中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 1 期（总第 204 期）　2023 年 1 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

2023 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

研究论文

（1）盐酸纳美芬鼻喷剂在大鼠体内的药动学及纤毛毒性研究 …… 张婷，李蒙，范冉冉，等

（7）3 种心血管类中药注射液对人肝微粒体 CYP450 酶的体外抑制作用 …… 刘艳文，刘黎

（14）Graves 病气阴两虚型病证结合模型的建立与评价 …… 丁崧，高长久，柳长凤，等

（21）苯并芘通过 AhR 影响肝脏脂质合成的分子机制研究 …… 苏敏，张梦迪，白图雅，等

（28）基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的桃核承气汤化学成分快速鉴定 …… 张瑶，葛飞，申冰清，等

（37）超微粉碎对七味广枣散体外溶出度及大鼠体内药动学的影响 …… 李书迪，张一凡，齐和日玛，等

（44）土牛膝的不同种质来源的差异性比较研究 …… 张云坤，欧阳文，王智，等

（50）雷公藤红素纳米结构脂质载体的抗肿瘤作用研究 …… 陈铭，张翔珂，董雨萌，等

（58）纳米雄黄诱导 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞凋亡和自噬的研究 …… 李旭，鲍蕾蕾，姜爽，等

（63）基于 OATP1B3 转运体活性与表达研究黄芩 - 黄连药对中黄连对黄芩黄酮肝脏分布的影响及其机制 … 梁燕，崔馨戈，訾苗苗，等

（68）UPLC-MS/MS 法测定人血浆中丙卡特罗的浓度 …… 赵想，杨亚楠，许杨，等

（75）黄芪多糖通过调节细胞自噬来增强胃癌 BGC823 细胞对紫杉醇的敏感性 …… 郝艳娇，李志宇，常明智，等

（82）注射用哌拉西林钠舒巴坦钠对中硼硅模制注射剂瓶中铝、硅、硼元素迁移量及其表面脱片趋势的影响 …… 吴统选，吴秋蓉，张聪，等

（87）富马酸喹硫平缓释片的体内外相关性溶出方法研究 …… 范诗雨，刘芳伶，贺劲杰，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　丹　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

（92）来那替尼自微乳的制备、表征及生物利用度研究
…… 张雪，张强，程泽能

（99）不同链长油相葛根素 *W/O* 型微乳在体肠吸收的研究
…… 唐甜甜，吴军勇，胡旖耘，等

（105）HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱应用于黄芪的质量评价
…… 陈淑娜，冯冰薇，成秋香，等

（110）桔梗多糖对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究
…… 宋婧，郝梦奇，翟晓虎，等

（116）不同年限黄芩根结构及黄酮类物质变化特征研究
…… 魏瑶，王娟，张岗，等

（123）黄芩提取物制备过程的关键工段辨识研究
…… 张雪灿，孟庆芬，关建丽，等

（130）一种盐酸普拉克索新晶型的制备及表征
…… 刘旭，尹利献，戴华山，等

（133）麦考酚钠肠溶片体外溶出曲线方法研究
…… 余博函，江文敏，李振，等

万古霉素的临床应用及递送研究进展专题

（138）万古霉素口服递送纳米制剂研究进展 … 顾开龙，张宁，苟靖欣

（146）玻璃体注射用万古霉素的应用与发展
…… 汪泽卿，唐永萍，赵应征，等

综述

（155）基于代谢组学的中医药防治肝纤维化的研究进展
…… 杨逸鑫，彭芳

（161）植物雌激素类中药诱导白色脂肪组织棕色化的研究进展
…… 于澄元，樊薛津，庄朋伟，等

（169）酮体在心力衰竭治疗中的潜在作用 …… 孔倩倩，郝琨，何华

（177）匙羹藤属植物化学成分及药理活性研究进展
…… 李航，王志允，陈乐园，等

（187）口腔局部用药防治造血干细胞移植致口腔黏膜炎的临床研究进展
…… 陈卫民，张璋，谢辉，等

（192）中药及民族药治疗类风湿关节炎的代谢组学研究进展
…… 吕丽苹，胡扬，宋辉，等

药物分析与检验

（199）高效液相色谱法测定司美格鲁肽原料药中游离脂肪酸侧链的含量
…… 杨庆，马鲁南，刘忠，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　倩
陈　璐　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。

（203）基于液相指纹图谱结合多成分含量测定的小儿肺热咳喘颗粒质量评价 …… 倪文琳，汤瑜晨，韩玉涛，等

（208）药典分析方法确认指标的确定 …… 杨芝博

（212）ICP-MS 法测定贡菊不同提取液中无机元素的浸出率 …… 张美皖，胡丹，李娜，等

医院药学

（218）卫生技术评估为 4 种生物制剂在炎症性肠病快速遴选中提供循证医学证据的应用与实践 …… 彭苗苗

（229）老年患者含雷公藤饮片中药处方用药规律分析 …… 张威风，李颖，林梦璐，等

（235）布地奈德气管内滴入对胎粪吸入综合征气道总氧化剂状态和抗氧化能力的影响 …… 周利，潘兆军

（239）纳武利尤单抗和帕博利珠单抗方案一线治疗转移性肾细胞癌的成本效益分析 …… 王野，崔佳

（243）吡非尼酮治疗肺纤维化血药浓度与不良反应监测 …… 杨雪容，郭璐，何星，等

（249）二维液相色谱法测定人血浆中泊沙康唑药物浓度及其在儿科临床的应用 …… 张胜男，周宇雪，王丹姝，等

临床药师在临床

（253）高剂量氟康唑治疗肥胖患者肺隐球菌病的药学实践 …… 袁亚平，刘婷婷，吴炯熇，等

（259）临床药师参与 1 例屎肠球菌血流感染患者治疗的临床实践 …… 杨建，何艳

药品不良反应

（263）222 例雷公藤及其制剂的不良反应报告分析 …… 张玲萍，黄榕珍，张纾，等

（269）1 例胰岛素治疗致急性痛性神经病变的不良反应分析 … 郝顺，唐翎

（272）瑞戈非尼致多形性红斑药疹 1 例 …… 陈琳，陈邓林，王敏

药事管理

（275）新医改形式下的我院药事管理工作实践与 DIP 政策下的思索 …… 李静，王旋，蔡永桥，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*25.0*46*2023-1

本期责任编辑：彭金飞，邬志娟，陆窈窈，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 1 January 20 2023

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

(1) Pharmacokinetics and ciliary toxicity of nalmefene hydrochloride nasal spray in rats ····· *ZHANG Ting, LI Meng, FAN Ran-ran, et al*

(7) Inhibition of 3 cardiovascular traditional Chinese medicine injections on human cytochrome P450 in vitro ····· *LIU Yan-wen, LIU Li*

(14) Establishment and evaluation of the combination model of Qi and Yin deficiency syndrome in Graves' disease ····· *DING Song, GAO Chang-jiu, LIU Chang-feng, et al*

(21) Molecular mechanism of BaP affecting liver lipid synthesis via AhR ····· *SU Min, ZHANG Meng-di, BAI Tu-ya, et al*

(28) Rapid identification of chemical constituents in Taohe Chengqi decoction based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS ····· *ZHANG Yao, GE Fei, SHEN Bing-qing, et al*

(37) Effect of ultrafine grinding on the in vitro dissolution and pharmacokinetics of Qiwei Guangzao powder in rats ····· *LI Shu-di, ZHANG Yi-fan, Qiherima, et al*

(44) Differences in *Achyranthes bidentata* from different germplasm sources ····· *ZHANG Yun-kun, OU-YANG Wen, WANG Zhi, et al*

(50) Antitumor effect of celastrol nanostructured lipid carriers ····· *CHEN Ming, ZHANG Xiang-ke, DONG Yu-meng, et al*

(58) Apoptosis and autophagy of B cell non-odgkin's lymphoma: Raji cells in vitro induced by nano-realgar ····· *LI Xu, BAO Lei-lei, JIANG Shuang, et al*

(63) Effect of Rhizoma Coptidis on the liver distribution of Radix Scutellaria flavones in Radix Scutellaria-Rhizoma Coptidis herb couple based on the activities of OATP1B3 transporters and expression and related mechanism ····· *LIANG Yan, CUI Xin-ge, ZI Miao-miao, et al*

(69) Determination of procaterol in human plasma by UPLC-MS/MS ····· *ZHAO Xiang, YANG Ya-nan, XU Yang, et al*

(75) Astragalus polysaccharide enhances the sensitivity of gastric cancer BGC823 cells to paclitaxel by regulating the cellular autophagy ····· *HAO Yan-jiao, LI Zhi-yu, CHANG Ming-zhi, et al*

(82) Effect of piperacillin sodium and sulbactam sodium for injection on the migration amount of aluminum, silicon and boron elements in medium borosilicate injection bottle and surface erosion ····· *WU Tong-xuan, WU Qiu-rong, ZHANG Cong, et al*

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 2023 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.

(87) In vitro-in vivo correlation of dissolution method for quetiapine fumarate sustained-release tablets ····· *FAN Shi-yu, LIU Fang-ling, HE Jin-jie, et al*

(92) Preparation, characterization and bioavailability of neratinib self-microemulsion ····· *ZHANG Xue, ZHANG Qiang, CHENG Ze-neng*

(100) Effect of oil with different chain lengths on intestinal absorption of puerarin *W/O* microemulsion ····· *TANG Tian-tian, WU Jun-yong, HU Yi-yun, et al*

(105) Quality evaluation of *Astragali Radix* based on HPLC-UV-CAD fingerprint ····· *CHEN Shu-na, FENG Bing-wei, CHENG Qiu-xiang, et al*

(110) Protective effect of polysaccharides from *Platycodon grandiflorum* on CCl_4-induced acute liver injury in mice and its regulatory mechanism ····· *SONG Jing, HAO Meng-qi, ZHAI Xiao-hu, et al*

(116) Changes in root structure and flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different years ····· *WEI Yao, WANG Juan, ZHANG Gang, et al*

(123) Identification of critical sections in the preparation of *Scutellaria baicalensis* extract ····· *ZHANG Xue-can, MENG Qing-fen, GUAN Jian-li, et al*

(130) Preparation and characterization of a new crystal form of pramipexole hydrochloride ····· *LIU Xu, YIN Li-xian, DAI Hua-shan, et al*

(134) In vitro dissolution curve of mycophenolate sodium enteric-coated tablets ····· *YU Bo-Han, JIANG Wen-min, LI Zhen, et al*

(138) Research progress on the nano-formulations for the oral delivery of vancomycin ····· *GU Kai-long, ZHANG Ning, GOU Jing-xin*

(146) Application and development of vancomycin for intravitreal injection ····· *WANG Ze-qing, TANG Yong-ping, ZHAO Ying-zheng, et al*

(155) Progress in prevention of hepatic fibrosis with traditional Chinese medicine based on metabolomics *YANG Yi-xin, PENG Fang*

(161) Research progress in browning of white adipose tissue induced by phytoestrogens in traditional Chinese medicine ····· *YU Cheng-yuan, FAN Xue-jin, ZHUANG Peng-wei, et al*

(169) Potential role of ketone bodies in the treatment of heart failure ····· *KONG Qian-qian, HAO Kun, HE Hua*

(177) Research progress in the chemical constituents from *Gymnema* R. Br. plants and their pharmacological activities ····· *LI Hang, WANG Zhi-yun, CHEN Le-yuan, et al*

(187) Clinical research progress of topical oral drugs in prevention and treatment of oral mucositis caused by hematopoietic stem cell transplantation ····· *CHEN Wei-min, ZHANG Zhang, XIE Hui, et al*

(192) Research progress in metabolomics of traditional Chinese medicine and ethnic medicine for rheumatoid arthritis ····· *LYU Li-ping, HU Yang, SONG Hui, et al*

(199) Content determination of free aliphatic side-chain in semaglutide by high performance liquid chromatography
…… *YANG Qing, MA Lu-nan, LIU Zhong, et al*

(203) Quality evaluation of Xiaoer Feire Kechuan granules based on liquid fingerprint combined with multi-component content determination
…… *NI Wen-lin, TANG Yu-chen, HAN Yu-tao, et al*

(208) Verification of characteristics of analytical-method
…… *YANG Zhi-bo*

(212) Leaching rate of inorganic elements in extracts of Gongju by ICP-MS
…… *ZHANG Mei-wan, HU Dan, LI Na, et al*

(218) Health technology assessment of evidence-based medical evidence for the rapid selection of four biologics for inflammatory bowel disease …… *PENG Miao-miao*

(229) Summary of traditional Chinese medicine prescriptions containing tripterygium wilfordii decoction pieces in elderly patients
…… *ZHANG Wei-feng, LI Ying, LIN Meng-lu, et al*

(235) Effect of intratracheal infusion of budesonide on total antioxidant capacity and oxidant status in airway lavage fluids in neonates with meconium aspiration syndrome …… *ZHOU Li, PAN Zhao-jun*

(239) Cost-effectiveness of nivolumab and pembrolizumab as first-line treatment for metastatic renal cell arcinoma … *WANG Ye, CUI Jia*

(243) Monitoring of blood concentrations and adverse reactions of pirfenidone for pulmonary fibrosis
…… *YANG Xue-rong, GUO Lu, HE Xing, et al*

(249) Determination of posaconazole in the plasma by two-dimensional liquid chromatography and its application in pediatric patients
…… *ZHANG Sheng-nan, ZHOU Yu-xue, WANG Dan-shu, et al*

(253) High-dose fluconazole for an obese patient with pulmonary cryptococcosis …… *YUAN Ya-ping, LIU Ting-ting, WU Jiong-he, et al*

(263) Analysis of 222 cases of adverse drug reaction reports of tripterygium wilfordii and its preparations
…… *ZHANG Ling-ping, HUANG Rong-zhen, ZHANG Shu, et al*

研究论文

盐酸纳美芬鼻喷剂在大鼠体内的药动学及纤毛毒性研究

张婷[1, 2]，李蒙[2]，范冉冉[2]，孙文军[2]，王荣荣[2]，高静[2]，聂广军[1*]，郑爱萍[2*]（1. 郑州大学基础医学院，郑州　450001；2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所，北京　100850）

摘要：目的　建立 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中盐酸纳美芬的浓度，研究盐酸纳美芬鼻喷剂在大鼠体内的生物利用度及纤毛毒性。**方法**　以盐酸纳美芬静脉注射为对照组，大鼠经鼻腔给药后，采用 LC-MS/MS 法测定血药浓度，并使用 WinNonlin 5.2.1 软件计算主要药动学参数。以离体蟾蜍上颚和大鼠鼻黏膜为模型，考察盐酸纳美芬经鼻给药后纤毛持续摆动时间及黏膜形态的变化。**结果**　盐酸纳美芬在 0.05 ～ 2.5 μg•mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好（r = 0.9999），定量下限为 0.05 μg • mL^{-1}；回收率在 96.81% ～ 102.55%；日间和日内精密度的 *RSD* 分别在 3.7% ～ 5.5% 和 0.99% ～ 7.0%，准确度（*RE*）在 1.51% ～ 7.13%；血浆样品稳定性良好。盐酸纳美芬鼻喷剂起效迅速，t_{max} 约为 1 min，绝对生物利用度可达 81.64%。在蟾蜍上颚模型中观察到纤毛排列整齐，呈流水状摆动，相对运动百分率为 66.52%，纤毛停止摆动后经生理盐水冲洗又可恢复摆动；在大鼠鼻黏膜模型中观察到，与生理盐水组相比，仅有少量纤毛出现簇状聚集和脱落现象。**结论**　建立的 LC-MS/MS 法快速高效、专属性强、灵敏度高。盐酸纳美芬鼻喷剂在大鼠体内起效迅速、生物利用度高；其对离体蟾蜍上颚和大鼠鼻黏膜纤毛毒性小。

关键词：盐酸纳美芬；鼻喷剂；药动学；纤毛毒性；绝对生物利用度

中图分类号：R969.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0001-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.001

Pharmacokinetics and ciliary toxicity of nalmefene hydrochloride nasal spray in rats

ZHANG Ting[1, 2], LI Meng[2], FAN Ran-ran[2], SUN Wen-jun[2], Wang Rong-rong[2], GAO Jing[2], NIE Guang-jun[1*], ZHENG Ai-ping[2*] (1. *School of Basic Medical Sciences*, *Zhengzhou University*, *Zhengzhou*　450001; 2. *Institute of Pharmacology and Toxicology*, *Academy of Military Medical Sciences*, *Academy of Military Sciences*, *Beijing*　100850)

Abstract: Objective　To establish an LC-MS/MS method to determine the concentration of nalmefene hydrochloride in rat plasma, and the bioavailability and ciliary toxicity of nalmefene hydrochloride nasal spray in rats. **Methods**　Intravenous injection of nalmefene hydrochloride was used as the control. After the intranasal administration, the plasma concentration was determined by LC-MS/MS method, and main pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 5.2.1 software. With the isolated toad upper jaw and rat nasal mucosa as models, the continuous oscillation time of cilia and the changes of mucosal morphology after nasal administration of nalmefene hydrochloride were measured. **Results**　The linear relationship of nalmefene hydrochloride was good at 0.05 ～ 2.5 μg • mL^{-1} (r = 0.9999), and the lower limit of quantification was 0.05 μg • mL^{-1}. The recovery rate was between 96.81% and 102.55%. The *RSD* of inter-day and intra-day precisions were 3.7% ～ 5.5% and 0.99% ～ 7.0%, respectively, and the accuracy was between 1.51% and 7.13%. The stability of plasma samples was

基金项目：国家科技重大专项（No.2018ZX09721003-007）。

作者简介：张婷，女，硕士，主要从事药物制剂的研发，email：1649316845@qq.com　*通信作者：郑爱萍，女，教授，主要从事药物制剂、3D 打印技术方面的研究，email：apzheng@163.com；聂广军，男，研究员，主要从纳米药物方面的研究，email：niegj@nanoctr.cn

good. Nalmefene hydrochloride nasal spray has a rapid onset of action, and t_{max} was 1 min and absolute bioavailability was 81.64%. In the toad upper jaw model, the cilia were neatly arranged and swayed like flowing water. The relative movement percentage was 66.52%. If the cilia stopped swinging, they were restored to swing after being washed with saline. In the rat nasal mucosa model, compared with the saline group, only a few cilia clustered and fell off. **Conclusion** The LC-MS/MS method is fast, efficient, specific and sensitive. Nalmefene hydrochloride nasal spray has a rapid onset of action with high bioavailability in rats. Its toxicity to isolated toad palate and rat nasal mucociliary is small.

Key words: nalmefene hydrochloride; nasal spray; pharmacokinetics; ciliotoxicity; absolute bioavailablity

阿片类药物是治疗疼痛最有效的药物之一[1]，然而，其非法供应以及滥用造成死亡人数的增加已经引起了全世界的关注，这种现象在美国尤为严重，其合成物及半合成物的出现进一步加剧了这一公共卫生挑战[2]。目前，FDA已批准上市的用于治疗疑似或确诊阿片类过量的药物为纳洛酮和纳美芬，纳洛酮作用持续时间短[3]，在应对长效阿片类过量时作用有限；而研究表明，与纳洛酮相比，纳美芬起效迅速，对天然和重组μ阿片受体（与阿片类药物结合的主要受体）的亲和力比纳洛酮高约5倍[4-5]，半衰期（8～9 h）[6]与芬太尼（8～10 h）和舒芬太尼（6～9 h）等合成药物相当[7]，这些优势在合成阿片类药物过量的抢救中至关重要。盐酸纳美芬（nalmefene hydrochloride）注射液于1995年在美国上市，但由于商业原因于2008年退出美国市场（没有出现重大安全问题）[8]。

近年来，鼻腔给药由于起效迅速、给药方便、无肝首过效应、生物利用度高以及脑靶向作用等特点[9-11]，成为国内外制剂领域研究的热点。因此，本课题组参考EP3793558专利[12]制备了一种盐酸纳美芬鼻喷剂，并建立了高效、灵敏的LC-MS/MS测定方法，研究了该鼻喷剂在大鼠体内的生物利用度及其对离体蟾蜍上颚和大鼠鼻黏膜的纤毛毒性，为新型制剂的研发以及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 试药

盐酸纳美芬原料药[批号：200501，四川海思科制药有限公司]，盐酸纳美芬对照品（纯度：95.3%，批号：171272-201501，中国食品药品检定研究院），盐酸纳美芬鼻喷剂（批号：20210223，规格：3 mg，100 μL/喷，实验室自制），地西泮（内标，批号：140708，山东信谊制药有限公司），乙酸铵（批号：10001218）、甲酸（批号：80065518）（国药集团化学试剂有限公司），去氧胆酸钠（批号：D1203A，大连美仑生物技术有限公司），乙腈（色谱纯，美国Fisher公司）。

1.2 仪器

Aglilent 1260液相色谱-Agilent G6460质谱联用仪（美国Agilent公司），涡旋振荡器（美国Scientific industries公司），高速冷冻离心机（美国sigma公司），BX53F光学显微镜（日本Olympus公司），A650数码相机（日本Canon公司）。

1.3 实验动物

Sprague-Dawley（SD）大鼠，雄性，SPF级，200～220 g；蟾蜍，雄性和雌性，30～40 g[北京科宇动物养殖中心，许可证号：SCXK（京）2018-0010]。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Kromasil 100-5-C18（2.1 mm×50 mm，5 μm）；流动相：乙腈-10 mmol·L^{-1}乙酸铵（含0.1%甲酸）(50∶50)，等度洗脱；流速：0.15 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：5 μL；运行时间：4.5 min。

2.1.2 质谱条件 离子源：电喷雾离子源（ESI）；离子极性：正离子模式；离子检测模式：多反应监测（MRM）；喷雾电压：3000 V；离子源温度：300 ℃；气流速度6 L·min^{-1}；雾化压力：50 psi；离子反应：纳美芬（*m/z*，340.1→268.3），碎裂电压120 eV，碰撞能量40 V；地西泮（*m/z*，285.2→193.1），碎裂电压70 eV，碰撞能量35 V。

2.1.3 溶液配制 盐酸纳美芬系列标准溶液和质控溶液的配制：精密称取2份盐酸纳美芬对照品适量于10 mL量瓶中，分别用50%的乙腈水溶液溶解，配制成1.5 mg·mL^{-1}的储备液，用乙腈稀释得到质量浓度为2.5、1.5、1.25、0.625、0.5、0.25和0.05 μg·mL^{-1}的系列标准工作液及0.05、

0.1、0.4、2 μg • mL^{-1} 的定量下限、低、中、高浓度的质控溶液，备用。

内标溶液的配制：精密称取地西泮原料药适量于 100 mL 量瓶中，加 50% 的乙腈水溶液溶解并稀释至刻度，得 0.1 mg • mL^{-1} 的储备液，再用乙腈逐级稀释至质量浓度为 100 ng • mL^{-1}，即得内标溶液。

2.1.4　血浆样品处理　40 μL 血浆样品加入到 EP 管中，再加入 10 μL 内标溶液及 200 μL 乙腈，涡旋混合 1 min，于 4 ℃、14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

2.1.5　专属性　以 6 只大鼠的空白血浆为基质，按照 “2.1.4” 项下的方法操作，制备空白血浆混内标样品，同时制备大鼠给药后 30 min 时的血浆样品，进样分析。结果如图 1 所示，血浆样品中内源性物质不干扰盐酸纳美芬及内标的定量分析，且盐酸纳美芬与内标相互无干扰，表明该方法特异性良好。

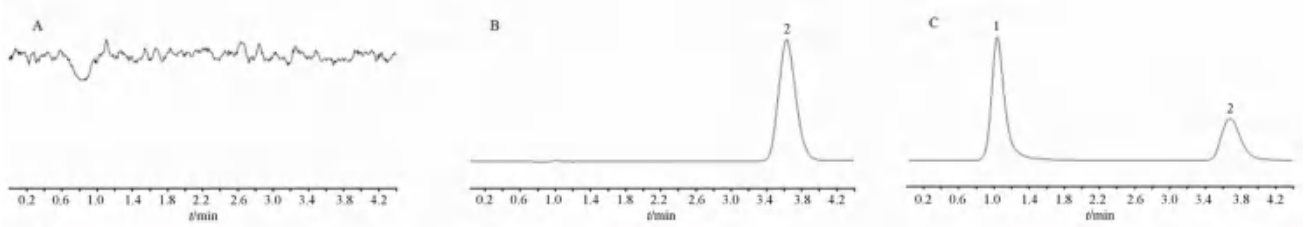


图 1　纳美芬与内标的代表性色谱图

Fig 1　Representative MRM chromatograms of nalmefene and internal standard

A. 空白血浆样品（blank plasma sample）；B. 空白血浆混内标（blank plasma mixed with internal standard）；C. 给药 30 min 时的血浆样品（plasma sample at 30 min after administration）；1. 盐酸纳美芬（nalmefene hydrochloride）；2. 内标（IS）

2.1.6　基质效应　分别取 6 个不同来源的大鼠空白血浆，配制质量浓度分别为 0.1、2 μg•mL^{-1} 低、高浓度的质控样品，按 “2.1.4” 项下操作，每个浓度平行 6 份，记录盐酸纳美芬和内标的峰面积比 A；同时，以乙腈代替空白血浆，配制相同浓度的含有盐酸纳美芬和内标的溶液，每个浓度平行 6 份，记录盐酸纳美芬和内标的峰面积比 B，两者峰面积的比值即为基质效应值。结果表明，低、高浓度质控样品的基质效应在 92.95% ～ 99.60%，*RSD* 在 4.1% ～ 4.4%，表明盐酸纳美芬和内标在血浆中不受电离增强或抑制现象的影响，符合生物样品定量分析相关指导原则要求。

2.1.7　标准曲线与定量范围　取 “2.1.3” 项下的各系列标准工作液 10 μL，氮气下吹干，加入大鼠空白血浆 40 μL，按 “2.1.4” 项下的方法处理后，进样分析。以盐酸纳美芬与内标峰面积之比（y）对药物浓度（x）作线性回归，且以标准曲线的最低点作为定量下限。所得回归方程为：y = 1.0247x − 0.0203（r = 0.9999），表明盐酸纳美芬在 0.05 ～ 2.5 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。定量下限为 0.05 μg • mL^{-1}。

2.1.8　回收试验　按照 “2.1.4” 项下的方法制备低、中、高 3 个浓度的质控样品，每个浓度平行 6 份，记录盐酸纳美芬和内标的峰面积比 C；同时，另取空白血浆，按质控样品同法处理，在离心后加入 10 μL 标准工作液和 10 μL 内标溶液，涡旋混合，取上清液进样分析，每个浓度平行 6 份，记录盐酸纳美芬和内标的峰面积比 D，两者峰面积比的比值 ×100% 即为提取回收率。结果低、中、高 3 个浓度质控样品的提取回收率分别为 96.81%、98.09%、102.55%，*RSD* 值分别为 6.2%、5.0%、2.7%，回收率符合要求。

2.1.9　准确度和精密度　按照 “2.1.4” 项下的方法分别制备低、中、高浓度及定量下限的质控样品，每个浓度平行 6 份，考察 3 个分析批次，连续测定 3 d，使用随行标准曲线的回归方程计算质控样品的实际浓度。结果如表 1 所示，盐酸纳美芬日间和日内精密度的 *RSD* 分别在 3.7% ～ 5.5% 和 0.99% ～ 7.0%，准确度（*RE*）在 1.51% ～ 7.13%，符合生物样品定量分析相关指导原则要求。

表 1　准确度和精密度考察结果 (n = 6)

Tab 1　Accuracy and precision (n = 6)

质控样品 /（μg • mL^{-1}）	精密度 /%		测定值（$\bar{x}\pm s$）	准确度（*RE*）/%
	日间 *RSD*	日内 *RSD*		
0.05	5.2	3.5	0.054±0.003	7.13
0.1	4.6	6.1	0.098±0.005	1.97
0.4	5.5	7.0	0.393±0.024	1.67
2	3.7	0.99	1.970±0.081	1.51

2.1.10　稳定性　按照 “2.1.4” 项下的方法制备低、高浓度的质控样品，考察其在室温放置 12 h、4 ℃放置 24 h、− 20 ℃放置 7 d 以及 − 20 ℃反复冻融 3 次的稳定性，每个浓度平行 6 份，记算测得浓度与

标示浓度的偏差。结果如表 2 所示，盐酸纳美芬在不同储存条件下的准确度（*RE*）在 0.46%～4.13%，表明样品在上述条件下稳定。

表 2　不同条件下盐酸纳美芬的稳定性考察结果（$n=6$）

Tab 2　Stability of nalmefene hydrochloride under various conditons ($n=6$)

放置条件	质控样品 /（μg • mL^{-1}）	测定值（$\bar{x}\pm s$）	准确度（*RE*）/%	精密度 *RSD*/%
室温，12 h	0.1	0.10±0.002	2.92	1.8
	2	1.99±0.065	0.67	2.9
4 ℃，24 h	0.1	0.10±0.002	1.19	2.0
	2	1.97±0.031	1.49	1.4
－20 ℃，7 d	0.1	0.10±0.004	4.13	4.1
	2	1.98±0.022	1.20	0.99
－20 ℃，3 次冻融	0.1	0.10±0.003	3.02	3.0
	2	2.01±0.066	0.46	2.9

2.2　体内药动学研究

2.2.1　给药方案　取 SD 大鼠 12 只，给药前禁食 12 h，自由饮水，随机分为 2 组，每组 6 只，编号，称重，用异氟烷麻醉。一组通过尾静脉注射 1.2 mg • mL^{-1} 的盐酸纳美芬溶液（加生理盐水配制）；另一组用平头微量注射器通过滴鼻法给予盐酸纳美芬鼻喷剂，给药剂量均为 1.2 mg • kg^{-1}，分别于给药后 1、3、5、10、15、20、30、60、120、180、240 min 从大鼠颈静脉取血约 0.4 mL 于肝素钠抗凝管中，并在 4 ℃、5000 r • min^{-1} 离心 10 min，血浆样品储存于－20 ℃待分析。

2.2.2　数据处理　用 WinNonlin 5.2.1 软件根据非房室模型计算药动学参数，数据以均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。并根据以下公式计算绝对生物利用度（*F*）：

$$F=[AUC\text{（nasal）}\times\text{Dose（iv）}]/[AUC\text{（iv）}\times\text{Dose（nasal）}]\times100\%$$

2.2.3　绝对生物利用度评估　盐酸纳美芬鼻腔和静脉注射给药后的平均血药浓度 - 时间曲线及主要药动学参数如图 2 和表 3 所示，静脉给药后，$AUC_{0\sim\infty}$ 约为 67.44 μg • min • mL^{-1}；鼻腔给药后，药物迅速吸收，约 1 min（可能更短）到达血药浓度峰值，C_{max} 约为 1.13 μg • mL^{-1}，$AUC_{0\sim\infty}$ 约为 55.06 μg • min • mL^{-1}，绝对生物利用度可达 81.64%。

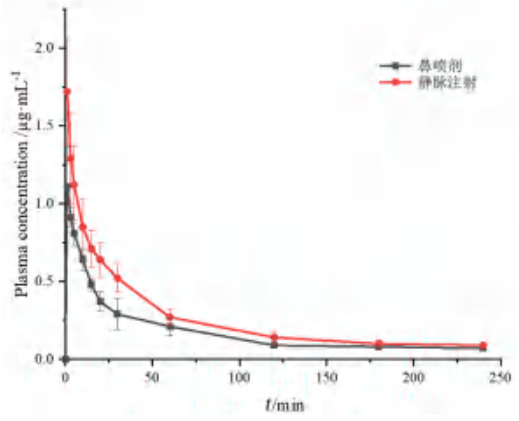


图 2　盐酸纳美芬鼻内及静脉给药后的平均血药浓度 - 时间曲线（$n=6$）

Fig 2　Mean plasma concentration-time curve of nalmefene hydrochloride after the intranasal and intravenous administration（$n=6$）

2.3　纤毛毒性评估

表 3　盐酸纳美芬鼻内和静脉给药后的主要药动学参数（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Main pharmacokinetic parameters of nalmefene hydrochloride after the intranasal and intravenous administration ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

给药途经	t_{max}/min	C_{max}/（μg • mL^{-1}）	$AUC_{0\sim t}$/（μg • min • mL^{-1}）	$AUC_{0\sim\infty}$/（μg • min • mL^{-1}）	$t_{1/2}$/min	V_z/F/L	CL/F/（mL • min^{-1}）	F/%
鼻喷	1.00	1.13±0.25	49.66±5.12	55.06±4.57	46.58±6.85	1.49±0.36	21.93±1.94	81.64
静脉注射	－	－	61.07±8.50	67.44±9.51	49.55±10.76	1.28±0.27	18.11±2.68	－

评价鼻黏膜纤毛毒性的方法主要有离体动物模型法、在体动物模型法和体外细胞培养法[13]。离体法操作简便，一只动物可同时制备多个标本，且可以进行自身对照；在体法由于接近实际给药情况，结果更加可靠，缺点是操作较烦琐，不便进行自身对照，且动物与人鼻黏膜也存在一定差异；体外法虽然可以直接培养人鼻黏膜纤毛细胞，但不能反映人体真实的生理状态，实验结果也存在一定的差异。本研究中采用离体蟾蜍上腭模型和大鼠鼻黏膜模型考察盐酸纳美芬鼻喷剂的纤毛毒性。

2.3.1　离体蟾蜍上颚模型　以生理盐水为阴性对照，1% 去氧胆酸钠为阳性对照，捣毁蟾蜍的脑脊髓后，用止血钳分开口腔，取其上颚黏膜，用生理盐水清洗血块及杂物，分割成约 3 mm×3 mm 的小块，黏膜面向上平铺于载玻片上，滴加 0.1 mL 测试药液，轻轻盖上盖玻片，于光学显微镜下（40×10）观察纤毛摆动情况，若摆动，则置于水蒸气饱和的层析缸中（温度为 20 ～ 25 ℃），每隔一段时间取出观察纤毛摆动情况，直至纤毛停止摆动，记录从开始给药到纤毛停止摆动的时间，即纤毛持续运动时间（lasting time of ciliary movement，LTCM），当纤毛停止摆动时，立即用生理盐水清洗黏膜表面的药液，盖上盖玻片，继续观察纤毛是否恢复摆动，如果恢复摆动，则记

录恢复摆动后的 LTCM，每个测试药液的纤毛持续运动总时间为 2 次测得的 LTCM 之和 [14]。不同测试药液组的纤毛相对运动百分率计算公式为：相对运动百分率（%）＝ $LTCM_{药液组}/LTCM_{生理盐水组}$ ×100%。测定结果如表 4 所示，与阴性对照组相比，盐酸纳美芬鼻腔给药后纤毛相对运动百分率为 66.52%，同时，在实验过程中发现，阴性对照组和盐酸纳美芬鼻腔给药组纤毛排列整齐，呈流水状摆动，且盐酸纳美芬鼻腔给药组纤毛停止摆动后经生理盐水冲洗后又可恢复摆动，而阳性对照组的相对运动百分率为 2.96%，给药后出现明显的纤毛脱落现象，且纤毛持续摆动时间极短，用生理盐水冲洗后不可恢复摆动。

表 4　盐酸纳美芬鼻喷雾剂对蟾蜍上颚纤毛运动的影响 ($n = 3$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of nalmefene hydrochloride nasal spray on the ciliary movement of the palate of toad ($n = 3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	LTCM/min	恢复后 LTCM/min	总 LTCM/min	相对运动百分率 /%
阴性对照组（生理盐水）	607.33±5.31	—	607.33±5.31	100.00
阳性对照组（1% 去氧胆酸钠）	18.00±4.55	—	18.00±4.55	2.96
给药组（鼻喷剂）	284.67±6.55	119.33±6.13	404.00±6.53	66.52

2.3.2　大鼠鼻黏膜模型　9 只 SD 大鼠随机分为 3 组，每组 3 只，分别为生理盐水组（阴性对照）、1% 去氧胆酸钠组（阳性对照）、盐酸纳美芬鼻喷剂组，每只大鼠每次每个鼻孔给予 100 μL 测试药液，每日 2 次，连续给药 7 d，于第 8 日处死，取下含有鼻黏膜的鼻中隔，用生理盐水清洗干净，再用 2.5% 戊二醛固定，然后制备电镜样品，在扫描电镜下观察黏膜形态的变化 [15]。结果如图 3 所示，生理盐水组纤毛浓密，排列整齐有序；1% 去氧胆酸钠组纤毛严重受损，几乎完全脱落；盐酸纳美芬鼻喷剂组纤毛仍然比较浓密，只有部分纤毛出现簇状聚集和脱落的现象。

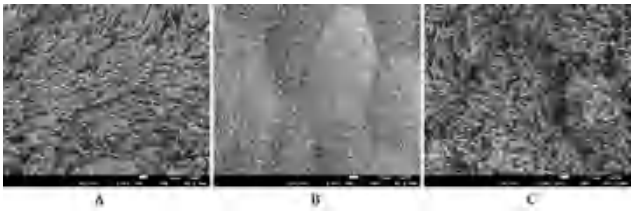


图 3　大鼠鼻黏膜扫描电镜图

Fig 3　Scanning electron microscope image of rat nasal mucosa

A. 生理盐水组（saline group）；B. 1% 去氧胆酸钠组（1% sodium deoxycholate group）；C. 盐酸纳美芬鼻喷剂组（namefen hydrochloride nasal spray group）

3　讨论

以乙腈 -10 mmol•L^{-1} 乙酸铵（含 0.1% 甲酸）为流动相时，乙酸铵可一定程度地改善盐酸纳美芬色谱峰拖尾的现象，甲酸能够提高化合物质子化能力并增强响应，但甲酸的加入量不宜过高，否则会损伤仪器寿命，增加信噪比 [16]，故本文加入 0.1% 甲酸。

纳美芬游离碱不易溶于水，而易溶于乙腈、二氯甲烷等有机溶剂，国内外报道的文献中多采用有机溶剂萃取法 [17-20]，但该方法有机溶剂耗量大，需要挥干、复溶，而且提取回收率较低。因此，本研究采用乙腈蛋白沉淀法处理样品，该方法操作简单、提取回收率较高、基质效应较低、分析物峰形良好 [21]，方法学验证结果符合相关指导原则的标准，适用于大鼠体内血药浓度的定量分析。

合成阿片类药物的亲脂性比吗啡和相关的半合成阿片类药物（如羟考酮）高几个数量级 [22]，这种高亲脂性有利于药物在血浆和脑脊液之间的快速平衡，快速起效 [23]。虽然这种特性在镇痛中受到高度重视，但它也会导致呼吸抑制的快速发作，缩窄救援窗口 [24-25]。因此，在药物过量的救援中，最初的几分钟至关重要，当涉及快速起效的合成类药物时更是如此。

鼻腔给药具有吸收快、生物利用度高、给药方便以及脑靶向性递药等特点，在中枢神经系统疾病药物治疗中已显示良好的临床应用前景 [26]。本研究中，盐酸纳美芬鼻喷剂大鼠体内药动学结果表明，鼻喷制剂经鼻腔给药后起效迅速，约 1 min 即到达血药浓度峰值，C_{max} 约为 1.13 μg • mL^{-1}，其绝对生物利用度可达 81.64%，充分体现了鼻腔给药起效迅速、生物利用度高的特点，其与脑内阿片受体的结合率还有待进一步研究。

鼻腔给药存在的最大问题是其对鼻黏膜纤毛的毒性，轻度的刺激可能导致鼻炎，损伤内鼻，严重时还会造成出血鼻窦炎、鼻中隔穿透、嗅觉丧失等 [27]。在本研究中，离体蟾蜍上颚模型及大鼠鼻黏膜模型结果均表明该制剂的纤毛毒性较小，在离体蟾蜍上颚模型中，当给予药物后纤毛停止摆动时，用生理盐水冲洗后又可迅速恢复摆动，表明药物对纤毛的损伤是可逆的；同时在大鼠鼻黏膜模型中观察到，鼻喷剂给药后鼻黏膜纤毛仍然浓密，只出现部分纤毛脱落和聚集现象，而且

盐酸纳美芬属于短期用药，在鼻腔中停留时间较短，因此可认为盐酸纳美芬鼻喷剂对离体蟾蜍上颚和大鼠鼻黏膜的纤毛毒性较小。

盐酸纳美芬鼻喷剂在大鼠体内表现出较高的生物利用度和较低的纤毛毒性，可为该制剂的研发以及临床应用提供参考，但其在人体中的生物利用度及安全性还有待进一步研究。

参考文献

[1] France CP，Ahern GP，Averick S，et al. Countermeasures for preventing and treating opioid overdose [J]. Clin Pharmacol Ther，2021，109（3）：578-590.

[2] Skolnick P. Treatment of overdose in the synthetic opioid era [J]. Pharmacol Ther，2021，233：108019.

[3] Ryan SA，Dunne RB. Pharmacokinetic properties of intranasal and injectable formulations of naloxone for community use：a systematic review [J]. Pain Manag，2018，8（3）：231-245.

[4] Emmerson PJ，Liu MR，Woods JH，et al. Binding affinity and selectivity of opioids at mu，delta and kappa receptors in monkey brain membranes [J]. J Pharmacol Exp Ther，1994，271（3）：1630-1637.

[5] Kelly E，Mundell SJ，Sava A，et al. The opioid receptor pharmacology of GSK1521498 compared to other ligands with differential effects on compulsive reward-related behaviours [J]. Psychopharmacology（Berl），2015，232（1）：305-314.

[6] Dixon R，Howes J，Gentile J，et al. Nalmefene：intravenous safety and kinetics of a new opioid antagonist [J]. Clin Pharmacol Ther，1986，39（1）：49-53.

[7] Kharasch ED. Opioid half-lives and hemlines：the long and short of fashion [J]. Anesthesiology，2015，122（5）：969-970.

[8] Skolnick P. On the front lines of the opioid epidemic：rescue by naloxone [J]. Eur J Pharmacol，2018，835：147-153.

[9] Bartos C，Varga P，Szabó-Révész P，et al. Physico-chemical and in vitro characterization of chitosan-based microspheres intended for nasal administration [J]. Pharmaceutics，2021，13（5）：608.

[10] Cloyd J，Haut S，Carrazana E，et al. Overcoming the challenges of developing an intranasal diazepam rescue therapy for the treatment of seizure clusters [J]. Epilepsia，2021，62（4）：846-856.

[11] Chokshi A，Vaishya R，Inavolu R，et al. Intranasal spray formulation containing rizatriptan benzoate for the treatment of migraine [J]. Int J Pharm，2019，571：118702.

[12] Roger C，Phil S，Edward T，et al. Formulations and methods for the prevention of opioid overdose：EP，3793558 [P]. 2021-03-24.

[13] 段丽红，王春宝，李映红，等 . 新型载药体系的鼻黏膜毒性和鼻腔黏膜吸收的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志，2020，30（5）：1-5.

[14] 杜生妮，高永良，潘卫三 . 盐酸纳美芬鼻腔喷雾剂纤毛毒性影响因素的考察与评价 [J]. 中国新药杂志，2007（15）：1199-1202. .

[15] 陆瑾，展冠军，郭立玮 . PEG-PLA-α- 细辛脑纳米粒的表征及其鼻纤毛毒性研究 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（18）：2280-2284.

[16] 孙筱初，林菲菲，万咪咪，等 . 液相色谱 - 串联质谱法测定大鼠血浆中赖脯胰岛素及其药动学研究 [J]. 药学学报，2021，56（9）：2383-2388.

[17] Costantini LC，Kleppner SR，McDonough J，et al. Implantable technology for long-term delivery of nalmefene for treatment of alcoholism [J]. Int J Pharm，2004，283（1-2）：35-44.

[18] Gaekens T，Guillaume M，Borghys H，et al. Lipophilic nalmefene prodrugs to achieve a one-month sustained release [J]. J Control Release，2016，232：196-202.

[19] 付志敏，袁洪，谭鸿毅，等 . 小剂量盐酸纳美芬注射液在中国健康志愿者体内的药动学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2010，15（11）：1256-1261.

[20] 章成，黄文祥，罗涛，等 . 盐酸纳美芬注射液药动学 [J]. 重庆医科大学学报，2009，34（9）：1250-1253.

[21] 戴国梁，欧阳冰琛，王一清，等 . 岩黄连总碱胶囊在人体内的药动学研究 [J/OL]. 中国医院药学杂志，1-7 [2022-02-13]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20220208.1740.008.html.

[22] Burns SM，Cunningham CW，Mercer SL. DARK classics in chemical neuroscience：fentanyl [J]. ACS Chem Neurosci，2018，9（10）：2428-2437.

[23] Drewes AM，Jensen RD，Nielsen LM，et al. Differences between opioids：pharmacological，experimental，clinical and economical perspectives [J]. Br J Clin Pharmacol，2013，75（1）：60-78.

[24] Picetti E，Rossi I，Caspani ML. Management of opioid analgesic overdose [J]. N Engl J Med，2012，367（2）：146-155.

[25] Krieter P，Gyaw S，Crystal R，et al. Fighting fire with fire：development of intranasal nalmefene to treat synthetic opioid overdose [J]. J Pharmacol Exp Ther，2019，371（2）：409-415.

[26] 李爽，黄晶，丛志新，等 . 左乙拉西坦 pH 敏感鼻用凝胶剂在大鼠脑组织内生物利用度的研究 [J]. 中南药学，2022，20（1）：108-112.

[27] 谢伟容 . 黄连解毒鼻用温敏凝胶对蟾蜍上颚黏膜纤毛毒性作用的研究 [J]. 江西中医药大学学报，2019，31（2）：85-87.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-08）

3 种心血管类中药注射液对人肝微粒体 CYP450 酶的体外抑制作用

刘艳文，刘黎*（湖南省脑科医院/湖南省第二人民医院药学部，长沙　410007）

摘要：目的　研究冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液对人肝微粒体细胞色素 P450（CYP450）酶 3 种亚型（CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4）的体外抑制作用。**方法**　3 种中药注射液 6 个不同体积分数的工作液分别与 CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4 对应的混合探针药物在人肝微粒体中共同孵育，采用超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法同时测定探针药物的代谢产物，即对乙酰氨基酚（CYP1A2）、5- 羟基奥美拉唑（CYP2C19）、6β- 羟基睾酮（CYP3A4）的生成量，计算半数抑制浓度（IC_{50}）。**结果**　在设定的浓度范围内，3 种中药注射液对 CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4 的抑制作用存在浓度依赖性；冠心宁注射液对 CYP2C19、CYP3A4 的 IC_{50} 分别为 3.76%、9.87%；心脉隆注射液对 CYP1A2、CYP2C19 的 IC_{50} 分别为 4.81%、2.65%；丹红注射液对 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 的 IC_{50} 分别为 16.74%、11.10% 和 9.84%。**结论**　在临床使用剂量下，冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液对 CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4 有一定的抑制作用。

关键词：中药注射液；人肝微粒体；细胞色素 P450；抑制作用；药物相互作用
中图分类号：R965，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0007-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.002

Inhibition of 3 cardiovascular traditional Chinese medicine injections on human cytochrome P450 in vitro

LIU Yan-wen, LIU Li* (*Department of Pharmacy*, *Hunan Brian Hospital/Second People's Hospital of Hunan, Changsha* 410007)

Abstract: Objective　To determine the inhibitory effect of 3 cardiovascular traditional Chinese medicine injections (TCM injections) on 3 cytochrome P450 (CYP450) enzymes (CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4), in human liver microsomes in vitro. **Methods**　Totally 3 cardiovascular TCM injections with 6 concentrations were incubated with human liver microsomes in the presence of CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4. UPLC-MS/MS method was used to simultaneously determine the 3 probe substrate-derived metabolites, that was acetaminophen (CYP1A2), 5-hydroxy omeprazole (CYP2C19) and 6β-hydroxytestosterone (CYP3A4). The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated. **Results**　The 3 cardiovascular TCM injections showed concentration-dependent inhibition on CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 in the present concentration range. The IC_{50} of Guanxinning injection of CYP2C19 and CYP3A4 was 3.76% and 9.87%; the IC_{50} of Xinmailong injection of CYP1A2 and CYP2C19 was 4.81% and 2.65%; and the IC_{50} of Danhong injection of CYP1A2, CYP2C19 and CYP3A4 was 16.74%, 11.10% and 9.84% respectively. **Conclusion**　Guanxinning injection, Xinmailong injection and Danhong injection have inhibitory effect on CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 at the clinical dosage in vitro.

Key words: TCM injection; human liver microsome; cytochrome P450; inhibitory effect; drug interaction

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ9029）；湖南省中医药科研计划项目（No.2021107）。
作者简介：刘艳文，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学及临床药理学研究，email：xtyiwen@126.com　*通信作者：刘黎，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学及新药临床研究，email：aliuli1984@126.com

中药注射液是以中医药理论为指导，采用现代科技和方法，从中药或其他天然药物中提取有效物质制成的可供注入人体内的各种无菌制剂，在临床治疗中起着不可替代的作用[1]。中药注射液常与化学药联合使用治疗各种复杂疾病，临床应用愈趋广泛，中药 - 药物相互作用（herb-drug interactions，HDIs）引起的不良反应也日渐受到关注。HDIs 主要发生在药代动力学和药效学水平上，大量的研究集中于药代动力学相互作用[2]。

细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP450）酶是人体内主要的代谢酶系统之一，由基因超家族编码的酶蛋白所组成，参与各种外源性和内源性物质的生物转化。CYP450 酶中的 1/2/3 亚族主要分布于肝脏，占肝脏中所有 CYP450 含量的 75% 以上[3-4]。CYP1A1 和 CYP1A2 是人 CYP1A 亚族的两个主要酶，其中 CYP1A2 占总 CYP450 酶的 13% ～ 15%；CYP2C 亚族占人肝脏 CYP450 酶的 30% 左右，主要包括 CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19，其中 CYP2C19 能参与临床上 10% 左右的药物代谢；CYP3A 亚族为肝内数量最多的 CYP450 酶，CYP3A4 约占肝脏总 CYP450 酶含量的 50%，已有超过 50% 的治疗药物被 CYP3A4 代谢[5-6]。引起代谢性药物相互作用的主要原因是对 CYP450 酶的抑制或诱导作用，而酶抑制作用约占其中的 70%[7]。因此，研究药物对 CYP450 酶的抑制作用，对临床合理用药、避免潜在的药物相互作用具有重要意义。2021 年全国药品不良反应 / 事件报告中，中药不良反应占 13.0%，其中活血化瘀类药品的报告数量居首位[8]。临床观察发现，我院治疗心血管疾病，常单用或联用冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液，也有过敏等相关不良反应的报道。如何安全、有效、合理使用中药注射液并预防不良反应的发生已成为临床亟需解决的问题。

本研究拟通过 Cocktail 探针底物法，选择 CYP450 酶中具有代表性的 3 种酶（CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4）及经典的 3 种探针药物（非那西丁、奥美拉唑、睾酮）分别作为其对应的特异性底物，测定 3 种心血管类中药注射液对人肝微粒体 CYP450 酶活性的影响，以期为临床合理用药提供参考，减少药物相互作用引起不良反应的发生。

1 材料

1.1 仪器

NexeraUHPLC/HPLC 型超高效液相色谱 -Triple Quad 6500 型三重四极杆串联质谱（美国 AB SCIEX 公司）；Centrifuge 5810R 型高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；THC-5B 型数控超声波清洗器（济宁天华超声电子仪器有限公司）；AB265-S 型十万分之一电子天平（梅特勒 - 托利多公司）；DW-86L486 型超低温保存箱（海尔集团公司）。

1.2 试药

冠心宁注射液（神威药业集团有限公司，规格：10 mL，批号：211214A1）；心脉隆注射液（云南腾药制药股份有限公司，规格：2 mL/100 mg，批号：20181226）；丹红注射液（山东丹红制药有限公司，规格：10 mL，批号：22022004）；地西泮（批号：171225-200903，纯度：99.9%）、奥美拉唑（批号：100367-201305，纯度：99.9%）、酮康唑（批号：100294-201904，纯度：99.8%）对照品（中国食品药品检定研究院）；还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH，武汉普莱特生医药技术有限公司，批号：NRS0012022001）；非那西丁（批号：AK201107-20，纯度：98.12%）、睾酮（批号：ML191227-13，纯度：99.59%）、对乙酰氨基酚（批号：L210507-22，纯度：99.12%）、α-萘黄酮（批号：0611-RC-0014，纯度：99.40%）（北京北方伟业计量技术研究院）；噻氯匹定（批号：20161201，纯度：99.0%，上海珞珐生化科技有限公司）；5- 羟基奥美拉唑（批号：7-AKS-23-2，纯度≥ 98%）、6β- 羟基睾酮（批号：21A065-A7，纯度≥ 98%）（加拿大 TRC 公司）。磷酸盐缓冲液（PBS，浓度 0.01 mol • L^{-1}，pH 7.4，批号：BB01255016，北京博奥森生物技术有限公司）；其他试剂（德国 CNW 或默克公司）。混合人肝微粒体（批号：M10001.2018001，武汉普莱特生物医药技术有限公司）。

2 方法与结果

2.1 冠心宁注射液、心脉隆注射液、丹红注射液和内标溶液的制备

精密称取地西泮对照品适量，用甲醇溶解并定容，配制成质量浓度为 318 μg • mL^{-1} 的内标溶液，于 4 ℃下保存，备用。冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液分别用 PBS 以 3 倍稀释倍数逐步稀释 5 次，各自配得包括原溶液在内的 6 个体积分数的实验溶液，分别为 0.41%、1.23%、3.70%、11.11%、33.33%、100.0% 的溶液。

2.2 混合探针药物溶液的制备

分别精密称取非那西丁、奥美拉唑、睾酮（分别为 CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4 的探针药物）对照品 9.92、5.12、13.2 mg，用甲醇溶解

并定容至 10 mL，配制得质量浓度分别为 0.992、0.512、1.32 mg • mL^{-1} 的探针药物储备液。临用前用 PBS 逐步稀释，最终制得非那西丁、奥美拉唑、睾酮质量浓度分别为 165、85.33、146.67 μg • mL^{-1} 的混合探针药物溶液。

2.3 特异性抑制剂溶液的制备

分别精密称取 α-萘黄酮、噻氯匹定、酮康唑（分别为 CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4 的特异性抑制剂）对照品 10.64、11.14、5 mg，用甲醇溶解定容，配制得质量浓度分别为 1.064、1.114、5 mg • mL^{-1} 的抑制剂储备液。临用时，用 PBS 稀释上述单一储备液，配制成质量浓度分别为 106.4、222.8、250 μg • mL^{-1} 的溶液，备用。

2.4 代谢产物标准溶液的制备

分别精密称取对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮（分别为非那西丁、奥美拉唑、睾酮的代谢产物）3 种对照品 13.9、1.44、4.56 mg，用甲醇溶解定容，配制得质量浓度分别为 1.39、1.44、0.456 mg • mL^{-1} 的代谢产物储备液。临用时，用甲醇将上述单一储备液稀释至相应质量浓度，备用。

2.5 体外人肝微粒体孵育体系

取人肝微粒体适量，用 PBS 稀释至 0.5 g•L^{-1}。于冰浴条件下，依次加入人肝微粒体溶液 20 μL、PBS 110 μL（浓度 0.01 mol • L^{-1}）、相应体积分数的冠心宁注射液、心脉隆注射液、丹红注射液或特异性抑制剂溶液 20 μL、NADPH 辅酶溶液 30 μL（A 液 25 μL，B 液 5 μL），置于 37 ℃生化培养箱中孵育 3 min；然后加入混合探针药物溶液 20 μL 开始反应，反应时间为 60 min。每个浓度平行 3 份。孵育体系总体积为 200 μL，其中溶解探针药物的甲醇含量不超过 1%。

2.6 UPLC-MS/MS 法的建立

2.6.1 样品处理 于体外孵育体系中加入冰乙腈（含 318 ng • mL^{-1} 地西泮）200 μL 终止反应，涡旋 120 s 后，14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.6.2 色谱与质谱条件 ① 色谱条件：色谱柱为 ACE Excel 5 Super C_{18}（150 mm×2.0 mm，5 μm），流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为甲醇，梯度洗脱（洗脱程序见表 1），柱温 40 ℃，流速 0.3 mL • min^{-1}，进样量 10 μL。② 质谱条件：电喷雾电离源（ESI），多反应监测（MRM）模式，正离子扫描，源喷射电压 5500 V，入口电压 10 V，离子源温度 450 ℃，碰撞气 9 psi，气帘气 35 psi，离子源气体 1 为 50 psi，离子源气体 2 为 55 psi，3 种探针药物代谢产物及内标的质谱参数见表 2。

表 1 UPLC-MS/MS 法的流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure of mobile phase of UPLC-MS/MS method

时间 /min	0.1% 甲酸水 /%	甲醇 /%
0.8	50	50
2.9	5	95
3.4	5	95
3.6	50	50
4.5	50	50

表 2 3 种探针药物代谢产物及内标的质谱条件参数

Tab 2 Parameters of mass spectrometry for 3 substrates probes and internal standards

酶	代谢产物 / 内标	探针药物	母离子	子离子	扫描时间 /ms	去簇电压 /V	碰撞能量 /eV
CYP1A2	对乙酰氨基酚	非那西丁	152.0	110.0	150	80	23
CYP2C19	5-羟基奥美拉唑	奥美拉唑	362.1	214.1	150	19	18
CYP3A4	6β-羟基睾酮	睾酮	305.4	269.3	150	107	20
	内标地西泮		285.5	154.1	150	93	36

2.6.3 专属性考察 取肝微粒体溶液，不加探针药物（用 PBS 补足体积）；取肝微粒体溶液，不加探针药物，加入代谢产物混合标准溶液；取肝微粒体溶液，均按“2.5”及“2.6.1”项下方法处理，进样测定，记录色谱图。结果显示，空白肝微粒体对对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮和内标的测定均无干扰，专属性良好，详见图 1。

2.6.4 线性关系考察 分别吸取对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮储备液适量混合，用 PBS 稀释，配制成对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑和 6β-羟基睾酮质量浓度分别为 1.08 ～ 463.33、0.83 ～ 360 和 3.52 ～ 1520 ng • mL^{-1} 的系列溶液，按“2.5”项下方法配制孵育体系（不加入探针药物，改为加入代谢产物混合系列溶液），照“2.6.1”项下方法处理后，进样测定，记录峰面积。分别以代谢产物与内标峰面积的比值（Y）为纵坐标，以代谢产物的质量浓度（X）为横坐标，采用加权最小二乘法（权重因子 $1/\chi^2$）进行线性回归，分别得到代谢产物的标准曲线方程。结果显示，人肝微粒体孵育体系中对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮的线性关系良好，定量

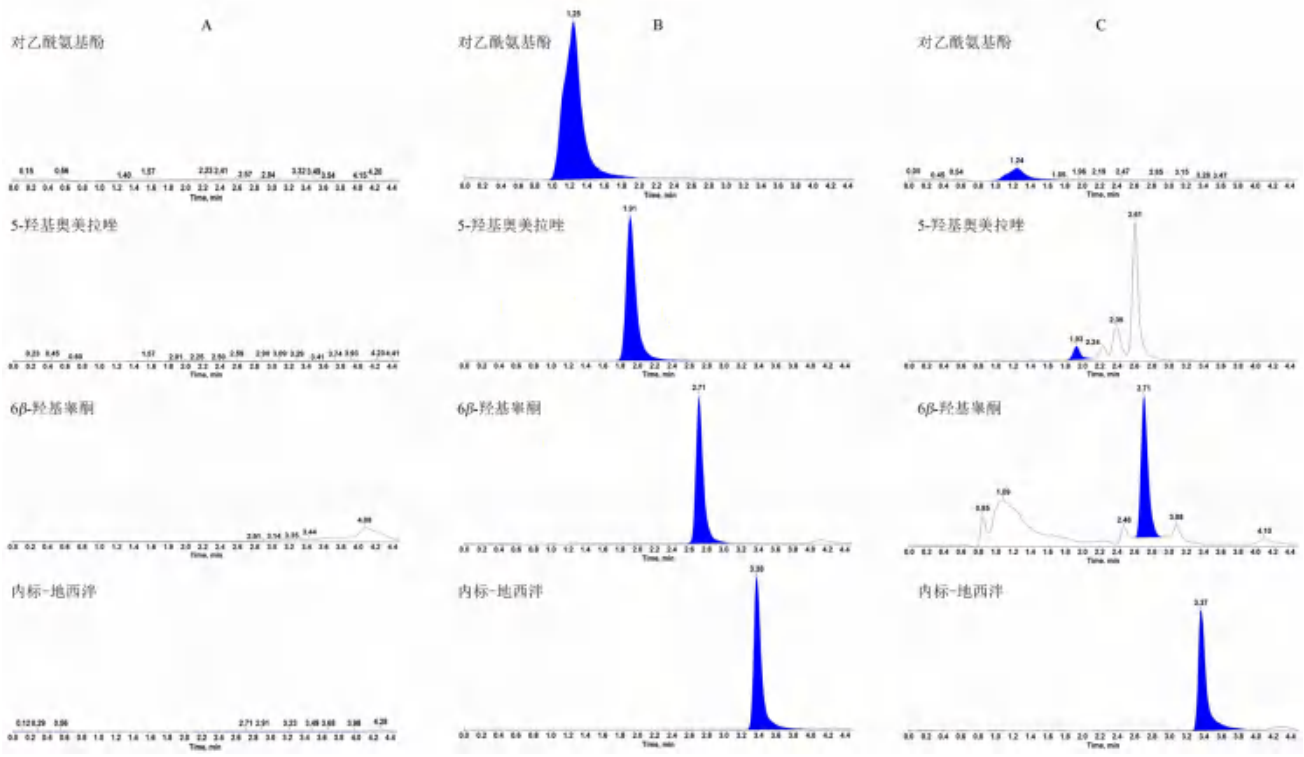


图 1 典型色谱图

Fig 1 Typical chromatogram

A. 空白孵育体系（blank incubation system）；B. 空白孵育体系加入代谢产物对照品及内标（对乙酰氨基酚：154.44 ng•mL^{-1}，5-羟基奥美拉唑：120 ng•mL^{-1}，6β-羟基睾酮：506.67 ng•mL^{-1}，内标：318 ng•mL^{-1}）（blank incubation system with reference substance，acetaminophen：154.44 ng•mL^{-1}，5-hydroxy omeprazole：120 ng•mL^{-1}，6β-hydroxytestosterone：506.67 ng•mL^{-1}，internal standards：318 ng•mL^{-1}）；C. 探针药物孵育样品（probe drug incubation sample）

下限分别为 1.08、0.83、3.52 ng•mL^{-1}，结果见表 3。

表 3 3 种探针药物代谢产物的回归方程与线性范围

Tab 3 Standard curve equation and linear range for 3 substrate probes

代谢产物	线性方程	R^2	线性范围 /（ng•mL^{-1}）
对乙酰氨基酚	$Y = 0.008\,21X - 0.0032$	0.9964	1.08 ～ 463.33
5-羟基奥美拉唑	$Y = 0.1797X + 0.0027$	0.9948	0.83 ～ 360
6β-羟基睾酮	$Y = 0.003\,81X - 0.0018$	0.9988	3.52 ～ 1520

2.6.5 准确度、精密度考察 按“2.5”项下方法分别配制定量下限和低、中、高浓度的对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮的孵育体系，每个浓度平行 5 份，按“2.6.1”项下方法处理样品后进样测定，考察准确度和日内精密度；每日测定 1 次、连续测定 3 d，考察日间精密度。结果显示，人肝微粒体孵育体系中对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮的准确度为（88.29±2.21）%～（110.51±4.91）%，日内、日间精密度的 *RSD* 均小于 12.0%，表明该方法准确、可靠、重现性好，结果见表 4。

表 4 3 种代谢产物的准确度和精密度 (%)

Tab 4 Accuracy and precision for 3 substrate probes (%)

代谢产物	质量浓度 /（ng•mL^{-1}）	准确度	日内 *RSD*	日间 *RSD*
对乙酰氨基酚	1.08	105.78±8.88	2.3	8.3
	2.15	98.54±8.02	7.5	8.1
	17.16	94.52±2.38	1.2	2.5
	154.44	88.29±2.21	2.0	2.5
5-羟基奥美拉唑	0.83	106.31±12.32	0.88	11.7
	1.67	108.02±8.97	0.57	8.2
	13.33	110.51±4.91	0.49	4.5
	120.00	98.52±6.97	2.1	7.1
6β-羟基睾酮	3.52	104.26±9.48	4.3	9.1
	7.04	99.78±8.20	4.9	8.2
	56.30	104.86±6.85	2.1	6.5
	506.67	102.85±4.82	0.87	4.7

2.6.6 稳定性和基质效应 按“2.5”项下方法分别配制定量下限和低、中、高浓度的孵育体系，置于 37 ℃生化培养箱中 60 min，每个浓度平行 5 份，然后按“2.6.1”项下方法处理样品后进样测定。另配制定量下限和低、中、高浓度的孵育体系，每个浓度平行 5 份，按“2.6.1”项下方法处理

后室温放置 6 h 后测定。配制空白肝微粒孵育体系 200 μL，加入冰乙腈（含 318 ng • mL^{-1} 地西泮）200 μL，涡旋 120 s 后，14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液至另一干净 2 mL EP 管中，再分别加入定量下限和低、中、高浓度的质控溶液，涡旋混匀后进样分析，得到相应峰面积。同时以甲醇配制相应浓度的代谢产物标准溶液（不含辅酶溶液），按上述方法处理后测得相应峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算基质效应，并以分析物和内标的比值计算内标归一化的基质效应。结果见表 5，样品处理后 6 h，对乙酰氨基酚、5-羟基奥美拉唑、6β-羟基睾酮的准确度为（99.85±7.67）%～（112.63±3.43）%；基质效应为（99.73±5.43）%～（108.5±4.63）%。在本方法的色谱和质谱条件下，可忽略基质效应的影响。

表 5 3 种代谢产物的稳定性和基质效应 ($\bar{x}\pm s$，$n=5$，%)

Tab 5 Stability and matrix effect for 3 substrate probes ($\bar{x}\pm s$，$n=5$，%)

代谢产物	质量浓度 /（ng • mL^{-1}）	生化培养箱 60 min 的准确度	样品处理后 6 h 的准确度	基质效应
对乙酰氨基酚	1.08	105.2±2.36	99.85±7.67	105.7±9.38
	2.15	105.9±6.30	102.5±3.81	102.9±9.35
	17.16	109.4±3.74	106.8±4.10	108.5±4.63
	154.44	111.48±1.16	108.0±1.20	103.7±3.29
5-羟基奥美拉唑	0.83	104.9±1.06	101.4±4.63	100.7±3.87
	1.67	107.1±2.33	106.3±2.79	103.5±4.56
	13.33	111.14±1.33	104.4±1.30	104.0±2.46
	120	108.6±5.01	106.9±4.56	101.9±4.55
6β-羟基睾酮	3.52	102.13±11.22	112.63±3.43	106.9±7.37
	7.04	101.9±6.60	100.3±6.91	105.1±8.76
	56.3	103.4±2.16	107.1±3.81	103.3±1.60
	506.67	101.4±1.31	105.0±0.99	99.73±5.43

2.7 体外孵育试验

体外孵育试验设试验组、空白组、阳性对照组，每组平行 3 次。按“2.5”项下方法制备孵育体系，试验组中分别加入体积分数为 0.41%、1.23%、3.70%、11.11%、33.33%、100.00% 的冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液，阳性对照组中分别加入“2.3”项下的 α-萘黄酮、噻氯匹定、酮康唑溶液，空白组中加入等体积的 PBS。按“2.6.1”项下方法处理后，分析并计算各探针药物对应的代谢产物的含量。以空白组代谢产物生成量为 V_0，其余不同体积分数试验组各代谢产物生成量为 V_x，剩余酶活性（%）= $V_x/V_0\times100\%$。以剩余酶活性为纵坐标，冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液体积分数的对数值为横坐标，使用 Graphpad Prism 5.0 软件进行非线性回归分析并计算半数抑制浓度（IC_{50}）。结果如表 6 所示。阳性抑制剂 α-萘黄酮、噻氯匹定、酮康唑对人肝微粒体中 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 的 IC_{50} 分别为 0.96、1.46、0.08 μmol • L^{-1}，与文献结果基本一致[7, 9]，表明测试系统符合该评价研究。冠心宁注射液对 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 的 IC_{50} 分别为 83.12%、3.76%、9.87%；心脉隆注射液对 CYP1A2、CYP2C19 的 IC_{50} 分别为 4.81%、2.65%；丹红注射液对 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 的 IC_{50} 分别为 16.74%、11.10% 和 9.84%，且存在浓度依赖性。

3 讨论

目前 CYP450 酶的诱导或抑制是体内外 HDIs 研究的热点。中药注射液对 CYP 酶活性的研究大多采用动物为实验对象[10]，而 CYP 酶有较大的种属差异，同种药物在不同种属体内的代谢途径和代谢产物可能不同，因此动物模型不足以精确推测中药注射液对人体的作用。本实验采用人肝微粒体探针法，是将肝微粒体置于类似人生理环境的条件下，进行生物代谢研究，易于操作，速度快，重现性好[11]。Cocktail 法比普通探针药物法省时、经济，可同时获得多个代谢途径的信息，减少个体间的影响，既可作为药物筛选工具，又可预测临床联合用药产生的相互作用[12]。本研究采用快速、灵敏的 UPLC-MS/MS 法测定探针药物的代谢产物，通过专属性、线性关系、日内及日间精密度、稳定性和基质效应的考察，表明本方法合理可行。

用探针代谢产物生成量来表示剩余酶活性，较探针底物原型减少量的方法更科学，能直接表示酶剩余活性，应用也越来越广泛[13-15]。中药注

表 6 3 种中药注射液对 3 种 CYP 酶的抑制作用 (%，n = 3，$\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Inhibitory effect of 3 traditional Chinese medicine injection on 3 CYP450 enzymes (%，n = 3，$\bar{x}\pm s$)

组别		剩余酶活性		
		CYP1A2	CYP2C19	CYP3A4
阴性对照	—	100±0.99	100±1.15	100±4.00
冠心宁注射液	0.41%	94.03±6.03	91.54±1.73	98.15±1.47
	1.23%	95.49±2.43	82.55±0.91	100.07±2.21
	3.70%	90.65±0.16	50.67±1.67	78.17±0.93
	11.11%	65.34±2.04	18.83±0.21	46.06±0.26
	33.33%	47.43±1.57	5.77±0.03	13.38±0.41
	100.00%	59.42±2.74	1.66±0.05	10.26±0.25
IC_{50}/%		83.12	3.76	9.87
95% 置信区间 /%		38.88 ～ 177.70	3.58 ～ 3.95	8.90 ～ 10.95
心脉隆注射液	0.41%	66.71±4.25	88.06±4.83	105.51±0.75
	1.23%	57.47±1.00	60.10±0.52	103.24±1.10
	3.70%	50.29±0.89	36.37±2.26	102.20±3.56
	11.11%	43.37±0.98	26.52±1.45	94.67±2.95
	33.33%	38.29±2.57	20.66±1.66	92.37±2.68
	100.00%	34.35±2.36	12.18±0.20	77.97±1.28
IC_{50}/%		4.81	2.65	＞ 300
95% 置信区间 /%		3.84 ～ 6.02	2.03 ～ 3.45	NA
丹红注射液	0.41%	88.71±4.61	97.17±4.77	101.29±2.13
	1.23%	87.58±3.23	96.09±2.41	101.26±1.65
	3.70%	77.20±2.89	87.44±4.24	83.41±3.65
	11.11%	48.64±3.08	51.22±0.57	44.48±0.80
	33.33%	30.37±1.28	10.00±0.58	10.95±0.18
	100.00%	37.55±0.89	1.26±0.05	6.17±0.53
IC_{50}/%		16.74	11.10	9.84
95% 置信区间 /%		11.50 ～ 24.37	10.36 ～ 11.89	9.12 ～ 10.61

射液抑制作用的判定尚未有统一的评判标准，查阅文献，有多项研究将中药注射液在血液中的体积分数换算成临床剂量，评价其对 CYP450 酶的抑制作用 [16-17]。据报道，丹红注射液的临床使用剂量为 0.4% ～ 1.6%；冠心宁注射液的日用量为 20 ～ 40 mL，一般正常成人血液总量有 4 ～ 5 L，相当于临床使用剂量为 0.4% ～ 1%；心脉隆注射液日用量为 8 ～ 16 mL，临床使用剂量为 0.16% ～ 0.4%[18]。本实验设置的 6 个体积分数（0.41% ～ 100.0%），显示冠心宁注射液、心脉隆注射液和丹红注射液对 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 酶的 IC_{50} 值在 2.65% ～ 16.74%，均大于临床使用剂量。提示在临床正常用量下，冠心宁注射液对 CYP2C19、CYP3A4 酶存在一定的弱抑制作用；心脉隆注射液对 CYP1A2、CYP2C19 酶有弱抑制作用；丹红注射液对 3 种 CYP450 酶均有弱抑制作用。

有多项研究表明，丹红注射液呈浓度依赖性地抑制人肝微粒体中 CYP1A2、CYP2A6、CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及 CYP3A4[18-19]，与本实验结果一致。而关于冠心宁注射液、心脉隆注射液对人肝微粒体 CYP450 酶活性的影响未见报道。近年来，对于慢性疾病如高血压、冠心病等的治疗，常采用中西药联合使用。普萘洛尔、维拉帕米、哌唑嗪等主要经 CYP1A2 代谢，抗血小板药物氯吡格雷主要经 CYP2C19 代谢，已知 CYP3A4 可代谢超过 50% 的治疗药物 [4]。当冠心宁、心脉隆及丹红注射液与上述药物，特别是与治疗窗较窄的药物联用时，应注意代谢性药物相互作用的发生。另有研究发现 [20]，多种中药注射液对 CYP450 酶的影响呈时间和剂量相关性，虽然短期使用未对 CYP450 酶有明显抑制作用，但长期大剂量或超剂量使用时，则可能产生 CYP450 酶抑制或诱导作用，应注意长期联合使用时引起的 HDIs。

肝微粒体属于脱离人体内环境的独立体系，由于研究条件、方法等差异及实验用药物剂型、批次等不同，同种药物实验结果可能会有偏差 [21]，其体外预测在一定的研究阶段能起到预警、预测的作用，但还需结合体内实验深入探究

其作用机制，减少中药注射液与 CYP450 酶相互作用引起的药物不良反应，保障其使用的安全、有效，促进中医药的现代化发展。

参考文献

[1] 彭国平，李存玉 . 中药注射剂安全性的分析与思考 [J]. 南京中医药大学学报，2019，35（6）：744-751.

[2] Singh A，Zhao K. Herb-drug interactions of commonly used Chinese medicinal herbs [J]. Int Rev Neurobiol，2017，135：197-232.

[3] Fritz A，Busch D，Lapczuk J，et al. Expression of clinically relevant drug-metabolizing enzymes along the human intestine and their correlation to drug transporters and nuclear receptors：an intrasubject analysis [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2019，124（3）：245-255.

[4] 张雯雯，刘鑫，温成铭，等 . 体外代谢体系中中药及其成分对肝脏 CYP450 代谢酶抑制作用的研究进展 [J]. 药学学报，2022，57（2）：303-312.

[5] 常泽娜，杨长青 . 中药注射剂对细胞色素 P4502C9 酶活性及细胞色素 P4502C9 底物的药物代谢影响的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（12）：1165-1168.

[6] 强婷婷，李益萍，王肖龙 . 治疗冠心病常用中药对 CYP450 酶系及转运体影响的研究进展 [J]. 中成药，2020，42（2）：428-433.

[7] 潘洁，陆苑，孙佳，等 . 艾迪注射液对体外人和大鼠肝微粒体中 CYP450 酶的抑制作用 [J]. 中成药，2016，38（11）：2332-2337.

[8] 国家药品不良反应监测年度报告（2021 年）. https：//www. cdr-adr. org. cn/drug_1/aqjs_1/drug_aqjs_sjbg/202203/t20220330_49586. html.

[9] 陈瑞，周维，张丽，等 . 树豆酮酸 A 对人肝微粒体中 5 种常见细胞色素 P450 酶的体外抑制作用研究 [J]. 中国药房，2021，32（2）：195-200.

[10] 邹莉，石园，刘高峰 . 中药注射剂的药物相互作用研究进展 [J]. 中南药学，2016，14（11）11：1183-1187.

[11] Balimane PV，Pat ELK，Marino A，et al. Utilitu of 96 well Caco-2 cell system for increased throughput of P-gp screening in drug discovery [J]. Eur J Pharm Biopharm，2004，58（1）：99-105.

[12] Li G，Huang K，Nikolic D，et al. High-throughput cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing-drug-drug and drug-botanical interactions [J]. Drug Metab Dispos，2015，43（11）：1670-1678.

[13] 龚婧如，杨涛，马芬芬，等 . 注射用血栓通对人 CYP450 酶的体外抑制作用及对阿托伐他汀体外代谢的影响 [J]. 中国药业，2021，30（16）：48-52.

[14] 陆惠平，杨涛，龚婧如 . 丹红注射液对阿司匹林和氯吡格雷体外代谢的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（3）：323-328.

[15] Ye LH，Zhao XQ，Kong LT，et al. Inhibitory effects of Danhong Injection and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes in vitro [J]. Biomed Chromatogr，2018，32：e4250.

[16] Zhang JX，Qi MJ，Shi MZ，et al. Effects of Danhong injection，a traditional Chinese medicine，on nine cytochrome P450 isoforms in vitro [J]. Biomed Chromatogr，2019，33：e4454.

[17] Li Z，Hou J，Li W，et al. Effect of injection of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on activity of CYP450 subtypes in human live [J]. Drug Eval Res，2018，41：1224-1228.

[18] 刘丽雅，韩永龙，余奇，等 . 10 种心血管类中药注射剂对人细胞色素 P450 7 种亚型的体外抑制作用 [J]. 中国药房，2014，25（11）：990-993.

[19] 李学林，张帆，李伟霞，等 . 基于人肝微粒体 CYP1A2 亚型酶研究丹红注射液与阿司匹林的相互作用 [J]. 中国新药杂志，2018，27（9）：1034-1039.

[20] 安会杰，邹江冰，黄雪峰，等 . 基于细胞色素 P450 酶的新型冠状病毒肺炎治疗用中药注射剂与心血管病常用化学药潜在相互作用分析 [J]. 中草药，2021，52（7）：2178-2183.

[21] 于月，殷硕，刘高峰 . 中药注射剂对细胞色素的调控与药物相互作用预测 [J]. 中国药师，2014，17（1）：99-103.

（收稿日期：2022-09-14；修回日期：2022-10-22）

Graves 病气阴两虚型病证结合模型的建立与评价

丁崧[1]，高长久[1]，柳长凤[2]，卢芳[2]，刘树民[2*]（1. 黑龙江中医药大学研究生院，哈尔滨 150040；2. 黑龙江中医药大学中医药研究院，哈尔滨 150040）

摘要：目的 建立 Graves 病气阴两虚型病证结合动物模型及评价方法，为病证结合动物模型提供借鉴。**方法** BALB/c 小鼠 60 只，随机分为 4 组，其中对照组、气阴两虚组各 10 只，腺病毒组、病证结合组各 20 只。腺病毒组、病证结合组于 1、4、7 周注射带有促性腺激素受体（TSHR）的 A 亚单位的重组腺病毒，对照组、气阴两虚组分别于 1、4、7 周注射等量 PBS 进行 Graves 病造模。同时，病证结合组与气阴两虚组采用睡眠剥夺加热药灌胃耗气伤阴。造模第 10 周，记录各组小鼠证候积分相关指标；采用 ELISA 试剂盒检测血清 TT3、TT4、TSH、TRAb 含量；记录各组小鼠心脏、脾脏、胸腺的重量，计算脏器指数；HE 染色观察小鼠甲状腺 Masson 染色观察小鼠心脏病理状态。**结果** 与对照组相比，腺病毒组的心脏指数增加，血清 TT3、TT4 和 TRAb 增加，TSH 降低（P 均＜ 0.01），证候积分增加（P ＜ 0.05），有 1 只小鼠符合 Graves 病气阴两虚证成模标准，成模率 5%；病证结合组心脏指数增加，脾脏指数降低，血清 TT3、TT4 和 TRAb 增加，TSH 降低，证候积分增加（P 均＜ 0.01），有 12 只小鼠符合 Graves 病气阴两虚证成模标准，成模率 60%；气阴两虚组脾脏指数与胸腺指数降低（P 均＜ 0.01）。**结论** 本研究建立的 Graves 病气阴两虚型病证结合动物模型有一定的可行性，为病证结合模型的建立与评价提供了思路。

关键词：Graves 病；气阴两虚；病证结合模型；重组腺病毒；动物模型
中图分类号：R332，R581 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0014-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.003

Establishment and evaluation of the combination model of Qi and Yin deficiency syndrome in Graves' disease

DING Song[1], GAO Chang-jiu[1], LIU Chang-feng[2], LU Fang[2], LIU Shu-min[2*] (1. *Graduate School of Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040; 2. *Institute of Chinese Medicine*, *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040)

Abstract: Objective To establish and evaluate the mouse model of combination of Qi and Yin deficiency syndrome in Graves' disease. **Methods** Totally 60 BALB/c mice were randomly divided into 4 groups: a control group (n = 10), a Qi and Yin deficiency group (n = 10), an adenovirus group (n = 20) and a disease-syndrome combination group (n = 20). The adenovirus group and the disease-syndrome combination group were injected TSHR subunit A recombinant adenovirus at the 1st, 4rd, and 7th week, while the control group and the Qi and Yin deficiency group were injected the same amount of PBS at the 1st, 4rd, and 7th week to establish Graves' disease model. At the same time, the combination of disease and syndrome group and the Qi and Yin deficiency group were deprived of sleep given hot drug by gavage to damage Qi and Yin. At the 10th week of modeling, the syndrome score related indexes of mice in each group were recorded. The content of TT3, TT4, TSH and TRAb in the serum was detected by ELISA. The weight of the heart, spleen and thymus was recorded, and the organ index was calculated. The pathological status of the thyroid was observed by HE staining while that of

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81302898）。
作者简介：丁崧，男，硕士研究生，主要从事中药药性理论及药效物质基础研究，email：980367598@qq.com *通信作者：刘树民，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药性理论及药效物质基础研究，email：keji-liu@163.com

the heart by Masson staining. **Results** Compared with the control group, the cardiac index, serum TT3, TT4 and TRAb were increased, TSH was decreased ($P < 0.01$), and the syndrome score was increased ($P < 0.05$) in the adenovirus group. One mouse in this group met the modeling criteria of Graves' disease with both Qi and Yin deficiency, and the modeling rate was 5%. The heart index was increased, the spleen index was decreased, serum TT3, TT4 and TRAb were increased, TSH was decreased, and the syndrome score was increased ($P < 0.01$) in the disease-syndrome combination group. Twelve mice met the modeling criteria of Graves' disease with deficiency of Qi and Yin in this group, and the modeling rate was 60%. The spleen index and thymus index were decreased in the Qi and Yin deficiency group ($P < 0.01$). **Conclusion** The combined mouse model of Qi and Yin deficiency syndrome of Graves' disease established in this study is feasible, which provides ideas for the establishment and evaluation of the combined model.

Key words: Graves' disease; Qi and Yin deficiency; disease-syndrome combination model; recombinant adenovirus; animal model

Graves 病（Graves' disease，GD）是一种自身免疫性疾病，占甲状腺功能亢进症所有临床类型的 85% 以上 [1]，典型表现有高代谢症候群、弥漫性甲状腺肿大、心律失常、眼球突出、腹泻等。其发病有严重的性别倾向，多见于 20 ～ 40 岁的成年女性 [2-3]。Graves 病属于中医的“瘿病”范畴，根据证候状态一般分为气郁痰阻、痰瘀互结、阴虚火旺、气阴两虚四种类型。其中气阴两虚型 Graves 病患者多本虚而标实，其自身正气不足，又因肝气郁滞，郁久而化热，耗气伤阴，最终气、血、痰、瘀郁结于颈部，进而发病 [4-5]。目前，尚未有 Graves 病气阴两虚型病证结合模型的造模方法。本研究使用目前较为公认的表达促甲状腺激素受体（TSHR）的 A 亚单位的重组腺病毒免疫法，得到 Graves 病模型 [6]，同时以“劳则气虚，饥则损气，热则伤阴”[7] 的原理，耗气伤阴，加重小鼠因疾病导致的自身气与阴的损耗，制备 Graves 病气阴两虚型病证结合小鼠模型。

1 材料

1.1 仪器

ZH-YLS-13A 大小鼠抓力测定仪（安徽正华生物仪器设备有限公司）；SY-5000 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；Alpha1-4LDplus 型冻干机（德国 Christ 公司）；Super Maze XR-XM101 动物行为视频分析软件；Anthos2010 酶标仪（奥地利安图斯公司）；KQ-250DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；KDC-160HR 型高速冷冻离心机（安徽科大创新股份有限公司中佳分公司）；AB265-S 型万分之一天平（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；BL-420S 生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）。

1.2 试药

带有 TSHR 的 A 亚单位的重组腺病毒 AV-CMV ＞ TSHR289/6xHis/IRES/EGFP[批号：210821 AVK502，赛业（苏州）生物科技有限公司]；戊巴比妥钠（批号：6902018，国药集团化学试剂有限公司）；小鼠血清总三碘甲状腺原氨酸（TT3）、血清总四碘甲状腺原氨酸（TT4）、促甲状腺激素受体抗体（TRAb）、促甲状腺激素（TSH）ELISA 试剂盒（货号：CK-E20591、CK-E20401、CK-E21239、CK-E20237，上海酶联生物科技有限公司）。肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl.、干姜 *Zingiber officinale* Rosc.、花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.、辣椒 *Capsicum annuum* L.（批 号：20210121、20210913、20201211、20190129，哈尔滨盛泽生物技术有限公司）。

热药制备：取肉桂、干姜、花椒、辣椒各 125 g，于圆底烧瓶中，加 10 倍蒸馏水浸泡 30 min，煎煮 50 min，滤出煎液，再次加入 10 倍蒸馏水煎煮 40 min，合并滤液，浓缩至生药质量浓度为 1 g•mL^{-1}。

1.3 动物

健康雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只，8 周龄，体质量 17 ～ 20 g[北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2021-0006]。小鼠在温度 20 ～ 24 ℃、湿度 40% ～ 50% 条件下适应性饲养 1 周，自由进食饮水。动物实验在黑龙江中医药大学中医药研究院完成，动物使用许可证号：SYXK（黑）2018-007，本研究经黑龙江中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准（批准文号 2021030605）。

2 方法

2.1 病证结合判定标准的建立

本研究以中医理论为指导，参考《甲状腺疾病病证结合治疗学》《中医病证诊疗标准》（ZY/T001.1-94）、《中药新药临床指导原则》《甲状腺功能亢进症病证结合诊疗指南》（2021-01-2）、《中医证候规范》《中医临床诊疗术语》拟订证候诊断标准，并采用分级赋分的方法，制订 Graves 病气阴两虚证中医证候积分表。同时查阅文献，搜集相关生物学指标[8]，建立 Graves 病气阴两虚证动物模型判定标准。

2.2 病证结合动物模型的建立

2.2.1 实验动物分组 将 60 只 BALB/c 小鼠分随机为 4 组，其中对照组、气阴两虚组各 10 只，腺病毒组、病证结合组各 20 只。

2.2.2 Graves 病模型的建立 实验第 1、4、7 周，腺病毒组、病证结合组用 PBS 对带有 TSHR 的 A 亚单位的重组腺病毒进行稀释，于胫前肌注射（每只每次免疫剂量为 1.878×10^{9} PFU/60 μL）；对照组、气阴两虚组注射等量 PBS 缓冲液。

2.2.3 气阴两虚模型的建立 每日 8：00 ～ 20：00 将小鼠放入自制睡眠剥夺箱（62 cm×49 cm×40 cm；底部固定有 15 个小圆柱，小圆柱直径 1.9 cm×4 cm；睡眠剥夺箱中水面高度 3 cm）进行睡眠剥夺，同时禁食禁水。20：00 后将小鼠取出擦干，对小鼠进行热药[7]灌胃，给药剂量为每日给药 0.01 g 生药 $\cdot g^{-1}$。灌服热药后，自由饮食饮水。

2.3 指标检测

2.3.1 证候相关指标检测

① 一般状态观察。通过触摸与观察，记录造模第 10 周末各组小鼠颈前肿大状态、眼球突出状态、四爪震颤状态和抓取激惹的程度，并测量其体重、腋温。

② 神疲乏力程度。抓力：造模第 10 周运用大小鼠抓力测定仪测量小鼠的抓力。每只小鼠测量 3 次，取均值作为小鼠抓力。

旷场实验：造模第 10 周，进行旷场实验检测。将小鼠置于检测房间，适应 30 min 后，进行实验。实验时间 8：00 ～ 11：00。小鼠背对实验人员放入旷场，记录小鼠运动，时间 300 s，人工记录小鼠双脚紧贴周围墙壁的次数。将小鼠取出，清理粪便和尿液，用 75% 乙醇祛除小鼠留下的气味，等待乙醇挥发，将下一只小鼠放入其中重复上述操作。

神疲乏力程度的计算：神疲乏力程度＝旷场实验活动总距离 / 对照组活动平均距离 ×0.3 ＋旷场实验站立次数 / 对照组平均站立次数 ×0.2 ＋抓力 / 对照组平均抓力 ×0.5[9]。

③ 唾液流率。记录造模第 10 周末的唾液流率。用镊子[10]持滤纸在小鼠舌面停留 5 s，记录滤纸湿润前的干重与湿润后的湿重，每 2 h 重复一次，测量 3 次，取均值。唾液流率（%）＝（滤纸湿重－滤纸干重）/5 s。

④ 粪便含水率。记录造模第 10 周末的粪便含水率。小鼠单笼放置 1 h，用冻存管及时收集每只小鼠的粪便防止水分流失，称重，记录为粪便湿重，放入烘箱 105 ℃，5 h，拿出记录干重[11]。粪便含水率（%）＝（粪便湿重－粪便干重）/ 粪便湿重 ×100%。

⑤ 心率。造模第 10 周，用 1% 戊巴比妥钠（40 mg $\cdot kg^{-1}$）对小鼠进行腹腔注射麻醉小鼠，待小鼠昏迷，置于实验台上，与 BL-420S 生物机能实验系统相连接，记录Ⅱ导联心电图 5 min。选择心电图的 2 min 后的平稳期进行自动测量，得到小鼠的心率。

2.3.2 血清指标的检测 造模结束后，摘小鼠眼球取血，于 EP 管中静置 2 h，3500 r $\cdot min^{-1}$ 离心 15 min。检测血清 TT3、TT4、TSH、TRAb 的含量。

2.3.3 病理染色 造模结束后，取小鼠甲状腺、心脏进行固定、脱水、包埋、切片、染色、中性树脂封片，之后于光镜下镜检。其中甲状腺用 HE 染色，心脏用 Masson 染色。

2.3.4 脏器指数 造模结束后，称取小鼠体重。摘取小鼠脾脏、胸腺、心脏，生理盐水冲洗后用滤纸吸干水分，称取重量。胸腺指数（%）＝胸腺重量 / 小鼠体质量 ×100%；脾脏指数（%）＝脾脏重量 / 小鼠体质量 ×100%；心脏指数（%）＝心脏重量 / 小鼠体质量 ×100%。

2.4 证候积分及成模率的计算

记录并计算各组小鼠证候指标对应分值即证候积分。

Graves 病模型成功率（%）＝ Graves 病模型建立成功的小鼠数 / 每组小鼠总数 ×100%。

病证结合模型成功率（%）＝ Graves 病气阴两虚型病证结合模型建立成功的小鼠数 / 每组小鼠总数 ×100%。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，数据进行正态分布检验与方差齐性检验，符合正态分布且方差齐者采用单因素方差分析，不符合正态分布或方差不齐者采

用非参数检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　Graves 病气阴两虚型病证结合模型判定标准的建立

根据重要程度对证候进行了赋分，得到 Graves 病气阴两虚证动物模型中医证候积分表，见表 1。本次研究从两个方面判定模型是否建立成功：

① Graves 病模型建立成功标准：同时满足 TT3、TT4 和 TRAb 的含量大于对照组的均值加 3 倍标准差[8]，TSH 的含量小于对照组的均值减 3 倍标准差；② Graves 病气阴两虚证中医证候评判标准：满足 Graves 气阴两虚证中医证候积分表中的主证的气虚相关、阴虚相关两个部分中各 1 个指标超出正常，以及次证中的 1 个指标超出正常。同时满足以上两个标准，则判定小鼠的 Graves 气阴两虚证造模成功。

表 1　Graves 病气阴两虚证动物模型中医证候积分表

Tab 1　TCM syndrome score of Graves' disease mouse model of Qi and Yin deficiency syndrome

		证候项目	小鼠宏观表征	检查项目	评分标准	评分
主证	疾病相关	颈前肿大	颈部形态	颈部触感	正常	0
					可触及或吞咽时可见	2
					非吞咽时可见	4
					颈部外形已变化	6
		眼球突出	眼睛形态	眼睛状态	正常	0
					眼裂增宽	2
					水肿及眼睑肥厚	4
					突出明显	6
		心悸	心率	心电图	$(\bar{x}_{对照组} - 3s_{对照组}) \leqslant \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组})$	0
					$(\bar{x}_{对照组} - 4s_{对照组}) \leqslant \bar{x} < (\bar{x}_{对照组} - 3s_{对照组})$	2
					$(\bar{x}_{对照组} - 5s_{对照组}) \leqslant \bar{x} < (\bar{x}_{对照组} - 4s_{对照组})$	4
					$\bar{x} < (\bar{x}_{对照组} - 5s_{对照组})$	6
	阴虚相关	口干咽燥	口渴程度	唾液流率	$(\bar{x}_{对照组} - 3s_{对照组}) \leqslant \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组})$	0
					$(\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组})$	2
					$(\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	4
					$\bar{x} > (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	6
		五心烦热	体温	腋温	$(\bar{x}_{对照组} - 3s_{对照组}) \leqslant \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组})$	0
					$(\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组})$	2
					$(\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	4
					$\bar{x} > (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	6
		消瘦[9]	体质量	体质量	$0.85 \leqslant \bar{x} \leqslant 1.2$	0
					$0.7 \leqslant \bar{x} < 0.85$	2
					$0.6 \leqslant \bar{x} < 0.7$	4
					$\bar{x} < 0.6$	6
	气虚相关	神疲乏力	精神状态与体力	旷场实验＋抓力	$0.75 \leqslant \bar{x} \leqslant 1.25$	0
					$0.5 \leqslant \bar{x} < 0.75$	2
					$0.25 \leqslant \bar{x} < 0.5$	4
					$\bar{x} < 0.25$	6
次证		烦躁易怒	性情	抓取反抗	躲藏不反抗	0
					偶尔挣扎	1
					持续挣扎	2
					有咬人倾向	3
		便溏	粪便	粪便含水率	$(\bar{x}_{对照组} - 3s_{对照组}) \leqslant \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组})$	0
					$(\bar{x}_{对照组} + 3s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组})$	1
					$(\bar{x}_{对照组} + 4s_{对照组}) < \bar{x} \leqslant (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	2
					$\bar{x} > (\bar{x}_{对照组} + 5s_{对照组})$	3
		手指震颤	四爪	四爪状态	无震颤	0
					偶有震颤	1
					经常发作	2
					持续震颤	3

3.2　证候相关指标

实验结束，对照组小鼠精神状态正常，性格温顺。腺病毒组小鼠较对照组小鼠唾液流率显著降低（$P < 0.01$），抓力显著降低（$P < 0.05$），体温和粪便含水率显著增加（$P < 0.05$），心率显著增加（$P < 0.01$）。病证结合组小鼠在实验过程中有 3 只小鼠死亡，较对照组小鼠体质量、抓力、旷场行动距离、旷场站立次数、气虚指数和唾液流率显著降低（$P < 0.01$），体温和粪便含水率显著增加（$P < 0.05$），心率显著增加（$P < 0.01$）；气阴两虚组小鼠较对照组小鼠体质量显著降低（$P < 0.01$），气虚指数、抓力和唾液流率显著降低（$P < 0.05$），见表 2。

表 2　各组证候相关指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Syndrome related indexes in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量 /g	抓力 /g	旷场行动距离 /mm	旷场站立次数 / 次	气虚指数	体温 /℃	粪便含水率 /%	唾液流率 /（mg・s^{-1}）	心率 /（次・min^{-1}）
对照组	10	22.01±1.24	259.98±39.76	29 132.87±3259.83	17.5±4.58	1±0.13	37.19±0.06	60.31±2.48	252.67±39.43	324.4±39.07
腺病毒组	20	22.22±1.03	223.21±56.12*	33 907.61±5882.04	22.1±8.40	1.03±0.15	37.44±0.19*	67.20±6.91*	193.00±58.18**	399.65±49.00**
病证结合组	17	17.95±1.17**	193.82±38.54**	12 035.93±6339.06**	8.71±7.49**	0.6±0.15**	37.43±0.23*	67.50±7.17*	166.67±46.96**	417.65±43.44**
气阴两虚组	10	19.86±1.22**	216.87±34.99*	24 886.92±4426.16	15.2±8.02	0.85±0.16*	37.18±0.12	58.19±10.01	203.33±42.66*	336.4±28.66

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.3　血清指标

腺病毒组和病证结合组的 TT3、TT4 和 TRAb 较对照组显著性增加（$P < 0.01$），TSH 较对照组显著性降低（$P < 0.01$）；气阴两虚组较对照组 TT3、TT4、TRAb 和 TSH 差异无统计学意义，见表 3。

表 3　各组血清 TT3、TT4、TSH、TRAb 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Serum TT3，TT4，TSH and TRAb contents in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TT3/（ng・mL^{-1}）	TT4/（ng・mL^{-1}）	TSH/（mU・L^{-1}）	TRAb/（U・L^{-1}）
对照组	10	2.59±0.31	53.54±5.27	12.54±0.73	39.34±6.68
腺病毒组	20	4.11±0.75**	89.49±21.17**	8.70±2.17**	69.62±9.38**
病证结合组	17	4.14±0.69**	87.53±23.18**	7.86±1.75**	66.42±4.93**
气阴两虚组	10	2.66±0.23	53.82±4.57	13.02±1.02	41.98±6.91

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.4　脏器指数

腺病毒组和病证结合组较对照组显著增加（$P < 0.05$，$P < 0.01$），气阴两虚组较对照组无明显差异；胸腺指数方面，气阴两虚组较对照组显著降低（$P < 0.01$），腺病毒组和病证结合组较对照组无明显差异；脾脏指数方面，气阴两虚组和病证结合组较对照组显著降低（$P < 0.01$），腺病毒组较对照组无明显差异，见表 4。

表 4　各组脏器指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4　Organ index in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心脏指数 /%	胸腺指数 /%	脾脏指数 /%
对照组	10	0.42±0.02	0.13±0.01	0.31±0.04
腺病毒组	20	0.46±0.05*	0.12±0.02	0.33±0.05
病证结合组	17	0.51±0.08**	0.13±0.03	0.23±0.03**
气阴两虚组	10	0.45±0.03	0.1±0.01**	0.26±0.03**

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

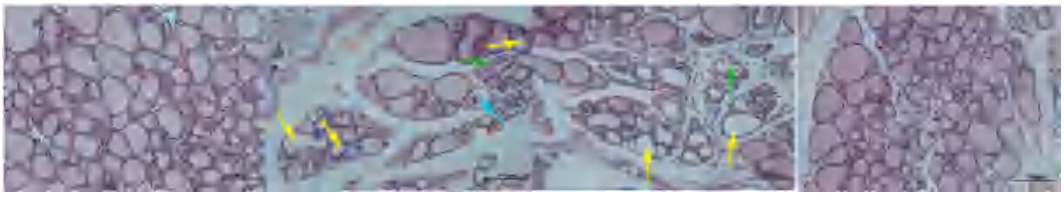
Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

3.5　病理染色

对照组和气阴两虚组的小鼠甲状腺由大小不等的滤泡组成，滤泡呈球形或椭圆形，滤泡壁由单层的滤泡上皮细胞围成，滤泡腔内充满胶质，呈均质状嗜酸性，着深浅略有不同的红色，滤泡间有少量结缔组织、丰富的毛细血管网和成群的滤泡旁细胞；腺病毒组和病证结合组甲状腺滤泡形态不规则，滤泡腔内大量胶质丢失（黄色箭头），部分滤泡上皮细胞向滤泡腔内增生（绿色箭头），腺病毒组可见部分滤泡上皮细胞脱落（蓝色箭头），见图 1。

对照组和气阴两虚组心肌间质纤维组织（蓝色条带）较少，心肌间裂隙较少；模型组和病证结合组心肌纤维化面积增加，心肌间裂隙增多，见图 2。

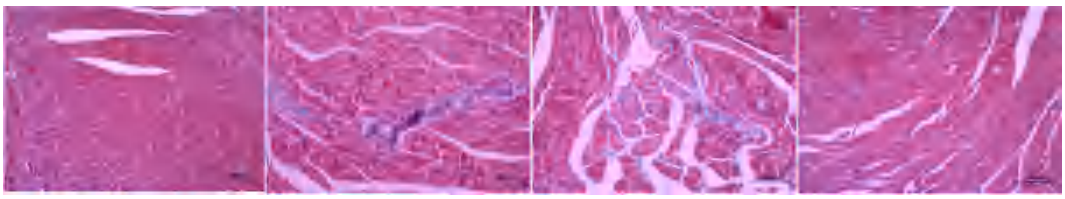
3.6　证候积分及成模率



对照组　腺病毒组　病证结合组　气阴两虚组

图 1　各组甲状腺病理图（HE，×200）

Fig 1　Pathological images of thyroid glands in each group（HE，×200）



对照组　腺病毒组　病证结合组　气阴两虚组

图 2　各组心脏病理图（Masson，×200）

Fig 2　Pathological images of heart in each group（Masson，×200）

造模结束，腺病毒组证候积分较对照组显著增加（$P < 0.05$），病证结合组证候积分较对照组显著增加（$P < 0.01$），见表 5。腺病毒组符合 Graves 病模型成功标准的有 13 只小鼠，疾病模型成功率是 65%；有 1 只小鼠符合 Graves 病气阴两虚证成模标准，腺病毒组成功率 5%。病证结合组符合 Graves 病模型成功标准的有 12 只小鼠，疾病模型成功率 60%；且这 12 只鼠都符合 Graves 病气阴两虚证成模标准，病证结合模型成功率 60%。

表 5　各组证候积分比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab 5　Syndrome scores in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	证候积分
对照组	10	0.4±0.52
腺病毒组	20	7.65±6.54*
病证结合组	17	11.88±8.12**
气阴两虚组	10	2.8±3.01

注：与对照组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$.

4　讨论

Graves 病是一种自身免疫性疾病，目前公认的发病原因是机体免疫失调分泌大量 TRAb，这些抗体结合并长期刺激 TSHR[12]，导致甲状腺素大量分泌，进而发病。此时血清中 TT3、TT4 含量增加，TSH 则由于被下丘脑 - 垂体 - 甲状腺轴负反馈调节所抑制，血清含量降低。从病理图片可以看到，为了合成过量的甲状腺素，腺病毒组和病证结合组小鼠的滤泡腔内储存的合成甲状腺素的原料被大量消耗，导致部分滤泡腔内胶质丢失，同时参与甲状腺素合成的甲状腺滤泡上皮细胞不断增殖，以便产生更多甲状腺素。而大剂量甲状腺素的存在，加重了心脏的负荷，影响钙通道，最终导致腺病毒组和病证结合组小鼠的心肌间质的纤维化与心脏重构[13]。

病证结合动物模型是现代医学和传统中医碰撞结合的产物，是“病”与“证”在实验动物上的结合体现，是适应当今以现代医学辨病与传统中医辨证的临床现状的实验室模拟[14-15]。本研究在重组腺病毒免疫造模的基础上，使用水平台睡眠剥夺、饥饱失常与热药灌胃的方法耗气伤阴，赋予小鼠气阴两虚的因素，建立 Graves 气阴两虚证病证结合动物模型。《素问・举痛论》言：“劳则气耗。”《灵枢・五味》言：“谷不入，半日则气衰，一日则气少矣。”《李氏医鉴》言：“饥饱劳役，伤其阴血。”又有《何氏虚劳心传》言：“劳倦伤脾，最能生热，热则内伐真阴。”《医宗金鉴・删补名医方论》记载：“大热则伤阴。”因此，长达 10 周，每日 14 h 水平台的站立与食物和睡眠的缺失会导致身心俱疲[16]、饥饱失常，进而耗气伤阴，而每日热药灌胃也会加重阴的损耗，最终人为的加快小鼠气与阴的消耗，建立气阴两虚模型。

本研究以血清 TT3、TT4、TRAb 和 TSH 作为疾病成功判断依据，以颈部状态、眼睛状态、粪便状态、心率、体温、体质量、口渴程度、烦躁程度、手颤抖状态、精神状态和体力作为中医证候表征依据。结果显示，和对照组相比，腺病毒组和病证结合组的血清 TT3、TT4、TRAb 显著升高，TSH 显著降低，表明小鼠 Graves 病模型建立成功，但 Graves 病模型的成功率较以往文献稍

低[17]。同时，与对照组比较，腺病毒组会出现口干舌燥、便溏、五心烦热、心悸的症状，表明腺病毒组气虚相关表征较少，可能更偏向于疾病早期的阴虚火旺;病证结合组会出现消瘦、神疲乏力、口干舌燥、便溏、五心烦热、心悸的症状，表明病证结合组气与阴的消耗都较为严重，Graves 病气阴两虚型病证结合动物模型制作成功；气阴两虚组出现消瘦、神疲乏力、口干舌燥的症状，表明也出现了一定的气与阴的损耗。

《素问遗篇·刺法论》言："正气存内，邪不可干"。气阴两虚同样会引起身体的虚弱，与免疫功能的紊乱[18]。本研究对小鼠胸腺、脾脏进行称重，计算免疫器官的脏器指数，发现与对照组相比，只有气阴两虚组的胸腺、脾脏指数降低，病证结合组只有脾脏指数下降，胸腺指数无显著差异，腺病毒组两脏器指数均无显著差异。这可能是 Graves 病作为自身免疫性疾病引起胸腺增大而导致的[19]。

本研究在表达 TSHR 的 A 亚单位的重组腺病毒免疫诱导的 Graves 病的基础上，参照 Graves 病气阴两虚证的证候特点，运用"劳则气虚，饥则损气，热则伤阴"的理论方法建立了 Graves 病气阴两虚型病证结合动物模型，并从宏观的证候、微观的血清指标以及显微病理观察对模型进行了评价，发现该模型在一定程度上符合气阴两虚型 Graves 病患者的临床指征，同时，该方法存在造模时间长，部分气阴两虚相关证候如舌淡白、脉细弱、出汗等难以检测的缺点。综上所述，Graves 病气阴两虚型病证结合小鼠模型在一定程度上符合患者临床状态，有一定的参考价值。

参考文献

[1] 杜娟，王欣，谭贵琴，等 . Graves 病易感基因研究进展 [J]. 中国比较医学杂志，2019，29（4）：126-132.

[2] 柴立超，王晶，魏雁，等 . 夏枯草口服液联合甲巯咪唑治疗 Graves 病心肝火旺证患者的临床疗效观察 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（11）：1246-1251.

[3] 周芳宇，王欣，谭贵琴，等 . Graves 病细胞免疫学机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志，2020，30（3）：98-102.

[4] 安芮 . 益气消瘿汤治疗气阴两虚型 Graves 甲亢的临床研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2019.

[5] 孔畅 . 加减生脉散治疗气阴两虚型 Graves 病的临床观察及对 TRAb 的影响 [D]. 济南：山东中医药大学，2015.

[6] 王悦，张萌，赵凤仪，等 . 小鼠及猕猴 Graves 病动物模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报，2020，28（4）：455-462.

[7] 马慕秾，董英杰，雷珊珊，等 . 黄精不同炮制品对气阴两虚模型大鼠的药效研究 [J]. 上海中医药杂志，2019，53（10）：83-89.

[8] Tang Y，Zhu X，Feng H，et al. An improved mouse model of Graves disease by once immunization with Ad-TSHR289 [J]. Endocr J，2019，66（9）：827-835.

[9] 方肇勤，潘志强，卢文丽，等 . 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法的建立及其评价 [J]. 中国中医基础医学杂志，2007，13（7）：502-505.

[10] 孙晓霞，任威铭，崔荣兴，等 . 阴虚证动物模型的建立与评价 [J]. 中医杂志，2021，62（13）：1156-1163.

[11] 马潇，康安，徐珊，等 . 麸炒苍术不同提取物对小鼠脾虚泄泻的影响 [J]. 南京中医药大学学报，2018，34（3）：292-297.

[12] Plöhn S，Hose M，Schlüter A，et al. Fingolimod improves the outcome of experimental Graves' disease and associated orbitopathy by modulating the autoimmune response to the thyroid-stimulating hormone receptor [J]. Thyroid，2019，29（9）：1286-1301.

[13] 方居正，陈如泉 . 甲状腺素影响心脏扩大的病理研究进展 [J]. 医药导报，2006，25（6）：558-560.

[14] 李磊，刘建勋，任钧国，等 . 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志，2022，32（1）：104-110.

[15] 方媛，桂文琪，聊晓玉，等 . 阴虚型慢性萎缩性胃炎大鼠病证结合模型的探索与评价 [J]. 中南药学，2022，20（3）：525-531.

[16] 王若冲，戴宁，李儒婷，等 . 平台水环境法构建人类疾病动物模型的应用与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志，1-11.

[17] 冒婧敬，相萍萍，刘超 . Graves 病动物模型构建的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志，2021，25（9）：113-116，122.

[18] 乐娜，吐尔逊·热依拉，赵凡，等 . 芝斛方对气阴两虚证小鼠环核苷酸、免疫及代谢水平的影响 [J]. 北京中医药大学学报，2021，44（10）：899-907.

[19] Popoveniuc G，Sharma M，Devdhar M，et al. Graves' disease and thymic hyperplasia：the relationship of thymic volume to thyroid function [J]. Thyroid，2010，20（9）：1015-1018.

（收稿日期：2022-09-06；修回日期：2022-11-04）

苯并芘通过 AhR 影响肝脏脂质合成的分子机制研究

苏敏[1]，张梦迪[1, 2]，白图雅[1, 2]，胡玉霞[1, 2, 3]，李君[1, 2, 3]，王蕾[1]，王朝杰[1]，杨帆[1, 4*]，常福厚[1, 2*]
（1. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特　010110；2. 内蒙古自治区新药筛选工程研究中心，呼和浩特　010110；3. 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心，呼和浩特　010110；4. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院，内蒙古　包头　014010）

摘要：目的　研究苯并芘（BaP）对肝脏脂质合成的影响及其分子机制。**方法**　用低、中和高剂量的 BaP 给小鼠灌胃，检测谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）的水平，油红 O 染色法检测脂质含量，qPCR 法和 Western blot 法检测脂肪生成及转运相关基因过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ（PPARγ）、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）和脂肪酸转运酶（CD36）的 mRNA 和蛋白表达。在 HepG2 细胞中加多环芳经受体（AhR）抑制剂 CH223191 观察 BaP 对以上各指标的影响。**结果**　与溶剂对照组相比，低、中和高剂量组的 BaP 可以显著升高小鼠肝脏中 ALT 水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$），中、高剂量组的 BaP 可以升高 AST 水平（$P < 0.05$，$P < 0.001$）；中、高剂量组的 BaP 能够显著增加小鼠肝脏脂质聚集（$P < 0.01$，$P < 0.001$）；三种剂量的 BaP 均可使 HepG2 细胞中脂质聚集增加（$P < 0.01$，$P < 0.001$）；三种剂量的 BaP 均可使小鼠肝脏的 PPARγ、SCD1 和 CD36 的蛋白表达和 *CD36* 的 mRNA 表达升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）；中、高剂量组的 BaP 均可使小鼠肝脏的 *PPARγ*、*SCD1* 的 mRNA 表达升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。中、高剂量的 BaP 均可使 HepG2 细胞中的 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 和蛋白表达增加（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）。加 AhR 抑制剂后，脂质含量明显降低，并可显著降低 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 和蛋白表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　BaP 可能通过 AhR 促进肝脏组织中脂肪生成及转运相关基因的表达进而促进肝脏脂质合成。

关键词：苯并芘；过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ；硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1；脂质合成；分子机制
中图分类号：R966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0021-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.004

Molecular mechanism of BaP affecting liver lipid synthesis via AhR

SU Min[1], ZHANG Meng-di[1, 2], BAI Tu-ya[1, 2], HU Yu-xia[1, 2, 3], LI Jun[1, 2, 3], WANG Lei[1], WANG Chao-jie[1], YANG Fan[1, 4*], CHANG Fu-hou[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110; 2. *The Center for New Drug Safety Evaluation and Research*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110; 3. *Inner Mongolia New Drug Screening Engineering Research Center*, *Hohhot* 010110; 4. *The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College*, *Inner Mongolia University of Science and Technology*, *Baotou Inner Mongolia* 014010)

Abstract: Objective　To determine the effect of Benzo[a] pyrene (BaP) on liver lipid synthesis and its molecular mechanism. **Methods**　Mice were gavaged with low, medium and high dose BaP. The levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were detected. The lipid content was detected by oil red O staining. The mRNA and protein expression of adipogenesis and transport related genes Peroxisome proliferators activated receptor γ (PPARγ), stearoyl-coA desaturase 1 (SCD1) and fatty acid translocase (CD36) were detected by qPCR and Western blot. AhR inhibitor CH223191 was added to HepG2 cells to observe the effect of BaP on the above indexes. **Results**　Compared with the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82260733，81760676）；内蒙古自治区自然科学基金项目（No.2019LH08017）；内蒙古自治区高等学校科学研究项目（No.NJZY21593）。
作者简介：苏敏，女，硕士，主要从事生化与分子药理学工作，email：1256699780@qq.com　*通信作者：常福厚，男，博士，教授，主要从事生化与分子药理学工作，email：changfh@163.com；杨帆，女，硕士，主要从事生化与分子药理学工作，email：2500352057@qq.com

solvent control group, the level of ALT in the mice liver in the low, medium and high BaP dose groups was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), and the level of AST in the mice liver in the medium and high BaP dose groups was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.001$). The lipid accumulation in the medium and high BaP dose groups was obvious increased in the mice liver ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and lipid aggregation in HepG2 cells in three doses of BaP was significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The protein expression of PPARγ, SCD1 and CD36 and mRNA expression of *CD36* in mice livers in the three doses BaP groups were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Administration of medium and high BaP dose groups significantly increased the mRNA expression of *PPARγ* and *SCD1* in the mice liver ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The mRNA and protein expressions of PPARγ, SCD1 and CD36 were significantly increased in HepG2 cells in the medium and high BaP dose groups ($P < 0.01$, $P < 0.001$). After adding AhR inhibitors, the lipid content was decreased significantly, and the mRNA and protein expressions of PPARγ, SCD1 and CD36 were decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** BaP may promote the expression of adipogenesis and transport related genes in the liver tissue through AhR and further affect liver lipid synthesis.

Key words: Benzo[a] pyrene; peroxisome proliferator activated receptor γ; stearoyl-CoA desaturase 1; lipid synthesis; molecular mechanism

脂质代谢紊乱是导致很多代谢性疾病的原因之一，如非酒精性脂肪肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD），其特征是从简单的肝脏脂肪积累进一步演变为肝脂肪变性，进而进展为更严重的疾病，如非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞癌[1-2]。导致肝脏脂质合成及代谢紊乱的因素很多，如不健康的生活方式、环境污染等，均能加剧 NAFLD 的发生发展[3]。流行病学调查显示吸烟是导致肝脏脂质代谢紊乱的主要危险因素[4]，香烟烟雾中多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbons，PAHs）具有潜在的干扰肝脏脂质代谢的作用，其暴露可以引起肝脏三酰甘油堆积[5]。BaP 是多环芳烃受体（aryl hydrocarbon receptor，AhR）的经典外源性配体，在没有配体存在的情况下，AhR 和分子伴侣 HSP90、p23、XAP2 形成无活性的复合物存在于细胞浆内[6]。当 BaP 和 AhR 结合后，AhR 与 ARNT 形成二聚体，转移到细胞核内，诱导其启动子中含有异生素反应元件（XRE）序列的基因的转录，例如细胞色素氧化酶 P4501A1（cytochrome P450 1A1，CYP1A1）等基因的激活[7-8]。目前关于 BaP 对肝脏脂质代谢影响的研究较少，所以本研究将探讨 BaP 对肝脏脂质合成的影响，明确 BaP 通过 AhR 影响肝脏脂质合成的分子机制。

在肝脏脂质代谢过程中，PPARγ 通过调控脂质代谢相关基因的表达，如 SCD1 和 CD36 进而影响肝脏脂肪变性[9]。CD36 易位到肝细胞质膜可能是肝脏脂肪变性的决定因素之一[10]。*CD36* 基因中含有 PPAR 反应元件，其中 PPARγ 作为脂肪生成过程中的“主要调节剂”，以特异性的方式调节游离脂肪酸转运体[11-13]。PPARγ、SCD1 和 CD36 在脂质合成中发挥重要作用，有研究显示 *SCD1* 和 *CD36* 基因上调会导致肝脏脂肪合成增加[14-15]，PPARγ 通过其对脂肪细胞活性的转录控制来调节全身脂质代谢和胰岛素敏感性[16]。本研究以上述三个基因作为脂肪生成及转运关键调控基因，研究 BaP 对肝脏脂质合成的影响，为寻找预防与治疗肝脏脂质代谢紊乱相关疾病的新靶标提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞株

C57BL/6 雄性小鼠 60 只，4 ～ 6 周龄，体质量（20±3）g [北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物质量合格证编号：SCXK（京）2020-0006，饲养于内蒙古医科大学新药安全评价研究中心]。人肝癌细胞株（HepG2，北京协和医科大学基础医学研究所）。

1.2 试药与仪器

苯并芘（BaP，美国 Sigma 公司）；谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）试剂盒（南京建成生物工程研究所）；过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ（PPARγ 抗体）、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）抗体、脂肪酸转运酶抗体（CD 36 抗体）、细胞色素氧化酶 P4501A1 抗体（CYP1A1 抗体）、β-actin [Abcam（上海）]；AhR 抑制剂 CH223191 [MCE（中国）]；反转录试剂盒 Rever Tra Ace qPCRRT Kit[天根生化科技（北京）有限公司]；Nanodrop 超微量分光光度计、Pikoreal 96 qPCR（美国 Thermo Scientific）。

1.3 实验分组及给药

普通饲料喂养一周后，将 60 只小鼠随机分为

空白组、溶剂对照组 [0.1 mL/（10 g • d）玉米油溶液]、BaP 低剂量组 [0.45 mg/（kg • d）BaP- 玉米油溶剂]、BaP 中剂量组 [0.9 mg/（kg • d）BaP- 玉米油溶剂]、BaP 高剂量组 [1.8 mg/（kg • d）BaP- 玉米油溶剂]，灌胃 12 周后进行取材及相关实验。

将 HepG2 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 中，放置于 37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱中培养。当细胞生长达到 80% ～ 90% 时，分别在各组加入 0.1、1、10 μmol • L^{-1} BaP；1 μmol • L^{-1} BaP ＋ 1 μmol • L^{-1} AhR 抑制剂（CH223191）、1 μmol • L^{-1}AhR 抑制剂，作用 24 h 后进行后续实验 [17]。

1.4　小鼠肝脏 ALT、AST 水平检测

取肝脏组织精确称量后放入匀浆机中研磨，匀浆机置于冰浴生理盐水中，然后 5000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液，使用试剂盒分别测定 ALT、AST 水平。

1.5　油红 O 染色法检测脂质含量

制备 8 μm 厚度肝脏冷冻切片，异丙醇清洗后使用油红 O 染色 10 min，Mayer 苏木素染核，封片观察，随后用 HALO 数字病理图像分析平台进行分析，根据肝组织的腺泡结构测算脂肪变的肝细胞百分比：5% ～ 33% 为轻度脂肪变，34% ～ 66% 为中度脂肪变，＞ 66% 为重度脂肪变 [18]。

1.6　qPCR 法测定 *PPARγ*、*SCD1*、*CD36*、*CYP1A1*、*β-actin* mRNA 的表达

使用 Trizol 试剂从肝脏和 HepG2 细胞制备总 RNA，合成 cDNA，按试剂盒说明进行 PCR，相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法处理。引物序列见表 1。

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequences

基因	上游引物	下游引物
PPARγ	5'-GCAGCTACGCTCCTTTCTTG-3'	5'-GCCCCTCTTTAGTGTCATGGATG-3'
SCD1	5'-ACTGTGGAGACGTGTTCTGGA-3'	5'-ACGGGTGTCTGGTAGACCTC-3'
CD36	5'-ATGGGCTGTGATCGGAACTG-3'	5'-GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC-3'
CYP1A1	5'-ACCCTTACAAGTATTTGGTCGT-3'	5'-GTCATCATGGTCATAACGTTGG-3'
β-actin	5'-CTACCTCATGAAGATCCTGACC-3'	5'-CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC-3'

1.7　PPARγ、SCD1、CD36、CYP1A1、β-actin 蛋白的表达

提取各组肝脏组织及细胞总蛋白，定量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，再将蛋白进行转膜，封闭，分别加入一抗和二抗孵育，结束后用红外荧光扫描成像系统进行扫膜，结果用 Image J 软件分析，以目标蛋白与内参 β-actin 条带的灰度值比值作为目标蛋白的相对表达水平。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism 7.0 对数据进行统计分析并作图。计量资料组间差异采用单因素方差分析法或非参数秩和检验法进行检验，数据采用（$\bar{x}\pm s$）表示，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　BaP 对肝脏脂质合成的影响

2.1.1　BaP 对小鼠肝脏组织中 ALT 和 AST 的影响

与空白组比，溶剂对照组中 ALT 和 AST 含量差异无统计学意义。与溶剂对照组相比，BaP 低、中和高剂量组中 ALT 含量显著升高；BaP 中、高剂量组中 AST 含量显著升高，见表 2。

表 2　不同剂量 BaP 对小鼠肝脏中 ALT 和 AST 含量的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effect of different doses of BaP on ALT and AST content in the mice liver（$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT/（U • L^{-1}）	AST/（U • L^{-1}）
空白组	55.42±9.68	54.12±8.028
溶剂对照组	68.97±5.987	63.42±4.609
低剂量 BaP 组	101.8±11.07*	71.36±3.945
中剂量 BaP 组	135.7±22.77**	94.45±17.77*
高剂量 BaP 组	176.6±27.58***	134.6±19.54***

注：与溶剂对照组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，***$P < 0.001$。

Note：Compared with the solvent control group，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，***$P < 0.001$.

2.1.2　BaP 对小鼠肝脏及 HepG2 细胞脂质聚积的影响　小鼠肝脏组织中 BaP 低、中和高剂量组的脂质聚集随着浓度的增加而增加。溶剂对照组与空白组相比，脂质聚集差异无统计学意义。与溶剂对照组相比，BaP 中、高剂量组脂质聚集明显（见图 1）。观察不同浓度的 BaP 对 HepG2 细胞中脂质聚集的影响。发现与空白组相比，随着 BaP 浓度的升高细胞脂质呈聚集状态，表明 BaP 会导致 HepG2 细胞中脂质的聚集（见图 2）。

2.1.3　BaP 对肝脏脂肪生成及转运相关基因影响

与空白组相比，溶剂对照组中 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 及蛋白表达差异均无统计学意义；BaP 低、中和高剂量组中 *CD36* 的 mRNA 及 PPARγ、SCD1 和 CD36 的蛋白表达升高，BaP 中、高剂量组中 *PPARγ*、*SCD1* 的 mRNA 表达升高。结果表明，BaP 可以促进小鼠肝脏组织中 PPARγ、SCD1 和 CD36 的表达，进而使肝脏脂肪变性，增加脂肪在肝脏的聚集（见图 3）。

如图 4 所示，与空白组相比，给予中、高剂

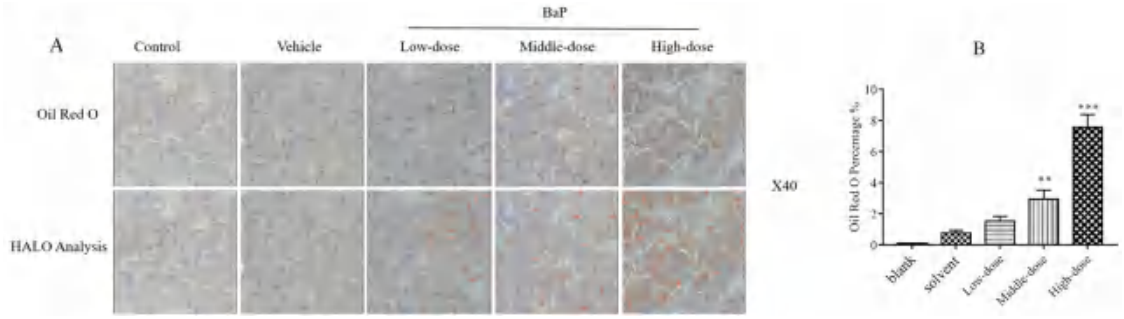


图 1 BaP 对小鼠肝脏组织中脂质聚集的影响

Fig 1 Effect of BaP on lipid aggregation in mice livers

注：与溶剂对照组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the solvent control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

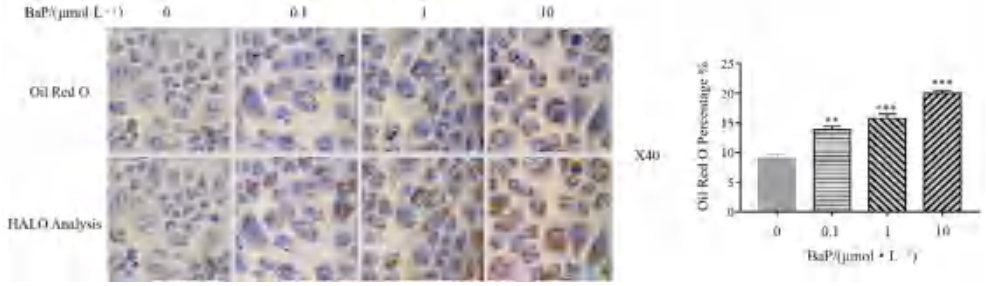


图 2 BaP 处理 HepG2 细胞后油红 O 染色结果

Fig 2 Oil red O staining of HepG2 cells treated with BaP

注：与空白组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

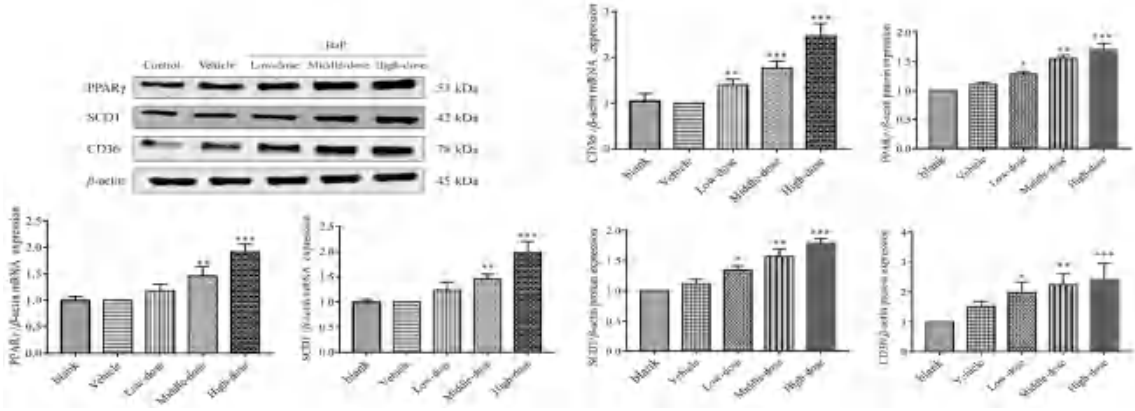


图 3 不同剂量的 BaP 对小鼠肝脏组织中 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of different doses of BaP on mRNA and protein expression of PPARγ，SCD1 and CD36 in the mice livers

注：与溶剂对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the solvent control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

量 BaP 均可促进 HepG2 细胞中 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 及蛋白表达增加。结果表明，BaP 可以促进 HepG2 细胞中 PPARγ、SCD1 和 CD36 的表达，进而促进 HepG2 细胞中脂肪生成及转运，使脂质聚集。

2.2 BaP 通过 AhR 对肝脏脂质合成的影响

2.2.1 BaP 对 CYP1A1 表达的影响 本研究通过检测 CYP1A1 的表达观察 BaP 是否激活 AhR，进而引起小鼠肝脏组织中 CYP1A1 表达，结果如图 5 所示。与空白组相比，溶剂对照组 CYP1A1 mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义。与溶剂对照组相比，BaP 低、中和高剂量组 CYP1A1 mRNA 表达显著升高，蛋白表达情况与 mRNA 的表达相似。

在 HepG2 细胞中，与空白组比较，中、高剂量 BaP 组 CYP1A1 mRNA 及蛋白表达显著升高（见图 6）。说明给予 HepG2 细胞中、高剂量 BaP 刺激可以激活 AhR 进而引起 CYP1A1 的表达。

2.2.2 抑制 HepG2 细胞中 AhR 后 BaP 对 CYP1A1 表达的影响 根据文献选定 AhR 抑制剂浓度为 1 μmol • L^{-1}[19]。根据本课题组前期研究结果采用

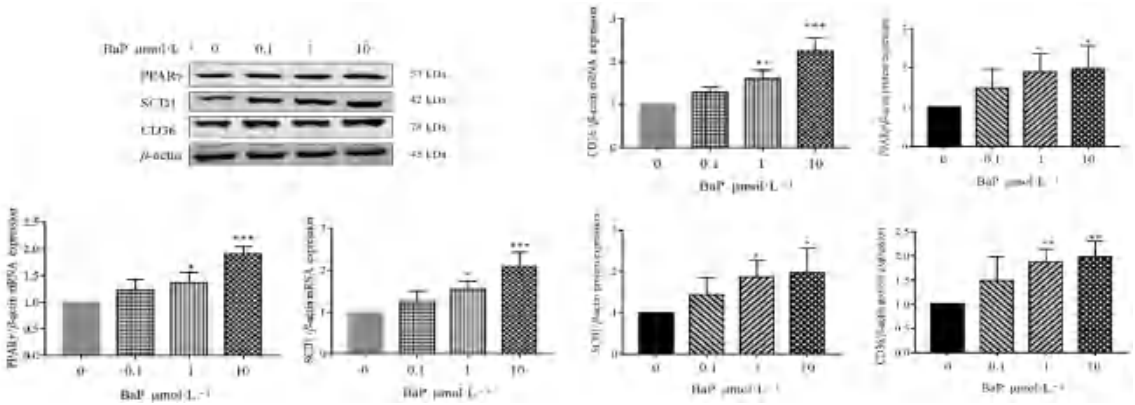


图 4　不同剂量的 BaP 处理 HepG2 细胞后对 PPARγ、SCD1 和 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响

Fig 4　Effect of different doses of BaP on mRNA and protein expression of PPARγ, SCD1 and CD36 in HepG2 cells

注：与空白组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

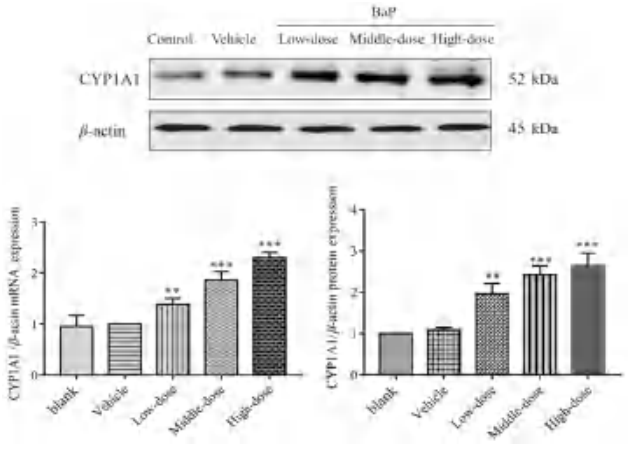


图 5　不同剂量 BaP 对小鼠肝脏中 CYP1A1 表达的影响

Fig 5　Effect of different doses of BaP on expression of CYP1A1 in mice livers

注：与溶剂对照组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the solvent control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

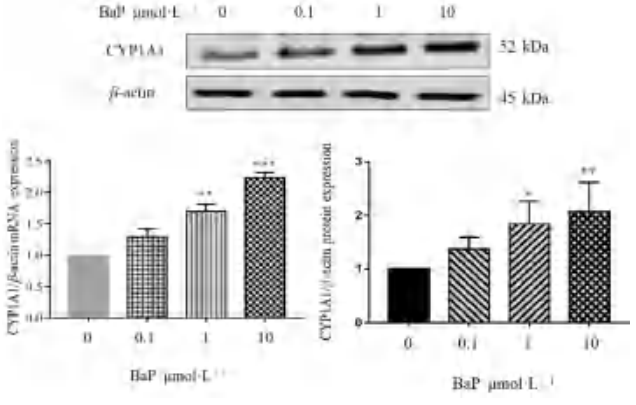


图 6　不同剂量 BaP 对 HepG2 细胞中 CYP1A1 表达的影响

Fig 6　Effect of different doses of BaP on expression of CYP1A1 in HepG2 cells

注：与空白组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

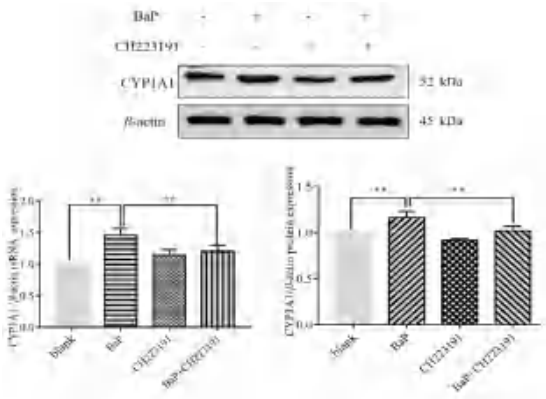


图 7　抑制 HepG2 细胞中 AhR 后 BaP 对 CYP1A1 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig 7　Effect of BaP on CYP1A1 mRNA and protein expression after the inhibition of AhR in HepG2 cells

注：与 BaP 组相比，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the BaP group，$^{**}P < 0.01$.

1 μmol • L^{-1} BaP 进行后续实验。结果如图 7 所示，与空白组相比，BaP 组的 CYP1A1 mRNA 及蛋白表达均升高；BaP ＋ CH223191 组与 BaP 组相比，CYP1A1 表达降低。因此，采用 1 μmol • L^{-1} CH223191 与 1 μmol • L^{-1} BaP 进行后续实验。

2.2.3　抑制 HepG2 细胞中 AhR 后 BaP 对脂质聚集的影响　如图 8 所示，与空白组相比，BaP 组脂质含量显著升高。BaP ＋ CH223191 组与 BaP 组相比，脂质含量明显降低。结果表明 BaP 通过 AhR 影响 HepG2 细胞中脂质聚集。

2.2.4　抑制 HepG2 细胞中 AhR 后 BaP 对脂肪生成及转运相关基因的影响　如图 9 所示，与空白组相比，BaP 组 的 PPARγ、SCD1 和 CD36 mRNA 及 蛋白表达显著升高。BaP ＋ CH223191 组与 BaP 组相比，PPARγ、SCD1 和 CD36 表达显著降低。结果表明 BaP 通过 AhR 影响 HepG2 细胞中脂肪生成及转运相关基因的表达。

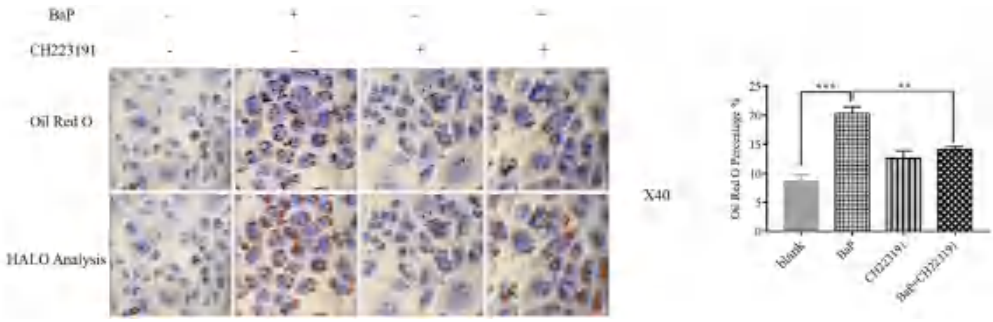


图 8 抑制 HepG2 细胞中 AhR 后油红 O 染色结果

Fig 8 Oil red O staining result after the inhibition of AhR in HepG2 cells

注：与 BaP 组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the BaP group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

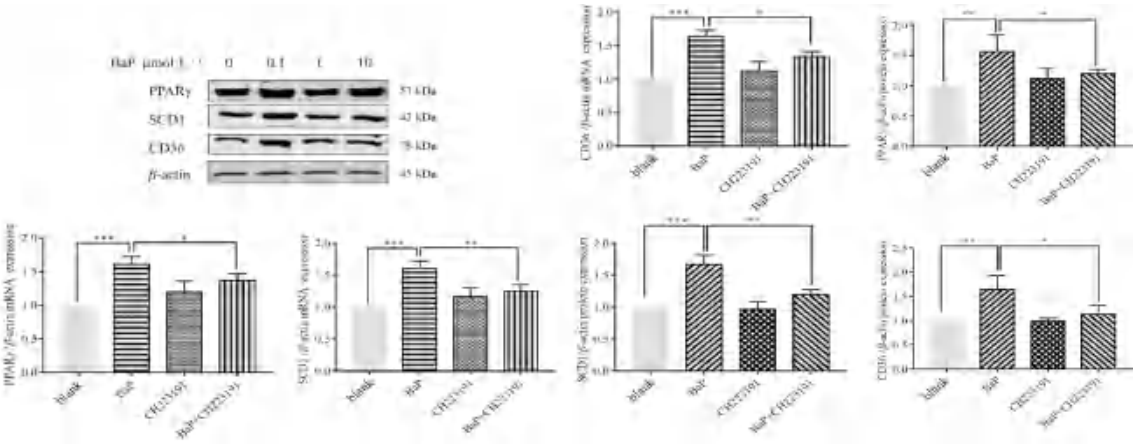


图 9 抑制 HepG2 细胞中 AhR 后 BaP 对 PPARγ、SCD1 和 CD36 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig 9 Effect of BaP on PPARγ and SCD1 and CD36 expressions after the inhibition of AhR in HepG2 cells

注：与 BaP 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the BaP group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

3 讨论

肝脏中脂质代谢的改变是肝脏疾病发展的关键，随着肥胖症和相关代谢综合征发病率的增加，NAFLD 已成为慢性肝病的重要病因 [20]。本研究中发现 BaP 可引起小鼠肝脏组织 ALT、AST 的显著升高，ALT、AST 水平是肝脂肪变性的最佳生化相关因素 [20]。同时有研究表明，吸烟人群患 NAFLD 的风险增加并且吸烟导致 AST、ALT 升高 [21-22]。BaP 是烟草烟雾中的 PAHs 之一 [23]，具有致畸、致癌、致突变等特性，是日常生活中常接触到的环境污染物，因此明确其对肝脏脂质合成的影响及作用机制对降低 NAFLD 发病率至关重要。

本实验采用 qPCR 法、Western blot 法检测小鼠肝脏组织及 HepG2 细胞中脂肪生成及转运相关基因 *PPARγ*、*SCD1* 和 *CD36*，结果显示给予 BaP 刺激可以促进 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 和蛋白的表达，结合体内外实验结果发现 BaP 通过诱导 PPARγ、SCD1 和 CD36 的 mRNA 和蛋白的表达进而使脂质聚集。PAHs 通过促进血液摄取或肝脏中的脂质合成及转化来诱导肝脂质的改变，可能导致 NAFLD、肝细胞膜损伤、炎症和信号传导紊乱 [24]。有研究显示，PAHs 可以上调小鼠肝脏脂肪中转录相关基因表达如 PPARγ[25]，PAHs 中 BaP 是 AhR 的配体，AhR 与 PPARγ 之间存在串扰且 AhR 过表达能够降低 PPARγ 的稳定性并抑制脂肪细胞的分化 [26-27]。另有研究显示，吸烟能够使 CD36 和 SCD1 表达水平升高 [28-29]，CD36 的表达在肝脏中具高诱导性且与肝组织中 TG 含量增加成正相关 [30-31]，另外 SCD1 过表达也可使 TG 合成增加，SCD1 的缺失可加重肝细胞凋亡及肝损伤 [32]，与本研究结果一致。本研究通过检测 CYP1A1 的表达来观察 BaP 影响脂质合成的同时是否激动 AhR，进一步证实 AhR 在这些过程中的重要作用，明确了 BaP 通过 AhR 影响肝脏脂质合成的分子机制。

综上，本实验通过研究 BaP 对肝脏脂质合成的影响，以一个全新的角度解释了肝脏脂质聚集等代谢疾病与 BaP 之间的联系，为治疗由 BaP 引起的 NAFLD 提供了实验依据，对于预防及治疗肝脏脂质代谢紊乱等相关疾病具有重要意义。

参考文献

[1] Clark JM，Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease：an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis [J]. JAMA，2003，289（22）：3000-3004.

[2] Powell EE，Wong VW，Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Lancet，2021，397（10290）：2212-2224.

[3] Iqbal J，Al Qarni A，Hawwari A，et al. Metabolic syndrome，dyslipidemia and regulation of lipoprotein metabolism [J]. Curr Diabetes Rev，2018，14（5）：427-433.

[4] Kotlyarov S，Kotlyarova A. Molecular mechanisms of lipid metabolism disorders in infectious exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Mol Sci，2021，22（14）：7634.

[5] Guo J，Wang C，Guo Z，et al. Exposure to environmental level phenanthrene induces a NASH-like phenotype in new born rat [J]. Environ Pollut，2018，239：261-271.

[6] Sato S，Shirakawa H，Tomita S，et al. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis，lipogenesis，and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2008，229（1）：10-19.

[7] Tsay JJ，Tchou-Wong KM，Greenberg AK，et al. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer [J]. Anticancer Res，2013，33（4）：1247-1256.

[8] Cox MB，Miller CA. Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling [J]. Cell Stress Chaperones，2004，9（1）：4-20.

[9] Wang F，Mullican SE，DiSpirito JR，et al. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARγ [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2013，110（46）：18656-18661.

[10] Rada P，Gueda GR，Carmelo GM，et al. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis：is CD36 a key driver?[J]. Cell Death Dis，2020，11（9）：802.

[11] Motojima K. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue and inducer-specific manner [J]. J Biol Chem，1998，273（27）：16710-16714.

[12] Issa N，Lachance G，Bellmann K，et al. Cytokines promote lipolysis in 3T3-L1 adipocytes through induction of NADPH oxidase 3 expression and superoxide production [J]. J Lipid Res，2018，59（12）：2321-2328.

[13] Lopes HF，Corrêa-Giannella ML，Consolim-Colombo FM，et al. Visceral adiposity syndrome [J]. Diabetol Metab Syndr，2016，19（8）：40.

[14] Zhu X，Bian H，Wang L，et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. Free Radic Biol Med，2019，141：192-204.

[15] Shen X，Liang X，Ji X，et al. CD36 and DGAT2 facilitate the lipid-lowering effect of chitooligosaccharides via fatty acid intake and triglyceride synthesis signaling [J]. Food Funct，2021，12（18）：8681-8693.

[16] Lodhi IJ，Semenkovich CF. Peroxisomes：a nexus for lipid metabolism and cellular signaling [J]. Cell Metab，2014，19（3）：380-392.

[17] Yi T，Liu M，Li X，et al. Benzo（a）pyrene inhibits endometrial cell apoptosis in early pregnant mice via the WNT5A pathway [J]. J Cell Physiol，2019，234（7）：11119-11129.

[18] Brunt EM，Janney CG，Di Bisceglie AM，et al. Nonalcoholic steatohepatitis：a proposal for grading and staging the histological lesions [J]. Am J Gastroenterol，1999，94（9）：2467-2474.

[19] Mohammadi-Bardbori A，Omidi M，Arabnezhad MR，et al. Impact of CH223191-Induced mitochondrial dysfunction on its aryl hydrocarbon receptor agonistic and antagonistic activities [J]. Chem Res Toxicol，2019，32（4）：691-697.

[20] European Association for the Study of the Liver（EASL），European Association for the Study of Diabetes（EASD），European Association for the Study of Obesity（EASO）. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol，2016，64（6）：1388-1402.

[21] Lee BW，Lee YH，Park CY，et al. Non-Alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus：a position statement of the fatty liver research group of the Korean diabetes association [J]. Diabetes Metab J，2020，44（3）：382-401.

[22] Suzuki A，Lindor K，Saver JS，et al. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol，2005，43（6）：1060-1066.

[23] Hamabe A，Uto H，Imamura Y，et al. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period [J]. J Gastroenterol，2011，46（6）：769-778.

[24] Zhou G. Tobacco，air pollution，environmental carcinogenesis，and thoughts on conquering strategies of lung cancer [J]. Cancer Biol Med，2019，16（4）：700-713.

[25] Li F，Xiang B，Jin Y，et al. Hepatotoxic effects of inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on lipid metabolism of C57BL/6 mice [J]. Environ Int，2020，134：105000.

[26] Curran CS，Kopp JB. Aryl hydrocarbon receptor mechanisms affecting chronic kidney disease [J]. Front Pharmacol，2022，13：782199.

[27] Dou H，Duan Y，Zhang X，et al. Aryl hydrocarbon receptor（AhR）regulates adipocyte differentiation by assembling CRL4B ubiquitin ligase to target PPARγ for proteasomal degradation [J]. J Biol Chem，2019，294（48）：18504-18515.

[28] Jin Y，Miao W，Lin X，et al. Sub-chronically exposing mice to a polycyclic aromatic hydrocarbon increases lipid accumulation in their livers [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2014，38（2）：353-363.

[29] Momeni-Moghaddam MA，Asadikaram G，Nematollahi MH，et al. Effects of cigarette smoke and opium on the expression of CD9，CD36，and CD68 at mRNA and protein levels in human macrophage cell line THP-1[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol，2020，19（1）：45-55.

[30] Inoue M，Ohtake T，Motomura W，et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun，2005，336（1）：215-222.

[31] Steneberg P，Sykaras AG，Backlund F，et al. Hyperinsulinemia enhances hepatic expression of the fatty acid transporter CD36 and provokes hepatosteatosis and hepatic insulin resistance [J]. J Biol Chem，2015，290（31）：19034-19043.

[32] Cazanave SC，Gores GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis [J]. Clin Lipidol，2010，5（1）：71-85.

（收稿日期：2022-09-26；修回日期：2022-11-07）

基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的桃核承气汤化学成分快速鉴定

张瑶[1]，葛飞[1]，申冰清[2]，罗亚敏[1]，侯鉴宸[1]，潘菽陔[1]，王春国[2*]，邱月华[1]，陶晓华[1*]（1.北京中医药大学中医学院，北京 102401；2.北京中医药大学北京中医药研究院，北京 102401）

摘要：目的 通过 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术联合分子网络方法快速鉴定桃核承气汤的化学成分。**方法** 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱，以 0.1% 甲酸水 - 乙腈为流动相进行梯度洗脱，采集正负离子模式下高分辨质谱数据，并根据 MS/MS 碎片模式相似性创建分子网络。依据保留时间、高分辨精确分子量、MS/MS 碎片等信息，结合对照品数据鉴定桃核承气汤全方化学成分。**结果** 桃核承气汤中共鉴定出 83 种化学成分，黄酮类 23 种，有机酸类 12 种，蒽醌类 10 种，皂苷类 10 种，苯丙素类 8 种，生物碱类 7 种，氨基酸类 4 种，其他 9 种。其中，穿心莲内酯、大豆苷元、淫羊藿素、矢车菊素 -3-*O*- 葡萄糖苷 4 种成分为桃核承气汤复方中首次发现的化合物。**结论** 桃核承气汤成分多样，主要含有黄酮类、蒽醌类、皂苷类、有机酸类等成分，该研究可为桃核承气汤成分分析、质量控制、临床应用等提供参考。

关键词：桃核承气汤；化学成分；超高效液相色谱串联四极杆轨道阱高分辨率质谱
中图分类号：R284.1，R932 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0028-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.005

Rapid identification of chemical constituents in Taohe Chengqi decoction based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

ZHANG Yao[1], GE Fei[1], SHEN Bing-qing[2], LUO Ya-min[1], HOU Jian-chen[1], PAN Shu-tao[1], WANG Chun-guo[2*], QIU Yue-hua[1], TAO Xiao-hua[1*] (1. *School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing* 102401; 2. *Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102401)

Abstract: Objective To rapidly identify the chemical constituents in Taohe Chengqi decoction by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS combined with molecular network. **Methods** ACQUITY UPLC HSS T3 column was used. Gradient elution was performed with 0.1% formic acid water-acetonitrile as the mobile phase. High-resolution mass spectrometry data were collected in the positive and negative ion modes, and molecular networks were created based on the similarity of MS/MS fragmentation modes. Based on the retention time, high-resolution accurate molecular weight, MS/MS fragmentation and other information, combined with reference substance data, the chemical components in Taohe Chengqi decoction were identified. **Results** Totally 83 chemical components were identified, including 23 flavonoids, 12 organic acids, 10 anthraquinones, 10 saponins, 8 phenylpropanoids, 7 alkaloids, 4 amino acids, 9 kinds of others. Four compounds (andrographolide, daidzein, icaritin, and kuromanin) were discovered for the first time in Taohe Chengqi decoction. **Conclusion** Taohe Chengqi decoction consists of various components, mainly flavonoids, anthraquinones, saponins, organic acids and others. This study provides reference and scientific basis for the component analysis, quality control and clinical application of Taohe Chengqi decoction.

Key words: Taohe Chengqi decoction; chemical constituent; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项（No. 2018ZX09721005-007-015）；北京中医药大学科研横向发展基金课题（No. 2021-HXFZJJ-008）。

作者简介：张瑶，男，在读硕士研究生，主要从事《伤寒论》病证辨证规律研究，email：yaozhang1861@126.com *通信作者：陶晓华，男，教授，博士研究生导师，主要从事《伤寒论》病证辨证规律研究，email：xhtao1963@126.com；王春国，男，实验师，主要从事中药药效物质和作用机制研究，email：wangcg1119@126.com

桃核承气汤出自东汉时期《伤寒论》，由桃仁、大黄、桂枝、芒硝和炙甘草组成，国家中医药管理局将其列为推动复方制剂的首批古代经典名方之一[1]。该方作用广泛，疗效突出，临床常被用于糖尿病及其并发症、中风、慢性肾衰竭、消化系统、骨伤科、妇科、五官科、皮肤科等疾病的治疗和研究[2]。现代药理研究证明该方具有降低血糖和血脂[3]、抗炎、抗氧化、抗纤维化、保护血管、改善血液流变[4-5]等作用。方中所含化学成分复杂，分析鉴定其化合物有助于明确该方药效物质，为中药复方制剂、质量控制等研究奠定基础。目前，该方化学成分的研究多为其核心成分的指认和单味药成分的鉴定[6-7]，而全方成分研究中仅鉴定出 26 种物质[8]，有待进一步研究。

UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术具有高分辨率、高灵敏度、高分离度等优异性能，可同时快速分辨物质裂解的一级质谱和二级质谱信息，能有效应对复杂方药化学成分定性定量研究[9-10]。全球自然产物社会分子网络平台可基于化合物碎片模式相似性创建分子网络，对化合物进行聚类和可视化分析，有助于更快更全面地推测未知化合物的结构类型[11]。本研究联合 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术和分子网络建立桃核承气汤提取物中化学成分快速鉴定的方法，并对其成分进行全面表征。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱与质谱联用仪（UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS，配有热喷雾离子源（HESI）、Xcalibur 4.1 质谱工作站、Vanquish 超高效液相色谱系统（含二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器）（美国 Thermo Scientific 公司）。Millipore Synergy UV 型超纯水机（美国 Millipore 公司）；十万分之一电子分析天平 [赛多利斯科学仪器（北京）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）；Centrifuge 5420 型微量离心机（德国 Eppendorf 公司）。

1.2 试药

甲酸、甲醇、乙腈（质谱级美国 Thermo Fisher 公司）；桃核承气汤配方颗粒 [北京康仁堂药业有限公司，大黄（批号：21028091）、桃仁（批号：21005872）、桂枝（批号:21029481）、炙甘草（批号：21025481）、芒硝（批号:21027551）]；柚皮素（批号：Y03001908013）、大黄酚（批号：D01711806020）、肉桂酸（批号：R00311812016）、甘草酸（批号：G00402007002）、原儿茶素（批号：Y03111812016）、白杨素（批号：B00111804027）对照品（成都瑞芬思生物科技有限公司，纯度≥ 98%）。

2 方法

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）-乙腈溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 7 min，1%B；7 ～ 20 min，1% ～ 22%B，20 ～ 35 min，22% ～ 60%B；35 ～ 45 min，60% ～ 95%B；45 ～ 46 min，95% ～ 1%B；46 ～ 50 min，1%B）；流速：0.3 mL • min^{-1}；柱温：35 ℃；进样量：5 μL。

2.2 质谱条件

正负离子同时扫描：HESI 离子源；离子源温度：400 ℃；电离源电压：3.5 kV（正离子模式）、3 kV（负离子模式）；毛细管温度：320 ℃；管透镜电压：55 V；鞘气和辅助气均为高纯氮气（纯度＞ 99.99%），鞘气流速：35 arb，辅助气流速：10 arb；扫描模式 Full MS/dd-MS^2：Full MS 分辨率 70 000，dd-MS^2 分辨率 17 500；扫描范围设为 *m/z* 120 ～ 1800 Da；碰撞能 30、35、40 eV。

2.3 供试品溶液制备

精确称量桃核承气汤颗粒 4 g，移入具塞 100 mL 锥形瓶中，加入 50% 甲醇，定容到 100 mL，封口，超声处理 30 min。提取液静置放凉，取适量溶液 12 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，取滤液放置于进样小瓶中，即得供试品溶液。

2.4 对照品溶液制备

精密称取柚皮素、大黄酚、肉桂酸、甘草酸、原儿茶素、白杨素对照品各 1 mg，加甲醇配制成 2 mL 混合对照品溶液，离心后取上清即得。

2.5 质谱分析

采用 Xcalibur 4.1 软件对质谱原始数据进行处理。通过分析化学成分保留时间、高分辨精确分子量、MS^2 二级碎片等信息，结合对照品相关数据、Chemspider 数据库及相关文献，对成分进行指认。

2.6 分子网络构建方法

使用 MsConvert 软件将 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 所测原始数据转换为 mzXML 格式，并上传至 GNPS 生成分子网络，运用 Cytoscape 3.7.2 软件将分析结果可视化。

3 结果

桃核承气汤提取物正、负离子总离子流图见图 1A、B。对其成分进行指认，共鉴定出 83 种化学成分，包含 4 种在桃核承气汤中首次发现的成分：穿心莲内酯、大豆苷元、淫羊藿素、矢车菊素 -3-*O*- 葡萄糖苷，详细信息见表 1。其中，黄酮类、蒽醌类、皂苷类和有机酸类化合物为该方

主要成分，详见图 1C。正负离子模式分别检出 72 种和 48 种化合物，见图 1D。

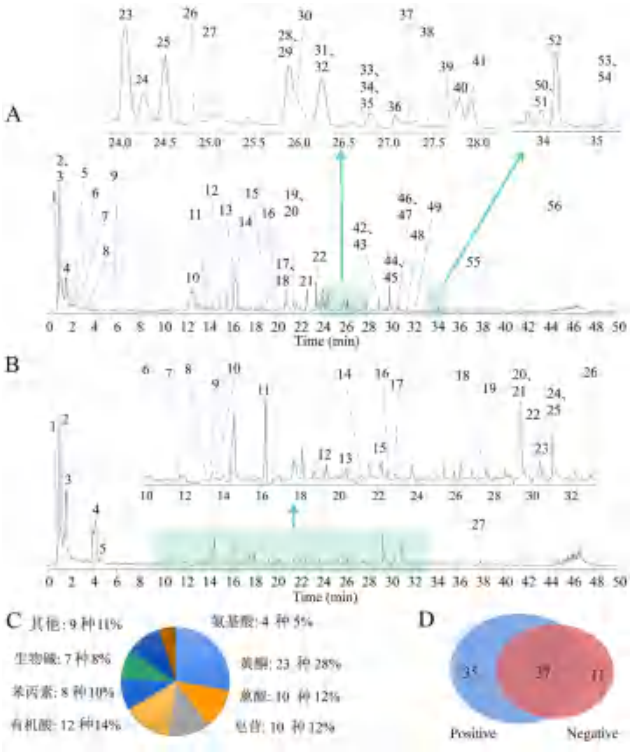


图 1 桃核承气汤化学成分鉴定结果

Fig 1 Chemical components of Taohe Chengqi decoction

A. 正离子模式下总离子流图（total ion current map in positive ion mode）；B. 负离子模式下总离子流图（total ion current map in negative ion mode）；C. 化合物类型（chemical type）；D. 正负离子检测模式下化合物数目（number of compounds in positive or negative ion detection mode）

注（Note）：正（A）、负（B）离子模式下的峰号与表 1 序号中完全对应（The peak number in the positive and negative ion modes corresponds to the serial number in Table 1）。

3.1 黄酮类成分鉴定

黄酮类成分共指认出 23 种，正离子模式下鉴定出 22 种，负离子模式下鉴定出 16 种。其中，柚皮素、甘草素分别为桃仁、炙甘草的主要黄酮类成分之一，本文以柚皮素和甘草素为例，详细介绍黄酮类成分鉴定过程。

峰 18 在负离子模式下，保留时间为 27.61 min，显示准分子离子峰为 *m/z* 271.0613 $[M-H]^-$，元素组成为 $C_{15}H_{12}O_5$（质量误差 2.44×10^{-6}）。在 MS/MS 中产生 *m/z* 271.06、177.02、151.00、109.03、107.01、93.03 等碎片离子，见图 2A。其中 *m/z* 151.00、119.05 离子碎片为黄酮苷元 RDA^{1,3}A$^-$裂解生成的典型互补离子对，因此推测峰 18 为黄酮类化合物。*m/z* 151.00 脱去一分子 CO_2 形成 *m/z* 107.01 特征碎片离子。通过分析对照品柚皮素在 HESI 负离子模式的准分子离子峰、MS/MS 离子碎片和保留时间（见图 2B），发现峰 18 与该对照品一致，由此鉴定峰 18 为柚皮素，其裂解过程见图 2C。

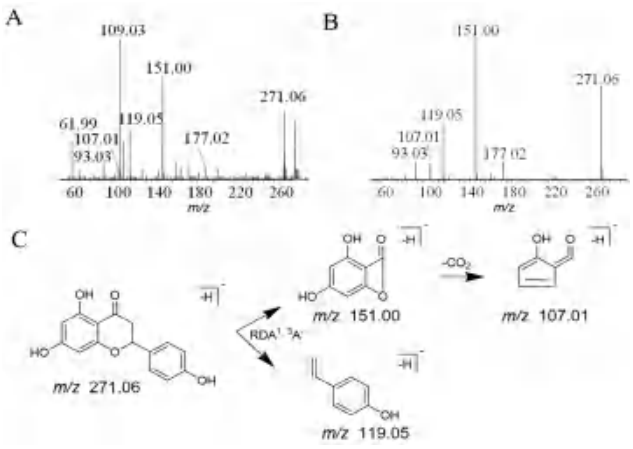


图 2 峰 18（A）、柚皮素对照品（B）的 MS/MS 质谱图及质谱裂解行为（C）

Fig 2 MS/MS mass spectra and mass spectrometry fragmentation behavior（C）of peak 18（A）and naringenin reference substance（B）

峰 27 在负离子模式下，保留时间为 37.98 min，显示准分子离子峰为 *m/z* 255.0652 $[M-H]^-$，元素组成为 $C_{15}H_{12}O_4$（质量误差 -2.17×10^{-6}）。在 MS/MS 中产生 *m/z* 153.02、135.01、119.05、91.02 等碎片离子，见图 3A。母核 *m/z* 255.0652 进行 RDA^{1,3}A$^-$裂解，产生 *m/z* 135.01 和 119.05 离子碎片，其中母核 *m/z* 135.01 再丢失一分子 CO_2，可产生 *m/z* 91.02 碎片，其裂解过程见图 3B。通过与文献中甘草素[12]准分子离子峰、MS/MS 离子碎片进行对比，发现峰 27 与该化合物一致，由此鉴定峰 27 为甘草素。

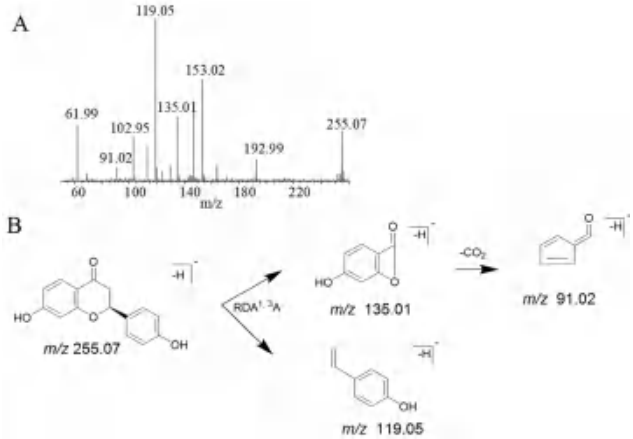


图 3 峰 27 的 MS/MS 质谱图（A）及甘草素质谱裂解行为（B）

Fig 3 MS/MS mass spectrum of peak 27（A）and mass spectrometry fragmentation behavior（B）of liquiritigenin

3.2 蒽醌类成分鉴定

蒽醌类成分共指认出 10 种，正负离子模式下各鉴定出 8 种，以大黄主要成分大黄酚和大黄酸为例介绍蒽醌类化合物的详细鉴定过程。

峰 20 在负离子模式下，保留时间为 29.44 min，显示准分子离子峰为 *m/z* 253.0506 $[M-H]^-$，元素组成为 $C_{15}H_{10}O_4$（质量误差 2.15×10^{-6}）。在 MS/MS

中产生 *m/z* 253.05、225.06、182.99、153.02、119.05 等碎片离子，见图 4A。母离子 *m/z* 253.05 失去一分子 CO，形成 *m/z* 225.06 碎片离子，再失去一分子 CH_3CO，形成 *m/z* 182.99 碎片离子，再失去一分子 CO，形成 *m/z* 153.02 碎片离子。通过分析对照品大黄酚在 HESI 负离子模式的准分子离子峰、MS/MS 离子碎片（见图 4B），发现峰 20 与该对照品一致，由此鉴定峰 20 为大黄酚，其裂解过程见图 4C。

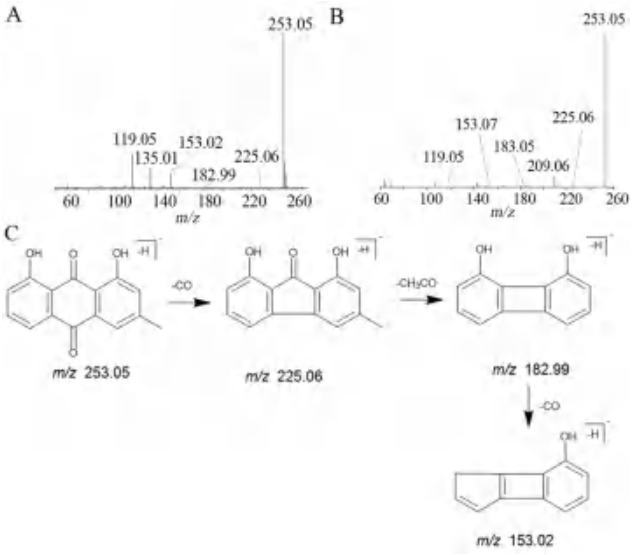


图 4　峰 20（A）、大黄酚对照品（B）的 MS/MS 质谱图及质谱裂解行为（C）

Fig 4　MS/MS mass spectrum and mass spectrometry fragmentation behavior（C）of peak 20（A）and chrysophanol reference substance（B）

峰 24 在负离子模式下，其保留时间为 31.10 min，显示准分子离子峰为 *m/z* 283.0254 $[M-H]^-$，元素组成为 $C_{15}H_8O_6$（质量误差 2.04×10^{-6}）。在 MS/MS 中产生 *m/z* 283.03、257.05、239.04、227.04、211.04、183.05 等碎片离子，见图 5A。其母离子 *m/z* 283.02 失去一分子 CO_2 生成 *m/z* 239.04 的离子碎片，再失去一分子 CO，生成碎片 *m/z* 211.04，再失去一分子 CO，生成碎片 *m/z* 183.05。通过与文献中大黄酸的特征碎片对比 [13]，发现峰 24 与大黄酸一致，由此鉴定峰 24 为大黄酸，其裂解过程见图 5B。

3.3　皂苷类成分鉴定

皂苷类成分共指认出 10 种，正离子模式下鉴定出 10 种。其中，皂苷类成分主要来源于炙甘草，而甘草酸是其主要成分之一，本文以甘草酸为例，详细介绍皂苷类成分鉴定过程。

峰 44 在正离子模式下，其保留时间为 29.95 min，显示准分子离子峰 *m/z* 823.4127 $[M+H]^+$，元素组成为 $C_{42}H_{62}O_{16}$（质量误差 0.42×10^{-6}），在 ESI-MS/MS 显示的碎片离子主要有 *m/z* 471.35、453.34、407.33、357.24、311.24 等，见图 6A。其中碎片离子 *m/z* 471.35 为甘草酸准分子离子峰丢

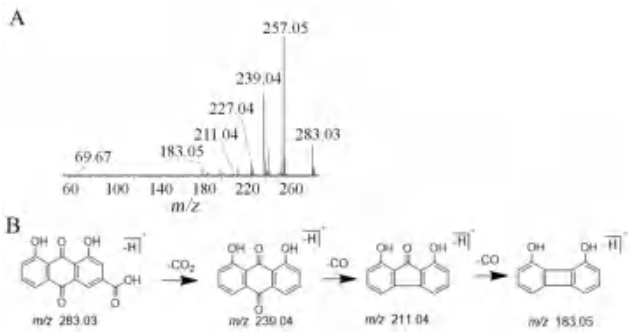


图 5　峰 24 的 MS/MS 质谱图（A）及大黄酸质谱裂解行为（B）

Fig 5　MS/MS mass spectrum of peak 25（A）and mass spectrometry fragmentation behavior of rhein（B）

失 2 分子葡萄糖醛酸（2GlcA），进一步丢失分子 H_2O 形成碎片离子 *m/z* 453.34，再丢失一分子 $COOH_2$ 形成碎片离子 *m/z* 407.33。而 *m/z* 357.24 为甘草酸脱去苷元后葡萄糖醛酸残基形成的碎片离子，进一步丢失一分子 $COOH_2$ 形成碎片离子 *m/z* 311.24。通过分析对照品甘草酸的 MS/MS 离子碎片（见图 6B），发现峰 44 与该对照品一致，由此鉴定峰 44 为甘草酸，其裂解过程见图 6C。

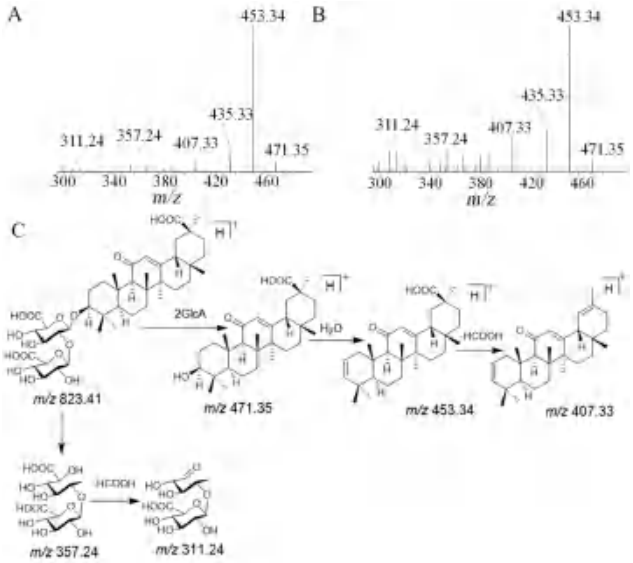


图 6　峰 44（A）和甘草酸对照品（B）的 MS/MS 质谱图及质谱裂解行为（C）

Fig 6　MS/MS mass spectrum of peak 44（A）and glycyrrhizic acid reference substance（B）and its mass spectrometry fragmentation behavior（C）

3.4　基于 MS/MS 关联的分子网络补充鉴定桃核承气汤化学成分

在上述化合物质谱裂解规律的基础上，采用基于 MS/MS 关联的分子网络进一步分析桃核承气汤的化学成分。基于 MS/MS 碎片模式的相似性，桃核承气汤化学成分聚集数目最高的分子网络多具有皂苷类化合物的碎片特征。以标准品甘草酸为种子节点，通过 MS/MS 碎片和节点间质

量差异对化合物进行注释，主要簇被注释为甘草皂苷 B_2、甘草皂苷 E_2、甘草皂苷 J_2、甘草皂苷 G_2、22-羟基甘草皂苷 G_2、乌拉尔甘草皂苷 D、乌拉尔甘草皂苷 F 和甘草皂苷 A_3，见图 7。将所鉴定成分作为“种子”进一步对其他未知成分进行推测和鉴定，最终在桃核承气汤中共鉴定到 10 种皂苷化合物，见表 1[14-45]。

表 1　UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 鉴定的桃核承气汤化学成分

Tab 1　Compounds of Taohe Chengqi decoction identified by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

No.	t_R/min	分子式	离子模式	实测值	理论值	误差/$\times10^{-6}$	二级碎片（MS/MS）	推测成分		分类	中药
								英文	中文		
1	0.84	Na_2O_4S	＋	141.9314	141.9312	1.34	131.97、113.96、90.95、72.94	sodiumsulfate	硫酸钠[14]	其他	芒硝
2	1.03	$C_6H_{11}NO_2$	＋	129.0792	129.0789	1.79	130.09、112.09、84.08、70.07	3-pyrrolidineaceticacid	3-吡咯烷乙酸[15]	有机酸	桃仁
3	1.14	$C_6H_{14}N_4O_2$	＋	174.1118	174.1116	0.73	175.12、158.09、130.10、116.07、70.07、60.06	arginine	精氨酸[16]	氨基酸	桃仁
4	1.73	C_8H_9NO	＋	135.0685	135.0684	0.97	136.06、119.05、91.05、	glicophenone	甘苯酮[17]	生物碱	炙甘草
5	2.15	$C_6H_{13}NO_2$	＋	131.0948	131.0946	1.46	132.10、87.10、86.10、70.53	isoleucine	异亮氨酸[16]	氨基酸	桃仁
6	2.22	$C_9H_{11}NO_3$	＋	181.0740	181.0738	1.11	165.05、147.04、136.08123.04、119.05	tyrosine	酪氨酸[16]	氨基酸	桃仁
7	2.49	C_8H_8O	＋	120.0578	120.0575	2.71	121.07、103.05、93.07、91.05	acetophenone	苯乙酮[18-19]	其他	桂枝、炙甘草
8	3.35	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	＋	267.0969	267.0967	0.70	268.10、136.06	adenosine	腺苷[16]	生物碱	桃仁
9	5.59	$C_9H_{11}NO_2$	＋	165.0791	165.0789	1.12	166.09、131.05、120.08	*N*-methoxy-*N*-methyl-benzamide	*N*-甲基-*N*-甲基苯甲酰胺[20]	生物碱	桂枝
10	12.70	$C_{20}H_{29}NO_{12}$	＋	475.1694	475.1689	0.94	152.07、134.06、106.07、85.03	mandelicacidamide-*β*-gentiobioside	扁桃酸酰胺-*β*-龙胆二糖苷[15]	生物碱	桃仁
11	14.05	$C_7H_6O_3$	＋	138.0319	138.0316	1.52	147.42、139.04、138.05、20.04、111.04、94.07	4-hydroxybenzoicacid	对羟基苯甲酸[20]	有机酸	桂枝
12	15.46	$C_{30}H_{26}O_{12}$	＋	578.1429	578.1424	0.82	287.05、271.06、163.04、139.04、127.04、123.04	procyanidin B_1	原花青素 B_1[21]	其他	大黄
13	16.20	$C_{15}H_{14}O_6$	＋	290.0792	290.0790	0.59	165.05、147.04、136.08、123.04、119.05	catechinhydrate	儿茶素[21]	黄酮	大黄、桂枝
14	16.48	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	＋	457.1579	457.1584	－0.95	296.11、158.06、145.04、127.03、85.02	amygdalin	苦杏仁苷[8]	生物碱	桃仁
15	19.37	$C_{21}H_{20}O_9$	＋	416.1096	416.1107	－2.73	303.09、255.06、151.04、139.04、127.04	chrysophanein	大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷[21]	蒽醌	大黄
16	20.03	$C_{15}H_{10}O_7$	＋	302.0414	302.0426	－3.85	261.07、193.04、163.03、137.02、123.04	quercetin	槲皮素[22-23]	黄酮	大黄、桃仁
17	20.77	$C_{15}H_{10}O_5$	＋	270.0534	270.0528	2.32	271.06、253.05、241.05、225.05	genistein	金雀异黄酮[24]	黄酮	炙甘草
18	20.78	$C_{22}H_{28}O_8$	＋	420.1785	420.1784	0.26	259.10、249.11、217.05、189.05	lyoniresinol	南烛木树脂酚[25]	苯丙素	桂枝
19	21.54	$C_9H_8O_2$	＋	148.0527	148.0524	1.84	149.02、131.05、103.05	cinnamicacid	肉桂酸[20]	苯丙素	桂枝
20	21.54	$C_{15}H_{18}O_7$	＋	310.1053	310.1052	0.20	275.09、149.06、131.05、81.03	cinnamoyl-glucose	桂皮酰葡萄糖[26]	有机酸	大黄
21	22.78	$C_{21}H_{20}O_{11}$	＋	448.1005	448.1005	0.05	287.05、163.04、127.04、85.03	kuromanin	矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷[27]	其他	首次发现
22	22.99	$C_9H_6O_2$	＋	146.0370	146.0367	1.75	147.04、103.05、91.05	coumarin	香豆素[20]	苯丙素	桂枝
23	24.09	$C_{26}H_{30}O_{13}$	＋	550.1690	550.1686	0.65	257.08、239.07、147.04、137.02、69.03	liquirtinapioside	芹糖甘草苷[28]	黄酮	炙甘草
24	24.29	$C_{22}H_{22}O_9$	＋	430.1267	430.1263	0.89	269.08、254.06、68.84	ononin	芒柄花苷[17]	黄酮	炙甘草
25	24.50	$C_{21}H_{22}O_9$	＋	418.12596	418.1258	0.32	137.02、147.04、257.08	liquiritin	甘草苷[8]	黄酮	炙甘草
26	24.67	$C_{15}H_{14}O_4$	＋	258.0895	258.0892	1.36	259.10、217.05、189.05	rhapontigenin	丹叶大黄素[29]	有机酸	大黄
27	25.17	$C_{16}H_{14}O_5$	＋	286.0845	286.0841	1.65	287.13、245.08、193.05、151.04、121.03、107.05	homobutein	高紫柳查尔酮[17]	黄酮	炙甘草
28	25.91	$C_{20}H_{22}O_8$	＋	390.1315	390.1314	0.21	325.11、313.11、285.11、271.10、259.10、229.09	polydatin	虎杖苷[29]	其他	大黄
29	25.91	$C_{20}H_{24}O_9$	＋	408.1440	408.1420	4.92	247.10、229.09、205.09、97.03、85.03	torachrysone 8-*O*-glucopyranoside	芦荟大黄素8-葡萄糖等[21]	蒽醌	大黄
30	26.01	$C_{21}H_{20}O_{10}$	＋	432.1057	432.1056	0.14	287.05、85.03、71.05	vitexin	牡荆素[30]	黄酮	大黄

续表 1

No.	t_R/min	分子式	离子模式	实测值	理论值	误差/$\times10^{-6}$	二级碎片（MS/MS）	推测成分 英文	推测成分 中文	分类	中药
31	26.24	$C_{15}H_{10}O_4$	+	254.0581	254.0579	1.10	255.07、227.07	chrysin	白杨素[31]	黄酮	炙甘草
32	26.29	$C_{15}H_{10}O_4$	+	254.0583	254.0579	1.66	256.07、255.07、227.07	daidzein	大豆苷元[32]	黄酮	首次发现
33	26.82	$C_{44}H_{64}O_{19}$	+	896.4048	896.4041	0.79	545.35、527.34、509.33、467.32、141.02	uralsaponin F	乌拉尔甘草皂苷 F[33]	皂苷	炙甘草
34	26.84	$C_{42}H_{62}O_{18}$	+	854.3942	854.3936	0.68	503.34、485.33、467.32、233.15、187.15、141.02	22-hydroxy-licoricesaponin G_2	22-羟基甘草皂苷 G_2[33]	皂苷	炙甘草
35	26.87	$C_{16}H_{10}O_7$	+	314.0435	314.0426	2.7	297.04、315.05、153.02	laccaicacid D	蟲漆酸 D[34]	蒽醌	大黄
36	27.09	$C_{48}H_{72}O_{21}$	+	984.4582	984.4566	1.66	615.39、453.34、435.33、407.33、149.13、141.02	licoricesaponin A_3	甘草皂苷 A_3[28]	皂苷	炙甘草
37	27.21	$C_{10}H_{10}O_3$	+	178.0632	178.0630	1.09	179.06、161.06、137.06、105.07	methoxycinnamicacid	甲氧基肉桂酸[35]	苯丙素	桂枝
38	27.48	$C_{42}H_{62}O_{17}$	+	838.3992	838.3987	0.62	469.33、451.32、233.15、217.16、187.15、149.13	licoricesaponin G_2	甘草皂苷 G_2[8, 33]	皂苷	炙甘草
39	27.62	$C_{20}H_{30}O_5$	+	350.2071	350.2093	−6.24	351.21、281.14、229.29、210.55、188.97、87.88	andrographolide	穿心莲内酯[36]	其他	首次发现
40	27.72	$C_{16}H_{14}O_4$	+	270.0896	270.0892	1.39	271.06、229.05、177.05、121.03、107.05	retrochalcone	刺甘草查尔酮[37]	黄酮	炙甘草
41	27.81	$C_{44}H_{64}O_{18}$	+	880.4097	880.4092	0.50	511.34、451.32、405.31、149.13	uralsaponin M	乌拉尔甘草皂苷 M[17]	皂苷	炙甘草
42	28.93	$C_{21}H_{20}O_6$	+	368.1263	368.1259	0.90	369.13、205.09、193.05、189.09、177.09、167.03	glicoricone	甘草瑞酮[33]	黄酮	炙甘草
43	29.05	$C_{42}H_{60}O_{16}$	+	820.3883	820.3881	0.19	469.33、451.32、433.31、141.02	licoricesaponin E_2	甘草皂苷 E_2[28]	皂苷	炙甘草
44	29.95	$C_{42}H_{62}O_{16}$	+	822.4041	822.4038	0.42	471.35、453.34、407.33、357.24、311.24	glycyrrhizic acid	甘草酸[8, 33]	皂苷	炙甘草
45	29.96	$C_{30}H_{46}O_4$	+	470.3398	470.3396	0.47	471.35、453.34、407.33、317.21、235.17、217.16	18-β-glycyrrhetinicacid	甘草次酸[8]	皂苷	炙甘草
46	30.57	$C_{42}H_{64}O_{15}$	+	808.4253	808.4250	0.35	457.37、439.36、421.35、149.13	licoricesaponin B_2	甘草皂苷 B_2[28, 33]	皂苷	炙甘草
47	30.65	$C_{21}H_{20}O_6$	+	368.1261	368.1259	0.42	313.07、285.08、271.06、243.07、177.06	icaritin	淫羊藿素[38]	黄酮	首次发现
48	31.50	$C_{42}H_{64}O_{16}$	+	824.4199	824.4194	0.65	455.35、437.34、189.16、141.02、85.03	licoricesaponin J_2	甘草皂苷 J_2[28]	皂苷	炙甘草
49	32.24	$C_{20}H_{16}O_6$	+	352.0952	352.0946	1.51	353.1、335.09、311.06、299.05、283.06、193.05	licoisoflavone B	甘草异黄酮 B[33]	黄酮	炙甘草
50	33.98	$C_{20}H_{18}O_6$	+	354.1111	354.1103	2.22	355.12、337.11、299.06、201.09、189.09、179.03	licoisoflavone A	甘草异黄酮 A[39]	黄酮	炙甘草
51	34.01	$C_{22}H_{22}O_6$	+	382.1419	382.1416	0.88	327.09、312.06、299.09、191.07、178.06	glycyrin	格里西轮[17]	苯丙素	炙甘草
52	34.27	$C_{21}H_{22}O_4$	+	338.1523	338.1518	1.53	339.12、297.15、271.1、245.12、229.09、121.03	licochalcone A	甘草查尔酮 A[37]	黄酮	炙甘草
53	35.19	$C_{20}H_{20}O_4$	+	324.1367	324.1361	1.81	203.11、189.09、149.06、147.08、123.04	glabridin	光甘草定[39]	黄酮	炙甘草
54	35.20	$C_{20}H_{16}O_5$	+	336.1003	336.0997	1.81	337.11、295.06、283.06、137.02、109.07	glabrone	光果甘草酮[40]	黄酮	炙甘草
55	36.85	$C_{21}H_{22}O_6$	+	370.1418	370.1416	0.69	315.09、297.08、205.09、193.05、123.04、68.79	glyasperin B	粗毛甘草素 B[17]	黄酮	炙甘草
56	44.67	$C_{18}H_{35}NO$	+	281.2721	281.2718	0.88	282.28、163.10、153.11、128.12、124.09	oleamide	油酸酰胺[41]	生物碱	桃仁
1	0.94	$C_6H_{12}O_6$	−	180.0637	180.0633	1.87	101.02、89.02、71.01、59.01	dextrose	无水葡萄糖	其他	炙甘草
2	1.37	$C_4H_6O_5$	−	134.0217	134.0215	1.63	133.01、115.00、89.02、71.01	malicacid	苹果酸[30]	有机酸	大黄
3	1.56	$C_6H_8O_7$	−	192.0273	192.0270	1.77	191.02、111.01、87.03、85.03	citricacid	柠檬酸[15, 30]	有机酸	大黄、桃仁
4	4.13	$C_7H_6O_5$	−	170.0217	170.0215	1.47	169.01、126.03、125.02	gallicacid	没食子酸[29]	有机酸	大黄

续表 1

No.	t_R/min	分子式	离子模式	实测值	理论值	误差/$\times10^{-6}$	二级碎片（MS/MS）	推测成分 英文	推测成分 中文	分类	中药
5	4.69	$C_{13}H_{16}O_{10}$	－	332.0743	332.0743	－0.11	331.07、271.05、221.03、169.01、125.02	glucogallin	没食子酸葡萄糖苷 [29]	有机酸	大黄
6	10.08	$C_7H_6O_4$	－	154.0269	154.0266	1.89	153.02、109.03、89.02、71.01、59.01	protocatechuicacid	原儿茶酸 [20]	有机酸	桂枝
7	11.72	$C_{14}H_{19}NO_7$	－	313.1161	313.1161	－0.01	169.01、150.06、125.02、112.99	mandelic acid amide-*β*-*D*-glucopyranoside	扁桃酸酰胺 -*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷 [15]	生物碱	桃仁
8	13.23	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	－	204.0900	204.0898	0.64	161.05、112.99、89.02、61.99	tryptophan	色氨酸 [15-16，22]	氨基酸	桃仁
9	13.42	$C_7H_6O_3$	－	138.0319	138.0316	1.52	137.02、61.99	salicylicacid	水杨酸 [42]	有机酸	桂枝
10	13.61	$C_{14}H_{18}O_8$	－	314.1006	314.1001	1.53	161.05、146.94、112.99、101.02、85.03、71.01	mandelic acid-*β*-*D*-glucopyranoside	扁桃酸 -*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷 [15，22]	其他	桃仁
11	16.11	$C_7H_6O_2$	－	122.0370	122.0367	1.81	121.03、102.95、93.03、61.99	benzoicacid	苯甲酸 [43]	有机酸	桃仁
12	19.33	$C_9H_8O_3$	－	164.0476	164.0473	2.13	163.04、119.05、112.99、89.02、71.01、59.01	*O*-hydroxycinnamicacid	邻羟基肉桂酸 [20]	苯丙素	桂枝
13	20.37	C_9H_8O	－	132.0578	132.0575	2.51	134.87、111.01、102.95、61.99	cinnamaldehyde	肉桂醛 [20]	苯丙素	桂枝
14	20.95	$C_{15}H_{12}O_4$	－	256.0736	256.0735	0.51	255.07、153.02、146.94、135.01、119.05、102.95	emodinanthrone	大黄素蒽酮 [44]	蒽醌	大黄
15	22.20	$C_{10}H_{10}O_2$	－	162.0684	162.0680	2.00	131.04、112.99、89.02、85.03、73.03、59.01	*O*-methoxycinnamaldehyde	邻甲氧基肉桂醛 [45]	苯丙素	桂枝
16	22.90	$C_9H_{16}O_4$	－	188.1052	188.1048	1.85	161.05、146.94、112.99、103.98、102.95、61.99	azelaicacid	壬二酸 [15]	有机酸	桃仁
17	23.10	$C_{16}H_{12}O_6$	－	300.0638	300.0633	1.63	299.06、255.07、199.04、175.04、147.01、112.99	fallacinol	迷人醇 [30]	蒽醌	大黄
18	27.61	$C_{15}H_{12}O_5$	－	272.0691	272.0684	2.44	271.06、177.02、151.00、109.03、107.01、93.03	naringenin	柚皮素 [16，22]	黄酮	桃仁
19	27.73	$C_{16}H_{12}O_5$	－	284.0688	284.0684	1.41	268.04、243.07、240.04、177.02、109.03、61.99	physcione	大黄素甲醚 [21]	蒽醌	大黄
20	29.44	$C_{15}H_{10}O_4$	－	254.0584	254.0579	2.15	253.05、255.06、182.99、153.02、119.05	chrysophanol	大黄酚 [21]	蒽醌	大黄
21	29.61	$C_{16}H_{12}O_4$	－	268.0738	268.0735	0.90	267.07、252.04、192.99、112.99、61.99	formononetin	刺芒柄花素 [33]	黄酮	炙甘草
22	30.07	$C_{15}H_{10}O_5$	－	270.0530	270.0528	0.69	269.05、225.06、192.99、112.99、61.99	emodin	大黄素 [21]	蒽醌	大黄
23	30.39	$C_{15}H_{10}O_5$	－	270.0540	270.0528	4.57	269.05、240.04	aloeemodin	芦荟大黄素 [21]	蒽醌	大黄
24	31.10	$C_{15}H_8O_6$	－	284.0326	284.0320	2.04	283.03、257.05、239.04、227.04、211.04、183.05	rhein	大黄酸 [21]	蒽醌	大黄
25	31.10	$C_{14}H_{10}O_5$	－	258.0533	258.0528	2.12	257.05、239.04、146.94、112.99、93.00	2-（3，4-dihydroxyphenyl）-1，3-benzodioxole-5-carboxaldehyde	2-（3，4- 二羟苯基）-1，3- 胡椒环 -5- 醛 [25]	其他	桂枝
26	32.95	$C_{21}H_{24}O_5$	－	356.1630	356.1623	1.92	355.12、337.11、299.06、201.09、189.09、179.03	glyasperin C	粗毛甘草素 C[17]	黄酮	炙甘草
27	37.98	$C_{15}H_{12}O_4$	－	256.0729	256.0735	－2.16	153.02、135.01、119.05、91.02	liquiritigenin	甘草素 [17，37]	黄酮	炙甘草

3.5 其他类成分鉴定

另外，在正负离子模式下，共有 12 种有机酸类，8 种苯丙素类，7 种生物碱类、4 种氨基酸类和 9 种其他类化合物在桃核承气汤中得以鉴定和表征。

4 结论

通过 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术和分子网络方法，本研究快速鉴定出桃核承气汤中的 83 种化合物。其中，黄酮类和皂苷类成分主要来源于炙甘草，蒽醌类来源于大黄，苯丙素类和有机酸类主要来源于桂枝，生物碱类主要源于桃仁，所鉴定化合物较好地表征了桃核承气汤药效物质基础。黄酮类成分具有降糖、抗氧化、抑制炎症反应、细胞凋亡和自噬等作用 [46-47]；蒽醌类化合物多被用作抗糖尿病、抗病毒、抗纤维化、杀真

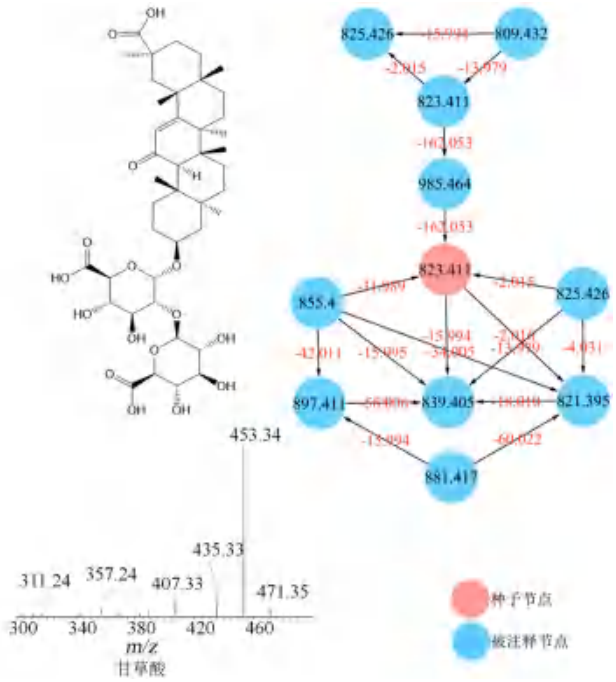


图 7 基于 MS/MS 关联的桃核承气汤分子网络图

Fig 7 Molecular network diagram of Taohe Chengqi decoction based on MS/MS correlation

菌和抗炎剂[48]；皂苷类成分具有降糖、护肝、抗炎、抗心肌缺血以及抗纤维化作用[49]；而 4 种在桃核承气汤中首次发现的化合物如大豆苷元、矢车菊素 -3-*O*- 葡萄糖苷、穿心莲内酯、淫羊藿素具有降糖、调节脂质代谢、抗炎、抗氧化等作用[50-54]。这可为桃核承气汤用于糖尿病及其并发症、中风、慢性肾衰竭、骨伤科等疾病治疗提供参考。

本研究成果进一步丰富和细化了桃核承气汤的药效物质信息特征，可为该方化学成分的快速鉴定、质量控制、体内药物代谢等研究提供参考，并且为中药复方的物质基础研究提供一种快速有效的分析方法。

参考文献

[1] 国家中医药管理局 . 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. 2018. http：//kjs.satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107. html.

[2] 周冉冉，付春梅，李冉，等 . 桃核承气汤的临床应用研究进展 [J]. 现代中医临床，2020，27（1）：71-76.

[3] 吴茂青，魏育华，叶宇 . 综合分析加味桃核承气汤治疗糖尿病（2 型）患者的效果及对患者血糖水平的影响 [J]. 海峡药学，2019，31（7）：83-84.

[4] 徐阳，王军，武海阔 . 桃核承气汤对糖尿病大鼠大血管纤维病变 Toll 样受体通路作用研究 [J]. 天津中医药，2016，33（5）：299-302.

[5] 梁立革 . 参芪地黄汤合桃核承气汤化裁辨治气阴亏虚、瘀浊阻络证糖尿病肾病的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志，2016，43（10）：2115-2117.

[6] 陈淮臣，何利，石亚，等 . HPLC 法测定桃核承气汤中 10 种成分的含量 [J]. 亚太传统医药，2020，16（2）：47-50.

[7] 郭佳宇，钱梦溪 . 超高效液相串联质谱法同时测定桃核承气汤中 5 种成分含量 [J]. 国际中医中药杂志，2021，43（9）：893-897.

[8] 周珊珊 . 桃核承气汤抗肾脏纤维化的药效物质基础及作用机制研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2020.

[9] Rodriguez-Aller M，Gurny R，Veuthey JL，et al. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry：constraints and possible applications [J]. Elsevier BV，2013，1292：2-18.

[10] Zhou ZY，Huang Y，Xiao JC，et al. Chemical profiling and quantification of multiple components in Jin-Gu-Lian capsule using a multivariate data processing approach based on UH-PLC-Orbitrap Exploris 240 MS and UHPLC-MS/MS [J]. J Sep Sci，2022，45（6）：1282-1291.

[11] Watrous J，Roach P，Alexandrov T，et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（26）：1743-1752.

[12] 王春国，宋慧荣，罗亚敏，等 . 偏痛汤 1 号化学成分的 UHPLC-LTQ-OrbitrapMS^n 快速鉴定研究 [J]. 中医药通报，2019，18（1）：63-69，42.

[13] 何涛 . 整合网络药理学和非靶向代谢组学探究黄连类方改善 T2DM 斑马鱼的共有机制 [D]. 北京：北京中医药大学，2021.

[14] 薛建英 . 芒硝无机成分的研究 [J]. 中药材，1991，14（12）：48.

[15] 周熙，谢斌，黄晓兰，等 . 基于高效液相色谱 - 四极杆飞行时间串联质谱法的苦杏仁与桃仁化学成分差异研究 [J]. 分析测试学报，2021，40（6）：940-946.

[16] 张聪聪，王长虹，李兴佳，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析桃仁化学成分及快速测定苦杏仁苷和野黑樱苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（4）：347-355.

[17] 姚玲玲，柯昌强，刘佳，等 . 不同炮制程度中药饮片蜜炙甘草的次生代谢化学成分组学研究 [J]. 药学学报，2021，56（5）：1444-1452.

[18] 周倩，戴衍朋，郭威，等 . 基于顶空 - 气相色谱 - 离子迁移谱的生、炙甘草饮片挥发性有机物指纹图谱分析 [J]. 中国中药杂志，2020，45（16）：3857-3862.

[19] 丁平，黄海波，徐鸿华 . 广东产中药桂枝挥发油成分分析 [J]. 华西药学杂志，2002，17（3）：175-176，179.

[20] 王丹 . 中药桂枝化学成分研究 [D]. 上海：上海中医药大学，2019.

[21] 曹瑞，窦志华，倪丽丽，等 . HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究 [J]. 中草药，2019，50（5）：1100-1110.

[22] 张妍妍，韦建华，卢澄生，等 . 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（1）：234-241.

[23] 咸婧 . 药用大黄地上部分化学成分及生物活性研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2017.

[24] Hatano T，Fukuda T，Miyase T，et al. Phenolic constituents of licorice. III. Structures of glicoricone and licofuranone，and inhibitory effects of licorice constituents on monoamine oxidase [J]. Chem Pharm Bull（Tokyo），1991，39（5）：1238-1243.

[25] 朱伶俐，艾志福，徐丽，等 . 桂枝化学成分的分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（14）：173-178.
[26] 王立雪 . 基于生物活性的大黄质量控制研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2020.
[27] Novak I，Janeiro P，Seruga M，et al. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromato-graphy with electrochemical detection [J]. Elsevier BV，2008，630（2）：107-115.
[28] 马海娟，高简，张亚丽，等 . 基于 HPLC-MS^n 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（3）：1120-1123.
[29] 孙玉明，徐蒙，李文慧，等 . 高效液相色谱 - 高分辨质谱法鉴定拉萨大黄化学成分 [J]. 质谱学报，2021，42（6）：1100-1112.
[30] 冯银平，苗小楼，张云鹤，等 . 大黄地上部分化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2022，29（3）：151-156.
[31] 刘晓华，卢素芳，王肆玖，等 . 不同工艺对甘草型功能蜂蜜活性成分及抗氧化功能的影响 [J]. 蜜蜂杂志，2020，40（8）：1-4.
[32] Leoni F，Hazrati H，Fomsgaard IS，et al. Determination of the effect of co-cultivation on the production and root exudation of flavonoids in four legume species using LC-MS/MS analysis [J]. J Agric Food Chem，2021，69（32）：9208-9219.
[33] 段伟萍，李缘媛，郑云枫，等 . 基于 LC-MS/MS 法分析生、炙甘草中水溶性成分 [J]. 中成药，2020，42（5）：1237-1243.
[34] 王玉，杨雪，夏鹏飞，等 . 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药，2019，50（19）：4821-4837.
[35] 刘瑞，泰刚，王瑞，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 快速鉴定桂枝中水溶性成分 [J]. 山西中医药大学学报，2021，22（1）：36-40.
[36] Xu FF，Fu SJ，Gu SP，et al. Simultaneous determination of andrographolide，dehydroandrographolide and neoandrographolide in dog plasma by LC-MS/MS and its application to a dog pharmacokinetic study of Andrographis paniculata tablet [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2015，990（2015）：125-131.
[37] 崔园园，周永峰，马艳芹，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析生、炙甘草中化学成分的差异性 [J]. 中国药房，2020，31（9）：1049-1053.
[38] Huang ZW，Yang YX，Huang LH，et al. Pharmacokinetics and metabolism of icaritin in rats by UPLC-MS/MS [J]. Food Sci Nutr，2019，7（12）：4001-4006.
[39] 陈佳，聂黎行，胡晓茹，等 . 基于超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱法分析乌拉尔甘草与光果甘草化学成分差异 [J]. 中国药物警戒，2022，19（9）：954-958.
[40] 邢珍珍，孟庆艳，卢亚玲，等 . 高效液相色谱法筛选甘草甜味素中抗氧化成分 [J]. 食品科学，2013，34（12）：203-207.
[41] 孙位军，周熙，王张，等 . GC-MS 法分析得荣县光核桃仁油中脂溶性成分 [J]. 中成药，2018，40（1）：142-146.
[42] 王丹，吴喜民，张东东，等 . 桂枝中羧酸及其衍生物的化学成分研究 [J]. 中草药，2019，50（1）：8-12.
[43] 沈旭，李清，王振中，等 . 桃仁药材 UPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志，2011，36（6）：718-720.
[44] 张宇航，徐佳元，曹丹，等 . 肠道微生物菌群对大黄蒽醌类化合物代谢研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（10）：203-211.
[45] 许源，宿树兰，王团结，等 . 桂枝的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中药材，2013，36（4）：674-678.
[46] 严啸东，郭美丽 . 黄酮类化合物抗心脑血管缺血性疾病作用的研究进展 [J]. 药学实践杂志，2022，40（2）：97-102.
[47] Alseekh S，Perez de Souza L，Benina M，et al. The style and substance of plant flavonoid decoration；towards defining both structure and function [J]. Phytochemistry，2020，174：112347.
[48] Hussain H，Al-Harrasi A，Al-Rawahi A，et al. A fruitful decade from 2005 to 2014 for anthraquinone patents [J]. Expert Opin Ther Pat，2015，25（9）：1053-1064.
[49] 胡泊，孟祥云，丁瑞洁 . 中药甘草中主要皂苷类成分研究进展 [J]. 海峡药学，2021，33（1）：180-182.
[50] Fraisse D，Bred A，Felgines C，et al. Impact of simulated gastrointestinal conditions on antiglycoxidant and α-glucosidase inhibition capacities of cyanidin-3-*O*-glucoside [J]. Antioxidants（Basel），2021，10（11）：1670.
[51] Cheong SH，Furuhashi K，Ito K，et al. Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in type 2 diabetic model mice [J]. J Nutr Biochem，2013，25（2）：136-143.
[52] Alshehri MM，Sharifi-Rad J，Herrera-Bravo J，et al. Therapeutic potential of isoflavones with an emphasis on daidzein [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6331630.
[53] Zhang H，Li S，Si Y，et al. Andrographolide and its derivatives：current achievements and future perspectives [J]. Eur J Med Chem，2021，224：113710.
[54] Wang M，Gao H，Li W，et al. Icariin and its metabolites regulate lipid metabolism：from effects to molecular mechanisms [J]. Biomed Pharmacother，2020，131：110675.

（收稿日期：2022-06-01；修回日期：2022-08-01）

超微粉碎对七味广枣散体外溶出度及大鼠体内药动学的影响

李书迪[1]，张一凡[2]，齐和日玛[2]，郭慧卿[2]，成日青[2*]（1. 内蒙古自治区人民医院药学处，呼和浩特 010017；2. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特 010110）

摘要：目的 研究超微粉碎对七味广枣散中没食子酸、原儿茶酸和丁香酚的体外溶出度及其在大鼠体内药动学的影响。**方法** 采用高效液相色谱（HPLC）法测定没食子酸、原儿茶酸和丁香酚 3 种指标成分含量，以普通粉为对照，对七味广枣散超微粉中指标成分在水、人工胃液和人工肠液 3 种溶出介质中的溶出性能进行评价；SD 大鼠灌胃给予七味广枣散普通粉或超微粉（用 0.5% CMC-Na 混悬），给药后眼眶取血，采用 HPLC 法测定血浆中丁香酚的质量浓度，LC-MS 法测定没食子酸和原儿茶酸的血药浓度，使用 DAS 3.0 软件计算药动学参数，利用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，以普通粉为参比，评价七味广枣散超微粉中 3 种指标成分在大鼠体内的药动学特性。**结果** 七味广枣散超微粉中丁香酚在 3 种溶出介质中的溶出度始终高于普通粉，而没食子酸和原儿茶酸在溶出开始的短时间内不同程度地高于普通粉，但随着时间的延长，累积溶出率与普通粉趋于一致；七味广枣散超微粉组丁香酚的 $AUC_{0\sim 720\ min}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 分别为普通粉组的 1.76 倍和 2.56 倍（$P < 0.05$），没食子酸和原儿茶酸的各药动学参数在七味广枣散超微粉组和普通粉组间差异不具有统计学意义。**结论** 超微粉碎对药材中不同理化性质成分影响不同，难溶性成分所受影响较水溶性成分可能更为显著。

关键词：七味广枣散；超微粉；体外溶出度；药动学；没食子酸；原儿茶酸；丁香酚
中图分类号：R965 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0037-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.006

Effect of ultrafine grinding on the in vitro dissolution and pharmacokinetics of Qiwei Guangzao powder in rats

LI Shu-di[1], ZHANG Yi-fan[2], Qiherima[2], GUO Hui-qing[2], CHENG Ri-qing[2*] (1. *Department of Pharmacy, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot* 010017; 2. *College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010110)

Abstract: Objective To determine the effect of ultrafine grinding on the in vitro dissolution and pharmacokinetics of gallic acid, protocatechuic acid and eugenol in Qiwei Guangzao powder in rats. **Methods** The content of gallic acid, protocatechuic acid and eugenol was determined by HPLC, and the dissolution of the index components in water, artificial gastric juice, and artificial intestinal juice was evaluated. SD rats were given common powder or ultrafine powder (suspended with 0.5% CMC-Na) by gavage, and blood was taken from the orbit after the administration. The concentration of eugenol in the plasma was determined by HPLC, and the plasma concentration of gallic acid and protocatechuic acid were determined by LC-MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.0 software, and the statistical analysis by SPSS 19.0 software. With common powder as the reference, we evaluated the pharmacokinetics of 3 index components in the ultrafine powder in rats. **Results** The dissolution rate of eugenol in the ultrafine powder in the 3 dissolution media was much higher than that of the common powder; while the dissolution of gallic acid and protocatechuic acid in

基金项目：内蒙古自治区自然科学基金项目（No.2018MS08032）。
作者简介：李书迪，女，硕士，主要从事药物新剂型与制剂新技术研究，email：Llishudi@163.com *通信作者：成日青，女，教授，硕士研究生导师，主要从事药物新剂型与制剂新技术研究，email：rqcheng@126.com

the ultrafine powder in the 3 dissolution media was higher than that of the common powder to various degrees shortly after the dissolution, but with time, the cumulative dissolution rate tended to be consistent with that of the common powder. The $AUC_{0\sim720\ min}$ and $AUC_{0\sim\infty}$ of eugenol in the ultrafine powder group were 1.76 times and 2.56 times higher than those in the common powder group, respectively ($P < 0.05$). The pharmacokinetic parameters of gallic acid and protocatechuic acid had no significant difference between the two groups. **Conclusion** Ultrafine grinding affects components with different physical and chemical properties in medicinal materials. Insoluble components are more easily affected than the water-soluble ones.

Key words: Qiwei Guangzao powder; ultrafine powder; in vitro dissolution; pharmacokinetics; gallic acid; protocatechuic acid; eugenol

传统蒙药方剂多数是以全粉入药，用药剂量大且服用不便，患者顺应性差，极大地限制了其临床应用。中药或蒙药的超微粉碎技术是以植物药材的细胞破壁为目的进行粉碎。虽然目前对于中药超微粉的定义尚无统一定论，但普遍认为中药超微粉碎应以细胞破壁为界定标准，粒径控制在 75 μm 以下的中药粉体可以被称为超微粉体[1-2]。借助超微粉碎技术，在不改变全成分入药特点的前提下达到提高疗效和减小剂量的目的，对于蒙药的临床应用推广具有重要的现实意义。七味广枣散为临床常用的蒙古族验方，最早收载于 1977 年版《中国药典》，具有养心益气、安神之功效，用于胸闷疼痛、心悸气短、心神不安、失眠健忘等症[3-4]。本课题组前期通过单因素试验对七味广枣散超微粉的制备工艺进行了优化，并通过指纹图谱研究确定了没食子酸、原儿茶酸和丁香酚 3 种成分为体外溶出与大鼠体内药动学研究的指标成分[5]。本文拟通过研究超微粉碎对七味广枣散中上述 3 种指标成分体外溶出度和大鼠体内药动学的影响，为超微粉碎技术更加合理地应用于中药或蒙药制剂提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

800Y 型多功能粉碎机（永康市铂欧五金制品有限公司），BFM-6A 型贝利微粉机（济南倍力粉技术工程有限公司），Winner3003 激光粒度分析仪（济南微纳颗粒仪器股份有限公司），LC-2030C3D 高效液相色谱仪（日本岛津公司），UltiMate 3000 型快速超高效液相色谱仪（包括二极管阵列检测器、双三元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱，美国 Thermo Fisher 公司），四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱系统（包括 ESI 离子源及 Thermo Xcalibur3.1.66.10 数据处理系统，美国 Thermo Fisher 公司），RC806 溶出试验仪（天津市天大天发科技有限公司），MX-S 型涡旋仪（美国 SCILOGEX 公司），H1850 型医用离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），AB135-S 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

1.2 试药

广枣（湖南，批号：C16121702）、丁香（广西，批号：151101）、木香（云南，批号：160201）、沉香（海南，批号：181411101）、肉豆蔻（广西，批号：180921001）、枫香脂（福建，批号：1811010589）、牦牛心（西藏，批号：1604001）（内蒙古天康蒙中医药有限责任公司，并经内蒙古医科大学渠弼副教授鉴定）；丁香酚对照品（中国食品药品检定研究院，批号：110725-201716，纯度：99.6%），没食子酸对照品（北京中科质检生物技术有限公司，批号：181208，纯度≥ 98%），原儿茶酸对照品（北京中科仪友化工技术研究院，批号:181007，纯度≥ 98%）；3，4- 二甲氧基苯乙烯（ARK，批号：AK553994，纯度≥ 97%）；β- 葡萄糖醛酸苷酶（SIGMA 试剂有限公司，批号：G0876，效价≥ 85 000 U • mL^{-1}）；乙腈为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠（SPF 级），雌雄各半，体质量（300±20）g [内蒙古医科大学实验动物中心，许可证号：SCXK（蒙）2015-0001]。

2 方法与结果

2.1 七味广枣散普通粉与超微粉的制备

取广枣、丁香、枫香脂、肉豆蔻、沉香、牦牛心、木香 7 味药材，分别粉碎，过 100 目筛，得各单味药材普通粉，按处方比例（广枣 450 g，其余药材各 75 g）混匀[4]，得七味广枣散普通粉。取广枣普通粉，超微粉碎 60 min，得广枣超微粉。取广枣超微粉与丁香、沉香、肉豆蔻、木香、牦牛心 5 味药材普通粉，按处方比例混匀，超微粉碎 20 min 后，加入枫香脂普通粉，混匀，得七味广枣散超微

粉。两种粉体样品粒径测定结果见表 1。

表 1　七味广枣散粉体粒径测定结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 1　Particle size of Qiwei Guangzao powder ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

样品	D_{50}/μm	D_{90}/μm
普通粉	132.864±1.720	229.183±1.734
超微粉	24.418±0.145	52.773±0.301

分别取七味广枣散超微粉和普通粉样品适量，置于离心管中，加入水合氯醛，超声，使粉体分散均匀。吸取样品液，装片，置于显微镜下观察，采集视野图片，见图 1。由图可见，普通粉中呈现出明显的细胞结构，而超微粉中细胞结构基本被破坏，显微结构不明显，说明基本达到细胞完全破壁。

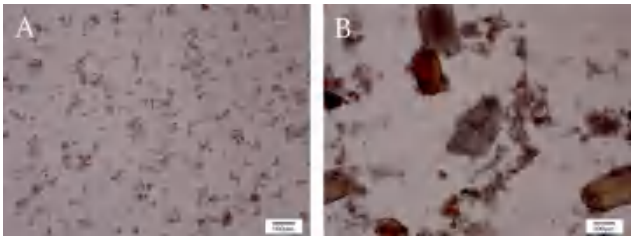


图 1　七味广枣散粉体显微结构图（×10）

Fig 1　Microstructure of Qiwei Guangzao powder（×10）

A. 超微粉（ultrafine powder）；B. 普通粉（common powder）

2.2　七味广枣散超微粉体外溶出度的测定

2.2.1　对照品溶液的制备　精密称取没食子酸、原儿茶酸、丁香酚适量，用 70% 甲醇溶解，制成质量浓度分别为 191、101、6700 μg·mL^{-1} 的混合对照品储备液，稀释至所需浓度，即得。

2.2.2　供试品溶液的制备　取七味广枣散粉体约 1.0 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇 20 mL，称定重量，超声处理（温度 50 ℃，频率 100 Hz）1 h，放冷，再次称重，用 70% 甲醇补足失重，10 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，作为供试品溶液。

2.2.3　色谱条件　以 SHIMADZU Shim-pack GIST（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.5% 乙酸水（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 5 min，5% ～ 6%A；5 ～ 10 min，6% ～ 11%A；10 ～ 20 min，11% ～ 44%A；20 ～ 31 min，44% ～ 55%A）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 254 nm；进样量为 10 μL。

2.2.4　专属性考察　分别取混合对照品溶液及供试品溶液，进样测定，色谱图见图 2。由图可见，供试品溶液中没食子酸、原儿茶酸、丁香酚 3 种成分色谱峰峰形良好，保留时间与相应的对照品一致，且与相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5，表明本方法专属性良好。

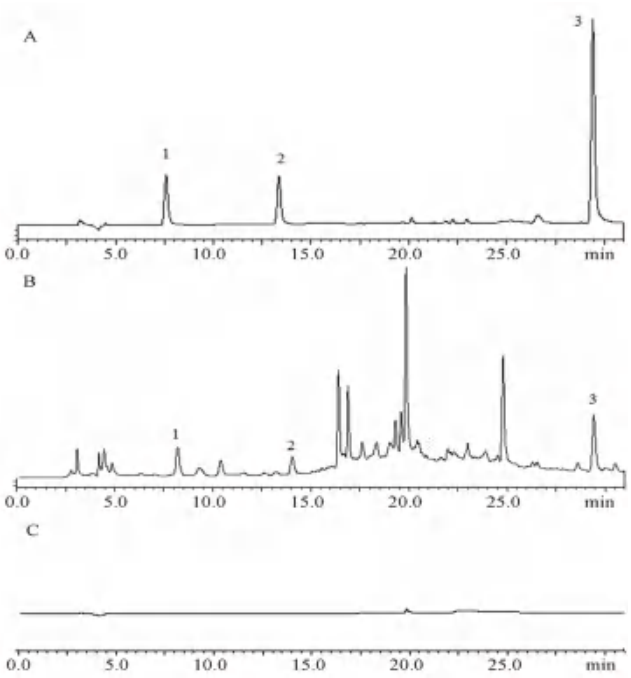


图 2　七味广枣散 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of Qiwei Guangzao powder

A. 混合对照品（mixed reference）；B. 供试品（sample）；C. 空白溶液（solvent blank）；1. 没食子酸（gallic acid）；2. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；3. 丁香酚（eugenol）

2.2.5　线性关系考察　取混合对照品储备液，用 70% 甲醇稀释并配制成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液，进样测定，以对照品质量浓度为横坐标（x），峰面积为纵坐标（y），进行线性回归，回归方程见表 2。

表 2　线性关系考察结果

Tab 2　Linearity

成分	回归方程	r	线性范围/（μg·mL^{-1}）
没食子酸	$y=1.410\times10^{4}x+2.86\times10^{3}$	0.9994	0.382 ～ 38.2
原儿茶酸	$y=2.610\times10^{4}x+228.7$	0.9997	0.202 ～ 20.2
丁香酚	$y=1.663\times10^{3}x-560.7$	1.000	13.40 ～ 1340

2.2.6　精密度试验　取七味广枣散超微粉样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积。结果没食子酸、原儿茶酸、丁香酚峰面积的 *RSD* 分别为 0.30%、0.34%、0.080%，表明仪器精密度良好。

2.2.7　稳定性试验　取七味广枣散超微粉样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后 0、1、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录峰面积。结果没食子酸、原儿茶酸、丁香酚峰面积的 *RSD* 分别为 0.22%、0.25%、0.30%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8　重复性试验　取同一批七味广枣散超微粉样品 6 份，分别按“2.2.2”项下方法制备供试品

溶液，进样测定，记录峰面积，根据回归方程计算 3 种成分的含量。结果没食子酸、原儿茶酸、丁香酚含量的 *RSD* 分别为 1.0%、1.7%、2.1%，表明方法重复性良好。

2.2.9　回收试验　取已知含量的七味广枣散超微粉样品，每份约 0.5 g，平行取 6 份，精密称定，加入与样品中没食子酸、原儿茶酸、丁香酚含量相当的对照品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率。结果没食子酸、原儿茶酸、丁香酚的平均加样回收率分别为 99.52%、99.39%、100.81%，*RSD* 分别为 1.2%、1.6%、0.21%，表明本方法准确度良好。

2.2.10　体外溶出度测定　采用 2020 年版《中国药典》四部通则“0931 溶出度与释放度测定法”第二法（桨法）测定 3 种成分的溶出度。取七味广枣散超微粉约 5 g，精密称定，置于溶出杯，加入经脱气处理的水 500 mL，转速 100 $r \cdot min^{-1}$、温度（37±0.5）℃。分别于 1、3、5、7、10、15、20、30、60、120、180、240 min 时取样，每次取样 1 mL，同时补充同温度的溶出介质 1 mL。取出的样品液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，进样测定，计算累积溶出率，平行测定 3 份。同法测定七味广枣散超微粉在人工胃液和人工肠液中的溶出度。同法测定七味广枣散普通粉在以上 3 种溶出介质中的溶出度，绘制溶出曲线，结果见图 3。超微粉中没食子酸和原儿茶酸在 3 种溶出介质中的溶出速率和累积溶出率在溶出开始后的短时间内均不同程度地高于普通粉，但随着时间的延长，累积溶出率与普通粉趋于一致；超微粉中丁香酚的累积溶出率始终高于普通粉。

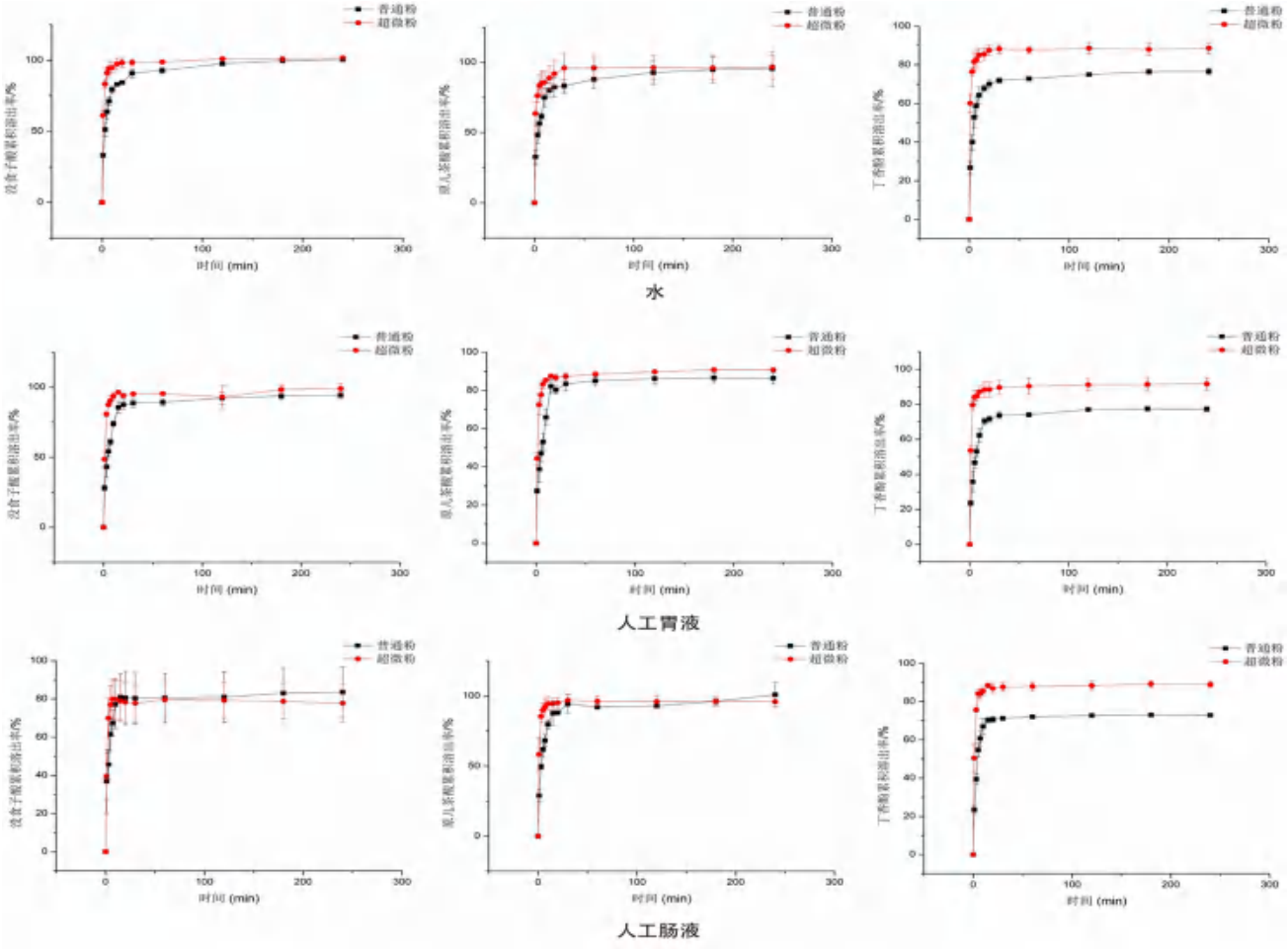


图 3　七味广枣散不同粉体中 3 种指标成分在水、人工胃液、人工肠液中的体外溶出曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 3　In vitro dissolution curves of 3 index components in different powders of Qiwei Guangzao powder in water, artificial gastric juice and artificial intestinal juice（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2.3　七味广枣散超微粉中丁香酚的药动学分析

2.3.1　色谱条件　以 Thermo C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）为色谱柱；以乙腈 -0.1% 甲酸水溶液（40∶60）为流动相；流速为 0.2 mL • min^{-1}；检测波长为 281 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 4 μL。

2.3.2　对照品溶液与内标溶液的制备　精密称取丁香酚对照品 3.16 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入乙腈溶解并定容，配制成质量浓度为 316

μg • mL^{-1} 的丁香酚储备液，于冰箱中 4 ℃冷藏备用。精密称取 3，4-二甲氧基苯乙烯对照品 10.70 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入乙腈溶解并定容，配制成质量浓度为 1.07 mg • mL^{-1} 的内标储备液，于冰箱中 4 ℃冷藏备用，使用时稀释至 42.8 μg • mL^{-1}。

2.3.3　动物给药及血浆样品采集　选取 SD 大鼠 30 只，雌雄各半，适应性饲养 1 周后，随机分为空白对照组、七味广枣散普通粉组和七味广枣散超微粉组，每组 10 只。实验前 12 h 大鼠禁食不禁水。空白对照组灌胃给予 0.5% CMC-Na 15 mL • kg^{-1}，另外两组分别灌胃给予普通粉和超微粉 3 g • kg^{-1}（药物用 0.5% CMC-Na 均匀混悬）。分别于给药后 5、10、15、20、30、45、60、90、120、180、240、360、720 min 经大鼠眼底静脉丛取血约 0.5 mL，置于含肝素钠的离心管中。血样以 4500 r • min^{-1} 离心 10 min，取上层血浆置于 1.5 mL 离心管中，－20 ℃保存，备用。

2.3.4　血浆样品处理[6]　取血浆样品 100 μL 置于 1.5 mL 离心管中，加入醋酸钠缓冲溶液（pH 6）100 μL，振摇。加入 *β*-葡萄糖醛酸苷酶 10 μL，振摇。37 ℃温育 1 h，取出，放至室温，加入 100 μL 内标溶液、100 μL 乙腈溶液，涡旋 2 min，静置 5 min，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，进样分析。

2.3.5　专属性考察　取空白对照组血浆，按“2.3.4”项下方法处理，用 100 μL 乙腈代替 100 μL 内标溶液，其他操作方法相同，进样分析，得空白对照血浆色谱图（见图 4A）；用 100 μL 丁香酚对照品溶液代替 100 μL 内标溶液，其他操作方法相同，进样分析，得空白对照血浆加丁香酚对照品的色谱图（见图 4B）；取空白对照血浆，按“2.3.4”项下方法处理，进样分析，得空白对照血浆加内标色谱图（见图 4C）；取给药大鼠血浆样品，按“2.3.4”项下方法处理，进样分析，得给药血浆加内标色谱图（见图 4D）。结果显示，丁香酚和内标色谱峰峰形良好，血浆内源性物质对测定无干扰，方法的专属性良好。

2.3.6　线性关系考察　取 6 份 100 μL 空白血浆，按“2.3.4”项下方法处理，分别加入一定量的丁香酚对照品溶液，使丁香酚质量浓度分别为 0.16、1.58、3.16、6.32、10.54、15.8 μg • mL^{-1}，进样测定，以对照品质量浓度为横坐标（*x*）、丁香酚和内标的峰面积比值（*y*）为纵坐标，进行线性回归，得回归方程 $y = 0.0406x + 0.0005$（$r = 0.9990$），血浆中的丁香酚质量浓度在 0.16 ～ 15.8 μg • mL^{-1} 与丁香酚和内标的峰面积比值呈良好的线性关系。

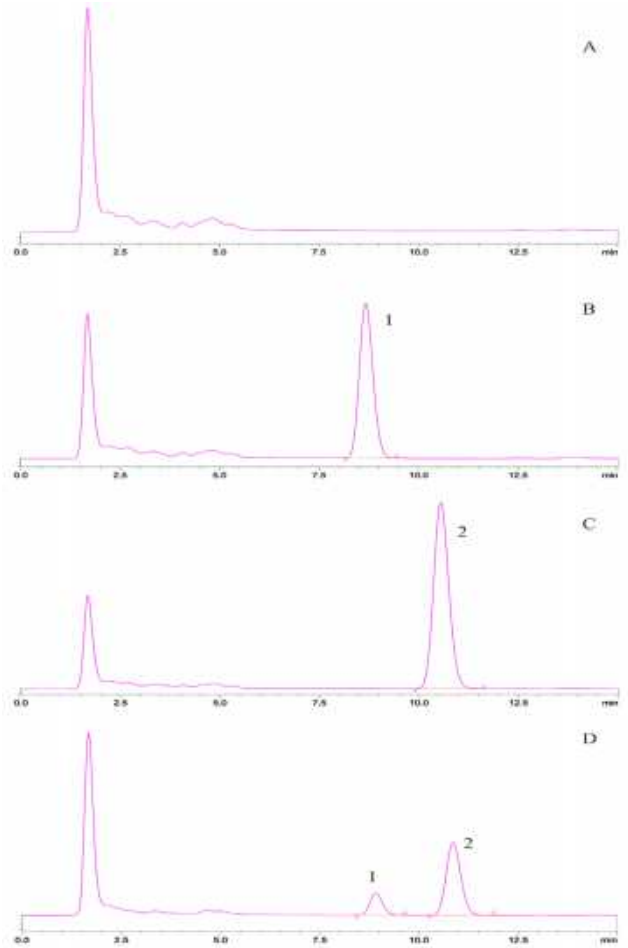


图 4　丁香酚与内标的高效液相色谱图

Fig 4　HPLC of eugenol and internal standard

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆加丁香酚对照品（blank plasma with eugenol）；C. 空白血浆加内标（blank plasma with internal standard）；D. 给药血浆加内标（administration of plasma with internal standard）；1. 丁香酚（eugenol）；2. 内标（internal standard）

2.3.7　精密度与准确度试验　取空白血浆 100 μL，按“2.3.4”项下方法分别配制低、中、高 3 个质量浓度（1.58、6.32、10.54 μg • mL^{-1}）的丁香酚血浆样品，进样测定，各质量浓度同日内分别连续进样 6 次，计算日内精密度及准确度；另每日测定 1 次，连续测定 5 d，计算日间精密度及准确度。结果低、中、高 3 个质量浓度样品的日内精密度 *RSD* 分别为 0.59%、3.6%、2.7%，准确度分别为 96.89%、104.60%、105.85%；日间精密度 *RSD* 分别为 0.79%、1.6%、2.6%，准确度分别为 97.10%、101.74%、101.09%，符合方法学要求。

2.3.8　提取回收试验　取空白血浆 100 μL，按“2.3.4”项下方法分别配制低、中、高 3 个质量浓度（1.58、6.32、10.54 μg • mL^{-1}）的丁香酚血浆样品，每一质量浓度平行 6 份，进样测定，记录丁香酚峰面积与内标峰面积比值（*S*），另取对

应质量浓度的丁香酚对照品溶液和内标溶液，进样测定，记录丁香酚峰面积与内标峰面积比值（A），以 $S/A\times100\%$ 计算提取回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度样品的提取回收率分别为 96.84%、105.12%、107.53%，RSD 分别为 2.3%、2.8%、3.2%，符合方法学要求。

2.3.9 稳定性试验　取空白血浆 100 μL，按“2.3.4”项下方法分别配制低、中、高 3 个质量浓度（1.58、6.32、10.54 μg·mL^{-1}）的丁香酚血浆样品，分别在室温放置 8 h、自动进样器内放置 24 h、冰箱冷藏 3 d，进样分析。结果 3 种条件下，各浓度样品的 RSD 均小于 6%（$n=6$），表明样品在上述条件下稳定性良好。

2.3.10 数据处理　采用 DAS 3.0 软件计算相关药动学参数，并利用 SPSS 19.0 软件对所得药动学参数进行统计学分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验进行组间比较，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.3.11 药动学参数的测定　采集的血样按“2.3.4”项下方法处理，进样测定，计算各时间点对应的丁香酚血药浓度，所得血药浓度 - 时间曲线见图 5，药动学参数见表 3。灌胃给药后丁香酚在大鼠体内的过程符合二室模型，权重为 $1/c^2$。统计学分析结果表明，超微粉组和普通粉组丁香酚的 C_{max}、t_{max} 及 $t_{1/2}$ 差异不具有统计学意义；超微粉组的 $MRT_{0\sim720\,min}$ 和 $MRT_{0\sim\infty}$ 分别为普通粉组的 1.47 倍和 3.47 倍（$P<0.05$），表明超微粉碎后丁香酚在体内的平均滞留时间延长；超微粉组的 $AUC_{0\sim720\,min}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 分别为普通粉组的 1.76 倍和 2.56 倍（$P<0.05$）。超微粉组和普通粉组均出现双峰现象，可能是由于丁香酚的肝肠循环所致。

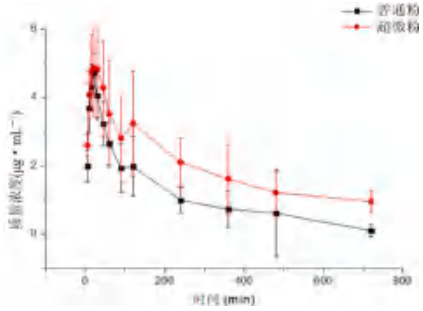


图 5　丁香酚血药浓度 - 时间曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig 5　Plasma concentration-time curve of eugenol（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

2.4　七味广枣散超微粉中没食子酸和原儿茶酸的药动学分析

采用 LC-MS 法同时测定大鼠血浆样品中没食子酸和原儿茶酸的含量。液相条件：色谱柱为 Thermo C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相由甲醇 -0.1% 甲酸水组成（12 ∶ 88）；流速：0.2 mL·min^{-1}；柱温：35 ℃；进样量：4 μL。质谱条件：ESI 离子源，负离子检出模式，离子源喷雾电压：3000 V；离子传输管温度：410 ℃，鞘气流量：30 unit，辅助气体：N_2，辅助气体流速：2 unit，辅助器温度：250 ℃。方法学考察结果表明，内源性物质不干扰测定，线性关系、精密度、稳定性、回收率等均符合生物样品含量测定要求。按“2.3.3”项下方法给药并采集血样，测定各样品中没食子酸与原儿茶酸的血药浓度，所得血药浓度 - 时间曲线见图 6，药动学参数见表 4。

表 3　七味广枣散超微粉和普通粉中丁香酚在大鼠体内的药动学参数（$n=10$）

Tab 3　Pharmacokinetic parameters of eugenol in ultrafine powder and common powder in rats（$n=10$）

参数	普通粉	超微粉
$AUC_{0\sim720}$/[mg/（min·L）]	779.093±336.290	1403.066±395.211*
$AUC_{0\sim\infty}$/[mg/（min·L）]	812.447±319.721	2078.263±608.119*
$t_{1/2\alpha}$/min	59.505±10.623	57.082±20.732
$t_{1/2\beta}$/min	63.941±9.932	69.315±0.000
t_{max}/min	19.000±2.108	22.000±7.888
C_{max}/（mg·L^{-1}）	4.716±0.573	5.172±1.297
$MRT_{0\sim720}$/min	179.394±55.802	263.660±44.888*
$MRT_{0\sim\infty}$/min	218.737±96.580	759.052±644.249*

注：与普通粉组比较，*$P<0.05$。

Note：Compared with the common powder group，*$P<0.05$.

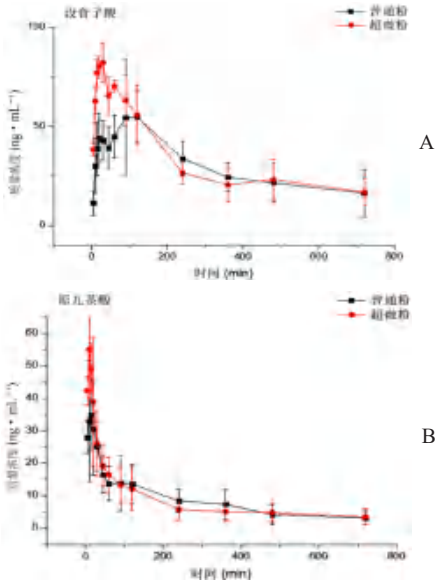


图 6　大鼠体内没食子酸（A）及原儿茶酸（B）血药浓度 - 时间曲线图（$n=10$）

Fig 6　Plasma concentration-time curve of gallic acid（A）and protocatechuic acid（B）in rats（$n=10$）

结果表明，灌胃给药后没食子酸和原儿茶酸在大鼠体内的过程符合二室模型，超微粉组没食子酸和原儿茶酸的 C_{max} 较普通粉组分别提高了 47.2% 和 47.6%；超微粉组没食子酸和原儿茶酸的 $AUC_{0\sim\infty}$ 为普通粉组的 1.21 倍和 1.25 倍。但统计

表 4 七味广枣散超微粉和普通粉中没食子酸和原儿茶酸的药动学参数 (n = 10)

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of gallic acid and protocatechuic acid in ultrafine powder and common powder (n = 10)

参数	没食子酸		原儿茶酸	
	普通粉	超微粉	普通粉	超微粉
$AUC_{0\sim720}$[μg/（L·min）]	21 291.808±4110.279	22 764.262±5444.188	5960.836±1800.702	5925.611±1223.594
$AUC_{0\sim\infty}$[μg/（L·min）]	27 838.362±7762.742	33 804.129±11 569.686	6310.874±1629.42	7889.711±3362.209
$t_{1/2\alpha}$/min	64.266±8.287	53.256±14.034	58.964±21.906	42.517±27.361
$t_{1/2\beta}$/min	69.315±0.000	69.315±0.000	69.315±0.000	69.315±0.000
t_{max}/min	58.333±37.914	52.222±36.238	13.000±5.869	14.000±4.595
C_{max}/（μg·L^{-1}）	67.104±23.662	98.757±56.469	42.573±23.006	62.824±43.617
$MRT_{0\sim720}$/min	280.333±38.500	266.374±57.677	225.166±41.117	220.245±78.167
$MRT_{0\sim\infty}$/min	491.046±152.734	685.609±251.112	387.173±165.278	393.394±216.142

学分析结果表明，以上药动学参数在超微粉组和普通粉组间差异不具有统计学意义。该结果说明，超微粉碎后，酚酸类成分没食子酸和原儿茶酸在大鼠体内的吸收率虽有所增加，但口服生物利用度并未发生明显变化。

3 讨论

七味广枣散方中的主药广枣为全果入药，其果核质硬且体积大，故而采用预先单独超微粉碎后再与其他几种药材普通粉混合进行二次超微粉碎的方法；枫香脂为金缕梅科植物枫香树 *Liquidambar formosana* Hance 的干燥树脂，不具有细胞结构，且受热时变软发黏不利于超微粉碎，故采取将其他 6 种药材先行超微粉碎后再将枫香脂普通粉混入的方法。

本研究体外溶出度测定结果表明，七味广枣散经超微粉碎后，丁香酚的体外溶出度显著提高，而没食子酸和原儿茶酸在溶出开始的短时间内溶出度有所提升，但随着时间的延长，累积溶出率与普通粉趋于一致。该研究结果提示，难溶性成分在超微粉和普通粉中的溶出行为差异与水溶性成分不同。体外溶出度测定结果中，偶有累积溶出率降低的现象，这可能是由于所测成分被吸附至粉体粒子表面所致。药动学研究结果显示，超微粉碎对七味广枣散中 3 种指标成分口服生物利用度的影响与体外溶出度测定结果具有较好的相关性。对于难溶性成分丁香酚，粉体经超微粉碎后，因可改善其溶出而使口服生物利用度得到显著提升；而对于水溶性成分没食子酸和原儿茶酸，超微粉碎对其口服生物利用度的影响并不显著，这与体外溶出度的测定结果具有一定的一致性。丁香酚属于生物药剂学分类系统（BCS）Ⅱ类[7]，即为低溶解性、高渗透性成分，口服生物利用度主要受溶出的影响而受肠吸收影响较小，对于这一类成分，粉体经超微粉碎后，因可改善溶出而可以较好地提高其口服生物利用度；而没食子酸和原儿茶酸则属于 BCS Ⅰ类[8-9]，即为高溶解性、高渗透性成分，该类成分的口服生物利用度原本就较高，超微粉碎对此类成分的影响并不显著，本研究结果亦证实了这一点。由此还可推知，超微粉碎对 BCS Ⅱ类和 BCS Ⅳ类（低溶解性、低渗透性）成分的影响相对于其他两类成分的影响更显著。

本研究结果提示，将药材制备成超微粉时，由于不同性质有效成分的生物利用度与普通粉比较具有不同的变化规律，因此有时还需考虑原处方配比的调整问题，如七味广枣散中的丁香酚主要源于丁香药材，因超微粉碎后丁香酚的生物利用度显著增加，故可考虑适当减少处方中丁香药材的比例。本研究因条件所限，仅选定了 3 种指标成分，且只包含了 1 种难溶性成分，并不能广泛代表处方中难溶性成分的药动学性质变化规律，还需进一步开展更为全面和深入的研究。

参考文献

[1] 杨艳君，邹俊波，张小飞，等 . 超微粉碎技术在中药领域的研究进展 [J]. 中草药，2019，50（23）：5887-5891.

[2] 钱珊珊，桂双英，杨满琴，等 . 中药超微粉碎技术的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报，2019，42（3）：136-140.

[3] 李杰，邢界红 .《中国药典》2010 年版一部所载蒙药品种情况评述 [J]. 中国药品标准，2011，12（5）：328-330.

[4] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：472.

[5] 李书迪，布仁，齐和日玛，等 . 七味广枣散 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材，2020，43（5）：1156-1161.

[6] 高文军，于牡丹，肖云峰，等 . 八味沉香散的药物代谢动力学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（20）：82-85.

[7] 王秀清，刘宇灵，林龙飞，等 . 中药相关生物药剂学分类系统的发展、检测方法及应用 [J]. 中草药，2018，49（12）：2742-2748.

[8] 王晓颖，连红，卢晓艺，等 . 盐肤木提取物酚酸类成分的大鼠在体单向灌流肠吸收研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（11）：2373-2378.

[9] 黄壮壮，李晔，陈衍斌，等 . 广枣提取物大鼠肠外翻的吸收研究 [J]. 西北药学杂志，2017，32（5）：610-613.

（收稿日期：2022-06-08；修回日期：2022-08-08）

土牛膝的不同种质来源的差异性比较研究

张云坤[1, 2, 3]，欧阳文[2, 3]，王智[2, 3]，李娟[2, 3]，姚蓉[1, 3]，唐纯玉[4, 5]，李顺祥[2, 3*]（1. 湖南食品药品职业学院生物工程研究所，长沙 410208；2. 湖南中医药大学药学院，长沙 410208；3. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心，长沙 410208；4. 湖南时代阳光药业股份有限公司，湖南 永州 425007；5. 湖南省抗感染中药工程研究中心，湖南 永州 425007）

摘要：目的 从植物形态学、药材性状特征、薄层色谱、有效成分含量、指纹图谱等方面对 3 种不同种质来源的土牛膝的差异性进行比较，为土牛膝质量标准提升及合理应用提供科学依据。**方法** 在植物分类学鉴定的基础上，对采集的样本进行植物形态学观察；采用传统药材性状鉴别方法对药材性状特征进行比较；通过 TLC 法比较不同药材粉末薄层色谱图；采用 HPLC 法测定药材中 β-蜕皮甾酮的含量；通过指纹图谱比较不同来源土牛膝药材相似度差异。**结果** 3 种不同种质来源土牛膝的植物形态、药材性状特征、薄层色谱图均存在一定差别；土牛膝指纹图谱标定了 11 个共有峰，不同来源土牛膝药材中 β-蜕皮甾酮含量及指纹图谱存在显著差异。**结论** 3 种不同种质来源土牛膝在植物形态学、药材性状特征、薄层色谱、有效成分含量及指纹图谱方面均存在较大差异，应加以甄别利用。

关键词：土牛膝；植物形态学；性状鉴别；薄层色谱；含量测定；指纹图谱
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0044-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.007

Differences in *Achyranthes bidentata* from different germplasm sources

ZHANG Yun-kun[1, 2, 3], OU-YANG Wen[2, 3], WANG Zhi[2, 3], LI Juan[2, 3], YAO Rong[1, 3], TANG Chun-yu[4, 5], LI Shun-xiang[2, 3*] (1. *Institute of Bioengineering*, *Hunan Food and Drug Vocational College*, *Changsha* 410208; 2. *School of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 3. *Hunan Engineering Technology Research Center of Bioactive Substance Discovery of TCM*, *Changsha* 410208; 4. *Hunan Timesun Pharmaceutical Co. Ltd.*, *Yongzhou Hunan* 425007; 5. *Hunan Research Center for Anti-infection Chinese Medicine Engineering Technology*, *Yongzhou Hunan* 425007)

Abstract: Objective To compare the differences in *Achyranthes bidentata* from 3 germplasm sources on plant morphology, medicinal material characteristics, thin layer chromatography (TLC), content of active ingredients, fingerprint, etc., to provide scientific basis for quality standard and rational application of *Achyranthes bidentata*. **Methods** On the basis of plant taxonomic identification, we observed the plant morphology of collected samples. Traditional identification methods were used to compare the characters of medicinal materials. TLC method was used to compare the medicinal powder. The content of β-ecdysterone was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The similarity of *Achyranthes bidentata* from different sources was compared by fingerprint. **Results** There were some differences in the plant morphology, medicinal material characters and TLC of *Achyranthes bidentata* from 3 germplasm sources. HPLC method for the content determination and fingerprint analysis of *Achyranthes bidentata* was established. Totally 11 common peaks were demarcated and β-ecdysterone content was determined in the 11 batches of *Achyranthes bidentata* of

基金项目：湖南省教育厅科学研究项目（No.18C1507，No.18B251）；湖南省自然科学基金项目（No. 2021JJ80055）；湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目（湘食药科 R201806）；湖南中医药大学中药学一流学科（校行科字 [2018]3 号）。
作者简介：张云坤，男，博士，讲师，主要从事中药药效物质基础及作用机制研究，email：zhang_yk2011@163.com *__通信作者__：李顺祥，男，二级教授，研究员，博士研究生导师，主要从事中药药效物质基础与作用机制研究，email：lishunxiang@hotmail.com

different sources. There were significant differences in the content of β-ecdysterone and fingerprints of *Achyranthes bidentata* from different sources. **Conclusion** Totally 3 *Achyranthes bidentata* germplasm show great differences in the plant morphology, medicinal material characters, TLC, content determination and fingerprint, etc., which should be identified.

Key words: *Achyranthes bidentata*; phytomorphology; morphological identification; thin layer chromatography; content determination; fingerprint

土牛膝，别名杜牛膝，其植物来源于苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的野生种及柳叶牛膝 *Achyranthes longifolia*（Makino）Makino、粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L.、钝叶土牛膝 *Achyranthes aspera* L. var. *indica* L. 的根及根茎 [1-2]。土牛膝属于地方习用药材，在许多民间复方中应用广泛，特别是在瑶族药中应用更多 [3-5]，但目前各省份药材标准或炮制规范中收载的植物种质来源并不一致 [6-9]，例如湖南、贵州等地方标准收载品种为粗毛牛膝，江苏、上海等地收载品种为牛膝野生种，而湖北等地收载品种为粗毛牛膝或柳叶牛膝，尚未见不同种质来源土牛膝的差异性比较的文献报道。此外，各地方质量标准的内容均较为简单，如无含量测定方法，也无法对不同种质来源土牛膝进行有效区分，市场上存在相互混用的情况。鉴于此，本研究拟从植物形态学、药材性状特征、薄层色谱、药材有效成分含量测定及指纹图谱等方面对不同种质来源土牛膝进行比较，系统分析不同种质来源土牛膝的差异性，为今后该药材基原确定、质量标准修订及合理应用提供科学依据。

1　材料

1.1　仪器

COODLOOK-1000 型薄层色谱成像系统（上海科哲生化科技有限公司）；1525 型 Waters 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；BSA124S-CW 万分之一电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；SY-1200 金利牌超声波提取器（上海宁商超声仪器有限公司）；Master-S 超纯水机（深圳市三利化学品有限公司）。

1.2　试药

乙腈（德国默克股份有限公司，色谱纯）；无水甲醇、甲酸（天津市光复精细化工研究所，分析纯）；对照品 β- 蜕皮甾酮（上海源叶生物科技有限公司，批号 B21268，纯度 98.0%）；自制超纯水（电阻率 18.2 Ω）。

分别于湖南永州、湖南道州、湖南江华、湖南桃江等地（属亚热带气候环境），收集不同来源土牛膝药材样品 11 批，具体信息见表 1，经湖南中医药大学中药资源中心王智老师鉴定，其中 S1 ～ S6 为苋科牛膝属植物粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L.，S7 ～ S8 为苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的野生种，S9 ～ S11 为苋科牛膝属植物柳叶牛膝 *Achyranthes longifolia* Makino，以上 3 个基原的植物标本均保存在湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心。另外，因钝叶土牛膝 *Achyranthes aspera* L. var. *indica* L. 非常少见，课题组未能采集到相关样本，因此该种暂未纳入研究范围。

表 1　土牛膝样本来源

Tab 1　Sample sources of *Achyranthes bidentata*

编号	采集地	地理位置	海拔高度 /m	药材基原	采样时间
S1	湖南永州马鞍岭基地	111.8ºE，26.2ºN	165	粗毛牛膝	2018-07-23
S2	湖南道州道州南路	111.6ºE，25.5ºN	189	粗毛牛膝	2018-07-23
S3	湖南江华县政府	111.6ºE，25.2ºN	218	粗毛牛膝	2018-07-24
S4	湖南永州马鞍岭基地	111.8ºE，26.2ºN	165	粗毛牛膝	2018-09-26
S5	湖南道州道州南路	111.6ºE，25.5ºN	189	粗毛牛膝	2018-09-26
S6	湖南江华县政府	111.6ºE，25.2ºN	218	粗毛牛膝	2018-09-26
S7	湖南永州马鞍岭基地	111.8ºE，26.2ºN	165	野生牛膝	2018-07-23
S8	湖南江华县政府	112.1ºE，28.5ºN	218	野生牛膝	2018-07-23
S9	湖南永州鹿鸣塘村	111.5ºE，26.1ºN	196	柳叶牛膝	2018-07-23
S10	湖南桃江药铺子村	112.1ºE，28.5ºN	125	柳叶牛膝	2018-11-09
S11	湖南桃江药铺子村	112.1ºE，28.5ºN	125	柳叶牛膝	2018-11-09

2　方法与结果

2.1　不同种质来源土牛膝植物形态学比较

课题组多次赴湖南永州马鞍基地、道州、江华、益阳桃江等地采集新鲜土牛膝样本，并结合文献参考资料[10]，仔细观察原植物的花穗、果实、茎秆、叶、根、茎等，比较并区分粗毛牛膝、牛膝野生种、柳叶牛膝的植物形态。3 种来源土牛膝原植物形态描述见表 2。柳叶牛膝叶片呈明显披针形或宽披针形，较易区分；而粗毛牛膝与牛膝野生种的根、茎、叶形态特征相近，很容易混淆，但从花的形态结构上可以明显区分（见图 1 ～ 2）。

表 2　3 种种质来源的土牛膝原植物形态学比较

Tab 2　Morphological comparison of the original plants from 3 germplasm sources of *Achyranthes bidentata*

部位	粗毛牛膝	野生牛膝	柳叶牛膝
植株	高 20 ～ 120 cm	高 70 ～ 120 cm	同野生牛膝
根	细长，直径 3 ～ 5 mm，黄褐色	圆柱形，直径 5 ～ 10 mm，黄褐色	同野生牛膝
茎	茎四棱形，有柔毛，节部稍膨大，分枝对生	茎有棱角或四方形，绿色或带紫色，有白色贴生或开展柔毛 或近无毛，分枝对生	同野生牛膝
叶	宽卵状倒卵形或椭圆状矩圆形，长 1.5 ～ 7 cm，宽 0.4 ～ 4 cm，顶端圆钝，具突尖，基部楔形或圆形，全缘或波状缘，两面密生柔毛，或近无毛，叶柄长 5 ～ 15 mm，密生柔毛或近无毛	椭圆形或椭圆披针形，少数倒披针形，长 4.5 ～ 12 cm，宽 2 ～ 7.5 cm，顶端尾 尖，尖长 5 ～ 10 mm，基部楔形或宽楔形，两面有贴生或开展柔毛，叶柄长 5 ～ 30 mm，有柔毛	披针形或宽披针形，长 10 ～ 20 cm，宽 2 ～ 5 cm，顶端尾尖
花	穗状花序顶生，直立，长 10 ～ 30 cm，花期后反折；总花梗具棱角，粗壮，坚硬，密生白色伏贴或开展柔毛；花长 3 ～ 4 mm，疏；苞片披针形，长 3 ～ 4 mm，顶端长渐尖；花后变硬且锐尖，具 1 脉；雄蕊长 2.5 ～ 3.5 mm，退化雄蕊顶端截状或细圆齿状，有具分枝流苏状长缘毛	穗状花序顶生及腋生，长 3 ～ 5 cm，花期后反折；总花梗长 1 ～ 2 cm，有白色柔毛；花多数，密生，长 5 mm；苞片宽卵形，长 2 ～ 3 mm，顶端长渐尖；小苞片刺状，长 2.5 ～ 3 mm，顶端弯曲，基部两侧各有 1 卵形膜质小裂片，长的 1 mm；花被片披针形，长 3 ～ 5 mm，光亮，顶端急尖，有 1 中脉，雄蕊长 2 ～ 2.5 mm，退化雄蕊顶端平圆，稍有缺刻状细锯齿	小苞片针状，长 3 ～ 5 mm，基部有 2 耳状薄片，仅有缘毛；退化雄蕊方形，顶端有不显明牙齿
果实	胞果卵形，长 2.5 ～ 3 mm	胞果矩圆形，长 2.5 ～ 3 mm，黄褐色，光滑	同野生牛膝
种子	种子卵形，不扁压，长约 2 mm，棕色	种子短矩形，长约 1 mm，黄褐色	同野生牛膝

1. 叶呈卵形，椭圆形，长圆状倒卵形或披针形；小苞片刺状，基部薄膜不为耳状。
2. 小苞片两侧有薄膜质翅；退化雄蕊顶端有流苏状长睫毛。……粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L.
2. 小苞片两侧有膜质小裂片，退化雄蕊顶端无睫毛，有缺刻状细锯齿状。……牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume
1. 叶呈披针形或宽披针形；小苞片针状，基部有耳状薄膜。……柳叶牛膝 *Achyranthes longifolia* Makino

图 1　3 种来源土牛膝植物分类检索表

Fig 1　Identification key of 3 germplasm sources of *Achyranthes bidentata*

2.2　不同种质来源土牛膝药材性状特征比较

采集不同种质土牛膝样本，除去茎叶、须根，洗净，鲜用或晒干，切斜薄片或不规则的段状，干燥，筛去灰屑。采用传统的药材性状鉴别方法，即眼看、手、摸、鼻、闻、口尝等方法对牛膝药材及饮片进行性状鉴别，同时取干燥好的土牛膝根置于标准比色卡上，比对药材色泽，并利用标准度量尺测量药材根的长度与直径，测量完毕后于体视显微镜下观察表面特征及切面。3 种来源的土牛膝根性状鉴别见表 3。3 种不同种质来源的土牛膝药材及饮片经炮制加工后，粗毛牛膝与野生牛膝在药材性状特征比较接近，从性状上难以区分；而柳叶牛膝由于其根及根茎断面呈淡粉色，可与另外 2 个基原较好地区分。

2.3　不同种质来源土牛膝药材薄层色谱比较

分别取野生牛膝、柳叶牛膝和粗毛牛膝药材粉末各 1 g，加甲醇 50 mL，超声提取 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取 β-蜕皮甾酮对照品，加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取供试品溶液各 10 μL、对照品溶液 5 μL，分别点于同一硅胶 GF_{254} 薄层板上，以三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸（10∶2∶0.05）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯（254 nm）下检视，再喷以 5% 香草醛硫酸溶液，在 105 ℃加热至斑点显色清晰。3 种种质来源的土牛膝药材薄层色谱结果见图 3。

从图 3 可知，3 种不同种质来源的土牛膝均含有 β-蜕皮甾酮，喷以 5% 香草醛硫酸溶液显色后，不同来源的土牛膝薄层色谱斑点存在一定差异，其中柳叶牛膝与其他种质来源差异较大。

表 3　3 种种质来源的土牛膝药材性状比较

Tab 3　Characters of *Achyranthes bidentata* from 3 germplasm sources

性状	粗毛牛膝	野生牛膝	柳叶牛膝
形状	主根较短，分枝较多，圆柱形，微弯曲，少见微扭曲状	主根较短，具有较多分枝，圆柱形，上段较粗	根粗短呈圆柱形
大小	直径 0.2 ～ 0.5 cm	直径 0.1 ～ 0.5 cm	直径 0.7 ～ 1.2 cm
颜色	黄褐色或灰黄色	灰黄色	红棕色
表面特征	具有细顺纹、侧根痕及横长皮孔样突起	具有细顺纹及侧根痕	具有侧根痕
质地	坚韧，不易折断	柔韧，不易折断	柔软，不易折断
断面	纤维性强，有小点状维管束排成数个轮环	纤维性强，小点状维管束排成数个轮环	淡粉色，有异型维管束散在
气味	气微，味淡	气微，味涩而淡	气微，味微甜

图 2　3 种种质来源的土牛膝原植物形态学比较

Fig 2　Morphological comparison of the protoplants from 3 germplasm sources of *Achyranthes bidentata*

A. 粗毛牛膝穗状花序（spike of *Achyranthes aspera* L.）；B. 野生牛膝穗状花序（spike of *Achyranthes bidentata* Blume）；C. 柳叶牛膝地上部分（aerial parts of *Achyranthes longifolia* Makino）；D. 野生牛膝地上部分（aerial parts of *Achyranthes bidentata* Blume）；E. 粗毛牛膝地上部分（aerial parts of *Achyranthes aspera* L.）

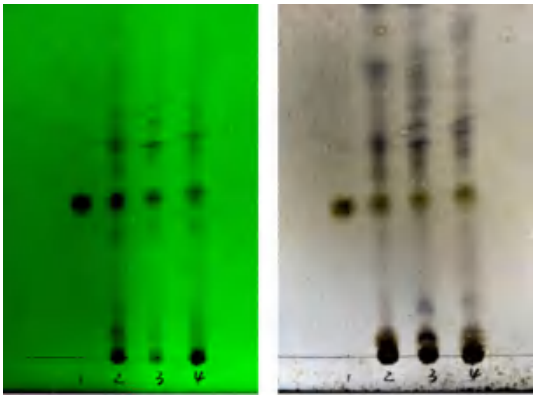


图 3　3 种种质来源的土牛膝药材薄层色谱

Fig 3　TLC of *Achyranthes bidentata* from 3 germplasm sources

1. *β*-蜕皮甾酮（*β*-ecdysterone）；2. 野生牛膝（*Achyranthes bidentata* Blume）；3. 柳叶牛膝（*Achyranthes longifolia* Makino）；4. 粗毛牛膝（*Achyranthes aspera* L.）

2.4　不同种质来源土牛膝药材中*β*-蜕皮甾酮含量比较

2.4.1　对照品溶液的制备　取*β*-蜕皮甾酮对照品适量，精密称定，加甲醇定容至 5 mL 量瓶中，制成 1 mg·mL^{-1} 的溶液，再精密量取 1 mL，稀释至 10 mL 量瓶中，制成 0.1 mg·mL^{-1} 的溶液。

2.4.2　供试品溶液的制备　取药材粉末（过三号筛）约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定重量，超声处理（功率 300 kW，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 25 mL 于蒸发皿中，蒸干，残渣用甲醇溶解，定容至 5 mL 量瓶中，摇匀，即得。

2.4.3　色谱条件　YMC-Pack ODS-A-C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 10 min，5% ～ 15%A；10 ～ 25 min，15% ～ 17%A；25 ～ 30 min，17% ～ 20%A；30 ～ 40 min，20% ～ 32%A；40 ～ 50 min，32% ～ 40%A；50 ～ 65 min，40% ～ 60%A；65 ～ 75 min，60% ～ 70%A；75 ～ 80 min，70% ～ 80%A）；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：40 ℃；检测波长：250 nm；进样量：10 μL；对照品及供试品溶液（S1）色谱图如图 4 所示。

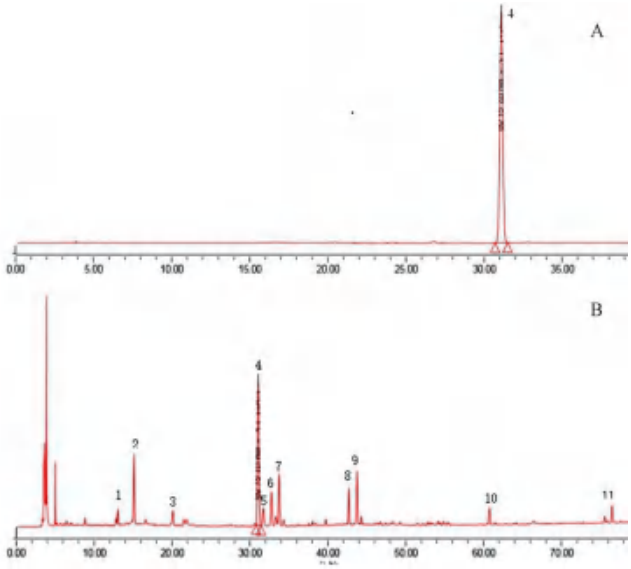


图 4　对照品溶液（A）和供试品溶液（B）的 HPLC 图

Fig 4　HPLC chromatogram of reference substances（A）and test solution（B）

4. *β*-蜕皮甾酮（*β*-ecdysterone）

2.4.4　方法学考察

① 线性关系考察：取“2.4.1”项下对照品溶液适量，用甲醇稀释成不同质量浓度的系列溶液，0.45 μm 微孔滤膜滤过，按“2.4.3”项下色谱条件测定，以峰面积为纵坐标（*A*），进样量为横坐标（*W*），进行回归处理，回归方程为：$A = 1.20\times10^{5}W + 3.64\times10^{4}$，$r = 0.9995$。结果表明，*β*-蜕皮甾酮在 19.96 ～ 199.60 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

② 重复性试验：精密称定 S1 号样品粉末 6 份，分别按“2.4.2”项下方法制备成供试品溶液，按“2.4.3”项下色谱条件测定。计算得*β*-蜕皮甾酮的含量为 0.05%，*RSD* 为 0.90%，表明方法重复性较好。

③ 精密度试验：精密称定 S1 号样品粉末约 1 g，按“2.4.2”项下方法制备成供试品溶液，按“2.4.3”项下色谱条件连续进样 6 次，计算得*β*-蜕皮甾酮峰面积的 *RSD* 值为 0.50%，表明仪器精密度良好。

④ 稳定性试验：精密称定 S1 号样品粉末约 1 g，按“2.4.2”项下方法制备成供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算得*β*-蜕皮甾酮峰面积的 *RSD* 值为 0.80%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

⑤ 加样回收试验：精密称定已知含量的样品（*β*-蜕皮甾酮含量为 0.42 mg • g^{-1}）0.5 g，置锥形瓶中，精密加入质量浓度为 0.004 mg • mL^{-1} 的*β*-蜕皮甾酮对照品溶液 50 mL，按“2.4.2”项下方法平行制备 6 份样品溶液，进样测定，计算得*β*-蜕皮甾酮的平均加样回收率为 99.90%，*RSD* 为 1.8%，表明方法准确度良好。

2.4.5　含量测定结果　取 11 批不同来源土牛膝样品，每批平行制备 3 份供试品溶液，进样测定，计算样品中*β*-蜕皮甾酮的含量（见表 4）。结果表明，不同来源土牛膝中*β*-蜕皮甾酮含量存在较大差异。其中产自湖南桃江产柳叶牛膝中*β*-蜕皮甾酮含量最高（达到 0.098%），其次为湖南道州产粗毛牛膝（0.084%），而湖南江华牛膝野生种中*β*-蜕皮甾酮含量最低（0.034%）。

2.5　不同种质来源土牛膝药材指纹图谱比较

选取 11 批样品，处理后进样分析得到 HPLC 色谱图，建立指纹图谱，见图 5。标定了 11 个共有峰。由于 4 号峰（*β*-蜕皮甾酮）峰面积较大且为所有样品共有，分离度较好，故确定 4 号峰作为参照峰。结果表明，各色谱峰相对保留时间变化不大，其 *RSD* 均在 5% 以内，各色谱峰相对峰面积的 *RSD* 有较大差异，但其谱图轮廓一致。

表 4　11 批土牛膝中*β*-蜕皮甾酮的含量测定（$n = 3$）

Tab 4　Content of *β*-ecdysterone content in 11 batches of of *Achyranthes bidentata* ($n = 3$)

样品编号	含量 /%	*RSD*/%
S1	0.050	1.5
S2	0.082	1.3
S3	0.052	1.5
S4	0.069	1.4
S5	0.084	1.3
S6	0.056	1.5
S7	0.076	1.2
S8	0.034	1.8
S9	0.042	1.7
S10	0.098	1.0
S11	0.095	1.1

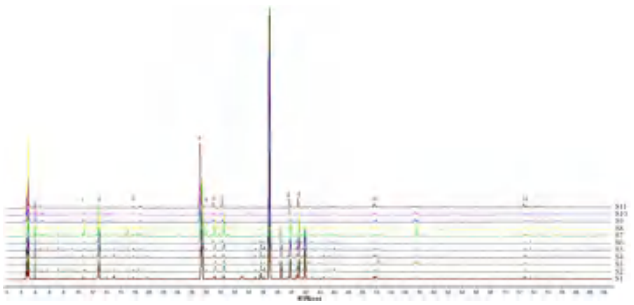


图 5　11 批土牛膝 HPLC 指纹图谱

Fig 5　HPLC fingerprints of 11 batches of *Achyranthes bidentata*

对本研究中收集的 11 批不同来源的土牛膝药材的指纹图谱通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行相似度分析（见表 5）。结果表明，湖南永州马鞍岭基地与湖南道州产粗毛牛膝相似度较高（均在 0.936 以上），湖南江华产粗毛牛膝相似度偏低（均在 0.850 ～ 0.866）；湖南永州马鞍岭基地及湖南江华产牛膝野生种相似度较低（均在 0.492 ～ 0.520）；湖南永州鹿鸣塘村、益阳桃江产柳叶牛膝相似度最低（均低于 0.204），说明不同种质来源的土牛膝药材之间存在明显的差异，应加以甄别利用。

表 5　11 批土牛膝的指纹图谱相似度

Tab 5　Similarity of 11 batches of *Achyranthes bidentata*

样本编号	相似度	样本编号	相似度
S1	0.936	S7	0.520
S2	0.966	S8	0.492
S3	0.850	S9	0.190
S4	0.948	S10	0.199
S5	0.976	S11	0.204
S6	0.866		

3　讨论

3.1　土牛膝基原鉴别

土牛膝由于种质来源较为复杂，不同省份药

材标准收载范围不一致，需对其进行基原考证，并加以甄别利用。通过植物形态学比较发现，柳叶牛膝原植物较易区分，而粗毛牛膝与野生牛膝很容易混淆，但从花的形态结构上可以明显区分。土牛膝经炮制加工后，粗毛牛膝与野生牛膝药材或饮片在性状特征方面更加接近，难以区分，而柳叶牛膝由于其根及根茎断面呈淡粉色，可与另外 2 个基原较好地区分。薄层色谱显示，三者薄层色谱斑点存在一定差异，其中柳叶牛膝与其他种质差异较大。此外，要准确鉴定土牛膝这味药材，还可配合相应的显微特征图进一步比较。

3.2 土牛膝物质基础及质量指标选择

目前土牛膝物质基础研究表明，其主要含有昆虫变态激素类（如*β*-蜕皮甾酮）、三萜皂苷类（如竹节参皂苷Ⅳa）、黄酮类、多糖类等化学成分[11-13]。其中，*β*-蜕皮甾酮作为土牛膝的主要有效成分之一，在促进核酸及蛋白质的合成、调整体内新陈代谢、抗炎、提高身体免疫力等方面起重要作用[14-15]，因此选择*β*-蜕皮甾酮作为薄层色谱、含量测定的指标，相对于采用齐墩果酸作为质量指标成分，更具有药材特征性。

比较了不同浸提方法，如浸渍法、回流法、超声法提取药材有效成分的效果。结果超声提取法在 30 min 左右提取率最好，提取时间较短，比其他提取方法高效。尝试了 6 种提取溶剂：50% 乙醇、甲醇（50%、70%、100%）、正丁醇，发现采用 50% 乙醇、50% 甲醇和 70% 甲醇作为提取溶剂时，虽得到的*β*-蜕皮甾酮含量与无水甲醇提取的并无太大差异，但过滤时，多糖物质易堵孔，致过滤时间长。在进行含量测定时发现无水甲醇提取*β*-蜕皮甾酮比正丁醇提取更完全，且色谱峰更丰富，因此，最后选取无水甲醇为提取溶剂。

3.3 高效液相色谱条件的优化

曾考察了 Agilent ZORBX SD-Aq 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、CAPCELL PAKC18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）和 YMC-Pack OS-A-C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）3 种色谱柱，30 ℃、35 ℃、40 ℃ 3 种柱温，比较了等度洗脱和梯度洗脱，最终确定采用 YMC-Pack OS-A-C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，柱温为 40 ℃，采用乙腈 -0.1% 甲酸水梯度洗脱，色谱峰信息更丰富，分离情况较好，峰形对称。

将对照品溶液在 190 ～ 400 nm 波长内进行扫描，得到全波长紫外扫描图，*β*-蜕皮甾酮的最大吸收波长为 250 nm，因此选择 250 nm 为检测波长。

4 小结

本研究从土牛膝原植物入手，从植物形态、性状特征、薄层色谱、含量测定、指纹图谱等方面对不同种质来源的土牛膝进行了系统比较。结果表明，3 种不同种质来源土牛膝存在较大差异，应加以甄别利用。本研究对于今后药材基原控制、质量标准修订及合理应用提供了科学依据，为我省土牛膝大宗药材的培育提供了技术支持。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草（第二册）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：836.

[2] 王国强 . 全国中草药汇编（卷二）[M]. 北京：人民卫生出版社，2014：9.

[3] 文庆，方磊，李瑞莲，等 . 土牛膝药材民族特色及研究现状 [J]. 中国药业，2018，27（21）：1-5.

[4] 欧阳文，罗懿钒，唐代凤，等 . 喉咽清口服液抗炎活性成分的筛选 [J]. 中成药，2021，43（7）：1932-1936

[5] 钟鸣，韦松基 . 常用壮药临床手册 [M]. 南宁：广西科学技术出版社，2010：292.

[6] 湖南省食品药品监督管理局 . 湖南省中药材标准 [S]. 长沙：湖南科学技术出版社，2009：292.

[7] 湖南省食品药品监督管理局 . 湖南省中药饮片炮制规范 [S]. 长沙：湖南科学技术出版社，2010：108.

[8] 江苏省药品监督管理局 . 江苏省中药材标准 [S]. 南京：江苏凤凰科学技术出版社，2018：9.

[9] 湖北省药品监督管理局 . 湖北省中药材标准 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2019：9.

[10] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1993.

[11] 欧阳文，罗懿钒，李顺祥，等 . 湘产土牛膝中蜕皮甾酮类化合物分离与鉴定 [J]. 湖南中医药大学学报，2018，38（10）：1129-1132.

[12] 罗懿钒，欧阳文，唐代凤，等 . 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22（12）：2122-2136.

[13] 欧阳文，罗懿钒，李顺祥，等 . 土牛膝中 1 种新异黄酮的分离与鉴定 [J]. 中草药，2018，49（14）：3208-3212.

[14] 欧阳文，罗懿钒，李震，等 . 土牛膝抗炎成分分离、鉴定与含量测定研究 [J]. 天然产物研究与开发，2020，32（7）：1171-1181.

[15] 汤样华，辛大伟，李国松，等 .*β*-蜕皮甾酮对激素性骨质疏松大鼠血清骨代谢指标及骨密度的影响 [J]. 温州医科大学学报，2019，49（2）：100-103.

（收稿日期：2022-06-29；修回日期：2022-08-19）

雷公藤红素纳米结构脂质载体的抗肿瘤作用研究

陈铭[1]，张翔珂[1]，董雨萌[1]，张新宇[1]，王雪莹[2]，苏慧[1]，阎雪莹[1*]（1.黑龙江中医药大学药学院，哈尔滨 150040；2.黑龙江中医药大学附属第一医院，哈尔滨 150040）

摘要：目的 对雷公藤红素（Cel）纳米结构脂质载体（Cel-NLC）进行体外释放动力学、大鼠体内药动学、体外抗肿瘤作用及对细胞周期和细胞凋亡的影响的影响，并对相关参数进行科学分析。**方法** 采用透析法考察 Cel-NLC 的体外释放行为；通过大鼠体内药动学研究绘制血药浓度 - 时间曲线，并对药动学参数进行分析；以 MTT 法考察 Cel-NLC 对 A549 细胞、SMMC-7721 细胞、MCF-7 细胞的毒性，计算半数致死量（IC_{50}）；采用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒法，通过流式细胞仪检测 Cel-NLC 对肿瘤细胞凋亡的影响；采用 PI 单染细胞仪检测 Cel-NLC 对肿瘤细胞周期阻滞的影响。**结果** Cel-NLC 在 4%SDS 释放介质中 48 h 内累积释放率为 66.98%。Cel-NLC 的消除半衰期是其注射乳的 3.9 倍，血药浓度 - 时间曲线下面积是注射乳的 2.4 倍，而血浆清除率仅为注射乳的 0.41 倍，差异有统计学意义。雷公藤红素单体及其纳米结构脂质载体对 SMMC-7721 细胞抑制作用 48 h 的 IC_{50} 分别为 6.197 μg • mL^{-1}、2.433 μg • mL^{-1}，诱导 SMMC-7721 细胞凋亡并呈剂量依赖性，阻滞 SMMC-7721 细胞周期于 S 期，抑制 DNA 合成。**结论** Cel-NLC 较游离雷公藤红素体外释放缓慢，具有一定的缓释效果，无突释现象；可显著延长大鼠的体内滞留时间；可更好地促进人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡，阻滞细胞 DNA 合成。

关键词：雷公藤红素；纳米结构脂质载体；体外释放；药动学；细胞凋亡；细胞周期
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0050-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.008

Antitumor effect of celastrol nanostructured lipid carriers

CHEN Ming[1], ZHANG Xiang-ke[1], DONG Yu-meng[1], ZHANG Xin-yu[1], WANG Xue-ying[2], SU Hui[1], YAN Xue-ying[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040; 2. *First Affiliated Hospital*, *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040)

Abstract: Objective To determine the in vitro release kinetics, pharmacokinetics in rats, anti-tumor effect in vitro and effect on the cell cycle and apoptosis of the celastrol (Cel) nanostructured lipid carriers (Cel-NLCs) preliminarily, and to analyze the related parameters. **Methods** The in vitro drug release behaviors of nanostructured lipid carriers were determined by dialysis method. The plasma concentration-time curves were obtained through the study of pharmacokinetics in rats and the pharmacokinetic parameters were analyzed. The toxicity of Cel-NLCs to A549 cells, SMMC-7721 cells and MCF-7 tumor cells was detected by MTT, and the median lethal dose (IC_{50}) was calculated. Annexin V-FITC/PI double staining kit was used to detect the effect of NLCs on the apoptosis of tumor cells by flow cytometry. The effect of compound liposomes on the blocking of tumor cell cycles was detected by PI single staining cytometry. **Results** The cumulative release rate of Cel-NLCs in 4% SDS release medium within 48 h was 66.98%. The elimination half-life of Cel-NLCs was 3.9 times that of the propofol injectable emulsion, the area under the plasma concentration-time curves was 2.4 times that of propofol injectable emulsion, while the plasma clearance rate was only 0.41 times that of propofol injectable emulsion, all of which showed significant difference. The IC_{50} of celastrol monomers and the Cel-NLCs on SMMC-7721 cells for 48 h were 6.197 μg • mL^{-1} and

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目（No.LH2020H096，No.LH2021H102）。
作者简介：陈铭，女，硕士，主要从事靶向及缓控释制剂研究，email：434411083@qq.com *__通信作者__：阎雪莹，女，教授，硕士研究生导师，主要从事靶向及缓控释制剂研究，email：yyyanxueying@sina.com

2.433 μg • mL^{-1} respectively. Cel-NLCs induced SMMC-7721 cell apoptosis in a dose-dependent manner, blocked SMMC-7721 cell cycled at S phase, and inhibited the DNA synthesis. **Conclusion** The release of Cel-NLCs is slow as compared with dissociation celastrol in vitro, which shows a certain sustained-release effect without initial burst release. Cel-NLCs can extend the retention time in rats significantly better promote the apoptosis of human liver tumor SMMC-7721 cells and block the DNA synthesis.

Key words: celastrol; nanostructured lipid carrier; in vitro release; pharmacokinetics; apoptosis; cell cycle

雷公藤红素（celstrol，简称 Cel）是中药雷公藤根皮部提取得到的天然活性成分[1]，具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、免疫调节等药理活性，且对多种肿瘤细胞具有抑制作用，如卵巢癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、结肠癌等[2]。然而，Cel 具有毒副作用较强、水不溶性、生物利用度低、体内消除快等缺点，限制了其临床应用[3]。在纳米给药系统中，脂质纳米粒是目前新剂型研究的前沿领域，广泛应用于透皮给药研究，以及肺部和眼部给药研究。脂质纳米粒包括固体脂质纳米粒和纳米结构脂质载体（NLC），NLC 是在固体纳米颗粒基础上发展起来的新型纳米脂质载药体系，由液体油脂、固体油脂和乳化剂构成。继承了固体脂质纳米粒的优点，并且解决了其粒径大，凝胶化趋势，以及由于固体脂质的晶体结构而导致的包封率低等问题[4-6]。且 NLC 具有良好的生物相容性、生物利用度、缓释特性[7]，可以作为水不溶性抗肿瘤药物载体，当静脉或肌内注射进入机体后，由于具有被动靶向性，大大增加了其在肿瘤部位的分布[8]。例如，Wang 等[9]为探讨 NLC 在姜黄素（Cur）高效靶向给药方面的潜力，研究了 Cur-NLC 单次腹腔注射给药后的药动学参数，发现与 Cur 相比，Cur-NLC 具有更明显的肺靶向性，且 Cur-NLC 处理的肺腺癌细胞凋亡率明显高于 Cur 处理的 A549 细胞；韩翠艳等[10]制备了具有丙氨酸 - 谷氨酸 - 酪氨酸 - 亮氨酸 - 精氨酸（aeylr）序列小肽修饰的紫杉醇（PTX）纳米结构脂质载体（a-p-NLC），并进行体内外抗肿瘤作用实验，发现其对 NCI-H1299 细胞、S180 细胞和小鼠 S180 实体瘤的抑制作用均优于游离 PTX 和 p-NLC。故本课题在前期研究基础上针对雷公藤红素纳米结构脂质载体（Cel-NLC），开展体外释放特性、大鼠体内药动学性质等考察，研究 Cel-NLC 的体外抗肿瘤作用，为进一步研究和开发雷公藤红素新型递药系统并提升其临床治疗效果提供相关实验基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；W202B 数控恒温水浴锅（上海申胜生物有限公司）；UV9100 紫外分光光度计（北京莱伯泰科仪器有限公司）；Unique-R20 多功能超纯水机（厦门锐思捷水纯化技术有限公司）；Scientz-ⅡD 超声波细胞破碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；KQ5200DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；HZS-HA 恒温水浴振荡器（东联电子技术开发有限公司）；BT25S 分析天平（德国赛多利斯公司）；HJ-6A 数显恒温磁力搅拌器（金坛市荣华仪器制造有限公司）；Alpha 1-2 LD 冷冻干燥机（德国 Christ 公司）；Allegra 64R 低温高速离心机（贝克曼公司）；HSC-12B 氮吹仪（天津恒奥科技有限公司）；QL-901 涡旋仪（其林贝尔仪器制造公司）；IX73 倒置显微镜（奥林巴斯公司）；WT-1ND 超净工作台（Heal Force 公司）；超低温冰箱（中科美菱公司）；HF90 二氧化碳培养箱（Thermo 公司）；YDS-30 液氮生物容器（四川亚西低温设备公司）；高压灭菌锅（ZEALWAY 公司）；MK3 酶标仪（美国热电仪器有限公司）。

1.2 试药

Cel 对照品（成都普菲德生物技术有限公司，批号：34157-83-0，纯度＞ 98%）；肉豆蔻酸异丙酯（上海源叶生物科技有限公司，批号：110-27-0，纯度：98%）；维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯（TPGS）、双硬脂酸甘油酯、嵌段式聚醚 F-68（上海源叶生物科技有限公司，批号：9002-96-4、1323-83-7、9003-11-6）；SephadexG-50 葡聚糖凝胶（瑞典法玛西亚公司，批号：17-0033-01）；胎牛血清（FBS，杭州四季青生物材料工程公司）；双抗（BiLLab 公司）；四甲基偶氮唑蓝（MTT，华美生物工程有限公司）；胰蛋白酶（BiLLab 公司）；Hoechst 33342 荧光染色液（碧云天生物技

术有限公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，北京中杉金桥有限公司）；二甲基亚砜（DMSO，北京化工厂）；1640 培养基（赛默飞世尔生物化学制品有限公司）；复方脂质体（本实验室自制）；油酸、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、卵磷脂（天津市科密欧化学试剂公司）；甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

1.3　实验动物

SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量（200±20）g；健康昆明小鼠 15 只，雌雄各半，体质量（20±0.2）g [黑龙江中医药大学 GLP 实验室，实验动物生产许可证号分别为 SYXK（黑）2018-003]。

2　方法与结果

2.1　雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备

本课题组前期采用熔融乳化超声法制备 NLC，优化了 Cel-NLC 的制备工艺，并对其进行了表征 [11]。最优处方的液态脂质比例为 39%，复合乳化剂用量为 196 mg，主药用量为 8 mg。所制 3 批 Cel-NLC 的平均包封率为 87.22%、平均粒径为（41.2±1.1）nm、平均 Zeta 电位为（－ 18.4±0.2）mV（n ＝ 3）。具体操作为：称取 72 mg 双硬脂酸甘油酯、28 mg 肉豆蔻酸异丙酯、8 mg Cel 于 20 mL 烧杯中，加适量甲醇，70 ℃恒温水浴使其充分熔融作为油相；取 196 mg 的嵌段式聚醚 F-68 和 TPGS 于 50 mL 烧杯中，加适量蒸馏水 70 ℃恒温水浴搅拌，待完全溶解后作为水相。将水相加入到油相中，在恒温磁力搅拌器下保持 70 ℃条件下 1500 r • min^{-1} 搅拌乳化 60 min，趁热将制得的初乳转移至细胞破碎机中 600 W 下探头超声 10 min，冷却后 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得 Cel-NLC，按最优处方制备 Cel-NLC 后，加入同体积的 10% 甘露醇作为冻干保护剂，－ 78 ℃预冻 24 h 后迅速转入冻干机中干燥 48 h，既得 Cel-NLC 冻干粉。

2.2　脂质体初步安全性评价

2.2.1　溶血性实验　健康 SD 大鼠腹主动脉取血，5000 r • min^{-1} 离心 10 min，弃去上层血浆，加三倍量生理盐水冲洗血细胞，5000 r • min^{-1} 离心 10 min，弃去上清，继续冲洗，离心，直至上层生理盐水不显红色，制备 2% 的红细胞悬液，37 ℃水浴静置保温观察溶血情况。将各管样品溶液置于干燥离心管中 2000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 2 mL 于 545 nm 处测定吸光度，计算溶血率。实验发现，1 ～ 6 号试管红细胞全部沉淀，肉眼观察无溶血，1 ～ 5 号试管内样品溶血率均小于 5%，说明制剂安全性较好，符合注射剂要求，结果见表 1 及图 1。

表 1　纳米结构脂质载体溶血实验结果

Tab 1　Hemolysis test of NLCs

组别	红细胞悬液 /mL	生理盐水 /mL	蒸馏水 / mL	Cel-NLC/ mL	结果	溶血率 /%
1	2.5	2.4	—	0.1	未溶血	1.42
2	2.5	2.3	—	0.2	未溶血	1.58
3	2.5	2.2	—	0.3	未溶血	2.13
4	2.5	2.1	—	0.4	未溶血	2.36
5	2.5	2.0	—	0.5	未溶血	2.19
6	2.5	2.5	—	—	未溶血	0.00
7	2.5	—	2.5	—	溶血	100.00

2.2.2　异常毒性　精密称取 Cel 对照品适量，转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，混匀，得到 520 μg • mL^{-1} 的 Cel 对照品溶液，储存备用。取健康昆明小鼠 10 只，分为游离药 Cel 组和 Cel-NLC 组，按体表面积法换算给药量后从尾静脉注射 Cel 对照品溶液和 Cel-NLC 分散液各 0.1 mL，观察 48 h 内动物病死率，结果两组小鼠均无死亡，证明 Cel-NLC 分散液异常毒性检查合格。

2.3　脂质体体外释放研究

2.3.1　释放介质的选择　由于 Cel 不溶于水，考虑漏槽条件，向透析外液中加入适量表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）。本实验考察了 Cel 在 2%SDS，4%SDS，pH7.4 的 PBS-2%SDS，pH 7.4 的 PBS-4%SDS 溶液中的溶解度，结果表明，在 4%SDS 中 Cel 溶解度最佳，为（981.53±3.18）μg • mL^{-1}，故选用 4%SDS 作为释放介质。

2.3.2　体外释放度的测定　分别取 2 mL Cel 溶液（含 Cel 2 mg）、2 mL Cel-NLC 纳米结构脂质载体冻干粉复溶液（含 Cel 2 mg）转移至透析袋中，除净气泡，夹紧透析袋两端，置于盛有 50 mL 透析外液的广口瓶中，恒温水浴振荡器 37 ℃下 100 r•min^{-1} 振摇。分别在 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48 h 吸取 1 mL 透析外液，同时向广口瓶中补充 1 mL 透析外液，HPLC 法测定透析外液中 Cel 含量，计算累积释放百分率，公式为：

$$Q(\%) = (V_0 \cdot C_t + V \cdot \sum_{n=1}^{t-1} C_t) \cdot 100\% \cdot W^{-1}$$

式中 V 为每次的取样体积，V_0 为释放介质总体积，C_t 为各时间点释放介质中 Cel 质量浓度（μg • mL^{-1}），W 为投入的 Cel 的总质量（μg）。Cel 原料药和 Cel-NLC 的累积释放百分率数据见图 2。从累积释放百分率看，Cel-NLC 在 30 min 内累积释放 6.48%，小于 40%，符合《中国药典》规定，不存在突释现象；Cel 溶液在 12 h 内释药量即达到了 96.42%，而 Cel-NLC 在 48 h 的释药量为 66.98%，说明 NLC 对 Cel 起到了较为明显的缓释作用。

2.3.3　数据拟合　将累积释放量结果与数学模型

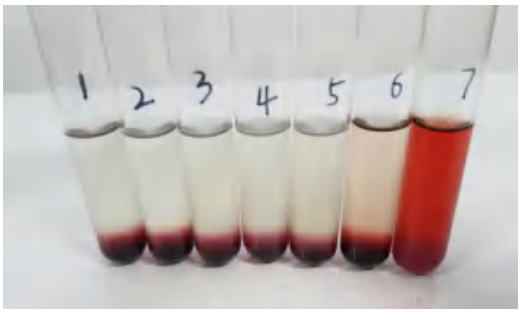


图 1　溶血性实验结果图

Fig 1　Hemolytic experiment

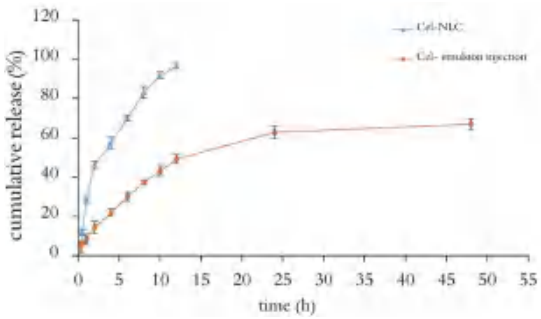


图 2　Cel 和 Cel-NLC 溶液的体外释放曲线

Fig 2　Release curve of Cel and Cel-NLC

进行拟合，可知，Cel-NLC 的体外释放机制符合 Weibull 方程（R^2 = 0.9818）和 Ritger-peppas 方程（R^2 = 0.9748），结果见表 2。

表 2　Cel 累积释药曲线的拟合方程

Tab 2　Fitting equation of the accumulative release percentage of Cel

数学模型	方程式	拟合度（R^2）
一级动力学方程	$\ln(100-Q) = -0.0225t + 4.4122$	0.8138
Higuchi 方程	$Q = 7.290t_{1/2} + 18.457$	0.9180
Niebergull 方程	$(100-Q)^{1/2} = 0.084t + 9.0681$	0.7658
Hixcon-crowell 方程	$(100-Q)^{1/3} = 0.0286t + 4.3493$	0.7823
Weibull 方程	$\ln[\ln 100/(100-Q)] = 0.6611\ln(t) - 2.2238$	0.9818
Ritger-peppas 方程	$\ln(Q) = 0.5652\ln(t) + 2.3144$	0.9748

2.4　方法学验证

2.4.1　色谱条件　色谱柱：Dikma Di-amonsil（钻石一代）C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）-水（B），梯度洗脱（0 ～ 12 min，85%A；12 ～ 20 min，85% → 90%A；20 ～ 30 min，90%A）；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长：426 nm；进样量：20 μL。

2.4.2　血浆样品处理方法　吸取 200 μL 血浆样品置于 1.5 mL 离心管中，加甲醇 1 mL，涡旋混合 1 min，5000 r • min^{-1} 离心 10 min，沉淀血浆蛋白。取上清液于 40 ℃水浴条件下氮气吹干，残留物加 200 μL 甲醇溶解，涡旋混匀，5000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.4.3　专属性验证　取大鼠空白血浆、加入一定浓度的 Cel 对照品的大鼠血浆各 200 μL，按“2.4.2”项下方法进行操作，按“2.4.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析得到色谱图见图 3，由图可见，Cel 保留时间为 19.83 min，血浆代谢物及其他内源性物质对 Cel 特征峰无干扰，说明本方法具有较好的专属性。

2.4.4　标准曲线的建立　分别制备质量浓度为 0.5、2.0、10.0、20.0、30.0、40.0 μg • mL^{-1} 的 Cel 血浆样品供试液，按“2.4.1”项下色谱条件进行分析。以质量浓度（C）为横坐标，峰面积（A）为纵坐标，得线性回归方程：$A = 1.09\times10^4C - 1.40\times10^3$（$R^2$ = 0.9991），表明 Cel 在 0.5 ～ 40.0 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

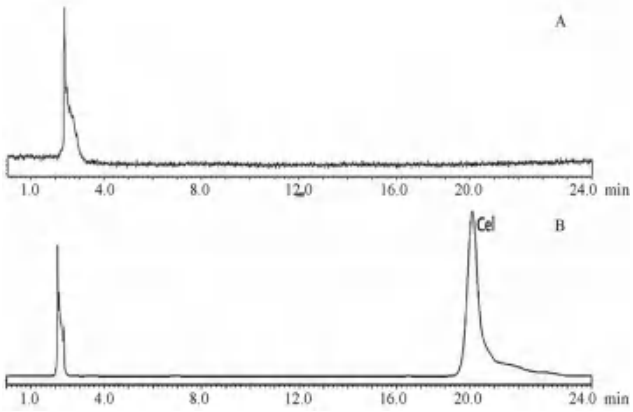


图 3　血浆样品 HPLC 色谱峰

Fig 3　Chromatograms of plasma

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 含 Cel 血浆（plasma with Cel）

2.4.5　精密度实验　分别制备质量浓度为 0.5、20.0、40.0 μg • mL^{-1} 的 Cel 血浆样品供试液，1 d 内连续测定 5 次，计算得日内 *RSD* 分别为 2.4%、1.4%、1.3%；连续测定 5 d，计算得日间 *RSD* 分别为 2.6%、2.2%、2.3%，表明仪器精密度良好。

2.4.6　回收实验　分别制备质量浓度为 0.5、20.0、40.0 μg • mL^{-1} 的 Cel 血浆样品供试液，每个浓度 3 份样品，按“2.4.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析，记录峰面积，将峰面积代入标准曲线中，计算样品浓度，与加入浓度进行比较，计算得方法回收率分别为 98.7%、99.6%、99.5%，*RSD* 分别

为 1.5%、2.4%、2.1%，表明该方法稳定可靠。

2.5　Cel 纳米结构脂质载体大鼠体内药动学研究

2.5.1　供试品的制备　按“2.1”项下最佳处方和工艺制备 Cel-NLC 冻干粉末，备用。由于 Cel 难溶于水，故将其制备成注射乳。

① 油相的制备：吸取肉豆蔻酸异丙酯 0.5 mL、注射用大豆油 5 mL 置于烧杯中，60 ℃恒温搅拌约 20 min，加入 Cel 100 mg，加热至 70 ℃并保持恒温，继续搅拌。

② 水相的制备：吸取医用甘油 1 mL，称取 0.50 g Poloxamer188 于烧杯中，加入 45 mL 注射用水，加热搅拌使之澄清，加热至 70 ℃并保持恒温，继续搅拌。

③ 静脉注射乳的制备：在 70 ℃恒定温度下，将油相逐滴加入到水相中 500 r•min^{-1} 不断搅拌，继续搅拌 20 min，制得初乳。初乳用超声细胞粉碎机冰水浴探头超声 10 min，功率 700 W，制得 Cel 静脉注射乳剂。并对乳剂初步质量进行考察，发现制得的 Cel 静脉注射乳剂呈淡黄色，外观均一，未出现挂壁现象，没有粒子及沉淀析出，4 ℃冰箱冷藏保存，半个月内未见有分层或变质现象，状态良好。

2.5.2　给药方案及血液样品的采集处理　SD 大鼠 16 只，雌雄各半，随机分为两组，分别为 Cel-NLC 组和 Cel 注射乳组。两组 SD 大鼠给药前 12 h 禁食，自由饮水，根据文献及预实验，给药剂量确定为 10 mg•kg^{-1}，尾静脉注射给药后分别在 0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 于眼眶后静脉丛取血 0.5 mL，置于肝素预处理的离心管中，5000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 200 μL，按“2.4.2”项下方法进行操作。

2.5.3　血药浓度 - 时间曲线　对处理后的血浆样品按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，以时间为横坐标，血药浓度为纵坐标，绘制血药浓度 - 时间曲线。各时间点的血药浓度见图 4。

2.5.4　数据处理分析　将所得平均血药浓度 - 时间数据用 DAS 2.0 软件进行统计矩分析，结果发现，相比于 Cel 注射乳组，Cel-NLC 组的消除半衰期是其 3.9 倍，血药浓度 - 时间曲线下面积（*AUC*）是 Cel 注射乳组的 2.4 倍，而血浆清除率仅为 Cel 注射乳组的 0.41 倍，差异均有统计学意义。这些药动学参数显示，与 Cel 注射乳组相比，Cel-NLC 组尾静脉注射后体内滞留时间延长，清除率降低，半衰期延长，对机体作用时间延长，具有长效作用。主要药动学参数见表 3。

2.6　细胞毒性实验

2.6.1　空白 NLC 的细胞毒性实验　分别取对数生长期的 SMMC-7721 细胞、MCF-7 细胞和 A549 细胞接种于 96 孔板中，置于细胞培养箱中培养 24 h 后，一组加入培养液作为对照组，其余加入不同质量浓度（0.1、0.5、5.0、20 μg•mL^{-1}）含有空白纳米粒的培养液作为实验组。继续培养 48 h 后，MTT 法检测细胞活性，并根据公式计算 3 种细胞的抑制率，抑制率（%）＝[1 －加药组 *OD* 值 / 对照组 *OD* 值]×100%，结果，当空白 NLC 质量浓度为 20 μg • mL^{-1} 时，最大抑制率为 6.273%，对 3 种细胞的抑制率均小于 10%，无细胞毒性。通过换算说明当 Cel-NLC 中 Cel 的质量浓度小于 125 μg • mL^{-1} 时，辅料对细胞无抑制作用。

2.6.2　雷公藤红素、雷公藤红素纳米结构脂质载体的细胞毒性实验　细胞培养 24 h 后，取出 96 孔板吸弃旧培养液，分别加入含 Cel 质量浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、15.0、30.0 μg • mL^{-1} 的 Cel 培养基溶液、Cel-NLC 冻干粉的培养基溶液 200 μL，阴性对照组加等体积培养基溶液，阳性对照药为阿霉素溶液（4.0 μg • mL^{-1}，培养基配制）。运用 SPSS19 软件计算 Cel、Cel-NLC 对 SMMC-7721 细胞 MCF-7 细胞和 A549 细胞的 IC_{50}，发现肝癌 SMMC-7721 对 Cel 和 Cel-NLC 细胞最敏感，

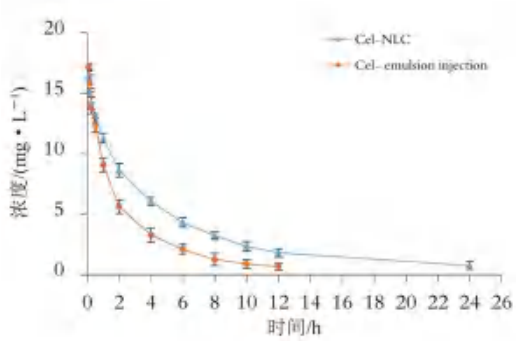


图 4　Cel 血药浓度 - 时间曲线

Fig 4　Cel concentration-time curve in rat plasma

表 3　大鼠药动学参数 (n = 6)

Tab 3　Pharmacokinetic parameters of rats (n = 6)

参数	Cel	Cel-NLC
$t_{1/2\alpha}$/h	0.464±0.066	2.176±0.123**
$t_{1/2\beta}$/h	2.958±0.271	11.645±4.03**
V_1/（L • kg^{-1}）	0.11±0.003	0.126±0.003**
CL/[L/（h • kg）]	0.44±0.14	0.18±0.01**
$AUC_{(0\sim t)}$/[mg/（L • h）]	41.801±1.756	87.12±5.967**
$AUC_{(0\sim\infty)}$/[mg/（L • h）]	45.401±2.224	108.997±6.38**
K_{10}/h^{-1}	0.401±0.031	0.146±0.006
K_{12}/h^{-1}	0.666±0.218	0.15±0.054*
K_{21}/h^{-1}	0.838±0.162	0.126±0.047**

注（Note）：与 Cel 组比较，*P < 0.05，**P < 0.01（Compared with the Cel group，*P < 0.05，**P < 0.01）。

而且在 3 种细胞中，Cel 和 Cel-NLC IC_{50} 的差异以肝癌 SMMC-7721 细胞表现最明显，分别为 0.355 倍（24 h）、0.393 倍（48 h）、0.481 倍（72 h），结果见表 4。综上所述，选择肝癌 SMMC-7721 细胞继续进行细胞凋亡和细胞周期实验。

表 4 Cel、Cel-NLC 对 SMMC-7721 细胞 MCF-7 细胞和 A549 细胞的 IC_{50} (μg・mL^{-1})

Tab 4 IC_{50} (μg・mL^{-1}) of Cel and Cel-NLC on SMMC-7721 MCF-7 and A549 cell

细胞	24 h		48 h		72 h	
	Cel	Cel-NLC	Cel	Cel-NLC	Cel	Cel-NLC
SMMC-7721	9.016	3.197	6.197	2.433	4.568	2.196
MCF-7	9.397	8.035	8.298	6.148	7.062	5.277
A549	12.435	9.694	11.014	7.941	9.319	8.263

2.7 细胞凋亡分析

2.7.1 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数期 SMMC-7721 细胞，以 5×10^5 个・mL^{-1} 的密度每孔 2 mL 接种于 6 孔板中。培养 24 h 后，含药组分别加入含 Cel 质量浓度为 1.0、2.0、4.0 μg・mL^{-1} 的 Cel、Cel-NLC 的培养基 2 mL，对照组加入同体积的空白培养基溶液，培养 48 h 后，细胞计数板计数并染色。将处理好的细胞样品用铝箔包裹，在室温（20 ～ 25 ℃）条件下孵育 20 min，随后置于冰浴中，进行流式细胞仪检测。流式细胞仪检测结果显示，相比于 Cel 组处理的 SMMC-7724 细胞，Cel-NLC 组诱导细胞凋亡的能力显著增强并呈剂量依赖关系，见表 5 及图 5。

表 5 Cel、Cel-NLC 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的检测结果 (n = 6)

Tab 5 Cel and Cel-NLC induced apoptosis in SMMC-7721 cells (n = 6)

药物质量浓度 /（μg・mL^{-1}）	检测方法	细胞凋亡率 /%	
		Cel	Cel-NLC
1.0	Annexin V$^-$/PI$^-$	64.8±3.5	53.8±4.2
	Annexin V$^+$/PI$^-$	28.0±2.6	33.2±1.6
	Annexin V$^+$/PI$^+$	7.1±3.4	12.9±1.2
2.0	Annexin V$^-$/PI$^-$	50.5±4.9	42.6±2.5
	Annexin V$^+$/PI$^-$	40.0±2.8	52.8±2.9*
	Annexin V$^+$/PI$^+$	8.4±1.6	4.3±0.8
4.0	Annexin V$^-$/PI$^-$	37.1±2.7	22.2±1.8
	Annexin V$^+$/PI$^-$	53.2±4.1	73.0±4.3**
	Annexin V$^+$/PI$^+$	8.9±2.3	4.8±0.6

注（Note）：与 Cel 组比较，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the Cel group，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

2.7.2 Hoechst 33342 染色 取对数期 SMMC-7721 细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h，分别加入含质量浓度为 1.0、2.0、4.0 μg・mL^{-1} 的 Cel、Cel-NLC 的培养基 200 μL，对照组加入 200 μL 空白培养基，继续培养 48 h，用预冷的 PBS（pH 7.4）清洗两次，避光条件下加入 Hoechst 33342 染色液，随即放置在荧光显微镜下以紫外光源观察染色情况，凋亡细胞的细胞核呈致密浓染，或呈碎块状致密浓染。Hoechst 33342 染色法检测结果表明，同浓度的 Cel-NLC 相比于 Cel，凋亡的细胞明显增多。这种作用可能是由于 NLC 增加了细胞对药物的摄取，使细胞中药物浓度增加，从而提升了细胞的凋亡比例 [12]，见图 6。

2.8 细胞周期分析

2.8.1 流式细胞仪检测 取对数期 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中。培养 24 h 后，分别加入含质量浓度为 1.0、2.0、4.0 μg・mL^{-1} Cel、Cel-NLC 的培养基 2 mL，对照组加入同体积的空白培养基，继续培养 48 h，加入 PBS 清洗细胞后，消化细胞，1000 r・min^{-1} 离心 5 min，重复该操作 2 ～ 3 次。每管加入预冷的 70% 乙醇 1 mL，重悬细胞，转移至 4 ℃冰箱中固定过夜，12 h 后加碘化丙啶（PI）染色液，重悬细胞，转移至 CO_2 培养箱中孵育 20 min，随后用流式细胞仪检测。流式细胞仪检测结果显示，相比于对照组，Cel 和 Cel-NLC 均阻滞细胞于 S 期，且组间差异有统计学意义；同时，随着给药浓度的增加，阻滞在 S 期的细胞比例显著性增多，证明 Cel 和 Cel-NLC 对 SMMC-7721 细胞的作用呈现剂量依赖性，并且与 Cel 组相比，同浓度的 Cel-NLC 能显著提高其阻滞 SMMC-7721 细胞在 S 期的能力（$P < 0.05$）。见图 7 及表 6。

3 结论

本文建立了 Cel-NLC 体外释放的检测方法，为满足漏槽条件，考察了 Cel 在不同浓度 SDS 溶液中的溶解度，最终选用 4%SDS 作为释放介质，并对其体外释药行为进行初步考察。实验表明 Cel-NLC 体外释放速率较 Cel 原料药明显变缓，前 6 h 释放较快，达到 30%，48 h 达到 66.98%，并且曲线趋于水平，而 Cel 原料药 12 h 释药量即已达到 95.12%，实验结果表明，Cel-NLC 具有一定的缓释作用。并对 Cel-NLC 的体外释放行为进行数学公式拟合，结果发现其体外释放机制符合 Weibull 方程（R^2 = 0.9818）和 Ritger-peppas 方程（R^2 = 0.9748），说明 Cel-NLC 中 Cel 的释放是一个双相过程 [13]，首先包裹在固体脂质中的 Cel 随着固体脂质的溶解不断渗出，其次随着液态油纳米隔室的不断释放，液态脂质中的药物进一步释放，初始时释放较为快速，但是随着药物释放与液态脂质的逐渐溶解，药物的释放逐渐呈现平缓的趋势，这也佐证了 NLC 的结构特点 [14-15]。

通过大鼠体内药动学实验比较 Cel-NLC 和普通 Cel 注射乳在大鼠体内的动力学性质，与普通

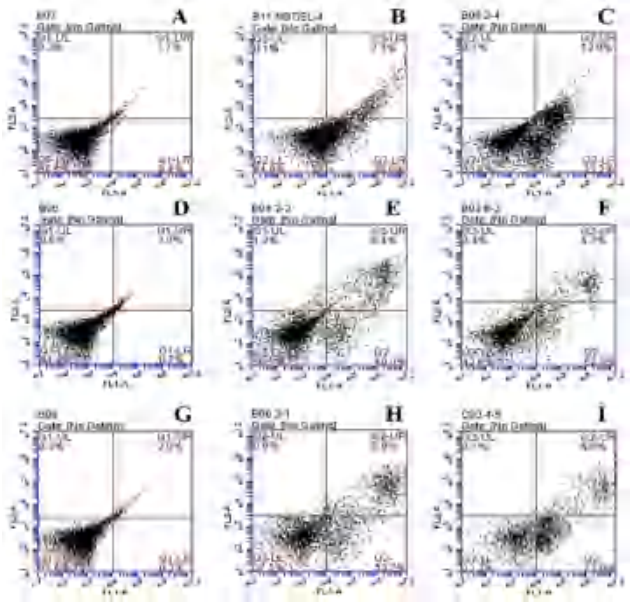


图 5　Cel 和 Cel-NLC 对 SMMC-7724 细胞凋亡的影响

Fig 5　Effect of Cel and Cel-NLC on the apoptosis of SMMC-7724 cells

A、D、G. 对照组（control）；B、E、H. 分别为 1、2、4 μg • mL^{-1} 的 Cel（1，2，and 4 μg•mL^{-1} Cel respectively）；C、F、I. 分别为 1、2、4 μg • mL^{-1} 的 Cel-NLC（1，2，and 4 μg • mL^{-1} Cel-NLC respectively）

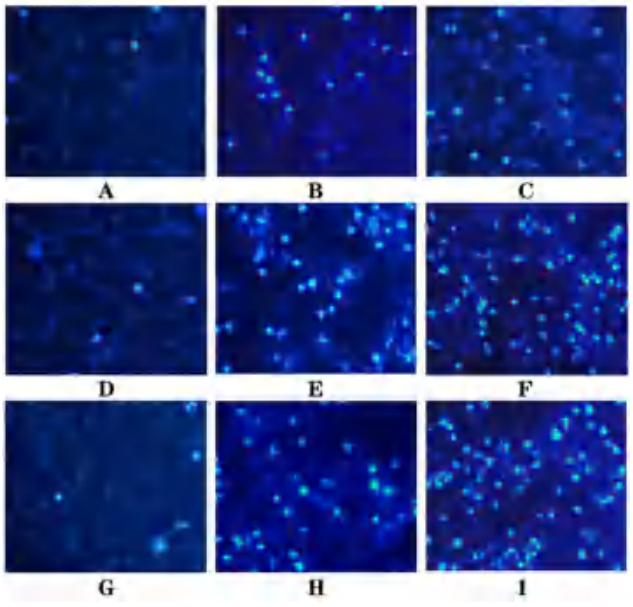


图 6　Cel 及 Cel-NLC 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

Fig 6　Effect of Cel and Cel-NLC on the apoptosis of SMMC-7721 cells

A、D、G. 对照组（control）；B、E、H. 分别为 1、2、4 μg • mL^{-1} 的 Cel（1，2，and 4 μg•mL^{-1} Cel respectively）；C、F、I. 分别为 1、2、4 μg • mL^{-1} 的 Cel-NLC（1，2，and 4 μg • mL^{-1} Cel-NLC respectively）

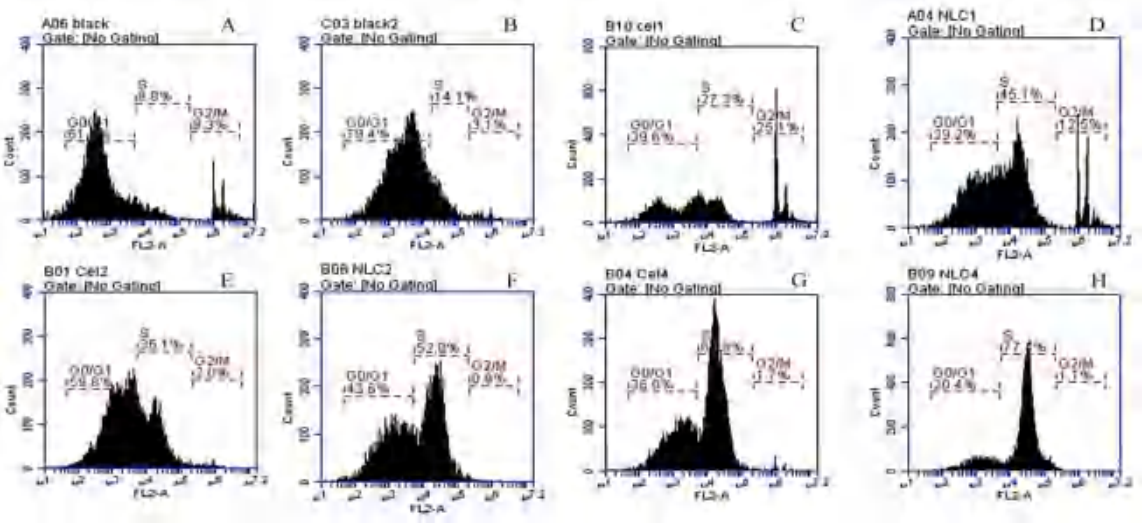


图 7　Cel、Cel-NLC 作用 48 h 对 SMMC-7721 细胞周期的影响

Fig 7　Effect of Cel、Cel-NLC on SMMC-7721 cycle after 48 h

A、B. 对照组（control）；C、E、G. 1、2、4 μg • mL^{-1} Cel；D、F、H. 1、2、4 μg • mL^{-1} Cel-NLC

表 6　不同浓度的 Cel、Cel-NLC 作用 48 h 对 SMMC-7721 细胞周期的影响 (n = 3)

Tab 6　Effect of different concentrations of Cel and Cel-NLC on SMMC-7721 cycle after 48 h (n = 3)

组别	1 μg • mL^{-1}			2 μg • mL^{-1}			4 μg • mL^{-1}		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	67.8±3.7	10.2±3.3	6.3±1.2	69.8±5.2	11.6±3.1	5.4±2.6	68.3±3.2	10.3±1.6	3.4±0.9
Cel 组	39.6±1.2	27.3±1.8**	25.1±1.5	59.8±3.6	36.1±4.2*	2.0±0.5	36.0±1.0	60.8±2.7**	1.7±1.1
Cel-NLC 组	39.2±2.7	45.1±1.9$^{**\#}$	12.5±1.4	43.6±4.9	52.8±2.9$^{**\#}$	1.9±0.6	20.4±1.0	77.4±4.8$^{*\#}$	1.1±0.8

注（Note）：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 Cel 组比较，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the Cel group，$^{\#}P < 0.05$）。

Cel 注射乳相比，尾静脉注射 Cel-NLC 后，血药浓度 - 时间曲线较平稳，体内作用时间延长，主要药动学参数均与 Cel 注射乳有明显差异，表明 NLC 与普通注射乳相比更有利于解决难溶性药物

体内存留时间的问题，改善难溶性药物的药动学性质，进而提升生物利用度。

对 Cel 和 Cel-NLC 的细胞毒作用进行了初步研究，通过 MTT 实验考察其对肝癌 SMMC-7721 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞和肺癌 A549 细胞的细胞毒作用，计算 IC_{50}，结果显示肝癌 SMMC-7721 细胞对于 Cel 和 Cel-NLC 较其他两种细胞敏感，乳腺癌 MCF-7 细胞对于 Cel 的敏感度近似于肝癌 SMMC-7721 细胞，而对 Cel-NLC 的敏感度远远低于肝癌 SMMC-7721 细胞，故而选择肝癌 SMMC-7721 细胞对其细胞凋亡、细胞周期的影响进一步研究。

通过流式细胞技术考察 Cel、Cel-NLC 对肝癌 SMMC-7721 细胞的细胞凋亡、细胞周期的影响，细胞凋亡结果显示，Cel、Cel-NLC 均能呈剂量依赖性地诱导细胞早期凋亡，而 Cel-NLC 比 Cel 作用更强。Hoechst 33342 染色法检测结果也验证了 Cel、Cel-NLC 对细胞凋亡的诱导作用，这种作用可能是由于 NLC 增加了细胞对药物的摄取，使细胞中药物浓度增加，从而提升了细胞的凋亡比例。细胞周期结果表明，Cel 和 Cel-NLC 对肝癌 SMMC-7721 细胞的阻滞都出现在 S 期，并且呈剂量依赖作用，证明 Cel 和 Cel-NLC 对细胞的 DNA 合成存在抑制，从而具有较强的细胞毒作用。

综上，本研究制备的 Cel-NLC 较游离 Cel 体外释放减慢，具有一定的缓释效果，无突释现象；可显著延长大鼠的体内滞留时间，减小清除率，增加血药浓度 - 时间曲线下面积；可促进人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡，阻滞细胞 DNA 合成，为 Cel 的后续开发及研究拓展了思路并提供了实验依据。

参考文献

[1] 张夜航，卢文丽，彭佩克，等 . α- 常春藤皂苷协同雷公藤红素对 SMMC7721 肝癌细胞增殖和周期的影响 [J]. 中成药，2022，44（4）：1099-1106.

[2] 景铭，王美灵，张媛媛，等 . 雷公藤红素调控 NLRP3 炎症小体改善大鼠代谢相关脂肪性肝病研究 [J]. 药物评价研究，2022，45（4）：624-632.

[3] 张夜航，卢文丽，彭佩克，等 . α- 常春藤皂苷协同雷公藤红素对 SMMC7721 肝癌细胞增殖和周期的影响 [J]. 中成药，2022，44（4）：1099-1106.

[4] Agrawal Y，Patil K，Mahajan H，et al. In vitro and in vivo characterization of entacapone-loaded nanostructured lipid carriers developed by quality-by-design approach [J]. Drug Deliv，2022，29（1）：1112-1121.

[5] 孙清瑞，申哲伟，李晶，等 . 叶黄素纳米结构脂质载体的制备与表征 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报，2021，33（4）：53-59.

[6] 陈梦雨，王慧楠，王佩华，等 . 纳米结构脂质载体在抗肿瘤中药单体活性成分中的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（12）：7227-7229.

[7] 程映雪，史浩，贺军波，等 . 1- 月桂酸 -3- 棕榈酸甘油二酯纳米结构脂质载体对麝香草酚的包埋与缓释特性 [J]. 中国油脂，2021，46（10）：37-41.

[8] Zheng SL，Deng ZY，Chen F，et al. Synergistic antioxidant effects of petunidin and lycopene in H9C2 cells submitted to hydrogen peroxide：role of Akt/Nrf2 pathway [J]. J Food Sci，2020，85（6）：1752-1763.

[9] Wang FL，Chen J，Dai WT，et al. Pharmacokinetic studies and anticancer activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers [J]. Acta Pharmaceutica，2017，67（3）：357-371.

[10] 韩翠艳，周建文，刘畅，等 . AEYLR 小肽修饰的紫杉醇纳米结构脂质载体的制备及抗肿瘤效果评价 [J]. 中国药房，2019，30（6）：770-775.

[11] 屈子卉，张备，陈洋洋，等 . 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备工艺优化及其表征 [J]. 中国药房，2019，30（11）：1470-1476.

[12] 史凡，杨红 . 紫草素纳米结构脂质载体制备与质量评价研究 [J]. 实验技术与管理，2019，36（1）：96-99.

[13] 马梦超，乔文梅，王鹤樵，等 . 纳米结构脂质载体肺部给药研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（20）：2146-2149.

[14] Patil-Gadhe A，Kyadarkunte A，Patole M，et al. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers：Part II Pulmonary drug delivery and in vitro-in vivo aerosol performance [J]. Eur J Pharm Biopharm，2014，88（1）：169-177.

[15] 谢小洁，袁其红，王啸洋，等 . 地塞米松纳米结构脂质载体的制备及体外肺沉积率考察 [J]. 解放军药学学报，2017，33（5）：404-408.

（收稿日期：2022-07-05；修回日期：2022-08-10）

纳米雄黄诱导 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞凋亡和自噬的研究

李旭[1]，鲍蕾蕾[1]，姜爽[2*]，王晓波[2*]（1. 海军军医大学第三附属医院药剂科，上海 200438；2. 中国人民解放军联勤保障部队第967医院药剂科，辽宁 大连 116021）

摘要：目的 探究纳米雄黄引起 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞凋亡和自噬的作用机制。**方法** 将细胞设为对照组和给药组（给药组分为水飞雄黄组和纳米雄黄组），进行 CCK-8 细胞活力检测、荧光显微镜观察、流式细胞术检测以及 Western blot 实验。**结果** 与对照组相比，水飞雄黄组和纳米雄黄组均会抑制 Raji 细胞的增殖，且呈浓度依赖性，其中，纳米雄黄组的抑制作用更为显著。Western blot 结果表明，纳米雄黄药物处理 Raji 细胞 24 h 后，凋亡相关蛋白 Bax 表达升高，Bcl-2 蛋白表达下降；自噬相关蛋白 Beclin-1 表达升高，p62 蛋白表达下降。**结论** 纳米雄黄可以通过线粒体途径诱导 Raji 细胞发生凋亡，且能够诱导 Raji 细胞发生自噬，有效抑制细胞增殖从而发挥抗肿瘤作用。

关键词：雄黄；水飞雄黄；纳米雄黄；B 细胞非霍奇金淋巴瘤；细胞凋亡；细胞自噬
中图分类号：R96，R733.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0058-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.009

Apoptosis and autophagy of B cell non-odgkin's lymphoma: Raji cells in vitro induced by nano-realgar

LI Xu[1], BAO Lei-lei[1], JIANG Shuang[2*], WANG Xiao-bo[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University*, *Shanghai* 200438; 2. *Department of Pharmacy*, *The* 967*th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army*, *Dalian Liaoning* 116021)

Abstract: Objective To determine the mechanism of nano-realgar on the apoptosis and autophagy of B cell non-Hodgkin's lymphoma Raji cells. **Methods** The cells were divided into a control group, a crude realgar group and a nano-realgar group. The CCK-8 cell viability assay, fluorescence microscopy, flow cytometry and Western blot were performed. **Results** Compared with the control group, the proliferation of Raji cells was inhibited in a concentration-dependent manner in both the crude realgar group and the nano-realgar group. The inhibition effect in the nano-realgar group was more obvious. Western blot showed that Bax expression was increased and expression of Bcl-2 protein decreased after the treatment with Raji cells for 24 h. The expression of autophagy-related protein Beclin-1 was elevated, while p62 protein expression decreased. **Conclusion** Nano-realgar can inhibit the proliferation of Raji cells, and induce their apoptosis and autophagy, which may be related to the inhibition of the expression of related pathway proteins.

Key words: realgar; crude realgar; nano-realgar; B cell non-Hodgkin's lymphoma; apoptosis; autophagy

基金项目：中国医药教育协会科学技术研究面上资助项目（No.2016SKT-M010）。
作者简介：李旭，女，硕士，主要从事医院临床药学工作，email：lllx9566@sina.com *通信作者：姜爽，女，博士，副主任药师，主要从事纳米药物抗肿瘤制剂研究，email：jshcrystal@qq.com；王晓波，男，教授，主任药师，博士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤药物制剂研发，email：wxbbenson0653@sina.com

淋巴瘤是一种恶性克隆性疾病，对人类健康危害极大，传统上，按病理学分类，将淋巴瘤分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤，其中非霍奇金淋巴瘤占淋巴瘤病例总数的 90%，发病率和病死率位居恶性肿瘤前五位，其发病率的 85% 均来源于 B 细胞淋巴瘤 [1-2]。中国的淋巴瘤发病率远高于西方国家，淋巴瘤预后恢复差，复发率高，严重危害着人类的健康。雄黄是一种含硫和砷的矿石，二硫化二砷（As_2S_2）或四硫化四砷（As_4S_4）是其主要成分。雄黄作用广泛，可以抗菌、抗病毒、抗肿瘤，近年来，雄黄抗肿瘤的作用机制引起了大家的关注 [3]，相关实验表明，雄黄对于血液肿瘤，尤其是白血病的疗效颇为显著 [4]，而广义的淋巴瘤又包括了白血病，这为雄黄抗淋巴瘤的研究提供了基础。在前期研究中，本课题组仅初步探讨了纳米雄黄引起 Raji 细胞的形态学等细胞水平作用的研究，在此基础上，本研究对纳米雄黄引起 Raji 细胞分子学变化的作用机制进行深入的研究，为纳米雄黄治疗淋巴瘤提供理论基础。

1 材料

1.1 实验细胞株

人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞（中国科学院细胞库）。

1.2 仪器

GS-15R 低温高速离心机（美国 Beckman 公司）；Multiskan Mk3 酶标仪（美国 Thermo 公司）；Accuri C6 流式细胞仪（美国 Bio-Rad 公司）；IX71 倒置式荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；DYY-6B 型电泳仪（北京六一仪器厂）。

1.3 试药

水飞雄黄（批号：140408，纯度：98%，湖北中药研究所），经解放军联勤保障部队第 967 医院药剂科主任药师王晓波鉴定为真品；纳米雄黄（解放军联勤保障部队第 967 医院自制）；Cell Counting Kit-8、Hoechst 33258 细胞核染液、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（碧云天生物技术研究所）；GAPDHS Rabbit Polyclonal antibody IgG（bc004109）、Bax Rabbit Polyclonal antibody IgG（bc014175）、Bcl-2 Rabbit Polyclonal antibody IgG（bc027258）、p62 Rabbit Polyclonal antibody（bc017222）、Beclin-1 Rabbit Polyclonal antibody（bc010276）（美国 Proteintech Group 公司）。

2 方法

2.1 纳米雄黄的制备

按照文献 [5] 的制备方法，采用温度可控的机械高能球磨法，球磨时间为 9 h，球磨转速为 38 $r \cdot min^{-1}$，球磨温度－ 20 ℃，获得平均粒径为（78±83）nm 的纳米雄黄。

2.2 纳米雄黄和水飞雄黄溶液的制备

分别称取已灭菌的纳米雄黄与水飞雄黄 5 mg 置于离心管中，加入已灭菌的 PBS 10 mL 溶解，超声震荡 30 min 使其混匀，配制成质量浓度均为 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的混悬液。取上述混悬液用 PBS 分别稀释至不同质量浓度（100、50、20、10、5、1、0.1 $\mu g \cdot mL^{-1}$，以 As_2S_2 计），于 4 ℃下保存，备用。

2.3 Raji 细胞的培养

将 Raji 细胞培养于 RP-MI1640 培养液（90% 1640、10%FBS、1% 青霉素与链霉素）中，置于 37 ℃，5%CO_2 的细胞培养箱中培养，每两日传代一次，待细胞增殖到对数生长期，用于以下实验的研究。

2.4 CCK-8 法检测 Raji 细胞增殖活力

将 Raji 细胞每孔 90 μL 接种于 96 孔板中，每孔细胞数为 5000 个，向各孔中加入 10 μL 水飞雄黄或纳米雄黄混悬液，使药物终质量浓度分别为 0.1、1、5、20、50 $\mu g \cdot mL^{-1}$。24 h 后，向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中继续培养 1 ～ 4 h，用酶标仪测定在波长 450 nm 的光密度（*OD*）值，并根据 *OD* 值绘制细胞生长曲线，实验重复 3 次。

细胞活力（%）＝ [$OD_{加药}$－ $OD_{空白}$]/[$OD_{对照}$－ $OD_{空白}$]×100%

抑制率（%）＝ 100% －细胞活力（%）

2.5 荧光显微镜观察 Raji 细胞的细胞核凋亡

将处于对数生长期的 Raji 细胞接种于 6 孔板中，每孔接种 1.8 mL，向各孔中加入 200 μL 水飞雄黄或纳米雄黄混悬液，使药物终质量浓度分别为 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 和 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$，并设置对照组，置于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养 24 h。离心，PBS 洗涤细胞两次，浓缩至 100 μL，加入 100 μL Hoechst 33258 染液，10 min 后，将各组细胞用 PBS 洗涤两次，将细胞悬液滴至载玻片上，用甘油进行封片，置于荧光显微镜下观察细胞的凋亡情况。

2.6 流式细胞术检测 Raji 细胞的凋亡率

细胞样品的制备以及给药方法与 “2.5” 项下相同，将细胞离心，PBS 洗涤细胞两次，弃去上清液，加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，再加入 5 μL Annexin V-FITC，轻轻混匀，加入 10 μL 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。室温避光孵育 10 ～ 20 min，立即用流式细胞仪进行检测。

2.7 Western blot 法检测细胞蛋白的表达水平

细胞样品的制备以及给药方法与 “2.5” 项下相同，离心，弃上清液，用 PBS 重悬细胞，再离心，

弃上清液，向下层沉淀中加入 1×loading buffer，于沸水中煮 8 min，制成蛋白样品，于－ 20 ℃保存。

根据实验检测相关蛋白分子量的大小，配制相应比例的凝胶，向凝胶中加入 Marker 和实验量的蛋白样品进行电泳，根据相关蛋白分子量大小调整相应的转膜时间，将转好的 PVDF 膜置于牛奶中，于摇床上室温封闭 1.5 h，随后，于 4 ℃环境孵育一抗过夜。将 PVDF 膜用 PBS 洗涤 3 次，于摇床上室温孵育二抗 1.5 h，再将 PVDF 膜用 PBS 洗涤 3 次，显影。

2.8　统计学分析

所有实验均重复 3 次，实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析，细胞的增殖和凋亡实验采用 ANOVA 进行分析，其他采用 *t* 检验进行分析，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　纳米雄黄对 Raji 细胞增殖的影响

如图 1 所示，Raji 细胞的增殖抑制呈浓度依赖性，随着药物质量浓度的增加，纳米雄黄组作用的 Raji 细胞生长活力受到的抑制作用较水飞雄黄显著，综合选择质量浓度为 1 μg • mL^{-1} 和 5 μg • mL^{-1} 的纳米雄黄进行后续实验。

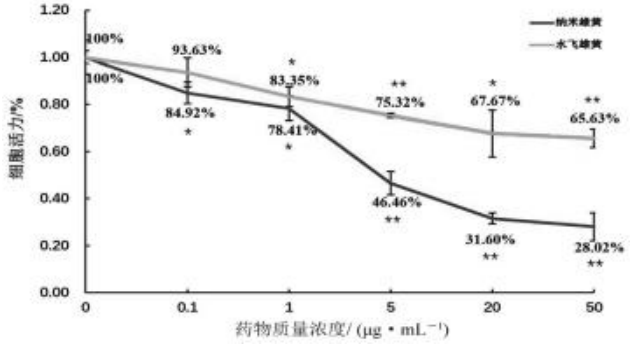


图 1　水飞雄黄、纳米雄黄对 Raji 细胞增殖的影响

Fig 1　Effect of crude realgar and nano-realgar on the proliferation of Raji cells

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2　纳米雄黄诱导 Raji 细胞凋亡

3.2.1　荧光显微镜观察 Raji 细胞的细胞核凋亡　对照组（见图 2A、F）的 Raji 细胞，可以观察到细胞核没有呈现出高亮的现象，细胞核呈圆形形态；水飞雄黄组（见图 2B、C、G、H）的 Raji 细胞，在数量上有增加的现象，说明细胞的增殖没有受到抑制，细胞核高亮的现象不明显；纳米雄黄组（见图 2D、E、I、J）的 Raji 细胞，随着给药浓度的增加，细胞的增殖受到明显抑制，细胞发生皱缩，体积变小，细胞核呈高亮现象，细胞凋亡较显著。

3.2.2　流式细胞术检测 Raji 细胞的凋亡率　如图 3 所示，对照组的 Raji 细胞总凋亡率为 5.0%；水飞雄黄组的 Raji 细胞，1 μg • mL^{-1} 作用的 Raji 细胞总凋亡率为 6.7%，5 μg • mL^{-1} 作用的 Raji 细胞总凋亡率为 7.5%；与对照组和水飞雄黄组相比，纳米雄黄组的 Raji 细胞凋亡现象更为显著，1 μg • mL^{-1} 作用的 Raji 细胞总凋亡率为 8.6%，5 μg • mL^{-1} 作用的 Raji 细胞总凋亡率为 22.6%。

3.2.3　Western blot 检测相关凋亡蛋白　如图 4 所示，与对照组相比，随着药物质量浓度的增加，促凋亡蛋白 Bax 的表达逐渐升高，抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达逐渐降低，具有浓度依赖性。其中，纳米雄黄组较水飞雄黄组蛋白表达含量变化更明显。

3.3　纳米雄黄诱导 Raji 细胞自噬

如图 5 所示，与对照组相比，随着药物质量浓度的增加，自噬相关蛋白 Beclin1 的表达呈逐渐升高的趋势，p62 的表达逐渐降低，具有浓度依赖性。其中，纳米雄黄组较水飞雄黄组蛋白表达含量变化更明显。

4　讨论

近年来，非霍奇金淋巴瘤作为一种恶性肿瘤，受到国内外的广泛关注，一些砷化合物，如三氧化二砷（As_2O_3）、有机砷化合物、砷酸钠等在治疗淋巴瘤方面有了新的进展，但砷制剂在一定程度上具有毒性，在临床上不能被广泛的使用。一些体外实验证实雄黄对肝癌、肺癌、乳腺癌、肠癌、宫颈癌等具有抑制肿瘤细胞生长的作用[6-8]，并且可以引起肿瘤细胞的凋亡，治疗白血病的疗效显著，但雄黄同时也具有生物利用度低的缺点，而纳米雄黄因粒径较小，生物利用度高，在治疗上可以给予很小的剂量，从而降低雄黄的毒性。为此，我们采用颗粒更为细小的纳米雄黄药物，来探究纳米雄黄对淋巴瘤的治疗作用。本实验采用人 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞系作为实验对象，通过 CCK-8 实验、光镜及荧光显微镜等研究、流式细胞术检测来探究纳米雄黄对 Raji 细胞增殖产生的影响。结果显示，纳米雄黄能够抑制 Raji 细胞的增殖，且具有浓度依赖性。此外，本研究结果还显示，与相同浓度的水飞雄黄相比较，纳米雄黄表现出的抑制细胞增殖的作用更强，具有更好的抗肿瘤作用。

在诱导细胞凋亡的内源性途径中（线粒体信号途径），应激信号引起胞质 Bcl-2 相关蛋白（Bax）/Bcl-2 同源拮抗剂杀伤细胞（BAK）寡聚化，BAK 与线粒体的外膜结合形成 BAK/BAK 复合物，此复合物通过 PT 孔（permeability transition pore）引起细胞色素 C 释放[9-10]。Bcl-2 家族蛋白

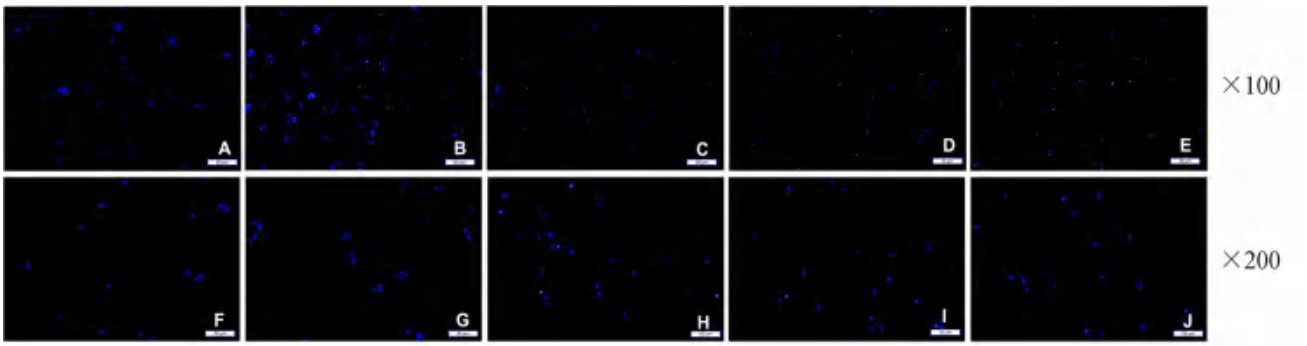


图 2　水飞雄黄、纳米雄黄诱导 Raji 细胞凋亡的情况

Fig 2　Apoptosis of Raji cells induced by crude realgar and nano-realgar

A、F. 对照（control）；B、G. 水飞雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} crude realgar）；C、H. 水飞雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} crude realgar）；D、I. 纳米雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} nano-realgar）；E、J. 纳米雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} nano-realgar）

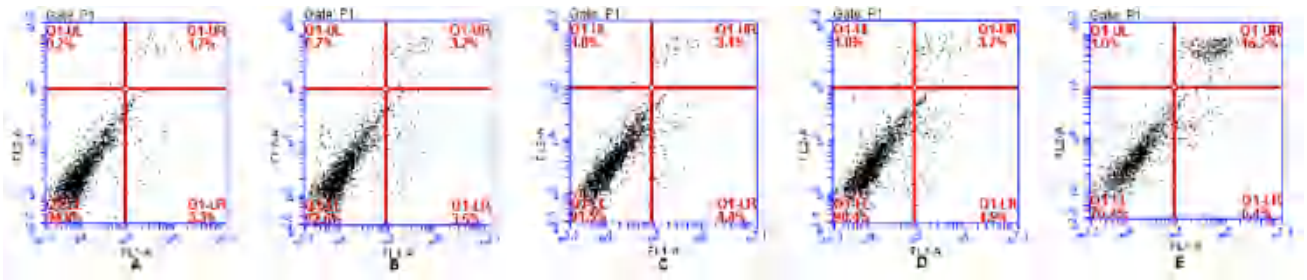


图 3　水飞雄黄、纳米雄黄诱导 Raji 细胞凋亡的情况

Fig 3　Apoptosis of Raji cells induced by crude realgar and nano-realgar

A. 对照（control）；B. 水飞雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} crude realgar）；C. 水飞雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} crude realgar）；D. 纳米雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} nano-realgar）；E. 纳米雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} nano-realgar）

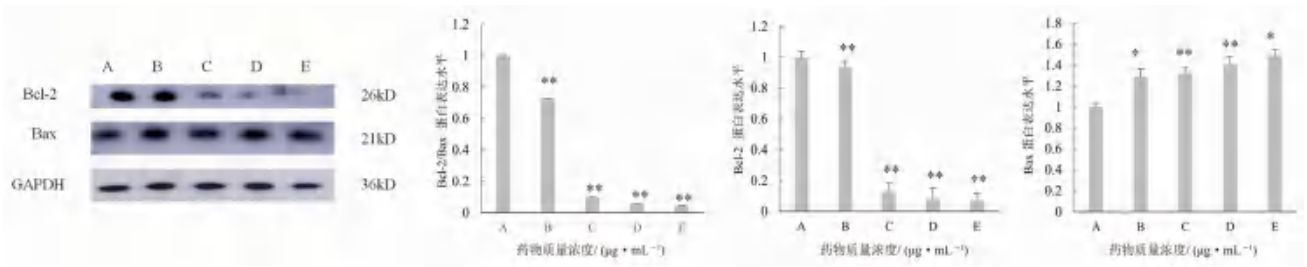


图 4　相关凋亡蛋白的表达情况

Fig 4　Expression of related apoptotic proteins

A. 对照（control）；B. 水飞雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} crude realgar）；C. 水飞雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} crude realgar）；D. 纳米雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} nano-realgar）；E. 纳米雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} nano-realgar）

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

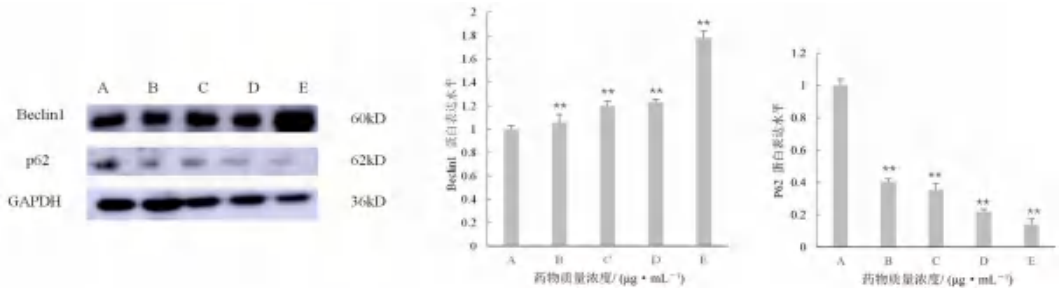


图 5　相关自噬蛋白的表达情况

Fig 5　Expression of related autophagy proteins

A. 对照（control）；B. 水飞雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} crude realgar）；C. 水飞雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} crude realgar）；D. 纳米雄黄 1 μg·mL^{-1}（1 μg·mL^{-1} nano-realgar）；E. 纳米雄黄 5 μg·mL^{-1}（5 μg·mL^{-1} nano-realgar）

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

影响着 PT 孔的开放和关闭，促凋亡蛋白 Bax 等可以通过与腺苷转位因子（ANT）或电压依赖性阴离子通道（VDAC）的结合介导 PT 孔的开放，而抗凋亡类蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL 等则可通过与 Bax 竞争性地与 ANT 结合，或者直接阻止 Bax 与 ANT、VDAC 的结合来发挥其抗凋亡效应。本实验通过 Western blot 检测了凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达情况，结果表明，纳米雄黄上调了 Bax 蛋白的表达，同时，下调了 Bcl-2 蛋白的表达，且蛋白表达呈浓度依赖性，表明纳米雄黄可能是通过线粒体途径来诱导 Raji 细胞凋亡的。

纳米雄黄并非仅仅通过细胞凋亡这一种途径来诱导 Raji 细胞死亡，纳米雄黄的作用机制除细胞凋亡外，还有细胞自噬 [11]。自噬是维持细胞内环境平衡所需的一种自我降解过程，涉及许多病理生理学疾病，包括癌症 [12]。最初，自噬被认为是一种肿瘤抑制因子，因为它的缺陷会导致氧化应激、DNA 损伤和基因组不稳定，某些情况下，这些都与肿瘤的发生有关 [13]。目前，大量证据表明，自噬通过抑制肿瘤细胞存活和诱导细胞死亡来抑制肿瘤的发生 [13-14]。作为关键的自噬调节剂，Beclin1 在自噬反应中起着不可或缺的作用 [15]，不仅参与自噬体的形成，还可通过调节自噬活性对肿瘤发生发展起着重要的作用。p62 作为自噬的另一个标志物，发挥自噬体与底物之间衔接蛋白的作用，p62 缺失可显著抑制肿瘤细胞生长或诱导细胞死亡，而 p62 过度表达可促进某些类型癌细胞的生存或生长 [16-18]。在目前的研究中，通过 Western blot 检测了自噬相关蛋白 Beclin1、p62 的表达情况，发现在纳米雄黄的作用下，Beclin1 蛋白的表达呈上调趋势，同时，p62 蛋白的表达呈下调状态，且蛋白表达呈浓度依赖性，表明纳米雄黄可能诱导 Raji 细胞发生了自噬反应。

综上，纳米雄黄可以通过线粒体途径诱导 Raji 细胞发生凋亡，且能够诱导 Raji 细胞发生自噬，有效抑制细胞增殖从而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

[1] Smith A，Crouch S，Lax S，et al. Lymphoma incidence，survival and prevalence 2004-2014：sub-type analyses from the UK’s Haematological Malignancy Research Network [J]. Br J Cancer，2015，112（9）：1575-1584.

[2] Cheah CY，Fowler NH，Wang ML. Breakthrough therapies in B-cell non-Hodgkin lymphoma [J]. Ann Oncol，2016，27（5）：778-787.

[3] 王玲，丁世权，李华伟，等 . 二硫化二砷联合伊曲康唑对弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞增殖和凋亡的作用 Hedgeho 信号通路的影响 [J]. 中国实验血液学杂志，2021，29（5）：1504-1509.

[4] Falchi L，Verstovsek S，Ravandi-Kashani F，et al. The evolution of arsenic in the treatment of acute promyelocytic leukemia and other myeloid neoplasms [J]. Cancer，2016，122（8）：1160-1168.

[5] Tian Y，Wang XB，Xi RG，et al. Enhanced antiyumor activity of reaglar mediated by milling it into nanosize [J]. Int J Nanomedicine，2014，9（1）：745-757.

[6] Zhang MH，Chen JQ，Guo HM，et al. Combination of LC/MS and GC/MS based metabolomics to study the hepatotoxic effect of realgarnanoparticles in rats [J]. Chin J Med，2017，15（9）：684-694.

[7] 王海媚，刘寨东 . 纳米雄黄外用治疗肠癌溃破创面的临床观察 [J]. 中医药导报，2017，16（23）：61-62.

[8] 王海媚，刘寨东 . 纳米雄黄外用治疗乳腺癌破溃创面的临床观察 [J]. 中国中医急症，2017，8（26）：1427-1429.

[9] Kalkavan H，Green DR. MOMP，cell suicide as a BCL-2 family business [J]. Cell Death Differ，2018，25（1）：46-55.

[10] Ganten TM，Haas TL，Sykora J，et al. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs [J]. Cell Death Differ，2004，11（Suppl 1）：S86-96.

[11] Shi D，Liu Y，Xi RG，et al. Caveolin-1 contributes to reaglar nanoparticle therapy in human chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：5823-5835.

[12] Doria A，Gatto M，Punzi L. Autophagy in human health and diseas e [J]. N Engl J Med，2013，368（19）：1845.

[13] White E. The role for autophagy in cancer [J]. J Clin Invest，2015，125（1）：42-46.

[14] Jiang XJ，Overholtzer M，Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer [J]. J Clin Invest，2015，125（1）：47-54.

[15] Fernández ÁF，Sebti S，Wei Y，et al. Disruption of the Beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice [J]. Nature，2018，558（7708）：136-140.

[16] Duran A，Linares JF，Galvez AS，et al. The signaling adaptor p62 is an importantNF-kappaB mediator in tumorigenesis [J]. Cancer Cell，2008，13（4）：343-354.

[17] Inami Y，Waguri S，Sakamoto A，et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocel-lular carcinoma cells [J]. J Cell Biol，2011，193（2）：275-284.

[18] Umemura A，He F，Taniguchi K，et al. p62，upregulated during preneoplasia，induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells [J]. Cancer Cell，2016，29（6）：935-948.

（收稿日期：2022-05-30；修回日期：2022-07-16）

基于 OATP1B3 转运体活性与表达研究黄芩 - 黄连药对中黄连对黄芩黄酮肝脏分布的影响及其机制

梁燕[1]，崔馨戈[1]，訾苗苗[1]，汪杰[1]，刘艳[1]，彭灿[1, 2, 3, 4*]，王茜[1, 2, 3, 4*]（1.安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2.中药复方安徽省重点实验室，合肥 230012；3. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室，合肥 230012；4. 安徽省中医药研究院，中药资源保护与开发研究所，合肥 230012）

摘要：目的 探究在连续给药过程中，黄连对黄芩黄酮在大鼠肝组织中分布的影响机制。**方法** 大鼠灌胃给药黄芩、黄连 - 黄芩药对提取物 14 d 后，LC-MS/MS 分析肝脏中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素的含量；采用稳定转染 OATP1B3 的 HEK293 细胞，以黄芩苷和汉黄芩苷为底物，小檗碱作为抑制剂，进行药物转运实验；大鼠灌胃给药黄芩、黄连 - 黄芩药对提取物 14 d 后，取肝脏进行 Western blot 实验，验证 Oatp4 的蛋白表达水平。**结果** 连续给药后，在肝脏中，黄连仅降低汉黄芩素的含量。小檗碱可抑制 OATP1B3 对黄芩苷和汉黄芩苷的转运功能；黄连可上调 Oatp4 的蛋白表达水平。**结论** 在连续给药过程中，黄连可通过影响 OATP1B3 转运体活性和蛋白水平共同影响黄芩黄酮在肝脏中的转运过程。

关键词：黄芩；黄连；配伍；OATP1B3 转运体；黄芩苷；黄芩素；汉黄芩苷；汉黄芩素

中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0063-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.010

Effect of Rhizoma Coptidis on the liver distribution of Radix Scutellaria flavones in Radix Scutellaria-Rhizoma Coptidis herb couple based on the activities of OATP1B3 transporters and expression and related mechanism

LIANG Yan[1], CUI Xin-ge[1], ZI Miao-miao[1], WANG Jie[1], LIU Yan[1], PENG Can[1, 2, 3, 4*], WANG Qian[1, 2, 3, 4*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application*, *Hefei* 230012; 4. *Institute of TCM Resources Protection and Development*, *Anhui Academy of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of Radix Scutellaria-Rhizoma Coptidis herb couple on the distribution of flavonoids of Radix Scutellaria in rat liver tissue during continuous administration. **Methods** After 14 days of intragastric administration of Radix Scutellaria and Rhizoma Coptidis-Radix Scutellaria extracts respectively, LC-MS/MS was used to analyze the content of baicalin, baicalein, wogonoside and wogonin in the liver. HEK293 cells stably transfected with OATP1B3 were used in drug delivery experiments. Baicalin and wogonoside were used as substrates, and berberine as the inhibitor. LC-MS/MS method was used to analyze the content of baicalin and wogonin in the cells. After 14 days of intragastric administration of Radix Scutellaria and Rhizoma Coptidis-Radix Scutellaria extracts, the livers were taken to verify the protein expression level of Oatp4 by Western blot. **Results** After continuous administration, Rhizoma Coptidis only reduced the content of wogonin in the liver. Berberine inhibited the uptake of baicalin and wogonoside via OATP1B3. Rhizoma Coptidis up-regulated the protein expression level of Oatp4. **Conclusion** During continuous

基金项目：国家自然科学基金项目（No.8180140889）；安徽省协同创新项目（No.GXXT-2020-025）。

作者简介：梁燕，女，在读硕士研究生，主要从事药物制剂与药物分析研究工作，email：925501211@qq.com *通信作者：彭灿，男，副教授，主要从事药剂学及药物分析研究，email：pengcanking@hotmail.com；王茜，女，副教授，主要从事药物分析研究，email：wangqian@ahtcm.edu.cn

administration, Coptis chinensis can affect the transport of flavonoids in the liver by affecting the activity of OATP1B3 transporters and protein levels.

Key words: Rhizoma Coptidis; Radix Scutellaria; compatibility; OATP1B3 transporters; baicalin; baicalein; wogonoside; wogonin

药对是中药配伍应用的基本形式，是中药方剂的重要组成部分[1-2]。黄芩 - 黄连常作为药对配伍使用，是泻心汤等众多复方的重要组方成分。黄连可引起黄芩黄酮类物质药动学特征的变化[3-5]，影响黄芩黄酮的肠道跨膜转运过程[3]。目前对于黄芩 - 黄连药对的研究多局限在临床观察或单用 / 合用后的药效差异[3，5-6]。对于连续给药后，黄连是否会影响肝脏内黄芩黄酮含量及其相关机制尚不明确。有机阴离子转运多肽 OATP1B3 特异性表达在肝脏基底膜，在药物体内吸收、分布、排泄、相互作用中扮演关键角色。同时，黄芩黄酮的体内转运与 OATP1B3 转运体息息相关[7]。

因此本实验通过研究 OATP1B3 转运体的活性和蛋白表达，探究黄连对黄芩黄酮的肝转运过程的影响机制，旨在为传统方剂研究及中医药理论研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AB SCIEX 4500 三重四极杆串联质谱仪（美国 ABSCIEX 公司），旋转蒸发仪（德国 heidolph 公司），超声波清洗仪（常丰市万丰仪器制造有限公司），BT25S 型电子分析天平（精度：十万分之一，赛多利斯科学仪器有限公司），涡旋混匀机（上海越众仪器设备有限公司），－ 80 ℃冰箱（日本 Sanyo/ 合肥美菱公司），Centrifuge 5430R 4 ℃离心机（上海迪图生物科技有限公司），减压干燥箱（上海越众仪器设备有限公司），Bioprep-24 生物样品均质仪（杭州奥盛仪器有限公司），垂直电泳系统（BIO-RAD）。

1.2 试药

对照品黄芩素（批号：C20M8Y31962）、汉黄芩素（批号：P11M9F61014）、黄芩苷（批号：P20A9F59353）、汉黄芩苷（批号：R31M9F62605）、利胆酚（批号：J10M8Y35798）、小檗碱（批号：P02A7F12369）（上海源叶科技有限公司，纯度均≥ 98%），黄连药材（批号：180919，苏州市天灵中药饮片有限公司），黄芩药材（批号：180710，南通三越中药饮片有限公司），DMEM 培养基、胎牛血清、双抗、胰酶、T25 培养瓶（Gibco）。HBSS 缓冲液（索莱宝）。甲酸、乙腈、甲醇（LC/MS 级）[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，超纯水（自制，Millipore 超纯水系统）。鼠抗 GAPDH 单克隆抗体（北京中杉金桥）。兔抗小鼠 Oatp4 单克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology）。

1.3 实验动物及细胞株

雄性 SD 大鼠（200±20）g，普通级 [山东省实验中心，许可证号：SCXK（鲁）2019-0003]。动物常规饲养于安徽中医药大学恒温（25±2）℃、恒湿（55±5）%、12 h 明暗交替、可自由饮水及摄取饲料的动物房中，适应性饲养 7 d。所有动物于实验开始前 12 h 禁食，期间自由饮水。HEK293-OATP1B3 细胞购自上海吉凯基因。OE 细胞为 HEK-293 细胞加目的基因过表达病毒感染的细胞。

2 方法

2.1 分析条件[8-9]

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Thermo GOLD 色谱柱（2.1 mm×100 mm，3 μm）；柱温为 30 ℃；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为乙腈；进样量 2 μL；流速 0.2 mL•min^{-1}。动物样品洗脱条件：0 ～ 6 min，70% ～ 30%A；6 ～ 7.5 min，30%A；7.5 ～ 8.5 min，30% ～ 70%A；8.5 ～ 10 min，70%A。细胞样品洗脱条件：0 ～ 4 min，60% ～ 30%A；4 ～ 4.5 min，30% ～ 60%A；4.5 ～ 5 min，60%A。

2.1.2 质谱条件 离子源：电喷雾电离源（ESI）；扫描方式：MRM（多反应离子检测）模式，正离子模式下测定；离子化电压为 5500 V；离子源温度：400 ℃；去溶剂化温度：500 ℃。利胆酚为正离子模式下的内标物。各化合物离子对、去簇电压、碰撞电压参数见表 1。

表 1 黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和利胆酚的质谱参数

Tab 1 MS/MS conditions of baicalin，baicalein，wogonoside，wogonin and osalmide

成分	母离子 /（*m/z*）子离子 /（*m/z*）	去簇电压 /V	碰撞电压 /V
黄芩苷	447.1 271.1	35.0	26.0
黄芩素	271.0 123.0	211.0	41.0
汉黄芩苷	461.1 270.2	123.0	50.3
汉黄芩素	285.0 270.0	90.0	32.0
利胆酚	230.3 121.0	87.0	27.0

2.2 动物实验

2.2.1 样本采集 24 只健康雄性 SD 大鼠随机分为黄芩组（A）、黄芩 - 黄连药对组（B）、黄连组（C）、空白组。每组 6 只大鼠，连续灌胃给药 14 d[10]（生药量：A 组为黄芩 10 g • kg^{-1}，B 组为黄连 10 g • kg^{-1}- 黄芩 10 g • kg^{-1}，C 组为黄连 10

g • kg^{-1}）[11]，给药结束后收集肝脏于－ 80 ℃冰箱保存备用。

2.2.2 生物样品前处理 取肝脏 100 mg，剪碎，加入超纯水 200 μL，连续 3 次用组织匀浆机匀浆 1 min，得组织匀浆液，取匀浆液 100 μL，加入 20 μL 内标溶液（利胆酚），加入 280 μL 乙腈沉淀蛋白，涡旋振荡 2 min，15 000 r • min^{-1} 在 4 ℃下离心 15 min，取上清液，于 0.22 μm 微孔滤膜过滤备用。

2.3 *细胞实验*

2.3.1 细胞样品前处理 取细胞破碎液 100 μL，加入 100 μL 含内标（利胆酚）甲醇溶液，涡旋振荡 2 min，在 15 000 r • min^{-1}、4 ℃下离心 15 min，取上清液，于 0.22 μm 微孔滤膜过滤备用。取细胞破碎液适量用 BCA 试剂盒进行蛋白定量，测定蛋白含量。

2.3.2 细胞毒性实验（MTS 法） MTS 是一种四唑类化合物，它与 MTT 的应用原理相同，即被活细胞线粒体中的多种脱氢酶还原成有色的水溶性产物，其颜色深浅与细胞数量和活性成高度正相关。

取生长良好的 HEK293-OATP1B3 细胞，细胞以 5×10^4 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔板中，设置空白组、对照组、实验组（小檗碱浓度梯度为 200、160、120、100、80、60、40、30、20、10、5 μmol • L^{-1}），每组 6 个复孔。于培养箱中静置培养 24 h 后取出，每孔加入 20 μL 的 MTS 溶液，随后放回培养箱中温孵 1 h，最后用酶标仪（波长 490 nm）检测各孔的吸光度值（A），根据下列公式计算细胞存活率。

细胞存活率（%）＝（$A_{实验组}$ － $A_{空白组}$）/（$A_{对照组}$ － $A_{空白组}$）×100%

2.3.3 细胞摄取实验 取处于对数生长期的 OE 细胞，以细胞密度为 5×10^5 个 • mL^{-1}，每孔加 1 mL，接种于 24 孔板中，培养 24 h，吸弃旧培养基，加入 37 ℃预热的 HBSS 缓冲液清洗细胞 2 ～ 3 次，然后加入 200 μL 37 ℃预热的 HBSS 缓冲液预孵育 10 min。预孵育结束后，取出 24 孔板，每孔加入 0.2 mL 含药 HBSS 溶液 [底物浓度：黄芩苷（5 μmol•L^{-1}）、汉黄芩苷（5 μmol•L^{-1}）；抑制剂浓度：小檗碱（10、30、100 μmol • L^{-1}）] 进行摄取实验（孵育时间：15 min）。摄取结束后，吸弃孔中液体，加入预冷的 HBSS 缓冲液终止摄取，并清洗细胞 2 ～ 3 遍，最后吸尽孔中液体，每个孔中加入 200 μL 无菌水，放置于－ 80 ℃冰箱反复冻融 3 次。

NC 组为 HEK293 细胞，除不加小檗碱，细胞每孔加入 0.2 mL 含药 HBSS 溶液底物浓度：黄芩苷（5 μmol • L^{-1}）、汉黄芩苷（5 μmol • L^{-1}），其余操作同上。

2.4 Western blot

取肝脏组织，剪碎，加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液，提取总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，加入上样缓冲液（Loading buffer），沸水浴变性。取适量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离，转至 PVDF 膜上，封闭。加入稀释后的 Oatp4（1 ∶ 500）；GAPDH（1 ∶ 1000），4 ℃孵育过夜。加入稀释后的二抗（1 ∶ 5000），室温孵育 2 h，显影。用 Image J 软件分析目的条带灰度值。

2.5 *数据处理与统计分析*

采用 GraphPad 8.0、IBM SPSS Statistics 21、Image J 等软件对实验结果进行分析、处理并作图，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，通过独立样本 t 检验进行比较，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 *方法学考察及结果*

在本文的分析条件下，动物组织样品中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷与内标利胆酚峰形良好，分离完全，表明杂质峰对各化合物和内标测定没有干扰，专属性良好，见图 1；细胞样品中黄芩苷、汉黄芩苷、内标利胆酚分离良好，无杂质峰干扰，专属性良好，见图 2。

精密吸取 100 μL 空白组织匀浆、空白细胞破碎液，分别加入 20 μL 系列浓度混标（含内标，用甲醇配制）、100 μL 系列浓度混标（含内标，用甲醇配制），分别按 “2.2.2” “2.3.1” 项下方法进行前处理后进行 LC-MS/MS 分析。纵坐标为各黄芩黄酮物质峰面积与内标物峰面积的比值，横坐标为浓度，采用 $1/\chi^2$ 加权方法，求得的直线回归方程见表 2、3。

表 2 肝脏中 4 种黄酮物质的线性方程

Tab 2 Linearity of 4 flavonoids in the liver

化合物	范围 /（ng • mL^{-1}）	回归方程	R^2
黄芩苷	0.10 ～ 1000.00	$Y = 0.015\,14X + 2.32\times10^{-4}$	0.995
汉黄芩苷	0.10 ～ 1000.00	$Y = 0.015\,54X + 8.02\times10^{-4}$	0.993
黄芩素	0.10 ～ 1000.00	$Y = 5.330\times10^{-3}X + 2.98\times10^{-4}$	0.996
汉黄芩素	0.10 ～ 1000.00	$Y = 0.037\,51X + 4.70\times10^{-3}$	0.990

表 3 细胞中黄芩苷、汉黄芩苷的线性方程

Tab 3 Linearity of baicalin and wogonin in cell

化合物	范围 /（ng • mL^{-1}）	回归方程	R^2
黄芩苷	0.15 ～ 156.25	$Y = 0.083\,73X - 4.91\times10^{-3}$	0.996
汉黄芩苷	0.15 ～ 156.25	$Y = 0.053\,58X + 4.12\times10^{-3}$	0.993

动物组织样品低、中、高浓度的各质控（QC）样品中 4 种物质精密度、准确度、提取回收率及在 24 h 内的稳定性的考察结果见表 4。细胞样品低、中、高浓度的各 QC 样品精密度、准确度（RE）、提取回收率及在 24 h 内的稳定性考察结果见表 5。

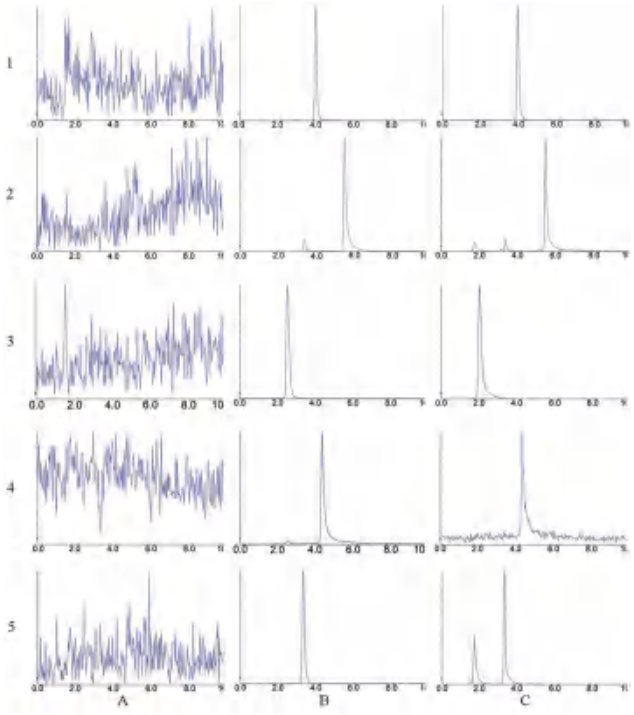


图 1　空白肝脏（A）、QC 样品（B）、肝脏样品（C）的典型 MRM 色谱图

Fig 1　MRM chromatograms of the blank liver（A），QC sample of the liver（B），and test sample of the liver（C）

1. 利胆酚（osalmide）；2. 汉黄芩素（wogonin）；3. 黄芩苷（baicalin）；4. 黄芩素（baicalein）；5. 汉黄芩苷（wogonoside）

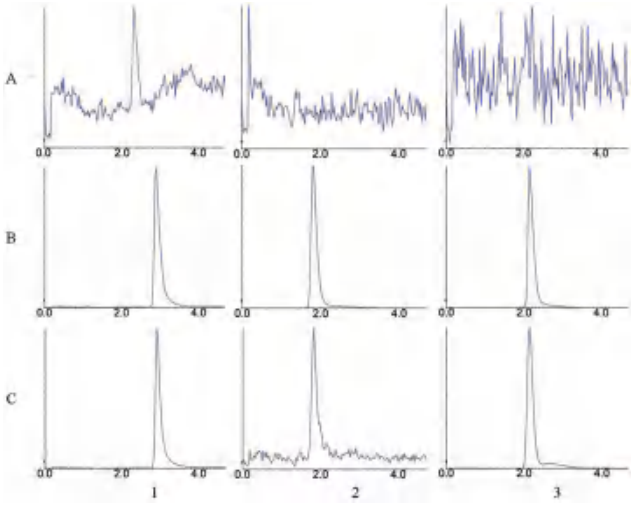


图 2　空白细胞（A）、细胞 QC 样品（B）、细胞样品（C）的典型色谱图

Fig 2　MRM chromatograms of blank cell（A），QC sample of cell（B），and test sample of cell（C）

1. 利胆酚（osalmide）；2. 黄芩苷（baicalin）；3. 汉黄芩苷（wogonoside）

表明该方法对于动物样品的精密度、准确度良好、样品 24 h 内稳定性良好，提取回收率稍低，但是提取回收率的重复性良好，亦可满足测定要求；对于细胞样品的精密度、准确度、提取回收率良好，并且样品 24 h 内稳定性良好，满足测定要求。

3.2　动物样本含量测定

表 4　肝脏中 4 种成分的精密度、准确度、提取回收率、稳定性

Tab 4　Precision，accuracy，extraction recovery and stability of the 4 components in liver

化合物	质量浓度 /（ng•mL^{-1}）	精密度 *RSD*/%		准确度	提取回	稳定性
		日内	日间	*RE*/%	收率 /%	*RSD*/%
黄芩苷	3.90	2.1	0.05	3.52	121.75±6.07	2.4
	100.00	2.5	1.5	14.44	104.16±1.39	2.1
	2000.00	1.7	0.59	5.05	96.96±1.23	0.62
黄芩素	3.90	1.5	1.5	− 14.97	120.07±4.06	1.7
	100.00	1.2	0.5	0.04	98.86±1.26	1.4
	2000.00	3.1	0.60	13.61	94.98±2.68	0.97
汉黄芩苷	3.90	1.7	0.62	5.15	99.57±1.58	1.8
	100.00	1.9	0.25	8.48	103.27±1.61	1.6
	2000.00	1.7	2.0	8.83	100.32±1.92	2.2
汉黄芩素	3.90	1.1	2.3	− 9.55	107.28±2.43	0.75
	50.00	1.7	0.41	4.23	99.06±1.84	0.89
	800.00	3.5	0.31	5.26	92.31±1.20	1.5

表 5　细胞中 2 种成分的精密度、准确度、提取回收率、稳定性

Tab 5　Precision，accuracy，extraction recovery and stability of the 2 components in cell

化合物	质量浓度 /（ng•mL^{-1}）	精密度 *RSD*/%		准确度	提取回	稳定性
		日内	日间	*RE*/%	收率 /%	*RSD*/%
黄芩苷	1.00	4.3	1.4	10.82	99.63±3.79	3.2
	20.00	5.3	1.2	12.05	93.37±2.09	4.7
	125.00	3.2	3.2	2.41	101.12±2.01	3.7
汉黄芩苷	1.00	7.3	1.4	10.24	103.05±3.13	2.3
	20.00	2.1	2.4	− 0.98	98.36±0.90	3.2
	125.00	3.3	2.2	− 4.00	100.74±0.79	3.3

由图 3 可见，在肝脏中，黄芩组的汉黄芩素的含量高于药对组（$P < 0.01$）。

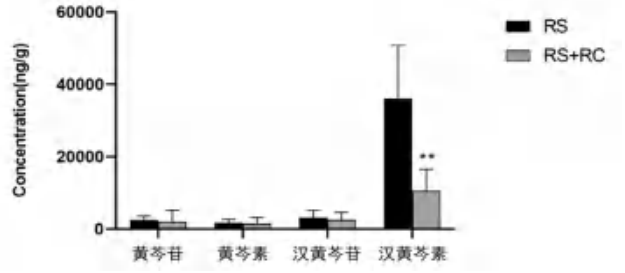


图 3　大鼠分别灌胃给药 14 d 后肝脏中 4 种黄酮成分的分布特征（$n = 6$）

Fig 3　Distribution of 4 flavonoids in the liver after 14 days of intragastric administration（$n = 6$）

注：与黄芩组比较，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the RS group，$^{**}P < 0.01$.

3.3　细胞毒性实验

由图 4 可见，当小檗碱浓度在 0 ～ 120 μmol • L^{-1} 时，细胞存活率均保持在 90% 以上，当小檗碱浓度高于 120 μmol • L^{-1}，细胞存活率低于 90%。因此本实验选择 0 ～ 100 μmol • L^{-1} 作为给药区间。

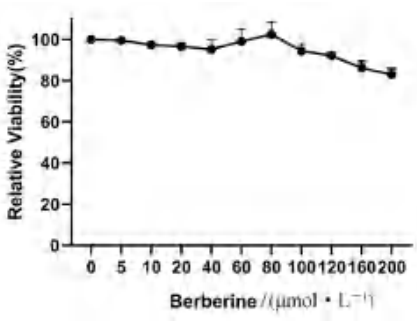


图 4　不同浓度小檗碱对细胞存活率的影响（$n = 6$）

Fig 4　Effect of different concentration of berberine on cell viablity（$n = 6$）

3.4　细胞摄取实验

细胞摄取实验选取了黄连中的主要成分小檗碱作为抑制剂，选择了 3 个浓度梯度进行考察。由图 5 可知，OE 组对黄芩苷（BG）和汉黄芩苷（WG）的摄取量远高于 NC 组，表明黄芩苷和汉黄芩苷均为 OATP1B3 的底物。小檗碱可以显著抑制 HEK293-OATP1B3 细胞对黄芩苷和汉黄芩苷的摄取（$P < 0.001$）。

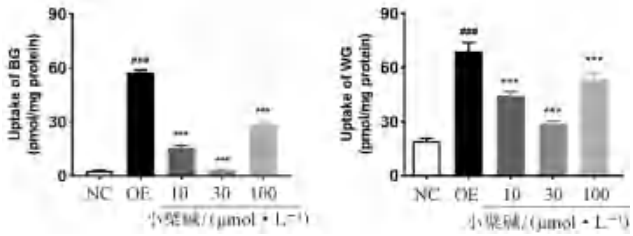


图 5　小檗碱对 HEK293-OATP1B3 细胞摄取黄芩苷（BG）、汉黄芩苷（WG）的影响（$n = 3$）

Fig 5　Effect of berberine on the uptake of baicalin（BG）and wogonoside（WG）by HEK293-OATP1B3 cells（$n = 3$）

注：与 NC 组比较，$^{###}P < 0.001$；与 OE 组比较，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the NC group，$^{###}P < 0.001$；compared with the OE group，$^{***}P < 0.001$.

3.5　Western blot

结果如图 6 所示，黄芩组与 Control 组无明显差异；与黄芩组相比，黄连组和药对组 Oatp4 蛋白表达呈上调趋势。因此，黄连可上调 Oatp4 的蛋白表达。

4　讨论

近年来研究表明黄连与黄芩合用时黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素等成分口服生物利用度均呈不同程度的降低 [5]。这可能与黄芩黄酮的肝脏转运有关。黄芩素和汉黄芩素通常以被动扩散的方式进入肝脏，因此，黄连素和汉黄芩素在肝脏内的含量差异可能与黄连影响肝脏中的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶（UGTs）对两者的葡萄糖醛酸化有关 [12]。而黄芩苷和汉黄芩苷由于其渗透性差而

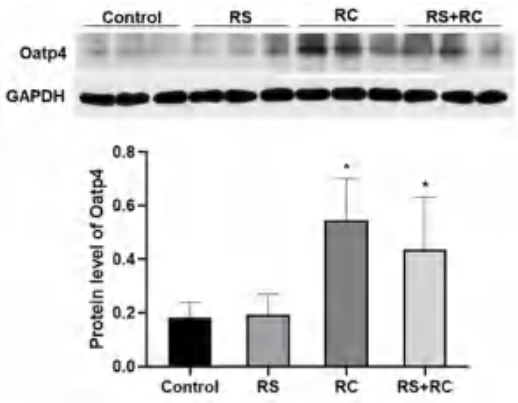


图 6　黄芩组（RS）、黄连组（RC）、黄芩 - 黄连药对组（RS ＋ RC）肝脏中 Oatp4 的蛋白表达（$n = 3$）

Fig 6　Protein expression of Oatp4 in the liver of Radix Scutellaria（RS），Rhizoma Coptidis（RC），and Rhizoma Coptidis-Radix Scutellaria（RS ＋ RC）groups（$n = 3$）

注：与黄芩组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

不被直接吸收，在肝脏 OATP1B3 和 OATP2B1 的介导下摄取入肝细胞 [9]。经课题组前期细胞摄取动力学研究表明，OATP1B3 在黄芩苷和汉黄芩苷的肝脏转运过程中起主导作用 [9]。同时，黄连中主要成分小檗碱也为 OATP1B3 的底物 [13]，能引起其他 OATP1B3 转运体底物的相互作用。因此，基于本文动物整体实验结果提出假说：在连续给药一段时间后，黄连引起黄芩黄酮在肝脏中的含量变化的机制与 OATP1B3 有关。

本文进行 HEK293-OATP1B3 细胞实验，验证黄连是否影响 OATP1B3 对黄芩苷和汉黄芩苷的转运功能。HEK293-OATP1B3 细胞实验结果验证了小檗碱可以抑制 OATP1B3 对黄芩苷和汉黄芩苷的转运活性，但是这一结果与动物整体实验结果不一致。我们推测在连续给药后，黄连还可能影响 OATP1B3 的蛋白表达。因此，我们进一步进行 Western blot 实验。由于 OATP1B3 只在人体肝脏基底膜中特异性表达，大鼠 Oatp4 为人类 OATP1B3 的直系同源物，具有相似的功能学特性 [14]，并且由于 Oatp4 在大鼠肝脏中高度表达，因此本实验选取了大鼠肝脏中 Oatp4 作为目的蛋白进行验证。通过 Western blot 实验，我们发现黄连可上调大鼠 Oatp4 蛋白表达。

综上所述，黄连可以通过影响 OATP1B3 的转运活性与蛋白表达，共同影响黄芩黄酮在大鼠肝脏中的分布特征。

参考文献

[1] 何颖，邹爱英，李春晓，等 . 试述配伍对方剂疗效的影响 [J]. 天津药学，2018，30（5）：54-57.

[2] 钟高堂 . 近二十年中药药对的研究进展与思考 [J]. 四川中

医，2016，34（9）：221-223.
[3] Rong S，Hui Z，Liu Z，et al. Influence of coptis chinensis on pharmacokinetics of flavonoids after oral administration of Radix Scutellariae in rats [J]. Biopharm Drug Dispos，2009，30（7）：398-410.
[4] 周慧，马越鸣，石荣，等 . 大鼠体内泻心汤及其不同配伍黄酮类成分药代动力学的变化规律研究 [J]. 时珍国医国药，2009，20（9）：2153-2156.
[5] 冯瑾 . 黄芩 - 黄连药对药代动力学及相互作用研究 [D]. 上海：第二军医大学，2010.
[6] Du LY，Guo JM，Qian DW，et al. Simultaneous determination of seven active ingredients in rat plasma by UPLC-MS/MS and application in pharmacokinetic studies after oral administration of scutellaria-coptis herb couple [J]. Med Chem Res，2015，24（3）：1289-1297.
[7] Kalapos-Kovacs B，Juhasz V，Temesszentandrasi-Ambrus C，et al. Baicalin is a substrate of OATP2B1 and OATP1B3 [J]. Phytother Res，2018，32（8）：1647-1650.
[8] Zhang Q，Ma YM，Wang ZT，et al. Pharmacokinetics difference of multiple active constituents from decoction and maceration of Fuzi Xiexin Tang after oral administration in rat by UPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal，2014，92：35-46.
[9] Wang Q，Shi R，Dai Y，et al. Mechanism in the existent difference in form of wogonin/wogonoside between plasma and intestine/liver in rats [J]. Rsc Adv，2018，8（7）：3364-3373.
[10] 周玟，申书华，程晔，等 . 葛根芩连汤治疗湿热瘀毒型肝细胞癌 TACE 术后栓塞综合征的临床观察 [J]. 南京中医药大学学报，2022，38（5）：397-403.
[11] Miao Q，Zhao YY，Miao PP，et al. Proteomics approach to analyze protein profiling related with ADME/Tox in rat treated with Scutellariae radix and Coptidis rhizoma as well as their compatibility [J]. J Ethnopharmacol，2015，173：241-250.
[12] 赵园园，苗培培，苗青，等 . 6 种黄连生物碱对鼠肝微粒体 UGTs 及 UGT1A1 活性影响的体内外研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（2）：309-313.
[13] Chen C，Wu ZT，Ma LL，et al. Organic anion-transporting polypeptides contribute to the hepatic uptake of berberine [J]. Xenobiotica，2015，45（12）：1138-1146.
[14] Lu H，Choudhuri S，Ogura K，et al. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice：essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR [J]. Toxicol Sci，2008，103（1）：35-45.

（收稿日期：2022-08-09；修回日期：2022-10-06）

UPLC-MS/MS 法测定人血浆中丙卡特罗的浓度

赵想[1]，杨亚楠[2]，许杨[2]，李玮[1, 3]，陶春蕾[1, 2*]（1. 安徽中医药大学 药学院，合肥 230012；2. 安徽万邦医药科技股份有限公司，合肥 230011；3. 安徽省食品药品检验研究院，合肥 230051）

摘要：目的 建立超高效液相色谱串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定人血浆中丙卡特罗的浓度，并研究丙卡特罗与原研制剂的人体生物等效性。**方法** 采用固相萃取法处理血浆样品，内标为替硝唑，色谱柱为 Hypersil GOLD C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.9 μm），流动相为 0.02% 乙酸水溶液（含 5 mmol·L^{-1} 甲酸铵）-80% 甲醇水溶液（含 5 mmol·L^{-1} 甲酸铵），流速为 0.30 mL·min^{-1}，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL。32 例健康受试者参加空腹试验，32 例健康受试者参加餐后试验，均采用自身两交叉试验设计。采用 WinNonlin 8.1 软件计算得到药代动力学参数，并进行统计分析。**结果** 丙卡特罗质量浓度在 2.00 ～ 500 pg·mL^{-1} 与测定值线性关系较好。空腹给药后参比制剂与受试制剂的 C_{max} 分别为（154±50.0）和（157±53.1）pg·mL^{-1}，t_{max} 分别为（1.01±0.38）和（1.17±0.54）h，$t_{1/2}$ 分别为（7.07±2.07）和（7.53±2.06）h，$AUC_{0\sim t}$ 分别为（719±194）和（724±168）pg·h·mL^{-1}。餐后给药后参比制剂与受试制剂的 C_{max} 分别为（54.0±17.6）和（52.3±16.2）pg·mL^{-1}，t_{max} 分别为（1.73±0.97）和（1.94±1.01）h，$t_{1/2}$ 分别为（5.26±1.42）和（5.48±1.28）h，$AUC_{0\sim t}$ 分别为（295±76.9）和（307±74.3）pg·h·mL^{-1}。**结论** 本方法可用于测定人血浆中丙卡特罗的浓度，两种片剂在空腹和餐后条件下均生物等效。

关键词：UPLC-MS/MS；丙卡特罗；固相萃取；生物等效性
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-068-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.011

作者简介：赵想，男，硕士，主要从事体内药物分析研究，email：1345138507@qq.com *通信作者：陶春蕾，女，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事新药临床研究和药代动力学研究，email：taochunlei@ahwbyy.cn

Determination of procaterol in human plasma by UPLC-MS/MS

ZHAO Xiang[1], YANG Ya-nan[2], XU Yang[2], LI Wei[1, 3], TAO Chun-lei[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Wanbang Pharmaceutical Technology Co.*, *Ltd.*, *Heifei* 230011; 3. *Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control*, *Heifei* 230051)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry tandem (UPLC-MS/MS) method for the determination of the concentration of procaterol in human plasma, and to study the bioequivalence of procaterol and the original preparation meptin-mini. **Methods** The plasma samples were processed by solid phase extraction method. The internal standard was tinidazole, the column was Hypersil GOLD C_{18} (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm), and the mobile phase was 0.02% acetic acid aqueous solution (containing 5 mmol • L^{-1} ammonium formate)-80% methanol aqueous solution (containing 5 mmol • L^{-1} ammonium formate). The flow rate was 0.30 mL • min^{-1}, the column temperature was 40 ℃ , and the injection volume was 5 μL. Totally 32 healthy subjects participated in the fasting test, and another 32 healthy subjects participated in the postprandial test. Both groups adopted their own two-crossover experimental design. Pharmacokinetic parameters were analyzed by WinNonlin 8.1 software. **Results** The standard curve of procaterol was good at 2.00 ～ 500 pg • mL^{-1}. The pharmacokinetic parameters for procaterol of reference and test preparation under fasting condition were as follows: C_{max} was (154±50.0) and (157±53.1) pg • mL^{-1}, t_{max} was (1.01±0.38) and (1.17±0.54) h, $t_{1/2}$ was (7.07±2.07) and (7.53±2.06) h, and $AUC_{0\sim t}$ was (719±194) and (724±168) pg • h • mL^{-1}. The pharmacokinetic parameters for procaterol of reference and test preparation under postprandial condition were as follow: C_{max} was (54.0±17.6) and (52.3±16.2) pg • mL^{-1}, t_{max} was (1.73±0.97) and (1.94±1.01) h, $t_{1/2}$ was (5.26±1.42) and (5.48±1.28) h, and $AUC_{0\sim t}$ was (295±76.9) and (307±74.3) pg • h • mL^{-1}. **Conclusion** This method can be used to determine the concentration of procaterol in human plasma, and both tablets are bioequivalent under fasting and postprandial condition.

Key words: UPLC-MS/MS; procaterol; solid-phase extraction; bioequivalence

盐酸丙卡特罗为β_2受体激动剂，对支气管平滑肌的β_2肾上腺素受体有较高的选择性，可以舒张气道平滑肌和促进呼吸道的纤毛运动，增加呼吸道的防御功能，起到止咳平喘的作用[1-3]。根据文献报道，丙卡特罗也具有一定的抗过敏作用，能抑制哮喘患者乙酰胆碱喷雾剂诱发的支气管收缩反应，对速发型和迟发型气道反应增高都具有很好的抑制作用[4-6]。临床上主要用于支气管哮喘、喘息性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病等。丙卡特罗片剂于 1980 年在日本上市，由于治疗剂量低，采用气相色谱串联质谱（GC-MS/MS）的方法很难准确测定丙卡特罗在人体内的药代动力学数据。本文采用固相萃取技术结合 UPLC-MS/MS 的方法，对人血浆中丙卡特罗的浓度进行测定，此方法快速灵敏，定量下限可以达到 2.00 pg • mL^{-1}，且成功应用于中国健康受试者体内研究。目前国内外关于丙卡特罗的药代动力学研究报道较少[7-9]，生物等效性研究尚未见发表，本研究可以为丙卡特罗制剂的临床应用和生物等效性试验研究提供参考，现报道如下。

1 材料

赛默飞世尔 TSQ Altis 质谱仪、VANQUISH Pump 液相色谱系统（美国赛默飞世尔科技公司），XP6 百万分之一电子天平（梅特勒 - 托利多仪器有限公司），台式高速冷冻离心机 4-16KS 型（美国西格玛公司），固相萃取装置 MULTI-SPE-M96 型、氮吹装置 Cleanert V96 型（天津博纳艾杰尔科技有限公司）。

受试制剂（T）：盐酸丙卡特罗片（某公司，规格：25 μg/ 片，批号：210415），参比制剂（R）：Meptin-mini（大冢制药公司，规格：25 μg/ 片，批号：OC95M1），盐酸丙卡特罗对照品（批号：100275201903，纯度：96.6%）、替硝唑对照品（批号：100336201704，纯度：100.0%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇（色谱级，美国西格玛公司），甲酸铵、甲酸、乙酸（色谱级，上海阿拉丁生化科技有限公司），水为超纯水。

2 方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Hypersil GOLD C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.9 μm）；流动相 A：0.02% 乙酸水溶液（含 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵），流动相 B：80% 甲醇水溶液（含 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵），梯度洗脱（0.00 min，8.0%B，3.50 ～ 5.00 min，40.0%B，5.01 ～ 6.50 min，8.0%B）；流速：0.30 mL•min^{-1}；柱温：40 ℃；进样量：5.0 μL。

2.2　质谱条件

ESI 正离子检测模式，选择反应监测（SRM）扫描；丙卡特罗（PCT）射频透镜电压：46 V，碰撞能量：12 V，Q1 和 Q3 分辨率分别为 0.4 和 1.2；内标替硝唑（TIN）射频透镜电压：68 V，碰撞能量：17 V，Q1 和 Q3 分辨率均为 0.4；丙卡特罗的离子对：*m/z* 291.2 → 273.2，内标离子对：*m/z* 248.1 → 121.1。丙卡特罗和内标的二级质谱图如图 1 所示。

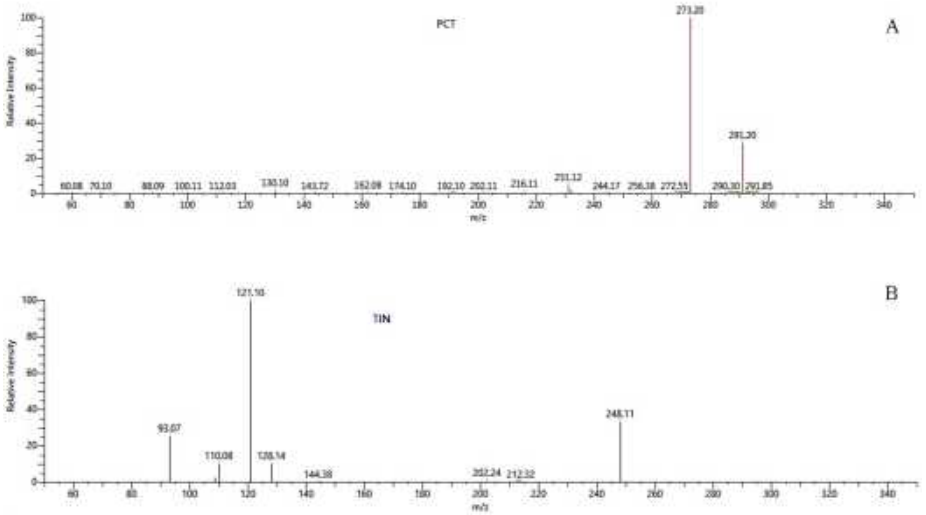


图 1　丙卡特罗（A）和替硝唑（B）的二级质谱图

Fig 1　MS spectra of procaterol（A）and tinidazole（B）

2.3　溶液的制备

精密称取盐酸丙卡特罗对照品适量，经质量校正系数校正后，用甲醇溶解并稀释得到质量浓度为 1.00 mg • mL^{-1} 的待测物储备液。将待测物储备液用 50% 甲醇定量稀释，最终得到质量浓度为 0.04、0.08、0.20、0.40、1.00、4.00、8.00、10.0 ng • mL^{-1} 的标准曲线工作液和 0.04、0.12、0.60、3.00、7.50 ng • mL^{-1} 的质控工作液。用同样的方式制备内标工作液，质量浓度为 5.00 ng • mL^{-1}。上述溶液均置于－ 20 ℃冰箱中保存，备用。

2.4　血浆样品处理方法

将室温下解冻的样品或新配制的样品，涡旋混匀，在 96 孔板中加入样品 200 μL 和内标工作溶液 50 μL，在每一个样品孔中加入纯水 100 μL，封膜，涡旋振荡 10 min。移取 250 μL 混匀后的样品置预先用纯甲醇 1200 μL 和纯水 1200 μL 活化过的 SPE 柱中，样品以约 0.2 mL • min^{-1} 的流速通过 SPE 柱，保持 1 ～ 2 min，依次用纯水 300 μL 和 10% 甲醇 600 μL 淋洗，最后加入纯甲醇 400 μL 洗脱，收集洗脱液至新的 96 孔板中，氮气（40 ℃）吹干已收集的洗脱液，加入 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵 200 μL 进行复溶，混匀 10 min，样品在 4 ℃，2623 g 离心 10 min，取 5 μL 进样分析。上述操作均在室温、黄光下进行。

2.5　方法学考察

2.5.1　选择性　制备来源于 6 个不同健康人体的空白血浆样品、一个来源的模拟空白高脂血浆样品和一个来源的模拟空白溶血样品，按“2.4”项下方法进行样品处理，配制每个不同来源的空白基质和配制的添加内标的定量下限样品，结果显示，丙卡特罗和内标色谱峰峰形均良好，不同来源的空白基质对分析物和内标的检测无明显干扰，不影响定量分析，内标与分析物之间也互不干扰。其典型色谱图如图 2 所示。

2.5.2　标准曲线　分别精密量取 475 μL 空白基质和 25 μL 丙卡特罗工作液，依次制备质量浓度为 2.00、4.00、10.0、20.0、50.0、200、400、500 pg • mL^{-1} 的血浆样品，按“2.4”项下方法进行样品处理，进样测定。以丙卡特罗质量浓度为横坐标，丙卡特罗色谱峰面积与内标物替硝唑色谱峰面积的比值为纵坐标，得丙卡特罗的回归方程为 $y = 0.009\,43x - 0.002\,21$（$r = 0.9954$），线性范围为 2.00 ～ 500 pg • mL^{-1}，其定量下限为 2.00 pg • mL^{-1}。

2.5.3　精密度和准确度　分别精密量取适量空白血浆和丙卡特罗工作液，配制 5 个质量浓度水平（定量下限、低、中 1、中 2、高）的质控血浆样品，丙卡特罗的质量浓度分别为 2.00

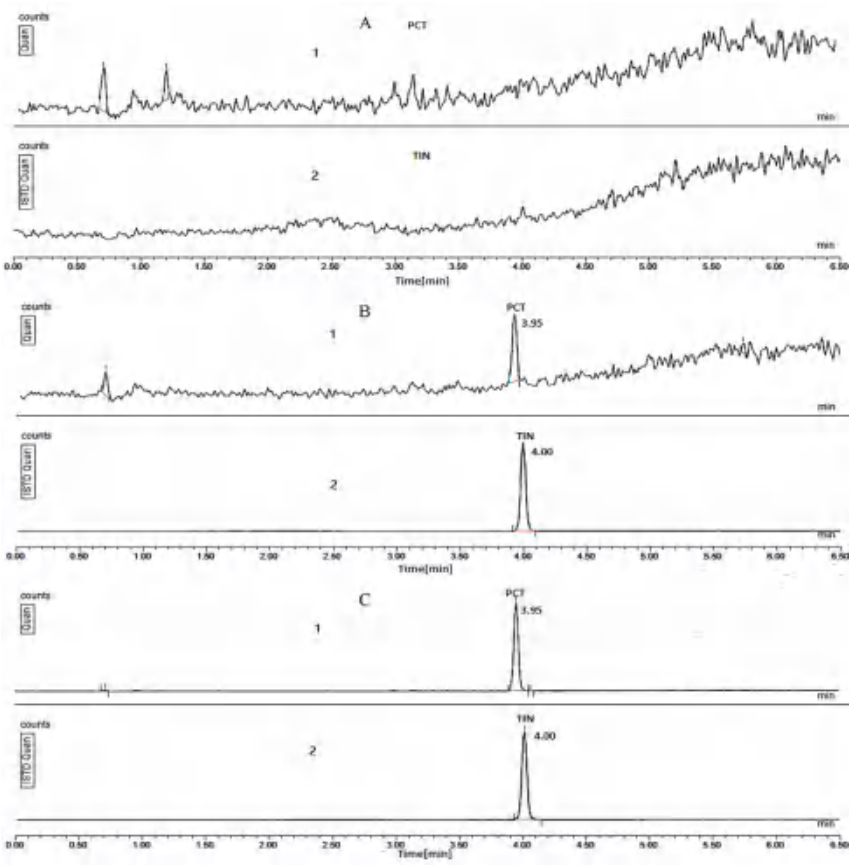


图 2　丙卡特罗的典型色谱图

Fig 2　Typical LC-MS/MS chromatogram of procaterol

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋ 40 pg • mL^{-1} 丙卡特罗＋ 5 ng • mL^{-1} 替硝唑 [blank plasma matrix ＋ 40 pg • mL^{-1} procaterol ＋ 5 ng • mL^{-1} tinidazole]；C. 受试者空腹口服盐酸丙卡特罗片后 0.75 h 的血浆样本（plasma sample after oral procaterol hydrochloride tablets under fasting condition for 0.75 h）；1. 丙卡特罗（procaterol）；2. 替硝唑（tinidazole）

pg • mL^{-1}（LLOQ）、6.00 pg • mL^{-1}（LQC）、30.0 pg • mL^{-1}（M1QC）、150 pg • mL^{-1}（M2QC）、375 pg • mL^{-1}（HQC）。按 “2.4” 项下方法处理进样分析，连续在 2 d 内处理 3 个批次，每个浓度水平的质控样品同时处理 6 个样品。结果显示丙卡特罗 LQC、M1QC、M2QC、HQC 样品的准确度均在 98.4% ～ 104.9%，丙卡特罗 LLOQ 样品批间准确度为 98.2%，批内、批间精密度（CV%）均≤ 7.5%，说明该方法重复性较好，结果见表 1。

表 1　丙卡特罗的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Precision and accuracy of procaterol ($\bar{x} \pm s$)

分析物	理论浓度 /（pg • mL^{-1}）	批内（n = 6）			批间（n = 18）		
		实测浓度 /（pg • mL^{-1}）	精密度 /%	准确度 /%	实测浓度 /（pg • mL^{-1}）	精密度 /%	准确度 /%
丙卡特罗	2.00	1.98±0.116	5.9	98.8	1.96±0.129	6.6	98.2
	6.00	6.13±0.162	2.6	102.2	5.98±0.328	5.5	99.6
	30.0	29.5±2.21	7.5	98.4	29.3±1.20	4.1	97.7
	150	156±3.51	2.2	104.2	149±3.03	2.0	99.1
	375	393±23.5	6.0	104.9	380±20.3	5.4	101.2

2.5.4　提取回收率　按 “2.4” 项下方法处理 LQC、M2QC、HQC 浓度的质控样品，进样分析，记录峰面积。取空白血浆按 “2.4” 项下方法处理样品，最终样品复溶前加入相同浓度水平待测物含内标的纯溶液，每个浓度平行测定 6 次，记录峰面积。通过比较正常提取样品峰面积和提取基质后样品峰面积比值，计算提取回收率。结果显示，丙卡特罗 LQC、M2QC、HQC 浓度水平的提取回收率分别为（80.5±0.43）%、（80.6±0.60）%、（82.5±0.48）%，替硝唑提取回收率为（75.3±1.27）%，丙卡特罗及其内标替硝唑在基质样品中的提取回收率均满足生物样品分析要求。

2.5.5　基质效应　使用 6 个不同来源的空白基质，按“2.4”项下方法进行处理，最终复溶前加入待测物含内标的纯溶液，使其最终浓度分别与 LQC、M2QC、HQC 样品的进样浓度一致，进样分析，记录峰面积。另外配制相同浓度水平待测物含内标的纯溶液，每个浓度平行测定 6 次，记录峰面积。通过比较提取基质后样品峰面积和纯溶液样品峰面积的比值，计算其内标归一化基质效应因子。结果显示，LQC、M2QC、HQC 浓度水平样品的内标归一化基质效应因子分别为 0.893、0.916、0.923，CV% 均不超过 5%，符合基质效应考察要求。

2.5.6　血浆样品稳定性　将配制完成后放置在不同条件下 LQC、HQC 的质控样品与新鲜配制的标准曲线样品一同测定。通过考察样品前处理过程中室温条件下放置 15 h、处理后样品放置操作台 1 h、处理后样品自动进样器温度下放置 127 h、样品 5 次反复冻融、样品在－ 70 ℃冰箱中长期储存 61 d。结果表明，丙卡特罗每一浓度水平的均值均在标示浓度的 ±15% 内，CV% 均小于 10%，在各种考察环境下稳定性均较好，见表 2。

表 2　丙卡特罗基质中稳定性考察结果 (n = 6)

Tab 2　Stability of procaterol in matrix (n = 6)

处理方式	丙卡特罗			
	6.00 pg·mL^{-1}		375 pg·mL^{-1}	
	实测浓度 /（pg·mL^{-1}）	CV/%	实测浓度 /（pg·mL^{-1}）	CV/%
样品前处理过程中放置室温 15 h	5.65±0.326	5.8	340±9.44	2.8
样品处理后放置操作台 1 h	5.34±0.138	2.6	345±0.946	0.30
样品处理后放置自动进样器 127 h	5.24±0.101	1.9	341±2.41	0.70
样品 5 次冻融循环（－ 70 ℃）	5.75±0.163	2.8	357±10.7	3.0
样品在－ 70 ℃冰箱中长期储存 61 d	5.51±0.223	4.0	375±4.92	1.3

2.5.7　高脂效应和溶血效应　高脂效应和溶血效应属于基质效应的一种，可能会对分析物的测定产生影响。通过使用高脂血浆和溶血血浆配制 LQC、HQC 浓度水平的高脂样品和溶血样品，每个浓度水平平行配制 6 份，并随行正常空白基质配制的标准曲线样品和质控样品。结果显示，高脂效应和溶血效应平均值的准确度偏差均不超过 ±15.0%，CV% 均小于 15%，即高脂及溶血效应不影响本次试验的含量测定。

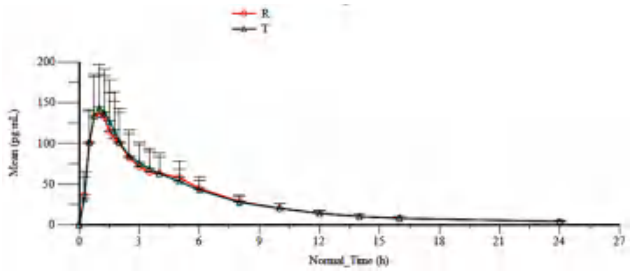
2.5.8　其他　分别考察了储备液、工作液室温放置 23 h 稳定性和－ 30 ～－ 15 ℃条件下放置 35 d 的稳定性、全血稳定性、稀释可靠性、人员和仪器耐用性等，其结果均在合格范围内。

2.6　生物等效性试验

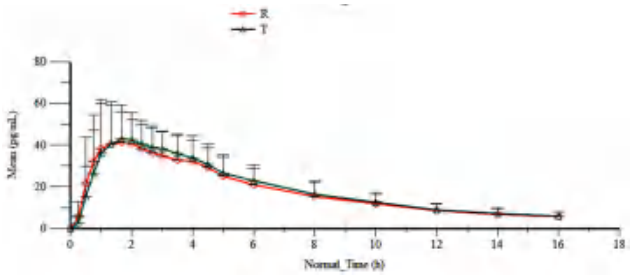
2.6.1　受试者筛选　本试验经蚌埠医学院第一附属医院伦理委员会审查通过（[2021]164 号），招募 64 例健康受试者（男女均有），年龄（30.03±7.24）岁，体质量指数（BMI）(22.92±1.87) kg·m^{-2}，空腹和餐后受试者人数均为 32 例，然后再采用区组随机方法，让每位受试者随机分配至 T-R 组或 R-T 组，每组 16 例。参与试验的健康受试者均通过人口学资料检查（如姓名、性别、出生日期等）；生命体征、体格检查；个人疾病 / 手术史检查，是否曾经历或正在经历相关的急性或慢性疾病或其他任何可能影响研究结果的疾病、手术等；临床实验室检查包括血常规、尿常规、血生化、妊娠试验（女性）、心电图（标准 12 导联）等。试验开始前，所有参与本研究的健康受试者均签署知情同意书。

2.6.2　给药方案与样品采集　空腹试验和餐后试验均采用两交叉试验设计，分别于两个周期口服某厂家生产的盐酸丙卡特罗片和原研制剂，剂量均为单剂量口服 2 片，其中餐后试验有一位受试者因个人原因，在第 2 周期退出，其余受试者均参与试验。本次试验清洗期为 5 d，受试者在试验第 5 日返回临床试验中心，参与第 2 周期试验，两周期操作程序一致。空腹给药试验：给药前（给药前 1 h 内采集）及给药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00、5.00、6.00、8.00、10.00、12.00、14.00、16.00、24.00 h 采集静脉血。餐后给药试验：给药前（进食高脂餐前 30 min 内采集）及给药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.33、1.67、2.00、2.33、2.67、3.00、3.50、4.00、4.50、5.00、6.00、8.00、10.00、12.00、14.00、16.00 h 采集静脉血。健康受试者每周期服药前 1 日晚上禁食 10 h 以上，第 2 日早上送服 2 片盐酸丙卡特罗片，餐后试验所有受试者须在次日早上进食高脂餐，然后送服 2 片盐酸丙卡特罗片。每个时间点约采集 4 mL 全血，加入至含抗凝剂的采血管中，置于冰水浴中暂存，2 ～ 8 ℃以 2500 g 离心 10 min，储存于－ 70 ℃的冰箱中以供生物样本分析。

2.6.3　血药浓度 - 时间曲线　丙卡特罗的药代动力学参数均采用 WinNonlin 8.1 软件进行计算并统计分析。32 名健康受试者空腹及餐后给药盐酸丙卡特罗片后的平均血药浓度 - 时间曲线见图 3。



A



B

图 3　空腹（A）和餐后（B）口服 50 μg 盐酸丙卡特罗片的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 3　Mean concentration-time curve of oral 50 μg procaterol hydrochloride tablets under fasting（A）and postprandial（B）condition

2.6.4　生物等效性评价　32 例健康受试者空腹和餐后给药盐酸丙卡特罗片受试制剂和原研制剂后丙卡特罗的关键药代动力学参数见表 3，空腹和餐后给药条件下丙卡特罗的 90% 置信区间结果见表 4。

结果显示，空腹试验条件下受试制剂和参比制剂的吸收速度（C_{max} 和 t_{max}）及吸收程度（$AUC_{0\sim t}$）相当。t_{max} 采用非参数检验，在给药序列、药物和周期间两制剂间无显著性差异，经自然对数转换后空腹和餐后条件下（受试制剂 / 参比制剂）的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 的几何均值比及其 90% 置信区间均在 80.00% ～ 125.00%，并经双单侧 *t*- 检验分析后 *P* 值均小于 0.05，即本试验在空腹和餐后给药条件下受试制剂与原研参比制剂均具有生物等效性。

2.6.5　安全性评价　采用 CTC AE 5.0 标准评价安全性，观察并记录所有受试者在临床研究期间发生的不良事件。本次试验共有 13 例受试者发生了 16 次不良事件，其中空腹试验共发生 7 例 9 次不良事件，餐后试验共发生 6 例 7 次不良事件，受试制剂和参比制剂不良事件发生情况总体相似，主要包括

表 3　空腹和餐后给药 50 μg 盐酸丙卡特罗片后的主要药代动力学参数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Main pharmacokinetic parameters after oral administration of 50 μg procaterol hydrochloride tablets under fasting and postprandial condition（$\bar{x}\pm s$）

时间	制剂	C_{max}/（pg • mL^{-1}）	t_{max}/h	$t_{1/2}$/h	$AUC_{0\sim t}$/（pg • h • mL^{-1}）	$AUC_{0\sim\infty}$/（pg • h • mL^{-1}）
空腹	参比制剂（n = 32）	154±50.0	1.01±0.38	7.07±2.07	719±194	764±200
	受试制剂（n = 32）	157±53.1	1.17±0.54	7.53±2.06	724±168	772±169
餐后	参比制剂（n = 31）	54.0±17.6	1.73±0.97	5.26±1.42	295±76.9	340±94.5
	受试制剂（n = 32）	52.3±16.2	1.94±1.01	5.48±1.28	307±74.3	335±89.6

表 4　空腹和餐后给药条件下丙卡特罗的 90% 置信区间结果

Tab 4　90% confidence interval for procaterol under fasting and postprandial condition

药代动力学参数	空腹（n = 32）			餐后（n = 31）		
	（T/R）%	CV/%	90% 置信区间	（T/R）%	CV/%	90% 置信区间
C_{max}/（pg • mL^{-1}）	101.84	27.8	90.70 ～ 114.35	97.38	24.3	87.88 ～ 107.91
$AUC_{0\sim t}$/（pg • h • mL^{-1}）	101.98	17.6	94.71 ～ 109.81	103.38	7.3	100.18 ～ 106.69
$AUC_{0\sim\infty}$/（pg • h • mL^{-1}）	102.42	16.9	95.37 ～ 110.00	103.74	8.6	99.83 ～ 107.81

头晕、γ- 谷氨酰转移酶升高、血胆红素升高等，无严重不良事件发生，且都在较短时间内恢复。

3　讨论

3.1　分析方法优化

丙卡特罗用药量小，血药浓度低，对分析方法的灵敏度要求较高。之前的文献报道所采用的样品处理方法，并不能满足本试验的测定需求，因此需要进行不断优化。本试验采用固相萃取技术结合 UPLC-MS/MS 法测定人体血浆中丙卡特罗的浓度，结合预试验数据，线性范围设定为 2.00 ～ 500 pg • mL^{-1}，定量下限为皮克数量级，因此方法建立难度较大。本试验首先采用蛋白沉淀法处理样品，尝试采用不同沉淀剂处理血浆样品，例如甲醇、乙腈等，但是蛋白沉淀方法达不到灵敏度的要求。考察了固相萃取法以及液 - 液萃取样品处理方法，液 - 液萃取方法考察了乙酸乙酯、甲基叔丁基醚作为萃取剂，但是液 - 液萃取后的回收率达不到要求且响应太低，不能满足本试验的测定要求。因此，选择固相萃取技术作为样品的前处理方法，而固相萃取技术相比液液萃取方法操作方便，萃取时间短，同时减少乙酸乙酯、甲基叔丁基醚等有机试剂的用量，具有较高的回收率和选择性。固相萃取法与蛋白沉淀法相比，可以减少血浆中内源性杂质的干扰，且能够起到富集、浓缩的效果，灵敏度更

高[10-11]。在选择流动相时，通过加入甲酸铵作为流动相添加剂，这样可增加样品的离子化程度，另外在 A 相中加入少量乙酸，可以降低基线、提高信号强度，也有助于改善峰形[12]。

3.2 *方法学验证讨论*

国内外主要采用高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）法测定丙卡特罗的血药浓度，但是对于方法学验证内容，国内外尚未有文献报道，本试验采用固相萃取技术结合 UPLC-MS/MS 法测定人体血浆中丙卡特罗的浓度，参考 2020 年版《中国药典》中生物样品定量分析方法验证指导原则[13]，对方法学内容进行全面的验证，保证生物样品分析的方法的精密可靠性，同时也为丙卡特罗临床药代动力学研究提供参考。本试验考察了提取回收率和基质效应，并对其进行了详细的描述，还考察了不同放置条件下储备液、工作液及血浆样品的稳定性。试验结果显示，本方法能够准确测定人血浆中丙卡特罗的浓度。

3.3 *关于研究结果分析*

本研究发现，在餐后给药条件下，受试制剂中丙卡特罗的末端消除相 $t_{1/2}$ 约为 5.26 h，根据《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》，要求 $AUC_{0\sim t}$ 至少应覆盖 $AUC_{0\sim\infty}$ 的 80%，从受试制剂和参比制剂药代动力学残留面积来看，都小于 20%，故本次餐后试验采血点设计到 16 h，能够满足法规要求。空腹给药后参比制剂与受试制剂的 C_{max} 分别为（157±53.1）和（154±50.0）pg·mL^{-1}，餐后给药后参比制剂与受试制剂的 C_{max} 分别为（54.0±17.6）和（52.3±16.2）pg·mL^{-1}，说明食物会降低丙卡特罗的吸收，因此在服用药物的过程中，应该严格遵循医嘱。对比空腹和餐后试验中的药代动力学参数，可知丙卡特罗片受试制剂与原研参比制剂的 C_{max}、t_{max}、$t_{1/2}$、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 数据整体相当，药代动力学特征基本一致。本试验测定了中国健康受试者，男性和女性均有，相比文献[8]报道只测定了日本男性健康受试者，结论更可靠。综上所述，本方法能准确定量人血浆中丙卡特罗的浓度，同时也可为我国患者的临床合理用药提供参考。

参考文献

[1] Nojiri M，Mizuno S，Nishiki K，et al. ADRB2 gene polymorphism and emphysema heterogeneity can modulate bronchodilator response in patients with emphysema [J]. Pulm Pharmacol Ther，2018，48：80-87.

[2] 任燕，陈颖，蔡强，等 . 丙卡特罗辅助治疗儿童哮喘对气道炎性反应、小气道功能的影响 [J]. 解放军预防医学杂志，2019，37（8）：103-109.

[3] 胡玲，林秋玉，黎小年，等 . 丙卡特罗口服溶液联合孟鲁司特片治疗儿童支气管哮喘的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（11）：1437-1439

[4] 张建梅，张粉霞，加妍，等 . 支原体肺炎患儿接受顺尔宁联合丙卡特罗治疗后的气道重塑、炎症反应的评估 [J]. 海南医学院报，2016，22（17）：1983-1988.

[5] 冯文，傅萍，刘峰，等 . HPLC 测定盐酸丙卡特罗片中有关物质的含量 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（18）：2239-2244.

[6] Kong D，Hu F，Jiang L，et al. Exploring the electrochemiluminescent behavior of procaterol hydrochloride in the presence of Ru（bpy）$_3^{2+}$ and its analytical application in pharmaceutical preparation [J]. Luminescence，2017，32（5）：745-750.

[7] Kusano K，Nomura M，Toju K，et al. Pharmacokinetics of procaterol in thoroughbred horses [J]. J Vet Pharmacol Ther，2016，39（3）：264-270.

[8] Kobayashi H，Masuda M，Kashiyama E，et al. Pharmacokinetic study of the oral administration of procaterol hydrochloride hydrate 50 μg in healthy adult Japanese men [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2010，48（11）：744-750.

[9] Krogh N，Backer V，Rzeppa S，et al. Pharmacokinetics of nebulized and oral procaterol in asthmatic and non-asthmatic subjects in relation to doping analysis [J]. Drug Test Anal，2016，8（10）：1056-1064.

[10] Goryński K，Kiedrowicz A，Bojko B. Development of SPME-LC-MS method for screening of eight beta-blockers and bronchodilators in plasma and urine samples [J]. J Pharm Biomed Anal，2016，127：147-155.

[11] 曹靖，曾欣，王婷 . 固相萃取 LC-MS/MS 法测定人血浆中头孢呋辛的浓度 [J]. 中南药学，2015，13（7）：732-735.

[12] 胡岚岚，张乐，汤建林 . 固相萃取结合 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中克拉霉素浓度及其药代动力学研究 [J]. 中国测试，2020，46（10）：43-53.

[13] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：466.

（收稿日期：2022-06-17；修回日期：2022-07-20）

黄芪多糖通过调节细胞自噬来增强胃癌 BGC823 细胞对紫杉醇的敏感性

郝艳娇，李志宇，常明智，张晓丽*（河北北方学院基础医学院，河北　张家口　075000）

摘要：目的　探究黄芪多糖（astragalus polysaccharides，APS）作用于胃癌 BGC823 细胞的机制及其对紫杉醇（paclitaxel，PTX）的药物敏感性。**方法**　MTT 法检测 BGC823 细胞的活性，利用 CompuSyn 软件计算药物联合指数，伤口愈合实验和 Transwell 实验检测细胞的迁移、侵袭能力，Hoechst 染色法检测细胞的凋亡水平，通过扫描电子显微镜观察细胞的表面结构，利用免疫荧光法检测 LC3 的相对表达量，蛋白免疫印迹法（Western blot）检测 Becline-1、Bax、LC3、p62、Bcl-2 蛋白的表达水平。**结果**　APS、PTX 均使 BGC823 细胞增殖受到抑制，CompuSyn 软件分析显示 APS 和 PTX 存在协同抑制作用，且联合用药组效果更为显著。与对照组比较，APS 和 PTX 能显著抑制细胞的迁移、侵袭能力。形态学观察显示各给药组细胞表面形态和结构均受到破坏。Western blot 结果显示各给药组 Becline-1、Bax 蛋白表达水平升高，LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值增加，p62、Bcl-2 蛋白表达水平下降。**结论**　APS 联合 PTX 能够抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力，其机制可能与诱导细胞自噬和凋亡有关。

关键词：黄芪多糖；紫杉醇；侵袭；凋亡；自噬
中图分类号：R735.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0075-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.012

Astragalus polysaccharide enhances the sensitivity of gastric cancer BGC823 cells to paclitaxel by regulating the cellular autophagy

HAO Yan-jiao, LI Zhi-yu, CHANG Ming-zhi, ZHANG Xiao-li* (*College of Basic Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou Hubei* 075000)

Abstract: Objective　To determine the mechanism of astragalus polysaccharides (APS) action on gastric cancer BGC823 cells and its sensitivity to paclitaxel (PTX). **Methods**　MTT assay was used to detect the activity of BGC823 cells. CompuSyn software was used to calculate the drug combination index. Wound healing assay and Transwell assay were used to detect the changes of migration and invasion ability of cells. Hoechst staining was used to detect the apoptosis level of cells. The surface structure of cells was observed by scanning electron microscope, and the relative expression of LC3 was detected by immunofluorescence assay. The expression levels of Becline-1, Bax, LC3, p62 and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results**　Both APS and PTX inhibited the proliferation of BGC823 cells, and the analysis by CompuSyn software showed that APS and PTX had a synergistic inhibitory effect, and the effect was more significant in the combination group. Compared with the control group, APS and PTX significantly inhibited the migration and invasion ability of the cells. Western blot showed that the expression levels of Becline-1 and Bax increased, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio increased, and p62 and Bcl-2 decreased in each administration group. **Conclusion**　APS combined with PTX can inhibit the cell proliferation, migration and invasion ability, and the mechanism may be related to the induction of cell autophagy and apoptosis.

Key words: astragalus polysaccharide; paclitaxel; invasion; apoptosis; autophagy

基金项目：河北北方学院自然科学研究计划项目（No.YB2018008）。
作者简介：郝艳娇，女，硕士研究生，主要从事中药抗肿瘤基础研究，email：smkx0805@163.com　*通信作者：张晓丽，女，教授，主要从事中药抗肿瘤基础研究，email：894915208@qq.com

胃癌是一种严重威胁人类健康的常见疾病。据统计，全世界每年有 100 多万人被诊断为胃癌，相关死亡病例约 78 万 [1]。临床上，化疗是治疗胃癌的主要手段，然而，许多胃癌患者对当前的化疗药物具有一定的耐药性 [2]。因此，研发新型辅助治疗药物并探究药物作用于胃癌的作用机制是临床上治疗胃癌和改善患者预后的有效策略。

天然中草药中富含多种有效的活性成分，已被证明具有抗肿瘤的作用 [3]。研究显示，中药及其提取物能够有效抑制胃癌的增殖，改善患者预后 [4-5]。黄芪是我国传统的中草药，为临床上常用的中药之一 [6]。黄芪多糖（astragalus polysaccharides，APS）是黄芪的重要成分之一，能够直接、间接杀伤肿瘤或协同化疗发挥多重抗肿瘤作用，因而在肿瘤领域备受关注 [7]。有研究通过微阵列测试细胞 miRNA 表达谱等方法来探究 APS 对卵巢癌的影响，结果显示，APS 在体外可能通过 miR-27a/FBXW7 轴抑制了卵巢癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡 [8]。此外，另一项在 APS 与宫颈癌的研究中显示，APS 可增强宫颈癌细胞的化疗药物的敏感性，其机制可能与诱导细胞自噬活性的增强相关 [9]。但是，关于 APS 联合紫杉醇（paclitaxel，PTX）对胃癌的作用研究尚未见报道。因此，本研究通过探讨 APS 联合紫衫醇对 BGC823 细胞的影响，旨在初步探讨 APS 对 PTX 产生增敏作用和降低毒副作用的机制，进而为 APS 应用于临床治疗提供相应的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株

BGC-823 细胞（中科院细胞库），保存于河北北方学院生命科学研究中心。

1.2 试药

黄芪多糖（天津赛诺制药有限公司，批号：210202），紫杉醇（四川汇宇制药有限公司，批号：2412110042），DMEM 培养基（美国 Corning 公司），胎牛血清（美国 Gegrogen 公司），Matrigel 基质胶（美国 BD 公司），Hoechst（33258）细胞染色液（北京碧云天公司），噻唑蓝（MTT）、0.1% 结晶紫染色液（北京索莱宝公司），Transwell 小室（美国 CORNING 公司）。微管相关蛋白 1 轻链 3（LC3B 抗体）和 p62 抗体（美国 CST 公司），自噬效应蛋白 Beclin1 抗体（美国 Abcam 公司），*β*-actin、Bcl-2、Bax 抗体（北京中杉金桥有限公司）。

1.3 仪器

细胞超净工作台、HEPA 100 级恒温培养箱（美国 Thermo 公司），酶联免疫分析检测仪（美国 MD 公司），电泳仪和全能型蛋白转膜仪（美国 Bio-Rad 公司），荧光显微镜（日本 Olympus 公司），扫描电子显微镜（日本日立公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

BGC823 细胞复苏后加入含 10% 胎牛血清、0.1% 青链霉素的 DMEM 培养基，置于含 5%CO_2、37 ℃的恒温培养箱中，细胞每日换液一次，待细胞生长至 70% ～ 80% 时进行胰酶消化，分瓶传代。传代 2 ～ 3 次后取对数生长期细胞分组进行后续实验。

2.2 MTT 法测定细胞的生长活性

将细胞用胰酶消化后置于 96 孔板中（2×10^4 个 / 孔），恒温培养箱孵育 24 h，设置为空白对照组（control，完全培养基）、黄芪多糖组（APS 组，质量浓度为 0、5、10、20 mg•mL^{-1}）、紫杉醇组（PTX 组，质量浓度为 0、5、10、15 μg • mL^{-1}）、黄芪多糖＋紫杉醇组 [（APS ＋ PTX）组，质量浓度为 5 mg • mL^{-1} ＋ 5 μg • mL^{-1}、10 mg • mL^{-1} ＋ 10 μg • mL^{-1}、20 mg • mL^{-1} ＋ 15 μg • mL^{-1}]，每组 6 个复孔，培养 24 h 后，加入 MTT（5 mg • mL^{-1}），继续培养 4 h，加入 DMSO 溶液，避光振摇 10 min 后，在 490 nm 处用酶标仪测定各孔的吸光度（*OD* 值）。计算细胞的抑制率。

2.3 联合指数（CI）的测定

根据 MTT 实验数据，将各组细胞的抑制率输入 CompuSyn 软件中计算其 CI 值，其数值＜ 1 表示协同作用、＝ 1 表示加性效应、＞ 1 表示拮抗作用。根据计算结果，我们选择 APS 组（10 mg • mL^{-1}），PTX 组（10 μg • mL^{-1}）和联合组（10 mg•mL^{-1} ＋ 10 μg•mL^{-1}）进行后续实验。

2.4 伤口愈合实验测定细胞的迁移能力

将细胞制成细胞悬液接种于 6 孔板中（4×10^5 个 / 孔），当细胞融合率达到 90% 时，用无菌枪头在孔板底部划出一道伤痕，然后用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗破碎细胞，按上述分组加入对应浓度的药物，然后置于恒温箱中孵育 24 h。在 0 h 和 24 h 时使用倒置显微镜在同一区域拍摄向划痕间隙内运动的细胞的图像。

2.5 Transwell 法测定细胞侵袭能力

在小室的上层中加入 1 mg • mL^{-1} 的 Matrigel 基质胶 60 μL，置于培养箱中 4 h 使其固化，在无血清的培养基将饥饿 12 h 的细胞制备为悬液，按“2.2”项下方法分为 4 组，接种于上室中（4×10^5

个 / 孔），在下室中添加 600 μL 含有血清的培养基诱导细胞，置于恒温箱中孵育 24 h，用棉签轻轻擦去上室中未侵袭的细胞，用多聚甲醛固定，在新的 24 孔板中加入 500 μL 的 0.1% 的结晶紫，染色 15 min，PBS 清洗，在每个孔的 5 个随机视野中进行拍照，分析各组细胞的侵袭数量。

2.6 Hoechst 进行染色观察 BGC823 细胞的凋亡情况

取生长良好的 BGC823 细胞按 2×10^4 个 / 孔接种于铺好爬片的 24 孔板中，待细胞贴壁后，弃旧培养基，将细胞按“2.2”项下方法分为 4 组，按分组加入不同浓度的药物，作用 24 h 后，用 4% 多聚甲醛固定，滴加 Hoechst 33258（10 μg•mL^{-1}）染色 15 min，取出爬片，置于载玻片上，避光，荧光显微镜下进行观察拍照。

2.7 扫描电子显微镜观察细胞的表面结构和形态

将无菌盖玻片置于 24 孔板中，细胞按 4×10^5 个 / 孔接种于含盖玻片的 24 孔板中，待细胞贴壁后，按“2.2”项下方法进行分组，培养 24 h 后，PBS 缓慢清洗，2.5% 的戊二醛固定样本于 4 ℃冰箱 6 h，用乙醇进行梯度脱水（30% ～ 100%），叔丁醇置换 2 次，放入冷冻干燥仪中干燥，离子溅射仪喷镀，扫描电子显微镜观察细胞的表面结构变化。

2.8 激光共聚焦显微镜检测 BGC823 细胞的 LC3 荧光表达强度

将细胞置于共聚焦小皿中培养，贴壁后按“2.2”项下方法分组培养 24 h，用 4% 多聚甲醛固定，0.1% Triton X-100 孵育 10 min，1%BSA 封闭 30 min，最后在一抗 LC3 中 4 ℃过夜，次日室温避光孵育相对应的二抗 2 h，PBS 清洗，DAPI 室温染色 5 min，滴加防淬灭封片液，激光共聚焦显微镜下进行观察并拍照。

2.9 Western blot 检测细胞自噬和凋亡相关蛋白表达

提取各组细胞蛋白，测蛋白浓度，制备分离胶和浓缩胶，在凝胶上进行电泳，然后将其转移到 PVDF 膜上，将膜在快速封闭液下封闭 15 min，4 ℃下与一抗（1∶1000）孵育过夜，加入对应的二抗（1∶5000），室温下置摇床 2 h，TBST 清洗后用超敏 ECL 化学发光底物试剂盒检测目标蛋白，使用凝胶成像仪获得图像，并通过 Image J 软件分析。

2.10 统计学处理

实验结果采用 SPSS 25 分析数据，结果采用 Graph Pad Prism 软件进行方差分析和绘图。多组之间的比较应用单因素的方差统计分析，两组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对细胞活力的影响

MTT 实验初步评估 APS、PTX 和联合用药对细胞活力的影响，结果提示细胞经不同质量浓度的药物处理 24 h 后，均可抑制细胞的生长活力，且具有浓度依赖性，并且联合用药时效果比单独用药更佳（见表 1）。基于 CompuSyn 软件对不同药物浓度所对应的抑制率和 CI 值的分析，我们采用细胞抑制率适中且协同作用较强的浓度（APS 10 mg • mL^{-1}，PTX 10 μg • mL^{-1}）作为联合组进行后续实验（见表 2）。

表 1 黄芪多糖联合紫杉醇对 BGC823 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Tab 1 Effect of astragalus polysaccharide combined with paclitaxel on the proliferation of BGC823 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	剂量	*OD* 值	抑制率 /%
control 组	0	1.021±0.03	—
APS 组	5 mg • mL^{-1}	0.841±0.02*	17
	10 mg • mL^{-1}	0.672±0.02*	34
	20 mg • mL^{-1}	0.465±0.02*	54
PTX 组	5 μg • mL^{-1}	0.747±0.03*	26
	10 μg • mL^{-1}	0.479±0.02*	53
	15 μg • mL^{-1}	0.341±0.02*	66
APS ＋ PTX 组	5 mg • mL^{-1} ＋ 5 μg • mL^{-1}	0.538±0.03$^{*\wedge}$	47
	10 mg • mL^{-1} ＋ 10 μg • mL^{-1}	0.331±0.01$^{*\wedge}$	67
	20 mg • mL^{-1} ＋ 15 μg • mL^{-1}	0.209±0.02$^{*\wedge}$	80

注：与对照组相比，$^{*}P<0.05$，与紫杉醇组相比，$^{\wedge}P<0.05$。

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

3.2 对细胞迁移、侵袭能力的影响

伤口愈合实验结果显示，药物组的伤口闭合间隙明显大于对照组，药物组的细胞运动性显著减弱（见图 1）。Transwell 分析表明，与对照组相比，药物组中穿膜细胞数量逐渐减少，表明细胞的侵袭受到了抑制（见图 2）。

3.3 对细胞凋亡能力的影响

如图 3 所示，对照组中活细胞核内多呈均匀荧光，单独用药组及联合组表现出明显的核浓缩，呈亮蓝色荧光信号等，表明 APS 和 PTX 联合使用可以促进细胞凋亡。

3.4 对细胞表面结构的影响

如图 4 所示，对照组中的细胞，呈三维立体椭圆形结构，表面可以看到丰富的微绒毛和伪

表 2　黄芪多糖和紫杉醇联合用药的 CI 值

Tab 2　CI values for the combination of astragalus polysaccharide and paclitaxel

Fa	CI Value	Total Dose
0.05	0.986 32	1.119 44
0.1	0.920 95	1.973 29
0.15	0.883 44	2.802 94
0.2	0.856 59	3.650 68
0.25	0.835 26	4.541 07
0.3	0.817 23	5.494 91
0.35	0.801 33	6.533 81
0.4	0.786 84	7.683 06
0.45	0.773 29	8.974 48
0.5	0.760 33	10.4502
0.55	0.747 68	12.1686
0.6	0.735 08	14.2140
0.65	0.722 26	16.7142
0.7	0.708 90	19.8742
0.75	0.694 60	24.0488
0.8	0.678 74	29.9142
0.85	0.660 22	38.9616
0.9	0.636 74	55.3427
0.95	0.601 30	97.5551
0.97	0.577 81	146.022

足，且伪足与其他细胞表面相互连接，APS 组和 PTX 组，细胞表面的微绒毛和伪足减少，且形态较对照组相比，呈不规则改变，联合组可见细胞膜皱缩明显，表面无微绒毛和伪足。说明 APS、PTX 通过破坏细胞的表面结构而进一步抑制细胞的增长，且联合应用效果更为显著。

3.5　对细胞 LC3 荧光强度的影响

如图 5 所示，对照组中 LC3 荧光强度较弱，单独用药组及联合组 LC3 荧光强度升高，联合组更为明显。此外，经药物处理后，活细胞数量明显减少，形态发生明显改变。表明 APS、PTX 及联合使用可以通过诱导 LC3 蛋白的表达进而诱导细胞发生自噬。

3.6　黄芪多糖联合紫杉醇对细胞自噬和凋亡相关蛋白的影响

如图 6 所示，与对照组相比，各药物组 p62 蛋白表达逐渐下降，Becline-1、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白表达水平升高，促凋亡蛋白 Bax 的表达量显著升高，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著降低，联合组效果更为显著，表明 APS 联合 PTX 可以诱导细胞发生自噬。

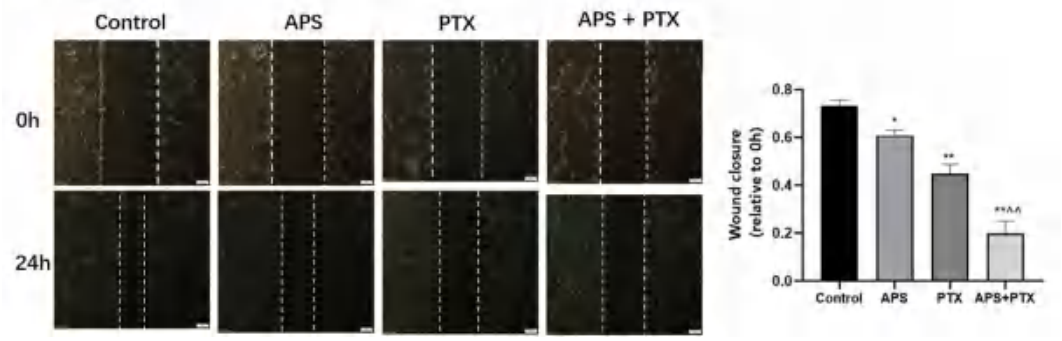


图 1　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞迁移能力的影响

Fig 1　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on the migration ability of BGC823 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与紫杉醇组相比，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the paclitaxel group，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

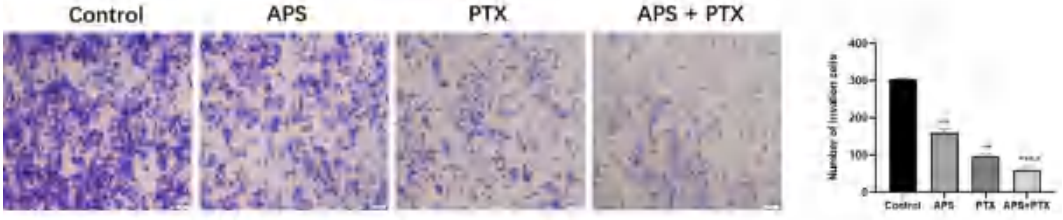


图 2　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞侵袭能力的影响

Fig 2　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on the invasion ability of BGC823 cells

注：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$，与紫杉醇组相比，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the paclitaxel group，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$.

4　讨论

胃癌是一种高度异质性的肿瘤，其病死率仅次于肺癌和肝癌 [10]。目前，对于胃癌的治疗主要是手术切除、化疗、放疗等综合治疗。然而，胃

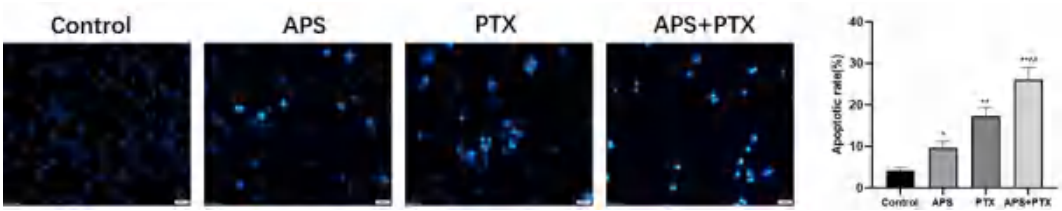


图 3　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞凋亡的影响

Fig 3　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on the apoptosis of BGC823 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，与紫杉醇组相比，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the paclitaxel group，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$.

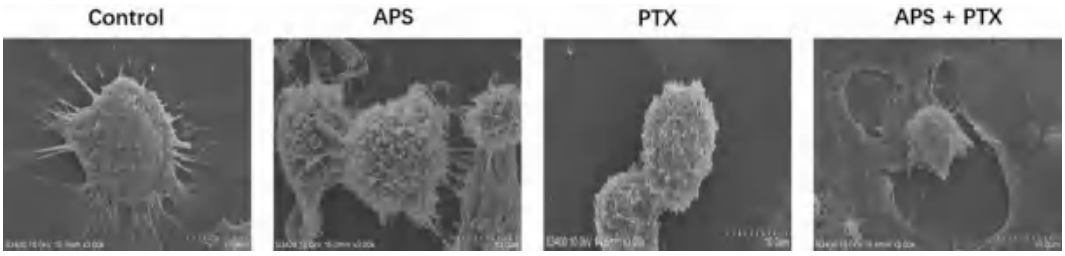


图 4　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞表面结构的影响

Fig 4　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on the surface structure of BGC823 cells

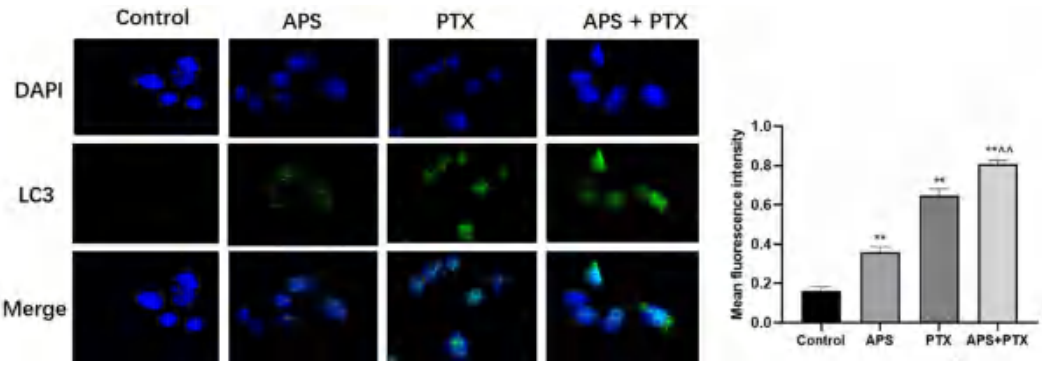


图 5　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞 LC3 荧光表达的影响

Fig 5　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on LC3 fluorescence expression in BGC823 cells

注：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$，与紫杉醇组相比，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the paclitaxel group，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$.

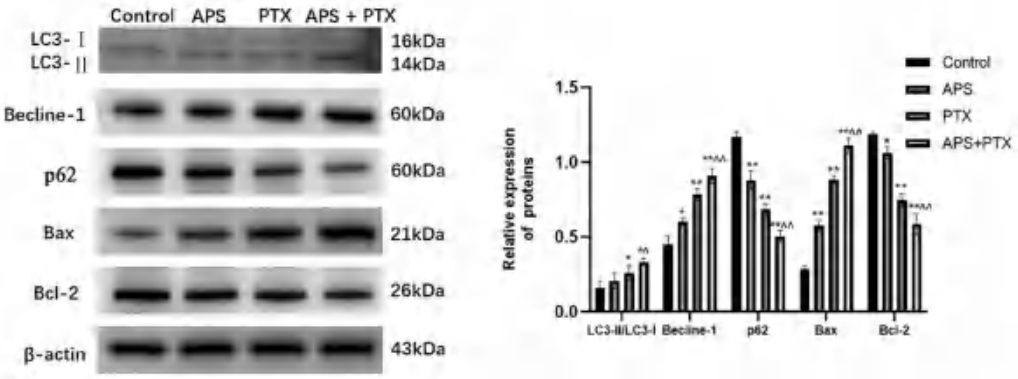


图 6　黄芪多糖、紫杉醇及联合用药对 BGC823 细胞自噬和凋亡相关蛋白的影响

Fig 6　Effect of astragalus polysaccharide，paclitaxel and combination on the autophagy and apoptosis-related proteins in BGC823 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，与紫杉醇组相比，$^{\wedge}P < 0.05$，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the paclitaxel group，$^{\wedge}P < 0.05$，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$.

癌早期特异性临床表现不明显，大多数患者确诊时病情已是晚期甚至转移，中晚期胃癌患者手术治疗后生存率较低，而单纯使用化疗药物，具有一定的耐受性和毒副作用[11]。因此，开发新的更

有效的治疗方案和手段对胃癌的治疗具有非常重要的意义。

我国一些传统中草药可通过多靶点、多层次发挥抗肿瘤作用[12]。近年来对于中草药抗肿瘤作用的研究已成为新的热点。APS 是一种具有生物活性的水溶性杂多糖，是黄芪中最重要的天然活性成分之一，具有多种药理特性[13]。研究发现 APS 通过介导细胞增殖发挥抗肿瘤作用[14]。Li 等[15]报道 APS 能够抑制卵巢癌的增殖，并提高顺铂的敏感性，降低 Bcl-2 的表达，促进促凋亡因子 Bax 的表达。目前 APS 对胃癌细胞的机制尚不完全明确，与 PTX 联合应用治疗胃癌的研究也未见相关文献报道。在本研究中，笔者对 APS 联合 PTX 对胃癌细胞的抑制作用及分子机制展开研究，为进一步研究药物治疗胃癌提供理论依据。MTT 检测发现，与对照组相比，不同浓度的 APS、PTX 及 APS 联合 PTX 应用，均可抑制 BGC823 细胞活力，且联合应用效果更为显著。同时笔者通过扫描电子显微镜评估细胞的形态和增殖。结果表明，与对照组相比，各药物组细胞形态不完整，且细胞数量明显减少，说明 APS 联合 PTX 对胃癌具有协同抑制的作用，该发现可能为研发胃癌治疗新方案提供新思路。

转移是恶性肿瘤的标志，迁移和侵袭是肿瘤转移的重要前期过程，已成为各种肿瘤临床治疗的巨大障碍[16-17]。因此，降低细胞迁移、侵袭行为可有效限制肿瘤细胞转移。研究者通过构建小鼠模型，发现 APS 能够显著抑制肝癌细胞的迁移和侵袭[18]。此外，APS 联合顺铂通过降低鼻咽癌细胞系 MMP-9 表达水平和增加 p53 表达量协同抑制了细胞的迁移和侵袭[19]。

近年来，凋亡和自噬之间关系的研究在癌症的治疗中引起了广泛关注。细胞凋亡是最著名的程序性细胞死亡形式，是限制细胞群扩增的关键生理机制，用于维持组织稳态或去除潜在的有害细胞，也是机体的一个基本生理过程，在细胞和组织中起着关键作用，许多靶向药物、化疗药等均能诱导细胞凋亡进而抑制肿瘤生长[20]。Bcl-2 家族成员对细胞凋亡的调节具有重要作用[21-22]，其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 被认为是确定凋亡过程是否发生的关键。据报道，APS 与纳米颗粒联合应用使细胞中 Bax/Bcl-2 和裂解半胱天冬酶 9/ 半胱天冬酶 9 的比例升高，进而诱导细胞发生凋亡[23]。在本研究中，笔者通过 Hoechst 染色发现，APS、PTX 及联合应用均使细胞亮蓝色荧光信号逐渐增强。Western blot 结果提示，Bax 的蛋白表达水平增加，Bcl-2 的蛋白表达水平降低，这可能是 APS、PTX 及联合用药促进细胞发生凋亡的机制之一。

自噬和凋亡是生物体内稳态所必需的分解代谢途径，两者都参与肿瘤细胞的调节。恶性肿瘤的发生发展过程中常伴随着自噬活性的改变，自噬是一种在进化上古老且高度保守的分解代谢过程，在应激条件下对维持细胞内稳态至关重要[24]。许多研究发现，自噬在包括能量代谢、细胞器更新、生长调节和衰老在内的病理生理反应中，以及在心血管疾病和神经退行性疾病等人类疾病中发挥着重要作用，并可缓解肿瘤治疗时发生的药物抵抗、不敏感、耐药等现象，故调节和改变肿瘤细胞自噬活性可有效防治肿瘤，提高肿瘤治疗过程中的放化疗敏感性，为肿瘤治疗和预防提供新的思路和方向[25]。p62、Becline-1、LC3 是标志性的自噬蛋白，为许多疾病和癌症的重要标志物，其中 p62 是一种多结构域蛋白，与 LC3 相互作用形成自噬小体。*Becline-1* 是一种与自噬有关的抑癌基因，是自噬体形成的关键基因，LC3 是最早发现的自噬小体膜蛋白[26-28]。由于 LC3 的数量和自噬水平相对应，因此可以通过检测 LC3 水平从而监测细胞的自噬活性[29]。田丽等[30]发现，萜类化合物 Telekin 能够升高 L3C-Ⅱ的表达，起到诱导自噬，抑制胃癌细胞增殖的作用。Yuan 等[31]发现天然化合物那昔卡辛可提高自噬蛋白 LC3-Ⅱ和 Beclin-1 的水平，降低自噬转运体 p62 的表达，并增加自噬通量，诱导胃癌细胞自噬依赖性凋亡，从而减少胃癌细胞的增殖。笔者通过 Western blot、激光共聚焦显微镜观察发现，与对照组相比，各药物组 p62 蛋白表达逐渐下降，Becline-1、LC3-Ⅱ /LC3-I 蛋白表达水平升高，各药物组 LC3 荧光强度不断增强，且联合组效果更为显著。说明 APS 联合 PTX 能够调控自噬相关蛋白的表达从而诱导细胞发生自噬。

4 结论

APS 联合 PTX 可以显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力，促进细胞发生凋亡，诱导细胞自噬，进而起到抑制肿瘤进程的作用，为进一步开发临床新型抗胃癌药物提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Thrift AP，El-serag HB. Burden of gastric cancer [J]. Clin

Gastroenterol Hepatol，2020，18（3）：534-542.
[2] Koustas E，Trifylli EM，Sarantis P，et al. The implication of autophagy in gastric cancer progression [J]. Life（Basel），2021，11（12）：1304-1319.
[3] 王栋，高宇，张佳，等 . 软坚散结类中草药治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（23）：219-225.
[4] Yu J，Song S，Jiao J，et al. ZiYinHuaTan recipe inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer by suppressing PI3K/AKT pathway [J]. Biomed Res Int，2020，2020：2018162.
[5] 范燕燕，陈有志，卢英恺，等 . 白花蛇舌草 - 半枝莲药对组分对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、线粒体自噬及凋亡的影响 [J]. 中医学报，2020，35（1）：130-135.
[6] 胡妮娜，张晓娟 . 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息，2021，38（1）：76-82.
[7] 谢荣丹，孙少伯，何建新，等 . 黄芪多糖对人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤生长及肿瘤相关凋亡蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（16）：37-43.
[8] Guo Y，Zhang Z，Wang Z，et al. Astragalus polysaccharides inhibit ovarian cancer cell growth via microRNA-27a/FBXW7 signaling pathway [J]. Biosci Rep，2020，40（3）：BSR20193396.
[9] 翟秋丽，胡向丹，肖静，等 . 黄芪多糖可能通过调控细胞自噬提高宫颈癌 HeLa 细胞对顺铂的敏感性 [J]. 中国中药杂志，2018，43（4）：805-812.
[10] Smyth EC，Nilsson M，Grabsch HI，et al. Gastric cancer [J]. Lancet，2020，396（10251）：635-648.
[11] Eusebi LH，Telese A，Marasco G，et al. Gastric cancer prevention strategies：a global perspective [J]. J Gastroenterol Hepatol，2020，35（9）：1495-1502.
[12] 李小江，邬明歆，孔凡铭，等 . 中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展 [J]. 中草药，2020，51（9）：2587-2592.
[13] Zheng Y，Ren W，Zhang L，et al. A review of the pharmacological action of astragalus polysaccharide [J]. Front Pharmacol，2020，11：349-363.
[14] Auyeung KK，Han QB，Ko JK. Astragalus membranaceus：a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers [J]. Am J Chin Med，2016，44（1）：1-22.
[15] Li C，Hong L，Liu C，et al. Astragalus polysaccharides increase the sensitivity of SKOV3 cells to cisplatin [J]. Arch Gynecol Obstet，2018，297（2）：381-386.
[16] Ganesh K，Massague J. Targeting metastatic cancer [J]. Nat Med，2021，27（1）：34-44.
[17] Fares J，Fares MY，Khachfe HH，et al. Molecular principles of metastasis：a hallmark of cancer revisited [J]. Signal Transduct Target Ther，2020，5（1）：28-43.
[18] Li C，Pan XY，Ma M，et al. Astragalus polysacharin inhibits hepatocellular carcinoma-like phenotypes in a murine HCC model through repression of M2 polarization of tumour-associated macrophages [J]. Pharm Biol，2021，59（1）：1533-1539.
[19] Yang YL，Lin ZW，He PT，et al. Inhibitory effect of astragalus polysaccharide combined with cisplatin on cell cycle and migration of nasopharyngeal carcinoma cell lines [J]. Biol Pharm Bull，2021，44（7）：926-931.
[20] Zhang M，Zhang M，Li R，et al. Melatonin sensitizes esophageal cancer cells to 5 fluorouracil via promotion of apoptosis by regulating EZH2 expression [J]. Oncol Rep，2021，45（4）：22-31.
[21] Tang JY，he AH，Jia G，et al. Protective effect of selenoprotein X against oxidative stress-induced cell apoptosis in human hepatocyte（LO2）cells via the p38 pathway [J]. Biol Trace Elem Res，2018，181（1）：44-53.
[22] Hu Y，Li H，Li R，et al. Protective effects of schisandrin B against D-GalN-induced cell apoptosis in human hepatocyte（L02）cells via modulating Bcl-2 and Bax [J]. Bioengineered，2021，12（1）：7205-7214.
[23] Duan Z，Liang M，Yang C，et al. Selenium nanoparticles coupling with astragalus polysaccharides exert their cytotoxicities in MCF-7 cells by inhibiting autophagy and promoting apoptosis [J]. J Trace Elem Med Biol，2022，73：127006.
[24] Onorati AV，Dyczynski M，Ojha R，et al. Targeting autophagy in cancer [J]. Cancer，2018，124（16）：3307-3318.
[25] Li X，He S，Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. Mol Cancer，2020，19（1）：12-27.
[26] Meng YC，Lou XL，Yang LY，et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma：a meta-analysis [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2020，146（5）：1103-1113.
[27] 陆麒瑾，李佳钰，蔡义思，等 . 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白 LC3，Beclin1，p62 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（1）：41-49.
[28] Islam MA，Sooro MA，Zhang P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy [J]. Int J Mol Sci，2018，19（5）：1404-1418.
[29] Cao Y，Luo Y，Zou J，et al. Autophagy and its role in gastric cancer [J]. Clin Chim Acta，2019，489：10-20.
[30] 田丽，向卫，汪蕾，等 . 萜类化合物 Telekin 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 HGC-27 细胞自噬 [J]. 中药药理与临床，2019，35（1）：67-71.
[31] Yuan Y，He X，Li X，et al. Narciclasine induces autophagy-mediated apoptosis in gastric cancer cells through the Akt/mTOR signaling pathway [J]. BMC Pharmacol Toxicol，2021，22（1）：70-80.

（收稿日期：2022-09-06；修回日期：2022-10-07）

注射用哌拉西林钠舒巴坦钠对中硼硅模制注射剂瓶中铝、硅、硼元素迁移量及其表面脱片趋势的影响

吴统选[1]，吴秋蓉[2]，张聪[1]，祝宇欣[3]，赵龙山[3*]（1. 天圣制药集团药物研究院有限公司，重庆 401120；2. 重庆圣华曦药业股份有限公司，重庆 400072；3. 沈阳药科大学药学院，沈阳 110016）

摘要：目的 研究注射用哌拉西林钠舒巴坦钠与中硼硅模制注射剂瓶中铝（Al）、硅（Si）、硼（B）元素的迁移量及其内表面脱片的趋势。**方法** 用电感耦合等离子体发射光谱仪（ICP-OES）考察 Si、B 和 Al 等元素的迁移量及变化趋势，并通过亚甲蓝染色法与扫描电子显微镜（SEM）观察中硼硅模制注射剂瓶被侵蚀后的脱片情况，根据迁移量的变化及脱片的趋势确定药物对中硼硅模制注射剂瓶的影响。**结果** 经加速与长期试验处理后，电感耦合等离子体发射光谱法测定的 Al 元素在一定范围内波动，但未见明显迁移，B 元素的测定值小于检测限，而 Si 元素的迁移量有上升趋势，但仍明显低于 PDE 限值；相对于阳性试验采用的碱性溶液，通过染色和 SEM 扫描显示中硼硅模制注射剂瓶内表面平整，未出现明显被侵蚀和染色现象。**结论** 注射用哌拉西林钠舒巴坦钠对中硼硅模制注射剂瓶中 Al、Si、B 元素的迁移量及其表面脱片无明显影响。

关键词：包材相容性；中硼硅模制注射剂瓶；电感耦合等离子体发射光谱仪；脱片
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0082-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.013

Effect of piperacillin sodium and sulbactam sodium for injection on the migration amount of aluminum, silicon and boron elements in medium borosilicate injection bottle and surface erosion

WU Tong-xuan[1], WU Qiu-rong[2], ZHANG Cong[1], ZHU Yu-xin[3], ZHAO Long-shan[3*] (1. *Pharmaceutical Research Institute of Tiansheng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chongqing* 401120; 2. *Chongqing Shenghuaxi Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing* 400072; 3. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To determine the effect of piperacillin sodium and sulbactam sodium for injection on the migration amount of aluminum (Al), silicon (Si) and boron (B) elements and the inner surface delamination in medium borosilicate injection bottle. **Methods** Inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) was used to determine the migration amount and variation trend of Si, B and Al elements. In addition, methylene blue staining and scanning electron microscope (SEM) were used to observe the erosion of the medium borosilicate molded injection bottle, and the effect of drugs on the medium borosilicate injection bottle was determined according to the migration amount and the trend of stripping. **Results** After accelerated and long-term experimental treatment, the content of Al measured by ICP-AES fluctuated within a certain range, but no significant migration was observed. The content of B was smaller than the detection limit, while the content of Si was obviously lower than the PDE limit. Compared with the alkaline solution used in the positive test, the inner surface of the medium borosilicate injection bottle was smooth and no obvious erosion and staining were observed by staining and scanning electron microscopy. **Conclusion** Piperacillin

作者简介：吴统选，男，高级工程师，主要从事药品制剂研发及质量分析，email：24781640@qq.com *通信作者：赵龙山，男，博士，主要从事仿制药一致性评价，email：longshanzhao@163.com

sodium and sulbactam sodium for injection has no significant effect on the migration of Al, Si and B in medium borosilicate injection bottle and its surface erosion.

Key words: package compatibility; medium borosilicate injection bottle; ICP-OES; erosion

注射用哌拉西林钠舒巴坦钠（piperacillin sodium and sulbactum sodium，PIP/SBT）是我国首创青霉素类广谱抗菌药物哌拉西林钠与辅助性药物舒巴坦钠按一定比例混合而成的注射用粉末状药物[1]，采用对耐药菌作用更好的舒巴坦钠取代化学成本高、青霉素过敏反应发生率高的他唑巴坦钠，作为β-内酰胺酶抑制剂而制得的新配方[2]。临床上用于各种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及厌氧菌引起的中、重度感染。

药品的包装材料和包装形式，对保证药品稳定性、安全性起着至关重要的作用，如果选用不当可能导致药物受到污染或有效成分降解，使药效降低，甚至产生有毒物质[3-6]。玻璃制品盛装的药品可能会与玻璃容器内表面相互作用，导致脱片或微粒的产生[7-8]，进入患者体内后易引起血管堵塞，中风甚至死亡[9-12]。本文作者采用碱性溶液进行阳性试验的方法[13]，考察玻璃内表面的耐受性，通过比较玻璃内表面形貌与亚甲蓝染色情况，分析预测玻璃内表面的脱片风险并对稳定性试验样品中硅（Si）、铝（Al）和硼（B）等元素进行检测，为进行包材与药物相容性试验奠定基础，为药品的质量研究以及检验监督提供方法借鉴和理论支持。

1 材料

Optima 2100DV 电感耦合等离子体发射光谱仪（美国珀金埃尔默有限责任公司），GS25 石墨赶酸器（成都奥普乐仪器有限公司），DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱（上海龙跃仪器设备有限公司），AUW120D 电子分析天平（日本岛津公司），扫描电子显微镜（日立科学仪器有限公司）。

注射用哌拉西林钠舒巴坦钠（济南名冠医药有限公司），硝酸（优级纯，69% ～ 70%，德国 CNW 公司），氢氧化钠（分析纯，天津市恒兴化学试剂制造有限公司），Al 标准溶液、Si 标准溶液、B 标准溶液（1000 μg·mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心）。

2 方法与结果

2.1 溶液配制与样品制备

2.1.1 Al、Si、B 混合标准溶液的配制 精密量取 Al、Si、B 标准溶液各 0.5 mL，用 2% 硝酸稀释成含各元素质量浓度为 10 μg·mL^{-1} 对照品储备液。精密量取对照品储备液 0.10、0.50、2.50、5.00 mL，用 2% 硝酸分别稀释到 50 mL，分别作为 S_1、S_2、S_3、S_4 线性溶液，精密量取对照品储备液 5 mL，用 2% 硝酸稀释到 10 mL，作为 S_5 线性溶液。

2.1.2 阳性脱片样品的制备 配制浓度为 0.01 mol·L^{-1} 的氢氧化钠溶液（pH 12.1），分别灌装至注射剂瓶中，密封后，于 121 ℃下，分别加热 0、1、2、4、8、12 h，作为系列阳性脱片样品。

2.1.3 Al、Si、B 供试品溶液的制备

① 阳性样品供试品溶液：取阳性脱片样品溶液，加入 2% 硝酸稀释至 10 mL 作为阳性样品供试品溶液。

② 药液供试品溶液：用 10 mL 灭菌注射用水溶解注射用哌拉西林钠舒巴坦钠，精密量取 2 mL 置于微波消解管中，加入 6 mL 浓硝酸，进行消解：在 5 min 内将温度升至 120 ℃，保持 5 min 后，在 5 min 内将温度升至 160 ℃，并保持 30 min。消解结束后，放至室温后，置于石墨赶酸器中，120 ℃下赶酸至 1 mL，加水定容到 10 mL 量瓶中，作为药液供试品溶液。

2.2 仪器条件

ICP-OES 工作参数额定电压：220 ～ 230 V；功率：50/60 kHz，2800 W（max）；氩气分压表压力：0.6 ～ 0.8 Mpa；蠕动泵流速：1.5 mL·min^{-1}；空气压缩机输出压力：65 psi；循环水机：恒定温度（20±2）℃；检测波长：Si 251.611 nm；Al 396.153 nm；B 249.677 nm。

2.3 Al、Si、B 含量检测分析方法验证

2.3.1 线性、灵敏度、精密度、重复性试验 取系列质量浓度在 0.02 ～ 5.0 μg·mL^{-1} 的 Al、Si、B 的混合标准溶液注入 ICP-OES 中分析，以各元素质量浓度为横坐标，仪器响应值为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程。取空白溶液，连续测定 11 次，计算信号强度的标准偏差（*SD*），以 3 倍的 *SD* 为检测限（LOD），以 10 倍的 *SD* 为定量限（LOQ）。取混合标准溶液（质量浓度为 1 μg·mL^{-1}），连续进样 6 次，根据结果计算响应值的 *RSD*。取供试品溶液，用 2% 硝酸稀释适当

倍数，平行制备 6 份，检测元素浓度，计算 *RSD*。结果见表 1，各元素在 0.02 ～ 5.0 μg • mL^{-1} 的线性范围内线性关系良好，相关系数 *r* 均高于 0.999，3 种待测元素的 LOD，LOQ，精密度试验 *RSD*，重复性 *RSD* 均符合方法学试验要求。

表 1　线性、检测限、定量限、精密度、重复性试验结果

Tab 1　Lineary，LODs，LOQs，precision and repeatability

元素	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	回归方程	*r*	LOD/（μg • mL^{-1}）	LOQ/（μg • mL^{-1}）	精密度 *RSD* /%	重复性 *RSD* /%
Al	0.02 ～ 5.0	$y = 2.519\times10^{5}x - 2.516\times10^{3}$	0.9999	0.0012	0.0040	0.78	1.0
Si	0.02 ～ 5.0	$y = 6.400\times10^{4}x - 1.085\times10^{2}$	0.9999	0.0030	0.0100	0.41	0.26
B	0.02 ～ 5.0	$y = 9.355\times10^{4}x - 3.819\times10^{2}$	0.9999	0.0015	0.0050	0.52	0.89

2.3.2　回收试验　精密量取供试品溶液，分别加入 5、10、15 μg mL^{-1} 的混合对照品溶液，每个水平平行制备 3 份，混匀。按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，经 ICP-OES 测定，计算 Al、Si、B 3 种元素的回收率。结果 3 种元素回收率在 95.89% ～ 117.68%，*RSD* 在 0.46% ～ 2.1%，表明方法准确性良好。

2.4　玻璃内表面稳定性测试结果

取阳性脱片样品的侵蚀液，用 2% 硝酸适当稀释，经 0.22 μm 滤膜滤过，进行元素检测。Al、Si、B 测定结果见图 1。

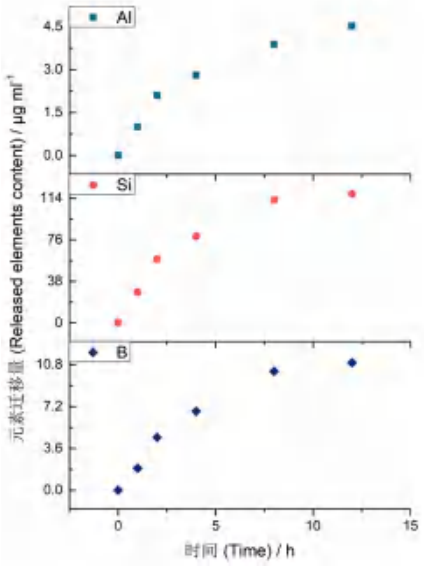


图 1　0.01 mol • L^{-1} NaOH 侵蚀液中元素迁移量测定结果

Fig 1　Determination results of released elements content in 0.01 mol • L^{-1}NaOH

取阳性脱片样品，倾倒侵蚀液，用蒸馏水将注射剂瓶清洗干净。晾干后，灌装 0.5% 的亚甲蓝溶液，静置 20 min 后倒出，用低流速水灌入瓶内再倒出，反复冲洗 5 ～ 10 次，至样品内表面的蓝色不变为止，晾干后，观察中硼硅模制注射剂瓶内壁亚甲蓝挂壁现象。染色结果见图 2。

取阳性脱片样品，倾倒侵蚀液，切割制取长宽 0.5 cm 的玻璃片，清洗后晾干。取制备空白玻璃片样品，应用扫描电镜进行观察，结果见图 3。

结果表明，随着时间的变化，侵蚀溶液中的 Al、Si、B 元素浓度逐渐上升；经侵蚀液浸泡 2 h 以上的阳性样品注射剂瓶，呈现亚甲蓝挂壁现象；同样，SEM 结果显示，相对于空白样品内表面的光滑、无突起，经 NaOH 溶液侵蚀 2 h 以上的注射剂瓶，内表面开始逐渐出现突起、白色的麻点等被侵蚀的现象，且随着时间延长，麻点越多越密集，预示玻璃内表面脱片趋势加剧。尽管中硼硅玻璃具有较好的耐腐蚀性，但玻璃产品在一定程度上仍具有反应性。

2.5　稳定性试验样品中 Al、Si、B 的迁移及脱片情况

将注射用哌拉西林钠舒巴坦钠药品置于（40±2）℃、RH（75±5）% 条件下进行加速试验，置于（25±2）℃、RH（60±5）% 条件下进行长期试验 [14]。取 0 月、稳定性试验 3 个月及 6 个月的注射用哌拉西林钠舒巴坦钠样品各 3 批，每批 2 个，按“2.1.3”项下方法制备药液供试品溶液，采用 ICP-OES 分析 Al、Si、B 的迁移情况，并通过亚甲蓝染色及 SEM 扫描观察玻璃内表面受侵蚀情况。结果见表 2、3 及图 4、5。

由表 2、3 结果可以看出，经加速与长期试验处理后，药品中 Al 元素在一定范围内波动，但未见明显迁移，B 元素的测定值小于检测限，而 Si 元素迁移量有上升趋势，但仍明显低于 PDE 限值（PDE：Al 50 μg • d^{-1}；Si 3428.6 μg • d^{-1}；B 10 000 μg • d^{-1}）。由图 4、5 可以看出，注射用哌拉西林钠舒巴坦钠所使用的中硼硅模制注射剂瓶内表面平整，未出现明显的麻点或突起等被侵蚀的现象。经亚甲蓝染色，注射剂瓶内表面也未发现明显的染色现象。哌拉西林钠舒巴坦钠对注射剂瓶内表面稳定性略有影响，但相对于阳性试验中采用的碱性溶液，由于药品呈粉末状，固体状态下，分子间

表 2　加速试验样品中 Al、Si、B 的迁移量 (μg)

Tab 2　Released content of Al，Si，B in accelerated testing samples (μg)

样品	批号	Al	Si	B
0 月样品	200401	0.4818	12.4296	—
	200402	0.5016	13.3178	—
	200403	0.5188	13.0731	—
加速 3 个月正置样品	200401	0.7085	19.3988	—
	200402	0.7324	20.0088	—
	200403	0.6999	19.5811	—
加速 3 个月倒置样品	200401	0.6405	17.6023	—
	200402	0.6501	18.8559	—
	200403	0.6411	17.3091	—
加速 6 个月正置样品	200401	0.5224	23.6875	—
	200402	0.6545	21.3697	—
	200403	0.7267	22.4634	—
加速 6 个月倒置样品	200401	0.5337	18.3317	—
	200402	0.6607	19.8561	—
	200403	0.5377	18.5299	—

注：“—”表示未检出。

Note：“—” means not detected.

表 3　长期试验样品中 Al、Si、B 的迁移量 (μg)

Tab 3　Released content of Al，Si，B in long-term testing samples (μg)

样品	批号	Al	Si	B
0 月样品	200401	0.4818	13.4296	—
	200402	0.5016	13.3178	—
	200403	0.5188	13.0731	—
长期 3 个月正置样品	200401	0.5595	16.3976	—
	200402	0.4995	15.7079	—
	200403	0.5862	14.2775	—
长期 3 个月倒置样品	200401	0.5842	15.7663	—
	200402	0.5870	12.6746	—
	200403	0.5809	15.7699	—
长期 6 个月正置样品	200401	0.5018	16.0995	—
	200402	0.7012	18.8202	—
	200403	0.4018	17.3951	—
长期 6 个月倒置样品	200401	0.4462	14.6774	—
	200402	0.5293	15.3875	—
	200403	0.5997	15.1882	—

注：“—”表示未检出。

Note：“—” means not detected.

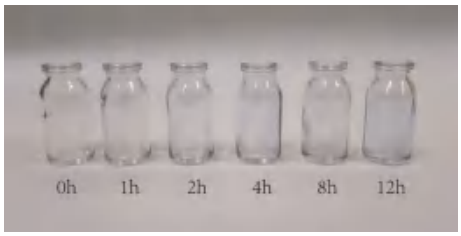


图 2　中硼硅模制注射剂瓶的亚甲蓝染色结果

Fig 2　Methylene blue staining results of medium borosilicate injection bottle

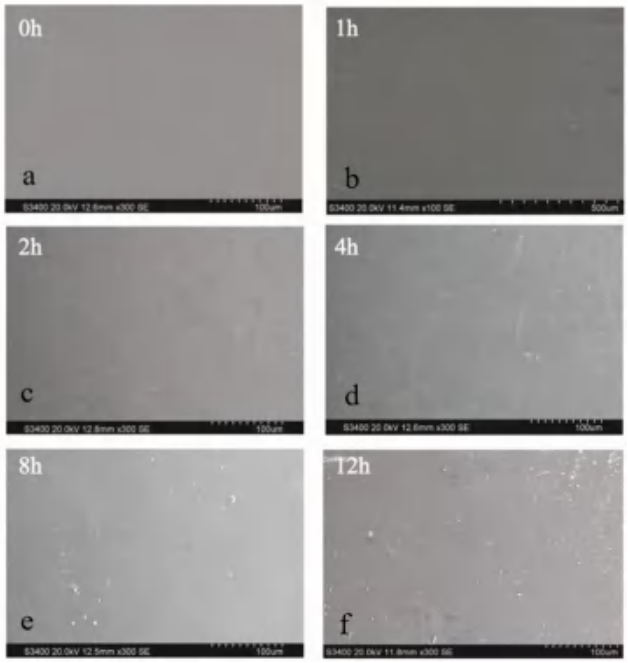


图 3　空白玻璃片样品的扫描电镜结果

Fig 3　Element mapping of blank glass sample

的相互作用较弱，对玻璃内表面的侵蚀能力较弱。

3　讨论

注射剂被认为是风险最高的药物剂型之一，也是药品抽检中不合格率最高的剂型。注射剂药品分为液体与固体两种状态，为方便贮存与流通，其包装多采用安瓿瓶、西林瓶、预灌封注射器、输液袋等形式。常用于注射剂的包装材料包括橡

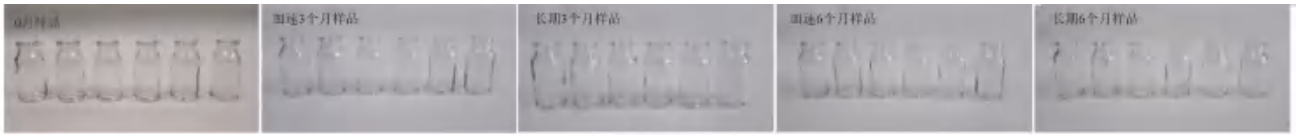


图 4　不同处理下注射用哌拉西林钠舒巴坦钠样品的亚甲蓝染色结果

Fig 4　Methylene blue staining of piperacillin sodium and sulbactam sodium for injection under different condition

图 5　不同处理下注射用哌拉西林钠舒巴坦钠样品的扫描电镜结果

Fig 5　Element mapping of piperacillin sodium and sulbactam sodium for injection under different condition

胶、塑料、玻璃、金属等。药物对中硼硅模制注射剂瓶 Al、Si、B 元素迁移量及其表面脱片趋势的影响试验结果，可以反映药物是否使中硼硅模制注射剂瓶元素迁移、脱片，甚至发生化学反应。

有研究表明，玻璃的耐酸碱侵蚀的能力与其结构有关[15-16]。硅氧四面体 [SiO_4] 构成了中硼硅玻璃的基本骨架，添加的 B_2O_3 形成 [BO_4]，与 [SiO_4] 紧密相连，生成 B-O-Si 键，构成结构稳定的网络结构[17-18]，此外还存在 Si-O-Al、Si-O-Al-O-B 等连接键[19]。尽管玻璃的结构稳定，溶液中的水分子仍能以分子形式进入硅酸盐骨架，破坏其结构[20]。另一方面，碱性溶液中的离子也可直接破坏 Si-O 键，使其形成硅酸盐不断被溶解[20-21]。

本文结合亚甲基蓝染色、SEM 和 ICP-OES 检测 Al、Si、B 元素的迁移量和脱片情况，判断药物对中硼硅模制注射剂瓶的影响。该方法可有效判断中硼硅模制注射剂瓶是否发生脱片或是否存在脱片趋势，并评估由此造成的风险。利用该方法，考察了一批灌装侵蚀液的中性硼硅玻璃安瓿的脱片情况及元素迁移量趋势。结果显示，在碱性条件下，所选用的中硼硅模制注射剂瓶内表面存在脱片的可能。但经稳定性试验处理的样品，玻璃内表面受侵蚀而迁移的 Al、Si、B 等元素与 0 月样品相比，几乎没有明显增加，亚甲蓝染色结果与 SEM 扫描结果，也未见明显染色与脱片现象，说明该药品对所选注射剂瓶内表面无影响，以固体粉末状态贮存的哌拉西林钠舒巴坦钠，相较于液体的侵蚀液，与玻璃内表面相互作用较弱，证明该药品对中硼硅模制注射剂瓶无明显影响。

参考文献

[1] 孙明杰，吕华冲，王霆 . 注射用哌拉西林钠 / 舒巴坦钠（2∶1）[J]. 中国新药杂志，2007（13）：1061-1064.

[2] 王霆，李苌清 . 复方抗生素哌拉西林钠舒巴坦钠的研究进展 [J]. 医学理论与实践，2011，24（2）：150-152.

[3] 索玲喆，于祥勇，徐健峰，等 . GC-MS 法应用于胶塞与疫苗注射液的包材相容性 [J]. 沈阳药科大学学报，2019，284（9）：805-811.

[4] Chatzimpaloglou A，Christophoridis C，Nika MC，et al. Degradation of antineoplastic drug etoposide in aqueous environment by photolysis and photocatalysis. Identification of photocatalytic transformation products and toxicity assessment [J]. Chem Eng J，2022，431（P2）：133969.

[5] Kurmi M，Sahu A，Tiwari SK，et al. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 6：evidence of formation of potentially toxic degradation products of zidovudine under hydrolytic and photolytic conditions [J]. Rsc Adv，2017，7（30）：18803-18814.

[6] Ping S，Lin W，Liu A，et al. Ultraviolet photolysis of four typical cardiovascular drugs：mechanisms，influencing factors，degradation pathways，and toxicity trends [J]. Environ Sci Pollut Res，2021，28（43）：60663-60675.

[7] Morandotti a，Swift R. Nexa syringe-the best choice for demanding products [J]. Pharm Packag，2015，38（2）：38.

[8] 张广湘，林杨，陈晓媛，等 . 预灌封注射器玻璃针管内表面化学稳定性研究 [J]. 临床医学工程，2016，23（3）：270.

[9] 雒翠霞 . 静脉药物配置中心集中干预对输液微粒污染的控制效果评价 [J]. 中国现代医药杂志，2019，21（5）：2.

[10] 詹瑞虹 . 如何预防输液中的微粒污染 [J]. 中国疗养医学，2009，18（11）：998.

[11] 郝玉红，陈鹰，周莹，等 . 扫描电子显微镜标准装置在药用玻璃容器脱片研究中的示范应用 [J]. 中国计量，2021（8）：111-113.

[12] 冯美彦 . 浅析化学药品注射剂一致性评价包材相容性研究的法规要求 [J]. 科技风，2022（1）：157-159.

[13] 李烨，张毅兰 . 通过加速试验考察不同介质对药用玻璃容器形成脱片的影响 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（3）：293-298.

[14] ICH Harmonized Tripartite Guideline，Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products [S]. ICH Q1A（R2），Geneva，2003.

[15] 韩娟，何峰，梅书霞，等 . Na_2O/B_2O_3 对硼硅酸盐玻璃结构与性能的影响 [J]. 武汉理工大学学报，2015，37（3）：13-17.

[16] 吴永坤，龚方红，沙德仁 . 纤维玻璃耐碱性的研究 [J]. 玻璃纤维，2004（4）：6-14.

[17] 蔺海艳，廖其龙，牟涛，等 . 硼硅酸盐玻璃固化体结构与化学稳定性研究 [J]. 中国陶瓷，2013，49（11）：30-34.

[18] 于晓杰，岳云龙，李永艳，等 . 铝硼硅酸盐玻璃纤维结构与耐水动力学 [J]. 高科技纤维与应用，2007（6）：14-17.

[19] Kapoor S，Youngman RE，Zakharchuk K，et al. Structural and chemical approach toward understanding the aqueous corrosion of sodium aluminoborate glasses [J]. J Phys Chem B，2018，122（48）：10913-10927.

[20] 李烨，张毅兰 . 药用玻璃容器内表面耐受性研究现状 [J]. 中国医药工业杂志，2014，45（12）：1186-1191.

[21] Iacocca RG，Allgeier M. Corrosive attack of glass by a pharmaceutical compound [J]. JMS，2007，42（3）：801-811.

（收稿日期：2022-08-05；修回日期：2022-10-20）

富马酸喹硫平缓释片的体内外相关性溶出方法研究

范诗雨[1]，刘芳伶[1]，贺劲杰[2]，周群[2, 3]，程泽能[1*]（1. 中南大学湘雅药学院，长沙 410013；2. 湖南慧泽生物医药科技有限公司，湖南 长沙 410000；3. 自乳化技术创新制剂湖南省工程研究中心，长沙 410000）

摘要：目的 通过流通池法模拟富马酸喹硫平缓释制剂的体内动力学过程，建立具有体内外相关性的溶出方法，并进行体内外相关性模型预测能力的评估。**方法** 采用 HPLC-MS/MS 法测得 T1、T2 和 R 制剂的血药浓度数据，通过 WinNonlin 软件的非房室模型和反卷积模块解析参比制剂的体内特征，依据参比制剂的体内特征指导溶出方法的设计，用 3 种释放速率不同的制剂的体内和体外数据建立体内外相关性模型，并进行模型预测能力验证。**结果** 建立了具有 A 级相关性（R^2 = 0.967）和 C 级相关性（R^2 = 0.996）的溶出方法，内部制剂预测和外部制剂预测的预测误差 PE% < 10%，符合标准。**结论** 本方法具有良好的体内外相关性，其体内外相关性模型经验证预测误差符合标准，对于吸收速率不同的制剂均具有良好的区分力，可以为富马酸喹硫平缓释片的制剂评价提供参考。

关键词：富马酸喹硫平缓释片；体内外相关性模型；流通池法
中图分类号：R94，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0087-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.014

In vitro-in vivo correlation of dissolution method for quetiapine fumarate sustained-release tablets

FAN Shi-yu[1], LIU Fang-ling[1], HE Jin-jie[2], ZHOU Qun[2, 3], CHENG Ze-neng[1*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 2. *Hunan Huize Biopharma S&T Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410000; 3. *Hunan Research Center for Self-Emulsification Technology Innovative Formulations*, *Changsha* 410000)

Abstract: Objective To simulate the in vivo kinetics of quetiapine fumarate sustained-release preparations by flow cell method, to establish a dissolution method with in vitro and in vivo correlation, and to evaluate the predictive ability of the in vivo and in vitro correlation model. **Methods** The blood concentration data of T1, T2 and R preparations were measured by HPLC-MS/MS method. Then, the in vivo characteristics of the reference preparation were analyzed by the non-compartmental model and deconvolution module of WinNonlin software. Finally, the dissolution was guided according to the in vivo characteristics of the reference preparation. The in vitro and in vivo correlation models were established with in vivo and in vitro data from the 3 formulations with different release rates, and the model predictive proficiency was validated. **Results** A dissolution method with A-level correlation (R^2 = 0.967) and C-level correlation (R^2 = 0.996) was established. The prediction error PE% was < 10% for both the internal formulation prediction and external formulation prediction, in line with the standard. **Conclusion** The dissolution method established in this study has good in vitro and in vivo correlation. The correlation model has been verified to meet the standard prediction error, has good discrimination power for various preparations with different rates, and can provide reference for the formulation evaluation of quetiapine maleate sustained-release tablets.

Key words: quetiapine fumarate sustained-release tablet; in vitro-in vivo correlation model; flow cell method

作者简介：范诗雨，女，在读硕士研究生，主要从事生物药剂学与药代动力学研究，email：3121848585@qq.com *通信作者：程泽能，男，教授，博士研究生导师，主要从事生物药剂学与药代动力学研究，email：chengzn@csu.edu.cn

富马酸喹硫平是英国 AstraZeneca 制药公司新开发的第二代非典型抗精神病药（second generation antipsychotics，SGA）。其缓释制剂可以延长药物治疗作用持续时间，降低毒副作用，减少用药次数，改善用药的依从性[1]。该药物于 2013 年在中国上市，由于其仿制难度较大，目前国内仅有 3 家仿制制剂为在售状态。体内外相关性（in vitro-in vivo correlation，IVIVC）模型是一种用于描述口服剂型体外特性（药物溶解或释放的程度）与体内性能（血浆药物的溶度和吸收量）之间相关性的数学模型[2]。依据 IVIVC 模型对药物体内时间 - 血浆药物浓度曲线的拟合程度，FDA 指南将 IVIVC 划分为 A、B、C 和多重 C 级 4 个级别。

本研究以富马酸喹硫平缓释片为研究对象，依据体内药动学特征来设计体外溶出方法，并初步建立和评估了该药物的体内外相关性模型。基于新型流通池法建立富马酸喹硫平缓释片具有体内外相关性的溶出方法，依据药物体外溶出行为来模拟预测药物的体内性能，这不仅有助于提高该制剂的生物等效性试验的成功率、节约仿制药研发成本、节省注册时间，还可以被用于建立体外溶出度标准，进行药品批间质量控制等[3-4]。

1 仪器与试药

HS-R660 型全自动流通池型溶出仪（湖南慧泽生物医药科技有限公司）[5]；高效液相色谱仪（Agilent1260，配有 DAD 检测器）；UX6200H 型百分之一电子天平 [岛津企业管理（中国）有限公司]；十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；HH-6 型电热恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）；Vortex-5 型可调式涡旋混合器（山海嘉鹏科技有限公司）；TG20-WS 台式低速离心机（湖南迈克尔实验仪器有限公司）；FE28 型 pH 计 [梅特勒 - 托利多国际贸易（上海）有限公司]，Eco-S15UVFV 型实验室纯水系统（上海和泰仪器有限公司）。

受试制剂 T1、T2（某公司自研产品，规格：200 mg）；受试制剂 T3（某市售制剂，规格：200 mg）；受试制剂 T4（某市售制剂，规格：200 mg）；富马酸喹硫平缓释片（R，阿斯利康制药有限公司，批号：MM2654、MK2374）；富马酸喹硫平原料药（浙江苏泊尔制药有限公司，批号：011-180305U），磷酸二氢钾（上海沪试，批号：20220110），氢氧化钠（上海沪试，批号：20210107），磷酸（天津市科密欧化学试剂有限公司，批号：20210710）；三乙胺（广州光华科技股份有限公司，批号：20200809）；盐酸（成都市科隆化学品有限公司，批号：2020112502）；富马酸喹硫平对照品（纯度：96.2%，批号：2413-025A2）、富马酸喹硫平内标（纯度：95.7%，批号：3298-096A6）（TLC pharmaceutical Standards）；甲醇、乙腈、乙腈均为色谱纯。

2 方法和结果

2.1 药物体内试验

2.1.1 T1 与 R 的人体生物等效性试验　采用随机、开放、两制剂、两周期（T-R、R-T）、自身交叉试验设计，周期间的洗脱期为 7 d。试验方案经海口市人民医院生物医学伦理委员会 [伦理批准号：2021-（伦审）-172] 批准，受试者均签署知情同意书。48 例受试者在试验当日早上空腹口服 T1 或 R 一片，于给药前（0 h）及给药后 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、24、28、32、36、48 h 分别采集静脉血 4 mL，血样置于肝素钠抗凝剂真空采血管中，1 h 内离心分离血浆，血样放于超低温冰箱（低于－ 60 ℃）中储存待分析，采用高效液相 - 质谱联用（HPLC-MS/MS）测定人体血浆喹硫平浓度，采用 WinNonlin 软件非房室模块计算富马酸喹硫平的药动学参数。

2.1.2 T2 与 R 的人体生物等效性试验　采用随机、开放、两制剂、两周期（T-R、R-T）、自身交叉试验设计，周期间的洗脱期为 7 d。试验方案经南华大学附属第二医院药物临床试验伦理委员会 [伦理批准号：【202106-03】药伦审字（191）号] 批准，受试者均签署知情同意书。48 例受试者在试验当日早上空腹口服 T2 或 R 一片，于给药前（0 h）及给药后 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、24、28、32、36、48 h 分别采集静脉血 4 mL，血样置于肝素钠抗凝剂真空采血管中，1 h 内离心分离血浆，血样放于超低温冰箱（低于－ 60 ℃）中储存待分析，采用 HPLC-MS/MS 测定人体血浆喹硫平浓度。

2.1.3 生物样本检测　① 色谱条件。色谱柱：Waters XBridge C18（4.6 mm×50 mm，3.5 μm），流速：0.6 mL·min^{-1}；进样量：10 μL；柱温：35 ℃；流动相：0.1% 甲酸水溶液为 A 泵，甲醇为 B 泵；梯度洗脱：0.00 ～ 1.00 min，80%A；1.00 ～ 1.5 min，80% → 10%A；1.5 ～ 4.5 min，10%A；4.5 ～ 4.6 min，10% → 80%A。

② 质谱条件。离子源：电喷雾离子源 ESI；

检测方式：正离子 MRM 模式；离子源喷雾电压：4000 V；离子源温度：300 ℃；碰撞能：喹硫平内标和喹硫平的碰撞能均为 25 V；监测离子对：喹硫平内标的检测离子为 *m/z* 392.2 ～ 258.1，喹硫平的检测离子为 *m/z* 384.2 ～ 253.1。

HPLC-MS/MS 法测得各制剂单位时间的平均血药浓度检测结果见图 1a、图 1b，将各制剂的血药浓度 - 时间曲线数据代入 WinNonlin 软件中的反卷积模块可求得各制剂的各时间点的吸收百分数图（见图 1c），各制剂的吸收速度和吸收程度差异明显，T1 ＞ R ＞ T2。采用非房室模块计算富马酸喹硫平的药动学参数，比较 T1、T2 和 R 制剂的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 的几何均值比 Ratio（T2/R）和 Ratio（T1/R），结果也说明在体内试验中 T1 的吸收程度比 R 高、吸收速度比 R 快，T2 的吸收程度比 R 低、吸收速度比 R 慢（见表 1、2）。

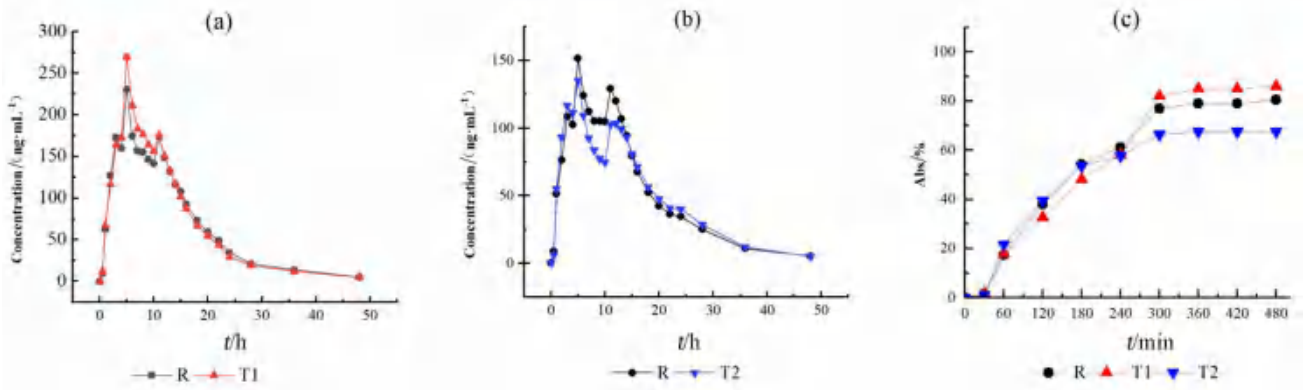


图 1　平均血药浓度 - 时间曲线图（a 和 b）和体内累积吸收百分数图（c）

Fig 1　Mean plasma concentration-time plot（a and b）and in vivo cumulative percent absorption plot（c）

表 1　T1 和 R 的人体试验药动学参数

Tab 1　Human trial pharmacokinetic parameters for T1 and R

参数	受试制剂（T1）（n = 46）	参比制剂（R）（n = 44）	比值（T1/R）/%
C_{max}/（ng·mL^{-1}）	268.54	251.80	106.65
$AUC_{0\sim t}$/（ng·h·mL^{-1}）	3049.89	2975.50	102.50
$AUC_{0\sim\infty}$/（ng·h·mL^{-1}）	3139.01	3042.42	103.17
t_{max}/h	5.00	5.00	/
$t_{1/2}$/h	7.76	7.27	/
λ_z/h^{-1}	0.11	0.11	

表 2　T2 和 R 的人体试验药动学参数

Tab 2　Human trial pharmacokinetic parameters for T2 and R

参数	受试制剂（T2）（n = 47）	参比制剂（R）（n = 48）	比值（T2/R）/%
C_{max}/（ng·mL^{-1}）	168.70	193.20	85.00
$AUC_{0\sim t}$/（ng·h·mL^{-1}）	2246.99	2316.41	97.40
$AUC_{0\sim\infty}$/（ng·h·mL^{-1}）	2327.97	2409.07	97.12
t_{max}/h	4.99	7.49	/
$t_{1/2}$/h	7.71	8.21	/
λ_z/h^{-1}	0.10	0.09	/

2.2　药物体外溶出试验

2.2.1　药物溶出度测定　由参比制剂体内药动学参数可知，富马酸喹硫平缓释片的体内吸收速率常数 K_a 约为 0.27，3 倍吸收半衰期 3 $t_{1/2}$ 约为 8 h，该数据提示富马酸喹硫平参比制剂 8 h 的累积吸收超过 85%。以此为依据，采用流通池法，溶出介质前 3 h 为 pH 1.2 的盐酸溶液，3 h 后为纯化水介质，流速 20 mL·min^{-1}，温度（37±0.5）℃，分别于 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 h 接取 1 mL 左右的溶出液，进行 10 000 r·min^{-1}，3 min 的离心后，取上清液，采用 HPLC 法进行检测，得到的喹硫平的微分溶出曲线通过数值积分法转换为累积溶出百分数曲线，转换公式如下：

$$Diss = \sum_{i=1}^{n}[(C_i + C_i)(t_i - t_{i-1}) \times Flowrate/(2\times dosage)]$$

其中，Diss 为累积溶出百分数，dosage 为药物活性成分总含量，C_i 为 t_i 时间点的药物浓度，Flowrate 为溶出介质流速 [6]。

2.2.2　样本检测　使用 HPLC 检测样品中药物浓度，色谱柱：Agilent 5 TC-C18（2）（150 mm×4.6 mm）；流动相：甲醇 - 水 - 三乙胺（600∶400∶4），调节 pH 至 4.5；检测波长：289 nm；流速：1 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL[7]。

结果 R、T1、T2 的 8 h 体外累积溶出曲线和溶出速度具有明显的差异，T1 比 R 的溶出速率快，但 T2 比 R 的溶出速率略慢（见图 2），该试验结果与各制剂体内试验不同时间的吸收百分数呈相同趋势（见图 1c）。

2.2.3　体内外相关性的建立和评估　依据体内外相关性模型计算体内预测累积吸收百分数，再根据卷积分法计算体内预测血药浓度，具体公式如下：

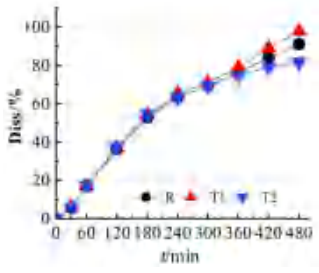


图 2　T1、T2 和 R 的 8 h 体外累积溶出百分数图（n = 6）

Fig 2　8-hour cumulative in vitro percent dissolution profile of T1, T2 and R (n = 6)

$$C_{t+1} = [(2\times\Delta F\times D)/V_d + C_t(2 - K_e\times\Delta t)]/(2 + K_e\times\Delta t)$$

其中，ΔF 是两个连续的取样时间点之间的累积溶出分数差，Δt 是两个连续的取样时间点之差，D 是药物活性成分总含量，V_d 是药物的表观分布容积，K_e 是消除速率常数 [8]。

采用 WinNonlin 软件计算累积吸收分数（Abs，%），以三个制剂各时间点的体外累积溶出百分数（Diss，%）为横坐标，以对应时间点的体内累积吸收数据（Abs，%）为纵坐标进行线性分析，可得到 T1、T2 和 R 的体内外 A 级相关性模型（Abs = 0.945×Diss + 0.337，R^2 = 0.967）。该结果表明该溶出方法具有 A 级体内外相关性（见图 3a）。

使用 DDsolver 程序对富马酸喹硫平缓释片的溶出数据进行分析可知其体外溶出特征符合 Weibull 模型，并得到各制剂累积溶出 80% 的时间 T80，以 T80 为横坐标，体内实测的 $AUC_{0\sim t}$ 为纵坐标进行相关性分析，可得到三个制剂的 C 级相关图（见图 3b）。

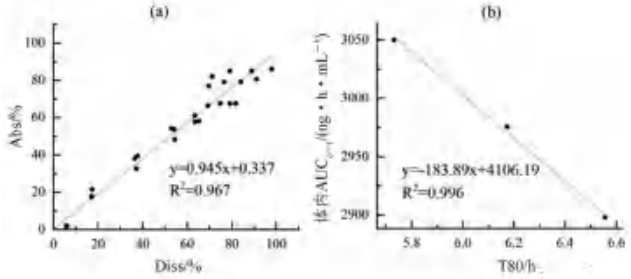


图 3　T1、T2 和 R 的 A 级（a）及 T1、T2 和 R 的 C 级体内外相关性图（b）

Fig 3　A-level in vitro-in vivo correlation plot of T1, T2 and R (a), and C-level in vitro-in vivo correlation plot of T1, T2 and R (b)

依据模型 Abs = 0.945×Diss + 0.337，R^2 = 0.967，由 T1、T2 和 R 的体外累积溶出百分数可预测三个制剂的体内吸收百分率，由体内吸收百分率通过卷积法可得到制剂的时间 - 血药浓度数据，进而得到 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 预测的几何均值比 Ratio（T/R），并分别计算 Ratio（T1/R）和 Ratio（T2/R）的预测误差率，T2 制剂 C_{max} 的 Ratio（T2/R）为 12.7% > 10%（见表 3），需继续进行外部制剂预测能力评估 [9]。

表 3　T1、T2 模型预测值与实测值的比较

Tab 3　Model predicted value and measured value of T1 and T2

参数	Ratio（T1/R）			Ratio（T2/R）		
	实测值 /%	预测值 /%	PE/%	实测值 /%	预测值 /%	PE/%
$AUC_{0\sim t}$	102.5	100.0	2.4	97.4	100.0	2.7
C_{max}	106.7	97.8	8.3	85.0	95.8	12.7

为进一步评估模型的可预测能力，使用市售制剂 T3、T4 进行模型外部制剂预测能力评估。依据 T1 和 T2 建立的 IVIVC 模型（Abs = 0.945×Diss + 0.337，R^2 = 0.967），由制剂 T3、T4 的体外数据各时间点的 Diss（见图 4）预测制剂 T3、T4 体内各时间点的体内吸收百分率 Abs%，进而得到 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 预测的几何均值比 Ratio（T3/R）、Ratio（T4/R），将市售制剂 T3、T4 的实测值默认为 100%，计算预测误差率 PE%，结果见表 4。两制剂 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 预测误差率均小于 10%，说明该模型的预测能力良好。

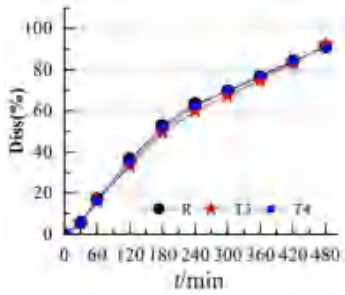


图 4　参比制剂 R 和受试制剂 T3、T4 的体外累积溶出图（n = 6）

Fig 4　In vitro cumulative dissolution profiles of reference formulation R and test formulation T3 and T4 (n = 6)

表 4　受试制剂 T3、T4 的模型预测值与实测值的比较 (%)

Tab 4　Model predicted value and measured value of T3 and T4 (%)

参数	Ratio（T3/R）			Ratio（T4/R）		
	实测值	预测值	PE	实测值	预测值	PE
$AUC_{0\sim t}$	100.0	99.9	0.0	100.0	99.9	0.0
C_{max}	100.0	101.2	1.2	100.0	100.3	0.3

3　讨论

文献报道富马酸喹硫平原料药溶出呈现明显的 pH 依赖性 [10]，溶解度随着 pH 值的降低而增大，而人体胃肠道存在由酸性胃液到碱性肠液的过渡过程，考虑到胃肠道 pH 变化可能对药物溶出速率产生的影响，本研究选择了 pH 1.2 的溶液和纯化水作为溶出介质，并且在 3 h 的时间点进

行了介质的转换。相比经典的篮法和桨法，本研究选用的为流通池法，流通池的动力学过程与体内的流体动力学过程更为相似，对于需要进行介质转换的试验，流通池的仪器构造比起篮法和桨法有更多的可操作性[11-12]。对体内吸收数据的解析也验证了上述设计的必要性，将体内数据和体外数据进行线性拟合后，A 级相关和 C 级相关的拟合优度 R^2 均大于 0.9，也说明了该溶出设计的合理性。

本研究的体内试验分为两个独立的试验进行，虽然各试验使用的参比制剂的厂家和批号相同，但在不同的试验中得出的药动学参数的具体数值仍差异较大，如参比制剂 R 在“T1 与 R 的人体生物等效性试验”中的 $AUC_{0\sim t}$ 和 C_{max} 值均比“T2 和 R 的人体生物等效性试验”中的参数值大，为了减少误差，在进行内部预测和外部预测时选用的药动学参数是几何均值比 Ratio（T/R）这类比率值；在进行 C 级体内外相关性分析时使用的 T2 制剂的 $AUC_{0\sim t}$ 也通过 Ratio（T2/R）进行了换算。

目前，文献关于 IVIVC 研究偏重于其所建立的溶出方法与体内数据的相关性，以线性相关方程和拟合优度 R^2 作为 IVIVC 研究的结果指标[13-15]。实际上，IVIVC 模型作为一种预测性的模型，其预测能力的评估也是 IVIVC 研究的重点，FDA 建议对于三种释放速率不同的制剂建立的 IVIVC 模型至少应进行建模制剂内部预测能力的评估，对于两种释放速率不同的制剂进行模型外部制剂预测能力的评估。本研究以三种释放速率不同的制剂建立 IVIVC 模型，进行内部制剂评估后发现 T2 制剂 C_{max} 的 Ratio（T2/R）的预测误差为 12.7%，略微超出 10% 的评价标准，进一步用外部制剂 T3 和 T4 对模型进行了评估，外部制剂预测误差均小于 10%，符合评价标准，说明模型具有良好的预测性。

4 结论

本研究依托流通池法创建富马酸喹硫平缓释片体内外相关性良好的体外溶出方法，对于吸收速率不同的制剂均具有良好的区分力，可为富马酸喹硫平缓释片质量标准的建立提供依据。建立的 IVIVC 模型经内部验证和外部验证显示其具有良好的可预测性，可通过富马酸喹硫平缓释片制剂的体外特征预测制剂的体内特征，在制剂评价、处方优化等方面都有重要的应用价值。

参考文献

[1] 张鸿燕 . 新剂型非典型抗精神病药富马酸喹硫平缓释片的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2015，24（1）：35-38.

[2] FDA. Guidance for industry：extended release oral dosage forms：development，evaluation，and application of in vitro/in vivo correlations [EB/OL].（1997-09）. https：//www.fda.gov/media/70939/download.

[3] Sakore S，Chakraborty B. In vitro-in vivo correlation（IVIVC）：a strategic tool in drug development [J]. J Bioequiv Availab，2011，doi：10.4172/jbb. S3-001.

[4] Hamed R，AlJanabi R，Sunoqrot S，et al. The effect of pH，buffer capacity and ionic strength on quetiapine fumarate release from matrix tablets prepared using two different polymeric blends [J]. Drug Dev Indl Pharm，2017，43（8）：1330-1342.

[5] 王磊，谭月香，肖旭，等 . 体外溶出仪及其溶出装置：CN113189286A [P]. 2021-07-30.

[6] 李辉，赵悦清，蒋妮谚含，等 . 基于流通池装置的新溶出方法用于尼莫地平片的一致性评价 [J]. 中国药科大学学报，2018，49（3）：301-309.

[7] 刘艳妮，蒋海松，高丽，等 . HPLC 法测定富马酸喹硫平缓释片的含量 [J]. 黑龙江医药，2012，25（1）：2-4.

[8] Gohel M，Delvadia R，Parikh D，et al. Simplified mathematical approach for back calculation in Wagner-Nelson method：applications in in vitro and in vivo correlation（IVIVC）and formulation development work [J]. Pharm Rev，2005，3（2）：1-8.

[9] 黄钦，马玉楠 . 从技术审评角度看药品的体内外相关性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2007，12（9）：961-964.

[10] 陈丹 . 富马酸喹硫平缓释片的开发方案 [D]. 延边朝鲜族自治州：延边大学，2017.

[11] Wähling C，Schröter C，Hanefeld A，et al. Flow-through cell method and IVIVR for poorly soluble drugs [J]. Dissolution Technol，2011，18（4）：15-25.

[12] 王维，王博，连潇嫣，等 . 口服缓释制剂体内外相关性评价方法研究进展 [J]. 药物评价研究，2011，34（5）：380-383.

[13] 吴晓雯，庞婕，孙增先 . 盐酸西那卡塞片的体内外相关性研究 [J]. 中国药房，2018，29（12）：1673-1677.

[14] 高杨，黄钦，马玉楠 . 化学药物口服缓控释制剂体内外相关性研究 [J]. 中国新药杂志，2010，19（10）：827-831.

[15] 白洁，陆洋，杜守颖等 . 川芎提取物经皮给药后体内外相关性的研究 [J]. 中国中药杂志，2013，38（3）：422-426.

（收稿日期：2022-08-23；修回日期：2022-10-18）

来那替尼自微乳的制备、表征及生物利用度研究

张雪[1, 2]，张强[2, 3]，程泽能[1, 2, 3*]（1. 中南大学湘雅药学院，长沙 410013；2. 湖南慧泽生物医药科技有限公司，长沙 410000；3. 徐州医科大学药学院，江苏 徐州 221000）

摘要：目的 制备来那替尼自微乳并对其进行体内外质量评价。**方法** 通过辅料溶解度和混合油相与表面活性剂相容性选择处方所用辅料；通过三元相图和星点设计 - 效应面法确定处方各辅料的比例；对来那替尼自微乳的粒径分布、Zeta 电位、微观形态及稀释稳定性进行体外质量评价；通过比格犬体内药动学实验计算来那替尼自微乳的相对生物利用度。**结果** 来那替尼自微乳处方：来那替尼 35 mg，油酸 200 mg，玉米油 200 mg，RH40 255 mg，Transcutol HP 345 mg。来那替尼自微乳加水稀释后，平均粒径为（33.45±1.38）nm，Zeta 电位为（－29.5±9.40）mV，透射电镜下为规则的球状且分布均匀，室温可保持 6 h 稳定。与原料药的混悬液相比，来那替尼自微乳在比格犬体内相对生物利用度为 315%。**结论** 来那替尼自微乳制剂可以显著提高生物利用度，有望成为来那替尼的新型给药制剂。

关键词：来那替尼；自微乳给药系统；生物利用度
中图分类号：R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-092-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.015

Preparation, characterization and bioavailability of neratinib self-microemulsion

ZHANG Xue[1, 2], ZHANG Qiang[2, 3], CHENG Ze-neng[1, 2, 3*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha* 410013; 2. *Hunan Huize Biopharma S&T Co., Ltd., Changsha* 410000; 3. *School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu* 221000)

Abstract: Objective To prepare neratinib self-microemulsion and evaluate its quality. **Methods** The formulation of neratinib self-microemulsion was selected by the solubility, compatibility, ternary phase diagram, and central composite design-response surface methodology. The assessment of the prepared neratinib self-microemulsion in-vitro mainly covered particle size distribution, Zeta potential, micromorphology and dilution stability. Besides, the relative bioavailability of neratinib self-microemulsion was also evaluated by the pharmacokinetic test in Beagle dogs. **Results** The optimized formulation was composed of 35 mg neratinib, 200 mg oleic acid, 200 mg corn oil, 255 mg RH40, and 345 mg Transcutol HP. After water dilution, the mean particle size was (33.45±1.38) nm and the Zeta potential was (－ 29.5±9.40) mV. The transmission electron microscope indicated a regular spherical shape and uniform distribution. There was no significant change in particle size after 6 h at room temperature. Compared with the suspension, the relative bioavailability of self-microemulsion was 315%. **Conclusion** Neratinib self-microemulsion can significantly improve the bioavailability, which is likely to be a new drug delivery agent for neratinib.

Key words: neratinib; self-microemulsifying drug delivery system; bioavailability

来那替尼（neratinib）于 2017 年在美国上市，被批准用于人表皮生长因子受体 -2（HER_2）阳性乳腺癌的延长性辅助治疗 [1]。它的主要作用靶点是人的表皮生长因子受体 [2]，特别是对 HER_2 选择性强，它可以通过氢键可逆地结合到 HER_2 酪氨酸激酶区的腺苷三磷酸（ATP）结合位点，阻止 ATP 的结合，抑制酪氨酸激酶的自磷酸化和激活，从而抑制细胞增殖 [3]。因此，它与传统化疗药物相比治疗效果更

作者简介：张雪，女，硕士研究生，主要从事新制剂研究，email：2277937162@qq.com *通信作者：程泽能，男，教授，博士研究生导师，主要从事生物药剂学和药代动力学研究，email：chengzn@csu.edu.cn

为理想。同时，来那替尼属于 BCSⅡ类化合物，其口服生物利用度低[4]，限制了其临床应用[5]。目前有关来那替尼剂型改良的研究仅有胃漂浮片[6]，但此研究并没有证明其生物利用度有所改善。

自微乳给药系统（self-microemulsifying drug delivery system，SMEDDS）作为基于脂质的新型药物递送系统，由疏水性药物、油相、表面活性剂和助表面活性剂组成，在胃肠道蠕动的内环境条件下自发乳化形成粒径小于 250 nm 的水包油（*O/W*）型乳剂。SMEDDS 通过提高难溶药物的溶解度、促进淋巴转运，以提高药物口服生物利用度[7-8]。本文旨在研究来那替尼的 SMEDDS，以期提高其生物利用度，为来那替尼后续剂型开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SQP QUINTIX224-1CN 型万分之一天平（德国赛多利斯）；UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（赛默飞）；FE28 型 pH 计（瑞士梅特勒）；VX-Ⅱ型气浴振荡器（北京踏锦）；Vortex-5 型涡旋混合仪（上海嘉鹏）；BT-50 型超声波分散器（丹东百特）；TG20-WS 型高速离心机（湖南迈克尔）；激光粒度仪（英国马尔文）；Tecnai 12 型透射电子显微镜（荷兰飞利浦）；API 5500 型三重四极杆液质联用仪（爱博才思），配有电喷雾电离源及 Analyst（Version1.6.3）数据处理系统，配有 AB Sciex ExionLC AD 液相色谱仪（含自动进样器、柱温箱等）；L3-5KR 台式低速冷冻离心机（湖南可成）。

1.2 试药

来那替尼（原料药，湖北威德利，批号：210923，纯度：99%）；来那替尼 -d_6（内标物，安耐吉化学，批号：390092，纯度：99%）；辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol）、二乙二醇单乙醚（Transcutol HP）、丙二醇单辛酸酯（Capryol 90）（法国 Gattefosse 公司）；辛酸癸酸单双甘油酯（Capmul MCM）、三辛酸甘油酯（Captex 8000）（美国 ABEITEC 公司）；聚乙二醇 400（PEG 400）、玉米油（江西益普生公司）；中链甘油三酯（MCT，荣佰生物）；聚氧乙烯氢化 40 蓖麻油（RH40，德国 BASF）；油酸（湖南尔康制药）；吐温 80（Tween 80，山东瑞生）；丙二醇（湖北葛店人福）；甲醇（HPLC 级，美国 ACS）；磷酸二氢钾、磷酸（AR 级，国药集团）。

1.3 实验动物

比格犬（Beagle），体质量 10 kg，雌雄各 2 只，许可证号：SYXK（湘）2020-0015，湖南普瑞玛公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Shim-pack GWS C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：水相 - 有机相（40∶60）（水相：2.72 g 磷酸二氢钾溶于 1.0 L 超纯水中，磷酸调 pH 至 3.0；有机相：甲醇）；检测波长 260 nm；流速 1.0 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2 辅料溶解度筛选

称取 1 g 辅料于离心管中，投入过量来那替尼药物，涡旋使药物充分分散后置于气浴振荡器（37 ℃，100 r·min^{-1}）平衡 48 h。10 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液适量置量瓶，用甲醇稀释后按“2.1”项下方法测定来那替尼含量，计算其在不同油相、表面活性剂、助表面活性剂中的溶解度。

由表 1 可知，来那替尼在油酸中溶解度最高，故选择油酸作为油相。助表面活性剂选择溶解度较高的 Transcutol HP，而表面活性剂的选择需进一步进行乳化能力的评价。

表 1 来那替尼在各辅料中的溶解度（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 1 Dissolution of neratinib in various excipients（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

辅料类型	名称	溶解度 /（mg·g^{-1}）
油相	油酸	207.39±2.62
	Maisine CC	5.82±0.64
	MCT	0.35±0.06
	Capmul MCM	20.95±0.82
	Capryol 90	11.87±0.34
	玉米油	0.19±0.02
表面活性剂	RH40	2.96±0.10
	Tween 80	3.48±0.69
	Labrasol	16.50±1.12
助表面活性剂	Transcutol HP	18.61±0.98
	PEG 400	10.85±0.35
	丙二醇	2.98±0.08

2.3 混合油相与表面活性剂相容性

通过预实验可知油酸作为单一油相乳化效果并不好，因此为了同时兼顾载药量和乳化效果，拟采用混合油相。取油酸与其他油相辅料各 0.5 g 混合均匀作为混合油相，分别称取混合油相与相应表面活性剂按照 1∶1 和 1∶2 的质量比混合均匀后，吸取 50 μL 上述混合物，滴入 5 mL 的纯化水中，搅拌（37 ℃，100 r·min^{-1}）使乳化，计时，观察并记录实验现象。待乳化完全后，溶液室温静置 2 h，以纯化水为参比，用紫外分光光度计测定乳液在 600 nm 处的吸光度，并计算透光率（T，%）。结合各实验组的透光率和乳化等级选择混合油相和表面活性剂。

五个自乳化等级标准如下[9]：A. 迅速乳化，时间＜ 1 min，澄清透明或淡蓝色乳光；B. 迅速

乳化，时间＜ 2 min，比 A 略浊，蓝白色；C. 时间＜ 3 min，呈奶白色液体状；D. 乳化缓慢，时间＞ 3 min，呈灰白色，半固态凝块；E. 时间＞ 3 min，分散不均一，液面一直有油滴漂浮。

由表 2 可知油酸单独作为油相，与各种表面活性剂以各种比例混合都不能达到较好的乳化效果，但当与其他油相混合后乳化效果有所改善。其中，油酸和玉米油是所有混合油相中表现最好的。在表面活性剂的选择中，RH40 显示出最强的乳化能力。至此，确定了混合油相为油酸与玉米油，表面活性剂为 RH40，助表面活性剂为 Transcutol HP，但它们的具体用量需进一步考察。

表 2 混合油相与表面活性剂的相容性

Tab 2 Compatibility of mixed oil phase with surfactant

序号	油相	表面活性剂	油相:表面活性剂	吸光度	透光率（T）/%	乳化等级
1	油酸	RH40	1∶1	0.600	25.12	E
2	油酸	RH40	1∶2	0.142	72.11	D
3	油酸: MCT ＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.112	77.27	E
4	油酸: MCT ＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.008	98.17	A
5	油酸:玉米油＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.065	86.10	B
6	油酸:玉米油＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.002	99.54	A
7	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.208	61.94	D
8	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.004	99.08	A
9	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.440	36.31	E
10	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.168	67.92	D
11	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.096	80.17	E
12	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.009	97.95	A
13	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	RH40	1∶1	0.078	83.56	C
14	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	RH40	1∶2	0.040	91.20	B
15	油酸	Tween 80	1∶1	0.410	38.90	E
16	油酸	Tween 80	1∶2	0.260	54.95	D
17	油酸: MCT ＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.788	16.29	E
18	油酸: MCT ＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.364	43.25	D
19	油酸:玉米油＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.804	15.70	C
20	油酸:玉米油＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.654	22.18	C
21	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.340	45.71	E
22	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.163	68.71	D
23	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.298	50.35	E
24	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.178	66.37	D
25	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.820	15.14	D
26	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.469	33.96	D
27	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	Tween 80	1∶1	0.294	50.82	D
28	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	Tween 80	1∶2	0.089	81.47	C
29	油酸	Labrasol	1∶1	0.414	38.55	E
30	油酸	Labrasol	1∶2	0.840	14.45	E
31	油酸: MCT ＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	1.766	1.71	D
32	油酸: MCT ＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.862	1.37	D
33	油酸:玉米油＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	1.224	5.97	C
34	油酸:玉米油＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.672	2.13	C
35	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	0.430	37.15	E
36	油酸: Capryol 90 ＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.274	5.32	E
37	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	0.672	21.28	E
38	油酸: Maisine CC ＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.002	9.95	E
39	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	1.832	1.47	D
40	油酸: Captex 8000 ＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.828	1.49	C
41	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	Labrasol	1∶1	0.574	26.67	E
42	油酸: Capmul MCM ＝ 1∶1	Labrasol	1∶2	1.080	8.32	E

2.4　三元相图绘制

将油酸和玉米油先按照质量比 1∶3、1∶2、1∶1、2∶1、3∶1 混匀作为混合油相，再将表面活性剂 RH40 与助表面活性剂 Transcutol HP 按质量比 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 混匀作为混合表面活性剂，然后分别将混合油相与混合表面活性剂按质量比 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4 进行复配。分别移取 50 μL，缓慢加入 5 mL 纯化水中（37 ℃，100 r • min $^{-1}$）进行乳化，目测记录乳化时间，取乳化后的溶液，用激光粒度仪测定乳滴的平均粒径。

分别以混合油相（油酸和玉米油）、表面活性剂（RH40）、助表面活性剂（Transcutol HP）作为三元相图的三个顶点，以成乳后的色泽（澄清透明）、乳化时间（＜ 2 min）和平均粒径（＜ 250 nm）作为考察指标，绘制三元相图，结果见图 1。从图 1 可以看出，当油酸∶玉米油＝ 1∶1 时微乳区域面积最大，故选择油酸∶玉米油＝ 1∶1 的比例作为混合油相。

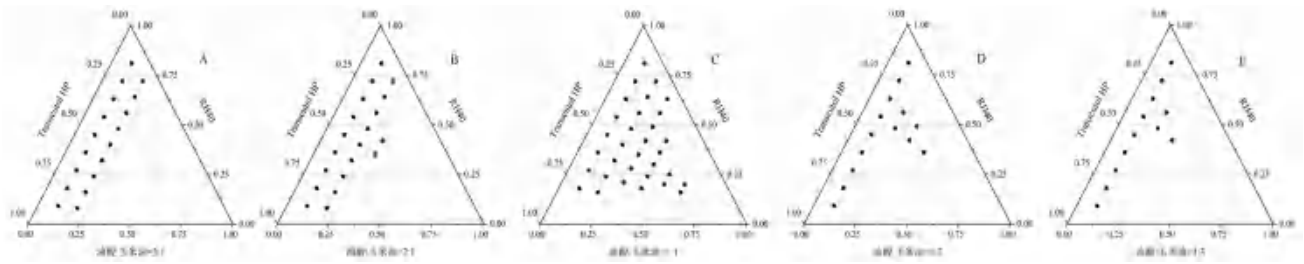


图 1　油酸和玉米油以不同比例混合的三元相图

Fig 1　Ternary phase diagram of oleic acid and corn oil mixed in different ratios

2.5　星点设计 - 效应面法优化处方

2.5.1　实验设计　在三元相图所得结果的基础上，选择对来那替尼自微乳性质影响最显著的两个因素：混合油相的质量百分比 W_{oil}（X_1）和表面活性剂与助表面活性剂的质量比 K_m（X_2）为考察因素；选取对自微乳质量评价比较重要的三个因素：平均粒径（Y_1）、乳化时间（Y_2）和饱和载药量（Y_3）为评价指标。根据三元相图和预实验得出的初步范围，X_1 的范围为 10% ～ 40%，X_2 的范围为 0.42 ～ 4，采用 Design Expert 12.0 软件，以两因素五水平进行星点设计，因素和水平见表 3。

表 3　星点设计的因素水平表

Tab 3　Variables of central composite design

因素	水平				
	$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
W_{oil}/%（X_1）	10	14.4	25	35.6	40
K_m（X_2）	0.42	0.95	2.225	3.48	4

根据星点设计表生成的 13 项实验，按比例精密称取油相、表面活性剂、助表面活性剂，投入过量药物，涡旋使药物充分分散后置于气浴振荡器（37 ℃，100 r • min $^{-1}$）平衡 48 h，10 000 r•min $^{-1}$ 离心 10 min，精密称取上清液于量瓶中，用甲醇稀释后按 “2.1” 项下方法测定来那替尼含量，计算饱和载药量。取上清液 50 μL，缓慢加入 5 mL 纯化水中（37 ℃，100 r • min $^{-1}$），目测法测定乳化时间，激光粒度仪测定平均粒径。

2.5.2　实验结果及模拟拟合　星点设计实验结果见表 4。在 Design Expert 12.0 软件中输入对应结果，根据软件对平均粒径、乳化时间、饱和载药量进行线性或多项式模型拟合，其中校正相关系数 R^2 和显著性水平（P）均满足要求，结果具有统计学意义（$P < 0.05$），对应的拟合方程如下：

$Y_1 = 24.65 + 4.93X_1 - 3.04X_2 - 1.18X_1X_2 - 0.857X_1^2 + 3.46X_2^2 + 2.58X_1^2X_2 + 3.95X_1X_2^2$，$R^2 = 0.9029$，$P = 0.0079$；

$Y_2 = 123.43 + 0.6576X_1 + 24.58X_2 - 2.60X_1X_2 - 17.13X_1^2 - 11.81X_2^2 - 9.68X_1^2X_2 - 20.06X_1X_2^2$，$R^2 = 0.9973$，$P < 0.0001$；

$Y_3 = 27.80 + 9.17X_1 + 0.4424X_2$，$R^2 = 0.9897$，$P < 0.0001$。

2.5.3　响应面分析与预测　在软件上，将混合油相的质量百分比 W_{oil}（X_1）和表面活性剂与助表面活性剂的质量比 K_m（X_2）分别对平均粒径、乳化时间和饱和载药量进行三维效应面图绘制，相应结果见图 2。

由图 2 可知，K_m（X_2）一定时，平均粒径随 W_{oil}（X_1）增大而增大，乳化时间随 W_{oil}（X_1）增大先增大后减小；W_{oil}（X_1）一定时，平均粒径随 K_m（X_2）的增大先减小后增大，乳化时间在 W_{oil}（X_1）＜ 30% 时随 K_m（X_2）增大而增大，而当 W_{oil}（X_1）＞ 30% 时乳化时间随 K_m（X_2）增大先增大后减小；饱和载药量与 K_m（X_2）基本无关，仅随 W_{oil}（X_1）增大而增大，这是因为来那替尼在油相中的溶解度远大于在表面活性剂和助表面活性剂

表 4　星点设计表及响应值

Tab 4　Central composite design，factors and response

序号	X_1/%	X_2	平均粒径 /nm	乳化时间 /s	饱和载药量 /（mg·g^{-1}）
1	14.4	0.95	19.18	94.90	20.52
2	35.6	0.95	32.68	61.30	37.11
3	14.4	3.48	21.17	129.90	18.18
4	35.6	3.48	27.42	85.88	36.59
5	10	2.225	18.12	89.73	14.21
6	40	2.225	32.03	91.59	41.33
7	25	0.42	38.52	66.55	27.14
8	25	4	28.91	136.07	26.66
9	25	2.225	24.43	124.14	26.77
10	25	2.225	23.92	123.76	28.72
11	25	2.225	24.68	123.96	27.80
12	25	2.225	25.37	122.28	28.25
13	25	2.225	24.84	122.99	28.11

中的溶解度。

综上，以平均粒径最小、乳化时间＜ 1 min、饱和载药量最大为标准，进行最优处方筛选，除去近似的预测，得到两个较理想的优化处方：

① X_1 ＝ 40，X_2 ＝ 0.689，Y_1 ＝ 35.891，Y_2 ＝ 30.000，Y_3 ＝ 41.295；

② X_1 ＝ 40，X_2 ＝ 3.921，Y_1 ＝ 34.962，Y_2 ＝ 21.073，Y_3 ＝ 40.174。

考虑到表面活性剂用量太高会刺激胃肠道，使胃黏膜的渗透性发生可逆性转变[10-11]，故选择处方①作为最优处方，即混合油相（油酸∶玉米油＝ 1∶1）的质量百分比为 40%，RH40 为 25.5%，Transcutol HP 为 34.5%，进行预测验证。

按照筛选出的最优处方（油酸∶玉米油∶RH40∶Transcutol HP ＝ 20%∶20%∶25.5%∶34.5%），投入过量药物，平行制备 3 份来那替尼自微乳制剂，置于气浴振荡器（37 ℃，100 r·min^{-1}）平衡 48 h，10 000 r·min^{-1} 离心 10 min 后取上清液，按“2.5.1”项下方法测定其平均粒径、乳化时间与饱和载药量，考察实测值和预测值是否相近，结果见表 5。结果表明，处方测定值与软件的预测值相比差距较小，说明所建立的数学模型具有良好的预测性。

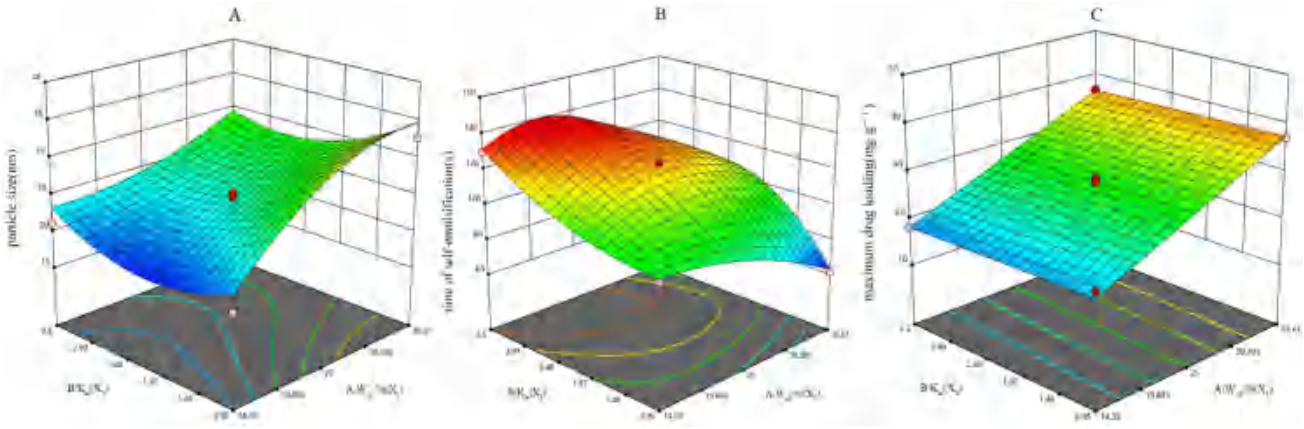


图 2　平均粒径（A）、乳化时间（B）、饱和载药量（C）的效应面三维图

Fig 2　3D response surface plot of particle size（A），time of self-emulsification（B）and maximum drug loading（C）

表 5　预测值与实际值（$\bar{x}\pm s$，n ＝ 3）

Tab 5　Predicted values and actual values（$\bar{x}\pm s$，n ＝ 3）

项目	平均粒径 /nm	乳化时间 /s	饱和载药量 /（mg·g^{-1}）
预测值	35.89	30.00	41.29
实际值	36.08±0.2	31.53±3.2	42.35±2.1
偏差 /%	0.61	5.1	2.57

2.6　来那替尼自微乳（NER-SMEDDS）的制备

按上述饱和载药量的 80% 投药，即精密称取 35 mg 来那替尼原料药，先加 200 mg 油酸超声溶解，溶解完全后依次加入 345 mg Transcutol HP、255 mg RH40 以及 200 mg 玉米油涡旋超声混匀即得，载药量为 33.8 mg·g^{-1}。

2.7　NER-SMEDDS 的表征

2.7.1　粒径分布与 Zeta 电位　取“2.6”项下 NER-SMEDDS 50 μL，缓慢加入 5 mL 纯化水中（37 ℃，100 r·min^{-1}），用激光粒度仪测定其平均粒径和 Zeta 电位，见图 3。粒径呈正态分布，平均粒径为（33.45±1.38）nm，多分散指数 PDI 为 0.124。Zeta 电位值为（－ 29.5±9.40）mV，说明乳滴表面带有较大的电荷，由于电荷的静电排斥作用，阻碍了乳滴之间的相互碰撞聚集，使 NER-SMEDDS 乳化后的乳滴具有较高的稳定性[12]。

2.7.2　透射微观形态　取“2.6”项下 NER-SMEDDS 50 μL，缓慢加入 5 mL 纯化水中（37 ℃，100 r·min^{-1}），形成澄清透明的乳液。取适量，滴在覆有支持膜的铜网上，静置 10 min 后用滤纸吸去多余液体，再滴加 2% 的磷钨酸溶液，负染 5 min，自

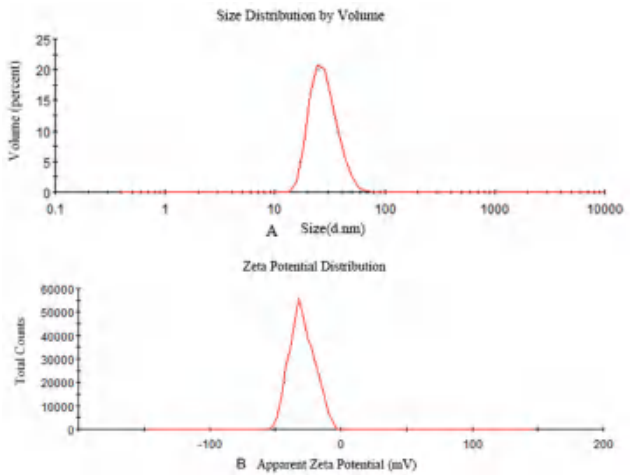


图 3　NER-SMEDDS 的粒径分布（A）与 Zeta 电位（B）

Fig 3　Particle size distribution（A）and Zeta potential（B）of NER-SMEDDS

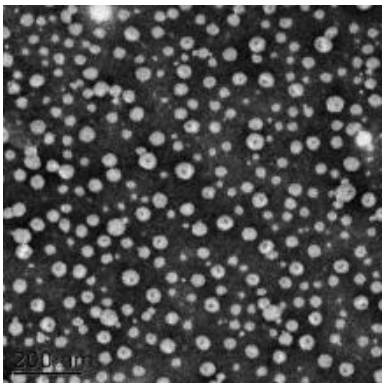


图 4　NER-SMEDDS 的透射电镜图

Fig 4　Transmission electron microscopy of NER-SMEDDS

然挥干，在透射电镜下观察。NER-SMEDDS 经稀释后的乳滴呈圆球形，没有聚集（见图 4）。

2.7.3　稀释后稳定性　分别考察 NER-SMEDDS 在不同分散介质（pH 1.0 稀盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、pH 7.0 纯化水）中的稀释后稳定性。按“2.7.1”项下方法将 NER-SMEDDS 分散在不同的介质中，考察其在各分散介质中 0、3、6 h 的外观状态及平均粒径 [13]（见表 6）。在上述分散介质中，NER-SMEDDS 稀释后形成的乳液在 6 h 内稳定，粒径大小没有明显变化、外观颜色不变、没有药物析出。

表 6　NER-SMEDDS 在不同介质中的稀释后稳定性 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 6　Post-dilution stability of NER-SMEDDS in different dispersion media ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

时间 /h	指标	pH 1.0 稀盐酸溶液	pH 4.5 醋酸盐缓冲液	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	pH 7.0 纯化水
0	平均粒径 /nm	48.48±0.94	46.88±1.86	39.22±0.45	37.31±1.38
	药物是否析出	未析出	未析出	未析出	未析出
	外观颜色	澄清透明	澄清透明	澄清透明	澄清透明
3	平均粒径 /nm	52.17±0.93	50.56±0.37	43.45±0.54	40.60±0.30
	药物是否析出	澄清透明	澄清透明	澄清透明	澄清透明
	外观颜色	未析出	未析出	未析出	未析出
6	平均粒径 /nm	51.91±0.43	50.07±0.54	44.15±1.09	40.97±0.64
	药物是否析出	未析出	未析出	未析出	未析出
	外观颜色	澄清透明	澄清透明	澄清透明	澄清透明

2.8　NER-SMEDDS 比格犬体内生物利用度研究

2.8.1　实验设计及采血　采用两周期交叉实验设计。将 4 只比格犬（雌雄各半）随机分为两组，每组 2 只（一雌一雄），A 组给予 NER-SMEDDS，剂量为 8 mg • kg^{-1}；B 组给予来那替尼混悬液，剂量为 8 mg • kg^{-1}。7 d 后 A、B 两组交换给药。给药前禁食一晚，并在服药后禁食 4 h，自由饮水。

给药前 0 h 及给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h 在前肢隐静脉采血 1 mL，采集的血液样本使用 EDTA-K_2 抗凝剂抗凝，3500 r • min^{-1} 离心 10 min，分离血浆样品，置于－ 80 ℃冰箱中保存待测。

2.8.2　检测方法　色谱及质谱条件条件：色谱柱：Waters XBridge C18 柱（4.6 mm×50 mm，3.5 μm）；流动相 A：5 mmol • L^{-1} 乙酸铵 -0.1% 甲酸水溶液，流动相 B：5 mmol • L^{-1} 乙酸铵 - 含 0.01% 甲酸乙腈∶水＝ 95∶5，梯度洗脱：0 ～ 2.5 min，95%B；2.51 ～ 3.5 min，35%B；流速 0.5 mL • min^{-1}；进样体积 2 μL，柱温 40 ℃。

离子源：离子喷雾离子化（ESI）源，正离子方式检测，离子源电压（IS）：5500 V；离子源温度（TEM）：550 ℃；气帘气（CUR）：35 psi；雾化气（GS1）：40 psi；辅助加热气（GS2）：45 psi；扫描方式：多重反应监测（MRM）；定量离子对：来那替尼 557.2 /112.1（DP 100 V，CE 32 eV），来那替尼 -d_6 563.3 /118.4（DP 100 V，CE 32 eV）扫描时间：100 ms。

样品前处理：取血浆样本 50 μL，加入内标储备液 50 μL（来那替尼 -d_6，180 ng • mL^{-1}），再加入 300 μL 乙腈沉淀蛋白，在 4 ℃条件下 2450 g 离心 10 min，取上清液。

2.8.3　实验结果　上述检测方法经过方法学验

证，专属性良好，准确度在 92.6% ～ 107.5%，线性范围为 3.0 ～ 600.0 ng•mL^{-1}，标准曲线为 y = 0.008x － 0.0079（r = 0.9988），定量下限为 3.0 ng • mL^{-1}，满足样品测定要求。

采用 Phoenix 软件分别计算 NER-SMEDDS 和混悬液的药动学参数（见表 7）；采用 Graphpad-Prism 6.0 版统计学软件，绘制平均血药浓度 - 时间曲线图（见图 5）。

表 7　药动学参数（$\bar{x}\pm s$，n = 4）

Tab 7　Main pharmacokinetic parameters（$\bar{x}\pm s$，n = 4）

参数	自微乳组	混悬液组
t_{max}/h	3.5±0.58	1.375±0.25
C_{max}/（μg • L^{-1}）	74.40±23.67	28.05±3.81
$AUC_{0\sim t}$/（μg • h • L^{-1}）	843.79±123.35	267.86±54.03

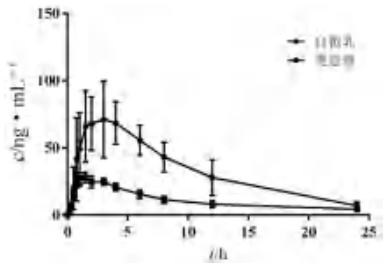


图 5　来那替尼平均血药浓度 - 时间曲线（$\bar{x}\pm s$，n = 4）

Fig 5　Mean serum concentration-time curve of neratinib（$\bar{x}\pm s$，n = 4）

由表 7 结果可知，自微乳的 t_{max} 为 3.5 h，较混悬液的 1.375 h 长，C_{max} 是混悬液的 2.65 倍，血药浓度 - 时间曲线下面积 $AUC_{0\sim t}$ 也有明显提高。由公式 F = $AUC_{0\sim t}$（自微乳）/ $AUC_{0\sim t}$（混悬液）×100%，算出相对生物利用度 F = 315%。

3　讨论

通过辅料溶解度实验发现，来那替尼仅在油酸中有较好的溶解度，但实验证明油酸作为单一油相与表面活性剂混合后乳化效果较差。因此，为了兼顾载药量和乳化效果，使用油酸和玉米油作为混合油相。玉米油是从禾本科的玉米粒胚中提取的脂肪油，安全性高，在自微乳制剂方面的应用潜力巨大 [14]。本研究将油酸与玉米油混合作为油相，既保证了载药量又优化了乳化效果，这为 SMEDDS 中油相的选择提供了更多思路。

有文献报道，载药量的大小会对自微乳的粒径产生影响 [15]。辛伐他汀自微乳制剂的研究显示，载药量越高乳滴的粒径越大 [16]。本文中，NER-SMEDDS 的载药量为 33.8 mg • g^{-1}，粒径为 33.45 nm；而其饱和载药量为 42.35 mg • g^{-1}，粒径为 36.08 nm，说明载药量确实会影响乳滴粒径。但是由于药物性质不同，对自微乳产生的影响也相去甚远 [17]。并且本文可参考的样本量太少，尚不能定论此研究中载药量的大小对粒径的具体影响，后续本课题组将会进行深入研究。

本研究结果显示，NER-SMEDDS 乳化后 Zeta 电位为（－ 29.5±9.40）mV，乳滴表面带有大量的负电荷，一方面表明体系比较稳定，不易聚集和破乳；另一方面，由于人体肠黏膜顶端与腔内的黏液带有负电荷，乳滴带过高的负电可能会影响药物在人体内的吸收 [18]。本文对 NER-SMEDDS 在各种介质中乳化后形成的乳滴在 6 h 内稳定性进行了考察，进而模拟预估 NER-SMEDDS 在胃肠道不同 pH 环境中乳滴的稳定性 [19]。其中，pH 7.0 纯化水为体外研究的常用介质，pH 1.0 稀盐酸溶液模拟人胃液 pH 环境，pH 4.5 醋酸盐缓冲液模拟人十二指肠 pH 环境，pH 6.8 磷酸盐缓冲液模拟人小肠 pH 环境。这证明了 NER-SMEDDS 在进入体内后不会因 pH 环境的变化而出现破乳、聚集等现象。

本文从体内外两方面对制备的 NER-SMEDDS 进行了评价。结果表明其乳化后乳滴粒径较小且形状规则，表面带电荷量高，不易聚集，即使在复杂的 pH 环境中也可保持稳定状态。比格犬药动学实验证明，与混悬液相比，NER-SMEDDS 可以显著提高来那替尼的生物利用度。综上所述，本研究制备的 NER-SMEDDS 可显著提高其生物利用度有望减少用药量，提高患者用药依从性，为来那替尼临床应用问题的解决与新剂型的研发提供新思路。但是关于制剂的稳定性问题还需进一步考察。

参考文献

[1] Deeks ED. Neratinib：first global approval [J]. Drugs，2017，77（15）：1695-1704.

[2] 陈本川 . 治疗乳腺癌新药——马来酸来那替尼（neratinib maleate）[J]. 医药导报，2018，37（3）：395-401.

[3] 李吉辉，王德鑫，赵冬梅 . 口服 HER 酪氨酸激酶抑制剂——来那替尼 [J]. 临床药物治疗杂志，2017，15（8）：10-14.

[4] Feldinger K，Kong A. Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer [J]. Breast Cancer，2015，7：147-162.

[5] Echavarria I，López-Tarruella S，Márquez-Rodas I，et al. Neratinib for the treatment of HER_2-positive early stage breast cancer [J]. Expert Rev Anticanc，2017，17（8）：669-679.

[6] Rahamathulla M，Alsahhrani SM，Al Saqr A，et al. Effervescent floating matrix tablets of a novel anti-cancer drug neratinib for breast cancer treatment [J]. J Drug Deliv Sci Tec，2021，66：102788.

[7] Bahadur S，Yadu K，Baghel P，et al. Review of formulation and evaluation of self-micro emulsifying drug delivery system（SMEDDS）[J]. Pharm Sci，2020，4（26）：25-35.
[8] Gumaste SG，Freire BOS，Serajuddin ATM. Development of solid SEDDS，VI：effect of precoating of Neusilin（R）US2 with PVP on drug release from adsorbed self-emulsifying lipid-based formulations [J]. Eur J Pharm Sci，2017，110：124-133.
[9] Liu J，Wang Q，Omari-Siaw E，et al. Enhanced oral bioavailability of bisdemethoxycurcumin-loaded self-microemulsifying drug delivery system：formulation design，in vitro and in vivo evaluation [J]. Int J Pharm，2020，590：119887.
[10] Kaur P，Garg T，Rath G，et al. Surfactant-based drug delivery systems for treating drug-resistant lung cancer [J]. Drug Deliv，2016，23（3）：727-738.
[11] Nardin I，Koellner S. Successful development of oral SEDDS：screening of excipients from the industrial point of view [J]. Adv Drug Deliv Rev，2019，142：128-140.
[12] Thakkar H，Nangesh J，Parmar M，et al. Formulation and characterization of lipid-based drug delivery system of raloxifene-microemulsion and self-microemulsifying drug delivery system [J]. J Pharm Bioallied Sci，2011，3（3）：442-448.
[13] Newton JM，Bazzigialuppi M，Podczeck F，et al. The rheological properties of self-emulsifying systems，water and microcrystalline cellulose [J]. Eur J Pharm Sci，2005，26（2）：176-183.
[14] Rani ER，Radha GV. Insights into novel excipients of self-emulsifying drug delivery systems and their significance：an updated review [J]. Crit Rev Ther Druc，2021，38（2）：27-74.
[15] Vasconcelos T，Marques S，Sarmento B. Measuring the emulsification dynamics and stability of self-emulsifying drug delivery systems [J]. Eur J Pharm Biopharm，2018，123：1-8.
[16] Kang BK，Lee JS，Chon SK，et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems（SMEDDS）for oral bioavailability enhancement of simvastatin in Beagle dogs [J]. Int J Pharm，2004，274（1-2）：65-73.
[17] 高广宇 . TID-101 自微乳化释药系统的研究 [D]. 北京：中国人民解放军军事医学科学院，2016.
[18] Buya AB，Beloqui A，Memvanga PB，et al. Self-nano-emulsifying drug-delivery systems：from the development to the current applications and challenges in oral drug delivery [J]. Pharmaceutics，2020，12（12）：1194.
[19] 李香玉 . 新型抗精神分裂症药 TD-195 自微乳化释药系统的研究 [D]. 开封：河南大学，2020.

（收稿日期：2022-09-23；修回日期：2022-10-13）

不同链长油相葛根素 *W/O* 型微乳在体肠吸收的研究

唐甜甜[1，2，3]，吴军勇[1，2，3]，胡祷耘[1，2，3]，刘新义[1，2，3]，胡雄彬[1，2，3*]，向大雄[1，2，3*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 湖南省转化医学与创新药物工程技术研究中心，长沙 410011；3. 中南大学临床药学研究所，长沙 410011）

摘要：目的 研究不同链长油相对葛根素 *W/O* 型微乳口服吸收的影响。**方法** 采用在体单向肠灌流法考察不同链长油相葛根素 *W/O* 型微乳的肠吸收行为。以吸收速率常数（K_a）和表观吸收系数（P_{app}）为评价指标，分析不同链长油相对葛根素 *W/O* 型微乳在大鼠不同肠段的吸收特性。**结果** 葛根素 *W/O* 型微乳在大鼠整个肠段的吸收均显著高于葛根素混悬液，不同链长油相 *W/O* 型微乳的肠吸收有差异。此外，葛根素 *W/O* 型微乳在大鼠整个肠段的肠吸收与微乳的油相链长在一定程度上成正相关，其中长链油微乳肠吸收最佳。**结论** 长链油微乳能增强葛根素的肠吸收，从而进一步提高葛根素的口服生物利用度。

关键词：葛根素；*W/O* 型微乳；油相碳链长度；在体单向肠灌流；肠吸收
中图分类号：R283，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-099-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.016

基金项目：湖南省自然科学基金青年基金项目（No.2019JJ50882，No. 2020JJ5808）；湖南省中医药管理局科研计划项目（No. 2021170）。
作者简介：唐甜甜，女，硕士，主管药师，主要从事药物新制剂及新型递送系统研究，email：tang05tian@csu.edu.cn *通信作者：向大雄，男，教授，博士研究生导师，主要从事药物新制剂及新型递送系统研究，email：xiangdaxiong@csu.edu.cn；胡雄彬，男，博士，主管药师，主要从事药物新制剂及新型递送系统研究，email：huxiongbin@csu.edu.cn

Effect of oil with different chain lengths on intestinal absorption of puerarin *W*/*O* microemulsion

TANG Tian-tian[1, 2, 3], WU Jun-yong[1, 2, 3], HU Yi-yun[1, 2, 3], LIU Xin-yi[1, 2, 3], HU Xiong-bin[1, 2, 3*], XIANG Da-xiong[1, 2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Hunan Key Laboratory of New Technology for Chinese Medicine Preparations*, *Changsha* 410011; 3. *Institute of Clinical Pharmacy*, *Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To determine the effect of oil with different chain lengths on the oral absorption of puerarin *W*/*O* microemulsions. **Methods** The intestinal absorption behavior of puerarin *W*/*O* microemulsions with different chain length oils was studied by single-pass intestinal perfusion in vivo. The absorption rate constant (K_a) and apparent absorption coefficient (P_{app}) were used as the evaluation indexes. The absorption characteristics of puerarin *W*/*O* microemulsion were analyzed in different intestinal segments of rats. **Results** The absorption of puerarin *W*/*O* microemulsion was significantly higher than that of puerarin suspension in the whole intestinal segment of rats. The intestinal absorption of puerarin *W*/*O* microemulsion varied with the oil chain length. In addition, the absorption of *W*/*O* microemulsion in the whole intestinal segment of rats was positively correlated with the oil phase chain length of the microemulsion. The microemulsion with long chain oil presented the best intestinal absorption. **Conclusion** Microemulsion with long chain oil can enhance the intestinal absorption of puerarin, which further improves its oral bioavailability.

Key words: puerarin; *W*/*O* microemulsion; oil phase chain length; in vivo single-pass intestinal perfusion; intestinal absorption

葛根素（puerarin，Pue）是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata*（Willd.）Ohwi 或甘葛藤（*Pueraria thomsonii* Benth）的干燥根中分离出的一种异黄酮类衍生物，已被广泛应用于多种心血管疾病，如高血压、冠心病、心绞痛等[1]。然而葛根素的水溶性较差，渗透性较低，口服生物利用度低[2]，严重影响了药物的治疗效果，因此，为提高患者顺应性，有必要通过制剂手段改善葛根素的口服生物利用度。

微乳（microemulsion，ME）能显著提高难溶性药物的生物利用度，降低药物不良反应，是继胶束、固体脂质纳米粒、脂质体等发展起来的新型递药系统[3]。微乳从结构上主要分为水包油型（*O*/*W*）、油包水型（*W*/*O*）和双连续型，由于具有热力学稳定、溶解度高、粒径小且渗透力强等优点，有较好的应用前景[4]。本课题组前期制备了葛根素 *O*/*W* 型和 *W*/*O* 型微乳，发现 *W*/*O* 型微乳在提高葛根素的口服生物利用度方面更优[5]。因此，为了进一步探索影响 *W*/*O* 型微乳的促进葛根素口服吸收的影响因素，本研究通过在体单向肠灌流实验，比较不同链长油相 *W*/*O* 型微乳对葛根素肠吸收的影响，为筛选出更优的葛根素口服微乳制剂提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；BT100-2F 电子恒流泵（保定兰格恒流泵有限公司）；HH 恒温水浴锅（江苏金坛市中大仪器厂）；101A-2 型干燥箱（上海理光仪器厂）；AG285 电子分析天平（瑞士 METTER-TOLEDO 公司）；DDS-11A 型电导仪（上海理达仪器厂）；NANO-ZS90 纳米粒度分析仪（英国马尔文公司）；JEM 1230 型透射电子显微镜（日本电子株式会社）；Thermo BR4i 多功能离心机（赛特湘仪离心机仪器有限公司）。

1.2 试药

葛根素对照品（中国食品药品检定研究院，批号：1502-200101）；葛根素原料药（南京泽朗医药科技有限公司，批号：ZL20110110，纯度＞ 99.2%）；卵磷脂（上海太伟药业有限公司）；大豆油、油酸（OA）（上海太达贸易合作公司）；油酸乙酯（EO，上海飞祥化工厂）；中链脂肪酸甘油酯（Labrafac CC）、辛酸癸酸三甘油酯（Labrafac Lipophile wL1349）（佳法赛公司赠送）；肉豆蔻酸异丙酯（IPM）、乙酸乙酯、正丁酸乙酯（国药集团化学试剂有限公司）；甲醇（色谱纯，美国 TEDIA 天地试剂公司）。

1.3 实验动物

健康 SD 大鼠，雄性，体质量（250±25）g，由中南大学湘雅二医院动物部提供，生产许可证号：SCXK（湘）2009-0004；实验动物合格证：HNASLKJ20120720。

2　方法与结果

2.1　含不同链长油相葛根素 *W*/*O* 型微乳处方的筛选

2.1.1　油相的筛选　大豆卵磷脂具有较好的生物相容性和乳化性能，可与多种油相形成稳定的微乳。同时，研究发现以卵磷脂 - 无水乙醇配伍可与不同油相形成更高载水量的 *W*/*O* 型微乳。因此，本文以卵磷脂作为表面活性剂，无水乙醇为助表面活性剂，制备不同油相与卵磷脂 - 无水乙醇混合形成的 *W*/*O* 型微乳 [6]。本研究分别以短链油：乙酸乙酯和正丁酸乙酯，中链油：肉豆蔻酸异丙酯（IPM）、中链脂肪酸甘油酯和辛酸癸酸三甘油酯，长链油：大豆油、油酸（OA）和油酸乙酯（EO）为油相；以卵磷脂为表面活性剂（SA）；以无水乙醇为助表面活性剂（Co-SA）制备微乳。称取处方量的油相、表面活性剂和助表面活性剂，磁力搅拌混合，同时逐滴加入双蒸水，制得不同链长油相空白微乳。

2.1.2　伪三元相图的绘制　用水滴定法绘制伪三元相图，确定不同链长油相葛根素微乳各组分的用量范围。按 K_m（表面活性剂与助表面活性剂质量比）为 2∶1、1∶1、1∶2，分别制备混合表面活性剂。将不同油相与混合表面活性剂（卵磷脂和无水乙醇）以质量比分别为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 混合均匀，于室温中磁力搅拌下用水滴定法制备微乳，并记录临界点时各组分的用量百分比。应用 Origin 8.1 软件绘制伪三元相图，结果见图 1，比较微乳区域面积大小确定 K_m 值。

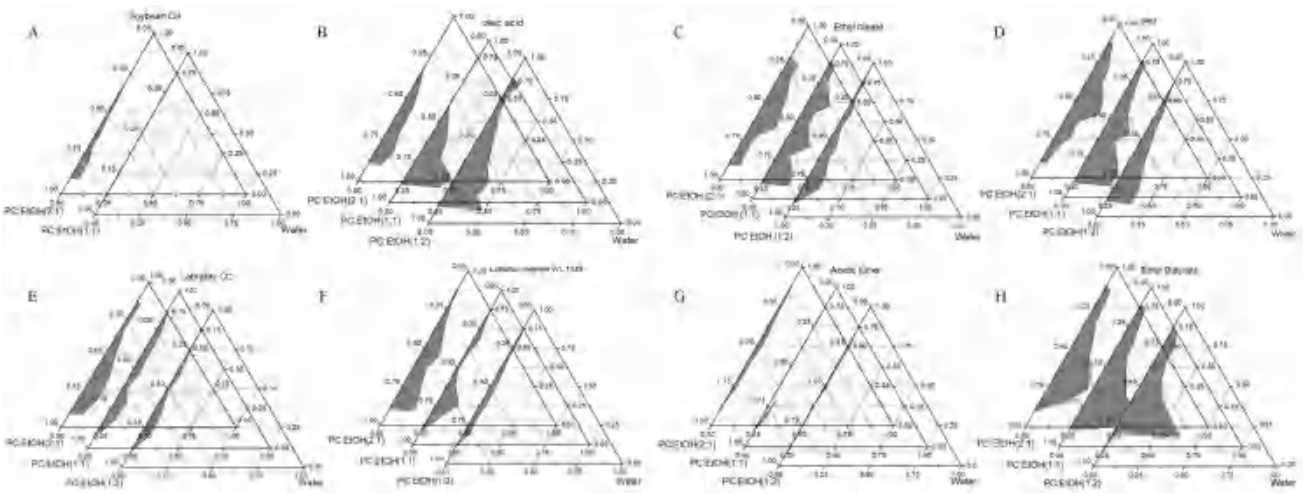


图 1　以卵磷脂和无水乙醇为混合表面活性剂、不同油相与其混合的伪三元相图

Fig 1　Pseudo ternary phase diagrams composed of oil，surfactant and co-surfactant for all the microemulisons

A. 大豆油（soybean oil）；B. 油酸（oleic acid）；C. 油酸乙酯（ethyl oleate）；D. 肉豆蔻酸异丙酯（isopropyl myristate）；E. 中链脂肪酸甘油酯（glycerides of medium chain fatty acids）；F. 辛酸癸酸三甘油酯（caprylic capric triglyceride）；G. 乙酸乙酯（ethyl acetate）；H. 正丁酸乙酯（ethyl *n*-butyrate）

综合伪三元相图面积、表面活性剂用量等因素，最终确定用于制备不同链长油相葛根素 *W*/*O* 型微乳的长链、中链、短链油分别为 EO、IPM 和乙酸乙酯。长链油微乳（L-*W*/*O*-ME）处方比例为 EO- 卵磷脂 - 无水乙醇 - 水（35.65%∶26.91%∶26.75%∶10.69%），中链油微乳（M-*W*/*O*-ME）处方比例为 IPM- 卵磷脂 - 无水乙醇 - 水（45.33%∶22.70%∶22.69%∶9.28%），短链油微乳（S-*W*/*O*-ME）处方比例为乙酸乙酯 - 卵磷脂 - 无水乙醇 - 水（58.88%∶26.17%∶13.09%∶1.86%）。

2.1.3　载药微乳的制备

① 微乳的制备：分别按比例精密称取处方量的油相和混合表面活性剂共 8.0 g，200 r·min^{-1} 磁力搅拌下混合均匀，用双蒸水缓慢滴定至形成澄清透明的微乳，加入适量的葛根素原料药，3000 r·min^{-1} 离心 10 min 后取上清液，制得不同链长油相的葛根素 *W*/*O* 型微乳。

② 微乳的形态：分别取少量的葛根素 *W*/*O* 型微乳，滴至覆盖碳膜的铜网上，用滤纸吸去多余的液滴，自然干燥后，置透射电镜（TEM）下观察拍照，见图 2，微乳的形态规则，微乳液滴之间界限清晰。透射电镜结果显示不同油相与混合表面活性剂（卵磷脂 - 无水乙醇体系）形成的微乳形态差异不显著）。

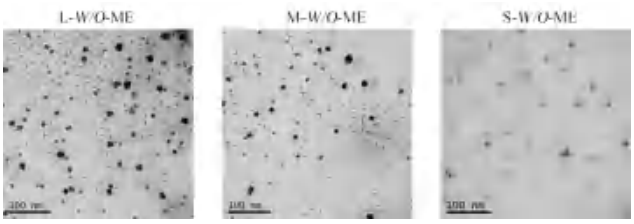


图 2　微乳的透射电镜照片

Fig 2　Transmission electron microscope photo of microemulsion

③ 含量测定：参照已建立的葛根素微乳测定方法[7]，以质量浓度 C（μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积 A 为纵坐标进行线性回归，得回归方程为 $A = 56.46C - 66.97$（$R^2 = 0.9992$）。结果葛根素在 2.25 ～ 45.00 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。以此方法测得，L-*W/O*-ME 的载药量为（17.87±0.45）mg•mL^{-1}，包封率为（83.2±1.4）%，M-*W/O*-ME 的载药量为（12.83±1.00）mg • mL^{-1}，包封率为（78.4±1.9）%，S-*W/O*-ME 的载药量为（25.09±1.09）mg•mL^{-1}，包封率为（80.7±2.1）%。

④ 初步稳定性考察：将葛根素 *W/O* 型微乳样品分装于西林瓶中，分别置于室温下于第 0、5、10 日取样测定电导率、ζ 电位、黏度、粒径和载药量。稳定性考察结果见表 1，随着放置时间的延长，3 种微乳的粒径略有增加，电导率、ζ 电位、黏度及载药量基本无变化，表明葛根素 *W/O* 型微乳在室温下基本稳定。

表 1　葛根素 *W/O* 型微乳室温下初步稳定性考察（$n = 3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Stability of puerarin *W/O* microemulisons at room temperature ($n = 3$, $\bar{x}\pm s$)

类别	时间 /d	电导率 /（μs • cm^{-1}）	ζ 电位 /mV	黏度 /（mPa • s）	粒径 /nm	载药量 /（mg • mL^{-1}）
L-*W/O*-ME	0	44.18±2.32	− 9.21±2.12	24.3±1.2	24.04±1.02	17.87±0.45
	5	43.12±1.28	− 9.14±1.96	28.6±0.8	24.80±0.98	17.67±0.67
	10	40.21±1.49	− 9.19±2.08	25.9±1.0	25.41±0.77	17.55±0.35
M-*W/O*-ME	0	14.10±0.90	− 8.54±1.94	25.8±0.9	15.77±0.58	12.83±1.00
	5	14.19±1.56	− 8.63±1.78	29.3±0.4	16.40±0.66	12.37±0.88
	10	15.25±1.08	− 8.50±1.85	28.1±0.7	16.09±0.64	13.70±0.39
S-*W/O*-ME	0	6.42±0.56	− 10.31±2.07	6.3±0.2	11.91±0.35	25.09±1.09
	5	6.41±0.98	− 10.12±2.14	7.0±0.3	11.86±0.49	24.73±1.20
	10	6.67±0.32	− 10.27±2.11	6.9±0.3	12.02±0.81	23.10±0.79

2.2　*葛根素 W/O 型微乳的大鼠在体单向肠灌流实验*

2.2.1　肠循环液中药物浓度的测定　精密称取葛根素对照品适量于 100 mL 量瓶中，用肠灌流液稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度为 100.0 μg • mL^{-1} 的葛根素对照品肠灌流液。分别精密量取 L-*W/O*-ME、M-*W/O*-ME、S-*W/O*-ME 和葛根素原料粉末适量，用肠灌流液稀释成葛根素质量浓度为 100.0 μg • mL^{-1} 的葛根素微乳及混悬液肠灌流供试液。采用 HPLC 法。供试液经 0.45 μm 滤膜过滤，取过滤液，用 2 倍体积的甲醇稀释，涡旋 2 min，13 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液测定葛根素的浓度。色 谱 柱：Diamonsil C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水溶液（35∶65，*V/V*）；流速为 1.0 mL • min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 250 nm；进样量为 10 μL。在此色谱条件下，空白肠灌流液对葛根素的含量测定无干扰，见图 3。

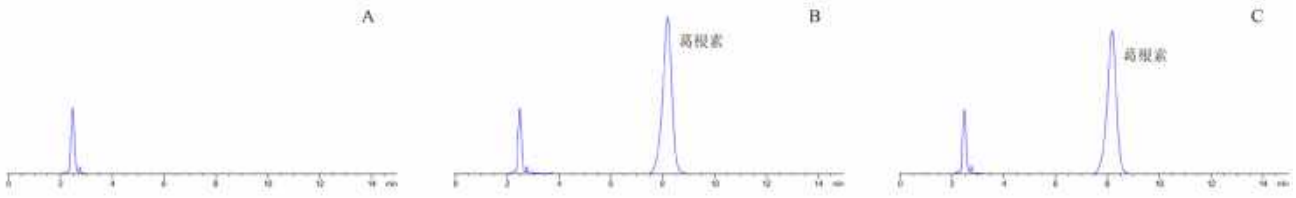


图 3　肠灌流液中葛根素的 HPLC 图

Fig 3　HPLC chromatogram of puerarin in intestinal perfusate

A. 空白肠灌流液（blank intestinal perfusate）；B. 含葛根素对照品的肠灌流液（intestinal perfusate with puerarin standard）；C. 样品（sample）

以流动相溶解葛根素对照品配制系列浓度的对照品溶液，绘制标准曲线。结果表明，葛根素在 1.875 ～ 80.0 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。线性方程为 $A = 36.16C + 0.8180$（$R^2 = 0.9999$）。检测限为 0.54 ng，定量限为 3.78 ng，低、中、高（3.75、15.0、60.0 μg • mL^{-1}）3 种不同质量浓度的平均回收率分别为 90.7%、101.1%、101.2%，*RSD* 分别为 0.85%、0.22%、0.32%。日内 *RSD* 分别为 2.37%、0.48%、0.52%，日间 *RSD* 分别为 2.2%、0.82%、0.71%。含葛根素肠灌流液室温放置 12 h、37 ℃水浴 3 h 的稳定性 *RSD* 分别小于 1.7% 和 2.3%，表明该方法的稳定性较好。

2.2.2　各肠段肠壁对葛根素物理吸附的影响　分别取大鼠十二指肠、空肠、回肠和结肠各 10 cm，用玻璃棒将黏膜层翻出，置于 10 mL 已知葛根素质量浓度为 100.0 μg·mL^{-1} 的肠灌流液中，37 ℃恒温水浴中孵育 2 h，取出肠段，测定各孵育液中葛根素的浓度。结果显示，2 h 后，十二指肠、空肠、回肠和结肠孵育液中的葛根素回收率分别为 97.8%、99.6%、98.1% 和 96.8%，表明各肠段肠壁对葛根素基本无吸附作用。

2.2.3　不同链长葛根素 *W*/*O* 型微乳的分段肠吸收　取健康 SD 大鼠 20 只，随机分为 4 组，分别为 EO-*W*/*O*-ME 即葛根素 *W*/*O* 长链油微乳组（L-*W*/*O*-ME），IPM-*W*/*O*-ME 即葛根素 *W*/*O* 中链油微乳组（M-*W*/*O*-ME），乙酸乙酯 -*W*/*O*-ME 即葛根素 *W*/*O* 短链油微乳组（S-*W*/*O*-ME）和葛根素混悬液组，每组 5 只。分别精密量取 L-*W*/*O*-ME、M-*W*/*O*-ME 和 S-*W*/*O*-ME 各 2 mL，用适量 Krebs-Ringer 营养液[8] 稀释成葛根素质量浓度为 100.0 μg·mL^{-1} 的葛根素微乳肠灌流供试液。精密称取葛根素原料药粉末适量，用 Krebs-Ringer 营养液稀释成浓度为 100.0 μg·mL^{-1} 的混悬液，混匀制成葛根素混悬液组供试液。

选取禁食 24 h 的雄性 SD 大鼠，实验前 24 h 禁食不禁水，腹腔注射 10% 水合氯醛（0.4 mL/100 g）麻醉，背部固定于手术台上，腹部用红外灯维持体温（37±0.5）℃，延腹中线切开腹部约 3 cm，选择肠段，缓缓注入 37 ℃生理盐水将肠道内容物冲净，再用空气将生理盐水排净。上端插管，手术线结扎固定，再将伤口用浸有生理盐水的纱布覆盖保湿。十二指肠自幽门 1 cm 处开始取 10 cm，空肠段距幽门 15 cm 开始取 10 cm，回肠段距离盲肠上行处 20 cm 处开始取 10 cm，结肠段从盲肠后段开始取 10 cm。

实验前用供试液将管道饱和一段时间，使得管道出口的药物浓度与供试液浓度相等，以消除管道对药物吸附的影响。将 37 ℃恒温的供试液以全速泵入肠段，使肠段内快速充满供试液，再将流速调至 0.25 mL·min^{-1} 平衡 0.5 h。之后进口处用已知质量的装有葛根素 *W*/*O* 型微乳供试液的小瓶进行灌流，出口处用已知质量的小瓶每隔 15 min 分段收集流出液，共收集 4 次流出液（同时迅速更换下一个供试液小瓶和收集液小瓶），每一次收集迅速精确称定供试液小瓶和收集液小瓶质量。

在肠灌流实验结束后，剪下所灌流的肠段，用细线测量其长度（*l*）和内径（*r*）。对照组葛根素混悬液组的大鼠在体肠灌流实验也按以上操作进行。取各时间点肠循环液 2 mL，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后，用 2 倍体积的甲醇稀释，涡旋 2 min，13 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液制得供试品液。供试品液按 HPLC 法测定葛根素含量，按照下列公式计算葛根素吸收速率常数（K_a）和表观吸收系数（P_{app}），实验结果见图 4。

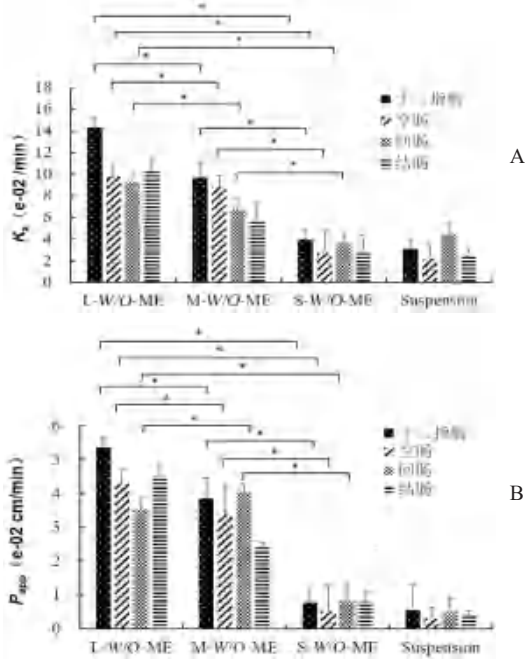


图 4　不同链长油相葛根素 *W*/*O* 型微乳在不同肠段的吸收速率常数（A）及药物表观吸收系数（B）（$^*P < 0.05$）

Fig 4　Absorption rate constants（A）and apparent permeability coefficients（B）obtained for in situ perfusion in the SPIP model for the suspension，L-*W*/*O*-ME，M-*W*/*O*-ME and S-*W*/*O*-ME in different intestinal segments（$^*P < 0.05$）

$$K_a = (1 - C_{out}V_{out}/C_{in}V_{in})\,Q/V$$

$$P_{app} = -Q\ln(C_{out}/C_{in})(V_{out}/V_{in})/2\pi rl$$

由图 4 可以看出，微乳在 4 个肠段的 K_a 和 P_{app} 均高于混悬液组，表明不同链长油相的葛根素 *W*/*O* 型微乳在整个小肠段均有不同程度的吸收，且优于混悬液组。

通过不同链长 *W*/*O*-ME 组间的比较，可以发现 L-*W*/*O*-ME 及 M-*W*/*O*-ME 在十二指肠、空肠、结肠的 K_a 及 P_{app} 均高于 S-*W*/*O*-ME；L-*W*/*O*-ME 在十二指肠、空肠、结肠的 K_a 及 P_{app} 均显著高于 M-*W*/*O*-ME（$P < 0.05$）。通过比较回肠段的 P_{app}，发现 M-*W*/*O*-ME 组的数值最大，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。结果表明，不同链长油相的 *W*/*O*-ME 能不同程度地促进葛根素在大鼠各肠段的吸收，其中微乳的肠吸收大致与油相链长成正相关（L-*W*/*O*-ME > M-*W*/*O*-ME > S-*W*/*O*-ME）（$P < 0.05$）。因此，油相长度可能是影响 *W*/*O* 型微乳肠吸收的因素之一。

3　讨论与结论

本研究发现，与混悬液组相比，葛根素 *W*/*O* 型微乳不仅可以显著提高葛根素的溶解度，还可以提高葛根素在肠道的 K_a 和 P_{app}，可能是由于微

乳将药物包裹在乳滴内，保护药物免受胃肠的降解，克服了酶屏障和膜屏障，同时微乳较低的表面张力可延长与胃肠道黏膜接触的时间，增加葛根素的跨膜转运。

从整个肠道的吸收情况来看，不同链长油相微乳在肠道的吸收特征为长链油具有明显的肠道吸收促进作用，中链油、短链油微乳其促吸收作用依次次之，整体表现为葛根素微乳的肠吸收与油相的碳链长度成正相关。理化性质结果显示，所制备的不同链长微乳其ζ电位、粒径等无显著差异，提示油相链长是影响 *W/O* 型微乳肠吸收的重要因素之一，油相链长度的增加与更高的药物转运效率密切相关。课题组前期研究也证实了含长链油的微乳能更好地促进药物的淋巴转运，且淋巴转运的比例与油相的链长成正相关[7，9]，这一结论也在其他的研究中得到了证实[10-11]。

药物的肠吸收主要受淋巴转运的影响，目前研究证实明确的肠道淋巴转运的主要通路为乳糜微粒（CM）途径[12]。其中，药物的肠吸收与其脂质载体脂质消化吸收方式密切相关，一般来说，短链脂肪酸经肠上皮细胞吸收后主要通过门静脉转运，而中链、长链脂肪酸主要的转运途径是淋巴转运[11，13-15]。文献报道[13，16-17]长链油具有较好的肠吸收促进作用，有以下原因：① 长链油具有更高的亲脂性，因此其对细胞内的 CM 和脂蛋白具有较好的亲和力；② 长链脂肪酸经肠吸收后，可在内质网中重新酯化为三酰甘油，然后组装成淋巴脂蛋白可以减少肝脏的首过效应，进一步增强药物的吸收；③ 长链油微乳具有较强的黏附性，可较长时间地与肠道黏膜紧密接触，促进药物的肠吸收。

本研究结果表明，葛根素 *W/O* 型微乳经肠吸收与油相相关，选择合适类型的油相是微乳提高药物肠吸收的影响因素，但不同链长油相促进药物肠吸收的具体吸收转运机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 江爽，韩燕星，蒋建东，等 . 葛根素抗动脉粥样硬化作用及其机制的研究进展 [J]. 药学学报，2021，56（4）：966-971.

[2] 吴秀娟，庞遵霆，杨思彤，等 . 共无定形技术改善葛根素水溶性及增溶机制研究 [J]. 药学学报，2021，56（2）：585-592.

[3] Salawi A. Self-emulsifying drug delivery systems：a novel approach to deliver drugs [J]. Drug Deliv，2022，29（1）：1811-1823.

[4] Gibaud S，Attivi D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications [J]. Expert Opin Drug Deliv，2012，9（8）：937-951.

[5] Tang TT，Hu XB，Liao DH，et al. Mechanisms of microemulsion enhancing the oral bioavailability of puerarin：comparison between oil-in-water and water-in-oil microemulsions using the single-pass intestinal perfusion method and a chylomicron flow blocking approach [J]. Int J Nanomedicine，2013，8：4415-4426.

[6] Avramiotis S，Bekiari VV，Lianos P，et al. Structural and dynamic properties of lecithin-alcohol based *W/O* microemulsions：a luminescence quenching study [J]. J Colloid Interf Sci，1997，194（2）：326-331.

[7] 吴军勇，杨苏芳，杨乐，等 . 不同链长油相对葛根素微乳经淋巴转运吸收的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（15）：1426-1430.

[8] Dahan A，West BT，Amidon GL. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration：evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion（TSPIP）approach in the rat [J]. Eur J Pharm Sci，2009，36（2-3）：320-329.

[9] Xing Q，Song J，You X，et al. Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously [J]. Int J Pharm，2016，511（2）：709-718.

[10] Porter CJ，Charman WN. Intestinal lymphatic drug transport：an update [J]. Adv Drug Deliv Rev，2001，50（1-2）：61-80.

[11] Caliph SM，Charman WN，Porter CJH. Effect of short-，medium-，and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats [J]. J Pharm Sci，2000，89（8）：1073-1084.

[12] Zhang Z，Lu Y，Qi J，et al. An update on oral drug delivery via intestinal lymphatic transport [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B，2021，11（8）：2449-2468.

[13] Holm R，Porter CJ，Müllertz A，et al. Structured triglyceride vehicles for oral delivery of halofantrine：examination of intestinal lymphatic transport and bioavailability in conscious rats [J]. Pharm Res，2002，19（9）：1354-1361.

[14] Imada C，Takahashi T，Kuramoto M，et al. Improvement of oral bioavailability of N-251，a novel antimalarial drug，by increasing lymphatic transport with long-chain fatty acid-based self-nanoemulsifying drug delivery system [J]. Pharm Res，2015，32（8）：2595-2608.

[15] Grove M，Mullertz A，Nielsen JL，et al. Bioavailability of seocalcitol Ⅱ：development and characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems（SMEDDS）for oral administration containing medium and long chain triglycerides [J]. Eur J Pharm Sci，2006，28（3）：233-242.

[16] Holm R. Examination of oral absorption and lymphatic transport of halofantrine in a triple-cannulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery systems（SMEDDS）containing structured triglycerides [J]. Eur J Pharm Sci，2003，20（1）：91-97.

[17] Garg B，Beg S，Kaur R，et al. Long-chain triglycerides-based self-nanoemulsifying oily formulations（SNEOFs）of darunavir with improved lymphatic targeting potential [J]. J Drug Target，2018，26（3）：252-266.

（收稿日期：2022-06-10；修回日期：2022-09-23）

HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱应用于黄芪的质量评价

陈淑娜[1]，冯冰薇[1]，成秋香[1]，杨柳[1, 2]，许舜军[1, 2*]（1. 珠海科技学院，广东 珠海 519041；2.云南金碧制药有限公司，云南 楚雄 675499）

摘要：目的 建立黄芪药材的 HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱，对 24 批不同产地的黄芪药材进行质量评价。**方法** 通过 HPLC 串联指纹图谱检测，并结合相似度计算和主成分分析（PCA）进行研究。**结果** 由黄芪指纹图谱相似度计算可知，黄芪药材相似度范围为 0.822 ～ 0.992（UV 检测器），0.916 ～ 0.995（CAD 检测器）；由 PCA 结果可知，3 个主成分的总累积方差贡献率为 85.953%，主成分综合得分模型为 $F = 0.477f_1 + 0.253f_2 + 0.130f_3$，由此对24批黄芪药材的综合质量进行了排名，从而对其质量进行评价。**结论** 该 HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱方法较全面准确，能反映黄芪药材化学成分分布的总体质量特征，并为黄芪或含黄芪的复方汤剂以及中成药的质控提供参考。

关键词：黄芪；HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱；相似度计算；主成分分析
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0105-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.017

Quality evaluation of *Astragali Radix* based on HPLC-UV-CAD fingerprint

CHEN Shu-na[1], FENG Bing-wei[1], CHENG Qiu-xiang[1], YANG Liu[1, 2], XU Shun-jun[1, 2*] (1. *Zhuhai College of Science and Technology*, *Zhuhai Guangdong* 519041; 2. *Yunnan Jinbi Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Chuxiong Yunnan* 675499)

Abstract: Objective To evaluate the quality of 24 batches of *Astragali Radix* from different origins by establishing the HPLC-UV-CAD fingerprints. **Methods** Combination of similarity analysis and principal component analysis (PCA) was used to study the HPLC-UV-CAD fingerprints. **Results** The similarity of the HPLC-UV-CAD fingerprints was 0.822 ～ 0.992 (UV detector) and 0.916 ～ 0.995 (CAD detector). The PCA showed that the total cumulative variance contribution rate was 85.953%, the principal component comprehensive score model was $F = 0.477f_1 + 0.253f_2 + 0.130f_3$. The comprehensive quality of the 24 batches of *Astragali Radix* was ranked to evaluate their quality. **Conclusion** The HPLC-UV-CAD fingerprints of *Astragali Radix* are comprehensive and accurate, which can reflect the overall characteristics of chemical composition distribution and facilitate the quality control of *Astragali Radix,* traditional Chinese medicine compound decoction and Chinese patent medicine containing *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; HPLC-UV-CAD fingerprint; similarity analysis; principal component analysis

中药指纹图谱技术是评价中药质量优劣和确保中药产品批次稳定性、一致性的有效方法，它可分析中药成分的种类和含量分布信息，从整体上反映中药的化学特征全貌，符合中医中药整体性和模糊性的特点，已成为国际公认的天然药物质控手段[1-3]。某些中药的有效成分如黄芪中的皂苷类成分，其本身结构不存在或存在极弱的紫外吸收，很难反映在以紫外检测手段为主的指纹图谱中。而电喷雾检测器是一种新型的通用型检测器，在 2020 年版《中国药典》四部通则当中，也首次增加了电喷雾检测器 CAD 的内容。相对于同是通用质量型检测器的蒸发光散射检测器来说，CAD 具有灵敏度高，重现性好，线性范围宽等优势[4-5]。经文献检索，黄芪药材尚未有串联紫外检测器和电喷雾检测器建立指纹图谱的报道，本研究作者首次尝试串联紫外和电喷雾检测器，通过梯度洗脱，对比各成

作者简介：陈淑娜，女，助理研究员，主要从事中药质控和质量标准研究，email：Sonia1010@163.com *通信作者：许舜军，男，研究员，主要从事中药质量评价研究，email：sjxu2002@163.com

分在黄芪药材中的分布情况，反映黄芪药材化学成分分布的总体质量特征。本实验通过优化检测方法，提高方法的稳定性及准确性，并结合多元统计分析方法[6-11]，为黄芪的质量评价研究[12-16]提供思路。

1 材料

1.1 试药

对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：111920-201606，纯度：97.6%）、黄芪甲苷（即黄芪皂苷Ⅳ，批号：110781-201717，纯度：96.9%）（中国食品药品检定研究院）；毛蕊异黄酮（批号：M-021-180614）、刺芒柄花素（批号:C-018-181217）、黄芪皂苷Ⅱ（批号：H-037-181216）（成都瑞芬思生物科技有限公司，纯度均＞ 98%）；刺芒柄花苷（批号：M02A11S120167），黄芪皂苷Ⅰ（批号：Y23N10H-104072）、黄芪皂苷Ⅱ（批号：Y22D9H78342）、黄芪皂苷Ⅲ（批号：P22D11F135291）、异黄芪皂苷Ⅰ（批号：P24J10F80493）、异黄芪皂苷Ⅱ（批号：P22D9F78337）（上海源叶生物科技有限公司，纯度均≥ 98%）。乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司），甲酸（色谱纯，天津科密欧公司），水为市售纯净水（屈臣氏），其余试剂均为分析纯。

黄芪药材或饮片由云南金碧制药有限公司提供并鉴定，来源于内蒙古、甘肃等产地，各样品编号和来源见表 1。

表 1 样品来源

Tab 1 Information of samples

样品编号	产地	来源	样品编号	产地	来源
1	内蒙古	市售饮片	13	内蒙古	市售饮片
2	甘肃	市售饮片	14	内蒙古	市售饮片
3	内蒙古	原药材	15	内蒙古	市售饮片
4	甘肃岷县	市售饮片	16	内蒙古	市售饮片
5	甘肃岷县	市售饮片	17	内蒙古	市售饮片
6	甘肃陇西	市售饮片	18	内蒙古	市售饮片
7	内蒙古	市售饮片	19	内蒙古	市售饮片
8	内蒙古	市售饮片	20	内蒙古	市售饮片
9	贵州	原药材	21	内蒙古	市售饮片
10	内蒙古	原药材	22	甘肃	市售饮片
11	山西	原药材	23	内蒙古	原药材
12	甘肃	原药材	24	内蒙古	原药材

1.2 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱仪（配有 DGP-3600SDN 双三元梯度泵；WPS-3000 自动进样器；TCC-3100 柱温箱；VWD-3100 紫外检测器；Corona Veo 电喷雾检测器；Chromeleon 7.2 色谱工作站）（美国赛默飞世尔公司）；Corona1010 氮气发生器（英国毕克公司）；CPA225D 电子天平（精度：0.01 mg，德国赛多利斯公司）；HWS-26 电热恒温水浴锅（上海一恒公司）；TDL-320 离心机（山东百欧公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 柱（150 mm×2.1 mm，5 μm）；以 0.1% 甲酸 - 乙腈为流动相 A，0.1% 甲酸为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 30 min，10% ～ 32%A；30 ～ 40 min，32%A；40 ～ 65 min，32% ～ 80%A；65 ～ 85 min，80% ～ 90%A）；UV 检测器：检测波长为 203 nm；CAD 检测器：雾化器温度为 50 ℃，雾化压力为 62.8 psi；柱温 40 ℃；流速 0.4 mL·min^{-1}；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 混合黄酮类对照品溶液 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、刺芒柄花素对照品适量于量瓶中，加 80% 甲醇制成每 1 mL 含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 526.5 μg、毛蕊异黄酮 531 μg、刺芒柄花苷 526.5 μg 和刺芒柄花素 503.5 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 混合皂苷类对照品溶液 取黄芪甲苷，黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ，异黄芪皂苷Ⅰ、Ⅱ对照品适量于量瓶中，加甲醇制成每 1 mL 含黄芪甲苷 725.3 μg、黄芪皂苷Ⅰ 850 μg、黄芪皂苷Ⅱ 468 μg、黄芪皂苷Ⅲ 295.6 μg、异黄芪皂苷Ⅰ 239 μg 和异黄芪皂苷Ⅱ 242.5 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取黄芪药材（过四号筛）约 1 g 于圆底烧瓶中，精密称定，精密加入 80% 甲醇 50 mL，称重，加热回流 1 h，用 80% 甲醇补足减失重量，转移至离心管中，3500 r·min^{-1} 离心 5 min，圆底烧瓶与离心管药渣用甲醇 20 mL 淋洗，收集离心后上清液和淋洗液，蒸至近干，残渣加 80% 甲醇溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取对照品溶液，连续进样 6 次，各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*（UV 检测器、CAD 检测器）均＜ 3%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 取同一批供试品 6 份，精密称定，按“2.3”项下方法制备并测定，各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*（UV 检测器）均＜ 3%，*RSD*（CAD 检测器）均＜ 5%，符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一批次的供试品溶液，分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样，测得各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*（UV 检测器、CAD 检测器）均＜ 3%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.4　加样回收试验　取已知含量的同一批黄芪药材粉末 6 份，精密称定，精密加入配好的混合对照品溶液，按“2.3”项下方法制备，并按“2.1”项下色谱条件进行 HPLC-CAD 测定，每份样品进样 3 次。经计算得 10 个成分平均回收率均在 95% ～ 105%，*RSD*（CAD 检测器）均＜ 5%。

2.5　样品含量测定结果

将 24 批不同产地的黄芪药材，分别按“2.3”项下方法制备并进行 HPLC-CAD 测定，结果见表 2。由含量结果可知，黄酮类成分中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量较多，其含量范围在 0.176 ～ 1.654 mg・g^{-1}；皂苷类成分中黄芪皂苷Ⅰ成分较多，其含量范围在 0.896 ～ 2.860 mg・g^{-1}。

表 2　黄芪黄酮类成分及皂苷类成分含量 (mg・g^{-1})

Tab 2　Content of flavonoids and saponins in *Astragali Radix* (mg・g^{-1})

No.	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	刺芒柄花苷	毛蕊异黄酮	刺芒柄花素	黄芪皂苷Ⅳ	黄芪皂苷Ⅱ	黄芪皂苷Ⅲ	异黄芪皂苷Ⅱ	黄芪皂苷Ⅰ	异黄芪皂苷Ⅰ
1	0.862	0.278	0.595	0.376	0.100	0.698	0.098	0.156	1.195	0.235
2	0.798	0.319	0.475	0.285	0.183	1.336	0.207	0.277	2.483	0.316
3	1.166	0.512	0.263	0.327	0.078	0.755	0.155	0.243	1.592	0.272
4	1.174	0.484	0.263	0.210	0.065	0.861	0.141	0.153	1.738	0.255
5	0.307	0.356	0.346	0.379	—	0.471	—	0.154	0.955	0.185
6	0.570	0.219	0.648	0.516	0.173	0.951	0.165	0.190	1.741	0.330
7	1.259	0.639	0.276	0.226	0.077	0.533	0.101	0.129	1.163	0.169
8	1.102	0.564	0.230	0.145	0.060	0.451	0.088	0.187	1.055	0.128
9	1.654	0.716	0.744	0.287	0.163	0.422	0.117	0.402	2.222	0.128
10	0.769	0.280	0.446	0.255	0.145	0.947	0.189	0.236	1.862	0.243
11	1.335	0.581	0.122	0.176	0.056	0.474	0.122	0.099	1.367	0.176
12	0.940	0.510	0.343	0.299	0.108	0.869	0.164	0.212	2.437	0.161
13	1.178	0.558	0.253	0.149	0.201	1.273	0.224	0.187	2.405	0.264
14	1.175	0.523	0.389	0.169	0.211	1.342	0.238	0.269	2.593	0.327
15	1.107	0.478	0.347	0.178	0.219	0.812	0.222	0.300	2.860	0.277
16	0.552	0.592	0.340	0.160	0.159	1.427	0.172	0.242	2.702	0.336
17	1.261	0.435	0.353	0.180	0.253	1.402	0.192	0.255	2.603	0.264
18	1.254	0.532	0.324	0.123	0.232	1.338	0.236	0.266	2.397	0.287
19	0.807	0.350	0.150	0.127	0.086	0.705	0.130	0.143	1.515	0.226
20	0.891	0.428	0.230	0.232	0.073	0.522	0.081	0.131	1.155	0.144
21	1.018	0.452	0.581	0.443	0.062	0.385	0.083	0.172	0.896	0.148
22	1.134	0.530	0.195	0.093	0.175	1.250	0.175	0.339	2.015	0.356
23	0.907	0.545	0.509	0.483	0.121	1.040	0.108	0.269	1.674	0.270
24	0.176	—	0.607	0.359	0.075	0.708	0.194	0.203	1.672	0.294

注：“—”为该批次黄芪样品无此成分或此成分含量低于检测限度。

Note：“—” means that the sample does not contain this chemical composition or the content is below the detection limit.

2.6　指纹图谱的建立

2.6.1　指纹图谱的制备　分别精密吸取黄芪供试品溶液各 10 μL，进样测定，记录其 HPLC-UV-CAD 色谱图，黄芪 HPLC 色谱图和 24 批黄芪药材样品 HPLC 指纹图谱见图 1 ～ 2。

2.6.2　峰的归属　取混合对照品溶液 10 μL，注入 HPLC 仪，进样测定，对比各吸收峰的相对保留时间可知，指纹图谱中 1 ～ 10 号峰分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、黄芪皂苷Ⅳ、黄芪皂苷Ⅲ、黄芪皂苷Ⅱ、异黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ和异黄芪皂苷Ⅰ。

2.7　相似度计算

本研究通过将 24 批黄芪药材液相指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版（国家药典委员会）软件，根据中位数 Mark 峰匹配，计算出相似度结果（UV）为：0.822 ～ 0.992；相似度结果（CAD）为：0.916 ～ 0.995，具体见表 3。

2.8　主成分分析

利用 SPSS 26.0 软件将原始变量，即用 CAD 检测器测定的 10 个黄芪成分，通过提取特征值大于 1 的因子作为主成分，并用最大方差法进行因子旋转，将 24 批黄芪经标准化处理后的 10 个原始变量（X_1 ～ X_{10}）降维成 3 个主成分：f_1，f_2 和 f_3，它们的总累积方差贡献率为 85.953%，总累积方差贡献率越高，说明这 3 个因子对总体的解释度越高，具体特征值和贡献率见表 4。根据因子载荷分布可知，f_1 与黄芪中的皂苷成分显著相关，而 f_2 主要反映了黄酮苷的含量情况，f_3 反映的是黄酮苷元的含量情况，其因子载荷矩阵见表 5。根据主成分载荷与因子载荷和特征值的关系，可算得如下主成分的表达式：

主成分 $f_1 = 0.424X_1 + 0.422X_2 + 0.415X_3 + 0.410X_4 + 0.371X_5 + 0.355X_6 + 0.181X_7 -$

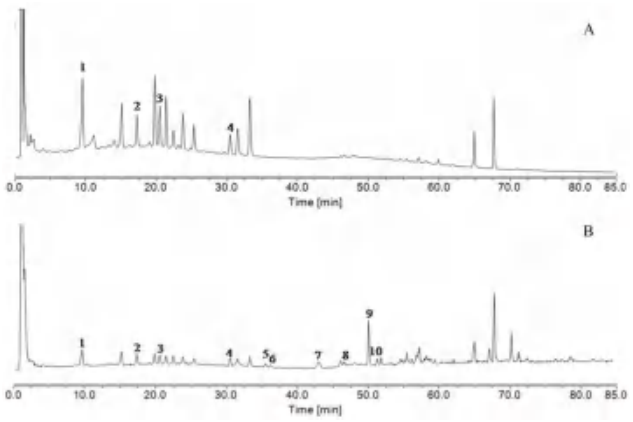


图 1 黄芪的 HPLC-UV（A）及 HPLC-CAD（B）色谱图

Fig 1 HPLC-UV（A）and HPLC-CAD（B）chromatogram of *Astragali Radix*

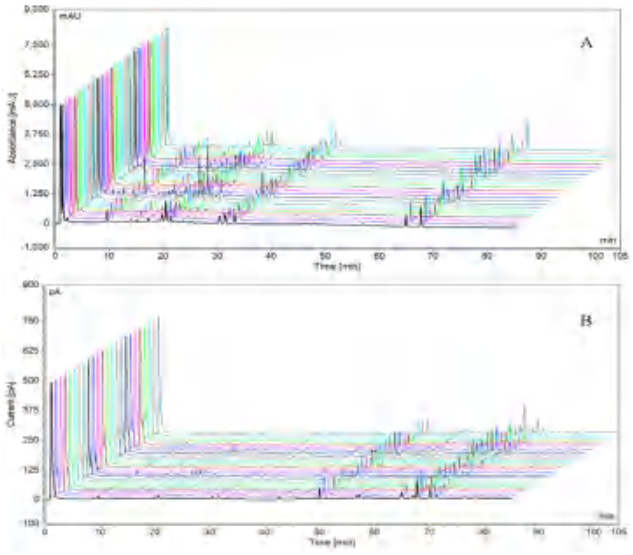


图 2 24 批黄芪药材样品的 HPLC-UV（A）及 HPLC-CAD（B）色谱图

Fig 2 HPLC-UV（A）and HPLC-CAD（B）fingerprints chromatogram of 24 batches of *Astragali Radix* samples

表 3 相似度结果

Tab 3 Similarity analysis

样品编号	相似度（UV）	相似度（CAD）	样品编号	相似度（UV）	相似度（CAD）
1	0.965	0.972	13	0.968	0.990
2	0.981	0.989	14	0.982	0.993
3	0.954	0.977	15	0.985	0.975
4	0.991	0.979	16	0.966	0.985
5	0.986	0.961	17	0.987	0.995
6	0.930	0.973	18	0.975	0.992
7	0.982	0.984	19	0.970	0.993
8	0.927	0.981	20	0.973	0.983
9	0.944	0.950	21	0.992	0.964
10	0.976	0.985	22	0.907	0.937
11	0.925	0.916	23	0.949	0.972
12	0.946	0.934	24	0.822	0.952

$0.016X_8 + 0.034X_9 - 0.135X_{10}$；

主成分 $f_2 = 0.008X_1 - 0.056X_2 - 0.029X_3 + 0.190X_4 + 0.092X_5 - 0.298X_6 + 0.585X_7 + 0.552X_8 - 0.069X_9 - 0.222X_{10}$；

主成分 $f_3 = -0.159X_1 - 0.127X_2 - 0.142X_3 + 0.085X_4 + 0.177X_5 - 0.117X_6 - 0.122X_7 - 0.217X_8 + 0.841X_9 + 0.701X_{10}$。

表 4 特征值和贡献率

Tab 4 Eigen value and contribution

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
f_1	4.767	47.670	47.670
f_2	2.527	25.266	72.936
f_3	1.302	13.017	85.953

表 5 旋转后因子载荷矩阵

Tab 5 Load matrix after rotation transform

因子	f_1	f_2	f_3
黄芪皂苷Ⅰ	0.926	0.013	−0.181
黄芪皂苷Ⅱ	0.922	−0.089	−0.145
黄芪皂苷Ⅲ	0.906	−0.046	−0.162
黄芪皂苷Ⅳ	0.895	0.302	0.097
异黄芪皂苷Ⅱ	0.811	0.146	0.202
异黄芪皂苷Ⅰ	0.776	−0.473	−0.134
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.075	0.930	−0.139
刺芒柄花苷	−0.036	0.878	−0.248
毛蕊异黄酮	0.075	−0.110	0.960
刺芒柄花素	−0.294	−0.353	0.800

以各主成分的方差贡献率为权数进行线性组合，可得到主成分综合得分模型 $F = 0.477f_1 + 0.253f_2 + 0.130f_3$，综合得分的高低反映了不同黄芪药材的质量情况，主成分得分、综合得分及排名见表 6，为评价黄芪药材的质量提供了量化依据。

3 讨论

本实验考察了乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 甲酸水、乙腈 -0.1% 磷酸水、含 0.1% 甲酸乙腈 -0.1% 甲酸水在黄芪供试品梯度洗脱时的效果，结果表明在水相加酸能明显促进部分成分的洗脱，而磷酸虽在紫外末端吸收能保持较平直的基线，但考虑到要串联电喷雾检测器，不适合添加不挥发的无机酸，最终选择含 0.1% 甲酸乙腈 -0.1% 甲酸水，它能满足在梯度洗脱的条件下，各目标成分的分离效果较好，在紫外末端吸收条件下，基线不发生大幅度的漂移。同时，还考察了黄芪供试品在 30、35、40 ℃柱温下的影响，结果表明，随着温度升高，洗脱加快，分离度提高，40 ℃时能满足目标成分的分离要求。

经过与化学对照品比对，指认并鉴定出其中的 4 个黄酮类成分：毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、刺芒柄花素；指认并鉴定出其中的 6 个皂苷类成分：黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅰ、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅲ、异黄芪皂苷Ⅰ、异黄芪皂苷Ⅱ。《中国药典》以毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷作为质量指标成分对黄芪药材进行含量质控，其中，黄芪甲苷中的大部分是由黄芪中能被碱化脱乙酰基的其他皂苷成分转化而来的，以此增加被检

表 6 主成分分析结果

Tab 6 Principal component analysis

样品编号	f_1	f_2	f_3	F	排名	样品编号	f_1	f_2	f_3	F	排名
1	8.29	1.55	2.49	4.67	19	13	14.11	3.29	－2.05	7.30	5
2	14.37	1.57	－0.07	7.24	6	14	15.19	3.04	－1.46	7.82	2
3	10.20	2.82	0.02	5.58	14	15	14.48	3.14	－1.28	7.53	4
4	10.51	2.87	－0.83	5.63	13	16	14.63	1.72	－1.64	7.20	7
5	5.50	0.49	2.11	3.02	24	17	15.13	3.23	－1.44	7.85	1
6	11.01	0.41	2.70	5.71	12	18	14.76	3.43	－1.78	7.68	3
7	7.70	3.67	0.09	4.61	20	19	9.29	2.11	－1.07	4.83	16
8	7.08	3.48	－0.04	4.25	21	20	7.25	2.52	0.32	4.14	22
9	8.12	4.91	2.53	5.44	15	21	6.16	2.45	3.18	3.97	23
10	11.53	1.64	0.51	5.98	10	22	13.61	3.09	－2.00	7.01	8
11	8.11	3.76	－1.10	4.68	18	23	10.92	2.09	1.74	5.96	11
12	12.18	2.68	－0.43	6.43	9	24	9.74	－0.90	2.43	4.73	17

出的黄芪甲苷的含量[17-18]。从 6 个皂苷类成分的测定结果可以看出，黄芪甲苷（黄芪皂苷Ⅳ）含量较少，但本实验的制备方法无需碱化即可检定，能反映出黄芪原药材化学成分的真实组成和含量。

从不同产地黄芪的相似度结果来看，紫外检测器与电喷雾检测器的相似度评价结果不尽相同，UV 指纹图谱中，有一批黄芪样品（No.24）的相似度低于 0.900，而 CAD 指纹图谱中，所有黄芪样品的相似度都在 0.900 以上；黄芪样品在两种检测器中的相似度没有明显规律。因为皂苷类成分表现为弱紫外吸收，在常用的紫外检测器中很难有检测峰响应，即使将供试品浓度尽可能浓缩，由于含量甚少，也难见理想的效果，反而会导致强紫外吸收的成分超载，影响图谱质量。而强紫外吸收的诸如黄酮类的成分，在紫外检测器下检测灵敏，有利于节省对照品等试药，降低检测成本。由此可见，不同类型的检测器聚焦药材不同化学层面的成分面貌，只用单一检测器或许在中药材的质量研究中只能得到较为片面的结果。串联不同的检测器，在研究中针对不同化学成分进行综合比较，有利于分析药材不同维度的质量特征，进一步提升中药质量评价研究。

本实验通过对 24 批不同产地的黄芪进行检测，建立了 HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱，指认并测定了黄芪药材中的 10 个化学成分，结合相似度分析和主成分分析对黄芪药材的内在质量进行综合评价，为黄芪质量评价研究提供了参考。

参考文献

[1] 刘东方，赵丽娜，李银峰，等 . 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药，2016，47（22）：4085-4094.

[2] 李强，杜思邈，张忠亮，等 . 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药，2013，44（22）：3095-3104.

[3] 徐妍，杨华蕊，杨永寿，等 . 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（76）：91-94.

[4] 刘兴国，李丽红，李仁勇，等 . 新型电喷雾式检测器 CAD 与蒸发光散射检测器 ELSD 用于分析黄芪甲苷的对比研究 [A]// 第十一届全国青年药学工作者最新科研成果交流会论文集 [C]. 中国药学会，2012：7.

[5] 南易，郑伟，马凤霞，等 . HPLC-CAD 同时测定知母中芒果苷和知母皂苷 BⅡ的含量 [J]. 药物分析杂志，2021，41（1）：111-116.

[6] 张艳欣，吴佩颖，王丹丹 . 中药指纹图谱中常用的数理统计方法 [J]. 上海医药，2019，40（9）：74-77.

[7] 刘娜，李军，李宝国 . 多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考 [J]. 中国中药杂志，2014，39（21）：4268-4271.

[8] 李宗民，朱浩东，于丹，等 . 基于多元统计学分析葛根指纹图谱研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2020，22（11）：50-53.

[9] 王越欣，苗雨露，王梅，等 . 青翘和老翘的 HPLC 指纹图谱比较及聚类分析、主成分分析 [J]. 中国药房，2021，32（6）：663-668.

[10] 赵凯，闫立文，赵子楠 . 基于 HPLC 指纹图谱、主成分分析和聚类分析的炒桑白皮质量研究 [J]. 现代中药研究与实践，2020，34（3）：33-37.

[11] 项锋，叶继锋，侯齐书 . 基于 PCA 和 PLS-DA 算法的不同生长阶段贯叶金丝桃药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2020，40（3）：568-576.

[12] 孙国祥，闫波，侯志飞，等 . 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（7）：673-681.

[13] 汪海斌，石岩，李芳，等 . 中药黄芪指纹图谱的研究进展 [J]. 中国药房，2017，28（33）：4749-4752.

[14] 杨慧洁，付娟，张海弢，等 . 黄芪药材质量评价研究现状 [J]. 药物分析杂志，2014，34（4）：570-576.

[15] 钟荣荣，李默影，肖苏萍，等 . 不同产地黄芪药材和饮片的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱分析 [J]. 中国现代中药，2021，23（4）：632-637.

[16] 张倩，杨怀瑾，周悦，等 . 基于传统煎药工艺的黄芪药材 HPLC 指纹图谱及化学计量学质量评价研究 [J]. 中草药，2021，52（4）：1128-1134.

[17] 覃红萍，桑彤，黄红泓 . 不同碱化处理方法对黄芪中四种皂苷类成分含量影响的研究 [J]. 中国卫生检验杂志，2012，22（10）：2310-2313.

[18] 陈超，吴惠勤，黄晓兰，等 . 黄芪药材提取纯化过程中黄芪皂苷Ⅳ含量变化及相关成分分析 [J]. 分析测试学报，2020，39（12）：1487-1493.

（收稿日期：2022-06-14；修回日期：2022-08-19）

桔梗多糖对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究

宋婧[1]，郝梦奇[1]，翟晓虎[1]，陈娟[1, 2, 3*]，桂双英[1, 2, 3]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 安徽省药物制剂技术与应用重点实验室，合肥 230012；3. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥 230012）

摘要：目的 探讨桔梗多糖对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其调控机制。**方法** C57BL/6 小鼠预先给予桔梗多糖（200、400 mg•kg^{-1}）共 21 d，腹腔注射 0.5% CCl_4（10 mg•kg^{-1}）诱发急性肝损伤模型。生化试剂盒测定血清中谷草转氨酶（AST）和谷丙转氨酶（ALT）活力，肝组织中的丙二醛（MDA）和超氧化物歧化酶（SOD）水平；HE 染色法评价肝脏病理组织学情况；免疫组化法（IHC）检测肝脏中内质网应激（ERS）标志性蛋白葡萄糖调节蛋白 78（GRP78）的表达；酶联免疫吸附（ELISA）法测定各组小鼠肝组织中的肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素 -6（IL-6）和白细胞介素 1β（IL-1β）的含量；Western blot 法检测肝组织中蛋白激酶 RNA 样内质网激酶（PERK）、人转录激活因子 5（ATF5）、硫氧还蛋白互作蛋白（TXNIP）和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）的表达情况。**结果** 桔梗多糖可改善 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠的肝细胞多发坏死，大量炎性细胞浸润，细胞边界模糊不清现象；有效改善血清转氨酶的异常情况；显著提高 SOD 活力（$P < 0.01$），显著降低 MDA 水平（$P < 0.01$）；桔梗多糖高剂量组（400 mg • kg^{-1}）显著抑制肝组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）；桔梗多糖干预后小鼠肝组织中 ERS 相关蛋白 GRP78 表达水平显著降低（$P < 0.01$），其高剂量组（400 mg • kg^{-1}）相关 PERK、ATF5、TXNIP 和 NLRP3 的表达得到有效抑制（$P < 0.01$）。**结论** 桔梗多糖预处理可明显保护 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤，改善炎性损伤和 ERS，这种保护作用可能与调控 PERK/TXNIP/NLRP3 通路有关。

关键词： 桔梗多糖；急性肝损伤；炎症反应；内质网应激

中图分类号： R285.5 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2023)01-0110-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.018

Protective effect of polysaccharides from *Platycodon grandiflorum* on CCl_4-induced acute liver injury in mice and its regulatory mechanism

SONG Jing[1], HAO Meng-qi[1], ZHAI Xiao-hu[1], CHEN Juan[1, 2, 3*], GUI Shuang-ying[1, 2, 3] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application*, *Hefei* 230012; 3. *MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the protective effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide on CCl_4-induced acute liver injury in mice and its regulatory mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were given *Platycodon grandiflorum* polysaccharides (200, 400 mg • kg^{-1}) for 21 days. The acute liver injury in mice was created by intraperitoneal injection of 0.5% CCl_4 (10 mg • kg^{-1}). The levels of AST, ALT in the serum, SOD and MDA in the liver tissue were measured via biochemical kits. The pathological condition of liver tissue was evaluated by HE staining. The expression of ERS marker protein GRP78 was detected by immunohistochemistry. The levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in the liver tissue was detected by ELISA. The expression levels of PERK, ATF5, TXNIP, and NLRP3

基金项目： 安徽省自然科学基金青年项目（No.2208085QC98）；安徽省教育厅自然科学类重点项目（No.KJ2020A0389）。

作者简介： 宋婧，女，硕士研究生，主要从事中药多糖活性研究，email：jingsong772022@163.com *通信作者：陈娟，女，副教授，主要从事中药多糖的活性与结构研究，email：ichenjuan319@163.com

were measured by Western blot. **Results** Compared with the model group, *Platycodon grandiflorum* polysaccharide ameliorated the multiple necrosis of hepatocytes in mice with CCl_4-induced liver injury, infiltration of many inflammatory cells, and blurred cell boundaries. The abnormality of serum transaminase was effectively improved. The activity of SOD was obviously increased ($P < 0.01$), and the level of MDA was significantly decreased ($P < 0.01$). In the high-dose group of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide (400 mg • kg $^{-1}$), the levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in the tissues of mice were effectively down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). After *Platycodon grandiflorum* polysaccharide treatment, the expression level of ERS-related protein GRP78 was significantly decreased in the liver tissue ($P < 0.01$). The protein expression of PERK and its downstream signaling pathway PERK, ATF5, TXNIP, and NLRP3 were effectively controlled in high dose group (400 mg • kg $^{-1}$) ($P < 0.01$). **Conclusion** *Platycodon grandiflorum* polysaccharide can protect against CCl_4-induced acute liver injury in mice and the regulation on inflammatory injury and ERS, which may be related to the regulation of PERK/TXNIP/NLRP3 pathway.

Key words: *Platycodon grandiflorum* polysaccharide; acute liver injury; inflammation; endoplasmic reticulum stress

外源性物质如酒精、药物、有毒化学物质等危险因素可诱发化学性肝损伤，是肝硬化和肝癌发生发展的始动环节，早期干预和有效修复对慢性肝病的防治具有积极意义。有研究表明，内质网应激（ERS）级联炎症反应是化学性肝损伤的重要病理机制[1]。ERS 本身是一种内源性保护机制，与氧化应激等多条信号途径偶联，调控下游信号分子介导生理病理活动。适度的 ERS 可以保护细胞功能，而持续的 ERS 可诱导细胞发生病理性损伤。基于内质网稳态调控效应的干预方式或将成为有效防治化学性肝损伤的新思路。

大量研究表明，中药多糖对化学性肝损伤具有良好的防治和改善作用，如茯苓多糖[2]、灵芝多糖[3]和石斛多糖[4]等。多糖是一种天然的生物大分子，具有广泛的药理活性，如抗肿瘤[5]、免疫调节[6]、抗氧化[7]和抗炎作用[8]等，在多种慢性疾病的预防和治疗中发挥重要作用。桔梗是桔梗科植物 *Platycodon grandiflorum* 的干燥根，为安徽省道地药材之一。多糖是其主要活性成分之一，具有显著的免疫调节[9]和抗氧化[10]作用。已有研究表明桔梗多糖对 CCl_4 诱导的肝损伤具有较好的保护作用，但其具体作用机制尚不明确[11]。本研究将基于与肝损伤相关的 ERS 效应器及其下游信号转导，通过 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤模型进行药效学评价和分子调控机制研究，旨在阐明桔梗多糖保护化学诱导肝损伤的作用，为桔梗的开发利用提供参考依据。

1 材料

1.1 动物

C57BL/6 小鼠，雄性，SPF 级，6 周龄，体质量（18±2）g，由安徽中医药大学实验动物中心提供，许可证号为 SCXK（浙）2019-0004，在安徽中医药大学动物房饲养，标准饲料喂养，自由饮水，取材前 12 h 禁食不禁水。动物实验经安徽中医药大学伦理委员会批准（编号：AHUCM-mouse-2022062）。

1.2 试药

桔梗（批号：200401，产自安徽，购自合肥曼迪新药业有限责任公司，经安徽中医药大学谢冬梅教授鉴定为桔梗的干燥根）。水飞蓟素胶囊（MADAUS GMBH，批号：B2001370）；CCl_4（批号：C12227796，上海麦克林生化科技有限公司）；桔梗多糖（实验室自制，多糖含量 92%）；谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、肝组织中的丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒（南京建成生物工程研究所）；肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素 -6（IL-6）、白细胞介素 1β（IL-1β）试剂盒（北京冬歌博业生物科技有限公司）；苏木素 - 伊红（HE）染液、GRP78（武汉塞维尔科技有限公司）；肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素 -6（IL-6）、白细胞介素 1β（IL-1β）和 β- 肌动蛋白（β-actin）（ZENBIO，批号分别为：R23549、382206、381207 和 R23613）。

1.3 仪器

YRE2000B 旋转蒸发仪（浙江予华仪器有限责任公司）；C Max plus 酶标仪（美国 Molecular Devices）；Alpha 1-4 LSC plus 冷冻干燥机（北京博劢行仪器有限公司）；病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；E100 显微镜（日本 Nikon）；KE0003087/KA0056573 移液枪（Dragon）；mini protean 3 cell 垂直电泳仪

（BIO-RAD）；研磨仪（上海净信，JXFSTPRP）。

2　方法

2.1　桔梗多糖的制备

取桔梗饮片粉碎至颗粒状后获得桔梗颗粒，经过脱脂，水提，获得桔梗多糖水提物。向桔梗多糖水提物中加入 95% 乙醇使醇浓度至 80%，4 ℃静置过夜后进行离心，除去上层溶液获得桔梗多糖 - 蛋白混合物[12]；利用 Sevag 法除蛋白，将水相溶液进行冷冻干燥 48 h，获得桔梗粗多糖；配制 10 mg • mL^{-1} 的桔梗粗多糖溶液，并缓慢滴加于 DEAE-52 纤维素柱填料表面，使其充分贴合填料后，开始以 2 倍柱体积的蒸馏水来洗脱；将所收集的所有糖溶液混合后浓缩并冷冻干燥，获得桔梗多糖。采用苯酚 - 浓硫酸法测定糖含量，得桔梗总多糖质量分数为 92%。

2.2　实验动物分组造模及给药

C57BL/6 小鼠适应性饲养 7 d 后，随机分成 5 组，分别为正常组，模型组，水飞蓟素组（100 mg • kg^{-1}），桔梗多糖低、高剂量组（200、400 mg • kg^{-1}），每组 5 只。连续给药 21 d，正常组和模型组小鼠灌胃等体积的生理盐水溶液。末次给药 12 h 后，正常组腹腔注射橄榄油（10 mg • kg^{-1}），其他各组腹腔注射 0.5% CCl_4（10 mg • kg^{-1}）进行造模。造模完成后 16 h 禁食不禁水，小鼠经戊巴比妥钠麻醉后摘眼球取血，3000 r • min^{-1} 离心 10 min 分离血清，摘取小鼠肝脏，置于－ 80 ℃保存。

2.3　生化指标的测定

严格按照试剂盒说明书，用酶标仪测定血清中的 AST、ALT 及肝组织中的 SOD、MDA 含量。

2.4　酶联免疫分析

将小鼠肝组织和生理盐水（1∶9）用组织匀浆器进行研磨，严格按照试剂盒说明书测定组织匀浆中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。

2.5　HE 染色观察肝脏组织病理变化

取新鲜肝组织，用生理盐水洗去表面血液，剪取小块置于 4% 多聚甲醛中固定，脱水后石蜡包埋，切成 4 ～ 5 μm 的薄片，然后将切片入苏木素染液中染 3 ～ 5 min，入伊红染液中染色 5 min。最后显微镜镜检，图像采集分析。

2.6　免疫组化（IHC）分析

取肝组织石蜡切成厚度为 5 μm 的切片进行脱蜡处理，严格按照免疫组化试剂盒说明书检测 GRP78 的表达。利用苏木素对细胞核进行复染，最后采用梯度乙醇进行脱水封片，显微镜镜检，采用 Image-Pro plus 图像采集分析。

2.7　蛋白免疫印迹法（Western blot）分析

通过 Western blot 分析肝组织中的 PERK、ATF5、TXNIP 和 NLRP3 的蛋白表达。在肝匀浆中加入 10 倍体积的裂解缓冲液。置于冰上充分分解 30 min，以 12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，即为总蛋白溶液。一部分使用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。另一部分以 4∶1 的体积比加入 5× 还原性蛋白上样缓冲液，沸水浴 15 min，－ 20 ℃保存备用。根据调节好的各组体积上样，通过电泳在 SDS-PAGE 胶中装载和分离，并通过电印迹转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。然后用脱脂牛奶室温下封闭 30 min，并与一抗在 4 ℃孵育过夜，然后回收一抗，然后与相应的辣根过氧化物酶偶联的二级抗体孵育。配制 ECL 发光液，根据用量，取 ECL 发光液 A 和 B 等量混匀，加在膜的正面暗室避光 5 min。倒掉显色液，用纸小心吸取显色液，在上面盖上一层平整的透明纸。将其放入成像系统中进行扫描。使用 Image Pro plus 软件读取灰度值。

2.8　数据统计学分析

本研究的所有数据均以均数 ± 标准差（mean±SD）表示。数据统计分析采用 SPSS 20.0 统计软件包进行单因素方差分析。组间比较采用 t 检验方法，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　桔梗多糖对肝组织病理学的影响

如图 1 所示，正常组的肝组织病理切片显示，肝小叶细胞排列有序，大小均匀，细胞核清晰，结构形态正常。而模型组的小鼠肝细胞多发坏死，存在大量炎性细胞浸润，细胞边界模糊不清。予桔梗多糖干预后，炎性浸润减少，细胞边界清晰明显，结构形态有明显改善。结果表明，桔梗多糖（400 mg • kg^{-1}）预处理具有保护 CCl_4 诱导的肝组织病理损伤的作用。

3.2　桔梗多糖改善 CCl_4 诱导的血清中 AST、ALT 异常

如图 2 所示，与正常组相比，模型组小鼠的血清中 AST、ALT 水平显著提高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。桔梗多糖（400 mg • kg^{-1}）干预后，小鼠血清中 AST、ALT 含量得到有效下调（$P < 0.01$，$P < 0.001$），提示桔梗多糖可改善 CCl_4 诱导的小鼠血清转氨酶异常情况。

3.3　桔梗多糖抑制 CCl_4 诱导的氧化应激

如图 3 所示，与正常组相比，模型小鼠肝组织中 SOD 的活力明显下降（$P < 0.001$），MDA 含量显著升高（$P < 0.001$）。与模型组相比，水飞蓟素组小鼠的肝脏中 SOD 活力显著提高（$P < 0.001$），MDA 指标的下调作用不显著。桔梗多糖处理后小鼠肝脏内 T-SOD 活力的抑制情况得到有效改善（$P < 0.01$，$P < 0.001$），MDA 水平有效下调

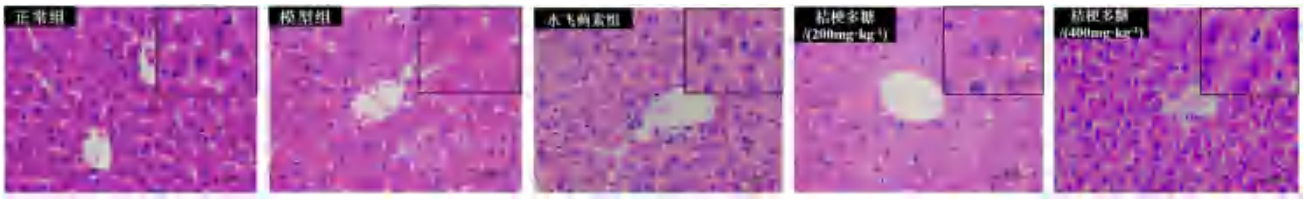


图 1　桔梗多糖对肝损伤小鼠肝脏组织病理变化的影响（×400）

Fig 1　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides on the histopathological changes of liver tissue in mice with acute liver injury（×400）

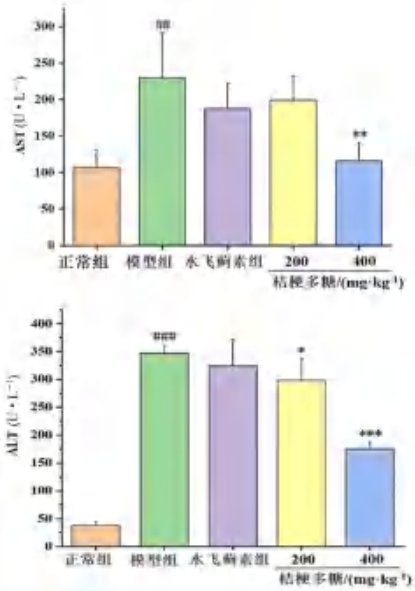


图 2　桔梗多糖对血清中 AST 和 ALT 的水平的影响（n = 5）

Fig 2　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides on the serum levels of AST and ALT（n = 5）

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

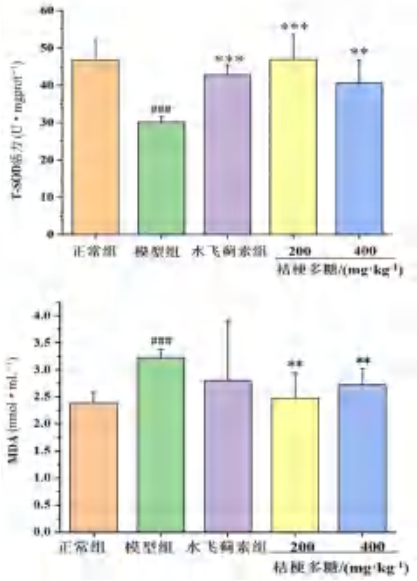


图 3　桔梗多糖对肝脏 T-SOD 和 MDA 的水平的影响（n = 5）

Fig 3　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides on hepatic levels of T-SOD and MDA（n = 5）

注：与正常组相比，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

（$P < 0.01$）。表明桔梗多糖对 CCl_4 诱导的肝脏氧化应激具有抑制作用。

3.4　桔梗多糖减轻 CCl_4 诱导的炎症反应

结果如图 4 所示，与正常组相比，模型小鼠的肝组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平均显著升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）；水飞蓟素干预可有效下调肝组织中上述炎症因子的阳性表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）。桔梗多糖（400 mg • kg^{-1}）对 TNF-α（$P < 0.05$）、IL-6（$P < 0.01$）和 IL-1β（$P < 0.001$）水平均有抑制作用，其中 IL-1β 的下调效果最为显著。IL-1β 作为一种重要的促炎因子，是炎症反应加剧的关键因素，并与肝损伤成正相关，推测桔梗多糖对 CCl_4 诱导的肝脏炎性损伤的改善作用可能与 IL-1β 的显著下调相关。

3.5　桔梗多糖对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠肝组织 GRP78 蛋白表达水平的影响

结果如图 5 所示，与正常组相比，模型小鼠肝脏中 ERS 标志因子 GRP78 蛋白阳性表达显著升高（$P < 0.001$）。水飞蓟素对肝脏中 GRP78 蛋白表达具有抑制作用（$P < 0.01$）。桔梗多糖（400 mg•kg^{-1}）能够显著下调 GRP78 蛋白表达（$P < 0.01$）。以上结果提示，桔梗多糖可能通过调控 ERS 级联炎性反应保护化学性肝损伤。

3.6　桔梗多糖对 PERK、ATF5、TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达的影响

如图 6 所示，与正常组相比，模型小鼠肝组织中 PERK、ATF5、TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达水平显著提高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。桔梗多糖可逆转上述蛋白的异常表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。PERK 是恢复内质网平衡的关键蛋白，可介导 ATF5 活化 TXNIP 和 NLRP3 诱导 IL-1β 表达，推测桔梗多糖保护 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的活性可能与调控 PERK/TXNIP/NLRP3 通路有关。

4　讨论

化学性肝损伤是导致肝功能衰竭的关键因素，病理机制复杂，转氨酶指标异常和强烈的氧化应

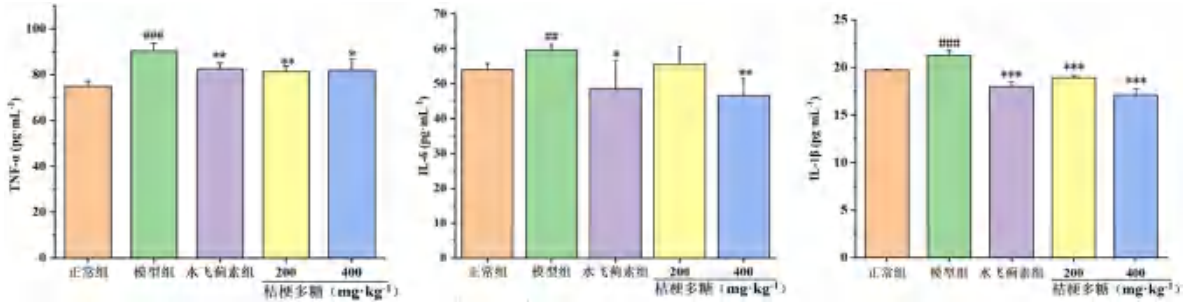


图 4　桔梗多糖对肝脏 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的水平的影响（n = 5）

Fig 4　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides on hepatic levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β（n = 5）

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

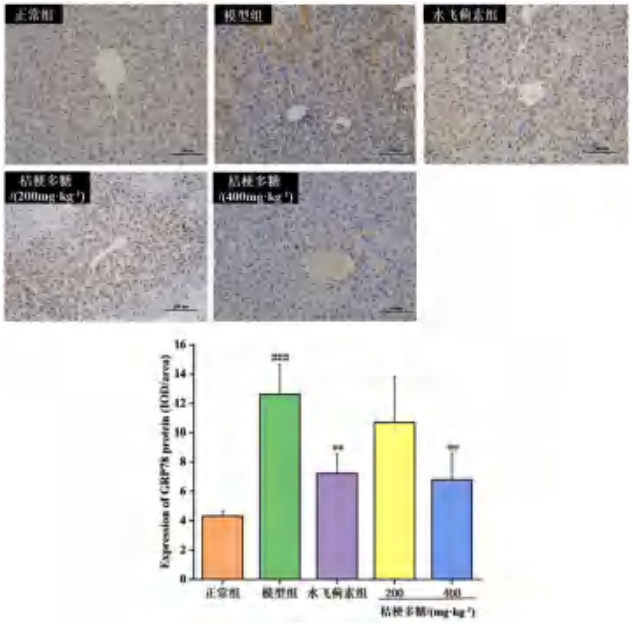


图 5　桔梗多糖对小鼠肝组织 GRP78 表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

Fig 5　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide on expression of GRP78 in liver tissue（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

注：与正常组相比，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$。

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

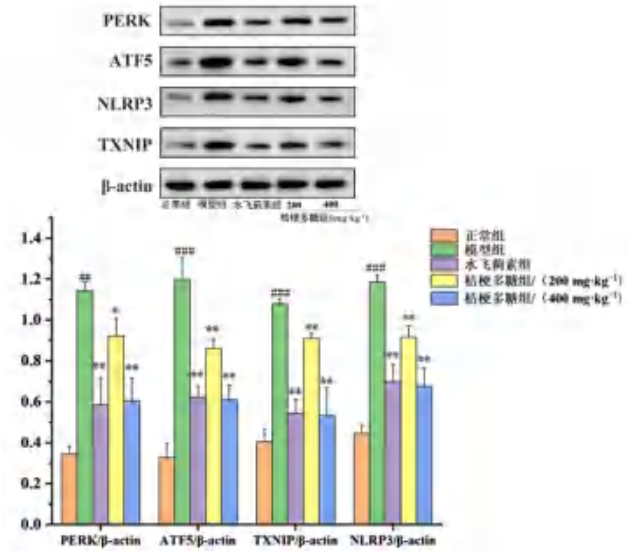


图 6　桔梗多糖对小鼠肝组织 PERK、ATF5、TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达的影响

Fig 6　Effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide on expression of PERK，ATF5，TXNIP and NLRP3 protein in liver tissue

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

激是其主要的临床特征。CCl_4 是诱导急性肝损伤的经典造模剂，自由基攻击细胞膜导致脂质过氧化，损伤的肝星状细胞和纤维细胞加剧肝功能障碍和肝硬化。本研究发现，桔梗多糖可显著降低血清中 AST 和 ALT 水平，提高 SOD 的活力，抑制 MDA 的产生，减少氧自由基的侵害，具有改善氧化应激损伤的活性。肝脏在对外源性物质进行解毒和排泄的过程中，处于抗炎和免疫耐受的动态平衡中[13]。化学物质诱导的肝损伤机制中，炎症反应是促进病程发展的关键环节。目前普遍认为，IL-6、TNF-α、IL-1β 等炎症细胞因子水平对肝损伤患者肝功能的恢复具有诊断和预测价值[14]。本研究中，桔梗多糖显著抑制了小鼠肝组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的异常表达，说明其可能通过调控炎症反应保护肝细胞损伤。

现有研究证明，ERS 与多种肝脏疾病相关，在肝脏炎症性疾病、急性肝损伤中扮演重要角色[15]。药理研究发现，多种中药成分可通过调节 ERS 发挥防治肝损伤的作用。例如，虎杖苷通过抑制氧化应激、ERS 和细胞凋亡从而改善肝损伤[16]。丹参酮ⅡA 通过调控 GRP78/caspase-12 通路改善小鼠 ERS 性肝损伤[17]。但是，关于中药多糖介导 ERS 级联炎症反应的报道甚少。GRP78 是 ERS 反应的标志性蛋白。研究表明，在化学性肝损伤的 SD 大鼠肝脏中 ERS 标志物人 X 盒结合蛋白 1（XBP-1）和 GRP78 显著增加，伴随着炎症介质如 TNF-α、IL-6 的水平聚集[18]。本研究结果表明，桔梗多糖预处理后模型小鼠的肝脏中 GRP78 显著下

调，说明调控 ERS 级联炎症反应的机制可能与桔梗多糖的保肝活性有关。

PERK 是 ERS 的效应器之一，密切参与细胞的炎症、凋亡和自噬等生理活动。已有研究表明，PERK 介导的 eIF2a 磷酸化调控 ATF5 蛋白翻译以及 ATF5 mRNA 转录 [19]。ATF5 是 ATF/cAMP 反应元件结合蛋白转录因子家族的一个成员，在细胞生理功能的维持和调控中起到重要作用 [20]。同时 TXNIP 是连接 ERS 和炎症的关键信号节点，研究表明在 ERS 条件下，ATF5 在上调 TXNIP 中发挥关键作用。同时，活化的 PERK 能够介导 TXNIP 激活 NLRP3 炎症小体产生 IL-1β[21]。有研究报道龙胆苦苷可通过巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体通路从而抑制 IL-1β 的产生，进而阻碍巨噬细胞与脂肪性肝细胞之间的交互作用，改善肝细胞损伤 [22]。基于此，我们推测 ERS 介导 PERK 调节 IL-1β 的调控机制可能参与了桔梗多糖的保肝作用，研究结果发现桔梗多糖保护 CCl_4 诱导肝损伤的机制，可能是通过抑制 PERK 蛋白表达水平，干预 ATF5/TXNIP/NLRP3 信号途径，减少 IL-1β 的产生，进而改善化学物质诱导的肝组织病理损伤。

综上所述，桔梗多糖对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用，其机制可能与调控 ERS 信号级联炎症反应，介导 PERK/TXNIP/NLRP3 信号转导有关。本研究可为桔梗多糖作为护肝活性物质进一步研究开发提供理论和实验依据。

参考文献

[1] Han CY，Lim SW，Koo JH，et al. PHLDA3 overexpression in hepatocytes by endoplasmic reticulum stress via IRE1-Xbp1s pathway expedites liver injury [J]. Gut，2016，65（8）：1377-1388.

[2] Cheng Y，Xie Y，Ge JC，et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of a galactoglucan from Poria cocos [J]. Carbohydr Polym，2021，263：117979.

[3] Chen YS，Chen QZ，Wang ZJ，et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of ganoderma lucidum polysaccharides against carbon tetrachloride-induced liver injury in Kunming mice [J]. Pharmacology，2019，103（3-4）：143-150.

[4] Yang K，Zhan L，Lu T，et al. Dendrobium officinale polysaccharides protected against ethanol-induced acute liver injury in vivo and in vitro via the TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Cytokine，2020，130：155058.

[5] Liu L，Jia J，Zeng G，et al. Studies on immunoregulatory and anti-tumor activities of a polysaccharide from Salvia miltiorrhiza Bunge [J]. Carbohydr Polym，2013，92（1）：479-483.

[6] 张萌，杨立诚，陈娟，等 . 牡丹皮多糖组分对糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47（3）：713-720.

[7] Zhao T，Mao G，Feng W，et al. Isolation，characterization and antioxidant activity of polysaccharide from Schisandra sphenanthera [J]. Carbohydr Polym，2014，105：26-33.

[8] Li Q，Feng Y，He W，et al. Post-screening characterisation and in vivo evaluation of an anti-inflammatory polysaccharide fraction from Eucommia ulmoides [J]. Carbohydr Polym，2017，169：304-314.

[9] Zhao X，Wang Y，Yan P，et al. Effects of polysaccharides from *Platycodon grandiflorum* on immunity-enhancing activity in vitro [J]. Molecules，2017，22（11）：1918.

[10] Shan S，Xiong Y，Liu M，et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a new polysaccharide isolated from the radix of Platycodon grandiflorum [J]. Int J Food Sci Tech，2021，56（6）：2662-2674.

[11] 侯巍，侯丽然，张云杰，等 . 纳米硒桔梗多糖复合物对 CCl_4 致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技，2018，39：308-311，317.

[12] 乔彩虹，孟祥顺 . 桔梗多糖降血糖作用及其机制 [J]. 中国老年学杂志，2015，35（7）：1944-1946.

[13] Liu H，Li A. MiR-340 suppresses CCl_4-induced acute liver injury through exerting anti-inflammation targeting Sigirr [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2020，24（20）：10687-10695.

[14] 朱晓文，孙瑜，戴新征，等 . 细胞因子水平对药物性肝损伤患者肝功能恢复的预测价值 [J]. 江苏医药，2021，47：1235-1237，1241.

[15] Feng Y，Cui R，Li Z，et al. Methane alleviates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting inflammation，oxidative stress，endoplasmic reticulum stress，and apoptosis through the Nrf2/HO-1/NQO1 signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：7067619.

[16] Fang J，Luo L，Ke Z，et al. Polydatin protects against acute cholestatic liver injury in mice via the inhibition of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J]. J Funct Foods，2019，55：175-183.

[17] 李晓明，常伟，刘浩 . 丹参酮ⅡA 通过调控 Grp78/caspase-12 通路改善小鼠内质网应激性肝损伤 [J]. 中国药理学通报，2021，37（8）：1081-1086.

[18] Hao J，Song Y，Tian B，et al. Platycodon grandifloras polysaccharides inhibit mitophagy injury induced by Cr（VI）in DF-1 cells [J]. Ecotoxicol Environ Safe，2020，202：110901.

[19] Zhou D，Palam LR，Jiang L，et al. Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions [J]. J Biol Chem，2008，283（11）：7064-7073.

[20] Persengiev SP，Green MR. The role of ATF/CREB family members in cell growth，survival and apoptosis [J]. Apoptosis，2003，8（3）：225-228.

[21] Oslowski CM，Hara T，O'sullivan-Murphy B，et al. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome [J]. Cell Metab，2012，16（2）：265-273.

[22] Li X，Zhang Y，Jin Q，et al. Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase-mediated regulation by gentiopicroside ameliorates P2X7 receptor-dependent alcoholic hepatosteatosis [J]. Br J Pharmacol，2018，175（9）：1451-1470.

（收稿日期：2022-09-24；修回日期：2022-11-10）

不同年限黄芩根结构及黄酮类物质变化特征研究

魏瑶，王娟，张岗，彭亮，颜永刚，陈莹*（陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/陕西中医药大学陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 建立快速鉴定黄芩生长轮数目的方法，探明其黄酮类物质的含量变化特征，为中药黄芩质量控制奠定基础。**方法** 采用石蜡切片法、徒手切片法对 1 ～ 3 年生黄芩根中的生长轮现象观察研究，高效液相色谱法对 2 ～ 4 年黄芩根中不同组织部位 7 种黄酮类成分黄芩苷、野黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 进行含量测定。**结果** 不同年限黄芩根、同一年限黄芩主根从上至下生长轮数目与黄芩实际种植年限一致；枯芩的年限鉴别中，由于上部有木间木栓，可以取根中部或下部的材料。4 种黄酮类成分黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 的含量随年限的延长而增加，7 种黄酮类成分的总含量为 4 年生＞ 2 年生＞ 3 年生。**结论** 徒手切片法结合间苯三酚 - 浓盐酸染色简单、快速，可用于实际生产中黄芩实际生长年限的鉴别，其木间木栓的形成对根中黄酮类物质的积累具有一定的影响，4 年生黄芩的木间木栓中含有丰富的黄酮类物质，在使用过程中建议保留使用。

关键词：黄芩；生长轮；子芩；枯芩

中图分类号：R282 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0116-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.019

Changes in root structure and flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different years

WEI Yao, WANG Juan, ZHANG Gang, PENG Liang, YAN Yong-gang, CHEN Ying* (*College of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine/Key Laboratory for Research and Development of "Qin Medicine" of Shaanxi Bureau of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To identify the number of growth rings of *Scutellaria baicalensis* Georgi by observing the growth rings in different years, find out the changes in characteristics of flavonoids content, and lay a foundation for the quality evaluation of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Methods** The growth rings of 1 ～ 3 years old *Scutellaria baicalensis* Georgi root were observed by paraffin section and freehand section. The content of 7 flavonoids (baicalin, scutellarin, baicalein, wogonoside, wogonin, chrysin and melaleuca A) in different tissues of 2 ～ 4 years old *Scutellaria baicalensis* Georgi was determined by HPLC. **Results** The main root and number of growth rings from top to bottom of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different years were consistent with the actual planting years of *Scutellaria baicalensis* Georgi. In the identification of the age of pith-decayed *Scutellaria baicalensis*, due to a wooden cork in the upper part, the material in the middle or lower part of the root was taken. The content of 4 flavonoids (baicalein, wogonin, chrysin and myricetin A) increased with the number of years, and the total content of 7 flavonoids were 4 year old ＞ 2 year old ＞ 3 year old. **Conclusion** The freehand slicing combined with phloroglucinol-concentrated hydrochloric acid staining is simple and rapid, which can be used to identify the actual growth

基金项目：陕西中医药大学校级科研课题（研究生创新项目）一般项目（No.2021CX23）；陕西中医药大学校级科研课题（国家基金培育项目）一般项目（No.2021GP26）；陕西中医药大学“秦药”品质评价与资源开发学科创新团队项目（No.2019-QN01）；陕西省科技厅项目（No.2016KTTSSF01-01-01）。

作者简介：魏瑶，女，在读硕士研究生，主要从事药用植物结构发育及资源研究，email：1263144925@qq.com *通信作者：陈莹，女，博士，副教授，主要从事药用植物结构发育及资源研究，email：chenying029@163.com

years of *Scutellaria baicalensis* Georgi. The formation of its interxylarycork affects the accumulation of flavonoids in the root. The interxylarycork of 4 year old *Scutellaria baicalensis* Georgi is rich in flavonoids, and suitable for use.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; growth ring; pithnodecayed *Scutellaria baicalensis;* pith-decayed *Scutellaria baicalensis*

中药黄芩为唇形科黄芩属多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根，其性寒味苦，具有清热燥湿、泻火解毒，止血、安胎等功效 [1]。黄芩的主要活性成分为黄酮类化合物，包括黄芩苷、野黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素等 [2-3]。现代研究表明黄芩有抗炎、抗肿瘤、抗菌、治疗糖尿病等作用 [4-8]。《神农本草经》中最早记载黄芩，并有别名腐肠 [9]，历代本草中均以“黄芩”为正名，并以条芩（子芩）、枯芩（宿芩、片芩）细分老根和新根，其他别名鲜少使用。

目前黄芩多以栽培为主，实际栽培过程中黄芩药材的生长年限从外观难以区分。近年来“草本植物生长轮”得到越来越多的关注，研究发现黄芪根、芍药根茎等都存在生长轮，可作为鉴定年限的依据 [10-12]，而黄芩根中也有有关生长轮的报道 [13]。随着栽培年限的增加，黄芩根逐渐加粗，产量增大，其活性成分随着生长年限呈现不同的变化 [2]，陶弘景根据黄芩生长年限的不同，将药材分为条芩和枯芩两种，认为“深色坚实者好”[14]。黄芩药材中 2 ～ 3 年质实者称为子芩，3 年以上黑心或中空者称为枯芩。枯芩是由于黄芩生长年限较久，根中出现了异常结构——木间木栓所造成的。因此枯芩的形成与黄芩根中木间木栓发育关系密切 [15]。本研究利用切片及显色技术对黄芩根中的生长轮现象进行细致观察，以确定不同年限黄芩根及同一年限黄芩根上、下段生长轮数目，进而建立快速鉴定黄芩根实际生长年限的方法。同时针对不同年限、不同部位黄芩根（子芩皮部和木质部，枯芩皮部、木质部和木间木栓）中的 7 种黄酮类成分的含量进行测定，分析木间木栓、子芩及枯芩中活性成分的含量差异，旨在为黄芩的质量控制以及子芩与枯芩的区别使用提供依据。

1 材料

1.1 试药

对照品黄芩苷（批号：110715-201611）、千层纸素 A（批号：110796-201615）（纯度：99.8%，中国食品药品检定研究院）；汉黄芩苷（批号：110796-201615）、黄芩素（批号：10217-201611）、汉黄芩素（批号：10184-201702）、野黄芩苷（批号：10513-201610）、白杨素（批号：10150-201508）（纯度：99.8%，南昌贝塔生物科技有限公司）。色谱甲醇、乙腈（上海泰坦科技有限公司）；其他试剂为分析纯。

采集陕西咸阳市淳化县车坞镇黄芩种植基地 1 ～ 4 年生黄芩，每个年限各采 30 株，经陕西中医药大学药学院颜永刚教授鉴定为唇形科黄芩属植物黄芩。黄芩隔水蒸后，去掉根茎，按有无木间木栓分为枯芩与子芩，子芩分为皮部和木质部，枯芩分为皮部、木质部和木间木栓（见图 1）。将分离好的样品编号放入烘箱烘干，粉粹，过筛，备用，样品信息详见表 1，所有样品均来自陕西咸阳市淳化县车坞镇黄芩种植基地。

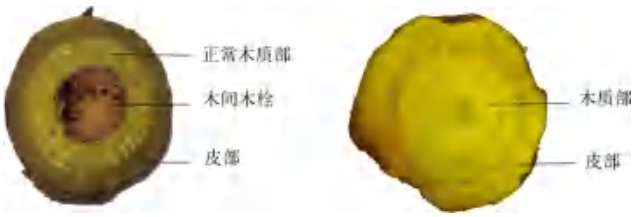


图 1 枯芩（左）与子芩（右）样品横切面图

Fig 1 Cross-sectional view of samples of pithnodecayed *Scutellaria baicalensis* (left) and pith-decayed *Scutellaria baicalensis* (right)

表 1 子芩与枯芩不同组织部位样品采集信息

Tab 1 Sample information of different tissue parts of pithnodecayed *Scutellaria baicalensis* and pith-decayed *Scutellaria baicalensis*

样品编号	组织部位	年限	分类
S1	木质部	2 年生	子芩
S2	皮部	2 年生	子芩
S3	木质部	3 年生	子芩
S4	皮部	3 年生	子芩
S5	木质部	4 年生	子芩
S6	皮部	4 年生	子芩
S7	木质部	3 年生	枯芩
S8	皮部	3 年生	枯芩
S9	木质部	4 年生	枯芩
S10	皮部	4 年生	枯芩
S11	木间木栓	4 年生	枯芩

1.2 仪器

Waters-e2695 高效液相色谱仪（Waters2998 紫外检测器，Empower 色谱工作站）；FA2004 型电子分

析天平（上海民桥精密科学仪器有限公司）；GB204 型电子分析天平（北京赛多利斯有限公司）；KH-400KDE 型超声波清洗机，功率为 500 W，频率为 80 kHz（昆山市超声仪器有限公司）；WGL-230B 型电热鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）。

2　方法

2.1　石蜡切片法

取新鲜健康 1 ～ 3 年生黄芩主根上部，切成 0.5 cm 左右的小段，标准固定液固定，梯度乙醇脱水，二甲苯透明、浸蜡、包埋、Leica RM 2335 切片机切片，厚度为 10 μm，番红 - 固绿染色，中性树胶封片，Leica DMBL 显微镜观察并拍照。

2.2　徒手切片法

选取健康的 1 ～ 4 年生黄芩主根，由根上至下进行徒手切片，切片厚度为 3 mm，盐酸 - 间苯三酚可以使木质素染红，使用间苯三酚 - 浓盐酸法对黄芩样品染色用于生长轮鉴别，并在光学显微镜 Nikon SMZ745T 下观察，拍照。

2.3　含量测定方法

2.3.1　色谱条件　色谱柱：C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈为流动相 A，0.1% 甲酸水为流动相 B，按表 2 的程序进行梯度洗脱；检测波长为 274 nm；柱温为 30 ℃，流速为 1.0 mL • min^{-1}，进样量为 10 μL。理论塔板数以黄芩苷峰计算不低于 25 000。混合对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 2。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution procedure

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ～ 10	10 → 15	90 → 85
10 ～ 20	15 → 20	85 → 80
20 ～ 30	20 → 25	80 → 75
30 ～ 60	25 → 45	75 → 55
60 ～ 70	45 → 60	55 → 40
70 ～ 75	60 → 10	40 → 90

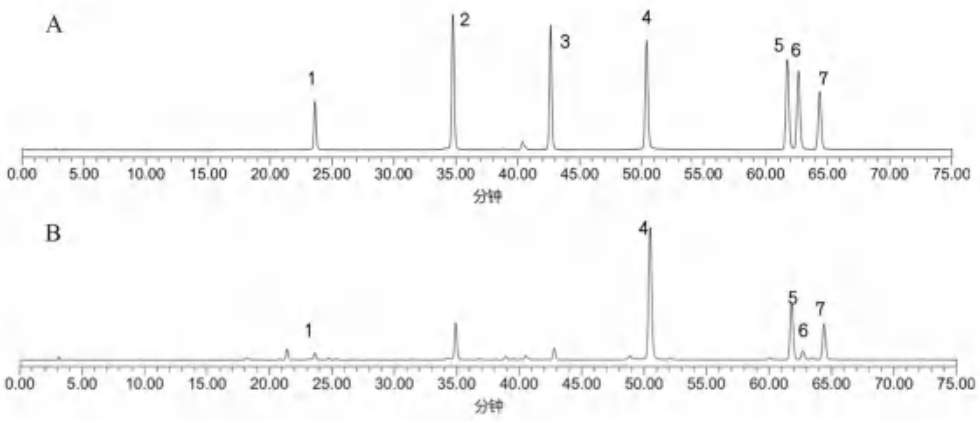


图 2　混合对照品溶液（A）及样品溶液（B）的色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of mixed reference substances（A）and samples（B）

1. 野黄芩苷（scutellarin）；2. 黄芩苷（baicalin）；3. 汉黄芩苷（baicalein）；4. 黄芩素（wogonoside）；5. 汉黄芩素（wogonin）；6. 白杨素（chrysin）；7. 千层纸素 A（melaleuca A）

2.3.2　混合对照品溶液的配制　分别精密称定对照品野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 适量，用甲醇配制成质量浓度分别为 51.2、626、266、42.2、42.0、31.6、38.8 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3.3　供试品溶液的制备　取黄芩样品粉末，精密称取 0.5 g，置 100 mL 的锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 50 mL，称重，超声处理（500 W，80 kHz）30 min，放至室温，称重，用 70% 乙醇补足减失的重量，摇匀，用滤纸过滤，取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.4　方法学考察

2.4.1　进样精密度考察　精密吸取混合对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测定野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 的峰面积，结果各成分峰面积 *RSD* 值分别为 1.2%、1.5%、1.0%、1.4%、1.0%、1.0%、1.7%。表明仪器精密度良好。

2.4.2　重复性考察　取同一黄芩样品 S1 适量，精密称取 0.5 g，平行 6 份，按“2.3.3”项下方法分别制备供试品溶液，进样测定，计算各成分的含量，结果野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素、千层纸素 A 含量的 *RSD* 值分别为 1.7%、1.3%、1.2%、1.0%、1.0%、1.3%、1.1%。表明方法重复性良好。

2.4.3　稳定性考察　分别于 0、2、4、8、12、16、

24 h 精密吸取黄芩样品（S1）10 μL，进样测定，计算得野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素以及千层纸素 A 含量的 *RSD* 值分别为 1.1%、1.3%、1.6%、1.0%、1.4%、1.7%、1.1%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 加样回收考察 精密称取已知含量黄芩样品 0.25 g，6 份，分别置 100 mL 的锥形瓶中，精密称取与该样品中等量的野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 对照品，混合后再按“2.3.3”项下方法制备，进样 10 μL，测定其含量，计算各成分的回收率及 *RSD*，结果野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 的平均加样回收率分别为 99.0%、98.1%、98.9%、99.2%、99.9%、98.0%、99.4%，*RSD* 分别为 1.9%、1.7%、1.9%、1.0%、1.5%、1.9%、0.90%。

2.4.5 线性关系 精密吸取混合对照品溶液制备系列浓度的对照品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，以峰面积值为纵坐标（*Y*），以进样量（μg）为横坐标（*X*），绘制标准曲线，得到黄芩苷、汉黄芩苷、野黄芩苷等 7 种黄酮类成分的线性回归方程、线性范围、相关系数（R^2），见表 3。

表 3 7 种黄酮类成分回归方程及线性范围

Tab 3 Regression equation and linear range of 7 flavonoids

成分	回归方程	R^2	线性范围 /μg
野黄芩苷	$Y = 1.394\times10^6X + 9.289\times10^4$	0.9996	0.10 ～ 1.02
黄芩苷	$Y = 3.480\times10^6X + 6.465\times10^4$	0.9995	1.25 ～ 12.52
汉黄芩苷	$Y = 3.037\times10^6X + 4.516\times10^4$	0.9989	0.53 ～ 5.32
黄芩素	$Y = 6.754\times10^6X + 1.892\times10^4$	0.9992	0.08 ～ 0.84
汉黄芩素	$Y = 2.562\times10^6X + 6.272\times10^4$	0.9993	0.08 ～ 0.84
白杨素	$Y = 4.106\times10^6X - 7.521\times10^4$	0.9982	0.06 ～ 0.63
千层纸素 A	$Y = 3.879\times10^6X - 8.916\times10^4$	0.9970	0.08 ～ 0.78

2.4.6 数据处理 使用 Excel 2016 和 Graphpad prism 8 对不同年限黄芩根指标成分的含量进行数据整理、统计分析及图表绘制；SPSS 25.0 进行差异性显著分析，各个不同因素组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 不同年限黄芩根上部生长轮的数目

对 1 ～ 3 年生黄芩主根横切面观察，黄芩根的结构主要由周皮、皮层、形成层、次生木质部以及初生木质部构成。其中次生木质部呈明显的同心圆环排列，具有明显的生长轮结构。徒手切片染色其木质部的导管逐渐变为红色，可观察到生长轮。1 年生黄芩主根次生木质部导管呈辐射状排列，具有 1 个生长轮（见图 3A、3B）。2 年生黄芩主根次生木质部的导管具有 2 个生长轮（见图 3C、3D）。3 年生黄芩主根次生木质部的导管具有 3 个生长轮（见图 3E、3F）。

3.2 黄芩主根上下段生长轮的数目

徒手切片可观察到与石蜡切片一致的结果，具有简单快速的优点，因此，选用该法对 1 ～ 4 年生黄芩主根上、下段的生长轮数目进行研究。在黄芩主根各位置的横切面中观察到：1 年生 1 个生长轮（见图 4A），2 年生 2 个生长轮（见图 4B），3 年生 3 个生长轮（见图 4C），4 年生 4 个生长轮（见图 4D）。由此可见，同一年限黄芩主根上、下段生长轮的数目一致并与其实际生长年限一致。

3.3 黄芩根中黄酮类成分的含量测定

3.3.1 不同生长年限黄芩根活性成分测定 取 2 ～ 4 年生黄芩根样品，分别测定皮层和木质部及木间木栓中 5 种活性成分的含量，结果见表 4 及图 5。

表 4 黄芩不同组织部位 7 种黄酮类成分含量

Tab 4 Contents of 7 flavonoids in different tissues of *Scutellaria baicalensis* Georgi

部位	年限	质量分数 /（mg·g^{-1}）							
		野黄芩苷	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	白杨素	千层纸素 A	总含量
子芩木质部	2 年生	5.70±0.01	142.60±0.09	28.43±0.09	0.72±0.02	0.13±0.02	0.09±0.01	0.06±0.01	177.72±0.02
	3 年生	5.71±0.07	135.35±0.15	27.66±0.14	0.75±0.02	0.21±0.02	0.09±0.01	0.11±0.01	169.89±0.11
	4 年生	6.21±0.05	146.14±0.05	26.42±0.09	0.94±0.02	0.18±0.02	0.08±0.01	0.07±0.01	180.04±0.06
子芩皮部	2 年生	6.44±0.09	145.09±0.04	26.83±0.03	1.45±0.03	0.36±0.01	0.63±0.02	0.43±0.03	181.23±0.03
	3 年生	6.38±0.08	138.70±0.13	26.76±0.06	1.73±0.03	0.83±0.02	0.62±0.01	0.56±0.06	175.58±0.02
	4 年生	6.37±0.01	148.09±0.07	24.39±0.10	3.17±0.03	1.25±0.03	0.61±0.02	0.92±0.02	184.79±0.06
枯芩皮部	3 年生	5.65±0.10	131.08±0.04	22.42±0.10	2.25±0.02	0.93±0.02	0.74±0.04	0.62±0.03	163.70±0.11
	4 年生	6.19±0.04	125.87±0.03	20.09±0.06	3.38±0.07	1.52±0.02	0.71±0.01	1.18±0.02	158.94±0.01
枯芩木质部	3 年生	5.08±0.04	128.67±0.08	22.30±0.06	0.53±0.01	0.21±001	0.13±0.01	0.10±0.01	157.02±0.01
	4 年生	5.42±0.03	119.42±0.13	20.75±0.11	0.82±0.02	0.15±0.02	0.26±0.02	0.15±0.02	146.97±0.64
木间木栓	4 年生	6.46±0.06	25.44±0.08	5.61±0.03	63.08±0.04	22.79±0.02	4.55±0.03	20.73±0.03	148.67±0.01

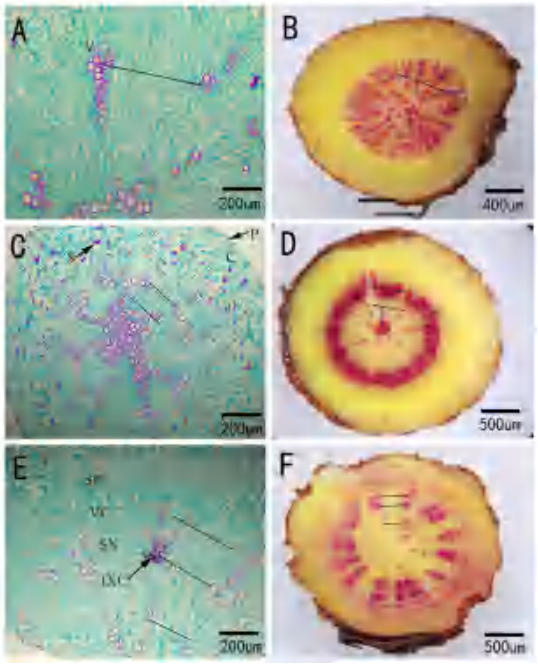


图 3　黄芩根的解剖结构

Fig 3　Anatomical structure of *Scutellaria baicalensis* Georgi root

P. 周皮（periderm）；SP. 次生韧皮部（secondary phloem）；VC. 形成层（cambium）；SX. 次生木质部（secondary xylem）；V. 导管（vessel）；IXC. 木间木栓（interxylarycor）；黑线 . 1 ～ 3 年生黄芩根中生长轮（1 ～ 3 growth ring in the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi）；A、B. 1 年生（1 year old）；C、D. 2 年生（2 year old）；E、F. 3 年生（3 year old）

3.3.2　子芩不同组织部位中 7 种黄酮类成分的含量比较　由图 5 及表 4 可看出，4 年生黄芩根中黄芩苷在木质部和皮部的含量较 2 ～ 3 年生黄芩含量高。黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 主要分布在皮部，野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷在子芩皮部与木质部分布较均匀。

3.3.3　枯芩不同组织部位中 7 种黄酮类成分的含量比较　由图 5 可知，枯芩皮部和木质部中 7 种黄酮类成分含量差异显著。黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 主要分布在枯芩皮部，较木质部多。木间木栓在黄芩苷和汉黄芩苷的含量明显低于木质部和皮部中的含量，在黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 的含量显著高于木质部和皮部中的含量。

3.3.4　相同年限子芩与枯芩中 7 种黄酮类成分含量的比较　野黄芩苷在子芩与枯芩各组织部位中的分布比较均匀，相同年限子芩不同组织部位中黄芩苷和汉黄芩苷较枯芩不同组织部位含量多。黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 主要分布在木间木栓中。

4　结论与讨论

4.1　黄芩根中生长轮可作为实际生长年限的鉴别依据

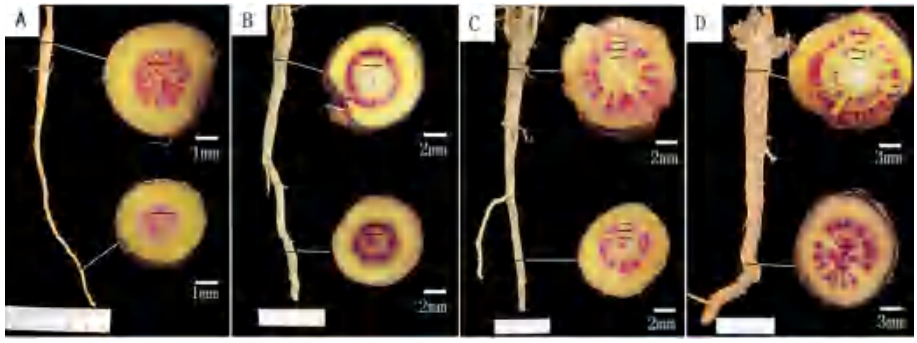


图 4　1 ～ 4 年生黄芩根中的生长轮

Fig 4　Growth ring in the root of 1 ～ 4 year old *Scutellaria baicalensis* Georgi

A. 1 年生（1 year old）；B. 2 年生（2 year old）；C.3 年生（3 year old）；D. 4 年生（4 year old）

注（Note）：不同字母表示差异有统计学意义（There is statistical significance in different letters）。

中药材主要以植物的根、根状茎、茎、花、果实、种子等各组织作为临床药用。其中多年生木本植物茎类药材的生长年限可根据年轮来判别 [16]。但绝大多数来源于多年生草本植物的根及根状茎类药材，其生长年限的鉴别仍缺少科学的判断依据。有研究表明在中药芍药 [12]、黄芪 [17-18]、丹参 [19]、人参 [20]、川续断 [21] 等植物的根中有生长轮的存在。在实际生产中，黄芩从外观上很难判断生长年限。而黄芩中生长年限是子芩和枯芩形成的关键，与活性成分的积累有着密切关系，生长年限可以作为黄芩质量评价的初步依据。杨冬野 [13] 提出黄芩的年轮即生长轮，可以根据年轮个数区别不同生长年限的黄芩根。本文采用石蜡切片法及徒手切片法观察 1 ～ 4 年生黄芩中的生长轮，结果表明不同年限黄芩根、同一年限黄芩主根从上至下生长轮数目与黄芩实际种植年限一致。且间苯三酚 - 浓盐酸可以使木质素染红，使用间苯三酚 - 浓盐酸法对黄芩样品染色可快速鉴别生长轮。而枯芩的年限鉴别中，由于根部有木间木栓，在同一条主根中木间木栓在近根茎处

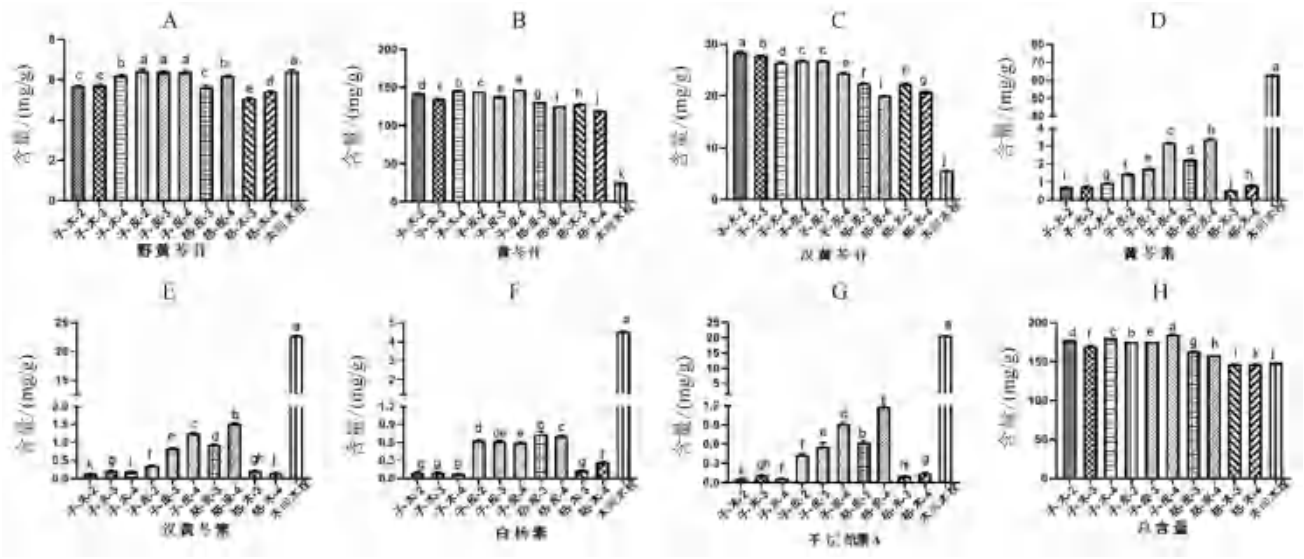


图 5　子芩与枯芩不同组织部位中 7 种黄酮类成分的含量

Fig 5　Content of 7 flavonoids in different tissues of *Scutellaria baicalensis* Georgi

的面积最大，其面积由根的上向下逐渐减小，根的下部一般无木间木栓存在，因此可选取根中段或下段的材料用于年限鉴别（见图 6）。该方法能够快速准确地区分不同生长年限的黄芩，可为实际生产中黄芩年限的识别提供依据。

4.2　木间木栓的形成对黄芩根中黄酮类物质的积累的影响

药用植物体内次生代谢产物的含量会随着植物生长年限的增加，发生一定程度的波动，使得中药材采收具有一定的时效性 [22]。黄芩根中主要生物活性物质为黄酮化合物，其中黄芩素、汉黄芩素及其苷类，具有抗肿瘤、抗血栓、抗病毒、抗炎、抗氧化及神经保护等药理活性 [23-24]。王丹等 [25] 研究发现木间木栓部位黄芩素与黄芩苷的比值高于正常部位，宋亚芳等 [26] 研究发现子芩与枯芩的化学成分存在明显差异，枯芩中黄芩素、千层纸素 A 和黄芩新素的含量要明显高于子芩。刘林等 [27] 对子芩与枯芩中 6 种黄酮类含量测定表明，子芩中苷类成分含量显著高于枯芩。目前国内外主要集中于对子芩和枯芩中不同成分含量的测定，本研究将黄芩按有无木间木栓分为枯芩与子芩，子芩分为皮部和木质部，枯芩分为皮部、木质部和木间木栓，对不同年限黄芩这些组织部位 7 种黄酮类成分含量测定发现，2 ～ 4 年生黄芩根在木质部中有效成分的含量依次为黄芩苷＞汉黄芩苷＞野黄芩苷＞黄芩素＞汉黄芩素，7 种黄酮类成分的总含量为 4 年生＞ 2 年生＞ 3 年生。

我们对 2 ～ 4 年生子芩皮部、木质部，3 ～ 4 年生枯芩皮部、木质部及木间木栓中 7 种黄酮类物质的分布及动态变化进行研究，结果显示：2 ～ 4 年野黄芩苷在子芩皮部与木质部分布较均匀，黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 在皮部中的含量大于木质部中的含量；枯芩中，7 种黄酮类成分含量差异显著，4 年生枯芩木质部和皮部中野黄芩苷、黄芩素及千层纸素 A 的含量较 3 年生黄芩含量高。木间木栓中黄芩苷和汉黄芩苷的含量低于子芩与枯芩皮部、木质部含量，但黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 的含量显著增加；黄芩苷与汉黄芩苷在子芩和枯芩中均有分布，且含量较多；相同年限子芩中黄芩苷和汉黄芩苷较枯芩中多。黄芩素、汉黄芩素、白杨素和千层纸素 A 主要分布在木间木栓中。由此

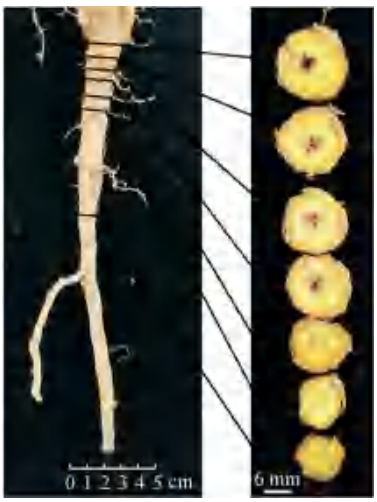


图 6　黄芩根中木间木栓的特征 [15]

Fig 6　Characteristics of interxylarycork in the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi[15]

可见，木间木栓的形成对黄芩根中黄酮类物质的积累有一定影响，进而造成了子芩和枯芩的成分变化，建议子芩和枯芩在临床上分开使用，充分发挥枯芩的作用。随着黄芩生长年限的不断增加，木间木栓对黄芩的进一步影响有待后续研究。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：314.

[2] 郭玲玲，刘毅，禄梦杰，等 . HPLC 法同时测定陕西产不同生长年限野生和栽培黄芩中 9 种化学成分含量 [J]. 中草药，2018，49（4）：935-940.

[3] 魏莹莹，王晓，张琳，等 . 不同生长年限黄芩根部活性成分分布及微观结构研究 [J] . 中药材，2015，38（5）：911-914.

[4] Zhang L，Ren B，Zhang J，et al . Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterization [J]. J Ethnopharmacol，2017，206：184-192.

[5] 苑艺蕾，汪娜，王洪玉，等 . 黄芩镇静作用有效组分的筛选 [J] . 哈尔滨商业大学学报（自然科学版），2016，32（2）：132-135.

[6] Orzechowska BU，Wróbel G，Turlej E，et al. Antitumor effect of baicalin from the *Scutellaria baicalensis* radix extract in B-acute lymphoblastic leukemia with different chromosomal rearrangements [J]. Int Immunopharmacol，2020，79：106114.

[7] Wang CZ，Calway TD，Wen XD，et al . Hydrophobic flavonoids from *Scutellaria baicalensis* induce colorectal cancer cell apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway [J]. Int J Oncol，2013，42（3）：1018-1026.

[8] Shin NR，Gu N，Choi HS，et al. Combined effects of *Scutellaria baicalensis* with metformin on glucose tolerance of patients with type 2 diabetes via gut microbiota modulation [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2020，318（3）：E52-E61.

[9] 尚志钧 . 神农本草经 [M]. 芜湖：皖南医学院科研处，1981：197-197.

[10] 高四云，李科，熊一峰，等 . 恒山仿野生黄芪绝对生长年限鉴别及黄酮和皂苷积累规律研究 [J]. 药学学报，2018，53（1）：147-154.

[11] 王军 . 苦参药用部位发育解剖暨黄芪道地药材的年限鉴别及其次生代谢产物积累研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2013.

[12] 张建军，陈莉祺，李建光，等 . 芍药根茎解剖结构特征及生长轮分析 [J]. 北京林业大学学报，2020，42（5）：124-131.

[13] 杨冬野，蔡少青，王璇，等 . 不同生长年限野生与栽培黄芩的药材鉴别研究 [J]. 中国中药杂志，2005，30（22）：8-15.

[14] 陶弘景 . 本草经集注 [M]. 北京：人民卫生出版社，1994：264.

[15] 王娟，颜永刚，张岗，等 . 黄芩根中木间木栓的形成与发育特性研究 [J]. 西北植物学报，2020，40（10）：1672-1678.

[16] Fritz HS . Tree rings：basics and applications of dendrochronology [M]. Dordrecht：Kluwer Academic Publishers，1988：118.

[17] Peng HS，Wang J，Zhang HT，et al. Rapid identification of growth years and profiling of bioactive ingredients in *Astragalus membranaceus var. mongholicus*（Huangqi）roots from Hunyuan，Shanxi [J]. Chin Med，2017，12：14.

[18] Yu KZ，Liu J，Guo BL，et al. Microscopic research on a multisource traditional Chinese medicine，Astragali Radix [J]. J Nat Med，2014，68（2）：340.

[19] Wang YJ，Peng HS，Shen Y，et al. The profiling of bioactive ingredients of differently aged *Salvia miltiorrhiza* roots [J]. Microsc Res Techniq，2013，76（9）：947.

[20] Liang JB，Jiang C，Peng HS，et al. Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity [J]. Sci Rep，2015，5：7985.

[21] 杨俊，彭华胜，轩艳，等 . 野生川续断和不同栽培年限川续断的组织结构鉴别研究 [J]. 中药材，2012，35（12）：1932.

[22] 田甜，韩蕊莲，梁宗锁 . 不同产地和不同年限黄芩 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 浙江农业科学，2018，59（3）：370-376.

[23] 崔孟颖，柳洁，杨蕾，等 . 黄芩，由古籍里走进现代生活的药用植物 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2016，18（11）：1921-1928.

[24] 李娟，张龙，刘继，等 . 黄芩黄酮的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学，2018，39（5）：71-73.

[25] 王丹，蒋亚杰，梁艳，等 . 黄芩不同规格与化学成分及内在质量相关性的研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（4）：426-433.

[26] 宋亚芳，夏伯候，杨红，等 . 子芩与枯芩超高效液相色谱指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（9）：92-96.

[27] 刘林，涂海声，叶慧敏，等 . 一测多评法同时测定枯芩、子芩中 6 个黄酮类成分的含量 [J]. 中药材，2022，45（1）：162-167.

（收稿日期：2022-09-30；修回日期：2022-11-03）

黄芩提取物制备过程的关键工段辨识研究

张雪灿[1]，孟庆芬[2]，关建丽[2]，王毅[3, 4]，龚行楚[1, 3, 4*]（1. 天津中医药大学制药工程学院，天津 300000；2. 河南福森药业有限公司，河南 南阳 474450；3. 组分中药国家重点实验室浙江大学交叉创新中心，杭州 310058；4. 浙江大学药物信息学研究所，杭州 310058）

摘要：目的 辨识黄芩提取物制备工艺的关键工段。**方法** 首先对液相色谱分析方法进行了方法学验证，然后采用多批次黄芩药材进行水煎、酸沉、碱溶、乙醇洗涤和干燥等工艺制备黄芩提取物。将制备工艺分为 8 个工段，分别检测了药材、中间体和黄芩提取物中总固体、黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素的含量，并根据结果计算总固体产量、黄酮产量和纯度。计算了过程中间体和黄芩提取物的组成相似度变化情况，提出采用一致性变化量（TVC）作为指标定量表征制药工艺对批次间一致性影响。**结果** 欧氏距离是较灵敏的相似度指标。根据 TVC 和相似度变化大小确定了关键工段为工段 1、工段 2 和工段 4，其对应的工艺包括水煎、酸沉和乙醇洗涤等。**结论** 综合考虑相似度变化和 TVC 可以用于辨识中成药生产关键工段，该方法适合用于分析流程较长的中成药生产工艺。

关键词：黄芩提取物；关键工段；工艺优化；一致性变化；相似度变化
中图分类号：R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0123-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.020

Identification of critical sections in the preparation of *Scutellaria baicalensis* extract

ZHANG Xue-can[1], MENG Qing-fen[2], GUAN Jian-li[2], WANG Yi[3, 4], GONG Xing-chu[1, 3, 4*] (1. *College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 300000; 2. *Henan Fusen Pharmaceutical Co., Ltd., Nanyang Henan* 474450; 3. *State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Innovation Center in Zhejiang University, Hangzhou* 310058; 4. *Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou* 310058)

Abstract: Objective To identify the critical sections in the preparation of *Scutellaria baicalensis* extract. **Methods** First, liquid chromatography analysis was verified. Then, different batches of *Scutellaria baicalensis* were used to prepare *Scutellaria baicalensis* extract with water decoction, acid precipitation, alkali dissolution, ethanol washing and drying. The preparation process was divided into 8 sections. The content of total solid, baicalin, wogonoside and baicalein in multiple materials was analyzed. The total solid yield, flavonoid yield, and flavonoid purity were calculated according to the results. The similarity changes of the intermediates and *Scutellaria baicalensis* extract in the process were measured. A quantitative indicator, namely total variation change (TVC) was proposed, and used to characterize the impact of pharmaceutical processes on batch-to-batch consistency. **Results** Euclidean distance is a more sensitive indicator of similarity. According to total variation change and similarity, the critical sections included section 1, section 2, and section 4. The corresponding processes included water decoction, acid precipitation, and ethanol washing. **Conclusion** Comprehensive consideration of similarity changes and consistency changes helps identify the critical sections of Chinese medicines, which is suitable for analyzing Chinese medicine production with many procedures.

Key words: *Scutellaria baicalensis* extract; critical process section; process optimization; consistency change; similarity change

基金项目：河南省重大科技专项项目（No. 201111310800）；国家中医药管理局创新团队与人才支持计划（No. ZYYCXTD-D-202002）。
作者简介：张雪灿，女，硕士研究生，主要从事中药质量控制研究，email：Zhxc918@163.com *通信作者：龚行楚，男，博士，副教授，主要从事中药质量控制研究，email：gongxingchu@zju.edu.cn

黄芩提取物收录于《中国药典》一部。以黄芩提取物为重要中间体的中成药有银黄颗粒、双黄连胶囊和双黄连片等超过 160 种。黄芩有抗菌、抗病毒[1]、抗炎、抗过敏、抗肿瘤[2]、抗氧化[3]和清除自由基等功效[4]。周锡钦等[5]研究了黄芩提取物化学成分及生物活性，认为黄芩提取物的主要活性成分包括黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸素 A、野黄芩苷等。

本研究以《中国药典》一部中注射用双黄连（冻干）的黄芩提取物制备工艺为研究对象，首先进行液相色谱方法学验证。然后以黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素为指标成分，研究其在黄芩提取中从黄芩药材、中间体到提取物工艺过程中的产量和纯度变化。提出了定量表征制药工艺对批次间一致性影响的新指标，并尝试将其用于辨识关键工段。

1　材料

1100 型高效液相色谱仪（Agilent 科技有限公司）；SevenMulti pH 计（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；Milli-Q 超纯水机（Millipore 公司）；XMTD-8222 烘箱（上海精宏实验设备有限公司）；85-2 恒温加热磁力搅拌器（杭州仪表电机有限公司）；5804R 冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；Centrifuge5424 高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；XS105 分析天平（上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；FreeZone2.5 冷冻干燥机（美国 LABCONCO 公司）；DZF6053 真空干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

甲醇、乙腈（色谱纯，德国默克公司）；甲酸（色谱纯，美国 ROE Scientific 公司）；对照品黄芩素（批号：200928，纯度≥ 97.9%）、汉黄芩苷（批号：191103，纯度≥ 98.5%）、黄芩苷（批号：200823，纯度≥ 94.2%）（中国食品药品检定研究院）；乙醇、氢氧化钠、盐酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。6 批不同批号和来源的黄芩药材信息见表 1。

表 1　6 批黄芩药材的厂家和产地

Tab 1　Manufacturer and origin of 6 batches of *Scutellaria baicalensis*

编号	生产厂家	产地	生产日期
YP1	渭源县会川世鸿中药材	甘肃	2021.11.25
YP2	亳州市松草堂药业有限公司	内蒙	2021.11.12
YP3	亳州市慈济堂中药饮片有限公司	山西	2020.02.01
YP4	河北楚风中药饮片有限公司	内蒙	2020.08.19
YP5	河北林益堂药业有限公司	陕西	2020.06.30
YP6	安徽道源堂中药饮片有限公司	山西	2020.11.20

2　方法与结果

2.1　黄芩提取物的制备

黄芩提取物制备工艺流程图见图 1。

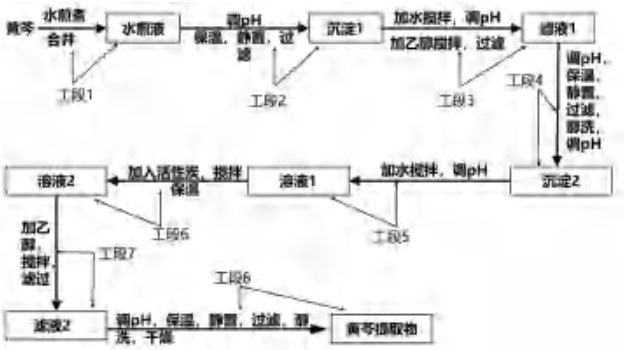


图 1　黄芩提取物制备工艺流程图

Fig 1　Flow chart of *Scutellaria baicalensis* extract preparation

黄芩水煎液制备（工段 1）：黄芩加水煎煮两次，每次 1 h，滤过，得到合并滤液。

黄芩沉淀 1 制备（工段 2）：2 mol • L^{-1} 盐酸溶液调 pH 值至 1.0 ～ 2.0，在 80 ℃保温 30 min，静置 12 h，滤过，用水洗去沉淀表面酸，抽真空干燥或冷冻干燥，得到沉淀 1。

黄芩滤液 1 制备（工段 3）：沉淀 1 加 8 倍量水搅拌，用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0，加入等量乙醇，搅拌使沉淀溶解，滤过，得到滤液 1。

黄芩沉淀 2 制备（工段 4）：用 2 mol • L^{-1} 盐酸溶液调节滤液 1 的 pH 值至 2.0，60 ℃保温 30 min，静置 12 h，沉淀用乙醇洗至 pH 值为 4.0。抽真空干燥，得到沉淀 2。

黄芩溶液 1 制备（工段 5）：沉淀 2 加 10 倍量水，搅拌，用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0，得到溶液 1。

黄芩溶液 2 制备（工段 6）：每 1000 mL 溶液 1 中加入 5 g 活性炭，充分搅拌，在 50 ℃保温 30 min，得到溶液 2。

黄芩滤液 2 制备（工段 7）：往溶液 2 加入等量乙醇，搅拌均匀，滤过，得到滤液 2。

黄芩提取物制备（工段 8）：滤液 2 用 2 mol • L^{-1} 盐酸溶液调节 pH 值至 2.0，在 60 ℃保温 30 min，静置 12 h，滤过，沉淀用少量乙醇洗涤，于 60 ℃以下干燥，得到最终提取物。

2.2　色谱条件

参考文献[6]，采用 Waters XBridge TMShield Rp18（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，流动相为：0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B）；梯度洗脱：0 ～ 10 min，10% ～ 15%B；10 ～ 20 min，15% ～ 20%B；20 ～ 30 min，20% ～ 25%B；30 ～ 60 min，25% ～ 45%B；60 ～ 70 min，45% ～ 60%B；70 ～ 75 min，60% ～ 10%B；流速 0.8 mL • min^{-1}，检测波长 274 nm，进样量 10 μL，柱温 28 ℃。所得典型色谱图见图 2。

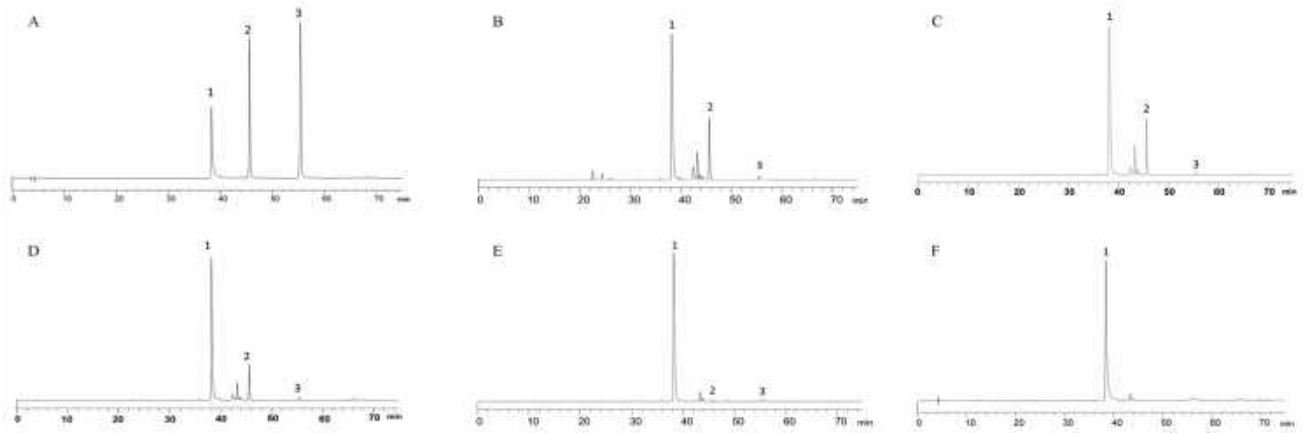


图 2　对照品及样品 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of control and sample

A. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；B. 水煎液供试品（water decoction solution sample）；C. 中间体沉淀 1 供试品（intermediates precipitate 1 sample）；D. 中间体滤液 1 供试品（intermediate filtrate 1 sample）；E. 中间体溶液 1 供试品（intermediate solution 1 sample）；F. 黄芩提取物供试品（*Scutellaria baicalensis* extract sample）；1. 黄芩苷（baicalin）；2. 汉黄芩苷（wogonoside）；3. 黄芩素（baicalein）

2.3　对照品溶液的制备

精密称取经真空干燥 24 h 的汉黄芩苷、黄芩素和黄芩苷对照品粉末适量，置量瓶中，加入甲醇超声溶解，并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 0.532 mg•mL^{-1}、0.55 mg•mL^{-1} 和 0.538 mg • mL^{-1} 的单一对照品储备液，备用。分别精密量取汉黄芩苷、黄芩素和黄芩苷对照品储备液各适量，置同一量瓶中，定容，摇匀，即得汉黄芩苷 0.106 mg • mL^{-1}、黄芩素 0.11 mg • mL^{-1} 和黄芩苷 0.269 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，逐级稀释上述混合对照品溶液获得一系列不同浓度的混合对照品溶液，备用。

2.4　供试品溶液的制备

精密称取适量黄芩提取物及各步骤工艺中间体至适合规格的量瓶，其中水煎液、溶液 1 和溶液 2 用超纯水进行稀释定容，沉淀 1、沉淀 2 和黄芩提取物使用碱溶液进行稀释定容，滤液 1 和滤液 2 用乙醇 - 水进行稀释定容。上述样品定容后，充分摇匀，用孔径 0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液，即得。

取黄芩药材中粉约 0.3 g，精密称定，加 70% 乙醇 40 mL，加热回流 3 h，放冷，滤过，滤液置 100 mL 量瓶中，用少量 70% 乙醇分次洗涤容器和残渣，洗液滤入同一量瓶中，加 70% 乙醇至刻度，摇匀。精密量取 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

2.5　方法学验证

2.5.1　线性关系考察　精密量取“2.3”项下的混合对照品溶液适量，进样测定。以对照品溶液质量浓度（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 2，各成分在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 2　线性范围考察

Tab 2　Linear range investigation

化合物	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	R^2
黄芩苷	$Y = 4.115\times10^4X - 51.79$	13.45 ～ 269.0	0.9996
汉黄芩苷	$Y = 4.835\times10^4X - 40.03$	5.316 ～ 106.3	0.9999
黄芩素	$Y = 5.829\times10^4X - 4.526$	5.500 ～ 110.0	1.000

2.5.2　检测限和定量限　基于响应值标准偏差和标准曲线斜率法，按照 LOD = 3.3σ/S 公式计算，黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素的检测限分别为 5.36、1.13、0.369 μg • mL^{-1}。按照 LOQ = 10σ/S 公式计算，黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素的定量限分别为 16.24、3.424、1.118 μg • mL^{-1}。

2.5.3　精密度考察　取黄芩水煎液，连续进样 6 次，记录色谱图，其中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素的峰面积 *RSD* 分别为 0.72%、0.26% 和 1.2%，表明仪器精密度良好。

2.5.4　重复性考察　平行制备 6 份黄芩水煎液，进样分析，计算黄芩提取液中黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素含量 *RSD* 分别为 1.5%、0.70% 和 1.3%，表明该方法具有良好的重复性。

2.5.5　稳定性考察　取黄芩水煎液，分别在室温放置 0、2、4、8、12 和 24 h 后进样分析，黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素 *RSD* 分别为 2.0%、0.31% 和 1.4%，表明该供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.5.6　加样回收率考察　按加样回收率实验方法，将对照品加入量与黄芩水煎液中待测定成分量之比为 1.0∶1.0、1.5∶1.0、0.5∶1.0 的方式加入对照品溶液，制成高、中、低各 3 份的加样回收率溶液。按照“2.2”项下色谱条件进样分析，结果黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素高、中、低浓度水平的平均加样回收率分别为 100.3%、99.65% 和 99.81%，*RSD*

分别为 2.8%、2.0% 和 2.6%。

2.5.7　本法与药典规定标准比较　对比了本文方法和药典中规定方法检测药材中黄芩苷含量的差别，所得平均结果见表 3。采用配对 t 检验，P 值为 0.429。差异无统计学意义，所以认为本文方法检测药材中黄芩苷含量是可靠的。

表 3　HPLC 法与药典规定方法比较

Tab 3　HPLC method with the method from Pharmacopoeia

编号	黄芩苷含量 /%	
	HPLC 方法	药典方法
YP1	10.56	11.96
YP2	11.66	10.43
YP3	11.15	10.97
YP4	12.40	11.07
YP5	9.72	9.51
YP6	10.12	9.59

2.6　总固体含量测定

取称量瓶放置于 105 ℃烘箱中预先烘干 1.5 h 至恒重，取出放入干燥器中，冷却至室温，称定称量瓶质量。取适量样品，置于已恒重的称量瓶中，称定称量瓶和样品溶液的质量，加入超纯水轻轻晃动，使样品均匀分散开，于瓶底形成一层均匀的薄膜，将称量瓶置于 105 ℃干燥箱中，烘干 5 h 以上，取出放入干燥器中，冷却至室温，称定称量瓶和样品固体的质量。根据烘干前后质量变化及样品溶液的质量计算其对应总固体含量。

2.7　数据处理

2.7.1　产量　本研究将各单元工艺前后黄酮各成分产量、总固体产量作为工艺评价指标，用于评价各单元工艺对物质总质量的影响大小，其计算公式见式 (1)、(2)。

黄酮成分（i）的产量 = [样品中黄酮成分（i）的质量 × 样品总质量]/ 药材质量　　(1)

总固体产量 =（样品中体总固体的质量 × 样品总质量）/ 药材质量　　(2)

其中，i（i = 1，2，3）分别表示黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素。

2.7.2　纯度　为从化学组成的角度评价黄芩提取物制备工艺的影响，本研究考察了黄芩药材及中间体中黄酮纯度的变化，纯度 P 计算公式见式 (3)。

$P_{k,\,i}$ = 样品中黄酮成分（i）的质量 / 样品中总固体含量 ×100%　　(3)

其中，下标 k（k = 1，2，…，9）分别代表不同的物料，分别为黄芩药材、水煎液、沉淀 1、滤液 1、沉淀 2、溶液 1、溶液 2、滤液 2、黄芩提取物。

2.7.3　相似度　中药成分复杂，随着工艺的进行，各黄酮成分也会发生不同程度的转移和转化，导致中间体物质组成比例发生变化。因此，本研究采用相似度计算来衡量中间体与最终提取物组成比例的相似性，以相似度变化量为指标考察工艺对产品物质组成比例的影响 [7]。相似度计算采用了 Pearson 相关系数（r）、夹角余弦值（cosθ）和欧氏距离（D），计算公式见式 (4) ～ (6)。

$$r=\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{P_{k,\,i}-\overline{P}_{k}}{S_{k}}\right)\left(\frac{P_{f,\,i}-\overline{P}_{f}}{S_{f}}\right) \quad (4)$$

$$cos\theta=\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(P_{k,\,i}\,P_{f,\,i}\right)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}P_{k,\,i}^{2}}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}P_{f,\,i}^{2}}} \quad (5)$$

$$D=\sqrt{\sum_{i=1}^{n}\left|P_{k,\,i}-P_{f,\,i}\right|^{2}} \quad (6)$$

其中，n 为黄酮成分或大类成分，本文中分别为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和未检测成分之和；$P_{k,\,i}$ 为第 k 个中间体中黄酮成分 i 纯度，$\overline{P}_{k}$ 为第 k 个中间体所有黄酮成分纯度的均值，S_{k} 为第 k 个中间体所有黄酮成分纯度的标准差，$P_{f,\,i}$ 为最终产品中黄酮成分 i 的纯度，$\overline{P}_{f}$ 为黄芩提取物中所有黄酮成分纯度的均值，S_{f} 为黄芩提取物中所有黄酮成分纯度的标准差。

所得相关系数、夹角余弦值越接近 1，则该样品组成比例与最终提取物越接近；欧氏距离值越大，相似性越差。相关系数、夹角余弦值和欧氏距离变化量越大，则表示该步工艺对产品的组成比例影响越大。

2.8　黄芩提取物制备工艺中的产量变化

6 批不同黄芩提取物制备工艺中的黄酮产量变化见图 3。总体来看，黄芩苷产量最大，汉黄芩苷次之。经过水煎，汉黄芩苷和黄芩素的产量有明显下降，平均分别损失了约 18.73% 和 56.09%。水煎液加酸沉淀后，汉黄芩苷的产量平均下降约 27%。加入氢氧化钠溶解沉淀 1，并且再加入乙醇后，黄芩苷产量平均下降 3.7%。滤液 1 加入盐酸产生沉淀 2 的过程中，3 种黄酮的产量都有明显下降。黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素分别平均损失了 52.34 mg • g^{-1} 药材，14.47 mg • g^{-1} 药材和 1.270 mg • g^{-1} 药材。沉淀 2 后续滤液 2 等工艺，并没有显著影响 3 种黄酮的产量。黄芩提取物中黄芩苷产量在 13.87 ～ 39.42 mg • g^{-1} 药材之间，显著高于汉黄芩苷和黄芩素。

图 4 为总固体在制备工艺中的产量变化。黄芩药材由于含水，所以烘干后测定其总固体质量的值低于 1000 mg•g^{-1}，平均值约为 900 mg•g^{-1}。黄芩药材从工段 1 到工段 2 的过程中，图 4 中总

固体质量值迅速降低，平均总固体质量的值约 139.30 mg·g^{-1}，约为黄芩药材质量的 1/6。在工段 4 过程，总固体产量有显著降低的趋势。工段 4 之后总固体产量也有小幅变化，但并不显著。

2.9　黄芩提取物制备工艺中的黄酮成分纯度变化

由图 5 可知，黄芩苷从纯度约 10% 的黄芩药材中经过工段 1 到工段 2 精制后纯度约 61%，汉黄芩苷相对应纯度提升约 8% 左右，黄芩素纯度提升约 1%，可以确定此过程对中间体纯度的提升贡献较大。在工段 4 中，其中沉淀 2 经过酸沉、醇洗极大地除去了中间体的杂质，使得汉黄芩苷纯度下降 10% ～ 12%，黄芩苷纯度从 60% 提升至 80% 左右，对黄芩苷和汉黄芩苷的纯度影响较大。黄芩素纯度受乙醇洗涤影响较小。因此，从纯度的变化规律、黄芩工艺中间体及黄芩提取物化学组成变化角度，可以看出沉淀 1 和沉淀 2 的制备过程中，黄芩苷的纯度得到了极大提升。

2.10　黄芩提取制备工艺过程中的相似度变化

Pearson 相关系数值、夹角余弦值和欧氏距离变化见图 6。药材经过水煎煮提取后，相关系数值和夹角余弦值变化量均有明显上升。在水煎煮到工段 2 的沉淀 1 制备过程中，相关系数值和夹角余弦值上升至超过 0.8，是中间体与黄芩提取物组成比例相似度提升最高的工艺环节。与夹角余弦值和 Pearson 相关系数比较，欧氏距离更灵敏地反映出对工段 4 后续工艺中间体产物的差异。总体来看，欧氏距离比相关系数和夹角余弦值更灵敏，更适用于表征黄芩提取物制备中间体和产物组成的相似程度。欧氏距离越远即差异越大，黄芩药材欧氏距离最大，相似度最差；黄芩药材经过工段 1 的酸沉精制，欧氏距离下降一半左右，变化量最大。水煎煮液与获得的黄芩提取物的欧氏距离在 0.60 ～ 0.83。沉淀 1 加入乙醇溶解后，中间体与黄芩提取物的差异增大，欧氏距离在 0.11 ～ 0.45。第一次调酸所得沉淀 1 与黄芩提取物的欧氏距离在 0.12 ～ 0.41，第二次调酸并醇洗沉淀所得沉淀 2 与黄芩提取物的欧氏距离在 0.037 ～ 0.23，说明调酸工艺和乙醇洗涤沉淀可以大幅度降低中间体与终产品黄芩提取物的差异性。

2.11　制药工艺对产物一致性的影响

本研究用不同批次黄芩药材所得总固体产量、黄酮成分产量、黄酮成分纯度等指标的离散程度来表征制备工艺对黄芩提取物的质量一致性的影响。离散程度可以有变异系数（*RSD*）、极差（Range）、四分位数间距等多种可能指标。由于本研究中药材批次数量较少，所以选择极差值作为一致性的表征指标，计算时采用上述指标的最大值减去最小值获得。表 4 为总固体产量和黄酮成分产量的极差值。从表 4 中可知，随着制备工艺进行，黄芩苷产量的极差相比药材有小幅缩小，汉黄芩苷和黄芩素产量极差有明显下降，但总固体产量极差略有增加。表 5 为黄酮类各成分纯度极差值。经过制备，黄芩苷纯度极差值有所增加，其他两种黄酮的则下降。

表 4　各黄酮类成分产量及总固体产量的极差值 (g·g^{-1})

Tab 4　Extreme differences in flavonoid production and total solid yield (g·g^{-1})

物料名称	汉黄芩苷产量	黄芩素产量	黄芩苷产量	总固体产量
黄芩药材	1.20×10^{-2}	2.19×10^{-3}	3.16×10^{-2}	2.28×10^{-2}
水煎液	5.95×10^{-3}	9.18×10^{-4}	6.09×10^{-2}	0.108
沉淀 1	5.31×10^{-3}	3.72×10^{-4}	5.22×10^{-2}	2.59×10^{-2}
滤液 1	6.68×10^{-3}	6.96×10^{-4}	2.59×10^{-2}	3.12×10^{-2}
沉淀 2	1.72×10^{-4}	2.77×10^{-4}	3.08×10^{-2}	3.09×10^{-2}
溶液 1	1.69×10^{-4}	1.25×10^{-4}	2.84×10^{-2}	3.22×10^{-2}
溶液 2	1.39×10^{-4}	2.85×10^{-5}	2.76×10^{-2}	3.39×10^{-2}
滤液 2	1.24×10^{-4}	1.87×10^{-5}	2.74×10^{-2}	2.96×10^{-2}
黄芩提取物	3.01×10^{-5}	3.73×10^{-5}	2.83×10^{-2}	2.79×10^{-2}

表 5　3 种黄酮成分纯度极差值

Tab 5　Extreme differences in purity of three flavonoids

物料名称	汉黄芩苷纯度 /%	黄芩素纯度 /%	黄芩苷纯度 /%
药材	1.37	0.25	3.10
水煎液	1.95	0.20	16.75
沉淀 1	5.00	0.36	20.01
滤液 1	4.41	0.40	19.50
沉淀 2	0.37	0.66	17.27
溶液 1	0.28	0.33	24.33
溶液 2	0.27	0.05	32.12
滤液 2	0.29	0.05	18.63
黄芩提取物	0.03	0.12	25.34

2.12　关键工段辨析

2.12.1　基于产物相似度变化量辨识关键工段　在“2.10”项下发现相关系数和夹角余弦值的灵敏度不如欧氏距离，所以采用各工段前后欧氏距离变化表征相似度的变化。以 $\overline{D}_a$ 表示各工段产物欧氏距离的平均值，那么平均欧氏距离的变化值 $\triangle\overline{D}$ 就可以表示工段对产物相似度的影响，其计算公式见式（7）。

$$\triangle\overline{D}=|\ \overline{D}_{a+1}-\overline{D}_a\ |\quad(7)$$

其中下标 a（a = 1，2，3…8）为各工段，如水煎液、调酸、调碱等。各工段后的 $\triangle\overline{D}$ 值见表 6。本研究将 $\triangle\overline{D}$ 的阈值设为 0.15，大于该值就认为是关键工段。工段 2 和工段 4 引起的 $\triangle\overline{D}$ 变化值均超过该阈值，那么从相似度变化的角度，认为工段 2 和工段 4 是黄芩提取物制备的关键工段。

2.12.2　基于一致性变化辨识关键工段　考虑到各黄酮成分产量等于总固体产量乘以各黄酮成分纯度，所以基于一致性变化辨识关键工段时仅考虑总固体产量的变异和黄酮成分纯度变异。首先

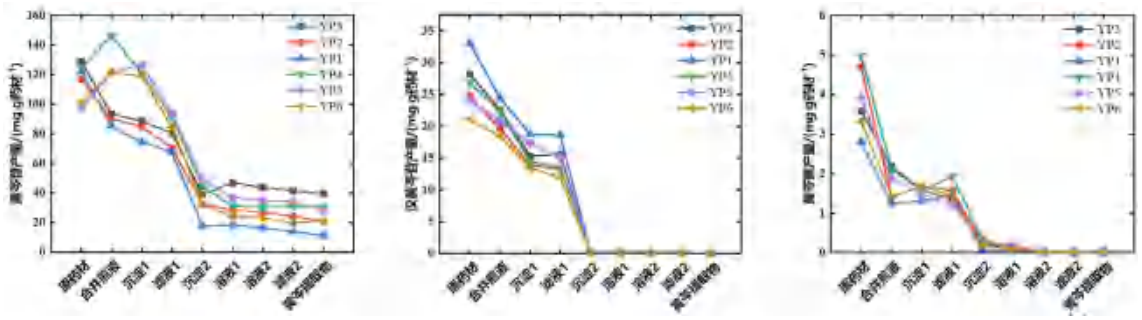


图 3　各黄酮成分产量变化图

Fig 3　Variation in the yield of flavonoid component

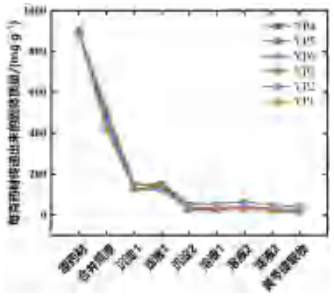


图 4　总固体在过程中的产量变化

Fig 4　Content change of total solid yield in the process

表 6　单个工段的相似度变化

Tab 6　Similarity changes for individual sections

工段	$\triangle \overline{D}$	工段	$\triangle \overline{D}$
1	0.1166	5	0.0368
2	0.3383	6	0.1219
3	0.0221	7	0.0879
4	0.1862	8	0.0985

计算各工段前后总固体产量和黄酮成分纯度的离差变化值△ Range，体现出各工段对一致性的影响，计算公式见式（8），所得结果见表 7。

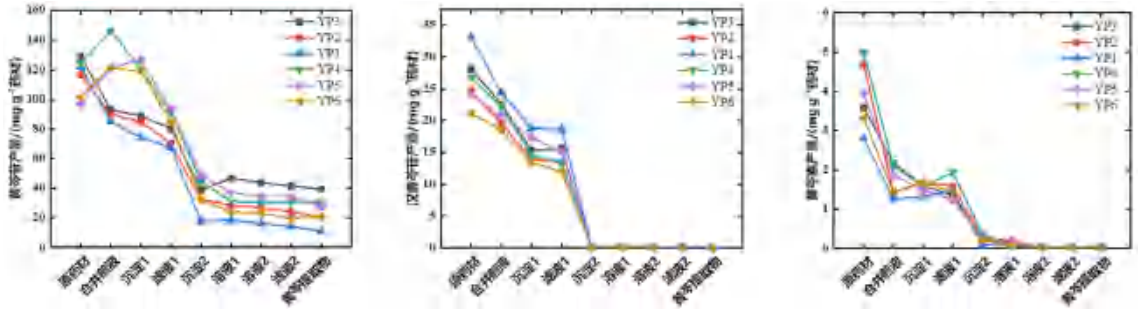


图 5　各黄酮成分纯度变化图

Fig 5　Variation in the purity of flavonoid component

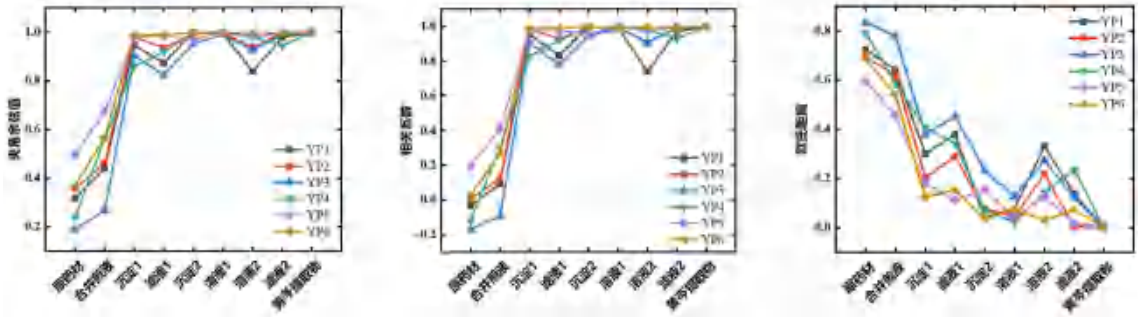


图 6　黄芩药材、中间体与最终产品组成相似度变化图

Fig 6　Variation in the similarity of *Scutellaria baicalensis*，intermediates and final products

△ Range ＝工艺后 Range －工艺前 Range（8）

然后再采用公式（9）综合考虑不同批次药材所得总固体产量和黄酮成分纯度的在不同工段后的一致性变化量（TVC）。

$TVC = |\Delta Range_{总固体产量}| \times (\sum_{i=1}^{n} |\Delta Range_{黄酮纯度}|)$（9）

公式中总固体产量和黄酮类成分纯度均为无量纲数值，本研究对△ Range 值取绝对值，公式（9）计算结果见表 8，得到不同工段一致性变化的影响，以 TVC ≥ 0.005 作为阈值，工段 1 和工段 2 总变化最大，可作为关键工段。

3　讨论

根据前面的研究，认为工段 1、工段 2 和工段 4 是关键工段。其中主要涉及的是水煎、2 次

表 7 各黄酮类成分纯度和总固体产量△ Range 值

Tab 7 △ Range values for the flavonoid purity and total solid yield

工段	黄芩苷纯度 /%	汉黄芩苷纯度 /%	黄芩素纯度 /%	总固体产量 /（$g \cdot g^{-1}$）
1	13.65	0.59	− 0.05	8.47×10^{-2}
2	3.26	3.04	0.16	-8.15×10^{-2}
3	− 0.51	− 0.59	0.04	5.26×10^{-3}
4	− 2.23	− 4.03	0.26	-2.90×10^{-4}
5	7.06	− 0.09	− 0.33	1.25×10^{-3}
6	7.79	− 0.01	− 0.27	1.71×10^{-3}
7	− 13.49	0.02	0.00	-4.26×10^{-3}
8	6.71	− 0.26	0.07	-1.71×10^{-3}

表 8 不同工段一致性变化值

Tab 8 Total variation change for different sections

工段	TVC	工段	TVC
1	0.0121	5	0.0001
2	0.0053	6	0.0001
3	0.0001	7	0.0006
4	0.0000	8	0.0001

调酸沉淀和乙醇洗涤等工艺。后续参数优化研究中应该重点考察这几个工段。黄芩苷在上述工段中存在产量下降的情况，有可能是因为沉淀过程中未充分进入沉淀，乙醇洗涤时溶解于乙醇，或者是过滤等步骤中残留于滤纸或漏斗表面等。虽然有文献报道黄芩苷在一定条件下水解成黄芩素（见图 7）[8-10]，但并未观察到黄芩素产量明显提高。所以我们推测在黄芩提取物制备工艺中，降解并非是导致黄芩苷产量下降的主要因素。

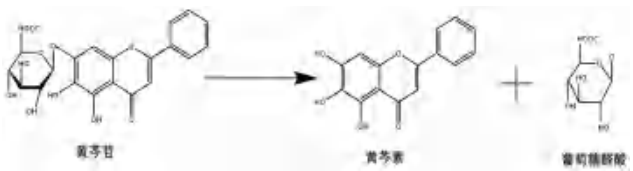


图 7 黄芩苷转化黄芩素的过程 [9]

Fig 7 Process of baicalin conversion of baicalein

从黄芩饮片制备为黄芩提取物，活性物质汉黄芩苷和黄芩素含量明显下降，甚至检测不到。考虑到该黄芩提取物是用于中药注射剂，成分简单有利于确保安全性，所以虽有损失，但也有一定合理性。

4 结论

ICH Q8 文件中指出应该建立过程参数的设计空间，使制药过程控制更为灵活 [11]。但部分中成药制药工艺流程较长，直接对生产全流程的参数进行优化难度较大，所以有必要先确定关键工段，再优化对应的过程参数 [12]。本研究将黄芩提取物的制备过程分为 8 个工段，测定了各工段产物对应的黄酮成分含量和总固体量，计算了纯度等指标。进一步提了量化表征各工艺对批间一致性影响的定量指标 TVC，根据 TVC 和相似度变化确定了关键工段为工段 1、工段 2 和工段 4，其对应的工艺包括水煎、调酸沉淀和乙醇洗涤等。本研究所提方法为定量考察制药工艺对批间一致性的影响提供了思路。但仍有不足之处，比如药材批次还不够多，阈值大小的设置主观性强，采用极差表征变异未必最佳等。今后可以尝试将本文方法应用于更多中药工艺研究上，进一步总结得出更为合理的阈值。本研究结果提示，后续工艺参数优化研究应该将重点放在工段 1、工段 2 和工段 4 上。如果企业中进行数字化车间改造，也应该重点考虑上述工段。

参考文献

[1] Lin H，Zhou J，Lin K，et al. Efficacy of *Scutellaria baicalensis* for the treatment of hand，foot，and mouth disease associated with encephalitis in patients infected with EV71：a multicenter，retrospective analysis [J]. Biomed Res Int，2016，2016（10）：1-9.

[2] Yu Z，Zhan C，Du H，et al. Baicalin suppresses the cell cycle progression and proliferation of prostate cancer cells through the CDK6/FOXM1 axis [J]. Mol Cell Biochem，2020，469（1-2）：169-178.

[3] Wang Z，Ma L，Su M，et al. Baicalin induces cellular senescence in human colon cancer cells via upregulation of DEPP and the activation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling [J]. Cell Death Dis，2018，9（2）：1-13.

[4] 马玲玲，孙燕 . 中药黄芩药理作用的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报，2016，18（2）：115-117.

[5] 周锡钦，梁鸿，路新华，等 . 中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究 [J]. 北京大学学报（医学版），2009，41（5）：578-584.

[6] 卫昊，郭玲玲，李柳柳，等 . 不同海拔和光照对黄芩中 7 种黄酮类有效成分含量的影响 [J]. 中草药，2019，50（6）：1472-1476.

[7] Pan JJ，He SY，Shao JY，et al. Critical pharmaceutical process identification considering chemical composition，biological activity，and batch-to-batch consistency：a case study of notoginseng total saponins [J]. Chin Herb Med，2020，12（1）：29-35.

[8] 郑辛甜，瞿海斌 . 紫外光谱法结合多元曲线分辨研究黄芩苷的转化规律 [J]. 高等学校化学学报，2012，33（7）：1450-1455.

[9] 郑辛甜 . 丹酚酸 B、丹酚酸 A 和黄芩苷的降解规律研究 [D]. 杭州：浙江大学，2011.

[10] 江慧玲 . 黄芩根及茎叶成分的提取和微生物转化利用研究 [D]. 南京：南京师范大学，2021.

[11] ICH. ICH Q8（R2）：Pharmaceutical development[EB/OL]，2009 8-1. [2022.5-16]. https：//data-base. ich. org/sites/default/files/Q8 R2 guideline pdf international.

[12] 龚行楚，陈滕，瞿海斌 . 基于质量源于设计理念的中成药二次开发研究进展 [J]. 中国中药杂志，2017，42（6）：1031-1036.

（收稿日期：2022-06-28；修回日期：2022-08-09）

一种盐酸普拉克索新晶型的制备及表征

刘旭，尹利献，戴华山，施晓枫，朱晶，翟佳平，罗宏军，梁慧兴（扬子江药业集团有限公司，江苏 泰州 225321）

摘要：目的 制备一种盐酸普拉克索新晶型（半水合物）。**方法** 利用粉末 X 射线衍射法、差示扫描量热法、热重法和红外光谱法分别对半水合物晶型和原研一水合物晶型进行表征分析，并通过加速 6 个月试验分别考察了半水合物晶型、一水合物晶型及无水物晶型的稳定性。**结果** 表征分析确认了两种晶型存在明显的差别，加速 6 个月试验显示半水合物晶型有关物质稳定性最佳。**结论** 半水合物晶型有很大潜力成为盐酸普拉克索的一种优势药用晶型。

关键词：盐酸普拉克索；晶型；半水合物；表征；稳定性
中图分类号：R913 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0130-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.021

Preparation and characterization of a new crystal form of pramipexole hydrochloride

LIU Xu, YIN Li-xian, DAI Hua-shan, SHI Xiao-feng, ZHU Jing, ZHAI Jia-ping, LUO Hong-jun, LIANG Hui-xing (*Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou Jiangsu* 225321)

Abstract: Objective To prepare a new crystal form of pramipexole hydrochloride (hemihydrate). **Methods** The crystal forms of hemihydrate and original monohydrate were characterized and analyzed by powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and infrared spectroscopy. The stability of hemihydrate crystal form, monohydrate crystal form and amorphous crystal form was investigated by 6-months acceleration tese. **Results** The characterization confirmed that there were obvious differences between the two crystal forms, and the 6-months acceleration test showed that the stability of the related substances with the hemihydrate crystal form was the best. **Conclusion** The hemihydrate crystal form may become the dominant pharmaceutical crystal form for pramipexole hydrochloride.

Key words: pramipexole hydrochloride; crystal form; hemihydrate; characterization; stability

化学药物一般是由晶态物质与非晶态物质组成，由于其分子内部的堆积与排列方式的不同，其固体物质状态可以存在多样形式，也就形成了药物的多晶型现象 [1-2]。理化性质不同的多晶型药物，在临床上可能会表现出不同的疗效，这直接影响着药物的应用和临床价值。新晶型的发现是研究优势药物晶型的基础，因此发现化学药物的多晶型现象有着十分重要的价值 [3-5]。

盐酸普拉克索是由德国勃林格英格翰公司研制的一种新型治疗帕金森病的药物，于 1997 年在美国和欧洲上市，并于 2005 年在中国上市，商品名为森福罗 [6-8]。其作用靶点为多巴胺系统的 D2 和 D3 受体亚型，通过兴奋纹状体的多巴胺受体减轻帕金森病患者的运动障碍，同时缓解伴发的抑郁症状，保护神经、延缓疾病进展 [9-13]。目前原研报道的盐酸普拉克索为一水合物晶型，此外 Kanwar 等 [14] 报道了盐酸普拉克索无水物晶型 A 和 B，制备方法为向普拉克索游离碱溶液中滴加盐酸而得，该方法得到的为无水物晶型 A 和 B 的混合晶型，工艺稳定性差，原料药质量无法得到保障，且对成品制剂质量以及人体生物利用度可能会产生一定的影响 [15]。

本研究报道了盐酸普拉克索一种全新的晶型，即半水合物晶型（见图 1）。通过控制干燥温度可成功制备出半水合物晶型，再通过粉末 X 射线衍射法（powder X-ray diffraction，PXRD）、差

作者简介：刘旭，男，硕士研究生，工程师，主要从事化学药物研发，email：liuxu@yangzijiang.com

示扫描量热法（differential scanning calorimetry，DSC）、热重法（thermogravimetry，TGA）和红外光谱法（infrared spectroscopy，IR）分别对半水合物晶型和原研一水合物晶型进行表征分析。同时还对比分析了半水合物晶型、一水合物晶型及无水物晶型的稳定性。

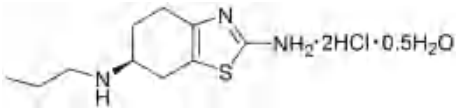


图 1　盐酸普拉克索半水合物结构式

Fig 1　Structure of pramipexole hydrochloride hemihydrate

1　仪器与试药

BRUKER AV-500 型核磁共振仪（瑞士 Bruker 公司）；Agilent 1260-6230 TOF LC-MS 质谱仪（美国 Agilent Technologies 公司）；XD-6 型 X 射线粉末衍射仪（北京普析通用仪器有限责任公司）；TGA4000 型热重分析仪、DSC8000 型差示扫描量热仪（美国 Perkinelmer 公司）；Thermo Nicolet is5 傅里叶变换红外光谱仪（Thermo Fisher Scientific 公司）。

盐酸普拉克索（扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司，批号：18032201，纯度：99.9%）。

2　方法与结果

2.1　盐酸普拉克索多晶型的制备

2.1.1　无水物晶型的制备　参考专利 WO2006/117614[14] 制备。

2.1.2　一水合物晶型制备　向 1 L 三口烧瓶中加入盐酸普拉克索（50 g）和纯化水（50 mL），开启搅拌，控制温度 20 ～ 30 ℃，待体系溶清后，缓慢加入丙酮（500 mL），1 h 加入完毕，冷却降温至 0 ～ 5 ℃，保温搅拌 2 ～ 2.5 h，抽滤，收集滤饼。将滤饼置于真空干燥箱中，控制温度 50 ～ 60 ℃，真空干燥 12 h，得白色固体（47.3 g）。

2.1.3　半水合物晶型制备　向 2 L 三口烧瓶中加入盐酸普拉克索（100 g）和纯化水（100 mL），开启搅拌，控制温度 20 ～ 30 ℃，待体系溶清后，缓慢加入丙酮（1000 mL），冷却降温至 0 ～ 5 ℃，保温搅拌 2 ～ 2.5 h，抽滤，收集滤饼。将滤饼置于真空干燥箱中，控制温度 80 ～ 90 ℃，真空干燥 9 h，得白色固体（92.3 g）。

2.2　盐酸普拉克索多晶型的表征

2.2.1　PXRD 表征分析　盐酸普拉克索的多晶型粉末制样后，置于粉末 X 射线衍射仪上测定。测试条件：Cu Kα_1 靶，λ ＝ 1.540 56 Å，电压 36 kV，电流 20 mA，扫描范围 3° ～ 40°，扫描速度 4° • min^{-1}。

采用 PXRD 法获得盐酸普拉克索的一水合物晶型和半水合物晶型的衍射叠加图（见图 2）。可见，两种晶型的 PXRD 特征峰有显著差异，其中，一水合物晶型的典型特征吸收峰 2θ 分别为 11.8°、13.1°、13.7°、17.1°、19.3°、21.2°、24.0°、24.5°、28.3°、34.8°；而半水合物晶型的典型特征吸收峰 2θ 分别为 6.4°、11.8°、12.6°、13.0°、13.4°、15.3°、17.0°、17.7°、19.2°、21.1°、24.0°、24.5°、25.5°、26.3°、28.2°、34.8°。粉末衍射特征吸收峰的差异表明这两种晶型的晶体结构存在差异。

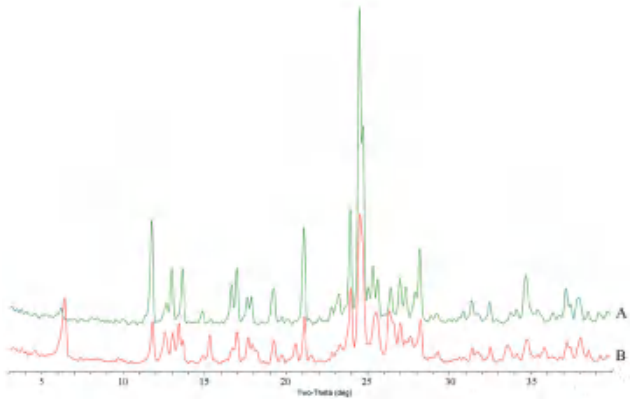


图 2　一水合物晶型（A）与半水合物晶型（B）的 PXRD 图

Fig 2　PXRD patterns of monohydrate crystal form（A）and hemihydrate crystal form（B）

2.2.2　DSC 表征分析　取样品 5 mg，压制成片置于差示扫描量热仪中。氮气保护下，在 30 ℃保持 1 min，再以 10 ℃ • min^{-1} 升温至 400 ℃，测定 DSC 数据。盐酸普拉克索一水合物晶型和半水合物晶型 DSC 图谱见图 3。结果显示，两种晶型在 300 ℃附近均出现明显的熔融吸热峰，此外半水合物晶型在 130 ～ 136 ℃还出现了一个明显的相变峰。DSC 结果表明两种晶型存在差异。

2.2.3　TGA 表征分析　取样品 5 mg，置于热重分析仪中。氮气保护下，在 30 ℃保持 1 min，再以 10 ℃ • min^{-1} 升温至 400 ℃，测定 TGA 数据。盐酸普拉克索一水合物晶型和半水合物晶型 TGA 图谱见图 4。结果显示，一水合物晶型失重为 6.00%，与水分理论含量 5.95% 一致；半水合物晶型失重为 3.16%，与水分理论含量 3.07% 一致。TGA 结果表明两种晶型结晶水含量存在差异。

2.2.4　IR 表征分析　红外吸收光谱是晶型物质鉴别与分析的一种辅助手段，不同晶型物质分子间作用力不同，共价键弯曲与伸缩振动可能存在差异，因此可利用红外吸收峰的差异分析不同晶型物质的氢键等分子间作用力[16]。

取样品约 1 mg，加入干燥的溴化钾粉末约 200 mg，在红外灯下用研钵研磨使混合均匀，置

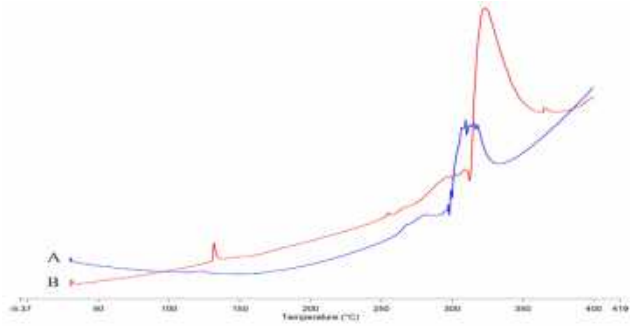


图 3　一水合物晶型（A）与半水合物晶型（B）的 DSC 图

Fig 3　DSC diagram of monohydrate crystal form and hemihydrate crystal form（B）

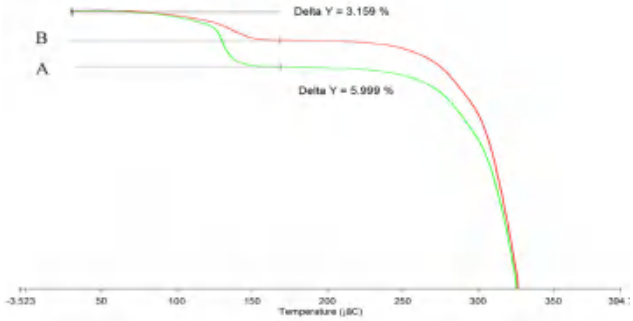


图 4　一水合物晶型（A）与半水合物晶型（B）的 TGA 图

Fig 4　TGA diagram of monohydrate crystal form（A）and hemihydrate crystal form（B）

压片装置中压成薄片。将薄片置红外光谱仪中在 400 ～ 4000 cm^{-1} 内扫描，记录色谱图。

盐酸普拉克索一水合物晶型和半水合物晶型 IR 图谱见图 5。结果显示，两者吸收峰数量存在一定的差异，一水合物晶型（见图 5A）中 1665 cm^{-1}，1651 cm^{-1} 和 1628 cm^{-1} 为 -NH_3^+ 弯曲振动，而在半水合物晶型（见图 5B）中 -NH_3^+ 弯曲振动只存在 1630 cm^{-1} 吸收峰，这进一步说明了半水合物晶型与一水合物晶型存在差异。

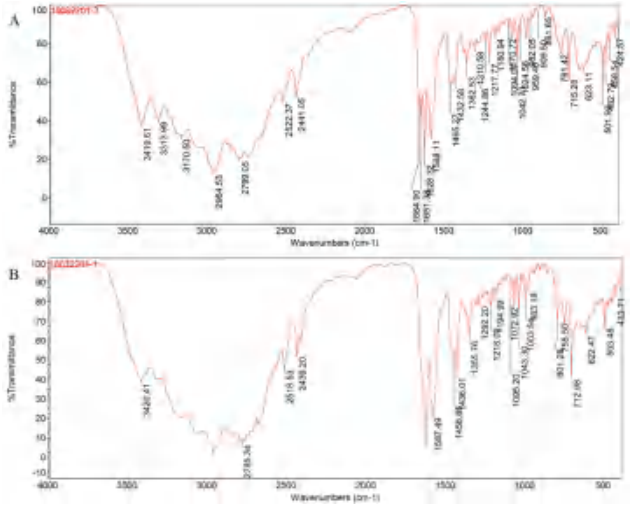


图 5　一水合物晶型（A）与半水合物晶型（B）的红外光谱图

Fig 5　Infrared spectrogram of monohydrate crystal form（A）and hemihydrate crystal form（B）

2.2.5　加速试验　将盐酸普拉克索半水合物晶型、一水合物晶型和无水物晶型进行加速试验 [（40±2）℃，RH（75±5）%] 考察，并分别在 0、1、2、3 和 6 个月时取样进行有关物质检测。

① 色谱条件：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Inertsil ODS-2 C18，4.6 mm×15 mm，5.0 μm），以磷酸盐缓冲液（取辛烷磺酸钠 5.0 g 和磷酸二氢钾 9.1 g 加水 1000 mL 使溶解，用磷酸调节 pH 值至 3.0）为流动相 A；以乙腈 - 流动相 A（50∶50）为流动相 B；按表 1 进行线性梯度洗脱；流速为 1.5 mL·min^{-1}；柱温为 40 ℃，检测波长为 264 nm。

表 1　HPLC 梯度洗脱程序

Tab 1　Program of HPLC gradient elution

时间 /min	A/%	B/%
0	60	40
15	20	80
15.1	60	40
20	60	40

② 测定法：取本品 15 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用乙腈 - 磷酸盐缓冲液（20∶80）溶解并稀释至刻度，作为供试品溶液。精密量取适量，用乙腈 - 磷酸盐缓冲液（20∶80）定量稀释制成每 1 mL 中含 1.5 μg 的溶液，作为对照溶液。照上述色谱条件，精密量取供试品溶液与对照溶液各 5 μL 分别注入液相色谱仪，记录色谱图。HPLC 检测结果见表 2。

表 2　不同晶型加速 6 个月总杂统计结果 (%)

Tab 2　Statistical results of total impurities of different crystal forms accelerated for 6 months (%)

晶型	0 月	加速 1 个月	加速 2 个月	加速 3 个月	加速 6 个月
半水合物	0.08	0.09	0.09	0.10	0.12
一水合物	0.09	0.11	0.13	0.14	0.21
无水物	0.11	0.14	0.18	0.20	0.39

结果表明，半水合物晶型加速 6 个月后杂质变化最不明显，说明其稳定性优于一水合物晶型和无水物晶型。

3　结论

药物多晶型现象对于药物的研发和应用具有极其重要的意义，约 50% 以上固体药物都存在着多晶型现象。不同的晶型对药物的稳定性和安全性产生较大影响。因此固体药物选择一种合适的晶型对于临床应用尤为重要 [17]。

本研究采用不同的方法分别制备了盐酸普拉克索半水合物、一水合物及无水物三种晶型。使用 PXRD、DSC、TG 及 IR 等多个手段对盐酸普拉克

索一水合物及半水合物进行了表征对比，可以直观地看出表征数据存在较大的区别，充分说明了两种晶型的差异性。将盐酸普拉克索半水合物、一水合物及无水物分别进行加速 6 个月试验，HPLC 检测结果表明三种晶型有关物质均存在着一定的增长，但是半水合物杂质增长最不明显，说明其稳定性优于其他两种晶型。

盐酸普拉克索半水合物晶型的发现不仅对晶型质量控制提供了帮助，而且其稳定性表现更好，有很大潜力成为该药物的一种优势药用晶型，可以更好地控制药品质量。

参考文献

[1] 吕扬，张丽，杨世颖，等 . 多晶型药品的质量控制技术与方法应用要求 [J]. 中国新药杂志，2014，23（7）：759-763.

[2] 闫富龙，祝宇龙，彭灿 . 盐酸小檗碱多晶型的制备、表征及其对自制片剂溶出行为的影响 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1786-179.

[3] 张燕，龚宁波，吕扬 . 阿达帕林的多晶型筛选和制备与表征研究 [J]. 中国新药杂志，2016，25（10）：1108-1113.

[4] 杜冠华，吕扬 . 固体化学药物的优势药用晶型 [J]. 中国药学杂志，2010，45（1）：5-10.

[5] 郝超，王国海，陈亮，等 . 一种盐酸卡利拉嗪的新晶型 [J]. 中国医药工业杂志，2018，49（6）：830-834.

[6] 汪文婷，宁剑波，王凌云，等 . 盐酸普拉克索的合成 [J]. 中国医药工业杂志，2012，43（7）：524-526.

[7] 宋波，张志伟，李日东，等 . 盐酸普拉克索降解杂质 BI-IO460BS 的合成 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（1）：17-19.

[8] 曹丽丽，郑忠辉，李进都，等 . 盐酸普拉克索的合成工艺研究 [J]. 中国药物化学杂志，2014，24（3）：201-204.

[9] 王艳峰，张丽华，赵宏伟，等 . 盐酸普拉克索中间体的合成方法：中国，CN105936629 [P]. 2016-09-14.

[10] 金华，李建其 . 盐酸普拉克索的合成 [J]. 中国药物化学杂志，2011，21（6）：430-432.

[11] 赵孝杰，刘远慧 . 一种关于普拉克索杂质 C 的合成方法：中国，CN105481792 [P]. 2016-04-13.

[12] 魏曼，胡霞敏 . 盐酸普拉克索缓释骨架片的制备 [J]. 中南药学，2016，14（11）：1198-1201.

[13] 李景，赵娟芝，黄斌，等 . 顶空毛细管气相色谱法测定盐酸普拉克索原料药中有机溶剂残留量 [J]. 中南药学，2018，16（11）：1608-1611.

[14] Kanwar S，Patel K，Deo K，et al. Process for the preparation of pramipexole and new anhydrous forms of its dihydrochloride：欧洲，WO2006/117614 [P]. 2006-11-09.

[15] 刘旭，徐镜人，施晓枫，等 . 盐酸普拉克索半水合物及其制备方法：中国，CN110698429 [P]. 2020-01-17.

[16] 房政钰，邢逞，邢文慧，等 . 伊马替尼草酸盐多晶型的制备、表征、转化规律及溶解性能研究 [J]. 药学学报，2021，56（11）：3153-3158.

[17] 陈建 . 药物多晶型转变因素的研究进展 [J]. 天津药学，2018，30（6）：44-48.

（收稿日期：2022-09-02；修回日期：2022-10-01）

麦考酚钠肠溶片体外溶出曲线方法研究

余博函[1, 2]，江文敏[3]，李振[3*]，吴欢[1*]（1. 安徽中医药大学，合肥 230012；2. 长三角药学高等工程学院，江苏 南通 226133；3. 广州迈凯安生物医药研究院有限公司，广州 510000）

摘要：目的 建立麦考酚钠肠溶片体外溶出曲线试验方法，评价自制制剂与原研制剂溶出曲线的一致性。**方法** 分别在 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液中耐受 2 h 后，以 pH 6.0、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质，采用紫外 - 可见分光光度法测定自制制剂与原研制剂溶出度，绘制溶出曲线，采用非模型依赖的相似因子法评价溶出曲线相似性。**结果** 3 批自制制剂在 4 种溶出介质中的溶出曲线与原研制剂相比，f_2 值均大于 50，与原研制剂溶出曲线相似。**结论** 建立的方法适用于麦考酚钠肠溶片自制制剂的溶出曲线测定，为麦考酚钠肠溶片处方工艺优化及一致性评价提供参考。

关键词：麦考酚钠肠溶片；溶出曲线；适度区分力；相似性

中图分类号：R917.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0133-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.022

作者简介：余博函，男，在读硕士研究生，主要从事药物制剂研究，email：bhyu.hm@simm.ac.cn *通信作者：吴欢，男，博士，副教授，主要从事药物分析学研究，email：wuhuancpu@ahtcm.edu.cn；李振，男，在读硕士研究生，主要从事化药及仿制药物开发研究，email：lizhen_medcan.163.com

In vitro dissolution curve of mycophenolate sodium enteric-coated tablets

YU Bo-Han[1, 2], JIANG Wen-min[3], LI Zhen[3*], WU Huan[1*] (1. *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Yangtze Delta Pharmaceutical College*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Guangzhou Michelangela Biomedical Research Institute Co.*, *Ltd.*, *Guangzhou* 510000)

Abstract: Objective To establish the dissolution curve of mycophenolate sodium enteric-coated tablets in vitro, and to evaluate the consistency of dissolution curve between self-made preparations and original preparations. **Methods** After acid resistance in pH 1.0 hydrochloric acid solution and pH 4.0 acetate buffer solution for 2 h, pH 6.0 and pH 6.8 phosphate buffer solution were used as the dissolution media, respectively. The dissolution curves were determined by UV-vis spectrophotometric method to determine the dissolution of the homemade preparations and the original preparations. The similarity of the dissolution curves was evaluated by the non-model-dependent similarity factor method. **Results** The dissolution curves of the 3 batches of homemade preparations in the 4 dissolution media were similar to those of the original formulations with f_2 values greater than 50. **Conclusion** The established method is suitable for the determination of dissolution curves of homemade mycophenolate sodium enteric-coated tablets, and provides a reference for prescription optimization and consistency evaluation.

Key words: mycophenlate sodium enteric-coated tablet; dissolution curve; moderate distinguish ability; similarity

麦考酚钠是一种新型抗代谢免疫抑制剂，临床多用于对接受同种异体肾移植成年患者急性排斥反应的预防[1]。麦考酚钠在体内代谢生成的麦考酚酸（mycophenolic acid，MPA）是一种可逆的非竞争性次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶（hypoxanthine nucleotide dehydrogenase，IMPDH）抑制药，可抑制鸟嘌呤核苷酸的经典合成途径，而人体 T、B 淋巴细胞主要依赖于从头合成途径合成鸟嘌呤，因此 MPA 能够抑制 T、B 淋巴细胞的增殖而发挥免疫抑制作用[2]。体外溶出是评价口服固体制剂处方及工艺的重要手段，建立具有适度区分力的溶出方法是评估仿制药与原研制剂体外溶出行为相似的有效途径。目前，国内外对麦考酚钠肠溶片的研究主要集中在临床方面，体外研究较少。本研究通过对 Myfortic 的研究，建立具有适度区分力的麦考酚钠肠溶片的溶出方法，为仿制药开发时处方工艺优化及一致性评价提供参考。

1 仪器与试药

UV-2600 紫外 - 可见分光光度计（日本岛津公司），BSA223S 电子分析天平、SECURS225D-1CN 电子分析天平、PB-10 pH 计（北京赛多利斯仪器系统有限公司），RT612-AT 溶出试验仪（深圳锐拓科技有限公司）。

Myfortic（规格：180 mg，批号：WPC03，诺华制药有限公司），麦考酚钠对照品（批号：1.0，EDQM，纯度：100.0%），麦考酚钠原料药（批号：07S620204，Concord Biotech Limited，含量：99.1%），空白辅料（批号：20210401，自制）。十二水磷酸钠、盐酸、冰醋酸、醋酸钠、氢氧化钠均为分析纯，甲醇为色谱纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 光谱条件

检测波长：190 ～ 600 nm，吸收池：1.0 cm（吸光度 0.3 ～ 0.7）。

2.2 溶液配制

pH 1.0 盐酸溶液：取浓盐酸 9 mL，用水稀释至 1000 mL，摇匀即得，浓度为 0.1 mol • L^{-1}。

0.2 mol • L^{-1} 磷酸钠溶液：取十二水磷酸钠 76.0 g，用水稀释至 1000 mL，即得。

pH 4.0 醋酸盐缓冲液：取 114 mL 冰醋酸用水稀释至 1000 mL，即得 2 mol • L^{-1} 醋酸溶液；另取醋酸钠 1.22 g，加水使溶解，加入 2 mol • L^{-1} 醋酸溶液 20.5 mL，加水溶解稀释至 1000 mL，摇匀，即得。

pH 5.0 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 375 mL 与 0.2 mol • L^{-1} 磷酸钠溶液 125 mL 混合，用盐酸溶液调节 pH 值至 5.0±0.05，即得。

pH 6.0 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 375 mL 与 0.2 mol • L^{-1} 磷酸钠溶液 125 mL 混合，用盐酸溶液调节 pH 值至 6.0±0.05，即得。

pH 6.5 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 375 mL 与 0.2 mol•L^{-1} 磷酸钠溶液 125 mL 混合，

用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.5±0.05，即得。

pH 6.8 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 375 mL 与 0.2 mol•L^{-1} 磷酸钠溶液 125 mL 混合，用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8±0.05，即得。

对照品溶液：取麦考酚钠对照品约 19.3 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入适量甲醇使溶解，分别加入上述对应 pH 介质稀释至刻度，作为对照品储备液。精密移取对照品储备液 1 mL 置 20 mL 量瓶中，加入对应溶剂稀释至刻度，作为对照品溶液。

2.3　*麦考酚钠在不同介质中紫外吸收情况*

精密称取麦考酚钠原料药适量，空白辅料适量，置于 20 mL 量瓶中，分别加入 pH 1.0 盐酸溶液，pH 4.0 醋酸盐缓冲液，pH 5.0、pH 6.0、pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，使麦考酚钠质量浓度约为 19 μg • mL^{-1}，同时以水作为对照，参照《中国药典》2020 年版四部通则 0401 紫外 - 可见分光光度法，按“2.1”项下光谱条件全波长进样测定，当麦考酚钠溶液质量浓度为 19 μg • mL^{-1}，采用紫外分光光度法时，可以得到最大吸收波长约为 250 nm。

2.4　*麦考酚钠在不同介质中溶解度*

取过量的麦考酚钠原料药置于 30 mL 试管中，分别加入 pH 1.0 盐酸溶液，pH 4.0 醋酸盐缓冲液，pH 5.0、pH 6.0、pH 6.5、pH 6.8 磷酸盐缓冲液，以水作为对照，在 37 ℃恒温水浴振荡器中振摇 18 h，过滤，取续滤液，作为供试品溶液。按“2.1”项下光谱条件，在 250 nm 最大吸收波长处进样测定，计算溶解平衡时各介质中麦考酚钠原料药的质量浓度，以质量浓度的均值为纵坐标，结果如图 1 所示，麦考酚钠原料药在生理 pH 范围内的溶解度呈依赖性。

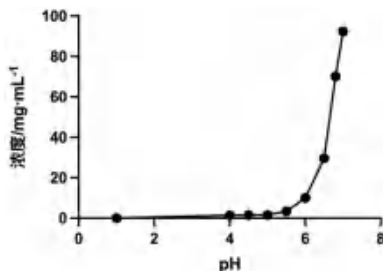


图 1　麦考酚钠的 pH- 溶解度曲线

Fig 1　pH-solubility curve of mycophenolate sodium

2.5　*有适度区分力溶出度方法的建立* [3]

2.5.1　溶出介质的选择　参照《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》、麦考酚钠进口注册标准 JX20180223[4] 及美国药典（USP41）[5] 推荐的溶出方法，选择 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液耐受 2 h 后，在 pH 6.0、pH 6.8 磷酸盐缓冲液进行溶出考察。

2.5.2　溶出方法的选择　根据欧洲药典 10.3 版 2.9.3 第二法方法 A、麦考酚钠肠溶片进口注册标准中溶出度方法及《中国药典》四部通则 0931 溶出度与释放度测定法 [6]，对不同溶出装置进行考察。由于 pH 6.8 磷酸盐缓冲液溶出介质是溶出曲线测定推荐介质之一且与肠道环境相似，故将溶出度方法测定所用溶出介质确定为 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 [7]。以 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 750 mL 为溶出介质，转速为 50 r • min^{-1}，依法操作，2 h 时取溶液 5 mL，滤过，取续滤液作为供试品溶液 1，并即时在操作容器中补充溶出介质 5 mL 与 37 ℃的 0.2 mol • L^{-1} 磷酸钠溶液 250 mL，混匀，使溶液的 pH 值为 6.8，继续依法操作，10、20、30、45、60、90 min 时分别取溶液 10 mL，滤过，精密量取续滤液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，作为供试品溶液 2。另取按“2.2”项下方法制备的对照品溶液。按照紫外 - 可见分光法在 250 nm 波长处测定供试品溶液 1、2 和对照品溶液吸光度，结果如图 2 所示，桨法、篮法和桨法＋沉降篮法分别于 60 min、45 min、45 min 时到达溶出平台。根据《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》，溶出曲线较平缓，60 min 到达溶出平台，具有适度的区分力，选择桨法用于评价原研制剂及自制制剂的溶出特性。

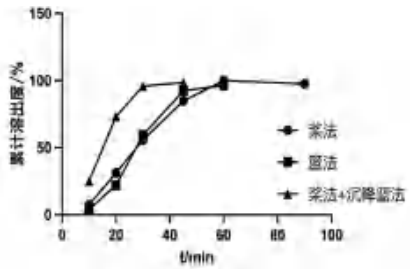


图 2　不同溶出方法测定麦考酚钠肠溶片溶出曲线

Fig 2　Dissolution curves of mycophenolate sodium enteric-coated tablets by different dissolution method

2.5.3　转速选择　转速可以显著影响制剂的溶出速率，本文比较了 50 r • min^{-1} 和 100 r • min^{-1} 不同转速下麦考酚钠肠溶片的溶出行为。采用桨法，按“2.5.2”项下溶出度方法，分别在 50、100 r • min^{-1} 转速条件下，于 20、25、30、40、50、60 min 时取溶出液 10 mL，制备供试品溶液。按照紫外 - 可见分光法在 250 nm 波长处测定各供试品和对照品溶液吸光度。结果见图 3，原研制剂在 100 r • min^{-1} 条件下溶出速率较快，40 min 即达溶出平台，区分力可能较差，当转速为 50 r • min^{-1} 时，溶出速率明显减慢，说明转速 50 r • min^{-1} 能更好地反映出肠溶制剂的溶出行为。

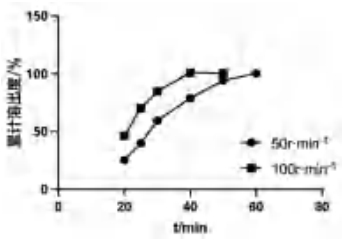


图 3　麦考酚钠肠溶片在不同转速下的溶出曲线

Fig 3　Dissolution profiles of mycophenolate sodium enteric-coated tablets at different dissolution rotating rates

2.6　方法学验证

综上各因素考察，确定麦考酚钠肠溶片溶出度试验条件为：分别在 pH 1.0 盐酸、pH 4.0 醋酸盐缓冲溶液 750 mL 耐受 2 h 后以 pH 6.0、pH 6.8 磷酸盐缓冲液 1000 mL 为溶出介质，选择桨法，转速为 50 r•min^{-1}，对建立的溶出度方法进行方法学验证[7-8]。

2.6.1　专属性　称取空白辅料 4 份，每份约 16 mg，置 50 mL 量瓶中，分别加入溶出介质（pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液）溶解并稀释至刻度，作为空白辅料供试品溶液。按“2.2”项下制备麦考酚钠对照品溶液，按照紫外 - 可见分光法在 200 ～ 400 nm 波长处进样测定供试品溶液和对照品溶液，如图 4 所示，空白辅料在 pH 1.0、pH 4.0 介质中，均无紫外吸收；在 pH 6.0、pH 6.8 介质中吸光度值占对照品溶液吸光度值的百分比 1.8%，该方法专属性良好。

2.6.2　线性关系试验　精密称取麦考酚钠对照品 5 份，每份约 38 mg，分别置 100 mL 量瓶中，以甲醇溶解并用水稀释至刻度，取上述各溶液分别加入溶出介质（pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液）稀释制成麦考酚钠质量浓度约为 3.8、7.6、11.4、15.2、19、22.8 μg • mL^{-1}，作为各线性浓度梯度溶液，按照紫外 - 可见分光法在 250 nm 波长处进样测定，由溶液质量浓度 C 对吸光度 A 进行线性回归，得回归方程，结果见表 2。

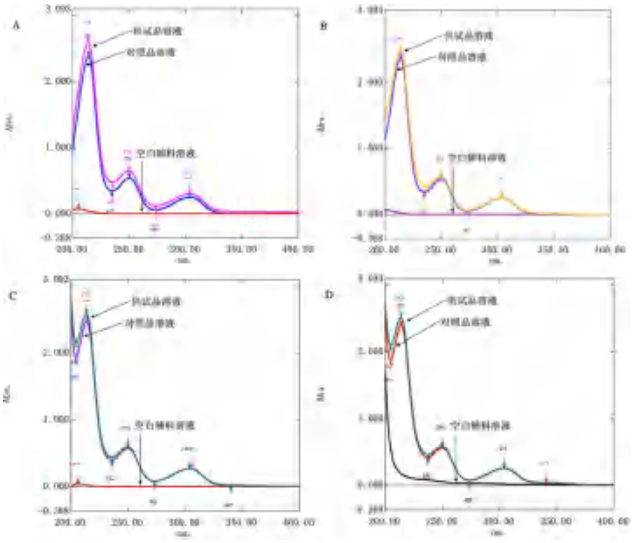


图 4　供试品溶液、对照品溶液、空白辅料溶液分别在 pH 1.0 盐酸溶液（A）、pH 4.0 醋酸盐缓冲液（B）、pH 6.0 磷酸盐缓冲液（C）、pH 6.8 磷酸盐缓冲液（D）的紫外吸收

Fig 4　UV absorption of test solution，control solution and blank excipient solution in pH 1.0 hydrochloric acid solution（A），pH 4.0 acetate buffer（B），pH 6.0 phosphate buffer（C）and pH 6.8 phosphate buffer（D）

表 2　麦考酚钠在不同溶出介质中的回归方程、相关系数和线性范围

Tab 2　Regression equation，correlation coefficient，and linear range of mycophenolate sodium in the different dissolution media

溶出介质	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
pH 1.0 盐酸溶液	A = 30.055C + 0.002	1.000	0.7249 ～ 21.75
pH 4.0 醋酸盐缓冲液	A = 30.098C + 0.003	1.000	0.7249 ～ 21.75
pH 6.0 磷酸盐缓冲液	A = 29.418C + 0.014	1.000	3.624 ～ 21.75
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	A = 29.705C + 0.001	1.000	3.624 ～ 21.75

2.6.3　滤膜吸附试验　经筛选确定 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液，使用 0.45 μm 水相滤膜，考虑到滤膜可能对不同浓度药物的吸附作用不同，设计使用 20% 及 100% 浓度水平的样品进行考察。分别称取麦考酚钠原料药 38 mg、190 mg，置 1000 mL 烧杯中，分别加入 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液溶解以及水，分别取上述 20% 及 100% 溶出度溶液的上清液，即得浓度水平为 20% 及 100% 的麦考酚钠原料药供试品溶液，分别向上述溶出度溶液加入 163 mg 空白辅料，取上清液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，即得浓度水平为 20% 及 100% 的麦考酚钠原料药＋空白辅料供试品溶液，分别取上述溶液，经 0.45 μm 水相滤膜过滤，分别弃去初滤液 1、2、3、5 mL 后，取续滤液 1、2、3、5 mL，按照紫外 - 可见分光法在 250 nm 波长处进样测定供试品吸光度，计算回收率及吸附率。结果显示，在 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液及水中，麦考酚钠原料药剂麦考酚钠原料药供试品溶液及麦考酚钠原料药＋空白辅料溶液在使用 0.45 μm 水相滤膜过滤后，回收率均在 98% ～ 102%，且吸附率在 ±2% 内，可见 0.45 μm 水相滤膜对麦考酚钠无吸附作用。

2.6.4　准确度　精密称定麦考酚钠对照品 5 份，每份 38 mg，加甲醇使溶解并用纯水稀释至刻度，作为对照品储备液，另精密称定空白辅料 32 mg 置 200 mL 量瓶中，分别加入溶出介质（pH 1.0 盐酸溶

液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液）至刻度，作为空白辅料储备液。分别按照 20%、100%、120% 3 个不同浓度水平量取空白辅料储备液适量、对照品储备液适量于同一量瓶中，并分别用上述经筛选确认的溶出介质及水稀释至刻度，各浓度水平平行制备 3 份，作为 20%、100%、120% 准确度溶液。在 250 nm 波长处进样测定吸光度，按照外标法计算回收率与 *RSD*。结果表明，本品不同质量浓度水平的回收率均在 98.0%～102.0%，*RSD*＜2.0%，本方法准确度良好。

2.7　溶出曲线相似性评价

采用非模型依赖的相似因子（f_2）法比较原研制剂和自制制剂溶出曲线相似性：若 $f_2 \geqslant 50$，可认为两条溶出曲线相似，即两者溶出量平均差异＜ 10%[9-10]。取 3 批麦考酚钠肠溶片自制制剂和 1 批原研制剂在上述溶出介质中测定溶出曲线。结果见图 5，表 3。原研制剂和自制制剂在 pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液中溶出曲线间的 f_2 值均大于 50，具有与原研制剂相似的溶出特性 [11-12]。

表 3　不同溶出介质中的 f_2 值

Tab 3　f_2 values in different dissolution media

溶出介质	f_2 值		
	M20220314	M20220517	M20220520
pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液	52.7	88.2	67.8
pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液	52.4	65.3	64.5
pH 4.0 醋酸盐 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液	75.0	74.1	71.1
pH 4.0 醋酸盐 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液	72.8	62.3	61.5

3　结论

麦考酚钠在 pH 值越大的条件下溶解度越高，在 pH 1.0 条件下几乎不溶，通过溶解度试验结果可知，麦考酚钠属于易溶性药物且具有 pH 依赖性。《中国药典》对肠溶制剂有耐酸性的要求，考察符合胃肠道 pH 条件下的溶出条件，通过 pH 6.8 磷酸盐溶出介质模拟人工肠液环境，考察不同溶出度方法及不同转速，最终得到具有适度区分力的溶出度方法。溶出曲线相似性试验结果表明，在不同条件下自制制剂与原研制剂相比，f_2 均大于 50，且在各溶出介质中溶出行为基本相似。此外，本试验对麦考酚钠的溶出度检查方法进行了验证，各项验证结果均符合规定，表明该方法良好。本次试验结果可为后续麦考酚钠肠溶片仿制药开发时处方工艺优化及一致性评价提供参考 [12]。

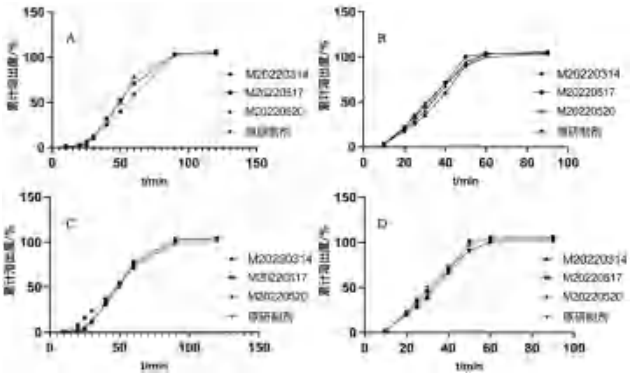


图 5　麦考酚钠肠溶片在 pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液（A）、pH 1.0 盐酸溶液 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液（B）、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 -pH 6.0 磷酸盐缓冲液（C）、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 -pH 6.8 磷酸盐缓冲液（D）的溶出曲线

Fig 5　Dissolution curves of mycophenolate sodium enteric-coated tablets in pH 1.0 HCL-pH 6.0 phosphate buffer（A），pH 1.0 HCL-pH 6.8 phosphate buffer（B），pH 4.0 acetate buffer-pH 6.0 phosphate buffer（C），and pH 4.0 acetate buffer-pH 6.8 phosphate buffer（D）

参考文献

[1] Neuberger M，Sommerer C，Böhnisch S，et al. Effect of mycophenolic acid on inosine monophosphate dehydrogenase（IMPDH）activity in liver transplant patients [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol，2020，44（4）：543-550.

[2] Tummala VBR，Nallagari SR，Golkonda R，et al. Development of stability indicating liquid chromatography-mass tandem spectrometric method for the estimation of mycophenolate mofetil in bulk and pharmaceutical formulations [J]. Trop J Pharm Res，2013，7（7）：640-646.

[3] 金方方，尹婕，南楠 . 化学口服固体制剂仿制药质量和疗效一致性评价研究思考 [J]. 药物分析杂志，2018，38（4）：575-581.

[4] 国家食品药品监督管理局 . 麦考酚钠肠溶片进口药品注册标准 [S]. JX20180223.2019-02-10.

[5] 美国药典 / 国家处方集 USP41-NF36 [S]. 2018：4697-4698.

[6] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：133，135-137.

[7] 谢沐风 . 溶出曲线相似性的评价方法 [J]. 中国医药工业杂志，2009，40（4）：308-311.

[8] 赵悦，张营，杜益，等 . 雷贝拉唑钠肠溶片的溶出度研究及方法学验证 [J]. 药学与临床研究，2022，30（1）：25-30.

[9] 侯飞，罗四海，方夏琴，等 . 阿司匹林肠溶片工艺与体外质量一致性研究 [J]. 中国医药导报，2019，16（3）：101-104.

[10] 张伟，刘建芳，赵彩霞 . 口服固体制剂溶出度测定方法的研究与应用进展 [J]. 中国医药导报，2016，13（3）：48-50，63.

[11] 陈贤春，吴清，王玉蓉，等 . 关于溶出曲线比较和评价方法 [J]. 中国医院药学杂志，2007，27（5）：662-664.

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

（收稿日期：2022-09-10；修回日期：2022-10-19）

万古霉素的临床应用及递送研究进展专题

【编者按】

万古霉素（vancomycin，VAN）是一种三环糖肽类抗菌药物，主要通过抑制细菌细胞壁的合成、改变细胞膜通透性、阻碍细菌 RNA 合成来发挥抗菌作用，目前广泛应用于临床耐甲氧西林金黄葡萄球菌（MRSA）、耐甲氧西林表皮葡萄球菌（MRSE）等β- 内酰胺类耐药菌所致严重感染的治疗。由于 VAN 本身分子量大、水溶解度高、透膜性差，其临床应用受到了一定的限制，而新型的递送系统或方式可有效提高 VAN 的生物利用度。本专题从不同的临床应用角度对 VAN 的递送研究进展进行综述。

【主持人简介】

寇龙发，博士，副教授，校聘研究员，硕士研究生导师，浙江省卫生高层次创新人才培养对象，主要开展基于临床问题的创新药物制剂研究。主持包括国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等各级科研课题 9 项；以第一或通信作者在 *Journal of Controlled Release*、*Bioactive Materials*、*Chemical Engineering Journal*、*Theranostics* 等杂志发表 SCI 论文 40 余篇；授权发明专利 5 项；担任中华医学会儿科学分会临床药理学组青年委员、浙江省药学会临床药学专委会委员、药剂专委会委员、*Asian Journal of Pharmaceutical Science* 客座主编，《中南药学》和《药物评价研究》青年编委，多个药学领域期刊审稿人。

万古霉素口服递送纳米制剂研究进展

顾开龙[2]，张宁[3]，苟靖欣[1*]（1. 沈阳药科大学药剂教研室，沈阳 110016；2. 辽宁成大生物股份有限公司，沈阳 110179；3. 沈阳市妇婴医院药剂科，沈阳 110011）

摘要：口服给药是肽类药物递送未来的发展趋势之一。本文以糖肽类抗菌药物万古霉素为研究对象，通过数据库检索，首先分析该药物口服递送所面临的挑战，随后对其口服递送相关纳米制剂的结构特点与作用方式进行综述，最后对相关药物口服递送所需关注的载体构建、药物担载、吸收转运速率、组织分布问题进行评述，提出了低药物泄漏、高载体稳定与完整性的载体设计方案，也指出了万古霉素口服递送后续研究需关注的关键科学问题与共性问题，以期为相关研究带来启发。

关键词：万古霉素；口服药物递送；纳米载体；整体吸收

中图分类号：TQ465.9，R944 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0138-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.023

Research progress on the nano-formulations for the oral delivery of vancomycin

GU Kai-long[2], ZHANG Ning[3], GOU Jing-xin[1*] (1. *Department of Pharmaceutics*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 2. *Liaoning Chengda Biotechnology Co., Ltd.*, *Shenyang* 110179; 3. *Department of Pharmacy*, *Shenyang Women's and Children's Hospital*, *Shenyang* 110011)

Abstract: Oral administration is a future trend for the delivery of peptide drugs. This review focused on vancomycin (VAN), a glycopeptide antibiotic. By database retrieval, the challenges in the oral

作者简介：顾开龙，男，工程师，硕士研究生，主要从事生物制剂研究，email：gukailong13@163.com *通信作者：苟靖欣，男，博士，讲师，主要从事肽类药物口服递送技术与机制研究，email：jxgou_syphu@163.com

delivery of this drug were analyzed, and then the structural characteristics and way of actions of related nano-formulations for VAN oral delivery were reviewed. Finally carrier construction, drug loading, absorption/transportation rate and tissue distribution as the focus in the oral delivery of related drugs were evaluated. A designing scheme concerning low drug leakage, high carrier stability and integrity was proposed. The key scientific and general problems on future VAN oral delivery that need attention were discussed to inspire related research.

Key words: vancomycin; oral drug delivery; nano-carrier; overall absorption

万古霉素（vancomycin，VAN）是一种三环糖肽类抗菌药物，该药物可抑制细菌细胞壁的合成、改变细胞膜通透性、阻碍细菌 RNA 合成，通过三重机制实现抗菌作用[1-2]，现广泛应用于耐药性革兰氏阳性菌所致的严重感染，如败血症、感染性心内膜炎、骨髓炎、关节炎与胃肠道细菌感染等。目前国内上市的 VAN 制剂为注射剂（注射用盐酸万古霉素），国外有 VAN 口服胶囊剂与溶液剂应用于临床，但仅限于肠道细菌感染的治疗。近年来，由于抗菌药物的滥用，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染、耐甲氧西林表皮葡萄球菌（MRSE）感染及假膜性小肠结肠炎病例日渐增多，如 MRSA 在医院感染病原菌中的检出率在 15 年内增加了近 10%[3-4]，使得 VAN 再次在临床上获得重视。

问世近 70 年来，VAN 注射剂的不良反应已较为明确，其中过敏反应较为常见[2]，主要包括与输注速度相关的速发型反应[5]（红人综合征，因肥大细胞脱颗粒造成血浆组胺水平升高导致）和迟发性反应[包括 DRESS（drug reaction with eosinophilia and systemic symptom）、线状 IgA 大疱性皮病、Stevens-Johnson 综合征、中毒性表皮坏死松解症等][6]。除过敏反应外，VAN 还存在包括注射部位疼痛、静脉炎在内的血管反应，以及肾毒性、耳毒性、中性粒细胞减少及血小板减少等不良反应[7]。此外，有 VAN 引发多种基础疾病（冠心病、肺癌）患者心搏骤停致死的案例报道，表明给药速率与血药浓度监控对 VAN 的安全使用具有重要意义[8]。

口服给药经济安全，可免除因注射疼痛、恐针[9]等带来的患者顺应性问题，通常是首选的给药方式。但部分药物因理化性质与生物药剂学性质缺陷而造成口服生物利用度低下，限制了其临床应用。2019 年，索马鲁肽片（Rybelsus®）的上市成为肽类药物口服制剂研发的里程碑事件。该品种以具有多重功能的 8-（2-羟基苯甲酰胺基）辛酸钠（SNAC）为关键辅料，通过调节胃液 pH 值以降低胃蛋白酶活性，与索马鲁肽形成表面疏水复合物以提高生物膜透过效率，调节生物膜流动性，改变胃上皮细胞膜渗透性，一举解决了索马鲁肽胃内降解与透膜困难两大难题，实现了索马鲁肽的口服递送[10]。更早的例子还有基于自微乳递送技术的环孢菌素口服制剂[11]。上述实例表明在递送策略适宜的前提下，肽类药物口服给药并非无法实现。本文通过文献梳理，对目前用于 VAN 口服递送的载体构建策略进行综述分析，以期为 VAN 及类似药物的口服制剂研发提供一定的参考。

1 万古霉素的生物药剂学性质与口服递送挑战

目前国外虽有 VAN 口服制剂应用于临床，但相关制剂仅用于假膜性小肠结肠炎等肠道内细菌感染的治疗，并未解决其口服吸收问题。目前，也未见关于可经肠道吸收的 VAN 新型口服制剂的临床研究报道，这一现状可能与 VAN 特殊的生物药剂学性质有关：VAN 相对分子质量 1449.2，水中溶解度大于 100 mg·mL^{-1}，略溶于甲醇和乙醇，不溶于高级醇、丙酮与醚，油水分配系数－ 3.1，其盐酸盐的等电点在 pH 5 左右[1]，属于典型的 BCS Ⅲ类药物。且 VAN 结构中的肽键存在被消化酶水解的风险，导致可被吸收的药物量进一步下降，影响其口服吸收。因此，根据理论分析，VAN 因同时具备水溶性高、相对分子量大、生物膜亲和力低以及易被消化酶降解的特点而难以口服吸收。结合一些口服实验数据，则可更加深入地了解 VAN 的生物药剂学特性。Sauter 等[12]以比格犬为模型动物，以静脉注射给药为参比，对比了口服溶液与口服肠溶胶囊的绝对生物利用度（F_{abs}），肠溶胶囊组的 F_{abs} 仅为（0.27±0.12）%，而溶液组的 F_{abs} 则达到（1.66±0.31）%，表明肠溶胶囊虽将药物与胃内不利因素隔绝，但并未能提升其吸收效果。考虑到肠溶胶囊在十二指肠与空肠上端溶散不完全的特性，该研究为“VAN 的吸收部位可能在肠道上端”的论断提供了依据。Fukushima 等[13]在对长期营养脂肪乳静脉注射致大鼠肠萎缩研究中发现，伴有肠黏膜屏障损伤的肠萎缩大鼠在十二指肠注射给予 VAN 后，血药浓度与药时曲线下面积分别提升至正常鼠的 2.4 倍与 2.6 倍。类似的，患有假膜性小肠结肠

炎或克罗恩病的患者在大剂量口服 VAN 后也可能出现血浆 VAN 水平升高的现象 [14]，提示肠黏膜损伤为 VAN 吸收提供了通路。因此，可以确定胃肠道上皮细胞的屏障作用（见图 1）以及药物的胃肠道内降解是限制 VAN 口服吸收的主要原因 [15]。

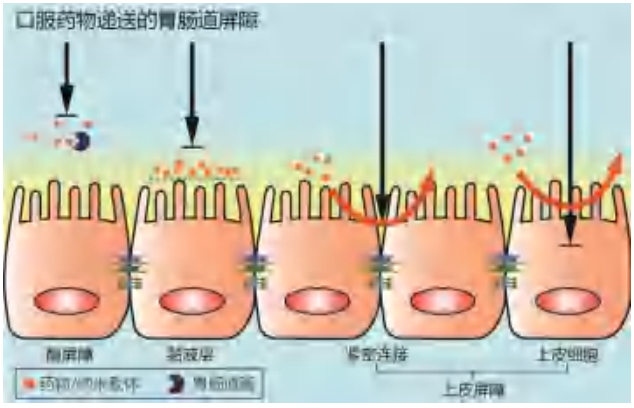


图 1　口服药物递送的胃肠道屏障

Fig 1　Gastrointestinal barrier by oral drug delivery

2　口服蛋白 / 多肽类药物递送策略

口服蛋白 / 多肽类药物递送是近年药剂学研究的热点，但该研究领域却已有近百年的历史 [15]，并形成了基于药物稳定化、黏液层渗透 / 黏附、药物吸收促进的三大策略体系（见表 1）。三个体系各有侧重，但都服务于蛋白 / 多肽类药物的吸收：药物稳定化策略主要关注药物在胃肠道内的结构维持，是后续药物吸收的物质基础；黏液层渗透 / 黏附策略则关注制剂分散于胃肠液后到胃肠道上皮细胞接触前的阶段，与药物稳定化策略共同决定可被吸收的药物量及药物吸收的时间窗口；药物吸收促进策略则重点关注如何提高药物跨过吸收屏障的速度与程度，是递送过程中的重要环节。因此，上述体系可分别作用于药物从口服到吸收的不同阶段，各自独立但也存在相互交叉（见图 2），而将各体系优势的有机结合，则可进一步提升口服递送效率，如纳米载体的药物包裹稳定化作用与主动靶向策略提升上皮细胞摄取作用以及与载体表面修饰提升黏液层渗透作用结合构建的纳米蛋白 / 多肽药物递送系统就是目前研究最为广泛的集成化载体。

3　万古霉素口服递送系统研究进展

针对 VAN 肠道吸收的研究目前已有诸多报道，如 Bowe 等 [30] 通过空回肠给药的方式考察了不同胆盐衍生物对 VAN 的吸收促进效果，并发现在胆酸的 C7、C12 位点进行糖基化修饰后得到的两亲性衍生物具有更好的 VAN 吸收促进效果，相对生物利用度提升至药物溶液的 440%。Prasad 等 [31] 则考察了非离子表面活性剂型吸收促进剂 Labrasol 和

图 2　现有口服蛋白 / 多肽类药物递送策略体系交互情况

Fig 2　Interplay between current strategies for oral protein/peptide drug delivery

维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯（TPGS）在不同配比下对 VAN 的口服递送效果，并发现在特定配比下 VAN 可达到较高的生物利用度（回肠给药）。Kajita 等 [32] 以 *W/O/W* 复乳为载体，通过监控结肠 / 直肠给药后血药浓度变化，证实了向复乳中引入不饱和脂肪酸（油酸、亚油酸、亚麻酸、二十二碳六烯酸）对 VAN 肠道吸收的必要性。上述研究并未采用灌胃给药，故无法获取胃液对相关制剂与药物影响的程度。同时，由于研究手段的局限性，上述研究并未在吸收机制方面进行深入探讨。

目前，用于蛋白 / 多肽药物口服递送的纳米载体种类繁多，结构与组成各异，但各类载体均通过担载药物、上皮细胞摄取、转胞运输的方式实现吸收。因此，本部分将以载体组成与结构为线索，对目前有报道用于 VAN 口服递送的纳米载体进行综述。

3.1　脂质体

脂质体是由磷脂双分子层包裹形成的封闭囊状体系，其水性内腔可用于水溶性肽类药物的担载，而磷脂双分子层则起到阻滞药物泄漏的作用，同时可在表面进行功能化修饰以提高吸收效率。脂质体在肽类及 BCS Ⅳ类药物的口服递送中的应用已有广泛报道 [33-35]，而 Diasome Pharma 公司开发的用于胰岛素口服递送肝靶向脂质体已进入Ⅲ期临床研究 [15]，表明相关制剂技术已较为成熟。

VAN 因其良好的水溶性，可被装载于脂质体的内水相中，进而实现药物与胃肠道酸、酶等不利于药物稳定的因素的隔绝，从而提升可被吸收的药物量。Anderson 等 [33] 采用薄膜水化法制备空白脂质体，并合成了叶酸 - 聚乙二醇 - 胆固醇（Fol-PEG-Chol），通过冻干 - 复溶法完成载药与脂质体的叶酸靶向修饰。制得的主动靶向脂质体

表 1 现有克服蛋白 / 多肽药物口服吸收与降解屏障策略

Tab 1 Strategies currently available for protein/peptide drugs to overcome the absorption and degradation barriers in oral administration

策略体系	具体策略	实现方式	优势	不足	文献
稳定化策略	pH 调节	使用有机酸或有机酸盐调节胃肠道 pH，降低酶活性以保护药物	制剂工艺简单，易于放大	未能提升药物吸收的速率与程度	[16]
	酶抑制	直接抑制消化酶活性以保护药物	制剂工艺简单，易于放大	长期使用可能造成消化酶不足；未能提升药物吸收的速率与程度	[15，17]
	肠溶包衣	借助肠溶胶囊防止药物的胃内破坏	制剂工艺简单，易于放大	单独使用无法提升药物吸收的速率与程度，需与其他策略联用	[17]
	微纳米包埋	借助微纳米颗粒装载药物实现与胃肠道不利因素的隔绝	可利用上皮细胞对载药颗粒的摄取提升药物的吸收效率	制剂工艺相对复杂	[18]
	药物 PEG 化	以 PEG 对药物进行化学结构修饰，实现水解位点与消化酶的空间阻隔	修饰后药物的血浆清除速率降低，具有长效作用	分子体积增大，增加吸收难度；PEG 修饰可能造成药物活性下降	[19]
	环肽化	通过成环反应遮蔽 C、N 末端，降低对酶的敏感性	环化可降低极性基团的暴露，有利于口服生物利用度的提升	适应面相对较窄	[20]
黏液层穿透与黏附策略	黏液层穿透	利用黏液溶解剂破坏黏液层结构，或使用非离子型高分子或净电中性材料修饰纳米载体表面，实现纳米颗粒的高效黏液层穿透	防止黏液层对载药颗粒的捕获与清除，提升可抵达上皮细胞表面的药物量	非离子型高分子修饰的纳米粒与细胞膜亲和力较差，可能对细胞摄取产生影响	[15，21]
	黏膜黏附	使用黏液层黏附材料、肠道贴片、肠黏附水凝胶等手段提高制剂在肠内的滞留时间	吸收时间窗口延长，有利于生物利用度的提升	需平衡黏液层滞留与黏液层穿透间的矛盾，过度滞留不利于生物利用度的提升	[22-24]
吸收促进策略	制备前药	将药物进行脂肪酸酰化，提高药物疏水性	可提升药物的胃肠道稳定性及对生物膜的亲和性，进而提升吸收效率	有降低药物活性、改变药物药动学行为的风险	[25]
	吸收促进剂	利用金属离子络合剂、表面活性剂、聚合物等对药物吸收具有促进作用的物质降低胃肠道上皮的屏障特性	可提高药物吸收的速度与程度	非选择性打开吸收屏障引发安全性隐患	[10-11]
	主动靶向	通过化学键合将特定配体修饰于纳米载体表面，借助受体介导胞吞实现药物吸收	吸收效率高，选择性强	载体构建难度大；部分配体对应的细胞受体在肠道内分布区域有限，缩小了吸收的空间窗口	[15]
	离子液体	将药物溶解或分散于离子液体中用于口服递送，可与肠溶包衣或吸收促进剂联用	离子液体具有降低黏液层黏度，打开旁细胞通路的作用，进而实现吸收促进	离子液体的吸收促进作用可能被水影响而降低	[26-27]
	肠道微针装置	采用仿生学或机械原理确保含药微针对胃肠道的有效刺入并递送药物	直接破坏吸收屏障，吸收效果好	药物递送时产生创口，有感染隐患	[28-29]
	纳米载体递送	将药物以适宜的方式装载于纳米载体中，并对纳米载体进行适当稳定化与功能化，从而满足口服递送需求	吸收效率高，载体材料与载药形式多样，可满足不同药物需求	递送效率受载体自身稳定性与载药牢固程度影响，部分基于无机材料的载体存在安全性隐患	[15，21]

平均粒径为（291.7±20.0）nm，包封率在 33% 左右。以 Caco-2 细胞单层为模型对 VAN 溶液、普通脂质体与叶酸修饰脂质体的表观渗透系数进行测定，孵育 2 h 后，三组样品的基底侧液中均未检出药物，但以顶端侧药物减失量为指标对不同制剂的摄取行为进行对比，发现 Caco-2 细胞对叶酸修饰脂质体的摄取更高。这一特性也在口服药动学实验中得到证实：叶酸修饰脂质体、普通脂质体和 VAN 溶液的口服 F_{abs} 分别为 21.8%、6.7% 和 1.74%。上述结果表明，采用适宜的载体装载药物，可实现药物在胃肠道内的保护，并提高消化道上皮细胞对药物的摄取。

对于 VAN 这种无法自行透过上皮屏障的药物，载体的完整性对其口服递送具有重要意义。脂质体中的磷脂在胃肠道内化学稳定性不佳，可能导致脂质体结构破坏进而影响口服吸收 [36]。四醚脂质是从生活在高温环境中的古核生物中提取的脂质，其亲脂部分由异戊二烯饱和侧链组成，2 个亲脂头部则可能为磷酸、甘油、多羟基化合物或氨基结构（见图 3）[37]。

目前，已有研究人员借助醚键在胃肠道内的天然稳定性，将四醚脂质体用于口服药物递送载体构建 [36-38]。例如，Uhl 等 [36] 使用卵磷脂、胆固醇与以甘油为亲水基团的四醚脂质（GCTE）为膜材，采用薄膜水化联合双不对称离心技术制备 VAN 脂质体（平均粒径为 134.0 nm，包封率

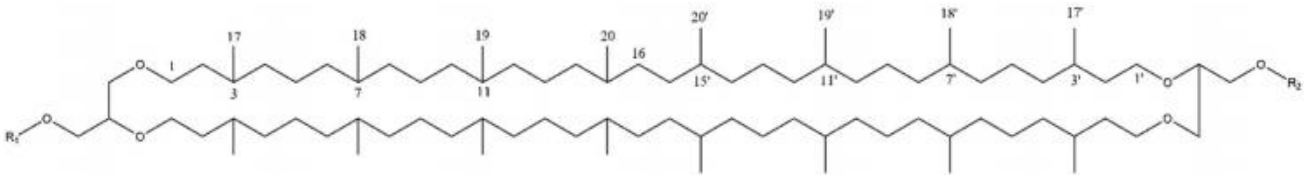


图 3 四醚脂质化学结构（R_1 和 R_2 代表极性头部）

Fig 3 Chemical structure of tetraether lipid（R_1 and R_2 represent polar head groups）

为 58.53%），该脂质体在人工胃液与人工肠液中的药物泄漏程度均低于不含 GCTE 的脂质体，且 GCTE 脂质体的 VAN 口服吸收程度比普通脂质体高约一倍，表明药物递送载体消化道稳定性的提升有利于药物口服吸收。

3.2 自乳化体系

自乳化体系（self-emulsifying drug delivery system，SEDDS）由油相、乳化剂、助乳化剂 / 潜溶剂组成的均相体系，该体系在遇到胃肠道液后可自发形成细小的含药乳滴，提高胃肠液中表观药物浓度，并借助消化道上皮细胞对含药乳滴的广泛摄取实现药物吸收 [34，39]。作为一种均相混合物，SEDDS 的放大与生产相较其他纳米载体更为简单，故在生产上更受青睐 [40]。

通常 SEDDS 遇水形成 *O/W* 乳液，故常应用于难溶性药物的口服递送，如目前已上市的环孢菌素自微乳制剂。VAN 水溶性强，通常情况下不适于自乳化体系，但可采用离子对技术对其进行疏水化处理，在不影响药物化学结构的前提下提高药物的脂溶性，进而提升包封率。VAN 结构中含 2 个碱性基团与 4 个酸性基团，因此可使用酸性或碱性试剂制备离子对。Zaichik 等 [41] 以药物沉淀效率为指标对比了 5 种阴离子表面活性剂（多库酯钠、十二烷基硫酸钠、亚油酸钠、牛磺胆酸钠、胆酸钠）和 2 种阳离子表面活性剂 [十二胺、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）] 对 VAN 的疏水化修饰能力，发现 CTAB 对 VAN 在物质的量比为 4∶1 时沉淀效率最高。随后 Zaichik 等 [41] 以离体肠黏膜渗透能力为指标对 SEDDS 的配方进行考察，发现粒径最大的 3 号配方（约 110 nm）拥有最高的黏膜渗透效率，而其他粒径较小的配方（约 15 nm）的渗透效率显著偏低。造成这一现象的原因可能是：① 3 号配方中含有 P 糖蛋白（P-gp）抑制作用的 Cremophor EL，通过降低药物外排提高黏膜渗透效率；② 3 号配方乳剂粒径最大，药物释放速率最低且单个乳滴中含药量最高，即可被吸收的药物量更高。小粒径样品虽更易被肠上皮细胞摄取 [42]，但细胞外快速的药物释放使得药物摄取并未因载体摄取受益。

通过功能化修饰提升递送效率是近年来 SEDDS 领域的研究热点。SEDDS 的功能化可分为配方功能化与化学功能化两大类：配方功能化指在 SEDDS 的配方中引入功能化成分，如 Efiana 等 [43] 将木瓜蛋白酶棕榈酸酯引入 SEDDS 配方以水解黏液层，降低其对含药乳滴的屏障作用以辅助 VAN 跨膜吸收；而化学功能化指对乳化剂进行化学结构改造以赋予 SEDDS 相应的功能，如 Friedl 等 [44] 对比 PEG、聚甘油（PG）与聚葡萄糖苷（APG）作为乳化剂亲水基团时制备的 SEDDS 的黏液层渗透能力、细胞摄取与细胞内分布行为，并发现不同表面材质对黏液层渗透的影响几乎无差异，但多羟基表面 SEDDS 的细胞摄取与内涵体逃逸效果均优于 PEG 表面 SEDDS。

3.3 聚合物纳米粒

聚合物纳米粒是一系列由不同聚合物材料经不同制备工艺制得的具有不同结构特征的纳米颗粒的统称，是目前研究最为广泛的药物递送载体 [15]。因聚合物化学结构的多样性与进一步结构修饰的便利性，聚合物纳米粒的功能化（如主动靶向修饰、黏液层渗透、黏膜黏附、紧密连接打开等）及其对药物的包裹与稳定作用，是确保此类纳米粒口服递送效率的重要措施，也使其成为广受关注的口服药物递送载体 [34，45]。根据组成，聚合物纳米粒可分为纯聚合物纳米粒与聚合物 - 脂质杂化纳米粒两大类，部分纳米粒拥有疏水载药环境，故多需对蛋白 / 多肽类药物进行疏水化处理 [46]。而近年来出现了一类拥有水性内核与聚合物交联囊壁结构的聚合物纳米囊 [47-48]，该类水核纳米囊可通过溶解直接载药，且基于化学交联的囊壁在胃肠道内较基于疏水相互作用的其他类型载体更为稳固，有望应用于蛋白 / 多肽类药物的口服递送。

微囊化封闭是 VAN 口服纳米颗粒构建方式之一，Loveymi 等 [49] 以尤特奇 RS-100 为载体材料，通过两步乳化法制备内含 VAN 的纳米囊，并通过改变药物 - 聚合物比例调节囊壁厚度，进而控制释药速率。该纳米囊表面吸附有 PVA 结构，因而具有一定的生物膜黏附性，其可在不影响肠壁屏障功能的前提下，通过生物膜黏附拓宽纳米囊细胞摄取时间窗口，从而将 VAN 的渗透系数提升 4.29

倍。Zakeri-Milani 等[50]则以 PLGA 为载体材料，采用两步乳化法制备 PLGA 纳米囊，该纳米囊的体外释药行为受药辅比影响较低，采用在体肠灌流实验对纳米囊的肠道吸收进行考察，发现各浓度下纳米囊可将 VAN 的渗透系数提升约 5 倍，但各浓度组间的渗透系数异不大。Zhang 等[51]以聚乙二醇共聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PEG-PLGA）与（2，3- 二油酰基 - 丙基）- 三甲胺（DOTAP）为载体材料，采用两步乳化法构建载药纳米粒，借助阳离子脂质提升纳米粒的黏液层渗透能力；以葡萄糖为主动靶向基团靶向小肠上皮细胞表面高表达的 Na^+ 依赖型葡萄糖转运体并介导胞吞以实现 VAN 的近端肠道吸收，从而降低抗菌药物对结肠菌群的影响。

3.4 介孔二氧化硅纳米粒

介孔二氧化硅是近年来广受关注的纳米药物递送载体构建材料，生物相容性良好。由介孔二氧化硅制备的纳米粒（MSN）具有孔径可控的多孔结构，比表面积大，可通过物理吸附或化学键合载药在胃肠道内保护所担载的药物[15]。与此同时，MSN 也拥有良好的表面修饰特性，可通过多种手段调控 MSN 表面亲疏水性、荷电性或对其进行主动靶向修饰，从而满足不同需求[52-54]。此外，MSN 还拥有有机材料无法比拟的化学惰性，故可在胃肠道环境内更好地维持结构完整性，以满足口服递送需求。目前，已有基于 MSN 的胰岛素口服制剂处于Ⅱ期临床研究阶段：以色列 Oshadi 公司采用粒径约 100 nm 的 MSN 颗粒吸附药物与多糖，该载药颗粒被混悬于油中并最终以肠溶胶囊包封以实现对药物的多重保护[45]。

MSN 在 VAN 口服递送领域也有一定应用，Ndayishimiye 等[55]采用模板法构建具有不同孔径（2 nm 与 9 nm）和不同表面修饰基团（羟基、氨基、磷酸酯基、烃链）的介孔二氧化硅纳米粒，然后以 Caco-2 细胞单层为模型，考察不同孔径及表面性质介孔硅纳米粒的表观渗透系数（P_{app}），发现表面羟基修饰的大孔纳米粒对 VAN 的渗透促进作用最强，孵育 3 h 后 P_{app} 可达 VAN 溶液的 6 倍左右。在对摄取过程中跨膜电阻（TEER）的监控中，发现给药后约 15 min 跨膜电阻可下降至给药前的 20% 左右并维持在该水平，并在将细胞单层两侧液体替换为培养液后的 4 h 内，TEER 逐步恢复。但需要注意的是，氨基修饰纳米粒组的 TEER 在 4 h 内只能恢复至初始的 90% 左右，完全恢复需要 12 h，而其他样品组的 TEER 在 4 h 左右即可恢复至初始水平。表明该介孔硅体系可通过打开紧密连接促进 VAN 的摄取，但阳离子颗粒对吸收屏障的潜在破坏也值得关注。

4 讨论与展望

随着材料科学与纳米技术的发展，近年来涌现出一系列用于口服药物递送的纳米载体[34，56]，其生物相容性好、递送效率高的特性使其成为新型药物递送系统研究中的热点领域，并积累了大量关于纳米颗粒粒径、形貌、表面性质、载药方式等剂型因素对药物递送效率影响的研究资料[35，57]。与其他递送载体相比，纳米颗粒在组成上更为灵活多变，因而在载药方式[58]、载体功能化[59]与表面修饰[46]等方面赋予相关递送体系更高的多样性。

借助纳米载体促进 BCS Ⅲ/Ⅳ类药物口服吸收的实质为利用胃肠道上皮细胞对纳米载体的整体摄取与转运作用实现药物的跨吸收屏障递送[35]。但在被摄取进入胃肠道上皮细胞之前，纳米载体需应对消化道内酸、盐、酶、黏液层等不利因素的挑战，若在抵达上皮细胞表面之前失去了载体结构的完整性或对药物的有效担载，则势必会造成递送效率的下降。因此，笔者认为在胃肠道内有效维持载体结构完整性以及药物担载状态是确保口服递送效果的必要条件。纳米载体对高水溶性药物的担载通常可采用静电复合[60]、疏水复合[46]、沉淀包埋[58]与微囊化封闭[49-50]的方案，其主要目的为借助适宜的相互作用提升药物与载体载药模块间的亲和力，阻止药物泄漏以提升可被吸收的药物量。而载体结构的改变则会导致其无法正常发挥设计功能，进而影响吸收效果。目前载体结构的稳定方法包括外部稳定、内部稳定及内外双重稳定。外部稳定即采用保护性材料对纳米载体进行包裹以防止载体结构破坏，如采用肠溶材料尤特奇 L100-55 对不同类型纳米载体的包裹实现了多西他赛[61]、拉洛他赛[62]、姜黄素[63]、艾塞那肽[58]等药物口服生物利用度的大幅提升。内部稳定则为采用交联的方式对纳米载体进行结构强化，提升载体对胃肠道不利因素的耐受能力的同时降低药物泄漏的速度与程度，如 Zhang 等[64]联合静电 - 共价双重交联策略构建的叶酸靶向果胶纳米粒，有效提升了胰岛素的口服吸收效率。内外双重稳定即同时采取外部保护材料对结构强化纳米载体进行保护，如 Benita 等[58]采用反溶剂沉淀结合相界面化学交联法制备了一种更为稳固的艾塞那肽纳米载体，并将其包裹于肠溶微囊中用于口服递送。结果表明，该体系的 F_r（对比皮下注射）可达 77%，有效地提升了艾塞那肽的口服递送效率，从而体现出载体结构完整性与药物担载状态维持对递送效果的重要意义。

作为一种治疗严重感染的抗菌药物，给药后迅速达到较高的血药峰浓度是 VAN 口服递送体系需要实现的目的，即药物的吸收速率与程度问题。基于纳米载体的胃肠道吸收过程包括黏液层渗透、上皮细胞摄取、胞内转运、基底侧（或顶端侧）外排、毛细血管 / 淋巴管转运等过程 [65]，涉及一系列生物学过程，且相较分子型药物的扩散吸收更为耗时。我们曾构建基于聚乙二醇共聚己内酯纳米粒的纳米药物载体，并将其分散于尤特奇 L100-55 中用于拉洛他赛和姜黄素的口服递送 [62-63]，两种药物可在灌胃后 1 h 左右达峰，基本可满足需求。但是，纳米载体性质与消化道上皮层透过速率间关系的研究却鲜有报道。

在担载 VAN 的纳米载体进入血液或淋巴循环后，其组织分布行为，特别是向感染组织中的分布，是决定其疗效的重要因素。纳米载体包裹可有效改变所担载药物的组织分布特征 [66]。因此，可以结合感染器官及组织的生理特性设计纳米载体，从而实现 VAN 在感染部位的蓄积以及对致病菌亲和力的提升 [67]，进而实现对 VAN 的“减毒增效”。

综上，在纳米技术蓬勃发展的今天，借助纳米载体实现 VAN 的高效口服递送存在良好的可行性，后续研究中还应重点关注药物担载状态维持能力、载体吸收过程与机制、口服生物利用度、口服药物组织分布等关键科学问题。VAN 的口服递送面临着其他肽类药物乃至 BCS Ⅳ类药物同样的问题，这些问题的解决将推动一系列药物口服制剂的发展。

参考文献

[1] PubChem Compound Summary for CID 14969，Vancomycin. 2022 [cited 2022 7.26]. https：//pubchem. ncbi. nlm. nih. gov/compound/14969.

[2] 刘晓东，原思佳 . 万古霉素与去甲万古霉素不良反应文献分析 [J]. 药物流行病学杂志，2010，19（9）：531-533.

[3] 王嵩宇，张雪云 . 2016 至 2019 年某三甲医院常见病原菌分布及细菌耐药性变迁 [J]. 沈阳医学院学报，2022，24（1）：40-45.

[4] 朱德妹，汪复，张婴元 . 2004 年上海地区细菌耐药性监测 [J]. 中国抗感染化疗杂志，2005，5（4）：195-200.

[5] 孔令冰 . 万古霉素致静脉炎伴药物热案例分析 [J]. 海峡药学，2021，33（10）：177-179.

[6] Zhu LJ，Liu AY，Wong PH，et al. Road less traveled：drug hypersensitivity to fluoroquinolones，vancomycin，tetracyclines，and macrolides [J]. Clin Rev Allergy Immunol，2022，62（3）：505-518.

[7] Donald PL. Vancomycin：a history [J]. Clin Infect Dis，2006，42（Supplement_1）：S5-S12.

[8] 闫正华，董亚琳，董海燕，等 . 警惕万古霉素的不良反应 [J]. 中国医院药学杂志，2001，21（9）：553-553.

[9] Yu M，Benjamin MM，Srinivasan S，et al. Battle of GLP-1 delivery technologies [J]. Adv Drug Delivery Rev，2018，130：113-130.

[10] Buckley S，Bækdal TA，Vegge A，et al. Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist [J]. Sci Transl Med，2018，10（467）：eaar7047.

[11] Drucker DJ. Advances in oral peptide therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov，2020，19（4）：277-289.

[12] Sauter M，Uhl P，Meid AD，et al. New insights into the pharmacokinetics of vancomycin after oral and intravenous administration：an investigation in Beagle dogs [J]. J Pharm Sci，2020，109（6）：2090-2094.

[13] Fukushima K，Okada A，Hayashi Y，et al. Enhanced oral bioavailability of vancomycin in rats treated with long-term parenteral nutrition [J]. Springer Plus，2015，4（1）：442.

[14] Pettit NN，DePestel DD，Fohl AL，et al. Risk factors for systemic vancomycin exposure following administration of oral vancomycin for the treatment of clostridium difficile infection [J]. Pharmacotherapy，2015，35（2）：119-126.

[15] Zhu Q，Chen Z，Paul PK，et al. Oral delivery of proteins and peptides：challenges，status quo and future perspectives [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（8）：2416-2448.

[16] Binkley N，Bolognese M，Sidorowicz-Bialynicka A，et al. A phase 3 trial of the efficacy and safety of oral recombinant calcitonin：the oral calcitonin in postmenopausal osteoporosis（ORACAL）trial [J]. J Bone Miner Res，2012，27（8）：1821-1829.

[17] Arbit E，Kidron M. Oral insulin delivery in a physiologic context：review [J]. J Diabetes Sci Technol，2017，11（4）：825-832.

[18] Ye C，Chi H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation：approaches，applications and challenges [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2018，83：233-246.

[19] Nojima Y，Suzuki Y，Iguchi K，et al. Development of poly（ethylene glycol）conjugated lactoferrin for oral administration [J]. Bioconjug Chem，2008，19（11）：2253-2259.

[20] Nielsen DS，Shepherd NE，Xu W，et al. Orally absorbed cyclic peptides [J]. Chem Rev，2017，117（12）：8094-8128.

[21] Ensign LM，Cone R，Hanes J，Oral drug delivery with polymeric nanoparticles：the gastrointestinal mucus barriers [J]. Adv Drug Delivery Rev，2012，64（6）：557-570.

[22] Yin L，Ding J，He C，et al. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery [J]. Biomaterials，2009，30（29）：5691-5700.

[23] Gupta V，Hwang BH，Lee J，et al. Mucoadhesive intestinal devices for oral delivery of salmon calcitonin [J]. J Control Release，2013，172（3）：753-762.

[24] Yin L，Ding J，Zhang J，et al. Polymer integrity related absorption mechanism of superporous hydrogel containing interpenetrating polymer networks for oral delivery of insulin [J]. Biomaterials，2010，31（12）：3347-3356.

[25] Vadlapudi AD，Vadlapatla RK，Kwatra D，et al. Targeted lipid based drug conjugates：a novel strategy for drug delivery [J]. Int J Pharm，2012，434（1）：315-324.

[26] Angsantikul P，Peng K，Curreri AM，et al. Ionic Liquids and deep eutectic solvents for enhanced delivery of antibodies in the gastrointestinal tract [J]. Adv Funct Mater，2021，31（44）：2002912.
[27] Tanner EL，Piston KM，Ma H，et al. The influence of water on choline-based ionic liquids [J]. ACS Biomater Sci Eng，2019，5（7）：3645-3653.
[28] Abramson A，Caffarel-Salvador E，Khang M，et al. An ingestible self-orienting system for oral delivery of macromolecules [J]. Science，2019，363（6427）：611-615.
[29] Abramson A，Caffarel-Salvador E，Soares V，et al. A luminal unfolding microneedle injector for oral delivery of macromolecules [J]. Nat Med，2019，25（10）：1512-1518.
[30] Bowe CL，Mokhtarzadeh L，Venkatesan P，et al. Design of compounds that increase the absorption of polar molecules [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1997，94（22）：12218-12223.
[31] Prasad YVR，Puthli SP，Eaimtrakarn S，et al. Enhanced intestinal absorption of vancomycin with Labrasol and d-α-tocopheryl PEG 1000 succinate in rats [J]. Int J Pharm，2003，250（1）：181-190.
[32] Kajita M，Morishita M，Takayama K，et al. Enhanced enteral bioavailability of vancomycin using water-in-oil-in-water multiple emulsion incorporating highly purified unsaturated fatty acid [J]. J Pharm Sci，2000，89（10）：1243-1252.
[33] Anderson KE，Eliot LA，Stevenson BR，et al. Formulation and evaluation of a folic acid receptor-targeted oral vancomycin liposomal dosage form [J]. Pharm Res，2001，18（3）：316-322.
[34] Haddadzadegan S，Dorkoosh F，Bernkop-Schnürch A. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins：technology landscape of lipid-based nanocarriers [J]. Adv Drug Delivery Rev，2022，182：114097.
[35] Wang Y，Tan X，Fan X，et al. Current strategies for oral delivery of BCS Ⅳ drug nanocrystals：challenges，solutions and future trends [J]. Expert Opin Drug Deliv，2021，18（9）：1211-1228.
[36] Uhl P，Pantze S，Storck P，et al. Oral delivery of vancomycin by tetraether lipid liposomes [J]. Eur J Pharm Sci，2017，108：111-118.
[37] 李正荣，四醚脂质体作为口服载体的研究 [D]. 上海：上海交通大学，2010.
[38] Uhl P，Helm F，Hofhaus G，et al. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B [J]. Eur J Pharm Biopharm，2016，103：159-166.
[39] Dhaval M，Vaghela P，Patel K，et al. Lipid-based emulsion drug delivery systems— a comprehensive review [J]. Drug Deliv Transl Res，2022，12（7）：1616-1639.
[40] Kubackova J，Holas O，Zbytovska J，et al. Oligonucleotide delivery across the caco-2 monolayer：the design and evaluation of self-emulsifying drug delivery systems（SEDDS）[J]. Pharmaceutics，2021，13（4）：459-485.
[41] Zaichik S，Steinbring C，Caliskan C，et al. Development and in vitro evaluation of a self-emulsifying drug delivery system（SEDDS）for oral vancomycin administration [J]. Int J Pharm，2019，554：125-133.
[42] Wang Y，Pi C，Feng X，et al. The influence of nanoparticle properties on oral bioavailability of drugs [J]. Int J Nanomedicine，2020，15：6295-6310.
[43] Efiana NA，Dizdarević A，Huck CW，et al. Improved intestinal mucus permeation of vancomycin via incorporation into nanocarrier containing papain-palmitate [J]. J Pharm Sci，2019，108（10）：3329-3339.
[44] Friedl JD，Jörgensen AM，Nguyen Le NM，et al. Replacing PEG-surfactants in self-emulsifying drug delivery systems：surfactants with polyhydroxy head groups for advanced cytosolic drug delivery [J]. Int J Pharm，2022，618：121633.
[45] Frank LA，Contri RV，Beck RCR，et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol，2015，7（5）：623-639.
[46] Wu L，Liu M，Shan W，et al. Bioinspired butyrate-functionalized nanovehicles for targeted oral delivery of biomacromolecular drugs [J]. J Control Release，2017，262：273-283.
[47] Tan C，Arshadi M，Lee MC，et al. A robust aqueous core-shell-shell coconut-like nanostructure for stimuli-responsive delivery of hydrophilic cargo [J]. ACS Nano，2019，13（8）：9016-9027.
[48] Kang B，Okwieka P，Schöttler S，et al. Tailoring the stealth properties of biocompatible polysaccharide nanocontainers [J]. Biomaterials，2015，49：125-134.
[49] Loveymi BD，Jelvehgari M，Zakeri-Milani P，et al. Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability [J]. Adv Pharm Bull，2012.2（1）：43-56.
[50] Zakeri-Milani P，Loveymi BD，Jelvehgari M，et al. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2013，103：174-181.
[51] Zhang G，Wang Q，Tao W，et al. Glucosylated nanoparticles for the oral delivery of antibiotics to the proximal small intestine protect mice from gut dysbiosis [J]. Nat Biomed Eng，2022，6（7）：867-881.
[52] Tan X，Yin N，Liu Z，et al. Hydrophilic and electroneutral nanoparticles to overcome mucus trapping and enhance oral delivery of insulin [J]. Mol Pharm，2020，17（9）：3177-3191.
[53] Tan X，Zhang Y，Wang Q，et al. Cell-penetrating peptide together with PEG-modified mesostructured silica nanoparticles promotes mucous permeation and oral delivery of therapeutic proteins and peptides [J]. Biomater Sci，2019，7（7）：2934-2950.
[54] Tan X，Liu X，Zhang Y，et al. Silica nanoparticles on the oral delivery of insulin [J]. Expert Opin Drug Deliv，2018，15（8）：805-820.
[55] Ndayishimiye J，Cao Y，Kumeria T，et al. Engineering mesoporous silica nanoparticles towards oral delivery of vancomycin [J]. J Mater Chem B，2021，9（35）：7145-7166.
[56] Aguirre T，Teijeiro-Osorio D，Rosa M，et al. Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials [J]. Adv Drug Delivery Rev，2016，106：223-241.
[57] Fox CB，Kim J，Le LV，et al. Micro/nanofabricated plat-

forms for oral drug delivery [J]. J Control Release，2015，219：431-444.
[58] Soudry-Kochavi L，Naraykin N，Nassar T，et al. Improved oral absorption of exenatide using an original nanoencapsulation and microencapsulation approach [J]. J Control Release，2015，217：202-210.
[59] Ren T，Wang Q，Xu Y，et al. Enhanced oral absorption and anticancer efficacy of cabazitaxel by overcoming intestinal mucus and epithelium barriers using surface polyethylene oxide（PEO）decorated positively charged polymer-lipid hybrid nanoparticles [J]. J Control Release，2018，269：423-438.
[60] Wong CY，Al-Salami H，Dass CR. Fabrication techniques for the preparation of orally administered insulin nanoparticles [J]. J Drug Target，2021，29（4）：365-386.
[61] Attili-Qadri S，Karra N，Nemirovski A，et al. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2013，110（43）：17498-17503.
[62] Gou J，Liang Y，Miao L，et al. The promoting effect of enteric materials on the oral absorption of larotaxel-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles [J]. Eur J Pharm Sci，2018，124：288-294.
[63] Wang N，Zhang Y，Liu H，et al. Toxicity reduction and efficacy promotion of doxorubicin in the treatment of breast tumors assisted by enhanced oral absorption of curcumin-loaded lipid-polyester mixed nanoparticles [J]. Mol Pharm，2020，17（12）：4533-4547.
[64] Zhang F，Pei X，Peng X，et al. Dual crosslinking of folic acid-modified pectin nanoparticles for enhanced oral insulin delivery [J]. Biomater Adv，2022，135：212746.
[65] Lundquist P，Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine：opportunities，limitations and studies in human tissues [J]. Adv Drug Delivery Rev，2016，106：256-276.
[66] Gou J，Liang Y，Miao L，et al. Improved tumor tissue penetration and tumor cell uptake achieved by delayed charge reversal nanoparticles [J]. Acta Biomater，2017，62：157-166.
[67] Zhang W，Taheri-Ledari R，Hajizadeh Z，et al. Enhanced activity of vancomycin by encapsulation in hybrid magnetic nanoparticles conjugated to a cell-penetrating peptide [J]. Nanoscale，2020，12（6）：3855-3870.

（收稿日期：2022-08-06；修回日期：2022-10-08）

玻璃体注射用万古霉素的应用与发展

汪泽卿[1，2]，唐永萍[3]，赵应征[2]，姚情[1，2]，寇龙发[1*]（1. 温州医科大学附属第二医院，浙江 温州 325027；2. 温州医科大学药学院，浙江 温州 325000；3. 温州医科大学附属眼视光医院，浙江 温州 325027）

摘要：万古霉素是治疗感染性眼内炎最常用的糖肽类抗菌药物，然而由于眼球结构特殊，常规的眼部给药生物利用度往往极低（＜5%）。而通过玻璃体腔注射药物，是目前解决这一难题的最好方式。最新的研究表明，纳米载体非常适合将亲水性或亲脂性药物递送至眼部组织，它可以克服眼部的多重屏障，延长药物在眼部组织中的驻留时间。纳米载体为万古霉素治疗感染性眼内炎提供了一种新的思路。本文综述了如何利用纳米载体提高药物在眼后段的渗透性和生物利用度，并阐明万古霉素纳米制剂在玻璃体内注射中的应用前景。

关键词：玻璃体注射；万古霉素；纳米载体；生物利用度；感染性眼内炎
中图分类号：R965，R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0146-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.024

Application and development of vancomycin for intravitreal injection

WANG Ze-qing[1, 2], TANG Yong-ping[3], ZHAO Ying-zheng[2], YAO Qing[1, 2], KOU Long-fa[1*] (1. *The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University*, *Wenzhou Zhejiang* 325027; 2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Wenzhou Medical University*, *Wenzhou Zhejiang* 325000; 3. *Eye Hospital of Wenzhou Medical University*, *Wenzhou Zhejiang* 325027)

基金项目：浙江省自然科学基金项目（No. LYY22H300001）。
作者简介：汪泽卿，男，硕士研究生，主要从事药物制剂研究，email：wzqpharm@163.com *__通信作者__：寇龙发，男，副教授，校聘研究员，硕士研究生导师，主要从事基于临床问题的药物递送系统开发及应用研究，email：klfpharm@163.com

Abstract: Vancomycin is a glycopeptide antibiotic commonly used for infectious endophthalmitis. However, the conventional ocular delivery strategies often have poor bioavailability (＜ 5%) due to the particular structure of eyeball, and the consequent drug deliver showed barriers. At present, the best solution is intravitreal injection. Latest studies, showed nanocarriers could deliver hydrophilic or lipophilic drugs to the ocular tissues, prolong the retention time and enhance the bioavailability. Nanocarriers provide a new idea for the treatment of infectious endophthalmitis with vancomycin. This study reviewed the current research progress in the role of ocular nanoparticle delivery in improving the drug penetration and bioavailability to the posterior segment of the eye, and elucidated the prospect of vancomycin nanocarriers in intravitreal injection.

Key words: intravitreal injection; vancomycin; nanocarrier; bioavailability; infectious endophthalmitis

眼睛是人类最重要的器官之一。据最新世界卫生组织统计，目前全球共有 21 亿眼部疾病患者，且患者数量还在不断增加，眼部疾病会导致视力受损甚至失明，因此亟需开发更多安全有效的眼部用药，改善全球公众眼部健康问题。

眼球结构特殊，存在三道生理屏障，包括泪液屏障、结膜角膜屏障及血眼屏障，其中血眼屏障又由血 - 房水屏障和血 - 视网膜屏障两部分组成（见图 1），这三道屏障可以有效抵御外来病原体的入侵，但也阻止了外来药物的进入。因此，使用口服、静脉注射、滴眼药水和涂抹眼膏等常规给药途径，在治疗某些眼科疾病时无法达到治疗所需的血药浓度，从而使治疗效果甚微或者根本无法起治疗效果。利用注射器将药物直接注入眼球玻璃体腔中，使药物跨越三道生理屏障直接到达眼后组织，是目前解决生物利用度低这一难题的最好方式之一 [1-3]。玻璃体手术起源于 20 世纪 60 年代末，随着近年来科研人员在给药途径、药物制剂方面的不断创新，使得玻璃体相关手术快速发展，其中玻璃体注射是将药物运送至眼后组织的最直接方法，可以快速达到较高血药浓度。但目前玻璃体注射用药物仍然存在一些临床不良反应，玻璃体注射用药物的研发是一个重大的挑战。

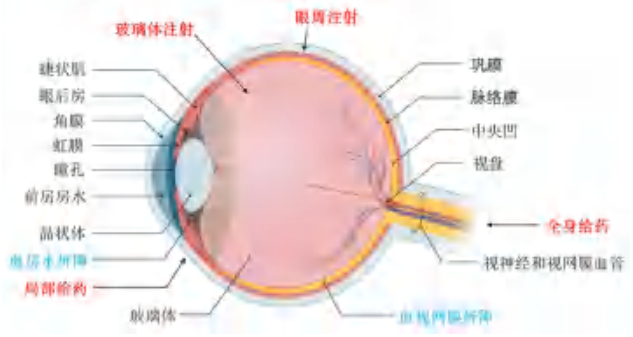


图 1　眼球结构、眼部生理屏障及眼部给药方式示意图

Fig 1　Eye structures, eye physiological barriers and ophthalmic administration

1　万古霉素

在人类的医疗发展史中，治疗金黄色葡萄球菌感染一直是世界公共卫生所面临的难题，是造成 20 世纪全球感染高发病率和病死率的一个重要原因。金黄色葡萄球菌是一种革兰氏阳性菌，因其能逃避免疫系统导致全身感染而闻名 [4-5]，并且金黄色葡萄球菌菌株具有形成生物膜组织的能力，形成生物膜的金黄色葡萄球菌具有高耐药性，使根除这类感染极其困难 [6-8]。

万古霉素（见图 2）是一种糖肽类抗菌药物，20 世纪 80 年代，由于 β- 内酰胺类抗菌药物的滥用，导致大量耐药菌出现，如耐甲氧西林金黄葡萄球菌（methicillin-resistant staphylococcus aureus，MRSA）[9-10]、耐甲氧西林表皮葡萄球菌（meticillin-resistant staphylococcus epidermidis，MRSE）[11-12]、难辨梭菌（clostridium difficile，CD）[13-15]，万古霉素是临床上用于治疗由 MRSA、MRSE 与 CD 导致的严重感染疾病的一线药物，因其不易产生细菌抗药性，被科研人员称为“人类对付耐药菌株的最后一道防线”[16-17]。

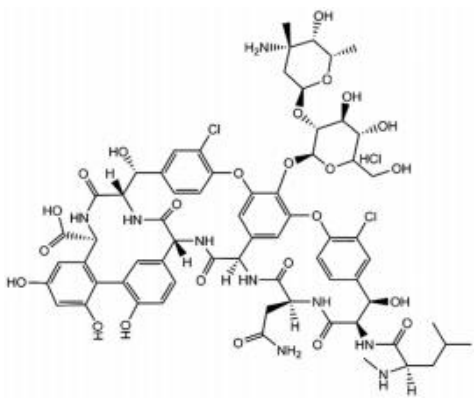


图 2　万古霉素结构式

Fig 2　Chemical structure of vancomycin

目前，万古霉素在眼科疾病的治疗中被广泛使用，在感染性眼内炎的治疗中最为常见 [18]。感染性眼内炎又称玻璃体炎症，是眼科最严重的并

发症之一，感染性眼内炎的病情发展迅速，治疗十分棘手，由微生物入侵眼部组织造成[19]，微生物在眼内产生的毒素和代谢物，炎症细胞和炎症因子会对眼部神经系统造成严重损伤。如果眼内炎感染得不到有效的控制，最终可能导致双目失明，甚至将眼球摘除以防止感染进一步扩散[20-21]。所以探讨感染性眼内炎处理的最佳手术时机及手术方式，一直是诸多眼科医师所关注的问题。感染性眼内炎可发生在任何内眼手术后，发生率为 0.07% ～ 0.34%，在白内障手术后最为常见，占发生眼内炎患者的 90%[22]。临床研究发现多种微生物可导致感染性眼内炎[23]，但绝大多数病例是由细菌感染造成的[24]，据统计约 80% 的感染性眼内炎由革兰氏阳性球菌引起，其中最常见的是凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌。然而，上述微生物几乎都对万古霉素敏感[24]。

2 万古霉素在眼科的应用

万古霉素作为治疗感染性眼内炎首选药物之一[25-26]。在治疗过程中，先对患者眼球进行表面麻醉，后在玻璃体腔内注射盐酸万古霉素（1 mg/0.1 mL），注射完成后在局部和静脉全身给广谱抗菌药物（如氟喹诺酮类和氨基糖苷类等药物），进行综合治疗，杀灭对万古霉素不敏感的革兰氏阴性菌。但由于血 - 视网膜屏障及血 - 房水屏障的存在，全身给药的抗菌药物在眼内难以达到有效的浓度。全身用药只能作为感染性眼内炎的辅助治疗，主要用以阻止炎症眼外蔓延。通过大量临床研究发现，在角膜移植、白内障、晶状体植入等眼内科手术中使用万古霉素可明显降低术后感染眼内炎的风险[27-28]。

玻璃体腔注射抗菌药物是针对疑似病例、早期病例的治疗方法或在实施玻璃体切除手术前的初期治疗措施，综合治疗方案中，早期玻璃体腔内注射盐酸万古霉素，能迅速在眼内达到有效的药物浓度。通过与形成细胞壁的蛋白质前体结合，抑制细胞壁合成，迅速分解细菌。但盐酸万古霉素有视网膜毒性，对视网膜感光层和色素上皮细胞会产生不可逆性的损伤。因此，万古霉素在玻璃体注射时浓度应严格控制低于 1 mg/0.1 mL，该浓度在临床运用中也被普遍认同[29]。在感染性眼内炎的治疗过程中不必连日给药，建议 2 ～ 3 d 注射 1 次。虽然在大多数情况下只需在玻璃体中注射一次万古霉素即可以控制感染[30]，但依旧要观察患者在术后的最佳矫正视力、眼压、前房闪辉及玻璃体混浊等情况。如尚未控制住眼内炎症需要再次注射给药，确保眼内炎感染被完全控制。

3 万古霉素临床用于眼部疾病治疗的局限

3.1 稳定性差

万古霉素分子结构中存在酚羟基及二酚基，暴露在空气中易发生水合和氧化反应，对产品的外观和纯度均会产生影响，药物不良反应发生率也随之增加[31]。临床治疗通常使用万古霉素冻干粉针剂。注射用盐酸万古霉素冻干粉针剂（稳可信®）的说明书中指出：临用前，将 10 mL 注射用蒸馏水加入到 500 mg 万古霉素无菌干粉小瓶中，配成 50 mg•mL^{-1} 的母液，配制后的溶液应贮存于冰箱内，且必须再稀释。含有 500 mg 万古霉素的溶液，须再用 100 mL 或 100 mL 以上 0.9% 氯化钠或 5% 葡萄糖注射液稀释[32]。我们可以发现，万古霉素配制完的母液保存条件比较苛刻且保存时间较短，在使用时需要现配现用，面对突发状况时无法快速使用，临时配制对医护人员也造成了一定的压力。

3.2 并发症和视网膜毒性

此前，临床流行术前在前房注射低浓度万古霉素溶液用于预防和治疗术后感染性眼内炎的发生。Witkin 等[33]在 2015 年报道了 6 例极为罕见且破坏性极强的白内障术后并发症：出血性闭塞性视网膜血管炎（hemorrhagic occlusive retinalvasculitis，HORV）[34]，认为 HORV 可能与白内障术毕前房注射万古霉素有关，这一致盲的灾难性的并发症，瞬间在国际上引起广泛关注。根据美国视网膜专家协会（ASRS）和美国视网膜协会（ASCRS）报道，HORV 预后不良，61% 的患者（22/36）视力低于 20/200，22% 的患者（8/36）失去所有光感[35-36]。随着万古霉素预防眼内炎的使用常规化，万古霉素良好的预防和治疗眼内炎作用和可能导致 HORV 的发生，致使其成为眼科医师手中的一把“双刃剑”。基于目前的临床数据，推断 HORV 的发生主要归结于万古霉素所致的 3 型迟发性超敏反应，并认为 HORV 的发生与万古霉素的使用剂量相关[35]。但万古霉素玻璃体腔注射治疗感染性眼内炎仍是首选且切实有效的方法。因此，面对上述状况，眼科医师在使用万古霉素时应保持严谨的态度，为避免 HORV 的发生，目前最佳的治疗方案是将万古霉素进行小剂量玻璃体注射，从而起到预防和治疗眼内炎的作用。

有学者对万古霉素玻璃体内注射的安全剂量范围进行了研究，发现玻璃体腔内注射 2 mg 万古霉素是没有毒性的，小于 2 mg 是安全剂量；当注射剂量大于 5 mg 会对视网膜的感光层及色素上皮细胞产生非常明显且不可逆的损害[37]。由于视网膜组织对外来药物十分敏感，对药物的理化作用几乎没有抵抗力，在治疗完成后其视网膜的形态会有所改变，即使完全恢复视力功能也较正

常人及未发生眼内炎的患者差[38]。同时临床用万古霉素治疗眼内炎时还观察到一系列并发症：角膜水肿、高眼压、虹膜炎症等，主要由角膜外伤、术后高眼压、玻璃体中的万古霉素渗透入房水后刺激角膜内皮的生理代谢所致。但此类并发症均能自行消失，不影响治疗后的最佳矫正视力。因此，临床在治疗眼内炎时需要在保证抑菌效果的同时尽可能减小万古霉素溶液的浓度，最大程度减轻万古霉素对视网膜及其他眼部组织的损伤。

3.3　生物利用度低

由于万古霉素的相对分子质量较大（分子量：1485.723），并且呈疏水性，即便采用玻璃体注射，万古霉素在眼内的生物利用度也极低。面对上述情况，为确保整个治疗过程中眼内万古霉素均能达到一定的药物浓度，彻底清除玻璃体腔及前房房水中残留的致病菌，控制炎症，有部分患者需要进行二次注射或静脉滴注来抑制残留的致病的革兰氏阳性菌，给患者带来了反复进行手术的痛苦，同时也增大了手术中眼内出血、视网膜脱落和引起眼中枢系统并发症的风险[39]。大剂量使用万古霉素还会对患者的肾脏、耳神经等组织器官造成严重损伤。

4　万古霉素新型制剂

如何有效地递送药物至靶部位，在高效释放药物治疗疾病的同时对其他邻近组织无毒性作用，这仍然是眼部给药体系面临的重要挑战。面对万古霉素注射液稳定性差，玻璃体注射时生物利用度低，需要反复注射，对眼球有一定的伤害和毒副作用等问题，亟需使用现代药剂学手段提高万古霉素在眼部组织的渗透性，延长万古霉素在眼内的滞留时间，利用最小的药物剂量达到最有效的治疗，避免进行二次注射，提高患者对玻璃体注射万古霉素治疗方案的顺应性。

4.1　新型即用型万古霉素注射液

面对万古霉素稳定性差这一问题，国内外众多科研团队在对万古霉素分子结构稳定性进行了深入研究，发现采用单个氨基酸或多肽作为配体与万古霉素结合时，能够阻止万古霉素构型的转变，从而提高万古霉素的稳定性[40-41]。

Xellia 制药公司将万古霉素的活性部位与某些氨基酸和多肽进行结合，通过大量的试验和尝试，最终发现 *N*- 乙酰 -*D*- 丙氨酸和 *L*- 赖氨酸盐酸盐与万古霉素的活性部位进行结合可以有效提高万古霉素溶液的稳定性（见图 3），以此作为处方成功研发了一种在室温下能够稳定保存的即用型预混万古霉素注射液（Van-RPI）[42]。Van-RPI 在 25 ℃下的有效期长达 16 个月，在患者紧急情况下，Van-RPI 可立即注射使用，大大提高了万古霉素注射液使用的便利性，减轻了医护人员的操作负担，为患者争取更多救治时间，克服现有万古霉素注射剂在使用方面的不足。目前，Van-RPI 已获得美国食品药品监督管理局（FDA）批准。

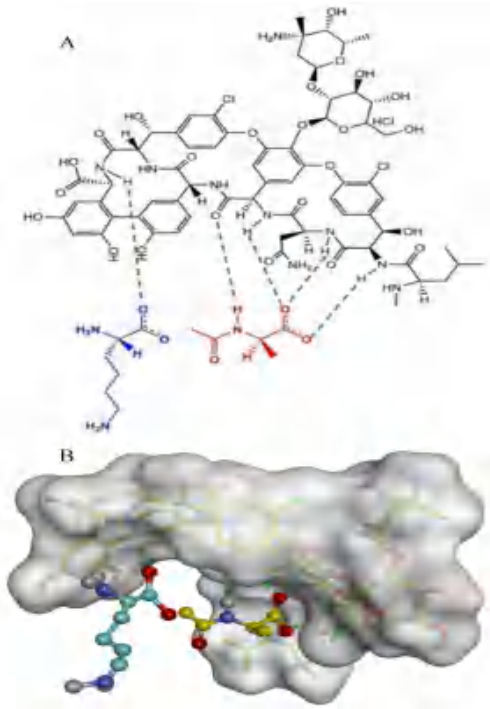


图 3　万古霉素与 *N*- 乙酰 -*D*- 丙氨酸和 *L*- 赖氨酸结合示意图（A）及万古霉素与 *N*- 乙酰 -*D*- 丙氨酸和 *L*- 赖氨酸计算机辅助分子对接模拟（B）

Fig 3　Vancomycin combined with *N*-acetyl-*D*-alanine and *L*-lysine（A）and computer-aided molecular docking simulation of vancomycin with *N*-acetyl-*D*-alanine and *L*-lysine（B）

4.2　万古霉素纳米制剂

克服现有万古霉素注射剂在使用方面的不足，提高万古霉素的稳定性仅完成了第一步。万古霉素通过生物膜的渗透性低和感染部位的低蓄积水平大大降低了其治疗效果，治疗过程中需要长期多次给药，面对上述问题，亟需开发一种可以提高万古霉素穿透性能力和其在眼部停留时间的新型药物递送系统，将万古霉素与纳米制剂相结合是目前最具吸引力和最具成本效益的方法。

4.2.1　脂质体　脂质体（liposome）是由磷脂等类脂为基本物质构建而成具有类似生物膜双分子层结构的封闭囊泡（见图 4），脂质体的粒径范围通常在 0.08 ～ 10.00 μm[43]。脂质体是近年来最为广泛应用的新型药物传递系统，它可以提高药物的稳定性，调节或改变药物的释放特性和方式，延长药物的作用时间，降低毒副作用，在生物体内可降解，安全性高，易于制备，是理想的药物载体系统[44-45]。且脂质体的特征恰恰可以解决玻璃体注射万古霉素后生物利用度低、药物作用时

间短、需要反复注射给药和万古霉素对视网膜会产生损伤的问题。

脂质体用于治疗细菌感染的一个最主要的优点是磷脂膜之间可以相融合，在细胞内释放高浓度抗菌药物，从而极大地改善感染部位的抗菌药物的传递。当抗菌药物以溶液形式进行便无法达到该效果[46-47]。已有研究报道将更昔洛韦装载在脂质体中用于玻璃体注射，结果表明药物的清除速率变慢，并且可以保护药物不受代谢酶影响。

Scriboni 等[48]已尝试将万古霉素制备成脂质体制剂，用于治疗金黄葡萄球菌感染，并对其理化性质进行检测，脂质体组成及其理化性质如表 1。对万古霉素脂质体进行抗菌效果检测，相关结合参数表明该类脂质体，特别是带负电荷脂质体的纳米技术策略具有很大的治疗潜力。对金黄葡萄球菌进行单次给药，相比于万古霉素溶液，万古霉素脂质体能更有效长时间杀灭金黄葡萄球菌，抑制菌株生长[49]。虽然 Scriboni 等[48]的实验制备的万古霉素脂质体目前主要用于外科治疗中，而非用于眼科玻璃体注射治疗感染性眼内炎。但该成果对今后的类似抗菌药物类药物设计具有十分重要的指导意义，在今后的研究可以在这个方向上不断进行尝试，采用毒性更小、生物亲和性更高的辅料替换，制备可用于眼科注射的万古霉素脂质体。

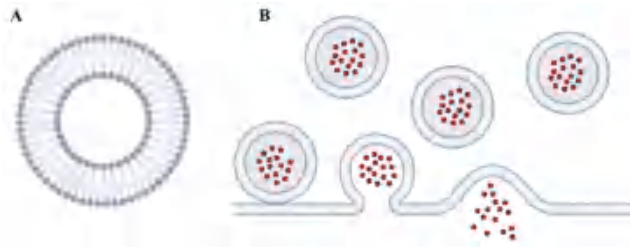


图 4　脂质体结构示意图（A）及脂质体与细胞膜融合过程（B）

Fig 4　Structure of liposome（A）and liposome membrane fusion process（B）

表 1　万古霉素和脂质组成对脂质体理化性质的影响

Tab 1　Effect of vancamycin and lipid composition on the physicochemical properties of liposome

药物	脂质成分（摩尔比）	药物装载量（μg・μmol^{-1}）	载药量 /%	粒径 /μm	Zeta 电位 /mV
万古霉素	DPPC-DOPE-CHEMS（4∶4∶2）	45±3	19±4	0.17（＜ 0.10）	－ 30±1
万古霉素	DPPC-DPPG（8∶2）	23±2	32±8	0.15（＜ 0.15）	－ 23±1

注（Note）：DPPG. 二棕榈酰甘油（dipalmitoyl phosphatidyl glycerol）；CHEMS. 胆固醇琥珀酸单酯（cholesteryl hemisuccinate）；DOPE. 油磷脂酰乙醇胺（dioleoyl phosphatidyl ethanolamine）。

4.2.2　纳米胶束　纳米胶束（micelle）是最常用的药物载体系统，近年来逐步获得关注，纳米胶束由两性分子形成，含有疏水核和亲水壳，适合跨越各种眼屏障递送疏水药物（见图 5）。在眼科药物传递应用中，球形聚合物胶束由于具有穿透眼部组织的能力而显示出巨大的治疗潜力。通过高渗透长滞留效应（enhanced permeability and retention effect，EPR）在相应靶器官组织中积累，正常组织中的非特异性药物累积可以被最小化，大大降低药物的毒副作用[50]。

刘勇等[51]在研究抗菌自适应纳米递送系统时发现，相比单纯的抗菌药物治疗，自适应纳米递送系统在人体内具有良好的生物相容性，通过微环境响应，纳米制剂可以在生物被膜附近富集并穿透生物被膜，被生物被膜中的酯酶降解，在细菌周围快速释放负载的抗菌药物，高浓度的抗菌药物可以快速杀灭细菌。值得一提的是，针对多重耐药病原菌，该团队还设计了载有光敏剂的混合壳层胶束，在胶束中装载多种抗菌药物，并在小鼠体内构建了多重耐药细菌感染模型，通过实验证明该体系能够通过血液循环，靶向性地在感染部位富集，通过光信号的指导，可以有效杀灭感染部位的细菌，治疗效率高于单纯的万古霉素溶液，并且在治疗完成后，胶束能够快速地从体内清除[52]，为日后抗菌药物纳米胶束递送系统的研发打下了基础，也展示了载有多种抗菌药物的混合壳层胶束在治疗细菌感染方面的优势。

图 5　胶束结构示意图

Fig 5　Structure of micelle

4.2.3　聚合物纳米颗粒　聚合物纳米颗粒（polymer nanoparticles）通常由生物可降解高分子聚合材料制备，常见的材料有明胶、壳聚糖、聚乙二醇（PEG）、聚乳酸（PLA）等，纳米粒子可以通过包埋、聚合、共轭等方式可以携带 RNA、抗体、药物等物质[53-55]（见图 6），因此纳米颗粒在眼部疾病等众多领域备受关注。有研究表明，纳米颗粒在眼部组织的滞留时间与纳米颗粒的粒径有关，200 ～ 2000 nm 的纳米颗粒可以在眼部组织停留超

过 2 个月，可以起到良好的贮存和缓释的作用[56]。此外，纳米颗粒的表面很容易进行额外的修饰，从而起到靶向、提高生物相容性的作用[57-58]。

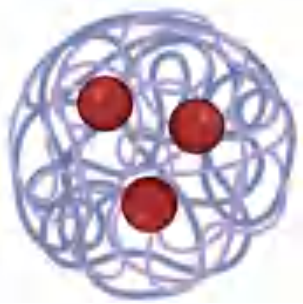


图 6　聚合物纳米颗粒结构示意图

Fig 6　Structure of polymer nanoparticles

先前已有学者证明将万古霉素与聚己内酯（PCL）等聚合物直接结合制成纳米粒可以起缓释作用[59-60]，为万古霉素纳米粒制剂的研发打下了基础。但万古霉素单纯与聚合物结合的控释性较差，且在眼内会引起轻微的炎症反应。于是，在此基础上研究人员研发了靶向控释万古霉素纳米粒，并且提高了聚合物纳米粒的生物相容性。

Chen 等[61]尝试使用光敏纳米颗粒治疗感染性眼内炎，用骨架材料沸石咪唑的 8- 聚丙烯酸酸酯（ZIF-8-PAA）先装载光敏剂甲基苯铵蓝（MB），随后再与银纳米颗粒（AgNPs）和万古霉素 / 氨基 - 聚乙二醇（Van/NH_2-PEG）聚合物进行分子结合，组合形成一种新型复合纳米材料 ZIF-8-PAA-MB-AgNPs-Van-PEG，将其制成纳米粒后用于眼部抗菌治疗。用家兔进行模拟试验发现上述制备的光敏纳米颗粒在光照的作用下能够快速有效地释放出药物和活性氧治疗感染性眼内炎。虽然该制剂仅用在动物实验中，但提示了光敏纳米颗粒具有将药物快速靶向递送至眼部组织的潜力。

Cardoso 等[62]将万古霉素和十二烷基甲基聚乙烯亚胺（DMPEI）先制成 VCM-DMPEI 纳米颗粒，后将玻璃体主要组成物质透明质酸（HA）[63]静电包裹在 VCM-DMPEI 纳米颗粒表面，制备了一种全新的 VCM-DMPEI/HA 纳米颗粒。该纳米颗粒中的万古霉素和 DMPEI 具有协同杀菌作用，包覆在表面的 HA 具有缓释作用，在模拟实验中 96 h 内释放了 58% 的药物。在 HA 的修饰下该颗粒还表现出了良好的理化性质，粒径为（154±3）nm，包封率为 93%，Zeta 电位为（26.4±3.3）mV。值得一提的是，在动物玻璃体中注射 VCM-DMPEI/HA 纳米颗粒后眼后段不存在炎症、免疫和血管生成等常见不良反应，并且没有诱导视网膜功能的改变。这表明 HA 包裹的 VCM-DMPEI 纳米颗粒在具有优异的眼生物相容性，在今后感染性眼内炎的治疗中具有巨大的潜力。而 HA 的低毒性和高生物相容性也为眼部药物递送系统的开发带来了启示。

4.2.4　脂质纳米颗粒　脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles）（见图 7）主要由固体脂类、乳化剂和原料药（如药物、基因、DNA、质粒和蛋白质）组成，原料药被包裹或镶嵌于脂质内核中，粒径在 10 ～ 1000 nm，常见的制备方法有水化法、均质法和挤出法等[64]。脂质纳米颗粒拥有脂质体和聚合物颗粒的优点[65]，具有与眼膜相容的特性，提高了药物在眼中的渗透性和生物利用度，在眼内有良好的耐受性[66-67]。纳米颗粒携带和释放的药物剂量比传统药物剂型更低，可以减少不良反应和对视网膜的毒性。若将万古霉素制备成上述脂质纳米颗粒，就可以大大提高万古霉素在眼内的治疗效果。

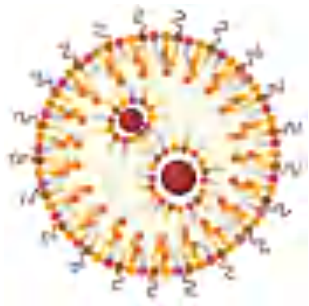


图 7　脂质纳米颗粒结构示意图

Fig 7　Structure of lipid nanoparticles

Sandeep 等[68]将万古霉素制成脂质树状杂化纳米粒（LDHNs）用于对抗 MRSA 感染，制得 LDHNs 的粒径为（52.21±0.22）nm，Zeta 电位为－（14.2±1.49）mV，该实验主要研究了万古霉素 LDHNs 在体外的抗菌疗效，结果表明在体外释放 72 h 后仍具有抗菌活性，证明了将万古霉素制成脂质纳米颗粒具有长期抗菌作用。若将其用于玻璃体注射可以长期维持抗菌活性，用于治疗或预防感染性眼内炎，是一种非常有前景的制剂策略。

Jounaki 等[69]利用冷均质技术成功制备了负载万古霉素的阳离子脂质纳米颗粒，制备的脂质纳米颗粒在显微镜观察下呈圆球形，粒径为（96.4±0.71）nm，粒径分布非常集中，包封率为（74.8±4.3）%，Zeta 电位为（29.7±0.47）mV，48 h 缓释率达到了 67%，在稳定性试验中该脂质体在 4 ℃和 25 ℃条件下均能稳定保存 12 周，具有良好的理化性质和稳定性；将制备的万古霉素纳米颗粒直接滴注在感染眼内炎的兔眼角膜上，每 5 min 滴两滴（50 μL），持续 0.5 h，然后每 30 min 滴注一次，持续 3 h，后续还需要不断进行滴注，次日滴注完成后发现在眼内也可

以达到较高的药物浓度，且无没有流泪、眨眼增加、发红或发炎的不良症状[70]。但该万古霉素纳米颗粒属于外眼给药系统，在使用时需要长时间不间断滴注给药才能在眼后达到有效药物浓度，若用于临床治疗该制剂无法快速到达急重症感染性眼内炎患者眼后部位，致使其可能错过最佳治疗时机，并且治疗过程中长期不间断给药给患者和医护人员带来了极大的不便，不同患者的眨眼、泪液引流等因素也会对疗效产生不可控的影响。

基于万古霉素脂质纳米颗粒的优点与缺点，如将上述万古霉素纳米颗粒通过玻璃体注射直接到达眼后组织，快速突破眼球的三道生理屏障，保留万古霉素纳米颗粒在眼内优良特性的同时克服了药物起效缓慢的缺点。

5 总结与展望

在研究万古霉素治疗眼内炎的过程中深刻地体会到，如何有效地递送药物至靶组织，在高效释放药物治疗疾病的同时减轻对邻近组织的损伤，仍然是当下眼部给药体系面临的重要挑战。纳米递送系统可以根据环境的变化而改变制剂本身的物理行为或化学结构，从而实现定点、定量和定时的药物释放，达到药物高效靶向的治疗效果。利用纳米制剂有望打破这一瓶颈，药学工作者们后续还需要对纳米制剂的毒性、稳定性、生物相容性、安全释放及生物可降解性等方面开展进一步的探索。相信今后抗菌药物纳米制剂势必日趋完善，可以快速高效地将药物送至靶目标治疗区域。

参考文献

[1] Oliveira I，Barbosa EJ，Peters M，et al. Cutting-edge advances in therapy for the posterior segment of the eye：solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers [J]. Int J Pharm，2020，589（3）：119831.

[2] Novack GD，Robin AL. Ocular pharmacology [J]. J Clin Pharmacol，2016，56（5）：517-527.

[3] Brockhaus L，Goldblum D，Eggenschwiler L，et al. Revisiting systemic treatment of bacterial endophthalmitis：a review of intravitreal penetration of systemic antibiotics [J]. Clin Microbiol Infect，2019，25（11）：1364-1369.

[4] Zimmerli W，Sendi P. Orthopaedic biofilm infections [J]. APMIS，2017，125（4）：353-364.

[5] Parastan R，Kargar M，Solhjoo K，et al. Staphylococcus aureus biofilms：structures，antibiotic resistance，inhibition，and vaccines [J]. Gene Reports，2020，20：100739.

[6] Sahukhal GS，Pandey S，Elasri MO. MsaABCR operon is involved in persister cell formation in *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Microbiol，2017，17（1）：218.

[7] Kavanagh N，Ryan EJ，Widaa A，et al. *Staphylococcal osteomyelitis*：disease progression，treatment challenges，and future directions [J]. Clin Microbiol Rev，2018，31（2）：e00084-00017.

[8] Guo Y，Song G，Sun M，et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Front Cell Infect Microbiol，2020，10：1-11.

[9] Enright MC，Robinson DA，Randle G，et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*（MRSA）[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2002，99（11）：7687-7692.

[10] Brumfitt W，Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. N Engl J Med，1989，320（18）：1188-1196.

[11] Siebert WT，Moreland N，Jr WT. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* [J]. South Med J，1978，140（3）：1353-1355.

[12] Bibel DJ，Aly R，Bayles C，et al. Competitive adherence as a mechanism of bacterial interference [J]. Can J Microbiol，1983，29（6）：700-703.

[13] Muto C，Metzger A，Querry A，et al. 1378 clostridium difficile（CD）hospital acquired infection（HAI）rates unaffected by switch from bleach（B）to hydrogen peroxide（H_2O_2）and peracetic acid（PA）based disinfectants-the new smell of clean [J]. Adv Mater，2014，23（48）：5796-5800.

[14] McFarland LV，Mulligan ME，Kwok RY，et al. Nosocomial acquisition of clostridium difficile infection [J]. N Engl J Med，1989，320（4）：204-210.

[15] Lyerly DM，Krivan HC，Wilkins TD. Clostridium difficile：its disease and toxins [J]. Clin Microbiol Rev，1988，1（1）：1-18.

[16] Fralish Z，Shelby SJ. Generation of a gelatin-based，vancomycin-eluting hemostatic agent for the prevention of surgical site infections [J]. FASEB J，2020，34（S1）：1-1.

[17] Yang X，Xie B，Peng H，et al. Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes [J]. J Control Release，2021，329：454-467.

[18] Peck TJ，Patel SN，Ho AC. Endophthalmitis after cataract surgery：an update on recent advances [J]. Curr Opin Ophthalmol，2021，32（1）：62-68.

[19] Fontana L，Moramarco A，Mandarà E，et al. Interface infectious keratitis after anterior and posterior lamellar keratoplasty. Clinical features and treatment strategies. A review [J]. Br J Ophthalmol，2019，103（3）：307-314.

[20] Grzybowski A，Turczynowska M，Kuhn F. The treatment of postoperative endophthalmitis：should we still follow the endophthalmitis vitrectomy study more than two decades after its publication? [J]. Acta Ophthalmol，2018，96（5）：e651-e654.

[21] Luaces-Rodríguez A，González-Barcia M，Blanco-Teijeiro MJ，et al. Review of intraocular pharmacokinetics of anti-infectives commonly used in the treatment of infectious endophthalmitis [J]. Pharmaceutics，2018，10（2）：66-76.

[22] Herrinton LJ，Shorstein NH，Paschal JF，et al. Compar-

ative effectiveness of antibiotic prophylaxis in cataract surgery [J]. Ophthalmology，2016，123（2）：287-294.
[23] Hernandez-Da Mota SE，Guerrero-Naranjo JL，Dalma-Weiszhausz J，et al. Acute postoperative infectious endophthalmitis：advances in diagnosis and treatment [M]. Infectious Eye Diseases. Recent Advances in Diagnosis and Treatment，2021：94-145.
[24] Murdock J，Sajjad A，Gomez J，et al. Overview and current recommendations for the treatment of bacterial endophthalmitis [M]. Orbital Cellulitis and Periorbital Infections，2018：185-209.
[25] Marquart ME，Benton AH，Galloway RC，et al. Antibiotic susceptibility，cytotoxicity，and protease activity of viridans group streptococci causing endophthalmitis [J]. PLoS One，2018，13（12）：e0209849.
[26] Pietras-Baczewska A，Jasi ń ska E，Toro MD，et al. Urgent vitrectomy with vancomycin infusion，silicone oil endotamponade，and general antibiotic treatment in multiple cases of endophthalmitis from a single day of intravitreal injections—case series [J]. J Clin Med，2021，10（5）：1059.
[27] Grzybowski A，Brona P，Zeman L，et al. Commonly used intracameral antibiotics for endophthalmitis prophylaxis：a literature review [J]. Surv Ophthalmol，2021，66（1）：98-108.
[28] 刘娜，余乐明 . 万古霉素玻璃体腔给药与前房冲洗对白内障患者术后感染性眼炎的临床特征及其对视功能改善的影响 [J]. 抗感染药学，2019，81（4）：171-173.
[29] Coco RM，López MI，Pastor JC，et al. Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes [J]. J Ocul Pharmacol Ther，1998，14（6）：555-563.
[30] 我国白内障摘除手术后感染性眼内炎防治专家共识（2017 年）[J]. 中华眼科杂志，2017，11（53）：810-812.
[31] Marshall FJ. Structure studies on vancomycin [J]. J Med Chem，1965，8（1）：18-22.
[32] https：//www. accessdata. fda. gov/scripts/cder/daf/index. cfm?event ＝ overview. process&ApplNo ＝ 050671.
[33] Witkin AJ，Shah AR，Engstrom RE，et al. Postoperative hemorrhagic occlusive retinal vasculitis：expanding the clinical spectrum and possible association with vancomycin [J]. Ophthalmology，2015，122（7）：1438-1451.
[34] Cunningham ET，Moorthy RS，Witkin AJ，et al. Occlusive retinal vasculitis following intravitreal drug delivery [M]. Taylor Francis，2021，13：1-4.
[35] Witkin AJ，Chang DF，Jumper JM，et al. Vancomycin-associated hemorrhagic occlusive retinal vasculitis [J]. Ophthalmology，2017，124（5）：131-140.
[36] Todorich B，Faia LJ，Thanos A，et al. Vancomycin-associated hemorrhagic occlusive retinal vasculitis：a clinical-pathophysiological analysis [J]. Am J Ophthalmol，2018，188：131-140.
[37] Pflugfelder SC，Hernández E，Fliesler SJ，et al. Intravitreal vancomycin. retinal toxicity，clearance，and interaction with gentamicin [J]. Archives Ophthalmol，1987，105（6）：831-837.
[38] Bjerrum SS，Prause JU，Fuchs J，et al. Morphological features in eyes with endophthalmitis after cataract surgery-histopathology and optical coherence tomography assessment [J]. Acta Ophthalmol，2016，94（1）：26-30.
[39] Sachdeva MM，Moshiri A，Leder HA，et al. Endophthalmitis following intravitreal injection of anti-VEGF agents：long-term outcomes and the identification of unusual micro-organisms [J]. J Ophthalmic Inflamm，2016，6（1）：1-7.
[40] Brown J，Terenius L，Feeney J，et al. A structure-activity study by nuclear magnetic resonance of peptide interactions with vancomycin [J]. Mol Pharmacol，1975，11（2）：126-132.
[41] Williams DH，Searle MS，Mackay JP，et al. Toward an estimation of binding constants in aqueous solution：studies of associations of vancomycin group antibiotics [J]. Proc Natl Acad Sci，1993，90（4）：1172-1178.
[42] https：//www. accessdata. fda. gov/scripts/cder/daf/index. cfm?event ＝ overview. process&ApplNo ＝ 211962.
[43] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. Nat Rev Drug Discov，2005，4（2）：145-160.
[44] Gupta P，Mazumder R，Padhi S，et al. Challenges of new generation liposomes–a review [J]. Int J Pharm Sci Nano，2020，13（2）：4815-4825.
[45] Liu Y，Bravo KMC，Liu J，et al. Targeted liposomal drug delivery：a nanoscience and biophysical perspective [J]. Nanoscale Horiz，2021，6（2）：78-94.
[46] Rukavina Z，Vanić Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms [J]. Pharmaceutics，2016，8（2）：18-28.
[47] Zhang S，Lu X，Wang B，et al. A soft anti-virulence liposome realizing the explosive release of antibiotics at an infectious site to improve antimicrobial therapy [J]. J Mater Chem B，2021，9（1）：147-158
[48] Scriboni AB，Couto VM，Ribeiro L，et al. Fusogenic liposomes increase the antimicrobial activity of vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Front Pharmacol，2019，10：1401-1423.
[49] Ferreira M，Pinto SN，Aires-Da-Silva F，et al. Liposomes as a nanoplatform to improve the delivery of antibiotics into staphylococcus aureus biofilms [J]. Pharmaceutics，2021，13（3）：321-333.
[50] Musacchio T，Torchilin VP. Advances in polymeric and lipid-core micelles as drug delivery systems [M]. Polymeric Biomaterials，2020：65-84.
[51] 刘勇，史林启 . 自适应纳米递送系统抗细菌生物被膜的感染 .（第 3 届）抗菌科学与技术论坛 [C]. 2018.
[52] Liu Y，Busscher HJ，Zhao B，et al. Surface-adaptive，antimicrobially loaded，micellar nanocarriers with enhanced penetration and killing efficiency in staphylococcal biofilms [J]. Acs Nano，2016：4779-4789.
[53] He C，Yue H，Xu L，et al. siRNA release kinetics from

polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery [J]. Acta Biomater，2020，103：213-222.

[54] Zhang L，Beatty A，Lu L，et al. Microfluidic-assisted polymer-protein assembly to fabricate homogeneous functional nanoparticles [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2020，111（4）：110768-110789.

[55] Brown SB，Wang L，Jungels RR，et al. Effects of cartilage-targeting moieties on nanoparticle biodistribution in healthy and osteoarthritic joints [J]. Acta Biomater，2020，101：469-483.

[56] Wang X，Wang S，Zhang Y. Advance of the application of nano-controlled release system in ophthalmic drug delivery [J]. Drug Deliv，2016 23（8）：2897-2901.

[57] Cao SJ，Xu S，Wang HM，et al. Nanoparticles：oral delivery for protein and peptide drugs [J]. AAPS PharmSciTech，2019，20（5）：190-211.

[58] Anselmo AC，Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic：an update [J]. Bioeng Transl Med，2019，4（3）：e10143-e10150.

[59] Petitti M，Barresi AA，Vanni M. Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application [J]. Chem Eng Res Des，2009，87（6）：859-866.

[60] Kodjikian L，Couprie J，Hachicha W，et al. Experimental intracameral injection of vancomycin microparticles in rabbits [J]. Invest Ophth Vis Sci，2010，51（8）：4125-4132.

[61] Chen H，Yang J，Sun L，et al. Synergistic chemotherapy and photodynamic therapy of endophthalmitis mediated by zeolitic imidazolate framework - based drug delivery systems [J]. Small，2019，15（47）：e1903880-1903891.

[62] Cardoso JF，Perasoli FB，Almeida TC，et al. Vancomycin-loaded *N*，*N*-dodecyl，methyl-polyethylenimine nanoparticles coated with hyaluronic acid to treat bacterial endophthalmitis：development，characterization，and ocular biocompatibility [J]. J Biol Macromol，2021，169：330-341.

[63] Zeng W，Qi L，Tao W，et al. Hyaluronic acid-coated niosomes facilitate tacrolimus ocular delivery：mucoadhesion，precorneal retention，aqueous humor pharmacokinetics，and transcorneal permeability [J]. Colloids Surf，2016，141：28-35.

[64] Duan Y，Dhar A，Patel C，et al. A brief review on solid lipid nanoparticles：part and parcel of contemporary drug delivery systems [J]. RSC Advances，2020，10（45）：26777-26791.

[65] Selvaraj K，Kuppusamy G，Krishnamurthy J，et al. Repositioning of itraconazole for the management of ocular neovascularization through surface-modified nanostructured lipid carriers [J]. Assay Drug Dev Technol，2019，17（4）：178-190.

[66] Jie S，Deng Y，Jin X，et al. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A：improving in vivo ocular distribution [J]. Int J Pharm，2010，402（1-2）：248-253.

[67] Shen J，Sun M，Ping Q，et al. Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement [J]. Nanotechnology，2010，21（2）：025101-025110.

[68] Sonawane SJ，Kalhapure RS，Rambharose S，et al. Ultra-small lipid-dendrimer hybrid nanoparticles as a promising strategy for antibiotic delivery：in vitro and in silico studies [J]. Int J Pharm，2016，504（1-2）：1-10.

[69] Jounaki K，Makhmalzadeh BS，Feghhi M，et al. Topical ocular delivery of vancomycin loaded cationic lipid nanocarriers as a promising and non-invasive alternative approach to intravitreal injection for enhanced bacterial endophthalmitis management [J]. Eur J Pharm Sci，2021：105991-105998.

[70] Youshia J，Kamel AO，Shamy AE，et al. Gamma sterilization and in vivo evaluation of cationic nanostructured lipid carriers as potential ocular delivery systems for antiglaucoma drugs [J]. Eur J Pharm Sci，2021，163：105887.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-04-08）

综述

基于代谢组学的中医药防治肝纤维化的研究进展

杨逸鑫[1, 2]，彭芳[1, 2*]（1. 大理大学药学院，云南 大理 671000；2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室，云南 大理 671000）

摘要：代谢组学可以定性和定量地研究机体在内部和外部因素作用下，代谢物质的动态变化与病理生理之间的相关性。近年来，中药通过多靶点和多通路在预防和治疗肝纤维化方面具有明显优势，已成为预防和治疗肝纤维化的研究热点。本文总结了近年来代谢组学在中医药抗肝纤维化领域的研究实例。

关键词：代谢组学；中医药；肝纤维化
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0155-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.025

Progress in prevention of hepatic fibrosis with traditional Chinese medicine based on metabolomics

YANG Yi-xin[1, 2], PENG Fang[1, 2*] (1. *College of Pharmacy*, *Dali University*, *Dali Yunnan* 671000; 2. *Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical Research and Development*, *Dali University*, *Dali Yunnan* 671000)

Abstract: Metabolomics can qualitatively and quantitatively examine the correlation between the dynamic changes of metabolic substances and pathophysiology of the organism with internal and external factors. In recent years, Chinese medicine has obvious advantages in the prevention and treatment of hepatic fibrosis, and can treat liver fibrosis through multi-targets and multi-pathways. It has become a research hotspot in the prevention and treatment of hepatic fibrosis. This paper summarized examples of metabolomics research in the field of traditional Chinese medicine against hepatic fibrosis.

Key words: metabolomics; traditional Chinese medicine; hepatic fibrosis

肝纤维化（hepatic fibrosis，HF）是在慢性肝脏疾病发展过程中肝细胞被反复破坏后再生，胶原、糖蛋白等细胞外基质在肝脏中过度沉积，导致汇管区大量纤维组织异常增生，是肝脏对慢性损伤的病理性修复。HF 进一步发展，可引起肝脏结构紊乱，肝细胞结节样再生，形成假小叶结构，即肝硬化。HF 是各种慢性肝病发展为肝硬化，最终恶化为肝癌的共同病理变化和必经路径，是影响慢性肝病预后的重要环节[1]。

HF 是一个现代医学概念，中医对 HF 并没有明确的概念[2]，但认为 HF 可归属“胁痛”“黄疸”“积聚”“臌胀”等不同中医病证阶段，HF 的内因是正气虚弱，外因是肌体皮肤受到湿、热、毒的侵邪；病理是内有湿热，脾不能化湿，气血凝滞，肝肾亏虚[3-4]。王云宝等[5]认为 HF 的病因表现为湿热内蕴、痰瘀互结、肝肾不足，早中期 HF 体现在实证，晚期则表现为虚实夹杂。王继萱等[6]认为 HF 的病因表现是正虚血瘀，毒瘀内蕴，轻者在气，重者在血。可见，HF 的中医病症都离不开气虚、湿热、血瘀等。

现代医学认为，病毒性肝炎、酒精性肝炎、脂肪肝均可引起 HF[7]。目前，HF 的评估主要基于肝

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160689）。
作者简介：杨逸鑫，女，在读硕士研究生，主要从事药理学方面的研究，email：2641471358@qq.com *通信作者：彭芳，女，教授，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药理学方面的研究，email：pengfang6556@aliyun.com

活检，这是最可靠、最灵敏的方法，但是这种方法的侵入性使其具有风险。此外，HF 在肝脏中的分布并不均匀，而且通过穿刺获得的组织量也很少，容易出现采样误差 [8]。因此，迫切需要在以侵入性较小或非侵入性的方式获得准确的生物标记物方面取得进展。代谢组学可以定性和定量地研究生物体系中的代谢物在受到刺激后的动态变化 [9]，更好地以较小的侵入性或非侵入性的方式评估和诊断 HF，了解与 HF 有关的病理生理学过程，对研究肝脏疾病具有重要意义。近年来，中医药在治疗 HF 方面取得了显著的效果，其通过多靶点、多途径治疗 HF 的能力，为寻找治疗 HF 的药物带来了新的研究方向。本文总结了近年来代谢组学在中医药抗 HF 领域的研究实例。

1 代谢组学的相关介绍

1.1 代谢组学的概念及其主要研究内容

代谢组学就是通过定性、定量分析生物体中相对分子质量低于 1000 的小分子代谢产物来发现疾病生物标记物并以此来分析代谢产物与其生理病理变化之间的相关关系的一门新兴学科 [10]。

代谢组学主要研究的是作为各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物。其常用的生物体液有尿液、血液和唾液。常用的器官组织有心、肝、肾及其提取物、细胞混悬液等 [10]。生物样本采集后，经过一系列的预处理，上清液可以被提取出来进行分析。

血液具有重要的生理功能，它在心血管系统中循环，遍布全身，维持各个组织、器官之间的联系。血液的成分和含量在一定程度上与器官的活动密切相关。人体血液循环中包含一些从不同组织释放出来的化合物及代谢产物，血液中代谢物的种类及浓度的变化能直接或间接地反映出机体代谢的情况及生理变化 [11]。血液样本主要来源于人体采血和动物实验，虽然收集和处理血样看起来很简单，但这一过程涉及许多细节。在给动物采血时，应使用麻醉药物，以减少动物应激反应引起的代谢物变化，减少采血时动物的疼痛和不适，采血时间应尽可能短，采血后应尽快分离血细胞，减少离体血细胞代谢造成的影响。Shanmuganathan 等 [12] 分别对 20 名丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）患者和 14 名健康对照者进行血清代谢组学分析，确定了组氨酸、2- 羟基丁酸、脯氨酸、胆碱这 4 种生物标记物。

因尿液易于收集且对动物或人体无创、代谢物较多，所以常常是检测样品的首选。尿液需采集空腹、晨起中段尿，女性需要避免生理期采样，采集后立即液氮速冻处理 15 min 后，－ 80 ℃保存，但要避免反复冻融，因为微生物代谢速度快，反复冻融会很大程度影响代谢水平。龙富立等 [13] 通过液相色谱 - 质谱（liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）技术对急性肝衰竭大鼠的尿液进行代谢组学分析，研究解毒化瘀颗粒的疗效及作用机制；给予解毒化瘀颗粒干预后，治疗组大鼠体内的溶血磷脂酰胆碱、谷氨酸的含量显著降低，黄嘌呤核苷、苯乙酰甘氨酸、烟酰胺核糖、缬氨酸、高肌肽等的含量升高，共筛选出 8 个贡献最大的生物标记物。Hong 等 [14] 利用高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）分析经四氯化碳（CCl_4）诱导的 HF 大鼠的尿液和血清，鉴定出尿液中包括 *L*- 色氨酸、犬尿酸、5- 羟基吲哚乙酰甘氨酸、3- 甲基二氧吲哚、顺乌头酸和异柠檬酸、*L*- 亮氨酸和甲基丙二酸等 9 种关键代谢物，为早期发现 HF 提供诊断信息。

1.2 代谢组学常用的分析技术

样品采集和预处理后，需要通过适当的方法测定代谢物。代谢组学的分析技术包括色谱、质谱、红外光谱、毛细管电泳等。最常见的代谢组学方法包括核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）、LC-MS、气相色谱 - 质谱（gas chromatography-mass spectrometry，GC-MS）等 [15]。

NMR 适用于亲水性代谢物的分析，可同时测定样品中所有可检测的分子，避免漏检；此外，不需要对样品进行复杂的预处理，一般不会破坏样品原始成分 [16]。常规 NMR 只需要几分钟就能给出定性和定量的信息，方便快捷，但灵敏度低。Biliotti 等 [17] 基于核磁共振代谢组学，比较了 23 名 HCV 患者和 20 名年龄匹配的健康男性对照的尿代谢组学特征，发现 HCV 患者的尿液中 *N*，*N*- 二甲基乙酰胺、谷氨酸、酪氨酸酶和次黄嘌呤水平均不同程度升高，提示这些变化可能与晚期肝病背景下的氧化应激有关。

GC-MS 适用于亲水性和中性代谢物的分析 [16]，经常被用来测量包括氨基酸、嘌呤、糖磷酸、嘧啶、脂肪酸、芳香族等众多化合物 [18]。在使用 GC-MS 技术分析生物体中的代谢物时，需要对样品进行预处理和衍生化，这可能会导致样品产生一定的变化。Moolla 等 [19] 在 275 名受试者中收集临床数据和尿样；其中，169 名患者被诊断为肝病（非酒精性脂肪肝病患者 121 名；酒精性脂肪肝患者 48 名）以及 106 名无已知肝病的对照；数据显示，非酒精

性脂肪肝病患者的 11*β*- 羟基类固醇脱氢酶和 5*α*- 还原酶活性均升高。

LC-MS 适用于大部分疏水及中性代谢物的分析 [16]。LC-MS 相对于 GC-MS 更具优势，其不需要复杂的衍生化预处理，非常适用于热不稳定、难挥发、不易衍生和高分子量物质 [20]。Pan 等 [21] 使用 LC-MS 方法来区分慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者的血清特征；研究发现了甘草酸（GA）、2- 二酰基 -3-*β*-*D*- 半乳糖基 -sn- 甘油和 5- 羟基 -6*E*、8*Z*、11*Z*、14*Z*、17*Z*- 二十碳五烯酸这几种生物标记物是从慢性乙型肝炎到肝硬化再到肝癌的肝病进展最密切的相关代谢物。选择代谢物的分析技术通常需要同时考虑仪器和相应技术的速度、选择性和敏感性，以便找到最适合目标化合物的方法。

1.3 代谢组学数据分析方法

研究人员可以根据不同的样品和分析方法来选择恰当的数据分析方法 [22]。代谢组学的数据分析较为复杂，一般包括原始数据预处理、数据质控、代谢物定性定量、生信分析这几个步骤。生信分析又包括重要的五大类方法：聚类分析、多元统计分析、差异分析、差异 KEGG 富集分析和趋势分析。聚类分析包括聚类树状图和热图；多元统计分析又分为了无监督分析和有监督分析两类 [23]，主成分分析（principal components analysis，PCA）是最实用的无监督分析法 [24]，其次还有分层聚类分析（hierarchical clustering analysis，HCA）[25]；偏最小二乘判别分析（partial least-squares discrimination analysis-discriminant analysis，PLS-DA）[26] 和正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least-squares discrimination analysis，OPLS-DA）[27] 可识别出不同样本间的差异化合物，是主流的有监督分析法；差异分析常用的图形包括差异火山图、ROC 图等；差异 KEGG 富集分析常见的包括富集柱状图、通路图等；趋势分析针对至少 3 个连续样本对代谢物表达模式进行聚类。

2 代谢组学在中药抗 HF 方面的应用

代谢组学可以帮助人们提高对体内物质的病理过程、代谢途径和代谢状态的理解，促进疾病生物标记物的发现和诊断，并实现个性化的诊疗 [28]。以下总结了近年来代谢组学在中药提取物、单味中药以及中药复方在抗 HF 领域的研究。

2.1 代谢组学在中药提取物抗 HF 领域的应用

陶朝阳等 [29] 采用 LC-MS 技术对硫代乙酰胺诱导 HF 小鼠的肝脏进行代谢组学分析，研究二氢丹参酮 I（dihydrotanshinone I，DHI）治疗 HF 的作用效果，筛选出与 HF 密切相关的 38 种差异代谢产物，主要涉及谷胱甘肽代谢、褪黑素代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、三羧酸循环等途径；经过 DHI 干预后，治疗组小鼠体内天冬氨酸、甘油磷酸、褪黑素等 34 种代谢物回调，提示 DHI 可调节部分失衡代谢通路，发挥抗 HF 作用。钮敏洁等 [30] 应用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析山茱萸生品以及制品水煎液对 CCl_4 诱导 HF 小鼠的疗效及保护机制，结果共鉴定出 24 个潜在的与 HF 相关的生物标记物；在使用山茱萸生品、制品水煎液后，生化指标谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）表达均有所下调，对包括视黄醇酯、甘油磷脂在内的 10 种生物标记物有一定的回调作用，且山茱萸制品的回调作用优于其生品；提示山茱萸生品、制品水煎液可通过回调溶血磷脂酰胆碱、视黄醇酯、花生四烯酸等多种生物标记物干预 HF 的过程，从而发挥抗 HF 的作用。上述研究表明，DHI、山茱萸生品以及制品水煎液这些中药单体对 HF 具有一定程度的抑制作用。山茱萸制品在调节视黄醇酯代谢、花生四烯酸代谢方面效果更佳，DHI 则调节天冬氨酸、甘油磷酸、褪黑素等部分失衡代谢通路从而发挥抗 HF 作用（见表 1）。

表 1 代谢组学在中药提取物抗 HF 领域的应用

Tab 1 Metabolomics in the field of herbal extracts against hepatic fibrosis

作者	研究发现	代谢组学方法	结论
陶朝阳等 [29]	DHI 可调节谷胱甘肽、褪黑激素、氨基酸和脂质代谢等不平衡的代谢途径	LC-MS	DHI 具有抗 HF 的作用
钮敏洁等 [30]	山茱萸生品、制品水煎液可通过回调溶血磷脂酰胆碱、视黄醇酯、花生四烯酸等多种生物标记物	UHPLC-Q-TOF-MS/MS	山茱萸生品、制品水煎液具有抗 HF 的作用

2.2 代谢组学在单味中药抗 HF 领域的应用

Sheng 等 [31] 通过 UPLC-MS/MS 技术探讨沙棘甾醇（SBS）对经 CCl_4 诱导引起急性肝损伤大鼠的疗效和保护机制；代谢组学结果显示，SBS

能降低细胞色素 P450 1A 的过表达，增加微管蛋白 B_6 的表达；同时 SBS 还可以降低大鼠血液中的 ALT、AST、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）、肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白细胞介素 -6（interleukin 6，IL-6）水平。刘旭文 [32] 利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对 CCl_4 诱导的 HF 大鼠肝组织进行代谢组学分析，发现了 6 个潜在的生物标记物；在使用岩黄连干预后，大鼠肝脏中的磷酸胆碱、氧化型谷胱甘肽 *N*- 丙烯酰甘氨酸均有下调的趋势；尿酸、核黄素和泛酸上调；提示岩黄连可通过减少脂质过氧化以及氧自由基的生成、保护肝脏细胞、调节肝脏功能来达到抗 HF 的作用。冯欣 [33] 使用 ^{1}H-NMR 技术探讨波棱瓜子对 CCl_4 诱发 HF 大鼠的疗效及作用机制；其血清代谢组学显示，波棱瓜子组与模型组相比，丙氨酸、甘氨酸、葡萄糖等含量显著升高；肝脏代谢组学显示，波棱瓜子能回调黄嘌呤、肌酐、丙氨酸、天冬氨酸等的表达水平，提示波棱瓜子抗 HF 可能与调节能量代谢和氧化应激有关。基于代谢组学的分析方法，上述研究表明，SBS、岩黄连以及波棱瓜子这些单味中药对 HF 具有一定程度的抑制作用。SBS 可以降低 ALT、AST、AKP、TNF-α 和 IL-6 的水平；岩黄连可以减少脂质过氧化以及氧自由基的生成，从而保护肝脏细胞；波棱瓜子则是调节能力代谢来达到抑制 HF 的目的，汇总结果见表 2。

表 2　代谢组学在单味中药抗 HF 领域的应用

Tab 2　Metabolomics in the field of single herbs against hepatic fibrosis

作者	研究发现	代谢组学方法	结论
Sheng 等 [31]	SBS 能降低细胞色素 P450 1A 的过表达，增加微管蛋白 B_6 的表达；降低大鼠血液中的 ALT、AST、AKP、TNF-α 和 IL-6 水平	UPLC-MS/MS	SBS 具有抗 HF 的作用
刘旭文 [32]	岩黄连可下调大鼠肝脏中的磷酸胆碱、氧化型谷胱甘肽 *N*- 丙烯酰甘氨酸尿酸、上调核黄素和泛酸	UPLC-Q-TOF/MS	岩黄连具有抗 HF 的作用
冯欣 [33]	波棱瓜子能回调黄嘌呤、肌酐、丙氨酸、天冬氨酸等的表达水平	^{1}H-NMR	波棱瓜子具有抗 HF 的作用

2.3　代谢组学在中药复方制剂抗 HF 领域的应用

Zhang 等 [34] 应用 ^{1}H-NMR 和 UPLC-MS 技术分析中药名方银尘五苓散（YCWLP）对 CCl_4 诱导肝损伤小鼠的作用机制，发现使用 YCWLP 后小鼠血浆中的 7 种代谢物、尿液中的 28 种代谢物和肝脏中的 6 种代谢物发生了显著变化，提示 YCWLP 可通过促进尿素循环、减少血氨积累和改善糖代谢等途径来治疗 HF。张春艳等 [35] 利用 UHPLC-TOF-MS 技术研究蒙药七味清肝散对 HF 小鼠的作用，共鉴定出包括黄酮、生物碱等在内的 45 种成分；与模型组相比，实验组小鼠中 α- 平滑肌肌动蛋白和重组人胶原蛋白 -1 表达量降低，肝细胞坏死和变性均有所减少，这表明七味清肝散通过调节 PI3K-Akt 信号通路中的关键靶点发挥抗 HF 作用。上述研究表明，中药复方制剂 YCWLP 和蒙药七味清肝散对 HF 具有一定的抑制作用。YCWLP 通过促进尿素循环、改善糖代谢来治疗 HF；蒙药七味清肝散则能降低 α- 平滑肌肌动蛋白和重组人胶原蛋白 -1 表达量，调节 PI3K-Akt 信号通路来发挥抗 HF 作用。汇总结果见表 3。

表 3　代谢组学在中药复方制剂抗 HF 领域的应用

Tab 3　Application of metabolomics in the field of herbal compounds against hepatic fibrosis

作者	研究发现	代谢组学方法	结论
Zhang 等 [34]	YCWLP 可使小鼠血浆中的 7 种代谢物、尿液中的 28 种代谢物和肝脏中的 6 种代谢物发生显著变化，也能促进尿素循环、减少血氨积累和改善糖代谢	^{1}H-NMR 和 UPLC-MS	YCWLP 具有抗 HF 的作用
张春艳等 [35]	蒙药七味清肝散能降低 α- 平滑肌肌动蛋白和重组人胶原蛋白 -1 表达量，调节 PI3K-Akt 信号通路	UHPLC-TOF-MS	蒙药七味清肝散具有抗 HF 的作用

3　HF 的预防

研究表明，HF 的进展是可以延缓的，早期 HF 甚至可以通过适当和及时的治疗而逆转，预防 HF 可以有效抑制肝硬化和肝癌的发展 [36-37]。管玘 [38] 利用 UPLC-Q-TOF-MSE 技术检测 NAFLD 大鼠血清和肝脏组织，结果从大鼠血清代谢物中共筛选出 23 种差异代谢物，主要包括磷脂酰胆碱、鞘氨醇等；与模型组相比，实验组大鼠体重减轻，且肝脏 TG、TC 的含量均降低，提示发酵黑大麦汁能发挥一定的预防作用。黄辉等 [39] 的研究发现，预先使用扶正化瘀方组小鼠的肝细胞变性、坏死程度较模型组均有所减轻，这与扶正化

瘀方诱导小鼠肝脏 $CD8^+$ T 淋巴细胞抑制 JS 1 的活化有关。邹荣[40]的研究发现，预先使用白芦藜醇制剂的小鼠血清中 ALT、AST、球蛋白（GLB）、总蛋白（TP）、HYP、丙二醛（MDA）的含量均降低，且以白芦藜醇靶向脂质体的预防效果最佳。上述研究表明，在造模前对小鼠进行预防用药，能减轻小鼠的病理损伤，对 HF 具有一定的预防作用。

4 小结

HF 是一种病因复杂的疾病，需要有效控制并促进其消退，若病情未得到有效控制很可能并发其他症状，甚至发展为肝癌[41]。为了有效防治 HF，应加快新药的开发。从中医药的角度，利用中医的整体观念和中药多途径、多层次、多靶点的药理作用优势，开发治疗 HF 的新药具有很大的潜力。大量研究发现，诸如大黄素、莪术、荔枝核总黄酮、白首乌姜黄素、苦杏仁苷等中药及中药单体，以及桃红四物汤、芪术颗粒、加味茵陈四逆汤、香参抗纤颗粒等中药复方制剂均具有抗 HF 的作用[42-51]。此外，中医理论的整体视角与代谢组学所研究的整体观不谋而合，这使得代谢组学在现代中医药研究中得到广泛的应用。代谢组学虽是近年来发展起来的一门新兴学科，但它正处于一个重要的发展阶段。随着代谢组学的深入发展及其在疾病诊断和治疗中的深入应用，相信未来代谢组学将为中医药抗 HF 提供强大助力。

参考文献

[1] 付洪彦，龚作炯 . 肝纤维化的发生机制及其诊疗研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志，2018，28（2）：125-128.

[2] 程亚伟，胡衡，杨华 . 中医辨治肝纤维化进展综述 [J]. 山东中医杂志，2017，36（11）：986-988.

[3] 张轻舟 . 肝纤维化病名中医传统历史文献研究 [J]. 内蒙古中医药，2016，35（4）：132-134.

[4] 郝建梅，袁超，杨震 . 肝纤维化的中医病名探析 [J]. 陕西中医，2013，34（7）：867.

[5] 王云宝，张娟，陈宏，等 . 肝豆状核变性伴肝纤维化中医证型分布及其相关临床因素分析 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（5）：74-79.

[6] 王继萱，艾宗雄，谢晶日 . 土鳖虫、姜黄、鳖甲、白芍治疗肝纤维化经验 [J]. 环球中医药，2021，14（2）：306-308.

[7] Aydın MM，Akçalı KC. Liver fibrosis [J]. Turk J Gastroenterol，2018，29（1）：14-21.

[8] 周秋香，余晓斌，涂国全，等 . 代谢组学研究进展及其应用 [J]. 生物技术通报，2013（1）：49-55.

[9] 曹蓓，阿基业，王广基，等 . 代谢组学在临床研究中的应用及进展 [J]. 生命科学，2010，22（8）：761-771.

[10] 王小娟，黄荣清，肖炳坤，等 . 基于 NMR 的代谢组学研究中样品的预处理方法 [J]. 现代仪器，2010，16（2）：16-19.

[11] 胡大利 . 肝衰竭和人工肝治疗干预的血液代谢组学研究 [D]. 南昌：南昌大学，2020.

[12] Shanmuganathan M，Sarfaraz MO，Kroezen Z，et al. A Cross-platform metabolomics comparison identifies serum metabolite signatures of liver fibrosis progression in chronic hepatitis C patients [J]. Front Mol Biosci，2021，8：676349-676364.

[13] 龙富立，林镛，冯逢，等 . 基于 LC-MS 分析解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠的尿液代谢组学的影响 [J]. 时珍国医国药，2021，32（7）：1551-1555.

[14] Hong C，Meng HY，Liu SM，et al. Identification of key metabolic changes during liver fibrosis progression in rats using a urine and serum metabolomics approach [J]. Sci Rep，2017，7（1）：11433-11445.

[15] 唐嘉键，胡泽平 . 代谢组学技术在精准用药研究中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（10）：1113-1118.

[16] Saigusa D，Matsukawa N，Hishinuma E，et al. Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics [J]. Drug Metab Pharmacokinet，2021，37（4）：100373-100389.

[17] Biliotti E，Giampaoli O，Sciubba F，et al. Urinary metabolomics of HCV patients with severe liver fibrosis before and during the sustained virologic response achieved by direct acting antiviral treatment [J]. Biomed Pharmacother，2021，143（4）：112217-112229.

[18] 李娟，任路静，孙冠男，等 . 气相色谱 - 质谱联用技术及其在代谢组学中的应用 [J]. 生物工程学报，2013，29（4）：434-446.

[19] Moolla A，de Boer J，Pavlov D，et al. Accurate non-invasive diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease using the urinary steroid metabolome [J]. Aliment Pharmacol Ther，2020，51（11）：1188-1197.

[20] 关瑾，许文雅，阎峰，等 . 液相色谱 - 质谱联用技术在药物代谢组学研究中的应用进展 [J]. 药物分析杂志，2016，36（1）：9-16.

[21] Pan HY，Wu QQ，Yin QQ，et al. LC/MS-based global metabolomic identification of serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis B and liver cirrhosis [J]. ACS Omega，2021，6（2）：1160-1170.

[22] 张楠，孔丹，杨淑佳，等 . 代谢组学及其在肿瘤研究中的应用 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志，2022，9（1）：117-121.

[23] 王文佶，张秋菊，曲思杨，等 . 动态代谢组学数据分析方法介绍 [J]. 中国卫生统计，2016，33（6）：1075-1078.

[24] Bro R，Smilde AK. Principal component analysis [J]. Ana Methods-UK，2014，6（9）：2812-2831.

[25] Zhou N，Sun YP，Zheng XK，et al. A metabolomics-based strategy for the mechanism exploration of traditional chinese medicine：descurainia sophia seeds extract and fractions as a case study [J]. Evidence-Based Comple-

ment Alternat Med，2017，2017：2845173-2845184.
[26] Westerhuis JA，Hoefsloot HCJ，Smit S，et al. Assessment of PLS-DA cross validation [J]. Metabolomics，2008，4（1）：81-89.
[27] Boccard J，Rutledge DN. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis（OPLS-DA）strategy for multiblock Omics data fusion [J]. Anal Chim Acta，2013，769（3）：30-39.
[28] 施钰琳，王小琴 . 代谢组学及其应用研究新进展 [J]. 医学综述，2007，13（20）：1543-1545.
[29] 陶朝阳，朱臻宇，邢心睿，等 . 基于 LC-MS 技术的二氢丹参酮Ⅰ抗肝纤维化肝脏代谢组学研究 [J]. 药学实践杂志，2021，39（5）：403-408，471.
[30] 钮敏洁，王梦晴，于慧，等 . 基于血浆代谢组学的山茱萸酒制后抗大鼠肝纤维化作用增强机制研究 [J]. 药学学报，2021，56（9）：2410-2418.
[31] Sheng C，Guo Y，Ma J，et al. Metabolomic profiling reveals protective effects and mechanisms of sea buckthorn sterol against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats [J]. Molecules，2022，27（7）：2224-2246.
[32] 刘旭文 . 基于肝脏代谢组学和网络药理学的岩黄连抗肝纤维化作用机制研究 [D]. 南宁：广西医科大学，2019.
[33] 冯欣 . 藏药波棱瓜子抗肝纤维化作用及机理研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[34] Zhang Y，Zhao M，Liu Y，et，al. Investigation of the therapeutic effect of Yinchen Wuling Powder on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats by ^{1}H NMR and MS-based metabolomics analysis [J]. J Pharm Biomed Ana，2021，200（5）：114073-114089.
[35] 张春艳，颜羽昕，高晓阳，等 . 蒙药七味清肝散抗肝纤维化的作用机制：基于 UHPLC-TOF-MS 和网络药理学方法 [J]. 南方医科大学学报，2021，41（8）：1131-1141.
[36] Zimmermann HW，Tacke F. In search of the magic bullet：can liver inflammation and fibrosis bereversed with medications [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol，2015，9（9）：1139-1141.
[37] 张文富，王振常 . 中医药治疗肝纤维化分子机制的研究概况 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（12）：119-124.
[38] 管玘 . 发酵黑大麦对高脂饮食诱导的 NAFLD 预防作用研究 [D]. 上海：上海交通大学，2020.
[39] 黄辉，徐列明，平键，等 . 扶正化瘀方通过改变急性肝损伤小鼠模型肝脏 $CD8^{+}$ T 淋巴细胞表型功能预防肝纤维化的价值分析 [J]. 临床肝胆病杂志，2022，38（2）：342-346.
[40] 邹荣 . 白藜芦醇肝靶向脂质体的制备及对大鼠肝纤维化预防作用的研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2020.
[41] 严何 . 肝纤维化的机制及研究进展 [J]. 基层医学论坛，2019，23（16）：2357-2358.
[42] 张峰，陈利，梁宝瑜，等 . 大黄素通过核受体 Nur77 诱导肝星状细胞衰老并减轻肝纤维化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2021，35（10）：755.
[43] 贾岩 . 莪术醇调控 HSC 程序性坏死在抗肝纤维化中的作用及其分子机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2019.
[44] 陈姗 . 荔枝核总黄酮对大鼠肝星状细胞 TGF-β_1/Smads 通路及 PPAR-r/c-Ski 通路的影响 [D]. 南宁：广西中医药大学，2019.
[45] 印鑫 . 白首乌 C-21 甾苷对肝肾纤维化大鼠的干预作用及机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2020.
[46] 赵祥安 . 姜黄素抑制单核细胞浸润并减少单核细胞来源 GRN 分泌抗肝纤维化的机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2019.
[47] 赵鑫，吕文良，李娟梅，等 . 苦杏仁苷抗纤维化作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（10）：109-112.
[48] 刘旭凌，杨广越，张玮，等 . 桃红四物汤对 CCl_4 诱导肝纤维化小鼠模型的干预作用及其机制 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（11）：2563-2568.
[49] 张荣 . 芪术颗粒治疗早期肝硬化临床疗效观察及其抗肝纤维化血管新生的机制研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2021.
[50] 陈亚宾 . 加味茵陈四逆汤对胆道闭锁模型小鼠 TGF-β_1/smad 及 MMP9/TIMPs 的机制研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2019.
[51] 王宇亮，李梦阁，郭淑云，等 . 香参抗纤颗粒治疗肝郁脾虚型肝纤维化 [J]. 中医学报，2022，37（5）：1076-1080.

（收稿日期：2022-06-21；修回日期：2022-10-10）

植物雌激素类中药诱导白色脂肪组织棕色化的研究进展

于澄元[1]，樊薛津[1]，庄朋伟[1]，张密霞[1*]，张艳军[1, 2, 3*]（1. 天津中医药大学中药学院，天津 301617；2. 天津中医药大学第一附属医院，天津 300193；3. 国家中医针灸临床医学研究中心，天津 300193）

摘要：当前全球范围内肥胖率急剧上升，并可诱发多种急慢性疾病，然而尚缺少安全有效的控制肥胖手段。通过减少机体的能量摄入或者促进能量消耗是控制体重增长的主要治疗方法与策略。作为调节能量平衡的主要器官，白色脂肪组织（WAT）负责储存机体摄入的多余能量，而棕色脂肪组织（BAT）则负责以适应性产热的方式消耗能量。当机体受到某些外部信号的影响时，如交感神经受到刺激、β_3 肾上腺素能受体（β_3-ARs）被激活后，WAT 中会出现功能与棕色脂肪细胞类似的脂肪细胞群，称为米色脂肪细胞，这一过程则称为 WAT 棕色化。通过激活 BAT 产热或促进 WAT 棕色化成为了目前预防和改善肥胖状态的重要途径之一。目前，有多项研究报道了具有雌激素样活性的中药单体及含有植物雌激素的中药提取物可以改善代谢综合征的各种症状。因此，本文就植物雌激素类中药通过激活 BAT 及促进 WAT 棕色化在预防或治疗肥胖及相关病理状态的研究展开综述，以期为今后探究植物雌激素类中药预防和治疗肥胖及相关代谢疾病的机制提供新的研究思路。

关键词：白色脂肪组织棕色化；脂肪组织；中药；植物雌激素；肥胖
中图分类号：R589.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0161-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.026

Research progress in browning of white adipose tissue induced by phytoestrogens in traditional Chinese medicine

YU Cheng-yuan[1], FAN Xue-jin[1], ZHUANG Peng-wei[1], ZHANG Mi-xia[1*], ZHANG Yan-jun[1, 2, 3*] (1. *College of Chinese Materia Medica*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300193; 3. *National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion*, *Tianjin* 300193)

Abstract: The obesity rate is rising rapidly worldwide, and can cause many acute and chronic diseases. However, safe and effective means to control obesity is still lacking. Reducing the body's energy intake or increasing energy expenditure is the main treatment strategy for weight gain. As the main organ for regulating energy balance, white adipose tissue (WAT) is responsible for storing excessive energy intake, while brown adipose tissue (BAT) is responsible for the expenditure of energy via adaptive thermogenesis. When the body is affected by some external signals, such as sympathetic nerve stimulation and β_3-adrenergic receptors (β_3-ARs) activation, groups of adipocytes that function similarly to brown adipocytes, called beige adipocytes will appear in WAT, which is called the browning of WAT. Activating BAT to generate heat or promoting the browning of WAT has become an important way to inhibit obesity. At present, many studies have reported that traditional Chinese medicine (TCM) monomers with estrogen-like activity and herbal extracts containing phytoestrogens can improve various symptoms of metabolic syndrome. This article reviewed the research on the prevention or treatment of obesity and related pathological states by activating BAT and promoting the browning of WAT to provide new research ideas for the mechanism exploration of phytoestrogenic TCM.

Key words: browning of white adipose tissue; adipose tissue; traditional Chinese medicine; phytoestrogen; obesity

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2018YFC1706804）。

作者简介：于澄元，男，在读硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：yuchengyuan0507@163.com *通信作者：张密霞，女，高级实验师，主要从事中药药理学研究，email：mimimixia@sina.com；张艳军，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事中药药理学研究，email：zyjsunye@163.com

肥胖是指由于能量摄入与消耗之间不平衡而致使机体出现以脂质沉积过多为主要特征的慢性代谢性疾病[1]，并与骨骼肌及肝脏等组织中胰岛素抵抗的发展密切相关[2]。由于过量脂肪蓄积所带来的质量或代谢效应，肥胖的发生发展会与诸多健康问题密切相关，并伴随多种代谢性疾病，如非酒精性脂肪肝、糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗等[3]。2015—2019 年，我国有超过 30% 的成年人处在超重的状态，有近 20% 的成年人处在肥胖的状态，而 17 岁以下的青少年及儿童的超重 / 肥胖率则达到了近 30%[4-5]。

由于调整饮食习惯和增加身体锻炼的方法减肥往往收效甚微，因此手术或药物干预成为了治疗肥胖的方法之一。手术干预对于肥胖的治疗效果较为显著，但其存在一定的风险并可能会伴随一些长期或短期的术后并发症[6-7]。目前，临床上用于治疗肥胖的药物主要通过减少脂肪吸收和抑制食欲以达到减轻体重的目的，然而，上述药物往往会涉及到胃肠道及心血管系统等相关不良反应的发生[8]。

随着棕色脂肪组织（brown adipose tissue，BAT）在成人体内的发现，激活其产热以及促进白色脂肪组织（white adipose tissue，WAT）棕色化成为了预防和治疗肥胖及相关代谢疾病的热点[9-10]。通过靶向激活 β_3-ARs，增加交感神经系统活性已被证实是激活 BAT 并改善机体代谢的有效途径之一，但临床上尚未有靶向激活棕色脂肪或促进脂肪转化的新药研制成功[11]。

作为维持能量稳态的关键因子，腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）可以通过下调其在下丘脑中的表达以及激活其在棕色 / 米色脂肪细胞中的表达，进而促进能量消耗[12]。研究表明，抑制下丘脑中 AMPK 的表达会诱导去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）的分泌，其后 NE 与棕色 / 米色脂肪细胞膜上的 β_3-ARs 结合会上调胞内环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）的表达水平从而激活蛋白激酶 A（protein kinases A，PKA），并最终激活胞内 AMPK 的表达[13]。

有研究发现，女性体内雌二醇水平的降低往往会导致能量消耗减少并造成体重增加[14]。雌二醇可以抑制卵巢切除大鼠下丘脑中 AMPK 的活性，并上调 BAT 中的产热基因，这表明雌二醇能够通过调控 AMPK 的表达，激活 BAT 的产热并最终促进能量消耗[15-16]。然而，由于雌激素替代疗法所带来的诸多不良反应及致癌风险，作用较温和的植物雌激素成为了替代雌激素的不二之选[17]。

近年来，中医药愈发广泛地被应用于肥胖及相关代谢性疾病的预防和治疗[18]。结合近些年来的研究，本文主要从具有植物雌激素样活性的中药单体和提取物，通过激活 BAT 产热或促进 WAT 棕色化进而预防或治疗肥胖及相关代谢疾病展开综述，以期为肥胖的中医药干预提供一定参考。

1 肥胖与脂肪组织

哺乳动物体内主要存在两种主要的脂肪组织，WAT 和 BAT。WAT 可以将机体从食物中摄取的多余能量储存起来，其中的白色脂肪细胞将大量的三酰甘油以化学能的形式储存在单房脂滴中，并根据需要释放游离脂肪酸参与全身循环[19-20]。与负责储存多余能量的 WAT 不同，BAT 可以通过解偶联蛋白 -1（uncoupling protein-1，UCP-1）进行适应性产热，并将能量以热能的形式耗散。UCP-1 为平衡机体能量稳态的重要调控因子，提高其在棕色脂肪细胞的表达水平可以改善机体的能量代谢[21]。

1.1 WAT

作为机体最大的能量储存库及内分泌器官，WAT 可通过分泌脂肪因子（如脂联素、瘦素）、炎症因子等调控因子进而影响周围组织器官的功能，最终调节全身能量平衡并维持糖脂代谢稳态[22-23]。WAT 根据解剖位置主要可以分为内脏 WAT 和皮下 WAT，并主要由大量的脂肪细胞、巨噬细胞、免疫细胞、成纤维细胞和脂肪祖细胞组成[24-25]。其中，WAT 中的白色脂肪细胞呈圆形或椭圆形，具有一个大的单房脂滴并分布少量线粒体，当机体摄入过量能量时，其能通过肥大和增生使得 WAT 不断扩张膨胀，并最终造成肥胖及代谢紊乱[26]。同时，有研究表明，当机体能量过剩时，适当的皮下 WAT 扩张会在一定程度上减轻内脏 WAT 扩张所带来的罹患代谢综合征的风险，这表明不同分布的 WAT 存在一定的异质性[27-28]。

1.2 BAT

作为机体进行非颤抖性产热的主要器官，BAT 存在于啮齿类动物和哺乳类动物中[29]。在啮齿类动物中，BAT 主要分布于肩胛和肾周，并通过一层结缔组织与 WAT 分离[30]。在婴儿体内，BAT 亦分布于这两个部位，且其介导的产热对维持婴儿体温尤为重要。而对于成人来说，肩胛部位的 BAT 随着年龄的增长逐步消失，但在颈部、锁骨和椎旁等区域仍有 BAT 的存在[31]。BAT 由棕色脂肪细胞和许多其他细胞类型组成，因其需要交换大量氧气为机体供热且受交感神经支配，故 BAT 周围布满了大量的毛细血管及神经网络[32]。BAT 中的棕色脂肪细胞呈多边形外观，其内部含

有大量多房性小脂滴、丰富的线粒体并表达 UCP-1、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 -1α（peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α，PGC-1α）和锌指转录因子 PR 结构域包含子 16（positive regulatory domain containing 16，PRDM-16）等特征基因 [33]。与白色脂肪细胞不同，棕色脂肪细胞与骨骼肌细胞有着相似的起源，均来自于表达生肌调节因子 5（myogenic factor 5，MYF5）的前体细胞 [34]。由于其出色的产热作用，BAT 在平衡调节体温中起着至关重要的作用。作为棕色脂肪的特征基因，UCP-1 可以通过消除线粒体内膜电位差，使线粒体氧化呼吸链与氧化磷酸化发生解偶联，抑制三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）的合成，进而以热能的形式释放能量 [35]。然而，肥胖状态可以影响 BAT 的结构，造成其表型的部分丢失，甚至还会导致产热功能的丧失 [36]。

2 WAT 棕色化

最近，在人类和动物模型中都发现了第三种类型的脂肪细胞——米色脂肪细胞。当机体受到某些外部信号的刺激，如交感神经受到刺激或白色脂肪细胞膜上的 β_3（β_3-ARs）被激活时，皮下 WAT，特别是腹股沟旁 WAT（inguinal white adipose tissue，iWAT）中会零星地出现一些有益的脂肪细胞亚群，这些细胞称为米色脂肪细胞，而这一过程被称为 WAT 棕色化。而与此相对，内脏 WAT 中几乎没有这些细胞的出现 [37]。

与棕色脂肪细胞相似，米色脂肪细胞同样具有丰富的线粒体并表达 UCP-1 及其他棕色脂肪细胞特征基因 [38]。此外，这些细胞亦具有其特异性，即能通过 UCP-1 非依赖性途径进行产热进而改善机体代谢状态 [39]。Kazak 等 [40] 发现了一条存在于鼠类米色脂肪细胞中，且不由 UCP-1 所介导的产热途径——肌酸底物循环途径，其能刺激线粒体呼吸进而增强米色脂肪细胞的能量消耗。Ikeda 等 [41] 研究发现，米色脂肪细胞还可以通过肌肉 / 内质网 Ca^{2+}-ATP 酶 2b（Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2b，SERCA2b）介导的钙离子循环途径进行产热，并维持机体全身能量及葡萄糖稳态。尽管 WAT 棕色化可以不由 UCP-1 介导而增加产热，但由于米色脂肪细胞均可进行 UCP-1 依赖性产热，因此 UCP-1 的高表达仍被普遍用于评价 WAT 是否发生了棕色化 [42]。

3 植物雌激素类中药通过作用于脂肪组织改善肥胖状态

作为一种具有雌激素样活性的非甾体天然化合物，植物雌激素按化学结构主要可以分为黄酮、香豆素、木脂素和萜类等物质。因其结构与 17-β-雌二醇相似且活性较低，植物雌激素可与雌激素受体（ERα、ERβ）结合发挥双重调节作用，即拟 / 抗雌激素样效应 [43]。

有研究表明，ERα 可以调控 WAT 和 BAT 中的线粒体功能和能量稳态 [44]。选择性激活 3T3-L1 脂肪细胞中的 ERα 可以激活 AMPK，上调 UCP-1 的表达，并促进 WAT 棕色化 [45]。此外，ERα 可以激活 AMPK 并上调沉默调节蛋白 1（sirtuin 1，SIRT1）的表达，促进 WAT 和 BAT 中的线粒体生物合成，使得其胞内线粒体丰度升高 [46]。以上研究表明，ERα 可以通过激活其下游的 AMPK 从而激活 BAT 产热并促进 WAT 棕色化。

3.1 中药单体

3.1.1 染料木黄酮 染料木黄酮又称金雀异黄酮、染料木素，是一种主要存在于淡豆豉、葛根、鸡血藤等中药中的异黄酮类化合物。染料木黄酮可以发挥多种生物学效应，如雌激素样作用、抗雌激素作用、抗氧化作用，并能抑制蛋白酪氨酸激酶（PTK）的活性 [47]。用染料木黄酮治疗高脂诱导的去卵巢大鼠，发现该成分可以通过调节 ERα 抑制大鼠的体重增长和胰岛素抵抗，并上调 iWAT 中线粒体生物合成相关基因（*NRF1*、*TFAM*）及棕色脂肪特征基因（*UCP-1*、*PRDM-16*、*PGC-1α*、*CIDEA*）的表达 [48]。体外实验表明，染料木黄酮可以通过刺激 AMPK 磷酸化并介导其下游的棕色 / 米色脂肪相关蛋白（UCP-1、PGC-1α、TBX1）的表达 [49]。此外，在阻断 ERα 的情况下，将染料木黄酮作用于 3T3-L1 前脂肪细胞，发现其脂质分布由单房脂滴转变为多房性小脂滴并伴随线粒体耗氧量的升高。同时，该单体降低了 3T3-L1 细胞中白色脂肪特征基因（*ACC*、*FASN*、*FABP4*）的表达，并升高了棕色 / 米色脂肪特征基因（*UCP-1*、*PGC-1α*、*CD137*）以及棕色 / 米色脂肪分化相关转录因子（*CEBPβ*、*SIRT1*）的表达。而当给予 SIRT1 抑制剂后，UCP-1 的表达亦受到了抑制 [50]。以上研究表明，染料木黄酮可以通过多种途径，如靶向 ERα、刺激 AMPK 磷酸化以及激活 SIRT1，介导其下游产热基因的表达，进而激活 BAT 以及促进 WAT 棕色化。

3.1.2 人参皂苷 人参皂苷是存在于人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer）和三七 [*Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen] 中的三萜皂苷类成分，具有抗肿瘤和保护心血管等作用 [51]。在人参总皂苷中，人参皂苷 Rd 可以直接激活 ERα 而发挥雌激素样作用 [52]，而人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 可以通过促进内源性雌激素与 ER 结合并表现出拟雌激素样活

性[53-54]。研究表明，人参皂苷 Rd 可以改善高脂饮食诱导小鼠的肥胖以及胰岛素抵抗，并通过激活 cAMP/PKA 通路促进产热相关基因的转录[55]。体外实验表明，人参皂苷 Rg_1 可以通过激活 AMPK 通路，上调 3T3-L1 和 C57BL/6 小鼠皮下白色脂肪细胞中的棕色脂肪特征基因（*UCP-1*、*PRDM-16*、*PGC-1α*）、棕色脂肪细胞分化相关转录因子（*CEBPβ*、*PPARγ*、*CPT-1*）的表达，并增强线粒体活性[56]。Park 等[57]研究发现，人参皂苷 Rb_1 可以通过激活 AMPK 进而诱导 PPARγ 以及棕色脂肪特征蛋白（UCP-1、PRDM-16、PGC-1α）的表达。Mu 等[58]研究发现，人参皂苷 Rb_1 可以通过直接激活 PPARγ，上调 UCP-1、PGC-1α 和 PRDM-16 的表达量，并显著增加 3T3-L1 细胞的基础呼吸和解偶联作用。Lim 等[59]用人参皂苷 Rb_1 治疗 db/db 小鼠，发现该成分可以减少小鼠的体重和白色脂肪的含量，并通过激活 β_3-ARs 诱导了 AMPK 和 SIRT1 的磷酸化，进而上调 UCP-1 的表达。以上研究表明，人参皂苷 Rb_1 可以通过直接激活 β_3-ARs、AMPK 或 PPARγ，介导其下游产热相关基因的表达从而激活 BAT 及促进 WAT 棕色化。

3.1.3 虫草素 长期以来，冬虫夏草 [*Cordyceps sinensis*（BerK.）Sacc.] 一直被用作滋补品和兴奋剂，并表现出增强能量代谢的潜力[60]。虫草素是存在于冬虫夏草中的一种腺苷的天然衍生物，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤以及预防动脉粥样硬化等多种药理活性[61-62]。虫草素已被证实可以通过诱导内源性雌激素催化酶的表达，调节体内激素水平而显示出拟 / 抗雌激素样效应[63]。有研究表明，虫草素可以抑制高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠的体重和白色脂肪含量的增长，改善血脂代谢紊乱和葡萄糖耐量，并通过激活 AMPK 通路以上调 WAT 和 3T3-L1 前脂肪细胞中 UCP-1 及其他产热蛋白的表达[64]。

3.1.4 补骨脂异黄酮 补骨脂异黄酮是从补骨脂（*Psoralea corylifolia* L.）中分离出的一种天然黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化活性、抑制肝癌以及诱导成骨细胞分化等多种药理活性[65]。Xin 等[66]研究发现，补骨脂异黄酮对于雌激素样受体（ERα、ERβ）均具有一定的活性。有研究表明，补骨脂异黄酮可以减少高脂饮食诱导下肥胖小鼠的体重增加及脂质累积，改善胰岛素敏感性，增加耗氧量及能量消耗[67]。同时，补骨脂异黄酮可以通过激活 SIRT1 的表达及调控 β_3-ARs 通路，上调 WAT、BAT 和 3T3-L1 前脂肪细胞中参与脂肪分解、β 氧化和产热相关基因的表达量从而促进脂肪分解、WAT 棕色化并激活 BAT[67]。

3.1.5 丹参酮ⅡA 作为从丹参（*Salvia miltiorrhiza* Bunge.）中提取分离出的一种亲脂性二萜类化合物，丹参酮ⅡA 可以直接与 ERα 和 ERβ 结合，并呈现出一定的雌激素样活性[68-69]。有研究表明，丹参酮ⅡA 可以减轻肥胖和糖尿病小鼠的体重，改善胰岛素敏感性，并通过激活 AMPK/PGC-1α 通路，增加 WAT 中的线粒体含量，上调脂肪细胞中 UCP-1 和其他产热蛋白的表达从而促进 WAT 棕色化并促进能量消耗[70]。

3.1.6 甘草查尔酮 A 甘草查尔酮 A 是一种来源于甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）的具有拟雌激素类活性的查尔酮类化合物，并具有抗炎、抗氧化、保肝、免疫调节等多种药理活性[71]。研究表明，甘草查尔酮 A 不仅能显著降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠的体重增加和白色脂肪含量，还改善了肥胖小鼠代谢紊乱，同时，该成分还上调了 iWAT 中棕色脂肪特征基因（*UCP-1*、*PRDM-16*、*PGC-1α*）的表达[72]。以上结果提示，甘草查尔酮 A 可能通过促进 WAT 棕色化以此发挥减肥作用并恢复代谢稳态。

3.1.7 芒柄花素 芒柄花素是一种存在于黄芪、鸡血藤、葛根等中药中的异黄酮类化合物，具有抗氧化、抗炎和雌激素样活性[73]。研究表明，芒柄花素可以直接激动 PPARγ，进而激活其通路下游产热蛋白 UCP-1 的表达，提高小鼠的产热能力并抑制其体重增长[74]。

3.2 中药提取物

3.2.1 枸杞提取物 枸杞子为茄科多年生灌木宁夏枸杞（*Lycium barbarum* L.）的干燥成熟果实，其富含多糖、生物碱和黄酮等活性成分。现代研究表明枸杞子具有包括免疫调节、抗氧化、调节糖脂代谢紊乱在内的多种药理学作用[75]。Li 等[76]研究发现，枸杞提取物可以通过调控调节 2- 羟雌酮与 16α- 羟雌酮的比例进而表现出雌激素样效应。有研究表明，枸杞提取物可以通过调节 AMPK 通路，下调体内外 WAT 基因和蛋白的表达，从而减少肝脏的脂质累积并改善高脂饮食诱导的脂肪肝。此外，枸杞提取物还显著上调了 BAT 中 UCP-1 和 PGC-1α 的表达[77]。这表明枸杞提取物可能通过激活 BAT，增加能量消耗，进而预防肥胖及其相关代谢性疾病。

3.2.2 葛根提取物 葛根为豆科植物野葛 [*Pueraria lobata*（Willd.）Ohwi] 或甘葛藤（*Pueraria thomsonii* Benth.）的干燥根，临床常用以治疗腹泻、心血管系统疾病以及 2 型糖尿病。葛根中主要含有异黄酮、三萜、香豆素类化合物，目前已经鉴定出包含具有雌激素样活性的葛根素、大豆苷元和染料木黄酮在

内的 70 余种化合物 [78]。Buhlmann 等 [79] 研究表明，葛根提取物可以减轻肥胖小鼠的体重并改善其糖脂代谢，并上调 UCP-1 的表达量，激活棕色脂肪细胞并诱导 iWAT 中米色脂肪细胞的生成。Jung 等 [80] 研究发现，葛根提取物可以通过提高骨骼肌能量代谢，上调 PGC-1α 表达水平并促进 AMPK 磷酸化以降低高脂饮食诱导小鼠的体重增加和脂质累积，并改善其糖脂代谢。

3.2.3　鸡血藤提取物　鸡血藤为豆科植物密花豆（*Spatholobus suberectus* Dunn）的干燥藤茎，具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎等药理学活性，并能影响酪氨酸磷酸化的双向调节。鸡血藤中主要存在黄酮、三萜、蒽醌和酚类物质，其中芒柄花素、异甘草素、甘草查尔酮 A 等化合物均具有雌激素样活性 [81-82]。Zhang 等 [83] 研究发现，鸡血藤提取物可以通过上调 AMPK 通路，增强 BAT 线粒体功能，进而激活 BAT 并诱导 iWAT 棕色化，最终抑制高脂饮食诱导小鼠的体重增长、脂质累积并改善其葡萄糖和胰岛素耐受。

4　讨论与展望

当机体长期处于能量失衡的状态，即能量摄入大于能量消耗，多余的能量会以三酰甘油的形式储存在 WAT 细胞的单房脂滴中，造成 WAT 的过量累积，最终导致肥胖。虽然预防和减轻肥胖的最直接方法是控制饮食限制能量摄入以及通过锻炼燃烧更多能量，但大部分肥胖患者往往无法达成。近年来，随着对 BAT 及 WAT 棕色化的深入研究，通过直接靶向作用于脂肪组织进而改变代谢效率，增加能量消耗并最终改善肥胖状态成为了学术界的研究热点。作为机体中负责产热消耗能量的两种细胞，棕色脂肪细胞和米色脂肪细胞如何激活或诱导其增多成为了预防和治疗肥胖及其相关并发症的潜在靶点。本文重点介绍了在动物模型和细胞培养中可以促进 WAT 棕色化或激活棕色脂肪产热的植物雌激素类中药，并对其相关作用及机制进行归纳，结果见表 1、表 2 和图 1。

表 1　植物雌激素类中药单体激活 BAT 或促进 WAT 棕色化研究

Tab 1　Study on activation of BAT or promoting of browning WAT by Chinese medicine monomers

中药单体	来源	相关作用	机制	文献
染料木黄酮	葛根	大鼠体重增长↓，iWAT 中棕色 / 米色脂肪特征基因表达↑	激活 ERα，AMPK，SIRT1	[48-50]
人参皂苷 Rd	人参	改善高脂饮食诱导小鼠的肥胖及胰岛素抵抗	激活 cAMP-PKA	[55]
人参皂苷 Rg_1	人参	白色脂肪细胞中的棕色脂肪特征基因和分化因子的表达↑，线粒体活性↑	激活 AMPK	[56]
人参皂苷 Rb_1	人参	3T3-L1 细胞基础呼吸↑，db/db 小鼠的体重和白色脂肪的含量↓，棕色脂肪特征基因↑	激活 β_3-ARs，AMPK，PPARγ	[57-59]
虫草素	冬虫夏草	小鼠体重增长和脂肪含量↓，TG、TC↓，改善葡萄糖耐量，产热基因表达↑	激活 AMPK	[64]
补骨脂异黄酮	补骨脂	小鼠体重及脂质累积↓，改善胰岛素敏感性，耗氧量、能量消耗↑	激活 β_3-ARs，SIRT1	[67]
丹参酮ⅡA	丹参	小鼠体重↓，改善胰岛素敏感性，线粒体含量↑	激活 AMPK	[70]
甘草查尔酮 A	甘草	小鼠体重增加和脂肪含量↓，改善代谢紊乱，iWAT 中棕色脂肪特征基因↑	尚不明确	[72]
芒柄花素	黄芪	小鼠体重增加↓，产热能力↑，UCP-1 表达↑	激活 PPARγ	[74]

表 2　植物雌激素类中药提取物激活 BAT 或促进 WAT 棕色化研究

Tab 2　Study on activation of BAT or promoting of browning WAT by Chinese medicine extract

中药提取物	植物雌激素类成分	相关作用及机制	文献
枸杞提取物	枸杞多糖	激活 AMPK 通路，WAT 特征基因表达↓，脂质累积↓，UCP-1、PGC-1α 表达↑	[77]
葛根提取物	葛根素、大豆苷元、染料木黄酮等	激活 AMPK 通路，小鼠体重↓，改善糖脂代谢紊乱，UCP-1、PGC-1α 表达↑	[80]
鸡血藤提取物	芒柄花素、甘草查尔酮 A 等	激活 AMPK 通路，BAT 线粒体功能↑，小鼠体重增长↓，脂质累积↓	[83]

虽已有文献证实，ERα 的激活可以通过促进 WAT 棕色化和激活 BAT 来增加产热并维持体内的能量稳态，但大多研究均围绕植物雌激素治疗骨质疏松、肿瘤、认知功能障碍和心血管系统疾病等展开，而鲜有学者就其预防或治疗肥胖及相关代谢性疾病展开深入研究 [84-85]。染料木黄酮是目前唯一被研究证实可以通过激活脂肪细胞核中的 ERα 进而发挥促进能量消耗等生物学效应的植物雌激素类中药单体成分，而大部分的植物雌激素类中药单体或提取物均被证实可以通过激活 AMPK，介导 UCP-1 的表达并促进产热发生。然而，包括染料木黄酮和补骨脂异黄酮在内的黄酮类成分因较差的水溶性和较低的口服生物利用度严重影响了其临床疗效并限制了其应用价值 [86]。近年来，药学工作者通过生物催化，药物共晶和“药物代谢酶 - 外排转运体偶联”等手段不断改善了其水溶性和生物利用度 [87-89]，并取得了较好的成果。此外，相较于啮齿类动物，人类的 BAT 往往含量较低，Blondin 等 [90] 亦表明与啮齿类动物不同，人类主要通过 β_2- 肾上腺素能受体（β_2-ARs）而非 β_3-ARs 以激活 BAT 的产热，这也解释了为何临床针对激活 β_3-ARs 所研制的药物往往疗

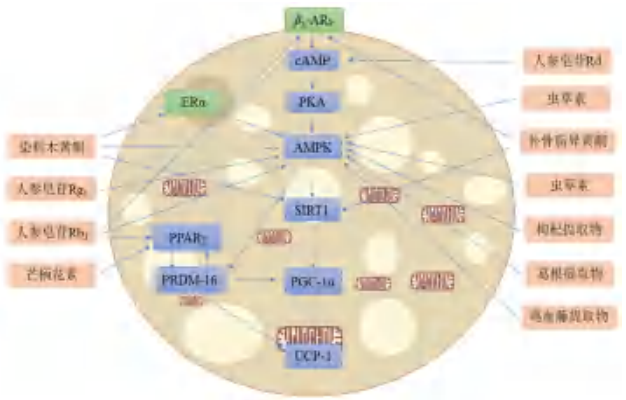


图 1 植物雌激素类中药单体（提取物）激活 BAT 或促进 WAT 棕色化的途径

Fig 1 Pathway of phytoestrogen ingredients from Chinese medicine monomers（extract）to activate BAT or promote browning of WAT

效甚微。因此，直接激活 β_3-ARs 的下游靶点——AMPK 以调节能量代谢并促进脂肪转化和棕色脂肪产热彰显出了植物雌激素类中药在预防和治疗肥胖中的广泛应用前景。总而言之，作为一类潜在的脂肪转化激动剂，植物雌激素类中药为今后研制和开发新的预防和治疗肥胖及相关代谢疾病的中药制剂提供了思路与参考。

参考文献

[1] Haslam DW，James WP. Obesity [J]. Lancet，2005，366（9492）：1197-209.

[2] Gavaldà-Navarro A，Villarroya J，Cereijo R，et al. The endocrine role of brown adipose tissue：an update on actors and actions [J]. Rev Endocr Metab Disord，2022，23（1）：31-41.

[3] 中国超重 / 肥胖医学营养治疗指南（2021）[J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2021，13（11）：1-55.

[4] 中国居民营养与慢性病状况报告（2020 年）[J]. 营养学报，2020，42（6）：521.

[5] Pan XF，Wang L，Pan A. Epidemiology and determinants of obesity in China [J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2021，9（6）：373-392.

[6] Sinclair P，Brennan DJ，Le Roux CW. Gut adaptation after metabolic surgery and its influences on the brain，liver and cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2018，15（10）：606-624.

[7] Nudel J，Sanchez VM. Surgical management of obesity [J]. Metabolism，2019，92：206-216.

[8] Son JW，Kim S. Comprehensive review of current and upcoming anti-obesity drugs [J]. Diabetes Metab J，2020，44（6）：802-818.

[9] van Marken Lichtenbelt WD，Vanhommerig JW，Smulders NM，et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. N Engl J Med，2009，360（15）：1500-1508.

[10] Rosina M，Ceci V，Turchi R，et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue [J]. Cell Metab，2022，34（4）：533-548. e12.

[11] Ma P，He P，Xu CY，et al. Recent developments in natural products for white adipose tissue browning [J]. Chin J Nat Med，2020，18（11）：803-817.

[12] van der Vaart JI，Boon MR，Houtkooper RH. The role of AMPK signaling in brown adipose tissue activation [J]. Cells，2021，10（5）：1122.

[13] Mottillo EP，Desjardins EM，Crane JD，et al. Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function [J]. Cell Metab，2016，24（1）：118-129.

[14] Mauvais-Jarvis F，Clegg DJ，Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis [J]. Endocr Rev，2013，34（3）：309-338.

[15] Torres Irizarry VC，Jiang Y，He Y，et al. Hypothalamic estrogen signaling and adipose tissue metabolism in energy homeostasis [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2022，13：898139.

[16] Martínez de Morentin PB，González-García I，Martins L，et al. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK [J]. Cell Metab，2014，20（1）：41-53.

[17] 李从文，魏云林 . 植物雌激素的特性及其应用研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学，2020，39（3）：1264-1269.

[18] 吴正雪，闫文月，刘维，等 . 近 10 年中药治疗肥胖症作用机制的实验研究进展 [J]. 中医儿科杂志，2022，18（3）：95-100.

[19] Montanari T，Pošćić N，Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis：a review [J]. Obes Rev，2017，18（5）：495-513.

[20] Tran TT，Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells：role in metabolism and disease [J]. Nat Rev Endocrinol，2010，6（4）：195-213.

[21] Hirschenson J，Melgar-Bermudez E，Mailloux RJ. The uncoupling proteins：a systematic review on the mechanism used in the prevention of oxidative stress [J]. Antioxidants（Basel），2022，11（2）：322.

[22] Liu Z，Wu KKL，Jiang X，et al. The role of adipose tissue senescence in obesity and ageing-related metabolic disorders [J]. Clin Sci（Lond），2020，134（2）：315-330.

[23] Wang X，Xu M，Li Y，et al. Adipose tissue aging and metabolic disorder，and the impact of nutritional interventions [J]. Nutrients，2022，14（15）：3134.

[24] Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue：structural and functional differences [J]. Obes Rev，2010，11（1）：11-18.

[25] Shen W，Wang Z，Punyanita M，et al. Adipose tissue quantification by imaging methods：a proposed classification [J]. Obes Res，2003，11（1）：5-16.

[26] Torres IVC，Jiang Y，He Y，et al. Hypothalamic estrogen signaling and adipose tissue metabolism in energy homeostasis [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2022，13：898139.

[27] Vishvanath L，Gupta RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity [J]. J Clin Invest，2019，129（10）：4022-4031.

[28] Kusminski CM，Holland WL，Sun K，et al. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity [J]. Nat Med，2012，18（10）：1539-1549.

[29] Gavaldà-Navarro A，Villarroya J，Cereijo R，et al. The en-

docrine role of brown adipose tissue：an update on actors and actions [J]. Rev Endocr Metab Disord，2022，23（1）：31-41.
[30] Lidell ME，Betz MJ，Dahlqvist LO，et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans [J]. Nat Med，2013，19（5）：631-634.
[31] Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human [J]. J Anat，1972，112（Pt 1）：35-39.
[32] Bargut TC，Aguila MB，Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue：updates in cellular and molecular biology [J]. Tissue Cell，2016，48（5）：452-460.
[33] Gaspar RC，Pauli JR，Shulman GI，et al. An update on brown adipose tissue biology：a discussion of recent findings [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2021，320（3）：E488-E495.
[34] Long JZ，Svensson KJ，Tsai L，et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes [J]. Cell Metab，2014，19（5）：810-820.
[35] Guillen C，Bartolome A，Vila-Bedmar R，et al. Concerted expression of the thermogenic and bioenergetic mitochondrial protein machinery in brown adipose tissue [J]. J Cell Biochem，2013，114（10）：2306-2313.
[36] Bargut TC，Silva-e-Silva AC，Souza-Mello V，et al. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers [J]. Eur J Nutr，2016，55（1）：159-169.
[37] Sidossis L，Kajimura S. Brown and beige fat in humans：thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis [J]. J Clin Invest，2015，125（2）：478-486.
[38] Chondronikola M，Volpi E，Børsheim E，et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans [J]. Diabetes，2014，63（12）：4089-4099.
[39] Ikeda K，Yamada T. UCP1 dependent and independent thermogenesis in brown and beige adipocytes [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2020，11：498.
[40] Kazak L，Chouchani ET，Jedrychowski MP，et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat [J]. Cell，2015，163（3）：643-655.
[41] Ikeda K，Kang Q，Yoneshiro T，et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis [J]. Nat Med，2017，23（12）：1454-1465.
[42] Bertholet AM，Kazak L，Chouchani ET，et al. Mitochondrial patch clamp of beige adipocytes reveals UCP1-positive and UCP1-negative cells both exhibiting futile creatine cycling [J]. Cell Metab，2017，25（4）：811-822. e4.
[43] Yamagata K，Yamori Y. Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome [J]. Molecules，2021，26（19）：5863.
[44] Zhou Z，Moore TM，Drew BG，et al. Estrogen receptor α controls metabolism in white and brown adipocytes by regulating Polg1 and mitochondrial remodeling [J]. Sci Transl Med，2020，12（555）：eaax8096.
[45] Santos RS，Frank AP，Fátima LA，et al. Activation of estrogen receptor alpha induces beiging of adipocytes [J]. Mol Metab，2018，18：51-59.
[46] Kim SN，Ahn SY，Song HD，et al. Antiobesity effects of coumestrol through expansion and activation of brown adipose tissue metabolism [J]. J Nutr Biochem，2020，76：108300.
[47] Sharifi-Rad J，Quispe C，Imran M，et al. Genistein：an integrative overview of its mode of action，pharmacological properties，and health benefits [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：3268136.
[48] Shen HH，Huang SY，Kung CW，et al. Genistein ameliorated obesity accompanied with adipose tissue browning and attenuation of hepatic lipogenesis in ovariectomized rats with high-fat diet [J]. J Nutr Biochem，2019，67：111-122.
[49] Palacios-González B，Vargas-Castillo A，Velázquez-Villegas LA，et al. Genistein increases the thermogenic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice [J]. J Nutr Biochem，2019，68：59-68.
[50] Aziz SA，Wakeling LA，Miwa S，et al. Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein [J]. Mol Nutr Food Res，2017，61（2）：1600574.
[51] Zhu GX，Zuo JL，Xu L，et al. Ginsenosides in vascular remodeling：cellular and molecular mechanisms of their therapeutic action [J]. Pharmacol Res，2021，169：105647.
[52] Yan X，Hu G，Yan W，et al. Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha [J]. Life Sci，2017，168：16-23.
[53] Wang Y，Shou X，Fan Z，et al. A Systematic review and meta-analysis of phytoestrogen protects against myocardial ischemia/reperfusion injury：pre-clinical evidence from small animal studies [J]. Front Pharmacol，2022，13：847748.
[54] 朱迪娜，王磊，王思彤，等 . 植物雌激素的研究进展 [J]. 中草药，2012，43（7）：1422-1429.
[55] Yao L，Han Z，Zhao G，et al. Ginsenoside Rd ameliorates high fat diet-induced obesity by enhancing adaptive thermogenesis in a cAMP-dependent manner [J]. Obesity（Silver Spring），2020，28（4）：783-792.
[56] Lee K，Seo YJ，Song JH，et al. Ginsenoside Rg_1 promotes browning by inducing UCP1 expression and mitochondrial activity in 3T3-L1 and subcutaneous white adipocytes [J]. J Ginseng Res，2019，43（4）：589-599.
[57] Park SJ，Park M，Sharma A，et al. Black ginseng and ginsenoside Rb1 promote browning by inducing UCP1 expression in 3T3-L1 and primary white adipocytes [J]. Nutrients，2019，11（11）：2747.
[58] Mu Q，Fang X，Li X，et al. Ginsenoside Rb_1 promotes browning through regulation of PPARγ in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun，2015，466（3）：530-535.
[59] Lim S，Park J，Um JY. Ginsenoside Rb_1 induces beta 3 adrenergic receptor-dependent lipolysis and thermogenesis in 3T3-L1 adipocytes and db/db mice [J]. Front Pharmacol，2019，10：1154.
[60] Radhi M，Ashraf S，Lawrence S，et al. A systematic review of the biological effects of cordycepin [J]. Molecules，2021，26（19）：5886.
[61] Tan L，Song X，Ren Y，et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin：a review [J]. Phytother Res，2021，35：1284-1297.
[62] Chen YY，Chen CH，Lin WC，et al. The role of autophagy in

anti-cancer and health promoting effects of cordycepin [J]. Molecules，2021，26（16）：4954.
[63] Huang BM，Hsiao KY，Chuang PC，et al. Upregulation of steroidogenic enzymes and ovarian 17beta-estradiol in human granulosa-lutein cells by Cordyceps sinensis mycelium [J]. Biol Reprod，2004，70（5）：1358-1364.
[64] Qi G，Zhou Y，Zhang X，et al. Cordycepin promotes browning of white adipose tissue through an AMP-activated protein kinase（AMPK）-dependent pathway [J]. Acta Pharm Sin B，2019，9（1）：135-143.
[65] Yu AX，Xu ML，Yao P，et al. Corylin，a flavonoid derived from Psoralea Fructus，induces osteoblastic differentiation via estrogen and Wnt/β-catenin signaling pathways [J]. FASEB J，2020，34（3）：4311-4328.
[66] Xin D，Wang H，Yang J，et al. Phytoestrogens from Psoralea corylifolia reveal estrogen receptor-subtype selectivity [J]. Phytomedicine，2010，17（2）：126-131.
[67] Chen CC，Kuo CH，Leu YL，et al. Corylin reduces obesity and insulin resistance and promotes adipose tissue browning through SIRT-1 and β_3-AR activation [J]. Pharmacol Res，2021，164：105291.
[68] Hwang SL，Yang JH，Jeong YT，et al. Tanshinone Ⅱ A improves endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance through AMP-activated protein kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun，2013，430（4）：1246-1252.
[69] Fan GW，Gao XM，Wang H，et al. The anti-inflammatory activities of tanshinone Ⅱ A，an active component of TCM，are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS [J]. J Steroid Biochem Mol Biol，2009，113（3-5）：275-280.
[70] Ma L，Zhao Z，Guo X，et al. Tanshinone Ⅱ A and its derivative activate thermogenesis in adipocytes and induce “beiging” of white adipose tissue [J]. Mol Cell Endocrinol，2022，544：111557.
[71] Kang TH，Seo JH，Oh H，et al. Licochalcone A suppresses specificity protein 1 as a novel target in human breast cancer cells [J]. J Cell Biochem，2017，118（12）：4652-4663.
[72] Lee HE，Yang G，Han SH，et al. Anti-obesity potential of glycyrrhiza uralensis and licochalcone A through induction of adipocyte browning [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，503（3）：2117-2123.
[73] Machado DJ，Espitia PJP，Andrade BR. Formononetin：biological effects and uses-a review [J]. Food Chem，2021，359：129975.
[74] Nie T，Zhao S，Mao L，et al. The natural compound，formononetin，extracted from Astragalus membranaceus increases adipocyte thermogenesis by modulating PPARγ activity [J]. Br J Pharmacol，2018，175（9）：1439-1450.
[75] 宋艳梅，张启立，崔治家，等 . 枸杞子化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 华西药学杂志，2022，37（2）：206-213.
[76] Li G，Sepkovic DW，Bradlow HL，et al. Lycium barbarum inhibits growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells by favorably altering estradiol metabolism [J]. Nutr Cancer，2009，61（3）：408-414.
[77] Li W，Li Y，Wang Q，et al. Crude extracts from Lycium barbarum suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation [J]. Biomed Res Int，2014，2014：196198.
[78] Bharti R，Chopra BS，Raut S，et al. Pueraria tuberosa：a review on traditional uses，pharmacology，and phytochemistry [J]. Front Pharmacol，2021，11：582506.
[79] Buhlmann E，Horváth C，Houriet J，et al. Puerariae lobatae root extracts and the regulation of brown fat activity [J]. Phytomedicine，2019，64：153075.
[80] Jung HW，Kang AN，Kang SY，et al. The root extract of pueraria lobata and its main compound，puerarin，prevent obesity by increasing the energy metabolism in skeletal muscle [J]. Nutrients，2017，9（1）：33.
[81] Wang Z，Wang D，Han S，et al. Bioactivity-guided identification and cell signaling technology to delineate the lactate dehydrogenase A inhibition effects of *Spatholobus suberectus* on breast cancer [J]. PLoS One，2013，8（2）：e56631.
[82] Lee MH，Lin YP，Hsu FL，et al. Bioactive constituents of Spatholobus suberectus in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells [J]. Phytochemistry，2006，67（12）：1262-1270.
[83] Zhang C，Liu J，He X，et al. Caulis spatholobi ameliorates obesity through activating brown adipose tissue and modulating the composition of gut microbiota [J]. Int J Mol Sci，2019，20（20）：5150.
[84] Liu J，Wang Y，Lin L. Small molecules for fat combustion：targeting obesity [J]. Acta Pharm Sin B，2019，9（2）：220-236.
[85] Chen LR，Chen KH. Utilization of isoflavones in soybeans for women with menopausal syndrome：an overview [J]. Int J Mol Sci，2021，22（6）：3212.
[86] Hostetler GL，Ralston RA，Schwartz SJ. Flavones：food sources，bioavailability，metabolism，and bioactivity [J]. Adv Nutr，2017，8（3）：423-435.
[87] 师少军 . 肠道 “药物代谢酶 - 外排转运体偶联” 对黄酮类化合物生物利用度影响的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（20）：2107-2112.
[88] 王雪凝，孔建强 . 生物催化介导的葛根素衍生化研究进展 [J]. 药学学报，2020，55（7）：1590-1603.
[89] 黄珊，蔡挺 . 黄酮类化合物共晶的研究进展 [J]. 现代医药卫生，2019，35（24）：3791-3795.
[90] Blondin DP，Nielsen S，Kuipers EN，et al. Human brown adipocyte thermogenesis is driven by β_2-AR stimulation [J]. Cell Metab，2020，32（2）：287-300. e7.

（收稿日期：2022-09-08；修回日期：2022-10-27）

酮体在心力衰竭治疗中的潜在作用

孔倩倩，郝琨，何华*（中国药科大学，南京 211198）

摘要：心力衰竭是一种高发病率和高致死率的心脏疾病，但现有抗心力衰竭药物治疗效果不佳，亟待开发新的治疗药物。能量代谢紊乱是心力衰竭发生的一种重要机制。近年来，研究发现心力衰竭患者体内的酮体水平升高，这可能是心力衰竭发生发展过程中机体的一种代偿性调节，改善心脏能量代谢以维持心脏泵血功能。采用生酮饮食、酮体输注、口服酮剂及药物调节等方式提高体内酮体水平后心功能得到改善，表明酮体水平的提高具有心功能保护作用。此外，酮体也可能通过抗炎、抗氧化以及保护内皮功能等其他机制发挥心血管保护作用。本文对酮体的体内生成代谢及其与心力衰竭的发生发展和治疗之间的关系进行综述。

关键词：心力衰竭；酮体；能量代谢；SGLT2 抑制剂

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0169-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.027

Potential role of ketone bodies in the treatment of heart failure

KONG Qian-qian, HAO Kun, HE Hua* (*China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198)

Abstract: Heart failure is a heart disease with high morbidity and mortality but the existing anti-heart failure drugs are not effective enough, so it is urgent to develop new drugs. Energy metabolism disorder is an important mechanism of heart failure. In recent years, increased ketone body level in patients with heart failurehas been found, which may be a compensatory regulation of the body during the heart failure to improve the cardiac energy metabolism and maintain cardiac pumping function. After increasing the level of ketone body by ketogenic diet, ketone body infusion, oral ketone agent and drug regulation, the improvement in the cardiac function indicated a protective effect of ketone body level on the cardiac function. In addition, ketone bodies might also play a cardiovascular protective role through other mechanisms such as anti-inflammation, antioxidation and protection of the endothelial function. This paper reviewed the production and metabolism of ketone bodies in vivo and how it influenced the occurrence, development and treatment of heart failure.

Key words: heart failure; ketone body; energy metabolism; SGLT2 inhibitor

心力衰竭是一种临床综合征，表现为心脏结构、功能异常引起的心输出量减少、心内压升高，是多种心血管疾病的晚期阶段。近年来，我国心力衰竭患病率显著增加，过去 15 年心力衰竭患者增加了 900 多万，患病率增加了 44%[1]，给社会和家庭带来了沉重的经济负担。目前心力衰竭治疗药物主要包括血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）、血管紧张素Ⅱ拮抗剂（ARB）、醛固酮受体拮抗剂（MRA）、β受体阻滞剂（BB）、利尿药以及强心苷类。这些药物主要是针对肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统（RAAS）和交感神经系统（SNS）进行调节，通过强心、利尿和扩血管改善血流动力学缓解临床症状（见图 1）。这种对症治疗虽然短期内可以改善患者症状，但心力衰竭的疾病进程并未受到影响，不仅患者的病死率与再住院率没有得到有效改善，随着用药时间延长其不良反应发生的风险还大大增加。此外，这些药物主要是针对射血分数下降型心力衰竭（HFrEF），对射血分数保留型心力衰竭（HFpEF）效果不佳。因此，探索心力衰竭发病

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81773826）。

作者简介：孔倩倩，女，硕士研究生，主要从事酮体代谢研究，email：3296981462@qq.com *通信作者：何华，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事定量药理学研究，email：huahe827@163.com

机制、找寻新的靶点是治疗心力衰竭亟待解决的关键问题。

图 1 传统抗心力衰竭药物及酮体机制图

Fig 1 Mechanism of traditional anti-heart failure drugs and ketone bodies

心脏每日要消耗大量三磷酸腺苷（ATP）为机体供能，心脏出现病变时，能量供应不足、代谢发生紊乱，进而诱导病情恶化引发心力衰竭[2]。因此，在能量代谢方面入手治疗心力衰竭具有重要意义。健康心脏的 ATP 来源主要是脂肪酸和葡萄糖的氧化，而在衰竭心脏中脂肪酸氧化降低，葡萄糖由有氧氧化大幅转为糖酵解[3]，同时观察到酮体氧化比例上升[4]。衰竭心脏对酮体利用增加可能是机体的一种代偿反应，相关研究表明提高体内酮体水平对于心力衰竭具有改善作用，这一现象也被认为是钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2（SGLT2）抑制剂发挥心血管保护作用的机制之一[5]。因此，本文通过综述酮体代谢以及在正常和心力衰竭疾病状态下其对心脏能量代谢的影响，探讨酮体对心力衰竭疾病的作用。

1 酮体体内过程

1.1 酮体生成

酮体是 β- 羟丁酸（β-HB）、乙酰乙酸（AcAcOH）和丙酮的统称。其中，β-HB 大约占 78%，AcAcOH 占 20%，由 AcAcOH 脱羧而来的丙酮大约占 2%。酮体主要来源于肝脏中的脂肪酸氧化，此外约 4% 来源于氨基酸[6]。在禁食、饥饿以及血糖浓度较低时，三酰甘油在激素敏感性脂肪酶（HSL）作用下生成脂肪酸，脂肪酸活化为脂酰辅酶 A 后，在肉碱脂酰转移酶 1、2（CPT1、2）的作用下进入肝脏线粒体，此过程中 CPT1 为限速酶[7]。进入线粒体后，脂酰辅酶 A 通过 β- 氧化生成乙酰辅酶 A（Ac-CoA），两分子 Ac-CoA 生成乙酰乙酰辅酶 A（AcAc-CoA），然后在 3- 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶（HMGCS2）的催化下，AcAc-CoA 和 Ac-CoA 缩合生成 3- 羟基 -3- 甲基戊二酸单酰辅酶 A（HMG-CoA）；HMG-CoA 裂解酶（HMGCL）裂解 HMG-CoA 释放 Ac-CoA 和 AcAcOH，AcAcOH 在 β-HB 脱氢酶（BDH1）还原下生成 β-HB 或自由脱羧生成丙酮[8]，酮体生成过程见图 2A。

1.2 酮体转运

肝脏缺乏酮体代谢的关键酶——琥珀酰辅酶 A 转移酶（SCOT），因此，酮体需要输送到其他部位发挥作用。AcAcOH 和 β-HB 在单羧酸转运蛋白（MCT）的介导下从肝细胞中释放出来，目前大多数学者认为这一过程由 MCT1 与 MCT2 介导[8]，但也有报道称 MCT7 在其中也发挥着关键作用，编码 MCT7 蛋白基因突变的斑马鱼在禁食后产生脂肪肝，可能是由于禁食产生的高水平酮体因缺乏转运体而进入脂质合成途径[9]。血液中酮体的浓度高于肝外组织，因此酮体以单纯扩散或在 MCT 介导下以易化扩散的方式进入肝外组织[10]。虽然 MCT 在细胞膜表面广泛表达，但在能量匮乏状态下，酮体主要为高能量消耗器官心脏、大脑和骨骼肌等提供能量。

1.3 酮体的利用和消除

正常情况下，心脏和骨骼肌主要利用葡萄糖和脂肪酸氧化供能，大脑主要利用葡萄糖提供能量，酮体氧化产生的 ATP 只占很少一部分。但在代谢紊乱情况下，酮体作为替代能量发挥重要作用，供能比例大幅上升。在长时间禁食的情况下，酮体对大脑的能量贡献甚至达到了 60%[11]。酮体进入肝外组织后，β-HB 被 BDH1 转化为 AcAcOH，AcAcOH 在 SCOT 的作用下生成 AcAc-CoA。与其他器官相比，心脏的 SCOT 表达水平最高[12]。因此，大量酮体进入心脏氧化分解为心脏供能后，心脏内外浓度差又会促进更多的酮体进入心脏，循环往复地给心脏提供能量。AcAc-CoA 在 Ac-CoA 乙酰基转移酶（ACAT）的催化下发生硫解反应，分解为两分子 Ac-CoA，随后进入三羧酸循环（TCA）[7]。除氧化供能外，酮体还可以通过转化为脂质、随尿液或肺呼气排出的方式来消除，酮体的代谢过程见图 2B。

2 心脏能量利用

2.1 健康状况下心脏能量代谢

心脏是身体中能量消耗和氧化需求最高的器官，心肌细胞具有代谢适应性的优点，可以灵活利用不同的能量底物，以满足心脏的高能量需求并维持收缩功能。在健康状况下，心脏能量主要来源于线粒体氧化磷酸化产生的 ATP，其中脂肪酸对其贡献最大，能产生 60% ～ 70%ATP；其

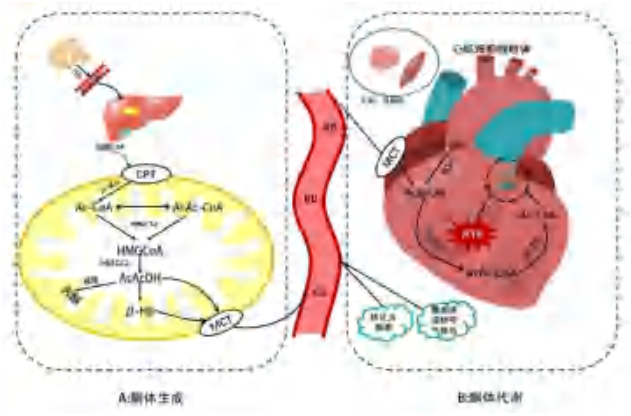


图 2 酮体在体内的生成、转运、利用和消除图

Fig 2 Generation, transport, utilization and elimination of ketone bodies in vivo

次是葡萄糖，产生 30% ～ 40%ATP；剩余 ATP 由乳酸、氨基酸和酮体提供。虽然酮体对健康心脏能量代谢贡献比较小，但在产能效率方面，脂肪酸 P/O 比为 2.33，葡萄糖 P/O 比为 2.58，酮体 P/O 比为 2.5，酮体优于脂肪酸，与葡萄糖相似，且其燃烧热比糖酵解终产物丙酮酸高出 31%[13]，因此，在心脏受损不能正常利用代谢底物的情况下，酮体是一个很好的替代能源。

2.2 心功能受损时酮体氧化增加

衰竭心脏丧失了代谢灵活性，氧化脂肪酸和葡萄糖的能力下降，处于能量匮乏状态。一方面，在病理条件下，心脏代谢重编程，编码脂肪酸代谢酶的基因下调 [14-15]；另一方面，虽然脂肪酸氧化降低，但心肌对其摄取并没有减少，脂肪酸蓄积在心肌细胞中，造成脂毒性 [16]，可能会进一步恶化心力衰竭。在心力衰竭早期阶段，葡萄糖心肌摄取增加，但葡萄糖氧化能力下降 [4]，糖酵解限速酶表达增加 [17]，葡萄糖的利用途径由高产能氧化转为低产能糖酵解；心力衰竭患者晚期心肌细胞胰岛素敏感性降低，葡萄糖进入心脏的水平降低，进一步减少了葡萄糖的氧化 [18-19]。衰竭心脏逐渐失去氧化脂肪酸和葡萄糖的能力，而酮体作为优秀替代“燃料”，能在衰竭心脏的代谢过程中发挥重要作用。

早期研究已经发现，HFrEF 患者的血酮水平升高且与心脏受损程度相关 [20]。最新代谢组学也发现，衰竭心脏消耗的酮体显著上升且与循环酮体水平成正比 [21]。研究发现，参与酮体代谢的关键酶在衰竭心脏中表达上升，在心力衰竭小鼠中发现 BDH1 的蛋白水平升高了 2 ～ 3 倍，酮体转运蛋白 MCT 表达也增加了 [22]；终末期心力衰竭患者体内的 SCOT 表达上调，生酮 β- 羟基丁酰辅酶 A 水平也提高，进一步说明了酮体的生成在心力衰竭疾病状态下有所提高 [23]。

现有研究结果表明，酮体水平在衰竭心脏中的上升是对受损心脏的一种保护性机制，而非引发或恶化心力衰竭的原因。SCOT$^{-/-}$的心力衰竭小鼠相较于对照组，左心室容积显著增加，射血分数降低，表明酮体缺乏与病理性心脏重塑加速有关 [24]。Horton 等 [25] 研究发现，BDH1 缺乏的心力衰竭小鼠表现出更严重的症状；而与之相反，BDH1 过表达的心力衰竭小鼠心肌纤维化、收缩功能障碍及氧化损伤程度均低于对照小鼠。对心力衰竭小鼠采用生酮饮食饲养方案及对心力衰竭犬输注酮酯均改善了心力衰竭症状，减轻了心脏病理重塑 [26]。同时，在人体中的研究表明酮体具有剂量依赖性的改善血流动力学、缓解心力衰竭症状的作用 [27]。近期 Monzo 等 [28] 研究发现，酮体利用率在心力衰竭初期就已经升高并为心脏提供额外能量，这是酮体对心脏保护的又一有力证据。因此，心功能受损下酮体的增加是对心脏的一种保护性机制。

3 酮体增加策略及对心脏保护作用

生理条件下，人体内酮体水平在 0.05 ～ 0.1 mmol • L^{-1}，大于 0.5 mmol • L^{-1} 即被认为达到酮症，禁食、长时间运动等可使酮体升至 1 mmol • L^{-1} 以上，在糖尿病酮症酸中毒等病理条件下体内酮体可达 20 mmol • L^{-1} [29]。有研究者提出酮体的整体生理影响遵循倒 U 形曲线，酮体的轻度和间歇性升高是有益的 [30]，酮体浓度过低达不到治疗效果，过高则会导致酮症酸中毒。因此，对于改善心力衰竭，酮体的剂量范围十分重要。Chu 等 [31] 提出，酮体较为理想的治疗浓度为 1 ～ 3 mmol • L^{-1}，高于 3 mmol • L^{-1} 可能会对机体产生不利影响（临床中血酮浓度＞ 3 mmol • L^{-1} 即对酮症酸中毒有诊断意义）。

增加衰竭心脏中酮体的方法主要有以下几种：生酮饮食、酮体输注和口服酮剂。这些增酮方法使体内酮体水平轻度增高，可改善心力衰竭，且随着给药时间的延长，酮体对心血管的保护作用也逐渐增强。表 1 总结了不同增酮方法及对心血管的作用。

3.1 生酮饮食

生酮饮食是一种由高脂肪、低碳水化合物及其他适量比例营养素组成的饮食，曾用于治疗儿童难治性癫痫。它是通过限制碳水化合物的摄入达到禁食状态，在体内低糖状态下，胰岛素水平

表 1 不同增酮方法及对心血管的作用

Tab 1 Different ketogenic methods and their cardiovascular effects

给药时长	增酮方法	研究对象	实验方法	对心血管影响
短期给药	酮体输注	慢性 HFrEF 患者[27]	对心力衰竭患者输注 β-HB[0.18 g/（mg·h）] 3 h	酮体水平在一定范围内，剂量依赖式增加心输出量，降低全身血管阻力；增加左心室射血分数（LVEF）及降低左室舒张末压（LVEDP）；增加心脏能量供应
	口服酮剂	健康受试者[32]	受试者服用口服酮剂前后超声心动图比较	
长期给药	生酮饮食	心肌肥大小鼠[33]	喂食心力衰竭小鼠 4 周高脂 - 低碳水饮食	减轻心脏病理性肥大和心肌纤维化，改善心脏收缩功能障碍，减缓心脏病理性重塑，包括增加 LVEF；减轻左心室扩张；抑制心肌细胞肥大；增强心肌细胞收缩能力；增加心脏线粒体数量等
	酮体输注	扩张型心肌病犬[25]	对心力衰竭犬输注 β-HB 14 d	
	口服酮剂	心力衰竭大鼠及小鼠[34]	喂食心力衰竭老鼠酮酯饮料 4 ～ 6 周	
	生酮饮食	全身缺血性损伤大鼠[35]	不同饮食的大鼠饲养 19 周后，造模缺血性损伤，比较心脏功能	

降低、胰高血糖素水平上升，进而刺激脂肪分解、氧化生酮[8]。动物研究表明，喂食生酮饮食的心力衰竭小鼠心肌肥大状况和收缩功能障碍得到改善[33]，Mccommis 等[36]的研究也得出类似的结论。在一项小样本临床试验中，两位左心室肥厚的心力衰竭患者在生酮饮食治疗一年后，心力衰竭标志物含量显著下降，心功能得到改善[37]。生酮饮食通过调整饮食结构刺激内源性产酮，并对受损心脏表现出保护作用。

经典的生酮饮食侧重于增加长链脂肪的摄入量，但此种方法存在一些问题，可能会导致肥胖[38]。因此，现在多采用由中链脂肪酸组成的生酮饮食。较短的脂肪酸可以更快速生酮，而且与长链三酰甘油相比，中链脂肪酸饮食还具有减轻体重的特点。现在生酮饮食正在成为减肥的一种新兴趋势，但它不适于长期使用，患者依从性差，且长期低碳水化合物饮食可能导致病死率增加[39]，摄入脂肪酸过多也可能导致血脂异常，对动脉粥样硬化患者存在很大风险，甚至造成非酒精性脂肪肝和胰岛素抵抗[40]。因此，通过生酮饮食来维持体内高酮体水平不是一个可以长期使用的方案。

3.2 酮体输注

酮体输注是向体内直接补充酮体的一种方法，它不同于生酮饮食，独立于体内脂肪酸和葡萄糖，不经过脂肪酸 β 氧化可迅速提高机体酮体水平。研究表明，酮体输注可显著减少缺血再灌注损伤的大鼠心肌梗死面积，降低细胞凋亡率[41]；Horton 等[25]研究发现，对犬长期输注 β-HB，可以显著增加犬的 LVEF、降低 LVEDD 等，改善心脏受损状况；同时人体研究表明，对心力衰竭患者输注酮体使得循环酮体水平增至 3.3 mmol·L^{-1} 时，在不增加心肌能量的消耗下，患者的心功能得到改善。

酮体输注相对于生酮饮食，缺点更少，更为可控，可以快速提升体内酮体水平。其因治疗方式的局限性并不适用于慢性心力衰竭患者，但对于急性心力衰竭患者不失为一个良好的治疗方式。

3.3 口服酮剂

口服酮剂包括酮盐和酮酯，但由于酮盐含有大量钠，并不适于长期口服，相比较之下，酮酯对于慢性心力衰竭更具有治疗意义。酮酯包括（*R*）-1，3- 丁二醇和（*R*）-3- 羟基丁酸乙酯。一项针对心力衰竭老鼠的研究发现，酮体可以恢复受损心脏的 ATP 水平，改善心力衰竭症状[34]，这说明酮体通过给衰竭心脏提供能量缓解了心功能受损状况。Takahara 等[42]通过长时间给心力衰竭小鼠补充酮酯，发现小鼠体内循环酮体水平显著升高，心肌肥大得到改善，心输出量显著上升，进一步说明酮体具有治疗心力衰竭的作用。酮酯试验目前多在健康人群中进行[32]，对心力衰竭患者研究较少，Monzo 等[28]的研究表明 HFrEF 患者服用酮酯后心脏的酮体摄取增加，酮体利用率增加。但尚未有长期酮酯饮食对心力衰竭影响的研究，仍需进一步探索。

酮酯饮食作为目前最先进的补充体内酮体的方法，安全性和有效性均优于其他方法，且缺点较少，（*R*）-1，3- 丁二醇可能会引起欣快感和眩晕[43]，另一个不良反应为胃肠道反应，但并不常见[44]。因此，未来可以研究酮酯饮食对于心力衰竭的保护作用。

4 影响体内酮体水平的药物

4.1 SGLT2 抑制剂

SGLT2 抑制剂是一种新型降糖药，通过抑制肾近曲小管对葡萄糖的重吸收，增加尿糖排出，发挥降糖作用（已上市药物见表 2）。在治疗过程中人们发现 SGLT2 抑制剂对心血管具有一定的保护作用[45]，恩格列净和达格列净在中国已获批用于心力衰竭治疗。目前人们还没有完全了解 SGLT2 抑制剂对于心力衰竭的保护机制，但这种益处不太可能用改善血糖来解释，因为并没有观察到其他降糖药对受损心脏具有保护作用，且

SGLT2 抑制剂在非糖尿病的心力衰竭动物或患者身上也表现出对受损心脏的保护作用[46-47]。另外，SGLT2 受体在心脏中几乎没有表达，其通过受体配体直接发挥心脏保护作用的可能性也不大[48]。

表 2 已上市 SGLT2 抑制剂药物

Tab 2 Marketed SGLT2 inhibitor drugs

药物名称	适应证	对心血管影响
卡格列净	糖尿病	降低心力衰竭住院率和心血管病死率[49]
恩格列净	糖尿病、心力衰竭	无论患者是否患有糖尿病，对心力衰竭均有显著效果；第一个被 FDA 批准用于心力衰竭的 SGLT2 药物[50]
达格列净	糖尿病、心力衰竭	无论患者是否患有糖尿病，均可降低 HFrEF 恶化风险[47]
伊格列净	糖尿病	降低年龄≥ 70 岁患者的左心室质量分数，降低 NT-proBNP 水平[51]
鲁格列净	糖尿病	显著降低 T2DM 和 HFpEF 患者的血浆容积，减少血管内容量和心脏前负荷[52]
托格列净	糖尿病	显著降低左心室舒张末期尺寸，改善心脏负荷，恢复血管内皮功能[53]
埃格列净	糖尿病	降低心力衰竭首次和总住院率及心力衰竭死亡风险[54]
索格列净	糖尿病	降低失代偿期心力衰竭患者的心血管住院率、病死率及急性就诊率[55]

目前很多学者倾向于 SGLT2 抑制剂通过增加酮体发挥心脏保护作用，研究发现使用 SGLT2 抑制剂的患者体内的循环酮体水平上升[56]。SGLT2 抑制剂升酮机制可能涉及以下两个方面：一方面，通过增加尿糖排出模拟饥饿状态，提高体内胰高血糖素水平，降低胰岛素 / 胰高血糖素比值，进而促进脂肪分解，增加体内酮体水平[57]；另一方面，它可直接作用于胰岛 α 细胞，促进胰高血糖素分泌[58]。已有研究证明 SGLT2 抑制剂可以通过增加酮体代谢来发挥心脏保护作用，在一项针对心肌梗死的非糖尿病大鼠研究中，恩格列净增加了大鼠体内循环酮体水平，且参与酮体代谢的关键酶表达水平增加[46]；另一项研究结果更为直观，使用恩格列净治疗的心肌梗死猪，心脏酮体摄取率与酮体代谢酶水平均增加，而葡萄糖摄取率下降，这说明恩格列净将心脏能量底物由葡萄糖转为酮体，进而改善能量不足，缓解心力衰竭症状[59]。

理想的酮体治疗浓度为 1 ～ 3 mmol • L^{-1}，而 SGLT2 抑制剂升酮水平就在这个范围内[31]。因此，SGLT2 抑制剂通过升高酮体治疗心力衰竭这一机制具有重要探索意义。

4.2 *其他药物*

除 SGLT2 抑制剂外，临床上也观察到一些药物能够不同程度地改变患者体内酮体水平。他汀类药物通过抑制 HMG-CoA 还原酶竞争性阻断细胞内羟甲戊酸代谢途径，减少胆固醇合成，进而增加酮体合成原料，提高体内酮体水平。但其对心力衰竭的作用存在很大争议，迄今为止尚未有他汀类药物可以改善心力衰竭的明确报道。两项大型临床试验研究表明，尽管瑞舒伐他汀降低了心力衰竭住院率，但并不会降低心血管疾病的病死率[60-61]。Okuyama 等[62] 提出他汀类药物具有线粒体毒性，可能会恶化心力衰竭。临床研究发现，患者服用他汀类药物 3 个月后，体内酮体从 0.16 mmol • L^{-1} 增加到 0.26 mmol • L^{-1}[63]，而这远达不到理想酮体治疗水平。虽然从作用机制推断他汀类药物具有升高酮体的作用，但在实际应用中由于其升高酮体水平的能力较弱，并未达到酮体的心脏保护有效浓度范围，因此并未表现出心脏保护作用。

沙库巴曲缬沙坦是一种新型抗心力衰竭药物，其机制为通过抑制脑啡肽酶和血管紧张素受体，增加心房利钠肽和血管紧张素水平，提高肾素活性，发挥利尿、降血压和舒张外周血管的作用，进而改善受损心脏的病理性重塑来缓解心力衰竭[64]。传统抗心力衰竭药物也作用于 RAAS，但治疗效果与沙库巴曲缬沙坦相差甚远。研究发现，沙库巴曲缬沙坦可以升高体内胰高血糖素，甚至达到 2 倍之多[65]，而胰高血糖素可以升高酮体，因此，沙库巴曲缬沙坦可能通过升高胰高血糖素进而升高酮体从而改善心力衰竭。然而，目前并没有关于这一假想的研究，未来可以进一步探索。

曲美他嗪是一种抗心绞痛药物，其通过调节脂肪酸 β 氧化改善心脏能量代谢来发挥心脏保护作用。Li 等[66] 经过实验验证，曲美他嗪增加了心力衰竭大鼠体内酮体代谢相关蛋白水平且治疗后酮体水平降低，病理性心脏重塑得到改善，因此，认为曲美他嗪通过提高心力衰竭大鼠的酮体利用率改善了心力衰竭。关于曲美他嗪与酮体的研究比较少，但作为能量调节药物，进一步探索其与酮体的关系具有重要意义。

5 酮体保护心脏的非代谢机制

虽然大量研究支持酮体代谢对受损心脏的保护作用，但也有研究显示酮体的心脏保护作用可能独立于能量代谢。一项针对离体小鼠肥大型心脏的研究表明，提高心脏的酮体水平后，虽然酮体氧化率显著增加，但是心脏的工作效率并没有

增加[67]，这提示了酮体在改善心脏能量代谢之外可能还有其他的心脏保护作用机制，如抗炎、抗氧化以及改善内皮功能等。

β-HB 可与许多免疫细胞大量表达的 G 蛋白偶联受体 GPR109A 结合发挥抗炎作用[68]；*β*-HB 也能与 NLRP3 炎性小体结合以抑制其活性，同时限制促炎细胞因子 IL-1*β* 和 IL-18 的释放[69]。但 AcAcOH 却被认为具有促炎作用。AcAcOH 浓度升高，尤其在高葡萄糖水平下，会通过氧化应激加剧内皮细胞损伤，且其与人单核细胞中 TNF-*α*、MCP-1 表达，活性氧（ROS）积累和 cAMP 水平降低有关[70]。因此，酮体在抗炎方面的机制还有待进一步研究。

在氧化应激心肌细胞模型中，*β*-HB 的积累使得 FOXO3a 增加（FOXO3a 具有调节细胞周期、凋亡，抑制肿瘤细胞生长以及抗氧化应激等多种功能），而 FOXO3a 诱导的抗氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的蛋白水平也提高了[71]。酮体还被认为是Ⅰ类组蛋白去乙酰化酶（HDAC）的重要内源性抑制剂，Ⅰ类 HDAC 与心肌肥大有关，还与编码抗氧化应激因子 FOXO3a 和 MT2 的基因相关[72]。因此，酮体也可能发挥抗氧化应激作用。

有研究发现酮体具有内皮依赖性血管扩张作用。用（*R*）-1，3- 丁二醇治疗会增加 Dahl 盐敏大鼠阻力动脉中的一氧化氮合酶活性[29]，生酮饮食喂养的小鼠一氧化氮合酶的蛋白表达水平也上升[73]，在临床上给患者输注酮体也观察到血管扩张、血流量增加[27]，心力衰竭状况得到缓解。

因此，酮体对受损心脏的益处并不仅仅局限于能量代谢，多方面探索酮体的保护机制对于进一步治疗心力衰竭以及其他疾病也具有深远意义。

6 总结与展望

心力衰竭作为发病率和病死率高的一种疾病，迫切需要新的治疗方法来改变目前治疗效果不佳的状况。在心力衰竭疾病进程中，代谢底物组成比例发生改变，而越来越多的证据表明，升高的酮体对衰竭心脏具有改善和保护作用。不同于传统抗心力衰竭药物的对症治疗，酮体可以改善心力衰竭状况，延缓疾病进程。但值得注意的是，治疗时的酮体水平需维持在一定范围内，过高或过低都不合适，SGLT2 抑制剂维持的酮体浓度范围具有参考意义。目前酮体对于改善心力衰竭的研究尚在发展阶段，未来需要进一步研究酮体对心脏的保护机制、更加安全的酮体给药方式以及长期酮体给药的安全性和有效性。总而言之，酮体对于心血管的保护作用在未来会得到进一步阐述，其很有可能是心力衰竭治疗的一个新的重要靶点。

参考文献

[1] Hao G，Wang X，Chen Z，et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China：the China Hypertension Survey，2012—2015 [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（11）：1329-1337.

[2] Shi X，Qiu H. New insights into energy substrate utilization and metabolic remodeling in cardiac physiological adaption [J]. Front Physiol，2022，13：831829.

[3] de Jong KA，Lopaschuk GD. Complex energy metabolic changes in heart failure with preserved ejection fraction and heart failure with reduced ejection fraction [J]. Can J Cardiol，2017，33（7）：860-871.

[4] Lopaschuk GD，Karwi QG，Tian R，et al. Cardiac energy metabolism in heart failure [J]. Circ Res，2021，128（10）：1487-1513.

[5] Cowie MR，Fisher M. SGLT2 inhibitors：mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control [J]. Nat Rev Cardiol，2020，17（12）：761-772.

[6] Thomas LK，Ittmann M，Cooper C. The role of leucine in ketogenesis in starved rats [J]. Biochem J，1982，204（2）：399-403.

[7] Fukao T，Lopaschuk GD，Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism：on the fringe of lipid biochemistry [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids，2004，70（3）：243-251.

[8] Puchalska P，Crawford PA. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism，signaling，and therapeutics [J]. Cell Metab，2017，25（2）：262-284.

[9] Hugo SE，Cruz-Garcia L，Karanth S，et al. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting [J]. Genes Dev，2012，26（3）：282-293.

[10] Lopaschuk GD，Karwi QG，Ho KL，et al. Ketone metabolism in the failing heart [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids，2020，1865（12）：158813.

[11] Jensen NJ，Wodschow HZ，Nilsson M，et al. Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci，2020，21（22）：8767.

[12] Fukao T，Song XQ，Mitchell GA，et al. Enzymes of ketone body utilization in human tissues：protein and messenger RNA levels of succinyl-coenzyme A（CoA）：3-ketoacid CoA transferase and mitochondrial and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolases [J]. Pediatr Res，1997，42（4）：498-502.

[13] Qian N，Wang Y. Ketone body metabolism in diabetic and non-diabetic heart failure [J]. Heart Fail Rev，2020，25（5）：817-822.

[14] Bae J，Paltzer WG，Mahmoud AI. The role of metabolism in heart failure and regeneration [J]. Front Cardiovasc Med，2021，8：702920.

[15] Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling [J]. Cardiovasc Res，2009，81（3）：412-419.

[16] Nakamura M，Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity，insulin resistance and diabetes [J]. J Physiol，2020，598（14）：2977-2993.

[17] Nascimben L，Ingwall JS，Lorell BH，et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart [J]. Hypertension，2004，44（5）：662-667.
[18] Erqou S，Adler AI，Challa AA，et al. Insulin resistance and incident heart failure：a meta-analysis [J]. Eur J Heart Fail，2022，24（6）：1139-1141.
[19] Tran DH，Wang ZV. Glucose metabolism in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. J Am Heart Assoc，2019，8（12）：e012673.
[20] Lommi J，Kupari M，Koskinen P，et al. Blood ketone bodies in congestive heart failure [J]. J Am Coll Cardiol，1996，28（3）：665-672.
[21] Murashige D，Jang C，Neinast M，et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart [J]. Science，2020，370（6514）：364-368.
[22] Aubert G，Martin OJ，Horton JL，et al. The failing heart relies on ketone bodies as a fuel [J]. Circulation，2016，133（8）：698-705.
[23] Bedi KC，Snyder NW，Brandimarto J，et al. Evidence for intramyocardial disruption of lipid metabolism and increased myocardial ketone utilization in advanced human heart failure [J]. Circulation，2016，133（8）：706-716.
[24] Schugar RC，Moll AR，Andre D，et al. Cardiomyocyte-specific deficiency of ketone body metabolism promotes accelerated pathological remodeling [J]. Mol Metab，2014，3（7）：754-769.
[25] Horton JL，Davidson MT，Kurishima C，et al. The failing heart utilizes 3-hydroxybutyrate as a metabolic stress defense [J]. JCI Insight，2019，4（4）：e124079.
[26] Uchihashi M，Hoshino A，Okawa Y，et al. Cardiac-specific bdh1 overexpression ameliorates oxidative stress and cardiac remodeling in pressure overload-induced heart failure [J]. Circ Heart Fail，2017，10（12）：e004417.
[27] Nielsen R，Moller N，Gormsen LC，et al. Cardiovascular effects of treatment with the ketone body 3-hydroxybutyrate in chronic heart failure patients [J]. Circulation，2019，139（18）：2129-2141.
[28] Monzo L，Sedlacek K，Hromanikova K，et al. Myocardial ketone body utilization in patients with heart failure：the impact of oral ketone ester [J]. Metabolism，2021，115：154452.
[29] Yurista SR，Chong CR，Badimon JJ，et al. Therapeutic potential of ketone bodies for patients with cardiovascular disease：JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol，2021，77（13）：1660-1669.
[30] Ferrannini E，Mark M，Mayoux E. CV protection in the EMPA-REG OUTCOME trial：a “Thrifty Substrate” hypothesis [J]. Diabetes Care，2016，39（7）：1108-1114.
[31] Chu Y，Zhang C，Xie M. Beta-hydroxybutyrate，friend or foe for stressed hearts [J]. Front Aging，2021，2：681513.
[32] Selvaraj S，Hu R，Vidula MK，et al. Acute echocardiographic effects of exogenous ketone administration in healthy participants [J]. J Am Soc Echocardiogr，2022，35（3）：305-311.
[33] Nakamura M，Odanovic N，Nakada Y，et al. Dietary carbohydrates restriction inhibits the development of cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Cardiovasc Res，2021，117（11）：2365-2376.
[34] Yurista SR，Matsuura TR，Sillje HHW，et al. Ketone ester treatment improves cardiac function and reduces pathologic remodeling in preclinical models of heart failure [J]. Circ Heart Fail，2021，14（1）：e007684.
[35] Al-Zaid NS，Dashti HM，Mathew TC，et al. Low carbohydrate ketogenic diet enhances cardiac tolerance to global ischaemia [J]. Acta Cardiol，2007，62（4）：381-389.
[36] Mccommis KS，Kovacs A，Weinheimer CJ，et al. Nutritional modulation of heart failure in mitochondrial pyruvate carrier-deficient mice [J]. Nat Metab，2020，2（11）：1232-1247.
[37] Brambilla A，Mannarino S，Pretese R，et al. Improvement of cardiomyopathy after high-fat diet in two siblings with glycogen storage disease type Ⅲ [J]. JIMD Rep，2014，17：91-95.
[38] Kosinski C，Jornayvaz FR. Effects of ketogenic diets on cardiovascular risk factors：evidence from animal and human studies [J]. Nutrients，2017，9（5）：517.
[39] Seidelmann SB，Claggett B，Cheng S，et al. Dietary carbohydrate intake and mortality：a prospective cohort study and meta-analysis [J]. Lancet Public Health，2018，3（9）：e419-e428.
[40] Zhang W，Guo X，Chen L，et al. Ketogenic diets and cardio-metabolic diseases [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2021，12：753039.
[41] Zou Z，Sasaguri S，Rajesh KG，et al. dl-3-hydroxybutyrate administration prevents myocardial damage after coronary occlusion in rat hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2002，283（5）：H1968-H1974.
[42] Takahara S，Soni S，Phaterpekar K，et al. Chronic exogenous ketone supplementation blunts the decline of cardiac function in the failing heart [J]. ESC Heart Fail，2021，8（6）：5606-5612.
[43] Shaw DM，Merien F，Braakhuis A，et al. The effect of 1，3-butanediol on cycling time-trial performance [J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab，2019，29（5）：466-473.
[44] Stubbs BJ，Cox PJ，Kirk T，et al. Gastrointestinal effects of exogenous ketone drinks are infrequent，mild，and vary according to ketone compound and dose [J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab，2019，29（6）：596-603.
[45] Zannad F，Ferreira JP，Pocock SJ，et al. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction：a meta-analysis of the EMPEROR-reduced and DAPA-HF trials [J]. Lancet，2020，396（10254）：819-829.
[46] Yurista SR，Sillje HHW，Oberdorf-Maass SU，et al. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（7）：862-873.
[47] Mcmurray JJV，Solomon SD，Inzucchi SE，et al. Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced

ejection fraction [J]. N Engl J Med，2019，381（21）：1995-2008.
[48] Lytvyn Y，Bjornstad P，Udell JA，et al. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition in heart failure：potential mechanisms，clinical applications，and summary of clinical trials [J]. Circulation，2017，136（17）：1643-1658.
[49] Radholm K，Figtree G，Perkovic V，et al. Canagliflozin and heart failure in type 2 diabetes mellitus：results from the canvas program [J]. Circulation，2018，138（5）：458-468.
[50] Packer M，Anker SD，Butler J，et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure [J]. N Engl J Med，2020，383（15）：1413-1424.
[51] Akasaka H，Sugimoto K，Shintani A，et al. Effects of ipragliflozin on left ventricular diastolic function in patients with type 2 diabetes and heart failure with preserved ejection fraction：the EXCEED randomized controlled multicenter study [J]. Geriatr Gerontol Int，2022，22（4）：298-304.
[52] Nakashima M，Miyoshi T，Ejiri K，et al. Effects of luseogliflozin on estimated plasma volume in patients with heart failure with preserved ejection fraction [J]. ESC Heart Fail，2022，9（1）：712-720.
[53] Tochiya M，Makino H，Tamanaha T，et al. Effect of tofogliflozin on cardiac and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes and heart diseases：a pilot study [J]. J Diabetes Investig，2020，11（2）：400-404.
[54] Cosentino F，Cannon CP，Cherney DZI，et al. Efficacy of ertugliflozin on heart failure-related events in patients with type 2 diabetes mellitus and established atherosclerotic cardiovascular disease：results of the VERTIS CV trial [J]. Circulation，2020，142（23）：2205-2215.
[55] Bhatt DL，Szarek M，Steg PG，et al. Sotagliflozin in patients with diabetes and recent worsening heart failure [J]. N Engl J Med，2021，384（2）：117-128.
[56] Ferrannini E，Baldi S，Frascerra S，et al. Shift to fatty substrate utilization in response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in subjects without diabetes and patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes，2016，65（5）：1190-1195.
[57] Wallenius K，Kroon T，Hagstedt T，et al. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin promotes systemic FFA mobilization，enhances hepatic beta-oxidation，and induces ketosis [J]. J Lipid Res，2022，63（3）：100176.
[58] Bonner C，Kerr-Conte J，Gmyr V，et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion [J]. Nat Med，2015，21（5）：512-517.
[59] Santos-Gallego CG，Requena-Ibanez JA，San AR，et al. Empagliflozin ameliorates adverse left ventricular remodeling in nondiabetic heart failure by enhancing myocardial energetics [J]. J Am Coll Cardiol，2019，73（15）：1931-1944.
[60] Kjekshus J，Apetrei E，Barrios V，et al. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure [J]. N Engl J Med，2007，357（22）：2248-2261.
[61] Tavazzi L，Maggioni AP，Marchioli R，et al. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure（the GISSI-HF trial）：a randomised，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Lancet，2008，372（9645）：1231-1239.
[62] Okuyama H，Langsjoen PH，Hamazaki T. Erratum. correction to：statins stimulate atherosclerosis and heart failure：pharmacological mechanisms [J]. Expert Rev Clin Pharmacol，2015，8（4）：503-505.
[63] Baul PB，Deepak AD，Kakkar M，et al. Effect of atorvastatin on blood ketone levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus：a single arm pilot study [J]. Diabetes Metab Syndr，2020，14（5）：1333-1337.
[64] Docherty KF，Vaduganathan M，Solomon SD，et al. Sacubitril/valsartan：neprilysin inhibition 5 years after PARADIGM-HF [J]. JACC Heart Fail，2020，8（10）：800-810.
[65] Kjeldsen SaS，Hansen LH，Esser N，et al. Neprilysin inhibition increases glucagon levels in humans and mice with potential effects on amino acid metabolism [J]. J Endocr Soc，2021，5（9）：bvab084.
[66] Li H，Ma Z，Zhai Y，et al. Trimetazidine ameliorates myocardial metabolic remodeling in isoproterenol-induced rats through regulating ketone body metabolism via activating AMPK and PPAR alpha [J]. Front Pharmacol，2020，11：1255.
[67] Ho KL，Zhang L，Wagg C，et al. Increased ketone body oxidation provides additional energy for the failing heart without improving cardiac efficiency [J]. Cardiovasc Res，2019，115（11）：1606-1616.
[68] Zhang SJ，Li ZH，Zhang YD，et al. Ketone body 3-hydroxybutyrate ameliorates atherosclerosis via receptor gpr109a-mediated calcium influx [J]. Adv Sci（Weinh），2021，8（9）：2003410.
[69] Deng Y，Xie M，Li Q，et al. Targeting mitochondria-inflammation circuit by beta-hydroxybutyrate mitigates HFpEF [J]. Circ Res，2021，128（2）：232-245.
[70] Jain SK，Kannan K，Lim G，et al. Hyperketonemia increases tumor necrosis factor-alpha secretion in cultured U937 monocytes and type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency [J]. Diabetes，2002，51（7）：2287-2293.
[71] Nagao M，Toh R，Irino Y，et al. beta-hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun，2016，475（4）：322-328.
[72] Shimazu T，Hirschey MD，Newman J，et al. Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate，an endogenous histone deacetylase inhibitor [J]. Science，2013，339（6116）：211-214.
[73] Ma D，Wang AC，Parikh I，et al. Ketogenic diet enhances neurovascular function with altered gut microbiome in young healthy mice [J]. Sci Rep，2018，8（1）：6670.

（收稿日期：2022-06-09；修回日期：2022-10-08）

匙羹藤属植物化学成分及药理活性研究进展

李航[1]，王志允[1]，陈乐园[2]，李祎亮[2*]，侯文彬[2*]（1. 天津中医药大学，天津 301617；2. 北京协和医学院 & 中国医学科学院放射医学研究所，天津市放射医学与分子核医学重点实验室，天津 300192）

摘要：匙羹藤属植物资源分布广泛，民间药用历史悠久，其全株均可入药，嫩叶亦可作茶饮。该属植物化学成分多样，包括三萜及其苷类、C_{21} 甾体皂苷类、木脂素类、酚苷类等多种结构，具有降血糖、抗肿瘤、免疫调节、抗菌、愈合伤口、保肝等生物活性。本文通过检索中国知网、PubMed 等数据库，对近十年国内外有关匙羹藤属植物化学成分及药理作用的最新研究进展进行综述，以期为该属植物资源的合理开发和利用提供参考。

关键词：匙羹藤属；化学成分；药理活性；研究进展
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0177-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.028

Research progress in the chemical constituents from *Gymnema* R. Br. plants and their pharmacological activities

LI Hang[1], WANG Zhi-yun[1], CHEN Le-yuan[2], LI Yi-liang[2*], HOU Wen-bin[2*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine*, *Institute of Radiation Medicine*, *Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences*, *Tianjin* 300192)

Abstract: The plant resources of *Gymnema* R. Br. are widely distributed and have a long history of folk medicinal use. The whole plant can be used as medicine, and the young leaves can be used as tea. The chemical constituents of this genus are diverse, including triterpenes and their glycosides, C_{21} steroidal saponins, lignans, phenolic glycosides and others. It has hypoglycemic, anti-tumor, immunomodulatory, antibacterial, wound healing, liver protection and other biological activities. In this paper, the latest research progress in the chemical constituents and pharmacological effect of *Gymnema* R. Br. at home and abroad in the past ten years was reviewed by searching databases such as CNKI and PubMed, to provide reference for the rational development and utilization of plant resources of this genus.

Key words: *Gymnema* R. Br.; chemical constituent; pharmacological activity; research progress

萝藦科（Asclepiadaceae）匙羹藤属（*Gymnema* R. Br.）植物全球约有 25 种，主要分布于亚洲热带和亚热带地区、非洲南部及大洋洲；我国有 8 种，分别为匙羹藤 *Gymnema sylvestre*、宽叶匙羹藤 *Gymnema latifolium*、云南匙羹藤 *Gymnema yunnanense*、广东匙羹藤 *Gymnema inodorum*、大叶匙羹藤 *Gymnema tingens*、海南匙羹藤 *Gymnema hainanense*、华宁藤 *Gymnema foetidum* 和会东藤 *Gymnema longiretinaculatum*，主产于广西、云南、广东、福建及海南等南部各省区[1]。匙羹藤属植物多具有解毒、消肿、止痛功效，民间主要用于治疗风湿、跌打肿痛等症。匙羹藤药用历史悠久，传统医学认为其性凉、味微苦，具祛风止痛、解毒消肿之功效，主要用于治疗风湿痹痛、咽喉肿痛、无名肿毒、虫蛇咬伤等[2]。广东匙羹藤药用部位为其根和嫩枝叶；根能消肿解毒、清热凉血，用于多发性脓肿、乳腺炎等治疗；嫩枝叶能止痛、消肿、生肌，用于治疗枪弹创伤、跌

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104012）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目（No.2021-I2M-1-042）。
作者简介：李航，男，硕士研究生，主要从事中药化学成分研究，email：lihangzy1215@163.com *通信作者：侯文彬，男，研究员，主要从事中药新药研发，email：houwenbin@irm-cams.ac.cn；李祎亮，男，研究员，主要从事药物化学研究，email：liyiliang@irm-cams.ac.cn

打肿痛[3]。大叶匙羹藤别名猪罗摆，始载于《海南植物志》，性微温、味苦，归肝肾经；具祛风通络功效，民间用于治疗风湿痛，全株亦可用于治疗肺结核及小儿麻痹症[1]。华宁藤性温、味辛涩，药用部位为其根，具舒筋活血、安胎止痛功效，可用于风湿骨痛、腰痛、骨折、寒凝冲任之胎动不安、闭经、痛经诸证[4]。会东藤止血效果良好，其种毛可作刀伤药，根煎服可治心口痛[1]。宽叶匙羹藤叶片具有抑制甜味的功能[5]。云南匙羹藤民间多用于治疗风湿性关节炎[6]。现代药理研究表明该属植物生物活性多样，如降血糖、抗肿瘤、抗疟、免疫调节等[7-8]，开发潜力巨大。目前国内外学者对该属植物的研究主要集中在匙羹藤、宽叶匙羹藤、广东匙羹藤和大叶匙羹藤，而其他植物的研究较少。笔者检索国内外文献发现，田晋等[9]对 2013 年以前有关该属植物的化学成分及药理活性进行了系统总结。而此后针对该属植物的化学成分、药理活性、作用机制等方面的研究又有许多新的进展。基于此，本文对近十年匙羹藤属植物化学成分及药理活性的最新研究进展进行综述，以期为该属植物资源的合理开发和利用提供参考。

1　化学成分

2013 年以来，国内外学者从该属植物中分离并鉴定了 150 个化合物，包括三萜及其苷类、C_{21} 甾体皂苷类、木脂素类、酚苷类和其他类化合物。目前该属植物中匙羹藤和大叶匙羹藤化学成分研究较多，宽叶匙羹藤、广东匙羹藤和云南匙羹藤的化学成分亦有研究，而其他植物未见有化学成分报道。本文所涉及化合物的取代基结构如图 1。

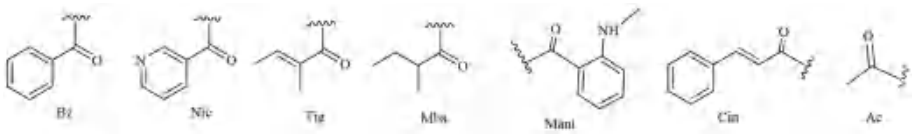


图 1　本文所涉及化合物中取代基结构

Fig 1　Substituent structure in the compounds involved in this paper

1.1　三萜及其苷类

三萜类化合物在匙羹藤属植物中含量最为丰富，从该属植物中分离得到的三萜均为五环三萜，结构类型大多为齐墩果烷型，少量羽扇豆烷型。大部分齐墩果烷型五环三萜以与糖成苷的形式存在，是该属植物降血糖的主要活性成分。化合物信息见表 1 和图 2。

1.1.1　齐墩果烷型　齐墩果烷型三萜及其苷类化合物的结构特点为：① 苷元 C_3 位上通常有 β-OH，C_{12}、C_{13} 位和 C_{15}、C_{16} 位通常有双键；② 糖链通常与苷元 C_3 位的 -OH 相连，糖与糖之间的连接通常发生在 C_1 和 C_3 位、C_1 和 C_6 位；③ 糖的类型主要有葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸和木糖等；④ 苷元上取代基种类多，如乙酰基、苯甲酰基等。

1.1.2　羽扇豆烷型　羽扇豆烷型与齐墩果烷型的区别在于其 E 环由 C-19 和 C-21 组成五元环。目前仅从匙羹藤中分离得到 3 个羽扇豆烷型五环三萜，为 3β，16β，23，28-tetrahydroxylup-20（**29**）-en（**63**）、3β，16β，29-trihydroxylup-20（**30**）-ene（**64**）和（3β，16β）-lupane-3，16，20，23，28-pentol（**71**），其中化合物 **63**、**64** 具有 $\Delta^{20(29)}$ 双键。

1.2　C_{21} 甾体皂苷类

C_{21} 甾体皂苷类成分是匙羹藤属植物中又一主要活性成分，其结构均以孕甾烷衍生物为基本骨架，C_{10}、C_{13} 位多有角甲基取代，双键多在 C_5、C_6 位或 C_6、C_7 位，个别化合物 C_{20} 位有羰基取代，所有糖链都与 C_3 位上 -OH 相连，最多可达 5 个糖，多为 2，6- 二去氧糖，其连接顺序多以 1 → 4 直链相连。化合物信息见表 2 和图 3。

1.3　酚苷类

酚苷类化合物是苷元分子上的酚羟基与糖端基碳上的半缩醛羟基脱水形成的苷，广泛存在于自然界中。研究人员从该属植物中共分离得到 9 个酚苷类化合物，包括 6 个新的酚二苷化合物（**116** ～ **121**）。化合物具体信息见表 3 和图 4。

1.4　木脂素类

该属植物中木脂素类化合物较少，目前仅从大叶匙羹藤中共分离得到 8 个木脂素类化合物，包括 2 个新的苯骈呋喃型木脂素 gymnefuranol A（**125**）、gymnefuranol B（**126**）和另外 6 个单环氧木脂素。化合物具体信息见表 4 和图 5。

1.5　其他类

除上述成分外，匙羹藤属植物中还含有植物甾醇、脂肪酸、黄酮等类型的化合物。化合物信息见表 5。

2　药理活性

现代研究表明，匙羹藤属植物粗提物或单体成分具有抗糖尿病、抗肿瘤、抗辐射、抗疟、抗菌、免疫调节和保肝等药理活性。该属植物中匙羹藤和广东匙羹藤药理作用研究较多，对大叶匙

表 1　匙羹藤属植物三萜及其苷类化合物

Tab 1　Triterpenes and their glycosides in *Gymnema* R. Br. plants

编号	化合物名称	来源	文献
1	23-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-21-*O*-tigloyl-28-*O*-benzoyl-16，22-dimethoxygymnemagenin	*Gymnema sylvestre*	[10]
2	3-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranosyl-16-*O*-acetyl-21-*O*-hydrocoumaroyl-16*β*，21*β*，23，29-tetrahydroxyoleanolic acid-28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl ester	*Gymnema sylvestre*	[10]
3	3-*β*-*O*-*D*-glucopyranosyl-21-*O*-hydrocinnamoyl-16*β*，21*β*，23，29-tetrahydroxyoleanolic acid-28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl ester	*Gymnema sylvestre*	[10]
4	3-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranosyl-21-*O*-hydrocinnamoyl-7*β*-hydroxygymnemagenin	*Gymnema sylvestre*	[10]
5	3-*β*-*O*-*D*-glucopyranosyl-3*β*，16*β*，23，28-tetrahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[10]
6	3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→6）-*O*-*β*-*D*-glucopyrasyl-erythrodiol-28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→6）-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
7	3-*O*-*β*-*D*-xylopyranosyl-（1→6）-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→6）-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-erythrodiol-28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→6）-*β*-*D*-glucopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
8	28-*O*-benzoylchichipegenin-3-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
9	28-*O*-（3-nicotinoyloxy）-chichipegenin-3-*O*-*β*-*D*-glucuropyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
10	21-*O*-tigloylsitaskisogenin-3-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
11	maniladiol-3-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[11]
12	3*α*，21*β*，22*α*-trihydroxy-21，22-bis（2-methyl-1-oxobutoxy）-olean-15-en-23-methyl-carboxylate-3yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl（1→3）-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[12]
13	3*α*，7*β*，21*β*，22*α*-tetrahydroxy-21，22-bis（2-methyl-1-oxobutoxy）-olean-15-en-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl（1→3）-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[12]
14	3*α*，7*β*，21*β*，22*α*-tetrahydroxy-21-（2-methyl-1-oxobutoxy）-22-[（2-methyl-1-oxobutenyl）oxy]-olean-15-en-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl（1→3）-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[12]
15	3*β*，7*β*，21*β*，22*α*，23，28-hexahydroxy-21-（2-methyl-1-oxobutoxy）-22-[（2-methyl-1-oxobutenyl）oxy]-olean-15-en-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl（1→3）-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[12]
16	3*α*，7*β*，21*β*，22*α*-tetrahydroxy-olean-15-en-23，29-dioicacid-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→3）-*O*-*β*-*D*-glucuronopyranoside	*Gymnema sylvestre*	[12]
17～23	gymlatinoside GL1～GL7	*Gymnema latifolium*	[13]
24	匙羹藤酸 IX（gymnemic acid IX）	*Gymnema latifolium*	[13]
25	匙羹藤新苷元（gymnemagenin）	*Gymnema latifolium*	[13]
26	（3*β*，16*β*，22*α*）-22-（*N*-methylanthraniloxy）-16，28-dihydroxy-olean-12-en-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
27	（3*β*，16*β*，22*α*）-22-（*N*-methylanthraniloxy）-16，23，28，29-tetrahydroxyolean-12-en-3-yl-*O*-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
28	（3*β*，16*β*，22*α*）-22-benzoyloxy-16，23，28-trihydroxy-olean-12-en-3-yl-*O*-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
29	（3*β*，16*β*）-16，23，28-trihydroxy-olean-12-en-3-yl-2-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
30	（3*β*，16*β*）-16-hydroxy-olean-12-en-3-yl-2-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
31	（3*β*，16*β*）-16，28，29-trihydroxy-olean-12-en-3-yl-2-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
32	（3*β*，16*β*）-16，29-dihydroxy-olean-12-en-3-yl-2-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
33	（3*β*，16*β*，22*α*）-22-（*N*-methylanthraniloxy）-16，23，28-trihydroxy-olean-12-en-3-yl-*O*-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
34	（3*β*，16*β*，22*α*）-22-（*N*-methylanthraniloxy）-16，23，28-trihydroxy-olean-12-en-3-yl-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-*β*-*D*-glucopyranosiduronic acid	*Gymnema inodorum*	[14]
35～40	匙羹藤酸Ⅰ～ⅩⅤ（gymnemic acid Ⅰ～ⅩⅤ）	*Gymnema sylvestre*	[15]
41	匙羹藤酸ⅩⅩ（gymnemic acid ⅩⅩ）	*Gymnema sylvestre*	[15]
42	匙羹藤酸ⅪⅩ（gymnemic acid ⅪⅩ）	*Gymnema sylvestre*	[15]
43	匙羹藤酸ⅩⅪ（gymnemic acid ⅩⅪ）	*Gymnema sylvestre*	[15]
44	3*β*，16*β*，28-trihydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
45	3*β*，16*β*，21*β*，28-tetrahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
46	3*β*，16*β*，22*α*，28-tetrahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
47	3*β*，23，28-trihydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
48	3*β*，16*β*，21*β*，23-tetrahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
49	3*β*，16*β*，21*β*，23，28-pentahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
50	3*β*，16*β*，21*α*，23，28-pentahydroxy-olean-12-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]

续表 1

编号	化合物名称	来源	文献
51	3*β*，16*β*，23，28-tetrahydroxy-olean-13（18）-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
52	16*β*，23，28-trihydroxy-olean-12-en-3-one	*Gymnema sylvestre*	[16]
53	16*β*，21*β*，23，28-tetrahydroxy-olean-12-en-3-one	*Gymnema sylvestre*	[16]
54	16*β*，21*β*，22*α*，23，28-pentahydroxy-olean-12-en-3-one	*Gymnema sylvestre*	[16]
55	3*β*，16*β*，23，28-tetrahydroxylup-20（29）-en	*Gymnema sylvestre*	[16]
56	3*β*，16*β*，29-trihydroxylup-20（30）-ene	*Gymnema sylvestre*	[16]
57	（3*β*，16*β*）-olean-12-ene-3，16，23，28-tetrol	*Gymnema sylvestre*	[17]
58	（3*β*，16*β*，21*β*，22*α*）-olean-12-ene-3，16，21，22，23，28-hexol	*Gymnema sylvestre*	[17]
59	（3*β*，16*β*，21*β*，22*α*）-3，16，22，23，28-pentahydroxy-olean-12-en-21-yl（2*S*）-2-methylbutanoate	*Gymnema sylvestre*	[17]
60	（3*β*，16*β*，21*β*，22*α*）-28-（acetyloxy）-3，16，22，23-tetrahydroxy-olean-12-en-21-yl-（2*S*）-2-methylbutanoate	*Gymnema sylvestre*	[17]
61	（3*β*，16*β*，21*β*，22*α*）-3，16，22，23，28-pentakis-（acetyloxy）-olean-12-en-21-yl（2*S*）-2-methylbutanoate	*Gymnema sylvestre*	[17]
62	（3*β*，16*β*，21*β*，22*α*）-3，16，22，23，28-pentahydroxyolean-12-en-21-yl（2*E*）-2-methylbut-2-enoate	*Gymnema sylvestre*	[17]
63	（3*β*，16*β*）-lupane-3，16，20，23，28-pentol	*Gymnema sylvestre*	[17]
64	3*β*-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl（1 → 6）-*β*-*D*-glucopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl ester	*Gymnema sylvestre*	[19]
65	3*β*-*O*-*β*-*D*-xylopyranosyl-（1 → 6）-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1 → 6）-*β*-*D*-glucopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl ester	*Gymnema sylvestre*	[19]
66	gymnemoside W1	*Gymnema sylvestre*	[19]
67	alternoside XIX	*Gymnema sylvestre*	[19]
68	3*β*-*O*-（*β*-*D*-glucopyranosyl-（1→3）-*α*-*L*-rhamnopyranosyl-（1→2）-*α*-*L*-arabinopyranosyl）-hederagenin-28-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl ester	*Gymnema sylvestre*	[32]
69	灰毡毛忍冬皂苷甲（macranthoidin A）	*Gymnema sylvestre*	[32]
70	灰毡毛忍冬皂苷乙（macranthoidin B）	*Gymnema sylvestre*	[32]
71	lonimacranthoide Ⅲ	*Gymnema sylvestre*	[32]

表 2 匙羹藤属植物 C_{21} 甾体皂苷类化合物

Tab 2 C_{21} steroidal saponins in *Gymnema* R. Br. plants

编号	化合物名称	来源	文献
72 ～ 79	gymnemogriffithoside A ～ H	*Gymnema griffithii*	[18]
80 ～ 82	gymsylvestroside A ～ C	*Gymnema sylvestre*	[19]
83	gymsylvestroside E	*Gymnema sylvestre*	[19]
84	gymsylvestroside D	*Gymnema sylvestre*	[19]
85 ～ 86	gyminoside A ～ B	*Gymnema inodorum*	[20]
87 ～ 88	tinctoroside B ～ C	*Gymnema inodorum*	[20]
89	gymnepregoside F	*Gymnema inodorum*	[20]
90 ～ 94	gymsyloside A ～ E	*Gymnema sylvestre*	[21]
95 ～ 98	gymlatifoside A ～ D	*Gymnema latifolium*	[22]
99	verticilloside J	*Gymnema latifolium*	[22]
100 ～ 101	gymnepregoside R ～ S	*Gymnema sylvestre*	[23]
102	12-*O*-（*E*）-cinnamoylgymnepregoside F	*Gymnema sylvestre*	[23]
103	stephanoside I	*Gymnema sylvestre*	[23]
104	gymnepregoside T	*Gymnema sylvestre*	[23]
105	12*β*-acetyloxy-3*β*，8*β*，14*β*，17*β*-tetrahydroxypregn-5-en-20-one 3-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-（1 → 4）-6-deoxy-3-*O*-methyl-*β*-*D*-allopyranosyl-（1 → 4）-*β*-*D*-oleandropyranosyl-（1 → 4）-*β*-*D*-cymaropyranosyl-（1 → 4）-*β*-*D*-cymaropyranoside	*Gymnema sylvestre*	[23]
106	gymnepregoside H	*Gymnema sylvestre*	[24]
107	gymnepregoside G	*Gymnema sylvestre*	[24]
108	deacetylkidjoladinin	*Gymnema sylvestre*	[24]
109	gymnepregoside I	*Gymnema sylvestre*	[24]
110 ～ 113	sylvepregoside A ～ D	*Gymnema sylvestre*	[24]
114 ～ 115	gymsyloside F ～ G	*Gymnema sylvestre*	[25]

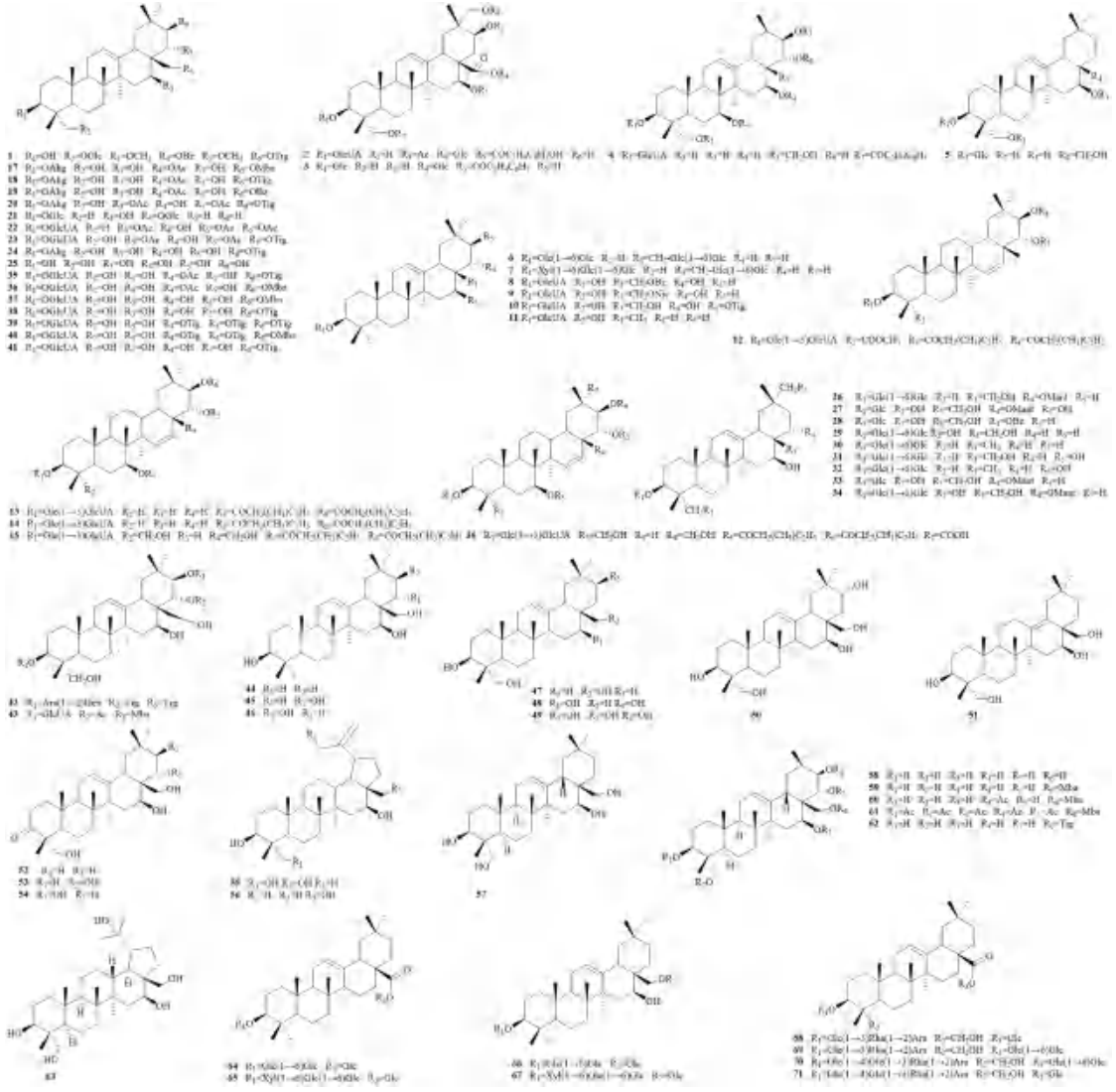


图 2　匙羹藤属植物中三萜及其苷类化合物结构

Fig 2　Structures of triterpenes and their glycosides in *Gymnema* R. Br. plants

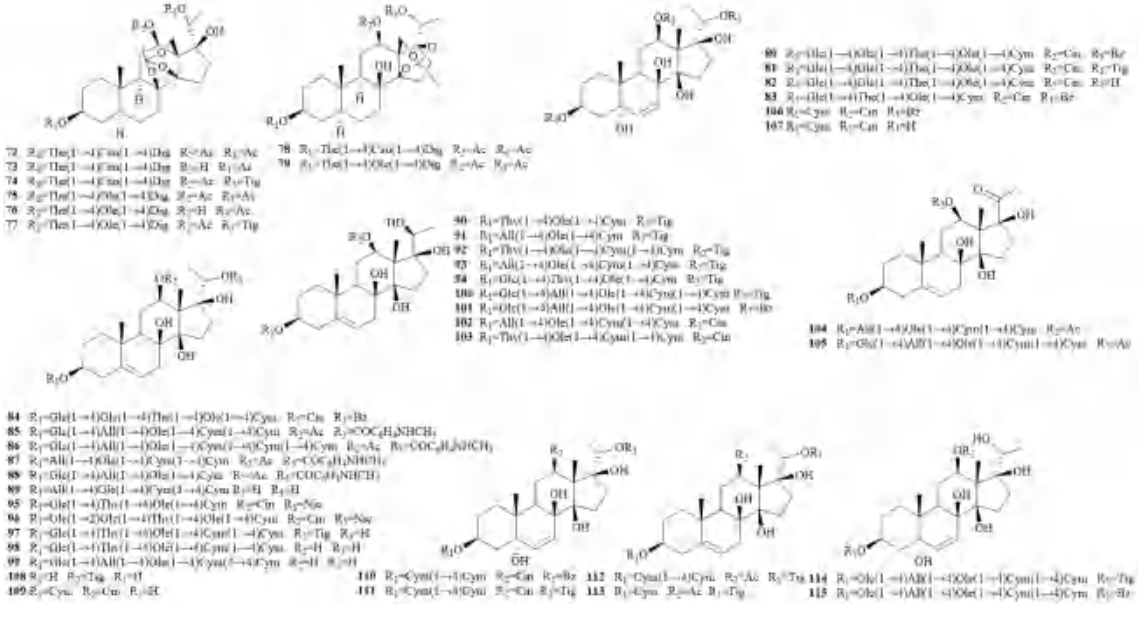


图 3　匙羹藤属植物中 C_{21} 甾体皂苷类化合物结构

Fig 3　Structures of C_{21} steroidal saponins in *Gymnema* R. Br. plants

表 3　匙羹藤属植物酚苷类化合物

Tab 3　Phenolic glycosides in *Gymnema* R. Br. plants

编号	化合物名称	来源	文献
116 ～ **121**	gymnetinoside A ～ F	*Gymnema tingens*	[26]
122	sequinoside K	*Gymnema tingens*	[26]
123	khaephuoside B	*Gymnema tingens*	[26]
124	白菜素内酯 A（albibrissinoside A）	*Gymnema tingens*	[26]

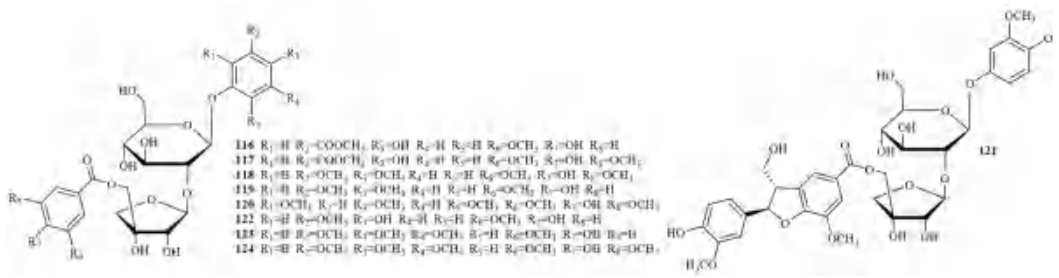


图 4　匙羹藤属植物中酚苷类化合物的结构

Fig 4　Structures of phenolic glycosides in *Gymnema* R. Br. plants

表 4　匙羹藤属植物中的木脂素类化合物

Tab 4　Lignans in *Gymnema* R. Br. plants

编号	化合物名称	来源	文献
125	gymnefuranol A	*Gymnema tingens*	[27]
126	gymnefuranol B	*Gymnema tingens*	[27]
127	（7'*S*，8*S*，8'*R*）-4，4'-dihydroxy-3，3'，5，5'-tetramethoxy-7'，9-epoxylignan-9'-ol-7-one	*Gymnema tingens*	[27]
128	海藻糖苷 D（alangilignoside D）	*Gymnema tingens*	[27]
129	（－）-落叶松树脂醇 9-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷 [（－）-lariciresinol 9-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside]	*Gymnema tingens*	[27]
130	（－）-落叶松树脂醇 [（－）-lariciresinol]	*Gymnema tingens*	[27]
131	5'-甲氧基落叶松脂素（5'-methoxylariciresinol）	*Gymnema tingens*	[27]
132	5，5'-二甲氧基落叶松树脂醇（5，5'-dimethoxylariciresinol）	*Gymnema tingens*	[27]

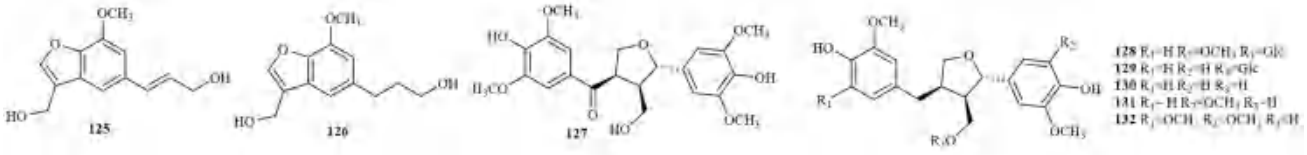


图 5　匙羹藤属植物中木脂素类化合物的结构

Fig 5　Structures of lignans in *Gymnema* R. Br. plants

研究表明匙羹藤属植物提取物或单体化合物具有显著降糖作用。*α*-葡萄糖苷酶是一种位于小肠上皮壁上的肠道酶，对其进行抑制会延迟碳水化合物的消化和吸收，从而抑制血糖水平升高。Alkefai 等 [10] 测试了从匙羹藤中得到的化合物 **1** ～ **4** 对 *α*-葡萄糖苷酶的抑制活性，结果表明所有化合物均显示出与阳性药阿卡波糖（IC_{50} 值为 265 μg • mL^{-1}）相当的 *α*-葡萄糖苷酶剂量依赖性抑制作用，其中化合物 **2**（IC_{50} 值为 145 μg • mL^{-1}）有最大抑制活性；随后对分离得到的化合物 **12** ～ **16** 在 31.25 ～ 500 μg • mL^{-1} 内筛选 *α*-葡萄糖苷酶抑制活性，结果显示所有化合物都以剂量依赖性的方式抑制酶活性，其中化合物 **15**（IC_{50} 值为 57 μg • mL^{-1}）有最大抑制活性 [12]。Trang 等 [20] 对从广东匙羹藤中获得的化合物 **85** ～ **89** 进行了 *α*-葡萄糖苷酶抑制活性测试，化合物 **89** 在 200 μmol • L^{-1} 浓度下表现出最强酶抑制活性，抑制率为 63.7%；化合物 **85** ～ **88** 表现出中等酶抑制活性，抑制率为 40.0% ～ 52.1%。Srinuanchai 等 [35] 发现广东匙羹藤叶 50% 乙醇提取物能显著降低 *α*-葡萄糖苷酶活性，但活性成分需进一步研究。

蛋白酪氨酸磷酸酶（PTPs）由于其在调节靶蛋白的酪氨酸磷酸化中的作用而被认为是治疗 2 型糖尿病的药物靶标，蛋白酪氨酸磷酸酶 1B（PTP1B）是 PTPs 家族的成员，已被证明是通过调节胰岛素和瘦素信号通路治疗 2 型糖尿病的有潜力的治疗靶点。Pham 等 [13] 评价了从宽叶匙羹藤中分离得到的化合物 **17** ～ **25** 对 PTP 1B 的抑制活性，结果表明化合物 **18**、**19** 有较优的抑制活

2.1　抗糖尿病

糖尿病是一种高发病率的代谢性疾病，寻找安全有效的治疗药物为研究热点 [34]。现代药理

表 5 匙羹藤属植物中的其他类化合物

Tab 5 Other compounds in *Gymnema* R. Br. plants

编号	化合物名称	来源	文献
133	十八烷酸	*Gymnema tingens*	[28]
134	油酸	*Gymnema tingens*	[28]
135	*β*-谷甾醇	*Gymnema tingens*	[28]
136	豆甾醇	*Gymnema tingens*	[28]
137	胡萝卜苷	*Gymnema tingens*	[28]
138	植醇	*Gymnema sylvestre*	[29]
139	(*Z*)-9-二十三烯	*Gymnema sylvestre*	[29]
140	二十一烯	*Gymnema sylvestre*	[29]
141	(*E*)-3-二十碳烯	*Gymnema sylvestre*	[29]
142	(*Z*)-2-甲基-2-二十二烷	*Gymnema sylvestre*	[29]
143	正十六烷酸	*Gymnema sylvestre*	[30]
144	十八烷	*Gymnema sylvestre*	[30]
145	硬脂酸	*Gymnema tingens*	[31]
146	棕榈酸	*Gymnema tingens*	[31]
147	油酸乙酯	*Gymnema tingens*	[31]
148	亚油酸乙酯	*Gymnema tingens*	[31]
149	朝霍定 C	*Gymnema sylvestre*	[32]
150	正二十九烷	*Gymnema sylvestre*	[33]

性，IC_{50} 分别为 28.7 μmol•L^{-1} 和 19.8 μmol•L^{-1}。

α-淀粉酶在小肠消化道降解葡萄糖过程中发挥关键作用，抑制其活性能延缓淀粉水解，从而控制血糖水平升高。Kiem 等[21]测试了来自匙羹藤中的化合物 **90** ～ **94** 的 *α*-淀粉酶抑制活性，化合物 **91** ～ **93** 抑制活性显著，IC_{50} 值范围为 113.0 ～ 176.2 μmol • L^{-1}。Yen 等[25]测试在 200 μmol • L^{-1} 浓度下从匙羹藤中得到的化合物 **114** 和 **115** 对 *α*-淀粉酶的抑制活性，结果显示有中等抑制活性，抑制率分别为 27.8%、34.5%。

Li 等[36]对匙羹藤酸改善糖尿病大鼠高血糖的作用机制进行了探究，结果表明其降血糖机制可能与促进胰岛素信号转导，激活 PI3K/Akt 和 AMPK 介导的信号通路有关。Majeed 等[37]发现匙羹藤复方对糖尿病大鼠模型的降糖作用十分显著，但其作用机制仍需进一步研究。

此外，大量研究发现匙羹藤能显著改善糖尿病并发症。Sandech 等[38]研究匙羹藤皂苷对糖尿病大鼠血管保护作用，结果表明给药后，糖尿病大鼠血管内皮生长因子和血管生成素 Ang-1 表达减少，提示其能显著改善糖尿病引起的脑血管损伤。El Shafey 等[39]研究匙羹藤叶提取物对糖尿病大鼠一些生理参数的影响，结果表明其对糖尿病引起的高脂血症、氧化应激等并发症改善显著。

2.2 辐射防护作用

当前电离辐射严重危害人类的身体健康，化学药物虽能起到一定防护作用，但对人体的副作用也十分明显[40]。天然来源的中草药以其作用温和、毒性低等特点引起人们广泛关注。研究人员发现匙羹藤提取物及其活性单体化合物具有显著抗辐射作用。Sinha 等[41]采用不同剂量的伽马射线（^{60}Co）照射淡水鱼模型 *Pangasius sutchi*，照射前给予肌内注射匙羹藤叶提取物（GS，25 mg • kg^{-1}）、匙羹藤新苷元（GG，0.3 mg • kg^{-1}）和氨磷汀（83.3 mg • kg^{-1}），接着通过测定不同时间点血液中的微核数和红细胞异常率来评价它们的防护效果。结果表明 GS 的辐射防护效果与阳性药氨磷汀相似且其优于单体化合物 GG。基于此，该课题组又深入研究了 GS 发挥辐射保护的作用机制，发现其能通过抑制电离辐射产生的活性氧（ROS）毒性攻击发挥潜在的防护作用[42]。

2.3 抗疟活性

Ounjaijean 等[43]对广东匙羹藤叶水提物的抗疟活性进行了研究，结果发现提取物给药浓度与疟原虫抑制率呈剂量依赖关系。当水提物给药剂量为 100 mg • kg^{-1} 时，对疟原虫抑制率最高。急性毒性试验未观察到疟原虫感染小鼠有任何中毒迹象发生，表明其安全性良好。Ounjaijean 等[44]研究证明广东匙羹藤叶水提物能显著改善疟原虫感染小鼠的低血糖、血脂异常和肝肾损伤等症状，且剂量在 500 mg • kg^{-1} 保护作用最强。Boonyapranai 等[45]也发现当水提物剂量为 500 mg • kg^{-1} 时能显著恢复疟疾小鼠的血液异常。上述研究为广东匙羹藤在民间治疗疟疾的合理性提供了有力证据。

2.4 免疫调节作用

Singh 等[46]研究发现当匙羹藤酸质量浓度为 20 μg • mL^{-1} 时，在体外能够显著刺激大鼠脾淋巴细胞的增殖。Ahirwal 等[47]研究了匙羹藤叶甲醇提取物对瑞士白化病小鼠的体内免疫调节作用，结果表明其能够发挥免疫调节活性。

2.5 抗菌活性

Ghous 等[48]对匙羹藤叶不同溶剂提取物进行抗菌活性研究，结果表明其甲醇和水提取物对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用最强。Arora 等[49]发现匙羹藤叶提取物对各种病原菌展现广谱活性。此外，Chodisetti 等[50]研究发现匙羹藤地上部分的氯仿提取物具有较强的抑菌活性，最低抑菌浓度和最小杀菌浓度分别在 0.04 ～ 1.28 mg • mL^{-1} 和 0.08 ～ 2.56 mg • mL^{-1}。

2.6 抗肿瘤活性

癌症是目前威胁人类健康的最大杀手之一，目前的放化疗虽有一定效果但副作用太大，因此寻找高效低毒的药物成为研究热点[51]。研究发现匙羹藤具有很好的抗肿瘤活性，对多种肿瘤具有杀伤作用。Chakraborty 等[52]研究发现匙羹藤叶乙醇提取物对人黑色素瘤 A375 细胞具有显著的

细胞毒活性，其作用机制可能为通过激活 caspase 3 和 PARP 途径诱导肿瘤细胞死亡。Pon 等 [53] 用二羟基匙羹藤酸三乙酸酯处理前列腺癌 PC-3 细胞，结果发现经处理后肿瘤细胞周期停滞于 G_2/M 期且有大量细胞凋亡，其作用机制可能与促凋亡蛋白 Bax、Bad 的水平升高及抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 和 Mcl-1 的水平降低有关。Ramkumar 等 [54] 研究发现匙羹藤通过改变线粒体膜电位、细胞周期停滞诱导 HL-60 细胞凋亡。研究表明匙羹藤乙醇提取物能抑制 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate（TPA）诱导的小鼠皮肤癌变 [55]。此外，Arunachalam 等 [56] 研究发现纳米材料包裹的匙羹藤药物对 HT29 人腺癌细胞具有较强体外抗肿瘤活性。Ahamed 等 [57] 用匙羹藤叶提取物合成 CuO 纳米粒子并测试其抗肿瘤活性，结果表明其能显著抑制 MCF-7 肿瘤细胞增殖。Srisurichan 等 [18] 对从匙羹藤果实甲醇提取物中分离得到的化合物 **72** ～ **79** 进行体外抗肿瘤活性测试，结果显示化合物 **74**、**77** 较其他化合物具有更强的细胞毒性。上述研究为匙羹藤属植物在临床抗肿瘤应用中提供了参考。

2.7 愈合伤口作用

研究发现通过使用现代材料搭载匙羹藤药物的方式敷于患者伤口处，能加速伤口愈合。Daisy 等 [58] 将姜黄素和匙羹藤药物加入氧化石墨烯 - 聚羟基丁酸酯 - 海藻酸钠复合材料中，通过对正常细胞和糖尿病成纤维细胞的体外研究表明，搭载药物的氧化石墨烯 - 聚羟基丁酸酯 - 海藻酸钠复合材料能增加受伤细胞的细胞活力且不产生细胞毒性，提示其可作为创面敷料应用于临床。Subramanian 等 [59] 将匙羹藤叶提取物加入聚己内酯（PCL）纳米纤维中，经 γ 射线灭菌后作为伤口敷料应用，结果表明其对伤口病原体具有抗菌活性且促进了成纤维细胞的增殖。上述研究为伤口愈合治疗提供了新的思路。

2.8 保肝作用

肝脏是人体最重要的代谢器官，感染、药物、酒精等因素均能导致肝脏细胞的损伤，从而影响肝脏正常的生理功能 [60]。研究发现从大叶匙羹藤中分离得到的木脂素、酚苷类化学成分具有保肝活性。Tian 等 [26] 采用 *D*- 半乳糖胺诱导 HL-7702 细胞损伤模型评价从大叶匙羹藤中分离得到的酚苷类化合物的保肝活性，结果表明化合物 **116**、**120**、**121** 的抑制活性（IC_{50} 值分别为 9.1、11.1 和 9.1 μmol • L^{-1}）与阳性药双环醇（IC_{50} 值为 11.6 μmol • L^{-1}）相当或更优；随后又对从该植物中分离得到的木脂素类成分的保肝活性进行研究，建立与上述相同的细胞损伤模型评价，结果表明化合物 **130** 具有显著的保肝活性，经其处理的细胞存活率高达 97.7%[27]。

2.9 其他作用

除上述药理活性外，匙羹藤属植物提取物还具有抗肥胖、杀虫、抗铀损伤、抗炎等作用 [61-64]。研究表明，匙羹藤水提物可通过提高多种抗氧化酶活性降低高脂饮食诱导肥胖大鼠的氧化应激水平，从而发挥减肥作用 [61]。钟婷婷等 [62] 采用浸渍法研究匙羹藤甲醇粗提物对莴苣指管蚜虫的触杀活性，结果表明其在 10 mg • mL^{-1} 质量浓度下有较好的杀虫活性。Joseph 等 [63] 发现匙羹藤水提物可以以剂量依赖的方式减轻金属铀对人外周血单核细胞的 DNA 损伤，表明其可作为抗铀损伤的保护剂，但其活性成分尚不明确，有待进一步研究。此外，Dunkhunthod 等 [64] 建立了以脂多糖（LPS）加 γ 干扰素（IFN-γ）诱导的 RAW264.7 细胞模型评价广东匙羹藤提取物的抗炎活性，结果表明其通过抑制一氧化氮、促炎细胞因子白细胞介素 6（IL-6）的产生，以及下调细胞内环氧化酶 -2（COX-2）和 IL-6 mRNA 的表达发挥抗炎活性。采用 GC-MS 对提取物主成分进行分析，发现挥发性成分居多，提示其抗炎活性的物质基础可能为挥发性成分。

3 结语

匙羹藤属植物分布广泛、资源丰富，民间药用历史悠久。迄今已从该属植物中分离得到多种化学成分，涵盖三萜及其苷类、C_{21} 甾体皂苷类、酚苷类和木脂素类等，且发现其具有降血糖、抗肿瘤、抗菌、免疫调节和保肝等多种生物活性，表明该属植物具有广阔的开发应用前景。

综上，虽然针对该属植物的研究已经取得了长足进展，但仍然存在一些不足亟待解决：① 目前针对匙羹藤、大叶匙羹藤、宽叶匙羹藤和广东匙羹藤的化学成分研究较多，关于该属其他植物的化学成分研究较少；② 针对匙羹藤属药理活性的研究多集中在总提取物或者萃取物层面上，分离得到的单体化合物活性评价报道较少，且相关作用机制研究尚无深入、详实的报道；③ 中药质量的优劣对于是否发挥药效至关重要，目前尚无对该属植物质量控制的标准，使得临床用药的安全性难以保证。因此，今后应该加强该属植物资源化学成分的深入系统研究，采用网络药理学及多组学技术对单体化合物发挥药理活性的机制作深入探索，结合质量标志物原则制定药材的质量控制标准，为临床用药的有效性提供保障。

参考文献

[1] 中国科学院植物志编辑委员会 . 中国植物志 . 第 63 卷 [M]. 北京：科学出版社，1977.

[2] 项佳媚，魏建和，肖伟，等 . 匙羹藤的应用及研究进展 [J]. 现代中药研究与实践，2018，32（3）：77-81.

[3] 广东中药志委员会 . 广东中药志（第二卷）[M]. 广州：广东科技出版社，1996：20.

[4] 王国强 .《全国中草药汇编》[M]. 北京：人民卫生出版社，2014.

[5] 刘光裕，朱仁斌，王莹，等 . 神奇植物在哪里？就在西双版纳的热带雨林 [J]. 环球人文地理，2020，10：72-79.

[6] 陈纪军 . 云南匙羹藤的化学成分 [J]. 云南植物研究，1989，11（2）：1-3.

[7] 林龙，陈艳伟，王丽岩，等 . 匙羹藤药理作用研究进展 [J]. 中成药，2013，35（8）：1748-1751.

[8] 卢汝梅 . 匙羹藤茎化学成分和降血糖作用的研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2005.

[9] 田晋 . 大叶匙羹藤的化学成分研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2013.

[10] Alkefai NH，Ahamad J，Amin S，et al. Arylated gymnemic acids from *Gymnema sylvestre* R. Br. as potential *α*-glucosidase inhibitors [J]. Phytochem Lett，2018，25：196-202.

[11] Pham HT，Kim HW，Han S，et al. Development of a building block strategy to target the classification，identification，and metabolite profiling of oleanane triterpenoids in *Gymnema sylvestre* using UHPLC-qTOF/MS [J]. J Nat Prod，2019，82（12）：3249-3266.

[12] Alkefai NH，Amin S，Sharma M，et al. New olean-15-ene type gymnemic acids from *Gymnema sylvestre*（Retz.）R. Br. and their antihyperglycemic activity through *α*-glucosidase inhibition [J]. Phytochem Lett，2019，32：83-89.

[13] Pham HT，Ryu B，Cho HM，et al. Oleanane hemiacetal glycosides from Gymnema latifolium and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B [J]. Phytochemistry，2020，170：112181.

[14] An JP，Park EJ，Ryu B，et al. Oleanane triterpenoids from the leaves of *Gymnema inodorum* and their insulin mimetic activities [J]. J Nat Prod，2020，83（4）：1265-1274.

[15] Pickrahn S，Dawid C，Babinger T，et al. Sensory-guided multidimensional exploration of antisweet principles from *Gymnema sylvestre*（Retz）Schult [J]. J Agr Food Chem，2021，69（19）：5510-5527.

[16] Zarrelli A，DellaGreca M，Ladhari A，et al. New triterpenes from *Gymnema sylvestre* [J]. Helv Chim Acta，2013，96（6）：1036-1045.

[17] Zarrelli A，Ladhari A，Haouala R，et al. New acylated oleanane and lupane triterpenes from *Gymnema sylvestre* [J]. Helv Chim Acta，2013，96（12）：2200-2206.

[18] Srisurichan S，Puthong S，Pornpakakul S. Pregnane-type steroidal glycosides from *Gymnema griffithii* Craib [J]. Phytochemistry，2014，106：197-206.

[19] Xu R，Yang Y，Zhang Y，et al. New pregnane glycosides from *Gymnema sylvestre* [J]. Molecules，2015，20（2）：3050-3066.

[20] Trang DT，Yen DT，Cuong NT，et al. Pregnane glycosides from *Gymnema inodorum* and their *α*-glucosidase inhibitory activity [J]. Nat Prod Res，2021，35（13）：2157-2163.

[21] Kiem PV，Yen DT，Hung NV，et al. Five new pregnane glycosides from gymnema sylvestre and their *α*-glucosidase and *α*-amylase inhibitory activities [J]. Molecules，2020，25（11）：2525.

[22] Yen DT，Trang DT，Tai BH，et al. Four new pregnane glycosides from Gymnema latifolium and their *α*-glucosidase and *α*-amylase inhibitory activities [J]. Nat Prod Res，2021，35（22）：4460-4467.

[23] Van Kiem P，Yen DT，Van Hung N，et al. The anti-glycative potentials of pregnane glycosides from *Gymnema sylvestre* [J]. Phytochem Lett，2020，38：19-24.

[24] Liu M，Zhou T，Zhang J，et al. Identification of C_{21} steroidal glycosides from *Gymnema sylvestre*（Retz.）and evaluation of their glucose uptake activities [J]. Molecules，2021，26（21）：6549.

[25] Yen PH，Hai Yen DT，Viet Thanh NT，et al. Gymsyloside F and Gymsyloside G，two new pregnane glycosides from the leaves of *Gymnema sylvestre* and their *α*-glucosidase and *α*-amylase inhibitory activities [J]. Nat Prod Commun，2021，16（7）：1934578X211029532.

[26] Tian J，Ma QG，Yang JB，et al. Hepatoprotective phenolic glycosides from Gymnema tingens [J]. Planta Med，2013，79（9）：761-767.

[27] Tian J，Wang YG，Ma J，et al. Hepatoprotective benzofurans and furanolignans from *Gymnema tingens* [J]. J Asian Nat Prod Res，2015，17（3）：268-273.

[28] 何际婵，王茂媛，董志超 . 大叶匙羹藤石油醚部位化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2013，25（12）：1673-1675.

[29] 丘琴，甄汉深，黄培倩 . 匙羹藤花挥发性成分分析 [J]. 中药材，2013，36（4）：575-577.

[30] 丘琴，甄汉深，石琳，等 . 匙羹藤叶石油醚浸泡物化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（7）：93-95.

[31] 何际婵，王茂媛，董志超 . 大叶匙羹藤茎的脂溶性成分分析 [J]. 中华中医药学刊，2014，32（4）：786-787.

[32] 刘悦，郑磊，范冰舵，等 . 匙羹藤叶的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（12）：102-106.

[33] 丘琴，甄汉深，黄晓玉 . 匙羹藤果实化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 中药材，2017，40（8）：1858-1860.

[34] 陈嘉骏，王颖，桑婷婷，等 . 灵芝多糖在糖尿病及其并发症防治中的研究进展 [J]. 中草药，53（3）：937-947.

[35] Srinuanchai W，Nooin R，Pitchakarn P，et al. Inhibitory effects of *Gymnema inodorum*（Lour.）Decne leaf extracts and its triterpene saponin on carbohydrate digestion and intestinal glucose absorption [J]. J Ethnopharmacol，2021，266：113398.

[36] Li Y，Liu Y，Liang J，et al. Gymnemic acid ameliorates hyperglycemia through PI3K/AKT-and AMPK-mediated signaling pathways in type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Agr Food Chem，2019，67（47）：13051-13060.

[37] Majeed W，Khaliq T，Aslam B，et al. Polyherbal formulation prevents hyperglycemia by modulating the biochemical

parameters and upregulating the insulin signaling cascade in alloxan induced hyperglycemic rats [J]. Pak Vet J，2018，38（2）：121-126.

[38] Sandech N，Jangchart R，Komolkriengkrai M，et al. Efficiency of *Gymnema sylvestre*-derived gymnemic acid on the restoration and improvement of brain vascular characteristics in diabetic rats [J]. Exp Ther Med，2021，22（6）：1-13.

[39] El Shafey AA，El-Ezabi MM，Seliem MM，et al. Effect of *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves extract on certain physiological parameters of diabetic rats [J]. J King Saud Univ Sci，2013，25（2）：135-141.

[40] 王莉，李微，彭小春，等 . 中药在造血系统中的辐射防护作用研究进展 [J]. 时珍国医国药，2022，33（6）：1423-1427.

[41] Sinha P，Arunachalam KD，Annamalai SK. Radio-protective dosimetry of Pangasius sutchi as a biomarker，against gamma radiation dosages perceived by genotoxic assays [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2018，164：629-640.

[42] Sinha P，Arunachalam KD，Nagarajan SK，et al. Radio-protective efficacy of *Gymnema sylvestre* on Pangasius sutchi against gamma（^{60}Co）irradiation [J]. Int J Radiat Biol，2022，98（2）：212-229.

[43] Ounjaijean S，Romyasamit C，Somsak V. Evaluation of antimalarial potential of aqueous crude *Gymnema inodorum* leaf extract against Plasmodium berghei infection in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：9932891.

[44] Ounjaijean S，Sukati S，Somsak V，et al. The potential role of *Gymnema inodorum* leaf extract treatment in hematological parameters in mice infected with plasmodium berghei [J]. J Trop Med，2021，2021：9989862.

[45] Boonyapranai K，Surinkaew S，Somsak V，et al. Protective effects of *Gymnema inodorum* leaf extract on plasmodium berghei-induced hypoglycemia，dyslipidemia，liver damage，and acute kidney injury in experimental mice [J]. J Parasitol Res，2021，2021：1896997.

[46] Singh VK，Dwivedi P，Chaudhary BR，et al. Immunomodulatory effect of *Gymnema sylvestre*（R. Br.）leaf extract：an in vitro study in rat model [J]. PLoS One，2015，10（10）：e0139631.

[47] Ahirwal L，Singh S，Dubey MK，et al. In vivo immunomodulatory effects of the methanolic leaf extract of *Gymnema sylvestre* in Swiss albino mice [J]. Arch Biol Sci，2015，67（2）：561-570.

[48] Ghous T，Akhtar K，Andleeb S，et al. Evaluation of α-glucosidase inhibition，antioxidant and antibacterial effects of *Gymnema sylvestre* R. Br. [J]. Bangl J Bot，2021，50（1）：61-68.

[49] Arora DS，Sood H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves and their biosafety evaluation [J]. AMB Express，2017，7（1）：1-13.

[50] Chodisetti B，Rao K，Giri A. Phytochemical analysis of *Gymnema sylvestre* and evaluation of its antimicrobial activity [J]. Nat Prod Res，2013，27（6）：583-587.

[51] 边亮，陈华国，周欣 . 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展 [J]. 食品科学，2020，41（7）：275-282.

[52] Chakraborty D，Ghosh S，Bishayee K，et al. Antihyperglycemic drug *Gymnema sylvestre* also shows anticancer potentials in human melanoma A375 cells via reactive oxygen species generation and mitochondria-dependent caspase pathway [J]. Integr Cancer Ther，2013，12（5）：433-441.

[53] Pon Nivedha R，Selvaraj J，Lalitha KG，et al. Effects of dihydroxy gymnemic triacetate（DGT）on expression of apoptosis associated proteins in human prostate cancer cell lines（PC3）[J]. J Recept Signal Transduct Res，2015，35（6）：605-612.

[54] Ramkumar KM，Manjula C，Elango B，et al. In vitro cytotoxicity of Gymnema montanum in human leukaemia HL-60 cells；induction of apoptosis by mitochondrial membrane potential collapse [J]. Cell Prolif，2013，46（3）：263-271.

[55] Yasukawa K，Okuda S，Nobushi Y. Inhibitory effects of Gymnema（*Gymnema sylvestre*）leaves on tumour promotion in two-stage mouse skin carcinogenesis [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2014，2014：328684.

[56] Arunachalam KD，Arun LB，Annamalai SK，et al. Potential anticancer properties of bioactive compounds of *Gymnema sylvestre* and its biofunctionalized silver nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine，2015，10：31.

[57] Ahamed AJ，Kumar PV，Loganathan K，et al. Synthesis，characterization and cytotoxicity studies of CuO nanoparticles by using *Gymnema sylvestre* leaf extracts [J]. J Indian Chem Soc，2016，93：655-660.

[58] Daisy ER，Rajendran NK，Houreld NN，et al. Curcumin and *Gymnema sylvestre* extract loaded graphene oxide-polyhydroxybutyrate-sodium alginate composite for diabetic wound regeneration [J]. React Funct Polym，2020，154：104671.

[59] Subramanian S，Karuppannan SK，Ramalingam R，et al. Effect of gamma sterilization on *Gymnema sylvestre* leaf extract fused polycaprolactone nanofiber for effective wound dressing applications [J]. Mater Lett，2021，300：130145.

[60] 王晓慧，杨波，周忠光，等 . 药食两用中药及活性成分抗肝损伤研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（5）：138-141.

[61] Kumar V，Bhandari U，Tripathi CD，et al. Anti-obesity effect of *Gymnema sylvestre* extract on high fat diet-induced obesity in Wistar rats [J]. Drug Res，2013，63（12）：625-632.

[62] 钟婷婷，史丹妮，钱小香，等 . 白花地胆草和匙羹藤粗提物生物活性初步研究 [J]. 热带林业，2020，48（2）：13-16.

[63] Joseph SJ，Shanmugasundaram S，Dowlath MJ，et al. Protective effect of *Gymnema sylvestre* leaf extract against uranium toxicity in human peripheral blood mononuclear cells [J]. J King Saud Univ Sci，2022，34（3）：101895.

[64] Dunkhunthod B，Talabnin C，Murphy M，et al. *Gymnema inodorum*（Lour.）Decne. extract alleviates oxidative stress and inflammatory mediators produced by RAW264.7 macrophages [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：8658314.

（收稿日期：2022-09-06；修回日期：2022-11-06）

口腔局部用药防治造血干细胞移植致口腔黏膜炎的临床研究进展

陈卫民[1]，张璋[1]，谢辉[1, 2*]，郭锦材[1, 3, 4*]（1. 湖南中医药大学口腔医(学)院，长沙 410006；2. 长沙市口腔医院牙周黏膜科，长沙 410006；3. 长沙市口腔医院药剂科，长沙 410006；4. 湖南中医药大学药学院，长沙 410208）

摘要：造血干细胞移植致口腔黏膜炎（HSCT-OM）临床治疗棘手，目前国内对其相关的临床研究较少，本文从生物制剂、镇痛药、消毒剂、天然药物提取物和其他等分类对 HSCT-OM 局部用药防治的国外临床研究进行综述。基于目前的临床研究证据，透明质酸酶喷雾剂、氯己定含漱液、洋甘菊提取物含漱液、茶叶提取物含漱液、薄荷胡椒草本含漱液、海藻酸钠悬浮液、过饱和磷酸钙含漱液、亚甲蓝含漱液、辛烯醇含漱液等有防治 HSCT-OM 的作用，但大部分药物都缺少循证医学证据支持，未来需更多的多中心大样本的随机对照临床试验来验证这些药物的安全性和有效性。

关键词：造血干细胞移植；口腔黏膜炎；局部用药

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0187-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.029

Clinical research progress of topical oral drugs in prevention and treatment of oral mucositis caused by hematopoietic stem cell transplantation

CHEN Wei-min[1], ZHANG Zhang[1], XIE Hui[1, 2*], GUO Jin-cai[1, 3, 4*] (1. *School of Stomatology*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410006; 2. *Department of Periodontal and Oral Mucosa*, *Changsha Stomatological Hospital*, *Changsha* 410006; 3. *Department of Pharmacy*, *Changsha Stomatological Hospital*, *Changsha* 410006; 4. *School of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: It is difficult to treat the oral mucositis caused by hematopoietic stem cell transplantation (HSCT-OM). At present, there are few related clinical studies in China. The research progress of topical treatment of HSCT-OM abroad was reviewed from biological agents, analgesics, disinfectants, natural drug extracts and other categories. Based on the current clinical research evidence, some drugs can prevent and treat HSCT-OM, such as hyaluronidase spray, chlorhexidine gargle, chamomile extract gargle, tea extract gargle, peppermint pepper herb gargle, sodium alginate suspension, supersaturated calcium phosphate gargle, methylene blue gargle, and octenol gargle. However, most of them lack the evidence support. In the future, more multicenter large sample randomized controlled clinical trials are needed to verify their safety and efficacy.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation; oral mucositis; topical drug

造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplantation，HSCT）是血液恶性肿瘤重要的治疗方式，但该治疗方法常出现口腔黏膜炎（oral mucositis，OM）的并发症，并发症的发生率高达86.5%[1]，HSCT-OM 表现为口腔黏膜溃疡、疼痛、水肿、糜烂、进食困难、味觉异常等，临床治疗棘手，而

基金项目：湖南省自然科学基金（No.2021JJ70062）；湖南省重点领域研发计划（No.2020SK2137）；长沙市自然科学基金（No.kq2014019）；湖南省医学会医学科研基金临床药学项目（No.HMA202001012）；湖南省卫生健康委科研计划项目（No.202313048136）；湖南中医药大学校院联合基金项目（No.2022XYLH120 和 No.2022XYLH134）；湖南省中医药科研课题（No.B2023048）。

作者简介：陈卫民，男，硕士，主要从事口腔黏膜病机制研究，email：kqyycwm@126.com *通信作者：郭锦材，男，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事口腔黏膜病的防治研究，email：540009728@qq.com；谢辉，男，主任医师，博士研究生导师，主要从事口腔黏膜病和牙周病的研究，email：kqyyxh1@126.com

口腔局部用药具有药物浓度高、作用强、不良反应少等优势，在 HSCT-OM 治疗中广泛应用，但国内相关临床研究较少，且目前尚无文献对其进行系统的综述。故本文就防治 HSCT-OM 的口腔局部用药的国外临床研究进展，以生物制剂、镇痛药、消毒剂、天然药物提取物等分类进行综述，为 HSCT-OM 临床治疗和研究提供参考。

1 生物制剂

生物制剂可以促进细胞增殖分化、加快创面修复愈合，对 OM 的治疗效果好。目前已有多种生物制剂在临床上以局部用药用于防治 HSCT-OM，主要有粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、重组人表皮生长因子（rhEGF）、促红细胞生成素、透明质酸钠等。

1.1 GM-CSF

GM-CSF 防治 HSCT-OM 的作用目前尚有争议。据 Dazzi 等 [2] 报道，90 例化疗后接受自体外周血干细胞移植的实体瘤患者，随机分为安慰剂组与 GM-CSF 含漱液组（150 μg • d^{-1}），GM-CSF 含漱液组和安慰剂组严重 OM（≥ 3 级）发生率（30% *vs* 36%）、OM 持续时间 [（4.8±4.7）d *vs*（4.4±2.7）d] 差异无统计学意义。另一 2%GM-CSF 甲基纤维素凝胶的临床试验，同样发现 GM-CSF 不能降低 HSCT-OM 的严重程度和发生率 [3]，故目前指南不推荐进行自体或同种异体 HSCT 的患者局部使用 GM-CSF 来预防 HSCT-OM[4]。

1.2 rhEGF 喷雾剂

与安慰剂组相比，rhEGF 口腔喷雾剂（50 μg • mL^{-1}，2 次 • d^{-1}）不能降低 OM（≥ 2 级）的发生率，但可降低 HSCT-OM 患者的吞咽困难程度和饮水的限制 [5]。另一随机双盲安慰剂对照Ⅱ期临床研究的结果同样显示，rhEGF 口腔喷雾剂治疗不能降低患者 OM 的患病率和持续时间，但可减少患者阿片类镇痛药使用的总时间和总剂量 [6]。

1.3 透明质酸酶喷雾剂

两项含透明质酸钠与胶原蛋白喷雾剂预防 HSCT-OM 的病例随机对照研究显示：HSCT 后至出院，实验组每日喷透明质酸酶喷雾剂 3 ～ 4 次，对照组每日用 0.2% 氯己定含漱 3 ～ 4 次，结果显示透明质酸酶喷雾剂组比氯己定含漱液组 OM 的严重程度更低（76.6% *vs* 90.6%），OM 持续时间小于 7 d 的患者比例更大（70.3% *vs* 37.6%）[7-8]。

1.4 促红细胞生成素含漱液

Hosseinjani 等 [9] 的一项随机双盲安慰剂临床对照试验，患者从高剂量化疗开始到移植后第 14 日或到出院当日接受促红细胞生成素含漱液（50 IU • mL^{-1}，4 次 • d^{-1}）（n = 40）或安慰剂（n = 40）治疗，结果含漱液组和安慰剂组 OM 的发生率为（27.5% *vs* 77.5%），OM 最大强度评分为 [（0.60±1.06）*vs*（1.67±1.27）]，OM 平均强度评分为 [（0.47±0.80）*vs*（1.28±0.86）]。结果显示促红细胞生成素含漱液干预的 HSCT 患者与安慰剂组相比，OM 发生率、严重程度和持续时间更低。

2 镇痛药

疼痛是 HSCT-OM 患者常见的并发症，有些患者甚至会出现严重疼痛，影响日常生活。对疼痛的治疗可以改善 HSCT-OM 患者生活质量，提高治疗的依从性。此外，疼痛症状缓解后，有利于患者饮食，从而改善患者营养状况。因 HSCT-OM 是持续性疼痛，镇痛药常用贴剂，如芬太尼透皮贴剂、丁丙诺啡透皮贴剂。

2.1 芬太尼透皮贴剂

有些 HSCT-OM 患者会出现严重疼痛，常需用镇痛药。Kim 等 [10] 研究发现 HSCT-OM 患者经皮给药，给予 25 μg • h^{-1} 的芬太尼透皮贴剂，既能有效缓解 OM 的疼痛，又能提高 HSCT-OM 患者的睡眠和生活质量。黄慧强等 [11] 的研究也得到了相似的结果，该研究对 22 例恶性肿瘤 HSCT 引起的严重 OM 患者给予 25 μg • h^{-1} 芬太尼透皮贴剂，每 72 h 更换一次贴剂，并根据患者疼痛变化情况调整芬太尼剂量，疼痛缓解的总体有效率为 100%，完全缓解率为 45.5%，患者的生活质量显著提高（P < 0.01）。

2.2 丁丙诺啡透皮贴剂

Meyer 等 [12] 关于 54 名 3 HSCT-OM（3 级）患者回顾性队列研究显示，其中 24 名为普通镇痛对照组，30 名为丁丙诺啡透皮贴剂镇痛组，两组患者的阿片类药物总需求量为 [（1961±1365）mg *vs*（928±625）mg，P = 0.02]，吞咽疼痛评分为 [（54±24）*vs*（41±18），P < 0.001]，结果显示严重 HSCT-OM 患者使用丁丙诺啡透皮贴剂镇痛，可显著降低阿片类药物的使用和患者吞咽疼痛感。

3 消毒剂

因 HSCT-OM 患者一般机体抵抗力差，易继发细菌感染，而氯己定含漱液、聚维酮碘含漱液等消毒剂价格便宜、杀菌消毒效果好，临床上常用于预防和治疗 HSCT-OM。

3.1 氯己定含漱液

一项回顾性研究报道，HSCT 患者在住院期间，B 组患者（35 人）使用软毛牙刷用牙膏每日清洁口腔两次，A 组患者（38 人）在此基础上，加用不含乙醇的 0.12% 氯己定溶液每日含漱 3 次。结果发现用氯己定溶液含漱可有效预防 HSCT 链球菌菌血症的发生 [13]。一项临床实践指南建议，氯

己定联合口腔护理方案，可以降低 HSCT-OM 的严重程度和持续时间 [14]。

3.2 聚维酮碘含漱液

Vokurka 等 [15-16] 将 132 例患者随机分为两组，整个 HSCT 住院期间分别用生理盐水（n = 65）或 1% 聚维酮碘溶液（n = 67）每日含漱 4 次，每次含漱 2 min，结果两组 HSCT-OM 平均持续时间都为 5 d，HSCT-OM 发病率分别为 71% *vs* 70%，差异无统计学意义。

4 天然药物提取物

天然药物提取物具有效果好、不良反应少等优势，是近年来开发口腔局部治疗 HCST-OM 药物的热点方向，目前已开展治疗 HCST-OM 临床试验的天然药物提取物有洋甘菊提取物含漱液、茶叶提取物含漱液、薄荷胡椒草本含漱液、海藻酸钠悬浮液、芦荟含漱液等。

4.1 洋甘菊提取物的含漱液

一项Ⅱ期临床随机对照试验显示，与安慰剂组相比，一日含漱两次 10 mL 1% 洋甘菊提取物试验组的 HSCT-OM 发生率、严重程度和持续时间更低，且没有发现中度或重度不良反应 [17]。

4.2 茶叶提取物含漱液

据一项前瞻性临床随机对照研究报道，试验组 28 例接受 HCST 患者从术前第 1 日到术后第 30 日在标准预防的基础上每日使用茶叶提取物含漱液漱口 3 次，对照组 32 例仅接受标准预防，试验组 OM 的发生率为 50%，而对照组为 82%。此外，试验组中 2 ～ 4 级 OM 发生率更低（25% *vs* 56.2%）。结果表明，茶叶提取物含漱液漱口可以显著降低 HCST-OM 的发生率、严重程度和持续时间。该结果可能是由于茶多酚化合物的抗氧化特性对口腔黏膜有保护作用 [18]。

4.3 薄荷胡椒草本含漱液

一项一日含漱 3 次 1% 薄荷胡椒草本含漱液组（n = 27）和安慰剂组（n = 33）的随机对照试验显示，薄荷胡椒草本含漱液组 OM 的持续时间 [（5.67±5.00）*vs*（11.27±6.73）]、严重程度 [（1.44±1.09）*vs*（2.18±1.01）] 均更低，且 HCST 患者的疼痛强度 [（1.79±1.99）*vs*（3.23±2.03）]、口腔干燥 [（1.33±2.03）*vs*（2.29±2.11）] 和吞咽困难 [（1.44±2.27）*vs*（2.89±2.47）] 等改善效果更好。此外还可以减少麻醉镇痛药使用率（14.81% *vs* 42.42%）、全胃肠外营养率（14.81% *vs* 42.42%）和平均使用时间 [（0.52±1.45）d *vs*（2.18±3.54）d]，结果表明接受薄荷胡椒草本含漱液治疗的 HCST 患者 OM 相关的并发症更少 [19]。

4.4 海藻酸钠悬浮液

研究发现海藻酸钠悬浮液漱口可以显著缓解与 HCST-OM 相关的疼痛，且可以减少镇痛药的使用，降低口腔干燥症和味觉障碍的发生率，海藻酸钠悬浮液漱口在预防 HCST-OM 方面非常有效 [20]。另一研究也显示海藻酸钠悬浮液漱口，HSCT 患者的 OM、口腔疼痛和味觉障碍等并发症的严重程度显著降低，并可以减少移植物抗宿主病的全身并发症 [21]。

4.5 芦荟含漱液

据一项Ⅱ期临床研究显示，HCST 患者每日使用含有牛初乳和芦荟的含漱液漱口 3 次预防 OM，出现 OM 后增加到 5 次，OM 平均发病时间为预处理开始后（9.1±3.5）d，平均持续时间为（10.4±4.3）d，平均最大疼痛评分为（3.7±2.7）。但其安全有效性还有待随机对照临床研究试验验证 [22]。

5 其他类

5.1 过饱和磷酸钙含漱液

临床研究显示，每日含漱 4 次过饱和磷酸钙溶液可降低 HCST-OM 的严重程度（0.9 d *vs* 1.8 d，P = 0.02）和持续时间（3.2 d *vs* 7.1 d，P = 0.02），并可以减少对阿片类药物（1.1 d *vs* 3.4 d，P = 0.047）和全胃肠外营养的需求（0 d *vs* 1.9 d，P = 0.009）[23-24]。另一项前瞻性双盲随机临床对照试验发现，整个住院期间每日含漱 4 次饱和磷酸钙含漱液与氟化物含漱液，每次 30 mL，OM 持续天数（3.72 d *vs* 7.22 d，P = 0.001）、疼痛持续时间（2.86 d *vs* 7.67 d，P = 0.0001）、吗啡使用剂量（34.54 mg *vs* 122.78 mg，P < 0.0001）、吗啡使用天数（1.26 d *vs* 4.02 d，P = 0.0001）都优于单独使用氟化物含漱液 [25]。

5.2 米索前列醇含漱液

Lalla 等 [26] 的随机双盲安慰剂临床对照试验显示，每日含漱 3 次米索前列醇溶液 15 mL（含米索前列醇 200 μg）或 15 mL 水，含漱 60 s 后咽下，米索前列醇含漱液组和安慰剂组的 HCST-OM 严重程度（OM 指数评分，P > 0.05）和疼痛严重程度（VAS 评分，P > 0.05）差异无统计学意义。

5.3 亚甲蓝含漱液

临床研究发现 HSCT 患者用足量的 0.5% 亚甲蓝水溶液含漱 5 min，每 6 h 含漱 1 次，结果发现 60% 患者第一次含漱 0.5% 亚甲蓝溶液后疼痛缓解，其余第二次含漱后疼痛缓解，从而可降低阿片类药物的使用量。0.5% 亚甲蓝含漱液漱口是一种有效且廉价的方式，可以安全地用于缓解与癌症治疗相关的 OM 患者的顽固性口腔疼痛 [27]。

5.4 辛烯醇含漱液

一项前瞻性双盲随机临床对照试验结果表明，

每次含漱 50 mL 0.1% 辛烯醇溶液或 0.1% 氯己定溶液，每日 4 次，都对降低 HCST-OM 严重程度 [OM 评分（1.24±0.79）*vs*（1.30±0.80）] 有效果，但预防作用差异无统计学意义，辛烯醇含漱液对口咽部细菌杀菌效果 [降低（5.0±8.3）*vs*（1.0±6.3）CFU] 更有优势，对院内感染的预防作用可能更好 [28]。

5.5 亚叶酸含漱液

Sugita 等 [29] 回顾性分析了 118 例 HCST 患者的数据。多因素分析结果显示，全身性亚叶酸给药显著降低了重度 OM 的发生率（*OR* ＝ 0.13，95%*CI*：0.04 ～ 0.73，*P* ＝ 0.014），单独使用 13% 的亚叶酸含漱液（每日 4 次）的患者重度 OM 发生率也有降低趋势（*OR* ＝ 0.39，95%*CI*：0.15 ～ 1.00，*P* ＝ 0.051），全身性亚叶酸和含漱液给药均有助于降低接受 HCST 患者严重 OM 的发生率。

6 总结与展望

据报道在接受放射治疗的患者中，OM 的增加成本为 5000 ～ 30 000 美元，在接受化疗的患者中，每个周期的增加成本约为 3700 美元，HCST-OM 总住院治疗的成本增加超过 7 万美元 [30]。一项 222 名接受造血干细胞移植的患者临床回顾性研究显示，OM（Ⅱ级及以上）患病率为 69.8%；且发现 OM 增加了住院天数，使用抗菌药物的天数以及镇痛药的数量和剂量 [31]。HCST-OM 的危险因素为较小的年龄、较低体质量指数、近期吸烟、近期抗菌药物暴露史、甲氨蝶呤的使用等，且 OM 会导致住院时间延长、中性粒细胞移植延期及胃肠道感染 [32]，故临床医师越来越重视 HCST-OM。

本文从生物制剂、镇痛药、消毒剂、天然药物提取物等分类就 HSCT-OM 的口腔局部用药防治的国外临床研究进行综述，文献研究显示透明质酸酶喷雾剂、氯己定含漱液、洋甘菊提取物含漱液、茶叶提取物含漱液、薄荷胡椒草本含漱液、海藻酸钠悬浮液、过饱和磷酸钙含漱液、亚甲蓝含漱液、辛烯醇含漱液等有防治 HSCT-OM 的作用，但目前未发现 GM-CFS 含漱液、米索前列醇含漱液、聚维酮碘含漱液有防治 HSCT-OM 的作用。故基于目前的国内外临床研究证据，较多的局部用药有防治 HSCT-OM 的作用，但基本上都缺少循证医学证据支持，未来需更多的多中心大样本随机对照临床试验来验证这些药物的安全性和有效性。

口腔局部用药防治 HSCT-OM 的药物较多，含漱液使用方便且安全经济，目前以含漱液为主，但由于其易受口腔内环境和饮食影响，作用时间相对短，疗效欠佳。已有循证医学研究证据证实冷冻疗法治疗 HSCT-OM 安全有效 [33]，也有学者探索性研究发现一些含漱液冷冻后用于漱口可增强治疗 HSCT-OM 疗效，故含漱液的冷冻疗法可能是以后提高局部治疗 HSCT-OM 疗效的一种经济的方法；另一方面开发乳膏、凝胶等作用时间长的局部制剂，治疗 HSCT-OM 也是以后的研究方向。此外，用好局部药物的同时，还要勤刷牙，注意口腔卫生，避免食用刺激性食物，防止 OM 继发感染；提供足够的营养支持，才能有利于干细胞移植后身体恢复，加快 OM 口腔黏膜的愈合，这些方面也需引起重视。

参考文献

[1] Chaudhry HM，Bruce AJ，Wolf RC，et al. The incidence and severity of oral mucositis among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients：a systematic review [J]. Biol Blood Marrow Transplant，2016，22（4）：605-616.

[2] Dazzi C，Cariello A，Giovanis P，et al. Prophylaxis with GM-CSF mouthwashes does not reduce frequency and duration of severe oral mucositis in patients with solid tumors undergoing high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation rescue：a double blind，randomized，placebo-controlled study [J]. Ann Oncol，2003，14（4）：559-563.

[3] Vander LH，Thomas BL，Vanoers RH，et al. Effect of locally applied GM-CSF on oral mucositis after stem cell transplantation：a prospective placebo-controlled double-blind study [J]. Ann Hematol，2001，80（3）：150-154.

[4] Logan RM，Al-Azri AR，Bossi P，et al. Systematic review of growth factors and cytokines for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines [J]. Support Care Cancer，2020，28（5）：2485-2498.

[5] Kim KI，Kim JW，Lee HJ，et al. Recombinant human epidermal growth factor on oral mucositis induced by intensive chemotherapy with stem cell transplantation [J]. Am J Hematol，2013，88（2）：107-112.

[6] Kim JW，Kim MG，Lee HJ，et al. Topical recombinant human epidermal growth factor for oral mucositis induced by intensive chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation：final analysis of a randomized，double-blind，placebo-controlled，phase 2 trial [J]. PLoS One，2017，12（1）：e0168854.

[7] Ruggiero T，Pol R，Camisassa D，et al. Use of sodium hyaluronate and synthetic amino acid precursors of collagen for the symptomatic treatment of mucositis in patients undergoing haematopoietic stem cell transplants [J]. J Biol Regul Homeost Agents，2016，30（3）：889-894.

[8] Ruggiero T，Pol R，Camisassa D，et al. Treatment of symptomatic oral mucositis with sodium hyaluronate and synthetic amino acid precursors of collagen in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation [J]. J Biol Regul Homeost Agents，2018，32（3）：737-743.

[9] Hosseinjani H，Hadjibabaie M，Gholami K，et al. The efficacy of erythropoietin mouthwash in prevention of oral mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic SCT：a dou-

ble-blind，randomized，placebo-controlled trial [J]. Hematol Oncol，2017，35（1）：106-112.

[10] Kim JG，Sohn SK，Kim DH，et al. Effectiveness of transdermal fentanyl patch for treatment of acute pain due to oral mucositis in patients receiving stem cell transplantation [J]. Transplant Proc，2005，37（10）：4488-4491.

[11] 黄慧强，蔡清清，林旭滨，等 . 芬太尼透皮贴剂治疗造血干细胞移植相关性口腔粘膜炎所致严重疼痛 [J]. 癌症，2007，4：390-393.

[12] Meyer I，Chan B，Cohen E，et al. Use of a buprenorphine-based pain management protocol is associated with reduced opioid requirements and pain on swallowing in oral mucositis：a retrospective cohort study [J]. Support Care Cancer，2022，30（7）：6013-6020.

[13] Antunes HS，Ferreira EM，de Faria LM，et al. Streptococcal bacteraemia in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation：the role of tooth brushing and use of chlorhexidine [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal，2010，15（2）：e303-309.

[14] Hong CHL，Gueiros LA，Fulton JS，et al. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines [J]. Support Care Cancer，2019，27（10）：3949-3967.

[15] Vokurka S，Bystrická E，Koza V，et al. The comparative effects of povidone-iodine and normal saline mouthwashes on oral mucositis in patients after high-dose chemotherapy and APBSCT--results of a randomized multicentre study [J]. Support Care Cancer，2005，13（7）：554-558.

[16] Vokurka S，Bystrická E，Koza V，et al. Higher incidence of chemotherapy induced oral mucositis in females：a supplement of multivariate analysis to a randomized multicentre study [J]. Support Care Cancer，2006，14（9）：974-976.

[17] Braga FT，Santos AC，Bueno PC，et al. Use of chamomilla recutita in the prevention and treatment of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation：a randomized，controlled，phase Ⅱ clinical trial [J]. Cancer Nurs，2015，38（4）：322-329.

[18] Carulli G，Rocco M，Panichi A，et al. Treatment of oral mucositis in hematologic patients undergoing autologous or allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells：a prospective，randomized study with a mouthwash containing camelia sinensis leaf extract [J]. Hematol Rep，2013，5（1）：21-25.

[19] Tavakoli AM，Ghassemi S，Mehdizadeh M，et al. Evaluating the effect of Matricaria recutita and Mentha piperita herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation：a randomized，double blind，placebo controlled clinical trial [J]. Complement Ther Med，2016，29：29-34.

[20] Hayashi H，Kobayashi R，Suzuki A，et al. Polaprezinc prevents oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy followed by hematopoietic stem cell transplantation [J]. Anticancer Res，2014，34（12）：7271-7277.

[21] Tsubura-Okubo M，Komiyama Y，Kamimura R，et al. Oral management with polaprezinc solution reduces adverse events in haematopoietic stem cell transplantation patients [J]. Int J Oral Maxillofac Surg，2021，50（7）：906-914.

[22] Guberti M，Botti S. Stem cell transplantation patients receiving a novel oral care protocol for oral mucositis prevention and treatment：patient-reported outcomes and quality of life [J]. Support Care Cancer，2022，30（7）：6317-6325.

[23] Wasko-Grabowska A，Rzepecki P，Oborska S，et al. A supersaturated calcium phosphate solution seems to effectively prevent and treat oral mucositis in haematopoietic stem cell transplanted cancer patients-single centre experience [J]. J Buon，2012，17（2）：363-368.

[24] Markiewicz M，Dzierzak-Mietla M，Frankiewicz A，et al. Treating oral mucositis with a supersaturated calcium phosphate rinse：comparison with control in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Support Care Cancer，2012，20（9）：2223-2229.

[25] Papas AS，Clark RE，Martuscelli G，et al. A prospective，randomized trial for the prevention of mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant，2003，31（8）：705-712.

[26] Lalla RV，Gordon GB，Schubert M，et al. A randomized，double-blind，placebo-controlled trial of misoprostol for oral mucositis secondary to high-dose chemotherapy [J]. Support Care Cancer，2012，20（8）：1797-1804.

[27] Roldan CJ，Nouri K，Chai T，et al. Methylene blue for the treatment of intractable pain associated with oral mucositis [J]. Pain Pract，2017，17（8）：1115-1121.

[28] Mutters NT，Neubert TR，Nieth R，et al. The role of Octenidol（®），Glandomed（®）and chlorhexidine mouthwash in the prevention of mucositis and in the reduction of the oropharyngeal flora：a double-blind randomized controlled trial [J]. GMS Hyg Infect Control，2015，10（5）：1-7.

[29] Sugita J，Matsushita T，Kashiwazaki H，et al. Efficacy of folinic acid in preventing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving MTX as prophylaxis for GVHD [J]. Bone Marrow Transplant，2012，47（2）：258-264.

[30] Elting LS，Chang YC. Costs of oral complications of cancer therapies：estimates and a blueprint for future study [J]. J Natl Cancer Inst Monogr，2019，53：lgz010.

[31] Jo KS，Kim NC. Incidence and factors influencing oral mucositis in patients with hematopoietic stem cell transplantation [J]. J Korean Acad Nurs，2014，44（5）：542-551.

[32] Shouval R，Kouniavski E，Fein J，et al. Risk factors and implications of oral mucositis in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Eur J Haematol，2019，103（4）：402-409.

[33] Patel P，Robinson PD，Baggott C，et al. Clinical practice guideline for the prevention of oral and oropharyngeal mucositis in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplant patients：2021 update [J]. Eur J Cancer，2021，154：92-101.

（收稿日期：2022-09-04；修回日期：2022-10-19）

中药及民族药治疗类风湿关节炎的代谢组学研究进展

吕丽苹[1]，胡扬[1]，宋辉[1]，孙向明[1*]，周爱珍[2*]（1. 哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨 150076；2. 浙江药科职业大学中药学院，浙江 宁波 315100）

摘要：类风湿关节炎（RA）是一种发病机制复杂的慢性自身免疫性疾病。现代医学主要以口服或外用非甾体抗炎药、手术等进行治疗，但不良反应明显、后期易复发。随着我国中医药事业的不断发展，中药在 RA 治疗方面的作用已愈发重要。基于代谢组学技术探讨中药药效机制，研究潜在生物标志物和治疗机制，更符合中医药的整体观，对于促进中医药防治 RA 的临床应用具有重要意义。因此，本文将基于代谢组学技术探讨 RA 的发病机制，并对中药及民族药中活性物质、单味药及复方干预 RA 的潜在生物标志物及相关代谢通路进行总结，旨在为今后中药及民族药防治 RA 的深入研究和临床应用提供参考。

关键词：代谢组学；中药；民族药；类风湿关节炎；生物标志物；作用机制
中图分类号：R259 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0192-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.030

Research progress in metabolomics of traditional Chinese medicine and ethnic medicine for rheumatoid arthritis

LYU Li-ping[1], HU Yang[1], SONG Hui[1], SUN Xiang-ming[1*], ZHOU Ai-zhen[2*] (1. *College of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076; 2. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Zhejiang Pharmaceutical University*, *Ningbo Zhejiang* 315100)

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease with complex pathogenesis. Treatment mainly include oral or topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), surgery, etc., but the adverse reactions are common and tend to recur. Traditional Chinese medicine (TCM) has become increasingly important in the treatment of RA. Metabolomics is in line with the holistic view of TCM in determining the efficacy and therapeutic mechanism of TCM, and potential biomarkers. It is of great significance to promote the clinical application of TCM in the prevention and treatment of RA. This paper discussed the pathogenesis of RA based on metabolomics technology, and summarized the potential biomarkers and related metabolic pathways of active substances, single drugs and formula of TCM and ethnic medicine, aiming provide reference for the further research and clinical application of TCM and ethnic medicine for RA.

Key words: metabolomics; traditional Chinese medicine; ethnic medicine; rheumatoid arthritis; biomarker; action mechanism

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以关节滑膜炎症和软骨损伤为病理特征的慢性自身免疫性疾病，发病率和致残率高，且无法治愈，多见于 35 ～ 50 岁成年人[1]。现阶段临床上西医常以非甾体抗炎药、糖皮质激素、生物制剂等进行治疗，治疗方式单一，并且伴随着胃肠道损伤、肝肾功能异常等不良反应[2]。中医则多将 RA 分期分型辨证论治，且中药具有安全性高、整体调节等特点，在 RA 的临床治疗上具有显著优势。但中药成分复杂、靶点多样，还需对其作

基金项目：浙江省中医药科技计划项目（No. 2016ZB116）；2022 年浙江省药品监管系统科技计划项目（No.2022008）。
作者简介：吕丽苹，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：llp08020230@163.com *通信作者：孙向明，女，博士，硕士研究生导师，主要从事中药药效物质基础研究，email：sunxiangming2002@163.com；周爱珍，女，博士，副教授，主要从事中药炮制和新药研发，email:aizhen_zhou@sina.com

用机制等问题进行深入研究和不断完善。

代谢组学是对受病理影响或药物干预后的复杂生物体中内源性代谢物的整体研究，结合代谢组学数据库对相关代谢物信息进行整合，提供生命系统代谢网络的变化。代谢组学的研究思路与中医药的整体思维不谋而合，可作为一种用于发现疾病生物标志物及探索生命系统与药物之间复杂效应关系的有效工具[3]。近年来，代谢组学已广泛应用于中医药防治 RA 的研究中，为更清晰地反映经中药治疗后生命体内代谢物的变化特点，本文基于代谢组学的研究方法，对 RA 的发病机制、中药及民族药治疗 RA 的潜在生物标志物及相关代谢通路进行总结，旨在为今后中药及民族药防治 RA 的深入研究和临床应用提供更多参考。

1 RA 发病机制的代谢组学研究

1.1 RA 发病与氨基酸代谢异常

氨基酸代谢紊乱和相关衍生物的异常表达可能导致炎症加重和关节滑膜增生的恶性循环。Li 等[4]应用基于液相色谱 - 质谱联用（LC-MS）的代谢组学技术，发现 RA 患者血清中色氨酸、精氨酸的含量显著减少，谷氨酸、*L*- 亮氨酸、*L*- 苯丙氨酸和 *L*- 脯氨酸的含量显著增加。色氨酸可以参与犬尿氨酸的代谢，犬尿氨酸可直接作用于成纤维样滑膜细胞（FLS）上的芳香烃受体从而诱导 FLS 异常活化，加重关节滑膜炎症[5]。精氨酸可在一氧化氮合酶（NOS）的催化下产生一氧化氮（NO），调节免疫并参与关节软骨病变，NO 含量过高可诱导肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和白细胞介素 1β（IL-1β）等促炎因子释放，加重 RA 炎症反应，导致关节软骨受损[6]。另有研究表明，谷氨酸可能是一种与早期骨侵蚀相关的 RA 的新预测因子[7]。由此可见，RA 的发病机制可能与氨基酸代谢异常密切相关。

1.2 RA 发病与脂质代谢异常

脂质能够广泛参与营养调节、能量存储、信号转导等生理过程，是软骨细胞所需营养的重要来源[8]。Wang 等[9]采用胶原诱导性关节炎（CIA）大鼠进行血浆代谢组学的研究，发现 CIA 大鼠体内花生四烯酸、油酸、亚油酸和胆固醇含量均有所减少。其中花生四烯酸作为生物体内分布最广泛的内源性活性物质，可与环氧合酶或脂氧合酶反应，生成具有促炎作用的类花生酸，使局部组织产生或加重炎症反应。而胆固醇可通过 Toll 样受体（TLR）3 或者 TLR4 途径激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路诱发炎症反应[10]。Luan 等[11]通过脂质组学研究，发现与健康受试者相比，RA 患者血清中 1- 磷酸鞘氨醇（S1P）、2- 羟基二十碳四烯酸（12-HETE）、溶血磷脂酰胆碱（LPC）和溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）的含量相对增加，其中 LPC 可诱导血管内皮细胞中的环氧合酶 2 表达，发挥促炎作用；12-HETE 作为花生四烯酸的代谢产物，亦可发挥促炎作用。因此脂质代谢异常在与 RA 相关的慢性炎症过程中发挥重要作用。

1.3 RA 发病与能量代谢异常

葡萄糖有氧氧化为正常滑膜细胞产能的主要途径，但 RA 患者体内 FLS 的产能代谢途径发生了改变。Shan 等[12]发现，CIA 大鼠血清中丙酮酸、乳酸、6- 磷酸葡萄糖水平显著增加，柠檬酸的水平下降。其中丙酮酸、乳酸为糖酵解的重要产物，含量增加表明 CIA 大鼠体内糖酵解活性增强，糖酵解活性的上调可导致 RA 患者关节滑膜增生、血管翳的形成，同时加剧炎症和骨质破坏[13]。柠檬酸是三羧酸循环（TCA 循环）中重要的中间代谢产物，柠檬酸含量减少，表明 CIA 大鼠体内糖的有氧分解代谢受到抑制。Yun 等[14]采用基于核磁共振氢谱（^{1}H-NMR）的代谢组学研究方法，发现 CIA 大鼠尿液中肌酸和肌酐的含量较对照组升高，肌酸及其磷酸化形式的磷酸肌酸是能量代谢的关键中间体，其水解后将产生的能量转移给腺苷二磷酸（ADP）再生成腺苷三磷酸（ATP），从而为机体供能，而肌酐是由肌酸和磷酸肌酸代谢产生的，肌酸和肌酐水平升高，表明 CIA 大鼠的能量需求增加，体内存在着一定程度的能量代谢紊乱。

2 中药及民族药治疗 RA 的代谢组学研究

针对 RA 引起的机体代谢紊乱，近年来一些研究表明，中药及民族药的活性物质、单味药及复方可有效调控机体内源性代谢物变化，改善 RA 代谢紊乱状态，进而发挥治疗 RA 的作用。

2.1 活性物质治疗 RA（见表 1）

2.1.1 苍术挥发油　苍术挥发油具有降血糖、保肝、抗炎和抗菌等药理作用。徐依依[15]采用基于气相色谱 - 质谱联用（GC-MS）的代谢组学技术，在佐剂关节炎（AA）大鼠血清中共检测鉴定出 12 种潜在生物标志物，涉及 6 条代谢途径，结果表明苍术挥发油可下调脯氨酸、牛磺酸、半乳糖、谷氨酸等水平，从而抑制关节中胶原蛋白降解，改善机体氨基酸、能量代谢紊乱，缓解关节疼痛，进而发挥治疗 RA 的作用。

2.1.2 栀子苷　栀子苷具有抗炎、抗血管生成和抗氧化等药理作用。占翔[16]采用基于 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学方法，发现栀子苷可通过干预精氨酸和脯氨酸代谢紊乱调节机体免疫，并通过干预鞘脂类代谢有效抑制血管内皮细胞中 S1P

表 1 基于代谢组学的中药及民族药活性物质治疗 RA

Tab 1 Treatment for RA with active substances of TCM and ethnic medicine based on metabolomics

名称	技术	样本	潜在生物标志物	代谢途径
苍术挥发油[15]	GC-MS	大鼠血清	*L*-苏氨酸、牛磺酸、*D*-半乳糖、半乳糖、谷氨酸等	精氨酸和脯氨酸代谢，氨酰基-tRNA 的生物合成，半乳糖代谢，牛磺酸和次牛磺酸代谢，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，*D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢
栀子苷[16]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血液、滑膜液	血液：*L*-精氨酸、乙酰谷氨酸、*L*-组氨酸等；滑膜液：棕榈酰乙醇胺、ATP、ADP、（*R*）-3-羟基-十八烷酸、苯乙酸等	血液：鞘脂代谢、组氨酸代谢、甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢；滑膜液：甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、嘌呤代谢
龙胆苦苷[17]	LC-MS	大鼠血浆	棕榈酰乙醇胺、水杨酸、羟基肉桂酸、溶血磷脂酸（20∶4）、LPC（20∶2）、天门冬氨酸等	苯丙氨酸代谢、半乳糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、胆汁分泌、磷酸肌醇代谢
牛膝总皂苷[18]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠关节腔透析液	胞苷、AMP、硬脂酸、棕榈酸皮质醇等	嘌呤代谢、嘧啶代谢、脂肪酸和类固醇激素合成
威灵仙总皂苷[19]	GC-TOF-MS	大鼠血清	2-羟基丁酸、柠檬酸、棕榈油酸、花生四烯酸等	脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢
铁线莲三萜皂苷[20]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血清、尿液	血清：9，11-十八碳二烯酸、21-脱氧皮质醇、花生四烯酸等；尿液：缬氨酸、马尿酸、泛酸、假尿苷、四氢皮质醇	甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢、类固醇激素生物合成、氨基酸代谢、泛酸和辅酶 A 生物合成
汉防己甲素[14]	^{1}H-NMR	大鼠尿液	甘氨酸、牛磺酸、肌酸、肌酐、黄尿酸、丙酮酸等	能量代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、肠道微生物代谢

的产生及其相关信号通路激活，减轻炎症。此外，栀子苷还能调节 ATP 等代谢物参与嘌呤代谢，抑制尿酸合成，减轻骨组织损伤。

2.1.3 龙胆苦苷 龙胆苦苷具有抗炎、保肝、抗氧化等药理作用。赵传怡[17]在 CIA 大鼠中进行了龙胆苦苷对 RA 炎症抑制作用的代谢组学研究，发现龙胆苦苷能够使 CIA 大鼠体内紊乱的 LPC（20∶2）、天门冬氨酸等 10 个生物标志物回调，提示龙胆苦苷能够调节苯丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成和胆汁分泌等治疗 RA。另外，龙胆苦苷能够调节辅助性 T 细胞 17/ 调节性 T 细胞（Th17/Treg）的平衡，抑制促炎因子释放缓解 RA 症状。

2.1.4 牛膝总皂苷 牛膝总皂苷具有抗炎、抗肿瘤、调节免疫等药理作用。张衡等[18]运用微透析技术采集纯净度较高的 AA 大鼠关节腔透析液，分析发现 AA 大鼠经牛膝总皂苷干预后，腺苷一磷酸（AMP）、胞苷、硬脂酸、皮质醇等代谢物回调，表明牛膝总皂苷能够调控嘌呤代谢、脂肪酸和类固醇激素合成等，起到调节免疫、抑制炎症、改善代谢紊乱的作用，同时还可以改善机体血脂异常，降低引发心血管疾病的风险。

2.1.5 威灵仙总皂苷 威灵仙总皂苷具有调节免疫、抗炎镇痛等药理作用。柳清等[19]在 AA 大鼠血清中发现并鉴定出了 17 个潜在生物标志物，这些生物标志物经威灵仙总皂苷治疗后均得到回调。其中棕榈油酸、花生四烯酸、肉豆蔻酸等含量升高，天冬氨酸、α-酮异己酸、肌醇等含量下降，表明威灵仙总皂苷能够调节紊乱的脂代谢、能量代谢以及氨基酸代谢，抑制机体炎症反应，减轻软骨和骨质损伤从而发挥防治 RA 的作用。

2.1.6 铁线莲三萜皂苷 铁线莲三萜皂苷具有抗炎镇痛、抗氧化、抗肿瘤等药理作用。Li 等[20]研究发现，CIA 大鼠经铁线莲三萜皂苷干预后，血清和尿液中多种甘油磷脂和氨基酸含量发生明显变化，推测铁线莲三萜皂苷可以通过干预甘油磷脂代谢影响中性粒细胞活化，减少中性粒细胞向 RA 炎症部位的迁移和聚集，改善氨基酸代谢紊乱，抑制滑膜增生。此外，铁线莲三萜皂苷还能够干预类固醇激素代谢从而抑制免疫反应和炎症过程。

2.1.7 汉防己甲素 汉防己甲素具有抗肿瘤、保护神经和心血管、抗肝纤维化等药理作用。Yun 等[14]通过尿液代谢组学研究，在 CIA 大鼠尿液中检测鉴定出 23 种潜在生物标志物，并发现汉防己甲素可降低丙酮酸、肌酸和肌酐水平从而恢复能量代谢稳态，并通过调节甘氨酸和牛磺酸等含量减轻氧化应激损伤和炎症反应。此外，还能够改善脂质代谢和肠道菌群代谢紊乱，在一定程度上保护关节，缓解 RA 症状。

2.2 单味药治疗 RA（见表 2）

2.2.1 刺山柑 维药刺山柑富含黄酮、脂质和生物碱等化学成分，具有祛风除湿、止痛活血的功效。蒋思思[5]采用柱前衍生-HPLC-UV 技术对大鼠血清和尿液中多种氨基酸进行检测，发现 CIA 大鼠连续给予刺山柑水提物后，RA 症状得到明显改善，血清和尿液中 10 种氨基酸水平得到恢复，其中精氨酸和谷氨酰胺呈现相同趋势，丙氨酸含量在血清中减少、尿液中增加，表明刺山柑水提物可能通过调节机体内分泌激素、促进糖代谢为机体供能，从而加强自身免疫，发挥抗炎保护作用。

表 2 基于代谢组学的单味中药及民族药治疗 RA

Tab 2 Treatment for RA with single TCM and ethnic medicine based on metabolomics

药材	技术	样本	潜在生物标志物	代谢途径
刺山柑 [5]	PITC-HPLC-UV	大鼠血清、尿液	血清：丙氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、色氨酸、精氨酸；尿液：丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、犬尿氨酸	氨基酸代谢
翼首草 [21]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血清	二十碳五烯酸、*L*-缬氨酸、LPC（20：5）、色氨酸、胆汁酸等	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解，花生四烯酸代谢，精氨酸和脯氨酸代谢，甘油磷脂代谢，胆汁酸生物合成
苍术 [22]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血浆	4-羟基肉桂酸、*L*-哌啶酸、3-磷酸甘油酸、11-脱氧皮质醇、牛磺鹅去氧胆酸、水杨酸、牛磺胆酸、24，25-羟基维生素 D_3、*L*-天门冬酰胺	胆汁酸生物合成、类固醇激素生物合成
类叶牡丹 [23]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血浆、尿液	血浆：对苯二酚、2-吲哚羧酸、胆甾烷醇、三羟基胆甾烷等；尿液：11*β*-羟基孕酮、3，4-二氢呋喃酮、四氢叶酸等	血浆：氨基酸代谢、脂肪酸代谢；尿液：氨基酸代谢、维生素代谢、能量代谢、脂质代谢
黄芪 [24]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠血清、尿液	血清：犬尿酸、维生素 B_6、黄尿酸、辛二酸等；尿液：胆酸、*L*-乙酰基肉碱、棕榈酸等	色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、TCA 循环、脂肪酸代谢、维生素 B_6 代谢

2.2.2 翼首草 藏药翼首草具有镇静、抗炎、抗肿瘤等药理作用。唐策等 [21] 通过血清代谢组学的研究方法，在 AA 大鼠血清中分析鉴定出 21 种潜在生物标志物，翼首草提取物可以使缬氨酸、花生四烯酸和脯氨酸等 19 种标志物恢复到对照组水平，而阳性药组（醋酸地塞米松）仅可对 10 种标志物进行回调，提示翼首草提取物可以改善机体免疫紊乱、抑制机体炎症反应，且较阳性药有更为广泛的代谢调控作用。

2.2.3 苍术 苍术具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效，常用于治疗脘腹胀满、风湿痹痛等。张北雪 [22] 研究发现 4 种苍术（朝鲜苍术、关苍术、北苍术、茅苍术）能够通过调控核转录因子 *κ*B（NF-*κ*B）通路，下调促炎细胞因子水平，抑制滑膜细胞增生和血管翳生成，保护关节软骨。此外，AA 大鼠经苍术提取物干预后，体内牛磺胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和 11-脱氧皮质醇含量降低，推测苍术可能通过影响原代胆汁酸生物合成和类固醇激素生物合成提高机体免疫功能。

2.2.4 类叶牡丹 类叶牡丹主含三萜皂苷和生物碱成分，具有理气止痛、祛风活血的功效。许丹 [23] 利用 CIA 大鼠进行尿液、血浆代谢组学的研究，发现类叶牡丹可使 16 种尿液代谢标志物和 13 种血浆代谢标志物恢复到正常水平，这些标志物主要涉及脂质代谢、能量代谢和氨基酸代谢等途径。研究表明，给予不同剂量类叶牡丹提取物均可减轻 CIA 小鼠滑膜组织损伤，且在安全范围内的高剂量具有显著的抗炎和免疫抑制作用。

2.2.5 黄芪 中药黄芪具有补中益气、利水消肿的功效。Xu 等 [24] 采用基于 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学技术，发现 AA 大鼠经黄芪提取物干预后，尿液和血清中分别有 13 个和 21 个代谢物受到调控，主要涉及色氨酸代谢、脂肪酸代谢等 5 条代谢途径，表明黄芪提取物具有抑制炎症反应和改善氧化应激状态的作用。

2.3 *中药复方治疗* RA（*见表 3*）

2.3.1 川乌-白蔹药对 川乌与白蔹为“十八反”中“半蒌贝蔹及攻乌”的相反药，两者配伍可用于治疗跌打损伤、风寒湿痹。Jin 等 [25] 采用 GC-MS 的代谢组学研究在 CIA 大鼠尿液中发现 21 种 RA 的潜在生物标志物，并发现 CIA 大鼠经给药后，尿液中 *D*-半乳糖、丙醛含量显著升高、肌醇和甘油含量减少，表明 RA 引起的半乳糖代谢紊乱、甘油和脂肪酸的相互转化平衡得到改善和恢复。此外，川乌和白蔹提取物还可以通过控制肌醇含量，介导磷酸肌醇代谢途径，调节中性粒细胞内钙离子浓度抑制炎症反应，从而干预 RA 疾病进程。

2.3.2 乌头汤 乌头汤由麻黄、黄芪和川乌等 5 味中药组成，具有温经散寒、除湿宣痹的功效。Xu 等 [26] 通过尿液代谢组学的研究方法，发现 26 个与乌头汤发挥治疗 RA 作用的潜在生物标志物，主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，牛磺酸和亚牛磺酸代谢等途径，表明乌头汤可通过降低机体氧化应激水平、抑制滑膜增生等方式防治 RA，并通过促进毒素排放减轻肾损伤。

2.3.3 复方祖师麻 复方祖师麻由祖师麻和甘草两味中药配伍而成，具有祛风除湿、活血止痛的功效。彭琳秀等 [27] 通过血浆代谢组学研究在 AA 大鼠中鉴定出 30 种潜在生物标志物，并发现复方祖师麻可调控苯丙氨酸、LPC、肉豆蔻酸等 12 种异常代谢物水平，介导炎症因子产生，缓解关节

表 3　基于代谢组学的中药及民族药复方治疗 RA

Tab 3　Treatment for RA with TCM and ethnic medicine formula based on metabolomics

中药复方	技术	样品	潜在生物标志物	代谢途径
川乌 - 白蔹 [25]	GC-MS	大鼠尿液	丙醛、甘油、肌醇、*D*- 半乳糖等	半乳糖代谢、甘油脂代谢、肌醇磷酸代谢
乌头汤 [26]	UPLC-Q-TOF-HDMS	大鼠尿液	苯丙氨酸、马尿酸、对甲酚、犬尿酸等	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，牛磺酸和亚牛磺酸代谢
复方祖师麻 [27-28]	UPLC/LTQ-Orbitrap-MS	大鼠血浆、血清	血浆：*L*- 乙酰肉碱、肉豆蔻酸、*L*- 苯丙氨酸、LPC（16∶1）等；血清：磷脂酰丝氨酸、神经酰胺、酰基肉碱、磷脂酰胆碱、三酰甘油等	血浆：脂类代谢、氨基酸代谢、嘧啶代谢、烟酰胺代谢；血清：脂质代谢
黄连解毒汤 [30]	LC-Q-TOF-MS	大鼠血浆、尿液	血浆：*D*- 脯氨酸、苯基丙酮酸、*L*- 苯丙氨酸、*L*- 色氨酸；尿液：马尿酸、肌酸酐、尿囊素、尿苷、柠檬酸、琥珀酸、泛酸	血浆：能量代谢，苯丙氨酸代谢、色氨酸代谢；尿液：抗氧化、能量代谢
黄连解毒汤 [31]	RRLC-Q-TOF-MS	大鼠血浆、尿液	血浆：肉碱、脱氧胞苷、马尿酸等；尿液：犬尿酸、3- 吲哚乙酸、磷二甲基乙醇胺等	苯丙氨酸代谢、色氨酸代谢、不饱和脂肪酸代谢
当归四逆汤 [32]	^{1}H-NMR	大鼠尿液	马尿酸、甜菜碱、牛磺酸、丙酮、尿素、丙酮酸、琥珀酸	氨基酸代谢、肠道微生物代谢、糖酵解 / 糖异生、TCA 循环、脂质代谢
秦艽地黄通痹汤 [33]	UPLC-Q-TOF-MS	RA 患者血清	*D*- 甘露糖、*L*-（－）- 阿卓糖、硬脂酰胺、棕榈酸、半乳糖醇、油酰磷酸胆碱	半乳糖代谢、甘油脂代谢、果糖和甘露糖降解、线粒体中的脂肪酸延伸、脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢、胆汁酸生物合成
清络饮 [34]	UPLC-Q-TOF-MS	RA 患者血清	PC、磷脂酰乙醇胺、二酰甘油等	甘油磷脂代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，精氨酸和脯氨酸代谢，糖基磷脂酰肌醇的生物合成，脂肪酸代谢
甘草附子汤 [35]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠尿液	对甲酚、硫酸对甲酚、尿酸、7- 甲基鸟嘌呤等	色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、TCA 循环、牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路、能量代谢、肠道菌群代谢
芍甘附子汤 [36]	UPLC-HRMS/MS	大鼠血清	亚精胺、组胺、2'- 脱氧胞苷、犬尿酸、胆酸、20α，22β- 二羟基胆固醇等	组氨酸代谢、甘油磷脂代谢
二妙散 [37]	UPLC-Q-TOF-MS	大鼠尿液	亚麻酸、花生四烯酸、α- 半乳糖、蔗糖等	花生四烯酸代谢、淀粉和半乳糖代谢、亚油酸代谢、鞘脂类代谢
三妙丸 [38]	LC-MS	大鼠血清	*L*- 苏氨酸、*L*- 天冬氨酸、胆固醇、二十烷酸等	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，氨酰 tRNA 生物合成，亚油酸代谢，丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢，花生四烯酸代谢
四妙丸 [9]	GC-MS	大鼠血浆	*L*- 天冬氨酸、*L*- 丙氨酸、丁酸、*L*- 亮氨酸等	氨基酸代谢、脂质代谢、能量代谢

疼痛；对血清进行非靶标脂质代谢轮廓分析，发现复方祖师麻可对磷脂酰丝氨酸、酰基肉碱和三酰甘油等多种内源性脂质代谢物水平进行调控，从而减轻关节炎症和氧化应激损伤 [28]。

2.3.4　黄连解毒汤　RA 活动期多具有热证表现，热邪侵蚀可致关节红肿热痛、骨质破坏 [29]。黄连解毒汤作为具有清热解毒作用的经典名方，还具有显著的抗炎活性。章华伟 [30] 通过血浆、尿液代谢组学研究发现黄连解毒汤可调控柠檬酸、琥珀酸等 6 种潜在标志物恢复到正常水平，说明黄连解毒汤可通过影响 TCA 循环来调节炎性环境下软骨细胞的代谢水平，减轻骨质损伤从而改善 RA 症状。此外，黄连解毒汤还可抑制体内氧化应激反应，调控苯丙氨酸、色氨酸、不饱和脂肪酸代谢，从而达到治疗 RA 的效果 [31]。

2.3.5　当归四逆汤　当归四逆汤出自《伤寒论》，具有温经散寒、养血通脉的功效。程邦 [32] 利用 ^{1}H-NMR 技术，发现当归四逆汤能够回调 CIA 大鼠尿液中牛磺酸、甜菜碱和丙酮酸等 7 个生物标志物水平，表明当归四逆汤可介导氨基酸代谢，恢复肠道微生物代谢平衡，抑制脂质过氧化从而减轻软骨损伤。这与网络药理学的分析结果部分一致，表明将代谢组学结合网络药理学的方法对中药药效机制的预测和研究具有一定的可信度。

2.3.6　秦艽地黄通痹汤　秦艽地黄通痹汤以桂枝芍药知母汤和大秦艽汤为基础加减化裁而成，具有清热解毒凉血、化湿通络止痛的功效。刘欢欢等 [33] 对经秦艽地黄通痹汤治疗前后的 RA 患者的血清进行代谢组学分析，发现 RA 患者经治疗后，血清中 *D*- 甘露糖、棕榈酸和油酰磷酸胆碱等 6 种代谢物含量发生显著变化，并涉及 7 条代谢通路，其中与差异代谢物相关性最强的为半乳糖代谢，表明秦艽地黄通痹汤可以通过激活肝脏中的半乳糖代谢间接改善能量代谢，从而治疗 RA 活动期湿热蕴毒症。

2.3.7　清络饮　清络饮以苦参、青风藤等寒凉药

物组方而成，可有效抑制滑膜血管新生，减少关节腔积液。殷丽茹[34]采用 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢研究发现 RA 患者在给药后血清中 29 种代谢物发生了显著变化，这些代谢物主要通过影响甘油磷脂代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢等途径调节机体免疫、缓解关节疼痛，进而起到治疗 RA 的作用。

2.3.8 甘草附子汤 甘草附子汤具有温阳散寒、祛湿止痛的功效，为临床上治疗风湿之良方。刘媛媛[35]基于大鼠尿液代谢组共检测鉴定出 26 个与 RA 相关的潜在生物标志物，这些潜在标志物主要涉及色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、亚牛磺酸和牛磺酸代谢、TCA 循环等代谢途径。并且甘草附子汤中生物碱组分及其与黄酮、皂苷组分配伍后，均可对这些生物标志物进行不同程度的调节，这表明甘草附子汤可通过调节机体免疫、改善大鼠肠内菌群结构发挥治疗 RA 的作用。

2.3.9 芍甘附子汤 芍甘附子汤由白芍、炙甘草和炮附子 3 味中药组方而成，具有温经通络、和营止痛、强筋健骨的功效。赵一颖等[36]基于血清代谢组学检测发现，芍甘附子汤可以通过调控组氨酸代谢通路中组氨酸脱羧酶等基因，上调 CIA 大鼠血清中组胺含量，促进抗炎细胞因子分泌；还可以调控甘油磷脂代谢减少磷脂酰胆碱（PC）、LPC 等含量，下调内皮细胞炎症趋化因子的表达，改善大鼠关节炎症及足跖肿胀度发挥治疗 RA 的作用。

2.3.10 二妙散、三妙丸和四妙丸 二妙散记载于《丹溪心法》，其中黄柏清热，苍术燥湿，用于治疗风湿痹痛效果显著，徐红丹等[37]研究发现，二妙散可通过调节花生四烯酸代谢，抑制促炎脂质释放、促进抗炎介质产生，并通过调节亚油酸和鞘脂代谢减轻 RA 大鼠的炎性肿胀，抑制关节炎症发生。三妙丸在前者基础上增加牛膝，可补肝肾、强筋骨，引药下行。石爱华等[38]发现，RA 大鼠经三妙丸干预后，血清中 *L*- 苏氨酸、*L*- 天冬氨酸等浓度降低，胆固醇含量增加，表明三妙丸可以通过增强免疫、抑制细胞因子增殖、恢复胆固醇的合成和运转等，发挥防治 RA 的作用。四妙丸在三妙丸基础上又加入薏苡仁，祛湿热、通筋利痹力道更强。Wang 等[9]研究发现，四妙丸可通过降低 RA 大鼠血浆中支链氨基酸水平，抑制关节胶原蛋白降解、保护关节软骨，并使亚油酸、油酸含等脂肪酸水平升高，进而抑制花生四烯酸代谢，减轻炎症反应。

3 结语与展望

RA 是一种发病机制复杂的自身免疫性疾病，经多项研究发现，RA 发病会导致机体内色氨酸、苯丙氨酸、丙酮酸、花生四烯酸、胆固醇等代谢物发生变化，并涉及氨基酸代谢、能量代谢、脂质代谢等途径。中药及民族药可对以上代谢途径进行调控：改善氨基酸分解代谢异常，恢复机体免疫平衡；抑制 RA 机体糖酵解活性，改善关节滑膜酸性和缺氧微环境，减轻炎症反应，延缓骨破坏；维持机体脂质代谢平衡，从而抑制炎症细胞的浸润，缓解关节肿胀；此外，还能够通过减少机体关节处尿酸沉积，逆转嘌呤代谢异常，恢复肠道菌群稳态等，进而改善 RA 病情。由此发现，基于 LC-MS、GC-MS、NMR 等技术的代谢组学是临床诊断 RA、阐释中药及民族药治疗 RA 机制的有力工具。

然而，代谢组学应用于中药及民族药药效机制的研究仍存在许多问题和不足。现阶段代谢组学技术存在着前期处理烦琐、对低丰度代谢物敏感度较低、数据库尚不健全等局限性；其模型的差异对相关代谢物影响较大，进一步筛选得到的生物标志物和代谢通路较少，难以通过几个生物标志物作为潜在生物标志物为 RA 的诊断和治疗提供依据；同时代谢组学筛选得到的生物标志物特异性较低，容易受到遗传、环境等因素影响，仍需进一步验证。因此，未来在代谢组学分析检测和数据处理技术方面还需进一步完善。针对这些问题和不足，近年来，将代谢组学与转录组学、基因组学、蛋白质组学等技术结合的新方法，可有效减少干扰因素，提高数据的多样性和准确性；同时研究代谢物变化与肠道微生物和免疫调节的相互作用也成为一个新的方向。因此代谢组学可与其他学科结合，为临床上 RA 的治疗提供更多的可能和依据。

参考文献

[1] Sharif K，Sharif A，Jumah F，et al. Rheumatoid arthritis in review：clinical，anatomical，cellular and molecular points of view [J]. Clin Anat，2018，31（2）：216-223.

[2] 周胜利，周奕璇 . 中医辨证治疗类风湿关节炎的临床研究进展 [J]. 中医药临床杂志，2019，31（11）：2035-2038.

[3] 王杰，隗鑫，陈威，等 . 代谢组学技术在中药复方配伍规律研究中的应用 [J]. 中草药，2022，53（5）：1528-1539.

[4] Li J，Che N，Xu LX，et al. LC-MS-based serum metabolomics reveals a distinctive signature in patients with rheumatoid arthritis [J]. Clin Rheumatol，2018，37（6）：1493-1502.

[5] 蒋思思 . 基于代谢组学的维药刺山柑抗类风湿性关节炎有效性评价及作用机制研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，

2015.
[6] Yang YY，Wei JY，Li JC，et al. Lipid metabolism in cartilage and its diseases：a concise review of the research progress [J]. Acta Bioch Bioph Sin，2021，53（5）：517-527.
[7] Bitnara L，Sungsin J，Sung-min K，et al. Poly-γ-glutamic acid suppresses osteoclastogenesis in human osteoclast precursors and prevents joint damage in a collagen-induced murine arthritis model [J]. Immunol Lett，2018，203：80-86.
[8] Brouwers H，Hegedus JV，Tose R，et al. Lipid mediators of inflammation in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Best Pract Res Clin Rh，2015，29（6）：741-755.
[9] Wang YM，Guo XJ，Xie JB，et al. A GC-MS based metabolomics study of rheumatoid arthritis and the interventional effects of the Simiaowan in rats [J]. Molecules，2015，20（12）：21364-21372.
[10] Sun Y，Ishibashi M，Seimon T，et al. Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K [J]. Circ Res，2009，104（4）：455-465.
[11] Luan HM，Gu WJ，Li H，et al. Serum metabolomic and lipidomic profiling identifies diagnostic biomarkers for seropositive and seronegative rheumatoid arthritis patients [J]. J Transl Med，2021，19（1）：500.
[12] Shan JJ，Peng LX，Qian WJ，et al. Integrated serum and fecal metabolomics study of collagen-induced arthritis rats and the therapeutic effects of the Zushima tablet [J]. Front Pharmacol，2018，9：891.
[13] Garcia-carbonell R，Divakaruni AS，Lodi A，et al. Critical role of glucose metabolism in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Arthritis Rheumatol，2016，68（7）：1614-1626.
[14] Yun XM，Dong S，Hu QQ，et al. ^{1}H NMR-based metabolomics approach to investigate the urine samples of collagen-induced arthritis rats and the intervention of tetrandrine [J]. J Pharm Biomed Anal，2018，154：302-311.
[15] 徐依依 . 基于苍术燥性对 RA 药效学及代谢组学研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2020.
[16] 占翔 . 微透析技术结合代谢组学探讨栀子苷干预佐剂性关节炎大鼠代谢紊乱的机制 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2020.
[17] 赵传怡 . 牛白藤中龙胆苦苷治疗类风湿关节炎及其代谢组学研究 [D]. 汕头：汕头大学，2021.
[18] 张衡，吴虹，卜妍红，等 . 微透析结合代谢组学探究佐剂性关节炎大鼠的代谢扰动及牛膝总皂苷的干预作用 [J]. 中国药理学通报，2021，37（6）：877-884.
[19] 柳清，汪永忠，姜辉，等 . 基于 GC-TOF-MS 研究威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎大鼠血清代谢谱的影响 [J]. 中国中药杂志，2016，41（12）：2321-2328.
[20] Li R，Guo LX，Li Y，et al. Dose-response characteristics of clematis triterpenoid saponins and clematichinenoside AR in rheumatoid arthritis rats by liquid chromatography/mass spectrometry-based serum and urine metabolomics [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，136：81-91.
[21] 唐策，干志强，罗世英，等 . 基于血清代谢组学的藏族药翼首草提取物治疗类风湿性关节炎的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47（4）：1001-1008.
[22] 张北雪 . 五种“术”类健脾和抗风湿的药效学和代谢组学研究 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2020.
[23] 许丹 . 类叶牡丹有效部位干预胶原诱导型关节炎大鼠的代谢组学研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2018.
[24] Xu TF，Feng GF，Zhao B，et al. A non-target urinary and serum metabolomics strategy reveals therapeutical mechanism of Radix Astragali on adjuvant-induced arthritis rats [J]. J Chromatogr B，2017，1048：94-101.
[25] Jin H，Ma NN，Li X，et al. Application of GC/MS-based metabonomic profiling in studying the therapeutic effects of aconitum carmichaeli with ampelopsis japonica extract on collagen-induced arthritis in rats [J]. Molecules，2019，24（10）：1934.
[26] Xu T，Liu S，Zhao J，et al. A study on the effective substance of the Wu-tou formula based on the metabonomic method using UPLC-Q-TOF-HDMS [J]. Mol Biosyst，2015，11（11）：3081-3091.
[27] 彭琳秀，陈良慧，狄留庆，等 . 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术的复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学研究 [J]. 中草药，2017，48（10）：1964-1970.
[28] 彭琳秀，单进军，钱文娟，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的类风湿性关节炎大鼠脂质代谢紊乱及祖师麻片的干预作用研究 [J]. 中草药，2018，49（18）：4356-4365.
[29] 程增玉，徐浩东，姜雯，等 . 类风湿关节炎滑膜微环境的中医属性及治则探讨 [J]. 现代中西医结合杂志，2022，31（6）：843-847，858.
[30] 章华伟 . 黄连解毒汤治疗类风湿性关节炎的代谢组学研究 [D]. 福州：福建中医药大学，2013.
[31] 赵玲 . 黄连解毒汤防治类风湿性关节炎的代谢组学研究 [D]. 长春：吉林农业大学，2012.
[32] 程邦 . 基于代谢组学和网络药理学的当归四逆汤干预类风湿性关节炎疾病的机制研究 [D]. 南宁：广西医科大学，2018.
[33] 刘欢欢，刘史佳，汪悦，等 . 秦艽地黄通痹汤治疗类风湿关节炎活动期湿热蕴毒证患者血清代谢组学研究 [J]. 中医杂志，2022，63（3）：245-250.
[34] 殷丽茹 . 清络饮治疗活动期类风湿性关节炎（湿热痹阻证）的临床观察及代谢组学研究 [D]. 芜湖：皖南医学院，2018.
[35] 刘媛媛 . 甘草附子汤治疗风湿病药效学及代谢组学的研究 [D]. 长春：吉林大学，2016.
[36] 赵一颖，董琳琳，丰晨然，等 . 基于血清代谢组学的芍甘附子汤治疗类风湿关节炎作用机制研究 [J]. 中南药学，2022，20（9）：2059-2067.
[37] 徐红丹，张博，姚远，等 . 基于尿液代谢组学技术的二妙散抗类风湿关节炎作用机制研究 [J]. 国际中医中药杂志，2019，41（8）：852-857.
[38] 石爱华，李艳，王昕，等 . 基于血液代谢组学技术的三妙丸抗类风湿关节炎作用机制研究 [J]. 国际中医中药杂志，2020，42（4）：359-360.

（收稿日期：2022-08-11；修回日期：2022-09-06）

药物分析与检验

高效液相色谱法测定司美格鲁肽原料药中游离脂肪酸侧链的含量

杨庆[1]，马鲁南[1]，刘忠[1]，曹宇[1]，张贵民[2*]（1.山东新时代药业有限公司，山东省蛋白类药物工程实验室，山东 临沂 273400；2.鲁南制药集团股份有限公司，哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东 临沂 276006）

摘要：目的 建立高效液相色谱法检测司美格鲁肽原料药中的游离脂肪酸侧链 [（*S*）-9，18，23- 三氧代 -2，5，11，14- 四氧杂 -8，17，22- 三氮杂三十九烷 -1，21，39- 三羧酸] 的含量。**方法** 采用 Kinetex C8（4.6 mm×150 mm，2.6 μm）色谱柱；流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸 - 水溶液；流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸 - 乙腈溶液；洗脱梯度（0 min，30%B；20 min，70%B；21 min，30%B；30 min，30%B），流速 0.7 mL • min^{-1}；柱温 35 ℃；检测波长 210 nm。考察方法的专属性、线性范围、定量限与检测限、准确度和耐用性等。采用该方法检测 3 批司美格鲁肽原料药中的游离脂肪酸侧链含量。**结果** 脂肪酸侧链与司美格鲁肽的分离度为 4.05，在 1.00 ～ 50.15 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，回归方程为 $Y = 0.2584X - 0.0936$，$R^2 = 0.9999$；检测限和定量限分别为 0.392 μg • mL^{-1} 和 0.784 μg • mL^{-1}。**结论** 建立的方法具有良好的专属性和准确度，可用于司美格鲁肽原料药中游离脂肪酸侧链含量的测定。

关键词：高效液相色谱法；司美格鲁肽；游离脂肪酸侧链

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0199-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.031

Content determination of free aliphatic side-chain in semaglutide by high performance liquid chromatography

YANG Qing[1], MA Lu-nan[1], LIU Zhong[1], CAO Yu[1], ZHANG Gui-min[2*] (1. *Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Shandong Engineering Laboratory of Protein Pharmaceutics, Linyi Shandong* 273400; 2. *Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., State Engineering Laboratory of High Expression of Mammalian Cells, Linyi Shandong* 276006)

Abstract: Objective To determine the content of free aliphatic side-chain [(*S*)-9, 18, 23-trioxo-2, 5, 11, 14-tetraoxa-8, 17, 22-triazanonatriacontane-1, 21, 39-tricarboxylic acid] in semaglutide by HPLC. **Methods** Kinetex C8 column (4.6 mm×150 mm, 2.6 μm) was used. Mobile phase A was water with 0.1% TFA and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% TFA, with gradient elution (0 min, 30%B; 20 min, 70%B; 21 min, 30%B; and 30 min, 30%B). The flow rate was 0.7 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 210 nm; the column temperature was 35 ℃ . The established method was verified its for specificity, linearity, detection limit, quantitative limit, accuracy and durability. The method was used to detect the content of free aliphatic side-chain in three batches of semaglutide. **Results** The resolution between the aliphatic side-chain peak and semaglutide peak was 4.05. The content of aliphatic side-chain at 1.00 ～ 50.15 μg • mL^{-1} showed good linearity with the peak area, and the regression equation was $Y = 0.2584X - 0.0936$, with R^2 of 0.9999. The detection limit and quanti

基金项目：泰山产业领军人才工程（No.2018TSCYCX-30，No.tscy20200329）。

作者简介：杨庆，男，主要从事生物制品的质量研究工作，email：me-yq@163.com *通信作者：张贵民，男，主要从事中药、化药及生物制品的研究开发与生产工作，email：lnzhangguimin@163.com

fication limit were 0.392 μg • mL^{-1} and 0.784 μg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The established method shows high specificity and accuracy, which can be used for the determination of free aliphatic side-chain content in semaglutide.

Key words: high performance liquid chromatography; semaglutide; free aliphatic side-chain

司美格鲁肽注射液是丹麦诺和诺德公司研发的一种长效胰高血糖素样肽 -1（glucagon-like peptide-1，GLP-1）类似物，其作用机制是激活胰岛素受体，促进胰岛素分泌，减少胰高血糖素分泌，主要应用于 2 型糖尿病的治疗，也有研究显示可以用于肥胖的控制 [1-5]。司美格鲁肽在结构上将 GLP-1（7-37）第 8 位的丙氨酸替换为 *α*- 氨基异丁酸，第 34 位的赖氨酸替换为精氨酸，在肽链第 26 位的赖氨酸上酰化修饰了一个脂肪酸侧链 [6]。经过这些改进后不但可以掩盖二肽基肽酶（DPP-4）的水解位点，而且能与白蛋白紧密结合，降低肾排泄，延长半衰期 [7]。

司美格鲁肽的制备方法主要分为生物发酵法和固相合成法，其中生物发酵法中的肽链是由酵母发酵产生，然后在肽链第 26 位的赖氨酸上酰化修饰了一个脂肪酸侧链，该侧链结构中包含 2 个 8- 氨基 -3，6- 二氧杂辛酸基团，1 个 *γ*- 谷氨酸基团，1 个 1，18- 十八烷脂肪二酸 [8]。在司美格鲁肽酰化修饰反应过程中，加入了过量的脂肪酸侧链，后续工艺过程中未完全去除的侧链将会残留在司美格鲁肽原料药中，成为一个工艺杂质。目前，该工艺杂质的毒理学作用尚不明确，因此有必要对其进行深入研究，并对其在产品中的残留量进行控制。

有文献报道采用电喷雾检测器检测利拉鲁肽中游离棕榈酸侧链的含量 [9]，而司美格鲁肽中游离侧链的检测方法未见相关报道。本文根据司美格鲁肽侧链的性质，采用紫外检测器，建立了司美格鲁肽原料药中游离脂肪酸侧链的检测方法，并进行了全面的验证。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U3000 高效液相色谱仪 [美国 Thermo Fisher 公司，配有四元泵（LPG-3400DN）、自动进样器（WPS-3000TSL）、柱温箱（TCC-3000RS）、紫外检测器（VWD-3100）]；XS105DU 分析天平（美国 Mettler Toledo 公司）。

1.2 试药

脂肪酸侧链对照品 [（*S*）-9，18，23- 三氧代 -2，5，11，14- 四氧杂 -8，17，22- 三氮杂三十九烷 -1，21，39- 三羧酸，纯度：99.5%，批号：YM2112001130001，厦门赛诺邦格有限公司]；司美格鲁肽原料药（批号：F027211201、批号：F027211202、批号：F027211203，山东新时代药业有限公司）；三氟乙酸、乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；磷酸二氢钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取脂肪酸侧链 10.06 mg，置于 100 mL 量瓶中，用 0.02 mol • L^{-1} 的磷酸二氢钠溶液（简称稀释液）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 2.5 mL，置于 50 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 精密称取司美格鲁肽原料药约 50.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，用稀释液溶解并稀释至刻度，摇匀，制成每 1 mL 中约含 2.0 mg 的溶液，作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

采 用 Kinetex C8（4.6 mm×150 mm，2.6 μm）色谱柱；流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸 - 水溶液；流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸 - 乙腈溶液；洗脱梯度（0 min，30%B；20 min，70%B；21 min，30%B；30 min，30%B），流速 0.7 mL • min^{-1}；柱温 35 ℃；检测波长：210 nm；进样量 50 μL。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性试验 取对照品储备液 2.5 mL，置于 50 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，制成每 1 mL 中约含 5 μg 的溶液，作为系统适用性溶液，连续测定 5 次，记录主峰保留时间和峰面积，并计算其 *RSD*。结果显示主峰保留时间的 *RSD* 为 0.090%，峰面积的 *RSD* 为 0.12%。

2.3.2 专属性试验 将供试品溶液与对照品溶液等体积混合作为专属性溶液。分别取稀释液、对照品溶液和专属性溶液适量，进样测定，记录色谱图。由图 1 结果可知，脂肪酸侧链保留时间约为 10.8 min，对称性良好，拖尾因子为 0.96，侧链峰与司美格鲁肽峰之间的分离度为 4.05，空白溶剂对脂肪酸侧链测定无干扰。

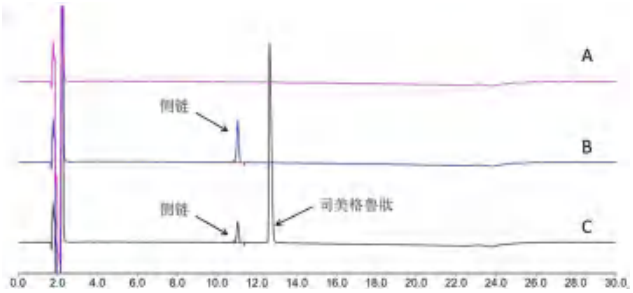


图 1　专属性试验色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of specificity test

A. 空白溶液（blank solution）；B. 对照品溶液（control solution）；C. 专属性溶液（specific solution）

2.3.3　线性关系考察　精密量取对照品储备液适量，分别置于 10 mL 量瓶中，加稀释液稀释至刻度，摇匀，得到质量浓度分别为 50.15、20.06、10.03、5.01 和 1.00 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，进样测定，记录色谱图。以对照品质量浓度 *X*（μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，进行线性回归。结果显示，对照品在 1.00 ～ 50.15 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，回归方程为 $Y = 0.2584X - 0.0936$，$R^2 = 0.9999$。

2.3.4　定量限与检测限　取对照品储备液适量，用稀释液逐步稀释后进样分析，记录主峰的信噪比（*S/N*）。当 *S/N* 约为 3 时检测限为 0.392 μg•mL^{-1}，*S/N* 约为 10 时定量限为 0.784 μg•mL^{-1}。

2.3.5　重复性　精密称取司美格鲁肽原料药 200 mg，置于 100 mL 量瓶中，加稀释液溶解并定容至刻度，作为供试品储备液。精密量取供试品储备液 5 mL 和对照品储备液 0.5 mL，置于 10 mL 量瓶中，加稀释液稀释至刻度，摇匀，即得重复性试验用供试品溶液，平行配制 6 份。按“2.2”项下色谱条件进样测定，结果显示，脂肪酸侧链含量的 *RSD* 为 0.9%，表明方法的重复性良好。

2.3.6　中间精密度　精密称取司美格鲁肽原料药适量，用稀释液溶解并配制成约 2.0 mg • mL^{-1} 的司美格鲁肽样品溶液；精密量取对照品储备液 10 mL，置于 100 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。取司美格鲁肽样品溶液和对照品溶液等体积混合，作为中间精密度供试品溶液，平行配制 6 份，进样测定，记录峰面积，按外标法计算供试品中脂肪酸侧链的含量。由另一名实验人员于不同时间采用不同仪器重复以上实验，结果显示，两名实验人员侧链含量测定结果的 *RSD* 为 1.3%，表明方法的中间精密度良好。

2.3.7　准确度　精密称取司美格鲁肽原料药（批号：F027211201）适量，用稀释液溶解，制成每 1 mL 约含 2.0 mg 的供试品溶液。取供试品溶液 7 mL，置于 10 mL 量瓶中，分别加入对照品储备液 2.0、1.0、0.5 mL，用稀释液稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度约为 20、10 和 5 μg • mL^{-1} 的加样回收率样品，每个浓度平行配制 3 次，依法测定。结果脂肪酸侧链在不同浓度水平下的回收率均在 97.33% ～ 99.75%，*RSD* 均在 0.36% ～ 1.1%，表明方法的准确度良好。

2.3.8　溶液稳定性　取司美格鲁肽原料药（批号：F027211201）供试品溶液，加入侧链对照品储备液适量，制成含侧链约为 5.0 μg • mL^{-1} 的供试品溶液，置于 2 ～ 8 ℃条件下，在 0、3、6、9 和 12 h 时进样测定。结果显示，在 12 h 内供试品溶液中脂肪酸侧链峰面积的 *RSD* 为 0.82%，表明在 12 h 内样品溶液稳定。

2.3.9　耐用性　精密称取司美格鲁肽原料药适量，用稀释液溶解并配制成约 2.0 mg • mL^{-1} 的司美格鲁肽样品溶液；精密量取对照品储备液 10 mL，置于 100 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。取司美格鲁肽样品溶液和对照品溶液等体积混合，作为耐用性供试品溶液，同时按照“2.1.1”项下方法配制一份对照品溶液。依次改变色谱条件（不同批次色谱柱、流速 ±0.1 mL • min^{-1}、柱温 ±5 ℃和三氟乙酸含量 ±0.01%），记录脂肪酸侧链含量检测结果，计算不同色谱条件下检测结果的 *RSD*。结果显示，在色谱条件发生微小变化时，耐用性供试品溶液中脂肪酸侧链含量检测结果的 *RSD* 为 1.1%，表明此方法耐用性良好。

2.4　样品测定

取 3 批司美格鲁肽原料药（批号：F027211201、F027211202 和 F027211203），按“2.2”项下色谱条件进样分析，计算样品中游离脂肪酸侧链的含量。检测结果显示，3 批司美格鲁肽原料药中均未检出游离脂肪酸侧链。

目前，该脂肪酸侧链的毒理学作用尚不明确，也未被国内外药典所收载。参考 ICH M7（R1）指导原则 [10]，对于治疗期在 1 ～ 10 年的药物，其单个杂质的可接受摄入量为 10 μg • d^{-1}，结合司美格鲁肽的临床给药方案，每日最大剂量为 2 mg，依此推算，初步确定该杂质的限度为 5 μg • mg^{-1}。下一步还需对脂肪酸侧链的毒理作用进行研究，并以此为基础建立更为科学合理的限度标准。

3 讨论

本研究采用乙腈-水体系（含0.1%三氟乙酸）作为流动相，调整方法的洗脱梯度，分别考察了 Phenomenex Kinetex C8（4.6 mm×150 mm，2.6 μm）和 Phenomenex Luna C8（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱对样品的分离效果。结果显示，Luna C8 色谱柱未能将侧链和司美格鲁肽完全分离（分离度小于 1.5）；Kinetex C8 色谱柱可以实现侧链和司美格鲁肽的基线分离（分离度大于 3.0）。Kinetex C8 柱为核壳型色谱柱，采用表面多孔型填料，可以减小涡流扩散，降低峰展宽，尤其适用于生物大分子的分离[11]。经全波长扫描发现脂肪酸侧链的最大吸收波长在 210 nm 左右，故选择 210 nm 作为方法的采集波长。对进样体积进行考察，当进样量为 20 μL 时，方法的定量限不能满足限度要求，当进样量增加到 50 μL 时，可以满足检测要求。此外还考察了柱温对分离效果的影响，结果发现，柱温对样品的分离效果影响较小。综合考虑以上因素确定了最终的检测方法，并对其进行了较全面的方法学验证。经验证，本方法具有专属性强、灵敏度高、准确性好等特点，可以用来检测司美格鲁肽原料药中游离脂肪酸侧链的含量。

参考文献

[1] Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1[J]. Physiol Rev，2007，87（4）：1409-1439.

[2] Tasyurek HM，Altunbas HA，Balci MK，et al. Incretins：their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus [J]. Diabetes Metab Res Rev，2014，30（5）：354-371.

[3] Singh G，Krauthamer M，Bjalme-Evans M. Wegovy（semaglutide）：a new weight loss drug for chronic weight management [J]. Investig Med，2022，70（1）：5-13.

[4] Wilding JPH，Batterham RL，Calanna S，et al. Once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity [J]. N Engl J Med，2021，384（11）：989.

[5] 董文彬，文婷婷，王文波，等 . 胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂抗脑缺血损伤作用研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（12）：2019-2026.

[6] Knudsen LB，Lau J. The discovery and development of liraglutide and semaglutide [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2019，10：155.

[7] Christou GA，Katsiki N，Blundell J，et al. Semaglutide as a promising antiobesity drug [J]. Obes Rev，2019，20（6）：805-815.

[8] Lau J，Bloch P，Schaffer L，et al. Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide（GLP-1）analogue semaglutide [J]. J Med Chem，2015，58（18）：7370-7380.

[9] 张雷，陈友金，唐洋明，等 . 一种利拉鲁肽中游离棕榈酸的检测方法：中国，105717203 [P]. 2018-06-19

[10] ICH M7（R1）. Assessment and Control of DNA Reactive（Mutagenic）Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [S]. 2017.

[11] 夏红军，刘家玮，白泉 . 核壳型二氧化硅色谱填料的研究进展 [J]. 色谱，2020，38（4）：372-382.

（收稿日期：2022-06-30；修回日期：2022-08-26）

基于液相指纹图谱结合多成分含量测定的小儿肺热咳喘颗粒质量评价

倪文琳[1]，汤瑜晨[3]，韩玉涛[1]，胡云飞[2, 3*]（1.安徽省铜陵市妇幼保健院，安徽　铜陵　244000；2.亳州学院中药学院，安徽　亳州　236800；3.天津中医药大学中药制药工程学院，天津　300193）

摘要：目的　采用指纹图谱结合多组分含量测定方法对市售小儿肺热咳喘颗粒进行质量评价。**方法**　采用 Waters Sunfire C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）以乙腈 -0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱，流速 1.0 mL•min^{-1}；柱温 55 ℃；检测波长 254 nm。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》对 24 批小儿肺热咳喘颗粒样品进行相似度评价，确定共有峰，使用 SIMCA-P（V 14.1）软件对 24 批样品数据进行偏最小二乘判别分析（PLS-DA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）。**结果**　不同厂家小儿肺热咳喘颗粒指纹图谱上存在差异，总体相似度 0.889 ～ 0.985。采用 PLS-DA、OPLS-DA 可明显区分，8 种组分平均加样回收率在 95.57% ～ 103.97%，*RSD* 在 1.0% ～ 2.7%。**结论**　指纹图谱结合多组分含量测定可用来评价不同来源小儿肺热咳喘颗粒质量，方法准确可靠，重现性良好，可为一致性评价与生产工艺均一性研究提供理论依据。

关键词：小儿肺热咳喘颗粒；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定

中图分类号：R286.2，O657.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0203-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.032

Quality evaluation of Xiaoer Feire Kechuan granules based on liquid fingerprint combined with multi-component content determination

NI Wen-lin[1], TANG Yu-chen[3], HAN Yu-tao[1], HU Yun-fei[2, 3*] (1. *Tongling Maternal and Child Health Hospital*, *Tongling Anhui* 244000; 2. *School of Chinese Medicine*, *Bozhou University, Bozhou Anhui* 236800; 3. *College of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 300193)

Abstract: Objective To evaluate the quality of Xiaoer Feire Kechuan granules by fingerprint and multi-component content determination. **Methods** Waters Sunfire C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Gradient elution was performed with acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 55 ℃; and the detection wavelength was 254 nm. The similarity evaluation system of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition) was used to evaluate the similarity of 24 batches of test granules to determine the common peaks. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were performed on 24 batches of sample data with SIMCA-P (V 14.1) software. **Results** There were differences in the fingerprints of granules from different manufacturers, and the overall similarity was 0.889 ～ 0.985. PLS-DA and OPLS-DA clearly distinguished the difference, and the average recoveries were 95.57% ～ 103.97%, with *RSD* of 1.0% ～ 2.7%. **Conclusion** Fingerprint combined with multi-component content determination can be used to evaluate the quality of Xiaoer Feire Kechuan granules from different sources. The method is accurate, reliable and reproducible, which provides theoretical basis for the consistency evaluation and uniformity of production.

Key words: Xiaoer Feire Kechuan granule; high performance liquid chromatography; fingerprint; content determination

基金项目：河北省重点研发计划项目（No.21372503D）。

作者简介：倪文琳，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：814034572@qq.com　*通信作者：胡云飞，男，在读博士研究生，主管中药师，主要从事中药评价与控制研究，email：cloudfly07@126.com

小儿肺热咳喘颗粒由麻黄、苦杏仁、金银花、板蓝根、连翘、甘草、知母、鱼腥草、黄芩、麦冬、生石膏组成，具有清热解毒、散肺化痰的功效，用于发热、出汗、微邪风寒、黄痰、咳嗽[1]。该方是由经典方麻杏石甘汤、银翘散的加减研制而成的现代中药制剂，麻黄长于宣肺平喘；石膏长于清气分实热、清中有热，具有泄热生津的功效；苦杏仁具有降肺气，止咳喘的功效；甘草为佐使药，具有清热解毒，润肺止咳，调和药性之功效；诸药合用，共奏清热解毒、宣肺平喘、化痰止咳之效[2]。同时，小儿肺热咳喘颗粒属于多成分、多靶点组成的复杂体系[3]，其质量稳定性与一致性评价一直是制约其发展的关键问题。现行标准载于卫生部药品标准中药成方制剂 18 册[4]，仅有鉴别、检查项，已然无法满足小儿肺热咳喘颗粒的现代工艺与临床要求，亟待进行补充性质量评价体系研究。

近年来，随着中药质量评价体系的不断发展，指纹图谱、特征图谱等技术得到了广泛运用，特别是指纹图谱结合多组分含量测定解决了中药整体性与特异性、准确性与模糊性等问题，能够全面评价中药的药效物质基础，已成为中药质量评价的常用手段。化学计量学凭借其丰富的数学建模方法以及开源的程序编辑，将中药的复杂成分通过色谱、光谱、质谱等分析手段转化成多维分析数据[5]。通过数据建模、判别分析等一系列方法深入挖掘有效数据信息，找出相关性。近年来，该方法在中成药十三味和中丸[6]、甘草泻心汤[7]，中药材陈皮[8]、川射干[9]、白芍[10]等中得到很好应用。

本试验采用 HPLC 法建立 24 批小儿肺热咳喘颗粒指纹图谱，对绿原酸、芒果苷、苦杏仁苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸等 8 个指标成分进行含量测定。在此基础上，采用主成分分析、偏最小二乘法 - 判别分析法（PLS-DA）以及正交偏最小二乘法 - 判别分析法（OPLS-DA）进行分析，以期为小儿肺热咳喘颗粒的质量评价提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC 2030C 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；AX523ZH 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司，精度：0.1 mg）；ME55 型分析天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司，精度：0.01 mg）；1598441 型超声清洗器（合肥金尼克机械制造有限公司）；XMTD-7000 型电热恒温水浴锅（上海科恒实业发展有限公司）；DZF-6020 型真空干燥箱；HWS-28 型水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；A11 型粉碎机（德国 IKA 公司）。

1.2　试药

异绿原酸 C（批号：110753-201817，纯度：96.80%）、汉黄芩苷（批号：MUST-21120601，纯度：99.06%）、苦杏仁苷（批号：MUST-21052507，纯度：99.20%）（成都曼斯特生物科技有限公司）；绿原酸（批号：110753-200413，纯度：98.80%）、芒果苷（批号：111607-201503，纯度：98.40%）、连翘酯苷 A（批号：111810-201707，纯度：97.20%）、黄芩苷（批号：110715-201619，纯度：93.50%）、甘草酸铵（批号：110731-201317，纯度：92.60%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈均为色谱纯（美国 Thermo 公司）；磷酸为分析纯（天津市大茂化学试剂厂）；水为纯净水（杭州娃哈哈集团公司）。

24 批样品购自于安徽合肥、铜陵零售药店及电商平台采购。信息见表 1。

表 1　样品信息

Tab 1　Information of samples

厂家	编号	批号	规格 /（g/ 袋）	厂家	编号	批号	规格 /（g/ 袋）
A	A-001	20211118	3	C	C-001	20211005	4
A	A-002	20210834	3	C	C-002	20212011	4
A	A-003	20211117	3	C	C-003	20215443	4
A	A-004	20210012	3	C	C-004	20216651	4
A	A-005	20216542	3	D	D-001	210610	4
A	A-006	20211111	3	D	D-002	211112	4
B	B-001	21111003	3	D	D-003	211065	4
B	B-002	21120133	3	D	D-004	211541	4
B	B-003	21103212	4	E	E-001	2101000	3
B	B-004	21153262	4	E	E-002	2100089	3
B	B-005	22114628	4	E	E-003	2111007	3
B	B-006	22113523	4	E	E-004	2001586	3

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　供试品溶液制备　取小儿肺热咳喘颗粒研磨成细粉（过 3 号筛），精密称取 0.20 g，置具塞锥形瓶中，加入 50% 甲醇 10 mL，超声提取 5 min，放冷后补重，经 0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.2　对照品溶液制备　分别精密称取绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸铵（甘草酸重量＝甘草酸铵重量 /1.0207）对照品适量，置 50 mL 量瓶中，加入 50% 甲醇，配制成质量浓度分别为 75、600、25、250、60、275、175、250 μg·mL^{-1} 的混合对照品储备液。

2.1.3　阴性样品溶液制备　按照小儿肺热咳喘颗粒处方及工艺制备缺主药的阴性样品，按照“2.1.1”项下方法制备缺主药的阴性样品溶液。

2.2　色谱条件

Waters Sunfire C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1% 磷酸（A）- 乙腈（B），梯度洗脱，洗脱程序见表 2；柱温 55 ℃；流速 1.0 mL·min^{-1}；波长 254 nm；进样量 10 μL。取阴性样品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液进样，色谱图见图 1。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution programs

时间 /min	乙腈 /%	时间 /min	乙腈 /%
0	5	70	15
8	5	80	16
12	5	85	22
16	6	104	29
25	7	121	35
40	13	127	42
43	14	137	100
67	15	140	100

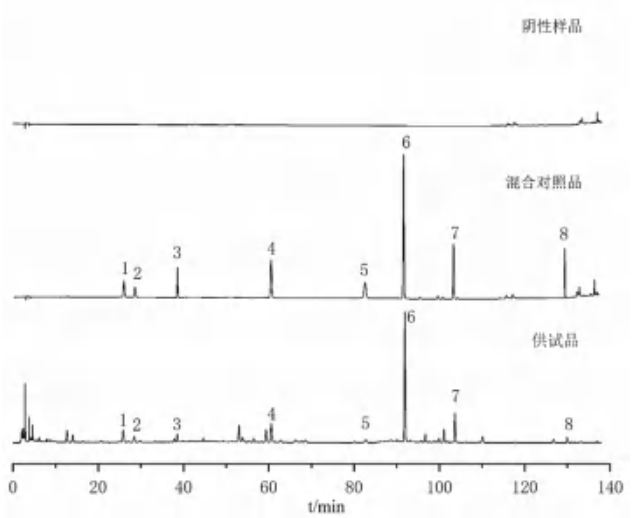


图 1　小儿肺热咳喘颗粒液相色谱图

Fig 1　HPLC of Xiaoer Feire Kechuan granules sample

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 苦杏仁苷（amygdalin）；3. 芒果苷（mangiferin）；4. 连翘酯苷 A（forsythin A）；5. 异绿原酸 C（isochlorogenic acid C）；6. 黄芩苷（baicalin）；7. 汉黄芩苷（wogonoside）；8. 甘草酸（glycyrrhizin）

2.3　方法学考察

2.3.1　线性范围考察　精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、10 mL，置 10 mL 量瓶中，用 50% 甲醇定容至 10 mL，混匀，得到一系列不同质量浓度的混合对照品溶液，进样测定，以峰面积为纵坐标，对照品质量浓度为横坐标进行回归。结果见表 3。

表 3　各成分线性关系

Tab 3　Linearity of various constituents

成分	回归方程	R^2	范围 /（μg·mL^{-1}）
绿原酸	$y = 7.242\times10^3x - 4.719\times10^3$	0.9997	7.5 ～ 75
苦杏仁苷	$y = 5.036\times10^2x + 1.419\times10^4$	0.9993	60 ～ 600
芒果苷	$y = 2.125\times10^4x + 1.005\times10^4$	0.9993	2.5 ～ 25
连翘酯苷 A	$y = 5.265\times10^3x - 1.132\times10^4$	0.9996	25 ～ 250
异绿原酸 C	$y = 5.985\times10^3x - 9.249\times10^3$	0.9997	6 ～ 60
黄芩苷	$y = 1.223\times10^4x - 1.583\times10^4$	0.9998	27.5 ～ 275
汉黄芩苷	$y = 7.908\times10^3x - 5.862\times10^3$	0.9995	17.5 ～ 175
甘草酸	$y = 2.820\times10^3x - 3.910\times10^3$	0.9995	25 ～ 250

2.3.2　精密度　精密称定 B-001 样品粉末约 0.20 g，按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液，连续进样 6 次，测得绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸的峰面积 *RSD* 分别为 1.4%、0.83%、0.49%、0.24%、0.51%、0.36%、0.43%、1.3%，表明仪器精密度良好。

2.3.3　稳定性　精密称定 B-001 样品粉末约 0.20 g，按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样测定，测得绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸的峰面积 *RSD* 分别为 0.91%、1.3%、1.5%、0.65%、0.64%、1.5%、0.39%、1.3%，表明该方法在 48 h 内稳定性较好。

2.3.4　重复性　取 6 份 B-001 样品粉末约 0.20 g，分别按“2.1.1”项下方法制备，进样测定，记录绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸的相对保留时间与峰面积，结果显示，相对保留时间 *RSD* 均小于 0.20%，峰面积 *RSD* 分别为 2.5%、1.6%、1.9%、1.0%、2.3%、1.4%、2.6%、1.3%，表明该方法重复性良好。

2.3.5　加样回收试验　取已知含量的样品 B-001 约 0.20 g，按照对照品量 - 样品中含量约 1∶1 的比例，加入对照品，平行制备 6 份样品溶液，进样测定，计算回收率。结果绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸的回收率分别为 96.65%、95.98%、96.79%、96.66%、103.97%、95.86%、95.57%、96.05%，*RSD* 分别为 1.6%、2.3%、1.0%、2.7%、2.1%、2.4%、1.7%、1.5%。

2.4　样品中各成分含量的测定

取 24 批小儿肺热咳喘颗粒样品约 0.20 g，按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，测定峰面积，采用外标法计算各化合物含量，结果见表 4。

表 4 各成分含有量测定结果 (n = 3，mg·g^{-1})

Tab 4 Content of various constituents (n = 3，mg·g^{-1})

编号	绿原酸	苦杏仁苷	芒果苷	连翘酯苷 A	异绿原酸 C	黄芩苷	汉黄芩苷	甘草酸
A-001	2.3162	19.9813	0.6587	1.7538	1.2918	12.9001	4.7233	2.2298
A-002	2.1955	17.7935	0.6461	1.7726	1.2991	11.7023	4.7755	2.2437
A-003	2.5045	21.3977	0.5502	1.2663	1.3136	15.8564	5.8948	1.9044
A-004	2.5815	23.2125	0.5469	1.2730	1.5214	16.3354	6.0504	1.9164
A-005	2.4346	19.0168	0.7700	1.8778	1.3682	12.9548	4.8781	2.2468
A-006	2.4262	19.0983	0.7927	1.9029	1.5070	12.2206	4.9596	2.2744
B-001	1.0060	7.4834	0.1162	2.1964	0.7199	4.0720	1.6554	0.4428
B-002	1.0451	8.0016	0.1135	2.2052	0.6963	4.1269	1.6690	0.5046
B-003	1.1235	7.8824	0.1202	2.1937	0.6948	4.4886	1.8316	0.4572
B-004	1.0910	7.9748	0.1201	2.2039	0.7402	4.5237	1.8555	0.4624
B-005	1.0068	7.1820	0.1143	2.2157	0.6731	4.0788	1.6658	0.4391
B-006	1.0451	7.6058	0.1162	2.2259	0.6913	4.1654	1.6825	0.4437
C-001	2.2461	20.8940	0.6330	2.1588	1.0540	14.9613	5.7074	2.2687
C-002	2.2204	21.0845	0.6535	2.2052	1.2194	15.4638	5.7953	2.3164
C-003	2.6886	23.7363	0.5180	1.2458	1.5264	13.4327	5.8179	2.5987
C-004	2.5985	21.5299	0.4864	1.4271	1.6839	13.8108	5.9322	2.6143
D-001	0.5305	5.1619	0.5954	1.3899	0.2440	10.9381	4.6091	1.6730
D-002	0.5317	5.1482	0.5990	1.3146	0.2769	11.4913	4.5957	1.1766
D-003	0.8594	6.1335	0.5383	1.2592	0.3995	8.0213	3.3082	1.8722
D-004	0.8482	6.4535	0.5700	1.2697	0.4273	8.2316	3.3651	1.7761
E-001	5.0459	30.0486	0.5632	10.5114	2.3050	19.5527	7.4500	2.7620
E-002	5.1378	30.6138	0.5728	10.6692	2.3329	19.7713	7.5357	3.0140
E-003	5.0510	29.9291	0.5402	10.5074	2.2314	20.0700	7.2346	2.7465
E-004	4.8949	29.0892	0.5039	10.4589	2.3198	19.3661	7.2061	2.9028

2.5 化学计量学分析

2.5.1 相似度分析 在小儿肺热咳喘颗粒的 24 批样品中，黄芩苷峰（6 号峰）峰面积大、分离度较好，为所有样品共有，确定为参考峰。将获得的小儿肺热咳喘颗粒液相色谱数据导入 2012 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件，建立小儿肺热咳喘颗粒的指纹图谱的共有模式图，确定了 29 个共有峰，并对 24 批样品图谱的相似度进行评估，不同厂家小儿肺热咳喘颗粒指纹图谱上存在差异，总体相似度 0.889 ～ 0.985，24 批样品液相图谱如图 2 所示。

2.5.2 多元数据分析 PLS-DA 通常用于多变量统计的判别分析[11]，为了区分和比较来源于 5 个厂家 24 批小儿肺热咳喘颗粒样品，筛选产生差异的主要化学成分，以指纹图谱中 243 个峰面积为变量，采用 SIMCA-P（V 14.1）软件进行 PLS-DA 分析。从图 3 可以看出，来自不同厂家的小儿肺热咳喘颗粒样品存在一定的差异，其中来源于 A 厂家的样品均分布在 Y 轴中心的右侧，B、E 厂家的样品均聚集在 X 轴附近，D 厂家的样品分布在 X 与 Y 轴中心附近，C 厂家的样品分布在 Y 轴的上方。从 95% 置信区间来看，24 批样品区分程度明显。

OPLS-DA 是在 PLS-DA 的基础上，通过一定的变换得到的分析方法[12-13]。与 PLS-DA 相比，OPLS-DA 将 X 变量中的系统标量分为两部分（Y 正交和同 Y 线性相关），提高了模型的解析能力和有效性，可增加组间差异信息。将小儿肺热热咳喘颗粒样品按厂家分类后进行 OPLS-DA 分析，并优化分析结果，发现使用 5 个主成分时所得 OPLS-DA 结果最好，不同厂家该样品聚类趋势明显，相同厂家不同批次的样品有所差异，也可聚为一类。不同厂家样品 OPLS-DA 的分类变量 Y 的解释程度参数（R^2Y）为 0.981，模型预测参数（Q^2）为 0.677，数值均大于 0.5，代表该模型的拟合效果和预测能力较好，见图 4。

使用 SIMCA-P（V 14.1）软件得到不同厂家的小儿肺热咳喘颗粒 OPLS-DA 的 VIP 值条形图。通过 VIP 值可以分析和筛选影响小儿肺热咳喘颗粒样品成分差异的主要成分，VIP 值越大表明该成分对不同厂家产生的差异贡献越大，如图 5 所示，以 VIP ＞ 1 为筛选标准，一共筛选出 34 个成分，是区分不同厂家样品间的主要差异性成分。由图 5 可知，不同厂家小儿肺热咳喘颗粒判别分析 VIP 值中，结合本试验 8 个成分，其中保留时间为 38.58 min（111 号峰芒果苷），91.93 min（184 号峰黄芩苷），103.70 min（204 号峰汉黄芩苷），129 min（227 号峰甘草酸）4 个峰可考虑作为小儿肺热咳喘颗粒质量评价的指标性成分，这也与小儿肺热咳喘颗粒相关文献报道相吻合[14-16]。

3 讨论与结论

3.1 提取方法考察

本研究考察了提取方式、提取时间、提取溶剂对提取效果的影响，根据色谱峰的数量、峰形等综合考虑，最终选择以超声提取 5 min、50% 甲醇为溶剂制备供试品溶液。

3.2 色谱方法考察

比较了不同比例的流动相系统（甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 磷酸水溶液、乙腈 -0.05% 磷酸水溶液）、柱温（45 ～ 60 ℃）、进样量（5 ～ 20 μL）、不同类型的色谱柱以及不同检测波长。经过反复梯度洗脱，优化色谱条件，最终确定以乙腈 -0.1% 磷酸水和 Waters Sunfire C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），进样量 10 μL，柱温 55 ℃，检测波长 254 nm 为色谱分析方法。

3.3 结果分析

《中国药典》2020 年版尚未收录小儿肺热咳喘颗粒，现行标准卫生部药品标准中药成方制剂 18 册中也未涉及含量测定项。本试验对市售小儿肺热咳喘颗粒成方制剂的质量现状进行初步探

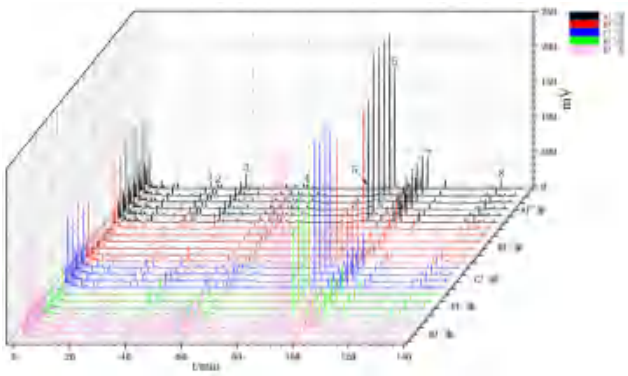


图 2　小儿肺热咳喘颗粒液相色谱指纹图谱

Fig 2　Fingerprint of Xiaoer Feire Kechuan granules samples

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 苦杏仁苷（amygdalin）；3. 芒果苷（mangiferin）；4. 连翘酯苷 A（forsythin A）；5. 异绿原酸 C（isochlorogenic acid C）；6. 黄芩苷（baicalin）；7. 汉黄芩苷（wogonoside）；8. 甘草酸（glycyrrhizin）

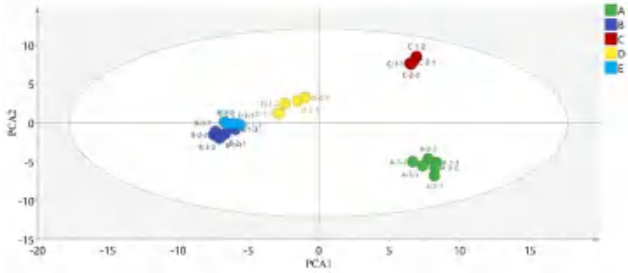


图 3　不同厂家小儿肺热咳喘颗粒 PLS-DA 得分图

Fig 3　PLS-DA score plot of Xiaoer Feire Kechuan granules from different manufacturers

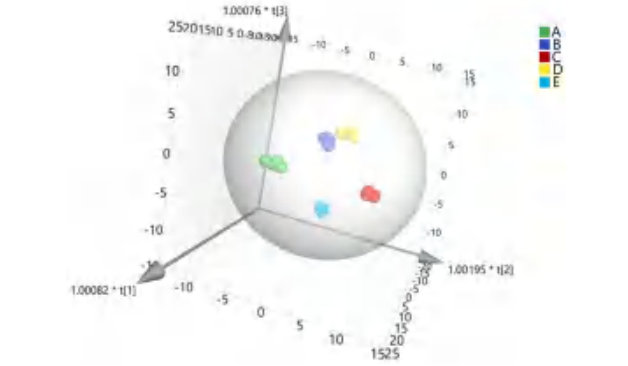


图 4　不同厂家的小儿肺热咳喘颗粒样品 OPLS-DA 得分图

Fig 4　OPLS-DA score of Xiaoer Feire Kechuan granules from different manufacturers

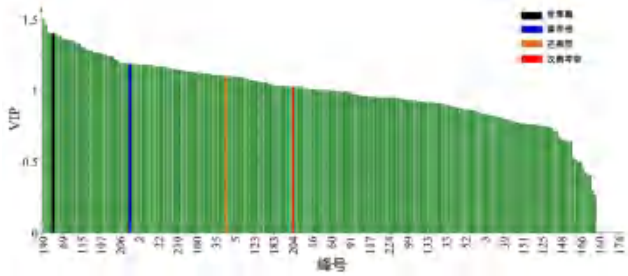


图 5　不同厂家的小儿肺热咳喘颗粒样品 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig 5　VIP score of OPLS-DA of Xiaoer Feire Kechuan granules from different manufacturers

究，建立了 24 批小儿肺热咳喘颗粒样品的指纹图谱，选取绿原酸、苦杏仁苷、芒果苷、连翘酯苷 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸进行含量测定，进一步利用 PLS-DA、OPLS-DA 法筛选出对 24 批样品差异产生贡献较大的 4 个特征峰，分别是芒果苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸。本研究对小儿肺热咳喘颗粒的质量标准提升与修订，全面控制该制剂质量具有指导意义。

参考文献

[1] 张秀英，胡玲，赵国华，等 . 小儿肺热咳喘颗粒治疗儿童支气管肺炎的临床观察 [J]. 中草药，2016，47（11）：1931-1934.

[2] 李蕊，刘俊 . 小儿肺热咳喘颗粒辅佐治疗儿童急性呼吸道感染疗效观察 [J]. 中国民康医学，2008，20（19）：2310.

[3] 周稼荣，陈金鹏，刘毅，等 . 基于网络药理学的小儿肺热咳喘颗粒抗冠状病毒作用机制探讨 [J]. 中草药，2020，51（15）：3952-3959.

[4] 中华人民共和国药典委员会 . 卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第十八册 . 1998：14.

[5] 郭海姣，覃洁萍，刘雯，等 . 穿黄制剂定性指纹图谱及多组分含量测定方法研究 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（3）：289-295

[6] 徐倩，杨满琴，鲍学梅，等 . HPLC 法同时测定十三味和中丸中 9 种成分 [J]. 中成药，2020，42（2）：297-300.

[7] 何颖，邹爱英，涂正伟，等 . 甘草泻心汤配方颗粒与传统汤剂 HPLC 指纹图谱一致性研究 [J]. 天津药学，2022，34（2）：14-21.

[8] 尚尔雨，申国涛，于新，等 . 不同陈化年份、不同产地陈皮药材的六君子汤指纹图谱的建立 [J]. 黑龙江科学，2022，13（12）：1-6.

[9] 刘晓凤，王姚，周思敏，等 . 川射干指纹图谱建立 [J]. 中成药，2021，43（7）：1950-1955.

[10] 许晨新，毛艺蓓，刘圣金，等 . 基于指纹图谱和化学计量学的白芍产地溯源和质量评价 [J]. 食品安全质量检测学报，2022，13（6）：1849-1858.

[11] 童培珍，李国卫，何嘉莹，等 . 基于指纹图谱和多指标成分含量测定的枳壳与枳实药材质量差异性研究 [J]. 中南药学，2022，20（4）：898-904.

[12] 宋奇，王隆隆，杨忠杰，等 . 双石清热合剂指纹图研究及 5 种成分含量测定 [J]. 中南药学，2022，20（1）：154-158.

[13] 陆超颖，王佳丽，王洪兰，等 . 不同基原枳实药材的质量差异评价研究 [J]. 中草药，2022，53（14）：4493-4503.

[14] Shang ZP，Xu LL，Kuang Y，et al，2021. Simultaneous determination of 35 constituents and elucidation of effective constituents in a multi-herb Chinese medicine formula Xiaoer Feire Kechuan [J]. J Pharm Anal，2021，11（6）：717-725.

[15] 胡英婕，王磊，朱冬冬 . HPLC 同时测定小儿肺热咳喘口服液中 10 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2022，42（2）：243-252.

[16] 王倩 . HPLC 法测定小儿肺热咳喘口服液中苦杏仁苷的含量 [J]. 临床合理用药杂志，2015，8（8）：37-39.

（收稿日期：2022-07-02；修回日期：2022-08-08）

药典分析方法确认指标的确定

杨芝博（沈阳药科大学工商管理学院，沈阳 110016）

摘要：目的 对药典分析方法确认的指标进行评估。**方法** 结合国内外相关技术文件的指导意见，总结并分析药典分析方法确认的指标选择，并对其合理性进行评估。**结果** 分别从药典“通用检测方法”“鉴别检查法”“低浓度定量 / 限度检查法”和“高浓度定量 / 限度检查法”四个方面对不同类型检查法的确认指标进行了归纳、总结与论述，确定了药典分析方法确认的指标。**结论** 明确了药典分析方法确认指标的选择依据，为制药行业的分析方法确认工作提供参考及借鉴。

关键词：药品；分析方法；确认指标；药典
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0208-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.033

Verification of characteristics of analytical-method

YANG Zhi-bo (*College of Business Administration, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To verify the characteristic indexes of analytical method. **Methods** We summarized and analyzed the characteristic indexes of analytical method based on domestic and foreign documents, and assessed their rationalization. **Results** We analyzed the indexes of different analytical methods from “general procedures” “identification procedures” “quantitative/limit test at a low concentration” and “quantitative/limit test at a high concentration”, and verified the characteristics of the analytical methods. **Conclusion** The selection of characteristic indexes of analytical methods verified, providing reference for the verification of analytical methods in pharmaceutical industry.

Key words: drug; analytical method; verification index; pharmacopoeia

近年来，国内制药行业发展迅速，伴随着药品上市许可持有人（MAH）制度的推出，持有人变更的情况大量出现，随之而来的是药品技术转移工作大量增加。在药品技术转移的过程中，分析方法转移是其中的一项重要内容，而在分析方法转移的过程中，“药典分析方法的转移”是其中最为常见的情况，根据目前国内外对于分析方法转移的相关指导原则，药典分析方法的转移采用分析方法确认的方式，因此，科学、合规地对分析方法确认指标进行评估、确认是药品生产企业最为关心的问题。

1 药典分析方法确认概述

分析方法确认概念的提出最早起源于国际人用药品注册技术协调会（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use，ICH）2000 年发布的 ICH Q7A[1]，该指导原则对分析方法验证的描述为“分析方法必须验证，除非是使用药典或是其他已知的标准文献的方法”。很显然，这句话将“非药典分析方法”与“药典分析方法”的验证区别对待，传统的“非药典分析方法”的验证对于已经成熟并且纳入药典的分析方法似乎过于严格和刻板，并且某些确认指标似乎必要性不大，因此，有必要将其区别对待。

基于此概念的提出，美国药典委员会发布了 USP ＜ 1226 ＞分析方法确认 [2] 和 USP ＜ 1224 ＞分析方法转移 [3] 两份指导文件，而《中国药典》也在 2020 年版中新增了《9099 分析方法确认指导原则》[4] 与《9100 分析方法转移指导原则》[4] 两个相关章节，同时，修订《9101 药品质量标准分析方法验证指导原则》名称为《9101 分析方法验证指导原则》[4]。对比美国药典相关章节的内容，其指导思想基本一致。对于药品生产企业来说，以上指导原则的提出，为企业的药典分析方法确认

作者简介：杨芝博，男，主要从事药事管理工作，email yzb.605@163.com

提供了依据，企业不必再按照复杂、常规的分析方法对验证指标进行一一确认，只要确认操作人员有能力成功操作药典分析方法，即达到了分析方法确认的目的[5]。但是，在实际执行过程中，根据指导原则的要求，企业明确药典分析方法的确认指标可以少于分析方法验证的指标，而对于少到什么程度，指导原则中并未明确[6-7]，而是需要根据实际情况进行评估，这也为药典分析方法的确认提出了挑战——如何能够正确地评估药典分析方法的确认指标。

2 现行的指导原则

对于药典分析方法确认指标评估的指导性文件相对较少，此类指导性文件一般都要求企业根据实际情况自行评估。典型的具有可操作性的指导性文件有欧洲药品质量控制实验室联盟（European Official Medicines Control Laboratories，OMCLs）发布的质量管理文件《分析方法验证与确认》[8]，该文件于 1999 年首次发布，最新版的更新日期为 2020 年，该文件指出：药典各论中描述的分析方法应认为是已经经过验证的方法，因此只需要对分析方法的适用性进行确认，技术文件中详细地列出了不同检验类型以及方法确认需要执行的内容[9]。另一份具有实际指导意义的文件为美国农业部下属的美国分析化学家协会（Association of Official Analytical Chemists，AOAC）2007 年发布的《如何达到 ISO17025 对方法确认的要求》[10]，该份指导原则中，一方面明确了分析方法确认指标的选择，另一方面给出了指标选择的理由，具有很好的指导意义。

美国药典委员会在 2022 年 1 月份发布的 USP ＜ 1220 ＞分析方法生命周期[11]引起了业界的广泛关注，但是该文件重点对分析方法开发作了比较详尽的阐述，对于分析方法确认并未提出新的建设性意见，文件中提到对于分析方法转移或者确认，其确认的程度应当基于分析目标（analytical target profile，ATP）和分析方法性能的风险评估，其本质还是基于风险评估来确定确认指标，并未明确、具体地对确认指标予以表述。

基于以上原则，药典方法都是经过验证的分析方法，无需进行全部指标的验证[12]，仅需实验人员在规定条件下能够重复操作，即可达到分析方法确认的目的[13-14]。本文以上述指导性文件为基础，对分析方法确认指标的选择依据进行梳理与归纳，以期对药品生产企业在进行药典分析方法确认时，对于确认指标的选择，提供具有指导性的建议。

3 分析方法确认指标选择的适用范围

根据《中国药典》中《9101 分析方法验证指导原则》[4]、《9099 分析方法确认指导原则》[4]、《9100 分析方法转移指导原则》[4]的指导思想，分析方法确认适用于全部《中国药典》收载的分析方法，但不适用于“微生物分析方法的确认”与“生物学测定方法的确认”。其原因在于对于“微生物分析方法”与“生物学测定方法”存在更多的生物学方面的影响因素，因此，这类分析方法的验证、确认、转移不在指导原则的范围内，本文不对这类分析方法的确认指标进行论述。

4 药典中的通用检测方法

无论是美国药典还是《中国药典》，对于通用检测方法的规定比较明确，如果没有特别说明，这些通用检测方法无需确认。通用检测方法通常包括但不限于干燥失重、炽灼残渣、多种化学湿法和简单的仪器测试（如 pH 值测定法）等。

由此可以看出，对于药典中的通用检测方法，指导思想还是非常明确的，即无需进行分析方法确认。那么对于非通用检测方法，如“鉴别检查”“低浓度定量 / 限度检查法”和“高浓度定量 / 限度检查法”则需要进一步评估其确认指标，以开展分析方法的确认工作。

5 药典中的鉴别检查

鉴别检查是药典收载分析方法中最为常见的一个检验项目，鉴别检查是根据药物组成、分子结构、理化性质，采用化学、物理或生物方法判断药物是否为“目标药物”[15]。关于 AOAC 与 OMCLs 对药典方法鉴别检查确认指标的具体要求，AOAC 鉴别检查确认指标参见表 1，OMCLs 鉴别检查确认指标参见表 2。

由此可以看出，鉴别试验的方法确认只需要确认其专属性。那么以 2022 年发布的 USP ＜ 1220 ＞分析方法生命周期的评估观点来看，仅确认其专属性是否违背其分析目标（ATP）呢？首先，对于分析方法验证来说，鉴别检查是需要对“专属性”和“耐用性”指标进行确认的，对于药典方法而言，其耐用性已经进行了充分的考虑。以利福平为例，在其紫外鉴别中，药典中明确规定了样品用量、溶剂用量、缓冲液 pH 值、最大吸收波长、最小吸收波长等参数，对于此类可能影响耐用性的测定条件，药典方法已经给予了充分考虑，规定了相关范围，因此，鉴别试验的方法确认不必对“耐用性”指标再次进行确认，仅确认其“专属性”，是符合 USP ＜ 1220 ＞分析方法生命周期的评估观点的。

6 药典中的低浓度定量 / 限度检查法

对于药典方法中收载的限度、含量检查来说，大致可以分为两种情况：第一种情况为被测物浓度在定量限或检测限附近的检测，样品浓度较

表 1 AOAC 鉴别检查确认 [10]

Tab 1 Verification of identification of AOAC[10]

确认指标	评估	方法学确认内容	方法学确认理由
专属性	不需要：如果检验样品与药典方法样品相同，并且检验仪器之间的差异不会影响专属性	—	检验样品与药典方法样品有相同的结构，且检验方法基于化学反应的原则，那么专属性就不会受到影响
	需要：如果检验样品与药典方法样品不同	与方法学验证中的要求相同	—
	需要：如果不同的检验仪器对专属性产生影响	仅需针对样品或检验仪器之间的差异开展确认活动	不同的检验仪器会对专属性产生影响

表 2 OMCLs 鉴别检查确认 [8]

Tab 2 Verification of identification of OMCLs[8]

检查方法	确认项目
鉴别	不需要正式的验证

低；第二种情况为被测物浓度远高于定量限或检测限。低浓度定量 / 限度检查法这类检测中最为常见的一类就是残留溶剂检测法，各国药典附录中都收载有残留溶剂检测法。AOAC 与 OMCLs 对低浓度定量 / 限度检查法确认指标作出了具体要求，AOAC 低浓度定量 / 限度检查确认指标参见表 3，OMCLs 有关物质检查确认指标参见表 4。

表 3 AOAC 低浓度定量 / 限度检查确认 [10]

Tab 3 Verification of quantitative/limit test at a low concentration of AOAC[10]

确认指标	评估		方法学确认内容	方法学确认理由
	定量	限度		
准确度	需要	不需要	如果检验的浓度范围较窄（小于 1 个数量级），需要测试 1 个浓度样品；否则，测试高、中、低 3 个浓度样品	在较窄的范围内，准确度和精密度不会发生较大变化，1 个浓度的确认是比较充分的；在较宽的范围内，准确度和精密度是会发生变化的，因此，需要在不同的浓度水平进行确认
精密度	需要	不需要	执行 1 次重复性测试；如果方法覆盖的浓度范围大于 1 个数量级，重复测试必须包括高、中、低 3 个浓度	在较窄的范围内，准确度和精密度不会发生较大变化，1 个浓度的确认是比较充分的；在较宽的范围内，准确度和精密度是会发生变化的，因此，需要在不同的浓度水平进行确认；需要执行中间精密度确认，以保证不同检验人员经过培训并且有能力正确的操作方法
专属性				参见表 1
检测限（LOD）	需要	需要	1 份检测限浓度附近的样品	检测限很容易受到样品结构和分析仪器的影响
定量限（LOQ）	需要	需要	1 份定量限浓度附近的样品	定量限很容易受到样品结构和检验仪器的影响

表 4 OMCLs 有关物质检查确认 [8]

Tab 4 Verification of related substances of OMCLs[8]

检查方法	确认项目	
	原料药	制剂
限度检查	不需要正式的验证	专属性 限度值

通过以上 AOAC 与 OMCLs 对于定量 / 限度检查确认指标的对比可以看出，确认指标的要求是存在一定差异的。AOAC 对于定量检测，确认指标包括“准确度”“精密度”“专属性”“检测限”“定量限”；对于限度检测，确认指标包括“专属性”“检测限”“定量限”。而 OMCLs 中对于有关物质检查仅要求“专属性”和“限度值”。其主要区别在于定量检测中是否需要对“准确度”“精密度”进行确认。而造成这种差异的本质原因是两份指导原则的分析方法分类差异造成的，AOAC 是按照“低浓度检测”和“高浓度检测”进行的分类，而 OMCLs 是按照“有关物质检测”和“含量检测”进行的分类，并且药典中“有关物质检测”通常是采用“限度检测”方式，因此，OMCLs 在此处的规定相当于 AOAC 的“限度检测”部分，而“定量检测”部分，归类在了“含量检测”的确认部分。因此，本质上 AOAC 与 OMCLs 对于定量 / 限度检查确认指标的要求是一致的。

而对于“检测限”和“定量限”AOAC 的要求是全部确认，这样规定可能会产生一些误解，因为对于“定量检测”其限度值定义为“定量限”；对于“限度检测”其限度值定义为“检测限”，这里 OMCLs 定义为“限度值”是比较合理的。因此，此部分建议按照《中国药典》的指导原则，对于“定量检测”只确认“定量限”；对于“限度检测”只确认“检测限”。

7 药典中的高浓度定量 / 限度检查法

对于高浓度定量 / 限度检查法，其浓度相对较高，而含量检查，大多数情况下与此种情况类似，因此，将 OMCLs 对于含量检查方法的确认在本部分一并论述。AOAC 高浓度定量 / 限度检查确认指标参见表 5，OMCLs 含量测定确认指标参见表 6。

表 5 AOAC 高浓度定量 / 限度检查法确认 [10]

Tab 5 Verification of quantitative/limit test at a high concentration of AOAC [10]

确认指标	评估	方法学确认内容	方法学确认理由
准确度	需要	如果是限度测试或者检验的浓度范围较窄（小于 1 个数量级），需要测试 1 个浓度样品；否则，测试高、中、低 3 个浓度样品	在较窄的范围内，准确度和精密度不会发生较大变化，1 个浓度的确认是比较充分的；在较宽的范围内，准确度和精密度是会发生变化的，因此，需要在不同的浓度水平进行确认
精密度	需要	执行 1 次重复性测试。如果方法覆盖的浓度范围大于 1 个数量级，重复测试必须包括高、中、低 3 个浓度	在较窄的范围内，准确度和精密度不会发生较大变化，1 个浓度的确认是比较充分的；在较宽的范围内，准确度和精密度是会发生变化的，因此，需要在不同的浓度水平进行确认；需要执行中间精密度确认，以保证不同检验人员经过培训并且有能力正确的操作方法
专属性	参见表 1		

表 6 OMCLs 含量测定确认 [8]

Tab 6 Verification of assay test of OMCLs[8]

检查方法	确认项目	
	原料药	制剂
含量检查	不需要正式的验证	专属性 准确度 精密度 线性

AOAC 规定，此种情况需要对 “专属性” “准确度” 和 “精密度” 三个指标进行确认，而 OMCLs 规定除以上三个指标外，还需要进行 “线性” 指标的确认。首先，对于浓度远高于 “检测限” 或 “定量限” 的情况，其 “检测限” 或 “定量限” 的确定，基本是没有意义的。其次，“线性” 指标是定量检测的一个确认指标（限度检测不涉及），由于分析方法针对的是较高浓度的检测或含量检测，样品浓度相对较高，样品的浓度范围变化也相对较大，因此，对于此种情况 “线性” 指标的确认还是有必要的。

综上，高浓度定量 / 限度检查法（包括含量检测）确认指标选择时，对于定量检测，包括 “准确度” “精密度” “专属性” “线性”；对于限度检测，包括 “准确度” “精密度” “专属性”。

8 结论

分析方法确认是企业在使用药典分析方法时，在实际使用条件下，为了确定方法的适用性所开展的确认工作。本文分别从 “通用检测方法” “鉴别检查法” “低浓度定量 / 限度检查法” 和 “高浓度定量 / 限度检查法” 四个方面对不同类型分析方法的确认指标进行了归纳、总结与论述，即 “通用检测方法” 无需确认；“鉴别检查法” 需要确认专属性；“低浓度定量 / 限度检查法” 的定量检测需要确认 “准确性” “精密度” “专属性” “定量限”；“低浓度定量 / 限度检查法” 的限度检测需要确认 “专属性” “检测限”；“高浓度定量 / 限度检查法” 的定量检测需要确认 “准确度” “精密度” “专属性” “线性”；“高浓度定量 / 限度检查法” 的限度检测需要确认 “准确度” “精密度” “专属性”。本文以行业内技术指导性文件的指导原则为基础进行评估与论述，以期为相关行业在分析方法确认工作中提供参考及借鉴。

参考文献

[1] ICH. Q7A Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients [S]. 2000.

[2] USP40-NF35 ＜ 1226 ＞ VERIFICATION OF ANALYTICAL PROCEDURES [M]. 2017：1786-1787.

[3] USP40-NF35 ＜ 1224 ＞ TRANSFER OF ANALYTICAL PROCEDURES [M]. 2017：1778-1780.

[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：478-480.

[5] 许明哲，黄宝斌，杨青云，等 . 分析方法验证、转移和确认概念解析 [J]. 药物分析杂志，2015，35（1）：168-175.

[6] 张艳丽，林玉梅，晁现民，等 . 分析方法验证、确认与转移在药企中的应用探讨 [J]. 机电信息，2018（8）：11-13.

[7] 吴耿锋，金泉泉，龚珊 . 化学原料药的分析方法验证、转移与确认 [J]. 化工设计通讯，2020，46（3）：245.

[8] PA/PH/OMCL（13）82 R5. Validation/Verification of Analytical Procedures，OMCL Network of the Council of Europe Quality Assurance Document [S]. 2020.

[9] 钟丽君，陈思，田军 . 分析方法确认的介绍和建议 [J]. 药物分析杂志，2019，39（5）：191-196.

[10] AOAC Guidance：How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification，Association of Official Analytical Chemists [S]. 2007.

[11] USP-NF New Chapter ＜ 1220 ＞ Analytical Life Cycle [M]. 2021. https：//www. uspnf. com/notice-gc-1220-prepost-20210924.

[12] 中国食品药品检定研究院 . 中国药品检验标准操作规范 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2019：728-744.

[13] 李娜，耿颖，谭德讲，等 . 分析方法确认和转移的评估标准探讨 [J]. 药物分析杂志，2021，41（4）：675-680.

[14] 孙红，梁毅 . 化学原料药的分析方法验证、转移及确认 [J]. 机电信息，2016（5）：15-19.

[15] 许明哲，黄宝斌，杨青云，等 . 分析方法确认内容介绍 [J]. 药物分析杂志，2015，35（1）：191-197.

（收稿日期：2022-06-14；修回日期：2022-07-05）

ICP-MS 法测定贡菊不同提取液中无机元素的浸出率

张美皖，胡丹，李娜，饶瑛捷，张玲*，薛璇（安徽中医药大学药学院，合肥 230012）

摘要：目的 测定贡菊药材和贡菊不同提取液中无机元素的含量，比较不同提取方法所得贡菊提取液中无机元素浸出率的差异。**方法** 根据含菊花中药制剂中菊花的常用提取方法（水煎煮、水热浸和 70% 乙醇回流）分别制备贡菊提取液，以 Rh 和 Re 两种元素作为内标，采用 ICP-MS 法测定贡菊不同提取液中 20 种无机元素的含量，计算不同元素的浸出率。**结果** 贡菊水煎煮提取液中 Al、Fe、Zn、Mo 等 13 种无机元素的浸出率高于水热浸和 70% 乙醇回流提取液；70% 乙醇回流提取液中 Co、Cd、Cr 浸出率高于水煎煮和水热浸提取液；除 Ni、Ba、Se、Pb、As、Hg 外，水热浸 1.5 h 提取液中无机元素浸出率高于水热浸 1 h 提取液。**结论** 中药制剂中菊花的提取方法影响其提取液中无机元素的含量和浸出率。

关键词：贡菊；提取方法；无机元素；浸出率；电感耦合等离子体质谱法
中图分类号：R284.1，R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0212-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.034

Leaching rate of inorganic elements in extracts of Gongju by ICP-MS

ZHANG Mei-wan, HU Dan, LI Na, RAO Ying-jie, ZHANG Ling*, XUE Xuan (*School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the content of inorganic elements in Gongju medicinal materials and extracts of Gongju, and to compare the leaching rates of inorganic elements in the extracts of Gongju by different methods. **Methods** According to the common extraction methods of Chrysanthemi Flos in traditional Chinese medicine preparations containing Chrysanthemi Flos, Gongju was extracted by boiling water, hot dipping in water and refluxing with 70% ethanol. Rh and Re were used as the internal standards, and the content of 20 inorganic elements in the extracts was determined by ICP-MS. **Results** The leaching rates of 13 inorganic elements such as Al, Fe, Zn and Mo in water decoction extracts of Gongju were higher than those in hot water dip and 70% ethanol reflux extract, while the leaching rates of Co, Cd, and Cr in 70% ethanol reflux extract were higher than those in water decoction and hot water dip extract. Except for Ni, Ba, Se, Pb, As and Hg, the leaching rates of inorganic elements in the extract of 1.5 h hot water dip were higher than those of 1 h hot water dip. **Conclusion** The extraction methods of Chrysanthemi Flos in traditional Chinese medicine preparations affect the content and leaching rates of inorganic elements in its extracts.

Key words: Gongju; extraction method; inorganic element; leaching rate; ICP-MS

2020 年版《中国药典》一部收载含有菊花的中药制剂共 54 个，制剂中菊花除粉末直接入药和水蒸气蒸馏法收集蒸馏液外，其余均采用溶剂提取，提取方法包括水煎煮、水热浸和 70% 乙醇回流等。如参乌健脑胶囊、辛夷鼻炎丸、障眼明片、清热银花糖浆和山菊降压片等制剂中菊花的提取方法为水煎煮，小儿感冒茶、牛黄上清片、芎菊上清片中菊花的提取方法为水热浸，黄连上清片中菊花的提取方法为 70% 乙醇回流提取后药渣加水煎煮，而杞菊地黄丸（浓缩丸）和明目地黄丸

基金项目：安徽省高校自然科学研究重点项目（No.KJ2020A0442）；安徽中医药大学校级科研项目（No.2020zryb08）；安徽中医药大学校级探索性项目（No.2021hxts23；No.2021zxts16）。

作者简介：张美皖，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量控制与评价研究，email：767009711@qq.com *通信作者：张玲，女，教授，主要从事中药质量控制与评价研究，email：zhangling407@sina.com

（浓缩丸）中菊花则采用 70% 乙醇浸渍提取 [1]。

菊花不仅含有有机酸、黄酮、挥发油等次生代谢产物 [2-3]，还含有人体所必需的无机元素 Se、Fe、Mn、Ni、Zn 等 [4]，同时还含有 Pb、Cd、As、Hg、Cu 等对人体有害的元素 [5]。费毅琴等 [6] 发现菊花经水煎煮后 21 种金属元素残留量明显降低。权春梅 [7] 研究发现菊花经乙醇回流提取后重金属元素中 Cu 的含量最高，Hg 和 Cd 的含量较低。目前有关菊花茶水冲泡或加水煎煮后无机元素含量的变化研究较多 [8-12]，但未见中药制剂中菊花不同提取方法对无机元素浸出率影响方面的报道。

本研究以贡菊为研究对象，采用中药制剂中菊花常见的提取方法：水煎煮、水热浸和 70% 乙醇回流制备贡菊不同提取液，运用电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）测定贡菊药材和贡菊提取液中 20 种无机元素的含量，计算不同元素的浸出率，分析不同提取方法对无机元素浸出率的影响，为进一步研究制剂中菊花的制法和临床功效之间的关系提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

ICS900-iCAPQ 型电感耦合等离子体质谱仪（美国赛默飞世尔上海有限公司）；ME104E/02 型电子天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司，精度：0.1 mg）；NBH-L 型恒温电热板（苏州九联科技有限公司）；DW-250 型调温电热器（通州市申通电热器厂）；FW80 型高速粉碎机（天津市泰斯特有限公司）。

1.2 试药

Pb、Cd、As、Cu、Se、Fe、Zn、Ni、Al、Cr、Co、Mn、Ba、Sr、V 多元素混标储备液（10 μg • mL^{-1}，批号：19D3018），Y、Dy、Ce 混标储备液（100 μg • mL^{-1}，批号：20D8221），Rh、Re 内标标准储备液（1000 μg • mL^{-1}，批号分别为：192016、192004）均购于国家有色金属及电子材料分析测试中心；Hg、Mo 单元素标准储备液（100 μg • mL^{-1}，批号分别为：B1804095、B1810046）、茶叶成分分析标准物质 GBW10016a（GSB-7a）（国家标准物质中心）；硝酸（优级纯，批号：20200825）、无水乙醇（优级纯，批号：20200716）、过氧化氢（优级纯，批号：20200923）（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

1.3 样品

贡菊药材样品于 2020 年 10 月采集自安徽歙县，经安徽中医药大学药学院张珂老师鉴定为菊科植物贡菊 *Dendranthema morifolium*（Ramat.）Tzvel.“Gongju”cv. nov. 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 仪器条件

射频功率：1550 W；蠕动泵转速：40 r • min^{-1}；雾化室温度：2.7 ℃；冷却气流速：14 L • min^{-1}；采样深度：5 mm；辅助气流量：0.8 L • min^{-1}；载气流量：1.2 L • min^{-1}；数据采集模式：跳峰采集模式；重复次数：3 次。

2.2 元素标准溶液的制备

精密量取各元素标准储备液适量，加水制成不同浓度的元素标准待测液，即 Pb、Cd、As、Cu、Se、Fe、Zn、Ni、Al、Cr、Co、Mn、Ba、Sr、V 混标待测液（0、1、5、10、50、100、200 ng•mL^{-1}）；Y、Dy、Ce 混标待测液（0、0.1、0.5、1、2、5、10 ng•mL^{-1}）；Mo 单标待测液（0、0.1、1、5、10、50、100 ng • mL^{-1}）；Hg 单标待测液（0、0.1、0.2、0.5、1 ng • mL^{-1}）。精密量取 Rh、Re 内标标准储备液适量，加水制成 Rh、Re 均为 10 ng • mL^{-1} 的内标待测液。

2.3 贡菊提取液的制备

2.3.1 水煎煮提取液 取贡菊药材约 5 g，精密称定，加入 60 mL 水，浸泡 30 min 后煎煮 30 min，滤过，药渣再加 50 mL 水煎煮 30 min，滤过，合并滤液。

2.3.2 水热浸 1.5 h 提取液 取贡菊药材约 5 g，精密称定，加入 110 mL 沸水，浸泡 1.5 h，滤过，收集滤液。

2.3.3 水热浸 1 h 提取液 取贡菊药材约 5 g，精密称定，加入 110 mL 沸水，浸泡 1 h，滤过，收集滤液。

2.3.4 70% 乙醇回流提取液 取贡菊药材约 5 g，精密称定，加入 60 mL 70% 乙醇，浸泡 30 min 后加热回流 30 min，滤过，药渣再加 50 mL 70% 乙醇，加热回流 30 min，滤过，合并滤液。

2.4 贡菊待测液的制备

2.4.1 贡菊提取液待测液 不同提取方法制备的贡菊提取液置电热板上 180 ℃加热 1 h，150 ℃加热 1 h，120 ℃加热浓缩至约 5 mL。再加入 10 mL 硝酸和 2.5 mL 过氧化氢，静置过夜，次日置电热板上 120 ℃加热 1 h，150 ℃加热 1 h，180 ℃加热至液体呈澄清透明状态，120 ℃赶酸至近干，冷却后用水定容至 25 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。同法制得空白样品溶液。

2.4.2　贡菊药材待测液　取贡菊药材粉末（过 5 号筛）约 0.2 g，精密称定，置聚四氟乙烯烧杯中，自“加入 10 mL 硝酸和 2.5 mL 过氧化氢”起，按“2.4.1”项下方法制备贡菊药材待测液。

2.5　*方法学考察*

2.5.1　线性关系考察　取“2.2”项下制备的标准待测液进样测定。以元素的质量浓度（ng•mL^{-1}）为横坐标（X），响应值为纵坐标（Y），绘制标准曲线，结果见表 1。20 种元素标准曲线的相关系数（r）均在 0.9990 ～ 1.000。

2.5.2　检测限和定量限　取空白样品溶液连续进样 11 次，以空白样品溶液响应值的 3 倍标准偏差所对应的待测元素质量浓度作为检测限（LOD），10 倍标准偏差所对应的待测元素质量浓度作为定量限（LOQ）。结果见表 1，20 种元素的 LOD 和 LOQ 均能满足分析要求。

表 1　20 种无机元素的线性关系、检测限和定量限

Tab 1　Linearity，limit of detection and limit of quantification of 20 inorganic elements

元素	回归方程	r	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	LOD/（ng • mL^{-1}）	LOQ/（ng • mL^{-1}）
^{27}Al	$Y = 3.788\times10^{5}X + 1.000\times10^{6}$	0.9994	0 ～ 200	2.16	7.20
^{51}V	$Y = 3.316\times10^{5}X + 4.933\times10^{4}$	0.9990	0 ～ 200	0.0140	0.0467
^{52}Cr	$Y = 3.627\times10^{5}X + 6.426\times10^{5}$	0.9996	0 ～ 200	0.153	0.510
^{55}Mn	$Y = 4.979\times10^{5}X - 3.125\times10^{5}$	0.9999	0 ～ 200	0.0270	0.0900
^{57}Fe	$Y = 1.155\times10^{4}X + 4.644\times10^{5}$	0.9997	0 ～ 200	11.6	38.7
^{59}Co	$Y = 3.786\times10^{5}X + 7.916\times10^{3}$	0.9999	0 ～ 200	0.005 00	0.0167
^{60}Ni	$Y = 8.629\times10^{4}X + 7.968\times10^{4}$	0.9995	0 ～ 200	0.0220	0.0733
^{63}Cu	$Y = 2.209\times10^{5}X - 1.622\times10^{5}$	0.9998	0 ～ 200	0.0360	0.120
^{66}Zn	$Y = 7.763\times10^{4}X + 9.188\times10^{5}$	0.9990	0 ～ 200	2.66	8.87
^{75}As	$Y = 5.181\times10^{4}X + 5.249\times10^{4}$	0.9990	0 ～ 200	0.142	0.473
^{82}Se	$Y = 7.369\times10^{3}X + 3.435\times10^{3}$	0.9998	0 ～ 200	0.129	0.430
^{88}Sr	$Y = 5.010\times10^{5}X - 4.620\times10^{5}$	0.9999	0 ～ 200	0.0210	0.0700
^{89}Y	$Y = 6.189\times10^{5}X - 1.296\times10^{3}$	1.000	0 ～ 10	0.001 00	0.003 33
^{95}Mo	$Y = 6.238\times10^{4}X + 4.688\times10^{4}$	0.9997	0 ～ 100	0.0140	0.0467
^{111}Cd	$Y = 4.322\times10^{4}X + 1.899\times10^{3}$	0.9992	0 ～ 200	0.0130	0.0433
^{137}Ba	$Y = 5.152\times10^{4}X - 8.474\times10^{3}$	0.9999	0 ～ 200	0.155	0.517
^{140}Ce	$Y = 3.811\times10^{5}X + 1.366\times10^{5}$	0.9993	0 ～ 10	0.0240	0.0800
^{163}Dy	$Y = 1.479\times10^{5}X + 3.256\times10^{2}$	0.9999	0 ～ 10	0.001 00	0.003 33
^{202}Hg	$Y = 1.719\times10^{4}X + 1.475\times10^{4}$	0.9994	0 ～ 1	0.172	0.573
^{208}Pb	$Y = 1.383\times10^{5}X + 1.573\times10^{4}$	0.9996	0 ～ 200	0.689	2.30

2.5.3　精密度试验　取“2.2”项下某一质量浓度的各元素标准待测液适量，连续测定 6 次。结果 20 种元素的 *RSD* 值均小于 3.0%，表明仪器的精密度良好。

2.5.4　重复性试验　取贡菊药材粉末约 0.2 g，精密称定，按“2.4.2”项下方法平行制备 6 份贡菊药材待测液，测定 20 种元素的含量。结果除 Hg 未检出外，其余各元素的含量的 *RSD* 值均在 0.59% ～ 2.8%，表明方法的重复性良好。

2.5.5　稳定性试验　取“2.5.4”项下制备的贡菊药材待测液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算 20 种元素的含量。结果各元素的含量的 *RSD* 值均小于 3.0%，表明待测液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6　准确度试验　将茶叶成分分析标准物质 GBW10016a（GSB-7a）按“2.4.2”项下方法制备待测液，进样测定，结果见表 2。20 种元素含量测定值均在标准值范围内，表明方法准确度良好。

2.6　*贡菊药材和提取液中无机元素的含量测定*

贡菊药材和不同提取方法制备的提取液中 20 种无机元素含量测定结果见表 3。以贡菊不同提取液中 20 种无机元素含量为变量，采用 TBtools 软件进行热图分析，结果见图 1A。

从表 3 可以看出，贡菊药材经水煎煮、水热浸和 70% 乙醇回流后的提取液中 20 种无机元素含量明显降低。贡菊药材中的 20 种元素以 Fe 含量最高，达到 145 mg • kg^{-1}；其次是 Mn 和 Al，分别为 135 mg • kg^{-1} 和 95.1 mg • kg^{-1}。贡菊不同提取液的 20 种元素中，Al 含量均为最高，在 5.52 ～ 10.8 mg•kg^{-1}；其次是 Fe，含量在 1.70 ～ 5.36 mg•kg^{-1}；Ba、Ce、Y、Dy 在 70% 乙醇提取液中未被检出，在水煎煮和水热浸提取液中的含量范围在 0.000 110 ～

表 2　GBW10016a(GSB-7a) 茶叶成分分析标准物质的标准值与测定值 (mg・kg^{-1}，n = 6)

Tab 2　Standard value and measurement value of GBW10016a (GSB-7a) CRM tea (mg・kg^{-1}，n = 6)

元素	标准值	测定值
^{27}Al	940±90	926
^{51}V	0.17±0.03	0.164
^{52}Cr	0.45±0.10	0.485
^{55}Mn	500±20	507
^{57}Fe	242±18	238
^{59}Co	0.22±0.02	0.232
^{60}Ni	3.4±0.3	3.35
^{63}Cu	18.6±0.7	19.1
^{66}Zn	51±2	50.7
^{75}As	0.09±0.01	0.0824
^{82}Se	0.098±0.008	0.0921
^{88}Sr	9.1±1.2	8.86
^{89}Y	0.23±0.03	0.214
^{95}Mo	0.040±0.012	0.0366
^{111}Cd	0.062±0.004	0.0597
^{137}Ba	9.6±0.5	9.52
^{140}Ce	0.39±0.05	0.419
^{163}Dy	0.025±0.006	0.0282
^{202}Hg	0.0038±0.0008	0.003 04
^{208}Pb	1.5±0.2	1.43

表 3　贡菊药材和不同提取液中无机元素含量 (mg・kg^{-1}，n = 3)

Tab 3　Contents of inorganic elements in Gongju and its different extracts (mg・kg^{-1}，n = 3)

元素	药材	提取液			
		水煎煮	水热浸 1.5 h	水热浸 1 h	70% 乙醇回流
^{27}Al	95.1	10.8	9.19	8.74	5.52
^{57}Fe	145	5.36	4.63	4.29	1.70
^{55}Mn	135	4.65	4.84	3.59	1.70
^{66}Zn	34.1	0.791	0.511	0.491	0.730
^{63}Cu	2.21	0.686	0.649	0.553	0.451
^{88}Sr	16.8	0.591	0.251	0.247	0.0181
^{60}Ni	3.16	0.101	0.0844	0.0858	0.0433
^{95}Mo	0.383	0.009 49	0.008 69	0.006 34	0.008 84
^{111}Cd	0.374	0.004 39	0.004 16	0.003 78	0.006 05
^{59}Co	0.244	0.0103	0.0100	0.009 80	0.0134
^{51}V	0.150	0.0156	0.0145	0.0141	0.003 20
^{52}Cr	0.0166	0.004 20	0.003 50	0.003 09	0.005 79
^{137}Ba	7.85	0.248	0.0257	0.0348	—
^{140}Ce	0.170	0.004 09	0.003 52	0.002 97	—
^{89}Y	0.0448	0.000 460	0.001 37	0.001 34	—
^{163}Dy	0.0162	0.000 170	0.000 140	0.000 110	—
^{208}Pb	0.533	0.001 99	—	—	—
^{82}Se	0.0257	0.001 01	—	—	—
^{75}As	0.0125	—	—	—	—
^{202}Hg	—	—	—	—	—

注：“—” 表示未检出。

Note：“—” means not detected.

0.248 mg•kg^{-1}；Pb、Se 仅在水煎煮提取液中被检出；As 和 Hg 在 4 种提取液中均未被检出。

贡菊不同提取液中无机元素的含量存在明显差异。从表 3 和图 1A 看出，水煎煮提取液中 13 种无机元素 Al、Fe、Zn、Mo、Cu、Sr、Ni、Ba、V、Ce、Se、Dy、Pb 的含量均高于水热浸和 70% 乙醇回流提取液；水热浸 1.5 h 提取液中 Mn、Y 含量高于水煎煮和 70% 乙醇回流提取液；70% 乙醇回流提取液中 Co、Cd、Cr 含量高于水煎煮和水热浸提取液。除 Ni、Ba、Se、Pb、As、Hg 外，水热浸 1.5 h 提取液中无机元素含量均高于水热浸 1 h 提取液。

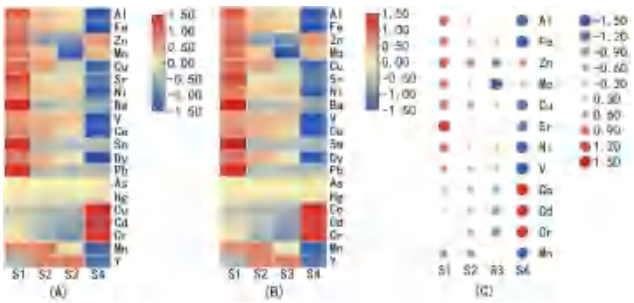


图 1　贡菊不同提取液中 20 种无机元素含量（A）、浸出率（B）及 12 种共有元素浸出率（C）热图

Fig 1　Heatmap of the contents（A）and leaching rates（B）of 20 inorganic elements and 12 common elements（C）in different extracts of Gongju

注：S1 为水煎煮，S2 为水热浸 1.5 h，S3 为水热浸 1 h，S4 为 70% 乙醇回流；从蓝色到红色，颜色越红，数值越大。

Note：S1 refers to water decocting，S2 refers to hot water dipping for 1.5 h，S3 refers to hot water dipping for 1 h，S4 refers to 70% ethanol refluxing. The transition from blue to red，the redder the color，the greater the value.

2.7　无机元素的浸出率

按照无机元素浸出率（%）=［（提取液的浓度 × 样品量）/（药材中的浓度 × 样品量）］×100% 进行计算。贡菊经不同提取方法所得提取液中无机元素浸出率结果见表 4。以贡菊不同提取液中 20 种无机元素的浸出率为变量，采用 TBtools 软件进行热图分析，结果见图 1B。

从表 4 可知，20 种无机元素浸出率差异较大，在 0.108%～34.9%。结合图 1A 和图 1B 发现，不同提取方法对贡菊中无机元素浸出率的影响与其对含量的影响趋势相同，即提取液中无机元素含量高的，浸出率也高。

20 种无机元素在不同提取液中均可以测出浸出率的仅有 12 种元素。以贡菊不同提取液中 12 种共有元素浸出率为变量，采用 TBtools 软件进行热图分析，结果见图 1C。结合图 1C 进一

表 4　贡菊不同提取液中 20 种无机元素浸出率 (%)

Tab 4　Leaching rates of 20 inorganic elements in different extracts of Gongju (%)

元素	提取液			
	水煎煮	水热浸 1.5 h	水热浸 1 h	70% 乙醇回流
^{63}Cu	31.0	29.4	25.0	20.4
^{52}Cr	25.3	21.1	18.6	34.9
^{51}V	10.4	9.67	9.40	2.13
^{27}Al	11.4	9.66	9.19	5.80
^{60}Ni	3.20	2.67	2.72	1.37
^{57}Fe	3.70	3.19	2.96	1.17
^{88}Sr	3.52	1.49	1.47	0.108
^{55}Mn	3.44	3.59	2.66	1.26
^{95}Mo	2.48	2.27	1.66	2.31
^{66}Zn	2.32	1.50	1.44	2.14
^{59}Co	4.22	4.10	4.02	5.49
^{111}Cd	1.17	1.11	1.01	1.62
^{137}Ba	3.16	0.327	0.443	—
^{89}Y	1.03	3.06	2.99	—
^{140}Ce	2.41	2.07	1.75	—
^{163}Dy	1.05	0.864	0.679	—
^{82}Se	3.93	—	—	—
^{208}Pb	0.373	—	—	—
^{75}As	—	—	—	—
^{202}Hg	—	—	—	—

注：“—”表示未检出。

Note：“—” means not detected.

步分析发现，此 12 种元素中 Al、Fe、Cu、Sr、Ni、V 的浸出率均为水煎煮＞水热浸＞ 70% 乙醇回流；Zn、Mo 的浸出率由大到小为：水煎煮＞ 70% 乙醇回流＞水热浸；Co、Cd、Cr 的浸出率为 70% 乙醇回流＞水煎煮＞水热浸。将贡菊 4 种提取方法的浸出率进行比较，结果见表 5。

表 5　贡菊不同提取方法浸出率的统计分析 (%)

Tab 5　Statistical analysis on the leaching rates of different extraction methods of Gongju (%)

提取方法	浸出率范围	均值	中位值
水煎煮	0.373 ～ 31.0	5.71	3.18
水热浸 1.5 h	0.327 ～ 29.4	4.80	2.17
水热浸 1 h	0.443 ～ 25.0	4.30	1.71
70% 乙醇回流	0.108 ～ 34.9	3.93	1.22

贡菊水煎煮提取液中 20 种无机元素浸出率均值明显高于水热浸和 70% 乙醇回流，其中 70% 乙醇回流提取液元素浸出率均值最小，但元素浸出率范围最大，说明 70% 乙醇回流提取液中多数元素的浸出率偏低，不同元素之间的浸出率差异较大。

3　讨论

3.1　*制剂中菊花的制法不同则无机元素的含量不同*

2020 年版《中国药典》一部收载以菊花提取液入药的中药制剂共 28 个，其中 19 个制剂中菊花的提取方法为加水煎煮法，煎煮次数 1 ～ 3 次，每次 1 ～ 3 h，剂型包括胶囊剂 7 个，片剂 6 个，颗粒剂 2 个，丸剂、口服液、糖浆剂、合剂各 1 个；6 个制剂中菊花的提取方法为加水热浸法，热浸 2 ～ 3 次，每次 0.5 ～ 2 h，剂型包括片剂 3 个，胶囊剂、搽剂、颗粒剂各 1 个；黄连上清片中菊花用 70% 乙醇回流提取 2 h，药渣再加水煎煮 2 次；2 个浓缩丸中菊花提取方法为 70% 乙醇浸渍 24 h。

贡菊水煎煮提取液中 Al、Fe、Zn、Mo、Se 等 13 种无机元素含量均高于水热浸和 70% 乙醇回流提取液，此 13 种元素中，多数为人体有益元素。且 Zn、Se 是影响菊花内在品质的重要微量元素，对提高菊花花序中总黄酮、绿原酸含量的作用显著 [13]。水热浸 1.5 h 提取液中 Mn、Y 的含量高于水煎煮和 70% 乙醇回流提取液，而 70% 乙醇回流提取液中 Co、Cd、Cr 的含量高于水煎煮和水热浸提取液。

3.2　*无机元素的浸出率高低与其在贡菊中的存在形态有关*

水煎煮提取液中无机元素的浸出率普遍高于水热浸和 70% 乙醇回流。熊冬梅等 [8] 通过研究不同品种菊花茶中重金属溶出特性，推测出溶出率的差异可能取决于元素在菊花中的存在形态，游离态或无机态元素溶出率高，有机态的元素难溶于水所以溶出率低。贡菊中 Al、Fe、Cu、Sr、Ni、V 这 6 种元素经水煎煮和水热浸的浸出率明显高于 70% 乙醇回流，原因可能是此 6 种元素在贡菊中主要以易溶于水的形式存在 [14]；水煎煮的浸出率高于水热浸可能是这 6 种元素在高温时更易溶出 [15]。水热浸 1.5 h 的贡菊提取液中无机元素浸出率高于水热浸 1 h，此结果与徐世伟等 [12] 研究不同浸泡时间下黄山贡菊中微量元素的溶出试验结果一致，原因是延长浸泡时间会有助于无机元素的溶出。

3.3　*有害元素和有益元素含量及浸出率情况分析*

贡菊提取液中无机元素含量与其药材相比有很大程度的降低，6 种重金属及有害元素（Pb、Cd、Hg、As、Cu、Cr）的含量均集中在较低范围（0 ～ 0.686 mg•kg^{-1}）内。参考 WM/T 2-2004《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》[16]，Pb、Cd、Hg、As、Cu 的限量值分别为 5.0、0.3、0.2、2.0、20.0 mg•kg^{-1}。Cr 元素在 2020 年版《中国药典》[17]

和 WM/T 2-2004《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》中暂无相关限量规定。因菊花为药食同源中药[18]，故 Cr 元素限量值参考 GB 2762-2022《食品安全国家标准食品中污染物限量》[19] 为 0.5 mg • kg^{-1}。本研究所测贡菊提取液中 6 种重金属及有害元素的含量均在限量值以下，除 Cu 和 Cr 的浸出率水平在 30% 上下浮动，其他重金属及有害元素浸出率均不超过 2%。提取液中人体必需的有益元素 V、Ni、Fe、Mn、Co、Zn、Se、Mo 含量在较小范围内（0 ～ 5.36 mg • kg^{-1}）波动，有益元素除 V 的浸出率最高达 10% 外，其他元素的浸出率均低于 5.5%。总体来说，重金属及有害元素浸出率差异比有益元素大，也比有益元素更难溶出，但是 Cu 和 Cr 的浸出率相对较高，对于菊花提取液中重金属及有害元素含量问题仍需重点关注。

4 结论

本研究根据含菊花中药制剂中菊花的主要提取方法，制备贡菊水煎煮、水热浸 1.5 h、水热浸 1 h 和 70% 乙醇回流提取液，运用 ICP-MS 法测定不同提取液中 20 种无机元素的含量，并计算其浸出率。本研究发现，制剂中菊花的提取方法会影响其提取液中无机元素的含量和浸出率。总体来说，无机元素的含量和浸出率由高到低的顺序为：水煎煮提取液＞水热浸提取液＞ 70% 乙醇回流提取液。无机元素的含量与中药中有效成分的含量密切相关，影响中药的有效性和安全性。不同制剂中菊花的不同提取方法是否影响菊花的临床功效，有待进一步研究。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.

[2] 牛广东 . 不同产地杭白菊中绿原酸、木樨草苷、异绿原酸含量分析 [J]. 河南大学学报（医学版），2022，41（2）：99-102.

[3] 赵先银，刘梦扬，王丹，等 . 药食两用中草药防治酒精性肝病的研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（2）：231-237.

[4] 纪宝玉，王炫璎，裴莉昕，等 . 不同商品规格怀菊花无机元素的 ICP-MS 分析 [J]. 中药材，2021，44（8）：1914-1920.

[5] 邓淙友，吴辉强，李定发，等 . ICP-MS 法测定不同产地菊花药材中重金属含量及聚类分析 [J]. 湖南中医杂志，2020，36（10）：173-176.

[6] 费毅琴，龙小艳，吕盼，等 . 菊花及水煎液中 21 种金属元素的分析与评价 [J]. 中国药师，2018，21（4）：617-623.

[7] 权春梅 . 亳州 4 种地产药材提取前后重金属转移率及风险评估研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（3）：59-63.

[8] 熊冬梅，郭素娟，谢鑫，等 . 不同品种菊花茶中重金属含量检测及溶出率分析 [J]. 中国卫生检验杂志，2018，28（19）：2420-2421，2424.

[9] 杨义钧 . 3 种菊花茶中 6 种微量元素的初级形态及溶出特性研究 [J]. 光谱实验室，2009，26（4）：959-962.

[10] 李向荣，方晓，刘晓光 . 降压中药饮片中无机元素煎出率的研究 [J]. 中国中药杂志，2001，24（3）：62-63.

[11] 衷明华 . 怀菊贡菊微量元素的初级形态分析及溶出率比较 [A] // 中国化学会第九届全国仪器分析及样品预处理学术研讨会论文集 [C]. 2017：62-64.

[12] 徐世伟，徐蓉，孙雨茜，等 . 电感耦合等离子体质谱法分析菊花茶中微量元素含量及其溶出特性 [J]. 食品安全质量检测学报，2016，7（12）：4946-4954.

[13] 汤璐，林江辉，闫广轩，等 . 铜、锌、硒对药用菊花主要有效成分和花中硒含量的影响 [J]. 植物营养与肥料学报，2009，15（6）：1475-1480.

[14] 刘月新，邹茜，袁园，等 . 不同产地玉竹中金属元素的水溶特性和含量特征研究 [J]. 药学研究，2022，41（1）：22-25.

[15] 许月明，周守标，孔娟娟 . 富硒黄山贡菊中硒的浸出率及硒形态分析 [J]. 绵阳师范学院学报，2017，36（5）：55-57.

[16] 中华人民共和国商务部 . 药用植物及制剂外经贸绿色行业标准：WM/T 2-2004 [S]. 北京：中国标准出版社，2005.

[17] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：524.

[18] 谢莉，邹维，肖瑶，等 . 3 种药食同源药材中 8 种有害金属元素测定及初步健康风险评估 [J]. 中成药，2021，43（8）：2263-2267.

[19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局 . 食品安全国家标准食品中污染物限量：GB 2762-2022 [S]. 北京：中国标准出版社，2022.

（收稿日期：2022-09-02；修回日期：2022-10-20）

医院药学

卫生技术评估为 4 种生物制剂在炎症性肠病快速遴选中提供循证医学证据的应用与实践

彭苗苗[1, 2]（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 为医疗机构合理采购及炎症性肠病（IBD）患者合理选择生物制剂提供循证医学证据。**方法** 依据《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南》制订评估体系，查阅相关药品说明书、临床指南、国家基本药物目录、国家医保目录及 Drugbank 等相关网站信息，并检索中国知网、PubMed、万方、维普等数据库中相关文献，收集英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗 4 种生物制剂在 IBD 治疗方面的相关信息，从药学特性、有效性、安全性、经济性、其他属性五个方面进行量化评分，并依据评分结果划分推荐级别。**结果** 4 种生物制剂的评分分别为：英夫利西单抗 71.5 分，阿达木单抗 77.75 分，维得利珠单抗 76.5 分，乌司奴单抗 85 分，4 种生物制剂评分均在 70 分以上，较强推荐进入医疗机构目录。英夫利西单抗和阿达木单抗在药学特征方面较有优势，评分均为 19 分；英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗在有效性方面均有较强优势，评分均为 18 分；乌司奴单抗在安全性方面和经济性方面均较有优势，评分分别为 16.5 分和 20 分；阿达木单抗在其他属性方面较有优势，评分为 12.75 分。**结论** 本次卫生技术评估可为医疗机构开展药品评价与遴选提供实践经验，同时为临床在 IBD 患者选择生物制剂时提供循证依据。

关键词：卫生技术评估；药品遴选与评价；英夫利西单抗；阿达木单抗；维得利珠单抗；乌司奴单抗；炎症性肠病

中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0218-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.035

Health technology assessment of evidence-based medical evidence for the rapid selection of four biologics for inflammatory bowel disease

PENG Miao-miao[1, 2] (1. *Department of Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing* 210008; 2. *Nanjing Center for Clinical Pharmacy, Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To provide evidence-based medical evidence for rational procurement in medical institutions and rational selection of biological agents for patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Methods** The evaluation system was established according to the "Quick Guide for Drug Evaluation and Selection in Chinese Medical Institutions". By referring to drug specifications, clinical guidelines, National Essential Medicine Directory, National Medical Insurance Directory, Drugbank and other related websites. We searched related literatures in CNKI, PubMed, Wanfang and VIP databases, and collected information about infliximab, adalimumab, vedolizumab and ustekinumab for IBD. Quantitative scoring was used for five aspects of pharmaceutical characteristics, efficacy, safety, economy and other attributes, and recommendation levels were divided according to the scoring. **Results** The scores of the four biological agents were: 71.5 for infliximab, 77.75 for adalimumab,

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方面的工作，email：pengmiaomiao1984@126.com

76.5 for vedolizumab, and 85 for ustekinumab. The scores of the four agents were all above 70, suggesting inclusion in the list of medical institutions. Infliximab and adalimumab had advantages in pharmaceutical characteristics with score of 19. Infliximab, adalimumab, vedolizumab and ustekinumab all had strong advantages in effectiveness with the scores of 18. Ustekinumab had advantages in both safety and economic burden with scores of 16.5 and 20 respectively. Adalimumab was superior to other attributes with score of 12.75. **Conclusion** Health technology assessment can provide practical experience for medical institutions to evaluate and select drug, and provide evidence-based medical evidence for selection of biological agents for IBD patients.

Key words: health technology assessment; drug selection and evaluation; infliximab; adalimumab; vedolizumab; ustekinumab; inflammatory bowel disease

炎症性肠病（IBD）常用治疗药物为 5- 氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂。生物制剂包括抗肿瘤坏死因子 -α（TNF-α），目前全球已经批准上市的 TNF-α 共 4 种，分别是英夫利西单抗、阿达木单抗、戈利木单抗和赛妥珠单抗。在美国，英夫利西单抗和阿达木单抗均获批治疗溃疡性结肠炎（UC）和克罗恩病（CD），戈利木单抗仅获批用于治疗 UC，赛妥珠单抗仅获批用于治疗 CD。在国内，英夫利西单抗获批用于治疗 UC 和 CD，阿达木单抗仅获批用于治疗 CD。戈利木单抗在国内未获批用于治疗 IBD，赛妥珠单抗在国内还未上市 [1]。IL-12/23 单克隆抗体中的乌司奴单抗，美国分别于 2016 年及 2019 年批准其用于 CD 及 UC 治疗，我国于 2020 年 5 月 20 日批准其用于成人 CD 治疗。生物制剂还包括新型整合素拮抗剂维得利珠单抗，该药是一种具有器官靶向性的人源化单抗，可选择性结合淋巴细胞表面整合素 α4β7，从而抑制淋巴细胞向肠黏膜迁移和聚集，减轻肠道局部炎症反应。美国于 2014 年批准维得利珠单抗用于 UC 和 CD 治疗，我国于 2020 年 11 月 23 日批准维得利珠单抗用于成人 UC 和 CD 治疗。

因此本文主要分析目前在国内上市，且在中国获批 IBD 适应证的 4 种原研的生物制剂（英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗），从药学特征、有效性、安全性、经济性及其他属性五个方面对治疗 IBD 的生物制剂进行卫生技术评估，以期对医疗机构遴选、合理应用 IBD 生物制剂提供依据。

1 资料与方法

1.1 药品遴选卫生技术评估技术

依据《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南》（以下简称指南）[2]，对英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗 4 种生物制剂在 IBD 中的适应证进行卫生技术评估。从药学特征、有效性、安全性、经济性及其他属性五个方面进行综合评估，评分依据参照药品说明书、国内外炎症性肠病指南 / 规范、国家基本药物目录、国家医保目录、中国知网、万方数据、维普网、Embased、PubMed 等中外文数据库及 Drugbank 等相关网站信息。具体评分细则见表 1。

2 结果

2.1 药学特性

2.1.1 适应证 [3-4] 英夫利西单抗是一种人鼠嵌合型 IgG1 单克隆抗体，其适应证为成人及 6 岁以上儿童 CD、瘘管型 CD、成人 UC。阿达木单抗是完全人源化的 TNF-α 单抗，适应证为充足皮质类固醇和 / 或免疫抑制剂治疗应答不充分、不耐受或禁忌的中重度活动性 CD 患者。维得利珠单抗作为一种具有器官靶向性的人源化单抗，适应证主要为对传统治疗或 TNF-α 抑制剂应答不充分、失应答或不耐受的中重度活动性 UC 和 CD 的成年患者。乌司奴单抗是抗白细胞介素 12 和 23 的全人源化 IgG1 单抗，在国内的适应证为对于传统治疗或 TNF-α 拮抗剂应答不足、失应答或无法耐受的成年中重度活动性 CD 患者。因此英夫利西单抗为 IBD 一线治疗药物，适应证得分为 3 分，乌司奴单抗、阿达木单抗和维得利珠单抗均为二线治疗药物，得分均为 2 分。

2.1.2 药理作用 在治疗 IBD 的药物中，生物制剂通过不同的靶点和作用机制在 IBD 的治疗中发挥了良好的作用，且安全性较高，已经成为治疗 IBD 的主流药物。4 种生物制剂中，英夫利西单抗和阿达木单抗为 TNF-α 制剂，英夫利西单抗是一种人鼠嵌合型 IgG1 单克隆抗体，阿达木单抗是一种全人源化 IgG1 单克隆抗体，免疫原性相对较低，过敏反应、输液反应的发生率也相对较低。TNF 具有多种生物学效应的炎性介质，在炎症反应早期出现，可通过刺激细胞间黏附分子表达，增加白细胞在炎症局部的聚集和活化；刺激

表 1 医疗机构药品评价与遴选量化记录表

Tab 1 Quantitative record form for drug evaluation and selection in medical institutions

指标体系及权重系数	细则（指标信息和数据来源）
一、药学特性（20）	
适应证（3）	□ 3 临床必需，首选 / 一线用药
	□ 2 临床需要，次选 / 二线用药
	□ 1 可选 / 替代药品较多
药理作用（3）	□ 3 疗效确切，作用机制明确
	□ 2 疗效确切，作用机制尚不十分明确
	□ 1 疗效一般，作用机制不明确
体内过程（3）	□ 3 体内过程明确，药动学参数完整
	□ 2 体内过程基本明确，药动学参数不完整
	□ 1 体内过程尚不明确，无药动学相关研究
药剂学和使用方法（6）（可多选）	□ 1 主要成分及辅料明确
	□ 2 剂型适宜
	□ 1 给药剂量便于掌握
	□ 1 给药频次适宜
	□ 1 使用方便
一致性评价（5）	□ 5 原研药品 / 参比药品
	□ 3 通过一致性评价的仿制药品
	□ 1 非原研或未通过一致性评价药品
二、有效性（20）	□ 20 诊疗规范推荐（国家卫生行政部门）
	□ 18 指南Ⅰ级推荐（A 级证据 18，B 级证据 17，C 级证据 16，其他 15）
	□ 14 指南Ⅱ级及以下推荐（A 级证据 14，B 级证据 13，C 级证据 12，其他 11）
	□ 10 专家共识推荐
	□ 6 以上均无推荐
三、安全性	
不良反应分级或 CTCAE 分级（7）	□ 7 症状轻微，无需治疗或 CTC 1 级
	□ 6 症状较轻，需要干预或 CTC 2 级
	□ 5 症状明显、需要干预或 CTC 3 级
	□ 4 症状严重，危及生命或 CTC 4 ～ 5 级，发生率＜ 0.1%
	□ 3 症状严重，危及生命或 CTC 4 ～ 5 级，发生率（0.1% ～ 1%）
	□ 2 症状严重，危及生命或 CTC 4 ～ 5 级，发生率＞（1% ～ 10%）
	□ 1 症状严重，危及生命或 CTC 4 ～ 5 级，发生率＞ 10%
特殊人群用（可多选）（7）	□ 2 儿童可用
	□ 1 老人可用
	□ 1 孕妇可用
	□ 1 哺乳期妇女可用
	□ 1 肝功能异常可用
	□ 1 肾功能异常可用
药物相互作用所致不良反应（3）	□ 3 轻中度：一般无需调整用药剂量
	□ 2 重度：需要调整剂量
	□ 1 禁忌：禁止在同一时段使用
其他（可多选）（3）	□ 1 不良反应均为可逆性
	□ 1 无致畸致癌
	□ 1 无特别用药警示
四、经济性（20）	
同通用名药品（5）	□ 5 日均治疗费用最低
	□ 4 日均治疗费用低于中位数
	□ 3 日均治疗费用居中
	□ 2 日均治疗费用高于中位数
	□ 1 日均治疗费用最高
主要适应证可替代药品（15）	□ 15 日均治疗费用最低
	□ 13 日均治疗费用低于中位数
	□ 11 日均治疗费用居中

续表 1

指标体系及权重系数	细则（指标信息和数据来源）
	□ 9 日均治疗费用高于中位数
	□ 7 日均治疗费用最高
五、其他属性	
国家医保（5）	□ 5 国家医保甲类，且没有限制条件
	□ 4 国家医保甲类，有支付限制条件
	□ 3 国家医保乙类 / 国家谈判药品，且没有支付条件限制
	□ 2 国家医保乙类 / 国家谈判药品，有支付条件限制
	□ 1 不在国家医保目录
基本药物（3）	□ 3 在《国家基本药物目录》，没有△要求
	□ 2 在《国家基本药物目录》，有△要求
	□ 1 不在《国家基本药物目录》
贮藏条件（3）	□ 3 常温贮藏
	□ 2.5 常温贮藏，避光或遮光
	□ 2 阴凉贮藏
	□ 1.5 阴凉贮藏，避光或遮光
	□ 1 冷藏 / 冷冻贮藏
药品有效期（3）	□ 3 ＞ 36 个月
	□ 2 24 ～ 36 个月
	□ 1 ＜ 24 个月
全球使用情况（3）	□ 3 美国、欧洲、日本均已上市
	□ 2 美国或欧洲或日本上市
	□ 1 美国、欧洲、日本均未上市
生产企业状况（3）	□ 3 生产企业为世界销量前 50 制药企业（美国制药经理人）
	□ 2 生产企业在国家工业和信息化部医药工业百强榜
	□ 1 其他企业

促炎细胞因子生成以增强、放大炎症级联反应；刺激成纤维细胞和巨噬细胞释放组织降解酶；诱导上皮间紧密连接分解和肠上皮细胞凋亡，破坏肠黏膜的屏障作用，增加肠黏膜在固有免疫和获得性免疫中暴露于促炎因子的机会，导致肠黏膜损害[5]。TNF-α 最主要的作用机制是与可溶性和跨膜性 TNF 结合，以抑制其与 TNF 受体（p55/p75 亚单位）结合，阻断其生物学活性，达到抗炎、保护肠黏膜的效果[6]。该类药物在提高 IBD 患者的临床缓解率、促进黏膜愈合及瘘管闭合等方面疗效显著，并能有效改善 IBD 患者疾病活动度，降低住院率和手术率，降低患者类固醇类药物的用量，提高患者的生存质量[7-8]。

整合素是由 α 和 β 亚基组成的一种异二聚体糖蛋白跨膜受体，可介导细胞的黏附、信号转导和迁移。整合素受体拮抗剂在 IBD 的运用中是通过拮抗 a4β7 整合素与肠黏膜血管地址素细胞黏附分子 1 相结合，从而抑制炎性细胞聚集活化，防止其迁移至肠道组织，减轻炎症反应。维得利珠单抗是重组人源化免疫球蛋白 G1 单克隆抗体，独特作用机制在于阻断 α4β7 T 细胞的肠道运输，从而抑制肠道炎症反应[9]。有研究表明维得利珠单抗在中重度 UC 患者诱导和维持治疗期临床疗效显著优于安慰剂组（P ＜ 0.01），其维持治疗可以使患者长期获益[10-11]。

白介素（IL）-12 和 IL-23 能够通过刺激辅助性 T 细胞增殖从而导致肠黏膜及全身多个组织器官急性炎性损伤，还可促进 IL-C1 和 IL-C3 互相转化，导致肠道慢性炎性损伤。乌司奴单抗是抗 IL-12/23 因子制剂的代表药物，能够通过与两者共有的 p40 亚单位结合，阻止 IL-12/23 与细胞表面的相应受体结合而拮抗肠内外炎症反应[9]。乌司奴单抗在 UC 患者诱导缓解、CD 合并肛瘘患者的诱导缓解肛周病变疗效显著，并且能有效提高患者的生存质量、缓解 IBD 患者的临床疗效，减少住院率和手术率[12-14]。因此，4 种生物制剂的疗效确切，作用机制明确，均为 3 分。

2.1.3　体内过程　英夫利西单抗治疗 UC 和 CD 的给药方法为第 0、2、6 周以 5 mg • kg^{-1} 静脉输注作为诱导缓解，以后每隔 8 周以相同剂量给药一次，其终末半衰期为 7.7 ～ 9.5 d，使用 3 ～ 10 mg 维持剂量治疗 8 周后，英夫利西单抗中位血清质量浓度为 0.5 ～ 0.6 μg • mL^{-1}。英夫利西单抗单次给药剂量达 20 mg•kg^{-1} 时未出现直接的毒性反应，但应密切监测患者不良反应。英夫利西单抗体内过程明确，药动学参数完整，得分为 3 分[15]。

阿达木单抗治疗 CD 的使用方法为：首次治疗剂量为皮下注射 160 mg，2 周后改为 80 mg 皮下注射，之后每 2 周皮下注射 1 次，每次 40 mg，诱导缓解后每 2 周皮下注射 1 次，每次 40 mg 作为维持缓解。阿达木单抗的平均末相消除半衰期约为 2 周，稳态表观分布容积为 5 ～ 6 L，平均绝对生物利用度为 64%，稳态平均谷浓度为 5 μg • mL^{-1}，单次给药后 7 d 可达到血清峰浓度。阿达木单抗遗传毒性试验未发现其可能对人体产生特殊的危害；围产期发育毒性研究中，阿达木单抗剂量达 100 mg • kg^{-1} 时，没有对短尾猴胎仔造成危害 [16]。阿达木单抗体内过程明确，药动学参数完整，得分为 3 分。

维得利珠单抗治疗 UC 和 CD 的给药周期为第 0、2、6 周，以后每隔 8 周给药一次，单次剂量为静脉输注 300 mg，第 6 周时平均血清浓度约为 27.01 μg • mL^{-1}，每 8 周给药 1 次维持治疗稳态谷浓度在 UC 和 CD 患者中分别为 11.2 和 13.0 μg • mL^{-1}[17-18]，分布容积约为 4.84 L，消除半衰期（$t_{1/2}$）为 25.5 d。临床试验给予维得利珠单抗高达 10 mg • kg^{-1} 剂量（大约为建议剂量的 2.5 倍），未观察到剂量限制性毒性 [19]。维得利珠单抗体的体内过程明确，药动学参数完整，得分为 3 分。

乌司奴单抗治疗 CD 给药方法为首次静脉输注 390 mg（55 ～ 85 kg），第 8 周给予 90 mg 皮下注射，之后每 12 周 90 mg 皮下注射（如果每 12 周给药 1 次期间失应答，缩短至每 8 周注射一次），首次静脉诱导后，乌司奴单抗血清峰浓度中位数是 126.1 μg • mL^{-1}，每 12 周 1 次 90 mg 的稳态谷浓度中位值范围为 0.61 ～ 0.76 μg • mL^{-1}。单次皮下注射 90 mg 后，血清浓度达峰时间（t_{max}）的中位值为 8.5 d，生物利用度为 57.2%，清除半衰期中位值约为 3 周，表观分布容积为 15.7 L[20]。动物体内每周两次给予乌司奴单抗最高剂量达人给药暴露量的 100 倍以上，未见生殖毒性，尚未进行其致癌性和遗传毒性的试验。乌司奴单抗的体内过程明确，药动学参数完整，得分为 3 分。

2.1.4 药剂学和使用方法及一致性评价 注射用英夫利西单抗的主要成分是英夫利西单抗，辅料包括蔗糖、吐温 -80、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠，主要成分及辅料明确，得 1 分；剂型适宜得 2 分；给药剂量明确便于掌握，得 1 分；给药频次适宜得 1 分；需要在医师和护士监护下静脉输注，输注过程中需要严密观察患者是否有输液反应和过敏反应，使用方便得 0 分。该项总得分为 5 分。阿达木单抗注射液主要成分是阿达木单抗，辅料包括甘露醇、柠檬酸 - 水合物、柠檬酸钠、磷酸二氢钠二水合物、磷酸氢二钠二水合物、氯化钠、聚山梨醇 80、氢氧化钠、注射用水，主要成分及辅料明确，得 1 分；剂型适宜得 2 分；给药剂量明确便于掌握，得 1 分；给药频次适宜得 1 分；该药为皮下注射，使用方便得 1 分。该项总得分为 6 分。注射用维得利珠单抗的主要成分是维得利珠单抗，辅料包括 *L*- 组氨酸、*L*- 组氨酸盐酸盐、*L*- 精氨酸盐酸盐、蔗糖和聚山梨酯 80，主要成分及辅料明确，得 1 分；剂型适宜得 2 分；给药剂量明确便于掌握，得 1 分；给药频次适宜得 1 分；需要在医师和护士监护下静脉输注，输注过程中需要严密观察患者是否有输液反应和过敏反应，使用方便得 0 分。该项总得分为 5 分。乌司奴单抗注射液的主要成分为乌司奴单抗，辅料包括蔗糖、*L*- 组氨酸、*L*- 组氨酸盐酸盐 - 水合物、聚山梨酯 80、注射用水，主要成分及辅料明确，得 1 分；剂型适宜得 2 分；给药剂量明确便于掌握，得 1 分；给药频次适宜得 1 分，仅首次用药需要在医师和护士监护下静脉输注，第二次开始皮下注射即可，使用方便，取平均值 0.5 分。该项总得分为 5.5 分。

一致性评价方面，本文分析的英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗均为原研药品，得分均为 5 分。

药学特性总得分情况，英夫利西单抗为 19 分，阿达木单抗为 19 分，维得利珠单抗为 18 分，乌司奴单抗为 18.5 分。

2.2 有效性

查阅国内外炎症性肠病相关指南和共识共 10 个，每个指南和共识对英夫利西单抗、阿达木单抗、维得利珠单抗和乌司奴单抗有不同程度的推荐，综合来看，每种生物制剂都有指南 I 级推荐的适应证，A 级证据，因此该项得分均为 18 分。详见表 2。

2.3 安全性

2.3.1 不良反应分级或 CTCAE 分级 《指南》指出，应当对待遴选药品不良反应及重度不良反应发生率进行评分，英夫利西单抗总体耐受性良好 [21]，主要不良反应包括输液反应（3% ～ 10%），多数为轻中度反应，严重输液反应的发生率约为 0.1% ～ 1%，主要临床症状包括过敏反应、惊厥、红斑和低血压 [22]，需要停药并使用药物干预；迟发性变态反应（1% ～ 2%），可表现为关节痛、肌肉痛、荨麻疹、面部水肿等，症状多可自行消退；出现自身抗体（40%），一般无需停

表 2 IFX、ADA、VDZ 和 UST 治疗 IBD 的国内外诊疗规范、指南及专家共识推荐情况

Tab 2 Domestic and international diagnosis and treatment norms，guidelines and expert consensus for infliximab，adalimumab，vedolizumab and ustekinumab

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2022	Use of biologics and small molecule drugs for the management of moderate to severe ulcerative colitis：IG-IBD clinical guidelines based on the GRADE methodology（使用生物制剂和小分子药物治疗中重度溃疡性结肠炎的临床指南）	意大利炎症性肠病研究组	对于未接受过生物制剂治疗且常规治疗难治的中重度 UC 成人患者，推荐使用 IFX 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据），与 ADA 相比，建议使用 IFX（有条件推荐，低质量证据）；使用 IFX 诱导缓解的，继续维持治疗（强烈推荐，高质量证据）	对于未接受过生物制剂治疗且常规治疗难治的中重度 UC 成人患者，推荐使用 ADA 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据）；使用 ADA 诱导缓解的，继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）	对于未接受过生物制剂治疗且常规治疗难治的中重度 UC 成人患者，推荐使用 VDZ 诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据），与 ADA 相比，建议使用 VDZ（有条件推荐，诱导缓解低质量证据，维持缓解中等质量证据）；使用 VDZ 诱导缓解的，继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）	对于未接受过生物制剂治疗且常规治疗难治的中重度 UC 成人患者，推荐使用 UST 诱导缓解（强烈推荐，低质量证据）；对于至少一种生物制剂难治的中重度 UC 成人患者，推荐使用 UST 来诱导缓解治疗（强烈推荐，低质量证据），与 ADA 或 VZD 相比，建议使用 UST（有条件推荐，极低质量证据）；使用 UST 诱导缓解的，继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）
2021	ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis：Medical Treatment（ECCO UC 治疗指南：药物治疗）	ECCO	建议 IFX 诱导对常规治疗反应不足或不耐受的中重度 UC 患者缓解（强烈推荐，中等质量证据），有应答者继续用于维持治疗（强烈推荐，高质量证据）	建议使用 ADA 来诱导对常规治疗反应不足或不耐受的中重度 UC 患者缓解（强烈推荐，中等质量证据），有应答者继续用于维持治疗（强烈推荐，高质量证据）	建议使用 VDZ 治疗对常规治疗反应不足或耐受不良的中重度活动性 UC 患者的诱导缓解（强烈推荐，低质量证据），有应答者继续用于维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；建议使用 VDZ 诱导和维持中度至重度活动性 UC 患者的缓解（弱推荐，低质量证据）	推荐 UST 治疗对常规治疗反应不足或不耐受的中重度活动性 UC 患者诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据），有应答者继续用于维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2021	AGA Clinical Practice Guidelines on the Medical Management of Moderate to Severe Luminal and Perianal Fistulizing Crohn’s Disease（AGA 中重度管腔和肛周瘘性 CD 医疗管理临床实践指南）	AGA	对于中重度门诊 CD 患者，建议使用 IFX 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；对于合并肛瘘的活动性门诊 CD 患者，推荐使用 IFX 诱导和维持瘘管愈合（强烈推荐，中等质量证据）；对于未使用过生物制剂的中度至重度门诊 CD 患者，建议使用 IFX 诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据）	推荐 ADA 用于中重度门诊 CD 患者诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；推荐其用于未使用过生物制剂的中重度门诊 CD 患者诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据）；推荐其用于合并肛瘘的活动性门诊 CD 患者诱导和维持瘘管愈合（有条件推荐，低质量证据）；推荐用于肿瘤坏死因子继发无应答的中重度 CD 患者诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据）	中重度门诊 CD 患者，建议使用 VDZ 诱导缓解（有条件推荐，低质量证据）并维持治疗（有条件推荐，中等质量证据）；伴活动性肛瘘的中重度门诊 CD 患者，使用 VDZ 诱导缓解并维持治疗（有条件推荐，低质量证据）；对于未使用过生物制剂的中度至重度门诊 CD 患者，建议使用 VDZ 诱导缓解（有条件推荐，低质量证据）；对 TNF-α 初始或继发无应答的中重度 CD 患者，建议使用 VDZ 诱导缓解导和维持瘘管愈合（有条件推荐，低质量证据）	中重度门诊 CD 患者，建议使用 UST 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；未使用过生物制剂的中重度门诊 CD 患者，建议使用 UST 诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据）；TNF-α 初始或继发无应答的中重度 CD 患者，建议使用 UST（强烈推荐，中等质量证据）诱导缓解；对于合并肛瘘的活动性门诊 CD 患者，可以选择 UST 诱导和维持瘘管愈合（有条件推荐，低质量证据）
2020	AGA Clinical Practice Guidelines on the Management of Moderate to Severe Ulcerative Colitis（AGA 中重度 UC 的临床实践指南）	AGA	门诊中重度 UC 患者，推荐使用 IFX 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据），并推荐早期使用（有条件推荐，低质量证据）；门诊中重度 UC 患者，如果既往未使用过生物制剂，推荐 IFX 诱导缓解（有条件推荐，中等质量证据）；住院的急性重症 UC 患者如果对激素不应答，建议选择 IFX 转换治疗（有条件推荐，低质量证据）	中重度 UC 的成人门诊患者，推荐使用 ADA 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据），并推荐早期使用（有条件推荐，低质量证据）	中重度 UC 的成人门诊患者，推荐使用 VDZ 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据），并推荐早期使用（有条件推荐，低质量证据）；门诊中重度 UC 患者，如果既往未使用过生物制剂，推荐 VDZ 诱导缓解（有条件推荐，中等质量证据）	对于中重度 UC 的成人门诊患者，推荐使用 UST 诱导缓解并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据），并推荐早期使用（有条件推荐，低质量证据）；对于初始使用 IFX 诱导缓解无应答的 UC 患者，建议 UST 诱导缓解（有条件推荐，低质量证据）

续表 2

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2019	ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease：Medical Treatment（ECCO 治疗指南：CD 的医学治疗）	ECCO	推荐 IFX 用于对常规治疗无效的中至重度 CD 患者诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据），并继续维持治疗（强烈推荐，中度等质量证据）；对常规治疗反应不充分的中度至重度 CD 患者，建议使用 IFX 联合硫唑嘌呤诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据）；推荐 IFX 用于 CD 复杂肛周瘘的诱导和缓解维持（强烈推荐，低质量证据）	推荐 ADA 用于对常规治疗无效的中度至重度 CD 患者诱导缓解（强烈推荐，中等质量证据），并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；推荐 ADA 联合硫唑嘌呤诱导 CD 缓解（弱推荐，中等质量证据）；建议 ADA 用于 CD 复杂肛周瘘的诱导和缓解维持（弱推荐，低质量证据）	推荐 VDZ 用于对常规治疗和 / 或抗肿瘤坏死因子治疗反应不足的中重度 CD 患者诱导反应和缓解（强烈推荐，中等质量证据），并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；建议使用 VDZ 治疗肿瘤坏死因子治疗失败的中重度活动性腔内 CD（弱推荐，低质量证据）	对于对常规治疗和 / 或抗 TNF 治疗反应不足的中度至重度活动性管腔 CD 患者，我们推荐使用 UST 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据）；推荐 UST 用于对常规治疗和 / 或 TNF-α 治疗反应不充分的中重度 CD 患者诱导缓解（强烈推荐，高质量证据），并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）
2019	ACG Clinical Guideline：Ulcerative Colitis in Adults（ACG 临床指南：成人 UC）	ACG	对于中度至重度活动期 UC 患者，建议使用 IFX 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据），并维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；糖皮质激素治疗 3 ～ 5 d 无应答的 UC 患者，建议使用 IFX 挽救治疗，诱导缓解后继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）	对于中度至重度活动期 UC 患者，建议使用 ADA 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据），并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）	对于中重度活动性 UC 患者，推荐使用 VDZ 诱导缓解，并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；对于 TNF-α 治疗失败的中重度活动性 UC 患者，推荐 VDZ 诱导缓解，并继续维持治疗（强烈推荐，中等质量证据）；环孢素诱导缓解的 UC 患者，建议使用 VDZ 维持治疗（有条件推荐，低质量证据）	无推荐

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2019	CD 肛瘘诊断与治疗的专家共识意见	CD 肛瘘共识专家组	建议在肛周脓肿充分引流的前提下使用 IFX 治疗活动性肛瘘 CD 以诱导临床缓解；对有临床应答者继续使用 IFX 以维持临床缓解，等级判定：推荐	无推荐	无推荐	无推荐
2019	儿童炎症性肠病诊断和治疗专家共识	中华医学会儿科学分会消化学组	IFX 可用于中重度活动期 CD 的诱导和维持缓解治疗；激素耐药的活动性 CD 的诱导缓解治疗；瘘管性 CD；有严重肠外表现（如关节炎、坏疽性脓皮病等）的 CD，有效者，继续维持治疗；可用于有重度 UC 患者激素治疗无效后转换治疗	无推荐	无推荐	无推荐
2018	ACG Clinical Guideline：Management of Crohn's Disease in Adults（ACG 临床指南：成人 CD 的管理）	ACG	推荐 IFX 可用于常规治疗无效的 CD 患者（强烈推荐，中等质量证据）；并推荐用于治疗有肛周瘘管、直肠阴道瘘的 CD 患者（强烈推荐，中等质量证据）；可用于重度活动性 CD（强烈推荐，中等质量证据），及暴发性 CD（有条件推荐，低质量证据）的治疗；应继续用于其诱导缓解后的维持治疗（强烈推荐，高质量证据）	推荐 ADA 用于常规治疗无效的 CD 患者（强烈推荐，中等质量证据）；对有肛周瘘管的 CD 可能有效（强烈推荐，低质量证据）；可用于重度活动性 CD（强烈推荐，中等质量证据）；应继续用于其诱导缓解后的维持治疗（强烈推荐，高质量证据）	中重度活动性 CD 患者，推荐使用 VDZ 诱导缓解（强烈推荐，高质量证据），并继续用于维持治疗（有条件推荐，中等质量证据）	UST 可用于传统治疗或 TNF-α 治疗失败的中重度 CD 患者的诱导缓解（强烈推荐，高质量证据）；并继续用于维持治疗（有条件推荐，中等质量证据）

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2018	炎症性肠病诊断与治疗的共识意见	中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组	IFX 可用于激素和免疫抑制剂治疗无效或激素依赖者或不能耐受以上治疗药物的中度活动期 CD 患者；对于重度 CD 患者，可在激素无效时应用，亦可一开始就应用；诱导缓解后应继续维持治疗。可用于激素和免疫抑制剂治疗无效或激素依赖或不能耐受上述药物的中度活动期 UC 患者，及重度 UC 患者较为有效的挽救治疗措施，抗诱导 UC 缓解后应继续维持治疗	无推荐	无推荐	无推荐

续表 2

年份	文献标题	制订组织	IFX	ADA	VDZ	UST
2017	抗肿瘤坏死因子 - 单克隆抗体治疗炎症性肠病的专家共识	中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组	中重度的活动性成人或 6 ～ 17 岁儿童 CD（非狭窄非穿透型、瘘管型）患者，对糖皮质激素治疗无效或激素依赖者，和 / 或免疫抑制剂治疗无效者，或不能耐受上述药物治疗者；复杂肛瘘经充分外科引流和抗感染治疗后，建议早期应用 IFX；肠切除术后的 CD，可早期使用 IFX 静脉激素抵抗的重度活动性 UC；激素依赖的活动性 UC 及免疫抑制剂无效或不耐受者；活动性 UC 伴突出肠外表现者，推荐 IFX	无推荐	无推荐	无推荐

注（Note）：IFX. 英夫利西单抗（infliximab）；ADA. 阿达木单抗（adalimumab）；VDZ. 维得利珠单抗（vedolizumab）；UST. 乌司奴单抗（ustekinumab）。

药，出现药物性红斑狼疮（1%），停药后 1 ～ 2 周可缓解；出现各种机会性感染比较常见，多数较轻，出现严重感染时宜先停药，控制感染。说明书指出其上市后发现恶性肿瘤的发生频率为罕见（≥ 0.01%，＜ 0.1%），因此，英夫利西单抗常见不良反应分级为“症状轻微，无需治疗”，得 7 分，其严重不良反应分级属于“症状严重，危及生命，发生率＜ 0.1%”，得 4 分，该项得分取常见不良反应和严重不良反应得分的平均值为 5.5 分。

阿达木单抗总体安全性和患者耐受性良好，不良反应比较轻微，常见不良反应包括感染、头痛、皮疹和注射部位反应等，其严重不良反应包括心搏骤停、血管性水肿等，发生频率为罕见；其常见不良反应分级为“症状轻微，无需治疗”，得 7 分，严重不良反应恶性肿瘤发生率约为 0.27%，其严重不良反应分级属于“症状严重，危及生命，发生率（0.1% ～ 1%）”，得 3 分，该项得分取常见不良反应和严重不良反应得分的平均值为 5 分。

维得利珠单抗在上市后的临床应用显示了其良好的安全性。常见不良反应为疲劳、鼻咽炎、头痛和关节痛，输液反应发生率大约为 4%，仅 1% 导致治疗中断。机会性感染在所有不良反应中的占比小于 1%，发生率与安慰剂相似，多数轻到中度，机会性感染中常见的严重不良反应包括艰难梭菌和肺炎，接受标准抗感染治疗后可好转，未观察到进行性多灶性白质脑病的不良反应 [23]，因此维得利珠单抗常见不良反应分级为“症状轻微，无需治疗”，得 7 分，严重不良反应分级属于“症状较轻，需要干预”，得 6 分，该项得分取常见不良反应和严重不良反应得分的平均值为 6.5 分。

乌司奴单抗上市后的不良反应监测结果表明患者对该药的总体耐受性良好，常见不良反应为鼻咽炎和头痛，多数为轻度，免疫原性较低，药物抗体发生率很低（小于 3%）[24]。因此乌司奴单抗常见不良反应分级为“症状轻微，无需治疗”，得 7 分，最严重的不良反应为严重超敏反应（包括速发过敏反应、血管性水肿），发生频率为罕见，分级属于“症状严重，危及生命，发生率＜ 0.1%”，得 4 分，该项得分取常见不良反应和严重不良反应得分的平均值为 5.5 分。

2.3.2 特殊人群用药 英夫利西单抗可用于儿童和青少年 CD 患者，得 2 分；老人可用，得 1 分；英夫利西单抗妊娠风险分级为 B 级（低风险），ECCO 共识推荐 [25] 妊娠早期可以使用，妊娠中晚期（22 ～ 24 周）暂停使用，得 1 分；哺乳期患者使用该药品对婴儿是安全的，得 1 分 [26-27]，肝功能异常可用，得 1 分；肾功能异常可用，得 1 分。英夫利西单抗该项得分共 7 分。

阿达木单抗儿童患者可以使用，目前国际上已有 86 个国家或地区批准用于儿童 IBD 患者的治疗，得 2 分；老年患者无需调整剂量，得 1 分；阿达木单抗在妊娠期风险级别为 B 级（低风险），妊娠晚期胎盘通过率明显低于英夫利西单抗，可在妊娠全程使用 [28]，得 1 分；哺乳期 IBD 患者也可以使用，得 1 分；肝功能异常可用，得 1 分；肾功能异常可用，得 1 分。阿达木单抗该项得分共 7 分。

维得利珠单抗在儿童患者中的安全性数据尚未建立，不可用；老人可用，无需调整剂量，得 1 分；妊娠期安全性数据尚未建立，不可用；哺乳期安全性数据尚未建立，不可用；肝功能异常可用，得 1 分；肾功能异常可用，得 1 分，维得利珠单抗该项得分共 3 分。

乌司奴单抗目前在中国没有获批儿童用药的适应证，但是 FDA 及欧盟委员会批准其可以用于 6 岁及以上的患者 [29]，所以可用于儿童患者，得 2 分；老人可用，无需调整剂量，得 1 分；乌司奴单抗的妊娠风险分级为 B 级（低风险），可在妊娠末期通过胎盘，所以对于使用乌司奴单抗维持治疗的 IBD 患者，妊娠全程可继续使用该药品，应在预产期前 6 ～ 8 周使用最后一次，得 1 分 [1]；哺乳期妇女使用乌司奴单抗可能安全，但是证据不足，暂不推荐使用；肝功能异常可用，得 1 分；肾功能异常可用，得 1 分。乌司奴单抗该项得分共 6 分。

2.3.3 药物相互作用及其他 英夫利西单抗与阿那白滞素或阿巴西普可能会导致严重感染的危险增高，不建议联用；与托珠单抗联合使用，潜在发生免疫抑制的可能和感染风险会增高，避免联用；与甲氨蝶呤联用会减少英夫利西单抗抗体产生，使其浓度升高；与免疫抑制剂联用，可减少英夫利西单抗的输液反应；与 CYP450 底物药物联用，需要调整此类药物剂量，但是禁忌证中无相关药物联用信息。因此英夫利西单抗该项得分为 2 分。阿达木单抗与甲氨蝶呤联用会减少英夫利西单抗抗体产生，使其浓度升高，虽然如此，并不建议调整两者剂量；不建议与阿那白滞素或阿巴西普及其他生物类抗风湿药物联合用药，可能会增加感染或其他潜在相互作用的风险；避免与活疫苗同时使用；与 CYP450 底物药物联用，需要调整此类药物剂量，但是禁忌证中无相关药物联用信息。因此阿达木单抗该项得分为 2 分。维得利珠单抗避免与 Natalizumab 及 TNF-α、活疫苗合并使用，但是禁忌证中无相关药物联用信息，该项得分为 2 分。乌司奴单抗不应与活疫苗同时使用；与 CYP450 底物药物联用，需要调整此类药物剂量，但是禁忌证中无相关药物联用信息。因此乌司奴单抗该项得分为 2 分。

其他方面，英夫利西单抗有致恶性肿瘤的风险，不良反应不可逆，并且有警示语：严重感染和恶性肿瘤，该项得分为 0 分；阿达木单抗有致恶性肿瘤的风险，不良反应不可逆，并且有警示语：严重感染和恶性肿瘤，该项得分为 0 分；维得利珠单抗不良反应均为可逆性，无致癌致畸，无特别用药提示，该项得分为 3 分；乌司奴单抗不良反应均为可逆性，无致癌致畸，无特别用药提示，该项得分为 3 分。

安全性总得分情况，英夫利西单抗为 14.5 分，阿达木单抗为 14 分，维得利珠单抗为 14.5 分，乌司奴单抗为 16.5 分。

2.4 经济性

2.4.1 同通用名药品 通过江苏省阳光采购平台查询这 4 种生物制剂，目前维得利珠单抗和乌司奴单抗只有原研药品，没有国内仿制药品，因此两者该项得分均为 5 分。英夫利西单抗和阿达木单抗，均有国内仿制药品，且原研药品价格高于所有仿制药品，因此两者该项得分均为 1 分。

2.4.2 主要适应证可替代药品 每种生物制剂的给药频次不一样，所以治疗费用按照 IBD 患者首年的治疗费用来做比较误差较小，英夫利西单抗单价每 100 mg 为 2006.8 元，按照给药方法及 60 kg 体质量计算，每次给药 3 支，首年给药 8 次，首年治疗费用为 48 163.2 元。阿达木单抗单价每 40 mg 为 1290 元，首年共需给药 25 次，首年治疗费用为 37 410 元。维得利珠单抗单价每 300 mg 为 4980 元，首年治疗费用约为 39 840 元；乌司奴单抗静脉用药规格单价每 130 mg 为 2531 元，皮下注射规格单价每 90 mg 为 7340.6 元，首年共需给药 5 次，首年治疗费用为 36 955.4 元。因此，4 种生物制剂首年治疗费用中位数为 38 625 元，英夫利西单抗首年治疗费用最高，得分为 7 分，乌司奴单抗首年治疗费用最低，得分为 15 分，维得利珠单抗首年治疗费用高于中位数，得分为 9 分，阿达木单抗首年治疗费用低于中位数，得分为 13 分。

该项总得分，英夫利西单抗为 8 分，阿达木单抗为 14 分，维得利珠单抗为 14 分，乌司奴单抗为 20 分。

2.5 其他属性

英夫利西单抗为国家医保乙类药品且为国家谈判药品，有支付条件限制（CD 患者的二线治疗、中重度 UC 患者的二线治疗），该项得分为 2 分；不在《国家基本药物目录》内，得分为 1 分；贮藏条件为 2 ～ 8 ℃避光保存，得分为 1 分；有效期为 36 个月，得分为 2 分；全球使用情况，在美国、欧洲、日本均已上市，得分为 3 分；生产企业为瑞士知名企业 Cilag AG，生产企业销量在 2021 年销售前 50 的排行榜，得分为 3 分。该项总得分为 12 分。

阿达木单抗为国家医保乙类药品且为国家谈判药品，有支付条件限制（对糖皮质激素或免疫调节剂应答不足的 6 岁及以上的中重度活动性 CD 的患儿减轻症状和体征，诱导和维持临床缓解），该项得分为 2 分；不在《国家基本药物目录》内，得分为 1 分；贮藏条件为：运输过程中需要 2 ～ 8 ℃冷藏，使用过程中可在常温下避光保存 14 d，该项得分取平均值为 1.75 分；有效期为 24 个月，得分为 2 分；在欧洲、美国、日本均已上市，得分为 3 分；生产企业为 Abbvie Ltd（艾伯维），生产企业销量在 2021 年世界销售前 50 的排行榜，得分为 3 分。该项总得分为 12.75 分。

维得利珠单抗为国家医保乙类药品且为国家谈判药品，有支付条件限制（限中度至重度活动性 UC 的二线用药或中度至重度活动性 CD 的二线用药），该项得分为 2 分；不在《国家基本药物目录》内，得分为 1 分；贮藏条件为 2 ～ 8 ℃冷藏，得分为 1 分；有效期为 36 个月，得分为 2 分；在欧洲、美国、日本均已上市，得分为 3 分；生产企业为

日本 Takeda（武田制药），生产企业销量在 2021 年世界销售前 50 的排行榜，得分为 3 分。该项总得分为 12 分。

乌司奴单抗为国家医保乙类药品且为国家谈判药品，有支付条件限制（适用于对传统治疗或 TNF-α 拮抗剂应答不足、失应答或无法耐受的成年中重度活动性 CD 患者），得分为 2 分；不在《国家基本药物目录》内，得分为 1 分；贮藏条件为 2 ～ 8 ℃避光冷藏，得分为 1 分；有效期为 36 个月，得分为 2 分；在欧洲、美国、日本均已上市，得分为 3 分；生产企业为瑞士知名企业 Cilag AG，生产企业销量在 2021 年世界销售前 50 的排行榜，得分为 3 分。该项总得分为 12 分。

按照上述细则进行评估后，4 种生物制剂的总评分分别是：英夫利西单抗为 71.5 分，阿达木单抗为 77.75 分，维得利珠单抗为 76.5 分，乌司奴单抗为 85 分。

3 讨论

本文采用卫生技术评估对 IBD 治疗中的 4 种生物制剂进行评分，评估结果显示，总评分最高的是乌司奴单抗，其次是阿达木单抗、维得利珠单抗，评分最低的为英夫利西单抗。4 种生物制剂的评分均在 70 分以上，根据《指南》推荐，均属于较强推荐进入医疗机构目录的药品；当临床选择用药时，可以参考本研究中各生物制剂的评分情况、总结的国内外指南推荐意见，结合患者临床诊断及临床表现合理选择用药。需要注意的是，特殊人群用药方面，能用于妊娠期妇女的生物制剂为英夫利西单抗、阿达木单抗和乌司奴单抗，其中英夫利西单抗仅可在妊娠早期使用，中晚期暂停使用，而阿达木单抗和乌司奴单抗可以妊娠全程使用；目前在中国能用于哺乳期妇女和儿童患者的生物制剂为英夫利西单抗和阿达木单抗。

4 种生物制剂中英夫利西单抗是最早上市的，是目前使用经验最丰富的生物制剂，各指南中对该药的推荐级别及证据级别均优于其他 3 种生物制剂，属于一线治疗药物，总评分却最低，评分较低的项目是安全性和经济性。安全性方面，英夫利西单抗和阿达木单抗同为 TNF-α，上市以来有导致恶性肿瘤发生的报道 [30-31]，说明书有警示语（严重感染和恶性肿瘤），导致其安全性方面的“其他”项得分较低，而维得利珠单抗 [32] 和乌司奴单抗 [33] 目前研究显示不增加肿瘤发生率，可能是因为这两种药物上市时间较短，临床证据尚不充分，长期用药过程中其是否会增加肿瘤发生率不得而知，需要时间验证。经济性方面，由于其上市最早，国内仿制技术成熟，目前国内有两家仿制企业，因仿制药品价格低，导致其“同通用名药品”项得分仅 1 分；并且其首年治疗费用高于其他生物制剂，故药物经济学不占优势，所以“主要适应证可替代药品”项得分仅 7 分。

卫生技术评估起源于 20 世纪 70 年代的美国，作为卫生政策和管理决策的基础工具和方法，广泛应用于临床指南制订、医疗保险政策、药品价格谈判、新技术准入等领域。在公立医院药品“零加成”的背景下，药品加成取消，医保支付模式改革，卫生技术评估能帮助医院基于循证证据作出符合本院情况的药品采购和使用决策，从而促进药物合理使用、缓解医保经费压力 [34]。今后，医院药品管理会对卫生技术评估产生更大的需求。考虑到新上市药品在适应证、指南推荐、特殊人群、医保等方面的评分可能处于劣势，因此医疗机构在药品遴选时除了参考本文评估方法中的五个方面，还可以结合其他可得到的药学信息综合考虑。

本研究结果具有一定的时效性，随着药品更多临床研究的循证依据、长期用药的安全性观察及药品价格等相关信息的变更、国家政策的变化，4 种生物制剂的评分可能会有变动。

参考文献

[1] 中国医药教育协会炎症性肠病专业委员会 . 中国炎症性肠病生物制剂治疗专家建议（试行）[J/OL]. 中华消化病与影像杂志（电子版），2021，11（6）：244-256.

[2] 健康中国研究中心药品与健康产品专家委员会 . 中国医疗机构药品评价与遴选快速指南 [J]. 医药导报，2020，39（11）：1457-14665.

[3] Tim R，Stefanos B，Johan B，et al. ECCO guidelines on therapeutics in ulcerative colitis：medical treatment [J]. J Crohns Colitis，2022，16（1）：2-17.

[4] Feuerstein JD，Isaacs KL，Schneider Y，et al. AGA clinical practice guidelines on the medical management of moderate to severe luminal and perianal fistulizing Crohn’s disease [J]. Gastroenterology，2021，160（7）：2496-2508.

[5] 刘占举 . 英夫利西单抗治疗克罗恩病的作用机制 [J]. 中华内科杂志，2013，52（12）：1065-1067.

[6] Liang S，Dai J，Hou S，et al. Structural basis for treating tumor necrosis factor（TNF）-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab [J]. J Biol Chem，2013，288：13799-13807.

[7] Hossain A，Lrdal M，Olsson AE，et al. Sustained clinical benefit，improved quality of life，and reduced intestinal surgery from maintenance infliximab treatment in inflammatory bowel disease [J]. Scand J Gastroenterol，2020，55（2）：178-183.

[8] 张巧，曾健，周金秋，等 . 中国炎症性肠病生物制剂使用现状的系统回顾和 Meta 分析 [J]. 临床内科杂志，2020，37（4）：281-286.
[9] 王蓉，唐源 . 生物制剂在炎症性肠病治疗中的应用分析 [J]. 现代消化及介入诊疗，2021，26（8）：1068-1072.
[10] Feagan BG，Rutgeerts P，Sands BE，et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. N Engl J Med，2013，369（8）：699-710.
[11] Loftus EV Jr，Colombel JF，Feagan BG，et al. Long-term efficacy of vedolizumab for ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis，2017，11（4）：400-411.
[12] Sands BE，Sandborn WJ，Panaccione R，et al. Ustekinumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. N Engl J Med，2019，381（13）：1201-1214.
[13] Lee MJ，Parker CE，Taylor SR，et al. Efficacy of medical therapies for fistulizing Crohn’s disease：systematic review and meta-analysis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2018，16（12）：1879-1892.
[14] Egeberg A，Ottosen MB，Gniadecki R，et al. Safety，efficacy and drug survival of biologics and biosimilars for moderate-to-severe plaque psoriasis [J]. Br J Dermatol，2018，178（2）：509-519.
[15] 国家药品监督管理局 . 注射用英夫利西单抗说明书 [EB/OL]. 2007-02-15 [2021-06-16]. https://www.xian-janssen.com.cn/sites/default/files/PDF/40.zhu_she_yong_ying_fu_li_xi_dan_kang_ni_yin_zhi_ban_shuo_ming_shu_.pdf.
[16] 国家药品监督管理局 . 阿达木单抗注射液说明书 [EB/OL]. 2020-03-28 [2021-08-25]. https://zy.yaozh.com/instruct/sms 20220809/wj202203111027.pdf
[17] Rosario M，Dirks NL，Milch C，et al. A review of the clinical pharmacokinetics，pharmacodynamics，and immunogenicity of vedolizumab [J]. Clin Pharmacokinet，2017，56（11）：1287-1301.
[18] Rosario M，Dirks NL，Gastonguay MR，et al. Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of vedolizumab in patients with ulcerative colitis and Crohn’s disease [J]. Aliment Pharmacol Ther，2015，42（2）：188-202.
[19] 国家药品监督管理局 . 注射用维得利珠单抗说明书 [EB/OL]. 2020-03-11 [2022-05-25]. https://www.takeda.com.cn/49e6dc/siteassets/zh-cn/home/what-we-do/our-products/Entyvio_20220525.pdf.
[20] 国家药品监督管理局 . 乌司奴单抗注射液说明书 [EB/OL]. 2020-03-11 [2021-09-14]. https://www.xian-janssen.com.cn/sites/default/files/PDF/28.wu_si_nu_dan_kang_zhu_she_ye_jing_mai_shu_zhu_.pdf.
[21] Lichtenstein GR，Feagan BG，Cohen RD，et al. Serious infection and mortality in patients with Crohn’s disease：more than 5 years of follow-up in the TREAT registry [J]. Am J Gastroenterol，2012，107（9）：1409-1422.
[22] 吕嘉琪，常建民 . 英夫利西单抗致急性重度输液反应 2 例 [J]. 中国新药与临床杂志，2021，40（4）：316-318.
[23] Colombel JF，Sands BE，Rutgeerts P，et al. The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn’s disease [J]. Gut，2017，66（5）：839-851.
[24] Hanauer SB，Sandbom WJ，Feagan BG，et al. IM-UNITI：3 year efficacy，safety，and immunogenicity of ustekinumab treatment of Crohn’s disease [J]. J Crohns Colitis，2020，14（1）：23-32.
[25] Van der Woude CJ，Ardizzone S，Bengtson MB，et al. European Crohn’s and Colitis Organization. The second European evidenced-based consensus on reproduction and pregnancy in inflammatory bowel disease [J]. J Crohns Colitis，2015，9：107-124.
[26] Nguyen GC，Seow CH，Maxwell C，et al. The toronto consensus statements for the management of inflammatory bowel disease in pregnancy [J]. Gastroenterology，2016，150（3）：734. e731-757. e731.
[27] 上海市疾病预防控制中心，杭州市疾病预防控制中心，苏州市疾病预防控制中心，等 . 特殊健康状态儿童预防接种专家共识之十九 - 免疫抑制剂与预防接种 [J]. 中国实用儿科杂志，2019，34（5）：335-336.
[28] Puchner A，Gröchenig HP，Sautner J，et al. Immunosuppressives and biologics during pregnancy and lactation：a consensus report issued by the Austrian Societies of Gastroenterology and Hepatology and Rheumatology and Rehabilitation [J]. Wien Klin Wochenschr，2019，131：29-44.
[29] 江建，陈宏翔 . 儿童银屑病生物治疗 [J]. 皮肤科学通报，2020，37（5）：496-502.
[30] Lemaitre M，Kirchgesner J，Rudnichi A，et al. Association between use of thiopurines or tumor necrosis factor antagonists alone or in combination and risk of lymphoma in patients with inflammatory bowel disease [J]. JAMA，2017，318：1679-1686.
[31] Annese V，Beaugerie L，Egan L，et al. ECCO. European evidence-based consensus：inflammatory bowel disease and malignancies [J]. J Crohns Colitis，2015，9：945-965.
[32] Loftus EV，Feagan BG，Panaccione R，et al. Long-term safety of vedolizumab for inflammatory bowel disease [J]. Aliment Pharmacol Ther，2020，52：1353-1365.
[33] Sandborn WJ，Feagan BG，Danese S，et al. Safety of ustekinumab in inflammatory bowel disease：pooled safety analysis of results from phase 2/3 studies [J]. Inflamm Bowel Dis，2021，27（7）：994-1007.
[34] 王庆，张蓉 . 医院卫生技术评估在药品管理中的应用现状与发展思路 [J]. 中国药房，2020，31（7）：773-777.

（收稿日期：2022-05-20；修回日期：2022-07-08）

老年患者含雷公藤饮片中药处方用药规律分析

张威风[1, 2]，李颖[1]，林梦璐[1, 2]，郭燕燕[2]，高家荣[1*]（1.安徽中医药大学第一附属医院，合肥　230031；2.安徽中医药大学药学院，合肥　230012）

摘要：目的　分析老年患者含雷公藤饮片中药处方的用药情况及特点，促进临床安全合理用药。**方法**　收集某中医院 2018—2021 年含雷公藤饮片的老年患者中药处方，对患者性别、年龄、用药剂量、科室等进行频数统计，对含雷公藤饮片的老年患者和非老年患者处方中的用药疗程、用药剂量和处方味数进行 *t* 检验，并对高频配伍药物进行因子分析、关联规则和聚类分析。**结果**　共纳入 1040 张处方。患者平均年龄为（68.48±6.01）岁；处方主要用于治疗肾脏及癌症方面的疾病；中医证型主要是脾肾亏虚证；老年患者平均用药疗程为（24.32±10.80）d；雷公藤饮片平均用药剂量为（9.65±2.09）g；处方平均味数为（18.44±3.31）味；与非老年患者含雷公藤饮片的中药处方相比，老年患者处方的疗程、剂量和味数都比较大（$P < 0.05$）；有 485 张处方未标注雷公藤饮片的特殊煎煮方法，属于不规范处方；配伍药物主要类别为补虚药和清热药；关联度较高的药对有“黄芪 - 雷公藤”“鸡内金 - 雷公藤”“山药 - 雷公藤”和“白术 - 雷公藤”等；聚类分析得到 6 个常用药物组合。**结论**　中药临床药师应开展针对使用雷公藤饮片老年患者的用药监护，完善处方审核，针对老年患者含雷公藤不同组方进行个体化用药监护及用药指导，保证老年患者用药安全。

关键词：雷公藤；老年人；处方分析；合理用药；用药监护
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0229-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.036

Summary of traditional Chinese medicine prescriptions containing tripterygium wilfordii decoction pieces in elderly patients

ZHANG Wei-feng[1, 2], LI Ying[1], LIN Meng-lu[1, 2], GUO Yan-yan[2], GAO Jia-rong[1*] (1. *the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230031; 2. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective　To analyze the medication use and characteristics of traditional Chinese medicine prescriptions containing tripterygium wilfordii decoction pieces in elderly patients, and to promote safe and rational clinical use of medication. **Methods**　The prescriptions of Chinese medicine for elderly patients containing tripterygium wilfordii decoction pieces in a Chinese hospital from 2018 to 2021 were collected, and patient gender, age, medication dose, and department were analyzed. Student's *t* test was performed for medication regimen, medication dose, and number of flavors in prescriptions for elderly and non-elderly patients containing tripterygium wilfordii decoction pieces. Factor analysis, association rules, and cluster analysis were performed for high-frequency dispensed drugs. **Results**　Totally 1040 prescriptions were included. The average age of patients was (68.48±6.01) years. The prescriptions were mainly used for kidney diseases and cancer, and the traditional Chinese medicine evidence type was mainly spleen and kidney deficiency. The average duration of medication was (24.32±10.80) d. The average dose of tripterygium wilfordii decoction pieces was (9.65±2.09) g. The average number of flavors in the prescriptions was (18.44±3.31).

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81973546）。
作者简介：张威风，男，硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：zwf15955114484@163.com　*通信作者：高家荣，男，主任药师，主要从事临床药学研究，email：zyfygjr2006@163.com

Compared with the prescriptions for the elderly patients, the duration of treatment, dose and number of flavors were larger in the prescriptions for the elderly patients ($P < 0.05$). Totally 485 prescriptions were not labeled with the special decoction method of tripterygium wilfordii decoction pieces, which was not standardized. The main categories of drugs used in the prescriptions were tonic and heat-clearing drugs. The drug pairs with high correlation were "astmgali radix-tripterygium wilfordii", "galli gigerii endothelium corneum-tripterygium wilfordii", "dioscoreae rhizoma-tripterygium wilfordii" and "macrocephalae rhizoma-tripterygium wilfordii", etc. The cluster analysis came up with six common drug combinations. **Conclusion** Clinical pharmacists of traditional Chinese medicine should monitor tripterygium wilfordii decoction pieces for elderly patients, improve prescription check, and provide individualized guidance for elderly patients to ensure the safety of medication use.

Key words: tripterygium wilfordii; elderly; prescription analysis; rational drug use; pharmaceutical care

雷公藤（*Tripterygium wilfordii* Hook. f.）是卫矛科植物雷公藤的根，主要有祛风除湿、活血通络、消炎解毒等功效[1]。课题组前期对某中医院含雷公藤的特色中药制剂"芪藤消浊颗粒"研究发现该制剂可通过调节 CircRNA 的表达对慢性肾小球肾炎、慢性肾脏病等有很好的治疗作用[2]。然而现代研究发现雷公藤对肝脏、肾脏、心脏、生殖器及免疫系统均有毒副作用，尤其对于机体衰弱的老年患者，会导致机体产生更严重的伤害[3-4]。而老年患者是使用雷公藤中药饮片的重要人群。随着我国人口老龄化进程加快，老年人用药安全问题日益受到关注[5]。为了保障老年患者雷公藤中药饮片用药安全，本文采用回顾性分析，探究某中医院老年患者含雷公藤饮片的中药处方的用药规律，分析用药情况及特点，为中药临床药师开展药学监护提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

通过医院信息管理系统收集某中医院 2018—2021 年口服雷公藤饮片的中药门诊处方，排除不含雷公藤、非口服、信息不全的门诊处方，共收集到 7470 张。筛选出年龄为 60 岁及以上的老年患者，最后纳入 1040 张含雷公藤饮片的老年患者中药门诊处方。

1.2 方法

将老年患者处方中的相关信息，如患者性别、年龄、科室、用药剂量、配伍药物等信息用 Excel 2019 软件进行频数统计。将 7470 张含雷公藤的中药处方筛选出患者年龄小于 60 岁的非老年患者处方，得到含雷公藤饮片的非老年患者处方 6430 张，通过 SPSS Statistics 25.0 软件将老年患者处方与非老年患者处方的用药疗程、雷公藤饮片用药剂量和处方味数分别进行独立样本 t 检验，计量资料用（$\bar{x}\pm s$）表示，当 $P < 0.05$ 时，说明差异有统计学意义。含雷公藤饮片老年患者处方中频数＞ 150 的药物称为高频配伍药物（共 36 种）[2]，通过 SPSS Statistics 25.0 对高频配伍药物（除雷公藤）进行因子分析。将高频配伍药物导入 SPSS Modeler 18.0 软件中，使用 Apriori 算法模型，设置支持度＞ 30%，置信度＝ 100%，最大前项为 3，进行关联规则分析。通过 Cytoscape 3.9.1 绘制关联规则复杂网络图。将高频配伍药物导入 SPSS Statistics 25.0 软件中，对雷公藤高频配伍药物进行系统聚类分析。

2 结果

2.1 患者的性别和年龄

1040 张处方中 69 岁及以下的患者数量较多，其中年龄最大为 90 岁，平均年龄为（68.48±6.01）岁，男女比例为 1.068∶1，如表 1 所示。

表 1 性别和年龄分布

Tab 1 Gender and age distribution

年龄 / 岁	男 / 例	女 / 例	处方数 / 张	构成比 /%
≤ 69	299	361	660	63.46
70 ～ 79	189	131	320	30.77
≥ 80	49	11	60	5.77
总计	537	503	1040	100.00

2.2 科室分布

老年患者处方应用排名前 5 位的科室如表 2 所示，其中肾病科门诊和肿瘤科门诊应用最多。

2.3 疾病和中医证型

1040 张处方中，处方数排名前 5 位的疾病及患者的中医证型如表 3 所示，可见雷公藤饮片老年患者处方主要用于治疗肾脏及癌症方面的疾病，且大多为慢性疾病；患者的中医证型主要是脾肾亏虚证。

表 2 科室分布

Tab 2 Distribution of department

科室	处方数 / 张	构成比 /%
肾病科门诊	382	36.73
肿瘤科门诊	298	28.65
名医堂	225	21.63
便民门诊	84	8.08
全科门诊	10	0.96

表 3 疾病及中医证型分布

Tab 3 Distribution of diseases and traditional Chinese medicine evidence types

疾病	处方数 / 张	构成比 /%	中医证型	处方数 / 张	构成比 /%
慢性肾脏病	552	53.08	脾肾亏虚证	387	37.21
肺癌	95	9.13	湿热内蕴证	157	15.10
乳腺癌	29	2.79	肝血亏虚证	155	14.90
胃癌	20	1.92	气滞血瘀证	123	11.83
高血压	19	1.83	冲任失调证	31	2.98

2.4 用药疗程、剂量和味数

对 1040 张老年患者处方的用药信息进行分析，分别对处方的用药疗程、用药剂量（雷公藤饮片）和处方味数进行频数统计，如表 4 所示。用药疗程最短为 1 d，最长为 60 d，平均用药疗程为（24.32±10.80）d。雷公藤饮片用药剂量最少为 1 g，最多为 30 g，平均用药剂量为（9.65±2.09）g。处方味数中最少有 1 味药，最多有 29 味药，平均处方味数为（18.44±3.31）味。

对 6430 张非老年患者处方的用药疗程、用药剂量（雷公藤饮片）和处方味数进行频数统计，如表 4 所示。用药疗程最短为 1 d，最长为 60 d，平均用药疗程为（21.53±10.26）d。雷公藤饮片用药剂量最少为 1 g，最多为 100 g，平均用药剂量为（9.27±6.45）g。处方味数中最少有 1 味药，最多有 38 味药，平均处方味数为（17.79±2.66）味。

表 4 老年患者及非老年患者处方的用药疗程、剂量和味数分布

Tab 4 Distribution of medication duration，dose and number of flavors prescribed to elderly patients and non-elderly patients

组别	用药疗程 /d	处方数 / 张	构成比 /%	用药剂量 /g	处方 / 张	构成比 /%	处方味数 / 味	处方数 / 张	构成比 /%
老年患者	≤ 20	382	36.73	＜ 10	272	26.15	≤ 10	18	1.73
	21 ～ 40	609	58.56	10 ～ 25	762	73.27	11 ～ 20	776	74.62
	≥ 41	49	4.71	＞ 25	6	0.58	≥ 21	246	23.65
非老年患者	≤ 20	3250	50.54	＜ 10	2136	33.22	≤ 10	28	0.44
	21 ～ 40	2955	45.96	10 ～ 25	4274	66.47	11 ～ 20	5582	86.81
	≥ 41	225	3.50	＞ 25	20	0.31	≥ 21	820	12.75

2.5 老年患者与非老年患者用药信息的比较

对含雷公藤饮片的老年患者处方与非老年患者处方的用药疗程、用药剂量（雷公藤饮片）和处方味数进行独立样本 *t* 检验，结果如表 5 所示。与非老年患者相比，老年患者含雷公藤饮片中药处方的特点是疗程长、剂量大、味数多。

表 5 老年患者与非老年患者的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 5 Information of elderly patients and non-elderly patients ($\bar{x}\pm s$)

用药信息	老年患者	非老年患者	*t*	*P*
用药疗程 /d	24.32±10.80	21.53±10.26	8.103	＜ 0.001
用药剂量 /g	9.65±2.09	9.27±6.45	3.638	＜ 0.001
处方味数 / 味	18.44±3.31	17.79±2.66	6.056	＜ 0.001

2.6 超剂量分析

根据 2019 年版《安徽省中药饮片炮制规范》[6] 规定雷公藤饮片的用药剂量为 10 ～ 25 g，1040 张处方有 6 张处方的雷公藤饮片超剂量使用，用药剂量均为 30 g，疗程均不超过 7 d。雷公藤饮片属于毒性中药，某中医院规定使用雷公藤饮片时需要双签及特殊煎法的操作，在 6 张超剂量处方中，1 张处方双签和特殊煎煮标注完整，4 张雷公藤超剂量处方双签明确但缺少特殊煎法的标识，1 张处方特殊煎法标注完整但缺少双签。1040 张老年患者处方中，共有 485 张处方未标注雷公藤饮片的特殊煎煮，属于不规范处方。

2.7 配伍药物的类别

将配伍药物按照功效分为以下 19 种药物类别，如表 6 所示，可知补虚药和清热药的出现频数较多，与雷公藤常配伍使用。

2.8 因子分析

将高频配伍药物（除雷公藤）导入 SPSS Statistics 25.0 中，进行因子分析。分析可知 KMO 值为 0.884 ＞ 0.5，*P* ＜ 0.001，说明变量之间存在良好的相关关系，可进行因子分析。从图 1 可以看出在第 9 个公因子之后，线条开始平缓，此时公因子累计贡献率为 65.11%，通过最大方差法和旋转分析法可得旋转后的空间成分图，如图 2 所示，因子分析组合如表 7 所示，得到常用药物组合。

2.9 关联规则

关联规则分析结果得到关联度较高的药对有“黄芪 - 雷公藤”“鸡内金 - 雷公藤”“山药 -

表 6　配伍药物的类别分布

Tab 6　Distribution of classes of drugs in combination

类别	频数 / 次	频率 /%	类别	频数 / 次	频率 /%
补虚药	3477	18.09	化湿药	596	3.10
清热药	3044	15.84	止血药	538	2.80
活血化瘀药	2064	10.74	理气药	489	2.54
利水渗湿药	1820	9.47	安神药	306	1.59
祛风湿药	1753	9.12	泻下药	170	0.88
收涩药	1546	8.04	开窍药	44	0.23
平肝熄风药	1182	6.15	温里药	29	0.15
化痰止咳平喘药	740	3.85	攻毒杀虫止痒药	26	0.14
解表药	740	3.85	驱虫药	9	0.05
消食药	645	3.36			

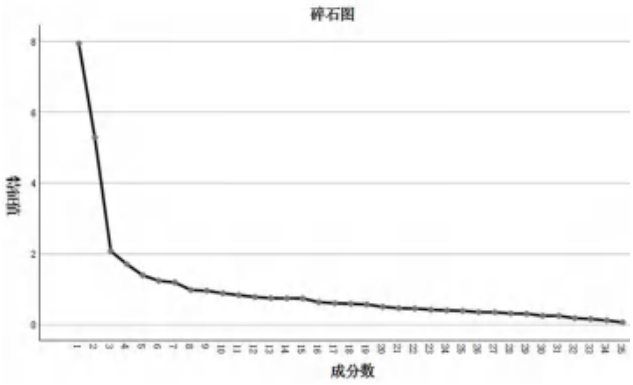


图 1　高频配伍药物碎石图

Fig 1　Gravel map for high frequency compatibility

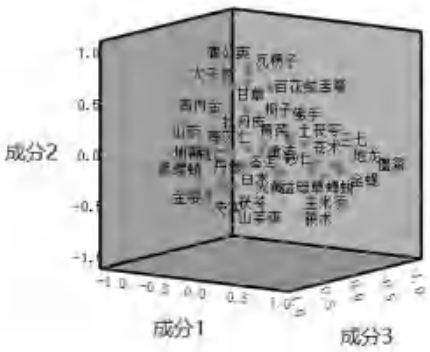


图 2　旋转后的空间成分图

Fig 2　Spatial component map after rotation

雷公藤”和“白术 - 雷公藤”等，见表 8。使用 Cytoscape 3.9.1 作出复杂网络图见图 3，其中节点颜色越深，面积越大表示该药物使用的频数越高，药物之间连接线越粗，颜色越深表示药物之间的关联度越大。

2.10　高频药物的聚类分析

将高频配伍药物导入 SPSS Statistics 25.0 软件来进行聚类分析，当高频药物分成 6 组时，此时分类较为稳定，且组内的味数与平均处方味数最接近合适。组 1：雷公藤；组 2：黄芪、蝉

表 7　因子分析组合

Tab 7　Factor analysis combination

公因子	药物组合	累计贡献率 /%
F1	蝉蜕、苍术、玉米须、地龙、全蝎、土茯苓、僵蚕、三七、莪术、砂仁	20.00
F2	太子参、甘草、瓦楞子、白花蛇舌草、蒲公英、栀子	28.74
F3	鸡内金、山药、芡实、金樱子、桑螵蛸	37.09
F4	丹参、益母草、桃仁	42.65
F5	白术、薏苡仁、茯苓	48.10
F6	黄芪	52.84
F7	牡丹皮、山茱萸、地黄	57.27
F8	黄连、佛手	61.36
F9	泽泻、大黄	65.11

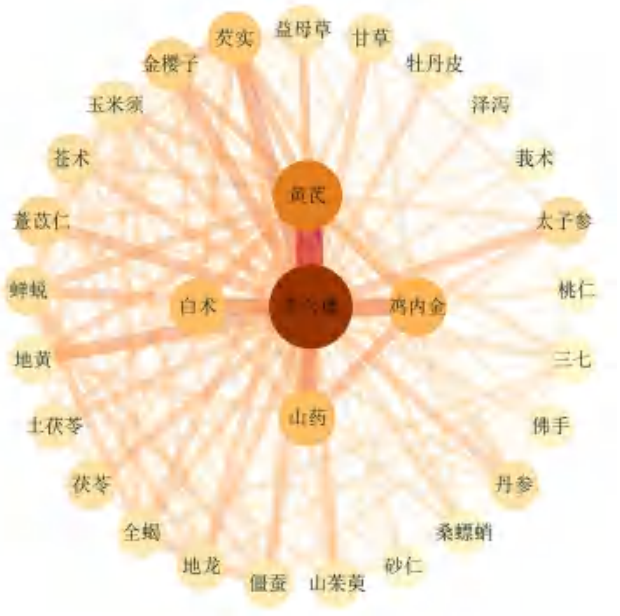


图 3　高频药物复杂网络图

Fig 3　Complex network diagram of high frequency drugs

表 8　高频药物关联分析

Tab 8　High frequency drug association analysis

后项	前项	支持度 /%	置信度 /%	提升度
雷公藤	黄芪	70.10	100.00	1
雷公藤	鸡内金	46.06	100.00	1
雷公藤	山药	42.21	100.00	1
雷公藤	白术	42.12	100.00	1
雷公藤	芡实	37.88	100.00	1
雷公藤	地黄	35.96	100.00	1
雷公藤	金樱子	33.75	100.00	1
雷公藤	薏苡仁	31.92	100.00	1

蜕、苍术、玉米须、地龙、全蝎、土茯苓、僵蚕、三七、佛手、莪术、砂仁、大黄；组 3：鸡内金、山药、白术、芡实、金樱子、薏苡仁、茯苓、丹参、益母草、山茱萸、地黄、桑螵蛸、桃仁；组 4：太子参、甘草、瓦楞子、白花蛇舌草、黄连、蒲

公英、栀子；组 5：牡丹皮；组 6：泽泻。系统聚类分析树状图见图 4。

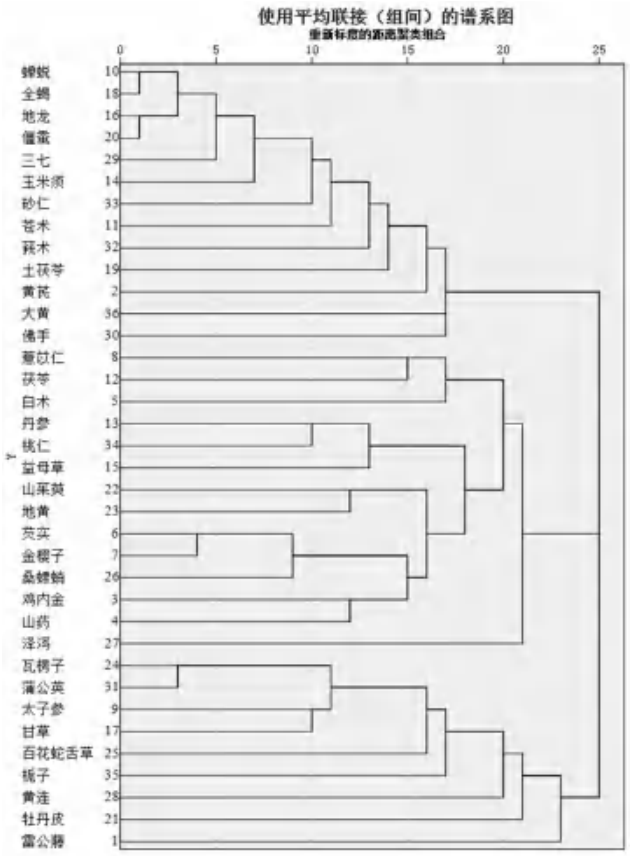


图 4 聚类分析

Fig 4 Cluster analysis

3 讨论

雷公藤饮片属于疗效强毒性强的中药，胃肠道不良反应、肝损伤、肾毒性等都是雷公藤较为常见的不良反应。由科室和疾病分布可知，某中医院老年患者含雷公藤饮片中药处方大多用于治疗慢性肾脏病和癌症等。而且与非老年患者相比，老年患者处方的用药疗程长、雷公藤用药剂量大和用药味数多是其用药特点，加之老年患者各项生理功能减退，解毒与排泄能力降低，导致药物在体内停留时间延长，药物代谢减慢，容易在体内蓄积 [7]，发生不良反应。因此，中药临床药师可以将服用雷公藤中药饮片的老年患者纳入药学监护对象。

根据《处方管理办法》[8] 和《长期处方管理规范（试行）》[9] 规定一般处方不得超过 7 d，对于某些慢性病或长期处方疗程一般在 4 周内，最长不得超过 12 周。本调查显示：老年患者处方的平均用药疗程为（24.32±10.80）d，大多数处方超过了 7 d，但很少超过 4 周，没有超过 12 周的处方。大多数处方用量均符合规范，但有 6 张处方超剂量使用。提示中药临床药师要关注处方疗程与使用剂量，建议若慢性疾病老年患者使用含雷公藤饮片的处方超过 4 周，需要通知医师重新评估患者病情。雷公藤饮片使用剂量宜控制在 10 ～ 25 g，若超剂量使用，需要医师双签确认，并与患者及家属说明相关注意事项及用药风险，定期随访。

研究发现可以通过炮制和煎煮等方法来增加雷公藤的疗效，减小毒副作用。如宋玲玲等 [10] 发现经过炒制以后可明显降低雷公藤的肝、肾毒性。蒋且英等 [11] 指出经过煎煮以后雷公藤的急性毒性明显降低，且仍具有较强的抗炎活性。所以在临床使用雷公藤饮片时，可以先将雷公藤饮片先煎再与其他药物混合，达到增效减毒的作用 [12]。某中医院规定雷公藤宜先煎，但实际约有 46.63% 的处方未标注雷公藤饮片的特殊煎煮方法，提示中药临床药师应加强处方审核规范，并指导患者如何正确煎煮中药。

由关联规则分析得到的四个关联度较高的药对：“黄芪 - 雷公藤”“鸡内金 - 雷公藤”“山药 - 雷公藤”和“白术 - 雷公藤”等。补虚药黄芪能减轻雷公藤的毒性作用，补气升阳、行滞通痹，并增加抗炎能力 [13]。消食药鸡内金健胃消食、消化瘀积，能降低雷公藤的胃肠道毒副作用，保护肾组织 [14]。山药多糖是补虚药山药的重要活性成分之一，研究发现山药多糖能减少肾组织纤维化，改善肾功能，对肠道的微生态也有良好的调节作用 [15-16]，山药与雷公藤合用时能健脾益肾、消肿益气、清热解毒，减轻慢性肾脏病的临床症状，增加雷公藤的治疗作用 [17]。补虚药白术与雷公藤合用时，可健脾益气，增强对胃肠道和肝细胞的保护作用 [18]。雷公藤可以通过与药物配伍来达到增效减毒的作用 [19]。

因子分析和聚类分析可得雷公藤配伍药物的常用药物组合，F1 和组 2 的药物组成与某中医院名老中医曹恩泽治疗慢性肾炎的常用组方相似 [20]，通过健脾益肾、祛风通络，行“清补法”治疗慢性肾炎，其中全蝎是毒性中药，提示中药临床药师应加强使用多种毒性中药老年患者的药学监护。F3 和组 3 中的药物组成与李顺民教授治疗慢性肾脏病的常用组方部分相似 [21]，能健脾益气、收敛固涩，与雷公藤合用能减小胃肠道不良反应，加强对肾小球细胞的保护作用。组 3 中部分药物如丹参、益母草和桃仁，有活血化瘀的功效，提示中药临床药师应注重患者出血风险方面

监护。F2 和组 4 与徐景藩教授治疗胃部疾病的药方相似[22]，调中理气、兼清郁热，加上清热药白花蛇舌草、栀子和黄连等，可清热燥湿、泻火解毒，在治疗癌症方面也有一定的作用，但清热解毒药物过多使用容易引起胃肠道不良反应，提示中药临床药师应加强监护此类老年患者胃肠道不良反应，或建议医师配伍护胃中药使用。

综上所述，雷公藤饮片既有较好的治疗作用也有较大的毒副作用，临床医师须谨慎使用，中药临床药师应对老年患者进行药学监护。使用前应明确患者肝肾功能情况，肝肾损伤患者应谨慎使用；在使用过程中，观察患者有无恶心、呕吐、胸闷、尿少、头昏等情况，定期监测患者肝、肾功能和血液常规指标；完善审方制度，严格控制使用疗程，并提醒患者及时复诊；叮嘱严格按医嘱用药，如不适及时就医；此外中药临床药师应对组方进行整体评估，针对不同疾病老年患者使用雷公藤不同方剂特点制订个体化的用药监护高风险患者可定期随访，提高毒性中药使用风险防控意识[23]，保障老年患者用药安全。

参考文献

[1] 刘霖，谢东浩，张菁，等 . 龙华医院门诊雷公藤多苷片处方合理用药分析 [J]. 中成药，2019，41（3）：698-701.

[2] Gao JR，Jiang NN，Jiang H，et al. Effects of Qi Teng Xiao Zhuo granules on circRNA expression profiles in rats with chronic glomerulonephritis [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：1901-1913.

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

[4] 张艳秀，蔡乐，赵佳慧，等 . 重视肾功能不全老年患者的临床合理用药 [J]. 中国临床保健杂志，2021，24（5）：582-588.

[5] 杜林娜，刘珊，郭艳，等 . 老年人潜在不恰当用药与衰弱危险因素之间的相关性及研究进展 [J]. 中华全科医学，2022，20（1）：104-108.

[6] 安徽省药品监督管理局 . 安徽省中药饮片炮制规范（2019 年版）[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，2019.

[7] 朱俊利，毛永炎 . 雷公藤多苷联合贝那普利对老年原发性肾病综合征病人肾功能及血清免疫球蛋白水平的影响 [J]. 安徽医药，2020，24（1）：179-183.

[8] 卫生部 . 处方管理办法 [S]. 中华人民共和国卫生部令第 53 号，2007-02-14.

[9] 《长期处方管理规范（试行）》主要内容 [J]. 中国卫生质量管理，2021，28（10）：82.

[10] 宋玲玲，王君明，关月晨，等 . 基于传统散剂和炒炙法的雷公藤炮制减毒作用研究 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（10）：6167-6171.

[11] 蒋且英，罗素花，杨瑞昆，等 . 炮制对雷公藤毒效及其化学成分影响的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（4）：216-221.

[12] 苏海萍，马悦宁 . 雷公藤减毒增效方法研究进展 [J]. 山西中医，2018，34（9）：55-56.

[13] 魏燕芙 . 雷公藤多苷片联合当归黄芪汤治疗糖尿病肾病疗效观察 [J]. 黑龙江中医药，2020，49（5）：11-12.

[14] 周丹妮，邵蒙苏，丁齐又，等 . 鸡内金的临床应用及其用量探究 [J]. 长春中医药大学学报，2022，38（2）：141-144.

[15] 高子涵，李瑞芳，吕行直，等 . 山药多糖对糖尿病肾病小鼠肾功能和醛糖还原酶通路的影响 [J]. 中药材，2019，42（3）：643-646.

[16] 张文杰，赖星海，陈佳薇 . 山药多糖治疗肥胖糖尿病肾病大鼠的效果观察及对其肾功能和肠道微生态的影响 [J]. 中国微生态学杂志，2021，33（1）：37-42.

[17] 李东洋 . 健脾益肾清化汤联合肾炎康胶囊治疗慢性肾小球肾炎气虚湿热瘀阻证患者的疗效观察 [J]. 医药论坛杂志，2019，40（11）：47-49.

[18] 顾思浩，孔维崧，张彤，等 . 白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（1）：69-73.

[19] 周学平，冯哲，周玲玲，等 . 基于“异类相制”理论探讨雷公藤的复方配伍减毒 [J]. 中医杂志，2018，59（9）：725-727.

[20] 雷淑君 . 基于数据挖掘探讨曹恩泽名老中医辨治慢性肾炎经验研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2021.

[21] 杨栋，祁爱蓉，李雨彦，等 . 基于数据挖掘及网络药理学探究李顺民治疗慢性肾脏病 3 ～ 5 期用药经验及作用机理 [J]. 新中医，2020，52（4）：176-180.

[22] 赵旦娅，郁宏文，宋昌娟，等 . 徐景藩运用调肝法治疗脾胃病经验 [J]. 中医杂志，2021，62（24）：2127-2130.

[23] 萨日娜，张冰，林志健，等 . 医疗机构药学服务中的中药药物警戒实践探讨 [J]. 中国药物警戒，2021，18（5）：422-426.

（收稿日期：2022-06-16；修回日期：2022-07-18）

布地奈德气管内滴入对胎粪吸入综合征气道总氧化剂状态和抗氧化能力的影响

周利[1]，潘兆军[2*]（1. 徐州医科大学附属淮安医院，江苏 淮安 223002；2. 徐州医科大学淮安妇幼临床学院，江苏 淮安 223002）

摘要：目的 研究布地奈德气管内滴入对胎粪吸入综合征新生儿气道灌洗液总氧化剂状态（TOS）和抗氧化能力（TAC）的影响。**方法** 将符合研究条件的 62 例胎粪吸入综合征新生儿随机分成对照组和研究组，每组 31 例。对照组给予患儿气管内滴入 9 g·L^{-1} 氯化钠溶液 2 mL，研究组给予患者气管内滴入布地奈德 2 mL，其他治疗一致。观察两组患者临床结局、并发症、氧疗时间、氧合指数、入院及 72 h 后气道灌洗液 TOS、TAC 和氧化应激指数（OSI）。**结果** 研究组患者病死率、并发症、总吸氧时间和氧合指数低于对照组患者，差异没有统计学意义；研究组有创呼吸支持时间显著低于对照组（P = 0.031）。入院时两组患者气道灌洗液 TOS、TAC 和 OSI 差异没有统计学意义。72 h 后，对照组患者气道灌洗液 TOS 较入院时显著升高（P = 0.022），研究组患者灌洗液 TOS 较入院时显著升高；两组患者气道灌洗液 TAC 无明显差异；对照组患者 OSI 显著高于研究组（P < 0.001）。**结论** 布地奈德气管内滴入治疗对胎粪吸入综合征可减轻患者气道灌洗液总氧化剂状态和 OSI，缩短有创通气时间。

关键词：胎粪吸入综合征；布地奈德；总氧化剂状态；抗氧化能力
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0235-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.037

Effect of intratracheal infusion of budesonide on total antioxidant capacity and oxidant status in airway lavage fluids in neonates with meconium aspiration syndrome

ZHOU Li[1], PAN Zhao-jun[2*] (1. *The Affiliated Huai'an Hospital of Xuzhou Medical University*, *Huai'an Jiangsu* 223002; 2. *Huai'an Maternity and Child Care Clinical College of Xuzhou Medical University*, *Huai'an Jiangsu* 223002)

Abstract: Objective To determine the effect of intratracheal infusion of budesonide on the total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) of airway lavage fluids in infants with meconium aspiration syndrome (MAS). **Methods** Sixty-two neonates with MAS were randomly assigned to a study group (intratracheal infusion of 2 mL budesonide, n = 31) and a control group (intratracheal infusion of 2 mL of 9 g·L^{-1} sodium chloride solution, n = 31). The airway lavage fluids were obtained both at the admission and 72 hours after the treatment to evaluate the TAC and TOS. Clinical outcomes, complications, the time of oxygen therapy, oxygenation index, TAC and TOS of airway lavage fluid, and oxidative stress index (OSI) in the newborns with MAS in both groups were compared. **Results** The mortality, total oxygen inhalation time and oxygenation index between the two groups were not significantly different. The invasive respiratory supporting time of the study group was shorter than that of the control group (P = 0.031). The TOS, TAC of airway lavage fluids and OSI between the two groups were not significantly different at the admission, while 72 h after the admission, the TOS of airway lavage fluids in the control group was higher than that at the admission (P = 0.022).

基金项目：江苏省妇幼健康科研项目（No.F201746）。
作者简介：周利，女，主管护师，主要从事儿科临床护理工作，email：panzhaojun1@sina.com *__通信作者__：潘兆军，男，博士，主任医师，硕士研究生导师，主要从事危重新生儿治疗，email：12766844511@qq.com

There were no significant changes in the TOS and TAC of airway lavage fluids between the two groups 72 h after the admission. OSI in the control group was higher than that in the study group at 72 h after the admission ($P < 0.001$). **Conclusion** The TAC of airway lavage fluids, OSI, and the time of invasive ventilation may be reduced in infants with MAS after intratracheal infusion of budesonide.

Key words: meconium aspiration syndrome; budesonide; total antioxidant capacity; total oxidant status

胎粪吸入综合征（meconium aspiration syndrome，MAS）是新生儿出生时吸入胎粪污染的羊水引起的以呼吸衰竭为特征的临床疾病，3% ～ 12% 的合并胎粪污染羊水的新生儿发生 MAS[1]，约三分之一需要气管插管和机械通气 [2]，MAS 病死率 5% ～ 12%[3-4]，存活后大约有 21% 婴儿出现神经系统并发症 [5]。胎粪引起的肺部细胞因子释放和补体激活为特征的炎症在 MAS 的发病过程中起着重要作用，吸入的胎粪通过 TLR4/MD-2 CD14 信号复合物触发炎症，导致核因子 κB（NF-κB）增加 [6-7]。增高的 NF-κB 诱发促氧化和炎症级联反应。炎症细胞如中性粒细胞的过度活化会通过氧化系统释放细胞毒性因子和免疫活化剂如活性氧、阳离子多肽等物质。过度的氧化应激和炎症的综合作用导致肺泡毛细血管渗漏增加，肺泡表面活性物质灭活增加，最终导致肺泡塌陷 [8]。MAS 动物模型气道内滴入布地奈德可以改善动物模型的呼吸功能、减轻炎症及氧化应激作用 [9]。新生儿气管内滴入布地奈德未出现明显不良反应 [10]，并减少雾化吸入治疗的非沉积损失 [11]。本研究对 MAS 新生儿气管内滴入布地奈德进行治疗，观察气道灌洗液总氧化剂状态（total oxidant status，TOS）、抗氧化能力（total antioxidant capacity，TAC）变化及临床疗效、氧需求等情况。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 6 月徐州医科大学淮安妇幼临床学院收治的 MAS 患者作为研究对象。纳入标准：① 孕周≥ 37 周且体质量≥ 2.5 kg 胎粪样羊水出生的新生儿；② 气管插管后在声带以下检测或吸引到胎粪；③ 出生后 6 h 内需要有创呼吸支持；④ 胸部 X 光检查出现浸润、过度充气或肺不张等征象。排除标准：① 严重先天性畸形；② 24 h 内死亡的新生儿，或放弃治疗的新生儿；③ 其他原因引起的新生儿呼吸窘迫；④ 父母不愿参加本研究。

本研究为单盲试验，同期共收治 MAS 患儿 88 例，排除 26 例不符合条件的，共 62 例 MAS 患儿纳入研究，按照纳入研究组时间顺序编号，按照随机数字表法分为对照组 31 例和研究组 31 例。两组患儿一般临床特征比较无明显差异，见表 1。本研究通过徐州医科大学淮安妇幼临床学院伦理委员会批准（批准号：201715），为单盲研究。布地奈德气管内滴入治疗，属超说明书用药，在徐州医科大学淮安妇幼临床学院药学部备案后获准使用。

表 1　两组患儿一般资料比较

Tab 1　General data of infants between the two groups

组别	男 / 女	分娩方式（剖宫产 / 阴道分娩）	产房插管（有 / 无）	胎龄 / 周	Apgar 评分（5 min）	pH	BE/（mmo・L^{-1}）	乳酸 /（mmol・L^{-1}）
对照组	18/13	17/14	11/20	39.17±0.83	4.42±0.62	7.30（7.18 ～ 7.35）	7.72±5.36	5.71±3.20
研究组	15/16	14/17	8/23	39.23±0.81	4.54±0.61	7.23（7.19 ～ 7.32）	5.71±4.63	4.95±3.74
$t/\chi^2/Z$	0.583	0.581	0.683	0.292	0.673	0.721	1.580	0.861
P	0.445	0.446	0.409	0.771	0.505	0.470 #	0.119	0.393

注（Note）：#为采用 Mann-Whitney U test 分析（# is analyzed by Mann-Whitney U test）。

1.2　治疗方法

研究组患者予以布地奈德 2 mL（1 mg）（AstraZeneca，批号：H20140475）气管内滴入，对照组患者予以 9 g・L^{-1} 氯化钠溶液 2 mL（上海大冢制药有限公司，批号：H12020024）气管内滴入。两组患者均予以机械通气（根据血气分析结果调整呼吸机参数，维持 pH 在 7.35 ～ 7.45，PO_2（60 ～ 80）mmHg，PCO_2（35 ～ 55）mmHg，必要时予以一氧化氮吸入治疗，按照正常撤机流程过渡至无创通气模式（鼻塞持续正压通气或经鼻高流量吸氧），逐步降低吸入氧浓度并直至停止吸氧。予以相同的抗感染、改善微循环、镇静及液体治疗策略。密切监测患者生命体征，维持患儿电解质以及血糖正常范围。在入院时、72 h 留取气道灌洗液 1 mL，2000 r・min^{-1} 离心 10 min 后上清液分装置入－ 80 ℃冰箱保存待检。

1.3　观察指标

临床疗效；有创呼吸支持时间；总吸氧时间；

氧合指数（oxygenation index，OI，OI = FiO_2×MAP×100/PaO_2）；入院时和 72 h 气道灌洗液 TOS、TAC；氧化应激指数（oxidative stress index，OSI）：TOS 与 TAC 的比值[12]。按照 ELISA 试剂盒（上海康朗生物科技有限公司）说明书进行检测。

1.4 统计学处理

SPSS 17.0 软件进行统计分析，符合正态分布计量资料采用平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）描述，两组间比较采用 t 检验；偏态分布计量资料采用中位数（四分位间距）描述，采用 Mann-Whitney U 检验；率比较采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

研究组发生 3 例死亡病例 [3 例均并发新生儿持续肺动脉高压（persistent pulmonary hypertension of newborn，PPHN）、1 例并发肺出血、1 例并发气胸]，其他病例中并发 2 例气胸、3 例 PPHN；对照组发生 6 例死亡病例（5 例 PPHN、2 例肺出血、2 例气胸），其他病例中并发 2 例气胸、4 例 PPHN，两组病死率、并发症发生率差异没有统计学意义（见表 2）。

2.2 两组患儿氧需求

入院时及 72 h 时研究组 OI 与对照组比较，差异没有统计学意义。研究组 OI 在 72 h 时低于入院时（$P = 0.003$）。研究组有创呼吸支持时间比对照组低（$P = 0.031$）；总吸氧时间差异没有统计学意义。具体见表 2。

表 2 两组患儿临床疗效及氧需求比较 ($n = 31$)

Tab 2 Clinical efficacy and oxygen therapy of infants between the two groups ($n = 31$)

组别	气胸	肺出血	PPHN	死亡	OI	OI（72 h）	有创呼吸时间 /h	总吸氧时间 /h
对照组	4（12.90%）	2（6.45%）	9（29.03%）	6（19.35%）	11.25±7.43	5.00（3.20 ～ 10.20）	126.23±80.72	279.10±169.92
研究组	3（9.68%）	1（3.22%）	6（19.35%）	3（9.68%）	11.71±8.00	5.10（4.00 ～ 8.30）	111.77±38.29	245.25±148.36
$t/\chi^2/Z$			0.791	1.170	0.238	0.014	4.733	0.195
P	1.000*	1.000*	0.374	0.279	0.812	0.989#	0.031	0.662

注（Note）：* 为采用 Fisher’s exact test 分析；# 为采用 Mann-Whitney U test 分析（* is analyzed by Fisher’s exact test；# is analyzed by Mann-Whitney U test）。

2.3 气道灌洗液 TOS、TAC 和 OSI

入院时两组气道灌洗液 TOS_1、TAC_1、OSI_1 差异没有统计学意义。72 h 时研究组气道灌洗液 TOS_3 高于入院时气道 TOS，差异没有统计学意义；对照组高于入院时气道 TOS（$P = 0.022$）；与对照组相比，研究组气道灌洗液 TOS_3、TAC_3 差异没有统计学意义。OSI_3 显著降低（$P < 0.001$）。见表 3。

表 3 两组 TAC、TOS 和 OSI 比较 ($\bar{x}\pm s$，$n = 31$)

Tab 3 TAC，TOS and OSI of the two groups ($\bar{x}\pm s$，$n = 31$)

组别	TAC_1/（103 u·L^{-1}）	TOS_1/（103 u·L^{-1}）	OSI_1	TAC_3/（103 u·L^{-1}）	TOS_3/（103 u·L^{-1}）	OSI_3
对照组	26.89±4.55	193.67±29.32	7.16±0.55	27.56±7.99	211.78±42.51#	8.01±0.84
研究组	27.11±4.98	186.60±21.77	6.97±0.51	27.20±5.43	201.69±22.50*	7.22±0.56
t	0.182	1.078	1.384	0.211	1.169	4.341
P	0.851	0.292	0.172	0.809	0.251	0.000

注：TOS_1，TAC_1，OSI_1 为入院时；TOS_3，TAC_3，OSI_3 为入院 72 h；# 为与对照组入院时相比，$P = 0.022$；* 为与研究组入院时相比，$P = 0.080$。

Note：TOS_1，TAC_1，OSI_1 were at admission；TOS_3，TAC_3，OSI_3 were at 72 h after admission；# meas compared with the control group at admission，$P = 0.022$；* meas compared with the study group at admission，$P = 0.080$.

3 讨论

尽管新生儿复苏技术在不断推广和普及，分娩后的任何干预措施（口、鼻和气管内吸引）均未证明可有效预防 MAS[13]，MAS 仍然是足月新生儿呼吸窘迫的主要原因之一，并有较高的病死率。朱建幸等[14]报道 20 世纪 90 年代重症 MAS 患者的病死率近 40%，重庆医科大学附属儿童医院报道 21 年内（1993 ～ 2014 年）MAS 患者的病死率为 29.25%[15]。随着肺泡表面活性物质、高频震荡通气和一氧化氮吸入等治疗的广泛应用，MAS 病死率逐渐下降。本研究中 MAS 患者的病死率仍高达 14.52%，高于 Thornton 等[16]报道的美国 MAS 患儿病死率（5.67%），可能与本研究医疗机构尚不能开展 ECMO 等治疗有关。研究组病死率较对照组下降，但差异没有统计学意义；其他并发症如肺出血、气胸和 PPHN 的结果差异也没有统计学意义，可能和研究病例数相对较少有关。虽然两组患儿总吸氧时间没有差异，但气管内滴入布地奈德可以显著降低 OI 和有创通气时间，说明布地奈德气道内滴入可以改善 MAS 患者急性期的呼吸功能。

胎粪吸入后最初阻塞气道，导致通气 - 灌注不匹配和低氧血症，在随后几小时内，严重的肺

部炎症反应出现并逐渐加重[17]。胎粪吸入后中性粒细胞大量涌入气道及肺泡，激活肺泡巨噬细胞产生氧自由基，引起强烈的炎症和肺损伤，并诱导肺泡上皮细胞死亡及凋亡[18]。过激的氧化应激和炎症反应加快肺泡表面活性物质的消耗，进一步加重肺损伤。气道内应用布地奈德可减少 MAS 动物模型中性粒细胞向肺的迁移、减少炎症反应和氧化，改善肺功能[19]。布地奈德通过抑制血管细胞黏附分子 -1 的表达、抑制中性粒细胞趋化和促炎蛋白的产生[20]。布地奈德添加到表面活性剂可减少胎粪诱导的中性粒细胞向肺的迁移，抑制促炎细胞因子产生和蛋白质和脂质的氧化修饰，减少肺部氧化损伤，减轻肺水肿[21]。

两组 MAS 患者入院时气道灌洗液 TOS、TAC 和 OSI 无明显差异。72 h 时，两组患儿 TAC 水平和入院时类似；两组患儿 TOS 均较入院时增高，对照组 TOS 升高更明显；两组患儿 OSI 较入院时升高，对照组 OSI 显著高于研究组。气管内滴入布地奈德虽然没有降低 MAS 患儿气道的 TAC，但可能减轻气道的 TOS，从而降低 MAS 患儿气道灌洗液 OSI，并减少有创呼吸机使用时间。

综上所述，布地奈德气管内滴入治疗胎粪吸入综合征新生儿可减少气道灌洗液 TOS 和 OSI，并缩短有创呼吸支持时间。

参考文献

[1] Fischer C，Rybakowski C，Ferdynus C，et al. A population-based study of meconium aspiration syndrome in neonates born between 37 and 43 weeks of Gestation [J]. Int J Pediatr，2012，2012：321545.

[2] Monfredini C，Cavallin F，Villani PE，et al. Meconium aspiration syndrome：a narrative review [J]. Children（Basel），2021，8（3）：230.

[3] Natarajan CK，Sankar MJ，Jain K，et al. Surfactant therapy and antibiotics in neonates with meconium aspiration syndrome：a systematic review and meta-analysis [J]. J Perinatol，2016，36（Suppl 1）：S49-54.

[4] Nangia S，Sunder S，Biswas R，et al. Endotracheal suction in term non vigorous meconium stained neonates-a pilot study [J]. Resuscitation，2016，105：79-84.

[5] Beligere N，Rao R. Neurodevelopmental outcome of infants with meconium aspiration syndrome：report of a study and literature review [J]. J Perinatol，2008，28（Suppl 3）：S93-101.

[6] Salvesen B，Stenvik J，Rossetti C，et al. Meconium-induced release of cytokines is mediated by the TRL4/MD-2 complex in a CD14-dependent manner [J]. Mol Immunol，2010，47（6）：1226-1234.

[7] Anand V，Basu S，Yadav SS，et al. Activation of Toll-like receptors in meconium aspiration syndrome [J]. J Perinatol，2018，38（2）：137-141.

[8] Schuliga M. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease [J]. Biomolecules，2015，5（3）：1266-1283.

[9] Mokra D，Mokry J，Drgova A，et al. Intratracheally administered corticosteroids improve lung function in meconium-instilled rabbits [J]. J Physiol Pharmacol，2007，58（Suppl 5）：389-398.

[10] Kothe TB，Sadiq FH，Burleyson N，et al. Surfactant and budesonide for respiratory distress syndrome：an observational study [J]. Pediatr Res，2020，87（5）：940-945.

[11] 刘学武，陈琼芳，唐小燕，等 . 吸入药物非临床安全性评价策略 [J]. 中南药学，2021，19（5）：902-908.

[12] Yuksel M，Ustabas KF，Selek S，et al. Oxidant and antioxidant levels and DNA damage in tuberous sclerosis [J]. Brain Dev，2019，41（3）：245-249.

[13] Gandhi CK. Management of meconium-stained newborns in the delivery room [J]. Neonatal Netw，2018，37（3）：141-148.

[14] 朱建幸，周晓苓，张旭东，等 . 重症胎粪吸入综合征患儿临床与死亡相关因素分析 [J]. 中国实用儿科杂志，2001，16（5）：277-279.

[15] 黄艳 . 612 例胎粪吸入综合征临床特征及并发症影响因素分析 [D]. 重庆：重庆医科大学，2015.

[16] Thornton PD，Campbell RT，Mogos MF，et al. Meconium aspiration syndrome：incidence and outcomes using discharge data [J]. Early Hum Dev，2019，136：21-26.

[17] Lindenskov PH，Castellheim A，Saugstad OD，et al. Meconium aspiration syndrome：possible pathophysiological mechanisms and future potential therapies [J]. Neonatology，2015，107（3）：225-230.

[18] Vidyasagar D，Zagariya A. Studies of meconium-induced lung injury：inflammatory cytokine expression and apoptosis [J]. J Perinatol，2008，28（Suppl 3）：S102-107.

[19] Mikolka P，Kopincová J，Košútová P，et al. Lung inflammatory and oxidative alterations after exogenous surfactant therapy fortified with budesonide in rabbit model of meconium aspiration syndrome [J]. Physiol Res，2016，65（Suppl 5）：S653-662.

[20] Strandberg K，Blidberg K，Sahlander K，et al. Effect of formoterol and budesonide on chemokine release，chemokine receptor expression and chemotaxis in human neutrophils [J]. Pulm Pharmacol Ther，2010，23（4）：316-323.

[21] Mikolka P，Kopincova J，Tomcikova ML，et al. Effects of surfactant/budesonide therapy on oxidative modifications in the lung in experimental meconium-induced lung injury [J]. J Physiol Pharmacol，2016，67（1）：57-65.

（收稿日期：2022-06-13；修回日期：2022-10-09）

纳武利尤单抗和帕博利珠单抗方案一线治疗转移性肾细胞癌的成本效益分析

王野[1]，崔佳[2*]（1.中国药科大学南京鼓楼医院，南京 211198；2. 江苏省药品监督管理局审核查验中心，南京 210008）

摘要：目的 从医疗保健角度评价纳武利尤单抗与帕博利珠单抗相较舒尼替尼在治疗晚期肾细胞癌的成本效益。**方法** 基于多中心随机对照的Ⅲ期随机临床试验，建立三状态分区生存模型。对模型进行为期 20 年的模拟，对结果进行敏感性分析。**结果** 目前对于中国晚期肾细胞癌患者，纳武利尤联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼相较舒尼替尼的增量成本效果比（ICER）分别为 1 518 045 元 /QALY、925 930 元 /QALY。**结论** 在中国当前的 GDP 情况下，纳武利尤单抗、帕博利珠单抗两种治疗方案并不具备经济学效益。

关键词：成本效益分析；纳武利尤单抗；帕博利珠单抗；分区生存模型；肾细胞癌
中图分类号：R96，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0239-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.038

Cost-effectiveness of nivolumab and pembrolizumab as first-line treatment for metastatic renal cell arcinoma

WANG Ye[1], CUI Jia[2*] (1. *Nanjing Drum Tower Hospital, China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198; 2. *Center for Food and Drug Inspection of Jiangsu, Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To evaluate the cost-effectiveness of nivolumab and pembrolizumab for advanced renal cell carcinoma in China. **Methods** A three-state partitioned survival model was established based on a multicenter randomized controlled clinical trial. The model was simulated for 20 years, and the sensitivity of results was analyzed. **Results** For Chinese patients with advanced renal cell carcinoma, the incremental cost-effectiveness ratios (ICERs) of nivolumab plus cabozantinib, pembrolizumab plus lenvatinib versus sunitinib were 1 518 045 yuan/QALY and 925 930 yuan/QALY, respectively. **Conclusion** In the current GDP situation, the two treatment regimens of nivolumab and pembrolizumab are not cost-effective.

Key words: cost-effectiveness; nivolumab; pembrolizumab; partitioned survival; renal cell carcinoma

肾细胞癌简称肾癌，是常见的癌症之一，其发病率和病死率一直在上升。在中国，肾癌对人们的健康影响不可低估[1-2]。据中国癌症数据统计，每年约有 6.68 万肾癌新发病例，2.34 万死亡病例[3]。2019 年全球疾病负担数据表明，以伤残调整生命年（DALYs）为指标时，肾癌在中国引起的 DALYs 计数高达 64.3 万年，占 DALYs 总数的 0.17%[4]，转移性肾细胞癌在肾癌中占 90% 以上。转移性肾细胞癌患者在初始阶段通常无症状，预后较差，5 年存活率仅有 11%[5]。

舒尼替尼是一种血管内皮生长因子受体抑制剂，在 2018 年之前为治疗转移性肾细胞癌的标准疗法，现已被新型免疫检查点抑制剂药物所取代。在 2021NCCN 指南[6]、2021CSCO 指南[7]中，帕博利珠单抗联合仑伐替尼、纳武利尤单抗联合卡博替尼已经被批准用于转移性肾细胞癌的一线治疗。这项批准主要是基于 CLEAR、CheckMate9ER 两项试验：Ⅲ期临床试验 CLEAR[8] 显示，与舒尼替尼相比，帕博利珠单抗联合仑伐替尼可延长患者疾病无进展期（中位数，23.9 *vs* 9.2 个月；HR 0.39；95%*CI* 0.32 ～ 0.49）。CheckMate9ER[7] 显示，与舒尼替尼相比，纳武利尤单抗联合卡博替尼在中位无进展生存期为 16.6 个月，舒尼替尼组为 8.3 个月（中位数，16.6 *vs* 8.3 个月；HR 0.51；95%*CI* 0.41 ～ 0.64）。

作者简介：王野，男，硕士，主要从事临床药学和药物经济学研究，email：1589936809@qq.com *通信作者：崔佳，男，硕士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：64472977@qq.com

帕博利珠单抗联合仑伐替尼、纳武利尤单抗联合卡博替尼两组方案均提高晚期肾癌患者的生活质量，延长患者的生存周期，但其在为患者带来健康获益的同时，也带来巨大的药物治疗成本，因此有必要评估纳武利尤单抗加卡博替尼与帕博利珠单抗加仑伐替尼在治疗转移性肾细胞癌的经济性。

1 资料与方法

1.1 模型结构

从中国卫生健康系统的角度，采用成本效用法，评估纳武利尤单抗联合卡博替尼与帕博利珠单抗联合仑伐替尼一线治疗肾细胞癌的经济效益。在 TreeageProSuit 2020 中构建三状态分区生存模型（见图 1），各状态成员由生存曲线确定。在模拟开始时所有患者均处于疾病无进展状态，随模型运行患者逐步转移至疾病进展和死亡状态 [9-11]。在疾病进展后患者接受后续治疗直至死亡。模型循环周期 6 周，研究时限为 20 年。模型主要计算直接医疗保健成本，不良事件（AE）发生率取自 CheckMate9ER、CLEAR 随机对照试验研究。效用值来源于以往的文献研究 [12-14]。根据中国药物经济性评价指南 [15]，对成本和效用值进行了每年 5% 的贴现。2021 年 3 倍人均 GDP 作为意愿支付阈值。模型结果表述为累计成本、质量调整生命年（QALYs）以及增量成本效果比（ICER）。

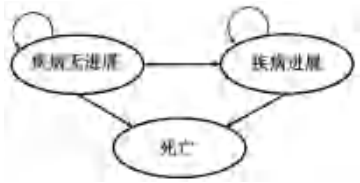


图 1 三状态分区生存图

Fig 1 Three-state partition model

1.2 目标人群

研究目标人群的入选标准和治疗方案与 CheckMate9ER 及 CLEAR 试验一致。模型纳入患者均为病理学确诊且尚未治疗的肾细胞癌患者，接受以下治疗之一：① 口服卡博替尼 40 mg·d^{-1} 联合静脉注射纳武利尤利单抗 240 mg/2 周；② 口服仑伐替尼 20 mg·d^{-1} 联合静脉注射帕博利珠单抗 200 mg/3 周；③ 口服舒尼替尼 50 mg·d^{-1}，连续服用 4 周停用 2 周；治疗措施以 42 d 为一个周期。患者在一线治疗失败后，后续治疗与随机对照临床试验一致，最常见的后续治疗是采用酪氨酸激酶抑制剂免疫检查点抑制剂。

1.3 数据与统计分析

使用 Engauge Digitizerversion 从试验中提取生存曲线数据点。根据 Guyot 等 [16] 的研究，使用 R 软件（版本 4.0.4）中的“survHE”包，对 Kaplan-Meier 曲线重构个体患者数据，并进行生存分布拟合。帕博利珠单抗联合仑伐替尼、纳武利尤单抗联合卡博替尼并不是头对头对照，故采用“netmeta”包进行荟萃统计分析，采用固定效应模型得出不同组别疾病无进展生存期（PFS）阶段以及总生存期（OS）阶段的风险比（HR）。帕博利珠单抗联合仑伐替尼组、纳武利尤单抗联合卡博替尼组阶段的 PFS、OS 生存分布参数根据荟萃分析结果 HR 进行调整，模型参数见表 1。

1.4 医疗成本

本研究从中国卫生角度出发，仅计算直接医疗成本：药物治疗方案成本、不良事件管理成本 [17]、随访成本、医院服务项目成本，见表 1。药品成本来自于中国医药信息网 - 米内网（www.menet.com）的中标价格。

1.5 敏感性分析

为了检验模型的稳健性，对参数模型进行单因素敏感性分析和概率敏感性分析。在单因素敏感性分析中，考虑到每个参数的变化对结果产生的独立影响。如果上下限变化不可用，那么设定成本的参数 ±20% 为变动范围，AE 发生率和效用值 ±10%。贴现率的合理范围是 0 ～ 8%。此外采用二阶蒙特卡洛模拟进行概率性敏感性分析，成本参数设置 Gama 分布，效用值设置 Beta 分布，所有模型参数在各种分布中随机取值，运行 5000 次，结果以成本效果可接受曲线形式展示。

2 结果

2.1 基础分析

在基础分析结果中，舒尼替尼、纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼组分别可以获得 2.98、4.67、5.22 个 QALYs。纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼相比较舒尼替尼组的 ICER 分别为 1 518 045 元 /QALY、925 930 元 /QALY（见表 2）。

2.2 敏感性分析

单因素敏感性分析结果见图 2、3。在纳武利尤单抗联合卡博替尼治疗策略的比较中对于整个模型结果影响最为显著的是 PFS 阶段的 HR，其次是卡博替尼价格、PFS 阶段的效用值。在仑伐替尼相比舒尼替尼组中对于 ICER 影响较大的是帕博利珠单抗的成本价格。在其他的变量中，随访成本、药品不良反应的效用值与药品不良反应处理成本对于增量成本效果比也存在一定影响。

运行 5000 次蒙特卡罗模拟得到总人群的成本 - 效果接受曲线（见图 4）。成本效果可接受性曲线显示，在三组用药策略中，纳武利尤单抗联合卡博替尼具有成本效益的概率是 0%，具有绝对劣势。以 2021

表 1　主要医疗成本、效用值和其他参数汇总

Tab 1　Summary of main medical costs，utility values，and other clinical data

主要参数	理论值	范围		分布	来源
		下限	上限		
拟合参数分布					
舒尼替尼 PFS_Shape	1.1785	1.0814	1.2844	Weibull	[6-7]
舒尼替尼 PFS_ Scale	17.7601	16.1880	19.4849	Weibull	[6-7]
舒尼替尼 OS_Shape	1.0937	0.9536	1.2545	Weibull	[6-7]
舒尼替尼 OS_ Scale	65.9446	53.5242	81.2471	Weibull	[6-7]
HR					
纳武利尤单抗＋卡博替尼组 _PFS_HR	0.42	0.34	0.52	Beta	[6-7]
仑伐替尼＋帕博利尤单抗组 _PFS_HR	0.52	0.42	0.64	Beta	[6-7]
纳武利尤单抗＋卡博替尼组 _OS_HR	0.59	0.43	0.80	Beta	[6-7]
仑伐替尼＋帕博利尤单抗组 _OS_HR	0.68	0.51	0.92	Beta	[6-7]
药物成本 / 元					
纳武利尤单抗 /mg	92.5	74	111	Gamma	MENET
卡博替尼 60 mg	3131.8	2505.4	3758.2	Gamma	MENET
帕博利珠单抗 /mg	179.18	143.3	215	Gamma	MENET
仑伐替尼 / 片	108	86.4	129.6	Gamma	MENET
舒尼替尼 / 片	98	78.4	117.6	Gamma	MENET
阿昔替尼 / 片	30.85	24.67	37.02	Gamma	MENET
培唑帕尼 / 片	160	128	192	Gamma	MENET
随访成本 /（元 / 周期）	462	370	555	Gamma	Local market
药物管理成本 /（元 / 周期）	296	236	355	Gamma	Local market
不良事件处理成本 /（元 / 周期）					
腹泻	276	220.8	331.2	Gamma	[15]
高血压	80.4	64.32	96.48	Gamma	[15]
谷丙转氨酶升高	160	127	191	Gamma	[15]
蛋白尿	775	620	930	Gamma	[15]
掌跖红肿疼痛	651	521	781	Gamma	[15]
皮疹	294	235	352	Gamma	[15]
红斑综合征	102	81.7	122.6	Gamma	[15]
药物不良反应发生比例（等级≥ 3）					
舒尼替尼	0.75	0.602	0.903	Beta	[7]
仑伐替尼＋帕博利珠单抗					[7]
纳武利尤单抗＋卡博替尼	0.71	0.564	0.847	Beta	[7]
效用值					
无进展	0.82	0.73	0.90	Beta	[10]
舒尼替尼	0.73	0.657	0.803	Beta	[10]
进展	0.66	0.726	0.594	Beta	[10]
不良事件（等级≥ 3）	0.157	0.127	0.188	Beta	[10]
贴现率 /%	5	0	8	Fixed	

年人均 GDP 的 3 倍为阈值，意愿支付值为 242 928 元 / QALY 的情况下，最优用药方案仍是舒尼替尼。

3　讨论

随着新型抗肿瘤药物的广泛使用，患者和公共卫生系统的经济负担显著增加，已成为发达国家和发展中国家关注的主要问题 [18]。特别是在中国，解决过高的医疗费用已成为一项紧迫的问题。

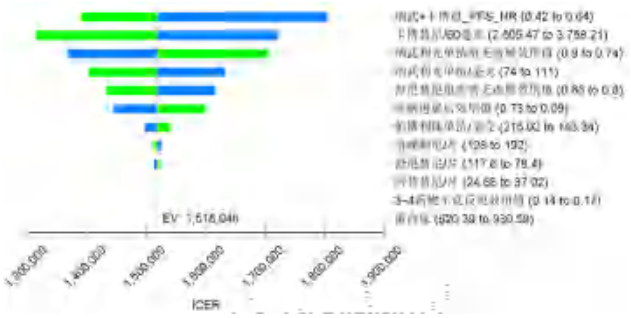


图 2　纳武利尤单抗联合卡博替尼对比舒尼替尼龙卷风图

Fig 2　Tornado diagram of nivolumab plus cabozantinib versus sunitinib

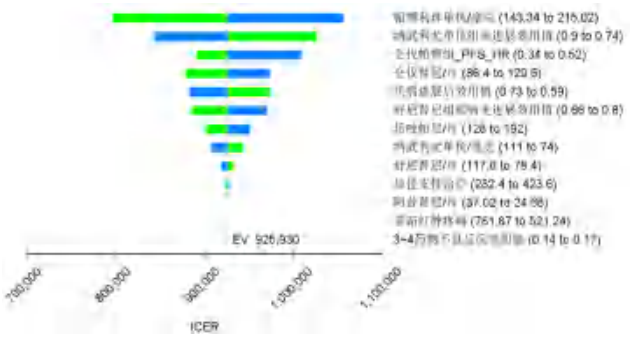


图 3　帕博利珠单抗联合仑伐替尼对比舒尼替尼龙卷风图

Fig 3　Tornado diagram of pembrolizumab plus lenvatinib versus sunitinib

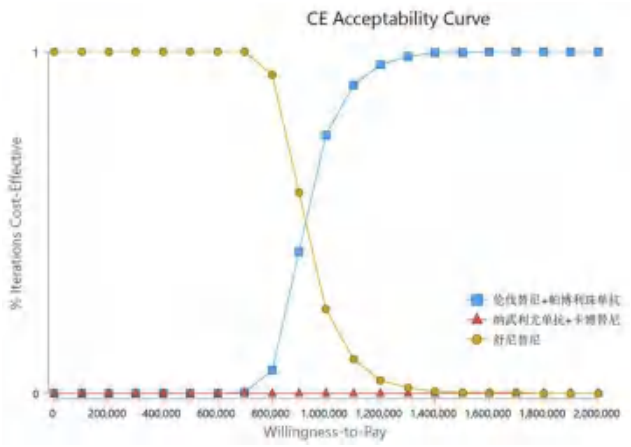


图 4　成本效果可接受曲线

Fig 4　Cost-effectiveness acceptable curve

免疫检查点抑制剂的出现为转移性肾细胞癌患者带来了新的选择。相对于传统的标准治疗（舒尼替尼单药治疗），酪氨酸酶抑制剂与免疫检查点抑制剂联合治疗可以延长晚期肾细胞癌患者生存时间。CheckMate9ER[9] 试验结果显示，与舒尼替尼相比，纳武利尤单抗和卡博替尼的组合可以改善 PFS 和 OS。同样在 CLEAR 试验中 [8]，帕博利珠单抗联合仑伐替尼也明显改善了 PFS 和 OS。我们通过间接比较两组试验的结果，建立一项三状态的分区生

表 2 基础分析

Tab 2 Basic results

干预措施	总成本 / 元	增量成本	QALYs	增量 QALYs	ICER/（元 /QALY）
舒尼替尼	732 196	—	2.98	—	—
仑伐替尼＋帕博利珠单抗	2 811 575	2 079 378	5.22	2.24	925 930
纳武利尤单抗＋卡博替尼	3 310 740	2 578 543	4.67	1.69	1 518 045

存模型评估纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼一线晚期肾细胞癌的成本效益。

在中国目前的药品价格下，纳武利尤单抗每个疗程花费超过 150 000 元，与舒尼替尼相比，一线纳武利尤单抗联合卡博替尼并不具有成本效益，ICER 为 1 518 045 元 /QALY。单向敏感性分析表明，患者开始治疗的效用值对模型的影响最大。概率敏感性显示，在 WTP 为 242 928 元 /QALY 的一线环境中，纳武利尤单抗联合卡博替尼具有成本效益的概率为 0%。这种不确定性分析表明，纳武利尤单抗联合卡博替尼的用药策略所带来的成本效益已经远远超过目前医保可以接受的范围。与纳武利尤单抗联合卡博替尼的用药策略相比，帕博利珠单抗联合仑伐替尼用药的策略为患者带来 5.22 QALYs 高于 4.67 QALYs，并且具有较低的成本。然而帕博利珠单抗联合仑伐替尼用药策略的 ICER 值同样远远超过目前的意愿支付值。

尽管本研究结果显示，在目前中国的意愿支付阈值下，纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼两种免疫抑制剂的组合都不太可能具有成本效益，但在临床上仍有相当大的价值。抗肿瘤药物的高价会给患者带来一定的经济压力，对于无法承担自付费用的患者，通常会延迟、中断和放弃治疗。所以，医疗保健系统需要确保患者能够获得和负担得起新颖且有效的治疗策略，并将其经济负担降至最低。目前中国政府通过推广全民健康保险、扩大对仿制药的投资和进行集中带量采购，进行医药行业的改革。国产程序性死亡受体（PD-1）抑制剂药品已经全部进入 2021 年国家医保目录中，价格不到 2000 元 / 疗程。国产 PD-1 抑制剂药物价格远远低于帕博利珠单抗、纳武利尤单抗，但是尚无晚期肾细胞癌的适应证。

这项研究有几个亮点：我们的模型是根据多中心、随机、Ⅲ期临床试验的结果进行荟萃分析，比较了纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼与舒尼替尼在一线环境中的疗效，考虑了药品不良反应的处理事件，例如由于药品不良事件导致的治疗中止，以及与药物毒性相关的成本和负效用。这项研究也有一些不足之处：首先，本研究是从中国医疗保健角度进行的，而不同国家的成本、医疗政策和医疗保健系统存在差异，本研究的结果无法应用于其他国家；其次，虽然我们从已发表的晚期肾细胞癌的成本效益分析中收集了健康效用值，但它并不能准确反映中国人群的效用，如果能够纳入中国人群免疫抑制剂治疗晚期肾细胞癌的效用评估，结果的准确性将会提高。

综上所述，对于转移性肾细胞癌患者，在中国目前意愿支付阈值为 242 928 元的情况下，与舒尼替尼相比，纳武利尤单抗联合卡博替尼、帕博利珠单抗联合仑伐替尼两种用药方案不能被视为具有成本效益的策略。

参考文献

[1] Hsieh JJ，Purdue MP，Signoretti S，et al. Renal cell carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers，2017，3：17009.

[2] Siegel RL，Miller KD，Goding SA，et al. Colorectal cancer statistics，2020 [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（3）：145-164.

[3] Chen W，Zheng R，Baade PD，et al. Cancer statistics in China，2015 [J]. CA Cancer J Clin，2016，66（2）：115-132.

[4] Murray CJL，Aravkin AY，Zheng P，et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories，1990—2019：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet，2020，396（10258）：1223-1249.

[5] Fisher R，Gore M，Larkin J. Current and future systemic treatments for renal cell carcinoma [J]. Semin Cancer Biol，2013，23（1）：38-45.

[6] Motzer RJ，Jonasch E，Boyle S，et al. NCCN Guidelines Insights：kidney cancer，Version 1. 2021 [J]. J Natl Compr Canc Netw，2020，18（9）：1160-1170.

[7] 中国临床肿瘤学会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）肾癌诊疗指南 2021 [M]. 北京：人民卫生出版社，2021.

[8] Motzer R，Alekseev B，Rha SY，et al. Lenvatinib plus pembrolizumab or everolimus for advanced renal cell carcinoma [J]. N Engl J Med，2021，384（14）：1289-1300.

[9] Choueiri TK，Powles T，Burotto M，et al. Nivolumab plus cabozantinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma [J]. N Engl J Med，2021，384（9）：829-841.

[10] Woods B，Sideris E，Palmer S，et al. NICE Decision Support Unit Technical Support Document 19：partitioned survival analysis for decision modelling in health care：a critical review [J]. Sheffield：NICE Decision Support Unit，2017.

[11] Woods B，Sideris E，Palmer S，et al. Partitioned survival and state transition models for healthcare decision making in oncology：where are we now? [J]. Value Health，2020，23（12）：1613-1621.

[12] Wan X，Zhang Y，Tan C，et al. First-line nivolumab plus ipilimumab vs sunitinib for metastatic renal cell carcinoma：a cost-effectiveness analysis [J]. JAMA Oncol，2019，5

（4）：491-496.
[13] Su Y，Fu J，Du J，et al. First-line treatments for advanced renal-cell carcinoma with immune checkpoint inhibitors：systematic review，network meta-analysis and cost-effectiveness analysis [J]. Ther Adv Med Oncol，2020，12：1758835920950199.
[14] Li S，Li J，Peng L，et al. Cost-effectiveness of frontline treatment for advanced renal cell carcinoma in the era of immunotherapies [J]. Front Pharmacol，2021，12：718014.
[15] 刘国恩，胡善联，吴久鸿，等 . 中国药物经济学评价指南（2020 中英双语版）[M]. 北京：中国市场出版社，2020.
[16] Guyot P，Ades AE，Ouwens MJNM，et al. Enhanced secondary analysis of survival data：reconstructing the data from published Kaplan-Meier survival curves [J]. BMC Med Res Methodol，2012，12：9.
[17] Chen J，Hu G，Chen Z，et al. Cost-effectiveness analysis of pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib in first-line advanced renal cell carcinoma in China [J]. Clin Drug Investig，2019，39（10）：931-938.
[18] Ocran Mattila P，Ahmad R，Hasan SS，et al. Availability，affordability，access，and pricing of anti-cancer medicines in low- and middle-income countries：a systematic review of literature [J]. Front Public Health，2021，9：628744.

（收稿日期：2022-06-19；修回日期：2022-08-12）

吡非尼酮治疗肺纤维化血药浓度与不良反应监测

杨雪容[1, 2]，郭璐[3]，何星[3]，杨柔[1, 2]，黎琪[1, 2]，谭昕[1, 2]，边原[1, 2]，张丽娟[1, 2]，杨勇[1, 2]，陈璐[1, 2*]
（1. 电子科技大学医学院/四川省医学科学院·四川省人民医院药学部，成都 610072；2. 电子科技大学医学院，个体化药物治疗四川省重点实验室，成都 610072；3. 电子科技大学医学院/四川省医学科学院·四川省人民医院呼吸与危重症医学科，成都 610072）

摘要：目的 研究吡非尼酮治疗肺纤维化患者的稳态谷浓度的分布情况并探索其与不良反应（ADR）的关系。**方法** 选用 Agilent ZORBAX SB-C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以乙腈 -0.2% 磷酸水溶液为流动相，对长期服用吡非尼酮的患者进行稳态谷浓度检测，并收集 ADR 信息，采用受试者工作特征曲线（ROC 曲线）分析稳态谷浓度预测 ADR 发生的效能。**结果** 吡非尼酮在 0.15 ～ 37.44 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 0.999）。共纳入 30 名长期服用吡非尼酮的肺纤维化患者，各剂量下稳态谷浓度水平均值在 0.62 ～ 3.57 μg·mL^{-1}，稳态谷浓度高是吡非尼酮发生 ADR 的危险因素（*OR*：1.800，95%*CI*：1.044 ～ 3.101，P = 0.034）。ROC 曲线显示，吡非尼酮稳态谷浓度预测 ADR 的曲线下面积为 0.738，截断值 3.1449，对应特异度 94.10%，灵敏度 46.20%。**结论** 吡非尼酮稳态谷浓度和 ADR 存在显著相关性，有望作为临床调整用药、不良反应预测和事后确认的依据。

关键词：肺纤维化；吡非尼酮；稳态谷浓度；高效液相色谱法；不良反应
中图分类号：R96，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0243-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.039

Monitoring of blood concentrations and adverse reactions of pirfenidone for pulmonary fibrosis

YANG Xue-rong[1, 2], GUO Lu[3], HE Xing[3], YANG Rou[1, 2], LI Qi[1, 2], TAN Xin[1, 2], BIAN Yuan[1, 2], ZHANG Li-juan[1, 2], YANG Yong[1, 2], CHEN Lu[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu* 610072; 2. *Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu* 610072; 3. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu* 610072)

基金项目：四川省人民医院临床研究及转化基金资助项目（No.2018LY07）；四川省科技厅重点研发项目（No.2022YFS0059）。
作者简介：杨雪容，女，在读硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：xuerongyang2022@163.com *__通信作者__：陈璐，女，主任药师，主要从事临床药学研究，email：50796877@qq.com

Abstract: Objective To determine the distribution of steady-state trough concentrations of pirfenidone in patients with pulmonary fibrosis and the relationship with adverse reactions (ADR). **Methods** An Agilent ZORBAX SB-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase was selected to determine steady-state trough concentrations and collecte ADR information in patients on long-term pirfenidone administration. Receiver operating characteristic curves (ROC curves) were used to analyze the efficacy of steady-state trough concentrations in predicting the occurrence of ADRs. **Results** Pirfenidone showed good linearity at 0.15 ～ 37.44 μg • mL^{-1} (r = 0.999). Totally 30 patients with pulmonary fibrosis on long-term pirfenidone administration were included. The mean value of steady-state trough concentrations at each dose was at 0.62 ～ 3.57 μg • mL^{-1}, with higher steady-state trough concentrations being a risk factor for ADR with pirfenidone (*OR*: 1.800, 95%*CI*: 1.044 ～ 3.101, P = 0.034). And the ROC curve showed that the area under the curve for the prediction of ADR by the steady-state trough concentrations of pirfenidone was 0.738, with a cut-off value of 3.1449, corresponding to a specificity of 94.10% and a sensitivity of 46.20%. **Conclusion** There is a significant correlation between steady-state trough concentrations of pirfenidone and ADR, which serves as a basis for clinical adjustment of dosing, ADR prediction and post hoc confirmation.

Key words: pulmonary fibrosis; pirfenidone; steady-state trough concentration; high performance liquid chromatography; adverse reaction

肺纤维化是一种常见的间质性肺疾病，患病后患者肺功能逐渐丧失，病程不可逆转，最终导致呼吸衰竭，以特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis，IPF）最为常见。吡非尼酮（pirfenidone，PFD）能有效延缓肺纤维化疾病进展，已得到多个国家指南的认可[1-2]。目前国内外关于 PFD 血药浓度的研究主要为药代动力学研究，集中在动物和健康人群，对患者群体关注很少[3-5]。PFD 用于治疗各类肺纤维化疾病的血药浓度如稳态谷浓度水平等未知。研究表明食物可降低 PFD 峰浓度，且与较低的不良反应（adverse reaction，ADR）发生率相关[3]。但谷浓度和 ADR 之间的关系尚不清楚，两者是否有明显的相关性尚待研究。然而，PFD 的 ADR 发生率高，患者停药后可选择的抗纤维化药物有限，仅尼达尼布可供选择，迫切需要某种检测指标来明确或预测 ADR 的发生，为用药方案调整提供依据。因此，本文拟建立一种测定 PFD 血浆浓度的高效液相色谱法，通过测定患者的稳态谷浓度，收集患者的疾病和 ADR 信息等，探索 PFD 治疗各类肺纤维化时的稳态谷浓度水平，明确稳态谷浓度和 ADR 的关系，为临床合理、安全使用 PFD 提供一定的数据支持。

1 材料

1.1 仪器

Vanquish Core 高效液相色谱仪 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；BP211D 电子分析天平 [精度：0.01 mg，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；Vortex Mixers 涡旋混合器（杭州米欧仪器有限公司）；HC-2518R 高速冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；DW-86L626 冰箱（海尔公司）。

1.2 试药

对照品 PFD（纯度：99.8%，批号：101276-202102）、对氨基苯甲酸甲酯（纯度≥98%，批号：T11M10 Y82635）（中国食品药品检定研究院）；磷酸和高氯酸为分析纯；甲醇和乙腈为色谱纯；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -0.2% 磷酸溶液＝ 30∶70；柱温：35 ℃；流速：1.0 mL • min^{-1}；进样量：80 μL；检测波长：314 nm。

2.2 溶液配制

精密称取 PFD 对照品 18.72 mg，对氨基苯甲酸甲酯对照品 19.59 mg，分别置于 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解，纯净水定容，得到 374.40 μg • mL^{-1} 的 PFD 储备液和 391.80 μg • mL^{-1} 的内标储备液。使用时用 10% 甲醇逐级稀释，得到 374.40、124.80、93.60、41.60、13.87、4.62 和 1.54 μg • mL^{-1} 的 PFD 工作溶液，以及 39.18 μg•mL^{-1} 的内标稀释液。于 4 ℃冰箱保存。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样本 200 μL 置 2 mL 离心管中，

加入 20 μL 内标稀释液，涡旋 30 s 后加入 25 μL 20% 高氯酸溶液，涡旋 3 min，12 000 r • min^{-1} 离心 6 min，取上清液 170 μL 待进样。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 随机取 6 个不同来源的空白人血浆，按照“2.3”项下方法处理后进样分析。配制 PFD 0.15 μg • mL^{-1} 和内标 2.88 μg • mL^{-1} 的血浆样本，按照“2.3”项下方法处理后进样分析。PFD 的保留时间为 8.075 min，与内标和血浆样本中的内源性物质分离度高，无杂质干扰，色谱峰峰形较好，见图 1。

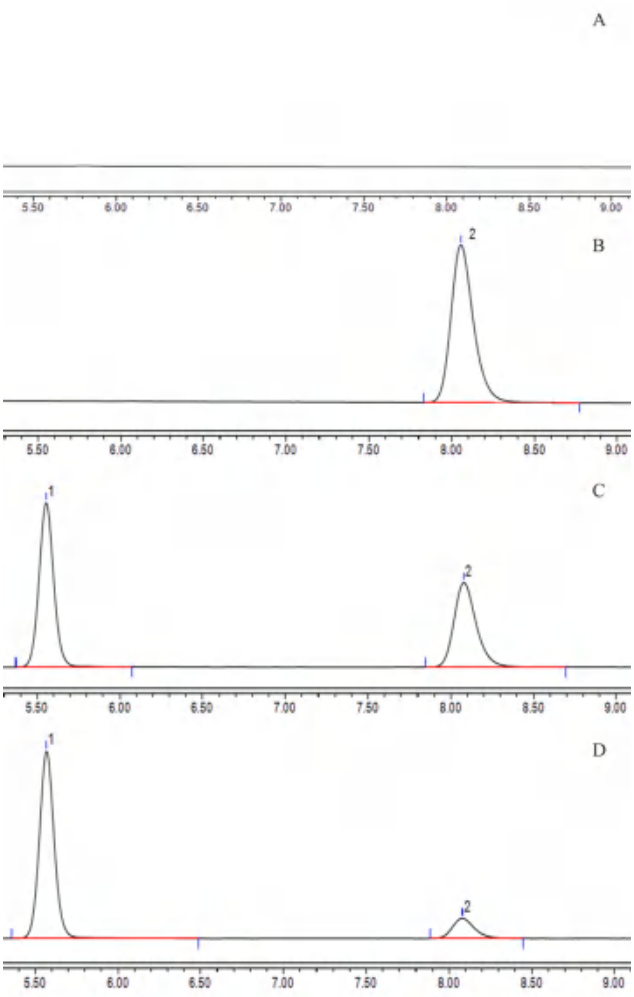


图 1 PFD 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of PFD

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 吡非尼酮和内标（pirfenidone and internal standard）；D. 患者血浆（patient’s plasma）；1. 内标（internal standard）；2. 吡非尼酮（pirfenidone）

2.4.2 线性关系考察 取 PFD 系列工作溶液各 27 μL，加入到 200 μL 空白血浆中，按照“2.3”项下方法加入内标和 20% 高氯酸溶液，得到质量浓度为 37.44、12.48、9.36、4.16、1.39、0.46、0.15 μg • mL^{-1} 的系列血浆药品，处理后进样分析。采用加权最小二乘法，用待测物与内标峰面积之比（Y）对待测物浓度（X）进行线性回归分析，得到回归方程 $Y = 17.11X - 0.1259$（$r = 0.999$）。PFD 在 0.15 ～ 37.44 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好线性关系，定量下限（LLOQ）为 0.15 μg • mL^{-1}。

2.4.3 溶剂残留 在连续测定标准曲线最高浓度（37.44 μg • mL^{-1}）3 次后测定 10% 甲醇样品，结果发现 PFD 响应低于 LLOQ 响应的 20% 和对氨基苯甲酸甲酯响应的 5%。

2.4.4 精密度和准确度考察 PFD 储备液用 10% 甲醇逐级稀释成 PFD 质量浓度为 0.15、0.46、18.72 和 28.82 μg•mL^{-1} 的 LLOQ 及低（LQC）、中（MQC）、高（HQC）浓度质控样品，每日每个浓度测定 5 个样本，连续分析 3 d，根据当日标准曲线计算各样本浓度，结果发现 PFD 在 4 个浓度水平下，批间（$n = 15$）和批内（$n = 5$）准确度均在 96.74% ～ 106.24% 内，精密度 $RSD < 5.7\%$。

2.4.5 回收试验 LQC、MQC、HQC 样品各 5 份按“2.3”项下方法处理并进样分析得 PFD 峰面积 A_1，计算相对回收率。另取 10% 甲醇 200 μL，按“2.3”项下方法处理后加入适量 PFD 的 QC 样品，制成相应浓度的 LQC、MQC、HQC 样品，各 5 份进样分析，得峰面积 A_2。用（A_1/A_2）×100% 的值表示绝对回收率，相同方法测定内标的绝对回收率。结果 PFD 的相对回收率在 97.16% ～ 104.75%，$RSD < 4.4\%$；绝对回收率在 57.04% ～ 57.75%，$RSD < 1.6\%$；内标的绝对回收率为 95.64%，RSD 为 2.7%。

2.4.6 稳定性考察 取 LQC 和 HQC 血浆样品各浓度 5 个样本，考察 4 ℃冰箱放置 2、9、16 d 的样品的稳定性。结果显示 PFD 于 4 ℃冰箱放置 16 d 稳定性仍然良好，准确度为 102.95%，RSD 为 3.5%。

2.5 PFD 稳态谷浓度测定

2.5.1 纳入与排除 纳入临床诊断为肺纤维化或间质性肺疾病并长期规律服用 PFD 的患者（同一剂量每日 3 次，至少规律服用 2 d），病例信息完整，患者知情同意。排除病例数据不完整（如缺失 PFD 用药信息、ADR 信息等）、妊娠或哺乳女性、儿童（< 18 周岁）、严重肝肾功能不全、血检存在问题或极端异常以及患者不配合等的病例。

2.5.2 研究方法 研究经四川省人民医院伦理委员会批准 [No. 伦审（研）2022 年第 152 号]，于四川省人民医院筛选患者，不干预患者用药方案。在患者早晨服药前 0.5 h 采取静脉血 3 mL 置于 EDTA 抗凝管，4000 r • min^{-1} 离心 4 min，取上清液至 2 mL 离心管中置 4 ℃冰箱中保存备用。

检测时取患者血浆 200 μL，加入 27 μL 10% 甲醇，随后按“2.3”项下方法处理分析。

2.5.3　数据分析　使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。计数资料组间采用 Fisher 确切概率法进行比较。符合正态分布的计量资料，以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组比较采用 t 检验；不符合正态分布采用中位数及四分位数表示 [M（$P25$，$P75$）]，两组比较采用 Mann Whitney U 检验，多组比较采用 K 独立样本非参数检验（Kruskal-Wallis H 检验）。利用受试者工作特征曲线（ROC 曲线）分析稳态谷浓度预测 ADR 发生的效能。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.5.4　不同组间 PFD 稳态谷浓度的比较　共纳入 30 名患肺纤维化患者，男女比例 1∶1，最大年龄 88 岁，最小年龄 48 岁，无吸烟患者，患者相关信息和健康状况见表 1。患者多合并其他疾病，并联合使用其他药物。人均合并使用 4.57 种药物，最多 10 种，单用 PFD 仅 6 人。合并使用较多的药物有糖皮质激素 15 人、雷贝拉唑 12 人、醋酸钙 9 人、他汀类 7 人、阿法骨化醇和乙酰半胱氨酸各 5 人、羟氯喹和利伐沙班各 4 人、茶碱 3 人、左氧氟沙星 2 人。由于联用雷贝拉唑的患者人次较多，其代谢物能抑制 PFD 代谢酶 CYP2C19[6]，故对是否联用雷贝拉唑进行比较。结果显示，联用雷贝拉唑组的 PFD 稳态谷浓度中位数和四分位数为 0.49（0.35，1.19），低于未联用组 2.11（0.78，3.80），差异有统计学意义（$Z = -2.455$，$P = 0.014$），但其余各组相比差异无统计学意义（见表 2）。

表 1　患者一般情况

Tab 1　General information of patients

项目	数值（$n = 30$）
性别 /（男，%）	15（50%）
年龄 / 岁	66.66±10.80
BMI/（kg・m^{-2}）	22.46±3.80
肌酐 /（μmol・L^{-1}）	65.07±17.78
尿酸 /（kg・m^{-2}）	270.40±128.08
eGFR/[mL/（min・1.73 m^2）]	93.08±24.71
总蛋白 /（g・L^{-1}）	71.04±8.46
白蛋白 /（g・L^{-1}）	42.13±5.30
ALT/（U・L^{-1}）	20.33±11.00
AST/（U・L^{-1}）	23.63±6.67
总胆红素 /（μmol・L^{-1}）	9.89±4.42

注（Note）：BMI. 体质量指数（body mass index）；eGFR. 估算肾小球滤过率（estimated glomerular filtration rate）；ALT. 谷丙转氨酶（alanine aminotransferase）；AST. 谷草转氨酶（aspartate aminotransferase）。

表 2　各组间 PFD 稳态谷浓度的差异

Tab 2　Difference in PFD steady-state trough concentrations among groups

一般资料		例数	稳态谷浓度 /（μg・mL^{-1}）		统计量	P
			$\bar{x}\pm s$	M（$P25$，$P75$）		
性别	男	15	2.22±2.00	1.59（0.35，3.85）	$Z = -0.767$	0.443
	女	15	1.38±1.18	0.87（0.64，2.20）		
年龄 / 岁	＜ 66	14	1.69±1.80	0.94（0.45，2.57）	$Z = -0.748$	0.454
	≥ 66	16	1.90±1.59	1.08（0.78，3.50）		
BMI/（kg・m^{-2}）	＜ 18.5	5	1.31±1.40	0.78（0.56，2.33）	$H = 0.437$	0.804
	18.5 ～ 23.99	15	1.98±1.95	1.15（0.50，3.65）		
	≥ 24	10	1.77±1.41	1.80（0.32，2.92）		
疾病种类	继发性肺纤维化	14	1.07±1.19	0.69（0.35，1.15）	$H = 5.839$	0.120
	IPF	8	2.70±2.12	2.62（0.49，4.92）		
	肺间质纤维化	8	2.18±1.50	1.81（0.94，3.44）		
	间质性肺炎	4	1.67±1.60	1.17（0.35，3.31）		
雷贝拉唑	联用	12	1.01±1.33	0.49（0.35，1.19）	$Z = -2.455$	0.014
	未联用	18	2.33±1.69	2.11（0.78，3.80）		

2.5.5　不同剂量 PFD 浓度的比较　30 名患者中，单次剂量在 200 ～ 600 mg，剂量为 500 mg 和 600 mg 的患者分别为 2 例和 3 例。500 或 600 mg 组的稳态谷浓度明显高于 300 mg 组，差异有统计学意义（见表 3）。

表 3　不同服药剂量下 PFD 稳态谷浓度

Tab 3　Steady-state trough concentrations of PFD at different doses

剂量（mg/ 次）	例数	稳态谷浓度 /（μg・mL^{-1}）		统计量	P
		$\bar{x}\pm s$	M（$P25$，$P75$）		
200	7	0.62±0.48	0.78（0.35，1.59）	$H = 9.733$	0.021
300	9	0.80±0.60	0.50（0.32，1.16）*		
400	9	2.32±1.61	2.20（0.87，3.86）		
500 或 600	5	3.57±1.70	3.65（1.77，5.33）		

注（Note）：与 500 或 600 mg 组相比，*$P < 0.05$（Compared with the 500 or 600 mg group，*$P < 0.05$）。

2.6　ADR

2.6.1　ADR 发生的影响因素分析　研究中有 13 人存在 ADR，涉及 10 种不同 ADR，多为轻中度，可耐受，同一患者可同时伴有两种反应。发生 ADR

组和未发生 ADR 组的患者相比，性别、年龄、BMI、用药剂量、疾病种类和是否联用雷贝拉唑的差异无统计学意义（$P > 0.05$）（见表 4）。发生 ADR 组的稳态谷浓度中位数及四分位数为 1.59（0.82，4.43），显著高于未发生 ADR 组 0.78（0.35，2.11），差异有统计学意义（$Z = -2.197$，$P = 0.028$）。进一步进行二元 logistic 回归分析，结果提示，患者稳态谷浓度值越高是发生 ADR 的独立危险因数（*OR*：1.800，95%*CI*：1.044 ～ 3.101，$P = 0034$）。

表 4 ADR 组和未发生 ADR 组的各项指标对比

Tab 4 Indicators between the ADR group and the group without ADR

项目	未发生 ADR 组	ADR 组	*P*
性别			1.000
男 /%	8（53.33）	7（46.67）	
女 /%	9（60.00）	6（40.00）	
年龄 / 岁	67.59±10.32	65.46±12.14	0.608
BMI/（kg・m^{-2}）	22.72±3.43	22.19±4.49	0.680
剂量 /[*M*（*P25*，*P75*），mg]	300（250，400）	300（250，450）	0.879
稳态谷浓度 /[*M*（*P25*，*P75*），μg・mL^{-1}]	0.78（0.35，2.11）	1.59（0.82，4.43）	0.028
疾病种类 [*n*（%）]			1.000
继发性肺纤维化	9（64.29）	5（35.71）	
IPF	4（50.00）	4（50.00）	
肺间质纤维化	3（75.00）	1（25.00）	
间质性肺炎	5（62.50）	3（37.50）	
雷贝拉唑			
联用	5	6	0.264
未联用	12	7	

2.6.2 ROC 曲线诊断稳态谷浓度预测 ADR 发生的效能 PFD 稳态谷浓度预测 ADR 的 ROC 曲线提示，当 PFD 稳态谷浓度取值为 3.1449 时，对 ADR 的预测价值最高，灵敏度 46.20%，特异度 94.10%，曲线下面积为 0.738，95%*CI*：0.555 ～ 0.920（见图 2）。

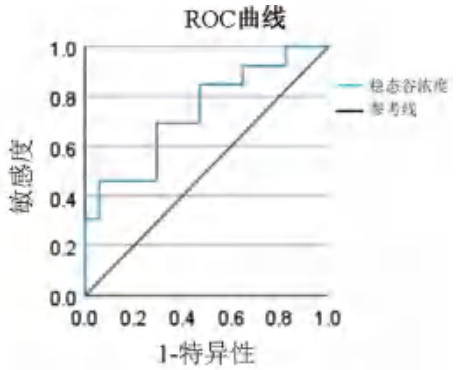


图 2 PFD 稳态谷浓度对 ADR 发生的预测价值分析

Fig 2 Predictive value of PFD steady-state trough concentrations for the occurrence of ADR

3 讨论

3.1 稳态谷浓度

为避免或减少 ADR 的发生，支持与餐同服或餐后服用 PFD[7]。故患者 PFD 随餐口服，在早上服药半小时前采血，基本与上次服药间隔 11 h 左右。另外，纳入的患者肝、肾功能正常，轻微异常值经临床判断对研究无影响。

本研究各剂量组的稳态谷浓度略高于其他研究。例如，何秀玲等 [4] 的研究中，400 mg 多次给药后 6 h 的血药浓度小于 2 μg・mL^{-1}，明显低于本研究给药后 11 h 的 2.32 μg・mL^{-1}。帅少军等 [8] 的研究中，200 mg 剂量水平下给药 8 h 后的浓度与本研究测得的浓度相似。在健康中国志愿者中，400 mg 的稳态谷浓度为（1.4±0.5）μg・mL^{-1}[3]，显著低于本研究中的（2.32±1.61）μg・mL^{-1}。主要的原因是，健康志愿者只服用 1 种药物，而本研究中真实患者常伴随多种疾病，联合使用多种药物。由于 PFD 在体内主要经过 CYP450 酶系（CYP1A2 代谢 72.8% 的 PFD，CYP2C19、2D6、2C9 和 2E1 起次要作用）代谢 [9]，容易发生代谢相关作用，影响 PFD 血药浓度。

研究表明，雷贝拉唑体内代谢物可抑制 CYP2C19 酶活性 [6]，且左氧氟沙星可抑制 CYP1A2 酶活性，联用的情况下可在一定程度上增加 PFD 谷浓度。虽然，本研究中联用雷贝拉唑组较未联用组浓度水平低，与理论矛盾，实际是因为联用组的用药剂量较高 [（383.33±133.95）μg・mL^{-1} *vs*（300±85.28）μg・mL^{-1}]，这种矛盾同样与样本量较小有关。此外，羟氯喹在体内可经过 CYP2D6 代谢，茶碱主要通过 CYP1A2 酶代谢，这些药物在一定程度上竞争代谢酶，导致 PFD 代谢减慢。因此使用 PFD 的患者群体稳态谷浓度实际偏高。王培乐等 [5] 的研究也证明了这一点，其研究对象也存在合并用药，结果 $t_{1/2}$ 和 *AUC* 值较之前的研究结果有所增大，而 *CL* 降低了约 41.8%，证明合并用药会使血药浓度 - 时间曲线上移。这与本研究中稳态谷浓度较之前的研究偏高相符。

3.2 ADR 和稳态谷浓度

本研究首次发现肺纤维化患者的稳态谷浓度和 ADR 的相关性，稳态谷浓度是重要的危险因数（*OR*：1.800，95%*CI*：1.044 ～ 3.101），稳态谷浓度越高，患者发生 ADR 的风险显著增加。同时，ROC 曲线显示，PFD 稳态谷浓度取值为 3.1449 μg・mL^{-1} 时，对 ADR 的预测价值最高，灵敏度 46.20%，特异度 94.10%，曲线下面积为 0.738，提示具有一定的临床价值。

本研究中腹胀出现 3 人次，消化不良、光敏

反应、食欲下降、腹痛和体重下降（1 个月下降超过 3 kg）分别出现 2 人次，恶心、乏力、胸口烧灼感和嗳气分别出现 1 人次。由于 PFD 的 ADR 主要集中在胃肠道不适[10]，因此本研究中胃肠道不适发生率高达 36.67%，发生胃肠道 ADR 组的稳态谷浓度中位数及四分位数为 3.65（0.87，4.98），未发生组为 0.78（0.35，2.02），差异无统计学意义（$Z=-0.947$，$P=0.355$）。PFD 光敏反应的发生率较低，仅观察到 2 人，应扩大样本量，深入探索内在联系。

剂量是造成血药浓度差异的首要因素，但并未发现剂量和 ADR 的相关性。由于患者基因多态性、联合用药相互作用以及食物的干扰[11-12]，剂量和 ADR 的相关性可能被模糊。而血药浓度是多种因素共同作用的结果，与 ADR 的关系更为直接和明确。本研究结果提示：PFD 的稳态谷浓度作为可直接检测的指标，有望作为临床 PFD 用药方案调整、ADR 预测和事后确认的依据。

3.3 局限性

本研究存在一定的局限性，患者服药方式为随餐口服，故未按照严格的 8 h 一次服用药物，采血时间多为末次服药后 11 h。另外，由于样本量小，仅 30 例，纳入的患者 ADR 多为轻中度，可耐受，未观察到肝功能受损等 ADR；加之临床上患者一旦出现严重 ADR 时，立即停药和换药，因此未收集到严重 ADR 的患者继续服用 PFD 的病例，故未深入探讨 ADR 分类和严重程度与稳态谷浓度的关系。

3.4 总结

本研究真实反映了临床实际用药情况下长期规律服用 PFD 的稳态谷浓度，明确了 PFD 稳态谷浓度与 ADR 的关系，为临床合理用药提供了一定的数据支持，尤其是方案调整，ADR 预测和事后确认。未来，应该进行更大样本量的研究，进一步探讨 PFD 相关基因位点、血药浓度、疗效和 ADR 的内在联系，进一步挖掘患者用药时预测疗效和 ADR 的指标。

参考文献

[1] Raghu G，Rochwerg B，Zhang Y，et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline：treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med，2015，192（2）：e3-19.

[2] Homma S，Bando M，Azuma A，et al. Japanese guideline for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Investig，2018，56（4）：268-291.

[3] Shi S，Wu J，Chen H，et al. Single and multiple-dose pharmacokinetics of pirfenidone，an antifibrotic agent，in healthy Chinese volunteers [J]. J Clin Pharmacol，2007，47（10）：1268-1276.

[4] 何秀玲，许馨文，张明，等 . 吡非尼酮在中国健康受试者单剂量及多剂量的药动学研究 [J]. 中国药学杂志，2015，50（13）：1134-1137.

[5] 王培乐，孙会婷，高梅梅，等 . UPLC-MS/MS 测定特发性肺纤维患者血浆中吡非尼酮及其代谢物的含量及药动学研究 [J]. 中国药学杂志，2021，56（8）：675-681.

[6] Li XQ，Andersson TB，Ahlström M，et al. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole，esomeprazole，lansoprazole，pantoprazole，and rabeprazole on human cytochrome P450 activities [J]. Drug Metab Dispos，2004，32（8）：821-827.

[7] Pan L，Gelzleichter T，Chen Y，et al. Effect of pirfenidone on gastric emptying in a rat model [J]. Pulm Pharmacol Ther，2018，51：41-47.

[8] 师少军，吴健鸿，陈汇，等 . 高效液相色谱法测定人血浆吡非尼酮浓度 [J]. 中国药学杂志，2011，46（2）：138-141.

[9] Zhang Y，Sato R，Fukami T，et al. Pirfenidone 5-hydroxylation is mainly catalysed by CYP1A2 and partly catalysed by CYP2C19 and CYP2D6 in the human liver [J]. Xenobiotica，2021，51（12）：1352-1359.

[10] Galli JA，Pandya A，Vega-Olivo M，et al. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice：tolerability and adverse drug reactions [J]. Respirology，2017，22（6）：1171-1178.

[11] Bahar MA，Setiawan D，Hak E，et al. Pharmacogenetics of drug-drug interaction and drug-drug-gene interaction：a systematic review on CYP2C9，CYP2C19 and CYP2D6 [J]. Pharmacogenomics，2017，18（7）：701-739.

[12] 李忠芳，吴健鸿，陈汇，等 . 食物对吡非尼酮胶囊人体药动学的影响 [J]. 中国药师，2018，21（10）：1731-1734.

（收稿日期：2022-09-22；修回日期：2022-11-11）

二维液相色谱法测定人血浆中泊沙康唑药物浓度及其在儿科临床的应用

张胜男，周宇雪，王丹姝，吕萌*（郑州大学附属儿童医院药学部，郑州　450000）

摘要：目的　建立一种测定血浆中泊沙康唑的二维液相色谱方法，并应用于临床检测。**方法**　全血经过离心、去蛋白前处理后进样分析，通过一维液相色谱柱 Aston SX1（3.5 mm×25 mm，5 μm）对泊沙康唑进行初步萃取分离，由中间柱 Aston SCB（4.6 mm×125 mm，5 μm）转移至二维液相色谱柱 Aston SCB（4.6 mm×10 mm，3.5 μm）进行最终的分离分析。一维流动相为甲醇 - 乙腈 - 磷酸铵盐水溶液＝1∶3∶3（*V/V/V*，氨水调 pH 至 7.00），流速 0.7 mL • min $^{-1}$；二维液相色谱系统流动相为 25 mmol • L $^{-1}$ 磷酸铵盐水溶液 -1.0 mmol • L $^{-1}$ 磷酸氢二铵溶液 - 乙腈＝18∶22∶60，流速 1.0 mL • min $^{-1}$。柱温 40 ℃，紫外检测波长 262 nm，进样量 200 μL。**结果**　泊沙康唑与血浆中其他杂质分离良好，质量浓度在 0.042 ～ 3.04 mg • L^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系（r ＝ 0.9993），平均回收率为 100.74%。**结论**　本法准确可靠，适用于临床开展常规泊沙康唑血药浓度监测及药动学研究。

关键词：二维液相色谱；泊沙康唑；药物浓度；测定；临床应用
中图分类号：R969　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0249-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.040

Determination of posaconazole in the plasma by two-dimensional liquid chromatography and its application in pediatric patients

ZHANG Sheng-nan, ZHOU Yu-xue, WANG Dan-shu, LYU Meng* (*Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou* 450000)

Abstract: Objective　To establish a detection method by using the two-dimensional liquid chromatography to determine the concentration of posaconazole in the plasma. **Methods**　After centrifugation and protein precipitation, the samples were analyzed. The initial extraction and separation of posaconazole were performed on a one-dimensional liquid chromatographic column Aston SX1 (3.5 mm×25 mm, 5 μm), and subsequently transferred to Aston SCB (4.6 mm×125 mm, 5 μm) for the final separation and analysis by the intermediate column Aston SCB (4.6 mm×10 mm, 3.5 μm). The one-dimensional mobile phase was methyl-acetonitrile-ammonium phosphate aqueous solution (1∶3∶3, *V/V/V*, with pH being adjusted to 7.00 by ammonium hydroxide) with a flow rate of 0.7 mL • min $^{-1}$. The two-dimensional mobile phase was a mixed system of 25 mmol • L $^{-1}$ ammonium phosphate aqueous solution-1.0 mmol • L $^{-1}$ diammonium hydrogen phosphate solution-acetonitrile (18∶22∶60). The flow rate was 1.0 mL • min $^{-1}$. The column temperature was 40 ℃, the wavelength was 262 nm and the injection volume was 200 μL. **Results**　Posaconazole was well separated from other impurities in the plasma. The plasma concentration of posaconazole had a good linear relationship with their peak areas at 0.042 － 3.04 mg • L^{-1} (r ＝ 0.9993). The average recovery was 100.74%. **Conclusion**　The method is sensitive and accurate, which is suitable for the routine determination and pharmacokinetic study of posaconazole.

Key words: two-dimensional liquid chromatography; posaconazole; plasma concentration; determination; clinical application

基金项目：河南省重点研发与推广专项（科技攻关）（No.212102310445）。
作者简介：张胜男，女，主管药师，主要从事儿童个体化药物治疗研究，email：zsnphar@126.com　*通信作者：吕萌，男，主管药师，主要从事儿童临床药理研究，email：lvmengyh@126.com

泊沙康唑为第二代三唑类抗真菌药，通过抑制真菌细胞膜生物合成发挥抗真菌作用。其对曲霉属和念珠菌属等多种真菌病原具有较强的抗真菌活性，临床广泛用于治疗 13 岁及以上患者侵袭性曲霉菌和念珠菌感染[1-4]。药动学 / 药效学研究表明，泊沙康唑临床疗效与其血药浓度存在一定的相关性[1]。用于预防真菌感染时，泊沙康唑血药稳态谷浓度应＞ 0.7 mg • L^{-1}，治疗真菌感染时血药稳态谷浓度应＞ 1.0 ～ 1.25 mg • L^{-1}[5-6]。但需要注意的是，泊沙康唑的体内过程与药物剂型、患者的饮食、联合用药有关，个体间变异较大[7]，需要通过开展血药浓度监测指导个体化用药。而儿童患者泊沙康唑血药浓度个体差异大于成人，因此对儿童患者进行泊沙康唑血药浓度监测至关重要[8]。本文建立了一种测定泊沙康唑血药浓度的二维液相色谱方法，对 30 名使用泊沙康唑的儿童患者进行了血药浓度监测，并对监测结果进行初步分析。

1　材料

1.1　仪器

全自动二维液相色谱仪（岛津 LC-20ATVP，德米特 FLC 2701 2D-LC-UV 系统）；FA1104 分析电子天平（上海上平仪器有限公司，精度为 0.0001 g）；SC-3616 低速离心机（安徽中科中佳）；Centrifuge-5425 高速离心机（Eppendorf），Vortex Mixer 旋涡混合器（Labnet）。

1.2　试药

泊沙康唑对照品（批号：1-MSW-3-1，加拿大多伦多研究化学品公司，含量：100%）；CAA-1D 流动相 [批号：20220427-1，甲醇 - 乙腈 - 磷酸铵盐水溶液＝ 1 ∶ 3 ∶ 3（*V/V/V*），氨水调 pH 至 7.00]、API-1 流动相（批号：20210701-1，25 mmol • L^{-1} 磷酸铵盐水溶液）、BPI-3 流动相（批号：20210701-1，1.0 mmol • L^{-1} 磷酸氢二铵溶液）、OPI-1 流动相（批号：20210712-1，乙腈）、ORG-1 去蛋白剂（批号：20220425-1，乙腈）（湖南德米特仪器有限公司）。泊沙康唑口服混悬液（Merck Sharp & Dohme Ltd.）。

2　方法与结果

2.1　测定方法

2.1.1　色谱条件　一维液相色谱系统采用 Aston SX1 色谱柱（3.5 mm×25 mm，5 μm），流动相为 CAA-1D 流动相，流速 0.7 mL • min^{-1}；中间柱为 Aston SCB（4.6 mm×125 mm，5 μm），流动相为纯水；二维液相色谱系统采用 Aston SCB 色谱柱（4.6 mm×10 mm，3.5 μm），流动相为 API-1 ∶ BPI-3 ∶ OPI-1 ＝ 18 ∶ 22 ∶ 60，流速 1.0 mL•min^{-1}。柱温 40 ℃，紫外检测波长 262 nm，采用等度洗脱，进样量 200 μL。时间程序设置见表 1。

表 1　时间程序

Tab 1　Time program

流程	时间 /min	系统工作状态
工序 1	0 ～ 2.45	LC1 色谱柱工作，进行样品初级分离
工序 2	2.45 ～ 3.60	LC1 与中间柱连通，样品中目标组分的捕获
工序 3	3.60 ～ 4.60	LC2 与中间柱连通，洗脱样品至 LC2
工序 4	4.60 ～ 13.00	样品中目标组分的分离检测

2.1.2　对照品溶液的配制　称取泊沙康唑对照品 30.4 mg，用纯甲醇溶解并定容至 100 mL，配制成质量浓度为 304 mg • L^{-1} 的泊沙康唑对照品溶液，置－ 20 ℃冰箱中保存，备用。

2.1.3　质控品的配制　取“2.1.2”项下对照品溶液 0.8 mL，置于 100 mL 量瓶中，用空白血浆定容至刻度，得高质量浓度质控品（2.43 mg • L^{-1}）。依次配得低质量浓度质控品（0.24 mg • L^{-1}）、中质量浓度质控品（0.81 mg • L^{-1}）置于－ 20 ℃冰箱备用。

2.1.4　样品处理及测定　样品低速离心 5 min（3500 r•min^{-1}），准确吸取上层血浆 200 μL 至 1.5 mL EP 管中，再准确吸取 ORG-1 去蛋白剂 500 μL 至 EP 管中，EP 管涡旋振荡 1 min 后，高速离心 8 min（14 000 r•min^{-1}），取 500 μL 上清液置 1.5 mL 进样瓶中待测。在“2.1.1”项色谱条件下进样 200 μL，记录色谱图和峰面积，采用外标工作曲线法定量，将样品峰面积代入标准曲线，计算所得浓度。样品每次测定同时随行测质控品，以保证结果的准确可靠。

2.2　方法学考察

2.2.1　专属性考察　分别取空白血浆（来源于健康体检维生素项目患儿的剩余血浆）、泊沙康唑对照品溶液、空白人血浆中加入泊沙康唑标准溶液，分别按“2.1.4”项下方法处理，按“2.1.1”项下条件进行测定，色谱图见图 1。泊沙康唑保留时间为 11.16 min。在对照品及血浆标准液样本中，泊沙康唑峰形及分离度均良好，且血浆中内源性物质及其他杂质均不干扰泊沙康唑测定。

2.2.2　标准曲线绘制　取“2.1.2”项下泊沙康唑对照品溶液，用空白血浆依次稀释成 3.04、2.03、1.01、0.51、0.25、0.084、0.042 mg • L^{-1} 的系列溶液，按照“2.1.4”项下方法处理并测定，以相应色谱峰面积为纵坐标（y），质量浓度为横坐标（x），进行线性回归，绘制标准曲线，得到线性回归方程：$y = 2.796\times10^{5}x + 3.102\times10^{3}$（$r$ ＝ 0.9993），线性范围为 0.042 ～ 3.04 mg • L^{-1}。

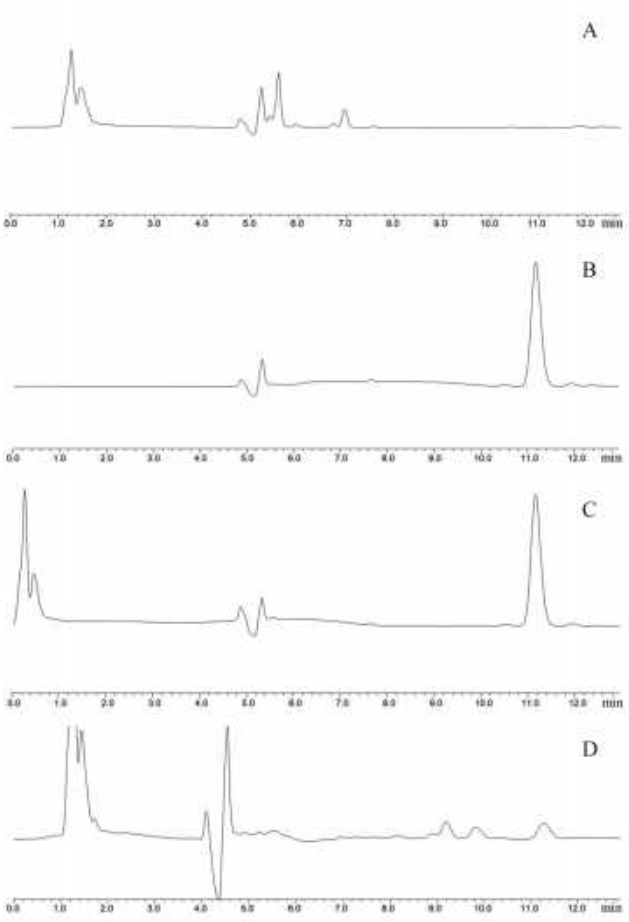


图 1 泊沙康唑色谱图

Fig 1 Chromatogram of posaconazole

A. 空白人血浆（blank plasma）；B. 泊沙康唑对照品溶液（15.2 mg • L^{-1}）[reference solution of posaconazole（15.2 mg • L^{-1}）]；C. 空白人血浆中加入对照品溶液（2.43 mg • L^{-1}）[blank plasma reference solution of posaconazole（2.43 mg • L^{-1}）]；D. 空白人血浆中加入定量下限浓度色谱图（0.042 mg • L^{-1}）[blank plasma ＋ reference solution of posaconazole（0.042 mg • L^{-1}）]

2.2.3 精密度和准确度考察 取“2.1.3”项下泊沙康唑低、中、高 3 个水平的质控品，按照“2.1.4”项下方法处理并测定，每个浓度平行设置 5 组，测出结果代入线性回归方程计算浓度，以测量浓度的 *RSD* 反映精密度，结果见表 2。通过“回收率（%）＝计算得到的浓度 / 理论浓度 ×100%”计算回收率。泊沙康唑在低、中、高 3 个水平浓度的平均回收率分别为 100.30%（*RSD* ＝ 0.83%）、101.95%（*RSD* ＝ 0.99%）和 99.97%（*RSD* ＝ 1.2%），表明该方法的回收率符合生物样品分析要求。

表 2 方法回收率日内和日间精密度考察

Tab 2 Recovery，intra-day and inter-day accuracy

组别	药物浓度 /（mg • L^{-1}）	日内精密度		日间精密度	
		测定浓度 /（mg • L^{-1}）	*RSD*/%	测定浓度 /（mg • L^{-1}）	*RSD*/%
低	0.24	0.24±0.0023	0.93	0.24±0.0055	2.2
中	0.81	0.83±0.0091	1.1	0.80±0.010	1.3
高	2.43	2.43±0.03	1.3	2.44±0.030	1.2

2.2.4 提取回收率 将对照品溶液稀释为 15.2 mg • L^{-1} 的溶液，分别用 CAA-1D 及空白血浆稀释浓度为原来的 10%，作为对照样品和质控品，各平行配制 5 份，按“2.1.4”项下方法进行前处理后直接进样，记录峰面积，计算提取回收率为 94.62%。

2.2.5 稳定性考察 取“2.1.3”项下高浓度质控品 3 份，按照“2.1.4”项下方法处理并测定，每份样品进样 2 次，考察样品在室温、4 ℃及－ 20 ℃条件下放置 3 d 的稳定性。结果表明，室温、4 ℃及－ 20 ℃条件下，泊沙康唑的降解均在 5% 以内，符合稳定性要求，具体见表 3。

表 3 方法稳定性考察结果

Tab 3 Stability

组别	药物浓度 /（mg • L^{-1}）	室温放置 3 d		4 ℃放置 3 d		－ 20 ℃放置 3 d	
		测定浓度 /（mg • L^{-1}）	*RSD*/%	测定浓度 /（mg • L^{-1}）	*RSD*/%	测定浓度 /（mg • L^{-1}）	*RSD*/%
低	0.24	0.23±0.0020	0.86	0.24±0.0048	2.0	0.23±0.0036	1.6
中	0.81	0.78±0.0088	1.1	0.80±0.0073	0.91	0.79±0.0068	0.86
高	2.43	2.34±0.03	1.2	2.40±0.04	1.7	2.44±0.04	1.6

2.3 临床应用

我院 2022 年 1 月—6 月期间对 30 例患儿进行泊沙康唑血药浓度检测，其中男 20 例，女 10 例。年龄为（8.1±4.5）岁，体质量为（30.9±31.0）kg。30 例患儿均为了预防真菌感染而服用泊沙康唑，其中 18 例为急性淋巴细胞白血病患儿，6 例为急性髓系白血病患儿，6 例为再生障碍性贫血患儿。所有患儿常规服用泊沙康唑混悬液 1 周后，于服药前 30 min 内采血，采血管使用 EDTA 抗凝管（紫色帽盖），3500 r • min^{-1} 离心 5 min 收集血浆，应用本方法进行泊沙康唑血药谷浓度检测。30 例患儿泊沙康唑的初始给药剂量为（5.2±1.2）mg • kg^{-1} tid。患儿的泊沙康唑血药浓度在 0.5 ～ 3.4 mg • L^{-1} 波动，平均谷浓度为（1.5±0.7）mg • L^{-1}。根据预防侵袭性真菌病（invasive fungal disease，IFD）时泊沙康唑血药谷浓度应＞ 0.7 mg • L^{-1} 的靶值范围，23/30（76.7%）例患儿泊沙康唑血药谷浓度达标，表明临床药师仍需要根据治疗药物监测结果对血药浓度不达标的患儿进行剂量调整。

3 讨论

近年来，随着对高危、难治或复发儿童急性淋巴细胞白血病化疗强度的增大，以及靶向药物和造血干细胞移植的应用，IFD 的发生率有上升的趋势 [9]。IFD 是免疫功能低下儿童发病和病死的主要诱因 [10]，如何有效预防、治疗儿童 IFD 显得尤为重要。泊沙康唑口服混悬液 2005 年经美国 FDA 批准上市，主要用于预防 13 岁及以上严重免疫功能缺陷患者的侵袭性曲霉病和念珠菌病以及口咽部念珠菌病治疗。研究表明，泊沙康唑血药浓度与疗效之间具有相关性，在临床中用于预防 IFD 时血药谷浓度应＞ 0.7 mg • L^{-1}，而用于治疗 IFD 时应＞ 1.0 ～ 1.25 mg • L^{-1}[1，5-6，9，11]。但泊沙康唑在儿童患者中较难达到目标浓度，尤其是在 13 岁以下的儿童患者中个体差异较大，因此需要通过血药浓度监测指导个体化用药 [8]。

目前泊沙康唑的药物浓度检测方法主要有高效液相 - 质谱 / 质谱联用法、高效液相色谱法 [12-19]。高效液相 - 质谱 / 质谱联用的方法检测泊沙康唑的血药浓度，检测精准、灵敏度高，但是仪器设备比较昂贵，检测费用相对较高，基层医院采用该方法进行日常泊沙康唑血药浓度检测较为困难，不利于推广。计建军等 [15] 通过高效液相色谱法测定血清中泊沙康唑浓度，但是该方法需要内标且前处理较为复杂。而本研究所用全自动二维液相色谱系统建立的泊沙康唑血药浓度检测方法，前处理简单，在医疗机构大量检测的情况下可以节约时间。此外，中间色谱柱作为转移接口，不仅承担了捕获与转移功能，同时还具备拦截功能，使目标物从共洗脱物中得以分离。本方法经方法学考察均符合规定，且成功用于 30 例儿童患者的临床血样检测，能较好满足临床检测需求。

综上所述，本研究建立了一种测定泊沙康唑血药浓度的二维液相色谱方法，具有前处理简单、准确性好、稳定性强等特点，能满足临床报告及时性、准确性和测定范围等要求，可以用于临床治疗药物浓度监测。

参考文献

[1] Chen L，Krekels EHJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole [J]. Drugs，2020，80（7）：671-695.

[2] Uchida K，Yokota N，Yamaguchi H. In vitro antifungal activity of posaconazole against various pathogenic fungi [J]. Int J Antimicrob Agents，2001，18（2）：167-172.

[3] Keating GM. Posaconazole [J]. Drugs，2005，65（11）：1553-1567.

[4] Herbrecht R. Posaconazole：a potent，extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections [J]. Int J Clin Pract，2004，58（6）：612-624.

[5] Jang SH，Colangelo PM，Gobburu JV. Exposure-response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal infections：evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma [J]. Clin Pharmacol Ther，2010，88（1）：115-119.

[6] Walsh TJ，Raad I，Patterson TF，et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy：an externally controlled trial [J]. Clin Infect Dis，2007，44（1）：2-12.

[7] 张飞雨，张瑞霞，宋学武，等 . 影响泊沙康唑血药浓度相关因素的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（9）：971-976.

[8] Jia M，Zhang Q，Qin Z，et al. Dose optimisation of posaconazole and therapeutic drug monitoring in pediatric patients [J]. Front Pharmacol，2022，13：833303.

[9] 张亚停，王健，周敦华，等 . 泊沙康唑初级预防在儿童急性淋巴细胞白血病诱导治疗中的作用 [J]. 中国实验血液学杂志，2021，29（6）：1710-1713.

[10] Lehrnbecher T，Groll AH. Invasive fungal infections in the pediatric population [J]. Expert Rev Anti Infect Ther，2011，9（3）：275-278.

[11] Ashbee HR，Barnes RA，Johnson EM，et al. Therapeutic drug monitoring（TDM）of antifungal agents：guidelines from the British Society for Medical Mycology [J]. J Antimicrob Chemother，2014，69（5）：1162-1176.

[12] 向东，余恒毅，刘璐，等 . LC-MS/MS 法同时测定伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼及伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑的血药浓度 [J]. 药物分析杂志，2022，42（2）：271-278.

[13] 张飞雨，张瑞霞，高慧儿，等 . UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中泊沙康唑、氟康唑、伏立康唑的血药浓度 [J]. 天津医科大学学报，2022，28（2）：195-199.

[14] Jenkins N，Black M，Schneider HG. Simultaneous determination of voriconazole，posaconazole，itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LC-MS/MS [J]. Clin Biochem，2018，53：110-115.

[15] 计建军，张慧，查丽，等 . 反相高效液相色谱法测定人血清中泊沙康唑的浓度 [J]. 中国药物应用与监测，2020，17（6）：367-370.

[16] 金鸿宾，董吉，丁一多 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定人血浆中泊沙康唑 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（24）：3241-3243.

[17] 牛壮，程晓亮，王陶陶，等 . 高效液相色谱 - 质谱联用法测定泊沙康唑的血药浓度 [J]. 中南药学，2016，14（7）：708-711.

[18] 王磊，孙文利，刘红星 . 高效液相色谱 - 串联质谱法测定移植患者血浆泊沙康唑水平 [J]. 检验医学与临床，2018，15（19）：2902-2905.

[19] 王磊，孙文利，刘瑞，等 . HPLC-MS/MS 法检测血浆伏立康唑、泊沙康唑和伊曲康唑浓度的方法建立及在白血病患者用药监测中的应用 [J]. 现代检验医学杂志，2019，34（3）：10-14.

（收稿日期：2022-08-03；修回日期：2022-09-05）

临床药师在临床

高剂量氟康唑治疗肥胖患者肺隐球菌病的药学实践

袁亚平[1,2]，刘婷婷[1,2]，吴炯熇[1,2]，方向群[2]，姜学革[2]，汤智慧[3]，李洪霞[2*]（1. 解放军医学院，北京 100853；2. 解放军总医院第二医学中心呼吸与危重症医学科，国家老年疾病临床医学研究中心，北京 100853；3. 解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100853）

摘要：通过高剂量氟康唑治疗 1 例免疫功能正常肥胖患者的药学实践，探索肺隐球菌病的个体化治疗。治疗过程中应用影像组学技术评估病灶变化，疗效不佳时根据药代动力学 / 药效动力学（PK/PD）调整氟康唑剂量，同时监测药物不良反应。1 年后患者病灶大部分吸收，未出现明显药物不良反应。提示临床，肺隐球菌病肥胖患者可能需要更高剂量的氟康唑，治疗过程中应监测其血药浓度，并推算 0 ～ 24 h 浓度时间曲线下药物面积（*AUC*）与最小抑菌浓度（*MIC*）的比值（$AUC_{0\sim24\,h}/MIC$），以保证疗效。病灶明显吸收后再逐渐减量。

关键词：肺隐球菌病；氟康唑；血药浓度；PK/PD；影像组学技术
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0253-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.041

High-dose fluconazole for an obese patient with pulmonary cryptococcosis

YUAN Ya-ping[1,2], LIU Ting-ting[1,2], WU Jiong-he[1,2], FANG Xiang-qun[2], JIANG Xue-ge[2], TANG Zhi-hui[3], LI Hong-xia[2*] (1. *Chinese PLA Medical School*, *Beijing* 100853; 2. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine*, *The Second Medical Center*, *National Clinical Research Center for Geriatric Diseases*, *Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100853; 3. *Department of Pharmacy*, *the Medical Supplies Center*, *Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100853)

Abstract: To explore the individualized treatment of pulmonary cryptococcosis by high dose fluconazole in an immunocompetent obese patient. Radiomics was used to assess the lesion changes during the treatment. The therapeutic dose of fluconazole was adjusted according to its pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) when the efficacy was not good. The side effects were monitored throughout the treatment. One year later, most of the lesions disappeared and no obvious side effects were observed in this patient, suggesting that obese patients with pulmonary cryptococcosis might need higher dosages of fluconazole. The serum drug concentration should be monitored during the treatment, and the ratio of area under the concentration-time curve ($AUC_{0\sim24\,h}$) to minimum inhibitory concentration (*MIC*) ($AUC_{0\sim24\,h}/MIC$) should be calculated to ensure the curative effect. After obvious absorption of the lesions, the dosage can be gradually reduced.

Key words: pulmonary cryptococcosis; fluconazole; plasma concentration; PK/PD; radiomics

氟康唑是一种对真菌甾醇合成有特异性强效抑制作用的三唑类抗真菌药物，因其抗菌效果佳、生物利用度好、价格便宜等优势而被广泛的应用于念珠菌及隐球菌感染的治疗中。

肺隐球菌病（pulmonary cryptococosis）是由新生隐球菌感染引起的一种急性、亚急性或慢性肺部真

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2020YFC2005402）；军委后勤保障部卫生局应用基础研究项目（No.20BJZ28）。
作者简介：袁亚平，女，硕士，主要从事肺部感染、急性肺损伤及抗菌药物临床应用方面的研究，email：yuanyp301@163.com
[*]**通信作者：**李洪霞，女，主任医师，主要从事老年重症感染、急性肺损伤、老年抗感染药物临床应用及药物浓度监测研究，email：lhxsls@sina.com

菌病。近年来免疫功能正常患者发病率逐年升高[1]。其临床表现不典型，经常被误诊为肺结核、肺癌或社区获得性肺炎，未及时给予正确的治疗，导致部分患者出现严重的并发症或死亡[2]。本文通过 1 例免疫功能正常肥胖患者肺隐球菌病的药学实践及疗效追踪，为肺隐球菌病的临床个体化治疗提供参考。

1 一般资料

1.1 病例概况

患者男性，58 岁，身高 186 cm，体质量 100 kg。因“查血癌胚抗原（CEA）升高近 2 年，发现肺部结节 1 年 8 月余”于 2020 年 5 月 14 日入院。

患者于 2018 年 5 月 24 日查 CEA 为 6.36 μg•L^{-1}，8 月 24 日血 CEA 升至 10.22 μg • L^{-1}，肺部 CT 示左下肺背段斜裂胸膜下有一直径约 6.7 mm 新发结节影，密度欠均匀，边缘清楚。PET-CT 为稍高代谢结节，最大标准摄取值（SUV_{max}）1.9，考虑炎症可能性大，门诊予头孢妥仑匹酯片（200 mg bid）口服抗感染治疗 2 周。10 月 16 日复查血 CEA 为 5.07 μg • L^{-1}，肺部 CT 提示结节直径增大至 9 mm，患者体温正常，无咳嗽咳痰等不适，查结核、真菌、血管炎及免疫相关检验指标均为阴性。10 月 17 日予氟氧头孢钠（2 g q12 h ivgtt）联合左氧氟沙星注射液（0.5 g qd ivgtt）抗感染治疗 2 周，分别于 11 月 1 日、12 月 17 日及 2019 年 3 月 13 日复查结节逐渐缩小，5 月 9 日复查结节基本消失，仅余少许斑片及条索影（见图 1）。此后 1 年未复查。2020 年 5 月 14 日门诊查血 CEA 为 5.87 μg • L^{-1}，肺 CT 示双肺多发结节影（包括左下肺背段）（见图 2），期间患者无发热、咳嗽咳痰、盗汗乏力、胸闷气短、消瘦、食欲下降等，无宠物饲养史，为进一步诊治入院。患者既往体健，入院体格检查无异常。查血、尿、便常规、凝血、血生化及呼吸道病原九项均正常。心电图、超声心动图及腹部超声无异常。入院诊断：双肺多发结节影性质待查：肺炎、肿瘤、血管炎均不除外。

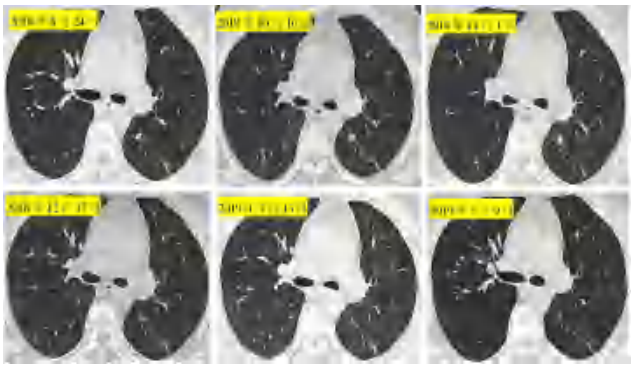


图 1 患者 2018 年至 2019 年左下肺背段结节的变化情况

Fig 1 Changes of nodules in the left lower dorsal lung from 2018 to 2019

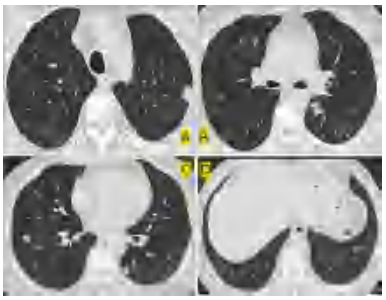


图 2 患者 2020 年 5 月 14 日的肺部 CT 表现

Fig 2 Patient’s lung CT findings on May 14，2020

A. 左上肺尖后段胸膜下直径 12 mm 实性结节（12 mm subpleural solid nodule in the posterior apex of the upper left lung）；B. 左下肺背段斑片状影，范围 15 mm×21 mm，邻近胸膜有凹陷（the 15 mm×21 mm patchy image of the left lower lung dorsal segment with indentation adjacent to the pleura）；C. 右下肺外基底段直径 9 mm 结节（9 mm diameter nodule in the basal segment of the outer right lower lung）；D. 左下肺后基底段直径 5 mm 结节（5 mm nodules in the posterior basal segment of the left lower lung）

1.2 前期临床诊治经过

2020 年 5 月 14 日予左氧氟沙星（0.5 g qd ivgtt）联合比阿培南（0.3 g q8 h ivgtt）抗感染治疗，同时完善相关检查，结果示：① 结核相关：血沉正常，结核菌素试验（PPD 试验）为强阳性（见图 3），结核感染 T 细胞检测抗原 A 和 B 均为 7 SFC，多次痰 X-pert 阴性（诱导痰）；② 真菌方面：真菌 D- 葡聚糖试验、曲霉菌半乳甘露聚糖抗原试验及隐球菌抗原检测（3 次）均为阴性；③ 血管炎：抗中性粒细胞胞浆抗体（ANCA）、抗核抗体（ANA）、自身抗体谱等阴性；④ PET-CT 示：左肺背段结节大小为 1.4 cm，放射性摄取高，SUV_{max} 4.1。双肺多发类圆形结节，左上肺为著，结节直径约 1.4 cm，SUV_{max} 10.8，右下肺结节 SUV_{max} 2.2。诊断倾向炎性改变，建议抗炎后复查除外肿瘤，其他部位未见异常代谢。2020 年 5 月 29 日复查结节无变化，当日行 CT 引导下经皮肺穿刺组织活检（左上肺尖后段胸膜下结节），同时行组织培养＋药敏。病理结果提示为肺隐球菌病（见图 4），药敏结果提示对 5- 氟胞嘧啶、伏立康唑、两性霉素 B、伊曲康唑及氟康唑均敏感（见表 1）。再次追问病史等，发现距患者单位 1.5 km 处有大型露天垃圾填埋场。综上，考虑患者肺隐球菌病诊断明确。另研究显示在免疫功能正常患者中，67% 的肺隐球菌病感染会播散到中枢神经系统，导致隐球菌脑膜炎发生[3]，该患者无脑膜炎相关症状，头颅 MRI 无异常，且多次快速隐球菌抗原检测均为阴性，暂不考虑隐球菌播散于中枢神经系统可能，未进一步行腰椎穿刺。

图 3 患者的 PPD 试验结果

Fig 3 PPD results

注：PPD 试验（＋＋＋＋）：双圈反应，直径＞ 20 mm，似要出小水泡。

Note：PPD（＋ ＋ ＋ ＋）：double loop reaction， ＞ 20 mm in diameter，seems to be small blisters.

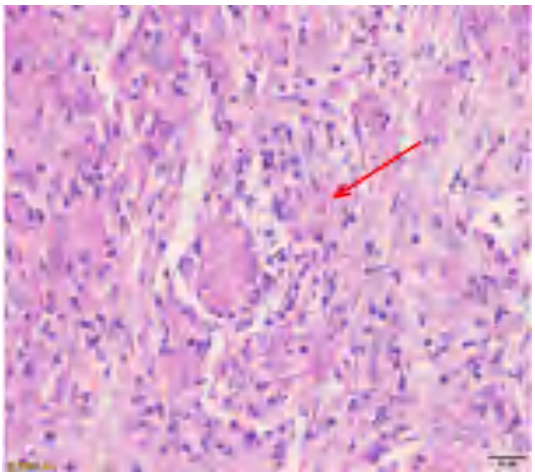


图 4 患者穿刺活检病理结果图（左上肺尖后段胸膜下结节）

Fig 4 Pathological results of biopsy（subpleural nodules in the posterior segment of the upper left lung apex）

注：病理可见多核巨细胞内散在圆形孢子（红色剪头所指），特殊染色 PAS（＋），考虑为肺隐球菌病。

Note：Pathological examination showed that multinucleated giant cells were scattered with round spores，with special staining PAS（＋）. Pulmonary cryptococcosis was considered.

表 1 患者新生隐球菌的药敏结果 (左上肺尖后段胸膜下结节)

Tab 1 Drug susceptibility of cryptococcus (subpleural nodules in the posterior segment of the upper left lung apex)

检验项目	结果
5- 胞嘧啶	S ≤ 4
两性霉素 B	S ≤ 0.5
氟康唑	S ≤ 2
伊曲康唑	S ≤ 0.125
伏立康唑	S ≤ 0.06

2 药学实践过程

2.1 治疗方案确定

根据 2010 年美国感染病学会（IDSA）隐球菌病临床实践指南 [4] 及国内多个隐球菌病专家共识 [5-6]，对于免疫功能正常、无症状患者，建议氟康唑 200 ～ 400 mg qd，疗程 6 ～ 12 个月。但有学者发现 [7]，体质量指数（BMI）≥ 30 kg • m^{-2} 的念珠菌及隐球菌感染的患者，标准剂量的氟康唑无法达到临床预期，对于氟康唑最小抑菌浓度（*MIC*）为 2 mg • L^{-1} 的病原菌，建议予负荷剂量 12 mg • kg^{-1}，维持剂量每日 6 mg • kg^{-1}。依据中国居民肥胖防治专家共识 [8] 制订的超重 / 肥胖的诊断标准，目前建议使用 BMI ≥ 24.0 kg • m^{-2} 和 ≥ 28.0 kg • m^{-2} 分别诊断成人超重（24.0 kg • m^{-2} ≤ BMI ＜ 28.0 kg • m^{-2}）及肥胖（BMI ≥ 28.0 kg • m^{-2}），该患者 BMI 为 28.9 kg • m^{-2}，属肥胖，入院后查免疫相关指标及肝肾功能正常，隐球菌药敏结果显示氟康唑的 *MIC* 为 2 mg • L^{-1}，且影像学表现为多发实性结节，综合考虑后给予氟康唑初始治疗剂量为 800 mg。

2.2 氟康唑 PK/PD

氟康唑是时间依赖性的三唑类抗真菌药物，并具有较长的抗真菌后效应 [9]。据此，0 ～ 24 h 浓度时间曲线下药物面积（*AUC*）与 *MIC* 的比值（$AUC_{0\sim24\,h}/MIC$）可作为判断氟康唑疗效的 PK/PD 指数 [10]。文献报道氟康唑治疗隐球菌性脑膜炎 $AUC_{0\sim24\,h}/MIC$ 的靶值＞ 389 mg/（L • h），但隐球菌肺炎靶值未知 [11]。另外氟康唑能够很好地渗透到各种体液中，其在唾液和痰液中的浓度与血浆浓度相近，在真菌性脑膜炎患者的脑脊液中氟康唑浓度约为同时间血浆浓度的 80%[12]，据此推算肺隐球菌病氟康唑的靶值在 300 ～ 389 mg/（L•h）。

氟康唑口服与静脉应用的药代动力学相似，在应用后 1 h 左右血浆浓度达峰值，且血浆浓度与给药剂量成正比，治疗过程中分别于氟康唑给药前后 1 h 测定的氟康唑浓度作为谷浓度（C_{min}）和峰浓度（C_{max}），按达稳态后的静脉滴注一室模型对患者氟康唑给药方案与血药浓度进行简单模拟，推算该患者氟康唑 $AUC_{0\sim24\,h}/MIC = C_{ss}\times24/MIC = [(C_{max} + C_{min})/2]\times24/MIC$（$C_{ss}$：稳态血药浓度）。

2.3 PK/PD 指导下患者的治疗及预后情况

该患者于 2020 年 6 月 1 日开始予氟康唑 800 mg qd 静脉滴注，6 月 5 日查血 r- 谷氨酰基转移酶（r-GT）为 68 U • L^{-1}，谷丙转氨酶（ALT）及谷草转氨酶（AST）均正常，加用谷胱甘肽及多烯磷脂酰胆碱保肝治疗。6 月 29 日复查肺部 CT 并应用 AI 智能系统对比发现左上肺胸膜下结节体积（穿刺部位）较前增大（1.55 cm^3 *vs* 1.05 cm^3），其余结节均稍有缩小（见图 5 及表 2），考虑治疗效果欠佳。

当日测得氟康唑峰谷浓度分别为 25.19 mg • L^{-1} 和 16.01 mg • L^{-1}，推算 $AUC_{0\sim24\,h}/MIC$ 为 241 mg/（L • h），未达到治疗靶值。且患者拒绝联用其他药物或更换为伏立康唑。6 月 30 日调整氟康唑剂量为 1200 mg qd 静脉滴注。7 月 13 日复查肺部 CT 及 AI 智能系统提示所有病灶较前均缩小（见表 2），当日测得氟康唑谷浓度为 21.77 mg • L^{-1}，峰浓度为 34.24 mg•L^{-1}，$AUC_{0\sim24\,h}/MIC$ 为 336 mg/（L•h），达到预期靶值，氟康唑剂量无调整。7 月 16 日血 r-GT 为 55 U • L^{-1}。7 月 30 日再次复查肺部 CT 及 AI 智能系统提示所有病灶均较前明显缩小（见图 5 及表 2），同时复查血 r-GT 为 47 U • L^{-1}。考虑病灶吸收明显，为减少氟康唑相关不良反应，8 月 5 日将氟康唑减量为 800 mg qd 静脉滴注。8 月 19 日血 r-GT 为 59 U • L^{-1}，8 月 21 日患者出院，继续氟康唑胶囊 750 mg、900 mg 交替每日口服巩固治疗（我院只有 150 mg 规格氟康唑胶囊），使氟康唑每日剂量接近于 800 mg。同时予多烯磷脂酰胆碱胶囊 2 粒、复方甘草酸苷片 3 片 qid 口服保肝治疗。

表 2　肺隐球菌病患者氟康唑治疗期间的肺部结节大小

Tab 2　Volume of pulmonary nodules in patient with cryptococcosis during fluconazole treatments

检查日期	结节体积 /cm^3		
	左上肺胸膜下	左下肺背段叶尖裂	左下肺后基底段
2020 年 5 月 14 日（入院当日）	1.05	2.29	1.49
2020 年 5 月 28 日（抗感染 2 周后）	1.19	2.54	1.46
2020 年 6 月 29 日（氟康唑 800 mg 1 个月后）	1.55	2.23	0.990
2020 年 7 月 13 日（氟康唑 1200 mg 2 周后）	0.965	1.79	0.745
2020 年 7 月 30 日（氟康唑 1200 mg 1 人月后）	0.705	1.51	0.596

出院后持续随诊，9 月 7 日复查肺部 CT 可见所有结节较前继续缩小，氟康唑剂量减至 450 mg。10 月 9 日测得氟康唑血浆谷浓度 10.52 mg • L^{-1}，峰浓度 13.83 mg • L^{-1}，$AUC_{0\sim24\,h}/MIC$ 为 146.1 mg/（L•h），当日复查肝功能 ALT 升至 109 U•L^{-1}，r-GT 为 86 U • L^{-1}，考虑可能与氟康唑相关，予减量至 300 mg 继续治疗。10 月 23 日 ALT 降至 75 U • L^{-1}，r-GT 降至 58 U • L^{-1}。11 月 5 日复查肺部 CT 发现结节进一步吸收（AI 测得结节体积较 2020 年 9 月 7 日缩小 8% ～ 33%），评估治疗效果明显，氟康唑再次减量至 150 mg。12 月 28 日查肝功能均恢复至正常范围。2021 年 1 月 11 日及 4 月 8 日复查肺部 CT 提示病灶进一步缩小，继续氟康唑 150 mg 维持治疗（见表 3）。7 月 5 日肺部 CT 提示结节较上次无变化（见图 6），且氟康唑治疗已达 13 个月，故停用氟康唑（该患者临床治疗过程中仅应用了氟康唑，未同时使用其他药物）。后续多次复查肺部 CT 较前均无变化，最近一次肺部 CT 为 2022 年 6 月 9 日，提示较前相仿。后续继续随访观察。

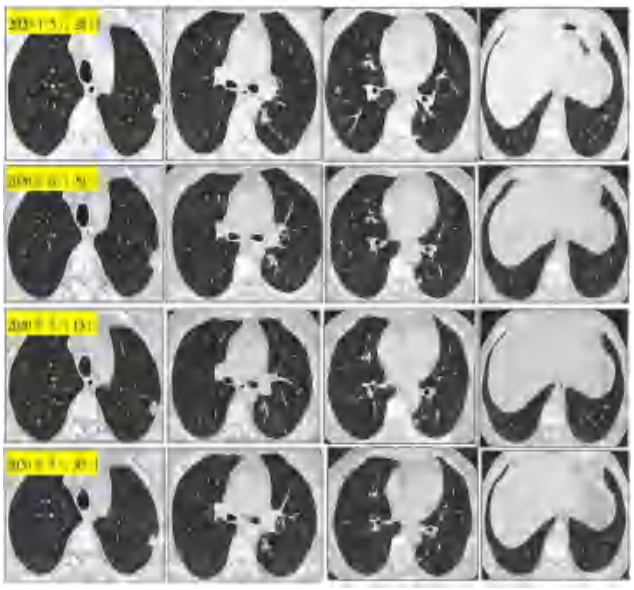


图 5　肺隐球菌病患者住院期间的肺部 CT 变化

Fig 5　Lung CT changes of patient with cryptococosis during hospitalization

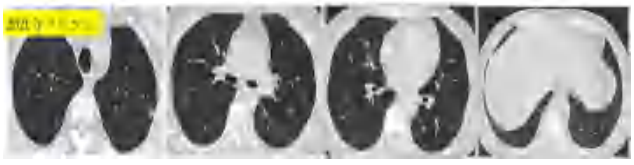


图 6　肺隐球菌病患者氟康唑治疗 1 年后的肺部 CT

Fig 6　Lung CT after fluconazole treatments in patient with cryptococcosis for a year

3　讨论

3.1　氟康唑初始剂量选择

氟康唑是常用抗真菌药物，但国内外关于其 PK/PD 的文献极少，对于免疫功能正常的无症状肺隐球菌病患者，国内外指南均推荐氟康唑每日 200 ～ 400 mg 的治疗方案，未考虑到患者体质量及肌酐清除率。国外一篇 [13] 关于氟康唑剂量及疗效的文章，认为氟康唑是剂量依赖性药物，使用 200 mg qd 只有约 20% 的患者治疗成功。也有学者发现 [14] 应用氟康唑每日 400 mg 的治疗方案，33% 的患者临床效果欠佳，建议高体质量患者应采用按体质量给药的个体化方案，当每日氟康唑剂量≥ 800 mg，意味着更高的治疗成功率。考

表 3　患者氟康唑剂量、疗效评估及肝功能水平

Tab 3　Dose of fluconazole，evaluation of efficacy and liver function in patient

日期	氟康唑剂量 /mg	期间血药浓度		PK/PD 指数（$AUC_{0\sim24\,h}/MIC$）	影像学评估	肝功能 r-GT/（U・L^{-1}）
		谷浓度 /（mg・L^{-1}）	峰浓度 /（mg・L^{-1}）			
2020 年 6 月 1 日—6 月 29 日	800	16.01	25.19	241	左上肺结节增大，余略缩小	68
2020 年 6 月 30 日—8 月 4 日	1200	21.77	34.24	336	有缩小	47
2020 年 8 月 5 日—9 月 7 日	800				明显缩小	59
2020 年 9 月 8 日—10 月 9 日	450	10.52	13.83	146.1		86
2020 年 10 月 10 日—11 月 5 日	300	6.75	8.51	91.56	明显缩小	58
2020 年 11 月 6 日—2021 年 7 月 4 日	150				稍有缩小	48.2
2021 年 7 月 5 日	停用				较前相仿	47

虑本例患者体质量较大，小剂量氟康唑难以在实性结节内达到有效浓度，故氟康唑初始剂量设为 800 mg，但 1 个月后评估治疗效果仍欠佳。

3.2　氟康唑疗效不佳时治疗方案选择

氟康唑疗效不佳时，伊曲康唑、伏立康唑、两性霉素 B 和泊沙康唑均可作为补救治疗 [15-16]。根据 2017 年肺隐球菌病诊治浙江省专家共识 [6]，对于影像学提示肺部病灶持续存在的患者，可考虑外科手术切除治疗。而该患者体外药敏试验提示氟康唑敏感（MIC = 2 mg・L^{-1}），每日剂量为 800 mg 时仍未达到疗效所需的 PK/PD 靶值，CT 提示肺部结节病灶多发，难以实施手术切除，且患者本人拒绝更换或联用其他药物，综合考虑后予增加氟康唑剂量至 1200 mg，达到了 PK/PD 靶值及临床效果。

也有学者报道 1 例 39 岁的病态肥胖男性（BMI 48.3 kg・m^{-2}）应用氟康唑 1200 mg qd（泵注 6 h），治疗 14 d 时测得稳态血药浓度（23.9 mg・L^{-1}）及 $AUC_{0\sim24\,h}$ [574.9 mg/（L・h）] 均明显低于非肥胖患者，考虑与肥胖患者表观分布容积增加及肾脏清除率增高相关，因此建议在肥胖患者中应给予更高剂量。据我们所知，大剂量氟康唑多用于隐球菌性脑膜炎 [4]，尚未检索到氟康唑每日 1200 mg 应用于免疫正常的无症状肺隐球菌病患者。本临床实践提示，肥胖患者肺隐球菌病可能需要更高剂量的氟康唑，治疗过程中应监测其血药浓度，并计算 AUC/MIC 值，以保证达到所需治疗靶值。病灶明显吸收后再逐渐减量。

3.3　氟康唑不良反应

氟康唑主要作用机制是高度选择性抑制真菌细胞色素 P450 酶（CYP 酶）介导 14a- 羊毛甾醇去甲基化，从而抑制麦角固醇的生物合成，发挥抗真菌作用的同时也抑制了肝脏 CYP 酶系，可能导致肝功能异常 [17]。Schuster 等 [18] 对比 ICU 患者经验性使用氟康唑与安慰剂，每日使用 800 mg 的维持剂量预防念珠菌病，高剂量氟康唑组发生肝功能异常的概率与对照组无明显差异，认为患者对高剂量氟康唑表现出较好的耐受性。本病例在应用氟康唑期间出现肝酶轻度升高时及时加用保肝药物或调整氟康唑剂量，因此未出现明显肝功能异常。氟康唑其他常见的不良反应有头痛、腹痛、腹泻、恶心、肾功能损伤和皮疹等 [19]，该患者在治疗期间未出现以上异常反应。

3.4　肺隐球菌病鉴别诊断

该病例仍有几点值得讨论：第一，患者住院治疗期间及出院后多次检测血清隐球菌荚膜抗原均为阴性，分析可能与患者病灶均为结节样改变、荚膜抗原入血较少有关；第二，本例患者起病时、住院期间及出院后血 CEA 均高于正常值，但入院后 PET-CT 检查及肺穿刺活检、胃肠镜等多系统排查均未提示肿瘤，且所有病灶经抗真菌治疗均明显好转，故考虑肿瘤的可能性小；第三，患者入院后查 PPD 强阳性，前期左氧氟沙星治疗后结节明显吸收，后续结节再发是否与结核相关？考虑患者整个发病期间无盗汗、乏力等临床表现，且多次痰 X-pert 为阴性，结核感染 T 细胞检测抗原 A 和 B 均为 7 SFC，穿刺病理未见抗酸杆菌，隐球菌感染治疗效果显著，结核的诊断依据不足。但后续仍会密切随访该患者。

本文对 1 例肥胖患者应用大剂量氟康唑治疗肺隐球菌病进行药学探索，考虑到该患者 BMI 偏高，肺内的多发实性结节内难以达到有效的药物浓度，起始剂量予每日 800 mg，最高剂量增至 1200 mg。治疗期间应用 AI 智能系统精准测量肺部结节的三维大小来评判疗效，并监测氟康唑血药浓度，以 PK/PD 理论调整氟康唑剂量，最后取得较满意的结果，可为临床肺隐球菌病个体化精准治疗提供参考。

参考文献

[1] Setianingrum F，Rautemaa-Richardson R，Denning D. Pulmonary cryptococcosis：a review of pathobiology and clinical aspects [J]. Med Mycol，2019，57（2）：133-150.

[2] Hung MS，Tsai YH，Lee CH，et al. Pulmonary cryptococcosis：clinical，radiographical and serological markers of dissemination [J]. Respirology，2008，13（2）：247-251.

[3] Suwatanapongched T，Sangsatra W，Boonsarngsuk V，et al. Clinical and radiologic manifestations of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients and their outcomes after treatment [J]. Diagn Interv Radiol，2013，19（6）：438-446.

[4] Perfect J，Dismukes W，Dromer F，et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease：2010 update by the infectious diseases society of america [J]. Clin Infect Dis，2010，50（3）：291-322.

[5]《中国真菌学杂志》编辑委员会 . 隐球菌感染诊治专家共识 [J]. 中国真菌学杂志，2010，5（2）：65-68.

[6] 浙江省医学会呼吸病学分会 . 肺隐球菌病诊治浙江省专家共识 [J]. 中华临床感染病杂志，2017，10（5）：321-326.

[7] Alobaid A，Wallis S，Jarrett P，et al. Effect of obesity on the population pharmacokinetics of fluconazole in critically ill patients [J]. Antimicrob Agents Chemother，2016，60（11）：6550-6557.

[8] 王友友 . 中国居民肥胖防治专家共识 [J]. 中国预防医学杂志，2022，23（5）：1-19.

[9] 万昆，张奕奕，周成合，等 . 抗真菌药物氟康唑研究新进展 [J]. 中国抗生素杂志，2012，37（1）：8-15.

[10] Aller A，Martin-Mazuelos E，Lozano F，et al. Correlation of fluconazole *MIC*s with clinical outcome in cryptococcal infection [J]. Antimicrob Agents Chemother，2000，44（6）：1544-1548.

[11] Sudan A，Livermore J，Howard S，et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluconazole for cryptococcal meningoencephalitis：implications for antifungal therapy and in vitro susceptibility breakpoints [J]. Antimicrob Agents Chemother，2013，57（6）：2793-2800.

[12] Hope W，Stone N，Johnson A，et al. Fluconazole monotherapy is a suboptimal option for initial treatment of cryptococcal meningitis because of emergence of resistance [J]. mBio，2019，10（6）：1-17.

[13] Clancy C，Yu V，Morris A，et al. Fluconazole *MIC* and the fluconazole dose/*MIC* ratio correlate with therapeutic response among patients with candidemia [J]. Antimicrob Agents Chemother，2005，49（8）：3171-3177.

[14] Sinnollareddy M，Roberts J，Lipman J，et al. Pharmacokinetic variability and exposures of fluconazole，anidulafungin，and caspofungin in intensive care unit patients：data from multinational defining antibiotic levels in intensive care unit（DALI）patients study [J]. Crit Care，2015，19（1）：33.

[15] Alexander B，Perfect J，Daly J，et al. Posaconazole as salvage therapy in patients with invasive fungal infections after solid organ transplant [J]. Transplantation，2008，86（6）：791-796.

[16] Bandettini R，Castagnola E，Calvillo M，et al. Voriconazole for cryptococcal meningitis in children with leukemia or receiving allogeneic hemopoietic stem cell transplant [J]. J Chemother，2009，21（1）：108-109.

[17] Krasulova K，Dvorak Z，Anzenbacher PJX，et al. In vitro analysis of itraconazole cis-diastereoisomers inhibition of nine cytochrome P450 enzymes：stereoselective inhibition of CYP3A [J]. Xenobiotica，2019，49（1）：36-42.

[18] Schuster M，Edwards J，Sobel J，et al. Empirical fluconazole versus placebo for intensive care unit patients：a randomized trial [J]. Ann Intern Med，2008，149（2）：83-90.

[19] 余靓平，谢小云，魏文树，等 . 抗深部真菌感染药物的特性及临床应用 [J]. 中南药学，2012，10（5）：380-384.

（收稿日期：2022-06-21；修回日期：2022-08-14）

临床药师参与 1 例屎肠球菌血流感染患者治疗的临床实践

杨建[1, 2]，何艳[1*]（1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部，武汉 430030；2. 中国人民解放军中部战区总医院药剂科，武汉 430070）

摘要：本文介绍临床药师参与 1 例胰腺占位术后多发皮肤软组织及关节脓肿败血症患者的治疗案例。患者初始抗感染治疗方案效果不佳，使用达托霉素治疗过程中出现药物相关不良反应。几次调整抗感染方案后，患者症状最终得到了有效控制，不良反应得到了及时纠正，病情好转出院。

关键词：屎肠球菌；横纹肌溶解；达托霉素；替考拉宁；万古霉素；利奈唑胺

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0259-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.042

屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）是人类胃肠道的共生菌，也是重要的医院感染革兰氏阳性病原体，可能导致诸如血流感染和心内膜炎等严重感染[1]。本文介绍临床药师参与 1 例胰腺占位术后屎肠球菌致多发皮肤软组织及关节脓肿败血症患者的案例，该患者病程长，病情反复，涉及多次抗菌药物的选择和调整。临床药师通过血药浓度监测和药学监护，从药学角度为临床治疗提供建议，保证患者用药安全、有效。

1 病例基本资料

患者，女性，36 岁，体质量 53.5 kg，体质量指数（BMI）21.4 kg·m^{-2}。2021 年 9 月 7 日因胰腺占位于我院胆胰外科行“全麻下 3D 腹腔镜下胰头部分切除术＋胰腺探查＋胰腺修补＋肠粘连松解术”。术后出现腹痛，伴间断发热，血培养检出屎肠球菌（KB 法药敏结果：氨苄西林、青霉素 G R，高浓度氯霉素 I，利奈唑胺、替考拉宁、替加环素、万古霉素 S），予以抗感染（头孢哌酮他唑巴坦→头孢哌酮舒巴坦→亚胺培南西司他丁＋替考拉宁）等治疗，好转后出院。本次入院 1 周前，患者无明显诱因四肢陆续出现红斑，进行性增多，伴间断发热，体温最高 38.7 ℃，可自行恢复正常，周身关节疼痛明显，至当地医院住院治疗。当地医院检查结果示：白细胞计数（WBC）11.1×10^9·L^{-1}↑，超敏 C 反应蛋白（h-CRP）6.9 mg·L^{-1}↑，红细胞沉降率（ESR）85 mm·h^{-1}↑，抗环瓜氨酸肽抗体、类风湿因子、血培养未见异常，予以抗感染（哌拉西林他唑巴坦＋替考拉宁）、间断小剂量糖皮质激素以及对症支持等治疗 5 d，无明显好转，于 2021 年 10 月 6 日以“发热”收入我院感染科。患者平素身体健康，否认特殊疾病史，否认食物及药物过敏史。

入院体检：T 36.5 ℃，P 95 次·min^{-1}，R 20 次·min^{-1}，BP 115 /80 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）；神志清楚，步入病房，自动体位，营养中等，查体合作；双下肢多发红斑，局部皮温增高、红肿、有波动感，皮疹无破溃。入院辅助检查：WBC 20.86×10^9·L^{-1}↑，中性粒细胞比值（N%）87.7%↑，淋巴细胞百分比（%）5.0%，淋巴细胞 1.04×10^9·L^{-1}，单核细胞 0.85×10^9·L^{-1}↑；ESR 122 mm·h^{-1}↑，降钙素原（PCT）0.16 ng·mL^{-1}↑，h-CRP 180.3 mg·L^{-1}↑，白细胞介素 6（IL-6）509 pg·mL^{-1}↑，谷丙转氨酶（ALT）109 U·L^{-1}↑，谷草转氨酶（AST）74 U·L^{-1}↑，铁蛋白（FC）328.1 μg·L^{-1}↑，白蛋白（AC）27.3 g·L^{-1}↓；磁共振：双膝关节改变，考虑感染性病变，骨质异常不排除骨梗死；双膝髌上囊、髌下滲囊、胭肌滑囊、腓肠肌内外侧滑囊及关节腔积液伴脓肿形成；双膝皮下软组织水肿明显。

临床初步诊断：感染性发热，皮肤软组织感染，关节脓肿，胰腺浆液性囊腺瘤术后。

2 抗感染治疗经过

患者 10 月 6 日入院，留取血标本后给予头孢哌酮他唑巴坦（8∶1）2.25 g ivgtt q8 h 联合替考拉宁 400 mg ivgtt qd 治疗。10 月 11 日，血培养分离出屎肠球菌（KB 法药敏结果：氨苄西林、高浓度氯霉素、青霉素 G R，利奈唑胺、替考拉宁、替加环素、万古霉素 S）；感染相关指标：

作者简介：杨建，男，硕士，主要从事药事管理、临床药学方面的研究，email：517040314@qq.com *通信作者：何艳，女，博士，主要从事抗菌天然药物、临床药学方面的研究，email：heyan_may@hotmail.com

WBC 31.40×10^9 • L^{-1}↑，h-CRP 202 mg • L^{-1}↑，PCT 1.57 ng • mL^{-1}↑，FC 491 μg • L^{-1}↑，ESR 33 mm • H^{-1}↑；持续低热，周身关节（主要为膝关节、肘关节、踝关节）疼痛难忍；临床药师建议增加替考拉宁剂量为 800 mg qd，首剂加倍，调整剂量 72 h 后检测血药谷浓度，确保达到目标谷浓度（C_{min} ＞ 20 mg • L^{-1}），医师采纳建议，增加替考拉宁的给药剂量。10 月 14 日，患者行双侧踝关节、左腕关节、左膝左肘切排或穿刺排脓，脓液培养未检出病原体。10 月 16 日，患者仍发热，感染相关指标：WBC 12.5×10^9 • L^{-1}↑，h-CRP 49 mg • L^{-1}↑，PCT 0.68 ng • mL^{-1}↑，FC 479 μg • L^{-1}↑，ESR 13 mm • h^{-1}↑，较前有所降低；替考拉宁谷浓度 7.15 μg • mL^{-1}↓，考虑到使用替考拉宁 800 mg qd 仍无法达到有效治疗窗，遂停用替考拉宁，换用万古霉素 1 g ivgtt q8h 继续治疗。10 月 20 日，患者持续低热，右膝新发感染灶；感染相关指标：WBC 10.6×10^9 • L^{-1}↑，h-CRP 61 mg • L^{-1}↑，PCT 0.9 ng • mL^{-1}↑，FC 603 μg • L^{-1}↑，ESR 49 mm • h^{-1}↑；万古霉素谷浓度 24.17 μg • mL^{-1}。10 月 26 日，患者左侧肘关节切排处见黄绿色黏稠脓液；感染指标较前升高：WBC 12.8×10^9 • L^{-1}↑，CRP 91 mg • L^{-1}↑，PCT 0.81 ng • mL^{-1}↑，FC 601 μg • L^{-1}↑，ESR 66 mm • h^{-1}↑。考虑到在万古霉素浓度已经达标的情况下疾病仍然在进展，临床药师建议停用万古霉素，换用达托霉素 500 mg ivgtt qd 或者利奈唑胺 600 mg ivgtt q12h。当日临床停用万古霉素，换用达托霉素 500 mg ivgtt qd 继续治疗。11 月 2 日，患者体温正常，双踝关节肉芽新鲜，稍渗液，诉肌肉酸痛无力。急查血：WBC 5.68×10^9 • L^{-1}，h-CRP 27 mg • L^{-1}↑，PCT 0.08 ng • mL^{-1}，FC 725 μg • L^{-1}↑，ESR 88 mm • h^{-1}↑，肌酸激酶（CK）1881 μmol • L^{-1}↑；临床药师建议立即停用达托霉素，换用利奈唑胺治疗，用药 3 d 后查血药谷浓度，确保达标（C_{min} = 2 ～ 7 mg • L^{-1}），医师采纳，换用利奈唑胺 600 mg ivgtt q12h。11 月 7 日，患者体温正常，全身肌肉无酸痛，伤口愈合良好。感染相关指标：WBC 4.03×10^9 • L^{-1}，IL-6 13 pg • mL^{-1}↑，h-CRP 10.8 mg • L^{-1}↑，PCT 0.03 ng • mL^{-1}，FC 927 μg • L^{-1}↑，ESR 45 mm • h^{-1}↑；利奈唑胺谷浓度 6.85 μg • mL^{-1}；CK 21 μmol • L^{-1}；11 月 10 日，患者伤口愈合良好，可步行活动，复查血常规正常，PCT 降至 0.03 ng • mL^{-1}。予以出院，嘱出院后继续口服利奈唑胺片 600 mg q12h 用药 28 d，每半月复查血常规及血药浓度，不适随诊。

3　讨论

3.1　抗感染治疗方案的选择和调整

患者 2021 年 9 月胰腺占位术后继发屎肠球菌血流感染，药敏提示病原菌对青霉素 G 和氨苄西林耐药，对替考拉宁和万古霉素敏感。替考拉宁和万古霉素具有相似的作用机制、抗菌谱 [vanB 基因型万古霉素耐药屎肠球菌（VRE-fm）对替考拉宁敏感 [2]]。考虑到患者 9 月住院使用替考拉宁取得了较好的治疗效果，故本次入院继续经验性选择替考拉宁治疗。替考拉宁的表观分布容积（V_d）0.7 ～ 1.4 L • kg^{-1}，血浆蛋白结合率 87% ～ 91%，较高的血浆蛋白结合率使该药物能在蛋白丰富的组织迅速分布，具有较好的组织穿透力，但因为大量药物与血浆蛋白结合，导致了血液中的游离药物浓度较低，达有效稳态血药浓度较慢，所以，其说明书中强调要给予负荷剂量，这对于快速达到有效稳态血药浓度具有重要临床意义 [3]。此外，《抗菌药物药代动力学 / 药效学理论临床应用专家共识》[4] 指出，替考拉宁在治疗骨关节感染时应给予加倍剂量：800 mg（12 mg•kg^{-1}）q12h，连续 3 ～ 5 次，续之 800 mg（12 mg • kg^{-1}）qd，确保 C_{min} ＞ 20 mg • L^{-1}，以保证疗效。本例患者出现替考拉宁治疗效果不佳的情况时，临床药师考虑到即使增加剂量至 800 mg qd，患者的稳态血药浓度仍未达到目标浓度，所以换用万古霉素继续治疗。

替考拉宁药动学表现个体差异较大，大剂量给药后血药浓度仍不达标的情况并不少见。在贾萌萌等 [5] 的研究中，按照 800 mg qd 维持给药的病例组中仍然有 15.81% 的患者血药谷浓度小于 10 mg • L^{-1}。感染患者的低白蛋白水平和炎症状态都会造成组织水肿而使水溶性药物如替考拉宁的 V_d 增加 [6]，而导致血管内药物血药浓度不易达标。患者换用万古霉素 1 g ivgtt q8h 的方案后，经监测血药浓度在目标范围内。但是，经过近 10 d 的治疗，患者右膝关节仍新发感染灶，h-CRP、PCT、ESR 等指标没降反增，血、脓液和引流液培养均为阴性。分析可能的原因在于：① 切开引流不充分或者存在未被发现的潜在感染源；② 万古霉素无法在感染部位达到有效浓度；③ 前期替考拉宁的血药浓度未达到治疗窗而落入屎肠球菌的耐药突变选择窗 [4]，诱导屎肠球菌对替考拉宁和万古霉素耐药，出现 VRE-fm 感染。

针对 VRE-fm 感染，利奈唑胺是首选的治疗药物[7]。达托霉素治疗 VRE-fm 的适应证虽然没有被 FDA 批准，但是其较高的血药浓度以及快速杀菌活性使其成为治疗 VRE-fm 感染的临床选择之一[8-9]。有 meta 分析表明，在治疗 VRE-fm 引起的血流感染（BSI）时，达托霉素和利奈唑胺在临床治愈率、微生物清除率、复发率和不良反应发生率方面的差异无统计学意义[10]。《桑德福抗微生物治疗指南（热病）》[11]（第 48 版）推荐达托霉素治疗 VRE-fm 引起的菌血症，建议剂量为 10 mg • kg^{-1}。需要密切关注达托霉素引起的 CK 升高和嗜酸细胞肺炎[12-13]。所以，在患者使用替考拉宁和万古霉素治疗效果不佳的情况下，换用达托霉素 500 mg qd（约 10 mg • kg^{-1}）和利奈唑胺 600 mg q12h 两个方案都可行。

该患者换用以上两种可选方案后，WBC、N%、PCT、CRP 等感染指标都持续好转，表明患者有可能为 VRE-fm 感染。值得一提的是，全球范围内 VRE-fm 的检出率相差悬殊。2014—2020 年，国内 VRE-fm 的检出率在 1.1% ～ 2.9%[14-15]，呈逐年递减的趋势。2021 年中国细菌耐药监测网数据显示，屎肠球菌对替考拉宁和万古霉素的耐药率分别为 1.9% 和 1.4%。Esnal 等[1，16]提到欧洲的 VRE-fm 分离率在 0% ～ 46%，而在美国则达到了 75% ～ 80%。这也许是《桑德福抗微生物治疗指南（热病）[11]》（第 48 版）与我国的《国家抗微生物治疗指南》[7]第 2 版不同，直接越过万古霉素和替考拉宁将达托霉素和利奈唑胺作为 VRE-fm 所致全身感染或者血流感染的首选治疗方案的原因。但是，针对屎肠球菌感染的治疗，一项 meta 分析多个 RCT 研究结论认为，利奈唑胺较万古霉素在治疗复杂皮肤软组织感染方面，无论是临床有效率还是微生物清除率方面都更胜一筹，临床在使用替考拉宁效果不理想的情况下，应该果断选择利奈唑胺或者达托霉素，可大大缩短治疗疗程[17]。

3.2 达托霉素相关不良反应的分析和处置

使用达托霉素 6 d 后，患者出现肌肉酸痛和 CK 明显升高，疑似发生横纹肌溶解症（RBS），药物不良反应相关性筛查结果提示与达托霉素（Naranjo 评分为 7 分）极有可能相关，遂停用达托霉素并持续监测 CK 水平。患者停用达托霉素，未采取特殊治疗措施，5 d 后 CK 水平回落至正常范围，肌痛症状也得到缓解。

RBS 是使用达托霉素期间应该关注的严重不良反应之一，是由于骨骼肌细胞损伤细胞膜完整性破坏而使毒素和细胞成分进入循环系统而产生的病理综合征。其产生的病理基础是细胞能量耗竭或者肌浆膜破坏导致的细胞质 Ca^{2+} 过载，进而诱发一系列相互促进循环恶化的下游反应，包括激活磷脂酶 A2、肌细胞的持续收缩、线粒体失活、氧化应激、电解质失衡等，导致骨骼肌细胞的持续破坏[18]，甚至造成急性肾损伤[19]。导致 RBS 的因素有很多，Giannoglou 等[18]将这些因素归纳为遗传性和获得性两类，包括麦卡德尔氏病、挤压综合征、感染、肥胖、过度劳累以及药物因素等。临床表现可能多样，包括无症状的 CK 升高、肌肉酸痛无力、棕红色尿、肾功能衰竭，甚至低血容量休克[19]。Bhavnani 等[20]发现，达托霉素的 C_{min} 与 CK 的升高相关，并且多数 CK 升高发生在治疗 1 周以上的患者中。因此，接受达托霉素治疗的患者，说明书建议应在使用前及用药后的每周监测其 CK 水平，对于最近或伴随使用 HMG-CoA 还原酶抑制剂进行治疗或者使用期间 CK 升高的患者，应该提高检测的频次。针对 RBS，首要治疗措施是移除诱发因素，其他的治疗方法还包括补液、纠正电解质异常以及使用碳酸氢盐和甘露醇[19]。屎肠球菌尤其是 VRE-fm 感染的患者，多为重症感染，该类病患常伴发热、疼痛或者意识丧失，RBS 早期的肌痛或者肌无力情况可能得不到足够重视和有效反馈。另外，一些与疾病和治疗相关的因素也可能会导致骨骼肌损伤的体征、症状和 / 或 CK 升高[21-25]，这一点也使得患者的药物相关骨骼肌毒性评估更为困难。因此，密切监测 CK 水平显得尤为重要。

4 总结

本案例报道了 1 例罕见的复杂屎肠球菌血流感染，临床在治疗过程中遇到了替考拉宁剂量不足，万古霉素耐药，达托霉素发生 CK 升高等情况，临床药师从药学角度出发，通过查阅文献，综合考虑药物的适应证、安全性、PK/PD 特点等因素，为临床提出了用药建议，并被临床采纳，取得了良好的治疗效果。这体现出个体化抗感染方案在临床治疗中的重要地位，也体现出了临床药师作为治疗团队成员的价值。

参考文献

[1] Esnal DE，Sorli L，Prim N，et al. Linezolid *vs* glycopeptides in the treatment of glycopeptide-susceptible *Enterococcus faecium* bacteraemia：a propensity score matched

comparative study [J]. Int J Antimicrob Ag，2019，54（5）：572-578.
[2] Hayashi HK，Niwa T，Ohata K，et al. Comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin in febrile neutropenic patients receiving hematopoietic stem cell transplantation [J]. J Clin Pharm Ther，2019，44：888-894.
[3] 替考拉宁临床应用剂量专家共识组 . 替考拉宁临床应用剂量专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2016，39（7）：500-508.
[4] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会 . 抗菌药物药代动力学 / 药效学理论临床应用专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2018，41（6）：409-466.
[5] 贾萌萌，张绮雯，秦子飞，等 . 不同剂量替考拉宁治疗重症感染患者的血药浓度监测及其影响因素的探讨 [J]. 中国药学杂志，2021，56（18）：1524-1529.
[6] Scaglione F，Paraboni L. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antibacterials in the Intensive Care Unit：setting appropriate dosing regimens [J]. Int J Antimicrob Agents，2008，32（4）：294-301.
[7] 张宗久，郭燕红，钟南山，等 . 国家抗微生物治疗指南 [M]. 北京：人民卫生出版社，2017.
[8] Ye JJ，Shie SS，Cheng CW. Clinical characteristics and treatment outcomes of vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia [J]. J Microbiol Immunol Infect，2018，51（6）：705-716.
[9] Foolad F，Taylor BD，Shelburne SA，et al. Association of daptomycin dosing regimen and mortality in patients with VRE bacteraemia：a review [J]. J Antimicrob Chemoth，2018，73（9）：2277-2283.
[10] Zhao M，Liang L，Ji L，et al. Similar efficacy and safety of daptomycin versus linezolid for treatment of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections：a meta-analysis [J]. Int J Antimicrob Agents，2016，48（3）：231-238.
[11] Gibert DN，Chambers HF，Eliopoulos GM，et al. 桑德福抗微生物治疗指南（热病）[M]. 北京：中国协和医科大学出版社，2019：85.
[12] Ibarra G，Elmaaz A，Hennel D，et al. Daptomycin-induced hyperkalemia as an early sign of rhabdomyolysis in a diabetic patient [J]. Cureus，2020，12（11）：e11674.
[13] King ST，Walker ED，Cannon CG，et al. Daptomycin-induced rhabdomyolysis and acute liver injury [J]. Scand J Infect Dis，2014，46：537-540.
[14] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗，2021，21（4）：377-387.
[15] 全国细菌耐药监测网 . 全国细菌耐药监测网 2014-2019 年细菌耐药性监测报告 [J]. 中国感染与化疗，2021，20（1）：15-30.
[16] Esnal DE，Sorli L，Prim N，et al. Daptomycin versus glycopeptides for the treatment of enterococcus faecium bacteraemia：a cohort study [J]. Antibiotics，2021，10（6）：716-721.
[17] Feng J，Xiang F，Cheng J，et al. Comparative efficacy and safety of vancomycin，linezolid，tedizolid，and daptomycin in treating patients with suspected or proven complicated skin and soft tissue infections：an updated network meta-analysis [J]. Infect Dis Ther，2021，10（3）：1531-1547.
[18] Giannoglou GD，Chatzizisis YS，Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis：pathophysiology and diagnosis [J]. Eur J Intern Med，2007，18（2）：90-100.
[19] Chavez LO，Leon M，Einav S，et al. Beyond muscle destruction：a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice [J]. Crit Care，2016，20（1）：135.
[20] Bhavnani SM，Rubino CM，Ambrose PG，et al. Daptomycin exposure and the probability of elevations in the creatine phosphokinase level：data from a randomized trial of patients with bacteremia and endocarditis [J]. Clin Infect Dis，2010，50（12）：1568-1574.
[21] Bertrand M，Godet G，Marie H. Lumbar muscle rhabdomyolysis after abdominal aortic surgery [J]. Anesth Analg，1997，85（1）：11-15.
[22] Wang LM，Tsaib ST，Hob LT. Rhabdomyolysis in diabetic emergencies [J]. Diabetes Res Clin Pract，1994，26（3）：209-214.
[23] Kodatsch I，Finsterer J，Stöllberger C. Serum creatine kinase elevation in a medical department [J]. Acta Med Austriaca，2001，28（1）：11-15.
[24] Craig IH. Statin-associated myopathy [J]. Med J Australia，2001，175：486-489.
[25] 余娜 . 慢性肾功能不全患者不同时期血清酶变化及其临床意义 [J]. 中国临床研究杂志，2014，27（9）：1087-1089.

（收稿日期：2022-05-17；修回日期：2022-06-30）

药品不良反应

222 例雷公藤及其制剂的不良反应报告分析

张玲萍[1, 2]，黄榕珍[2]，张纾[2]，林翼旻[2]，林羽[1*]（1. 福建中医药大学药学院，福州　350122；2. 福建省药品审评与监测评价中心，福州　350003）

摘要：目的　探讨雷公藤及其制剂的不良反应（ADR）发生特点及规律，为临床合理用药提供参考。**方法**　收集 2004—2021 年福建省内上报的雷公藤及其制剂不良反应 / 事件（ADR/AE）报告和 2009—2021 年福建省生产企业相关品种在全国收集的 ADR/AE 报告，剔除重复报告后对不良反应发生情况进行分析。**结果**　222 例涉及雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告多用于治疗免疫系统疾病，以中老年居多，女性略多于男性；严重不良反应报告占总报告的 14.86%；主要涉及胃肠系统，但以肝胆系统较突出；多数患者痊愈或好转，但仍有部分患者未好转或有后遗症。**结论**　临床使用时应严密监测其不良反应，及时采取干预措施，避免潜在风险。

关键词：雷公藤；不良反应；肝胆系统
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)01-0263-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.043

Analysis of 222 cases of adverse drug reaction reports of tripterygium wilfordii and its preparations

ZHANG Ling-ping[1, 2], HUANG Rong-zhen[2], ZHANG Shu[2], LIN Yi-min[2], LIN Yu[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Fujian University of Traditional Chinese Medicine*, *Fuzhou* 350122; 2. *Fujian Center for Drug Evaluation and Monitoring*, *Fuzhou* 350003)

Abstract: Objective　To determine the characteristics and patterns of adverse reactions (ADR) of tripterygium wilfordii and its preparations, and to provide reference for its rational clinical use in the future. **Methods**　The adverse reaction/event (ADR/AE) reports of tripterygium wilfordii and its preparations in Fujian Province from 2004 to 2021 and nationwide ADR/AE reports collected by Fujian enterprises from 2009 to 2021 were analyzed. **Results**　Totally 222 ADR/AE reports involving tripterygium wilfordii and its preparations were mostly used for the diseases in the immune system, mostly middle-aged and elderly, and slightly more women than men. Serious adverse reaction reports accounted for 14.86% of the total reports and most adverse reactions involved diseases in the gastrointestinal system, especially the hepatobiliary system diseases. Most patients recovered or improved, but some did not or had sequelae. **Conclusion**　ADR should be closely monitored during clinical use, and timely intervention should be taken to avoid potential risks.

Key words: triptergium wilfordii; adverse reaction; hepatobiliary

雷公藤（*Triptergium wilfordii* Hook. f），卫矛科雷公藤属藤本植物的木质部分，其药性苦、凉，有大毒，归肝、肾经，以根入药，具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒的作用[1]。雷公藤及其制剂在治疗自身免疫性疾病及肾脏疾病方面疗效确切，以治疗类风湿关节炎（RA）的报道最为

基金项目：福建省科技计划（引导性）项目（No.2020Y0050）。
作者简介：张玲萍，女，主管药师，主要从事药品不良反应监测与评价工作，email：116421805@qq.com　*通信作者：林羽，男，博士研究生导师，主要从事药品分析检验 / 药械不良反应监测工作，email：yulam@163.com

多见，其疗效显著，受到国际风湿病学界的高度关注[2]。已上市的雷公藤制剂有雷公藤总萜片、雷公藤双层片、雷公藤片、雷公藤多苷片、雷公藤内酯软膏[3]。雷公藤毒性及其制剂的临床不良反应报道虽不少见，但以少样本和综述性文献居多，本研究通过对多年来福建省收到的数据报告进行分析，以期为科学合理评价雷公藤及其制剂的安全性和临床安全合理用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

本文收集 2004—2021 年福建省内上报的雷公藤及其制剂的不良反应 / 事件（ADR/AE）报告和 2009—2021 年福建省生产企业相关品种在全国收集的 ADR/AE 报告，剔除重复报告，筛选评价结果为“可能”及以上报告，共纳入有效报告 222 例，其中关联性评价结果为肯定的 4 例，很可能的 20 例，可能的 198 例。涉及雷公藤多苷片 174 例、雷公藤片 17 例、雷公藤煎剂 2 例、雷公藤总苷片 1 例、雷公藤内酯软膏 28 例。

1.2　方法

使用 Excel 对数据进行汇总，采用回顾性分析方法对 222 例雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告的患者人口学特征、给药途径、用药原因、联合用药、ADR 发生时间、ADR 累及系统 - 器官损害、转归、单独用药严重病例等因素进行整理和统计，并分析其发生特点和影响因素。使用 SPSS 24.0 软件对数据进行处理，率（%）的比较采用卡方检验，若理论频数小于 1，则采用 Fisher 确切概率法检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　性别与年龄分布

222 例雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告涉及 107 名男性患者和 115 名女性患者，男女比例为 1∶1.07；年龄最小为 7 岁，最大为 87 岁，平均年龄 50 岁，其中 45 ～ 64 岁年龄段病例报告较多，占 45.50%（见表 1）。

表 1　患者性别、年龄分布情况

Tab 1　Distribution of patients' gender and age

年龄 / 岁	例数		合计 [n（%）]
	男	女	
≤ 14	3	0	3（1.35）
15 ～ 44	37	41	78（35.14）
45 ～ 64	44	57	101（45.50）
≥ 65	23	17	40（18.02）
总计	107	115	222（100.00）

2.2　给药途径与用药原因

222 例 ADR/AE 报告除雷公藤内酯软膏为外用制剂外，其余均为口服制剂。对 222 例 ADR/AE 报告的用药原因分布进行分析，雷公藤及其制剂主要用于免疫系统疾病的治疗，其中口服制剂多用于治疗 RA、风湿性关节炎、肾病综合征等，外用制剂大部分用于治疗银屑病（见表 2）。

表 2　用药原因分布

Tab 2　Distribution of reasons for medication

系统 - 器官分类（SOC）	用药原因（n）	合计 [n（%）]	药品名称
免疫系统疾病	类风湿关节炎（62），银屑病（40），风湿性关节炎（24），风湿病（8），强直性脊柱炎（5），系统性红斑狼疮（4），脉管炎（1），皮肌炎，间质性肺病（1），白塞病（1）	146（65.77）	雷公藤多苷片（107），雷公藤内酯软膏（26），雷公藤片（11），雷公藤煎剂（2）
肾脏及泌尿系统疾病	肾病综合征（17），慢性肾炎（7），蛋白尿（2），IgA 肾病（2），紫癜性肾炎（1），肾源性糖尿病（1），肾性高血压（1），慢性肾衰竭（1），急性肾炎综合征（1）	33（14.86）	雷公藤多苷片（29），雷公藤片（3），雷公藤总苷片（1）
皮肤及皮下组织类疾病	皮炎（9），湿疹（6），慢性荨麻疹（2），痤疮（2），脓疱病（2），红皮病（1），白癜风（1），过敏性紫癜（1），过敏性皮炎（1），天疱疮（1）	26（11.71）	雷公藤多苷片（24），雷公藤片（2）
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	关节炎（5），关节痛（4），腰椎间盘突出（2），强直性椎骨骨肥厚病（1），结缔组织病（1），骨关节病（1），干燥综合征（1）	15（6.76）	雷公藤多苷片（14），雷公藤片（1）
全身性疾病及给药部位各种反应	身体不适（1），瘙痒症（1）	2（0.90）	雷公藤内酯软膏（2）

2.3　用药情况与转归、报告类型分布情况

222 例雷公藤及其制剂 ADR/AE 报告中，161 例病例为单独用药（占比为 72.52%），61 例病例为联合用药（占比为 27.48%），最多达到 6 药联用，联用较多的药品有醋酸泼尼松片、甲氨蝶呤片、来氟米特片等。单独用药中转归为痊愈和好转报告占 95.65%，联合用药中转归为痊愈和好转报告占 93.45%。

222 例雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告中，严重 ADR 报告 33 例，一般 ADR 报告 189 例，其中单独用药严重报告数占单独用药总数的 9.32%，联合用药的严重报告数占联合用药总数的 29.51%，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；不良反应结果好转 121 例，痊愈 90 例，未好转 5 例，不详 4 例，

有后遗症 2 例（1 例表现为多脏器功能衰竭，1 例不详），单独用药与联合用药的转归分布差异无统计学意义（见表 3）。

表 3 用药情况与转归、报告类型分布情况统计

Tab 3 Statistics of drug use and outcome，distribution of report types

项目	单独用药 [*n*（%）]	联合用药 [*n*（%）]	合计 [*n*（%）]	统计量	*P*
转归				Fisher = 3.511	0.425
痊愈	70（43.48）	20（32.79）	90（40.54）		
好转	84（52.17）	37（60.66）	121（54.50）		
未好转	3（1.86）	2（3.28）	5（2.25）		
有后遗症	1（0.62）	1（1.64）	2（0.90）		
不详	3（1.86）	1（1.64）	4（1.80）		
报告类型				χ^2 = 14.252	< 0.001
一般	146（90.68）	43（70.49）	189（85.14）		
严重	15（9.32）	18（29.51）	33（14.86）		
总计	161（100.00）	61（100.00）	222（100.00）		

2.4 给药途径与 ADR 发生时间

222 例雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告中，ADR 在用药当日发生较多，发生时间最快的为 20 min，最长的为用药持续近 10 年后发生（见表 4）。

表 4 ADR 发生时间分布 (*n*)

Tab 4 Distribution of occurrence time of ADR (*n*)

ADR 发生时间	雷公藤多苷片	雷公藤内酯软膏	雷公藤片	雷公藤总苷片	雷公藤煎剂	总计
< 1 d	72	18	7	1	—	98
1 ～ 7 d	49	8	4	—	—	61
7 d ～ 1 个月	25	1	1	—	1	28
1 ～ 3 个月	15	1	1	—	—	17
3 ～ 12 个月	9	—	4	—	1	14
> 12 个月	4	—	—	—	—	4
总计	174	28	17	1	2	222

2.5 ADR 累及系统 - 器官

按照 MedDRA24.1 术语集对 ADR 名称进行规整，222 例雷公藤及其制剂的 ADR/AE 报告共涉及 ADR 表现 335 例次，累及全身多个系统 - 器官损害，雷公藤内酯软膏的 ADR 主要涉及皮肤及皮下组织类，口服制剂则主要累及胃肠系统和肝胆系统（见表 5），雷公藤多苷片的 ADR 构成比占 77.91%。

2.6 单独用药 ADR 严重病例

161 例单独用药病例中，共有 15 例严重 ADR/AE 病例，其中 12 例（序号 4 ～ 15）累及肝胆系统，占单独用药严重 ADR/AE 报告比例的 80.00%（见表 6）。

2.7 雷公藤中毒典型案例

患儿，男，13 岁，以“膝关节疼痛 4 年，呕吐 5 d，抽搐昏迷 1 d”为主诉于 2005 年 10 月 18 日急诊入院。患儿于入院前 14 d（10 月 4 日）开始服用雷公藤煎汁，共服 9 d（第一日服用一汤匙，第二日服用两汤匙，第三日服用三汤匙，三汤匙剂量连续服用 6 d），10 月 13 日患儿出现恶心、呕吐胃内容物约 8 ～ 9 次，并感乏力胸闷，遂停服雷公藤。10 月 15 日就诊于当地医院，治疗效果不佳，遂于 10 月 18 日下午转诊我院，急诊拟为“休克、雷公藤中毒”收住院。查体：体温 39.0 ℃，心率 160 次 • min^{-1}，呼吸 26 次 • min^{-1}，血压 40/10 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa）。神志不清，处于浅昏迷状态，抬送入院，被动体位，无法对答。面色苍白，四肢欠温，双侧瞳孔等大等圆，直径约 0.25 cm，对光反射迟钝，压眶反应存在。咽红充血，双侧扁桃体Ⅰ度大，未见脓点。颈无抵抗，颈动脉搏动存在，颈静脉无充盈，呼吸深长，未见三凹征，双肺呼吸音粗，未闻及干性啰音。心率 160 次 • min^{-1}，律齐，心音低钝，各瓣膜听诊区未闻及杂音。四肢呈非凹陷性浮肿，双膝腱反射及跟腱反射未引出。血生化：血清谷丙转氨酶 916 IU • L^{-1}↑，血清谷草转氨酶 5417 IU • L^{-1}↑，血尿素氮 19.9 mmol • L^{-1}↑，血清肌酸酐 241 μmol • L^{-1}↑。入院后考虑患儿“雷公藤中毒，中毒性休克，多脏器功能衰竭”，急给予吸氧，心电监护及血浆生理盐水扩容，多巴胺升压，肝素静脉滴注，头孢曲松钠抗感染等处理后，患儿血压回升，于入院后 1 h 升至 95/75 mmHg，四肢末端渐温暖，开始排尿，呈酱油色，于入院后半日尿量达 1200 mL，血压于 120/75 mmHg 左右波动，神志转清，但不能视物，四肢肌力Ⅰ～Ⅱ级，排黑便数次，查 OB（+），查心电图示：Q-T 间期延长，血常规示血红蛋白最低至 63 g • L^{-1}，血小板最低至 41×10^9 • L^{-1}，考虑骨髓抑制。患者于入院后第 4 日尿量减少，经利尿，扩容，改善循环等处理，尿量仍进行性减少，患儿诉胸闷、头晕、视物模糊，有时胡言乱

表 5 ADR 累及系统 - 器官及临床表现

Tab 5 Systems-organs with ADRs and clinical manifestations

累及系统 - 器官分类（SOC）	不良反应表现（*n*）	合计 [*n*（%）]	药品名称
胃肠系统	恶心（33），呕吐（20），腹痛（15），腹泻（11），口干（10），腹胀（7），胃肠不适（7），味觉异常（1），十二指肠溃疡（1），便秘（1）	106（31.64）	雷公藤多苷片（98），雷公藤片（8）
皮肤及皮下组织类	局部皮肤反应（36），皮疹（28），荨麻疹（5），接触性皮炎（4），脱发（2），过敏性紫癜（1），带状疱疹（1），大疱性表皮松解（1），全身性红斑（1）	79（23.58）	雷公藤多苷片（41），雷公藤内酯软膏（36），雷公藤片（2）
肝胆系统	肝功能异常（29），高转氨酶血症（10），肝细胞损害（7），皮肤变黄（1），黄疸（2），肝炎（2）	51（15.22）	雷公藤多苷片（40），雷公藤片（9），雷公藤煎剂（2）
各类神经系统	头晕（20），头痛（3），晕厥（1），手足麻木（1）	25（7.46）	雷公藤多苷片（23），雷公藤片（2）
全身性疾病及给药部位各种反应	乏力（5），水肿（5），胸闷（3），疼痛（2），胸痛（1），行走困难（1）	17（5.07）	雷公藤多苷片（11），雷公藤内酯软膏（4），雷公藤片（2）
血管与淋巴管类	白细胞减少症（5），血小板减少症（5），全血细胞减少症（1），贫血（1），骨髓抑制（1），循环衰竭（1），中性粒细胞减少症（1），中毒性休克（1）	16（4.78）	雷公藤多苷片（14），雷公藤煎剂（2）
生殖系统及乳腺	月经不规则（9），闭经（2），月经量减少（1），阴道出血（1）	13（3.88）	雷公藤多苷片（12），雷公藤总苷片（1）
肾脏及泌尿系统	多尿（2），肾功能异常（2），血尿（1），少尿（1），急性肾衰竭（1）	7（2.09）	雷公藤多苷片（4），雷公藤煎剂（2），雷公藤片（1）
代谢及营养类	食欲不振（6）	6（1.79）	雷公藤多苷片（6）
心脏器官	心悸（4），左心室衰竭（1），结性心律失常（1）	6（1.79）	雷公藤多苷片（5），雷公藤片（1）
眼器官	眼部不适（1），视物模糊（1），复视（1），眼痛（1）	4（1.19）	雷公藤多苷片（4）
各种肌肉骨骼及结缔组织	下肢疼痛（2），关节痛（1），肌酸激酶升高（1）	4（1.19）	雷公藤多苷片（3），雷公藤内酯软膏（1）
呼吸系统、胸及纵隔	呼吸急促（1）	1（0.30）	雷公藤多苷片（1）

表 6 单独用药严重病例的主要信息

Tab 6 Key information for severe cases of medication alone

序号	药品名称	性别	年龄 / 岁	持续用药时间 /d	用药原因	不良反应名称	结果
1	雷公藤多苷片	女	67	10	肾病综合征	全血细胞减少症	好转
2	雷公藤多苷片	女	35	7	风湿性关节炎	白细胞减少症	痊愈
3	雷公藤多苷片	女	41	333	肾性高血压	月经紊乱	好转
4	雷公藤多苷片	男	28	12	IgA 肾病	高转氨酶血症	不详
5	雷公藤多苷片	女	39	24	湿疹	肝功能异常	好转
6	雷公藤多苷片	男	37	12	肾病综合征	肝功能异常	痊愈
7	雷公藤多苷片	男	52	36	类风湿关节炎	肝功能异常	痊愈
8	雷公藤多苷片	男	53	34	类风湿关节炎	皮肤变黄；肝功能异常	好转
9	雷公藤多苷片	男	82	34	类风湿关节炎	肝炎	好转
10	雷公藤多苷片	男	67	106	类风湿关节炎	肝功能异常	好转
11	雷公藤多苷片	男	53	35	慢性肾衰竭	肝功能异常	痊愈
12	雷公藤多苷片	女	33	69	类风湿关节炎	肝功能异常	痊愈
13	雷公藤片	女	51	111	白癜风	肝功能异常；黄疸	好转
14	雷公藤片	男	17	120	强直性脊柱炎	肝功能异常	痊愈
15	雷公藤煎剂	男	13	9	强直性脊柱炎	骨髓抑制；肝功能异常；中毒性休克；急性肾衰竭；循环衰竭	有后遗症

语，考虑患儿雷公藤中毒时间较久，各脏器损伤已不可逆，病情危重，随时可能死亡，将病情反复告诉家属，家属表示理解，要求放弃治疗，自动出院。

3 讨论

3.1 ADR 与性别、年龄分布

总体上女性患者略多于男性患者，这可能与该类药物多用于治疗 RA，而 RA 的女性患病率高于男性[4]有关。结合年龄分布来看中老年发生较多，65 岁及以上的男性高于女性，这可能与 RA 的发病规律有关，中老年是 RA 的高危人群[5]，男性 RA 患者主要集中在 50 ～ 69 岁，而女性 RA 患者为 40 ～ 59 岁。另外，本研究发现尚有个别儿童用药，雷公藤口服制剂说明书明确儿童禁用，但目前使用雷公藤多苷制剂治疗儿童紫癜性肾炎、过敏性紫癜等[6-7]的报道和临床研究很多，且取

得较好疗效。对使用雷公藤多苷的儿童远期随访研究显示，部分男性患者精液常规检查异常，女性患者性腺的长期影响不明显[8-9]。建议儿童使用安全性更高的其他治疗药物，必须使用雷公藤口服制剂时可优先考虑女性患儿。

3.2 ADR 与给药途径、用药原因

从用药原因来看，雷公藤及其制剂主要用于治疗免疫系统疾病。随着对雷公藤及其制剂的不断深入研究，发现其已被广泛应用于多种皮肤科疾病的治疗上[10]，但雷公藤制剂说明书并未明确记载其可以用于治疗皮肤及皮下组织类疾病如皮炎、湿疹等，因此雷公藤及其制剂用于治疗皮肤及皮下组织类疾病仍属于超说明书用药。建议雷公藤制剂生产企业加强临床研究，适时增加适应证；临床使用时应符合说明书或卫生行政部门发布的诊疗指南。

本研究中外用制剂雷公藤内酯软膏主要用于治疗银屑病，ADR 多表现为皮疹、瘙痒、皮肤局部反应等，均为一般反应。口服制剂中，雷公藤多苷片报告数相对雷公藤片、雷公藤总苷片、雷公藤煎剂更多，可能与雷公藤多苷片是国家基本药物，是免疫抑制剂的首选药物之一[11]，在市场上的使用比其他口服制剂更多有关。

3.3 ADR 与用药情况及转归、报告类型

联合用药的严重报告数构成比更高，查阅与雷公藤及其制剂联用较多的醋酸泼尼松片、甲氨蝶呤片、来氟米特片等药品说明书，均记载这些药品对胃肠系统、肝胆系统等有损伤，提示临床在保证药物疗效的前提下，应尽量避免雷公藤与有 ADR 叠加风险的药物联合使用，因治疗需要的联合使用，应严密监测其 ADR，避免潜在风险。

严重 ADR/AE 报告占总报告的 14.86%，主要累及肝胆系统、血管与淋巴管类、肾脏及泌尿系统、生殖系统及乳腺等。多数患者转归或预后良好。222 例报告中，有 2.25% 患者未好转，其中 4 例 ADR 表现为肝功能异常，1 例表现为大疱性表皮松解，另外还有 2 例有后遗症，因此不可忽视雷公藤及其制剂的安全性问题。应注重平衡风险与效益之间的关系，临床使用时应详细询问有无肝病史或药物性肝病史、过敏史及其他疾病史等，用药期间应注意定期随诊并检查血、尿常规及心电图和肝肾功能，对因个体差异等因素出现严重 ADR 或 ADR 未能好转的患者应调整用药方案，及时减量或停药，并进行对症处理。

3.4 ADR 发生时间

从 ADR 发生时间结合病例的用药持续时间来看，ADR 在整个用药周期均可出现，发生时间在 1 d 内的主要以恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠系统表现及过敏反应为主，超过一周后累及系统器官逐渐增多。雷公藤制剂说明书建议连续用药一般不超过 3 个月，本研究中部分患者用药时间超过说明书的建议用药时间，有的甚至用药长达 10 年。导致超说明书疗程用药的原因，一方面可能是部分病例是 2012 年国家要求修改说明书之前收集的，另一方面是自身免疫系统疾病过程漫长且较难治愈，需长期用药，存在患者在院外自行购买使用不当的情况。因此应加强院内外患者的用药教育，重点强调用药疗程、禁忌、注意事项、ADR 等，避免因认知缺陷或其他原因导致出现不可逆转的严重后果。

3.5 ADR 累及系统 - 器官

本研究中 ADR 累及多系统，以胃肠系统最多，其次为皮肤及皮下组织类、肝胆系统等。因本研究均为自发报告，受到自发报告系统的局限性，无法计算发生率。但孙萍萍等[12]用随机对照试验的方法统计了各系统的 ADR 发生率，基本印证了上述 ADR 结果。胃肠系统、皮肤及皮下组织类 ADR 上报率高可能与临床表现容易被患者或医师发现有关。造成胃肠系统损伤可能是雷公藤及其制剂刺激胃肠道黏膜，造成平滑肌痉挛导致的一系列症状[13]。而造成严重 ADR 的多涉及肝胆系统，这与文献报道的雷公藤制剂的 ADR 以肝胆系统损伤程度较严重相一致[2]。雷公藤引起肝毒性的毒理学基础并不完全清晰，其作用机制复杂，目前研究认为，造成肝毒性可能与脂质过氧化反应、肝细胞凋亡、免疫损伤、肝药酶活性改变及代谢异常等有关[14]。有文献指出多数药物性肝损伤并无症状，需要通过实验室检查才能发现[15]。有些药物性肝损伤有厌油、乏力、恶心、呕吐、腹痛等表现[16-17]，推测雷公藤及其制剂的实际肝损伤病例可能比统计的更多。因此，患者一旦出现厌油、乏力等症状时应及时报告医师。同时雷公藤及其制剂还具有一定蓄积性，对有肝病患者更应避免使用[18]。本研究统计有 13 例次的生殖系统与乳腺相关 ADR，有文献报道雷公藤存在一定的生殖毒性[19]，孙凤等[20]采用 meta 分析认为其生殖毒性发生率较高，以闭经、月经紊乱、精子活力下降等为主，且用药时间越长，发生月经紊乱的风险越高，提示对有生育计划的男性女性均应谨慎使用。

3.6 单独用药严重 ADR 病例

对关联性较高的雷公藤及其制剂单独用药的严重 ADR 病例进行重点分析，可见年龄分布、用药持续时间跨度较大，提示任何年龄和用药时间均有可能发生严重 ADR。严重 ADR 涉及肝胆系统的占比最大，提示临床在使用雷公藤及其制剂

时应控制用药时间，用药过程中，应该早期、定期监测肝功能指标，必要时联合保肝药物使用，避免造成严重肝损伤，提高用药的安全性。

3.7 典型中毒案例分析

该案例是一名 13 岁的儿童，属超禁忌人群使用，且超剂量服用时间较长，患儿出现中毒症状未及时就医，入院后虽然采取积极救治，但中毒时间较久，病情进展迅速，造成多系统损伤，各脏器损伤不可逆。该病例为院外使用雷公藤，可能存在家属对雷公藤剂量、用药部位和炮制方法等把握不当的情形，对雷公藤可能引起中毒的认识不清，导致病情延误。因此建议雷公藤应在中医的辨证施治下使用，同时严格掌握用药指征、剂量、时间，定期监测血、尿常规，肝、肾功能及心电图，一旦出现中毒症状应及时就医。

4 展望

雷公藤及其制剂在治疗自身免疫性疾病上具有显著的疗效 [21] 和价格优势，但治疗窗狭窄限制了它的使用。通过以上分析可以看出，雷公藤及其制剂在合理使用下总体安全，其不良反应可涉及多系统，对胃肠、肝胆、生殖、神经等系统均存在一定的损伤，以肝胆系统较为突出，提示临床应早期干预，避免潜在毒性，必要时开展前瞻性真实世界研究。鉴于雷公藤及其制剂的毒效二重性，对其质量应该严格把关。但雷公藤产地、环境、采收季节、种植方法等不同，药材成分也可能不同；而其制剂的质量状况同样存在差异，不同企业制剂化学成分差异大，同企业制剂批次间质量不稳定、残留溶剂超标等问题，造成疗效与 ADR 的差异 [22-23]。如何减毒增效，控制产品质量，科学合理使用，是今后研究亟需解决的问题。因此应深入开展雷公藤活性、毒性物质的基础研究，探究不限于结构修饰、制剂改良、传统炮制、复方配伍 [24] 等方法减毒增效，研究探索量效关系的平衡，工艺技术的改善，制剂标准的优化，产品质量的控制，以期雷公藤能更加安全有效地应用。

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]. 第五册．1999：204-214.

[2] 田雅格，苏晓慧，刘立玲，等 . 近 20 年来雷公藤肝毒性研究概述 [J]. 中国中药杂志，2019，44（16）：3399-3405.

[3] 国家药品监督管理局 . 数据查询 . [DB/OL]. https：//www.nmpa. gov. cn/datasearch/searchresult. html.

[4] 葛均波，徐永健，王辰 . 内科学 [M]. 9 版 . 北京：人民卫生出版社，2018：807.

[5] 张嘉怡，戎娜，李贞 . 郑州市居民类风湿关节炎筛查结果分析 [J]. 华南预防医学，2021，47（11）：1458-1460.

[6] 汪靓雯，邹新蓉，王长江，等 . 雷公藤多苷治疗过敏性紫癜性肾炎随机对照试验的系统评价 [J]. 中国中药杂志，2018，43（13）：2806-2816.

[7] 丁樱，李雪军，张霞，等 . 雷公藤颗粒治疗儿童反复性过敏性紫癜的剂量探索 [J]. 中医学报，2021，36（4）：860-864.

[8] 张维真，王淑华，王蒙，等 . 雷公藤对小儿性腺远期影响的观察研究：附 29 例报告 [J]. 临床儿科杂志，1994（5）：312-313.

[9] 丁樱，杨晓青，李向峰，等 . 中成药雷公藤多苷对儿童性腺发育的影响 [J]. 中医儿科杂志，2013，9（1）：20-23，1.

[10] 吴闽枫，马瑜宏，李军，等 . 雷公藤及其衍生物在皮肤疾病中的应用研究 [J]. 辽宁中医杂志，2016，43（1）：191-194.

[11] 李逸群，胡瑞学，贾可欣，等 . 雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎的安全性系统评价 [J]. 中国中药杂志，2020，45（4）：775-790.

[12] 孙萍萍，张天娇，许可嘉，等 . 雷公藤及其制剂临床不良反应分布特点随机对照试验的系统评价 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2015，17（9）：1899-1905.

[13] 任利文，郑湘锦，李婉，等 . 雷公藤毒性的历史认识与评价 [J]. 医药导报，2021，40（5）：637-641.

[14] 付晓春，沈小莉，蒋平 . 雷公藤多苷药理作用及肝毒性机制研究 [J]. 医学信息，2020，33（5）：37-39.

[15] 杨婉娜，谢雯 . 药物性肝损伤的临床表现和分型 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（11）：2525-2529.

[16] 周政文，路永媚，陈文辉，等 . 回顾性分析临床药物性肝病 147 例 [J]. 中南药学，2009，7（11）：866-869.

[17] 赵向前，董菁 . 药物性肝损伤患者的临床特点及 CT 影像学表现分析 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志，2019，17（3）：83-86.

[18] 孙凤，杨兴华，马冬梅，等 . 雷公藤用药者消化系统不良事件发生率的 Meta 分析 [J]. 中国新药杂志，2014，23（7）：843-852.

[19] 徐颖，樊媛芳，赵元，等 . 近 40 年雷公藤生殖毒性研究概述 [J]. 中国中药杂志，2019，44（16）：3406-3414.

[20] 孙凤，杨兴华，马冬梅，等 . 雷公藤用药者生殖毒性发生率的 Meta 分析 [J]. 中国药物警戒，2014，11（2）：94-99，103.

[21] ZhangYQ，Xia MX，Li WJ，et al. Tripterygium wilfordii：an inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment [J]. Med Res Rev，2020，41（3）：1337-1374.

[22] 汪祺，王亚丹，郑笑为，等 . 不同企业雷公藤多苷片的制剂质量比较与评价 [J]. 中国现代中药，2020，22（9）：1534-1538.

[23] 王爱武，王楠楠，刘帅，等 . 不同雷公藤制剂雷公藤甲素、雷公藤内酯甲及雷公藤总内酯含量的比较 [J]. 中南药学，2015，13（10）：1081-1085.

[24] Hou W，Liu B，Xu HT. Celastrol：progresses in structure-modifications，structure-activity relationships，pharmacology and toxicology [J]. Eur J Med Chem，2020，189（C）：112081.

（收稿日期：2022-06-02；修回日期：2022-08-05）

1 例胰岛素治疗致急性痛性神经病变的不良反应分析

郝顺[1]，唐翎[2, 3*]（1. 张家界市人民医院药学部，湖南 张家界 427000；2. 中南大学湘雅医院药学部，长沙 410008；3. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心，长沙 410008）

关键词：胰岛素；糖尿病；急性痛性神经病变；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)01-0269-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.044

糖尿病神经病变是糖尿病最常见的并发症之一，多与血糖控制不佳相关，主要为慢性隐匿性起病。Caravati 于 1933 年首次报道了在高血糖得到控制后急性发作的神经性疼痛病例，并命名为胰岛素神经炎（insulin neuritis，IN）[1]。IN 是一种快速降糖治疗所诱发的罕见医源性小纤维神经病变，与糖尿病病因致周围神经病变不同的是，此类患者快速控制血糖后出现某特定部位、四肢乃至全身烧灼样或针刺样剧烈疼痛[2-3]。本文就 1 例胰岛素强化治疗后糖化血红蛋白（HbA1c）大幅度下降，致严重程度少见的以全身剧烈疼痛症状为主要表现的急性神经病变患者进行分析，从临床药师角度提高对药物不良反应的认识，寻求有效的防治方法，保障患者用药安全。

1 病例资料

患者，女，39 岁，因“口干、多饮、多尿伴消瘦 3 年余，全身剧烈疼痛、四肢麻木 1 月余”于 2021 年 2 月 19 日入院就诊。患者既往体健，2017 年开始无明显诱因出现口干、多饮，每日饮水量约 3000 mL，尿量明显增多伴体质量减轻约 3 kg，无发热、咳嗽，无突眼、心悸不适，前往当地卫生院就诊，测空腹血糖高，考虑糖尿病，予以格列齐特片（80 mg bid）联合二甲双胍片（1 g bid）口服降糖，血糖控制欠佳，2020 年 12 月于当地医院测空腹血糖 18.8 mmol·L^{-1}、HbA1c 14.9%，诊断为 1 型糖尿病，停口服降糖药改用甘精胰岛素睡前 22 u，赖脯胰岛素早餐前 8 u- 中餐前 8 u- 晚餐前 6 u 皮下注射，自诉血糖控制尚可。胰岛素治疗 1 月余（2021 年 2 月）出现肢体远端皮肤疼痛，麻木，后迅速发展至全身皮肤火灼感，针刺痛，疼痛剧烈，夜间更甚且难以入睡，再次当地医院住院治疗，测空腹血糖 8.27 mmol·L^{-1}、HbA1c 9.2%，予以输液治疗 1 周（具体药物不详），症状稍好转后出院，出院后继续口服硫辛酸、复合维生素 B 片、甲钴胺片营养神经治疗，口服曲马多缓释片 1 片·d^{-1} 治疗。既往无腰腿痛等类似疾病发生，无外伤史，否认高血压、冠心病，否认实物、药物过敏史，预防接种史不详。

入院体查：体温 36.6 ℃，脉搏 110 次·min^{-1}，呼吸 16 次·min^{-1}，血压 115/85 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa），身高 152 cm，体质量 40 kg，BMI 17.31 kg·m^{-2}。发育正常，营养中等，消瘦，神志清楚，被动体位，急性病容，表情痛苦，入睡困难，情绪波动大；四肢活动正常，无关节红肿、活动障碍，四肢及躯干部痛觉过敏，震动觉、10 g 尼龙丝试验未见异常，双下肢无水肿，双足背动脉搏动正常，无杵状指趾，双膝反射正常，四肢肌力、肌张力正常，双侧病理征阴性。入院疼痛评分（疼痛评分采用数字分级法）9 分。辅助检查：外院（2021 年 2 月 2 日）血糖：8.27 mmol·L^{-1}、HbA1c 9.2%、血酮 0.30 mmol·L^{-1}、血常规、肝肾功能、凝血功能、脑钠肽（BNP）、血脂、心肌酶、大小便常规示基本正常，胸片未见异常。入院后（2 月 19 日），查肝肾功能、甲状腺功能三项＋皮质醇＋性激素＋甲状旁腺激素、三大常规大致正常，HbA1c 8.9%，C 肽释放试验：空腹 C 肽值 0.2 ng·mL^{-1}、峰值 1.1 ng·mL^{-1}，甲胎蛋白、癌胚抗原、抗核抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 Sm 抗体、糖尿病自身抗体（GAD/ICA/IAA）均阴性。动脉彩超双侧颈动脉、椎动脉、下肢动静脉未见明显异常。

治疗过程：入院后完善相关检查，第 1 日患者诉全身疼，以胸背痛为甚，查 HbA1c 8.9%、随机血糖 7.0 mmol·L^{-1}，继续院外基础加餐前胰岛素降糖方案；针对神经病变起始治疗：甲钴胺注射液（1 mg qd iv drip）、硫辛酸注射液（0.6 g qd iv drip）营养神经；加巴喷丁胶囊（0.2 g tid）联合普瑞巴林胶囊（75 mg bid）缓解疼痛治疗；住院第 5 日患者仍诉全身疼痛，夜间难忍，严重影响睡眠，情绪

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金（No.2021JJ80085）。
作者简介：郝顺，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：363354738@qq.com *通信作者：唐翎，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：tangling82@126.com

低落，肌电图提示双侧正中神经、尺神经、双腓神经、双腓肠神经轻度损害，CT 检查排除椎体相关性疾病，临床药师建议加用 5- 羟色胺再摄取抑制剂度洛西汀肠溶片（20 mg bid），根据患者耐受性可加量滴定，最大剂量为 60 ～ 120 mg • d^{-1}，分两次服用，停用普瑞巴林胶囊，根据疗效和耐受性增加加巴喷丁胶囊剂量，最大剂量为 1.8 g • d^{-1}，分 3 次服用，当无法睡眠可临时给予阿普唑仑片（0.4 mg qn）助眠，曲马多缓释片（100 mg qn）止痛，临床医师采纳药师建议；患者住院第 21 日诉疼痛较前稍有缓解，但仍全身疼痛，夜间偶需加服阿普唑仑助眠，曲马多缓释片镇痛。住院期间降糖方案未变，根据血糖水平微量调整胰岛素剂量，监测餐前血糖波动于 5.3 ～ 10.9 mmol • L^{-1}，餐后血糖波动于 6.6 ～ 12.6 mmol • L^{-1}，C 肽释放试验示胰岛功能极差，胰岛素相关抗体阴性，结合病史诊断为 1 型糖尿病，带药出院。跟踪回访患者被告知 2021 年 8 月左右疼痛大幅缓解并停用所有口服药，继续胰岛素治疗，至 2022 年 2 月左右疼痛完全消除，体质量升至 55 kg，能正常参与生产生活。临床药师根据患者病史、用药史、疼痛特点查阅相关资料 [2]，考虑不良反应为胰岛素神经炎。

2 分析讨论

2.1 不良反应关联性评价

结合患者发病史、家族史及既往用药史，临床药师考虑患者急性神经疼痛为胰岛素快速降糖所致。根据国家药品不良反应（adverse drug reaction，ADR）中心制定的关联性判定结果为“很可能”：① 胰岛素治疗与神经痛的时间关联性：治疗前无感觉异常及疼痛，胰岛素强化控糖 1 月余无明显诱因四肢疼痛，快速进展至全身痛，病程较短；② 患者胰岛素治疗前有 4 年糖尿病史，未予正规检查和治疗，2020 年 12 月测 HbA1c 14.9%，胰岛素强化治疗 1 月余后测 HbA1c 为 9.2%（2021 年 2 月 2 日），入院后（2021 年 2 月 24 日）测得 HbA1c 为 8.9%，HbA1c 两月降幅达 6%，与文献报道血糖下降幅度大相关结论一致 [3-4]；③ 因治疗需要未停用胰岛素，通过微量下调胰岛素剂量减缓降糖速度、对症治疗后疼痛稍缓解；④ 患者服用二甲双胍片与格列齐特片 3 年余未出现相似症状，说明书及文献未查阅到两药致痛性神经病变的报道；⑤ 糖尿病周围神经病变常慢性起病，长时间局限于肢体远端，少累及躯干及全身，血糖的良好控制一般不会使其加重，患者对缓解神经痛类药物（如普瑞巴林、度洛西汀）反应较好 [5]；⑥ 脑血管、中枢神经系统、血液系统、脑血管病变以及类风湿疾病也可引起身体感觉异常及疼痛，结合患者体征、检验结果和相关影像学资料，不支持此类疾病；⑦ 其他特殊原因引起的感觉异常及疼痛（如神经毒性药物、食物、肾功能不全代谢毒物、肿瘤等对神经的损伤），往往还伴有其他表现及相应病史，患者疼痛特点、病史、体检及辅助检查结果均不支持；⑧ 通过后期跟踪回访，患者发病后半年在停用镇静镇痛药物的情况下神经疼痛大幅缓解，1 年左右疼痛完全消失，符合绝大多数胰岛素神经炎患者在 3 ～ 8 个月后疼痛症状逐渐缓解甚至消失的时间自限性特点 [6]。

2.2 诱发胰岛素神经炎的可能机制

胰岛素神经炎的机制目前不明确，有学者将其划归为糖尿病急性医源性并发症 [7]，诱发胰岛素神经炎的机制可能是多方面的：

① 神经外膜血管形态明显异常，导致神经外膜动静脉分流，血流动力学在短时间内发生改变，神经内膜缺血缺氧而致神经病理性疼痛 [8]。② 血糖快速下降所致的神经毒性作用：血糖是神经系统最主要的能量供应来源，因此神经系统对低血糖特别敏感，既往长期处于高血糖状态，血糖快速下降后处于相对低血糖的状态，可通过多种机制引起急性痛性神经病变，即使血糖水平在正常范围均可能触发神经痛等症状 [9]。③ 血糖快速下降后所致代谢紊乱：患者既往血糖控制很差，长期处于高血糖状态，快速纠正高血糖后，血糖快速下降打破了原本的代谢平衡，从而引发一系列的代谢改变引起患者的急性痛性神经病变 [10]。④ 血糖快速下降致神经纤维再生超兴奋性：神经纤维的自发性去极化可引起麻木、感觉异常和疼痛，在这种情况下，神经病变疼痛的急性发作反应已被损坏，神经纤维开始修复与再生，同时反映着病情的好转 [11]。

2.3 胰岛素神经炎的特点及常用治疗药物

胰岛素神经炎最常见的症状是在快速血糖控制改变后 2 ～ 8 周出现急性或亚急性神经性剧烈疼痛，以小纤维受累为主的触痛和痛觉过敏为特征，青、中年女性多见；起病时疼痛多见于四肢，尤其是足部，可扩展至大腿、会阴、腹部、胸部、上肢、颈部，甚至全身；常常夜间疼痛超过白天；温觉、震动觉多无明显异常，少数患者可有轻度感觉减退；体征较少，可出现踝反射和膝反射减退；神经电生理检查无异常或轻度异常；同时可伴有微血管病变如肾病、视网膜病变，自主神经功能障碍和焦虑、抑郁等精神症状；1 型、2 型糖尿病均可发生，总体 1 型糖尿病患者发生的风险更大，与治疗前血糖控制差，治疗后血糖水平迅速改善相关，且通常是由胰岛素治疗引起的 [5，12-14]。HbAlc 降低的幅度越大、速度越快，这种不良反应发生的风险就越

高、症状越重。研究报道胰岛素治疗 3 个月 HbAlc 下降幅度超过 2% 的发生率达 10%；超过 4% 的发生率达 50%；超过 5% 的发生率高达 90%[7]。目前由于临床重视不足易被误诊，且 IN 的发病机制尚未明确，病因治疗较困难，主要在管理好血糖的基础上对症治疗，治疗措施与糖尿病外周神经病变类似，同时重视心理治疗。

① 血糖管理：至今未有足够的证据表明维持或重回高血糖状态可成为 IN 的治疗策略，因此对于糖尿病患者预防和治疗相关并发症，合理的血糖控制仍是基础，此病具有自限性，绝大多数患者在 3 ～ 8 个月后疼痛症状逐渐缓解甚至消失，因此控制降糖速度是预防和减少 IN 的重点，目前大部分学者认为以 3 个月内 HbAlc 下降 2% 作为预防该病的切入点较为合理 [15]。② 止痛治疗：虽然与糖尿病周围神经病变止痛对症治疗药物相同，但由于疼痛要严重得多，药物的用法用量可能需要区别对待。目前临床可供医师选择的有效镇痛药有多种，包括抗惊厥药物（如加巴喷丁、普瑞巴林）、抗抑郁药物（如阿米替林、丙咪嗪）、5- 羟色胺再摄取抑制剂（如度罗西汀、文拉法辛）、阿片类药物（如曲马多、吗啡、羟考酮）等 [16]。对于剧烈神经性疼痛的治疗，往往须联合使用两种甚至三种药物，后续治疗应根据神经性疼痛的改善情况进行方案和剂量的调整，以便在患者可容忍的情况下适当减少神经性疼痛药物的使用 [17]。③ 心理治疗：部分患者可能因长时间严重疼痛、睡眠障碍导致生活质量下降，甚至出现焦虑、抑郁状态，故增强患者治疗信心非常重要，必要时应进行抗焦虑治疗。

3 总结与体会

IN 所致全身剧烈疼痛给患者带来了巨大的痛苦，严重影响患者的生活质量，临床药师通过药学服务为患者提供了合理的用药方案与科学的健康教育，增强了患者战胜疾病的信心。此患者对疼痛治疗药物反应不佳，经过数月后神经痛大幅缓解直至消失，符合 IN 病程的相关报道 [18]。临床药师通过对此例患者的总结与文献学习，排除其他疼痛性疾病且有严格控糖用药史的糖尿病患者，出现急性亚急性神经痛考虑为 IN。IN 临床特征主要表现为神经急性或亚急性剧烈疼痛，治疗药物和方案与外周神经病变类似。IN 患者常伴有焦虑、抑郁等精神症状，一旦发生应及时干预。避免血糖控制过快是预防该病的关键，特别是 1 型糖尿病或长期高血糖史等危险因素的患者，应注意血糖控制的速度，由于目前尚没有关于预防 IN 的前瞻性数据，建议降糖治疗前做好临床疗效与用药风险评估，改善 HbA1c 水平同时兼顾降糖幅度，降低 ADR 发生风险。

参考文献

[1] Caravati C. Insulin neuritis：a case report [J]. Va Med Mon，1933，59：745-746.

[2] Vinik AI. Clinical practice. Diabetic sensory and motor neuropathy [J]. N Engl J Med，2016，374（15）：1455-1464.

[3] 袁晶晶，陈科，赵少俐，等 . 糖尿病治疗诱导的神经病变 2 例并文献复习 [J]. 中南大学学报（医学版），2020，45（3）：349-353.

[4] 张倩影，汤智慧，肖彦革 . 1 例胰岛素致相关急性痛性神经病变的案例分析 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（2）：118-120.

[5] 李玉成，杨震，张洪梅，等 . 胰岛素神经炎的临诊应对 [J]. 中华内分泌代谢杂志，2016，32（11）：952-955.

[6] Guisado Vasco P，Llanero-Luque M，Cano-Megías M，et al. Treatment-induced diabetes neuropathy：description of singular clinical signs to reach a prompt diagnosis [J]. BMJ Case Rep，2020，13（12）：e235165.

[7] Gibbons CH，Freeman R. Treatment-induced neuropathy of diabetes：an acute，iatrogenic complication of diabetes [J]. Brain，2015，138（Pt 1）：43-52.

[8] Tesfaye S，Malik R，Harris N，et al. Arterio-venous shunting and proliferating new vessels in acute painful neuropathy of rapid glycaemic control（insulin neuritis）[J]. Diabetologia，1996，39（3）：329-335.

[9] Honma H，Podratz JL，Windebank AJ. Acute glucose deprivation leads to apoptosis in a cell model of acute diabetic neuropathy [J]. J Peripher Nerv Syst，2003，8（2）：65-74.

[10] Ohshima J，Nukada H. Hypoglycaemic neuropathy：microvascular changes due to recurrent hypoglycaemic episodes in rat sciatic nerve [J]. Brain Res，2002，947（1）：84-89.

[11] Gemignani F. Acute painful diabetic neuropathy induced by strict glycemic control（“insulin neuritis”）：the old enigma is still unsolved [J]. Biomed Pharmacother，2009，63（4）：249-250.

[12] Gibbons CH. Treatment induced neuropathy of diabetes [J]. Auton Neurosci，2020，226：102668.

[13] Gibbons CH，Freeman R. Treatment-induced diabetic neuropathy：a reversible painful autonomic neuropathy [J]. Ann Neurol，2010，67（4）：534-541.

[14] Stainforth-Dubois M，McDonald EG. Treatment-induced neuropathy of diabetes related to abrupt glycemic control [J]. CMAJ，2021，193（28）：E1085-E1088.

[15] Storz MA. Treatment-induced neuropathy of diabetes：a call for acknowledgement [J]. Diabet Med，2020，37（2）：369-370.

[16] Feldman EL，Callaghan BC，Pop-Busui R，et al. Diabetic neuropathy [J]. Nat Rev Dis Primers，2019，5（1）：41.

[17] Pop-Busui R，Boulton AJ，Feldman EL，et al. Diabetic neuropathy：a position statement by the American diabetes association [J]. Diabetes Care，2017，40（1）：136-154.

[18] Ferreira M，Camoes G，Gomes JFF，et al. Treatment-induced diabetes neuropathy：reminder of an important clinical lesson [J]. BMJ Case Rep，2021，14（5）：e241849.

（收稿日期：2022-05-08；修回日期：2022-06-15）

瑞戈非尼致多形性红斑药疹 1 例

陈琳[1, 2]，陈邓林[2]，王敏[2*]（1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院 药学部，海口 570208；2. 海南省人民医院，海南医学院附属海南医院，海口 570311）

关键词：瑞戈非尼；多形性红斑；药物不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)01-0272-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.045

肝癌是目前全球最常见的恶性肿瘤之一。大多数患者发现时为中、晚期，治疗选择非常有限[1]。瑞戈非尼是一种新型口服小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂，主要通过阻断肿瘤新生血管生长抑制肿瘤增殖与侵袭。在美国、欧盟、中国和日本等多个国家及地区被批准用于治疗成人既往经过索拉非尼治疗失败的肝细胞癌的二线治疗[2]。瑞戈非尼等酪氨酸激酶抑制剂会引起一系列特异性皮肤不良事件，包括手足皮肤反应（hand-foot skin reaction，HFSR）和皮疹或脱屑，也可能引起严重皮肤毒性，包括多形性红斑（erythema multiforme，EM）甚至 Stevens-Johnson 综合征（Stevens-Johnson syndrome，SJS）等[3]。皮肤毒性如果管理不当会降低患者生存质量，导致治疗减量甚至终止进而可能缩短患者总生存期，而严重皮肤毒性例如 SJS 则可能危及生命[4]。因而及早辨识和管理瑞戈非尼皮肤毒性对管理晚期肝细胞癌患者生存质量有重要意义。本文通过对 1 例患者使用瑞戈非尼后出现 EM 并再挑战失败的病例进行分析，以期为临床安全用药提供参考。

1 病例资料

患者，女性，39 岁，于 2021 年 9 月因“上腹部 MR 平扫＋增强检查示肝右下段占位并肝内多发结节灶，考虑肝癌可能性大；肝硬化”入院治疗。查体：身高 150 cm，体质量 46.3 kg，体表面积 1.36 m^2，美国东部肿瘤协作组（Eastern Cooperative Oncology Group，ECOG）体力状况评分 1 分，数字评定量表（Numeric Rating Scale，NRS）评分 0 分。全身皮肤、黏膜无黄染，腹平坦，未见腹壁静脉曲张，腹软，剑突下、右下腹部有压痛，反跳痛可疑阳性，肝脾肋下未触及，全腹未及包块。肝区叩击痛阳性，其余无特殊。辅助检查：甲胎蛋白＞ 2000.00 ng • mL^{-1}。乙肝表面抗原定量＞ 225.000 ng • mL^{-1}、乙肝核心抗体定量＞ 12.000 U•mL^{-1}。Child-Pugh 评分 A 级。上腹部＋下腹部＋盆腔（三维＋增强扫描）CT 检查示：肝内散在多发结节和肿块，考虑为肝癌并肝内多发子灶或肝内转移。诊断：肝恶性肿瘤并肝内多发转移，慢性乙型病毒性肝炎，肝硬化。2021 年 10 月开始给予替雷利珠单抗注射液，200 mg ivgtt，每 3 周一次联合仑伐替尼，8 mg po qd 行姑息治疗。2021 年 10 月至 2022 年 5 月使用仑伐替尼期间出现 3 级 HFSR 后给予停药及对症处理后恢复至 2 级并继续仑伐替尼治疗，疗效评价疾病稳定（stable disease，SD）。2022 年 6 月患者甲胎蛋白 1206.15 ng • mL^{-1}，影像学提示：肝内散在多发结节和肿块，部分较前增大。考虑肿瘤进展，6 月 9 日更换二线治疗方案为替雷利珠单抗注射液 200 mg ivgtt，每 3 周一次，联合瑞戈非尼 160 mg po qd，服用 21 d 停药 7 d，28 d 为一周期。6 月 20 日因为瑞戈非尼引起的 3 级 HFSR 停药，当日全身出现散在皮疹。6 月 21 日因全身泛发红斑及丘疹入院皮肤科诊断 EM（见图 1）。查体：头面部、躯干、四肢可见大量深红色豌豆至蚕豆大小，圆形或椭圆形水肿性红斑或丘疹。红斑融合成片，未见明显糜烂及渗出，尼氏征（－）。入院后给予甲泼尼松，60 mg ivgtt qd 冲击治疗，西替利嗪片，10 mg po bid 等对症治疗后于 7 月 5 日痊愈出院并继续口服甲泼尼龙片 20 mg qd 维持治疗。7 月 12 日在参考说明书减量后使用瑞戈非尼 120 mg po qd 进行再启动，7 月 13 日出现颜面部浮肿，7 月 14 日双下肢出现片状红斑皮疹，考虑为瑞戈非尼再激发引起的药疹，永久停用瑞戈非尼转入三线治疗。

作者简介：陈琳，女，硕士，主要从事临床药学工作，email：chenmercury@qq.com *通信作者：王敏，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：wangmin2020@hainmc.edu.cn

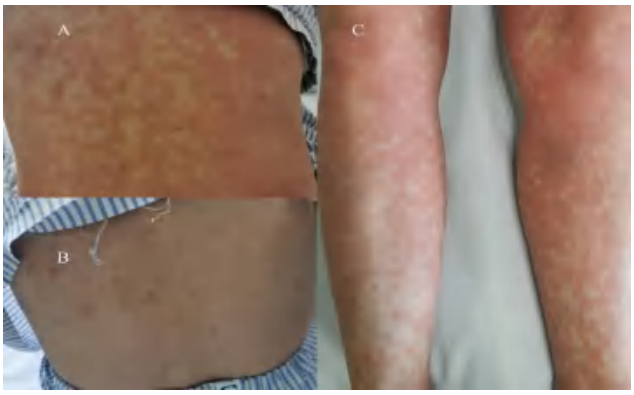


图 1　瑞戈非尼致多形性红斑

A. 2022 年 6 月 21 日多形性红斑型药疹；B. 2022 年 7 月 5 日痊愈出院；C. 2022 年 7 月 14 日瑞戈非尼再激发皮疹

2　讨论

患者于 2022 年 6 月 9 日首次服用瑞戈非尼，6 月 20 日开始出现散在皮疹并发展为 EM，遂入院治疗。痊愈出院后于 7 月 12 日进行瑞戈非尼再启动，次日出现 EM 再激发。根据 Naranjo 标准 [5] 就瑞戈非尼与 EM 进行不良反应关联性评价：瑞戈非尼说明书提及皮肤不良反应包括 EM（少见）。根据患者用药史，在 6 月 9 日至 7 月 13 日期间使用的药物仅瑞戈非尼一种，首次发生 EM 停药痊愈后重启瑞戈非尼治疗出现 EM 再激发，参考国外类似报道 [6]，Naranjo 评分为 10 分，瑞戈非尼与该患者 EM 关系为确定。具体评分详见表 1。

表 1　瑞戈非尼与 EM 的 Naranjo 评分结果

相关问题	Naranjo 评分			瑞戈非尼		
	是	否	未知	是	否	未知
1. 以前是否有关于此种不良反应确定的研究报告	1	0	0	1		
2. 此种不良反应是否发生于服药之后	2	－1	0	2		
3. 当停药或服用此药之解药，不良反应是否减轻	1	0	0	1		
4. 停药一段时间再重新服用此药，同样的不良反应是否再度发生	2	－1	0	2		
5. 有没有其他原因（此药物以外）可以引起同样的不良反应	－1	2	0		2	
6. 当给予安慰剂时，此不良反应是否会再度发生	－1	1	0			0
7. 此药物的血中浓度是否达到中毒剂量	1	0	0		0	
8. 对此患者而言，药物剂量与不良反应的程度是否是正向关系	1	0	0			0
9. 患者过去对同样或类似药物是否也产生同样的不良反应	1	0	0	1		
10. 此项不良反应是否有客观的证据证明是药物所引起	1	0	0	1		
总分				10		

注：判断结果分为 4 级，依次为“可疑”（总分≤ 0）、“可能”（总分 1 ～ 4 分）、“很有可能”（总分 5 ～ 8 分）、“确定”（总分≥ 9 分）。

瑞戈非尼常见的不良反应包括皮肤毒性、高血压、肝损伤、蛋白尿、腹泻、疲劳等。但由于其作用靶点多，药物不良反应的表现多样，涉及范围较广 [7]。其中以皮肤毒性最常见。在 CORRECT 试验中接受瑞戈非尼患者中 26% 出现了皮疹（3 级不良反应发生率为 6%）[8]，在 GRID 试验中 18% 的患者出现任一级别的皮疹 [9]。在美国 FDA 不良事件报告系统（FDA Adverse Event Reporting System，FAERS）中挖掘的瑞戈非尼皮肤及皮下组织类疾病（包含 EM）比例为 17.76%[10]，但是目前未有瑞戈非尼引起 EM 比例的确切数据，在 PubMed 中检索仅发现 Mototsugu 等 [6] 在 2016 年报道了 1 例由瑞戈非尼引起的 EM，文中提及瑞戈非尼引起 EM 的比例不足 0.6%。目前国内尚未有瑞戈非尼引起 EM 的案例报道。

EM 是一种急性、免疫介导的皮疹，特点为独特的靶形皮损，往往累及肢体远端，重症 EM 是指伴有黏膜受累的 EM，重度病例可能伴有发热和不适等症状 [11]。许多因素都与 EM 的发生有关，包括感染、药物、自身免疫性疾病等，不到 10% 的 EM 病例由药物诱发 [11-12]。很多药物都可引起发疹，最常见的致病药物可能是非甾体类抗炎药、抗癫痫药和抗菌药物 [11-12]。随着抗肿瘤靶向药物临床应用越来越广泛，目前也陆续报道了多种靶向药物比如酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼引起的 EM[13]。有关 EM 发病机制的现有数据大多来自于针对单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）引起的 EM（HSV-associated erythema multiforme，HAEM）的研究，该机制认为 HAEM 主要与皮肤中 *HSV* 基因表达生成干扰素 γ（interferon-gamma，IFN-γ）有关。但是对于药物引起的 EM（drug-induced EM，DIEM）则是与肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor α，TNF-α）有关。两者可根据皮肤活检病理进行一定程度的区别 [14]。

本例患者虽未进行皮肤活检进一步明确诊断 DIEM，但经历了瑞戈非尼减量再挑战后 EM 的激发，权衡临床继续治疗的获益与风险，考虑到患者目前进行的是姑息治疗，应保证生存质量，最终停止了瑞戈非尼的治疗。

抗肿瘤药物的皮肤毒性的管理与患者获得较好的生活质量息息相关，特别在晚期肿瘤患者中，可能延长患者的总生存期。虽然 EM 罕见引起危及生命的并发症[1]，但是部分 DIEM 可能是其他严重致死性不良反应比如 SJS 的前驱症状（虽然目前认为两者发病机制不同）[15]。早期辨识 DIEM 并充分评估再启动或调整治疗方案的获益与风险需要个体化的评估。

参考文献

[1] Ding XX，Zhu QG，Zhang SM，et al. Precision medicine for hepatocellular carcinoma：driver mutations and targeted therapy [J]. Oncotarget，2017，8（33）：55715-55730.

[2] Sun W，Roniel C. Systemic treatment of patients with advanced，unresectable hepatocellular carcinoma：emergence of therapies [J]. J Gastrointest Cancer，2018，49（2）：107-115.

[3] 黄烽如，连可，钱依，等 . 酪氨酸激酶抑制剂的不良反应 [J]. 药学与临床研究，2019，27（2）：108-112.

[4] McLellan B，Kerr H. Cutaneous toxicities of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib [J]. Dermatol Ther，2011，24（4）：396-400.

[5] 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.

[6] Mototsugu M，Tomoyuki U，Masaru F，et al. Erythema multiforme induced byregorafenib [J]. J Gen Fam Med，2017，18（2）：90-91.

[7] 裴育莹，高宇，娄彦妮 . 瑞戈非尼致不良反应的文献回顾性分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（6）：616-623.

[8] Grothey A，Sobrero A，Siena S，et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer（CORRECT）：an interna-tiona，multicentre，randomised，placebo-controlled phase 3 trial [J]. Lancet，2013，381（9863）：303-312.

[9] Demetri GD，Reichardt P，Kang YK，et al. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib（GRID）：an international，multicentre，randomised，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet，2013，381（9863）：295-302.

[10] 龙霞，干小红，曾晓欢 . 瑞戈非尼的安全警戒信号检测与评价 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（15）：1573-1577.

[11] Kathryn P，Trayes MD，Gillian L，et al. Erythema multiforme：recognition and management [J]. Am Fam Physician，2019，100（2）：82-88.

[12] Pavel G，Maja M，Rüdiger P，et al. Erythema multiforme，Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis-diagnosis and treatment [J]. J Dtsch Dermatol Ges，2020，18（6）：547-553.

[13] Augusto M，Mário R，Álvares D，et al. Anaphylaxis preceded by erythema multiforme with sorafenib：first case report [J]. Ann Hepatol，2019，18（5）：777-779.

[14] Aurelian L，Ono V，Burnett J，et al. Herpes simplex virus（HSV）-associated erythema multiforme（HAEM）：a viral disease with an autoimmune component [EB/OL]. Dermatol Online J，2003，9（1）：1.

[15] Giraud K，Bellon N，Welfringe A，et al. Childhood epidermal necrolysis and erythema multiforme major：a multicentre French cohort study of 62 patients [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2021，35（10）：2051-2058.

（收稿日期：2022-08-20；修回日期：2022-09-13）

药事管理

新医改形式下的我院药事管理工作实践与 DIP 政策下的思索

李静，王旋，蔡永桥，刘香男，李静婷，丁兴伟，鲁威*（上海市普陀区人民医院，上海 200060）

摘要：新医改背景下，医院药学部门的工作模式也在加速向“以病人为中心”转变。本文介绍了我院药剂科在医改深化的新形势下，对药事管理工作进行的探索和实践经验。通过实施信息化的合理用药闭环式监管、探索开展创新药学服务、开展多模式多渠道的合理用药宣教等举措，药事管理工作不断地改进，亮点突出。合理用药效果显著，“三位一体”慢病管理药学服务实现对患者的闭环式持续化的管理。药学服务得到临床医师和患者的一致好评，患者关注度和满意度不断提升。本文对药学工作的进一步开展进行深入思索，并对临床药师如何发挥自身价值、提供药学服务提出合理建议以适应按病种分值付费（DIP）支付时代的来临。

关键词：新医改；药事管理；药学服务；DIP 支付

中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)01-0275-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.01.046

2017 年，我国药品“零加成”开始全面实行，这意味着医院传统的“以药补医”时代的结束，药剂科仅提供药品保障已无法满足发展的需要[1-2]。各医院的药事管理工作面临着巨大的挑战。国家卫生健康委员会联合国家中医药管理局在 2018 年 11 月联合下发文件《关于加快药学服务高质量发展的意见》[3]，文中提出对药学服务重要性的认识需要进一步提高，药学服务模式需要积极转变。2020 年 2 月又发布了《关于加强医疗机构药事管理 促进合理用药的意见》[4]，再次强调医疗机构要加强合理用药监管，并不断拓展药学服务。随着医药卫生改革的全面深化推进，医院药学的工作和服务模式不再是“以药品为中心”，而是加速向“以病人为中心”转变。创新发展思路、推行新的举措是医院药事管理工作发展的需要[1]。然而，现阶段，许多基层医疗机构在药事管理工作方面还存在以下问题：药事管理观念陈旧、医院管理层对药事管理工作重视不足、各项管理措施不够完善、药学服务能力薄弱及人才资源缺乏等[5]。新医改背景下，我院药剂科积极应对挑战，牢固树立药事管理新观念，通过不断的探索，开展新型药学服务模式，提升药学服务质量，取得了一定成效。

1 药事管理工作措施及亮点

1.1 实施信息化的合理用药闭环式监管

药品使用信息化管理，积极开展处方点评，对重点监控药品实施监管，形成比较完善的闭环管理（见图 1）。处方点评工作小组依据重点监控药品目录、区监控平台信息、信息科每月出具的全院药品用量排行（按金额、数量）、各病区金额排名前十的药品信息、门诊药品使用药品金额排名前十的医师等信息，每月开展处方点评工作，形成专项点评报告。点评结果通过药讯、院内 OA 系统进行双公示，并报送医务科，医务科根据点评结果，将合理用药情况纳入考核评价，同时责令有不合理用药的临床科室进行反馈整改。医务科不断加大对不合理用药的惩罚力度，对于存在不合理用药的医师责令其整改；再次出现则进行警告，并对相应科室及医师进行诫勉谈话；对于不合理用药情况出现 3 次以上者，给予绩效考核，限制其对该药品的处方权；限制处方权后，仍连续 2 次以上开具超常处方且无正当理由的，取消其处方权；一个考核周期内 5 次以上开具不合理处方的医师，应当认定为医师定期考核不合格，离岗参加培训。

平均病种组合指数（CMI）反映了医院收治病种和开展诊治技术的难易程度，是医院服务能力和水平的体现。指数单价标准反映了医院收费的规范性，药品指数单价偏离度是药品的指数单价偏离标准指数单价的情况，药品实际指数与标准偏离度高

基金项目：上海市普陀区卫生健康委员会卫生管理类研究课题重点项目（No.2021PTGL01）。

作者简介：李静，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：ljttxs0122@163.com *通信作者：鲁威，男，博士，副研究员，主要从事医院管理工作，email：luwei@shsmu.edu.cn

提示在同样病种诊治中可能存在药品费用消耗不合理的情况。根据区卫生计生委所建立的病种组合指数监管平台，对临床科室、各医师组的病种组合指数、药品指数单价偏离度等指标以及病种组合与全市同级同类医院比较情况进行分析与监管，将药品偏离度指标纳入综合目标管理考核体系。同时，进一步加强辅助用药的管理。将用量排名靠前、用量出现异动、多次上榜区监管平台的药品作为区监管平台重点监控品种，但点评合理率高的药品，经药事会讨论并决议，对于用量出现异动以及多次（≥ 4 次 / 年）上榜标红的区合理用药监管平台重点监控药品，采取限量采购措施，严控辅助用药的使用量，杜绝过度使用情况。

图 1　合理用药闭环监管模式图

1.2　推进创新药学服务——“三位一体”慢病管理

临床药学团队积极开展“以病人为中心”的医院药学服务，基于药物治疗管理（MTM）理论，提供“三位一体”慢病管理药学服务。建立慢病全程化药学管理中心，形成“住院 - 居家 - 门诊”闭环式管理模式，为慢病患者提供持续而主动的管理。以患者住院为起点，临床药师从入院药物宣教开始，做到药学评估、干预实时化、用药宣教全程化，完成患者院内的药学监护和管理。与呼吸科、儿科、心内科、内分泌科等科室协作开设医师药师联合门诊，患者出院后，通过联合门诊进行定期随访。同时，充分利用新媒体平台优势，建立慢病管理药学服务微信平台，实现对患者居家期间的持续管理。该平台可实现患者健康档案建立、健康管理、复诊预约、在线实时咨询、科普宣教等功能。实时、高效、优质地对慢病患者进行“三位一体”闭环式持续化的管理。

1.3　探索互联网药学服务新形式，助力院外用药安全

我院推出“在线复诊”服务，医师通过在线问诊，开具处方，药师通过前置审方系统完成处方审核，患者完成在线付费后，处方单会发送至药房，药房人员根据处方单将药品打包好交给物流，寄到患者家里。药师与慢病患者建立伙伴关系，通过电话、微信等方式，及时回复患者留言信息。部分老年患者不会使用微信，药师会每月定期电话随访患者，以及时掌握患者用药依从性和慢病控制情况。药师还会通过微信公众平台宣传疾病知识、用药知识、生活注意事项等，对慢病患者进行持续化的宣传教育。

1.4　开展多模式、多渠道的合理用药宣教

临床药师面向医务人员、在院患者及公众提供各种线上、线下的合理用药宣教活动。开展线下的合理用药宣教活动：

① 住院期间临床药师与医师查房后，为患者提供用药咨询、用药教育等药学服务。② 制作合理用宣教手册和易拉宝，向门急诊、病房发放合理用药宣教手册。③ 门诊咨询窗口提供药物咨询服务。④ 积极参加社会公益活动。高年资药师多次深入社区和楼宇，参与大型义诊活动，提供合理用药咨询服务。与社区家庭医师结对，定期下社区或通过微信药学服务平台协同社区卫生服务站药师完成对慢病患者的管理，与社区卫生服务站药师共同制订药学干预计划，定期随访患者用药情况；⑤ 每年定期面向全院开展麻、精药品专题培训、抗菌药物合理应用培训考核，辅助用药及抗肿瘤药物合理使用专题报告。

提供线上药学服务：① 发布合理用药推文和科普视频。② 开展线上合理用药培训。临床药师通过腾讯会议及 CCMTV 临床频道，面向医务人员、社区药师开展线上合理用药培训活动。

2　药事管理工作成效

2.1　合理用药效果

药事管理工作通过持续的监管及整改，取得显著成效。我院药品指数单价偏离度连续 4 年达标，在本市 32 家同级同类医院排名中逐年上升，于 2020 年在同级别的 32 家医院中排名第 2 名。2021 年药占比为 37.3%，比 2020 年下降 3.09%；比 2019 年下降 4.75%；比 2018 年下降 8.22%；比 2017 年下降 28.28%。门诊患者抗菌药物使用率 2021 年较 2020 年下降 39.17%，较 2019 年下降 55.14%；急诊患者抗菌药物使用率 2021 年较 2020 年下降 7.02%，较 2019 年下降 12.14%；住院患者抗菌药物使用率 2021 年较 2020 年下降 3.17%，较 2019 年下降 8.51%；抗菌药物使用强度（DDD）2021 年较 2020 年下降 4.44%，较 2019 年下降 14.65%。自费药品、辅助用药等重点监控药品使用金额逐年下降，自费药品使用金额 2021 年较 2020 年下降 2.07%，较 2019 年下降 24.89%；辅助用药等重点监控药品使用金额 2021 年较 2020 年下降 19.25%，较 2019 年下降 82.10%。相关指标情况见图 2 ～ 4。

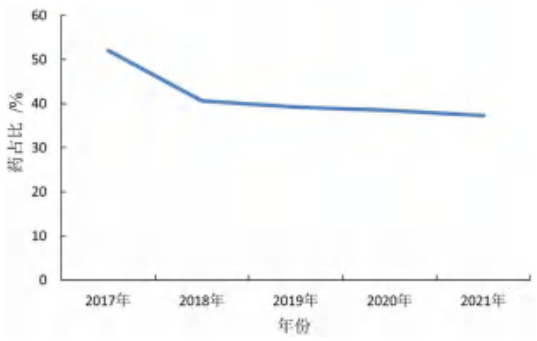


图 2　药占比变化趋势图

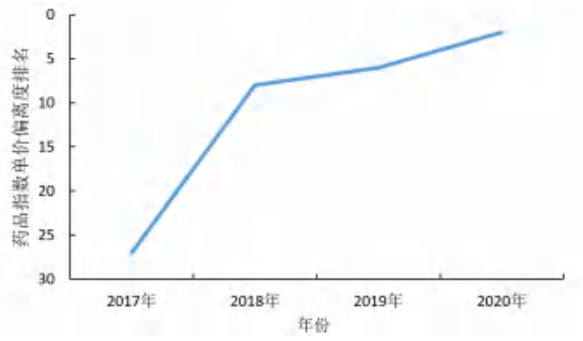


图 3　药品指数单价偏离度在本市同级同类医院排名趋势图

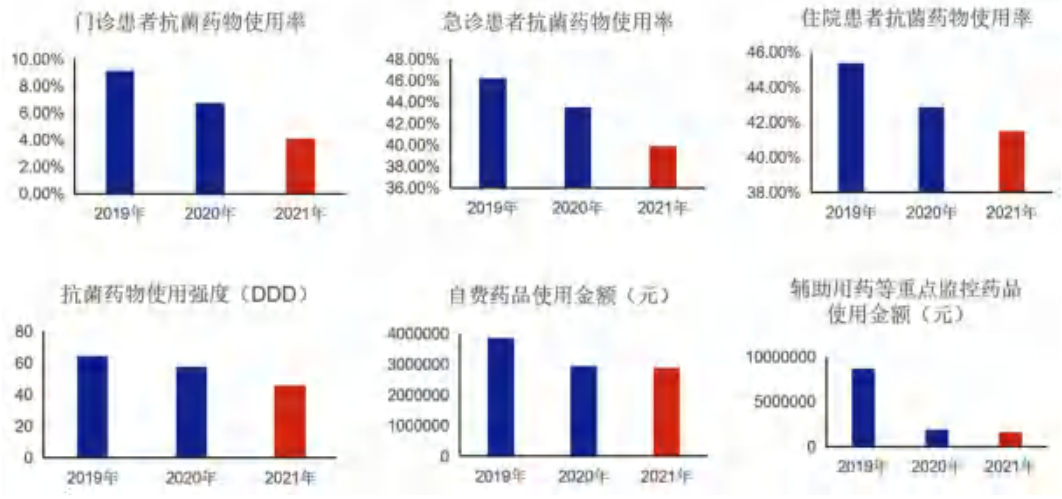


图 4　我院药品使用情况

2.2　慢病管理药学服务成果

我院药剂科于 2013 便与呼吸科协作开设哮喘医药联合门诊，临床药师协助呼吸科医师对哮喘患者进行管理，研究发现经过临床药师管理，6 个月后患者的用药依从性、装置使用评分、哮喘控制测试评分、最大呼气第一秒呼出的气量的容积占预计值的百分比（FEV1%）、呼气峰值流速（PEF）均显著提高（$P < 0.05$）[6]，之后与心内科、儿科、肿瘤科、内分泌科加强合作，陆续开展房颤医药联合门诊、哮喘慢病联合门诊（儿童）、癌痛药学服务门诊和科学减脂联合门诊。目前，慢病管理入组 300 余人，在研课题 2 项，成功创建 2021 年 PCCM 咳喘药学服务门诊（CWPC）项目区域示范中心。

2.3　患者关注度和满意度

笔者通过举办系列合理用药宣教活动，提供用药咨询服务，将药学服务惠及更多的慢病患者。同时我们向社区医院推广新型药学服务模式的方法和经验，实现分级药学服务。与社区合作，加大药学服务的影响力，为更多的慢病患者提供全面、精细的管理。在医院微信公众平台及团队自主研发建立的慢病管理微信服务平台持续发布合理用药推文数百篇，累计关注订阅人数 4000 余人。本课题组通过开展“线上＋线下”的药学服务，得到临床科室的广泛认可，使患者满意度不断提升。

3　讨论与思考

随着国家医改政策的深入，药学部门的角色也是不断的变化和发展，虽然我院药事管理工作取得一定成效，但仍需紧跟政策发展要求，不断地实践和探索。国家医疗保障局联合四部门在 2019 年 5 月 21 日发布《关于印发按疾病诊断相关分组付费国家试点城市名单的通知》[7]，意味着我国医保支付即将进入新阶段。按病种分值付费（DIP）是我国本土化的医保支付改革的探索，通过利用真实、全量的数据来客观还原病种全貌 [8]。2020 年 11 月 20 日，国家医疗保障局办公室发布《国家医疗保障局办公室关于印发国家医疗保障按病种分值付费（DIP）技术规范和 DIP 病种目录库（1.0 版）的通知》（医保办发 [2020]50 号），明确以地级市统筹区为单位开展试点工作 [9]。各部门相继出台了大量 DIP 相关政策。2021 年 6 月，国务院办公厅印发国办发 [2021]18 号文——《关于推动公立医院高质量发展的意见》，要求

推行以按病种付费为主的多元复合式医保支付方式[10]。DIP 付费时代的来临，公立医院改革面临新的压力与挑战，加强成本管理是发展的关键。医院药学部门需要助力医院加大对药品成本管控，进一步加强合理用药监管，发挥临床药师的作用。药剂科在原有工作基础上，需进一步探索 DIP 付费下的药学工作模式，可以在以下几个方面发挥积极作用。

3.1 参与临床用药目录制订

在遴选药物品种时，药师充分利用药物专业知识，落实基本药物、集采药品、国谈药品相关政策，参与临床用药目录制订。把最具有合理性、经济性的药品纳入到目录和临床路径中，严格把控药品准入，发挥 DIP 中的国家药品目录主导作用。

3.2 参与临床路径管理，确定用药方案

有相关研究表明，临床路径的开展对降低药占比、减少患者平均住院时间和人均住院药费有明显效果[11]。DIP 付费下，医院需要发挥专科专病特色，扩大高难度病种收治量，专科临床药师可以临床路径为切入点，遵循循证医学、指南和疾病诊疗规范，利用专业知识参与到临床路径用药的管理。严格掌控药物的适应证、用法用量，避免不良的药物相互作用，加强不良反应监测，协助临床医师制订个体化用药建议，提供最安全、有效的治疗方案。

3.3 利用药物经济学，协助医保控费管理

成本管控成为 DIP 付费的重要内容，需要进行病种合理控费，药耗降低。临床药师可以充分利用药物经济学的原理和知识，帮助患者选择更加经济合理的药物治疗方案。比如成本 - 效果分析的基本思想是探讨如何以最小的成本获得最好的效果，将其应用于药事管理，有助于提高药事管理的绩效和质量[12]。在合理用药前提下，进行经济学分析与评价，降低药品成本，减轻患者经济负担。

3.4 对超出支付标准的用药方案提出合理用药建议，加强用药监管

运用大数据 DIP 工具，可以精准地找到超出支付标准的病例和用药方案，临床药师有很大的发挥空间。临床药师可以协助临床各科室，对于超出支付标准的用药方案提出合理用药建议，通过开展合理用药点评，使用药监管更加精细化，帮助减少临床科室超出支付标准的病例和用药方案。与职能部门和其他科室联动管理合理用药工作，监测 DIP 盈亏情况，评估实施效果，并进行持续改进，改变以往给患者开具贵重药品、不必要的辅助药品等不合理医疗行为。

药学部门应及时抓住 DIP 付费政策推进中的机遇，构建合理的人员梯队和人才引进培养计划，充分发挥和展现药师价值，探索药学服务模式，发挥积极的作用，助力医院的可持续发展。

参考文献

[1] 杨谨成，王会凌，费小非，等 . “新医改” 背景下对医院药剂科改革的思考 [J]. 中国药业，2019，28（2）：93-95.

[2] 卢进，霍炎，张东梅，等 . 新医改形势下我院药学门诊服务新模式的持续改进 [J]. 药学实践杂志，2020，38（5）：469-475.

[3] 沈峻，鲁威 . 基于人工智能的区域处方前置审核系统建设与应用 [J]. 中国卫生信息管理杂志，2019，16（4）：493-496.

[4] 国家卫生健康委，教育部，财政部，等 . 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知 [EB/OL]. [2020-02-21]（2022-06-08）. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s3594/202002/789bc1df3d3f4c4997674e9d9013b927.

[5] 刘玉龙，孙燕，李璘，等 . 基层医疗机构医联体药事管理发展的现状与思考 [J]. 安徽医药，2020，24（9）：1884-1887.

[6] 李静，李静婷，姚伟珉，等 . 新型药学服务模式探索——某院开设医师 - 药师哮喘慢病管理联合门诊的现状及成效 [J]. 中南药学，2020，18（1）：158-162.

[7] 徐林丽 . DRGs 支付对医院运营的影响 [J]. 中国总会计师，2020（6）：90-91.

[8] 赵东辉 . 病种分值付费背景下医院提质控费管理实践 [J]. 中国医疗保险，2021（7）：73-75.

[9] 焦之铭，王芊予，冯占春，等 . 我国实施按病种分值付费方式（DIP）的 SWOT 分析 [J]. 卫生软科学，2021，35（9）：45-49.

[10] 冯芳龄，胡希家，叶向明，等 . DRG 与 DIP 助力公立医院高质量发展的政策内涵及改革实践——“DRG 及公立医院高质量发展研讨会” 综述 [J]. 卫生经济研究，2021，38（8）：35-38.

[11] 周勤，祁清华，沙良瑞，等 . 安徽省县级公立医院临床路径开展情况分析 [J]. 现代医院，2017，17（6）：790-793.

[12] 姚望 . 论新医改下医院药事管理工作重点与思路 [J]. 东方食疗与保健，2015（6）：262-262.

（收稿日期：2022-06-08；修回日期：2022-08-17）