中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 8 期（总第 211 期）　2023 年 8 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑：中南药学编辑委员会

地址：长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内

出版：中南药学杂志社

发行：湖南省报刊发行局

印刷：长沙建华印务有限公司

订阅：全国各地邮局

定价：每期 25.00 元，全年 300.00 元

邮编：410011

电话：（0731）82258487/84895602

传真：（0731）82258487

邮发代号：42-290

投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net

email：znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证：4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2023 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

研究论文

（1979）从 *HNRNPC* 基因角度探讨胰岛素抵抗发生机制 …… 张义，郑思琦，关子赫，等

（1985）异欧前胡素通过 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路抑制巨噬细胞 M1 极化发挥抗炎镇痛作用…… 王绍展，朱青霞，陈井霞，等

（1991）薰衣草挥发油香薰吸入的抗焦虑、抗抑郁作用及其机制 …… 周欣，宋宁，林景，等

（1998）基于 RBL-2H3 细胞的复杂基质生化药类过敏反应评估及体内外相关性评价…… 吴畅，杨奇涛，王瑶，等

（2004）单叶铁线莲总皂苷抑制滑膜细胞激活的作用及机制研究 …… 孙晓博，李伟，饶一淞，等

（2009）基于网络药理学和实验验证探讨黄芩射干汤治疗小儿肺炎的抗炎作用机制…… 李巧玲，彭静，周本宏，等

（2016）新型高效 g-C_3N_4 电化学发光材料的制备 … 韩智莉，王梦媛，李慧萧，等

（2022）基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析石生与树生铁皮石斛化学成分的差异 …… 贾小换，秦琳，陆安静，等

（2029）双黄连 pH 依赖型梯度释药微丸的研究 … 黄权华，田辰彬，徐乐乐，等

（2035）三叶青黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性分析 …… 李兆慧，师砚首，喻晓雁，等

（2041）不同压缩式雾化器对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果研究 …… 李逸飞，董亚男，王勇，等

（2046）帕瑞昔布钠鼻用温敏凝胶的制备及其体外性质研究 …… 黄晶，谷福根，吴春芝

（2053）阿里红总三萜酸的制备及其抗哮喘作用研究…… 许福春，杜茂波

（2059）苗药大蝎子草药材与标准汤剂指纹图谱对比及药材化学模式识别分析 …… 董贺，杨一，周芳丽，等

（2064）蟾毒灵抑制 TRPV1 通道及炎症反应缓解神经病理性疼痛的机制研究 …… 巴茜远，熊东林，肖礼祖，等

（2069）基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析桂附地黄丸的化学成分及入血成分…… 刘爽，戴宇滢，赵爽同，等

（2076）金银花近红外定性定量快检模型的建立 … 耿泽宇，左旭丽，潘秀珍，等

（2083）流通池法在泊沙康唑口服混悬液体外溶出研究中的应用 …… 刘德鹏，李倩，郝贵周，等

（2088）基于指纹图谱和网络药理学的山蜡梅叶颗粒质量标志物及含量测定研究 …… 关志宇，彭石根，张可欣，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　朱荣华　向大雄　刘　韶
刘文虎　刘艺平　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
徐华丽　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　覃　丽　傅　强　温金华
谢　诚　谢奕丹　睢大筠　肇丽梅
翟　青　黎　敏　颜　苗　潘卫三
魏高文

（2095）不同来源猪皮与重建人类表皮模型对面膜中咖啡因透过性比较研究
…… 魏国志，许飞飞，李和伟

（2101）HPLC-MS/MS 法快速测定儿童微量血浆中甲氨蝶呤和丙戊酸浓度
…… 姜锡娟，秦亚彬，张古英，等

（2106）LC-MS/MS 法测定人血浆中阿哌沙班的浓度
…… 田继堂，王娜，张红菱，等

（2111）基于溶出曲线的测定评价富马酸伏诺拉生片与原研制剂的一致性
…… 刘庆晓，伊磊，郝贵周，等

（2115）滁菊硒含量与根际土壤硒赋存形态的相关性分析
…… 李娜，喻格，胡丹，等

药品临床综合评价专题

（2120）药品临床综合评价中经济性指标设置思考… 胡嘉浩，李芬，刘宇晗，等

（2125）PCSK9 抑制剂用于降脂治疗的临床综合评价——基于多准则决策分析法
…… 刘宇晗，胡嘉浩，朱碧帆，等

综述

（2133）基于组蛋白去乙酰化酶 6 设计的多靶点抗阿尔茨海默病抑制剂研究进展
…… 曹端源，徐青霞，刘鹏，等

（2140）清肺排毒汤治疗新型冠状病毒感染的研究进展
…… 马思文，孟雅，车宏伟，等

（2146）不同给药途径的糖皮质激素治疗非感染性葡萄膜炎的研究进展
…… 李可，何海冰，冯颖淑，等

（2151）小柴胡汤对化疗的增效减毒作用研究进展…… 王航天，何娜，朱婧，等

药物分析与检验

（2158）复肝汤 HPLC 特征图谱及波长切换法同时测定 6 种成分的含量
…… 袁文钦，黄伟鹏，林雅丽，等

（2163）高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学评价上清丸的质量
…… 肖琳婧，秦学玲，龙琴，等

（2170）反相高效液相色谱法测定 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中光学异构体 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量 …… 杨欣茹，李铁健，王金迪，等

（2174）反相高效液相色谱法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的含量
…… 刘伟，毛柯，秦绍刚，等

（2178）HPLC-MS/MS 法测定注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类杂质
…… 邓鸣，曾庆花，梁秋霞，等

（2182）ICP-TOFMS 测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中铝元素的迁移
…… 陶俊钰，刘伟，毛柯，等

（2185）药用辅料聚乙二醇 6000 质量评价及质量研究
…… 郑金凤，谢莹莹，张悦，等

（2191）GC-MS/MS 法测定聚乙二醇 6000 中 4 种常用抗氧剂的含量
…… 赵勇，张悦，郑金凤，等

医院药学

（2195）127 例地高辛血药浓度监测结果及影响因素分析
…… 马丙锁，杨坤，晏子俊，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 弘
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　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。

（2201）替诺福韦在 HBV 感染患者哺乳期使用有效性及安全性的单中心回顾性队列研究…… 张川，卫蔷，高宝荣，等

（2206）毒性中药饮片在某院肺系疾病中的应用…… 李悦，陈树和，高越

（2211）超重 / 肥胖对感染性心内膜炎患者的万古霉素药动学参数及不良反应的影响…… 吴莉莉，夏晨，詹志坤，等

药事管理

（2215）医院新型供应链 SPD 管理模式在中心药房药品管理中的应用
…… 柴煜莹，孙怡，唐婕

（2219）药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架构建
…… 唐密，杨燕，陈珉惺，等

（2224）药用辅料二丁基羟基甲苯吸收系数测定的能力验证研究
…… 王珏，许凯，杨洋，等

（2228）基于人工智能的肿瘤患者免疫相关不良反应管理软件的应用及效果评价
…… 孙宝，罗芝英，傅媛媛，等

药品不良反应信号监测专题

（2232）基于美国 FAERS 数据库对免疫检查点抑制剂致肌炎、心肌炎和重症肌无力重叠综合征的分析 …… 吴汀溪，张杨，石延枫，等

（2237）白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇不良反应真实世界数据的比较
…… 周保柱，陈慧慧，李娜，等

药学教育

（2242）BOPPPS 教学模式在《临床药物治疗学》教学中的设计初探
…… 龚慧，颜苗，张毕奎，等

临床药师在临床

（2246）临床药师参与 1 例纳武利尤单抗致严重皮疹的诊治实践
…… 王旦旦，郑萍，刘世霆，等

药品不良反应

（2250）无敌丹胶囊致剥脱性皮炎 1 例及治疗体会 … 崔雪萍，宁德琼，彭红艳，等

（2252）卡瑞利珠单抗致致命性急性肝衰竭 1 例并文献分析 … 邢晓敏，韩冰，王凯

（2256）儿童患者过量口服拉考沙胺出现晕厥、癫痫发作 1 例
…… 俎亚杰，韩耀巍，李硕，等

（2258）1 例长期口服屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）致下肢深静脉血栓形成的病例分析
…… 曹莹，韩旭，陈飞，等

（2261）矛头蝮蛇血凝酶致双相过敏反应 1 例…… 谌介秀，祁蕙，秦博，等

（2263）美罗培南、替考拉宁和左氧氟沙星联用致 Stevens-Johnson 综合征 1 例
…… 邢百倩，李忠东

（2267）奈玛特韦 / 利托那韦片致老年新型冠状病毒感染患者癫痫 2 例
…… 金旻，汪硕闻，范国荣，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*290*zh*P*25.0*57*2023-8

本期责任编辑：邬志娟，陆窈窈，彭金飞，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 8 August 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

(1979) Mechanism of IR from the perspective of *HNRNPC* gene
…… *ZHANG Yi, ZHENG Si-qi, GUAN Zi-he, et al*

(1985) Anti-inflammation and analgesic effect of isoimperatorin on the polarization of macrophage M1 via NF-κB and JAK1/STAT1 signaling pathway
…… *WANG Shao-zhan, ZHU Qing-xia, CHEN Jing-xia, et al*

(1991) Anxiolytic and antidepressant effect of lavender volatile oil inhalation and related mechanism …… *ZHOU Xin, SONG Ning, LIN Jing, et al*

(1998) Evaluation of anaphylactoid reactions induced by complex matrix biochemical drugs based on RBL-2H3 cells and its in vivo correlation
…… *WU Chang, YANG Qi-tao, WANG Yao, et al*

(2004) Effect of total saponins from *Clematis henryi* Oliv. on the activation of synovial cells and related mechanism
…… *SUN Xiao-bo, LI Wei, RAO Yi-song, et al*

(2009) Effect and anti-inflammation mechanism of Huangqin Shegan decoction for pediatric pneumonia based on network pharmacology and experimental studies…… *LI Qiao-ling, PENG Jing, ZHOU Ben-hong, et al*

(2016) Preparation of novel high-efficiency g-C_3N_4 electrochemiluminescent materials …… *HAN Zhi-li, WANG Meng-yuan, LI Hui-xiao, et al*

(2022) Difference in chemical compositions of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees based on UPLC-Q-TOF-MS
…… *JIA Xiao-huan, QIN Lin, LU An-jing, et al*

(2029) Preparation of Shuanghuanglian pH-dependent gradient-release pellets
…… *HUANG Quan-hua, TIAN Chen-bin, XU Le-le, et al*

(2035) Optimization of extraction of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* and its antioxidant activities
…… *LI Zhao-hui, SHi Yan-shou, YU Xiao-yan, et al*

(2041) Nebulization effect of different compressed air nebulizers on the inhalation of ambroxol hydrochloride solution
……*LI Yi-fei, DONG Ya-nan, WANG Yong, et al*

(2046) Preparation of parecoxib sodium thermosensitive nasal gel and its in vitro properties …… *HUANG Jing, GU Fu-gen, WU Chun-zhi*

(2053) Preparation of total triterpene acid and its anti-asthma effect
……*XU Fu-chun, DU Mao-bo*

(2059) Fingerprints of Miao medicine *Girardinia diversifolia* and standard decoction and chemical pattern recognition of medicinal materials
…… *DONG He, YANG Yi, ZHOU Fang-li, et al*

(2064) Mechanism of bufalin inhibiting TRPV1 channel and inflammation in relieving neuropathic pain
…… *BA Xi-yuan, XIONG Dong-lin, XIAO Li-zu, 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.

(2069) Chemical constituents of Guifu Dihuang pills and absorbed components in the plasma based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technology ……*LIU Shuang, DAI Yu-ying, ZHAO Shuang-tong, et al*

(2076) Establishment of qualitative and quantitative near infrared rapid detection model for *Lonicerae Japonicae* flos …… *GENG Ze-yu, ZUO Xu-li, PAN Xiu-zhen, et al*

(2083) Application of flow-through cell apparatus in the in vitro dissolution of posaconazole oral suspension …… *LIU De-peng, LI Qian, HAO Gui-zhou, et al*

(2088) Quality markers and content determination of Shanla Meiye granules based on fingerprints and network pharmacology ……*GUAN Zhi-yu, PENG Shi-gen, ZHANG Ke-xin, et al*

(2095) Transdermal permeation of caffeine in facial masks of miniature pig skin from various sources and reconstructed human epidermis model …… *WEI Guo-zhi, XU Fei-fei, LI He-wei*

(2101) Rapid determination of methotrexate and valproate in trace plasma from pediatric patients by HPLC-MS/MS …… *JIANG Xi-juan, QIN Ya-bin, ZHANG Gu-ying, et al*

(2106) Determination of apixaban concentration in human plasma by LC-MS/MS …… *TIAN Ji-tang, WANG Na, ZHANG Hong-ling, et al*

(2111) Consistency of in vitro dissolution between vonoprazan fumarate tablets and original preparation …… *LIU Qing-xiao, YI Lei, HAO Gui-zhou, et al*

(2115) Correlation between the selenium content in Chuju and the occurrence forms of selenium in rhizosphere soil…… *LI Na, YU Ge, HU Dan, et al*

(2120) Economic indexes in clinical comprehensive evaluation of drugs …… *HU Jia-hao, LI Fen, LIU Yu-han, et al*

(2125) Clinical comprehensive evaluation of PCSK9 inhibitors for lipid-lowering therapy-based on multi-criteria decision analysis …… *LIU Yu-han, HU Jia-hao, ZHU Bi-fan, et al*

(2133) Research progress in multi-target anti-Alzheimer's disease inhibitors based on histone deacetylase 6 …… *CAO Duan-yuan, XU Qing-Xia, LIU Peng, et al*

(2140) Research progress in the treatment of COVID-19 by Qingfei Paidu decoction ……*MA Si-wen, MENG Ya, CHE Hong-wei, et al*

(2146) Research progress in different administration routes of corticosteroids for noninfectious uveitis …… *LI Ke, HE Hai-bing, FENG Ying-shu, et al*

(2151) Research progress in synergismtic effect of Xiaochaihu decoction on chemotherapy and toxicity reducation …… *WANG Hang-tian, HE Na, ZHU Jing, et al*

(2158) Characteristic fingerprints and simultaneous determination of 6 constituents in Fugan decoction by HPLC wavelength switching method …… *YUAN Wen-qin, HUANG Wei-peng, LIN Ya-li, et al*

(2163) Quality evaluation of Shangqing pills by HPLC coupled with chemometrics …… *XIAO Lin-jing, QIN Xue-lin, LONG Qin, et al*

(2170) Determination of optical isomer Fmoc-*D*-His (Trt)-OH in Fmoc-*L*-His (Trt)-OH by RP-HPLC …… *YANG Xin-ru, LI Tie-jian, WANG Jin-di, et al*

(2174) Determination of gluconate acid radical in calcium gluconate oral solution by RP-HPLC …… *LIU Wei, MAO Ke, QIN Shao-gang, et al*

(2178) Determination of 7 *N*-nitrosamine impurities in cefmenoxime hydrochloride for injection by HPLC-MS/MS ····· *DENG Ming, ZENG Qing-hua, LIANG Qiu-xia, et al*

(2182) Determination of aluminum migration in calcium and zinc gluconate oral solution by ICP-TOFMS ····· *TAO Jun-yu, LIU Wei, MAO Ke, et al*

(2186) Quality evaluation and quality research of polyethylene glycol 6000 ····· *ZHENG Jin-feng, XIE Ying-ying, ZHANG Yue, et al*

(2191) Determination of 4 antioxidants in polyethylene glycol 6000 by GC-MS/MS ····· *ZHAO Yong, ZHANG Yue, ZHENG Jin-feng, et al*

(2195) Analysis of serum digoxin concentration monitoring results and influencing factors in 127 cases ····· *MA Bing-suo, YANG Kun, YAN Zi-jun, et al*

(2201) Efficacy and safety of tenofovir in the parturient with HBV infection during breast-feeding: a single-center retrospective cohort study ····· *ZHANG Chuan, WEI Qiang, GAO Bao-rong, et al*

(2206) Toxic Chinese herbal pieces for pulmonary diseases in our hospital ····· *LI Yue, CHEN Shu-he, GAO Yue*

(2211) Effect of overweight/obesity on the pharmacokinetic parameters and adverse reactions of vancomycin in patients with infective endocarditis ····· *WU Li-li, XIA Chen, ZHAN Zhi-kun, et al*

(2215) New supply-processing-distribution management model of hospital supply chain in the management of central pharmacy ····· *CHAI Yu-ying, SUN Yi, TANG Jie*

(2219) Multi-criteria decision-making framework for the selection of drug supply enterprises in centralized volume-based procurement ····· *TANG Mi, YANG Yan, CHEN Min-xing, et al*

(2224) Proficiency test study on the determination of absorption coefficient of pharmaceutical excipient dibutylhydroxytoluene ····· *WANG Jue, XU Kai, YANG Yang, et al*

(2228) Artificial intelligence-based software in the treatment and management of tumor patients with immune-related adverse reactions ····· *SUN Bao, LUO Zhi-ying, FU Yuan-yuan, et al*

(2232) Immune checkpoint inhibitor-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis overlap syndrome based on the US FDA adverse event reporting system ····· *WU Ting-xi, ZHANG Yang, SHI Yan-feng, et al*

(2238) Real word data of adverse drug reactions induced by albumin-bound paclitaxel or ordinary paclitaxel ····· *ZHOU Bao-zhu, CHEN Hui-hui, LI Na, et al*

(2242) Design and effect of BOPPPS model in the teaching of *Clinical Pharmacotherapeutics* ····· *GONG Hui, YAN Miao, ZHANG Bi-kui, et al*

研究论文

从 *HNRNPC* 基因角度探讨胰岛素抵抗发生机制

张义，郑思琦，关子赫，葛鹏玲*（黑龙江中医药大学 基础医学院，哈尔滨 150000）

摘要：目的 以 *HNRNPC* 基因为研究对象，在细胞水平上，探讨 *HNRNPC* 基因、CaSR、PI3K/Akt 信号通路与胰岛素抵抗（IR）之间的关系。**方法** 建立人肝癌 HepG2 细胞 IR 模型，采用基因沉默 / 过表达技术干扰 IR 细胞及正常 HepG2 细胞中 *HNRNPC* 的表达。利用 qRT-PCR、Western blot 技术检测 *HNRNPC* 表达水平，以检测沉默及过表达效率；通过 Western blot 技术检测各组细胞内 CaSR 蛋白表达量，同时检测 IR 相关信号通路 PI3K/Akt 的磷酸化水平；通过 GOD-POD 实验检测各组细胞葡萄糖消耗量。**结果** IR-HepG2 组 *HNRNPC* 基因及蛋白表达升高，CaSR 蛋白表达降低，PI3K/Akt 信号通路被抑制，细胞葡萄糖消耗量降低；成功沉默及过表达 *HNRNPC* 后，IR-*HNRNPC*-siRNA 组 CaSR 蛋白表达升高，PI3K/Akt 信号通路抑制状态有所改善，细胞葡萄糖消耗量提高；HepG2-*HNRNPC*-OE 组 CaSR 蛋白表达降低，PI3K/Akt 信号通路被抑制，细胞葡萄糖消耗量降低。**结论** *HNRNPC* 基因的高表达可下调 CaSR 表达，从而降低 PI3K/Akt 信号通路活性，这可能是 IR 的发生机制之一。

关键词：胰岛素抵抗；*HNRNPC* 基因；CaSR 蛋白；PI3K/Akt 信号通路

中图分类号：R587.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-1979-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.001

Mechanism of IR from the perspective of *HNRNPC* gene

ZHANG Yi, ZHENG Si-qi, GUAN Zi-he, GE Peng-ling* (*College of Basic Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin* 150000)

Abstract: Objective To explore the relationship between *HNRNPC*, CaSR, PI3K/Akt signaling pathways and insulin resistance (IR) from the perspective of *HNRNPC* at the cellular level. **Methods** The IR model was established based on human liver cancer HepG2 cells, and gene silencing/overexpression techniques were used to interfere with the expression of *HNRNPC* in IR cells and normal HepG2 cells. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression level of *HNRNPC* to determine the silencing and overexpression efficiency. Western blot was used to detect the expression level of CaSR protein in cells, as well as the phosphorylation level of PI3K/Akt, an IR related signaling pathway. GOD-POD experiment was used to detect the glucose consumption of cells in each group. **Results** In the IR-HepG2 group, *HNRNPC* gene and protein expressions were increased, CaSR protein expression was reduced, PI3K/Akt signaling pathway was inhibited, and cell glucose consumption was reduced. After the successful silencing and overexpression of *HNRNPC*, the expression of CaSR protein in the IR-*HNRNPC*-siRNA group was increased, the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway was improved, and the glucose consumption of cells was increased. In the HepG2-*HNRNPC*-OE group, the expression of CaSR protein was reduced, the PI3K/Akt signaling pathway was inhibited, and the cell glucose consumption was reduced. **Conclusion** The expression of CaSR can be downregulated by high

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81273650）；国家“重大新药创制”科技重大专项（No.2012ZX09103201-018）；省部共建教育部重点实验室哈尔滨医科大学开放基金项目（No.KF201619）；哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目（No.2016RAXXJ100）。

作者简介：张义，男，博士研究生，主要从事中药防治 2 型糖尿病的现代药理学方面的研究，email：1291575791@qq.com *通信作者：葛鹏玲，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药防治 2 型糖尿病的现代药理学方面的研究，email：penglingge@126.com

expression of the *HNRNPC* gene, thereby reducing the activity of the PI3K/Akt signaling pathway, a possible mechanism of IR.

Key words: insulin resistance; *HNRNPC* gene; CaSR protein; PI3K/Akt signaling pathway

糖尿病是全球公共卫生面临的主要非传染性疾病之一[1]。2 型糖尿病（T2DM）占糖尿病人数的 90% ～ 95%，主要发病机制为胰岛素抵抗（IR）[2-3]。

IR 发生在 T2DM 的前期并贯穿疾病发展的全过程，当胰岛素的靶组织对常规剂量胰岛素的反应低于应有的正常生物学效应时，则认为发生 IR[4]。研究发现，PI3K/Akt 信号通路是胰岛素信号传导的重要途径之一，蛋白激酶 B（Akt）位于这一信号传导通路的中心环节，其主要作用是负责该通路中生物信息的传导[5]。钙敏感受体（CaSR）是一种 C 类同源二聚体 G 蛋白偶联受体，该受体不仅在甲状旁腺和肾细胞表面高度表达，同时也在其他组织如胰岛 α 和 β 细胞中广泛表达，并且已被证明参与葡萄糖代谢[6]。CaSR 与 PI3K/Akt 信号通路关系密切，下调 CaSR 的表达可降低 Akt 磷酸化水平，参与 IR 的发生[7-8]。

本课题组前期通过基因芯片技术，在 IR 模型 db/db 小鼠的肝脏组织中，筛选出 25 个差异表达的基因[9]。其中异质性胞核核糖核蛋白 C（*HNRNPC*）基因差异表达显著。研究发现，*HNRNPC* 的表达降低，会使神经酰胺含量下降从而改善 IR。

关于 *HNRNPC* 是否与 CaSR 及 PI3K/Akt 信号通路有关尚未见报道。我们推测 *HNRNPC* 可能通过影响 CaSR 的表达进而影响 PI3K/Akt 信号通路参与 IR，根据这一猜想，本课题组通过体外实验，在细胞水平上探究 *HNRNPC* 可能参与 IR 的级联通路，为 IR 的防治提供新靶点、新思路。

1 材料

1.1 HepG2 细胞

HepG2 人肝癌细胞株（FH0067），购于上海中医药大学，保存于黑龙江中医药大学方剂学重点实验室。

1.2 试药

胎牛血清（FBS，批号：10100147）、胰酶（批号：25200072）、DMEM 培养基（批号：11965092）、青霉素 - 链霉素混合液（批号：15640055，美国 GIBCO 公司）；胰岛素（美国 Sigma 公司，批号：I2643）；磷酸盐缓冲液（PBS，康宁试剂有限公司，批号：R20854）；总 RNA 提取液（Trizol 试剂）（美国 Invitrogen 公司，批号：A7051）；蛋白裂解液（碧云天公司，批号：R0278）；4× 蛋白上样缓冲液（碧云天公司，批号：P0015）；蛋白预染 Marker（美国 Thermo Fisher 公司，批号：D0151FT）；*HNRNPC* 抗体、CaSR 抗体、PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体（美国 CST 公司）；细胞冻存液（中国新赛美生物科技有限公司，批号：BI-2757）；GOD-POD 检测试剂盒（中国北京雷根生物有限公司，批号：TC0711）。

1.3 仪器

超净工作台（中国泸净净化设备厂）；生物安全柜 SCB-1360（中国北京东联仪器制造公司）；电泳仪、半干转膜仪（美国 BIO-RAD 公司）；紫外分光光度计（中国岛津有限公司）；摇床、ZQ-2008 恒温水浴（中国江苏其林贝尔有限公司）；恒温 CO_2 培养箱、台式高速离心机、移液枪（美国 Thermo Fisher 公司）；恒温干燥箱（中国上海一恒科学仪器公司）；分析天平（德国 Sartorius）；酶标仪、IX70 倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；5810R 离心机（德国 Eppendorf 公司）；milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）。

2 方法

2.1 HepG2 细胞的培养

从液氮罐中取出细胞，迅速放入 37 ℃水浴锅中快速摇晃复苏。复苏后的细胞马上移入 15 mL 离心管中，1000 r • min $^{-1}$ 离心 3 min，弃上清液。细胞沉淀中加入 2 mL DMEM 培养基（含 10%FBS 及 1% 双抗），吹匀细胞，移入培养瓶，加培养液至 5 mL，以 37 ℃、5%CO_2 的条件培养备用。

2.2 IR 细胞模型的建立

向配制好的高糖培养基中加入 1×10^{-7} mol•mL $^{-1}$ 胰岛素，混匀，培养 HepG2 细胞 48 h，GOD-POD 法检测各组细胞中葡萄糖的含量，并计算葡萄糖消耗量，模型组细胞葡萄糖消耗量明显低于空白组，则 IR-HepG2 细胞模型复制成功。细胞模型的稳定性本课题组前期已验证。

2.3 *HNRNPC* 表达抑制序列及过表达质粒的合成与转染

2.3.1 *HNRNPC* 表达抑制序列的合成与转染　由中国安徽通用生物系统有限公司针对人 *HNRNPC* 基因，根据 RNAi 序列设计原则合成特异性

HNRNPC 表达抑制序列（*HNRNPC*-siRNA），以腺病毒包裹，冷冻保存，同时制备未包裹 siRNA 质粒的腺病毒（siRNA-NC）。

2.3.2　*HNRNPC* 过表达质粒的合成与转染　由中国安徽通用生物系统有限公司针对人 *HNRNPC* 基因，根据人工构建的方式在目的基因上游加入调控元件，合成特异性 *HNRNPC* 基因过表达质粒（*HNRNPC*-OE），以腺病毒包裹，冷冻保存，同时制备未包裹过表达质粒的腺病毒（NC）。

2.4　qRT-PCR 法检测基因表达

倾倒培养液，用预冷的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次。用 Trizol 法抽提细胞总 RNA，经逆转录合成互补脱氧核糖核酸（cDNA），以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增（见表 1），增加 cDNA 样本 2.0 μL，2×Greenstar Master Mix 12.5 μL，引物 F-primer、引物 R-primer 各 1.0 μL，DEPC 8.5 μL，共 25.0 μL。将溶液混合并按照 95 ℃ 10 min，95 ℃ 10 s 和 47 ℃ 30 s 的标准进行 PCR 反应，40 个周期。

表 1　PCR 引物序列

Tab 1　PCR primer sequence

基因	正向引物 [5'-3']	反向引物 [5'-3']
HnRNPC	TTCCCGTGTATTCATTGG	TACTGGACAAAGGCAAAG
GAPDH	ATCACTGCCACCCAGAAG	TCCACGACGGACACATTG

2.5　Western blot 法检测蛋白表达

倾倒培养液，用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次。洗涤后细胞加入 100 μL 的细胞裂解液，于冰上裂解 30 min，4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 15 min。提取出的蛋白，经凝胶电泳分离后，将蛋白质转至 PVDF 膜上。于 37 ℃的 5% 脱脂牛奶封闭液中存储 1 h 后，用 TBST 洗 PVDF 膜，孵育一抗，即 *HNRNPC* 抗体、CaSR 抗体、PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、Akt 抗体及 p-Akt 抗体用 TBST 稀释，将 PVDF 膜放入一抗中 4 ℃下过夜。TBST 洗涤后，孵育二抗，37 ℃下孵育 1 h，用 TBST 洗涤 PVDF 膜。使用凝胶成像系统曝光并拍照，以 GAPDH 为内参，目的基因与 GAPDH 的吸光度比值来表示组织中蛋白的相对蛋白含量。

2.6　葡萄糖量的检测

利用 GOD-POD 比色法测定细胞内的葡萄糖量。按试剂盒说明书操作。用酶标仪测定 505 nm 处的吸光度（*OD* 值），以空白孔调零，读取标准组、样品组的 *OD* 值，根据标准组绘制标准曲线，根据标准曲线计算样品组的样品浓度，再根据葡萄糖消耗量公式计算葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量＝（测定 *OD* 值－空白 *OD* 值）/（标准 *OD* 值－空白 *OD* 值）× 稀释倍数。

2.7　统计学方法

采用 SPSS 22.0 以及 Graphpad 统计分析软件包进行处理，组间使用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述，两组间指标比较采用 *t* 检验，多组间指标比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　沉默 / 过表达效率

3.1.1　沉默 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞中 *HNRNPC* 表达的影响　如图 1 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组 *HNRNPC* 基因表达升高（$P < 0.05$），表明 IR 发生时细胞内 *HNRNPC* 基因表达上调；与 IR-HepG2 组比较，IR-*HNRNPC*-siRNA 组 *HNRNPC* 基因表达降低（$P < 0.05$）；而 IR-siRNA-NC 组无明显变化（$P > 0.05$），说明空载腺病毒对实验结果无影响。

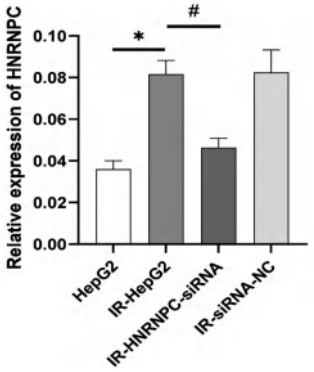

图 1　沉默 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞内 *HNRNPC* 基因表达的影响（$^{*}P < 0.05$；$^{\#}P < 0.05$）

Fig 1　Effect of silencing *HNRNPC* on the expression of *HNRNPC* gene in HepG2 cells（$^{*}P < 0.05$；$^{\#}P < 0.05$）

如图 2 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组 *HNRNPC* 蛋白表达升高（$P < 0.01$），表明 IR 发生时细胞内 *HNRNPC* 蛋白表达上调；与 IR-HepG2 组比较，IR-*HNRNPC*-siRNA 组 *HNRNPC* 蛋白表达降低（$P < 0.01$），而 IR-siRNA-NC 组无明显变化。综上，已成功沉默 IR-HepG2 细胞中 *HNRNPC*。

3.1.2　过表达 *HNRNPC* 对 IR 细胞中 *HNRNPC* 表达的影响　如图 3 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组 *HNRNPC* 基因表达升高（$P < 0.01$），HepG2-*HNRNPC*-OE 组 *HNRNPC* 基因表达升高（$P < 0.05$），而 HepG2-NC 组与 HepG2 组比较无明显变化。

如图 4 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组细胞中 *HNRNPC* 蛋白表达升高（$P < 0.01$），

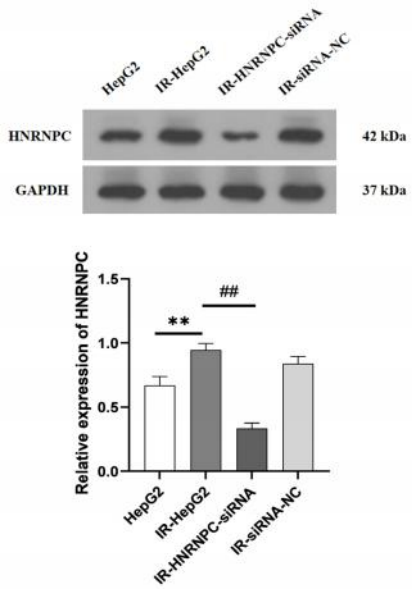

图 2 沉默 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞内 HNRNPC 蛋白表达的影响（$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 2 Effect of silencing *HNRNPC* on the expression of HNRNPC protein in HepG2 cells ($^{**}P < 0.01$; $^{\#\#}P < 0.01$)

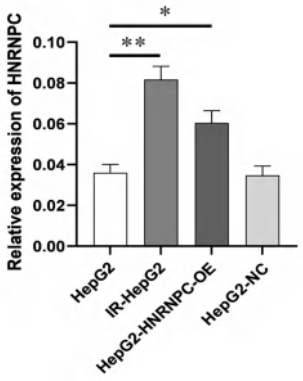

图 3 过表达 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞内 *HNRNPC* 基因表达的影响（$^{*}P < 0.05$；$^{**}P < 0.01$）

Fig 3 Effect of overexpression *HNRNPC* on the expression of *HNRNPC* gene in HepG2 cells ($^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$)

HNRNPC-OE 组 *HNRNPC* 蛋白表达升高（$P < 0.01$），而 HepG2-NC 组与 HepG2 组比较无明显变化。综上，已成功过表达 HepG2 细胞中 *HNRNPC*。

3.2 沉默 / 过表达 *HNRNPC* 对 CaSR、PI3K、Akt 蛋白的影响

3.2.1 沉默 *HNRNPC* 对 CaSR、PI3K、Akt 蛋白活性的影响 如图 5 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组 CaSR 蛋白表达降低（$P < 0.01$），PI3K、Akt 蛋白表达及磷酸化水平均降低（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；与 IR-HepG2 组比较，IR-*HNRNPC*-siRNA 组 CaSR 蛋白表达升高（$P < 0.01$），PI3K、Akt 蛋白表达及磷酸化水平均升高（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；IR-siRNA-NC 组 CaSR 蛋白表达，PI3K、Akt 蛋白表达及磷酸化水平均无明显变化。以上结果说明：

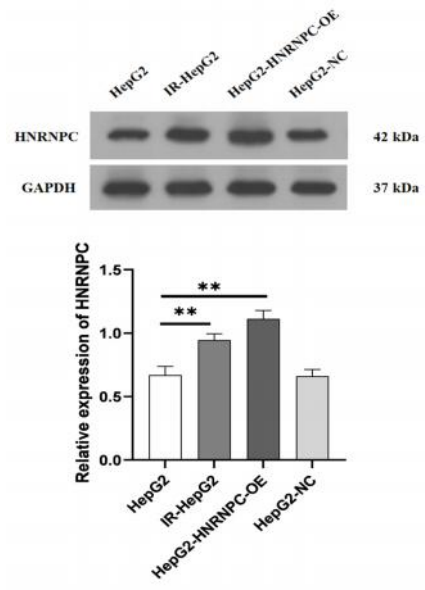

图 4 过表达 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞内 HNRNPC 蛋白表达的影响（$^{**}P < 0.01$）

Fig 4 Effect of overexpression of *HNRNPC* on the expression of HNRNPC protein in HepG2 cells ($^{**}P < 0.01$)

HNRNPC 下调可提高 CaSR 蛋白表达，进而提高 PI3K/Akt 信号通路活性。

3.2.2 过表达 *HNRNPC* 对 CaSR、PI3K、Akt 蛋白活性的影响 如图 6 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组、HepG2-*HNRNPC*-OE 组 CaSR 蛋白表达降低（$P < 0.01$），PI3K、Akt 蛋白表达及磷酸化水平均降低（$P < 0.05$）；HepG2-NC 组 CaSR 蛋白表达，PI3K、Akt 及磷酸化水平均无明显变化。说明 *HNRNPC* 上调可降低 CaSR 蛋白表达，进而抑制 PI3K/Akt 信号通路活性。

3.3 沉默 / 过表达 *HNRNPC* 对葡萄糖消耗量的影响

3.3.1 沉默 *HNRNPC* 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 如图 7 所示，与 HepG2 组比较，IR-HepG2 组细胞葡萄糖消耗量明显降低（$P < 0.01$）；与 IR-HepG2 组比较，IR-*HNRNPC*-siRNA 组细胞葡萄糖消耗量有所升高（$P < 0.01$）。IR 细胞是在高浓度胰岛素的条件下建立，当抑制 *HNRNPC* 时葡萄糖消耗量升高，说明细胞对胰岛素敏感性提高，在一定程度上改善了 IR；IR-siRNA-NC 组细胞葡萄糖消耗量与 IR-HepG2 组比较无明显变化。以上结果说明下调 *HNRNPC* 的表达可在一定程度上改善细胞 IR。

3.3.2 过表达 *HNRNPC* 对 IR 细胞葡萄糖消耗量的影响 如图 8 所示，与 HepG2 组细胞比较，HepG2-*HNRNPC*-OE 组细胞葡萄糖消耗量降低（$P < 0.01$），HepG2-NC 组细胞葡萄糖消耗量无明显变化。以上实验结果说明：上调 *HNRNPC* 的表达可降低细胞胰岛素敏感性。

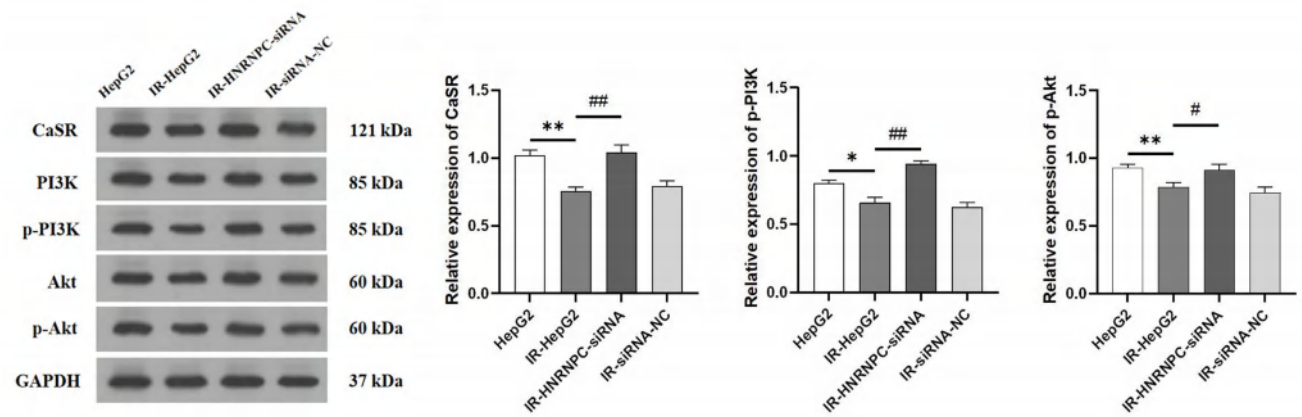

图 5　沉默 *HNRNPC* 对细胞内 CaSR、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 5　Effect of silencing *HNRNPC* on the expression of intracellular CaSR，p-PI3K，and p-Akt proteins（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

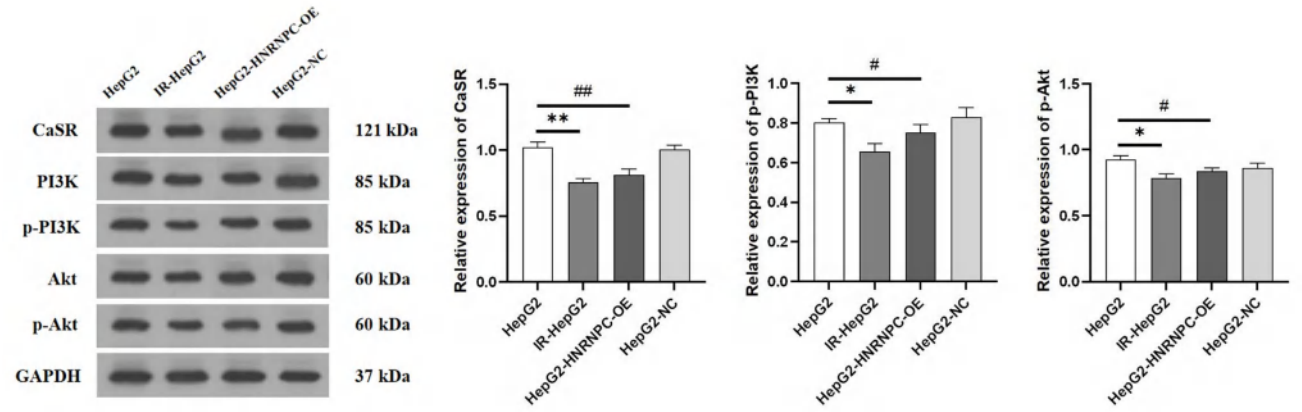

图 6　过表达 *HNRNPC* 对细胞内 CaSR、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 6　Effect of overexpression *HNRNPC* on the expression of intracellular CaSR，p-PI3K，and p-Akt proteins（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

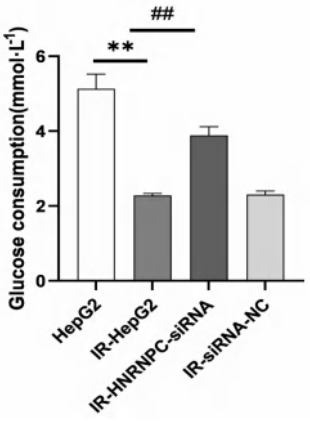

图 7　沉默 *HNRNPC* 对细胞葡萄糖消耗量的影响（$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 7　Effect of silencing *HNRNPC* on the cell glucose consumption（$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

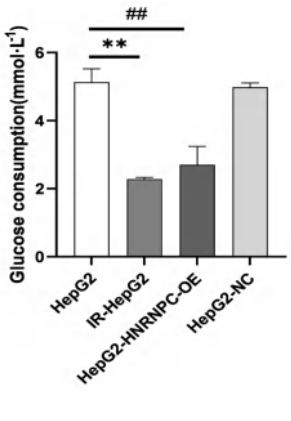

图 8　过表达 *HNRNPC* 对细胞葡萄糖消耗量的影响（$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 8　Effect of overexpression of *HNRNPC* on cell glucose consumption（$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

4　讨论

T2DM 发病率在全球范围内呈现出逐年增高的流行态势[10]。IR 是 T2DM 的主要发病机制，其特征是组织对循环胰岛素水平的反应降低，导致葡萄糖摄取和氧化能力降低、糖原合成减少、抑制脂质氧化的能力降低[11-12]。本实验以 HepG2 细胞复制 IR 细胞模型，通过基因沉默及过表达技术对细胞转染 *HNRNPC*-siRNA 及 *HNRNPC*-

OE，以 *HNRNPC* 为研究对象，在细胞水平上，探讨 *HNRNPC*、CaSR、PI3K/Akt 信号通路与 IR 之间的关系。

HNRNPC 基因是本课题组采用基因芯片技术于 IR 模型鼠 db/db 小鼠的肝脏组织中筛选出的差异表达倍数较大的基因。李佳欣等[13]通过体外实验证实了 *HNRNPC* 的表达增加可降低 Akt 活性，参与 IR。研究表明，在高脂饮食诱导的 IR 大鼠肝脏中，CaSR 的表达下调，IR 相关信号通路 PI3K/Akt 中的 Akt 磷酸化水平降低[14]。阚玉娜等[15]同样发现，在 IR 大鼠模型中，CaSR 表达下调，PI3K/Akt 信号通路的活性被抑制。张宇驰等[16]研究发现，通过药物治疗后的 IR 大鼠 CaSR 蛋白表达及 Akt 磷酸化水平明显升高。为了探究 *HNRNPC* 与 CaSR 是否存在某种联系，本研究通过利用基因沉默及过表达技术，人工合成 *HNRNPC* 基因抑制序列（*HNRNPC*-siRNA）及 *HNRNPC* 过表达质粒（*HNRNPC*-OE），特异性干扰正常 HepG2 细胞及 IR 细胞中 *HNRNPC* 基因的表达。沉默及过表达实验成功后，检测 CaSR 的表达及 PI3K/Akt 信号通路活性，并检测细胞葡萄糖消耗量，以判断 IR 发生情况。结果显示，当在 HepG2 细胞中过表达 *HNRNPC* 基因时，引起 CaSR 蛋白表达下降，PI3K 及 Akt 蛋白磷酸化水平降低，PI3K/Akt 信号通路被抑制，进而引起 IR。而在 IR 细胞中抑制 *HNRNPC* 基因后，CaSR 蛋白表达升高，PI3K 及 Akt 蛋白磷酸化水平升高，PI3K/Akt 信号通路抑制状态有所改善。

5 结论

本实验通过对 IR 细胞转染 *HNRNPC*-siRNA 以及对正常 HepG2 细胞转染 *HNRNPC*-OE 后两种细胞 *HNRNPC* 基因及蛋白的表达、CaSR 蛋白及 IR 相关通路 PI3K/Akt 的活性及细胞中葡萄糖消耗量的比较，来探究 *HNRNPC*、CaSR、PI3K/Akt 信号通路与 IR 之间的关联。结合实验结果提示：*HNRNPC* 表达上调，可抑制 CaSR 的表达，进而降低 PI3K/Akt 信号通路活性，引起 IR，这可能是 IR 的发生机制之一，但此结论尚需在后续实验中通过沉默 CaSR 进一步验证。

参考文献

[1] Anastassios GP，Tetsuya K，Rolf J，et al. Vitamin D and risk for type 2 diabetes in people with prediabetes：a systematic review and meta-analysis of individual participant data from 3 randomized clinical trials [J]. Ann Intern Med，2023，176（3）：355-363.

[2] Christophe DB，Clifford B，Carol W，et al. Tirzepatide for the treatment of adults with type 2 diabetes：an endocrine perspective [J]. Diabetes Obes Metab，2023，25（1）：3-17.

[3] Petter B，Lily CC，Melanie CG，et al. Youth-onset type 2 diabetes mellitus：an urgent challenge [J]. Nat Rev Nephrol，2023，19（3）：168-184.

[4] Meiyuan D，Huiling C，Song W，et al. The neuronal and non-neuronal pathways of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor on body weight-loss and insulin resistance [J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2023，16：425-435.

[5] Ye WL，Young HP. Monascus-fermented grain vinegar enhances glucose homeostasis through the IRS-1/PI3K/Akt and AMPK signaling pathways in HepG2 cell and db/db mice [J]. Food Sci Biotechnol，2022，31（12）：1583-1591.

[6] Tamara Z，Hannelore D. Intestinal nutrient sensing and blood glucose control [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care，2015，18（4）：381-388.

[7] 张义，于鹏洋，郑思琦，等 . 基于 CaSR 表达及 AKT 磷酸化水平的花旗泽仁改善胰岛素抵抗作用机制 [J]. 中成药，2021，43（1）：44-49.

[8] 王博，黄启晶，李佳欣，等 . 基于钙敏感受体探讨花旗泽仁改善胰岛素抵抗的作用机制 [J]. 医学研究杂志，2020，49（6）：40-46.

[9] Zhang YC，Wu XY，Zhao C，et al. Integrative analysis of whole-genome expression profiling and regulatory network identifies novel biomarkers for insulin resistance in leptin receptor-deficient mice [J]. Med Chem，2020，16（5）：635-642.

[10] Lee LL，Elaine C，Juliana CN. Cardiorenal diseases in type 2 diabetes mellitus：clinical trials and real-world practice [J]. Nat Rev Endocrinol，2023，19（3）：151-163.

[11] Mario GC，Claudia MP，Pamela MR，et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets，2023，23（4）：503-514.

[12] Zhang XH，Liu F，Li WL，et al. Metabolic score for insulin resistance（METS-IR）predicts adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and ischemic cardiomyopathy [J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2023，16（2）：1283-1295.

[13] 李佳欣，陈思琦，葛鹏玲 . 基于 HnRNPC 基因探究花旗泽仁改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（11）：29-37.

[14] Xie JM，Jiang Y，Kan YN，et al. Calcium-sensing receptor is involved in the pathogenesis of fat emulsion-induced insulin resistance in rats [J]. Mol Med Rep，2015，12（2）：2043-2048.

[15] 阚玉娜，谢佳明，简白羽，等 . 基于钙敏感受体分子表达水平探讨大鼠脂肪组织胰岛素抵抗发病机制 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1558-1562.

[16] 张宇驰，阚玉娜，韩东卫，等 . 花旗泽仁对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠胰腺组织钙敏感受体表达及 AKT 活性的影响 [J]. 中医药信息，2018，35（3）：6-11.

（收稿日期：2023-04-27；修回日期：2023-05-26）

异欧前胡素通过 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路抑制巨噬细胞 M1 极化发挥抗炎镇痛作用

王绍展[2]，朱青霞[2]，陈井霞[1]，王学彬[1]，王卓[1]，杨云云[1*]（1. 海军军医大学第一附属医院药剂科，上海 200433；2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科，上海　201999）

摘要：目的　探讨异欧前胡素抗炎镇痛作用的潜在药理作用机制。**方法**　通过醋酸致小鼠扭体模型观察异欧前胡素的镇痛作用，采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型观察抗炎作用；通过脂多糖（LPS，100 ng·mL^{-1}）＋干扰素 -γ（IFN-γ，20 ng·mL^{-1}）诱导小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 构建 M1 极化模型，分别采用 CCK8 法、Real-time PCR 法、ELISA 法测定异欧前胡素对 RAW264.7 细胞增殖、M1 极化标志蛋白（CD86 和 iNOS）的 mRNA 水平及白细胞介素 -6（IL-6）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）表达水平的调控作用；通过 Western blot 法检测 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号途径相关蛋白表达水平。**结果**　异欧前胡素（30 和 60 mg·kg^{-1}）能有效减少醋酸致扭体次数，抑制小鼠耳郭肿胀。异欧前胡素（20 和 40 μmol·L^{-1}）能抵抗 LPS/IFN-γ 诱导的 RAW264.7 细胞 M1 极化，抑制细胞增殖，降低 IL-6 和 TNF-α 的表达，并能有效地降低 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号途径相关蛋白磷酸化和转录。**结论**　异欧前胡素可通过调节 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路抑制巨噬细胞 M1 极化，发挥抗炎镇痛作用。

关键词：抗炎镇痛；异欧前胡素；M1 极化；NF-κB 信号通路；JAK1/STAT1 信号通路
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-1985-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.002

Anti-inflammation and analgesic effect of isoimperatorin on the polarization of macrophage M1 via NF-κB and JAK1/STAT1 signaling pathway

WANG Shao-zhan[2], ZHU Qing-xia[2], CHEN Jing-xia[1], WANG Xue-bin[1], WANG Zhuo[1], YANG Yun-yun[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *the First Affiliated Hospital of Naval Medical University*, *Shanghai* 200433; 2. *Department of Pharmacy*, *Shanghai* 9*th People's Hospital*, *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai* 201999)

Abstract: Objective　To determine the potential pharmacological mechanism of anti-inflammation and analgesic effect of isoimperatorin. **Methods**　The anti-inflammation and analgesic effect of isoimperatorin was observed by acetic acid-induced writhing model and xylene induced ear swelling model in mice. M1 polarization model of mouse macrophage RAW264.7 was constructed by lipopolysaccharide (100 ng·mL^{-1}) ＋ IFN-γ (20 ng·mL^{-1}). The effect of isoimperatorin on the proliferation of macrophage, mRNA levels of CD86 and iNOS, and the protein level of IL-6 and TNF-α was measured by CCK8, Real-time PCR and ELISA respectively. Finally, Western blot was used to determine the protein expression levels of NF-κB and JAK1/STAT1 signaling pathway. **Results**　Isoimperatorin (30 and 60 mg·kg^{-1}) decreased the number of body writhings, and attenuated ear swelling induced by xylene. Isoimperatorin (20 and 40 μmol·L^{-1}) inhibited the M1 polarization of RAW264.7 cells, decreased the expression of IL-6 and TNF-α, and decreased the phosphorylation of NF-κB and JAK1/STAT1 signaling pathway. **Conclusion**　Isoimperatorin has significant anti-inflammation and analgesic effects, the mechanism may be related to inhibition of the M1 polarization of macrophages via NF-κB and JAK1/STAT1 signaling pathway.

Key words: anti-inflammation and analgesics; isoimperatorin; M1 polarization; NF-κB signaling pathway; JAK1/STAT1 signaling pathway

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81703779）。
作者简介：王绍展，男，博士，主管药师，主要从事中药活性小分子抗炎和免疫调节作用机制研究，email：wsz_2001@126.com
[*]**通信作者：**杨云云，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学实践与研究，email：13262246965@163.com

白芷具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓的作用，广泛用于感冒头痛、鼻渊、白带和疮疡肿痛等症[1]。异欧前胡素是白芷中香豆素类的主要活性成分，具有很强的抗炎镇痛作用[2-5]。研究发现异欧前胡素对核因子 κB（NF-κB）和丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）介导的炎症信号通路[6]，Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/ 核因子 E2 相关因子 2/ 抗氧化反应元件通路（Keap1/Nrf2/ARE）介导的氧化应激系统[7]，以及炎症因子如白细胞介素 -6（IL-6）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）的释放[3, 8]，均有很强的调控作用。近年来，巨噬细胞 M1 极化在炎症中的作用越来越受到关注[9-10]，NF-κB 和 Janus 酪氨酸蛋白激酶 1/ 信号转导和转录激活因子 1（JAK1/STAT1）信号通路对巨噬细胞 M1 极化（促炎巨噬细胞转变）的调控也已被证实[11-12]。异欧前胡素的抗炎镇痛作用是否与巨噬细胞 M1 极化相关，目前鲜有这方面的研究报道。为了更全面地揭示异欧前胡素药理作用机制，本研究采用醋酸致小鼠扭体模型和二甲苯致小鼠耳肿胀模型考察异欧前胡素的体内抗炎镇痛作用，体外采用脂多糖（LPS）＋干扰素 -γ（IFN-γ）诱导小鼠巨噬细胞（RAW264.7）构建 M1 极化模型，研究异欧前胡素对 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路的调控作用。

1 材料

1.1 实验动物和细胞

SPF 级昆明种小鼠，6 ～ 8 周龄，体质量 18 ～ 22 g，雌雄兼用 [上海斯莱克实验动物有限责任公司，许可证号 SCXK（沪）2017-0005]。RAW264.7 细胞（中国科学院上海生命科学研究院），采用 DMEM 高糖完全培养基（含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素）培养。

1.2 试药

异欧前胡素（CAS：482-45-1，上海诗丹德生物技术有限公司，纯度≥ 98%）；冰乙酸、二甲苯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，分析纯）；JAK1 兔单克隆抗体（#3344）、Phospho-JAK1（Tyr1034/1035）兔单克隆抗体（#74129）、STAT1 兔单克隆抗体（#3950）、Phospho-STAT1（Tyr701）兔单克隆抗体（#9167）、NF-κB（P65）兔单克隆抗体（#8242）、Phospho-IκB 兔单克隆抗体（#2859）和 Histon H3 兔单克隆抗体（#4499S）（Cell Signaling Technology 公司）；GAPDH 小鼠单克隆抗体（#sc-365062，Santa Cruz Biotechnology）；Alexa Fluor 546 标记驴抗鼠 IgG（#A-10036）、Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG（#A-21206）（Thermo Fisher Scientific）；LPS（Sigma-Aldrich）；IFN-γ、IL-6、TNF-α、ELISA 试剂盒（R&D Systems）；引物序列由上海生工工程技术服务有限公司合成。其他试剂（上海碧云天生物技术公司）。

1.3 仪器

电子天平（Ohaus 美国）；CO_2 培养箱（Hereus）；台式低温高速离心机（Eppendorf）；Nanodrop 2000 分光光度计（Thermo Fisher Scientific）；LightCycler 480 RT-QPCR 仪器（Hoffman. La Roche）；奥德赛红外探测及图像成像分析系统（LI-COR Biotechnology）。

2 方法

2.1 二甲苯致小鼠耳郭肿胀实验

昆明小鼠共 50 只，雌雄对半，随机分为空白对照组、吲哚美辛阳性对照组（10 mg • kg^{-1}），异欧前胡素各剂量组（15、30 和 60 mg • kg^{-1}），每组 10 只。药物均用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成混悬液，按 10 mL • kg^{-1} 灌胃给药；空白对照组灌胃等剂量 0.5% 羧甲基纤维素钠。给药 60 min 后，于小鼠右耳均匀涂抹二甲苯 30 μL，左耳作为对照。致炎 20 min 后处死小鼠，取下双耳用直径 8 mm 打孔器取相同部位耳郭，称重，以每鼠右耳重减去左耳重为肿胀度；计算肿胀度抑制率[13]：

肿胀度抑制率（%）＝（空白组平均肿胀度－给药组平均肿胀度）/ 空白组平均肿胀度 ×100%。

2.2 醋酸致小鼠扭体实验

昆明小鼠共 50 只，雌雄对半，分组及给药同“2.1”项下。给药 60 min 后，腹腔注射 0.6% 醋酸溶液（10 mL • kg^{-1}），5 min 后观察记录 15 min 内出现扭体反应的次数（腹部内凹，伸展后肢，臀部抬高，蠕行），并计算扭体反应抑制率[14]：

扭体反应抑制率（%）＝（空白组平均扭体次数－给药组平均扭体次数）/ 空白组平均扭体次数 ×100%。

2.3 RAW264.7 细胞 M1 极化模型的建立

对数生长期 RAW264.7 细胞消化离心后，以（1 ～ 3）×10^5 个 • mL^{-1} 接种于细胞培养板（96 孔或 6 孔），置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h，加入 LPS（100 ng•mL^{-1}）和 IFN-γ（20 ng•mL^{-1}），继续孵育 24 h，诱导巨噬细胞 M1 转型[15-16]。

2.4 MTT 法检测 RAW264.7 细胞的增殖

对数生长期 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔板（M1 组），每孔 100 μL，将细胞分为正常对照组、模型组、异欧前胡素 3 个剂量组（10、20、40 μmol • L^{-1}），每组 3 个复孔，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后，除正常对照组加 100 μL 培养基，其余各组均加入含 LPS（100 ng • mL^{-1}）和 IFN-γ（20 ng • mL^{-1}）的培养基 100 μL；异欧前胡素各处理组分别加入对应浓度的药物

母液 1 μL。继续培养 24 h，每孔加入 10 μL MTT 溶液（5 mg • mL^{-1}），4 h 后弃上清，加入 150 μL 二甲基亚砜（DMSO），振荡 10 min，以酶标仪在 490 nm 处测各孔吸光度值（*OD*），将正常对照组的细胞活性设为 100%，计算各组细胞活性，细胞活性（%）＝（实验组平均 *OD* 值 / 对照组平均 *OD* 值）×100%。

2.5　ELISA 法检测 RAW264.7 细胞上清中 IL-6 和 TNF-*α* 的含量

对数生长期 RAW264.7 细胞以 3×10^5 • mL^{-1} 接种于 6 孔板，每孔 2 mL，细胞分组及培养同“2.4”项下。除正常对照组加 2 mL 培养基，其余各组均加入含 LPS（100 ng • mL^{-1}）和 IFN-*γ*（20 ng • mL^{-1}）的培养基 2 mL；异欧前胡素各处理组则分别加入对应浓度的药物母液 20 μL。继续培养 24 h 后，收集上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清中 IL-6 和 TNF-*α* 的含量。

2.6　定量 PCR 检测 RAW264.7 细胞中 CD86 和 STAT1 的 mRNA

RAW264.7 细胞分组及处理方式见“2.5”项下。待药物处理 24 h 后，提取细胞总 RNA，按照 TaKaRa 逆转录及 PCR 试剂盒说明书，在 LightCycler 480 仪器（Hoffman-La Roche）上进行逆转录合成 cDNA 并扩增。以 *β*-actin 为内参，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式对目的基因（见表 1）进行进一步定量分析。

表 1　mRNA 扩增的基因引物序列

Tab 1　Gene primer sequences for mRNA amplification

基因名称	上游引物序列	下游引物序列	产物 /bp
CD86	5'-TCCAGAACTTACGGAAGCACC-3'	5'-TGTGCCCAAATAGTGCTCG-3'	241
iNOS	5'-CGCAAAACATTTCCTGGGAGC-3'	5'-AGTGAAATCCGATGTGGCCT-3'	237
β-actin	5'-TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA-3'	5'-GGACCCAGGAAGGAAGGCT-3'	153

2.7　Western blot 法检测 RAW264.7 细胞中蛋白表达及磷酸化情况

RAW264.7 细胞分组及处理方式见“2.5”项下。按 BCA 试剂盒说明书提取总蛋白，测定蛋白浓度，加入 5× 上样缓冲液，沸水浴变性 15 min，取 30 μg 蛋白上样，待 SDS-PAGE 电泳分离后，转移至 PVDF 膜，用 5%BSA 溶液 4 ℃封闭 3 h，加入一抗（1∶1000），4 ℃过夜；TBST 洗涤 3 次、5 min/ 次，加入对应的二抗，室温孵育 2 h。采用奥德赛红外探测及图像成像系统进行检测，以 GAPDH 为内参，计算目的条带的灰度值 [17]。

2.8　统计分析

使用 SPSS 21.0 对数据进行分析，数据以平均值 ± 标准差表示，统计分析方法采用单因素方差分析（one-way ANOVA），$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　异欧前胡素对小鼠耳郭肿胀的抑制作用

结果表明阳性药吲哚美辛及异欧前胡素中、高剂量组能不同程度地抑制耳郭肿胀，且高剂量组的抑制效果强于低、中剂量组，与阳性药组相比没有显著差异。结果见表 2。

表 2　异欧前胡素对二甲苯致小鼠耳郭肿胀及扭体反应的抑制作用 ($n = 10$)

Tab 2　Inhibition effect of isoimperatorin on xylene induced ear swelling and acetic acid-induced writhing in mice ($n = 10$)

组别	剂量 /（mg • kg^{-1}）	肿胀度 /mg	肿胀度抑制率 /%	扭体反应 / 次	扭体反应抑制率 /%
空白对照组	—	11.86±1.45	—	35.50±9.35	—
吲哚美辛组	10	5.23±1.50*	50.88	12.80±3.08*	63.94
异欧前胡素组	15	10.17±1.85^{a}	14.22	27.90±9.53^{a}	21.41
	30	7.93±1.20^{*ab}	33.10	25.00±7.18^{*a}	29.58
	60	5.90±1.28^{*bc}	50.26	14.70±3.83^{*bc}	58.59

注：与空白对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与吲哚美辛组相比，$^{a}P < 0.05$；与异欧前胡素 15 mg • kg^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$；与异欧前胡素 30 mg • kg^{-1} 组相比，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the blank control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the indometacin group，$^{a}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 15 mg • kg^{-1} group，$^{b}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 30 mg • kg^{-1} group，$^{c}P < 0.05$.

3.2　异欧前胡素对醋酸致小鼠扭体反应的抑制作用

结果表明阳性药吲哚美辛及异欧前胡素中、高剂量组可抑制小鼠扭体反应；高剂量组的抑制作用与吲哚美辛组相比没有显著差异（见表 2）。

3.3　异欧前胡素对 RAW264.7 细胞增殖的影响

结果表明 10 ～ 40 μmol • L^{-1} 的异欧前胡素处理 24 h 对正常 RAW264.7 细胞的增殖活性没有影响（见图 2A）。LPS 联合 IFN-*γ* 刺激 24 h 能显著提升 RAW264.7 细胞的增殖活性，说明 RAW264.7 细胞 M1 极化后，表现出显著的增殖现象。而 10 ～ 40 μmol • L^{-1} 异欧前胡素处理 24 h，能有效抑制 LPS 联合 IFN-*γ* 诱导的 RAW264.7 细胞增殖，且在 40 μmol • L^{-1} 剂量时抑制效率最高，且呈现剂量依赖性（见图 2B）。

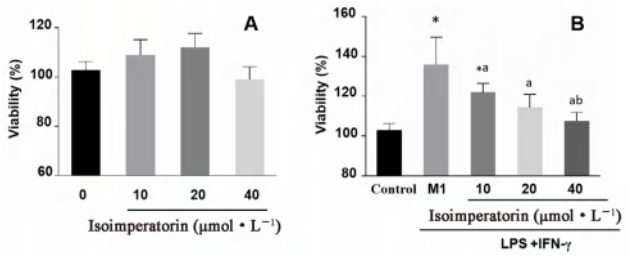

图 2 异欧前胡素对正常（A）及 M1 极化（B）RAW264.7 细胞增殖活性的影响

Fig 2 Effect of isoimperatorin on proliferation activity of normal（A）and M1-polarized（B）RAW264.7 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 M1 组相比，$^{a}P < 0.05$；与异欧前胡素 10 μmol • L^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the M1 group，$^{a}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 10 μmol • L^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

3.4 异欧前胡素对 RAW264.7 细胞表达 IL-6 和 TNF-α 的影响

采用 LPS 联合 IFN-γ 刺激 24 h，可显著诱导 RAW264.7 分泌炎症因子 IL-6 和 TNF-α（见图 3）。M1 组（单独刺激）同对照组相比，细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 的含量显著提升，说明 RAW264.7 细胞发生了 M1 转变。而异欧前胡素（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）处理 24 h，能剂量依赖性地抑制 RAW264.7 细胞 M1 极化过程中分泌 IL-6 和 TNF-α。

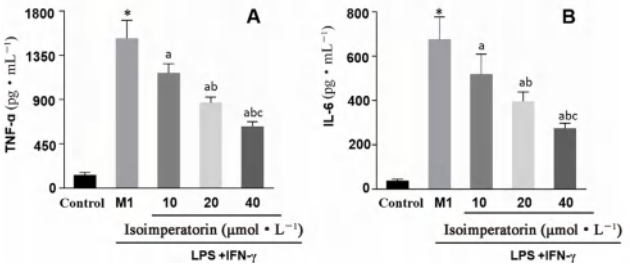

图 3 异欧前胡素对 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α（A）和 IL-6（B）的影响

Fig 3 Effect of isoimperatorin on the secretion of TNF-α（A）and IL-6（B）in RAW264.7 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 M1 组相比，$^{a}P < 0.05$；与异欧前胡素 10 μmol • L^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$；与异欧前胡素 20 μmol • L^{-1} 组相比，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the M1 group，$^{a}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 10 μmol • L^{-1} group；$^{b}P < 0.05$，compared with the isoimperatorin 20 μmol • L^{-1} group，$^{c}P < 0.05$.

3.5 异欧前胡素对 RAW264.7 细胞中 CD80 和 iNOS mRNA 水平的影响

LPS 联合 IFN-γ 刺激 24 h，M1 组（单独刺激）同对照组相比，RAW264.7 细胞中 M1 型标志物 CD86 和 iNOS 的 mRNA 水平上调（见图 4），说明 RAW264.7 细胞发生了 M1 转变。而异欧前胡素（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）处理 24 h，能剂量依赖性地下调 CD86 和 iNOS 的 mRNA 表达水平。

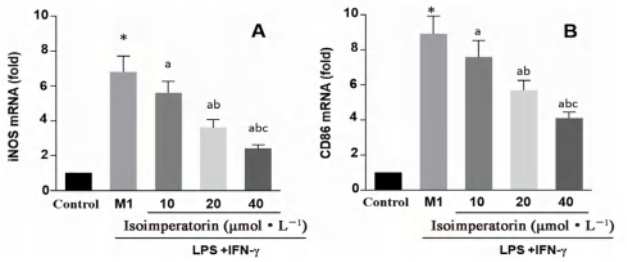

图 4 异欧前胡素对 RAW264.7 细胞 iNOS 及 CD86 mRNA 水平的影响

Fig 4 Effect of isoimperatorin on the levels of iNOS and CD86 mRNA in RAW264.7 cells

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 M1 组相比，$^{a}P < 0.05$；与异欧前胡素 10 μmol • L^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$；与异欧前胡素 20 μmol • L^{-1} 组相比，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the M1 group，$^{a}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 10 μmol • L^{-1} group，$^{b}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 20 μmol • L^{-1} group，$^{c}P < 0.05$.

3.6 异欧前胡素对 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路的调控作用

LPS 联合 IFN-γ 刺激 24 h，M1 组（单独刺激）同对照组相比，RAW264.7 细胞质中 p-IκBα，细胞核 NF-κB 亚基 P65 蛋白 p-JAK1 和 p-STAT1 蛋白水平显著上调（$P < 0.05$），说明 NF-κB 信号通路、JAK1/STAT1 信号通路被激活（见图 5）。异欧前胡素（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）处理 24 h，能剂量依赖性地抑制 p-IκBα、p-JAK1 和 p-STAT1 的蛋白磷酸化水平，并抑制上调 NF-κB 亚基 P65 蛋白的入核（$P < 0.05$），说明异欧前胡素能有效地抑制 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路活化。

4 讨论

巨噬细胞与机体炎症反应和疼痛的调控有密切的关系。炎症发生时，血液中的单核巨噬细胞可以迁移病灶，在 LPS 等细菌产物以及 IFN-γ 和 TNF-α 等诱导下，进一步极化为 M1 型巨噬细胞，发挥促炎、致痛作用：① 能够促进 Th1 细胞反应，诱发组织破坏效应，导致 PGE2、缓激肽等炎症介质释放，刺激外周痛觉神经[18-19]；② 释放大量的 TNF-α、IL-6 和 IL-1 等促炎细胞因子，可提高外周及中枢神经系统敏感性，导致痛觉过敏[20-21]。

异欧前胡素是中药白芷发挥药理作用的关键活性成分，《中国药典》将其列为白芷质量考察的指标成分之一[22]。二甲苯致小鼠耳郭肿胀和醋酸致小鼠扭体实验模型是两种非常经典的考察药物抗炎镇痛作用的药理模型[23-24]。本研究发现，异

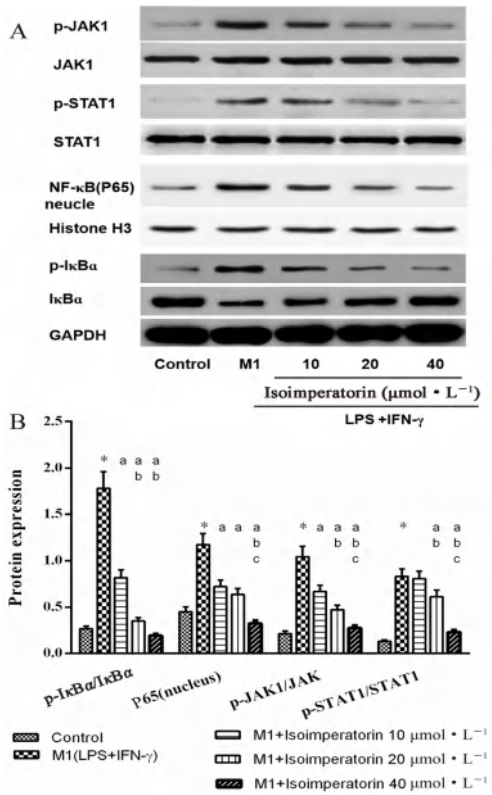

图 5 异欧前胡素对 RAW264.7 细胞 NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路调控作用

Fig 5 Regulation effect of isoimperatorin on NF-κB and JAK1/STAT1 signal pathways

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$；与 M1 组相比，$^{a}P < 0.05$；与异欧前胡素 10 μmol • L^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$；与异欧前胡素 20 μmol • L^{-1} 组相比，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the M1 group，$^{a}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 10 μmol • L^{-1} group，$^{b}P < 0.05$；compared with the isoimperatorin 20 μmol • L^{-1} group，$^{c}P < 0.05$.

欧前胡素（15 ～ 60 mg • kg^{-1}）能剂量依赖性地抑制小鼠耳郭炎症和腹部疼痛，且高剂量组的药理效应与阳性对照药吲哚美辛无明显差异，说明异欧前胡素具有很好的抗炎镇痛效果。

LPS 联合 IFN-γ 刺激可诱导巨噬细胞发生 M1 极化[25-26]，M1 极化的巨噬细胞高表达 CD86 和 iNOS（诱导型 NO 合成酶）等 M1 型标志分子，并大量合成分泌炎症因子 IL-6 和 TNF-α 等[27-28]。iNOS 催化 *L*-精氨酸产生一氧化氮（NO），NO 作为一种重要的神经递质，具有参与痛觉调制、促进疼痛传入以及释放致痛介质等多方面作用[29-31]。IL-6 和 TNF-α 通过介导炎症发生促进炎性疼痛产生[32-33]。本研究采用 LPS 联合 IFN-γ 刺激小鼠巨噬细胞 24 h，RAW264.7 细胞中 CD86 和 iNOS 的 mRNA 水平显著升高，且细胞培养上清中 IL-6 和 TNF-α 含量大幅提升，说明 RAW264.7 发生了 M1 极化。而异欧前胡素（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）能剂量依赖性地抑制上述分子的表达水平，抑制 RAW264.7 向 M1 型巨噬细胞极化，降低炎症因子的产生。

巨噬细胞 M1 极化过程中，NF-κB 和 JAK1/STAT1 信号通路发挥关键的调控作用[11-12]。LPS 与巨噬细胞表面的 TLR4 受体结合，活化胞浆内的信号接头分子 MyD88，后者激活 IKK 导致 IκB 磷酸化失活，与 NF-κB 二聚体解离，解离后的 NF-κB 亚基 P65 蛋白被磷酸化后，进入细胞核，启动炎症因子 IL-6、iNOS 和 TNF-α 等的转录，促使巨噬细胞 M1 极化转变[34-35]。JAK/STAT 信号通路是由细胞因子刺激引起级联酶促反应的信号传导通路，由酪氨酸激酶 JAK、酪氨酸激酶相关受体和转录因子 STAT 组成，与细胞的活化、增殖、凋亡和免疫调节等生物学过程密切相关[36]。IFN-γ 与干扰素 γ 受体 2 结合后，促进 JAK1 与 JAK2 形成二聚体和磷酸化，并进一步诱导 STAT1 磷酸化和二聚体形成，最终在核内启动 IL-6 和 iNOS 等下游靶基因表达，诱导巨噬细胞 M1 极化[16，37]。本研究结果表明，异欧前胡素能有效地降低 IκB 磷酸化，减少 P65 亚基蛋白入核，抑制 NF-κB 信号通路被激活；而且异欧前胡素还能抑制 JAK1 和 STAT1 的磷酸化，对 JAK1/STAT1 的活化也有显著的抑制作用。所以异欧前胡素通过抑制 NF-κB 和 JAK1/STAT1 两条信号通路的活化，阻断 LPS 联合 IFN-γ 刺激 RAW264.7 细胞发生 M1 极化转变。

5 结论

本研究证实，异欧前胡素具有很好的抗炎镇痛药理作用，其机制可能与阻断 NF-κB 和 JAK1/STAT1 两条信号通路的活化，阻遏巨噬细胞发生 M1 极化，进而降低炎症介质 IL-6、iNOS 和 TNF-α 等释放相关。然而，异欧前胡素具体是通过何种方式来实现对 NF-κB 和 JAK1/STAT1 两条信号通路的精细化调控，需要进一步深入研究。综上，本研究为异欧前胡素抗炎镇痛机制研究提供了细胞分子水平的初步理论支持，也为中药白芷在临床上的广泛应用提供了更多依据。

参考文献

[1] 郑虎战 . 中药现代研究与应用（2）[M]. 北京：文苑出版社，1998，98.

[2] Chen YF，Tsai HY，Wu TS. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of Angelica pubescens [J]. Planta Med，1995，61（1）：2-8.

[3] Wang J，Zhang YJ，Zeng YN，et al. Isoimperatorin reduces the effective dose of dexamethasone in a murine model of asthma by inhibiting mast cell activation [J]. Phytother Res，2020，34（11）：2985-2997.

[4] Moon TC，Jin M，Son JK，et al. The effects of isoimperatorin isolated from Angelicae dahuricae on cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells [J]. Arch Pharm Res，2008，31（2）：210-215.

[5] Xu Y，Yu Y，Wang Q，et al. Active components of Bupleurum chinense and Angelica biserrata showed analgesic effects in formalin induced pain by acting on Nav1.7 [J]. J Ethnopharmacol，2021，269：113736.
[6] Wijerathne CUB，Seo CS，Song JW，et al. Isoimperatorin attenuates airway inflammation and mucus hypersecretion in an ovalbumin-induced murine model of asthma [J]. Int Immunopharmacol，2017，49：67-76.
[7] Hassanein EHM，Sayed AM，Hussein OE，et al. Coumarins as modulators of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：1675957.
[8] Sun DD，Yan QY，Xu XF，et al. LC-MS/MS analysis and evaluation of the anti-inflammatory activity of components from Bushen-Huoxue decoction [J]. Pharm Biol，2017，55（1）：937-945.
[9] Song HY，Yang Y，Sun YL，et al. Circular RNA Cdyl promotes abdominal aortic aneurysm formation by inducing M1 macrophage polarization and M1-type inflammation [J]. Mol Ther，2022，30（2）：915-931.
[10] Zhang B，Yang Y，Yi JN，et al. Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis [J]. J Periodontal Res，2021，56（5）：991-1005.
[11] Liu L，Guo H，Song A，et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-κB and MAPK pathways [J]. BMC Immunol，2020，21（1）：32.
[12] Liang YB，Tang H，Chen ZB，et al. Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type [J]. Mol Med Rep，2017，16（5）：6405-6411.
[13] 赵映娟，段小花，沈莹，等 . 制黄草乌中主要成分南乌碱乙的毒性及抗炎镇痛活性研究 [J]. 时珍国医国药，2019，30（10）：2388-2390.
[14] 张亚涛，包晓玮，曾兰君，等 . 刺山柑果实醇提物正丁醇部位提取物抗炎镇痛效果分析 [J]. 新疆农业科学，2021，58（1）：159-167.
[15] Xu Y，Fan WW，Xu W，et al. Yiguanjian decoction enhances fetal liver stem/progenitor cell-mediated repair of liver cirrhosis through regulation of macrophage activation state [J]. World J Gastroenterol，2018，24（42）：4759-4772.
[16] 孙颖，刘玲，施晓艳，等 . 丹皮酚通过下调 miR-155/JAK1-STAT1 通路抑制巨噬细胞 M1 极化 [J]. 中国中药杂志，2020，45（9）：2158-2164.
[17] Li J，Li XX，Xu WH，et al. Antifibrotic effects of luteolin on hepatic stellate cells and liver fibrosis by targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGFβ/Smad signalling pathways [J]. Liver Int，2015，35（4）：1222-1233.
[18] De Paoli F，Staels B，Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis [J]. Circ J，2014，78（8）：1775-1781.
[19] Labonte AC，Tosello-Trampont AC，Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases [J]. Mol Cell，2014，37（4）：275-285.
[20] Kiguchi N，Kobayashi Y，Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain [J]. Curr Opin Pharmacol，2012，12（1）：55-61.
[21] Itokazu T，Hayano Y，Takahashi R，et al. Involvement of Wnt/beta-catenin signaling in the development of neuropathic pain [J]. Neurosci Res，2014，79：34-40.
[22] 国家药典委员会 . 中国药典分析检测技术指南 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2017：189.
[23] Ma HY，Huang Q，Qu WS，et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of Sophora flavescens residues [J]. J Ethnopharmacol，2018，224：497-503.
[24] Liao YH，Su YC，et al. Social disruption-induced stress pre-exposure aggravates，while the presence of conspecifics diminishes，acetic acid-induced writhing [J]. Psychopharmacology（Berl），2021，238（10）：2851-2865.
[25] Shapouri-Moghaddam A，Mohammadian S，Vazini H，et al. Macrophage plasticity，polarization，and function in health and disease [J]. J Cell Physiol，2018，233（9）：6425-6440.
[26] Huang YL，Tian C，Li QM，et al. TET1 knockdown inhibits porphyromonas gingivalis LPS/IFN-γ-induced M1 macrophage polarization through the NF-κB pathway in THP-1 cells [J]. Int J Mol Sci，2019，20（8）：2023.
[27] Wang SX，Cao M，Xu SH，et al. Luteolin alters macrophage polarization to inhibit inflammation [J]. Inflammation，2020，43（1）：95-108.
[28] Wang L，Zhao H，Wang LW，et al. Effects of selected resveratrol analogues on activation and polarization of lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells [J]. J Agric Food Chem，2020，68（12）：3750-3757.
[29] Jain NK，Patil CS，Singh A，et al. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway [J]. Brain Res，2001，909（1-2）：170-178.
[30] LI XH，QI Y，CAI RL，et al. Effect of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by Aloe-emodin in RAW264.7 cells [J]. Chin Pharmacol Bull，2010，26（4）：488-492.
[31] Kuroda R，Kawao N，Yoshimura H，et al. Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the antinociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spi-nal nociceptive neurons in the rat [J]. Brain Res，2001，903（1/2）：110-116.
[32] 周银霞，张崇，傅海珍，等 . 姜黄素类组分通过下调 TLR4/NF-κB 通路抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤 [J]. 中南药学，2018，16（11）：1521-1525.
[33] 蒋宗明，陈忠华，郑羡河，等 . 帕瑞昔布钠超前镇痛对骨科患者术后血 IL-1β、IL-6 和 IL-8 水平的影响 [J]. 第三军医大学学报，2010，32（13）：1485-1486.
[34] Hoshino K，Takeuchi O，Kawai T，et al. Cutting edge：toll-like receptor 4（TLR4）-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide：evidence for TLR4 as the LPS gene product [J]. J Immunol，1999，162：3749-3752.
[35] Bergqvist S，Ghosh G，Komives EA. The Ikappa Balpha/NF-kappa B complex has two hot spots，one at either end of the interface [J]. Protein Sci，2008，17：2051-2058.
[36] Constantinescu SN，Girardot M，Pecquet C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer [J]. Trends Biochem Sci，2008，33（3）：122-131.
[37] Majoros A，Platanitis E，Kernbauer-Hölzl E，et al. Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling：lessons from interferons for cytokine responses [J]. Front Immunol，2017，8：29.

（收稿日期：2022-11-15；修回日期：2023-02-03）

薰衣草挥发油香薰吸入的抗焦虑、抗抑郁作用及其机制

周欣[1]，宋宁[2]，林景[1]，弓宝[3*]（1. 海南省第五人民医院/海南医学院附属皮肤病医院药剂科，海口　570100；2. 河南中医药大学药学院，郑州　450046；3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所（海南省南药资源保护与开发重点实验室&国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室），海口　570311）

摘要：目的　考察薰衣草挥发油（LVO）香薰吸入的抗焦虑、抗抑郁作用，并探究其作用机制。**方法**　采用间氯苯哌嗪（MCPP）和慢性不可预知性温和刺激（CUMS）分别复制小鼠焦虑模型和抑郁模型，通过旷场实验、明暗箱穿梭实验、自发活动实验、悬尾实验、强迫游泳实验等行为学检测，考察 LVO 香薰吸入的抗焦虑和抗抑郁作用；ELISA 法测定小鼠海马组织中五羟色胺（5-HT）、谷氨酸（Glu）、γ-氨基丁酸 A 受体（$GABA_A$）神经递质水平，同时采用 Western blot 法检测颗粒体蛋白（GRN2B）、代谢型谷氨酸受体 5（GRM5）抗体、谷氨酸能系统代谢和转运相关蛋白谷氨酸受体 1（GluR1）及囊泡谷氨酸转运蛋白 1（VGluT1）表达，初步探究 LVO 香薰吸入抗焦虑和抗抑郁的作用机制。**结果**　与焦虑模型组比较，LVO 中、高剂量能显著降低模型动物总活动路程和速度，增加静止时间，降低模型动物在暗箱中的活动路径和速度（$P < 0.05$）；同时降低 Glu 水平，升高 5-HT 水平及 $GABA_A$ 水平，提高焦虑模型动物中 GRN2B、GRM5 蛋白表达。与抑郁模型组比较，LVO 能显著增加模型组动物总路程和运动速度，降低静止时间，降低模型动物强迫游泳及悬尾不动时间，升高 5-HT 和 Glu 水平，降低 $GABA_A$ 水平，提高抑郁模型动物中 GRN2B、GluR1、VGluT1 蛋白表达。**结论**　LVO 香薰吸入具有一定的抗焦虑、抗抑郁作用，其作用机制可能与调控神经递质分泌及相关蛋白的表达有关。

关键词：薰衣草挥发油；抗焦虑；抗抑郁；机制
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-1991-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.003

Anxiolytic and antidepressant effect of lavender volatile oil inhalation and related mechanism

ZHOU Xin[1], SONG Ning[2], LIN Jing[1], GONG Bao[3*] (1. *Department of Pharmacy, The Fifth People's Hospital of Hainan Province & Affiliated Dermatology Hospital of Hainan Medical Institute, Haikou* 570100; 2. *College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046; 3. *Hainan Key Laboratory of Resource Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Haikou* 570311)

Abstract: Objective　To determine the effect and of lavender volatile oil (LVO) on anxiety and depression related mechanism. **Methods**　Chronic mild unforeseeable stress (CUMS) was used to induce depression-like model and M-chloropheniperazine (MCPP) was applied to induce the anxiety model. The general activity of open field test, light-dark transition test, tail suspension test, and forced swim test were conducted. The effect on the brain monoamine neurotransmitters such as 5-HT, Glu, and $GABA_A$ was observed. Western blot technique was used to determine the protein expressions of GRN2B, GRM5, GluR1, and VGluT1. **Results**　Compared with the anxiety model group, LVO middle

基金项目：全国中药特色技术传承人才培训项目（No. 国中医药人教函 [2019]43 号）；海南省科技厅海南省基础与应用基础研究计划（自然科学领域）高层次人才项目（No.2019RC345）。
作者简介：周欣，女，硕士，主管药师，主要从事中药制剂与化妆品研发的研究，email：zx5575759@126.com　*通信作者：弓宝，男，副研究员，主要从事中药药效及机制研究，email：gongbao0112@aliyun.com

and high dose significantly reduced the total distance and average speed, increased the rest time, reduced the distance and average speed in the black box ($P < 0.05$). At the same time it increased the level of 5-HT, and GABA, decreased the level of Glu; and increased the protein expression of GRN2B and GRM5. Compared with the depression model group, LVO significantly increased the total distance and average speed, decreased the rest time; decreased the immobile time of forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST); increased the level of 5-HT and Glu, decreased the level of $GABA_A$; and increased the protein expression of GRN2B, GluR1, and VGluT1. **Conclusion** LVO has a signifificant anxiolytic and antidepressant effect, whose mechanism may be related to regulation of the level of 5-HT, Glu, and $GABA_A$, and the expression of related proteins in the hypothalamus.

Key words: lavender volatile oil; anxiolytic; antidepressant; mechanism

目前临床上焦虑症和抑郁症的发病人群逐年增多，对人类的身心健康造成了很大的危害，且其发病原因复杂，多伴有并发症[1]。焦虑症以出汗、胸闷、忧虑等一系列神经官能症并伴随自主神经紊乱等为主要特征[2]；而抑郁症则有情绪低落、悲观、兴趣减低，甚至出现自残、自杀等行为表现[3]。目前临床治疗药物多以西药为主，不良反应较多，起效较慢，且因多采用联合用药方式，加重了患者的肝、肾负担[4]。

薰衣草 *Lavandula angustifolia* Mill 为唇形科植物，主要含有挥发油成分，国外早有报道采用熏香方式吸入薰衣草挥发油（LVO）或以 LVO 为主的复方精油，可改善失眠患者睡眠质量，减少快速入睡时间[5]。国内临床上使用薰衣草及其全草制剂治疗神经衰弱、失眠，并改善认知功能障碍[6]，且其制剂在国家《药品标准》维吾尔药分册和《维吾尔药材标准》[7]均有收载。根据文献报道，镇静、助眠等作用的药物多具有抗焦虑、抗抑郁等方面的潜质[8]，虽然已有研究称，吸入或腹腔注射 LVO 可缓解恐惧条件下具有社交障碍的小鼠焦虑情绪症状[9-10]，但目前关于 LVO 如何改善焦虑以及抗抑郁的研究报道较少，其作用机制也未得到明确阐释。因此本研究采用自制熏香装置，模拟传统芳香疗法，通过加热 LVO 吸入的方式观察其抗焦虑、抗抑郁作用及其分子机制，期待为临床治疗焦虑症和抑郁症提供新的方法和参考。

1 材料

1.1 试药

薰衣草样品采自海南万宁兴隆南药园内，经中国医学科学院药用植物研究所海南分所资源栽培中心周亚奎副研究员鉴定为唇形科植物狭叶薰衣草 *Lavandula angustifolia* Mill，参照文献报道方法[11]制备 LVO；帕罗西汀片（批号：H0950043，中美天津史克制药有限公司）；间氯苯哌嗪（MCPP，批号：R031956，罗恩试剂公司）；地西泮片（批号：20200921，太原市振兴制药有限责任公司）；五羟色胺（5-HT）、γ-氨基丁酸 A 受体（$GABA_A$）、谷氨酸（Glu）试剂盒（批号分别为：DRE29060、DRE14537、DRE17329，北京博胜经纬科技有限公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号：BL521A，北京兰杰柯科技有限公司），颗粒体蛋白（GRN2B）一抗、代谢型谷氨酸受体 5（GRM5）一抗、囊泡谷氨酸转运蛋白 1（VGluT1）一抗、蛋白谷氨酸受体 1（GluR1）一抗、山羊抗兔二抗（批号分别为：AZ050、BOS4062BP871、BS3416、A1312、AF3211，碧云天生物技术有限公司）。

1.2 仪器

自制熏香仪（50 cm×50 cm×40 cm，其内部放置 1 个底半径为 20 cm，高为 20 cm 镂空的圆柱体，中间可放置香薰加热装置）；JLBehv-CUMSM-4 型慢性不可预知性温和刺激（CUMS）模型箱、RD-1112-OM-M4 型旷场活动仪、RD-1118-CO-M4 型自发活动实验箱、RD-1112-OM-M4 型动物旷场活动检测仪、RD-1119-FSTS-M4 型动物悬尾 / 游泳实验测定仪，RD-1107-BWB-M4 型动物明暗穿梭箱（上海欣软信息科技有限公司）；1510-04123 型酶标仪 [赛默飞世尔科技（上海）有限公司]。

1.3 实验动物

雄性昆明小鼠 96 只，体质量 18 ～ 22 g [海南省药物研究所动物实验中心，许可证号 SCXK（琼）2020-0013]；常规于 SPF 级动物房饲养，环境保持（23±2）℃温度和（50±5）% 湿度，日夜光照时间为 12 h/12 h，饲养 3 d 后随机分组进行相关实验。实验方案及规程符合海南省动物研究所伦理学审查标准（批准号：2021HL014）。

2 方法

2.1 MCPP 制备焦虑模型方法

除空白组外，其他各组小鼠参照文献报道方法[8, 11]，分别皮下注射 MCPP（8 mg • kg^{-1}，0.2

mL/ 只），连续 3 d，制备焦虑模型。若模型动物进入明箱次数和时间与空白组动物比较，降低程度具有显著差异，则提示造模成功 [2]。

2.2 CUMS 制备抑郁模型方法

参照文献方法 [12-14]，除空白组外，其余各组动物依次放置 CUMS 造模箱中进行包括声（1 min）、电（1 min）、明 / 暗光（2 min）等 3 种刺激，结合禁食 24 h、禁水 24 h、睡眠剥夺 24 h 及束缚 3 h • d^{-1} 等刺激进行抑郁模型的制备。每日随机挑选 1 ～ 2 种进行，相邻时间不能重复，连续刺激 28 d。若大鼠出现饮水减少、体质量减轻、毛色晦暗、探索行为减少等症状，则提示建模成功 [12]。

2.3 LVO 香薰吸入对焦虑模型小鼠的行为学变化的考察

雄性昆明小鼠 48 只，随机分为 6 组，每组 8 只，分别为空白组，模型组，阳性组，LVO 低、中、高剂量组（4、8、16 μL）。除空白组外，其余各组小鼠按照“2.1”项下方法制备焦虑模型。阳性组腹腔注射地西泮（2 mg • kg^{-1}，0.25 mL/ 只）；LVO 各组动物 1 h/ 次置香薰仪中进行香熏吸入，连续 7 d。

明暗箱穿梭检测：在第 2、5 日给药 1 h 后，记录小鼠 5 min 内在暗室运动的总路程和平均运动速度，取两次测定结果的平均值进行统计。

旷场活动检测：在第 3、6 日给药 1 h 后，采用计算机监测分析系统进行实时记录，观察动物的运动路程、运动速度等自发活动，观察时间为 10 min，取两次测定结果的平均值进行统计。

2.4 LVO 香熏吸入对抑郁模型小鼠的行为学变化的考察

按照“2.2”项下方法进行造模，造模后第 22 日开始给药。阳性组动物采取腹腔注射方式给予帕罗西汀（10 mg • kg^{-1}）0.25 mL；LVO 各组动物 1 h/ 次置薰香仪中进行香薰吸入，连续 7 d。

自发活动实验：在第 22、25、28 日，采用计算机监测分析系统进行实时记录。小鼠放入自主活动箱后应适应 3 min，全程采用自动录像设备记录 10 min 内各组小鼠运动的总路程以及平均速度，实验间应采用 30% 乙醇溶液进行场箱内壁及底面的清洁。实验全程应保持安静状态，取三次测定结果的平均值进行统计。

悬尾实验：在第 23、26 日，用医用胶布固定小鼠尾部于挂钩上，使其倒悬，固定部位距小鼠尾尖 1 cm。利用计算机信号采集传感器采集小鼠挣扎时张力变化，记录 6 min 内小鼠悬尾不动时间，并统一收集统计后 4 min 数据进行分析，取两次测定结果的平均值进行统计。

强迫游泳实验：在第 24、27 日，将小鼠放置高 20 cm，直径 18 cm，水深 12 cm 的恒温游泳仪中，利用强迫游泳实时监测系统，采集记录 6 min 内小鼠游泳活动状态，并统一收集统计后 4 min 数据进行分析，取两次测定结果的平均值进行统计。

2.5 脑组织海马相关神经递质水平及功能蛋白表达

2.5.1 ELISA 法测定脑组织海马相关神经递质水平　末次给药后，采用脱颈椎处死小鼠，于冰袋上断头取脑，生理盐水冲洗并用滤纸擦干后称重。剥离脑海马组织，加入生理盐水在 4 ℃下冰浴匀浆，并以 3000 r • min^{-1} 低温离心 15 min，离心液使用酶标仪进行 *OD* 值的测定。采用 ELISA 法按照试剂盒说明制作标准曲线，计算样品中 Glu、5-HT、$GABA_A$ 的水平。

2.5.2 Western blot 对小鼠脑组织中蛋白表达的检测　将小鼠海马体脑组织从全脑中分离，加入生理盐水匀浆，离心，弃去上清液，加入 RIPA 裂解液后进行蛋白定量，按照试剂盒说明，应用酶标仪对海马体脑组织中的蛋白进行浓度检测，进行配胶并上样、电泳，转膜至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后，加入一抗 β-actin（1∶2000），GRN2B（1∶1000），GRM5（1∶1000），GluR1（1∶1000），VGluT1（1∶1000）。样本置 4 ℃温度下过夜，二抗置于室温条件下孵育后，采用凝胶成像仪成像的方法测定。

2.6 数据分析和处理

实验结果均采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计学处理。采用单因素方差分析（One-way ANVOA）比较各数据，各组数据之间进行方差齐性检验，方差齐性一致的组进行两两比较采用最小显著性差异法（LSD），方差不齐的组间比较采用 Dunnett-*t* 检验，$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义，并使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制成柱形图展示。

3 结果

3.1 对模型小鼠行为学方面的影响

3.1.1 对焦虑模型小鼠行为学的影响　结果显示，与空白组比较，模型组运动总路程、平均运动速度及静止时间差异有统计学意义，表明造模成功；与模型组比较，阳性组及 LVO 中、高剂量组均能显著降低小鼠运动总路程和平均运动速度，增加静止时间。阳性给药组及 LVO 中、高剂量组能够显著降低焦虑模型小鼠在暗箱中运动路程和运动速度。说明 LVO 香薰吸入可影响模型小鼠的自主活动行为（见图 1）。

3.1.2 对抑郁模型小鼠行为学的影响　自发活动

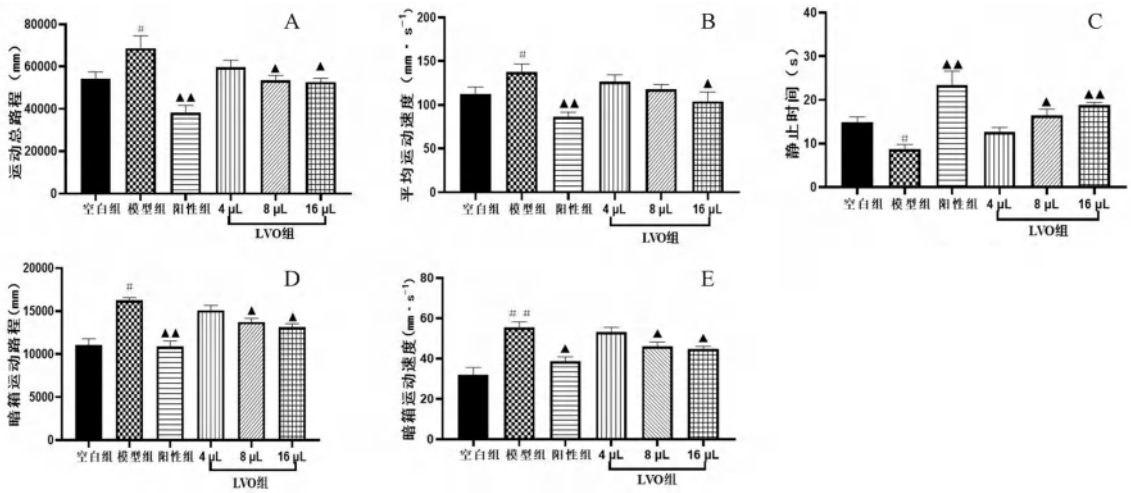

图 1 LVO 熏香吸入对焦虑模型动物旷场实验（A ～ C）和明暗箱穿梭实验（D ～ E）行为学的影响（n = 8）

Fig 1 Effect of LVO inhalation on the behavior in the open field test（A ～ C）and light-dark transition test（D ～ E）of the anxiety model（n = 8）

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。

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

实验结果如图 2（A、B、C）所示，与空白组比较，抑郁模型组在运动总路程、运动速度及静止时间差异具有统计学意义，说明造模成功；与模型组比较，阳性组及 LVO 中、高剂量组可以显著增加抑郁模型组动物运动总路程和运动速度，减少抑郁模型动物静止时间。

强迫游泳实验和悬尾实验结果如图 2（D、E）所示，与空白组比较，抑郁模型组强迫游泳不动时间、悬尾不动时间均显著增加，说明造模成功；与抑郁模型组比较，阳性组对抑郁模型动物强迫游泳及悬尾不动时间均有显著的降低；LVO 中、高剂量组均可降低抑郁模型动物强迫游泳不动时间，LVO 各剂量组均可降低悬尾不动时间。说明 LVO 对抑郁模型动物强迫游泳不动时间和悬尾不动时间有影响。

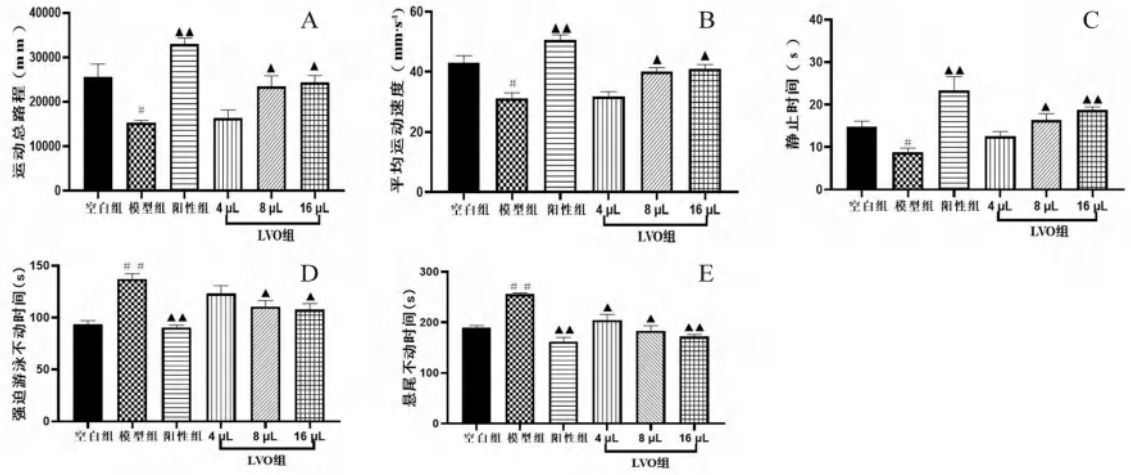

图 2 LVO 熏香吸入对抑郁模型小鼠自发活动实验、强迫游泳实验和悬尾实验行为学评价的影响（n = 8）

Fig 2 Effect of LVO inhalation on the behavior evaluation of spontaneous activity test，forced swimming test and tail suspension test of the depression model（n = 8）

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。

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

3.2 对模型小鼠脑海马组织中神经递质 Glu、$GABA_A$、5-HT 水平的影响

3.2.1 对焦虑模型小鼠脑海马组织中神经递质的影响 结果如图 3 所示，与空白组比较，模型组脑组织中 Glu 水平显著升高，而 $GABA_A$ 和 5-HT 水平显著下降，说明造模成功；与模型组比较，阳性组和 LVO 各剂量组的 Glu 水平显著降低；阳性给药组 $GABA_A$、5-HT 水平均显著升高；LVO 组中、高剂量组 $GABA_A$ 水平均显著升高；LVO 各剂量组 5-HT 水平显著升高。从以上结果可以看出，LVO 香熏后对焦虑模型动物 Glu、$GABA_A$、5-HT 递质水平有调控作用。

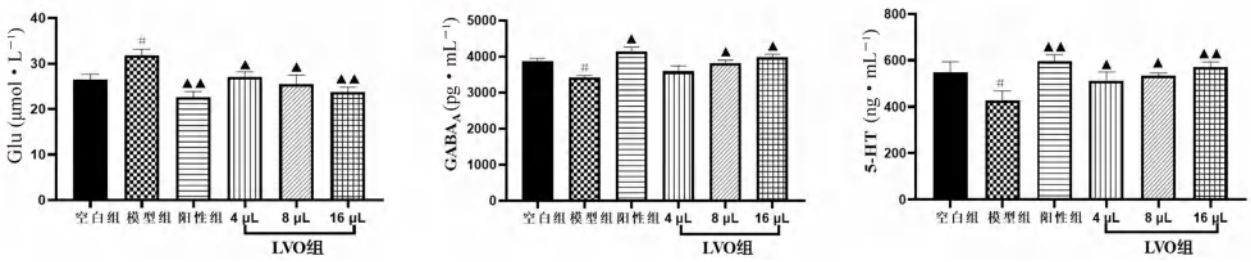

图 3　LVO 香薰吸入对焦虑模型小鼠脑组织 Glu，$GABA_A$ 及 5-HT 的影响（$n = 8$）

Fig 3　Effect of LVO inhalation on the level of 5-HT，$GABA_A$，and Glu of the anxiety model（$n = 8$）

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型对照组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。

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

3.2.2　对抑郁模型小鼠脑海马组织中神经递质的影响　结果如图 4 所示，与空白组相比，模型组的 5-HT 和 Glu 水平降低，而 GABAa 水平升高，说明造模成功；与模型组相比，阳性组和 LVO 各剂量组均能显著提高抑郁模型动物 5-HT 和 Glu 水平；阳性对照组和 LVO 中、高剂量组可显著降低抑郁模型动物 $GABA_A$ 水平。以上结果说明 LVO 熏香能调控抑郁模型动物脑组织中神经递质 5-HT、Glu、$GABA_A$ 的水平。

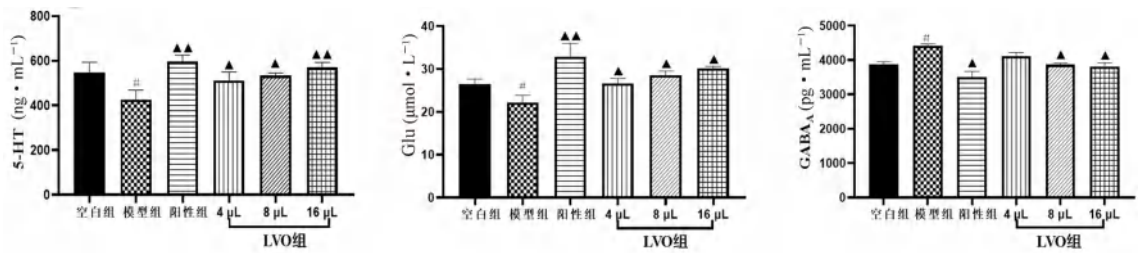

图 4　LVO 香熏吸入对抑郁模型小鼠脑组织 5-HT，$GABA_A$ 及 Glu 的影响（$n = 8$）

Fig 4　Effect of LVO inhalation on the level of 5-HT，$GABA_A$，and Glu of the depression model（$n = 8$）

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。

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

3.3　对脑内海马体中 GRN2B、GRM5、GluR1、VGluT1 相关蛋白表达的影响

3.3.1　对焦虑模型小鼠脑内海马体中相关蛋白表达的影响　从 Western blot 实验结果可以看出（见图 5、6），与模型组相比，阳性组可增强 GRN2B、GRM5 蛋白的表达，减弱 VGluT1 蛋白的表达，而对 GluR1 蛋白表达无明显影响；LVO 高剂量组可增强 GRN2B 蛋白的表达，LVO 各组均可明显增强 GRM5 蛋白的表达，而低、中剂量组则显著减弱 GluR1、VGluT1 蛋白的表达，而地西泮组差异无统计学意义，提示 LVO 香薰抗焦虑的作用机制与地西泮可能有一定区别。同时 LVO 随着高剂量组对 GluR1 蛋白的表达有增强的趋势，是否与 Glu/GABA 的平衡转化有关或具有双向调节作用，需进一步深入研究。

3.3.2　对抑郁模型小鼠脑内海马体中相关蛋白表达的影响　从 Western blot 结果可以看出（见图 7、8），与模型组比较，阳性给药组可增强 GRN2B、GluR1 的蛋白表达，而 LVO 组各组均可增强 GRN2B 蛋白的表达，中、高剂量组可增强 GluR1、VGluT1 蛋白的表达，而均对 GRM5 蛋白的表达无明显影响，提示 LVO 抗抑郁的作用可能与帕罗西汀相似。

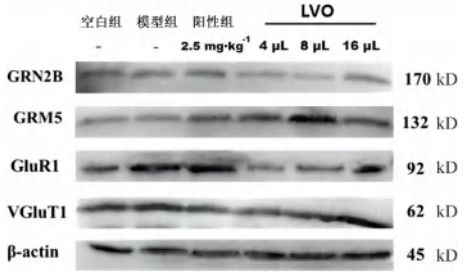

图 5　LVO 香熏吸入对焦虑模型小鼠脑组织中 GRN2B，GRM5，GluR1 及 VGluT1 蛋白表达的影响

Fig 5　Effect of LVO inhalation on the expression of GRN2B，GRM5，GluR1，and VGluT1 of the anxiety model

4　讨论

临床上抑郁症和焦虑症往往有同时存在的现象[15-17]，称为焦虑抑郁综合征[18]。发病时伴随的临床症状较多，病情复杂，且容易复发[19]，西医多采用联合用药的方式进行治疗，但药物副作用较大[20]。

4.1　LVO 对抑郁模型动物和焦虑模型动物行为学的影响

旷场实验是常用的观察动物在陌生环境下因恐惧而产生焦虑行为的实验，可评价动物是否有焦虑和抑郁的行为，通常抗焦虑药物会增加动物在中央区域的活动频率[21]；动物本能地对明亮的地方有排

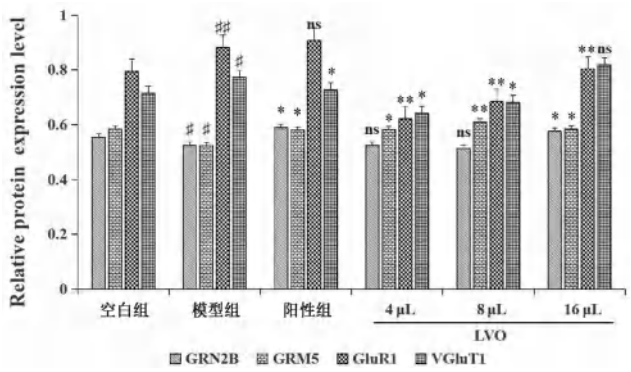

图 6 LVO 香熏吸入对焦虑模型小鼠脑组织中 GRN2B，GRM5，GluR1 及 VGluT1 蛋白相对表达量的影响

Fig 6 Effect of LVO inhalation on the expression of GRN2B，GRM5，GluR1，and VGluT1 of the anxiety model

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

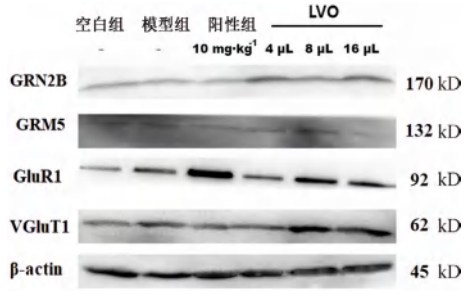

图 7 LVO 香熏吸入对抑郁模型小鼠脑组织 GRN2B，GRM5，GluR1 及 VGluT1 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of LVO inhalation on the expression of GRN2B，GRM5，GluR1，and VGluT1 of the depression model

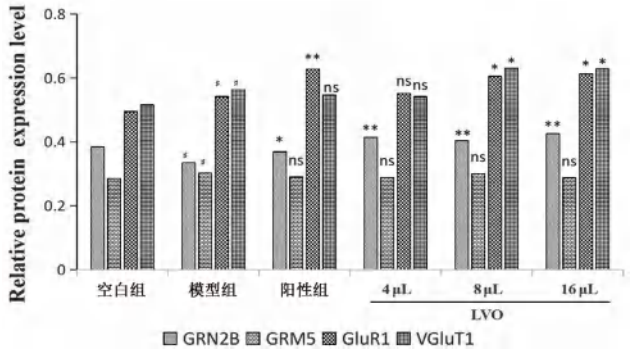

图 8 LVO 香熏吸入对抑郁模型小鼠脑组织 GRN2B，GRM5，GluR1 及 VGluT1 蛋白表达的影响

Fig 8 Effect of LVO inhalation on the expression of GRN2B，GRM5，GluR1，and VGluT1 of the depression model

注：与空白组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

斥和好奇两种倾向 [22]，有报道称正常动物或低焦虑动物在暗箱中的活动频次和时间会低于高焦虑水平的动物 [23]；CUMS 是目前公认较为成功的制作抑郁症模型的方法 [24]，可造成动物探索行为能力降低、兴趣丧失、绝望表现（增加悬尾不动时间和强迫游泳不动时间）等一系列表现 [25]，评价行为学指标的变化是神经精神药物研究中常见的方法 [26]。

实验结果显示，LVO 中、高剂量组均能显著改善焦虑模型动物在旷场以及暗箱中活动频次高的现象，增加其在旷场中的静止时间；而对抑郁模型动物，LVO 中、高剂量组可显著增加其自发活动的活动频率，同时 LVO 各剂量组均可增加其在强迫游泳实验中的活动时间，LVO 中、高剂量组还能显著增加其悬尾挣扎时间。以上结果说明，LVO 香熏吸入后对焦虑模型动物和抑郁模型动物出现的行为学活动现象均有一定的改善作用。

4.2 LVO 对焦虑模型和抑郁模型动物相关神经递质的影响

单胺类神经递质学说是目前研究焦虑症和抑郁症的主流学说之一 [27]，认为如 5-HT、多巴胺（DA）、去甲肾上腺素（NE）、GABA、Glu 等递质水平发生变化，是导致焦虑症和抑郁症疾病产生的原因之一，有报道称抑郁症和焦虑症患者体内 5-HT 递质水平偏低 [28]，而焦虑症患者体内 GABA 等递质水平偏低 [29-30]。本研究以 Glu、5-HT、$GABA_A$ 递质水平变化为考察指标，结果发现 LVO 香薰后可以降低焦虑模型动物 Glu 水平，升高 $GABA_A$、5-HT 水平，同时能提高抑郁模型动物 5-HT 和 Glu 水平，降低 $GABA_A$ 水平。结果说明 LVO 香熏抗焦虑、抗抑郁的作用可能与调控 Glu、$GABA_A$、5-HT 神经递质的水平有关。

4.3 LVO 对焦虑模型动物和抑郁模型动物相关蛋白表达的影响

研究表明 GRN2B 是谷氨酸受体的亚基，在神经元可塑性，情绪调节过程中发挥着重要作用 [31]；促代谢性谷氨酸受体 5（GRM5）与精神类疾病的发生有一定的关联性 [32]；AMPA 受体与抑郁症的发生有很大相关性 [33-34]，升高 GluR1、GluR2 的表达及 GluR1 磷酸化水平，对 CUMS 造模的抑郁样行为有改善作用 [35-36]。VGluT1 可协助谷氨酸在囊泡间进行转运，对维持机体内谷氨酸含量平衡起到重要作用 [37-38]。神经生理学研究表明，机体内兴奋型的神经递质 Glu 与抑制型的神经递质 GABA 可以相互转化，Glu 与 GABA 之间的平衡是否稳定与大脑兴奋或抑制有一定关联性 [39]。LVO 香熏抗焦虑作用可能与提高脑组织中 GRN2B 及 GRM5 蛋白的表达有关；同时低、中剂量组可降低焦虑模型动物的 GluR1、VGluT1 蛋白的表达，而高剂量组对 Glu 相关蛋白表达反而呈现加强的趋势，其原因是

否与 Glu/GABA 的平衡转化有关或具有双向调节作用，需进一步深入研究。LVO 香薰抗抑郁作用机制可能与提高 GRN2B、GluR1、VGluT1 蛋白的表达，加强或维持 Glu 的兴奋性信息传递有关。

综上可知，LVO 香熏吸入对 MCPP 诱导的焦虑样行为和 CUMS 诱导的抑郁样行为均有改善作用，其作用机制可能与调控脑内海马体 5-HT 等神经递质水平，影响 GRN2B 等相关蛋白表达有一定的关联，研究结果为下一步开展深入的机制探索提供了方向。

参考文献

[1] 刘欢乐，卫拂晓，秦雪梅，等 . 中西药联合用药抗抑郁研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（16）：3776-3783.

[2] 兰嘉琦，赵春阳，吴镭，等 . 抗焦虑障碍药物非临床药效学评价体系探索 [J]. 药学学报，2021，56（4）：949-965.

[3] Liang L，Yu AL，Wang ZL，et al. Chaihu-Shugan-San and absorbed meranzin hydrate induce antiatherosclerosis and behavioral improvements in high-fat diet ApoE$^{-/-}$ micevia anti-inflflammatory and BDNF-TrkB pathway [J]. Biomed Pharmacother，2019，115：108893.

[4] 汤涔 . 中西医结合治疗抑郁症的临床分析 [J]. 中国医药指南，2018，16（8）：176.

[5] Demesquita S. p-Chloroamphetamine：effect on sleep and respiration in the rat [J]. Pharmacol Biochem Be，1985，22（5）：889-891.

[6] 都田芳，赵军，窦勤，等 . 复方薰衣草颗粒镇静催眠及改善认知障碍作用研究 [J]. 药物评价研究，2022，45（11）：2215-2223.

[7] 新疆维吾尔自治区卫生厅，维吾尔药材标准（上册）[M]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生出版社，1991：394.

[8] Wang S，Wang CH，Yu ZX，et al. Agarwood essential oil ameliorates restrain stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity [J]. Int J Mol Sci，2018，19：3468.

[9] Coelho LS，Correa-Netto NF，Masukawa MY，et al. Inhaled Lavandula angustifolia essential oil inhibits consolidation of contextual-but not tone-fear conditioning in rats [J]. J Ethnopharmacol，2018，215：34-41.

[10] Lucia C，Marina D，José M，et al. Lavandula angustifolia essential oil and linalool counteract social aversion induced by social defeat [J]. Molecules（Basel，Switzerland），2018，23（10）：2694.

[11] 贾丽华，陈卫民 . 新疆薰衣草挥发油提取工艺及药理作用研究进展 [J]. 中国误诊学杂志，2010，10（21）：5057-5058.

[12] Xie WJ，Meng XB，Zhai YD，et al. Panax notoginseng saponins：a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology [J]. Molecules，2018，23：940.

[13] 张齐，武丽，高月，等 . 抑郁症、焦虑症模型大鼠情绪加工神经环路 5-HT、5-HT$_{1A}$ 含量变化以及加味温胆汤的双向调节作用研究 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（12）：62-65.

[14] Li KW，Yan L，Zhang YP，et al. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function [J]. J Ethnopharmacol，2020，250：112487.

[15] Chai C，Jin B，Yan YY，et al. Study on serum metabolomics and hippocampus signaling pathway to evaluate the anti-depressant effect of Zhi-zi-chi decoction on CUMS mice [J]. J Ethnopharmacol，2020，266：113283.

[16] Hunt C，Issakidis C，Andrews G. DSM-IV generalized anxiety disorder in the Australian National Survey of Mental Health and Well-Being [J]. Psychol Med，2002，32（4）：649-659.

[17] Gorman JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders [J]. Depress Anxiety，1996，4（4）：160-168.

[18] Choi KW，Kim YK，Jeon HJ. Comorbid anxiety and depression：clinical and conceptual consideration and transdiagnostic treatment [J]. Adv Exp Med Biol，2020，1191：219-235.

[19] 许秀峰 . 抑郁症的多学科协同治疗 [J]. 中华精神科杂志，2013，46（2）：114.

[20] 黄飞，姜祥智，徐勇，等 . 联合用药治疗抑郁症的效果和安全性 [J]. 齐鲁医学杂志，2016，31（1）：79.

[21] Prut L，Belaung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors：a review [J]. Eur J Pharmacol，2003，463：3-33.

[22] Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice [J]. Neurosci Biobehav Rev，1985，9：37-44.

[23] 魏伟 . 药理实验方法学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2010：653-654.

[24] 田萍，张薇，李开言，等 . 地黄对慢性不可预知温和应激模型大鼠抑郁样行为及海马单胺类神经递质的影响 [J]. 中国中药杂志，2022，47（17）：4691-4697.

[25] 王钦，蔡萧君，李宇，等 . 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（21）：44-53.

[26] 买文丽，王琼，刘新民，等 . 小鼠自主活动实验中的评价指标 [J]. 中国实验动物学报，2008，16（3）：172-175，244.

[27] Schienle A，Hettema J，Caceda R，et al. Neurobiology and genetics of generalized anxiety disorder [J]. Psychiatr Ann，2011，41：113-123.

[28] 许鹏，周童，孙易娜，等 . 通督安神方对抑郁模型大鼠治疗作用及其机制研究 [J]. 时珍国医国药，2022，33（3）：542-546.

[29] Kumar JR，Rajkumar R，Lee LC，et al. Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats：involvement of 5-HT 1A receptors [J]. Neuropharmacology，2016，110：1-14.

[30] 谢正，王娜，李恒芬，等 . 5- 羟色胺 1A 受体基因 1019 6295 单核苷酸多态性与中国汉族人群焦虑障碍的关联分析鄢 [J]. 中国现代医学杂志，2016，26（11）：29-33.

[31] 佚名 . 杨巍教授和罗建红教授团队揭示 *N*- 甲基 -*D*- 门冬氨酸受体 GluN2B 磷酸化修饰介导抑郁症新机制 [J]. 浙江大学学报（医学版），2021，50（4）：528.

[32] 柴潇潇，王秀丽 . *N*- 甲基 -*D*- 门冬氨酸受体 2B 亚基在

抑郁症形成机制中作用的研究进展[J]. 河北医药，2014（21）：3323-3325.
[33] Bao HK，Sun LJ，Zhu Y，et al. Lentinan produces a robust antidepressant-like effect via enhancing the prefrontal Dectin-1/AMPA receptor signaling pathway [J]. Behav Brain Res，2017，317：263-271.
[34] Xiao D，Liu L，Li YJ，et al. Licorisoflavan a exerts antidepressant-like effect in mice：involvement of BDNF-TrkB pathway and aMPA receptors [J]. Neurochem Res，2019，44（9）：2044-2056.
[35] Hou XY，Hu ZL，Zhang DZ，et al. Rapid antidepressant effect of hydrogen sulfide：evidence for activation of mTORC1-TrkB-AM-PA receptor pathways [J]. Antioxid Redox Signal，2017，27（8）：472-488.
[36] Suzuki A，Murakami K，Tajima Y，et al. TAK-137，an AMPA receptor potentiator with little agonistic effect，produces antide-pressant-like effect without causing psychotomimetic effects in rats [J]. Pharmacol Biochem Behav，2019，183：80-86.
[37] Takata K，Kasahara T，Kasahara M，et al. Erythrocyte/Hep G2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers [J]. Biochem Biophres Co，1990，173：67-73.
[38] 俞晓燕，孙子林 . GLUT1 的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志，2012，21（30）：3411-3414.
[39] 弓宝，王灿红，王新腾，等 . 沉香线香燃香吸入助睡眠作用及机制探究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2022，24（4）：1567-1574.

（收稿日期：2023-03-29；修回日期：2023-06-02）

基于 RBL-2H3 细胞的复杂基质生化药类过敏反应评估及体内外相关性评价

吴畅[1, 2]，杨奇涛[2, 3]，王瑶[2]，吴殷囡[1, 2]，刘洋[2]，孟长虹[2]，陆益红[2]，汪玉馨[2*]，史清水[2*]（1. 徐州医科大学，江苏 徐州 221004；2. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；3. 中国药科大学，南京 211198）

摘要：目的 建立适宜的细胞模型对复杂基质生化药骨肽类注射剂和垂体后叶注射剂类过敏反应风险进行评估，并与类过敏反应体内评价模型实验结果的相关性进行比较。**方法** 采用 RBL-2H3 细胞脱颗粒实验，选择β-氨基己糖苷酶作为适宜的评价指标以评估骨肽类注射剂和垂体后叶注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响；采用实验室已建立的类过敏反应体内评价模型小鼠耳郭蓝染实验，以蓝染率及伊文思蓝升高率为指标评价两种复杂基质生化药注射剂体内类过敏反应风险的相关性。**结果** 骨肽类注射剂可诱导β-氨基己糖苷酶的释放率增加，与阴性对照组相比差异存在统计学意义（$P < 0.01$），垂体后叶注射剂不可诱导β-氨基己糖苷酶的释放。小鼠耳郭蓝染实验高剂量组中，复方骨肽注射液和骨肽注射液为临床等效剂量的 6.67、10 倍，类过敏反应阳性率分别为 100%、66.7%；随着剂量的降低，复方骨肽注射液和骨肽注射液为临床等效剂量的 1.67、2 倍时，类过敏反应均判定为阴性，垂体后叶注射剂类过敏反应均为阴性，与体外结果一致。**结论** 通过结合 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型与小鼠耳郭蓝染模型可对药物类过敏反应风险进行评估和筛查，同时也可为复杂基质类生化药类过敏反应物质基础及机制的研究评价提供参考和手段。

关键词： 类过敏反应；复杂基质生化药；RBL-2H3 细胞；小鼠耳郭蓝染实验
中图分类号： R392.8 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2023)08-1998-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.004

Evaluation of anaphylactoid reactions induced by complex matrix biochemical drugs based on RBL-2H3 cells and its in vivo correlation

WU Chang[1, 2], YANG Qi-tao[2, 3], WANG Yao[2], WU Yin-nan[1, 2], LIU Yang[2], MENG Chang-hong[2], LU Yi-hong[2], WANG Yu-xin[2*], SHI Qing-shui[2*] (1. *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou Jiangsu* 221004; 2. *Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019; 3. *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

基金项目： 江苏省药品监督管理局科研计划课题（编号：202119）。
作者简介： 吴畅，女，硕士，主要从事药理毒理研究，email：wuchang0703@163.com *__通信作者__：汪玉馨，女，副主任药师，主要从事药理毒理研究，email：wyx_carrie@163.com；史清水，男，主任药师，主要从事药理与药品检验研究，email：qsshi@126.com

Abstract: Objective To establish an appropriate cell model to evaluate the risk of anaphylactoid reactions induced by complex matrix biochemical drugs such as osteopeptide injections and posterior pituitary injections, and to compare the correlation with the results of evaluation model of anaphylactoid reactions in vivo. **Methods** RBL-2H3 cell degranulation test was done and *β*-hexosaminidase (*β*-Hex) was used as an evaluation indicator to determine the effect of osteopeptide injections and posterior pituitary injections on RBL-2H3 cell degranulation. The mouse ear blue staining test was conducted in the laboratory before, which was used to evaluate the anaphylactoid reaction in vivo, and the risk of anaphylactoid reactions in vivo between two complex matrix biochemical injections with the increase rate in blue staining rate and Evans blue (EB) as indicators. **Results** Osteopeptide injections induced the increase release of *β*-Hex, with a statistical difference when compared with the negative control group ($P < 0.01$). The posterior pituitary injections failed to induce the release of *β*-Hex. Among the high-dose groups on the mouse ear blue staining test, when the compound bone peptide injections and bone peptide injections were 6.67 and 10 time of the clinical equivalent dose, the positive rates of anaphylactoid reactions were 100% and 66.7%. However, with the decrease of dose, when the compound bone peptide injections and bone peptide injections were 1.67 and 2 times of the clinical equivalent dose, and the anaphylactoid reactions were negative. The anaphylactoid reactions of the posterior pituitary injection were negative, which was consistent with in vitro the results. **Conclusion** Combination of RBL-2H3 cell degranulation model and mouse ear blue staining model can assess and screen the risk of anaphylactoid reactions, and also provide reference and means for research and evaluation of the substance basis and mechanism of anaphylactoid reactions of complex matrix biochemical drugs.

Key words: anaphylactoid reaction; complex matrix biochemical drug; RBL-2H3 cell; mouse ear blue staining

类过敏反应发生于首次给药后，无需 IgE 介导，临床主要表现为注射部位反应，恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道反应，血压下降等循环系统反应以及过敏性休克等[1-2]，与Ⅰ型过敏反应临床症状表现相似，容易混淆[3]。同时，类过敏反应的发生机制较为复杂，与肥大细胞表面受体、补体系统以及凝血系统等多种因素有关[4-6]，目前尚未建立公认的体内外评价标准，因此类过敏反应体内外评价方法及药物评估研究具有重要意义，可以为药物的类过敏的判断和筛查、临床用药的安全性的提升提供借鉴和参考。

近年来类过敏反应体外评价方法多为细胞脱颗粒实验，用于研究的细胞模型[7-9]有大鼠嗜碱性细胞白血病细胞（RBL-2H3）、人外周血嗜碱性白血病细胞（Ku812）、小鼠肥大细胞瘤细胞（P815）和人肥大细胞（LAD2），除了直观的细胞染色方法[10]，组胺、*β*-氨基己糖苷酶、类胰蛋白酶等作为肥大细胞与嗜碱性粒细胞脱颗粒时释放的物质[11]，常用作评价脱颗粒程度的有效指标；而对于类过敏反应体内实验，涉及到的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、比格犬、猪等[12]，常用于体内类过敏风险评价的实验方法有小鼠耳郭蓝染实验[13]、大鼠皮肤蓝斑实验[14]，具有直观的定性与较为合适的定量判断标准，适用于药物的类过敏相关性筛选。

骨肽类注射剂和垂体后叶注射剂均为多组分生化药，属于复杂基质药物，其不良反应多表现在皮肤、呼吸系统、消化系统，临床表现为皮疹、瘙痒、呕吐、咳嗽、呼吸困难、寒战、发热、过敏性休克等，多为过敏样反应[15-18]。本课题通过建立体外细胞模型与动物体内模型相结合，并对检测指标进行筛选以评估这两种复杂基质类药物的类过敏反应，同时采用已建立的类过敏反应体内评价模型，即筛选好阳性对照组药物及摸索出适宜的染料浓度的小鼠耳郭蓝染实验进行评估，比较体内外模型实验结果的相关性[19]。

1 材料

1.1 *动物*

SPF 级 ICR 健康小鼠，雌雄各半，体质量为 22 ～ 24 g [北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（浙）2019-0001，使用许可证号：SYXK（苏）2019-0047]。动物饲养于江苏省食品药品监督检验研究院屏障系统内，自由饮水，室温 20 ～ 22 ℃，相对湿度 60% ～ 70%，昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h，适应性喂养 7 d 后进行实验。本实验经江苏省食品药

品监督检验研究院实验动物福利伦理审查委员会批准（审查编号为 JSIFDC2020-04）。

1.2 细胞

大鼠嗜碱性细胞白血病细胞（RBL-2H3）[美国模式菌种收集中心（ATCC）]。

1.3 试药

复方骨肽注射液（企业 A、B）、骨肽注射液（企业 C、D、E）、垂体后叶注射液（企业 F、G）；组胺（北京百灵威科技有限公司，批号：LK90T46）；0.9% 氯化钠注射液（中国大冢制药有限公司，批号：8J95D4）；伊文思蓝（EB，批号：MKCF0851）、甲酰胺（批号:94024020）、C48/80（批号:039M4108V）、4- 硝基苯基 -*N*- 乙酰 -*β*-*D*- 氨基半乳糖苷（批号：SLCB8641）、Triton X-100（批号：SLBZ2181）（Sigma 公司）；MEM 培养基、丙酮酸钠、青霉素 - 链霉素、MEM 非必需氨基酸、0.25% 胰酶（Gibco 公司）；柠檬酸、柠檬酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠（国药集团）。

1.4 仪器

Thermo 1300series A2 生物安全柜（美国赛默飞世尔科技公司）；5%CO_2 恒温培养箱（德国 Memmert 公司）；OLYMPUS IX53 倒置显微镜（日本奥林巴斯株式会社）；Panasonic mLS-3781L 高压蒸汽灭菌器（日本松下电器株式会社）；Countstar BioMed 细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；各种规格的移液器（德国艾本德 Eppendorf 公司）；XP6 型 / XS205DU 型电子天平（瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司，精度：0.1 mg）；Synergy H1 多功能酶标仪（美国博腾 Bio Tek 公司）；Beckman Coulter Allegra 64R 台式高速冷冻离心机（美国贝克曼库尔特有限公司）；XiangYi L-550 低速离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司）。

2 方法

2.1 RBL-2H3 细胞脱颗粒实验

2.1.1 细胞培养 RBL-2H3 细胞用含有 15% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素、1% 丙酮酸钠和 1% 非必需氨基酸的 MEM 培养基培养于 37 ℃、5%CO_2 培养箱内，对数生长期间 2 ～ 3 d 按比例传代。

2.1.2 细胞分组及给药 取对数期生长的 RBL-2H3 细胞，以 2×10^5 个 • mL^{-1} 的细胞密度，每孔 200 μL 接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，吸弃培养液，用 PBS 缓冲液清洗 2 次，设置分组。

① 骨肽注射剂组：阴性组（台氏液）；阳性组（10 μg • mL^{-1} C48/80）；总酶组（0.1% Triton X-100 裂解液）；药物组，复方骨肽注射液与骨肽注射液稀释至 0.5 mg • mL^{-1}。

② 垂体后叶注射剂组：阴性组（台氏液）；阳性组（0.025 mg • mL^{-1} C48/80）；总酶组（0.1% Triton X-100 裂解液）；药物组（垂体后叶注射液稀释至 0.3 U • mL^{-1}）。

上述各组设置 6 个复孔，每孔 200 μL，培养箱内孵育 30 min 后收集上清液，再用 PBS 缓冲液清洗 2 次，除总酶组外每孔加 200 μL 0.1% Triton X-100 裂解液，培养箱孵育 30 min 收集上清液。

2.1.3 *β*- 氨基己糖苷酶释放率测定 取 50 μL 各组上清液，添加台氏液作为空白组，加入 50 μL 基质液（含 1 mmol•L^{-1} 底物 4- 硝基苯基 -*N*- 乙酰 -*β*-*D*- 氨基半乳糖苷的 0.1 mol • L^{-1} 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液，pH 4.5，过滤除菌），37 ℃孵育 1 h，每孔加 150 μL 终止液（0.1 mol • L^{-1} Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 缓冲液，pH 11，过滤除菌），5 min 内测定 405 nm 处的吸光度（*OD*）值。细胞外 *β*- 氨基己糖苷酶释放率（%）=（阴性组 *OD*/ 给药组 *OD* －空白组 *OD*）/（总酶组 *OD* －空白组 *OD*）×100%；细胞内 *β*- 氨基己糖苷酶剩余含量（%）=（阴性组 *OD*/ 给药组裂解后 *OD* －空白组裂解后 *OD*）/（总酶组裂解后 *OD* －空白组裂解后 *OD*）×100%。

2.2 小鼠耳郭蓝染实验

本实验中设定的类过敏反应判断标准如下：a. 耳郭蓝染发生率≥ 30%；b. 耳郭 EB 升高率≥ 50%。若同时符合 a、b 两项条件，则类过敏反应判断为阳性。

2.2.1 溶液配制 称取 EB 1 g，溶于 50 mL 0.9% 氯化钠注射液，超声 10 ～ 15 min 至完全溶解，用 0.22 μm 的滤膜过滤后得到 2% EB，用于后续溶液配制；称取 EB 5 mg，溶于 5 mL 甲酰胺，混匀，配制成 1 mg • mL^{-1} 储备液，用 1 mg • mL^{-1} EB 甲酰胺储备液配制质量浓度为 10、8、6、4、2、1、0.5、0.25 μg•mL^{-1} 的 EB 甲酰胺标准曲线溶液。

2.2.2 动物实验分组 ICR 小鼠按照体质量随机分组，每组 6 只，实验分为 ① 阴性组：0.9% 氯化钠注射液（含 0.16% EB）；② 阳性组：0.5 mg • mL^{-1} 组胺的阳性对照溶液（含 0.16% EB）；③ 药物组：复方骨肽注射液与骨肽注射液稀释成含 0.16% EB 的高剂量组（5 mg • mL^{-1}）、中剂量组（2.5 mg • mL^{-1}）和低剂量组（1 mg • mL^{-1}）；垂体后叶注射液稀释成含 0.16% EB 的高剂量组（0.6 U • mL^{-1}）和低剂量组（0.3 U • mL^{-1}）。

2.2.3 小鼠耳郭蓝染实验方法 每只小鼠尾静脉给予 0.5 mL 各组对应的溶液。给药 30 min 后脱颈处死小鼠，观察并记录各组出现耳郭蓝染色的动物数量，计算各组耳郭蓝染的发生率。立即沿耳根部剪去双耳后，剪成小块，用 2 mL 甲酰胺浸没，室温浸泡 48 h，提取耳郭中渗出的 EB 染料。

2.2.4 EB 渗出量测定 48 h 后将各组的双耳甲酰

胺浸泡液以 3000 r • min^{-1} 离心 15 min。离心后取各组上清液 200 μL 于 96 孔板中，添加标准曲线溶液，添加等量甲酰胺作为空白对照组，用酶标仪在 620 nm 下测定吸光度（*OD*）值。根据标准曲线计算 EB 含量，将其换算成 2 mL 甲酰胺中所含有 EB 染料的总渗出量，并计算 EB 升高率。EB 升高率（%）＝（给药组 EB 含量－阴性对照组 EB 含量）/ 阴性对照组 EB 含量 ×100%。

2.3　数据处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对所有实验数据进行统计分析，实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示；组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　类过敏反应体外评价方法的建立

本课题组在前期研究中采用间接荧光法，以组胺溶液为阳性组筛查骨肽注射剂时发现，在骨肽类注射剂中可能存在组胺类似物，对组胺的体外检测存在一定的干扰，而类胰蛋白酶的检测灵敏度较低，因此本研究选择 *β*- 氨基己糖苷酶为类过敏反应体外评价的指标。通过检测 *β*- 氨基己糖苷酶的释放率作为 RBL-2H3 细胞脱颗粒的指标，建立类过敏反应体外评价的模型，并对骨肽类注射剂和垂体后叶注射剂进行评估。

图 1A 显示，阴性组的细胞外 *β*- 氨基己糖苷酶释放率在 0.79% ～ 1.27%，各企业骨肽类注射剂的细胞外 *β*- 氨基己糖苷酶释放率在 1.61% ～ 2.72%。各组骨肽类注射剂给药 30 min 后均能引起 RBL-2H3 细胞外的 *β*- 氨基己糖苷酶的释放率增加，与阴性组相比，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。同时各组 RBL-2H3 细胞内的 *β*- 氨基己糖苷酶的剩余含量差异无统计学意义，表明各组骨肽类注射剂均能诱导 RBL-2H3 细胞的脱颗粒，可能存在类过敏反应的风险。

而在垂体后叶注射剂体外类过敏评价实验中，阴性组的细胞外 *β*- 氨基己糖苷酶释放率在 2.22% ～ 2.58%，各组垂体后叶注射剂的细胞外 *β*- 氨基己糖苷酶释放率在 1.52% ～ 2.74%。与阴性组相比，给药 30 min 后基本不能引起 RBL-2H3 细胞外的 *β*- 氨基己糖苷酶的释放率增加，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）（见图 1B）。

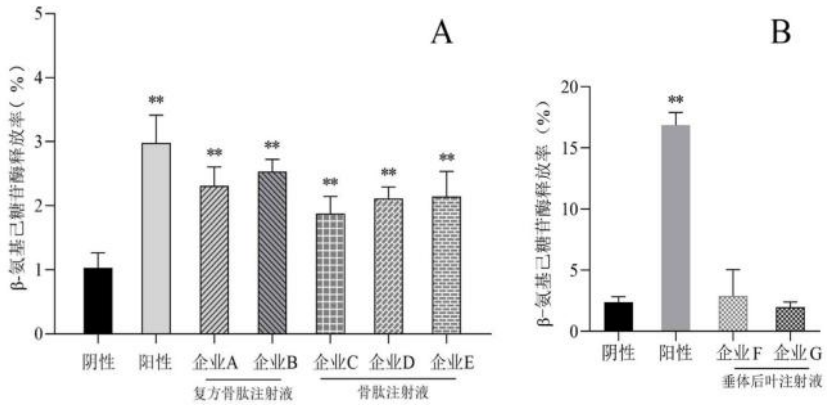

图 1　各企业骨肽注射剂（A）和垂体后叶注射剂（B）诱导 RBL-2H3 脱颗粒结果

Fig 1　RBL-2H3 degranulation induced by osteopeptide injections（A）and posterior pituitary injections（B）from various enterprises

注：与阴性对照组相比较，$^{*}P < 0.05$；$^{**}P < 0.01$。

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

3.2　类过敏反应体内评价方法的建立

利用小鼠耳郭蓝染实验，以磷酸组胺作为阳性对照，并依据类过敏反应判断标准，建立类过敏反应体内评价的模型，并对骨肽类注射剂及垂体后叶注射剂进行评估。根据复方骨肽注射液和骨肽注射液的临床等效剂量，设置高剂量组的药液质量浓度为 5 mg • mL^{-1}（均相当于临床等效剂量的 10 倍）、中剂量组的药液质量浓度为 2.5 mg • mL^{-1}（分别相当于临床等效剂量的 3.34、5 倍）和低剂量组的药质量液浓度为 1 mg • mL^{-1}（分别相当于临床等效剂量的 1.67、2 倍）。同理根据垂体后叶注射液临床最大等效剂量，设置高剂量组 0.6 U • mL^{-1}（1 倍）和低剂量组 0.3 U • mL^{-1}（0.5 倍）。

在骨肽类注射剂小鼠耳郭蓝染实验高剂量组中，不同企业的骨肽类注射剂引起的类过敏反应存在一定的差异（见图 2 和表 1）。根据 “2.2” 项下判定方法，企业 A 与企业 B 的复方骨肽注射液、企业 C 与企业 D 的骨肽注射液在高剂量下类过敏反应均判断为阳性；企业 E 的骨肽注射液类过敏反应呈阴性。在中剂量组中，企业 B 的复方骨肽注射液、企业 C 的骨肽注射液类过敏反应判断为阳性；企业 A

的复方骨肽注射液、企业 D 与企业 E 的骨肽注射液故类过敏反应呈阴性。由于企业 A 的复方骨肽注射液、企业 D 与企业 E 的骨肽注射液在中剂量时均呈现类过敏反应阴性，在低剂量组中不再考察。企业 B 的复方骨肽注射液和企业 C 的骨肽注射液在低剂量时，类过敏反应判定均为阴性（见图 3）。

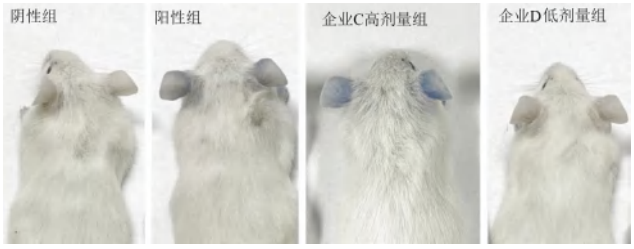

图 2 骨肽类注射剂体内类过敏实验小鼠蓝染典型图

Fig 2 Typical diagrams of mouse ear blue staining test about osteopeptide injections by anaphylactoid test in vivo

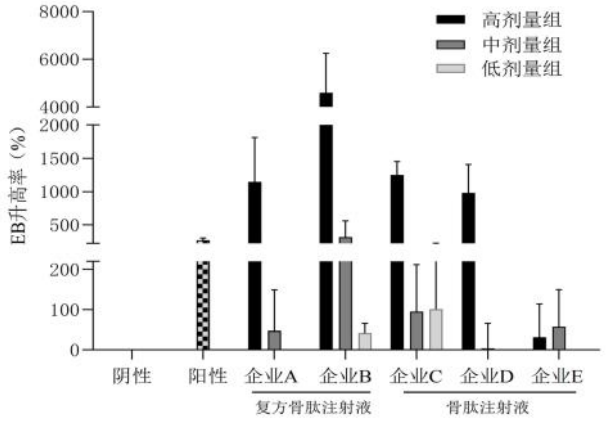

图 3 不同企业骨肽类注射剂耳郭蓝染实验的 EB 升高率

Fig 3 EB increase rate in mouse ear blue staining test of osteopeptide injections from different enterprises

在垂体后叶注射剂小鼠耳郭蓝染实验中，两个企业的垂体后叶注射液的高、低剂量组中，EB 升高率均低于 50%；蓝染发生率均为 0，与阴性组相比无显著性差异，类过敏反应判断为阴性（见图 4）。

图 4 垂体后叶注射剂体内类过敏实验小鼠蓝染典型图

Fig 4 Typical diagrams of mouse ear blue staining test about posterior pituitary injections by anaphylactoid test in vivo

4 讨论

药物的类过敏反应常发生在首次给药后 30 min 内，引起过敏样症状是由于类过敏相关物质进入体内引发肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒释放活性介质，从而导致一系列的炎症反应 [19]，因此可尝试利用相关细胞的脱颗粒实验对类过敏反应进行体外评价。肥大细胞或嗜碱性粒细胞中颗粒内容物主要有组胺、β-氨基己糖苷酶与类胰蛋白酶等，其中组胺的半衰期短，适用于早期检测；类胰蛋白酶在肥大细胞及嗜碱性颗粒中含量丰富，又能够稳定存在，但检测灵敏度较低；β-氨基己糖苷酶相比组胺的半衰期更长，存在较为稳定，检测灵敏度也较类胰蛋白酶更高，能够较好地反映细胞脱颗粒情况 [20-22]。结合本课题组前期的探究发现，组胺与类胰蛋白酶这两个指标都不适于用作类过敏体外评价，因此在本研究中选取了β-氨基己糖苷酶作为类过敏评价的主要指标。结果发现，复方骨肽注射液与骨肽注射液给药 30 min 后均能引起 RBL-2H3 细胞的β-氨基己糖苷酶释放率显著性增加，表明骨肽类注射剂可能存在类过敏反应的风险；而垂体后叶注射剂给药 30 min 后不引起 RBL-2H3 细胞的β-氨基己糖苷酶释放率显著性增加，表明其基本上不具有诱导类过敏反应的风险。这两种药物都属于复杂基质类生化药，成分较为复杂，药物本身成分可能对实验结果产生影响，仅采用体外细胞过敏实验难以确证实验结果。故本课题组又进行体内实验，可以与体外实验结果进行互相佐证，使实验结果具有一定的可靠性。

表 1 各企业骨肽类注射剂的耳郭蓝染结果（n = 6）

Tab 1 Mouse ear blue staining test of osteopeptide injections from various enterprises (n = 6)

制剂	生产企业	高剂量组（5 mg·mL^{-1}）			中剂量组（2.5 mg·mL^{-1}）			低剂量组（1 mg·mL^{-1}）		
		蓝染发生率 /%	EB 升高率 /%	结果判定	蓝染发生率 /%	EB 升高率 /%	结果判定	蓝染发生率 /%	EB 升高率 /%	结果判定
复方骨肽注射液	A	100	1145.38±668.39	＋	16.7	47.88±101.07	－	/	/	/
	B	100	4601.86±1752.15	＋	100.0	317.92±243.08	＋	0	42.48±23.45	－
骨肽注射液	C	100	1249.34±202.48	＋	83.3	95.76±116.28	＋	16.7	100.90±122.89	－
	D	100	981.97±425.12	＋	16.7	3.83±62.09	－	/	/	/
	E	0	31.83±82.31	－	16.7	57.52±91.79	－	/	/	/

注：“＋”表示类过敏反应阳性；“－”表示类过敏反应阴性。

Note：“＋” Means the anaphylactoid reactions in vivo is positive，“－” means the anaphylactoid reactions in vivo is negative.

小鼠耳郭蓝染实验是依据类过敏药物在体内引起组胺释放导致的血管通透性增加[23]，30 min内观察小鼠的耳郭蓝染情况是一种直观的评价方法，同时用甲酰胺萃取小鼠双耳的EB并通过定量化数据计算对类过敏反应的评价。根据骨肽类注射剂小鼠耳郭蓝染实验（相当于临床剂量的6.67倍）的类过敏反应判断均为阳性，骨肽类注射剂（相当于临床剂量的10倍）的类过敏反应阳性率为66.7%；随着给药剂量的降低，部分阳性组在中剂量时转变为阴性；当给药质量浓度为1 mg·mL^{-1}时，骨肽类注射剂（相当于临床剂量的1.67～2倍）的类过敏反应判断均为阴性，但与阴性对照组相比仍有差异。因此，骨肽类注射剂的安全窗较窄，存在一定的类过敏风险，需要考虑临床用药剂量的合理性，并且注意在输液期间的观察和检测。而垂体后叶注射剂均不诱导小鼠类过敏反应阳性，这一结果与骨肽注射液实验结果相比，证明本实验具有一定的筛选作用。

RBL-2H3细胞易于体外培养，而底物法测定β-氨基己糖苷酶快速稳定，便于对药物的体外初步筛选；小鼠耳郭蓝染实验具有较好的敏感性和特异性，检测周期短，可以进一步确认药物的类过敏风险。本实验可得出RBL-2H3细胞脱颗粒实验与小鼠耳郭蓝染实验的结果具有较好的一致性，通过结合体内外模型的实验结果可对骨肽类注射剂等复杂基质类药物类过敏反应风险作出评估，以对药物类过敏风险作出可靠的评估，为临床安全、合理用药以及建立类过敏反应临床前评估模型提供借鉴。

参考文献

[1] 王新宇，张艳仙，蒋睿，等 . 药物不良反应1055份报告分析 [J]. 临床合理用药杂志，2021，14（7）：141-142.

[2] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy：a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals [J]. Mol Immunol，2014，61（2）：163-173.

[3] 臧清策，靳洪涛，再帕尔·阿不力孜，等 . 注射剂中致敏成分分析方法研究进展 [J]. 中国药物警戒，2018，15（4）：216-220，225.

[4] McNeil BD，Pundir P，Meeker S，et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions [J]. Nature，2015，519（7542）：237-241.

[5] Őrfi E，Mészáros T，Hennies M，et al. Acute physiological changes caused by complement activators and amphotericin B-containing liposomes in mice [J]. Int J Nanomedicine，2019，14：1563-1573.

[6] 徐煜彬，窦德强 . 中药注射剂类过敏研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（14）：2765-2773.

[7] 易娟娟，谢家骏，张立波，等 . RBL-2H3细胞体外试验评价药物类过敏的方法学研究和适用性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（13）：180-184.

[8] 高婕，罗佳波，雷林生，等 . 3种细胞用于建立体外肥大细胞脱颗粒模型的比较研究及应用 [J]. 广州中医药大学学报，2012，29（3）：295-299，304.

[9] Murakami T，Suzuki K，Niyonsaba F，et al. MrgX2-mediated internalization of LL-37 and degranulation of human LAD2 mast cells [J]. Mol Med Rep，2018，18（6）：4951-4959.

[10] 熊克朝，李泽君，李志刚，等 . 参麦注射液致RBL-2H3细胞脱颗粒的研究 [J]. 药物评价研究，2015，38（2）：140-146.

[11] 郭永超，李振兴，林洪 . 组胺、类胰蛋白酶、β-己糖胺酶在肥大细胞体外释放过程中的相互关系 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2009，25（12）：1073-1075.

[12] 陈梦，李伟，王雪，等 . 药物类过敏反应发生机制及临床前评价方法研究进展 [J]. 中国新药杂志，2017，26（1）：51-59.

[13] 万梅绪，宋美珍，李智，等 . 小鼠耳郭蓝染类过敏检测方法用于注射益气复脉（冻干）的质控研究 [J]. 药物评价研究，2018，41（3）：405-410，428.

[14] 黄怡文，谢家骏，杨艺帆，等 . 大鼠皮肤类过敏试验的组织学机制 [J]. 中成药，2019，41（3）：548-553.

[15] 李二平 . 91例骨肽和复方骨肽注射剂的不良反应病例分析 [J/OL]. 中国药物警戒：1-6 [2021-05-07]. http：//kns.cnki.net/kcms/detail/11.5219.R.20210202.1109.014.html.

[16] 张燕芬 . 复方骨肽注射液的不良反应特征 [N]. 中国医药报，2021-04-20（003）.

[17] 丁娇 . 复方骨肽注射液的不良反应与安全用药研究 [J]. 化工设计通讯，2020，46（3）：242，260.

[18] 郑欣 . 中药注射剂不良反应的调查与分析 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19（95）：235-236.

[19] 杨奇涛，吴殷囡，汪玉馨，等 . 骨肽类注射剂类过敏反应评价研究 [J]. 中国比较医学杂志，2022，32（2）：53-59.

[20] 杨艺帆，谢家骏，陈锰，等 . 中药注射剂类过敏反应机制的研究进展 [J]. 中成药，2019，41（8）：1935-1940.

[21] 王志国，王丹巧，于友华，等 . 组胺致Beagle犬类过敏反应实验模型研究 [J]. 中国中药杂志，2011，36（14）：1842-1844.

[22] 黄玉萨，谢家骏，胡风丽 . 类胰蛋白酶在过敏性疾病诊断中的研究进展 [J]. 中成药，2016，38（6）：1355-1359.

[23] 郑倩倩，董甜甜，李世刚，等 . 资木瓜中莽草酸对大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒及抗炎作用研究 [J]. 中国免疫学杂志，2017，33（7）：1035-1038.

（收稿日期：2022-11-05；修回日期：2023-01-06）

单叶铁线莲总皂苷抑制滑膜细胞激活的作用及机制研究

孙晓博[1]，李伟[1*]，饶一淞[1]，毛彩霞[1]，向大雄[2]（1. 益阳市中心医院药学部，湖南 益阳 413000；2. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410013）

摘要：目的 研究单叶铁线莲总皂苷（TsCH）抑制滑膜细胞激活的作用及可能机制。**方法** 细胞实验：用不同浓度的 TsCH 预孵育滑膜细胞 12 h 后用肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）处理。CCK-8 和流式细胞仪检测细胞增殖和细胞周期；Transwell 检测细胞迁移；ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1β 和 IL-18 的水平；Western blot 法检测 NLRP3、caspase-1、MMP2 和 MMP9 的表达。动物实验：建立胶原诱导的大鼠风湿性关节炎模型，TsCH 灌胃处理 4 周后评价关节炎指数评分、足趾体积以及厚度；检测大鼠关节组织中 IL-1β、IL-18、NLRP3 和 Caspase-1 的表达。**结果** 细胞实验结果表明 TsCH 能抑制 TNF-α 诱导的滑膜细胞增殖以及迁移，同时抑制 IL-1β、IL-18、NLRP3、Caspase-1、MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平的升高。动物实验结果表明 TsCH 能降低关节炎大鼠的关节炎指数评分、减小足趾容积和足趾厚度，以及降低关节组织中 TNF-α、IL-18、IL-1β、NLRP3、Caspase-1 的表达水平。**结论** TsCH 对类风湿关节炎有治疗作用，可抑制 TNF-α 诱导的滑膜细胞激活，其作用机制可能与其抑制 NLRP3/caspase-1 信号通路有关。

关键词：含 pyrin 结构域 nod 样受体家族 3；单叶铁线莲；总皂苷；滑膜细胞；肿瘤坏死因子 -α
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2004-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.005

Effect of total saponins from *Clematis henryi* Oliv. on the activation of synovial cells and related mechanism

SUN Xiao-bo[1], LI Wei[1*], RAO Yi-song[1], MAO Cai-xia[1], XIANG Da-xiong[2] (1. *Pharmacy Department of Yiyang Central Hospital*, *Yiyang Hunan* 413000; 2. *Department of Pharmacy*, *the Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the effect of total saponins from *Clematis henryi* Oliv. (TsCH) on the activation of synovial cells and its possible mechanism. **Methods** In vitro experiment: synovial cells were pre-incubated with various concentrations of TsCH for 12 h, before being treated with tumor necrosis factor-α (TNF-α). After the treatment, CCK-8 and flow cytometry were used to detect the cell proliferation and cell cycle, respectively. Transwell detected the cell migration, and ELISA was used to detect the level of IL-18 and IL-1β. The expression of NLRP3, Caspase-1, MMP2 and MMP9 were detected by Western blot. Animal experiment: collagen-induced rat rheumatoid arthritis model was established. After 4 weeks of intragastric treatment with TsCH, the arthritis index score, paw volume and thickness were evaluated. The expression level of IL-1β, IL-18, NLRP3 and Caspase-1 in the rat joint tissue was detected. **Results** The in vitro experiment indicated that TsCH inhibited TNF-α-induced synovial cell proliferation and migration, and inhibited the expression level of IL-18, IL-1β, NLRP3, Caspase-1, MMP2 and MMP9. The animal experiments showed that TsCH decreased the arthritis index score, paw volume and thickness, and attenuated the level of TNF-α, IL-18, IL-1β, NLRP3 and Caspase-1 in the joint tissue. **Conclusion** TsCH has therapeutic effect on rheumatoid arthritis and can inhibit TNF-α induced activation of synovial cells, whose mechanism may be related to its inhibition of the activation of NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.
Key words: nod-like receptor family pyrin domain containing 3; *Clematis henryi* Oliv; total saponin; synovial cell; tumor necrosis factor-α

基金项目：湖南省中医药科研计划项目（No.2021067）。
作者简介：孙晓博，男，硕士，副主任药师，主要从事医院药学和天然药物研究，email：sunxiaobo16@126.com *通信作者：李伟，男，主任药师，主要从事医院药学和Ⅰ期临床研究，email：liwei_1973@126.com

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以关节滑膜炎症为主要表现的全身性自身免疫疾病，常伴有关节外器官受累及血清类风湿因子阳性[1]。正常情况下，滑膜仅有1～2层滑膜细胞，并发挥多种生理功能。而在患RA时，成纤维样滑膜细胞（fibroblast-like synoviocyte，FLS）被激活，呈肿瘤样、侵蚀性增生，并分泌大量的促炎性细胞因子、基质金属蛋白酶（MMP2、MMP9）等[2]。肿瘤坏死因子-α（TNF-α）是RA中重要的致炎因子，RA患者滑膜细胞的激活与滑膜中TNF-α等促炎性细胞因子水平的升高密切相关，TNF-α抑制剂可抑制成纤维样滑膜细胞的增殖，延缓RA的发展[3]。炎症小体是一种多蛋白复合物，负责细胞内的免疫和炎症过程。在应激状态下，NLRP3/Caspase-1信号通路被激活，将无活性的pro-IL-1β和pro-IL-18剪切成为有生物活性的IL-1β和IL-18[4]。IL-1β和IL-18可诱导多种与炎症级联反应相关的细胞因子的表达和活化，参与RA的发生、发展[5]。有研究证实，抑制NLRP3介导的炎症反应有助于控制RA的发生、发展[6]。

土家药单叶铁线莲块根，系湖南湘西北土家族经典常用草药，在《纲目拾遗》《湖南药物志》等多种药物典籍中都有收载。前期研究以单叶铁线莲为原料，制备了单叶铁线莲总皂苷（total saponins from *Clematis henryi* Oliv，TsCH）提取物，并对其进行了化合物分离和结构确证[5]。本文通过细胞实验和动物实验，探索了TsCH对Ⅱ型胶原诱导型关节炎的干预作用，以及其对TNF-α诱导的滑膜细胞增殖的作用及可能机制，为阐明TsCH抗RA的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白细胞介素（IL）-18、IL-1β和TNF-α ELISA试剂盒、抗MMP9抗体（武汉博士德生物）；弗氏不完全佐剂（美国Sigma公司）；抗MMP2多克隆抗体、抗Caspase-1单克隆抗体、抗NLRP3单克隆抗体以及CCK-8检测试剂盒（碧云天生物）；胎牛血清（FBS，浙江天杭生物科技股份有限公司）；人滑膜细胞（Jenni生物技术公司）；甲氨蝶呤（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；免疫级别牛Ⅱ型胶原（上海懋康生物科技有限公司）；重组人TNF-α[生工生物工程（上海）股份有限公司]。

1.2 TsCH的制备

单叶铁线莲根茎用70%的乙醇浸提，微波辅助提取，制成含生药0.2 g·mL^{-1}药材的提取液。经过D-101大孔吸附树脂纯化，收集洗脱液，减压回收至无醇味。经比色法检测，所得溶液中总皂苷含量为0.167 g·mL^{-1}，经计算TsCH的得率为4.55%。

1.3 胶原诱导大鼠风湿性关节炎模型的建立及药物干预

雄性SD大鼠共30只，体质量250～280 g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号SCXK（湘）2009-0009号]。实验室温度23～25 ℃，湿度60%～70%，定时排气、换气，实验动物使用许可证号：YXK（湘）2009-0002号。将大鼠随机分为对照组、模型组、低剂量TsCH组（L-TsCH，50 mg·kg^{-1}）、高剂量TsCH组（H-TsCH，150 mg·kg^{-1}）以及甲氨蝶呤组（阳性药物，1 mg·kg^{-1}）。除对照组外，其余各组大鼠建立胶原诱导的大鼠风湿性关节炎模型。具体方法如下：将Ⅱ型胶原溶于0.05 mol·L^{-1}的乙酸中，在4 ℃下搅拌使之充分溶解，质量浓度为2 mg·mL^{-1}，置4 ℃冰箱过夜，再将灭活的卡介苗置于液体石蜡中，配成0.5 μg·L^{-1}的完全弗氏佐剂，将两者等体积混合、乳化，制成Ⅱ型胶原乳剂。将该乳剂于大鼠的尾根部多点皮内注射0.3 mL致炎，第14日于尾根部近三分之一处和背部3～5点方向皮内注射该乳剂0.1 mL作为加强免疫。造模成功后，L-TsCH和H-TsCH组按10 mL·kg^{-1}给药。对照组和模型组大鼠每天给予相同体积的生理盐水。甲氨蝶呤组大鼠给药剂量为1 mg·kg^{-1}，每周一次。4周后，测定相应指标。

1.4 骨关节炎指数测定

根据以下标准对关节的肿胀范围与程度进行关节炎指数评分：0分，无红肿；1分：小趾关节红斑或轻度肿胀；2分：趾关节和足踝关节中度肿胀；3分：踝关节以下的足爪肿胀；4分：包括踝关节在内的全部足爪肿胀。四肢分别评分，累计每只大鼠四肢关节的最高得分为16分。

1.5 足趾容积和足趾厚度的测定

依据排水法原理用自制足趾容积测定装置测量大鼠右后足趾容积；使用游标卡尺测定大鼠右后足足趾厚度。

1.6 细胞增殖检测

用含有2%FBS的DMEM培养液调节滑膜细胞密度为3×10^{4}个·mL^{-1}，按100 μL/孔接种于96孔板中，将培养板置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h后。将细胞分为对照组（不做任何处理），TNF-α组（用10 ng·mL^{-1} TNF-α处理48 h）以及不同浓度的TsCH组（加入不同浓度TsCH预孵育4 h后加入10 ng·mL^{-1} TNF-α，继续培养48 h），按CCK-8试剂盒说明书检测细胞增殖情况，每孔加入10 μLCCK-8工作液，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养2 h后，用酶标仪于450 nm检测光密度（*OD*）值。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

将细胞分为对照组（不做任何处理），TNF-α 组（用 10 ng • mL^{-1} TNF-α 处理 48 h）和 TsCH 组（40 μg • mL^{-1} 的 TsCH 预孵育 4 h，加入 TNF-α 处理 48 h），细胞用 0.25% 胰酶消化，PBS 洗涤 3 次，加入适量 70% 预冷乙醇溶液，4 ℃固定 12 h 以上，去除乙醇，PBS 洗涤 3 次。再用 PBS 重悬细胞，并加入碘化丙啶（PI）和 RNase A，上机检测。

1.8 Transwell 迁移实验

取对数生长期的 FLS，调整细胞密度至 5×10^5 个 • mL^{-1}。Transwell 上室加入细胞悬液，下室加入含 10% FBS 完全培养基，将细胞分为对照组（不做任何处理），TNF-α 组（用 10 ng • mL^{-1} TNF-α 处理 48 h）和 TsCH 组（用 40 μg • mL^{-1} 的 TsCH 预孵育 4 h 后加入 TNF-α，放入 37 ℃、5%CO_2 培养箱孵育 48 h）。取出小室，将小室上层未迁移的细胞擦去。将小室转移至 4% 的多聚甲醛溶液中固定 20 min，结晶紫溶液染色 30 min。倒置显微镜观察细胞并拍照。

1.9 炎症因子的测定

收集细胞或者大鼠关节滑膜组织，加入裂解液后用匀浆仪打碎裂解，12 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液，测定蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中 TNF-α、IL-18、IL-1β 的水平。

1.10 蛋白表达检测

收集细胞或组织样本，用 RIPA 裂解液裂解 30 min。4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液变性后待用。制备 10%SDS-PAGE 凝胶，上样量为 40 μg。于 80 V 运行 30 min 后，120 V 分离 60 min，将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h，TBST 清洗 3 次，每次 5 min。用 NLRP3、Caspase-1、MMP2、MMP9- 抗体孵育膜过夜。用二抗孵育 1 h 后检测 NLRP3、Caspase-1、MMP2、MMP9 的蛋白表达水平。

1.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism7 对实验数据进行统计分析，计量资料表示形式为均数 ± 标准差。多组间比较采用单因素方差分析，然后进行 Tukey 检验。当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TsCH 抑制 TNF-α 诱导 FLS 细胞的增殖

由图 1A 中结果可知，与对照组相比，TsCH 浓度在 160 μg • mL^{-1} 以下时，对 FLS 细胞活力无明显影响。TNF-α 显著增加了 FLS 细胞的增殖，而 20 和 40 μg • mL^{-1} 的 TsCH 明显抑制了 TNF-α 对 FLS 细胞的增殖作用（见图 1B）。流式细胞术检测结果表明，与对照组相比，TNF-α 增加了（S + G_2 期）/（G_1 + G_2 + S 期）的水平，与 TNF-α 组相比，40 μg • mL^{-1} 的 TsCH 显著抑制（S + G_2 期）/（G_1 + G_2 + S 期）的水平（见图 1C）。

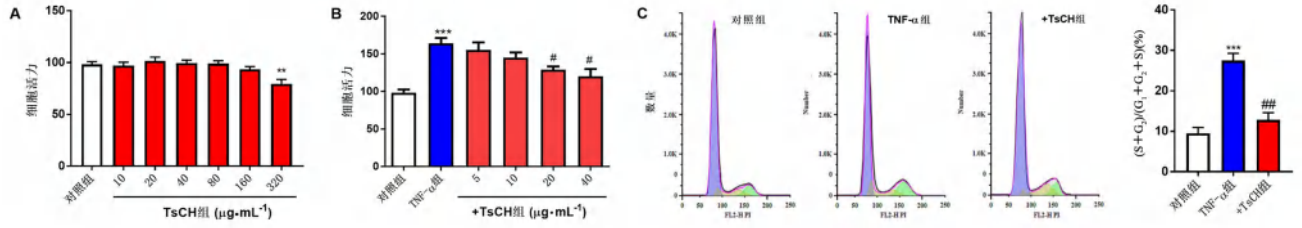

图 1 TsCH 对 TNF-α 诱导的细胞增殖的影响

Fig 1 Effect of TsCH on the TNF-α induced proliferation of FLS

A. TsCH 对 FLS 细胞活力的影响（Effect of TsCH on cell viability）；B. TsCH 对 TNF-α 诱导的 FLS 细胞增殖的影响（Effect of TsCH on TNF-α-induced cell proliferation）；C. TsCH 对 TNF-α 诱导的 FLS 细胞周期的影响（Effect of TsCH on the cell cycle of FLS）。

注（Note）：与对照组比较，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{***}P < 0.001$）；与 TNF-α 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（compared with the TNF-α group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

2.2 TsCH 抑制 TNF-α 诱导 FLS 细胞的迁移

如图 2 结果可知，TNF-α 显著增加了 FLS 细胞的迁移，而 40 μg • mL^{-1} 的 TsCH 抑制了 TNF-α 对 FLS 细胞的迁移作用。与对照组相比，TNF-α 增加了 MMP2 和 MMP9 的水平，与 TNF-α 组相比，TsCH 显著抑制了 MMP2 和 MMP9 的升高。

2.3 TsCH 对 NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响

与对照组相比，TNF-α 显著增加 IL-1β 和 IL-18 的水平；与 TNF-α 组相比，TsCH 显著抑制炎症因子表达的升高（见图 3）。与对照组相比，TNF-α 明显上调了炎症小体组成蛋白 NLRP3、Caspase-1 的表达水平；与 TNF-α 组相比，TsCH 明显抑制了上述蛋白的表达（见图 3）。

2.4 TsCH 对胶原诱导大鼠关节炎的影响

如图 4 所示，相比于对照组，模型组大鼠关节炎指数评分、足趾体积以及足趾厚度均升高；而相比于模型组，L-TsCH 和 H-TsCH 均能降低大鼠关节炎指数评分、足趾体积以及足趾厚度。同时测定了各组大鼠关节组织中 TNF-α、IL-1β 以及 IL-18 的水平，结果显示 L-TsCH 和 H-TsCH 可抑制胶原诱导 TNF-α、IL-1β 以及 IL-18 的水平的升高。

2.5 TsCH 对关节组织中 NLRP3/Caspase-1 的影响

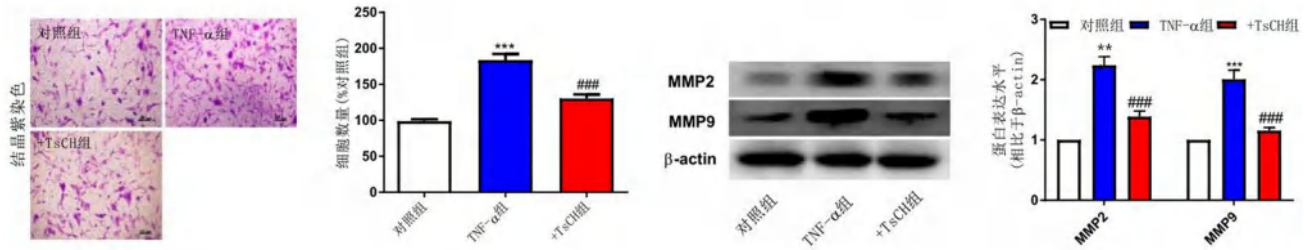

图 2　TsCH 对 TNF-α 诱导的细胞迁移的影响

Fig 2　Effect of TsCH on the TNF-α induced FLS migration

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与 TNF-α 组比较，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；compared with the TNF-α group，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

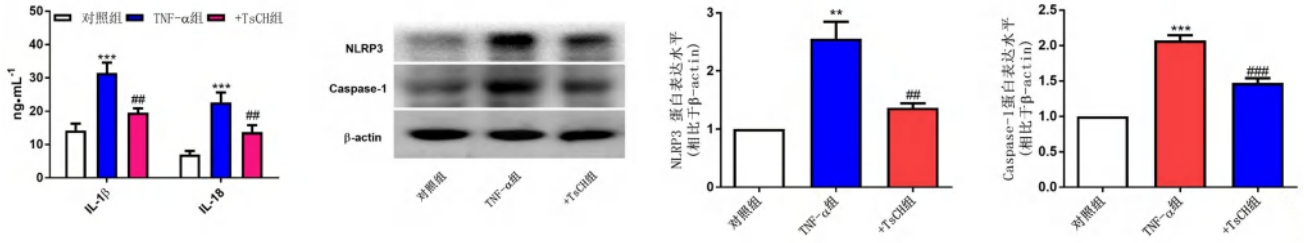

图 3　TsCH 对 NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响

Fig 3　Effect of TsCH on NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与 TNF-α 组比较，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；compared with the TNF-α group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

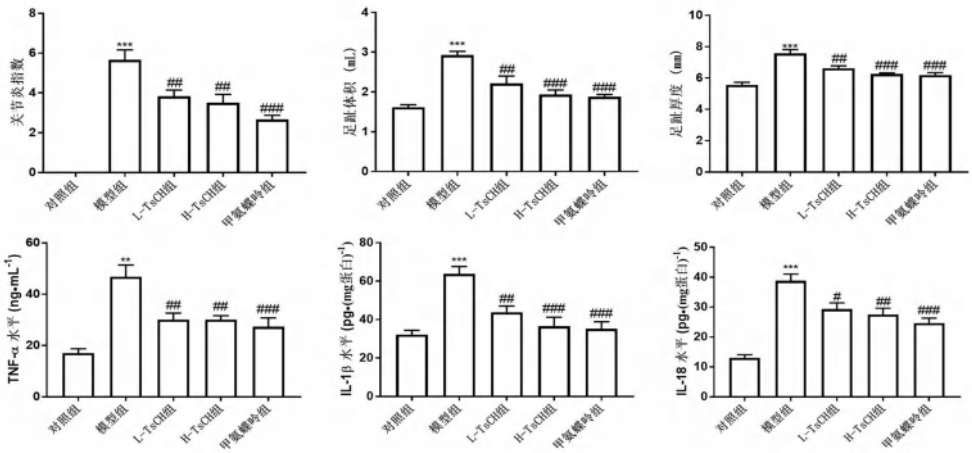

图 4　TsCH 对胶原诱导大鼠关节炎的影响

Fig 4　Effect of TsCH on collagen-induced arthritis in rats

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

相比于对照组，模型组大鼠关节组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达明显升高；相比于模型组，TsCH 显著降低了 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平（见图 5）。

3　讨论

RA 以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现的自身免疫炎性疾病，是我国最常见的慢性疾病之一，也是造成青壮年劳动能力丧失的主要原因，给家庭和社会带来了沉重的负担[7]。中药单叶铁线莲分布于长江流域中、下游和长江以南各省区，性平味辛，具行气止痛、活血消肿功能，民间用于散瘀止痛和跌扑昏迷之急救，故有“拐子药”“救命王”之称[8]。单叶铁线莲也是湖南湘西北土家族的经典药物，常用于治疗关节疼痛等疾病，其有效成分 TsCH 具有很好的药理活性[9]。本实验表明 TsCH 能明显降低关节炎指数评分，减小足趾容积和足趾厚度，能有效缓解 RA 症状，其中 H-TsCH 组治疗效果与常见的 RA 治疗药物甲氨蝶呤相近，表明 TsCH 是一个具有治疗 RA 潜力的中药组分。

RA 的发病起源于关节附近的滑膜组织，然后向软骨和骨扩散，活化的 FLS 展现出与肿瘤细胞

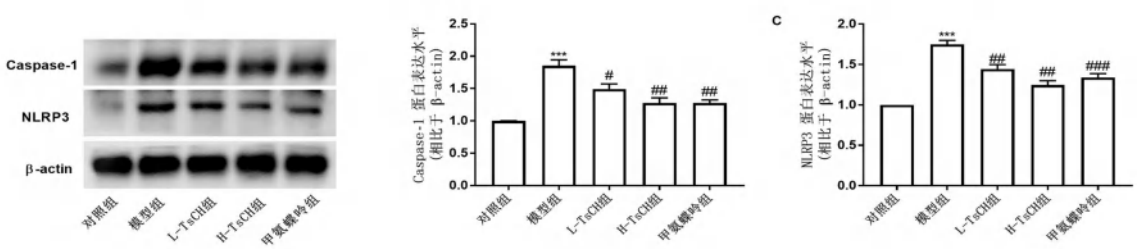

图 5 TsCH 对关节组织中 NLRP3/Caspase-1 的影响

Fig 5 Effect of TsCH on NLRP3/Caspase-1 in joint tissue

注：与对照组比较，$^{***}P < 0.001$；与 TNF-α 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

类似的生物学行为，其增殖、迁移和侵袭能力明显增强[10]。结果表明 TsCH 可抑制 TNF-α 诱导的细胞增殖以及细胞周期的转变。在病理条件下，类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞（RA-FLS）迁移至骨和软骨的表面，并分泌蛋白水解酶，导致软骨和骨结构的破坏。MMPs 是一组锌离子依赖的蛋白水解酶，可降解关节的所有细胞外基质成分。MMP2 和 MMP9 两者均可降解Ⅳ和Ⅴ型胶原、明胶以及弹性蛋白，是病变骨关节以及软骨组织细胞外基质降解的主要原因[11]。本实验结果显示，TNF-α 能诱导 FLS 发生迁移以及诱导滑膜细胞 MMP2 和 MMP9 的表达水平增加，而 TsCH 能减轻 TNF-α 诱导的 FLS 的迁移，抑制 MMP2 以及 MMP9 表达的升高，说明 TsCH 可通过抑制滑膜细胞的增殖和迁移从而保护关节骨以及软骨组织的病变。

目前发现能够形成炎症小体的模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）主要有 NOD 样受体（NOD-like receptor，NLR）及 PYHIN 蛋白家族受体。NLR 包括 NLRP1、NLRP3、NLRP7、NLRP12、NLRC4 以及 NAIP，其中 NLRP3 是目前研究最多的炎症小体[12]。在应激状态下，细胞装配形成炎症小体，将无活性的 pro-Caspase-1 水解为活化的 Caspase-1。而 Caspase-1 能将无活性的 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 剪切成为有生物活性的 IL-1β 和 IL-18[4]。有研究证实，风湿性关节炎滑膜组织中炎症小体成分 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的表达升高[5]。动物及细胞实验结果显示 TsCH 能有效降低 TNF-α 诱导的滑膜细胞或胶原诱导的关节炎大鼠骨关节中 IL-18、IL-1β、NLRP3、Caspase-1 的表达水平的升高，提示 TsCH 抑制滑膜细胞的激活与抑制炎症小体的活化有关。

本研究发现 TsCH 可有效降低 TNF-α 诱导的滑膜细胞增殖和迁移，明显减轻胶原诱导的大鼠关节炎症状，其机制可能与抑制 NLRP3/caspase-1 信号通路有关。

参考文献

[1] Jiang Y，Zhong SX，He SH，et al. Biomarkers（mRNAs and non-coding RNAs）for the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol，2023，14：1087925.

[2] Tsaltskan V，Firestein GS. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Pharmacol，2022，67：102304.

[3] Wang M，Dai TM，Li SM，et al. Eugenol suppresses the proliferation and invasion of TNF-α-induced fibroblast-like synoviocytes via regulating NF-κB and COX-2 [J]. Biochem Biophys Res Commun，2022，612：63-69.

[4] Gritsenko A，Green JP，Brough D，et al. Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases [J]. Cytokine Growth Factor Rev，2020，55：15-25.

[5] 孙晓博，张凯，李兰林，等 . 大孔吸附树脂分离纯化单叶铁线莲总皂苷的研究 [J]. 中草药，2011，42（10）：1977-1981.

[6] Mathews RJ，Robinson JI，Battellino M，et al. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis（RA）：genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment [J]. Ann Rheum Dis，2014，73（6）：1202-1210.

[7] Huang RZ，Jin MH，Liu YF，et al. Global trends in research of fibroblasts associated with rheumatoid diseases in the 21st century：a bibliometric analysis [J]. Front Immunol，2023，14：1098977.

[8] Lin TF，Wang L，Zhang Y，et al. Uses，chemical compositions，pharmacological activities and toxicology of *Clematidis Radix* et *Rhizome*——a review [J]. J Ethnopharmacol，2021，270：113831.

[9] Sun XB，Liu YP，Yang YY，et al. Anti-arthritic effect of total saponins from *Clematis henryi* Oliv. on collagen-induced arthritis rats [J]. Eur J Inf，2016，14（2）：71-77.

[10] Torres A，Pedersen B，Guma M. Solute carrier nutrient transporters in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Front Immunol，2022，13：984408.

[11] Li ZQ，Chen ML，Wang ZY，et al. Berberine inhibits RA-FLS cell proliferation and adhesion by regulating RAS/MAPK/FOXO/HIF-1 signal pathway in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Bone Joint Res，2023，12（2）：91-102.

[12] Zhan XY，Li Q，Xu G，et al. The mechanism of NLRP3 inflammasome activation and its pharmacological inhibitors [J]. Front Immunol，2022，13：1109938.

（收稿日期：2023-03-20；修回日期：2023-04-28）

基于网络药理学和实验验证探讨黄芩射干汤治疗小儿肺炎的抗炎作用机制

李巧玲[1]，彭静[1*]，周本宏[2]，徐华[1]（1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院药学部，武汉　430016；2. 武汉大学人民医院药学部，武汉　430060）

摘要：目的　探讨黄芩射干汤对小儿肺炎的调控机制及抗炎作用，为进一步探究黄芩射干汤治疗小儿肺炎的有效成分及作用机制提供研究基础。**方法**　通过网络药理学技术预测黄芩射干汤治疗小儿肺炎的主要活性成分及相应靶点，并构建了药物 - 活性成分 - 疾病 - 靶点网络，进一步运用 Autodock 平台对主要活性成分与作用靶点进行分子对接验证。最后，采用脂多糖（LPS）诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建炎症模型，进行相关作用靶点和通路的验证。**结果**　网络药理学分析显示黄芩射干汤的主要活性成分包括木犀草素、汉黄芩素、黄芩素等，主要通过调控包括 IL-6、TNF-α 和 NF-κB 等在内的核心靶点介导的 TNF、NF-κB 等信号通路发挥抗小儿肺炎的作用。体外 ELISA 实验结果显示，与空白组相比，模型组炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的表达量显著上调（$P < 0.01$），黄芩射干汤干预后能有效降低 IL-1β 和 TNF-α 的表达（$P < 0.01$）。Western blot 实验结果显示，与空白组相比，模型组 NF-κBp65、p-NF-κBp65、NLRP3 和 TNF-α 蛋白的表达显著上调（$P < 0.01$）；与模型组相比，黄芩射干汤组对应蛋白显著下调（$P < 0.05$）。**结论**　黄芩射干汤可以通过多靶点、多途径参与小儿肺炎疾病的治疗，且作用靶点可能与 NF-κB 炎症信号通路有关。

关键词：黄芩射干汤；小儿肺炎；网络药理学；抗炎活性；NF-κB
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2009-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.006

Effect and anti-inflammation mechanism of Huangqin Shegan decoction for pediatric pneumonia based on network pharmacology and experimental studies

LI Qiao-ling[1], PENG Jing[1*], ZHOU Ben-hong[2], XU Hua[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Wuhan Children's Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430016; 2. *Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan* 430060)

Abstract: Objective　To determine the regulation mechanism and anti-inflammation effect of Huangqin Shegan decoction on pediatric pneumonia, and to provide reference for further exploration of the active components of Huangqin Shegan decoction. **Methods**　The active ingredients and corresponding targets of Huangqin Shegan decoction in the treatment of acute lung injury were predicted by network pharmacology, and the drug-active ingredient-disease-target network was established. Autodock Vina software was used to verify the binding force between effector components and pediatric pneumonia related targets. Finally, the inflammatory model of RAW264.7 macrophages was established by lipopolysaccharide (LPS) induction, and to verify related targets and pathways. **Results**　Network pharmacology showed that the main active components of Huangqin Shegan decoction included luteolin, wogonin, baicalein etc. The mainly mechanism was via regulating the TNF and NF-κB signaling pathways mediated by core targets such as IL-6, TNF-α and NF-κB.

基金项目：武汉市卫生健康科研基金资助重点项目（项目编号：WZ21A07）；武汉市卫生健康科研基金资助青年项目（项目编号：WZ22Q07）。
作者简介：李巧玲，女，硕士，主要从事中药及其活性成分的药理学研究及医院药学研究，email：liqiaoling@zgwhfe.com
[*]**通信作者：**彭静，女，硕士，副主任药师，主要从事中药及其活性成分的药理学研究及临床药学研究，email：pengjing@zgwhfe.com

The in vitro ELISA showed that compared with the blank group, the expression of inflammatory factors IL-1β and TNF-α in the model group was significantly up-regulated ($P < 0.01$). Huangqin Shegan decoction treatment effectively reduced the expression of IL-1β and TNF-α ($P < 0.01$). Western blot showed that compared with the blank group, the protein expressions of NF-κBp65, p-NF-κBp65, NLRP3 and TNF-α proteins in the model group were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, Huangqin Shegan decoction treatment effectively reduced the proteins expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Huangqin Shegan decoction participates in the treatment of pediatric pneumonia through multiple targets and pathways, and the target may be related to NF-κB inflammatory signaling pathway.

Key words: Huangqin Shegan decoction; pediatric pneumonia; network pharmacology; anti-inflammation activity; NF-κB

肺炎是儿童时期常见的一种呼吸系统疾病，其发生主要与感染病毒和细菌等病原体有关，最常见的病原体包括肺炎链球菌、肺炎支原体、衣原体、流血嗜血杆菌、肺炎杆菌和肺炎克雷伯菌等[1-2]。小儿肺炎的临床表现主要为发热、咳嗽、咳痰、肺部听诊可闻及固定湿啰音，是影响儿童成长、导致儿童住院和死亡的重要疾病之一。据统计，全球 5 岁以下儿童死亡人数中，因肺炎导致死亡的与早产导致死亡人数并列第一[3]。目前认为，各种病原体感染可引起儿童肺泡内炎症改变或炎症细胞浸润，进一步引起肺组织的损伤和破坏[4]。一直以来，中医药在治疗感染性疾病方面发挥着特有的优势，中药治疗肺炎可减少对抗菌药物的依赖[5]，因此迫切需要探索中药治疗小儿肺炎及其作用机制。

黄芩射干汤由黄芩和射干两味中药组成，多用于治疗肺胃两经热毒所致喉中腥臭。现代药效学研究显示其具有抗气道炎症、抗菌、抗病毒等作用[6-8]。尽管目前对于黄芩射干汤中各个中药成分的药理作用研究已达到分子水平，但其治疗小儿肺炎的作用机制却鲜有报道，在治疗疾病过程中可能形成的复杂作用机制网络尚不明确。本研究首次结合大数据平台和分子对接技术探讨黄芩射干汤治疗小儿肺炎的潜在机制，并通过药理学实验初步验证其预测结果，从而揭示其潜在的作用机制，以期为进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 成分的筛选和作用靶点的预测

通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP），根据吸收、分布、代谢和排泄相关参数进行筛选，可得到黄芩和射干的主要作用成分以及活性成分对应的靶点，结合 Uniprot 库，导入蛋白靶点名称，同时选择物种为“Homo sapiens”，将蛋白靶点名称标准化。

1.2 小儿肺炎相关靶点的获取

在人类孟德尔遗传综合数据库（Online Mendelian Inheritance in Man，OMIM） 和 GeneCards 数据库检索框输入“Pediatric Pneumonia”进行检索，获取小儿肺炎相关的靶蛋白。基于 VennDiagram 程序运行 R 语言，将上述获得黄芩射干汤作用靶点与小儿肺炎相关作用靶点通过 Venny 平台进行基因映射，得到黄芩射干汤治疗小儿肺炎的潜在作用靶点，并得到 Venny 图。

1.3 蛋白质 - 蛋白质相互作用（PPI）关系网络的构建及核心靶点的筛选

将黄芩射干汤治疗小儿肺炎的潜在作用靶点导入 STRING 数据库，以 combined score ＞ 0.7 为筛选条件构建黄芩射干汤治疗小儿肺炎的 PPI 网络，为明确药物作用的核心靶点，筛选得到排名前 30 的蛋白。

1.4 药物 - 活性成分 - 疾病 - 靶点网络的建立

将黄芩射干汤治疗小儿肺炎的潜在作用靶点导入可视化 Cytoscape 3.8.2 软件，构建黄芩射干汤 - 活性成分 - 小儿肺炎 - 靶点的可视化网络图。

1.5 富集分析

应用 Bioconductor 软件，并通过 R 统计程序设计语言对黄芩射干汤治疗小儿肺炎的核心靶点进行基因本体（GO）功能和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，分析黄芩射干汤主要分子生物过程或信号通路。

1.6 分子对接

结合 PPI 网络分析中关键靶点蛋白互作程度，选取互作程度最高的靶点蛋白，利用 ZINC 数据库获得药物成分的 mol2 格式的结构，利用 PDB 数据库获得靶蛋白的 PDB 格式的结构图。运用 PyMOL 软件对靶点蛋白进行预处理，基于 Autodock Tools 1.5.6 软件对靶点蛋白和配体进行分子对接，获得两者对接所需的最低结合能，对接结果采用 PyMOL 软件进行可视化处理。

1.7 实验验证

1.7.1　药材　黄芩（批号：20201103）、射干（批号：20200701）（湖北天济药业有限公司）。参考文献制备黄芩射干汤：黄芩和射干原药材按 1∶1 配比，加 8 倍量水煎煮 2 次，滤纸过滤，合并滤液即得[8]。

1.7.2　CCK8 法检测细胞活性　选择 RAW264.7 巨噬细胞（Procell CL-0190，Procell 生命科学技术有限公司）作为研究对象，细胞培养在含 10% 胎牛血清（四季青，批号：21110704）和 1% 青霉素 - 链霉素的 DMEM 高糖培养基中（Yeasen Blotechnology，批号：D5230580），于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养。以 6×10^5 个 • mL^{-1} 的 RAW264.7 巨噬细胞，每孔 100 μL 接种于 96 孔板（$n=5$），置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱培养，采用 CCK-8 法检测不同浓度药物对细胞活性的影响。

1.7.3　炎症模型的构建及 ELISA 实验　按照“1.7.2”项下方法，将细胞种于 6 孔板，每孔 2 mL，实验分为空白组，脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）组（模型组），药物高、中、低剂量组，每组设置 3 个复孔，培养过夜贴壁后，药物组分别将 0.5%、0.25%、0.125% 浓度的黄芩射干汤加入预培养的细胞中，刺激 24 h 后，弃去上清液，除空白组外，所有组以 200 ng • mL^{-1} 的 LPS 加入预培养的细胞中构建炎症细胞模型，LPS 刺激 6 h 后，收集上清液按照酶联免疫试剂盒 TNF-α（MULTI SCIENCES，批号：A28210852）和 IL-1β（MULTI SCIENCES，批号：A201B11115）说明书检测各组 TNF-α 和 IL-1β 浓度。

1.7.4　Western blot 实验　取“1.7.3”项下 6 孔板中细胞沉淀，每孔加入 1 mL 预冷的 PBS 清洗两次，用细胞刮刀将细胞刮下，收集至 1.5 mL 离心管，12 000 r • min^{-1}、4 ℃下离心 5 min，去掉上清液，向细胞沉淀加入 50 μL 含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液，冰上裂解 30 min。12 000 r • min^{-1}、4 ℃下离心 5 min，取上清液即为总蛋白样品提取液。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒（批号：B1108011）测定样品蛋白浓度，保证所有样品蛋白上样量为 40 μg，再分别进行电泳（恒压 100 V 条件下 1 h）、转膜（恒压 100 V 条件下 1 h）、封闭（5%BSA 溶液常温摇床 1 h）、孵一抗（GAPDH（antgene，Lot：100216420516），1∶3000）、TNF-α（MULTI SCIENCES，批号 A28210852，1∶1000）、NF-κB-p65（CST，批号：8242T，1∶3000），P-NF-κB-p65（CST，批号：3033T，1∶3000）、NLRP3（CST，批号：0600560301，1∶3000）4 ℃过夜，常温摇床孵 HRP 标记山羊抗兔的二抗 1 h（CST，批号：20000339，1∶5000）、化学显色操作，检测各组样品中 TNF-α、NF-κB-p65、P-NF-κB-p65 和 NLRP3 蛋白的表达量。

1.8　统计学处理

使用 Excel 处理数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用单因素方差分析，$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。Western blot 图片采用 Image J 软件进行灰度量化处理，所有数据采用 GraphPad Prism 软件和 Photoshop 软件作图。

2　结果

2.1　黄芩射干汤潜在活性成分的筛选及作用靶点的收集

从 TCMSP 数据库中筛选黄芩射干汤满足条件的潜在活性成分共 52 个，其中黄芩 36 个，射干 17 个，包含一个重复的活性成分。通过 TCMSP 共检索出黄芩射干汤可能的作用靶点蛋白 510 个，去重后得 130 个。最终在黄芩、射干中共筛选得到 38 个有效成分参与通路网络的构建，根据自由度排名，其中最主要的活性成分的基本信息见表 1。

表 1　黄芩射干汤主要活性成分的基本信息

Tab 1　Basic information on the main active ingredients of Huangqin Shegan decoction

编号	化合物名称	口服生物利用度（OB）/%	类药性（DL）	Degree	归属药材
MOL000006	luteolin（木犀草素）	36.16	0.25	38	射干
MOL000173	wogonin（汉黄芩素）	30.68	0.23	29	黄芩
MOL002714	baicalein（黄芩素）	33.52	0.21	16	黄芩
MOL000358	beta-sitosterol（β- 谷甾醇）	36.91	0.75	14	黄芩
MOL001689	acacetin（金合欢素）	34.97	0.24	14	黄芩
MOL002928	oroxylina（千层纸素）	41.37	0.23	12	黄芩
MOL000354	isorhamnetin（异鼠李素）	49.60	0.31	10	射干
MOL003758	iristectorigenin（9CI）（鸢尾黄素）	71.55	0.34	10	射干

2.2　黄芩射干汤治疗小儿肺炎潜在靶点的筛选及 PPI 网络图的构建

在 GeneCards 和 OMIM 数据库中筛选后共得到 503 个关于小儿肺炎疾病靶点。将 503 个疾病靶点和 130 个药物活性成分作用靶点利用 R 软件制作韦恩图，结果得到药物 - 疾病共同作用靶点 45 个。将上述筛选的 45 个作用靶点导入 STRING 数据库，获取其相关作用关系图，见图 1。并利用 R 软件对核心靶点的网络图进行分析，筛选排名前 30 的核心靶点，其中也包含 TNF-α、NF-κB 和 IL-6 等关键靶点，表明这些靶点在 PPI 中处于关键地位（见图 2）。

2.3　构建成分 - 靶点 - 通路网络

将“2.1”项下得到的黄芩射干汤 38 个有效成分和“2.2”项下得到 45 个共同作用靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件，得到黄芩射干汤活性成分 - 靶点 - 通路网络图，体现了黄芩射干汤多成分、多靶点的特点（见图 3）。

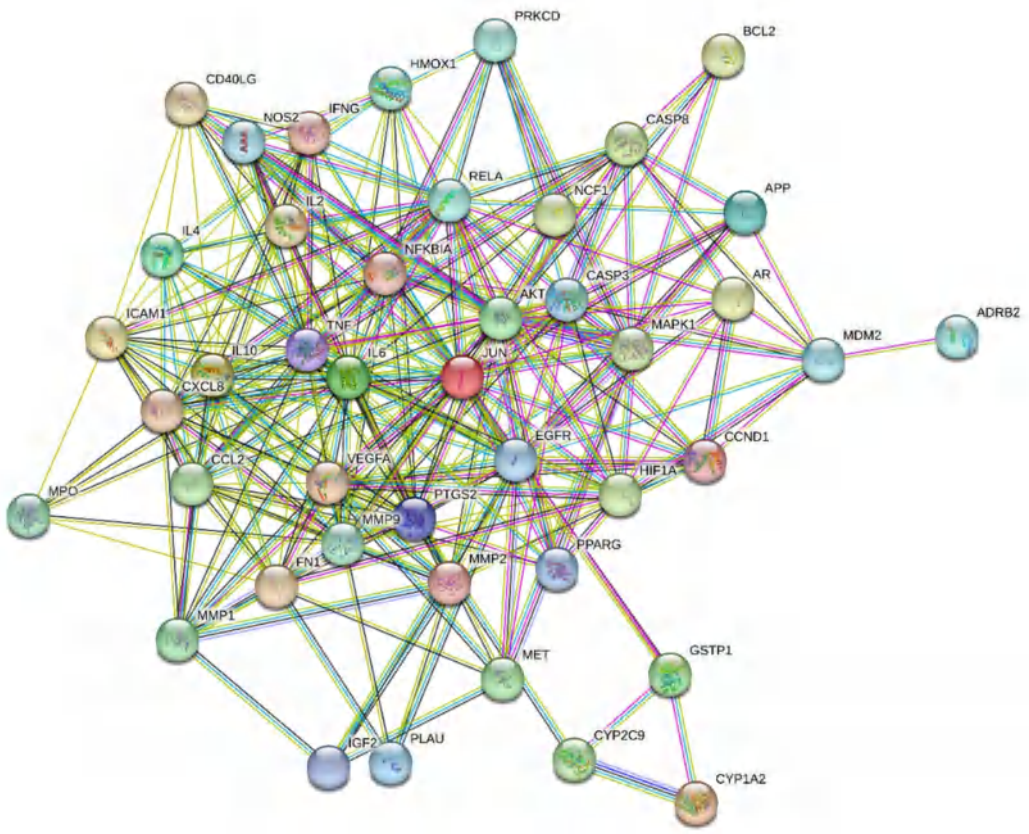

图 1 利用 STRING 对 45 个靶基因进行 PPI 分析

Fig 1 PPI analysis with 45 target genes by STRING

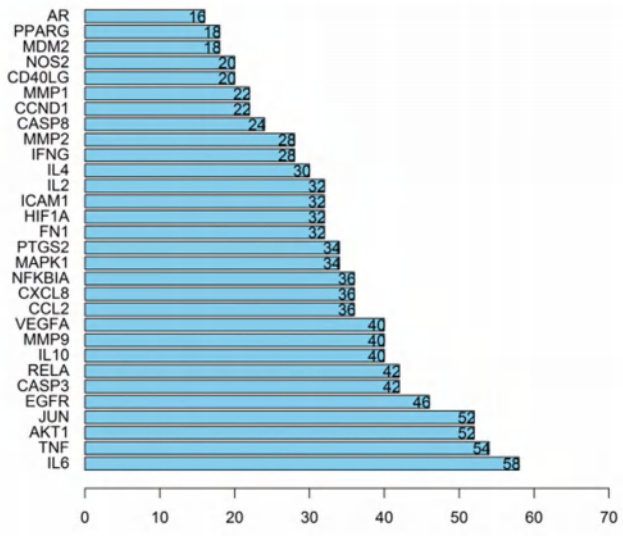

图 2 作用靶点筛选

Fig 2 Screening of core targets

2.4 共表达靶点 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

本研究进行 GO 生物学功能富集，共得到 108 条有显著意义的通路（$P < 0.05$），前 20 条 GO 分析结果见图 4A。黄芩射干汤治疗小儿肺炎可能与影响细胞因子受体结合（cytokine receptor binding）、泛素样蛋白连接酶结合（ubiquitin-like protein ligase binding）、细胞因子活性（cytokine activity）、受体配体活性（receptor ligand activity）、DNA 结合转录因子结合（DNA-binding transcription factor binding）、磷酸酶结合（phosphatase binding）、肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）等功能密切相关。

KEGG 富集结果共得到 155 条通路（$P < 0.05$），涉及与传染性疾病（疱疹病毒感染、人类巨细胞病毒感染、肝炎、甲型流感等）、信号通路（NF-κB、TNF、IL 类、PI3K-Akt 等）、物质调节等。其中 NF-κB、TNF、IL 类、PI3K-Akt 等信号通路可能直接参与黄芩射干汤的抗炎作用，排名前 20 位的通路气泡图见图 4B。

2.5 分子对接

基于以上网络药理学预测结果，结合相关领域文献分析，选取核心靶点 NF-κB 和 NLRP3 作为研究对象，结果显示木犀草素、汉黄芩素、黄芩素均与核心靶点结合性较好，结合能均小于 $-5\ kJ \cdot mol^{-1}$（见表 2），值得进一步实验验证。使用 Pymol 软件对所得对接结果进行可视化展示，可见如木犀草素可通过与 GLU-147、LYS-146、ARG-23 和 ASP-19 形成氢键，使结构趋于稳定，见图 5。

2.6 CCK8 实验和炎症因子表达的结果分析

CCK8 实验结果显示，0.5%、0.25%、0.125% 浓度的黄芩射干汤刺激细胞后细胞存活率分别为 106.21%、102.01%、97.89%，即 3 个浓度不影响细

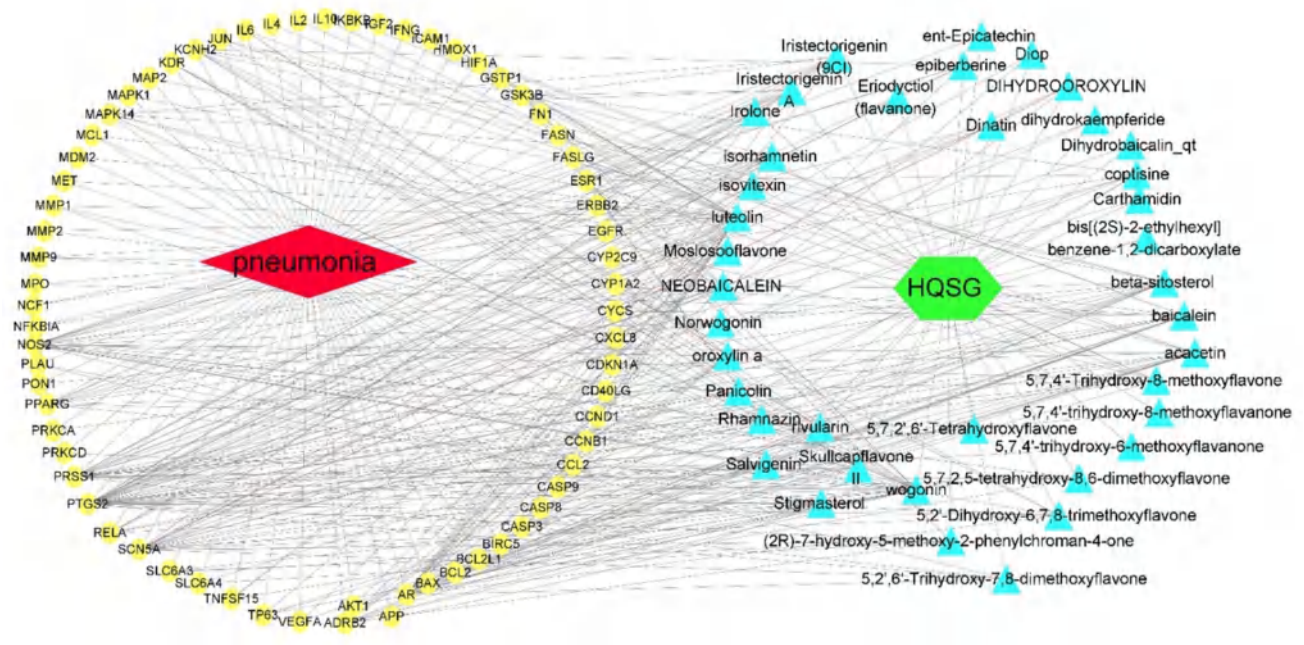

图 3　黄芩射干汤活性成分 - 靶点 - 通路网络图

Fig 3　Drug-active ingredients-core target network diagram

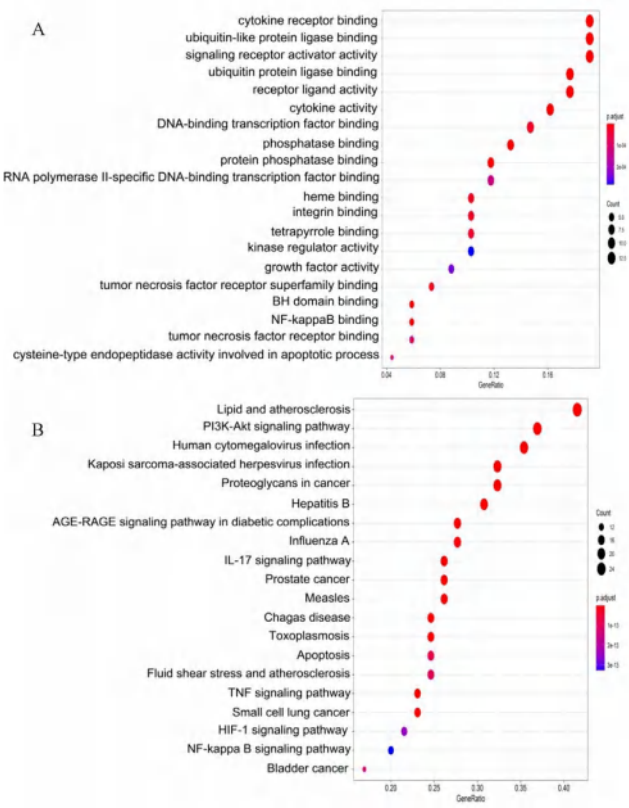

图 4　GO（A）和 KEGG（B）富集结果

Fig 4　GO（A）and KEGG（B）enrichment analysis

胞活性，因此选择这 3 个浓度的药物进行后续实验。当各药物组给予 LPS 刺激后，由表 3 可见，各组细胞活性无显著性差异，即 LPS 刺激后不影响各组细胞活性。ELISA 法检测了 TNF-α 和 IL-1β 浓度，LPS 诱导后，模型组中炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 显著性

表 2　成分 - 作用靶点分子对接结合能 (kJ・mol^{-1})

Tab 2　Composition-target docking binding energy (kJ・mol^{-1})

活性成分	对接结合能	
	NLRP3	NF-κB
木犀草素	− 6.10	− 5.78
汉黄芩素	− 5.57	− 6.05
黄芩素	− 6.28	− 6.45

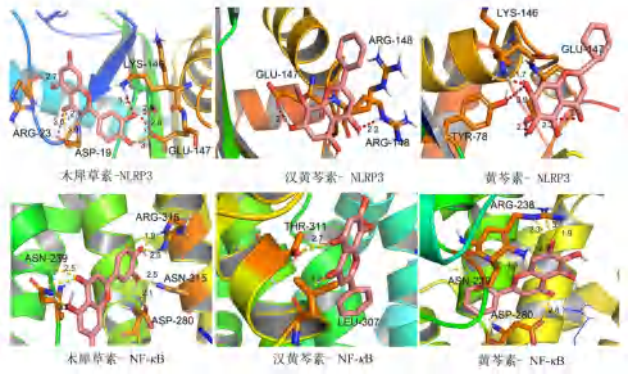

图 5　分子对接模式图

Fig 5　Molecular docking mode diagram

升高（$P < 0.01$），表明炎症模型诱导成功，当给予黄芩射干汤干预后，与模型组相比，各药物组中炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的浓度显著降低（$P < 0.01$）。其作用结果与本文网络药理学和分子对接结果相符，表明黄芩射干汤有较好的抗炎作用。

2.7　Western blot 实验蛋白表达结果

如图 6 所示，与空白组相比，模型组和各药物组给予 LPS 诱导后，p-NF-κBp65、NF-κBp65、NLRP3和 TNF-α 蛋白表达量均显著上升（$P < 0.01$），表明 LPS 刺激后可诱导 RAW264.7 细胞中上述相

表 3 黄芩射干汤对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响及炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 浓度的影响

Tab 3 Effect of Huangqin Shegan decoction on the activity of RAW264.7 cells and inflammatory factors TNF-α and IL-1β

组别	细胞活性 /%（无 LPS 刺激）	细胞活性 /%（LPS 刺激后）	TNF-α 浓度 /（pg·mL^{-1}）	IL-1β 浓度 /（pg·mL^{-1}）
空白组	100	100	49.98±7.14	11.62±0.53
模型组（LPS 组）	/	99.25±14.21	672.75±26.33$^{\#\#}$	154.38±5.83$^{\#\#}$
药物低剂量组	106.21±19.62	105.2±11.02	487.11±5.60**	128.75±6.88**
药物中剂量组	102.01±9.48	98.3±5.99	478.91±8.02**	89.75±4.55**
药物高剂量组	97.89±8.26	96.8±12.23	457.08±11.05**	37.75±2.55**

注：与空白组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$。

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

关炎症通路蛋白表达上调。与模型组相比，黄芩射干汤药物组中 NF-κBp65、p-NF-κBp65、NLRP3 和 TNF-α 蛋白表达量均下调（$P < 0.05$），且呈现剂量依赖性地下调，说明黄芩射干汤可下调 NF-κBp65、p-NF-κBp65、NLRP3 和 TNF-α 蛋白的表达，抑制 NF-κB 信号通路，减轻 RAW264.7 细胞中炎症反应。

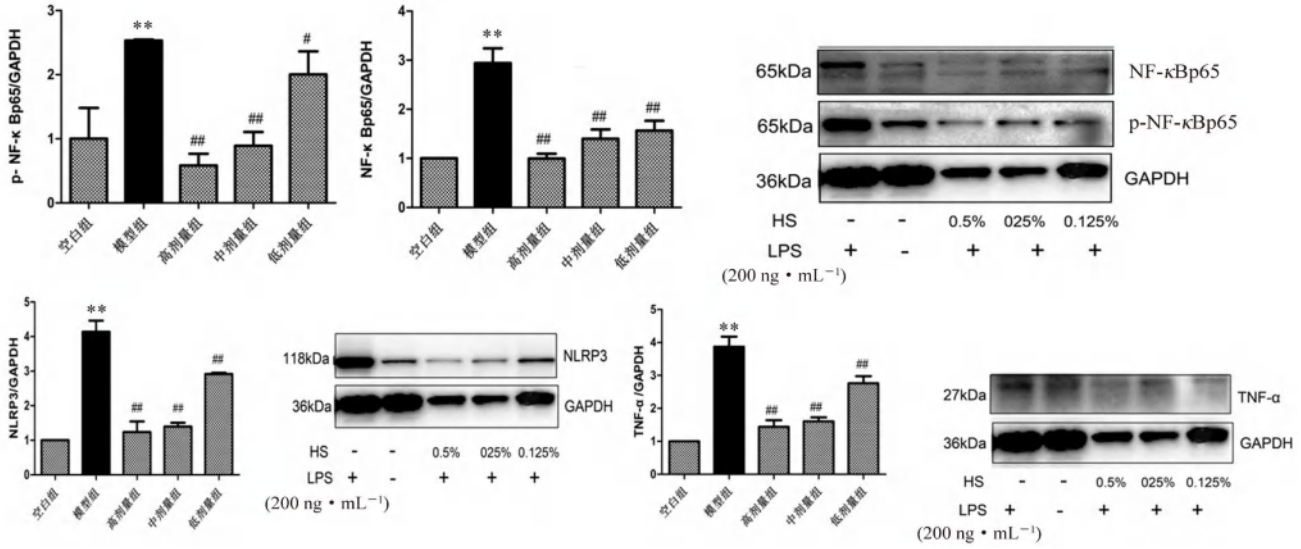

图 6 黄芩射干汤对 p-NF-κBp65、NF-κBp65、NLRP3 和 TNF-α 蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of Huangqin Shegan decoction on the expression of p-NF-κBp65，NF-κBp65，NLRP3 and TNF-α protein

注：空白组相比，$^{**}P < 0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

3 讨论

中医认为肺炎多系温热之邪袭肺所致，其中心环节为风热与痰热，故治疗多以宣肺解表，清热豁痰解毒为主。李亮等 [9] 基于数据挖掘分析了中医药治疗小儿肺炎的用药规律，其中寒性药、苦味药、入肺经、止咳平喘类药物使用频率最高，且中医药治疗小儿肺炎的方剂中黄芩、射干使用频率较高。黄芩射干汤收载于“医钞类编”卷十二（咽喉门方），黄芩，主入肺经，常用清肺热，为治肺热咳嗽之要药。射干，有清热解毒，消痰，利咽之功效，常用于热毒痰火郁结，咽喉肿痛，咳嗽气喘。两药配伍，祛肺、胃热毒雍滞，散结利咽缓其症，协同发挥治疗小儿肺炎的作用 [6]。

NF-κB 是多种效应因子的上游调节蛋白，包括炎症细胞因子、趋化因子和表面受体等，主要参与免疫和炎症反应 [10]，激活后可介导 NLRP3 炎症小体的激活，NLRP3 炎症小体可识别多种病原体相关分子模式和损伤相关分子模式，主要在巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞等多种免疫细胞中表达，参与肺部炎症的过程 [11-12]。信号刺激后，一系列级联炎症反应被触发，从而诱导针对病原体入侵的初级免疫反应，最后导致下游炎症细胞因子如 TNF-α 和 IL-1β 大量释放 [13-15]，甚至可诱导其他炎症因子的释放，进而介导和进一步扩大炎症级联反应 [16]。NLRP3 炎症小体还与常见呼吸道疾病如慢性阻塞性肺疾病、传染性肺炎、哮喘、硅沉着病等的发生发展密切相关 [17]。IL-1β 是宿主对微生物感染反应的重要炎症介质，其中活化的单核细胞和巨噬细胞是主要的细胞来源。由革兰氏阴性菌引起的肺部感染主要原因是存在于细胞壁中 LPS 有效刺激了相应免疫细胞 [18]，LPS 的刺激可激活 NF-κB 信号通路，从而诱导其下游一系列炎症反应的发生，最终导致肺部损伤 [19]。因此，NF-κB/NLRP3 轴可作为研究肺炎的关键途径。

LPS 是一种革兰氏阴性细菌内毒素，在小儿肺炎相关的炎症反应中起关键作用[20]。研究发现，LPS 可在体内外多种细胞中引起趋化因子和炎症因子的高表达，因此在许多疾病中被用于诱导细胞炎症模型，包括肺炎[21-22]。在本研究中，通过大数据库分析得到药物 - 疾病相关靶点，包括 TNF-α 和 NF-κB 等在内的核心靶点。富集分析显示，黄芩射干汤抗肺炎与 TNF 和 NF-κB 等信号通路有关。因此，提示黄芩射干汤治疗小儿肺炎可能与其抗炎作用密不可分。进一步通过用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞构建炎症反应模型，结果显示黄芩射干汤能够抑制 NF-κB/NLRP3 轴介导的信号通路，且抑制其下游 TNF-α 和 IL-1β 的表达。因此，我们认为黄芩射干汤治疗肺炎与其抑制 NF-κB/NLRP3 轴相关。此外，网络药理学结果预测显示，黄芩射干汤对肺炎的治疗可能与 NF-κB、TNF、IL、PI3K-Akt 等信号通路有关，这表明黄芩射干汤对肺炎的作用还可能涉及细胞凋亡等，后续研究将进一步探索其他相关靶点和途径。

综上所述，黄芩射干汤可通过抑制 NF-κB/NLRP3 轴对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞表现出较强的保护作用，且其治疗小儿肺炎可能与该抗炎信号通路有关。本研究为黄芩射干汤的临床应用提供了确切依据，对其二次开发具有重要意义。然而网络药理学也有一定的局限性，一是缺少足够的中医药临床和基础研究数据，且只有少数专门的药理学数据库。其次，中医药混合成分的权重是不确定的，导致最终分析结果还需要进一步验证。

参考文献

[1] Ottosen J，Evans H，Pneumonia：challenges in the definition，diagnosis，and management of disease [J]. Surg Clin North Am，2014，94（6）：1305-1317.

[2] Cilloniz C，Pericas JM，Rojas JR，et al. Severe infections due to respiratory viruses [J]. Semin Respir Crit Care Med，2022，43（1）：60-74.

[3] 江载芳，申昆玲，沈颖 . 诸福棠实用儿科学 [M]. 8 版 . 北京：人民卫生出版社，2015：1253.

[4] Guo SS，Bao L，Qu TG，et al. Ameliorative effects of infantile feire kechuan oral solution on mycoplasma pneumoniae pneumonia in infant mouse and rat models [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2018，2018：8139040.

[5] Xi SY，Li YH，Yue LF，et al. Role of traditional Chinese medicine in the management of viral pneumonia [J]. Front Pharmacol，2020，11：582322.

[6] 尹江涛，王晓月，顾希，等 . HS 中异黄酮类成分与 MAPK 信号通路的分子对接研究 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（10）：52-54，269-270.

[7] 刘志强 . HS 主要黄酮类成分与 H7N9 病毒神经氨酸酶的分子对接 [J]. 邵阳学院学报（自然科学版），2020，17（3）：110-116.

[8] 鲁婧，任铭，高龙妹，等 . HS 对 MRSA 抑菌作用及初步作用机制研究 [J]. 实用中医内科杂志，2022，https：//kns.cnki. net/kcms/detail/21.1187. R. 20220830.1519.004. html.

[9] 李亮，韩斐 . 基于数据挖掘的中医药治疗小儿肺炎的用药规律研究 [J]. 实用心脑肺血管病杂志，2020，28（11）：109-113.

[10] Hayden MS，Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling [J]. Cell，2008，132（3）：344-362.

[11] Chen CH，Wen HJ，Chen PC，et al. Prenatal and postnatal risk factors for infantile pneumonia in a representative birth cohort [J]. Epidemiol Infect，2012，140：1277-1285.

[12] Grinspan ZM，Mytinger JR，Baumer FM，et al. Crisis standard of care：management of infantile spasms during COVID-19 [J]. Ann Neurol，2020，88：215-217.

[13] Zhang J，Wang CH，Liu XJ，et al. Efficacy and safety analysis of dopamine combined with creatine phosphate sodium in the treatment of infantile pneumonia combined with heart failure [J]. J Biol Regul Homeost Agents，2020，34：2103-2108.

[14] Guo H，Callaway，JB Ting JP. Inflammasomes：mechanism of action，role in disease，and therapeutics [J]. Nat，Med，2015，21（7）：677-687.

[15] Feng T，Zhou LY，Gai SC，et al. *Acacia catechu*（L. f.）Willd and Scutellaria baicalensis Georgi extracts suppress LPS-induced pro-inflammatory responses through NF-κB，MAPK，and PI3K-Akt signaling pathways in alveolar epithelial type Ⅱ cells [J]. Phytother Res，2019，33（12）：3251-3260.

[16] Pu ZC，Liu YH，Li C，et al. Using network pharmacology for systematic understanding of geniposide in ameliorating inflammatory responses in colitis through suppression of NLRP3 inflammasome in macrophage by AMPK/Sirt1 dependent signaling [J]. Am J Chin Med，2020，48：1693-1713.

[17] Wu DD，Pan PH，Liu B，et al. Inhibition of alveolar macrophage Pyroptosis reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Chin Med J，2015，128（19）：2638-2645.

[18] Tang J，Xu LQ，Zeng YW，et al. Effect of gut microbiota on LPSinduced acute lung injury by regulating the TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol，2021，91：107272.

[10] Tang FY，Fan KF，Wang KL，et al. Atractylodin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome and TLR4 pathways [J]. J Pharmacol Sci，2018，136（4）：203-211.

[20] Liu Q，Yang H，Xu SN，et al. Downregulation of p300 alleviates LPS-induced inflammatory injuries through regulation of RhoA/ROCK/NF-kappaB pathways in A549 cells [J]. Biomed Pharmacother，2018，97：369-374.

[21] Zhou JT，Ren KD，Hou J，et al. α-rhamnrtin-3-α-rhamnoside exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells by abrogating NF-κB and activating the Nrf2 signaling pathway [J]. Mol Med Rep，2021，24（5）：799.

[22] Wang P，Zhang HT，Zhao WQ，et al. Silencing of long non-coding RNA KCNQ1OT1 alleviates LPS-induced lung injury by regulating the miR-370-3p/FOXM1 axis in childhood pneumonia [J]. BMC Pulm Med，2021，21（1）：247.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-11-20）

新型高效 g-C_3N_4 电化学发光材料的制备

韩智莉[1]，王梦媛[1]，李慧萧[1]，赵成程[1]，王雅迪[1]，胡晓蝶[1]，李玮[2]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 安徽省食品药品检验研究院，合肥 230051）

摘要：目的 利用电化学插层手段调控 g-C_3N_4 电化学发光行为，制备高效、稳定的 g-C_3N_4 电化学发光新材料。**方法** 利用电化学插层方法，将有机阳离子插入到 g-C_3N_4 的层间距中，制备新型高效电化学发光 g-C_3N_4 材料，并对其电化学发光性质进行研究。**结果** 利用电化学插层的方法成功将 CTAB 和 TCNQ 分子插入到 g-C_3N_4 层间距中，实现了层状 g-C_3N_4 电化学发光性质由多层到单层的转变，有效提高了 g-C_3N_4 的导电性和电化学发光强度。研究表明插层分子尺寸越大，层间距增加得越多，g-C_3N_4 的电化学发光效率提升得越多。此外，TCNQ 本身即具有电化学发光性质，将其作为插层分子不仅能提高 g-C_3N_4 的发光效率，而且能带来具有不同波长的新的发光峰。**结论** 电化学插层手段为提高 g-C_3N_4 的电化学发光性能开辟了一种简单有效的新方法。所合成的新型高效、稳定的 C-g-C_3N_4 电化学发光材料为构建新型分析界面或分析探针，发展高灵敏度、高选择性的药物分析新方法奠定了重要基础。

关键词：石墨相氮化碳；电化学插层；电化学发光；药物分析

中图分类号：O626，O657.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2016-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.007

Preparation of novel high-efficiency g-C_3N_4 electrochemiluminescent materials

HAN Zhi-li[1], WANG Meng-yuan[1], LI Hui-xiao[1], ZHAO Cheng-cheng[1], WANG Ya-di[1], HU Xiao-die[1], LI Wei[2] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Institute for Food and Drug Control*, *Hefei* 230051)

Abstract: Objective To modulate the electrochemiluminescence behavior of g-C_3N_4 by means of electrochemical intercalation and to prepare new highly efficient and stable g-C_3N_4 electrochemiluminescent materials. **Methods** With the electrochemical intercalation method, organic cations were inserted into the layer spacing of g-C_3N_4 to prepare new high-efficiency g-C_3N_4 electrochemiluminescent materials, and their electrochemiluminescent properties were determined. **Results** CTAB and TCNQ molecules into the g-C_3N_4 layer spacing was successfully inserted by the electrochemical intercalation method to transform the electrochemiluminescence properties of layered g-C_3N_4 from multilayer to monolayer, which effectively improved the electrical conductivity and electrochemiluminescence intensity of g-C_3N_4. The larger the size of the intercalated molecules, the more increase the layer spacing and the better the electrochemiluminescence efficiency of g-C_3N_4. In addition, TCNQ itself had electrochemiluminescence properties, and using it as an intercalating molecule can not only improve the luminescence efficiency of g-C_3N_4, but also caused new luminescence peaks with different wavelengths. **Conclusion** The electrochemical intercalation proposed in this work opens up a simple and effective method to improve the electrochemiluminescence performance of g-C_3N_4. The new efficient and stable C-g-C_3N_4 electrochemiluminescent materials synthesized lay an important foundation for the construction of novel analytical interfaces or analytical probes and further development of new methods in drug

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 22104003）；安徽中医药大学校内人才项目（重点）（No. 2020rczd003）；国家级创新训练项目（No. G202210369027）。

作者简介：韩智莉，女，讲师，博士，主要从事新型发光材料的制备及其在药物分析中的应用研究，email：han303@ahtcm.edu.cn

analysis with high sensitivity and selectivity.

Key words: graphite phase carbon nitride; electrochemical intercalation; electrochemiluminescence; drug analysis

电化学发光（electrochemiluminescence）是指由电极对含有化学发光试剂的体系施加电压后产生的发光现象[1]。它不仅具有电化学的反应过程可控、可实现原位检测、选择性好的优势，也具有化学发光的无需光源、仪器简单、灵敏度高等优点[2]。基于此，电化学发光分析法作为一种有效的痕量分析技术一直是分析领域的研究热点[3]，已被广泛应用于食品安全[4]、临床诊断[5]、药物分析[6]和环境监测[7]等领域。近年来，电化学发光分析法在药物分析中的应用日益受到人们的关注[8-10]。如 Wang 等[11]合成了一种超薄的二维镱基金属有机框架，将其作为一种高效的发光体构建了电化学发光传感器，实现了对人血清样本中苦味酸和盐酸小檗碱的灵敏检测；Wang 等[12]将锌基的有机框架材料作为 *N*-（4- 氨基丁基）-*N*- 乙基异鲁米诺电化学发光反应的促进剂，发展了一种无标记的电化学发光生物传感器实现了对氯霉素的选择性检测。但是，随着生命科学的快速发展，药物分析的样本成分越来越复杂，而且其分析对象已逐渐从传统的体外分析逐渐向体内的活性物质追踪、药物代谢研究等领域发展[13-15]。因此，需要发展具有更高灵敏度和选择性的电化学发光分析新方法以满足日益增长的新需求。

发展电化学发光分析方法的关键在于电化学发光分析界面或分析探针的构建，而电化学发光材料又是构建分析界面或分析探针的核心。因此，合成具有更高发光性能的电化学发光材料一直是发展高灵敏度和高选择性电化学发光分析新方法的研究重点。石墨相氮化碳（g-C_3N_4）作为一种新型的电化学发光纳米发光体，具有独特的电子带结构、高度稳定的物理化学特性、一定的电化学发光性能以及良好的生物兼容性，已被用于发展电化学发光药物分析方法[16-18]。但是，由于受电导性差和电极钝化的影响，g-C_3N_4 的电化学发光信号还不够强且稳定性有待进一步提高，严重制约了其在药物分析中的应用。基于此，本文拟首次利用电化学插层方法提高 g-C_3N_4 的电化学发光性能，以推进其在药物分析中的应用。

1 材料

无水乙醇、过硫酸钾（国药集团化学试剂有限公司）；7，7，8，8- 四氰基苯醌二甲烷（TCNQ）（上海麦克林生化科技有限公司）；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、二甲基亚砜（DMSO）（国药集团化学试剂有限公司）。含有一定浓度过硫酸钾的磷酸缓冲溶液（pH 7）作为电解液，用于电化学发光的测定。所有的试剂均为分析纯级别。超纯水（18.2 MΩ）由 Milli-Q 系统（法国 Millipore）制备。

CHI-760E 电化学分析仪 / 工作站（上海辰华仪器有限公司）；RFL-1 型超微弱化学发光 / 生物发光检测仪（西安瑞迈分析仪器有限责任公司）；KQ-100TDE 高频数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SCI-VS 可调式混匀仪（上海辅泽商贸有限公司）。

2 方法

2.1 层状 g-C_3N_4 的制备

通过双氰胺的热缩聚反应得到 g-C_3N_4 块状材料，随后在水 / 乙醇混合溶剂系统中通过超声波剥离方法得到所需的 g-C_3N_4 纳米片[19-21]。具体的操作步骤为：称取 10 g 双氰胺固体，置于半密封的坩埚中，在马弗炉中以 2.3 ℃ • min^{-1} 的速度升温至 550 ℃下煅烧 4 h；自然冷却至室温后，将所得的淡黄色块状材料充分研磨，得到粉末状 g-C_3N_4 体相材料；将 0.3 g g-C_3N_4 粉末分散于 100 mL H_2O/EtOH 混合溶剂中，持续超声 8 h；所得分散液于 5000 r • min^{-1} 离心 10 min 以除去残留的未剥落的 g-C_3N_4 纳米片，乳白色上清液即为 g-C_3N_4 纳米片分散液，将其于 12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，重新分散于 H_2O 中备用[10]。将剥离好的 g-C_3N_4 乳白色分散液持续超声 10 min，得到分散均匀后的 g-C_3N_4 溶液，各取 1.0 mL 置于两个 1.5 mL 的离心管中，在 6000 r • min^{-1} 离心 10 min，沉淀中各加入 1 mL 乙醇溶液分散均匀后，在 1500 r • min^{-1} 离心 5 min。离心完成后取上清液。即得层状 g-C_3N_4 样品，避光储存于 4 ℃冰箱中备用。

2.2 电化学插层法制备 C-g-C_3N_4

将所得的多层 g-C_3N_4 样品持续超声 10 min 后通过滴涂的方式修饰到工作电极表面，每次滴涂样品的体积为 10 μL，使用标准的三电极体系（Ag/

AgCl 为参比电极，铂丝为对电极），通过对工作电极施加一定范围的扫描电压（0V →－ 2.1V → 0V），使插层分子（TCNQ 和 CTAB）插入 g-C_3N_4 的层间距，制备出新型 g-C_3N_4 电化学发光材料：C-g-C_3N_4。

2.3 材料的表征

利用紫外 - 可见吸收光谱（Agilent 8453 紫外 - 可见分光光度计）对 C-g-C_3N_4 进行表征。实验时，将 TCNQ 溶液、g-C_3N_4 分散液以及 TCNQ 和 g-C_3N_4 混合 10 min 后离心去除上清液后的样品作为对照。

2.4 电化学发光检测

采用传统的三电极系统 [包括浸有饱和 KCl 溶液的 Ag/AgCl 参比电极、铂丝对电极和修饰了 C-g-C_3N_4 材料的氟掺杂氧化锡（FTO）工作电极] 进行 C-g-C_3N_4 电化学发光检测。FTO 裸电极预先在丙酮、乙醇、超纯水中分别超声 10 min 以清洁 FTO 裸电极表面，随后将打好孔（Φ ＝ 6 mm）的合适长度的聚酰亚胺双面胶贴合在 FTO 电极表面，用于后期电化学发光活性材料的修饰。所获得的原始数据通过 OriginLab 软件处理分析。

3 结果与讨论

3.1 电化学插层法制备 C-g-C_3N_4

传统的层状 g-C_3N_4 一般会表现出层数依赖的性质，比如层数越少，其发光效率越高。但是利用传统方法（如超声剥离）制备少层的 g-C_3N_4 的效率较低，而且难以得到单层的 g-C_3N_4。因此，本研究利用电化学插层的方法，成功将两种插层分子（TCNQ 和 CTAB）插入到 g-C_3N_4 的层间距中，制备了新型 g-C_3N_4 电化学发光材料 C-g-C_3N_4（见图 1）。

3.2 材料的表征

采用紫外 - 可见吸收光谱对制备的 C-g-C_3N_4 进行了表征。如图 2 所示，g-C_3N_4 和 TCNQ 分子的特征吸收峰分别位于 326 和 395 nm 附近。TCNQ 分子插层后的 C-g-C_3N_4 展现出明显的 g-C_3N_4 和 TCNQ 特征吸收峰，表明 TCNQ 分子与 g-C_3N_4 成功结合。同时，本研究也检测了 g-C_3N_4 和 TCNQ 混合 10 min 后离心去掉上清液后样品的紫外 - 可见收光谱。如图 2 中绿色曲线所示，其吸收峰主要位于 326 nm 处，来自于 g-C_3N_4。而在 395 nm 处的 TCNQ 特征吸收峰非常微弱，表明 TCNQ 分子很难通过吸附作用与 g-C_3N_4 结合。上述结果表明，本研究通过电化学插层方法成功将 TCNQ 插入 g-C_3N_4 的层间距中，合成了 C-g-C_3N_4。

3.3 C-g-C_3N_4 的电化学发光性质

利用循环伏安法在 0.1 mol • L^{-1} 过硫酸钾作为共反应试剂的条件下探究了 C-g-C_3N_4 的电化学发光性质。图 3A 为 CTAB 分子插层前后 g-C_3N_4 的电化学发光 - 电位（I_{ECL}-E）曲线。从图中可以观察到 CTAB 分子插层后的 C-g-C_3N_4 具有两个 ECL 峰，分别为 ECL-1 和 ECL-2。对比插层前 g-C_3N_4 的 I_{ECL}-E 曲线，可以明显地看出：插层前，g-C_3N_4 较难被电还原，发光电位很高，在－ 2.0 V 附近；插层后，C-g-C_3N_4 出现新的发光峰 ECL-1，发光电位较低，在－ 1.6 V 附近。g-C_3N_4 发光峰电位的变化可能是由于 CTAB 插层后 C-g-C_3N_4 的导电性变好，所需的还原电位降低。此外，通过比较插层前后 g-C_3N_4 的 ECL 强度观察到 CTAB 分子插层后 g-C_3N_4 的发光强度比插层前的增强了 4 ～ 5 倍，表明具有更高电化学发光效率的 C-g-C_3N_4 被成功制备。上述结果证明 CTAB 分子被成功插层到 g-C_3N_4 的层间距中，实现了其电化学发光性质有多层像单层的转变，有效增强了 g-C_3N_4 的导电性和电化学发光强度，进而有望提高基于 C-g-C_3N_4 的电化学发光分析方法的分析性能。

为了探究不同尺寸的有机分子对插层效果的影响，本研究也使用了具有更小尺寸的 TCNQ 分子对 g-C_3N_4 进行电化学插层，并在同样的条件下探究了其电化学发光行为。图 3B 为 TCNQ 分子插层前后 g-C_3N_4 的 I_{ECL}-E 曲线，由图可知在 TCNQ 分子后 C-g-C_3N_4 虽然只有一个发光峰，但是其发光电位相较插层前仍然有所降低。该现象与 CTAB 分子插层不太一样，可能是由于 TCNQ 分子尺寸更小，对 g-C_3N_4 导电性的提升效果较小。此外，比较 TCNQ 分子插层前后 g-C_3N_4 的发光强度，可以得到 TCNQ 插层后 g-C_3N_4 的发光强度虽然有所增加，但只增强了 2 ～ 3 倍，效果略差于 CTAB 分子插层。上述结果表明，较小尺寸的 TCNQ 分子虽然也可以通过电化学插层到 g-C_3N_4 的层间距中，但是由于其尺寸比 CTAB 的小，因此其增强 g-C_3N_4 导电性和电化学发光强度的效果不如 CTAB。这也进一步证明通过调控插层分子的尺寸来改变层间距，进而实现 g-C_3N_4 电化学发光性质的调控是完全可行的。

3.4 电化学发光光谱

研究 CTAB 插层前后 g-C_3N_4 的电化学发光光谱变化，验证了电化学插层手段是否成功使有机分子插入到 g-C_3N_4 的层间距中。图 4A 和 4B 是 CTAB 插层前后 g-C_3N_4 的三维电化学发光光谱。当过硫酸钾作为共反应试剂时，C-g-C_3N_4 和

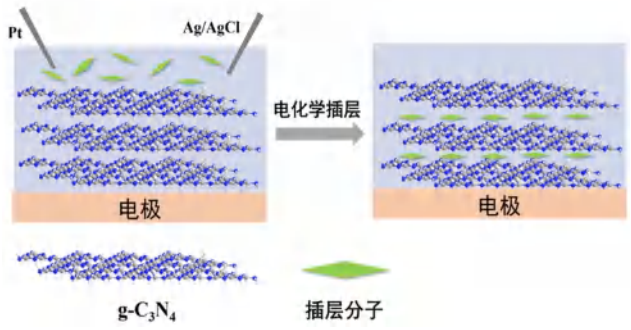

图 1　电化学插层法制备 C-g-C_3N_4 示意图

Fig 1　Preparation of C-g-C_3N_4 by electrochemical intercalation method

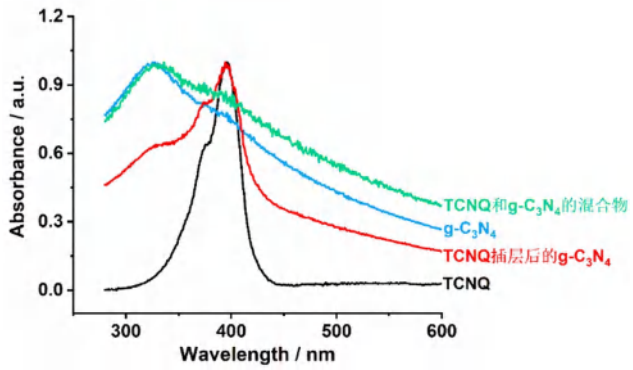

图 2　紫外 - 可见吸收光谱

Fig 2　UV-Vis absorption spectra

$g\text{-}C_3N_4$ 的 ECL 的强度都随着电位的增大而增强，而且与之前的研究结果一致，CTAB 分子插层后 $g\text{-}C_3N_4$ 的电化学发光强度明显增加。此外，如图 4C 所示，CTAB 分子插层后 $g\text{-}C_3N_4$ 的最大电化学发光发射峰的位置都在 456 nm，表明 CTAB 分子的插层前后的发光体都是 $g\text{-}C_3N_4$，且电化学插层没有影响 $g\text{-}C_3N_4$ 的能级。

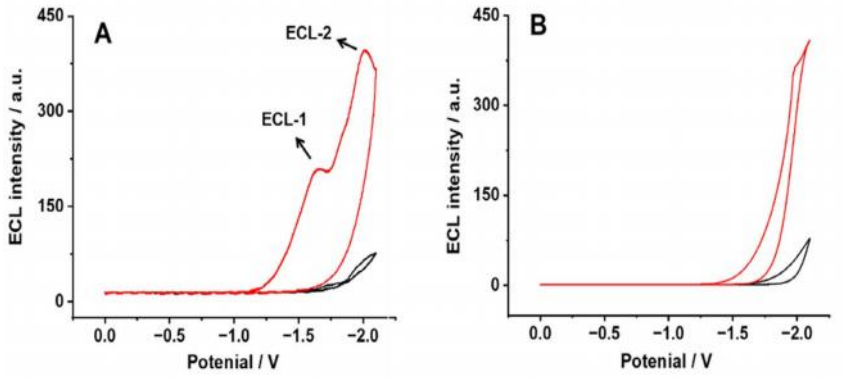

图 3　CTAB（A）及 TCNQ（B）插层前（黑色曲线）和 CTAB 插层后（红色曲线）g-C_3N_4 的 I_{ECL}-E 曲线

Fig 3　I_{ECL}-E curve of g-C_3N_4 before（black curve）and after（red curve）CTAB electrochemical intercalation（A）and TCNQ electrochemical intercalation（B）

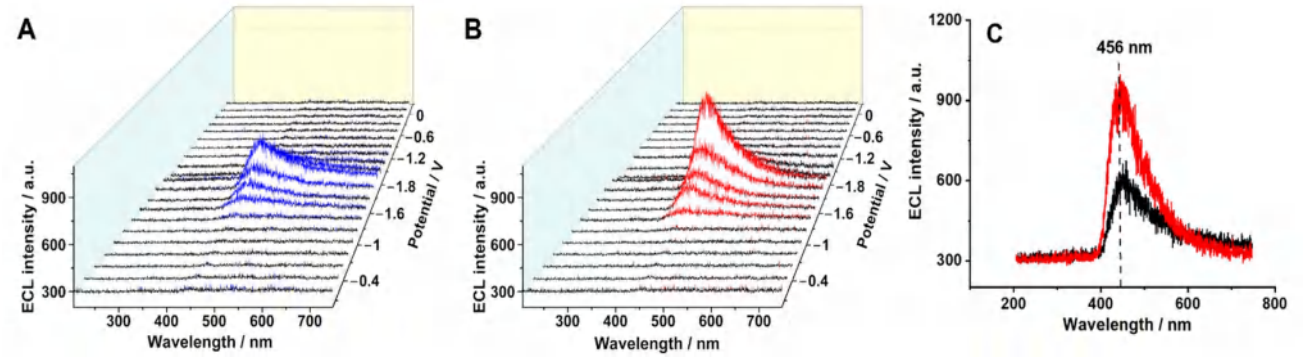

图 4　CTAB 分子插层前（A）、插层后 g-C_3N_4（B）的三维电化学发光光谱及 CTAB 分子插层前（黑色）和插层后（红色）g-C_3N_4 的电化学发光光谱（C）

Fig 4　3D electrochemiluminescence spectra of g-C_3N_4 before（A）and after（B）CTAB molecular intercalation and electrochemiluminescence spectra of g-C_3N_4 before（black）and after（red）CTAB molecular intercalation（C）

图 5A 和 5B 是 TCNQ 插层前后 $g\text{-}C_3N_4$ 的三维电化学发光光谱图。C-g-C_3N_4 和 $g\text{-}C_3N_4$ 的电化学发光的强度都随着电位的增大而增强，与之前的研究结果一致，TCNQ 分子插层后 $g\text{-}C_3N_4$ 的电化学发光强度也明显增强，表明 TCNQ 插层也能有效提高 $g\text{-}C_3N_4$ 的电化学发光效率。此外，本研究还考察了 TCNQ 分子插层前后 $g\text{-}C_3N_4$ 电化学发光波长的变化。如图 5C 所示，TCNQ 分子插层后的 C-g-C_3N_4 出现了两个电化学发光峰，分别位于 456 和 630 nm 附近，而插层前的 $g\text{-}C_3N_4$ 只有一个位于

456 nm 的发射峰。为了研究这一变化，我们进一步研究了在过硫酸钾作为共反应试剂时 TCNQ 的电化学发光行为，发现 TCNQ 分子也具有电化学发光性质，且其电化学发光波长位于 610 nm。该结果表明，TCNQ 分子插层后的 C-g-C_3N_4 位于 630 nm 附近的发光峰来自于 TCNQ 分子。

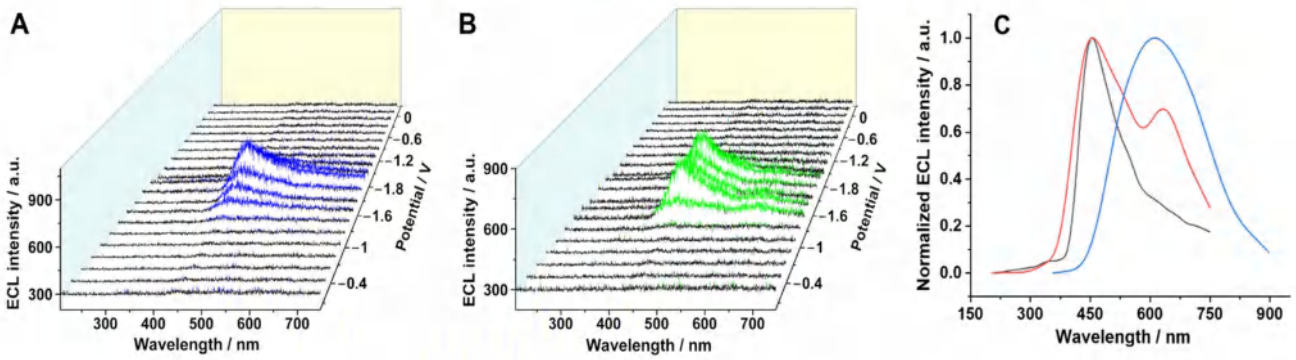

图 5 TCNQ 分子插层前（A）、插层后（B）g-C_3N_4 的三维电化学发光光谱及 g-C_3N_4（黑色）、TCNQ 分子插层后的 g-C_3N_4（红色）以及 TCNQ 分子（蓝色）（C）的电化学发光光谱

Fig 5 3D electrochemiluminescence spectrum g-C_3N_4 before（A）and after（B）TCNQ molecular intercalation and electrochemiluminescence spectra of g-C_3N_4（black），g-C_3N_4 after TCNQ molecular intercalation（red）and TCNQ molecule（blue）（C）

为进一步验证 TCNQ 分子不是通过吸附在 g-C_3N_4 表面来增强其电化学发光，本课题组又做了进一步的研究。图 6 是单独 TCNQ 分子、单独 g-C_3N_4、g-C_3N_4 和 TCNQ 的混合物以及 TCNQ 插层后 C-g-C_3N_4 的 I_{ECL}-E 曲线。从图 6 可以看到，TCNQ 分子自身就具有 ECL 性质，TCNQ 插层后 g-C_3N_4 的发光强度明显比单独的 TCNQ 分子、单独的 g-C_3N_4 分子以及 TCNQ 和 g-C_3N_4 分子混合物的发光强度强。上述结果证明 TCNQ 分子不是通过吸附于 g-C_3N_4 分子表面的方式来使 g-C_3N_4 发光增强，而是通过插层进入 g-C_3N_4 中，通过增大 g-C_3N_4 的层间距来增强其电化学发光。

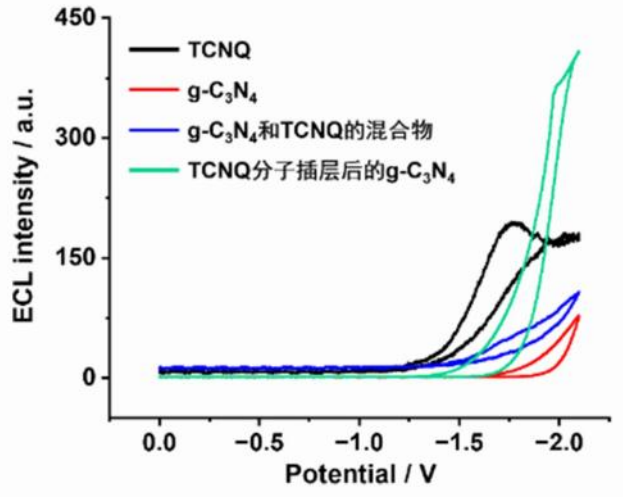

图 6 I_{ECL}-E 曲线

Fig 6 I_{ECL}-E curves

4 结论

本文首次利用电化学插层的方法将 CTAB 和 TCNQ 分子成功插入到 g-C_3N_4 层间距中，实现了层状 g-C_3N_4 电化学发光性质由多层到单层的转变，有效提高了 g-C_3N_4 的导电性和电化学发光强度。研究表明插层分子尺寸越大，层间距增加的越多，g-C_3N_4 的电化学发光效率提升的越多。此外，我们发现 TCNQ 本身即具有电化学发光性质，将其作为插层分子不仅能提高 g-C_3N_4 的发光效率，而且能带来具有不同波长的新的发光峰，这对于构建基于 C-g-C_3N_4 的波长分辨的比率型电化学发光分析方法具有重要意义。总而言之，本研究所提出的电化学插层手段为提高 g-C_3N_4 的电化学发光性能开辟了一种简单有效的新方法。所合成的新型高效、稳定的 C-g-C_3N_4 电化学发光材料为构建新型分析界面或分析探针，发展高灵敏度、高选择性的药物分析新方法奠定了重要基础。

参考文献

[1] Liu ZY，Qi WJ，Xu GB. Recent advances in electrochemiluminescence [J]. Chem Soc Rev，2015，44：3117-3142.

[2] Li LL，Chen Y，Zhu JJ. Recent advances in electrochemiluminescence analysis [J]. Anal Chem，2017，89：358-371.

[3] Miao WJ. Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications [J]. Chem Rev，2008，108（7）：2506-2553.

[4] Hao N，Wang K. Recent development of electrochemiluminescence sensors for food analysis [J]. Anal Bioanal Chem，2016，408：7035-7048.

[5] Du DX，Shu JN，Guo MQ，et al. Potential-resolved differential electrochemiluminescence immunosensor for cardiac troponin I based on MOF-5-wrapped CdS quantum

dot nanoluminophores [J]. Anal Chem，2020，92（20）：14113-14121.

[6] Wang DW，Jiang SH，Liang YY，et al. Selective detection of enrofloxacin in biological and environmental samples using a molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor based on functionalized copper nanoclusters [J]. Talanta，2022，236：122835.

[7] Li LB，Zhao WL，Zhang JY，et al. Label-free Hg（Ⅱ）electrochemiluminescence sensor based on silica nanoparticles doped with a self-enhanced $Ru(bpy)_3^{2+}$-carbon nitride quantum dot luminophore [J]. J Colloid Interf Sci，2022，608：1151-1161.

[8] Hu LQ，Lei M，Zhang JJ，et al. An “off-on-off” mode ECL sensor for drug detection based on the host-guest interaction of cucurbit[7] uril [J]. Sens Actuators B Chem，2021，344：130328.

[9] Ma XG，Gao WY，Du FX，et al. Rational design of electrochemiluminescent devices [J]. Acc Chem Res，2021，54（14）：2936-2945.

[10] Zou Y，Zhang HX，Wang ZH，et al. A novel ECL method for histone acetyltransferases（HATs）activity analysis by integrating HCR signal amplification and ECL silver clusters [J]. Talanta，2019，198：39-44.

[11] Wang XY，Xiao SY，Jiang ZW，et al. An ultrathin 2D Yb（Ⅲ）metal-organic frameworks with strong electrochemiluminescence as a “on-off-on” platform for detection of picric acid and berberine chloride form [J]. Talanta，2021，234：122625.

[12] Wang XT，Jiang YR，Huang LY，et al. The electrochemiluminescence coreactant accelerator of metal-organic frameworks grafted with *N*-（aminobutyl）-*N*-（ethylisoluminol）for the ultrasensitive detection of chloramphenicol [J]. Analyst，2021，146：5995-6004.

[13] Liu G，Jin BK，Ma C，et al. Potential-resolved electrochemiluminescence nanoprobes for visual apoptosis evaluation at single-cell level [J]. Anal Chem，2019，91（9）：6363-6370.

[14] Wasalathanthri DP，Li DD，Song DH，et al. Elucidating organ-specific metabolic toxicity chemistry from electrochemiluminescent enzyme/DNA arrays and bioreactor bead-LC-MS/MS [J]. Chem Sci，2015，6：2457-2468.

[15] Zheng YJ，Ning ZQ，Pan D，et al. Electrochemiluminescent detection of hNQO1 and associated drug screening enabled by futile redox cycle reaction [J]. Sens Actuators B Chem，2020，321：128557.

[16] Chen LC，Zeng XT，Si P，et al. Gold nanoparticle-graphite-like C_3N_4 nanosheet nanohybrids used for electrochemiluminescent immunosensor [J]. Anal Chem，2014，86（9）：4188-4195.

[17] Liu YT，Wang QB，Lei JP，et al. Anodic electrochemiluminescence of graphitic-phase C_3N_4 nanosheets for sensitive biosensing [J]. Talanta，2014，122：130-134.

[18] Ma XM，Li MM，Kang Q，et al. A simple and sensitive approach to monitor the spectrum change during the electrochemiluminescence process and reveal the mutual promotion between g-C_3N_4 and co-reactant of $S_2O_8^{2-}$ [J]. Sens Actuators B Chem，2022，360：131679.

[19] Shiravand G，Badiei A，Goldooz H，et al. A fluorescent g-C_3N_4 nanosensor for detection of dichromate ions [J]. Curr Anal Chem，2020，16（5）：593-601.

[20] Yang LR，Liu XY，Liu ZG，et al. Enhanced photocatalytic activity of g-C_3N_4 2D nanosheets through thermal exfoliation using dicyandiamide as precursor [J]. Ceram Int，2018，44（17）：20613-20619.

[21] Shan X，Ge GF，Zhao ZK. Facile and scalable fabrication of porous g-C_3N_4 nanosheets with nitrogen defects and oxygen-doping for synergistically promoted visible light photocatalytic H_2 evolution [J]. Energy Technol，2019，7（5）：1800886.

（收稿日期：2023-03-09；修回日期：2023-05-05）

基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析石生与树生铁皮石斛化学成分的差异

贾小换，秦琳，陆安静，谭道鹏，何芋岐*，吴发明*（遵义医科大学 贵州省高等学校金钗石斛产业发展关键技术工程研究中心，贵州 遵义 563000）

摘要：目的 分析石生和树生铁皮石斛的多糖含量和次生代谢产物的差异，探究“石斛”和“木斛”是否存在品质差异。**方法** 参考《中国药典》测定石生和树生铁皮石斛的多糖含量，进一步采用 UPLC-Q-TOF-MS 系统分析其次生代谢产物，通过主成分分析（PCA）与正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）等多元统计技术对代谢轮廓及化学成分差异性聚类，并挖掘其差异化学成分。**结果** 石生铁皮石斛的多糖含量显著高于树生铁皮石斛，PCA 及 OPLS-DA 结果表明两者的化学成分含量存在明显差异，进一步对筛选得到的差异变量进行鉴定，并对其进行含量比较分析，发现其中棉子糖、蔗糖、葡萄糖、维采宁 -1 和 1-acetate-*α*-*D*-mannopyranose 或其同分异构体在石生铁皮石斛中含量较高，而 pinellic acid、*α*- 羟基亚麻酸、*L*- 亮氨酸或其同分异构体以及 *L*- 苯丙氨酸或其同分异构体等的含量在树生铁皮石斛中较高。**结论** 参考传统观点以及《中国药典》以多糖含量作为铁皮石斛的质量评价标准，石生铁皮石斛的质量在一定程度上优于树生铁皮石斛，对目前铁皮石斛药用质量控制及其规范化种植具有一定参考价值。

关键词：铁皮石斛；多糖；次生代谢产物；UPLC-Q-TOF-MS
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2022-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.008

Difference in chemical compositions of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees based on UPLC-Q-TOF-MS

JIA Xiao-huan, QIN Lin, LU An-jing, TAN Dao-peng, HE Yu-qi*, WU Fa-ming* (*Engineering Research Center for Key Technologies of Dendrobium Nobile Industry Development*, *Zunyi Medical University*, *Zunyi Guizhou* 563000)

Abstract: Objective To determine the difference in polysaccharide contents and secondary metabolites in *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees to determine whether there were quality differences between “Muhu” and “Shihu”. **Methods** The polysaccharide contents of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees were measured with reference to the *Chinese Pharmacopoeia*, and their secondary metabolites were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS. The metabolic profiles and chemical compositions were clustered differently by multivariate statistical techniques such as principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and their differential chemical compositions were explored. **Results** The polysaccharide content of *Dendrobium officinale* growing on rocks was much higher than that of *Dendrobium officinale* growing on trees. PCA and OPLS-DA showed that there was a significant difference in the content of chemical components between the two. Further identification and comparative analysis of the content of the selected variables showed that the content of raffinose, sucrose, glucose, vicinin-1

基金项目：贵州省科技计划项目（No. 黔科合支撑 [2019]2953，黔科合支撑 [2020]4Y072）；贵州省教育厅平台项目（No. 黔教技 [2022]048）；贵州省卫健委科学技术基金项目（No. gzwkj2021-447）。
作者简介：贾小换，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量控制与中药代谢研究，email：jxh0925@foxmail.com *通信作者：何芋岐，男，教授，主要从事中药质量控制研究，email：yqhe.pharm@foxmail.com；吴发明，男，副教授，主要从事中药质量控制研究，email：wufaming@zmu.edu.cn

and 1-Acetate-*α*-*D*-mannopyranose or its isomer in *Dendrobium officinale* growing on rocks was higher, while the content of pinellia acid, *α*-hydroxylinolenic acid, *L*-leucine or its isomer and *L*-phenylalanine or its isomer was higher in *Dendrobium officinale* growing on trees. **Conclusion** The quality of *Dendrobium officinale* growing on rocks is better than that of *Dendrobium officinale* growing on trees to some extent, and has certain reference value for the current medical quality control and standardized planting of *Dendrobium officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; polysaccharide; secondary metabolite; UPLC-Q-TOF-MS

石斛是兰科三大属之一，常以其新鲜或干燥茎入药。其入药始载于《神农本草经》，被列为上品，因其生长在特殊的环境和具有强大的滋补功效而享有“救命仙草，植物黄金”的美誉[1]。其作为功能性食品和重要药物在中国已有一千多年的历史，秦汉时期的《神农本草经》记载铁皮石斛“主伤中、除痹、下气、补五脏虚劳羸瘦、强阴、久服厚肠胃”[2-4]，2020 年中华人民共和国国家卫生委员会将其列为药食两用植物[5]，具有抗癌、保肝、降血脂、抗疲劳、抗氧化、降血糖、抗胃溃疡、免疫增强、抗高血压等作用[6-10]。

铁皮石斛喜温暖、湿润、阴凉的环境[11-13]。《本草纲目》记载生于树上者名“木斛”，不入丸散，生于石上者名“石斛”，两者疗效有差异，以石生者为正品[14]。《中国药学大辞典》记载的“生于高山湿润之岩石或古木上新采于山崖者”，第一次将古木（即树木）作为石斛的着生物，与古代本草著作的记载有着较大的出入，对比《中国植物志》可知确实存在既附生在石头上，又附生在树木上的石斛属植物[15]。可见，不同生长方式的铁皮石斛入药现象历来有之，并且古人对不同来源的铁皮石斛药效已有说明，但石斛“以石生者为正品”的论述尚未见有科学依据。

多糖含量是目前评判铁皮石斛品质的主要依据，2020 年版《中国药典》也以多糖含量作为铁皮石斛质量评价指标。本研究于贵州省兴义市采集附生在石上及树上的铁皮石斛，除测定其多糖含量外，进一步采用 UPLC-Q-TOF-MS 系统分析其次生代谢产物，挖掘其差异化学成分，以综合分析探究《本草纲目》中所记载的“木斛”和“石斛”是否存在化学成分的差异，进而为目前铁皮石斛药用质量控制及其规范化种植提供参考。

1　材料

1290 Infinity Ⅱ 超高效液相（UPLC）色谱仪和 654 质谱仪（美国安捷伦科技有限公司），MULTISKANGO 全波长酶标仪（美国 Thermo 公司），KQ-300DB 数控超声仪（昆山市超声仪器有限公司），CORTECS C18 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）[沃特世科技（上海）有限公司]，3K15 离心机、葡萄糖对照品（上海西格玛奥德里奇公司），水为屈臣氏蒸馏水，乙腈、甲酸为质谱纯，其他试剂均为分析纯。铁皮石斛样本采集于贵州省兴义市，经遵义医科大学杨建文教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo，样本详细信息见表 1。

表 1　铁皮石斛样本信息表

Tab 1　Information of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

附生方式	海拔 /m	附生物种	样本数量
石生	1179	石灰石	16
石生	1190	石灰石	18
树生	1122	合欢树	18
树生	1122	青冈树	18

2　方法

2.1　多糖含量测定

精密称取葡萄糖对照品，配制成 180 μg • mL^{-1} 的对照品备液。取对照品储备液稀释成 30、60、90、120、150 和 180 μg • mL^{-1}，精密量取系列对照品溶液各 1 mL，参照《中国药典》2020 年版一部[16] 中铁皮石斛质量标准中的方法绘制标准曲线。

参照《中国药典》2020 年版一部中铁皮石斛质量标准中的多糖提取及含量测定方法，精密称取铁皮石斛样本 60 mg，加 40 mL 水加热回流 2 h，离心，取上清液，精密取 2 mL 上清液加 10 mL 无水乙醇在 4 ℃放置 1 h，离心，弃去上清液，加 80% 乙醇 8 mL 洗涤沉淀，离心，弃去上清液，重复 1 次。将沉淀用热水溶解，放冷定容至 10 mL，即为待测样本。取待测样本加 5% 苯酚和浓硫酸进行苯酚硫酸显色反应，测定各样品吸光度值，并以标准曲线回归方程及样品配制浓度计算出铁皮石斛样品中的多糖含量。

2.2　基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术检测铁皮石斛次生代谢产物

2.2.1 样本制备 精密称定铁皮石斛样本 75 mg，加入 70% 甲醇 1 mL，超声仪超声提取 30 min，放冷，12 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液装入进样小瓶中，用于 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.2.2 色谱与质谱条件 色谱条件：使用 Agilent 1290 Infinity Ⅱ UPLC 仪器，色谱柱为 Waters CORTECS UPLC C18（100 mm×2.1 mm，1.6 μm），以 0.1% 甲酸水为流动相 A，0.1% 甲酸乙腈为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 4 min，5% → 40%B；4 ～ 5 min，40% → 75%B；5 ～ 5.1 min，75% → 95%B；5.1 ～ 6.6 min，95% → 5%B；6.6 ～ 10 min，5%B），进样量为 1 μL，柱温为 40 ℃，流速为 0.4 mL·min^{-1}，紫外检测波长为 280、254、210 nm。

质谱条件：使用 Agilent 6545Q-TOF 高分辨质谱，在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。毛细管电压（CV）为 4000 V，锥孔电压（NV）为 1000 V，雾气压力为 45 psi，干燥气流量为 10 L·min^{-1}，鞘气温度为 350 ℃，鞘气流量为 11 L·min^{-1}；离子源温度为 350 ℃，碰撞能量（CE）为 10 V，质量扫描范围为 *m/z* 50 ～ 1200。采集二级质谱信息采用 Auto MS/MS 模式，碰撞能量分别为 20、30、40 V。

2.3 数据处理

将 UPLC-Q-TOF/MS 得到的样品数据导入 Agilent MassHunter Profinder10.0 软件中，进行峰识别、峰对齐、离子融合和归解卷积等预处理，输出三维数据矩阵（由保留时间、精确分子量和峰面积组成），采用 Qualitative Analysis B.07.00 软件拟合计算得到相应的分子式，并与本地数据库进行匹配，初步推测结构。依据二级质谱数据，与参考文献、Scifinder 数据库等提供的信息进行对比，进一步鉴定化学成分。

3 结果

3.1 石生和树生铁皮石斛的多糖含量

结果葡萄糖标准曲线的线性回归方程为 $y = 215.19x - 1.0056$，$R^2 = 0.9996$。结果表明葡萄糖质量浓度在 30.47 ～ 182.80 μg·mL^{-1} 内与吸光度呈良好的线性关系。对石生和树生两种不同附生方式下的铁皮石斛多糖含量进行独立样本 *t* 检验分析，结果如图 1 所示，虚线为 2020 年版《中国药典》一部药材与饮片规定的铁皮石斛中多糖含量的标准限 25.00%，高于此线代表铁皮石斛样本合格，可见石生铁皮石斛多糖含量合格率为 61.76%，树生铁皮石斛多糖含量合格率为 11.11%，石生铁皮石斛多糖含量明显高于树生铁皮石斛（$P < 0.05$），差异具有统计学意义。

3.2 基于 UPLC-Q-TOF-MS 对铁皮石斛次生代谢产物的全成分分析

3.2.1 海拔及附生树种对铁皮石斛次生代谢产物积累的影响 如图 2A 所示，海拔为 1179 m、1190 m 的铁皮石斛次生代谢产物轮廓明显交叉，说明两个海拔下的铁皮石斛的次生代谢产物无明显影响（$R^2X = 0.614$，$Q^2 = 0.304$），可视为一个整体，即石生附生方式的铁皮石斛；如图 2B 所示，附生在两个树种的铁皮石斛次生代谢产物轮廓几乎是重合的，说明两个树种对铁皮石斛的次生代谢产物无明显影响 [R^2X（cum）= 0.565，Q^2（cum）= 0.278]，可视为一个整体，即树生附生方式的铁皮石斛。

3.2.2 石生和树生两种附生方式的铁皮石斛代谢产物的差异 由图 3 可知不同附生方式下的铁皮石斛样品的色谱图有明显差异，进一步利用 SIMCA-P 软件对各组次级代谢物进行 PCA 分析，可以看到两者分布有所离散，说明所含化学成分存在一定差异。此外当模型概括 *X* 矩阵解释率（R^2X）> 0.4 时说明该模型可靠，本实验中生成的 PCA 模型的质量参数 $R^2X = 0.646$，因此所建立的模型可以很好地解释各组间差异，即本实验样品的聚类分离效果可信度高。

应用 OPLS-DA 模型来评估石生和树生两种附生方式的铁皮石斛样本之间代谢物含量的差异 [17-19]，如图 4A 所示，在 95% 置信区间内，OPLS-DA 模型显示的可接受值为 R^2X（0.454）、R^2Y（0.955）和 Q^2（0.851），可见石生和树生两种附生方式的铁皮石斛代谢产物存在差异。

OPLS-DA 模型具有良好的预测能力，因此我们建立 OPLS-DA 模型进行筛选石生和树生的铁皮石斛的差异化学成分，结果见图 4A，结果显示石生和树生的铁皮石斛样品之间实现了明显的区分，表明两组之间的次生代谢产物存在差异 [R^2X（cum）= 0.454，R^2Y（cum）= 0.955，Q^2（cum）= 0.851]。每个次生代谢产物对 OPLS-DA 模型的贡献都按可变的重要性（VIP）进行排序 [20]，以 VIP > 4 为阈值进行筛选 [21-22]，共得到 40 个差异变量，如图 4B 所示，黑色虚线代表 VIP = 4。

3.2.3 差异化合物鉴定及相对含量分析 对筛选得到的 40 个差异变量进行鉴定，共有 23 个差异变量被鉴定出，其余差异变量有待进一步鉴定，鉴定结果见表 2。

对差异成分进行相对含量比较，结果如图 5

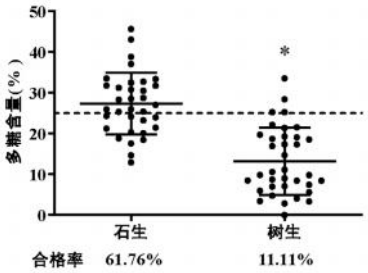

图 1　石生和树生铁皮石斛的多糖含量

Fig 1　Polysaccharide content of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees

注：与石生铁皮石斛比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with *Dendrobium officinale* growing on rocks, $^{*}P < 0.05$.

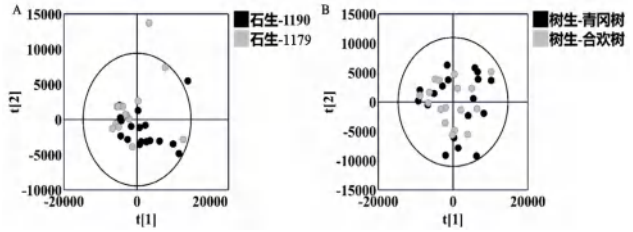

图 2　石生附生方式下不同海拔铁皮石斛（A）和不同附生树种铁皮石斛（B）的 PCA 得分图

Fig 2　PCA score chart of *Dendrobium officinale* at different altitudes growing on rocks（A）and different epiphytic tree species（B）

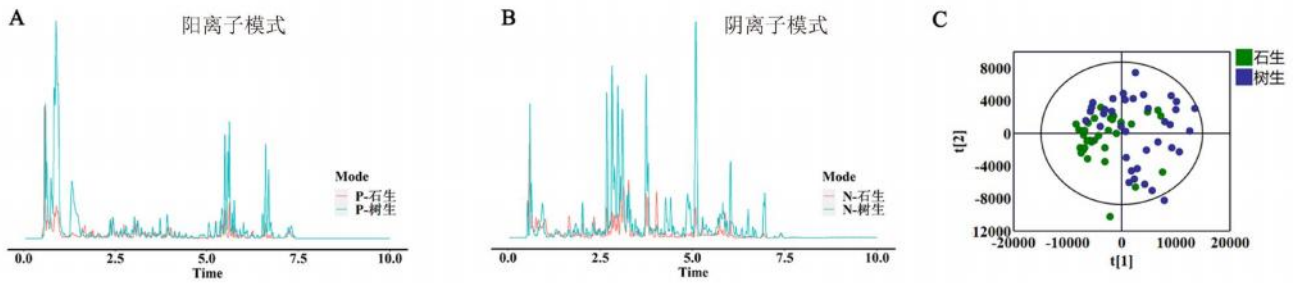

图 3　石生和树生铁皮石斛的典型代表 BPC 图（A、B）和 PCA 得分图（C）

Fig 3　Typical representative BPC images（A、B）and PCA score map（C）of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees

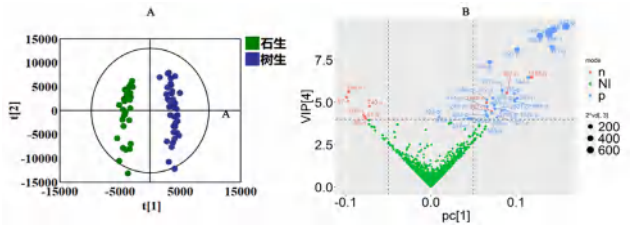

图 4　石生和树生铁皮石斛的 OPLS-DA 得分图（A）和差异代谢成分 VIP 评分图（B）

Fig 4　OPLS-DA score（A）and VIP score map（B）of the differential metabolic components of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees

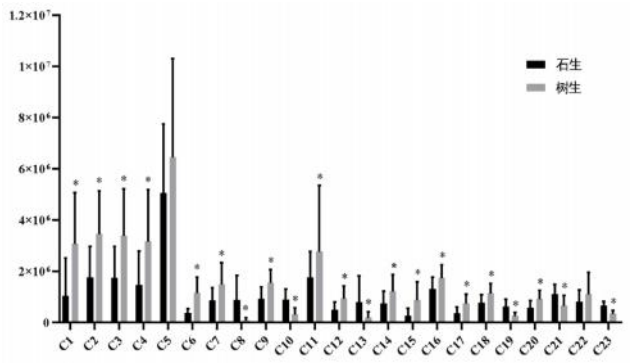

图 5　石生和树生铁皮石斛差异化学成分含量比较

Fig 5　Contents of the different chemical constituents in *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees

注：与石生铁皮石斛比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with *Dendrobium officinale* growing on rocks, $^{*}P < 0.05$.

在石生铁皮石斛中含量较高，而 pinellic acid、*α*-羟基亚麻酸、*L*-亮氨酸或其同分异构体以及 *L*-苯丙氨酸或其同分异构体等化合物的含量在树生铁皮石斛中显著高于石生的铁皮石斛。

4　讨论

传统的标准认为石斛“质重，嚼之黏牙，味甘，无渣者为优”，研究发现石斛中化学成分多种多样，其主要有效成分为石斛多糖，它们是由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、鼠李糖等单糖合成的[39]。研究发现石生铁皮石斛的多糖含量显著高于树生铁皮石斛。进一步通过植物代谢组学研究揭示了不同附生方式铁皮石斛化学谱的差异性，挖掘出了区分石生和树生铁皮石斛的所示，可以看到棉子糖、蔗糖、葡萄糖、维采宁 -1 和 1-acetate-*α*-*D*-mannopyranose 或其同分异构体差异化合物，对其进行含量比较分析，发现棉子糖、蔗糖和葡萄糖在石生铁皮石斛中含量较高。蔗糖在植物生长发育中起着核心作用，许多单糖由蔗糖的水解或水解衍生物产生[40]；棉子糖植物遭受非生物胁迫（盐碱、干旱和极端温度等）时，可以通过诱导渗透调节物质合成酶基因的表达来合成一些小分子物质，增加植物细胞的渗透压，提高植物组织抵抗胁迫的能力，从而维持植物自身的代谢和生长发育[41]。此外，可溶性糖，如葡

表 2 石生与树生铁皮石斛差异化学成分鉴定信息

Tab 2 Identification of the differential chemical composition of *Dendrobium officinale* growing on rocks and trees

No.	VIP	t_R/min	加合离子	测量值	理论值	δ/（$\times10^{-6}$）	分子式	名称	碎片离子（*m/z*）
C1	9.38	1.42	$[M+H]^+$	310.1289	310.1285	− 1.29	$C_{15}H_{19}NO_6$	2-methyl-1H-indol-7-yl-*β*-*D*-mannopyranoside 或其同分异构体 [23]	292.1182；264.1237；244.0977；166.0847；132.0812；120.0810；91.0530
C2	9.18	1.42	$[M+H]^+$	310.1289	310.1285	− 1.29	$C_{15}H_{19}NO_6$	2-methyl-1H-indol-7-yl-*β*-*D*-mannopyranoside 或其同分异构体 [23]	292.1182；264.1237；244.0977；166.0847；132.0812；120.0810；91.0530
C3	9.10	1.42	$[M+H]^+$	310.1289	310.1285	− 1.29	$C_{15}H_{19}NO_6$	2-methyl-1H-indol-7-yl-*β*-*D*-mannopyranoside 或其同分异构体 [23]	292.1182；264.1237；244.0977；166.0847；132.0812；120.0810；91.0530
C4	8.91	2.42	$[M+H]^+$	310.1289	310.1285	− 1.29	$C_{15}H_{19}NO_6$	2-methyl-1H-indol-7-yl-*β*-*D*-mannopyranoside 或其同分异构体 [23]	292.1182；264.1237；244.0977；166.0847；132.0812；120.0810；91.0530
C5	7.30	0.89	$[M+H]^+$	276.1453	276.1442	− 3.99	$C_{12}H_{21}NO_6$	1-{[（1，1-dimethylethoxy）carbonyl] amino}-*α*-hydroxy-3-methoxycyclobutaneacetic acid 或其同分异构体 [24]	276.1331；258.1251；230.1301；86.0901；69.0273
C6	6.42	5.05	$[M-H]^-$	329.2329	329.2334	1.52	$C_{18}H_{34}O_5$	pinellic acid[25]	290.9839；211.1327；171.1009；139.1127；99.0815
C7	5.61	6.61	$[M+H]^+$	609.2699	609.2694	− 0.82	$C_{34}H_{40}O_{10}$	neogenkwanine G[26]	609.2697；591.2588
C8	5.57	3.13	$[M-H]^-$	563.1399	563.1406	1.24	$C_{26}H_{28}O_{14}$	维采宁 -1/ 异夏佛塔苷 / 夏佛塔苷 [27-28]	473.1080；443.0980；383.0758；353.0666
C9	5.47	0.89	$[M+H]^+$	132.1012	132.1019	5.30	$C_6H_{13}NO_2$	*L*- 亮氨酸或同分异构体 [29]	
C10	5.26	0.59	$[M-H]^-$	503.1612	503.1618	1.19	$C_{18}H_{32}O_{16}$	棉子糖 [30]	NA
C11	5.20	0.83	$[M+H]^+$	276.1394	276.1415	7.61	$C_8H_{17}N_7O_4$	*L*-2-amino-*N*-（carbamoylmethyl）-5-（3-nitroguanidino）-valeramide 或其同分异构体 [31]	258.1340；230.1389；212.1281；144.1024；121.0649；86.0966；
C12	4.78	1.42	$[M+H]^+$	292.1182	292.1180	− 0.68	$C_{15}H_{17}NO_5$	buxifoxime B/C[32]	264.1237；246.1121；244.0955；178.0858；166.0850；143.0580；132.0808；120.0803；97.0279
C13	4.72	3.13	$[M+COOH]^-$	609.1453	609.1461	1.31	$C_{26}H_{28}O_{14}$	维采宁 -1/ 异夏佛塔苷 / 夏佛塔苷 [27-28]	NA
C14	4.69	0.94	$[M+H]^+$	456.2074	456.2076	0.44	$C_{18}H_{33}NO_{12}$	6-*O*-*L*- 异亮氨酸蔗糖 [33]	438.1964；392.1900；276.1445
C15	4.51	5.70	$[M+H]^+$	295.2272	295.2268	− 1.36	$C_{18}H_{30}O_3$	*α*- 羟基亚麻酸 [34]	151.1101；95.0850；71.0848
C16	4.46	0.63	$[M+H]^+$	262.1285	262.1300	5.73	$C_{11}H_{19}NO_6$	mycosporine 或其同分异构体 [35]	244.1167；216.1221；198.1110；84.0804；72.0804
C17	4.41	1.29	$[M-H]^-$	164.0714	164.0717	1.83	$C_9H_{11}NO_2$	*L*- 苯丙氨酸或其同分异构体 [36]	162.8377；147.0434；103.0551
C18	4.24	0.76	$[M+H]^+$	262.1291	262.1285	− 2.29	$C_{11}H_{19}NO_6$	mycosporine[35]	244.1170；216.1230；198.1126；130.0587；97.0275；84.0814；72.0798
C19	4.23	0.59	$[M-H]^-$	221.0662	221.0667	2.26	$C_8H_{14}O_7$	1-acetate-*α*-*D*-mannopyranose or isomer[33]	NA
C20	4.13	0.89	$[M+H]^+$	276.1453	276.1442	− 3.99	$C_{12}H_{21}NO_6$	1-{[（1，1-dimethylethoxy）carbonyl] amino}-*α*-hydroxy-3-methoxycyclobutaneacetic acid 或其同分异构体 [24]	276.1331；258.1251；230.1301；86.0901；69.0273
C21	4.11	0.59	$[M-H]^-$	341.1094	341.1089	− 0.15	$C_{12}H_{22}O_{11}$	蔗糖 [37]	341.0991；119.0318；101.0219；89.0224；71.0115；59.0124
C22	4.02	5.49	$[M+H]^+$	304.2843	304.2846	0.99	$C_{17}H_{37}NO_3$	4-hydroxyheptadeca sphinganine 或其同分异构体 [34]	286.2652；268.2542；250.2421；60.0371
C23	4.00	0.59	$[M-H]^-$	179.0558	179.0561	1.68	$C_6H_{12}O_6$	葡萄糖 [38]	NA

注：NA 表示未检测到此离子碎片。

Note：NA means no ion fragments are detected.

葡糖和蔗糖，可以在渗透胁迫下作为渗透液[42]，这些代谢物的积累在对环境胁迫的响应下得到增强，并已被证明有助于干旱和耐冻性[43]。

由此我们分析石生铁皮石斛的多糖以及棉子糖、蔗糖、葡萄糖、维采宁-1和1-acetate-α-D-mannopyranose或其同分异构体的含量在一定程度上高于树生铁皮石斛的原因，可总结为以下两个方面：一方面，与树干相比，岩石表面土壤层有机质极度匮乏，温差变化大，铁皮石斛产生抵抗逆境的生理响应，进而调控次生代谢产物合成的关键基因和酶的表达，从而影响其次生代谢产物的累积；另一方面，植物所需的化学元素可以分为三类：有机结合元素、离子元素以及微量元素[44]，这些元素保持植物执行特定功能的能力，对生长至关重要，而铁皮石斛常以较发达的气生根着生于满布苔藓的有腐殖质聚集的岩石，藓类比附生植物更富含钙，这是由于钙从岩石基质中的溶解和释放。同时藓类还能在岩石表面生长成不同的斑块，在岩石缝隙中生长并分泌一些酸性物质逐步溶解岩面增加成土量，富集营养元素，改善微环境，为铁皮石斛生长提供条件[45]。

因此参考传统观点以及《中国药典》以多糖含量作为质量评价标准，石生铁皮石斛的质量在一定程度上优于树生铁皮石斛，验证了《本草纲目》中“两者疗效有差异，以石生者为正品”的观点。然而铁皮石斛中化学成分复杂，树生铁皮石斛中也存在一些优势化学成分，如pinellic acid、neogenkwanine G以及氨基酸类成分*L*-亮氨酸、*L*-苯丙氨酸等，具有免疫刺激[46]、抗肿瘤[47]、改善记忆损伤[48]、降血压[35]等药理活性。综上，本研究综合分析了石生和树生铁皮石斛的多糖含量和次生代谢产物的差异，可为铁皮石斛药用质量控制及其规范化种植提供参考。

参考文献

[1] 魏丽芳，于桂芬，冯国宝，等 . 铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展 [J]. 安徽农业科学，2013，41（35）：13561-13563.

[2] 马继兴 . 神农本草经辑注 [M]. 北京：人民卫生出版社，1995.

[3] 陈心启，吉占和 . 中国兰花全书 [M]. 北京：中国林业出版社，1998.

[4] 寇宗墉 . 本草衍义 [M]. 北京：人民卫生出版社，1995.

[5] Ng TB，Liu J，Wong JH，et al. Review of research on Dendrobium，a prized folk medicine [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2012，93（5）：1795-1803.

[6] 吕圭源，颜美秋，陈素红 . 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志，2013，38（4）：489-493.

[7] He TB，Huang YP，Liu Y. Structural characterization and immunomodulating activity of polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. Int J Biol Macromol，2016，83：34-41.

[8] Luo QL，Tang ZH，Zhang XF，et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from Dendrobium officinale [J]. Int J Biol Macromol，2016，89：219-227.

[9] Teixeira D，Ng TB. The medicinal and pharmaceutical importance of Dendrobium species [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2017，101（6）：1-13.

[10] Tang HX，Zhao TW，Sheng YJ，et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo：a review on its ethnopharmacology，phytochemistry，pharmacology，and industrialization [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2017，2017：7436259.

[11] 刘高慧，李昆，孙永玉，等 . 齿瓣石斛光合特性研究 [J]. 林业科学研究，2014，27（2）：137-141.

[12] 刘蔚秋，戴小华，王永繁，等 . 影响广东黑石顶树附生苔藓分布的环境因子 [J]. 生态学报，2008，28（3）：1080-1088.

[13] 孙永玉，高成杰，刘方炎 . 近自然栽培模式下不同宿主树种对齿瓣石斛营养成分的影响 [J]. 扬州大学学报（农业与生命科学版），2016，37（3）：37-41.

[14] 李时珍 . 本草纲目 [M]. 王育杰整理 . 北京：人民卫生出版社，2004.

[15] 焦连魁，曾燕，王继永，等 . 石斛药材基原的本草学研究概况 [J]. 中国现代中药，2019，21（4）：542-551.

[16] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：295.

[17] He CX，Liu Y，Liu HL，et al. Compositional identification and authentication of Chinese honeys by 1H NMR combined with multivariate analysis [J]. Food Res Int，2019，130：108936.

[18] Senizza B，Rocchetti G，Ghisoni S，et al. Identification of phenolic markers for saffron authenticity and origin：an untargeted metabolomics approach [J]. Food Res Int，2019，126：108584.

[19] Zhao GH，Zhai XY，Qu M，et al. Sulfated modification of the polysaccharides from Crassostrea gigas and their antioxidant and hepatoprotective activities through metabolomics analysis [J]. Int J Biol Macromol，2019，129：386-395.

[20] Bergdahl M，Bergdahl J. Burning mouth syndrome：prevalence and associated factors [J]. J Oral Pathol，2010，28（8）：350-354.

[21] 白志尧，杨雁芸，周宁，等 . 白术配伍桑白皮对肾病综合征大鼠尿液代谢组学的影响 [J]. 中药材，2018，41（7）：1707-1712.

[22] 张娜，赵良友，刘永武，等 . 基于“异类相制”的马钱子复方配伍减毒的代谢组学研究 [J]. 中医药学报，2020，48（7）：8-16.

[23] Hu J，Shi XD，Mao X，et al. Cytotoxic mannopyrano-

sides of indole alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* [J]. Chem Biodivers，2014，11（6）：970-974.
[24] 陆安静 . 仿野生金钗石斛物质基础积累与环境因素相关性研究 [D]. 遵义：遵义医科大学，2020.
[25] Bin Q，Peterson DG. Identification of bitter compounds in whole wheat bread crumb [J]. Food Chem，2016，203：8-15.
[26] Li LZ，Song SJ，Gao PY，et al. Neogenkwanines A–H：daphnane-type diterpenes containing 4，7 or 4，6-ether groups from the flower bud of Daphne genkwa [J]. RSC Adv，2015，5（6）：4143-4152.
[27] Mareya CR，Tugizimana F，Piater LA，et al. Untargeted metabolomics reveal defensome-related metabolic reprogramming in sorghum bicolor against infection by burkholderia andropogonis [J]. Metabolites，2019，9（1）：8.
[28] 肖观林，江洁怡，胥爱丽，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合多元统计分析不同产地布渣叶化学成分的差异 [J]. 湖南中医杂志，2021，37（12）：171-177.
[29] Wei YM，Li TH，Xv SS，et al. The profile of dynamic changes in yellow tea quality and chemical composition during yellowing process [J]. LWT-Food Sci Technol，2021，139：110792.
[30] 陈鑫凤，张学兰，张艳雪，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析黄精炆制前后化学成分差异 [J]. 中药材，2022，45（7）：1605-1610.
[31] Huang H，Martasek P，Roman LJ，et al. N*ω*-nitroarginine-containing dipeptide amides. potent and highly selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase [J]. J Med Chem，1999，42（16）：3147-3153.
[32] Chang FR，Li PS，LIU RH，et al. Bioactive phenolic components from the twigs of *Atalantia buxifolia* [J]. J Nat Prod，2018，81（7）：1534-1539.
[33] 曾瑶 . 不同环境仿野生铁皮石斛差异化学成分挖掘研究 [D]. 遵义：遵义医科大学，2020.
[34] Smith CR，Wolff IA. Characterization of naturally occurring *α*-hydroxylinolenic acid [J]. Lipids，1969，4（1）：9-14.
[35] Wang ZJ，Cheng C，Yang XY，et al. *L*-phenylalanine attenuates high salt-induced hypertension in Dahl SS rats through activation of GCH1-BH4 [J]. PLoS One，2021，16（4）：e0250126.
[36] 熊之琦，李莹，徐媛，等 . 基于 UPLC-Q/TOF-MS 研究蚕砂不同炮制品主成分差异 [J]. 江西中医学院学报，2021，33（3）：89-94.
[37] 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.
[38] 梁泽华，潘颖洁，邱丽媛，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析黄精九蒸九晒炮制过程中化学成分的变化 [J]. 中草药，2022，53（16）：4948-4957.
[39] Zha XQ，Luo JP，Luo SZ，et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of Dendrobium huoshanense [J]. Carbohydr Polym，2007，69（1）：86-93.
[40] Jang JC，Sheen J. Sugar sensing in higher plants [J]. Plant Cell，1994，6（11）：1665-1679.
[41] 李芳，汪晓峰 . 植物中棉子糖系列寡糖代谢及其调控关键酶研究进展 [J]. 西北植物学报，2008，28（4）：4852-4859.
[42] Fan HH，Li TC，Guan L，et al. Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress [J]. Plant Cell Tiss Org，2012，109（2）：307-314.
[43] Rosa M，Prado C，Podazza G，et al. Soluble sugars--metabolism，sensing and abiotic stress：a complex network in the life of plants [J]. Plant Signal Behav，2009，4（5）：388-393.
[44] Tian D，Reich PB，Chen HYH，et al. Global changes alter plant multi-element stoichiometric coupling [J]. New Phytologist，2018，221（2）：807-817.
[45] 籍烨，张朝晖 . 喀斯特石漠生态系统不同自然演替阶段中苔藓植物多样性特征分析 [J]. 植物科学学报，2014，32（6）：577-585.
[46] Nagai T，Kiyohara H，Munakata K，et al. Pinellic acid from the tuber of Pinellia ternata Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine [J]. Plant Signal Behav，2009，4（5）：388-393.
[47] Hou ZL，Yao GD，Song SJ. Daphnane-type diterpenes from genus Daphne and their anti-tumor activity [J]. Chinese Herbal Medicines，2021，13（2）：145-156.
[48] 周保柱，栾飞，李茂星，等 . *L*- 亮氨酸改善高原记忆损伤作用 [J]. 医药导报，2016，35（3）：237-241.

（收稿日期：2022-11-02；修回日期：2022-12-20）

双黄连 pH 依赖型梯度释药微丸的研究

黄权华[1]，田辰彬[2]，徐乐乐[2]，宁婧岐[2]，杨星钢[2*]（1. 深圳华润九新药业有限公司，广东　深圳　518000；2. 沈阳药科大学，沈阳　110016）

摘要：目的　制备 pH 依赖型梯度释药的双黄连微丸，以实现药物在体内的梯度脉冲释放。**方法**　将酸中溶解度低的指标性成分黄芩苷制备成固体分散体，采用挤出滚圆法分别制备双黄连素丸和双黄连固体分散体微丸，选择 Eudragit L30D-55 和 Eudragit L100/S100 为包衣材料，采用流化床进行包衣。将固体分散体微丸、Eudragit L30D-55 包衣微丸和 Eudragit L100/S100 包衣微丸按照比例混合即得。**结果**　双黄连固体分散体微丸在 pH ＞ 1.2 的介质中释药，Eudragit L30D-55 包衣微丸在 pH ＞ 5.5 的介质中开始释药，Eudragit L100/S100 包衣微丸在 pH ＞ 6.8 的介质中开始释药。三种微丸按照比例混合之后在模拟人体胃肠道 pH 环境变化的体外释放介质中呈现良好的 pH 依赖型释药特性，且指标性成分黄芩苷和绿原酸的体外释放行为相似。**结论**　利用人体胃肠道 pH 变化，采用多元定位释药技术制备的双黄连 pH 依赖性梯度释药微丸可以在长效释放的同时达到同步释放，满足中医药理论下的用药思想和整体观念。

关键词：双黄连 pH 依赖型梯度释药微丸；固体分散体；多元定位释药技术；同步释放
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2029-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.009

Preparation of Shuanghuanglian pH-dependent gradient-release pellets

HUANG Quan-hua[1], TIAN Chen-bin[2], XU Le-le[2], NING Jing-qi[2], YANG Xing-gang[2*] (1. *Shenzhen CR Gosun Pharmaceutical Co*, *Ltd.*, *Shenzhen*　*Guangdong*　518000; 2. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang*　110016)

Abstract: Objective　To prepare Shuanghuanglian pH-dependent gradient-release pellets to achieve gradient pulse release in the body. **Methods**　To prepare baicalins with low solubility in acid into solid dispersion. Shuanghuanglian and Shuanghuanglian solid dispersion pellets were prepared with extrusion roller. Eudragit L30D-55 and Eudragit L100/S100 were used as coating in fluidized beds. Solid dispersion pellets, Eudragit L30D-55 coated pellets and Eudragit L100/S100 coated pellets were mixed in proportion. **Results**　Shuanghuanglian solid dispersion pellets were released medium with in pH ＞ 1.2, and Eudragit L30D-55 coated pellets started to release in the medium with pH ＞ 5.5, and Eudragit L100/S100 coated pellets in the medium with pH ＞ 6.8. After mixing the three pellets, a good pH-dependent release property was present in an in vitro release medium that simulated the changes of human gastrointestinal pH. The in vitro release behavior of the chlorogenic acid and baicalin of the indicator component was similar. **Conclusion** Shuanghuanglian pH-dependent gradient-release pellets prepared with human gastrointestinal pH, and multiparticulate site-controlled release technology improve the modification of index components, can synchronously release with gradient at long term. That complies with the organic whole conception of compatibility of traditional Chinese medicinal compound recipe.

Key words: Shuanghuanglian pH-dependent gradient-release pellet; solid dispersion; multi-particulate site-controlled release technology; synchronous release

作者简介：黄权华，男，硕士，主要从事药品工艺研发与质量控制，email：huangquanhua@999.com.cn　*通信作者：杨星钢，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药新剂型和中药新技术研究，email：yangxg123@163.com

中药复方是传统中医药理论整体观念和辨证施治的集中体现，也是中医用药的基础和灵魂。目前，针对现代中药复方缓控释制剂的研发，主要是根据方剂用药的特点，将中药组分相互配伍以适应不同证候的用量需求，不同的配伍不仅能够发挥不同的药物疗效，而且对药效成分及其代谢产物的药动学过程也会产生显著影响[1]。但是中药复方的有效成分众多，药效物质基础复杂，各种成分之间的理化性质差异巨大[2]。因此，采用传统的制备缓控释制剂的手段很难达到一个理想的效果。

双黄连复方由金银花、黄芩、连翘三味药材组成，具有清热解毒、疏风解表之功效，临床上已经证明其具有广谱抗菌、抗病毒能力，在治疗肺炎、支气管炎、扁桃体炎等病症上具有良好的疗效[3]。但患者对普通双黄连制剂的顺应性差，易漏服，严重制约了药效的发挥。复方中药物质基础复杂，药效物质基础暂不明确，无法获得像化学药物制备缓释制剂相关的药动学参数（如吸收速度常数、表观分布容积、消除速度常数、绝对生物利用度等），因此难以采用传统的方法制备缓释制剂[4]；传统复方中药多是从汤剂发展而来，普通制剂的服用一般为每日 3 次，因此本研究模拟传统给药方式设计了日释放 3 次的 pH 梯度缓释微丸，其中的药物随着胃肠道 pH 值的变化可以实现同步释放，与普通制剂（汤剂）的释放时间、释放次数、药物释放度一致，既能改善中药制剂服用顺应性，同时也满足中医药理论下的用药思想和整体观念[5-6]。因此，本实验以双黄连为模型处方，处方药材精制之后将难溶性成分黄芩苷制成固体分散体，随后分别制备双黄连素丸和固体分散体微丸，根据人体胃肠道的 pH 变化，利用 Eudragit L30D-55 和 Eudragit L100/S100 等包衣材料进行包衣[7]，以期达到长效并同步释放的目的。

1 仪器与试药

LC-10ATVP 高效液相色谱仪、SPD-10AVP 高效液相检测器（日本岛津株式会社），ZRS-6G 型药物溶出度仪（天津天大天发科技有限公司），RE-2000B 旋转蒸发器（上海凌科实业发展有限公司），E-50 轴向单螺杆挤出机 -S-50 滚圆机（重庆英格造粒包衣技术有限公司），Mini-XYT 流化制粒包衣机（深圳信宜特科技有限公司）。

双黄连素丸（自制），黄芩提取物（黄芩苷＞ 85%，批号：2020325）、连翘提取物（连翘苷＞ 2%，批号：20200303）、金银花提取物（绿原酸＞ 10%，批号：20200315）（陕西浩洋生物科技有限公司），黄芩苷、连翘苷、绿原酸对照品（成都普菲德生物技术有限公司，批号分别为 21061301、21022602、21032502），聚维酮 K30（PVP K30 美国巴斯夫公司），微晶纤维素（MCC）、羧甲基淀粉钠（CMS-Na）、柠檬酸三乙酯（TEC）、滑石粉（安徽山河药用辅料有限公司），Eudragit L30D-55、Eudragit L100/S100（上海昌为医药辅料技术有限公司）。

2 方法

2.1 HPLC 法测定黄芩苷与绿原酸

2.1.1 黄芩苷的测定 采用 YMC-Pack ODS-A（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相为甲醇 - 水（含 0.2% 的磷酸）（60∶40）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 280 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 20 μL。取一定量的微丸粉末或固体分散体粉末，加 50% 甲醇 100 mL 超声滤过。精密吸取 1 mL 续滤液置 25 mL 量瓶中，加 50% 甲醇至刻度，0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液，进样测定。

2.1.2 绿原酸的测定 采用 YMC-Pack ODS-A（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相为乙腈 - 水（15∶85）；流速为 1 mL·min^{-1}；检测波长为 324 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 20 μL。精密称取一定量微丸粉末或固体分散体粉末，加入 50% 甲醇 50 mL，超声滤过。精密吸取 1 mL 续滤液置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇至刻度，摇匀，0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液，进样测定。

2.1.3 释放度测定 照《中国药典》（2020 年版）四部通则 0931 溶出度与释放度测定法第一法（篮法），取适量微丸于溶出杯中，加入 900 mL 人工胃液孵育 2 h（pH 1.2 的盐酸溶液），水浴温度（37±0.5）℃，转篮转速为 100 r·min^{-1}；2 h 之后升起转篮，更换溶出介质为 900 mL 人工十二指肠液（pH 5.5 的磷酸盐缓冲液），转篮转速为 100 r·min^{-1}，继续溶出；2 h 之后继续更换溶出介质为 900 mL 人工小肠液（pH 6.8 的磷酸盐缓冲液），其余条件不变。在设定的时间点取样 5 mL，同时补加 5 mL 37 ℃介质。取出的样品经 0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液进样测定黄芩苷和绿原酸的峰面积，计算累计释放度（Q，%）。

2.2 黄芩苷固体分散体的制备

采用溶剂挥发法制备固体分散体[8]。将处方量的黄芩提取物和 PVP K30 分别溶于适量甲醇中，待全部溶解之后混合，50 ℃水浴搅拌 60 min。真空旋转蒸发除去甲醇，得到固体粉末，研磨，过 80 目筛，即得到黄芩苷固体分散体。

2.3 双黄连素丸的制备

采用挤出滚圆法制备双黄连素丸，加入 40 g 双黄连提取物（黄芩提取物、连翘提取物、金银花提取

物按照比例混合而成），60 g MCC，40 mL 水制备软材。在挤出速度 40 r•min^{-1}，滚圆速度 1800 r•min^{-1}，滚圆时间 7 min 的工艺条件下制备双黄连素丸。

2.4　双黄连固体分散体微丸的制备

采用挤出滚圆法制备固体分散体微丸。加入 30 g 双黄连提取物（黄芩苷固体分散体、连翘提取物、金银花提取物按照比例混合而成），60 g MCC，10 g CMS-Na，在挤出速度 40 r • min^{-1}，滚圆速度 2100 r•min^{-1}，滚圆时间 5 min 进行制备。

2.5　包衣微丸的制备

采用流化床底喷式包衣法进行微丸包衣。投料量为 50 g，分别以 Eudragit L30D-55 水分散体为包衣材料，进风量为 2300 r • min^{-1}，包衣温度为 28 ～ 32 ℃，雾化压力为 0.12 MPa，喷液速度为 4 r•min^{-1}；Eudragit L100/S100 为有机溶剂包衣材料，进风量为 2000 r • min^{-1}，包衣温度为 20 ～ 25 ℃，雾化压力为 0.15 MPa，喷液速度为 2 r • min^{-1}。

2.5.1　Eudragit L30D-55 包衣液的配制　称取处方量的 TEC、滑石粉加入一定量的水中，用高剪切匀化机匀化 10 min，随后将滑石粉混悬液缓缓倒入 Eudragit L30D-55 水分散体中，同时用普通搅拌机中速搅拌。在包衣前需要将混悬液过 40 目筛，包衣过程中持续搅拌。

2.5.2　Eudragit L30D-55 包衣液处方因素考察　采用单因素考察法对聚合物浓度（PVP K30 5%、10%、15%），包衣增重（5%、10%、15%），TEC 用量（0%、10%、20%），滑石粉用量（0%、10%、20%），固化时间（0、1、3、6、12、18 h）分别进行考察。

2.5.3　Eudragit L100/S100 包衣液的配制　称取处方量的 Eudragit L100 和 S100 缓缓加入一定量的有机溶剂中，加入过程中应避免 Eudragit 材料相互粘连成团块状，搅拌 30 ～ 60 min 得到澄清透明的溶液。称取处方量的 TEC，滑石粉加入一定量的有机溶剂中，高剪切匀化机匀化 10 min，随后缓慢加入到 Eudragit 的有机溶液中，不断搅拌。包衣前需将包衣液过 40 目筛，包衣过程中保持持续搅拌。

2.5.4　Eudragit L100/S100 包衣液处方因素考察　采用单因素考察法对 TEC 用量（20%、25%、30%、35%），包衣增重（20%、25%、30%），Eudragit L100 与 S100 的比例（1∶1、1∶1.5、1∶2、1∶3、1∶4），滑石粉用量（10%、20%、30%）进行考察，并确定最终工艺。

3　结果

3.1　黄芩苷固体分散体的体外溶出度

图 1 表明黄芩苷固体分散体在 pH 1.2 盐酸溶液中 10 min 累计溶出度超过 60%，同等条件下黄芩苷只能释放 10% 左右；而固体分散体和黄芩苷在 pH 5.5 和 pH 6.8 的释放介质中 120 min 的累计溶出度均超过 85%，两者差距不大，证明该固体分散体显著提升了黄芩苷在酸中的溶出度和释放速率，且维持了黄芩苷本身在 pH 5.5 和 pH 6.8 的释放介质中良好的释放行为。

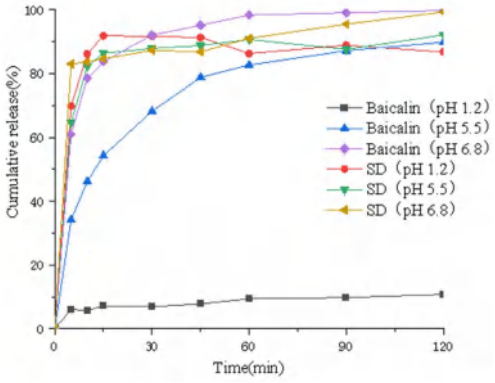

图 1　黄芩苷原料药和固体分散剂在不同介质中的释放行为

Fig 1　Dissolution behavior of baicalin and solid dispersion in different medium

3.2　固体分散体微丸和双黄连素丸的体外溶出结果

由图 2 可知，固体分散体微丸相较于普通的双黄连素丸，其黄芩苷和绿原酸在 pH 1.2 的释放介质中均释放良好，尤其是黄芩苷在 30 min 内累计溶出度超过 60%，120 min 的累计溶出度达到 90%，远高于双黄连素丸，且两者的绿原酸释放行为并无明显差异，达到设计目的。

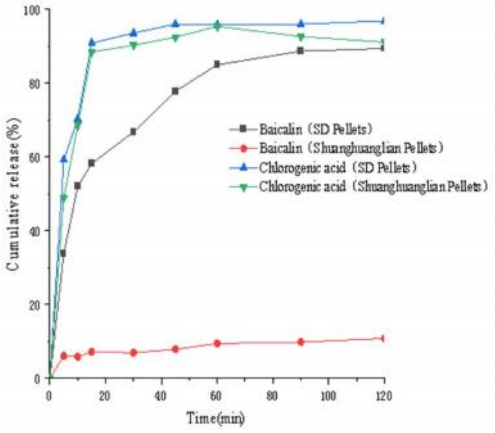

图 2　双黄连素丸和固体分散体微丸在 pH 1.2 的介质中黄芩苷和绿原酸的释放行为

Fig 2　Dissolution behavior of baicalin and chlorogenic acid of Shuanghuanglian pellets and solid dispersion in pH 1.2 medium

3.3　包衣微丸的考察结果

3.3.1　Eudragit L30D-55 包衣液外方单因素的考察结果　由图 3 可知，聚合物浓度为 15% 时包衣微丸的抗酸性较差，采用 5% 和 10% 聚合物浓度制备的包衣微丸释放度相似。由于聚合物浓度越低，包衣液质量越高，包衣时间越长，包衣效率越低。因此，综合考虑，选择 10% 作为聚合物浓度。

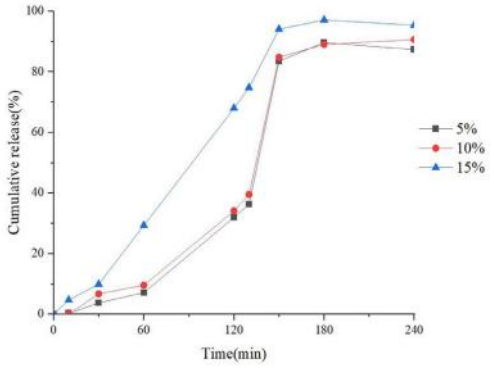

图 3 不同聚合物浓度对药物释放的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of coating on the cumulative drug release

由图 4 可知，包衣增重对包衣微丸的释放有极其显著的影响。随着包衣增重的增加，包衣微丸的抗酸性逐步增强，5% 和 10% 的包衣增重均不能使微丸具有较好的抗酸性，因此，综合考虑选择 15% 作为包衣增重。

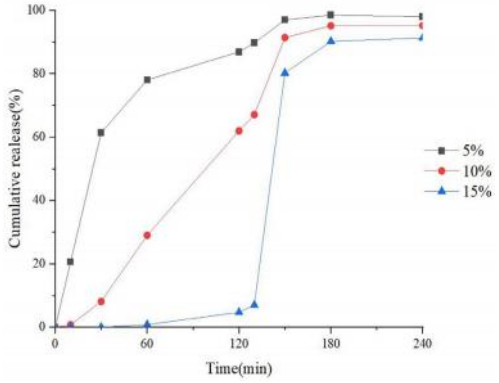

图 4 不同包衣增重对药物释放的影响

Fig 4 Effect of different coating levels on the cumulative drug release

从图 5 中可以看出，TEC 浓度较低时，衣膜的抗酸性较差，随着 TEC 浓度的增加，情况得到改善，当 TEC 浓度为 20% 时，药物的抗酸性良好。此时，如果再增加 TEC 的量，会导致包衣液黏度增大，增加堵枪的风险。因此，最终选择 TEC 浓度为 20%。

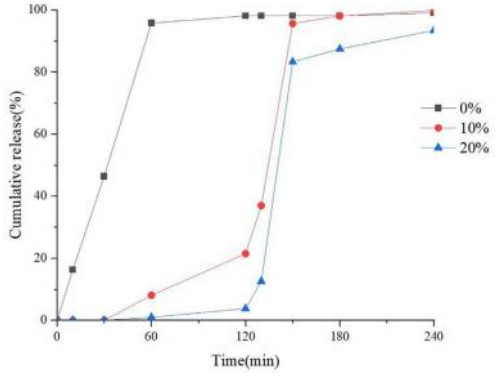

图 5 不同 TEC 用量对药物释放的影响

Fig 5 Effect of different amounts of TEC on the cumulative drug release

从图 6 中可以看出，随着滑石粉用量的增加，微丸的抗酸性有所减弱。而在实际试验过程中发现，当滑石粉用量为 20% 时，管路中沉淀较多的滑石粉，存在堵枪的风险；滑石粉用量为 0% 时，部分微丸出现粘连。综合考虑，将滑石粉用量控制在干聚合物浓度的 10%。

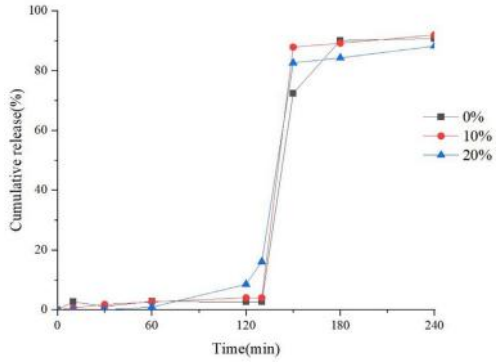

图 6 不同滑石粉用量对药物释放的影响

Fig 6 Effect of different amount of talc on the cumulative release

从图 7 中可以看出，固化时间为 12 h 时，微丸的抗酸性良好，在 pH 5.5 的释放介质中释放迅速，且固化完成后微丸不粘连，固化时间过高或者过低，均会对微丸的抗酸性产生一定的影响。因此，选择固化时间为 12 h。

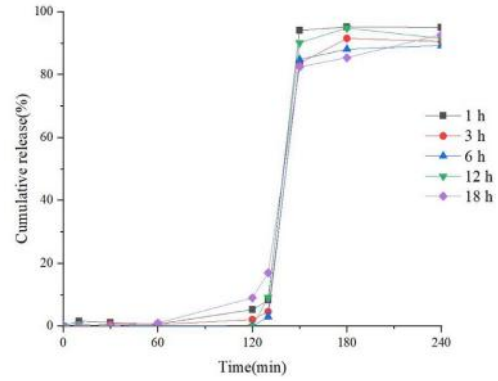

图 7 不同固化时间在 pH 5.5 的介质中对药物释放的影响

Fig 7 Effect of different curing time on the cumulative release in pH 5.5 medium

综上所述，固定 Eudragit L30D-55 水分散体包衣液的聚合物浓度为 10%，包衣增重为 10%，TEC 用量为 20%，滑石粉用量为 10%，固化时间为 12 h。以此为最优处方制备包衣微丸，其与双黄连素丸在 pH 1.2 和 pH 5.5 中的释放行为如图 8 所示。双黄连素丸中两种成分的释放行为不具有同步性；而包衣微丸在保持较好抗酸性的同时，黄芩苷和绿原酸释放曲线的相似因子（f_2）因子为 70.17，大致上体现出同步释放的特点，基本满足设计要求。

3.3.2 Eudragit L100/S100 包衣液外方单因素的考察结果 由图 9 可见，TEC 含量小于 30% 的时候，微

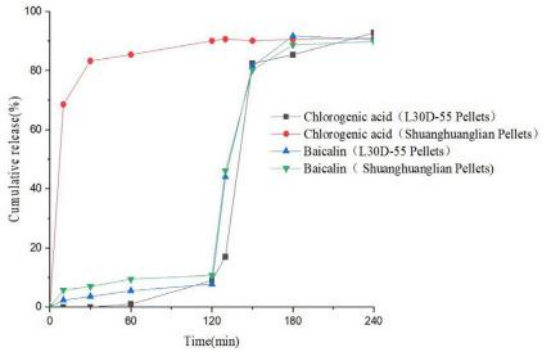

图 8　Eudragit L30D-55 最优处方与双黄连素丸药物的释放行为

Fig 8　Dissolution behavior of Eudragit L30D-55 optimal formulations and Shuanghuanglian pellets

丸在 pH 1.2 和 pH 5.5 的介质中释放量较大。随着增塑剂用量的增加，前 4 h 的释放量逐渐减小。但是增塑剂用量为 35% 的时候，微丸整体的释放行为则会受到抑制，同时，在微丸的储存过程中，出现结块现象。因此，综合考虑选择 TEC 含量为 30%。

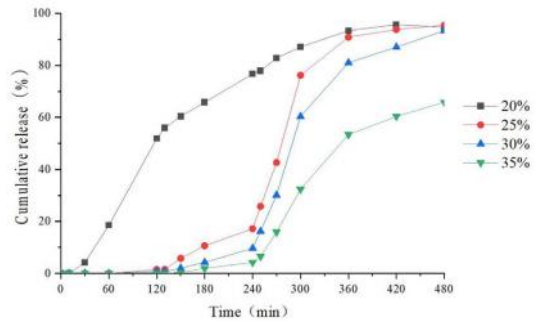

图 9　不同 TEC 用量对微丸释放的影响

Fig 9　Effect of different amount of TEC on the cumulative release

由图 10 可知，随着包衣增重的增加，微丸的释放逐渐缓慢，在不同介质中的释放量也逐步减少。因此，综合考虑，选择包衣增重为 25%，可以得到较好的释放行为。

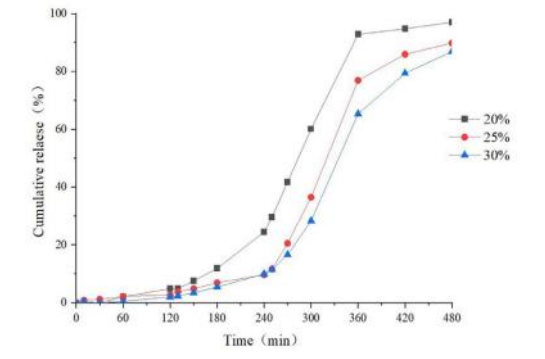

图 10　不同包衣增重对微丸释放的影响

Fig 10　Effect of different coating level on the cumulative release

从图 11 可以看出，不论 L100 与 S100 的比例如何，包衣微丸均具有较好的抗酸性。而 L100 与 S100 比例不同带来的最大影响是微丸在 pH 5.5 的释放介质中的释放行为。随着 S100 比例的增加，微丸在 pH 5.5 的介质中的释放量逐步减少，其整体的释放行为也受到了限制。因此，综合考虑选择 L100∶S100 ＝ 1∶2 作为最优的比例。

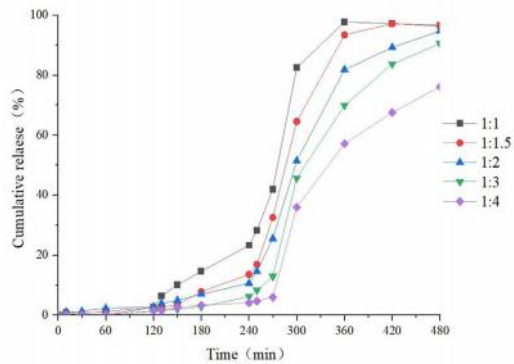

图 11　不同 L100 与 S100 的比例对微丸释放的影响

Fig 11　Effect of different amount of L100 and S100 on the cumulative release

由图 12 可知，当滑石粉用量为 10% 时，微丸在 pH 1.2 和 pH 5.5 介质中均有一定释放，结合实验过程中微丸存在的粘连现象，猜想微丸之间相互的粘连破坏了衣膜的完整性。而滑石粉过多时，则会导致衣膜的渗透性增加，影响衣膜质量。综合考虑，选择滑石粉用量为 20%。

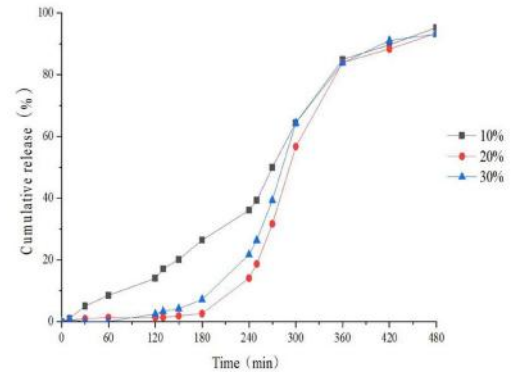

图 12　不同滑石粉用量对微丸释放的影响

Fig 12　Effect of different amount of talc on the cumulative release

综上所述，固定 TEC 用量为 30%，包衣增重 25%，L100∶S100 为 1∶2，滑石粉用量为 10%。以此为最优处方制备包衣微丸，其与双黄连素丸的释放行为如图 13 所示。包衣微丸在 pH 1.2 和 pH 5.5 的介质中累计释放量低于 20%，在 pH 6.8 的介质 2 h 释放量超过 60%，4 h 释放量达到 90%，且黄芩苷和绿原酸释放曲线的 f_2 值为 74.30，基本满足同步释放的要求。而双黄连素丸中两种成分的释放行为明显不具有同步性。

3.4　双黄连 pH 依赖型梯度释药微丸的考察

将固体分散体微丸、Eudragit L30D-55 微丸和 Eudragit L100/S100 微丸按照 1∶1∶1 的比例混合，对比相同剂量的双黄连素丸，进行释放度考察。

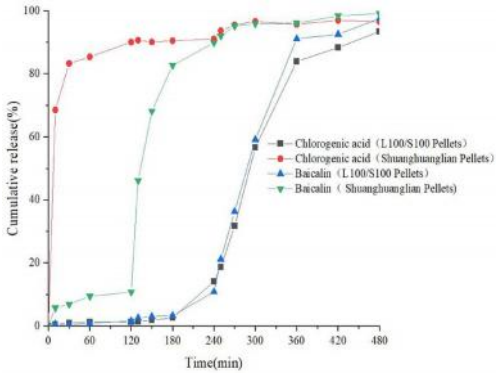

图 13 L100/S100 最优处方与双黄连素丸中药物的释放行为

Fig 13 Dissolution behavior of L100/S100 optimal formulations and Shuanghuanglian pellet

通过图 14 可以发现，双黄连素丸的释放行为不具有长效性和有效成分的同步释放，而梯度释放微丸则可以保证释放的长效性，同时黄芩苷和绿原酸的 f_2 值为 69.49，表明两者在梯度释放介质中具有相似的释放行为。

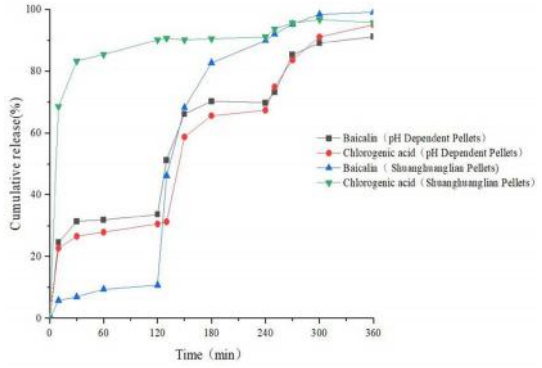

图 14 在模拟人体 pH 环境下的释放介质中两种微丸的释放行为

Fig 14 Dissolution behavior of both pellets in the simulated gastrointestinal pH conditions

4 讨论

文献报道，通过 pH 敏感无线电遥测技术，现在已经基本了解了人体胃肠道内不同生理环境的 pH 变化情况，一般胃内的 pH 在 1.2 ～ 5.0，十二指肠的 pH 在 5 ～ 6，小肠的 pH 则在 6.8 ～ 7.5[9-13]。有研究表明，微丸的平均胃排空时间为 1 ～ 3 h，小肠平均转运时间为 3 ～ 4 h，禁食与否对微丸的小肠转运时间影响不大 [13]。

黄芩苷在胃内的吸收较差，在小肠内的吸收较好，将黄芩苷与 PVP K30 制备形成共沉淀物之后可以显著改善其在酸中的溶解度和生物利用度。因此，采用溶剂挥发法将黄芩苷制备成固体分散体，可提高其酸中溶解度及溶出速率，使其具有与绿原酸相似的释放行为。

固体分散体微丸是在双黄连素丸的基础上对处方进行改良而制备得到的。而包衣时选择双黄连素丸而不是固体分散体微丸作为丸芯，是因为这部分微丸需要在 pH 5.5 和 pH 6.8 的环境下释放，此环境下黄芩苷的溶解度良好，考虑到载药量的影响，所以选择了双黄连素丸作为丸芯。而在考察包衣微丸的处方工艺时，选择的评价指标是绿原酸在梯度释放介质中的释放行为而不是黄芩苷的释放行为，这是因为由于黄芩苷本身在酸中的溶解度低，无法根据包衣微丸在酸中的释放行为评价包衣膜的抗酸性。因此在处方筛选时选择绿原酸作为评价包衣微丸质量的指标性成分。

参考文献

[1] 朱铁梁，张静泽，白淑芳，等 . 中药配伍对有效成分药代动力学的影响 [J]. 解放军药学学报，2014，30（6）：566-569.

[2] 邓建功 . 中药缓控释微丸制剂的研究进展 [J]. 疾病与监测控制杂志，2015，9（7）：483-485.

[3] 孙启慧 . 双黄连制剂抑菌抗病毒药效物质基础和组方结构配伍及作用机理研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2019.

[4] 唐勤，张继芬，侯世祥，等 . 中药口服缓控释制剂的研究进展 [J]. 中国药学杂志，2013，48（12）：953-957.

[5] Chen LB，Wang ZH，Fu DD. Application of chemomic release kinetics to evaluation of the release characteristics of Yin qiaojiedu tablets [J]. Chin J Nat Med，2008，6（6）：450-455.

[6] Zhang JW，Chen LB，Gu JK，et al. Novel method for the evaluation of the synchronicity of the chemomic release/dissolution of multi-component traditional Chinese medicines [J]. Acta Pharm Sin，2008，43（6）：647-651.

[7] 戚秋鹏，王中彦，莫凤奎 . pH 依赖型万氏牛黄清心缓释胶囊的制备与体外释放 [J]. 中国医药工业杂志，2004，35（4）：27-30.

[8] Zhao J，Gao P，Mu CQ，et al. Preparation and evaluation of novel supersaturated solid dispersion of magnolol：theme：advancements in amorphous solid dispersions to improve bioavailability [J]. AAPS PharmSciTech，2022，23（4）：97.

[9] Xia DN，Yu HZ，Tao JS，et al. Supersaturated polymeric micelles for oral cyclosporine A delivery：the role of Soluplus-sodium dodecyl sulfate complex [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2016，141：301-310.

[10] 宋洪涛，郭涛，康鲁平，等 . 多元定位释药技术制备舒胸缓释胶囊的研究 [J]. 中草药，2005，36（7）：93-998.

[11] Evans DF，Pye G，Bramley R，et al. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects [J]. Gut，1988，29（8）：1035-1041.

[12] Watts PJ，Lllum L. Colonic drug delivery [J]. Drug Dev Ind Pharm，1997，23（9）：893-913.

[13] Clarke GM，Newton JM，Short MB. Comparative gastrointestinal transit of pellet systems of varying density [J]. Int J Pharm，1995，114（1）：1-11.

（收稿日期：2022-11-11；修回日期：2023-02-14）

三叶青黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性分析

李兆慧[1]，师砚首[2]，喻晓雁[1]，陈云[1]，王强[2]，阮洪生[1*]（1. 浙江药科职业大学中药学院，浙江 宁波 315500；2. 浙大宁波理工学院生物与化学工程学院，浙江 宁波 315100）

摘要：目的 响应面法优化三叶青块根黄酮的提取工艺，测定 9 种单体物质的含量，评价黄酮的体外抗氧化活性。**方法** 根据中心组合设计，对提取温度、提取时间、甲醇浓度、液料比 4 个因素进行考察，以三叶青黄酮得率为指标优化提取工艺。采用超高效液相色谱分析 9 种黄酮单体的含量。以 DPPH 自由基和羟自由基清除率为指标评价总黄酮的体外抗氧化能力。**结果** 确定的优化工艺条件为提取温度 78 ℃，提取时间 92 min，甲醇浓度 78%，液料比 15∶1，总黄酮得率为 1.725%，通过中试验证，总黄酮得率为 1.709%。异荭草苷、荭草苷、芦丁、异槲皮苷、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、芹菜素和山柰酚含量依次为 119.6、25.3、26.4、28.8、41.6、30.4、150.8、18.1、20.6 μg • g^{-1}。总黄酮对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率高达 92.56% 和 72.96%，IC_{50} 值分别为 0.061 mg • mL^{-1} 与 0.115 mg • mL^{-1}。**结论** 确定的提取工艺稳定、高效、经济，可用于三叶青黄酮的提取，所得提取物具强抗氧化活性。

关键词：三叶青；响应面分析法；黄酮；抗氧化活性
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2035-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.010

Optimization of extraction of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* and its antioxidant activities

LI Zhao-hui[1], SHi Yan-shou[2], YU Xiao-yan[1], CHEN Yun[1], WANG Qiang[2], RUAN Hong-sheng[1*] (1. *College of Traditional Chinese Medicines*, *Zhejiang Pharmaceutical University*, *Ningbo Zhejiang* 315500; 2. *School of Biological and Chemical Engineering, NingboTech University*, *Ningbo Zhejiang* 315100)

Abstract: Objective To optimize the extraction of total flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* roots by response surface methodology, determine the contents of 9 flavonoids. To evaluate the antioxidant activities of total flavonoids. **Methods** With central composite design (CCD), four factors (extraction temperature, extraction time, methanol concentration and liquid-solid ratio) were measured. The extraction process was optimized with total flavonoids yield as the index. Ultra performance liquid chromatography was used to analyze the content of 9 flavonoid monomers. The antioxidant activities in vitro were evaluated by the scavenging ability of total flavonoids on DPPH radical and hydroxyl radical. **Results** Under optimal conditions of 78 ℃ , 92 min, 78% methanol, and 15∶1 for liquid-solid ratio, the highest yield was 1.725% for total flavonoids. The pilot test showed that the total flavonoids yield reached 1.709%. The content of isoorientin, orientin, rutin, isoquercitin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, astragaline, quercetin, apigenin and kaempferol was 119.6, 25.3, 26.4, 28.8, 41.6, 30.4, 150.8, 18.1 and 20.6 μg • g^{-1}, respectively. The scavenging rate of DPPH radical and hydroxyl radical was 92.56% and 72.96%, and the IC_{50} values were 0.061 mg • mL^{-1} and 0.115 mg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The established extraction process is stable, efficient and economical, which can be used for the extraction of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum*, and the extracts show strong antioxidant activity.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum*; response surface methodology; flavonoid; antioxidant activitiy

---

基金项目：国家自然科学基金委员会面上项目（No. 32071509）；浙江省自然科学基金委青年基金项目（No. LQ19C020003）；浙江省中医药科技计划项目（No. 2019ZB116）。

作者简介：李兆慧，女，副教授，主要从事中药化学与药理学研究，email：maylzh@126.com *通信作者：阮洪生，男，教授，主要从事中药化学与药理学研究，email：360535646@qq.com

三叶崖爬藤（*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg）俗称三叶青，属于葡萄科（Vitaceae）崖爬藤属（*Tetrastigma*），野生资源分布于我国长江以南各省份[1]，种植区主要集中在浙江磐安、遂昌、江西上饶等地[2]。三叶青以块根或全草入药，具有清热解毒[3]、活血止痛[4]、祛风化痰[5]等功效，可用于肺炎、气管炎、肝炎、风湿等症的治疗[6]，也是抗肿瘤常用药物，且长期应用未见毒副作用[7]。三叶青中主要含有黄酮[8]、三萜及甾体[9]、多糖[10]等几大类物质，其中黄酮类成分是重要的药效物质。药理学研究表明，黄酮具有抗肿瘤、抗氧化、清除自由基、防治心血管疾病等重要作用[11-12]，现已广泛应用于医药、化妆品、食品等行业。已确定的三叶青黄酮有 40 余种，包括槲皮素、山柰酚、金丝桃苷、异槲皮苷、牡荆苷等[13-14]。目前三叶青黄酮的研究主要集中在成分鉴定和抗肿瘤活性研究，作为一类天然的抗氧化剂，三叶青黄酮的抗氧化活性报道较少。本研究以栽培三叶青块根为研究对象，响应面设计优化回流提取总黄酮的工艺，UPLC 测定异荭草苷、荭草苷、芦丁、异槲皮苷、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、芹菜素和山柰酚 9 种单体的含量，并进一步考察三叶青黄酮体外抗氧化活性，以期为其资源开发利用提供参考。

1 材料

1.1 试药

异荭草苷（批号 111974-201401）、荭草苷（批号 111973-201401）、芦丁（批号 100080-201811）、异槲皮苷（批号 111809-201804）、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（批号 112007-201602）、紫云英苷（批号 1109-201815）、槲皮素（批号 100081-201610）、芹菜素（批号 111901-201603）和山柰酚（批号 112025-201601）（中国食品药品检定研究院，含量≥ 98%）；1，1-二苯基 -2- 三硝基苯肼（DPPH）、羟自由基、维生素 C（北京化学试剂公司）；超纯水（自制）；色谱纯乙腈，分析纯生化试剂（宁波航景生物科技有限公司）；三年生三叶青块根 [宁波圣旺生物科技有限公司，经宁波市农科院章建红教授鉴定为崖爬藤属植物三叶崖爬藤（*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg）的块根]。

1.2 仪器

1290 超高效液相色谱仪（安捷伦公司）；UV2600 紫外分光光度计（岛津公司）；AL204 电子天平（梅勒特 - 托利多仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 总黄酮得率的测定

2.1.1 芦丁标准曲线绘制 取 1 mg • mL^{-1} 芦丁对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、2.0 mL，加 1.0 mL 5% $NaNO_2$ 溶液摇匀静置；加 1.0 mL 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液摇匀静置；加 10 mL 4% NaOH 溶液，用甲醇定容至 25 mL，摇匀静置；λ_{510} 测定吸光度，得吸光度（*Y*）和质量浓度（*X*）的线性回归方程：$Y = 0.4822X - 0.0098$，$r^2 = 0.9995$，范围为 0.004 ～ 0.08 mg • mL^{-1}。

2.1.2 三叶青总黄酮得率 三叶青块根粉碎、过筛，5 g 粉末加 70% 甲醇，液料比 20∶1（mL/g），冷凝回流 2 h，重复提取一次，滤液浓缩后甲醇定容至 50 mL，静置，滤液即样品溶液。取 1 mL 测吸光度，根据回归方程得黄酮浓度，计算得率：得率（%）＝黄酮浓度（mg • mL^{-1}）×50（mL）×25/ 样品质量（mg）×100%。

2.1.3 方法学考察 芦丁对照品溶液显色反应后，连续 5 次测吸光度，*RSD* 为 1.4%，表明仪器的精密度良好；供试品溶液显色反应后，在 0、10、20、50、70 min 测吸光度，*RSD* 为 1.1%，表明溶液稳定；取同一批样本 5 份，制备样品溶液后测吸光度，*RSD* 为 1.8%，表明方法重现性良好；取同一批样本 5 份，加芦丁对照品后制备样品溶液，测吸光度，*RSD* 为 1.6%，加样回收率为 99.3%。表明方法准确性良好，可行。

2.2 单因素实验

分别考察提取温度（70、75、80、85、90、95 ℃），提取时间（60、75、90、105、120、135 min），甲醇浓度（65%、70%、75%、80%、85%、90%），液料比（5∶1、10∶1、15∶1、20∶1、25∶1、30∶1）对总黄酮得率的影响。结果显示，提取温度 80 ℃、提取时间 90 min，甲醇浓度 80%，液料比 15∶1 为最优结果，黄酮得率较高（见图 1），需进一步优化。

2.3 响应面优化总黄酮提取工艺

在单因素实验的基础上，选定提取温度、提取时间、甲醇浓度、液料比 4 个因素为响应变量，采用 Design Expert 10.0 软件 CCD 设计方法，按表 1 设定因素水平，以黄酮提取率（*Y*）为响应值，对 4 个主要影响因素进行优化。

2.3.1 结果与分析 结果见表 2，采用 Design-Expert 10.0 软件进行多元回归拟合，得黄酮得率（*Y*）的二次多项回归方程：$Y = 18.31 + 3.39A + 0.30B - 0.59C - 0.12D + 0.084AB - 1.61AC - 0.89AD + 0.13BC + 0.21BD + 0.17CD - 1.94A^2 - 1.94B^2 - 1.18C^2 - 1.02D^2$。

对回归模型进行方差分析（见表 3），三叶青黄酮得率的回归模型 *F* 值为 60.12，$P < 0.01$，模型回归极显著；回归系数 R^2 为 0.982，失拟项 *P* 为

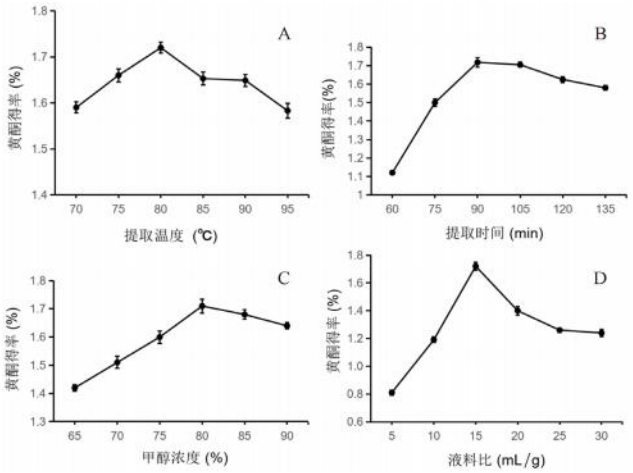

图 1　提取温度（A）、提取时间（B）、甲醇浓度（C）、液料比（D）对三叶青黄酮得率的影响

Fig 1　Effect of exraction temperature（A）, extraction time（B）, methanol concentration（C）and liquid-solid ratio（D）on the yield of total flavonoids

表 1　中心组合设计因素与水平

Tab 1　Factor and level of CCD

水平	因素			
	A. 温度 / ℃	B. 提取时间 /min	C. 甲醇浓度 /%	D. 液料比 /（mL/g）
－2	70	60	70	5 ∶ 1
－1	75	75	75	10 ∶ 1
0	80	90	80	15 ∶ 1
1	85	105	85	20 ∶ 1
2	90	120	90	25 ∶ 1

0.8911，差异不显著，模型拟合程度较高，实验误差小，可用于分析和预测三叶青黄酮的提取工艺。由 F 值可看出，各因素对黄酮得率影响的主次顺序为提取温度＞甲醇浓度＞提取时间＞液料比，其中，提取温度和甲醇浓度的影响极显著。模型中 A、B、C、AC、AD、A^2、B^2、C^2、D^2 对黄酮得率的影响显著（$P < 0.05$，$P < 0.01$），且与 Y 的变化不是单一的线性变化。

2.3.2　响应面法优化与验证　各因素两两交互作用对三叶青黄酮得率的影响见图 2。提取温度和甲醇浓度的影响极显著，曲面变化极明显；提取时间的影响显著，曲面变化明显；料液比的影响不显著，曲面平缓。

试验得三叶青黄酮最佳提取理论条件为：提取温度 77.96 ℃，提取时间 91.69 min，甲醇浓度 78.04%，液料比 14.87∶1，此条件下黄酮得率理论值为 1.712%。为便于操作，选提取温度为 78 ℃，提取时间为 92 min，甲醇浓度为 78%，液料比为 15∶1，提取验证 3 次，总黄酮实际得率为 1.725%，相对偏差为 0.8%，理论值与实际值相差小，说明该工艺稳定可靠。

表 2　中心组合实验设计与结果

Tab 2　Experimental design and results for CCD

序号	A	B	C	D	Y/%
1	－2	0	0	0	1.303
2	1	－1	1	1	1.714
3	0	2	0	0	1.689
4	0	0	0	0	1.865
5	0	0	0	0	1.835
6	1	－1	－1	1	1.864
7	1	－1	1	－1	1.805
8	－1	－1	1	－1	1.471
9	－1	1	－1	－1	1.486
10	0	0	－2	0	1.758
11	0	0	0	0	1.774
12	－1	1	－1	1	1.515
13	0	－2	0	0	1.598
14	－1	－1	1	1	1.515
15	2	0	0	1	1.908
16	0	0	0	0	1.883
17	1	－1	－1	－1	1.941
18	0	0	0	0	1.829
19	－1	1	1	1	1.546
20	1	1	1	1	1.749
21	0	0	0	2	1.750
22	－1	－1	－1	－1	1.515
23	0	0	0	－2	1.717
24	1	1	1	－1	1.811
25	1	1	－1	－1	1.969
26	1	1	－1	1	1.901
27	0	0	2	0	1.680
28	0	0	0	0	1.798
29	－1	1	1	－1	1.515
30	－1	－1	－1	1	1.486

表 3　回归模型方差分析结果

Tab 3　Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	84.08	14	9.17	60.12	＜ 0.0001
A	66.33	1	66.33	663.99	＜ 0.0001
B	0.55	1	0.55	5.48	0.0334
C	2.08	1	2.08	20.81	0.0004
D	0.092	1	0.092	0.92	0.3536
AB	0.007 15	1	0.007 15	0.072	0.7927
AC	2.65	1	2.65	26.54	0.0001
AD	0.89	1	0.89	8.86	0.0094
BC	0.016	1	0.016	0.16	0.6948
BD	0.043	1	0.043	0.43	0.5236
CD	0.028	1	0.028	0.28	0.6019
A^2	6.09	1	6.09	60.92	＜ 0.0001
B^2	6.38	1	6.38	63.84	＜ 0.0001
C^2	2.37	1	2.37	23.75	0.0002
D^2	1.75	1	1.75	17.53	0.0008
残差	1.50	15	0.19		
失拟项	0.68	10	0.17	0.41	0.8911
纯误差	0.82	5	0.21		
总差	85.57	29			

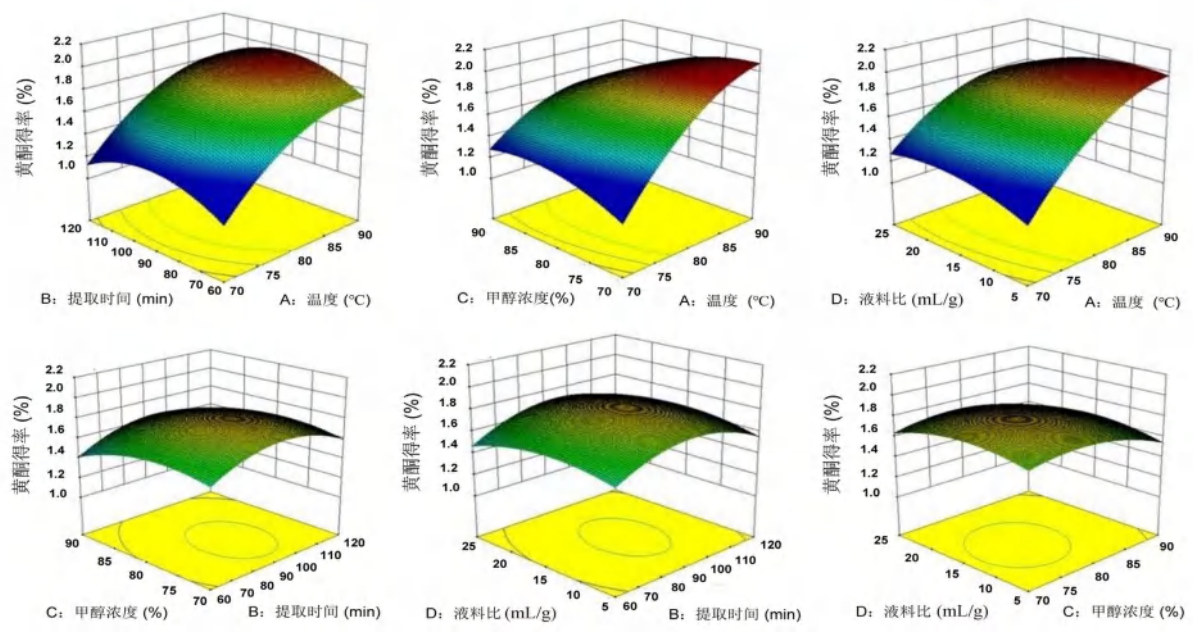

图 2 提取温度、提取时间、甲醇浓度、液料比交互作用影响黄酮得率的响应曲面图

Fig 2 Responses surface of the interaction between extraction temperature，extraction time，methanol concentration and liquid-solid ratio on total flavonoids yields

2.4 9 种黄酮单体含量的测定

2.4.1 UPLC 色谱条件 色谱柱：Agilent SB-C18（4.6 mm×100 mm，1.8 μm）；柱温：32 ℃；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）和乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 3 min，6% ～ 10%B；3 ～ 8 min，10% ～ 15%B；8 ～ 21 min，15% ～ 40%B；21 ～ 24 min，40% ～ 55%B）；流速：1.0 mL•min^{-1}；进样量：10 μL；检测波长：280 nm。色图谱见图 3。

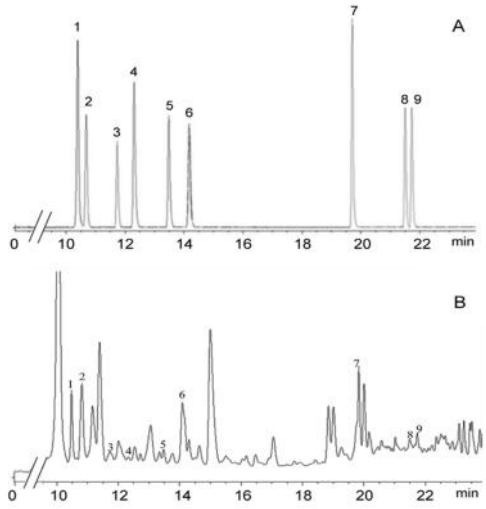

图 3 混合对照品溶液（A）与样品溶液（B）的 UPLC 图

Fig 3 UPLC chromatogram of mixed reference（A）and sample（B）

1. 异荭草苷（isoorientin）；2. 荭草苷（orientin）；3. 芦丁（rutin）；4. 异槲皮苷（isoquercitin）；5. 山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（kaempferol-3-*O*-rutinoside）；6. 紫云英苷（astragaline）；7. 槲皮素（quercetin）；8. 芹菜素（apigenin）；9. 山柰酚（kaempferol）

2.4.2 9 种单体标准曲线的绘制 精密称取异荭草苷、荭草苷、芦丁、异槲皮苷、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、芹菜素和山柰酚对照品适量，甲醇定容至 10 mL，得到质量浓度依次为 1812.5、708.5、1000、1150、1250、1330、950、800、937.5 μg•mL^{-1} 的混合对照品溶液。取混合对照品溶液 2、4、10、20、40、80 μL，用甲醇稀释为 1 mL，配制成系列对照品溶液，进样分析，以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线，得各成分的回归方程，结果见表 4。

表 4 三叶青中 9 种黄酮单体的标准曲线方程

Tab 4 Standard curve equations of 9 flavonoid monomers

对照品	标准曲线方程	R^2	线性范围 /（μg•mL^{-1}）
异荭草苷	$Y = 10.06X - 132.7$	0.9992	3.63 ～ 145.00
荭草苷	$Y = 6.548X - 5.634$	0.9998	1.42 ～ 56.68
芦丁	$Y = 3.255X - 9.241$	0.9995	2.00 ～ 80.00
异槲皮苷	$Y = 5.092X - 36.20$	0.9997	2.30 ～ 92.00
山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷	$Y = 6.175X + 22.00$	0.9994	2.50 ～ 100.00
紫云英苷	$Y = 9.106X + 12.41$	0.9995	2.66 ～ 106.40
槲皮素	$Y = 2.715X + 11.88$	0.9999	1.90 ～ 76.00
芹菜素	$Y = 16.18X - 231.4$	0.9992	1.60 ～ 64.00
山柰酚	$Y = 4.254X + 15.00$	0.9997	1.88 ～ 75.00

2.4.3 方法学考察 取对照品溶液，连续进样 6 次，9 种黄酮单体峰面积 *RSD* 在 1.1% ～ 1.8%，表明仪器的精密度良好；取供试品溶液，分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样，9 种黄酮单体峰面积 *RSD* 在 1.3% ～ 2.1%，表明方法稳定可靠；取同一样本 6 份，制备成供试品溶液并进样测定，9 种

黄酮单体峰面积 *RSD* 在 1.3% ～ 2.0%，表明方法重现性良好；同一批样本 6 份，加对照品后制备供试品溶液，进样测定，9 种黄酮单体的加样回收率在 98.0% ～ 102%，*RSD* 在 2.1% ～ 3.5%，表明该方法准确性良好，方法可行。

2.4.4　黄酮单体含量的测定　取 5 g 三叶青块根粉末，优化工艺提取总黄酮，经色谱分析，计算单体含量：单体含量（μg•g^{-1}）＝单体的浓度（μg•mL^{-1}）×50（mL）/ 样品的质量（g）。得异荭草苷、荭草苷、芦丁、异槲皮苷、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、芹菜素、山柰酚含量分别为 119.6、25.3、26.4、28.8、41.6、30.4、150.8、18.1、20.6 μg • g^{-1}，*RSD* 分别为 1.2%、0.77%、0.46%、0.74%、0.17%、0.28%、1.6%、0.22%、0.34%（n ＝ 3）。

2.5　黄酮提取中试

在最佳提取工艺条件下，取 10 kg 三叶青块根粉末进行中试，重复 3 次，结果见表 5。在 10 kg 规模的试验中，黄酮的平均提取率为 1.709%，9 种单体含量也基本符合预期，证明该工艺获得了较高的三叶青黄酮提取率。

表 5　三叶青黄酮提取中试结果

Tab 5　Pilot test of flavonoids yield from *Tetrastigma hemsleyanum*

No.	投料量 / kg	黄酮得率 / %	单体化合物含量 /（μg • g^{-1}）								
			异荭草苷	荭草苷	芦丁	异槲皮苷	山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷	紫云英苷	槲皮素	芹菜素	山柰酚
1	10.04	1.712	108.2	23.7	25.0	25.0	38.1	28.7	143.4	16.3	19.4
2	10.01	1.708	106.7	21.9	23.4	26.6	40.2	32.6	146.0	16.3	19.3
3	9.99	1.707	107.0	24.5	23.3	26.3	37.9	27.9	145.8	17.5	23.5

2.6　抗氧化活性测定

2.6.1　清除 DPPH 自由基能力 [15]　制备 0 ～ 0.2 mg • mL^{-1} 总黄酮溶液，取各样品溶液 2.0 mL，加 2 mL 0.2 mmol • L^{-1} DPPH 乙醇溶液，暗反应 30 min，λ_{517} 测吸光度 A_i 值，对照组（A_j）用乙醇代替 DPPH 溶液；空白组（A_c）为 DPPH 溶液和乙醇混合，各平行测 3 次。计算公式如下：DPPH 自由基清除率（%）＝ [1 －（A_i － A_j）/A_c]×100%。

2.6.2　清除羟自由基能力 [16]　制备 0 ～ 0.2 mg • mL^{-1} 总黄酮溶液，取各样品溶液 2.0 mL，加 0.5 mL 2 mmol • L^{-1} $FeSO_4$ 溶液和水杨酸溶液、0.5 mL10 mmol • L^{-1} H_2O_2 溶液，蒸馏水定容至 10 mL，置 37 ℃水浴 30 min，λ_{510} 测吸光度 A_1 值。对照组（A_2）用蒸馏水代替 H_2O_2 溶液；空白组（A_0）用蒸馏水代替样品溶液，各平行测 3 次。计算公式如下：羟自由基清除率（%）＝ [1 －（A_1 － A_2）/A_0]×100%

由图 4A、B 可知，在受测浓度范围内，三叶青黄酮对 DPPH 和羟自由基的清除率随质量浓度的增大逐渐增强。黄酮浓度高于 0.16 mg • mL^{-1} 时，DPPH 自由基清除率超过 90%，与维生素 C 的结果相当，IC_{50} 值为 0.061 mg • mL^{-1}。质量浓度在 0.04 ～ 0.16 mg • mL^{-1} 时，清除羟自由基能力迅速提高，后随浓度增加增长趋势变缓，IC_{50} 值为 0.115 mg • mL^{-1}。0.2 mg • mL^{-1} 下，DPPH 和羟自由基清除率分别为 92.56% 和 72.96%。

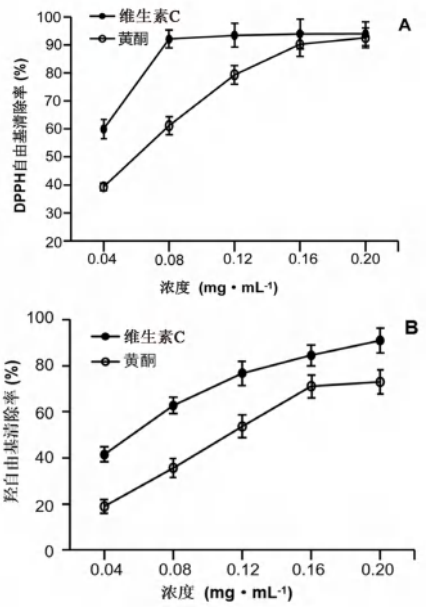

图 4　DPPH 自由基（A）和羟自由基（B）清除率的测定结果

Fig 4　Determination of DPPH radical（A）and hydroxyl radical（B）scavenging rate

3　讨论

回流提取法具有简单、高效、安全、环保等优点，常用于黄酮类物质的提取。与超声法、微波法相比，热回流法提取的三叶青活性物质含量高，DPPH、ABTS自由基清除力和 Fe^{3+} 还原力强 [17]。三叶青黄酮易溶于甲醇，且甲醇提取物药理活性强于乙醇 [18]。Ye 等 [19] 优化了乙醇提取三叶青总黄酮工艺，提取时间为 126 min，黄酮得率为 1.23%，与本研究结果（1.725%）相比，产率低，耗时也大幅增加。本试验通过回流提取三叶青黄酮，得到最优工艺为提取温度 78 ℃，提取时间 92 min，甲醇浓度 78%，液料比 15∶1，通过中试验证，能够得到稳定的三叶青黄酮产率，且接近试验值，可为工业化生产提供参考。

自由基是细胞代谢过程中产生的活性物质，

能够诱导氧化反应。机体在正常状态下可被体内自由基清除系统，如超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、谷胱甘肽酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）等捕获并清理，但当机体病变或处于恶劣的外界生理环境时，会诱导异常自由基反应、堆积，引起细胞功能和多种生物大分子的损伤，从而导致器官组织的损伤[20]。三叶青黄酮活性酚羟基较多，可以与自由基反应生成较稳定的半醌式结构，有效清除体内过量自由基，终止自由基的链式反应，抑制自由基导致的脂质过氧化损伤，保护细胞膜。

关于 9 种黄酮单体的抗氧化活性及机制早有报道。异荭草苷、荭草苷天然存在于淡竹叶、败酱草等植物中，能有效清除自由基、抑制 Cu^{2+} / H_2O_2 诱导的脂质过氧化、牛血清蛋白和 DNA 氧化损伤等[21]；芦丁、槲皮素、异槲皮苷天然存在于桑叶、川楝等植物中，都能够明显抑制脂质过氧化[22]。紫云英苷是黄芪、杜仲和罂粟科等植物的活性成分之一，可通过降低肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶（LDH）的活性和丙二醛（MDA）含量，提高 SOD 活性对缺氧损伤细胞发挥保护作用[23]。山柰酚和山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷天然存在于姜科植物的根茎中，是强抗氧化成分，能够抑制脂多糖（LPS）诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中刀豆素 A 和一氧化氮或活性氧产生诱导的 T 细胞增殖[24]。由此可知，上述黄酮类成分都是三叶青中发挥抗氧化活性的重要物质基础。

参考文献

[1] 彭昕，吉庆勇，李玉兰，等 . 濒危药用植物三叶青 ISSR 分子标记的建立 [J]. 中成药，2015，37（7）：1507-1514.

[2] 何文，李瀚鑫，王晰雯，等 . 三叶青不同萃取部位抗氧化活性 [J]. 食品工业，2020，41（2）：151-155.

[3] 廖淑彬，陈丹，余文静，等 . 三叶青地上部分抗炎提取物效应组分群不同生理状态体内组织分布规律及特性研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（5）：1224-1249.

[4] 王丹丹，高荣，闫滨 . 三叶青对呼吸道合胞病毒作用实验研究 [J]. 天然产物研究与开发，2019，31（6）：1070-1074.

[5] Wang CY，Jiang HJ，Han YK，et al. Alkaloids from *Tet-rastigma hemsleyanum* and their anti-inflammatory effects on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. Molecules，2018，23（6）：1445-1462.

[6] Sun Y，Tsao R，Chen F，et al. The phytochemical composition，metabolites，bioavailability and in vivo antioxidant activity of *Tetrastigma hemsleyanum* leaves in rats [J]. J Funct Foods，2017，30：179-193.

[7] Sun Y，Hui QR，Chen R，et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by the phenolics of Tetrastigma hemsleyanum leaves and their antitumor effects in H22 tumor-bearing mice [J]. J Funct Foods，2018，40：349-364.

[8] Peng X，Zhang YY，Wang J，et al. Ethylacetate extract from *Tetrastigma hemsleyanum* induces apoptosis via the mitochondrial-caspase-dependent intrinsic pathway in HepG2 cells [J]. Tumor Biol，2016，37（1）：865-876.

[9] 黄艳萍，吴学谦，胡玲，等 . 三叶青内生真菌 *Phomopsis* sp. YK-7 的化学成分研究 [J]. 中草药，2017，48（15）：3032-3036.

[10] 郭菁菁，赵英杰，李伟，等 . 三叶青地上部分多糖对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用 [J]. 中成药，2019，41（4）：916-919.

[11] Ji T，Ji WW，Wang J，et al. A comprehensive review on traditional uses，chemical compositions，pharmacology properties and toxicology of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. J Ethnopharmacol，2020，264：1-19.

[12] Zuchowski J，Rolnik A，Weronika S，et al. Modulation of oxidative stress and hemostasis by flavonoids from Lentil aerial parts [J]. Molecules，2021，26（2）：497.

[13] 孙梦佳，王焕军，丁富娟，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 和质量亏损过滤技术的三叶青黄酮类化合物定性分析 [J]. 质谱学报，2020，41（4）：359-367.

[14] 范世明，谢心月，曾繁天，等 . 三叶青叶化学成分鉴定及其总黄酮含量测定研究 [J]. 药物分析杂志，2017，37（8）：1481-1488.

[15] 马雪洁，程路峰，杨淑梅，等 . 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1130-1133.

[16] 杜月，朱贲贲，杜佼 . 基于 Box-Behnken 模型优化金锦香总黄酮闪式提取工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 中南药学，2019，17（4）：512-517.

[17] 丁丽，王淑君，徐冰婉，等 . 基于体外抗氧化试验的三叶青活性物质提取工艺研究 [J]. 食品科技，2021，46（12）：224-229.

[18] 李士敏，李强，孙崇鲁，等 . 基于多模式识别结合指纹图谱的三叶青产地鉴别比较研究 [J]. 中草药，2020，51（1）：197-203.

[19] Ye CL，Liu XG. Extraction of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and their antioxidant activity [J]. J of Food Process Pres，2015：2197-2205.

[20] Sies H，Belousov VV，Chandel NS，et al. Defining roles of specific reactive oxygen species（ROS）in cell biology and physiology [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2022，23（7）：499-515.

[21] 袁莉，吴雨晨，任骁萌，等 . 荭草素和异荭草素抗氧化活性及对肝癌细胞增殖的影响 [J]. 食品科学技术学报，2013，31（6）：21-27.

[22] 王叶情，王宇红，邹蔓姝，等 . 槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药，2021，53（5）：1-10.

[23] Laura G，Bruna DF，Riccardo M，et al. Corn poppy，*Papaver rhoeas* L.：a critical review of its botany，phytochemistry and pharmacology [J]. Phytochem Rev，2021，20：227-248.

[24] Ding L，Zhang XM，Zhang JJ. Antioxidant activity in vitro guided screening and identification of flavonoids antioxidants in the extract from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg [J]. Int J Anal Chem，2021：1-11.

（收稿日期：2022-11-15；修回日期：2023-03-13）

不同压缩式雾化器对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果研究

李逸飞[1]，董亚男[1]，王勇[1]，朱建强[1, 2]，王博[1, 2*]（1. 天津药物研究院药业有限责任公司，天津　300301；2. 释药技术与药代动力学国家重点实验室，天津　300301）

摘要：目的　比较 3 种不同品牌雾化器对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果。**方法**　采用新一代撞击器及呼吸模拟装置，测定 3 种雾化器配合吸入用盐酸氨溴索溶液使用的空气动力学粒径分布和递送速率、递送总量，选取微细粒子剂量、微细粒子分数、质量中位数空气动力学粒径和几何标准偏差等参数，表征不同雾化器对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果。**结果**　单因素方差分析结果显示，8 个主要指标的 *P* 值均小于 0.05，说明 3 种雾化器的雾化效果差异有统计学意义。雾化器 A 对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果最佳。**结论**　本研究测定的结果表明了不同雾化器对吸入液体制剂的递送速率、递送总量及体外空气动力学粒径分布特征均有较大影响。为保证临床用药效果，应加强吸入液体制剂与雾化装置的关联研究，且应制订严格的雾化器标准。

关键词：吸入用盐酸氨溴索溶液；雾化器；递送速率；递送总量；空气动力学粒径分布
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2041-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.011

Nebulization effect of different compressed air nebulizers on the inhalation of ambroxol hydrochloride solution

LI Yi-fei[1], DONG Ya-nan[1], WANG Yong[1], ZHU Jian-qiang[1, 2], WANG Bo[1, 2*] (1. *Tianjin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Tianjin* 300301; 2. *State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin* 300301)

Abstract: Objective　To compare the nebulization effect of three different nebulizers on the inhalation ambroxol hydrochloride solution. **Methods**　Three different nebulizers were used to determine the aerodynamic particle size distribution, delivery rate and total delivery of ambroxol hydrochloride inhalation solution by next generation impactor and breath simulator. The fine particle dose, fine particle fraction, mass median aerodynamic diameter and geometric standard deviation were selected to characterize the nebulization effect of different nebulizers for ambroxol hydrochloride inhalation solution. **Results**　The ANOVA analysis showed that the *P* values of eight main indexes were all less than 0.05, suggesting the difference in the nebulization effect of three nebulizers was obviously significant. Nebulizer A has the best nebulization effect on ambroxol hydrochloride inhalation solution. **Conclusion**　Nebulizers have great effect on the delivery rate, total delivery and aerodynamic particle size distribution of inhalation solution. Correlation between inhalation solution and nebulizers should be studied, and the quality standard of nebulizers should be established to ensure clinical efficacy.

Key words: ambroxol hydrochloride inhalation solution; nebulizer; delivery rate; the total delivery; aerodynamic particle size distribution

基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目（No. 2017ZX09201002-001-004）。
作者简介：李逸飞，男，实习研究员，主要从事药物制剂新剂型与新技术研究，email：liyf8@tipr.com.cn　*通信作者：王博，男，副研究员，主要从事药物制剂新剂型与新技术研究，email：wangb@ tipr.com.cn

吸入制剂的剂型主要有定量干粉吸入剂、气雾剂、吸入液体制剂和喷雾剂等，其中吸入液体制剂具有处方简单、无剂量约束等优点，临床应用较为广泛，但临床用药时需与雾化装置结合使用[1]。根据装置特点及原理不同，雾化装置可分为压缩式雾化器（也叫压缩空气式雾化器、射流雾化器或喷射雾化器）、振动筛孔雾化器及超声雾化器等。各类雾化装置的性能不尽相同，进而可能导致临床疗效的差异。目前市面上最常见的雾化装置是压缩式雾化器，其具有操作简单方便、日常维护轻松、药物利用率高等优点。此外，压缩式雾化器在临床应用中能够降低患者放弃治疗率[2]，是目前临床应用最多的雾化器种类之一。

盐酸氨溴索是祛痰药溴己新的活性代谢物，毒性低于溴己新，而活性更高，是新一代黏痰溶解剂。该药在临床上广泛用于伴有呼吸道异常分泌的急慢性呼吸道疾病，特别是慢性支气管炎的祛痰治疗，新生儿呼吸窘迫症以及肺部手术的辅助治疗，具有毒性低、疗效确切、能与抗菌药物并用产生良好的协同效果等优点[3]，为最常用的祛痰药之一[4]。作为用于呼吸道疾病的药物，吸入用盐酸氨溴索溶液可直接进入呼吸道和肺部，直达患病部位，因此盐酸氨溴索吸入制剂的临床疗效显著优于静脉注射给药[5]。

国家药品监督管理局药品审评中心于 2021 年 11 月发布的《化学药品吸入液体制剂药学研究技术要求》中提出，不同原理、不同型号和品牌的雾化装置性能可能存在差异，对药液雾化效果影响较大，吸入液体制剂临床疗效与雾化装置关系密切，因此应加强药液与雾化装置的关联研究。目前市面上在售的雾化器品牌型号众多，同一类型不同品牌型号的雾化器，对部分吸入液体制剂的雾化效果也可能有较大的差异[6-10]。因此本研究选择 3 种品牌的压缩式雾化器各 3 台，采用新一代撞击器（next generation internet，NGI），对吸入用盐酸氨溴索溶液进行空气动力学粒径分布（aerodynamic particle size distribution，APSD）、递送速率和递送总量研究，对比不同雾化器雾化效果及递送性能的差异。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695-2998PDA 高效液相色谱系统、Empower 色谱工作站（美国 Waters 公司）；BRS2100 呼吸模拟装置、新一代撞击器 NGI（配有 HCP5 高流量真空泵、DFM-2000 流量仪表器、NGI Cooler 降温柜、Inhalytix 计算软件）（英国 COPLEY 公司）；BP211D 电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司，d = 0.1 mg]。

1.2 试药

吸入用盐酸氨溴索溶液（Mucosolvan，Sanofi S.P.A/Boehringer Ingelheim Italia S.P.A，批号：428812A，规格：15 mg/2 mL）；雾化器（市售样品，A、B、C 3 个品牌各 3 台，均为压缩式雾化器）；盐酸氨溴索对照品（纯度：99.9%，中国食品药品检定研究院，批号：100599-201604）；乙腈（天津康科德科技有限公司，批号：2020AG001，色谱纯）；氯化钠注射液（上海百特医疗用品有限公司，批号：S1801069）。水为超纯水（试验室自制）。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

采用高效液相色谱法测定氨溴索含量。色谱柱：Thermo syncronis C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：0.01 mol·L^{-1} 磷酸氢二铵（以磷酸调节 pH 值至 7.0）- 乙腈（40∶60）；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：25 ℃；进样量：20 μL；检测波长：248 nm。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取盐酸氨溴索对照品 15 mg 置 100 mL 量瓶中，加入流动相适量，超声使之完全溶解并稀释至刻度，摇匀。精密量取 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 按吸入用盐酸氨溴索溶液处方，不加入盐酸氨溴索，配制空白辅料溶液，处方信息见表 1。精密量取空白辅料溶液 0.5 mL，置于 50 mL 量瓶中，加入流动相稀释至刻度，摇匀，作为空白辅料供试品溶液。取空白辅料溶液及对照品溶液注入色谱仪，记录色谱图，见图 1。专属性试验结果表明，空白辅料在盐酸氨溴索主峰位置无峰出现，不干扰盐酸氨溴索含量的测定。

表 1 吸入用盐酸氨溴索溶液处方

Tab 1 Formulation of ambroxol hydrochloride inhalation solution

原辅料	处方量 /（mg/ 支）	空白溶液处方量 /（mg/ 支）
盐酸氨溴索	15	0
枸橼酸	2	2
磷酸氢二钠	4	4
氯化钠	12	12

2.3.2 线性关系考察 取盐酸氨溴索对照品溶液，用流动相逐步稀释成质量浓度为 5.20、20.80、52.0、104.0、208.0、416.0、520.0 μg·mL^{-1} 的系列溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图，以盐酸氨溴索峰面积（A_1）与质量浓度（C_1，μg·mL^{-1}）进行线性回归，得到回归方程为 $A_1 = 29\,373 C_1 + 5611.7$（$r = 0.9999$），表明盐酸氨溴索在

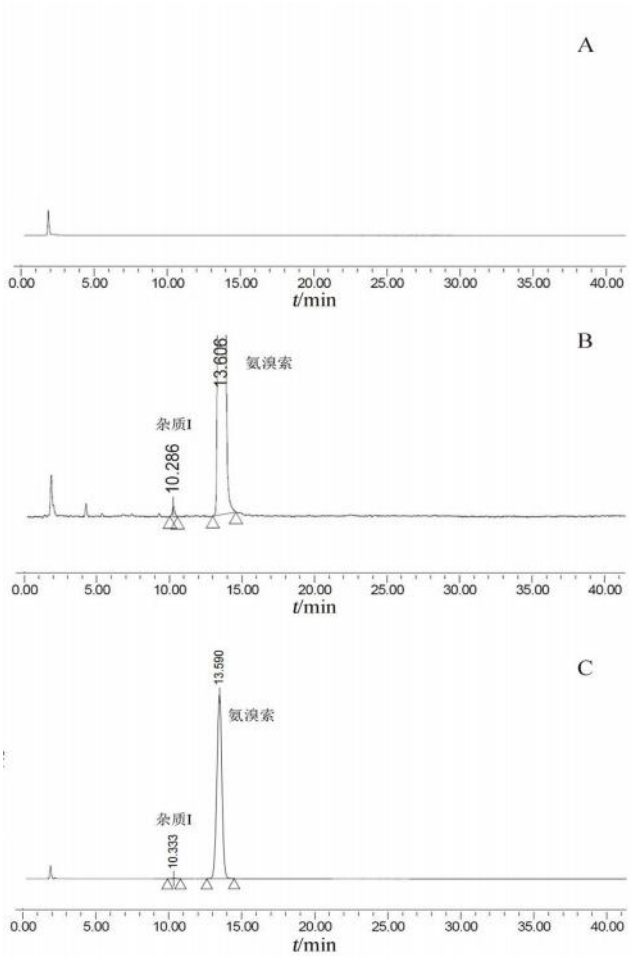

图 1　盐酸氨溴索的色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of ambroxol hydrochloride

A. 空白辅料溶液（excipient solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 样品溶液（sample solution）

5.20 ～ 520.0 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.3.3　定量限与检测限　取盐酸氨溴索对照品溶液用流动相稀释成系列溶液，注入液相色谱仪，记录峰面积，定量限为 0.0296 μg·mL^{-1}，检测限为 0.0104 μg·mL^{-1}。

2.3.4　精密度试验　取盐酸氨溴索对照品溶液连续进样 6 次，盐酸氨溴索峰面积的 *RSD* 为 0.32%，表明仪器精密度良好。

2.3.5　稳定性试验　取盐酸氨溴索对照品溶液分别在 0、2、4、8、16、24、36 h 时进样，盐酸氨溴索峰面积的 *RSD* 为 0.13%，样品溶液在 36 h 内稳定。

2.4　*递送速率和递送总量测定*

按《中国药典》2020 年版通则 0111 中组装呼吸模拟器和滤纸装置。取本品和氯化钠注射液适量（成人模式各 3 mL，儿童模式各 2 mL），置于雾化杯中，设定呼吸模拟装置为成人模式和儿童模式分别测定，两种模式的呼吸特性及给药量见表 2。开启呼吸模拟装置，同时开启雾化器，持续 1 min。雾化结束后关闭雾化器和呼吸模拟装置。将滤纸吸附的药液用流动相洗至 50 mL 量瓶中，并用流动相稀释至刻度，摇匀，即得递送速率供试品溶液。更换一张新的滤纸，继续雾化直至雾化完毕。将滤纸及滤纸装置中的药液用流动相洗至 100 mL 量瓶中，并用流动相稀释至刻度，摇匀，即得递送总量供试品溶液。

表 2　模拟不同年龄段人群的呼吸特性及给药量

Tab 2　Simulation of the breathing properties and dosage of different age groups

递送模式	吸入呼出比	呼吸波形	给药量 /mg	理论药物递送总量 /mg
儿童模式	1∶2	正弦型	15	5
成人模式	1∶1	正弦型	22.5	11.25

将 A、B、C 3 种不同品牌的雾化器各 3 台同法测定 3 次，计算递送速率和递送总量，结果见表 3。采用 SPSS 统计分析软件对上述研究数据进行方差分析以考察不同品牌雾化器的差异及各品牌雾化器的批间差异，分析结果表明 3 种不同品牌雾化器在儿童模式及成人模式下的递送速率和递送总量 *P* 值均小于 0.01，证明不同品牌雾化器在药物气溶胶递送效果差异有统计学意义。邦弗伦尼（Bonferroni）多重均数比较结果显示，雾化器 A 与雾化器 C 的成人模式递送速率差异无统计学意义，两者均大于雾化器 B；成人模式递送总量、儿童模式递送速率及递送总量均为 A ＞ C ＞ B。该结果表明不同品牌雾化器的雾化效率差异非常明显，最大差异可能接近 3 倍，其中雾化器 A 的递送效率最高。

2.5　*空气动力学粒径分布测定*

按《中国药典》2020 年版通则 0951 安装 NGI，将 NGI 置冷却箱中，5 ℃冷却 90 min，取本品和氯化钠注射液各 2 mL，置雾化杯中，将雾化器口含器通过适配器与 NGI 连接，调节流速为 15 L·min^{-1}，打开真空泵，持续 1 min 后，关闭真空泵电源，将适配器、人工喉与 NGI 分离，将各层级收集盘中药液用流动相清洗转移至各量瓶中，作为 APSD 各层级供试品溶液。

将 A、B、C 3 种不同品牌的雾化器各 3 台同法测定 3 次，使用 Inhalytix 软件计算微细粒子剂量（fine particle dose，FPD）、微细粒子分数（fine particle fraction，FPF）、质量中位数空气动力学粒径（mass median aerodynamic diameter，MMAD）和几何标准偏差（geometric standard deviation，GSD）值，结果见表 4、图 2 ～ 5。采用 SPSS 25.0 统计分析软件对上述研究数据进行方差分析以考察不同品牌雾化器的差异及各品牌雾化器的批间差异，结果显示 3 种不同品牌雾化器之间各项主要考察指标 *P* 值均小于 0.01，证明不同品牌雾化器在各项

表 3 递送速率与递送总量测定结果

Tab 3 Delivery rate and the total delivery

雾化器品牌	雾化器编号	递送速率 /（mg • min^{-1}）		递送总量 /mg	
		成人模式	儿童模式	成人模式	儿童模式
A	A1	0.686±0.090	0.325±0.010	9.790±0.368	3.730±0.132
	A2	0.724±0.178	0.318±0.030	9.973±0.783	4.277±0.168
	A3	0.669±0.145	0.339±0.057	9.777±1.092	3.776±0.204
	均值	0.693±0.126**	0.327±0.034**	9.847±0.703**	3.927±0.301**
B	B1	0.239±0.074	0.108±0.014	4.289±0.219	1.511±0.321
	B2	0.244±0.070	0.155±0.048	4.336±0.225	1.314±0.287
	B3	0.277±0.011	0.152±0.008	4.355±0.060	1.330±0.020
	均值	0.254±0.054**	0.138±0.034**	4.337±0.164**	1.385±0.235**
C	C1	0.603±0.065	0.232±0.008	6.365±0.266	1.986±0.157
	C2	0.649±0.033	0.212±0.033	6.547±0.872	2.513±0.671
	C3	0.587±0.037	0.244±0.019	6.233±0.284	2.055±0.072
	均值	0.613±0.049**	0.230±0.024**	6.382±0.497**	2.185±0.426**

注：3 组样品组间比较，**$P < 0.01$。

Note：Compared among three groups of samples，**$P < 0.01$.

指标中的差异均有统计学意义。邦弗伦尼多重均数比较结果显示，雾化器 B 的 FPF 最高，MMAD 最低。虽然雾化器 B 的 FPF 高于其他两种品牌雾化器，但其 FPD 低于其他雾化器。FPD 为空气动力学粒径小于 5 μm 的气溶胶药物粒子的质量，一般情况下粒径 5 ～ 10 μm 的气溶胶颗粒主要沉积于口咽部，粒径 3 ～ 5 μm 的气溶胶颗粒主要沉积于肺部，粒径＜ 3 μm 的气溶胶颗粒 50% ～ 60% 沉积于肺泡[11]，而 FPF 指空气动力学粒径小于 5 μm 的气溶胶药物粒子所占百分比，通常用来描述在肺部的沉积率，但其高估了肺部沉积的实际情况，因此相较于 FPF，FPD 更能直观描述可能进入肺部的药物粒子质量。故雾化器 B 的实际雾化效果并不理想。雾化器 A 的 FPD 高于其他两种雾化器，可使药物在肺部沉积质量最多，且 FPF、MMAD 均高于雾化器 C，综合各项指标可判定雾化器 A 对吸入用盐酸氨溴索溶液的雾化效果最佳。

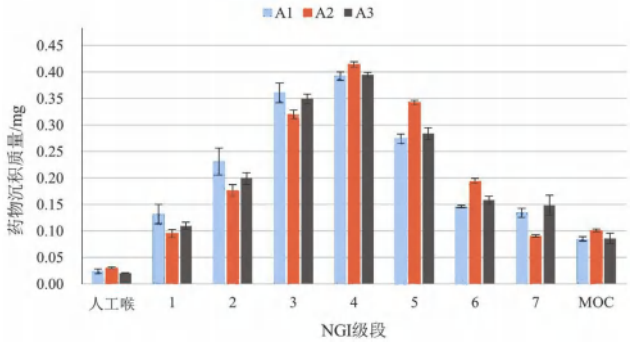

图 2 药液经 3 台雾化器 A 雾化后药物分布

Fig 2 Aerodynamic particle size distribution of drug by three type A nebulizers

此外，雾化器 A 和雾化器 C 均存在不同程度的批间差异，而雾化器 B 并未表现出明显的批间差异。A1 与 A2 两台雾化器 FPF、MMAD

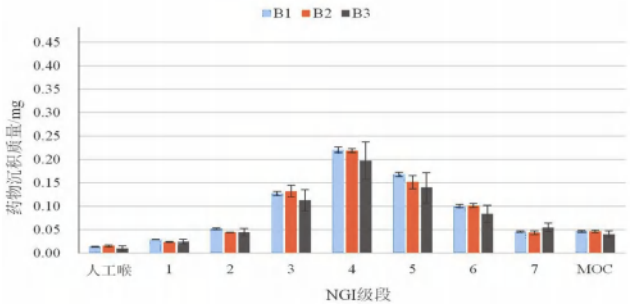

图 3 药液经 3 台雾化器 B 雾化后的药物分布

Fig 3 Aerodynamic particle size distribution of drug by three type B nebulizers

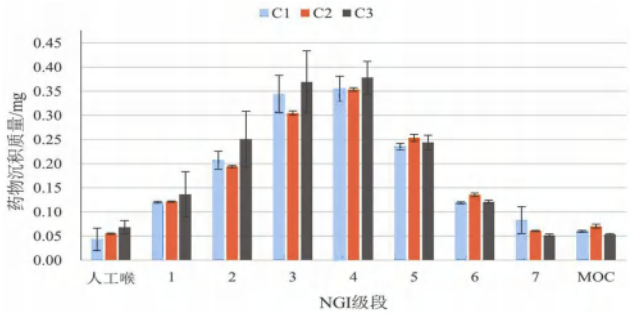

图 4 药液经 3 台雾化器 C 雾化后药物分布

Fig 4 Aerodynamic particle size distribution of drug by three type C nebulizers

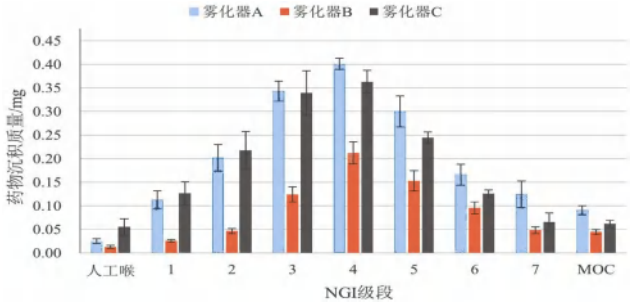

图 5 药液经 3 种不同品牌雾化器雾化后药物分布

Fig 5 Aerodynamic particle size distribution of drug by three different brands of atomizers

表 4 空气动力学粒径分布测定结果

Tab 4 FPD，FPF，MMAD and GSD

雾化器	编号	FPD/mg	FPF/%	MMAD/μg	GSD
A	A1	0.972±0.025	52.994±1.462$^{\#\#}$	4.450±0.118$^{\#}$	2.707±0.079$^{\#\#}$
	A2	1.082±0.014	61.325±0.519$^{\#\#}$	3.881±0.036$^{\#}$	2.319±0.021$^{\#\#}$
	A3	1.011±0.048	57.817±0.481$^{\#\#}$	4.170±0.060$^{\#}$	2.717±0.115$^{\#\#}$
	均值	1.022±0.056**	57.379±2.991**	4.167±0.256**	2.581±0.209**
B	B1	0.550±0.011	68.687±0.287	3.543±0.021	2.211±0.028
	B2	0.531±0.017	68.440±2.069	3.579±0.133	2.257±0.034
	B3	0.488±0.080	69.213±1.394	3.531±0.139	2.381±0.183
	均值	0.523±0.049**	68.447±1.301**	3.551±0.099**	2.283±0.121**
C	C1	0.797±0.051	50.850±0.436	4.766±0.041$^{\#}$	2.442±0.103
	C2	0.819±0.014	52.873±0.601	4.531±0.067$^{\#}$	2.351±0.014
	C3	0.789±0.042	47.542±4.262	5.063±0.423$^{\#}$	2.290±0.019
	均值	0.802±0.036**	50.422±3.180**	4.787±0.315**	2.361±0.085**

注：3 组样品比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，每组内 3 批样品比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared among 3 groups of samples，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared 3 batches of samples in each group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

与 GSD 的结果差异均有统计学意义，说明 A 品牌雾化器的质量控制可能较差，但其中效果较差的 A1 雾化器雾化效果依然优于其余两种品牌雾化器。

3 讨论

本研究选用 3 种不同厂家生产的压缩式雾化器各进行 3 批次试验，结果表明不同品牌雾化器间差异较大，同一制剂使用不同品牌雾化器雾化后个别考察参数可能相差 3 倍以上；同时对于同一品牌的不同批次产品，也存在一定的批间差异。将本研究中递送速率、递送总量以及 APSD 测定结果综合进行分析发现，雾化器 A 对吸入用盐酸氨溴索溶液的综合雾化效果最佳。由于 APSD 测定时给药时间固定，导致测定结果受递送速率影响较大，雾化器 A 递送速率大于其余两种雾化器可能是导致其 FPD 大于其余两种雾化器的主要原因。此外，雾化装置只是影响吸入液体制剂雾化特性的因素之一，而溶液的理化性质、处方中添加的辅料、环境温湿度等均可能影响雾化特性 [12-13]，因此对于雾化器雾化效果的优劣评价不可一概而论。

由于吸入液体制剂在临床使用时必须与雾化装置结合使用，雾化器的类型、品牌与型号对吸入溶液的雾化特性影响较大。在吸入液体制剂仿制药微细粒子剂量一致性评价研究中，选用不同雾化器进行研究可能导致一致性判定结果出现偏差 [14-15]，因此应选择合适的雾化器进行试验。建议对不同品牌多批次雾化器进行对比研究后，选定批间差异较小、质量较稳定的雾化器进行后续研究。在确定雾化器的选择后，若在研究过程中变更试验所使用的雾化器，可能导致试验结果出现偏差，进而影响试验的结论。对于新药开发，在制剂研究时应根据不同雾化器的特点、药物的理化性质、药品适应证、患者的健康状况及手口协调操作能力等综合因素合理选择雾化装置以提高患者用药依从性 [16]。同时，也应将临床研究时所采用的雾化装置信息在最终的药品说明书中明确，以期为临床用药提供指导。

目前我国将雾化器作为医疗器械管理，在国家药品监督管理局网站医疗器械数据查询系统中可查询到各类雾化器境内注册信息 500 余条，市面上雾化器种类繁多，雾化效果参差不齐。由于雾化效果的差异也会导致临床应用效果的差异 [17]，为了加快吸入液体制剂的发展，保证临床用药效果，应尽快对各类雾化器的产品质量进行全方位的评估并制订严格的标准。

参考文献

[1] 魏宁漪，周颖，陈翠翠，等 . 盐酸氨溴索吸入溶液的空气动力学粒径分布测定 [J]. 中国新药杂志，2018，27（17）：1994-1998.

[2] 赵哲 . 用空气压缩式雾化器吸入沙丁胺醇和布地奈德治疗慢性阻塞性肺气肿 COPD 的效果 [J]. 智慧健康，2018，4（30）：78-79.

[3] 赵玉仙 . 慢性支气管炎采用盐酸氨溴索结合抗生素治疗的临床效果分析 [J]. 数理医药学杂志，2022，35（2）：248-250.

[4] Yang ZQ，Xiao XM，Huang YM，et al. Effects and mechanisms of ambroxol inhalation（Mucosolvan®）in the treatment of neonatal pneumonia [J]. Die Pharmazie，2017，72（10）：604-607.

[5] 陈楠，方圆，徐玲 . 盐酸氨溴索雾化吸入与静脉注射给药治疗慢性支气管炎急性发作的疗效与安全性研究 [J]. 中国药物警戒，2017，14（5）：262-265.

[6] 李翠，聂其霞，杜学航，等 . 不同压缩式雾化器对痰热清吸入溶液体外沉积性能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（13）：12-16.

[7] Sidler-Moix AL，Di Paolo ER，Dolci U，et al. Physico-

chemical aspects and efficiency of albuterol nebulization: comparison of three aerosol types in an in vitro pediatric model [J]. Respiratory Care，2015，60（1）：38-46.
[8] Ari A. Effect of nebulizer type，delivery interface，and flow rate on aerosol drug delivery to spontaneously breathing pediatric and infant lung models [J]. Pediatric Pulmonol，2019，54（11）：1735-1741.
[9] 王婷，魏焕莉，周晓雪，等 . 吸入用乙酰半胱氨酸溶液雾化特性的体外评价 [J]. 现代药物与临床，2020，35（12）：2317-2320.
[10] 周晓雪，王婷，魏焕莉，等 . 吸入用色甘酸钠溶液雾化特性的体外评价 [J]. 现代药物与临床，2021，36（3）：453-456.
[11] 中华医学会临床药学分会《雾化吸入疗法合理用药专家共识》编写组 . 雾化吸入疗法合理用药专家共识（2019 年版）[J]. 医药导报，2019，38：135-146.
[12] 杨亚如，尚悦，金方 . 影响吸入气雾剂递送剂量及吸入有效性的环境因素研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（20）：1696-1702.
[13] 王祯，魏宁漪，周颖，等 . 不同处方盐酸氨溴索吸入溶液雾化特性比较 [J]. 中国新药杂志，2020，29（13）：1535-1539.
[14] 李苗，冯光，黄慧芬 . 吸入用异丙托溴铵溶液的空气动力学粒径分布研究 [J]. 中国药师，2020，23（4）：655-670.
[15] 黄慧芬，李苗，肖梦琦，等 . 吸入用硫酸特布他林溶液的空气动力学粒径分布比较 [J]. 药物分析杂志，2020，40（6）：1039-1044.
[16] 刘冀衡，谢倩，黄丽，等 . 慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入剂用药依从性的研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（5）：1113-1117.
[17] 尚云海 . 压缩空气式雾化器在小儿肺炎临床治疗中的应用体会 [J]. 中国医疗器械信息，2021，27（19）：83-84.

（收稿日期：2022-08-05；修回日期：2022-10-02）

帕瑞昔布钠鼻用温敏凝胶的制备及其体外性质研究

黄晶[1, 2]，谷福根[1*]，吴春芝[1]（1. 内蒙古医科大学附属医院，呼和浩特 010050；2. 呼和浩特市第一医院，呼和浩特 010030）

摘要：目的 制备帕瑞昔布钠鼻用温敏凝胶（PS-TNG）并对其体外性质进行评价。**方法** 以胶凝温度为主要观察指标，采用星点设计 - 效应面法对 PS-TNG 处方进行优化，然后以离体羊鼻黏膜为模型，采用 Franz 透皮扩散池法筛选 PS 最佳促渗剂，最后制备 PS-TNG 并对其体外性质进行研究。分别测定该制剂的胶凝温度、胶凝时间、pH 值、体外溶蚀率、药物释放率以及药物释放度，并考察温度和转速对制剂黏度的影响以及制剂的膨胀系数和持水能力。**结果** PS-TNG 理想处方组成为：5.0%PS、20.88%F127、3.28%F68、0.28%HPMC、5.0%HP-β-CD、0.05% 尼泊金乙酯及适量水。测得 PS-TNG 的胶凝温度为 32.2 ℃，胶凝时间为 48.2 s，pH 值为 7.4；PS-TNG 体外累积溶蚀与药物累积释放量间具有良好的线性关系（r = 0.9997）；制剂释放度试验表明，PS-TNG 具明显缓释特征。此外，发现温度和搅拌对制剂的黏度均有明显影响，该制剂的持水能力强且膨胀系数小。**结论** PS-TNG 处方组成合理，制备工艺简单，其胶凝温度、胶凝时间、pH 值、膨胀系数和持水能力适宜，药物缓释作用明显，预计有良好的临床应用前景。

关键词：帕瑞昔布钠；鼻用温敏凝胶；星点设计 - 效应面法；吸收促渗剂；体外性质
中图分类号：R943，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2046-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.012

Preparation of parecoxib sodium thermosensitive nasal gel and its in vitro properties

HUANG Jing[1, 2], GU Fu-gen[1*], WU Chun-zhi[1] (1. *Affiliated Hospital*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010050; 2. *The First Hospital of Hohhot City*, *Hohhot* 010030)

作者简介：黄晶，女，硕士研究生，主要从事鼻黏膜给药新剂型研究，email：1498116033@qq. com *通信作者：谷福根，男，主任药师，硕士研究生导师，主要从事鼻黏膜给药新剂型研究，email：gfg1968@163. com

Abstract: Objective To prepare parecoxib sodium thermosensitive nasal gel (PS-TNG) and evaluate its in vitro properties. **Methods** The gelation temperature was used as the main evaluating index, and the formulation of PS-TNG was optimized by central composite design-response surface method. Meanwhile, the ideal nasal absorption enhancer for PS and its concentration were selected by the Franz diffusion cell method with the in vitro sheep nasal mucosa as the test model. Finally, PS-TNG was prepared and its main in vitro properties were determined. The gelation temperature, gelation time, pH, in vitro erosion and release of the drug thermo-sensitive nasal gel were investigated. The effect of temperature and stirring speed on the viscosity of PS-TNG, expansion coefficient and water-holding capacity was also investigated. **Results** The optimized formulation of PS-TNG consisted of 5.0% PS, 20.88% F127, 3.28% F68, 0.28% HPMC, 5.0% HP-*β*-CD, 0.05% ethylparaben and appropriate amount of purified water. The gelation temperature, gelation time and pH of PS-TNG were 32.2 ℃, 48.2 s and 7.4, respectively. There was a good linearity between the in vitro cumulative erosion of PS-TNG and its cumulative drug release (r = 0.9997). Additionally, the cumulative release of PS from the nasal gel showed obvious sustained release behavior. The temperature and stirring speed had obvious effect on the viscosity of the nasal gel. Meanwhile, PS-TNG showed low expansion coefficient and good water-holding capacity. **Conclusion** PS-TNG has good clinical application prospects due to its reasonable formulation composition, easy preparation, appropriate gelation temperature, gelation time, low expansion coefficient, good water-holding capacity and obvious in vitro sustained drug release characteristics.

Key words: parecoxib sodium; thermosensitive nasal gel; central composite design-response surface method; absorption enhancer; in vitro property

帕瑞昔布钠（parecoxib sodium，PS）是一种新型环氧合酶 -2（COX-2）选择性抑制剂，通过抑制体内前列腺素的合成而发挥镇痛作用[1]。具有使用剂量小、疗效显著、副作用少及安全性高等特点，在临床上广泛用于术后疼痛的治疗[2-3]。目前 PS 上市剂型为注射剂，属于侵入性用药，会造成一定疼痛和不适，且需要医护人员协助用药，故使用不便，依从性差，且生产成本高。鼻腔给药具有吸收起效快、使用方便、配制工艺简单、成本低等特点，作为某些镇痛药物注射剂的理想替代给药途径而受到国内外高度关注[4]。迄今为止，国外已有非甾体抗炎镇痛药酮咯酸氨丁三醇鼻喷剂、麻醉性镇痛药芬太尼鼻喷剂和酒石酸布托啡诺鼻喷剂获批上市，国内也有酒石酸布托啡诺鼻喷剂产品上市，这些鼻用制剂均具有起效迅速、疗效确切、使用方便等显著特点[5-7]。与滴鼻剂、鼻喷剂等传统鼻用制剂相比，鼻用温敏凝胶（TNG）是一种新型鼻腔给药制剂，它以溶液形式给药，在鼻腔生理条件下，可发生相转变而形成半固体状态，因而具有给药方便、剂量准确、吸收起效快、鼻腔滞留时间长、生物利用度高以及缓释长效等优点[8-10]。基于上述分析，本文制备了 PS-TNG，并对其体外性质进行评价，旨在为今后研制该药物的鼻腔给药新制剂提供重要参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；PHS-3C 型 pH 计（上海仪电科学仪器有限公司）；AB265-S 型电子分析天平（瑞士梅特勒·托利多公司）；TP-6 智能透皮试验仪（天津市鑫洲科技有限公司）；KQ5200E 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Arioso UP 900 型超纯水器（韩国 Human 公司）；DF-Ⅱ集热式磁力加热搅拌器（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司）；SY-6D 型片剂四用测定仪（上海黄海药检仪器有限公司）；NDJ-9S 数显黏度计（邦西仪器科技有限公司）；H1750R 离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）。

1.2 试药

PS 对照品（武汉华翔科洁生物技术有限公司，批号：190715，纯度：100.09%）；泊洛沙姆 407（F127）、泊洛沙姆 188（F68）（德国 BASF 公司）；羟丙基甲基纤维素（HPMC，安徽山河药用辅料股份有限公司）；羟丙基 -*β*- 环糊精（HP-*β*-CD，山东新大精细化工有限公司，纯度：99.0%）；磺丁基 -*β*- 环糊精（SBE-*β*-CD，山东新大生物科技有限公司，纯度：99.5%）；二甲基 -*β*- 环糊精

（DM-β-CD，山东滨洲智源生物科技有限公司，纯度：98.3%）；尼泊金乙酯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，纯度：99.0%）；乙腈、甲醇均为色谱纯；其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

2　方法

2.1　星点设计 - 效应面法试验[11-12]

以胶凝温度（T，℃）为观察指标，温敏凝胶处方中基质材料 F127（A，%，w/V），F68（B，%）及生物黏附剂 HPMC（C，%）的用量为影响因素，采用星点设计 - 效应面法优化空白温敏鼻用凝胶的处方组成。因素与水平设计见表 1。

表 1　因素与水平

Tab 1　Factor and level

水平	因素		
	A	B	C
－1.732	18	1	0.1
－1	18.81	1.81	0.18
0	20	3	0.3
1	21.19	4.19	0.42
1.732	22	5	0.5

2.2　PS 含量测定方法的建立

2.2.1　色谱条件[13]　Inert Sustain C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -0.01 mol • L^{-1} 磷酸氢二钠溶液（用磷酸调 pH 3.0）（65∶35）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：215 nm；柱温：室温；进样体积：20 μL。

2.2.2　标准曲线的制备及精密度考察　精密称取 PS 对照品 5.0 mg，加生理盐水溶解，配制质量浓度分别为 0.1、0.2、0.8、10.0、20.0、40.0、60.0 μg • mL^{-1} 的 PS 系列对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件，分别进样分析，记录色谱峰面积。以 PS 的峰面积（A）对其质量浓度（C）作线性回归，求得回归曲线方程。另分别配制质量浓度为 0.2、10.0、40.0 μg • mL^{-1} 的 PS 对照品溶液各 5 份，日内测定 5 次，连续测定 5 d，记录色谱峰面积，计算方法的日内与日间精密度。

2.3　促渗剂的选择

2.3.1　促渗剂种类的选择[14]　以 3 种 β-CD 水溶性常用衍生物包括 HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD 作为 PS 鼻黏膜吸收候选促渗剂，采用 Franz 扩散池法，对最佳促渗剂进行筛选。取新鲜离体羊鼻黏膜，剪成适宜大小，固定于扩散池接口处，生理盐水为接收液，供给池内加 0.1%PS 供试液 1 mL，试验温度为 34 ℃，转速为 300 r • min^{-1}，分别于 20、40、60、90、120、180 min 从接收池中取样 1 mL，并立即补充同温等体积生理盐水。样品经微孔滤膜过滤后，取续滤液，进样测定，求得样品中 PS 的浓度并计算药物累积渗透量（Q，μg • cm^{-2}）。以药物 Q 对时间（t）作线性回归，直线斜率即为药物稳态渗透速率（J_{ss}，μg • cm^{-2} • min^{-1}）；渗透系数（P，cm • min^{-1}）计算公式为：$P = J_{SS}/C_0$，式中，C_0 为供试液中药物初始浓度；增渗倍数（ER）= J_E/J_0，式中，J_E 与 J_0 分别为使用促渗剂与未使用促渗剂时药物的稳态渗透速率。

2.3.2　促渗剂浓度的选择　方法同“2.3.1”项下。考察浓度分别为 1.0%、3.0%、5.0%、7.0% 的 HP-β-CD 对 PS 经离体羊鼻黏膜的促渗作用。

2.4　PS-TNG 最优处方组成的确定

根据空白温敏鼻用凝胶处方优化试验及药物促渗剂筛选结果，结合药物临床使用剂量，确定 PS-TNG 的理想处方组成。

2.5　制剂体外性质的评价

2.5.1　胶凝温度、胶凝时间及 pH 值的测定　采用反转试管法[15]测定制剂的胶凝温度。另取 PS-TNG 2 mL，置于玻璃试管中，先将样品预热至室温 20 ℃，然后置于 32 ℃恒温水浴中，当凝胶由自由流动液体变为不可流动的半固体时所需时间即为胶凝时间[16]。最后，采用精密 pH 计测定制剂的 pH 值。

2.5.2　体外溶蚀及药物释放率的测定　采用无膜溶出法[17]，考察 PS-TNG 体外溶蚀以及药物释放情况。以制剂的累积溶蚀率（Q）为纵坐标，时间（t）为横坐标，绘制 PS-TNG 的溶蚀曲线。在测定制剂溶蚀率的同时，取各时间点倾出的释放介质样品，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，求得样品中 PS 的浓度并计算药物累积释放率（R）。以 R 为纵坐标，时间（t）为横坐标，绘制 PS-TNG 的累积释药曲线。

2.5.3　体外释放度的测定　按照《中国药典》2020 年版四部中“溶出度与释放度测定法”项下第二法（桨法）进行试验。取 PS-TNG 或 2.5%PS 溶液适量，装于透析袋中，以 pH 6.4 PBS 缓冲液为释放介质，体积为 500 mL，温度为（34±0.5）℃，转速为 100 r • min^{-1}，分别于第 5、15、30、60、120、180、240、360、480、600 min 取样 1 mL，立即补加等体积同温释放介质。样品以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，进行测定，计算药物的累积释放百分率（Q）。

2.5.4　黏度影响因素的考察　取 PS-TNG 适量，置于烧杯中，于水浴中缓慢加热，使温度逐渐升高，采用数显黏度计测定不同温度下制剂的黏度，以黏度（η，mPa • s）为纵坐标，温度为横坐标，绘制制剂黏度随温度变化的曲线。此外，将已发生相转变，形成半固体凝胶的制剂样品，于

32 ℃恒温条件下，通过改变黏度计转子的转速，测定不同转速下，制剂黏度的变化。

2.5.5　膨胀系数测定[18]　精密取 PS-TNG 1 mL 于刻度试管中，在 25 ℃下其体积记为 V_0，然后将试管置于 32 ℃水浴中，使制剂完全胶凝，此时凝胶剂的体积记为 V_1，膨胀系数 S 根据公式：S（%）=（V_1 − V_0）/V_0×100%，进行计算。

2.5.6　持水能力考察　持水能力也是鼻用凝胶的重要质量性质，可用来评价制剂在储藏时或在受外力情况下保持水的能力。本文采用离心失水法[19]对制剂的持水能力进行考察。取 PS-TNG 1 mL 置于预先称重的离心管中（W_0），记录初始总重量（W_1），将离心管置于 32 ℃下使样品完全胶凝，以 12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，将凝胶中渗出的水用滤纸小心吸弃，并称取离心管的总重量（W）。凝胶的持水性能根据公式：持水率（%）=（W − W_0）/（W_1 − W_0）×100%，进行计算。

3　结果

3.1　空白温敏鼻用凝胶处方的优化

星点设计 - 效应面法因素与水平组合及试验结果见表 2。采用 Design-Expert 10.0.7 软件，以胶凝温度（T）为因变量，处方中 F127（A）、F68（B）、HPMC（C）的用量为自变量，将表 2 中数据进行二次多项式回归拟合，以方程的拟合优度（R^2）和置信度（P）来评价拟合效果。结果拟合方程为：$T = 33.43 - 4.20A + 4.05B - 0.74C - 0.29AB - 0.31AC - 0.087BC - 0.073A^2 - 1.36B^2 - 0.28C^2$（$R^2 = 0.9820$，$P < 0.0001$）。由 R^2 和 P 值可见，上述数学模型具有高度显著性，拟合效果良好，可用于温敏凝胶的胶凝温度预测。由拟合方程系数大小可知，对温敏凝胶胶凝温度影响的大小顺序为：F127 > F68 > HPMC。胶凝温度三维效应面图见图 1。可见，当 F68 以及 HPMC 浓度一定时，胶凝温度随着 F127 浓度的增大而降低，当 F127 以及 HPMC 浓度一定时，胶凝温度随着 F68 浓度的增大而增大；当 F127 以及 F68 浓度一定时，胶凝温度随着 HPMC 浓度的增大而降低，但相较于 F127 及 F68，后者的影响程度较小。根据人鼻腔的生理温度范围，设定该鼻用温敏凝胶的目标胶凝温度为 32 ℃，可得空白温敏鼻用凝胶处方的最优组成为：20.88%F127，3.28%F68，0.28%HPMC 及水。根据该处方组成所制备 3 批空白温敏鼻用凝胶，测得其胶凝温度为（32.15±0.08）℃，与预测值（32.0 ℃）相比，偏差仅为 0.47%，表明上述数学模型准确度高，预测性良好。

表 2　星点设计及试验结果

Tab 2　Response surface design and results

试验号	A	B	C	T/℃
1	21.19	4.19	0.18	32.7
2	18	3	0.3	41.5
3	21.19	4.19	0.42	30.6
4	21.19	1.81	0.18	23.9
5	20	3	0.1	34.8
6	18.81	4.19	0.42	39.8
7	20	5	0.3	35.8
8	18.81	0.18	0.42	30.2
9	20	1	0.3	24.4
10	22	3	0.3	26.0
11	18.81	0.81	0.18	30.7
12	20	3	0.5	31.5
13	18.81	4.19	0.18	40.3
14	21.19	1.81	0.42	22.5
15 ～ 20	20	3	0.3	33.4

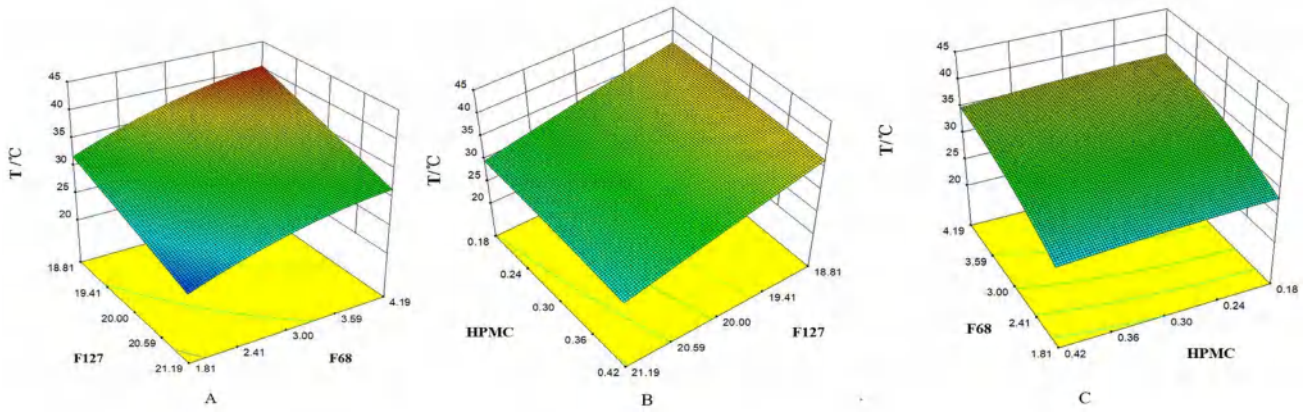

图 1　胶凝温度三维效应面图

Fig 1　3D response surface of gelation temperature

3.2　PS 含量测定方法的建立

以 PS 的峰面积（A）对其浓度（C）作线性回归，求得方程为：$A = 6.751\times10^4C - 1.495\times10^4$（$r = 0.9999$），表明 PS 在 0.1 ～ 60.0 μg • mL^{-1} 内与其峰面积呈良好线性关系。该方法的日内 *RSD* 在 0.10% ～ 0.46%，日间 *RSD* 在 0.47% ～ 0.73%（$n = 5$），表明该方法的精密度良好。

3.3　促渗剂的选择

不同促渗剂对 PS 经羊鼻黏膜渗透作用的影响实验结果见表 3。可见，3 种促渗剂对药物经鼻黏膜吸收均有明显促进作用，其中以 HP-β-CD 的促渗效果最好。而不同浓度 HP-β-CD 对 PS 经羊鼻黏膜渗透作用的影响结果见表 4。可见，当 HP-β-CD 浓度较低时，随着其浓度的增加，促渗作用随之增加，当浓度为 5.0% 时，其促渗效果达最大，当 HP-β-CD 浓度增加到 7.0% 时，反而表现为抑制药物的渗透。因此，选择 5.0% 的 HP-β-CD 作为 PS 鼻用温敏凝胶的促渗剂。

表 3　促渗剂种类对 PS 经羊鼻黏膜渗透吸收的影响 (n = 3)

Tab 3　Effect of different penetration enhancers on the permeation of PS through sheep nasal mucosa (n = 3)

促渗剂	Q/（μg·cm^{-2}）	J_{ss}/（μg·cm^{-2}·min^{-1}）	P/（×10^3 cm·min^{-1}）	ER
HP-β-CD	84.71±0.16	0.4921	0.49	2.30
SBE-β-CD	67.32±3.39	0.3971	0.40	1.85
DM-β-CD	52.03±2.11	0.2978	0.30	1.39
空白	38.44±3.98	0.2144	0.21	1.00

表 4　HP-β-CD 浓度对 PS 经羊鼻黏膜渗透吸收的影响 (n = 3)

Tab 4　Effect of HP-β-CD concentration on the permeation of PS through sheep nasal mucosa (n = 3)

HP-β-CD 浓度 /%	Q/（μg·cm^{-2}）	J_{ss}/（μg·cm^{-2}·min^{-1}）	P/（×10^3 cm·min^{-1}）	ER
1	51.80±2.61	0.3048	0.30	1.42
3	68.67±2.84	0.4039	0.40	1.88
5	84.71±0.16	0.4921	0.49	2.30
7	20.70±1.77	0.1137	0.11	0.53
空白	38.44±3.98	0.2144	0.21	1.00

3.4　最优处方组成及制备工艺确定

根据空白温敏凝胶处方优化及药物促渗剂筛选结果，结合药物临床使用剂量，确定 PS-TNG 的理想处方组成为：5.0%PS、20.88%F127、3.28%F68、0.28%HPMC、5.0%HP-β-CD、0.05% 尼泊金乙酯及适量水。制备过程为：称取处方量 HP-β-CD，置于适量水中使其溶解，然后依次加入 PS 以及尼泊金乙酯，超声使完全溶解，之后依次加入 F127、F68 及 HPMC，均匀分散于液面上，于 4 ℃冰箱中放置 24 h，使凝胶材料充分溶胀，形成澄明溶液，最后加水至全量，搅匀即得。同法制备 3 批 PS-TNG，用于其体外性质评价。

3.5　制剂体外性质的评价

3.5.1　凝胶温度、胶凝时间及 pH 值　测得 PS-TNG 的胶凝温度为 32.2 ℃，与空白温敏凝胶的胶凝温度接近。另外，测得 PS-TNG 的胶凝时间仅为 48.2 s，pH 值为 7.4。

3.5.2　体外溶蚀与药物释放率　PS-TNG 的累积溶蚀与累积释药曲线见图 2。可见，PS-TNG 的 Q 与 t 呈良好线性关系（Q = 1.233t − 1.010，r = 0.9989），符合零级动力学过程。此外，该制剂的 R 与 t 同样呈良好线性关系（R = 1.098t − 2.420，r = 0.9991），同样符合零级动力学过程。研究还发现该制剂药物释放率要慢于其溶蚀率，但制剂累积释药率与累积溶蚀率两者间存在明显线性相关（r = 0.9997）。

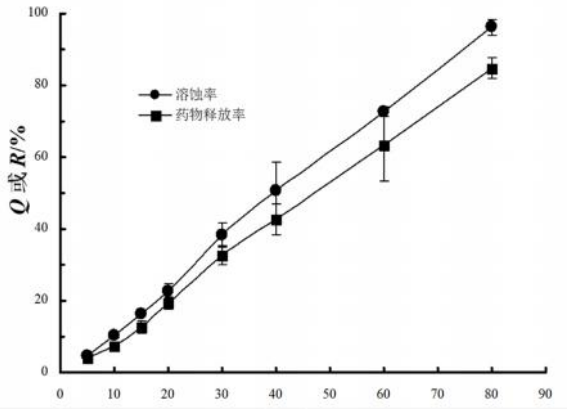

图 2　PS-TNG 累积溶蚀与累积释药曲线（$\bar{x}$±s，n = 3）

Fig 2　Cumulative erosion and drug release profiles of PS-TNG（$\bar{x}$±s，n = 3）

3.5.3　体外释放度　PS-TNG 的体外释放研究结果见图 3。可见，PS 溶液释药速度较快，3 h 累积释药约 80.0%，6 h 累积释药约 90.0%，而 PS-TNG 的释药比较缓慢，在 3 h 时累积释药 50.0%，10 h 累积释药为 90.0%，表明 PS-TNG 具有良好缓释效果。同时，将释药数据进行动力学方程拟合，结果可见，拟合较优的是一级动力学方程 [ln（100 − Q）= − 0.0043t + 4.624，r = 0.9975] 和 Riger-Peppas 方程（ln$Q$ = 0.6736ln$t$ + 0.3381，r = 0.9955）。

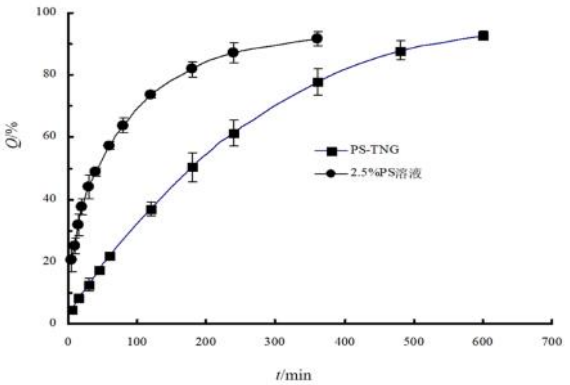

图 3　PS-TNG 与 PS 溶液的体外释放曲线（$\bar{x}$±s，n = 3）

Fig 3　Cumulative drug release profiles of PS-TNG and its solution（$\bar{x}$±s，n = 3）

3.5.4　黏度影响因素的考察　温度对制剂黏度影响的实验结果见图 4。可见，当温度低于 25 ℃时，温敏凝胶的黏度很低，随着温度不断上升，当接近 30 ℃时，样品的黏度急剧增加，并开始发生相转变，变成黏稠半固体凝胶形式。温度进一步升

高，其黏度仍在增大。搅拌速度对制剂黏度影响的结果见图 5。可见，在 32 ℃恒温条件下，随着转速的增加，制剂黏度在逐渐下降。

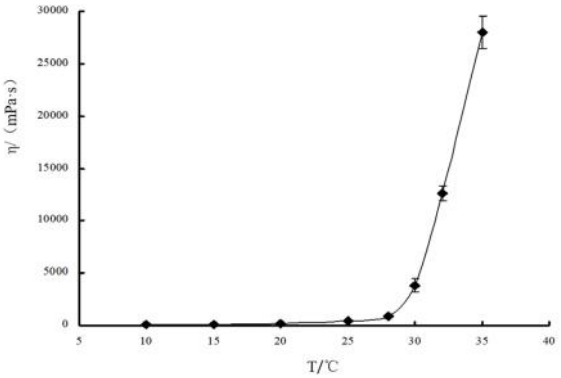

图 4　温度对 PS-TNG 黏度的影响（$\bar{x}$±s，n = 3）

Fig 4　Effect of temperature on viscosity of PS-TNG（$\bar{x}$±s，n = 3）

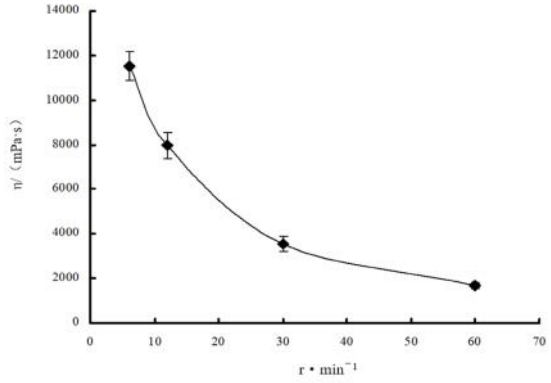

图 5　搅拌速度对 PS-TNG 黏度的影响（$\bar{x}$±s，n = 3）

Fig 5　Effect of agitation speed on viscosity of PS-TNG（$\bar{x}$±s，n = 3）

3.5.5　膨胀系数与持水能力　测得该制剂的膨胀系数为（2.78±0.58）%（n = 3），其持水率为（97.81±0.21）%（n = 3），表明该制剂进入鼻腔形成凝胶后，其体积变化很小，且持水能力良好。

4　讨论

在制剂处方优化研究中，本文选用了毒性小、安全性高且在温敏凝胶制剂研究中最常用辅料 F127 及 F68 作为 PS-TNG 的基质材料，此外，为了进一步延长制剂在鼻黏膜的滞留时间，以提高药物生物利用度并延长药效，在该鼻用凝胶处方中还添加了生物黏附剂 HPMC，后者性质稳定，对黏膜无毒性和刺激性，不仅可增加制剂的黏度，还可通过吸附作用附着于鼻黏膜表面，增加制剂的黏附强度，从而发挥生物黏附剂的作用[20-21]。星点设计 - 效应面法是近年来制剂处方优化中广泛使用的实验设计方法，具有试验次数少、简单直观、精度高和预测性好的优点[22]。文中以 F127、F68 及 HPMC 为自变量，以温敏凝胶的胶凝温度为因变量，采用星点设计 - 效应面试验设计方法，成功得到胶凝温度符合鼻用温敏凝胶制剂要求的优化处方，其胶凝温度实测值与预测值的偏差＜ 1.0%，再次证实了该实验设计方法的可靠性和良好预测性，为下一步确定 PS-TNG 处方组成奠定了基础。

PS 水溶性好，极性大、脂溶性小，为改善其经鼻黏膜吸收，在其鼻用温敏凝胶处方中加入吸收促进剂。以离体羊鼻黏膜为模型，研究比较 HP-β-CD、DM-β-CD、SBE-β-CD 对 PS 促渗能力的差异，结果表明，3 种促渗剂均可促进该药物的经鼻黏膜吸收，其中以 HP-β-CD 的促渗效果最好，且其最佳使用浓度为 5.0%，当其浓度增大到 7.0% 时甚至表现出抑制吸收作用，这与文献报道相似[23-24]，表明 β-CD 衍生物的促渗效果并非与其浓度成简单的正比关系，具体机制尚不明确。此外，考虑到 PS-TNG 为多剂量制剂，为增加制剂的稳定性，防止被微生物污染，在处方中还添加了在微酸性及中性 pH 条件下具有良好抑菌作用的尼泊金乙酯作为制剂的防腐剂。根据课题组前期研究结果可知，在近中性 pH 条件下，PS 的溶解度高，溶液化学稳定性好，同时也具有适宜的油水分配系数，测得制剂的 pH 为 7.4，略高于鼻腔分泌液的 pH 值范围，与人血浆 pH 值相同，从理论上讲，此 pH 值不会对鼻黏膜产生刺激性，因此，在该鼻用凝胶制备过程中没有对其 pH 进行调节。

胶凝温度与胶凝时间测定结果表明，制剂的胶凝温度为 32.2 ℃，胶凝时间为 48.2 s，与空白凝胶优化处方基本相同，表明 PS、促渗剂及防腐剂的加入对制剂的胶凝温度和胶凝时间的影响很小。由体外溶蚀及体外药物释放研究结果可见，两者均与时间呈线性相关，且凝胶溶蚀与药物释放之间也呈良好的线性关系，但药物释放速度略慢于凝胶的溶蚀，表明溶蚀过程是药物释放的限速步骤，溶蚀越快，药物的释放也越快。制剂体外释放度结果可见，药物释放初期中未见突释现象，提示制剂的胶凝过程迅速，这可能与制剂胶凝时间很短有关；此外，与药物水溶液相比，制剂中药物的释放较缓慢而持久，表明该制剂具有明显缓释特性。药物释放动力学拟合结果可见，采用一级动力学方程与 Riger-Peppas 方程拟合较优，提示，PS 从制剂中的释放是凝胶溶蚀与药物扩散协同作用的结果[25]。制剂黏度研究可见，温度对该凝胶的黏度有非常大的影响，在室温下 25 ℃以下时，其黏度很低，故给药方便，剂量准确；当温度超过 25 ℃，尤其在 30 ℃以上时，制剂的黏度骤然升高，这一现象再次证实该制剂的

确属于温度敏感型鼻用凝胶。另外，胶凝后制剂的黏度随着转速增加而逐渐减小，提示该制剂具有剪切稀化的现象，这与大部分非牛顿流体的流动特性一致。鼻用温敏凝胶在经历溶胶 - 凝胶相转变后其体积可能会变大，结果可能会阻塞鼻腔或引起不适。膨胀系数与持水能力研究表明，该制剂进入鼻腔后其体积增加＜ 3%，表明制剂没有明显体积膨胀现象发生。该制剂的持水率接近 98.0%，表明其具有良好持水能力，其机制可能是，水分子通过氢键作用与三维凝胶网状结构中 F127、F68 分子链上的亲水嵌段牢固结合，且处方中 HPMC、HP-β-CD 也均可与水形成氢键，这些因素均有利于处方中水分的保持。

综上所述，本文所制备 PS-TNG 处方组成合理、制备工艺简单、使用方便，也具有一定缓释效果，这可为今后进一步研究该制剂的体内药动学及生物利用度奠定坚实基础。

参考文献

[1] Ferrer MD，Busquets-Cortés C，Capóx，et al. Cycloxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Curr Med Chem，2019，26（18）：3225-3241.

[2] 仇晓娟，陈锴，胡彬，等 . 帕瑞昔布钠在术后镇痛中应用的研究进展 [J]. 现代生物医学进展，2018，18（2）：385-388，396.

[3] 胡曦丹，王卓 . 选择性环氧合酶 -2（COX-2）非甾体抗炎药的安全性与有效性 [J]. 药学服务与研究，2016，16（2）：81-85.

[4] 吕莹，张栋，张超，等 . 鼻腔给药研究进展 [J]. 天津中医药，2014，31（12）：766-768.

[5] Chernii VI，Kuhler SY. New features of postoperative analgesia [J]. Trauma，2016，17（2）：29-35.

[6] Pardo J，Mena A，Jiménez E，et al. Effectiveness of fentanyl pectin nasal citrate in controlling episodes of breakthrough cancer pain triggered by routine radiotherapy procedures [J]. Clin Transl Oncol，2019，21（11）：1568-1572.

[7] 赵雩卿，李方，赵赟博，等 . 酒石酸布托啡诺鼻喷剂治疗 252 例癌痛患者临床疗效观察 [J]. 中国肿瘤临床，2009，36（9）：497-499.

[8] Wang Q，Zuo Z，Cheung CKC，et al. Updates on thermosensitive hydrogel for nasal，ocular and cutaneous delivery [J]. Int J Pharm，2019，559：86-101.

[9] 黄星雨，袁佳敏，杨琼梁，等 . 鼻用原位凝胶剂的研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（3）：448-453.

[10] 宋亚，祁小乐，沙康，等 . 温度敏感型原位凝胶药物递送系统的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2019，46（4）：245-255.

[11] Rençber S，Karavana SY，Şenyiğit ZA，et al. Mucoadhesive in situ gel formulation for vaginal delivery of clotrimazole：formulation，preparation，and in vitro/in vivo evaluation [J]. Pharm Dev Technol，2017，22（4）：551-561.

[12] Shelke S，Shahi S，Jalapure S，et al. Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes：formulation，optimization，evaluation and permeation studies [J]. J Liposome Res，2016，26（4）：313-323.

[13] 聂忠莉，郭兆元，萧茂玲，等 . HPLC 法测定帕瑞昔布钠中有关物质的方法研究 [J]. 中国测试，2015，41（12）：54-58.

[14] Xia YJ，Li L，Huang XW，et al. Performance and toxicity of different absorption enhancers used in the preparation of poloxamer thermosensitive in situ gels for ketamine nasal administration [J]. Drug Dev Ind Pharm，2020，46（5）：697-705.

[15] Qian S，Wong YC，Zuo Z. Development，characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine [J]. Int J Pharm，2014，468：272-282.

[16] 王军，何文 . 苯甲酸利扎曲普坦鼻用温度 - 离子敏感型原位凝胶的体外溶蚀特性及安全性评价 [J]. 中国药师，2019，22（7）：1338-1340.

[17] 张春燕，赵迎春，范义凤 . 诺氟沙星阴道用温度敏感原位凝胶的制备及体外释放度研究 [J]. 中国药师，2017，20（11）：1983-1986.

[18] Hao JF，Zhao J，Zhang SP，et al. Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2016，147：376-386.

[19] 李新方，王骐榕，陈敏，等 . 薄荷脑鼻用原位凝胶流变与凝胶特性研究 [J]. 海军医学杂志，2018，39（3）：214-218.

[20] Hu Y，Zhang SW，Han DD，et al. Construction and evaluation of the hydroxypropyl methyl cellulose-sodium alginate composite hydrogel system for sustained drug release [J]. J Polym Res，2018，25（7）：1-12.

[21] Zakia NM，Awad GA，Mortada ND，et al. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties [J]. Eur J Pharm Sci，2007，32：296-307.

[22] 刘新国，舒翔 . 星点设计 - 效应面法优选磷酸川芎嗪鼻用原位凝胶基质处方的研究 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（21）：2168-2171，2197.

[23] 樊慧敏，丛志新，谷福根 . 盐酸多奈哌齐鼻用温敏原位凝胶的制备及其体外性质评价 [J]. 中南药学，2018，16（9）：1194-1199.

[24] 刘晓雷，张莉，刘志东，等 . β- 环糊精对丹酚酸 B 肠黏膜透过性的促进作用研究 [J]. 天津中医药，2016，33（1）：47-52.

[25] Gu FG，Fan HM，Cong ZX，et al. Preparation，characterization，and in vivo pharmacokinetics of thermosensitive in situ nasal gel of donepezil hydrochloride [J]. Acta Pharm，2020，70（3）：411-422.

（收稿日期：2022-12-23；修回日期：2023-03-17）

阿里红总三萜酸的制备及其抗哮喘作用研究

许福春[1]，杜茂波[2*]（1. 国药控股星鲨制药（厦门）有限公司，福建　厦门　361028；2. 中国中医科学院中药研究所，北京　100700）

摘要：目的　以总三萜酸和 3 个三萜酸单体作为指标优化阿里红总三萜酸的制备工艺，并对总三萜酸的抗哮喘作用进行研究。**方法**　以总三萜酸含量和转移率为指标，采用 Hunter 和星点设计 - 响应面法优化阿里红总三萜酸的大孔树脂富集纯化工艺，确定关键工艺参数，并以 3 个三萜酸成分含量对制备工艺进行验证。最后采用氯化乙酰胆碱和磷酸组织胺致喘豚鼠的动物模型，评估阿里红总三萜酸对哮喘豚鼠引喘潜伏期和血清中血栓素 B_2（TXB_2）和白三烯 B_4（LTB_4）含量的影响。**结果**　最优工艺为：乙醇除杂浓度 30.0%（23.0% ～ 35.7%），乙醇解析浓度 83.0%（72.0% ～ 97.2%）和乙醇解析用量 7.5 倍（5 ～ 10 倍）；3 批总三萜酸中齿孔酸含量依次为 7.91%、6.56%、8.91%，去氢齿孔酸含量依次为 4.95%、4.56%、6.02%，去氢硫色多孔菌酸含量依次为 11.2%、11.0%、12.8%；与模型组相比，阿里红总三萜酸低、中和高剂量组均能显著延长哮喘豚鼠引喘潜伏期，中和高剂量组均可显著降低哮喘豚鼠血清中 TXB_2 和 LTB_4 含量。**结论**　所建立的 HPLC 分析方法可准确测定阿里红总三萜酸中 3 个三萜酸的含量，优化的 D101 型大孔树脂富集纯化阿里红总三萜酸的工艺稳定可行，所得总三萜酸具有较好的抗哮喘活性。

关键词：阿里红总三萜酸；星点设计 - 响应面法；设计空间；含量测定；抗哮喘作用
中图分类号：R284.1，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2053-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.013

Preparation of total triterpene acid and its anti-asthma effect

XU Fu-chun[1], DU Mao-bo[2*] (1. *Sinopharm Xingsha Pharmaceuticals* (*Xiamen*) *Co*., *Ltd*., *Xiamen Fujian* 361028; 2. *Institute of Chinese Materia Medica*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700)

Abstract: Objective　To optimize the process parameters of total triterpene acid enrichment from *Fomes officinalis* Ames based on total triterpene acid and three triterpenoids, and to determine its anti-asthma effect. **Methods**　Total triterpene acid content and transfer rate were used as indexes. Hunter and the central composite design response surface method were combined to optimize the process of total triterpene acid enrichment. The optimum values and acceptable ranges of the key process parameters were determined. The content of three triterpenoids was used to verify the preparation process. The asthma model of guinea pigs was established by acetylcholine chloride and histamine phosphate, which was used to assess the effect of total triterpene acid on the incubation period of asthma, and the amount of TXB_2 and LTB_4 in the blood serum. **Results**　The optimum values and acceptable ranges of the three key parameters were: ethanol fraction for impurity removal 30.0% (23.0% ～ 35.7%), ethanol fraction for elution 83.0% (72.0% ～ 97.2%) and ethanol amount for elution 7.5 fold (5 ～ 10 fold). Three batches of samples were analyzed, with the contents of eburicoic acid 7.91%, 6.56%, and 8.91%, that of dehydroeburicoic acid 4.95%, 4.56%, 6.02%, and that of dehydrosulphurenic acid 11.2%, 11.0%, and 12.8%. The total triterpene acid significant prolonged the incubation period of asthmatic guinea pigs in the three dose groups, and reduced TXB_2 and LTB_4 levels in the blood serum in the middle and high dose groups. **Conclusion**　HPLC is suitable for

作者简介：许福春，男，高级工程师，主要从事药物、功能食品的研究与开发，email：2665184251@qq.com　*通信作者：杜茂波，男，副研究员，主要从事中药活性与物质基础研究，email：3599282805@qq.com

the simultaneous determination of three triterpenoids. The developed enrichment method for total triterpene acid from *Fomes officinalis* Ames using D101 macroporous resin is stable and feasible. The obtained total triterpene acids have good bioactivity and anti-asthma effect.

Key words: total triterpene acid from *Fomes officinalis* Ames; central composite design response surface; design space; content determination; anti-asthma effect

阿里红主产于新疆，是新疆维吾尔族医生主要应用的民族药之一[1]，据《新疆中草药手册》记载，阿里红能够用于治疗咳嗽哮喘、慢性风湿性关节炎和慢性气管炎等多种病症。阿里红中主要化学成分为三萜酸类、倍半萜类、多糖类、脂肪酸类等[1-3]，羊毛甾烷型三萜酸是其含量最高的成分，也是主要的药理活性成分[2, 4]。三萜酸成分具有多种生物活性，如增强免疫力和抗衰老等[1]。最新研究发现阿里红齿孔酸具有良好的抗炎[5]和降尿酸作用等[6]。尽管阿里红在传统用药中可以治疗咳嗽哮喘，但目前尚未见报道关于阿里红总三萜酸治疗哮喘活性与机制研究的论文。因此，对阿里红总三萜酸抗哮喘作用与机制进行评估，对药效物质基础进行鉴定非常有必要。

目前少有研究聚焦于优化阿里红总三萜酸的提取工艺[7-9]，且这些方法也只能将总三萜酸含量提高至20%左右。而关于阿里红中三萜酸成分的含量测定也仅限于两篇研究[4, 10]，同时测定多个三萜酸成分也未见文献报道。本实验以阿里红总三萜酸为研究对象，建立3个三萜酸单体和总三萜酸的定量分析方法；应用Hunter和星点设计-响应面法（中心复合设计，central composite design，CCD）确定总三萜酸大孔树脂富集纯化的工艺参数和制备路线；最后探索阿里红总三萜酸对致喘豚鼠的抗哮喘作用与机制。

1 材料

UV-2501PC型紫外分光光度计、LC-16型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；BSA124S型（精度：0.1 mg）、CPA225D型（精度：0.01 mg）电子分析天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；Multiskan FC酶标仪（Thermo公司）；DZ-2BC真空干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）；SB-5200DT型超声波清洗仪器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；HH-S4A恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；N-1300型（5L）和N4000W（20L）旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）；402AI超声雾化器（上海鱼跃医疗设备有限公司）。豚鼠60只，雌雄各半，150～200 g[科宇实验动物养殖中心提供，合格证号：SCXK（京）2015-0003]。药材经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所研究员余霖老师鉴定为多孔菌科真菌药用层孔菌*Fomes officinalis* Ames的干燥菌体，产地新疆，批号：20151026）；阿里红总三萜酸（批号：ALH1001，ALH1002，ALH1003，自制）；齿孔酸对照品（纯度：99.7%，批号：161220，成都普菲德对照品科技有限公司）；去氢齿孔酸对照品（纯度：99.7%，自制）；去氢硫色多孔菌酸对照品（纯度：98.6%，自制）；ZTC-1、AB-8、D1400、DM-301、NKA-9和D101大孔吸附树脂（陕西蓝深科技有限公司）；LSA-10和LX-3020大孔吸附树脂（西安蓝晓科技新材料股份有限公司）；甲醇、乙腈为色谱纯（赛默飞世尔科技有限公司）；血栓素B_2（TXB_2）试剂盒和白三烯B_4（LTB_4）试剂盒（美国RD公司，批号：201606）；磷酸组织胺（国药集团化学试剂有限公司，批号：20140212）；氯化乙酰胆碱（批号：20150219）、氨基甲酸乙酯（批号:20161101）(北京化学试剂公司)；磷酸、冰醋酸、香草醛为分析纯（北京化工集团股份有限公司）。本研究中实验设计和数据统计分析均由JMP 11.0.0平台实现（SAS Institute Inc.）。

2 方法与结果

2.1 阿里红总三萜酸测定

2.1.1 对照品储备液 精密称取齿孔酸对照品5.12 mg，用甲醇溶解并定容于10 mL量瓶中，摇匀，即得0.512 mg·mL^{-1}的对照品溶液，备用。

2.1.2 标准曲线制备 精密取上述齿孔酸对照品溶液0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80 mL置10 mL具塞试管中，水浴蒸干，分别依次加入5%香草醛-冰醋酸0.40 mL，高氯酸0.80 mL，摇匀，于60 ℃水浴中加热20 min，置水浴中冷却5 min，加冰醋酸10.0 mL，摇匀，放置冷却至室温后，照紫外可见分光光度法，在553 nm处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标（Y），质量为横坐标（X），得标准曲线方程$Y = 2.857X - 0.0994$，$r = 0.9997$，表明齿孔酸在0.0512～0.410 mg质量内与吸光度值线性关系良好。

2.1.3 样品测定 称取干燥后的阿里红总三萜酸约0.2 g，精密称定，加入30 mL甲醇超声（250 W，33 kHz）5 min使溶解，再用甲醇定容至10 mL（低含量样品）和50 mL（高含量样品）量瓶中，0.45

μm 滤膜过滤，精密量取续滤液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，即得供试品溶液。取供试品溶液 0.40 mL，从“置 10 mL 具塞试管中”按照“2.1.2”项下方法操作，计算样品中总三萜酸含量，根据药材提取液中含量计算总三萜酸的转移率。

2.2　HPLC 测定阿里红总三萜酸中 3 个三萜酸的含量

2.2.1　色谱条件　色谱柱为 RP-C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为 0.4% 磷酸溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0 ～ 70 min，50% ～ 90%B；70 ～ 75 min，90% ～ 95%B；波长 210 nm，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃。

2.2.2　溶液的制备　① 对照品溶液：精密称取 3 个三萜酸对照品（去氢齿孔酸和去氢硫色多孔菌酸对照品纯度采用“2.2.1”项下色谱条件应用峰面积归一化法计算所得）各约 25 mg，加入甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中，摇匀，即得质量浓度约为 1.0 mg • mL^{-1} 的对照品储备液，备用。② 供试品溶液：称取干燥后的阿里红总三萜酸约 0.1 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入约 20 mL 甲醇超声 5 min（250 W，33 kHz）使溶解，再用甲醇定容至刻度，0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液，即得供试品溶液。计算样品中齿孔酸、去氢齿孔酸和去氢硫色多孔菌酸的含量。

2.2.3　线性关系考察　分别精密量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 5.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇定容至刻度，摇匀。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），绘制标准曲线，结果见表 1。在线性范围内 3 个化合物质量浓度和峰面积的线性关系良好，高效液相色谱图见图 1。

表 1　三萜酸线性关系

Tab 1　Linearity of triterpene acids

化合物	回归方程	r	范围 /（mg • mL^{-1}）
齿孔酸	$Y = 3.867\times10^{6}X + 1.018\times10^{5}$	0.9997	0.0499 ～ 0.499
去氢齿孔酸	$Y = 7.156\times10^{6}X - 3.046\times10^{2}$	0.9998	0.0497 ～ 0.497
去氢硫色多孔菌酸	$Y = 9.158\times10^{6}X + 9.67\times10^{3}$	0.9999	0.0493 ～ 0.493

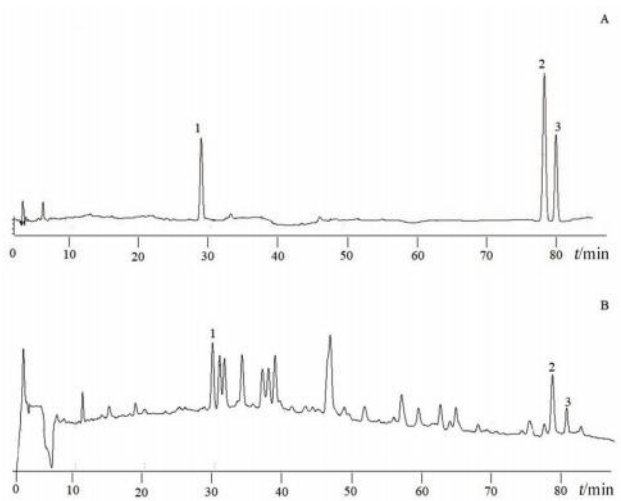

图 1　阿里红总三萜酸含量测定的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of total triterpene acid

A. 对照品（reference substances）；B. 供试品（sample）；1. 去氢硫色多孔菌酸（dehydrosulphurenic acid）；2. 齿孔酸（eburicoic acid）；3. 去氢齿孔酸（dehydroeburicoic acid）

2.2.4　方法学验证　考察发现，齿孔酸、去氢齿孔酸和去氢硫色多孔菌酸日内和日间精密度 *RSD* 分别为 1.0% 和 0.94%，0.50% 和 0.68%，0.35% 和 0.44%。24 h 内峰面积 *RSD* 分别为 0.49%、0.76% 和 0.26%。重复性得齿孔酸、去氢齿孔酸和去氢硫色多孔菌酸的含量分别为 7.8%、4.9% 和 11.8%，含量 *RSD* 分别为 0.52%、0.47% 和 1.1%。齿孔酸、去氢齿孔酸、去氢硫色多孔菌酸的高、中、低浓度平均回收率均在 94.8% ～ 110.1%，*RSD* 均在 1.4% ～ 6.4%。方法学验证表明，所建分析方法符合 3 个三萜酸含量测定要求。

2.3　大孔树脂富集纯化阿里红总三萜酸

2.3.1　大孔吸附树脂选择　取 8 种预处理后的树　脂（ZTC-1、AB-8、D101、D1400、NKA-9、DM-301、LSA-10、LX-3020）加入上样液，静态吸附，计算吸附率和解析率。结果表明，ZTC-1、AB-8 和 D101 树脂对阿里红总三萜酸的吸附率与解析率均较大，可选择用于后续研究。

2.3.2　大孔树脂上样液制备　20 倍量 80% 乙醇加热回流提取 3 次，每次 2 h。提取液回收乙醇，水分散，制成质量浓度为 0.1 ～ 0.3 g（生药）• mL^{-1} 的药液，滤过，即得。

2.4　实验设计

2.4.1　Hunter 实验设计　采用 Hunter 设计考察可能影响阿里红总三萜酸富集纯化的高风险工艺参数：大孔树脂类型（A），上样液质量浓度（B，g 生药 • mL^{-1}），树脂与药材比（C），除杂乙醇体积分数（D，%），除杂乙醇用量（E，倍），解析乙醇体积分数（F，%），解析乙醇用量（G，倍），洗脱速率（H，mL • min^{-1}）和大孔树脂使用次数（I，次）。Hunter 设计和实验结果见表 2。

表 2　Hunter 实验设计与结果

Tab 2　Hunter design and results

A	B 生药/g	C	D	E	F	G	H	I	总三萜酸	
									含量 /%	转移率 /%
ZTC-1	0.1	3	30	3	60	6	30	1	48.3	33.7
AB-8	0.1	1	30	5	60	4	30	1	46.2	36.4
AB-8	0.3	3	10	3	80	4	30	1	38.5	50.1
D101	0.3	3	30	5	80	6	30	1	55.6	58.6
ZTC-1	0.3	3	30	3	60	4	10	5	46.6	26.1
AB-8	0.1	1	30	3	80	4	30	5	49.2	41.7
ZTC-1	0.1	3	10	5	60	4	30	5	31.3	29.0
D101	0.1	1	10	3	60	4	10	1	46.9	45.4
ZTC-1	0.3	1	30	3	80	6	10	1	43.5	49.0
AB-8	0.1	3	10	3	80	6	10	5	39.1	53.3
ZTC-1	0.3	1	10	5	80	4	10	5	38.5	38.5
D101	0.1	1	10	3	60	4	10	1	43.7	44.2
D101	0.3	3	30	5	80	6	30	5	56.8	60.7
AB-8	0.1	1	30	5	60	6	10	5	53.3	44.2
AB-8	0.3	3	10	5	60	6	10	1	40.3	43.0
D101	0.1	3	30	5	80	4	10	1	51	56.2
D101	0.3	1	10	3	60	6	30	5	46.7	49.7
ZTC-1	0.1	1	10	5	80	6	30	1	33.3	50.8

以阿里红总三萜酸的含量和转移率为响应指标，分别对各个工艺参数与两个响应指标进行主效应多变量回归分析，基于最小贝叶斯信息准则（BIC）采用逐步回归方法建立模型。2 个拟合模型的 P 值均为＜ 0.0001，R^2 值分别为 0.89 和 0.97，说明所建立的回归模型能用于评估各工艺参数对阿里红总三萜酸含量（%）和转移率（%）的影响 [11]。基于方差分析，参数 A 和 D 对阿里红总三萜酸含量（%）的影响差异有统计学意义（P ＜ 0.01）；参数 A、F 和 G 对阿里红总三萜酸转移率的影响差异有统计学意义（P ＜ 0.01），其他工艺参数对以上两个模型响应的影响差异没有统计学意义。为了得到更好的工艺耐用性，5 个不显著工艺参数 B、C、E、G、I 在后续研究中均选择中间值作为确定的工艺参数；显著因素 A 属于分类变量，可以确定选择 D101 大树脂；3 个连续变量 D、F、G 采用星点设计 - 响应面法进一步优化。

2.4.2　星点设计 - 响应面实验

① 实验设计：采用 CCD 可旋转加 3 个中心点重复的响应面优化 Hunter 实验中确定的 3 个关键工艺参数。以 D、F、G 为因素，每个因素设计 5 个水平。以阿里红总三萜酸含量（%，Y_1）和阿里红总三萜酸转移率（%，Y_2）为响应值。采用文献中 Hansan 方法 [12] 将 2 个响应指标标准化为 0 ～ 1 之间归一值（OD 值）每个指标权重系数分别按 0.5 计算。CCD 设计和结果见表 3。

表 3　中心复合设计与实验结果

Tab 3　Central composite design and result

D	F	G	Y_1/%	Y_2/%	OD
47	70	7.5	47.6	26.1	0.28
40	90	10.0	58.1	50.3	0.59
20	90	5.0	48.3	63.6	0.67
30	36	7.5	69.5	11.6	0.01
30	70	12	53.7	68.1	0.78
30	100	7.5	42.8	75.8	0.59
20	50	5.0	42.9	28.9	0.17
20	90	10.0	46.3	78.1	0.67
30	70	7.5	52.3	60.5	0.75
13	70	7.5	38.2	66.2	0.16
40	90	5.0	63.9	41.6	0.68
40	50	5.0	51.2	21.5	0.12
30	70	3.0	63.4	41.6	0.64
30	70	7.5	55.1	62.3	0.79
20	50	10.0	40.8	36.1	0.16
40	50	10.0	48.6	39.2	0.19
30	70	7.5	54.8	61.8	0.79

② 回归模型建立与方差分析：应用 BIC 评估准则，以 OD 值作为响应，采用逐步回归方法获得最优模型（见表 4）。结果表明，回归模型的 P 值小于 0.01，模型 R^2 ＝ 0.95，表明模型具有显著性和预测的准确性，可用以评估工艺参数对 OD 值的影响 [11]。如预测刻画器所示（见图 2），因素 D 和 F 最优值分别为 30% 和 83% 乙醇分数。因素 G 对 OD 值无显著影响，选择中间值 7.5 倍用量。

表 4　星点设计 - 响应面法实验方差分析

Tab 4　Variance analysis for central composite design response

项目	平方和	F 值	P 值
模型	1.232	61.370	＜ 0.0001
D	0.0009	0.188	0.672
F	0.564	112.479	＜ 0.0001
DD	0.424	84.532	＜ 0.0001
FF	0.271	54.008	＜ 0.0001
纯误差	0.0228	50.815	—

注（Note）：“—”. 无统计数据（No data）。

③ DS 建立：基于回归模型，绘制等高线图。图 3 中标示的白色区域即为工艺参数的 DS。根据图 3，可以确定 3 个关键工艺参数的可接受范围（D：23% ～ 35.7%；F：72.0% ～ 97.2%；G：5 ～ 10 倍柱体积）。

2.5　阿里红总三萜酸中 3 个三萜酸成分含量测定

按确定的最优工艺参数制备 3 批阿里红总三萜酸，含量测定结果见表 5。

2.6　阿里红总三萜酸对致喘豚鼠的影响

2.6.1　实验动物分组　豚鼠 60 只，雌雄各半，随

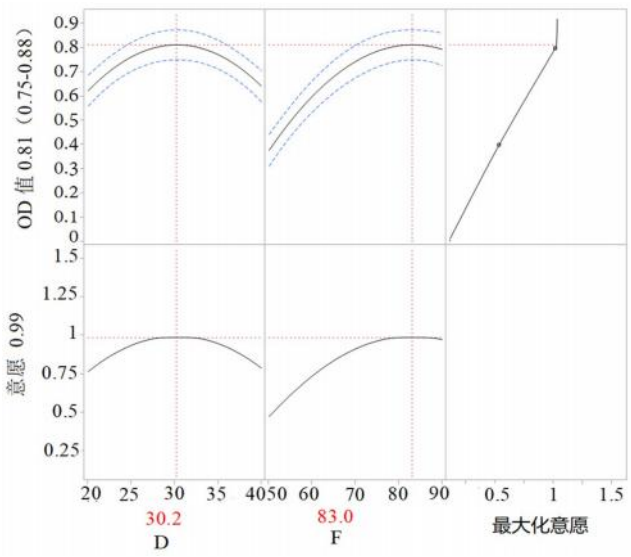

图 2　最优值预测刻画器图

Fig 2　Prediction profiler for optimum value

表 5　样品含量测定结果 (%)

Tab 5　Content determination (%)

批号	齿孔酸	去氢齿孔酸	去氢硫色多孔菌酸
ALH1001	7.91	4.95	11.2
ALH1002	6.56	4.56	11.0
ALH1003	8.91	6.02	12.8
平均值 /%	7.79	5.18	11.7
RSD/%	15.1	14.6	8.87

机分为 6 组。分别为空白对照组，模型组，阳性药氨茶碱 [100 mg/（kg • d）] 组，阿里红三萜酸低、中和高剂量组 [200、400、800 mg/（kg•d）]。

2.6.2　造模　造模方法参考文献进行 [13-14]。将豚鼠放入玻璃钟罩中，以适当压力喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.1% 磷酸组织胺等溶剂混合液 15 s，记录自喷雾开始至豚鼠发生抽搐、翻滚反应的时间为引喘潜伏期，引喘潜伏期不超过 120 s 证明模型成功。

2.6.3　给药剂量设置　跟据阿里红临床治疗咳嗽用量（3 ～ 6 g 生药）、总三萜酸出膏率（约 25%）、人与豚鼠剂量换算（系数 5.4[13]），计算总三萜酸给予豚鼠的剂量。各给药组均按 1 mL/100 g 灌胃给药，模型组给予等体积的生理盐水，每日 1 次，连续 7 d。

2.6.4　指标检测　于末次给药后 1 h 重测引喘潜伏期，观察 360 s，不跌倒者引喘潜伏期以 360 s 计。引喘期观测之后 30 min，腹腔注射氨基甲酸乙酯（1000 mg • kg^{-1}）麻醉，腹主动脉采血 4 mL，凝固 30 min，收集血清，采用试剂盒检测血清中 TXB_2 和 LTB_4 含量。

2.6.5　统计学方法　药效实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据之间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

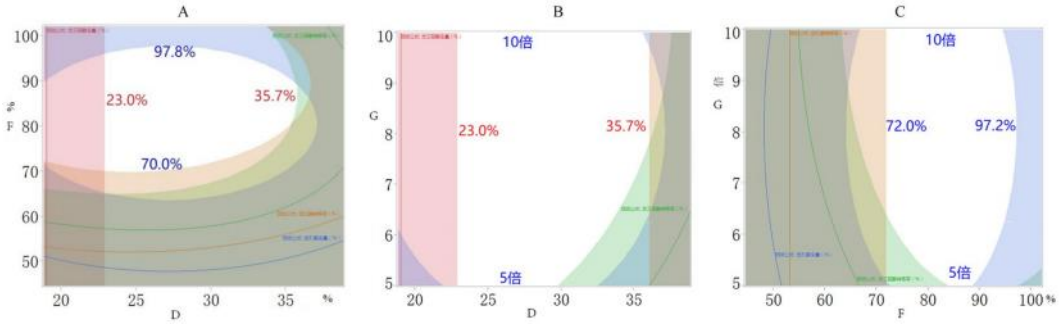

图 3　三因素（D、F、G）设计空间图

Fig 3　Contour profiler plots of three factors（D、F、G）

A. 以因素 D 和因素 F 为变量，因素 G 设置为 7.5 倍（D and F factors as variables，G = 7.5）；B. 以因素 D 和因素 G 为变量，因素 F 设置为 83%（D and G factors as variables，F = 83%）；C. 以因素 F 和因素 G 为变量，因素 D 设置为 30%（F and G factors as variables，D = 30%）

2.6.6　实验结果　阿里红总三萜酸 3 个剂量组均可延长哮喘豚鼠引喘潜伏期，与模型组比较差异有统计学意义，总三萜酸对实验动物的体重无明显影响（见表 6）。

与模型组相比，阿里红总三萜酸中、高剂量组均可降低 TXB_2 和 LTB_4 含量，差异有统计学意义。阿里红总三萜酸低剂量组有降低 TXB_2 和 LTB_4 趋势，但差异无统计学意义（见表 7）。实验表明阿里红总三萜有良好的抗哮喘活性作用。

表 6　阿里红总三萜酸对豚鼠引喘潜伏期和体重影响 ($\bar{x}\pm s$，$n = 10$)

Tab 6　Effect of total tritepene acid on the incubation period and weight of asthma guinea pig ($\bar{x}\pm s$，$n = 10$)

组别	引喘期 /s	体重 /g	
		给药前	给药 7 d
模型组	82.56±21.40	186.80±28.67	217.78±34.23
阳性药组	178.80±46.76**	197.70±28.61	238.10±29.93
总三萜酸低剂量组	107.89±21.05*	185.78±24.65	231.25±31.53
总三萜酸中剂量组	122.60±36.02**	189.67±25.02	241.89±40.47
总三萜酸高剂量组	146.56±33.47**	189.11±27.97	225.89±18.17

注（Note）：与模型组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$（Compared with the model group，*$P < 0.05$；**$P < 0.01$）。

表 7 阿里红总三萜酸对豚鼠 TXB_2 和 LTB_4 影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 7 Effect of total tritepene acid on the TXB_2 和 LTB_4 amount of asthma guinea pig（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TXB_2/（ng·L^{-1}）	LTB_4/（ng·L^{-1}）
空白对照组	48.62±9.45	966.41±156.33
模型组	66.09±12.09$^{\triangle}$	1177.87±457.65$^{\triangle}$
阳性药组	51.27±8.36**	1015.94±129.58*
总三萜酸低剂量组	58.42±7.34	1126.20±125.82
总三萜酸中剂量组	55.26±8.24*	990.68±107.86**
总三萜酸高剂量组	53.17±9.37*	1015.91±130.02*

注（Note）：与空白对照组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（Compared with the blank control group，$^{\triangle}P<0.05$；compared with the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

3 讨论

阿里红中含有大量的三萜酸类成分，已有大量研究证明三萜酸类具有良好的药理作用[1]。因此，需要对阿里红尤其是其中的三萜酸类成分进行现代化研究，以进一步提高对于阿里红药理作用的认识以及促进其临床应用和工业化发展。在这个过程中，充分富集纯化阿里红总三萜酸是所有研究的重点和难点。

本研究选择具有生物活性的阿里红总三萜酸含量和转移率为指标，优化总三萜酸制备的工艺路线。Hunter 设计可以同时评估连续变量和分类变量的主效应显著性，因此，选择 Hunter 设计进行初始工艺参数评估。星点设计 - 响应面法具有精度高和预测性强的优势，可用于回归模型的构建，以实现预测最优参数值和确定参数的设计空间。本研究以 Hunter 结合星点设计 - 响应面法设计作为工具对阿里红总三萜酸的富集纯化工艺进行优化，通过工艺优化能够将阿里红总三萜酸的含量提高至 50% 以上，要远高于之前研究报道的 20%[8-9]。总三萜酸中 3 个单体成分加和接近 25%，是阿里红总三萜酸部位的主要成分。其他未确定含量的三萜酸成分，需进一步研究。

TXB_2 是血栓素 A2 降解产物，血栓素 A2 能促使支气管平滑机细胞收缩，黏膜水肿而导致哮喘。LTB_4 在哮喘发生的多个环节起作用[15-16]。TXB_2 和 LTB_4 可以被认为是与哮喘发病相关的主要生物标志物[17]。因此，降低血清中 TXB_2 和 LTB_4 含量能达到缓解哮喘的作用。氯化乙酰胆碱和磷酸组织胺诱导豚鼠哮喘模型是文献报道较多的经典造模方法[14，18-19]，一般模型组的豚鼠引喘潜伏期低于 120 s，并且 TXB_2 和 LTB_4 含量与空白对照组相比差异均有统计学意义，可以认为造模成功。阿里红总三萜酸具有延长哮喘豚鼠引喘潜伏期作用，这表明其具有治疗哮喘的药效活性，实验也表明其作用机制可能与降低血清中 TXB_2 和 LTB_4 含量有关。

参考文献

[1] 乌云娜，刘颖，池梦怡，等 . 菌物药阿里红的研究进展 [J]. 食用菌学报，2021，28（3）：154-162.

[2] 吴霞，杨峻山，董悦生 . 阿里红化学成分的研究（Ⅰ）[J]. 中草药，2005，36（6）：811-814.

[3] 郭雄飞，魏鸿雁，马晓玲，等 . 阿里红的化学成分研究 [J]. 中药材，2021，44（1）：99-102.

[4] 任佳伟，马月梅，陈新晶，等 . 阿里红中齿孔酸和总三萜酸的含量测定 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（10）：1478-1481.

[5] 汪鋆植，张琳，孙文军，等 . 齿孔酸对大鼠佐剂型关节炎的影响 [J]. 中药药理与临床，2016，32（2）：23-27.

[6] 张琳，汪鋆值，余海立，等 . 齿孔酸对高尿酸血症黄嘌呤氧化酶活性的影响 [J]. 生物资源，2017，39（2）：102-107.

[7] 吐尔洪·买买提，木妮热·依布拉，吐尔洪·买买提 . 阿里红中总三萜酸的提取工艺优选及含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（17）：24-27.

[8] 张慧锋，郭淑英，申蕾，等 . 响应曲面法提取阿里红中总三萜酸成分 [J]. 吉林医药学院学报，2014，35（6）：401-406.

[9] 杨芳，孟玲，王萍 . 基于星点设计法的阿里红总三萜酸提取研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2015，22（12）：86-89.

[10] 吴霞，徐硕，罗容，等 . 阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定 [J]. 中草药，2010，41（9）：1546-1548.

[11] 伊博文，张芹，江晓泉，等 . 基于 AQbD 的培植牛黄中 18 种氨基酸含量测定方法的建立与优化 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（7）：927-933.

[12] 吴伟，崔光华，陆彬 . 实验设计中多指标的优化：星点设计和总评“归一值”的应用 [J]. 中国药学杂志，2000，35（8）：530-533.

[13] 徐叔云，卞如濂 . 药理实验方法学 [M]. 2 版 . 北京：人民卫生出版社，1991.

[14] 赵书策，贾强，廖富林，等 . 广藿香提取物的止咳，化痰，平喘药理研究 [J]. 中成药，2008，30（3）：449-449.

[15] 陈贺，张慧颖，刘禾，等 . 复方川贝颗粒对 OVA 介导的豚鼠过敏性哮喘模型的平喘作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（18）：228-231.

[16] 王保芹，李泽庚 . 中医药治疗支气管哮喘实验研究进展 [J]. 中医药临床杂志，2021，33（11）：2251-2254.

[17] Chen LC，Tseng HM，Kuo ML，et al. Levels of 15-HETE and TXB2 in exhaled breath condensates as markers for diagnosis of childhood asthma and its therapeutic outcome [J]. Pediat Allerg Imm-UK，2021，32（8）：1673-1680.

[18] Fu M，Zou B，An K，et al. Anti-asthmatic activity of alkaloid compounds from Pericarpium Citri Reticulatae（Citrus reticulata‘Chachi’）[J]. Food Funct，2019，10（2）：903-911.

[19] Hagras MM，Kamel FO. Effect of protease-activated receptor-2-activating peptide on guinea pig airway resistance and isolated tracheal strips [J]. J Microsc Ultrastruct，2020，8（1）：7-13.

（收稿日期：2022-11-28；修回日期：2023-02-24）

苗药大蝎子草药材与标准汤剂指纹图谱对比及药材化学模式识别分析

董贺，杨一，周芳丽，唐晓琴，赵泽林，孙恒灿，李军*，张丽艳*（贵州中医药大学，贵阳 550025）

摘要：目的 建立苗药大蝎子草药材和标准汤剂的 HPLC 指纹图谱，并对 15 批大蝎子草药材进行化学模式识别分析。**方法** 根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》建立黔产苗药大蝎子草 15 批药材及标准汤剂的指纹图谱并对两者中的对羟基肉桂酸进行含量测定；采用 SPSS 26.0 统计学软件进行聚类分析、主成分分析；采用 SIMCA 14.1 统计软件进行偏最小二乘判别分析。**结果** 15 批大蝎子草药材指纹图谱确立了 11 个共有峰，标准汤剂确认了 8 个共有峰，指认出峰 9 为对羟基肉桂酸。聚类分析结果显示，15 批大蝎子草药材可聚为两类。主成分分析结果显示，前 3 个主成分的累计方差贡献率为 83.385%。偏最小二乘判别分析筛选出造成不同产地差异的 6 个色谱峰。**结论** 大蝎子草药材和标准汤剂指纹图谱、主要成分基本一致，该方法可用于大蝎子草药材质量控制的研究。

关键词：大蝎子草；指纹图谱；聚类分析；主成分分析；化学模式识别分析
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2059-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.14

Fingerprints of Miao medicine *Girardinia diversifolia* and standard decoction and chemical pattern recognition of medicinal materials

DONG He, YANG Yi, ZHOU Fang-li, TANG Xiao-qin, ZHAO Ze-lin, SUN Heng-can, LI Jun*, ZHANG Li-yan*(*Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guiyang* 550025)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of Miao medicine *Girardinia diversifolia* and standard decoction, and to recognize 15 batches of *Girardinia diversifolia* by chemical patterns. **Methods** According to "Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System", fingerprints of 15 batches of medicinal materials and standard decoction of Miao medicine *Girardinia diversifolia* from Guizhou were established and the content of *p*-hydroxycinnamic acid was determined. SPSS 26.0 was used in cluster analysis and principal component analysis. SIMCA 14.1 was used in partial least squares discriminant analysis. **Results** Totally 11 common peaks for *Girardinia diversifolia* and 8 common peaks for standard decoction were confirmed in the fingerprints of the 15 batches. Peaks 9 was identified as *p*-hydroxycinnamic acid. Cluster analysis showed that 15 batches of *Girardinia diversifolia* were grouped into two. Principal component analysis showed that the cumulative variance contribution rate of the first three principal components reached 83.385%. Partial least square discriminant analysis was used to screen out 6 chromatographic peaks which caused the difference between different from areas. **Conclusion** The fingerprints and main components of the *Girardinia diversifolia* herbs and standard decoction are basically the same. The method can be used to control the quality of *Girardinia diversifolia.*

Key words: *Girardinia diversifolia*; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; chemical pattern recognition

基金项目：国家重点研发计划（No.2019YFC1712500）；贵州省科技计划项目（No. 黔科合后补助 [2020]3003）；贵州中医药大学科研创新和探索专项（No.2019YFC171250102）。

作者简介：董贺，女，硕士，主要从事中药及民族药质量控制及新药研究，email：760710312@qq.com *通信作者：李军，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事植物分子生物学及分子生药学研究，email：speker@163.com；张丽艳，女，教授，硕士研究生导师，主要从事中药及民族药质量控制及新药研究，email：zly1964@163.com

大蝎子草 [*Girardinia diversifolia*（Link）Friis] 来源于荨麻科蝎子草属大蝎子草的全草或根部 [1]。其功效有祛风解表、利气消痰、清热解毒 [2-3]，常被用于治疗咳嗽痰多，水肿，外用治疮毒，根鲜用捣烂外敷，治骨折，还用于治疗中风不语、跌打损伤、皮肤瘙痒 [4]、肝损伤、肾炎、前列腺肥大、肿瘤以及血管栓塞性等心血管疾患 [5-6]。大蝎子草为少数民族常用药，但对其研究尚浅，仍有待发掘。

中药具有多组分、多功效的整体特征，中药指纹图谱是国际公认的质量控制手段 [7-10]，其中高效液相色谱法（HPLC）指纹图谱可以同时反映中药中多种化学成分的含量特征 [11]。化学模式识别分析可将指纹图谱的信息整合，找出产生差异的成分，对中药质量控制进行综合评估。目前，对大蝎子草指纹图谱的研究尚未见报道，基于此，本研究建立了苗药大蝎子草的高效液相色谱指纹图谱，并结合化学模式识别分析等对其质量进行评价，旨在为大蝎子草的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪（含四元高压泵、自动进样器、柱温箱、PDA2998 检测器、Empower 色谱工作站，美国 Waters 公司）；KQ5200DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；BSG-24 型电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；METTLER TOLEDO XSE105DU 型十万分之一电子分析天平（梅特勒公司）。

1.2 试药

大蝎子草均产自贵州（见表 1），经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为荨麻科蝎子草属植物大蝎子草 [*Girardinia diversifolia*（Link）Friis] 的干燥全草；甲醇、乙腈、乙醇（分析纯，天津市北辰方正试剂有限公司）；磷酸（分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司，批号：20190415）；对羟基肉桂酸（成都普思生物科技股份有限公司，批号：PS020634，含量：98%）；水为娃哈哈纯净水。

表 1 大蝎子草药材来源信息

Tab 1 Source information of *Girardinia diversifolia*

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	贵州贵阳	20200701	S9	贵州毕节	20200709
S2	贵州贵阳	20200702	S10	贵州毕节	202007010
S3	贵州贵阳	20200703	S11	贵州安顺	202007011
S4	贵州贵阳	20200704	S12	贵州安顺	202007012
S5	贵州贵阳	20200705	S13	贵州安顺	202007013
S6	贵州毕节	20200706	S14	贵州安顺	202007014
S7	贵州毕节	20200707	S15	贵州安顺	202007015
S8	贵州毕节	20200708			

2 方法与结果

2.1 大蝎子草药材、标准汤剂的 HPLC 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C18（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）进行梯度洗脱（0 ～ 20 min，5% → 9%A；20 ～ 30 min，9% → 12%A；30 ～ 80 min，12% → 21%A；80 ～ 85 min，21%A）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 270 nm；柱温为 25 ℃；进样量为 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取 5.09 mg 对羟基肉桂酸对照品置于 50 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，即得。

2.1.3 供试品的制备 大蝎子草药材溶液：精密称取大蝎子草药材粉末（过 3 号筛）1 g，以 1∶40 的料液比加入 70% 乙醇溶液回流 1 h，过滤，滤液蒸干，以 50% 甲醇为溶剂，溶解并定容至 10 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。15 批大蝎子草药材溶液依次记为 S1 ～ S15。

大蝎子草标准汤剂溶液：根据《中药饮片标准汤剂》制备大蝎子草标准汤剂：取 100 g 大蝎子草干燥药材，精密称定，以纯净水为溶剂，加 12 倍量水浸泡 30 min，武火煮沸，文火保持微沸 30 min，趁热滤过；药渣加 10 倍水煎煮，武火煮沸，文火保持微沸 20 min，趁热滤过，合并 2 次煎液，减压浓缩至 500 mL。精密吸取大蝎子草标准汤剂 5 mL，水浴蒸干，以 50% 甲醇为溶剂，溶解并定容至 10 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。15 批大蝎子草标准汤剂溶液依次记为 T1 ～ T15。

2.2 指纹图谱方法学考察

2.2.1 对照品指认 取对照品溶液、大蝎子草药材及标准汤剂溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果见图 1。

2.2.2 精密度考察 分别取两种供试品（编号 S12、T12）溶液适量，按“2.1.1”项下色谱条件分别连续进样测定 6 次，以对羟基肉桂酸为参照，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果 *RSD* 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性考察 取两种供试品（编号 S12、T12）溶液各 6 份，按“2.1.1”项下色谱条件分别进样测定，以对羟基肉桂酸为参照，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果 *RSD* 均小于 3.0%，表明方法重复性良好。

2.2.4 稳定性考察 取两种供试品（编号 S12、T12）溶液，分别于室温下放置 2、4、6、8、10、12、24 h 后，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以对羟基肉桂酸为参照，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果 *RSD* 均小于 3.0%，表明供试品溶液在室温条件下放置 24 h 稳定。

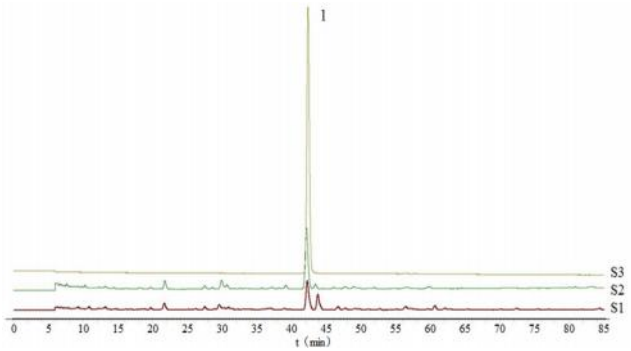

图 1　对照品指认 HPLC 色谱图

Fig 1　Reference HPLC chromatogram

S1. 大蝎子草药材（the medicinal material of *Girardinia diversifolia*）；S2. 大蝎子草标准汤剂（the standard decoction of *Girardinia diversifolia*）；S3. 对羟基肉桂酸对照品溶液（*p*-hydroxycinnamic acid reference solution）；1. 对羟基肉桂酸（*p*-hydroxycinnamic acid）

2.3　大蝎子草药材、标准汤剂中对羟基肉桂酸含量测定对比分析

2.3.1　供试品制备　药材采用过 3 号筛粉末，纯净水为提取溶剂，取 1 g 药材粉末，以 1∶40 的料液比进行回流提取 75 min，所得滤液蒸干，以 50% 甲醇定容至 10 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得药材含量测定供试品，每个样品平行 3 次。

大蝎子草标准汤剂含量测定供试品参照“2.1.3”项下大蝎子草标准汤剂供试品方法，即得，每个样品平行 3 次。

2.3.2　色谱条件　色谱柱为 Diamonsil C18（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）进行等度洗脱（17∶83），流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 310 nm，柱温为 35 ℃，进样量为 10 μL。

2.3.3　方法学考察

① 线性关系考察：精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液适量，分别配制成质量浓度为 2.04、8.16、16.32、24.48、32.64、40.80 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件分别进样检测，记录色谱图，以质量浓度（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，在 2.04 ～ 40.80 μg·mL^{-1} 的线性范围内，得到对羟基肉桂酸对照品回归方程为 $Y = 8\times10^{8}X - 3.73\times10^{4}$（$R^2 = 0.9996$）。

② 精密度考察：精密吸取上述对照品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件分别连续进样测定 6 次，记录色谱图，计算峰面积，*RSD* 小于 2%，表明仪器精密度良好。

③ 重复性考察：分别取“2.3.1”项下两种供试品溶液适量，各 6 份，按“2.3.2”项下色谱条件分别测定，记录峰面积，峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明方法重复性良好。

④ 稳定性考察：取“2.3.1”项下两种供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 后，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，结果峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明供试品溶液室温条件下放置 24 h 稳定。

⑤ 加样回收试验：分别精密称取 0.5 g 已知含量大蝎子草干燥药材粉末及 2.5 mL 大蝎子草标准汤剂，各 6 份，供试品含量 1∶1 的比例加入对羟基肉桂酸对照品，按“2.3.1”项下方法制备待测液溶液，分别注入高相液相色谱仪中，记录峰面积，并计算回收率，结果回收率 *RSD* 均小于 2.0%。

2.4　大蝎子草药材、标准汤剂 HPLC 指纹图谱的生成及含量测定相关性评价

取 15 批大蝎子草药材及标准汤剂供试品溶液按“2.1.1”项下方法进样测定，记录色谱图，并将 15 批大蝎子草药材和标准汤剂指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（见图 2），结果显示，15 批大蝎子草药材检测出 11 个共有峰，相似度在 0.725 ～ 0.997（见表 2），15 批标准汤剂共检测出 8 个共有峰，相似度在 0.995 ～ 0.999（见表 2），药材与标准汤剂指纹图谱相比较可知，标汤中未检测出 1、8、10 号峰，经比较分析确定大蝎子草药材与标准汤剂有 8 个共有峰相同。

表 2　15 批大蝎子草药材及标准汤剂指纹图谱相似评价结果

Tab 2　Fingerprint similarity evaluation of 15 batches of *Girardinia diversifolia* and standard decoction

药材编号	相似度	标汤标号	相似度
S1	0.878	T1	0.999
S2	0.997	T2	0.999
S3	0.842	T3	0.998
S4	0.889	T4	0.998
S5	0.909	T5	0.995
S6	0.983	T6	0.998
S7	0.995	T7	0.998
S8	0.804	T8	0.996
S9	0.957	T9	0.995
S10	0.994	T10	0.996
S11	0.996	T11	0.995
S12	0.996	T12	0.999
S13	0.725	T13	0.999
S14	0.952	T14	0.996
S15	0.834	T15	0.998

采用平均数法生成对照图谱，图 3 为大蝎子草药材和标准汤剂对照图谱对比图。结果显示药材与标准汤剂对照指纹图谱相似度为 0.986，两者有效成分差异很小。

通过“2.3.1”项下的方法分别对 15 批大蝎子草药材和 15 批大蝎子草标准汤剂中的对羟基肉桂酸含量进行测定，并计算其标准汤剂的转移率（式 1），由表 3 可知，15 批大蝎子草药材中对羟基肉桂酸含量差异较大，可能因产地及其生长环境的

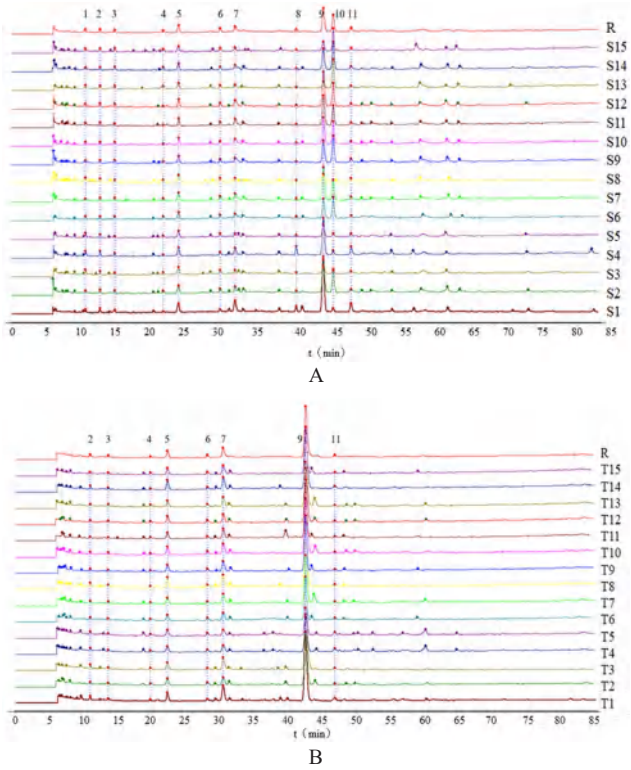

图 2 15 批大蝎子草药材（A）及标准汤剂（B）指纹图谱

Fig 2 Fingerprint analysis of 15 batches of *Girardinia diversifolia*（A）and standard decoction（B）

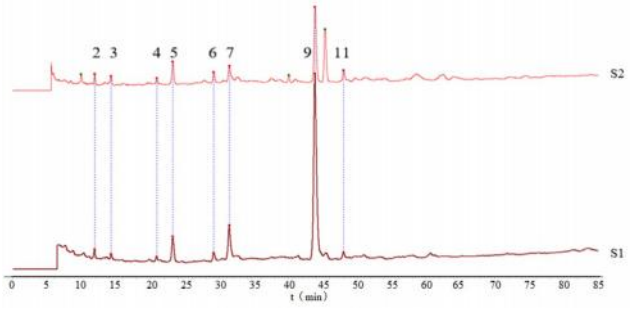

图 3 大蝎子草药材（S1）与标准汤剂（S2）对照图谱

Fig 3 *Girardinia diversifolia*（S1）and standard decoction（S2）

影响。15 批标准汤剂中对羟基肉桂酸转移率在 38.66% ～ 98.52%，平均转移率为 73.02%，表明大蝎子草药材和标准汤剂相似性较高，关联性较强。

转移率（%）=（标汤含量 × 出膏率）/（药材含量 × 药材重量）×100% （式 1）

2.5 聚类分析

以 15 批大蝎子草药材指纹图谱中 11 个共有峰的峰面积为变量，应用 SPSS 26.0 软件，采用组间平均数连接法进行聚类分析 [12-14]。结果显示，当距离为 15 时，15 批药材可以聚为两类，其中 S2、S3、S5 ～ S15 聚为一类，S1、S4 聚为一类。S1 和 S4 均来自贵州贵阳，说明同产地大蝎子草药材化学成分存在差异，其中贵州贵阳的大蝎子草药材较其他产地化学成分差异更大，见图 4。

2.6 主成分分析

表 3 大蝎子草药材、标准汤剂含量测定及标准汤剂转移率

Tab 3 Determination of content and transfer rate of standard decoction of *Girardinia diversifolia*

药材	药材含量 /（mg·g^{-1}）	出膏率 /%	标准汤剂	标汤含量 /（mg·g^{-1}）	转移率 /%
S1	0.4436	14.3865	T1	1.1989	38.88
S2	0.4424	13.6507	T2	1.2529	38.66
S3	0.2773	12.6802	T3	1.2220	55.87
S4	0.0638	11.0757	T4	0.5535	96.11
S5	0.0833	13.7866	T5	0.3360	55.62
S6	0.2214	12.1440	T6	1.0682	58.58
S7	0.2474	12.0574	T7	1.0150	49.48
S8	0.1238	9.0675	T8	1.2494	91.47
S9	0.1631	10.1892	T9	1.3111	81.92
S10	0.1703	10.2292	T10	1.2592	75.62
S11	0.2425	13.6742	T11	1.5461	87.19
S12	0.2121	12.6775	T12	1.2580	75.18
S13	0.0721	7.5387	T13	0.9165	95.84
S14	0.1084	8.0087	T14	1.3047	96.37
S15	0.0980	9.5572	T15	1.0105	98.52

利用 SPSS 26.0 软件，将 15 批大蝎子草药材指纹图谱中 11 个共有峰峰面积进行标准化处理，在通过主成分分析法进行因子分析，以特征值＞ 1 为提取标准，总方差结果显示，共提取到 3 个主成分，说明这 3 个主成分在反映大蝎子草药材共有成分关系中起到主导作用，其方差贡献率分别为 47.911%、20.502%、14.972%，累计方差贡献率为 83.385%，结果见表 4。由主成分矩阵可知（见表 5），各个共有峰对 3 个主成分不同的独立方差贡献率，第一个主成分代表了峰 2、6、7、8、9、11；第二个主成分代表了峰 1、10；第三个主成分代表了峰 3、4。

表 4 大蝎子草药材前 3 个主成分的特征值和方差贡献率

Tab 4 Characteristic values and variance contribution rates of the first 3 principal components of *Girardinia diversifolia*

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	5.270	47.911	47.911
2	2.255	20.502	68.413
3	1.647	14.972	83.385

表 5 15 批大蝎子草药材主成分矩阵

Tab 5 Principal component matrix of 15 batches of *Girardinia diversifolia*

共有峰	主成分		
	1	2	3
1	0.356	0.828	− 0.392
2	0.870	0.128	− 0.258
3	0.112	0.418	0.807
4	− 0.253	0.558	0.650
5	0.887	− 0.201	0.256
6	− 0.614	0.183	0.266
7	0.784	− 0.450	0.144
8	0.897	0.174	− 0.096
9	0.770	− 0.474	0.382
10	− 0.526	− 0.709	0.145
11	0.927	0.182	0.140

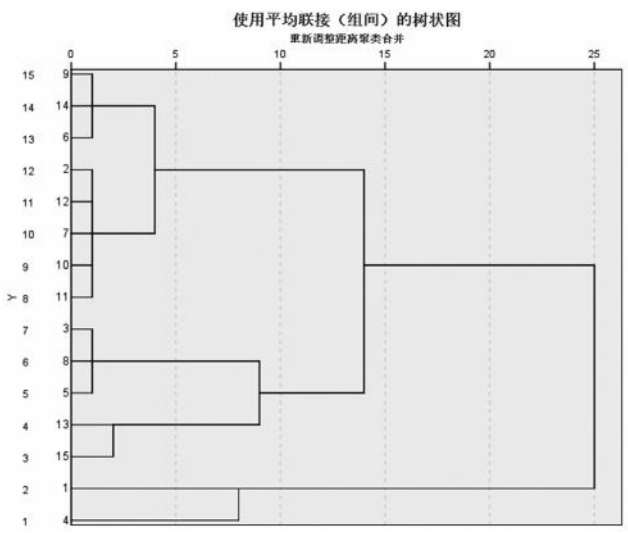

图 4　15 批大蝎子草药材聚类分析树状图

Fig 4　Cluster analysis tree diagram of 15 batches of *Girardinia diversifolia*

2.7　偏最小二乘判别分析

将 15 批大蝎子草分为两类，其中 S2、S3、S5 ～ S15 聚为一类，S1、S4 聚为一类。这两类大蝎子草药材的投影点相聚比较远，说明样品间存在差异（见图 5）。影响大蝎子草质量差异的不是单一成分，而是多成分相互作用的效果，该结果与聚类分析结果一致。以 VIP 值＞ 1 为标准，对影响大蝎子草成分差异的标志性成分进行筛选，标记出 6 个贡献较大的成分，依次为峰 7（VIP ＝ 1.2526）、峰 6（VIP ＝ 1.1731）、峰 2（VIP ＝ 1.1504）、峰 9（VIP ＝ 1.1422）、峰 11（VIP ＝ 1.1238）、峰 5（VIP ＝ 1.0276），以上 6 个色谱峰是影响大蝎子草质量差异的主要标志性成分，结果见图 6。

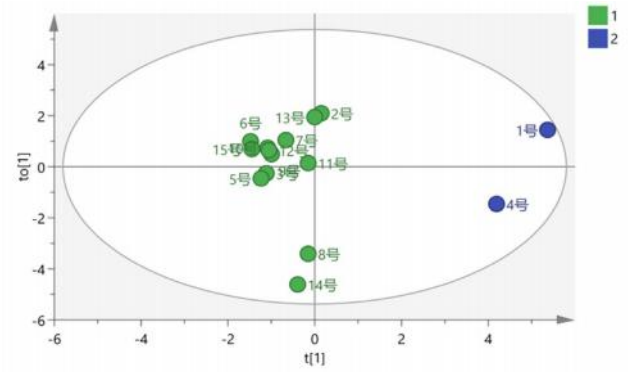

图 5　15 批大蝎子草药材的偏最小二乘判别分析得分图

Fig 5　Partial least square discriminant analysis score map of 15 batches of *Girardinia diversifolia*

3　讨论

3.1　指纹图谱方法优化

前期研究对提取方法（超声、回流）、流动相（乙腈 - 水、甲醇 -0.1% 磷酸溶液、乙腈 - 磷酸溶液）、检测波长（250、260、270、280、290、300、310 nm）、流速（0.8、1.0、1.2 mL・min^{-1}）、柱温（20、25、30 ℃）进行考察，以指纹图谱的共有峰数量、分离度、峰性状及峰面积为衡量标准，筛选最优条件，最终确定了提取方法为回流提取，流动相为乙腈 -0.1% 磷酸水溶液，检测波长为 270 nm，柱温为 25 ℃，流速为 1.0 mL・min^{-1}。

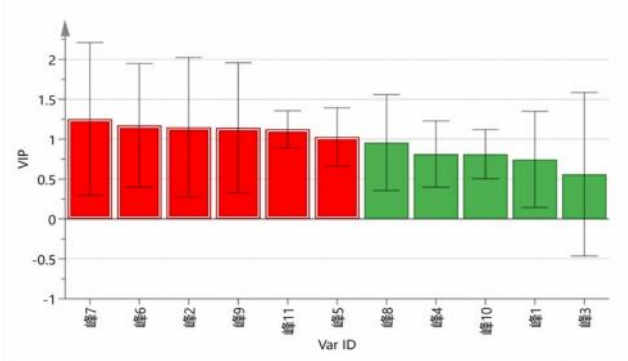

图 6　15 批大蝎子草药材偏最小二乘判别分析 VIP 值图

Fig 6　Partial least square discriminant analysis of VIP values of 15 batches of *Girardinia diversifolia*

3.2　大蝎子草药材及标准汤剂相似度分析

通过对建立的 15 批大蝎子草药材和 15 批大蝎子草标准汤剂指纹图谱进行分析，从各峰面积来看，峰面积大小存在较大差异，可能与其药材产地和生长环境有关。从其共有峰来看，15 批大蝎子草药材指纹图谱与其对照图谱比较，相似度范围为 0.725 ～ 0.997，15 批大蝎子草标准汤剂相似度均在 0.9 以上，而大蝎子草药材对照图谱与标准汤剂对照图谱的相似度为 0.986，说明 15 批大蝎子草药材与其标准汤剂具有一致性，通过对两者中对羟基肉桂酸含量的测定，其标准汤剂中平均转移率高达 73.02%，可知，两者相关性较高。

参考文献

[1] 蒋佳雯，殷少文，谭家华，等 . 采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 比较苗药红禾麻鲜、干品差异 [J]. 贵州中医药大学学报，2021，43（4）：63-67.

[2] 支娜，陶玲，沈祥春 . 大蝎子草水层部位对 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 与 TNF-α 的影响 [J]. 中药药理与临床，2010，26（3）：39-41.

[3] 吴林菁，徐旖旎，姜丰，等 . 大蝎子草干、鲜品水提物的抗炎镇痛作用实验研究 [J]. 贵州医科大学学报，2016，41（10）：1185-1188，1192.

[4] 沈祥春，支娜，许立，等 . 大蝎子草乙酸乙酯部位对脂多糖诱导巨噬细胞炎症介质表达的影响 [J]. 中华中医药杂志，2010，25（9）：1397-1400.

[5] 陶玲，支娜，柏帅，等 . 大蝎子草抗炎镇痛活性部位研究 [J]. 时珍国医国药，2009，20（6）：1404-1405.

[6] 沈祥春 . 大蝎子草的临床新用途：CN101224226B [P].

2011-01-05.
[7] 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.
[8] Cui JX，Hong WX，Zhou RJ，et al. Feature extraction of chinese materia medica fingerprint based on star plot represenation of multivariate data [J]. Chinese Herbal Medicines，2011，3（2）：140-143.
[9] 李潮，温柔，严丽萍，等 . 车前子的品种、炮制及质量评价研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（5）：224-232.
[10] 郑振兴，胡瀚文，曾利，等 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（21）：174-180.
[11] 崔锦鹏，耿晓桐，程梦娟，等 . 基于指纹图谱及抗氧化活性考察不同杀青方法地黄叶的质量特征 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（23）：197-204.
[12] 张淼，陈龙，朱华，等 . 石仙桃药材 HPLC 指纹图谱的建立及聚类分析 [J]. 中国药房，2019，30（13）：1792-1795.
[13] 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.
[14] 冯华，刘亮，王祥培，等 . 黔产苗药对坐叶药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药房，2019，30（2）：232-235.

（收稿日期：2022-11-07；修回日期：2022-12-07）

蟾毒灵抑制 TRPV1 通道及炎症反应缓解神经病理性疼痛的机制研究

巴茜远[1]，熊东林[1]，肖礼祖[1]，郝悦[2]，蒋昌宇[1*]（1. 深圳市华中科技大学协和深圳医院疼痛科重点实验室，广东 深圳 518060；2. 深圳大学医学部药学院，广东 深圳 518060）

摘要：目的 探索蟾毒灵对长春新碱所致的大鼠疼痛行为的影响及对脊髓内瞬时受体电位香草酸亚型 1（TRPV1）蛋白和星形胶质细胞活化的影响。**方法** 32 只 SD 雄性大鼠随机分为 4 组（n = 8）：对照组（Control 组）、长春新碱组（Vcr 组）、长春新碱＋蟾毒灵低剂量组（Vcr ＋ Bufalin 0.25 mg • kg^{-1}）、长春新碱＋蟾毒灵高剂量组（Vcr ＋ Bufalin 0.5 mg • kg^{-1}）。连续 10 d 腹腔给予长春新碱（75 μg • kg^{-1}）造模，治疗组连续 10 d 腹腔给予相应剂量的蟾毒灵。分别测定大鼠的热缩足潜伏期（TWL）和机械缩足反应阈（MWT）。qPCR 检测大鼠脊髓内 *trpv1*、*trpv4* mRNA 的表达情况，Western blot 法检测大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白表达情况。免疫荧光检测脊髓星形胶质细胞的活化情况。ELISA 实验检测脊髓内肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和白细胞介素 -1β（IL-1β）的表达水平。**结果** 蟾毒灵可以提高大鼠热痛阈值及机械痛阈值，降低大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白表达水平，并可抑制长春新碱诱导的脊髓内星形胶质细胞的活化，降低 TNF-α、IL-1β 的过表达。**结论** 蟾毒灵可缓解长春新碱诱导的大鼠神经病理性疼痛，并可降低脊髓 TRPV1 蛋白的过表达及抑制星形胶质细胞活化和炎性反应。

关键词：蟾毒灵；长春新碱；神经病理性疼痛；TRPV1；GFAP
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2064-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.015

Mechanism of bufalin inhibiting TRPV1 channel and inflammation in relieving neuropathic pain

BA Xi-yuan[1], XIONG Dong-lin[1], XIAO Li-zu[1], HAO Yue[2], JIANG Chang-yu[1*] (1. *Key Laboratory of Pain, Union Shenzhen Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Shenzhen Guangdong* 518060; 2. *Department of Pharmacy, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong* 518060)

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81971065）；深圳市科创委基础研究面上项目（No.JCYJ20190808154603578）。
作者简介：巴茜远，女，硕士，主要从事神经病理性疼痛的机制及中药镇痛研究，email：xiyuan.ba@foxmail.com *__通信作者__：蒋昌宇，男，硕士研究生导师，主要从事慢性疼痛的发病机制及多肽的镇痛机制研究，email：jiang-changyu@hotmail.com

Abstract: Objective To determine the effect of bufalin on vincristine induced pain in rats and its effect on TRPV1 protein and astrocytes activation in the spinal cord. **Methods** Totally 32 male SD rats were randomly divided into 4 groups (n = 8): a control group (Control group), a vincristine group (Vcr group), a vincristine + bufalin low-dose group (Vcr + bufalin 0.25 mg • kg^{-1}) and a vincristine + bufalin high-dose group (Vcr + bufalin 0.5 mg • kg^{-1}). Vincristine (75 μg • kg^{-1}) was intraperitoneally given for 10 days to establish the model, and different doses of bufalin was intraperitoneally given in the treatment group for 10 days. The thermal withdrawal lantency (TWL) and mechanical withdrawal threshold (MWT) of rats were measured. The expression of *trpv1, trpv4* mRNA in the rat spinal cord was detected by qPCR, while the expression of TRPV1 protein in the rat spinal cord was detected by Western blot. The activation of astrocytes in the spinal cord was detected by immunofluorescence. ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors TNF-α and IL-1β. **Results** Bufalin increased the TWL and MWT of rats, reduced the expression level of TRPV1 protein and inhibited the activation of astrocytes in the rat spinal cord. Bufalin also decreased the expression levels of TNF-α and IL-1β. **Conclusion** The neuropathic pain induced by vincristine can be alleviated by bufalin in rat. Bufalin can reduce TRPV1 protein over expression and inhibit activation of astrocytes and inflamation.

Key words: bufalin; vincristine; neuropathic pain; TRPV1; GFAP

化疗引起的外周神经病变（chemotherapy-induced peripheral neuropathy，CIPN）是癌症治疗中最常见的不良反应，这一不良反应常常会限制化疗药物的剂量，严重时甚至会导致化疗终止。CIPN 的主要症状包括麻木、灼热、刺痛、热 / 冷过敏，机械性超敏，以及自主活动功能减弱等 [1]。30% ～ 70% 的患者在化疗结束 1 年后仍伴有 CIPN 的症状。CIPN 对传统的镇痛药物反应不佳，极难治疗 [2]。因此，开发能有效缓解和治疗 CIPN 药物非常重要。

多项研究 [3-4] 表明瞬时感受器电位离子通道（TRP）家族在 CIPN 中会被激活，TRPV1、TRPV4 在 CIPN 的形成与发展过程中有重要的作用。此外，化疗药会导致脊髓星形胶质细胞和小胶质细胞的激活，触发促炎细胞因子，如肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -1β（IL-1β）和白细胞介素 -6（IL-6）等的释放，这些炎性因子会引起伤害性神经元的敏化和神经炎症 [5-6]，进一步加重 CIPN。蟾毒灵是我国传统中药华蟾素最主要的活性成分，华蟾素是由中华大蟾蜍的干燥表皮和腺体分泌物制成的现代中药注射液，大量临床实践表明，华蟾素有确切的抗肿瘤疗效，与化疗药合用在提高疗效的同时还有缓解 CIPN 的作用，这一作用可能主要是由其活性蟾毒灵介导 [7-9]。研究表明，蟾毒灵可以抑制核调节因子 κB（NF-κB）信号通路的激活来发挥抗炎作用，并可抑制小胶质细胞中 iNOS，减少 NO 的产生，但其缓解 CIPN 的具体机制不详 [10]。

本研究采用经典化疗药长春新碱（Vcr）建立大鼠 CIPN 模型，检测蟾毒灵对大鼠痛阈值及对 TRP 通道、星形胶质细胞活化的影响，探究蟾毒灵缓解 CIPN 的机制，以期为寻找治疗 CIPN 的新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SD 大鼠，体质量 220 ～ 250 g，雄性 [广东省医学实验动物中心，合格证号码 SCXK（粤）2013-0002]。饲养条件：自由摄食和饮水，室温保持在 20 ～ 25 ℃，湿度为 45%，光照与黑暗时间均为 12 h，适应性喂养 7 d 后用于实验。

采用随机数字表法将 32 只大鼠分为 4 组（n = 8）：对照组（Control 组）、长春新碱组（Vcr 组）、长春新碱＋蟾毒灵低剂量组（Vcr ＋ Bufalin 0.25 mg • kg^{-1}）、长春新碱＋蟾毒灵高剂量组（Vcr ＋ Bufalin 0.5 mg • kg^{-1}）。连续 10 d 腹腔注射 75 μg • kg^{-1} 长春新碱（大连美仑生物有限公司，批号：MB1298-1）建立神经病理性疼痛模型，蟾毒灵低、高剂量组分别在给予长春新碱前 1 h 腹腔给予 0.25 和 0.5 mg • kg^{-1} 蟾毒灵（大连美仑生物有限公司，批号：MB7115），持续 10 d。对照组给予等量生理盐水。

1.2 行为学检测

1.2.1 体重记录及运动能力 [3] 实验期间记录大鼠的体重，给药前使用转棒仪（移数，上海）20 r • min^{-1} 训练 2 d，可在棒上停留大于 90 s 的大鼠被用于实验，以减小组间差异。检测时，将转棒仪在 5 min 内从 4 r • min^{-1} 升至 40 r • min^{-1}，记录各组大鼠自放上转棒仪到掉落的时间（s）。每只大鼠测试两次，取平均值。

1.2.2 热缩足潜伏期（thermal withdrawal lantency，TWL）[11] 设定热板（BIO-CHP，Bioseb，France）温度为（52±0.5）℃。将大鼠放在热板上，开始计时，到大鼠出现舔后足或者跳跃停止计时，记录大鼠的痛阈值潜伏期（s）。每只大鼠重复测 3 次，每次间隔 10 min，取平均值。

1.2.3 机械缩足反射阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT） 使用电子测痛仪（IITC，USA）的 Von Frey 针垂直顶至大鼠后足爪心固定位置直至大鼠发生撤足反应，记录撤足时测痛仪所显示最大力度，每隔 5 min 测定一次，共 3 次，取平均值（刺激后出现明显缩足、舔足、抬足均视为阳性反应）[11]。

1.3 实时荧光定量（q-PCR）检测大鼠脊髓中 *trpv1*、*trpv4* mRNA 的表达情况

行为学实验结束后，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（40 mg·kg^{-1}）麻醉大鼠处死，冰上取出腰膨大（L_4 ～ L_6）段脊髓。采用 Trizol 提取脊髓组织（DRG）组织的总 RNA。使用 TaKaRa 试剂盒依次加入各试剂反转录。按照 NovoStar Green PCR Mix 说明依次加入上下游引物、各组产物 cDNA 及双蒸水制备 25 μL PCR 扩增反应体系的混合物，混匀后置于 PCR 仪进行 PCR 扩增实验。反应结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。上样，电压 120 V，电流 50 mA，电泳 1 h。紫外凝胶成像仪检测。以 *β-actin* mRNA 内参定量。引物序列如下：TRPV1：F5'-GTAGCACGCAGACCCCTAATC-3'，R5'-GAAGTAGAAGATGCGCTTGACA-3'；TRPV4：F5'-CCGATGA GCTGGGTCATTTC-3'，R5'-GAAGGGCAGATCCACGT CATA-3'；*β*-actin：F5'-TGTTACCAACTGGGACGAC-3'，R5'-GGTGTGAAGGTCTCAAACAT-3'。

1.4 蛋白质印迹（Western blot）法检测大鼠脊髓中 TRPV1 蛋白的表达水平

脊髓加入 RIPA 裂解液进行匀浆，4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，BCA 法进行蛋白定量。配制 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，每个上样孔加样 30 μg，恒压 90 V，120 min 电泳。恒流 350 mA，120 min 进行转膜。转膜后 5% 脱脂牛奶 4 ℃封闭过夜，TRPV1（1∶500），GAPDH（1∶1000，Abcam，United States）室温孵育 1 h，TBST 冲洗 3 次（5 min/ 次）。二抗（1∶2000）室温孵育 1 h，TBST 冲洗 3 次（5 min/ 次），加入适量的显影液，曝光。使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.5 免疫荧光检测大鼠脊髓背角星形胶质细胞活化情况

行为学实验结束后，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（40 mg·kg^{-1}）麻醉大鼠，4% 多聚甲醛灌流固定，取 L_4 ～ L_6 段脊髓，后固定 24 h，20% ～ 30% 蔗糖梯度脱水，组织沉底后，OTC 包埋制备成脊髓组织冰冻切片。切片 30 μm，PBS 漂洗后置于载玻片上，0.15% Triton X-100 和 0.25% 牛血清白蛋白（BSA）室温封闭 1 h，PBS 漂洗 3 次，孵育一抗（1∶200，Abcam，United States）4 ℃过夜，PBS 漂洗 3 次，二抗（1∶500，Abcam，United States）避光室温下孵育 1 h，PBS 漂洗 3 次，用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片，于显微镜下观察并拍照，使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行荧光强度定量分析。

1.6 ELISA 检测大鼠脊髓炎性因子 TNF-*α*、IL-1*β* 表达水平

取大鼠脊髓组织，剪成小块并捣碎。以 1000 r·min^{-1} 的速率离心 10 min，取上清液，保存在－ 80 ℃冰箱。检测时，在室温下解冻。按照 ELISA 试剂盒肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）（货号：ER-C102a.96，NeoBioscience）和 ELISA 试剂盒白细胞介素 1*β*（IL-1*β*）（货 号：ERC007.96，NeoBioscience）操作说明书分别检测 TNF-*α*、IL-1*β* 的水平。

1.7 统计方法

符合正态分布的计量资料表示为 $\bar{x}\pm s$，行为学数据的统计采用重复度量的方差分析。在重复度量的方差分析中，以分组作为组间因素，以时间作为组内因素。如果存在差异则采用单因素方差分析结合 *LSD* 检验进一步考察差异的来源。多组间比较通过 One-way ANOVA 分析，两组间比较采用 *t* 检验，全部统计过程采用 SPSS 17.0 计软件包进行。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蟾毒灵对大鼠体重及运动能力的影响

如图 1A 所示，给药前大鼠基础体重差异均无统计学意义。造模期间，与对照组相比，长春新碱组大鼠自给药第 2 日体重开始出现显著下降（$P < 0.01$）。蟾毒灵（0.25、0.5 mg·kg^{-1}）未改善长春新碱所致的大鼠体重增长减缓。在转棒实验中（见图 1B），与对照组相比，长春新碱组大鼠在给药 15 d 后，转棒停留时间明显缩短（$P < 0.05$）。与长春新碱组相比，蟾毒灵（0.25、0.5 mg·kg^{-1}）组大鼠转棒时间明显延长（$P < 0.01$），提示蟾毒灵可以一定程度改善长春新碱所致的大鼠的运动协调能力受损。

2.2 蟾毒灵对大鼠疼痛行为的影响

如图 2 所示，长春新碱组在给药第 10 日后热痛阈明显下降（$P < 0.05$），并维持到 20 d 左右。长春新碱组在给药第 10 日左右出现了机械痛阈值明显的下降（$P < 0.05$），由基础值 20 g 降低到了 10 g 左右。与长春新碱组相比，蟾毒灵

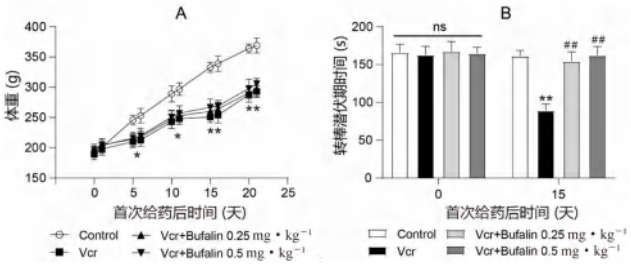

图 1　各组大鼠体重（A）及转棒运动时间（B）的比较

Fig 1　Body weight（A）and rotarod test retention time at different time（B）of each rat group

注：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$；与长春新碱组相比，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the control group，$^{**}P < 0.01$；*vs* the Vcr group，$^{\#\#}P < 0.01$.

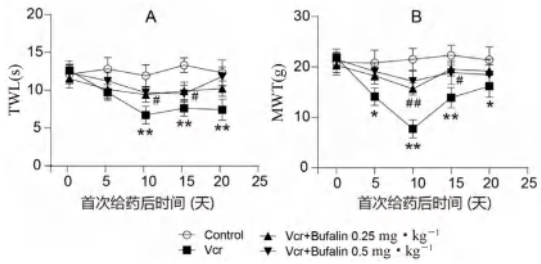

图 2　各组大鼠不同时间点 TWL（A）和 MWT（B）的比较

Fig 2　TWL（A）and MWT（B）at different time of each rat group

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与长春新碱组相比，$^{\#}P < 0.05$。

Note：*vs* the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the Vcr group，$^{\#}P < 0.05$.

（0.25，0.5 mg • kg^{-1}）组大鼠热 / 机械痛阈值下降的幅度显著较小（$P < 0.05$）。表明蟾毒灵可缓解长春新碱所致的热 / 机械痛敏。

2.3　蟾毒灵对大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白表达的影响

如图 3 所示，与对照组相比，长春新碱组大鼠脊髓内 *trpv1* mRNA 及 TRPV1 蛋白表达水平均有明显的上升（$P < 0.01$），而 *trpv4* mRNA 无明显表达差异。与长春新碱组相比，蟾毒灵（0.25、0.5 mg • kg^{-1}）可显著降低大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。提示蟾毒灵可以抑制长春新碱所致的大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白的表达升高。

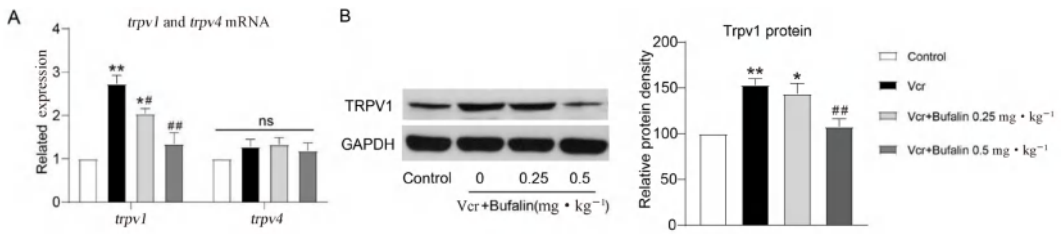

图 3　各组大鼠脊髓内 *trpv1*、*trpv4* mRNA 表达水平（A）及 TRPV1 蛋白表达水平（B）

Fig 3　*Trpv1*，*trpv4* mRNA（A）and TRPV1 protein expression levels（B）in each rat group

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与长春新碱组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the Vcr group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.05$.

2.4　蟾毒灵对大鼠脊髓背角星形胶质细胞活化及炎症因子的影响

如图 4 所示，长春新碱组大鼠脊髓背角处星形胶质细胞活化标志物 GFAP 蛋白的表达相较于对照组明显增多（$P < 0.01$）。蟾毒灵（0.25、0.5 mg • kg^{-1}）组相较长春新碱组，GFAP 蛋白表达有明显降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。此外，蟾毒灵（0.25、0.5 mg • kg^{-1}）可缓解长春新碱诱导的脊髓 TNF-α 的表达上调（$P < 0.05$）。蟾毒灵（0.5 mg • kg^{-1}）可缓解 IL-1β 的表达上调（$P < 0.05$）。以上结果表明蟾毒灵可部分抑制长春新碱所致的脊髓星形胶质细胞的活化和炎症反应。

3　讨论

本研究选用长春新碱建立大鼠 CIPN 模型，结果显示 Vcr 组大鼠机械痛阈值、热痛阈值均显著降低，证明 CIPN 模型成功建立。同时，Vcr 组大鼠脊髓内 *trpv1* mRNA 及 TRPV1 蛋白均显著增高，脊髓背角星形胶质细胞活化标志物 GFAP

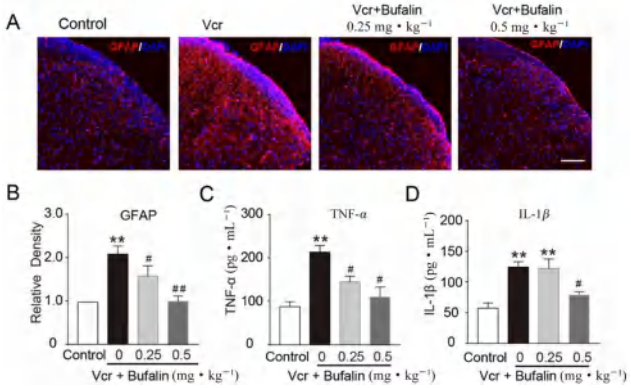

图 4　各组大鼠脊髓背角星形胶质细胞活化情况（A，B），以及脊髓 TNF-α（C）和 IL-1β（D）表达水平分析（×200）

Fig 4　Aactivation of astrocytes in the spinal dorsal horn of rats in each group（A and B）and the expression levels of TNF-α（C）and IL-1β（D）in the spinal cord（×200）

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与长春新碱组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the Vcr group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.05$.

以及炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 表达也显著增高。腹腔给予蟾毒灵可缓解 Vcr 所致的大鼠机械 / 热痛敏，并可显著减低 Vcr 所致的 TRPV1 表达上调和星形胶质细胞的活化。

TRPV1 可被热、酸、辣椒素等刺激激活，在 CIPN 的形成过程中发挥着重要的作用 [12-13]。此外，TRPV1 还可参与多种炎症介质产生的有害刺激的痛觉传递，研究表明 [14]，多种促炎性细胞因子，如 TNF-α 和 IL-1β 会激活感觉神经元中的信号转导通路，导致下游 TRP 通道的激活和敏化。本研究结果显示，Vcr 组大鼠脊髓内 TRPV1 蛋白的表达明显增高，而蟾毒灵显著抑制了 TRPV1 蛋白的上调。研究表明，蟾毒灵有很强的抗炎活性，可抑制 NF-κB 信号通路的激活，在炎性模型中，可降低组织中促炎症相关因子 iNOS、COX-2、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的表达 [15]。本实验结果显示，蟾毒灵显著抑制了脊髓水平炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 的表达，蟾毒灵调控 TRPV1 蛋白表达可能是其发挥抗炎作用的原因之一。脊髓星形胶质细胞的功能改变在 CIPN 中也发挥着重要的作用，化疗药物可诱导星形胶质细胞的活化，进而触发促炎细胞因子 TNF、IL-1β 和 IL-6 的释放 [16]。与报道一致，本实验结果证明长春新碱诱导的大鼠脊髓背角星形胶质细胞出现了明显的活化，而蟾毒灵可抑制星形胶质细胞的活化和炎症，这可能是蟾毒灵发挥镇痛作用的机制。

综上所述，本研究表明蟾毒灵（0.25、0.5 mg • kg^{-1}）可改善长春新碱诱导的大鼠神经病理性疼痛，该镇痛作用可能与抑制脊髓背角炎症反应和抑制 TRPV1 通道有关。本研究明确了蟾毒灵对长春新碱所致神经病理性疼痛的确切镇痛作用，并部分阐明了机制，为临床上蟾毒灵相关制剂与化疗药物联合用药应用提供了理论依据。

参考文献

[1] Hu LY，Mi WL，Wu GC，et al. Prevention and treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy：therapies based on cipn mechanisms [J]. Curr Neuropharmacol，2019，17（2）：184-196.

[2] Maihöfner C，Diel I，Tesch H，et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy（CIPN）：current therapies and topical treatment option with high-concentration capsaicin [J]. Support Care Cancer，2021，29（8）：4223-4238.

[3] Ba X，Wang J，Zhou S，et al. Cinobufacini protects against paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain and suppresses trpv1 up-regulation and spinal astrocyte activation in rats [J]. Biomed Pharmacother，2018，108：76-84.

[4] Singh R，Adhya P，Sharma SS. Redox-sensitive trp channels：a promising pharmacological target in chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. Expert Opin Ther Targets，2021，25（7）：529-545.

[5] Sisignano M，Baron R，Scholich K，et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain [J]. Nat Rev Neurol，2014，10（12）：694-707.

[6] 李锐莉，金建闻，张慧峰，等 . 红花注射液通过抑制脊髓小胶质细胞激活及炎性因子的释放缓解大鼠炎性痛的研究 [J]. 中南药学，2019，17（11）：1859-1863.

[7] Wang Z，Qi F，Cui Y，et al. An update on chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics [J]. Biosci Trends，2018，12（3）：220-239.

[8] Zhou B，Wu F，Yuan L，et al. Is huachansu beneficial in treating advanced non-small-cell lung cancer? Evidence from a meta-analysis of its efficacy combined with chemotherapy [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2015，2015：408145.

[9] Long L，Zhong W，Guo L，et al. Effect of bufalin-plga microspheres in the alleviation of neuropathic pain via the cci model [J]. Front Pharmacol，2022，13：910885.

[10] Wen L，Huang Y，Xie X，et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of bufalin in rodents [J]. Mediators Inflamm，2014，2014：171839.

[11] Wang J，Jiang C，Ba X，et al. Selective activation of metabotropic glutamate receptor 7 blocks paclitaxel-induced acute neuropathic pain and suppresses spinal glial reactivity in rats [J]. Psychopharmacology（Berl），2021，238（1）：107-119.

[12] Luo J，Bavencoffe A，Yang P，et al. Zinc inhibits trpv1 to alleviate chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. J Neurosci，2018，38（2）：474-483.

[13] 周海辉，张海霞，葛卫红 . 化疗引起的神经痛治疗靶点温度选择性 trp 通道的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2018，33（6）：1551-1554.

[14] Wang Y，Feng C，He H，et al. Sensitization of trpv1 receptors by tnf-α orchestrates the development of vincristine-induced pain [J]. Oncol Lett，2018，15（4）：5013-5019.

[15] Wang JY，Chen L，Zheng Z，et al. Cinobufocini inhibits NF-κb and COX-2 activation induced by TNF-α in lung adenocarcinoma cells [J]. Oncol Rep，2012，27（5）：1619-1624.

[16] Fumagalli G，Monza L，Cavaletti G，et al. Neuroinflammatory process involved in different preclinical models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. Front Immunol，2020，11：626687.

（收稿日期：2022-12-08；修回日期：2023-02-13）

基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析桂附地黄丸的化学成分及入血成分

刘爽[1]，戴宇滢[1]，赵爽同[2]，陈晴[1]，魏苗苗[1]，周昌燕[1]，高金薇[1*]（1. 沈阳医学院药学院，沈阳 110034；2. 沈阳医学院口腔学院，沈阳 110034）

摘要：目的 采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱联用技术（UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS）对该复方的体外化学成分谱及入血成分进行研究。**方法** 利用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），以 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0 ～ 1 min，1%B；1 ～ 10 min，1% ～ 99%B；10 ～ 11.5 min，99%B；11.5 ～ 11.6 min，99% ～ 1%B；11.6 ～ 13.5 min，1%B），流速为 0.4 mL • min^{-1}，在电喷雾离子源（ESI）下，以正、负离子模式采集数据。运用 Xcalibur software 软件，根据化合物保留时间、准分子离子峰和二级质谱信息，结合对照品及文献报道，对该复方的化学成分及入血成分进行解析。**结果** 在桂附地黄丸体外样品中共鉴定出 85 个化学成分，包括生物碱类 11 个、环烯醚萜苷类 14 个、苯乙醇苷类 9 个、单萜苷类 11 个、三萜类 14 个、酚酸类 9 个、有机酸 / 醛 6 个、糖苷类 5 个、其他类 6 个，并对化学成分进行药材来源归属；共表征了大鼠血浆中的化合物 22 个，包括 14 个原形药物和 8 个代谢物。**结论** 所建立的方法能高效、灵敏地分析桂附地黄丸中的体外化学成分和入血成分，初步阐明了该复方的体外化学成分轮廓及血中移行成分，为其体内的药效物质基础和作用机制研究奠定基础。

关键词：桂附地黄丸；UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS；化学成分；入血成分

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2069-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.016

Chemical constituents of Guifu Dihuang pills and absorbed components in the plasma based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technology

LIU Shuang[1], DAI Yu-ying[1], ZHAO Shuang-tong[2], CHEN Qing[1], WEI Miao-miao[1], ZHOU Chang-yan[1], GAO Jin-wei[1*] (1. *School of Pharmacy, Shenyang Medical College, Shenyang* 110034; 2. *College of Dentistry, Shenyang Medical College, Shenyang* 110034)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents spectrum of Guifu Dihuang pills and absorbed components in the plasma by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technology. **Methods** Gradient elution was performed on an ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid in water (A) to 0.1% formic acid in acetonitrile (B) as the mobile phase (0 ～ 1 min, 1%B; 1 ～ 10 min, 1% ～ 99%B; 10 ～ 11.5 min, 99%B; 11.5 ～ 11.6 min, 99% ～ 1%B; 11.6 ～ 13.5 min, 1%B) and the flow rate at 0.4 mL • min^{-1}. The data were collected in the positive and negative ion mode under the electrospray ion source. The chemical constituents and absorbed components in the plasma were analyzed by Xcalibur software according to the retention time, excimer ion peak and secondary mass spectrum, in combination with the reference substance and literature reports. **Results** Totally 85 chemical components were identified in Guifu Dihuang pills, including 11 alkaloids, 14 iridoid glycosides, 9 phenylethanolic glycosides, 11 monoterpene glycosides, 14 triterpenes, 9 phenolic acids, 6 organic acids/aldehydes, 5 glycosides and

基金项目：沈阳医学院大学生科研课题（No.20219042）；沈阳医学院博士科研启动基金（No.20205045）。

作者简介：刘爽，女，主要从事中药质量控制方法研究，email：656120105@qq.com *通信作者：高金薇，女，讲师，主要从事中药复方药效物质基础研究，email：gaojinwei0903@163.com

6 other types. Totally 22 chemical constituents were identified in the rat plasma after the intragastric administration, including 14 prototype constituents and 8 metabolites. **Conclusion** The established method can efficiently analyze the chemical constituents and absorbed components in the plasma in Guifu Dihuang pills and elucidate the contour of the chemical components in vitro in the compound prescription and constituents absorbed into the blood, which lays a foundation for the study of the material basis and mechanism of its in vivo efficacy.

Key words: Guifu Dihuang pill; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; chemical component analysis; absorbed component in the plasma

桂附地黄丸收载于 2020 年版《中国药典》一部成方制剂和单味制剂中，由肉桂（20 g）、附子（制）（20 g）、熟地黄（160 g）、山茱萸（制）（80 g）、牡丹皮（60 g）、山药（80 g）、茯苓（60 g）、泽泻（60 g）八味药组成，具有温补肾阳的功效，用于肾阳不足，腰膝痠冷，肢体浮肿，小便不利或反多，痰饮喘咳，消渴 [1]。现代药理研究表明，该药具有改善肾功能、降血脂、降血糖、增强免疫功能、改善内分泌等作用，临床上主要用于治疗慢性肾炎、慢性尿道炎、顽固性遗尿、男性不育和精子减少症、骨质疏松等疾病 [2-3]。

桂附地黄丸成分复杂，药效物质基础不明确，要阐明该复方的药效物质，对其体外化学成分及体内入血成分研究至关重要。前期报道中，只涉及到少数几个化学成分，如采用 HPLC 法测定肉桂中的桂皮醛含量 [4]；采用 HPLC 法测定芍药苷、丹皮酚和没食子酸的含量 [5]。因此，亟需建立一种全面、系统的分析方法对桂附地黄丸的体外化学成分和血中移行成分进行全面表征，为其药效物质基础及机制研究提供参考。UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 具有灵敏度高、准确性好等优点，适用于中药复方复杂体系中化合物的鉴定，近年来广泛应用于中药分析领域 [6]。本实验拟采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 对桂附地黄丸的体内外化学成分进行全面分析，表征该复方的体外化学成分轮廓及体内入血成分，以期为其体内的药效物质基础及机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

UHPLC-Q Exactive Orbitrap MS、Xcalibur 2.2 质谱工作站（Thermo Scientific 公司）；TTL-DCI 型氮吹仪（北京同泰联科技发展有限公司）；Sartorious BT25S 型十万分之一电子分析天平（北京赛多利斯仪器有限公司）；－ 80 ℃超低温冷冻储藏冰箱（ThermoFisher Scientific 公司）；KQ-300 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

毛蕊花糖苷（批号：HR4429881）、马钱苷（批号：HL163398198）、莫诺苷（批号：HR912382）、獐芽菜苷（批号：HR11123W3）、丹皮酚（批号：HR151219S1）、没食子酸（批号：HR14726S1）、原儿茶酸（批号：HR14413S1）、桂皮醛（批号：HR20031W1）、芍药苷（批号：HR2031881）对照品（陕西宝鸡辰光科技有限公司，纯度均≥ 98%）。桂附地黄丸（水蜜丸，批号：20031676，北京同仁堂）。乙腈和甲醇（质谱级，美国 ThermoFisher 公司）；甲酸（色谱级，德国 Merck 公司）。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 12 只，体质量（250±10）g [辽宁长生生物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（辽）2015-0001]，饲养于 SPF 级动物房，光照 12 h，温度 22 ～ 24 ℃，相对湿度 55% ～ 65%，实验前适应性喂养 1 周。动物实验经沈阳医学院实验动物伦理委员会批准，批准号 SYYXY2020090201。

2 方法

2.1 色谱条件和质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），以 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0 ～ 1 min，1%B；1 ～ 10 min，1% ～ 99%B；10 ～ 11.5 min，99%B；11.5 ～ 11.6 min，99% ～ 1%B；11.6 ～ 13.5 min，1%B），流速 0.4 mL・min^{-1}，进样量 2 μL，柱温 30 ℃。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源（ESI），正、负离子检测模式；扫描模式为 Full MS/dd-MS^2；离子源参数为氮气分别作为鞘气和辅助气体，流速分别为 30、10 arb，毛细管温度 320 ℃，辅助气温度 350 ℃。质谱质量扫描范围 *m/z* 100.0 ～ 1500.0，一级分辨率为 70 000，二级分辨率为 17 500，二级碰撞能为 15、30、60 eV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取丸剂约 1.0 g，精密

称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 20 mL，称重。超声处理 45 min，放冷，补足失重，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2　对照品溶液的制备　分别取对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含毛蕊花糖苷 0.173 mg、马钱苷 0.102 mg、莫诺苷 0.163 mg、獐芽菜苷 0.160 mg、丹皮酚 0.253 mg、没食子酸 0.205 mg、原儿茶酸 0.250 mg、桂皮醛 0.224 mg、芍药苷 0.148 mg 的混合对照品溶液，过滤，备用。

2.2.3　血浆样品的采集　12 只大鼠随机分成空白组和给药组，实验前禁食不禁水 12 h，给药组按 1.2 g·kg^{-1} 给药，空白组给予等量生理盐水。灌胃给药前和给药后 0.5、1、1.5、2、3、4、8、12、24 h 眼眶取血 0.5 mL，置于肝素钠抗凝 EP 管中，混合均匀，在冷冻离心机中（3000 r·min^{-1}）离心 10 min，取上清液，置于－ 80 ℃冰箱保存备用。

2.2.4　血浆样品的处理　分别取 6 只鼠给药后 9 个时间点的血浆各 30 μL，共 1.6 mL 于 EP 管中，涡旋混匀 30 s，取 1 mL 混合血浆于另一 EP 管中，加 3 mL 甲醇沉淀蛋白，涡旋混匀 5 min，离心（12 000 r·min^{-1}）10 min，分取上清液于另一离心管中，于 30 ℃氮气流下吹干，残留物用 50% 甲醇 100 μL 溶解，超声 3 min，涡旋混匀 1 min，离心（12 000 r·min^{-1}）10 min，取上清液进样分析。空白血浆按同法处理。

2.3　数据处理

首先，通过检索 Web of Science、中国知网（CNKI）等网络资源，建立桂附地黄丸化学成分的内部数据库，包括化合物名称、化学式、准分子离子峰及二级质谱信息。在 Q-Exactive Orbitrap 质谱仪上以正、负离子模式获得高分辨率全质量扫描，并使用 dd-MS^2 数据扫描模式同时获得 MS^2 数据。根据建立的数据库筛选出分子式匹配、精确相对分子质量误差在 5（×10^{-6}）内的潜在候选化合物。其次，有对照品的化合物，直接通过比对出峰时间、准分子离子峰、二级碎片离子信息来鉴定确认。其他化合物根据出峰时间、准分子离子峰及二级碎片离子信息与文献进行比对指认。

通过与桂附地黄丸的体外成分匹配，筛选大鼠体内吸收的原形成分。通过比较每种代谢物碎片离子的 *m/z* 值与原形的 *m/z* 值，将代谢位点定位到分子的某个区域，并提出代谢物的可能结构。最后，通过将主要代谢物的保留时间、准确质量和碎片离子与文献中进行比较，确定主要代谢物。

3　结果

3.1　桂附地黄丸的化学成分分析

在桂附地黄丸中共检测到 85 个化合物，其中包括生物碱类 11 个，环烯醚萜苷类 14 个，苯乙醇苷类 9 个，单萜苷类 11 个，三萜类 14 个，酚酸类 9 个，有机酸 / 醛 6 个，糖苷类 5 个，其他类 6 个。桂附地黄丸中正、负离子模式下得到的总离子流图见图 1，所鉴定化合物的具体信息见表 1。

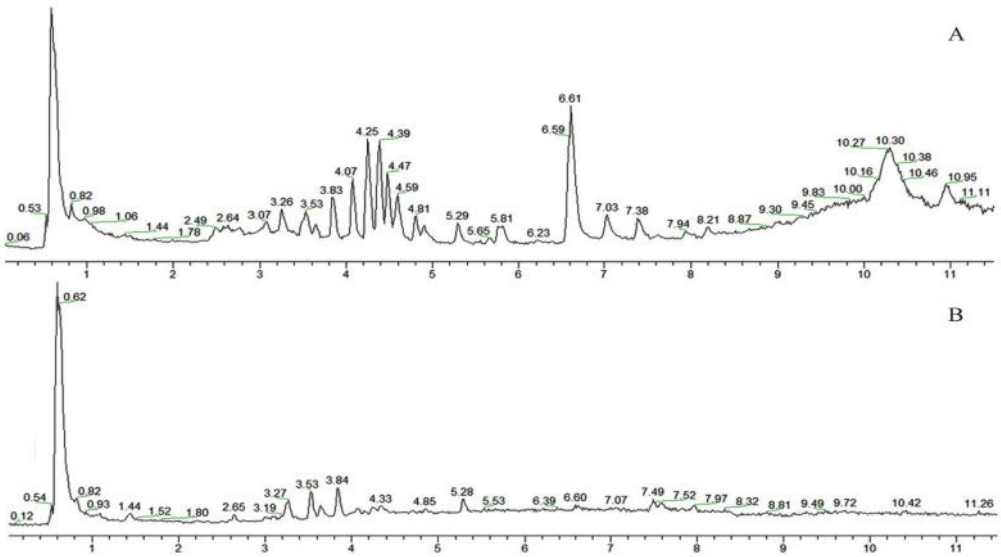

图 1　桂附地黄丸供试品 TIC 图

Fig 1　Total ion chromatograms（TIC）of Guifu Dihuang pill

A. 正离子模式（positive ion mode）；B. 负离子模式（negative ion mode）

3.1.1　生物碱类化合物的鉴定　在桂附地黄丸中鉴定的 11 个生物碱类化合物，均来源于君药附子，该类成分的准分子离子峰均为强烈的 [M ＋ H]$^+$ 峰，在二级质谱中易脱去一分子相对分子质量为 60 的 CH_3COOH 中性碎片分子，在三级质谱中继续脱去 CH_3COOH 中性分子或失去相对分子质量

表 1 桂附地黄丸中体外化学成分及体内入血成分的鉴定结果

Tab 1 Identification of chemical components *in vitro* and absorbed components *in vivo* in Guifu Dihuang pills

No.	t_R/min	化合物	分子式	准分子离子峰 / (*m/z*)	偏差 / ($\times10^{-6}$)	碎片离子	化合物类型
1	0.65	水苏糖	$C_{24}H_{42}O_{21}$	665.2154 $[M-H]^-$	2.3	383.1195，179.0551	糖类
2	0.70	酒石酸	$C_4H_6O_6$	149.0080 $[M-H]^-$	− 0.3	87.0073，59.0124	有机酸
3	0.71	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.1092 $[M-H]^-$	3.9	221.0660，179.0551	糖类
4	0.72	苹果酸 #	$C_4H_6O_5$	133.0131 $[M-H]^-$	− 0.2	115.0024，71.0124	酚酸类
5	0.91	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0876 $[M-H]^-$	2.6	191.0546，173.0082，111.0074	酚酸类
6	0.91	腺嘌呤 #	$C_5H_5N_5$	136.0615 $[M+H]^+$	− 3.9	107.0490，91.0542	嘌呤碱
7	0.92	尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	243.0618 $[M-H]^-$	2.6	200.0557，152.0339，110.0234	核苷
8	0.92	柠檬酸 #	$C_6H_8O_7$	191.0189 $[M-H]^-$	1.4	173.0079，129.0182，111.0074，11111.01	有机酸
9	0.93	梓醇 #	$C_{15}H_{22}O_{10}$	407.1179 $[M+HCO_2]^-$	2.5	361.1156，199.0602，155.0340	环烯醚萜苷
10	1.24	香草酸 #	$C_8H_8O_4$	167.0339 $[M-H]^-$	− 0.8	149.0226，123.0438	酚酸类
11	1.28	没食子酸 *	$C_7H_6O_5$	169.0134 $[M-H]^-$	0.5	125.0231，107.0440	酚酸类
12	1.36	没食子酰葡萄糖	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0674 $[M-H]^-$	4.0	295.9763，271.0450，169.0133，125.0232	糖苷类
13	1.98	鸟苷	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	282.0845 $[M-H]^-$	0.3	219.8451，150.0410	核苷
14	2.55	5-HMF#	$C_6H_6O_3$	127.0387 $[M+H]^+$	− 3.7	109.0281，97.0283	呋喃衍生物
15	2.61	牡丹苷 B	$C_{18}H_{24}O_{14}$	463.1098 $[M-H]^-$	2.6	403.0884，373.0778，343.0672，169.0133	糖苷类
16	2.65	8- 表番木鳖酸	$C_{16}H_{24}O_{10}$	375.1299 $[M-H]^-$	3.4	213.0763，151.0753	环烯醚萜苷
17	2.68	原儿茶酸 #*	$C_7H_6O_4$	153.0183 $[M-H]^-$	− 0.2	109.0282，81.0332	酚酸类
18	2.77	10- 羟在多根乌头碱	$C_{22}H_{35}NO_6$	394.2575 $[M+H]^+$	− 4.9	376.2463	生物碱
19	2.92	2，3-di-*O*- 没食子酰 -*β*-*D*- 葡萄糖	$C_{20}H_{20}O_{14}$	483.0788 $[M-H]^-$	3.9	331.0673，313.0564，169.0133	糖苷类
20	2.97	Decaffeoyl-verbascoside	$C_{20}H_{30}O_{12}$	461.1674 $[M-H]^-$	3.5	161.0445，135.0440	苯乙醇苷类
21	3.01	6-*O*- 甲基梓醇	$C_{16}H_{24}O_{10}$	375.1304 $[M-H]^-$	1.9	213.0762，125.0596	环烯醚萜苷
22	3.08	马钱苷酸	$C_{16}H_{24}O_{10}$	375.1304 $[M-H]^-$	1.9	213.0763，169.0861，151.0753	环烯醚萜苷
23	3.18	原儿茶醛 #	$C_7H_6O_3$	137.0232 $[M-H]^-$	− 0.15	109.0285，119.0127	有机醛
24	3.20	马钱子苷 #*	$C_{17}H_{26}O_{10}$	435.1491 $[M+HCO_2]^-$	3.5	389.1467，227.0921，127.0391，101.0231	环烯醚萜苷
25	3.22	carmichaeline	$C_{22}H_{35}NO_4$	378.2627 $[M+H]^+$	− 5.0	360.2515	生物碱
26	3.24	桂皮酸 #	$C_9H_8O_2$	149.0591 $[M+H]^+$	− 4.4	121.0644，103.0541，93.0698	有机酸
27	3.29	7-*O*- 甲基马钱苷酸	$C_{17}H_{26}O_{10}$	389.1095 $[M-H]^-$	4.9	345.1560，183.0317，165.0543，59.0124	环烯醚萜苷
28	3.29	宋果灵	$C_{22}H_{31}NO_3$	358.2359 $[M+H]^+$	− 5.0	340.2255，322.2152	生物碱
29	3.29	乌头原碱	$C_{25}H_{41}NO_9$	500.2831 $[M+H]^+$	− 4.5	450.2469，418.2215	生物碱
30	3.30	没食子酸甲酯	$C_8H_8O_5$	183.0290 $[M-H]^-$	1.0	168.0054，151.0386，140.0103	酚酸类
31	3.31	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	179.0342 $[M-H]^-$	0.5	135.0441	有机酸
32	3.34	7- 脱氢马钱素	$C_{17}H_{24}O_{10}$	389.1784 $[M+H]^+$	3.5	227.0902，195.0643	环烯醚萜苷
33	3.37	莫诺苷 #*	$C_{17}H_{26}O_{11}$	451.1455 $[M+HCO_2]^-$	1.1	405.1396，243.0878，155.0337，101.0230	环烯醚萜苷
34	3.37	牡丹皮苷 E	$C_{24}H_{30}O_{13}$	525.1617 $[M-H]^-$	2.6	495.1502，317.1247，167.0340	单萜苷类
35	3.53	丹皮酚原苷	$C_{20}H_{28}O_{12}$	505.1569 $[M+HCO_2]^-$	5.0	459.1524，293.0880，165.0547，150.0311	糖苷类
36	3.53	丹皮酚 #*	$C_9H_{10}O_3$	167.0695 $[M+H]^+$	− 4.7	125.0593，121.0644，102.9701	有机酚
37	3.55	neoline	$C_{24}H_{39}NO_6$	438.2829 $[M+H]^+$	− 4.8	420.2727，388.2466	生物碱
38	3.58	松果菊苷	$C_{35}H_{46}O_{20}$	785.2524 $[M-H]^-$	3.4	623.2196，461.1679，161.0235	苯乙醇苷类
39	3.58	地黄苦苷	$C_{16}H_{26}O_8$	345.1559 $[M-H]^-$	− 3.5	183.1019，165.0912	有机酸
40	3.61	獐牙菜苷 *	$C_{16}H_{22}O_9$	403.1226 $[M+HCO_2]^-$	2.5	357.1198，195.0654，151.0749，125.0231	环烯醚萜苷
41	3.66	没食子酰氧化芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{16}$	647.1625 $[M-H]^-$	3.5	509.1331，399.0930，313.0567，271.0461	单萜苷类
42	3.74	suffruticoside A/C	$C_{27}H_{32}O_{16}$	611.1616 $[M-H]^-$	1.3	445.0991，343.0689，169.0132，125.0231	糖苷类
43	3.74	没食子酰 - 芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{15}$	631.1648 $[M-H]^-$	− 1.5	479.0412，399.7472，313.0565，169.0134	单萜苷类
44	3.76	塔拉乌头胺	$C_{24}H_{39}NO_5$	422.2880 $[M+H]^+$	− 4.9	390.2619，358.2367	生物碱
45	3.77	焦地黄苷 A1/A2	$C_{36}H_{48}O_{20}$	799.2682 $[M-H]^-$	5.0	623.2199，477.1635	苯乙醇苷类
46	3.85	桂皮醛 *	C_9H_8O	133.0645 $[M+H]^+$	− 3.0	105.0697，95.0491	有机醛
47	3.97	没食子酸乙酯	$C_9H_{10}O_5$	197.0448 $[M-H]^-$	1.7	169.0133，125.0232	酚酸
48	4.04	焦地黄苷 B1/B2	$C_{37}H_{50}O_{20}$	813.2847 $[M-H]^-$	4.5	637.2349，175.0393	苯乙醇苷类
49	4.06	毛蕊花糖苷 *	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.1992 $[M-H]^-$	3.5	461.1670，315.1103，161.0235，135.0440	苯乙醇苷类
50	4.16	芍药苷 *	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.1606 $[M+HCO_2]^-$	4.3	479.1606，449.1456，327.1095，165.0547，121.0283	单萜苷类
51	4.22	山茱萸新苷Ⅰ	$C_{34}H_{50}O_{20}$	823.2892 $[M+HCO_2]^-$	2.3	777.2825，615.2300，227.0925	环烯醚萜苷
52	4.23	异毛蕊花糖苷	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.1992 $[M-H]^-$	3.5	461.1670，161.0235	苯乙醇苷类

续表 1

No.	t_R/min	化合物	分子式	准分子离子峰 / (*m/z*)	偏差 / ($\times10^{-6}$)	碎片离子	化合物类型
53	4.25	牡丹皮苷 H	$C_{30}H_{32}O_{14}$	615.1718 $[M-H]^-$	1.5	477.1414，431.1353，281.0664，137.0233	单萜苷类
54	4.32	焦地黄苷 D	$C_{30}H_{38}O_{15}$	637.2153 $[M-H]^-$	4.0	461.1667，175.0391，160.0155	苯乙醇苷类
55	4.37	山茱萸新苷Ⅱ	$C_{24}H_{30}O_{14}$	541.1567 $[M-H]^-$	1.5	347.0753，169.0133，125.0231	环烯醚萜苷
56	4.37	氧化芍药苷 #	$C_{23}H_{28}O_{12}$	541.1572 $[M+HCO_2]^-$	1.7	495.1543，195.0645	单萜苷类
57	4.38	7-*α*-*O*- 乙基莫诺苷	$C_{19}H_{30}O_{11}$	479.1213 $[M+HCO_2]^-$	4.5	271.1189，123.0233，101.0229	环烯醚萜苷
58	4.52	7-*β*-*O*- 乙基莫诺苷	$C_{19}H_{30}O_{11}$	479.1213 $[M+HCO_2]^-$	4.5	271.1189，123.0233，101.0229	环烯醚萜苷
59	4.53	6-*O*-E- 阿魏酰基筋骨草醇	$C_{25}H_{32}O_{12}$	523.1805 $[M-H]^-$	− 0.5	479.1539，449.1465，193.0502，175.0389	环烯醚萜苷
60	4.56	苯甲酰新乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	590.2932 $[M+H]^+$	− 3.2	540.2562，526.2400，508.2310，105.0333	生物碱
61	4.65	地黄苷	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.2311 $[M-H]^-$	4.8	475.1831，160.0155	苯乙醇苷类
62	4.68	牡丹皮苷 C	$C_{30}H_{32}O_{13}$	599.1784 $[M-H]^-$	3.5	551.1588，477.1411，447.1337，431.1337	单萜苷类
63	4.69	牡丹皮苷 J	$C_{31}H_{34}O_{14}$	629.1889 $[M-H]^-$	4.6	599.1769，507.1504	单萜苷类
64	4.83	异地黄苷	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.2311 $[M-H]^-$	4.8	475.1831，160.0155	苯乙醇苷类
65	4.86	苯甲酰氧化芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{13}$	599.1784 $[M-H]^-$	2.0	569.1609，477.1397，165.0547，137.0232	单萜苷类
66	4.99	苯甲酰次乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_9$	574.2992 $[M+H]^+$	− 3.2	542.2724，510.2512，105.0304	生物碱
67	5.24	牡丹皮苷 B	$C_{31}H_{34}O_{14}$	629.1889 $[M-H]^-$	3.2	553.1752，535.1865，121.0282	单萜苷类
68	5.24	苯甲酰 - 芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{12}$	629.1889 $[M+HCO_2]^-$	2.9	583.1865，121.0282	单萜苷类
69	5.4	新乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	632.3047 $[M+H]^+$	− 2.6	572.2833，540.2532，105.0333	生物碱
70	5.54	泽泻醇 H	$C_{30}H_{46}O_4$	471.3504 $[M+H]^+$	2.5	453.1995，177.0539	三萜类
71	5.63	次乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	616.3095 $[M+H]^+$	− 4.6	524.2617，338.1734，105.0333	生物碱
72	5.66	乌头碱	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	646.3189 $[M+H]^+$	− 1.8	586.2980，554.2717，526.2773，105.0333	生物碱
73	5.82	16- 氧代泽泻醇 A	$C_{30}H_{48}O_6$	505.3507 $[M+H]^+$	− 3.3	487.3396，451.3180，415.2823，397.2732	三萜类
74	5.85	泽泻醇 C-23- 醋酸酯	$C_{32}H_{48}O_6$	529.3506 $[M+H]^+$	4.4	511.3420，469.3294，451.3186，397.2594	三萜类
75	5.99	16- 氧代泽泻醇 A-24- 醋酸酯	$C_{32}H_{50}O_7$	547.3590 $[M+H]^+$	4.9	529.3506，469.3296，415.2825，353.2476	三萜类
76	6.23	泽泻醇 C	$C_{30}H_{46}O_5$	487.3414 $[M+H]^+$	− 1.2	469.3292，451.3200，397.2725，353.2466	三萜类
77	6.78	泽泻醇 L-23- 醋酸酯	$C_{32}H_{46}O_5$	511.3403 $[M+H]^+$	− 3.1	451.3185，397.2725	三萜类
78	7.13	泽泻醇 L	$C_{30}H_{44}O_4$	469.3306 $[M+H]^+$	− 2.9	451.3185，397.2713，353.2455	三萜类
79	7.46	泽泻醇 A	$C_{30}H_{50}O_5$	535.3648 $[M+HCO_2]^-$	2.8	471.3532，353.2512	三萜类
80	7.58	泽泻醇 B-23- 醋酸酯	$C_{32}H_{50}O_5$	515.3721 $[M+H]^+$	− 4.3	497.3602，437.3398，419.3295，383.2926	三萜类
81	7.74	茯苓酸	$C_{33}H_{52}O_5$	527.3744 $[M-H]^-$	− 3.3	511.3412，451.3211	三萜类
82	7.93	泽泻醇 A-24- 醋酸酯	$C_{32}H_{52}O_6$	577.3753 $[M+HCO_2]^-$	2.1	531.3743	三萜类
83	8.01	茯苓新酸 A#	$C_{31}H_{46}O_5$	497.3283 $[M-H]^-$	4.5	478.9883，423.2906，390.9847，211.1496	三萜类
84	8.14	泽泻醇 O	$C_{32}H_{48}O_5$	513.3567 $[M+H]^+$	4.9	495.3464，435.3240，339.2670	三萜类
85	8.69	山楂酸	$C_{30}H_{48}O_4$	517.3529 $[M+HCO_2]^-$	2.8	395.8311，314.9901	三萜类
M1	2.90	丹皮酚的羟基化和硫酸化	$C_9H_{10}SO_7$	261.0076 $[M-H]^-$	0.9	181.0498，166.0261，138.0309，123.0535	有机酚
M2	3.26	丹皮酚的硫酸化	$C_9H_{10}SO_6$	245.0124 $[M-H]^-$	2.3	165.0548，150.0312	有机酚
M3	3.47	丹皮酚的葡萄糖醛酸化	$C_{15}H_{18}O_9$	341.0884 $[M-H]^-$	4.2	165.0548，150.0311	有机酚
M4	3.67	羟基酪醇的硫酸化	$C_8H_{10}SO_6$	233.0124 $[M-H]^-$	3.8	153.0547，123.0401，109.0645	苯乙醇类
M5	3.72	原儿茶酸的甲基化和硫酸化	$C_8H_8O_7S$	246.9918 $[M-H]^-$	− 2.4	167.0339，151.0027	酚酸类
M6	3.90	原儿茶酸的二甲基化和硫酸化	$C_9H_{10}O_7S$	261.0076 $[M-H]^-$	− 3.1	181.0497，166.0261，137.0959	酚酸类
M7	3.96	去甲基化的丹皮酚	$C_8H_8O_3$	151.0389 $[M-H]^-$	4.8	135.0076，109.0280，91.2779，65.0382	有机酚
M8	4.93	没食子酸甲基化	$C_8H_8O_5$	183.0039 $[M-H]^-$	− 2.9	153.0057，139.0412	酚酸类

注：* 通过对照品比对确认；# 入血原形成分。

Note：* represents the compounds identified by the comparison of the reference substance；# absorbed prototype components in the plasma.

为 32 的 CH_3OH 中性分子、相对分子质量为 18 的 H_2O、相对分子质量为 50 的 $CH_3OH + H_2O$ 中性分子等。峰 72 在正离子模式下，准分子离子峰为 *m/z* 646.3189 $[M + H]^+$，二级碎片离子 *m/z* 586.2980 是由母离子丢失 CH_3COOH 而产生，此离子继续丢失 CH_3OH 产生 *m/z* 554.2717，继续丢失 $-CH_2CH_2$ 产生 *m/z* 526.2773，再继续脱 -OH 产生 *m/z* 509.2352。通过文献 [7] 比对，推测为乌头碱。峰 60 在正离子模式下，准分子离子峰为 *m/z* 590.2932 $[M + H]^+$，二级质谱中主要碎片离子峰为 *m/z* 540.2562 $[M + H\text{-}CH_6O_2]^+$、*m/z* 526.2400 $[M + H\text{-}CH_6O_2\text{-}CH_2]^+$，通过文献 [8] 比对，推测为苯甲酰新乌头原碱，其二级质谱图和裂解途径见图 2。

3.1.2 环烯醚萜苷类化合物的鉴定 本方中，环烯醚萜苷类成分主要来源于熟地黄、山茱萸两味中药，共鉴定 14 个化合物，如马钱苷、莫诺苷、梓醇、獐芽菜苷等。该类成分具有特征的二氢吡喃环顺式连接 1 个五元环的单元结构，主要

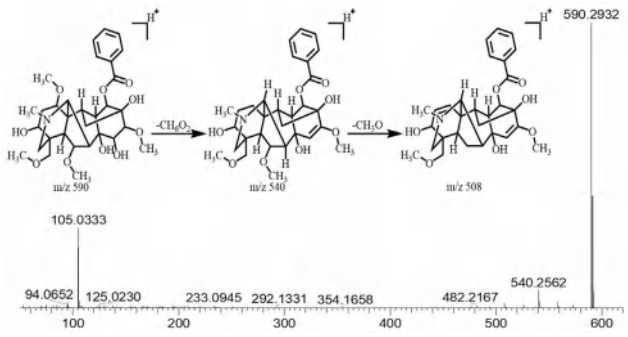

图 2　苯甲酰新乌头原碱的二级质谱图（ESI$^+$）和裂解途径

Fig 2　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of benzoylmesaconine

存在环戊烷型和裂环环烯醚萜苷 2 种类型 [9]。当流动相中有酸存在时，该类成分在一级质谱中易形成 [M ＋ HCO_2]$^-$及 [M-H]$^-$峰；在二级质谱中易丢失糖（-$C_6H_{10}O_5$）产生苷元，苷元再继续碎裂。因裂环烯醚萜苷类化合物具有半缩醛结构，化学性质活泼，在糖苷键断裂后继而发生逆狄尔斯 - 阿德尔（RDA）裂解，丢失 -H_2O、-CO_2 及 -CH_3 等碎片离子。峰 24 的保留时间为 3.20 min，分子式 $C_{17}H_{26}O_{10}$，准分子离子峰 *m/z* 435.1491 [M ＋ HCO_2]$^-$或 *m/z* 389.1467 [M-H]$^-$，二级质谱中可见碎片离子 *m/z* 227.0921 [M-H-Glc]$^-$，*m/z* 127.0391 [M-H-$C_6H_{12}O$]$^-$，*m/z* 101.0231 [M-H-$C_4H_{14}O_4$]$^-$，通过对照品比对，确认为马钱子苷。峰 40 的保留时间为 3.61 min，分子式为 $C_{16}H_{22}O_9$，准分子离子峰 *m/z* 403.1226 [M ＋ HCO_2]$^-$或 *m/z* 357.1198 [M-H]$^-$。二级质谱中 *m/z* 357.1198 丢失葡萄糖，可见碎片离子 *m/z* 195.0654 [M-H-Glc]$^-$，继而发生 RDA 裂解，脱去 -CO_2，得到 *m/z* 151.0749 [M-H-Glc-CO_2]$^-$，同时观察到碎片离子 *m/z* 125.0231 [M-H-$C_{10}H_{16}O_6$]$^-$，结合对照品比对，确认为獐芽菜苷。

3.1.3　苯乙醇苷类化合物的鉴定　苯乙醇苷类成分主要来源于熟地黄，共鉴定了 9 个化合物，该类化合物通常是由咖啡酰基、苯乙醇苷元和糖连接而成，通常在质谱中均可检测出 *m/z* [M-H-162]$^-$，是由准分子离子脱去 1 个葡萄糖基 *m/z* [M-H-$C_6H_{10}O_5$]$^-$或 1 个咖啡酰基 *m/z* [M-H-$C_9H_6O_3$]$^-$得到。峰 49 的保留时间为 4.06 min，分子式为 $C_{29}H_{36}O_{15}$，准分子离子峰 *m/z* [M-H]$^-$ 623.1992。二级质谱中可观察到碎片离子 *m/z* 461.1670，是由该化合物脱去一分子葡萄糖基或咖啡酰基而来。同时，还能观察到 *m/z* 315.1103 [M-H-$C_6H_{10}O_5$-$C_6H_{10}O_4$]$^-$、*m/z* 161.0235 [$C_6H_{10}O_5$-H]$^-$、*m/z* 135.0440 [$C_8H_8O_2$-H]$^-$碎片离子峰，通过与对照品比对，确定为毛蕊花糖苷。

3.1.4　三萜类化合物的鉴定　三萜类化合物主要来源于泽泻和茯苓，共鉴定了 14 个化合物。峰 74 的保留时间为 5.85 min，分子式为 $C_{32}H_{48}O_6$，在正离子模式下，准分子离子峰为 *m/z* 529.3506 [M ＋ H]$^+$，二级碎片离子为 *m/z* 511.3420 [M ＋ H-H_2O]$^+$、*m/z* 469.3294 [M ＋ H-HAc]$^+$、*m/z* 451.3186 [M ＋ H-HAc-H_2O]$^+$、*m/z* 397.2594 [M ＋ H-H_2O-$C_6H_{10}O_2$]$^+$，与文献 [10] 比对，可推断该化合物为泽泻醇 C-23- 醋酸酯，其二级质谱图和裂解规律见图 3。

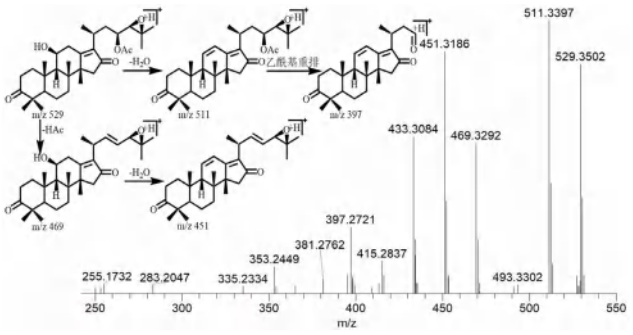

图 3　泽泻醇 C-23- 醋酸酯的二级质谱图（ESI$^+$）和裂解途径

Fig 3　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of Alisol C-23-acetate

3.2　桂附地黄丸入血成分的分析

运用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术，对桂附地黄丸灌胃后的含药血浆、空白血浆以及桂附地黄丸提取物样品进行比对分析，根据保留时间和裂解规律，结合文献，在大鼠血浆中共鉴定出 14 个原形成分、8 个代谢物，结果见表 1。

丹皮酚为牡丹皮的主要药效成分，在血中除检测到原形外，还检测到与之相关的 3 个代谢物（M1 ～ M3），这些代谢反应主要涉及羟基化、硫酸化和葡萄糖醛酸化等。代谢物 M2 的分子离子峰 [M-H]$^-$ *m/z* 245.0124，较丹皮酚 [M-H]$^-$多 80 Da，推测为丹皮酚的硫酸化产物。二级质谱产生碎片离子 165.0548 [M-H-SO_3]$^-$，151.0312 [M-H-SO_3-CH_2]$^-$，裂解途径与丹皮酚相似，鉴定代谢物 M2 为丹皮酚的硫酸化产物。代谢物 M3 的分子离子峰 [M-H]$^-$ *m/z* 341.0884 较丹皮酚 [M-H]$^-$峰多 176 Da。同时，产生二级碎片离子 165.0548，151.0311，推测代谢物 M3 为丹皮酚的葡萄糖醛酸化产物。代谢物 M1 的分子离子峰 [M-H]$^-$ *m/z* 261.0076 较 M2 的 [M-H]$^-$峰多 16 Da。同时，产生的碎片离子均较 M2 的碎片离子多 16 Da，推测 M1 为 M2 的羟基化产物。代谢物 M7 的分子离子峰 [M-H]$^-$ *m/z* 151.0389 较丹皮酚 [M-H]$^-$峰少 14 Da，推测为丹皮酚的去甲基化产物。产生二级碎片离子 135.0076 [M-H-O]$^-$，109.0280 [M-H-C_2H_2O]$^-$，进一步证明为丹皮酚的去甲基化产物。

毛蕊花糖苷为苯乙醇苷类成分，该类成分进入体内后，被代谢为咖啡酸和羟基酪醇，因此

在血中并未检测到原形。代谢物 M4 的分子离子峰 $[M-H]^-$ *m/z* 233.0124，较羟基酪醇的 $[M-H]^-$ 峰多 80 Da。产生二级碎片离子 123.0401 $[M-H-CH_2O]^-$，与羟基酪醇的裂解途径相似。基于此，推断代谢物 M4 为羟基酪醇的硫酸化。

本研究检测到 3 个与酚酸类化合物相关的代谢物，2 个来自原儿茶酸，1 个来自没食子酸，主要涉及甲基化、硫酸化和葡萄糖醛酸化等代谢反应。代谢物 M5 的分子离子峰 $[M-H]^-$ *m/z* 246.9918，较原儿茶酸甲基化产物的 $[M-H]^-$ 峰多 80 Da。同时，在二级质谱中，碎片离子 *m/z* 167.0339 较原儿茶酸 $[M-H]^-$ 峰多 14 Da，还检测到脱一个羟基的碎片离子 *m/z* 151.0027 $[M-H-O]^-$ 峰。基于此，推测 M5 为原儿茶酸的甲基化和硫酸化产物。代谢物 M6 的分子离子峰 $[M-H]^-$ *m/z* 261.0076，较 *m/z* 181 多 80 Da。在二级质谱中，碎片离子 *m/z* 181 较原儿茶酸 $[M-H]^-$ 峰多 28 Da，检测到脱羧的碎片离子 *m/z* 137.0959。因此，推测代谢物 M6 为原儿茶酸的二甲基化和硫酸化产物。代谢物 M8 的分子离子峰 $[M-H]^-$ *m/z* 183.0039，较没食子酸 $[M-H]^-$ *m/z* 169.0134 多 14 Da。在二级质谱中，检测到碎片离子 *m/z* 153.0057 $[M-H-CH_2-O]^-$，*m/z* 139.0412 $[M-CO_2]^-$。基于此，推测代谢物 M8 为没食子酸甲基化产物。

4 讨论

桂附地黄丸方中附子、肉桂温补命门之火，共为君药。生物碱类化合物主要来源于附子，是其主要的活性成分和毒性物质，包括双酯型生物碱（如乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等）、单酯型生物碱（如苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱）、胺醇型生物碱（如乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱）等 [11]。熟地黄及山茱萸、山药滋补肾中阴精，于阴中求阳，使阳得阴助而生化无穷，共为臣药。环烯醚萜苷和苯乙醇苷类化合物主要来源于熟地黄和山茱萸，是其主要的药效成分。有文献报道，环烯醚萜苷对糖尿病及代谢综合征具有治疗作用，可预防糖尿病引起的血管并发症，延缓糖尿病肾病的发生 [12]。毛蕊花糖苷为苯乙醇苷类化合物，现代药理研究表明，该化合物具有显著的抗炎、抗氧化、保护神经、增强记忆力、抗肿瘤等药理活性 [13]。泽泻、茯苓为佐药，通调水道，泄浊渗湿，三萜类化合物主要来源于茯苓和泽泻，为药效成分。如泽泻醇及其衍生物，具有较强的药理作用 [14]。牡丹皮同为佐药，可入血以活血行血，与肉桂配伍可调血分之滞，单萜苷类化合物主要来源于牡丹皮，是其含量较高的一类成分，该类化合物大多是芍药苷元或其类似物与糖缩合而成，具有较强的药理作用 [15]。

本研究采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术结合血清药物化学理论，探究口服桂附地黄丸后的入血成分，共检出 22 个化合物，其中 14 个原形和 8 个代谢物，主要包括环烯醚萜苷类、苯乙醇类、酚酸类、单萜苷类、三萜类以及有机酚 / 酸类。这些入血成分可能是桂附地黄丸在体内直接作用的物质，该结果可为进一步研究药理作用机制提供基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1435-1437.

[2] 王芳，周敏，陈邵芳，等 . 桂附地黄丸辅助盆底生物刺激反馈仪治疗产后压力性尿失禁肾阳虚证的临床观察 [J]. 现代养生，2022，22（11）：890-895.

[3] 杨超茅，杨志新，程雯，等 . 桂附地黄丸联合氯沙坦钾治疗阳虚血瘀型Ⅲ期糖尿病肾病患者的临床效果观察 [J]. 世界临床药物，2022，43（3）：264-273.

[4] 钟镜金，杨仙方 . HPLC 法测定桂附地黄丸中桂皮醛的含量 [J]. 中华中医药，2008，26（2）：415-421.

[5] 张学婷，刘启德，曾武，等 . HPLC 法同时测定桂附地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的含量 [J]. 中药新药与临床药理，2014，25（2）：201-207.

[6] 王莉婷，李颜伶，徐广，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术的车前子不同溶剂提取物成分分析 [J]. 中国药师，2022，25（8）：1341-1349.

[7] 叶先文，夏澜婷，张金莲，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS “建昌帮” 煨附片炮制前后化学成分差异研究 [J]. 时珍国医国药，2021，32（9）：2159-2163.

[8] 张定堃，韩雪，李瑞煜，等 . UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异 [J]. 中国中药杂志，2016，41（3）：463-468.

[9] 段吉平，段琼，王铁战，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的当药化学成分分析 [J]. 中国现代中药，2021，23（7）：1182-1190.

[10] 崔琳琳，包永睿，王帅，等 . UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定补肺健脾方的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（9）：184-193.

[11] 张存艳，魏蔼玲，刘红梅，等 . 附子药对化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（9）：5421-5433.

[12] 崔永，王利丽，孙孝亚，等 . 山茱萸环烯醚萜苷类成分的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（5）：2869-2873.

[13] 郭梦环，甘露，司婧，等 . 毛蕊花糖苷的药理作用及作用机制研究进展 [J]. 中成药，2020，42（8）：2119-2126.

[14] 肖飞艳，冯育林，杨世林，等 . 泽泻化学成分的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2009，20（5）：491-498.

[15] 张树蓉，赵宏苏，佟沫儒，等 . 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物（Q-Marker）的预测分析 [J]. 中草药，2022，53（16）：5215-5221.

（收稿日期：2023-01-11；修回日期：2023-03-20）

金银花近红外定性定量快检模型的建立

耿泽宇[1]，左旭丽[1]，潘秀珍[1]，马威[2]，李卫东[1*]（1. 北京中医药大学 中药学院，北京 102488；2. 北京宇辰致业科技有限公司，北京 101200）

摘要：目的 利用近红外光谱结合化学计量学，同时建立金银花中多种指标成分定量检测模型和真伪金银花定性鉴别模型。**方法** 考察粉末粒径和装样厚度对 NIR 光谱的影响，结合偏最小二乘法建立绿原酸、酚酸、木犀草苷 3 种成分的定量检测模型，结合马氏距离法与偏最小二乘判别分析建立金银花与山银花定性鉴别模型。**结果** 当粉末粒径≤ 250 μm 且装样厚度≥ 15 mm 时，同一样品 NIR 光谱的相关系数大于 0.95，均方根值、欧氏距离分别小于 0.020、0.680 且无明显变化，其重复性与稳定性可被接受；绿原酸、酚酸、木犀草苷定量检测模型的预测相对平均偏差分别为 2.99%、2.44%、6.09%，预测值与真实值有较高拟合度；金银花与山银花定性鉴别模型预测准确率为 100%。**结论** 在确定金银花前处理方法的基础上，同时建立多种定量和定性 NIR 快检模型，对提高检测效率并进行多角度分析有积极意义。

关键词：金银花；近红外；前处理；偏最小二乘法；快速检测
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2076-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.017

Establishment of qualitative and quantitative near infrared rapid detection model for *Lonicerae Japonicae* flos

GENG Ze-yu[1], ZUO Xu-li[1], PAN Xiu-zhen[1], MA Wei[2], LI Wei-dong[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Beijing Yuchen Zhiye Technology Company*, *Ltd.*, *Beijing* 101200)

Abstract: Objective To establish quantitative detection models by near infrared (NIR) spectroscopy combined with chemometrics for various index components in *Lonicerae Japonicae* flos and qualitative identification models to differentiate genuine and fake *Lonicerae Japonicae* flos. **Methods** The effect of particle size and thickness on NIR spectra was determined. The quantitative detection models of chlorogenic acid, phenolic acid and luteoloside were established with partial least square method. The qualitative identification models of *Lonicerae Japonicae* flos and *Lonicerae* flos were established with Mahalanobis distance method and PLS discriminant analysis. **Results** When particle size ≤ 250 μm and thickness ≥ 15 mm, the correlation coefficient of NIR spectrum of the same sample was greater than 0.95, and the RMS value and euclidean distance were less than 0.020 and 0.680 respectively, without significant change. Its repeatability and stability were acceptable. The relative mean deviations of the quantitative detection models for chlorogenic acid, phenolic acid and luteoloside were 2.99%, 2.44% and 6.09% respectively, and the predicted values were highly consistent with the measured values. The prediction accuracy of qualitative identification models for *Lonicerae Japonicae* flos and *Lonicerae* flos was 100%. **Conclusion** On the basis of pretreatment of *Lonicerae Japonicae* flos, varieties of quantitative and qualitative NIR rapid detection models have been established simultaneously to improve the detection efficiency and conduct multi-angle analysis.

Key words: *Lonicerae Japonicae* flos; near infrared; pretreatment; partial least square method; rapid detection

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.31370360）。

作者简介：耿泽宇，男，硕士研究生，主要从事中药资源开发利用研究，email：m18611422921@163.com *通信作者：李卫东，男，研究员，主要从事中药资源评价与利用研究，email：liweidong2005@126.com

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花[1]，近年来在新型冠状病毒感染的防治中使用频率较高[2]。因其价格较高、市场需求量大，不法商家常掺入山银花或以次充好，给临床用药安全带来隐患。传统检测方法中，肉眼很难直接区分金银花与山银花，而薄层色谱法鉴别与 HPLC 定量耗时、烦琐，因此金银花快速定性鉴别与定量检测的需求十分迫切。

近红外（near infrared，NIR）光谱技术是实现定性定量快速检测的有效方法之一，通过分析样品在 780 ～ 2500 nm 波长范围的 NIR 吸收光谱并建立定量或定性检测模型[3]，具有快速、无损、绿色的特点。近年来已有研究报道了 NIR 结合化学计量学建立金银花中各指标成分快速检测的方法，包括用于水分[4]、木犀草苷[5]、绿原酸[6]及其他酚酸类成分[7]的定量检测模型，以及用于区分金银花与山银花[8-10]、不同产地金银花[10]的定性鉴别模型，均表现出较好的理论预测性能。但不同研究的 NIR 模型样品前处理要求不同，导致实际应用中不能同时检测一份样品的多种指标，降低了快检技术应有的效率，而测量一次可同时得到指标成分含量以及金银花真伪等结果在理论上是可行的[11-12]。因此，金银花的 NIR 快检需要进一步优化以满足单次测量同时定性鉴别与定量检测的需求。

本研究通过比较不同粉末粒径（d）与装样厚度（h）对金银花 NIR 光谱的影响并确定最佳前处理条件，以此为基础分别结合偏最小二乘法（partial least square method，PLS）建立绿原酸、酚酸、木犀草苷 3 种成分的 NIR 定量检测模型，结合马氏距离法与偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）建立金银花与山银花 NIR 定性鉴别模型，旨在提高金银花的 NIR 检测效率并为 NIR 技术在金银花产业的实际应用提供科学依据。

1 材料

1.1 样品

金银花 192 批次，分别采集于河北省巨鹿县、甘肃省通渭县、云南省云龙县、山东省平邑县和曹县、河南省封丘县、陕西省蒲城县等地，原植物忍冬科忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的花蕾或已开放的花；山银花 22 批次，其中灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 收购于湖南省隆回县、怀化县和郴州县，红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 收购于广西省古寨县，黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvoto-mentosa* Hsu et S. C. Cheng 收购于贵州省黔西南州冷洞村，均为干燥花蕾或带初开的花，华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 未收集到。以上样品均由北京中医药大学中药学院李卫东研究员鉴定。

1.2 试药

对照品绿原酸（批号：Y22M8K36544）、木犀草苷（批号：Y13J10H93050）（纯度≥ 98%，上海源叶生物科技有限公司），3，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸（批号：Z05M10X87215）、4，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸（批号：Z05M10X87215）（纯度≥ 98%，成都德斯特生物技术有限公司）。甲醇、乙腈、磷酸为 Fisher 色谱纯（美国赛默飞世尔科技公司），乙醇为分析纯（北京化工厂），娃哈哈纯净水。

1.3 仪器

RA-6200 近红外光谱分析仪（北京宇辰致业科技有限公司）：配有下照式漫反射双光源、样品盘（可旋转）、光纤探头、温控装置，附带 ChemoStudio2018 化学计量学软件；Waters alliance 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）：配有 Waters 2489 PDA 检测器，Breeze 软件系统；BT25S 型 1/100 000 电子分析天平（赛多利斯科学仪器北京有限公司）；HH-S4A 型电热恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；DFY-200C 型摇摆式高速粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；药典筛 1 ～ 8 号。

2 方法与结果

2.1 金银花样品前处理方法考察

2.1.1 NIR 光谱采集 取金银花样品，除去枝叶等杂质，粉碎，将样品粉末装入样品盘，压紧，开始扫描。每份样品设置 9 种粉末粒径：未粉碎（d_0）、＜ 2000 μm（d_1）、＜ 850 μm（d_2）、＜ 355 μm（d_3）、＜ 250 μm（d_4）、＜ 180 μm（d_5）、＜ 150 μm（d_6）、＜ 125 μm（d_7）、＜ 88 μm（d_8），使不同粉末粒径样品的原样品保持一致。每种粉末粒径分别设置 4 种装样厚度：5 mm（h_5）、10 mm（h_{10}）、15 mm（h_{15}）、20 mm（h_{20}）。

仪器参数：扫描温度（27±0.1）℃，扫描方式为漫反射，波长范围 1300 ～ 2600 nm，光谱分辨率 8 cm^{-1}，仪器内置背景，样品盘旋转。重复扫描 3 次，每份样品采集得 135 张谱图。

2.1.2 光谱处理与分析 分别比较同一样品在不同粉末粒径与装样厚度条件下原始光谱的吸光度偏差、相关系数、均方根值、欧氏距离，其中相关系数越高，吸光度偏差、均方根值及欧氏距离越小，说明样品的 NIR 光谱受粉末粒径与装样厚度的影响越小。

控制粉末粒径与装样厚度不变，同一样品的 NIR 光谱理论上无差别或差别极小，但其吸光度偏差在 d_0 ～ d_2（粉末粒径＞ d_3）时均较高且随装样厚

度增大而有减小趋势，在 d_3 ～ d_8（粉末粒径≤ d_3）时，吸光度偏差趋近于 0（见图 1），说明 NIR 光谱的吸光度偏差会随装样厚度增大而减小，粉末粒径＞ d_3 时光谱重复性较差，不可用于 NIR 光谱建模。相关系数均值与均方根值在数值上差异不大，其欧氏距离有明显变化（见图 2），在 d_4 ～ d_8 时，随着粉末粒径减小，欧氏距离无明显变化，趋于稳定且均小于 0.010。说明当样品至少完全通过 4 号筛（粉末粒径≤ d_4）时，NIR 光谱测量的重复性与稳定性可被接受。

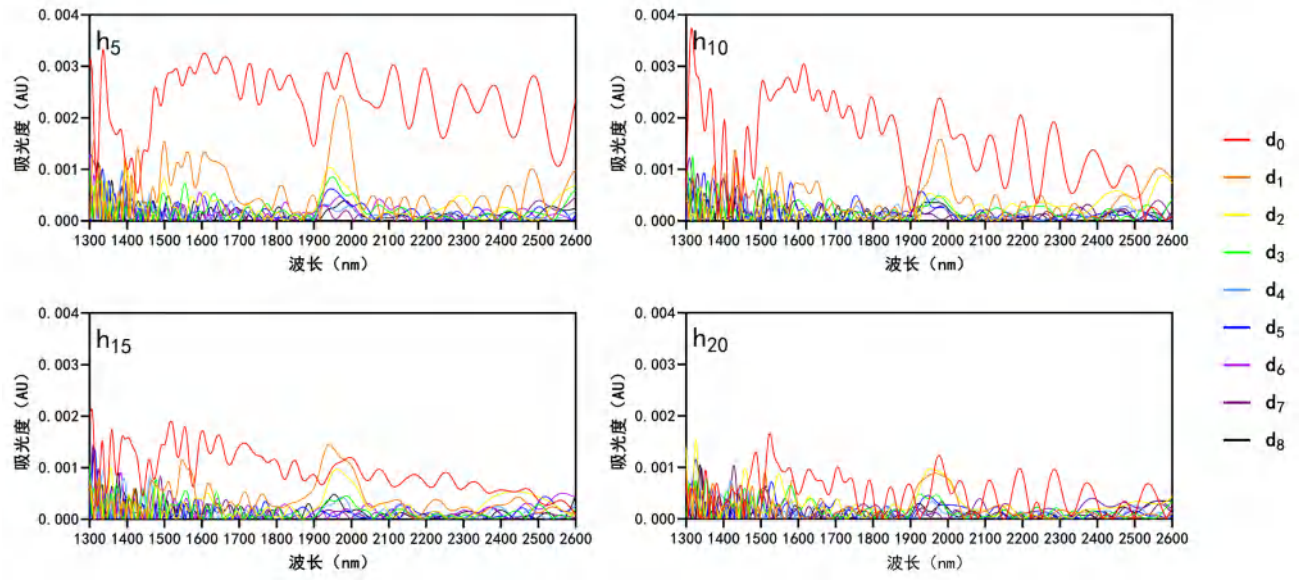

图 1 同一样品在粉末粒径与装样厚度不变时 NIR 光谱吸光度偏差

Fig 1 NIR spectral absorbance deviation of the same sample with constant particle size and thicknesses

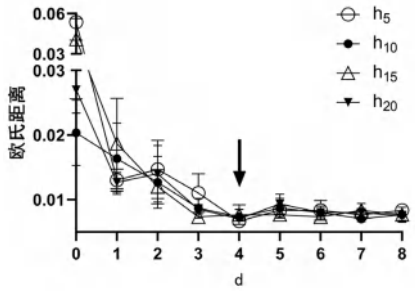

图 2 同一样品在粉末粒径与装样厚度不变时 NIR 光谱的欧氏距离

Fig 2 Euclidean distance of NIR spectrum for the same sample with constant particle size and thicknesses

相邻粉末粒径或装样厚度梯度的比较可以反映其对 NIR 光谱影响的趋势。h_5/h_{10} 与 h_{10}/h_{15} 的吸光度偏差虽然随粉末粒径减小有所降低，但均未明显稳定为 0；h_{15}/h_{20} 与 h_{20}/h_{20} 的吸光度偏差在 d_3 ～ d_8 时基本一致且趋近于 0（见图 3），说明当装样厚度≥ h_{15} 时 NIR 光谱变化不明显，在粉末粒径分别为 d_3、d_4、d_5 时表现较佳；相关系数均值与均方根值在不同装样厚度比较时无明显变化趋势；粉末粒径为 d_3 与 d_4 时，h_{15}/h_{20} 的欧氏距离最小，最低为 0.006。可以初步认为装样厚度的最低要求是 h_{15}，且 d_3 或 d_4 是较好的粒径条件。

在不同粉末粒径的比较中，随粉末粒径减小吸光度偏差也减小且趋近于 0，d_4/d_5、d_5/d_6、d_6/d_7、d_7/d_8 的吸光度偏差与 d_8/d_8 十分接近且没有显著区分，波长＜ 1900 nm 时吸光度偏差基本一致的最小粉末粒径为 d_4，波长＞ 1900 nm 时吸光度偏差基本一致的最小粉末粒径为 d_5（见图 4），说明当粉末粒径分别小于 d_4、d_5 时 NIR 光谱吸光度偏差趋于一致，再减小粉末粒径带来的收益不显著；相邻粉末粒径的相关系数均值在 d_3 ～ d_8 均大于 0.95，均方根值与欧氏距离在 d_4 ～ d_8 降低趋势平缓且分别小于 0.020 与 0.680（见图 5）。可以认为粉末粒径≤ d_4 是粒径的最低要求。

通过以上分析可以得知，粉末粒径≤ 250 μm（d_4）且装样厚度≥ 15 mm（h_{15}）是金银花样品 NIR 前处理的理想条件，该条件对实际操作要求较低，能在一定程度上保证样品 NIR 光谱的稳定性与重复性。由于药典对金银花含量测定的粒径要求为过 4 号筛（d_4），则该前处理条件更进一步保证 NIR 检测与 HPLC 测定的样品一致性。

2.2 金银花 NIR 定量检测模型的建立与验证

2.2.1 绿原酸、酚酸、木犀草苷含量测定 采用 2020 年版《中国药典》一部中的含量测定方法 [1]，测得绿原酸含量在 1.17% ～ 3.97%；酚酸类含量以绿原酸、3，5-二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸、4，5-二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸总量计，在 3.33% ～ 7.94%；木犀草苷含量在 0.031% ～ 0.206%。

2.2.2 NIR 光谱采集 取金银花样品，除去枝叶等杂质，粉碎使样品完全通过 4 号筛，装入样品

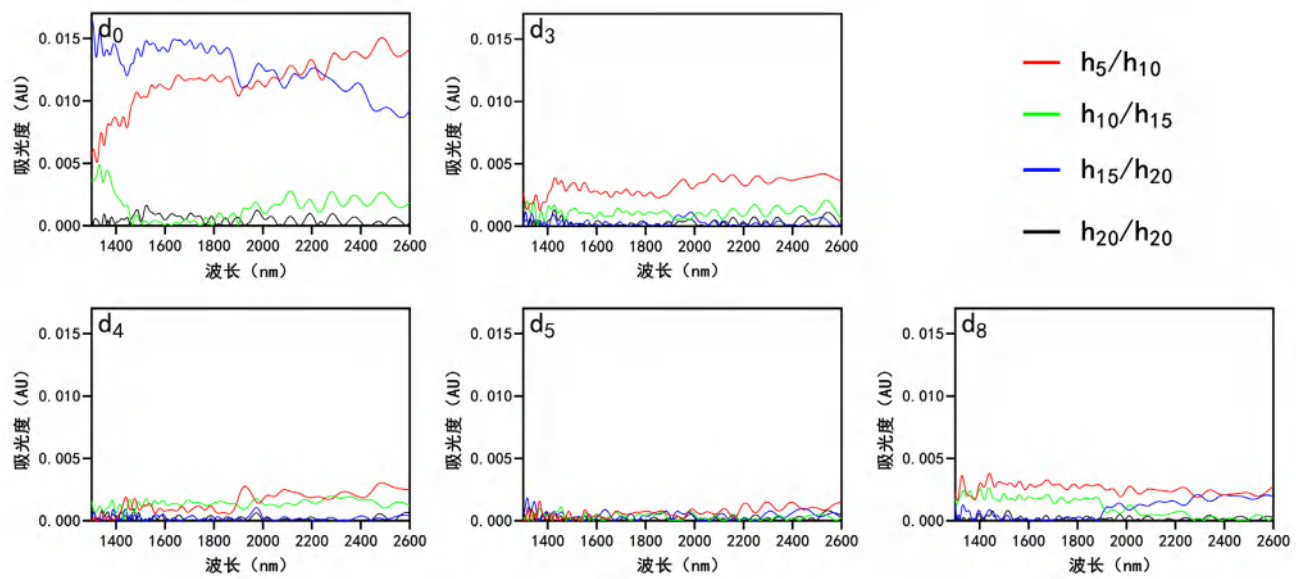

图 3　同一样品不同装样厚度的 NIR 光谱吸光度偏差

Fig 3　NIR spectral absorbance deviation of the same sample with different thicknesses

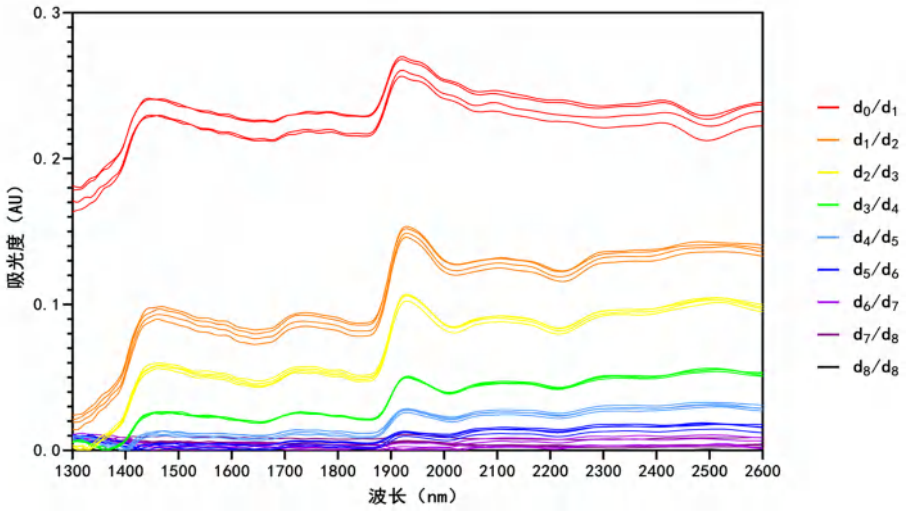

图 4　同一样品不同粉末粒经的 NIR 光谱吸光度偏差

Fig 4　NIR spectral absorbance deviation of the same sample with different particle sizes

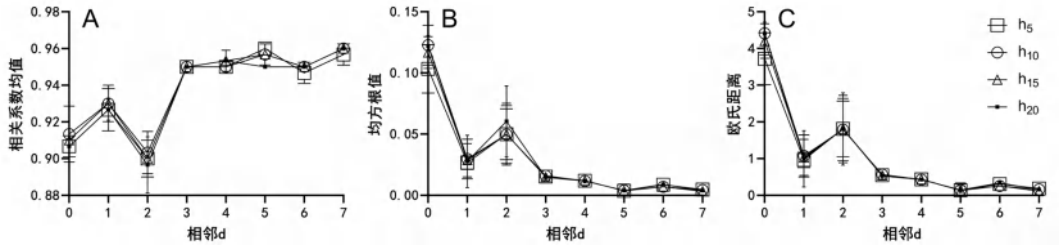

图 5　同一样品不同粉末粒经的 NIR 光谱相关系数均值（A）、均方根值（B）、欧氏距离（C）

Fig 5　Mean value（A），root mean square value（B）and Euclidean distance（C）of NIR spectral correlation coefficient of the same sample with different particle sizes

盘，压紧使装样厚度≥ 15 mm，开始扫描。其余仪器参数同“2.1.1”项下。每份样品重复 3 次，共得到金银花谱图 576 份，山银花谱图 66 份。金银花与山银花的原始 NIR 光谱无显著区分，经二阶 Savitzky-Golay（S-G）卷积导数处理后，在 1300 ～ 1850 nm，2150 ～ 2600 nm 内金银花与山银花的光谱有较大差别（见图 6）。

2.2.3　定量检测模型的建立与筛选　采用 Kennard-Stone（K-S）法，将样品分为校正集（70%）与验证集（30%），校正集中样品绿原酸含量为

1.17% ～ 3.97%、酚酸含量为 3.33% ～ 7.94%、木犀草苷含量为 0.031% ～ 0.206%，验证集中样品绿原酸含量为 1.67% ～ 3.69%、酚酸含量为 3.56% ～ 6.53%、木犀草苷含量为 0.040% ～ 0.190%。剔除 2 张马氏距离离群的光谱。将“2.2.1”项下测定的 3 种成分含量与对应样品 NIR 光谱匹配，由 ChemoStudio2018 化学计量学软件结合不同光谱预处理方法、建模区间、主因子数建立 PLS 回归模型。其中光谱预处理包括 7 种单独预处理方法：无处理（NONE）、S-G 卷积平滑、S-G 卷积导数、标准正态变量变换（SNV）、多元散射校正（MSC）、矢量归一化（VN）、最大 - 最小归一化（MMN），以及此 7 种方法随机 2 ～ 3 种共同使用的组合预处理方法；建模区间的筛选是将光谱全区间划分为 11 个间隔（1300 ～ 2600 nm、1300 ～ 1500 nm、1500 ～ 1700 nm、1700 ～ 1850 nm、1850 ～ 1950 nm、1950 ～ 2050 nm、2050 ～ 2150 nm、2150 ～ 2250 nm、2250 ～ 2350 nm、2350 ～ 2450 nm、2450 ～ 2600 nm），建模时随机选择若干间隔相结合，或者计算每个波长与目标信息的相关系数，随机设定相关系数阈值，剔除低于阈值的区间；主因子数 1 ～ 15。

光谱预处理方法、建模区间、主因子数随机组合分别建立绿原酸、酚酸、木犀草苷定量检测模型各 19 817 个，计算校正集预测标准偏差（SEC）、交互验证预测标准偏差（SECV）、验证集预测标准偏差（SEP）。将 SEC、SECV、SEP 分别作为三维坐标系的 x，y，z 轴（见图 7），以每个模型对应点至原点（0，0，0）的距离作为评价模型综合能力的指标，距离越小表示模型的预测能力越好。得到的绿原酸、酚酸、木犀草苷最佳模型的距离分别为 0.6364、0.9767、0.0352，其建模信息见表 1。其中绿原酸定量检测模型的校正集相关系数（RC）、交互验证相关系数（RCV）、验证集相关系数（RV）分别为 0.86、0.79、0.82，校正集定向系数（RPDC）、交互验证定向系数（RPDCV）、验证集定向系数（RPDV）分别为 1.925、1.584、1.737；酚酸定量检测模型的 RC、RCV、RV 分别为 0.90、0.80、0.68，RPDC、RPDCV、RPDV 分别为 2.180、1.650、1.294；木犀草苷定量检测模型的 RC、RCV、RV 分别为 0.90、0.84、0.86，RPDC、RPDCV、RPDV 分 别为 2.260、1.832、1.930。3 种模型的预测值与参考值作直线线性回归（见图 8），拟合度均较高，预测相对平均偏差分别为 2.99%（绿原酸）、2.44%（酚酸）、6.09%（木犀草苷），说明预测能力较好。

2.3 马氏距离法与 PLS-DA 定性鉴别模型的建立与验证

建模光谱同“2.2.2”项下，校正集与验证集划分、异常光谱剔除方法同“2.2.3”项下。

马氏距离判别模型：将金银花设置为同类，山银花设置为异类，所有 NIR 光谱采用二阶 S-G 导数处理后，选取差异较大的 1300 ～ 1850 nm，2150 ～ 2600 nm 为建模区间。所得模型对校正集金银花的预测范围在 [1.61，6.19]，山银花的预测范围在 [29.34，38.41]；对验证集金银花的预测范围在 [1.56，4.54]，山银花的预测范围在 [32.37，37.97]。金银花与山银花的马氏距离没有交集且有较大差别，可以完全区分。

PLS-DA[9-10]：将金银花赋值为“0”，山银花赋值为“1”，其余步骤同“2.2.3”项下，预测结果位于 [－ 0.5，0.5] 的为金银花，位于 [0.5，1.5] 的为山银花，超出范围为预测失败。得到最佳模型为经 S-G 平滑＋ S-G 导数处理后，采用相关性＞ 0.35 的区间，主因子数 7 建立模型。所得模型对校正集金银花的预测范围在 [－ 0.04，0.05]，山银花的预测范围在 [0.97，1.03]；对验证集金银花的预测范围在 [－ 0.03，0.04]，山银花的预测范围在 [0.96，1.03]。预测准确率为 100%，预测失败率为 0%。

为进一步区分金银花与山银花，将 3 种基原的山银花分别赋值为“0”“1”“－ 1”，建立 PLS-DA 模型，以预测值在赋值 ±0.5 范围内为预测成功，超出此范围为预测失败。得到最佳模型为经 S-G 平滑＋ VN ＋ S-G 导数处理后，采用相关性＞ 0.45 的区间，主因子数 5 建立模型。预测结果见图 9，图中每个点均代表一个校正集或验证集山银花样品的预测结果，校正集预测准确率为 93.33%，验证集预测准确率为 80.95%。仅有黄褐毛忍冬能够完全准确识别，红腺忍冬与灰毡毛忍冬识别率较低。说明应用马氏距离法与 PLS-DA 可以完全区分金银花与山银花，但对不同基原的山银花不能完全识别。

3 讨论与结论

目前对中药 NIR 前处理的研究较少，仅有少数研究报道了粉末粒径 [13] 或装样厚度 [14] 等单一因素对 NIR 光谱的影响，不足以形成明确的前处理方法考察依据。NIR 光谱漫反射法是依靠固体样品分子中含 H 基团的倍频与合频吸收而产生的吸收光谱，由于 NIR 光穿透能力弱，当粉末粒径过大时粉末内部的分子信息不能被有效提取，装样厚度过小时则会有部分携带信息的 NIR 光透射而出，使 NIR 光谱信息不完整。因此，对有

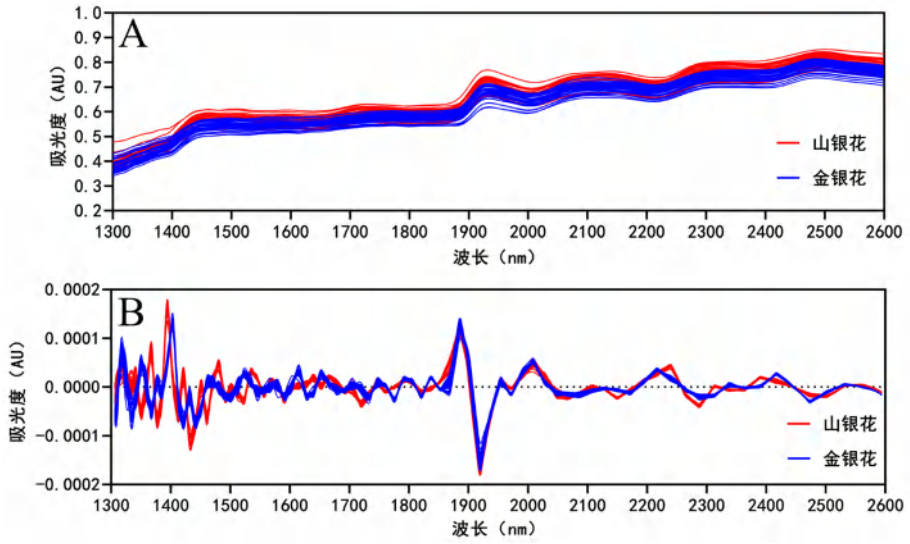

图 6　NIR 原始光谱（A）与二阶 S-G 卷积导数处理后光谱（B）

Fig 6　NIR original spectrum（A）and second order S-G convolution derivative processed spectrum（B）

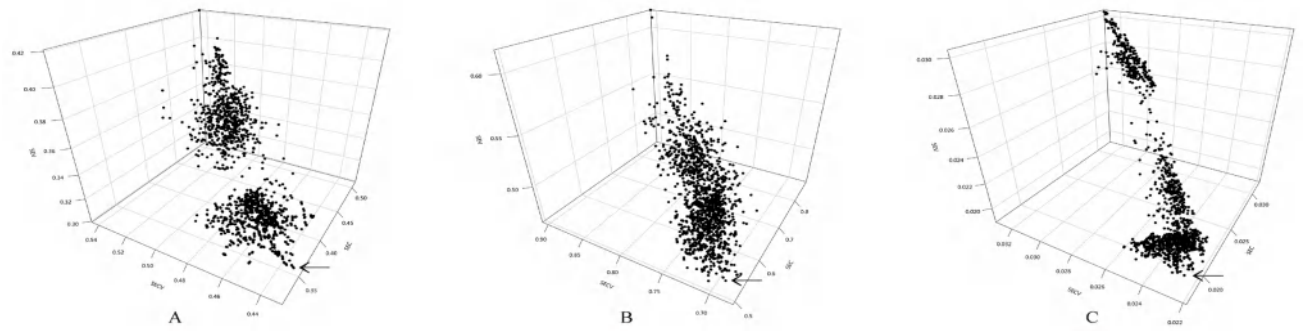

图 7　绿原酸（A）、酚酸（B）、木犀草苷（C）定量检测模型筛选

Fig 7　Quantitative screening models for chlorogenic acid（A），phenolic acid（B）and luteolosid（C）

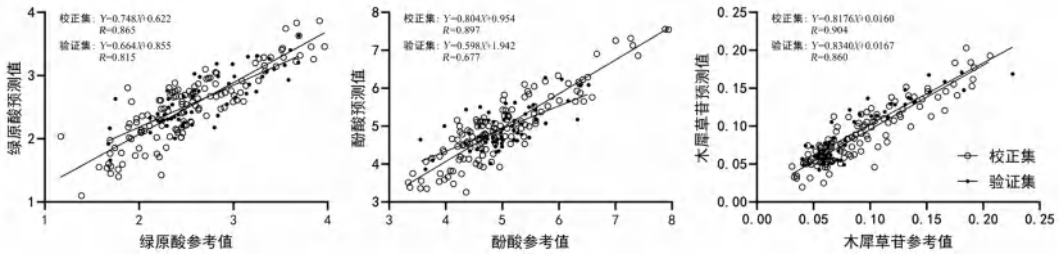

图 8　定量检测模型的预测值与参考值

Fig 8　Predicted value and reference value of quantitative testing model

表 1　最佳定量检测模型建模信息

Tab 1　Modeling information of the best quantitative testing model

化合物	光谱预处理	建模区间 /nm	主因子数
绿原酸	S-G 平滑＋ MSC ＋ S-G 导数	1500 ～ 1950，2050 ～ 2150，2250 ～ 2350	8
酚酸	S-G 平滑＋ MMN ＋ S-G 导数	1300 ～ 1850，2250 ～ 2450	9
木犀草苷	S-G 导数	1500 ～ 1850，1950 ～ 2450	9

效 NIR 光谱信息的提取与接收有影响的因素都具有考察价值。本研究表明，在粉末粒径与装样厚度满足一定条件后，光谱欧氏距离等指标趋于稳定，其他因素如颗粒形状、紧密程度等 [15] 的影响很小，粉末粒径与装样厚度可以作为 NIR 样品前处理考察的主要因素。在统一前处理方法的基础上，本研究证明单次测量同时获得定性和定量结果是可行的，为金银花其他 NIR 模型的共同应用减少障碍，为建立多方面的金银花 NIR 检测技术，提高模型稳定性与应用范围奠定了基础。

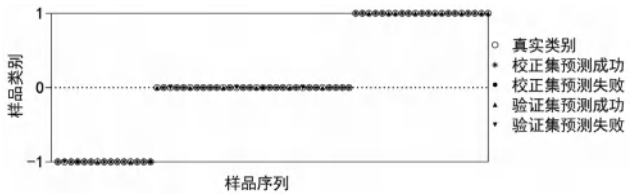

图 9 PLS-DA 对山银花基原的预测结果

Fig 9 Prediction of PLS-DA on the origin of *Lonicerae* flos

本研究发现，通过单一性能指标（如预测标准偏差）筛选得到最佳模型的其他指标（如相关系数、定向系数等）一般同为最佳值，而通过单一集合（如验证集）筛选得到的最佳模型对其他集合（校正集、交互验证）的预测能力较差。推测原因是单一集合筛选的模型有过拟合现象 [16]，部分研究采用多种性能指标独立筛选的方法有可能造成数据重复利用 [17-18]，两种方法都不利于筛选综合性能较好的模型。本研究以每个模型的 3 种预测标准偏差（SEC、SECV、SEP）建立三维坐标系并以到原点的距离筛选模型。结果显示该方法筛选出的模型对校正集与验证集都有较高的预测能力，且未参与筛选的指标（相关系数、定向系数）反映出模型有较高的性能。表明采用综合指标可以降低模型对单一集合的过拟合，减少不同指标的重复利用与数据浪费，为模型的筛选与优化提供思路。

综上所述，确定样品前处理方法既能保证金银花 NIR 检测的重复性与稳定性，也可以增加 NIR 光谱的利用率。本研究采用相同 NIR 光谱同时建立绿原酸、酚酸、木犀草苷 3 种成分定量检测模型以及金银花与山银花定性鉴别模型，有利于提高金银花 NIR 检测效率并进行多角度分析，为解决金银花掺假与有效成分含量不合格等实际问题提供思路和科学依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：230.

[2] 郑依玲，欧阳勇，梅全喜，等 . 金银花在新型冠状病毒肺炎防治中的应用探析 [J]. 亚太传统医药，2021，17（7）：180-184.

[3] GB/T 29858—2013. 分子光谱多元校正定量分析通则 [S]. 2013：3-4.

[4] 杨天鸣，和顺芳，孙丽英，等 . 近红外漫反射光谱法快速测定金银花中水分含量 [J]. 化学与生物工程，2020，37（6）：66-68.

[5] 耿姝，陈勇，金叶，等 . 基于近红外技术的金银花药材多指标成分快速检测 [J]. 中国现代应用药学，2016，33（2）：144-150.

[6] 郝海群 . 近红外光谱法测定金银花中绿原酸含量 [J]. 河南中医，2015，35（3）：640-642.

[7] Xue J，Yang Q，Li C，et al. Rapid and simultaneous quality analysis of the three active components in *Lonicerae Japonicae* Flos by near-infrared spectroscopy [J]. Food Chem，2021，342：128386.

[8] 刘征辉，魏静娜，赵琳琳，等 . 近红外光谱技术在金银花和山银花判别中的应用研究 [J]. 中国现代中药，2020，22（1）：58-64.

[9] Zhao J，Cui P，Liu H，et al. Rapid screening and quantitative analysis of adulterant Lonicerae Flos in *Lonicerae Japonicae* Flos by Fourier-transform near infrared spectroscopy [J]. Infrared Phys Techn，2020，104：103139.

[10] 陈璐，张惠，张丙春，等 . 基于近红外光谱技术快速鉴别不同产地金银花 [J]. 农产品质量与安全，2019，100（4）：41-44.

[11] 白钢，侯媛媛，丁国钰，等 . 基于中药质量标志物构建中药材品质的近红外智能评价体系 [J]. 药学学报，2019，54（2）：197-203.

[12] 范林宏，范文翔，韦志强，等 . 近红外光谱技术结合化学计量学在中药分析中的应用现状 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（24）：205-210.

[13] 吴志生，杜敏，潘晓宁，等 . 粒径对多类中药材 NIR 频谱区的检测研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（2）：287-291.

[14] 杨华生，吴维刚，谭丽霞，等 . 麦芽炒制过程中近红外在线监测模型的建立及“炒香”终点判断研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（3）：478-485.

[15] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：486.

[16] 董波，陈艾睿，张明 . 机器学习在解决过拟合现象中的作用 [J]. 心理科学，2021，44（2）：274-281.

[17] 黄志伟，郭拓，黄文静，等 . 近红外光谱技术在名贵中药材质量评价中的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（20）：6328-6336.

[18] 张苹苹，石文杰，杨清山 . 基于近红外漫反射光谱法所建的模型快速预测甜叶菊中甜菊糖苷、绿原酸及水分的含量 [J]. 理化检验 - 化学分册，2022，58（4）：458-464.

（收稿日期：2022-12-08；修回日期：2023-02-21）

流通池法在泊沙康唑口服混悬液体外溶出研究中的应用

刘德鹏，李倩，郝贵周，丁静雯，张贵民*（鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东 临沂　273400）

摘要：目的　建立一种有区分力的流通池法检查泊沙康唑口服混悬液的体外溶出。**方法**　以研磨法制成不同粒度分布的泊沙康唑混悬液中间体，并通过调节辅料黄原胶的加入量，制备成具有不同粒度分布和不同黏度的泊沙康唑口服混悬液。对关键参数（玻璃珠用量、加样方式以及流速）进行筛选，建立检查泊沙康唑口服混悬液体外溶出的流通池法。用新建立的流通池法和 FDA 溶出度数据库收载的桨法分别检测泊沙康唑口服混悬液的体外溶出曲线。**结果**　桨法测得的溶出曲线药物释放较快，20 min 时已基本释放完全；而新建立的流通池法测得的溶出曲线药物释放缓慢，并且对混悬液的粒度分布和黏度差异显示出良好的区分力。**结论**　与桨法相比，流通池法检查泊沙康唑口服混悬液的体外溶出时具有更高的区分力。

关键词：流通池法；区分力；泊沙康唑口服混悬液；体外溶出
中图分类号：R917，R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2083-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.018

Application of flow-through cell apparatus in the in vitro dissolution of posaconazole oral suspension

LIU De-peng, LI Qian, HAO Gui-zhou, DING Jing-wen, ZHANG Gui-min* (*National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceuticals*, *Lunan Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective　To establish flow-through cell apparatus to test the in vitro dissolution of posaconazole oral suspension with good discrimination. **Methods**　Posaconazole suspension intermediates with different particle sizes were prepared by bead-milling method. Posaconazole oral suspensions with different particle sizes and viscosities were prepared by adjusting the amount of addition in excipient xanthan gum. The flow-through cell apparatus for testing the dissolution of posaconazole oral suspension was established by screening the key parameters: the amount of glass beads, the way of adding samples and the flow rate. The in vitro dissolution profiles of the posaconazole oral suspensions were tested by the newly constructed flow-through cell apparatus and the paddle apparatus recorded in the FDA dissolution methods database. **Results**　The dissolution profiles measured by the paddle apparatus showed faster release of the drug, and the drug was released at most completely at 20 min; while the newly established flow-through cell apparatus demonstrated slow release, with good discrimination for the particle size and viscosity of the suspension. **Conclusion**　Compared with the paddle apparatus, the flow-through cell apparatus has better discrimination for the in vitro dissolution of posaconazole oral suspension.

Key words: flow-through cell apparatus; discrimination; posaconazole oral suspension; in vitro dissolution

作者简介：刘德鹏，男，硕士，主要从事药物质量分析工作，email：liudepeng6886@163.com　*通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事药物研发和工程化研究，email：lunanzhangguimin@163.com

泊沙康唑（posaconazole）是一种三唑类抗真菌药，具有抗菌谱广、活性强、耐受性好、安全性高等特点，广泛应用于临床，具有良好的治疗效果[1-2]。泊沙康唑被开发成多种剂型上市，其中，泊沙康唑口服混悬液（规格：40 mg·mL^{-1}，商品名：诺科飞、Noxafil）由原先灵葆雅公司研发，于 2005 年 11 月在欧洲上市，2013 年 6 月在中国获批上市，目前国内尚无仿制产品上市。

流通池法作为一种新型的溶出度检查方法，已收载于 2020 年版《中国药典》，但暂未见具体检查品种实例。在该方法下，预先加热至合适温度的溶出介质经恒流泵以一定流速持续通过流通池，与流通池中的药物接触并使其释放。可以通过改变溶出模式、调节流速、更换流通池内径、调整玻璃珠用量等方式调整溶出速度，使溶出方法可以更好地模拟体内环境。尤其是在闭环模式下，样品时刻暴露于新鲜的溶出介质中，始终维持着适宜的漏槽条件，更适用于难溶性药物的体外溶出研究，在一些药物的体外溶出研究中显示出更好的区分力[3-4]。

文献研究[5]显示，在进食高脂肪食物时，泊沙康唑的平均粒径为 1.7 μm 和 2.3 μm 的混悬液在健康受试者体内不具有生物等效性，大粒径混悬液的相对生物利用度为小粒径的 76%，表明原料的粒度分布是泊沙康唑口服混悬液的关键质量属性。但因其处方中含有二氧化钛等水不溶性辅料，采用常规粒径分析方法检测时易受干扰，难以准确剖析参比制剂中原料的粒度分布。因此，本研究结合流通池法的特点，建立了一种能区分泊沙康唑口服混悬液中原料粒度分布差异的体外溶出检测方法，为该产品的开发及质量控制提供支持。

1 材料

1.1 仪器

DYNO-MILL 型研磨机（瑞士 WAB 公司）；L5M 型高剪切乳化器（英国 Silverson 公司）；Mastersizer 3000 型激光粒度分析仪（英国 Malvern 公司）；XS204 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；MCR302 型流变仪（奥地利 Anton Paar 公司）；SOTAX AT.7x 溶出仪、CE 7 Smart 型流通池法溶出仪（瑞士 Sotax 公司）；UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

1.2 试药

泊沙康唑原料药（含量：100.8%，批号：20210434）、泊沙康唑对照品（含量：99.8%，批号：RSP-0271-20201011，浙江奥翔药业股份有限公司）；聚山梨酯 80（南京威尔药业集团股份有限公司）；枸橼酸钠、二甲硅油、麦芽糖浆、十二烷基硫酸钠（SDS）（湖南尔康制药股份有限公司）；枸橼酸（湖南九典宏阳制药有限公司）；黄原胶（CP Kelco U.S.，Inc.）；苯甲酸钠（南京化学试剂股份有限公司）；甘油（丰益生物科技有限公司）；香精（森馨香精色素科技中国有限公司）；二氧化钛（江苏宏远药业有限公司）；纯化水（山东新时代药业有限公司）。

2 方法与结果

2.1 泊沙康唑口服混悬液的制备

取聚山梨酯 80 8.7 g，加至 275 g 中纯化水，搅拌至溶解，加入泊沙康唑原料药 35 g，继续搅拌至分散均匀；用高剪切乳化器乳化（10 000 r·min^{-1}）10 min；再将乳化后的混悬液经研磨机湿法研磨（转速 8.0 m·s^{-1}），进一步减小粒径，循环研磨 2 次收集混悬液 1；同法制备，循环研磨 3 次收集混悬液 2。采用激光粒度分析仪湿法模块检测粒度分布，遮光度 10% ～ 20%、颗粒折射率 1.657、吸收率 0.01、搅拌速度 2000 r·min^{-1}，测量时间 30 s，测定 3 次取平均值。结果显示：混悬液 1 的粒度分布 D_{10} 为（0.92±0.015）μm；D_{50} 为（2.15±0.051）μm；D_{90} 为（9.78±0.022）μm；混悬液 2 的粒度分布 D_{10} 为（0.56±0.017）μm；D_{50} 为（1.67±0.048）μm；D_{90} 为（6.82±0.021）μm。

依次取二甲硅油 2.6 g、黄原胶 2.62 g、苯甲酸钠 1.75 g、甘油 87.25 g、香精 4.4 g、二氧化钛 3.5 g、麦芽糖浆 350 g，分别加至 275 g 纯化水中，搅拌至溶解分散均匀后，用枸橼酸 - 枸橼酸钠缓冲液（pH 4.0）调节 pH 至 4.0 ～ 5.0，得溶液 1；另取黄原胶 2.22 g，其他同法制备，得溶液 2。

将上述混悬液与溶液按表 1 方式以 1∶1 混合均匀，即得泊沙康唑口服混悬液。分别测定沉降体积比，结果显示，BHXY1、BHXY2 和 BHXY3 的沉降体积比均为 1.0。用流变仪分别测定黏度，测定温度 25 ℃，转子 CP50，结果显示，BHXY1、BHXY2 和 BHXY3 的黏度分别为（356±45）mPa·s、（212±32）mPa·s 和（353±30）mPa·s。

2.2 HPLC 方法及其验证

采用 HPLC 测定泊沙康唑口服混悬液的溶出度，并对分析方法进行验证。

表 1　泊沙康唑口服混悬液的组成

Tab 1　Composition of posaconazole oral suspension

样品编号	混悬液	溶液
BHXY1	混悬液 1	溶液 1
BHXY2	混悬液 1	溶液 2
BHXY3	混悬液 2	溶液 1

2.2.1　色谱条件[6]　色谱柱 Diamonsil C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈 - 水（60∶40）；流速 1.0 mL·min^{-1}；检测波长 262 nm；柱温 25 ℃；进样量 10 μL。

2.2.2　专属性　按照处方量配制空白辅料，取“2.4”项下各溶出介质定量稀释制成空白辅料溶液。取各溶出介质及其配制的空白辅料溶液，进样测定，结果显示辅料和溶出介质对主成分的测定均无干扰，该方法专属性较好。

2.2.3　线性关系考察　精密称取泊沙康唑对照品约 200 mg，置 100 mL 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。分别取对照品储备液适量，定量稀释制成每 1 mL 中含泊沙康唑约 10、50、80、100、150、200 和 250 μg 的溶液，作为系列线性溶液，进样测定，以峰面积（A）对浓度（C）进行线性回归，回归方程为：$A = 104.41C - 142.63$，$r = 0.9993$，表明泊沙康唑在 10 ～ 250 μg·mL^{-1} 内与峰面积的线性关系良好。

2.2.4　精密度　取“2.2.3”项下的 100 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，连续进样测定 6 次，结果峰面积的 *RSD* 为 0.62%，表明方法精密度良好。

2.2.5　回收试验　按处方量配制辅料溶液，精密量取适量置 50 mL 量瓶中，再分别加入“2.2.3”项下配制的泊沙康唑对照品储备液 2、5、6 mL（各 3 份），加 0.3%SDS 溶液稀释至刻度，摇匀，过滤。进样检测，并计算回收率，结果泊沙康唑低、中、高浓度样品的平均回收率为 99.54%、99.63% 和 99.62%，*RSD* 为 0.37%、0.36% 和 0.17%（$n = 3$）。

2.2.6　耐用性　分别采用不同色谱柱、柱温（20、25 和 30 ℃）及流动相比例进行耐用性试验，结果各条件下均能满足系统适用性要求，说明方法的耐用性良好。

2.3　流通池体外溶出检测方法的研究

流通池法有两种运行模式，即开环模式和闭环模式，示意图见图 1。开环模式下新鲜的溶出介质连续泵入样品池中，是非循环模式；闭环模式下溶出介质在泵的作用下重复进入样品池中，是循环模式。相比而言，开环模式可以使样品在良好的漏槽条件下持续释放，因此本研究选用开环模式。

2.3.1　流通池法初步试验　选用内径为 22.6 mm 的

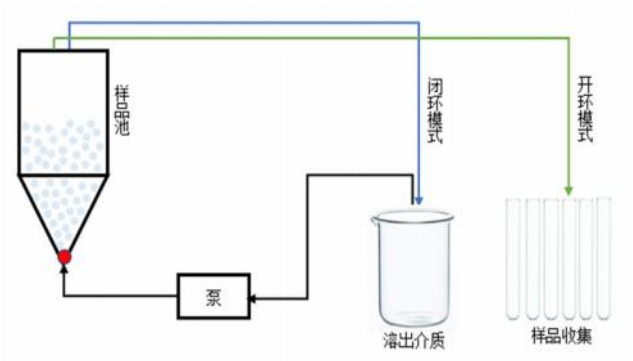

图 1　流通池开环与闭环模式示意图

Fig 1　Open-loop and closed-loop mode of flow-through cell apparatus

标准流通池，在倒置的锥体下端放入直径为 5 mm 的红宝石以防止样品池中的介质倒流入管路，用注射器吸取 5 mL 样品并精密称定，加至样品池锥体下端红宝石上，样品池内充填直径 1 mm 的玻璃珠 20 g，滤室内加入 GF/D 滤膜，将滤室与样品池组装好后，装入溶出仪，开环模式，温度 37 ℃，流速 8 mL·min^{-1}，分别于 10、20、30、45、60、90、120、180、240 和 360 min 时取样，经 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤，取滤液作为供试品溶液；另精密称取泊沙康唑对照品适量，用流动相溶解并稀释制成 100 μg·mL^{-1} 的对照品溶液。取供试品溶液和对照品溶液分别进样测定，采用外标法计算药物浓度并绘制累计溶出曲线。

2.3.2　方法参数优化　选取含 0.3%SDS 的水溶液为溶出介质，使用 BHXY3 样品对流通池法的关键参数如玻璃珠用量、加样方式及流速等进行筛选和优化。

① 玻璃珠用量：用注射器取 5 mL 泊沙康唑口服混悬液，加至样品池的锥体下端，再分别加入 10、15 和 20 g 玻璃珠，流速为 8 mL·min^{-1}，结果溶出曲线见图 2。玻璃珠用量对溶出速度基本无影响，但较多量的玻璃珠可以获得更好的分散效果，因此玻璃珠用量选择 20 g。

② 样品加样方式：用注射器取 5 mL 泊沙康唑口服混悬液，分别在样品池锥形下端、玻璃珠上层以及与玻璃珠交替分散加样[7]（见图 3），玻璃珠用量为 20 g，流速为 8 mL·min^{-1}，溶出曲线见图 4。

结果表明，在样品池锥形下端先加入混悬液后再加入玻璃珠，玻璃珠在重力作用下沉至红宝石处，使混悬液均匀分散至玻璃珠层，可使药物缓慢释放，且重复性好；混悬液与玻璃珠交替加入样品池时，玻璃珠与混悬液间易形成断层，且操作烦琐，不同人员间操作差异较大；混悬液加至玻璃珠上层时，由于混悬液黏度较大，难以分散至玻璃珠

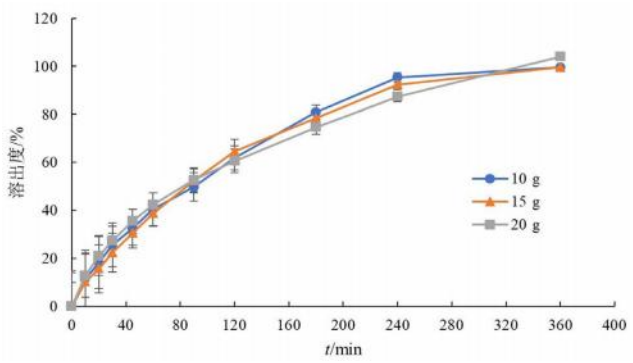

图 2 玻璃珠用量对溶出速度的影响（n = 6）

Fig 2 Effect of the amount of glass beads on dissolution rate（n = 6）

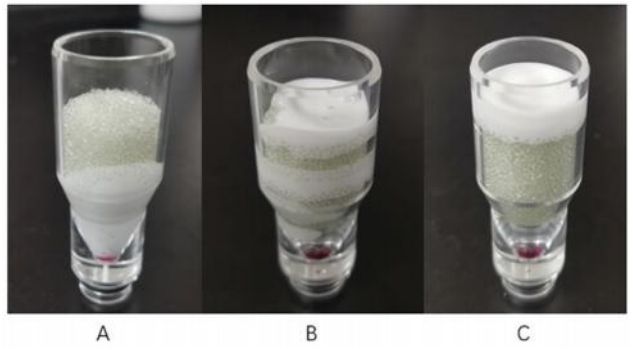

图 3 样品池中加样方式示意图

Fig 3 Schematic diagram of the sample adding methods in the sample cell

A. 在样品池锥形下端加入（adding at the conical bottom of the sample cell）；B. 与玻璃珠交替分散加入（dispersing and adding alternately with glass beads）；C. 在玻璃珠上层加入（adding above the glass beads）

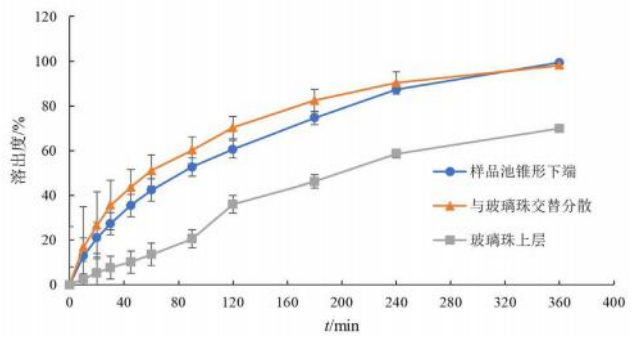

图 4 加样方式对溶出速度的影响（n = 6）

Fig 4 Effect of sample adding methods on dissolution rate（n = 6）

层，而集中于玻璃珠层表面，使药物的释放缓慢。因此，选用在样品池锥形下端加入样品。

③ 流速：用注射器取 5 mL 泊沙康唑口服混悬液加至样品池内，再加入 20 g 玻璃珠，流速分别为 4、8、16 mL·min^{-1}，溶出曲线见图 5。

结果表明，混悬液的溶出速率与流速成正相关，流速越大，溶出越快；溶出达 85% 以上时，流速为 4、8、16 mL·min^{-1} 时所需的溶出时间分别为 360 min 以上、240 min 和 90 min。为保证方法对粒度分布和黏度有一定区分力，并且在 6 h 内可溶出完全，流速选用 8 mL·min^{-1}。

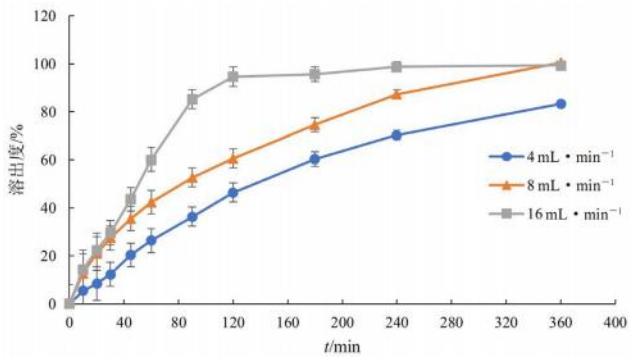

图 5 流速对溶出速度的影响（n = 6）

Fig 5 Effect of flow rate on dissolution rate（n = 6）

2.4 流通池法和桨法的对比

泊沙康唑属于 BCS Ⅱ类药物，在酸性介质中溶解度较高，在弱酸性和中性介质中的溶解度较低。因此，将不同 pH 的溶出介质[8]选定为：pH 1.0 盐酸溶液、含 0.3%SDS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、含 0.3%SDS 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液和含 0.3%SDS 的水溶液。使用新建立的流通池法检测 BHXY1、BHXY2 和 BHXY3 在以上四种介质中的溶出曲线，并与桨法进行对比。

FDA 溶出度方法数据库中收载的泊沙康唑口服混悬液的溶出度测定方法为桨法，转速为 25 r·min^{-1}，介质为含 0.3%SDS 的溶液，介质体积为 900 mL。参照该方法，按以下方式投样[6]检测：用注射器吸取 5 mL 混悬液并精密称定，迅速按压注射器投样并开启溶出仪计时，分别于 10、20、30、45、60 min 时取样，用 0.45 μm 滤膜过滤，续滤液作为供试品溶液；对照品溶液配制同“2.3.1”项下。取供试品溶液和对照品溶液分别进样测定，采用外标法计算药物浓度并绘制溶出曲线，见图 6。

结果表明，采用桨法检测的泊沙康唑口服混悬液溶出均较快，20 min 时已基本溶出完全，对处方中粒度分布和黏度差异无区分力；而采用流通池法检测时，混悬液在四种溶出介质中缓慢溶出，且对处方中粒度分布和黏度差异具有较好的区分力。

3 讨论

本研究采用研磨法制备了两种不同粒度分布的粗混悬液，中位值粒径分别为 2.15 μm 和 1.67 μm，与文献报道的原研制剂临床用样品的粒径中位值相当，并通过调节助悬剂黄原胶的加入量制备出不同黏度的泊沙康唑口服混悬液。其中 BHXY1 与 BHXY2 为大粒径产品（2.15 μm）、BHXY3 为小粒径产品（1.67 μm），BHXY2 黏度较小。桨法检测时，用注射器将混悬液加入溶出杯中后，混悬液快速分散，启动搅拌桨后带动混

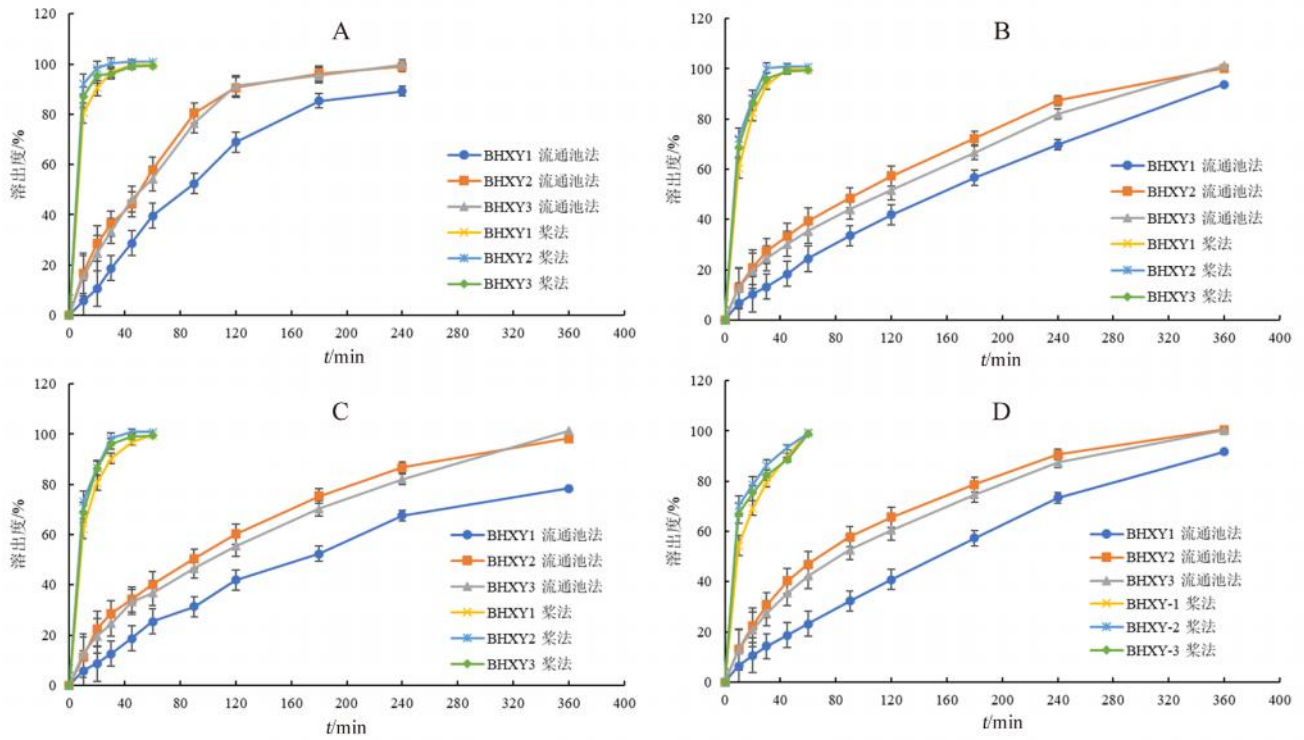

图 6　两种方法测得泊沙康唑口服混悬液在四种介质中的溶出曲线（$n = 6$）

Fig 6　Dissolution profiles of the posaconazole oral suspension by two methods in 4 media（$n = 6$）

A. pH 1.0 盐酸（pH 1.2 hydrochloric acid solution）；B. 含 0.3%SDS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液（pH 4.5 acetic acid buffer solution with 0.3%SDS）；C. 含 0.3%SDS 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液（pH 6.8 phosphate buffer solution with 0.3%SDS）；D. 0.3%SDS 水溶液（water with 0.3% SDS）

悬液进一步分散。由于药物粒径较小呈现出快速溶出，对混悬液粒径的微小差异不具有区分力，与文献报道一致[5-7, 9-10]，相反，用新建立的流通池法检测时，混悬液呈现出相对缓慢的溶出，且能区分处方中粒度分布和黏度的微小差异。

综上，本研究建立的流通池法检测泊沙康唑口服混悬液体外溶出的方法具有重现性好、区分力强的优点，可为该产品的开发提供更好的指示，也为其他难溶性混悬制剂的体外溶出研究提供了参考。

参考文献

[1] 刘伟，刘洁，胡小平 . 三唑类抗真菌新药泊沙康唑和伏立康唑简介 [J]. 菌物学报，2018，37（10）：1391-1398.

[2] 叶珍洁，吴灵洁，张晓颖，等 . 泊沙康唑药动学及其治疗药物检测方法研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（1）：222-228.

[3] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：132-137.

[4] 周畅，方瑜，杜青，等 . 流通池法在药物制剂中的应用进展 [J]. 中国药学杂志，2021，56（21）：1706-1711.

[5] Vuletic L，Herveg M，Ferderber K，et al. Single-dose pharmacokinetic properties and relative bioavailability of different formulations of posaconazole oral suspension in healthy volunteers [J]. Clin Pharmacol Drug Dev，2019，8（6）：827-836.

[6] 张多婷 . 中心复合设计 - 效应面法优化泊沙康唑口服混悬液制备工艺 [J]. 沈阳药科大学学报，2019，36（8）：655-661.

[7] Forrest WP，Reuter KG，Shah V，et al. USP apparatus 4：a valuable in vitro tool to enable formulation development of long-acting parenteral（LAP）nanosuspension formulations of poorly water-soluble compounds [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2018，19（1）：413-424.

[8] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则 [EB/OL]. https：//www. cde. org. cn/zdyz/index，2015-02-05.

[9] 杜蓉，方松，任力 . 不同厂家布洛芬混悬液的溶出度对比研究 [J]. 中国药师，2016，19（9）：1804-1807.

[10] 毛利娟，徐云龙，李学明，等 . 非洛贝特纳米混悬剂的制备及其体外溶出性考察 [J]. 中国药房，2010，21（45）：4268-4271.

（收稿日期：2022-11-23；修回日期：2023-01-12）

基于指纹图谱和网络药理学的山蜡梅叶颗粒质量标志物及含量测定研究

关志宇[1, 2]，彭石根[1]，张可欣[1]，王勇平[1, 2*]，刘荣华[1*]，刘志强[1]，谢毓敏[1]（1. 江西中医药大学，南昌 330004；2. 江西佑美制药有限公司，江西 上饶 334000）

摘要：目的 基于指纹图谱和网络药理学方法，对山蜡梅叶颗粒质量标志物（Q-Marker）进行预测分析，并测定相关 Q-Marker 的含量。**方法** 建立山蜡梅叶颗粒 HPLC 指纹图谱，对 15 批山蜡梅叶颗粒进行相似度评价和共有峰指认，并结合化学模式识别方法，筛选 Q-Marker 的候选成分；通过网络药理学筛选山蜡梅叶颗粒相关成分的靶点和通路，构建“成分 - 靶点 - 通路”网络图，预测山蜡梅叶颗粒的 Q-Marker 及核心靶点，并利用分子对接验证。最后，采用 HPLC 法对筛选出的 Q-Marker 进行含量测定研究。**结果** 建立了相似度大于 0.95 的山蜡梅叶颗粒 HPLC 指纹图谱，共指认了 8 个共有峰，其中东莨菪苷（峰 1）、东莨菪内酯（峰 3）、芦丁（峰 5）、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（峰 8）、紫云英苷（峰 9）、山柰素（峰 12）、异嗪皮啶（峰 4）、槲皮素（峰 11）为 Q-Marker 候选成分。网络药理学分析表明芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、山柰素、槲皮素是山蜡梅叶颗粒发挥退热消炎作用的有效成分，可作为山蜡梅叶颗粒的 Q-Marker。分子对接表明芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、山柰素、槲皮素与筛选出的 5 个核心靶点具有良好的结合能力，体现了山蜡梅叶颗粒 Q-Marker 较好的生物活性。含量测定方法学考察结果显示，各成分的线性关系良好（$r \geq 0.9990$），平均加样回收率在 98.80% ～ 101.82%，*RSD* 值在 1.1% ～ 2.1%。**结论** 建立的山蜡梅叶颗粒 HPLC 指纹图谱方法灵敏度高、结果准确、重复性好，结合网络药理学和分子对接技术筛选出 Q-Marker 并进行含量测定，可为山蜡梅叶颗粒的质量控制和药效相关机制的研究提供参考。

关键词：山蜡梅叶颗粒；指纹图谱；质量标志物；清热消炎；网络药理学；分子对接
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2088-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.019

Quality markers and content determination of Shanla Meiye granules based on fingerprints and network pharmacology

GUAN Zhi-yu[1, 2], PENG Shi-gen[1], ZHANG Ke-xin[1], WANG Yong-ping[1, 2*], LIU Rong-hua[1*], LIU Zhi-qiang[1], XIE Yu-min[1] (1. *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Jiangxi Youmei Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Shangrao Jiangxi* 334000)

Abstract: Objective To predict and analyze the quality markers (Q-Marker) for Shanla Meiye granules based on fingerprints and network pharmacology, and to determine the content of related Q-Markers. **Methods** The HPLC fingerprints of Shanla Meiye granules were established. The similarity was evaluated and common peaks were identified for 15 batches of granules. The candidate components of Q-Markers were screened with chemical pattern recognition. Targets and pathways of related components were selected to build a “component-target-pathway” network predict the Q-Marker and

基金项目：江西省人事厅博士后科研项目（No. 252591）；江西省“三区”人才支持计划项目（2022 年）；江西省研究生创新专项资金项目（No. YC2022-s849）；江西中医药大学中药学一流学科科研项目（No. JXSYLXK-ZHYAO049）；江西中医药大学校级科技创新团队发展计划（No. CXTD-22004）。

作者简介：关志宇，男，教授，主要从事药物新制剂与生物药剂学研究，email：yaoxueyuanc212 @163.com *__通信作者__：刘荣华，男，教授，主要从事天然产物活性物质基础研究，email：rhliu@163.com；王勇平，男，工程师，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：yongping 830414@163.com

core targets of Shanla Meiye granules, and verify by molecular docking. Finally, the content of Q-Marker was determined by HPLC. **Results** HPLC fingerprints of Shanla Meiye granules with similarity greater than 0.95 were established, and 8 common peaks were identified, including scopolin (peak 1), scopoletin (peak 3), rutin (peak 5), kaempferol-3-rutinoside (peak 8), astragalin (peak 9), isofraxidin (peak 12), quercetin (peak 4) and kaempferol (peak 11) as candidate components of Q-Markers. The network pharmacology analysis showed that rutin, kaempferol-3-rutinoside, astragalin, quercetin and kaempferol were 5 components to exert the medicinal effect, and could be used as Q-Markers. Molecular docking showed the 5 components and core targets also had good binding ability and biological activity. The content determination showed that the linear relationship between the components was good ($r \geqslant 0.9990$), the average recovery was 98.80% ～ 101.82%, and the *RSD* was 1.1% ～ 2.1%. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method of Shanla Meiye granules has high sensitivity, accurate results, and good repeatability. Combined with network pharmacology and molecular docking, Q-Markers are screened and determined, providing a reference for its quality control and mechanism for drug efficacy.

Key words: Shanla Meiye granule; fingerprint; quality marker; heat diminish inflammation; network pharmacology; molecular docking

山蜡梅叶为腊梅科腊梅属植物山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv. 的干燥叶，主产于江西德兴、婺源及安徽徽州，是医家习用于治疗流行性感冒、慢性支气管炎及中暑的江西省道地药材 [1]。山蜡梅叶颗粒为单一山蜡梅叶提取物制备的现代制剂之一，具辛凉解表、清热解毒之功效，风热感冒、发热、恶寒、咽痛者均可用之 [2]，在治疗上呼吸道感染、小儿手足口病等方面具有良好的临床疗效 [3-4]。中药颗粒剂作为在传统汤剂、酒剂等剂型的基础上改进的新型中药制剂，是我国中成药和日本汉方药最常采用的剂型，因其便捷、耐药性小，广被患者接受。外观性状、溶化性和含量测定是中药颗粒剂的主要质量标准，但由于中药制剂成分多样且制备过程复杂，仅靠这些指标不能全面反映其内在质量。

中药指纹图谱是一种全面的、可量化的质控手段，结合化学模式识别方法对复杂指纹图谱数据进行科学的解析，常用于评价中药材、中药制剂及半成品质量的优良性、真实性和稳定性，在中药的整体质量控制中起着重要作用 [5-7]。中药产品的质量尤其是有效成分的含量有着较大差异，主要原因为中药材来源广和产地繁多，中药质量标志物（Q-Marker）的概念应运而生 [8]，Q-Marker 可反映中药安全性和有效性，以标志性物质对中药进行质量控制 [9]。网络药理学以整体性和系统性为特点，可快速发现中药主要作用通路及相关靶点 [10]，对于预测中药成分的潜在作用靶点具有重要意义 [11-12]。近年来，大量科研人员通过将指纹图谱与网络药理学技术结合起来，分析中药及中药制剂的质量标志物，从而为其全面的质控过程提供有效的参考 [13-15]。

已有文献对山蜡梅叶进行指纹图谱和多成分含量测定研究 [16-17]，但未见山蜡梅叶颗粒多成分指纹图谱及质量标志物的预测分析。故本研究通过建立 3 个主产地山蜡梅叶颗粒共 15 批的 HPLC 指纹图谱，结合化学模式识别方法对其整体成分进行综合评价，再采用网络药理学和分子对接技术分析预测其 Q-Marker，为全面控制和评价山蜡梅叶颗粒质量提供了科学依据，也为其他中药制剂的质量控制提供了参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

安捷伦 1260 型 HPLC 仪（美国安捷伦公司）；百万分之一电子分析天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；超声波清洗器（昆山超声波仪器有限公司）。

1.2 试药

异嗪皮啶（批号：110837-202009，纯度：99.8%）、芦丁（批号：100080-201811，纯度：91.7%）、槲皮素（批号：100081-201610，纯度：99.8%）和山柰素（批号：110861-201812，纯度：93.8%）（中国食品药品检定研究院）；东莨菪苷（批号：B20307，纯度≥ 98%）、东莨菪内酯（批号：B20309，纯度≥ 99%）、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（批号：B21133，纯度≥ 98%）、紫云英苷（批号：B21704，纯度≥ 98%）（上海源叶生物科技有限公司）；甲醇（国药集团化学试剂有限公司）、乙腈（西陇科学股份有限公司）、甲酸（上海易恩化学技术有限公司），均为色谱纯；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.3 药材

15 批山蜡梅叶来源于江西佑美制药有限公司，经江西中医药大学中药资源教研室邓可众教授鉴定为腊梅科腊梅属植物山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv. 的干燥叶。将 15 批山蜡梅叶加工成相应批次颗粒，样品信息见表 1。

表 1 山蜡梅叶颗粒样品信息

Tab 1 Sample information of Shanla Meiye granules

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	2009081	江西婺源	S9	2101004	贵州
S2	2009082	江西婺源	S10	2101005	贵州
S3	2009083	江西婺源	S11	2105036	江西广丰
S4	2009084	江西婺源	S12	2105037	江西广丰
S5	2009085	江西婺源	S13	2105038	江西广丰
S6	2101001	贵州	S14	2105039	江西广丰
S7	2101002	贵州	S15	2105040	江西广丰
S8	2101003	贵州			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Welch C_{18} 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 ～ 20 min，10% ～ 15%A；20 ～ 30 min，15%A；30 ～ 45 min，15% ～ 25%A；45 ～ 70 min，25% ～ 45%A；流速：0.8 mL • min^{-1}；进样量 10 μL；柱温 30 ℃；检测波长 359 nm。

2.2 山蜡梅叶颗粒的制备

根据 2020 年版《中国药典》四部通则中“0104 颗粒剂”项下方法制备。取山蜡梅叶 1000 g，用水蒸气蒸馏法提取挥发油，备用；蒸馏后的水溶液另器保存；药渣加水煎煮两次，每次 30 min，合并煎液，滤过，滤液与上述蒸馏后的水溶液合并，浓缩至相对密度为 1.10（90 ～ 95 ℃）的清膏，放冷，加等量乙醇，搅匀，静置 24 h，滤过，滤液回收乙醇并浓缩至相对密度为 1.35（70 ～ 80 ℃）的稠膏，加入糊精适量、三氯蔗糖 1.8 g，制成颗粒，干燥，喷入上述挥发油，混匀，制成 600 g，即得山蜡梅叶颗粒。

2.3 供试品溶液的制备

取山蜡梅叶颗粒适量，研细，称取 1.0 g，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25.00 mL，称重，超声（200 W，45 kHz）提取 30 min，放冷，称重，用甲醇补足失重，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.4 对照品溶液的制备

取适量东莨菪苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶、芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素对照品，精密称定，甲醇溶解成母液。各移取 1 mL，置 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，得质量浓度分别为 10.0、32.0、24.0、30.2、36.0、10.2、38.4、22.0 mg • L^{-1} 的混合对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 参照峰的选择 槲皮素为山蜡梅叶颗粒的主要成分之一，峰面积大，化学性质、色谱峰保留时间稳定，故以槲皮素为参照峰。

2.5.2 精密度试验 取山蜡梅叶颗粒（S7），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，以槲皮素为参照峰，得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均＜ 0.2%，相对峰面积的 *RSD* 均＜ 4.0%，表明该仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取山蜡梅叶颗粒（S7），按“2.3”项下方法平行制备 6 份样品，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以槲皮素为参照峰，得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均＜ 2.1%，相对峰面积的 *RSD* 均＜ 4.0%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取山蜡梅叶颗粒（S7），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，以槲皮素为参照峰，得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* ＜ 1.8%，相对峰面积的 *RSD* ＜ 4.0%，表明该供试品在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱的建立及评价

2.6.1 指纹图谱的建立 取 15 批山蜡梅叶颗粒样品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。所得图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统软件（2012 版）”，参照图谱为 S7，采用平均数法，时间窗宽度设为 0.1 min，进行多点校正和 Mark 峰匹配，得山蜡梅叶颗粒的指纹图谱叠加图，见图 1。

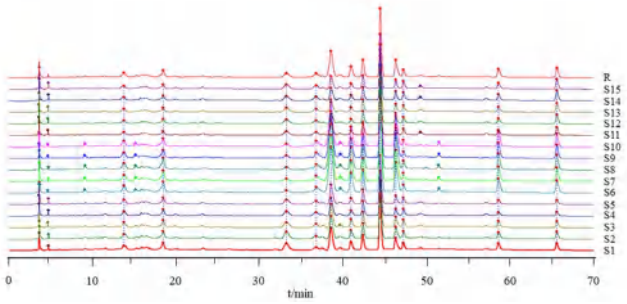

图 1 15 批山蜡梅叶颗粒的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprints of 15 batches of Shanla Meiye granules

2.6.2 相似度分析 以对照指纹图谱（R）为参照，计算相似度，见表 2。15 批山蜡梅叶颗粒样品图谱相似度均＞ 0.95，表明各批次样品化学成分相似，山蜡梅叶颗粒的质量均一稳定。

2.6.3 共有峰的指认 使用指纹图谱分析结果，将混合对照品和山蜡梅叶颗粒的样品进行比对，得 12 个共有峰，8 个被指认，分别为东莨菪苷（峰 1）、东莨菪内酯（峰 3）、异嗪皮啶（峰 4）、芦丁（峰 5）、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（峰 8）、紫云英苷（峰 9）、槲皮素（峰 11）、山柰素（峰 12），见图 2。

表 2　山蜡梅叶颗粒样品相似度

Tab 2　Similarity of samples of Shanla Meiye granules

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.975	S9	0.988
S2	0.977	S10	0.983
S3	0.978	S11	0.994
S4	0.978	S12	0.993
S5	0.993	S13	0.978
S6	0.993	S14	0.992
S7	0.994	S15	0.977
S8	0.994		

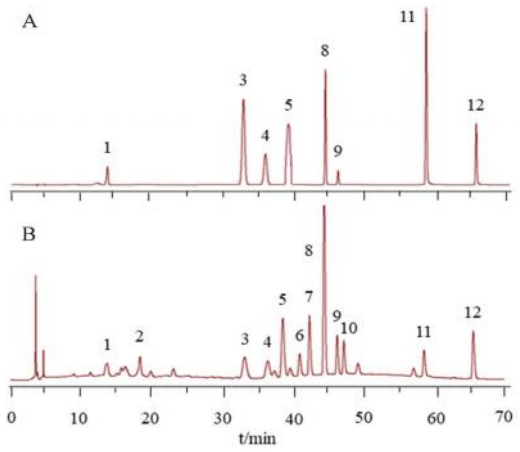

图 2　混合对照品溶液（A）和供试品溶液（B）的 HPLC 图

Fig 2　HPLC of mixed reference solution（A）and the test solution（B）

1. 东莨菪苷（scopolin）；3. 东莨菪内酯（scopoletin）；4. 异嗪皮啶（isofraxidin）；5. 芦丁（rutin）；8. 山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷（kaempferol-3-*O*-rutinoside）；9. 紫云英苷（astragalin）；11. 槲皮素（quercetin）；12. 山柰素（kaempferol）

2.6.4　聚类分析（CA）　在 SPSS 21.0 软件中导入 15 批山蜡梅叶颗粒共有峰的峰面积，采用组间连接法，标准为平方欧氏距离，图 3 为聚类结果。当欧氏距离为 5 时，样品 S6 ～ S10 为第一类，样品 S1 ～ S5、S11 ～ S15 为第二类。说明不同产地的合格药材所生产出来的山蜡梅叶颗粒存在一定的差异，与前期调查厂家药材来源结果相符。

2.6.5　主成分分析（PCA）　在 SIMCA 14.1 软件中导入 15 批山蜡梅叶颗粒共有峰的峰面积，进行 PCA，得分矩阵图见图 4。结果发现 15 批样品可分为两类，样品 S6 ～ S10 为一组，样品 S1 ～ S5、S11 ～ S15 为另一组，此分类结果与聚类分析结果一致。

2.6.6　正交 - 偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）

为寻找引起不同产地山蜡梅叶颗粒差异的标志性成分，在 PCA 基础上进行有监督的 OPLS-DA 处理，得分矩阵图见图 5。模型解释率参数 R^2Y 为 0.990，预测能力参数 Q^2 为 0.978，均高于 0.5，表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。结果显

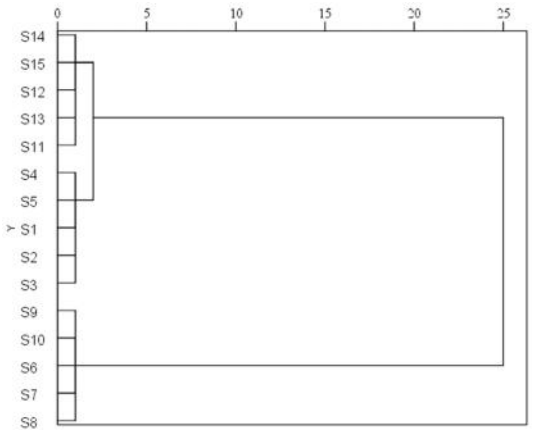

图 3　15 批山蜡梅叶颗粒的 CA

Fig 3　CA of 15 batches of Shanla Meiye granules

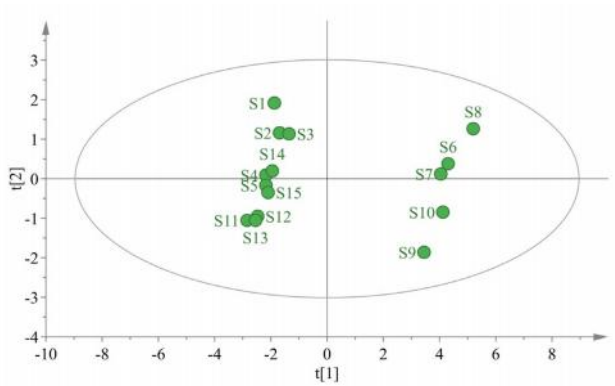

图 4　15 批山蜡梅叶颗粒的 PCA

Fig 4　PCA of 15 batches of Shanla Meiye granules

示 3 个产地的山蜡梅叶颗粒各自聚集在不同的区域，具有明显的区分。山蜡梅叶颗粒的差异标志物可用 VIP 值筛选，由图 6 可知，12 号峰（山柰素）、5 号峰（芦丁）、8 峰（山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷）、9 号峰（紫云英苷）、3 号峰（东莨菪内酯）的 VIP 值均＞ 1，表明这 5 种引起组间差异的标志性成分在区分不同产地山蜡梅叶颗粒时起重要作用。

2.7　网络药理学研究

现代药理研究表明，山蜡梅叶具有抑菌、抗炎、解热、祛痰、镇咳和降血脂等功效。本研究指认的 8 个成分中，槲皮素具有抗流感病毒、抗炎等活性；异嗪皮啶具有清热解毒、抗菌抗炎的药效[1, 18]，结合引起不同产地山蜡梅叶颗粒差异的 5 种标志性成分，利用网络药理学进一步寻找山蜡梅颗粒的 Q-Maker 以增强中药单方制剂的质量控制手段及与中药有效性的关联性。

将 Q-Marker 候选成分的 sdf 结构导入 Phamer Mapper 数据库获取活性成分作用靶点，得靶点 302 个；再通过 GeneCards 数据库检索“Fever”和“Inflammation”，得疾病靶点 3559 个。将成分、疾病靶点进行匹配后，得 63 个交集靶点，导入 STRING 11.0 数据库，得到“string_interactions.tsv”

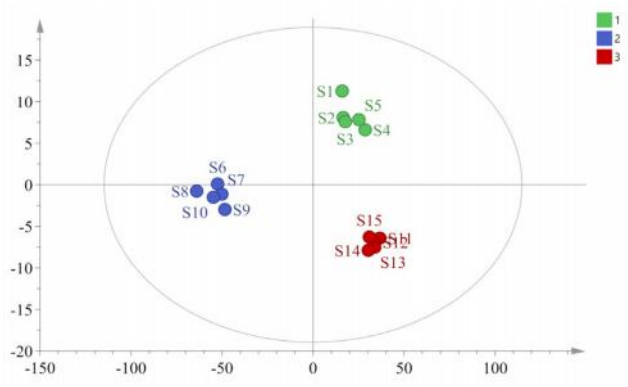

图 5 15 批山蜡梅叶颗粒 OPLS-DA

Fig 5 OPLS-DA of 15 batches of Shanla Meiye granules

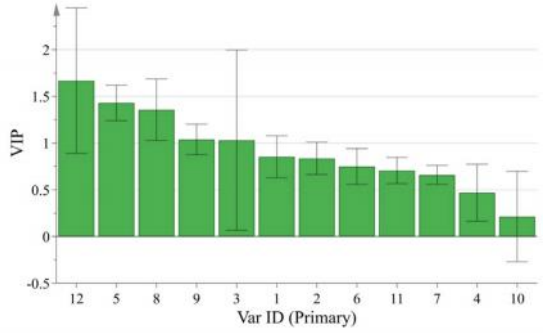

图 6 山蜡梅叶颗粒 OPLS-DA 的 VIP 值

Fig 6 VIP value of OPLS-DA of Shanla Meiye granules

格式文件，利用 Cytoscape 3.7.1 构建 PPI，以度值（degree）、介数中心性（betweenness centrality）和接近中心性（closeness centrality）均大于中位数为标准筛选核心靶点，得 24 个核心靶点。

将 24 个核心靶点导入 DAVID 6.8 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。本研究通过查阅文献和数据库筛选出 18 条与清热、消炎相关的通路。

使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建筛选所得的 7 个成分、24 个靶点和 18 条通路网络见图 7。结果显示，芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素及山柰素的连接度较高，可将其作为山蜡梅叶颗粒的 Q-Marker。24 个核心靶点中 *AKT1*、*AKT2*、*STAT1*、*JAK2*、*RAF1* 连接度较高，表明这 5 个靶点非常重要，为关键靶点。18 条与清热消炎有关的通路中，PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、趋化因子信号通路、脂质和动脉粥样硬化连接度较高，均大于平均值，为重要通路。

2.8 分子对接验证

以 Q-Marker 芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素及山柰素为配体，与 5 个关键靶点（*AKT1*、*AKT2*、*STAT1*、*JAK2*、*RAF1*）对应的活性位点（*2UZS*、*3D0E*、*1YVL*、*2B7A*、*3OMV*）进行分子对接，结果见表 3。小分子与受体结合时

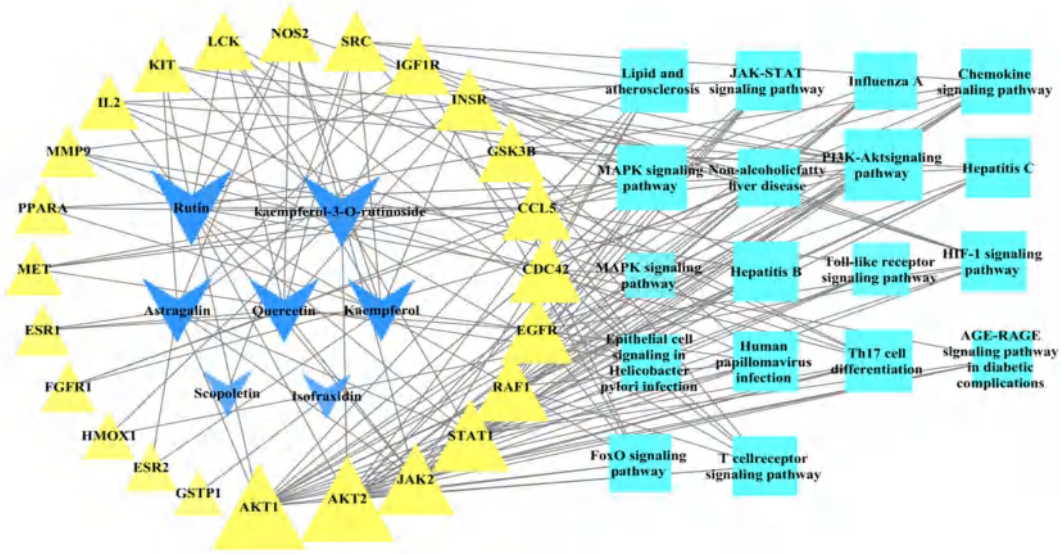

图 7 “成分 - 靶点 - 通路”网络

Fig 7 “Component-target-pathway” network

的能量越低、构象形状匹配度越高，则配体越容易与小分子结合，表明小分子具有的潜在作用活性越强 [19]。结果显示，Q-Marker 与靶点蛋白的结合能在－9.55～－4.32 kcal•mol^{-1}，表明 Q-Marker 与核心蛋白靶点之间亲和力较高，具有较高的药效活性，提示山蜡梅叶颗粒的 Q-Marker 可能通过作用于上述核心靶点发挥退热消炎的作用。

2.9 山蜡梅叶颗粒 Q-Marker 的含量测定

2.9.1 线性关系考察 取“2.4”项下混合对照品溶液适量，按倍数用甲醇稀释 6 次，得系列对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定。以对照品质量浓度为横坐标（*x*），以对照品峰面积为纵坐标（*y*）绘制标准曲线，进行线性回归，得到 5 种化合物的回归方程及线性范围，结果见表 4。

表 3　山蜡梅叶颗粒 Q-Marker 与核心靶点的分子对接

Tab 3　Molecular docking between Q-Marker and core target of Shanla Meiye granules

化合物	结合能 /（kcal・mol^{-1}）					
	AKT1（*2uzs*）	*AKT2*（*3d0e*）	*STAT1*（*1yvl*）	*JAK2*（*2b7a*）	*RAF1*（*3mov*）	总和
芦丁	－ 8.20	－ 4.32	－ 5.64	－ 6.04	－ 7.94	－ 32.14
山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷	－ 6.61	－ 4.94	－ 4.93	－ 4.81	－ 8.49	－ 29.78
紫云英苷	－ 7.97	－ 4.82	－ 5.25	－ 5.41	－ 6.72	－ 30.17
槲皮素	－ 9.42	－ 6.43	－ 6.44	－ 6.70	－ 9.55	－ 38.54
山柰素	－ 9.09	－ 6.98	－ 6.54	－ 6.55	－ 8.77	－ 37.93
总和	－ 41.29	－ 27.49	－ 28.80	－ 29.51	－ 41.47	

表 4　线性关系考察

Tab 4　Linear relationship examination

化合物	回归方程	*r*	范围 /（μg•mL^{-1}）
芦丁	$y = 386.4x + 6.832$	0.9992	1.491 ～ 44.73
山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷	$y = 522.0x + 8.115$	0.9995	5.97 ～ 179.28
紫云英苷	$y = 574.5x + 40.72$	0.9990	7.77 ～ 233.1
槲皮素	$y = 1132.7x - 1.349$	0.9999	2.565 ～ 76.95
山柰素	$y = 1530.2x - 6.070$	0.9999	5.321 ～ 159.63

2.9.2　精密度试验　精密吸取“2.9.1”项下对照品溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录各成分峰面积，结果芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素峰面积的 *RSD* 分别为 0.64%、0.35%、0.41%、0.29%、0.14%，表明仪器精密度良好。

2.9.3　重复性试验　取山蜡梅叶颗粒（S7）6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定，记录各成分峰面积，结果芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素的质量分数的 *RSD* 分别为 2.2%、1.4%、1.0%、1.4%、1.0%，表明该方法的重复性良好。

2.9.4　稳定性试验　取山蜡梅叶颗粒（S7）6 份，按“2.3”项下方法制备，在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录各成分峰面积，结果芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素峰面积的 *RSD* 分别为 2.1%、1.2%、1.2%、1.2%、0.97%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9.5　加样回收试验　精密称定已测定指标成分含量的山蜡梅叶颗粒样品粉末（S7），分别精密加入与样品中待测成分已知含量相当的 0.5、1.0、1.5 倍混合对照品溶液，每个梯度平行 3 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰素峰面积，并计算得平均加样回收率均在 98.80% ～ 101.82%，*RSD* 均在 1.1% ～ 2.1%。

2.9.6　样品测定　分别精密称取 15 批山蜡梅叶颗粒样品，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进样测定，各成分含量，结果见表 5。

表 5　15 批山蜡梅叶颗粒样品含量测定结果（*n* = 3）

Tab 5　Content of 15 batches of Shanla Meiye granules（*n* = 3）

样品	质量分数 /（mg・g^{-1}）				
	芦丁	山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷	紫云英苷	槲皮素	山柰素
S1	1.67	2.93	0.33	0.19	0.28
S2	1.77	3.04	0.37	0.22	0.30
S3	1.69	2.82	0.32	0.19	0.28
S4	1.63	2.62	0.28	0.18	0.25
S5	1.58	2.94	0.31	0.23	0.26
S6	6.64	7.84	2.61	0.61	0.40
S7	7.64	8.60	2.88	0.67	0.47
S8	6.95	7.73	2.51	0.60	0.42
S9	7.12	7.87	2.52	0.61	0.42
S10	6.73	7.38	2.61	0.58	0.41
S11	2.88	3.34	0.37	0.16	0.14
S12	2.60	3.11	0.24	0.15	0.13
S13	3.25	3.70	0.60	0.25	0.20
S14	3.35	4.00	0.72	0.27	0.21
S15	2.91	3.26	0.53	0.21	0.18

3　讨论

中药颗粒剂是一种相比传统汤剂携带服用方便、剂量准确的优势剂型，因其吸收快、作用迅速，更易被患者接受，助力着中医药现代化的发展进程。但中药颗粒剂制备过程复杂，特别是含挥发油的品种，导致不同批次颗粒剂质量不均一等问题。故找到中药颗粒剂的 Q-Marker，实时监测其制作过程中的关键点，对保证中药颗粒剂质量稳定有着重要意义。根据 Q-Marker 溯源性、可测性原则，本研究建立 15 批山蜡梅叶颗粒 HPLC 指纹图谱，共确认 12 个共有峰，通过与对照品比对指认了其中 8 个成分。采用化学模式识别方法对图谱结果进行分析，其中 OPLS-DA 分析结果显示山柰素、芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、东莨菪内酯是其差异化合物，可作为山蜡梅叶颗粒的候选 Q-Marker。基于此，结合异嗪皮啶、槲皮素等药效指标成分展开网络药理学研究，其结果显示芦丁、山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素及山柰素的连接度较高，在山蜡梅叶颗粒的清热抗炎过程中发挥着重要作用，可将其作为山蜡梅叶颗粒的 Q-Marker；*AKT1*、*AKT2*、*STAT1*、*JAK2*、*RAF1* 是其关键靶点；PI3K-Akt 信号通路、

趋化因子信号通路、MAPK信号通路、脂质和动脉粥样硬化是其重要通路。研究发现，*AKT1*、*AKT2*等*AKT*家族在巨噬细胞的炎症反应中起重要的调控作用，是PI3K/AKT信号通路抗炎作用主要涉的两个亚型[20-22]。*STAT1*被认为可能是抗炎治疗的新分子靶点[23]；*JAK2*参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程[24]，*RAF1*在人体内发挥多种生物学作用，其激活后可影响下游基因或信号转导，进而调控不同的生理及病理过程[25]。核心靶点的相应作用均与山蜡梅叶颗粒Q-Marker清热抗炎等药效相关。

综上分析，芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素及山柰素可作为山蜡梅叶颗粒的Q-Marker。后续可采用系统生物学、蛋白组学或高通量测序技术对关键成分进行清热消炎活性验证及在模型动物体内代谢、组织分布，以进一步验证网络药理学结果的可靠性。指纹图谱与网络药理学、分子对接技术相结合的方法为筛选山蜡梅叶颗粒Q-Marker提供有效的参考，同时也为其他中药制剂的质量控制提供新思路。

参考文献

[1] 吴艳秋，刘宇灵，林龙飞，等. 山蜡梅叶化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中华中医药杂志，2021，36（11）：6599-6607.

[2] 黄平，毛坤军，金贤武，等. 响应面法优化山蜡梅叶颗粒总黄酮提取工艺[J]. 中国现代中药，2019，21（12）：1688-1692.

[3] 田琳，张立明，董春晓. 山腊梅叶颗粒治疗儿童急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 临床合理用药杂志，2010，3（12）：57.

[4] 叶娇燕，袁慧强，王美. 山腊梅叶颗粒联合西药治疗小儿手足口病临床观察[J]. 新中医，2018，50（11）：147-149.

[5] 刘娟，冯芮，蒲忠慧，等. 指纹图谱结合HPLC定量分析在中药川芎质量评价中的应用研究[J]. 中药材，2019，42（2）：353-357.

[6] 张涛，张青，易海燕，等. 基于指纹图谱结合化学计量法对何首乌不同炮制品多指标成分分析[J]. 中草药，2022，53（15）：4653-4662.

[7] 郑振兴，胡瀚文，曾利，等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（21）：174-180.

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

[9] 陈丽华，肖发林，黄诗雨，等. 中药质量评价研究思路及创新发展趋势[J]. 中草药，2021，52（9）：2541-2547.

[10] Wang YL，Cui T，Liao ML，et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology[J]. Chin Herb Med，2019，11（4）：349-356.

[11] 张淑娟，张育贵，李东辉，等. 基于网络药理学及指纹图谱的黄芪质量标志物预测[J]. 中国中药杂志，2021，46（11）：2691-2698.

[12] Zhang GB，Li QY，Chen QL，et al. Network pharmacology：a new approach for Chinese herbal medicine research[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2013，2013（9）：621423-621431.

[13] 倪术仁，连云岚，赵思俊，等. 强力脑清素片HPLC指纹图谱的建立及质量标志物预测[J]. 中草药，2021，52（4）：1011-1019.

[14] 胡晓茹，郑海荣，党海霞，等. 基于网络药理学的红花注射液用红花药材质量控制方法研究[J]. 药学学报，2019，54（11）：2074-2082.

[15] 孙媛，王璐，彭梅梅，等. 甘草不同炮制品的指纹图谱研究及质量标志物预测分析[J]. 中国中药杂志，2020，45（21）：5209-5218.

[16] 黄文平，温芝琪，王萌萌，等. 不同产地山腊梅叶HPLC指纹图谱[J]. 中成药，2018，40（8）：1795-1798.

[17] 黄文平，温芝琪，王萌萌，等. 山腊梅叶中8种成分含量测定及主成分分析[J]. 中药新药与临床药理，2018，29（6）：799-803.

[18] 于宏，汪涛涌，王建，等. 山蜡梅的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 药物分析杂志，2021，41（9）：1477-1486.

[19] 李蕊，赵金伟，宁停波，等. 基于网络药理学和分子对接方法研究山花晶颗粒抗视疲劳的作用机制[J]. 中草药，2021，52（16）：4921-4930.

[20] Wang C，Zeng L，Zhang T，et al. Tenuigenin prevents IL-1β-induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes by suppressing PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway[J]. Inflammation，2016，39（2）：807-812.

[21] Brown AE，Palsgaard J，Borup R，et al. p38 MAPK activation upregulates proinflammatory pathways in skeletal muscle cells from insulin-resistant type 2 diabetic patients[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2015，308（1）：E63-70.

[22] Arranz A，Doxaki C，Vergadi E，et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（24）：9517-9522.

[23] 高梦丹，张永宏，赵艳. STAT1与STAT3在肝细胞癌及肝衰竭发病机制中的作用[J]. 临床肝胆病杂志，2018，34（9）：2017-2020.

[24] Owen KL，Brockwell NK，PAKER BS. JAK-STAT signaling：a double-edged sword of immune regulation and cancer progression[J]. Cancers，2019，11（12）：2002.

[25] Ge P，Wei L，Zhang M，et al. TRPC1/3/6 inhibition attenuates the TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the Ras/Raf1/ERK signaling pathway[J]. Cell Biol Int，2018，42（8）：975-984.

（收稿日期：2022-12-14；修回日期：2023-02-10）

不同来源猪皮与重建人类表皮模型对面膜中咖啡因透过性比较研究

魏国志，许飞飞，李和伟*（常州伟博海泰化妆品有限公司，江苏　常州　213000）

摘要：目的　探索评估面膜中咖啡因经皮透过性最适合的皮肤模型。**方法**　采用两种离体小型猪皮肤（巴马小型猪和小型家猪）和重建人类表皮为皮肤模型材料，应用 Franz 扩散池法测定 4 个处方面膜（面膜 1 不加渗透剂，面膜 2、3 和 4 促渗剂用量分别为 0.5%、1.0% 和 2.0%）中咖啡因的累积透过量，以 HPLC 法测定接收液中不同时间点咖啡因的浓度。**结果**　面膜 1 中咖啡因在两种小型猪皮肤模型中 120 min 累积透过百分率和咖啡因在人体的实际透过率是基本一致的。面膜 2 中咖啡因在重建人类表皮模型中的时间 - 累积透过量、稳态流量（J_{SS}）和渗透系数（K_p）均显著高于两种离体小型猪皮肤模型。巴马小型猪皮肤模型对面膜 2、3 和 4 中咖啡因的时间 - 累积透过量具有显著区分力，但小型家猪皮肤模型对面膜 3 和 4 中咖啡因的时间 - 累积透过量差异无统计学意义。**结论**　巴马小型猪皮肤是最适合于评估面膜中咖啡因皮肤透过性研究的模型。

关键词：面膜；咖啡因；经皮渗透；巴马小型猪皮肤模型
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2095-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.020

Transdermal permeation of caffeine in facial masks of miniature pig skin from various sources and reconstructed human epidermis model

WEI Guo-zhi, XU Fei-fei, LI He-wei* (*Changzhou Weibo Hi-Tech Co., Ltd., Changzhou Jiangsu* 213000)

Abstract: Objective　To determine the optimum skin model to assess the transdermal permeation of caffeine in facial masks. **Methods**　Two types of miniature pigs skin and one type of reconstructed human epidermis were used as skin model materials. Franz diffusion cells were used to determine the cumulative amount of caffeine permeation in facial masks of 4 formulations (formulation 1: no penetration enhancers, formulation 2, 3 and 4: penetration enhancers at 0.5%, 1.0% and 2.0%, respectively). An HPLC method was developed to determine the content of caffeine in the receiver solution at various spots. **Results**　The transdermal cumulative permeation of caffeine in facial mask 1 from two types of miniature pig skin at 120 min was close to that of the observed human data. The time-cumulative amount of caffeine permeation in facial mask 2, the calculated steady-state flux (J_{SS}) and permeability coefficient (K_p) through the reconstructed human epidermis model were significantly higher than those of the two types of miniature pig skin models. The time-cumulative amounts of caffeine in facial masks 2, 3 and 4 differed significantly in the bama miniature pig skin model, however the time-cumulative amounts of caffeine in facial masks 3 and 4 did not differ significantly in small domestic pig skin model. **Conclusion**　The bama miniature pig skin model is the optimum model in assessing the transdermal permeation of caffeine in facial masks.

Key words: facial mask; caffeine; transdermal permeation; bama miniature pig skin model

面膜在化妆品领域中占有重要的位置，在实际生活中应用广泛。面膜中经常需要添加一些能改善皮肤细胞代谢的活性成分，但这些生物活性成分是否能发挥作用往往依赖于其透过皮肤表皮角质层的能力[1]。由于伦理原因，面膜中活性成分在人体内进行皮肤透过性评估是不可行的[2]。

作者简介：魏国志，男，中级工程师，主要从事化妆品与生物医药方面的研究，email：weiguozhi114@sina.com　*通信作者：李和伟，男，博士，高级工程师，主要从事化妆品与生物医药方面的研究，email：lihewei@hotmail.com

应用手术或外科整形切除的人体皮肤和胶带粘贴技术评估面膜中活性成分在人体内的渗透性，被认为是与真实人体内最接近的经皮给药研究的实验方法[3]。但由于切除的人体皮肤不易获得，与胶带粘贴试验对皮肤造成的损伤、仅能获得表皮角质层透过数据、不能获得连续时 - 量数据和需要临床伦理审批等缺点，其在实际应用中受到限制，这两个方法目前只能在初始阶段评估和少数场景中应用[2]。因此，建立合适的可替代人体皮肤的药物体外透过性皮肤模型是有必要的。

目前，可代替人类皮肤进行经皮给药渗透性研究的替代模型已经被逐渐建立，这些替代模型包括平行人工膜、重建人类表皮模型和开源全厚度皮肤模型等[4-5]。在这些模型中，重建人类皮肤模型是较理想的替代模型。学者们通过比较各种皮肤的生理参数，最终确定猪皮是最理想的皮肤模型，可代替人类皮肤用于经皮给药研究[6-8]。

咖啡因具有多种与改善皮肤相关的活性，如阻止多余脂肪在皮肤中堆积[9]，保护皮肤避免光损伤，清除自由基 DPPH 和抑制脂质过氧化等[9-10]。并且国家食药总局发布的《关于已使用化妆品原料名称目录的公告》和中国香化协会发布的《国际化妆品原料标准中文名称目录》都收录咖啡因作为化妆品原料[10]。咖啡因的水溶性极强，log*P* 为 － 0.07，脂溶性很差，不易透过皮肤吸收[9]。因此在经皮给药研究领域，咖啡因经常被用作水溶性模型药物来评估透皮吸收制剂的有效性[9]。研究显示，多个试验均以咖啡因作为模型药物来评估经皮给药系统或新建立的皮肤透过性研究方法的可行性[3，11-13]。

本研究以咖啡因为模型药物，建立适合评估面膜中活性成分咖啡因经皮透过的皮肤模型方法，主要研究内容如下：① 建立咖啡因在透皮接收液中含量的测定方法并进行方法学验证；② 测定面膜 1（无促渗剂）中咖啡因在重建人类表皮模型和两种小型猪（巴马小型猪和小型家猪）皮肤模型中的透过百分率，并与文献实测值进行比较；③ 评价面膜 2（0.5% 促渗剂）中咖啡因在重建人类表皮模型和两种小型猪皮肤模型不同时间点的经皮累积透过量的差异；④ 评价加入不同量促渗剂的面膜处方中（面膜 3：1.0% 促渗剂；面膜 4：2.0% 促渗剂）咖啡因在两种小型猪皮肤模型的不同时间点累积透过量的差异。通过本试验研究，预期为评估面膜中活性成分咖啡因皮肤透过性研究提供皮肤模型评估方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSA2202 型天平（精度 0.01 g）、CPA225D 型天平（精度 0.01 mg）（赛多利斯公司）；LC-16 型高效液相色谱仪、SPD-16 型紫外检测器（日本岛津公司）；TT-B（D）型 Franz 透皮试验仪（天津市正通科技有限公司）；800D-1 型离心机（常州天瑞仪器有限公司）。

1.2 材料

面膜（面膜 1：无促渗剂，面膜 2：0.5% 促渗剂，面膜 3：1.0% 促渗剂，面膜 4：2.0% 促渗剂，常州伟博海泰化妆品有限公司）；咖啡因对照品（纯度：99.5%，批号：ST00450116，坛墨质检科技股份有限公司）；Kinetex EVO C_{18} 色谱柱（批号：H15-078416，广州菲罗门科学仪器有限公司）；FiveEasy Plus 型 pH 计（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；BIO-DL 型移液枪（赛多利斯公司）；Episkin 型重建人类表皮模型（1.07 cm^2 分散面积，法国欧莱雅公司），Nunclon Sphera 12 孔板（ThermoFisher 公司），滤膜（0.22 μm，天津津腾公司）；色谱纯乙腈（Fisher 公司）；娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；D-PBS（杜氏磷酸盐缓冲液）、生理盐水、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸（分析纯，北京化工集团股份有限公司）。

1.3 动物

巴马小型猪 [合格证号：SCXK（苏）2022-0013，泰州泰和生物科技有限公司，雄性，日龄 30，体质量 2.5 ～ 3.5 kg]；小型家猪（雄性，日龄 30，体质量 5.5 ～ 8.5 kg，于养殖户处购买）。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定接收液中咖啡因的含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 C_{18}（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相为乙腈 - 水（12∶88）；流速 1.0 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃，检测波长 280 nm；进样量 20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取咖啡因对照品约 20 mg，加入纯净水溶解并定容于 10 mL 量瓶中，摇匀，即得质量浓度约为 2.0 mg·mL^{-1} 的对照品溶液，备用。

2.1.3 线性关系考察 用移液枪量取不同体积对照品溶液，再加入纯净水进行稀释，摇匀，配制成质量浓度分别为 500.0、200.0、50.0、20.0、2.0、0.20 μg·mL^{-1} 的系列对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液各 20 μL 依次进样测定，以咖啡因质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标

（Y），绘制标准曲线，得咖啡因回归方程为 $Y=6.338\times10^4X+5.041\times10^4$，$r=0.9999$。结果表明，咖啡因质量浓度在 0.2 ～ 500 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.4　精密度试验　配制高、中、低质量浓度（10、5、1 μg·mL^{-1}）咖啡因对照品溶液，分别精密吸取对照品溶液各 20 μL，分别于同 1 d 之内连续进样测定 6 次，并在 6 d 之内连续进样测定，记录峰面积。结果显示高、中、低浓度对照品溶液日内精密度 *RSD* 分别为 1.5%、0.45%、0.96%，日间精密度 *RSD* 分别为 1.7%、1.8%、1.1%。

2.1.5　稳定性试验　精密量取供试品溶液 20 μL（巴马小型猪、小型家猪皮接收液和重建人类表皮接收液样品共 3 份），放置在室温条件下，分别于 0、1、2、4、8、24 h 进样测定，记录峰面积，结果显示峰面积 *RSD* 分别为 1.0%、1.6%、1.5%，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.1.6　回收试验　在已知高（5 μg·mL^{-1}）、中（2.5 μg·mL^{-1}）、低（0.5 μg·mL^{-1}）3 个质量浓度的 pH 6.8 磷酸盐（PBS）和 D-PBS 缓冲液中按 1∶1 比例分别加入高、中、低 3 个浓度的咖啡因对照品溶液，每个浓度平行制备 3 份供试品溶液，进样测定，计算回收率。PBS 中低、中、高 3 个质量浓度咖啡因回收率分别为 101.4%、100.3%、100.7%，*RSD* 分别为 1.8%、2.4%、1.5%；D-PBS 缓冲液中低、中、高 3 个质量浓度咖啡因回收率分别为 98.8%、101.7%、99.3%，*RSD* 分别为 1.4%、1.5%、2.3%。

2.1.7　专属性试验　取供试品溶液（离体猪皮试验和重建人类表皮模型透皮试验的接收液样品）、阴性样品（空白接收液）、咖啡因对照品溶液进样测定，记录色谱图。咖啡因的出峰时间约为 7.4 min，峰形良好，供试品与对照品在相应位置上存在相同峰，且阴性样品无干扰。

2.2　离体猪皮透皮试验

2.2.1　离体猪皮制备　两种小型猪处死后立即剪取腹部皮肤，剥离皮下脂肪和结缔组织，用生理盐水冲洗干净，滤纸吸干水分，备用。

2.2.2　试验步骤　参考文献方法 [14]，应用 Franz 透皮试验仪进行透皮试验，水浴温度（37±0.5）℃，搅拌速度 100 r·min^{-1}，扩散池暴露的皮肤面积为 3.14 cm^2，接收池体积为 12 mL，接收溶液为 PBS。将面膜剪成 3.14 cm^2 小块，贴敷于皮肤上，固定于接收池上，开始试验。试验开始后 10、30、60、90、120、150 min，取接收液 0.5 mL，每个时间点平行 3 份，取样后向接收池内补充同体积接收液，取出时接收液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，待测。

2.3　重建人类表皮模型透皮试验

参考文献方法 [15] 从营养琼脂糖培养液中取出重建人类表皮组织，放置到 12 孔板中，每孔中加入 2 mL 维护介质。在（37±0.5）℃、95% 湿度和 5%CO_2 条件下，重建人类表皮组织孵育 18 h。然后将重建人类表皮组织转移到另一个 12 孔板中，接收溶液为 D-PBS，室温条件下平衡 30 min。然后将面积约为 1.08 cm^2 小块面膜去掉背衬层，面膜基质加水润湿稀释后平铺于重建人类表皮组织之上。表皮组织接收液样品：试验开始后 10、30、60、90、120、150 min，取接收液 2.0 mL，每个时间点平行 3 份，溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，待测。每个时间点取样后将表皮组织立即转移到已经充满 2 mL D-PBS 溶液的新 12 孔板上。

2.4　数据分析

应用文献的公式 [15]，计算单位面积皮肤中咖啡因的累积透过量，公式（1）如下所示。

$$Q_n=(C_n\times V_{rec}+\sum_{i=1}^{i=n-1}C_i\times V_i)/S \quad (1)$$

式中 Q_n（μg·cm^{-2}）代表面膜中咖啡因在某个时间点的单位面积累积透过量；S（cm^2）代表扩散池暴露皮肤面积（离体猪皮：3.14 cm^2；重建人类表皮组织：1.08 cm^2）；C_n（μg·mL^{-1}）代表不同时间点咖啡因在接收介质中的质量浓度；V_{rec}（mL）代表接收液体积（离体猪皮：12 mL；重建人类表皮：2 mL）；C_i（μg·mL^{-1}）代表在 C_n 前一个时间点的咖啡因在接收介质中的质量浓度；V_i（mL）代表取样体积（离体猪皮：0.5 mL；重建人类表皮：2.0 mL）。计算面膜中咖啡因的透过百分率如公式（2）所示。

$$透过百分率(\%)=Q_n\times S/M_u\times100\% \quad (2)$$

公式中 M_u（μg）是扩散池暴露皮肤面积的面膜中咖啡因的质量。为了比较不同处方面膜和经过不同皮肤（巴马小型猪，小型家猪和重建人类表皮）的咖啡因渗透性差异，引入两个参数（稳态流量 J_{SS} 和渗透系数 K_p）来表征咖啡因从面膜中渗透至皮肤的整体动力学过程，J_{SS}（μg·cm^{-2}·min^{-1}）采用公式（3）计算，K_p（cm·h^{-1}）采用公式（4）计算。

$$J_{SS}=d_Q/d_t \quad (3)$$

$$K_p=J_{SS}/C_d \quad (4)$$

式中 d_Q 代表累积透过量（μg·cm^{-1}）；d_t 代表累积时间（min）；C_d（μg·mL^{-1}）代表面膜中咖啡因浓度。所有试验结果以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，单因素方差分析（Tukey-Kramer HSD 检验）比较均值，以 $P<0.05$ 表示差异有

统计学意义。本研究中数据统计分析均由 JMP 11.0.0 平台实现（SAS Institute Inc.），多组数据间均值的比较应采用单因素方差分析。

2.5 面膜 1 中咖啡因在两种猪皮和重建人类表皮模型中经皮渗透与人体内数据[16]的比较

先通过文献[16]获取了没有加入促渗剂的咖啡因在真实人体内的渗透性数据（约 2.5%）。为了研究 3 种皮肤模型是否适合评估面膜中咖啡因经皮透过情况，本试验首先制备了没有加入促渗剂的面膜 1。图 1 显示了面膜 1 中咖啡因在两种小型猪皮肤模型中 120 min 时间内的平均透过百分率均小于 10%，方差分析显示，咖啡因在两种小型猪皮肤模型透过百分率与真实人体的数据差异无统计学意义。相比较而言，咖啡因在重建人类表皮模型中具有更高的透过百分率，均值达到 13.8%，与人体内的实测值差异有统计学意义。

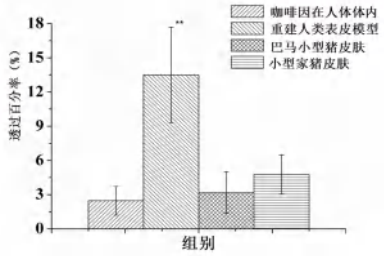

图 1 咖啡因在人体体内[16]、重建人类表皮模型、巴马小型猪皮肤和小型家猪皮肤透过百分率比较

Fig 1 Percentage of caffeine permeation in human[16], reconstructed human epidermis, bama miniature pig skin and small domestic pig skin

注（Note）：与咖啡因在人体体内相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the human group，$^{**}P < 0.01$）。

2.6 面膜 2 中咖啡因在两种猪皮和重建人类表皮模型中经皮渗透的比较

如图 2 所示，咖啡因在 3 种皮肤中具有相似的释药趋势，但咖啡因在重建人类皮肤模型的释药速度更快，两种小型猪皮肤模型中咖啡因在不同时间点累积渗透量比较接近。除了 150 min 时间点（$P = 0.036$），方差分析显示其他时间点咖啡因在两种小型猪的皮肤模型的渗透量差异无统计学意义（$0.21 < P < 0.86$）。同时，方差分析显示所有时间点的咖啡因从巴马小型猪的皮肤中渗透量与在重建人类表皮模型中渗透量差异均有统计学意义（$0.0005 < P < 0.018$）。

如图 3 所示，咖啡因在巴马小型猪与在小型家猪的累积渗透量的比值在 0.56 ～ 1.1，结果表明咖啡因在巴马小型猪与在小型家猪的皮肤模型中具有类似的经皮释药方式。咖啡因在巴马小型猪与在重建人类表皮中累积渗透量的比值在 1.2 ～ 3.6。前端时间点（10、30 和 60 min）结果显示咖啡因在巴马小型猪与在重建人类皮肤中累积渗透量的比值更大，这说明在开始阶段咖啡因在重建人类皮肤中渗透速度更快。

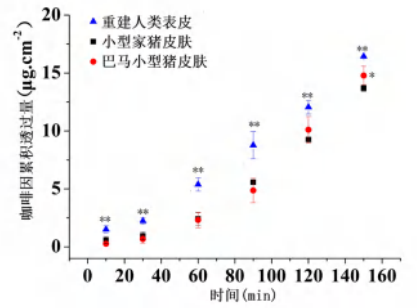

图 2 咖啡因在重建人类表皮模型（▲）、巴马小型猪皮肤（●）和小型家猪皮肤（■）中累积透过量 - 时间曲线

Fig 2 Cumulative amount versus time profiles of caffeine permeated through the reconstructed human epidermis（▲）and the pig's skins（● and ■）

注（Note）：与咖啡因在巴马小型猪皮肤模型透过量相比，$^{**}P < 0.01$，$^{*}P < 0.05$（Compared with the cumulative amount of caffeine through bama miniature pig skin，$^{**}P < 0.01$，$^{*}P < 0.05$）。

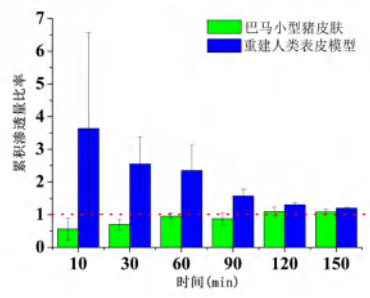

图 3 咖啡因在巴马小型猪皮肤、重建人类表皮模型与小型家猪皮肤的累积透过量比率

Fig 3 Ratios of cumulative caffeine permeation in bama miniature pig skin，the reconstructed human epidermis and small domestic pig skin

面膜 2 中咖啡因通过皮肤渗透的两个关键动力学参数见表 1。咖啡因在巴马小型猪和小型家猪与在重建人类皮肤中 J_{SS} 和 K_p 差异均具有统计学意义。3 组皮肤的 K_p 值均大于 5×10^{-4}cm•min^{-1}，显示面膜 2 中咖啡因在 3 种皮肤中渗透均属于高渗透性过程（面膜 1 中咖啡因在皮肤模型中属于低渗透过程），表明促渗剂对咖啡因透过皮肤有较强的助渗作用。

2.7 3 个不同处方面膜在两种猪皮模型中经皮渗透性的比较

如图 4A 所示，巴马小型猪皮肤模型对不同处方面膜中咖啡因不同时间的经皮渗透量具有较好的区分力。除了 150 min 时间点，方差分析显示其他时间点 3 个处方面膜中咖啡因从巴马小型猪的皮肤渗透量差异均有统计学意义（面膜 3 与

面膜 2：$0.0036 < P < 0.025$；面膜 4 与面膜 3：$0.0065 < P < 0.043$）。如图 4B 所示，咖啡因在面膜 3 和 4 中经皮渗透量没有区分力。方差分析显示，除 150 min 时间点，其他时间点的面膜 2 中咖啡因透过量与面膜 3 和 4 透过量差异均有统计学差异，但面膜 3 与 4 中咖啡因累积透过量在各个时间点差异均无统计学意义（$0.14 < P < 0.93$）。

表 1　咖啡因在 3 种皮肤模型中稳态流量和渗透系数

Tab 1　Steady-state fluxes (J_{ss}) and permeability coefficients (K_p) of caffeine calculated using 3 skin models

皮肤	J_{SS}/（μg·cm^{-2}·min^{-1}）	K_p/（×10^{-4}cm·min^{-1}）
重建人类皮肤	0.11±0.014	21.6±2.9
巴马小型猪	0.081±0.010*	16.8±1.2*
小型家猪	0.077±0.011*	15.9±2.2*

注：与重建人类表皮模型相比，$^{*}P < 0.05$。

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

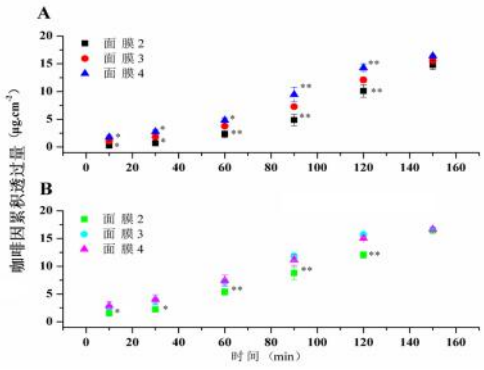

图 4　3 种面膜中咖啡因在猪皮肤模型中累积透过量 - 时间曲线

Fig 4　Cumulative amount versus time profiles of caffeine from 3 different face masks permeated through the pig skins

A. 巴马小型猪皮肤（bama miniature skin）；B. 小型家猪皮肤（small domestic pig skin）

注（Note）：与面膜 3 中咖啡因累积透过量相比，$^{**}P < 0.01$，$^{*}P < 0.05$（Compared with the cumulative amount of caffeine from the face mask 3，$^{**}P < 0.01$，$^{*}P < 0.05$）

3 种处方面膜中咖啡因在两种猪皮肤模型中 J_{SS} 和 K_p 见表 2。在巴马小型猪模型里，3 个面膜处方中咖啡因的 J_{SS} 和 K_p 值差异均有统计学意义。但在小型家猪模型中，面膜 2 的 J_{SS} 和 K_p 和面膜 3 差异有统计学意义，但面膜 3 与面膜 4 中这两个动力学参数差异没有统计学意义。

3　讨论

目前研究药物经皮给药的模型方法有很多。尽管以切除的人体皮肤作为药物经皮给药研究是与人体相关性最强的皮肤模型，但除了不易获得之外[3]，其皮肤生理特征与真正的人体皮肤相比也有一些缺陷，文献研究发现切除的人体皮肤相对于正常皮肤的毛囊存储明显降低[17]。而文献研究显示促渗剂通过打开皮肤毛囊能增加约 3 倍的咖啡因透过皮肤量[13]，文献也证实了咖啡因通过皮肤吸收的主要通路之一是皮肤的毛囊[13，16]。相对于正常人体皮肤而言，重建人类表皮模型对药物的体外透过量经常会偏高，在本次试验中也证实该模型对咖啡因的透过量明显高于小型猪的皮肤模型，这是该模型在文献报道中被提及最多的缺点[3]。遗憾的是，目前的重建人类表皮模型中还不能实现表达类似人体皮肤毛囊的生理结构[18]。

小型猪皮肤的各种生理属性和通透性被公认与人类皮肤最接近，欧盟委员会和 WHO 等多个国际组织均认定其为最理想的可代替人类皮肤进行经皮给药研究的离体皮肤模型[8]。咖啡因是水溶性的可改善皮肤生理功能的小分子化合物，因其在不同皮肤模型中与不同经皮给药制剂中均表现出有差异的渗透动力学过程。在多个文献研究中[3，11-13，18]，均采用该化合物来评估不同皮肤模型或不同经皮给药制剂的透过情况。在本研究中，我们聚焦于评估不同的皮肤模型对面膜中咖啡因经皮透过的影响，探索适合的可用于筛选不同用量促渗剂的咖啡因面膜经皮透过皮肤模型。

表 2　3 种处方面膜中咖啡因在 2 种猪皮肤模型中稳态流量和渗透系数

Tab 2　Steady-state fluxes (J_{ss}) and permeability coefficients (K_p) of caffeine in 2 types of pig skin models in 3 different face masks

面膜	巴马小型猪模型		小型家猪模型	
	J_{SS}/（μg·cm^{-2}·min^{-1}）	K_p/（×10^{-4}cm·min^{-1}）	J_{SS}/（μg·cm^{-2}·min^{-1}）	K_p/（×10^{-4}cm·min^{-1}）
面膜 2	0.081±0.010	16.8±1.2	0.077±0.011	15.9±2.2
面膜 3	0.010±0.004*	21.4±0.9*	0.13±0.006*	26.1±1.2*
面膜 4	0.12±0.015$^{\triangle}$	24.1±3.1$^{\triangle}$	0.13±0.010	26.8±2.1

注：与面膜 2 组数据相比，$^{*}P < 0.05$；与面膜 3 组数据相比，$^{\triangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the formulation 2 group，$^{*}P < 0.05$；compared with the formulation 3 group，$^{\triangle}P < 0.05$.

3.1　皮肤模型对面膜中咖啡因透过性的影响

本研究发现，当面膜中没有添加促渗剂时，咖啡因在两种小型猪皮肤模型中透过百分率均较低（低于 10%），这与文献报道的咖啡因在人体内实测的渗透百分率基本相当[2]。但在重建人类皮肤模型中咖啡因透过量明显增加，与真实人体内数据差异有统计学意义。虽然小型猪皮肤模型和重建人类表皮模型接收液 pH 值不同，但我们

前期的测定的溶解度数据显示，咖啡因在 PBS，D-PBS 缓冲液和纯净水中的溶解度几乎没有差异，所以接收液的 pH 值不会影响咖啡因的透过性。结果表明两种小型猪皮肤模型可能更适用于评估面膜中咖啡因经皮透过研究。由“2.6”项下的试验结果可知，咖啡因在重建人类表皮模型中累积渗透量更高，释药速度更快，这与“2.5”项下的结果和文献报道的该模型一般来说药物透过较快的特点是相符合的。对于同一处方面膜（面膜 1），咖啡因在两种小型猪皮肤模型上多个时间点均具有相似的经皮累积渗透量。

3.2 处方中促渗剂对面膜中咖啡因透过性的影响

由“2.7”项下的试验结果可知，相比于小型家猪皮肤模型，巴马小型猪皮肤模型对面膜中促渗剂用量具有更好的区分力。经皮给药制剂中，药物主要是靠促渗剂来协助水溶性药物穿过皮肤角质层而进入皮肤。在巴马小型猪皮肤模型中，不同用量促渗剂对面膜中咖啡因透过量的改善能被明显区分出来，并且在贴敷 150 min 时，累积透过百分率能达到 49.4%，这与文献报道的咖啡因通过皮肤透过百分率很接近（51% 和 54%）[13]。因此在以咖啡因作为生物活性成分的面膜前期的处方筛选中，采用巴马小型猪皮肤模型可能是评估面膜处方中促渗剂用量最理想的皮肤模型。

综上所述，虽然小型猪皮肤是公认的与人类皮肤透过性最接近的皮肤模型，但本试验显示巴马小型猪皮肤模型是研究面膜中咖啡因经皮透过性更适合的猪皮肤模型。

参考文献

[1] Herman A，Herman AP. Caffeine’s mechanisms of action and its cosmetic use [J]. Skin Pharmacol Phys，2013，26（1）：8-14.

[2] Trauer S，Patzelt A，Otberg N，et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin-a comparison of in vivo and in vitro data [J]. Brit J Clin Pharmaco，2009，68（2）：181-186.

[3] Abd E，Yousef SA，Pastore MN，et al. Skin models for the testing of transdermal drugs [J]. Clin Pharmacol，2016，8：163-176.

[4] Neupane R，Boddu SHS，Renukuntla J，et al. Alternatives to biological skin in permeation studies：current trends and possibilities [J]. Pharmaceutics，2020，12（2）：152-176.

[5] Zoio P，Lopes-Ventura S，Marto J，et al. Open-source human skin model with an in vivo-like barrier for drug testing [J]. Altex-altern Anim Ex，2022，39（3）：405-418.

[6] 黄小平，万新祥，王卓斌，等 . 猪不同部位皮肤与人体皮肤对药物渗透性的比较 [J]. 中国医院药学杂志，1997，17（7）：309-310.

[7] 藤堂浩明 . 動物皮膚を介した薬物の皮膚透過性について [J]. Drug Delivery System，2017，32（5）：411-417.

[8] Pavlačková J，Egner P，Polašková J，et al. Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles [J]. J Cosmet Dermatol-Us，2019，18（5）：1410-1415.

[9] Luo L，Lane ME. Topical and transdermal delivery of caffeine [J]. Int J Pharmaceut，2015，490（1-2）：155-164.

[10] 王建新 . 化妆品天然成分原料介绍（XVIII）[J]. 日用化学品科学，2020，43（7）：60-64.

[11] Alberti M，Dancik Y，Sriram G，et al. Multi-chamber microfluidic platform for high-precision skin permeation testing [J]. Lab Chip，2017，17（9）：1625-1634.

[12] Davies DJ，Heylings JR，Gayes H，et al. Further development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin [J]. Toxicol In Vitro，2017，38：101-107.

[13] Abd E，Benson HAE，Roberts MS，et al. Follicular penetration of caffeine from topically applied nanoemulsion formulations containing penetration enhancers：in vitro human skin studies [J]. Skin Pharmacol Phys，2018，31：252-260.

[14] 周刚，付晓婷，潘静茹，等 . 他克莫司软膏透皮一致性的体外 Franz 扩散池测定比较研究 [J]. 药物分析杂志，2020，40（12）：2126-2133.

[15] Kichou H，Dancik Y，Eklouh-Molinier C，et al. Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin [J]. Int J Cosmetic Sci，2022，44：262-270.

[16] Otberg N，Patzelt A，Rasulev U，et al. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine [J]. Brit J Clin Pharmaco，2008，65（4）：488-492.

[17] Lademann J，Patzelt A，Richter H，et al. Comparison of two in vitro models for the analysis of follicular penetration and its prevention by barrier emulsions [J]. Eur J Pharm Biopharm，2009，72（3）：600-604.

[18] Vahav I，van den Broek LJ，Thon M，et al. Reconstructed human skin shows epidermal invagination towards integrated neopapillae indicating early hair follicle formation in vitro [J]. J Tissue Eng Regen M，2020，14（6）：761-773.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2023-01-05）

HPLC-MS/MS 法快速测定儿童微量血浆中甲氨蝶呤和丙戊酸浓度

姜锡娟，秦亚彬，张古英，赵德运*，孙玉林（河北省儿童医院药学部，石家庄　050031）

摘要：目的　建立高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）法快速测定儿童微量血浆中甲氨蝶呤（MTX）和丙戊酸（VPA）的浓度。**方法**　10 μL 血浆经甲醇沉淀蛋白后取上清液直接进样分析，内标为 MTX-D3 和 VPA-D6；采用 Phenomenex Kinetex C18 柱（50 mm×2.1 mm，5 μm）分离，以水（含 0.01% 甲酸）和甲醇为流动相，梯度洗脱，进样量 5 μL，流速 0.5 mL • min^{-1}，分析时长 2.4 min。电喷雾离子源（ESI）正负离子切换扫描下，采用多反应监测（MRM）模式进行质谱分析，用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 455.1 → 308.2（MTX），143.2 → 143.2（VPA），458.1 → 311.1（MTX-D3）和 149.2 → 149.2（VPA-D6）。**结果**　MTX 在 31.25 ～ 2000 ng • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（r = 0.9995），定量下限为 31.25 ng • mL^{-1}；VPA 在 1.88 ～ 120 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（r = 0.9992），定量下限为 1.88 μg • mL^{-1}；批内、批间准确度在 98.05% ～ 104.89%，批内、批间精密度的变异系数（CV）均≤ 6.73%，平均提取回收率为 90.21% ～ 100.55%，基质效应为 93.22% ～ 102.73%，溶血效应（溶血程度≤ 5%）不影响测定结果，血浆样品可分别在冻融 3 次、室温（25 ℃）24 h、4 ℃进样器 12 h 和冷冻（－20 ℃）30 d 等条件下稳定保存；该法成功用于 169 例临床患儿血浆样本分析。**结论**　本方法所需样本量小，快速、准确、灵敏、稳定，且不受溶血效应影响（溶血程度≤ 5%），可应用于儿童 MTX 和 VPA 治疗药物监测及联合用药研究。

关键词：甲氨蝶呤；丙戊酸；高效液相色谱串联质谱；治疗药物监测；儿科患者
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2101-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.021

Rapid determination of methotrexate and valproate in trace plasma from pediatric patients by HPLC-MS/MS

JIANG Xi-juan, QIN Ya-bin, ZHANG Gu-ying, ZHAO De-yun*, SUN Yu-lin (*Department of Pharmacy*, *Children's Hospital of Hebei Province*, *Shijiazhuang* 050031)

Abstract: Objective　To establish a rapid HPLC-MS/MS method to determine the concentration of methotrexate (MTX) and valproate (VPA) in trace plasma from pediatric patients. **Methods** Plasma specimens (10 μL) were precipitated by methanol, and then the supernatant was injected for detection. The internal standards included MTX-D3 and VPA-D6. The chromatographic separation was performed with gradient elution on a Phenomenex Kinetex C18 column (50 mm×2.1 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of water (0.01% formic acid) and methanol, at a flow rate of 0.5 mL • min^{-1}. The injection volume was 5 μL and the total running time was 2.4 min. For the mass spectrometry, electrospray ionization source was chosen, and both positive and negative ion switching were under multi-reaction monitoring (MRM) mode. Ions monitored were *m/z* 455.1 → 308.2 for MTX, 143.2 → 143.2 for VPA, 458.1 → 311.1 for MTX-D3 and 149.2 → 149.2 for VPA-D6, respectively. **Results**　The calibration curves were linear at 31.25 ～ 2000 ng • mL^{-1} (r = 0.9995) for MTX and 1.88 ～ 120 μg • mL^{-1} for VPA (r = 0.9992). LLOQ of MTX and VPA was 31.25 ng • mL^{-1} and 1.88 μg • mL^{-1} respectively. The intra and inter accuracy of MTX and VPA

基金项目：河北省医学科学研究课题计划（No.20190795）；河北省政府资助临床医学优秀人才项目（No.ZF2023205）。
作者简介：姜锡娟，女，硕士，主管药师，主要从事药物分析、治疗药物监测方面的研究，email：jiang_309639729@126.com
*通信作者：赵德运，男，硕士，主任药师，主要从事医院药学、治疗药物监测方面的研究，email：zhaodeyun1974@126.com

ranged 98.05% ～ 104.89%. The intra and inter precisions (CV) were less than 6.73%. The average extraction recoveries of the two analytes were 90.21% ～ 100.55%, and the matrix effects were 93.22% ～ 102.73%. The hemolytic effect (hemolytic concentration ≤ 5%) was acceptable. Analytes in the plasma were stable after 3 freeze-thaw cycles and robust for 24 h (at room temperature, 25 ℃), 12 h (in the autosampler, 4 ℃) and 30 days (－ 20 ℃). This method successfully analyzed the plasma samples from 169 pediatric patients. **Conclusion** This assay is rapid, sensitive and robust, without interference by hemolytic effect, which can be used in the combination medication study of MTX and VPA and their therapeutic drug monitoring in pediatric patients.

Key words: methotrexate; valproate; HPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring; pediatric patients

甲氨蝶呤（MTX）和丙戊酸（VPA）分别为临床上推荐儿童进行治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）的抗肿瘤药和抗癫痫药[1]。临床常用大剂量MTX治疗儿童肿瘤性疾病，并依据其血药浓度，调整甲酰四氢叶酸（CF）的剂量和频次以降低MTX对正常细胞的毒性[1]；VPA治疗窗窄，体内药动学个体间差异大，疗效和不良反应发生率与血药浓度密切相关[2]。据报道，常规剂量或高剂量MTX均可降低VPA浓度并导致癫痫复发[3-4]；且最新的研究表明，MTX联合VPA治疗乳腺癌可能具有临床和/或辅助治疗应用价值[5]。然而，目前尚未见同时测定人血浆中MTX和VPA方法的报道。因此，建立同时测定儿童血浆中MTX和VPA浓度的方法，可为两者联合用药提供参考，具有重要意义。

高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）具有专属性强、灵敏度高、分析速度快等诸多优点，近年来被广泛应用于TDM[6-8]，国内外不乏采用HPLC-MS/MS对MTX或VPA进行TDM[9-14]，但这些方法分析时间长，未对特殊基质进行考察验证，且所需样本体积多，然而儿童采血量小，采血依从性差。因此，本研究拟建立一种样本用量少、快速简单、准确的HPLC-MS/MS方法同时测定儿童微量血浆中MTX和VPA的浓度，为临床合理用药和药物相互作用研究提供参考。

1 仪器与试药

1260超高效液相色谱仪、6465三重四极杆质谱仪（美国Agilent公司），Explorer分析天平（美国Ohaus公司），BY-R20高速冷冻离心机（北京白洋医疗器械有限公司）。

MTX对照品（批号：100138-201704，纯度：99.4%）、丙戊酸钠对照品（批号：100963-202205，纯度：99.9%）（中国食品药品检定研究院），MTX-D3对照品（批号：H17M9Q56012，纯度＞98.0%）、丙戊酸钠-D6对照品（批号：B71884，纯度＞97.0%）（上海源叶生物有限公司）。甲醇、甲酸为色谱纯；水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用Phenomenex Kinetex C18（50 mm×2.1 mm，5 μm）色谱柱，以水（A，含0.01%甲酸）-甲醇（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 0.60 min，97%A；0.60 ～ 0.90 min，97% ～ 5%A；0.90 ～ 1.90 min，5%A；1.90 ～ 1.91 min，5% ～ 97%A；1.91 ～ 2.40 min，97%A）；流速0.5 mL·min^{-1}；柱温45 ℃；进样量5 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源（ESI）及MRM模式，正负离子切换扫描分析，毛细管电压4000 V，干燥气流速7 L·min^{-1}，雾化气压力15 psi，干燥气温度350 ℃。MTX碎裂电压110 V，碰撞能量10 V，离子对：*m/z* 455.1 → 308.2，正离子扫描分析；VPA碎裂电压55 V，碰撞能量15 V，离子对：*m/z* 143.2 → 143.2，负离子扫描分析；MTX-D3（MTX内标）碎裂电压100 V，碰撞能量20 V，离子对：*m/z* 458.1 → 311.1，正离子扫描分析；VPA-D6（VPA内标）碎裂电压55 V，碰撞能量10 V，离子对：*m/z* 149.2 → 149.2，负离子扫描分析。

2.2 溶液配制

2.2.1 混合工作液 精密称取MTX对照品2.00 mg，置于25 mL量瓶中，加甲醇溶解定容即得MTX质量浓度为80.00 μg·mL^{-1}的标准储备液；精密称取丙戊酸钠对照品5.62 mg，置于2 mL量瓶中，加甲醇溶解定容即得丙戊酸钠质量浓度为2.81 mg·mL^{-1}，相当于VPA质量浓度为2.40 mg·mL^{-1}的标准储备液。将上述溶液分装成若干份，－20 ℃冷冻保存备用。临用前精密量取MTX储备液500 μL和VPA储备液1 mL，置于2 mL量瓶中，加甲醇定容，即得含20.00 μg·mL^{-1}MTX和1.20 mg·mL^{-1}VPA的混合工作液。

2.2.2 内标溶液 精密称取MTX-D3对照品2.00 mg，置于100 mL量瓶中，加甲醇溶解定容即得MTX-D3质量浓度为20.00 μg·mL^{-1}的内标（IS）储备液；精密称取丙戊酸钠-D6对照品2.75 mg，置于10 mL量瓶中，加甲醇溶解定容即得丙戊

酸钠 -D6 质量浓度为 275.00 μg • mL^{-1}，相当于 VPA-D6 质量浓度为 240.00 μg • mL^{-1} 的 IS 储备液。将上述溶液分装成若干份，－ 20 ℃冷冻保存备用。临用前精密量取 125 μL MTX-D3 储备液和 625 μL VPA-D6 储备液，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇定容，即得含 25.00 ng•mL^{-1} MTX-D3 和 1.50 μg • mL^{-1} VPA-D6 的混合 IS 溶液兼蛋白沉淀剂。

2.2.3　标准曲线和质控样品配制　取 900 μL 空白血浆于 1.5 mL 离心管中，精密加入混合工作液 100 μL，涡旋混匀，用空白血浆进行等比稀释，分别配制成 MTX 系列质量浓度为 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1000.00、2000.00 ng • mL^{-1} 和 VPA 系列质量浓度为 1.88、3.75、7.50、15.00、30.00、60.00、120.00 μg • mL^{-1} 的校正标样。

另取空白血浆适量，加入混合工作液，涡旋混匀，分别配制成低、中、高 3 个质量浓度水平（MTX 质量浓度为 93.75、375.00、1500.00 ng•mL^{-1}，VPA 质量浓度为 5.63、22.50、90.00 μg • mL^{-1}）的质控样品。

2.3　样本预处理

精密吸取血浆样品 10 μL，加入 100 μL 混合 IS 溶液，涡旋混匀 1 min 后离心 10 min（12 000 r • min^{-1}，4 ℃），取 5 μL 上清液进样分析。

3　方法学验证及结果

3.1　选择性

取 6 份不同来源的空白血浆，按“2.3”项下方法处理分析。MTX 和 VPA 的典型色谱图见图 1，表明不同来源的空白血浆在相应色谱峰保留时间内均无干扰。

3.2　标准曲线和定量下限（LLOQ）

将“2.2.3”项下方法制备的系列对照品溶液，

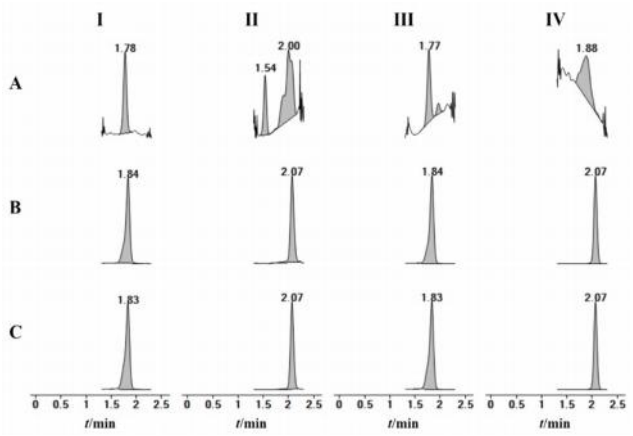

图 1　甲氨蝶呤和丙戊酸的 HPLC-MS/MS 典型色谱图

Fig 1　Representative HPLC-MS/MS chromatograms of MTX and VPA

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 定量下限（LLOQ）；C. 临床样本（clinical sample）；Ⅰ. 甲氨蝶呤（MTX）；Ⅱ. 丙戊酸（VPA）；Ⅲ. 甲氨蝶呤内标（MTX-D3）；Ⅳ. 丙戊酸内标（VPA-D6）

按“2.3”项下方法处理后进样检测，采用最小二乘法线性拟合计算标准曲线参数并回算校正标样浓度。MTX 和 VPA 均采用内标法定量，内标分别为 MTX-D3 和 VPA-D6。结果表明，MTX 在 31.25 ～ 2000 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程为 $Y = 3.40\times10^{-3}X - 6.33\times10^{-3}$，$r = 0.9995$，LLOQ 为 31.25 ng • mL^{-1}；VPA 在 1.88 ～ 120 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，线性回归方程为 $Y = 0.0256X - 0.0146$，$r = 0.9992$，LLOQ 为 1.88 μg • mL^{-1}。

3.3　准确度和精密度

取一个分析批的 LLOQ 以及低、中、高 3 个质量浓度的质控样品，每个浓度平行 5 份，考察批内准确度和精密度；连续测定 3 d，考察批间准确度和精密度。批内和批间的准确度和精密度结果见表 1，均符合要求。

表 1　血浆中 MTX、VPA 的准确度、精密度试验结果

Tab 1　Accuracy and precision of MTX and VPA in plasma

分析物	理论质量浓度	批内（$n = 5$）		批间（$n = 15$）	
		准确度 /%	CV/%	准确度 /%	CV/%
MTX	31.25 ng • mL^{-1}	98.05±3.67	3.75	99.26±3.25	3.27
	93.75 ng • mL^{-1}	99.35±1.08	1.09	100.47±2.10	2.09
	375.00 ng • mL^{-1}	102.85±4.31	4.19	102.96±3.40	3.33
	1500.00 ng • mL^{-1}	103.71±3.50	3.37	101.57±4.20	4.13
VPA	1.88 μg • mL^{-1}	103.51±4.85	4.69	101.42±6.83	6.73
	5.63 μg • mL^{-1}	103.13±0.73	0.71	101.65±4.36	4.29
	22.50 μg • mL^{-1}	104.49±4.95	4.73	104.41±4.20	4.02
	90.00 μg • mL^{-1}	104.89±3.25	3.10	104.07±3.94	3.79

3.4　残留效应

注射定量上限样品之后，注射空白样品，记录待测物与内标的色谱峰面积值，考察残留情况。空白样品中 MTX 和 VPA 的残留分别小于 8.0% 和 5.1%，MTX-D3 和 VPA-D6 的残留分别小于 0.31% 和 2.0%，符合要求。

3.5　稀释可靠性

配制含 MTX 25 μg • mL^{-1}、VPA 150 μg • mL^{-1}

的含药血浆样品，模拟超高浓度样品，以空白血浆稀释 20 倍，按“2.3”项下方法处理，平行测定 5 次，样品稀释后 MTX 和 VPA 的平均准确度偏差分别为 1.9% 和 7.3%，CV 分别为 1.1% 和 2.2%，表明超高浓度样品稀释 20 倍测量结果具有可靠性。

3.6 提取回收率

取低、中、高浓度的质控样品，按“2.3”项下方法处理，各平行测定 5 批，另以沉淀后基质配制相应的低、中、高浓度质控样品，计算回收率。结果见表 2，低、中、高浓度的质控样品具有相似的提取回收率，满足分析要求。

表 2 血浆中 MTX、VPA 的提取回收率、基质效应结果

Tab 2 Matrix effect and recovery of MTX and VPA in the plasma

分析物	理论质量浓度	提取回收率 /%	内标归一化基质因子 /%	内标归一化溶血基质因子 /%
MTX	93.75 ng·mL^{-1}	90.21±3.36	93.22±1.47	111.07±3.09
	375.00 ng·mL^{-1}	100.55±1.74	—	—
	1500.00 ng·mL^{-1}	94.61±1.55	99.80±5.03	107.08±2.30
VPA	5.63 μg·mL^{-1}	99.11±1.25	101.10±4.57	99.11±0.58
	22.50 μg·mL^{-1}	93.21±1.13	—	—
	90.00 μg·mL^{-1}	91.65±0.69	102.73±4.47	100.63±0.79

3.7 基质效应和溶血效应

分别取 6 个不同来源的空白血浆 10 μL，加入 100 μL 甲醇，其余按“2.3”项下处理，上清液即为沉淀后的基质。分别用空白溶剂和沉淀后的基质配制低、高浓度的质控样品并加入混合 IS，分析物和 IS 的基质效应（MF，%）=（基质存在的峰面积 / 基质不存在的峰面积）×100%，用分析物的基质效应除以相应 IS 的 MF 即得内标归一化的 MF。

参照文献 [15-16] 对溶血效应进行评估。将适量空白新鲜全血置于干净的离心管中，于－ 20 ℃冷冻 1 h，解冻，即将全血制备成溶血全血。取适量的溶血全血至空白血浆中，按体积比配制成 3 种不同溶血程度（0.5%、2%、5%）的溶血血浆试验组，按上述基质效应考察方法考察溶血基质效应。

经考察，MTX 和 VPA 的绝对 MF 批次间差异较大，低浓度水平下尤甚，例如，MTX 低浓度水平下绝对 MF 的 CV 高达 19.85%，说明 MTX 和 VPA 易受基质干扰。本法采用 MTX-D3 和 VPA-D6 作为 IS，正常及溶血基质中，内标归一化后的 MF 为 93.22% ～ 102.73%（CV ≤ 5.04%），说明稳定同位素内标可最大程度降低基质对 2 种分析物的干扰，从而获得准确可靠的测定结果（见表 2）。

3.8 稳定性

本研究考察了低、高质量浓度质控样品（n = 5）于室温（25 ℃）放置 24 h、处理后 4 ℃自动进样器放置 12 h、冻融 3 次（－ 20 ～ 25 ℃）和冷冻－ 20 ℃放置 30 d 的稳定性，由新鲜制备的标准曲线分析经上述条件处理后的质控样品。结果见表 3。

表 3 血浆中 MTX、VPA 的稳定性试验结果（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

Tab 3 Stability of MTX and VPA in the plasma（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

化合物	理论质量浓度	25 ℃ 24 h	4 ℃进样器 12 h	冻融 3 次	－ 20 ℃ 30 d
MTX	93.75 ng·mL^{-1}	105.21±4.30	103.00±4.98	103.77±1.91	104.52±4.61
	1500.00 ng·mL^{-1}	104.01±4.24	103.49±2.93	98.73±1.20	100.61±1.68
VPA	5.63 μg·mL^{-1}	107.00±6.37	103.94±3.24	104.58±3.33	102.24±6.01
	90.00 μg·mL^{-1}	107.62±3.58	107.03±2.53	99.95±0.62	96.11±1.94

3.9 方法重现性和临床应用

采用上述方法用于临床样品（来源：河北省儿童医院）分析，隔天随机抽取已测样品总量的 10% 进行再分析以评价方法重现性。结果显示，对于 100% 重复测试，首次分析测得浓度和重新分析测得浓度之间的差异在两者均值的 ±9.78% 范围内，符合《中国药典》2020 年版 [17] 规定，表明该方法重现性良好。

目前，该方法已应用到我院临床 TDM 中，累积监测 MTX 61 例，VPA 108 例。24 h MTX 血药浓度检测值为（21 181.68±12 556.13）ng•mL^{-1}（n = 20）；48 h MTX 血药浓度检测值为（113.39±89.52）ng·mL^{-1}（n = 21）；72 h MTX 血药浓度检测值为（111.57±165.65）ng·mL^{-1}（n = 20）；VPA 血药浓度检测值为（63.77±21.83）μg·mL^{-1}。从检测结果可以看出，2 种药物在儿科患者中个体药动学差异较大，需密切监测血药浓度。

4 讨论

由于 MTX 分子中含具备氮杂环结构的蝶啶基，且基团上 2 个氢原子被氨基取代，在正离子扫描模式下响应较强，流动相中添加适量的酸能提高其离子响应；相反，VPA 为不含氮的饱和脂肪酸，采用负离子扫描模式时响应较强，流动相中的酸会抑制其离子化。为兼顾两者灵敏度，本研究采用正负离子切换模式，对流动相水相中加入的甲酸浓度进行考察后发现，甲酸体积分数为 0.01% 时，MTX 和 VPA 均获得了较好的峰形及响应。

大剂量 MTX 治疗儿童急性淋巴细胞性白血病时，血药安全浓度标准为：用药 48 h ≤ 1 μmol·mL^{-1}，72 h ≤ 0.1 μmol·mL^{-1}[1]；此外 FDA 发布的 MTX 说明书 [18] 认为 MTX 静脉滴注 24 h 就需要监测血药浓度，其 24 h 的中毒浓度大

于 50 μmol • mL^{-1}。本研究共测定 MTX 血样 61 例，将质量浓度单位转换成物质的量浓度单位，分别有 9 例（24 h）和 8 例（72 h）超出上述标准。且儿童体内 MTX 排泄存在着较大个体差异，应当严格监测血药浓度和肝肾功能，对于消除延迟者，及时给予甲酰四氢叶酸解救，直至 MTX 血药浓度下降至 0.1 μmol • mL^{-1}。此外，多种药物（如水杨酸类、苯妥英、糖皮质激素等）可致 MTX 血药浓度升高而加重毒性反应[19]，合用上述药物时应密切关注 MTX 的毒性反应。

VPA 血浆蛋白结合率高（90% ～ 95%），口服吸收后主要通过肝脏代谢，多种药物（苯巴比妥、苯妥英钠、拉莫三嗪和卡马西平等）与 VPA 联用可抑制或诱导后者代谢，影响血药浓度[19]，指南推荐其稳态谷浓度范围为 50 ～ 100 μg • mL^{-1}，并应在出现中毒反应时随时监测血药浓度[1]。本研究共测定 108 例 VPA 血样，其中 32 例（29.63%）超出范围，未达标准的病例中，门诊患者占比高，经电话回访或查阅病历后得知，多数浓度不达标门诊患儿长时间未行 TDM，在此期间患儿身高体重等变化可能为引起 VPA 浓度波动的主要原因；此外，1 例患儿服药依从性差，漏服药物导致 VPA 浓度偏低；住院患者中有 1 例癫痫患儿因重症肺炎入院，治疗期间使用美罗培南抗感染，导致 VPA 浓度急剧下降。综上说明，临床治疗过程中应加强对患儿（尤其是门诊患儿）及其家属的合理用药指导，可对长期未行 TDM 的患者进行回访提醒，并密切观察联合用药可能产生的影响，同时关注患儿肝功能和血浆白蛋白浓度对 VPA 血药浓度的影响。

本法仅需 10 μL 血浆，远低于文献报道的 100 μL 以上[10，12-14]，对儿科患者友好；同时，本法单次样品分离时长仅需 2.4 min，远远短于一些单组分测定方法的分析时长（7 ～ 10 min）[10，12，14]，MTX 和 VPA 的同时测定使研究者在实际工作中节约了前处理、实验准备及分析时间，极大地提高了检测速率，更高效地服务于临床。本研究不足之处是暂未收集到同时含有 MTX 和 VPA 的血浆样本，但本法已成功应用于含有 MTX 或 VPA 单一成分血浆样本的测定，为两者联合用药研究奠定了基础，后续将继续关注两者药物相互作用研究。

参考文献

[1] 中华医学会儿科学分会临床药理学组 . 儿童治疗性药物监测专家共识 [J]. 中华儿科杂志，2015，53（9）：650-659.

[2] 于思源，陈克强，冯志平 . HPLC-MS/MS 同时测定癫痫患者血浆中拉莫三嗪、卡马西平和丙戊酸钠的浓度 [J]. 中国药学杂志，2021，56（14）：1172-1177.

[3] Schrøder H，Ostergaard JR. Interference of high-dose methotrexate in the metabolism of valproate? [J]. Pediatr Hematol Oncol，1994，11（4）：445-449.

[4] Cherian A，Shetty SC，Divya KP，et al. Weekly methotrexate may reduce valproate levels causing relapse of genetic generalized epilepsy [J]. Epilepsy Behav Rep，2021，7（16）：100457.

[5] Elsaid HH，Badary OA，Shouman SA，et al. Enhanced antitumor activity of combined methotrexate and histone deacetylase inhibitor valproic acid on mammary cancer in vitro and in vivo [J]. Can J Physiol Pharmacol，2022，100（9）：915-925.

[6] 钱亚芳，杨旭萍，蒋艳，等 . LC-MS/MS 法测定人血浆中比阿培南浓度 [J]. 中南药学，2023，21（2）：432-436.

[7] 杨旭萍，蒋振伟，蒋艳，等 . LC-MS/MS 法测定人全血中他克莫司和西罗莫司浓度及临床应用 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2514-2519.

[8] 马颖超，董维冲，吴瑕，等 . 液相色谱串联质谱法测定人血浆中硫酸黏菌素的浓度 [J]. 中南药学，2022，20（1）：80-84.

[9] Ren XX，Wang ZP，Yun YL，et al. Simultaneous quantification of methotrexate and its metabolite 7-hydroxy-methotrexate in human plasma for therapeutic drug monitoring [J]. Int J Anal Chem，2019，3：1536532.

[10] 董维冲，赵晓晓，张学琴，等 . HPLC-MS/MS 法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（14）：1874-1877.

[11] 刘匡一，虞佳，熊国营，等 . UHPLC-MS/MS 测定人血浆中 4 种一线抗癫痫药物浓度及其临床应用 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（17）：2236-2240.

[12] 刘洪，邓艳，徐永寿，等 . LC-MS/MS 法测定人血清中丙戊酸钠浓度及临床应用 [J]. 中国药物警戒，2022，19（2）：154-157，168.

[13] 陈敏纯，闫抗抗，马群安，等 . LC-MS 检测丙戊酸钠血药浓度 [J]. 临床医学研究与实践，2018，3（10）：1-3.

[14] 郑笑笑，仝俊太，徐圣秋，等 . HPLC-MS/MS 法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度 [J]. 药学与临床研究，2017，25（2）：95-98.

[15] 李文魁，张杰，谢励诚 . 液相色谱 - 质谱（LC-MS）生物分析手册：最佳实践、实验方案及相关法规 [M]. 北京：科学出版社，2017：412-420.

[16] 张古英，尹志萍，赵德运，等 . 高效液相色谱 - 质谱联用技术测定儿童血浆中厄他培南的浓度并考察溶血效应 [J]. 中国药学杂志，2020，55（22）：1867-1872.

[17] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：469.

[18] Hospira. Lable for methotrexate sodium [EB/OL]. https：//www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/011719s117lbl.pdf，2011，10.

[19] 王丽 . 儿科治疗药物监测与合理用药 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：447.

（收稿日期：2023-04-07；修回日期：2023-05-18）

LC-MS/MS 法测定人血浆中阿哌沙班的浓度

田继堂[1]，王娜[2*]，张红菱[3]，陈琳[4]（1. 浙江花园药业有限公司，浙江 东阳 322100；2. 武汉轻工大学生命科学与技术学院，武汉 430023；3. 武汉轻工大学医学与健康学院，武汉 430023；4. 南京西默思博检测技术有限公司，南京 210000）

摘要：目的 建立 LC-MS/MS 法测定人血浆中阿哌沙班的浓度。**方法** 以阿哌沙班 -^{13}C-d_3 为内标，血浆经乙腈沉淀蛋白后，采用 Poroshell 120 EC-C_{18}（4.6 mm×50 mm，2.7 μm）色谱柱分离，以 5% 乙腈水溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，流速 0.7 mL·min^{-1}，线性梯度洗脱，电喷雾离子化源（ESI）正离子模式，以选择反应监测（SRM）模式监测阿哌沙班（*m/z* 460.08 → 443.17）和内标阿哌沙班 -^{13}C-d_3（*m/z* 464.08 → 447.08）。**结果** 人血浆中的阿哌沙班标准曲线方程为 $Y = 2.303X + 0.121$（$R^2 = 0.994$），经验证阿哌沙班在 0.500 ～ 200 ng·mL^{-1} 内线性关系良好。**结论** 本法操作灵敏简便，具有可靠性，可用于阿哌沙班人体内血药浓度的测定及药代动力学和生物等效性研究。

关键词：阿哌沙班；LC-MS/MS；血药浓度
中图分类号：R917，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2106-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.022

Determination of apixaban concentration in human plasma by LC-MS/MS

TIAN Ji-tang[1], WANG Na[2*], ZHANG Hong-ling[3], CHEN Lin[4] (1. *Zhejiang Huayuan Pharmaceutical Co., Ltd., Dongyang Zhejiang* 322100; 2. *College of Life Sciences and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan* 430023; 3. *College of Medicine and Health Sciences, Wuhan Polytechnic University, Wuhan* 430023; 4. *Nanjing Simoslab Testing Technology Corp., Ltd., Nanjing* 210000)

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of apixaban concentration in human plasma. **Methods** Apixaban-^{13}C-d_3 was used as the internal standard. After protein precipitation by acetonitrile, Poroshell 120 EC-C_{18} (4.6 mm×50 mm, 2.7 μm) chromatographic column was used for the separation with 5% acetonitrile aqueous solution as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B at 0.7 mL·min^{-1} with linear gradient elution. Electrospray ionization source under positive ion and selected reaction monitoring mode were used. The ion transitions were *m/z* 460.08 → 443.17 (apixaban) and *m/z* 464.08 → 447.08 (apixaban-^{13}C-d_3). **Results** The standard curve equation of apixaban in human plasma was $Y = 2.303X + 0.121$ ($R^2 = 0.994$). Apixaban had a good linear relationship at 0.500 ～ 200 ng·mL^{-1}. **Conclusion** The LC-MS/MS method is sensitive, simple and reliable. It can be used for the determination of plasma concentration of apixaban in human body, and study its pharmacokinetics and bioequivalence.

Key words: apixaban; LC-MS/MS; plasma concentration

阿哌沙班属于Xa因子抑制剂，是近年来我国获批上市的新型口服抗凝血药（direct-acting oral anticoagulants，DOACs）[1]，具有抑制作用强、选择性高等特点[2]，阿哌沙班给药 3 h 后就可以迅速起效，它的血浆蛋白结合率约 87%，在人体内主要通过肝脏和肾脏消除[3]，临床主要用于治疗静脉血栓栓塞症（venous thrombus embolism，VTE）。目前临床上有大量试验对 DOACs 和香豆素类抗凝剂进行比较，DOACs 具有可预测的药代动力学和药效学特征，抗凝作用更加稳定，在

作者简介：田继堂，男，制药工程师，执业药师，主要从事中西药物注册生产工艺与质量标准研究，email：hardn0531@163.com
*通信作者：王娜，女，硕士研究生，主要从事药理学和药物分析研究，email：3036576087@qq.com

预防血栓事件上更具有优势[4-6]，无需进行常规实验室监测。然而在高龄、严重肝肾功能不全等一些特殊情况下会引起药物的代谢异常，导致药物残留或者抗凝活性过高[7-8]，所以在研究实验中对DOAC进行监测就显得十分必要。

LC-MS/MS法作为定量检测DOAC血药浓度的“金标准”，不仅可以准确定量，还可以对凝血抑制物进行特定的检测和定量[9-10]。本研究旨在建立一种LC-MS/MS法，测定人血浆中阿哌沙班的浓度，并验证其分析方法的可行性，为临床研究提供参考依据。

1 材料

1.1 试药

阿哌沙班对照品（纯度：95.6%，TLC Pharmaceutical Standards，批号：1771-024A1）；内标对照品为阿哌沙班-^{13}C-d$_3$（纯度：94.3%，TLC Pharmaceutical Standards，批号：1869-012A5）；乙腈、甲醇（色谱级，Merck公司）；二甲基亚砜（DMSO，分析级，Titan公司）。人血浆（含K_2-EDTA）、人全血（含K_2-EDTA）（潍坊高新技术产业开发区人民医院）。

1.2 仪器

WH-3涡旋仪（上海沪西分析仪器厂）；MX-M摇板机（DRAGON LAB）；XPR2百万分之一微量天平、Bench Smart 96移液工作站（Mettler）；HH-ZK4水浴锅（巩义市予华仪器）；Millipore Milli-Q纯水仪（默克化工）；Centrifuge 5810R冷冻离心机（Eppendorf）。

1.3 溶液配制

1.3.1 对照品溶液 精密称量化合物阿哌沙班，用适量的DMSO溶解，配制成质量浓度为1.00 mg·mL^{-1}的储备液SS-A（使用校正因子）；取0.0750 mL的SS-A加到2.925 mL的甲醇中，混合均匀配制成储备液SS-B（25.0 μg·mL^{-1}）；取0.120 mL的SS-B加到2.88 mL的甲醇中，混合均匀配制成储备液SS-C（1.00 μg·mL^{-1}）。

1.3.2 内标溶液 精密称取内标对照品（阿哌沙班-^{13}C-d$_3$），用适量的DMSO溶解，配制成质量浓度为1.00 mg·mL^{-1}的内标储备液IS-A（使用校正因子）；取0.0200 mL的IS-A加到1.98 mL的甲醇中，混合均匀配制成10.0 μg·mL^{-1}的内标储备溶液IS-B；取0.0200 mL的IS-B加到1.98 mL的甲醇∶水（1∶1）溶液中，混合均匀配制成100 ng·mL^{-1}的内标工作溶液IS-C（使用前新鲜配制）。

2 方法与结果

2.1 样品预处理

移取50.0 μL血浆样品（空白样品和内标空白样品加50.0 μL空白血浆）至96孔板中，加入20.0 μL内标工作液（100 ng·mL^{-1}）溶液[空白样品加入20.0 μL甲醇∶水（1∶1）]，涡旋2 min；加入430 μL乙腈溶液，涡旋5 min后，在4000 r·min^{-1}、4 ℃条件下离心5 min，使用移液工作站移取上清液100 μL至新的96孔板中；加入200 μL的30%乙腈水溶液，涡旋5 min，在4000 r·min^{-1}、4 ℃条件下离心5 min，后用LC-MS/MS分析。

2.2 LC-MS/MS条件

2.2.1 色谱条件 采用Vanquish UHPLC超高效液相系统，色谱柱型号为Poroshell 120 EC-C_{18}（4.6 mm×50 mm，2.7 μm），柱温30 ℃；进样量6 μL。水相为5%乙腈水溶液（A），有机相为乙腈（B），流速是0.7 mL·min^{-1}，运行时间为3.5 min。梯度洗脱程序为[0 min，35%B→1.8 min，95%B→2.2 min，95%B→2.21 min，35%B→3.5 min（stop）]，0.6 min质谱切入，2.0 min质谱切出。

2.2.2 质谱条件 采用Thermo TSQ Altis三重四极杆质谱仪，电喷雾离子化源（ESI）正离子模式，扫描方式为选择反应监测（SRM），阿哌沙班和内标阿哌沙班-^{13}C-d$_3$的检测离子对分别是（*m/z*）460.08→443.17和（*m/z*）464.08→447.08，其离子扫描图见图1。

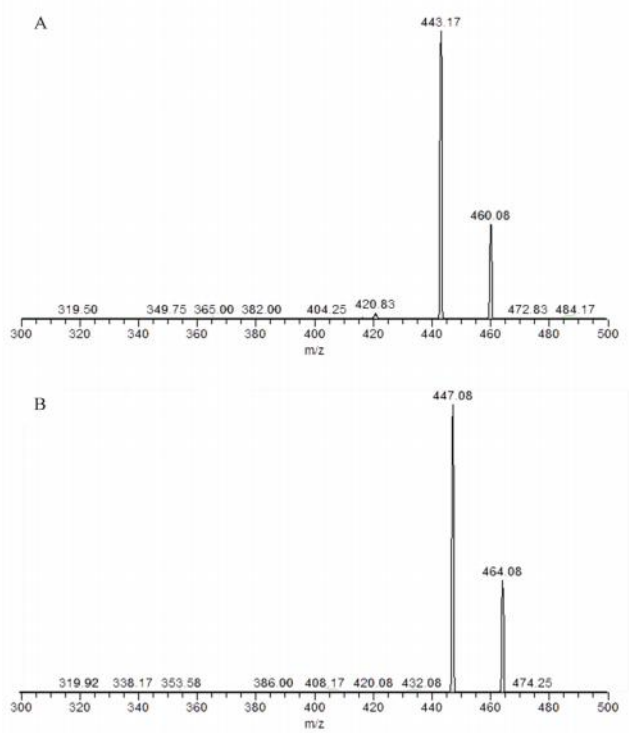

图1 阿哌沙班（A）和阿哌沙班-^{13}C-d$_3$（B）的离子扫描图

Fig 1 Ion scan images of apixaban（A）and apixaban-^{13}C-d$_3$（B）

2.3 方法学验证结果

2.3.1 标准曲线与线性范围 利用空白人血浆配制血浆样品，建立阿哌沙班血浆（0.500、1.00、3.00、8.00、30.0、100、160、200 ng·mL^{-1}）的标准曲线，测定每个标准样品的分析物和内标的峰面积。以阿哌沙班与内标峰面积比值为纵坐标（Y），阿哌沙班质量浓度为横坐标（X），用加权最小二乘法进行线性回归拟合，得到标准工作曲线方程 $Y = 2.303X + 0.121$（$R^2 = 0.994$），线性范围为 0.500 ～ 200 ng·mL^{-1}。

2.3.2 准确度和精密度考察 按照血浆样品预处理的方法，利用空白人血浆分别配制阿哌沙班高（HQC，150 ng·mL^{-1}）、中（MQC，80 ng·mL^{-1}）、几何中（GMQC，10 ng·mL^{-1}）、低（LQC，1.50 ng·mL^{-1}）4 个浓度的质控样品，每个浓度 6 个样品，对各浓度质控样品进行连续 3 d 的分析，计算阿哌沙班的准确度和精密度（连续考察 3 批）以及阿哌沙班批内、批间准确度和精密度偏差，结果见表 1，结果表明阿哌沙班的准确度和精密度均满足生物样品定量分析方法验证指导原则[11]。

表 1 阿哌沙班质控样品准确度和精密度

Tab 1 Accuracy and precision of apixaban quality control sample

样品	批内测得平均浓度 /（ng·mL^{-1}）	批间测得浓度 /（ng·mL^{-1}）	批内平均 *RSD*/%	批间 *RSD*/%
LQC	1.40±0.0436	1.39±0.0509	－7.13	－7.13
GMQC	9.29±0.192	9.30±0.241	－7.14	－7.02
MQC	82.3±1.76	82.3±1.85	2.90	2.90
HQC	160±3.66	160±5.38	6.73	6.73

2.3.3 提取回收率 分别考察了 HQC、MQC、LQC 3 个浓度质控样品的提取回收率，每个浓度 6 个样品，同时考察了内标的提取回收率（n = 18），提取回收率的考察结果见表 2，结果表明在本方法的定量范围内阿哌沙班具有足够、相对均一的提取回收率，且内标具有较高的回收率。

表 2 待测物和内标的提取回收率

Tab 2 Extraction recovery of the tested substance and internal standard

样品	平均回收率 /%	提取回收率的变异系数 /%	总平均回收率 /%	总平均变异系数 /%
LQC	84.10	4.95	89.07	5.55
MQC	90.27	2.92		
HQC	92.84	3.47		
内标	99.39	2.90		

2.3.4 基质效应 本研究考察了 6 个不同来源的空白人血浆，对于每批基质，分别在低浓度和高浓度下通过计算基质存在下的峰面积（由空白人血浆前处理后加入分析物和内标测得），与不含基质的样品（分析物和内标的纯溶液）相应峰面积的平均值的比值，计算分析物和内标的基质因子，并通过分析物的基质因子除以内标的基质因子，计算经内标归一化的基质因子。低、高浓度质控样品经内标归一化的基质因子的变异系数（CV，%）均低于 15%，表明人血浆中阿哌沙班和内标化合物的测定不受生物基质的影响。

2.3.5 耐用性 考察了阿哌沙班在一个分析批中连续分析包括标准样品和质控样品在内的 186 个样品，阿哌沙班的耐用性考察结果见表 3。结果表明此方法耐用性好，可连续分析 186 个样品。

表 3 阿哌沙班血浆样品的耐用性

Tab 3 Durability of apixaban plasma samples

样品	测得浓度 /（ng·mL^{-1}）	*RSD*/%
LLOQ	0.536±0.0215	7.1
LQC	1.37±0.0698	－8.83
GMQC	9.08±0.225	－9.2
MQC	82.7±2.9	3.38
HQC	162±5.99	7.89

2.3.6 选择性考察 按照血浆样品预处理办法，考察 6 个不同来源的空白人血浆，分别配制了空白样品（不含分析物和内标的处理过的基质样品）、内标空白样品（含内标的处理过的基质样品）、定量下限；此外使用不同来源空白人血浆的混合基质配制内标空白样品和不含内标的阿哌沙班定量上限样品。空白基质（不含分析物和内标的处理过的基质样品）的色谱图见图 2A，人血浆内标空白样品色谱图见图 2B，定量下限（LLOQ，0.50 ng·mL^{-1}）样品色谱图及人血浆不含内标的阿哌沙班定量上限（ULOQ，200.00 ng·mL^{-1}）样品色谱图分别见图 2C、2D。结果表明不同来源的基质对阿哌沙班的测定干扰较小。

2.3.7 稀释验证 配制浓度高于定量上限的 DQC（750 ng·mL^{-1}）质控样品，用空白人血浆稀释 5 倍，平行配制 6 份，提取后进行分析，结果显示稀释质控样品的准确度在真实值的 ±15% 之内，精密度低于 15% 且至少 67% 稀释质控样

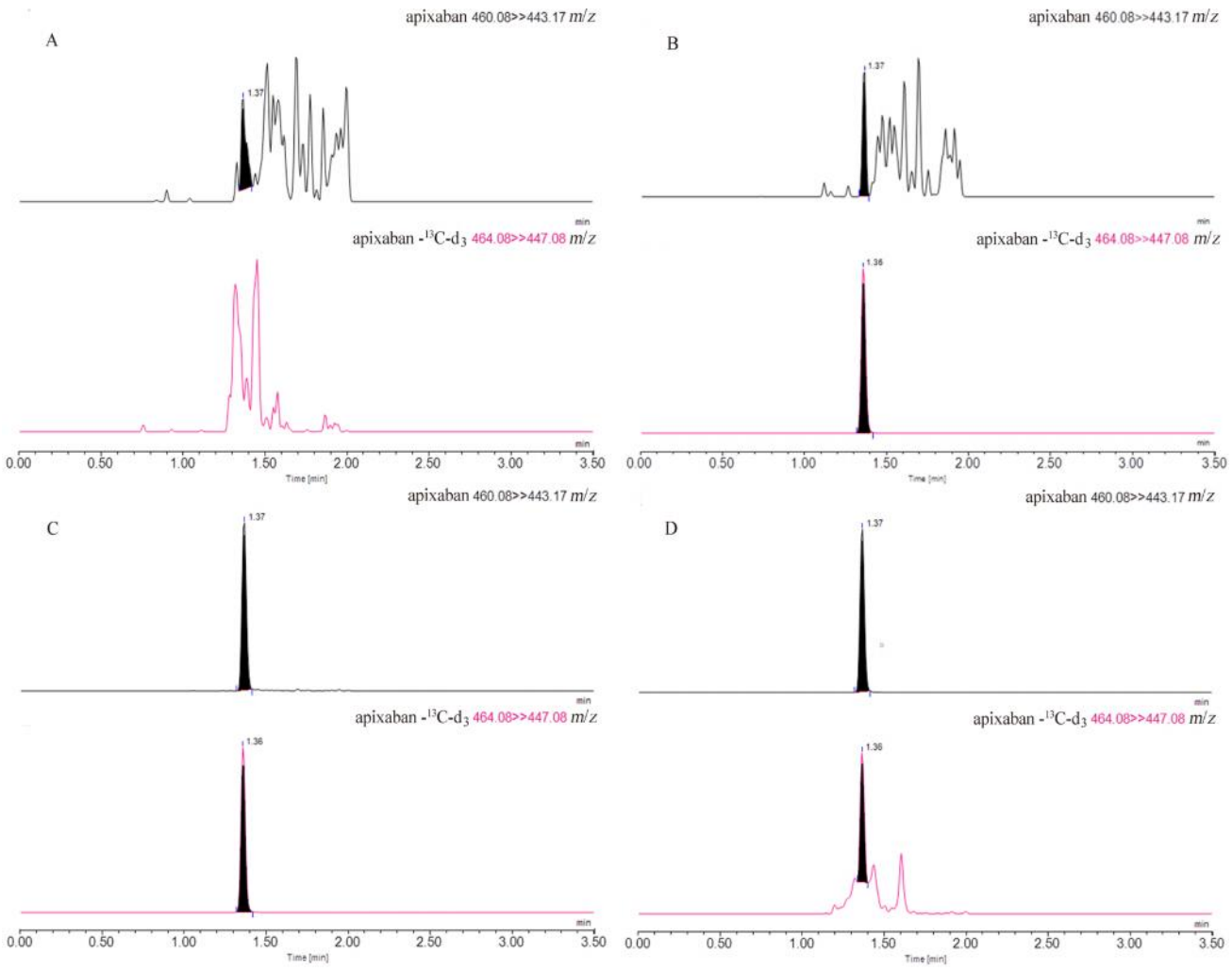

图 2　阿哌沙班的典型色谱图

Fig 2　Typical chromatograms of apixaban

A. 空白基质（blank matrix）；B. 内标空白（internal standard blank）；C. 定量下限样品（lower limit of quantification sample）；D. 定量上限样品（upper limit of quantitation sample）

品测定值与理论值的偏差不超过 ±15.0%，均满足相应的接受标准。表明基质稀释方法适用于对超出定量上限的样品进行稀释后准确测定阿哌沙班浓度。

2.3.8　稳定性　将高、低浓度质控样品置于－20 ℃和－80 ℃条件下冷冻后，再置于室温白光条件下融解，反复冻融 5 次后，处理样品并进行 LC-MS/MS 分析，考察阿哌沙班在人血浆中的冻融稳定性；同时考察了分析物高、低浓度质控样品在室温白光条件下放置 25 h 的稳定性以及分别于－20 ℃和－80 ℃条件下冻 5 次、放置 30 d 的稳定性，结果见表 4，表明阿哌沙班血浆样品的稳定性良好。

2.3.9　高脂效应评价　考察了阿哌沙班人血浆高脂现象在高、低浓度质控样品（每个浓度 4 个样品）中对阿哌沙班真实浓度的影响。提取后高脂样品的准确度在 ±15% 之内，精密度 CV ≤ 15%，且至少 50% 的高脂质控样品测定值与理论值的偏差（RE）不超过 ±15.0%，均满足相应的接受标准，表明人血浆高脂现象对阿哌沙

表 4　阿哌沙班血浆样品的稳定性考察

Tab 4　Stability of apixaban plasma samples

条件	样品	测得浓度 /（ng • mL^{-1}）	*RSD*/%
－20 ℃冻 5 次	LQC	1.43±0.0226	－4.70
	HQC	160±2.78	6.74
－80 ℃冻 5 次	LQC	1.42±0.0274	－5.65
	HQC	61±1.20	7.51
室温白光 25 h	LQC	1.40±0.0597	－6.43
	HQC	154±5.62	2.54
－20 ℃冻 30 d	LQC	1.35±0.0208	－10.27
	HQC	152±4.96	1.19
－80 ℃冻 30 d	LQC	1.33±0.0348	－11.13
	HQC	150±7.31	－0.03

班血浆样品真实浓度无影响。

3 讨论与总结

本研究通过选择反应监测（SRM）方式进行检测，可以排除更多噪声和干扰，灵敏度、信噪比也更高，有益于阿哌沙班的准确定量；同时采用了高敏度的 Thermo TSQ Altis 三重四极杆质谱仪，可以实现数据结果的可靠性。

选择乙腈作为沉淀剂对阿哌沙班样品进行蛋白沉淀批量处理，排除了血浆中内源物质的干扰，方便快捷，回收率高，又采用了梯度洗脱的方式，对测定人血浆中阿哌沙班的 LC-MS/MS 法进行了全面系统的方法验证，此方法的选择性、准确度、精密度、基质效应、耐用性等均满足接受标准。

有相关试验已经通过 LC-MS/MS 检测阿哌沙班，但主要是对阿哌沙班在人体的生物等效性和药代动力学特征进行研究 [12-13]，本研究对 LC-MS/MS 的条件进行优化，建立了一种简便、灵敏、快速、可靠的 LC-MS/MS 法，并对其方法进行全面充分的验证总结，证实该法可以满足人血浆中阿哌沙班临床药代动力学及生物等效性研究中大批量样品快速分析的要求，可为临床研究提供参考。

参考文献

[1] 孙红娜，郑玉粉，于锋 . 新型口服抗凝药的药物相互作用 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（3）：314-320.

[2] 张乾坤，沈思思，张峻铭，等 . 阿哌沙班的合成工艺研究 [J]. 中国药物化学杂志，2022，32（3）：199-203.

[3] 季顺东 . 血栓形成机制及抗凝药物的药理特点 [J]. 中国计划生育和妇产科，2021，13（3）：25-28.

[4] 缪帅，李广平 . 新型口服抗凝药物在血栓栓塞性疾病中的应用研究 [J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2022，36（4）：336-338.

[5] Di Minno A，Frigerio B，Spadarella G，et al. Old and new oral anticoagulants：food，herbal medicines and drug interactions [J]. Blood Rev，2017，31（4）：193-203.

[6] Weinberg EM，Palecki J，Reddy KR. Direct-acting oral anticoagulants（DOACs）in cirrhosis and cirrhosis-associated portal vein thrombosis [C]. Semin Liver Dis，2019，39（2）：195-208.

[7] Douxfils J，Adcock DM，Bates SM，et al. 2021 Update of the International Council for Standardization in Haematology recommendations for laboratory measurement of direct oral anticoagulants [J]. Thromb Haemost，2021，121（8）：1008-1020.

[8] Salmonson T，Dogne JM，Janssen H，et al. Non-vitamin-K oral anticoagulants and laboratory testing：now and in the future：views from a workshop at the European Medicines Agency（EMA）[J]. Eur Heart J-Card Pha，2017，3（1）：42-47.

[9] Dunois C. Laboratory monitoring of direct oral anticoagulants（DOACs）[J]. Biomedicines，2021，9（5）：445.

[10] Samuelson BT，Cuker A，Siegal DM，et al. Laboratory assessment of the anticoagulant activity of direct oral anticoagulants：a systematic review [J]. Chest，2017，151（1）：127-138.

[11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：466-472.

[12] 齐谢敏，张婕妤，陈晨，等 . 阿哌沙班片在中国健康受试者体内的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（9）：1035-1038.

[13] 宁晓艺，况赟，黄洁，等 . 阿哌沙班片在中国健康志愿者体内的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（3）：306-311.

（收稿日期：2022-12-01；修回日期：2023-02-16）

基于溶出曲线的测定评价富马酸伏诺拉生片与原研制剂的一致性

刘庆晓，伊磊，郝贵周，郑华，耿兴锴，张贵民*（鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东　临沂　273400）

摘要：目的　建立富马酸伏诺拉生片溶出度的测定方法，评价自研制剂与原研制剂溶出行为的一致性。**方法**　采用高效液相色谱法，测定了富马酸伏诺拉生片自研制剂与原研制剂分别在 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水 4 种溶出介质中的溶出曲线，并评价其一致性。**结果**　自研制剂与原研制剂在 4 种不同溶出介质中溶出曲线均相似。**结论**　自研制剂与原研制剂体外溶出一致，保证了自研制剂的安全性和有效性。

关键词：富马酸伏诺拉生片；溶出曲线；一致性评价；原研制剂
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2111-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.023

Consistency of in vitro dissolution between vonoprazan fumarate tablets and original preparation

LIU Qing-xiao, YI Lei, HAO Gui-zhou, ZHENG Hua, GENG Xing-kai, ZHANG Gui-min* (*Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective　To establish a method to determine the dissolution of vonoprazan fumarate tablets, and to evaluate the consistency of in vitro dissolution between self-prepared vonoprazan tablets and original preparation. **Methods**　The dissolution curves of the self-developed vonoprazan fumarate tablets and the original preparation were determined by high performance liquid chromatography in hydrochloric acid solution (pH 1.2), acetate buffer (pH 4.5), phosphate buffer (pH 6.8) and water respectively. Their consistency was evaluated. **Results**　The dissolution curves of the self-developed preparation and the original preparation in 4 dissolution media were similar. **Conclusion**　The dissolution of the self-developed preparation is consistent with that of the original preparation ensured the safety and effectiveness of the self-developed preparation ensured.

Key words: vonoprazan fumarate tablet; dissolution curve; consistency evaluation; original preparation

富马酸伏诺拉生片属于钾离子竞争性酸阻滞剂（potassium-competitive acid blocker，P-CAB），是一种新型的可逆性质子泵抑制剂[1-2]。富马酸伏诺拉生片常用于治疗酸相关疾病，包括反流性食管炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、在使用低剂量阿司匹林或非甾体抗炎药治疗期间预防胃溃疡或十二指肠溃疡的复发和幽门螺杆菌的根除[3-7]。具有首剂全效、持久抑酸、半衰期较长（一天仅需服药一次）等优势[8-9]。

固体制剂口服给药后，药物的吸收取决于药物从制剂中的溶出或释放、药物在生理条件下的溶解以及在胃肠道的渗透。由于药物的溶出和溶解对吸收具有重要影响，因此，药物在体外的溶出行为有可能预测其体内行为，同时药物体外溶出行为能够在一定程度上反映出制剂的质量[10]。本研究在模拟人体消化道内体液的 4 种基本介质中，对自研制剂（规格：20 mg）进行溶出曲线研究，并与原研制剂（商品名：Takecab）溶出曲线

作者简介：刘庆晓，女，工程师，主要从事新药研究与开发，email：liuqingxiao0103@126.com　*通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事新药研究与开发，email：lunanzhangguimin@163.com

进行体外溶出一致性评价。

1 材料

1.1 仪器

UDT-812A-12 型智能溶出仪、MDS-600PL 型真空脱气机（禄亘仪器设备有限公司）；FADT-1200RC 型智能溶出仪（上海富科思分析仪器有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；e2695 型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；XS205 型电子天平 [梅特勒托利多科技（中国）有限公司]；MS 204 TS 型电子天平、Sevencompact 型 pH 计 [梅特勒托利多科技（中国）有限公司]。

1.2 试药

富马酸伏诺拉生对照品（含量：99.9%，鲁南制药集团股份有限公司）；富马酸伏诺拉生片原研制剂（商品名：Takecab，规格：20 mg，批号：HH1114，武田药品工业株式会社）；富马酸伏诺拉生片（规格：20 mg，批号：ZY01、ZY02、ZY03，鲁南制药集团股份有限公司）。

乙腈为色谱纯（Merk 公司）；盐酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠、醋酸钠、冰醋酸和磷酸氢二铵等均为分析纯；水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶出曲线测定方法的建立

根据富马酸伏诺拉生片原研 IF 文件等相关信息，初步建立了体外溶出的测定方法。

2.1.1 溶出介质的配制 [11]

pH 1.2 盐酸溶液：量取 7.65 mL 盐酸，加水稀释至 1000 mL，摇匀，即得。

pH 4.5 醋酸盐缓冲液：取醋酸钠 2.99 g 和 2 mol • L^{-1} 醋酸溶液 [取 120.0 g（114 mL）冰醋酸用水稀释至 1000 mL，即得]14.0 mL，加水溶解并稀释至 1000 mL，摇匀，即得。

pH 6.8 磷酸盐缓冲液：取 0.2 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（取 27.22 g 磷酸二氢钾，用水溶解并稀释至 1000 mL）250 mL 与 0.2 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液（取 8.00 g 氢氧化钠，用水溶解并稀释至 1000 mL）112.0 mL 混合后，再加水稀释至 1000 mL，摇匀，即得。

水：为脱气纯化水。

2.1.2 溶出方法 照《中国药典》2020 年版（第四部通则 0931）溶出度与释放度测定法，采用第二法（桨法）装置，分别以 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水为溶出介质，体积为 900 mL、转速为 50 r • min^{-1}，依法操作。依次于 5、10、15、30、45 min 时取样 5 mL，用 0.45 μm 滤膜过滤，续滤液作为供试品溶液，同时补加同温度、同体积的溶出介质。供试品溶液注入液相色谱仪分析。按外标法计算每片伏诺拉生的溶出量。

2.2 方法学验证

2.2.1 色谱条件 照《中国药典》2020 年版（第四部通则 0512）高效液相色谱法，用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.02 mol • L^{-1} 磷酸氢二铵溶液（用磷酸调节 pH 值至 4.5）- 乙腈（70∶30）为流动相，检测波长：220 nm，流速：1.0 mL • min^{-1}，柱温：30 ℃，进样量：10 μL。

2.2.2 专属性 称取空白辅料适量（约相当于伏诺拉生 20 mg），分别置 1000 mL 量瓶中，加溶出介质 900 mL，超声溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，依法测定。结果表明，色谱峰分离良好，空白辅料对溶出度的测定无干扰。故空白辅料不干扰溶出度测定，本方法专属性良好。

2.2.3 系统适用性试验 精密量取“2.2.4”项下对照品母液 2.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性试验溶液；精密量取 10 μL 注入液相色谱仪，连续进样 6 次。结果表明，伏诺拉生峰面积的相对标准偏差（*RSD*）均小于 2.0%，保留时间 *RSD* 均小于 0.50%，理论塔板数均大于 3000，符合规定。

2.2.4 线性与范围 精密称取富马酸伏诺拉生对照品约 74.8 mg，置 50 mL 量瓶中，加 30% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液；精密量取储备液 10 mL，置 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为对照品母液。精密量取对照品母液 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0 mL，分别置 10 mL 的量瓶中，加溶出介质稀释至刻度，摇匀，依法测定，记录色谱图，计算回归方程。结果见表 1。4 种介质中伏诺拉生质量浓度在 1.116 ～ 33.44 μg • mL^{-1} 内线性关系良好。

2.2.5 进样精密度 精密量取“2.2.4”项下对照品母液 2.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加溶出介质稀释至刻度，摇匀，每个浓度制备 6 份，依法测定，计算得 4 种溶出介质中的伏诺拉生峰面积的 *RSD* 值在 0.030% ～ 0.27%。均小于 2.0%，结果表明本方法进样精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取自研制剂，平行制备 6 份样品，进样检测，计算得 4 种介质中伏诺拉生溶出度的 *RSD* 值在 0.43% ～ 1.1%。结果表明本方法重复性良好。

2.2.7 中间精密度 取同一批自研片，不同日期、不同人员使用不同仪器，按“2.2.6”项下操作进行试验，计算得 4 种介质中伏诺拉生溶出度的 *RSD* 值在 0.55% ～ 1.2%。结果表明本方法中

表 1　线性与范围试验结果

Tab 1　Linearity and range

介质	回归方程	r	线性范围 /（μg·L^{-1}）
水	$A = 4.223\times10^4C + 1.435\times10^3$	1.000	1.116 ～ 33.48
pH 1.2 盐酸溶液	$A = 46.52C - 1.45$	1.000	1.115 ～ 33.44
pH 4.5 醋酸盐缓冲液	$A = 4.410\times10^4C + 2.870\times10^2$	1.000	1.116 ～ 33.48
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	$A = 4.459\times10^4C + 3.914\times10^3$	1.000	1.115 ～ 33.44

间精密度良好。

2.2.8　回收试验　精密量取对照品母液 2.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。称取空白辅料约 118 mg，置 100 mL 量瓶中，加溶出介质适量超声溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为空白辅料母液。精密量取对照品母液和空白辅料母液各 2.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为 100% 浓度供试品溶液，同法配制 50% 和 150% 浓度的供试品溶液，每个浓度配制 3 份。

分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，依法测定。经计算 4 种介质中伏诺拉生的平均回收率均在 100.00% ～ 100.54%，*RSD* 值均在 0.09% ～ 0.52%。表明该测定方法的回收率高，准确度良好。

2.2.9　溶液稳定性

① 对照品溶液：对照品溶液室温放置，在 24 h 内每隔 2 h 取样测定，记录峰面积。结果在室温自然光下，在 4 种溶出介质中伏诺拉生 24 h 内峰面积的变化量均小于 2%，表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

② 供试品溶液：分别取本品 1 片，置 1000 mL 量瓶中，加入 4 种不同的溶出介质 900 mL 超声使溶解，滤过，取续滤液作为供试品溶液；室温放置，分别在 22 h 内每隔 2 h 取样测定，记录峰面积。结果表明，室温自然光下，在 4 种溶出介质中，供试品溶液 22 h 内峰面积的变化量均小于 2%，在 22 h 内稳定。

2.2.10　滤膜吸附性　分别取本品 1 片，置 1000 mL 量瓶中，加入 4 种不同的溶出介质 900 mL，超声使溶解；分别取离心（转速为 6000 r·min^{-1}）10 min 的上清液和用滤膜（材料：聚醚砜；规格：0.45 μm×25 mm；厂家：津腾）过滤 1、2、3、4、5、6 mL 的续滤液，分别精密量取 10 μL 注入液相色谱仪，依法测定，将经过离心处理的样品峰面积作为 100%，过滤处理的样品峰面积与之进行对比。结果表明，本品在 pH 1.2 盐酸溶液中弃去 1 mL，在其他 3 种介质中弃去 2 mL 变化值小于 2%，滤膜即可达到饱和。

2.2.11　溶出仪耐用性　按照“2.1.2”项下溶出方法，通过改变溶出仪的转速①（52、48 r·min^{-1}）及水温②（38、36 ℃），考察溶出仪的耐用性，结果显示，改变转速和水温时，30 min 取样时本品溶出度均大于 90%，与标准条件相比，无明显差异。说明本品的溶出度受溶出仪参数波动影响较小，耐用性良好。

2.2.12　不同厂家溶出仪测定溶出曲线差异　取自研制剂，使用不同品牌溶出仪，照“2.1.2”项下方法各检测 12 份样品，分别于 5、10、15、30、45 min 时取样，计算平均累积溶出度，结果见表 2。并计算两台溶出仪共 24 片样品的累积溶出度 *RSD*，*RSD* 均小于 5.0%。说明采用不同厂家溶出仪检测溶出曲线，各取样时间点的累积溶出度无明显差异。说明本品的溶出度受不同厂家溶出仪的差异影响较小。

表 2　不同厂家溶出仪测定溶出曲线差异

Tab 2　Difference in dissolution curves by dissolution apparatus from different manufacturers

溶出仪	溶出介质	平均累积溶出度 /%				
		5 min	10 min	15 min	30 min	45 min
禄亘	pH 1.2 盐酸溶液	87.93	96.52	97.68	97.83	97.70
	pH 4.5 醋酸盐缓冲液	85.49	96.35	98.44	99.06	99.55
	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	82.87	94.69	98.98	99.47	99.48
	水	76.04	93.41	96.50	97.47	98.86
富科思	pH 1.2 盐酸溶液	90.05	98.62	99.73	100.25	100.27
	pH 4.5 醋酸盐缓冲液	89.85	97.55	99.15	99.78	99.94
	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	85.31	98.06	98.59	98.94	99.05
	水	76.36	94.08	97.62	98.51	100.04

2.3　自研制剂与原研制剂溶出曲线比较

取本品自研制剂（批号：ZY01、ZY02、ZY03）及原研制剂（批号：HH1114）各 12 片，按“2.1.2”项下方法溶出后，照“2.2.1”项下条件测定每个点的溶出度，绘制溶出曲线，如图 1 所示，并比较自研制剂与原研制剂溶出行为的相似性。由溶出曲线可知，3 批自研制剂和原研制剂溶在 4 种溶出介质中 15 min 的平均溶出度均大于 85%，说明自研制剂与原研制剂溶出曲线相似。

3　讨论

本研究建立高效液相色谱法检测富马酸伏诺拉生片的体外溶出。该方法经验证，专属性强，准确度高。溶出仪的耐用性良好，且不同厂家溶出仪对溶出度测定影响较小。

药物体外溶出试验是评价口服固体制剂质量的

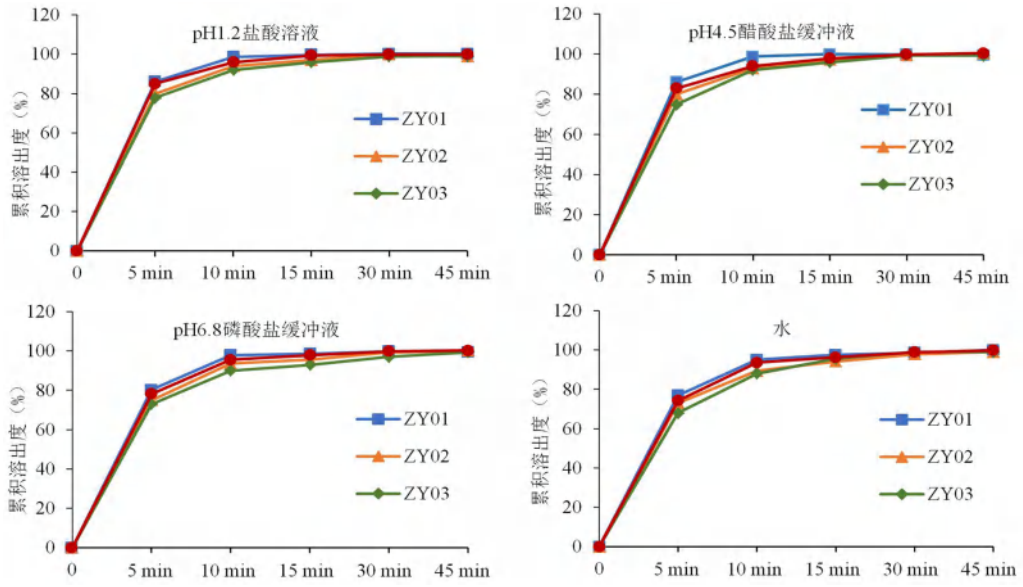

图 1 自研制剂与原研制剂在不同溶出介质中的溶出曲线

Fig 1 Dissolution curves of self-made preparation and original preparation in different media

一种重要手段，药物体外溶出程度对人体吸收有着重要的影响。通过对多种溶出介质中溶出曲线的测定结果进行对比，评价自研制剂与参比制剂溶出程度的一致性，可以更好地控制其质量，保证与原研药的安全性及有效性[12]。本研究根据国家食品药品监督管理总局发布的《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》，通过比较自研制剂与原研制剂体外多条溶出曲线相似性的方法，评价仿制制剂的质量一致性。根据富马酸伏诺拉生片的药代动力学参数，富马酸伏诺拉生片在胃中释放，在小肠吸收，生物利用度较低，因此模拟体内的环境，确定溶出介质为 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水。经对比研究，自研制剂与原研制剂 4 条溶出曲线 15 min 溶出度均大于 85%，说明自研制剂与原研制剂溶出行为一致。自研制剂与原研制剂溶出行为的一致性不仅在一定程度上反映出两者质量的一致性，保证了药物的安全性和有效性，也可为富马酸伏诺拉生片在临床上生物等效性研究提供指导。

参考文献

[1] Jenkins H，Sakurai Y，Nishimura A，et al. Randomised clinical trial：safety，tolerability，pH armacokinetics and pH armacodynamics of repeated doses of TAK-438（vonoprazan），a novel potassium-competitive acid blocker，in healthy male subjects [J]. Aliment Pharmacol Ther，2015，41（7）：636-648.

[2] Murakami K，Sakurai Y，Shiino M，et al. Vonoprazan，a novel potassium-competitive acid blocker，as a component of first-line and second-line triple therapy for Helicobacter pylori eradication：a phase Ⅲ，randomised，double-blind study [J]. Gut，2016，65（9）：1439-1446.

[3] 薛朝军，杜雨晗，靳会欣，等 . 应用《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南》评价富马酸伏诺拉生片 [J]. 中国医院用药评价与分析，2022，22（10）：1228-1232.

[4] 郑延和，赵晓芸，魏宗苹 . 富马酸伏诺拉生治疗难治性反流性食管炎疗效观察 [J]. 实用药物与临床，2022，25（9）：808-812.

[5] 马原，孙倩，王爽，等 . 富马酸伏诺拉生片治疗复发性反流性食管炎患者的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（15）：1735-1738.

[6] Kiyotoki S，Nishikawa J，Sakaida I. Efficacy of vonoprazan for helicobacter pylori eradication [J]. Int Med，2020，59（2）：153-161.

[7] Martin，Zhou Y，Meng CX，et al. Vonoprazan vs proton pump inhibitors in treating post-endoscopic submucosal dissection ulcers and preventing bleeding：a meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies [J]. Medicine，2020，99（9）：19357.

[8] 何丛，祝荫 . 2020 年幽门螺杆菌研究领域的重要进展 [J]. 中华医学信息导报，2021，36（3）：10.

[9] 陈珑，焦红梅 . 基于富马酸伏诺拉生的幽门螺杆菌根除治疗方案的现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（20）：2506-2509.

[10] 国家食品药品监督管理总局 . 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则 [S]. 2016-03-18.

[11] 国家食品药品监督管理总局 . 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则 [S]. 2015-02-05.

[12] 刘湾，涂亮星，杨世林，等 . 口服固体制剂仿制药一致性评价体内外相关性研究进展 [J]. 药物评价研究，2020，43（12）：2565-2570.

（收稿日期：2022-12-07；修回日期：2023-02-23）

滁菊硒含量与根际土壤硒赋存形态的相关性分析

李娜，喻格，胡丹，秦莉，马玲，张玲*（安徽中医药大学 药学院，合肥　230012）

摘要：目的　研究滁菊硒含量与根际土壤硒及不同赋存形态硒含量的相关性。**方法**　采用连续浸提技术提取滁菊生长根际土壤中 5 种形态硒，运用原子荧光分光光度法（AFS）测定滁菊植株不同器官中硒、根际土壤中硒和不同形态硒的含量，应用 SPSS 26.0 软件分析滁菊植株不同器官硒含量与根际土壤硒及不同形态硒含量之间的相关性。**结果**　滁菊植株不同器官硒含量由高到低顺序为花序＞叶＞根＞茎；根际土壤中硒的赋存形态主要为酸溶态，其次为残渣态，而水溶态、可交换态和有机结合态硒含量较低；滁菊植株不同器官中硒含量与根际土壤中硒含量之间无相关性；滁菊花序和叶中的硒含量与根际土壤中水溶态硒、可交换态硒和有机结合态硒含量成显著性正相关，滁菊根中的硒含量与根际土壤中水溶态硒含量成显著性正相关，滁菊茎中的硒含量与根际土壤中有机结合态硒含量成显著性正相关。**结论**　滁菊中硒的含量与根际土壤中水溶态硒、可交换态硒和有机结合态硒密切相关，为探究滁菊中硒的来源和提高滁菊中硒的含量提供依据。

关键词：滁菊；根际土壤；硒含量；硒赋存形态；相关性
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2115-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.024

Correlation between the selenium content in Chuju and the occurrence forms of selenium in rhizosphere soil

LI Na, YU Ge, HU Dan, QIN Li, MA Ling, ZHANG Ling* (*School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective　To determine the correlation between selenium content in Chuju and the occurrence forms of selenium in rhizosphere soil. **Methods**　Continuous extraction technology was used to extract 5 forms of selenium in Chuju growing in rhizosphere soil. Atomic fluorescence spectrometry (AFS) was used to determine the content of selenium in different organs of Chuju plants, selenium and different forms of selenium in rhizosphere soil. SPSS 26.0 software was used to analyze the correlation between selenium in different parts of Chuju plants and selenium and different forms of selenium in rhizosphere soil. **Results**　Selenium content in different parts of Chuju plants was inflorescence ＞ leaf ＞ root ＞ stem. The enrichment coefficient of selenium in inflorescence of Chuju was higher than that in other parts of the plant. The occurrence forms of selenium in rhizosphere soil were mainly acid soluble, followed by residues, and the content of water-soluble, exchangeable and organic bound selenium was low. There was no correlation between the selenium content in different parts of Chuju plants and that in rhizosphere soil, while the selenium content in the inflorescence and leaves of Chuju was positively correlated with the water-soluble selenium, exchangeable selenium and organic bound selenium in the rizosphere soil. Selenium in the root of Chuju was also positively correlated with the water-soluble selenium in the rizosphere soil, and selenium in the stem of Chuju showed significant positive correlation with the organic bound selenium

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探索性项目（No.2021hxts23，No.2021zxts16）；安徽中医药大学研究生教育教学改革研究项目（No.2022YJG015）。
作者简介：李娜，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量控制与评价，email：1993701899@qq.com　*通信作者：张玲，女，教授，主要从事中药质量控制与评价，email：zhangling407@sina.com

in rhizosphere soil. **Conclusion** The content of selenium in Chuju is closely related to the water-soluble, exchangeable and organic bound selenium of rhizosphere soil, which provides reference for exploring the source of selenium in Chuju and improving the content of selenium in Chuju.

Key words: Chuju; rhizosphere soil; selenium content; selenium occurrence form; correlation

滁菊为菊科植物滁菊 *Dendranthema morifolium*（Ramat.）Tzvel.‘Chuju’cv.nov. 的干燥头状花序[1]，主产于安徽滁州，素有“金心玉瓣、翠蒂天香”之美誉，以药用而闻名，品质居于上乘[2]。滁菊中含有多种无机元素，其中硒元素的含量明显高于其他品种菊花[3]。硒作为一种微量元素，对植物具有抗逆、抗氧化、拮抗重金属等作用[4]，对人体有提高免疫功能，防癌抗癌的作用[5-6]。植物对硒元素的吸收大多是通过根系从土壤中吸收，但植物难以完全吸收利用硒的全部形态，最容易吸收和利用的是水溶态硒[7-8]。土壤中硒的赋存形态是决定其有效性的重要因素[9-11]。目前文献集中于对滁菊中硒的含量和施硒对其有机酸、黄酮等成分的影响进行研究[12-13]，未见滁菊硒含量与土壤硒赋存形态相关性方面的报道。

本研究采用连续浸提技术提取滁菊生长根际土壤中的硒，运用原子荧光分光光度法（AFS）测定硒的含量，分析滁菊植株不同器官中硒含量与根际土壤中硒及硒赋存形态的相关性，为探究滁菊硒的来源及进一步研究硒在土壤 - 滁菊植株中的迁移分布规律提供依据。

1 材料

1.1 仪器

AFS-830 型双道原子荧光分光光度计（北京吉天仪器有限公司）；NBH-L 型恒温电热板（苏州九联科技有限公司）；ME104E/02 型电子天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司）；HY-2 型调速多用振荡器（常州朗越仪器制造有限公司）；HH-6 型恒温数显水浴锅（常州天瑞仪器有限公司）。

1.2 试药

硒标准储备液（质量浓度 1000 μg • mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心）；茶叶成分分析标准物质（GBW10016a，国家标准物质中心）；土壤标准物质（GBW07401，地球物理地球化学勘察研究所）；磷酸氢二钾（天津市光复精细化工研究所）；过硫酸钾（上海玻尔化学试剂有限公司）；氢氧化钠、铁氰化钾（上海麦克林有限公司）；硼氢化钾（天津市大茂化学试剂厂）；磷酸二氢钾、盐酸（HCl）、氢氟酸（HF）、过氧化氢、硝酸均购于国药集团化学试剂有限公司。所用试剂均为优级纯，试验用水为超纯水。

1.3 样品

2019 年 11 月在安徽滁州南谯区和琅琊区采集滁菊植株样品（CJ1 ～ CJ4）和根际土壤样品（T1 ～ T4）。滁菊植株样品经安徽中医药大学王德群教授鉴定为菊科植物滁菊 *Dendranthema morifolium*（Ramat.）Tzvel.‘Chuju’cv.nov.。滁菊植株依次用自来水、蒸馏水和超纯水冲洗干净，分出根、茎、叶和花序 4 个器官，60 ℃烘干，粉碎（过 80 目筛）。滁菊生长根际土壤样品拣去植物残体、石块等，自然风干，研细（过 200 目筛），室温干燥贮存备用。

2 方法与结果

2.1 仪器工作条件

硒的测定波长 196 nm；光电倍增管负高压 280 V；灯电流 80 mA；载气流量 800 mL • min^{-1}；屏蔽气流量 800 mL • min^{-1}；原子化器高度 8 mm；注入量 0.5 mL；载流 5% 盐酸；还原剂为 0.5% 氢氧化钠和 1.5% 硼氢化钾混合液。

2.2 硒标准溶液的制备

精密量取硒标准储备液（1000 μg • mL^{-1}）适量，用超纯水溶解制成 0.1 μg • mL^{-1} 的硒标准储备液。分别精密量取 0.1 μg • mL^{-1} 的硒标准储备液 0、0.5、1、2、4、5 mL 置 50 mL 量瓶中，加入 5 mL 盐酸，用超纯水制成每 1 mL 含有 0、1、2、4、8、10 ng 硒的标准溶液。

2.3 滁菊植株不同器官和根际土壤待测液的制备

2.3.1 滁菊植株不同器官待测液的制备 分别取滁菊根、茎、叶、花序粉末约 0.2 g，精密称定，置聚四氟乙烯烧杯中，精密加入 8 mL HNO_3 和 2 mL H_2O_2，盖上表面皿，静置过夜。第二日置电热板上，120 ℃加热 1 h，再以 150 ℃加热 1 h，最后以 180 ℃加热至溶液澄清透明。将消化好的样品溶液 120 ℃赶酸至近干，待冷却后，加入 5 mL 6 mol • L^{-1} HCl 溶液，置电热板上，于 180 ℃加热 1 h，冷却后转移至 25 mL 棕色量瓶中，精密加入 0.1 g • mL^{-1} 铁氰化钾溶液 2 mL，用超纯水定容，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

同法制备植物空白样品溶液。

2.3.2　根际土壤待测液的制备　取根际土壤样品粉末约 0.2 g，精密称定，置聚四氟乙烯烧杯中，精密加入 5 mL HNO_3、2 mL H_2O_2 和 2 mL HF，自“盖上表面皿”起，按照“2.3.1”项下方法制备土壤待测液。同法制备土壤空白样品溶液。

2.4　*土壤硒形态待测液的制备*

取根际土壤样品粉末约 0.2 g，精密称定，置 50 mL 离心管中，参照吴少尉等[14]土壤中硒的连续浸提形态分析方法，提取土壤中硒的 5 种赋存形态：水溶态硒、可交换态硒、酸溶态硒、有机结合态硒和残渣态硒。空白对照同法处理。

2.5　*方法学考察*

2.5.1　线性关系考察　采用“2.2”项下方法配制硒标准溶液进样测定，以硒元素的质量浓度（ng·mL^{-1}）为横坐标（X），荧光强度为纵坐标（Y），绘制标准曲线。结果回归方程为 $Y=51.363X-0.2391$，线性范围为 0 ～ 10 ng·mL^{-1}，$r=0.9999$，表明线性关系良好。

2.5.2　精密度试验　取“2.2”项下硒标准溶液（4 ng·mL^{-1}）适量，连续进样测定 6 次。结果硒含量的 *RSD* 值小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.5.3　重复性试验　取根际土壤样品粉末约 0.2 g，精密称定，按“2.3.2”项下方法制备根际土壤样品待测液，平行制备 6 份，测定硒的含量。结果硒含量的 *RSD* 值小于 3.0%，表明方法重复性良好。

2.5.4　稳定性试验　取“2.3”项下制备的滁菊植株不同器官和根际土壤待测液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算硒的含量及 *RSD* 值。结果硒含量的 *RSD* 值均小于 3.0%，表明待测液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5　准确度试验　将茶叶成分分析标准物质（GBW10016a）和土壤标准物质（GBW07401）按“2.3”项下方法分别制备待测液，平行 6 份，进样测定，结果茶叶成分分析标准物质和土壤标准物质硒含量都在标准值范围之内，表明方法准确度良好。

2.6　*滁菊植株不同器官中硒的含量*

按照“2.1”项下方法对滁菊植株根、茎、叶、花序 4 个部位硒含量进行测定，平行 3 份，利用 SPSS 26.0 软件进行差异显著性分析，结果见表 1。由表 1 可知，南谯区和琅琊区两个产区，滁菊植株不同器官硒含量不同，花序中硒含量最高，在 0.091 ～ 0.24 μg·g^{-1}；其次为叶和根中硒的含量，叶中硒的含量范围在 0.088 ～ 0.23 μg·g^{-1}，根中硒的含量在 0.053 ～ 0.19 μg·g^{-1}；茎中硒的含量最低，在 0.033 ～ 0.15 μg·g^{-1}。且两个产区滁菊植株不同器官硒含量差异具有统计学意义（$P<0.05$），表现为南谯区滁菊植株不同器官中硒的含量高于琅琊区。

表 1　滁菊植株不同器官中硒的含量 (μg·g^{-1})

Tab 1　Contents of selenium in different organs of Chuju plants (μg·g^{-1})

采集地点	No.	根	茎	叶	花序
滁州南谯区	CJ1	0.17^{c}	0.15^{d}	0.20^{b}	0.21^{b}
滁州南谯区	CJ2	0.19^{d}	0.11^{c}	0.23^{c}	0.24^{c}
滁州琅琊区	CJ3	0.053^{a}	0.047^{b}	0.094^{a}	0.097^{a}
滁州琅琊区	CJ4	0.071^{b}	0.033^{a}	0.088^{a}	0.091^{a}

注：同一列不同小写字母表示差异具有统计学意义，$P<0.05$。

Note：Different lowercase letters in the same column indicate significant differences，$P<0.05$.

2.7　*滁菊生长根际土壤中硒的含量*

按照“2.3.2”项下方法制备滁菊生长根际土壤样品溶液，按照“2.1”项下方法测定，滁菊生长根际土壤中硒的含量测定结果见表 2。由表 2 可知，南谯区滁菊生长根际土壤硒含量均值为 0.365 μg·g^{-1}，琅琊区滁菊生长根际土壤硒含量均值为 0.335 μg·g^{-1}，南谯区硒含量略高于琅琊区。

2.8　*滁菊生长根际土壤中硒的赋存形态*

按照“2.4”项下方法提取土壤样品中硒的 5 种赋存形态待测液，按照“2.1”项下方法测定，滁菊生长根际土壤中 5 种硒赋存形态含量测定结果见表 2。从表 2 可以看出，在南谯区和琅琊区两个产区，滁菊生长根际土壤中 5 种赋存形态硒含量由高到低的顺序均为：酸溶态硒＞残渣态硒＞水溶态硒＞有机结合态硒＞可交换态硒。

表 2　滁菊生长根际土壤中硒和 5 种赋存形态硒的含量 (μg·g^{-1}，$n=3$)

Tab 2　Contents of selenium and 5 occurrence forms of selenium in Chuju growing rhizosphere soil (μg·g^{-1}，$n=3$)

采集地点	No.	硒	水溶态硒	可交换态硒	酸溶态硒	有机结合态硒	残渣态硒	5 种形态硒之和	浸提率 /%
滁州南谯区	T1	0.37	0.022	0.0066	0.14	0.021	0.11	0.30	81
滁州南谯区	T2	0.36	0.022	0.0078	0.15	0.021	0.12	0.32	89
滁州琅琊区	T3	0.33	0.021	0.0038	0.14	0.018	0.11	0.29	88
滁州琅琊区	T4	0.34	0.021	0.0023	0.14	0.017	0.11	0.29	85

滁菊生长根际土壤中 5 种赋存形态硒在硒中的占比（土壤 5 种赋存形态硒含量 / 土壤硒含量）结果见图 1。从图 1 可以看出，滁菊生长根际土壤硒的主要赋存形态为酸溶态硒，占硒含量的 38% ～ 42%；其次是残渣态硒，占硒含量的 30% ～ 33%；水溶态、可交换态和有机结合态硒在土壤中占比较少，三者之和仅占硒含量的 12% ～ 14%。

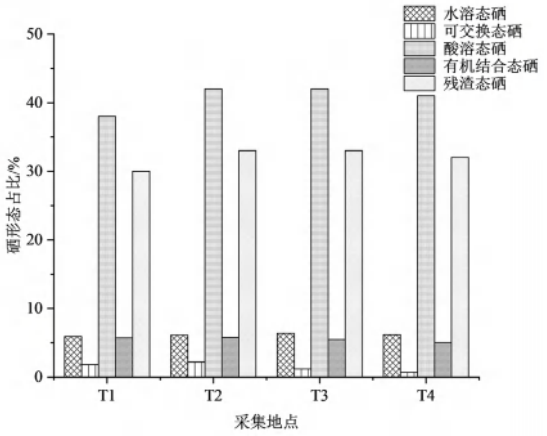

图 1 滁菊生长根际土壤中硒的 5 种赋存形态在硒中的占比

Fig 1 Proportion of 5 occurrence forms of selenium in selenium of Chuju growing in rhizosphere soil

2.9 滁菊植株不同器官中硒的富集系数

以滁菊植株不同器官硒的含量与根际土壤硒的含量之比作为富集系数，结果见表 3。对于同一滁菊植株，不同器官对土壤中的硒均有一定的吸收富集，富集能力由高到低依次为：花序＞叶＞根＞茎。不同产区滁菊植株相同器官对硒的富集系数相差较大，富集系数南谯区＞琅琊区。

表 3 滁菊植株不同器官硒的富集系数

Tab 3 Enrichment coefficients of selenium in different parts of Chuju plants

No.	根	茎	叶	花序
CJ1	0.46^{c}	0.41^{d}	0.54^{c}	0.57^{b}
CJ2	0.53^{d}	0.31^{c}	0.64^{d}	0.67^{c}
CJ3	0.16^{a}	0.14^{b}	0.28^{b}	0.29^{a}
CJ4	0.21^{b}	0.10^{a}	0.26^{a}	0.27^{a}

注：同一列不同小写字母表示差异具有统计学意义，$P < 0.05$。

Note：Lowercase letters in the same column indicate significant differences，$P < 0.05$.

2.10 滁菊植株不同器官硒含量与根际土壤各形态硒含量的相关性

采用 SPSS 26.0 软件，对滁菊植株不同器官中硒的含量和滁菊生长根际土壤各形态硒的含量进行 Pearson 相关性分析，结果见表 4。滁菊花序和叶中硒含量与根际土壤中水溶态硒、可交换态硒和有机结合态硒含量均成显著性正相关（$P < 0.05$）；滁菊根中的硒含量与根际土壤中水溶态硒含量成显著性正相关（$P < 0.05$）；滁菊茎中的硒含量与根际土壤中有机结合态硒含量成显著性正相关（$P < 0.05$）；而滁菊不同器官硒含量与根际土壤硒含量无相关性。

表 4 滁菊植株不同器官硒含量与根际土壤各形态硒含量的相关性

Tab 4 Correlation between selenium content in different parts of Chuju plants and various forms of selenium content in rhizosphere soil

器官	水溶态硒		可交换态硒		酸溶态硒		有机结合态硒		残渣态硒		硒	
	r 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值
根	0.987*	0.013	0.935	0.065	0.427	0.573	0.947	0.053	0.353	0.647	0.934	0.066
茎	0.949	0.051	0.869	0.131	0.126	0.874	0.951*	0.049	0.076	0.924	0.943	0.057
叶	0.985*	0.015	0.977*	0.023	0.518	0.482	0.972*	0.028	0.455	0.545	0.889	0.111
花序	0.987*	0.013	0.976*	0.024	0.511	0.489	0.973*	0.027	0.447	0.553	0.893	0.107

注（Note）：*$P < 0.05$。

3 讨论

本研究采用连续浸提技术对滁菊生长根际土壤样品中不同形态的硒进行了提取，测定了 5 种赋存形态硒的含量，5 种形态硒浸提率（赋存形态硒含量之和与根际土壤硒含量的比值）在 81% ～ 89%，其结果与根际土壤硒水平比较接近，表明根际土壤不同形态硒在浸提过程中硒的损失较小。

滁菊植株不同器官硒含量不同，表现为花序＞叶＞根＞茎，花序中硒的含量最高，茎中硒含量最低。这可能有两方面的原因：一方面是由于滁菊植株不同器官对硒的吸收和富集能力不同，导致了植株体内硒的分布不均匀。在整个植株中，花序作为滁菊的药用部分，其对硒的吸收富集能力最强，这与王潇等 [15] 对水稻的研究结果相似。另一方面可能是由于滁菊植株中的硒由根部从土壤中吸收后，迁移转运到了滁菊植株其他器官。茎作为根与叶、花序之间的转运器官，含量最低。胡婷等 [16] 对辣椒不同器官硒含量的分布进行研究，表明辣椒茎中硒含量最低。仰路希等 [17] 对人参菜 [*Talinum paniculatum*（Jacq.）Gaertn] 的研究也表明茎中硒含量最低，与本研究结果一致。

南谯区和琅琊区两个产区，不同滁菊植株相同器官中硒的含量和富集系数相差较大，表现为

南谯区＞琅琊区。这可能受两方面因素的影响：一方面可能受土壤含水量的影响。土壤含水量可通过影响土壤的氧化还原电位进而影响植物对硒的吸收[18]。通常情况下，土壤的氧化还原电位会随着土壤含水量的升高而降低，不利于植物的呼吸和微生物的代谢活动，从而影响了植物对硒的吸收富集。课题组前期调查发现，南谯区根际土壤比琅琊区根际土壤干燥，低水环境更利于滁菊对硒的吸收富集。另一方面可能受土壤 pH 的影响。pH 可通过影响土壤中硒的有效性和溶解度进而影响植物对硒的吸收[19-20]。通常情况下，随着 pH 值的增加，土壤中硒的吸附会由于黏粒矿物和倍半氧化物边缘的正电荷减少而降低，使得环境中硒的流动性得到提升，硒在土壤中的溶解度增大，增加硒的生物有效性。课题组前期研究发现，南谯区根际土壤 pH 值（pH 6.96）比琅琊区土壤 pH 值（pH 6.36）大，南谯区土壤中的硒可能更利于被滁菊植株吸收富集。因此，两个产区滁菊植株硒的含量和富集系数有所差异。

植物中硒的含量与根际土壤硒的赋存形态密切相关。朱磊等[21]对湘西 9 种中药材药用部位中硒含量及其根际土壤硒赋存形态进行分析，表明中药材的硒含量受土壤水溶态硒和可交换态硒含量的影响。王仁琪等[22]通过对水稻中硒的含量与其根际土壤硒赋存形态进行相关性分析，结果表明，水稻中硒的含量不仅与根际土壤中水溶态硒有关，还与根际土壤中有机结合态硒有关。本研究表明，影响滁菊硒含量的主导因子是根际土壤中水溶态、可交换态和有机结合态硒的含量，这 3 种形态的硒作为植物可利用态硒，对于提高滁菊植株中硒的含量具有一定的积极作用。提示在栽培过程中应充分考虑到滁菊对土壤中硒的吸收特点，重点关注土壤中硒元素的生物有效性，可采取适当的农艺手段调节土壤含水量、pH 值等理化性质，增加土壤中有效硒的含量，以提高滁菊中硒的含量。

参考文献

[1] 王德群，刘守金，梁益敏 . 中国菊花药用类群研究 [J]. 安徽中医学院学报，2001，20（1）：45-48.

[2] 苗文娟，何鑫，夏玥，等 . 滁菊多酚氧化酶和过氧化物酶热钝化动力学研究 [J]. 食品研究与开发，2021，42（13）：9-14.

[3] 林慧彬，彭广芳，张素芹，等 . 菊花微量元素的研究 [J]. 时珍国药研究，1998，9（3）：32.

[4] 索艳敏，咎丽霞，王超 . 硒对植物生长作用的研究进展 [J]. 农业技术与装备，2020，364（4）：60-62.

[5] 韩东，杜霞，李林林，等 . 基于 ICP-MS 对肝爽颗粒中 26 种无机元素的分析及质量评价 [J]. 中南药学，2022，20（1）：146-153.

[6] 陈长兰，郇丰宁，孟雪莲，等 . 硒对人体的作用机理及科学补硒方法 [J]. 辽宁大学学报（自然科学版），2016，43（2）：155-168.

[7] 周越，吴文良，孟凡乔，等 . 土壤中硒含量、形态及有效性分析 [J]. 农业资源与环境学报，2014，31（6）：527-532.

[8] 梁帅，朱建新，戴慧敏，等 . 黑龙江拜泉地区硒元素在土壤 - 植物系统中的迁移富集规律 [J]. 地质与资源，2021，30（4）：456-464

[9] 姜磊 . 土壤硒的特征有效性及其影响因素研究 [J]. 绿色科技，2011，（11）：123-125.

[10] Shen J，Jiang CQ，Yan Y F，et al. Selenium distribution and translocation in rice under different naturally seleniferous soils [J]. Sustainability，2019，11（2）：14146-14158.

[11] Song TJ，Su XS，He J，et al. Selenium uptake and dynamic changes of Se content in soil-plant systems [J]. Environ Sci Pollut Res，2018，25（2）：34343-34350.

[12] 于云霞，史亚东，陈发棣，等 . 亚硒酸钠喷施方式对滁菊富硒效果的影响 [J]. 江苏农业科学，2019，47（2）：131-134.

[13] 俞浩，周国梁，肖新 . 叶面喷施亚硒酸钠对滁菊品质及抗氧化酶活性的影响 [J]. 中药材，2017，40（3）：540-542.

[14] 吴少尉，池泉，陈文武，等 . 土壤中硒的形态连续浸提方法的研究 [J]. 土壤，2004，36（1）：92-95.

[15] 王潇，张震，朱江，等 . 青阳县富硒土壤中硒的形态与水稻富硒的相关性研究 [J]. 地球与环境，2019，47（3）：336-344.

[16] 胡婷，李文芳，向昌国，等 . 硒对常见蔬菜种子萌发的影响及在植株中的分布 [J]. 食品科学，2015，36（7）：45-49.

[17] 仰路希，谢永东，贺忠群 . 施硒对人参菜生长及生理特性的影响 [J]. 西北植物学报，2019，39（9）：1636-1641.

[18] 王伟 . 藜蒿在湿地生境下吸收富集砷、硒和镉的研究 [D]. 南昌：南昌大学，2014.

[19] 谢薇，杨耀栋，侯佳渝，等 . 天津市蓟州区土壤硒的有效性及影响因素 [J]. 环境化学，2019，38（10）：2306-2316.

[20] 王志强，杨建锋，魏丽馨，等 . 石嘴山地区碱性土壤硒地球化学特征及生物有效性 [J]. 物探与化探，2022，46（1）：229-237.

[21] 朱磊，胡婷，刘德明，等 . 湘西 9 种中药材富硒能力及根际土壤硒形态研究 [J]. 湖南农业大学学报（自然科学版），2019，45（2）：162-165.

[22] 王仁琪，张志敏，晁旭，等 . 陕西省安康市西部稻田土壤硒形态特征与水稻富硒状况研究 [J]. 中国地质，2022，49（2）：398-408.

（收稿日期：2022-11-28；修回日期：2023-02-20）

药品临床综合评价专题

【编者按】

2021 年 7 月 28 日，国家卫生健康委员会印发《关于规范开展药品临床综合评价工作的通知》（国卫办药政发〔2021〕16 号），标志着我国的药品临床应用管理进入新的阶段。国家层面陆续出台了心血管病药物、抗肿瘤药物、儿童用药三大重点领域的技术指南。全国各省正从工作方案、组织管理协调机制建设、课题试点等方面积极推进相关工作。

不同药品管理周期评价侧重点不同，如药监部门在审评审批时关注药品带来的获益是否大于其风险，医保部门在医保目录调整时会额外关注药品经济性，而卫生行政管理部门则需对药品多维价值进行评判以促进临床合理用药。本专题围绕全生命周期管理，提出不同场景下指标选择建议；同时，针对经济性、创新性两个非常重要的维度，比较了不同评价方案；最后，选择 PCSK9 类药品进行实证研究，旨在为相关研究提供参考。

【主持人简介】

李芬，女，博士，副研究员，上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所）卫生政策研究部主任，兼上海市卫生经济学会副秘书长、理事，上海市卫生和健康发展研究中心嘉定分中心执行主任、长宁分中心副主任。主要服务卫生健康领域决策咨询，研究方向为卫生筹资和支付、医院管理和规划、药品管理政策和评估、大数据挖掘，获得上海市卫健委优青、上海市卫健委五四青年奖章。主持国家自然科学基金青年科学基金项目、上海市科委面上和重点项目、国家卫健委科研项目等 100 余项，主编论著 3 本，发表论文 105 篇，获得科研奖项 10 次。

药品临床综合评价中经济性指标设置思考

胡嘉浩，李芬，刘宇晗，金春林*（上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所），上海 200040）

摘要：药品临床综合评价中的经济性是重要的评价维度，但由于药品临床综合评价的决策目标和应用场景广泛，往往需要对多个药品一同进行评估。常见的增量成本效果比并不适合直接纳入综合评价指标体系。本文从基础理论和方法入手，系统介绍经济学评价中基于确定性分析和概率敏感性分析的多方案比较方法及结果解读方式，分析不同方法的优势与缺点，并针对不同的方法作出指标设计的建议，为药品临床综合评价提供参考。

关键词：经济学评价；确定性分析；概率敏感性分析；多方案比较

中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2120-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.025

Economic indexes in clinical comprehensive evaluation of drugs

HU Jia-hao, LI Fen, LIU Yu-han, JIN Chun-lin* (*Shanghai Health Development Research Center* (*Shanghai Medical Information Center*), *Shanghai* 200040)

基金项目：上海市药品监测与临床综合评价专项（No.22Y10001）。

作者简介：胡嘉浩，男，研究实习员，硕士研究生，主要从事药物经济学、药物政策研究，email：hujiahao@shdrc.org *通信作者：金春林，男，研究员，主要从事卫生经济、卫生管理研究，email：jinchunlin@shdrc.org

Abstract: Economy is an important evaluation dimension in clinical evaluation. However, due to the decision-making objectives and application scenarios of clinical comprehensive evaluation of drugs, it is often necessary to evaluate several drugs together. The common incremental cost-effectiveness ratio is not suitable to be directly incorporated into the comprehensive evaluation index system. With basic theory and method, this paper systematically introduced the full incremental analysis and the interpretation method of results based on deterministic analysis and probabilistic sensitivity analysis in economic evaluation, analyzed the advantages and disadvantages of different methods, and provided suggestions for index selection to provide reference for high quality scientific evaluation of drugs.

Key words: economic evaluation; deterministic analysis; probabilistic sensitivity analysis; full incremental analysis

2021 年 7 月，国家卫生健康委员会发布了《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》，重点明确了药品临床综合评价目的、规范流程、内容方法和质量控制等内容，明确技术评价与政策评价两条主线，提出药品临床综合评价应从安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性、可及性等 6 个维度开展[1]。2021 年 12 月 31 日，国家药物和卫生技术综合评估中心（现国家卫生健康委卫生发展研究中心）发布了《心血管病药品临床综合评价技术指南（2021 年版）》（简称“心血管药技术指南”）、《抗肿瘤药品临床综合评价技术指南（2021 年版）》（简称“抗肿瘤药技术指南”）和《儿童药品临床综合评价技术指南（2021 年版）》（简称“儿童用药技术指南”）[2-4]。3 份指南于 2022 年 6 月进行更新。更新后的指南均在经济性维度提出：在进行成本效果分析和成本效用分析时，如仅有 2 个方案则使用增量成本效果（效用）比作为评估结果。但“若存在多个对照方案比较，可参考国际做法以排名形式（League Table）比较干预方案与对照方案间的成本及产出，剔除处于绝对劣势（Dominated）和延伸绝对劣势（Extendedly Dominated）的药品，从剩余药品中根据决策环境选出最具经济性的药品”。鉴于 3 份指南均提出基于多准则决策分析（Multi-Criteria Decision Analysis，MCDA）进行药品临床综合评价，本文将基于 MCDA 的方法学框架和综合评价指南推荐的经济学评价方法，系统介绍相应的理论、方法学基础和操作步骤，并进一步探讨应当如何在药品临床综合评价指标体系中设置经济性维度指标以期为科学合理进行药品临床综合评价提供参考。

1　增量成本效果比简介

药物经济学中，成本效用分析（Cost Utility Analysis，CUA）与成本效果分析（Cost Effectiveness Analysis，CEA）的唯一差异在于结局指标的不同，CEA 使用临床单位衡量健康产出，而 CUA 使用质量调整生命年（Quality-Adjusted Life Years，QALYs）衡量健康产出，因此一般可认为 CUA 是一种特殊形式的 CEA，以下统称为 CEA[5]。

CEA 的结果为增量成本效果比（Incremental Cost Effectiveness Ratio，ICER），其计算公式为：

$$ICER = (C_2 - C_1) / (E_2 - E_1) = \triangle C / \triangle E$$

其中，C_1 是对照干预的成本，E_1 是对照干预的疗效，C_2 是新干预措施的成本，E_2 是新干预措施的疗效。

对照干预一般选择为最优替代方案。在仅有 2 个干预措施的情况下，ICER 越小（正值情况下）即代表新干预措施越具有经济性，但在有多个干预措施时，ICER 最小的干预措施并不是最经济的。以下通过 1 例说明：假设目前有 3 种干预措施，其成本和 QALYs 如表 1 所示。

表 1　假设的 3 种干预措施的成本与 QALYs

Tab 1　Costs and QALYs of 3 assumed interventions

干预措施	成本 / 元	QALYs
空白对照	0	0
A	404	0.146
B	6124	2.107

其中 $ICER_{A\text{-}空白}$（2767.12）＜ $ICER_{B\text{-}空白}$（2906.50）＜ $ICER_{B\text{-}A}$（2916.88），但并不能简单认为干预 A 是“最经济的”干预措施，因为干预 B 带来的健康获益远超干预 A。$ICER_{B\text{-}A}$ 与 $ICER_{A\text{-}空白}$ 较为接近，究竟哪个方案更为经济需要结合支付意愿（Willingness To Pay，WTP）进行确定。

药品临床综合评价往往对针对某一适应证或某一治疗领域内的一类或多个药品进行评价，在多方案比较时无法根据 ICER 直接判断各个方案的经济性，因此更无法将 ICER 直接作为指标纳入药品临床综合评价指标体系。从方法学上来

讲，ICER 是需要进行解释后方能使用。尤其是存在多个干预方案时需要进行多方案比较（Full Incremental Analysis），即指南中提到的排名形式，多方案比较的详细操作将在下文进行介绍。

不建议根据 ICER 直接判断经济性或直接纳入指标体系的另一个原因是，药物经济学评价中涉及了药品的有效性、安全性与费用信息，前两类信息在安全性和有效性维度已有体现，在 MCDA 方法学框架下恐违背指标设立时与应当遵循的不“重复计算”（Double Counting）原则相违背 [6]。

2 ICER 运用方法简介

2.1 多方案比较

进行多方案比较的前提是：如使用药物经济学模型进行经济学评价，多个方案需要使用同一药物经济学模型进行建模以评估其成本及健康产出，也就是说不可使用来源于不同模型的多个干预措施的产出进行比较，主要是因为不同模型间的结构、假设、参数不同会造成结果不具有可比性。如直接计算 ICER 则不存在上述前提。现举例介绍多方案比较的操作流程，假设有以下 8 种干预措施（即表 2 中的空白对照以及干预方案 A ～ G），其使用同一药物经济学模型产出的成本和 QALYs 如表 2 所示。

由于药物经济学对照干预的选择为最优替代方案，首先对此 8 种干预措施按照健康产出即 QALYs 从小到大的顺序进行排序，“排名形式”见表 3。

表 2 进行多方案比较的 8 种干预措施的成本与 QALYs

Tab 2 Costs and QALYs of 8 interventions by full incremental analysis

干预措施	成本 / 元	QALYs
空白对照	0	0
A	704	0.146
B	6124	2.107
C	2159	2.210
D	2853	0.055
E	8820	3.045
F	7475	0.572
G	9996	0.504

表 3 8 种干预措施按 QALYs 从小到大进行排序后的结果

Tab 3 Eight interventions ranked by QALYs results

干预措施	成本 / 元	QALYs
空白对照	0	0
D	2853	0.055
A	704	0.146
G	9996	0.504
F	7475	0.572
B	6124	2.107
C	2159	2.210
E	8820	3.045

排序后，对这些干预方案进行两两比较，如前一种干预措施的费用高于后一种则将前一干预措施剔除，理由是这些干预措施效果较差且成本更高，为处于绝对劣势的干预措施。在本例中，干预措施 B、D、F、G 需要进行剔除。也可根据成本效果平面（Cost Effectiveness Plane）按照从左至右的顺序进行两两比较，如果左侧点在右侧点上方则进行排除，理由同上。本例的成本效果平面见图 1，其中红色代表绝对劣势的方案。

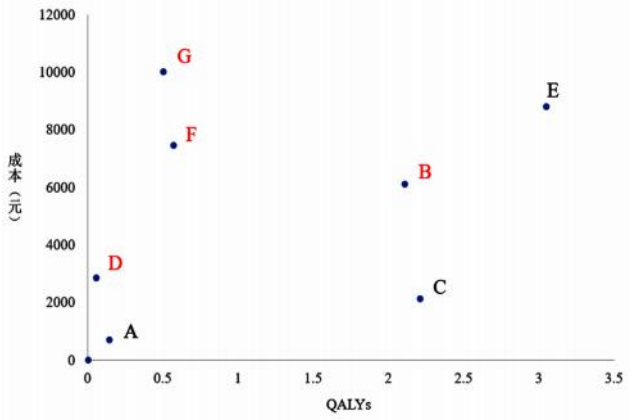

图 1 8 种干预方案的成本效果平面图

Fig 1 Cost-effectiveness of the eight interventions

排除绝对劣势方案后，按照顺序计算相邻干预措施间的 ICER 值，见表 4。可见 $ICER_{A\text{-空白对照}}$（4821.92）＞ $ICER_{A\text{-}C}$（704.94），则干预措施 A 称之为“扩展绝对劣势”或“延伸绝对劣势”的干预措施，因为空白对照和干预措施 C 的组合会比干预措施 A 效果更好且成本更低。借助成本效果平面可更好地理解，空白对照和干预措施 C 的组合的费用和健康产出必定在空白对照与 C 点的连线上，而 A 点高于连线，因此进行排除。至此，仅剩下干预措施 C 和干预措施 E，$ICER_{E\text{-}C}$ 为 7977.25，如其高于 WTP 则干预措施 C 为本例中一系列干预措施中最经济的，反之则干预措施 E 为最经济的。此时，“零点”与干预措施 C 的连线和干预措施 C 与干预措施 E 的连线称为“成本效果边界”（Cost Effectiveness Frontier）。具体情况见图 2。

表 4 排除绝对劣势干预措施后 ICER

Tab 4 ICERs between interventions after excluding the absolute disadvantaged option interventions

干预	成本 / 元	QALYs
空白对照	0	0
A	704	0.146
C	2159	2.210
E	8820	3.045

根据多方案比较的方法，可在多方案中排除绝

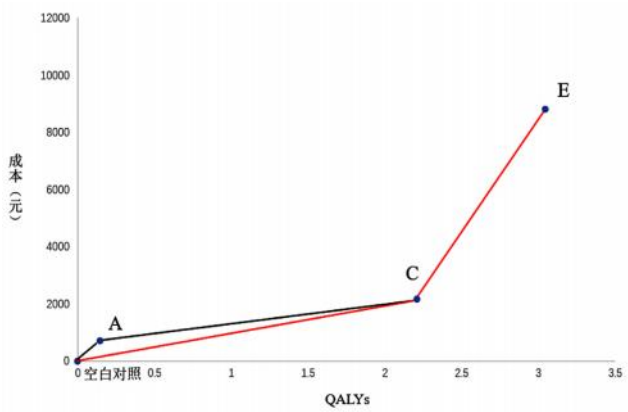

图 2　本例中排除绝对劣势方案后的成本效果平面

Fig 2　Cost-effectiveness after excluding the dominated interventions in this case

注：A、C、E 为 8 种干预方案中排除绝对劣势方案后剩余的方案。

Note：A，C，and E are the remaining options after excluding the absolute disadvantaged option among the eight intervention options.

对劣势和扩展绝对劣势的方案。如采用此法，根据决策目标的不同可设计指标如“是否为绝对劣势和扩展绝对劣势的药品”“是否为最有经济性的药品”。前一指标可排除这些方案中明显在经济性方面较差的药品，剩余药品皆认为较有经济性；后一指标则直接选出方案中最具有经济性的一个。但多方案比较的劣势在于无法对于所有方案经济性优劣作出明确区分。以下将介绍其他方法以弥补该劣势。

2.2　净效益法（Net Benefit Approach）

准确测量 ICER 是比较新的干预措施或研究关注的干预措施与所有相关替代方案的重要步骤。使用不恰当的对照组可能会导致偏倚或产生误导性的结果。净效益法是可替代 ICER 的一种方法，其核心为建立成本与效果之间的转化，转化比例定义为 λ，亦为 WTP[7]。净效益可分为净健康效益（Net Health Benefit，NHB）和净货币效益（Net Monetary Benefit，NMB），其计算公式分别为：

$$NHB = E - C/\lambda$$

$$NMB = E \times \lambda - C$$

E 为干预措施的效果，C 为干预措施的成本，λ 为 WTP。

无论是 NMB 还是 NHB，最具成本效果的干预为净效益最高的干预措施。但使用净效益法的最大问题在于 λ 的不确定性。如使用净效益法，建议在药品临床综合评价中经济性维度设置的指标为：“净效益高低的排序”，排序越高，则代表净效益越好，方案越具有经济性。不使用具体净效益值的考量为弱化 λ 不确定性的影响。

2.3　基于概率敏感性分析的方法

成本效果可接受曲线（Cost Effectiveness Acceptability Curve，CEAC）由 Van Hout 等[8]于 1994 年提出，近年来已在药物经济学评价中广泛使用。CEAC 的原理为根据药物经济学模型概率敏感性分析中蒙特卡洛模拟的结果，判定在不同 WTP 下不同干预措施具有成本效果的概率。CEAC 曲线的横轴为支付意愿，纵轴为具有成本效果的概率，具有成本效果的概率通过计算单次模拟下不同方案的净效益得到。

成本效果可接受边界（Cost Effectiveness Acceptability Frontier，CEAC）与 CEAC 原理类似，但其反映的并不是多种干预在不同意愿支付值下具有经济性的概率，而是具有最高期望净效益的技术，并对其进行标记，其蕴含信息较 CEAC 更多，CEAF 中不同方案的切换点为 ICER，推导如下：

若此时意愿支付值为 λ^*，则

$$\overline{NBM}1 = \overline{NBM}_2$$

$$\overline{E}_2\lambda^* - \overline{C}_2 = \overline{E}_1\lambda^* - \overline{C}_1$$

$$\overline{E}_2\lambda^* - \overline{E}_1\lambda^* = \overline{C}_2 - \overline{C}_1$$

$$\lambda^* = (\overline{C}_2 - \overline{C}_1)/(E_2 - \overline{E}_1) = ICER$$

图 3 和图 4 为通过同一数据源绘制的 CEAC 和 CEAF。

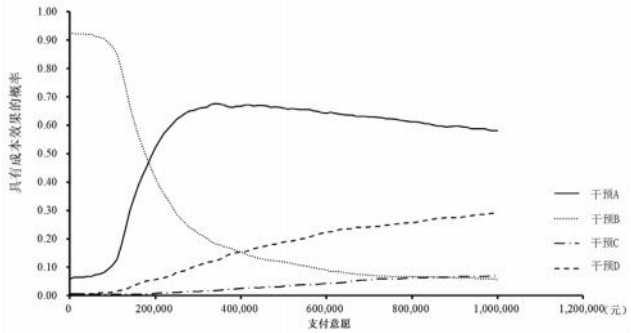

图 3　成本效果可接受曲线样图（CEAC）

Fig 3　Acceptable curve of cost effective

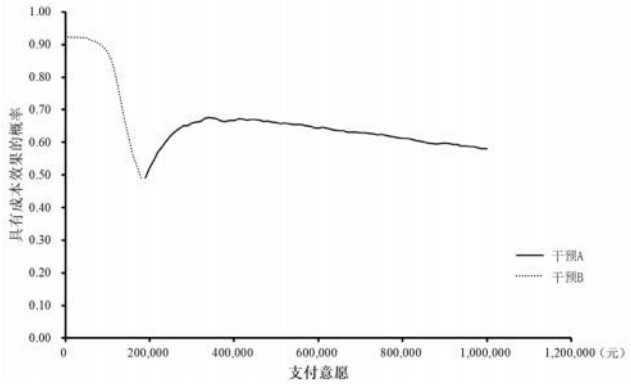

图 4　成本效果可接受边界样图（CEAF）

Fig 4　Acceptable frontier of cost effective

如基于概率敏感性分析评估药品经济性，建议在药品临床综合评价中经济性维度设置的指标为“在

特定支付意愿下（由决策者决定）各方案具有成本效果的可能的排序”。笔者不建议使用“特定支付意愿下各方案下具体的概率”作为指标，因为概率敏感性分析的结果受各参数分布的选取、分布参数的设置及蒙特卡洛模拟次数的影响，具体到概率可能受主观因素影响较大，进而影响综合评价整体结果。

3 讨论

本文针对现在药品临床综合评价经济性维度指标设计存在的空白和问题进行了初步探索和思考。

3.1 经济性维度指标的设计

经济性评估主要用于评价资源消耗与临床疗效的性价比，因此，仅纳入成本数据是不够的，该维度也不能再被称之为“经济性”。在药品临床综合评价中进行经济学评价是唯一且必要的选择。但经济学评价最重要的结果之一的 ICER 不可直接作为指标纳入，会导致整个综合评价结果出现偏差。

3.2 3 种经济学评价结果方法的优劣

按前文所述，必须要对经济学评价结果进行解读才能作为指标纳入指标体系。本文介绍了 3 种不同方法，各有优劣：

多方案比较的方法较为常规，其基于药物经济学的确定性分析的结果，操作相对而言较为简便。但缺点在于药物经济学评价中往往具有各类不确定性，包括方法学不确定性、参数不确定性以及模型不确定性等 [9]，仅使用确定性分析的结果忽略了对各类不确定性的量化结果，是对药物经济学评价的不完全的解读。使用多方案比较方法设计的指标充分考虑了多方案比较的方法学步骤，可在多种药品之间进行区分。

净效益法相较于多方案比较的方法更为简便，无需按步骤对多种方案进行剔除，直接按照 WTP 计算各方案的 NMB 或 NHB 即可，但难点在于确定 WTP 的取值，目前学界对于 WTP 没有明确的共识，《中国药物经济学评价指南》将 WTP 定为 1 ～ 3 倍人均国内生产总值的情况下，使用本法应当慎重。

CEAC 和 CEAF 方法学最为可靠，且可以最大可能地弥补前两种方法的缺陷，即可以量化药物经济学评价的不确定性，且不需要确定 WTP，可供决策者自由选择 WTP 并得到较为直观且容易理解的证据，建议优先使用。但该方法的缺点在于技术难度较高，需要规范的建模和药物经济学专业人员参与。

药品临床综合评价各参与主体可根据自身实际情况自行于 3 种方法中选择运用，并根据本文建议在经济性中设置相应指标。

4 总结

药品临床综合评价是药品供应保障决策的重要技术工具，经济性维度对指导资源配置有着重要意义。在各技术指南中，经济性维度相较其余维度没有明确推荐指标，且如何进行评估，学界仍存在争议。建议在可靠的药物经济学方法学基础上，对药物经济学评价结果进行处理和解读，设置相应指标以建立科学规范的药品临床综合评价指标体系。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会，国家卫生健康委办公厅 . 关于规范开展药品临床综合评价工作的通知：国卫办药政发 [2021]16 号 [EB/OL].（2021-07-18）[2022-04-18]. https：//www. nhc. gov. cn/yaozs/s2908/202107/532e20800a-47415d84adf3797b0f4869. shtml.

[2] 国家药物和卫生技术综合评估中心（国家卫生健康委卫生发展研究中心）. 心血管病药品临床综合评价技术指南（2021 年版）[R]. 2021.

[3] 国家药物和卫生技术综合评估中心（国家卫生健康委卫生发展研究中心）. 抗肿瘤药品临床综合评价技术指南（2021 年版）[R]. 2021.

[4] 国家药物和卫生技术综合评估中心（国家卫生健康委卫生发展研究中心）. 儿童药品临床综合评价技术指南（2021 年版）[R]. 2021.

[5] Edlin R，McCabe C，Hulme C，et al. Cost effectiveness modelling for health technology assessment：a practical course [M]. Springer Int Publ Switz，2016.

[6] Marsh K，Ijzerman M，Thokala P，et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making-emerging good practices：report 2 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force [J]. Value in Health，2016，19（2）：125-137.

[7] Stinnett A，Mullahy J. Net Health benefits：a new framework for the analysis of uncertainty in cost effectiveness analysis [J]. Med Decis Making，2018，18（2 Suppl）：S68-S80.

[8] Van Hout BA，AL MJ，Gordon GS，et al. Costs，effects and C/E-ratios alongside a clinical trial [J]. Health Economics，1994，3（5）：309-319.

[9] 《中国药物经济学评价指南》编写组 . 中国药物经济学评价指南 2019 版 [EB/OL].（2021-07-18）[2022-04-18]. https：//proa28198. pic40. websiteonline. cn/upload/0ikw. pdf.

（收稿日期：2022-10-26；修回日期：2023-05-29）

PCSK9 抑制剂用于降脂治疗的临床综合评价——基于多准则决策分析法

刘宇晗，胡嘉浩，朱碧帆，潘星明，金春林，李芬*（上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所），上海　200040）

摘要：血脂异常是心血管疾病的重要危险因素，PCSK9 类抑制剂为一类新的降脂药物，可有效降低低密度脂蛋白胆固醇并预防心血管事件的发生。本研究旨在从促进合理用药角度出发，基于多准则决策分析方法，从安全性、有效性、经济性、适宜性、可及性五个维度对依洛尤单抗和阿利西尤单抗进行评价。根据相关指南建立临床综合评价指标体系，使用德尔菲法对指标体系进行修改和赋权。通过文献综述、网状 meta 分析和专家咨询搜集整合两药品在各维度的信息和证据，通过客观绩效得分标化法处理两药品在指标下得分并纳入指标体系进行计算。结果显示依洛尤单抗各维度得分均高于阿利西尤单抗，该结果在敏感性分析中保持一致。建议可优先使用依洛尤单抗以提升合理用药水平。

关键词：血脂异常；PCSK9 抑制剂；药品临床综合评价；合理用药
中图分类号：R972.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2125-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.026

Clinical comprehensive evaluation of PCSK9 inhibitors for lipid-lowering therapy-based on multi-criteria decision analysis

LIU Yu-han, HU Jia-hao, ZHU Bi-fan, PAN Xing-ming, JIN Chun-lin, LI Fen* (*Shanghai Health Development Research Center* (*Shanghai Medical Information Center*), *Shanghai* 200040)

Abstract: Dyslipidemia is an important risk factor of cardiovascular diseases. PCSK9 inhibitors are a new class of lipid-lowering drug, which can effectively reduce the density lipoprotein cholesterol and prevent the occurrence of cardiovascular events. To promote rational drug use, this study aimed to evaluate evolocumab and alirocumab from five dimensions (safety, effectiveness, economy, suitability and accessibility) based on multi-criteria decision analysis. The clinical comprehensive evaluation index system was established according to related guidelines, and the Delphi method was used to modify and empower the index system. Information and evidence of the two drugs in various dimensions were collected and integrated through literature review, network meta-analysis and expert consultation. The scores of the two drugs under the indicators were processed by the objective performance scoring method and included in the index system for calculation. The scores of all dimensions of evolocumab were higher than those of alirocumab, which remained consistent in the sensitivity analysis, suggesting preference of evolocumab.

Key words: dyslipidemia; PCSK9 inhibitor; clinical comprehensive evaluation; rational drug use

2018 年，心血管病造成的死亡占总体死亡的 40%[1]。血脂异常（dyslipidemia）是心血管疾病的重要危险因素，近年来血脂异常及相关疾病的发生率逐年增加 [2-3]。

血脂异常在动脉粥样硬化性心血管疾病（atherosclerotic cardiovascular disease，ASCVD）的发生和发展中起主要作用 [4]。目前已有大量研究证实低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein

作者简介：刘宇晗，男，硕士研究生，主要从事药物经济学、药物政策研究，email：liuyuhan@shdrc.org　*通信作者：李芬，女，副研究员，主要从事药物经济学、药物政策研究，email：lifen@shdrc.org

cholesterol，LDL-C）水平与心血管事件风险相关[5]，有研究表明 LDL-C 每下降 1 mmol·L^{-1}，3 ～ 4 年 ASCVD 风险下降 22%[6]，因此血脂异常的治疗主要以降低 LDL-C 为主。

他汀类药物作为一线降 LDL-C 类药物，目前在临床中已被广泛使用，临床研究显示，单独使用他汀类药物时患者 LDL-C 降幅可达 30% ～ 50%[7]，但他汀类药物每增加 1 倍的剂量仅能进一步增加 6% 的 LDL-C 降幅，且大剂量存在不良反应明显增加的风险。因此他汀类药物在我国患者中的实际效果并不理想，中国血脂异常调查研究显示，中国患者经他汀类药物治疗后 LDL-C 达标率仅为 31%[8]。约 2.3 亿血脂异常的中国患者在他汀类药物治疗后出现不耐受、不达标的情况。

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（proprotein convertases subtilisin/kexin type 9，PCSK9）基因靶点的发现及创新靶向药物的研发对于解决 ASCVD 的残余风险具有里程碑意义。PCSK9 抑制剂不仅能显著降低各类 ASCVD 患者的 LDL-C 水平（降幅 59%[9]），稳定、逆转冠状动脉斑块，减少心血管事件发生，且对于心血管风险越高的人群获益越大[10]。目前 PCSK9 抑制剂依洛尤单抗及阿利西尤单抗已分别于 2018 年和 2019 年在我国上市，并于 2021 年一同进入国家基本医保目录。

药品临床综合评价是药品供应保障决策的重要技术工具，可在促进药品回归临床价值及促进医疗机构合理用药方面发挥重要的抓手作用[11]。鉴于目前我国高胆固醇血症患者治疗后达标率差的现状，本研究对已上市的两种 PCSK9 抑制剂依洛尤单抗和阿利西尤单抗用于降脂治疗开展药品临床综合评价，以期为各级医疗机构管理和使用药物提供参考依据，进一步促进合理用药。

1 方法

本研究拟在优先使用哪种 PCSK9 抑制剂的决策背景下，基于已发表文献及公开数据，基于多准则决策分析方法（multiple criteria decision analysis，MCDA）进行快速药品临床综合评价。

1.1 指标体系的构建

本文根据《心血管药品临床综合评价技术指南（2021 年版）》（简称《指南（2021 版）》）的要求，并结合 PCSK9 抑制剂的特点，初步构建 PCSK9 抑制剂类药品临床综合评价指标池。形成初步指标池后，邀请来自卫生行政部门、医保部门、药监局、医疗机构、高校和科研机构的专家，对指标池中的备选指标进行增补、修改和删除。使用克隆巴赫系数对问卷进行信度分析。以指标的重要性和可行性为判定系数，应用界值法，对两指标的算数平均数、标准差和变异系数等进行判定。并结合各专家的意见对指标进行修改、删除、增加或合并，直至专家意见趋于一致（肯德尔协调系数＞ 0.4），形成最终指标体系。最后，使用层次分析法（analytic hierarchy process，AHP）对指标体系的六个维度下的二、三级指标进行赋权。

1.2 各维度评价方法

根据前期构建的指标体系，对依洛尤单抗和阿利西尤单抗相关维度、指标等信息进行检索。

1.2.1 有效性评价 有效性与安全性维度主要采用贝叶斯网状 meta 分析对已发表的随机对照试验（randomized controlled trial，RCT）研究结果进行合并，定量比较依洛尤单抗、阿利西尤单抗治疗高胆固醇血症的有效性。

1.2.2 安全性评价 根据《指南（2021 版）》安全性评价指标选择的要求，本文将从定性指标和定量指标两方面分析依洛尤单抗和阿利西尤单抗安全性方面的差异，其中定性指标根据药品使用说明书分析两者在禁忌证、注意事项、药物相互作用及药物过量等方面的差异；定量指标根据已发表文献中报道的不良反应发生率和严重不良反应发生率进行评价。

1.2.3 经济性评价 两种药品均已被纳入国家基本医保目录，其经济性已经得到普遍认可。故本研究对两药的经济性评价采取简化处理，用增量成本效果比[12]（incremental cost effectiveness ratio，ICER）指标来比较两者的经济性，公式如下：

$$ICER=\frac{\Delta C}{\Delta E}=\frac{C_1-C_2}{E_1-E_2}$$

其中 C_1、C_2 分别表示依洛尤单抗及阿利西尤单抗的年治疗费用；E_1、E_2 分别表示依洛尤单抗及阿利西尤单抗的 LDL-C 降幅。

1.2.4 适宜性评价 适宜性和可及性维度采用专家访谈法和文献研究法获取两种药品的相关信息。其中适宜性评价采用专家访谈法，从药品技术适宜性和药品使用适宜性两个层面进行评估，评价结果使用描述性统计进行分析。

1.2.5 可及性评价 可及性评价的指标为医疗机构配备率与年治疗负担。医疗机构配备率的数据来源于中国药学会的全国医药经济信息网。年治疗负担计算方式为药品年治疗费用 / 中国家庭平均年支出。

1.3 MCDA

MCDA 可对多种相互冲突、不可公度的准则进行综合考量[13]。在卫生决策领域应用最广的是基于价值测量法的 MCDA[14]，具有结果可视化程度高，

易于理解，较容易进行不确定性分析的特点[13]。

为减少专家主观打分的不确定性，本研究采用客观绩效得分相对标化法，客观绩效得分为药品在各指标下的原始数据，负向指标（即数字越大代表表现越差，例如 1、2 级不良反应发生率）采用定量数据的倒数作为原始数据。部分定性指标通过描述性统计结果转换为客观绩效得分，以“是否有特殊储存条件”为例，认为依洛尤单抗有特殊储存条件的专家占有效问卷的比例为原始绩效得分。二分类指标（只能判定优劣的指标）对于“优”“劣”分别赋原始绩效得分为 1 和 0。相对标化公式如下[15]：

$$S_{aj}=\frac{X_{aj}}{\sqrt{X_{aj}^2+X_{bj}^2}}\times 100$$

$$S_{bj}=\frac{X_{bj}}{\sqrt{X_{aj}^2+X_{bj}^2}}\times 100$$

其中：S_{aj} ＝标化后 a 选项在 j 准则上的得分；S_{bj} ＝标化后 b 选项在 j 准则上的得分；X ＝原始绩效得分。

2　结果

2.1　临床综合评价指标体系

在维度选择方面，由于依洛尤单抗和阿利西尤单抗为同一机制的药品，上市时间相近、适应证相近，无明显区分，药品给药途径一致，给药间隔一致，主要临床疗效、安全性等患者获益已于安全性、有效性维度有所体现，故本研究不对两者创新性进行评价。结合《指南（2021 版）》以及专家建议，本研究形成了包含 5 个维度、14 个二级指标、18 个三级指标的初版指标池。经德尔菲法，删去一个三级指标“药品包装是否合适”。最后一轮德尔菲法时，专家权威系数达到 0.82，权威性较高；问卷信度较好，克隆巴赫 α 系数为 0.864；专家意见一致性较高，肯德尔协调系数为 0.412（$P<0.01$）。经层次分析法对各级指标进行赋权后的指标体系见表 1。

2.2　各维度评价结果

2.2.1　有效性　通过系统检索 Embase、Medline、中国知网、万方、维普等数据库，检索词包括依洛尤单抗、阿利西尤单抗、LDL-C、心肌梗死、卒中、不良反应等。截止时间为 2022 年 3 月 27 日。纳入标准：① 研究对象为接受过他汀类药物或依折麦布治疗后，LDL-C 仍未达标的高脂血症患者；② 干预措施为依洛尤单抗或阿利西尤单抗；③ 研究类型为 RCT；④ 结局指标为心血管事件发生率、LDL-C 下降水平、血脂达标率、斑块成分变化、斑块容积变化、不良反应发生率；⑤ 排除标准研究对象为特殊人群或合并严重疾病。

具体检索流程如图 1 所示。针对他汀类药物治疗后不佳的高胆固醇血症共得到有效性维度相关文献 2846 篇，经筛选后纳入 27 篇文献[9, 16-41]。应用 Cochrane 协作网偏倚风险评估工具对纳入的 RCT 研究进行质量评价[42]，风险评估结果见图 2，总体来看研究的偏倚风险均较低。

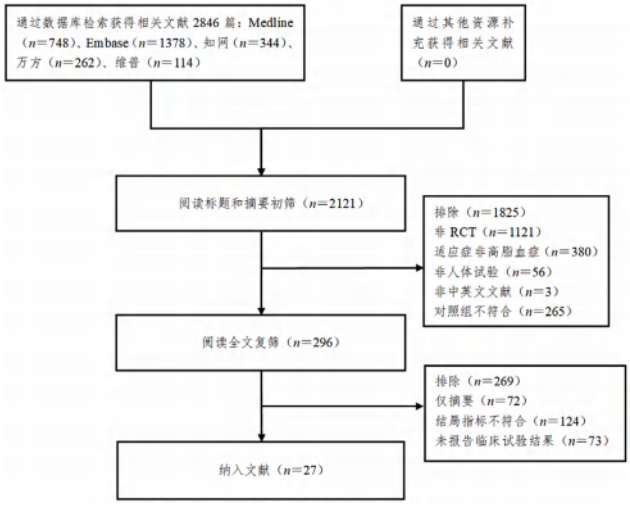

图 1　文献检索流程图

Fig 1　Flow diagram of the study selection process

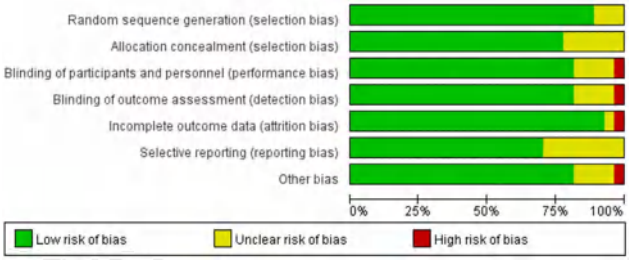

图 2　偏倚风险图

Fig 2　Summary of risk of bias

根据文献提取结果，对 LDL-C 降幅、主要心血管不良事件（major adverse cardiovascular events，MACE）发生率两个指标进行网状 meta 分析。根据森林图及联赛表的结果显示，依洛尤单抗与阿利西尤单抗在 LDL-C 降幅指标上存在显著差异，依洛尤单抗 LDL-C 降幅为 60%，阿利西尤单抗为 51%。在 MACE 发生率方面，依洛尤单抗相比较安慰剂的 *OR* 值为 0.85，阿利西尤单抗为 0.84，两者不存在显著性差异，见图 3 及表 2、表 3。

2.2.2　安全性　在定性指标方面，依洛尤单抗和阿利西尤单抗在禁忌证、药物相互作用和药物过量方面无差异，在特殊人群用药方面，依洛尤单抗在儿童患者和肾功能不全患者方面有更多的数据支持其在两类患者中使用的安全性，相比之下基于阿利西尤单抗目前的药品使用说明书来看，

表 1 PCSK9 抑制剂临床综合评价指标库

Tab 1 Comprehensive evaluation index library of PCSK9 inhibitors

一级指标	一级指标权重 /%	二级指标	三级指标	三级 / 二级指标权重 /%
安全性	29.07	1 ～ 2 级不良反应发生率	—	7.71
		3 ～ 5 级不良反应发生率	—	11.90
		中和抗体发生情况	—	3.21
		特殊人群用药		6.25
有效性	29.17	LDL-C 降幅	—	19.45
		心血管事件发生率	—	9.72
经济性	16.74	是否为（延伸）绝对劣势药品	—	16.74
适宜性	10.77	药品技术适宜性	药品包装标签标注的完整性	0.23
			药品说明书是否满足临床处方需求	0.35
			给药途径或剂型是否适宜使用	0.23
			是否有特殊的存储条件	0.11
			是否需要特殊装置	0.14
			用药后是否需要监测或随访服务	1.08
			用药依从性	1.46
		药品使用适宜性	临床使用是否存在超说明书适应证使用的情况	0.67
			超药品说明书用药是否有充分理由	0.34
			药品疗效是否精准针对适应证	0.68
			药品用量是否适宜患者的年龄、体重、体表面积和身体状况	0.33
			给药时间点是否有限制	0.34
			给药时间间隔是否适宜	0.39
			用药疗程长短是否符合患者、疾病、药品特点	0.65
			患者用药是否容易出现不耐受的情况	2.05
			药物 - 药物相互作用或药物 - 食物相互作用是否给处方带来限制	0.90
			用药是否容易准确排除禁忌证	0.81
可及性	14.25	医疗机构药品配备使用情况	—	9.50
		年费用负担	—	4.75

表 2 各药物之间比较 LDL-C 降幅联赛表

Tab 2 LDL-C reduction for various drugs

组别	Diff（95%*CI*）			
干预组	阿利西尤单抗			
	0.088（0.005，0.1802）	依洛尤单抗		
	－0.303（－0.382，－0.223）	－0.392（－0.4946，－0.2878）	依折麦布	
对照组	－0.507（－0.5754，－0.4397）	－0.595（－0.6701，－0.5198）	－0.204（－0.2993，－0.1096）	安慰剂

表 3 各药物之间比较 MACE *OR* 值联赛表

Tab 3 MACE *OR*

组别	*OR*（95%*CI*）		
干预组	阿利西尤单抗		
	0.9985（0.67，1.32）	依洛尤单抗	
对照组	0.8401（0.60，1.06）	0.8496（0.68，1.1）	安慰剂

表 4 各药物之间比较 1 ～ 2 级不良反应 *OR* 值联赛表

Tab 4 1 ～ 2 grade adverse events

组别	*OR*（95%*CI*）		
干预组	阿利西尤单抗		
	1.07（0.79，1.34）	依洛尤单抗	
	1.07（0.83，1.31）	0.82（0.65，6.36）	依折麦布
对照组	1.06（0.79，1.33）	1.00（0.59，5.61）	1.42（0.59，5.63） 安慰剂

表 5 各药物之间比较 3 ～ 5 级不良反应 *OR* 值联赛表

Tab 5 3 ～ 5 grade adverse events

组别	*OR*（95%*CI*）		
干预组	阿利西尤单抗		
	1.12（0.79，6.45）	依洛尤单抗	
	0.93（0.73，4.31）	1.00（0.65，1.36）	依折麦布
对照组	1.20（0.66，2.80）	0.99（0.96，1.03）	0.99（0.64，1.34） 安慰剂

该药品在儿童患者和肾功能不全患者中的安全性证据尚不充分，有待进一步证据加以证明。

在定量指标方面，针对 1～2 级不良反应发生率、3 ～ 5 级不良反应发生率两个指标的网状 meta 分析结果如图 4 所示，尽管阿利西尤单抗的 1 ～ 2 级不良反应发生率和 3 ～ 5 级不良反应发生率方面均高于依洛尤单抗，但两者差异不存在统计学意义，见表 4 及表 5。安全性结果汇总见表 6。

2.2.3 经济性 依洛尤单抗和阿利西尤单抗的单价分别为 283.8 元和 306 元，按每月两支计算，年治疗费用分别为 7378.80 元和 7956.00 元。依洛尤单抗 LDL-C 降幅为 60%，阿利西尤单抗为 51%。计算得 ICER 值为－ 64.13 元 /%。依洛尤单抗相比较

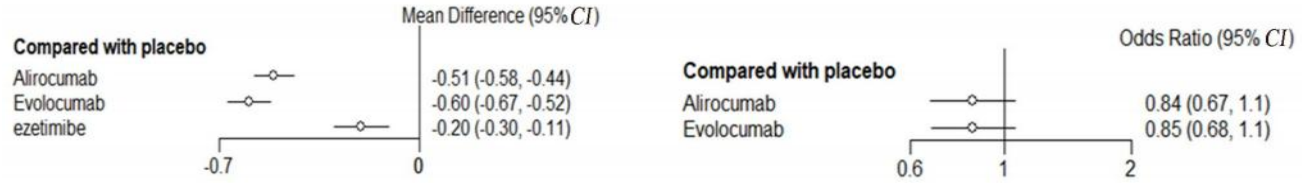

图 3　各治疗方案与安慰剂对比 LDL-C 降幅（左）与 MACE 发生率（右）森林图

Fig 3　Effect of PCSK9 on percent change of LDC-C from baseline（left）and the risk of MACE（right）

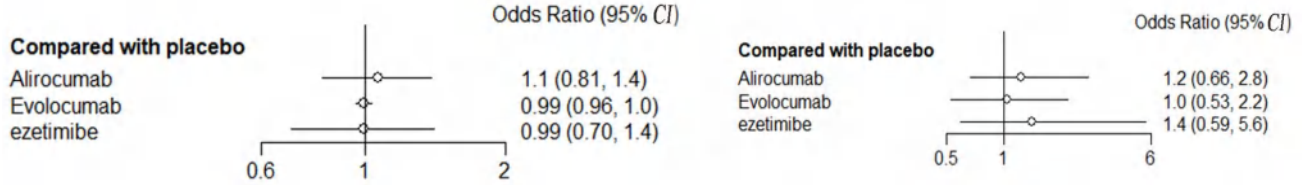

图 4　各治疗方案与安慰剂对比 1 ～ 2 级不良反应发生率（左）与 3 ～ 5 级不良反应发生率（右）

Fig 4　1 ～ 2 grade（left）and 3 ～ 5 grade（right）adverse events of PCSK9

与阿利西尤单抗成本更低，效果更好，经济性优于阿利西尤单抗。

2.2.4　适宜性　本研究通过问卷调查的形式对 PCSK9 抑制剂的适宜性进行分析。共咨询 10 位临床专家，90% 来自三级医疗机构、40% 为正高级职称、30% 为副高级职称，平均从事本专业年限为 19.7 年。

问卷调查结果中，依洛尤单抗相比阿利西尤单抗的主要差异在于患者耐受性和依从性两方面，见表 7。结果表明，依洛尤单抗在患者依从性和耐受性方面优于阿利西尤单抗。适宜性各指标得分及标化后结果见表 8。

2.2.5　可及性　在可获得性方面，来自全国医药经济信息网全国 1520 家医院调研结果显示，2021 年依洛尤单抗的医疗机构配备率为 13.62%，阿利西尤单抗为 5.59%，依洛尤单抗的可获得性更高；在可负担性方面，依洛尤单抗和阿利西尤单抗的年治疗费用依洛尤单抗为 7378.80 元，阿利西尤单抗为 7956.00 元，分别占 2021 年我国人均消费支出的 8.11% 和 8.75%，依洛尤单抗具有更好的可负担性。

2.3　MCDA 结果

2.3.1　基础分析结果　综合两类 PCSK9 产品在各个维度上的评价结果，并对结果进行标化，各项指标得分见表 9。整体上，依洛尤单抗在安全性、有效性、经济性、适宜性、可及性 5 个维度的表现均优于阿利西尤单抗。

结合各指标权重对不同维度的评价结果进行汇总，结果显示，在满分为 100 的情况下，依洛尤单抗总分为 63.1，阿利西尤单抗总分为 29.7。

2.3.2　敏感性分析结果　由于二分类指标存在夸大两种药品之间差异的可能性（得分为 0 或 100），为获得稳健性检验结果，本研究对定性指标中打分为 0 的药品赋值为 100 分，并重新计算得分。结果显示，调整两种药品定性指标得分后，依洛尤单抗总分为 63.1 分，阿利西尤单抗总分为 52.9 分，依洛尤单抗仍优于阿利西尤单抗，结果稳健。

3　讨论

综合以上研究结果，依洛尤单抗相比于阿利西尤单抗更适合在医院优先配备和使用。在安全性方面，依洛尤单抗相比较与阿利西尤单抗的主要优势在于特殊人群用药中儿童患者以及肾功能不全患者有更多的证据支持依洛尤单抗的安全性；在有效性方面，通过 meta 分析可知依洛尤单抗 LDL-C 降幅优于阿利西尤单抗，且该指标存在显著差异，在 MACE 指标方面两者降幅相当；在经济性方面，依洛尤单抗年治疗费用更低，效果更好，更具有经济性；在适宜性方面，根据来自临床医师的调研结果来看，依洛尤单抗在患者依从性和耐受性方面优于阿利西尤单抗；在可及性方面，依洛尤单抗的可获得性和可负担性均优于阿利西尤单抗。

目前尚无有关 PCSK9 抑制剂临床综合评价的研究发表。本研究从其他相关研究主要考虑的安全性、有效性、经济性 3 种评估维度外，增加了适宜性与可及性维度进行评价，将各维度评价结果聚合成了一个单一值进行表达，可视化程度高。同时，本研究采用标化绩效得分的方法，避免了传统采用李克特量表进行专家打分方式存在的上下文效应，极值效应及专家出于指标以外的因素进行打分等问题。

本研究的局限性在于使用绩效得分标化存在指标的标化结果和两种药品之间的真实差异毫无关系的特殊情况，从而可能夸大药品之间的差异。因此，两者的最终得分差值的大小并不能完全代表两种产品之间的实际差异。对此，本研究对标化为 0 的定性指标在 0 ～ 1 内进行了敏感性分析以验证结果的稳健性。因此，在结果解读方面本研究中两种产品的最终排序以及敏感性分析更具参考价值，而

表 6 PCSK9 抑制剂安全性结果分析汇总表

Tab 6 Safety of PCSK9 inhibitors

分类	指标	依洛尤单抗	阿利西尤单抗	结论
定性	禁忌证	过敏	过敏	无差异
	特殊人群用药			
	儿童患者	13 ～ 17 岁纯合子家族性高胆固醇血症患者	未确定	依洛尤单抗优于阿利西尤单抗
	老年患者	无需调整剂量	无需调整剂量	无差异
	肝功能不全患者	轻中度无需调整，无严重肝损伤患者使用数据	轻中度无需调整，无严重肝损伤患者使用数据	无差异
	肾功能不全患者	不会通过肾脏途径清除	尚不清楚是否会通过肾脏途径消除	依洛尤单抗证据更充足
	药物相互作用	无	无	无差异
	药物过量	对症治疗	对症治疗	无差异
	中和抗体	未发现	检测到患者产生中和抗体	依洛尤单抗优于阿利西尤单抗
定量	1 ～ 2 级不良反应发生率	与安慰剂对比 *OR* ＝ 0.99	与安慰剂对比 *OR* ＝ 1.10	差异无统计学意义
	3 ～ 5 级不良反应发生率	与安慰剂对比 *OR* ＝ 1.00	与安慰剂对比 *OR* ＝ 1.20	差异无统计学意义

表 7 关键适宜性指标评价结果 [*n*(%)]

Tab 7 Evaluation of key appropriateness indexes [*n*(%)]

指标	依洛尤单抗			阿利西尤单抗		
	是	否	不清楚 / 未使用过	是	否	不清楚 / 未使用过
临床使用是否存在超说明书适应证使用的情况	0（0）	9（90）	1（10）	0（0）	9（90）	1（10）
超药品说明书用药是否有充分理由	1（10）	1（10）	8（80）	1（10）	1（10）	8（80）
药品用量是否适宜患者的年龄、体重、体表面积和身体状况	9（90）	1（10）	0（0）	9（90）	1（10）	0（0）
患者用药是否容易出现不耐受的情况	0（0）	10（100）	0（0）	2（20）	8（80）	0（0）

表 8 PCSK9 抑制剂各维度评价结果汇总

Tab 8 Summary of PCSK9 inhibitors

一级指标	二级指标	依洛尤单抗	阿利西尤单抗	依洛尤单抗标化得分	阿利西尤单抗标化得分
有效性	LDL-C 降幅	60.0%	51.0%	76	65
	心血管事件发生率	0.85	0.84	29	30
安全性	1 ～ 2 级不良反应发生率	0.99	1.10	33	26
	3 ～ 5 级不良反应发生率	1.00	1.20	36	23
	中和抗体发生情况	优	劣	100	0
	特殊人群用药	优	劣	100	0
经济性	是否具有成本效果	优	劣	100	0
适宜性	患者依从性	70%	40%	87	50
	患者耐受性	100%	80%	78	62
可及性	医疗机构药品配备使用情况	13.62%	5.59%	93	38
	年费用负担	9.29%	10.02%	32	27

表 9 PCSK9 抑制剂临床综合评价得分结果汇总

Tab 9 Summary score of the comprehensive evaluation of PCSK9 inhibitors

维度	依洛尤单抗	阿利西尤单抗（原始得分）	阿利西尤单抗（敏感性分析）
有效性（满分 29.2）	9.9	7.2	7.2
安全性（满分 29.1）	18.1	10.4	17.0
经济性（满分 16.7）	16.7	0.0	16.7
适宜性（满分 10.8）	8.0	7.1	7.1
可及性（满分 14.3）	10.3	4.9	4.9
总分（满分 100）	63.1	29.7	52.9

不应着重关注两者最终得分的差值。在经济性维度评价方面，由于国内尚无最新的 PCSK9 类药品的药物经济学研究发表，本研究仅利用 PCSK9 类药品年治疗成本及有效性维度的网状 meta 分析结果对经济性进行比较。此类药品的经济性研究还有待进一步完善。除此之外，考虑到两者刚进入医保目录，并且尚有部分 RCT 仍在进行中，未来在安全性、有效性、可及性维度可能会有更多的证据发表。因此，未来在具体决策层面，建议决策者结合最新的证据对两种产品进行进一步的评估。

本研究是国内首个 PCSK9 抑制剂用于降脂治疗的临床综合评价研究，运用 MCDA 方法，将该类药品各维度的价值进行量化分析，决策的透明度与科学性高。同时本研究还对基础分析结果进行了不确定性分析，研究结果的可信度高、稳健性强。基于现有证据的基础上，本研究建议在临床应用 PCSK9 抑制剂进行血脂异常干预时优

先选用依洛尤单抗，以提高临床用药的合理性，从而提高医疗资源利用率。

参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组 . 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志，2021，36（6）：521-545.

[2] Liang X，Ye M，Tao M，et al. The association between dyslipidemia and the incidence of chronic kidney disease in the general Zhejiang population：a retrospective study [J]. BMC Nephrol，2020，21（1）：252.

[3] 张坚，赵文华 . 中国居民营养与健康状况监测报告 - 之三 -2010—2013 年血脂 [M]. 北京：人民卫生出版社，2020.

[4] 王薇，刘静，孙佳艺，等 . 甘油三酯水平与糖尿病发病危险的队列研究 [J]. 中华内科杂志，2012，51（7）：4.

[5] Baigent C，Keech A，Kearney PM，et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment：prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins [J]. Lancet，2005，366（9493）：1267-1278.

[6] Armitage J. The safety of statins in clinical practice [J]. Lancet，2007，370（9601）：1781-1790.

[7] 中华医学会心血管病学会分会动脉粥样硬化及冠心病学组，中华心血管病杂志编辑委员会 . 家族性高胆固醇血症筛查与诊治中国专家共识 [J]. 临床医学研究与实践，2018，3（9）：201.

[8] Gitt AK，Lautsch D，Ferrieres J，et al. Contemporary data on low-density lipoprotein cholesterol target value attainment and distance to target in a cohort of 57，885 statin-treated patients by country and region across the world [J]. Data in Brief，2016，9：616-620.

[9] Sabatine MS，Giugliano RP，Keech AC，et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease [J]. New Engl J Med，2017，376（18）：1713-1722.

[10] Schwartz GG，Bessac L，Berdan LG，et al. Effect of alirocumab，a monoclonal antibody to PCSK9，on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes：rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial [J]. Am Heart J，2014，168（5）：682-689.

[11] 赵锐，胡若飞，石秀园，等 . 我国药品临床综合评价全面质量管理体系的构建 [J]. 中国药房，2022，33（12）：1409-1414.

[12] 刘国恩 . 中国药物经济学评价指南 2020 [M]. 北京：中国市场出版社，2020.

[13] 唐密，杨燕，胡善联，等 . 多准则决策分析应用于卫生决策的理论基础与进展 [J]. 中国卫生资源，2020，23（4）：326-331.

[14] 陈晓炜，陈钱，耿劲松，等 . 多准则决策分析应用于医疗保险报销的系统评价 [J]. 中国卫生资源，2018，21（3）：218-223.

[15] van den Bogaart EH，Kroese ME，Spreeuwenberg MD，et al. Economic evaluation of new models of care：does the decision change between cost-utility analysis and multi-criteria decision analysis? [J]. Value Health，2021，24（6）：795-803.

[16] Cannon CP，Cariou B，Blom D，et al. Efficacy and safety of alirocumab in high cardiovascular risk patients with inadequately controlled hypercholesterolaemia on maximally tolerated doses of statins：the ODYSSEY COMBO Ⅱ randomized controlled trial [J]. Eur heart J，2015，36（19）：1186-1194.

[17] Roth EM，McKenney JM. ODYSSEY MONO：effect of alirocumab 75 mg subcutaneously every 2 weeks as monotherapy versus ezetimibe over 24 weeks [J]. Future Cardiol，2015，11（1）：27-37.

[18] Bays H，Farnier M，Gaudet D，et al. Efficacy and safety of combining alirocumab with atorvastatin or rosuvastatin versus statin intensification or adding ezetimibe in high cardiovascular risk patients：ODYSSEY OPTIONS Ⅰ and Ⅱ [J]. Circulation，2014，130（23）：2118-2120.

[19] Leiter LA，Cariou B，Müller WD，et al. Efficacy and safety of alirocumab in insulin-treated individuals with type 1 or type 2 diabetes and high cardiovascular risk：the ODYSSEY DM-INSULIN randomized trial [J]. Diabetes Obes Metab，2017，19（12）：1781-1792.

[20] Kastelein JJ，Robinson JG，Farnier M，et al. Efficacy and safety of alirocumab in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia not adequately controlled with current lipid-lowering therapy：design and rationale of the ODYSSEY FH studies [J]. Cardiovasc Drug Ther，2014，28（3）：281-289.

[21] Kastelein JJ，Ginsberg HN，Langslet G，et al. ODYSSEY FH Ⅰ and FH Ⅱ：78 week results with alirocumab treatment in 735 patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia [J]. Eur heart J，2015，36（43）：2996-3003.

[22] Han Y，Chen J，Chopra VK，et al. ODYSSEY EAST：alirocumab efficacy and safety vs ezetimibe in high cardiovascular risk patients with hypercholesterolemia and on maximally tolerated statin in China，India，and Thailand [J]. J Clin Lipidol，2020，14（1）：98-108.

[23] Ginsberg HN，Rader DJ，Raal FJ，et al. ODYSSEY HIGH FH：efficacy and safety of alirocumab in patients with severe heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. Circulation，2014，130（23）：2119.

[24] Teramoto T，Usami M，Takagi Y，et al. Efficacy and safety of alirocumab in Japanese patients with diabetes mellitus：post-hoc subanalysis of ODYSSEY Japan [J]. J Atheroscler Thromb，2019，26（3）：282-293.

[25] Nam CW，Kim DS，Li J，et al. Efficacy and safety of alirocumab in Korean patients with hypercholesterolemia and high cardiovascular risk：subanalysis of the ODYSSEY-KT study [J]. Korean J Inter Med，2019，34（6）：1252-1262.

[26] Taskinen M，Del Prato S，Bujas-Bobanovic M，et al. Efficacy and safety of alirocumab in individuals with type 2 diabetes mellitus with or without mixed dyslipidaemia：analysis of the ODYSSEY LONG TERM trial [J]. Atherosclerosis，2018，276：124-130.

[27] Bays H，Gaudet D，Weiss R，et al. Alirocumab as add-on to atorvastatin versus other lipid treatment strategies：ODYSSEY OPTIONS Ⅰ randomized trial [J]. J Clin Endocr Metab，2015，100（8）：3140-3148.

[28] Schwartz GG，Steg PG，Szarek M，et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome [J].

New Engl J Med，2018，379（22）：2097-2107.
[29] Koren MJ，Sabatine MS，Giugliano RP，et al. Long-term low-density lipoprotein cholesterol-lowering efficacy，persistence，and safety of evolocumab in treatment of hypercholesterolemia：results up to 4 years from the open-label osler-1 extension study [J]. JAMA Cardiol，2017，2（6）：598-607.
[30] Kiyosue A，Honarpour N，Kurtz C，et al. A phase 3 study of evolocumab（AMG 145）in statin-treated Japanese patients at high cardiovascular risk [J]. J Am Coll Cardiol，2016，117（1）：40-47.
[31] Rosenson RS，Daviglus ML，Handelsman Y，et al. Efficacy and safety of evolocumab in individuals with type 2 diabetes mellitus：primary results of the randomised controlled BANTING study [J]. Diabetologia，2019，62（6）：948-958.
[32] Blom DJ，Djedjos CS，Monsalvo ML，et al. Effects of evolocumab on vitamin E and steroid hormone levels：results from the 52-week，phase 3，double-blind，randomized，placebo-controlled DESCARTES study [J]. Circ Res，2015，117（8）：731-741.
[33] Koskinas KC，Windecker S，Pedrazzini G，et al. Evolocumab for early reduction of LDL cholesterol levels in patients with acute coronary syndromes（EVOPACS）[J]. J Am Coll Cardiol，2019，74（20）：2452-2462.
[34] Nissen SE，Stroes E，Dent-Acosta RE，et al. Efficacy and tolerability of evolocumab vs ezetimibe in patients with muscle-related statin intolerance：the GAUSS-3 randomized clinical trial [J]. JAMA，2016，315（15）：1580-1590.
[35] Koba S，Inoue I，Cyrille M，et al. Evolocumab vs. ezetimibe in statin-intolerant hyperlipidemic Japanese patients：phase 3 GAUSS-4 trial [J]. J Atheroscler Thromb，2020，27（5）：471-484.
[36] Puri R，Nissen SE，Somaratne R，et al. Impact of PCSK9 inhibition on coronary atheroma progression：rationale and design of global assessment of plaque regression with a PCSK9 antibody as measured by intravascular ultrasound（GLAGOV）[J]. Am Heart J，2016，176：83-92.
[37] Moriarty PM，Thompson PD，Cannon CP，et al. Efficacy and safety of alirocumab vs ezetimibe in statin-intolerant patients，with a statin rechallenge arm：the ODYSSEY ALTERNATIVE randomized trial [J]. J Clin Lipidol，2015，9（6）：758-769.
[38] Roth EM，Moriarty PM，Bergeron J，et al. A phase Ⅲ randomized trial evaluating alirocumab 300 mg every 4 weeks as monotherapy or add-on to statin：ODYSSEY CHOICE Ⅰ [J]. Atherosclerosis，2016，254：254-262.
[39] Stroes E，Guyton JR，Lepor N，et al. Efficacy and safety of alirocumab 150 mg every 4 weeks in patients with hypercholesterolemia not on statin therapy：the ODYSSEY CHOICE Ⅱ study [J]. J Am Heart Assoc，2016，5（9）：e3421.
[40] Kereiakes DJ，Robinson JG，Cannon CP，et al. Efficacy and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor alirocumab among high cardiovascular risk patients on maximally tolerated statin therapy：the ODYSSEY COMBO Ⅰ study [J]. Am Heart J，2015，169（6）：906-915.
[41] Robinson JG，Rogers WJ，Nedergaard BS，et al. Rationale and design of LAPLACE-2：a phase 3，randomized，double-blind，placebo-and ezetimibe-controlled trial evaluating the efficacy and safety of evolocumab in subjects with hypercholesterolemia on background statin therapy [J]. Clin Cardiol，2014，37（4）：195-203.
[42] Schwingshackl L，Balduzzi S，Beyerbach J，et al. Evaluating agreement between bodies of evidence from randomised controlled trials and cohort studies in nutrition research：meta-epidemiological study [J]. BMJ，2021，374：n1864.

（收稿日期：2022-10-26；修回日期：2023-03-02）

综述

基于组蛋白去乙酰化酶 6 设计的多靶点抗阿尔茨海默病抑制剂研究进展

曹端源[1]，徐青霞[2]，刘鹏[1]，罗金重[1]，谢赛赛[1*]（1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心，南昌　330004；2. 金溪县中医院，江西　抚州　344800）

摘要：阿尔茨海默病（AD）的发生是一个涉及多因子、多步骤的复杂过程。多靶点抗 AD 抑制剂能同时作用于 AD 发生的多个相关通路，比单靶点抗 AD 抑制剂疗效好。研究发现，组蛋白去乙酰化酶 6（HDAC6）在 AD 中过度表达，是治疗 AD 的重要靶点，因此以抑制 HDAC6 为基础设计兼顾作用于其他靶点的多靶点抗 AD 抑制剂，成为研究的重要方向。本文总结了近些年 HDAC6 和乙酰胆碱酯酶、磷酸二酯酶、*N*- 甲基 -*D*- 天门冬氨酸受体、抗氧化作用、糖原合成酶激酶 3*β* 协同作用的多靶点抑制剂以及它们在抗 AD 方面的生物活性，并对今后的发展进行了展望。

关键词：组蛋白去乙酰化酶 6 抑制剂；抗阿尔茨海默病；多靶点

中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2133-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.027

Research progress in multi-target anti-Alzheimer’s disease inhibitors based on histone deacetylase 6

CAO Duan-yuan[1], XU Qing-Xia[2], LIU Peng[1], LUO Jin-chong[1], XIE Sai-sai[1*] (1. *National Research Center for Pharmaceutical Engineering of Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang* 330004; 2. *Jinxi Hospital of Chinese Medicine, Fuzhou Jiangxi* 344800)

Abstract: The development of Alzheimer’s disease (AD) is a complex process involving many factors and steps. Multi-target anti-AD inhibitors that simultaneously interact with two or more targets have greater therapeutic benefits than single target anti-AD inhibitors. Studies indicate that histone deacetylase 6 is overexpressed in AD, and has been identified as a key target in the treatment of AD. Therefore, designing of multi-target anti-AD inhibitors that can simultaneously act on histone deacetylase 6 and other targets has become an important research direction. This review summarizes the recent multi-target inhibitors of HDAC6 and acetylcholinesterase (AChE), phosphodiesterase (PDEs), *n*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR), antioxidant (anti-oxidant), glycogen synthase kinase 3*β* (GSK-3*β*) and their biological activities in anti-Alzheimer's disease, and predicted the future.

Key words: histone deacetylase 6 inhibitor; anti-Alzheimer’s disease; multi-target

阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）[1]，俗称老年性痴呆，是一种典型的中枢神经系统退行性疾病，多发于 65 岁以上的老人，起病隐匿，病程发展缓慢。AD 的特点是进行性记忆丧失，语言技能下降及其他认知障碍。据报道，目前全世界有 AD 患者 5500 多万，其中中国超过 1000 万，

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81760622）；江西省杰出青年人才资助计划（No.20192BCB23018）；江西省自然科学基金（No.20192ACBL21034）；江西省教育厅项目（No.GJJ190673）。

作者简介：曹端源，男，硕士研究生，主要从事基于天然产物的合理药物设计、合成与活性研究，email：1171286970@qq.com　*通信作者：谢赛赛，男，教授，硕士研究生导师，主要从事基于天然产物的合理药物设计、合成与活性研究，email：xiesaisainanchang@hotmail.com

居全球之首，预计到 2050 年我国 AD 患者将突破 4000 万，已成为严重的全球公共卫生问题[2]。虽然其病因尚不明确，但现有研究表明 AD 的发病有多种原因，包括淀粉样蛋白β（β-amyloid，Aβ）聚集、Tau 蛋白（Tau protein）过度磷酸化、乙酰胆碱缺乏、基因突变、脑外伤、氧化应激、神经炎病和 Ca^{2+} 诱导的神经毒性等[3]。根据这些病理病状，研究人员提出了多种致病假说，如胆碱能假说，Aβ级联假说，金属离子假说，神经炎病假说，Tau 蛋白过度磷酸化假说等[4]。在过去的几十年里，抗 AD 药物的发现一直集中在单靶标配体上，追求高选择性以避免不良反应的发生[5]，但是对改善 AD 患者病状效果不明显，因此，近年来还没有能治愈 AD 的药物通过Ⅲ期临床试验[6]。AD 的脑功能障碍涉及许多信号通路，在 AD 发病机制中相互重叠和影响[7]，对单靶点药物治疗 AD 带来了不小的挑战[8]。因此，发展能同时作用于多个通路的多靶点抗 AD 药物可能比单靶点抗 AD 药物有更好的疗效。在这些多靶点药物分子中，由于组蛋白去乙酰化酶 6（histone deacetylase 6，HDAC6）在 AD 发生中的重要作用，以 HDAC6 为基础设计的多靶点分子被广泛研究。基于此，本文对近年来报道的 HDAC6 多靶点抗 AD 抑制剂的结构设计和生物学活性进行综述，以期为此类分子的研究提供参考。

1 HDAC6 与 AD

组蛋白去乙酰化酶（histone deacetylases，HDACs）是一组表观遗传酶，可以在不改变基因序列的情况下调节基因表达。HDACs 从组蛋白上的赖氨酸中去除乙酰基，导致核小体结构紧缩，抑制基因表达[9-10]。此外，HDACs 还可调节微管蛋白、HSP90、P53 等非组蛋白的乙酰化[11]。目前已经发现了 18 个 HDACs 亚型，分为四个类 别：Class Ⅰ（HDAC1、2、3 和 8），Class Ⅱ（HDAC4、5、6、7、9、10），Class Ⅲ（SIRT1-7）和 Class Ⅳ（HDAC11）。Class Ⅱ 又分为 Class Ⅱa（HDAC4、HDAC5、HDAC7 和 HDAC9）和 Class Ⅱb（HDAC6 和 HDAC10）[12-13]。Class Ⅱb 类 中的 HDAC6 具有独特结构，主要存在于细胞质中，由 1215 个氨基酸残基组成，是 HDACs 家族最大的成员，也是唯一包含 2 个功能性催化结构域的 HDACs 蛋白。HDAC6 主要结构域由强核输出信号（NES）、2 个催化结构域（DD1 和 DD2）、8 个连续重复的十四肽（SE14）和泛素结合锌指结构域（ZnF-UBP）组成（见图 1）。泛素结合锌指结构域能与泛素连接，具有泛素连接酶的作用，因此可通过泛素化依赖性方式降解 HDAC6 蛋白[14]。DD1 和 DD2 均有去乙酰化活性，DD2 区域主要催化体外的去乙酰化，SE14 和 NES 共同作用使 HDAC6 主要存在于细胞质中。研究发现 AD 患者的脑皮层和海马区的 HDAC6 蛋白水平显著提高。AD 的一个显著特征是神经原纤维缠结（neurofibrillary tangles，NFTs），与过度磷酸化 Tau 蛋白的异常积累有关，这主要是由 HDAC6 的高表达引起的[15]。过度磷酸化的 Tau 蛋白，降低了 Tau 蛋白对微管的亲和力，导致细胞骨架瓦解，最终导致细胞死亡。另一方面 HDAC6 诱导的去乙酰化微管蛋白 Aβ影响微管的稳定性和细胞囊泡运输，引起线粒体和神经递质恶化，导致突触降解或丢失。基于以上研究，HDAC6 在 AD 发病中起到重要作用，抑制 HDAC6 是治疗 AD 的一种可行方法。虽然，目前还没有 HDAC6 抑制剂被批准用于临床治疗 AD，但研究还在进行中。

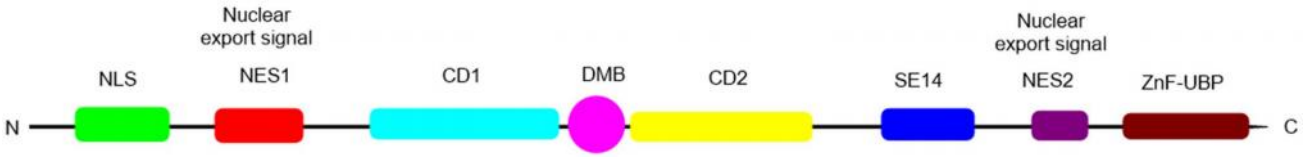

图 1 HDAC6 的结构

Fig 1 Structure of HDAC6

2 多靶点 HDAC6 抑制剂的设计

HDAC6 抑制剂药效团模型包含帽子区（CAP）、连接区（linker）、Zn^{2+} 结合基团（zinc binding group，ZBG）。CAP 一般为芳环或芳杂环等环状结构，linker 通常为脂肪长链或取代芳环，因为与 Zn^{2+} 的螯合作用对抑制 HDAC6 的活性至关重要，而异羟肟酸和邻氨基苯甲酰胺能与 Zn^{2+} 形成强效的螯合作用，所以一直是优选的 ZBG。异羟肟酸和邻氨基苯甲酰胺常作为 ZBG 基团，通过改造 CAP 和 linker 提高对 HDAC6 的抑制活性。CAP 基团不仅能影响 HDAC6 抑制剂的选择性，也能影响异羟肟酸和邻氨基苯甲酰胺与 Zn^{2+} 的结合强度，此外，CAP 能够接受更为广泛的结构变化，因此设计 HDAC6 多靶点抑制剂时，一般从 CAP 入手，通过引入具有其他活性的分子片段与 ZBG 拼合或融合，构建多靶点 HDAC6 抑制剂（见图 2）。

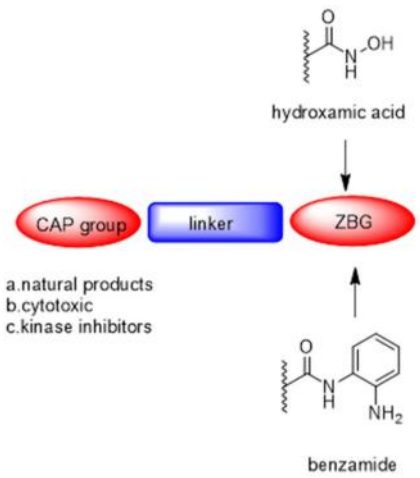

图 2　HDAC6 抑制剂的药效团模型及其多靶点抑制剂设计策略

Fig 2　Pharmacophore models and multi-target compound design strategy for HDAC6 inhibitors

3　多靶点 HDAC6 抑制剂

3.1　具有 HDAC6 和乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase，AChE）抑制作用的多靶点抑制剂

AChE 是胆碱酯酶（cholinesterase，ChE）的两种主要类型之一，胆碱能假说认为 AChE 是一种抗 AD 的重要靶点，在预防和治疗 AD 中起关键作用，目前已获批准的抗 AD 药物几乎都是 AChE 抑制剂[16-17]。基于 AChE 和 HDAC6 抑制剂都表现出相似疾病的临床活性，AChE/HDAC6 多靶点抑制剂对 AD 可能具有更好的疗效。研究证明吖啶作为一种结构多样的骨架，其基团具有抗 AChE 作用，可以用于抗 AD 药物的设计[18]。Jiang 等[19]合成了化合物 **1**，为吖啶衍生物，具有较强的 AChE 抑制活性，并且吖啶的 C-9 通过化学偶联可以产生新的多靶点药物，并且不会降低其抗 AChE 的作用。Givinostat 为正在进行临床研究的 HDAC6 抑制剂，含有的苯基羟肟酸部分可以作为酶抑制活性的核心结构（见图 3）[20]。Tseng 等[21]通过结合化合物 **1** 和 Givinostat 的核心结构，设计合成了一系列新的 AChE/HDAC6 多靶点抑制剂。其中化合物 **2** 和化合物 **3** 对 HDAC6（IC_{50} = 0.025 μmol • L^{-1}、IC_{50} = 0.026 μmol • L^{-1}）有较高的选择性和抑制活性，且能有效地抑制 AChE（IC_{50} = 0.72 μmol • L^{-1}、IC_{50} = 0.88 μmol • L^{-1}）。化合物 **1** 和化合物 **2** 显著诱导组蛋白和微管蛋白乙酰化，并且可以促进神经突触生长而没有明显的神经毒性。

他克林（tacrine）是第一个被批准用于治疗 AD 的 AChE 抑制剂，但由于其肝毒性而被停用，可通过结构修饰提高其效力，降低其毒性[22-23]。Xu 等[24]选择他克林结构为 CAP，伏地诺他（suberoylanilide hydroxamic acid，SAHA）的异羟肟酸部分为 ZBG，并选择存在疏水性、柔性和空间位阻占据较小的烷基碳链和不同种类的苯基作为 linker，设计合成了 28 个新的 AChE/HDAC6 多靶点抑制剂。大多数化合物对 AChE 和 HDAC6 表现出良好的抑制效果。特别是化合物 **4**（见图 3）对 AChE（IC_{50} = 0.12 nmol • L^{-1}）具有较强的选择性抑制作用，对 HDAC6 具有一定的抑制作用（IC_{50} = 33.2 nmol • L^{-1}），表明含 3 个碳链和对甲酰胺肉桂酸结构的化合物具有最佳的抑制活性。此外，化合物 **4** 对 $A\beta_{1\text{-}42}$ 的自聚集有抑制作用，还具有抗氧化活性。动力学和分子对接研究表明，化合物 **4** 不仅可以与 AChE 的催化活性位点（catalytic site，CAS）结合，还可以与 AChE 的外周阴离子位点（peripheral anionic site，PAS）结合。

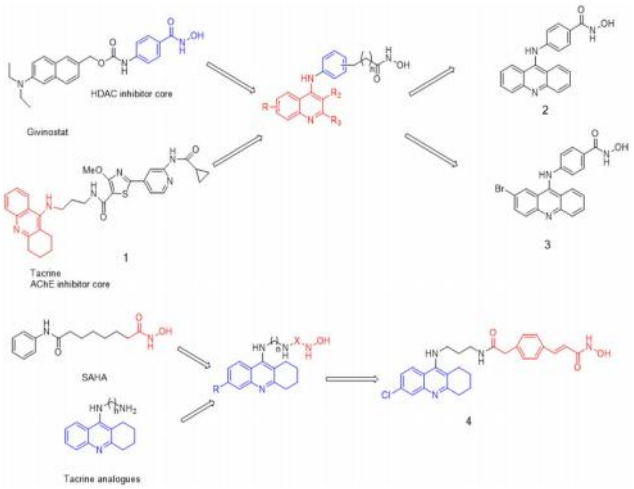

图 3　AChE/HDAC6 多靶点抑制剂

Fig 3　AChE/HDAC6 dual target inhibitor

3.2　具有 HDAC6 和磷酸二酯酶（phosphodiesterases，PDEs）抑制作用的多靶点抑制剂

PDEs 是体内唯一负责水解环磷酸腺苷（cyclic adenosinec monophosphatec，cAMP）和环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphatec，cGMP）的酶家族。到目前为止，PDEs 有 11 个亚家族，至少包括 22 个亚型，每个家族是根据酶的特征和药理抑制特性区分的功能性组合。磷酸二酯酶 5（phosphodiesterase 5，PDE5）为 PDEs 的一种，抑制 PDE5 能够增加 cGMP 的浓度。已发现 AD 患者脑脊液中 cGMP 会下降，因此 PDE5 成为抗 AD 药物研究的一个有效靶点[25]。西地那非（sildenafil）可以高选择性地抑制人体内的 PDE5 活性，且近期研究发现使用西地那非可使 AD 发病风险显著降低[26]。Cuadrado-Tejedor 等[27]将西地那非活性部分作为 CAP，甲基环丁烷作为 linker，异羟肟酸结构作为 ZBG，合成一个新的 PDE5/HDAC6 多靶点抑制剂化合物 **5**。化合物 **5**（见图 4）对 HDAC6（IC_{50} =

7.04 nmol • L^{-1}）有较高的选择性和抑制活性，且能有效地抑制 PDE5 的活性（IC_{50} = 8.5 nmol•L^{-1}）。给予化合物 **5** 治疗 Tg2576 小鼠，其大脑 Tau 蛋白磷酸化水平显著降低。Rabal 等[28]在化合物 **5** 的基础上，以芳基烷基链作为 linker，设计合成了一系列新的 PDE5/HDAC6 多靶点抑制剂化合物，大多数化合物对 PDE5 和 HDAC6 表现出良好的抑制效果。以 2- 甲基噻吩为 linker 的化合物 **6** 对 HDAC6 具有较强的抑制作用（IC_{50} = 15 nmol • L^{-1}），对 PDE5（IC_{50} = 11 nmol • L^{-1}）具有一定的选择性抑制作用，下一步将在 AD 小鼠模型（Tg2576）体内进行测试。

磷酸二酯酶 9（phosphodiesterase 9，PDE9）作为 PDEs 的一类，对 cGMP 具有高亲和力。PDE9 广泛分布于脑组织，在海马和皮质等部位具有高水平表达，PDE9 的脑区分布提示其可能与学习记忆有关[29]。研究显示，AD 患者脑组织中 PDE9 表达显著增加并伴随 cGMP 水平的下降，提示 PDE9 及其介导的信号通路可能参与 AD 的发病过程，因此 PDE9 抑制剂具有促智作用，并可以用于治疗 AD[30]。BAY 73-6691 是拜尔公司开发的抗 AD 的 PDE9 抑制剂，在动物实验中已被证明可以改善大鼠的学习和记忆[31]。研究发现 PF-04447943 和 PF-04449613 是具有高选择性的 PDE9 抑制剂（IC_{50} = 8 nmol • L^{-1}，IC_{50} = 22 nmol • L^{-1}）[32]，且与 BAY 73-6691 同属于 *N*- 取代吡唑并 [3，4-d] 嘧啶酮类化合物，因此 *N*- 取代吡唑并 [3，4-d] 嘧啶酮可以作为设计 PDE9 抑制剂的活性结构。Rabal 等[33]选择 *N*- 取代吡唑并 [3，4-d] 嘧啶酮为 cap、烷基芳香链为 linker、异羟肟酸为 ZBG，设计合成了 18 个 PDE9/HDAC6 多靶点抑制剂，结果表明化合物 **7** 显示出最强的 PDE9（IC_{50} = 8 nmol•L^{-1}）抑制作用，但对 HDAC6（IC_{50} = 608 nmol • L^{-1}）的抑制作用较弱（见图 4）。化合物 **8** 显示出最强的 HDAC6（IC_{50} = 40 nmol • L^{-1}）抑制活性，且对 PDE9（IC_{50} = 107 nmol • L^{-1}）也显示出较强的抑制作用，选择化合物 **9** 进行评估体内功效，并研究其作用机制。

3.3 具有 HDAC6 和 *N*- 甲基 -*D*- 天门冬氨酸受体（*N*-methyl-*D*-aspartate receptor，NMDAR）抑制作用的多靶点抑制剂

NMDAR 是学习和记忆过程中一类重要的受体，它与 AD 的病理过程密切相关，已成为抗 AD 药物的重要靶点，已上市的美金刚属于 NMDAR 拮抗剂，通过阻断谷氨酸刺激 NMDAR 引起的神经损伤缓解 AD 症状[34-35]。He 等[36]以美金刚

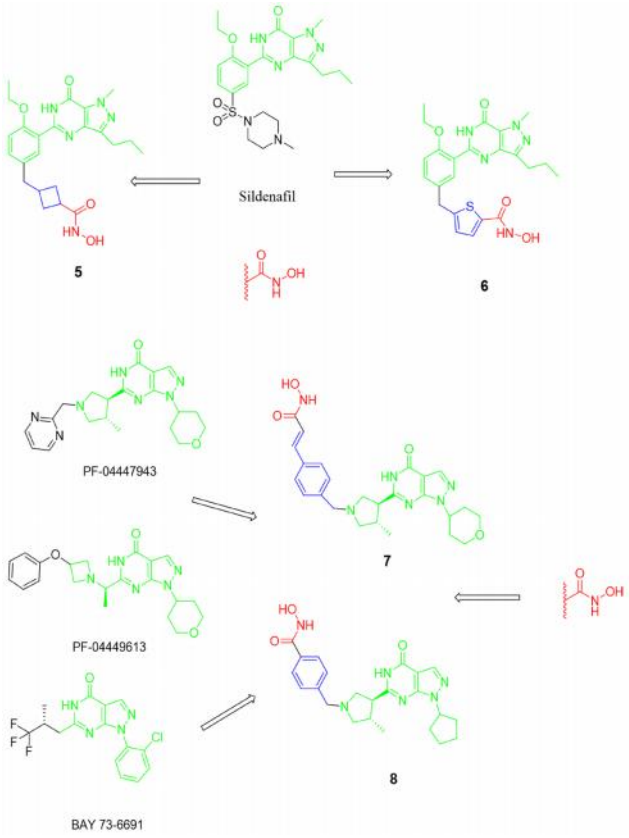

图 4 PDEs/HDAC6 多靶点抑制剂

Fig 4 PDEs/HDAC6 dual target inhibitor

为 CAP，烷基碳链或芳香链为 linker，异羟肟酸和邻氨基苯甲酰胺作为 ZBG，设计合成了一系列新型的 NMDAR/HDAC6 多靶点抑制剂。研究结果表明，化合物 **9** 显示出最强的 HDAC6[IC_{50} =（0.12±0.03）μmol • L^{-1}] 抑制作用，但对 NMDAR（K_i = 13.06 μmol • L^{-1}）的抑制作用较弱。化合物 **10** 对 NMDAR（K_i = 0.59 μmol • L^{-1}）和 HDAC6（IC_{50} = 0.18 μmol • L^{-1}）都表现出较强的抑制活性，并且其对 NMDAR 的活性与美金刚相当（见图 5）。用化合物 **10** 处理 MV4-11 细胞，提高了 MV4-11 细胞中 AcTubulin（acetylated tubulin）的水平；动物研究还表明化合物 **10** 可有效穿透血脑屏障到达脑组织。

3.4 具有 HDAC6 和糖原合成酶激酶 3*β*（glycogen synthase kinase 3*β*，GSK-3*β*）抑制作用的多靶点抑制剂

A*β* 可引起 Tau 蛋白过度磷酸化进而引起神经纤维缠结，GSK-3*β* 作为调节 Tau 蛋白过度磷酸化的关键信号酶，在淀粉样蛋白和 Tau 蛋白之间起连接作用。Huang 等[37]发现给小鼠注射 A$\beta_{25\text{-}35}$ 能使 Tau 蛋白磷酸化水平上升，同时使 GSK-3*β* 表达增加。另有研究发现，给 AD 小鼠注射 4- 苯基丁酸（4-phenylbutyric acid，PBA）后观察到 Tau 蛋

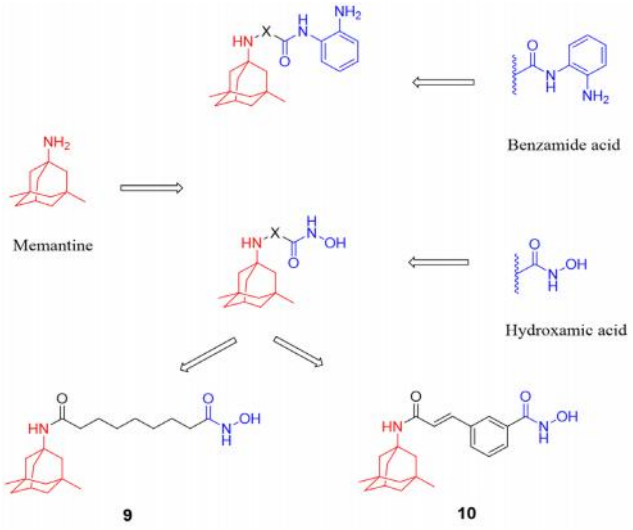

图 5　NMDAR/HDAC6 多靶点抑制剂

Fig 5　NMDAR/HDAC6 dual target inhibitor

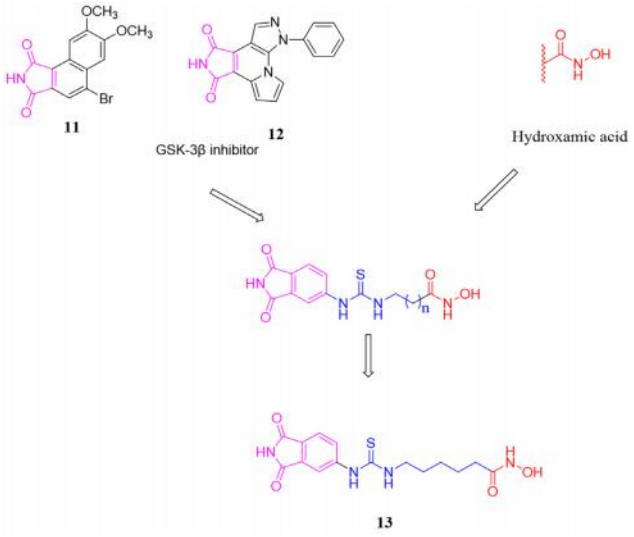

图 6　GSK-3β/HDAC6 多靶点抑制剂

Fig 6　GSK-3β/HDAC6 dual target inhibitor

白磷酸化水平下降和非活性的 GSK-3β 增多，同时改善了 AD 小鼠的学习和认知能力，提示 GSK-3β 在 Aβ 诱导 Tau 蛋白磷酸化中起作用，因此 GSK-3β 在 AD 的发生和发展中起着重要作用，可以作为 AD 治疗的一个重要靶点[38]。De Simone 等[39]通过利用 GSK-3β 抑制剂如化合物 **11** 和 **12**（见图 6）的邻苯二酰亚胺的活性部分和异羟肟酸的活性结构设计合成了一系列的 HDAC6 和 GSK-3β 受体的多靶点抑制剂。其中化合物 **13** 对 GSK-3β（IC_{50} = 2.69 μmol•L^{-1}）和 HDAC6（IC_{50} = 3.19 μmol • L^{-1}）都具有最佳的选择性抑制作用，选择性约为 HDAC1 [IC_{50} =（12.78±0.11）μmol • L^{-1}] 的 4 倍。化合物 **13** 诱导组蛋白乙酰化增加和 Tau 磷酸化减少。此外，化合物 **13** 具有较高的水溶性，可促进神经发育并显示免疫调节作用，且在斑马鱼模型中没有显示出致死性（< 100 μmol • L^{-1}）。

3.5　具有 HDAC6 抑制作用和抗氧化作用的多靶点抑制剂

氧化应激学说是 AD 的发病机制之一[40-41]，因此，抗氧化在预防和治疗 AD 中具有十分重要的作用。谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）是人体分泌的一种特殊蛋白质，是一种重要的过氧化物分解酶，广泛存在于体内，可将有毒的过氧化物还原为无毒的羟基化合物，从而产生保护作用。其结构和功能不受过氧化物的干扰和破坏，具有抗氧化作用。由于氧化应激是导致 AD 的原因之一，而 GSH-Px 具有抗氧化作用，因此 GSH-Px 是 AD 的潜在作用靶点。Hu 等[42]以抗氧化剂依布硒啉（Ebselen）的活性结构为 CAP，烷基碳链或芳香链为 linker，异羟肟酸为 ZBG，设计合成了 16 个化合物。体外实验表明，其中一些化合物表现出有效的 HDACs 抑制活性和依布硒啉相关的药理作用。化合物 **14**（见图 7）具有最强的 HDAC6（IC_{50} = 0.037 μmol • L^{-1}）抑制活性、GSH-Px 活性（v_0 = 150.0 μmol • min^{-1}）和良好的抗氧化能力（ORAC：2.2）。此外，化合物 **14** 对 H_2O_2 诱导的损伤具有显著的保护作用，并具有防止 PC12 细胞中活性氧积累的能力。

天然产物褪黑素和阿魏酸具有抗氧化作用、神经保护和对中枢神经系统的调节作用，可用于 AD 的治疗。He 等[43]通过将褪黑激素和阿魏酸的化学结构与芳香烷基链、异羟肟酸拼合，设计合成了 15 个抗 AD 的新型多靶点化合物，在不失去对 HDAC6 的亲和力和选择性的情况下以协同方式发挥抗氧化作用。其中基于褪黑激素的化合物 **15**（IC_{50} = 11.2 nmol • L^{-1}）和基于褪黑激素 - 阿魏酸的化合物 **16**（IC_{50} = 30.7 nmol • L^{-1}）显示出较高的 HDAC6 抑制活性，其选择性是其他亚型的 20 倍以上（见图 7）。化合物 **15** 和 **16** 都保持了褪黑激素和阿魏酸的抗氧化能力，尤其是化合物 **16**（EC_{50} = 10.8 μmol • L^{-1}）清除 1，1- 二苯基 -2- 三硝基苯肼（DPPH）自由基能力与阿魏酸（EC_{50} = 13.7 μmol • L^{-1}）相当，并且具有与褪黑素相当的 ORAC 值。化合物 **16** 在 10 μmol • L^{-1} 时未表现出神经毒性，并且与阳性对照和强效螯合剂 EDTA 的 Cu^{2+} 螯合能力相当，这表明化合物 **16** 对减少金属介导的氧化应激和 Aβ 聚集具有一定作用。化合物 **16** 还显示出免疫调节作用，能够减少脂多糖诱导的小胶质细胞炎症。化合物 **16** 的体内功效表明 HDAC6 抑制作用可能与其抗氧化活性之间具有协同作用。

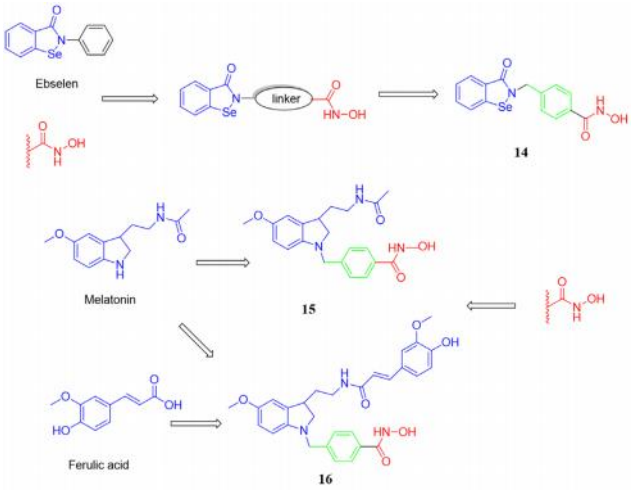

图 7 HDAC6 抑制和抗氧化作用的多靶点抑制剂

Fig 7 Multi-targeted inhibitors of HDAC6 inhibition and antioxidants

4 总结与展望

AD 的发生涉及复杂的病理过程，而 HDAC6 又与 AD 的发生发展密切相关，因此可以作为抗 AD 的一个重要靶点。从上述研究可以看出以 HDAC6 为基础兼具其他活性的多靶点抑制剂是抗 AD 的有效策略，这些多靶点抑制剂能显著提高治疗 AD 的疗效。在设计这些多靶点分子时，多是以 HDAC6 结构为基础，通过融合替换或结构拼合其药效团中的 CAP 基团设计多靶点 HDAC6 抑制剂，且 CAP 基团大多来源于激酶抑制剂和其他抗 AD 药物的核心片段。目前还没有抗 AD 的 HDAC6 多靶点抑制剂上市，且失败的大部分原因是由于抑制剂缺乏安全性和无法达到治疗指数[44]，其主要原因是作用于 AD 多个靶点的单一抑制剂无法对其作用的所有靶点均达到最佳抑制浓度，且选择性较低的抑制剂容易产生与作用机制无关的不良反应。关于抗 AD 的 HDAC6 多靶点抑制剂的活性机制根本原因的结论并不可靠，很难对它们的治疗效果进行有效的预测，因此未来对 AD 发生通路的突破和诠释是一个重要的研究方向，这样将会有更多高效且低毒的多靶点 HDAC6 抗 AD 药物被研发出来。总之，高效且低毒性的多靶点抗 AD 药物是目前药物研发的趋势，多靶点抗 AD 可能会在 AD 治疗上产生新的突破。

参考文献

[1] Selkoe DJ. Alzheimer disease：mechanistic understanding predicts novel therapies [J]. Ann Intern Med，2004，140（8）：627-638.

[2] Bohnen NI，Grothe MJ，Ray NJ，et al. Recent advances in cholinergic imaging and cognitive decline——revisiting the cholinergic hypothesis of dementia [J]. Curr Geriatr Rep，2018，7（1）：1-11.

[3] Leon R，Garcia AG，Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer’s disease [J]. Med Res Rev，2013，33（1）：139-189.

[4] Glass CK，Saijo K，Winner B，et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration [J]. Cell，2010，140（6）：918-934.

[5] Zheng H，Fridkin M，Youdim M. From single target to multitarget/network therapeutics in Alzheimer’s therapy [J]. Pharmaceuticals，2014，7（2）：113-135.

[6] Doody RS，Thomas RG，Farlow M，et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer’s disease [J]. New Engl J Med，2014，370（4）：311-321.

[7] De Wilde A，Van Maurik IS，Kunneman M，et al. Alzheimer’s biomarkers in daily practice（ABIDE）project：rationale and design [J]. Alzh Dement-Dadm，2017，6：143-151.

[8] Uddin MS，Al Mamun A，Kabir MT，et al. Multi-target drug candidates for multifactorial Alzheimer’s disease：AChE and NMDAR as molecular targets [J]. Mol Neurobiol，2021，58（1）：281-303.

[9] Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription [J]. Nature，1997，389（6649）：349-352.

[10] Marmorstein R，Roth SY. Histone acetyltransferases：function，structure，and catalysis [J]. Curr Opin Genetdev，2001，11（2）：155-161.

[11] Glozak MA，Sengupta N，Zhang X，et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins [J]. Gene，2005，363：15-23.

[12] Witt O，Deubzer HE，Milde T，et al. HDAC family：what are the cancer relevant targets? [J]. Cancer Lett，2009，277（1）：8-21.

[13] Verza FA，Das U，Fachin AL，et al. Roles of histone deacetylases and inhibitors in anticancer therapy [J]. Cancers，2020，12（6）：1664.

[14] Simões-Pires C，Zwick V，Nurisso A，et al. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases：what makes it different from the other HDACs? [J]. Mol Neurodegener，2013，8（1）：1-16.

[15] Ausó E，Gómez-Vicente V，Esquiva G. Biomarkers for Alzheimer’s disease early diagnosis [J]. J Pers Med，2020，10（3）：114.

[16] Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer’s disease [J]. Mech Ageing Dev，2001，122（16）：1961-1969.

[17] Kucukoglu K，Gul HI，Taslimi P，et al. Investigation of inhibitory properties of some hydrazone compounds on hCA Ⅰ，hCA Ⅱ and AChE enzymes [J]. Bioorg Chem，2019，86：316-321.

[18] Makhaeva GF，Lushchekina SV，Boltneva NP，et al. 9-Substituted acridine derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors possessing antioxidant activity for Alzheimer’s disease treatment [J]. Bioorgan Med Chem，2017，25（21）：5981-5994.

[19] Jiang XY，Chen TK，Zhou JT，et al. Dual GSK-3β/AChE inhibitors as a new strategy for multitargeting anti-Alzheimer’s disease drug discovery [J]. Acs Med Chem Lett，2018，

9（3）：171-176.
[20] Carta S，Tassi S，Semino C，et al. Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1β-containing secretory lysosomes：role of microtubules [J]. Blood，2006，108（5）：1618-1626.
[21] Tseng HJ，Lin MH，Shiao YJ，et al. Synthesis and biological evaluation of acridine-based histone deacetylase inhibitors as multitarget agents against Alzheimer’s disease [J]. Eur J Med Chem，2020，192：112193.
[22] Lin HZ，Li Q，Gu K，et al. Therapeutic agents in Alzheimer’s disease through a multi-targetdirected ligands strategy：recent progress based on tacrine core [J]. Curr Top Med Chem，2017，17（27）：3000-3016.
[23] Teponnou GA，Joubert J，Malan SF. Tacrine，trolox and tryptoline as lead compounds for the design and synthesis of multi-target agents for Alzheimer’s disease therapy [J]. Open Med Chem J，2017，11：24.
[24] Xu AN，He F，Zhang XN，et al. Tacrine-hydroxamate derivatives as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer’s disease：design，synthesis，and biological evaluation [J]. Bioorg Chem，2020，98：103721.
[25] Cuadrado-Tejedor M，Garcia-Barroso C，Sanzhez-Arias J，et al. Concomitant histone deacetylase and phosphodiesterase 5 inhibition synergistically prevents the disruption in synaptic plasticity and it reverses cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Clin Epigenetics，2015，7（1）：1-11.
[26] Fang JS，Zhang PY，Zhou YD，et al. Endophenotype-based in silico network medicine discovery combined with insurance record data mining identifies sildenafil as a candidate drug for Alzheimer’s disease [J]. Nat Aging，2021，1（12）：1175-1188.
[27] Cuadrado-Tejedor M，Garcia-Barroso C，Sánchez-Arias JA，et al. A first-in-class small-molecule that acts as a dual inhibitor of HDAC and PDE5 and that rescues hippocampal synaptic impairment in Alzheimer’s disease mice [J]. Neuropsychopharmacol，2017，42（2）：524-539.
[28] Rabal O，Sánchez-Arias JA，Cuadrado-Tejedor M，et al. Design，synthesis，biological evaluation and in vivo testing of dual phosphodiesterase 5（PDE5）and histone deacetylase 6（HDAC6）-selective inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease [J]. Eur J Med Chem，2018，150：506-524.
[29] Chan AM，Fletcher S. Shifting the paradigm in treating multi-factorial diseases：polypharmacological co-inhibitors of HDAC6 [J]. RSC Med Chem，2021，12（2）：178-96.
[30] Wunder F，Tersteegen A，Rebmann A，et al. Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line [J]. Mol Pharmacol，2005，68（6）：1775-1781.
[31] Van Der FJ，Rutten K，Bärfacker L，et al. The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents [J]. Neuropharmacology，2008，55（5）：908-918.
[32] Schwam EM，Nicholas T，Chew R，et al. A multicenter，double-blind，placebo-controlled trial of the PDE9A inhibitor，PF-04447943，in Alzheimer’s disease [J]. Curr Alzheimer Res，2014，11（5）：413-421.
[33] Rabal O，Sánchez-Arias JA，Cuadrado-Tejedor M，et al. Multitarget approach for the treatment of Alzheimer’s disease：inhibition of phosphodiesterase 9（PDE9）and histone deacetylases（HDACs）covering diverse selectivity profiles [J]. Acs Chem Neurosci，2019，10（9）：4076-4101.
[34] Claffey MM，Helal CJ，Verhoest PR，et al. Application of structure-based drug design and parallel chemistry to identify selective，brain penetrant，in vivo active phosphodiesterase 9A inhibitors [J]. J Med Chem，2012，55（21）：9055-9068.
[35] Ashley C，Dunleavy A，Cunningham J. The renal drug handbook：the ultimate prescribing guide for renal practitioners [M]. CRC Press，2018.
[36] He F，Ran Y，Li X，et al. Design，synthesis and biological evaluation of dual-function inhibitors targeting NMDAR and HDAC for Alzheimer’s disease [J]. Bioorg Chem，2020，103：104109.
[37] Huang J，Chen YJ，Bian WH，et al. Unilateral amyloid-β25-35 injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant tau phosphorylation kinases [J]. Chinese Med J-Peking，2010，123（10）：1311-1314.
[38] Qing H，He G，Ly PT，et al. Valproic acid inhibits Aβ production，neuritic plaque formation，and behavioral deficits in Alzheimer’s disease mouse models [J]. J Exp Med，2008，205（12）：2781-2789.
[39] De Simone A，La Pietra V，Betari N，et al. Discovery of the first-in-class GSK-3β/HDAC dual inhibitor as disease-modifying agent to combat Alzheimer’s disease [J]. Acs Med Chem Lett，2019，10（4）：469-474.
[40] Smith MA，Zhu X，Tabaton M，et al. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment [J]. J Alzheimers Dis，2010，19（1）：363-372.
[41] Padurariu M，Ciobica A，Hritcu L，et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease [J]. Neurosci Lett，2010，469（1）：6-10.
[42] Hu J，An B，Pan T，et al. Design，synthesis，and biological evaluation of histone deacetylase inhibitors possessing glutathione peroxidase-like and antioxidant activities against Alzheimer’s disease [J]. Bioorgan Med Chem，2018，26（21）：5718-5729.
[43] He F，Chou CJ，Scheiner M，et al. Melatonin-and ferulic acid-based HDAC6 selective inhibitors exhibit pronounced immunomodulatory effects in vitro and neuroprotective effects in a pharmacological Alzheimer’s disease mouse model [J]. J Med Chem，2021，64（7）：3794-3812.
[44] Harrison RK. Phase Ⅱ and phase Ⅲ failures：2013—2015 [J]. Nat Rev Drug Discov，2016，15（12）：817-818.

（收稿日期：2022-11-20；修回日期：2023-01-13）

清肺排毒汤治疗新型冠状病毒感染的研究进展

马思文[1, 2]，孟雅[1]，车宏伟[1]，王辉[2]，焦杨[2]，郑稳生[1*]（1. 北京协和医学院 中国医学科学院药物研究所 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室，北京 100050；2. 广西医科大学，南宁 530021）

摘要：清肺排毒汤由麻杏石甘汤、射干麻黄汤、小柴胡汤、五苓散加减裁合而成，可作为中医临床用药以治疗新型冠状病毒感染。本文通过对相关期刊文献和专利等整理和分析，从清肺排毒汤中医理论解析、现代药理研究和临床应用疗效评价等方面进行归纳总结，为新型冠状病毒感染临床用药以及清肺排毒汤研究提供参考。

关键词：清肺排毒汤；新型冠状病毒感染；中医理论解析；临床疗效评价

中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2140-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.028

Research progress in the treatment of COVID-19 by Qingfei Paidu decoction

MA Si-wen[1, 2], MENG Ya[1], CHE Hong-wei[1], WANG Hui[2], JIAO Yang[2], ZHENG Wen-sheng[1*] (1. *Institute of Materia Medica*, *Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College*, *Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation*, *Beijing* 100050; 2. *Guangxi Medical University*, *Nanning* 530021)

Abstract: Qingfei Paidu decoction is a combination of Maxing Shigan decoction, Shegan Mahuang decoction, Small Chaihu decoction and Wuling powder, which can be used for COVID-19. By sorting and analyzing relevant journals and patents, this paper summarized the theoretical analysis of traditional Chinese medicine, modern pharmacological research and clinical efficacy of Qingfei Paidu decoction, to provide reference for clinical medication choice and research of Qingfei Paidu decoction for COVID-19.

Key words: Qingfei Paidu decoction; COVID-19; theoretical analysis of traditional Chinese medicine; evaluation of clinical efficacy

新型冠状病毒（SARS-CoV-2）疫情爆发，短时间内造成了全球大流行的新型冠状病毒感染（COVID-19），严重危害了世界公共卫生安全。疫情暴发初期，由于没有特效药物，各国主要通过“老药新用”将一些广谱抗病毒药物（如瑞德西韦、法匹拉韦、氯喹和羟氯喹等）应用于 COVID-19 的治疗[1]。而中医药作为我国独有的疾病治疗手段，在疫情治疗中及早、广泛地介入，为 COVID-19 的治疗起到了促进作用。清肺排毒汤由麻杏石甘汤、射干麻黄汤、小柴胡汤、五苓散加减裁合而成，是中医药管理局治疗 COVID-19 的临床推荐用药[2]，也是《新型冠状病毒感染诊疗方案（第六版）》[3] 中中药改动部分新增的抗疫方，其被推荐应用于不同分型 COVID-19 的治疗并发挥了明显的作用。为了对清肺排毒汤治疗 COVID-19 的临床疗效有更全面的认识，本文从清肺排毒汤的中医理论解析、现代药理研究和临床应用疗效评价等方面进行归纳总结。

1 现代医学对 COVID-19 的认识

现代医学研究表明 COVID-19 引起的肺炎的主要致病及病理过程是病毒侵入肺部造成肺部细胞损伤，损伤进展进一步引起免疫细胞炎症因子风暴，危重期甚至会导致脓毒血症和呼吸困难。

梁倩倩等[4] 通过探讨 SARS-CoV-2 致肺损伤的机制指出 COVID-19 所产生的炎性渗出导致炎症风暴，造成急性肺损伤；即肺细胞受损引起免疫细胞释放大量细胞因子，导致炎性细胞被大量

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金资助（No.2021-I2M-1-028）。

作者简介：马思文，女，硕士研究生，主要从事新药研发与生产，email：1137687848@qq.com *通信作者：郑稳生，男，教授，博士研究生导师，主要从事中、西药物新制剂及新释药系统关键技术研究，email：zhengwensheng@imm.ac.cn

激活，形成恶性循环，最终形成细胞因子风暴加剧肺部渗出和水肿[5]；细胞因子风暴继续引起以活化的巨噬细胞、中性粒细胞和 T 细胞为主的复杂免疫反应，这些细胞和受感染的细胞可在短时间内分泌大量的炎症因子，趋化更多的炎症细胞参与肺损伤过程，从而放大炎症效应造成肺的免疫损伤[6]。

2　中医对 COVID-19 的认识

COVID-19 属于“疫病”范畴，但是不同的学者对病机的认识不同，对“疫病”的定性也不同[7]。目前从中医辨证角度以及临床症状分析，大部分医家将其归为寒湿疫，认为病机为寒湿阻络，气机不利[8-9]。结合仝小林等[10]在临床抗疫一线收集到的疾病症状体征及舌脉表现来看，他认为 COVID-19 属于中医“寒湿疫”的范畴；国医大师薛伯寿亦提出 COVID-19 属“寒湿疫”[11]；福建省卫健委抗疫防治中医专家组结合 COVID-19 发病特点、气候特点及患者的临床表现，指出此次疫情属于“寒湿疫”，可从“寒湿”论治[12]；邹本良医师[13]进一步指出，COVID-19 的病理因素多涉及毒、湿、寒、热、燥、瘀、虚等，病位主要在肺、脾，与心、肝、肾、大肠密切相关，因湿邪致病特点为重浊、黏滞、碍气伤阳、趋下，故“寒湿疫”病机核心是毒邪闭肺困脾，寒疫可伤阳，但亦可化热、变燥、伤阴，重型 COVID-19 证候常寒热错杂、虚实并见。

奚胜艳等[14]则根据中医所辨的各种“证”将 COVID-19 划为湿疫郁肺轻证、疫毒闭肺、毒损肺络、危重脱症等不同证型，其“已病态”的阶段特征与《新型冠状病毒感染诊疗方案（第六版）》中普通型、重型、危重型患者的临床症状相似。

3　清肺排毒汤中医理论解析

3.1　清肺排毒汤组方来源

清肺排毒汤由张仲景《伤寒杂病论》中多种经方化裁而成[15]，此外还融合了麻黄汤、小青龙加石膏汤、苓桂术甘汤、越婢加半夏汤、枳术汤等经方[16]，方药组成为：麻黄 9 g，炙甘草 6 g，杏仁 9 g，生石膏（先煎）15 ～ 30 g，桂枝 9 g，泽泻 9 g，猪苓 9 g，白术 9 g，茯苓 15 g，柴胡 16 g，黄芩 6 g，姜半夏 9 g，生姜 9 g，紫菀 9 g，款冬花 9 g，射干 9 g，细辛 6 g，山药 12 g，枳实 6 g，陈皮 6 g，藿香 9 g[17]，药材归属见表 1。

3.2　清肺排毒汤方药分析

邵建柱等[19]从“方阵”角度探讨了其组方思路：以整副经方之功效辨证中医理论中君、臣、佐、使之用，形成“君方、臣方、佐方、使方”。薛伯寿等[20]认为寒湿疫必须善用麻黄剂，麻黄宣肺透邪，既开表闭又开肺闭，消散肺间质郁饮，是宣通寒凝血脉瘀滞之圣药，故麻黄类方是为君方，起主要治疗作用。其他经方功效辨证分析如下：组方中有宣、有清、有健脾、有和胃，处方涵盖面广，考虑到了寒、热、燥以及胃肠问题，故该方可减轻 COVID-19 患者主要症状，对普通型、轻型和重型均有明显疗效[19，21-22]（详见表 2）。

表 1　清肺排毒汤主要经方组成药物[18]

Tab 1　Main prescription of Qingfei Paidu decoction[18]

经方	药材
麻杏石甘汤	麻黄 9 g、炙甘草 6 g、杏仁 9 g、生石膏 15 ～ 30 g（先煎）
射干麻黄汤	紫菀 9 g、冬花 9 g、射干 9 g、细辛 6 g
小柴胡汤	柴胡 16 g、黄芩 6 g、姜半夏 9 g、生姜 9 g
五苓散	桂枝 9 g、泽泻 9 g、猪苓 9 g、白术 9 g、茯苓 15 g

4　现代药理研究

清肺排毒汤作为中药具有宣通寒凝之效，此为中医辨证之理；而现代药理学研究表明，清肺排毒汤组方确实含有抗炎、抗病毒以及调节代谢功能的活性成分。

Zhang 等[23]探究出 SARS-CoV-2 转录复制与 3C 类似蛋白酶密切相关，而病毒进入宿主细胞主要靠血管紧张素转换酶Ⅱ（ACE2）受体。基于网络药理学和分子对接技术的研究表明，清肺排毒汤中的主要活性成分不但可以通过调节 MAPK1、MAPK3、MAPK8、MAPK14、IL-6、RELA、STAT1 等不同的靶点，进而调控 TNF、NF-κB 等信号通路来抑制炎症反应、调节免疫功能，还可以通过调节与肺损伤通路有关的 3C 类似蛋白酶和 ACE2 减轻肺炎，从而达到治疗 COVID-19 的目的[24-25]；王琨等[26]研究已经证明清肺排毒汤可在 RNA 水平及蛋白水平抑制冠状病毒，且抑制冠状病毒的吸附及增强细胞内干扰素相关基因的表达，具有较好的体外抗冠状病毒活性；赵静等[27]进一步探讨出清肺排毒汤中的中药大多数归肺经，除了调控 ACE2 及其共表达的蛋白起到平衡免疫、消除炎症的作用，还抑制靶向病毒复制必需的蛋白——核糖体蛋白进而抑制病毒 mRNA 翻译，起到抗病毒作用。

Chen 等[28]从系统药理学的角度探讨了清热排毒汤抗 COVID-19 的作用机制，提示清肺排毒汤部分机制与抗病毒、抗炎活性和代谢的调节有关；吴高松等[29]则通过大鼠内源性代谢实验揭示清肺排毒汤临床疗效机制与其对机体的内源性代谢调控及肠道菌群组成的调节相关；李荣宇等[30]

表 2 清肺排毒汤的“方阵”配伍分析

Tab 2 Compatibility of “Square Array” of Qingfei Paidu decoction

方阵	类方	配伍特点	组成	功效
君方	麻黄类	宣肺透邪	麻黄汤	辛温发汗、宣肺平喘
		散寒化饮	麻黄加术汤	发汗解表、散寒除湿
			小青龙汤	解表蠲饮、止咳平喘
			麻杏石甘汤	辛凉疏表、清肺平喘
			射干麻黄汤	宣肺散寒、化饮止咳
臣方	苓桂类	温阳散寒	五苓散	利水渗湿、温阳化气
		化饮利湿	苓桂术甘汤	温阳化饮、健脾利水
			茯苓泽泻汤	健脾渗湿、温阳化饮、降逆止呕
			茯苓杏仁甘草汤	宣肺化饮、利水调气
	半夏类	化痰逐饮	小半夏汤	和胃降逆、消痰蠲饮
		和胃降逆	小半夏加茯苓汤	和胃止呕、利水消痞
			二陈汤	燥湿化痰、理气和中
佐方	枳实类	（佐助）行气散水、降逆消痞	枳术汤	行气消痞
		（佐制）防君方过度耗散	橘枳姜汤	行气开郁、和胃化饮
使方	—	—	小柴胡汤	通达表里、和解少阳、调和肝胃

通过体外抗菌实验也证实清肺排毒汤对呼吸道致病菌（主要为金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌）具有一定的抑制作用。

5 临床疗效研究进展

5.1 清肺排毒汤治疗不同分型 COVID-19 的疗效

基于《新型冠状病毒感染诊疗方案》的治疗要求以及药理研究结果的佐证，清肺排毒汤可以被推荐用于轻型、普通型、重型、危重型 COVID-19 治疗，且临床治疗效果显著。通过对近几年的文献进行整理发现在多家医院相继开展的有关于清肺排毒汤的临床回顾性研究中，临床研究得出的评价结果与理论是一致的。

如代卓青等 [31] 对 36 例确诊 COVID-19 患者应用中药复方清肺排毒汤治疗两个疗程后发现，清肺排毒汤显著地改善了 SARS-Cov-2 感染患者的实验室检测异常指标，有效提高了治疗效果，有较好的临床疗效；孙天峰等 [32] 也以临床症状改善程度为指标，对两年间收治的 70 例病毒性肺炎患者进行了临床疗效评价，发现使用清肺排毒汤治疗能显著缩短患者主要症状消失时间，改善肺功能，调节血常规指标水平，进一步证实了清肺排毒汤在临床上改善症状和调节指标的作用；余恒毅等 [33] 给予 64 例患者接受清肺排毒汤单药治疗，患者的转重率和好转患者住院时长皆低于阿比多尔药物组，提示单用清肺排毒汤治疗的效果可能优于西药治疗。

针对轻型 / 普通型 COVID-19 的研究，孙易娜等 [34] 收集轻型 / 普通型 COVID-19 患者 295 例（清肺排毒汤组 199 例、联合用药组 96 例），通过比较两组患者住院期间重症 / 危重症转化情况、平均住院时间、核酸转阴时间、临床主要症状（包括发热、咳嗽、咯痰、咽痛、乏力、头痛、腹泻、憋闷）改善情况及胸部 CT 影像学改善情况，得出结论清肺排毒汤单独使用亦能促进轻型 / 普通型 COVID-19 患者核酸转阴、胸部 CT 及咯痰症状的改善，缩短住院时间，较药物联用方案具有一定优势；王恩成等 [35] 则通过探讨 75 例确诊轻型与普通型 COVID-19 患者的酶学指标改善研究证明清肺排毒汤调节指标的效果显著；孔令玉等 [36] 对普通型 / 重型 COVID-19 患者用清肺排毒汤治疗后比较疗效，证明清肺排毒汤对于 COVID-19 患者的预后也起到了良好的作用。

而对于重型 / 危重型 COVID-19 患者，张平等 [37] 回顾性分析了 24 例 COVID-19 危 / 重型患者的临床资料，清肺排毒汤降低炎症反应损伤效果显著优于西医治疗组，且王芳等 [38] 回顾性分析清肺排毒汤联合西医常规治疗重型 COVID-19 患者的临床疗效后得出结论：在临床症状得到改善的积极疗效基础上，使用清肺排毒汤治疗的患者不良反应发生少，用药安全性更好。

由此可见，清肺排毒汤治疗轻型、普通型、重型、危重型 COVID-19 的疗效能达到临床的治疗和预后期望，且清肺排毒汤针对不同型的 COVID-19，无论单独使用还是与西药联合使用，都发挥了积极的作用。

5.2 清肺排毒汤治疗特殊型 COVID-19 的疗效

对于一些特殊型的患者，比如老年人和儿童等免疫力低下的人群，清肺排毒汤的临床疗效也

值得进一步考察。王晶亚等[39]回顾性分析清肺排毒汤联合西医常规治疗 36 家医院确诊的 157 例老年 COVID-19 患者的临床效果，发现清肺排毒汤联合西医常规疗法可改善老年 COVID-19 患者的临床症状，改善炎症指标，促进肺部病灶的吸收，改善预后，且安全性好。李婵[40]和刘宁等[41]分析儿童型 COVID-19 病例，发现清肺排毒汤结合西医结合治疗核酸转阴迅速，疗效确切，安全性好；联合雷火灸治疗小儿寒湿闭肺证 COVID-19 可有效增强疗效，缓解患儿临床症状，提高免疫球蛋白水平；邹林珂等[42]通过对 COVID-19 的儿童病例文献进行分析发现：低龄儿童虽然易感但是临床症状表现普遍较轻，而抗病毒药物的应用和干扰素的治疗会可能有药物不良反应。而清肺排毒汤作为中药，疗效显著而缓和，可能更加适合用于儿童 COVID-19 的治疗。

5.3 *清肺排毒汤治疗 COVID-19 合并不同基础慢性疾病的疗效评价*

考虑到疾病的复杂程度，在自身疾病的基础上感染了 COVID-19 的患者，受本身疾病的影响，COVID-19 的治疗难度也大大增加。如高血压使 COVID-19 患者发生严重肺炎和器官损伤的风险增加，同时病程延长，增加了死亡的风险[43]，而关于全国 31 个省市 575 家医院共计 1590 例 COVID-19 患者的回顾性案例研究显示[44]，约有 25%（399 例）的患者存在合并症，最常见的合并症包括高血压（269 例，占 67.4%），糖尿病（130 例，占 32.58%）和其他心血管疾病（59 例，占 14.79%）。所以清肺排毒汤治疗 COVID-19 合并基础慢性疾病时的临床疗效评价也值得进一步考察，以证实在 COVID-19 合并基础慢性疾病的情况下，清肺排毒汤仍能够发挥出同样的疗效。

目前这方面有关的研究主要是中国中医科学院中医临床基础医学研究所对清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗 COVID-19 合并其他慢性疾病进行的临床回顾性分析[45-48]。其对 COVID-19 联合高血压病 /2 型糖尿病 / 慢性乙型肝炎 / 心脑血管疾病等慢性疾病都进行了研究，并通过比较患者主要临床症状（包括咳嗽、发热、乏力、干咳、厌食、气喘）改善情况、各症状消失时间、实验室检测异常指标改善情况、肺部病灶吸收情况、病毒核酸转阴时间以及记录不良反应发生情况对清肺排毒汤的疗效进行了评价，评价结果见表 3。

表 3　清肺排毒汤治疗 COVID-19 合并其他疾病疗效评价

Tab 3　Efficacy evaluation of Qingfei Paidu decoction for COVID-19 complicated with other diseases

合并疾病	组别	住院时间 /d	核酸转阴时间 /d	症状缓解时间 /d	联合用药	病灶吸收 /%	不良反应
高血压	老年组	20	11	1	是	81	无
	非老年组	16	11	1	是	70	无
2 型糖尿病		18	11	3	是	13	恶心、腹泻
慢性乙型肝炎	清肺排毒汤组	15	7.0	＜ 3	是	95	恶心、腹泻
	常规治疗组	15.5	7.5	3	否	84	恶心、腹泻
心脑血管疾病	心血管疾病	未统计	8.0	1	是	92	胃部不适、腹泻
	脑血管疾病	未统计	11	1	是	88	胃部不适、腹泻

COVID-19 合并其他慢性疾病多属于重型 / 危重型 COVID-19[37]，而重型 COVID-19 的回顾性研究结果显示：第一次核酸平均转阴时间为 10.0 d，平均住院时间为 19.36 d，清肺排毒汤合并西医常规治疗 3 d 后症状可缓解，且约 92.0% 的患者肺部病灶显示不同程度的吸收[38]。

可见，清肺排毒汤对 COVID-19 合并高血压病、慢性乙型肝炎和心脑血管疾病的症状仍具有明显的改善作用（2 型糖尿病除外，不排除此病病程长且能迅速降低人免疫力的可能），可降低肺持续损伤的风险，且缩短了核酸转阴时间和住院时间。从疾病的严重程度方面综合评价，可以肯定清肺排毒汤治疗慢性合并症的积极作用；而安全性方面除了轻微恶心、腹泻外无其他严重不良反应。所以，清肺排毒汤在 COVID-19 疾病复杂程度加重的情况下仍能够改善临床症状、减少核酸转阴时间和住院时长，发挥出积极的治疗作用，具有良好的临床疗效。

6　讨论

清肺排毒汤具有清热解毒、健脾利湿、宣肺平喘的功效，并且可以通过多成分、多靶点作用于 COVID-19[49]，疗效显著，治疗总有效率达到 94%[50]。清肺排毒汤应用于临床治疗 COVID-19 是基于中医理论下的经方创新以及药理实验研究证实的结果，临床回顾性研究的分析结果也进一步证明了其在临床上发挥的疗效：清肺排毒汤不

仅对于治疗 COVID-19 不同分型（轻型、普通型、重型、危重型）有效，对 COVID-19 合并慢性疾病（高血压、2 型糖尿病、慢性乙肝、心脑血管疾病）等更复杂的疾病，也有改善症状、缩短核酸转阴时间和住院时间，促进肺部病灶吸收防治肺损伤、提高治愈率的积极作用，且不良反应少，值得在临床继续推荐使用。

但是就目前的临床研究来说，对清肺排毒汤应用于 COVID-19 不同分型以及合并不同的慢性基础疾病的研究依然不够全面，临床上肾炎、肝病也是常见基础病，而清肺排毒汤治疗这些疾病方面的临床研究文献很少能查阅到，故医院的相关科室可以针对这些慢性疾病进行临床回顾性研究，为治疗用药进一步提供依据。而某些患者由于其特殊性，清肺排毒汤的应用也只是在理论层面分析，如妊娠期、哺乳期女性有诸多用药禁忌 [51]，COVID-19 合并妊娠及产褥期这一类高危人群，其机体一系列生理、血流动力学改变会增加患者发生静脉血栓栓塞症的风险，进一步增加了治疗难度 [52]。朱莉红等 [53] 在分析中医药在 COVID-19 妊娠期患者治疗的安全性时表明清肺排毒汤可作为备选；王新等 [54] 通过从中医角度探讨清肺排毒汤治疗产妇 COVID-19，也提出了经方加减以提高用药安全性的治疗方案。所以，清肺排毒汤对于 COVID-19 妊娠期患者治疗的临床回顾性研究亦有望在理论数据可靠和医患沟通良好的条件下开展，以期获得更全面的清肺排毒汤应用于临床治疗的依据，提高我国中药治疗 COVID-19 的水平。

参考文献

[1] 许叶春，柳红，李剑峰，等 . 抗新冠肺炎药物研究进展 [J]. 中国生物工程杂志，2021，41（6）：111-118.

[2] 路志正，路喜善 . 清肺排毒汤彰显中医药抗疫疗效与自信 [J]. 中医杂志，2020，61（10）：833-834.

[3] 新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第六版）[J]. 天津中医药，2020，37（3）：242-246.

[4] 梁倩倩，陈伟，徐浩，等 . 基于淋巴管系统在免疫调节中的作用探讨新冠病毒致肺损伤的机制及中药干预作用 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（2）：270-277.

[5] 陈彦昕，陈泳诗，谢健鸿，等 . 炎症因子风暴在新型冠状病毒肺炎中的作用 [J]. 广东医科大学学报，2021，39（5）：651-654.

[6] 姜慧欣，黄学涵，林果，等 . 细胞因子风暴在 2019 新型冠状病毒肺炎肺损伤中的作用 [J]. 临床与病理杂志，2022，42（2）：462-471.

[7] 王倩，曲道炜 . 从中医角度对新型冠状病毒肺炎病因及特点的认识 [J]. 实用中医内科杂志，2022，36（6）：12-14.

[8] 杨华升，李丽，勾春燕，等 . 北京地区新型冠状病毒肺炎中医证候及病机特点初探 [J]. 北京中医药，2020，39（2）：115-118.

[9] 沈爱明，张伟，吴卓，等 . 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. 辽宁中医杂志，2020，47（3）：106-108.

[10] 仝小林，李修洋，赵林华，等 . 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略 [J]. 中医杂志，2020，61（6）：465-470，553.

[11] 范逸品，王燕平，张华敏，等 . 试析从寒疫论治新型冠状病毒肺炎 [J]. 中医杂志，2020，61（5）：369-374.

[12] 余永鑫，阮诗玮 . 基于《寒湿论治》探析新型冠状病毒肺炎的中医认识 [J]. 实用中医内科杂志，2022，36（8）：47-49.

[13] 邹本良，李敏，范铁兵，等 . 中医药治疗重型新型冠状病毒肺炎经验总结及诊疗方案建议 [J]. 中医杂志，2020，61（15）：1289-1293.

[14] 奚胜艳，钱林超，丁红平，等 . 基于中医状态辨治理论探讨新型冠状病毒肺炎的防治 [J]. 厦门大学学报（自然科学版），2020，59（3）：304-309.

[15] 李松桃，吴昊，李梓菡，等 . “清肺排毒汤”治疗新型冠状病毒肺炎的经方理论探析 [J]. 成都中医药大学学报，2021，44（2）：11-14.

[16] 王汉，王敦方，宋红新，等 . 从《伤寒论》六经辨证探讨抗新冠肺炎“清肺排毒汤”的组方规律 [J]. 海南医学院学报，2020，26（19）：1441-1445，1454.

[17] 沈爱明，张伟，吴卓，等 . 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析 [J]. 辽宁中医杂志，2020，47（3）：106-108.

[18] 王朝，尹梦碟，方泓，等 . 基于中医名家经典浅析新冠肺炎中清肺排毒汤的运用 [J]. 中医药文化，2020，15（4）：11-16.

[19] 邵建柱，郭杏林，宋斌，等 . 从“方阵”角度探讨“清肺排毒汤”组方思路 [J]. 吉林中药，2021，41（3）：301-303.

[20] 薛伯寿，姚魁武，薛燕星 . “清肺排毒汤”快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的医理论分析 [J]. 中医杂志，2020，61（6）：461-462.

[21] 曹艳梅，张囡，史楠楠，等 . 基于古代经方传承的清肺排毒汤组方配伍分析 [J]. 世界中医药，2022，17（9）：1343-1349.

[22] 刘厚利，呼兴华，何莉，等 . 清肺排毒汤组方原理、药物用量及煎煮方法概述 [J]. 陕西中医，2020，41（5）：560-562.

[23] Zhang HB，Penninger J，Li YM，et al. Angiotensin-converting enzyme 2（Ace2）as a SARS-Cov-2 receptor：molecular mechanisms and potential therapeutic target [J]. Int Care Med，2020，46（4）：586-590.

[24] 许冬玉，许玉龙，王至婉，等 . 基于网络药理学研究清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. 中药药理与临床，2020，36（1）：26-32.

[25] 吴昊，王佳琪，杨雨薇，等 . 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制 [J]. 药学学报，2020，55（3）：374-383.
[26] 王琨，颜海燕，吴硕，等 . 清肺排毒汤的体外抗冠状病毒作用研究 [J]. 药学学报，2021，56（5）：1400-1408.
[27] 赵静，田赛赛，杨健，等 . 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J]. 中草药，2020，51（4）：829-835.
[28] Chen J，Wang YK，Gao Y，et al. Protection against COVID-19 injury by Qingfei Paidu decoction via anti-viral，anti-inflammatory activity and metabolic programming [J]. Biomed Pharmacother，2020，129（3）：110281.
[29] 吴高松，钟婧，郑宁宁，等 . 清肺排毒汤对大鼠整体代谢及肠道菌群的调节作用研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（15）：3726-3739.
[30] 李荣宇，林少玲，骆月姬 . 清肺排毒汤体外抗菌作用研究 [J]. 亚太传统医药，2020，16（11）：58-59.
[31] 代卓青，江四华，刘田，等 . 清肺排毒汤治疗 36 例新型冠状病毒肺炎的临床疗效分析 [J]. 贵州中医药大学学报，2020，42（6）：34-38.
[32] 孙天峰，吴静文，高倩 . 清肺排毒汤对病毒性肺炎患者主要症状消失时间、血清 D- 二聚体水平及 ESR 的影响 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（S2）：70-71.
[33] 余恒毅，任秀华，祁星星，等 . 阿比多尔、清肺排毒汤、连花清瘟胶囊、金叶败毒颗粒对某方舱医院轻型 / 普通型新冠肺炎患者疗效的回顾性研究 [J]. 中药药理与临床，2020，36（6）：2-6.
[34] 孙易娜，吕文亮，李昊，等 . 清肺排毒汤治疗轻型 / 普通型新型冠状病毒肺炎 295 例多中心临床研究 [J]. 中医杂志，2021，62（7）：599-603.
[35] 王恩成，唐琳，徐奎，等 . 清肺排毒汤治疗 75 例新型冠状病毒肺炎轻型与普通型酶学指标改善的疗效评价 [J]. 中药与临床，2020，11（1）：3-5.
[36] 孔令玉，苑丽双，陈杰勇，等 . 清肺排毒汤对普通型和重型新型冠状病毒肺炎患者的疗效观察 [J]. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）学报，2021，42（12）：917-921.
[37] 张平，潘广涛 . 清肺排毒汤改善新型冠状病毒肺炎危重型患者炎性细胞因子的临床研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（2）：391-395.
[38] 王芳，郭旸，焦丽雯，等 . 清肺排毒汤联合西医常规治疗重型新型冠状病毒肺炎 50 例临床疗效回顾性分析 [J]. 中医杂志，2021，62（20）：1801-1805.
[39] 王晶亚，李慧珍，郭玉娜，等 . 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗老年新型冠状病毒肺炎 157 例临床疗效回顾性研究 [J]. 中医杂志，2021，62（20）：1788-1794.
[40] 李婵 . 雷火灸联合清肺排毒汤治疗临床症状符合小儿寒湿闭肺证新型冠状病毒肺炎的临床疗效 [J]. 临床合理用药杂志，2022，15（4）：32-35.
[41] 刘宁，王栋庭，周利刚，等 . 清肺排毒汤结合西医对症治疗儿童新型冠状病毒感染 2 例 [J]. 亚太传统医药，2021，17（5）：83-85.
[42] 邹林珂，闫峻峰，边原，等 . 新型冠状病毒感染的儿童病例文献分析 [J]. 中南药学，2020，18（8）：1306-1311.
[43] 吴亮，赵平，王建军，等 . 常见慢性疾病与新型冠状病毒肺炎患者重症化风险的系统评价及荟萃分析 [J]. 中华传染病杂志，2021，39（1）：2-8.
[44] 韩丽珠，边原，童荣生，等 . 新型冠状病毒肺炎合并心血管疾病患者的药学监护策略 [J]. 中南药学，2020，18（4）：591-597.
[45] 李慧珍，王晶亚，郭玉娜，等 . 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗新型冠状病毒肺炎合并高血压病 119 例临床疗效回顾性分析 [J]. 中医杂志，2021，62（20）：1795-1800.
[46] 焦丽雯，郭玉娜，宗星煜，等 . 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗新型冠状病毒肺炎合并 2 型糖尿病患者 49 例回顾性临床研究 [J]. 中医杂志，2021，62（19）：1709-1714.
[47] 陈仁波，史楠楠，李慧珍，等 . 清肺排毒汤联合西医常规治疗新型冠状病毒肺炎合并慢性乙型肝炎的多中心回顾性研究 [J]. 中医杂志，2021，62（19）：1694-1701.
[48] 张磊，王芳，马艳，等 . 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗新型冠状病毒肺炎合并心脑血管疾病 124 例回顾性研究 [J]. 中医杂志，2021，62（19）：1702-1708.
[49] 翟文姣，张德斌，李红，等 . 清肺排毒汤中 5 种成分的含量测定与煎煮工艺优化 [J]. 中南药学，2022，20（1）：60-65.
[50] 刘春宇，古敏，史楠楠，等 . 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的药性功效分析 [J]. 国医论坛，2021，36（1）：20-23.
[51] 黄淑洁，黄叶芳，唐家禾，等 . 清肺排毒汤治疗妊娠期新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的运用探讨 [J]. 实用中医内科杂志，2021，35（9）：80-82.
[52] 张贝，陈俊，曾芳，等 . 妊娠及产褥期新型冠状病毒肺炎合并静脉血栓栓塞症患者的合理用药及药学服务 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1464-1468.
[53] 朱莉红，于姝娟，邵明鸣，等 . 中医药在新型冠状病毒肺炎妊娠期患者治疗中的安全性分析 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（12）：1291-1295，1329.
[54] 王新，师伟，杜惠兰，等 . 清肺排毒汤治疗产妇新型冠状病毒肺炎应用探讨 [J]. 山东中医药大学学报，2022，46（2）：181-184.

（收稿日期：2022-11-02；修回日期：2022-12-05）

不同给药途径的糖皮质激素治疗非感染性葡萄膜炎的研究进展

李可[1, 2]，何海冰[2, 4]，冯颖淑[5]，唐欣怡[2]，殷站暖[2]，刘宏飞[1, 2, 3, 4*]（1. 江西中医药大学药学院，南昌 330004；2. 长三角药物高等研究院，江苏 南通 226100；3. 江苏大学药学院，江苏 镇江 212013；4. 江苏海之宏生物医药有限公司，江苏 南通 226100；5. 医药技术学院，江苏 镇江 212013）

摘要：葡萄膜炎是一种眼内炎症疾病，其中，非感染性葡萄膜炎是一种自身免疫性炎症反应，治疗预后较差。糖皮质激素是非感染性葡萄膜炎治疗的一线药物，具有多种给药途径和给药方案。葡萄膜炎的治疗策略旨在实现疾病缓解、预防复发和保护视力，同时将相关不良反应降至最低。当针对影响眼前段的非感染性葡萄膜炎时，局部点药是常用的选择，眼周、玻璃体内给药主要用于非感染性中间、后部葡萄膜炎。在本综述中，笔者对糖皮质激素不同给药途径的治疗研究进行阐述，并分析不同给药途径的优势与劣势，对糖皮质激素药物治疗非感染性葡萄膜炎的研究进行展望。

关键词：非感染性葡萄膜炎；糖皮质激素；玻璃体内给药；离子导入

中图分类号：R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2146-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.029

Research progress in different administration routes of corticosteroids for noninfectious uveitis

LI Ke[1, 2], HE Hai-bing[2, 4], FENG Ying-shu[5], TANG Xin-yi[2], YIN Zhan-nuan[2], LIU Hong-fei[1, 2, 3, 4*] (1. *School of Graduate*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226100; 3. *College of Pharmacy*, *Jiangsu University*, *Zhenjiang Jiangsu* 212013; 4. *Jiangsu Haizhihong Biopharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100; 5. *School of Medical Technology*, *Zhenjiang Jiangsu* 212013）

Abstract: Uveitis is an intraocular inflammation, among which noninfectious uveitis belongs to an autoimmune inflammatory reaction with poor prognosis. Glucocorticoids are the first-line drugs for noninfectious uveitis, with multiple administration routes and regimens. The treatment strategy aims to relieve symptoms, prevent the recurrence, protect the eyesight, and minimize side effects. In terms of noninfectious uveitis affecting the anterior ocular segment, local medication is common, while periocular and intravitreal administration are mainly for posterior noninfectious uveitis. This paper reviewed the research on different administration routes of glucocorticoids, analyzed the advantages and disadvantages of various routes, and summarized treatment of noninfectious uveitis with glucocorticoids.

Key words: noninfectious uveitis; corticosteroid; intravitreal administration; iontophoresis

葡萄膜炎是一种眼内炎症疾病，涉及虹膜、睫状体、脉络膜及玻璃体，可引发一些严重并发症[1]。根据病因可分为感染性葡萄膜炎和非感染性葡萄膜炎（noninfectious uveitis，NIU）。其中，NIU 是一种自身免疫性炎症反应，临床表现的异质性被认为是由不同的抗原引发的[2]。治疗的主要目的是缓解炎症，抑制疾病反复发作，保护视觉功能[3]，同时降低不良反应。在各类 NIU 的治疗药物中，糖皮质激素应用较早，具有强效抗炎和免疫抑制的作用[4]，是 NIU 治疗的一线药物。临床常用有地塞米松、二氟泼尼酯、醋酸氟轻松、氟米龙、氯替泼诺、泼尼松龙和曲安奈德等[5]，可以通过全身、眼表、眼周和玻璃体内注射等途径给药。不同的糖皮质激素给药途径存在各自的

基金项目：中国博士后科学基金项目（No. 2020M681532 国博后）。

作者简介：李可，女，硕士研究生，主要从事眼科制剂的研究，email：like1998j@163.com *通信作者：刘宏飞，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事液体缓控释制剂的研究，email：Liuhongfei2000@163.com

优势与劣势，给药选择取决于多种因素，与全身性疾病、发病部位、眼部疾病的严重程度、潜在的疾病病因等相关联[6]，需权衡利弊保证药物使用的安全性和有效性。选择合适的给药途径是治疗的重要环节，故本文对糖皮质激素不同给药途径治疗 NIU 的研究作一综述。

1 糖皮质激素治疗机制

目前，NIU 发病主要由 CD 4$^+$ T 细胞引起[7]，这些活化的 T 细胞由特定的转录因子和特征细胞因子介导而刺激免疫反应产生。糖皮质激素可产生抗炎和免疫抑制作用，在临床应用广泛，治疗机制分为基因组和非基因组效应，两者发挥互补作用[8]。糖皮质激素治疗 NIU 的短期疗效较好，但长期和全身给药通常会引起极强的不良反应，降低糖皮质激素敏感性，使应用受限。

在基因组效应中，糖皮质激素与细胞质中的糖皮质激素受体结合，通过反式激活和反式抑制特定基因的表达调控抗炎基因的转录[9]。反式激活与反式抑制的调控是相辅相成的，目前技术尚不能实现完全分离。但早期研究发现，一些糖皮质激素的不良反应是由基因反式激活引起的[10]。

一直以来，糖皮质激素被认为通过基因组效应发挥大部分作用，但越来越多的研究发现非基因组效应在治疗过程中也具有重要地位[11-13]。在非基因组效应中糖皮质激素能直接抑制 T 细胞受体介导的信号传递途径，与膜受体结合，不涉及转录过程和蛋白质合成，独立于基因表达机制直接调节细胞黏附和运动、抑制磷脂酶 A2 和白细胞的迁移[14]。研究还发现，仅通过非基因组机制起作用的糖皮质激素药物可以减少基因组机制产生的一些不良反应[15]，安全性更高，在未来的治疗中具有极大的潜力。

2 不同给药途径下糖皮质激素的 NIU 治疗研究

眼睛具有复杂而独特的生理结构，易受到疾病的影响。生理屏障和血眼屏障是眼部药物输送的主要障碍[16]，传统药物剂型和给药方式较难克服这些眼部屏障，外源药物较难进入眼部的靶组织，克服这些障碍将是 NIU 治疗药物开发的主要挑战。

根据发病部位可以将 NIU 分为非感染性前部、中段、后段和全葡萄膜炎。糖皮质激素是 NIU 治疗的首选药物，给药方式主要分为 5 种：全身给药、局部点药、眼周给药、眼部离子导入、玻璃体内注射给药。临床应基于发病部位等多因素进行个体化给药，提高疗效与安全性。本文总结了糖皮质激素不同给药途径治疗 NIU 的研究进展以及各种给药途径的优势与劣势，以供临床参考。

2.1 全身给药

自 20 世纪 50 年代以来，糖皮质激素全身给药被广泛应用于眼科临床，疗效好、起效快，使其成为治疗 NIU 的基石[17]。糖皮质激素全身给药途径包括口服、静脉注射和肌内注射，其中口服给药在临床上显现出较好的患者依从性。最常见的全身糖皮质激素药物是口服泼尼松和静脉注射甲泼尼龙。这些药物见效快，常用来迅速控制严重的 NIU。全身糖皮质激素治疗需根据临床表现和患者体质，重症 NIU 可在发病初期 3 ～ 5 d 内静脉注射甲泼尼龙，每日 1 g。口服泼尼松初始剂量为 0.5 ～ 1 mg/（kg•d），应 3 个月内逐渐减量[18]。

Charkoudian 等[19] 在治疗非感染性眼部炎症的临床研究中，对 NIU 患者进行大剂量静脉注射糖皮质激素，在一个月内患者眼睛实现炎症完全控制的比例从 57% 提升至 82%，显著改善大多数患者的临床症状。

全身给药由于受血视网膜屏障和血房水屏障阻挡，进入眼后段和前段的药物较少，生物利用度低，通常需要高剂量给药，而糖皮质激素相关不良反应的发生率会随给药剂量增加而变高[20]，易引发严重的眼部不良反应，如库欣综合征、高血糖、心血管疾病、免疫抑制等，每日维持不高于 7.5 mg 泼尼松给药可以最大限度地减少全身糖皮质激素治疗的严重的长期不良反应[21]。NIU 的预后和病程变化很大，疾病得到控制后，是否停止全身治疗需要进行风险效益分析——炎症复发的风险和不进行全身免疫抑制治疗的益处。

全身给药疗效好，如何避免全身糖皮质激素给药严重的不良反应是此类给药方式需要解决的难题。

2.2 局部点药

非感染性前部葡萄膜炎的治疗的主要给药方式是局部点药，将药物制剂直接用于眼表，患者依从性好，与全身给药相比，局部点药可以最大限度地减少全身不良反应[22]。但也存在一些局限，如角膜和玻璃体的阻挡，药物几乎不能到达眼后段，对中后段 NIU 无效。

眼部局部点药的主要剂型有滴眼液、眼膏剂和眼用凝胶，糖皮质激素局部点药常用的药物有醋酸泼尼松龙混悬液、地塞米松混悬液、二氟泼尼酯眼用乳液、氯替泼诺混悬液和氟米龙混悬液。制剂在眼表的滞留会影响药物的治疗效果，与低黏度制剂相比，高黏度制剂如眼膏、凝胶等可以减少药物从眼表的排出，眼部生物利用度更高[23]，但应用时会引起短暂的视力模糊。

大部分糖皮质激素滴眼液被证明存在升高患者眼压的趋势[24]，Sheppard 等[25] 通过研究发现与

醋酸泼尼松龙或地塞米松（联合妥布霉素）相比，氯替泼诺滴眼液显著降低了患者眼压升高的发生率，累积数据也证实了氯替泼诺滴眼液短期和长期使用均具有良好的安全性。在患者需要长期使用糖皮质激素滴眼液，但受到高眼压限制的情况下，氯替泼诺是治疗 NIU 眼前段炎症较好的选择。

NIU 的局部点药治疗已有许多新剂型的研究，包括纳米混悬剂、微乳剂、脂质体等，这些新型制剂有望成为传统滴眼液的潜在替代品。

2.3 眼周给药

眼周糖皮质激素注射有两种常见给药方法，一种是通过下眼睑皮肤将糖皮质激素注射到眼眶下间隙的跨隔法，另一种是眼球筋膜下注射，通过结膜和眼球筋膜将针放到巩膜表面，然后沿着球面向后推进，在接近后眼球后的眼球筋膜下区域注射 [26]。曲安奈德可以通过不同的方式进行眼球筋膜下注射，将糖皮质激素药物集中在靶位，避免全身不良反应。Sen 等 [27] 对 914 名患者（1192 只眼睛）进行了眼周糖皮质激素注射，有效治疗了大多数患者的炎症，在 6 个月内，将近 50% 的患者视力得到了改善。

眼周给药的不良反应与注射部位有关，给药后可能引发的并发症有药物眼球渗透、眼睑下垂、视网膜撕裂和脱离 [28] 等。有研究对眼周给药的两种方法进行比较，发现在 NIU 的治疗中两种方法的安全性和有效性差异不大 [29]。与玻璃体内注射给药相比，眼周给药疗效较弱，但安全性相对较高 [30]。

2.4 眼部药物离子导入

眼部药物离子导入是一种非侵入性的给药系统，通过利用电流促进带电药物在眼部组织内迁移，从而克服药物的眼部障碍 [31]。近年来，对经皮和眼部离子导入的研究越来越多，大量的实验验证了离子导入治疗眼部炎症性疾病的可行性。经巩膜离子导入给药没有玻璃体内注射和眼周注射的侵入性风险，已发展成为一种增加眼内生物利用度和延长作用时间的新型给药方式 [32]。

EyeGate Ⅱ输送系统是一种获得专利的经巩膜药物离子导入系统，目前，通过 EyeGate Ⅱ递送磷酸地塞米松已被广泛应用于治疗 NIU。Sheppard 等 [33] 将 193 例非感染性前葡萄膜炎分为两组，一组在第 0 日和第 7 日采用 EyeGate Ⅱ药物释放系统经巩膜离子导入磷酸地塞米松，另一组每日外用 1% 醋酸泼尼松龙，连续 28 d。结果表明两种疗法的安全性和耐受性都很好，在葡萄膜炎较严重的患者中，采用离子导入的患者眼压升高等不良反应发生率较少，疗效趋势更好。Cohen 等 [34] 将 40 名非感染性前葡萄膜炎患者随机分为 4 个离子电渗剂量组（1.6、4.8、10.0、14.0 mA·min^{-1}），通过 EyeGate Ⅱ输送磷酸地塞米松治疗，并随访至第 28 日。在研究过程中，各组平均眼压均保持在正常范围内，没有严重的不良事件报告；研究还发现低剂量是最有效的，而且治疗耐受性很好。

通过眼部药物离子导入可减少糖皮质激素滴眼液的需求，降低高眼压的风险，增加了患者便利性和治疗依从性，有望取代局部糖皮质激素滴眼液给药成为非感染性前部葡萄膜炎的治疗选择。

2.5 玻璃体内给药

玻璃体内糖皮质激素给药已逐渐取代全身给药用于治疗影响眼后段的 NIU。玻璃体内给药可分为玻璃体内注射和玻璃体内植入，通过将药物直接定位在玻璃体内，绕过泪膜屏障、血房水屏障、血视网膜屏障等多种眼部屏障，最大限度地减少所需的药物剂量和全身不良反应 [35]。

玻璃体内注射被认为是将药物直接输送到视网膜和脉络膜的最佳方式 [36]。但糖皮质激素药物在玻璃体内半衰期短，较难维持玻璃体内的有效浓度，并且需要频繁注射，易导致眼部结构损伤和感染。Steeples 等 [37] 在一个小型回顾性研究中，对 40 名患者（44 只眼）的玻璃体内注射不含苯甲醇的醋酸曲安奈德的疗效进行分析，结果表明患者平均视网膜中央厚度降低，视力得到改善，但改善持续时间有限。

玻璃体内植入能在较长的时间内进行低剂量玻璃体内给药，更适合慢性 NIU。此类给药方式研究的关键目标是使用不同的药物或缓释系统来延长药物在玻璃体内的滞留时间，满足疾病治疗需求的同时减少青光眼和白内障的发生。

地塞米松在眼中的半衰期为 3.5 h，为了满足眼后段 NIU 治疗需求需要设计成为缓释给药。一种可生物降解的地塞米松植入物 Ozurdex 由 PLGA 和地塞米松组成，缓释时间为 6 个月，给药后药物与载体在玻璃体内会慢慢被吸收，治疗效果会在 3 ～ 4 个月内减弱 [38]。Pohlmann 等 [39] 对 76 名伴有黄斑囊样水肿或玻璃体炎的 NIU 患者（109 眼）进行玻璃体内手术植入 0.7 mg 地塞米松，在注射后 1、3 和 6 个月进行随访。结果显示在 1 个月后，44% 的眼睛玻璃体混浊情况显著改善，在第 1、3、6 个月时患者视力均得到改善，平均眼压在术后 1 个月和 3 个月出现升高的情况。

非生物降解的 0.18 mg 醋酸氟轻松植入剂 Yutiq 于 2018 年在美国被批准用于治疗慢性 NIU。它是以醋酸氟轻松为核心的聚酰胺圆柱体，长度为 3.5 mm，直径为 0.37 mm [40]。一项涉及 129 名

NIU 患者的Ⅲ期研究，将患者分为氟轻松玻璃体内植入给药组和假手术组，分别在 6、12、36 个月时考察两组患者的累积葡萄膜炎复发率，结果表明 0.18 mg 的醋酸氟轻松植入剂能显著降低 NIU 的复发率，且首次复发的时间相应延长 [41-42]。

基于真实世界临床研究数据，2019 年 8 月，依托特许准入、先行先试政策，氟轻松玻璃体内植入剂在国内完成首次应用。2020 年 12 月，在国内该药品被纳入研究试点，临床显示植入氟轻松的患者 NIU 复发率降低，视力显著提高，随访期间未发生非预期的严重不良反应。国内外临床试验佐证其疗效，2022 年 6 月，国家药品监督管理局批准氟轻松玻璃体内植入剂上市。在此之前，国内 NIU 的治疗常用糖皮质激素全身给药联合免疫抑制剂，氟轻松玻璃体内植入剂的获批填补了国内 NIU 治疗玻璃体内给药的空白。氟轻松玻璃体内植入剂常用于全身治疗不耐受的患者，或者作为全身治疗的辅助手段。

玻璃体内给药价格昂贵，从玻璃体内植入物的临床试验中可以清晰地看到其控制 NIU 炎症优异的疗效，并且都具有良好的安全性。与注射相关的不良反应有玻璃体出血、视网膜脱离、植入物迁移 [43] 和非感染性眼内炎 [44]，产生的不良反应在可接受范围内。

3 总结与展望

糖皮质激素起效快，药效好，是治疗 NIU 的首选药物，但长期应用和高剂量带来的不良反应在一定程度上限制了其临床应用。不同的糖皮质激素药物和给药途径产生的药效与安全性不一样，糖皮质激素全身给药疗效强、起效快，是治疗的主要方式，但耐受性差，易出现糖皮质激素抵抗；局部点药一般剂量低，优于全身给药，但更易导致眼压升高，诱导白内障形成；玻璃体内植入物，在一定程度上能避免全身不良反应，长期使用易导致白内障和青光眼，需要进一步优化植入物的剂量、作用时间和给药部位。不同给药途径的优势与劣势见表 1。

表 1 糖皮质激素不同给药途径的优势与劣势比较

Tab 1 Advantages and disadvantages of each administration route glucocorticoids

给药途径	优势	劣势
全身给药	见效快、疗效强；治疗严重 NIU；与局部点药相比，白内障和青光眼发生率低	不良反应较为严重，如低钾血症、高血糖症和糖尿病、库欣综合征、心血管疾病和免疫抑制；不适合长期给药
局部点药	给药方便；患者依从性高	需要频繁使用；对中后段 NIU 无效
眼周给药	与局部点药相比，药效持久；与玻璃体内给药相比，眼周给药侵入性小更加安全，且可注射剂量更高；避免了全身不良反应，药物直达病灶	不良反应与注射部位有关；需重复注射
眼部药物离子导入	减少滴眼液的需求；眼压升高发生率低；与局部点药相比，眼部清除率低，生物利用度高；与眼部注射相比，患者依从性更好	导入药物离子数量少，不能精确控制，临床无法达到全面推广；需要相应的离子导入设备
玻璃体内给药	与全身给药和局部点药相比，药物在眼内具有更高浓度，治疗中后段 NIU 疗效优；玻璃体内植入物作用时间长	可能导致眼压升高和白内障；植入物前房迁移

总的来说，需综合考虑 NIU 的严重程度、发病部位、潜在病因、患者病史、经济和顺应性等找到最佳的给药方案，通过适当的治疗严格控制 NIU，同时最大限度地减轻相关不良反应。

参考文献

[1] Hermann L，Falcão-Reis F，Figueira L. Epidemiology of uveitis in a tertiary care centre in Portugal [J]. Semin Ophthalmol，2021，36（1-2）：51-57.

[2] Farhadi J，Nouri M，Sakhinia E，et al. Epigenetics and Behçet’s disease：DNA methylation specially highlighted [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol，2019，18（5）：462-472.

[3] Modugno RL，Testi I，Pavesio C. Intraocular therapy in noninfectious uveitis [J]. J Ophthalmic Inflamm Infec，2021，11（1）：37.

[4] 王蒙蒙，任戎，李丽，等 . 糖皮质激素在重型及危重型 COVID-19 患者中的应用进展 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1605-1609.

[5] Ferreira LB，Farrall AL，Furtado JM，et al. Treatment of noninfectious uveitis [J]. Arq Bras Oftalmol，2021，84（6）：610-621.

[6] Dang DH，Riaz KM，Karamichos D. Treatment of non-infectious corneal injury：review of diagnostic agents，therapeutic medications，and future targets [J]. Drugs，2022，82（2）：145-167.

[7] Fan NW，Li J，Mittal SK，et al. Characterization of clinical and immune responses in an experimental chronic autoimmune uveitis model [J]. Am J Pathol，2021，191（3）：425-437.

[8] Jia WY，Zhang JJ. Effects of glucocorticoids on leukocytes：genomic and non-genomic mechanisms [J]. World J Clin Cases，2022，10（21）：7187-7194.

[9] Syed AP，Greulich F，Ansari SA，et al. Anti-inflammatory glucocorticoid action：genomic insights and emerging concepts [J]. Curr Opin Pharmacol，2020，53：35-44.

[10] Lesovaya EA，Chudakova D，Baida G，et al. The long winding road to the safer glucocorticoid receptor（GR）targeting therapies [J]. Oncotarget，2022，13：408-424.

[11] Längericht J，Krämer I，Kahaly GJ. Glucocorticoids in Graves’orbitopathy：mechanisms of action and clinical application [J]. Ther Adv Endocrinol Metab，2020，11：2042018820958335.

[12] Li AFY，Wang CL，Tai HY，et al. Pandemic aspect of dexamethasone：molecular mechanisms and clinical application [J]. J

Chin Med Assoc，2021，84（3）：245-247.
[13] Matsushita T. Corticosteroid therapy in patients with autoimmune diseases of the central nervous system [J]. Brain Nerve，2021，73（5）：408-413.
[14] Panettieri RA，Schaafsma D，Amrani Y，et al. Non-genomic effects of glucocorticoids：an updated view [J]. Trends Pharmacol Sci，2019，40（1）：38-49.
[15] Nuñez FJ，Johnstone TB，Corpuz ML，et al. Glucocorticoids rapidly activate cAMP production via G to initiate non-genomic signaling that contributes to one-third of their canonical genomic effects [J]. FASEB J，2020，34（2）：2882-2895.
[16] 戴学栋，尹华静，王庆利，等 . 眼科药物非临床研究的考虑 [J]. 中南药学，2018，16（10）：1345-1349.
[17] Agrawal H，Doan H，Pham B，et al. Systemic immunosuppressive therapies for uveitis in developing countries [J]. Indian J Ophthalmol，2020，68（9）：1852-1862.
[18] Foster CS，Kothari S，Anesi SD，et al. The ocular immunology and uveitis foundation preferred practice patterns of uveitis management [J]. Surv Ophthalmol，2016，61（1）：1-17.
[19] Charkoudian LD，Ying GS，Pujari SS，et al. High-dose intravenous corticosteroids for ocular inflammatory diseases [J]. Ocul Immunol Inflamm，2012，20（2）：91-99.
[20] Wu K，Michalski A，Cortes D，et al. Glucocorticoid-induced myopathy in people with asthma：a systematic review [J]. J Asthma，2022，59（7）：1396-1409.
[21] Wong CW，Metselaar JM，Storm G，et al. A review of the clinical applications of drug delivery systems for the treatment of ocular anterior segment inflammation [J]. Br J Ophthalmol，2021，105（12）：1617-1622.
[22] Valenzuela RA，Flores I，Urrutia B，et al. New pharmacological strategies for the treatment of non-infectious uveitis. a minireview [J]. Front Pharmacol，2020，11：655.
[23] Vooturi S，Bourne D，Panda JJ，et al. Effect of particle size and viscosity of suspensions on topical ocular bioavailability of budesonide，a corticosteroid [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2020，36（6）：404-409.
[24] Musleh MG，Bokre D，Dahlmann-Noor AH. Risk of intraocular pressure elevation after topical steroids in children and adults：a systematic review [J]. Eur J Ophthalmol，2020，30（5）：856-866.
[25] Sheppard JD，Comstock TL，Cavet ME. Impact of the topical ophthalmic corticosteroid loteprednol etabonate on intraocular pressure [J]. Adv Ther，2016，33（4）：532-552.
[26] McKay KM，Borkar DS，Sevgi DD，et al. Comparison of modified posterior sub-tenon’s vs. trans-septal triamcinolone injection for non-infectious uveitis [J]. Ocul Immunol Inflamm，2021，29（5）：857-864.
[27] Sen HN，Vitale S，Gangaputra SS，et al. Periocular corticosteroid injections in uveitis：effects and complications [J]. Ophthalmology，2014，121（11）：2275-2286.
[28] Mohan R，Fazal R. Periocular steroids for macular edema associated with retinal arteriovenous malformation：a case report [J]. Indian J Ophthalmol，2020，68（10）：2298-2300.
[29] Gagnon NA，Hartley C，Gilger BC. Efficacy and safety of suprachoroidal triamcinolone injection in horses with poorly responsive equine recurrent uveitis [J]. Vet Ophthalmol，2021，24（3）：308-312.
[30] José-Vieira R，Ferreira A，Menéres P，et al. Efficacy and safety of intravitreal and periocular injection of corticosteroids in noninfectious uveitis：a systematic review [J]. Surv Ophthalmol，2022，267（4）：991-1013.
[31] Perez VL，Wirostko B，Korenfeld M，et al. Ophthalmic drug delivery using iontophoresis：recent clinical applications [J]. J Ocul Pharmacol Ther，2020，36（2）：75-87.
[32] Drakon AK，Pateyuk LS，Sheludchenko VM，et al. Lekarstvennyi elektroforez v oftal’mologii [Ocular iontophoresis] [J]. Vestn Oftalmol，2021，137（6）：119-127.
[33] Sheppard J，Garg S，Lievens C，et al. Iontophoretic dexamethasone phosphate compared to topical prednisolone acetate 1% for noninfectious anterior segment uveitis [J]. Am J Ophthalmol，2020，211：76-86.
[34] Cohen AE，Assang C，Patane MA，et al. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis [J]. Ophthalmology，2012，119（1）：66-73.
[35] Alba-Linero C，Sala-Puigdollers A，Romero B，et al. Long-term intravitreal dexamethasone implant outcomes in uveitis [J]. Ocul Immunol Inflamm，2020，28（2）：228-237.
[36] Panos GD. Advances in intravitreal therapy and implants：where are we now? [J]. Ther Deliv，2020，11（2）：69-73.
[37] Steeples LR，Anand N，Moraji J，et al. Clinical outcomes of intravitreal preservative-free triamcinolone preparation（Triesence®）for cystoid macular oedema and inflammation in patients with uveitis [J]. Ocul Immunol Inflamm，2018，26（7）：997-1004.
[38] Lam WC，Albiani DA，Yoganathan P，et al. Real-world assessment of intravitreal dexamethasone implant（0.7 mg）in patients with macular edema：the CHROME study [J]. Clin Ophthalmol，2015，9：1255-1268.
[39] Pohlmann D，Vom Brocke GA，Winterhalter S，et al. Dexamethasone inserts in noninfectious uveitis：a single-center experience [J]. Ophthalmology，2018，125（7）：1088-1099.
[40] Jaffe GJ，Lin P，Keenan RT，et al. Injectable fluocinolone acetonide long-acting implant for noninfectious intermediate uveitis，posterior uveitis，and panuveitis：two-year results [J]. Ophthalmology，2016，123（9）：1940-1948.
[41] Jaffe GJ，Foster CS，Pavesio CE，et al. Effect of an injectable fluocinolone acetonide insert on recurrence rates in chronic noninfectious uveitis affecting the posterior segment：twelve-month results [J]. Ophthalmology，2019，126（4）：601-610.
[42] Jaffe GJ，Foster CS，Pavesio CE，et al. Effect of a fluocinolone acetonide insert on recurrence rates in noninfectious intermediate，posterior，or panuveitis：three-year results [J]. Ophthalmology，2020，127（10）：1395-1404.
[43] Mahmud H，Stewart JM. Migration of a fluocinolone acetonide implant（Yutiq）to the anterior chamber and its nonurgent removal [J]. Am J Ophthalmol Case Rep，2020，20：100987.
[44] Mason RH，Ballios BG，Yan P. Noninfectious endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide：clinical case and literature review [J]. Can J Ophthalmol，2020，55（6）：471-479.

（收稿日期：2022-11-14；修回日期：2023-03-14）

小柴胡汤对化疗的增效减毒作用研究进展

王航天[1, 2]，何娜[1, 2]，朱婧[1, 2]，张静媚[1, 2]，辛灵怡[1, 2]，陈琴华[3]，杨光义[1, 2*]（1. 深圳市中西医结合医院，广东　深圳　518104；2. 广州中医药大学第七临床医学院，广东　深圳　518000；3. 深圳市宝安纯中医治疗医院，广东　深圳　518102）

摘要：化疗是现代治疗恶性肿瘤的重要治疗方式，但是化疗具有选择性低、不良反应大等问题，严重影响患者的生命质量。经典方剂小柴胡汤可有效改善化疗引起的毒副作用，同时协同增强化疗的抗肿瘤活性。目前，小柴胡汤联合化疗已应用于肝癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤的治疗。现代研究表明，小柴胡汤对化疗增效减毒作用主要体现在促进肿瘤细胞凋亡、调节信号通路、逆转化疗耐药、增强免疫力等方面。本文结合国内外文献，总结了小柴胡汤对化疗增效减毒的作用机制，并对其临床应用进行综述。

关键词：小柴胡汤；化疗；增效；减毒；恶性肿瘤

中图分类号：R259.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2151-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.030

Research progress in synergismtic effect of Xiaochaihu decoction on chemotherapy and toxicity reducation

WANG Hang-tian[1, 2], HE Na[1, 2], ZHU Jing[1, 2], ZHANG Jing-mei[1, 2], XIN Ling-yi[1, 2], CHEN Qin-hua[3], YANG Guang-yi[1, 2*] (1. *Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shenzhen Guangdong* 518104; 2. *The Seventh Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong* 518000; 3. *Shenzhen Bao'an Hospital of Authentic Traditional Chinese Medicine Therapy, Shenzhen Guangdong* 518102)

Abstract: Chemotherapy is an important treatment for malignant tumors, but due to low selectivity and side effects, chemotherapy seriously affect the quality of life of patients. The classical formula Xiaochaihu decoction can effectively reduce the toxic effects caused by chemotherapy, while synergistically enhancing the anti-tumor activity of chemotherapy. At present, Xiaochaihu decoction combined with chemotherapy has been applied in the treatment of liver cancer, breast cancer, lung cancer and other malignant tumors. Modern studies have shown that the efficacy and toxicity-reducing effects of Xiaochaihu decoction on chemotherapy are mainly reflected in promoting apoptosis of tumor cells, regulating signaling pathways, mitigation of chemotherapy resistance, and enhancing the immunity. This paper summarized the mechanism of effect of Xiaochaihu decoction on the efficacy and toxicity reduction of chemotherapy, and reviewed its clinical application based on domestic and foreign literatures.

Key words: Xiaochaihu decoction; chemotherapy; efficacy enhancement; toxicity reduction; malignant tumor

小柴胡汤是张仲景所著《伤寒论》中的经典汉方，由柴胡、黄芩、人参、半夏、炙甘草、生姜、大枣所组成。方中柴胡味辛、苦，气微寒，入肝胆经，能疏泄气机之郁滞；又配黄芩清泄少阳之热，平调阴阳；佐以生姜、半夏调胃失和降，人参、甘草、大枣益气补中，扶正祛邪；全方并

基金项目：深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助（No.SZZYSM202106004）；深圳市科创委项目（No.JCYJ20210324142012033）。

作者简介：王航天，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：Kedyso_tian@163.com　*通信作者：杨光义，男，博士，主要从事医院药学管理、中药活性成分与药代动力学研究，email：13971908298@163.com

用，共奏和解表里、调和阴阳之功效，可用于治疗肝郁脾虚、寒热互结之症[1]。现代研究发现小柴胡汤具有多种药理活性，如免疫调节[2]、解热抗炎[3]、保肝护胃、抗病毒、抗肿瘤[4]等。临床主要用于治疗感冒、肝硬化、肝炎等常见疾病。此外，有报道小柴胡汤对肝癌[5]、乳腺癌[6]和肺癌[7]等多种癌症均具有较好的疗效。

恶性肿瘤是严重威胁人类生命健康的危险性疾病。目前其治疗手段仍然以疗效相对较好的化疗为主，而化疗在杀伤肿瘤细胞的同时会对机体正常细胞产生一定的杀伤性，从而引发心脏毒性、胃肠道毒性、骨髓抑制、肝肾功能损伤等毒副作用[8]，并且极易产生耐药性[9]。近年来，有不少研究发现小柴胡汤不仅可增强化疗对癌症治疗的作用，还可降低化疗在癌症治疗中产生的毒副作用[5-7，10-11]。因此，本文就小柴胡汤对化疗增效减毒的作用机制及临床应用情况的相关文献进行综述，以期为提高恶性肿瘤治疗方法的安全性和有效性提供参考。

1 小柴胡汤对化疗的协同增效作用

1.1 协同化疗增效的作用机制

小柴胡汤和化疗药物联合用药可以起到协同增效的作用。T 淋巴细胞等免疫细胞对肿瘤细胞具有杀伤作用，小柴胡汤通过提高免疫细胞水平来抑制肿瘤的发展[12]。小柴胡汤联合经导管静脉栓塞治疗（TACE）能有效保护患者的细胞免疫及体液免疫功能，显著提高患者免疫功能水平[5]。黄小龙等[13]给予晚期乳腺癌患者小柴胡汤联合化疗治疗，结果显示联合治疗组患者 $CD4^+$/$CD8^+$、IgG、IgM 等免疫球蛋白水平高于单纯化疗组患者，且肿瘤标志物癌胚抗原（CEA）、CA15-3 水平低于单纯化疗组。宗嘉宝等[10]临床研究验证小柴胡汤可显著提高 T 淋巴细胞水平，增强患者免疫力，因此小柴胡汤联合化疗药物治疗癌症患者的疗效优于单用化疗药物。

小柴胡汤可增强环磷酰胺对肝癌小鼠的疗效，抑制肝癌细胞的增殖，促进肝癌细胞凋亡[14]。邵和一等[15]探究小柴胡汤联合顺铂对 HepG2 肝癌细胞凋亡的影响，发现小柴胡汤可增强顺铂对 HepG2 肝癌细胞促凋亡效果。其机制为小柴胡汤可协同顺铂减少抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，增强促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达（见图 1）。进一步基因通路分析发现，小柴胡汤抑制肝癌组织中增长标志物 ki-67 的表达并改变了 Bax、Bcl-2、CDK4 和 cyclin-D1 的表达，从而阻止肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡（见图 1）[16]。NF-κB 通路已被认为是人类肿瘤中的一种致癌信号，与肿瘤患者的不良反应有密切关系[17]，且 TNF-α 受到该通路调节（见图 2）[18-19]。研究发现小柴胡汤可抑制 NF-κB 信号通路[20-22]，降低 TNF-α 等炎性因子水平[23]。因此，可推测小柴胡汤能通过影响凋亡蛋白的表达、调节 NF-κB 信号通路的表达等进一步增强化疗的治疗效果。

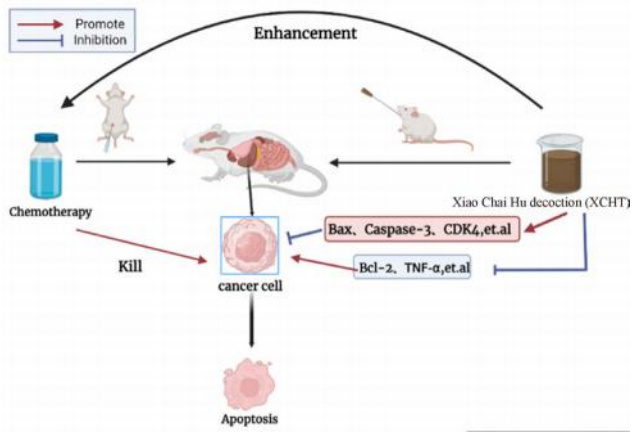

图 1 小柴胡汤对化疗药物的协同增效作用

Fig 1 Synergistic effect of Xiaochaihu decoction on chemotherapeutic drugs

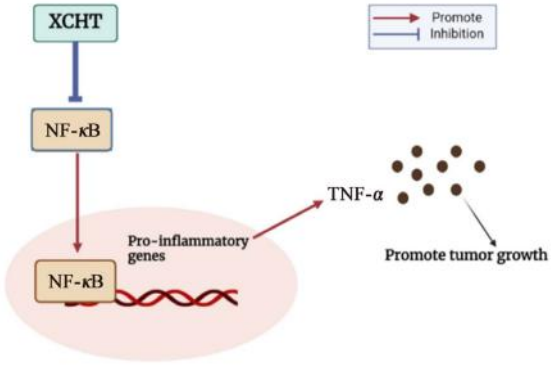

图 2 小柴胡汤作用的基因通路分析

Fig 2 Gene pathway analysis of the action of Xiaochaihu decoction

由此可见，小柴胡汤与化疗药物联用，通过发挥药物各自的作用，从改善免疫功能，抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡等多个环节产生协同效果。小柴胡汤联合化疗药物不仅增强化疗对肿瘤细胞的促凋亡效果，还可有效抑制肿瘤生长。这提示小柴胡汤与化疗药物联合治疗恶性肿瘤具有明显优势，是中药辅助西药治疗的具体体现。

1.2 逆转肿瘤细胞对化疗的耐药作用

化疗的多药耐药现象严重阻碍了化疗疗效[24]，其原因之一为多药耐药基因产物 P-gp 的过度表达[25]；P-gp 是一种跨膜蛋白，可将化疗药物排至细胞外，降低细胞内药物浓度，使细胞产生

耐药性[26]。盖晓东等[27]发现小柴胡汤具有逆转肝癌细胞对长春新碱多药耐药的作用，其机制可能为小柴胡汤降低肝癌细胞 P2170 糖蛋白的水平、抑制多药耐药基因 mRNA 的表达，由此增加耐药肝癌细胞内长春新碱的累积，加强长春新碱对肿瘤细胞的阻滞作用。小柴胡汤能通过调控 miR-122 逆转肝癌多药耐药，其作用机制与调节耐药基因表达、抑制细胞周期和抗凋亡基因相关[28]。赵锦燕等[29]通过体内外实验研究小柴胡汤对肝癌细胞多药耐药基因表达的影响，发现小柴胡汤干预后，BEL-7450/5-FU 细胞多药耐药基因表达明显下调，P-gp 蛋白表达也呈下降趋势，且小柴胡汤能够抑制药物泵的外排作用。因此小柴胡汤可以逆转 BEL-7450/5-FU 细胞抑制瘤的化疗耐药。

以上研究表明，小柴胡汤可有效逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药性，主要机制为增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感度，提高化疗药物在细胞内的浓度，抑制耐药基因的表达。

2　小柴胡汤对化疗的调和减毒作用

2.1　减轻化疗引起的胃肠道反应

治疗恶性肿瘤时，化疗会引起严重的胃肠道毒副作用，临床表现为腹痛、腹泻、胃肠出血等，主要原因有黏膜屏障功能受损[30]和肠道微生物群失调[31]。吴山永等[32]研究发现小柴胡汤可以提高机体内肠道乳杆菌、双歧杆菌等菌群水平，调节胃肠道功能，保护肠道菌群和肠道黏膜。小柴胡汤中主要活性成分黄芩素具有保肝、抗炎、抗肿瘤等药理活性[33]。王睿等[34]发现黄芩素可降低小鼠炎性因子的含量、减缓炎症反应发生、促进肠道菌群正常化，有效改善小鼠化疗性肠黏膜炎。

伊立替康（CPT-11）为治疗大肠癌的一线化疗药物，其活性代谢产物 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱（SN-38）在肠局部浓度过高时会引起肠黏膜损伤导致血便[35]。小柴胡汤通过影响 CPT-11 的体内代谢，减少 SN-38 在肠腔中的浓度及滞留时间，从而减轻 CPT-11 所致的肠黏膜损伤[36]。葡萄糖醛酸化转移酶（UGTs）可代谢毒性化合物 SN-38，小柴胡汤能显著上调 UGTs 的肠道活性，加强该酶对 SN-38 的灭活作用从而降低 CPT-11 毒性[37]。CPT-11 存在肝肠循环，宋文杰[38]研究发现小柴胡汤能通过抑制外排转运蛋白 P-gp、多药耐药蛋白（MRP2）和乳腺癌耐药蛋白（BCRP）的表达，降低 CPT-11 及其代谢物的胆汁排泄量（见图 3）。

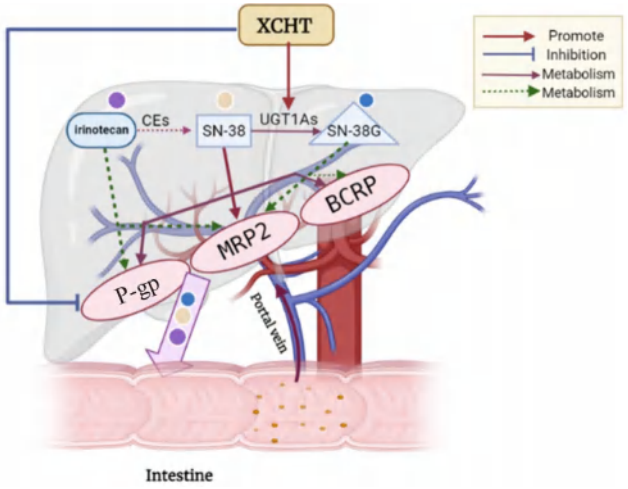

图 3　小柴胡汤对肠毒性的抑制作用

Fig 3　Inhibitory effect of Xiaochaihu decoction on enterotoxicity

可见，小柴胡汤的“保效减毒”的作用[39]，可有效缓解化疗引起的胃肠毒性，调节胃肠道功能，保护肠道菌群和肠道黏膜受损。综上，小柴胡汤对化疗的调和减毒作用显著，具有作为化疗辅助药物的潜力。

2.2　减轻化疗引起的肝肾和免疫器官损伤

化疗药物的选择性不高，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会对肝、肾及免疫系统等产生毒副作用。Chen 等[40]探究小柴胡汤对甲氨蝶呤诱导的肝损伤的保护作用，发现小柴胡汤有效降低了肝酶谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）水平，降低了肝组织的组织学恶化，证明小柴胡汤对甲氨蝶呤诱导的大鼠肝损伤具有保护作用。吴芙蓉等[41]研究证实小柴胡汤可以降低血清中 ALT、AST 水平，减轻肝脏病理学损伤程度，对肝脏起到保护作用。

Nrf2 通路是细胞抗氧化的关键途径，该信号通路可以调节抗氧化酶水平以及消除氧自由基和其他有害物质，从而达到解毒中和的作用[42]。研究发现，小柴胡汤可以抑制肝 HSCT6 细胞的增殖和激活，其机制可能与 Nrf2 途径的上调有关[43]。贾为壹等[44]进行的动物实验验证了小柴胡汤通过 Nrf2 通路保护肝损伤、改善肝功能。顺铂及阿霉素联合用药可以诱导细胞膜脂质过氧化、细胞膜裂解从而引起肝细胞变性甚至坏死。刘应柯等[45]探讨小柴胡汤对顺铂与阿霉素所产生肝肾损伤的保护作用，发现服用加味小柴胡汤的实验小鼠肝细胞变性数量减少，可知加味小柴胡汤具有增强细胞抗氧化的作用，并且可保护小鼠的肝、肾等靶器官。

化疗易引起机体免疫功能抑制，小柴胡汤可

以刺激淋巴细胞[46]和巨噬细胞[47]的生成，激活免疫系统，对人体的免疫功能起保护作用。胸腺是机体重要的免疫器官，王军等[48]发现小柴胡汤能显著提高小鼠胸腺指数，拮抗环磷酰胺的免疫抑制作用，提高肿瘤坏死因子（TNF）-α、白细胞介素（IL）-2 在血液中的浓度，增强细胞免疫。唐小云等[49]探讨小柴胡汤对免疫抑制小鼠淋巴细胞的共刺激分子的调节作用，发现小柴胡汤有明显上调淋巴细胞表达的作用，调节机体免疫功能。张雯雯等[50]系统评价了 880 例原发性肝癌患者发现，小柴胡汤联合 TACE 可显著改善患者的肝功能，降低 TACE 疗法所带来的不良反应，提高患者的生活质量与生存率。

Liu 等[51]研究了小鼠肝癌伴肝郁脾虚期间，小柴胡汤可以通过肠道、肝脏和大脑中的脂多糖 - 儿茶酚胺（LPS-CA）相互作用来减轻氧化应激和碱性磷酸酶（ALP）失活之间的恶性循环，最终改善肠、肝和脑损伤以及肠 - 肝 - 脑相互作用的功能障碍。

综上，小柴胡汤对机体的保护主要在肝、肾及免疫系统，其机制主要有调节肝酶水平、增强细胞的抗氧化水平、加强机体免疫功能，进而保护肝、肾等器官。

3 小柴胡汤联合化疗的临床应用

3.1 小柴胡汤协同增效的临床应用

中国的肝癌发病人数及死亡人数均居世界首位[52]。小柴胡汤中柴胡具有疏肝解郁的作用，配以黄芩清热燥湿解毒及人参扶正驱邪的作用，可有效辅助化疗药物治疗肝癌患者，改善患者生活质量。赵玉芬[53]使用小柴胡汤联合 TACE 治疗肝癌患者，其治疗结果显示，在 TACE 治疗基础上采用小柴胡汤加减辅助治疗可以稳定肿瘤的增长。孟凡瑞等[54]同样采用小柴胡汤加味联合 TACE 治疗 120 例原发性肝癌患者，结果发现小柴胡汤组甲胎蛋白水平相较于对照组下降明显，小柴胡汤联合治疗可明显提高 TACE 对原发性肝癌的治疗疗效。

乳腺癌病因病机与肝气郁结、阴血亏虚、痰瘀互阻有关，小柴胡汤加减以和解少阳，有疏肝健脾，化痰散结之功效。陈宏鹏等[6]对乳腺癌患者采用小柴胡汤联合静脉化疗。治疗后患者血清肿瘤标志物水平低于单纯化疗的患者。这提示小柴胡汤可降低肿瘤标志物的增长速度，提高静脉化疗的疗效。刘宝义[11]以 132 例晚期乳腺癌患者为研究对象，发现给予小柴胡汤辅助化疗组临床疗效明显高于对照组（$P < 0.05$）。因此小柴胡汤辅助化疗可有效提高治疗疗效，改善患者的临床症状。

3.2 小柴胡汤调和减毒的临床应用

近年来，小柴胡汤与多种肿瘤治疗手段联合应用可显著降低毒副作用，主要包括对肺癌、肝癌和乳腺癌等患者的治疗。盘锋等[7]对 122 例非小细胞肺癌术后患者进行小柴胡汤辅助常规化疗，发现小柴胡汤辅助常规化疗不仅不影响手术进程，还能改善机体机能，减少毒副反应的发生。蒋庆锋等[55]以小柴胡汤辅助 GP 化疗方案（吉西他滨＋顺铂及抗药物不良反应的药物）对肺癌晚期患者进行治疗，治疗后患者 KPS 评分明显提升，且明显高于单纯使用 GP 化疗组（$P < 0.05$）。唐婷婷等[56]探究小柴胡汤辅助化疗对晚期肺癌患者免疫功能及炎性因子的影响，结果患者的炎性因子水平降低、免疫功能增强，且肾功能损伤、恶心呕吐等不良反应明显下降。王文英等[57]对 64 例原发性肝癌患者采用小柴胡汤联合微波消融法治疗，结果发现小柴胡汤干预后，可有效改善患者肝功能，调节肿瘤微环境，延长生存期。杜家豪等[58]发现患者静脉注射化疗药物同时口服小柴胡汤的生命质量评分提升，不良反应如恶心呕吐、头痛头晕、肾损伤、心脏毒性等发生率均降低，其机制为小柴胡汤可增强乳腺癌患者的免疫能力从而提高临床疗效，提高患者生命质量。

由此可见，已有大量的临床实践表明小柴胡汤可改善化疗药物的毒副作用，使患者生活质量水平得到提高（见图 4）。因此，小柴胡汤这一经典方剂在未来有望成为化疗临床治疗的辅助药物。

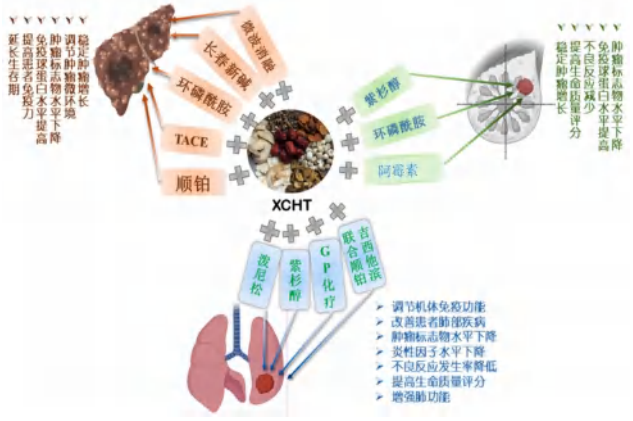

图 4 小柴胡汤联合化疗在临床中的应用

Fig 4 Xiaochaihu decoction combined with chemotherapy in clinical practice

4 讨论

小柴胡汤在治疗恶性肿瘤的增效减毒方面效果显著，表现为小柴胡汤通过提高化疗药物在细胞内的浓度、抑制耐药基因的表达等机制发挥逆转化疗耐药的综合作用，同时发挥小柴胡汤平衡阴阳等自身优势抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡、调节信号通路，增强化疗对肿瘤细胞的诱导凋亡作用。另外，小柴胡汤可有效减轻化疗引起的毒副反应，改善肝肾的组织学恶化，并且小柴胡汤具有增强患者免疫力、保护患者机体生理功能的作用。需要注意的是，小柴胡汤在辅助西药抗肿瘤方面存在许多问题，本文建议可从以下几个方面加强小柴胡汤与化疗药物的结合抗肿瘤研究。

① 加强小柴胡汤的抗肿瘤作用机制研究。可通过数据挖掘和网络药理学分析小柴胡汤抗肿瘤的药效物质基础及其作用靶点[59]，通过分子对接等手段初步预测成分与靶点间的作用。再结合体外细胞实验及体内动物实验进一步验证，最终循序渐进地阐明小柴胡汤对化疗药物增效减毒作用的机制。小柴胡汤在减轻化疗所致的机体损伤时具有抗氧化作用，可采用分子杂交等技术考察小柴胡汤对相关基因表达水平及其蛋白活性的影响。同时，对已筛选到的小柴胡汤活性成分如槲皮素、黄芩苷等开展体内实验证实其活性[60]。小柴胡汤与化疗药物联用可能会发生化学反应，观测小柴胡汤在体内与化疗药物作用时产生的新成分并加以分析，并且在体内进一步研究小柴胡汤的药效药代动力学过程。

② 提升小柴胡汤抗肿瘤的临床证据质量。小柴胡汤辅助化疗药物治疗已经有大量的临床研究，但是，上述临床研究存在样本量小、随机性差等问题，具有局限性。建议通过现代人工智能等大数据方法对肿瘤的诊断和小柴胡汤的疗效进行客观的统计及归类分析，严格依据国际规范进行临床试验设计、注册、实施和报告，建立健全小柴胡汤的临床数据共享互联网平台，以便更好地提高小柴胡汤的临床证据水平。

③ 目前关于小柴胡汤的研究多聚焦于“增效”，关于“减毒”方面的机制研究较少，值得进一步深入探索和解析。小柴胡汤是《伤寒论》中的经典方剂，在长期使用及研究中未发现明显不良反应及毒性[61]。值得注意的是，小柴胡汤中含有半夏，半夏为有毒物质，在使用时应严格遵循医嘱。小柴胡汤与化疗药物合理联用能取得良好的治疗效果，但化疗药物受中药成分协同、拮抗而致吸收、代谢改变，可能引起过敏、肾衰竭等新的不良反应，因此中西药合用体外实验不可缺少，但体外实验并不能代表体内真实情况，要定期对患者进行检查，避免长期合用药物对人体造成伤害。建议可以重点关注小柴胡汤在临床应用中的安全性及有效性，在此基础上，循序渐进地阐明“减毒”的内在作用机制。

中医药在我国历史悠久，资源丰富。广泛分布于中草药中的葫芦素 E 可作为大肠癌治疗的增敏剂[62]；葛根芩连汤能降低肿瘤细胞的免疫逃逸[63]；黄芩汤与广谱抗肿瘤药物联用能明显增强化疗药物的抗肿瘤活性，降低化疗毒性[64]。由此，中药作为补充和替代疗法对癌症治疗具有重要意义，发挥中医药辨证论治的特点，重视个体差异和病症演变，为恶性肿瘤治疗提供更多的选择与策略。

参考文献

[1] 马萌，王克穷 . 基于《伤寒论》和法理论探析肿瘤经方论治思路 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（2）：997-1001.

[2] 杨清鑫，吕红君，王小博，等 . 基于中药整合药理学计算平台的小柴胡汤抗脓毒症的分子机制研究 [J]. 中国药房，2019，30（11）：1506-1512.

[3] 陈平安，黄家望，廖灿，等 . 小柴胡汤对 NTHi 诱导的肺部炎症的影响 [J]. 中医药学报，2019，47（4）：28-32.

[4] 李燕，刘怀民，彭亮，等 . 小柴胡汤对食管癌化疗增敏及免疫耐受的逆转作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志，2018，26（7）：579-581，585.

[5] 许文翼，金大业，吴倩倩，等 . 小柴胡汤联合常规疗法对原发性肝癌 TACE 术后患者免疫功能及生活质量的影响 [J]. 新中医，2022，54（13）：151-154.

[6] 陈宏鹏，郑霭萱，陈俊鹏 . 小柴胡汤联合静脉化疗对晚期三阴型乳腺癌患者肿瘤标志物及免疫功能的影响 [J]. 黑龙江医药，2021，34（3）：614-616.

[7] 盘锋，陈运芳 . 小柴胡汤辅助常规化疗对Ⅱ—ⅢA 期非小细胞肺癌术后患者 CEA、CA199、CA125 水平的影响 [J]. 中国药物滥用防治杂志，2022，28（3）：353-358.

[8] Hsiao YH，Kuo SJ，Tsai HD，et al. Clinical application of high-intensity focused ultrasound in cancer therapy [J]. J Cancer，2016，7（3）：225-231.

[9] 苗耀东，李英红，沈浩玥，等 . 恶性肿瘤化疗所致骨髓抑制的中医药研究进展 [J]. 吉林中医药，2019，39（2）：273-277.

[10] 宗嘉宝，韩磊，卢元丽，等 . 小柴胡汤联合泼尼松对肺癌患者免疫性肺炎及 T 淋巴细胞的影响 [J]. 肿瘤药学，2021，11（5）：607-611.

[11] 刘宝义 . 小柴胡汤辅助化疗治疗晚期乳腺癌的近期疗效观察 [J]. 中国医药指南，2019，17（2）：148.

[12] 姜夏微，张延芳，郑秀峰，等 . 小柴胡汤加减联合环磷

酰胺及激素治疗系统性红斑狼疮的临床研究 [J]. 中医药导报，2016，22（9）：72-74.
[13] 黄小龙，王玮，木海鸥 . 小柴胡汤联合化疗对晚期乳腺癌患者免疫功能及血清肿瘤标志物的影响 [J]. 中国卫生检验杂志，2018，28（21）：2619-2621，2625.
[14] 王珊丽，王迎，赵金茹，等 . 小柴胡汤联合环磷酰胺对 EAC 肝癌小鼠细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 实用中医内科杂志，2011，25（5）：38-39.
[15] 邵和一 . 小柴胡汤含药血清联合顺铂对 Hep-G2 肝癌细胞凋亡的影响 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2018.
[16] Zhao JY，Liu LY，Zhang YC，et al. The herbal mixture Xiao-Chai-Hu Tang（XCHT）induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma Huh7 cells in vitro and in vivo [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med，2017，14（3）：231-241.
[17] Lupi LA，Cucielo MS，Silveira HS，et al. The role of Toll-like receptor 4 signaling pathway in ovarian，cervical，and endometrial cancers [J]. Life Sci，2020，247（C）：117435.
[18] Perez-Pardo P，Dodiya HB，Engen PA，et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson’s disease：a translational study from men to mice [J]. Gut，2019，68（5）：829-843.
[19] Sun MF，Zhu YL，Zhou ZL，et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson’s disease mice：gut microbiota，glial reaction and TLR4/TNF-alpha signaling pathway [J]. Brain Behav Immun，2018，70：48-60.
[20] Shao SY，Jia R，Zhao L，et al. Xiao-Chai-Hu-Tang ameliorates tumor growth in cancer comorbid depressive symptoms via modulating gut microbiota-mediated TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway [J]. Phytomedicine，2021，88：153606.
[21] Jin JY，Chen B，Zhan XY，et al. Network pharmacology and molecular docking study on the mechanism of colorectal cancer treatment using Xiao-Chai-Hu-Tang [J]. PLoS One，2021，16（6）：e0252508.
[22] 邵诗芸，温昊天，张兆洲，等 . 小柴胡汤对压力应激性大肠癌小鼠 NF-κB /NLRP3 信号通路的影响 [J]. 上海中医药杂志，2020，54（S1）：132-136，141.
[23] 马丽，王艳，叶华 . 小柴胡汤联合针对性护理对放疗后癌性发热患者血清 TNF-α、1β、COX-2 水平的影响 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2020，4（6）：92-93.
[24] 王永存，余忠华，李芸 . 多药耐药基因 1 与肝癌 [J]. 海南医学，2011，22（5）：133-136.
[25] Huesker M，Folmer Y，Schneider M，et al. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes [J]. Hepatology，2002，36：874-884.
[26] Akiyama S，Chen ZS，Kitazono M，et al. Mechanisms for resistance to anticancer agents and the reversal of the resistance [J]. Hum Cell，1999，12（3）：95-102.
[27] 盖晓东，曾常茜，洪敏 . 柴胡逆转肝细胞癌多药耐药作用与相关机制的研究 [J]. 高等学校化学学报，2005，26（8）：1446-1450.
[28] 赵锦燕 . 小柴胡汤调控 miR-122 逆转肝癌多药耐药的作用机制 [D]. 福建：福建中医药大学，2016.
[29] 赵锦燕，刘丽雅，张毓宸，等 . 小柴胡汤逆转人肝癌细胞 BEL-7402/5-FU 的多药耐药作用 [J]. 实用中西医结合临床，2016，16（9）：1-3，35.
[30] Maimela NR，Liu SS，Zhang Y. Fates of CD8 ＋ T cells in tumor microenvironment [J]. Comput Struct Biotechnol J，2018，17：1-13.
[31] Wong SH，Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer：mechanisms of action and clinical applications [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2019，16（11）：690-704.
[32] 吴山永，姜宁华，石彦波，等 . 小柴胡汤联合厄贝沙坦对高血压患者肠道菌群及脂代谢影响 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（1）：169-172.
[33] Zhu Y，Fang J，Wang H，et al. Baicalin suppresses proliferation，migration，and invasion in human glioblastoma cells via Ca^{2+}-dependent pathway [J]. Drug Des Devel Ther，2018，12：3247-3261.
[34] 王睿，王霖，魏广义，等 . 黄芩素调节肠道菌群并改善小鼠化疗诱导性肠黏膜炎的作用及其机制 [J]. 药学学报，2020，55（5）：868-867.
[35] Recht JR. Gastrointestinal toxicity or irinotecan [J]. Oncology（Williston Park，NY），1998，12（8 Suppl 6）：72-78.
[36] 胡培 . 小柴胡汤对伊立替康体内代谢的影响及肠道保护作用 [D]. 咸宁：湖北科技学院，2018.
[37] 孙荣进 . 小柴胡汤及其活性成分在降低伊立替康所致腹泻中的作用及机制 [D]. 广州：广州中医药大学，2018.
[38] 宋文杰 . 小柴胡汤作用于外排转运蛋白降低伊立替康腹泻的分子机制 [D]. 广州：广州中医药大学，2018.
[39] Sun RJ，Basu S，Zeng M，et al. Xiao-Chai-Hu-Tang（XCHT）intervening Irinotecan’s disposition：the potential of XCHT in alleviating irinotecan-induced diarrhea [J]. Curr Cancer Drug Targets，2019，19（7）：551-560.
[40] Chen C，Liu YH，Cheng SB，et al. The hepatoprotective effects of XCHD and MgIG against methotrexate-induced liver injury and inflammation in rats through suppressing the activation of AIM2 inflammasomes [J]. Pathol Res Pract，2020，216（4）：152875.
[41] 吴芙蓉，宁丽娟，周冉 . 小柴胡汤对化学性肝纤维化小鼠的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（5）：481-488.
[42] Cheraghi O，Dabirmanesh B，Ghazi F，et al. The effect of Nrf deletion on the proteomic signature in a human colorectal cancer cell line [J]. BMC Cancer，2022，22（1）：979.
[43] Hu R，Jia WY，Xu SF，et al. Xiaochaihutang inhibits the activation of hepatic stellate cell line T6 through the Nrf2 pathway [J]. Front Pharmacol，2018，9：1516.
[44] 贾为壹，刘佳佳，胡睿，等 . 小柴胡颗粒激活 Nrf2 通路抗 TAA 致大鼠急性肝损伤的机制讨论 [J]. 中国实验方剂

学杂志，2019，25（8）：54-59.
[45] 刘应柯，董红兵，张喜卿，等 . 加味小柴胡汤对顺铂、阿霉素致大鼠肝肾损害的保护作用 [J]. 中国中医基础医学杂志，2008，14（5）：364-366.
[46] Kawakita T，Yamada A，Kumazawa Y，et al. Functional maturation of immature B cells accumulated in the periphery by an intraperitoneal administration of a traditional Chinese medicine，xiao-chai-hu-tang（Japanese name：shosaiko-to）[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，1987，9：299-317.
[47] Kawakita T，Yamada A，Mitsuyama M，et al. Protective effect of a traditional Chinese medicine，xiao-chai-hu-tang（Jaoanese name：shosaiko-to），on *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，1987，9（4）：523-540.
[48] 王军，苏海涛，孙丽梅，等 . 小柴胡汤对免疫抑制小鼠细胞因子影响的研究 [J]. 中华中医药学刊，2013，31（10）：2242-2245.
[49] 唐小云，刘开蕾，杨美荣 . 小柴胡汤对免疫抑制小鼠淋巴细胞共刺激分子的免疫调节作用 [J]. 热带医学杂志，2010，10（9）：1048-1050.
[50] 张雯雯，蒋吟啸，杨丹，等 . 小柴胡汤联合经导管动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌的有效性与安全性的系统评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2020，20（2）：149-153，157.
[51] Liu XQ，Hu XJ，Xu HX，et al. Xiaochaihu Decoction attenuates the vicious circle between the oxidative stress and the ALP inactivation through LPS-catecholamines interactions in gut，liver and brain during CCl_4 + ethanol-induced mouse HCC [J]. BMC Complement Altern Med，2013，13：375.
[52] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global Cancer Statistics 2020：GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：206-249.
[53] 赵玉芬 . 小柴胡汤加减联合肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌的临床疗效研究 [J]. 世界复合医学，2018，4（2）：79-81.
[54] 孟凡瑞，孙建业，伦俊杰 . 观察小柴胡汤加味联合肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌的临床疗效 [J]. 海峡药学，2021，33（3）：170-172.
[55] 蒋庆锋，马东阳，程金华，等 . 小柴胡汤对肺癌晚期患者生命质量、免疫能力及炎性反应效应的影响 [J]. 世界中医药，2019，14（4）：982-987.
[56] 唐婷婷，施贝德，陈小会，等 . 小柴胡汤辅助化疗对晚期肺癌患者炎性因子与免疫功能的影响 [J]. 中华中医药学刊，2016，34（7）：1759-1761.
[57] 王文英，张克勤，刘金明，等 . 加味小柴胡汤联合微波消融治疗原发性肝细胞癌的临床疗效 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（7）：121-126.
[58] 杜家豪，金军，吴衍伟 . 小柴胡汤辅助化疗对乳腺癌免疫功能及生命质量的影响 [J]. 世界中医药，2018，13（6）：1452-1455，1460.
[59] 李雄，李玉运，温赐祥，等 . 基于网络药理学和生物信息学探讨小柴胡汤治疗肝细胞癌的作用机制 [J]. 肿瘤药学，2021，11（4）：456-462.
[60] Liu W，Yang M，Chen X，et al. Mechanisms of antiulcer effect of an active ingredient group of modified xiao chaihu decoction [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2018 2018：5498698.
[61] 彭龙玲，杨亚斯，曹毓，等 . 小柴胡汤提取物灌胃给药的长期毒性实验研究 [J]. 时珍国医国药，2003，14（9）：517-520.
[62] Yang P，Liu W，Fu R，et al. Cucurbitacin E chemosensitizes colorectal cancer cells via mitigating TFAP4/Wnt/β-catenin signaling [J]. J Agric Food Chem，2020，68（48）：14148-14160.
[63] Montfort A，Bertrand F，Rochotte J，et al. Neutral sphingomyelinase 2 heightens anti-melanoma immune responses and anti-PD-1 therapy efficacy [J]. Cancer Immunol Res，2021，9（5）：568-582.
[64] Changou CA，Shiah HS，Chen LT，et al. A phase Ⅱ clinical trial on the combination therapy of PHY906 plus capecitabine in hepatocellular carcinoma [J]. Oncologist，2021，26（3）：367-373.

（收稿日期：2023-01-31；修回日期：2023-03-20）

药物分析与检验

复肝汤 HPLC 特征图谱及波长切换法同时测定 6 种成分的含量

袁文钦[1]，黄伟鹏[1]，林雅丽[1]，段崇申[1]，刘怡馨[1]，陈乃宏[2]，刘应蛟[1*]（1. 江西中医药大学药学院，南昌 330004；2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所，北京 100050）

摘要：目的 建立复肝汤 HPLC 特征图谱，并测定复肝汤中毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA 6 种主要成分的含量。**方法** 采用高效液相色谱法，色谱柱为 Agilent 5 TC-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇 - 水，梯度洗脱，流速为 1.0 mL•min^{-1}，检测波长分别为 310 nm（毛蕊花糖苷）、370 nm（芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素）、250 nm（丹参酮ⅡA），柱温 30 ℃，进样量 20 μL。**结果** 确定复肝汤 HPLC 特征图谱 13 个共有峰，利用相似度软件对 10 批样品特征图谱进行分析，各批样品相似度均在 0.95 以上。毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素和丹参酮ⅡA 的线性范围分别在 4.394 ～ 87.880 μg•mL^{-1}（r = 0.9999）、1.501 ～ 30.020 μg • mL^{-1}（r = 0.9999）、0.475 ～ 9.505 μg • mL^{-1}（r = 0.9997）、0.547 ～ 10.945 μg • mL^{-1}（r = 0.9995）、1.028 ～ 20.550 μg • mL^{-1}（r = 0.9998）、0.854 ～ 17.070 μg • mL^{-1}（r = 1.000）；平均加样回收率在 92.1% ～ 101.3%，*RSD* 在 0.78% ～ 1.4%。**结论** 该方法简便、准确、重复性高，并可同时测定复肝汤中 6 种成分的含量，为复肝汤质量控制提供了参考。

关键词：高效液相色谱法；复肝汤；毛蕊花糖苷；芦丁；槲皮素；木犀草素；芹菜素；丹参酮ⅡA
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2158-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.031

Characteristic fingerprints and simultaneous determination of 6 constituents in Fugan decoction by HPLC wavelength switching method

YUAN Wen-qin[1], HUANG Wei-peng[1], LIN Ya-li[1], DUAN Chong-shen[1], LIU Yi-xin[1], CHEN Nai-hong[2], LIU Ying-jiao[1*] (1. *School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang* 330004; 2. *Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing* 100050)

Abstract: Objective To simultaneously determine the content of verbascoside, rutin, quercetin, luteolin, apigenin and tanshinone ⅡA in Fugan decoction by HPLC and establish the HPLC fingerprints. **Methods** Agilent 5 TC-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of methyl alcohol-water in a gradient elution at 1.0 mL • min^{-1}. The detection wavelengths was 310 nm (for verbascoside), 370 nm (for rutin, quercetin, luteolin and apigenin), and 250 nm (for tanshinone ⅡA). The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 20 μL. **Results** Totally 13 common peaks of HPLC characteristic chromatogram of Fugan decoction were determined. Similarity software was used to analyze the feature maps of 10 batches of samples. The similarity of each batch of samples was higher than 0.95. The above mentioned 6 main ingredients showed linearity at 4.394 ～ 87.880 μg • mL^{-1} (r =

基金项目：江西省中医药管理局科技计划项目（No.2021A333）；江西省卫生健康委科技计划（No.202211412）；江西中医药大学校级教改课题（No.2021jzyb-14）；江西中医药大学校级科技创新团队发展计划（No.CXTD22002）。
作者简介：袁文钦，男，主要从事中药质量标准及活性研究工作，email：1343201231@qq.com *__通信作者__：刘应蛟，男，副教授，主要从事中药质量标准及活性研究，email：liuyingjiaojiao@sina.com

0.9999), 1.501 ～ 30.020 μg•mL^{-1} (r = 0.9999), 0.475 ～ 9.505 μg•mL^{-1} (r = 0.9997), 0.547 ～ 10.945 μg • mL^{-1} (r = 0.9995), 1.028 ～ 20.550 μg • mL^{-1} (r = 0.9998), and 0.854 ～ 17.070 μg • mL^{-1} (r = 1.000), respectively. The average recoveries ranged from 92.1% to 101.3%, with *RSD* at 0.78% ～ 1.4%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, and can simultaneously determine the content of 6 components in Fugan decoction, which provides the experimental basis for the quality control of Fugan decoction.

Key words: HPLC; Fugan decoction; verbascoside; rutin; quercetin; luteolin; apigenin; tanshinone ⅡA

目前，具有保肝降酶的传统方剂众多，但抗乙型肝炎病毒药方甚少[1]。复肝汤由北刘寄奴、白茅根、络石藤、南丹参、山楂根、金樱子根等组成，其中北刘寄奴为君药，具有疗伤止血、破血通经、消食化积、醒脾开胃的功效，可用于急性黄疸型肝炎、慢性气管炎、扁桃体炎等[2]。白茅根和南丹参为臣药，白茅根具有凉血止血、清热利尿、清肺胃热的功效，主治血热出血证、热淋、黄疸等；南丹参具有活血化瘀、调经止痛的功效，主治月经不调、痈肿丹毒、风湿痹病、慢性肝炎等。金樱子根具有补肾固精、活血散瘀的功效，能够发挥抗肿瘤、提高机体免疫功能、抗氧化及耐缺氧等作用[3]。诸药并用，共奏利胆退黄，祛风利湿之效。

复肝汤是在临床经验基础上得到的验方，其中北刘寄奴的主要活性物质是黄酮类（如木犀草素、芹菜素、芦丁、槲皮素等）、苯乙醇苷类（如毛蕊花糖苷）等成分[4-5]，可有效降低谷丙转氨酶活性，具有显著的保肝、抗炎、抗肿瘤等作用[6-7]。南丹参功效同丹参，主含总丹参酮、丹参酮ⅡA、隐丹参酮、丹酚酸 A、丹酚酸 B 等成分，可抑制 HepG2、A549 等肿瘤细胞活性[8-9]。山楂根主含黄酮类成分，具有抗炎、拮抗雷公藤生殖损伤作用等[10]。络石藤总黄酮具有明显的抗炎作用，常用于治疗风湿热痹且疗效明确[11-12]。本研究采用 HPLC 波长切换法，对复肝汤特征图谱及 6 个成分的含量进行研究，为复肝汤的质量控制提供科学参考。

1 材料

XS3DU 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司），Waters 2695-2998 高效液相色谱仪（Waters 公司），二极管阵列检测器。

毛蕊花糖苷（批号：210301，纯度为 99.37%）、槲皮素（批号：210601，纯度为 100.00%）、木犀草素（批号:210201，纯度为 98.63%）、芹菜素（批号：210401，纯度为 98.55%）（武汉小火柴生物科技有限公司），丹参酮ⅡA（批号：110766-201520，纯度为 98.9%）、芦丁（批号：100080-200707，纯度为 90.5%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇、乙腈为色谱纯（ACS 公司），其他试剂均为分析纯（西陇科学），水为纯净水。

北刘寄奴为玄参科植物阴行草 *Siphonostegia chinensis* Benth. 的干燥全草，白茅根为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major*（Nees）C. E. Hubb. 的干燥根茎，络石藤为夹竹桃科植物络石 *Trachelos permum jasminoides*（Lindl.）Lem. 的干燥带叶藤茎，南丹参为唇形科植物南丹参 *Salvia bowleyana* Dunn 的干燥根，山楂根为蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥根，金樱子根为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥根。药材均由江西中医药大学药学院中药鉴定教研室副主任刘应蛟副教授鉴定。北刘寄奴、白茅根和络石藤药材质量均符合《中国药典》2020 年版，南丹参药材质量符合江西省中药饮片炮制规范（2008 年版），金樱子根和山楂根药材质量符合上海市中药饮片炮制规范（2018 年版），药材批号及产地见表 1，样品保存于江西中医药大学药学院中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent 5 TC-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：水（A）- 甲醇（B），梯度洗脱（0 ～ 7 min，20%B；7 ～ 10 min，20% ～ 25%B；10 ～ 30 min，25% ～ 55%B；30 ～ 45 min，55% ～ 65%B；45 ～ 48 min，65% ～ 80%B；48 ～ 60 min，80% ～ 90%B）；流速：1.0 mL•min^{-1}；检测波长：310 nm（毛蕊花糖苷，0 ～ 34.0 min）、370 nm（芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素，34.1 ～ 45.0 min）、250 nm（丹参酮ⅡA，45.1 ～ 60.0 min）；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA对照品适量，分别置于量瓶中，加甲醇适量定容，配制成每 1 mL 分别含毛蕊花糖苷 0.4394 mg、芦丁 0.3002 mg、槲皮素 0.1901 mg、木犀草素 0.2189 mg、芹菜素 0.2055 mg、丹参酮ⅡA 0.1707 mg 的储备液。分别精密吸取上述毛蕊花

表 1 复肝汤药材信息

Tab 1 Sample information of Fugan decoction

编号	北刘寄奴		白茅根		络石藤		南丹参		山楂根		金樱子根	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	江西九江	21816	江西樟树	21101	广西玉林	20923	江西赣州	20111	辽宁阜新	21823	湖南怀化	21623
S2	江西九江	21810	江西樟树	21923	广西玉林	20915	江西赣州	20113	辽宁阜新	21902	湖南怀化	21628
S3	江西九江	21723	江西樟树	21108	广西玉林	20916	江西赣州	20109	辽宁阜新	21911	湖南怀化	21712
S4	江西九江	21715	湖南隆回	20117	江西吉安	20918	江西赣州	20108	广东普宁	20827	江西樟树	20115
S5	安徽亳州	20826	湖南隆回	20112	江西吉安	20925	湖南娄底	20117	广东普宁	20823	江西樟树	21103
S6	安徽亳州	20815	湖南隆回	20109	江西吉安	21913	湖南娄底	19103	广东普宁	20817	江西樟树	20921
S7	安徽亳州	20714	湖南隆回	20114	湖南邵阳	20828	湖南娄底	19115	广东普宁	20812	陕西西安	21823
S8	河南禹州	20726	山东鄄城	20115	湖南邵阳	20911	浙江磐安	20103	江西南昌	21804	陕西西安	20913
S9	河南禹州	20714	山东鄄城	20117	湖南邵阳	20917	浙江磐安	20108	江西南昌	21812	陕西西安	20918
S10	河南禹州	20712	山东鄄城	20104	湖南邵阳	21914	浙江磐安	19119	江西南昌	21915	陕西西安	20109

糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA对照品溶液 2 mL、1 mL、500 μL、500 μL、1 mL、1 mL 置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀，即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取复肝汤药材粉末（过二号筛）1.0 g，置具塞锥形瓶中，精密量取 15 mL 70% 甲醇溶液，称重，超声 60 min，冷却至室温，补充减失的重量，摇匀，用 0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液即可。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按“2.2.2”项下方法，分别制备白茅根阴性样品溶液、山楂根及南丹参阴性样品溶液、北刘寄奴及络石藤阴性样品溶液。

2.3 *复肝汤提取方法的优化*

以溶剂浓度、超声时间和料液比为考察因素，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验（见表 2），6 种成分的含量之和作为各水平和因素的评价选择和指标。

精密称取复肝汤混合粉末（过二号筛）约 1.00 g，依表 2 按“2.2.2”项下方法进行试验。由表 3、4 分析结果可知，正交试验方差分析：料液比和超声时间对结果无明显影响（$P > 0.05$），而甲醇浓度对结果有显著影响（$P < 0.05$）。同时极差分析显示 $R_{甲醇浓度} > R_{超声时间} = R_{料液比}$，说明对于复肝汤不同甲醇浓度的总含量来说，溶剂浓度占最主要因素。综合考虑复肝汤 6 种成分的含量之和，总含量和因素最大均数水平，因而选择最佳提取参数为 $A_1B_3C_1$，即料液比为 1∶15，甲醇浓度为 70%，超声 90 min。

表 2 复肝汤提取方法的正交设计

Tab 2 Orthogonal design for the extraction of Fugan decoction

水平	因素		
	料液比 C	超声时间 B/min	甲醇浓度 A/%
1	1∶15	30	70
2	1∶20	60	90
3	1∶25	90	100

表 3 复肝汤提取方法的正交试验结果

Tab 3 Orthogonal experiment results of the extraction of Fugan decoction

No.	A	B	C	总含量 /（mg·g^{-1}）
1	1	1	1	0.3188
2	1	2	2	0.2334
3	1	3	3	0.1950
4	2	1	3	0.2229
5	2	2	2	0.1879
6	2	3	1	0.3318
7	3	1	2	0.1455
8	3	2	3	0.2611
9	3	3	1	0.2360
Ⅰ	0.2491	0.2291	0.3039	
Ⅱ	0.2476	0.2275	0.2308	
Ⅲ	0.2142	0.2543	0.1761	
R	0.03	0.03	0.14	

表 4 复肝汤提取方法的正交试验方差分析

Tab 4 Variance analysis of orthogonal design for the extraction of Fugan decoction

因素	离差平方和	自由度	均差	*F* 值	*P* 值
A	0.002	2	0.001	3.444	0.225
B	0.001	2	0.001	2.002	0.333
C	0.025	2	0.012	36.475	0.027

2.4 *指纹图谱方法学考察*

2.4.1 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL 进样分析，连续进样 6 次，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的峰面积 *RSD* 分别为 0.24%、0.52%、1.2%、0.25%、0.77%、0.93%，表明仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取复肝汤供试品（S10）溶液，按“2.3”项下最佳条件制备供试品溶液，在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的含量 *RSD* 分别为 1.8%、1.9%、1.5%、1.4%、0.99%、1.6%，表明 24 h 内样品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性考察 精密称取复肝汤药材粉末（S10）6 份，按“2.3”项下最佳优化条件制备供

试品溶液，每份取溶液 20 μL 进样，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的含量 *RSD* 分别为 1.2%、0.96%、0.89%、1.3%、0.88%、1.4%，表明该方法重复性良好。

2.4.4　复肝汤 HPLC 特征图谱的建立及相似度评价　将 10 批复肝汤分别按“2.3”项下最佳条件制备供试品溶液，进样测定，运用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”进行数据匹配，以 S1 为参照图谱，选取 13 个特征峰生成对照指纹图谱，见图 1。木犀草素（峰 9）峰面积相对较大、分离度且稳定性较好，故以其为参照峰。进行匹配后的 10 批样品色谱图见图 2，10 批复肝汤特征图谱的相似度依次分别为 0.971、0.997、0.976、0.982、0.965、0.975、0.984、0.981、0.974、0.998。

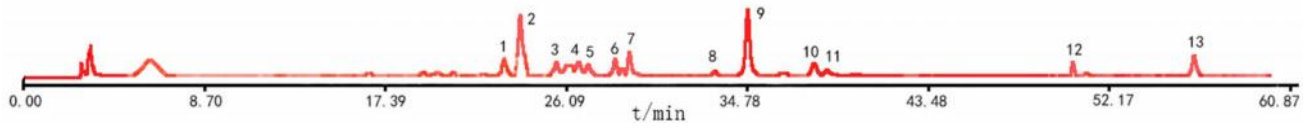

图 1　复肝汤的 HPLC 对照指纹图谱

Fig 1　HPLC fingerprint of Fugan decoction

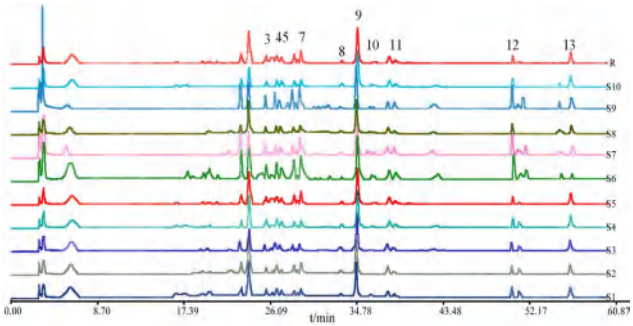

图 2　10批复肝汤样品指纹图谱（S1～S10）及其对照指纹图谱（R）

Fig 2　Fingerprints of 10 batches of Fugan decoction（S1 ～ S10）and the control fingerprint（R）

2.4.5　专属性考察　精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液，进样 20 μL。采用对照品定位，其中峰 2 为毛蕊花糖苷、峰 5 为芦丁、峰 8 为槲皮素、峰 9 为木犀草素、峰 10 为芹菜素、峰 13 为丹参酮ⅡA，这 6 个特征峰均可在药材中找到归属，峰 2 归属于北刘寄奴，峰 9 归属于北刘寄奴和络石藤，峰 13 归属于山楂根和南丹参，结果见图 3。

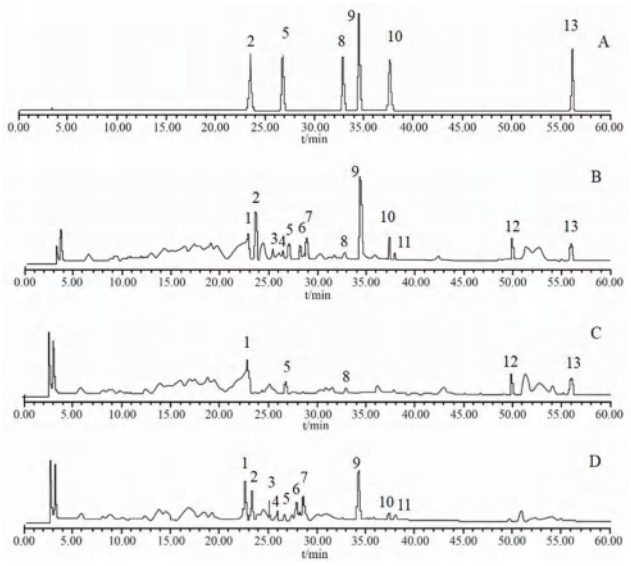

图 3　复肝汤的 HPLC 图

Fig 3　HPLC chromatogram of Fugan decoction

A. 对照品（reference sample）；B. 供试品（sample）；C. 北刘寄奴和络石藤阴性样品（negative sample without *Trachelos permum* jasminoides and *Siphonostegia chinensis*）；D. 山楂根和南丹参阴性样品（negative sample without *Crataegus pinnatifida* and *Salvia bowleyana*）；2. 毛蕊花糖苷（verbascoside）；5. 芦丁（rutin）；8. 槲皮素（quercetin）；9. 木犀草素（luteolin）；10. 芹菜素（apigenin）；13. 丹参酮ⅡA（tanshinone ⅡA）

2.5　6 种成分的含量测定

2.5.1　线性关系考察　精密吸取混合对照品母液，稀释成不同浓度的溶液后进样测定，以对照品的浓度（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，得到标准曲线回归方程、线性范围、相关系数见表 5。

2.5.2　精密度试验　精密吸取混合对照品溶液 20 μL，连续进样 6 次，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的峰面积 *RSD* 分别为 0.26%、0.49%、1.3%、0.20%、0.71% 和 0.90%，表明仪器的精密度良好。

2.5.3　稳定性试验　精密吸取复肝汤供试品（S10）溶液，按“2.2.2”项下条件制备供试品溶液，在 0、2、4、6、8、12、24 h 按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素和丹参酮ⅡA的含量 *RSD* 分别为 1.8%、1.9%、1.7%、1.3%、0.90% 和 1.5%，表明 24 h 内样品溶液稳定性良好。

2.5.4　重复性考察　精密称取复肝汤供试品（S10）6 份，每份取溶液 20 μL 连续进样，按“2.2.2”项下条件制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定峰面积，结果毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素和丹参酮ⅡA的含量 *RSD* 分别为 1.3%、0.92%、0.84%、1.3%、0.82% 和 1.3%，表明该方法重复性良好。

2.5.5　加样回收试验　取同一批已知各指标成分的复肝汤药材粉末（过二号筛）0.5 g，平行 6 份，精密称定，每份精密吸取相当于已知含量的 100% 质量浓度

表 5 6 种对照品的回归方程、线性范围、相关系数

Tab 5 Regression，linearity and correlation coefficient of 6 standard

对照品	回归方程	范围 /（μg·mL^{-1}）	相关系数
毛蕊花糖苷	$Y=2820X-6685$	4.394 ～ 87.880	0.9999
芦丁	$Y=2237X-1682$	1.501 ～ 30.020	0.9999
槲皮素	$Y=4959X-1352$	0.475 ～ 9.505	0.9997
木犀草素	$Y=6122X-1406$	0.547 ～ 10.945	0.9995
芹菜素	$Y=8900X-4801$	1.028 ～ 20.550	0.9998
丹参酮ⅡA	$Y=8290X-3649$	0.854 ～ 17.070	1.000

的 6 种对照品储备液，按“2.2.2”项下条件制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，结果 6 种成分的回收率在 92.1% ～ 101.3%，*RSD* 为 0.78% ～ 1.4%。

2.5.6 样品的含量测定 精密称取复肝汤样品，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算样品中毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的含量，结果见表 6。

表 6 样品成分含量测定结果（$n=3$，mg·g^{-1}）

Tab 6 Content determination of sample（$n=3$，mg·g^{-1}）

编号	毛蕊花糖苷	芦丁	槲皮素	木犀草素	芹菜素	丹参酮ⅡA
S1	0.0956±0.0073	0.0260±0.0011	0.0069±0.0005	0.0795±0.0043	0.0152±0.0034	0.0129±0.0023
S2	0.1235±0.0104	0.0459±0.0015	0.0079±0.0010	0.1225±0.0047	0.0174±0.0041	0.0146±0.0015
S3	0.1099±0.0093	0.0374±0.0010	0.0067±0.0009	0.0675±0.0022	0.0160±0.0027	0.0138±0.0009
S4	0.1124±0.0098	0.0401±0.0023	0.0066±0.0006	0.0689±0.0041	0.0167±0.0031	0.0134±0.0025
S5	0.0858±0.0056	0.0201±0.0031	0.0068±0.0008	0.0832±0.0052	0.0148±0.0022	0.0123±0.0033
S6	0.1094±0.0068	0.0397±0.0013	0.0067±0.0009	0.0680±0.0074	0.0165±0.0029	0.0146±0.0017
S7	0.1137±0.0101	0.0398±0.0014	0.0068±0.0007	0.0698±0.0063	0.0162±0.0018	0.0103±0.0008
S8	0.1117±0.0087	0.0393±0.0033	0.0069±0.0005	0.0693±0.0044	0.0164±0.0027	0.0136±0.0023
S9	0.0945±0.0052	0.0203±0.0024	0.0068±0.0004	0.0844±0.0083	0.0151±0.0013	0.0150±0.0041
S10	0.1042±0.0077	0.0384±0.0027	0.0070±0.0011	0.0965±0.0077	0.0223±0.0037	0.0127±0.0026

3 讨论

3.1 流动相的选择

试验考察了甲醇 - 水、乙腈 - 水的组合色谱条件，发现甲醇 - 水的流动相条件下色谱峰、分离度等最好，甲醇 - 水比乙腈 - 水所观察到的色谱峰较多，如丹参酮ⅡA和槲皮素等，且色谱峰对称性更好，故选用甲醇 - 水作为洗脱流动相。

3.2 检测波长的选择

本试验采用 HPLC 全波长（210 ～ 400 nm）扫描分析，比较分析不同波长条件下的峰数目、峰形、分离度、对称因子等参数。结果表明，在 310 nm 条件下毛蕊花糖苷分离度较好；在 370 nm 波长下，芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素有最大吸收；在 250 nm 条件下，丹参酮ⅡA有最大吸收。故根据各成分出峰时间设定波长，即 310 nm（毛蕊花糖苷，0 ～ 34.0 min）、370 nm（芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素，34.1 ～ 45.0 min）、250 nm（丹参酮ⅡA，45.1 ～ 60.0 min）。

3.3 小结

本试验建立了 HPLC 特征图谱并采用波长切换法同时测定复肝汤中毛蕊花糖苷、芦丁、槲皮素、木犀草素、芹菜素、丹参酮ⅡA的含量。特征图谱、多成分含量测定与功能主治密切相关，方法简便可靠、稳定可行，为复肝汤质量控制提供试验依据。

参考文献

[1] 徐广灿，袁洁，田儒艳，等 . 肝靶向马蹄金素衍生物的合成及抗乙肝病毒活性研究 [J]. 中南药学，2016，14（5）：449-456.

[2] 林雅丽，袁文钦，陈林林，等 . 抗乙型肝炎病毒药物的活性及其机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（11）：2880-2889.

[3] 龙小琴，戴应和 . 金樱子根化学成分与药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药，2017，13（18）：68-70.

[4] 陈筱清，庄红艳，张欣，等 . 北刘寄奴的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志，2014，49（23）：2065-2068.

[5] 张祎，李春梅，吴春华，等 . 北刘寄奴中苯乙醇苷类成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2013，30（2）：95-99.

[6] 汪凤山，刘娟 . 阴行草化学成分及药理作用研究进展 [J]. 黑龙江医药科学，2008，31（6）：61-62.

[7] 林宗涛，梁毅，刘淑娟，等 . HPLC 法测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素的含量 [J]. 药物分析杂志，2011，31（9）：1689-1692.

[8] 黄小慧，张艺凡，王志彪，等 . 南丹参根化学成分及肿瘤细胞毒活性研究 [J]. 中药材，2020，43（6）：1383-1387.

[9] 任正宇，王小青，李晶 . 赣产南丹参药材含量测定研究 [J]. 实用中西医结合临床，2016，16（2）：83-84，89.

[10] 王嘉欢，高洁，李伟鑫，等 . 南北山楂不同药用部位抗氧化、抗炎作用研究 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2018，27（2）：111-115.

[11] 赵晨晨 . 络石藤总黄酮的提取纯化工艺及抗炎镇痛药理作用的研究 [D]. 锦州：辽宁医学院，2011.

[12] 丁本珺，黄传兵，陈蕾蕾，等 . 黄传兵应用藤类药辨治类风湿关节炎经验拮萃 [J]. 中医药临床杂志，2021，33（5）：862-865.

（收稿日期：2022-12-13；修回日期：2023-02-13）

高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学评价上清丸的质量

肖琳婧，秦学玲，龙琴，金蒙，付兴情，张赟华*（云南省食品药品监督检验研究院，昆明　650106）

摘要：目的　建立上清丸 HPLC 指纹图谱，并结合化学计量学评价其质量。**方法**　利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）建立上清丸 HPLC 指纹图谱并进行相似度评价，共标定 13 个共有峰，通过对照品比对指认 11 个共有峰。采用主成分分析和偏最小二乘法 - 判别分析等化学计量学研究方法，对上清丸质量进行评价。**结果**　79 批次上清丸（大蜜丸、水蜜丸）与对照制剂相比，相似度均大于 0.9，12 批次 L 企业生产的水丸与对照制剂相比，相似度均低于 0.7。通过主成分分析对上清丸（大蜜丸、水丸）进行综合评价，大蜜丸综合排名靠前的是 A、C、H 企业；水丸综合排名靠前的是 N、M 企业；上清丸（大蜜丸、水丸）大致可以分为 2 类，结合偏最小二乘法 - 判别筛选出质量差异标志物，上清丸（大蜜丸）为 13（大黄素甲醚）、5（芦荟大黄素）、12（大黄酚）号峰，上清丸（水丸）为 3（汉黄芩苷）、1（黄芩苷）号峰。**结论**　该分析方法简单可行，具有良好精密度、重复性和稳定性，建立的指纹图谱可为上清丸的质量评价提供参考。

关键词：上清丸；高效液相色谱法；指纹图谱；相似度评价；化学计量学；质量评价；质量差异标志物

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2163-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.032

Quality evaluation of Shangqing pills by HPLC coupled with chemometrics

XIAO Lin-jing, QIN Xue-lin, LONG Qin, JIN Meng, FU Xing-qing, ZHANG Yun-hua* (*Yunnan Institute for Food and Drug Control*, *Kunming*　650106)

Abstract: Objective　To establish the HPLC fingerprint of Shangqing pills, and evaluate its quality by chemometrics. **Methods**　The fingerprint of Shangqing pills was established by HPLC. Totally 13 common peaks were confirmed and 11 were identified by comparison with the reference substances. Then, the quality of the drug was assessed by principal components analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). **Results**　The similarity value of these 79 batches of Shangqing pills was over 0.9, and that of 12 batches from L enterprise was lower than 0.7. Shangqing pills were comprehensively evaluated by PCA. The top companies in the comprehensive ranking of Shangqing big honeyed pills were A, C, and H companies. The comprehensive ranking of Shangqing water pills produced by companies M and N was high. According to the PCA, Shangqing pills (big honeyed pills and water pills) were roughly divided into two categories. Combined with PLS-DA, three common peaks were identified as the quality markers of Shangqing big honeyed pills, which were No.13 (physcion), 5 (aloe-emodin), and 12 (chrysophanol). For Shangqing water pills, No. 3 (wogonin) and 1 (baicalin) peaks were identified as the quality markers. **Conclusion**　The analytical method is simple and feasible, with good precision, repeatability and stability. The established fingerprint can provide a reference for the quality evaluation of Shangqing pills.

Key words: Shangqing pill; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; chemometrics; quality evaluation; quality difference marker

基金项目：国家药品抽检项目（No. 国药监药管 [2022]1 号）。

作者简介：肖琳婧，女，硕士研究生，主要从事中药质量标准研究，email：xiaolinjing1@126.com　*通信作者：张赟华，男，副主任药师，主要从事中药质量标准研究，email：33683185@qq.com

上清丸来源于《丹溪心法》“朱丹溪方上清散加减”，但与现行处方一致的上清丸最先记载于《北京市中药成方选集》。上清丸由菊花、薄荷、川芎、白芷、荆芥、防风、桔梗、连翘、栀子、黄芩（酒炒）、黄柏（酒炒）及大黄（酒炒）12 味药材组成，主要有清热散风、解毒通便的功效。临床上常用于头晕耳鸣，目赤，鼻流黄涕，口舌生疮，牙龈肿痛，大便秘结[1]。目前，对上清丸的质量评价仅对其中的欧前胡素、黄芩苷、绿原酸及大黄中总蒽醌进行含量测定[2-4]，然而上清丸的药理作用是多种饮片及不同类型的化学成分综合作用的结果，中药成分复杂多样，仅靠个别指标来判断饮片的整体质量过于局限。中药指纹图谱具有整体性、系统性和模糊性的显著特点，已成为国际公认的控制天然药物、中成药质量的有效方法[5]。中药化学模式识别则是模糊数学概念渗透到药学领域的重要突破，解决了中药质量多维信息的综合分析问题，可实现对中药质量的整体控制[6-8]。

上清丸为 2022 年国家药品抽检重点监管品种之一，共抽取上清丸样品 103 批次。抽样地域覆盖全国 26 个省、自治区、直辖市，涉及 14 家生产企业，包括大蜜丸、水丸、水蜜丸 3 种剂型。为综合评价不同企业生产的上清丸的质量，本试验采用了 HPLC 建立了 103 批样品的指纹图谱，运用中药指纹图谱相似度评价系统，对 103 批样品的相似度进行评价；运用化学计量学的方法对共有峰进行主成分分析（PCA）和偏最小二乘法 - 判别分析（PLS-DA），对 55 批上清丸（大蜜丸）及 16 批次上清丸（水丸）样品质量进行综合评价，并筛选出质量差异标志物，实现上清丸质量科学、系统的控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津）；赛多利斯 BS224S 电子天平、SECURA225D 电子天平（德国赛多利斯公司）。

1.2 试药

芦荟大黄素（批号：110795-201308，含量：97.8%）、大黄酸（批号：110757-201607，含量：99.3%）、大黄素（批号：110756-201512，含量：98.7%）、大黄酚（批号：110796-201621，含量：99.2%）、大黄素甲醚（批号：110758-201415，含量：99.1%）、黄芩苷（批号：110715-202122，含量:94.2%）、黄芩素（批号:111595-201808，含量：97.9%）、汉黄芩苷（批号：112002-201702，含量：98.5%）、汉黄芩素（批号：111514-201706，含量：94.2%）、欧前胡素（批号：110826-201918，含量：99.0%）、异欧前胡素（批号：110827-201812，含量：99.6%）（中国食品药品检定研究院）。乙腈为色谱纯（默克公司），水为纯化水，甲醇、乙醇、磷酸等其他试剂均为分析纯。

1.3 样品

方法学考察样品上清丸（水蜜丸，批号：A12003，广州白云山陈李济药厂有限公司），其余 103 批次上清丸样品来源于 14 家生产企业，由于国家药品抽检，涉及数据保密，生产企业由 A ～ N 代替，具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab 1 Information of sample batches

剂型	样品编号	生产企业
大蜜丸	S1 ～ S7	A
	S8 ～ S23	B
	S24 ～ S29	C
	S30 ～ S36	D
	S37 ～ S43	E
	S44 ～ S47	F
	S48 ～ S52	G
	S53 ～ S59	H
	S60 ～ S65	I
	S66 ～ S67	J
	S68 ～ S72	K
水蜜丸	S73 ～ S79	A
	S80 ～ S92	L
水丸	S93 ～ S97	M
	S98 ～ S103	N

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用月旭 Xtimate-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以乙腈（A）-0.1% 磷酸（B）为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 60 min，30% ～ 80%A），流速为 1 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃，检测波长为 254 nm，进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取各对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成每 1 mL 含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、欧前胡素、异欧前胡素各 10 μg 对照品溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取大蜜丸，剪碎，精密称定，取 2 g；取水丸或水蜜丸适量，研细，精密称定，取 1 g，置具塞三角锥形瓶中，精密

加入甲醇 20 mL，称定重量，加热回流 45 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3　对照制剂样品溶液的制备　按照上清丸的处方，从市场上购买正品药材，经检验合格后，按处方比例和制法制备上清丸大蜜丸、水蜜丸、水丸标准制剂各 3 份，并按照“2.2.2”项下方法，制成对照制剂样品溶液。

2.3　指纹图谱方法学考察

2.3.1　精密度试验　取上清丸按“2.2.2”项下方法操作，精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪，连续进样 6 次，测定各共有峰的保留时间、峰面积，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值为 0.24% ～ 0.51%，峰面积的 *RSD* 值为 0.58% ～ 1.8%，方法的精密度良好，符合指纹图谱的要求。

2.3.2　重复性试验　取上清丸按“2.2.2”项下方法操作，平行提取 6 份，进样测定。采用中药指纹图谱的相似性计算软件进行计算，其相似度均在 0.999 以上，考察 6 份供试品色谱中各共有峰的保留时间及对相对峰面积（峰面积 / 取样量）的一致性，各共有峰的保留时间 *RSD* 值为 0.12% ～ 0.46%，其相对峰面积的 *RSD* 值为 1.2% ～ 4.8%，结果表明方法的重现性良好，符合指纹图谱的要求。

2.3.3　稳定性试验　取同一供试品溶液，在同一色谱条件下，分别在 0、4、8、12、20、24 h 各进样一次，结果各组分的峰面积 *RSD* 在 0.6% ～ 1.8%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4　指纹图谱的建立及相似度评价

将本次试验得到的色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）计算软件，分别用 3 批大蜜丸、水蜜丸、水丸标准制剂的色谱图生成参照色谱图，采用多点校正后进生成叠加指纹图谱，见图 1，然后将所有样品与参照色谱图进行相似度计算，得出不同企业上清丸（大蜜丸、水蜜丸、水丸）样品相似度结果，见表 2。通过检测得到的共有峰与混合对照品保留时间对比指认了 11 个成分，分别是 1 号峰黄芩苷、3 号峰汉黄芩苷、4 号峰黄芩素、5 号峰芦荟大黄素、6 号峰大黄酸、7 号峰汉黄芩素、9 号峰欧前胡素、10 号峰大黄素、11 号峰异欧前胡素、12 号峰大黄酚、13 号峰大黄素甲醚，见图 2。

72 批次上清丸大蜜丸的相似度均大于 0.9，大蜜丸样品在指纹图谱上差异不明显，仅有 F 企业 4 批次样品相似度相对偏低。7 批 A 企业的水蜜丸相似度均大于 0.95，批间差异较小。24 批次水丸相似度差异较大，12 批次 L 企业生产的水丸与对照制剂相比，相似度均低于 0.7，该企业生产的水丸与对照制剂存在较大差异，具体数据见表 2。

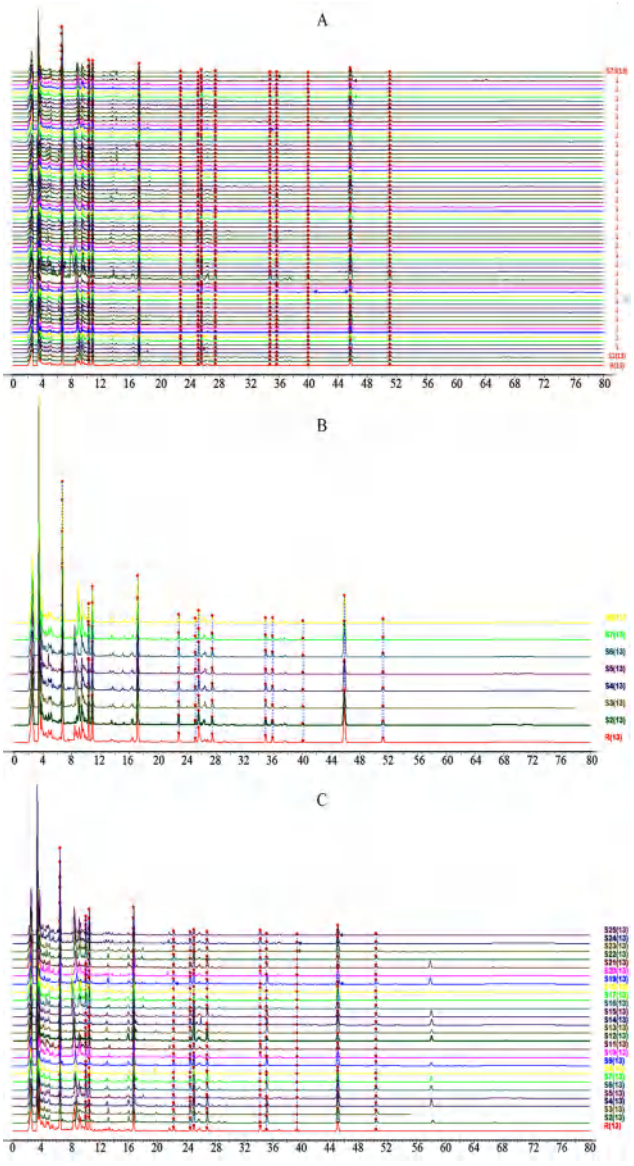

图 1　不同企业不同批次上清丸大蜜丸（A）、水蜜丸（B）、水丸（C）样品溶液色谱图

Fig 1　HPLC fingerprints of Shangqing big honeyed pills（A），water-honeyed pills（B），and water pills（C）

2.5　化学计量学分析

2.5.1　PCA 及综合评价　完全从相似度差别上很难全面反映不同企业不同批次上清丸之间的差异。进一步对上清丸指纹图谱的原始数据进行 PCA 及综合评价。

7 批次水蜜丸为 A 企业独家生产，因水蜜丸样本量较少未做主成分分析；相同生产企业同批次样品仅取一批次进行主成分分析。将 55 批次上清丸大蜜丸、16 批次上清丸水丸 11 个共有峰峰

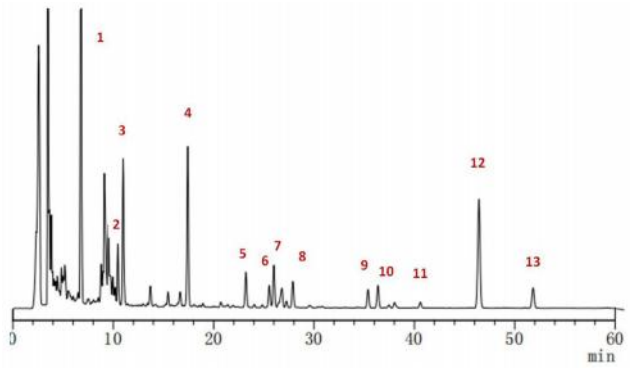

图 2 上清丸指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprints of Shangqing pills

1. 黄芩苷（baicalin）；3. 汉黄芩苷（wogonoside）；4 黄芩素（baicalein）；5. 芦荟大黄素（aloe-emodin）；6. 大黄酸（rhein）；7. 汉黄芩素（wogonin）；9. 欧前胡素（imperatorin）；10. 大黄素（emodin）；11. 异欧前胡素（isoimperatorin）；12. 大黄酚（chrysophanol）；13. 大黄素甲醚（physcion）

面积导入 SPSS 18.0 软件，共有峰峰面积标准化处理后，得出相关矩阵的特征值和方差，见表 3。根据表 3 分别显示前 3 个主成分特征值均大于 1，累积方差贡献率分别为 74.478%、94.505%。分别选取前 3 个主成分，并以相应主成分的权重系数计算出综合得分。

不同批次上清丸（大蜜丸、水丸）主成分得分 F 值越大，该批次样品整体质量越好 [9-11]，得分及排名见表 4。同时通过用 SIMCA 12.0 分析软件得到上清丸大蜜丸、水丸 PCA 得分图，见图 3。

上清丸大蜜丸中综合排名前 10 名 A 企业有 3 批次样品，C 企业有 4 批次样品，H 企业有 2 批次样品，说明这 3 家企业生产的大蜜丸整体质量较好。综合排名靠后的主要是 I、D、E 3 家企业生产的，说明这 3 家企业生产的大蜜丸整体质量较差。上清丸水丸中 L 企业生产的水丸综合排名均靠后，质量整体较差。N、M 企业生产的水丸综合排名均靠前，质量整体较好。

表 2 不同企业不同批次上清丸 (大蜜丸、水蜜丸、水丸) 样品相似度结果

Tab 2 Similarity evaluation of Shangqing pills (big honeyed pills，water-honeyed pills，and water pills)

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S27	0.99	S53	0.984	S80	0.549
S2	0.997	S28	0.991	S54	0.977	S81	0.733
S3	0.982	S29	0.977	S55	0.982	S82	0.559
S4	0.993	S30	0.942	S56	0.989	S83	0.611
S5	0.992	S31	0.948	S57	0.976	S84	0.554
S6	0.995	S32	0.951	S58	0.997	S85	0.84
S7	0.993	S33	0.953	S59	0.972	S86	0.581
S8	0.989	S34	0.947	S60	0.981	S87	0.675
S9	0.99	S35	0.948	S61	0.978	S88	0.561
S10	0.989	S36	0.948	S63	0.98	S89	0.625
S11	0.991	S37	0.971	S64	0.96	S90	0.657
S12	0.985	S38	0.971	S65	0.958	S91	0.686
S13	0.982	S39	0.956	S66	0.994	S92	0.605
S14	0.988	S40	0.957	S67	0.956	S93	0.96
S15	0.988	S41	0.955	S68	0.978	S94	0.935
S16	0.989	S42	0.962	S69	0.979	S95	0.967
S17	0.989	S43	0.968	S70	0.979	S96	0.926
S18	0.99	S44	0.901	S71	0.985	S97	0.933
S19	0.991	S45	0.912	S72	0.986	S98	0.999
S20	0.991	S46	0.908	S73	1.000	S99	0.999
S21	0.99	S47	0.904	S74	0.971	S100	0.994
S22	0.994	S48	0.966	S75	0.999	S101	0.994
S23	0.992	S49	0.977	S76	0.966	S102	0.996
S24	0.992	S50	0.994	S77	1.000	S103	0.999
S25	0.986	S51	0.989	S78	0.971		
S26	0.987	S52	0.994	S79	0.985		

通过上清丸大蜜丸、水丸 PCA 得分图，大蜜丸样品大致可分为 2 组，大蜜丸的质量存在差异，结合综合排名，红色部分大蜜丸综合质量最好较

好，绿色部分综合质量较差。水丸样品大致可分为 2 组，红色部分为 N、M 企业生产，综合质量较好，绿色部分为 L 企业生产，综合质量较差。

表 3　上清丸特征值和方差贡献率

Tab 3　Characteristic value and variance contribution rate

上清丸	主成分	特征值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
大蜜丸	1	4.343	39.485	39.485
	2	2.280	20.729	60.214
	3	1.569	14.264	74.478
水丸	1	6.325	57.498	57.498
	2	2.791	25.369	82.867
	3	1.280	11.638	94.505

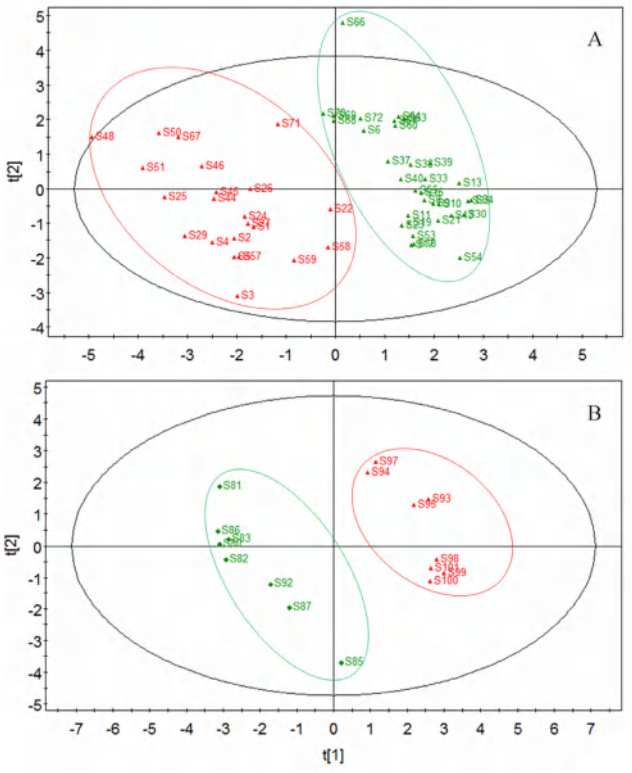

图 3　不同企业不同批次上清丸大蜜丸（A）和水丸（B）PCA 得分散点图

Fig 3　PCA score plot of Shangqing pills big honeyed pills（A）and water honeyed pills（B）from different enterprises samples

2.5.2　PLS-DA　PCA 得分图表明不同企业不同批次上清丸大蜜丸、水丸有一定的区别，化学成分量上具有一定的差异性。根据 PLS-DA 模型的 VIP 值来筛选导致差异性的主要化学成分，一般认为 VIP 值越大，对分类的作用越大 [12-14]。

上清丸大蜜丸中 VIP 值排名前 3 位的是 13 号峰（大黄素甲醚）、5 号峰（芦荟大黄素）、12 号峰（大黄酚），具体见图 4A，说明它们是造成样品组间差异的主要色谱峰，这 3 个峰均来自上清丸处方中的酒大黄。上清丸水丸中 VIP 值排名前 2 位是 3 号峰（汉黄芩苷）、1 号峰（黄芩苷），具体见图 4B，这两个峰均来自上清丸处方中的酒黄芩。

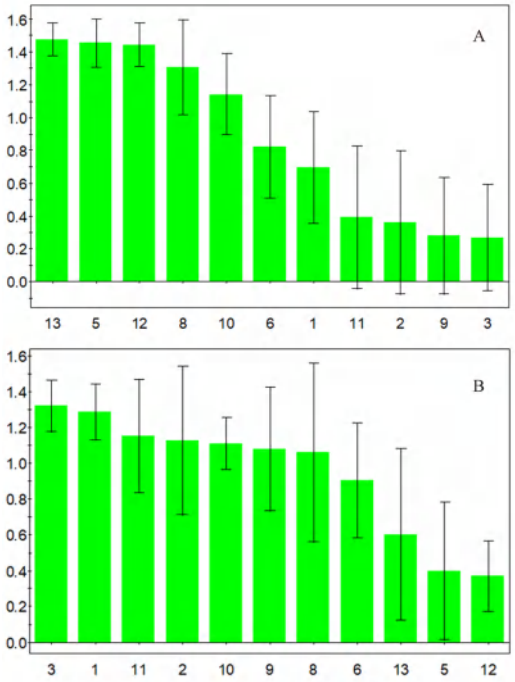

图 4　不同企业不同批次上清丸大蜜丸（A）和水丸（B）VIP 图

Fig 4　VIP of Shangqing pills big honeyed pills（A）and water honeyed pills（B）from different enterprises

3　讨论与总结

本试验建立了上清丸 HPLC 指纹图谱，共标定了 13 个共有峰，同时指认 11 种化学成分，但是含挥发性成分药味未指认到共有峰，后续将尝试应用其他方法对其进行质量控制。

本研究采用指纹图谱结合相似度评价、PCA 和 PLS-DA 等多元统计分析方法，对不同企业不同批次上清丸进行评价，并筛选出上清丸（大蜜丸、水丸）质量差异标志物分别来自处方中的酒大黄和酒黄芩。进一步分析造成不同企业上清丸水丸质量差异标志物来源于黄芩的原因，发现 L 企业黄芩苷的平均峰面积仅为 M、N 企业的三分之一，提示该企业上清丸中投料的酒黄芩质量较差。为确保上清丸产品质量稳定性和临床疗效的一致性，各相关企业在生产过程中应加强对上述两味饮片的质量控制，保证饮片质量。

综上，本试验采用指纹图谱结合化学计量学方法对市售上清丸进行综合分析，对不同企业不同批次的上清丸进行 PCA 和综合评分，采用 PLS-DA 快速筛选出不同企业不同批次上清丸的质量差异标志物，为综合评价上清丸质量提供依据。

表 4 不同企业不同批次上清丸因子得分、主成分得分、综合得分及排名

Tab 4 Factor scores，principal component scores，total scores，and ranking of three principal components

上清丸	编号	厂家	FAC1	FAC2	FAC3	*F*1	*F*2	*F*3	*F*	综合排名
大蜜丸	S29	C	1.47	0.91	0.95	0.70	0.60	0.76	0.686	1
	S25	C	1.66	0.15	1.51	0.80	0.10	1.20	0.680	2
	S57	H	0.94	1.32	1.25	0.45	0.87	1.00	0.672	3
	S3	A	0.96	2.05	－0.04	0.46	1.36	－0.03	0.615	4
	S24	C	0.88	0.55	1.45	0.42	0.36	1.16	0.546	5
	S27	C	0.85	0.68	1.17	0.41	0.45	0.93	0.521	6
	S59	H	0.40	1.37	1.03	0.19	0.91	0.82	0.512	7
	S4	A	1.20	1.03	－0.37	0.58	0.68	－0.30	0.438	8
	S5	A	0.99	1.32	－.049	0.47	0.87	－0.39	0.419	9
	S67	J	1.53	－0.99	1.30	0.73	－0.65	1.04	0.406	10
	S2	A	0.98	0.96	－0.36	0.47	0.64	－0.29	0.372	11
	S26	C	0.83	0.00	0.89	0.40	0.00	0.71	0.346	12
	S58	H	0.07	1.13	0.70	0.03	0.75	0.56	0.333	13
	S1	A	0.80	0.74	－0.47	0.38	0.49	－0.37	0.267	14
	S22	B	0.05	0.38	0.80	0.02	0.25	0.64	0.205	15
	S44	F	1.18	0.19	－1.04	0.57	0.13	－0.83	0.176	16
	S51	G	1.87	－0.40	－1.63	0.90	－0.26	－1.30	0.153	17
	S45	F	1.16	0.07	－1.07	0.56	0.04	－0.85	0.144	18
	S54	H	－1.21	1.33	1.03	－0.58	0.88	0.82	0.093	19
	S48	G	2.37	－0.99	－2.16	1.14	－0.65	－1.72	0.092	20
	S71	K	0.56	－1.24	1.11	0.27	－0.82	0.89	0.084	21
	S46	F	1.30	－0.44	－1.10	0.63	－0.29	－0.88	0.082	22
	S17	B	－0.74	1.09	0.20	－0.36	0.72	0.16	0.043	23
	S18	B	－0.76	1.07	0.22	－0.37	0.71	0.18	0.038	24
	S23	B	－0.65	0.71	0.21	－0.31	0.47	0.17	－0.002	25
	S53	H	－0.76	0.91	0.04	－0.36	0.60	0.03	－0.018	26
	S50	G	1.71	－1.07	－1.75	0.82	－0.71	－1.40	－0.029	27
	S19	B	－0.72	0.67	0.17	－0.34	0.44	0.14	－0.033	28
	S11	B	－0.71	0.53	0.16	－0.34	0.35	0.13	－0.060	29
	S21	B	－1.00	0.61	0.06	－0.48	0.40	0.05	－0.134	30
	S8	B	－0.87	0.21	0.29	－0.42	0.14	0.23	－0.138	31
	S68	K	0.02	－1.30	0.63	0.01	－0.86	0.51	－0.138	32
	S70	K	0.12	－1.44	0.62	0.06	－0.95	0.50	－0.140	33
	S9	B	－0.96	0.28	0.19	－0.46	0.18	0.15	－0.163	34
	S55	H	－0.78	0.03	0.20	－.037	0.02	0.16	－0.163	35
	S69	K	0.01	－1.40	0.55	0.01	－0.93	0.44	－0.170	36
	S43	E	－1.12	0.52	0.05	－0.54	0.35	0.04	－0.182	37
	S16	B	－0.84	0.08	0.11	－0.40	0.05	0.09	－0.182	38
	S10	B	－1.01	0.29	0.02	－0.48	0.19	0.02	－0.198	39
	S40	E	－0.64	－0.18	－0.04	－0.31	－0.12	－0.03	－0.201	40
	S72	K	0－.24	－1.34	0.40	－0.12	－0.89	0.32	－0.248	41
	S60	I	－0.58	－1.21	0.60	－0.28	－0.80	0.48	－0.280	42
	S66	J	－0.07	－3.18	2.04	－0.03	－2.10	1.63	－0.291	43
	S61	I	－0.57	－1.29	0.55	－0.28	－0.86	0.44	－0.300	44
	S13	B	－1.21	－0.11	0.04	－0.58	－0.07	0.03	－0.321	45
	S6	A	－0.27	－1.11	－0.40	－0.13	－0.74	－0.32	－0.335	46
	S64	I	－0.62	－1.38	0.48	－0.30	－0.91	0.38	－0.337	47
	S63	I	－0.67	－1.35	0.43	－0.32	－0.89	0.34	－0.353	48

续表 4

上清丸	编号	厂家	FAC1	FAC2	FAC3	*F*1	*F*2	*F*3	*F*	综合排名
	S30	D	－1.25	0.50	－1.24	－0.60	0.33	－0.99	－0.415	49
	S33	D	－0.87	－0.19	－1.12	－0.42	－0.13	－0.89	－0.429	50
	S35	D	－1.29	0.22	－1.07	－0.62	0.15	－0.85	－0.451	51
	S34	D	－1.32	0.21	－1.09	－0.63	0.14	－0.87	－0.464	52
	S37	E	－0.52	－0.53	－2.06	－0.25	－0.35	－1.64	－0.544	53
	S38	E	－0.73	－0.46	－2.01	－0.35	－0.30	－1.61	－0.579	54
	S39	E	－0.92	－0.49	－1.97	－0.44	－0.33	－1.57	－0.626	55
水丸	S98	N	1.11	－0.25	1.08	0.44	－0.15	.96	0.35	1
	S101	N	1.05	－0.42	1.28	0.42	－0.25	1.13	0.33	2
	S99	N	1.20	－0.51	1.03	0.48	－0.31	0.91	0.32	3
	S96	M	1.03	0.88	－0.72	0.41	0.52	－0.63	0.31	4
	S100	N	1.04	－0.67	1.08	0.41	－0.40	0.95	0.26	5
	S94	M	0.36	1.38	－0.74	0.14	0.83	－0.65	0.23	6
	S93	M	0.45	1.59	－1.33	0.18	0.95	－1.18	0.22	7
	S95	M	0.87	0.78	－1.10	0.35	0.47	－0.98	0.22	8
	S81	L	－1.24	1.13	1.19	－0.49	0.68	1.06	0.01	9
	S86	L	－1.25	0.28	0.62	－0.50	0.17	0.55	－0.19	10
	S83	L	－1.14	0.14	0.39	－0.45	0.08	0.34	－0.21	11
	S80	L	－1.24	0.04	0.10	－0.49	0.03	0.09	－0.28	12
	S92	L	－0.69	－0.73	－0.17	－0.27	－0.44	－0.15	－0.30	13
	S82	L	－1.17	－0.25	－0.06	－0.46	－0.15	－0.05	－0.33	14
	S87	L	－0.49	－1.17	－0.88	－0.19	－0.70	－0.78	－0.40	15
	S85	L	0.08	－2.21	－1.77	0.03	－1.33	－1.57	－0.53	16

参考文献

[1] 卫生部颁药品标准 . 中药成方制剂 [S]. 第 10 册 . 1996：8.

[2] 范贤标 . 上清丸中欧前胡素和异欧前胡素含量的同时测定 [J]. 海峡药学，2019，31（12）：86-88.

[3] 周远雄，陈繁华 . 高效液相色谱 - 可变波长检测法用于上清丸的质量标准提高 [J]. 中国医药科学，2018，8（9）：53-55.

[4] 黄敏，陆石英，叶萍 . HPLC 法测定上清丸中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量 [J]. 中药材，2013，36（7）：1174-1176.

[5] 刘东方，赵利娜，刘珊珊，等 . 中药指纹图谱技术的研究进展和应用 [J]. 中草药，2016，47（22）：4085-4094.

[6] 刘江，陈兴福，邹元锋 . 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志，2012，37（8）：1081-1088.

[7] 王露露，孙倩怡，杨慧海，等 . 模式识别及其在中药质量评价中的应用 [J]. 中草药，2016，47（23）：4282-4288.

[8] 于洋，李军，李宝国 . 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药，2018，40（5）：1139-1142.

[9] 聂韡，朱培林，房海灵，等 . HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量 [J]. 中草药，2017，48（1）：185-191.

[10] 杨忠杰，王博，王隆隆，等 . 基于高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别的疮疡生肌散质量控制研究 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1168-1172.

[11] 李小胜，陈珍珍 . 如何正确应用 SPSS 软件做主成分分析 [J]. 统计研究，2010，27（8）：105-108.

[12] 张可佳，孙宁宁，杨雪，等 . UPLC 结合化学计量学方法的胡黄连指纹图谱研究 [J]. 统计研究，2010，27（8）：105-108.

[13] 谢百波，里艳茹，寻园，等 . 基于多波长高效液相色谱指纹图谱和多成分定量分析的益肝明目口服液质量标准研究 [J]. 中南药学，2022，20（5）：1148-1152.

[14] 司徒文辉，谢诗婷，刘颖，等 . 生发片 HPLC-DAD 指纹图谱及指标性成分定量研究 [J]. 中南药学，2022，20（1）：165-170.

（收稿日期：2022-12-08；修回日期：2023-01-16）

反相高效液相色谱法测定 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中光学异构体 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量

杨欣茹，李铁健，王金迪，张贵民*（国家手性制药工程技术研究中心，鲁南制药集团股份有限公司，山东 临沂 273400）

摘要：目的 结合外标法和面积归一化法，建立反相高效液相色谱法测定 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中的光学异构体 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量。**方法** 采用 Chiral MX（2）-RH 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；以乙腈 - 水 - 乙酸（500∶500∶1）为流动相，等度洗脱；流速为 0.8 mL • min^{-1}；紫外检测器检测，波长为 220 nm；柱温为 30 ℃；进样体积为 10 μL。**结果** Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 和 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 分离良好；Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 在 0.15 ～ 2.93 mg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系（相关系数为 0.9999）；定量限为 0.15 μg • mL^{-1}，检测限为 0.049 μg • mL^{-1}。回收率在 95% ～ 100% 内，*RSD* 为 0.96%。**结论** 本方法操作简单，专属性强，灵敏度高，为 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中光学异构体 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 研究提供参考。

关键词：Fmoc-*L*-His（Trt）-OH；Fmoc-*D*-His（Trt）-OH；反相高效液相色谱法；等度洗脱；光学异构体

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2170-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.033

Determination of optical isomer Fmoc-*D*-His (Trt)-OH in Fmoc-*L*-His (Trt)-OH by RP-HPLC

YANG Xin-ru, LI Tie-jian, WANG Jin-di, ZHANG Gui-min* (*National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceuticals*, *Lunan Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective To establish a reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) to determine Fmoc-*D*-His (Trt)-OH in Fmoc-*L*-His (Trt)-OH by the external standard method and area normalization method. **Methods** The separation was performed on a Chiral MX (2)-RH column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with mobile phase consisting of acetonitrile-water-acetic acid (500∶500∶1). Isocratic elution was used and the flow rate was 0.8 mL • min^{-1}. Ultraviolet detector was used with the detection wavelength at 220 nm. The column temperature was 30 ℃ , and the injection volume was 10 μL**. Results** Fmoc-*L*-His (Trt)-OH and Fmoc-*D*-His (Trt)-OH were well separated. Fmoc-*D*-His (Trt)-OH had a good linearity at 0.15 ～ 2.93 mg • mL^{-1} (r ＝ 0.9999). The limit of quantitative was 0.15 μg • mL^{-1} and the limit of detection was 0.049 μg • mL^{-1}. The recovery ranged at 95% ～ 100%, *RSD* was 0.96%. **Conclusion** The method is simple, specific and sensitive, which provides reference for the determination of Fmoc-*D*-His (Trt)-OH with RP-HPLC in Fmoc-*L*-His (Trt)-OH.

Key words: Fmoc-*L*-His (Trt)-OH; Fmoc-*D*-His (Trt)-OH; RP-HPLC; isocratic elution; optical isomer

基金项目：山东省重大科技创新工程项目（No.2019JZZY010516）。

作者简介：杨欣茹，女，硕士，工程师，主要从事多肽药物研发，email：yangxinru2005@163.com *通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事药物研究及工程化研究，email：lunanzhangguimin@163.com

多肽药物因其高活性、低毒性、强特异性等优点，成为国内外制药企业研发的热点之一。多肽药物的合成工艺主要为经典的液相合成和固相合成，其中固相合成工艺越来越成熟并逐渐占据了主导地位[1-2]。保护氨基酸是固相合成多肽的起始物料之一，其质量对多肽的质量有重要的影响。起始物料引入的杂质常常难以分离，给后续的纯化带来不便，必须从源头加强质量控制[3]。原国家食品药品监督管理局于 2007 年出台的《合成多肽药物药学研究技术指导原则》[4] 中，对氨基酸的质量标准有明确的要求“作为起始原料的氨基酸及其衍生物的质量标准一般应包括性状、熔点、比旋度、化学纯度、色谱纯度、光学纯度、含量等，其中对于起始原料的化学纯度和光学纯度的控制尤为重要”。一个 10 肽的合成中，每个氨基酸发生 1% 的差向异构体，则生成的非对映异构体混合物中只有 90.4% 的肽含有正确的立体构型[5]；故需关注保护氨基酸的消旋异构体，建立严格的质控标准，以提高目标产物的光学纯度。

目前，有许多文献报道了多肽药物中异构体的控制方法[6-10]，而国内注册申请人通常在起始物料的内控标准中仅对比旋度进行控制，鉴于比旋度检查方法在专属性、灵敏度方面的限制，此项指标并不能有效地控制氨基酸的光学纯度，对于比旋度数值较小的保护氨基酸更是如此，因此，建议采用专属性强的手性 HPLC 对起始原料的光学纯度进行控制[11]。起始物料保护氨基酸中控制异构体的 HPLC 方法鲜有报道[12-14]，本研究建立了一种用反相液相色谱测定芴甲氧羰基 - 三苯甲基 -*L*- 组氨酸 [Fmoc-*L*-His（Trt）-OH] 中光学异构体芴甲氧羰基 - 三苯甲基 -*D*- 组氨酸 [Fmoc-*D*-His（Trt）-OH] 的方法（结构式见图 1），为 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 光学异构体的测定提供参考。

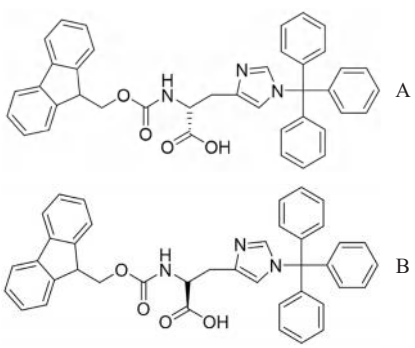

图 1　Fmoc-*L*-His（Trt）-OH（A） 和 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH（B）的结构式

Fig 1　Structural formula of Fmoc-*L*-His（Trt）-OH（A）and Fmoc-*D*-His（Trt）-OH（B）

1　仪器与试药

1.1　仪器

e-2695 高效液相色谱仪（Waters 公司，紫外检测器，Empower 工作站）；Mettler Toledo 电子天平（十万分之一，MS205DU）；超纯水机（赛多利斯）。

1.2　试药

Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 对照品（含量：96.52%，批号：GLS200813-36705）、Fmoc-*L*-His（Trt）-OH [批号：GLS201225-36701、GLS200426-36701、GLS200507-36701）[吉尔生化（上海）有限公司]；乙腈（色谱纯，Merck）；乙酸（分析纯，国药集团）；水（超纯水，自制）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为 Chiral MX（2）-RH（5 μm，4.6 mm×250 mm）；以乙腈 - 水 - 乙酸（500∶500∶1）为流动相，流速为 0.8 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 220 nm；进样体积为 10 μL。

2.2　溶液的制备

2.2.1　空白溶剂　空白溶剂为乙腈 - 水（50∶50）。

2.2.2　Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 对照品溶液　精密称取 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 对照品约 1.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，得 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 储备液；精密量取储备液 1 mL，置 20 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，即得 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液　取本品约 10 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，先加 2 mL 乙腈溶解，再加溶剂稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.2.4　混合溶液　取本品约 10 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，先加 2 mL 乙腈和适量溶剂溶解，再加入 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 储备液 1 mL，加溶剂稀释至刻度，摇匀，作为混合溶液。

2.3　方法学评价

2.3.1　系统适用性试验　取“2.2”项下混合溶液进行分析。结果 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 保留时间为 8.013 min，Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 保留时间为 9.678 min，两者分离度为 2.95，理论板数按 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 计为 3618，拖尾因子为 1.01。连续进样 6 次，Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 峰面积和保留时间的 *RSD* 分别为 0.63%、0.040%，Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 峰面积和保留时间的 *RSD* 分别为 0.29%、0.020%，均符合规定。

2.3.2　专属性试验　取空白溶剂、对照品溶液、

供试品溶液、混合溶液进样测定，记录色谱图，见图 2，结果表明空白溶剂对 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 测定无干扰；Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 保留时间为 7.990 min；Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 保留时间为9.660 min，无其他杂质干扰 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 测定；两者分离度为 2.95。专属性良好。

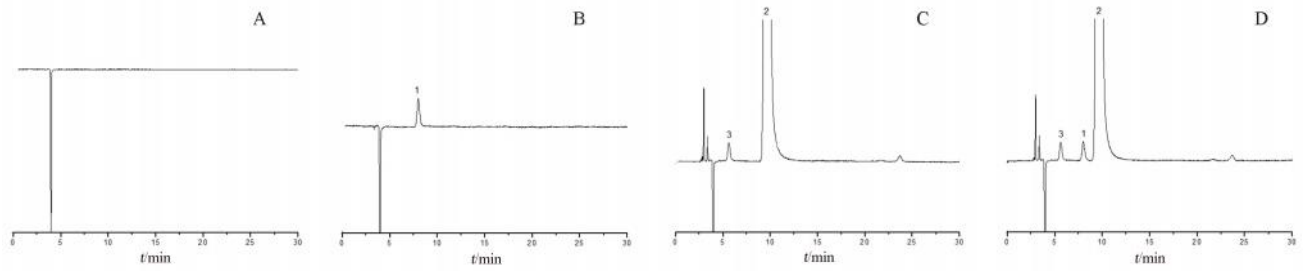

图 2 专属性试验色谱图

Fig 2 Chromatograms of specificity test

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）；D. 混合溶液（mixed solution）；1. Fmoc-*D*-His（Trt）-OH；2. Fmoc-*L*-His（Trt）-OH；3. 未知杂质（unknown impurity）

2.3.3 精密度试验 不同试验人员分别于不同日期按“2.2”项下方法配制对照品溶液、供试品加标溶液，每人平行配制 6 份。按“2.1”项下色谱条件于不同仪器中测定，按外标法及面积归一化法分别计算，结果 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量分别为 0.296%、0.318%，*RSD* 分别为 1.1%、0.95%，说明方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法配制对照品溶液、供试品溶液、混合溶液，分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，对照品溶液以峰面积为考察指标，供试品溶液、混合溶液均以 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 含量（%）为考察指标，结果对照品溶液、混合溶液的 *RSD* 均小于 2%，供试品溶液均未检出 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH，对照品溶液、混合溶液及供试品溶液在 24 h 内均稳定。

2.3.5 定量限（LOQ）与检测限（LOD） 取 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 储备液，加溶剂进行逐步稀释。以 *S/N* ≈ 10 时的浓度作为定量限，以 *S/N* ≈ 3 时的浓度作为检测限，Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的定量限和检测限分别为 0.15、0.049 μg • mL^{-1}，表明方法灵敏度较高。

2.3.6 线性关系考察 精密量取 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 储备液适量，用溶剂稀释成从定量限（0.15 μg • mL^{-1}）至约相当于限度质量浓度（1.5 μg • mL^{-1}）的 40%（0.59 μg • mL^{-1}）、80%（1.17 μg • mL^{-1}）、100%（1.46 μg • mL^{-1}）、120%（1.76 μg • mL^{-1}）、150%（2.20 μg • mL^{-1}）、200%（2.93 μg • mL^{-1}）的溶液，进样测定，记录色谱图。以质量浓度（x，μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积（y）为纵坐标，绘制标准曲线，回归方程为 $y = 4.05\times10^{4}x - 317.22$，$r = 0.9999$。表明 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 在 0.15 ～ 2.93 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.7 回收试验 取本品 9 份，各约 10 mg，精密称定，分别置 20 mL 量瓶中，先加 2 mL 乙腈及适量溶剂溶解，分别加入 0.8、1.0、1.2 mL Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 储备液，各 3 份，分别用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为 80%、100%、120% 的准确度溶液。依法测定，记录色谱图。按外标法计算得各准确度溶液中 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的回收率均在 95% ～ 100%，*RSD* 为 0.96%，本法的准确度较高。外标法计算结果分别为 0.233%、0.296%、0.355%；面积归一化法计算结果分别为 0.251%、0.320%、0.386%。两种计算方法结果基本一致，表明面积归一化法可准确用于 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量测定。

2.3.8 耐用性 通过改变流速（0.7、0.9 mL•min^{-1}）、柱温（28、32 ℃）、流动相 [乙腈 - 水 - 甲酸（480∶520∶1）、乙腈 - 水 - 甲酸（520∶480∶1）、乙腈 - 水 - 甲酸（500∶500∶0.9）、乙腈 - 水 - 甲酸（500∶500∶1.1）]，分别取空白溶剂、溶液考察本法的耐用性，结果混合改变柱温、流速、流动相比例后，测得混合溶液中 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 含量的 *RSD* 均＜ 2.5%，且分离度均符合要求，说明本法耐用性良好。

3 样品含量检测

取 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH（批号：GLS200426-36701、GLS200507-36701、GLS201225-36701），在“2.1”项色谱条件下进样分析，记录色谱图。结果 3 批样品中均未检出 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH。

4 结论

4.1 色谱方法的确定

光学异构体的检测方法通常为正相色谱法，采用手性色谱柱，以毒性比较大的有机溶剂作为流动相。而本方法中采用以纤维素 - 三 -（4- 氯 -3- 甲基苯基氨基甲酸酯）为固定相的 Chiral MX（2）-RH 反相手性色谱柱，以乙腈 - 水 - 乙酸为流动相，等度洗脱，即能实现 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 和 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的分离，参考此方法，调整乙腈 - 水的比例，成功分离了 Fmoc-*L*-Tyr（tBu）-OH 和 Fmoc-*D*-Tyr（tBu）-OH，为其他保护氨基酸中异构体的分离提供了参考。取混合溶液在 200 ～ 400 nm 内进行全波长扫描，Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 和 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 在 220 nm 处有最大吸收，因此选择 220 nm 作为检测波长。

4.2 色谱条件的优化

本方法采用反相高效液相色谱法，流动相先采用乙酸 - 甲醇 - 水（1∶600∶400）溶液，在该色谱条件下，Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 不能与 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 完全分离。将流动相中甲醇换为乙腈，并调整乙腈和水的比例，乙酸含量不变，Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 与 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 可以良好分离。

4.3 外标法与面积归一化法对比

本试验中主要采用了外标法和面积归一化法进行方法学验证，在精密度试验、准确度试验及耐用性试验中对外标法和面积归一化法进行了对比，从结果可以看出，外标法和面积归一化法均可以较准确地测定 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量，外标法和面积归一化法测定结果无明显差异。因外标法需用到杂质对照品，杂质对照品较难获得，而面积归一化法不需要杂质对照品，操作简单，因此，可用面积归一化法对 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中的 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 进行检测。

4.4 小结

本研究建立了面积归一化法检测 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中异构体 Fmoc-*D*-His（Trt）-OH 的含量，该方法简单，灵敏度高，专属性强，准确度好，适用于 Fmoc-*L*-His（Trt）-OH 中异构体的检测，为多肽药物起始物料保护氨基酸质量研究提供了依据。

参考文献

[1] 林龙，姜素云，汤新强 . 多肽类药物体外合成方法的研究进展 [J]. 大连医科大学学报，2014，36（2）：177-181.

[2] 胡玉玺，蒋煜，韩天娇 . 制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响 [J]. 中国新药杂志，2017，26（18）：2143-2148.

[3] 吴一凡，刘福利 . 多肽固相合成中起始物料的控制策略 [J]. 中国新药杂志，2022，31（10）：937-941.

[4] 国家食品药品监督管理总局 . 合成多肽药物药学研究技术指导原则 [S]. 2007.

[5] 王鹏 . 合成多肽药物的合成工艺中关键问题分析 [J]. 中国新药杂志，2010，19（2）：102-105.

[6] 张若蘅，王宏，徐筱杰 . 应用反相高效液相色谱法分离 *L*，*D*- 多肽非对映异构体 [J]. 色谱，1996，14（3）：202-204.

[7] 郜炎龙，吴超柱，徐凡，等 . 多肽药物固相合成中的水解杂质和非对映异构体杂质的研究 [J]. 重庆理工大学学报（自然科学），2014，28（3）：69-76.

[8] 何刚，唐洋明，陶安进，等 . 多肽药物中氨基酸消旋和非对映异构体杂质的检测方法：CN106290601B [P]. 2019-03-22.

[9] 邵红霞，邢亚军，钱志琴，等 . 一种用高效液相色谱法分离测定含多个手性中心的多肽手性异构体的方法：CN110702819B [P]. 2022-09-06.

[10] 林洁虹，汪泓，邵泓，等 . 基于质谱技术的手性氨基酸分析以控制消旋肽杂质的研究进展 [J]. 药学学报，2019，54（11）：1958-1964.

[11] 康建磊，徐冰珠，李建宇 . 关于合成多肽药物中非对映异构体杂质的研究 [J]. 中国现代应用药学，2010，27（5）：387-389.

[12] 郭晓蓉，张松，邱霞，等 . 一种保护氨基酸对映异构体检测方法：CN111505161A [P]. 2020-08-07.

[13] 孙宝丹，周灵祺，柳宏巧 . HPLC 法测定 2 种保护组氨酸衍生物中的对映体 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（10）：1366-1370.

[14] 林琳，夏立钧，许旭 . 大环糖肽抗生素键合相高效液相色谱法拆分 7 种氨基带保护基的氨基酸对映体 [J]. 色谱，2006，24（2）：144-147.

（收稿日期：2022-11-09；修回日期：2022-12-13）

反相高效液相色谱法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的含量

刘伟[1]，毛柯[1]，秦绍刚[2]，汪梦美[2]，夏宇航[2]，张蒙蒙[2]，陶俊钰[2*]，刘为中[1]（1.合肥医工医药股份有限公司，合肥 230601；2.合肥市食品药品检验中心，合肥 238000）

摘要：目的 建立反相高效液相色谱法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的含量。**方法** 色谱柱为赛默飞 Thermo Acclaim Mixed-Mode WAX-1 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.025 mol·L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（用三乙胺调节 pH 至 6.0）；流动相 B 为乙腈，梯度洗脱；流速为 0.6 mL·min^{-1}；柱温为 35 ℃；检测波长为 210 nm；进样体积为 10 μL。**结果** 空白溶液、空白溶剂均不干扰葡萄糖酸根的测定，葡萄糖酸根在 0.0545 ～ 0.5448 mg·mL^{-1}（r = 1.000）内与峰面积线性关系良好，平均回收率在 99.39% ～ 101.2%，*RSD* < 2.0%。**结论** 本法灵敏度高，专属性强，可准确测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的含量。

关键词：反相高效液相色谱法；葡萄糖酸钙锌口服溶液；葡萄糖酸根
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2174-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.034

Determination of gluconate acid radical in calcium gluconate oral solution by RP-HPLC

LIU Wei[1], MAO Ke[1], QIN Shao-gang[2], WANG Meng-mei[2], XIA Yu-hang[2], ZHANG Meng-meng[2], TAO Jun-yu[2*], LIU Wei-zhong[1] (1. *Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei* 230601; 2. *Hefei Food and Drug Inspection Certer, Hefei* 238000)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method to determine gluconate acid radical in calcium gluconate oral solution. **Methods** The chromatographic column was Thermo Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Mobile phase A was a monopotassium phosphate solution of 0.025 mol·L^{-1} (adjusting pH to 6.0 by triethylamine). Mobile phase B was acetonitrile, with gradient elution. The flow rate was 0.6 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 210 nm. The column temperature was set at 35 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** The negative blank solution and the blank solvent had better separation of the gluconate. The calibration curve of gluconate acid radical had a good linearity at 0.0545 ～ 0.5448 mg·mL^{-1} (r = 1.000). The average recoveries ranged at 99.39% ～ 101.2%, with *RSDs* all less than 2.0%. **Conclusion** The method is sensitive and accurate, which is suitable for the determination of gluconate acid radical in calcium gluconate oral solution.
Key words: RP-HPLC; calcium gluconateoral solution; gluconate acid radical

钙和锌是人体必需的矿物质元素，必需从外界获取，当各种因素使矿物质元素的摄入长期不足时，就会产生各种缺乏症状。从我国第三次营养普查的资料显示来看，儿童缺钙或钙营养不足占 50%，儿童缺锌或锌营养不足占 60%。赖氨酸能促进儿童生长、增强成人体质，可与钙、铁等矿物质元素螯合形成可溶性的小分子单体，促进这些矿物质元素的吸收[1]。

原研厂家澳诺（中国）制药有限公司的葡萄糖酸钙锌口服溶液在中国上市多年，为钙锌同补类药物，并添加赖氨酸促进儿童生长发育。本文研究仿制葡萄糖酸钙锌口服溶液，规格为 10 mL 含葡萄糖

作者简介：刘伟，男，硕士研究生，主要从事药品研发与质量研究，email：32287671@qq.com *通信作者：陶俊钰，女，主任药师，主要从事药品检验与质量研究，email：942884082@qq.com

酸钙 600 mg、葡萄糖酸锌 30 mg 与盐酸赖氨酸 100 mg，与原研制剂的剂型、规格、辅料类型均相同。

本品含有合理剂量的葡萄糖酸钙、葡萄糖酸锌和盐酸赖氨酸，钙锌同补在发挥生理机能功效上有互相促进的协同作用；额外添加的赖氨酸，促进儿童生长发育[2-3]。因此建立合理的分析方法控制葡萄糖酸钙锌口服溶液中主要活性成分葡萄糖酸根的含量有重要的意义。

国内外对葡萄糖酸根测定的报道较少，主要采用 NMR 法[4]、HPLC-ELSD 法[5]等，未见采用 RP-HPLC 法使用紫外检测器测定葡萄糖酸根含量的报道。本文选择乙二胺四乙酸二钠（EDTA）与葡萄糖酸根进行络合，混合型 Mixed-Mode 色谱柱进行分离，RP-HPLC 法进行梯度洗脱[6-12]，样品前处理简单方便，分析测定准确、灵敏，完全满足对葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根含量的检测要求。

1　仪器与试药

LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津公司）。葡萄糖酸钙锌口服溶液自研产品（规格：10 mL/ 支，批号：181107-1B）、不含葡萄糖酸根的空白溶液（规格：10 mL/ 支，批号：181025）和葡萄糖酸钙锌口服溶液样品（规格：10 mL/ 支，批号：11201101、11201102、11201103）（合肥恩瑞特药业有限公司），市售产品 1 [澳诺（中国）制药有限公司，规格：10 mL/ 支，批号：2003112-B111]，市售产品 2（湖北福人金身药业有限公司，规格：10 mL/ 支，批号：200722），市售产品 3（扬子江药业集团有限公司，规格：10 mL/ 支，批号：20073111）；葡萄糖酸钠对照品（中国食品药品检定研究院，含量：99.8%，批号：100736-201803）；乙腈为色谱纯；乙二胺四乙酸（EDTA，阿拉丁，含量：98%，分析纯，批号：I2015048）；其他试剂为分析纯。

2　方法与结果

2.1　溶液配制

溶剂：0.025 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（用三乙胺调节 pH 至 6.0）- 乙腈（90∶10，*V/V*）。

对照品溶液：取葡萄糖酸钠对照品约 15 mg，精密称定，加 0.02 mol • L^{-1} EDTA 溶液 2.5 mL 溶解稀释，振摇后，加溶剂稀释定容，制成每 1 mL 约含 0.27 mg 的溶液，摇匀，作为对照品溶液。

供试品溶液：精密移取本品 5 mL，用 0.02 mol • L^{-1} EDTA 溶液 50 mL 稀释溶解后，摇匀，精密移取 1 mL，用溶剂 20 mL 稀释并定容，制成每 1 mL 中约含葡萄糖酸根 0.27 mg 的溶液，摇匀，作为供试品溶液。

空白溶液：精密移取不含葡萄糖酸根的空白溶液 5 mL，用 0.02 mol • L^{-1} EDTA 溶液 50 mL 稀释溶解后，摇匀，精密移取 1 mL，用溶剂 20 mL 稀释并定容，摇匀，作为空白溶液。

空白溶剂：移取 0.02 mol • L^{-1} EDTA 溶液 2.5 mL 置 50 mL 量瓶中，加溶剂稀释定容，作为空白溶剂。

2.2　色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim Mixed-Mode WAX-1（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.025 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（用三乙胺调节 pH 至 6.0）（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 13 min，90%A；13 ～ 20 min，90% ～ 25%A；20 ～ 50 min，25%A；50 ～ 60 min，25% ～ 90%A；60 ～ 70 min，90%A）；流速为 0.6 mL • min^{-1}；检测波长为 210 nm；柱温为 35 ℃；进样体积为 10 μL。

2.3　专属性

分别精密量取空白溶液、对照品溶液、空白溶剂各 10 μL 注入高效液相色谱仪，记录色谱图，结果见图 1。此条件下葡萄糖酸根的保留时间为 10.163 min，空白溶液、空白溶剂均不干扰葡萄糖酸根的测定。

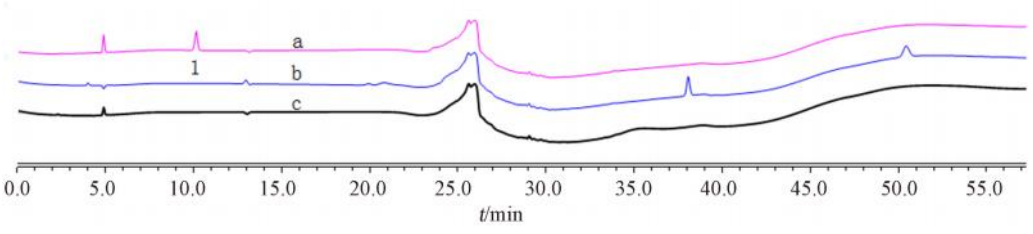

图 1　葡萄糖酸根检测方法 HPLC 色图谱

Fig 1　HPLC chromatogram of gluconate acid radical

a. 对照品溶液（reference solution）；b. 空白溶液（negative blank solution）；c. 空白溶剂（blank solvent）；1. 葡萄糖酸根（gluconate acid radical）

2.4 灵敏度试验

取葡萄糖酸根对照品适量，精密称定，以溶剂溶解并逐级稀释，当信噪比（*S/N*）约为 10∶1 时为定量限。结果葡萄糖酸根在本色谱条件下定量限为 1.2 μg·mL^{-1}，约相当于供试品浓度的 0.4%，灵敏度满足检测要求。

2.5 线性和范围

精密称取葡萄糖酸钠对照品 27.29 mg，加溶剂溶解并稀释定容制成含葡萄糖酸根 2.724 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.2、0.5、1.0、1.5、2 mL 置 10 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，制成含葡萄糖酸根质量浓度为 0.0545、0.1362、0.2724、0.4086、0.5448 mg·mL^{-1} 的标准溶液。以质量浓度 *C* 为横坐标，以峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归，得回归方程为 $A = 12.17C - 0.0272$（$r = 1.000$）。结果表明，葡萄糖酸根在 0.0545 ～ 0.5448 mg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.6 精密度及稳定性试验

精密量取“2.5”项下质量浓度为 0.2724 mg·mL^{-1} 对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次；并考察 0、3、6、9、15、24 h 的稳定性，结果表明，仪器精密度良好（*RSD* 为 0.74%），对照品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品（11201101 批），按照“2.1”项下方法平行配制 6 份供试品溶液，各精密量取 10 μL，分别注入高效液相色谱仪，记录色谱图，结果样品含量 *RSD* 为 0.45%，说明本方法重复性良好。

2.8 回收试验

分别在处方量的不含葡萄糖酸根的空白溶液中加入处方量 80%、100%、120% 的葡萄糖酸钠对照品，照“2.2”项下方法测定，考察方法的准确度情况，结果见表 1。

表 1 回收试验结果

Tab 1 Recovery

浓度水平	加入量 / mg	检测量 /（mg·mL^{-1}）	准确度 /%	均值 /%	*RSD*/%
80%	10.95	10.87	99.27	99.35	0.59
	10.73	10.73	100.0		
	10.69	10.56	98.78		
100%	13.93	14.02	100.6	100.5	0.40
	13.88	13.90	100.1		
	13.49	13.61	100.9		
120%	16.07	16.40	102.1	101.2	1.0
	16.44	16.45	100.1		
	16.91	17.15	101.4		

2.9 样品含量测定

3 批葡萄糖酸钙锌口服液按照“2.1”项下方法配制供试品溶液，精密量取 10 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算葡萄糖酸根的含量，结果见表 2。

表 2 葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的含量测定结果（mg·mL^{-1}）

Tab 2 Content of gluconate acid radical in calcium gluconate oral solution (mg·mL^{-1})

分类	批号	含量
自研产品	11201101	52.20
	11201102	53.09
	11201103	53.73
市售产品 1	2003112-B111	55.16
市售产品 2	200722	54.27
市售产品 3	20073111	56.63

3 讨论

3.1 色谱条件的筛选

通过文献调研，采用赛默飞混合型 Mixed-Mode 色谱柱用于葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄酸根的检测。初步拟订葡萄糖酸根检测方法为 RP-HPLC 法，采用 Thermo Acclaim Mixed-Mode WAX-1 为色谱柱；以乙腈 -0.025 mol·L^{-1} 磷酸二氢钾（用三乙胺调节 pH 值至 6.0）（10∶90，*V*/*V*）为流动相；检测波长为 210 nm；柱温 35 ℃；流速为 0.6 mL·min^{-1}。方法 1 采用等度洗脱，该方法下葡萄糖酸根保留时间为 10.060 min，空白溶剂、空白溶液均不干扰其测定，供试品溶液在 40 min 左右仍有未洗脱完全色谱峰；方法 2 采用梯度洗脱（0 ～ 13 min，90%A；13 ～ 13.1 min，90% ～ 40%A；13.1 ～ 30 min，40%A；30 ～ 30.1 min，40% ～ 90%A；30.1 ～ 40 min，90%A），该方法下葡萄糖酸根保留时间为 10.152 min，空白溶剂、空白溶液均不干扰其测定，供试品溶液在 36 min 左右仍有色谱峰；方法 3 在方法 2 梯度洗脱基础上增加有机相比例，该方法下葡萄糖酸根保留时间为 10.018 min，空白溶剂不干扰样品的检测；方法 4 在方法 3 基础上调整梯度、延长高比例有机相运行时间，考察组分是否被完全洗脱，该方法下葡萄糖酸根保留时间为 9.513 min，空白溶剂不干扰样品的检测；方法 5 在方法 4 基础上进一步优化洗脱梯度，缩短运行时间，该方法下葡萄糖酸根保留时间为 9.768 min，溶剂不干扰样品检测，但葡萄糖酸根峰对称因子 0.64，对称性较差；方法 6 采用梯度洗脱同方法 5，降低样品质量浓度至 0.27 mg·mL^{-1}，

该方法下葡萄糖酸根保留时间为 9.742 min，溶剂不干扰样品检测，葡萄糖酸根峰对称因子为 1.02，对称性良好，同时对该方法进行全面的分析方法学验证，结果均满足要求，对比图谱见图 2。

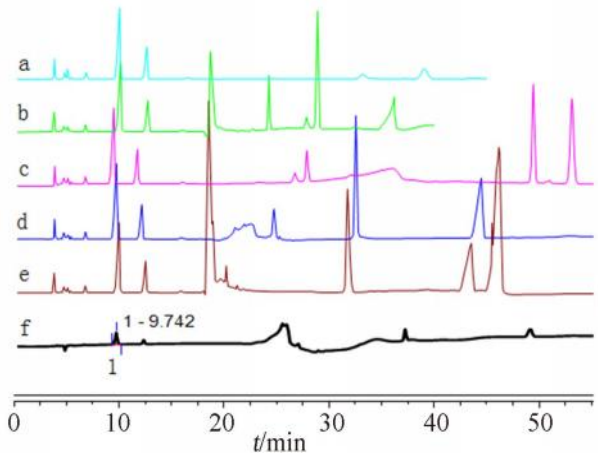

图 2　葡萄糖酸根检测方法色谱条件筛选供试品溶液 HPLC 图谱

Fig 2　HPLC chromatogram of screening conditions for the detection of gluconate acid radical

a. 方法 1（method 1）；b. 方法 2（method 2）；c. 方法 4（method 4）；d. 方法 5（method 5）；e. 方法 3（method 3）；f. 方法 6（method 6）；1. 葡萄糖酸根（gluconate acid radical）

3.2　葡萄糖酸根限度的制订

本文采用专属性较好的 RP-HPLC 方法控制产品中葡萄糖酸根的含量，并对其进行全面的分析和方法学验证。参照多个厂家多批市售产品中葡萄糖酸根的标示量（54.80 mg • mL^{-1}），同时严格控制自研产品活性成分含量限度范围（93.0% ～ 107.0%），将葡萄糖酸钙锌口服溶液中葡萄糖酸根的限度范围定为 51.0 ～ 58.6 mg • mL^{-1}。

3.3　小结

本试验采用梯度洗脱方法测定复杂基质中葡萄糖酸根含量，方法准确、灵敏，操作简便，可用于产品大生产过程中的质量控制及标准研究。

参考文献

[1] 孙婷 . 葡萄糖酸钙锌与维生素 D 联用治疗维生素 D 缺乏性佝偻病患儿的临床效果 [J]. 慢性病学杂志，2021，22（7）：1110-1111，1114.

[2] 贾振丽，左霞，宋威 . 葡萄糖酸钙锌口服溶液佐治小儿轻度腹泻的临床效果 [J]. 临床医学，2020，40（4）：89-90.

[3] 刘和兰 . 葡萄糖酸钙锌口服液联合消旋卡多曲治疗小儿急性腹泻 [J]. 中国处方药，2014，12（8）：55.

[4] 冷霄云，史淑丹，李怡然，等 . NMR 技术测定口服液中葡萄糖酸含量 [J]. 化学试剂，2019，41（6）：598-602.

[5] 陈树，刘留成 . HPLC-ELSD 法测定复合葡萄糖酸钠铁 / 蔗糖注射液中葡萄糖酸含量 [J]. 今日药学，2019，29（2）：90-92，96.

[6]《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组 . 化学药物杂质研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理总局，2005.

[7] 李田洋，杨婷婷，张琪，等 . 高效液相色谱法同时测定骨炎消方中 8 种有效成分的含量 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1666-1669.

[8] 黄媛 . 高效液相色谱法同时测定减肥类保健食品中 6 种蒽醌苷元的含量 [J]. 食品与药品，2022，24（5）：455-459.

[9] 杨旭，张蕊 . 反相高效液相色谱法同时测定复方氨酚烷胺片中三种主要组分的含量 [J]. 中国当代医药，2023，30（3）：61-64.

[10] 李沁璇，杨芳 . 高效液相色谱法同时测定三拗片中盐酸麻黄碱和苦杏仁苷的含量 [J]. 中南药学，2011，9（1）：38-41.

[11] 林海滨 . 高效液相色谱法同时测定烟叶中 7 种多酚物质 [J]. 山东化工，2022，51（18）：123-125，128.

[12] 侯倩煜，李飞宇，陈燕艳，等 . UPLC-PDA 测定胆木中异长春花苷内酰胺含量 [J]. 中南药学，2022，20（4）：915-918.

（收稿日期：2022-11-30；修回日期：2023-02-10）

HPLC-MS/MS 法测定注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类杂质

邓鸣，曾庆花，梁秋霞，朱健萍*（广西壮族自治区食品药品检验所，南宁 530021）

摘要：目的 建立高效液相色谱 - 串联质谱法（HPLC-MS/MS）同时测定注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质（*N*- 亚硝基二甲胺、*N*- 亚硝基二乙胺、*N*- 亚硝基二乙醇胺、*N*- 亚硝基 -*N*- 甲基苯胺、*N*- 亚硝基 -*N*- 乙基苯胺、*N*- 亚硝基二异丙胺、*N*- 亚硝基二正丁胺）。**方法** 色谱柱为 ACE EXCEL 3 C18-AR（3 μm，100 mm×4.6 mm），流动相为 0.1% 甲酸甲醇溶液（A）-0.1% 甲酸（B），梯度洗脱，流速 0.6 mL • min^{-1}，采用 APCI 离子源，以正离子、多重反应监测（MRM）模式进行检测。**结果** 7 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质在 1 ～ 20 ng•mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。回收率在 78.9% ～ 89.6%，*RSD* 均小于 6.1%。检测限低于 1.5 ng•g^{-1}。样品中各杂质均未检出。**结论** 该方法灵敏度高、专属性强，可用于注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质的质量控制。

关键词：注射用盐酸头孢甲肟；*N*- 亚硝胺；基因毒性杂质；含量测定；HPLC-MS/MS
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2178-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.035

Determination of 7 *N*-nitrosamine impurities in cefmenoxime hydrochloride for injection by HPLC-MS/MS

DENG Ming, ZENG Qing-hua, LIANG Qiu-xia, ZHU Jian-ping* (*Guangxi Institue for Food and Drug Control, Nanning* 530021)

Abstract: Objective To determine 7 *N*-nitrosamine impurities (*N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosodiethylamine, *N*-nitrosodiethanolamine, *N*-nitroso-*N*-methylphenylamine, *N*-nitroso-*N*-ethylphenylamine, *N*-nitrosodiipropylamine, and *N*-nitrosodibutylamine) in cefmenoxime hydrochloride for injection by HPLC-MS/MS. **Methods** The separation was performed on an ACE EXCEL 3 C18-AR (3 μm, 100 mm×4.6 mm) column with the mobile phase 0.1% formic acid methanol solution (A)-0.1% formic acid solution (B) by gradient elution at a flow rate of 0.6 mL • min^{-1}. Multiple reaction monitoring was performed on a triple quadripole mass spectrometer equipped with an APCI source in the positive mode. **Results** The calibration curves were in good linearty at 1 ～ 20 ng • mL^{-1} for 7 *N*-nitrosamine impurities. The recoveries were within 78.9% ～ 89.6% with *RSD* under 6.1%. The limit of detection was less than 1.5 ng•g^{-1}. No impurities were detected in the samples. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method is accurate, highly sensitive, strong specific, and can be used for the quality control of 7 *N*-nitrosamine genotoxic impurities in cefmenoxime hydrochloride for injection.

Key words: cefmenoxime hydrochloride for injection; *N*-nitrosamine; genotoxic impurity; content determination; HPLC-MS/MS

近年来，沙坦类药物、雷尼替丁中陆续发现了痕量的 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质，引发国内外制药企业和监管部门的广泛关注。细胞和动物水平的实验证明，*N*- 亚硝胺类化合物具有强致癌作用和明显的肝毒性[1-3]，根据 ICH M7（R1）(《评估和控制药物中 DNA 反应性（致突变）杂质以限制潜在

作者简介：邓鸣，女，副主任药师，主要从事药品质量控制与标准研究工作，email：34482178@qq.com *通信作者：朱健萍，女，主任药师，主要从事药品质量控制与标准研究工作，email：22701650@qq.com

致癌风险》》指南中对基因毒性杂质的分类，亚硝胺类化合物属于高效致突变致癌物（关注队列）[4]。国家药品监督管理局发布了亚硝胺类杂质研究技术指导原则[5]，旨在为化学药品中亚硝胺类杂质的研究和控制提供指导。亚硝胺类杂质有多种产生原因，如工艺产生、降解途径和污染引入等。沙坦类原料药中 *N*- 亚硝胺杂质被认为来源于结构中四氮唑环的合成工艺，盐酸头孢甲肟也含有四氮唑结构，在原料生产过程中有引入该类杂质的风险，因此有必要对该类杂质进行筛查及质量控制。

目前药物中亚硝胺类杂质测定方法主要采用气相色谱串联质谱法（GC-MS/MS）[6-7] 和液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）[8-11]。本文采用 LC-MS/MS 法对注射用盐酸头孢甲肟中 *N*- 亚硝基二甲胺（*N*-nitrosodimethylamine，NDMA）、*N*- 亚硝基二乙胺（*N*-nitrosodiethylamine，NDEA）、*N*- 亚硝基二乙醇胺（*N*-nitrosodiethanolamine，NDELA）、*N*- 亚硝基 -*N*- 甲基苯胺（*N*-nitroso-*N*-methylphenylamine，NMPA）、*N*- 亚硝基 -*N*- 乙基苯胺（*N*-nitroso-*N*-ethylphenylamine，NEPA）、*N*- 亚硝基二异丙胺（*N*-nitrosodiipropylamine，NDIPA）、*N*- 亚硝基二正丁胺（*N*-nitrosodibutylamine，NDBA）的含量进行分析，可为注射用盐酸头孢甲肟中亚硝胺类基因毒性杂质的检测提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 6460 型串联三重四极杆质谱，配 Agilent1290 型液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Milli-Q 去离子水发生器（美国 Milli-Q 公司）；CPA2250 型电子天平（梅特勒 - 托利多公司）。

1.2 试药

NDMA（批号：510166-202004，含量：99.5%）、NDEA（批号：510168-202103，含量：99.7%）、NDELA（批号：430006-202101，含量：99.2%）、NMPA（批号：510211-202001，含量：99.6%）、NEPA（批号：510212-202001，含量：99.4%）、NDIPA（批号：510209-202001，含量：99.9%）、NDBA（批号：510208-202001，含量：99.7%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇、甲酸为色谱纯试剂，水为超纯水，其他试剂为分析纯。注射用盐酸头孢甲肟样品（规格：1.0 g，批号：210101、210102、220501、220504，来自抽检样品）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ACE EXCEL 3 C18-AR（3 μm，100 mm×4.6 mm）；流动相：A 为 0.1% 甲酸甲醇溶液，B 为 0.1% 甲酸溶液，梯度洗脱程序（0 ～ 6 min，30% ～ 80%A；6 ～ 10 min，80% ～ 90%A；10 ～ 14 min，90%A；14 ～ 15 min，90% ～ 30%A；15 ～ 20 min，30%A），流速为 0.6 mL • min^{-1}，进样量为 20 μL，柱温为 30 ℃。

2.2 质谱条件

离子源：大气压化学离子源（APCI）；扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应监测（MRM）；干燥气：氮气；干燥气温度：325 ℃；干燥气流速：10 L • min^{-1}；雾化气压力：55 psi；鞘流气温度：350 ℃；鞘流气流速：10 L • min^{-1}。质谱参数见表 1。

表 1 7 种 *N*- 亚硝胺类杂质质谱参数

Tab 1 Parameter of mass spectra of 7 *N*-nitrosamine impurities

化合物	母离子 $[M+H]^+$	子离子	驻留时间 /ms	碎裂电压 /V	碰撞能量 /V
NDELA	135.0	56.0（定量）	70	40	8
	135.0	104.1	70	40	16
NDMA	75.2	58.0（定量）	70	40	8
	75.2	43.0	70	40	16
NDEA	103.1	75.0（定量）	70	65	5
	103.1	47.0	70	65	13
NDIPA	131.1	89.0（定量）	70	65	4
	131.1	43.0	70	65	6
NMPA	137.0	66.1（定量）	70	45	10
	137.0	107.1	70	45	16
NEPA	151.0	77.1（定量）	70	40	20
	151.0	51.0	70	52	25
NDBA	159.2	103.0（定量）	70	70	8
	159.2	57.0	70	70	12

2.3 溶液的制备

2.3.1 空白溶剂 以超纯水作为空白溶剂。

2.3.2 供试品溶液 取注射用盐酸头孢甲肟粉末适量（约相当于盐酸头孢甲肟 1.0 g），精密称定，置于 5 mL 量瓶中，加入适量超纯水溶解并稀释至刻度，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3.3 对照品储备液 取各杂质对照品约 10 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，制成 1.0 mg • mL^{-1} 储备液，置于 4 ℃保存。精密量取各杂质对照品储备液 0.1 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，用超纯水稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品溶液，精密量取适量，用超纯水稀释制成质量浓度约为 1、2、3、5、10、20 ng • mL^{-1} 的线性对照品溶液。

2.4 专属性

分别取空白溶剂、供试品溶液和混合对照品

溶液（10 ng • mL^{-1}）进样分析并记录色谱图。结果空白溶剂对各杂质的检测无干扰，各杂质峰分离完全，表明方法专属性良好，见图 1。

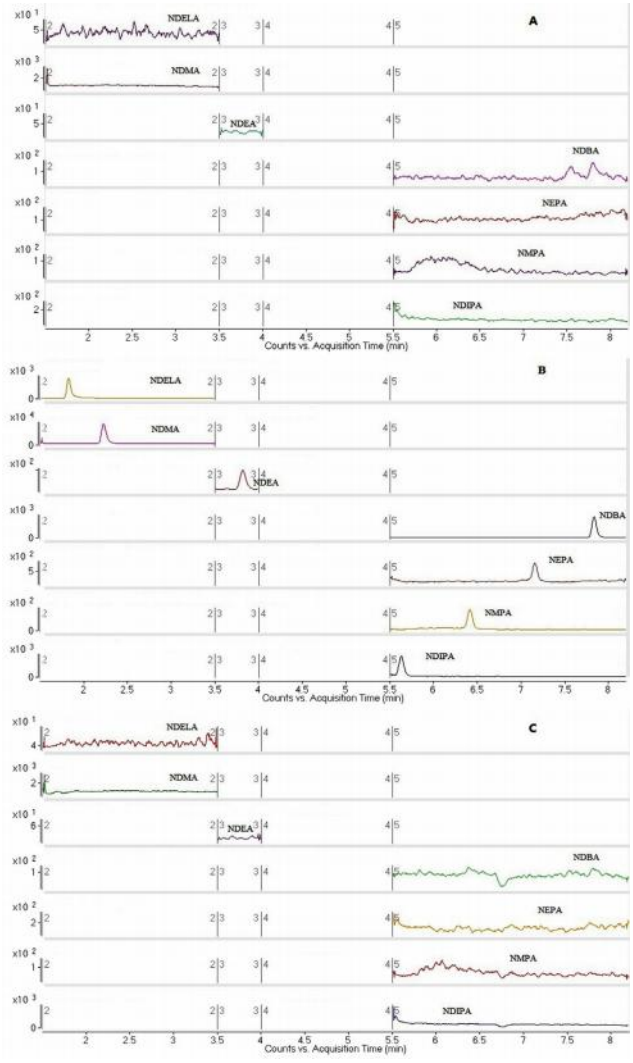

图 1　7 种 *N*- 亚硝胺类杂质测定的典型色谱图

Fig 1　Typical chromatogram of 7 *N*-nitrosamine impurities

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）

2.5　线性关系考察

精密量取“2.3.3”项下各杂质的线性对照品溶液分别进样检测，记录色谱图，以质量浓度（*X*，ng • mL^{-1}）为横坐标，以峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，结果见表 2，各杂质在其线性范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.6　检测限和定量限

精密量取“2.3.3”项下混合对照品溶液，逐级稀释后进样，分别将信噪比（*S/N*）约为 3 和 10 的质量浓度作为检测限和定量限，结果见表 2。

2.7　精密度考察

取“2.5”项下 10 ng • mL^{-1} 线性溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，计算 *RSD*。结果 NDELA、NDMA、NDEA、NDIPA、NMPA、NEPA、NDBA 峰面积的 *RSD* 分别为 2.6%、5.8%、4.9%、5.7%、4.0%、4.4%、5.3%，均小于 10%，表明仪器精密度良好。

2.8　回收率考察

取注射用盐酸头孢甲肟粉末适量（约相当于盐酸头孢甲肟 1.0 g）共 6 份，精密称定，置于 5 mL 量瓶中，分别精密加入“2.3.3”项下混合对照品溶液 50 μL，按“2.3.2”项下方法制备得到回收率溶液，分别进样测定，记录色谱图，计算 7 个亚硝胺杂质的回收率，结果 NDELA、NDMA、NDEA、NDIPA、NMPA、NEPA、NDBA 的平均回收率分别为 88.1%、82.3%、80.3%、84.8%、89.6%、85.8%、78.9%，*RSD* 分别为 5.7%、4.8%、5.5%、2.8%、3.9%、3.9%、6.1%，满足方法学要求。

2.9　稳定性考察

取“2.8”项下回收率溶液，室温条件下放置，分别于 0、2、4、16、20 h 进样分析，记录峰面积，计算 *RSD*。结果 NDELA、NDMA、NDEA、NDIPA、NMPA、NEPA、NDBA 的峰面积 *RSD* 分别为 3.9%、3.0%、5.5%、7.8%、4.6%、7.5%、8.3%，表明 7 个亚硝胺杂质在 20 h 内稳定。

表 2　7 种 *N*- 亚硝胺类杂质线性方程、相关系数、定量限、检测限

Tab 2　Regress linear formulation，relative coefficient，limit of quantitation，limit of detection of 7 *N*-nitrosamine impurities

化合物	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	线性方程	*r*	定量限 /（ng • g^{-1}）	检测限 /（ng • g^{-1}）
NDELA	1.006 ～ 20.12	*Y* = 782.7X − 206.3	0.9998	4.0	1.5
NDMA	0.9960 ～ 19.92	*Y* = 4502.6X + 1004.3	0.9970	5.0	1.5
NDEA	1.065 ～ 21.30	*Y* = 177.3X − 70.8	0.9976	5.0	1.5
NDIPA	1.052 ～ 21.01	*Y* = 838.7X − 742.1	0.9972	5.0	1.5
NMPA	1.021 ～ 20.43	*Y* = 558.2X − 283.9	0.9992	5.0	1.5
NEPA	0.9550 ～ 19.10	*Y* = 789.0X − 291.8	0.9941	5.0	1.5
NDBA	1.007 ～ 20.14	*Y* = 1068.9X − 53.8	0.9994	2.0	1.0

2.10　耐用性考察

分别将柱温改为 29、31 ℃；流动相流速改为 0.58、0.62 mL • min^{-1}，取混合对照品溶液（10 ng • mL^{-1}）进样测定。结果显示，在较小范围改

变测定条件，空白溶剂对各杂质的检测无干扰，各杂质峰分离完全，表明该方法具有较好的耐用性。

2.11 样品检测

取注射用盐酸头孢甲肟样品，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液并进样测定，结果 4 批样品均未检出 7 种亚硝胺类杂质。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

有研究报道采用 GC-MS 法测定 NMPA、NEPA，其在进样口处分解为 *N*- 甲基苯胺和 *N*- 乙基苯胺 [12]，但如样品中含有上述分解产物，将得到假阳性结果。通过降低进样口温度可减少分解，但即使进样口温度低至 150 ℃时仍会轻度分解，而过低的进样口温度将影响检测灵敏度，因此本文采用 LC-MS/MS 法测定 *N*- 亚硝胺杂质。

3.2 供试品溶液浓度的选择

注射用盐酸头孢甲肟在水中易溶，考察以水作为溶剂，供试品溶液质量浓度分别为 400 mg • mL^{-1} 及 200 mg • mL^{-1} 时的回收率，结果前者不能满足 7 个亚硝胺杂质的回收率均在 70% 以上。

FDA 发布的《人用药中 *N*- 亚硝胺类杂质控制》[13] 的指导意见中，NDMA 建议的可接受摄入量为 96 ng • d^{-1}，NDEA、NMPA、NDIPA 建议的可接受摄入量为 26.5 ng • d^{-1}，NDELA、NMPA、NEPA 无推荐限度，可参考较为严格的 NDEA 的限度。按注射用盐酸头孢甲肟每日最大用药 4 g 计算，NDMA 限度为 24 ng • g^{-1}，NDEA、NMPA、NDIPA、NDELA、NMPA、NEPA 的限度为 6.6 ng • g^{-1}，本文建立的方法中 7 个亚硝胺杂质定量限均≤ 5 ng • g^{-1}，可满足检测要求。

3.3 色谱柱的选择

头孢甲肟极性与亚硝胺类杂质相似，干扰测定，分别采用色谱柱 ① SymmetryShidle RP18（150 mm×3.9 mm，5 μm）、② ACE EXCEL 3 C18-AR（100 mm×4.6 mm，3 μm）、③ Kinetex F5（100 mm×3.0 mm，2.6 μm）考察主峰与各杂质的分离度，其中以色谱柱②分离度最好，不干扰亚硝胺类杂质的测定。

3.4 质谱参数的优化

分别在正离子模式下对各杂质进行母离子全扫描，再对其子离子进行全扫描，以各子离子的色谱峰峰高为指标，对碎裂电压和碰撞能量进行优化选择。选择两个丰度最高的特征离子作为定性离子，并以其中丰度较高的子离子作为定量离子。头孢甲肟出峰时间大约为 4.5 min，为了保护离子源不被污染，在 NDEA 出峰后及 NDIPA 出峰前，将流动相切换至废液。

3.5 小结

目前缬沙坦等药物中已发现了 NDMA 及 NDEA，结合其他可能存在的亚硝胺类物质，本研究建立了注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质的 HPLC-MS/MS 检测方法，结果表明，所建立的方法具有良好的灵敏度、专属性和准确度，可为注射用盐酸头孢甲肟中亚硝胺类基因毒性杂质的风险评定提供技术依据。

参考文献

[1] 常伟，张稳稳，李培培，等 . 二乙基亚硝胺联合四氯化碳诱导原发性肝癌小鼠模型的方法 [J]. 中国新药杂志，2017，26（10）：1169-1173.

[2] 陈高峰，平键，高月求，等 . 二甲基亚硝胺对不同年龄及性别小鼠急性肝损伤的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志，2015，25（2）：92-94.

[3] 徐淼，张倩男，杨辉，等 . 亚硝胺及前体化合物的致癌效应及其食用安全性研究进展 [J]. 癌变畸变突变，2018，30（1）：76-79.

[4] ICH M7（R1）Current Step 5 Version：Assessment and Control of DNA Reactive（Mutagenic）Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [S]. 2018

[5] 国家药品监督管理局 . 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则（试行）[EB/OL].（2020-05-08）. https：//www.nmpa. gov. cn /xxgk /ggtg /qtggtg /202005 08160101122. Html.

[6] 李俊，张璐，张瑄，等 . GC-MS/MS 测定头孢菌素类药物中 8 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国药师，2022，25（2）：350-354.

[7] 周刚，李鹏飞，高家敏，等 . GC-MS/MS 法测定阿莫西林原料药中 12 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国抗生素杂志，2021，46（4）：291-296.

[8] 宋芸峰，耿悦，孙春业，等 . UPLC-MS/MS 法测定注射用头孢美唑钠中潜在亚硝胺类物质的含量 [J]. 药物分析杂志，2022，42（7）：1186-1194.

[9] 袁松，黄海伟，于颖洁，等 . UPLC-MS/MS 法测定替米沙坦中 16 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国新药杂志，2022，31（5）：477-482.

[10] 侯金凤，李珉，寇晋萍，等 . 超高效液相色谱串联质谱法测定缬沙坦原料中 4 种亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国药学杂志，2021，56（10）：842-848.

[11] 杨越莛，郑枫，蔡浒，等 . LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺的含量 [J]. 中南药学，2022，20（2）：405-409.

[12] 陶进雄，张海煊，林紫威 . 气相色谱 - 质谱法测定橡胶产品中两种 *N*- 亚硝胺 [J]. 分析试验室，2019，38（9）：1051-1056.

[13] FDA. Control of nitrosamine impurities in human drugs [EB/OL].（2020-09-01）. https：//www. fda. gov /media/141720/download.

（收稿日期：2023-03-17；修回日期：2023-05-12）

ICP-TOFMS 测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中铝元素的迁移

陶俊钰[1]，刘伟[2]，毛柯[2]，刘静[1]，蒋菲[1]，蒋咏梅[1]，陈扣宝[1]，王玮[1]，刘为中[2*]（1. 合肥市食品药品检验中心，合肥 238000；2. 合肥医工医药股份有限公司，合肥 230601）

摘要：目的 建立电感耦合等离子体发射飞行时间质谱仪（ICP-TOFMS）法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中铝元素的迁移量。**方法** 样品经硝酸和盐酸微波消解后，采用外标法，建立 ICP-TOFMS 法对葡萄糖酸钙锌口服溶液中的铝元素含量进行测定。同时考察样品经低温冻融、影响因素、加速和长期试验留样过程中包材中铝元素的迁移。**结果** 铝元素在 0 ～ 100 ng • mL^{-1} 内线性关系良好（r = 0.9982），检测限和定量限分别为 0.92 ng•mL^{-1}、3.05 ng•mL^{-1}，低、中、高浓度加样回收率分别为 91.55%、83.67%、84.67%，*RSD* 分别为 9.1%、4.1%、4.4%。**结论** 在低温冻融试验中，铝元素含量均未检出；在影响因素试验、加速试验和长期试验中，铝元素含量有增长趋势，但远低于限度（8.3 μg • mL^{-1}），故所选包材铝元素迁移风险较小。

关键词：葡萄糖酸钙锌口服溶液；ICP-TOFMS；铝元素；迁移量

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2182-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.036

Determination of aluminum migration in calcium and zinc gluconate oral solution by ICP-TOFMS

TAO Jun-yu[1], LIU Wei[2], MAO Ke[2], LIU Jing[1], JIANG Fei[1], JIANG Yong-mei[1], CHEN Kou-bao[1], WANG Wei[1], LIU Wei-zhong[2*] (1. *Hefei Food and Drug Inspection Center*, *Hefei* 238000; 2. *Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei* 230601)

Abstract: Objective To establish an ICP-TOFMS method to determine aluminum migration from packaging materials in calcium and zinc gluconate oral solution. **Methods** After microwave digestion with nitric acid and hydrochloric acid, ICP-TOFMS method was established to determine the content of aluminum in calcium and zinc gluconate oral solution by external standard method. At the same time, cryogenic freezing-thawing, influence factors, acceleration and long-term tests were conducted to determine the amount of aluminum migration. **Results** The linearity of aluminum was good in the concentration range of 0 ～ 100 ng • mL^{-1} (r = 0.9982). The limit of detection and quantitation were 0.92 ng • mL^{-1} and 3.05 ng • mL^{-1}, respectively. The low, medium, and high concentration recovery was 91.55%, 83.67%, and 84.67%, with *RSD* of 9.1%, 4.1%, and 4.4%. In the cryogenic freezing-thawing test, the content of aluminum was not detected. **Conclusion** With influence factors, accelerations and long-term tests, the aluminum content tends to increase but is far below the limit (8.3 μg • mL^{-1}). So risk of aluminum migration from the selected packaging material is small.

Key words: calcium and zinc gluconate oral solution; ICP-TOFMS; aluminum element; migration amount

包装是药品不可或缺的重要组成部分，对药品有保护作用，不仅可保证药效正常发挥，还可方便药品的存储、运输及使用，但不恰当的包材会与药物之间产生迁移和吸附等现象，从而影响药品的质量和疗效，造成严重的药品安全事件，因此有必要进行相容性研究[1]。本品葡萄糖酸钙锌口服溶液包装材料为聚酯 - 铝 - 聚酯 - 聚乙烯口服液体药用复合膜袋，材质成分中含有金属铝

作者简介：陶俊钰，女，主任药师，主要从事药品检验与质量研究，email：942884082@qq.com *通信作者：刘为中，男，副研究员，主要从事新药研发工作，email：lwzhipi@163.com

（Al）元素可能会迁移至药液中。经研究表明，人体摄入过多的铝，会使机体内磷的储存降低，致使缺钙，进而造成骨质疏松等症状，此外阿尔茨海默病的出现也与平时过多地摄入铝元素有关[2]。参照 ICH Q3D 指导原则，液体制剂在有效期内元素杂质从包装系统中浸出的可能性高，应对包装系统的潜在浸出物进行研究，为严格控制产品质量，将对本品中铝的含量进行控制。

电感耦合等离子发射飞行时间质谱仪（ICP-TOFMS）是将电感耦合等离子体的高温电离特性与质谱计的灵敏快速扫描的优点相结合而形成的一种高灵敏度的分析技术，具有灵敏度高、速度快、可多元素同时测定等优点[3-4]。本文将利用 ICP-TOFMS 对葡萄糖酸钙锌口服溶液包装材料中的铝元素进行含量测定，同时考察样品经低温冻融、影响因素、加速和长期试验稳定性留样过程中铝元素迁移变化情况，为葡萄糖酸钙锌口服溶液选择适宜的包装材料提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ICP-TOFMS 电感耦合等离子发射飞行时间质谱仪（GBC 9500）、COOLPEX 微波消解仪（上海屹尧），默克明澈 TM 超纯水机（默克密理博）。

1.2 试药

硝酸（批号：1119020，Trace Metal Grade，Fisher Chemical），盐酸（批号：20200414，GR，国药集团），多元素标准溶液（含铝等 24 种元素，质量浓度：100 μg·mL^{-1}，批号：196046-4，国家有色金属及电子材料分析测试中心）。

1.3 样品

葡萄糖酸钙锌口服溶液（批号分别为 11201101、11201102、11201103，合肥恩瑞特药业有限公司，包装规格：10 mL / 袋，包材：聚酯 - 铝 - 聚酯 - 聚乙烯口服液体药用复合膜袋）。

2 方法与结果

2.1 试验方案

2.1.1 影响因素试验 取葡萄糖酸钙锌口服溶液（批号：11201101）进行影响因素试验（40 ℃、60 ℃、光照），取样点为 5、10、30 d。

2.1.2 低温冻融试验 取葡萄糖酸钙锌口服溶液（批号：11201101）进行低温冻融试验，取样点为 4、8、12 d。

2.1.3 加速试验和长期试验 取 3 批葡萄糖酸钙锌口服溶液进行加速试验 [（40±2）℃、RH（75±5）%] 和长期试验 [（25±2）℃、RH（60±5）%]，加速试验取样点为 1、2、3、6 个月，长期试验取样点为 3、6、9、12 个月。

2.2 ICP-TOFMS 仪器参数

采用碰撞反应池模式，射频功率：1200 W，雾化器流量：0.85 L·min^{-1}；等离子体流量：10 L·min^{-1}，辅助气体流量：0.5 L·min^{-1}，RF 匹配：710 V，泵转速：10 r·min^{-1}；冷却水温度：18 ℃，蠕动泵转速：10 r·min^{-1}，重复次数：3 或 6 次。

2.3 溶液的制备

2.3.1 标准溶液 精密量取多元素标准溶液适量，用 2% 硝酸稀释成含铝 0、5、20、50、80、100 ng·mL^{-1} 的线性溶液。

2.3.2 供试品溶液 精密量取本品 1 mL，置消解罐中，加硝酸 5 mL、盐酸 2 mL，照表 1 进行消解，消解结束后，60 ℃赶酸 1 h，赶酸结束后将样品溶液转移至 100 mL 量瓶中，并用 2% 硝酸多次清洗，清洗液一并转移至量瓶中，加 2% 硝酸定容至刻度，摇匀，作为供试品溶液；取硝酸 5 mL、盐酸 2 mL，置消解罐中，同法制备空白溶液。

2.3.3 对照品溶液 精密量取多元素标准溶液适量，用 2% 硝酸稀释成含铝 50 ng·mL^{-1} 的溶液。

2.3.4 供试品加标溶液 精密量取本品 1 mL，置消解罐中，加入含铝质量浓度为 5000 ng·mL^{-1} 的标准溶液 1 mL，按照“2.3.2”项下方法制备，即得。

表 1 消解程序

Tab 1 Digestion procedure

步骤	温度 /℃	保持时间 /min	压力 /atm
1	80	3	20
2	120	3	25
3	150	10	30
4	180	20	35

2.4 专属性试验

取空白溶液、对照品溶液及供试品溶液依次进样分析，检测并记录结果，空白溶液的响应值小于对照品溶液响应值的 50%（即 0.3% 的限度），故空白溶液对该方法的干扰可以忽略不计；供试品溶液的响应值小于加标供试品溶液响应值的 40%（即 0.24% 的限度），表明该方法测定铝元素含量专属性良好[5-7]。

2.5 检测限与定量限

采用取空白溶剂（2% 硝酸）连续测试 11 次，以空白溶剂响应值的 10 倍标准偏差 / 斜率的方式计算定量限；以空白溶剂响应值的 3 倍标准偏差 / 斜率的方式计算检测限。铝元素的定量限为 3.05 ng·mL^{-1}，占分析评价阈值（AET）的 0.04%；检测限结果为 0.92 ng·mL^{-1}，占 AET 的 0.01%，灵敏度满足要求。

2.6 线性关系考察

取“2.3.1”项下标准溶液从低浓度到高浓度依次进样分析，以铝元素的质量浓度（ng·mL^{-1}）为横坐标，以铝元素响应值为纵坐标，绘制标准曲线，其回归方程为 $Y = 750.8C + 3.556\times10^3$（$r = 0.9982$），结果表明铝元素在 0 ～ 100 ng·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.7 系统适用性试验

精密量取多元素标准溶液适量，用 2% 硝酸稀释成含铝 50 ng·mL^{-1} 的溶液，取该溶液注入 ICP-MS 进行测试，连续进样 6 次测定结果的 *RSD* 小于 3%，表明仪器精密度良好。

2.8 准确度试验

分别精密量取本品 1 mL，置消解罐中，分别加入含铝 5000 ng·mL^{-1} 的标准溶液 0.3、1.0、1.5 mL，按照“2.3.2”项下方法制备加标供试品溶液，每个浓度平行配制 3 份，并按照“2.3.2”项下方法制备空白溶液及供试品溶液。将空白溶液、供试品溶液、加标供试品溶液分别上机测试，检测并记录结果，以外标法计算回收率。结果显示，在 30%、100%、150% 不同的浓度水平，铝元素的回收率分别为 91.55%、83.67%、84.67%，*RSD* 分别为 9.1%、4.1%、4.4%，表明方法准确度良好 [8]。

2.9 精密度和重复性试验

按照“2.8”项下 100% 浓度水平配制加标供试品溶液，平行制备 6 份，上机检测，结果铝元素准确度 *RSD* 为 5.8%，表明方法重复性良好。

不同实验人员于不同天按照“2.8”项下 100% 浓度水平配制加标供试品溶液，平行 6 份，上机检测，结果两名实验人员配制的 12 份 100% 加标供试品溶液回收率在 77.45% ～ 105.6% 内，*RSD* 为 9.1%，表明该方法精密度良好。

2.10 溶液稳定性试验

按照“2.8”项下 100% 浓度水平配制加标供试品溶液，平行 6 份，分别于不同的时间点上机检测，考察溶液稳定性，结果表明，在 47 h 内 100% 加标溶液铝元素测得浓度的 *RSD* 小于 9%，表明溶液稳定性良好。

2.11 样品测定

2.11.1 影响因素试验铝迁移量测定 按照“2.3.2”项下方法对影响因素试验样品（批号：11201101）中铝元素进行检测，结果见表 2，表明铝元素杂质含量均远小于限度。

表 2 葡萄糖酸钙锌口服溶液影响因素试验铝迁移量测定结果（μg·mL^{-1}）

Tab 2 Influence factor on the migration of aluminum (μg·mL^{-1})

条件	放置时间			
	0 d	5 d	10 d	30 d
光照（4500±500）lx	未检出	未检出	0.6	未检出
40 ℃	未检出	未检出	0.5	未检出
60 ℃	未检出	未检出	0.4	0.3

2.11.2 低温冻融试验铝迁移量测定 按照“2.3.2”项下方法对低温冻融试验样品中铝元素进行检测，经低温冻融 4、8、12 d 均未检出铝元素。

2.11.3 加速试验和长期试验铝迁移量测定 按照“2.3.2”项下方法对加速试验和长期试验样品中铝元素进行检测，结果见表 3，铝元素杂质含量均远小于限度。

表 3 3 批葡萄糖酸钙锌口服溶液稳定性试验铝迁移量测定结果（μg·mL^{-1}）

Tab 3 Stability test for 3 batches of calcium and zinc gluconate oral solution (μg·mL^{-1})

批号	留样条件	放置时间						
		0 月	1 个月	2 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月
11201101	加速试验	ND	ND	ND	ND	0.66	/	/
	长期试验	ND	/	/	ND	ND	1.11	0.56
11201102	加速试验	ND	ND	ND	ND	0.52	/	/
	长期试验	ND	/	/	ND	0.33	0.38	1.02
11201103	加速试验	ND	ND	ND	ND	0.42	/	/
	长期试验	ND	/	/	ND	ND	0.38	ND

注：“ND”表示未检出；“/”代表该时间点不检测。

Note：“ND” indicates no detection；“/” indicates no detection at these points.

3 讨论

3.1 铝元素测定方法选择依据

铝元素的测定常用分光光度计法、石墨炉原子吸收光谱法、火焰原子吸收光谱法、电感耦合等离子体发射光谱法（ICP-OES）等 [10]，这些方法均存在干扰大、灵敏度低等缺点 [11-13]。本文建立 ICP-TOFMS 对葡萄糖酸钙锌口服溶液包装材料中铝元素的迁移进行研究，该方法灵敏度高、专属性强，操作简便，适用于产品大生产过程控制及质量标准研究。

3.2 铝元素限度制订

人每日允许最大暴露量（PDE），指某一物质被允许摄入而不产生毒性的日平均最大剂量，某一具体物质的 PDE 值是由不产生反应量、体重调整系数、种属之间差异的系数、个体差异、短期接触急性毒性研究的可变系数等推算出的。

AET 根据 PDE 或安全性阈值 / 限定阈值、用药剂量以及制剂包装特点等计算每单个包装容器中特定的可提取物 / 浸出物含量，当一个特定的可提取物 / 浸出物水平达到或超过这个量值时，需要开始对这个可提取物 / 浸出物进行分析，并进行安全性评估。

葡萄糖酸钙锌口服溶液每日最大用药量为 30 mL，按成人 50 kg 体质量计算口服液体制剂中铝元素 PDE 值为 250 μg • d^{-1} [14]。限度 AET 为 PDE 除以每日最大用药剂量，即 8.3 μg • mL^{-1}。

3.3　小结

本品经低温冻融试验铝元素均未有迁移，经影响因素试验、加速试验及长期试验铝元素含量有增长趋势，但远低于限度（8.3 μg • mL^{-1}）。表明葡萄糖酸钙锌口服溶液在长期存放过程中包材中的铝元素会向药液中迁移，故将铝元素检测收入本品质量标准，持续考察稳定性留样及后期生产。

参考文献

[1] 方旻，梁伊琳，谢新艺，等 . 药品包装与药品的相容性研究进展 [J]. 中国包装，2018，38（7）：78-81.

[2] 谢利亚 . 铝超标危害健康的那些事儿 [J]. 保健文汇，2021，22（3）：44.

[3] 曾涛，沈倩 . 电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）应用进展及展望 [J]. 广东化工，2018，45（18）：116，119.

[4] 李丽敏，周如洁，曹帅，等 . 电感耦合等离子体质谱法在不同药典中的方法体系和在中药无机成分研究中的应用进展 [J]. 理化检验（化学分册），2021，57（7）：665-672.

[5] 刘鸿 . ICP-MS 测定镝铁合金中杂质元素的分析方法研究 [D]. 长沙：中南大学，2008.

[6] 蒋秋桃，曾丽，丁野，等 . 微波消解 -ICP-OES 法检测湘产朱砂中重金属的含量 [J]. 中国药事，2014，28（11）：1247-1251.

[7] 石雪峰，胡琳娜，吴希桃，等 . ICP-OES 法分析钴钼催化剂中助剂锌含量的研究 [J]. 能源化工，2022，43（3）：81-84.

[8] 张慧，张惠珠，牛红霞，等 . 微波消解 ICP-MS 与快速消解 ICP-MS 法测定大米粉质控样、盲样中铅、镉、总砷的对比研究 [J]. 现代食品，2022，28（18）：150-153，162.

[9] 胡敏虹 . 硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片的质量标准及其稳定性研究 [D]. 杭州：浙江大学，2019.

[10] 吕晓超，惠香，封雪，等 . 食品中铝含量检测方法的探索与分析 [J]. 食品安全导刊，2022，332（3）：146-148.

[11] 孟欣 . 分光光度计法测定超市面制品中铝含量 [J]. 食品安全导刊，2021，326（33）：78-80，85.

[12] 李变变 . 石墨炉原子吸收光谱法测定面制品中铝的含量 [J]. 中国无机分析化学，2018，8（4）：13-15.

[13] 王棘，杨宏伟，刘晓菲，等 . ICP-AES 法测定复方氨基酸注射液中铝元素的含量 [J]. 中国药品标准，2021，22（3）：227-230.

[14] Klein GL，Leichtner AM，Heyman MB. Aluminum in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition：response to the Food and Drug Administration notice of proposed rule by the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr，1998，27（4）：457-460.

（收稿日期：2022-11-30；修回日期：2023-03-13）

药用辅料聚乙二醇 6000 质量评价及质量研究

郑金凤[1, 2]，谢莹莹[1, 2]，张悦[1, 2]，周颖[1, 2]，蒋赟[1, 2]，石蓉[1, 2]，刘杨[1, 2]，蔡立荣[1, 2]，刘雁鸣[1, 2]，赵勇[1, 2*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　评价药用辅料聚乙二醇 6000 质量现状及存在的问题，对该品种国家标准修订提供参考依据，同时为药品监管提供技术支持。**方法**　对国家抽检的样品进行全项检验，对检验结果进行统计分析；基于检验中发现的问题，同时围绕聚乙二醇 6000 的安全、有效等方面开展探索性研究，建立并完善检验方法，全面分析其质量现状。**结果**　7 家生产企业的 36 批次样品按照现行质量标准检验，有 2 批样品不合格，不合格率为 5.6%，不合格项目为酸度。探索性研究检验不合格率为 19.4%。**结论**　药用辅料聚乙二醇 6000 整体质量状况一般，现行质量标准有待完善。

关键词：聚乙二醇 6000；质量评价；质量标准；酸度

中图分类号：R917，R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2185-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.037

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金项目（No.2021JJ80044）。

作者简介：郑金凤，女，副主任药师，主要从事化学药品及药用辅料质量控制与研究，email：332410419@qq.com　*通信作者：赵勇，男，副主任药师，主要从事药用辅料质量控制与研究，email：254790459@qq.com

Quality evaluation and quality research of polyethylene glycol 6000

ZHENG Jin-feng[1, 2], XIE Ying-ying[1, 2], ZHANG Yue[1, 2], ZHOU Ying[1, 2], JIANG Yun[1, 2], SHI Rong[1, 2], LIU Yang[1, 2], CAI Li-rong[1, 2], LIU Yan-ming[1, 2], ZHAO Yong[1, 2*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To evaluate the quality status and existing problems of polyethylene glycol 6000, and provide a basis for the revision of national drug standards and technical support for drug supervision. **Methods** All of the samples by national sampling evaluation were tested, and the results were statistically analyzed. Moreover, based on the problems found in the tests, exploratory research works were carried out in the aspects of safety and effectiveness of the drug, and a number of detection methods were established to fully analyze the quality. **Results** Totally 36 batches of samples from 7 manufacturers were tested, and 2 batches were unqualified, the overall unqualified rate was 5.6%, and the unqualified item was acidity. According to the exploratory study, the overall unqualified rate was 19.4%. **Conclusion** At present, the quality of polyethylene glycol 6000 is just passable. It is recommended to improve the quality standards as soon as possible.

Key words: polyethylene glycol 6000; quality evaluation; quality standard; acidity

药用辅料聚乙二醇 6000 为环氧乙烷和水缩聚而成的混合物，分子式以 HO（CH_2CH_2O）$_n$H 表示，其中 *n* 代表氧乙烯基的平均数 [1]。聚乙二醇 6000 主要作为软膏基质和润滑剂等，用于片剂、胶囊剂、栓剂、外用乳剂和阴道用制剂等，其水溶性好，能显著改善药物的溶出速率和生物利用度 [2]。国家药品监督管理局将本品列入 2022 年度国家药品抽检计划，湖南省药品检验检测研究院对抽检的国内 7 家生产企业的 36 批次样品，开展了现行质量标准检验和探索性研究。本品现行质量标准收载于《中国药典》2020 年版四部 [1]。根据各项研究的结果分析，对该品种的质量现状和质量标准可控性进行了全面评价，为今后提升其质量水平和监管工作提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

S220 型酸度计（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；Thermo ICS-5000 型离子色谱仪（美国赛默飞公司）；UV-2550 型紫外分光光度计、LC-20A 高效液相色谱仪、GC-2010 Plus 型气相色谱仪（日本岛津公司）；Agilent 8890-7010B 气质联用仪（美国安捷伦公司）；iCAPQc 型电感耦合等离子体质谱分析仪（美国赛默飞公司）；Mastersizer 3000 型激光粒度分布仪（英国马尔文公司）；MS105DU 型电子分析天平（精度：0.01 mg，瑞士 Mettler-Toledo 公司）；Dionex IonPac AS11-HC 阴离子交换柱（250 mm×4 mm）及 IonPac AG11-HC 保护柱（50 mm×4 mm）；Waters XBridge C8（4.6 mm×250 mm×5 μm）；Agilent DB-17 毛细管柱（30 m×0.53 mm，1.0 μm）；Agilent DB-5 毛细管色谱柱（30 m×0.25 mm，1.0 μm）；Shodex OHpak SB-803 HQ 凝胶色谱柱（300 mm×8.0 mm，6 μm）。

1.2 试药

国家药品抽检共抽取样品 36 批次，涉及生产企业 7 家，样品批次数大于等于 6 的生产企业 3 家（编号 A ～ C）；草酸对照品（批号：101097-201702，纯度：100.0%）、柠檬酸对照品（批号：111679-201602，纯度：97.0%）、冰醋酸对照品（批号：190079-202002，纯度：99.9%）、甲酸对照品（批号：101414-202104，纯度：100%）、乙二醇对照品（批号：101111-201904，纯度：100%）、二甘醇对照品（批号：101127-201904，纯度：99.5%）、三甘醇对照品（批号：190112-201904，纯度：99.52%）、聚乙二醇 1000 对照品 [批号：190232-202102，Mp：982.4]、聚乙二醇 4000 对照品（批号：190231-202103，Mp：3732）、聚乙二醇 7000 对照品（批号：190230-202102，Mp：8521）、聚乙二醇 10000 对照品（批号：190229-202102，Mp：10 110）、聚乙二醇 13000 对照品（批号：190228-202102，Mp：14 375）（中国食品药品检定研究院）；水中氟成分分析标准物质（批号：20220223，质量浓度 1000 μg·mL^{-1}）、水中氯成分分析标准物

质（批号：20220323，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）、硫酸盐溶液标准物质（批号：20220418，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）、磷酸根溶液标准物质（批号：20220407，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）、水中甲醛溶液标准物质（批号：20211208，质量浓度 10 mg • mL^{-1}）、26 种金属元素混合标准溶液（批号：20210726）（北京北方伟业计量技术研究院）；酒石酸对照品（批号：20180923，R 化学试剂有限公司）；*L*-乳酸对照品（批号：LRAC 7354，纯度：93.3%，Sigma-Alorich 公司）；乙醛（批号：22040034，纯度：99.7%）、乙腈中 15 种醛酮 -DNPH 混标（批号：22060218，质量浓度 100 μg • mL^{-1}）、乙腈中甲醛 -DNPH（批号：22050724，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）、乙腈中乙醛 -DNPH（批号：A21060229，质量浓度 1000 μg • mL^{-1}）（坛墨质检标准物质中心）；环氧乙烷对照品（批号：0315-RD-0034，质量浓度 4980.5 μg • mL^{-1}，CATO Research Chemicals Inc.）；二氧六环对照品（批号：2106682，纯度：99.1%，上海安谱璀世标准技术服务有限公司）；2，6- 二叔丁基对甲基苯酚（BHT，批号：G974372，纯度：98.8%）、叔丁基对羟基茴香醚（BHA，批号：G752666，纯度：99.8%）（德国 Dr）；叔丁基对苯二酚（TBHQ，批号:P1810100）、2，6- 二叔丁基 -4 羟基苯酚（Ionox-100，批号：1-F-4E6-1）（上海安谱实验科技股份有限公司）；金（Au）标准溶液（批号：17B035-3，质量浓度：1000 μg • mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心）；钪（Sc）、铟（In）、锗（Ge）、铋（Bi）标准混合溶液（批号：4-75MKBY2，质量浓度均为 100 μg • mL^{-1}，安捷伦有限公司）；硝酸（优级纯，国药集团化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，Burdick & Jackson）；水为超纯水；其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 现行质量标准检验

按现行质量标准检验 36 批次样品，其中有 2 批次不合格，不合格率 5.6%，不合格项目均为酸度。酸度标准限度为“pH 值应为 4.0 ～ 7.0”，36 批次样品的 pH 值分布在 3.3 ～ 6.7，平均 pH 值为 5.7，标准差为 0.77%，有 2 批次样品的 pH 值低于标准限度的下限。A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.248，同企业批间差异显著，A 企业极差为 3.4，并且出现了不合格样品。

2.2 探索性研究

本品主要由水或乙二醇，以氢氧化钠或氢氧化钾为催化剂，在聚合釜内与环氧乙烷进行加成聚合，聚合反应后经中和、吸附、脱水、过滤、精馏等处理过程而得，其中中和处理过程常用乳酸、酒石酸、盐酸、稀硫酸、磷酸等进行 pH 值的调节 [3-5]。另生产过程中环氧乙烷聚合会形成聚氧乙烯醚链，该醚链会发生自由基氧化降解反应，在氧气存在下，随着温度增加降解反应速率逐步增加，生成甲醛、乙醛等降解产物，甲醛、乙醛会继续氧化生成甲酸、乙酸等酸性物质 [6]。围绕标准检验中可能导致样品不合格的原因及聚乙二醇 6000 本身的理化特性和生产工艺有针对性地开展探索性研究，建立更加科学的质量控制方法，以期全面评价其质量状况。

2.2.1 有机酸和无机阴离子 现行质量标准采用酸度检查项对本品的有机酸和无机酸杂质进行控制，本次标准检验中发现有 2 批次样品酸值超出标准限度。为找出聚乙二醇 6000 中可能含有的有机酸及无机盐类型，参考相关文献 [7-9]，建立了离子色谱法同时测定聚乙二醇 6000 中 10 种有机酸及无机阴离子含量，典型色谱图见图 1。结果表明 36 批次样品中主要检出乳酸根、乙酸根、甲酸根、磷酸根等酸根离子，不同企业不同批次样品中检出的酸根离子种类和含量有较大差异，其中乳酸根来源于工艺中加入的乳酸作为中和剂；磷酸根离子来源于工艺中加入的磷酸盐调节 pH，与企业提供的工艺相吻合；甲酸根与一部分乙酸根检出与聚乙二醇氧化降解可能有关 [10-11]。36 批次样品均检出甲酸根离子，且 2 批次不合格样品检出的甲酸根离子含量远高于其他批次。36 批样品甲酸根离子测定结果为 0.000 58% ～ 0.195 93%，A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.020 628%，同企业批间差异显著，A 企业极差为 0.195 35%。

2.2.2 甲醛、甲醛和乙醛总量 现行质量标准中甲醛采用紫外分光光度法进行控制，但未控制乙醛。鉴于小分子醛的强亲水性、高挥发性以及缺乏生色团或荧光团等性质，参考相关文献 [12-13]，建立了 DNPH 柱前衍生高效液相色谱法对聚乙二醇 6000 中甲醛、乙醛进行测定，典型色谱图见图 2。36 批样品甲醛测定结果为 0.000 05% ～ 0.024 29%，A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.003 63%，同企业批间差异显著，A 企业极差为 0.024 22%；甲醛和乙醛总量测定结果为 0.000 49% ～ 0.024 98%，A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.017 66%，同企业批间差异显著，A 企业极差为 0.024 49%。

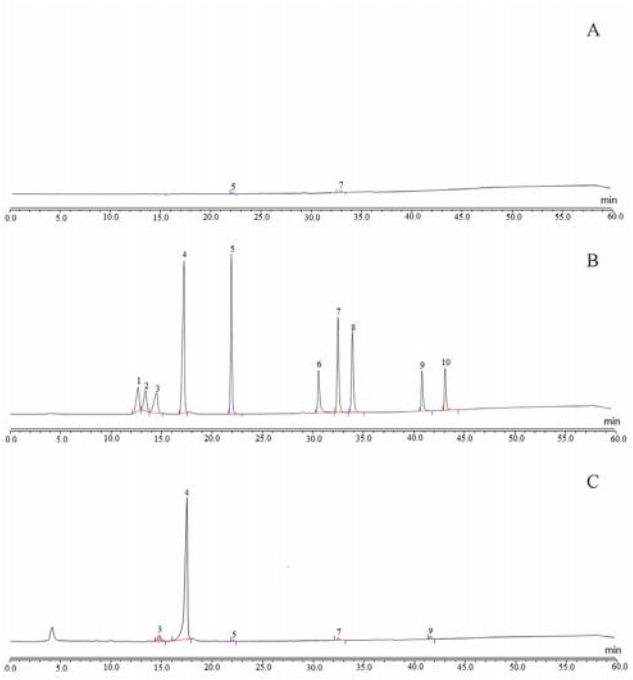

图 1 典型离子色谱图

Fig 1 Typical chromatogram of ion chromatography

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 氟（fluorine）；2. 乳酸（lactic acid）；3. 乙酸（acetic acid）；4. 甲酸（methanoic acid）；5. 氯（chlorine）；6. 酒石酸（tartaric acid）；7. 硫酸（sulphuric acid）；8. 草酸（oxalic acid）；9. 磷酸（phosphoric acid）；10. 柠檬酸（citric acid）

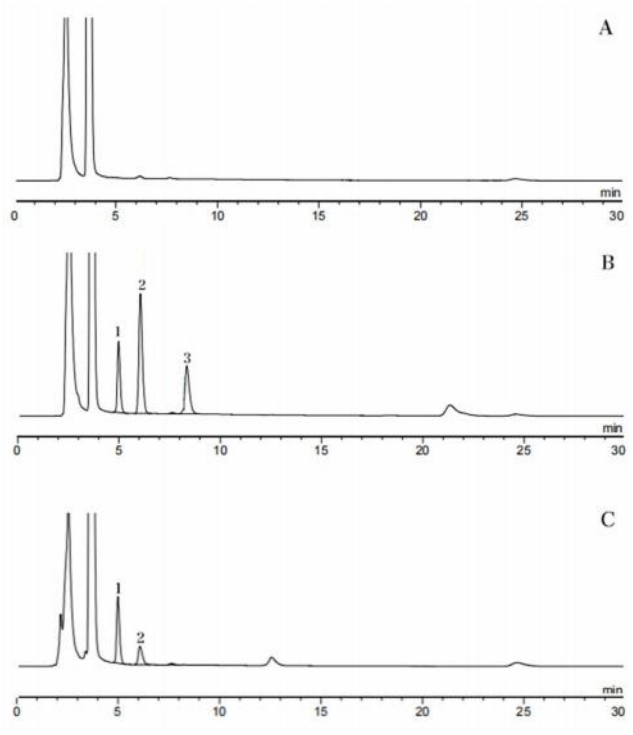

图 2 典型 HPLC 色谱图

Fig 2 Typical chromatogram of HPLC

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 甲醛（formaldehyde）；2. 乙醛（acetaldehyde）；3. 丙醛（propionaldehyde）

2.2.3 总醛 参考中华人民共和国国家标准 GB/T 14571.3—2008《工业用乙二醇中醛含量的测定分光光度法》[14]，采用酚试剂分光光度法测定聚乙二醇 6000 中甲醛和乙醛总醛含量。36 批样品总醛测定结果为 0.000 79% ～ 0.107 76%，A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.011 84%，同企业批间差异显著，A 企业极差为 0.106 97%。

2.2.4 有关物质 现行质量标准采用 GC 法测定本品中的有关物质乙二醇、二甘醇、三甘醇以及环氧乙烷和二氧六环，其中乙二醇、二甘醇、环氧乙烷为合成聚乙二醇 6000 的起始原料，三甘醇为聚乙二醇 6000 的降解产物，二氧六环为工艺中两分子环氧乙烷开环聚合而成，为工艺中的副产物。因聚乙二醇 6000 不稳定，在高温下碳链会发生随机断裂，可能产生乙二醇、二甘醇、三甘醇、四甘醇、五甘醇等系列醇类物质以及甲醛、乙醛等醛酮类物质。参考相关文献 [15-16]，建立了 GC-MS 法测定高温破坏样品中的降解产物，主要检出乙二醇、二甘醇、三甘醇、甲酸等，36 批样品中 4 批检出乙二醇，测定结果在 0.006% ～ 0.028%；1 批检出二甘醇，测定结果为 0.0076%；11 批检出三甘醇，测定结果在 0.004% ～ 0.038%，含量均远低于标准限度。

2.2.5 Mp 及其分布 现行质量标准【标示】项下收载了该项目，为非必检项目，但作为功能性指标，有必要对不同企业、不同批次样品间 Mp 及其分布是否有差异进行考察。36 批样品中，Mp 测定结果为 5538.1 ～ 6575.4，A、B、C 3 家企业间均值极差为 951.5，同企业批间差异显著，A 企业极差为 825.7；分布系数测定结果为 1.0379 ～ 1.1572，A、B、C 3 家企业间均值极差为 0.0090，同企业批间差异显著，A 企业极差为 0.1193。

2.2.6 元素杂质 现行质量标准检验过程中发现 B 企业的样品炽灼残渣结果均接近限度，结合该品种的生产工艺调研，可能为催化剂的残留或其他元素。参照《ICH Q3D（R2）：元素杂质指导原则》[17]，对风险评价的第 1 类元素砷（As）、镉（Cd）、汞（Hg）、铅（Pb），第 2A 类元素钴（Co）、镍（Ni）、钒（V）和其他元素钠（Na）、钾（K）等 9 种金属元素杂质进行考察研究。参考相关文献 [18-19]，建立了 ICP-MS 法测定 As 等 9 种元素杂质，结果催化剂 Na^+、K^+残留较高，其他元素远低于限度要求。36 批样品中，Na^+测定结果为 0.00 ～ 68.08 μg • g^{-1}，A、B、C 3 家企业间均值极差为 62.30 μg • g^{-1}，同企业批间差异较

小；K^+测定结果为 0.26 ～ 435.25 μg•g^{-1}，A、B、C 3 家企业间均值极差为 425.83 μg • g^{-1}，同企业批间差异较小。

2.2.7 抗氧化剂 《美国药典》现行版[20]和《欧洲药典》11.0 版[21]聚乙二醇 6000 各论标准在定义中明确可添加合适的稳定剂和抗氧化剂，但《中国药典》2020 年版四部尚无此方面的规定。BHT、BHA、TBQH、2，6-Ionox-100 是目前最常用的 4 种抗氧化剂[22-23]，本研究参考国内相关文献[24-26]，建立了 GC/MS/MS 法对 4 种常用抗氧化剂进行筛查。36 批样品中，1 批检出 BHA；29 批检出 BHT，结果为 0.40 ～ 35.06 ppb，A、B、C 3 家企业间均值极差为 16.37 ppb，同企业批间差异较为显著，A 企业 35.06 ppb；3 家企业均未检出 TBQH、Ionox-100。

2.2.8 影响因素试验 选取 7 家生产企业各 1 ～ 3 批样品共 10 批样品，参照《中国药典》2020 年版四部通则 9001 进行影响因素试验，分别置高温 50 ℃、高湿（75±1）% 及强光（4500±500）lx 下 30 d，于第 0、5、10、30 日取样，以性状、酸度、溶液的澄清度与颜色、乙二醇、二甘醇、三甘醇、环氧乙烷和二氧六环、Mp 及其分布、甲醛和乙醛、有机酸项作为评价指标，采用现行质量标准方法和探索性研究中建立的方法进行测定。结果表明：高湿和强光条件下，各指标与第 0 日比较未发生明显改变。高温条件下，各指标与第 0 日测试结果比较，酸度（pH 值）呈下降趋势，乙酸根和甲酸根含量呈上升趋势，变化显著；A 企业样品（含酸度不合格的样品）甲醛含量明显增加，Mp 明显下降，分布系数明显增大，其他企业样品该项目未发生明显变化。

3 讨论

3.1 酸根离子与酸度的相关性

对“2.1”项下的酸度和“2.2.1”项下的酸根离子含量的相关性进行 SPSS 分析，结果显示酸度（pH 值）与甲酸根离子含量成显著相关性（$P < 0.05$），与其他酸根离子无明显相关性，表明甲酸根离子在 pH 值的表现中占主导影响因素，甲酸根离子在样品中以甲酸的形式存在，分析原因可能为乳酸根离子、磷酸根离子为工艺中添加作为中和碱催化剂，已与碱催化剂发生反应形成乳酸盐和磷酸盐，对酸度基本无影响；乙酸根离子来源有工艺添加和聚乙二醇 6000 自身降解两种途径，工艺添加形成乙酸盐，对酸度的相关性产生干扰，故乙酸根离子与酸度无明显相关性。

3.2 甲醛、甲醛和乙醛总量及总醛的限度

现行质量标准采用紫外分光光度法对甲醛进行控制，限度为不得过 0.003%，36 批样品均合格。探索性研究中建立了 HPLC 法测定样品中的甲醛、乙醛含量及酚试剂分光光度法测定的总醛含量。同系列品种聚乙二醇 3350《美国药典》现行版甲醛限度为不得过 50 ppm（0.005%），甲醛和乙醛的总量不得过 200 ppm（0.02%）。从 36 批样品的检测结果来看，甲醛及甲醛和乙醛总量测定结果均未超过同系列品种聚乙二醇 3350《美国药典》现行版以及本品现行质量标准限度，故拟订甲醛不得过 0.003%，甲醛和乙醛的总量不得过 0.02%。36 批样品总醛测定结果为 0.000 79% ～ 0.107 76%，大部分样品测定结果均略高于甲醛和乙醛的总量，说明本品醛类降解产物除甲醛和乙醛外还可能存在其他醛，但主要以甲醛和乙醛为主，因此参照甲醛和乙醛总量的限度以及 36 批样品总醛平均值，拟订总醛限度为不得过 0.03%。36 批样品中共 7 批不合格，其中 1 批甲醛、甲醛和乙醛总量、总醛均不符合规定；1 批甲醛、总醛不符合规定；1 批甲醛、甲醛和乙醛总量不符合规定；1 批甲醛不符合规定；3 批甲醛和乙醛总量不符合规定。

3.3 有关物质测定方法的选择

现行质量标准采用 GC 法测定本品中的有关物质，从本研究结果来看，GC-MS 法虽然检出杂质的种类及方法的灵敏度均优于 GC 法，但现行质量标准的 GC 法能较好地反映样品中的杂质情况，该项目无需进行修订。

3.4 抗氧化剂的选择

从抗氧化剂的筛查结果来看，国内市场聚乙二醇 6000 中大部分添加了抗氧化剂，主要为 BHT、BHA，且不同企业不同批次样品中抗氧化剂的含量差异较大。添加抗氧化剂在一定程度上可以保证产品的稳定性，但过量使用该类物质会对人体造成染色体异常、肝脏肥大等问题，国家标准 GB2760—2014《食品添加剂使用标准》[27]、GB9685—2016《食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准》[28]都有严格的使用限量规定，且抗氧化剂可能与某些原料药发生相容性问题，因此建议在质量标准标示项下注明添加的抗氧化剂名称和含量。

3.5 Na^+、K^+元素残留

从元素杂质的测定结果来看，A 企业和 C 企业的 Na^+ 含量较高，分别为 39.74 ppm 和 62.30

ppm，根据两家公司提供的生产工艺可知合成过程中使用了氢氧化钠作为催化剂；B 企业的 K^+ 含量较高，根据该公司提供的生产工艺可知采用工业聚乙二醇 6000 精制而来，说明起始原料工业聚乙二醇 6000 在制备过程中使用了氢氧化钾作为催化剂，另该公司样品在标准检验中炽灼残渣项结果接近 0.1% 的限度，说明可能与样品中 K^+ 元素残留高有关。

3.6 对本品现行质量标准的评价

从 36 批次样品检验结果分析，本品现行质量标准基本可行，能起到质量控制作用，但仍需进一步完善，建议删除甲醛项；增订甲醛、乙醛和总醛项，并在标示项下注明添加的抗氧化剂名称和含量。按拟订质量标准检验，本次抽检不合格率为 19.4%。

3.7 对本品质量状况的评价

36 批次样品总体评价“一般”，按现行质量标准检验不合格率为 5.6%，按探索性研究检验不合格率为 19.4%。从探索性研究结果来看温度对本品稳定性影响较大，应关注生产工艺过程及贮藏时对温度的控制，对于采用精制工艺的企业，提示应关注起始物料的质量，同时优化工艺，减少元素杂质的残留。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：802-803.

[2] 张伟，刘琳婕，何仲贵 . 聚乙二醇在药物制剂中的应用 [J]. 中国药剂学杂志（网络版），2007，5（2）：67-74.

[3] 谢富春，朱长春，张玉清 . 聚乙二醇合成工艺 [J]. 化学推进剂与高分子材料，2005，3（4）：6-9.

[4] 绪国梅，郭振，李晓光 . 聚乙二醇 6000 的精制方法研究 [J]. 化工时刊，2019，33（2）：18-19.

[5] 范存良，杨忠保 . 聚乙二醇的合成 [J]. 合成纤维工业，2003，26（5）：60.

[6] 蔡如琳，胡伟，胡冬芳，等 . 不同相对分子质量聚乙二醇的热氧降解行为 [J]. 高分子材料学与工程，2017，33（3）：107-110，115.

[7] 孙莲莲，刘英 . 离子色谱法同时测定洁厕剂中 10 种有机酸和无机酸 [J]. 理化检验（化学分册），2019，55（6）：701-704.

[8] 何成，张颖，熊中强，等 . 离子色谱法同时测定化学抛光液中的 4 种有机酸 [J]. 电镀与涂饰，2021，40（17）：1384-1387.

[9] 袁力，梅芊，刘英 . 离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧化剂和硫酸盐的含量 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1643-1647.

[10] Hemenway JN，Carvalho TC，Rao VM，et al. Formation of reactive impurities in aqueous and neat polyethylene glycol 400 and effects of antioxidants and oxidation inducers [J]. J Pharm Sci，2012，101（9）：3305-3318.

[11] Seongok H. Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol [J]. Polymer，1997，38（2）：317-323.

[12] 顾晓风，杨袁，郝刚，等 . 柱前衍生高效液相色谱法测定尼莫地平注射液中的甲醛和乙醛 [J]. 化学分析计量，2022，31（1）：41-44.

[13] 张敏，丁洪流，代菲 . 柱前衍生 - 高效液相色谱法测定牙膏中甲醛的方法研究 [J]. 中国标准化，2019（24）：233-234.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会 . 工业用乙二醇中醛含量的测定 - 分光光度法 [S]. GB/T 14571.3—2008.

[15] 王倩，陈茂钦，杨秋红，等 . GC-MS 法测定奥硝唑注射液中的二甘醇 [J]. 华西药学杂志，2021，36（6）：696-698.

[16] 程红新，袁月，郭春梅 . 气相色谱 - 质谱联用法测定化妆品中的二甘醇 [J]. 品牌与标准化，2021（1）：126-128.

[17] Guideline ICH. Guideline for elemental impurities Q3D（R2）[J]. 2022.

[18] 朱俐，赵瑜，肖超强，等 . 电感耦合等离子质谱法测定盐酸头孢卡品酯颗粒中 9 种元素杂质的含量 [J]. 理化检验（化学分册），2022，58（5）：512-516.

[19] 朱俐，赵瑜，尹利辉，等 . 电感耦合等离子体原子发射光谱法和电感耦合等离子质谱法检测元素杂质的研究进展 [J]. 理化检验（化学分册），2022，58（3）：361-372.

[20] USP2020 [S]. 2020：5498.

[21] EP 11.0 [S]. 2023：3289.

[22] 王伟，尚丙坤，胡少强，等 . 聚乙二醇稳定性研究的方法及抗氧化剂选择 [A]// 中国聚氨酯工业协会第十二次年会论文集 [C]. 1994：65-68.

[23] 冯青仪，王希岳，秦志忠 . 抗氧化剂对聚乙二醇热稳定性的影响 [J]. 合成技术及应用，1995，10（2）：1-5.

[24] 张悦，赵勇，刘杨，等 . GC-MS 法测定黄凡士林中 2，6- 二叔丁基对甲酚的含量 [J]. 中国药师，2020，23（1）：193-195.

[25] 赵丽萍，杨帅杰，高鑫，等 . GPC-GC-MS/MS 法测定食用植物油中抗氧化剂 BHA、BHT 和 TBHQ [J]. 食品工业，2022，43（1）：290-292.

[26] 王继才，李少飞，熊小婷，等 . 气相色谱 - 质谱联用法测定食品包装材料中 4 种苯酚类抗氧化剂迁移量 [J]. 分析测试学报，2018，37（7）：815-819.

[27] 国家卫生和计划生育委员会 . GB2760-2014. 食品添加剂使用标准 [S]. 2014.

[28] 国家卫生和计划生育委员会 . GB9685-2016. 食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准 [S]. 2016.

（收稿日期：2023-04-01；修回日期：2023-06-02）

GC-MS/MS 法测定聚乙二醇 6000 中 4 种常用抗氧剂的含量

赵勇[1, 2]，张悦[1, 2*]，郑金凤[1, 2*]，刘雁鸣[1, 2]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　建立药用辅料聚乙二醇 6000 中 4 种抗氧剂的定量测定方法，为聚乙二醇 6000 的质量控制提供技术支撑。**方法**　采用气质联用（GC-MS/MS）法同时检测聚乙二醇 6000 中 2，6- 二叔丁基对甲基苯酚（BHT）、叔丁基对羟基茴香醚（BHA）、叔丁基对苯二酚（TBHQ）、2，6- 二叔丁基 -4 羟基苯酚（Ionox-100）4 种抗氧剂的含量。使用 DB-5 MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；多反应监测（MRM）模式。**结果**　4 种抗氧剂相关系数在 0.9996 ～ 1.000；平均回收率（n ＝ 6）为 92.7% ～ 101.3%，*RSD* 为 2.2% ～ 3.0%。**结论**　该方法灵敏度高、专属性强，适用于聚乙二醇 6000 中 4 种抗氧剂的检测。

关键词：聚乙二醇 6000；抗氧剂；GC-MS/MS；多反应监测
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2191-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.038

Determination of 4 antioxidants in polyethylene glycol 6000 by GC-MS/MS

ZHAO Yong[1, 2], ZHANG Yue[1, 2*], ZHENG Jin-feng[1, 2*], LIU Yan-ming[1, 2] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To quantitatively determine 4 antioxidants in polyethylene glycol 6000 to provide a reference for the quality control of polyethylene glycol 6000. **Methods** The content of 4 antioxidants in polyethylene glycol 6000 was determined under the multiple reaction monitoring (MRM) mode by GC-MS/MS. The capillary column was DB-5 MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm). **Results** The 4 antioxidants of correlation coefficient values were at 0.9996 ～ 1.000. The average recovery ranged 92.7% ～ 101.3% (n ＝ 6), and the *RSD* 2.2% ～ 3.0%. **Conclusion** The method is sensitive and specific, which is suitable for the determination of 4 antioxidants in polyethylene glycol 6000.

Key words: polyethylene glycol 6000; antioxidant; GC-MS/MS; multiple reaction monitoring

药用辅料聚乙二醇 6000 为环氧乙烷和乙二醇或二甘醇缩聚而成的混合物，主要用于软膏基质和润滑剂等[1]。欧洲药典（EP11.0[2]）和美国药典（USP2020[3]）质量标准中注明聚乙二醇 6000 中可添加合适的稳定剂或抗氧剂，但《中国药典》（ChP2020[1]）尚无相关的规定或注释。目前，国内外文献中均无对药用辅料聚乙二醇 6000 中抗氧剂测定方法的报道，为了解我国药用辅料聚乙二醇 6000 生产现状，国内生产企业在生产药用辅料聚乙二醇 6000 时是否加入了抗氧剂及产品中抗氧剂是否超标，建立抗氧化剂的检测方法十分必要。

本研究参考国内相关文献[4-6]，建立 GC-MS/MS 法测定聚乙二醇 6000 中 2，6- 二叔丁基对甲酚等 4 种常用抗氧剂的含量，并评价收集的 44 批聚乙二醇 6000 的总体质量。

1　仪器与试药

Agilent 8890-7010B GC-MS/MS 气相色谱质谱联用仪；梅特勒 Mettler Toledo MS105DU 电子天平。2，6- 二叔丁基对甲基苯酚（BHT，批号：

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金项目（No.2021JJ80044）。
作者简介：赵勇，男，副主任药师，主要从事中药和药用辅料研究，email：254790459@qq.com　*__通信作者__：张悦，女，硕士，主管药师，主要从事药用辅料标准制修订，email：873813723@qq.com；郑金凤，女，硕士，副主任药师，主要从事化学药、药用辅料标准制修订，email：332410419@qq.com

G974372，纯度：98.8%）、叔丁基对羟基茴香醚（BHA，批号：G752666，纯度：99.8%）、叔丁基对苯二酚（TBHQ，批号：P1810100）、2，6-二叔丁基-4-羟基苯酚（Ionox-100，批号：1-F-4E6-1）（上海安谱实验科技股份有限公司）；乙腈（色谱纯，批号：RBAG1H，Burdick & Jackson）；聚乙二醇 6000 样品共 44 批，来自于 15 家调研生产企业。

2 方法与结果[7-9]

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 取 BHT、BHA、TBHQ、Ionox-100 对照品适量，精密称取，用乙腈溶解并稀释成 0.1 mg·mL^{-1} 的混合溶液，作为混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液适量，用乙腈定量稀释制成 10、20、50、100、200、500 ng·mL^{-1} 的系列混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取聚乙二醇 6000 1.0 g，精密称定，置 5 mL 量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2 仪器分析条件

2.2.1 气相色谱条件 DB-5 MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；载气：高纯氦气（99.999%），柱流量：1.0 mL·min^{-1}；进样口温度：230 ℃；进样体积：1 μL；分流比：3∶1；程序升温：初始温度 70 ℃，保持 1 min，以 10 ℃·min^{-1} 升至 200 ℃，保持 4 min，再以 10 ℃·min^{-1} 升至 280 ℃，保持 4 min。

2.2.2 质谱条件 离子化方式：电子轰击离子源（EI）；离子源温度：230 ℃；色谱-质谱接口温度：280 ℃；溶剂延迟时间：8 min；数据采集模式：多反应监测模式（MRM），详见表 1。

表 1 4 种抗氧剂定量和定性选择离子

Tab 1 Ion for quantitative and qualitative selection of 4 antioxidants

化合物名称	保留时间 /min	定量离子（*m/z*）	定性离子（*m/z*）
BHT	11.55	220 > 205（10）	220 > 145
BHA	11.21	180 > 165（10）	180 > 37
TBHQ	11.97	166 > 151（15）	166 > 23
Ionox-100	14.54	236 > 221（15）	236 > 131

注（Note）：括号里数字为碰撞能量，单位 eV（The figures in brackets are collision energy with units of eV）。

2.3 系统适用性试验

精密量取上述系列空白溶液、对照品溶液和供试品溶液各 1 μL，注入 GC-MS/MS 仪，记录色谱图，结果见图 1，空白溶液无干扰，各杂质能有效分离。

2.4 线性关系考察

取“2.1”项下系列混合对照品溶液，分别进样，记录峰面积。以质量浓度（*X*）为横坐标，以

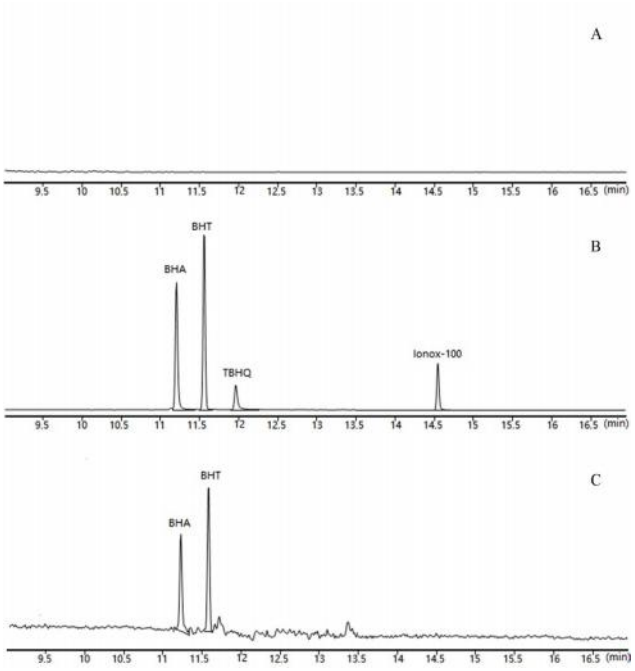

图 1 4 种抗氧剂的 MRM 图

Fig 1 MRM chromatogram of 4 antioxidants

A. 空白溶液（blank solution）；B. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；C. 供试品溶液（test solution）

定量离子的峰面积（*Y*）为纵坐标，绘制标准曲线。回归方程和相关系数见表 2。结果表明，4 种抗氧剂在 10 ～ 500 ng·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，相关系数 $r \geqslant 0.9996$。

2.5 检测限和定量限试验

取质量浓度为 1 ng·mL^{-1} 的混合对照品溶液 1 μL 注入气相色谱-串联质谱仪，记录色谱图，以 3 倍信噪比估算各组分的检测限，以 10 倍信噪比估算各组分的定量限，4 种抗氧剂的检测限为 0.31 ～ 1.48 ng·mL^{-1}，定量限为 1.03 ～ 4.93 ng·mL^{-1}，具体结果见表 2。

2.6 精密度试验

取线性关系考察中质量浓度为 50 ng·mL^{-1} 的混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录 4 种抗氧剂峰面积，结果各峰面积的 *RSD* 在 1.1% ～ 2.2%，表明方法精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一聚乙二醇 6000 样品（批号：FS211101195）6 份，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录 4 种抗氧剂峰面积，计算各抗氧剂的含量，结果仅检出 BHT，BHT 含量为 35.06 ng·g^{-1}，*RSD* 为 1.8%，表明方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

取聚乙二醇 6000 样品（批号：FS211101195）1.0 g，精密称定，共 6 份，分别精密加入 BHT、BHA、TBHQ、Ionox-100 混合对照品溶液（质量浓

度分别为 48.5028、106.37、110.4、12.68 ng•mL^{-1}）5.0 mL 使溶解，依法测定并计算回收率，4 种抗氧剂的平均回收率（n = 6）在 92.7% ～ 101.3%，*RSD* 在 2.2% ～ 3.0%，见表 2。

表 2　4 种抗氧剂线性关系、检测限、定量限以及回收率

Tab 2　Linearity，detection limit，quantitation limit and recovery of 4 antioxidants

成分	回归方程	r	检测限 /（ng • mL^{-1}）	定量限 /（ng • mL^{-1}）	平均回收率 /%	*RSD*/%
BHT	$Y = 244.6X + 1.45\times10^3$	0.9999	0.31	1.03	98.1	2.2
BHA	$Y = 240.4X - 607.6$	0.9996	0.33	1.09	96.1	2.5
TBHQ	$Y = 57.65X - 1.52\times10^3$	0.9997	1.48	4.93	101.3	2.3
Ionox-100	$Y = 66.33X + 719.8$	1.000	1.00	3.32	92.7	3.0

2.9　稳定性试验

取 1 份加样回收试验中的供试品溶液，分别于 0、1、4、8、12、16 h 进样测定，以峰面积为考察指标，结果各抗氧剂 8 h 内峰面积的 *RSD* 在 2.0% ～ 2.9%，表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.10　样品测定

采用本方法对 44 批聚乙二醇 6000 中的 4 种抗氧剂进行了检测，结果 TBHQ 和 Ionox-100 均未检出，BHA 和 BHT 检出情况详见表 3。

表 3　44 批样品中 BHA 和 BHT 的测定结果

Tab 3　Content of BHA and BHT in 44 samples

序号	厂家	批号	BHA/（ng • g^{-1}）	BHT/（ng • g^{-1}）	序号	厂家	批号	BHA/（ng • g^{-1}）	BHT/（ng • g^{-1}）
1	A	B2210061	未检出	未检出	23	I	FS210802127	未检出	未检出
2	B	LMA0T30	未检出	未检出	24	I	FS211207224	未检出	35.06
3	B	LD80V46	未检出	未检出	25	I	FS211101195	未检出	未检出
4	C	20200723	未检出	未检出	26	J	C12602842	未检出	未检出
5	D	103320211106	未检出	15.73	27	K	211117674Z	未检出	未检出
6	D	103320210305	未检出	低于定量限（4.72）	28	L	20210104	未检出	未检出
7	D	103320211202	未检出	低于定量限（4.80）	29	L	20210703	未检出	未检出
8	D	103320211201	未检出	未检出	30	L	20210201	未检出	低于定量限（4.31）
9	D	103320211202	未检出	未检出	31	L	20210801	未检出	11.62
10	E	TF58210701	未检出	未检出	32	L	20210904	未检出	低于定量限（4.74）
11	E	TF58210901	未检出	未检出	33	L	20201106B-2	未检出	低于定量限（2.38）
12	E	TF58211201	未检出	未检出	34	L	20210701B-1	未检出	未检出
13	F	20211003	20.01	10.32	35	L	20201205B-2	未检出	低于定量限（3.08）
14	F	20210903	未检出	低于定量限（2.80）	36	L	20201205A-1	未检出	13.46
15	F	20201103	未检出	低于定量限（3.69）	37	L	20210802B-1	未检出	未检出
16	F	20210901	14.95	未检出	38	L	20210402B-1	未检出	低于定量限（2.42）
17	F	20211101	15.49	未检出	39	L	20211201	未检出	未检出
18	G	20211201	未检出	未检出	40	L	20211202	未检出	未检出
19	H	0285C	未检出	未检出	41	L	20190301	未检出	未检出
20	H	6ZYMB-IF	未检出	未检出	42	M	BNL682	未检出	未检出
21	H	Z7VNG-JW	未检出	未检出	43	N	25322-68-3	未检出	未检出
22	I	FS210322067	未检出	未检出	44	O	20211017	未检出	未检出

3　讨论

3.1　结果分析

本研究结果显示，44 批样品中 14 批检测出 BHT，含量在 0 ～ 35.06 ng • g^{-1}，均值为 2.41 ng • g^{-1}，说明整体 BHT 含量较低。15 家生产企业中有 11 家企业各批次聚乙二醇 6000 样品中均未检出 BHT，有 4 家企业检出 BHT，其中以 L 公司有 7 批聚乙二醇 6000 中检出，且平均含量最高，BHT 均值为 2.56 ng • g^{-1}。前期稳定性研究显示，添加了抗氧剂的 L 公司生产的聚乙二醇 6000 样品在高温前 10 d 稳定性明显好于未添加抗氧剂的样品，说明加入少量抗氧剂可保证本品的稳定性。

另 44 批样品中 3 批检出 BHA，均为 F 公司生产，含量在 0 ～ 20.01 ng • g^{-1}，其中 1 批同时检出 BHT、BHA。提示聚乙二醇 6000 生产企业可能会添加不同种类的抗氧剂，甚至会同时添加几种抗氧剂来维持产品的稳定。BHT、BHA、TBHQ 和 Ionox-100 是目前最常用的 4 种抗氧化剂，但过量使用该类物质会造成人体染色体异常、肝脏肥大等。国家标准 GB2760—2014《食品添加剂使用标准》[10]、GB9685—2016《食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标

准》[11] 都有严格的使用限量规定。本研究显示聚乙二醇 6000 中整体 BHT、BHA 含量较低，但抗氧剂的联合使用是否会造成限量超标等问题仍有待研究，故亟需建立一种快速准确检测抗氧剂含量的方法对其加入量进行严格控制。

3.2 各国药典聚乙二醇 6000 定义的规定

ChP2020、USP2020、EP11.0 中对聚乙二醇 6000 的定义为“环氧乙烷和乙二醇或二甘醇缩聚而成的混合物”，其中 USP2020、EP11.0 中增加了“可添加合适的抗氧剂”。文献报道聚乙二醇 6000 不稳定，易发生降解产生甲醛、乙醛等小分子醛、酮类物质，在合成聚乙二醇时应加入抗氧剂保证产品的稳定性 [12-16]，与本文结果一致。拟建议相关部门对聚乙二醇 6000 的定义修订为“环氧乙烷和乙二醇或二甘醇缩聚而成的混合物，可含有适宜的抗氧剂”。同时，聚乙二醇 6000 作为药用辅料在制剂中应用时，本品中的抗氧剂可能会与制剂中的原料药发生反应，产生相容性问题 [17-18]。因此，生产企业应注明聚乙二醇 6000 中的抗氧剂的种类及含量。

3.3 抗氧剂种类的选择

聚乙二醇 6000 含有聚醚结构，在氧进攻下，生成氢过氧化物，氢过氧化物均裂，分解成多种自由基，从而造成醚键断裂。酚型抗氧剂可与自由基发生反应，从而终止自动氧化过程或者延缓被氧化过程的速度，达到抗氧化的目的。BHT、BHA、TBHQ、Ionox-100 是常用的酚型抗氧化剂，并且前期企业调研中反馈聚乙二醇 6000 在高温下不稳定，在生产过程中常加入 BHT、BHA 作为稳定剂，因此结合企业调研结果选择以上 4 种抗氧剂进行研究。

3.4 国内药用辅料中抗氧剂研究情况

《中国药典》2020 年版四部共收载 335 个药用辅料品种，其中稳定性较差的橄榄油、花生油、黄凡士林、白凡士林以及聚乙二醇系列品种等在标准正文中均未对抗氧剂或稳定剂进行规定，而 USP2020、EP11.0 在上述品种定义中均明确可加入适宜的抗氧剂或稳定剂，并要求在标示项下对加入的抗氧剂的名称和含量进行标示。本课题组前期采用 GC-MS/MS 在国内药用辅料黄凡士林中检出抗氧剂 BHT[7]，说明国内药用辅料生产企业在生产稳定性较差的药用辅料时存在添加抗氧剂保证产品稳定性的现象，因此本研究建立的抗氧剂检测方法对于此类药用辅料中抗氧剂的控制具有借鉴意义。

3.5 小结

本研究建立的 GC-MS 法，方法简便，结果准确，重复性好，能准确测定 BHT、BHA、TBHQ 和 Ionox-100 的含量。国内部分药用辅料聚乙二醇 6000 产品中添加了抗氧剂。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：802.

[2] USP2020 [S]. 2020：5498.

[3] EP [S]. 11.0th ed. 2023：3289.

[4] 王伟，尚丙坤，胡少强，等 . 聚乙二醇稳定性研究的方法及抗氧剂选择 [A]// 中国聚氨酯工业协会第十二次年会论文集 [C]. 1994.

[5] 冯青仪，王希岳，秦志忠 . 抗氧剂对聚乙二醇热稳定性的影响 [J]. 合成技术及应用，1995，10（2）：1-5.

[6] 谢富春，朱长春，张玉清 . 聚乙二醇合成工艺 [J]. 化学推进剂与高分子材料，2005，3（4）：6-9.

[7] 张悦，赵勇，刘杨，等 . GC-MS 法测定黄凡士林中 2，6- 二叔丁基对甲酚的含量 [J]. 中国药师，2020，23（1）：193-195.

[8] 赵丽萍，杨帅杰，高鑫，等 . GPC-GC-MS/MS 法测定食用植物油中抗氧剂 BHA、BHT 和 TBHQ [J]. 食品工业，2022，43（1）：290-292.

[9] 王继才，李少飞，熊小婷，等 . 气相色谱 - 质谱联用法测定食品包装材料中 4 种苯酚类抗氧剂迁移量 [J]. 分析测试学报，2018，37（7）：815-819.

[10] 国家卫生和计划生育委员会 . GB2760-2014. 食品添加剂使用标准 [S]. 2014.

[11] 国家卫生和计划生育委员会 . GB9685-2016. 食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准 [S]. 2016.

[12] 王勇，赵小红，匙丹丹，等 . 紫外分光光度法测定聚乙二醇中抗氧剂含量 [J]. 化学推进剂与高分子材料，2016，14（6）：85-87.

[13] 李满秀，赵娟，郑红利，等 . 高效液相色谱法同时测定食品中的 TBHQ、BHA 和 BHT [J]. 食品工业，2017，36（7）：273-275.

[14] 黄萍，刘兴兰 . SPE-HPLC 法测定三层共挤输液袋中抗氧剂在氧氟沙星氯化钠注射液中的迁移量 [J]. 中国药师，2016，19（12）：2267-2269.

[15] 陈蓉，晏菊姣 . 药用丁基胶塞中抗氧剂 BHT 的 UPLC 法测定 [J]. 中国药师，2018，21（8）：1494-1495.

[16] 彭瑾，王红，周茜，等 . 气相色谱法检测食用油中的抗氧剂叔丁基对羟基茴香醚、2，6- 二叔丁基对甲基苯酚和叔丁基对苯二酚 [J]. 中国卫生检验杂志，2022，32（4）：399-405.

[17] 张智力，齐永润，周婉茹，等 . 气相色谱质谱联用法快速测定食品用塑料袋中 3 种抗氧化剂 [J]. 塑料工业，2020，48（11）：119-123.

[18] 赵冬吉 . 食用油中 5 种合成抗氧剂同时检测方法研究 [J]. 中国油脂，2021，46（2）：139-142.

（收稿日期：2023-03-07；修回日期：2023-05-20）

医院药学

127 例地高辛血药浓度监测结果及影响因素分析

马丙锁[1, 2]，杨坤[1, 2]，晏子俊[2]，李欣坪[2]，徐兴梦[2]，李珂心[1, 2]，张良明[2*]（1. 大理大学药学院，云南 大理 671000；2. 攀枝花市中心医院，四川 攀枝花 617067）

摘要：目的 探讨地高辛血药浓度的影响因素，为合理使用地高辛提供依据。**方法** 采用回顾性分析方法，筛选并收集我院 2021 年 6 月—2022 年 7 月进行地高辛血药浓度监测患者的病历资料，分析患者性别、年龄、肾功能、肝功能、伴有基础疾病、联用药物及心功能不全等因素对地高辛血药浓度的影响。**结果** 通过单因素分析可知，碱性磷酸酶、冠心病、慢性胃炎、联用药物去乙酰毛花苷和 NYHA 心功能分级对患者的地高辛血药浓度有显著影响（$P < 0.05$）；多元线性回归分析得出联用药物去乙酰毛花苷对患者的地高辛血药浓度有显著影响（$P < 0.05$）。**结论** 地高辛的血药浓度影响因素较多，使用时需进行血药浓度监测，防止中毒事件发生。

关键词：地高辛；治疗药物监测；影响因素；安全性

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2195-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.039

Analysis of serum digoxin concentration monitoring results and influencing factors in 127 cases

MA Bing-suo[1, 2], YANG Kun[1, 2], YAN Zi-jun[2], LI Xin-ping[2], XU Xing-meng[2], LI Ke-xin[1, 2], ZHANG Liang-ming[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Dali University*, *Dali Yunnan* 671000; 2. *Central Hospital of Panzhihua*, *Panzhihua Sichuan* 617067)

Abstract: Objective To determine the factors affecting the serum digoxin concentration (SDC), to provide reference for the rational use of digoxin. **Methods** The medical records of patients who underwent the SDC monitoring in our hospital from June 2021 to July 2022 were retrospectively analyzed. The effect of gender, age, renal function, liver function, former health conditions, combined drug use and cardiac dysfunction on the SDC was determined. **Results** The univariate analysis showed that alkaline phosphatase, coronary heart disease, chronic gastritis, combined use of deslanoside and the New York Heart Association (NYHA) Functional Classification all had significant effect on the patients' SDC ($P < 0.05$). The multiple linear regression analysis showed that combined use of deslanoside significantly affected patients' SDC ($P < 0.05$). **Conclusion** Many factors affect the SDC, so it is necessary to monitor the SDC to prevent poisoning events.

Key words: digoxin; therapeutic drug monitoring; influencing factor; safety

随着人们生活水平的提高，心血管疾病的发病率也越来越高。2021 年中国心衰联盟报告显示，我国每年新增心力衰竭（heart failure，HF）患者 297 万例，随着老龄化的加剧，每年的新增患者数也在持续增多，HF 已成为影响健康的巨大挑战，有效的药物治疗显得尤为重要[1]。当前治疗 HF 的

基金项目：云南省科学技术厅地方高校联合专项 - 面上项目（No.202001BA070001-041）；四川省预防医学会项目（No. 川预学 - 静配 -2020-005）；四川省医院协会青年药师科研专项资金项目（No.22009）；成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划医院专项项目（No.YYZX2021144）。

作者简介：马丙锁，男，硕士研究生，主要从事临床药学工作，email：330094501@qq.com *通信作者：张良明，男，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，email：396795576@qq.com

药物种类繁多，治疗方案复杂，合理选择 HF 治疗药物和确定药物最佳剂量成为医师的难题[2]。

地高辛（digoxin）是强心苷类药物，已应用于 HF 治疗多年[3]，临床随机对照试验证实了地高辛对 HF 的治疗效果[4]。《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018》和《2021 ESC 急慢性心力衰竭诊断指南》均推荐地高辛作为 HF 的治疗药物[5-6]。然而，地高辛的药物治疗窗较窄，其有效安全浓度范围为 0.8 ～ 2.0 ng•mL^{-1}，药品不良反应与地高辛血药浓度（serum digoxin concentration，SDC）有很强的相关性[7]。临床上服用地高辛的患者多为老年人，存在合并多重用药、伴有多种基础疾病、肝肾功能不全以及地高辛口服用药等因素的影响，使得地高辛血药浓度的个体差异较大[8]。尽管已有较多医院对地高辛开展血药浓度监测（therapeutic drug monitoring，TDM），但临床上仍未能为医师提供很好的个体化用药指导，使得 SDC 及临床疗效充满不确定性[9]。

本研究基于地高辛在人体内血药浓度个体差异较大这一特点，回顾性分析某三甲医院 127 例患者 SDC 的影响因素，为临床使用地高辛进行抗 HF 治疗提供个体化用药依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2021 年 6 月 10 日至 2022 年 7 月 31 日在我院进行住院治疗的患者，使用医院信息管理系统（hospital information system，HIS）收集资料，并进行回顾性分析。纳入病例 127 例，其中男性 88 例，女性 39 例，平均年龄为 71 岁。有 62 例病历资料提供了心功能等级，108 例病历资料提供了肾功能评价指标，106 例病历资料提供了肝功能评价指标。本研究获得了伦理委员会的批准（伦理批件号：攀科伦审字第 [2023-002] 号）。

纳入标准：① 年龄≥ 18 周岁；② 使用地高辛至少 5 d，用药依从性较好；③ 能准确得到病历资料的患者；④ 用药期间进行过 TDM 的患者；⑤ 用药期间进行过肝、肾功能检测的患者；⑥ 给药方案为 0.125 mg po qd。

排除标准：① 年龄＜ 18 周岁；② 因血药浓度过高（＞ 5.00 ng • mL^{-1}）或过低（＜ 0.30 ng • mL^{-1}）导致 Viva-ProE 全自动生化分析仪无法测出血药浓度的患者。

1.2 方法

1.2.1 血药浓度检测方法 采用酶放大免疫测定法 [Viva-ProE 全自动生化分析仪，西门子医学诊断产品（上海）有限公司] 检测地高辛血药浓度。具体操作为：抽取患者晨起服药前的静脉血，将血液样品于 3000 r • min^{-1} 离心 20 min 后，以地高辛定标液和检测试剂 [西门子医学诊断产品（上海）有限公司] 建立测定方法，进样检测血药浓度。检测范围为 0.30 ～ 5.00 ng • mL^{-1}，灵敏度为 0.30 ng•mL^{-1}，最低定量限（LLOQ）为 0.30 ng•mL^{-1}。

1.2.2 性别、年龄 对患者病历资料进行检索，收集患者的性别、年龄资料，按年龄分为≤ 65 岁、66 ～ 79 岁、≥ 80 岁三个组[10]。

1.2.3 肾功能指标 肌酐（CREA）和尿素（BUN）是评价肾功能的关键指标[11-12]，本次研究将其作为肾功能的评价指标。使用 CKD-EPI 公式[13] 计算肾小球滤过率（eGFR），根据《慢性肾脏病及透析的临床实践指南》，将 eGFR 大小不同的患者进行分组，分别是＞ 90、60 ～ 89、15 ～ 29、30 ～ 59、＜ 15 mL/（min • 1.73 m²）五个组[14]。

1.2.4 肝功能指标 参考《ACG Clinical Guideline：Evaluation of Abnormal Liver Chemistries》指南及文献中使用的肝功能指标[15-16]，选择谷丙转氨酶、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白、白 / 球蛋白和碱性磷酸酶作为本次研究患者肝功能的评价指标。

1.2.5 伴有基础疾病 参考部分类似研究文献[17-18] 并结合我院患者病历资料，确定纳入本次研究的基础疾病种类，包括高血压、冠心病、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、肺部感染、糖尿病、脑梗死、心肌梗死、癌症和慢性胃炎。

1.2.6 联用药物 参考已发表的部分类似研究文献中[10，18-19] 影响 SDC 的药物种类，确定本次研究纳入的药物有他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂（ACEI）或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（ARB）、β 受体阻滞剂、保钾利尿剂、髓袢利尿剂、噻嗪类利尿剂、抗菌药物（AA）、去乙酰毛花苷、质子泵抑制剂（PPI）和钙离子通道阻滞剂（CCB）。

1.2.7 心功能不全指标 《心力衰竭合理用药指南》指出 NYHA 心功能分级可在一定程度上代表患者 HF 的严重程度，因此提取患者 NYHA 心功能分级作为患者心功能不全指标[19-20]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行相关性分析。定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，定性资料采取百分率（%）表示。对于单因素分析，本次进行统计分析的“因变量”为连续型变量，当“自变量”为连续型变量时，采取 Pearson 相关性分析；当“自变量”为二分类变量或有序多分类变量时，采取 Mann-Whitney U 非参数检验。以 P ＜ 0.05 认为差异具有统计学意义。根据单因素分析结果，将 P ＜ 0.05 的因素纳入多元线性回归分析中，筛选对 SDC 具有影响的因素。

2　结果

2.1　血药浓度监测结果

本次共回顾性研究 127 例病历资料，结果表明 45 例（35.43%）患者血药浓度＜ 0.80 ng•mL^{-1}，平均血药浓度为（0.54±0.16）ng • mL^{-1}；58 例（45.67%）患者血药浓度在有效血药浓度范围内，平均血药浓度为（1.33±0.36）ng • mL^{-1}；24 例（18.90%）患者血药浓度＞ 2.00 ng • mL^{-1}，平均血药浓度为（2.94±0.69）ng • mL^{-1}。

2.2　血药浓度监测患者的性别、年龄分布

本次研究的 127 例病历资料中，有男性患者 88 例，平均血药浓度为 1.36 ng • mL^{-1}；女性患者 39 例，平均血药浓度为 1.34 ng • mL^{-1}。统计结果显示男性与女性患者之间的 SDC 差异无统计学意义。127 例患者的平均年龄为（71.33±10.46）岁，将年龄与地高辛血药浓度之间进行统计分析，表明 SDC 在 65 岁以内、66 ～ 79 岁和 80 岁以上的患者间的 SDC 差异无统计学意义，详见表 1。

表 1　不同年龄段的地高辛血药浓度比较

Tab 1　SDC in different age groups

年龄 / 岁	n（%）	平均血药浓度 /（ng • mL^{-1}）	不同地高辛血药浓度 /[n（%）]			P 值
			＜ 0.80 ng • mL^{-1}	0.80 ～ 2.00 ng • mL^{-1}	＞ 2.00 ng • mL^{-1}	
≤ 65	31（24.41）	1.34±0.90	12（38.71）	12（38.71）	7（22.58）	0.80
66 ～ 79	70（55.12）	1.35±0.99	27（38.57）	30（42.56）	13（18.57）	
≥ 80	26（20.47）	1.38±0.84	6（23.08）	16（61.54）	4（15.38）	

2.3　肾功能情况对 SDC 的影响

本研究有 108 例患者在进行血药浓度时监测了肾功能情况。检验结果显示，患者肾功能不同分级之间 SDC 差异无统计学意义，见图 1。对患者的肌酐（平均值 170.40，标准偏差 180.24）、尿素进行检验（平均值 12.43，标准偏差 8.46），检验结果显示患者的肌酐水平、尿素水平与患者的 SDC 之间无显著相关性，见表 2。

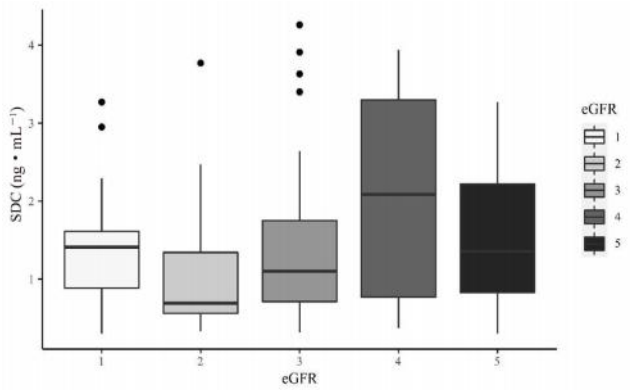

图 1　肾功能不同分级之间的地高辛血药浓度比较

Fig 1　SDC between different levels of renal function

表 2　肌酐、尿素与地高辛血药浓度相关性分析

Tab 2　Correlation of CREA，BUN and SDC

指标	平均值	标准偏差	P
肌酐 /（μmol • L^{-1}）	170.74	180.24	0.56
尿素 /（mmol • L^{-1}）	12.43	8.46	0.17

2.4　肝功能情况与 SDC 之间的关系

本研究从病历资料中得到进行了肝功能测定的患者共 106 例。通过统计分析，谷丙转氨酶、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白和白 / 球蛋白与患者的 SDC 无显著相关性；患者的 SDC 与碱性磷酸酶成正相关性，见表 3。

表 3　肝功能指标与地高辛血药浓度相关性分析

Tab 3　Correlation between liver function indicators and SDC

指标	平均值	标准偏差	P
谷丙转氨酶 /（U • L^{-1}）	42.21	98.02	0.62
总胆红素 /（μmol • L^{-1}）	18.05	17.22	0.91
直接胆红素 /（μmol • L^{-1}）	10.89	12.45	0.63
间接胆红素 /（μmol • L^{-1}）	7.16	7.28	0.58
总蛋白 /（g • L^{-1}）	63.42	7.88	0.81
白蛋白 /（g • L^{-1}）	35.17	5.22	0.59
球蛋白 /（g • L^{-1}）	28.25	8.08	0.56
白 / 球蛋白	1.38	0.49	0.32
碱性磷酸酶 /（U • L^{-1}）	119.86	144.30	0.01

2.5　伴有基础疾病对 SDC 的影响

结果显示伴有冠心病的患者 SDC 高于不伴有冠心病的患者；伴有慢性胃炎的患者 SDC 低于不伴有慢性胃炎的患者。其余基础疾病伴有组与不伴有组之间 SDC 差异无统计学意义，见表 4。

2.6　联合用药对 SDC 的影响

结果表明，联用去乙酰毛花苷的患者 SDC 高于未联用去乙酰毛花苷的患者；其余联用药物使用组与未使用组 SDC 差异无统计学意义，见表 5。

2.7　心功能不全程度对 SDC 的影响

本次研究中可从病历资料获得 NYHA 心功能分级的病例有 62 例，其中Ⅱ级有 2 例，Ⅲ级有 20 例，Ⅳ级有 40 例。对上述三个等级进行统计分析，发现随着 NYHA 心功能分级的增高，患者的 SDC 水平呈升高趋势，见图 2。

表 4　基础疾病对地高辛血药浓度的影响

Tab 4　Effect of primary diseases on SDC

伴有基础疾病	是否伴有	n（%）	血药浓度 /（ng·mL^{-1}）	P
高血压	是	53（41.73）	1.45±0.97	0.26
	否	74（58.27）	1.28±0.90	
冠心病	是	27（21.26）	1.73±1.11	0.03
	否	100（78.74）	1.25±0.86	
慢性阻塞性肺疾病	是	44（34.65）	1.46±0.93	0.27
	否	83（65.35）	1.30±0.94	
肺部感染	是	80（62.99）	1.46±0.98	0.10
	否	47（37.01）	1.18±0.83	
糖尿病	是	35（27.56）	1.38±1.03	0.99
	否	92（72.44）	1.35±0.90	
脑梗列心肌梗死	是	16（12.60）	1.51±1.16	0.67
	否	111（87.40）	1.33±0.90	
癌症	是	5（3.94）	2.16±1.29	0.11
	否	122（96.06）	1.32±0.91	
慢性胃炎	是	25（19.69）	0.96±0.55	0.02
	否	102（80.32）	1.45±0.98	

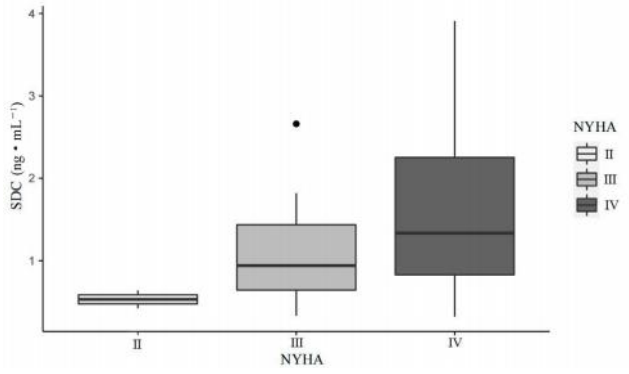

图 2　NYHA 心功能分级不同之间地高辛血药浓度的比较

Fig 2　SDC of various NYHA cardiac function classifications

2.8　多元线性回归分析

根据单因素分析结果，将 $P < 0.05$ 的因素（碱性磷酸酶、冠心病、慢性胃炎、去乙酰毛花苷、NYHA 心功能分级）纳入多元线性回归中进行多因素分析，分析结果显示联用药物去乙酰毛花苷对 SDC 具有显著影响，见表 6。

3　讨论

地高辛是治疗 HF 的有效药物，但其治疗窗较窄、个体差异大，定期进行 TDM 是很有必要的，而对监测结果的进一步分析可有效指导地高辛的个体化用药。

本次研究结果显示，男性、女性之间 SDC 无明显差异，提示性别因素对于 SDC 无显著影响，与文献报道 [19] 一致，但也有研究认为女性患者 SDC 高于男性 [18]。导致这一结果的原因可能与本次纳入研究的病历资料中患者年龄较高有关（男性平均年龄 70.63 岁，女性平均年龄 71.32 岁）。地高辛在脂肪组织中分布较少，对于体脂率较高的女性而言，体内游离的地高辛浓度应较高 [8]。有研究证实，对于患慢性病的中老年人群而言，男性、女性之间的脂肪含量不具有显著差异，这可能导致两者之间 SDC 不具有显著差异 [21]。从表 1 可以看出，随着年龄增加，患者 SDC 有增高的趋势，但差异无统计学意义，这与文献报道 [19, 22] 的结果相似。随着患者年龄升高，患者功能性的肾单位数量减少，地高辛在体内经肾排泄减少，老年人 Na^+-K^+-ATP 酶活性较弱，对地高辛较为敏感，因此 SDC 水平较高 [18]。

地高辛的主要排泄方式为肾脏排泄，SDC 与患者的肾小球滤过率成负相关，即肾小球滤过率

表 5　联用药物对地高辛血药浓度的影响

Tab 5　Effect of combined drugs on the SDC

联用药物	是否使用	n（%）	平均血药浓度 /（ng·mL^{-1}）	P
他汀类	是	41（32.28）	1.42±1.05	0.76
	否	86（67.72）	1.32±0.88	
ACEI 或 ARB	是	34（26.77）	1.36±1.02	0.83
	否	93（73.23）	1.35±0.91	
β- 受体阻滞剂	是	17（13.39）	1.17±0.62	0.76
	否	110（86.61）	1.38±0.97	
保钾利尿剂	是	47（37.01）	1.26±0.93	0.40
	否	80（62.99）	1.41±0.93	
髓袢利尿剂	是	82（64.57）	1.38±0.99	0.88
	否	45（35.43）	1.31±0.83	
噻嗪类利尿剂	是	15（11.81）	1.33±1.22	0.44
	否	112（88.19）	1.36±0.89	
抗菌药物	是	59（46.46）	1.34±0.92	0.94
	否	68（53.54）	1.36±0.95	
去乙酰毛花苷	是	16（12.60）	2.11±0.98	＜ 0.01
	否	111（87.40）	1.25±0.88	
质子泵抑制剂	是	28（22.05）	1.37±1.06	0.61
	否	99（77.95）	1.35±0.90	
钙离子通道阻滞剂	是	14（11.02）	1.54±1.35	0.95
	否	113（88.98）	1.33±0.87	

表 6　地高辛血药浓度影响因素的多元线性回归分析

Tab 6　Multivariate linear regression analysis of influencing factors for SDC

因素	标准系数	t 值	P
碱性磷酸酶	0.22	－ 1.75	0.09
冠心病	0.04	0.37	0.71
慢性胃炎	－ 1.50	－ 1.15	0.26
去乙酰毛花苷	0.38	3.19	＜ 0.01
NYHA 心功能分级	0.18	1.36	0.18
常量		－ 0.22	0.83

越高，患者的 SDC 水平越低 [17]。此次研究结果显示，患者的肾功能分级和肌酐、尿素水平对 SDC 均不具有显著影响，这与王宏 [18] 的研究结果相似，可能与本次纳入研究的患者用药剂量较小，且老年人肾功能多有退化等原因有关 [23]。肝功能指标中，除碱性磷酸酶外，谷丙转氨酶、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白和白 / 球蛋白对患者的 SDC 不具有显著影响，原因是地高辛吸收进入血液后几乎不经过肝脏代谢，因此肝脏功能对 SDC 不具有显著影响 [24]。

从单因素分析结果来看，碱性磷酸酶、冠心病、慢性胃炎、去乙酰毛花苷、NYHA 心功能分级都会对患者的 SDC 造成显著影响。碱性磷酸酶与 SDC 具有正相关性，对于碱性磷酸酶值较高的患者需警惕地高辛在体内的蓄积。碱性磷酸酶是胆汁淤积和胆道损伤的标志物，碱性磷酸酶升高提示患者可能患有胆汁淤积或是胆道损伤 [25]。本研究发现随着患者碱性磷酸酶升高，SDC 也升高。地高辛的分布与处置和胆汁排泄具有相关性，胆汁淤积和胆道损伤导致地高辛蓄积 [26]。地高辛在肝脏与葡糖醛酸结合后随胆汁排入小肠后，药物再次被小肠吸收形成肝肠循环 [27]。因此胆汁淤积和胆道损伤将会影响地高辛的肝肠循环过程，进而致使地高辛药物蓄积。

患者的基础疾病可影响到患者的 SDC，特别是冠心病和慢性胃炎。本次研究的结果表明，冠心病对地高辛的血药浓度具有影响，伴有冠心病的患者血药浓度显著高于不伴有冠心病的患者。伴有冠心病的患者其服用的药物复杂，多种药物之间可发生相互作用，引起地高辛蓄积，从而血药浓度过高 [28]。另外，本研究还发现伴有慢性胃炎的患者 SDC 显著低于不伴有慢性胃炎的患者。可能的原因有：① 本研究中患者服用地高辛的方式均为口服，慢性胃炎可能会影响其吸收；② 慢性胃炎治疗药物也可能对地高辛药物的吸收及代谢造成一定影响，使有慢性胃炎的患者 SDC 较低。

患者的 NYHA 心功能分级对患者的 SDC 有影响，对于心功能不全程度较为严重的 HF 患者，应减少用药剂量。NYHA 分级是衡量患者心功能不全等级的重要指标，随着患者心功能不全程度加重，患者的心脏泵血能力逐步减弱，自主神经系统和肾素 - 血管紧张素系统会被激活，血液中去甲肾上腺素增加，致使外周血容量减少，从而使得 SDC 增加 [29]。因此，对于心功能不全等级较高的患者，不能为了追求临床疗效而增加地高辛的剂量。此外，对 SDC 影响因素进行多元线性回归分析，发现去乙酰毛花苷能显著影响患者 SDC，使其超出有效安全浓度范围，联用此药物时应警惕中毒风险。去乙酰毛花苷是强心苷类的一种，在体内主要代谢为地高辛再经肾脏排出。本研究的结果表明去乙酰毛花苷能显著提高患者的 SDC 水平，在临床上需特别注意规范使用。

SDC 影响因素较多，有研究报道患者的体质量指数、电解质紊乱、用药剂量也会对 SDC 产生显著影响 [19，30]。体质量指数较高也会导致 Na^+-K^+-ATP 酶活性降低，地高辛也可与 Na^+-K^+-ATP 酶特异性结合从而抑制该酶的活性，这导致患者心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，心脏泵血能力加强，血液循环加快，使得患者 SDC 变低，因此，对于过于肥胖或瘦弱的患者，应当适当调整药物剂量，防止药物中毒或药物无效的情况发生 [30]。电解质紊乱也会影响到患者的 SDC 水平，低钾或低镁均会使患者对地高辛的敏感性增加从而增加不良反应的发生概率；血钾含量较低时，肾小管对地高辛的排泄显著减少，将会导致患者 SDC 水平上升 [31]。Ca^{2+} 与地高辛均能使患者的心肌收缩力增强，且具有相同的毒性作用，当 Ca^{2+} 浓度过高时，将会使地高辛毒性增强，这可能诱发患者心律失常 [32]。在临床上使用地高辛时，需要检测患者的电解质水平，从而避免不良事件的发生。SDC 随着用药剂量的增多而升高，有研究证实 “0.125 mg qd” 的有效性和安全性优于 “0.25 mg qd” 和 “0.125 mg bid” [33]。我院地高辛用药方案多为 “0.125 mg qd”，低剂量的地高辛能使得心肌收缩力增强，且小剂量的维持疗法在经过 4 ～ 5 个半衰期后也能达到治疗所需的稳态血药浓度，在保证临床疗效的同时降低地高辛中毒发生率 [28，33]。

地高辛在临床应用时，因患者生理、病理状态各不相同，致使不同患者对地高辛的吸收和代谢水平不同。临床药师在患者入院时进行问诊，确认用药史及过敏史，综合考虑患者情况，结合 TDM 结果，对临床医师提出合理的用药建议，对患者进行用药教育及用药方案优化，提高患者的用药依从性，可以使患者使用最佳的药物剂量达到最优的治疗效果，减少药物相互作用及药物不良反应的发生，降低患者的再住院率 [34]。

综上所述，地高辛进行治疗的患者多为老年人，其心肌组织退化、Na^+-K^+-ATP 酶活性降低、骨骼肌减少和肾血流量减少等因素均可导致患者 SDC 增高 [35]。体内代谢、联用药物、个体差异和基础疾病等因素均可引起 SDC 有较大差异，容易导致地高辛蓄积中毒。对地高辛进行 TDM，可有效防止患者地高辛中毒，提高有效性及安全性。

本研究进行了回顾性分析，将为临床使用地高辛提供个体化用药依据。

参考文献

[1] 中国心衰中心工作报告（2021）——心力衰竭患者的诊疗现况 [J]. 中国介入心脏病学杂志，2022，30（5）：328-336.

[2] Golden L，Rogers JG. Heart failure drug therapy：new treatments，new guidelines [J]. Tex Heart Inst J，2022，49（5）：e227920.

[3] Boursi B，Haynes K，Mamtani R，et al. Digoxin use and the risk for colorectal cancer [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2014，23（11）：1147-1153.

[4] Aguirre DL，Weber K，Bavendiek U，et al. Digoxin-mortality：randomized vs. observational comparison in the DIG trial [J]. Eur Heart J，2019，40（40）：3336-3341.

[5] McDonagh TA，Metra M，Adamo M，et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. Eur Heart J，2021，42（36）：3599-3726.

[6] 王华，梁延春 . 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46（10）：760-789.

[7] Rathore SS，Curtis JP，Wang Y，et al. Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure [J]. JAMA，2003，289（7）：871-878.

[8] 徐莉，杨晔，尹登科 . 地高辛口服吸收及药动学的研究进展 [J]. 中国药师，2020，23（11）：2248-2252.

[9] 张亿晨 . 我院血药浓度监测开展情况调查 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（22）：113-114.

[10] 郭健雄，李超，袁进，等 . 我院 436 例 / 次地高辛血药浓度监测结果分析 [J]. 中国药房，2015，26（11）：1499-1501.

[11] Luo H，Yang X，Chen K，et al. Blood creatinine and urea nitrogen at ICU admission and the risk of in-hospital death and 1-year mortality in patients with intracranial hemorrhage [J]. Front Cardiovasc Med，2022，9：967614.

[12] Gul A，Khan H，Shah SI，et al. Pharmaceutical development of intraperitoneal arachis hypogaea as a renal protective agent [J]. Front Biosci（Landmark Ed），2023，28（1）：14.

[13] 程莹，李宁娜，游志清，等 . 三种 CKD-EPI 公式与改良 MDRD 公式诊断糖尿病肾病一致性分析 [J]. 中国全科医学，2016，19（29）：3584-3588.

[14] 刘章锁，王沛 . K/DOQI 指南关于慢性肾脏病分期的临床指导意义 [J]. 中国实用内科杂志，2008，28（1）：21-24.

[15] Kwo PY，Cohen SM，Lim JK. ACG clinical guideline：evaluation of abnormal liver chemistries [J]. Am J Gastroenterol，2017，112（1）：18-35.

[16] Sun Z，Chai J，Zhou Q，et al. Establishment of gender-and age-specific reference intervals for serum liver function tests among the elderly population in northeast China：a retrospective study [J]. Biochem Med（Zagreb），2022，32（2）：20707.

[17] 周家军，孟祥云，姜怡，等 . 地高辛血清药物浓度影响因素及检测方法 [J]. 临床药物治疗杂志，2020，18（10）：72-75.

[18] 王宏 . 地高辛血药浓度监测及影响因素分析 [J]. 临床合理用药杂志，2022，15（4）：158-160.

[19] 钱懿轶，孟禄明，王晶晶，等 . 334 例住院患者地高辛血药浓度的监测及影响因素分析 [J]. 中国药房，2018，29（13）：1816-1819.

[20] 心力衰竭合理用药指南（第 2 版）[J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2019，11（7）：1-78.

[21] 刘陪沛，杨雪，彭楠，等 . 老年人患慢性病的数量与脂肪、肌肉等体成分的相关性研究 [J]. 中华老年多器官疾病杂志，2017，16（12）：910-914.

[22] 朱翠平，刘俊 . 355 例次地高辛血清浓度监测结果及影响因素分析 [J]. 药学与临床研究，2014，22（2）：171-173.

[23] Turnheim K. When drug therapy gets old：pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly [J]. Exp Gerontol，2003，38（8）：843-853.

[24] Smith TW，Haber E. Digoxin intoxication：the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration [J]. J Clin Invest，1970，49（12）：2377-2386.

[25] Fargo MV，Grogan S P，Saguil A. Evaluation of jaundice in adults [J]. Am Fam Physician，2017，95（3）：164-168.

[26] Wojcicki M，Drozdzik M，Sulikowski T，et al. Pharmacokinetics of intravenously administered digoxin and histopathological picture in rabbits with experimental bile duct obstruction [J]. Eur J Pharm Sci，2000，11（3）：215-222.

[27] 杨光义，张晨宁，张荣娇，等 . 具有肝肠循环特征药物诱发的毒副作用及其机制研究进展 [J]. 医药导报，2017，36（3）：299-302.

[28] 林良沫，黄春新，韩方璇 . 冠心病患者地高辛中毒的药学监护 [J]. 中国医院用药评价与分析，2016，16（5）：694-696.

[29] 刘秀梅，贺含珍，张一，等 . 临床药师对心功能不全合并地高辛中毒患者的药学监护 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（2）：285-288.

[30] 尹慧 . 某医院地高辛 TDM 结果分析及米力农对地高辛在大鼠体内药代动力学的影响 [D]. 宁夏：宁夏医科大学，2019.

[31] 杨庆宇，刘秀梅，刘平 . 心房颤动合并地高辛中毒老年患者的药学监护 [J]. 中国药师，2017，20（8）：1425-1427.

[32] 李艳，刘欣 . 244 例次地高辛血药浓度监测及影响因素分析 [J]. 中国医院药学杂志，2008，28（13）：1099-1101.

[33] 李国扬 . 地高辛在老年慢性心功能不全患者中的应用及其血药浓度变化研究 [J]. 中国医院用药评价与分析，2015，15（7）：878-880.

[34] Upton AJ，Tilton R，Ogedengbe O，et al. Impact of a pharmacist-inclusive post-discharge clinic on outcomes in heart failure patients with reduced ejection fraction：rates of hospital readmission，emergency department visits，or death [J]. J Am Coll Clin Pharm，2021，4（12）：1516-1523.

[35] 成守龙，苗苗，刘俊 . 地高辛中毒影响因素分析 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（19）：123-125.

（收稿日期：2022-11-29；修回日期：2023-02-09）

替诺福韦在 HBV 感染患者哺乳期使用有效性及安全性的单中心回顾性队列研究

张川[1, 2, 3]，卫蔷[3, 4]，高宝荣[3, 4]，代雨峰[5]，刘丹[1, 2, 3]，张力[3, 4*]，张伶俐[1, 2, 3*]（1. 四川大学华西第二医院药学部，成都　610041；2. 四川大学华西第二医院循证药学中心，成都　610041；3. 四川大学华西第二医院出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都　610041；4. 四川大学华西第二医院妇产科，成都　610041；5. 四川大学华西药学院，成都　610041）

摘要：目的　探索替诺福韦在乙型肝炎病毒（HBV）感染患者哺乳期使用的有效性及安全性。**方法**　采用回顾性队列研究，选取妊娠期服用替诺福韦行 HBV 母婴阻断的患者 114 例，产后按照婴儿是否通过母乳接触到药物分为暴露组（55 例）和对照组（59 例），观察两组产妇哺乳期抗乙肝病毒治疗及病毒载量情况；婴儿乙肝阻断情况及生长发育、健康情况。**结果**　暴露组和对照组新生儿性别、Apgar 评分、早产儿比例、转新生儿科和出生缺陷差异没有统计学意义。暴露组和对照组婴儿随访时平均月龄分别为（8.80±2.90）个月和（8.44±3.04）个月，两组婴儿 HBsAg 阳性率均为 0%。暴露组和对照组出生后身高、体重、所患疾病差异没有统计学意义。**结论**　HBV 感染患者在哺乳期使用替诺福韦未显示对婴儿生长发育有明显影响，哺乳期继续使用替诺福韦的有效性尚需大样本高质量证据。

关键词：慢性乙肝；替诺福韦；母婴传播；母乳喂养；安全性
中图分类号：R714.251　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2201-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.040

Efficacy and safety of tenofovir in the parturient with HBV infection during breast-feeding: a single-center retrospective cohort study

ZHANG Chuan[1, 2, 3], WEI Qiang[3, 4], GAO Bao-rong[3, 4], DAI Yu-feng[5], LIU Dan[1, 2, 3], ZHANG li[3, 4*], ZHANG Ling-li[1, 2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *Evidence-Based Pharmacy Center*, *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 3. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children* (*Sichuan University*), *Ministry of Education*, *Chengdu* 610041; 4. *Department of Obstetrics and Gynecology*, *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 5. *West China School of Pharmacy*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041)

Abstract: Objective　To determine the efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) in patients with hepatitis B virus (HBV) infection during lactation. **Methods**　A retrospective cohort study was conducted to select 114 patients who were treated with TDF during pregnancy to block hepatitis B from mother to child. After the delivery, they were divided into an exposure group (n = 55) and a control group (n = 59) according to whether the infants were exposed to drugs through breast milk. The blocking of hepatitis B in infants and their growth, development and health were observed. **Results**　There were no significant differences in gender, Apgar score, proportion of premature infants, transfer to neonatology and birth defects between the exposure group and the control group. The mean follow-up age of infants in the exposure group and the control group was (8.80±2.90) months and (8.44±3.04) months, respectively. The positive rate of HBsAg in the two groups was 0%. There was no significant difference in the height, weight and health between the exposure group and the control group. **Conclusion**　The use of TDF in HBV infected patients during lactation has no obvious effect on the growth and development of infants. Research with large samples and high-quality evidence of the effect of TDF use during lactation is needed.
Key words: chronic hepatitis B; tenofovir; mother-to-child transmission; breast feeding; safety

作者简介：张川，女，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：zhang_chuan@aliyun.com　*通信作者：张力，女，主任医师，主要从事产科临床研究，email：zhanglilxz@163.com；张伶俐，女，主任药师，主要从事循证药学研究，email：zhlingli@sina.com

乙型肝炎病毒（HBV）感染是全球公共卫生挑战，给全球带来巨大的公共卫生负担，据估计，每年约有 140 万人死于肝炎急性感染及与肝炎有关的肝癌和肝硬化，近一半与 HBV 感染相关[1]。HBV 的母婴传播是高流行区的主要传播方式，阻断 HBV 母婴传播是消除乙型肝炎的关键[2]。我国是乙型肝炎的中高流行区，2015 年孕产妇中乙型肝炎表面抗原（HBsAg）阳性率约为 6.3%[3]。新生儿接受乙型肝炎疫苗＋乙型肝炎免疫球蛋白（HBIG）的联合免疫阻断方法后，母婴传播率从 50% 降至 6%，但在 HBeAg 阳性高病毒载量孕妇中仍高达 11%[4]。妊娠晚期孕妇高病毒载量是导致母婴传播的主要原因，多个权威指南都推荐高病毒载量（HBV-DNA ＞ 2×10^6 IU • mL^{-1}）的孕妇在妊娠中晚期口服核苷（酸）类似物降低病毒载量，阻断 HBV 母婴传播[5-9]。

替诺福韦（TDF）被广泛用于阻断 HBV 的垂直传播[5-6]，但哺乳期使用对哺乳婴儿的安全性尚无详细的数据报道。尽管有药动学研究报道 TDF 在乳汁中的含量非常低[10]，但也有动物研究提示 TDF 对幼年恒河猴的骨密度可能存在一定的影响[11]。本研究通过回顾性队列研究的方法，观察 HBV 感染母亲在哺乳期使用 TDF 的有效性和安全性，为 TDF 在这一特殊时期的使用提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 纳排标准

纳入患者为 2021 年 1 月到 2021 年 10 月在某三甲妇女儿童医院就诊的高 HBV-DNA 载量（HBV-DNA 定量＞ 2×10^5 IU • mL^{-1}）慢性乙型肝炎孕妇，年龄在 20 ～ 45 岁；所有患者在妊娠期间接受替诺福韦治疗，具体治疗方案为口服 TDF 300 mg qd，或口服富马酸丙酚替诺福韦（TAF）25 mg qd；新生儿于出生后 12 h 内完成 HBIG 和第一针乙型肝炎疫苗的接种。排除标准为：① 患者合并有其他可以母婴传播或引起新生儿出生缺陷的病原体感染，如获得性免疫缺陷病毒感染、丙肝病毒感染、TORCH 感染等。其中 TORCH 感染包括弓形虫、巨细胞病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒和其他病原体（如梅毒）等的感染；② 患者的乙型肝炎已明显进展，如已确诊肝硬化或肝癌；③ 胎儿或新生儿处于不良状态，如影像学检查证实孕妇腹中胎儿存在畸形、发育缺陷或母亲患有某些已明确证明会影响胎儿发育的疾病；④ 患者拒绝随访。

1.2 患者分组情况

符合纳排标准的患者根据婴儿是否通过母乳接触到药物分为暴露组及对照组，暴露组为哺乳期继续用药，同时选择纯母乳喂养或混合喂养；对照组为哺乳期继续用药，但选择纯人工喂养或哺乳期停止用药。

1.3 数据获取方法

采用回顾性队列研究的方法，通过病历系统中提取符合纳排标准的患者基本信息，包括患者年龄、分娩孕周、生产方式及分娩情况等；通过电话随访获取患者及婴儿信息，包括患者及婴儿乙型肝炎监测情况、婴儿体格发育情况、神经心理发育情况等。本研究经四川大学华西第二医院医学伦理委员会批准 [批准号：2021 伦审批第（120）号]。

1.4 评价指标

有效性：① 哺乳期抗乙型肝炎病毒药物使用情况及 HBV-DNA 载量变化情况，通过随访获取患者复查 HBV-DNA 载量变化情况；② 婴儿 HBV 阻断情况，通过随访婴儿乙型肝炎疫苗接种情况及乙型肝炎两对半检查结果。安全性：① 两组婴儿生长发育情况，通过随访儿保时的身高和体重、神经心理发育情况获得；② 出生后婴儿患病情况，通过随访婴儿出生后是否发生常见疾病如上呼吸道感染、肺炎、腹泻等。

1.5 统计学方法

以样本均数与总体均数比较的样本量公式计算，计算公式如下：$n=(t_{\alpha/2}+t_{\beta})^2\sigma^2/\delta^2$，本研究以小于或大于卫生部发布的《中国 7 岁以下儿童生长发育参照标准》[12] 中的数据的 2 个标准差作为生长发育障碍的标准，取 $\alpha=0.05$，则 $t_{0.05/2}=1.96$；$\beta=0.2$，$t_{\beta}=0.84$；以 6 ～ 7 月龄儿童的体重样本标准差代替总体标准差 σ，$\sigma=0.68$ kg[12]；以文献中 6 ～ 7 月龄儿童的体重中位数 ±2SD 的数据和对应年龄中国儿童标准体重 ±2SD 处的差值作为允许的相差范围 δ[13]，则 $\delta=0.21$ kg。计算本研究估计的样本量 $n=83$，考虑到失访率为 20%，则全部样本量为 100 人。研究结果计量资料全部经正态性检验，符合正态分布以平均值 ± 标准差表示，组间用独立样本 t 检验；分类变量采用卡方检验，结果以频次和百分数表示，当样本数较少时，则使用 Fisher 精确概率法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。研究使用 Epidata V3.1 进行数据录入，并使用 SPSS V26 进行数据分析。

2 结果

2.1 纳入患者一般情况

共纳入 2021 年 1 ～ 10 月于四川大学华西第二医院就诊的妊娠合并乙型肝炎患者 853 例，其中在妊娠期使用 TDF 或 TAF 的患者共 167 例。对这 167 例患者进行电话随访，符合排除标准 7 例，拒绝随访 14 例，无法联系 32 例，最终共纳入 114 例，暴露组 55 例，分娩婴儿 55 名；对照组 59 例，分娩婴儿 62 名，患者纳入流程图见图 1。

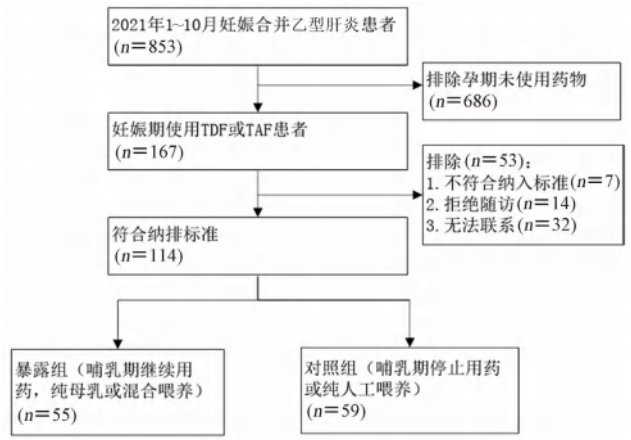

图 1　患者筛选流程图

Fig 1　Patient screening flow chart

2.2　产妇基线信息及治疗情况

两组产妇的年龄、孕产次、生产方式和使用药物种类差异没有统计学意义，产妇基线信息见表 1。暴露组孕周稍大于对照组患者，差异有统计学意义。暴露组小三阳构成比高于对照组，大三阳构成比低于对照组，两组差异有统计学意义。妊娠期使用药物时间两组有差异，暴露组 24 例（43.6%）患者在妊娠前已开始使用抗病毒药物，对照组 37 例（62.7%）在妊娠 24 周后开始使用抗病毒药物，与暴露组大三阳更多，对照组小三阳更多有关。

表 1　产妇基线信息比较

Tab 1　Maternal baseline characteristics

变量	暴露组（n = 55）	对照组（n = 59）	P
年龄 / 岁	31.49±3.096	30.86±3.396	0.307
孕周 / 周	39.15±1.17	38.63±1.48	0.041
初次妊娠患者 [n（%）]	24（43.6%）	26（44.1%）	0.963
初次生产患者 [n（%）]	37（67.3%）	39（66.1%）	0.895
剖宫产 [n（%）]	33（60%）	38（64.4%）	0.628
大三阳患者 [n（%）]	19（34.5%）	33（55.9%）	0.010
小三阳患者 [n（%）]	33（60.0%）	19（32.2%）	
HBsAg 阳性患者 [n（%）]	3（5.5%）	7（11.9%）	
转氨酶异常患者 [n（%）]	5（9.1%）	9（15.3%）	0.316
使用药 [n（%）]			
TDF	54（98.2%）	54（89.8%）	0.143
TAF	1（11.8%）	5（10.2%）	
药物使用时间 [n（%）]			
妊娠前	24（43.6%）	12（20.3%）	0.027
妊娠 23 周及以前	11（20.0%）	10（16.9%）	
妊娠 24 ～ 32 周	18（32.7%）	32（54.2%）	
妊娠 32 周后	2（3.6%）	5（8.5%）	

暴露组 55 例患者在哺乳期均继续使用 TDF；对照组有 26 例患者在哺乳期仍继续用药停止哺乳。这 81 例哺乳期继续用药的患者中，哺乳期监测 HBV-DNA 的有 68 例（84%），HBV-DNA ＜ 2×10^3 IU • mL^{-1} 的有 66 例，占 97%；HBV-DNA ＞ 2×10^3 IU • mL^{-1} 的仅有 2 例（3%）。哺乳期没有继续用药的 33 例患者中，继续监测 HBV-DNA 的仅有 16 例（48%），其中出现 HBV-DNA 拷贝数异常（＞ 2×10^4 IU • mL^{-1}）的有 5 例（31.25%），其中有 1 例虽然 HBV-DNA 拷贝数正常，但产后 3 个月 B 超发现肝结节，仍在继续随访中。

2.3　婴儿出生信息

暴露组和对照组婴儿性别、Apgar 评分、早产儿比例、转新生儿科和出生缺陷差异没有统计学意义，见表 2。对照组中有 1 例婴儿出生后发现肺动脉狭窄，原因不详。转新生儿科原因暴露组新生儿肺炎 3 例，新生儿黄疸 2 例，早产 2 例；对照组新生儿黄疸 1 例，早产 3 例。

表 2　婴儿出生信息比较

Tab 2　Infant birth information

变量		暴露组（n = 55）	对照组（n = 62）	P
性别	男	26（47.3%）	33（53.2%）	0.52
	女	29（52.7%）	29（46.8%）	
Apgar 评分	1 min	9.98±0.13	9.85±0.54	0.07
	5 min	9.98±0.135	9.98±0.127	0.93
	10 min	9.98±0.135	9.98±0.127	0.93
早产儿数 [n（%）]		2（3.6%）	3（4.8%）	1.0
转新生儿科 [n（%）]		7（12.7%）	4（6.5%）	0.25
出生缺陷 [n（%）]		0（0）	1（1.6%）	1.0
出生身高 /cm	男	49.73±1.87	49.30±2.59	0.48
	女	49.00±1.98	48.45±1.96	0.29
出生体重 /kg	男	3.36±0.34	3.16±0.53	0.078
	女	3.15±0.44	3.00±0.43	0.21

2.4　婴儿乙型肝炎疫苗接种情况和 HBV 母婴阻断结果

117 名婴儿中已完成全部免疫预防过程的共 93 人（79.49%），24 例因未满 6 月龄尚未完成免疫预防。行乙型肝炎两对半检查的婴儿共 41 名，均没有出现 HBsAg 阳性，仅抗 -HBs 阳性 34 人（82.9%）；抗 -HBs、抗 -HBc 阳性 3 人（7.3%）；三项抗体均阳性 4 人（9.8%）。

2.5　婴儿生长发育及健康情况

暴露组详细报告婴儿身高体重数据的 52 例，对照组有 54 例，随访时平均月龄暴露组（8.80±2.90）个月，对照组（8.44±3.04）个月。两组大部分婴儿最近一次儿保的身高、体重均处于标准中位数 ±1SD 的正常范围内。两组婴儿的身高和体重的分布差异没有统计学意义（P = 0.407 和 0.781），见表 3。随访两组婴儿健康情况，出生后至少患过一次疾病 65 例，暴露组 28 例，对照组 37 例。疾病以上呼吸道感染为主，其次为肺炎和腹泻，两组差异没有统计学意义。暴露组住院治疗 8 例（1 例肠炎、4 例肺炎和 3 例高胆红素血症），对照组 7 例（1 例肺静脉狭窄、1 例尿路感染、4 例肺炎和 1 例高胆红素血症），见表 4。

表 3 两组婴儿身高体重比较

Tab 3 Infant height and weight

变量	暴露组（n = 52）	对照组（n = 54）	P
年龄 / 月	8.80±2.90	8.44±3.04	0.51
身高			
＜－ 2SD	1（1.9%）	2（3.7%）	0.41
－ 2SD ～－ 1SD	4（5.9%）	8（14.8%）	
－ 1SD ～＋ 1SD	46（88.5%）	40（74%）	
＋ 1SD ～＋ 2SD	1（1.9%）	4（7.4%）	
＞＋ 2SD	0（0）	0（0）	
体重			
＜－ 2SD	1（1.9%）	2（3.7%）	0.78
－ 2SD ～－ 1SD	2（3.8%）	5（9.3%）	
－ 1SD ～＋ 1SD	42（80.8%）	42（77.8%）	
＋ 1SD ～＋ 2SD	7（13.5%）	5（9.3%）	
＞＋ 2SD	0（0）	0（0）	

表 4 两组婴儿出生后所患疾病

Tab 4 Diseases of infant after birth

疾病	暴露组（n = 55）	对照组（n = 62）	P
上呼吸道感染	24（43.6%）	32（51.6%）	0.39
肺炎	4（7.3%）	4（6.5%）	1.0
腹泻	4（7.3%）	9（14.5%）	0.21
高胆红素血症	3（5.5%）	1（1.6%）	0.34
肠炎	1（1.8%）	0（0）	0.47
贫血	1（1.8%）	0（0）	0.47
手指血管瘤	1（1.8%）	0（0）	0.47
过敏（皮疹）	1（1.8%）	0（0）	0.47
尿路感染	0（0）	1（1.6%）	1.0
疱疹病毒感染	0（0）	1（1.6%）	1.0
巨细胞病毒感染	0（0）	1（1.6%）	1.0
肺动脉狭窄	0（0）	1（1.6%）	1.0

3 讨论

有生育需求的慢性乙型肝炎妇女，有抗病毒治疗适应证时，首选不易产生耐药的 TDF，因拉米夫定和替比夫定易产生耐药，不建议首选；已使用拉米夫定或替比夫定者，最好换为 TDF[5]。研究显示妊娠中晚期服用 TDF 可有效预防 HBV 母婴传播 [14]，本研究也未发现母婴阻断失败患儿。TDF 可降低骨密度，因此有担心母亲使用 TDF 会影响胎儿的生长和发育；但评估妊娠期暴露 TDF 的研究发现，胎儿的生长和发育通常不会受影响 [15-17]。但也有研究发现，接受 TDF 治疗的 HBV 感染母亲所生婴儿在出生后 1 个月的骨矿物含量比非 TDF 暴露组低 12%[18]，但尚不明确这些结果的临床意义和长期意义。本研究中患者在孕期均使用了 TDF，婴儿出生体重和生长发育均在正常范围内，未发现骨骼发育异常。

妊娠合并乙型肝炎患者往往担心母乳喂养增加母婴传播风险。本研究中对照组选择人工喂养的主要原因包括担心母乳喂养增加母婴传播风险、药物对婴儿有影响等。暴露组大三阳构成比低于对照组可能是导致患者选择母乳喂养的原因之一。虽然 HBsAg 阳性孕妇的乳汁存在病毒，婴儿出生后接种了 HBIG，母乳喂养不增加额外的 HBV 母婴传播风险。一项针对携带 HBV 母亲所生 147 例婴儿的研究发现，没有证据表明母乳喂养与婴儿将来发生慢性 HBV 感染之间存在关联 [19]。另一项研究纳入了 369 例慢性 HBV 感染母亲分娩的新生儿，所有新生儿接受并完成了 HBV 免疫预防计划，结果发现 101 例母乳喂养的婴儿都未检出 HBsAg 阳性，9 例配方奶喂养婴儿检出 HBsAg 阳性 [20]。因此，无论孕妇 HBeAg 阳性还是阴性，HBV 母婴传播预防临床指南均鼓励新生儿母乳喂养，且在预防接种前就可以开始哺乳 [5]。并且新生儿出生后 12 h 内已完成免疫预防，具有免疫力，乳头皲裂或损伤出血、婴儿口腔溃疡或舌系带剪开造成口腔损伤等，均可哺乳，无需检测乳汁 HBV DNA 水平 [5]。

目前对以母婴阻断为目的抗病毒治疗孕妇，产后停药的安全性存在疑虑，何时停药观点不一。以预防母婴传播为目的的妊娠期抗病毒药物治疗，2020 年乙型肝炎病毒母婴传播预防临床指南建议分娩当日停药，同时孕妇于产后每 2 ～ 3 个月复查一次肝功能，至产后 6 个月，观察产后立即停药是否引起明显肝功能损伤 [5]。产后是否应该立即停药仍有争议。研究显示停药后 40% ～ 50% 的非妊娠乙型肝炎患者谷丙转氨酶（ALT）水平会升高 [21]。由于妊娠的生理特性，HBV 在妊娠早期及产后早期更易被激活，一项观察性研究中发现，12 例妊娠合并乙型肝炎患者停药，有 8 例出现了 ALT 升高，其中 6 例 ALT 升高了 5 倍 [22]。本研究哺乳期继续用药的 81 例患者，在监测 HBV DNA 的患者中出现异常的仅有 2 例；停药的 33 例患者中出现异常的有 5 例，还有 1 例出现了肝结节。亚太地区妊娠合并乙型肝炎指南建议以预防母婴传播为目的的妊娠期抗病毒药物治疗可在产后立即停药或继续治疗至产后 12 周，停药后 24 周内要监测肝功能及病毒载量，但仍提出产后停药时机和监测方案仍待更多的研究；如妊娠期间有 ALT 升高或晚期肝纤维化或肝硬化的孕妇应在分娩后继续长期抗病毒治疗，并应遵循慢性乙型肝炎患者治疗指南 [23]。我国慢性乙型肝炎基层诊疗指南推荐抗病毒治疗主要依据血清 HBV DNA、ALT 水平和肝脏疾病严重程度，同时需结合年龄、家族史和伴随疾病等因素，综合评估患者疾病进展风险，决定是否需要启动抗病毒治疗。对血清 HBV DNA 阳性的慢性乙型肝炎患者，若 ALT 持续异常（＞ 1 倍 ULN）且排除其他原因导致的 ALT 升高，均应考虑开始抗病毒治疗。对于血清 HBV DNA 阳性、ALT 持续正常，有肝硬化或肝癌家族史且年龄＞ 30 岁者，疾病进展风险较大，建议启动抗病毒治疗 [7]。但对于是否应同时满足家族史和年龄要求仍有争议，国外指南建议仅满足一项即可启动抗病毒治疗 [24]。

随访中发现大部分患者对婴儿出生后如何检查是否患有乙型肝炎不清楚，应加强产后乙型肝炎患者出院教育。本研究已完成全部免疫预防过程的共93人，但行乙型肝炎两对半检查的婴儿仅有41例，仅占44%。婴儿随访的适当时间为7～12月龄，即接种第3针乙型肝炎疫苗后1～6个月。接种第3针乙型肝炎疫苗后1～2个月，抗-HBs滴度最高，是随访的最佳时机[5]。检查了乙型肝炎两对半的婴儿中未发现HBsAg阳性，但有抗-HBc和e抗体阳性。因母体IgG抗体能通过胎盘，婴儿体内的母源性抗-HBc最长可持续2年，但只要婴儿HBsAg阴性、抗-HBs阳性，就说明没有感染，而且具有免疫力。因此，应做好乙型肝炎患者出院教育，及时随访婴儿乙型肝炎两对半情况。

本研究关注乙型肝炎患者产后药物使用及对哺乳婴儿的影响，为这一特殊群体提供临床治疗参考意见，但存在以下局限：本研究是回顾性研究，在随访过程中，由于患者记忆模糊容易产生回忆偏倚，我们通过多方面调查患者情况，如调查婴儿身高体重值同时调查儿保就诊记录、生长曲线等，保证数据的一致性。另外，患者数量有限，最终仅纳入了114名乙型肝炎母亲及其分娩的117名婴儿，由于是观察性研究，部分患者还存在信息缺失，可能无法观测到某些罕见事件的发生。未来研究应关注用于母婴阻断的抗乙型肝炎药物治疗在哺乳期是否继续使用的问题。

参考文献

[1] World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021 [EB/OL].（2016-06）[2021-02-01]. https. // www. who. int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/.

[2] 中国肝炎防治基金会，中华医学会感染病学分会，中华医学会肝病学分 . 阻断乙型肝炎病毒母婴传播临床管理流程（2021年）[J]. 临床肝胆病杂，2021，37（3）：527-531

[3] Cui F，Woodring J，Chan P，et al. Considerations of antiviral treatment to interrupt mother-to-child transmission of hepatitis B virus in China [J]. Int J Epidemiol，2018，47（5）：1529-1537.

[4] Liu JF，Yao NJ，Chen TY，et al. Prevalence of mother-to-child transmission of hepatitis B virus：a systematic review and meta-analysis [J]. J Hepatol，2019，70（Suppl 1）：e123-e124.

[5] 中华医学会妇产科学分会产科学组，中华医学会围产医学分会 . 乙型肝炎病毒母婴传播预防临床指南（2020）[J]. 中华妇产科杂志，2020，55（5）：291-299.

[6] 中华医学会感染病学分会，GRADE中国中心 . 中国乙型肝炎病毒母婴传播防治指南（2019年版）[J]. 中华传染病杂志，2019，37（7）：388-396.

[7] 中华医学会感染病学分会，中华医学会肝病学分会 . 慢性乙型肝炎防治指南（2019年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2019，27（12）：938-961.

[8] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol，2017，67（2）：370-398.

[9] Terrault NA，Lok ASF，McMahon BJ，et al. Update on prevention，diagnosis，and treatment of chronic hepatitis B：AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. Hepatology，2018，67（4）：1560-1599.

[10] Hu XT，Wang LM，Xu FJ. Guides concerning tenofovir exposure via breastfeeding：a comparison of drug dosages by developmental stage [J]. Int J Infect Dis，2019，87：8-12.

[11] Siberry GK，Jacobson DL，Kalkwarf HJ，et al. Lower newborn bone mineral content associated with maternal use of tenofovir disoproxil fumarate during pregnancy [J]. Clin Infect Dis，2015，61：996.

[12] 卫生部 . 中国7岁以下儿童生长发育参照标准 [S]. 2009年 [EB/OL]. https：//baike. so. com/doc/24590816- 25466015. html.

[13] 石跃，朱丽影，于雷，等 . HBV感染产妇应用替诺福韦酯期间哺乳婴儿安全性观察 [J]. 中国肝脏病杂志，2018，10（2）：37-42.

[14] 吴小艳，高学松，刘如玉，等 . 妊娠中晚期服用富马酸替诺福韦二吡呋酯预防乙型肝炎病毒母婴传播有效性和安全性的meta分析 [J]. 药物不良反应杂志，2020，22（2）：85-94.

[15] Gibb DM，Kizito H，Russell EC，et al. Pregnancy and infant outcomes among HIV-infected women taking long-term ART with and without tenofovir in the DART trial [J]. PLoS Med，2012，9：e1001217.

[16] Wang L，Kourtis AP，Ellington S，et al. Safety of tenofovir during pregnancy for the mother and fetus；a systematic review [J]. Clin Infect Dis，2013，57：1773.

[17] Salvadori N，Fan B，Teeyasoontranon W，et al. Maternal and infant bone mineral density 1 year after delivery in a randomized，controlled trial of maternal tenofovir disoproxil fumarate to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus [J]. Clin Infect Dis，2019，69：144.

[18] Gill US，Al-Shamma S，Burke K，et al. Factors determining bone mineral density loss in chronic hepatitis B patients：is tenofovir disoproxil fumarate the main culprit? [J]. Gut，2011，60：A230.

[19] Beasley RP，Stevens CE，Shiao IS，et al. Evidence against breast-feeding as a mechanism for vertical transmission of hepatitis B [J]. Lancet，1975，2：740.

[20] Hill JB，Sheffield JS，Kim MJ，et al. Risk of hepatitis B transmission in breast-fed infants of chronic hepatitis B carriers [J]. Obstet Gynecol，2002，99：1049.

[21] Seto WK，Hui AJ，Wong VW，et al. Treatment cessation of entecavir in Asian patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B：a multicentre prospective study [J]. Gut，2015，64：667-672.

[22] Kim HY，Choi JY，Park CH，et al. Outcome after discontinuing antiviral agents during pregnancy in women infected with hepatitis B virus [J]. J Clin Virol，2013，56：299-305.

[23] Manoj K，Zaigham A，Milad A，et al. Asian Pacifc association for the study of liver（APASL）guidelines：hepatitis B virus in pregnancy [J]. Hepatol Inter，2022，16：211-253.

[24] 庄辉 . 对ALT正常HBeAg阳性或阴性慢性乙型肝炎病毒感染患者治疗是否需同时兼备年龄和家族史？[J]. 中华肝病杂志，2022，30（2）：230-232.

（收稿日期：2022-09-10；修回日期：2022-11-08）

毒性中药饮片在某院肺系疾病中的应用

李悦[1, 2, 3]，陈树和[1, 2, 3]，高越[1, 2, 3*]（1. 湖北省中医院，武汉 430061；2. 湖北省中医药研究院，武汉 430061；3. 湖北中医药大学附属医院，武汉 430061）

摘要：目的 分析湖北省中医院肺病科门诊毒性中药的临床应用情况，探讨其用药的临床特点。**方法** 利用医院 HIS 系统分析 2020 年 7 月至 2021 年 7 月的含毒性中药饮片的处方。**结果** 收集整理治疗肺系疾病的含有毒性中药的处方共 3282 张。处方中含有 20 种毒性中药，从药味、剂量、病种等方面进行分析总结，其中，苦杏仁、吴茱萸、蜈蚣、全蝎为最常用。在药物使用剂量方面，有 15 种毒性中药出现超药典使用剂量的情况。**结论** 肺病科门诊使用毒性中药总体用药情况符合临床疾病需求，但仍有部分用药问题亟待改进，以确保用药安全。

关键词：毒性；中药；处方分析；用药频率；合理用药
中图分类号：R288 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2206-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.041

Toxic Chinese herbal pieces for pulmonary diseases in our hospital

LI Yue[1, 2, 3], CHEN Shu-he[1, 2, 3], GAO Yue[1, 2, 3*] (1. *Hubei Hospital of Tradional Chinese Medicine*, *Wuhan* 430061; 2. *Hubei Academy of Traditional Chinese Materia Medica*, *Wuhan* 430061; 3. *Affiliated Hospital of Hubei University of Traditional Chinese Medicine*, *Wuhan* 430061)

Abstract: Objective To analyze the application of toxic Chinese herbs in the Department of Pulmonary Disease in our hospital, and determine their clinic characteristics. **Methods** The Hospital Information System was used to analyze the prescriptions of toxic Chinese herbal pieces from July 2020 to July 2021. **Results** Totally 3282 of prescriptions were included with toxic Chinese herbs. Totally 20 toxic Chinese medicines were used. Armeniacae semen amarum, euodiae fructus, scolopendra, and scorpios were most common, and 15 toxic Chinese medicines were overdosed. **Conclusion** Basically, the use of toxic Chinese herb in our hospital meet the requirement of patients' diseases reasonably. Some problems need improvement to ensure medication safety.

Key words: toxicity; traditional Chinese medicine; prescription analysis; medication frequency; rational administration

毒性中药历来就受医家的重视与关注，并在临床实践中总结出其疗效确切且安全的应用方法。最早的中药学专著《神农本草经》[1]首创了三品分类法，将有毒中药列为下品，多为佐使之用，认为其“不可久服”。张仲景在《伤寒论》[2]和《金匮要略》[3]的多个方剂中应用了附子、巴豆、大戟、吴茱萸等毒性中药。张景岳在《类经·五脏病气法》[4]中也提出“药以治病，因毒为能”，说明了可以利用中药的毒性治疗疾病，得当则能起沉疴，失当则会危及生命。张亭栋教授[5]在治疗急性早幼粒细胞白血病应用了毒性中药砒霜（三氧化二砷），取得了良好疗效，并向世界推广，这是毒性中药在现代医学中使用的新范例。

《中国药典》[6]2020 年版一部中收录中药材和饮片共 616 种，其中关于毒性中药的描述均在其“性味与归经”目录下。共收载毒性中药 83 种，根据毒性大小进行划分，大毒品种 10 种，有毒品种 42 种，小毒品种 31 种。本文按《中国药典》2020 年版一部毒性中药目录收集 2020 年 7 月至 2021 年 7 月期间肺病科门诊涉及毒性中药的所有中药处方，对其治疗疾病的用药规律和合理使用等方面进行统计分析。

1 资料与方法

利用 HIS 系统收集整理本院肺病科门诊 2020 年

基金项目：湖北省卫生健康委员会中医药科研项目（No. ZY2019M027）。
作者简介：李悦，男，硕士，副主任医师，主要从事中西医结合防治呼吸系统疾病研究，email：80685622@qq.com *通信作者：高越，女，硕士，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事中药临床药学研究，email：gaoyuegaoyang@126.com

7月至2021年7月治疗肺系疾病（如咳嗽病、肺胀病、哮病）的中药饮片处方。依据《中国药典》2020 年版一部，对处方中出现的毒性中药饮片使用频率情况，根据毒性大小和剂量范围进行调查研究与分析。

2　结果

2.1　处方基本情况

得到 7807 张肺病科门诊中药处方，其中 3282 张为含有毒性中药的处方，占总处方数的 42.04%。

2.2　患者年龄分布

3282 张处方中男性患者处方有 1884 张，占 57.4%，女性患者处方有 1398 张，占 42.6%。患者年龄分布范围为 14 ～ 95 岁，平均年龄为 62.7 岁，具体见表 1。

表 1　患者年龄性别分布

Tab 1　Distribution of the patients' age and gender

年龄 / 岁	性别（男 / 女）	处方数	占处方百分比 /%
≤ 30	59/52	111	3.4
31 ～ 40	152/204	356	10.9
41 ～ 50	267/118	385	11.7
51 ～ 60	442/252	694	21.1
61 ～ 70	640/425	1065	32.4
71 ～ 80	252/247	499	15.2
＞ 80	72/100	172	5.3

2.3　毒性中药的使用情况

经统计，肺病科门诊使用毒性中药 20 种，使用频率排在前 3 位的中药分别是苦杏仁、吴茱萸、土鳖虫，而罂粟壳、艾叶、马钱子使用最少。其中，超药典剂量使用的有 15 味，除山豆根、重楼、绵马贯众为生品外，其余品种均为炮制品。具体见表 2。

2.3.1　使用频率较高的毒性中药的用药分析　从表 2 可知苦杏仁是本院肺系疾病中最常用的毒性中药。本品味苦，性微温，有小毒，既能润肺止咳化痰，又能润肠通便。肺系疾病患者往往痰多，咳痰困难，憋闷喘息，部分患者还有大便不畅，费力排便则喘息明显加重的情况。现代研究认为，苦杏仁具平喘镇咳，抗炎止痛，抗氧化等作用[7]，配伍桔梗等调畅肺的气机，增强止咳、祛痰、平喘的功效，有利于提高疗效，且可改善咳、痰、喘等多种呼吸道症状。

吴茱萸辛，苦，热，有小毒，具散寒止痛，降逆止呕，助阳止泻之功。在肺系疾病中的临床应用有以下两方面：肝寒犯肺者，咳吐白稀痰，甚者呕吐涎沫，选用吴茱萸能达木郁，温阳散寒，痰饮自消；脾胃虚寒者，清浊混杂，气机上逆，胃气失于和降，可犯肺而喘。吴茱萸毒性多

表 2　肺病科门诊毒性中药使用情况

Tab 2　Use of toxic Chinese medicine in the Outpatient Department of Lung Diseases

序号	中药饮片	毒性大小	规定剂量 /g	超量剂量 /g	处方数 / 张	超量处方数 / 张	占毒性中药处方比例 /%	占肺病科门诊总处方使用比率 /%	超剂量百分比 /%
1	苦杏仁	有小毒	5 ～ 10	12 ～ 20	1598	138	48.69	20.47	8.64
2	吴茱萸	有小毒	2 ～ 5	6 ～ 10	457	10	13.92	5.85	2.19
3	土鳖虫	有小毒	3 ～ 10	12 ～ 20	275	32	8.38	3.52	11.64
4	水蛭	有小毒	1 ～ 3	6 ～ 10	253	146	7.71	3.24	57.71
5	蜈蚣	有毒	3 ～ 5	无	185	0	5.64	2.37	0
6	全蝎	有毒	3 ～ 6	8 ～ 20	153	81	4.66	1.96	52.94
7	苍耳子	有毒	3 ～ 10	12 ～ 20	127	19	3.87	1.63	14.96
8	山豆根	有毒	3 ～ 6	8 ～ 12	111	66	3.38	1.42	59.46
9	川楝子	有小毒	5 ～ 10	12 ～ 15	31	18	0.94	0.40	58.06
10	附子	有毒	3 ～ 15	20	24	3	0.73	0.31	12.50
11	制天南星	有毒	3 ～ 9	10 ～ 20	19	17	0.58	0.24	89.47
12	重楼	有小毒	3 ～ 9	10	10	6	0.31	0.13	60.00
13	绵马贯众	有小毒	4.5 ～ 9	10	10	8	0.31	0.13	80.00
14	刺蒺藜	有小毒	6 ～ 10	12 ～ 30	8	6	0.25	0.10	75.00
15	蛇床子	有小毒	3 ～ 10	15 ～ 20	6	3	0.18	0.08	50.00
16	仙茅	有毒	3 ～ 10	12 ～ 15	5	2	0.15	0.06	40.00
17	白附子	有毒	3 ～ 6	无	4	0	0.12	0.05	0
18	罂粟壳	有毒	3 ～ 6	无	3	0	0.09	0.04	0
19	艾叶	有小毒	3 ～ 9	无	2	0	0.06	0.03	0
20	马钱子	有大毒	0.3 ～ 0.6	无	1	0	0.03	0.01	0
	总计				3282	555	100.00	42.04	16.91

表现为肝毒性[8]，临床上对于有肝脏疾病的患者在使用该药时应更为谨慎。

土鳖虫、水蛭、蜈蚣、全蝎均为虫类药，也是肺病科较为常用的毒性中药。中医学认为[9]，在肺系疾病中，虫类药的作用主要表现在化痰、散瘀、祛风等方面；现代药理学研究表明，土鳖虫、水蛭、蜈蚣、全蝎等毒性药物均具有抗肿瘤、抗炎、调节免疫等作用，土鳖虫和水蛭还具有抗

凝血的作用[10-14]。因肺胀病、哮病、肺痿病、肺癌都有反复发作或逐渐加重的特点，病程长，往往难以速效，根据叶天士的“久病入络”理论及“当以虫蚁疏逐，以搜剔络中之邪”的思想，在止咳平喘药物的基础上加虫类药物后往往力专效宏。土鳖虫、水蛭正是搜剔化瘀通络的代表性药物。

土鳖虫咸，寒，有小毒，具破血逐瘀作用，《神农本草经》谓其“破坚下血闭”[1]。水蛭咸、苦，平，有小毒，擅长破血逐瘀，《神农本草经》载有：“主逐恶血瘀血、破血瘕积聚 ..... 生池泽”[1]。瘀血停留日久，气机阻滞，络脉不通，祛瘀血生新血方能恢复生理机能，仅用活血之品力之不及，非破血逐瘀之类不能起效。水蛭则无此弊端，正如张锡纯言其“破瘀血而不伤新血”，临床使用更为广泛。如杨志欣等[15]利用水蛭与虻虫配伍，治疗病机见瘀血内阻、气机不利、津液不布者。

蜈蚣辛，温，有毒，具有息风通络，攻毒散结的功效，因其走串之力最速，张锡纯谓之“凡气血凝聚之处皆能开之”。全蝎辛，平，有毒，能息风镇痉，通络止痛，攻毒散结；能使浊散瘀化，毒清络解，正如《本草汇言》所述：“全蝎攻风痰风毒之药也”。蜈蚣、全蝎两者功效相似，均为息风止痉要药，常相须为用，以提高息风通络的功效。

苍耳子在肺系疾病中主要应用在咳嗽病、哮病和肺痈病上。很多呼吸道疾病患者常伴随鼻痒、流涕、喷嚏等症状，苍耳子苦、甘、辛、温，能散风寒，通鼻窍，祛风湿，止痛。《本草备要》言其“治鼻渊”，一方面肺开窍于鼻，肺和则鼻知香臭，肺脏不调，邪气壅滞而鼻塞流涕；另一方面，涕为肺之液，鼻窍不通，甚至返流于肺，阻碍肺金之气，气机不畅，水液停聚，咳喘难平，此时肺鼻同治事半功倍[16]。现代药理研究表明苍耳子有抗菌、抗炎、镇痛、抗过敏等作用[17]。苍耳子虽仅有小毒，但剂量大于 10 g 或疗程过长，会引起蓄积性中毒，导致多脏器功能损害，以肝肾功能损害最为严重[18]，在临床上也需引起注意。

山豆根能利咽喉消肿疡，是喉科要药。程钱等[19]研究认为，山豆根具有抗炎、抗菌、抗病毒、调节免疫、抗肿瘤等作用。肺主气，声由气发，喉为肺之门户，也是气息出入之所，肺气郁闭，则会失音或声音嘶哑，使用山豆根甚为对症。山豆根成分复杂，造成毒性反应的成分并不十分明确。研究表明，山豆根造成的毒性反应最易出现的为神经系统症状，其次为恶心呕吐等胃肠道症状[20]，且有一定的“量毒关系”，因此严格把控好用药剂量是必要的。

其他毒性中药中，重楼能清热解毒、消肿止痛，主要用于治疗肺癌。贯众清热解毒，擅长治疗风热感冒。蛇床子温肾壮阳；仙茅补肾阳、强筋骨、祛寒湿；两者均为温肾助阳药，但门诊治疗中使用较少，因肺系疾病证型中有阴伤、痰湿等，肺气亏虚亦多见，通常以滋阴润肺，理气化痰，健脾益肺为治即可获效。有肾阳亏虚者以肉桂、附子、紫河车等亦能温补肾阳；阳虚水泛明显者往往病情危重，需综合治疗，故蛇床子、仙茅较少应用在肺病科门诊。

罂粟壳能涩肠止泻、敛肺止咳，但仅偶尔应用于肺癌引起的顽固性咳嗽。因临床上引起咳嗽的病因较多，治疗也需针对病因进行，或疏风，或滋阴，或祛痰，或清肝，或健脾，辨证施治可获得确切疗效。罂粟壳具成瘾性，也是唯一一味属于麻醉药品管理的中药饮片，临床使用需另外开具麻醉处方，进一步限制了它在门诊中的使用。马钱子则由于有大毒，安全剂量小，故多外用，肺病科门诊仅有 1 例肺癌患者使用，剂量为 0.5 g 内服。

2.3.2 超剂量用毒性中药情况分析 药物的超量使用存在着一定的安全隐患，毒性中药更是如此，为规避可能会出现的风险，保障医疗安全，本研究对超药典用量的中药饮片进行分析。从表 2 中可以得出，在肺系疾病中，超量使用最多的中药为水蛭、苦杏仁、全蝎、山豆根。

经分析得出超剂量用药主要有以下几个方面原因：

其一是某些药物的标准剂量较小，如全蝎 3 ～ 6 g，水蛭 1 ～ 3 g，山豆根 3 ～ 6 g，这些在临床使用过程中容易超量。含全蝎和水蛭的超量处方，多为肺胀病及肺痿病后期患者，其瘀象明显，需加强活血通络的力量，或是肺癌患者，需增强解毒散结的功效，这是长期临床过程中总结的实践经验。目前本院临床使用中并未发现和用量相关的严重不良反应，但仍需关注，做好用药后的随访。山豆根的超量现象较为普遍，查阅的处方均配伍甘草以解毒，随访患者中未发现有心慌、恶心、呕吐等不良反应，但药典中规定山豆根不可久服，应中病即止，故临床上仍尽量按药典规定剂量使用，或选用替代品，以免发生不良后果。

其二是某些药典规定剂量最大量为 9 g 的饮片，常因包装规格为 10 g 导致处方剂量超量，如 17 张制天南星超量的处方中，有 13 张均为此原因。绵马贯众更为明显，8 张超量处方全部开具 10 g。

其三是肺癌患者的中药处方中毒性中药配伍较多，剂量较大，这与肺癌的病因病机特点相关。肺癌的发病机制，癥积致病，瘀滞阻络和毒邪致病为其主要因素，治疗上以消积、祛瘀、解

毒为重要的治法。因此肺癌的治疗常以多种毒性中药联用，并且往往使用剂量较大。在临床上值得注意的是肿瘤患者本身存在正气不足的问题，在攻伐的同时，需固护患者的胃气，体质虚弱且同时长期服用抗肿瘤中药的患者建议减小毒性药物剂量并定期复查血常规、肝肾功能等。

从患者的适应证上分析，肺癌患者的超量使用最为频繁，这与本病特点相关。其次为咳嗽病，超量使用山豆根、苦杏仁的处方较多，山豆根因标准剂量较小，临床容易出现超量使用的情况，苦杏仁超量使用在整体含苦杏仁的处方中占比较小（8.6%），多数还是按规定剂量使用。通过和开方医师沟通，超剂量使用苦杏仁多为两方面原因：一为部分肺系病患者同时存在大便不通的情况，为兼顾润肠通便作用增加疗效，苦杏仁使用至每剂 15 g；二是患者的咳痰情况较重，常规剂量不一定有较好的临床疗效，所以通过增加剂量来提高临床疗效。

从患者人群上分析，除肺癌患者，多为老年患者（≥ 65 岁），其多因生理机能有不同程度的退行性改变，肝肾功能也存在不同程度的减退，或合并有其他多种基础疾病，临床上在毒性饮片的使用中会比较注重药物的剂量和疗程，较少超剂量使用毒性中药或药性峻猛的饮片。

从总体上来说，我国临床用药存在毒性中药饮片超剂量使用现象。超剂量使用与不良反应的发生存在一定的关联，虽然目前本院超剂量使用的毒性中药尚未发现不良反应的发生，但仍需医师严格把控中药饮片用药剂量，特别是毒性较大的中药饮片，确保用药的合理性，提高用药的安全性。

2.3.3　毒性中药联用情况　毒性中药的合用可能会加重毒副作用，因此，对毒性中药的联用情况进行统计，表 3 列举了二联和三联使用最多的五组毒性中药。

表 3　毒性中药品种联用情况排序表

Tab 3　Ranking of the combined use of toxic traditional Chinese medicine

序号	联用毒性中药品种	处方数
1	苦杏仁、吴茱萸	347
2	苦杏仁、水蛭	198
3	土鳖虫、水蛭	127
4	苦杏仁、土鳖虫	109
5	苦杏仁、山豆根	67
6	苦杏仁、吴茱萸、水蛭	132
7	苦杏仁、水蛭、土鳖虫	116
8	苦杏仁、吴茱萸、土鳖虫	93
9	苦杏仁、吴茱萸、全蝎	91
10	苦杏仁、水蛭、全蝎	72

从表 3 中可以看出，毒性中药在肺系疾病中的联用基本上都是以苦杏仁为基础，肺系疾病多有咳喘的临床症状，苦杏仁为治疗肺系疾病的要药。苦杏仁有小毒，但炒制后能起到温肺减毒的功效，在常规使用时极少见不良反应发生，虽常与其他有毒药物联用，仍无需刻意降低用药剂量。苦杏仁最常配伍使用的毒性中药为吴茱萸，分析认为，肺系疾病常用方剂主要作用为清肺化痰，养阴润燥，更易导致肺阳虚衰，吴茱萸擅治肝寒咳嗽，有温经功效，联用可以提高疗效。毒性药物联用时的剂量较单用时减小，且在老年患者中未发现超药典量使用的情况，均在安全用药的范围之内，说明临床针对毒性中药联用的剂量还是较为谨慎。

2.4　不同肺系疾病门诊毒性中药使用情况

不同肺系疾病使用的毒性中药有所不同，整体而言，苦杏仁、吴茱萸、蜈蚣、全蝎为最常使用毒性中药，具体见表 4。

表 4　各种肺系疾病使用的毒性中药

Tab 4　Toxic traditional Chinese medicine for lung disease

病名	用药频次			
咳嗽病	苦杏仁（529）	吴茱萸（222）	山豆根（64）	苍耳子（50）	全蝎（39）
肺胀病	苦杏仁（594）	水蛭（145）	吴茱萸（139）	土鳖虫（101）	全蝎（61）
哮病	苦杏仁（204）	苍耳子（35）	吴茱萸（35）	全蝎（25）	蜈蚣（11）
肺痿病	苦杏仁（104）	水蛭（64）	土鳖虫（21）	全蝎（15）	蜈蚣（6）
肺痈病	苦杏仁（82）	吴茱萸（24）	苍耳子（10）	山豆根（8）	蜈蚣（5）
肺癌	土鳖虫（105）	蜈蚣（86）	苦杏仁（80）	全蝎（13）	水蛭（13）

2.4.1　毒性中药在咳嗽病中的应用　咳嗽是多种肺系疾病常见的共有临床症状，将门诊中以咳嗽为主要症状的咽炎、急慢性支气管炎、社区获得性肺炎、咳嗽变异性哮喘归于咳嗽病。肺病科门诊中使用最多的五味毒性中药依次是苦杏仁、吴茱萸、苍耳子、山豆根、全蝎。苦杏仁润肺化痰，降气止咳，对于多种证型咳嗽均有效。吴茱萸能治肝寒犯肺和脾胃虚寒的咳嗽。鼻塞、咽痒是咳嗽的主要伴随症状，苍耳子、山豆根分别治疗咳嗽病中伴有鼻窍不通，鼻塞流涕和咽痒咽痛患者，使用较为频繁。咳嗽变异性哮喘患者在肺病科门诊也很常见，表现为咳嗽气急，喉痒呛咳，符合“风盛则挛急”的特点，晁恩祥教授[21]将本病归于“风咳”，并率先提出“以风立论”，确立了“疏风止咳，缓急解痉”的治法。药物使用上除应用蝉蜕、地龙等疏风药物外，对于咳嗽剧烈，风盛挛急明显者，加入全蝎、蜈蚣等解痉通络之品。

2.4.2　毒性中药在肺胀病中的应用　肺胀病常用五味有毒药物依次为苦杏仁、水蛭、吴茱萸、土鳖虫、全蝎。本病常由咳嗽、喘病、哮病反复发作或失治误治引起，其临床特点主要表现为咳嗽

咳痰，气短而喘，胸中胀闷。因其病程较长，后期往往存在痰瘀互结的临床表现。单用祛痰行气之品往往疗效欠佳，此时加入水蛭、土鳖虫、全蝎等虫类药破血逐瘀，使瘀祛痰消，提高疗效。肺胀病后期损伤肺气及脾阳，对于咳吐清稀白痰，伴反酸漕杂吞酸者应用吴茱萸尤佳。

2.4.3 毒性中药在哮病中的应用 哮病最常用的毒性中药为苦杏仁、苍耳子、吴茱萸、全蝎和蜈蚣。哮病常因肺、脾、肾等脏气亏虚，水液代谢异常，日久不化，聚而成痰，痰邪伏肺，外邪引动伏痰，痰气相搏，阻于肺与气道，使气道挛急，故而发病。临床治疗上以祛风解痉，化痰利气为大法。全蝎、蜈蚣解痉止咳，祛风散结，哮病患者多有过敏性鼻炎病史，鼻塞喷嚏为常见兼证，苍耳子也常配伍其中。

2.4.4 毒性中药在肺痿病中的应用 肺痿病最常使用的毒性中药与哮病类似，只是虫类药物使用更多，分析其原因，肺痿病病程长，患者面唇紫绀，杵状指，舌下络脉迂曲的血瘀征象和气短、疲乏、多汗的气虚表现更明显。血瘀阻碍气的运行，气滞进一步加重血瘀，益气活血通络是其主要治则。应用蜈蚣、全蝎主要是取其搜剔通络的功效，配合土鳖虫、水蛭更能增强其破血逐瘀的作用。

2.4.5 毒性中药在肺痈病中的应用 肺痈病多因感染外邪，失治误治，内犯于肺，或痰热灼肺，致肺叶生疮，破溃化脓的肺系疾病。临床表现为咳嗽，咳大量腥臭黄绿色脓痰。苦杏仁润燥除痰，下气平喘，对于肺痈的痰多，咳甚伴喘息尤为适用，在门诊毒性中药中使用最多。吴茱萸虽辛热，但在治疗肺痈时常配伍黄连，且吴茱萸用药剂量小于黄连，使全方不会过于温燥，同时取苍连汤之燥湿化痰，清胃和中之意。肺痈病患者也常兼有咽部不适和鼻塞流涕，遂伍以山豆根和苍耳子治疗。

2.4.6 毒性中药在肺癌中的应用 肺癌多由于正气亏损，阴阳平衡失调，六淫等邪气乘虚袭肺，邪滞胸中，气机不利，水液聚而成痰，日久痰瘀阻络而发为本病。治疗上在固护正气的基础上，以化痰祛瘀解毒为大法。门诊常用毒性药物蜈蚣、全蝎、土鳖虫、水蛭，其走串搜逐之力强，引药直达病所，能化痰散结，通络祛瘀，解毒止痛。其中蜈蚣、全蝎均擅长于搜风通络止痛，常相须为用。土鳖虫活血祛瘀止痛，水蛭破血逐瘀消癥，均为肺癌常用药物。

3 结语

毒性中药是中医药宝库中的瑰宝，应用得当可起沉疴，救患者于垂危，使用不当则极易给患者带来身心的损害。毒性中药在本院肺病科门诊的使用较为广泛，最常用的毒性中药为苦杏仁、吴茱萸、土鳖虫和水蛭。因其毒性小，疗效确切而广泛应用在咳嗽病、哮病、肺胀病、肺痿病、肺痈病、肺癌等多种肺系疾病中。本研究中超剂量使用毒性中药也较为普遍，接近 20% 的处方中毒性中药饮片超药典用量。经综合分析并非开方医师的处方失误或不合理使用，而是因患者疾病特点、临床治疗经验以及药品包装规格限定等。临床上需强调辩证准确，药证相符，减少不良反应的发生。

毒性中药临床安全用药的关键除剂量外也包括炮制是否得当，为降低处方的毒性，本院肺病科使用的毒性中药饮片多数经过了炮制，特别是毒性较大的饮片如附子、天南星等，炮制品可降解或破坏中药中的毒性成分，提高临床用药的安全性，临床在关注其疗效的同时，一方面应注意监测毒性中药的不良反应，另一方面通过规范的炮制方法及配伍使毒性中药增效减毒，提高毒性中药的合理使用，更好服务于临床。

参考文献

[1] 马继兴 . 神农本草经辑注 [M]. 北京：人民卫生出版社，2013.

[2] 张仲景 . 伤寒论 [M]. 北京：人民卫生出版社，2005.

[3] 张仲景 . 金匮要略 [M]. 北京：人民卫生出版社，2005.

[4] 张景岳 . 医学全书 [M]. 李志庸，主编 . 北京：中国中医药出版社，1999.

[5] 张亭栋 . 含砷中药治疗白血病研究——谈谈癌灵 1 号注射液对白血病的治疗 [J]. 中国中西医结合杂志，1998（10）：581.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.

[7] 武晏屹，苗明三 . 基于临床应用的苦杏仁配伍规律分析 [J]. 中医学报，2020，35（7）：1505-1508.

[8] 魏舒婷，刘元乾，黄坚，等 . 吴茱萸化学成分、药效及肝毒性的研究进展 [J]. 世界中医药，2020，15（23）：3580-3585，3592.

[9] 尹硕淼，高志凌，聂卫群 . 虫类药在肺系疾病中的应用探析 [J]. 陕西中医药大学学报，2021，44（5）：59-62.

[10] 王鹏程，吕文纲 . 土鳖虫质量控制及药理作用研究进展 [J]. 山东中医杂志，2016，35（9）：846-848.

[11] Hildeb R Andt JP，Lemke S. Small bite，large impact-saliva and Sali-varymolecules in the medicinal leech，Hirudo medicinalis [J]. Naturwissenschaften，2011，98（12）：995-1008.

[12] 唐小杰，冯奕钧，崔雅妹，等 . 水蛭内科临床应用研究进展 [J]. 实用中医内科杂志，2020，34（10）：86-89.

[13] 汲丽丽，吕邵娃，杨志欣 . 蜈蚣化学成分与药理作用研究进展 [J]. 特产研究，2020，42（4）：75-84.

[14] 沈仕伟，邸莎，韦宇，等 . 水蛭临床应用及其用量 [J]. 吉林中医药，2019，39（3）：313-316.

[15] 杨志欣，汲丽丽，刘慧，等 . 全蝎化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1523-1529

[16] 汪昂撰 . 本草备要 [M]. 北京：人民卫生出版社，2005.
[17] 于盼盼，杨忠杰，郭丽娜，等 . 基于网络药理学苍耳子的物质基础和作用机制的分析 [J]. 安徽医药，2020，24（2）234-237，425.
[18] 聂安政，高梅梅，贾文瑞，等 . 苍耳子安全问题探讨与合理用药思考 [J]. 中国中药杂志，2019，44（24）：5336-5344.
[19] 程钱，王金凤，王宝丽，等 . 山豆根化学成分、生物活性及质量控制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2017，19（7）：119-125.
[20] 汪琼，史艳平，梁蓬勃 . 儿童山豆根中毒 17 例临床报道及分析 [J]. 时珍国医国药，2020，31（8）：1934-1936.
[21] 晁恩祥 . 晁恩祥临证方药心得 [S]. 北京：科学出版社，2012.

（收稿日期：2022-01-07；修回日期：2022-03-02）

超重 / 肥胖对感染性心内膜炎患者的万古霉素药动学参数及不良反应的影响

吴莉莉[1]，夏晨[1]，詹志坤[2]，曹媛[1]，庞佩珊[1]，徐巧芬[1]，张红雨[1]，王妍[1*]（1.佛山市第一人民医院药学部，广东　佛山　528000；2.福建医科大学附属第一医院药学部，福州　350004）

摘要：目的　分析超重 / 肥胖对感染性心内膜炎患者万古霉素药动学的影响。**方法**　以 2019 年 4 月～ 2021 年 8 月静脉使用万古霉素且进行药物浓度监测的感染性心内膜炎患者为研究对象进行回顾性研究，根据体质量指数（BMI）将患者分为正常组（BMI ＜ 24 kg • m^{-2}）和超重 / 肥胖组（BMI ≥ 24 kg • m^{-2}），采用 Bayesian 反馈法预估药动学参数并分析超重 / 肥胖对万古霉素药动学及不良反应的影响。**结果**　超重 / 肥胖组患者的药动学参数谷浓度（C_{min}）、药时曲线下面积（*AUC*）和表观分布容积（V_d）显著高于正常组（$P < 0.05$），而谷浓度达标率和治疗有效率明显低于正常组（$P < 0.05$）。相比正常组患者，超重 / 肥胖组患者总体不良反应发生率增加。**结论**　对于感染性心内膜炎合并超重 / 肥胖患者，有必要开展基于治疗药物监测及 Bayesian 反馈法的万古霉素个体化给药方案设计。

关键词：万古霉素；超重 / 肥胖患者；感染性心内膜炎；药动学
中图分类号：R96，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2211-00
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.042

Effect of overweight/obesity on the pharmacokinetic parameters and adverse reactions of vancomycin in patients with infective endocarditis

WU Li-li[1], XIA Chen[1], ZHAN Zhi-kun[2], CAO Yuan[1], PANG Pei-shan[1], XU Qiao-fen[1], ZHANG Hong-yu[1], WANG Yan[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *The First People's Hospital of Foshan, Foshan Guangdong* 528000; 2. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University*, *Fuzhou* 350004)

Abstract: Objective　To determine the effect of overweight/obesity on the pharmacokinetic parameters of vancomycin in patients with infective endocarditis. **Methods**　The retrospective analysis was conducted. Patients data from the hospital medical record system from April 2019 to August 2021 during the cardiovascular surgery with use of vancomycin in were collected. The subjects were divided into a normal group (BMI ＜ 24 kg • m^{-2}) and an overweight/obesity group (BMI ≥ 24 kg • m^{-2}) according to body mass index (BMI). According to the population pharmacokinetic model, the measured trough concentration was used for a Bayesian approach to estimate individual pharmacokinetic parameters and analyze influence of

基金项目：2022 年度佛山市卫生健康局医学科研课题（No.20220379）。
作者简介：吴莉莉，女，博士，主管药师，主要从事临床药学方面的研究，email：xnwll668@126.com　*通信作者：王妍，女，博士，副主任药师，主要从事临床药学方面的研究，email：77565663@qq.com

overweight/obesity on the pharmacokinetics of vancomycin. **Results** The C_{min}, AUC and V_d of vancomycin in the overweight/obesity patients were higher than those in the normal group, whereas the target attainment rate of C_{min} and therapeutic efficiency of vancomycin in the overweight/obesity patients were lower than those of the normal group. Compared with the normal group, the overall incidence of adverse reactions in the overweight/obesity group was increased. **Conclusion** Among obse patients with infective endocarditis individual dosage regimen based on TDM coupled with Bayesian forecasting is necessary.

Key words: vancomycin; overweight/obesity patient; infective endocarditis; pharmacokinetics

感染性心内膜炎是临床常见的心血管系统感染性疾病，其发病率逐年升高，病情发展迅速，治疗困难，院内及远期病死率高。调查显示[1]，感染性心内膜炎的院内病死率高达 30%。感染性心内膜炎多为革兰氏阳性菌感染，主要包括金黄色葡萄球菌、草绿色链球菌、肺炎链球菌及粪肠球菌等[2]，万古霉素是治疗严重革兰氏阳性菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染的一线药物。近年来，超重、肥胖人口的数量急剧增加，肥胖会影响多种药物的药动学参数，进而影响药物的疗效及不良反应[3]。按照实际体重给予肥胖患者万古霉素可能会增加血药浓度超标和肾毒性的发生风险，因此《中国万古霉素治疗药物监测指南（2020 更新版）》强推荐对于肥胖患者开展万古霉素药物浓度监测[4-5]。本文根据群体药动学模型结合 Bayesian 反馈法分析感染性心内膜炎伴超重患者的万古霉素药动学参数，研究超重 / 肥胖对感染性心内膜炎患者万古霉素药动学参数及不良反应的影响，为合理使用万古霉素及制订个体化的精准用药方案提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病例选择

回顾分析 2019 年 4 月至 2021 年 8 月我院心血管外科收治的接受万古霉素治疗的感染性心内膜炎患者，本研究已获我院伦理委员会批准（伦审研〔2021〕第 25 号）。纳入标准：心血管外科年龄≥ 18 周岁且静脉使用万古霉素的感染性心内膜炎患者，万古霉素的血药谷浓度需在第 4 剂给药前 30 min 采样。排除标准：使用万古霉素小于 4 剂的患者；接受肾脏替代治疗的患者；临床资料不完整的患者。

1.2 试药与仪器

注射用盐酸万古霉素 [规格为 0.5 g/ 瓶，希腊 VIANEX S.A.（PLANT C）公司]。ARCHITECT i2000SR 化学发光微粒子免疫分析仪和 ARCHITECT 万古霉素测定试剂盒（美国雅培）。

1.3 分组与治疗方法

根据体质量指数（BMI）将研究对象分为正常组（BMI ＜ 24 kg • m^{-2}）和超重 / 肥胖组（BMI ≥ 24 kg • m^{-2}），两组患者的给药方案均由临床医师根据患者的具体情况及药品说明书制定，入组患者均在第 4 剂给药前 30 min 采集血样。

1.4 观察指标

监测并记录患者的万古霉素血药浓度，同时观察患者的肾功能情况及是否有不良反应事件的发生。

1.5 万古霉素药动学参数的计算

利用万古霉素个体化给药决策系统 SmartDose 软件[6]，根据群体药动学模型结合最大后验 Bayesian 反馈法进行计算。首先登录网页（https：//smartdose.huashan.org.cn：28080），监测药物选择“万古霉素”，人群选择“成人”，模型选择“调整方案”，填入患者的完整信息包括姓名、性别、年龄、体重、血肌酐、目标谷浓度等，继续输入万古霉素的给药剂量、给药途径、输注时间、给药间隔、给药次数及肌酐值等，系统可调用 MAPB 法估算患者的药动学参数包括肌酐清除率（CL_{Cr}）、清除率（CL）、表观分布容积（V_d）、半衰期（$t_{1/2}$）及药时曲线下面积（AUC），其中公式中的 ηi（i 为 1，2，3）为个体间变异，AGE 为年龄。

$$CL = [1.71 \times e^{\eta 1} + 8.31 \times (1 - e^{-0.0113 \times e^{\eta 2} \times CLcr})] \times 0.475^{(AGE/72)}$$ [6]

$$V_d = 2.62 \times 2.09^{(AGE/72)} \times e^{\eta 3}$$ [6]

1.6 统计分析

使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析，两组间的计量资料比较采用独立样本 t 检验，计数资料采用百分比表示，两组间的计数资料采用卡方检验，P ＜ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入 89 例患者，年龄为 25 ～ 70 岁，包括 58 例男性和 31 例女性，根据 BMI 将患者分为正常组（57 例）和超重 / 肥胖组（32 例）。89 例患者的一般资料见表 1。这些患者主要诊断为感染性心内膜炎，合并的基础疾病主要为心脏瓣膜病（包括主动脉瓣关闭不全、二尖瓣关闭不全和三尖瓣关闭不全）、高血压、糖尿病、胃炎及肺部感染，两组患者间的年龄、用药前血肌酐、用药前肌酐清除率及治疗时间等情况差异均无统计学意义，两组间具

有可比性。万古霉素给药剂量是由临床医师根据患者的实际体重、病理生理情况及药品说明书确定。

根据《中国万古霉素治疗药物监测指南（2020更新版）》[4]，推荐普通感染患者的万古霉素谷浓度为 10 ～ 15 mg • L^{-1}，推荐严重 MRSA 感染的成人患者的万古霉素谷浓度为 10 ～ 20 mg • L^{-1}。表 1 显示超重 / 肥胖患者的谷浓度在 10 ～ 20 mg • L^{-1} 的达标率为 31.25%，正常组患者的谷浓度达标率为 59.65%，超重 / 肥胖组的谷浓度达标率明显低于正常组（$P < 0.05$）。

表 1　两组患者的基本情况比较

Tab 1　General information between two groups

分类	正常组	超重 / 肥胖组	P
人数 /n	57	32	—
年龄（岁）	50±13	52±13	0.47
性别（男 / 女）	39/18	19/13	—
体质量 /kg	53.25±6.66	69.01±8.11	0.01
BMI/（kg • m^{-2}）	19.93±1.78	26.19±1.45	0.01
用药前肌酐 /（μmol • L^{-1}）	83.08±39.97	86.38±33.78	0.69
用药前肌酐清除率 /（mL • min^{-1}）	84.53±36.65	98.57±33.75	0.08
用药时间 /d	13.26±9.69	16.44±14.25	0.22
谷浓度达标人数及达标率 /n（%）			
＜ 10 mg • L^{-1}	7（12.28）	4（12.50）	—
10 ～ 20 mg • L^{-1}	34（59.65）	10（31.25）	0.01
＞ 20 mg • L^{-1}	16（28.07）	18（56.25）	—

2.2　超重 / 肥胖对万古霉素药动学的影响

用 Bayesian 反馈法计算得到的两组患者万古霉素药动学参数如表 2 所示，超重 / 肥胖型患者的 C_{min}、AUC 及 V_d 显著高于正常组（$P < 0.05$），其余药动学指标如清除率 CL、肌酐清除率 CL_{Cr} 及半衰期 $t_{1/2}$ 等差异均无统计学意义。

表 2　患者万古霉素药动学参数比较

Tab 2　Pharmacokinetic parameters of vancomycin in both groups

分类	正常组（n = 57）	超重 / 肥胖组（n = 32）	P
C_{min}/（mg • L^{-1}）	17.80±8.86	24.75±18.07	0.02
$t_{1/2}$/h	17.35±14.10	19.25±11.60	0.52
V_d/L	43.60±4.09	48.84±4.59	0.01
CL/（L • h^{-1}）	3.21±1.41	3.42±1.89	0.55
CL_{Cr}/（mL • min^{-1}）	70.28±33.42	75.10±44.73	0.57
AUC/（mg • h • L^{-1}）	557.96±226.60	673.47±273.65	0.03

2.3　万古霉素的疗效及不良反应

依据《抗菌药物临床研究指导原则 2015 版》，按痊愈、显效、无效和死亡评定患者感染的治疗效果，痊愈：治疗后患者的症状、体征、实验室及致病菌检查均恢复正常；显效：治疗后病情明显好转，但上述四项中有一项未完全恢复正常；无效：用药 72 h 后症状无明显改善或加重；死亡：住院期间患者死亡。将痊愈和显效合计为有效，并以此计算有效率。正常组患者经治后痊愈人数和显效人数分别为 26 例和 17 例，超重 / 肥胖组痊愈人数和显效人数分别为 10 例和 7 例，两组间的临床有效率比较，差异有统计学意义（75.44% *vs* 53.12%，$P = 0.03$，χ^2 检验）。

纳入的患者在使用万古霉素的过程中发生的主要不良反应为胃肠道反应（恶心、呕吐和纳差）、肾功能损伤和红人综合征（斑丘疹样红斑、胸痛和低血压等）。正常组与超重 / 肥胖组患者中分别有 6 例和 9 例出现不良反应（见表 3），相比正常组，超重 / 肥胖组患者不良反应发生率增加。

表 3　患者使用万古霉素的不良反应发生率 [n(%)]

Tab 3　Adverse effect rate of vancomycin in two groups [n(%)]

分类	正常组（n = 57）	超重 / 肥胖组（n = 32）
胃肠道反应	2（3.51）	2（6.25）
肾功能损伤	3（5.26）	5（15.63）
红人综合征	1（1.76）	2（6.25）
合计	6（10.53）	9（28.13）

3　讨论

感染性心内膜炎患者中有不少肥胖患者，但临床上肥胖患者的用药剂量往往是基于正常体重个体的药动学数据，众多研究均指出肥胖会改变多数药物的药动学特性 [3, 7]，因此超重、肥胖患者给药方案依从健康个体给药方案是不准确的，不同人群尤其是重症患者要想达到个体化精准用药还需借助于药物浓度监测的手段 [8]。

本研究结果显示正常组和超重 / 肥胖组患者的万古霉素谷浓度 C_{min} 平均值分别为（17.80±8.86）mg • L^{-1} 和（24.75±18.07）mg • L^{-1}，超重 / 肥胖组的谷浓度 C_{min} 和 AUC 明显高于正常组（$P < 0.05$），超重 / 肥胖患者的谷浓度达标率和治疗有效率明显低于正常组（$P < 0.05$）。相比正常组，超重 / 肥胖组不良反应发生率明显增加。一项调查研究也表明肥胖患者按常规给药方式会导致万古霉素谷浓度更高、达标率低，而按照调整后的个体化给药方式可改善谷浓度的达标率，减轻肾毒性 [9]。

有文献报道肥胖患者的脂肪组织显著增加，会显著影响某些药物的药动学特征 [10]，抗病毒药利托那韦和地瑞那韦的平均稳态浓度（C_{ss}）与脂肪含量有显著相关性，肥胖患者中 C_{ss} 更高 [11]。高脂溶性药物的 V_d 与体重具有明显的相关性，一般而言，脂溶性强的药物在肥胖患者体内分布容积 V_d 增大，消除半衰期延长，如麻醉药阿芬太尼和右托咪定 [12-13]。药物表观分布容积的变化还受到药物本身的亲脂性、循环系统血容量和血浆蛋白结合程度等因素的影响。肥胖患者比正常体重患者有更多的脂肪组织，会出现机体全血容量和心输出量的绝对增加以及血浆蛋白结合的改变，因此可能会显著影响某些药物的表观分布容积 [14]。万古霉素是水溶性的抗菌药物，肥胖患者中万古霉素的 V_d 值相比正

常患者是增加的，由于肥胖人群更高的血流量增加了万古霉素的 V_d，这与文献报道基本一致[15]。

万古霉素在体内基本不被代谢，在给药后 24 h 内，肾功能正常的成年人体中 90% 的万古霉素会随着尿液排出体外。但过高浓度的万古霉素会导致肾毒性，研究表明超重、肥胖与万古霉素诱导的肾毒性有极高的相关性[16]。肥胖可能与万古霉素诱发的肾毒性风险增加相关，这是因为按实际体重计算剂量会造成超过有效治疗范围的浓度。一项多中心的万古霉素临床试验表明肥胖患者接受经验性万古霉素治疗会导致较差的临床疗效[17]。《万古霉素个体化给药临床药师指引》则建议当患者为正常体重者，给药体重为实际体重；当患者为肥胖患者，给药体重应为调整体重[18]。男性理想体重＝ 50 kg ＋ 2.3 kg×（实际身高厘米数 /2.54 － 60）[18]；女性理想体重＝ 45 kg ＋ 2.3 kg×（实际身高厘米数 /2.54 － 60）[18]；调整体重＝ 0.4×（实际体重－理想体重）＋理想体重[18]。

因此，对于感染性心内膜炎伴超重患者，应根据调整后的体质量制订合理的给药方案，且有必要开展基于治疗药物监测及 Bayesian 反馈法的万古霉素个体化给药方案设计，提高感染性心内膜炎重症患者的救治率，降低万古霉素的不良反应。

参考文献

[1] Sevilla T，Lopez J，Gomez I，et al. Evolution of prognosis in left-sided infective endocarditis：a propensity score analysis of 2 decades [J]. J Am Coll Cardiol，2017，69（1）：111-112.

[2] 孟凡兵 . 感染性心内膜炎患者血培养病原菌分布特点和耐药性分析 [J]. 罕少疾病杂志，2022，29（8）：34-35.

[3] Smit C，Wasmann RE，Goulooze SC，et al. A prospective clinical study characterizing the influence of morbid obesity on the pharmacokinetics of gentamicin：towards individualized dosing in obese patients [J]. Clin Pharmacokinet，2019，58（10）：1333-1343.

[4] He N，Su S，Ye Z，et al. Evidence-based Guideline for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin：2020 Update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring，Chinese Pharmacological Society [J]. Clin Infect Dis，2020，71（Suppl 4）：S363-S371.

[5] 何娜，苏珊，翟所迪，等 .《中国万古霉素治疗药物监测指南（2020 更新版）》解读 [J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（1）：12-16.

[6] 高玉成，焦正，黄虹，等 . 万古霉素个体化给药决策支持系统的研制 [J]. 药学学报，2018，53（1）：104-110.

[7] Takahashi T，Smith AR，Jacobson PA，et al. Impact of obesity on voriconazole pharmacokinetics among pediatric hematopoietic cell transplant recipients [J]. Antimicrob Agents Chemother，2020，64（12）：e00653-20.

[8] 朱德胜，曾方玲 . 重症肺炎患儿应用万古霉素后血药浓度检测结果分析 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1552-1555.

[9] Reynolds DC，Waite LH，Alexander DP，et al. Performance of a vancomycin dosage regimen developed for obese patients [J]. Am J Health Syst Pharm，2012，69（11）：944-950.

[10] Jain R，Chung SM，Jain L，et al. Implications of obesity for drug therapy：limitations and challenges [J]. Clin Pharmacol Ther，2011，90（1）：77-89.

[11] Lloret-Linares C，Rahmoun Y，Lopes A，et al. Effect of body weight and composition on efavirenz，atazanavir or darunavir concentration [J]. Therapie，2018，73（3）：185-191.

[12] 宋阳 . 国产阿芬太尼应用于肥胖患者的药动学研究 [D]. 唐山：华北理工大学，2021.

[13] 任莉 . 盐酸右美托咪定在肥胖患者体内的临床药动学研究 [D]. 广州：南方医科大学，2014.

[14] Hanley MJ，Abernethy DR，Greenblatt DJ. Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans [J]. Clin Pharmacokinet，2010，49（2）：71-87.

[15] 蒙龙，李娟，龙锐，等 . 万古霉素在肥胖人群与正常人群中药动学参数的系统评价 [J]. 重庆医科大学学报，2015，40（2）：309-313.

[16] Choi YC，Saw S，Soliman D，et al. Intravenous vancomycin associated with the development of nephrotoxicity in patients with class Ⅲ obesity [J]. Ann Pharmacother，2017，51（11）：937-944.

[17] Hall RN，Payne KD，Bain AM，et al. Multicenter evaluation of vancomycin dosing：emphasis on obesity [J]. Am J Med，2008，121（6）：515-518.

[18] 何志超，伍俊妍，邱凯锋 . 万古霉素个体化给药临床药师指引 [J]. 今日药学，2015，25（2）：78-82.

（收稿日期：2023-01-12；修回日期：2023-03-07）

药事管理

医院新型供应链 SPD 管理模式在中心药房药品管理中的应用

柴煜莹，孙怡，唐婕*（苏州大学附属第一医院药学部，江苏　苏州　215006）

摘要：目的　探讨医院新型供应链供应 - 加工 - 配送（SPD）管理模式在中心药房的应用效果，为中心药房药品智慧物流体系的建设提供一定参考。**方法**　将新型供应链 SPD 物流管理模式应用于中心药房药品管理，并对 SPD 物流管理模式下与原系统管理模式下的药品调剂效率、请领验收效率、盘点效率、药品调剂差错率及账物相符率进行对比观察。**结果**　与原系统管理模式相比较，SPD 物流管理模式下的药品调配过程虽然增加了扫码步骤，但可以显著降低药品调剂差错率且并未降低中心药房的药品调剂效率。除此以外，该模式下的药品请领验收效率、盘点效率及账物相符率明显提高。**结论**　医院新型供应链 SPD 管理模式在中心药房药品管理中应用良好，提高了工作效率和药学服务质量，实现了药品管理工作的精细化和信息化，有一定的应用前景。

关键词：SPD 管理模式；中心药房；药品管理
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2215-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.043

New supply-processing-distribution management model of hospital supply chain in the management of central pharmacy

CHAI Yu-ying, SUN Yi, TANG Jie* (*Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu* 215006)

Abstract: Objective　To determine the effect of new supply-processing-distribution (SPD) management model of hospital supply chain in the central pharmacy to provide reference for the establishment of drug smart logistics system. **Methods**　The SPD model was used for drug management in the central pharmacy. The drug dispensing efficiency, requisition and acceptance efficiency, inventory efficiency, drug dispensing error rate and account conformity rate were compared between the new SPD management model and the original system. **Results**　Compared with that of the original system, the drug dispensing efficiency of the central pharmacy was not reduced despite the extra scanning step. On the contrary, it significantly reduced the error rate of drug dispensing. In addition, the efficiency of drug requisition, drug acceptance, inventory efficiency and compliance rate of accounts and goods were significantly improved. **Conclusion**　The new SPD management model improves the work efficiency and the quality of pharmaceutical service, and refines and informatizes drug management with a good application prospect.

Key words: supply-processing-distribution management model; central pharmacy; drug management

近年来，随着医院药学的高速发展及医院药房管理水平的提高，信息化系统在医院药房的工作与运行中发挥着越来越重要的作用[1-3]。本院中心药房承担着全院 58 个病区的药品调配工作以及相关的药学服务工作，存储的药品品种、数量繁多，总计约 1200 种各剂型药品。随着药品品种及剂型的不断增多，临床药品管理难度也相应增大，如何对药品进行规范化管理成为药品管理

作者简介：柴煜莹，女，硕士，药师，主要从事医院药学工作，email：18351976702@163.com　*通信作者：唐婕，女，副主任药师，主要从事医院药学工作，email：janetong90@qq.com

的重要工作之一。药品精细化管理是一种新型的管理理念，泛指将管理程序精细化，使药品管理更规范化、数据化、细节化，并以此提高药学服务质量的管理措施[4]。但近期有研究发现，将精细化管理应用于医院医疗中虽然能够取得一定的效果，但其对医院经济管理的影响也越来越大，包括采购、供应和管理等环节，无法有效保证各种医用耗材的使用和管理情况[5]。供应 - 加工 - 配送（supply-processing-distribution，SPD）管理模式是一种将包括药品在内的医院物资的进、消、存等环节进行信息化、一体化的新型供应链管理模式，可节省人力、提高工作效率、降低运行成本，因其具有高效、高质量等优点而被认可[6-8]。本研究将新型供应链 SPD 管理模式用于中心药房药品精细化管理中，再次对管理流程进行优化，以期进一步提高医院药品管理质量。

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集本中心药房在原管理系统下（即 2020 年 8 ～ 10 月）和 SPD 管理模式下（即 2021 年 8 ～ 10 月）的药品管理情况资料。实施人员纳入标准：① 已经取得执业资格证书者；② 参与人员均经过相关培训并通过考核。排除标准：① 请病假或者产假人员；② 研究过程中退出者。

1.2 SPD 管理模式下中心药房药品管理工作流程

1.2.1 SPD 管理模式下中心药房药品调剂流程 药品调剂是中心药房日常工作中占比最大的工作内容，提高药品调剂工作质量至关重要，因此我们利用 SPD 管理模式对药品调剂流程进行优化改善，具体工作流程见图 1。病区提交药品统领清单，合并后生成各病区拣货单与拣货签。登录扫码设备，扫描拣货签，手持设备将逐一显示待调剂药品的药名、剂型、规格、数量、批号等信息，逐一扫描对应的药品货位条码即可完成调配。另一部分药品数据传输至发药机，选中待选拣货汇总单进行拣货。最后将扫码拣货、发药机拣货的药品合并打包后配送至病区。

1.2.2 SPD 管理模式下中心药房退药流程 住院患者退药问题一直是医疗机构药事管理的难题，虽然《医疗机构药事管理规定》中明确道：为保障患者用药安全，除药品质量原因外，药品一经发出，不得退换[9]。但在实际临床工作中，常因医护、药房、患者及家属等多方面因素产生退药[10]。因此，优化退药流程，加强药品管理非常重要。利用 SPD 管理模式优化的退药流程见图 2。

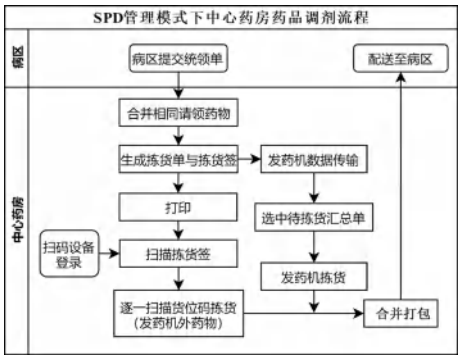

图 1 SPD 管理模式下中心药房药品调剂工作流程图

Fig 1 Flow chart of drug dispensing in the central pharmacy under SPD

病区待退药品中与病区当前领药清单中相同的药品将相抵合并，剩余待退药品将生成退药清单。退药清单被送至病区后，病区据其退回药品，药房接收后扫描退药单并查验退药，核对无误后确认退药。一键汇总所有病区退回药品生成退药明细后，通过手持设备扫描货位码确认，并将对应药品退回货架或发药机，库存数据随之发生动态变化。

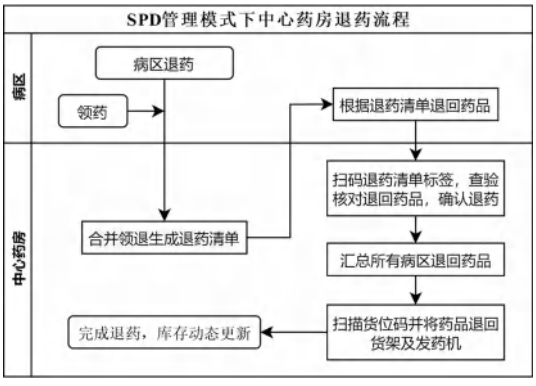

图 2 SPD 管理模式下中心药房退药工作流程图

Fig 2 Flow chart of drug returning procedure in the central pharmacy under SPD

1.2.3 SPD 管理模式下中心药房药品请领验收流程 系统根据药品消耗、周转天数、储存能力等数据进行分析，自动生成请领单（见图 3）。一级库根据请领单完成拣货并生成配送单进行配送，二级库（中心药房）工作人员利用条形码和中转箱进行验收工作并确认完成验收，系统形成实际入库单并更新相关库存数据。

1.2.4 SPD 管理模式下中心药房药品盘点流程 在 SPD 管理模式下，工作人员利用信息化手段进行盘点（见图 4）。系统根据盘点类型、区域等选择条件生成盘点计划和盘点表。工作人员在手持设备上录入实际盘点数据结果，系统将自动运算实盘结果和库存数据的差异，并据此一键生成损溢清单。

图 3　系统自动生成的请领计划

Fig 3　Request plans automatically generated by the system

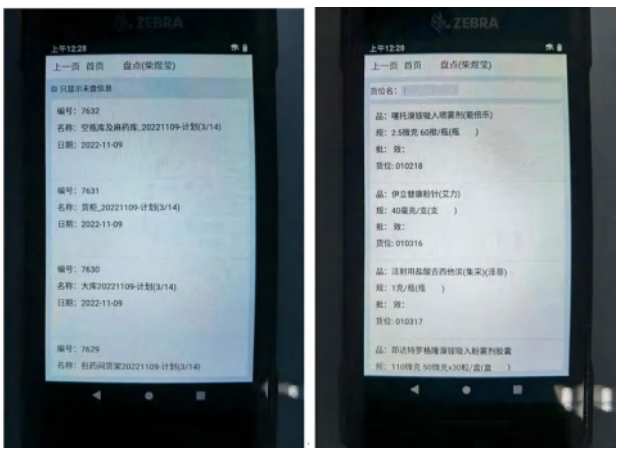

图 4　系统自动生成的盘点计划

Fig 4　Inventory plans automatically generated by the system

1.3　观察指标

1.3.1　SPD 管理模式应用对工作效率的影响　各病区会在每日午间提交当日长期医嘱统领单，根据药房工作人员开始调配和结束调配这些统领单的时间来记录调配耗时。将新模式下与原系统下的调配耗时进行比较，考察 SPD 管理模式对药品调剂效率的影响；对新模式下和原系统下库管人员每日请领、验收环节耗时分别进行记录和比较，考察 SPD 管理模式对请领验收效率的影响。对新模式下和原系统下每日贵重药盘点环节耗时分别进行记录和比较，考察 SPD 管理模式对盘点效率的影响。

1.3.2　SPD 管理模式应用对差错率的影响　观察记录中心药房 SPD 管理模式下与之前同时期原系统管理模式下 3 个月内的调配差错次数，考察 SPD 管理模式对药品调剂差错率的影响。

1.3.3　SPD 管理模式应用对账物相符率的影响　根据月度盘点结果，观察记录中心药房 SPD 管理模式下与之前同时期原系统管理模式下 3 个月内的账物相符情况，考察 SPD 管理模式对账物相符率的影响。

1.4　统计学方法

采用 SPSSAU 统计软件进行数据的录入与分析，利用 K-S 检验分别对每日调配、请领、验收、盘点环节在原系统下和 SPD 管理模式下耗时的差值进行正态性考察，利用 S-W 检验分别对调配差错次数、账物相符率在原系统下和 SPD 管理模式下的差值进行正态性考察。然后采用配对 t 检验考察原系统下和 SPD 管理模式下各组数据的差异，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与讨论

2.1　SPD 管理模式应用与原调配模式工作效率的比较

SPD 管理模式新系统试用的第一个月平均调配耗时约为 110 min，大于原系统下工作人员调配中午各病区所有长期医嘱的平均耗时（约为 100 min），分析其原因：① 工作人员经培训后使用新系统，需一定时间适应新的调剂方式，尤其是手持设备的使用；② 新系统的应用需要与本中心药房的规模、环境、现有设备及病区领药习惯等特征相磨合并进行一定程度的调整完善，最终形成一个当前条件下最适合本药房特征的高效率的新系统。因此，经过一个阶段的适应与调整后，第 2 个月和第 3 个月平均调配时间接近 100 min，工作效率与原系统下工作效率相近。

原系统下库管人员提交每日请领计划平均耗时为 60 min，SPD 管理模式下平均耗时缩短为 30 min。原系统下药房库管人员需查看二级库药品库存，预估药品消耗后，手工录入所需药品种类及数量，向一级库提交每日请领计划。SPD 管理模式下，系统根据药品消耗、周转天数、储存能力等数据进行分析，自动生成请领单，经药房库管人员调整确认后即可向一级库提交每日请领计划，省去了常用药物的库存查看、消耗计算和手工录入等耗时环节。原系统下本药房通过一级库纸质发货单进行人工核对验收，新系统下本药房利用条形码和中转箱进行扫码验收，平均耗时从 40 min 缩短为 20 min。

原系统下工作人员每日盘点贵重药平均耗时为 50 min，SPD 管理模式下平均盘点时间缩短为 20 min。在原系统下，需工作人员根据纸质盘点结果手工计算库存差异并与前次盘点结果一一比对。在 SPD 管理模式下，将盘点结果输入手持设备后，系统将自动计算库存差异并进行数据比较与记录，使工作人员能更及时准确地发现问题。新系统不仅减少了人工环节，与纸质盘点结果相比，还能使后期回溯分析数据变得简单易行。新的盘点流程同样可用于普药定期盘点，也可随时

盘点指定药物，使以前繁重的盘点工作变得灵活、及时、方便。结果见表 1，调配效率没有明显提升，但请领、验收、盘点工作效率有明显提升。

表 1 SPD 管理模式系统与原系统下工作效率的比较

Tab 1 Work efficiency under SPD management system and original system

项目	两种模式下的平均差值	t	P
调配时间（8 ～ 9 月）	－ 0.85	－ 0.568	＞ 0.05
请领时间（7 ～ 9 月）	29.74	22.624	＜ 0.05
验收时间（7 ～ 9 月）	19.98	16.230	＜ 0.05
盘点时间（7 ～ 9 月）	30.59	53.512	＜ 0.05

2.2 SPD 管理模式应用对差错率的影响

分别记录中心药房使用 SPD 管理模式与原系统管理模式在 3 个月内调配发生差错的次数，结果原系统下月平均差错为（23±4.36）例，而使用 SPD 管理模式后月平均差错为（5±1.73）例（P ＜ 0.05）。调剂差错率明显下降的主要原因为：① 利用手持设备扫描药品货位码进行调剂的方式可基本避免药品品种调剂差错，包括看似、听似、一品多规、多剂型药物等原因导致的品种错误；② 使用新系统处理退药基本避免了退药摆放错误的情况，减少了因此导致的调剂错误；③ 手持设备显示待调剂药品信息相较纸质统领单更清晰易辨，一定程度上减少了调剂药品时可能发生的数量差错。

2.3 SPD 管理模式应用对账物相符率的影响

观察记录中心药房在 SPD 管理模式下与原系统管理模式下 3 个月内的账物相符情况，结果见表 2。由表 2 数据可得，SPD 管理模式下账物相符率有明显提升。原因分析为：① 新系统应用后，调剂差错率明显下降；② 应用新系统处理请领验收及退药流程时，药品库存信息自动实时更新，减少人工更新库存信息的滞后性和差错率；③ 应用新系统退回药品避免了退药摆放差错。

表 2 SPD 管理模式系统与原系统同期账物相符率的比较 (%)

Tab 2 Compliance rate of accounts and goods under SPD management system and the original system in the same period (%)

模式	账物相符率			$\bar{x}\pm s$	t	P
	7 月	8 月	9 月			
原系统管理模式	79.1	82.5	77.3	79.63±2.64	－ 4.932	＜ 0.05
SPD 管理模式	91.0	89.6	92.3	90.97±1.35		

3 讨论

随着大数据时代的来临，信息收集、统计与管理显得尤为重要。医院的药品管理是医院管理中的难点，对管理人员素养和能力要求很高。新型供应链 SPD 管理模式紧跟时代发展，不断借助新技术提高管理模式的先进性，如借助射频识别系统 [11]，医院能够动态追踪药品的配送，同时提高工作效率 [12]。

本研究发现将医院新型供应链 SPD 管理模式应用于中心药房药品管理后，与原系统相比，在药品调配流程中增加了扫码步骤，明显降低了药品调配差错率。SPD 管理模式的应用还可以提高药品请领验收及盘点效率。除此以外，各个环节的扫码操作为药品在院内的流通提供了追溯途径，有利于药品信息化追溯体系的建设。值得注意的是，对于新系统，应及时组织对参加人员进行岗前培训及定期业务考核，从而确保相关人员能够熟练操作系统。

参考文献

[1] 石新，王永，张诗超，等 . 某院中心药房信息化电子报损软件的应用及其对药品报损原因的分析及改进对策 [J]. 抗感染药学，2020，17（10）：1524-1527.

[2] 陈利芳，吴宇枫，黄荣海，等 . SPD 与 HIS 协同应用于药品物流管理的成效分析 [J]. 中国药房，2017，28（13）：1797-1800.

[3] 陈晓旭，聂春杰，葛艳慧，等 . 本院静脉用药集中调配中心信息化管理与流程优化的效果评价 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1743-1747.

[4] 杨香瑜，陈辰，张韶辉，等 . 临床药师基于疾病诊断相关分组数据参与消化内科药事精细化管理的实践 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1219-1222.

[5] 陈淼娣，殷素萍，李红 . SPD 管理模式在医院医用耗材精细化管理中的应用 [J]. 中医药管理杂志，2020，28（3）：152-153.

[6] Yang C，Gu W，Liu TZ. Application and evaluation of SPD based logistics management model for medical consumables in clinical nursing departments [J]. Iran J Public Health，2019，48（8）：1452-1460.

[7] Lin HD，Li Q，Xu XG，et al. Research on dispatch of drugs and consumables in Spd warehouse of large scale hospital under uncertain environment：take respiratory consumables as an example [J]. J Comb Optim，2021，42（4）：848-865.

[8] 方豪，岑宏飞 . 医院基于 SPD 创新理念的医用耗材精益化管理新模式 [J]. 中国卫生标准管理，2022，13（9）：32-35.

[9] 杨强，陈敏 . 多学科合作优化住院部退药模式效果评价 [J]. 中国药业，2022，31（2）：13-17.

[10] 张朔，张秋，崔平 . 住院药房退药原因分析及综合应对措施的效果评价 [J]. 河北医药，2020，42（24）：3814-3816，3820.

[11] Cheng JF，Wen CJ，Jiang SB，et al. Construction and application of spd automated management module for interventional high-value consumables based on rfid sensors [J]. J Sensors，2022，https://doi.org/10.1155/2022/2184694.

[12] 赵英慧，陈玲艳 . 医院 SPD 物资供应链模式的风险与管理——以耗材为例 [J]. 经济师，2019，360（2）：234-235.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-20）

药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架构建

唐密，杨燕，陈珉惺，金春林，何江江*（上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所），上海　200031）

摘要：目的　构建药品带量采购供应企业遴选多准则决策框架，为国家或地方层面后续常态化的药品集中带量采购实践提供参考。**方法**　基于多准则决策分析理论，通过政策分析、文献研究以及专家咨询确定决策初步框架，采用德尔菲法对决策框架进行评价，分析咨询结果，筛选并修改指标，建立最终的决策框架。**结果**　专家积极系数为 88.23%，专家权威系数为 0.82，整体指标重要性、敏感性和可行性的专家协调系数对应的 *P* 值均小于 0.05，经专家咨询讨论，最终确定由 3 个维度、8 个一级指标和 16 个二级指标组成的药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架。框架各指标重要性 / 敏感性 / 可行性赋值均数在 3.53 ～ 4.67 分，变异系数在 0.16 ～ 0.28，符合设计要求。**结论**　构建的多准则决策框架对国家或地方层面后续常态化的药品集中带量采购实践具有一定的现实指导意义，未来还需进一步细化评分标准，在实践中不断修正和完善决策框架。

关键词：药品集中带量采购；多准则决策分析；药品供应企业；决策框架
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2219-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.044

Multi-criteria decision-making framework for the selection of drug supply enterprises in centralized volume-based procurement

TANG Mi, YANG Yan, CHEN Min-xing, JIN Chun-lin, HE Jiang-jiang* (*Shanghai Health Development Research Center* (*Shanghai Medical Information Center*), *Shanghai* 200031)

Abstract: Objective　To establish a multi-criteria decision-making framework for the selection of drug supply enterprises in centralized volume-based procurement, and to provide reference for the follow-up normalized centralized volume-based procurement of drug at the national or local level. **Methods**　Based on the multi-criteria decision analysis theory, the preliminary decision-making framework was determined through policy analysis, literature research and expert consultation. Delphi method was used to evaluate the decision-making framework, analyze the consultation results, screen and modify the indicators, and establish the final decision-making framework. **Results**　The expert positive coefficient was 88.23%, and the expert authority coefficient was 0.82. The *P* values corresponding to the expert coordination coefficients of the importance, sensitivity and feasibility of the overall indicators were all less than 0.05. After expert consultation and discussion, a multi-criteria decision-making framework for the selection of drug supply enterprises in centralized volume-based procurement was established, which consisted of 3 dimensions, 8 first-level indicators and 16 second-level indicators. The average value assigned to the importance/sensitivity/feasibility of each index in the framework ranged 3.53 ～ 4.67 score, and the coefficient of variation ranged 0.16 ～ 0.28, which met the design requirements. **Conclusion**　The multi-criteria decision-making framework helps guide the follow-up normalized centralized volume-based procurement of drug at the national or local level. In the future, the scoring criteria need to be further refined, and the decision-making framework should be continuously improved in practice.

Key words: centralized volume-based procurement of drug; multi-criteria decision analysis; drug supply enterprise; decision-making framework

作者简介：唐密，女，研究实习员，硕士，主要从事药物政策与药物经济学研究，email：tangmicool@163.com　*通信作者：何江江，男，副研究员，博士，主要从事药物政策与药物经济学、卫生体系与政策评价、社区卫生服务等研究，email：hjj_465@163.com

为控制医药费用的过快增长，各个国家和地区采取了一系列政策，其中对药品实行集中招标采购制度是各个国家和地区控制药品费用的主要措施之一[1]。由政府主导的药品集中采购在我国已有 20 余年历史，自 2018 年底国家统筹开展药品集中带量采购实践至今，已完成八批九轮药品采购，各省市药品集中带量采购工作也开展了积极探索，取得了积极进展和显著成效：大幅降低了药品价格、有效减轻了患者负担、加速了医药企业转型升级、提升了医疗机构运营效益[2-4]，但也出现过一些药企断供事件。药品采购的最终目标是让患者能用上质优价廉的好药，因此在进行药品集中带量采购时应该对药品质量、生产配送能力、企业信誉等方面进行多方考量。为进一步完善药品集中带量采购政策，本研究对国家和地方药品集中带量采购品种供应企业遴选框架进行系统梳理和归纳，基于多准则决策分析（multi-criteria decision analysis，MCDA）理论，构建药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架，以期为国家或地方层面后续常态化的药品集中带量采购实践提供参考。

1 资料与方法

1.1 理论基础

MCDA 是一种帮助决策者通过一致且透明的方式在复杂的价值组合中做出取舍的方法，目前已在包括中国在内的 20 多个国家或地区的卫生决策领域应用[5]，主要包括明确决策问题、选择和建立评估准则、测量绩效、对备选方案打分、对准则赋权重、计算总得分、处理不确定性、结果审查以及支持决策等步骤[6]。研究以国家卫生健康委员会发布的《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》[7] 中药品评价的 6 个维度（安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性、可及性）和药品供应链评价框架的 5 个维度（计划、采购、生产、配送、退货）为决策框架的构建基础[8]，基于 MCDA 构建药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架。

1.2 文献研究法

收集国家或地区药品集中带量采购政策相关文件，整理和分析国家或地区药品集中带量采购实践过程中的供应企业遴选指标，并以“药品采购”“药品集中采购”“带量采购”“药品供应企业”等关键词检索国内外文献数据库对指标进行补充，基于上述理论框架，通过专家咨询研讨，初步形成药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架。

1.3 德尔菲法

德尔菲法是一种利用部分专家的专业知识、经验和主观判断能力，对特定项目进行预测和判断的方法，可以应用到众多领域的咨询决策中，具有匿名性、反馈性和统计性等特点[9]。通常包括专家遴选、制订专家咨询问卷、专家咨询、统计分析以及指标框架筛选、调整与确定等步骤，研究于 2022 年 3 ～ 4 月对通过问卷网平台形成电子问卷的二维码或填写链接进行问卷发放，对遴选专家进行了问卷咨询，当专家意见基本达成一致时，形成最终的指标框架。

2 结果

2.1 专家基本情况

从药品集中带量采购工作相关的医保、卫生等领域，遴选熟悉药品采购相关工作、工作 5 年以上、具有中级及以上专业技术职称的专家，主要包括行政管理人员、临床医师 / 临床药师、科研人员三类，来自国家 / 省级集中带量采购平台机构、医疗机构以及高校 / 研究机构。回收有效问卷中的 15 位专家分别来自上海、北京、江苏、湖北 4 个省市，年龄在 30 ～ 49 岁，从事药品采购相关专业领域时间≥ 8 年的比例为 93.33%，文化程度多为硕士及以上，其中具有中级职称的专家 4 名，副高级职称 4 名，正高级职称 7 名，具有副高级及以上职称的专家比例为 73.33%。

2.2 专家积极性分析

专家积极性用专家咨询表的回收率表示。本次研究共发放咨询表 17 份，收回有效咨询表 15 份，有效回收率为 88.23%，大于 70%[10]，表明专家积极性较高，专家咨询结果较为可信。

2.3 专家权威程度分析

专家权威程度 $C_r = (C_\alpha + C_s)/2$，C_α 为判断依据，C_s 为熟悉程度，通常认为 $C_r > 0.70$ 可作为咨询结果可靠的标准[10]。专家对指标的熟悉程度包括非常熟悉、比较熟悉、一般、较不熟悉和非常不熟悉 5 个等级，分别赋值 1.0、0.8、0.6、0.4 和 0.2，专家的判断依据主要包括工作实践经验、理论分析、国内外同行的了解、直觉 4 个方面，专家对 4 个方面的影响程度进行赋分，赋值表见表 1[11]。

对专家反馈回来的结果进行统计，结果 $C_\alpha = 0.87$，$C_s = 0.78$，$C_r = 0.82 > 0.70$，表明专家权威程度高，研究结果相对可靠。

2.4 专家协调程度分析

Kendall 协调系数是计算多个等级变量的相关程度变量，可用 Kendall’s W 检验统计量 W 表示，其对应的 P 值若小于 0.05，则说明具有一致性，W 值介于 0 ～ 1，越靠近 1 表明协调程度越高。指标重要性的整体 W 值为 0.317，敏感性的整体 W 值为 0.296，可行性的整体 W 值为 0.160，表明专家意见比较一

表 1　专家判断依据及其影响程度赋值

Tab 1　Assignment of expert judgment basis and its degree of influence

判断依据	对专家判断的影响程度		
	大	中	小
实践经验	0.5	0.4	0.3
理论分析	0.3	0.2	0.1
国内外同行的了解	0.1	0.1	0.1
直觉	0.1	0.1	0.1

致，详见表 2。

2.5　专家意见集中程度分析

专家意见集中程度用指标重要性、敏感性、可行性得分的均数和变异系数来表示，专家根据 Likert 量表对各级指标的重要性、敏感性和可行性赋以 1 ～ 5 分，以重要性为例，1 分表示非常不重要，5 分表示非常重要，指标的重要性、敏感性、可行性评分均数数值越大、变异系数越小，表明专家的意见越集中。计算结果显示，除创新性、适宜性、售后服务、创新能力 4 个一级指标，技术创新、技术特点适宜、伴随服务、社会贡献、研究开发费用、创新成果 6 个二级指标以外，其他指标的重要性、敏感性、可行性评分均数都≥ 3.5 分且变异系数≤ 0.3。

表 2　指标重要性 / 敏感性 / 可行性的 Kendall's *W* 协调系数检验结果

Tab 2　Kendall's *W* coordination coefficient test for index importance/sensitivity/feasibility

项目	重要性			敏感性			可行性		
	W 值	χ^2 值	*P* 值	*W* 值	χ^2 值	*P* 值	*W* 值	χ^2 值	*P* 值
一级指标	0.349	57.59	＜ 0.001	0.243	40.10	＜ 0.001	0.173	28.61	＜ 0.001
二级指标	0.326	102.77	＜ 0.001	0.345	108.76	＜ 0.001	0.163	51.42	＜ 0.001
整体	0.317	157.00	＜ 0.001	0.296	146.67	＜ 0.001	0.160	79.20	＜ 0.001

2.6　供应企业遴选多维决策框架的修改与确认

根据计算结果和专家咨询意见，删除创新性、适宜性、售后服务、创新能力 4 个一级指标，删除技术创新、技术特点适宜、伴随服务、社会贡献、研究开发费用、创新成果 6 个二级指标，其他保留的指标重要性 / 敏感性 / 可行性赋值均数为 3.53 ～ 4.67 分，变异系数为 0.16 ～ 0.28，保留指标的赋值均数≥ 3.5 分且变异系数≤ 0.3[12]，专家对保留的指标的意见集中程度较高，研究认为专家意见基本达成一致，形成最终的指标框架，见表 3。

表 3　药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架

Tab 3　Multi-criteria decision-making framework for the selection of drug supply enterprises in centralized volume-based procurement

评价维度	一级指标	二级指标
药品评价	药品质量	质量类型
		质量标准
		质量认证
		质量检验
	有效性	临床疗效
		临床效果
	安全性	不良反应
	经济性	价格水平
供应评价	生产能力	原料保障
		药品产量
	市场规模	市场占有情况
		市场覆盖情况
	配送能力	配送规模
		配送效率
企业评价	企业信誉	财务状况
		不良记录

2.6.1　药品评价维度　药品评价维度下包含药品质量、有效性、安全性、经济性 4 个一级指标，质量类型、质量标准、质量认证、质量检验、临床疗效、临床效果、不良反应、价格水平 8 个二级指标。

质量类型，即申报药品的质量层次类型，可根据原研药及国家药品监督管理局发布的仿制药质量和疗效一致性评价参比制剂；通过国家药品监督管理局仿制药质量和疗效一致性评价的仿制药品；根据《国家药监局关于发布化学药品注册分类及申报资料要求的通告》〔2020 年第 44 号〕，按化学药品注册分类批准的仿制药；纳入《中国上市药品目录集》的药品；国家保密处方中成药；国家中药一级保护品种；其他药品等类型药品进行质量分层。

质量标准，即申报药品现行质量标准情况。可根据药品说明书或注册用质量检测报告项目指标（主要质量指标：含量、杂质、溶出度 / 透明度、有效期等）是否高于新版药典标准或国家药品监督管理局标准（YBH 注册标准）或者药品具备安全性或有效性对药品质量控制有必要但国家标准未收载的检验项目等进行评价。

质量认证，即申报药品及其原料药质量管理体系认证情况。可根据取得的认证，如美国、欧盟（德国、法国）、英国、日本质量体系认证、省级药监部门 GMP 认证等进行评价。

质量检验，即申报药品申报前送至省级及以上药品检测机构或口岸药品检测机构进行质量检验情况以及申报产品近三年药品监督管理局质量检查抽验情况。申报前的质量检验可根据国家标准检验项目及其限度制定公式，以省级及以上药品检测机构或口岸药品检测机构出具的检测结果

进行评分，药品监督管理局质量抽查抽验情况可以近三年以来国家及省级以上药品监督管理局发布的药品质量公告或通报等为依据，药品抽检不合格记录指药品含量、杂质、装量差异、溶出度等与生产过程密切相关的指标存在不合格记录。

临床疗效，即申报药品在严格控制环境下对患者产生的治疗结果情况。可根据随机对照临床试验中患者用药后的主要临床结局、次要临床结局和患者报告结局等相关指标进行评价。

临床效果，即申报药品在真实世界的临床环境下所表现出的治疗结果情况。可根据真实世界数据中患者用药后的主要临床结局、次要临床结局和患者报告结局等相关指标进行评价。

不良反应，即申报药品临床使用不良反应的发生情况。根据药品临床使用的真实世界数据或者临床安全性文献资料、国家药品不良反应监测系统、卫健部门通报药品使用时出现的不良反应的严重程度、发生率等情况进行评价。

价格水平，即申报药品单位可比价格水平。可根据价格的绝对值、降幅以及排名情况进行评价。

2.6.2 供应评价维度 供应评价维度下包含生产能力、市场规模、配送能力 3 个一级指标，原料保障、药品产量、市场占有情况、市场覆盖情况、配送规模、配送效率 6 个二级指标。

原料保障，即申报药品原料保障情况，可根据申报药品主要原料来源（主要原料来源于本企业、本集团其他企业或者其他企业）、原料产量、成本等进行评价。

药品产量，即申报药品近一年产量情况，可根据申报药品品种在《中国医药统计年报（最新版）》中主要品种产量统计数据进行评价。

市场占有情况，即申报药品市场占有情况，包括申报药品销售时间长度和申报药品市场份额；其中药品销售时长可根据申报药品在国内市场上连续销售时间长短进行评价，市场份额可根据省级药品集中采购平台上近一年申报药品的采购量占同采购品种总采购量的比例进行评价。

市场覆盖情况，即申报药品市场覆盖情况，包括申报药品覆盖省 / 直辖市 / 自治区、覆盖医疗机构的数量等。其中覆盖省 / 直辖市 / 自治区情况可根据申报药品近一年在全国省级药品集中采购平台挂网的个数占全国省份个数的比例进行评价，覆盖医疗机构的情况可根据申报药品近一年在省级药品集中采购平台中采购医疗机构数占采购同品种的总医疗机构数的比例进行评价。

配送规模，即近一年申报企业药品配送规模情况，包括申报药品配送规模和配送企业数量等，其中配送企业规模可根据配送企业的企业职工人数、销售额、资产总额等指标进行评价，配送企业数量可根据申报品种在采购区域内拥有的配送企业数量进行评价。

配送效率，即近一年申报企业药品配送效率情况，包括申报药品配送及时率、配送数量满足率和配送金额满足率等，其中配送及时率根据省级药品集中采购平台中申报药品按要求及时配送的累计包装数量占医院订单累计包装数量的比例进行评价、配送数量满足率根据配送企业完成配送申报药品订单明细数量占医疗机构申报药品订单明细数量总和的比例进行评价、配送金额满足率根据配送企业申报药品配送金额占医疗机构申报药品订单总金额的比例进行评价。

2.6.3 企业评价维度 企业评价维度下包含企业信誉 1 个一级指标，财务状况、不良记录 2 个二级指标。

财务状况，申报企业财务状况情况，即用价值形态反映企业经营活动的状况。可根据工业和信息化部《中国医药统计年报（最新版）》中统计的申报企业资产总额、负债、主营业务收入、利润等进行评价。

不良记录，申报企业存在的不良记录信息情况。可根据国家企业信用信息公示系统公布的经营异常名录公告和严重违法失信名单公告、官方媒体公开报道的不良记录、国家 / 省级药品监督管理局、国家 / 省级药品集中采购平台、医保局网站公布的不良记录（不符合药品生产质量管理规范、中标产品废标记录、中选断供、医药购销领域商业贿赂不良记录）等进行评价。

3 讨论

3.1 构建药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架方法的科学性

研究基于 MCDA 理论和德尔菲法构建药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架。MCDA 能够同时对客观测量和主观判断进行综合考量，具备详细的执行步骤和使用指南，已经越来越多地用于卫生决策领域，并在药品采购决策中有所应用，且已证实可以用于提高药品采购决策的透明度和一致性 [13-14]。德尔菲法中选择咨询专家数量较为合理 [11]，专家均为从事药品集中带量采购相关工作多年，具有丰富的工作经验，专家具有一定的代表性。专家积极系数为 88.23% ＞ 70%，专家权威系数为 0.82 ＞ 0.70，整体指标重要性、敏感性和可行性的专家协调系数对应的 P 值均小于 0.05，纳入指标的重要性 / 敏感性 / 可行性评分均在 3.5 分以上，变异系数均小于 0.3，专

家的积极性高，权威程度、协调程度和集中程度都较好，药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架具有一定的科学性和可靠性。

3.2 构建药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架的意义

对国家或地区药品集中带量采购政策相关文件进行梳理发现，国家、地区之间对药品集中带量采购供应企业的遴选准则有所差异[15]，在当前推动药品集中带量采购工作常态化制度化开展的政策背景下[16]，有必要对药品集中带量采购供应企业的遴选准则进行总结归纳，确定最终准则框架以支持科学决策。本研究以《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》中药品评价框架、药品供应链评价框架为基础，系统梳理和分析国家或地区药品集中带量采购政策相关文件，整理实践中应用到的遴选指标，检索国内外文献进行补充，并通过德尔菲法筛选确定最终的药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架，包括药品、供应、企业 3 个维度，药品维度主要考量的是药品的本身特质，包含药品质量、有效性、安全性和经济性，有利于保障选择可提供质优价廉药品的供应企业，此外通过生产能力、市场规模、配送能力评价药品供应情况，通过企业信誉对供应企业资质进行考量，可以科学评价企业供应保障能力，有利于保障选出来的质优价廉的药品顺利采购，提高患者的可及性和政策获得感。药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架可引导企业注重药品、供应等多方面的提升，为社会带来更多的健康获益[17]，同时也对国家或地方层面后续常态化的药品集中带量采购实践具有一定的现实指导意义。

3.3 药品集中带量采购供应企业遴选多准则决策框架的应用建议

为了保证决策框架在实践中发挥作用，在实际运用中需要注意以下四点：第一，为促进决策框架的应用、提高决策效率，各相关利益主体和使用者应该熟悉 MCDA 方法的具体流程和步骤；第二，应注重对企业提供的证据的准确性和真实性的评价与审核，决策的科学性很大程度上取决于所使用数据的准确性和真实性；第三，应加强对真实世界证据、官方公布的客观数据的应用，将客观数据作为评审依据，减少主观判断；第四，可根据实际需求自行设置附加指标，并根据实际决策情境合理确定指标权重；第五，进一步细化评分标准，在实践中不断修正和完善决策框架，以适用于不同决策场景的采购情况，发挥其对采购实践的指导作用。

参考文献

[1] Carone G，Schwierz C，Xavier A. Cost-containment policies in public pharmaceutical spending in the EU [M]. Belgium：European Union，2012.

[2] 杜雪，马珺，黎雯霞 . 药品带量采购存在的问题与对策分析 [J]. 卫生经济研究，2020，37（8）：42-44，49.

[3] 李玉水，康洽福，韩雅清，等 . 药品带量采购对患者医疗负担的政策效应研究 [J]. 卫生经济研究，2021，38（4）：28-32.

[4] 张雨薇，王莉 . 我国国家药品集中采购政策实施效果的系统评价 [J]. 医学与社会，2023，36（3）：119-124.

[5] 唐密，杨燕，胡善联，等 . 多准则决策分析应用于卫生决策的理论基础与进展 [J]. 中国卫生资源，2020，23（4）：326-331.

[6] Thokala P，Devlin N，Marsh K，et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making：an introduction：report 1 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force [J]. Value Health，2016，19（1）：1-13.

[7] 国家卫生健康委药物政策与基本药物制度司 . 国家卫生健康委办公厅关于规范开展药品临床综合评价工作的通知 [EB/OL]. https：//www. nhc. gov. cn/yaozs/s2908/ 202107/532e20800a47415d84adf3797b0f4869. shtml（2023-03-26）.

[8] 黄哲，徐阳，徐凤翔 . 区块链技术背景下药品供应链评价模型的构建 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（2）：211-216.

[9] 刘伟涛，顾鸿，李春洪 . 基于德尔菲法的专家评估方法 [J]. 计算机工程，2011（S1）：189-191.

[10] 冯旅帆，彭颖，金春林 . 健康发展力评价指标体系构建 [J]. 中国卫生资源，2021，24（2）：139-142.

[11] 孙振球 . 医学综合评价方法及其应用 [M]. 北京：化学工业出版社，2006.

[12] 王美凤，葛燕萍，葛振兴，等 . 上海市老年人健康服务供给评价指标体系构建 [J]. 卫生经济研究，2021，38（9）：29-32.

[13] Farghaly MN，Dallal SAMA，Fasseeh AN，et al. Recommendation for a pilot MCDA tool to support the value-based purchasing of generic medicines in the UAE [J]. Front Pharmacol，2021，12：680-737.

[14] Abdullah AH，Holtorf AP，Al-Hussaini M，et al. Stakeholder driven development of a multi-criteria decision analysis tool for purchasing off-patent pharmaceuticals in Kuwait [J]. J Pharm Policy Pract，2019，12（1）：9.

[15] 张梦然，田磊 . 注射剂区域带量采购的模式研究和政策建议 [J]. 中国药房，2021，32（15）：1908-1915.

[16] 国务院办公厅 . 国务院办公厅关于推动药品集中带量采购工作常态化制度化开展的意见（国办发〔2021〕2 号）[EB/OL]. https：//www. gov. cn/zhengce/content/2021-01/28/content_5583305. html，2023-03-26.

[17] Inotai A，Brixner D，Maniadakis N，et al. Development of multi-criteria decision analysis（MCDA）framework for off-patent pharmaceuticals-An application on improving tender decision making in Indonesia [J]. BMC Health Serv Res，2018，18（1）：1003.

（收稿日期：2023-05-08；修回日期：2023-06-12）

药用辅料二丁基羟基甲苯吸收系数测定的能力验证研究

王珏，许凯，杨洋，杨锐，肖新月，杨会英*（中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室，北京 100050）

摘要：目的 设计和组织紫外分光光度计法测定药用辅料二丁基羟基甲苯的吸收系数的能力验证项目（编号 NIFDC-PT-398），评价参加者吸收系数的测定能力。**方法** 按照中国合格评定国家认可委员会（CNAS）规定的程序进行样品制备，在发样前完成均匀性和稳定性检验，结果均符合要求。采用基于 z 比分数的稳健统计方法对上报数据进行统计分析，将稳健均值作为能力验证指定值，将稳健标准差作为能力评定标准差。**结果** 在提交的 130 个数据中，108 家为“满意”，12 家为“可疑”，10 家为“不满意”，满意率为 83.1%。**结论** 本次能力验证项目检测结果主要受到样品溶液配制中溶液转移体积及器具、称样量、紫外分光光度计、溶剂等因素影响，建议未获得满意结果的实验室通过采用移液管、改正溶液配制时的转移体积、按要求满足称样量、规范紫外分光光度计的操作等措施以保证结果的准确。

关键词：药用辅料；吸收系数；能力验证
中图分类号：R95，R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2224-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.045

Proficiency test on the determination of absorption coefficient of pharmaceutical excipient dibutylhydroxytoluene

WANG Jue, XU Kai, YANG Yang, YANG Rui, XIAO Xin-yue, YANG Hui-ying* (*NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients*, *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050)

Abstract: Objective To design and organize the proficiency test project (No. NIFDC-PT-398) to determine the absorption coefficient of the pharmaceutical excipient dibutylhydroxytoluene by ultraviolet spectrophotometer and evaluate participants' ability in determining the absorption coefficient. **Methods** The samples were prepared according to the procedures specified in the China National Accreditation Service for Conformity Assessment. The uniformity and stability were tested were completed before the sample was issued, and the results met the requirements. Robust statistical method based on the z score was used to analyze the reported data. The robust mean was used as the specified value in the ability verification, and the robust standard deviation was used as the standard deviation in the ability evaluation. **Results** Among the 130 data submitted, 108 laboratory results were satisfactory, 12 were suspicious, and 10 were not qualified. The satisfaction rate was 83.1%. **Conclusion** The proficiency test project is mainly affected by factors such as solution transfer volume and instrument, sample weight, ultraviolet spectrophotometer and solvent in the sample solution preparation. Correcting the transfer volume and instrument during solution preparation, proper sample weight, and standard operation of ultraviolet spectrophotometer will help ensure the accuracy of the results.

Key words: pharmaceutical excipient; absorption coefficient; proficiency test

作者简介：王珏，女，硕士，助理研究员，主要从事药用辅料质量控制和应用研究，email：myxsj2007@163.com *通信作者：杨会英，女，主任技师，主要从事药包材和药用辅料质量控制研究，email：yanghuiying@nicpbp.org.cn

随着我国医药工业的发展和药品监管环境的不断完善，制药行业对药用辅料质量控制的关注度不断提高，各实验室药用辅料检测检验水平需要跟随行业发展和监管要求获得有效提升。能力验证（proficiency test，PT）就是通过实验室间比对，按照预先制订的准则评价参加者能力的一种有计划的活动[1]，可以有效帮助实验室识别与其他实验室之间的差异、了解自身实验室在具体项目检测过程中存在的技术漏洞，提前识别潜在风险，进而完善自身实验室的质量控制体系，提升检验检测工作质量[2-6]。

二丁基羟基甲苯（BHT）是一种常用的抗氧剂，在药用辅料和药品包装材料中都有广泛的应用，其质量标准收载于《中国药典》2020 年版四部。吸收系数是反映纯度的重要检测项目，采用紫外分光光度法测定。虽然，紫外分光光度法在药用辅料检测领域是常见的检测方法，但吸光系数测定时仍然存在容易忽略的操作要点，需要实验室具备较高的技术能力[7]。基于以上考量，本次能力验证计划（NIFDC-PT-398）由中国食品药品检定研究院组织实施，面向全国各省、地、市药检机构、相关药品生产企业和第三方实验室等，提供行业内各相关检验检测单位参加能力验证的机会。本文对本次能力验证计划的实施情况和结果进行分析和总结，通过对原始记录和检测报告的深入解读，向参加实验室提出技术改进的建议。

1　仪器与试药

本项目中各参加实验室使用的仪器型号不同，以下仅列出其中一家实验室使用的仪器及型号：UV2550 型紫外分光光度仪（日本 Shimadzu 公司）；十万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；乙醇（国药化学试剂有限公司）。

2　方法与结果

2.1　能力验证样品的制备

本次能力验证样品为超纯的二丁基羟基甲苯（纯度＞ 99.5%，水分为 0.02%，阿拉丁生化科技股份有限公司）。样品为白色结晶状粉末，热稳定性良好。在 23 ℃、25% 湿度条件下避光分装于 2 mL 棕色西林瓶中，每瓶约为 100 mg，于室温下保存。

2.2　样品均匀性和稳定性研究

依据能力验证样品均匀性和稳定性评价指南（CNAS-GL003：2018）[8] 和该项目自身特点，对样品的均匀性和稳定性进行评价。

在样品发出前，以随机方式抽取 10 瓶样品用于均匀性检验，对于抽取的每瓶样品以外标法测定含量，采用单因素方差分析法评价均匀性，结果 F ＝ 0.1033，表明样品均匀。另取 10 瓶样品于 40 ℃、60% 湿度条件下放置 10 d 后测定吸收系数，并用 t 检验评价与 0 d 样品测定结果的一致性，结果 P ＝ 0.766，表明样品在该条件下放置 10 d 稳定。参加者数据回收后，取室温（25±2）℃、相对湿度＜ 50% 放置的完整包装的样品 10 瓶，以吸收系数为测定指标考察样品长期稳定性，采用 t 检验评价，结果 P ＝ 0.439，表明样品于上述条件下放置 1 个月稳定。结果符合要求。

2.3　样品的分发和要求

本计划向报名参加的 133 家实验室发放了样品，每个单位 3 瓶，要求收到样品后在能力验证平台进行样品确认，将样品室温保存并尽快按照作业指导书要求进行检测。检测完成后提交 2 份平行测定的吸收系数结果并报告均值，均值保留小数点后 2 位。

2.4　参加实验室的情况分析

报名参加本次能力验证计划的 133 家实验室分布于除青海省、广西壮族自治区和西藏自治区外的 29 个省 / 自治区 / 直辖市。其中 100 家实验室来自地市级检验检测机构（占比 75.2%），22 家实验室来自省级检验检测机构（占比 16.5%），11 家实验室来自企业实验室（占比 8.3%），每个省 / 自治区 / 直辖市的各级实验室分布见图 1。

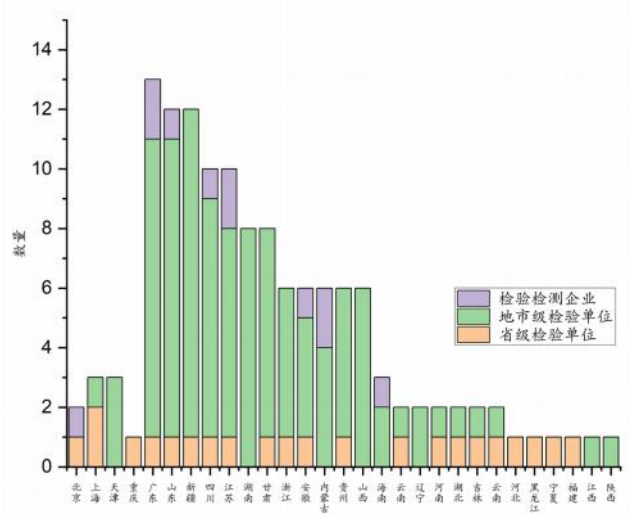

图 1　参加实验室级别分布情况

Fig 1　Distribution of participating laboratory level

133 家报名的实验室中，有 3 家退出，其余 130 家实验室按要求反馈了结果并提交了报告和原始数据记录。对 130 个实验室提交的结果分布直方图可以看出数据呈单峰分布（见图 2）。

2.5　参加者测定结果的统计分析和评定

根据中国合格评定国家认可委员会（China

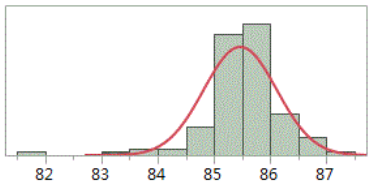

图 2 参加单位结果分布直方图

Fig 2 Distribution histogram of participating laboratories

National Accreditation Service for Conformity Assessment，CNAS）能力验证结果的统计处理和能力评价指南 [9] 以及利用实验室间比对进行能力验证的统计方法 [10]，能力验证统计方法一般可用经典统计算法或稳健统计方法进行。与经典统计算法相比，稳健统计法是对给定概率模型假定条件的微小偏离不敏感的统计方法，能够减少正态分布假设或异常值（离群值）对总体的影响。具体算法包括中位数和中位绝对离差或标准四分位距法、迭代算法 A、算法 S 等。迭代法是国际标准化组织（International Organization for Standardization，ISO）标准推荐的稳健统计方法 [11]，此方法不需要对“离群值”进行人为干预，其原理是对按顺序排列，位于数据排列两端远离中位值的可疑值或离群值均以较小权重予以保留，与中位值接近的值则以较大权重参与计算，充分利用了全部测量数据的信息。

在本计划中，采用迭代算法 A 获得数据总体的稳健均值和稳健标准差，作为能力验证指定值和标准差，采用 z 比分数评价各参加实验室的结果。评价原则为：当 $|z| \leqslant 2$ 时，结果为“满意”；当 $|z|$ 在 2 ～ 3 时，结果为“可疑”；当 $|z| \geqslant 3$ 时，结果为“不满意”。

以全部报送结果的 130 家实验室结果为统计总体，计算极大值、极小值、极差、均值、相对标准偏差（%）等统计量，采用迭代算法 A 计算得到稳健均值（reference）和稳健标准差（σ），分别作为能力验证指定值（x_{pt}）和能力评定标准差（σ）。按照下式计算各参加实验室的 z 比分数。

$$z_i = (x_i - x_{pt}) / \sigma$$

其中，x_i 为参加者结果，x_{pt} 为能力验证指定值，σ 为能力评定标准差。由于在本计划中指定值的不确定度经下式计算小于 0.3σ，所以指定值的不确定度可以忽略。

$$u(x_{pt}) = 1.25 \times s^* / \sqrt{p}$$

其中，s^* 为稳健标准差，p 为样本数。

计算 130 家实验室结果的 z 比分数，108 家为“满意”，12 家为“可疑”，10 家为“不满意”，z 值分布表见表 2，采用柱状图 [12] 绘制所有参加者的 z 比分数分布图，结果见图 3。

表 1 检测结果对统计量汇总

Tab 1 Summary of test results for statistics

	Count/N	Reference	Max	Min	Rang	Mean	*RSD*/%	σ
Sample	130	85.50	87.31	81.80	5.51	85.47	0.76	0.3595

表 2 实验室 z 值分布

Tab 2 z value distribution

z 值范围	实验室数量	比例 /%
$\|z\| \leqslant 2$	108	83.1
$2 < \|z\| < 3$	12	9.2
$\|z\| \geqslant 3$	10	7.7

3 讨论

3.1 本次能力验证计划的结果分析

本次能力验证检测方法参考《中国药典》2020 年版四部二丁基羟基甲苯“吸收系数”检查项下的方法，但在作业指导书中明确了称样量。由于紫外分光光度法是实验室检测的常用方法，因此报名单位数较多，而且地市级检验检测实验室和企业实验室占绝大多数，尤其是中西部地区的检验检测单位与往年相比数量显著增加。

从统计结果来看，“可疑”和“不满意”结果的 22 家实验室中，16 家为市级药检单位，4 家为企业检验检测实验室，2 家为省级药检机构，多分布于新疆、内蒙、贵州、甘肃、山西等中西部地区。这说明在这些地区的实验室检测能力仍存在较大的提升空间。其中省级检测实验室“可疑”结果数为 1（占省级检验检测实验室结果总数的 4.8%），“不满意”结果数为 1（占省级检验检测实验室结果总数的 4.8%）；地市级检验检测实验室“可疑”结果数为 10（占地市级检验检测实验室结果总数的 10.1%），“不满意”结果数为 6（占地市级检验检测实验室结果总数的 6.1%）；企业检测实验室“可疑”结果数为 1（占企业检验检测实验室结果总数的 10%），“不满意”结果数为 3（占企业检验检测实验室结果总数的 30%）。从以上结果可以看出地市级和企业检验检测实验室满意率较低（分别为 84% 和 60%），尤其是企业检验检测实验室能力仍需进一步提升。

3.2 分析过程质量控制中存在的问题

采用紫外分光光度法对吸收系数进行测定，由于规定的浓度较低，因此十分考验参加者准确称量和进行溶液配制等基本操作，如应尽可能保证最大的称样量，最少的溶液稀释次数以及移液

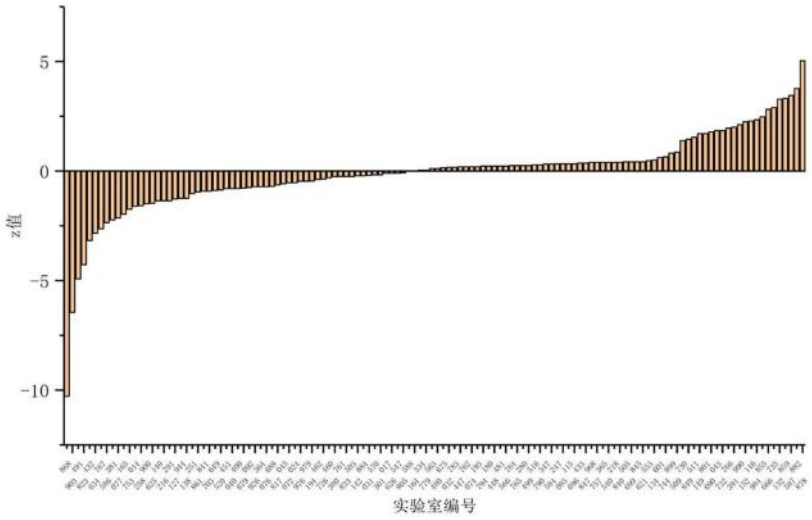

图 3　实验室 *z* 比分数柱状图

Fig 3　Laboratory *z*-score bar chart

体积最小应为 5 mL 等。同时对规范使用紫外分光光度法测定吸光系数的具体技术细节要求也应该注意，如吸收池配对应检测透光率，保证在 0.3% 以下；吸收池每次放入样品室时的方向应相同；使用如乙醇这种挥发性溶剂时在检测前应检查溶剂在测定波长附近是否符合要求，测定过程应加盖防止挥发的同时控制好环境温度；测定前应在规定波长适宜范围内进行扫描以确定最大波长，除另有规定外，最大吸收波长应在规定波长的 ±2 nm 以内，如本次计划中规定的是 278 nm，则最大吸收波长应在（278±2）nm 内。若最大吸收波长发生偏离则应考虑仪器波长的准确度 [13]。

在判定为不满意或可疑结果的单位报告中主要发现了以下问题：① 称样量过小，不符合《中国药典》2020 年版的规定；② 稀释溶液移取体积过小，导致溶液配制浓度误差增大；③ 错误的称量过程以及样品转移未使用移液管，从而导致误差增大；④ 平行测定的相对平均偏差不符合要求；⑤ 用酶标仪代替紫外分光光度计进行测定；⑥ 未在临近波长处考察吸光度，无法保证最大吸收。

3.3　技术建议

针对上述问题给出以下几条建议：各实验室在执行《中国药典》标准时，应重视《中国药品检验标准操作规范》中的相关规定，并按照规范中的要求进行测试；实验用紫外 - 可见分光光度计应按照国家计量检定规程进行检定，对于老旧仪器应及时更新，用到的量瓶和移液管均应经检定合格后方可使用，溶液配制时须使用检定后的移液管而不是移液枪；明确溶液配制时的移取体积会较大程度上影响检测准确度，在本项目中溶液转移稀释时所取体积应不少于 5 mL；在吸收系数测定实验中应在临近波长处考察吸光度，确保在最大波长的准确性。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会 . CNAS-CL03 能力验证提供者认可准则 [S]. 2010.

[2] 姚尚辰，马步芳，张培培，等 . 抗生素 HPLC 含量测定能力验证研究 [J]. 中国抗生素杂志，2020，45（10）：1034-1039.

[3] 贝琦华，李祎，刘逸韬，等 . 电位滴定法测定尼美舒利含量能力验证结果分析 [J]. 中国药事，2019，33（3）：290-294.

[4] 陈祝康，陆继伟，谷广志，等 . 药品的比旋度测定能力验证研究 [J]. 中国药事，2020，34（12）：1396-1400.

[5] 李耀磊，李海亮，昝珂，等 . 远志药材中黄曲霉毒素 B1 残留量测定能力验证研究 [J]. 中国新药杂志，2022，31（4）：337-342.

[6] 丁有学，秦玺，张河战，等 . 重组蛋白溶液 pH 测定的能力验证结果分析 [J]. 中国药师，2019，22（9）：1722-1724.

[7] 陆明，王林波，沈漪，等 . 盐酸二甲双胍药品吸收系数测定的能力验证 [J]. 中国医药工业杂志，2014，45（8）：758-762.

[8] CNAS-GL003. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南 [S]. 北京：中国合格评定国家认可委员会，2018.

[9] CNAS-GL002. 能力验证结果的统计处理和能力评价指南 [S]. 北京：中国合格评定国家认可委员会，2018.

[10] GB/T 28043—2019/ISO 13528：2015. 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法 [S]. 北京：中国合格评定国家认可委员会，2019.

[11] 毛燕 . 四分位法和迭代法对数据分散的能力验证检测数据统计分析结果的比较 [J]. 冶金分析，2016，36（5）：76-81.

[12] 寻延滨，敖红光，王林波，等 . 关于实验室能力比对 Z 比分数统计结果的几种图示方式的比较 [J]. 中南药学，2016，14（12）：1404-1407.

[13] 中国药品生物制品检定所 . 中国药品检验标准操作规范 [M]. 2010 年版 . 北京：中国医药科技出版社，2010：168-172.

（收稿日期：2022-12-05；修回日期：2023-01-16）

基于人工智能的肿瘤患者免疫相关不良反应管理软件的应用及效果评价

孙宝[1, 2]，罗芝英[1, 2]，傅媛媛[1, 3]，张毕奎[1, 2]，刘文辉[1, 2*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 中南大学临床药学研究所，长沙 410011；3. 浏阳市妇幼保健院，湖南 浏阳 410399）

摘要：目的 探索基于人工智能的肿瘤患者免疫相关不良反应管理软件的应用及效果评价。**方法** 通过采集接受免疫检查点抑制剂肿瘤患者住院、门诊及居家的全病程信息数据，构建医学相关知识库，对患者数据进行智能提取和分析后推荐管理方案，最后以患者免疫相关不良反应发生率作为评价指标进行效果评价。**结果** 通过对肿瘤患者信息以及相关指南、文献、药品说明书等信息的抽提和融合，构建了智能医学知识库。随后，智能医学知识库可以在不同场景下给肿瘤患者推荐个体化治疗和管理方案。患者免疫相关不良反应发生率由 38.5% 降至 31.2%。**结论** 基于人工智能的肿瘤患者免疫相关不良反应管理对降低临床患者不良反应有较大帮助，可以提升并优化肿瘤患者治疗和自我管理的质量。

关键词：人工智能；肿瘤患者；免疫相关不良反应；智能医学知识库；治疗和管理
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2228-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.046

Artificial intelligence-based software in the treatment and management of tumor patients with immune-related adverse reactions

SUN Bao[1, 2], LUO Zhi-ying[1, 2], FU Yuan-yuan[1, 3], ZHANG Bi-kui[1, 2], LIU Wen-hui[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Institute of Clinical Pharmacy*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 3. *Liuyang Maternity and Infant Hosipital*, *Liuyang Hunan* 410399)

Abstract: Objective To evaluate the effect of artificial intelligence on immune-related adverse reaction management in tumor patients. **Methods** Through collecting data of inpatients, outpatients and home disease course information of cancer patients received immune checkpoint inhibitors, the medical knowledge related data base was established. Data of patient was analyzed before recommending the management plan. Finally, the incidence of immune-related adverse reactions was used as an index to evaluate the effect. **Results** Through summarizing tumor patient information, related guidelines, literatures, drug instructions and other information, the intelligent medical knowledge base was constructed, which could recommend individualized treatment options for cancer patients in different scenarios. The incidence of immune-related adverse reactions decreased from 38.5% to 31.2%. **Conclusion** The management of immune-related adverse reactions in tumor patients based on artificial intelligence helps reduce adverse reactions in clinical practice, and optimize the quality of treatment and self-management of tumor patients.

Key words: artificial intelligence; tumor patient; immune-related adverse reaction; intelligent medical knowledge base; treatment and management

免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhib- itors，ICIs）疗法彻底改变了多种肿瘤的管理，目

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82104307）；湖南省自然科学基金项目（No. 2021JJ40865，No. 2021JJ40486）。
作者简介：孙宝，男，博士，主管药师，主要从事遗传药理学、药物基因组学研究，email：507630@csu.edu.cn *通信作者：刘文辉，女，副主任药师，副教授，主要从事抗肿瘤药物的合理使用以及免疫检查点抑制剂不良反应相关研究，email：menzi@csu.edu.cn

前也是治疗多种肿瘤的主要方法之一。ICIs，包括细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（cytotoxic T lymphocyte associated protein 4，CTLA-4）抑制剂、程序性细胞死亡受体 1（programmed cell death 1，PD-1）和程序性细胞死亡配体 1（programmed cell death ligand 1，PD-L1）抑制剂，主要靶向负调节 T 细胞介导的宿主免疫反应，进而激活免疫和发挥抗肿瘤作用[1]。随着越来越多的肿瘤患者接受 ICIs 治疗[2]，免疫相关不良事件（immune-related adverse events，irAEs）也逐渐增多[3]。这些 irAEs 可能会对器官系统（如胃肠道、内分泌腺、皮肤和肝脏）产生不同程度的影响[4-7]。而严重不良反应一旦发生，很可能危及患者生命[6]，这也成为了这一新疗法的主要的限制。

人工智能（artificial intelligence，AI）通过计算机算法和高通量数据的结合，构建训练和测试数据集模型[8]。目前 AI 用于医学领域的研究如火如荼，在个体化医学、智能诊疗和复杂性疾病的诊断和预后等方面应用广泛[9]。Thompson 等[10]认为 AI 凭借其先进的计算技术，能够减少错误，改善患者治疗。同时研究表明，将基于 AI 的诊断算法与医师的解释相结合，可以提高难以分辨的癌症亚型的诊断准确性[11]。基于此，我们利用 AI 技术开发肿瘤患者 irAEs 治疗和管理功能的软件，以期降低肿瘤患者 irAEs，提高患者生活质量。

1 IrAEs 治疗和管理软件功能介绍

1.1 功能简介及界面展示

本院开发了 irAEs 治疗和管理软件，通过手机端采集患者数据，为每位肿瘤患者单独建档，并进行了包括药品不良反应、静脉血栓栓塞风险、化疗毒性预测、情绪状态、生活质量、体力状态、营养状况、疼痛、功能状态共九个维度的筛查、评估（见图 1），进行定期监测、健康追踪、医患交流、科普推送等，采集患者治疗方案、体质量指数等数据。集成了肿瘤患者从诊断前到治疗中、治疗后与疾病及用药安全相关的数据库。患者通过自助浏览知识库，可以获取有关疾病知识、药品行情、用药指导、不良反应管理、饮食管理、情绪管理、基因检测以及科普文章等肿瘤相关的最新知识。患者通过自学和自我管理，可以更好地了解和应对 irAEs，提高生活质量，延长生存期。

1.2 技术方案介绍

irAEs 智能模块通过资料收集、信息提取和知识更新三个阶段来实现。资料收集阶段，基于医学教科书、疾病指南、药品说明书、医保信息以及专家临床经验等进行资料数据的采集工作。信息提取阶段，将收集到的资料信息进行整理，同时由相关专家对各类医学信息进行质量评估，去除重复冗杂的信息，对错误信息进行修正，并将整理的部分文字以生动活泼的图片形式进行展示，增加患者阅读的科普性和趣味性。知识更新阶段，为保证知识库的准确性，根据最新的资料持续性地迭代更新入库的有效知识。目前涵盖了具体癌种数量 33 条，药品信息 273 条，肿瘤治疗相关信息 86 条，图片 200 余幅，文字内容总计 75 万字。具体知识库构建流程见图 2。

门诊或居家患者通过手机端上传治疗相关信息，进行 irAEs 的评估，后台将录入的全量信息进行整合、标准化，并自动判读后，将评估结果推送至患者手机端。根据评估结果的不同分级，为患者自动提供进一步的建议。同时后台还可以根据结果，在知识库中自动筛选相关词条，并自动推送，帮助患者进行自学和自我管理。具体智能模块流程见图 3。

1.3 使用方法

患者通过扫描“E 药智库”二维码，进入主页面，并进行注册。点击“人工智能”模块进行九个维度的评估，自动获取由系统推送的建议方案。点击疾病科普、药品行情、用药指导、不良反应指导、膳食及生活指导、疼痛管理、基因检测、科普文章这八大模块（见图 4），患者可以获取相应的知识库内容，实现自学与自我管理。

2 IrAEs 治疗和管理软件应用与效果评价

2.1 IrAEs 治疗和管理软件的 irAEs 发生率

为评价 irAEs 治疗和管理软件对使用 ICIs 患者 irAEs 发生率的影响，本研究抽提某三甲医院住院和门诊肿瘤患者全病程数据信息，对全病历中 2022 年 1—6 月份的常见 irAEs 进行判读分析，计算发生 irAEs 的患者占使用 ICIs 总体人群的比率，具体情况见图 5。IrAEs 发生率（%）=（发生 irAEs 的患者）/（使用 ICIs 总体人群）×100%。

2.2 IrAEs 治疗和管理软件的应用效果

为评价 irAEs 治疗和管理软件的应用效果，本研究抽提 2022 年 1—6 月未使用 irAEs 治疗和管理软件的 irAEs 发生率（均值为 38.5%）和 2022 年 1—6 月使用 irAEs 治疗和管理软件的 irAEs 发生率（均值为 31.2%）。分析发现，使用基于 AI 技术的治疗和管理软件能够显著降低 irAEs 发生率，具体见图 6。

图 1 IrAEs 治疗和管理软件功能介绍及界面展示

Fig 1 Function introduction and interface display of irAEs treatment and management software

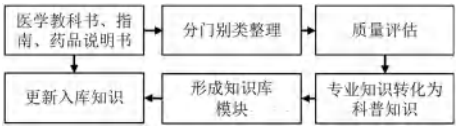

图 2 基于自主学习的知识库模块构建流程图

Fig 2 Knowledge base module construction based on autonomous learning

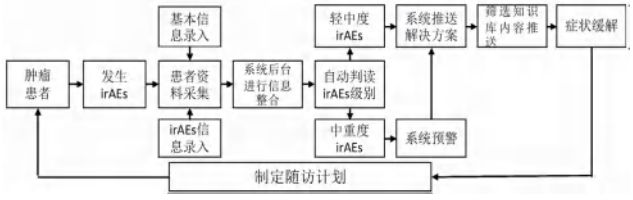

图 3 基于 AI 技术的肿瘤患者 irAEs 治疗和管理的流程图

Fig 3 Treatment and management of irAEs in tumor patients based on AI

3 讨论

IrAEs 仍是限制 ICIs 临床使用的主要因素之一。我们利用 AI 技术开发智能 irAEs 治疗和管理软件，能够根据患者疾病症状和相关指标推荐个体化治疗和管理的方案，对减少患者 irAEs 的发生意义重大。尽管该软件展示了预期的结果，但是目前还处于调试阶段，还需要更多的数据进行进一步验证。此外，我们仍会在临床使用中不断优化相关功能和方案，以便更好地服务于临床。

图 4 知识库八大模块界面

Fig 4 Eight modulars of knowledge base

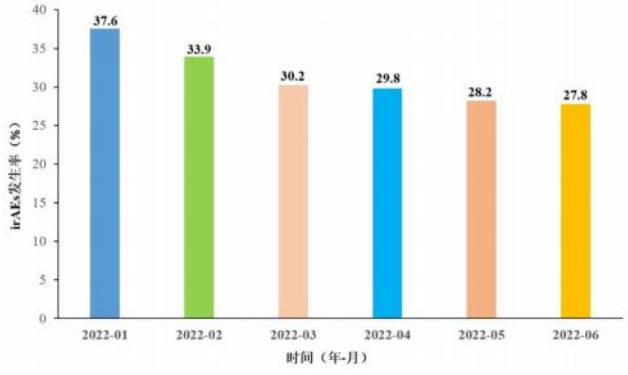

图 5 某三甲医院使用 irAEs 治疗和管理软件 irAEs 的发生率

Fig 5 Incidence of irAEs with irAEs treatment and management software in a tertiary hospital

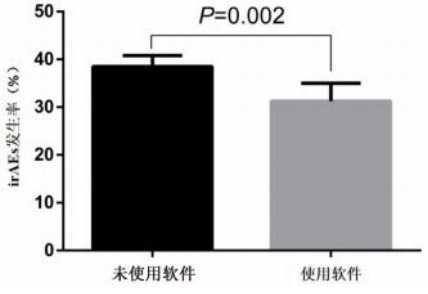

图 6 某三甲医院使用 irAEs 治疗和管理软件前后 irAEs 的发生率

Fig 6 Incidence of irAEs before and after the use of irAEs treatment and management software in a tertiary hospital

AI 能够以人类无法识别的方式组合信息和识别模式，为免疫疗法带来了巨大的希望[12]。尽管 AI 方法在癌症免疫治疗方面具有强大的潜力，但将 AI 技术整合到医疗服务中仍面临许多障碍。首先，可用数据量的不足是一大主要的障碍。考虑到商业目的或者个人隐私的问题，医院和研究机构之间数据信息不能共享，不利于提高 AI 在

医疗服务中的准确性。其次，原始数据和模型中被忽视的假设可能会导致 AI 系统提供错误的建议[13]。因此，基于免疫治疗监测和策略相当复杂的情况，我们不应夸大 AI 在免疫治疗中的前景。最后，临床医师应该与 AI 相互合作，相互学习，以更好地服务于患者的免疫治疗。

参考文献

[1] Haslam A，Prasad V. Estimation of the percentage of US patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs [J]. JAMA Netw Open，2019，2（5）：e192535.

[2] Haslam A，Gill J，Prasad V. Estimation of the percentage of US patients with cancer who are eligible for immune checkpoint inhibitor drugs [J]. JAMA Netw Open，2020，3（3）：e200423.

[3] Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy [J]. Nat Commun，2020，11（1）：3801.

[4] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.

[5] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.

[6] Dougan M. Checkpoint blockade toxicity and immune homeostasis in the gastrointestinal tract [J]. Front Immunol，2017，8：1547.

[7] Liu W，Chen B，Liu Y，et al. Durvalumab-induced demyelinating lesions in a patient with extensive-stage small-cell lung cancer：a case report [J]. Front Pharmacol，2021，12：799728.

[8] Kantarjian H，Yu PP. Artificial intelligence，big data，and cancer [J]. JAMA Oncol，2015，1（5）：573-574.

[9] 高萌，杨仙鸿，姜祎群 . 人工智能在医学领域的研究进展 [J]. 中华皮肤科杂志，2019，52（2）：131-134.

[10] Thompson RF，Valdes G，Fuller CD，et al. Artificial intelligence in radiation oncology：a specialty-wide disruptive transformation? [J]. Radiother Oncol，2018，129（3）：421-426.

[11] Rajkomar A，Dean J，Kohane I. Machine learning in medicine [J]. N Engl J Med，2019，380（14）：1347-1358.

[12] Jabbari P，Rezaei N. Artificial intelligence and immunotherapy [J]. Expert Rev Clin Immunol，2019，15（7）：689-691.

[13] Cabitza F，Rasoini R，Gensini GF. Unintended consequences of machine learning in medicine [J]. JAMA，2017，318（6）：517-518.

（收稿日期：2022-11-14；修回日期：2023-03-28）

《中南药学》2024 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流，我刊现在开始启动 2024 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药学硕、博毕业研究生的研究论文、综述，一经录用，即可在我刊 2024 年 1 — 6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊，被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录，被中国核心期刊（遴选）数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体征稿要求及处理如下：

1. 与药学相关的研究论文或综述；
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”；
3. 全日制硕士、博士毕业研究生；
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版；
5. 投稿时间：即日起至 2024 年 1 月底；
6. 出刊时间：2024 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日，共 6 期，带基金项目的文章优先刊登；
7. 投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net，请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们：

Tel：0731-82258487，0731-84895602

email：znyxzz2003@vip.163.com

药品不良反应信号监测专题

基于美国 FAERS 数据库对免疫检查点抑制剂致肌炎、心肌炎和重症肌无力重叠综合征的分析

吴汀溪[1]，张杨[2]，石延枫[3]，曹明楠[1]，朱斌[1]，武明芬[1]，赵志刚[1*]（1. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部，北京 100070；2. 首都医科大学附属北京友谊医院药学部，北京 100050；3. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部国家神经系统疾病临床医学研究中心卒中多组学创新中心，北京 100070）

摘要：目的 利用美国 FDA 不良事件报告系统（FAERS）挖掘免疫检查点抑制剂（ICIs）致肌炎、心肌炎和重症肌无力的信号，分析其重叠情况，为该类药在临床安全用药提供参考。**方法** 收集 2011 第 1 季度到 2021 年第 4 季度首要怀疑药物为 ICIs 的不良事件报告，采用报告比值比（ROR）法分别对 ICIs（包括阿替利珠单抗、阿维单抗、度伐利尤单抗、Cemiplimab、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、伊匹木单抗和 Tremelimumab）相关肌炎、心肌炎和重症肌无力不良事件进行信号挖掘，比较不同 ICIs 致相关不良事件信号强度，并分析出现肌炎、心肌炎和重症肌无力重叠综合征的病例和死亡报告。**结果** 共提取 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力病例 3046 例。除 Tremelimumab 外，其他 ICIs 均检测到致肌炎、心肌炎和重症肌无力的信号，有 20.29% 的患者存在重叠综合征，发生时间中位数为 21 d，病死率较高（重叠综合征：43.86%，单一：33.90%），有 2 例患者重新引入 ICIs 治疗后发生不良事件。**结论** 医师应特别警惕出现 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力的患者是否存在重叠现象，谨慎评估再重启 ICIs 治疗。

关键词：免疫检查点抑制剂；重叠综合征；FAERS；信号挖掘；报告比值比
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2232-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.047

Immune checkpoint inhibitor-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis overlap syndrome based on the US FDA adverse event reporting system

WU Ting-xi[1], ZHANG Yang[2], SHI Yan-feng[3], CAO Ming-nan[1], ZHU Bin[1], WU Ming-fen[1], ZHAO Zhi-gang[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100070; 2. *Department of Pharmacy*, *Beijing Friendship Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100050; 3. *Center of Excellence for Omics Research*, *National Clinical Research Center for Neurological Diseases*, *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100070)

Abstract: Objective To determine the risk signals of myositis, myocarditis and myasthenia gravis overlapping syndrome caused by immune checkpoint inhibitors (ICIs) based on the US FDA adverse event reporting system (FAERS), and to provide reference for the clinical drug safety. **Methods** Records were collected from the first quarter of 2011 to the fourth quarter of 2021. The reporting odds ratio (reporting odds ratio, ROR) method was used to mine the signals of myositis, myocarditis and myasthenia gravis caused by ICIs including atezolizumab, avelumab, durvalumab, cemiplimab,

基金项目：中国毒理学会临床毒理专业委员会基金（No.CST2021CT205）。
作者简介：吴汀溪，女，硕士，主要从事临床药学、药物警戒工作，email：wtx0122@126.com *通信作者：赵志刚，男，主任药师，教授，博士研究生导师，主要从事医院药事管理和临床药学工作，email：1022zzg@sina.com

nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab and tremelimumab. The safety signal intensity was compared among different ICIs, and the occurrence of overlapping syndrome was analyzed. **Results** Totally 3046 cases of ICIs-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis were collected. Except for tremelimumab, the signals of myositis, myocarditis and myasthenia gravis caused by ICIs were detected. 20.29% had overlapping syndrome associated with ICIs, the median onset of time was 21 days and the mortality increased significantly (overlapping syndrome: 43.86%; mono syndrome: 33.90%). Two patients with ICIs rechallenges had adverse effect. **Conclusion** Clinicians should be cautions of overlapping syndrome associated with ICIs and ICIs therapy can be restarted after careful assessment.
Key words: immune checkpoint inhibitor; overlap syndrome; FAERS; signal mining; reporting odds ratio

免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）主要通过抑制程序性死亡蛋白 1 受体（programmed death-1，PD-1）、程序性死亡受体 -配体 1（programmed death-ligand 1，PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 -4（cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4，CTLA-4）等靶点激活抗肿瘤免疫，恢复识别肿瘤细胞的能力，并进一步恢复 T 细胞的细胞识别和杀伤能力 [1]。但由于其独特的机制，ICIs 免疫治疗也常会伴有免疫相关性不良反应 [2]，近年来有病例报道 ICIs 可致心肌炎合并肌炎或重症肌无力的重叠综合征 [3-5]，且患者预后不佳。为了解 ICIs 致肌炎、心肌炎、重症肌无力重叠综合征情况，本文采用美国不良事件报告系统（the US Food and Drug Adverse Event Reporting System，FAERS）对 ICIs 致上述不良反应进行信号挖掘，分析其重叠情况、发生时间、患者结局等情况，为临床安全使用 ICIs 提供参考依据。

1　资料与方法

1.1　资料来源

收集 FAERS 数据库中 2011 年第 1 季度到 2021 年第 4 季度共 44 个季度的数据，每个季度的文件包括人口统计学信息、药物信息、用药适应证和不良反应事件及患者结局等内容。

1.2　数据清洗与提取

按照文献报道方法 [6] 剔除原始数据中重复报告，并根据官方提供的 Deleted 文件，删除其中的错误事件，仅选取首要怀疑药物为 ICIs（包括阿替利珠单抗、阿维单抗、度伐利尤单抗、Cemiplimab、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、伊匹木单抗和 Tremelimumab）的不良反应报告，并通过美国 Micromedex 网站（https：//www.micromedexsolutions.com/）确定其通用名和商品名，提取目标药物。为减少不良事件报告上报偏倚，本研究仅纳入上报者为有医药专业背景的人员。

根据监管活动医学词典（medical dictionary for drug regulation activities，MedDRA）25.0 版中不良事件首选术语（preferred term，PT）对提取的目标药物相关不良事件报告进行编码。参考文献 [7]，选取 PT 肌炎（MedDRA 代码 10028653、10036102 和 10083073）、心肌炎（10028606、10082606 和 10064539）和重症肌无力（10028417、10028419、10028424、10049168 和 10062758）为关键词，检索不良事件报告。本文将使用 ICIs 后表现为不止一个上述不良事件的患者分为重叠综合征组，仅表现为单一不良事件的患者分为单一组。

1.3　统计学方法

采用 R 4.1.2 软件进行数据提取、整理及分析。信号挖掘采用报告比值比（reporting odds ratio，ROR）法 [6]，分别对 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力进行信号计算。为提高信号识别准确度，本研究认为当不良事件报告例数≥ 3、ROR ＞ 2，且 95%*CI* 下限（ROR_{025}）＞ 1 时，判定该不良事件存在信号。ROR 值越大，代表目标药物相关不良事件发生风险越高 [6，8]。

2　结果

2.1　不良事件报告基本信息

2011 年第 1 季度到 2021 年第 4 季度，共提取医务人员上报的 ICIs 相关不良事件的病例 90 151 例，其中涉及肌炎、心肌炎和重症肌无力不良事件 3046 例，涉及 2459 名患者。ICIs 相关心肌炎病例数最多，重症肌无力病例数最少，以男性患者为主，年龄以 65 岁及以上老年患者居多，出现心肌炎不良反应的患者年龄中位数最小。上述 ICIs 相关不良事件的报告国家以日本为主，美国次之。医师为主要不良事件报告人，其次为药师。药物适应证以黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌较为常见，详细情况见表 1。

2.2　信号分析

表 1 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力报告基本信息 [*n*(%)]

Tab 1 Basic information of reports for immune checkpoint inhibitors-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis [*n*(%)]

特征	肌炎（*n* = 989）	心肌炎（*n* = 1277）	重症肌无力（*n* = 780）
性别	可分析数 945	可分析数 1162	可分析数 719
女性	266（28.15）	372（32.01）	222（30.88）
男性	679（71.85）	790（67.99）	497（69.12）
年龄分组 / 岁	可分析数 892	可分析数 1080	可分析数 662
＜ 65	298（33.41）	368（34.07）	171（25.83）
65 ～ 74	269（30.16）	439（40.65）	235（35.50）
≥ 75	325（36.43）	273（25.28）	256（38.67）
上报人	可分析数 989	可分析数 1277	可分析数 780
医师	713（72.09）	854（66.88）	527（67.56）
其他医务者	196（19.82）	310（24.28）	161（20.64）
药师	80（8.09）	113（8.85）	92（11.79）
报告国家	可分析数 989	可分析数 1277	可分析数 780
日本	413（41.76）	399（31.25）	371（47.56）
美国	209（21.13）	303（23.73）	222（28.46）
法国	88（8.90）	150（11.75）	21（2.69）
其他	262（26.46）	425（33.28）	166（21.28）
免疫检查点抑制剂	可分析数 989	可分析数 1277	可分析数 780
纳武利尤单抗	527（53.29）	735（57.56）	433（55.51）
帕博利珠单抗	176（17.8）	220（17.23）	169（21.67）
Cemiplimab	16（1.62）	19（1.49）	10（1.28）
阿替利珠单抗	145（14.66）	147（11.51）	69（8.85）
度伐利尤单抗	31（3.13）	39（3.05）	28（3.59）
阿维单抗	12（1.21）	19（1.49）	7（0.9）
伊匹木单抗	81（8.19）	98（7.67）	64（8.21）
Tremelimumab	1（0.1）	0	0
适应证	可分析数 934	可分析数 1199	可分析数 725
黑色素瘤	217（23.23）	230（19.18）	173（23.86）
肾细胞癌	172（18.42）	219（18.27）	120（16.55）
非小细胞肺癌	134（14.35）	204（17.01）	100（13.79）
其他	411（44.00）	546（45.54）	332（45.79）

2.2.1 信号挖掘 Tremelimumab 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力报告不足 3 例，不纳入信号分析。对其他 ICIs 致上述不良事件分析后发现，ICIs 相关心肌炎报告数最多。与 PD-L1 抑制剂和 CLTA-4 抑制剂相比，PD-1 抑制剂致肌炎、心肌炎和重症肌无力报告最多，其中 Cemiplimab 致重症肌无力的风险最大（ROR = 33.39，95%*CI*：17.86 ～ 62.40），帕博利珠单抗次之（ROR = 31.35，95%*CI*：26.80 ～ 36.67）。与其他 PD-L1 抑制剂相比，阿维单抗相关心肌炎报告例数最少，但是风险大（ROR = 20.18，95%*CI*：12.81 ～ 31.79）。伊匹木单抗致上述 3 个不良事件的风险信号均较弱，见表 2。

2.2.2 重叠情况 患者接受 ICIs 治疗后仅表现为肌炎、心肌炎或重症肌无力不良事件的例数分别为 570 例、948 例和 442 例，有 20.29% 的患者存在重叠综合征，其中有 3.58% 的患者同时被诊断为肌炎、心肌炎和重症肌无力。42.37% 的患者表现为 ICIs 相关肌炎的同时，还合并心肌炎和 / 或重症肌无力，而仅有 25.76% 的患者在出现心肌炎后累及其他器官，表现为肌炎和 / 或重症肌无力，详见图 1。

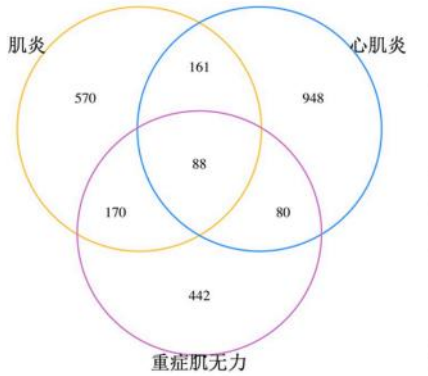

图 1 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力重叠情况

Fig 1 Overlap of immune checkpoint inhibitors-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis

表 2 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力的信号挖掘

Tab 2 Disproportionate analysis of immune checkpoint inhibitors-associated myositis, myocarditis and myasthenia gravis

药物	ROR（95%*CI*）		
	肌炎	心肌炎	重症肌无力
纳武利尤单抗	16.26（14.85 ～ 17.81）	22.21（20.53 ～ 24.02）	25.95（23.40 ～ 28.78）
帕博利珠单抗	17.37（14.93 ～ 20.21）	20.56（17.95 ～ 23.56）	31.35（26.80 ～ 36.67）
Cemiplimab	29.48（17.94 ～ 48.44）	32.99（20.89 ～ 52.09）	33.39（17.86 ～ 62.40）
阿替利尤单抗	13.09（11.09 ～ 15.46）	12.43（10.54 ～ 14.66）	11.28（8.88 ～ 14.33）
度利尤单抗	9.09（6.38 ～ 12.95）	10.76（7.84 ～ 14.76）	15.05（10.36 ～ 21.87）
阿维单抗	13.49（7.63 ～ 23.84）	20.18（12.81 ～ 31.79）	14.32（6.80 ～ 30.13）
伊匹木单抗	9.21（7.39 ～ 11.48）	10.49（8.58 ～ 12.82）	13.37（10.43 ～ 17.15）

2.2.3 发生时间 进一步对患者接受 ICIs 治疗后出现为单一不良事件（肌炎、心肌炎或重症肌无力）和重叠综合征的发生时间进行分析。结果发现，重叠综合征发生时间更短（重叠综合征：21 d [IQR 1532]，单一：30 d [IQR 1764.25]）。单一组中，ICIs 致肌炎、心肌炎和重症肌无力的发生

时间中位数分别为 33.5 d、28 d 和 30 d。

2.2.4 病死率及 ICIs 再引入 ICIs 致上述 3 个不良事件报告中，35.71% 患者最终死亡（n = 878 例），出现重叠综合征的患者病死率更高（重叠综合征：43.86%，单一：33.90%）。有 2 例患者是在重启 ICIs 治疗后出现的不良事件，一例是 83 岁老年男性结肠癌患者在接受帕博利珠单抗单药治疗后，出现肌炎合并重症肌无力；另一例是患有非小细胞肺癌的男性患者使用度伐利尤单抗后出现肌炎。

3 讨论

3.1 患者特征

在 3046 例 ICIs 相关肌炎、心肌炎和重症肌无力的病例中，以黑色素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌的患者为主，符合 ICIs 肿瘤免疫治疗获批的适应证。性别方面，男性患者占比高。既往关于性别对 ICIs 相关免疫不良事件的影响研究较少，目前尚无证据表明性别差异是其影响因素之一 [9]。年龄方面，ICIs 相关重症肌无力比例在小于 65 岁的人群中较低，而心肌炎在 65 ～ 74 岁老年人群中占比高，75 岁以上人群中比例最低，提示 ICIs 相关不良事件在老年人群中的高发谱系可能有所不同。既往研究认为老年患者在接受 ICIs 治疗时，其特征性免疫微环境可能会导致 ICIs 的疗效和安全性有所差异 [10]，提示老年患者接受 ICIs 治疗后出现致死性不良事件的比例高 [11]；另有研究则发现 65 岁老年患者较少出现内分泌毒性，而皮肤毒性更为常见 [12]，与本研究结果近似。此外，本研究还发现有 60% ～ 70% 的不良事件是由医师上报，可能与 ICIs 致神经系统不良反应发病隐匿有关，由于其常被原发肿瘤症状掩盖，因此临床诊断困难 [13]，主要依靠医师经验，而药师和其他医务人员对此经验较少。提高医务人员对 ICIs 相关不良反应特征的认知，可能有利于临床上识别和诊断其相关不良反应。

3.2 风险信号

结果显示 ICIs 相关心肌炎病例报告例数最多，且信号强，提示 ICIs 致心肌炎风险高，与既往研究结果一致。ICIs 致心脏毒性并不常见，多以心肌炎为主 [14]，患病率约为 1.14%[15]。与抗 PD-L1 和抗 CTLA-4 药物相比，PD-1 抑制剂（包括纳武利尤单抗、帕博利珠单抗和 Cemiplimab）致心肌炎信号最强，提示可能导致心肌炎风险最大，与既往研究一致 [14-16]。Mahmood 等 [15] 于 2013—2017 年间收集了 35 例 ICIs 相关心肌炎的病例，在对其进行随机抽样匹配后发现，与其他 ICIs 相比，纳武利尤单抗和帕博利珠单抗致心肌炎不良事件的占比最多，分别为 0.6% 和 1.3%；Moslehi 等 [16] 在世界卫生组织不良反应个人呈报系统中收集了 101 例确诊为 ICIs 相关心肌炎的患者，其中 57% 的患者报告使用 PD-1 抑制剂后诱发心肌炎。目前 ICIs 致心肌炎的机制尚不明确，可能与 T 细胞的活化与功能抑制有关，被激活的 T 淋巴细胞在识别肿瘤的同时也识别心肌共有抗原 [14]。提示医师在启用抗 PD-1 肿瘤免疫治疗的时候，如患者出现其他原因无法解释的胸痛、呼吸困难等症状，或较基线出现心肌损伤标志物升高，应警惕心肌炎可能。除 Tremelimumab 外，ICIs 在重症肌无力和肌炎不良事件中也检测出信号。一项基于美国商业和医疗保险数据库的回顾性研究分析结果显示，接受 ICIs 肿瘤免疫治疗的患者更易出现重症肌无力表现（HR = 2.60，95%*CI*：1.34 ～ 5.07）[17]。此外，既往研究表明有 1% 接受抗 PD-1 抑制剂治疗的患者可能出现肌炎 [18]，可表现为自身免疫性肌炎、皮肌炎和多发性肌炎等 [13]。Hamada 等 [19] 对 88 例 ICIs 相关肌炎病例分析后发现，PD-1 抑制剂诱发肌炎比抗 CTLA-4 药物更常见。本研究亦发现 CTLA-4 抑制剂伊匹木单抗致肌炎风险相对最低（ROR = 9.21，95%*CI*：7.39 ～ 11.48）。

3.3 重叠综合征

在 3046 例 ICIs 相关肌炎、心肌炎或重症肌无力报告中，有 20.29% 患者存在重叠综合征，重症肌无力合并肌炎的病例是重症肌无力合并心肌炎的 2 倍，提示 ICIs 相关重症肌无力更易重叠肌炎表现，与既往研究有所差异。Aldrich 等 [20] 在一项纳入 9088 名接受 ICIs 治疗的患者回顾性队列研究中发现，0.40%（36 名）的患者出现肌炎不良事件，其中 52.78%（19 名）患者有重叠现象。Johnson 等 [21] 研究发现 8.8% 重症肌无力患者合并肌炎，16.2% 合并心肌炎。但另有研究表明 ICIs 致重症肌无力合并肌炎的发病率更高 [3]。分析原因可能与诊断 ICIs 相关重症肌无力不良事件较难有关，进而影响重症肌无力合并其他不良事件的分析结果。有研究表明，ICIs 致重症肌无力临床上可表现为呼吸肌肌力减弱、呼吸困难等多种症状，多数患者在发病时可能会伴随肌钙蛋白、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶等检查指标升高，但缺乏特异性，而肿瘤科医师可能对神经相关不良反应诊疗经验不足，且在出现 ICIs 相关重症肌无力患者中，只有不足 60% 患者体内检出乙酰胆碱能受体阳性，给早期确诊带来挑战 [22]。此外，不同疾病下 ICIs 相关的上述重叠综合征发生时间略有差异，总体发病中位数时间不超过 23 d。有研究报道，ICIs

致重症肌无力以新发重症肌无力为主，少部分患者出现原重症肌无力症状加重，发病中位时间 4 周，重叠综合征发生时间变短[23]，与本研究结果基本一致（中位数 21 d），提示 ICIs 致上述不良事件重叠综合征的发生率不低，且发病时间更短，临床应提高警惕。

3.4 患者结局与再引入

肌炎、心肌炎和重症肌无力是致死率较高的 ICIs 相关不良反应[24]，ICIs 以心肌炎和肌炎为表现的重症肌无力的病死率可高达 62.5%[21]，出现重叠综合征的患者预后不佳，只有 50% 的患者治疗后可恢复[25]，另有报告 79% 的患者出现呼吸衰竭[20]。目前临床上治疗 ICIs 相关不良反应的措施是首先停用 ICIs，并予以大剂量糖皮质激素等治疗。本研究中，有 2 例 ICIs 再激发后患者出现肌炎和 / 或重症肌无力的报告，提示 ICIs 再激发也会出现免疫相关不良反应，且有报告表明不良反应可能与之前的表现不一致[26]。因此临床上一旦出现高致死率的 ICIs 相关不良反应，如心肌炎、重症肌无力等，再次启用 ICIs 应谨慎，可根据末次出现不良反应严重程度、患者基础状况和是否有其他替代疗法来决定是否恢复 ICIs 免疫疗法。

3.5 研究不足

本研究采用美国最大的自发呈报药物不良反应数据库 FAERS，目前自发呈报系统是最主要的监测上市后药品安全的方式[6, 8]，有利于发现罕见或既往未被识别的新的药品不良反应。但由于该系统固有的局限性，如不良反应的低报、漏报和错报等，可能会影响数据质量；且该数据库仅记录了出现药物不良反应的病例，无法评估其在真实世界中的发病率。尽管 ROR 法具有高灵敏度和特异度，常用于国内外药物警戒领域中[8]，但其检测到信号只能表示该药与某一不良反应有统计学相关性，且无更多患者特征、临床检查指标及既往用药等信息，无法对不良事件进行关联性评价，亦无法探知有意义的临床指标，未来仍需进一步研究。

4 结论

ICIs 致肌炎、心肌炎和重症肌无力的风险信号明确，常出现于 ICIs 治疗早期，重叠现象并不少见，发病时间更短，病死率更高，一旦发生，临床上较少会重启 ICIs 免疫治疗。医师在 ICIs 治疗早期应提高警惕重叠综合征的发生，早期诊断、及时治疗，可避免或减少相关不良反应导致的严重后果。

参考文献

[1] Kennedy LB，Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（2）：86-104.

[2] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.

[3] Anquetil C，Salem JE，Lebrun-Vignes B，et al. Immune checkpoint inhibitor-associated myositis：expanding the spectrum of cardiac complications of the immunotherapy revolution [J]. Circulation，2018，138（7）：743-745.

[4] Guha A，Al-Kindi S，Jain P，et al. Association between myocarditis and other immune-related adverse events secondary to immune checkpoint inhibitor use [J]. Int J Cancer，2020，147（6）：1753-1754.

[5] Touat M，Maisonobe T，Knauss S，et al. Immune checkpoint inhibitor-related myositis and myocarditis in patients with cancer [J]. Neurology，2018，91（10）：e985-e994.

[6] 赵科，孔金霞，钟雯，等 . 基于美国 FDA 不良事件报告系统数据库的帕博利珠单抗不良反应信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：359-363.

[7] Pathak R，Katel A，Massarelli E，et al. Immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis with myositis/myasthenia gravis overlap syndrome：a systematic review of cases [J]. Oncologist，2021，26（12）：1052-1061.

[8] Wu T，Zhang Y，Shi Y，et al. Safety of glucagon-like peptide-1 receptor agonists：a real-world study based on the US FDA adverse event reporting system database [J]. Clin Drug Investig，2022，42（11）：965-975.

[9] Eggermont AMM，Kicinski M，Blank CU，et al. Association between immune-related adverse events and recurrence-free survival among patients with stage Ⅲ melanoma randomized to receive pembrolizumab or placebo：a secondary analysis of a randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol，2020，6（4）：519-527.

[10] 段建春，李梦侠，刘秀峰，等 . 免疫检查点抑制剂特殊人群应用专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志，2022，27（5）：442-454.

[11] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.

[12] Samani A，Zhang S，Spiers L，et al. Impact of age on the toxicity of immune checkpoint inhibition [J]. J Immunother Cancer，2020，8（2）：e000871.

[13] Spain L，Walls G，Julve M，et al. Neurotoxicity from immune-checkpoint inhibition in the treatment of melanoma：a single centre experience and review of the literature [J]. Ann Oncol，2017，28（2）：377-385.

[14] 免疫检查点抑制剂相关心肌炎监测与管理中国专家共识（2020 版）[J]. 中国肿瘤临床，2020，47（20）：1027-1038.

[15] Mahmood SS，Fradley MG，Cohen JV，et al. Myocarditis in patients treated with immune checkpoint inhibitors [J].

J Am Coll Cardiol，2018，71（16）：1755-1764.
[16] Moslehi JJ，Salem JE，Sosman JA，et al. Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis [J]. Lancet，2018，391（10124）：933.
[17] Xia T，Brucker AJ，McGeehan B，et al. Risk of non-infectious uveitis or myasthenia gravis in patients on checkpoint inhibitors in a large healthcare claims database [J]. Br J Ophthalmol，2022，106（1）：87-90.
[18] Eggermont AMM，Blank CU，Mandala M，et al. Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage Ⅲ melanoma [J]. N Engl J Med，2018，378（19）：1789-1801.
[19] Hamada N，Maeda A，Takase-Minegishi K，et al. Incidence and distinct features of immune checkpoint inhibitor-related myositis from idiopathic inflammatory myositis：a single-center experience with systematic literature review and meta-analysis [J]. Front Immunol，2021，12：803410.
[20] Aldrich J，Pundole X，Tummala S，et al. Inflammatory myositis in cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors [J]. Arthritis Rheumatol，2021，73（5）：866-874.
[21] Johnson DB，Manouchehri A，Haugh AM，et al. Neurologic toxicity associated with immune checkpoint inhibitors：a pharmacovigilance study [J]. J Immunother Cancer，2019，7（1）：134.
[22] 李建萍.《重症肌无力管理国际共识指南：2020 更新版》解读 [J]. 神经病学与神经康复学杂志，2021，17（1）：32-38.
[23] Safa H，Johnson DH，Trinh VA，et al. Immune checkpoint inhibitor related myasthenia gravis：single center experience and systematic review of the literature [J]. J Immunother Cancer，2019，7（1）：319.
[24] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.
[25] Moreira A，Loquai C，Pföhler C，et al. Myositis and neuromuscular side-effects induced by immune checkpoint inhibitors [J]. Eur J Cancer，2019，106：12-23.
[26] Dolladille C，Ederhy S，Sassier M，et al. Immune checkpoint inhibitor rechallenge after immune-related adverse events in patients with cancer [J]. JAMA Oncol，2020，6（6）：865-871.

（收稿日期：2022-11-18；修回日期：2022-12-25）

白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇不良反应真实世界数据的比较

周保柱[1]，陈慧慧[1]，李娜[1, 2]，汪涛[1*]（1. 联勤保障部队第九〇一医院药剂科，合肥 230031；2. 皖南医学院药学院，安徽 芜湖 241002）

摘要：目的 研究白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇不良反应（ADR）在真实世界的差异，为临床合理使用紫杉醇类药物提供科学依据。**方法** 调取军队药品不良反应监测管理系统中 2012 年 1 月 1 日—2022 年 6 月 30 日我院上报的白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇 ADR 报告，利用统计软件对两种药物致 ADR 病例信息进行差异性分析，包括患者基本情况、ADR 时间相关性、转归情况、关联性评价；采用报告比值比（ROR）法对两种药物 ADR 信号进行检测。**结果** 在病例信息差异性分析方面，两种药物致 ADR 的原患疾病、ADR 持续时间、转归情况、关联性分析之间差异有统计学意义（$P < 0.05$）；在 ROR 法检测 ADR 信号方面，普通紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇 ADR 强信号分别有 8 个、6 个。其中，普通紫杉醇白细胞减少、下肢痛、过敏反应、心功能异常 ADR 信号较强，白蛋白结合型紫杉醇神经毒性 ADR 信号是独有的。**结论** 临床医师在使用两种药物时，应注重其 ADR 的差异性，尤其重点关注普通紫杉醇的过敏反应，以及白蛋白结合型紫杉醇的神经毒性；同时在制订化疗方案时，应充分了解患者基本情况和病情需要，正确选择药物种类、给药方案、药物剂量，做到合理个体化给药。

关键词：白蛋白结合型紫杉醇；普通紫杉醇；不良反应；ROR 法；信号挖掘
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)05-02237-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.048

基金项目：皖南医学院校级课题（No.JXYY202205，No.JXYY202108）。

作者简介：周保柱，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：zhoubz2014@sina.com *通信作者：汪涛，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：wz153888@163.com

Real word data of adverse drug reactions induced by albumin-bound paclitaxel or ordinary paclitaxel

ZHOU Bao-zhu[1], CHEN Hui-hui[1], LI Na[1, 2], WANG Tao[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *The 901st Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force*, *Hefei* 230031; 2. *College of Pharmacy*, *Wannan Medical College*, *Wuhu Anhui* 241002)

Abstract: Objective To compare the real word data of adverse drug reactions (ADR) induced by both albumin-bound paclitaxel or ordinary paclitaxel, and provide a reference for clinical use of paclitaxel varieties. **Methods** ADR reports of albumin-bound paclitaxel and ordinary paclitaxel in our hospital were collected from the military adverse drug reaction monitoring and management system from January 1st, 2012 to June 30th, 2022. The difference was analyzed concerning ADR case information, namely basic patient information, ADR time correlation, outcome and correlation evaluation. The reported odds ratio (ROR) method was used to detect the ADR signals. **Results** Significant differences was found in the original disease, ADR duration, outcome and correlation ($P < 0.05$). In terms of ADR signal detection by ROR method, there were 8 strong ADR signals for ordinary paclitaxel and 6 strong ADR signals for albumin-bound paclitaxel. Ordinary paclitaxel showed strong ADR signals of leukopenia, lower extremity pain, allergic reaction and abnormal cardiac function, while albumin-bound paclitaxel showed unique neurotoxicity ADR signal. **Conclusion** Clinicians should pay attention to the difference in ADR when using paclitaxel varieties, especially the allergic reactions of ordinary paclitaxel and the neurotoxicity of albumin-bound paclitaxel. We should fully understand patients' basic situation and needs, select the right drug, administration, and dosage for individuals.

Key words: albumin-bound paclitaxel; ordinary paclitaxel; adverse drug reaction; ROR method; signal mining

紫杉醇是一种特异性作用于微管的细胞毒类抗肿瘤药物，临床广泛应用于乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、食管癌及胃癌等恶性肿瘤的治疗。普通紫杉醇最早于 1992 年在美国上市，由于其疏水性强，需要以聚氧乙烯蓖麻油为溶剂，而后者易引发一系列过敏反应，严重限制了紫杉醇的临床使用[1]。白蛋白结合型紫杉醇为新型紫杉醇制剂，于 2005 年在美国上市，2009 年进入中国市场。白蛋白结合型紫杉醇以人血白蛋白为载体，耐受剂量大幅度提高，在临床显示出较好的疗效[2]。两种紫杉醇制剂在肿瘤领域均得到高频使用，但它们的获批适应证、超敏反应预处理和不良反应等不尽相同[3]。有研究表明，白蛋白结合型紫杉醇治疗妇科肿瘤的有效率显著优于普通紫杉醇，且不良反应（ADR）发生率更低[4]。然而白蛋白结合型紫杉醇在我国上市时间较短，与普通紫杉醇在安全用药方面缺乏对比，严重影响紫杉醇类药品合理使用[5]。本研究基于军队药品不良反应监测管理系统中我院上报的 ADR 数据库，收集白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇的 ADR 病例，并归纳、评价其在真实世界的安全性，筛选两种药物的潜在 ADR 信号，为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

查询军队药品不良反应监测管理系统中我院上报的 ADR 数据，检索 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 6 月 30 日应用白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇导致的 ADR 报告。纳入标准：患者使用白蛋白结合型紫杉醇或普通紫杉醇发生 ADR 的报告（需记录 ADR 治疗过程及预后等病历资料）。排除标准：在外院化疗期间发生 ADR 的病例；患者在同一个月多次就诊发生重复 ADR；治疗过程中发生病理性类型转换。共收集到普通紫杉醇 ADR 109 例，白蛋白结合型紫杉醇 ADR 71 例。

1.2 研究内容

通过医院信息系统整理病例信息，包括① 患者的基本情况：年龄、性别、体质量指数（BMI）、原患疾病；② ADR 时间相关性：ADR 潜伏时间、ADR 持续时间；③ ADR 分析：表现类型和临床表现、转归情况；④ 关联性评价。

采用统计软件对白蛋白结合型紫杉醇和普通

紫杉醇致 ADR 病例信息进行差异性分析，包括患者基本情况、ADR 相关性时间、转归情况、关联性评价；采用报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）[6] 进行两种药物 ADR 的检测，评价药物和 ADR 之间差异有无统计学意义，挖掘药物与 ADR 信号及信号强度的关系。ROR 法基于四格表（见表 1）进行相应计算。

表 1　用于信号计算得四格表

Tab 1　Fourfold table for signal calculation

类别	目标 ADR	其他 ADR	合计
目标药品	A	B	A ＋ B
其他药品	C	D	C ＋ D
合计	A ＋ C	B ＋ D	N ＝ A ＋ B ＋ C ＋ D

ROR 法计算公式为：ROR 值＝（A/C）（B/D）＝ AD/BC；95% 置信区间（*CI*）＝$e^{\ln(ROR)} \pm 1.96SE^{(lnROR)}$；$SE(\ln ROR)=\sqrt{1/A+1/B+1/C+1/D}$。信号检测标准为：报告数 A ≥ 3 例；ROR 值 95%*CI* 下限＞ 1。若满足上述两个条件，提示一个可疑信号生成，ADR 信号越强则提示药物与 ADR 之间的关联性越强 [7]。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计和分析，计量资料组间比较采用 *t* 检验，计数资料组间比较采用 χ^2 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 患者的基本情况

白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 患者的年龄、BMI 和性别比较差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。两种药物 ADR 发生率较高患者的年龄和 BMI 为 51 ～ 75 岁、18.5 ～ 23.9 kg • m^{-2}；白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 患者的原患疾病比较差异有统计学意义（$P < 0.05$），详见表 2。

表 2　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 患者的基本情况

Tab 2　Basic situation of ADR induced by albumin-bound paclitaxel and ordinary paclitaxel

一般资料		普通紫杉醇 [*n*（%）]	白蛋白结合型紫杉醇 [*n*（%）]	χ^2 值	*P* 值
年龄 / 岁	18 ～ 50	14（12.84）	7（9.86）	1.308	0.520
	51 ～ 75	83（76.15）	59（83.10）		
	＞ 75	12（11.01）	5（7.04）		
BMI/（kg • m^{-2}）	＜ 18.5	21（19.27）	8（11.27）	4.419	0.110
	18.5 ～ 23.9	57（52.29）	33（46.48）		
	≥ 24	31（28.44）	30（42.25）		
性别	男	50（45.87）	39（54.93）	1.411	0.235
	女	59（54.13）	32（45.07）		
原患疾病	肺癌	12（11.01）	22（30.99）	32.529	＜ 0.001
	乳腺癌	12（11.01）	7（9.86）		
	胃癌	13（11.93）	11（15.49）		
	食管癌	26（23.85）	5（7.04）		
	卵巢癌	17（15.60）	8（11.27）		
	胰腺癌	0（0.00）	6（8.45）		
	宫颈癌	13（11.93）	1（1.41）		
	其他	16（14.68）	11（15.49）		

2.2　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 的时间分析

白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇给药到 ADR 发生时间比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）；与普通紫杉醇致 ADR 持续时间相比，白蛋白结合型紫杉醇致 ADR 持续时间显著降低（$P < 0.05$），详见表 3。

表 3　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 时间分析

Tab 3　Occurrence time analysis of ADR induced by albumin-bound paclitaxel and ordinary paclitaxel

参数	给药到 ADR 发生时间 /d	ADR 持续时间 /d
普通紫杉醇	4.05±4.63	4.12±4.04
白蛋白结合型紫杉醇	4.42±6.63	2.86±2.15
t 值	－ 0.444	2.411
P 值	0.658	0.017

2.3　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 的转归和关联性分析

白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 的转归情况、关联性分析比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。其中，两种药物致 ADR 转归情况主要为好转，详见表 4。

2.4　白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 的信号挖掘结果分析

1 份报告可能涉及多种 ADR，109 份普通紫杉醇 ADR 报告拆分后有 110 例次 ADR，71 份白蛋白结合型紫杉醇 ADR 报告拆分后有 72 例次 ADR。经 ROR 法检测，普通紫杉醇有 8 个 ADR

表 4 白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 转归和关联性分析 [*n*(%)]

Tab 4 Outcome and correlation analysis ADR induced by albumin-bound paclitaxel and ordinary paclitaxel [*n*(%)]

参数	转归情况				关联性分析			
	痊愈	好转	未好转	有后遗症	可能	很可能	肯定	可能无关
普通紫杉醇	21（19.27）	74（67.89）	7（6.42）	7（6.42）	34（31.19）	63（57.80）	9（8.26）	3（2.75）
白蛋白结合型紫杉醇	4（5.63）	64（90.14）	2（2.82）	1（1.41）	50（70.42）	19（26.76）	2（2.82）	0（0.00）
χ^2 值	12.079				27.307			
P 值	0.007				＜ 0.001			

强信号（粒细胞减少、白细胞减少、骨髓抑制、肌肉疼痛、关节痛、下肢痛、过敏反应、心功能异常），白蛋白结合型紫杉醇有 6 个 ADR 强信号（粒细胞减少、骨髓抑制、肌肉疼痛、关节痛、胃肠道反应、神经毒性）。其中，普通紫杉醇白细胞减少、下肢痛、过敏反应、心功能异常 ADR 信号较强，神经毒性 ADR 强信号是白蛋白结合型紫杉醇独有的（见表 5）。

表 5 白蛋白结合型紫杉醇与普通紫杉醇致 ADR 信号挖掘结果

Tab 5 Signal mining results of ADR induced by albumin-bound paclitaxel and ordinary paclitaxel

累及器官或系统	ADR 信号	普通紫杉醇			白蛋白结合型紫杉醇		
		报告数 / 份	ROR 值	95%*CI*	报告数 / 份	ROR 值	95%*CI*
血液系统	粒细胞减少	12	4.80	（2.55，9.04）#	7	4.04	（1.81，9.04）#
	白细胞减少	30	6.71	（4.31，10.45）#	7	1.73	（0.79，3.84）
	骨髓抑制	17	2.97	（1.74，5.07）#	18	5.50	（3.17，9.54）#
肌肉骨骼系统	肌肉疼痛	10	15.64	（7.28，33.57）#	8	18.22	（7.94，41.78）#
	关节痛	4	35.59	（8.78，144.24）#	3	33.13	（7.76，141.39）#
	下肢痛	6	14.47	（5.50，38.04）#	1	2.67	（0.35，20.19）
消化系统	恶心	10	0.50	（0.26，0.96）	6	0.45	（0.20，1.05）
	腹泻	3	0.82	（0.26，2.62）	3	1.28	（0.40，4.13）
	呕吐	3	0.31	（0.10，0.99）	3	0.49	（0.15，1.57）
	胃肠道反应	3	0.77	（0.24，2.47）	7	3.10	（1.39，6.90）#
全身性损害	过敏反应	4	4.28	（1.49，12.30）#	1	1.48	（0.20，10.93）
神经系统	神经毒性	0	—	—	3	6.10	（1.81，20.59）#
	头晕	3	1.26	（0.39，4.06）	0	—	—
呼吸系统	心功能异常	4	3.92	（1.37，11.22）#	1	1.36	（0.18，10.06）
皮肤	皮疹	1	0.11	（0.02，0.80）	4	0.73	（0.26，2.01）

注：# 表示报告数 $n \geq 3$ 例；ROR 值 95%*CI* 下限＞ 1。

Note：#Indication：report number $n \geq 3$ cases；ROR value 95%*CI* lower limit ＞ 1.

3 讨论

2022 年国家卫生健康委员会发布《抗肿瘤药物的临床综合评价技术指南（2022 年版试行）》[8]，强调安全性（主要包括 ADR 指标）是评价核心维度之一，建议所有抗肿瘤药品的临床综合评价均开展安全性评估。紫杉醇作为一类高效、广谱抗肿瘤药物，据米内网中国样本医院数据统计，其在抗肿瘤药物品种市场份额排名第一。其中，普通紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇近年来纳入国家集中采购目录，进一步扩大了紫杉醇的市场规模。然而目前缺乏对普通紫杉醇和白蛋白结合型紫杉醇的安全性评估，且尚未见文献报道两种药物致 ADR 的比较，给紫杉醇品规选择、合理应用评价标准带来了挑战 [9]。本研究基于军队药品不良反应监测管理系统中我院上报的白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇 ADR 病例，评价其在真实世界的安全性和差异性，以此提升紫杉醇的临床合理应用水平。

在本研究中，白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇致 ADR 患者年龄、BMI 和性别比较差异无统计学意义，说明年龄、BMI 和性别并不是影响这两种药物化疗致 ADR 差异性的因素。而两种药物化疗致 ADR 患者的原患疾病比较差异有统计学意义，分析原因，可能是由于胰腺癌和胆道系统肿瘤为白蛋白结合型紫杉醇的新适应证 [10]。在分析使用白蛋白结合型紫杉醇、普通紫杉醇与不良反应发生时间的联系时，发现两种药物给药到 ADR 发生时间比较差异无统计学意义，分析其原因可能是两种药物血浆浓度均呈双相曲线，血浆中总紫杉醇暴露情况基本相似；ADR 持续时间比较差异有统计学意义，可能是普通紫杉醇药代动力学为非线性曲线，而白蛋白结合型紫杉醇药代动力学特征发生改变（呈线性曲线），且耐受剂量显著增加有关 [11]。此外，在分析使用白

蛋白结合型紫杉醇、普通紫杉醇致 ADR 的转归情况、关联性分析时，发现两种药物之间差异均存在统计学意义，且 ADR 转归情况主要为好转。分析其原因，可能一方面是由于普通紫杉醇在输注前，经过糖皮质激素加 H_1 和 H_2 受体拮抗剂预处理，而白蛋白结合型紫杉醇不需要预处理，导致 ADR 转归情况有差异；另一方面是合并用抗肿瘤药物不同影响两种药物 ADR 关联性分析差异 [3]。

ROR 法具有计算简单、偏倚小、灵敏度高等特点，广泛应用于 ADR 信号的挖掘 [12]。本研究利用 ROR 法对白蛋白结合型紫杉醇、普通紫杉醇 ADR 进行信号挖掘，发现普通紫杉醇有 8 个 ADR 强信号（粒细胞减少、白细胞减少、骨髓抑制、肌肉疼痛、关节痛、下肢痛、过敏反应、心功能异常），白蛋白结合型紫杉醇有 6 个 ADR 强信号（粒细胞减少、骨髓抑制、肌肉疼痛、关节痛、胃肠道反应、神经毒性），与国外文献报道相符 [5]。其中，过敏反应信号在普通紫杉醇中检测出，而在白蛋白结合型紫杉醇中未检测出。发生过敏反应的原因可能是普通紫杉醇中含有聚氧乙烯蓖麻油成分，该成分具有一定的生物学效应，会引起超敏反应、脂蛋白异常及外周神经病变等 [13]。在临床用药时，可通过延长输注时间（3 h）和预先给予糖皮质激素联合抗组胺药，以降低过敏反应的风险；神经毒性信号是白蛋白结合型紫杉醇检测独有的，与发生率高有关。一项关于白蛋白结合型紫杉醇荟萃分析的文献报道中，乳腺癌患者所有级别和高度级别周围神经病的总发生率分别为 49% 和 12%[14]。神经毒性的原因可能是紫杉醇类的剂量限制和长期不良反应，从而引起轴突和施万细胞中的微管聚集产生神经毒性 ADR。在化疗治疗阶段发生神经毒性，可以给予神经细胞修复类药物甲钴胺及佩戴冰手套与冰脚套等对症治疗，能够在一定程度上减轻症状 [15]。

4 小结

本研究通过对军队药品不良反应监测管理系统中我院上报的白蛋白结合型紫杉醇和普通紫杉醇 ADR 报告进行数据挖掘和分析，探索白蛋白结合型紫杉醇、普通紫杉醇在真实世界临床应用中的 ADR 差异。临床医师在使用上述两种药物时，应注重其 ADR 的差异性，尤其重点关注普通紫杉醇的过敏反应，以及白蛋白结合型紫杉醇的神经毒性。同时在制订化疗方案时，应充分了解患者基本情况和病情需要，正确选择药物种类、给药方案、药物剂量，做到合理的个体化给药。本研究的结果基本能反映普通紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇安全性关注的重点信息，但也存在一定的局限性：真实世界回顾性研究受数据样本量限制，可能会导致结果出现偏倚，期望有多中心的研究助力数据的客观性。

参考文献

[1] 季鹏，宁丽娟，陈泳伍，等 . 白蛋白结合型紫杉醇治疗晚期非小细胞肺癌的有效性和安全性 [J]. 中国药房，2022，33（22）：2762-2765.

[2] 贾建浩，赵静 . 紫杉类抗肿瘤药物国内市场分析 [J]. 现代商贸工业，2018，39（7）：107-108.

[3] 辛文秀，黄萍，卢晓阳，等 . 紫杉醇制剂超敏反应预处理指导意见 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（8）：1023-1027.

[4] 张亚妮，肖竹维，刘振国，等 . 不同剂型紫杉醇联合顺铂对晚期卵巢癌患者的应用疗效观察 [J]. 中国肿瘤临床与康复，2022，29（5）：568-572.

[5] Naganuma M，Tahara K，Hasegawa S，et al. Adverse event profiles of solvent-based and nanoparticle albumin-bound paclitaxel formulations using the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System [J]. Sage Open Med，2019，7：2050312119836011.

[6] Fujimoto M，Hosomi K，Takada M. Statin-associated lower urinary tract symptoms：data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system，FAERS [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2014，52（4）：259-266.

[7] 汤榕，李林贵，孙维红，等 . 药品不良反应报告常用信号检测方法应用研究 [J]. 中国药房，2012，23（14）：1309-1311.

[8] 国家卫生健康委卫生发展研究中心 . 抗肿瘤药物临床综合评价技术指南（2022 年版试行）[EB/OL]. https://www.nhei.cn/nhei/zjjd/202206/6334af5e701b477d94494fd6aa747468.shtml（2022-6-29）.

[9] 刘芬，龚倩，符一岚，等 . 某肿瘤医院白蛋白结合型紫杉醇合理应用评价标准的建立与应用 [J]. 肿瘤药学，2021，11（5）：624-629.

[10] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组 . 中国胰腺癌诊治指南（2021）[J]. 中华消化外科杂志，2021，20（7）：713-729.

[11] 徐佳茗，夏学军，刘玉玲 . 紫杉醇新型制剂及临床研究进展 [J]. 实用药物与临床，2016，19（4）：510-517.

[12] 王登旭，马栋栋，曲辉 . 某市基于报告比值比法挖掘药品不良反应风险信号的探索 [J]. 药学研究，2021，40（8）：557-560.

[13] Li Y，Chen N，Palmisano M，et al. Pharmacologic sensitivity of paclitaxel to its delivery vehicles drives distinct clinical outcomes of paclitaxel formulations [J]. Mol Pharm 2015，12（4）：1308-1317.

[14] Peng L，Bu Z，Ye X，et al. Incidence and risk of peripheral neuropathy with nab-paclitaxel in patients with cancer：a meta-analysis [J]. Eur J Cancer Care，2017，26（5）：346-371

[15] 杨颖涛，刘晓哲 . 白蛋白紫杉醇治疗晚期乳腺癌致周围神经毒性 12 例临床分析及文献复习 [J]. 临床医学，2022，42（2）：4-7.

（收稿日期：2022-11-07；修回日期：2022-12-07）

药学教育

BOPPPS 教学模式在《临床药物治疗学》教学中的设计初探

龚慧[1, 2]，颜苗[1, 2]，张毕奎[1, 2]，胡志宇[1, 2]，谭胜蓝[1, 2*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 中南大学临床药学研究所，长沙 410011）

摘要：目的 探讨 BOPPPS 教学模式在《临床药物治疗学》教学的实践应用效果，建立一种简单高效的教学手段，培养学生的职业胜任力和药学监护能力。**方法** 介绍 BOPPPS 模式的组成特点，并结合实例讲授 BOPPPS 模式在《临床药物治疗学》教学“心源性卒中的药物治疗”这一章节的运用，对其在《临床药物治疗学》教学设计中的应用进行思考和分析。**结果** 团队采用 BOPPPS 教学模式在临床药学本科生中开展《临床药物治疗学》教学，教学效果显著，学生满意度 100%，授课教师获中南大学教学竞赛“三十佳”称号。**结论** BOPPPS 教学模式有效弥补了传统教学模式中师生互动少、学生被动学习等不足，为《临床药物治疗学》的课程教学提供了一种简洁明了、实操性强的教学方法。

关键词：《临床药物治疗学》；教学；BOPPPS 模式
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2242-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.049

Design and effect of BOPPPS model in the teaching of *Clinical Pharmacotherapeutics*

GONG Hui[1, 2], YAN Miao[1, 2], ZHANG Bi-kui[1, 2], HU Zhi-yu[1, 2], TAN Sheng-lan[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410011; 2. *Institute of Clinical Pharmacy*, *Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To determine the effect of the BOPPPS model in the teaching of *Clinical Pharmacotherapeutics* to train students the professional competence of serving the clinic and providing effective pharmaceutical care for patients. **Methods** The composition characteristics of the BOPPPS model were introduced, and the BOPPPS model was analyzed with examples in the chapter of “Cardiogenic Stroke”. **Results** The team adopted the BOPPPS model in teaching *Clinical Pharmacotherapeutics* for undergraduates, and won 100% satisfaction. The leading teacher was awarded the Top 30 Best Teachers of Central South University. **Conclusion** BOPPPS model effectively makes up for the shortcomings of the traditional teaching model, introduce more interactions between teachers and students to avoid passive learning.

Key words: *Clinical Pharmacotherapeutics*; teaching; BOPPPS model

药学服务作为医疗服务的重要组成部分，对于促进临床合理用药、保障患者用药安全、提升药物治疗水平、节约医疗费用、减少药源性伤害等具有十分重要的意义。随着我国一系列医改政策和法规的出台，药学服务得到了快速发展。药学服务工作正逐步从“以药品为中心”转变为“以病人为中心”。因此，培养学生具备扎实的药学专业技术服务能力以及良好的医患沟通能力是对

基金项目：中南大学教育教改项目（No.2022jy166，No.2023JGB039）；美国中华医学会基金项目（No.19-343）。
作者简介：龚慧，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：feelgonghui@126.com *通信作者：谭胜蓝，女，博士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：sltan@csu.edu.cn

未来药学专业学生培养模式的新要求。

《临床药物治疗学》是以患者为中心、疾病防治为目标，运用临床药学和相关学科的专业知识，研究与实践药物合理应用的一门科学[1]。《临床药物治疗学》是临床药学专业本科生的核心课程，是为药学专业学生今后在工作中开展药学服务夯实基础的一门重要课程。该课程涵盖了药理学、诊断学、内科学等多个学科的知识，涉及的知识面广、内容多，而且实践性与应用性强，学习难度较大。传统的教学存在较多问题，如教学模式以教师讲述为主，学生被动接受相关知识，师生之间缺少多样的互动，难以激发学生的学习兴趣及主动性[2]；教学内容偏重医学和药学理论知识，与既往学习的内科学、诊断学等内容重复，缺乏药学监护传授、药学思维培养、人文关怀培养等[3]。那么，如何提升教学效果，帮助学生构建知识体系，加强分析实践能力和自主能力的培养，是值得探索的问题。

BOPPPS 教学模式由导入（Bridge-in）、学习目标（Objective/Outcome）、前测（Pre-assessment）、参与式学习（Participatory Learning）、后测（Post-assessment）和总结（Summary）六个教学环节构成[4]，起源于加拿大的教师技能培训，是一种以教学目标为导向、以学生为中心的教学模式。BOPPPS 教学模式是教师进行教学设计及课堂组织教学的一种有效模式。我们将 BOPPPS 模式应用于临床药学本科生的《临床药物治疗学》理论课堂教学，使教师能更加有效地组织课堂教学，内容生动活泼，全面激发学生学习兴趣，促进学生主动学习热情，深受学生喜欢，教学效果显著。本文以“心源性卒中的药物治疗”为例，探索 BOPPPS 模式在《临床药物治疗学》的应用。

1 方法与结果

1.1 导入（Bridge-in）

导入主要是通过讲述与课题内容相关的故事或新闻、提出问题、开展相关活动等方式，吸引学生注意力和提高学习兴趣，为接下来的授课创造良好的开端。如课程开始时，教师以提问的方式现场调查学生一、二级亲属发生脑卒中的患病率，迅速吸引学生的注意力。之后，带领学生回顾卒中的“高致残率、高致死率、高复发率”特点以及危害，并进一步引出在引起卒中的众多病因中，还有一种十分隐匿的危险因素，常被称为“无声的杀手”，也就是本节课的主题——心源性卒中，很好地激发了学生的学习兴趣。真实案例或临床经典案例是最常用的导入形式，可以快速提高学生的学习兴趣，并有助于学生将理论知识与临床实践结合。

1.2 学习目标（Objective/Outcome）

好的学习目标需要具备明确、适当、可达成、可测量等特点。临床药学专业的学生是临床药师队伍的重要后备军，提高学生未来的岗位胜任力是讲授本课时的核心期望目标。我们将每堂课的学习目标拆分为知识目标、能力目标和素质目标，并用不同的动词准确表达特定要求，用一种能更好理解的方式将学习目标传递给学生。因此，导入完成后，教师立即向学生介绍本堂课的学习目标。其中，知识目标包括：① 理解心源性卒中的发病机制；② 阐述心源性卒中的危害与病因；③ 掌握心源性卒中的治疗原则、目标和时机以及一线抗栓药物的药代动力学和药学监护要点。能力目标是能够为心房颤动引起心源性卒中的患者制订初始治疗方案。而素质目标是能够初步建立心源性卒中的临床药学服务思维，可独立分析相关治疗方案。

1.3 前测（Pre-assessment）

对于教师来说，前测可以了解学生的知识背景，方便教师根据学情及时调整教学；对于学生来说，前测可以回忆旧知，增强信心。上课前一周，教师已向学生们推送心源性卒中的慕课及一个相关的临床真实案例，并让学生思考该患者发生心源性卒中的原因和治疗方案，培养学生自主学习和主动思考的能力。另外，在学习本章的重点内容之前，通过一首顺口溜带领学生回忆了普通卒中的诊疗关键点：“一看二查三聆听，一旦异常 120；溶栓药物急救兵，窗口期用要谨记；二级预防莫大意，抗凝抗板和他汀”。① 通过“中风 120”口诀，观察并判断是否发生了脑卒中，“1”代表“看到 1 张不对称的脸”；“2”代表“检查两只手臂有一侧无力”；“0”代表“聆（零）听到说话不清晰”。一旦怀疑卒中，需立刻将患者送往有救治能力的医院。② 根据患者卒中发生的时间，确定是否给予溶栓治疗。③ 不同病因引起的脑卒中患者，需采用不同的二级预防治疗药物，包括他汀类调脂药、阿司匹林等抗血小板药以及抗凝药等。这样一种方式很好地活跃了课堂气氛，激发了学生的学习兴趣，提高后续听课的效率。

1.4 参与式学习（Participatory Learning）

参与式学习是 BOPPPS 教学模式最重要的环节。本阶段，教师通过采用真实案例、情景模拟、

信息化教学等混合式教学方法，利用自制教具、视频、图片和表格等教学元素加深学生对重点和难点知识的理解，整个教学过程中始终以学生为中心。教师以案例和提问引导学生主动思考和思辨，激发求知欲；让学生角色扮演临床药师做药学监护，提高岗位胜任力和医者仁心道德品质；还可以介绍疾病治疗最新指南，引导学生建立循证思维。以本节课为例，首先，采用思维导图梳理本章节重要的知识脉络，包括心源性卒中的急性期治疗，针对原发病预防心源性卒中的复发等；结合教具自制水管模型，并用日常生活中的水管堵塞进行类比，将疾病抽象的机制具体化，使学生更加直观地认识及理解心源性卒中的发病机制。另外，借用一些可以帮助记忆的顺口溜或短语，例如，经典的内源性和外源性凝血途径过程中有多种凝血因子参与其中，以往教学过程中，同学们感觉很难记忆。本次课堂上，教师将经典的凝血途径编成了一句顺口溜，并进行板书（见图 1），用“三七二十一，抗凝很容易”来辅助记忆：组织因子（Ⅲ因子）由于血管损伤等途径进入血液，激活Ⅶ因子，形成复合物，这是外源性凝血途径；再激活共同凝血通路，分别包括Ⅹ因子、Ⅱ因子和Ⅰ因子，这几个凝血因子组合起来就是一句乘法口诀。而内源性凝血途径，按照Ⅻ因子、Ⅺ因子、Ⅸ因子顺序激活后，再逐级激活共同通路上的Ⅹ因子、Ⅱ因子和Ⅰ因子。经过教师生动的讲解，同学们迅速记住了外源性凝血途径中的凝血因子有哪些，也加深了对外源性和内源性凝血途径的理解，对于掌握不同抗凝药治疗靶点也更加容易。最重要的是，教学过程中，不断根据教学内容，以真实病例为引线，层层递进，不断启发学生应用所学知识综合分析病例特点，并最终制订合理的用药方案和监护计划。通过教师提出问题 → 学生探究问题 → 师生解决问题的模式，启发、引导学生思考、讨论，鼓励学生表达自己的观点，教师适当归纳总结，以此激发学生的分析思维。

1.5 后测（Post-assessment）

后测的目的是验收学习成果。后测和前测相对应，可以加深学习效果。通常可考虑利用问卷星等软件设计课堂测试题二维码链接，让学生当堂作答或者课后交卷。本节课中，教师设计了一个案例，请学生结合该案例完成客观题和主观题。其中客观题为三道单选题，考点涉及心源性卒中发病机制、病因分析、一线抗栓药的药学特点等知识。主观题则推选两名学生代表，分别扮演患者和药师，模拟药师对患者进行用药教育。这种师生互动的形式，让学生融会贯通所学知识，调动积极性，主动参与教学过程，并能很好地培养人文沟通能力。最后教师对参考答案和学生表现进行点评。课堂测试成绩将作为过程学习考核的一部分。

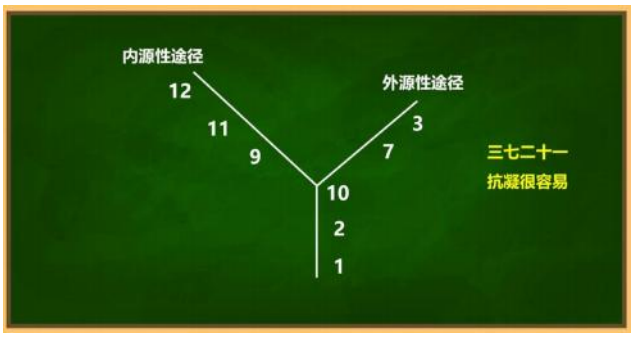

图 1 抗凝机制示意图

Fig 1 Instruction chart of anticoagulant mechanism

1.6 总结（Summary）

最后，教师应对本堂课进行归纳总结，帮助学生进行重点和难点知识的梳理，建立理论联系实际的临床思维。除了使用传统的文字总结，还可以借助板书、表格、思维导图等形式进行总结。本课堂教师又使用一段顺口溜进行总结，并且带领学生一起朗读加深印象——“房颤卒中急，溶栓与抗凝；三七二十一，抗凝很容易；达比与沙班，肝素华法林；性质各不同，监护要谨记”。最后，通过“瓣膜性房颤的孕妇发生心源性卒中应如何抗凝治疗”这一开放思考题与课前呼应，引发学生思考。

2 讨论

《临床药物治疗学》在美国药学院校中被列为顶端课程（Capstone course）[5]，是一门教授药学学生如何在人体上运用药物治疗的学科，是基础科学与临床科学的桥梁，是学生从事临床药学实践的重要基础。药物治疗学教学是一项具有挑战性的任务，它涉及多个学科知识，内容多，实践性与应用性强。目前，国内临床药学的教育以传统的讲授式教学方法为主，教学效果不佳[6]。近年来，研究表明新颖的教学方法可有效提高学生的学习成绩、科学素养及主动学习的能力[7]。

作为一种注重教学互动和反思的闭环反馈课程设计模式，BOPPPS 教学是教师进行教学设计及课堂组织时行之有效的设计模式之一。BOPPPS 教学模式本质上是对以学生为中心的教与学的实践，一方面，注重引导学生参与课堂，使课堂教学从“以

教师为中心”向“以学生为中心”转变，建立起良好的师生互动关系，活跃课堂气氛，维持学生的专注度。另一方面，教师可及时获取学生反馈，掌握学生的学习动态，调整教学侧重点，进而提高课堂教学质量。BOPPPS 教学模式有效弥补了传统教学模式中师生互动少，学生被动学习，教师对教学效果难以把控等不足，为《临床药物治疗学》的课程教学提供了一种简洁明了、实操性强的教学方法。

BOPPPS 教学可包含多种教学形式，可以更好地与其他高效的教学方法相融合，如基于问题的学习（PBL）[8]，基于团队的学习（TBL）[9] 和基于案例的学习（CBL）[10]，六要素在实际应用中也可灵活调整。重点关注学生的反馈，因为能否提高学生学习效率和深度，很大程度取决于师生之间能否通过及时、准确的“教学反馈”，实现教与学的同步，产生情感共鸣。BOPPPS 教学模式首先引导教师关注学生“学到了什么”，而不是自己“教了什么”；然后要按照认知规律，设定清晰、可衡量的目标，便于学生评估自己掌握知识的程度；最后，强调参与式教学，力求学生能在课堂上充分发挥主观能动性，独立思考、创造新思维 [11]。这种教学方法对于教师和学生提出了更高的要求：教师需花费大量的时间和精力去设计教学过程，包括寻找案例、设计课堂互动提问，了解学生现有基础等，同时要求教师有较强的掌控课堂时间的能力。对学生而言，不能只是简单地听老师讲课，上课过程中要积极思考，课前课后需要花时间查找相关资料完成作业，整堂课下来不仅是知识的学习，也有助于思维能力和表达能力的提升。

笔者团队采用 BOPPPS 教学模式开展《临床药物治疗学》的本科生教学，获得师生的一致好评，在期末学生满意度测评时，该课程的学生满意度达 100%。中南大学在全校 34 个二级学院中号召教师积极参加“三十佳”课堂教学竞赛（每两年一次），通过各级学院层层选拔，全面考核教师综合教学水平，最终只有 30 位教师能荣获此殊荣，本文通信作者以 BOPPPS 模式讲授《临床药物治疗学》展示教学风采，最终获得中南大学第十一届“三十佳”课题教学竞赛“三十佳”称号，这也是多年来药学专业教师首次获此荣誉。因此，笔者认为该教学模式值得在《临床药物治疗学》教学实践中推行，以提高学生未来的岗位胜任力，为临床药师队伍的储备构建重要后备军。

参考文献

[1] 吴永佩 . 临床药物治疗学 - 总论 [M]. 北京：人民卫生出版社，2017.

[2] 沈杰，贾元威，谢海棠 . 临床药物治疗学教学现状及存在问题分析 [J]. 教育教学论坛，2018（21）：84-85.

[3] 吴知桂，罗宏丽，黄毅岚 . 临床药物治疗学教学改革探索：PBL、CBL 联合 EBP 教学方法 [J]. 中国继续医学教育，2020，12（8）：3-5.

[4] 曹丹平，印兴耀 . 加拿大 BOPPPS 教学模式及其对高等教育改革的启示 [J]. 实验室研究与探索，2016，35（2）：196-200.

[5] Olsen KM，Dang SA，Nguyen OV，等 . 美国临床药学教育与实践 [J]. 中国药房，2016，27（2）：145-148.

[6] Zeng HL，Chen DX，Li Q，et al. Effects of seminar teaching method versus lecture-based learning in medical education：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Med Teach，2020，42：1343-1349.

[7] Cheng LF，Kang JS，Xu Q. Research on the constructing the holistic thinking mode and teaching effect of pharmacology [J]. Indian J Pharm Educ Res，2021，55：939-946.

[8] Sengupta P，Sur T. Effectiveness of whatsapp as a teaching learning tool for problem based learning in pharmacology：a quasi-experimental study [J]. J Clin Diagn Res，2021，15：5-9.

[9] El-Banna MM，Whitlow M，McNelis AM. Improving pharmacology standardized test and final examination scores through team-based learning [J]. Nurse Educ，2020，45：47-50.

[10] Chiranjeevi UK，Gedela V，Rao HJG. A comparative study of case-based learning with conventional teaching in undergraduate training of pharmacology [J]. Natl J Physiol Pharm Pharmacol，2022，12：1-716.

[11] 魏曙寰，耿俊豹，刘晓威 . BOPPPS 教学模型的内涵及运用方法探析 [J]. 教育教学论坛，2019（1）：198-199.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-04-08）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例纳武利尤单抗致严重皮疹的诊治实践

王旦旦，郑萍，刘世霆，谢聪*（南方医科大学南方医院临床药学中心，广州 510515）

摘要：临床药师参与 1 例纳武利尤单抗致严重皮疹的诊治实践，为免疫检查点抑制剂引起严重皮肤不良反应的诊治及后续重启免疫治疗的时机和安全性提供参考。本案例中，临床药师协助评估患者发生严重皮疹与使用纳武利尤单抗的相关性，参与皮疹的诊治与治疗方案的调整，并查阅文献对患者是否可以重启免疫治疗进行分析。最终经过治疗，患者严重的皮疹得到了有效控制，患者重启 2、3 周期免疫治疗过程顺利，均未再次出现免疫相关不良反应。

关键词：临床药师；免疫检查点抑制剂；皮肤不良反应；重启免疫治疗

中图分类号：R735.2，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2246-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.050

相比于传统的化疗及靶向治疗，肿瘤免疫治疗具有应答持久，使患者得到长期生存获益的优势[1]，但它在激活免疫系统的同时容易造成免疫系统的失衡，从而发生免疫相关不良反应（immune-related adverse effects，irAEs）[2]。研究显示，截至 2019 年 11 月，中国肿瘤患者使用免疫抑制剂程序性死亡受体 1（PD-1）后致严重 irAEs 的发生率约为 3%，病死率为 0.8%，当患者接受 PD-1 联合化疗时，严重 irAEs 的发生率则增加至约 7%[3]。严重 irAEs 的发生容易导致肿瘤患者病情的进一步加重及复杂化，现阶段我国针对严重免疫相关不良反应的临床治疗经验不足。本文报道了 1 例使用纳武利尤单抗导致严重 irAEs 病例的发生、发展、救治及转归过程，为临床诊治提供借鉴经验。

1 病例概况

患者男，55 岁，身高 168 cm，体质量 54 kg，体质量指数（BMI）：19.1 kg·m^{-2}。2021 年 11 月 20 日因“反复中上腹疼痛伴腹胀 3 个月”至当地医院检查，诊断为胃恶性肿瘤，未行抗肿瘤治疗。后转诊至我院，入院查全腹增强 CT 提示①胃窦部及胃角胃壁不规则增厚，考虑胃癌可能；② 肝 S5 稍低密度结节，血管瘤可能，未能完全除外转移瘤，建议随访。电子胃十二指肠镜检查提示胃角溃疡性肿物。超声胃镜检查提示胃窦溃疡性肿物：考虑胃癌（T4N0）。病理结果回报：混合性腺神经内分泌癌 [低分化腺癌（部分为印戒细胞癌）约 30%，小细胞神经内分泌癌约 70%]。免疫组化结果：MSH2（＋）、MSH6（＋）、PMS2（＋）、MLH1（＋）、PD-1（CPS ＜ 1）、PD-L1（22C3）（CPS ≈ 10，阴性对照为阴）、Her-2（0）。综合患者病情，诊断为胃混合性腺神经内分泌癌，于 2021 年 11 月 23 日行第 1 周期纳武利尤单抗联合 CapeOX 方案新辅助治疗，具体用药为：纳武利尤单抗 360 mg d1 ＋奥沙利铂 190 mg d1 ＋卡培他滨 1.5 g bid d1 ～ d14，q3w，治疗过程顺利，治疗期间未诉特殊不适。12 月 7 日患者躯干及四肢出现大量红色风团，为求进一步诊疗再次入院，患者精神状态较差，睡眠较差，食欲食量较差，体力情况一般，体重无明显变化。

患者入院时生命体征平稳，躯干、四肢弥漫类圆形红斑，中央颜色较深，呈靶形损害，相互融合，面积约 80%，躯干、四肢红斑处瘙痒伴皮温升高，无水疱、糜烂、溃疡。肝功能：谷丙转氨酶（ALT）111 U·L^{-1}↑，谷草转氨酶（AST）77 U·L^{-1}↑；感染二项：C 反应蛋白（CRP）9.17 mg·L^{-1}↑，降钙素原（PCT）0.075 ng·mL^{-1}↑；肿瘤标志物：组织多肽特异抗原（TPS）213.73 U·mL^{-1}↑，甲胎蛋白（AFP）20.75 ng·mL^{-1}↑；细胞因子：白细胞介素 6（IL-6）59.01 pg·mL^{-1}↑，余未见明显异常。患者皮肤不良反应表现及救治过程见表 1 和图 1。此外，该患者入院时肝酶偏高，予还原型谷胱甘肽 1 g 联合异甘草酸镁注射液 40 mL 护肝治疗 3 d 后复查，患者肝药酶

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.82204499）；2021 年广东省医院协会药学科研专项基金（恒瑞）（No.2021YXQN01）。

作者简介：王旦旦，女，硕士，主管药师，主要从事抗肿瘤药理学及临床药学方面的研究，email：smuwdd@126.com *通信作者：谢聪，男，主管药师，主要从事生物药剂学与药代动力学及抗肿瘤临床药学方面的研究，email：chuncuixc@126.com

ALT 56 U·L^{-1}，AST 33 U·L^{-1} 降低，继续治疗一周后复查，患者肝药酶降至正常，停用护肝药物。

表 1　不良反应表现及救治过程

日期	患者情况	相应处理措施
12 月 7 日	躯干、四肢红斑处瘙痒伴皮温升高	甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg qd 治疗
12 月 9 日	体温 37.5 ℃，躯干、四肢红斑面积较前增大，无水疱、糜烂、溃疡	甲泼尼龙琥珀酸钠加量至 108 mg qd 治疗，氯雷他定片 10 mg qd po，卤三松 / 三氯生乳膏 0.2 g qd 外用
12 月 12 日	体温正常，四肢及躯干部位红斑颜色较前加深，瘙痒较前明显减轻，左侧肋、双侧大腿根部出现 2 ～ 3 簇隆起水疱	甲泼尼龙琥珀酸钠加量至 108 mg qd 治疗，停止外用药膏涂抹水疱处
12 月 16 日	四肢及躯干部位红斑颜色较前加深，未见新增水疱，瘙痒感基本消失；CRP 0.83 mg·L^{-1}，PCT 0.054 ng·mL^{-1}；IL-6 4.06 pg·mL^{-1}	甲泼尼龙琥珀酸钠减量至 80 mg qd，停用氯雷他定片
12 月 19 日	四肢及躯干部位红斑颜色较前褪色，未见新增水疱，无瘙痒	甲泼尼龙琥珀酸钠减量至 60 mg qd
12 月 22 日	四肢及躯干部位红斑颜色较前减退，有小面积脱屑，可见新生皮肤，无瘙痒；CRP 0.31 mg·L^{-1}，PCT 0.024 ng·mL^{-1}	甲泼尼龙琥珀酸钠减量为 40 mg qd
12 月 25 日	上肢、躯干、下肢部位红斑颜色明显减退，下肢尚有小面积脱屑，可见新生皮肤；IL-6 3.0 pg·mL^{-1}	甲泼尼龙琥珀酸钠减量为 30 mg qd
12 月 27 日	躯干红斑基本褪色、下肢部分可见淡粉色新鲜皮肤，部分可见少许脱屑	出院，带泼尼松片 30 mg qd

图 1　患者入院时（A、B）及出院时（C、D）皮肤皮疹状况

2　分析与讨论

2.1　纳武利尤单抗致皮肤不良反应相关性分析

皮肤不良反应是最常见的 irAEs，2021 年 CSCO 发布的《免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南（2021）》中指出，纳武利尤单抗皮肤不良反应的发生率约为 34% ～ 40%[4]。irAEs 通常发生在治疗的早期，可在治疗开始后的几天到几个月内发生，目前有报道的皮肤不良反应主要有皮疹、瘙痒、白癜风、皮肤干燥、红斑、多形性红斑、荨麻疹等，多数症状较轻[5-6]。根据我国药品不良反应监测中心制定的判定准则，该患者用药后约 3 d 出现皮疹，7 d 躯干及四肢出现大量红色风团，用药时间与毒性反应存在相关性，症状符合已知不良反应类型且不能用联用药物的作用、患者的临床症状或其他治疗方法的影响来解释，停药并给予对症治疗后患者皮肤症状明显好转，可判定为“很可能相关”。

2.2　免疫相关皮肤不良反应的分级与处理

根据 CSCO 指南意见，免疫相关皮肤不良反应按斑丘疹 / 皮疹面积及瘙痒程度可分为 3 级。该患者躯干、四肢红斑面积约 80%，伴全身持续性强烈瘙痒，日常生活明显受限，影响睡眠，可评定为 G3 级。

对于 G3 级皮疹及瘙痒，ESMO、NCCN 及 CSCO 指南均建议暂停免疫治疗[7-8]，推荐强效的糖皮质激素外用，联合泼尼松 / 甲泼尼龙 0.5 ～ 1 mg/（kg·d）治疗，并口服抗组胺药物。该患者初始治疗方案为甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg·d^{-1}，使用 2 d 后患者皮肤红斑面积较前继续增大，临床医师请临床药师会诊调整治疗方案。临床药师认为，该患者体质量为 54 kg，根据 CSCO 指南建议对于中低剂量治疗效果不佳时，甲泼尼龙琥珀酸钠可加量至 2 mg/（kg·d）即 108 mg·d^{-1} 治疗，并辅以氯雷他定片口服，卤三松 / 三氯生乳膏外用。在大剂量甲泼尼龙琥珀酸钠用药 7 d 后，该患者皮肤症状及瘙痒较入院明显好转，临床药师建议可停用外用激素及抗组胺药物。同时，临床

药师考虑长期大剂量使用糖皮质激素可能对免疫治疗有负性影响并增加机会性感染的风险[9]，建议尽早停用甲泼尼龙琥珀酸钠。对于短程使用糖皮质激素，停药时需要逐渐减量至停药[10]，但目前没有固定的减量方案，需要结合患者的个体状态来综合考虑。对于该患者目前症状好转但皮疹面积仍较大，临床药师建议每 3 日减量约 20 mg，该患者甲泼尼龙琥珀酸钠 9 d 内由 108 mg 减量至 30 mg，皮疹控制良好，达到出院标准。由于患者出院时皮疹仍未完全消退，因此临床药师建议该患者继续口服泼尼松 30 mg 治疗，并嘱患者如皮疹进一步消退，可每周减量 10 mg，直至停药。

2.3 *该患者是否可重启免疫治疗及治疗药物的选择*

纳武利尤单抗是第一个经大型Ⅲ期临床试验证实能给晚期胃癌患者带来生存获益的 PD-1 抑制剂[11]，CheckMate-649 研究中国亚组数据显示，与化疗组相比，纳武利尤单抗联合化疗治疗先前未经治疗的中国晚期胃癌患者，取得了具有临床意义的总生存期与中位无进展生存期获益，在 PD-L1 阳性患者中获益更为显著[12]。该患者为胃癌（T4N0），Her-2（0），PD-L1（22C3）（CPS ≈ 10，阴性对照为阴），纳武利尤单抗联合方案为该患者的一线治疗方案。有临床研究发现，出现皮肤相关不良反应可能预示着 PD-1 治疗有效[13]，对于临床医师提出该患者是否可再次启用纳武利尤单抗治疗，临床药师分别查阅了 CSCO、NCCN 及 ESMO 指南，不同的指南对于发生严重 irAEs 患者是否可重启免疫治疗的意见不一，如表 2 所示。

表 2 重启免疫治疗的意见

指南	不良反应分级	免疫治疗
CSCO 指南	G3 级	停用，基于患者的风险 / 获益比讨论是否恢复免疫检查点抑制剂治疗
CSCO 指南	斑丘疹和 / 或瘙痒，或反应性皮肤毛细血管增生症等症状	待症状消退至 G1 级后，可以重启 ICIs 治疗
NCCN 指南	严重 irAEs	永久停止这种免疫治疗
NCCN 指南	中度 irAEs	可能需要永久停止该类免疫治疗
ESMO 指南	3 级以上	立即停药，并全身应用糖皮质激素，直至降至 1 级；未明确指出后续是否可以继续使用

为获得更好的推荐意见，临床药师查阅相关文献报道，希望可以获得临床实践经验。临床药师共查阅了 3 篇回顾性研究，均评估了在发生严重 irAEs 导致停药患者中重启免疫治疗的有效性与安全性，研究数据如表 3 所示。这些患者重启免疫治疗后，约 1/3 的患者会出现与之前相同的不良反应，再次发生皮肤不良反应的患者比例为 38%。也有小部分患者会出现新的不良反应，程度一般较前轻微，患者通常是可以耐受的。文献指出，对免疫治疗已经起效或肿瘤已到稳定期的患者，无论是否重启免疫治疗，患者的无进展生存期和总生存期结果相似，因此研究者认为这部分患者因 irAEs 停用后可能不需要再次启动免疫治疗作为维持治疗。但在发生 irAEs 之前未观察到肿瘤部分缓解的患者以及因 irAEs 发生而停止免疫治疗后导致病情进展的患者来说，再次挑战免疫治疗可能是有益的。

表 3 回顾性研究数据

文献	irAEs	再挑战	相同不良反应	其他不良反应	严重程度
Santini[14]	68（14%）发生严重 irAEs	38（56%）	10（26%）	10（26%）	大多数复发 / 新 irAEs 是轻微的（60% 为 1 ～ 2 级，85% 已解决或改善至 1 级），2 例死亡；复发 / 新的 irAEs 在首次 irAEs 需要住院的患者中更常见（87% *vs* 43%）
Simonaggio[15]	2 级以上 irAEs 93 例	40（43%）	17（42.5%）	5（12.5%）	18 例患者（81.8%）较前轻微或相同；只有 4 例患者第二次 irAE 比初始严重，但均未发生死亡事件
Haanen[16]	大多数是严重的 irAEs	452	130（28.8%），其中皮肤不良反应占 38%	20（4.4%）	各类型的 irAEs 平均发病时间相似，但发生严重 irAEs 的比例更高（87.3% *vs* 85.1%），致死率更低（10.5% *vs* 11.7%）

综上所述，临床药师认为该患者此次因严重皮肤不良反应需入院治疗，再次予纳武利尤单抗后出现相同或其他不同类型的 irAEs 可能性大，但严重程度可能有所减弱，由于该患者目前为首次接受免疫治疗，机体对免疫治疗尚无应答[17]，因此建议可在患者皮疹症状进一步好转后重启免疫治疗。

对于 Her-2 阴性胃癌的一线治疗，目前已上市的免疫抑制剂中纳武利尤单抗是标准之选[18]，此外，信迪利单抗联合化疗也被认为可以改善中国胃癌患者的无进展生存期和总生存期[19]，但研究表明，中国肿瘤患者使用纳武利尤单抗相较于其他 PD-1，具有最低的治疗相关不良事件发生率[20]。因此对于该患者，重启免疫治疗，临床药师仍更推荐使用纳武利尤单抗。患者重启免疫治疗后需密切监测 irAEs，若再次出现严重免疫相关皮肤不良反应，需永久停用纳武利尤单抗。

2.4 后续随访

该患者出院后皮疹逐渐消退，泼尼松片每周减量 10 mg，直至停药（2021 年 12 月 27 日至 2022 年 1 月 17 日共口服 3 周）。患者分别于 2022 年 1 月 18 日、2 月 8 日再次入院行第 2、3 周期纳武利尤单抗联合 CapeOX 方案新辅助治疗，过程顺利，未再次出现 irAEs。

3 小结

近年来，随着免疫检查点抑制剂的快速发展和广泛应用，该类药物导致的 irAEs 也越来越受临床关注，甚至被认为是一种全新的自身免疫相关性疾病。不良反应的早期诊断及处理在肿瘤治疗中同样占据重要地位。本文通过对 1 例严重免疫相关皮肤不良反应案例的诊治方案进行分析，为临床处理类似病例提供参考。在这个案例中，临床药师全程参与制订治疗方案，对患者进行药学监护，并查阅了大量国内外指南共识及相关文献，为患者后续是否可以重启免疫治疗及选药提供参考意见，体现了临床药师参与多学科诊治的重要性。这也提示临床药师在工作中应重视不良反应的发生并在治疗过程中进行监测，为患者用药安全保驾护航。

参考文献

[1] Topalian SL，Wolchok JD，Chan TA，et al. Immunotherapy：the path to win the war on cancer? [J]. Cell，2015，161（2）：185-186.

[2] Cousin S，Seneschal J，Italiano A. Toxicity profiles of immunotherapy [J]. Pharmacol Ther，2018，181：91-100.

[3] Li L，Li G，Rao B，et al. Landscape of immune checkpoint inhibitor-related adverse events in Chinese population [J]. Sci Rep，2020，10（1）：15667.

[4] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 2021 [M]. 北京：人民卫生出版社，2021：148.

[5] Geisler AN，Phillips GS，Barrios DM，et al. Immune checkpoint inhibitor-related dermatologic adverse events [J]. J Am Acad Dermatol，2020，83（5）：1255-1268.

[6] Kennedy LB，Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（2）：86-104.

[7] Lacouture ME，Sibaud V，Gerber PA，et al. Prevention and management of dermatological toxicities related to anticancer agents：ESMO clinical practice guidelines [J]. Ann Oncol，2021，32（2）：157-170.

[8] Thompson JA，Schneider BJ，Brahmer J，et al. Management of immunotherapy-related toxicities，Version 1.2022 [J]. J Natl Compr Cancer Network，2022，20（4）：387-405.

[9] Arbour KC，Mezquita L，Long N，et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol，2018，36（28）：2872-2878.

[10] 糖皮质激素急诊应用共识专家组 . 糖皮质激素急诊应用专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志，2020，29（6）：765-772.

[11] Janjigian YY，Shitara K，Moehler M，et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric，gastro-oesophageal junction，and oesophageal adenocarcinoma（CheckMate 649）：a randomised，open-label，phase 3 trial [J]. Lancet，2021，398（10294）：27-40.

[12] Shen L，Bai Y，Lin X，et al. Abstract CT184：First-Line（1L）nivolumab（NIVO）plus chemotherapy（chemo）versus chemo in patients（pts）with advanced gastric cancer/gastroesophagealjunction cancer/esophageal adenocarcinoma（GC/GEJC/EAC）：CheckMate 649 Chinese-subgroup analysis [J]. Cancer Res，2021，81（13 Supplement）：T184.

[13] Maher VE，Fernandes LL，Weinstock C，et al. Analysis of the association between adverse events and outcome in patients receiving a programmed death protein 1 or programmed death ligand 1 antibody [J]. J Clin Oncol，2019，37（30）：2730-2737.

[14] Santini FC，Rizvi H，Plodkowski AJ，et al. Safety and efficacy of re-treating with immunotherapy after immune-related adverse events in patients with NSCLC [J]. Cancer Immunol Res，2018，6（9）：1093-1099.

[15] Simonaggio A，Michot JM，Voisin AL，et al. Evaluation of readministration of immune checkpoint inhibitors after immune-related adverse events in patients with cancer [J]. JAMA Oncol，2019，5（9）：1310.

[16] Haanen J，Ernstoff M，Wang Y，et al. Rechallenge patients with immune checkpoint inhibitors following severe immune-related adverse events：review of the literature and suggested prophylactic strategy [J]. J Immunother Cancer，2020，8（1）：1-10.

[17] Kwak Y，Seo AN，Lee HE，et al. Tumor immune response and immunotherapy in gastric cancer [J]. J Pathol Transl Med，2020，54（1）：20-33.

[18] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）胃癌诊疗指南 2021 [M]. 北京：人民卫生出版社，2021：73.

[19] Nie C，Lv HF，Liu YJ，et al. Clinical study of sintilimab as second-line or above therapy in patients with advanced or metastatic gastric cancer：a retrospective study [J]. Front Oncol，2021，11：741865.

[20] Xu J，Jiang H，Pan Y，et al. LBA53 Sintilimab plus chemotherapy（chemo）versus chemo as first-line treatment for advanced gastric or gastroesophageal junction（G/GEJ）adenocarcinoma（ORIENT-16）：First results of a randomized，double-blind，phase Ⅲ study [J]. Ann Oncol，2021，32（suppl 5）：S1331.

（收稿日期：2022-10-20；修回日期：2022-12-06）

药品不良反应

无敌丹胶囊致剥脱性皮炎 1 例及治疗体会

崔雪萍[1]，宁德琼[2]，彭红艳[3]，邹应梅[1*]（1. 曲靖市第一人民医院呼吸与危重症医学科，云南 曲靖 655000；2. 曲靖市第一人民医院心血管内科，云南 曲靖 655000；3. 曲靖市第一人民医院临床药学科，云南 曲靖 655000）

关键词：无敌丹胶囊；剥脱性皮炎；治疗体会；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)08-2250-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.051

剥脱性皮炎（exfoliative dermatitis，ED）又称红皮病（erythroderma），是一种重症药疹，多见于老年男性。初期症状表现为细小密集的红斑、荨麻疹或斑丘疹，迅速泛发全身，一般＞ 90% 体表面积，皮损融合成大的斑片，全身呈弥漫性潮红、肿胀，尤以面部和肢体末端严重，进一步进展可出现渗出、糜烂，可伴剧烈瘙痒。一般 2 周后红肿可逐渐消退，全身出现大片状脱屑，掌跖部可成手套或袜套样剥脱，指甲可增厚，干燥，失去光泽。可继发感染甚至呼吸循环衰竭危及生命。如果及时治疗，一般 4 ～ 6 周后皮肤逐渐恢复正常，可遗留色素沉着[1-2]。ED 的发病因素有药物、肿瘤、皮肤病等，其中药物引起的 ED 占 12.69% ～ 21.6%[3]。查阅国内外相关文献，目前尚未见无敌丹胶囊致剥脱性皮炎的报道。本案例为无敌丹胶囊致剥脱性皮炎，属于罕见药品不良反应，现报道如下。

1 病例资料

患者苏某，男，75 岁，身高 169 cm，体质量 75 kg。因“咳嗽、咳痰、皮疹 5 d”，于 2018 年 10 月 23 日以“肺炎、剥脱性皮炎”收住呼吸与危重症医学科。既往有风湿性关节炎 6 年，平时疾病发作时自行服用“布洛芬缓释胶囊”止痛。否认药物、食物过敏史。患者因风湿性关节炎疼痛于 2018 年 10 月 18 日服用无敌丹胶囊（0.4 g/ 粒，批号：20180607）治疗，口服，1 次 2 粒，3 次 • d^{-1}，服药 24 h 后出现全身皮肤皮疹、水疱，伴皮肤瘙痒，立即停服无敌丹胶囊，并未服用抗过敏药物治疗，未至医院就诊，后因咳嗽、咳痰、皮疹较前加重，于 2018 年 10 月 23 日至我院就诊，收住我科。入院查体：体温 36.7 ℃，脉搏 87 次 • min^{-1}，呼吸 18 次 • min^{-1}，血压 127/80 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），血氧饱和度 95%。一般情况差，神清，口腔黏膜可见散在破溃，右耳散在破溃，全身满布红色药疹，腰背部及骶尾处皮疹融合成片，呈紫红色。腰背部皮疹表皮干燥、脱皮，骶尾部 1 cm×1 cm 破溃，左侧股骨粗隆 2 cm×2.5 cm 破溃，创面鲜红，有少许渗血。双足趾缝脱皮，足趾及足底部皮肤紫红。足底及手掌水泡。双肺呼吸音增粗，右下肺闻及湿啰音，余无特殊。胸部 CT 示：右肺下叶感染。入院初步诊断：① 右肺下叶肺炎；② 剥脱性皮炎。予内科一级护理，氧疗，头孢哌酮舒巴坦 3 g q8h 静脉滴注抗感染，请皮肤科及临床药学科会诊后诊断：剥脱性皮炎。建议停用可疑致敏药物并予抗过敏治疗：甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg qd ivgtt、盐酸左西替利嗪胶囊、氯雷他定分散片口服抗过敏；康复新液、碳酸氢钠液含漱，5 ～ 6 次 • d^{-1}；碘伏或新洁尔灭消毒清洁皮损破溃处；白色洗剂（本院自制制剂，由氧化锌、醋酸铅、苯酚、甘油组成，其中氧化锌为主要成分，规格：140 mL/ 瓶，适应证为消炎、收敛、止痛，用于皮肤瘙痒、湿疹、皮炎等，批号为 20180814-3）涂抹；卤米松乳膏、夫西地酸乳膏 1∶1 混匀后外用红斑处，1 ～ 2 次 • d^{-1}，破溃处除外；人免疫球蛋白 0.4 g/（kg•d）ivgtt 治疗；并且告知患者瘙痒时勿抓皮肤，避免破溃感染。

本病例属于药物性剥脱性皮炎，为重症药疹，病情重，患者心理压力大、情绪不稳定，给予心理干预。2018 年 10 月 30 日患者皮肤状况未

作者简介：崔雪萍，女，硕士，主治医师，主要从事过敏性哮喘与嗜酸性粒细胞增多相关性肺疾病、呼吸危急重症疾病方面的研究，email：1241962279@qq.com *通信作者：邹应梅，女，副主任医师，主要从事呼吸感染性疾病方面的研究，email：erosy520@126.com

恶化，瘙痒较前好转，改甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg qd ivgtt 并停用人免疫球蛋白。2018 年 11 月 7 日口腔黏膜及右耳破溃，部分已结痂，创面干燥，胸腹部及四肢散在红色点状药疹，腰背部、骶尾部、双手掌及双足底药疹融合成片，呈紫红色；腰背部皮疹表皮干燥、脱皮，右侧肩胛、骶尾部及坐骨结节药疹表皮散在破溃，创面鲜红，有少许渗血，双足趾缝硬壳块状脱皮。改用甲泼尼龙琥珀酸钠 30 mg qd ivgtt。11 月 14 日患者瘙痒较前明显好转，口腔黏膜及右耳破溃已结痂，胸腹部及四肢散在红色片状药疹，腰背部、骶尾部、双手掌及双足底药疹融合成片，呈紫红色；腰背部皮疹表皮干燥、脱皮；臀裂两侧及双侧股骨粗隆药疹表皮部分破溃，创面干燥，无渗血，双手及双足硬壳块状脱皮，双足趾甲脱落。改用甲泼尼龙琥珀酸钠 20 mg qd ivgtt。11 月 21 日患者偶有瘙痒，全身皮肤皮疹明显消退，腰背部皮疹表皮干燥、脱皮；臀裂两侧及双侧股骨粗隆药疹表皮破溃已结痂；双手及双足硬壳大部分脱落。给予患者办理出院，出院诊断：① 剥脱性皮炎；② 右下肺肺炎。院外治疗方案：醋酸泼尼龙片 20 mg po qd，逐渐减量。每周至我科、皮肤科门诊随诊。并定期进行院外随访，未再出现新皮疹，患者于 12 月 10 日皮肤病变完全好转。

2　讨论

无敌丹胶囊由黄芪、杜仲、续断、肉苁蓉、苏木、川穹、没药（制）、淫羊藿、怀牛膝、骨碎补、补骨脂、熟地、细辛、桂枝、血竭、三七、当归、乳香（制）、香加皮、羌活组成，性状为胶囊剂，内容物为红棕色至褐色的粉末或颗粒；气微香，味微苦，其适应证为益气活血，滋补肝肾，祛风除湿，消肿止痛。用于气虚血瘀、肝肾不足引起的骨性关节炎、骨质增生、骨折。禁忌证为：① 孕妇、哺乳期妇女禁用；② 儿童禁用；③ 对本品及所含成分过敏者禁用。说明书不良反应为瘙痒、皮疹、腹痛、恶心、呕吐、口干、便秘、咽喉痛、口麻木、水肿、心悸、胸闷、多形性红斑。

本例患者既往无食物、药物过敏史，因风湿性关节炎疼痛自行服用无敌丹胶囊，服药 24 h 后出现全身皮肤皮疹、水疱，伴皮肤瘙痒，立即停服无敌丹胶囊，入院后经治症状好转后有合理的时间关系。根据我国药物不良反应（adverse drug reaction，ADR）判断标准 [4]，采用 Naranjo 评估量表对无敌丹胶囊与 ADR 的关联性进行分析（见表 1），无敌丹胶囊得分为 6 分，符合关联性 “很可能” 的判定。因此本例发生剥脱性皮炎很可能为无敌丹胶囊所致。查阅国内外相关文献，目前尚未见无敌丹胶囊导致剥脱性皮炎的报道，属于罕见不良反应。

表 1　Naranjo 评估量表得分情况（分）

相关问题	问题分值			得分
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	0（否）
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0（未知）
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0（未知）
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0（未知）
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分值				＋6

剥脱性皮炎的机制主要有迟发型过敏反应、抗原抗体反应、类过敏反应 [5]。本例患者为服药 24 h 后出现剥脱性皮炎，为迟发型超敏反应。剥脱性皮炎的治疗药物主要为糖皮质激素，抗组胺药物可缓解瘙痒及外用药辅助治疗，亦可注射大剂量免疫球蛋白。本例患者予糖皮质激素、人免疫球蛋白、左西替利嗪、氯雷他定抗过敏；白色洗剂、复方多黏菌素 B 软膏、卤米松乳膏、夫西地酸乳膏涂抹，经上述治疗后好转。本病例属于药物所致剥脱性皮炎，为重症药疹，患者心理压力大、情绪不稳定，故同时给予患者心理干预。

无敌丹胶囊被越来越多的临床医师用于临床，如治疗风湿性关节炎 [6]、腰椎骨质增生 [7]、绝经后骨质疏松症 [8]、促进骨折愈合 [9]、骨关节炎 [10-11]、膝骨关节炎 [12-13]、老年骨性关节病 [14]、早期外伤性颈髓损伤 [15]。临床医师在使用药物过

程中，应该做到以下 6 点：① 详细询问病史，尤其是药物过敏史；② 掌握药物适应证、禁忌证及不良反应；③ 规范用法用量；④ 密切观察用药后反应，若发生不良反应，应立即停用可疑致敏药物，并积极进行抗过敏治疗，做好抢救准备，避免发生严重过敏反应；⑤ 进行心理干预；⑥ 进行院外随访。

参考文献

[1] Yacoub MR，Berti A，Campochiaro C，et al. Drug induced exfoliative dermatitis：state of the art [J]. Clin Mol Allergy，2016，14（1）：9.

[2] 包振宇，邹先彪 . 重症药疹的研究进展 [J]. 实用皮肤病学杂志，2015，8（2）：112-114，118.

[3] Li J，Zheng HY. Erythroderma：a clinical and prognostic study [J]. Dermatology，2012，225（2）：154-162.

[4] 李博，高蕊，李睿，等 . 药物临床试验不良反应 / 不良事件关联性判定方法研究探讨 [J]. 中国新药杂志，2014，23（12）：1465-1470.

[5] 季士亮 . 药物致剥脱性皮炎的临床分析 [J]. 医学信息，2018，31（18）：112-114.

[6] 王铁英 . 无敌丹治疗风湿性关节炎 43 例疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志，2017，38（7）：50-51.

[7] 姚仁福，孔庆利 . 无敌丹治疗腰椎骨质增生临床观察 [J]. 云南中医中药杂志，2017，38（5）：102-103.

[8] 周路祥 . 无敌丹胶囊对绝经后骨质疏松症患者 60 例临床观察 [J]. 云南中医中药杂志，2016，37（12）：63-64.

[9] 姚志刚 . 无敌丹胶囊促进骨折愈合的临床观察 [J]. 云南中医中药杂志，2017，38（8）：100-101.

[10] 孟亚轲，刘岩，王宏瑞，等 . 中成药无敌丹对骨关节炎软骨细胞活力和软骨细胞凋亡的影响 [J]. 中国组织工程研究，2015，19（37）：5983-5987.

[11] 高宇声 . 无敌丹胶囊治疗骨性关节炎的临床观察 [J]. 云南中医中药杂志，2018，39（7）：40-42.

[12] 张慧，李荣慧，徐无忌 . 无敌丹胶囊治疗膝骨关节炎的临床观察 [J]. 云南中医中药杂志，2022，43（6）：43-46.

[13] 李卫国，李灏，魏建新，等 . 无敌丹胶囊联合塞来昔布治疗膝骨关节炎的疗效及对炎症介质的影响 [J]. 现代药物与临床，2021，36（6）：1231-1235.

[14] 王琦，何渝煦，王会 . 无敌丹胶囊治疗老年骨性关节病 256 例疗效观察 [J]. 现代康复，2000，4（12）：125.

[15] 张群 . 无敌丹胶囊在外伤性颈髓损伤早期治疗中的应用 [J]. 云南中医中药杂志，2018，39（11）：51-52.

（收稿日期：2022-11-21；修回日期：2022-12-20）

卡瑞利珠单抗致致命性急性肝衰竭 1 例并文献分析

邢晓敏，韩冰，王凯*（青岛大学附属医院药学部，山东 青岛 266000）

关键词：免疫检查点抑制剂；卡瑞利珠单抗；急性肝衰竭

中图分类号：R747.2，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2252-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.052

卡瑞利珠单抗（camrelizumab，SHR-1201）是我国自主研发的、具有 IgG4-kappa 人源化高亲和力的程序性死亡受体 1（PD-1）抑制剂，于 2019 年 5 月 31 日获批上市 [1]，至今已在肺癌、肝癌、食管癌、鼻咽癌以及淋巴癌中获批 8 个适应证。其报道较多的不良反应为反应性毛细血管瘤和免疫性心肌炎，引起肝损伤的报道较少，但与较差的预后相关。本文对我院 1 例应用单次剂量卡瑞利珠单抗致致命性急性肝衰竭的病例进行介绍，对其相关性进行分析，并检索国内外相关数据库，查阅卡瑞利珠单抗致肝损伤和肝衰竭的文献资料并进行复习，以期为临床提供参考。

1 病例介绍

患者，男，68 岁，身高 170 cm，体质量 60 kg。1 月余前查体发现肺部占位，无发热，无咳嗽、咳痰，无胸闷、憋气，于外院诊断为“肺恶性肿瘤”，行培美曲塞 800 mg d1 联合奈达铂 60 mg d1 ～ 2 第 1 周期化疗，过程顺利，肝功能正常，无肝转移。免疫组化示细胞程序性死亡 - 配体 1（PD-L1）高表达（TPS 65%），2020 年 12 月 26 日前静脉滴注 200 mg 注射用卡瑞利珠单抗（江苏恒瑞医药股份有限公司，规格：200 mg，批

基金项目：山东省药学会医院合理用药中青年项目（No.hlyy2021-06）。

作者简介：邢晓敏，女，硕士，主管药师，主要从事疼痛药物治疗研究，email：xingxiaomin@qdu.edu.cn *通信作者：王凯，男，主管药师，主要从事医院药学工作，email：yaoqwang@163.com

号：202010050A），2021 年 1 月 6 日前患者出现低热，伴皮肤黄染，外院肝功能检查示总胆红素（TBil）209 μmol·L^{-1}，直接胆红素（DBiL）120 μmol·L^{-1}，期间未服用对乙酰氨基酚等可致肝损伤的退热药物，于 2021 年 1 月 13 日转入我院重症医学科行进一步治疗。吸烟史 50 年，饮酒史 30 年（250 mL·d^{-1}），既往无慢性肝炎及特殊疾病史，无食物、药物过敏史。查体：T 36.7 ℃，P 83 次·min^{-1}，R 20 次·min^{-1}，BP 125/77 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），神志清楚，体型消瘦，皮肤及巩膜黄染，对光反应迟钝，双肺呼吸音粗，可闻及干湿性啰音。实验室检查示谷丙转氨酶（ALT）264 U·L^{-1}↑，谷草转氨酶（AST）225 U·L^{-1}↑，TBiL 433 μmol·L^{-1}↑，DBiL 287 μmol·L^{-1}↑，碱性磷酸酶（ALP）1260 U·L^{-1}↑，γ-谷氨酰转移酶（γ-GT）1122 U·L^{-1}↑，白蛋白 32.6 g·L^{-1}↓，D-二聚体 5800 ng·mL^{-1}↑，凝血酶原时间 46.4 s↑，乳酸 2.00 mmol·L^{-1}↑，血氨 26.00 μmol·L^{-1}↑。入院诊断：急性肝衰竭；肺恶性肿瘤。

治疗经过：患者近期未服用特殊药物，肝功能指标短时间内剧烈升高，考虑卡瑞利珠单抗引起的肝细胞及小胆管细胞损伤，为 G4 级。入院后静脉滴注甲泼尼龙注射液（80 mg q12h）激素治疗、异甘草酸镁注射液（150 mg qd）护肝，同时皮下注射低分子肝素钙注射液（4100 IU qd）抗凝，静脉注射人免疫球蛋白（10 g qd）、注射用胸腺法新（1.6 mg qd）增强免疫力。1 月 15 日 ALT 421 U·L^{-1}，AST 329 U·L^{-1}，右小腿肌间静脉血栓形成，全身黄疸并陷入昏迷。临床药师考虑药物所致淤胆可能性大，建议调整糖皮质激素剂量，甲泼尼龙注射液加量至 320 mg·d^{-1}，加用门冬氨酸鸟氨酸注射液（5 g qd），丁二磺酸腺苷蛋氨酸注射液（1 g q12h），行人工肝血浆置换治疗。1 月 18 日肝功能未见好转，血液灌流和胆红素吸附治疗效果不显著，患者出现口腔溃疡和垂体功能减退。继续行人工肝血浆置换治疗，输注丙种球蛋白，加用口服左甲状腺素钠片（25 μg qd），甲泼尼龙注射液减量至 160 mg·d^{-1}，2 日后调整至 80 mg·d^{-1}。1 月 22 日患者黄疸加重，加用口服他克莫司（1 mg bid），临床药师监测他克莫司血药浓度为 5.4 ng·mL^{-1}。1 月 25 日，患者烦躁，伴氧合下降、憋喘明显、全身黄染，股静脉穿刺置管处见大面积血肿，血红蛋白下降，乳酸进行性升高，肝功能未见好转。停用他克莫司，行人工肝血浆置换治疗，输注红细胞、血浆，气管插管呼吸机辅助通气，期间患者生命体征变化不明显。患者对糖皮质激素治疗反应较差，复查肝功能持续恶化（见图 1）。1 月 29 日，患者呈镇静状态，肝功能指标仍高，甲泼尼龙调整至 60 mg·d^{-1}。2 月 3 日，患者黄疸加重，出现昏迷伴呼吸衰竭，给予人工肝血浆置换治疗后效果不佳，肺部出现炎症并持续恶化。2 月 5 日患者病情危重，心率进行性下降，最低值 40 次·min^{-1}，心电图示直线，血红蛋白 42 g·L^{-1}↓，乳酸 12.9 mmol·L^{-1}↑，pH 6.84↓，二氧化碳分压 109.0 mmHg↑，血氧饱和度 60%↓，ALT 618 U·L^{-1}↑，AST 915 U·L^{-1}↑，TBiL 370 μmol·L^{-1}↑，DBiL 254 μmol·L^{-1}↑，抢救无效后去世。

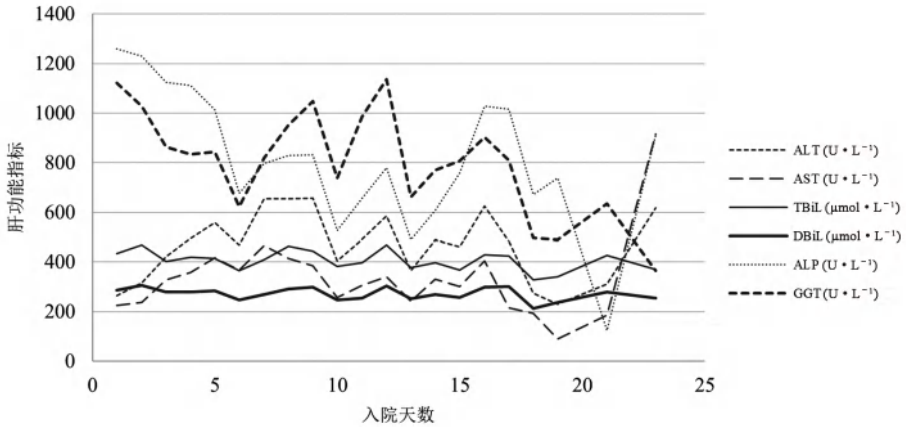

图 1　患者住院期间肝功能指标

2　文献检索资料及结果

检索 PubMed、Embase 数据库，以“camrelizumab、hepatotoxicity、hepatic injury、acute hepatic failure”等为检索词，检索到 2 篇使用卡瑞利珠单抗后出现肝损伤的文献[2-3]。检索万方全文数据库、中国知网（CNKI），以“卡瑞利珠单抗、肝损伤、肝毒性、肝衰竭、肝脏不良反应”等为检索词，排除非核心期刊，检索到相应文献

2 篇[4-5]。总结临床资料，4 例患者均为中国人，2 例男性，2 例女性，年龄 43 ～ 75 岁，使用卡瑞利珠单抗治疗 2 ～ 8 周期后出现肝脏不良反应。其中 3 例为胆汁淤积型，1 例未明确表述肝损伤类型。2 例患者为 G3 级或 G4 级急性肝衰竭，使用保肝药、糖皮质激素、免疫抑制剂和人工肝血浆置换治疗无效后去世[2-3]。1 例患者为 G4 级严重肝损伤，对症治疗后好转[4]。1 例肝损伤程度较轻，对皮质类固醇有轻度反应，换用 PD-L1 抑制剂度伐单抗后好转[5]。其原因可能与药物结构差异有关，度伐利尤单抗属于免疫球蛋白 G1 亚类，阻断 PD-1 和 PD-L1 分子的结合，而卡瑞利珠单抗属于 IgG4 亚类，可以同时阻断 PD-L1 和 PD-L2 通路；PD-L2 与巨噬细胞受体结合增加，导致肺驻留 T 细胞扩增，打破呼吸耐受平衡，在该患者晚期和已报道[3]的患者中伴有间质性肺炎的发生。

3 讨论

3.1 卡瑞利珠单抗致致命性急性肝衰竭的相关性评价

PD-1 抑制剂引起的肝损伤可发生在治疗后任何时期，多在 2 ～ 12 周内发生，范围从 ALT 或 AST 的轻度无症状到严重的急性肝衰竭。在接受单一 PD-1 抑制剂治疗的患者中，3 ～ 4 级血清 TBL 升高（＞ 3 ULN）伴发 ALT 升高的报告少于 0.1%，临床上也很少报告因 PD-1 抑制剂引起的急性肝衰竭（0.1% ～ 0.2%）[6]。

本例患者年龄超过 55 岁，有饮酒史，既往无自身免疫性疾病史，甲、乙、丙、戊型肝炎病毒血清学检测均为阴性，自身免疫性肝病相关抗体阴性。使用卡瑞利珠单抗药品说明书中报告了肝损伤的不良反应，治疗前肝功能检查正常，治疗 2 周后出现发热等初期流感样症状，肝功能指标升高，TBiL、DBiL、ALP、GGT 均升高，后迅速出现凝血功能障碍、黄疸、肝性脑病等临床表现。患者之前使用药物为培美曲塞和奈达铂，肝损伤不是该两类药物的常见和严重不良反应，且使用后肝功能正常。考虑卡瑞利珠单抗引起的急性药物性肝损伤可能性大，Roussel uclaf 因果关系评估量表（RUCAM）[7]得分为 7 分，结论为“很可能”，初始 R 值（ALT/ALT 正常范围上限）/（ALP/ALP 正常范围上限）＝ 0.58，根据 R 值判断是胆汁淤积型损伤。

3.2 卡瑞利珠单抗致肝损伤的临床特点及机制

免疫检查点抑制剂（ICIs）已在多种恶性肿瘤中显示出临床获益，但也会引起免疫相关的不良事件[8]。对于 ICIs 引起的肝损伤，PD-1 抑制剂的发生率最低（0.7% ～ 2.1%），PD-L1 抑制剂和标准剂量细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）居中（0.9% ～ 12%），CTLA-4 联合 PD-1（13%）和高剂量 CTLA-4（16%）抑制剂最高，但这不能预测肝炎的严重程度[9]。一项荟萃分析显示（RCT ＝ 14，n ＝ 9572），在 ICIs 治疗的晚期非小细胞肺癌患者中，度伐单抗、卡瑞利珠单抗联合铂类引起肝脏严重不良反应的发病率分别为 57.9% 和 42%[10]。

一项关于亚洲晚期黑色素瘤患者的Ⅰ期临床研究中，36 名患者使用剂量递增（60 mg、200 mg 和 400 mg）的卡瑞利珠单抗进行治疗，2 例发生无症状 γ- 谷氨酰基转移酶升高，1 例发生 G3 级以上肝损伤[11]。一项二线治疗晚期或转移性食管鳞状细胞癌患者的Ⅲ期临床研究显示，228 例患者使用卡瑞利珠单抗后，4 例出现了 G3 级以上肝功能异常[12]。免疫功能障碍是卡瑞利珠单抗所致急性肝衰竭机制的核心[13]，可能是由于免疫抑制剂诱导的 T 细胞活化，从而增加了对肝细胞的自身免疫性，不是由其固有的肝毒性或免疫原性引起的。查阅美国 LiverTox 和中国 HepaTox 数据库，未查阅到卡瑞利珠单抗引起肝损伤的临床总结。Patrinely 等[14]研究表明，肝脏不良反应的易感因素为男性（53.7%）、黑色素瘤（83.5%）、肿瘤分期Ⅳ期（86.0%），最常见的是 G2 级（30.5%）或 G3 级（45.7%）肝损伤，中位数发病时间为 61 d。患者初期最常见的是无症状（46.2%）或流感样症状，病死率为 3%，主要与区域性坏死或胆汁淤积性肝损伤有关。

3.3 卡瑞利珠单抗致肝损伤的防治

ICIs 全程化药学服务指引指出，患者在进行治疗前必须进行不良反应易感性评估；治疗中应密切监测，对新出现的症状及时进行评估；治疗后疾病稳定时，仍要考虑 ICIs 所致的不良反应，第一年每 3 个月评估一次，以后每 6 个月评估一次[15]。癌症支持疗法多国学会、肿瘤免疫治疗学会、中国临床肿瘤学会等专家协会对 G3 级或 G4 级肝毒性的管理建议包括：永久停用，入院开始甲泼尼龙 1 ～ 2 mg/（kg・d）治疗，进行正式的肝病咨询和肝活检；若 3 d 后没有改善，考虑添加辅助药物（吗替麦考酚酯类和 / 或他克莫司）；不推荐使用英夫利昔单抗；每 1 ～ 2 日检测一次肝功能[16-19]。

Ziemer 等[20]研究显示，布地奈德是肝靶向性的局部类固醇，3 mg tid 使用可减少全身类固醇的用量，但对于肝转移患者，可能会影响 ICIs 的抗肿瘤活性。此外，乙酰半胱氨酸可能是体外

人工肝支持的可选择药物[21]。人工肝血浆置换可提高对乙酰氨基酚引起的急性肝衰竭有效，但其对免疫抑制剂所致的急性肝衰竭是否有效并无相关研究[18]。肝活检有助于急性肝衰竭诊断和提供预后信息，美国胃肠学会急性肝衰竭指南中，考虑凝血功能障碍导致肝活检风险增加，不推荐对急性肝衰竭患者进行肝活检（有条件推荐，极低证据），推荐使用体外人工肝支持系统，对非对乙酰氨基酚相关急性肝衰竭患者，可考虑使用 *N*-乙酰半胱氨酸进行治疗[22]。该患者为老年男性，在免疫抑制剂治疗期间，肝损伤可能由多种因素引起，包括肝转移、感染和循环障碍等。该患者无其他基础疾病，糖皮质激素和有效血药浓度的他克莫司效果均不佳，可考虑霉酚酸酯、布地奈德、熊去氧胆酸和 *N*- 乙酰半胱氨酸等。

4 小结

卡瑞利珠单抗是我国自行研发的 PD-1 抑制剂，且于 2020 年 12 月 28 日成功进入医保目录，价格降幅达到 85%，为恶性肿瘤患者带来了显著的临床获益。但在临床使用中应严格把控，警惕肝脏相关不良反应，出现后应予以重视并立即就医。对于已经发生的肝损伤，进行正确的药物选择、肝活检和以患者为导向的管理，确保治疗的安全、有效。

参考文献

[1] Markham A，Keam SJ. Camrelizumab：first global approval [J]. Drugs，2019，79（12）：1355-1361.

[2] Tan YW，Chen L，Zhou XB. Efficacy of artificial liver support system in severe immune-associated hepatitis caused by camrelizumab：a case report and review of the literature [J]. World J Clin Cases，2021，9（17）：4415-4422.

[3] Tan YW，Ye Y，Chen L. Fatal immune-related hepatitis with intra hepatic cholestasis and pneumonia associated with camrelizumab：a case report and literature review [J]. Open Med（Wars），2021，16（1）：553-557.

[4] 项敏敏，任伟芳，方忠宏，等 . 卡瑞利珠单抗联用阿帕替尼致药物性肝损伤 1 例 [J]. 中国新药与临床杂志，2021，40（7）：542-544.

[5] 司瑞丽，周永芳，刘宗展 . 卡瑞利珠单抗致严重肝损伤一例分析 [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（2）：91-92.

[6] Regev A，Avigan MI，Kiazand A，et al. Best practices for detection，assessment and management of suspected immune-mediated liver injury caused by immune checkpoint inhibitors during drug development [J]. J Autoimmun，2020，114：102514.

[7] 王维娜，侯文婧，杨鸿鸽，等 . 甲硝唑致罕见重度肝损伤 1 例 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2695-2697.

[8] Chan SL，Yip TC，Wong VW，et al. Pattern and impact of hepatic adverse events encountered during immune checkpoint inhibitors-A territory-wide cohort study [J]. Cancer Med，2020，9（19）：7052-7061.

[9] Peeraphatdit TB，Wang J，Odenwald MA，et al. Hepatotoxicity from immune checkpoint inhibitors：a systematic review and management recommendation [J]. Hepatology，2020，72（1）：315-329.

[10] Gu JJ，Shi L，Jiang XW，et al. Severe immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors for advanced non-small cell lung cancer：a network meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Cancer Immunol Immunother，2022，71（9）：2239-2254.

[11] Zhou L，Wu XW，Chi ZH，et al. Safety，activity，and pharmacokinetics of camrelizumab in advanced Asian melanoma patients：a phase Ⅰ study [J]. BMC Cancer，2022，22（1）：565.

[12] Huang J，Xu JM，Chen Y，et al. Camrelizumab versus investigator's choice of chemotherapy as second-line therapy for advanced or metastatic oesophageal squamous cell carcinoma（ESCORT）：a multicentre，randomised，open-label，phase 3 study [J]. Lancet Oncol，2020，21（6）：832-842.

[13] Triantafyllou E，Woollard KJ，Mcphail MJ，et al. The role of monocytes and macrophages in acute and acute-on-chronic liver failure [J]. Front Immunol，2018，9：2948.

[14] Patrinely JR，Mcguigan B，Chandra S，et al. A multicenter characterization of hepatitis associated with immune checkpoint inhibitors [J]. Oncoimmunology，2021，10（1）：1875639.

[15] 广东省药学会 . 免疫检查点抑制剂全程化药学服务指引（2019 年版）[J]. 今日药学，2020，30（5）：289-307.

[16] Brahmer JR，Abusbeih H，Ascierto PA，et al. Society for Immunotherapy of Cancer（SITC）clinical practice guideline on immune checkpoint inhibitor-related adverse events [J]. J Immunother Cancer，2021，9（6）：e002435.

[17] Dougan M，Blidner AG，Choi J，et al. Multinational Association of Supportive Care in Cancer（MASCC）2020 clinical practice recommendations for the management of severe gastrointestinal and hepatic toxicities from checkpoint inhibitors [J]. Support Care Cancer，2020，28（12）：6129-6143.

[18] 中国临床肿瘤学会（CSCO）. 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：33-36.

[19] Remash D，Prince D，Mckenzie C，et al. Immune checkpoint inhibitor-related hepatotoxicity：a review [J]. World J Gastroenterol，2021，27（32）：5376-5391.

[20] Ziemer M，Koukoulioti E，Beyer S，et al. Managing immune checkpoint-inhibitor-induced severe autoimmune-like hepatitis by liver-directed topical steroids [J]. J Hepatol，2017，66（3）：657-659.

[21] He GL，Feng L，Cai L，et al. Artificial liver support in pigs with acetaminophen-induced acute liver failure [J]. World J Gastroenterol，2017，23（18）：3262-3268.

[22] 杨淑娟，赵英仁，何英利 . 2017 年 AGA 关于急性肝衰竭诊断和管理指南解读 [J]. 中国循证医学杂志，2017，17（12）：1394-1399.

（收稿日期：2022-11-15；修回日期：2023-01-06）

儿童患者过量口服拉考沙胺出现晕厥、癫痫发作 1 例

俎亚杰[1, 2]，韩耀巍[1, 2]，李硕[1, 2]，刘菁[1, 2]（1. 天津中医药大学第一附属医院儿科，天津 300193；2. 国家中医针灸临床医学研究中心，天津 300193）

关键词：拉考沙胺；抗癫痫药物；药物过量；不良事件；毒性
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)08-2256-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.053

拉考沙胺（LCM）是第三代新型抗癫痫药物（AEDs），于 2018 年在我国上市。目前临床主要用于≥ 4 岁癫痫患者局灶性发作的治疗[1]。拉考沙胺通过增强选择性钠通道的缓慢失活来稳定神经元细胞膜，降低神经元持续兴奋性，同时不影响生理功能而发挥抗惊厥作用[2]。拉考沙胺口服生物利用度接近 100%，吸收迅速，服药后 0.5 ～ 4.0 h 内达到血药浓度峰值，24 h 内下降 65%，其药代动力学稳定，血药浓度与剂量成正比，消除半衰期为 13 h，每日给药 2 次，服药 3 d 后达稳态血浓度[3-4]。其常见不良反应包括头晕、头痛、嗜睡、复视、恶心和呕吐，此外，还有低钠血症、皮疹、心脏损害、精神障碍和自杀风险[5]。国内尚无关于拉考沙胺过量服用的报道。本文报道 1 例儿童过量服用拉考沙胺后出现的毒性反应及诊治经过，为临床工作提供参考。

1 病历资料

患儿，男，10 岁，身高 145 cm，体质量 27 kg，主因“6 h 内晕厥 1 次，抽搐发作 3 次”入院。既往癫痫病史 9 年，每月发作 4 ～ 5 次，均为夜间睡眠中全身强直发作，持续约半分钟后缓解，醒后无发作，长期口服抗癫痫药物治疗。用药方案为拉考沙胺（Aesica Pharmaceuticals GmbH，规格：100 mg/ 片）100 mg po bid。2022 年 9 月 29 日 9 点左右患儿自行一次性口服拉考沙胺≥ 400 mg。10 点左右，患儿于上网课过程中突然出现意识丧失后倒地，持续数秒后意识恢复正常；服药约 3 h 后患儿间断抽搐 3 次，均表现为面色发青，口吐涎沫，四肢强直抖动，每次持续半分钟左右，后自行缓解；于 15 点收入院。入院时患儿嗜睡，可唤醒，伴头晕、乏力。入院查体：体温 36.8 ℃，脉搏 94 次 • min^{-1}，呼吸 24 次 • min^{-1}，血压 110/80 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），神志清楚，轻度嗜睡，Glasgow 评分 14 分，双瞳孔等大等圆，对光反射存在，颈软，双肺呼吸音清，心率 94 次 • min^{-1}，律齐，无杂音，腹软，肝脾未及肿大，生理反射存在，病理反射未引出。实验室检查示：血常规（白细胞 $14.05\times10^{9}\cdot L^{-1}$，红细胞 $4.07\times10^{12}\cdot L^{-1}$，血小板 $330\times10^{9}\cdot L^{-1}$，中性粒细胞百分数 89.1%，淋巴细胞百分比 9.1%，血红蛋白 117 $g\cdot L^{-1}$）、C 反应蛋白（＜ 10 $mg\cdot L^{-1}$）、降钙素原（＜ 0.05 $ng\cdot mL^{-1}$），患儿白细胞及中性粒细胞百分比升高，降钙素原及 C 反应蛋白未见异常，考虑为癫痫发作后产生的应激反应；电解质（Na^{+} 136.3 $mmol\cdot L^{-1}$、K^{+} 4.03 $mmol\cdot L^{-1}$、Ca^{2+} 2.32 $mmol\cdot L^{-1}$、Cl^{-} 104.9 $mmol\cdot L^{-1}$），凝血功能（凝血酶原时间 12.2 s、纤维蛋白原 1.86 $g\cdot L^{-1}$、活化部分凝血活酶时间 28.6 s、凝血酶时间 19.2 s），肝功能（谷丙转氨酶 14.8 $U\cdot L^{-1}$、谷草转氨酶 19.7 $U\cdot L^{-1}$、总胆红素 8.14 $\mu mol\cdot L^{-1}$、结合胆红素 3.51 $\mu mol\cdot L^{-1}$），肾功能（尿素氮 5.42 $mmol\cdot L^{-1}$、肌酐 37.4 $\mu mol\cdot L^{-1}$），心肌酶谱（肌酸激酶 78.3 $U\cdot L^{-1}$、肌酸激酶同工酶 13.6 $U\cdot L^{-1}$、乳酸脱氢酶 160.2 $U\cdot L^{-1}$）均未见异常。心电图示窦性心律，未见传导阻滞。颅脑 CT 未见异常。给予心电监护、静脉补液支持治疗，23 点患儿清醒，Glasgow 评分 15 分，仍有轻微乏力、头晕症状。9 月 30 日晨起 6 点左右，患儿乏力、头晕症状缓解，未诉特殊不适，巩固观察 1 d，患儿生命体征平稳，复查电解质、肝肾功能、心电图均正常，予以出院。患儿出院后按原剂量口服拉考沙胺，随访 2 周，患儿未再述与该药相关的不良反应症状。

2 讨论

说明书提示根据本例患儿年龄、体质量，拉考沙胺单药服用剂量最高应为每次 6 $mg\cdot kg^{-1}$，但患儿一次性口服药物剂量≥ 14.8 $mg\cdot kg^{-1}$，属于过量中毒。本例患儿因用药错误导致药物不良事件的发生，属于用药依从性错误，分级为 E 级（错误造成患儿暂时性伤害，需要采取处置措施）。患儿单次过量口服拉考沙胺约 1 h 出现晕厥并于数秒后恢复意识，其晕厥原因考虑与拉考沙胺毒性相关。Vossler

作者简介：俎亚杰，女，硕士，主要从事中西医结合儿科学研究，email：1402701552@qq.com

等[6]研究发现在接受拉考沙胺单药治疗的 292 例患者中，最常见的紧急不良事件为抽搐（2.7%）和晕厥（0.7%）。患儿口服拉考沙胺 3 h 左右间断出现 3 次癫痫发作，美国毒物控制中心的一项研究发现，17% 的拉考沙胺中毒病例发生癫痫发作[7]。根据患儿既往癫痫发作均发生在睡眠中，醒后无发作，出院后沿用拉考沙胺治疗，随访 2 周，患儿日间未再出现癫痫发作，推测患儿 3 次癫痫发作的诱因为拉考沙胺的毒性作用。患儿病程中出现头晕、嗜睡、乏力均为拉考沙胺常见不良反应，与既往研究相似[5, 8]。使用诺氏评估量表对患儿出现的晕厥、癫痫发作、头晕、嗜睡、乏力一系列不良事件进行关联性评价，评分为 7 分，提示患儿出现药物不良事件与拉考沙胺关联性为很可能相关[9]（见表 1）。

表 1　诺氏药物不良反应评估量表（分）

相关问题	问题分值			得分
	是	否	未知	
1. 该不良反应此前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
2. 该不良反应是否在使用可疑药物后发生	＋2	－1	0	＋2
3. 该不良反应是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1	0	0	0
4. 该不良反应是否再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该不良反应	－1	＋2	0	＋2
6. 该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
8. 该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	＋1
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分				7

注：总分≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能相关；1 ～ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑。

目前关于拉考沙胺单独过量服用的报道较少，Coss 等[10]报道 1 例成人癫痫患者单次过量口服拉考沙胺 900 mg 后出现眩晕、复视、恶心和呕吐，伴 PR 间期和 QRS 延长，予补液、劳拉西泮治疗，1 d 后患者不适症状缓解，复查心电图恢复正常。Ng 等[7]报道 1 例成人单独过量口服拉考沙胺（约 5700 mg）企图自杀，出现 QRS 延长和 2 次癫痫发作，予碳酸氢钠、对症支持治疗，过量服药后 5.5 h 心电图恢复正常。2 例病例均报道了心血管系统的不良反应。体外研究证实过量使用拉考酰胺可能对心脏钠通道产生显著影响[11]。本患儿服药约 2 h 完善心电图及入院后监测心脏节律均未见异常。

拉考沙胺急性过量处理尚无相应的拮抗药物可用，以对症处理、抑制药物吸收和促进排泄为主。由于本药蛋白结合率低于 15%，血液透析可有效清除体内残余药量[2]。该药主要通过肾脏排泄，约 40% 以原形由尿液排出，约 60% 经肝脏代谢分解后由肾脏排泄，不到 0.5% 以母体化合物形式经粪便排出[12-13]，因此补液、促进排尿可有效促进药物代谢及排泄。本例患儿入院后经补液、排尿后嗜睡、头晕、乏力症状即明显缓解。

综上，拉考沙胺总体安全性较高，药物代谢较快，急性过量时应及时监测生命体征、对症治疗、促进药物排泄，必要时采用洗胃、活性炭、血液透析治疗，注意有无心脏传导阻滞、电解质紊乱和呼吸困难。同时加强对患儿的用药安全教育也是避免药物过量的有效措施。

参考文献

[1] 张鹤声，张恩惠，刘文钰，等 . 拉考沙胺单药治疗癫痫发作的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志，2022，41（2）：79-84.

[2] Cawello W. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lacosamide [J]. Clin Pharmacokinet，2015，54（9）：901-914.

[3] Beydoun A，D’Souza J，Hebert D，et al. Lacosamide：pharmacology，mechanisms of action and pooled efficacy and safety data in partial-onset seizures [J]. Expert Rev Neurother，2009，9（1）：33-42.

[4] Kellinghaus C. Lacosamide as treatment for partial epilepsy：mechanisms of action，pharmacology，effects，and safety [J]. Ther Clin Risk Manag，2009，5：757-766.

[5] Li JY，Sun MZ，Wang XF. The adverse-effect profile of lacosamide [J]. Expert Opin Drug Saf，2020，19（2）：131-138.

[6] Vossler DG，Wechsler RT，Williams P，et al. Long-term exposure and safety of lacosamide monotherapy for the treatment of partial-onset（focal）seizures：results from a multicenter，open-label trial [J]. Epilepsia，2016，57（10）：1625-1633.

[7] Ng PC，Schimmel J，Wang GS. Lacosamide overdose：a case of QRS prolongation and seizure [J]. J Emerg Med，2019，56（6）：652-656.

[8] Yang CS，Yang Y，Peng YX，et al. Efficacy and safety of lacosamide in pediatricpatients with epilepsy：a systematic review and meta-analysis [J]. Epilepsy Behav，2022，134：108781.

[9] 郑飞跃，吴燕，饶跃峰，等 . 诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及实例分析 [J]. 中国药学杂志，2012，47（8）：650-652.

[10] Coss C，Mcfadden P，Riley B，et al. Acute on chronic lacosamide monotherapy overdose：a case report [J]. Clin Toxicol，2019（10）：57.

[11] Wang GK，Wang SY. Block of human cardiac sodium channels by lacosamide：evidence for slow drug binding along the activation pathway [J]. Mol Pharmacol，2014，85（5）：692-702.

[12] Cawello W，Stockis A，Andreas JO，et al. Advances in epilepsy treatment：lacosamide pharmacokinetic profile [J]. Ann N Y Acad Sci，2014，1329：18-32.

[13] Carona A，Bicker J，Silva R，et al. Pharmacology of lacosamide：from its molecular mechanisms and pharmacokinetics to future therapeutic applications [J]. Life Sci，2021，275：119342.

（收稿日期：2022-11-13；修回日期：2022-12-31）

1 例长期口服屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）致下肢深静脉血栓形成的病例分析

曹莹[1]，韩旭[3]，陈飞[4]，杨昭毅[2*]（1. 安徽医科大学第一附属医院药剂科，合肥 230031；2. 中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院）药学部，合肥 230001；3. 全椒县人民医院药剂科，安徽 滁州 239500；4. 合肥市第八人民医院药学部，合肥 238000）

摘要：1 例 19 岁年轻女性因患多囊卵巢综合征长期每日口服一片屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）（每片含屈螺酮 3 mg 和炔雌醇 0.02 mg）治疗。服用 4 个半周期后，患者无明显诱因出现左下肢肿胀。双下肢静脉血管彩超提示左侧下肢深静脉内血流淤滞、左侧髂静脉血栓形成。停用该药，给予抗凝、溶栓、放置下腔静脉滤器预防肺栓塞等治疗。8 d 后患者左下肢红肿好转，两个月后患者门诊复查左下肢已无肿胀。

关键词：下肢深静脉血栓；屈螺酮；炔雌醇

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)08-2258-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.054

血液在深静脉内不正常凝结引起的静脉回流障碍性疾病称为深静脉血栓形成（DVT），常发生在下肢[1]。有研究表明服用复方口服避孕药（COC）会增加静脉血栓栓塞症（VTE）的发生风险[2-3]。本文通过对 1 例多囊卵巢综合征（PCOS）年轻女性患者服用屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）后形成的下肢 DVT，分析其发生的原因并制订抗凝方案，总结抗凝专业临床药师对该类患者开展药学服务的切入点，为临床合理使用口服避孕药物，积极预防 DVT 的发生提供参考。

1 病史摘要

1.1 基本信息

患者女性，19 岁，身高 163 cm，体质量 51 kg，体质量指数（BMI）19.20 kg·m^{-2}。患者 4 d 前无明显诱因出现左下肢肿胀，急诊下肢静脉 B 超检查提示下肢 DVT，拟“左下肢深静脉血栓形成”收住我院。入院查体：体温 36.6 ℃，脉搏 94 次·min^{-1}，呼吸 21 次·min^{-1}，血压 123/74 mmHg（1 mmHg＝0.133 kPa）。神清，精神可。心肺未见明显异常，腹平软，无压痛及反跳痛，左下肢较对侧明显肿胀，左下肢皮温增高，双侧股动脉及足背动脉搏动可及。患者既往体健，因月经紊乱于 2021 年 10 月 15 日外院检查性激素六项提示：睾酮 0.43 ng·mL^{-1}；于 2022 年 1 月 15 日外院再次检查性激素六项提示：睾酮 0.58 ng·mL^{-1}，医师考虑患者 PCOS，于 1 月 15 日开始给予屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）每日口服 1 片治疗，服用 4 个半周期出现下肢 DVT，5 月 26 日患者入院后即停药。辅助检查：5 月 25 日双肢静脉血管彩超提示左侧下肢深静脉内血流淤滞；5 月 26 日双侧髂静脉彩超提示左侧髂静脉血栓形成。入院诊断：下肢 DVT；PCOS。

1.2 治疗经过

入院后积极完善相关检查，主要结果显示血常规：白细胞（WBC）8.62×10^{9}·L^{-1}、红细胞（RBC）3.46×10^{12}·L^{-1}、血红蛋白（HGB）118.0 g·L^{-1}、血小板（PLT）114×10^{9}·L^{-1}；凝血功能：凝血酶原时间（PT）110.90 s↑、国际标准化比值（INR）0.93；生化指标：血钾（K^{+}）3.36 mmol·L^{-1}↓、血糖（GLU）5.62 mmol·L^{-1}、谷丙转氨酶（ALT）9 IU·L^{-1}、谷草转氨酶（AST）23.8 IU·L^{-1}、肌酐（CREA）56.70 μmol·L^{-1}、尿酸（UA）456.60 μmol·L^{-1}↑、血清总蛋白（TP）54.50 g·L^{-1}↓。患者入院第 1 日嘱绝对卧床，抬高患肢，同时予抗凝、溶栓治疗，排除禁忌后在入院当日行“下腔静脉滤器（IVCF）置入术”。第 2 日继续予以依诺肝素钠 4000 IU ih qd 抗凝治疗，迈之灵片 0.3 g po bid 改善微循环、巴曲酶降纤等治疗；第 3 日复查纤维蛋白原（FIB）7.60 g·L^{-1}。第 4 日临床药师结合该患者情况推荐抗凝方案更换为依诺肝素钠 4000 IU ih q12h 治疗，以达到抗凝强度。第 8 日患者恢复可，复查 FIB 1.9 g·L^{-1}，左下肢红肿好转，予以出院。结合患者情况，出院后变更抗凝药方案：出院后第 1 周给予利伐沙班 15 mg po bid，3 周后改为 20 mg po qd。

作者简介：曹莹，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：zzhx1016@sina.com *通信作者：杨昭毅，男，博士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：young2382@ustc.edu.cn

该患者出院后恢复良好，左下肢肿胀情况好转，于 2022 年 6 月 15 日再次入院拟行 IVCF 取出术。入院第 3 日抗凝方案改为胃肠外抗凝，予以依诺肝素钠 4000 IU ih qd 治疗；入院第 6 日停用依诺肝素钠，完善相关检查后在局麻下行 IVCF 取出术，手术顺利。手术完成并充分止血后考虑患者血栓负荷重，立即给予依诺肝素钠 4000 IU ih qd 治疗。6 月 22 日患者出院，继续使用利伐沙班 20 mg po qd。8 月 11 日患者门诊复查，左下肢已无肿胀，继续予以抗凝治疗。

2 分析与讨论

2.1 该患者出现 DVT 的原因分析

本例患者使用的屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）主要成分是屈螺酮 3 mg 和炔雌醇 0.02 mg，是一种新型 COC。COC 主要是由雌激素和孕激素按照不同比例组成的人工合成甾体类激素制剂，可显著改善月经周期，防止子宫内膜病变，也能改善多毛、痤疮等高雄激素血症的临床表现 [4]。PCOS 患者血清中的雄激素主要来源于卵巢及肾上腺皮质的分泌。COC 可通过影响下丘脑 - 垂体 - 卵巢性腺轴（H-P-O）功能抑制垂体合成及分泌黄体生成素，以此减少卵巢源性雄激素的分泌。COC 也可以直接作用于肾上腺来抑制雄激素产生。该患者睾酮偏高，而 COC 则是 PCOS 患者调整月经周期和治疗高雄激素血症的一线药物，一般倾向于使用低剂量制剂 [5]。近十年来，含有孕激素成分的 COC 已从第一、二、三代发展到含有屈螺酮等（第四代孕激素）的新一代 COC[6]。本例 PCOS 患者是育龄期暂无生育要求的年轻女性，COC 作为调整月经周期的首选药物 [7]，持续使用了 4 个半周期，但是发生了严重的下肢 DVT。

VTE 形成的主要原因是静脉壁损伤、血流缓慢和血液高凝状态。危险因素包括原发性因素和继发性因素，如遗传性的蛋白 C 或蛋白 S 缺乏、抗凝血酶缺乏、纤溶酶原异常、凝血酶原 *20210A* 基因变异、抗心磷脂抗体和 / 或狼疮抗凝物阳性、口服避孕药和激素替代治疗、吸烟等 [8]。本例患者既往无相关肥胖、吸烟、妊娠、家族史等高危因素，未进行相关易栓症检查。患者因外院诊断 PCOS，长期服用屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）后发生下肢 DVT，考虑用药与不良反应之间存在合理的时间关系，同时该患者未合并使用其他药物。根据国家药品不良反应监测中心关于药品不良反应关联性评价方法评判：① 屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）的使用与患者 VTE 发生存在时间相关性；② 屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）药品说明书记载了 VTE 的相关不良反应；③ 停用屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）及经过治疗后，患者血栓逐渐消失；④ 患者停药后未再次使用屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）；⑤ 患者无 VTE 相关病史，既往体健；⑥ 未合并使用其他药物。经评价，该患者使用屈螺酮炔雌醇片（Ⅱ）与此次发生 VTE 的关联性为“很可能”。

2.2 COC 致 VTE 的可能机制

一般来说，COC 在初始服药第一年内，VTE 发生的风险最高，之后随着服药时间延长，VTE 的风险并未增加。含有屈螺酮的 COC 有更高的致 VTE 风险，特别是合并 BMI ＞ 30 kg•m^{-2}、年龄≥ 35 岁、吸烟、饮酒、既往有心血管疾病史、有基因缺陷或 VTE 家族史的女性。因为屈螺酮在结构上类似于螺内酯，属于醛固酮的竞争性抑制剂，会增加水钠排泄，在减轻水肿的同时提高了血液的黏滞度，所以提高了患者的 VTE 风险 [9]。同时，COC 中的雌激素可引起机体纤维蛋白原，凝血酶原，凝血因子Ⅶ、Ⅷ、Ⅹ的浓度和活性增加，也可引起血小板的黏附和聚集。通常认为，COC 中常选择的炔雌醇是增加血栓形成风险的主要原因。因此，为降低此种风险，炔雌醇已从最早期的 100 ～ 150 μg 改成目前的 30 ～ 35 μg 和 20 μg[10]。有研究表明患者发生 VTE 的风险与 COC 中雌激素的剂量相关，雌激素的剂量越高，VTE 的风险就越高。因此，在与不同类型的孕激素配伍中，雌激素剂量相似的 COC 发生静脉血栓的相对风险相似 [11]。

2.3 COC 致 VTE 的预防

从以上阐述中可以看出，COC 中雌激素剂量越高，VTE 的发生风险也越高。而实验表明，含第一代、第二代和第三代孕激素的 COC 发生 VTE 的风险分别增加约 3.2 倍、2.8 倍和 3.8 倍 [12]。临床工作中应该在确认患者没有相关危险因素的基础上选择适宜的药品。目前 COC 一般会使用低剂量的雌激素配方，而与之配伍的孕激素中第四代孕激素屈螺酮发生 VTE 的风险又是已知最高的。一项纳入 36 项研究的 Meta 分析结果也显示，不同类型的口服避孕药（OC）均能增加女性 VTE 的发生率，第一代目前临床使用较少，第二代发生 VTE 的风险较低，第三、四代则有较高导致 VTE 的风险 [9]。综合来看，对于具有 VTE 高风险因素需 COC 治疗的女性，想要降低 COC 的 VTE 风险应该尽可能选择 VTE 发生风险相对较低的第二代孕激素复合制剂，此类制剂对凝血功能的影响相对减少，也能相对降低静脉血栓的风险。一旦患者发生 VTE，应权衡血栓风险和抗凝治疗的出血风险，实行个体化治疗。

2.4 患者行 IVCF 取出术的围术期抗凝方案分析

经皮置入 IVCF 可以有效拦截脱落的血栓预防致死性肺动脉栓塞（PE），同时能够保证下腔静脉的血流通畅，因操作简便安全已被广泛应用。PE

的风险往往是暂时的或经过抗凝是可控的，在临床上除非脑出血或严重复合创伤的患者在 1 个月之内都可以进行临时滤器的回收。该患者病情稳定，恢复良好，于取出时间窗内行 IVCF 取出术合理[13-15]。该患者围手术期的抗凝方案是临床药师关注的重点。患者在 IVCF 置入后选择了非维生素 K 拮抗剂口服抗凝药（NOAC）进行抗凝治疗[13，16]。常见的 NOAC 主要有两类，包括直接凝血酶抑制剂和Xa 因子抑制剂。该患者选用的利伐沙班是一种直接的、高选择性的、可逆的Xa 因子抑制剂[17]。研究表明利伐沙班停药两个半衰期（剩余药物浓度＜ 25%）被认为是减少出血风险和预防血栓栓塞事件的适宜时间[18]。但是医师考虑手术的特殊性，于术前 3 d 停用利伐沙班，停用 24 h 后开始皮下注射依诺肝素进行桥接治疗，并于手术当日停用依诺肝素，在停药时间超过 24 h 后手术。根据指南推荐，NOAC 应该术前 1 d 停药，术后 24 h 恢复抗凝治疗[19]。该患者属于血栓高风险，出血低风险，术后应尽早开始抗凝治疗。医师考虑 IVCF 取出术是在静脉内操作，出血风险可控。即在手术当日充分止血后，立即给予依诺肝素抗凝治疗，临床药师进行严密的药学监护，未发现患者有出血风险。该患者整个围手术期的抗凝治疗充分考虑了血栓风险，也把出血风险降到了最低。

3 治疗体会

通过对该患者整个病程的回顾，我们发现合理使用 COC 是预防 VTE 非常重要的一点。如果患者既往有 VTE 病史或 VTE 家族史、血栓相关的基因突变、抗磷脂抗体阳性、严重静脉或动脉血栓栓塞风险因素、伴血管损害的糖尿病，确诊或疑似的性激素依赖性恶性肿瘤等情况时需要禁用 COC。只有在确认患者没有相关禁忌证后，才能选择适宜的药物。对于存在高风险因素的患者建议选择低剂量雌激素的配方制剂。对于正在服用 COC 的患者，服药前半年的定期随访很重要，一旦发生下肢肿胀、呼吸困难等现象要及时就医。

参考文献

[1] 李晓强，张福先，王深明 . 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南（第三版）[J]. 中国血管外科杂志（电子版），2017，9（4）：250-257.

[2] Baratloo A，Safari S，Rouhipour A，et al. The risk of venous thromboembolism with different generation of oral contraceptives：a systematic review and meta-analysis [J]. Emerg（Tehran），2014，2（1）：1-11.

[3] Li J，Panucci G，Moeny D，et al. Association of risk for venous thromboembolism with use of low-dose extended-and continuous-cycle combined oral contraceptives：a safety study using the sentinel distributed database [J]. JAMA Intern Med，2018，178（11）：1482-1488.

[4] Helvaci N，Yildiz BO. Oral contraceptives in polycystic ovary syndrome [J]. Minerva Endocrinol，2014，39（3）：175-187.

[5] Teede HJ，Misso ML，Costello MF，et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome [J]. Clin Endocrinol（Oxf），2018，89（3）：251-268.

[6] 复方口服避孕药临床应用中国专家共识专家组 . 复方口服避孕药临床应用中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志，2015，50（2）：81-91.

[7] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组 . 多囊卵巢综合征中国诊疗指南 [J]. 中华妇产科杂志，2018，53（1）：2-6.

[8] Righini M，Le Gal G，Bounameaux H. Venous thromboembolism diagnosis：unresolved issues [J]. Thromb Haemost，2015，113（6）：1184-1192.

[9] 郑荣荣，袁为标，周蓉，等 . 口服避孕药增加静脉血栓发病率的 Meta 分析 [J]. 现代妇产科进展，2019，28（10）：774-780.

[10] Stegeman BH，Bastos MD，Rosendaal FR，et al. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis：systematic review and network meta-analysis [J]. BMJ，2013，347：f5298.

[11] Bastos MD，Stegeman BH，Rosendaal FR，et al. Combined oral contraceptives：venous thrombosis [J]. Cochrane Database Syst Rev，2014，3（3）：CD010813.

[12] Stocco B，Fumagalli HF，Franceschini SA，et al. Comparative study of the effects of combined oral contraceptives in hemostatic variables：an observational preliminary study [J]. Medicine（Baltimore），2015，94（4）：e385.

[13] Imberti D，Dentali F，Ageno W，et al. Evidence and clinical judgment：vena cava filters [J]. Thromb Haemost，2014，111（4）：618-624.

[14] 刘建龙，张蕴鑫 . 建立下腔静脉滤器应用新理念 [J]. 中国普通外科杂志，2017，26（6）：680-685.

[15] Guez D，Hansberry DR，Eschelman DJ，et al. Inferior vena cava filter placement and retrieval rates among radiologists and nonradiologists [J]. J Vasc Interv Radiol，2018，29（4）：482-485.

[16] Ha CP，Rectenwald JE. Inferior vena cava filters：current indications，techniques，and recommendations [J]. Surg Clin North Am，2018，98（2）：293-319.

[17] Koenig-Oberhuber V，Filipovic M. New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants [J]. Br J Anaesth，2016，117（Suppl 2）：ii74-ii84.

[18] Hornor MA，Duane TM，Ehlers AP，et al. American College of Surgeons’Guidelines for the Perioperative Management of Antithrombotic Medication [J]. J Am Coll Surg，2018，227（5）：521-536.

[19] 抗血栓药物围手术期管理多学科专家共识 [J]. 中华医学杂志，2020，100（39）：3058-3074.

（收稿日期：2022-11-09；修回日期：2022-12-16）

矛头蝮蛇血凝酶致双相过敏反应 1 例

谌介秀[1]，祁蕙[1]，秦博[2]，何梦婕[1]，贾萍[1]（四川省妇幼保健院，1. 临床药学科，2. 药学部，成都　610045）

关键词：过敏性休克；双相过敏反应；肾上腺素；矛头蝮蛇血凝酶；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2261-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.055

1　病例资料

患者，女，32 岁，双乳结节，为求进一步手术治疗来我院就诊。入院后生命体征平稳，血压 99/64 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），心率 85 次 • min^{-1}，呼吸频率 20 次 • min^{-1}。患者自诉既往对外用酒精过敏，表现为抽血后肘关节处出现红色丘疹；饮用含酒精饮品未出现不适；对彩超耦合剂过敏，表现为皮肤红斑；无其他食物药物过敏史。

入院第 2 日拟行右乳结节微创旋切术，术前予矛头蝮蛇血凝酶 1 U iv（蓬莱诺康药业有限公司，批号：2011122，规格：1 U）。在此之前，患者未接受任何药物治疗。10 min 后患者出现全身瘙痒，颈部、胸部多发风团样改变，考虑药物过敏，予地塞米松 5 mL ivgtt。15 min 后患者诉四肢无力、胸闷、呼吸困难，予葡萄糖酸钙 20 mL iv。24 min 后患者突然出现意识模糊，轻度昏迷，血压降至 80/56 mmHg，约 30 s 后患者神志恢复，但随即出现呕吐，此时血压进一步下降至 69/48 mmHg，血氧饱和度下降至 80%，考虑过敏性休克，予氢化可的松琥珀酸钠 100 mg ivgtt、盐酸肾上腺素 1 mg iv 等过敏性休克急救治疗。然而，患者血压未恢复正常，10 min 后先后再次给予去甲肾上腺素 4 mg ivgtt 及肾上腺素 1 mg iv。随后转入 ICU，继续予去甲肾上腺素 4 mg iv bolus 维持血压。11 h 后患者血压恢复正常，停用去甲肾上腺素。

过敏性休克缓解 11 h 后，患者出现潮热、腹痛（位于脐周、下腹），伴皮肤轻微瘙痒。此时，患者的生命体征平稳，考虑过敏反应复发，予地塞米松磷酸钠 5 mg ivgtt、异丙嗪 25 mg im 抗过敏治疗，用药 80 min 后患者腹痛加重，并进一步出现咽喉部麻木、头晕、全身皮肤瘙痒、心悸，随即出现呕吐，轻度昏迷，血压再次从 107/54 mmHg 下降至 54/23 mmHg，血氧饱和度降至 88%，心率约 140 次 • min^{-1}。考虑过敏性休克复发，经 3 剂肾上腺素 0.5 mg im、去甲肾上腺素 4 mg ivgtt 后，患者生命体征平稳。在抗休克治疗期间，患者心率一度达到 163 次 • min^{-1}。2 d 后，患者痊愈出院，未再行手术治疗。

2　讨论

注射用矛头蝮蛇血凝酶是从巴西矛头蝮蛇（Bothrops atrox）的蛇毒中提取的血凝酶，其主要成分为巴西矛头蝮蛇巴曲酶和磷脂依赖性凝血因子 X 激活物，不含神经毒素及其他毒素。矛头蝮蛇血凝酶通过作用于纤维蛋白原发挥抗凝和溶纤的作用，从而用于需减少流血或止血的各种医疗情况，也可用来预防出血[1]。有研究显示，矛头蝮蛇血凝酶的不良反应（adverse drug reaction，ADR）发生率远低于其他蛇毒类血凝酶，且过敏性休克罕见[2]。作为一种异种动物蛋白变应原，矛头蝮蛇血凝酶可通过与体内肥大细胞或嗜碱性细胞表面的分子结合，使细胞发生一系列反应，引起血管活性物质，如组胺、慢反应物质释放，作用于机体，可刺激机体发生Ⅰ型变态反应[3]。另外，本品纯化过程中引入的杂质及残余毒液酶也可能引起变态反应[4]。

双相过敏反应，又称双相反应，是指首次症状完全缓解后 1 ～ 72 h 内，无诱发因素触发下再次出现严重过敏反应的症状[5]。本例患者在注射矛头蝮蛇血凝酶后，以轻微皮肤瘙痒、皮疹为前驱表现，迅速发展为过敏性休克，并在过敏性休克症状缓解后再次发生，符合双相过敏反应诊断标准。在此之前，该患者无其他药物使用史及皮肤相关疾病。根据 Naranjo 不良反应因果关系评分量表[6]，得分为 6 分（见表 1），表明该患者双相过敏反应很可能归因于矛头蝮蛇血凝酶。

作者简介：谌介秀，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：chenjiexiu217@163.com

表 1 Naranjo 药品不良反应评估量表结果

相关问题	是	否	未知	评分理由
1. 该 ADR 此前是否有结论性报告		0		有过敏性休克报道，但无双相过敏反应报道
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生	＋2			用药后即刻发生
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1			停药、抗过敏治疗后好转
4. 该 ADR 是否再次使用可疑药物后重复出现			0	未再次使用
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR		＋2		无其他药物使用史及相关疾病史
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现			0	未使用安慰剂
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度			0	未检测
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解			0	未调整剂量
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应		0		患者既往未使用过该药，也无过敏性休克史
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1			患者血压下降、新发皮疹、意识丧失等情况可作为过敏性休克客观证据
总分 / 分	6			

注：总分值≥ 9 分，确定；5 ～ 8 分，很可能；1 ～ 4 分，可能；≤ 0 分，可疑。

双相过敏反应的真实发生率尚不明确。最新的一项荟萃分析研究显示，在所有的过敏反应病例中，双相过敏反应仅占 3.92%[7]。一般情况下，第二相过敏反应的症状通常比第一相反应轻微。然而，该患者在两次过敏反应中均出现严重低血压、呼吸困难、缺氧、呕吐和意识丧失。根据过敏反应严重程度分级标准 [8]，该患者两次过敏性休克均为 3 级严重过敏反应。双相过敏反应通常是不可预测的，在第一相症状消退后，第二相症状的出现时间差异较大（1 ～ 72 h），中位时间约为 10 h[9]。该患者的第二相过敏性休克是在第一次过敏性休克完全缓解 11 h 后发生的，与文献报道一致 [9]。

双相过敏反应的发病机制尚不清楚，可能与第一相反应中炎症细胞，如肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞等，对细胞因子和趋化因子释放做出的反应性涌入有关 [10]。其他发病机制还包括肥大细胞第二波脱颗粒、血小板活化因子晚期合成、IgE 介导反应等 [11-13]。

根据欧洲变应性反应与临床免疫学会（EAACI）指南推荐，当同时累及皮肤或黏膜组织、呼吸或发生心血管的过敏反应时，应立即通过肌内注射肾上腺素抗过敏治疗，而抗组胺药和糖皮质激素只能作为辅助药物联用 [14]，这与注射用矛头蝮蛇血凝酶药品说明书中的推荐不一致，可能让医务人员在临床工作时产生困惑，并由此导致不规范给药行为。一项系统评价发现，发生双相过敏反应的高危因素包括严重的初始症状、肾上腺素需要量超过 1 剂及延迟给予肾上腺素治疗等三个因素 [5]。本例患者使用矛头蝮蛇血凝酶 10 min 后出现皮肤症状，15 min 后累及呼吸系统，但直至 24 min 后出现休克表现时才启用肾上腺素，经 3 剂治疗后生命体征恢复平稳。因此，患者存在发生双相过敏反应的高危因素。

矛头蝮蛇血凝酶所致双相过敏反应罕见，目前国内外尚无相关报道。由于双相过敏反应发生的不确定性，最佳留观时间仍未知，临床医师需权衡利弊。本病例旨在提醒临床医师识别高危人群，尤其需警惕过敏反应表现重、使用超过 1 剂肾上腺素的全身过敏反应患者。在发生全身过敏反应时，及时通过肌内注射足剂量的肾上腺素是预防和治疗双相过敏反应的最有效方法 [14-15]。

参考文献

[1] 曹旭，苏强 . 注射用矛头蝮蛇血凝酶致儿童严重不良反应 1 例 [J]. 中国药师，2019，22（5）：905-906.

[2] Zhao ZG，Li LG，Xu F，et al. An evaluation of the safety of hemocoagulase atrox for injection in preventing bleeding events in perioperative patients：a real-world data analysis [J]. Clin Med J，2020，18：39-42.

[3] 赵珊珊，李静 . 注射用蛇毒类血凝酶制剂的不良反应文献分析 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（24）：2227-2230.

[4] 高红瑾，王少明，陈宇星 . 基于 logistic 分析法的注射用血凝酶致过敏性休克研究 [J]. 中国药学杂志，2019，28（1）：21-26.

[5] Shaker MS，Wallace DV，Golden DBK，et al. Anaphylaxis-a 2020 practice parameter update，systematic review，and grading of recommendations，assessment，development and evaluation（GRADE）analysis [J]. J Allergy Clin Immunol，2020，145：1082.

[6] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30：239-245.

[7] Miles LM，Ratnarajah K，Gabrielli S，et al. Community use of epinephrine for the treatment of anaphylaxis：a re-

view and meta-analysis [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2021，9：2321-2333.
[8] Iqbal FM，Basit A，Salem F，et al. Feeling blue，going green and finding other attractive alternatives：a case of biphasic anaphylaxis [J]. BMJ Case Rep，2015，2015：bcr2015213107.
[9] Ellis AK，Day JH. Incidence and characteristics of biphasic anaphylaxis：a prospective evaluation of 103 patients [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2007，98：64.
[10] Confino-Cohen R，Goldberg A. Allergen immunotherapy-induced biphasic systemic reactions：incidence，characteristics，and outcome：a prospective study [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2010，104：73.
[11] Yang PC，Berin MC，Yu L，et al. Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat [J]. Am J Pathol，2001，158：681.
[12] Vadas P，Gold M，Perelman B，et al. Platelet-activating factor，PAF acetylhydrolase，and severe anaphylaxis [J]. N Engl J Med，2008，358：28.
[13] Reber LL，Hernandez JD，Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis [J]. J Allergy Clin Immunol，2017，140：335-348.
[14] Muraro A，Worm M，Alviani C，et al. EAACI guidelines：anaphylaxis（2021 update）[J]. Allergy，2022，77：357-377.
[15] Lieberman PL. 双相性和持久性全身性过敏反应 [EB/OL]. UpToDate 临床顾问 . https：//www. uptodate. com/contents/zh-Hans/biphasic-and-protracted-anaphylaxis? search ＝ %E5%8F%8C%E7%9B%B8%E8%BF% 87% E6%95%8F%E5%8F%8D%E5%BA%94&source ＝ search_result&selectedTitle ＝ 1 ～ 23&usage_type ＝ default&display_rank ＝ 1#H2[2022-12-28].

（收稿日期：2022-11-11；修回日期：2022-12-20）

美罗培南、替考拉宁和左氧氟沙星联用致 Stevens-Johnson 综合征 1 例

邢百倩，李忠东*（首都医科大学电力教学医院，国家电网公司北京电力医院药剂科，北京 100073）

关键词：Stevens-Johnson 综合征；多种药物联用；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-2981(2023)08-2263-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.056

史 - 约综合征（Stevens-Johnson syndrome，SJS）/ 中毒性表皮坏死松解症（toxic epidermal necrolysis，TEN）是一种严重的皮肤 - 黏膜反应，绝大多数由药物引起，以水疱及泛发性表皮松解为特征，可伴有多系统受累[1]。SJS 和 TEN 的区别在于表皮松解面积占体表面积的比例不同，SJS 表皮松解面积＜ 10%，TEN 表皮松解面积＞ 30%。可诱发 SJS/TEN 的常见药物包括抗惊厥药、抗抑郁药、非甾体抗炎药、磺胺类药物、抗感染药物及近年来广泛应用的靶向药物。本文介绍 1 例患者联用多种药物导致 SJS 的病例，以期为临床合理用药提供参考。

1 病例资料

患者男性，83 岁，身高 160 cm，体质量 65 kg，主因“突发喘憋 9 h，加重伴意识丧失 7 h”。于 2022 年 1 月 25 日 14：27 收入重症监护病房。入院查体：镇痛镇静状态，气管插管接呼吸机辅助呼吸，双侧瞳孔 1 mm，对光反射消失，双肺呼吸音粗。体温（T）36.5 ℃，呼吸（R）20 次 • min^{-1}，心率（P）64 次 • min^{-1}，血压（BP）144/58 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），血氧饱和度 99%。辅助检查：二氧化碳分压（PCO_2）68 mmHg；N 末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）20 300 pg • mL^{-1}。1 月 25 日急诊胸片：双肺支气管炎改变，右肺感染可能，右侧胸腔积液，心影稍大。既往史：2006 年诊断冠心病，2012 年行冠状动脉支架置入术；2007 年诊断肾血管性高血压，右肾动脉内置入支架；2011 年诊断脑梗死；1997 年诊断 2 型糖尿病，合并糖尿病周围神经病变；2013 年诊断慢性肾功能不全，2014 年诊断肾性贫血；否认过敏史。入院诊断：

作者简介：邢百倩，女，硕士研究生，主管药师，主要从事临床药学工作及个体化药学服务研究，email：dlyyxbq@163.com
*通信作者：李忠东，男，教授，主任药师，主要从事临床药学工作及个体化药学服务研究，email：zhdl009@126.com

心肺复苏术后、缺血缺氧性脑病、细菌性肺炎、呼吸衰竭、慢性心功能不全急性加重、冠状动脉粥样硬化性心脏病、冠状动脉支架置入术、不稳定性心绞痛、高血压 3 级、高脂血症、慢性肾功能不全（尿毒症期）、血液透析状态、2 型糖尿病、糖尿病性周围神经病、肾动脉支架置入术后。

入院后主要抗感染治疗过程及不良反应发生和处理情况：1 月 25 日入重症监护病房时患者意识不清，听诊双肺可闻及湿罗音。白细胞（WBC）$10.4\times10^9\cdot L^{-1}$↑；高敏 -C 反应蛋白（hs-CRP）33.25 $mg\cdot L^{-1}$↑；1 月 25 日至 2 月 1 日给予哌拉西林钠他唑巴坦钠 2.25 g ivgtt q8h 抗感染。1 月 26 日血培养为苯唑西林耐药表皮葡萄球菌。1 月 26 日至 2 月 4 日血滤期间予万古霉素 100 万 IU ivgtt qd。2 月 1 日患者 T 37.2 ℃，hs-CRP 143.21 $mg\cdot L^{-1}$↑，2 月 1 日至 2 月 6 日给予美罗培南 1 g ivgtt q8h 抗感染治疗。2 月 7 日患者肺泡灌洗液二代基因测序（NGS）结果回报为纹带棒状杆菌及人类疱疹病毒 I 型，2 月 7 日至 2 月 16 日给予替考拉宁 0.2 g ivgtt qd 和阿昔洛韦 0.25 g ivgtt q12h 抗感染治疗。2 月 15 日患者胸部 CT 结果回报双肺散在炎症较前部分吸收，双侧胸腔积液吸收消失。2 月 16 日 hs-CRP 20.24 $mg\cdot L^{-1}$↑，停用所有抗菌药物。2 月 18 日 T 37.7 ℃↑，降钙素原（PCT）16 $ng\cdot mL^{-1}$↑；hs-CRP 120.09 $mg\cdot L^{-1}$↑；WBC $21.8\times10^9\cdot L^{-1}$↑，血小板（PLT）$205\times10^9\cdot L^{-1}$；2 月 18 日至 2 月 25 日给予美罗培南 1 g ivgtt q8h，连续性肾脏替代治疗期间 2 g ivgtt q8h（北大医药股份有限公司，批号：211203），2 月 18 日至 2 月 20 日替加环素 100 mg ivgtt q12h 抗感染治疗。2 月 20 日患者腹泻，且 PLT 持续下降至 $130\times10^9\cdot L^{-1}$。2 月 22 日至 2 月 25 日左氧氟沙星 0.3 g ivgtt qd 抗感染治疗。2 月 24 日 T 38 ℃↑，WBC $11.9\times10^9\cdot L^{-1}$↑，PLT $106.0\times10^9\cdot L^{-1}$↓，N% 79.3%↑，嗜酸细胞数 $1.13\times10^9\cdot L^{-1}$↑，hs-CRP 33.10 $mg\cdot L^{-1}$↑。深静脉置管时间长，不除外导管相关感染，2 月 24 日至 2 月 28 日予替考拉宁首日 0.4 g ivgtt q12h，维持剂量 0.2 g ivgtt qd（浙江医药股份有限公司新昌制药厂，批号：113210706）抗感染治疗。2 月 25 日 T 37.7 ℃↑，hs-CRP 37.71 $mg\cdot L^{-1}$↑；WBC $21.7\times10^9\cdot L^{-1}$↑，PLT $148.0\times10^9\cdot L^{-1}$，嗜酸细胞数 $1.53\times10^9\cdot L^{-1}$↑。不除外真菌感染可能，2 月 25 日至 2 月 26 日给予卡泊芬净 50 mg ivgtt qd 抗感染治疗。2 月 26 日早晨，患者双上肢稍肿，双上肢皮肤发红，右上肢散在张力性水泡；T 36.3 ℃，WBC $20.6\times10^9\cdot L^{-1}$↑，PLT $118.0\times10^9\cdot L^{-1}$↓，嗜酸细胞数 $0.54\times10^9\cdot L^{-1}$↑，N% 92.0%↑；hs-CRP 45.09 $mg\cdot L^{-1}$↑；肌酐（Cr）276 $\mu mol\cdot L^{-1}$↑。停用卡泊芬净。2 月 28 日患者躯干、上肢大片水肿性红斑，局部张力性水泡，部分已破溃。T 37.4 ℃，WBC $18.6\times10^9\cdot L^{-1}$↑，PLT $83.0\times10^9\cdot L^{-1}$↓，嗜酸细胞数 $2.68\times10^9\cdot L^{-1}$↑；hs-CRP 29.34 $mg\cdot L^{-1}$↑。临床药师会诊评估皮肤剥脱面积约 2%，考虑 SJS。患者嗜酸细胞数升高，考虑不除外药物导致过敏反应，停用替考拉宁。给予地塞米松 5 mg iv qd 后皮疹稍减轻。3 月 1 日双上肢散在张力性水泡，部分已破溃，双上肢出现局部皮肤松解表现，以右上肢为重，碘伏消毒破溃除后保持干燥，外敷 0.05% 卤米松乳膏，予无菌棉垫覆盖。3 月 3 日嗜酸细胞数 $0.08\times10^9\cdot L^{-1}$ 双上肢散在红斑水疱，躯干较多浅表性水疱，部分已破溃，停用地塞米松。3 月 11 日双上肢散在张力性水泡已破溃，较前好转，全身皮肤散在浅表脱皮。3 月 25 日患者右上肢破溃基本愈合。患者皮肤剥脱情况见图 1。

图 1 患者皮肤损害情况

Fig 1 Cutaneous lesions of the patient

2 讨论

2.1 关联性评价

SJS/TEN 的致病诱因主要是药物因素，其次是肺炎支原体感染、病毒感染等。该患者住院期间检测血清肺炎支原体抗体 IgM、肺炎衣原体抗体等均为阴性。艾滋病病毒抗体 /P24 抗原阴性。住院期间 2 月 7 日和 2 月 18 日两次支气管镜肺泡灌洗液 NGS 结果均未见巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6 型等。本例患者在入院 1 个月后发生 SJS 综合征，且患者发生皮疹的同时伴发嗜酸粒细胞数升高，排除原发疾病肺炎和慢性心功不全急性加重的原因，考虑本例患者 SJS 可能为药物导致的迟发型超敏反应。患者 2 月 26 日 8：00 查房发现双上肢稍肿，双上肢皮肤发红，右上肢散在张力性水泡。2 月 28 日躯干、上肢大片水肿性红斑，右上肢散在张力性水泡，较前加重，停替考拉宁，给予地塞米松 5 mg iv 后，躯干皮疹稍减轻。在 2 月 26 日之前使用的

说明书中关于不良反应有描述 SJS/TEN，且在 2 月 28 日后未再使用的药物主要有哌拉西林钠他唑巴坦钠、盐酸万古霉素、美罗培南、替考拉宁、替加环素、左氧氟沙星、醋酸卡泊芬净。依据《药品不良反应报告和监测工作手册》[2] 及 Naranjo 评分 [3]，上述药物的关联性评价结果均为可能。ALDEN 评分 [4] 是针对 SJS/TEN 设计的评价方法，是一个快速评估 SJS/TEN 患者药物因果关系的工具，对使用过多种药物的患者尤其适用，在评估可疑药物和 SJS/TEN 的因果关系时，相对于前两种方法，可靠性更高 [5]。ALDEN 评分也有一定的局限性，“药物在过往史中的恶名度” 是参考国外的数据库。分别对上述药物进行 ALDEN 评分，结果见表 1。ALDEN 评分结果为：美罗培南和替考拉宁均为 4 分，判定为很可能。左氧氟沙星 2 分，判定为可能。其余药物得分≤ 1 分，判定为不可能或极不可能。

表 1　ALDEN 评分表

指标	ALDEN 评分细则	评分分值	哌拉西林钠他唑巴坦钠	万古霉素	美罗培南	替考拉宁	替加环素	左氧氟沙星	卡泊芬净
开始使用药物日期到线索日之间相隔的时间	5 ～ 28 d	＋3			＋3	＋3	＋3		
	29 ～ 56 d	＋2	＋2	＋2					
	1 ～ 4 d	＋1						＋1	
	＞ 56 d	－1							
	线索日当日或之后才开始使用药物	－3							－3
	过去曾经使用过相同药物且发生过敏反应时间：1 ～ 4 d	＋3							
	5 ～ 56 d	＋1							
评估在线索日内时药物是否仍存在体内	在线索日时药物仍持续使用，或是药物停用时间点和线索日之间相隔的时间小于药物半衰期的 5 倍	0			0	0	0	0	0
	药物停用时间点和线索日之间相隔的时间大于药物半衰期的 5 倍，但患者有肝 / 肾功能异常或怀疑有药物相互作用存在	－1							
	药物停用时间点和线索日之间相隔的时间大于药物半衰期的 5 倍，且患者无肝 / 肾功能能异常和药物相互作用存在	－3	－3	－3			－3		
再度重新使用相同药物 / 过去曾经使用同一成分或类似药物的反应情况	再度重新使用相同药物引起 SJS/TEN	＋4							
	再度重新使用类似药物引起 SJS/TEN，或是再度重新使用相同药物引起其他非 SJS/TEN 的过敏反应	＋2							
	再度重新使用类似药物引起其他非 SJS/TEN 的过敏反应	＋1							
	过去从未使用相同药物	0							
	过去曾经使用相同或类似药物但无过敏反应发生	－2							
SJS/TEN 进展过程中，是否仍持续使用	停药或不清楚	0	0	0	0	0	0	0	0
	仍持续使用该药未造成症状恶化	－2							
该药物在过往历史中的恶名度	高风险药物	＋3							
	风险已确定但属于低风险药物	＋2	＋2	＋2	＋2	＋2	＋2	＋2	＋2
	监视中的药物	＋1							
	未知	0							
	无相关性证据的药物	－1							
可疑药物不只一个	若可疑药物不只一个，只要其中一个药物前五项加和的总分大于正 3 分），则所有其他可疑药物的分数皆要扣 1 分后才是最后的总分	－1	－1	－1	－1	－1	－1	－1	－1
总分			0	0	4	4	1	2	－2

注：判定结果分为 5 级：极不可能（＜ 0 分）；不可能（0 ～ 1 分）；可能（2 ～ 3 分）；很可能（4 ～ 5 分）；极有可能（≥ 6 分）。

查阅国内外文献，检索万方、中国知网和维普数据库及 PubMed 数据库至 2022 年 4 月，检索到 1 例替考拉宁和万古霉素交叉过敏致 SJS 的报道 [6]，美罗培南导致 SJS 也有相关文献报道 [7-8]。本例 SJS 是在使用替考拉宁和美罗培南之后发生的，存在一定的时间相关性，停药后经积极对症治疗，皮疹消退。综合上述三种评价方法的评分结果，判断本例患者的 SJS 为美罗培南和替考拉宁联合作用引起的可能性较大。

2.2　SJS/TEN 发生机制及治疗

SJS/TEN 的发病主要与药物相关，如抗惊厥药、抗感染药物等可诱发 SJS/TEN[1]。发生的危险因素包括 HIV 感染、恶性肿瘤、遗传因素主要与人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）的多态性相关等。本例患者没有恶性肿瘤病史和 HIV 感染等危险因素，当时我院尚未开展 HLA 基因检测，未筛查患者 HLA 类型。SJS/TEN 发病前期可能出现发热及类似上呼吸道感染的症状。皮损的类型及受累情况差异较大，早期皮损多初发于躯干上部、四肢近端和面部，为靶型或紫癜样表现，逐渐扩散至躯干和四肢远端，严重者可出现水疱、大疱甚至大面积融合成片的表皮松解。大面积表皮松解可导致真皮外露形成大片糜烂、渗出，易导致出血和感染。该例患者发病前期出现发热，感染指标升高，无法排除感染导致，发病较隐匿。早期皮疹初发于躯干上部、四肢，出现水疱、大疱，局部出现融合成片的表皮松解，形成大片糜烂、渗出。表皮松解面积＜ 10% 体表面积，诊断为 SJS。

SJS/TEN 的治疗首先应选用常温无菌水、氯化钠溶液或抗菌剂等对皮肤糜烂面进行清洁，同时注意补液和营养支持治疗。临床上常将糖皮质激素、静脉注射免疫球蛋白、环孢素及 TNF-α 拮抗剂作为 SJS/TEN 的系统性治疗方案。推荐早期足量系统应用糖皮质激素控制病情进展。该患者发生皮疹后立即停用可疑药物，给予静脉注射地塞米松 5 mg 共 4 d，予碘伏消毒后保持干燥，外敷 0.05% 卤米松乳膏，予无菌棉垫覆盖，后皮疹逐渐好转。

参考文献

[1] 中华医学会皮肤性病学分会药物不良反应研究中心 . Stevens-Johnson 综合征 / 中毒性表皮坏死松解症诊疗专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志，2021，54（5）：376-381.

[2] 国家食品药品监督管理局药品安全监管司，国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应报告和监测工作手册 [S]. 2012：49-50.

[3] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30（2）：239-245.

[4] Sassolas B，Haddad C，Mockenhaupt M，et al. ALDEN，an algorithm for assessment of drug causality in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis：comparison with case-control analysis [J]. Clin Pharmacol Ther，2010，88（1）：60-68.

[5] 刘敏，李忠东 . 实例探讨药物引起 SJS 或 TEN 的评分方法——Naranjo 评分与 ALDEN 评分比较 [J]. 中国药物应用与监测，2014，11（4）：247-249.

[6] Yang LP，Zhang AL，Wang DD，et al. Stevens-Johnson syndrome induced by the cross-reactivity between teicoplanin and vancomycin [J]. Clin Pharm Ther，2014，39（4）：442-445.

[7] Sameed M，Nwaiser C，Bhandari P，et al. Meropenem-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in a patient with known type Ⅳ penicillin hypersensitivity [J]. BMJ Case Rep，2019，12（8）：e230144.

[8] 徐珊珊，谢雪萍，田亮，等 . 美罗培南致 Stevens-Johnson 综合征 1 例 [J]. 中国药师，2022，25（2）：306-308.

（收稿日期：2023-03-21；修回日期：2023-05-16）

奈玛特韦 / 利托那韦片致老年新型冠状病毒感染患者癫痫 2 例

金旻[1]，汪硕闻[2]，范国荣[2]，娄月芬[1*]（1. 同济大学附属上海市第四人民医院药剂科，上海　200434；2. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科，上海　200080）

关键词：奈玛特韦 / 利托那韦；癫痫；新型冠状病毒感染；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)08-2267-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.057

1　病历资料

病例 1：患者女，66 岁，2022 年 4 月 18 日因筛查新型冠状病毒核酸阳性转至我院治疗。既往脑梗死、2 型糖尿病、高血压、慢性肾功能不全病史多年。长期卧床，消瘦，无法交流，营养状况差。入院查体：体温（T）37.3 ℃，心率（P）86 次 • min^{-1}，脉搏（R）20 次 • min^{-1}，血压（BP）125/80 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。稍咳嗽、咳痰，咳痰无力。胸部 CT 平扫示：双肺散在炎症，双侧胸腔少量积液。诊断：新型冠状病毒感染（COVID-19）普通型、脑梗死后遗症（血管性痴呆）、高血压病、2 型糖尿病、慢性肾功能不全。入院后予苯磺酸氨氯地平片 5 mg qd po 抗高血压治疗，肠内营养混悬液 100 mL qd 鼻饲营养支持治疗，人胰岛素注射液 6 IU q12h ih 降糖治疗，连花清瘟颗粒 1 袋 tid po 抗病毒治疗。5 月 11 日，核酸检测结果仍为阳性，考虑患者合并多种基础疾病且肾功能不全，停用连花清瘟颗粒，予奈玛特韦 / 利托那韦片（辉瑞制药有限公司，规格：奈玛特韦片 150 mg/ 利托那韦片 100 mg，批号：FX2760）150/100 mg q12h po 抗病毒治疗。5 月 12 日 14：30，患者突发左上肢抽搐抖动，双眼向上凝视，心电监护提示：P144 次 • min^{-1}，氧饱和度 99%（鼻导管吸氧中，氧流量 4 L • min^{-1}），考虑癫痫发作，立即停药并予地西泮注射液 10 mg iv st 抗癫痫治疗。10 min 后患者心率逐渐下降，症状缓解，予注射用丙戊酸钠 800 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 100 mL 泵入给药（3 mL • h^{-1}）维持治疗。16：50，患者生命体征平稳，无抽搐抖动，心电监护示：P86 次 • min^{-1}，氧饱和度 97%（氧流量 2 L • min^{-1}），血压 110/75 mmHg，头颅 CT 平扫示：脑内多发梗死灶，部分边缘钙化，未见明显出血及新发脑梗死征象。5 月 13 日，患者连续 2 日新型冠状病毒核酸检测结果为阴性，予以出院。

病例 2：患者男，68 岁，2022 年 5 月 10 日因新型冠状病毒核酸检测阳性收治入院。既往精神分裂症病史多年。无药物、食物过敏史，无家族及遗传病病史。入院查体：T 36.0 ℃，P 80 次 • min^{-1}，R 19 次 • min^{-1}，BP 121/94 mmHg。间断咳嗽、咳痰。胸部 CT 平扫提示：两肺炎症，右侧胸腔少量积液。诊断：COVID-19 普通型。入院后予奈玛特韦 / 利托那韦片（批号：FX2760）300/100 mg q12h po 抗病毒治疗。5 月 12 日 13：20，患者出现身体抽搐症状，心电监护提示：P 101 次 • min^{-1}，考虑癫痫发作，立即停药并予注射用丙戊酸钠 800 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 100 mL 泵入给药（2 mL • h^{-1}）治疗。14：00，心电监护提示：P 75 次 • min^{-1}，体征平稳。5 月 13 日，患者未再出现抽搐症状。5 月 15 日，患者病情好转且核酸检测结果为阴性，予以出院。

2　分析讨论

2.1　关联性评价

病例 1 和病例 2 在使用奈玛特韦 / 利托那韦抗病毒治疗后均出现以肢体抽搐抖动、心率加快为主的癫痫不良反应，停药及对症处理治疗后好转。根据 Naranjo’s 评估量表[1]计算得分均为 6 分，患者出现的癫痫很可能是由奈玛特韦 / 利托那韦片所致，具体评估结果见表 1。

2.2　讨论

癫痫是多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征[2]，主要表现为相应的神经运动、感觉、意识、自主神经、精神等不同程度障碍。癫痫的发病机制可能与离子通道、神经递质失衡、遗传和免疫有密切的关系，但具体的发病机制较为复杂，目前尚未完全明确[3]。

2022 年 2 月 11 日，国家药品监督管理局按照药品特别审批程序，附条件批准奈玛特韦 / 利托那韦片进口注册，用于治疗成人伴有进展为重症高风

基金项目：新建附属医院专项（No.2021YXFS02）。
作者简介：金旻，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：jmrenren@163.com　*通信作者：娄月芬，女，硕士，主任药师，主要从事临床药学工作，email：louyuefen@sina.cn

表 1 2 例奈玛特韦 / 利托那韦片致 COVID-19 患者癫痫的诺氏评估结果

相关问题	得分情况					
	是	否	未知	病例 1	病例 2	评分理由
该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	0	0	奈玛特韦 / 利托那韦片说明书无致癫痫不良反应记载
该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2	＋2	癫痫是在使用奈玛特韦 / 利托那韦片后发生的
该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后有缓解	＋1	0	0	＋1	＋1	停药对症治疗后不良反应症状好转
该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0	0	未再使用奈玛特韦 / 利托那韦
是否存在其他因素能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2	＋2	患者用药前体征无明显异常
该 ADR 是否在使用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0	0	患者未服用安慰剂
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0	0	未测定奈玛特韦 / 利托那韦是否达到毒性浓度
该 ADR 是否随剂量增加而加重或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	＋1	＋1	未加量或减量
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0	0	患者为第一次使用奈玛特韦 / 利托那韦
是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1	＋1	患者体征可证实该反应
总分值 / 分				6	6	

注：总分值≥ 9 分，为肯定的；5 ～ 8 分为很可能有关；1 ～ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑的。

险因素的轻至中度 COVID-19 患者。奈玛特韦 / 利托那韦片为组合片剂，其中奈玛特韦是新型冠状病毒 2 型（SARS-CoV-2）的主要蛋白酶 Mpro（也称为 3C- 样蛋白酶，3CLpro）的拟肽类抑制剂，抑制 SARS-CoV-2 Mpro 可使其无法处理多蛋白前体，从而阻止病毒复制 [4]。利托那韦抑制 CYP3A 介导的奈玛特韦代谢，从而升高奈玛特韦的血药浓度 [5]，达到协同抗病毒作用 [6]。奈玛特韦 / 利托那韦最常见的不良反应是腹泻、味觉倒错、消化不良、胃食管反流病、呕吐、肌痛、头晕和谷丙转氨酶（ALT）/ 谷草转氨酶（AST）升高 [7]，癫痫发作属于较少见的神经系统不良反应。NCT04960202 研究是一项Ⅱ/Ⅲ期随机、双盲、安慰剂临床试验对照 [8]。2246 名患者接受了随机分组：1120 名患者使用奈玛特韦 / 利托那韦治疗（奈玛特韦 / 利托那韦组），1126 人使用安慰剂（安慰剂组）。神经系统不良反应主要表现为味觉障碍（奈玛特韦 / 利托那韦组 5.6% *vs* 安慰剂组 0.3%）及头痛（奈玛特韦 / 利托那韦组 1.4% *vs* 安慰剂组 1.3%），且大多为轻度至中度不良反应，未出现昏迷、抽搐、癫痫等相关不良反应。而通过搜索利托那韦片相关不良反应发现，截至 2020 年 2 月，欧洲药品不良事件数据库上报洛匹那韦 / 利托那韦相关药品不良反应 5833 例，其中诱发癫痫发作 54 例（8.6%）[9]；2004—2019 年，FDA 共收集洛匹那韦 / 利托那韦的不良反应 10 120 份，其中发生抽搐的不良反应为 93 例（0.92%）[10]。这可能与利托那韦通过损伤线粒体、触发细胞凋亡等导致多器官系统损伤有关 [11]。本次报道的 2 例不良反应均发生于老年 COVID-19 且伴有多种基础疾病的患者。由此可见使用奈玛特韦 / 利托那韦片在治疗 COVID-19 患者中存在诱发癫痫的潜在风险，特别是在伴有神经系统基础疾病的老年 COVID-19 患者中。

COVID-19 患者治疗过程中除了关注奈玛特韦 / 利托那韦的疗效外，更需要关注该药物的不良反应，尤其是高龄合并多种基础疾病的患者，以利于制订最佳的药物剂量及个体化的用药方案，一旦出现不良反应需及时对症治疗，保障患者用药安全。同时临床在了解说明书所记载的药品不良反应的基础上，更应加强药物的真实世界研究，为该药物的安全使用提供依据。

参考文献

[1] Naranjo CA，Shear NH，Lanctôt KL. Advances in the diagnosis of adverse drug reactions [J]. J Clin Pharmacol，1992，32（10）：897-904.

[2] 熊敏，苏化庆，向明钧 . 癫痫发病机制的研究进展 [J]. 中国当代医药，2019，26（30）：24-27.

[3] 张立群 . 癫痫发病机制及治疗研究 [J]. 医学信息，2021，34（16）：44-46.

[4] 王欢，张铖 . 口服新型冠状病毒肺炎治疗新药——Paxlovid [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（2）：13-17.

[5] 陈本川 . 治疗新型冠状病毒肺炎新药——奈玛特韦（nirmatrelvir）片与利托那韦片组合用药 Paxlovid [J]. 医药导报，2022，41（7）：1073-1079.

[6] FDA. Fact sheet for healthcare providers：emergency use authorization for Paxlovid™ [EB/OL]. https：//www. fda. gov/media/ 155050/download.（2021-12-12）[2022-03-29].

[7] 张竞文，胡欣，赵紫楠，等 . 新冠病毒治疗药物奈玛特韦片 / 利托那韦片的作用机制和临床研究情况 [J]. 中国药学杂志，2022，57（10）：845-850.

[8] Hammond J，Heidi LT，Gardner A，et al. Oral nirmatrelvir for high-risk，nonhospitalized adults with Covid-19 [J]. N Engl J Med，2022，386（15）：1397-1408.

[9] 田晓江，贾运涛，王柯静，等 . 基于欧洲药品不良事件数据库对洛匹那韦 / 利托那韦不良事件的快速挖掘和分析 [J]. 中国新药杂志，2020，29（9）：1073-1080.

[10] 马攀，龚莉，张妮，等 . 基于 FDA 不良事件数据库对洛匹那韦 / 利托那韦安全信号的检测与分析 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（4）：406-413.

[11] Tricarico PM，Freitas DOFR，Pacor S，et al. HIV protease inhibitors apoptotic effect in SH-SY5Y neuronal cell line [J]. Cell Physiol Biochem，2016，39（4）：1463-1470.

（收稿日期：2022-11-24；修回日期：2023-01-10）