的炎症反应 [39]；在脂肪细胞中，三叶苷可通过调节 miR-375-3p 影响 *FABP4* 基因表达、抑制炎

症反应，进而改善机体脂代谢[40]。

2.4 神经营养与保护作用

研究表明木姜叶柯叶水提物（根皮苷 0.64%、三叶苷 18.54% 及茶多酚 27.65%）和三叶苷均可显著促进 PC12 细胞增殖，且水提物的促增殖作用比三叶苷更显著，而不同浓度的根皮苷及茶多酚对 PC12 细胞的增殖均无影响[41]。木姜叶柯叶乙醇提取物能促进 Neuro-2a 细胞分化和神经轴突生长，其机制可能与激活 Akt 和细胞外信号调节激酶 1/2（extracellular signal-regulated kinase，ERK1/2）信号通路表达相关[42]。此外，木姜叶柯不同浓度总黄酮部位可以提高蟾蜍离体坐骨神经干动作电位幅度，降低阈强度，缩短绝对不应期，增强神经兴奋性，加快神经动作电位的传导[43]。三叶苷可以通过抑制 HT22 细胞内线粒体 ROS 的过量产生，恢复抗氧化酶活性，同时逆转 A$\beta_{25\text{-}35}$ 诱导的 Bax/Bcl-2 比率增加，Tau、JNK、p38-MAPK 磷酸化和 Sirt3 表达下降，抑制 ROS/p38-MAPK/caspase3 依赖性途径，阻碍神经元细胞死亡[44]。此外，三叶苷通过降低 SH-SY5Y 细胞乳酸脱氢酶产生，降低 Bax、NMDA-NR2B 蛋白表达，提高 Bcl-2 表达，促进细胞生长，提高细胞存活率，抑制 *N*- 甲基 -*D*- 天冬氨酸（*N*-methyl-*D*-aspartate，NMDA）对细胞的损伤作用[45]。这些研究表明三叶苷对神经细胞具有一定保护作用，将有助于木姜叶柯用于神经系统疾病防治。

2.5 抗肿瘤作用

木姜叶柯水提物能抑制乳腺癌细胞（MCF-7）增殖和集落形成，增加细胞凋亡，并能抑制裸鼠乳腺癌的生长；进一步研究发现其作用机制可能与上调 *PPARγ*、*Bax* 和 *caspase-3* 的基因和蛋白表达，下调 *cyclinD1* 和 *Bcl-2* 基因表达有关[46]。木姜叶柯挥发性组分亦具有抗肿瘤作用，在质量浓度为（27.50±0.10）μg·mL^{-1} 时，可诱导小鼠肝癌细胞 Hepa1c1c7 的醌还原酶活性呈剂量依赖效应增加，表明其具有较强的抗肿瘤活性[47]。

2.6 降血压和心脏保护作用

研究表明木姜叶柯总黄酮部位能显著降低自发性高血压大鼠的血压，而对正常血压无明显影响，能减少肾素和血管紧张素Ⅱ水平，但对内皮素、一氧化氮无明显影响，同时能促进皮肤微循环[48]。此外，三叶苷还能抑制细胞凋亡相关蛋白的表达，提高 SOD 活性和 Bcl-2 蛋白表达，保护缺氧缺糖对心肌细胞 H9C2 的损伤，其保护作用可能与上调 miR-539-5p 表达有关[49]。综上所述，木姜叶柯具有降血糖、降血脂及抗氧化作用，或可为代谢紊乱导致的动脉粥样硬化的预防提供新的思路。

2.7 抗菌、抗病毒作用

木姜叶柯不同溶剂的提取物对大肠埃希菌、普通变形杆菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、藤黄八叠球菌、枯草芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用，但对白假丝酵母菌没有明显效果；其中 70% 乙醇提取物中黄酮含量最高，对藤黄八叠球菌抑菌效果最明显[50]。根皮苷对金黄色葡萄球菌（革兰氏阳性菌）和大肠埃希菌（革兰氏阴性菌）均具有较强的抑制作用[51]。目前尚未见三叶苷抗菌作用报道，但三叶苷具有抗人类免疫缺陷病毒 1 型（human immunodeficiency virus type 1，HIV-1）作用，其作用机制可能是特异地靶向结合 gp41 的 N 末端重复序列区域，从而抑制 HIV 进入宿主[52]。此外，研究表明木姜叶柯三萜类成分也具有抗菌作用，lithocarpic acid A 对枯草芽孢杆菌和藤黄微球菌最低抑菌浓度分别为 6.3 μg·mL^{-1} 和 3.1 μg·mL^{-1}[10]，抑菌效果较为理想。

2.8 抗过敏作用

研究发现木姜叶柯在 85 ℃、固液比为 1∶25 的条件下，其 70% 乙醇提取物对透明质酸酶具有显著抑制作用，提取物质量浓度在 0.5 ～ 8.0 mg·mL^{-1} 抗过敏活性显著[53]。后续有研究发现其抗过敏主要活性成分为二氢查尔酮 -2'-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷和二氢查尔酮 -4'-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷[54]。

2.9 其他作用

三叶苷能抑制核因子 *κ*B 受体激活配体（receptor activates NF-*κ*B ligand，RANKL）诱导破骨细胞分化，降低破骨细胞基质金属蛋白酶 -9、组织蛋白酶 K、骨吸收蛋白（碳酸酐酶Ⅱ型、整联蛋白 *β*3）和破骨细胞生成信号蛋白（肿瘤坏死因子受体相关分子 -6）的表达；可以升高卵巢切除模型小鼠的骨保护素（osteoprotegerin，OPG）的表达，从而减轻骨丢失，防止骨质疏松[55]。

3 木姜叶柯质量评价

木姜叶柯由于产地来源、采收时期、采摘部位等不同，所含的活性成分及其含量均有一定的差异，直接影响其质量及效用。因此，产地和采收时间的选择具有重要意义。本文通过文献资料对木姜叶柯的有效成分综合分析，以期为木姜叶柯建立较为科学、合理的质量控制方法，为其产业化利用提供依据。

3.1 不同产地环境

通过超高液相色谱串联质谱对 5 个不同地区木姜叶柯分析，发现其叶中总多酚含量在 90 ～ 134 mg·g^{-1} 没食子酸当量[56]。通过田间随机区组试验结合方差和主成分进行分析，对 6 个省（区、直辖市）30 个木姜叶柯品种分析，发

现不同地区木姜叶柯中主要活性成分根皮苷和三叶苷含量存在明显差异，其中重庆种源（4 个）、广西种源（6 个）比其他地区的木姜叶柯品质更优[57]；通过高效液相色谱法对 15 份不同地区（广西 9 份、广东 1 份、湖南 3 份、江西 1 份、重庆 1 份）木姜叶柯样品分析，发现根皮苷和三叶苷的总含量也存在差异，其中产地为广西南宁南阳乡地区的木姜叶柯总含量较高，可达 31.62%[58]。产地不仅对木姜叶柯叶中有机化合物含量有影响，对其无机元素含量也有影响。通过三氯化铝法和液相色谱法等对 5 个不同源种的多穗柯叶进行检测分析，发现不同种源多穗柯叶总黄酮、根皮苷、三叶苷、有机碳、氮、磷、钾元素含量方面均存在极显著差异。其各成分含量变化范围如下：总黄酮（61.59 ～ 81.05 mg • g^{-1}）、根皮苷（16.03 ～ 64.35 mg • g^{-1}）、三叶苷（4.76 ～ 29.97 mg • g^{-1}）、有机碳（44.12 ～ 45.82 mg • g^{-1}）、氮元素（13.64 ～ 17.05 mg•g^{-1}）、磷元素（1.25 ～ 3.37 mg • g^{-1}）、钾元素（6.70 ～ 7.31 mg • g^{-1}）。此外，生长环境与总黄酮、三叶苷、根皮苷含量也有相关性。总黄酮含量随经度与降水量增加呈极显著增加的趋势，三叶苷含量随无霜期增加呈显著降低趋势，而根皮苷含量随日照时数增加呈显著降低趋势，并且与全氮含量成极显著正相关，与有机碳和全钾含量成显著负相关[59]。

3.2 不同采收时间和叶龄

有研究通过电喷雾质谱和磁共振法对云南、湖南、江西不同采收时间嫩叶、老叶的主要成分定量分析，发现黄酮类化合物含量在嫩叶中含量较高，随着叶的成熟而下降[5]。研究通过高效液相色谱法对怀化芷江不同采收时间和不同叶龄木姜叶柯进行分析，发现 3 ～ 8 月份其二氢查耳酮含量持续上升，8 月份达到最高值（5.43%），随后含量逐渐下降，12 月份含量约为 4.33%；不同叶龄相比较，嫩叶中的含量最高，而在两年生的老叶中二氢查耳酮的含量最低[60]。快速液相色谱测定发现，从木姜叶柯叶芽、细叶到中叶，其根皮苷的含量逐渐增高，而三叶苷的含量却逐渐下降[61]。研究通过高效液相色谱对 11 批不同季节采收的木姜叶柯叶进行含量测定，其中根皮苷 4 ～ 8 月份含量由 0.74% 大幅度增加至 6.26%，而三叶苷 4 ～ 6 月份含量由 17.14% 大幅度降低至 0.66%[62]。此外，研究通过高效液相色谱检测发现木姜叶柯其嫩叶中槲皮素和山柰酚苷元含量分别为 0.904% 和 0.123%，明显高于老叶中槲皮素（0.438%）和山柰酚苷元（0.102%）含量[63]。

采摘时间除影响含量外，对其活性作用也有影响。研究通过冷凝回流提取不同季节木姜叶柯叶中的根皮苷，同时通过 DPPH 检测根皮苷粗提物的抗氧化活性，发现木姜叶柯叶中根皮苷的含量在一年中随着季节的推移呈先上升后下降的趋势，秋季含量达到最高；而根皮苷粗提物对 HO • 和 O_2^- • 的清除率呈现先下降后上升的趋势，其中春季的根皮苷粗提物对 HO • 和 O_2^- • 的清除率最高[64]。

3.3 不同部位

研究通过 Folin-Ciocalteu 比色法对 12 份不同产地的木姜叶柯样品进行总酚含量测定，发现不同产地木姜叶柯中总酚含量差异较大，且不同部位和叶龄总酚含量也有差异，枝干样品中总酚含量远低于嫩叶，老叶中含量亦低于嫩叶[65]。研究通过高效液相色谱法对 15 份不同地区木姜叶柯样品进行分析，发现老叶与枝条中成分以根皮苷为主，最高含量可达 9.04%，而茶叶制品与鲜叶中成分以三叶苷为主，最高含量可达 24.35%[58]。研究通过高效液相色谱 - 二极管阵列检测器结合化学计量分析，对不同地区 26 批木姜叶柯嫩叶及花穗进行质量分析，发现嫩叶样品中根皮苷的平均含量为 24.77 mg • g^{-1}，低于花穗中的 56.57 mg • g^{-1}；而嫩叶样品中三叶苷的平均含量为 146.26 mg•g^{-1}，高于花穗中的 132.23 mg•g^{-1}[66]。

4 讨论及展望

木姜叶柯属珍贵的乔木类药材，富含多酚类、黄酮类和三萜类等物质，具有多种医疗保健功效，在我国侗族、瑶族、布依族等少数民族已有上千年的食用历史。随着木姜叶柯被批准为新食品原料，以及受众对其功能的进一步认识与了解，木姜叶柯类产品越来越受民众喜爱。然而，目前对木姜叶柯的研究与认识尚浅，其应用尚处于初级阶段，绝大部分以木姜叶柯为原料开发的产品为茶类产品（别样茶类），部分开发为抗氧化及调节血糖血脂的保健食品（仅限袋泡茶类），少量开发为食品添加色素及甜味剂，在医药领域的应用研究还停留在动物实验阶段。总体而言，针对木姜叶柯缺少深层次研究和高附加值产品开发，一方面木姜叶柯的开发利用受其批准应用形式 [嫩叶（芽），冲泡] 的限制，使得其研究仅集中在黄酮类成分的开发应用，而对三萜类和多酚类等成分知之甚少；且对黄酮类成分的研究又主要集中于老叶含量丰富的根皮苷成分，而对嫩叶中主要成分三叶苷的研究相对较少。此外，有研究表明木姜叶柯茶经全发酵后，乙醇提取物中总多酚和总黄酮的含量分别降低 26.39% 和 23.29%，三叶苷和根皮苷的含量分别降低 10.24%

和 39.37%，主要涩味物质儿茶素类化合物的含量降低 61.38%，而降血糖和抗氧化以及对肝脏、胰腺的保护作用显著优于发酵前[67]。因此，木姜叶柯嫩叶中三叶苷成分及发酵后药效物质的传递、药理作用及分子机制亟待深入研究。进一步拓展木姜叶柯的应用形式并明晰其功效成分与作用机制，将为木姜叶柯的开发利用带来广阔前景。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志（第 22 卷）[M]. 北京：科学出版社，1998：201.

[2] 彭勇，周君，黄宇潮，等 . 基于文献计量的木姜叶柯国内研究现状分析 [J]. 江西科学，2020，38（4）：607-610.

[3] 何春年，彭勇，肖伟，等 . 多穗柯甜茶的研究进展 [J]. 时珍国医国药，2012，23（5）：1253-1255.

[4] Wei WW，Wu P，You XY，et al. Dihydrochalcones from the leaves of *Lithocarpus litseifolius* [J]. J Asian Nat Prod Res，2021，23（9）：819-824.

[5] Yang J，Huang YY，Yang Z，et al. Identification and quantitative evaluation of major sweet ingredients in sweet tea（*Lithocarpus polystachyus* Rehd.）based upon location，harvesting time，leaf age [J]. J Chem Soc Pakistan，2018，40（1）：158-164.

[6] Zhao Y，Li X，Zeng X，et al. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus* [J]. Anal Methods-Uk，2014，6（5）：1359-1363.

[7] Wang MK，Liu X，Zhang ZJ，et al. Phytochemicals and bioactive analysis of different sweet tea（*Lithocarpus litseifolius* Hance Chun）varieties [J]. J Food Biochem，2021，45（3）：e13183.

[8] Liu LH，Peng J，Shi SL，et al. Characterization of flavonoid constituents in stems of *Lithocarpus litseifolius*（Hance）Chun by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. Curr Anal Chem，2021，17（4）：521-527.

[9] 吴东蓉，郝梓敏，付继珍，等 . 木姜叶柯研究进展 [J]. 贵州农机化，2018（4）：39-40，44.

[10] Wang HM，Ning RN，Shen Y，et al. Lithocarpic acids A-N，3，4-seco-cycloartane derivatives from the cupules of *Lithocarpus polystachyus* [J]. J Nat Prod，2014，77（8）：1910-1920.

[11] Ning RN，Wang HM，Shen Y，et al. Lithocarpic acids O-S，five homo-cycloartane derivatives from the cupules of *Lithocarpus polystachyus* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2014，24（23）：5395-5398.

[12] 谢仁康，罗蒙裕，周福才，等 . 珍稀药食同源植物——木姜叶柯生物学特性及应用价值 [J]. 特种经济动植物，2021，24（6）：35-37.

[13] 唐晓峰，陈宗道，包先进，等 . 甜茶应用开发研究 [J]. 西南农业大学学报，1998（2）：83-85.

[14] 冯芳，饶欣雨，程建峰，等 . 木姜叶柯的种植现状与开发利用 [J]. 现代农业科技，2021（19）：67-72，81.

[15] 梁坚 . 甜茶的研究进展 [J]. 广西医学，2004（6）：845-847.

[16] 申东，赖飞，姚文化，等 . 贵州野生天然饮料——甜茶 [J]. 茶叶通讯，2002（3）：5-7.

[17] Ejaz A，Wu DY，Kwan P，et al. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice [J]. J Nutr，2009，139（5）：919-925.

[18] Zhou CJ，Huang S，Liu JQ，et al. Sweet tea leaves extract improves leptin resistance in diet-induced obese rats [J]. J Ethnopharmacol，2013，145（1）：386-392.

[19] 张俭，曾军英，唐铭 . 多穗柯不同液相提取物对糖尿病小鼠 MDA/CAT 活性的影响 [J]. 湖北农业科学，2012，51（2）：354-357.

[20] 潘慧敏，何春年，姜保平，等 . 多穗柯乙醇提取物不同萃取部位及 5 个主要成分对 HepG2 细胞胰岛素抵抗改善作用的研究 [J]. 中南药学，2015，13（6）：570-574.

[21] 韦宝伟，李茂，李伟芳 . 多穗柯总黄酮的降糖作用 [J]. 内科，2008（4）：510-512.

[22] 韦宝伟，刘布鸣，曾宪彪，等 . 木姜叶柯总黄酮对大小鼠血糖和糖耐量的影响 [J]. 现代药物与临床，2012，27（1）：19-22.

[23] Hou SZ，Chen SX，Huang S，et al. The hypoglycemic activity of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves in the experimental hyperglycemic rats [J]. J Ethnopharmacol，2011，138（1）：142-149.

[24] Zhang W，Chen SQ，Fu HL，et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of phlorizin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd in diabetes rats [J]. Food Sci Nutr，2021，9（4）：1989-1996.

[25] 王冰心，朱冬梅，刘华桢，等 . 根皮苷对肥胖小鼠的降脂保肝作用及机制研究 [J]. 中药材，2019，42（3）：647-651.

[26] 张毅，宁正祥，董华强 . 多穗柯三叶苷的抑制糖尿病关键酶活性和抗氧化性 [J]. 食品科学，2011，32（5）：32-35.

[27] Liu M，Wang LJ，Li XG，et al. Trilobatin ameliorates insulin resistance through IRS-AKT-GLUT4 signaling pathway in C2C12 myotubes and ob/ob mice [J]. Chin Med-Uk，2020，15（1）：110.

[28] Gao JM，Xu YS，Zhang JY，et al. *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves aqueous extract protects against hydrogen peroxide-induced SH-SY5Y cells injury through activation of Sirt3 signaling pathway [J]. Int J Mol Med，2018，42（6）：3485-3494.

[29] 陈文，门雪，罗秋月，等 . 不同工艺木姜叶柯提取物清除氧自由基作用的研究 [J]. 北方药学，2017，14（9）：146，153.

[30] 李胜华，伍贤进，曾军英 . 多穗柯中总黄酮的体内和体外抗氧化研究 [J]. 中国药学杂志，2014，49（9）：731-735.

[31] Li SH，Zeng JY，Tan J，et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Lithocarpus polystachyus* against carbon tetrachloride-induced injuries in rat [J]. Bangl J Pharmacol，2013，8（4）：420-427.

[32] 刘晓东，温雯静，赵志军 . 多穗柯总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 医药导报，2020，39（12）：1626-1630.

[33] 董华强，宁正祥，于立静，等 . 多穗柯黄酮根皮苷对

糖尿病小鼠的降血糖血脂效果 [J]. 食品科学，2006，27（12）：714-718.
[34] Sun YS，Li W，Liu ZB. Preparative isolation，quantification and antioxidant activity of dihydrochalcones from sweet tea（*Lithocarpus polystachyus* Rehd.）[J]. J Chromatogr B，2015，1002：372-378.
[35] Shen T，Shang Y，Wu QL，et al. The protective effect of trilobatin against isoflurane-induced neurotoxicity in mouse hippocampal neuronal HT22 cells involves the Nrf2/ARE pathway [J]. Toxicology，2020，442：152537.
[36] Gao JM，Liu S，Xu F，et al. Trilobatin protects against oxidative injury in neuronal PC12 cells through regulating mitochondrial ROS homeostasis mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 signaling pathway [J]. Front Mol Neurosci，2018，11：267.
[37] 范小龙，董华强，张英慧，等 . 多穗柯三叶苷对脂多糖诱导小鼠炎症反应的保护作用 [J]. 食品科学，2014，35（21）：186-189.
[38] Fan X，Zhang Y，Dong H，et al. Trilobatin attenuates the LPS-mediated inflammatory response by suppressing the NF-κB signaling pathway [J]. Food Chem，2015，166：609-615.
[39] 吴玉翠 . FABP4 与三叶苷拮抗巨噬细胞炎症反应的相关性研究 [D]. 重庆：重庆理工大学，2020.
[40] 李心淦 . FABP4 与三叶苷拮抗脂肪细胞炎症反应的相关性研究 [D]. 重庆：重庆理工大学，2020.
[41] 吕纯，高健美，邓艳，等 . 多穗石柯叶水提物及其主要成分对 PC12 细胞增殖的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33（6）：446.
[42] 周准，王衣清，彭瑶，等 . 多穗柯甜茶乙醇提取物对 Neuro-2a 细胞分化的影响 [J]. 怀化学院学报，2019，38（5）：46-50.
[43] 向德标，李胜华，伍贤进，等 . 多穗柯总黄酮对蟾蜍坐骨神经干动作电位的影响 [J]. 基因组学与应用生物学，2017，36（3）：1189-1194.
[44] Chen N，Wang J，He Y，et al. Trilobatin protects against Aβ（25-35）-induced hippocampal HT22 cells apoptosis through mediating ROS/p38/Caspase 3-dependent pathway [J]. Front Pharmacol，2020，11：584.
[45] 周芮萱，马松涛，蒋刚 . 三叶苷对 *N*- 甲基 -*D*- 天冬氨酸诱导的人神经母细胞瘤细胞损伤的保护作用 [J]. 安徽医药，2019，23（10）：1926-1929.
[46] Lin CY，Wang L，Wang H，et al. *Lithocarpus Polystachyus* Rehd leaf aqueous extract inhibits human breast cancer growth in vitro and in vivo [J]. Nutr Cancer，2014，66（4）：613-624.
[47] 燕妮，王佐，高雄，等 . 多穗柯挥发性组分分析及抗癌活性的初步研究 [J]. 现代食品科技，2017，33（3）：35-39，73.
[48] Hou SZ，Xu SJ，Jiang DX，et al. Effect of the flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. on spontaneously hypertensive and normotensive rats [J]. J Ethnopharmacol，2012，143（2）：441-447.
[49] 王栋宇，邵春芝，孙伟，等 . 三叶苷调控 miR-539-5p 表达保护缺氧缺糖心肌细胞损伤研究 [J]. 中国药师，2021，24（3）：462-467.
[50] 李胜华，伍贤进，向晓军 . 多穗柯有效成分的提取及抑菌效果研究 [J]. 食品科技，2010，35（3）：211-214.
[51] 罗颖，黄帅，杨雪彬，等 . 木姜叶柯老叶根皮苷的抗氧化及抑菌活性研究 [J]. 中国食品添加剂，2021，32（2）：51-57.
[52] Yin SW，Zhang XX，Lai FY，et al. Trilobatin as an HIV-1 entry inhibitor targeting the HIV-1 Gp41 envelope [J]. Febs Lett，2018，592（13）：2361-2377.
[53] 赵红芳，杨亚玲，周强 . 云南甜茶中总黄酮的提取及其抗过敏活性研究 [J]. 河北化工，2006（5）：10-11.
[54] 杨勇，彭炳华，马庭升，等 . 保健甜茶 - 多穗柯的研究与开发 [J]. 时珍国医国药，2007，18（4）：1014-1015.
[55] Kim SC，Kim HJ，Park GE，et al. Trilobatin ameliorates bone loss via suppression of osteoclast cell differentiation and bone resorptive function in vitro and in vivo [J]. Life Sci，2021，270：119074.
[56] Meng Y，Ding L，Wang Y，et al. Phytochemical identification of *Lithocarpus polystachyus* extracts by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-MS and their protein tyrosine phosphatase 1B and α-glucosidase activities [J]. Biomed Chromatogr，2020，34（1）：e4705.
[57] 王坤，黄晓露，李宝财，等 . 30 个多穗柯种源主要经济性状及活性成分分析与评价 [J]. 西南农业学报，2019，32（5）：1051-1056.
[58] 张亚洲，王涛，朱晶晶，等 . 木姜叶柯中根皮苷与三叶苷含量测定研究 [J]. 中国药业，2018，27（18）：5-8.
[59] 何平，厉月桥，刘儒，等 . 不同种源多穗柯主要生物活性成分与矿质元素含量变异分析 [J]. 中南林业科技大学学报，2021，41（1）：188-194.
[60] 李胜华，伍贤进，牛友芽 . HPLC 测定多穗柯中二氢查耳酮含量研究 [J]. 食品科技，2010，35（6）：281-283.
[61] 何春年，彭勇，肖伟，等 . RSLC 快速测定多穗柯甜茶中 5 种甜味成分 [J]. 中国中药杂志，2012，37（7）：961-965.
[62] 王钰，王磊，张东星，等 . 高效液相色谱法测定木姜叶柯中根皮苷、三叶苷和根皮素的含量 [J]. 天津科技，2019，46（7）：66-68，70.
[63] 杨彩艳，陈全斌 . 多穗柯甜茶叶黄酮提取及含量测定 [J]. 广东化工，2011，38（2）：152-154.
[64] 王代波，刘国华，李冰晶，等 . 多穗柯叶中根皮苷的含量变化及抗氧化性 [J]. 贵州科学，2021，39（1）：23-26.
[65] 敖绍林，宋成建，周贤平，等 . 木姜叶柯茶样品中总酚含量测定研究 [J]. 贵州农机化，2019（1）：42-45.
[66] Wei M，Tuo YL，Zhang Y，et al. Evaluation of two parts of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. from different chinese areas by multicomponent content determination and pattern recognition [J]. J Anal Methods Chem，2020，2020：8837526.
[67] 刘韫滔，黄伟民，李诚，等 . 木姜叶柯全发酵茶的活性成分及其降血糖活性研究 [J]. 食品与发酵工业，2020，46（20）：53-60.

（收稿日期：2022-04-13；修回日期：2022-05-30）

注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注后脑功能保护作用的研究进展

李汶泽[1, 3]，李智[2, 3]，万梅绪[2, 3]，张燕欣[2, 3]，许晴[2, 3]，李德坤[2, 3]，庄朋伟[1]，鞠爱春[2, 3]（1.天津中医药大学，天津 300193；2.天津天士力之骄药业有限公司，天津 300410；3.天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室，天津 300410）

摘要：缺血性脑卒中是当前我国高发的疾病之一，严重威胁人们的生命健康安全。因其致死率高，恢复期漫长，治疗预后不理想，历来为研究者所重视。注射用丹参多酚酸（SAFI）是冻干粉针剂，目前在国内治疗缺血性脑卒中中应用广泛。脑缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中损伤神经功能的重要环节。近年来，国内外学者对 SAFI 在脑缺血再灌注后神经保护作用进行了大量研究，本文围绕抗氧化、抗炎、血脑屏障、调节小胶质细胞、调节信号通路、蛋白和基因影响等，就 SAFI 及其单体成分在脑缺血再灌注损伤中的脑功能保护作用及其机制进行了综述，以期为 SAFI 进一步开发和利用提供参考，为其临床应用提供理论依据。

关键词：缺血性脑卒中；脑缺血再灌注；神经保护；丹参多酚酸 B；抗炎；抗氧化；调节信号通路
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2658-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.034

Research progress in the protective effect of salvianolic acid for injection on cerebral function after the cerebral ischemia-reperfusion

LI Wen-ze[1, 3], LI Zhi[2, 3], WAN Mei-xu[2, 3], ZHANG Yan-xin[2, 3], XU Qing[2, 3], LI De-kun[2, 3], ZHUANG Peng-wei[1], JU Ai-chun[2, 3] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300193; 2. *Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Tianjin* 300410; 3. *Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections*, *Tianjin* 300410)

Abstract: Ischemic stroke is currently a prevalent disease in China, which seriously threatens the life and health of Chinese people. Researchers have paid much attention to it because of its high mortality, long recovery period and poor prognosis. Salvianolic acid for injection (SAFI) is a lyophilized powder injection manufactured by Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd, and is now widely used for ischemic stroke in China. Cerebral ischemia-reperfusion injury is an important neurological function in ischemic stroke. In recent years, domestic and foreign scholars have conducted a lot of research on the neuroprotective effect of SAFI after the cerebral ischemia-reperfusion. This article focused on the antioxidation, anti-inflammatoion, blood-brain barrier, regulation of microglia, signaling pathways, protein and gene effects reviewed the neuroprotective effect of SAFI and its monomer components in the cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanism, hoping to provide a theoretical basis for the clinical use of SAFI and a reference for further development and utilization of this preparation.

Key words: ischemic stroke; cerebral ischaemia reperfusion; neuroprotection; salvia miltiorrhiza polyphenolic acid B; anti-inflammatory; antioxidant; regulating signalling pathway

人口老龄化问题日益严重，心脑血管疾病中，特别是缺血性脑血管疾病，已成为对人类健康产生威胁的严重疾病。每年我国因缺血缺氧性心脑血管病死亡的人数约有 300 万人。缺血性脑

作者简介：李汶泽，男，在读硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：1425543591@qq.com *通信作者：鞠爱春，男，正高级工程师，主要从事中药注射剂工艺及质量控制，email：1272850453@qq.com；庄朋伟，男，教授，主要从事中药药理学研究，email：zhaungpengwei@163.com

卒中临床治疗指南指出：脑缺血疾病的治疗中尽可能早地恢复脑组织供血供氧是治疗的重要手段。然而，当患者脑部供氧恢复后，脑功能受到了严重的障碍损伤，即脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury，CIRI）[1]。

1 CIRI 的病理机制

1.1 CIRI 的现代医学研究

CIRI 系在发生脑缺血后，脑组织的细胞受到损伤，待脑血管的血液重新恢复流动后，脑部的缺血性损伤未减轻，相反更加严重的现象。全世界每年罹患缺血性脑血管疾病的患者病死率高达 30%，是造成残疾和死亡的重要原因。CIRI 病理过程十分复杂，病理机制牵涉炎症反应、兴奋性氨基酸（EAA）毒性、细胞内 Ca^{2+} 超载等多个环节 [2]。目前分子免疫学和分子生物学发展日益进步，众多研究指出，在继发性脑损伤中存在免疫损伤。发生 CIRI 后，免疫细胞释放氧自由基等物质，作用于内皮细胞，对内皮细胞的结构和功能造成破坏，血液中血小板聚集，在免疫细胞影响下相互作用，阻塞微血管，导致损伤 [3]。

在 CIRI 的发展中，缺血位置脑组织没有足够的血氧供应，主要通过无氧酵解获得能量。Na^+/K^+-ATP 酶的活性下降，细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度上升。一旦 Ca^{2+} 浓度上升，随之大量释放兴奋性氨基酸递质谷氨酸，谷氨酸与受体结合，活性氧与活性氮大量产生，引起氧化应激损伤和硝化应激损伤。血脑屏障通透性受到影响，细胞自噬因子促进表达，血脑屏障进一步被破坏，引发细胞自噬。炎性因子方面，当 CIRI 发生时，激活脑部小胶质细胞、星形胶质细胞、巨噬细胞，促进诸多炎性因子如：肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、IL-1β 的大量释放，导致炎症反应加剧。CIRI 发生和发展的许多联系环节中，各种因素相互交错，彼此影响，共同引发脑组织神经细胞的损伤、坏死乃至凋亡 [4]。

1.2 CIRI 的传统中医研究

就中医理论而言，CIRI 从属于“中风”一类范畴，气滞血瘀、脑络不通和气虚不能统血分别为缺血性脑卒中和出血性脑卒中的病机 [5]。本虚标实，肝肾阴虚，而至气虚血瘀。虚证是根本，有“气虚致中”之说，“中风诸症皆为气虚所致”[6]，“元气亏损”是缺血性脑卒中的主要原因 [7]。气虚则血虚，脉道失荣。“气行则血行，气止则血止，气温则血滑，气寒则血凝”[8]。目前临床采用的方法主要是溶栓治疗、神经保护、自由基清除等。由于治疗的时间窗很短，恢复往往不理想。近年来中药复方制剂在缺血性脑血管疾病的预防和治疗上取得了良好的成果。

注射用丹参多酚酸（SAFI）是由丹参水提物中的多种丹酚酸组成的中药制剂，有活血通络功效，用于中风病中经络（轻中度脑梗死）恢复期瘀血阻络证 [9]。SAFI 的主要化学成分为丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 D、丹酚酸 Y、丹酚酸 A 等水溶性酚酸 [10]。现代药理研究表明，SAFI 具有抗炎、抗氧化应激、神经营养、再生和对脑神经血管单元的保护等药理作用 [11]，能够明显改善缺血性脑卒中患者的神经功能损伤情况，恢复其日常生活行为，提高预后效果和生存质量 [12]。

目前针对 SAFI 对 CIRI 的药效研究比较明确，但仍有许多作用机制有待深入研究。本文综述了 SAFI 对 CIRI 的脑功能保护作用及其作用机制的研究，以期为 SAFI 发挥脑功能保护作用基础研究提供新的思路，为其临床疗效的精确定位提供理论支持。

2 SAFI 对 CIRI 保护作用的临床研究

2.1 改善神经功能缺损症状

王巧燚等 [13] 研究 64 例缺血性脑卒中患者，参照组口服他汀类降脂药、抗血小板聚集药等常规治疗方案，观察组在常规治疗基础上，加用丹参多酚酸治疗。结果观察组超敏 C- 反应蛋白（hs-CRP）、缺氧诱导因 1α（HIF-1α）的水平均显著改善，效果优于参照组；用美国国立卫生研究院卒中量表（NIHSS）评分，参照组低于观察组 [（7.13±1.11）分和（9.23±1.38）分]，说明丹参多酚酸可有效改善神经功能缺损。

刘晗等 [14] 选取多中心、随机、双盲、平行对照等临床试验，选用急性缺血性脑卒中患者，对其 NIHSS 评分和 Barthel 指数评分进行评估。研究组和对照组的 NIHSS 评分、Barthel 指数组间差异均有统计学意义（$P < 0.05$），治疗后 30 d、90 d 研究组预后良好率优于对照组。说明 SAFI 可以用于治疗脑缺血再灌注神经功能缺损。

2.2 降低梗死体积

唐子又 [15] 探讨了丹参多酚酸盐注射液在治疗缺血性脑卒中患者的治疗效果以及治疗后对血清溶血磷脂酸（LPA）、同型半胱氨酸（Hcy）、hs-CRP 水平的影响，干预组的 hsCRP、Hcy、LPA 水平不同程度降低，证明丹参多酚酸盐在缺血性脑卒中的治疗过程中，安全性较高，可有效缓解患者的临床症状，降低 hs-CRP、Hcy、LPA 水平及脑血管梗死体积。

2.3 改善脑水肿

王楠 [16] 报道了 80 例脑卒中患者，分别给予阿

替普酶治疗（对照组）、丹参多酚酸联合阿替普酶治疗（研究组），统计患者血液流变指标、神经功能损伤程度、QLI 评分及临床治疗效果进行对比，其中对照组临床疗效为 77.50%，研究组临床疗效为 97.50%。结果表明丹参多酚酸可改善脑水肿。

2.4 增加脑血流

艾艳萍等[17]选取 90 例缺血性脑卒中患者为研究对象，入院后要求在 4.5 h 内开展治疗，对照组进行常规药物治疗，试验组在常规药物治疗的基础上使用丹参多酚酸，2 周后进行比较，损伤率试验组为 4.44%，对照组为 22.22%，试验组效果有明显提升，说明丹参多酚酸有增加脑血流的作用。

2.5 抗血栓

高爱民等[18]的研究选取入院治疗的 100 例缺血性脑卒中患者作为研究对象，观察组在常规治疗基础上注射 SAFI 进行治疗，患者血清 hs-CRP 水平均低于治疗前。其血浆黏度、全血黏度高切、全血黏度低切、红细胞比容也较治疗前降低。结果表明 SAFI 可以降低血清 hs-CRP 水平，调节血液流变参数，起到抑制血栓生成的作用。

3 SAFI 对 CIRI 保护作用药理学研究

3.1 SAFI 对脑功能保护作用

3.1.1 抗炎抗氧化损伤 贾壮壮等[19]选用 Nissl 染色，神经元核蛋白（NeuN）免疫荧光染色两种方法，观察 CIRI 大鼠神经元损伤状态。结果显示 CIRI 大鼠脑部神经功能损伤、组织形态变化等情况均得到不同程度改善，促进了 M2 型小胶质细胞 CD206/Iba-1（巨噬细胞标志物）的表达；提升 CD206、IL-10 的蛋白表达水平；抑制 M1 型小胶质细胞 CD16/Iba-1 表达；下调 IL-1β、IL-6、TNF-α 等蛋白表达。可见丹参多酚酸对大鼠 CIRI 有显著调节作用，其作用机制可能是促进小胶质细胞 M1 型极化向 M2 型转换。

王富江等[20]研究关注 SAFI 针对局灶性 CIRI 大鼠脑组织中星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制。选取 Longa 法建立大鼠大脑中动脉闭塞 / 再灌注（MCAO/R）模型，形成缺血 1.5 h-再灌注 24 h 后，大鼠尾静脉注射给予 SAFI。结果显示给药组大鼠神经功能损伤改善，病死率明显降低，SAFI 可促进星形胶质细胞活化，抑制小胶质细胞活化，发挥对 CIRI 的保护作用。下调胶质纤维酸性蛋白（GFAP）和 IBA-1 的表达，抑制高迁移率族蛋白通路和 IL-8 信号通路，调节星形胶质细胞和小胶质细胞活化，是其可能的作用机制。

马岱朝[21]研究了通路中分子表达的影响，考察了 SAFI 抑制小胶质细胞 P2X7/NLRP3/ GSDMD 通路，从而对大鼠 CIRI 起到神经保护作用及其分子机制。SAFI 可以明显恢复模型鼠神经功能损伤，对氧糖剥离再灌注（OGD/R）处理的神经元具有直接神经保护作用，也有一部分可能通过拮抗小胶质细胞对神经细胞的毒性，间接起到保护神经功能的作用。作用机制可能是 SAFI 通过小胶质细胞 P2X7/NLRP3/GSDMD 通路抑制 NLRP3 炎症的激活及细胞凋亡，控制下游炎症发展。

孙瑞坦等[22]选用成年雄性 SD 大鼠健康个体，对大鼠术后神经行为学评分、脑梗死体积进行评定。并检测大鼠脑组织中过氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）等指标。结果显示脑组织中 SOD、GSH-Px 等指标均明显升高，MDA 明显下降，表明 SAFI 可以治疗 CIRI，其机制可能是促进清除脑中氧自由基，抑制脂质过氧化，减少梗死体积，起到神经保护效果。

唐浩等[23]在大鼠脑再灌注 24 h 后对软脑膜静脉中过氧化物产生、白细胞黏附、白蛋白渗出情况进行了观察。用神经功能评分、TTC 染色、脑含水量测定、MDA 含量测定等考察脑神经元损伤程度。结果显示 SAFI 可改善大鼠脑缺血再灌注引起的微循环障碍，缓解神经功能损伤；可使细胞膜亚基 GP91PHOX 增加，激活腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK），抑制蛋白激酶 B（AKT）的磷酸化及蛋白激酶（CPKC）的转位。结果表明 SAFI 可改善脑缺血再灌注形成的神经功能损伤，主要机制通过调节 AMPK/AKT/PKC 相关通路抑制脑缺血再灌注后还原型辅酶Ⅱ（NADPH）氧化酶的激活。

脑部炎性反应形成脑细胞缺氧、代谢紊乱，导致脑细胞坏死和神经功能障碍，常出现脑水肿、颅内压增高，需要维持正常的颅内压，营养脑细胞，促进脑功能恢复。CIRI 时炎性因子大量释放，SAFI 可以抑制这种现象，抑制炎症发展和细胞凋亡，保护脑神经功能。

氧化应激是指生物体内氧化作用与抗氧化作用失衡的一种状态，氧化过程大于抗氧化过程，产生大量中间产物，造成 CIRI 时脑部细胞损伤。SAFI 可以促进清除脑中氧自由基，抑制氧化应激反应，恢复脑细胞生理功能，抑制细胞凋亡。

3.1.2 调节线粒体 ATP 酶活性 李富强等[24]的研究应用 HE 染色法，对大鼠大脑神经元组织病理变化过程观察分析。利用分光光度计法，测量脑细胞中线粒体 MDA 的含量和 Na^+/K^+-ATP 酶、Ca^{2+} ATP 酶、Mg^{2+} ATP 三种酶的生理活性，治疗组脑部梗死体积有所减轻，线粒体中 MDA

的含量有所下降，观察到其中 Na^+/K^+ ATP 酶、Ca^{2+} ATP 酶、Mg^{2+} ATP 三种酶活性与治疗前相比有所升高。进而得出结论，SAFI 对 CIRI 具有神经保护作用，作用机制与提高线粒体 ATP 酶活性有密切关系。

侯帅[25]通过研究原代培养的星形胶质细胞糖氧剥夺模型（oxygen glucose deprivation，OGD），应用免疫荧光定位法，观察了星形胶质细胞中缝隙连接蛋白 43（Cx43）的分布状况。检测 SOD 活力和 MDA 含量，以此评价不同给药情况下线粒体功能变化，然后针对脑皮层梗死区 Cx43、p-Cx43 等蛋白表达含量定量检测，结果表明线粒体 Cx43 可以在 CIRI 中起到保护神经血管单元的作用，通过线粒体 ATP 敏感性钾通道，调节 PKC 活性，发挥神经保护作用。

线粒体功能发生障碍，影响缺血性脑损伤过程。CIRI 发生时，线粒体 ATP 酶活性下降，影响神经细胞的凋亡，SAFI 可以提高线粒体 ATP 酶活性，从而发挥脑功能保护作用。

3.1.3 保护血脑屏障 贾壮壮等[26]的研究选择 mNSS 评分法，评估大鼠神经功能损伤程度，结果显示 CIRI 大鼠神经功能缺损显著改善、组织形态学变化改善、显著提升紧密连接（TJs）蛋白 Claudin-5、Occludin 以及基底膜相关蛋白 Col-Ⅳ、LN 的表达，抑制基质金属蛋白酶（MMP）-2、MMP-9 蛋白表达。结论表明丹参多酚酸可以抑制 MMPs 的表达，缓解脑微血管内皮连接蛋白及基底膜损伤，从而抑制缺血后血脑屏障损伤，减轻脑神经损伤。

曹自为等[27]的研究选用 mNSS 法评估大鼠神经功能损伤情况，结果表明丹参多酚酸可以显著抑制高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）、P-53、NF-κB 蛋白表达；加用丹参多酚酸组大鼠沉默信息调节因子（1SIRT1）蛋白表达明显提升，HMGB1 mRNA 表达明显降低，神经细胞凋亡指数下降。结论表明丹参多酚酸可以通过促进 SIRT1 转录，抑制 HMGB1 迁移和表达，减少炎症因子 P-53、NF-κB 的释放，抑制神经细胞凋亡，从而减轻大鼠 CIRI 神经功能损伤。

王伟[28]研究选取 Zea Longa 法制备大鼠脑缺血再灌注模型，给予 SAFI。选用 Western blot 法测定脑组织中半胱氨酸蛋白水解酶（Caspase-12）的蛋白含量。缺血再灌注损伤时，内质网产生大量错误折叠蛋白。当内质网功能难以修复时，将激活 Caspase-12 蛋白酶系统，启动细胞死亡程序。结果显示使用 SAFI 大鼠脑梗死体积明显减少；降低 Caspase-12 的蛋白表达，抑制细胞死亡程序。结果表明抑制内质网应激是 SAFI 发挥脑神经保护作用的可能途径之一。

何前松等[29]的研究考察了 SAFI 对糖尿病脑损伤大鼠神经行为恢复的影响，以及其对脑组织中相关微管蛋白（MAP2）表达的影响。通过构建脑损伤糖尿病大鼠模型，经过 SAFI 治疗，明显改善大鼠神经功能。观测脑组织中 MAP2 蛋白和 mRNA 表达情况，结果表明 MAP2 蛋白和 mRNA 表达增多。SAFI 能显著改善脑神经功能，作用机制可能是促进脑组织中 MAP2 蛋白表达。

血脑屏障保护脑组织不受循环血液中有害物质损害，维护脑部内环境稳定，其功能遭到破坏，是 CIRI 损伤的重要原因。在 CIRI 过程中，SAFI 可以影响多种紧密连接蛋白、HMGB1、P-53、NF-κB 蛋白、MAP2 等蛋白的表达，起到保护血脑屏障、减轻炎症反应、抑制细胞凋亡的作用，从而起到脑功能保护作用。

3.1.4 调节相关信号通路 贾壮壮等[30]的研究观察 MCAO 大鼠脑部血流、脑部神经功能损伤、神经元凋亡情况，以及磷酸肌醇 -3- 激酶（PI3K）、蛋白激酶（p-AKT/AKT）等相关蛋白表达情况。结果显示 SAFI 显著改善大鼠脑血流状况，改善神经功能损伤，减少组织形态变化，抑制神经元凋亡，上调 Bcl-2/Bax、PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达，下调 cleaved caspase-3 蛋白表达。结果表明 SAFI 可以调节 PI3K/AKT 信号通路，缓解神经元损伤。

张雯等[31]探索了 SAFI 缓解大鼠 CIRI 的原因，构建了“成分 - 靶点 - 通路 - 疾病”多层次多方位网络模型。结果 SAFI 明显减轻大鼠肢体偏瘫，恢复其运动能力，降低脑梗死体积，提高 OGD/R 损伤后，PC12 细胞中 Akt 信号转导和转录激活因 3（STAT3）的磷酸化水平，作用机制可能与 PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 信号通路共同作用有关。

Yin 等[32]选用人 EA.hy926 细胞体外培养，选取主要的 12 种 SAFI 有效成分，观察抗人凝血因子ⅡA（FⅡA）和凝血因子 XA（FXA）活性，以及纤溶酶原激活物抑制物 -1（PAI-1）和 t-PA 蛋白及基因表达。大量的临床证据表明 SAFI 抗血栓作用明确且良好[33]。体外细胞模型实验结果表明，SAFI 具有良好的抗血栓能力，有效成分中紫草酸的抗血栓活性最强，其次是丹酚酸 B。紫草酸可通过 NF-κB/JNK/p38MAPK 信号通路抑制血栓的形成。

何前松等[34]探讨了 SAFI 对糖尿病大鼠 CIRI 相关基因表达的影响。腹腔注射链脲佐菌素

（STZ）溶液构造大鼠糖尿病模型。选取基因芯片技术，观察脑组织中相关基因表达，选择 SAFI 治疗后，表达出现改变的基因有 64 条，其中 45 条基因上调，19 条基因下调，其中与炎症、凋亡密切相关的 *MMP-9* 和 *c-fos* 基因下调，提示其可能是药物作用的靶点。

信号通路是将分子信号经过细胞膜传导进入细胞内部，从而发挥相应作用的酶促反应通路。CIRI 发生时，SAFI 主要通过 PI3K/AKT 信号通路、JAK2/STAT3 信号通路、NF-κB/JNK/p38MAPK 信号通路三条蛋白传送途径，激活或抑制上下游相关蛋白表达，调节 *MMP-9* 和 *c-fos* 基因，达到改善脑神经功能损伤，恢复运动能力，抑制血栓生成等治疗效果。

3.2 SFAI 中单体成分的神经保护作用

3.2.1 丹参多酚酸 B（Sal B） Sal B 是一种低聚体化合物 [35]，是丹参中含量最高、生物活性最强的水溶性化合物 [36]。Sal B 具有抗炎、抗氧化、清除氧自由基、缺血性神经损伤保护等重要作用 [37-38]。

Zhu 等 [39] 选取 Janus 激酶 2 和转录激活因子 3，考察 SMND-309（Sal B 有效衍生物）的作用机制。SMND-309 上调促红细胞生成素（EPO）、促红细胞生成素受体（EPOR）的水平，从而缓解 CIRI，作用机制可能是 JAK2/STAT3 通路调节 VEGF 表达增加，大脑中 EPO/EPOR 表达激活，起到脑部神经保护的作用。Jiang 等 [40] 建立小鼠 CIRI 模型。测定其 MDA 含量、NOS 活性、SOD 活性和总抗氧化能力（T-AOC），检测海马 CA1 神经元变化和 Bcl-2 和 Bax 两种蛋白表达。结果显示，实验小鼠大脑 MDA 含量和 NOS 活性显著下降，SOD 活性提升，T-AOC 提升；Bcl-2 蛋白表达显著上调，Bax 蛋白表达下调。表明 Sal B 能够发挥神经保护作用，其作用机制可能是通过线粒体依赖通路对 CIRI 小鼠海马 CA1 神经元形成保护。Zhong 等 [41] 采用 BrdU 方法研究大鼠侧脑室的室下区（SVZ）和海马齿状回的亚粒状区（SGZ）的神经影响。结果显示，SGZ 和 SVZ 中的 BrdU 阳性细胞增加，Sal B 明显改变神经元缺损，恢复同侧 CA1 和大脑神经元数量。Sal B 刺激脑缺血发生后 SGZ 和 SVZ 的神经发生过程，缓解大鼠脑部神经功能损伤，恢复受损的运动功能。Zhang 等 [42] 的研究建立了小鼠急性脑缺血模型。观察能量电荷（EC）、磷酸肌酸（PCr）含量、乳酸水平（Lac）。结果显示，经 Sal B 治疗后 EC、PCr 含量明显提升，Lac 水平、脑含水量均明显降低。结果表明 Sal B 可以通过改善小鼠能量代谢来治疗脑积水与 CIRI。

Sal B 是 SAFI 中主要的有效成分，作用广泛。近来研究表明，Sal B 除了传统的抗炎、抗氧化、调节 VEGF 之外，可以通过刺激脑缺血发生后 SGZ 和 SVZ 的神经发生过程、改善小鼠能量代谢起到脑神经保护作用。

3.2.2 丹参多酚酸 D（Sal D） Sal D 是从丹参中提取的生物活性化合物，近年来研究日益广泛 [43]。近期研究显示，Sal D 可以促进羟基自由基清除 [44]，表现出抗血小板活性，抑制过氧化物酶作用。

Zhang 等 [45] 的研究选取 MCAO/R 损伤模型，在 PC12 细胞中建立 OGD/R 损伤模型。检测神经功能损伤程度、脑梗死体积，水肿情况。结果显示，Sal D 能够明显缓解 I/R 大鼠的神经功能缺损、缩小脑梗死体积，治疗脑水肿。Sal D 恢复 OGD/R 下调的 PC12 细胞活力，促进 Bcl-2 表达，抑制 Bax、细胞色素 C 等表达。显著降低体内 Toll 样受体 4（TLR4）、髓样分化因子（MyD88）和肿瘤坏死因子受体相关分子 6（TRAF6）蛋白表达。Sal D 还可以抑制 I/R 大鼠皮质和海马区神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中的 HMGB1 细胞质易位。Sal D 通过抑制炎症缓解脑功能损伤，其机制与 HMGB1 的核质易位减少，抑制下游 TLR4/MyD88/NF-κB 信号传导有密切关系。

3.2.3 迷迭香酸 迷迭香酸（rosmarinic acid，RA）属于酚酸类物质，能溶于水，具有抗凋亡、抗炎作用 [46]。

Cui 等 [47] 的研究建立了 CD-1 小鼠缺血性中风模型。选取改良的 Longa 评分，估算脑神经功能损伤情况；选取 TUNEL 染色法，检查细胞凋亡情况；选取实时定量 PCR 分析 Nrf2、HO-1、Bcl-2 和 Bax 等的表达情况。结果 RA 能促进 Bcl-2、HO-1、Nrf2 蛋白表达，抑制 Bax 蛋白表达，明显恢复神经功能缺损，缩小梗死体积，缓解细胞凋亡，表明 RA 能够发挥抗氧化、抗凋亡功能，作用机制与调节 PI3K/Akt 信号通路，促进 Nrf2 和 HO-1 表达有关。高丽萍等 [48] 的研究选取 MCAO 大鼠，观察大鼠行为能力变化，检测血清中 MDA 的含量，SOD 和 GSH-Px 的生理活性。结果显示，RA 能够明显恢复大鼠行为障碍，缩小脑梗死体积，抑制 MDA 生成，显著提高 SOD 和 GSH-Px 生理活性，表明 RA 可以有效保护 CIRI，作用机制与脑部抗氧化有关。

RA 也是 SAFI 含量较高的有效成分之一，可以通过调节相关蛋白表达、调节氧化因子，进而抗氧化，抑制炎症，缓解脑部细胞损伤，保护脑功能。

3.2.4 丹参多酚酸 A（Sal A） Sal A 是咖啡酸的一类衍生物，丹参主要的水溶性成分之一。研究表明 Sal A 有多种药理作用，其中抗炎、抗氧化是其主要的药理作用[49]。Zhao 等[50]选取 OGD/R 诱导的 PC12 细胞，分析 Sal A 对体外 CIRI 的影响，考察脑神经损伤评分、细胞增殖与凋亡、炎症反应等，检测 Sal A 与 miR-449a/DKK1 和 Wnt/*β*-catenin 通路的关联性。结果显示 Sal A 能缓解细胞凋亡，抑制炎症，减轻脑水肿，促进 PC12 细胞增殖。表明了 DKK1 mRNA 的 3'-UTR 是 miR-449a 的作用靶点。Sal A 可以通过调节 miR-499a/DDK1 从而激活 Wnt/*β*-catenin 通路，保护脑部神经功能。

4 结语

注射用 SAFI 取自中药丹参中含有的多种丹酚酸的水溶性混合物[51]，其作为现代创新中药代表，在临床上广泛应用。长期应用治疗轻中度脑梗死引起的半身不遂、肢体麻木、口眼歪斜等症状[52]。

本文围绕抗氧化，抗炎，血脑屏障，调节小胶质细胞，调节信号通路，对蛋白和基因影响等，就 SAFI 及其单体成分在 CIRI 中的脑功能保护作用及其机制进行了综述，进一步揭示了 SAFI 治疗的路径与影响因素，为 SAFI 的临床研究提供理论依据。但是，对于 SAFI 治疗脑缺血再灌注的脑功能保护机制及各种活性成分发挥药效的机制还有待深入研究。

参考文献

[1] 王国军，张琳成，陈冰，等 . 丹参中丹酚酸 B 对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用研究 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（7）：1566-1568.

[2] 汪宁，高军，白方会，等 . 基于 Akt/GSK-3*β* 通路研究紫檀茋对脑缺血再灌注大鼠脑保护作用及血管内皮间质过度转化的影响 [J]. 中草药，2022，53（8）：2399-2406.

[3] 付如意，毛露，孙硕，等 . 脑缺血再灌注后免疫损伤分子机制研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志，2019，36（9）：852-854.

[4] 于潇，王贵阳，侯宇东，等 . 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（5）：1471-1484

[5] 荣远航，滕晶 . 喻昌论治中风病学术思想探讨及现代临床应用 [J]. 中国中医急症，2022，31（2）：345-347，354.

[6] 刘艳华，周德生，张梦雪，等 . 周德生教授辨治缺血性中风临床经验 [J]. 亚太传统医药，2022，18（5）：129-132.

[7] 陈珍，侯阳波，胡寅钦，等 . 基于数据挖掘探讨《类证治裁》治疗中风的用药规律 [J]. 中成药，2022，44（4）：1342-1345.

[8] 杨小钰，黄海红，谌泽芳，等 . 脑缺血再灌注后炎症反应研究进展及中西医结合防治思路 [J]. 中国现代医药杂志，2019，21（12）：95-99.

[9] 苏小琴，张磊，李海燕，等 . 基于 Q-marker 的中药注射剂质量控制研究思路——以注射用丹参多酚酸为例 [J]. 中草药，2019，50（19）：4663-4672.

[10] 李德坤，苏志刚，苏小琴，等 . 注射用丹参多酚酸化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究，2019，42（2）：362-368.

[11] Lyu J，Xie Y，Wang Z，et al. Salvianolic acids for injection combined with conventional treatment for patients with acute cerebral infarction：a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Med Sci Monitor，2019，25：7914-7927.

[12] 刘华丽，秦虹霞 . 脑梗死急性期注射丹参多酚酸的用药护理效果研究 [J]. 中国药物滥用防治杂志，2022，28（4）：541-544.

[13] 王巧燚 . 丹参多酚酸治疗缺血性中风的临床效果及不良反应 [J]. 中国冶金工业医学杂志，2021，38（5）：573-574.

[14] 刘晗，姚静，杨凌飞，等 . 注射用丹参多酚酸治疗中度急性缺血性脑卒中多中心、随机、双盲、平行对照临床研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志，2019，45（8）：471-476.

[15] 唐子又 . 丹参多酚酸盐注射液治疗缺血性脑卒中患者的疗效及对血清 LPA Hcy hs-CRP 水平的影响 [J]. 淮海医药，2021，39（3）：291-293.

[16] 王楠 . 首发急性缺血性脑卒中行丹参多酚酸联合阿替普酶对患者 QLI 评分的影响 [J]. 吉林医学，2021，42（12）：2940-2943.

[17] 艾艳萍，丁涛 . 丹参多酚酸对缺血性脑卒中再灌注损伤的保护效果分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17（20）：3195-3198.

[18] 高爱民，王宁，钱倩，等 . 注射用丹参多酚酸对缺血性脑卒中患者 hs-CRP 水平和血液流变参数的影响 [J]. 中国医药导报，2019，16（22）：162-165.

[19] 贾壮壮，陈红阳，赵磊，等 . 丹参多酚酸配伍三七总皂苷通过调节 M1/M2 型小胶质细胞极化对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 天津中医药，2020，37（7）：824-830.

[20] 王富江，李芮琳，贾壮壮，等 . 注射用丹参多酚酸和血栓通注射液联合应用对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制研究 [J]. 中草药，2017，48（19）：4029-4036.

[21] 马岱朝 . 丹参多酚酸通过小胶质细胞 P2X7/NLRP3/GSDMD 通路减轻实验性脑缺血再灌注损伤研究 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2021.

[22] 孙瑞坦，朴翔宇，蔡鸣，等 . 丹参多酚酸治疗局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠对神经行为及因子水平的影响 [J]. 海南医学院学报，2019，25（14）：1057-1060.

[23] 唐浩，张双彦 . 注射用丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [A]. 第十五届中国中西医结合学会微循环专业委员会暨第二届中国微循环学会痰瘀专业委员会学术会议资料汇编 [C]，2015：61.

[24] 李富强，王伟，尹金鹏，等 . 大鼠脑缺血再灌注后线粒

体 ATP 酶活性、形态学变化及丹参多酚酸的保护作用 [J]. 中风与神经疾病杂志，2019，35（3）：238-241.
[25] 侯帅 . 脑缺血再灌注损伤中线粒体缝隙连接蛋白 43 对神经血管单元的保护作用及丹参多酚酸干预 [D]. 长春：吉林大学，2016.
[26] 贾壮壮，赵磊，陈红阳，等 . 注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通（冻干）通过抑制 MMPs 对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（19）：135-145.
[27] 曹自为，张嵘，李蒙，等 . 丹参多酚酸通过 SIRT1/HMGB1 路径改善大鼠脑缺血 / 再灌注损伤的机制研究 [J]. 中风与神经疾病杂志，2021，38（1）：4-8.
[28] 王伟 . 丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注内质网应激的影响 [J]. 中国老年保健医学，2018，16（1）：52-54.
[29] 何前松，况时祥，王少峡，等 . 丹参多酚酸对脑缺血再灌注损伤糖尿病大鼠神经功能及微管相关蛋白 2 表达的影响 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2015，24（10）：877-881.
[30] 贾壮壮，何前松，赵磊，等 . 丹参多酚酸对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（20）：3237-3241.
[31] 张雯，宋俊科，杜冠华 . 丹参多酚酸通过 PI3K/Akt-JAK2/STAT3 途径减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33（9）：670.
[32] Yin SJ，Luo YQ，Zhao CP，et al. Antithrombotic effect and action mechanism of Salvia miltiorrhiza and Panax notoginseng herbal pair on the zebrafish [J]. Chin Med-UK，2020，15（1）：1-10.
[33] Zheng X，Liu H，Ma M，et al. Anti-thrombotic activity of phenolic acids obtained from *Salvia miltiorrhiza* f. alba in TNF-*α*-stimulated endothelial cells via the NF-*κ*B/JNK/p38 MAPK signaling pathway [J]. Arch Pharm Res，2021，44（4）：427-438.
[34] 何前松，马萌萌，胡利民，等 . 丹参多酚酸对大鼠糖尿病脑缺血再灌注损伤恢复期相关基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（7）：80-86.
[35] 魏西羽，杨婷，刘厚汝，等 . 丹酚酸 B 的药理作用研究进展 [J]. 药学研究，2021，40（11）：748-752.
[36] Wang L，Ma R，Liu C，et al. Salvia miltiorrhiza：a potential red light to the development of cardiovascular diseases [J]. Curr Pharm Design，2017，23（7）：1077-1097.
[37] Ren Z，Wang X，Wang S，et al. Mechanism of action of salvianolic acid B by module-based network analysis [J]. BioMed Mater Eng，2014，24（1）：1333-1340.
[38] 张彤，刘文杰，李芮琳，等 . 丹参酚酸 B 对缺血性脑中风保护作用的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（13）：1410-1412，1416.
[39] Zhu H，Zou L，Tian J，et al. SMND-309，a novel derivative of salvianolic acid B，protects rat brains ischemia and reperfusion injury by targeting the JAK2/STAT3 pathway [J]. Eur J Pharmacol，2013，714（1-3）：23-31.
[40] Jiang Y，Liu Z，Cui W，et al. Antioxidant effect of salvianolic acid B on hippocampal CA1 neurons in mice with cerebral ischemia and reperfusion injury [J]. Chin J Integr Med，2019，21（7）：516-522
[41] Zhong J，Tang MK，Zhang Y，et al. Effect of salvianolic acid B on neural cells damage and neurogenesis after brain ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta Pharm Sin B，2007，42（7）：716-721.
[42] Zhang Y，Jiang YF，Liu ZQ，et al. Effect of salvianolic acid B on brain energy metabolism and hydrocephalus of cerebral ischemia in mice at different time [J]. Acta Pharm Sin B，2007，42（12）：1250-1253.
[43] Ai C，Li L. Salvianolic acids D and E：two new depsides from Salvia miltiorrhiza [J]. Planta Med，1992，58（2）：197-199.
[44] Wang YQ，Zhuang G，Li SJ. Multiple on-line screening and identification methods for hydroxyl radical scavengers in Yudanshen [J]. J Pharmaceut Biomed，2019，156：278-283.
[45] Zhang W，Song J，Li W，et al. Salvianolic acid D alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing the cytoplasmic translocation and release of HMGB1-triggered NF-*κ*B activation to inhibit inflammatory response [J]. Mediat Inflamm，2020，2020：9049614.
[46] 姚润心，王歆烨，杨瑞瑞 . 迷迭香酸对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 农垦医学，2020，42（5）：448-452.
[47] Cui HY，Zhang XJ，Yang Y，et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling [J]. Neural Regen Res，2018，13（12）：2119.
[48] 高丽萍，张文斌，景玉宏，等 . 迷迭香酸对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机理探讨 [J]. 亚太传统医药，2011，7（12）：8-10.
[49] Du G，Song J，Du L，et al. Chemical and pharmacological research on the polyphenol acids isolated from Danshen：a review of salvianolic acids [J]. Adv Pharmacol，2020，87：1-41.
[50] Zhao J，Li L，Fang G. Salvianolic acid A attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury induced rat brain damage，inflammation and apoptosis by regulating miR-499a/DDK1 [J]. Am J Transl Res，2020，12（7）：3288.
[51] 陈璐，聂永伟，张燕欣，等 . 丹参单体化合物及丹参类制剂对心脑血管系统信号通路影响的研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（11）：2333-2342.
[52] 李德坤，苏志刚，苏小琴，等 . 注射用丹参多酚酸化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究，2019，42（2）：362-368.

（收稿日期：2022-04-05；修回日期：2022-07-03）

医院药学

氨基酸肠外营养支持对肝硬化患者营养和预后影响的 meta 分析

陆素芳[1]，丁玉珍[1]，王丹丹[1]，黄睿[1]，赵红利[1]，张晓燕[1]，刘金春[2, 3*]（1.南京大学医学院附属鼓楼医院感染性疾病科，南京　210008；2.南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京　210008；3.南京临床药学中心，南京　210008）

摘要：目的　通过对肝硬化患者使用氨基酸的肠外营养方式进行 meta 分析，探索其对肝硬化患者各项肝功能指标的影响。**方法**　检索中国知网、中国生物医学文献数据库、万方数据库、PubMed 和 Embase 中采用氨基酸作为肝硬化患者肠外营养添加剂的随机对照试验（RCT），检索时间设置为建库至 2021 年 5 月 31 日。对筛选的文献进行数据提取和 meta 分析，软件使用 STATA 15.1，质量评估软件使用 Review Manager 5.3。**结果**　共纳入 16 篇 RCT，meta 分析结果显示，与使用常规肠外营养的对照组相比，添加氨基酸的肠外营养的试验组总胆红素（SMD ＝－ 0.27，95%*CI*：－ 0.43 ～－ 0.11）显著降低，白蛋白（SMD ＝ 0.67，95%*CI*：0.03 ～ 1.30）显著增加，而谷丙转氨酶（SMD ＝－ 0.12，95%*CI*：－ 0.27 ～ 0.02）和谷草转氨酶（SMD ＝－ 0.15，95%*CI*：－ 0.35 ～ 0.04）改变差异无统计学意义。**结论**　氨基酸作为肠外营养补充剂可有效改善肝硬化患者的营养状况和肝功能。

关键词：氨基酸；肠外营养；肝硬化；营养；预后 meta 分析
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2665-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.035

Effect of amino acid-containing parenteral nutrition on the nutrition and prognosis in patients with liver cirrhosis: a meta-analysis

LU Su-fang[1], DING Yu-zhen[1], WANG Dan-dan[1], HUANG Rui[1], ZHAO Hong-li[1], ZHANG Xiao-yan[1], LIU Jin-chun[2, 3*] (1. *Department of Infectious Disease*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School*, *Nanjing* 210008; 3. *Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective　To determine the effect of amino acid-containing parenteral nutrition on the liver function indexes in patients with liver cirrhosis by meta-analysis. **Methods**　We searched CNKI, China Biology Medicine Disc, Wanfang Database, PubMed and Embase for randomized controlled trials using amino acids as parenteral nutrition additives for patients with liver cirrhosis up to May 31, 2021. We conducted meta-analysis of the selected articles and collected data. STATA 15.1 was used in the meta-analysis and Review Manager 5.3 was used for the quality evaluation. **Results**　Totally 16 articles were included. The meta-analysis showed that compared with the control group (using conventional parenteral nutrition), the total bilirubin (SMD ＝ － 0.27, 95%*CI*: － 0.43 ～ － 0.11) in the experimental group (using amino acid added parenteral nutrition) was decreased, while the albumin (SMD ＝ 0.67, 95%*CI*: 0.03 ～ 1.30) was increased. However, there were no statistical differences in alanine aminotransferase

基金项目：南京大学医院管理研究所课题项目和南京鼓楼医院医学发展医疗救助基金会资助项目（No. NDYG2020052；No. NDYG2021016）；国家自然科学基金青年基金项目（No. 81702011）。

作者简介：陆素芳，女，副主任护师，主要从事护理工作，email：sufanglu0708@126.com　*通信作者：刘金春，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：liujinchun@njglyy.com

(SMD ＝ － 0.12, 95%*CI*: － 0.27 ～ 0.02) and aspartate aminotransferase (SMD ＝ － 0.15, 95%*CI*: － 0.35 ～ 0.04). **Conclusion** Amino acids as parenteral nutritional supplements can effectively improve the nutrition status and liver function in patients with liver cirrhosis.

Key words: amino acid; parenteral nutrition; liver cirrhosis; nutrition; prognostic meta-analysis

肝脏是人体最重要的代谢器官，通过调节糖原合成、糖原分解和糖异生来控制血糖稳定[1]；此外，人体中重要且必备的蛋白质和脂质也在肝细胞中进行代谢与合成。除了这些代谢途径之外，肝脏细胞通过分泌胆汁酸、尿素及合成谷氨酰胺来对氨排泄解毒[2]。因此，肝脏疾病会对患者的营养状况产生非常严重的影响[3]。

失代偿期肝病患者通常会出现营养失衡的状况[4]。失代偿期肝硬化患者的蛋白质 - 能量营养不良（protein-energy malnutrition，PEM）的发生率为 10% ～ 100%，迄今针对营养不良的诊断和治疗仍相对欠缺。营养不良是肝硬化进展及死亡的重要因素，其分子致病机制可能与缺锌、血液中的瘦素和肿瘤坏死因子 -*α* 含量增加有关[5-6]；此外，许多患者可能因腹水或肝性脑病而出现食欲不振[7]。肝硬化合并门静脉高压导致消化道出血往往因手术治疗引起的创伤进一步加重肝功能损伤及营养不良[8]。

约有 2/3 的肝硬化患者存在 PEM，危害包括热量摄入不足、吸收不良、肠道通透性增加导致蛋白质丢失、肝脏蛋白质合成减少甚至引起肌肉萎缩，最终导致肝硬化患者的死亡风险增加[7, 9]。为全面解决终末期肝病患者的营养不良问题，亟需对需要营养支持患者开展及时诊断和个体化精准治疗。适当的肠外营养可有效减少患者的肝功能损伤，有研究指出常规肠外营养的同时加入氨基酸如精氨酸、谷胱甘肽等可显著改善患者的营养状况[10]。因此，本研究通过对肝硬化患者在术后使用氨基酸肠外营养的效果进行 meta 分析和评估，探索其对肝硬化患者各项肝功能指标的影响。

1 资料与方法

1.1 文献纳入和排除标准

纳入标准：① 随机对照试验（randomized controlled trial，RCT）；② 因各种原因进行肠外营养支持的肝硬化患者研究；③ 干预措施为常规肠外营养的基础上进行各类氨基酸的补充；④ 观察指标为谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、白蛋白（albumin，ALB）和总胆红素（total bilirubin，TBIL）；⑤ 研究人群为中国人群。

排除标准：① 个案报告、队列研究、病例对照研究、横断面研究、综述及会议摘要；② 数据资料不全、研究设计不严谨；③ 非中英文文献；④ 样本量＜ 10。

1.2 文献检索的数据库与关键词

中文文献数据库选择中国知网、中国生物医学文献数据库及万方数据库；英文文献数据库选择 PubMed 和 Embase 数据库。文献语种限制为中英文，检索时间为数据库建库至 2021 年 5 月 31 日。

1.3 文献筛选与数据提取

文献筛选：由两位研究员独立完成文献筛选。分歧之处与第三位研究员共同商议。根据检索式检索相关文献，逐步确定纳入分析的研究。中文主题词包括肠外营养、肝硬化及氨基酸。英文主题词包括“parenteral nutrition”“PN”“liver cirrhosis”和“amino acid”。

数据提取：① 第一作者的姓名、研究所在地区、样本量、年龄、性别等基本信息；② 使用肠外营养后的 ALT、AST、ALB 和 TBIL 指标。

1.4 文献质量评价

采用 Cochrane 偏倚风险工具评估随机方法是否正确、是否有分配隐藏、是否使用盲法（研究者和受试者、研究结果）、是否有不完整数据偏倚、是否有选择性偏倚及其他偏倚。

1.5 统计学分析方法

采用 STATA 15.1 软件进行 meta 分析，RCT 的质量评估采用 Review Manager 5.3。连续性变量采用标准化均数差（standardized mean difference，SMD）及其 95% 可信区间（confidence interval，*CI*）表示。各文献研究间的异质性采用 I^2 检验。若 $I^2 \geqslant 50\%$，认为各研究间的异质性较大，采用随机效应模型进行分析；反之，采用固定效应模型。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 文献检索及纳入研究的基线资料

通过检索关键词后初步得到 874 篇文献，阅读题目和摘要并排除重复研究后得到 94 篇相关文献，排除研究类型为非随机对照试验以及观察指标无 ALT、AST、ALB 和 TBIL 的文献后，最终纳入 16 篇文献（见图 1）[8, 10-24]。涉及 898 例患者，其中试验组 451 人，对照组 447 人，纳入文献的基本特征见表 1。

2.2 纳入文献的质量

表 1　纳入文献的基本特征

Tab 1　Basic characteristics of included literatures

作者	年份	地区	试验组			对照组			肠外营养原因	观察指标
			例数	男 / 女	年龄	例数	男 / 女	年龄		
杨先芬 [8]	2018	安徽	20	—	—	20	—	—	肝硬化门静脉高压	ALT，AST，TBIL
孟勇 [10]	2013	江苏	23	—	—	24	—	—	活动期失代偿期肝硬化	ALT，AST，TBIL，ALB
秦侃 [11]	2013	安徽	29	21/8	64.93±10.59	30	20/10	63.93±16.44	肝硬化肝功能不全	ALT，AST，TBIL，ALB
杨先芬 [12]	2012a	安徽	20	13/7	47.80±11.60	20	15/5	49.58±13.50	肝硬化门静脉高压	ALT
杨先芬 [13]	2012b	安徽	28	19/9	47.86±12.61	27	18/9	49.83±13.79	肝硬化门静脉高压	ALT，ALB，TBIL
罗时敏 [14]	2004	广东	15	14/1	53.80±8.70	7	6/1	51.00±13.10	原发性肝硬化肝癌	ALT，ALB，TBIL
符辉 [15]	2016	海南	80	41/39	61.90±5.10	80	42/38	62.40±5.70	失代偿期肝硬化	ALT，AST，TBIL，ALB
张雷 [16]	2014	湖北	40	26/14	39.90±16.26	40	22/18	39.98±16.21	病毒性肝炎肝硬化	ALT，AST，TBIL，ALB
赵建军 [17]	2014	北京	70	55/15	56.40±13.30	77	58/19	55.50±11.40	原发性肝癌合并肝硬化	ALT，AST，TBIL，ALB
姚萍 [18]	2013	江苏	20	11/9	46±3.2	20	13/7	45±3.8	失代偿期肝硬化	TBIL，ALB
吴国豪 [19]	2011	上海	42	—	—	40	—	—	肝硬化门静脉高压	ALT，AST，TBIL，ALB
李狱 [20]	2004	重庆	15	12/3	46.53±9.62	15	14/1	47.20±9.11	肝硬化所致肝移植	ALT，AST，TBIL
葛智成 [21]	2004	北京	9	2/7	43.3	7	3/4	45.4	肝硬化门静脉高压	ALT，AST，TBIL，ALB
王彬 [22]	2002	浙江	18	15/3	49.00±10.43	18	16/2	48.11±10.29	肝硬化门静脉高压	ALB
Cao Jie[23]	2007	广东	12	11/1	46.10±13.60	12	10/2	50.30±10.60	原发性肝癌合并肝硬化	ALT，AST，TBIL，ALB
鱼晓波 [24]	2007	上海	10	9/1	48.40±12.40	10	9/1	43.70±12.60	肝硬化所致肝移植	ALT，AST，TBIL，ALB

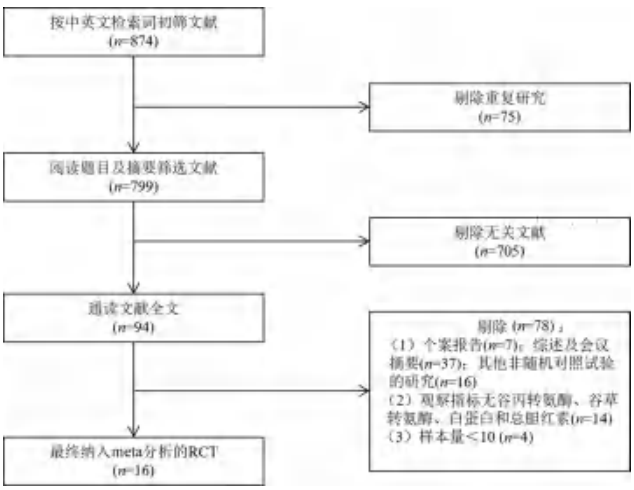


图 1　文献筛选流程

Fig 1　Process of literature screening

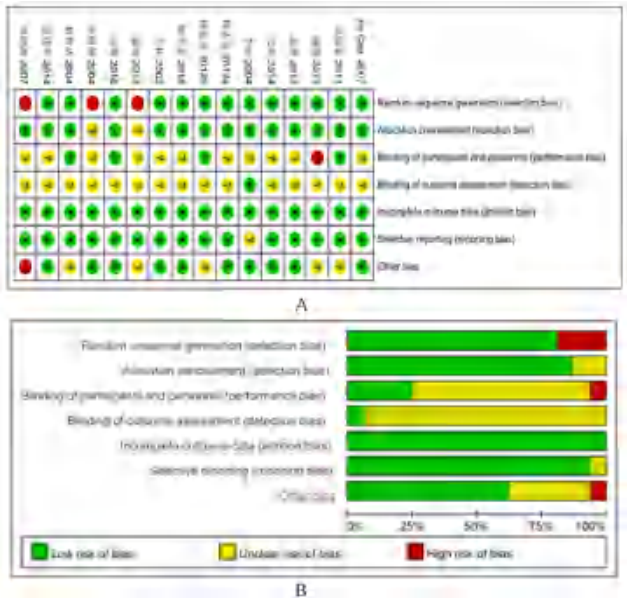


图 2　风险偏倚评估

Fig 2　Risk of bias assessment

A. 各个纳入研究的风险偏倚评估（risk of bias assessment of included studies）；B. 风险偏倚评估等级（risk of bias scored according to meta analysis of statistics assessment）

完全随机分组的研究有 13 篇，其余 3 篇未提及随机；16 篇研究数据结果具有完整性，均有本研究所需要的观察指标。纳入文献质量评估见图 2。

2.3　Meta 分析结果

在术前和术后采用肠外营养的第 7 日对试验组和对照组患者进行 ALT、AST、TBIL 和 ALB 指标检测。对包含上述指标的研究分别汇总数据，进行 meta 分析，异质性检验提示各研究间存在不同程度的异质性，ALT（I^2 = 36.0%）、AST（I^2 = 28.2%）和 TBIL（I^2 = 44.1%）的 I^2 < 50%，因此采用固定效应模型，而 ALB（I^2 = 84.2%）的 I^2 > 50%，因此采用随机效应模型。通过试验组和对照组测定 TBIL（SMD = − 0.27，95%*CI*：− 0.43 ～ − 0.11）和 ALB（SMD = 0.67，95%*CI*：0.03 ～ 1.30）水平差异可判断肠外营养补充氨基酸可显著降低患者 TBIL 水平、增加患者 ALB 水平。而试验组和对照组中的 ALT（SMD = − 0.12，95%*CI*：− 0.27 ～ 0.02）和 AST（SMD = − 0.15，95%*CI*：− 0.35 ～ 0.04）差异无统计学意义，见图 3。

2.4　亚组分析

因四个指标的异质性检验发现均存在异质性，对其进行亚组分析。以干预原因为亚组分析的依据，亚组分析结果见图 4 ～ 7，干预原因为

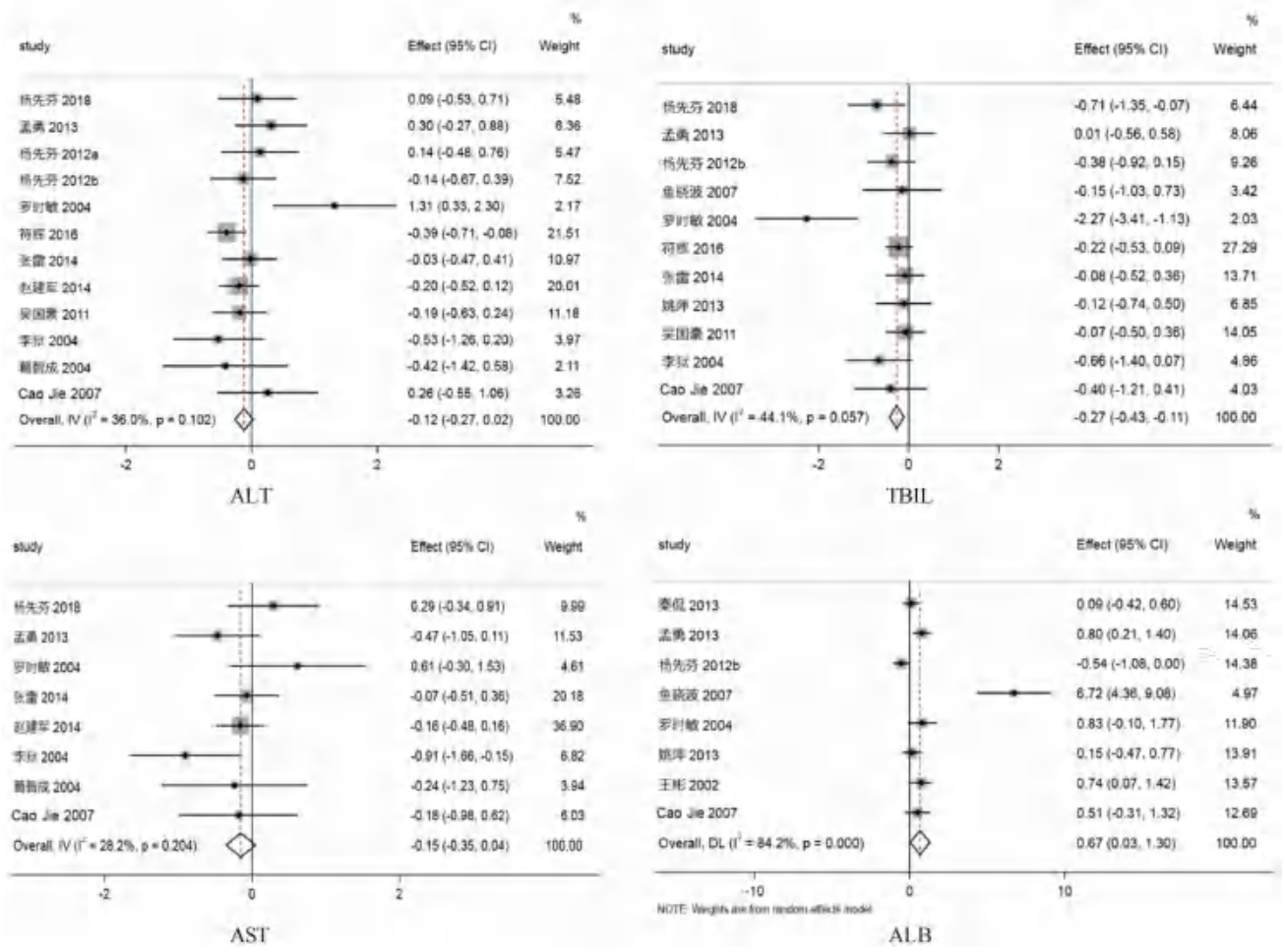


图 3 试验组和对照组肝功能指标差异比较的森林图

Fig 3 Forest diagram for liver function indexes of the experimental group and the control group

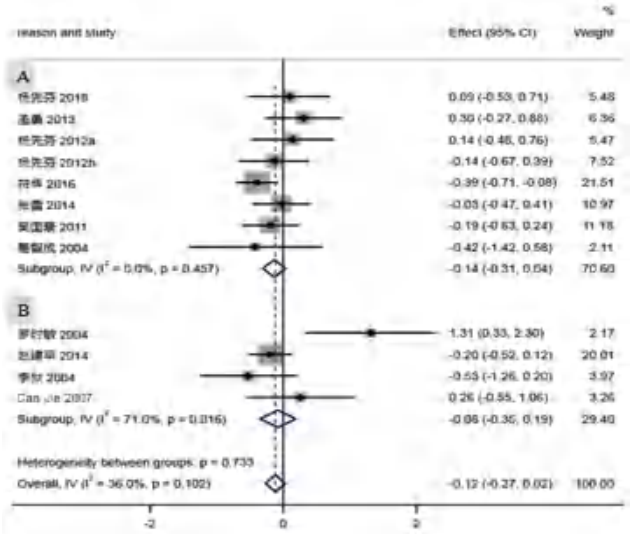


图 4 根据干预原因对 ALT 进行的亚组分析

Fig 4 Subgroup analysis of ALT according to the reasons of intervention

A. 肝硬化引起的门静脉高压、肝功能不全（portal hypertension and liver insufficiency caused by liver cirrhosis）；B. 原发性肝癌或肝移植（primary liver cancer or liver transplantation）

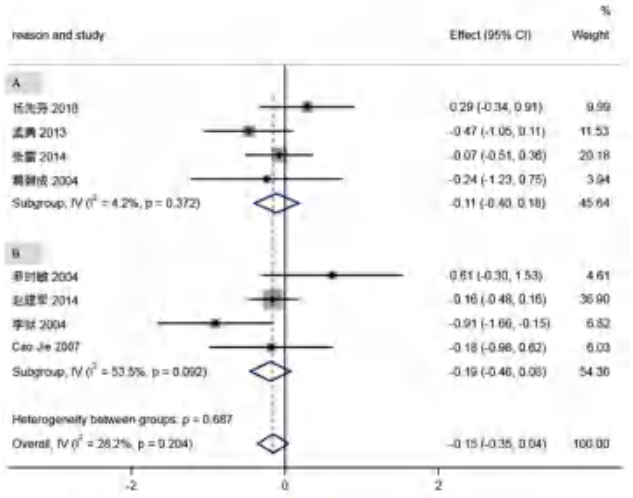


图 5 根据干预原因对 AST 进行的亚组分析

Fig 5 Subgroup analysis of AST according to the reasons of intervention

A. 肝硬化引起的门静脉高压、肝功能不全（portal hypertension and liver insufficiency caused by liver cirrhosis）；B. 原发性肝癌或肝移植（primary liver cancer or liver transplantation）

肝硬化引起的门静脉高压、肝功能不全组的 ALT 和 TBIL 指标异质性显著降为 0。其他指标通过亚组分析之后异质性也相对降低。

本研究采用 Begg 检验和 Egger 检验分析是否存在发表偏倚，Begg 检验显示四组均不存在

发表偏倚，而 Egger 检验发现除 ALB 组（P = 0.006）外，ALT、AST、TBIL 三组均不存在发表偏倚。试验组和对照组 ATL、AST、TBIL 和 ALB 指标的发表偏倚检验结果见表 2 及图 8。

表 2　发表偏倚检验

Tab 2　Test of publication bias

肝功能指标	P 值	
	Egger's test	Begg's test
ALT	0.054	0.086
AST	0.954	1.000
TBIL	0.054	0.087
ALB	0.006	0.108

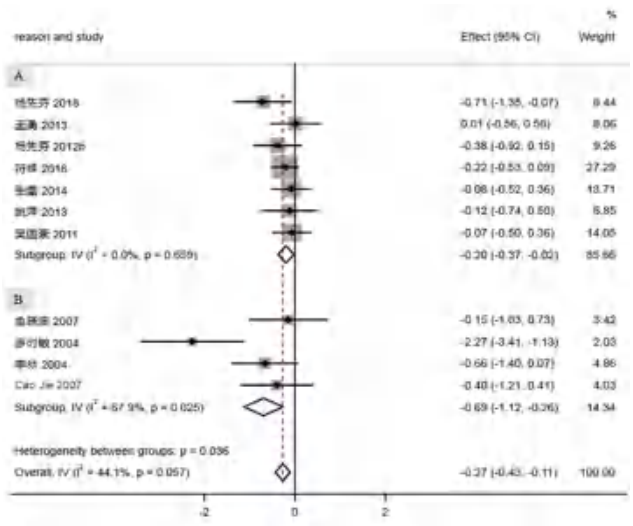


图 6　根据干预原因对 TBIL 进行的亚组分析

Fig 6　Subgroup analysis of TBIL according to the reasons of intervention

A. 肝硬化引起的门静脉高压、肝功能不全（portal hypertension and liver insufficiency caused by liver cirrhosis）；B. 原发性肝癌或肝移植（primary liver cancer or liver transplantation）

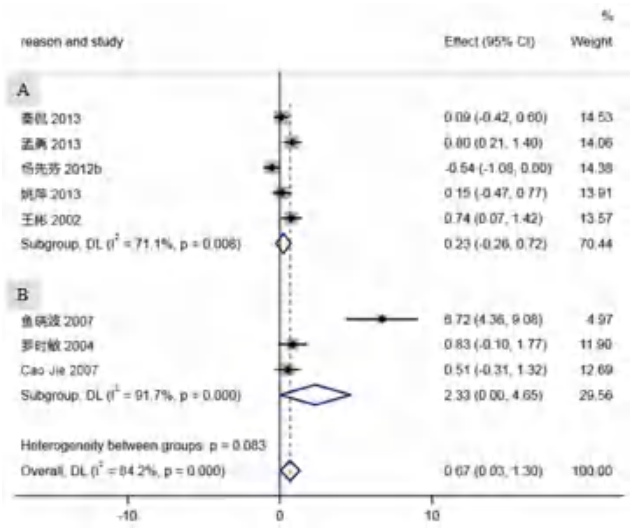


图 7　根据干预原因对 ALB 进行的亚组分析

Fig 7　Subgroup analysis of ALB according to the reasons of intervention

A. 肝硬化引起的门静脉高压、肝功能不全（portal hypertension and liver insufficiency caused by liver cirrhosis）；B. 原发性肝癌或肝移植（primary liver cancer or liver transplantation）

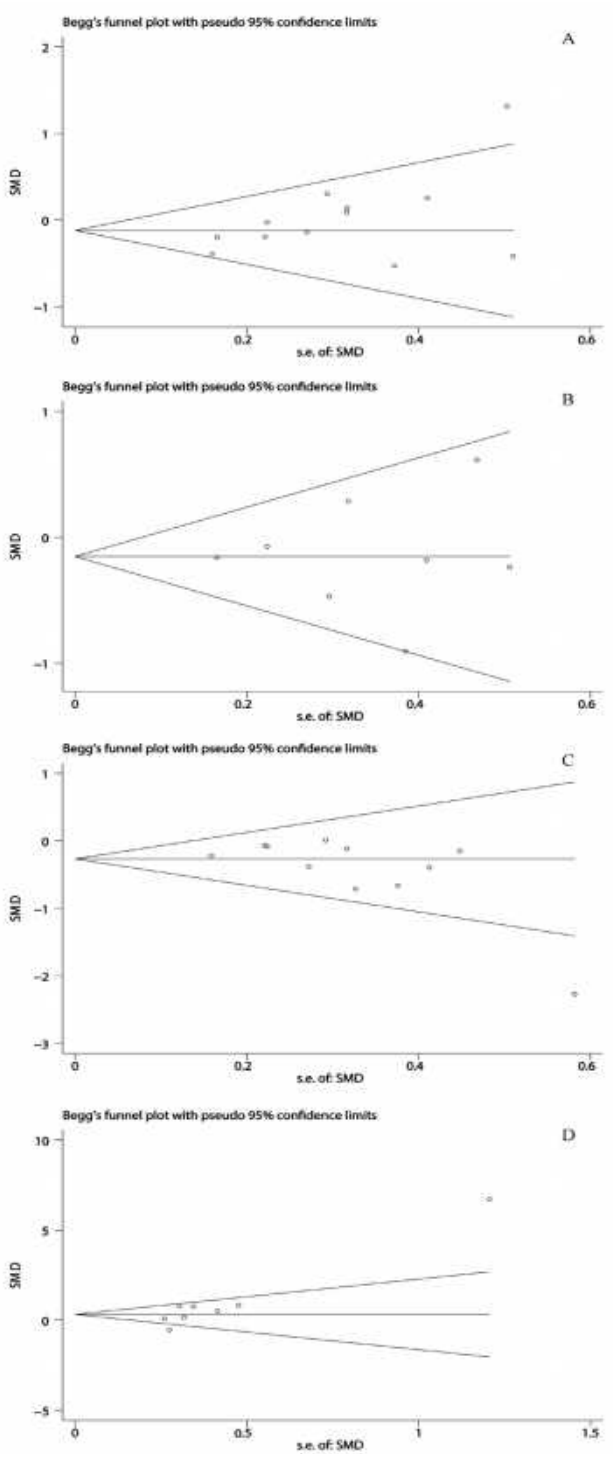


图 8　氨基酸肠外营养支持对肝硬化患者肝功能指标影响的漏斗图

Fig 8　Funnel plot of the effect of amino acid-containing parenteral nutrition support on liver function indexes in patients with liver cirrhosis

A. ALT；B. AST；C. TBIL；D. ALB

3　讨论

ALT 和 AST 在肝细胞中的浓度最高，而在其他脏器中的浓度很低，是反映肝功能的重要指标，也是急性肝细胞损害的敏感标志物 [25]；TBIL 是直接胆红素和间接胆红素的总和，肝脏对胆红素的代谢起着重要作用，因此 TBIL 是反映肝脏

代谢功能的重要指标[26]；肝脏亦是合成 ALB 的唯一场所，故血清 ALB 可作为肝脏合成功能的的真实指标[26-27]。本 meta 分析对肝硬化患者的肠外营养中添加氨基酸的情况进行了深入探讨，结果发现肝硬化患者在采用氨基酸肠外营养后可显著改善 TBIL 和血清 ALB 的水平。有研究发现肠外补充高支链氨基酸组的血清 ALB 水平显著高于常规肠外营养组[21，24]；ALT 水平显著低于对照组[13，28]；符辉等[15]发现试验组 ALT、AST、TBIL 和血清 ALB 的水平亦优于对照组。

本 meta 研究中 ALT、AST 和 TBIL 的异质性检验显示其异质性较小，而血清 ALB 的 $I^2 > 50\%$，在根据干预原因进行亚组分析后，发现 ALT、AST 和 TBIL 的异质性显著性降低，说明该因素是异质性来源。干预原因为门静脉高压和肝功能不全的 TBIL 亚组中，异质性显著降低（SMD ＝－ 0.20，95%*CI*：－ 0.37 ～－ 0.02）。门静脉高压和肝功能不全引起的肝硬化通过氨基酸肠外营养会通过 TBIL 指标的降低从而改善患者的营养状况。除了亚组分析之外，本研究对各个研究之间的发表偏倚以 Begg 和 Egger 检验的方式进行了探索，发现在 ALB 组纳入的文献中存在一定的发表偏倚。

由于骨骼肌中氨解毒为谷氨酰胺的过程中支链氨基酸的消耗增加导致肝硬化患者其血浆中支链氨基酸减少[29]，因此肠外或肠内营养补充支链氨基酸可改善低蛋白血症，提高肝硬化患者生存率[30-31]。既往研究表明，氨基酸可通过增加血浆 ALB 水平、增强葡萄糖代谢水平、减少骨骼肌中脂肪的积累、降低肝硬化患者发生肝癌的风险等途径改善肝硬化患者的预后[31-32]。肠内营养支持对于重症患者提供营养量仅 30% ～ 60%，仍存在营养供应不足的缺陷；而肠外营养提供的营养成分相对全面，且可根据患者的实际状况制订个体化的全营养混合制剂[33]。补充氨基酸的肠外营养制剂对提高重症肝硬化患者的生存质量具有重要的临床意义。

总之，本研究发现相对于常规肠外营养者，补充氨基酸肠外营养制剂的肝硬化患者具有更低的 TBIL 和更高的血清 ALB 水平，表明补充氨基酸肠外营养制剂能够显著改善肝硬化患者的肝功能。

参考文献

[1] Storck LJ，Imoberdorf R，Ballmer PE. Nutrition in gastrointestinal disease：liver，pancreatic，and inflammatory bowel disease [J]. J Clin Med，2019，8（8）：1098-1111.

[2] Mitra A，Ahn J. Liver disease in patients on total parenteral nutrition [J]. Clin Liver Dis，2017，21（4）：687-695.

[3] Mantovani A，Byrne CD，Bonora E，et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes：a meta-analysis [J]. Diabetes Care，2018，41（2）：372-382.

[4] Periyalwar P，Dasarathy S. Malnutrition in cirrhosis：contribution and consequences of sarcopenia on metabolic and clinical responses [J]. Clin Liver Dis，2012，16（1）：95-131.

[5] Perumpail BJ，Li AA，Cholankeril G，et al. Optimizing the nutritional support of adult patients in the setting of cirrhosis [J]. Nutrients，2017，9（10）：1114-1124.

[6] Ye Q，Yin WL，Zhang L，et al. The value of grip test，lysophosphatidylcholines，glycerophosphocholine，ornithine，glucuronic acid decrement in assessment of nutritional and metabolic characteristics in hepatitis B cirrhosis [J]. PLoS One，2017，12（4）：e0175165.

[7] Patel JJ，McClain CJ，Sarav M，et al. Protein requirements for critically ill patients with renal and liver failure [J]. Nutr Clin Pract，2017，32（Suppl 1）：101S-111S.

[8] 杨先芬，陈西兰，许明友 . 精氨酸强化肠外营养在肝硬化门静脉高压症术后应用研究 [J]. 肝胆外科杂志，2018，26（5）：380-384.

[9] Kim CH，Kallman JB，Bai CH，et al. Nutritional assessments of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Obes Surg，2010，20（2）：154-160.

[10] 孟勇，杜忠祥，孙健，等 . 辅助部分肠外营养在失代偿期肝硬化治疗中的应用 [J]. 山东医药，2013，53（7）：76-77.

[11] 秦侃，王金亮，卞晓洁 . 复方氨基酸注射液（17AA-H）在肝功能不全病人中的应用研究 [J]. 肠外与肠内营养，2013，20（2）：68-71.

[12] 杨先芬，荚卫东，许戈良，等 . 添加丙氨酰 - 谷氨酰胺肠外营养在肝硬化门静脉高压患者术后的应用研究 [J]. 安徽医科大学学报，2012，47（9）：1131-1134.

[13] 杨先芬，荚卫东，许戈良，等 . 肠外营养在肝硬化门静脉高压断流术后的应用研究 [J]. 山东医药，2012，52（24）：16-18，21.

[14] 罗时敏，梁力建，赖佳明 . Hepa 氨基酸溶液对肝癌肝切除术后肠外营养的应用价值 [J]. 中国实用外科杂志，2004，24（6）：40-42.

[15] 符辉 . 对失代偿期肝硬化患者进行肠外营养支持治疗的效果分析 [J]. 当代医药论丛，2016，14（16）：74-75.

[16] 张雷，戴一菲 . 17AA-H 对肝功能不全患者的营养支持效果及肝功能恢复的影响 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2014，23（9）：1076-1078.

[17] 赵建军，毕新宇，黄振，等 . 不同营养支持治疗方式对肝癌术后恢复的前瞻性对照研究 [J]. 医学研究杂志，2014，43（4）：75-79.

[18] 姚萍，孟勇，孙健 . 肝硬化失代偿期患者的营养管理分析 [J]. 辽宁医学院学报，2013，34（6）：26-28.

[19] 吴国豪，张波，韩寓嵩，等 . 高支链氨基酸在肝功能损害外科患者肠外营养中的作用 [J]. 中华肝胆外科杂志，2011，17（2）：92-95.

[20] 李狱，马正伟，卢倩，等 . 肝移植术后早期脂肪乳剂支持治疗对移植肝功能影响的临床研究 [J]. 消化外科，

2004，3（6）：388-393.
[21] 葛智成，王宇，张忠涛 . 含谷氨酰胺双肽肠外营养在门腔分流术后应用的临床研究 [J]. 中华肝胆外科杂志，2004，10（9）：6-9.
[22] 王彬，沈洁，黄回，等 . 肠外营养联合重组人生长激素改善门静脉高压患者低蛋白血症的研究 [J]. 浙江医学，2002，24（1）：10-11，14.
[23] Cao J，Luo SM，Liang LJ，et al. Effects of parenteral nutrition without and with growth hormone on growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis after hepatectomy in hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis [J]. J Parenter Enteral Nutr，2007，31（6）：496-501.
[24] 鱼晓波，夏强，张建军，等 . 高支链氨基酸在肝移植术后病人肠外营养中的应用 [J]. 肠外与肠内营养，2007，14（1）：35-38.
[25] Senior JR. Alanine aminotransferase：a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past，present，and future [J]. Clin Pharmacol Ther，2012，92（3）：332-339.
[26] Woreta TA，Alqahtani SA. Evaluation of abnormal liver tests [J]. Med Clin North Am，2014，98（1）：1-16.
[27] Wilde B，Katsounas A. Immune dysfunction and albumin-related immunity in liver cirrhosis [J]. Mediators Inflamm，2019，2019：7537649.
[28] 唐彪，欧阳正晟 . 合并肝硬化的原发性肝癌患者术后三种肠外营养支持方案的效果比较 [J]. 肝胆胰外科杂志，2015，27（2）：149-152.
[29] Holecek M. Branched-chain amino acid supplementation in treatment of liver cirrhosis：updated views on how to attenuate their harmful effects on cataplerosis and ammonia formation [J]. Nutrition，2017，41：80-85.
[30] Hidaka H，Nakazawa T，Kutsukake S，et al. The efficacy of nocturnal administration of branched-chain amino acid granules to improve quality of life in patients with cirrhosis [J]. J Gastroenterol，2013，48（2）：269-276.
[31] Muto Y，Sato S，Watanabe A，et al. Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2005，3（7）：705-713.
[32] Nishitani S，Takehana K，Fujitani S，et al. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2005，288（6）：G1292-G1300.
[33] 王翠萍 . 肠内联合肠外营养支持疗法治疗 ICU 老年患者的疗效分析 [J]. 中国实用医药，2021，16（10）：63-65.

（收稿日期：2022-05-05；修回日期：2022-07-21）

专利竞争视角下的溶瘤病毒药物发展状况研究

尤瑾[1，3]，乔志伟[1，3]，邹玥[1，3]，李洋[1，3*]，李红玉[1，2，3]（1. 药学院，2.生命科学学院，3. 技术与创新支持中心，兰州大学，兰州 730000）

摘要：目的 了解我国溶瘤病毒药物领域发展现状。**方法** 对比分析全球及我国溶瘤病毒药物专利的申请态势、重点技术领域、技术来源与布局、技术创新实体以及专利法律状态等情况，挖掘我国溶瘤病毒药物领域的技术创新现状。**结果** 我国溶瘤病毒领域技术专利质量有待提升，专利侧重于本土化布局且处于技术输入国的地位，发生专利运营的专利仅占 10.13%，运营状态不佳。**结论** 我国在溶瘤病毒药物领域具有强大的发展潜力的同时也存在一些问题，未来应找准问题逐个击破，实现高质量发展。

关键词：溶瘤病毒药物；专利分析；创新发展；发展建议
中图分类号：R951 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2671-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.036

Current development of oncolytic virus drug in the light of patent competition

YOU Jin[1，3], QIAO Zhi-wei[1，3], ZOU Yue[1，3], LI Yang[1，3*], LI Hong-yu[1，2，3] (1. *School of Pharmacy*, 2. *School of Life Sciences*, 3. *Technology and Innovation Support Center*, *Lanzhou University*, *Lanzhou* 730000)

基金项目：国家知识产权局专利专项研究项目（No.FX202211）；国家知识产权局 2018 年全国专利信息传播利用工作计划“地方专利信息传播利用特色能力培育项目”（No.2018-216 号）；兰州大学 2018“一带一路”专项项目（No.2018ldbryb029）。
作者简介：尤瑾，女，硕士研究生，主要从事生物医药知识产权研究，email：youj2019@lzu.edu.cn *__通信作者__：李洋，男，讲师，主要从事生物医药知识产权研究，email：li_yang@lzu.edu.cn

Abstract: Objective To understand the current development of oncolytic virus drug. **Methods** We compared and analysed the global and Chinese oncolytic virus patent applications, key technology areas, technology sources and layout, technology innovation entities and legal status of patents to determine the current technological innovation in oncolytic virus drug in China. **Results** The quality of China's patents in oncolytic virus drug needs improvement. The patents were mostly localised and technology imported, with only 10.13% of patents in operation and some in poor operation drug. **Conclusion** While China has strong development potential in oncolytic virus drug, problems also should be identified and tackled to achieve better quality.

Key words: oncolytic virus drug; patent analysis; innovation development; development proposal

溶瘤病毒是基于天然或基因工程改造的，通过不同的调控机制在肿瘤细胞内复制，并造成肿瘤细胞裂解，但又不影响正常细胞的病毒[1]，使用溶瘤病毒治疗肿瘤具有杀伤效率高、靶向性好、安全性高、不良反应小等特点[2]，溶瘤病毒疗法已经成为肿瘤治疗研究领域的新热点[3]。溶瘤病毒在临床上的应用最早可以追溯到 19 世纪末，一位患有慢性白血病的妇女在一次流感病毒感染后，出现了病情意外好转的现象。1912 年，意大利医师 Depace 发现宫颈癌患者接种减毒狂犬疫苗后肿瘤自发消退[4]。随着生物技术和基因工程的不断发展，到 20 世纪末人们对病毒基因组的改造得以实现，进入 21 世纪，基因插入及联合治疗开始发展，溶瘤病毒具有了更高的特异性和安全性。

目前已经有多个溶瘤病毒药物获批，2005 年重组人 5 型腺病毒注射液（安柯瑞）在我国批准上市，用于治疗头颈部肿瘤、肝癌、胰腺癌、宫颈癌等多种适应证[5]，2015 年美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局批准了用基因工程改造的单纯疱疹病毒Ⅰ型溶瘤病毒药物 Imlygic，用于治疗晚期黑色素瘤[6]，2021 年 6 月 11 日，日本厚生劳动省批准 Delytact 用于治疗恶性胶质瘤。

在医学领域，专利是测量创新的一个关键指标[7]，本文拟通过在智慧芽专利数据平台检索溶瘤病毒相关专利并对其进行分析，以期了解全球溶瘤病毒药物领域的发展现状并为我国企业及科研单位对溶瘤病毒药物的研究提供技术竞争情报，助力我国生物医药领域持续蓬勃发展。

1 数据来源与方法

本文分析使用的全球溶瘤病毒技术领域专利数据来自智慧芽数据库，智慧芽专利数据库每周更新，数据范围涵盖 126 个国家。检索时以“溶瘤病毒”为关键词，结合相关 IPC 分类号检索，去重规则为每件申请只显示一个公开文本。数据更新时间截至到 2021 年 11 月 6 日，共检索到与溶瘤病毒药物密切相关的专利 5592 件。

本文主要利用了定量分析方法，利用 Excel2016 和 PPT2016 对专利申请趋势、重点技术领域分布、技术来源与布局、技术创新实体分析以及法律状态等方面进行详尽分析。

2 结果与分析

2.1 申请趋势分析

全球及我国溶瘤病毒药物领域专利申请趋势见图 1。

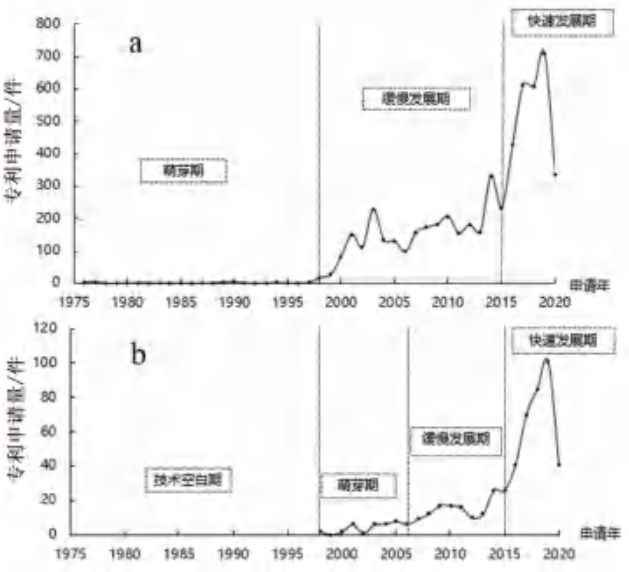


图 1 全球（a）和中国（b）溶瘤病毒专利申请趋势

Fig 1 Global（a）and China（b）patent application for oncolytic virus drug

如图 1a 所示，全球溶瘤病毒药物专利申请总体趋势大致分为以下三个阶段：

① 萌芽期：1976—1997 年，这一时期内年均专利申请量极少，该阶段持续 21 年，且每年申请量维持在一个极低水平。首件申请出现在 1976 年，该专利由 Wistar 研究所申请，专利名称为“用于刺激哺乳动物对物种特异性肿瘤的免疫机制的病毒性溶瘤疫苗”，提供了一种病毒裂解的肿瘤疫苗，所使用的病毒为痘苗病毒。这一阶

段申请人主要集中在欧美等发达地区，技术布局同样也是在欧洲、澳大利亚和美国等发达地区。

② 缓慢发展期：1998—2015 年，经过十几年的探索，溶瘤病毒药物行业持续发展，该阶段专利申请量明显增多，每年申请量达几百件，但均在 500 件以下，该阶段与萌芽期相同，技术来源与布局地区同样集中在欧美等发达地区。这一阶段经过基因工程技术改造的溶瘤病毒药物研究逐渐增多，2004 年非致病性的人肠道埃可病毒产品 Rigvir 在拉脱维亚获批用于治疗黑色素瘤，2005 年改造的重组人 5 型腺病毒注射液（安柯瑞）在中国获批上市，2015 年 FDA 批准溶瘤单纯疱疹病毒药物 T-vec 用于首次手术后复发的黑色素瘤患者局部治疗，一系列药品的获批上市推动了该领域的持续发展。

③ 快速发展期：2016 年至今，这段时期研究人员更注重溶瘤效应的增强，如与免疫检查点抑制剂联用、与化疗剂联用等，同时基因工程技术在这一阶段持续发展，溶瘤病毒药物技术得以进一步发展，其中 2019 年申请量高达 711 件，为近年来的申请高峰，预计未来溶瘤病毒药物将会持续发展。

中国溶瘤病毒药物的专利申请趋势见图 1b，从图 1b 中可以明显看出，中国总体专利申请趋势晚于全球整体趋势，但后续研发实力增长明显，总体可划分为如下四个阶段：

① 技术空白期：1976—1997 年，这一阶段我国在溶瘤病毒药物领域研究呈空白状态，国内尚未对这一技术领域开展大规模研究。

② 萌芽期：1998—2006 年，结合全球总体趋势来看，中国溶瘤病毒药物疗法发展较晚，在这一阶段中国总体专利总体申请量极少，共申请 11 件。

③ 缓慢发展期：2007—2015 年，这一阶段随着分子生物学和基因工程的发展，加之 2005 年溶瘤病毒药物安柯瑞在我国批准上市，开启了我国溶瘤病毒药物研发的新浪潮，专利总体申请量持续发展，涌现出浙江理工大学、复旦大学、中国科学院上海生命科学研究院、北京锤特生物科技有限公司等科研院所及企业，我国溶瘤病毒药物领域在该时期内发展速度较快，与全球总体差距逐步缩小。

④ 快速发展期：2016 年至今，这一阶段总体申请量大幅度增长，并于 2019 年达到最大值，这一时期内众多企业开始崭露头角，如上海元宋生物技术有限公司、杭州康万达医药科技有限公司等企业。进一步说明近年来我国在溶瘤病毒药物领域内发展速度较快，国内企业及科研单位对溶瘤病毒药物领域研发愈发重视，研发投入也在逐步增大。

2.2　重点技术领域分析

2.2.1　IPC 排名分析　IPC 分类号的统计可以显示出溶瘤病毒药物中的重点技术领域构成的技术分布，由此可以为相关研发机构提供重点方向和热门技术的参考 [8]。

该领域内排名前十的 IPC 大组专利申请情况见表 1，可见，A61K 与 C12N 为核心技术类别，分布在 A61K 的类别有 6 个大组，主要涉及医药配置品，占专利总数的 58.9%，分布在 C12N 类别的有 2 个大组，主要涉及病毒改造的相关技术。

表 1　全球溶瘤病毒主要技术类别及 IPC 大组分类号释义

Tab 1　Global key technical categories of oncolytic virus drug and interpretation of IPC classification

序号	IPC 大组分类号	数量	涉及技术领域
1	A61K35	112	含有其有不明结构的原材料或其反应产物的医用配制品
2	A61P35	88	抗肿瘤药物
3	A61K39	54	含有抗原或抗体的医药配制品
4	C12N7	51	病毒（如噬菌体），其组合物，其制备或纯化
5	C12N15	50	突变或遗传工程；遗传工程涉及的 DNA 或 RNA，载体（如质粒）或其分离、制备或纯化
6	A61K38	47	含肽的医药配制品
7	A61K31	37	含有机有效成分的医药配制品
8	A61K48	37	含有插入到活体细胞中的遗传物质以治疗遗传病的医药配制品；基因治疗
9	C07K14	28	具有多于 20 个氨基酸的肽；促胃液素；生长激素释放抑制因子；促黑激素；其衍生物
10	A61K9	24	以特殊物理形状为特征的医药配制品

2.2.2　重点 IPC 领域专利申请年度分析　重点 IPC 领域分类申请趋势可以反映出研发热点的发展趋势，申请量排名前五的重点 IPC 小组领域的年度申请量随年份的变化趋势见图 2，自 2002—2013 年，A61P35/00（抗肿瘤药物）和 A61K35/76（病毒、亚病毒颗粒、细菌病毒）两个小组类别是溶瘤病毒药物领域发展最快的技术领域，说明这一时期溶瘤病毒药物研发主要集中在使用病毒本身治疗肿瘤方面；2012—2014 年，C12N7/00[病毒（如噬菌体）、其组合物、其制备或纯化] 技术领域专利申请量开始增多，这三年内关于病毒的制备或纯化技术逐步发展，2007 年开始 A61K48/00（含有插入到活体细胞中的遗传物质以治疗遗传病的医药配制品；基因治疗）技术领域专利申请量开始逐步发展，2013 年后发展较为

迅速，2015 年开始至今，A61P35/00 领域的专利申请大幅领先于其他技术领域，说明抗肿瘤药物领域的创新持续性仍然强劲，但 A61K35/76 技术领域近年来呈下滑态势，研究人员在该领域研究时应当谨慎评估，确立研究方向。

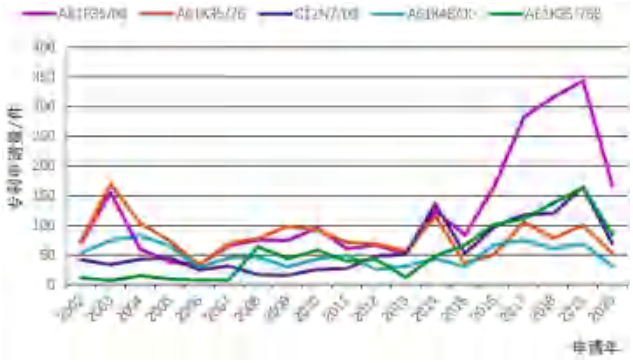
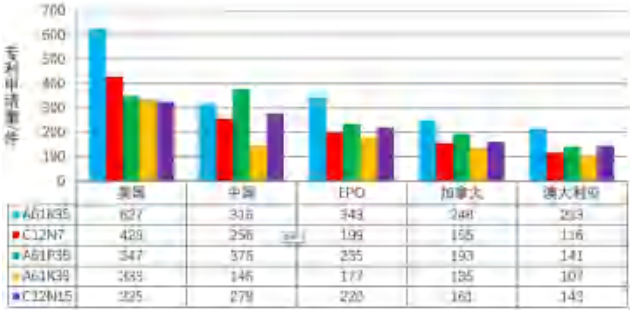


图 2 全球溶瘤病毒药物重点 IPC 领域专利申请年度分析

Fig 2 Annual analysis of global patent applications in key IPC areas for oncolytic virus drug

2.2.3 不同地域受理局技术聚焦及应用布局情况

对溶瘤病毒药物专利全球申请量排名前五的受理局进行重点技术领域统计分析发现，溶瘤病毒药物领域的专利重要受理局技术主要集中在 A61K35、C12N7、A61P35、A61K39 以及 C12N15 等 5 个 IPC 大组中，其中美国在 5 个重点技术领域整体上处于领先地位，除中国外的重要申请国家均在 A61K35 技术领域申请专利最多，中国则在 A61P35 技术领域申请最多，同时在 A61K39 技术领域申请的专利数量明显少于其他技术领域，说明目前中国在改造溶瘤病毒药物使其可以表达相关抗体和在与抗体药物联用方面申请专利较少，这一领域还有较大进步空间。欧盟、加拿大和澳大利亚侧重领域则相同（见图 3）。



	美国	中国	EPO	加拿大	澳大利亚
A61K35	627	316	348	248	253
C12N7	429	256	199	155	116
A61P35	347	376	255	193	141
A61K39	269	146	177	135	107
C12N15	225	279	220	161	143

图 3 主要受理局技术聚焦及应用布局情况

Fig 3 Technology focus and application of major acceptance authorities

2.3 技术来源与布局分析

2.3.1 技术来源与布局地区分布 对一个技术领域的来源和布局地区进行分析有助于科研人员了解该领域的主要技术分布国家和重点市场，图 4 显示了全球溶瘤病毒药物疗法技术来源与布局地区。可以看出溶瘤病毒药物领域技术主要来源于美国、加拿大、英国、中国、德国及韩国，其中美国以绝对优势占据领先地位。这与这些国家的重要科研机构密不可分，例如美国的 DNAtrix 公司、德克萨斯大学体系董事会，加拿大的 Oncolytics Biotech 公司，英国的 PsiOxus Therapeutics 公司，中国的杭州康万达医药科技有限公司，德国的癌症研究公共权益基金会以及韩国的 GeneMedicine 公司等。从布局地区来看，有大量专利布局在世界知识产权组织，说明各个研发单位较为重视技术在国外地区的保护。

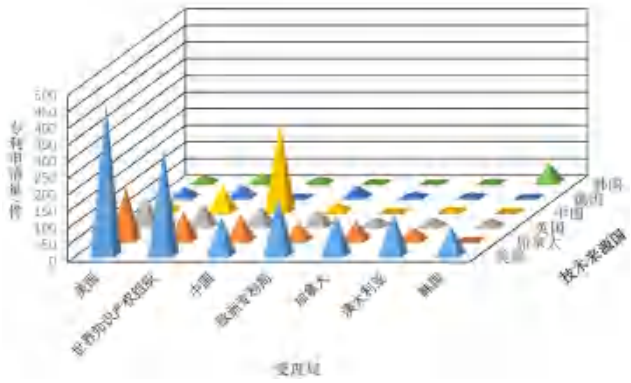


图 4 全球溶瘤病毒药物技术来源与布局地区

Fig 4 Global regional distribution of oncolytic virus technology sources and deployment

2.3.2 主要技术来源国专利产出对比

① 专利质量对比分析：专利质量是专利有效应用的基础，是专利能否支撑创新驱动发展战略的关键 [9]，一般认为衡量专利质量的指标有授权专利数量、同族专利数、被引用频次和 PCT 专利数量，授权和简单同族专利数量越多、被引频次越高、申报的 PCT 专利数量越多说明该国家或地区的专利质量越高 [10]。全球溶瘤病毒药物疗法主要技术来源国的专利质量指标对比见表 2，可以看出在 PCT 专利占比指标下美国排名第一，韩国第二，中国紧随其后，在平均简单同族专利数量指标下排名前三的国家分别是英国、加拿大、德国，在近五年专利平均被引频次指标下加拿大排名第一，美国第二，英国次之。总体来看美国在这一领域的专利质量较高，中国授权专利数量占比、平均简单同族专利数量和近五年专利平均被引频次排名都靠后，反映出中国在该领域的研究需进一步加强，研究单位应进一步加大创新投入，努力提升专利质量，在专利申请量提升的同时更要注重专利质量的提升。

② 专利保护力度对比分析：专利保护具有地域性的特点，即指专利权只在授予国的法律有效管辖范围内有效 [11]。其中，专利保护区域数

表 2　全球溶瘤病毒技术主要申请国家专利产出质量对比

Tab 2　Quality of patent output of main countries filing for oncolytic virus technology globally

国家	授权专利		PCT 专利		平均简单同族专利数量	近五年专利平均被引频次
	数量	占比 /%	数量	占比 /%		
美国	361	19.97	314	17.37	12.27	2.14
加拿大	314	42.78	86	11.72	20.96	4.64
英国	188	33.69	69	12.37	31.58	1.74
中国	136	26.87	76	15.02	5.86	0.55
德国	83	32.17	37	14.34	15.17	1.63
韩国	62	37.13	28	15.91	9.72	0.47

量、海外专利申请占比等指标均可从一定程度上反映专利保护的国际化水平。表 3 显示了全球溶瘤病毒药物疗法主要申请国家专利保护区域，可以看出专利地域保护强度最高的国家是英国，专利保护区域数量有 42 个，海外专利申请占比高达 98.74%，其专利主要布局在美国、欧盟、中国、加拿大，其次为德国、加拿大、美国、韩国和中国，从表中数据可见我国专利保护区域数量 19 个，海外专利申请占比低于 50%，反映出该领域内我国技术创新实体将绝大多数专利布局在本土，国际保护力度亟待加强。

表 3　全球溶瘤病毒主要申请国家专利保护区域

Tab 3　Global patent protection regions for oncolytic virus in major countries

国家	保护区域数量	海外专利申请占比 /%	海外主要受理地区
美国	38	74.72	欧盟、澳大利亚、加拿大、中国
加拿大	29	92.23	美国、欧盟、中国、澳大利亚
英国	42	98.74	美国、欧盟、中国、加拿大
中国	19	47.63	美国、欧盟、日本、澳大利亚
德国	40	96.12	欧盟、美国、加拿大、澳大利亚
韩国	14	67.45	美国、中国、澳大利亚、欧盟

③ 主要国家的专利受理及申请流向分析：图 5 显示了全球溶瘤病毒药物的主要申请国家专利技术流向，在 6 个主要技术来源国中选取申请量最多的美国和同处于亚洲地区的韩国以及中国，对其技术流向进行统计分析，结果发现美国处于明显的技术输出地位，分别在中国和韩国申请 113 件和 84 件专利，而中国和韩国则仅向美国输出 39 件和 22 件。在中韩两国之间可以看到韩国向中国申请了 18 件，而中国仅向韩国申请了 6 件。总体来说中国处于技术输入国的地位，我国技术创新实体倾向于向本土进行专利布局，相关技术创新实体应该提升专利国际化保护的意识。

2.4　技术创新实体分析

2.4.1　技术创新实体类型分析　通过对溶瘤病毒药物领域技术创新实体进行分析，可以反映该领域的竞争对手类型的具体情况，同时有助于了解该领域的主要研究主体 [12]。图 6 显示了全球溶瘤病毒药物疗法领域的技术创新实体的类型，分别有公司、院校 / 研究所、医院、政府机构、个人以及其他类型等 6 类。可以看到在全球范围内，技术创新实体以公司和院校 / 研究所为主，公司专利申请量占比超过 1/2，院校 / 研究所专利申请量占比超过 1/5，公司和院校 / 研究所在全球溶瘤病毒药物疗法领域占据了重要地位，公司专利申请量多也反映出这一领域的技术市场化程度较高。

2.4.2　全球主要技术创新实体　全球溶瘤病毒药物领域专利申请数量排名前十的技术创新实体见图 7，其中有 7 家企业，加拿大企业和美国企业各 2 家、英国企业、法国企业和德国各 1 家，其余 3 所为院校 / 研究所，2 所来自美国，1 所来自加拿大。

其中申请量和授权量均排名第一的公司是加拿大的 Oncolytics Biotech 公司，该公司专注于研究溶瘤呼肠孤病毒，在溶瘤呼肠孤病毒领域占绝对的优势。目前公司就其溶瘤病毒药物产品 Pelareorep，商品名为 Reolysin® 与辉瑞、默克、罗氏、BMS 等制药巨头进行合作开展多项临床试验。排名第二的是英国的 PsiOxus Therapeutics 公司，该公司的主要技术是创新了 T-SIGn 载体，T-SIGn 是基于第一代溶瘤腺病毒药物 enadenotucirev 作为基因载体，与传递编码免疫治疗性蛋白的转基因组合而成的基因疗法。排名第三的是法国的 Transgene 公司，其主要技术是拥有 Invir.IO™和 myvac™两个痘苗病毒载体平台。

2.4.3　中国主要技术创新实体　中国溶瘤病毒药物领域专利申请数量排名前十的技术创新实体见图 8，从申请人类型来看，企业占据 9 家，反映出我国目前在该领域内市场化程度较高；从专利申请量来看，位列前三的是杭州康万达医药科技有限公司、广州威溶特医药科技有限公司和养生堂有限公司，其中杭州康万达医药科技有限公司主要研究腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒，主要技术是在腺病毒中插入免疫检测点基因敲除序列、痘病毒携带免疫细细胞调控因子、单纯疱疹病毒携带免疫细激活因子。广州威溶特医药科技有限公司则主要研究 M1 病毒，M1 病毒是一种从中国海南岛分离得到的天然病毒。养生堂有限公司则主要与厦门大学共同研究溶瘤肠道病毒。从专利授权量占比来看，成都康弘生物科技有限公司授权量占比最高，该公司主要研究能表达粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）的溶瘤腺病毒。

2.5　专利法律状态分析

从简单法律状态来看，溶瘤病毒药物领域

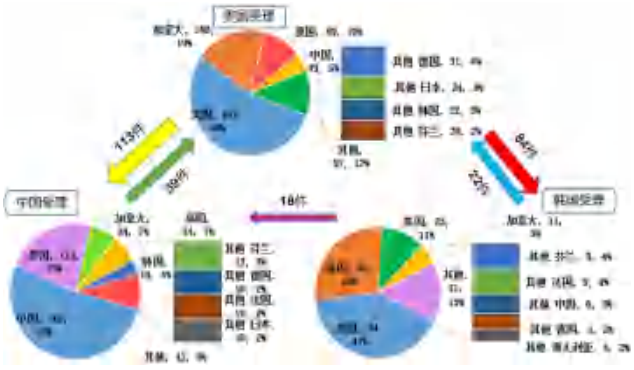


图 5 全球溶瘤病毒主要申请国家专利技术流向图

Fig 5 Global patent technology flow of oncolytic virus of major filing countries

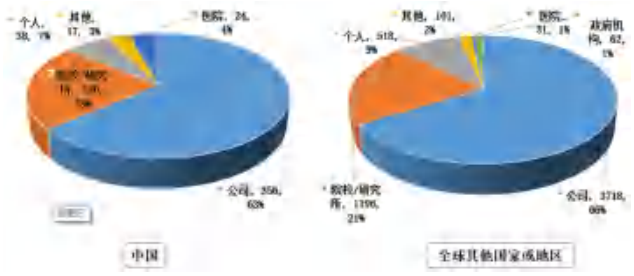


图 6 全球及中国溶瘤病毒技术创新实体类型

Fig 6 Innovation entity types of global and China oncolytic virus technology

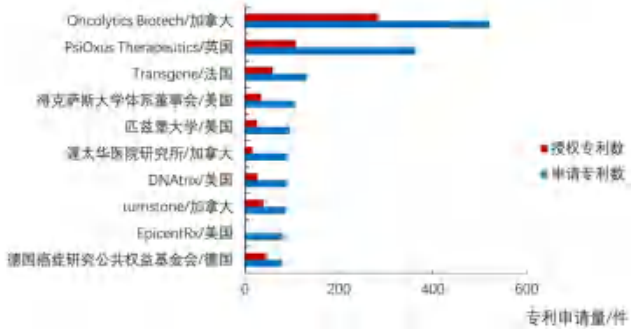


图 7 全球 TOP10 申请人专利申请及授权情况

Fig 7 Patent applications and authorization of globally top 10 applicants

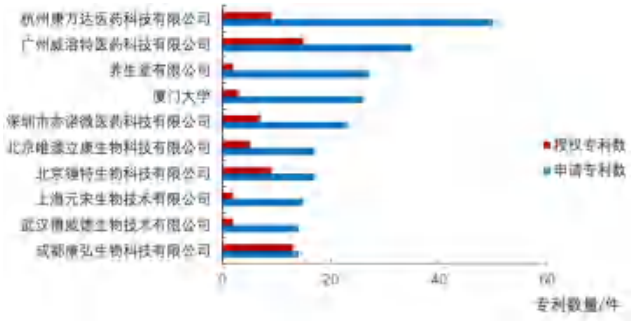


图 8 中国 TOP10 申请人专利申请及授权情况

Fig 8 Patent applications and authorization of top 10 applicants in China

的有效专利 1290 件，包括授权、部分无效或权利恢复状态，占专利申请总量的 23.07%；失效 1485 件，占比 26.56%；审查中的专利有 1788 件，占专利申请总量的 31.97%；其余专利处在 PCT 指定期内或指定期满或状态暂未确认。从首件溶瘤病毒药物领域出现专利申请至今，可以看出该领域内各个研发单位在不断地进行研发投入，专利申请与授权较为活跃。其中专利寿命在 5 ～ 10 年的专利有 280 件，10 年以上的专利有 737 件，专利保护期期限即将到期（专利寿命小于 1 年）的专利有 29 件，有 304 件因期限届满而终止，其中 Oncolytics Biotech 公司和 Biovex 公司期限届满专利较多，分别为 66 件和 22 件，说明这些专利中记载的技术方案市场应用价值度较高，且在授权期间维持较好。中国仅有 1 件由杭州康科生物技术有限公司于 2001 年 10 月 9 日申请的专利 CN1304559C，专利名称为“表达热休克蛋白的溶瘤微生物及其应用”因有效期届满而终止了专利权。此外，发生权利转移的专利有 527 件，占总申请量的 9.42%，进行许可的专利仅有 40 件，占总申请量的 0.72%，说明该领域内专利运营情况有待加强。总体来看，有效专利总数较多，整体研发势头强劲，但发生权利转移及许可使用专利占比较低，反映出在技术运营方面活跃度需进一步加强。

3 讨论

近年来我国高度重视生物医药的发展，并陆续颁布与溶瘤病毒药物相关的文件，2020 年 8 月 7 日国家药监局药审中心发布关于公开征求《溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则（征求意见稿）》意见的通知[13]，2021 年 2 月 9 日发布关于《溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则（试行）》的通告[14]，2021 年 4 月 30 日发布关于公开征求《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）》意见的通知[15]。本文从专利分析的角度发现了我国在该领域大力发展的同时存在的一些问题；从总体专利申请趋势来看，我国在该领域起步较晚；从专利质量来看，我国专利质量有待提升；从专利布局地域来看，我国侧重于本土化布局，处于技术输入国的地位；从法律状态来看，授权的专利中发生专利运营的专利占 10.13%，有大量获得授权的专利被闲置[16]；在我国 TOP10 申请人中仅有养生堂有限公司和厦门大学开展合作，反映出我国专利运营状态不佳。针对上述问题，我国技术创新实体应采取如下策略持续推动溶瘤病毒药物领域的发展，争取在该领域再创辉煌。

3.1 加强技术创新

政府应继续大力支持我国各个技术创新实体在该领域的研究，对于具有经济优势的东南部企业继续引导鼓励，采取相应激励政策，例如

提高技术研发报酬，鼓励已经具备一定竞争优势的企业取得更好的成绩，对于中西部地区实行适当的政策倾斜，给予一定的科研补助，鼓励项目立项发展[17]。同时加大人才引进力度，大力引进高精尖人才，增强创新实力。高校应不断整合自身优势学科资源，加强该领域的基础研究，同时寻求机会与企业合作，营造资源共享共赢的发展局面。

3.2 全面提升专利质量

提升专利质量首先要把好源头关，严格审批相关立项内容，评估开展研究的可行性、创新性、实用性及新颖性，保证研究内容质量；其次专利代理机构人员要提升专利代理质量，加强专利申请文件的撰写功底，保证申请文本能够体现发明创造的最大价值；最后国家知识产权局应当进一步规范对该领域专利的审查标准，2021 年 3 月 11 日国家知识产权局发布《关于规范申请专利行为的办法》的公告，旨在加强知识产权保护的各项决策部署，全面提高专利质量，确保实现专利法鼓励真实创新活动的立法宗旨[18]，未来应持续规范专利申请行为，杜绝非正常专利申请行为的出现。

3.3 重视全球化布局

专利保护具有地域性的限制，针对我国这一领域在国外保护力度不强的问题，相关技术创新实体在选择专利布局地域时，应综合考虑专利保护成本与可能取得的最大收益，谨慎权衡，尽可能多地选择保护国家或地区，最大程度维护自身合法权益，扭转我国处于技术输入国的局面。

3.4 提升专利运营水平

专利运营对企业创新成果市场化、资本化与构筑国际竞争优势具有重要作用[19]，具体内容包括专利权的许可、转让、质押等[20]。企业可以运用专利运营手段来增强融资能力，并分散专权利人独自持有专利带来的风险，此外高校应加大产学研合作力度，推动与企业合作，转化有价值的创新成果。

参考文献

[1] 孙礼媛，刘荻萩，王晓钧，等 . 溶瘤病毒的治疗进展 [J]. 医学综述，2017，23（2）：235-239.

[2] 宁小平，虞淦军，吴艳峰 . 溶瘤病毒的肿瘤临床应用研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2020，27（6）：705-710.

[3] Bell JC，Mcfadden G. Editorial overview：oncolytic viruses-replicating virus therapeutics for the treatment of cancer [J]. Current Opinion in Virology，2015，doi. org/10.1016/j. coviro. 2015.07.005.

[4] 黄慧雅，陆荫英，谢震 . 溶瘤病毒在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 传染病信息，2019，32（1）：30-36.

[5] Garber K. China approves world’s first oncolytic virus therapy for cancer treatment [J]. J Natl Cancer Inst，2006，98（5）：298-300.

[6] Heidi L. Cancer-fighting viruses win approval [J]. Nature，2015，526（7575）：622.

[7] Smith JA，Arshad Z，Thomas H，et al. Evidence of insufficient quality of reporting in patent landscapes in the life sciences [J]. Nature Biotechnology，2017，3（35）：210-214.

[8] 王友华，邹婉依，柳小庆，等 . 全球转基因玉米专利信息分析与技术展望 [J]. 中国生物工程杂志，2019，39（12）：83-94.

[9] 宋河发，穆荣平，陈芳，等 . 基于中国发明专利数据的专利质量测度研究 [J]. 科研管理，2014，35（11）：68-76.

[10] 陈煌琼，吴凡 . 中国发明专利质量评价指标体系研究 [J]. 南阳理工学院学报，2018，10（6）：31-34.

[11] 王强 . 集装箱货船用止裂钢专利分析 [J]. 四川冶金，2018，40（3）：44-46，53.

[12] 王娟，闫娟娟，靳玉瑶，等 . 基于中药专利视角的中药仓储技术研究 [J]. 中南药学，2021，19（3）：557-561.

[13] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 关于公开征求《溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则（征求意见稿）》意见的通知 . [EB/OL].（2020-8-7）[2021-11-13]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/221da88c-181dcbaac878733a6a5801bc.

[14] 国家药品监督管理局药品审评中心 .《溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则（试行）》[EB/OL].（2021-2-9）[2021-11-13]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/a58d1fe54b9cd01161bc143a8ba1a600.

[15] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 关于公开征求《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）》意见的通知（2021-4-30）[2021-11-13]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/23e-744ec72d900ff425446b3004fdc2d.

[16] 谢小丽，陈振夏，于福来，等 . 基于专利分析探讨我国艾纳香产业发展现状 [J]. 中国药房，2021，32（10）：1158-1164.

[17] 舒灵芝，文玲芳 . 全球抗阿尔茨海默症化学药物专利情报研究 [J]. 中国发明与专利，2021，18（12）：26-36.

[18] 国家知识产权局 . 国家知识产权局公告第四一一号 [EB/OL].（2021-3-11）[2021-11-13]. https://www.cnipa.gov.cn/art/2021/3/12/art_74_157677.html.

[19] 李莹莹，王宏起，王珊珊 . 战略性新兴企业专利运营活动与服务需求识别 [J/OL]. 科学学研究，https：//doi. org/10.16192/j. cnki. 1003-2053.20211126.001.

[20] 杨思思，戴磊，郝屹 . 专利经济价值度通用评估方法研究 [J]. 情报学报，2018，37（1）：52-60.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-20）

药品集中带量采购后某院抗菌药物使用及细菌耐药率变迁情况

向左娟，陈小娟，胡晓杰，谷秀梅，付滢舟*（湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院，长沙 410013）

摘要：目的 探讨抗菌药物专项集中带量采购对临床选用药物及细菌耐药情况的影响，促进合理用药。**方法** 调取某院 2017 年 5 月—2022 年 4 月抗菌药物消耗的品种及数量，其中 2020 年 5 月—2022 年 4 月为专项集采执行期，收集病原菌检出情况和耐药数据，采用 *t* 检验比较专项集采执行前后的耐药率，Pearson 法分析药物使用强度和耐药率之间的相关性。**结果** 专项集采执行后，喹诺酮类、一代头孢菌素使用强度降低超过 0.5 DDDs，而 *β*- 内酰胺类 /*β*- 内酰胺酶抑制剂复方制剂（BL/BLIs）、三代头孢菌素升高超过 0.5 DDDs。头孢哌酮 / 舒巴坦、哌拉西林 / 他唑巴坦、氨苄西林 / 舒巴坦、头孢他啶、头孢曲松对大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌的耐药率升高，左氧氟沙星则对肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌的耐药率降低（$P < 0.05$）。相关性分析显示多个 BL/BLIs 和三代头孢菌素耐药率与这两类药物及碳青霉烯类使用强度成正相关。**结论** 医疗机构应密切关注药品集采过程中临床用药习惯的改变和耐药率的变迁，及时调整抗菌药物管理办法，促进合理用药，延缓耐药发生。

关键词：药品集中带量采购；耐药性；抗菌药物；使用强度；合理用药
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2678-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.037

Antibacterial drug use and drug resistance rate in a hospital after drug centralized volume-based procurement

XIANG Zuo-juan, CHEN Xiao-juan, HU Xiao-jie, GU Xiu-mei, FU Ying-zhou* (*Hunan Cancer Hospital/Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine*, *Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the influence of special centralized volume-based procurement of antibacterial drugs on clinical drug selection and drug resistance and promote rational drug use. **Methods** The types and quantity of antibacterial drugs from May 2017 to April 2022 were retrospectively analyzed. May 2020 to April 2022 were the implementation periods of special centralized volume-based procurement of antibacterial drugs. Bacterial drug resistance data of pathogens during the same period were collected. *t* test was used to compare the drug resistance rates before and after the special centralized procurement. Pearson method was used to analyze the correlation between density of antibiotics use and resistance rate. **Results** After the implementation of special centralized volume-based procurement of antibacterial drugs, the density of antibiotics use decreased by more than 0.5 DDDs for quinolones and first-generation cephalosporins, while that increased by more than 0.5 DDDs for BL/BLIs and third-generation cephalosporins. The drug resistance rates of cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam, ampicillin/sulbactam, ceftazidime and ceftriaxone to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* increased, while the drug resistance rates of levofloxacin to *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* decreased ($P < 0.05$). The drug resistance rates of several BL/BLIs and third-generation cephalosporins were positively correlated with the density of use of both drugs and carbapenems. **Conclusion** Medical institutions should pay close attention to the change of

基金项目：湖南省自然科学基金 - 科卫联合项目（No. 2018JJ6031）。
作者简介：向左娟，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学和药事管理，email：xiangzuojuan@163.com *通信作者：付滢舟，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学和药事管理，email：fuyingzhou@hnca.org.cn

clinical medication habits and drug resistance rates during the implementation of centralized volume-based procurement, timely adjust antimicrobial management methods, and promote rational drug use.
Key words: drug centralized volume-based procurement; drug resistance; antibacterial drug; density of antibiotics use; rational drug use

药品集中带量采购政策是近年来在深化医疗改革过程中，国家医疗保障局采用以量换价、招采合一方式大力缓解人们“看病难、看病贵”的重大举措，自实施以来效果显著，药品价格有了大幅降低，患者用药可及性不断提高[1]。迄今为止，国家组织的带量采购已经开展到第七轮，同时，以省际联盟为代表的其他集采形式也逐步成为主流，集采品种的覆盖范围快速增加[2]。在此背景下，湖南省医疗保障局于 2019 年颁布了《湖南省 2019 年公立医疗机构抗菌药物专项集中采购实施方案》（湘医保发 [2019]29 号），方案以 2018 年在全省累计采购金额占前 80% 的抗菌药物品种为主，结合抗菌药物临床使用规范等文件遴选了专项集采的目录，基本覆盖了医疗机构常用的抗菌药物品种，要求各医疗机构积极完成各药品的约定任务量，并控制非中选品种采购金额在上年度本医疗机构抗菌药物总采购金额的 20% 以内，以保障抗菌药物的临床使用、切实减轻医疗负担。

我院自 2020 年 5 月 1 日起正式执行抗菌药物专项集采政策后，基本药品供应目录中集采中选品种覆盖了所有抗菌药物品种的 70%。而作为抗肿瘤专科医院，患者常因疾病、放化疗、手术等多种原因导致免疫力下降，细菌感染风险增加[3]。本文旨在探讨专项集采对药物临床使用及细菌耐药情况产生的影响，为促进医改环境下抗菌药物的合理使用提供依据。

1　材料与方法

1.1　菌株来源

收集 2017 年 5 月—2022 年 4 月从我院检验科的标本中分离出的菌株，标本主要来自呼吸道、血液、伤口脓液组织、引流液、尿液、无菌体液、生殖道分泌物、大便、其他分泌物拭子、导管尖端等。

1.2　细菌鉴定与药敏试验

严格参照《全国临床检验操作规程》进行分离，采用 TDR-L002 型半自动微生物分析仪（湖南长沙天地人生物科技有限公司）进行细菌鉴定。药敏试验采用纸片扩散（K-B）法，结果判读参照美国临床试验室标准化委员会（CLSI）推荐的标准。质控菌株：大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700324、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.3　抗菌药物使用情况

调取医院信息系统（HIS）2017 年 5 月—2022 年 4 月期间抗菌药物消耗的品种及数量，按照世界卫生组织推荐的限定日剂量（defined daily dose，DDD 值）计算抗菌药物用药频度（defined daily dose system，DDDs）和使用强度（antibiotics use density，AUD）。DDDs ＝抗菌药物消耗量 /DDD 值，可反映临床选用药物的倾向性；AUD ＝ DDDs×100/（同期出院患者人数 × 同期患者平均住院天数），用于测算药物使用的广度和强度。

1.4　统计方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析，在数据符合正态分布的前提下，专项集采执行前后耐药率的组间比较采用 t 检验，AUD 和耐药率之间的相关性运用 Pearson 法计算。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　病原菌检出情况

2017 年 5 月—2022 年 4 月期间分离出的细菌总数为 19 768 株，以革兰氏阴性杆菌为主（68.21%，13 483 株），其次为革兰氏阳性球菌（21.93%，4335 株）和真菌（9.50%，1878 株）。剔除同一患者相同部位的重复菌株后得到检出率，检出率最高的革兰氏阴性菌依次为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌，检出率最高的革兰氏阳性菌为金黄色葡萄球菌，见表 1，其中 2020 年 5 月—2022 年 4 月为开始执行专项集采后的时期。

表 1　主要病原菌的非重复分离率

Tab 1　Non-repeat isolation rate of main pathogenic bacteria

菌株	2017 年 5 月—2020 年 4 月		2020 年 5 月—2022 年 4 月	
	检出数 / 株	占比 /%	检出数 / 株	占比 /%
总数	10 016	—	8326	—
大肠埃希菌	1895	18.92	1159	13.92
肺炎克雷伯菌	1319	13.17	1081	12.98
铜绿假单胞菌	897	8.96	798	9.58
金黄色葡萄球菌	828	8.27	778	9.34
鲍曼不动杆菌	627	6.26	596	7.16

2.2　病原菌耐药情况

分析我院最常见的两种革兰氏阴性菌的耐药情况，见表 2，专项集采实施以后，头孢哌酮 /

舒巴坦、哌拉西林 / 他唑巴坦、氨苄西林 / 舒巴坦、头孢他啶、头孢曲松对大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌的耐药率均升高（$P < 0.05$），左氧氟沙星对肺炎克雷伯的菌耐药率降低（$P < 0.05$）。

表 2　大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的年度耐药率 (%)

Tab 2　Annual resistance rate of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to commonly used antibiotics (%)

抗菌药物	大肠埃希菌耐药率			肺炎克雷伯菌耐药率		
	专项集采执行前	专项集采执行后	*P*	专项集采执行前	专项集采执行后	*P*
头孢哌酮 / 舒巴坦	2.58±0.15	3.75±0.21	0.005	4.88±0.39	7.78±0.79	0.011
哌拉西林 / 他唑巴坦	2.80±0.35	4.00±0.37	0.034	4.97±1.13	8.24±0.54	0.035
氨苄西林 / 舒巴坦	48.52±1.12	54.63±1.60	0.014	27.48±0.81	34.15±1.51	0.007
头孢他啶	19.65±0.82	24.43±0.83	0.008	10.17±0.41	13.90±0.18	0.001
头孢曲松	53.46±1.12	60.97±1.15	0.005	26.86±1.74	35.20±0.33	0.008
氨曲南	35.59±0.57	36.76±0.29	0.082	16.23±1.52	17.86±0.50	0.256
亚胺培南	1.29±0.43	1.41±0.69	0.833	2.34±2.15	5.03±0.82	0.203
美罗培南	1.28±0.30	0.81±0.06	0.129	2.85±1.34	4.27±0.49	0.263
阿米卡星	1.57±0.32	1.63±0.16	0.840	2.42±2.07	5.02±1.16	0.215
庆大霉素	39.07±2.05	34.29±0.85	0.058	12.78±1.33	12.97±1.43	0.887
环丙沙星	54.54±2.12	56.34±1.24	0.370	30.00±0.49	30.55±2.72	0.822
左氧氟沙星	47.51±0.74	45.98±0.57	0.092	20.21±0.67	15.64±0.97	0.008

抗菌药物对金黄色葡萄球菌的耐药情况未因集采产生明显波动，仅左氧氟沙星和红霉素耐药率有所下降（$P < 0.05$），见表 3。

表 3　金黄色葡萄球菌对常用抗菌药物的年度耐药率 (%)

Tab 3　Annual resistance rate of *Staphylococcus aureus* to commonly used antibiotics (%)

抗菌药物	专项集采执行前	专项集采执行后	*P*
青霉素 G	89.40±2.10	89.29±1.39	0.950
苯唑西林	28.53±0.84	25.16±1.66	0.052
庆大霉素	7.32±1.88	6.57±0.19	0.628
利福平	2.65±0.66	3.02±0.69	0.588
环丙沙星	13.64±1.85	12.07±0.40	0.343
莫西沙星	11.16±1.15	10.67±0.19	0.609
复方磺胺甲噁唑片	6.57±0.79	4.28±1.09	0.069
克林霉素	35.35±1.15	36.93±0.13	0.164
阿奇霉素	51.24±2.08	49.03±0.52	0.255
红霉素	49.44±1.61	44.72±0.44	0.031
四环素	21.32±2.00	22.38±0.23	0.528
左氧氟沙星	14.16±0.70	8.36±0.57	0.002

2.3　抗菌药物使用情况

湖南省抗菌药物专项集采执行后，我院除抗真菌外的抗菌药物供应目录见表 4。

根据湖南省抗菌药物临床应用分级管理目录（2021 年版）（湘卫医发 [2021]44 号）将抗菌药物分为非限制使用级、限制使用级和特殊使用级三类，统计不同级别抗菌药物的用药频度所占比例，见图 1。考虑到新版目录对部分我院使用较广的药物级别进行了调整，如头孢孟多、头孢硫脒、头孢地嗪等从限制使用级更改为特殊使用级，限制和特殊使用级抗菌药物的整体用药频度所占比例在集采执行期间增加了 7.6%。

表 4　抗菌药物供应目录

Tab 4　Supply list of antibacterial agents

抗菌药物类型	药物
青霉素类	氟氯西林钠、青霉素钠
BL/BLIs	哌拉西林 / 他唑巴坦、阿莫西林 / 克拉维酸钾、头孢哌酮 / 舒巴坦
一代头孢菌素类	头孢硫脒、头孢唑林钠
二代头孢菌素类	头孢孟多酯钠、头孢呋辛钠
三代头孢菌素类	头孢地嗪钠、头孢他啶、头孢曲松钠、头孢克肟分散片、头孢噻肟钠
四代头孢菌素类	头孢吡肟
单酰 β- 内酰胺类	氨曲南
头霉素类	头孢美唑钠、头孢西丁钠
氧头孢烯类	拉氧头孢钠
碳青霉烯类	亚胺培南 / 西司他丁、美罗培南
氨基糖苷类	庆大霉素、阿米卡星
大环内酯类	阿奇霉素、克拉霉素
林可酰胺类	克林霉素
喹诺酮类	左氧氟沙星、莫西沙星
咪唑衍生物	奥硝唑
四环素类	多西环素
糖肽类	万古霉素
其他	磷霉素、复方磺胺甲噁唑、呋喃妥因、利奈唑胺

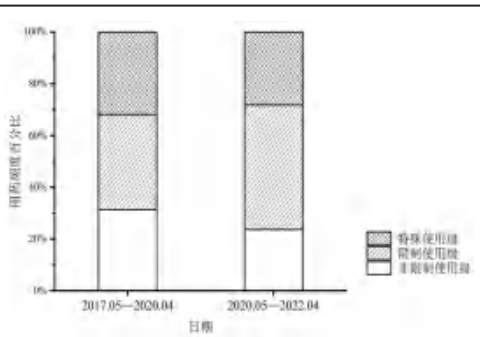


图 1　不同使用级别抗菌药物的用药频度百分比堆积图

Fig 1　DDDs percentage of different levels of use of antibiotics

专项集采执行后，AUD 较高的抗菌药物依次为 BL/BLIs、头霉素类、三代头孢菌素类、喹诺酮类等，AUD 平均降低超过 0.5 DDDs 的有喹诺酮类和一代头孢菌素类，升高超过 0.5 DDDs 的有 BL/BLIs、三代头孢菌素类，二代头孢菌素类、碳青霉烯类、糖肽类 AUD 也有所增加，见图 2。

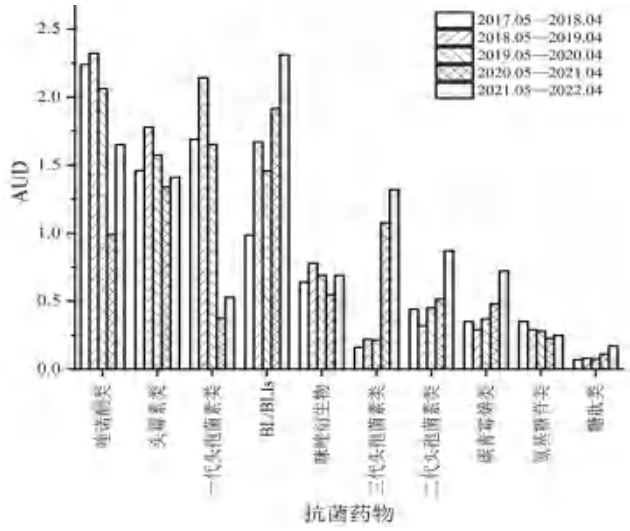


图 2　抗菌药物 AUD 分析

Fig 2　AUD analysis of antibiotics

2.4　AUD 与耐药率的相关性分析

选择专项集采后耐药率显著改变的几种抗菌药物，分析其耐药率与常见用于革兰氏阴性菌的药物 AUD 之间的相关性，结果见表 5。对大肠埃希菌而言，头孢哌酮 / 舒巴坦耐药率与 BL/BLIs、三代头孢菌素类、碳青霉烯类 AUD，氨苄西林 / 舒巴坦耐药率与 BL/BLIs、三代头孢菌素类、二代头孢菌素类、碳青霉烯类 AUD，哌拉西林 / 他唑巴坦耐药率与三代头孢菌素类、碳青霉烯类 AUD，头孢他啶、头孢曲松耐药率与 BL/BLIs、三代头孢菌素类 AUD 均成正相关。对肺炎克雷伯菌而言，头孢哌酮 / 舒巴坦耐药率与三代头孢菌素类、二代头孢菌素类、碳青霉烯类，氨苄西林 / 舒巴坦耐药率与 BL/BLIs、三代头孢菌素类，哌拉西林 / 他唑巴坦耐药率与 BL/BLIs、三代头孢菌素类、碳青霉烯类，头孢他啶、头孢曲松耐药率与三代头孢菌素类均成正相关。此外，多个抗菌药物耐药率与一代头孢菌素类 AUD 成负相关。

3　讨论

3.1　抗菌药物专项集采对临床选用药物的影响

肿瘤患者受疾病本身和放化疗等治疗手段的影响，细菌感染风险相对较高，腹部、消化系统、呼吸系统、血液系统、手术部位等均是恶性肿瘤患者常见的感染部位，头孢菌素类、BL/BLIs、喹诺酮类、碳青霉烯类等均为常用抗菌药物。专项集采执行后，临床在选用药物方面发生了较大变化，如选用头孢菌素时改用第二、三代品种，BL/BLIs、碳青霉烯类、糖肽类等使用强度增加，且选择限制和特殊使用级药物的意愿增加。

表 5　细菌耐药率与 AUD 相关性分析

Tab 5　Pearson correlation analysis between bacterial resistance rate and AUD

抗菌药物	致病菌株	喹诺酮类	头霉素类	一代头孢菌素类	BL/BLIs	咪唑衍生物	三代头孢菌素类	二代头孢菌素类	碳青霉烯类	氨基糖苷类
头孢哌酮 / 舒巴坦	大肠埃希菌	− 0.816	− 0.646	− 0.931*	0.901*	− 0.399	0.991**	0.841	0.911*	− 0.841
氨苄西林 / 舒巴坦	大肠埃希菌	− 0.749	− 0.625	− 0.892*	0.879*	− 0.342	0.941*	0.879*	0.929*	− 0.829
哌拉西林 / 他唑巴坦	大肠埃希菌	− 0.707	− 0.572	− 0.852	0.866	− 0.306	0.971**	0.814	0.881*	− 0.691
头孢他啶	大肠埃希菌	− 0.773	− 0.539	− 0.873	0.931*	− 0.308	0.983**	0.782	0.864	− 0.825
头孢曲松	大肠埃希菌	− 0.790	− 0.564	− 0.888*	0.922*	− 0.337	0.988**	0.784	0.866	− 0.826
左氧氟沙星	大肠埃希菌	0.797	0.297	0.691	− 0.817	0.306	− 0.781	− 0.344	− 0.478	0.874
头孢哌酮 / 舒巴坦	肺炎克雷伯菌	− 0.774	− 0.748	− 0.947*	0.814	− 0.455	0.979**	0.914*	0.960**	− 0.722
氨苄西林 / 舒巴坦	肺炎克雷伯菌	− 0.749	− 0.409	− 0.808	0.980**	− 0.204	0.931*	0.719	0.808	− 0.926*
哌拉西林 / 他唑巴坦	肺炎克雷伯菌	− 0.778	− 0.594	− 0.902*	0.924*	− 0.334	0.993**	0.842	0.912*	− 0.827
头孢他啶	肺炎克雷伯菌	− 0.893*	− 0.637	− 0.933*	0.870	− 0.483	0.975**	0.705	0.802	− 0.866
头孢曲松	肺炎克雷伯菌	− 0.868	− 0.855	− 0.971**	0.655	− 0.678	0.937*	0.754	0.820	− 0.628
左氧氟沙星	肺炎克雷伯菌	0.777	0.568	0.891*	− 0.935*	0.317	− 0.989**	− 0.822	− 0.897*	0.839

注：表内相关系数 r 通过 Pearson 相关性分析获得，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Correlation coefficient r in the table was obtained by Pearson correlation analysis，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

究其原因，首先考虑药物质量层次的影响。参与本轮专项集采的抗菌药物共划分为 4 个质量层次：第一层次主要为专利期内的药品和国家一类新药；第二质量层次主要为专利到期药、通过质量一致性评价的仿制药、其他批准上市的新药及出口药；第三质量层次是获得国家级奖项、国家重大新药创制专项药品及增加了适应证的药品；第四质量层次主要为通过药品生产质量管理规范（GMP）认证但未进行一致性评价的药品。从药品使用情况来看，临床倾向于选用质量层次更好

的品种，如喹诺酮类药物左氧氟沙星因在肺、腹腔等组织中浓度较高，一直在胸内科、妇瘤科等科室使用较多，但在集采后使用强度大幅降低，可能与我院集采品种为第四质量层次有关。

其次，对集采药物临床效果的质疑[4]。原本恶性肿瘤患者使用高级别抗菌药物的概率相对一般人群较高，而临床药师在查房过程中发现，临床还存在因担心集采品种疗效欠佳而选用更高级别、抗菌谱更广的品种，或者通过增加剂量来增强疗效的心理，加之高级别抗菌药物在集采中获得的价格优势又进一步促进了其使用，如特殊使用级药物美罗培南在我院供应目录中的价格由 77.48 元降至 9.48 元，降幅达到 87.8%，集采后用药频度增加了 80.21%。由于少数肿瘤患者出现了消化道肿瘤术后吻合口瘘、严重肺部感染、造血干细胞移植后感染等危重情况，重症监护室等科室多次提出需要使用美罗培南、亚胺培南 / 西司他丁、头孢哌酮 / 舒巴坦等药物的原研品种，为此，考虑到部分原研药在杂质含量、不良反应、疗效等方面可能更具优势[5]，我院对部分危重症等特殊情况的患者用药采用临时采购模式，由临床医师在 OA 中提出用药申请，经临床药师对患者病情进行核实、分析，并通过相关部门审批后方可采购，从而在保证临床用药的前提下尽量减少非中选品种的使用次数。

3.2 病原菌谱和耐药情况变迁

目前，病原菌组成的情况未发生明显变化，与全国细菌监测网 CHINET 数据及其他肿瘤专科医院研究数据大致相符[6-7]，耐药率也未出现较大波动，但是一些变化趋势值得关注。青霉素 G 对金黄色葡萄球菌的耐药率一直偏高，超过 85%，建议停用；阿奇霉素、红霉素耐药率约 50%，不建议作为经验治疗的首选用药。在两种革兰氏阴性菌中，几种常用的 BL/BLIs 和三代头孢菌素类耐药率呈现出上升趋势，目前，氨苄西林 / 舒巴坦和头孢曲松对肺炎克雷伯菌的耐药率分别为 34.15% 和 35.20%，建议经验用药的同时及时参照药敏试验结果调整方案；对大肠埃希菌的耐药率为 54.63% 和 60.97%，建议参照药敏试验结果选用。

3.3 AUD 和耐药率相关性分析

抗菌药物的使用水平和细菌耐药率之间存在宏观量化关系，细菌耐药性可在抗菌药物压力因素下发生变化[8-9]。在本文相关性分析中，BL/BLIs 和第三代头孢菌素类耐药率不仅受这两类药物 AUD 的影响，还受到碳青霉烯类等 AUD 的影响，反映了抗菌药物耐药迁移的复杂性。第三代头孢菌素类较一、二代抗菌谱更广，但其 AUD 增加与多个抗菌品种耐药率上升相关，提示应加强此类药物的临床点评，减少滥用。而对产超广谱 β- 内酰胺酶（ESBLs）的革兰氏阴性菌而言，BL/BLIs 复方制剂比单用 β- 内酰胺类抗菌药作用更强[10]，故临床常经验用药选择 BL/BLIs 复方制剂覆盖不确定的致病菌，以期快速达到疗效，但只有合理控制使用才能保持其作为碳青霉烯类前一道防线的地位[11]。碳青霉烯类作为治疗革兰氏阴性菌多重耐药菌最可靠、有效的抗菌药物，目前对大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药率控制在 10% 以下，但应警惕各类抗菌药物使用不当诱发多重耐药菌，如第三代头孢菌素类、BL/BLIs、碳青霉烯类的不合理使用均是诱发多重耐药菌的独立风险因素[12]。

3.4 关于抗菌药物管理的建议

考虑到集采执行期间临床在选用品种、强度等用药习惯上发生了改变，耐药率呈现出一定的变化趋势，且两者之间存在相关性，笔者建议医疗机构应制订与集采政策同步、配套的抗菌药物使用整治方案：首先，应及时发布细菌监测数据，为制订治疗方案提供重要依据；其次，坚持严格的抗菌药物管理制度，加强专项点评，AUD 异常上升的品种需重点监控，进行抗菌药物使用合理性评价报告；再次，加强政策宣讲消除临床对集采药品的疑虑；最后，鼓励开展中选品种临床疗效与安全性的真实世界研究。同时，为了保证专项集采任务量的顺利完成，医疗机构应鼓励医务部、药学部、信息部、绩效办等部门通力合作，积极分析各个临床科室抗菌药物集采品种的使用情况，在绩效上体现相应的激励与惩罚机制，并对非中选品种的使用加强监测。

综上，医疗机构在执行抗菌药物专项集采期间应密切关注药物使用和细菌耐药情况变化，建立科学、适宜的抗菌药物管理机制，加强用药合理性评价工作，避免药物滥用，优化治疗策略，延缓耐药菌的产生，切实落实好深化医疗改革的相关方案。

参考文献

[1] 谭清立，郭润镒，孙慧琳，等 . 药品集中带量采购与医保谈判政策的协同作用 [J]. 中国药房，2021，32（15）：1793-1799.

[2] 张秋玉，王芸，胡元霞，等 . 我国药品及医用耗材集中带量采购政策的实施现状及建议 [J]. 中国药房，2022，33（2）：136-141.

[3] 李继荣 . 肿瘤患者医院感染的病原菌分布及危险因素分

析 [J]. 中华医院感染学杂志，2012，22（22）：5141-5143.
[4] 胡善联 . 国家组织药品集中采购的卫生经济学理论基础及完善建议 [J]. 中国卫生资源，2021，24（1）：12-14，23.
[5] 赵洁，李巍，王皋俊 . 价值医疗视角下国家药品集中带量采购在某公立医院的实施效果评价 [J]. 中国药房，2021，32（19）：2410-2414.
[6] 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告 [J]. 中国感染控制杂志，2021，20（1）：15-31.
[7] 吴春霖，李卫兵，宋晓玉，等 . 肿瘤患者医院感染病原体分布及其耐药性分析 [J]. 现代预防医学，2016，43（4）：758-761.
[8] 杨涛，邓卫平，陆怡，等 .β- 内酰胺类抗菌药物 /β- 内酰胺酶抑制剂复方制剂使用强度与常见革兰阴性菌耐药率关联性分析 [J]. 中国药业，2021，30（3）：91-95.
[9] Rogues AM，Dumartin C，Amadéo B，et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol，2007，28（12）：1389-1395.
[10] 欧尾妹，吕媛，李耘，等 .β 内酰胺类 /β 内酰胺酶抑制剂的体外抗菌活性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2015，31（11）：916-920.
[11] Sukhyun R，Klein EY，Chul CB. Temporal association between antibiotic use and resistance in Klebsiella pneumoniae at a tertiary care hospital [J]. Antimicrob Resist Infect Control，2018，7（1）：83.
[12] 郭春霞，邓一农，黎明，等 . 2015—2019 年我院主要病原菌耐药性变化趋势分析 [J]. 国外医药（抗生素分册），2021，42（3）：154-160.

（收稿日期：2022-04-08；修回日期：2022-07-13）

引入 PCNE 分类系统对消化内科药物相关问题进行探索与实践

彭苗苗[1, 2]，张桂凡[1]（1.南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京 210008；2.南京临床药学中心，南京 210008）

摘要：目的 运用欧洲医药保健网（PCNE）分类系统对消化内科药物相关问题进行总结和讨论，为今后临床药师药学工作的开展及工作方向提供参考。**方法** 以我院消化内科临床药师医嘱审核记录及审方软件调取的 2018 年 1 月 1 日—2021 年 6 月 30 日消化内科医嘱问题为研究对象，采用 PCNE 分类系统（V9.0）评估药物相关问题（DRPs），并对发生 DRPs 的类型、原因、干预方案、干预方案的接受程度及 DRPs 状态等进行分析。**结果** 本研究涉及患者共计 386 人，药物相关问题共计 434 条，平均每人用药问题为 1.12 条。实际干预 434 条，干预成功率为 97.24%；医嘱审核记录中相关药物分类排名前三的是消化系统药物（34.10%）、抗感染药物（24.88%）及糖盐类药物（20.28%）；DRPs 问题分类排名前三位的分别是不确定的问题或抱怨需要进一步说明（35.25%）、可能发生药物不良事件（30.18%）、治疗效果不佳（16.82%）。**结论** PCNE 分类体系引入医嘱审核工作能够提升临床药师发现和解决 DRPs 的能力，明确相关科室主要的药物相关问题，提高临床药师在临床的药学监护效率，确保临床合理用药。

关键词：药物相关问题；PCNE 分类系统；医嘱审核；临床药师；消化内科
中图分类号：R969.3，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)11-2683-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.038

PCNE classification system for drug-related problems in the Department of Gastroenterology

PENG Miao-miao[1, 2], ZHANG Gui-fan[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University*, *Nanjing* 210008; 2. *Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy*, *Nanjing* 210008)

基金项目：南京大学医院管理研究所课题项目，南京鼓楼医院医学发展医疗救助基金会资助项目（No. NDYG2020042）；天晴医院药学基金科研项目（No. Q202006）；南京临床药学中心课题。
作者简介：彭苗苗，女，主管药师，主要从事消化内科临床药学工作，email：pengmiaomiao1984@126.com

Abstract: Objective To summarize drug-related problems in the Department of Gastroenterology with PCNE classification system to provide reference for clinical pharmacists' work in the future. **Methods** We reviewed the medical order review records and prescriptions in the Department of Gastroenterology from January 1st, 2018 to June 30th, 2021. Drug related problems (DRPs) were evaluated by PCNE (V9.0) classification system. The types, causes, intervention schemes, acceptance of intervention schemes and the status of DRPs were analyzed. **Results** Totally 386 patients were involved: 434 DRP cases, with an average of 1.12 DRP for each patient. All 434 DRP cases were intervened, with a success rate of 97.24%. The top three categories of related drugs in medical order review records were digestive system drugs (34.10%), anti-infective drugs (24.88%), and sugar and salt drugs (20.28%). The top three DRPs were: uncertainty or complaints awaiting further explanation (35.25%), possible adverse drug events (30.18%), and poor treatment effect (16.82%). **Conclusion** PCNE classification system helps clinical pharmacists to improve their ability to find and solve DRPs in relevant departments, improve the pharmaceutical care efficiency, and ensure rational drug use.

Key words: drug-related problem; PCNE classification system; medical advice review; clinical pharmacist; Department of Gastroenterology

欧洲医药保健网（Pharmaceutical Care Network Europe，PCNE）分类系统是目前经过国际验证的分类系统，使用范围较广且简单易行，本研究用的版本是 PCNE V9.0，该版本以有效性和安全性为依据对药物相关问题（DRPs）进行分类，可对 DRPs 进行定性和流行率研究[1]。本研究使用 PCNE 系统对消化内科用药问题进行分类汇总并分别讨论，记录临床药师发现和干预临床用药问题的整个过程，提高消化内科临床药师在临床的药学监护效率。

1 资料与方法

1.1 资料

从消化内科临床药师医嘱审核记录及审方软件（逸曜药师临床辅助决策管理系统 V4.0）调取 2018 年 1 月 1 日至 2021 年 6 月 30 日审核出的消化内科医嘱问题，并从信息系统调取有医嘱问题患者病例信息。2018 年 1 月 1 日至 2020 年 4 月 30 日主要由消化内科临床药师人工审核医嘱，自 2020 年 5 月 1 日，我院审方系统上线，临床药师和审方系统共同审核消化内科住院医嘱。

1.2 医嘱审核及干预方法

临床药师工作日每日审核消化内科所有住院患者医嘱，参考药品说明书、消化内科相关疾病治疗指南、《2015 版抗菌药物临床应用指导原则》，结合患者最新实验室检查中的肝肾功能、凝血指标、药敏结果及临床治疗效果等，判断患者用药医嘱的合理性，记录有问题的医嘱并及时反馈给临床医师，并记录干预结果。审方系统在工作日每日审核消化内科用药医嘱问题，有问题的医嘱及时发送临床科室医师工作站，系统记录医嘱问题及干预结果。

1.3 干预记录与统计分析

将本研究原始医嘱审核及干预记录采用 PCNE V9.0 版本中 DRPs 的分类标准进行分类统计并分析。PCNE V9.0 将药物相关问题的分类分为 5 个部分，问题（P），原因（C），介入方案（I），介入方案的接受（A），DRPs 状态（O），其中问题类别包括 3 个一级分类及 7 个二级分类，原因类别分为 9 个一级类别及 43 个二级类别，介入方案类别分为 4 个一级类别及 16 个二级类别，介入方案的接受类别分为 4 个一级类别及 11 个二级类别，DRPs 状态类别分为 4 个一级类别及 7 个二级类别。

并根据医嘱问题中涉及的药物按照药品分类进行统计，统计每种类别的药物所占的比例。

1.4 统计学处理

应用 SPSS19.0 版软件进行统计分析，其中计数资料以例数（n）或率（%）表示；计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结果

2.1 患者基本情况

本研究涉及病例 386 人，其中男性 238 例（61.66%），女性 148 例（38.34%），平均年龄为（59.1±16.4）岁，患者第一诊断主要是胆总管结石、急性胰腺炎、肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血、肝小静脉闭塞症、胃肠息肉、梗阻性黄疸、非静脉曲张消化道出血、胆管炎、肝性脑病、胰腺癌、克罗恩病、溃疡性结肠炎、贲门失弛缓、腹腔积液、

胃早癌等，均为消化系统常见诊疗疾病。

2.2　药物相关问题的分类

本研究中涉及到的药物分类，主要是消化系统药物、抗感染药物、糖盐类药物、血液系统药物、心血管药物、营养类药物等，排名前三的是消化系统药物（34.10%）、抗感染药物（24.88%）及糖盐类药物（20.28%），详见表 1。

表 1　药物相关问题中的药物分类

Tab 1　Classification of drugs in drug-related problems

药物分类	人工审核 / 条	审方系统审核 / 条	合计 / 条	比例 /%
消化系统药物	40	108	148	34.10
抗感染药物	82	26	108	24.88
糖盐类药物	0	88	88	20.28
血液系统药物	19	7	26	5.99
心血管药物	2	16	18	4.15
营养类药物	6	9	15	3.46
其他	18	13	31	6.91

2.3　DRPs 分类

2.3.1　DRPs 问题分类　386 例患者，DRPs 共计 434 条，平均每人用药问题为 1.12 条，低于张莎等[2]对社区慢性病患者研究的数据。对于发现的 434 条用药问题，按照 PCNE V9.0 版本中对 DRPs 的问题分类标准进行分类，其中排名前三位的分别是 P3.3 不确定的问题或抱怨需要进一步说明（35.25%），包括预防用药的选择及给药时机不规范、适应证不适宜；P2.1（可能）发生药物不良反应（30.18%），包括通过肾脏排泄的药物未及时根据肾功能调整给药剂量及给药频次、治疗窗较窄的药物未及时根据血药浓度或实验室检查调整给药剂量、患者使用有禁忌证的药物；P1.2 治疗效果不佳（16.82%），包括药物溶媒量较少导致溶解不完全、有相互作用的药物联合使用导致药效下降，以上三项为临床 DRPs 的主要问题，其他问题分类及占比详见表 2。总体来看，治疗有效性问题占比为 18.89%，治疗安全性问题占比为 30.18%，其他问题占比为 51.38%。

2.3.2　DRPs 原因分类　按照 DRPs 原因分类，在 PCNE V9.0 版本中提到的 43 个可能原因中，有 14 条可能原因至少出现过 1 次，其中排名在前三位的原因分别是 C1.4 不适当的组合（32.49%），包括溶媒选择不当、给药方法不适宜、有相互作用的药物联合使用；C1.3 无用药指征（18.66%），主要为医院重点管控药品不符合医保适应证；C3.2 药物剂量过高（14.52%），主要为肾功能受损、药物浓度过高未及时减量。其他问题的原因见表 3。总体来算，消化内科 DRPs 用药问题的原因类别中，药物选择不适宜占 72.80%，药物剂型选择不适宜占 1.84%，药物剂量选择不适宜占 23.04%，药物治疗疗程不适宜占 2.07%，药物使用过程存在不适宜占 0.23%。

表 2　DRPs 的问题分类 (n = 434)

Tab 2　Problem classification of DRPs (n = 434)

问题分类	人工审核 / 条	审方软件审核 / 条	合计 [n（%）]
治疗有效性			
P1.2 治疗效果不佳	31	42	73（16.82）
P1.3 有未治疗的症状或适应证	9	0	9（2.07）
治疗安全性			
P2.1（可能）发生药物不良事件	81	49	131（30.18）
其他			
P3.1 治疗成本效益的问题	5	2	8（1.84）
P3.2 不必要的药物治疗	35	27	62（14.29）
P3.3 不确定的问题或抱怨需要进一步说明	6	147	153（35.25）

表 3　DRPs 的原因分类 (n = 434)

Tab 3　Causes of DRPs classification (n = 434)

原因分类	人工审核 / 条	审方软件审核 / 条	合计 [n（%）]
药物选择			
C1.1 选药不适宜（因未依据指南或处方集）	11	0	11（2.53）
C1.2 选药不适宜（指南推荐，但对此患者为使用禁忌）	16	19	35（8.06）
C1.3 无用药指征	5	76	81（18.66）
C1.4 不适当的组合	21	120	141（32.49）
C1.5 药物重复使用	13	26	39（8.99）
C1.6 尽管存在适应证，未给予药物治疗或没有给予完整的药物治疗	9	0	9（2.07）
药物剂型			
C2.1 剂型不适宜	4	4	8（1.84）
剂量选择			
C3.1 药物剂量过低	3	0	3（0.69）
C3.2 药物剂量过高	52	11	63（14.52）
C3.3 给药频次不足	2	5	7（1.61）
C3.4 给药频次过多	14	6	20（4.61）
C3.5 用药时间的指示错误，不清晰或遗漏	7	0	7（1.61）
治疗疗程			
C4.2 疗程过长	9	0	9（2.07）
药物使用过程			
C6.1 不恰当的给药时间或给药间隔	1	0	1（0.23）

2.3.3　DRPs 介入方案分类　所有 DRPs 一经发现，临床药师或者审方药师直接跟管床医师沟通

干预，100.00% 的 DRPs 从医师层面进行了沟通并提供药物调整方案，见表 4。

表 4 DRPs 的介入方案类别 (n = 434)

Tab 4 Types of DRPs intervention schemes (n = 434)

介入方案分类	人工审核 / 条	审方软件审核 / 条	合计 [n（%）]
医师层面			
I1.3 提供介入方案给医师	167	267	434（100.00）

2.3.4 介入方案的接受及解决 对于临床药师提供的介入方案，97.24% 的 DRPs 被医师或者患者接受并完全执行，1.84% 的 DRPs 医师接受介入方案，但未执行；0.69% 的 DRPs 医师未接受介入方案，不赞同；0.23% 的 DRPs 医师未接受介入方案，没说明拒绝原因，详见表 5。

表 5 DRPs 的介入方案的接受类别 (n = 434)

Tab 5 Categories of intervention schemes for DRPs (n = 434)

介入方案的接受类别	人工审核 / 条	审方软件审核 / 条	合计 [n（%）]
介入被接受			
A 1.1 接受介入方案并完全执行	154	268	422（97.24）
A 1.3 接受介入方案，但并未执行	7	1	8（1.84）
介入未被接受			
A 2.2 未接受介入方案，不赞同	2	1	3（0.69）
A 2.4 未接受介入方案：不清楚原因	1	0	1（0.23）

因此，本研究中消化内科医嘱审核的 434 条 DRPs，临床药师干预率为 100%，全部解决的 DRPs 占比为 97.24%，未解决的 DRPs 占比为 2.77%，详见表 6。

表 6 DRP 状态类别 (n = 434)

Tab 6 DRP status categories (n = 434)

状态类别	人工审核 / 条	审方软件审核 / 条	合计 [n（%）]
解决			
1.1 问题已全部解决	157	265	422（97.24）
没有解决			
3.2 问题没有解决，医师不合作	10	2	12（2.77）

3 讨论

PCNE 分类体系主要用于研究 DRPs 的性质、流行病和发生率，也可以作为研究药学监护成果过程中的一个指标，本系统中描述的“原因”就是我们平常所说的“用药错误”。本文按照 PCNE V9.0 版本中 DRPs 的分类标准对近几年本院在消化内科临床药学工作中审核出的用药问题进行分类统计并分析，通过对 DRPs 的根源及发生原因进行分析，对今后预防同类用药错误提供帮助，临床药师可通过药学监护工作解决并减少 DRPs 的发生，优化临床治疗方案，从而提高临床药师服务质量 [2-5]。

3.1 消化内科用药问题的药物类别

对消化内科用药问题的药物类别分析，发现有 DRPs 问题的主要药物类别包括抗酸药与胃黏膜保护剂、抑酸药、促胃肠动力药、助消化药、催吐与止吐药、泻药与止泻药、肝胆辅助用药、肠道微生态制剂，主要问题包括使用了禁忌证药品、超疗程用药、患者可以经口进食后未及时将静脉质子泵抑制剂改为口服用药、重复用药等；其次是抗感染药物相关的问题，消化内科感染性疾病包括急性胆管炎、急性胰腺炎伴感染，肝硬化自发性腹膜炎等引起的复杂感染，预防性使用抗菌药物的疾病包括失代偿期肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血、内镜黏膜下剥离术、内镜下黏膜切除技术、经口内镜下食管括约肌切开术等内镜下操作的预防用药；排在第三位的是药物溶媒相关的问题，包括溶媒的用量过少，导致药物无法溶解，或者溶媒选择不符合说明书要求，影响药物稳定性等问题。

3.2 消化内科 DRPs 分类

本研究分析发现，问题分类排名前三位的是其他问题中的 P3.3（35.25%）、治疗安全性问题中的 P2.1（30.18%）、治疗有效性问题中的 P1.2（16.82%）。

P3.3 主要包括：① 预防用药选择及给药时机不规范的问题。消化内镜操作预防用药不规范的问题主要集中在药物选择及给药时机方面 [6]，2015 版《抗菌药物临床应用指导原则》中对消化内镜操作的预防用药推荐有感染高危因素的患者可选择一、二代头孢，时机是操作前 0.5 h 开始给药，用药疗程不超过 24 h，我院消化内科内镜操作不合理现象主要表现在预防用药选择三代头孢和 / 或在内镜操作结束后开始预防用药和 / 或预防用药的疗程大于 24 h，临床药师对不合理用药现象及时干预，指导管床医师调整用药方案，并定期在消化内科业务学习活动中对抗菌药物合理用药问题进行培训，保障了我院临床用药的合理性；② 我院重点管控药物，按照 2020 年国家医保规定，患者不符合医保适应证而选择医保用药的问题，主要药物包括多烯磷脂酰胆碱注射液（限抢救和肝衰竭患者使用）、异甘草酸镁注射液（限肝功能衰竭或无法口服甘草酸口服制剂患者）、多糖铁复合物（限妊娠妇女使用），临床药

师和审方药师通过医嘱审核，协助医师规范医保适应证，为优化医疗资源发挥了重要作用。虽然医保系统可自动筛选出违规医嘱，但系统中维护规则单一，药师才是医嘱审核的主力军，通过医嘱审核，可以减少因不恰当用药或不必要治疗引起的住院日延长、医药费用增加[7]的问题。

P2.1 的主要问题包括：① 通过肾脏排泄的药物，医师未根据患者变化的肾功能及时调整给药剂量或给药频次，如常用药品头孢唑肟钠、恩替卡韦、拉米夫定、依诺肝素钠、替考拉宁、门冬氨酸鸟氨酸、氟康唑、哌拉西林他唑巴坦、左氧氟沙星、亚胺培南西司他丁、头孢哌酮舒巴坦等，临床药师结合患者体质量、年龄、肌酐水平，运用肌酐清除率计算公式计算出患者精确的肌酐清除率，个体化制订肾功能不全患者以上药物的具体使用剂量，并将方案提供给临床医师，确保患者安全、有效使用相关药物；② 治疗窗较窄的药物进行血药浓度监测或相关实验室检查后，结果提示浓度过高，医师未及时根据血药浓度调整剂量的，如万古霉素、华法林，对于普通感染的成人患者，推荐万古霉素目标谷浓度维持在 10 ～ 15 mg • L^{-1}，对于严重耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染的成人患者，建议万古霉素目标谷浓度维持在 10 ～ 20 mg • L^{-1}[8]；华法林抗凝治疗推荐国际标准化比值（INR）目标范围为 2.0 ～ 3.0[9]，临床药师根据万古霉素血药浓度及华法林 INR 值，指导管床医师调整患者用药剂量，避免因药物剂量过大引发不良反应或剂量过小而疗效不足；③ 患者使用有禁忌证的药物，如肝功能评分为 Child B 级的患者，使用多潘立酮促胃动力，该药禁用于中重度肝功能不全的患者，临床药师建议此类患者可以换用伊托必利、莫沙必利等促动力剂改善患者胃动力不足的症状；肝硬化门静脉血栓患者肝功能分级为 Child B 级，选择利伐沙班抗凝治疗，利伐沙班为新型直接口服抗凝药（NOAC），禁用于肝功能分级为 Child B 级和 C 级患者，其他的 NOAC 包括达比加群、阿哌沙班、依度沙班禁用于 Child C 级患者，可以供 Child B 级患者选择使用。由于 NOAC 的肝脏不良反应（肝损伤的发生率为 0.1% ～ 1.0%[10]）及在肝功能减退患者中使用的限制，目前在肝硬化患者中使用 NOAC 的研究较少。2016 年意大利肝病学会推荐[11]肝硬化门静脉血栓患者使用低分子肝素和华法林抗凝安全有效，未提及 NOAC，而 2021 年《美国胃肠病学会临床实践指南：肝硬化患者凝血功能障碍的管理》中将 NOAC 列为肝硬化血栓患者可选药物，但是对于抗凝剂的选择，尚无不同抗凝剂之间可比性的研究资料，无法评估其优劣性[12]。而一项来自埃及的随机对照试验[13]，比较了利伐沙班和华法林治疗肝硬化代偿期门静脉血栓患者的治疗效果，结果显示利伐沙班组门静脉完全再通率及部分再通率均显著高于华法林组，而消化道出血发生率及病死率显著低于华法林，同时结合国内外指南逐渐把 NOAC 纳入肝硬化抗凝药物的行列，提示 NOAC 在肝病患者中的地位在逐渐上升，因此临床药师建议对于肝硬化 Child A 的患者可以尝试使用 NOAC，而 Child B 级及 C 级的患者尽量选择华法林或者低分子肝素。

P1.2 主要问题包括药物溶媒量过少，导致药物浓度超过说明书规定药物浓度的限制，可能会因为刺激静脉引起静脉炎，另一方面溶媒量过少可能会导致药物溶解不完全而产生浑浊，影响输液安全[14]，同时会因实际输注药物的总剂量低于给药剂量而影响药物疗效，如亚胺培南西司他丁钠 1 g 使用 100 mL 溶媒溶解，说明书规定每 0.5 g 亚胺培南西司他丁钠需要使用 100 mL 溶媒溶解，临床药师建议医师至少需要 200 mL 的溶媒溶解 1 g 的亚胺培南西司他丁钠；联合用药不合理，氯吡格雷跟奥美拉唑联合使用，氯吡格雷为前体药物，需要通过 CYP2C19 转化为活性代谢物才能发挥抗血小板的作用，奥美拉唑是 CYP2C19 的抑制剂，会减弱氯吡格雷的抗血小板作用，崔艳丽等[15]研究表明奥美拉唑与氯吡格雷联合应用能显著减弱后者的抗血小板作用，但并不增加心血管事件发生率。

3.3 消化内科用药问题原因分类

本研究结果显示，消化内科用药问题原因分类多是处方相关原因（99.77%），结果不同于国内其他研究[2]，因为本研究的研究对象是消化内科医嘱审核的问题，入院患者药物重整及用药宣教不在本研究的范围之内。DRPs 原因分类排名前三位的原因分别为不适当的组合 C1.4（32.49%）、无用药指征 C1.3（18.66%）和药物剂量过高 C3.2（14.52%）。C1.4 不恰当的组合主要包括感染患者使用亚胺培南西司他丁钠 1 g 加用 100 mL 溶媒溶解，溶媒过少；奥美拉唑与氯吡格雷联合用药，减弱了氯吡格雷抗血小板作用；使用维生素 K_1 纠正凝血，加用 100 mL0.9% 氯化钠注射液作溶媒静脉滴注，该使用方法不当，维生素 K_1 注射

液应该静脉滴注、肌内注射或深部皮下注射，因维生素 K_1 对光线敏感，在稀释过程中会发生氧化还原反应，导致药效下降。C1.3 无用药指征的情况如下：多烯磷脂酰胆碱注射液和异甘草酸镁注射液用于非肝衰和非禁食的患者，属于医保适应证不符。C3.2 药物剂量过高主要是肝肾功能受损，未及时调整用药剂量，或者患者血药浓度超过安全范围，未及时减量，以上原因在 DRPs 分类部分已经进行详细讨论，这里不再赘述。

3.4 介入方案分类及介入状态

本研究介入方案的类别全部是医师层面，434 条问题医嘱全部反馈给管床医师，其中 422 条医嘱（97.24%）的用药建议被管床医师接受并修改医嘱，确保患者用药安全。

4 小结

综上所述，本研究运用 PCNE 分类系统对消化内科用药问题进行分析，有助于提高临床药师在临床的药学监护效率，并为药学部门制订规范化的临床药师干预流程、标准化的工作记录方式提供依据。临床药师作为医疗团队中的一员，在患者的用药安全及用药规范性方面发挥着不可或缺的作用[16]。

本研究的局限性在于：仅对住院医嘱审核结果进行 DRPs 分析，并未将药物重整、药学查房、对护士的相关药物指导工作中发现的问题纳入其中，导致对消化内科 DRPs 的现状分析不够全面，下一步将对临床药师在临床工作中所有用药相关的工作进行 DRPs 分析，进一步提升临床药师发现和解决 DRPs 的能力，以期在源头上降低消化内科 DRPs 的发生率，确保临床用药安全。

参考文献

[1] 李慧馨，蔡俊，张雨昇，等 . PCNE 分类系统在老年高血压患者药物相关问题中的应用 [J]. 中南药学，2021，19（3）：528-533.

[2] 张莎，王婧，祝德秋 . 引入 PCNE 分类系统对社区慢病患者进行药学监护的实践探索 [J]. 中南药学，2020，18（6）：1051-1056.

[3] 李文喆，刘洋，吴茜，等 . 基于欧洲医药保健网分类系统的某中医医院重症医学科药物相关问题的分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21（2）：232-236.

[4] 刘丽亚，温小明，杨西晓，等 . 引入 PCNE 分类系统对 2 型糖尿病患者开展 MTM 的实践探索 [J]. 中国药房，2019，30（19）：2685-2690.

[5] 吴汀溪，余俊先，邢云利，等 . 利用欧洲药学监护网络分类系统对老年慢病患者用药分析 [J]. 医药导报，2020，39（2）：168-171.

[6] 刘小华，罗璨 . 干预前后江苏省人民医院消化内镜预防用抗菌药物的比较 [J]. 现代药物与临床，2015，30（10）：1280-1284.

[7] 李聪，李志浩，陈富超，等 . 某医院基于医保控费系统重点监控药品管理模式实践 [J]. 安徽医药，2020，24（1）：189-193.

[8] He N，Su S，Ye ZK，et al. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin：2020 update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring，Chinese Pharmacological Society [J]. Clin Infect Dis，2020，71（Suppl）：S363-S371.

[9] 中华医学会心血管病学分会，中国老年学学会心脑血管专业委员会 . 华法林抗凝治疗的中国专家共识 [J]. 中华内科杂志，2013，52（1）：76-82.

[10] 回翔，范晴晴，段琰，等 . 新型口服抗凝药物致肝损伤研究进展 [J]. 药物不良反应杂志，2018，20（4）：289-295.

[11] Italian Association for the Study of Liver Diseases. Hemostatic balance in patients with liver cirrhosis：report of a consensus conference [J]. Dig Liver Dis，2016，48：455-467.

[12] 王冰琼，何志颖，吴晓宁 .《2021 年美国胃肠病学会临床实践指南：肝硬化患者凝血功能障碍的管理》摘译 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（12）：2790-2792.

[13] Hanafy AS，Abd-Elsalam S，Dawoud MM. Randomized controlled trial of rivaroxaban versus warfarin in the management of acute non-neoplastic portal vein thrombosis [J]. Vascul Pharmacol，2019，113：86-91.

[14] 王志远 . 我院静脉中心抗菌药物医嘱分析 [J]. 海峡药学，2021，33（5）：200-201.

[15] 崔艳丽，武峰，戴玉洋 . 奥美拉唑对氯吡格雷抗血小板效应影响的 Meta 分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（15）：2331-2334.

[16] 刘杨从，张韶辉，郭珩，等 . 新医改形势下药师参与住院药费控制成效分析 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（2）：189-191.

（收稿日期：2022-04-07；修回日期：2022-05-17）

医药护协作的全院血糖管理模式在骨科糖尿病患者围术期应用效果及经济学评价

代晶[1]，李林通[2]，张宁[3]，葛卫红[2]，毕艳[3]，计成[2*]（1.苏州大学附属第二医院药学部，江苏　苏州　215000；2.南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京　210008；3. 南京大学医学院附属鼓楼医院内分泌科，南京　210008）

摘要：目的　评价医药护协作的全院血糖管理模式对骨科围术期糖尿病患者血糖控制效果及经济学价值。**方法**　选取在某院骨科就诊的 2 型糖尿病患者，随机分为干预组和对照组，对照组由其所在科室医师进行血糖管理，干预组由内分泌科专科医师、临床药师、护士组成的全院血糖管理小组进行降糖干预。比较两组患者接受降糖干预第 3 日的血糖改善情况、不良事件发生率以及血糖管理治疗成本的差异。**结果**　两组患者降糖干预前血糖控制水平及日间血糖波动幅度无差异。降糖干预第 3 日，与对照组比，干预组的空腹及餐后血糖明显下降（$P < 0.05$），且血糖波动幅度较小；高、低血糖发生率（$P < 0.05$）以及术后感染发生率（$P > 0.05$）均下降；患者住院总费用减少（$P > 0.05$）。进一步分析降糖治疗相关成本 - 效果，干预组的降糖成本 - 效果比（C/E）较对照组显著减少。**结论**　医药护协作的全院血糖管理模式能平稳控糖、且减少骨科围术期糖尿病患者的不良事件发生、降低成本 - 效果比，值得开展。

关键词：多学科协作；住院血糖管理；围术期；成本 - 效果分析

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2689-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.039

糖尿病是困扰全世界 4.63 亿患者的慢性疾病，而这种困扰不仅仅来源于身体的不适，更多来源于其不可治愈、长期的综合治疗、监测血糖以及诊疗花费。糖尿病患者在检测设备、药物方面的医疗花费巨大，2013 年，美国糖尿病经济成本调查结果显示，糖尿病在美国的耗资连续五年增长超过 41%[1]；2014 年，我国慢病管理网发布数据显示，我国糖尿病医疗消耗资源为 803.30 亿元，占慢性病医疗资源 5%[2]。住院患者高血糖现象普遍，高血糖对各科室的患者产生不同程度的临床不良结局，如增加 ICU 患者感染概率、延迟外科患者伤口愈合、对妇产科孕妇及胎儿造成不良影响等 [3-4]。

然而，由于患者对低血糖的恐惧、营养状况、疾病状态对血糖影响的差异以及非内分泌科医务人员的专业限制，理想的血糖控制仍然具有挑战性。因此，在前期的工作基础上，本院构建了临床药师参与的多学科合作的全院血糖管理模式，对非内分泌科住院高血糖患者实现全程跟踪管理，并以围术期患者血糖管理实践为例，探讨了医药护协作的全院血糖管理模式的管理效果，研究结果显示效果显著 [5]。但前期研究只关注了效果的探讨，没有对该模式的经济学价值进行评价，存在一定的欠缺。本研究拟从成本 - 效果角度进一步评估医药护协作的全院血糖管理模式的优势，为住院高血糖患者的血糖管理提供现实参考依据。

1　资料与方法

1.1　入选病例及分组

1.1.1　研究对象纳入　本研究纳入的研究对象为在某院骨科行择期手术的 2 型糖尿病患者。纳入标准：① 符合骨科相关手术指征；② 符合 1999 年 WHO 给出的 2 型糖尿病诊断标准；③ 经研究者普及不同血糖管理模式优劣后，同意参加并能积极配合医务人员相关工作。排除标准：① 有严重肝肾功能不全，呼吸、循环系统障碍的患者；② 无法与工作人员正常交流的患者；③ 有神经或精神病者；④ 不愿每日监测 7 次血糖的患者；⑤ 未成年、妊娠或哺乳期妇女；⑥ 有相关药物过敏史的患者；⑦ 术后长期禁食及使用营养制剂的患者；⑧ 术前术后管理时间小于 3 d 的患者。

1.1.2　患者分组　根据纳排标准选择符合的患

基金项目：广东省药学会研究基金立项项目（No.2020ZX03）。

作者简介：代晶，女，药师，主要从事临床药学研究，email：13615135611@163.com　*通信作者：计成，男，硕士，副主任药师，主要从事慢性疾病的药物治疗管理，email：getcct@sina.com

者，通过从电脑生成的随机数字表中抽取数字，将患者分为对照组和干预组，对照组患者由内分泌科专科医师通过会诊进行诊疗；干预组患者由全院血糖管理小组成员管理血糖。最终纳入研究对象 100 例，对照组和干预组各 50 例，其中对照组男 29 例，女 21 例，年龄（60.9±8.78）岁，糖尿病病程（7.5±6.69）年，体质量指数（BMI）为（25.3±2.71）kg·m^{-2}，入院第一诊断为颈椎病的 8 例、骨折 9 例、腰椎管狭窄 6 例、腰椎滑脱 13 例和腰椎间盘突出 14 例，手术级别为Ⅲ级的 16 例、Ⅳ级的 34 例；干预组男 26 例，女 24 例，年龄（59.4±12.25）岁，糖尿病病程（5.4±5.01）年，BMI 为（26.5±4.23）kg·m^{-2}，入院第一诊断为颈椎病的 12 例、骨折 8 例、腰椎管狭窄 9 例、腰椎滑脱 10 例和腰椎间盘突出 11 例，手术级别为Ⅲ级的 14 例、Ⅳ级的 36 例，两组患者手术切口类别均为Ⅰ类切口。本研究经医院伦理委员会批准（伦理批号：2020-263-02），所有患者均知情同意。

1.2 *研究方法*

对照组患者接受内分泌科专科医师的普通会诊后，由其所在科室的医师根据会诊意见进行降糖治疗，内分泌科药师在医院信息系统中查看患者的血糖控制情况；术后，每日床边查看患者相关评价指标，对患者不多加干预。

干预组由全院血糖管理小组成员（以下简称小组成员）纳入全院血糖管理系统进行全程跟踪管理。2019 年 9 月，本院成立了医、药、护多学科合作的小组成员对住院患者进行血糖管理。小组主要成员有内分泌科主任医师 1 名，主治医师 1 名，内分泌科专职临床药师 2 名、护士 1 名。管理流程（见图 1）如下：

1）接诊：骨科的医师申请全院血糖管理，全院血糖管理小组接受申请。

2）初次管理：小组全员到患者床边进行问诊后，综合评估患者的情况，由专科医师制订降糖方案。

3）日常管理：

① 术前管理：根据患者疾病状况、糖尿病病程、低血糖发生风险以及手术类型制订血糖控制目标，每日专科医师或临床药师联合护士进行线上或床边查房，评估患者状况；② 术中管理：小组成员关注患者术中血糖变化情况，及时为突发状况给出指导意见；③ 术后管理：术后患者血糖波动较大，及时评估患者术后情况，如是否禁食、是否使用营养液，确定术后降糖方案。

4）出院管理：患者治疗结束预出院时，临床药师明确出院降糖方案，为患者制订出院教育及随访周期表，告知患者出院后的降糖方案及血糖监测、饮食运动注意事项，嘱其根据随访周期表定期到内分泌科门诊复诊。

5）随访：临床药师电话或微信随访患者血糖控制水平，自我血糖监测情况，是否合理饮食、运动，并提供指导、教育。

图 1　血糖管理流程图

1.3 *观察指标*

1.3.1　一般信息　① 一般指标：患者的年龄、性别、BMI、吸烟饮酒史、糖尿病病程、高血压病史、手术时长、术中出血量；② 检验指标：肝肾功能、血脂水平、空腹血糖（FPG）、餐后血糖（PPG）、糖化血红蛋白（HbA1c）、空腹 C 肽水平、餐后 2 h C 肽水平。

1.3.2　效果评价指标　① 血糖控制水平：比较干预前 1 日的血糖水平与降糖干预第 3 日的血糖水平；② 血糖波动幅度：比较干预前 1 日与降糖干预第 3 日的血糖波动幅度，根据《糖尿病患者血糖波动管理专家共识》[6] 指出，利用自我血糖监测评估血糖波动的指标有：血糖水平的标准差（SDBG），即 1 d 内多点血糖值的标准差（＜ 2.0 mmol·L^{-1}）、餐后血糖波动幅度（PPGE）即三餐后 2 h 的血糖与其相应餐前血糖差值绝对值的平均值（＜ 2.2 mmol·L^{-1}）、最大血糖波动幅度（LAGE）即日内最大和最小血糖值之差（＜ 4.4 mmol·L^{-1}）；③ 患者术前血糖达标情况：根据《中国住院患者血糖管理专家共识》[7] 推荐的围手术期患者血糖管理控制目标，结合患者情况，制

订血糖控制目标，当患者血糖达制订的目标值以下，且未出现低血糖并维持 1 d 以上即为血糖达标，血糖达标率为达标人数占总人数的百分比；④ 住院时间：患者入院到出院的累积天数。

1.3.3 不良事件指标 ① 低血糖发生率：低血糖事件（血糖≤ 3.9 mmol • L^{-1}）≥ 1 次的患者人数占总人数的百分比；② 高血糖发生率：管理后发生随机血糖值≥ 16.6 mmol • L^{-1} 的患者人数占总人数的百分比；③ 术后感染判断：患者术后出现体温升高（≥ 38 ℃）、血常规及 C- 反应蛋白检测至少 2 次异常，同时结合病程中对切口局部情况的描述（如红、肿、热、痛）及手术部位组织、分泌物培养结果等情况综合判断。符合以上判断标准的人数占总人数的百分比即为术后感染发生率。

1.3.4 血糖管理成本 本次的成本 - 效果评价中，效果评价指标主要采用的是患者的血糖达标率，因此计算的成本为降糖治疗所产生的医疗费用，主要包括糖尿病治疗药物费用、血糖监测费用、胰岛素笔或胰岛素泵的材料费、胰岛功能检测费用以及人力服务成本，以上成本均为直接医疗成本。由于患者的餐食费、住院费等个体差异大且难以判断是否与血糖管理有关，故不考虑直接非医疗成本。间接成本是指由疾病、创伤等原因造成的患者及其家庭成员时间和生产力损失；隐性成本是指因疾病或医疗服务所引起的疼痛、忧虑、紧张等生理上和精神上的痛苦及不适，间接成本和隐性成本均难以测算，因此也不考虑。

糖尿病治疗药物费用、血糖监测费用、材料费、检查费等通过医院信息系统的住院费用小结中获得。人力服务成本由医务工作者在血糖管理过程中所花费的时间折算而来，按该院各科医务工作者基本工资以及科室的绩效奖金综合计算成本。具体服务时间计算如下：干预组患者接受小组成员全程管理，每日平均接受管理服务时间约 25 min，其中专科医师为患者提供服务的平均时间为 5 min，临床药师为患者提供服务的平均时间为 15 min，护士为患者提供服务的平均时间为 5 min。干预组人力服务成本＝专科医师服务成本＋临床药师服务成本＋专科护士服务成本。对照组患者接受内分泌科会诊诊疗服务，内分泌科对每位患者的平均会诊时间为 5 min，临床药师每日查询患者血糖控制情况的时间为 3 min，对照组人力服务成本＝内分泌科会诊的服务成本＋临床药师服务成本。

1.4 统计学方法

利用 Excel 收集数据，应用 SPSS 23.0 对数据进行分析，其中连续定量资料采用平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，符合正态分布的用 t 检验分析，不符合正态分布的用非参数秩和检验；计数资料用百分数表示，采用 χ^2 检验。组间比较采用独立样本检验，组内比较采用配对样本检验，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般资料

两组患者性别、年龄、糖尿病病程、入院时的肝肾功能、血脂等指标差异均无统计学意义；干预组患者的 HbA1c 在入组时数值高于对照组，但差异无统计学意义，空腹 C 肽及餐后 2 h C 肽两组患者差异无统计学意义，以上结果表明两组患者在后期的研究中相关指标存在可比性。具体情况见表 1。

2.2 血糖控制情况分析

2.2.1 血糖控制水平 组间比较发现：两组患者干预前 1 日的血糖水平无差异，降糖治疗第 3 日，干预组的空腹及餐后血糖较对照组下降明显（$P<0.05$）；组内比较发现：两组患者降糖治疗第 3 日血糖均有所下降（$P<0.05$），但干预组下降幅度更大。详见表 2。

2.2.2 血糖波动幅度 组间比较发现：干预前两组 SDBG、PPGE、LAGE 无差异，降糖治疗第 3 日，干预组的血糖波动幅度明显小于对照组（$P<0.05$）；组内比较发现：对照组降糖治疗第 3 日，SDBG 和 LAGE 变化无差异（$P>0.05$），PPGE 下降显著（$P<0.05$），而干预组的 SDBG、PPGE、LAGE 较降糖治疗前均显著下降（$P<0.05$）。详见表 2。

2.3 两组患者其他相关指标比较

血糖达标时间方面，干预组的血糖达标时间较对照组缩短，但餐后血糖达标时间两组差异无统计学意义。安全性方面，高血糖、低血糖发生率均显著降低（$P<0.05$），术后感染发生率下降；手术费用及住院费用虽然无差异，但干预组较对照组均减少。具体见表 3。

2.4 两组患者血糖管理成本比较

干预组的血糖管理总成本明显高于对照组（$P<0.05$），但以血糖达标率为效果指标计算成本 - 效果比，干预组的空腹血糖成本效果比为 28.6，低于对照组的 33.7；餐后血糖成本效果比为 27.8，低于对照组的 35.3。具体见表 4。

3 讨论

表 1 患者的基本资料

项目	对照组	干预组	t/χ^2	P
一般临床特征				
年龄 / 岁	60.9±8.78	59.4±12.25	0.698	0.487
BMI/（kg・m^{-2}）	25.3±2.71	26.5±4.23	－1.569	0.121
病程 / 年	7.5±6.69	5.4±5.01	1.809	0.074
性别（男 / 女）	29/21	26/24	0.364	0.546
吸烟史（有 / 无）	6/44	8/42	0.332	0.564
饮酒史（有 / 无）	5/45	5/45	0	1.000
高血压（有 / 无）	25/25	27/23	0.16	0.689
糖尿病家族史（有 / 无）	16/34	14/36	0.19	0.663
血糖控制及胰岛功能				
HbA1c/%	7.6±1.05	8.0±1.22	－1.763	0.078
空腹 C 肽 /（pmol・L^{-1}）	707.2（561.7，891.9）	874.7（590.9，1105）	－1.376	0.172
餐后 2 h C 肽 /（pmol・L^{-1}）	2233.64±1080.43	2045.0±1022.55	0.802	0.425
生化检查指标				
谷丙转氨酶 /（U・L^{-1}）	20（14.9，26.5）	21.7（14.7，33.7）	－0.788	0.431
谷草转氨酶 /（U・L^{-1}）	16.9（14.3，22.1）	17.0（14.0，19.3）	－0.784	0.433
肌酐 /（mmol・L^{-1}）	56（47，64）	52（45.8，66）	－0.123	0.902
尿酸 /（mmol・L^{-1}）	229.4±70.48	266±115.27	－1.837	0.070
估算肾小球滤过率（eGFR）/[mL/（min・173 m^2）]	128.2（113.1，143.6）	116.2（104.9，141.8）	－1.137	0.255
三酰甘油 /（mmol・L^{-1}）	1.06（0.71，1.48）	1.32（0.99，1.62）	－1.753	0.080
总胆固醇 /（mmol・L^{-1}）	3.63（3.06，4.59）	4.09（3.31，4.95）	－1.392	0.164
高密度脂蛋白 /（mmol・L^{-1}）	0.90（0.75，1.07）	0.93（0.84，1.15）	－1.269	0.204
低密度脂蛋白 /（mmol・L^{-1}）	2.78±0.49	2.86±0.72	－0.580	0.563

表 2 两组患者血糖下降水平及波动幅度比较 (mmol・L^{-1})

项目	对照组	干预组	t	P
血糖控制水平				
干预前 1 日 FPG	9.7±2.81	9.9±2.60	－0.411	0.682
干预第 3 日 FPG	8.6±2.00	7.4±1.32	3.285	0.001
t	2.489	5.288		
P	0.016	＜0.001		
干预前 1 日 PPG	13.9±4.44	12.8±3.81	1.354	0.179
干预第 3 日 PPG	11.4±3.10	9.6±1.68	3.563	0.001
t	3.245	4.647		
P	0.002	＜0.001		
血糖波动幅度				
干预前 1 日 SDBG	2.9±1.36	2.8±0.94	0.567	0.572
干预第 3 日 SDBG	2.8±1.46	1.9±0.64	3.938	＜0.001
t	0.383	5.484		
P	0.703	＜0.001		
干预前 1 日 PPGE	4.9±3.09	4.7±2.65	0.360	0.719
干预第 3 日 PPGE	3.4±2.71	2.4±1.05	2.458	0.017
t	2.715	5.635		
P	0.009	＜0.001		
干预前 1 日 LAGE	6.6±3.15	6.8±2.45	－0.338	0.736
干预第 3 日 LAGE	6.5±3.58	4.9±1.30	2.821	0.006
t	0.244	4.599		
P	0.808	＜0.001		

糖尿病的病因及并发症复杂，需要多种治疗策略综合干预。非内分泌科医师对控制血糖的相关技术掌握欠缺，在血糖管理方面常力不从心，因此，多学科协作的专科团队管理顺应了医师和患者对疾病控制的需求。目前国内针对糖尿病的多学科协作诊疗的研究多是医师和护士作为服务的提供者，研究结果显示较单独医师管理临床效果更佳[8-9]。但这些研究只局限于效果评价，在成本分析时也只是简单地计算了住院费用[10]，没有细化治疗成本，将服务成本纳入研究，导致降糖治疗的成本 - 效益不够明确。同时多学科协作不应只限于医师和护士，其他专科人员如药师、营养师、运动康复师等的加入可能会优化团队组成，带来更优的临床效果。国外有文献显示，多学科协作如药师参与管理很大程度地减少了患者的治疗负担[11]。本研究在主要管理成员组成上突破了以往以医护为核心的较为单一的团队组成，加入了专科临床药师，构建了临床药师全程参与的多学科协作全院血糖管理模式，充分地发挥临床药师的主观能动性，每日床边查房为患者提供个体化用药指导以及饮食、运动教育。同时利用药学专业知识在诊疗过程中及时发现药物治疗相关问题并协助医师制订最佳的治疗方案，优化诊疗服务。本研究中，临床药师还被授予部分处方权，在查房过程中发现患者血糖异常高值时，在团队医师知情下，可以调整处方的胰岛素剂量。在此

表 3　两组患者的其他指标比较

项目		对照组	干预组	Z/χ^2	P
其他相关效果指标	FPG 达标时间 /d	5.5（5，9）	4（2，7）	－ 2.439	0.015
	PPG 达标时间 /d	6（5，8）	5（2，8）	－ 1.361	0.101
	切口愈合时间 /d	9（7，10.5）	6（5，8）	－ 4.633	＜ 0.001
	住院时间 /d	22.4±7.01	18.9±5.69	2.709	0.008
安全性指标（n）	术后感染（有 / 无）	11/39	8/42	0.585	0.444
	高血糖（有 / 无）	27/23	16/34	4.937	0.026
	低血糖（有 / 无）	13/37	5/45	4.336	0.037
治疗费用 / 元	手术费	7963（5875.1，9723.9）	6990.5（5872.7，9969.8）	－ 0.605	0.545
	住院总费用	78 648（62 804，101 029）	73 715（59 155，91 851）	－ 0.619	0.536

表 4　两组患者的成本效果比较

项目	对照组	干预组	Z/t	P
降糖药物总费用 / 元	269.7（89.2，444.5）	643（417.2，877.2）	－ 4.533	＜ 0.001
血糖监测费用 / 元	520.0（410.8，629.2）	650（795.6，504.4）	－ 3.383	0.001
血糖管理材料费 / 元	293.7（223.5，491.6）	412.7（322.5，528.3）	－ 2.503	0.012
检查费用 / 元	146.9±70.4	160.8±48.6	－ 0.420	0.657
人力服务成本 / 元	105.4（65.5，136.8）	343.2（218.4，468）	－ 7.600	＜ 0.001
治疗总成本（C）/ 元	1483.2（964.1，1876.9）	2172.4（1617.5，2855.1）	－ 3.991	＜ 0.001
空腹血糖达标率（E）/%	44	76	10.667	0.001
餐后血糖达标率（E）/%	42	78	13.5	＜ 0.001
C/E（空腹血糖）	33.7	28.6		
C/E（餐后血糖）	35.3	27.8		

研究中临床药师参与患者血糖的全程管理，加深了专科临床药师的工作内容，拓宽了工作范围和工作领域，对如何提升临床药师服务水平具有一定的参考价值。

本次研究发现：

① 有效性方面：医药护协作的全院血糖管理模式较普通会诊模式，可以更加快速而又平稳地降糖。近年来，不断有研究证实血糖波动影响糖尿病并发症如大血管病变、微血管病变、神经病变、认知功能障碍等[12-15]，因此，控制糖尿病患者血糖波动至关重要。本院血糖管理小组成员对管理患者实行连续、实时、动态血糖管理，每日查房，综合评估患者情况，多学科探讨及制订降糖方案并及时调整降糖方案，做到实时的个体化、精细化治疗，达到了更快更平稳地降糖，对预防糖尿病并发症的发生具有重要的意义。

② 安全性方面：既往研究证明，糖尿病患者在住院期间强化降糖易发生低血糖现象[16]，低血糖是糖尿病患者在治疗过程中血糖安全达标的主要障碍[17]，影响住院患者低血糖发生的因素复杂，包括年龄、病程、肝肾功能、使用胰岛素剂量过大、临床护理不规范等[18]，非内分泌科糖尿病患者同时还合并一种或多种其他疾病，血糖管理难度更大，因此对非内分泌科糖尿病患者给予专业化的团队管理尤为重要。医药护多学科全院血糖管理小组每日床边查房，评估患者病情，结合患者病情给予专业治疗意见，同时药师时刻关注患者血糖，发现血糖偏低现象及时反馈医师，采取应对措施，可以很好地预防低血糖的发生。《中国住院患者血糖管理专家共识》[7]指出，糖尿病患者血糖高于 300 ng•mL^{-1} 即（16.6 mmol•L^{-1}）易发生酮症酸中毒，研究中将这一数值作为高血糖发生与否的判断值，结果显示，干预组高血糖发生率也明显减少，安全性较高。

③ 经济性方面：本研究针对性地分析了血糖管理的成本 - 效果，纳入服务成本指标，充分考虑人力消耗成本，包括全院血糖管理小组成员及专科医师会诊的服务成本。由于干预组的患者由全院血糖管理小组成员实时管理血糖，管床医师在血糖管理上不提供相关服务；对照组患者的血糖管理主要通过内分泌医师会诊以及专科临床药师每日药学监护，管床医师负责接收会诊意见后下达医嘱，每日专用于血糖管理上的时间较少，因此本研究两组患者均未纳入管床医师的服务成本。结果显示，干预组患者的住院总费用较少，成本 - 效果比（C/E）较低，更具有经济性。分析

住院总费用减少的可能原因为：干预组患者由小组成员采取个体化的血糖治疗方案，同时在治疗过程中临床药师为患者提供饮食、运动的指导，使患者术前血糖达标时间缩短，减少了术前等待时间；术后根据手术状况及时调整降糖方案，减少术后严重高血糖及术后感染发生，一定程度上缩短了术后住院时间。曾祥嫚等[19]研究结果显示与住院天数≤ 9 d的患者住院费用相比，住院天数＞ 9 d的患者费用高于平均水平的概率至少增加了 10 倍。因此，缩短住院天数是减少患者住院费用的主要措施。成本 - 效果分析中，干预组患者的血糖管理相关成本明显高于对照组，其中药物费用两组差别较大。分析可能原因为干预组患者由全院血糖管理小组管理，降糖治疗更连续，而对照组只接受普通会诊，由于主治医师对会诊意见的接受度及执行力差异，可能导致降糖治疗不充分；另一方面，相较于非内分泌科医师对胰岛素的使用畏惧，胰岛素使用率低的现象，干预组患者的胰岛素使用率更高，而胰岛素的平均费用要高于口服降糖药，因此干预组的药物费用明显高于对照组，这也提示管理过程中要加强多学科协作，共同探讨、优化治疗方案，在提高血糖达标率的同时尽量降低治疗成本。

综上所述，医药护协作的全院血糖管理模式在非内分泌科住院患者的血糖管理中具有显著的有效性，同时安全性高，在获得相同治疗效果的时候，花费的成本更低，具有较高的经济性，在节省医疗资源方面有明显优势，可供推广开展。但该模式还存在一定的局限性，缺少专业营养师和运动康复师。糖尿病的治疗需要饮食、运动、药物、自我管理等多维度控制，专业的营养师和运动康复师可以给患者提供个体化的指导，达到最佳控糖效果。

参考文献

[1] http：//www. usatoday. com/story/news/nation/2013/03/06/diabetes-care-cost/1965185/.

[2] 张毓辉，万泉，柴培培，等 . 我国糖尿病医疗费用及筹资负担研究 [J]. 中国卫生经济，2017，36（4）：17-19.

[3] Lowe WL，Scholtens DM，Kuang A，et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome follow-up study（HAPO FUS）：maternal gestational diabetes mellitus and childhood glucose metabolism [J]. Diabetes Care，2019，42（3）：372-380.

[4] Richards JE，Kauffmann RM，Zuckerman SL，et al. Relationship of hyperglycemia and surgical-site infection in orthopaedic surgery [J]. J Bone Joint Surg Am，2012，94（13）：1181-1186.

[5] 代晶，计成，李林通，等 . 临床药师参与多学科合作全院血糖管理模式对围手术期患者血糖控制的影响研究，中国医院药学杂志，2021，41（2）：215-219.

[6] 中华医学会内分泌学分会 . 糖尿病患者血糖波动管理专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志，2017，33（8）：633-636.

[7] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会，中国住院患者血糖管理专家组 . 中国住院患者血糖管理专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志，2017，33（1）：1-10.

[8] 林武，吴丽萍 . 非内分泌科住院糖尿病患者血糖管理现状和多学科诊疗管理模式探讨 [J]. 现代实用医学，2020，32（3）：302-304.

[9] 徐晶晶，谢晓峰，黄晓萍，等 . 非内分泌科胰岛素泵治疗患者的多学科协作优化管理 [J]. 护理学杂志，2015，30（13）：22-25.

[10] 秦娜，张培莉 . 多学科协作护理模式在围术期 2 型糖尿病病人护理中的应用 [J]. 护理研究，2020，34（4）：711-714.

[11] Franklin BE，Farland MZ，Thomas J，et al. Pharmacoeconomic analysis of the diabetes initiative program：a pharmacist-physician collaborative care model [J]. Ann Pharmacother，2013，47（12）：1627-1634.

[12] Lee CL，Sheu WH，Lee IT，et al. Trajectories of fasting plasma glucose variability and mortality in type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab，2018，44（2）：121-128.

[13] Yang YF，Li CL. Visit-to-visit glucose variability predicts the development of end-stage renal disease in type 2 diabetes：10-year follow-up of Taiwan Diabetes Study [J]. Medicine，2015，94（44）：e1804.

[14] Picconi F，Parravano M，Ylli D，et al. Retinal neurodegeneration in patients with type 1 diabetes mellitus：the role of glycemic variability [J]. Acta Diabetologica，2017，54（5）：489-497.

[15] Rawlings AM，Sharrett AR，Mosley TH，et al. Glucose peaks and the risk of dementia and 20-year cognitive decline [J]. Diabetes Care，2017，40（7）：879-886.

[16] 李萍 . 老年糖尿病患者胰岛素泵治疗中低血糖反应原因分析及护理 [J]. 齐鲁护理杂志，2017，16（13）：34-36.

[17] 杨毅，李蓬秋 . 糖尿病治疗达标的主要障碍 - 低血糖 [J]. 实用医院临床杂志，2017，7（4）：8-11.

[18] 高丽 . 2 型糖尿病患者住院期间低血糖发生情况的影响因素分析及护理对策探讨 [J]. 中国药物与临床，2020，20（18）：3163-3165.

[19] 曾祥嫚，杨毓芳，王明红，等 . 2 型糖尿病患者住院费用及影响因素研究 [J]. 医院管理论坛，2020，37（2）：21-25，40.

（收稿日期：2022-04-11；修回日期：2022-06-22）

药品不良反应

甲硝唑致罕见重度肝损伤 1 例

王维娜，侯文婧，杨鸿鸽，邸宣，李新刚*（首都医科大学附属北京友谊医院药学部，北京　100050）

关键词：不良反应；甲硝唑；药物性肝损伤
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)11-2695-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.040

1　病例摘要

患者男性，44 岁，身高 1.75 m，体质量 77 kg，体质量指数（BMI）25.1 kg·m^{-2}。2022 年 1 月 2 日发现巩膜及皮肤重度黄染，伴严重皮肤瘙痒。发现黄疸前 1 周内，因牙痛间断口服甲硝唑片（规格：200 mg/ 片，远大医药中国有限公司），共服用 6 片。患者高脂血症病史 1 年余，一直口服氟伐他汀（80 mg qn）治疗，规律监测肝功能均正常，无其他病史，无吸烟饮酒史等，其余无特殊。1 月 3 日，患者于我院门诊就诊，肝功能检查示谷丙转氨酶（ALT）1609 U·L^{-1}，谷草转氨酶（AST）1296.9 U·L^{-1}，碱性磷酸酶（ALP）290 U·L^{-1}，谷氨酰转肽酶（GGT）205 U·L^{-1}，总胆红素（T-BIL）373.85 μmol·L^{-1}，直接胆红素（D-BIL）257.23 μmol·L^{-1}，间接胆红素（I-BIL）116.62 μmol·L^{-1}；甲型（HAV）、乙型（HBV）、丙型（HCV）、戊型（HDV）病毒性肝炎检查未见异常；腹部超声示轻度脂肪肝。医师建议入院诊治，患者因私事暂拒绝入院，予口服甘草酸二铵肠溶胶囊（150 mg tid）和茵栀黄颗粒（6 g tid）治疗，暂停用氟伐他汀。1 月 10 日患者以“肝功能异常、胆汁淤积、轻度脂肪肝、高脂血症”收入院，入院时全身及巩膜重度黄染（患者自述皮肤及巩膜黄染较 1 周前有所减轻），肝功能检查示 ALT 930 U·L^{-1}，AST 632.5 U·L^{-1}，T-BIL 217.89 μmol·L^{-1}，D-BIL 144.13 μmol·L^{-1}，I-BIL 73.76 μmol·L^{-1}。药物性肝损伤为排他性诊断，综合患者病史、实验室及影像学检查，病因除外病毒性、遗传相关性、酒精性和自身免疫性肝病等，考虑甲硝唑引起的急性药物性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）可能性大。根据 DILI 相关指南[1-2]，计算 R 值≥ 5，临床类型为肝细胞损伤型；严重程度为重度肝损伤，3 级。利用 Roussel Ucloof 因果关系评估法（the Roussel Uclaf Causality Assessment Method，RUCAM）评估量表对甲硝唑与肝损伤的因果关系进行评估，评分为 8 分，结论为“很可能”，见表 1。

治疗经过：入院后静脉使用异甘草酸镁注射液（200 mg qd）和注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸（1 g qd）治疗。1 月 11 日，患者皮肤和巩膜黄染有所减轻，无明显皮肤瘙痒，小便颜色仍发黄，复查肝功能示 ALT 679 U·L^{-1}，AST 366.6 U·L^{-1}，ALP 223 U·L^{-1}，GGT 163 U·L^{-1}，T-BIL 176.27 μmol·L^{-1}，D-BIL 80.31 μmol·L^{-1}，I-BIL 95.96 μmol·L^{-1}，转氨酶和胆红素明显下降。1 月 15 日，患者皮肤和巩膜黄染明显减轻，无皮肤瘙痒，小便颜色基本正常；复查肝功能示 ALT 248 U·L^{-1}，AST 101.5 U·L^{-1}，ALP 161 U·L^{-1}，GGT 140 U·L^{-1}，T-BIL 107.98 μmol·L^{-1}，D-BIL 45.27 μmol·L^{-1}，I-BIL 62.71 μmol·L^{-1}，转氨酶和胆红素显著降低。1 月 16 日，患者因私事坚持出院，出院后口服甘草酸二铵肠溶胶囊（150 mg tid）和丁二磺酸腺苷蛋氨酸肠溶片（1 g qd）治疗。1 月 30 日，患者复查肝功能示 ALT 69 U·L^{-1}，AST 44.8 U·L^{-1}，ALP 143 U·L^{-1}，GGT 151 U·L^{-1}，T-BIL 68.31 μmol·L^{-1}，D-BIL 21.3 μmol·L^{-1}，I-BIL 47.01 μmol·L^{-1}，转氨酶和胆红素进一步下降。2 月 14 日复查肝功能示 ALT 33 U·L^{-1}，AST 29.6 U·L^{-1}，ALP 122 U·L^{-1}，GGT 105 U·L^{-1}，T-BIL 45.07 μmol·L^{-1}，D-BIL 13.37 μmol·L^{-1}，I-BIL 31.70 μmol·L^{-1}，转氨酶大致恢复正常，胆红素高于正常值上限 2 倍。2

基金项目：北京市医院管理中心创新梦工场经费资助项目（No.202101）。
作者简介：王维娜，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：wweina@126.com　*通信作者：李新刚，男，主任药师，主要从事药事管理及药代动力学研究，email：lxg198320022003@163.com

表 1　RUCAM 评估量表 [1]

肝细胞损伤型（R 值≥ 5）[R 值＝（初始 ALT/ULN）/（初始 ALP/ULN）]					
1. 用药至发病的时间		初次用药	再次用药	计分标准	评分
○从用药开始	●提示	5 ～ 90 d	1 ～ 15 d	＋ 2	2
	●可疑	＜ 5 d 或＞ 90 d	＞ 15 d	＋ 1	
○从停药开始	●可疑	≤ 15 d	≤ 15 d	＋ 1	
2. 病程		ALT 在峰值和 ULN 之间的变化			
○停药后	●高度提示	8 d 内下降≥ 50%		＋ 3	
	●提示	30 d 内下降≥ 50%		＋ 2	2
	●可疑	不适用此指标评价		＋ 1	
	●无结论	无资料或 30 d 后下降≥ 50%		0	
	●与药物作用相反	30 d 后下降＜ 50% 或再次升高		－ 2	
○若继续用药	●无结论	出现以上任何情况		0	
3. 危险因素	○饮酒	有		＋ 1	
		无		0	0
	○年龄	≥ 55 岁		＋ 1	
		＜ 55 岁		0	0
4. 伴随用药	○无伴随用药，或无资料，或伴随用药至发病时间不相合			0	0
	○伴随用药至发病时间相符合			－ 1	
	○伴随用药已知有肝毒性，且至发病时间提示或相合			－ 2	
	○伴随用药的肝损伤证据明确（再刺激反应呈阳性，或与肝损伤明确相关并有典型的警示标志）			－ 3	
5. 除外其他肝损伤原因					
第Ⅰ组：○急性甲型肝炎（抗 -HAV-IgM$^+$）或 HBV 感染（HBsAg 和 / 或抗 -HBc-IgM$^+$）或 HCV 感染（抗 -HCV$^+$和 / 或 HCV RNA$^+$，伴有相应的临床病史）○胆道梗阻（影像检查证实）○酒精中毒（有过量饮酒史且 AST/ALT ≥ 2）○近期有低血压、休克或肝脏缺血史（发作 2 周以内）					
第Ⅱ组：○合并自身免疫性肝炎、脓毒症、慢性乙型或丙型肝炎、原发性胆汁性胆管炎（PBC）或原发性硬化性胆管炎（PSC）等基础疾病○或临床特征及血清学和病毒学检测检测提示急性巨细胞病毒（CMV）、EB 病毒（EBV）或单纯疱疹（HSV）感染					
●排除组Ⅰ和组Ⅱ中的所有病因				＋ 2	2
●排除组Ⅰ中的所有病因				＋ 1	
●排除组Ⅰ中的 5 或 4 种病因				0	
●排除组Ⅰ中的少于 4 种病因				－ 2	
●非药物性因素高度可能				－ 3	
6. 药物既往肝损伤信息　○肝损伤反应已在产品介绍中标明				＋ 2	2
○肝损伤反应未在产品介绍中标明，但曾有报道				＋ 1	
○肝损伤反应未知				0	
7. 再用药反应　ALT 水平					
○阳性　再次单用该药后 ALT 升高 2 倍				＋ 3	
○可疑　再次联用该药和曾同时应用的其他药物后，ALT 升高 2 倍				＋ 1	
○阴性　再次单用该药后 ALT 升高，但低于 ULN				－ 2	
○未做或无法判断　其他情况				0	0
总分					8

注：总分意义判定：＞ 8 分为极可能，6 ～ 8 分为很可能，3 ～ 5 分为可能，1 ～ 2 分为不太可能，≤ 0 分可排除。ULN 正常值上限，CMV. 巨细胞病毒，EBV. EB 病毒，HSV 单纯疱疹病毒。

月 28 日复查肝功能示转氨酶和胆红素完全恢复正常，患者完全康复。

2　讨论

由国际医学科学组织理事会肝脏病委员会 Roussel Uclaf 研制的 DILI 因果性评估方法（RUCAM）是当前设计最合理、要素最全面、操作最方便、诊断准确率相对较高的 DILI 诊断工具。与其他 DILI 评估方法相比，RUCAM 的可靠性和可重复性更高。Naranjo 药物不良反应评分系统（NADRPS）是评价药物不良反应的最常用方法，简便且应用广泛，但其主要用于评价药理学相关不良反应，如药物浓度监测、剂量关系、

安慰剂反应等，与特发性 DILI 无关。因此有研究认为 NADRPS 评估量表不适用于 DILI 的因果评价 [3]，NADRPS 逊于 RUCAM[4]。DILI 相关指南 [1-2] 也推荐使用 RUCAM 量表来评估 DILI 的因果关系，指导对疑似 DILI 患者进行系统和客观评估。利用 RUCAM 对本例患者是由甲硝唑引起的急性肝损伤的相关性进行评价，评分均为 8 分，评价结果均为“很可能”。

甲硝唑是一种硝基咪唑类抗菌药物，主要用于治疗阿米巴病、滴虫病、细菌性阴道病、厌氧菌感染和口腔感染等，常见不良反应为口中金属味、恶心、呕吐、腹部不适和腹泻。笔者查阅了国内不同厂家的甲硝唑说明书，仅个别厂家最新修订版说明书中注明了“甲硝唑可能引起肝胆疾病，但非常罕见。表现为肝酶（AST、ALT、ALP）增加、胆汁淤积性或混合性肝炎和肝细胞肝损伤、黄疸和胰腺炎，也有甲硝唑联合其他抗菌药物治疗的患者报告了需要肝移植的肝功能衰竭病例”，其他大部分说明书未提及可能引起肝损伤。国内外报道的甲硝唑引起肝损伤的病例非常少 [5-6]，且大多是甲硝唑合用其他药物或饮酒导致肝损伤甚至肝衰竭，鲜有单独口服甲硝唑引起肝损伤的报道。美国 LiverTox 和中国 HepaTox 等网络互动平台的建立和应用是近年来 DILI 研究领域的重大进展之一 [7-8]，可提供药物肝毒性信息、专业术语、诊断量表、最新资讯以及病例报告 - 管理 - 随访互动系统等。笔者查阅了 LiverTox 和 HepaTox 数据库，均显示甲硝唑引起临床症状明显的急性肝损伤极为少见，但可导致肝衰竭甚至死亡，潜伏期较短；经治疗后，患者预期会在 1 ～ 3 个月内完全恢复；患者再次使用甲硝唑可能会导致急性肝损伤复发，情况严重可致命。甲硝唑致肝损伤的机制可能涉及药物或代谢产物的直接肝脏毒性和免疫介导的反应 [5]。

根据 DILI 相关指南 [1-2]，其危险因素包括宿主因素（高龄、女性、妊娠和慢性肝病病史），药物因素（化学性质、剂量、疗程和药物相互作用）和环境因素（饮酒）。本例患者为中年男性，仅有高脂血症病史，服用氟伐他汀期间规律监测肝功能无异常，无饮酒史；因牙痛常规剂量间断使用甲硝唑，与氟伐他汀不存在明确的药物相互作用。因此本例患者无上述 DILI 危险因素。提示即使是无 DILI 危险因素的患者，在常规使用甲硝唑的过程中，也可能出现罕见的重度肝损伤。因此，临床在应用甲硝唑的过程中，医务人员、患者和家属都应该高度重视其罕见的肝损伤的发生。发生 DILI 后，应立即停用甲硝唑，及时采取相应治疗，避免再次使用硝基咪唑类药物，患者大多可以完全康复。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学分会药物性肝病学组 . 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志，2015，23（11）：810-820.

[2] 中华医学会 . 药物性肝损伤基层诊疗指南（2019 年）[J]. 中华全科医师杂志，2020，19（10）：868-875.

[3] 李继瑾 . Naranjo 药物不良反应评分系统不适用药物性肝损伤因果评价 [J]. 肝脏，2008，13（6）：495-498.

[4] García-Cortés M，Lucena MI，Pachkoria K，et al. Evaluation of naranjo adverse drug reactions probability scale in causality assessment of drug-induced liver injury [J]. Aliment Pharmacol Ther，2008，27（9）：780-789.

[5] 陈子安，罗玉英，雷招宝 . 硝基咪唑类抗菌药物致肝损害患者的文献分析 [J]. 抗感染药学，2016，13（1）：114-117.

[6] 张红梅，田旭，何扬芳，等 . 甲硝唑与布洛芬联用致肝损伤 [J]. 药物不良反应杂志，2020，22（12）：705-706.

[7] Hoofnagle JH，Serrano J，Knoben JE，et al. LiverTox：a website on drug-induced liver injury [J]. Hepatology，2013，57（3）：873-874.

[8] 茅益民 . HepaTox：促进中国药物性肝损伤临床和转化研究的专业网络平台 [J]. 肝脏，2014，8：575-576.

（收稿日期：2022-04-14；修回日期：2022-05-05）

比阿培南致中毒性表皮坏死松解症不良反应分析

兰艳[1, 2]，付琳[1, 2*]，舒成仁[1, 2]，刘莹[1, 2]，鲁憬莉[3]（1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院湖北理工学院附属医院，湖北 黄石 435000；2. 肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室，湖北 黄石 435000；3. 郑州大学第一附属医院，郑州 450000）

关键词：比阿培南；中毒性表皮坏死松解症；不良反应；分析
中图分类号：R969.3 **文献标识码**：B **文章编号**：1672-2981(2022)11-2698-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.11.041

比阿培南是碳青霉烯类抗菌药物中的一种，对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及厌氧菌均有较好的抗菌活性。目前临床广泛用于多重耐药菌及重症感染的目标性及经验性治疗。比阿培南的常见不良反应主要包括皮疹、恶心和腹泻等[1]。本文对我院 1 例应用比阿培南致中毒性表皮坏死松解症（TEN）最终因并发症而导致死亡的病例进行介绍，对其相关性进行分析，并检索国内外相关数据库，查阅公开发表的比阿培南等碳青霉烯类致 TEN 文献资料并进行复习，以期为临床提供参考。

1 病史介绍

1.1 病史摘要

患者，女，62 岁。既往有高血压病史多年，口服硝苯地平缓释片、缬沙坦胶囊、琥珀酸美托洛尔缓释片控制。冠状动脉粥样硬化性心脏病病史，未规律治疗，心包积液。糖尿病病史 10 余年，规律注射门冬胰岛素注射液和甘精胰岛素注射液，糖尿病肾病病史，肾功能异常。2020 年 10 月 19 日因“多浆膜腔积液原因待查;肺部感染”入院。入院诊断：2 型糖尿病肾病Ⅳ期、高血压病 3 级（极高危）、肺部感染、慢性肾脏病 2 期、低蛋白血症、多浆膜腔积液。

1.2 诊疗过程

该患者初始治疗方案为静脉滴注注射用头孢哌酮他唑巴坦钠（海南通用三洋药业有限公司，规格：1 g，批号：191212）2 g 每日 2 次抗感染，静脉注射呋塞米注射液 20 mg 每日 1 次利尿，静脉滴注人血白蛋白注射液 50 mL 补充白蛋白，皮下注射门冬胰岛素注射液 3 IU 每日 3 次控制血糖，并规律服用降压药。10 月 31 日患者痰培养结果显示为产超广谱 β- 内酰胺酶（ESBLs）的肺炎克雷伯菌且对比阿培南敏感，结合患者体征及感染性指标情况，医师根据药敏结果于 11 月 1 日将抗感染治疗方案调整为静脉滴注注射用比阿培南（正大天晴药业集团股份有限公司，规格：0.3 g，生产批号：200527125）0.3 g 每日 3 次进行抗感染治疗。11 月 5 日患者颈部躯干四肢见黄豆至蚕豆大小红斑丘疹水疱，部分水疱融合成大疱，疱壁薄，疱液清亮，部分水疱破溃，可见白色脱屑，渗出不明显。口角及口腔黏膜糜烂可见黄痂。立即请皮肤科会诊，诊断为 TEN，考虑比阿培南引起可能性大，建议停用比阿培南，同时静脉滴注注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg 每日 1 次及注射用丙种免疫球蛋白 10 g 每日 1 次进行治疗，皮肤破损处外用新锌油擦剂。11 月 7 日患者症状未见好转，全身散在皮下紫癜、瘀斑，全身多处大水疱，颜面、胸部、背部、双侧腰部及臀部尤为明显，面积最大约 7 cm×7 cm，伴皮肤剥脱，其内可见新生肉芽组织，全身多处散在破溃，口唇眼睑红肿出血伴少许血凝块，并多处轻度凹陷性水肿，以下肢及颜面部明显。给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠激素冲击治疗，联合静注人免疫球蛋白注射液以及补液等对症治疗。11 月 10 日患者病情加重，转入 ICU 抢救治疗。11 月 12 日患者因脓毒血症、呼吸衰竭死亡。

2 讨论

2.1 比阿培南致 TEN 相关性分析

根据我国药品不良反应关联性评价分析方法[2]进行分析：① 用药与不良反应事件的出现有无合理的时间关系：患者既往无 TEN 病史，本次入院第一次使用比阿培南，用药 4 d 出现 TEN 症状。因此从服药后出现的时间上来看，考虑比阿培南引起的 TEN 可能性大；② 该药物既往是否有

基金项目：河南省医学科技攻关计划项目（No.201602037）。
作者简介：兰艳，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：390097500@qq.com *通信作者：付琳，女，副主任药师，主要从事药学服务工作，email：21160361@qq.com

相关不良反应的报道：目前该药无相关不良反应报道，但同药理作用的亚胺培南及美罗培南均有报道，因此考虑为比阿培南引起的 TEN 可能性较大；③ 停药或减量后，不良反应是否消失或减轻：患者出现 TEN 症状后，立即停用比阿培南，并予以激素等对症治疗，但患者因合并脓毒血症最终死亡；④ 再次使用药物是否再次出现同样的不良反应事件：患者未再次使用；⑤ 不良反应事件是否可用并用药物的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来解释：患者高血压病史及糖尿病病史多年，一直规律服用硝苯地平缓释片、缬沙坦胶囊、琥珀酸美托洛尔缓释片及注射门冬胰岛素注射液和甘精胰岛素注射液进行治疗，虽上述药物的说明书中有收载皮疹等不良反应，但目前未报道过上述药物出现 TEN 的不良反应。患者入院因肺部感染使用头孢哌酮他唑巴坦进行抗感染治疗，使用 12 d 后根据药敏结果调整抗感染治疗方案，治疗期间未出现任何症状，且目前未报道过该药出现类似不良反应，但不可排除合并头孢哌酮他唑巴坦用药的影响，也不能排除疾病进展的影响。根据药品不良反应关联性评价，结合院多学科（MDT）团队判定比阿培南关联性等级为“可能”。同时采用诺氏（Naranjo’s）评估量表 [3] 对该患者 TEN 发生的因果关系进行评分，得分为 3 分。综上，认为该患者发生 TEN“可能”由比阿培南引起。

2.2 TEN 的发病机制及病理特征

2.2.1 发病机制 TEN 是一种严重的皮肤 / 黏膜反应，绝大多数由药物引起，并以水疱及泛发性表皮松解为特征，可伴有多系统受累。根据“Stevens-Johnson 综合征 / 中毒性表皮坏死松解症诊疗专家共识”[4]（简称共识），目前该疾病的发病机制主要与药物和机体遗传背景相关。其中药物引起的 TEN 其皮肤组织病理上表现为广泛的角质细胞（KC）的凋亡，该过程主要由药物特异性的细胞毒性 T 细胞介导，并受多种细胞、细胞因子及细胞表面分子的影响。目前普遍研究认为 KC 的凋亡是由主要组织相容性复合体（MHC）Ⅰ类分子将作为抗原的药物呈递给 $CD8^+$ T 淋巴细胞，皮肤内的 T 细胞被激活并大量增殖所致，并在此过程中 Fas 配体（FasL）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、穿孔素、颗粒酶 B 均高水平表达。

2.2.2 病理特征 TEN 所致皮损受累情况差异较大，早期患者皮损多初发于躯干上部、四肢近端和面部，逐渐扩散至躯干和四肢远端，严重者可出现水疱、大疱甚至大面积融合成片的表皮松解 [4]。眼、口、鼻及生殖器黏膜损伤是 TEN 的临床特征之一，可出现糜烂、出血等。患者起初颈部躯干四肢见黄豆至蚕豆大小红斑丘疹水疱。口角及口腔黏膜糜烂可见黄痂。2 d 后患者症状扩散至全身皮下紫癜、瘀斑、大水疱伴皮肤剥脱，全身多处散在破溃，口唇眼睑红肿出血伴少许血凝块，并多处轻度凹陷性水肿。

2.3 比阿培南与头孢哌酮他唑巴坦交叉致 TEN 反应分析

根据文献显示 [5-6]，已有 100 多种药物被认定为 TEN 的潜在诱导剂。其中，抗菌药物是最常见的诱导药物，且几乎所有的抗菌药物都是 TEN 的潜在诱导剂 [7]，而 β- 内酰胺类抗菌药物是最大的风险药物之一 [8]，因其结构式中所含的 β- 内酰胺环是导致 TEN 发生的常见诱导结构之一，碳青霉烯类药物中亦含该化学结构。本例患者在使用比阿培南之前使用了 12 d 的头孢哌酮他唑巴坦，最初给予的头孢哌酮他唑巴坦可能是第一种药物过敏原。根据文献报道，因两类抗菌药物交叉致 TEN 的反应通常被认为是一种细胞超敏反应。在复发或激发试验中，开始服用药物和表皮坏死之间的时间间隔大大缩短，首次发生的平均时间为 12 ～ 14 d，而再次暴露后发生的时候缩短为 2 d 以内，甚至几小时，这提示可能为原发性致敏和免疫记忆 [7, 9]，因此该患者在使用了 12 d 头孢哌酮他唑巴坦后使用比阿培南 4 d 即出现了 TEN 反应。碳青霉烯类与青霉素类都具有与双环核心相关的相似性结构，双环核心都由一个附着在 β- 内酰胺环上的五元环组成，因此对这两类药物交叉反应的研究较多 [10]。对于碳青霉烯类与头孢菌素类药物交叉过敏的报道研究较少，在一项关于免疫球蛋白 E（IgE）介导的对头孢菌素过敏的 98 名受试者的研究显示，约 2% 受试者对亚胺培南 / 西司他丁的反应为阳性，1% 受试者对美罗培南的反应为阳性 [11]，因此不排除存在两种抗菌药物之间的交叉反应。

2.4 碳青霉烯类药物致 TEN 相关 ADR 案例资料

目前文献报道，导致 TEN 最常见的药物类别是抗菌药物，其中发生率最高的是青霉素类及头孢菌素类，碳青霉烯类较罕见 [12]。通过检索 PubMed、Embase、中国知网、万方等各数据库，未检索到比阿培南致 TEN 的相关报道，但碳青霉烯类中的亚胺培南及美罗培南均有报道且文献年份较久远 [13-18]。从所报道的文献来看，所

有病例无相关基础性疾病，在及时停用可疑药物并采取对症处理措施后，患者所引发的 TEN 症状均得到了有效的改善。Yang 等[19]统计分析显示，发生 TEN 的死亡率达 5.4%，且在这些死亡的病例中患者有心血管疾病、糖尿病及肾病等不同程度的基础疾病。我院报道的该比阿培南所致 TEN 的死亡病例其基础疾病较多，包括糖尿病、高血压及肾病，虽立即停用可疑药物且积极对症处理了，但患者仍因合并脓毒血症等并发症而死亡，不排除原发性疾病进展对该不良反应进展的影响。因此，临床在使用抗菌药物期间，不仅要对药物的不良反应引起高度重视，也要及时对患者的原发性疾病进行积极治疗。

3 小结

TEN 属于皮疹中的一种，是一种非常罕见又严重的皮肤延迟性反应，常可因脓毒血症、呼吸衰竭等合并症而死亡。流行病学显示，其在亚洲人群中的发生率高于西方人群。目前对于 TEN 的处理方式包括立即停用可疑药物、给予注射免疫球蛋白联合糖皮质激素以及对症支持治疗。通过本例病例报告及文献复习强调，在临床药物治疗方面，不仅要关注抗菌药物的合理使用，也应做好药物使用监测，避免使用可能存在化学相似的药物，减少药物交叉反应发生的概率。一旦认识到这种潜在的交叉反应，因及早停用可疑性药物。此外，应对原发性疾病进行积极的治疗，以尽可能降低死亡风险，确保患者用药安全。

参考文献

[1] Perry CM，Ibbotson T. Biapenem [J]. Drugs，2002，62（15）：2221-2234.

[2] 杨华，魏晶，王嘉仡，等 . 药品不良反应 / 事件报告评价方法研究 [J]. 中国药物警戒，2009，6（10）：581-584.

[3] 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.

[4] 中华医学会皮肤性病学分会药物不良反应研究中心 . Stevens-Johnson 综合征 / 中毒性表皮坏死松解症诊疗专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志，2021，54（5）：376-381.

[5] Chan HL，Stern RS，Arndt K，et al. The incidence of erythema multiforme，Stevens-Johnson syndrome，and toxic epidermalnecrolysis [J]. Arch Dermato，1990，126：43-47.

[6] Brand R，Rohr JB. Toxic epidermal necrolysis in Western Australia [J]. Aust J Dermato，2000，41：31-33.

[7] Philippe P，Eric J，Pierre D，et al. Recurrent fatal drug-induced toxic epidermal necrolysis（Lyell’s syndrome）after putative-lactam cross-reactivity：case report and scrutiny of antibiotic imputability [J]. Crit Care Med，2002，30（11）：2580-2583.

[8] Schöpf E，Stühmer A，Rzany B，et al. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome：an epidemiologic study from West Germany [J].Arch Dermatol，1991，127：839-842.

[9] Pasricha J，Khaitan B，Shantharaman R，et al. Toxic epidermal necrolysis [J]. Int J Dermatol，1996，35：523-527.

[10] Romano A，Gaeta1 F，Arribas Poves MF，et al. Cross-reactivity among beta-lactams [J]. Curr Allergy Asthma Rep，2016，16（3）：24.

[11] Romano A，Gaeta F，Valluzzi RL. IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins：cross-reactivity and tolerability of penicillins，monobactams，and carbapenems [J]. J Allergy Clin Immunol，2010，126：994-999.

[12] 杜巨豹，褚燕琦，郭爽，等 . 亚胺培南 - 西司他丁钠相关中毒性表皮坏死松解症 [J]. 药物不良反应杂志，2010，12（6）：431-433.

[13] 徐锦龙，王雄雄，陈武，等 . 亚胺培南西司他丁钠致中毒性表皮坏死松解型药疹 1 例 [J]. 中国药物应用与监测，2014，11（5）：325-326.

[14] 陈彬 . 静脉输入美罗培南致全身剥脱性皮炎及器官衰竭死亡 1 例 [J]. 护理研究，2010，24（4）：933-934.

[15] 许静，李天媛，徐进，等 . 美罗培南致重症大疱型药疹 2 例及文献分析 [J]. 药物安全与合理应用，2013，22（18）：2219-2222.

[16] Zaki SA，Shanbag P. Meropenem-induced hypokalemia and metabolic alkalosis [J]. Indian J Pharmacol，2012，44（2）：276-277.

[17] Maria J. Torres，Miguel B. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity：penicillins，cephalosporins，monobactams，carbapenems，and clavams [J]. Med Clin N Am，2010，94（4）：805-820.

[18] Trubiano JA，Aung AK，Nguyen M，et al. A comparative analysis between antibiotic-and nonantibiotic-associated delayed cutaneous adverse drug reactions [J]. J Allergy Clin Immunol，2016，4（6）：1187-1193.

[19] Yang SC，Hu S，Zhang SZ，et al. The epidemiology of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in China [J].J Immunol Res，2018，2018：4154507.

（收稿日期：2022-04-22；修回日期：2022-09-15）