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

ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2023年9月 第21卷 第9期
Volume 21 Number 9 September 2023

CENTRAL SOUTH PHARMACY

◆广东神曲对食积小鼠胃肠动力及Cx43、BDNF的调节影响
◆桃红四物汤通过上调FTH1抑制铁死亡治疗子宫异常出血
◆基于富勒烯高渗透性磁性纳米递药系统的构建及其磁热性能考察
◆细胞膜仿生纳米颗粒靶向治疗肺部炎症性疾病的研究进展

ISSN 1672-2981
09
9 771672 298231

9
2023

中南药学 第二十一卷 第九期 第2269~2546页 二〇二三年九月

中国科技核心期刊

（中国科技论文统计源期刊）

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL

FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038　　www.istic.ac.cn

2022年12月

证书编号：2021-G599-2450

有效期至：2023年12月

中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 9 期（总第 212 期）　2023 年 9 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

（2269）广东神曲对食积小鼠胃肠动力及 Cx43、BDNF 的调节影响 …… 江垭霓，王冬妮，吴浩忠，等

（2275）桃红四物汤通过上调 FTH1 抑制铁死亡治疗子宫异常出血 …… 黄荣，张艳艳，刘晓闯，等

（2282）不同产品转移因子对免疫功能低下小鼠免疫功能的调控及多肽图谱分析 …… 古红婷，邝莹，陈垒，等

（2288）华中五味子根皮乙酸乙酯部位化学成分研究 …… 李睿，黄仕其，张子龙，等

（2293）黄甲软肝颗粒对阿尔茨海默病的药效学研究 …… 张诗涵，马四补，张丽艳，等

（2300）缬草的化学成分研究 …… 但林蔚，高天慧，吴国庆，等

（2306）微芯片电泳技术鉴定金银花和山银花 …… 董露，石晶，李丽潇，等

（2311）茅岩莓提取物治疗放射性口腔溃疡的作用研究 …… 唐梓宁，彭冬冬，刘学武，等

（2316）薰衣草挥发油香薰吸入给药助睡眠作用及机制探究 …… 周欣，宋宁，林景，等

（2322）安神助眠药茶活性成分含量测定及安全性评价 …… 王楠，高太祥，张洪雄，等

（2328）姜黄素介孔缓释载药系统制备工艺优化及其体外抗肿瘤活性研究 …… 胡宪龙，苏厚霖，邱圣楷，等

（2335）抗菌肽 LL37 固体脂质纳米粒的制备、优化和评价 …… 王芳，厉祯，淦新悦，等

（2342）基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术的青海枸杞“柴杞 1 号”化学成分分析 …… 乔亚玲，孟昭军，刘亚蓉，等

（2348）干燥方法对五味消毒饮浸膏粉质量属性的影响 …… 张英俊，吴样明，饶小勇，等

（2354）基于系统药理学解析林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的作用机制 …… 赵晓昂，王云，李友明，等

（2362）恩格列净片的体外溶出行为一致性评价研究 …… 王晶萍，夏颖，李耕，等

（2367）响应面法优化苓桂术甘汤的提取工艺 … 胡晓红，刘冬涵，杨雪颖，等

（2373）基于高效液相色谱 - 串联质谱和分子网络联合应用技术快速鉴定川黄柏和关黄柏中的化学成分 …… 李道政，鄂环宇，丁国钰

《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

（2379）基于富勒烯高渗透性磁性纳米递药系统的构建及其磁热性能考察
…… 邓晓兰，王思琴，李馥伶，等

综述

（2386）芍药苷的心脏保护作用及作用机制研究进展
…… 邵庆瑞，张小军，零伟德，等
（2391）芜菁的化学成分和生物活性研究进展
…… 王证德，平措绕吉，刘莹，等
（2400）细胞膜仿生纳米颗粒靶向治疗肺部炎症性疾病的研究进展
…… 卢佩珊，李佳宁，吴婉华，等
（2407）*L*-天冬酰胺酶在肿瘤中的研究进展 …… 江媛媛，孙立
（2413）清除脑内衰老细胞治疗阿尔茨海默病的研究进展
…… 边宇航，张凌，王丹，等

中药资源开发与利用

（2419）民族药血满草的本草考证…… 黄江丽，王葳，彭登庭，等

药物分析与检验

（2424）UPLC-MS/MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中的一种基因毒性杂质
…… 侯继鹏，时晓燕，张业华，等
（2428）乳酸质量分析…… 周颖，刘雁鸣，郑金凤，等
（2433）一测多评法同时测定羌活胜湿汤中 6 种成分的含量
…… 田欢，祁庆瑞，翟秉涛，等
（2439）电感耦合等离子体质谱法测定氟马西尼注射液中金属元素的含量
…… 吴秋云，陈民辉，曹玲
（2442）太行菊的性状及显微鉴别研究…… 柴天川，段吉平，段琼，等
（2448）景参浓缩丸高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种成分的含量测定
…… 杨玉畅，许煜晨，刘曼婷，等
（2454）多潘立酮片有关物质检测方法优化和一致性评价研究
…… 王发，李继，杜玮，等
（2458）离子色谱法测定聚乙二醇 6000 中有机酸和无机阴离子
…… 谢莹莹，赵勇，肖菁，等
（2463）离子色谱法测定布洛芬原料药中 2-氯丙酸根及 2，2-二氯丙酸根的含量 …… 邢雪敏，刘葵葵，李欣，等
（2466）一测多评法同时测定刺五加配方颗粒中 6 种成分的含量
…… 黄贵发，黎桃敏，林嘉明，等

医院药学

（2471）HPLC-MS/MS 法同时测定儿童微量血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤浓度
…… 秦亚彬，姜锡娟，张古英，等
（2476）失效模式与效应分析在高血压患者慢病药学服务中的效果评价
…… 张凤怡，钱巧，马红，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。

（2482）万古霉素血药浓度危急值与急性肾损伤相关性分析
…… 高航，邹素兰，蒋艳，等

（2487）多黏菌素 B 治疗多重耐药和泛耐药菌所致医院获得性肺炎老年患者的观察 …… 苏晶，刘志青，杨悦，等

（2495）环泊酚与丙泊酚用于无痛胃肠镜疗效与安全性的 Meta 分析
…… 韩俊萍，沈珠，罗兴献，等

临床药师在临床

（2501）1 例达格列净致多次酮症酸中毒及酮症患者的药学监护及文献分析
…… 唐棠，赵珩，王瑞风，等

（2504）对 1 例免疫治疗期间发生结肠炎的肝癌患者的药物治疗管理
…… 栾伟，古今

（2508）B 细胞水平监测在 1 例单剂量利妥昔单抗治疗特发性膜性肾病中的应用 …… 房珊平，王艺霏，丁愉

（2511）临床药师参与小细胞肺癌合并 IgA 肾病治疗的药学实践
…… 司倩，刘相端，高钟丽，等

（2514）临床药师参与 1 例晚期结直肠癌患者抗血管生成药物个体化选择策略制订及药学监护实践 …… 王家雪，张瑞，赵华叶，等

药事管理

（2519）药物早期临床试验信息化建设应用与实践
…… 陈元璐，谢朋飞，崔宏娣，等

（2524）基于风险的药物临床试验方案偏离管理模式探讨
…… 邱博，杜润璇，杨浩天，等

药学教育

（2529）基于科学引文数据库的临床药学教育研究文献计量学分析
…… 郭琳娜，罗芬，颜苗，等

药品不良反应

（2534）PD-1 抑制剂致甲状腺功能减退 2 例 …… 温晓莉，张晴，唐翎

（2537）心力衰竭伴低钠血症患者使用托伐普坦致肝性脑病 1 例
…… 郑晓圆，谢芬，过晶，等

（2541）1 例糖皮质激素致肾病综合征患儿颅内深静脉血栓的案例分析
…… 周敬强，韩旭，方玉婷

（2544）冠心病患者使用质子泵抑制剂致皮肤损害 1 例
…… 高超，吴佳芸，吴超勇，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*25.0*52*2023-9

本期责任编辑：彭金飞，陆窈窈，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 9 September 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

(2269) Effect of Guangdong Shenqu on the gastrointestinal motility, Cx43 and BDNF in mice with food stagnation
…… *JIANG Ya-ni, WANG Dong-ni, WU Hao-zhong, et al*

(2275) Effect of Taohong Siwu decoction against abnormal uterine bleeding in rats by inhibiting ferroptosis via up-regulating FTH1
…… *HUANG Rong, ZHANG Yan-yan, LIU Xiao-chuang, et al*

(2282) Regulation of different transfer factors on the immune function in immunocompromised mice and polypeptide profiling
…… *GU Hong-ting, KUANG Ying, CHEN Lei, et al*

(2288) Chemical constituents from the ethyl acetate fraction of the root bark of *Schisandra sphenanthera*
…… *LI Rui, HUANG Shi-qi, ZHANG Zi-long, et al*

(2293) Pharmacodynamics of Huangjia Ruangan granules for Alzheimer's disease
…… *ZHANG Shi-han, MA Si-bu, ZHANG Li-yan, et al*

(2300) Chemical compositions of *Valeriana officinalis* L.
…… *DAN Lin-wei, GAO Tian-hui, WU Guo-qing, et al*

(2306) Identification of *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* by microchip electrophoresis technology…… *DONG Lu, SHI Jing, LI Li-xiao, et al*

(2311) Effect of thatch berry extract on radioactive oral ulcer
…… *TANG Zi-ning, PENG Dong-dong, LIU Xue-wu, et al*

(2317) Sleep-enhancing effect and its mechanism of essential oil of lavender incense inhalation…… *ZHOU Xin, SONG Ning, LIN Jing, et al*

(2322) Content determination and safety evaluation of active ingredients in Anshen Zhumian medicinal tea
…… *WANG Nan, GAO Tai-xiang, ZHANG Hong-xiong, et al*

(2328) Optimization of the preparation of curcumin mesoporous sustained-release drug loading system and its in vitro antitumor activity
…… *HU Xian-long, SU Hou-lin, QIU Sheng-kai, et al*

(2335) Preparation, optimization and evaluation of antimicrobial peptides LL37-SLNs …… *WANG Fang, LI Zhen, GAN Xin-yue, et al*

(2342) Chemical constituents of *Lycium barbarum* "Chaiqi 1" from Qinghai based on UPLC-Q-Orbitrap-MS
…… *QIAO Ya-ling, MENG Zhao-jun, LIU Ya-rong, et al*

(2348) Effect of drying methods on the quality attribute of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction
…… *ZHANG Ying-jun, WU Yang-ming, RAO Xiao-yong, 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.

(2355) Anti-fatigue mechanism of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol based on system pharmacology
…… *ZHAO Xiao-ang, WANG Yun, LI You-ming, et al*

(2362) Consistency of dissolution behaviors of empagliflozin tablets in vitro
…… *WANG Jing-ping, XIA Ying, LI Geng, et al*

(2367) Optimization of the extraction of Linggui Zhugan decoction by Box-Behnken response surface methodology
…… *HU Xiao-hong, LIU Dong-han, YANG Xue-ying, et al*

(2373) Rapid identification of components in Phellodendri Chinensis Rupr and Phellodendri Amurensis Schneid with HPLC-MS and molecular network
…… *LI Dao-zheng, E Huan-yu, DING Guo-yu*

(2379) High-permeability magnetic nano-drug delivery system based on fullerene and its magnetocaloric properties
…… *DENG Xiao-lan, WANG Si-qin, LI Fu-ling, et al*

(2386) Advances in cardioprotective effect of paeoniflorin and related mechanism
…… *SHAO Qing-rui, ZHANG Xiao-jun, LING Wei-de, et al*

(2391) Research progress in chemical constituents and biological activities of *Brassica rapa* L.
……*WANG Zheng-de, Ping-cuo-rao-ji, LIU Ying, et al*

(2400) Research progress in cell membrane biomimetic nanoparticles for pulmonary inflammatory diseases
……*LU Pei-shan, LI Jia-ning, WU Wan-hua, et al*

(2407) Research progress of *L*-asparaginase in tumor
…… *JIANG Yuan-yuan, SUN Li*

(2413) Review of theoretic methods for Alzheimer's disease by removing the senescent brain cells
…… *BIAN Yu-hang, ZHANG Ling, WANG Dan, et al*

(2419) Herbal textual research on *Sambucus adnata* Wall.
…… *HUANG Jiang-li, WANG Wei, PENG Deng-ting, et al*

(2424) A genotoxic impurity in ketorolac tromethamine determined by UPLC-MS/MS …… *HOU Ji-peng, SHI Xiao-yan, ZHANG Ye-hua, et al*

(2428) Quality assessment of lactic acid
…… *ZHOU Ying, LIU Yan-ming, ZHENG Jin-feng, et al*

(2433) Simultaneous determination of 6 components in Qianghuo Shengshi decoction by quantitative analysis of multi-components by single markers
…… *TIAN Huan, QI Qing-rui, ZHAI Bing-tao, et al*

(2439) Content of metallic elements in Flumazenil injection by ICP-MS
……*WU Qiu-yun, CHEN Min-hui, CAO Ling*

(2442) Morphological and microscopic identification of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih
…… *CHAI Tian-chuan, DUAN Ji-ping, DUAN Qiong, et al*

(2448) HPLC fingerprints of Jingshen compact pills and content determination of three components
…… *YANG Yu-chang, XU Yu-chen, LIU Man-ting, et al*

(2454) Optimization of content determination of related substances and consistency evaluation of related substances in domperidone tablets
…… *WANG Fa, LI Ji, DU Wei, et al*

(2459) Determination of organic acids and inorganic anions in polyethylene glycol 6000 by ion chromatography
…… *XIE Ying-ying, ZHAO Yong, XIAO Jing, et al*

(2463) Content determination of 2-chloropropionate and 2, 2-dichloropropionate in ibuprofen by ion chromatography
…… *XING Xue-min, LIU Kui-kui, LI Xin, et al*

(2466) Simultaneous determination of the content of 6 components in acanthopanax senticosus formula granules by QAMS method
…… *HUANG Gui-fa, LI Tao-min, LIN Jia-ming, et al*

(2471) Simultaneous determination of dasatinib and methotrexate in children with small volume of plasma by HPLC-MS/MS
…… *QIN Ya-bin, JIANG Xi-juan, ZHANG Gu-ying, et al*

(2476) Effect evaluation of failure mode and effect analysis for pharmaceutical care of hypertensive patients
…… *ZHANG Feng-yi, QIAN Qiao, MA Hong, et al*

(2482) Correlation between critical blood concentration of vancomycin and acute kidney injury …… *GAO Hang, ZOU Su-lan, JIANG Yan, et al*

(2487) Patients with hospital acquired pneumonia induced by multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria
…… *SU Jing, LIU Zhi-qing, YANG Yue, et al*

(2495) Meta-analysis of the efficacy and safety of ciprofol and propofol used in painless gastrointestinal endoscopy
…… *HAN Jun-ping, SHEN Zhu, LUO Xing-xian, et al*

(2504) Drug therapy for a patient with liver cancer complicating with colitis during immunotherapy …… *LUAN Wei, GU Jin*

(2519) Informatization in early phase clinical trial: application and practice
…… *CHEN Yuan-lu, XIE Peng-fei, CUI Hong-di, et al*

(2525) Risk-based management model of protocol deviation from drug clinical trials …… *QIU Bo, DU Run-xuan, YANG Hao-tian, et al*

(2529) Bibliometrics of literatures on clinical pharmacy research based on scientific citation database…… *GUO Lin-na, LUO Fen, YAN Miao, et al*

研究论文

广东神曲对食积小鼠胃肠动力及 Cx43、BDNF 的调节影响

江垭霓[1]，王冬妮[2]，吴浩忠[1]，王萌[3]，王晶娟[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 阿斯利康医药（北京）有限公司，北京　100020；3. 广东合鑫医药有限公司，广州　510600）

摘要：目的　探究广东神曲治疗食积的作用机制。**方法**　将 60 只 ICR 雄性小鼠随机分为空白组、模型组、广东神曲低剂量组、广东神曲中剂量组、广东神曲高剂量组及乳酸菌素片组，每组 10 只。采用蜂蜡 - 橄榄油（1∶15）灌胃法构建食积证小鼠模型。造模后，各给药组给予相应的药物灌胃，空白组予以等量生理盐水，模型组予以等量蜂蜡 - 橄榄油，1 次 • d^{-1}，连续 5 d。观察小鼠一般状态情况、体重、腹围和平均食量变化。HE 染色法观察小鼠胃肠组织病理学变化，ELISA 法检测小鼠血清中胃泌素（GAS），5- 羟色胺（5-HT）和 P 物质（SP）的水平，Western blot 测定结肠组织中缝隙连接蛋白（Cx43）和脑源性神经营养因子（BDNF）蛋白表达。**结果**　造模后，与空白组相比，模型组与各给药组小鼠的腹围显著增大（$P < 0.01$），平均进食量减少。给药后，与空白组相比，模型组 GAS、5-HT、SP 含量显著降低（$P < 0.01$），Cx43、BDNF 蛋白的表达水平显著降低（$P < 0.01$）。与模型组相比，各给药组腹围显著降低（$P < 0.01$），GAS、5-HT、SP 含量显著升高（$P < 0.01$），广神曲中剂量和乳酸菌素组 Cx43 蛋白的表达水平升高（$P < 0.05$），乳酸菌素组 BDNF 蛋白的表达水平升高（$P < 0.05$）。造模后，模型组的胃肠组织结构出现中重度异常；广东神曲和乳酸菌素均能够改善胃肠黏膜，恢复肠绒毛，减轻炎症和组织水肿症状。**结论**　广东神曲能够调节 ICR 小鼠胃肠动力，具有消食化滞的功效，其作用机制可能与胃肠结构形态、调节脑肠肽中各激素蛋白的水平有关。

关键词：广东神曲；食积；脑肠肽；胃；十二指肠
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2269-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.001

Effect of Guangdong Shenqu on the gastrointestinal motility, Cx43 and BDNF in mice with food stagnation

JIANG Ya-ni[1], WANG Dong-ni[2], WU Hao-zhong[1], WANG Meng[3], WANG Jing-juan[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing*　102488; 2. *AstraZeneca Pharmaceutical* (*Beijing*) *Co., Ltd., Beijing*　100020; 3. *Guangdong Hexin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou*　510600)

Abstract: Objective　To determine the mechanism of Guangdong Shenqu for food stagnation. **Methods** Male SPF ICR mice were randomly divided into a control group, a model group, Guangdong Shenqu low, medium, and high dose groups, and a lactobacillin tablet group (10 mice in each group). Food stagnation mouse model was established by intragastric administration of beeswax-olive oil (1 ∶ 15) mixture. After the modeling, the drug administration groups were given corresponding drugs by gavage, the control group was given the same amount of normal saline, and the model group was given the same amount of beeswax-olive oil once daily for 5 days. The general state, body weight, abdominal circumference and average food intake of mice were observed. HE staining was used to observe the pathological changes in the gastrointestinal tissues. The serum levels of gastrin, 5-HT and substance P were detected by ELISA.

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81872995）。
作者简介：江垭霓，女，在读博士研究生，主要从事中药鉴定与质量评价方面的研究，email：jyn009183@163.com　*通信作者：王晶娟，女，教授，主要从事中药物质基础与质量评价、民族药开发方面的研究，email：wangjj@bucm.edu.cn

The protein expressions of Cx43 and BDNF in the colon tissues were determined by Western blot. **Results** After the modeling, compared with the control group, the abdominal circumference of mice in the model group and the intervention groups was significantly increased ($P < 0.01$), while the average food intake was decreased. Compared with the control group, the levels of GAS, 5-HT and SP in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression of Cx43 and BDNF proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the abdominal circumference of each drug administration group was significantly lower ($P < 0.01$), the levels of GAS, 5-HT and SP were increased ($P < 0.01$), the expression of Cx43 protein in the Shenqu medium dose group and the lactobacillin tablet group was increased ($P < 0.05$), and the expression level of BDNF protein in the lactobacillin tablet group was increased ($P < 0.05$). After the modeling, the gastrointestinal tissue structure of the model group showed moderate to severe abnormalities. Both Guangdong Shenqu and lactobacillin improved the gastrointestinal mucosa, restored the intestinal villi, reduced the inflammation and tissue edema symptoms. **Conclusion** Guangdong Shenqu can regulate the gastrointestinal motility of ICR mice, and its mechanism may be related to the improvement of gastrointestinal structure and regulation of the levels of various hormones and proteins in brain-gut peptides.

Key words: Guangdong Shenqu; food stagnation; brain-gut peptide; stomach; duodenum

广东神曲始于1710年陈飞鹏存仁堂，由辣蓼、青蒿、紫苏、羌活、厚朴、白术、陈皮、广藿香等62味药材经发酵制成。后于1999年载于《药品标准·中药成方制剂》第19册（WS3-B-3547-98），具有祛风消滞、健胃和中的功效[1]，是岭南地区治疗小儿暑湿食滞的常用药。虽神曲用于治疗食积的历史悠久，但关于广东神曲的研究甚少，其药效作用及其治疗机制尚未明确。食积是小儿的重要常见病症，治疗不当可引起发热、咳嗽等不良影响[2]。研究发现，胃泌素（gastrin，GAS）、5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）、P物质（P substance，SP）等激素通过脑-肠轴，在调节胃肠运动中扮演至关重要的角色，尤其是在治疗食积、消化不良疾病有重要作用[3-6]。因此，本实验在首次建立蜂蜡-橄榄油（1∶15）所致的小鼠食积模型基础上，观察广东神曲对胃肠组织形态变化、脑肠肽激素水平和Cx43、BDNF蛋白表达的高低，探究其治疗食积的作用机制，为其进一步开发利用提供实验支撑。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性ICR小鼠60只，3～4周，体重（17±1）g[斯贝福北京生物技术有限公司，动物许可证号：SCXK（京）2019-0010]，饲养于北京中医药大学良乡校区动物房，分笼饲养，每笼5只，环境温度23～27℃，湿度45%～50%。本实验经北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查通过，动物伦理审查编号：BUCM-4-2022092102-3110。所有实验小鼠的喂养、造模、处死等严格遵照实验动物伦理协会规定的动物伦理福利条款进行。

1.2 试药

广东神曲（广东合鑫医药有限公司，批号：210501），经粉碎机粉碎后过100目筛，根据低、中、高剂量分别加生理盐水制成10%、20%、40%原药混悬液，现配现用。乳酸菌素片（江中药业股份有限公司，规格：含乳酸菌素0.4 g/片），加生理盐水研磨，配制成62.5 g·L^{-1}的乳酸菌素混悬液。蜂蜡（批号：B802923）、橄榄油（批号：O815210）（上海麦克林生化科技有限公司），苏木素-伊红染液（武汉百仟度生物科技有限公司），GAS、5-HT、SP ELISA试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技有限公司）；缝隙连接蛋白（Cx43）、β-actin兔抗单克隆抗体（上海Abcam贸易有限公司），脑源性神经营养因子（BDNF）兔抗单克隆抗体（杭州华安生物技术有限公司，批号：ET1606-42）；山羊抗兔HRP、山羊抗小鼠HRP（SeraCare公司）。

1.3 仪器

FW100高速万能粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司），YH-A 20002电子天平（瑞安市英衡电器有限公司），ECLIPSE CI型正置光学显微镜（日本NIKON公司），JJ-12J型脱水机、JB-P5型包埋机（武汉俊杰电子有限公司），RM2016型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司），Epoch酶标仪（美国BioTek仪器有限公司），PP-1105电泳仪（北京CAVOY公司），TGL-16型冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），WD-9405A型脱色摇床（北京市六一仪器厂）。

2 方法与结果

2.1 广东神曲对食积小鼠胃肠功能调节作用的影响

2.1.1　动物分组、造模及给药　SPF 级 ICR 雄性小鼠适应性饲养 5 日后，采用堆积数字法将 60 只小鼠分为空白组，模型组，广东神曲低、中、高剂量组及乳酸菌素片组，每组 10 只。

根据文献报道[7]，综合食用蜂蜡热可逆性的特点，采用蜂蜡 - 橄榄油（1∶15）联合灌胃法构建食积消化不良模型，每次 35 mL·kg^{-1}，1 次·d^{-1}，共 5 日。同时期，空白组予以等量生理盐水。通过小鼠腹围、食量及解剖后胃肠黏膜病理学检查确定是否造模成功。

造模成功后，空白组予以生理盐水（20 mL·kg^{-1}），模型组予以等量蜂蜡 - 橄榄油，广东神曲低、中、高剂量组分别给予 2、4、8 g·kg^{-1} 混悬液，乳酸菌素片组给予 0.625 g·kg^{-1} 混悬液灌胃，2 次·d^{-1}，共 5 日。

2.1.2　动物一般行为学表现、腹围和日平均食消耗量考察　每日观察小鼠的精神状态、毛发、二便、食量等情况，测量体重和腹围。测腹围时，调整小鼠体位使其完全舒展，其剑突与髋关节上侧间垂直中点一周的长度即为腹围。结果显示，模型组小鼠相较于空白组小鼠好抱团聚集，活动减少，易暴躁，部分小鼠毛发光泽暗 / 呈炸毛状，小便黄赤，粪便小而干硬，饮水量减少；小鼠体重增长速度略缓，无显著性差异。经各剂量广东神曲或者乳酸菌素治疗后，小鼠活动增加，毛发较有光泽，粪便整体大、质地偏软，饮水量增多。

实验期间各组小鼠腹围情况见表 1。经 5 日造模，与空白组相比，各组小鼠的腹围显著增大（$P < 0.01$），说明此时模型小鼠腹部胀满，符合中医临床诊断中食积中焦脘腹胀满、腑气不通的症状。给药后，模型组腹围与空白组相比仍显著增加（$P < 0.01$）；与模型组相比，广东神曲三个剂量的给药组和乳酸菌素片组的小鼠腹围减小且均有显著效果（$P < 0.01$）。

小鼠日平均食物消耗量见表 2。与空白组相比，造模后小鼠日平均食物消耗量均下降约 40%；给药后，模型组平均食物消耗量略有降低，其余除广东神曲高剂量组外，相较于模型组小鼠的摄食量均有不同程度的恢复，广东神曲高剂量组效果略差，推测与原粉给药、总药量过高，增加胃肠消化负担有关。

粪便形态见图 1，其中空白组小鼠粪便呈圆柱状，质松软、湿润，色黄棕；模型组小鼠粪便小而干硬，呈梭形，颜色偏暗，味酸臭，切开断面可见未消化的小鼠饲料碎块（红色圆圈）；各给药组小鼠粪便个体变大，质软，略呈圆柱形，偏黑，味略淡，未消化的小鼠饲料碎块减少，与空白组粪便形态相近。

表 1　广东神曲对食积小鼠腹围的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 1　Effect of Guangdong Shenqu on the abdominal circumference of mice with food stagnation（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	腹围 /cm		
	造模前	造模后	给药后
空白组	7.71±0.23	7.88±0.20	7.91±0.13
模型组	7.91±0.14	8.69±0.25**	8.53±0.28**
广东神曲低剂量组	7.74±0.14	8.61±0.28**	7.76±0.24$^{\triangle\triangle}$
广东神曲中剂量组	7.75±0.14	8.70±0.23**	7.75±0.21$^{\triangle\triangle}$
广东神曲高剂量组	7.75±0.14	8.66±0.23**	7.70±0.16$^{\triangle\triangle}$
乳酸菌素片组	7.85±0.18	8.83±0.27**	7.93±0.15$^{\triangle\triangle}$

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

表 2　实验期间各组小鼠的日平均食物消耗量（$n = 10$）

Tab 2　Average daily food intake of mice in each group（$n = 10$）

组别	每日食耗量 /g		
	造模前	造模后	给药后
空白组	5.63	5.56	5.54
模型组	5.48	3.45	3.13
广东神曲低剂量组	5.41	3.79	5.07
广东神曲中剂量组	5.61	3.50	4.62
广东神曲高剂量组	5.43	3.36	3.20
乳酸菌素片组	5.53	3.73	5.15

2.2　广东神曲治疗食积作用机制研究

2.2.1　胃、十二指肠组织病理学检测　取小鼠全胃和十二指肠，用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗，4% 多聚甲醛固定 48 h。后将胃肠组织进行脱水、石蜡包埋后，以 4 μm 厚度切片保存。HE 染色前，将组织切片脱蜡，先后放入 Harris 苏木素和伊红染料中染色，后脱水封片，通过正置光学显微镜观察、拍照，分析胃肠组织形态学特点。参照 Chiu 等[8-9]报道的组织损伤评分量表进行胃、小肠损伤评分。

结果表明，空白组胃组织基本正常，上皮细胞排列规则，固有层管状腺排列紧密，组织无炎症细胞浸润。模型组胃组织中度异常，黏膜层上皮细胞排列紊乱，部分糜烂脱落，黏膜下层水肿，结缔组织增生，大量炎症细胞浸润。各给药组胃组织均轻度异常。其中，乳酸菌素组固有层可见管状腺排列疏松，黏膜下层轻度水肿，结缔组织增生，伴少量炎症细胞浸润。广东神曲低剂量组黏膜层上皮细胞局部糜烂、脱落，无炎症细胞浸润。广东神曲中剂量组黏膜下层轻度水肿，伴随少量炎症细胞浸润。广东神曲高剂量组黏膜层上皮细胞部分脱落；黏膜下层水肿，伴随少量炎症细胞浸润。小鼠胃组织病理切片结果见图 2。与空白组比较，模型组的胃黏膜损伤评分升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，各给药组胃黏膜损伤评分均显著下降（$P < 0.01$）（见表 3）。

空白组十二指肠横切呈近圆形；模型组肠环

图 1　给药 5 日后各组小鼠粪便形态图

Fig 1　Fecal morphology of mice in each group after 5 days of administration

形态明显变形，呈 U 状；各给药组呈椭圆形，除空白组外各组肠腔明显增大，推测为食积肠胀气所致。空白组肠组织基本正常，肠绒毛排列紧密，长度正常；黏膜层结构完整、排列整齐，黏膜下层无水肿、炎症细胞浸润。模型组肠组织重度异常，肠绒毛排列疏松、长度短缩，黏膜层大量上皮细胞糜烂脱落，固有层裸露，隐窝排列疏松、数量减少，伴少量炎症细胞浸润。乳酸菌素组肠组织轻度异常，固有层部分细胞溶解消失，肠绒毛排列紧密，黏膜层结构完整。广东神曲低剂量组肠组织轻度异常，黏膜层上皮细胞糜烂、脱落，肠绒毛排列紧密。广东神曲中剂量组肠组织基本正常，肠绒毛排列紧密，黏膜层结构完整。广东神曲高剂量组肠组织中度异常，固有层部分细胞溶解消失；黏膜层结构完整，伴炎症细胞浸润。小鼠胃组织病理切片结果见图 3 和图 4。与空白组比较，模型组的小肠组织 Chiu’s 氏评分升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，各给药组小肠组织 Chiu’s 氏评分均显著下降（$P < 0.01$）。见表 3。

表 3　各组胃、肠组织病理损伤评分表 ($n = 8$)

Tab 3　Pathological injury evaluation of gastric and intestinal tissues in each group ($n = 8$)

组别	胃黏膜损伤评分	Chiu’s 氏评分
空白组	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	11.25±1.04**	4.38±0.74**
广东神曲低剂量组	6.88±0.84△△	2.13±0.84△△
广东神曲中剂量组	6.25±0.46△△	0.63±0.52△△
广东神曲高剂量组	6.25±0.46△△	2.13±0.64△△
乳酸菌素片组	7.00±1.07△△	2.50±0.93△△

注：与空白组比较，**$P < 0.01$；与模型组比较，△△$P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，**$P < 0.01$；compared with the model group，△△$P < 0.01$.

2.2.2　ELISA 法检测血清 GAS、5-HT、SP 含量　末次给药后，以 0.3% 的戊巴比妥钠，10 mL·kg^{-1} 剂量麻醉后，摘眼球取血，将全血静置 1 h 后，1000 g 离心 20 min，取上清液。按 ELISA 试剂盒测定血清中 GAS、5-HT、SP 的含量，结果见表 4。

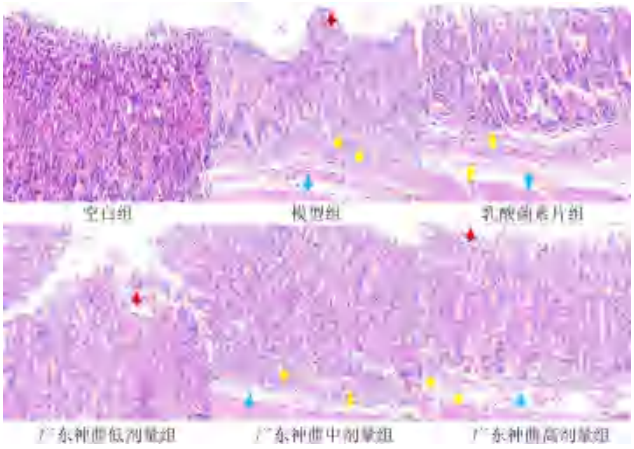


图 2　各组小鼠胃组织病理切片（HE 染色，×200）

Fig 2　Histopathological sections of mouse stomach in each group（HE staining，×200）

注：红色箭头指示黏膜上皮细胞异常；黄色箭头指示炎症细胞；蓝色箭头指示组织间隙异常。

Note：The red arrow indicates the abnormal gastric epithelial cells, the yellow arrow indicates the inflammatory cells，and the blue arrow indicates the abnormal tissue space.

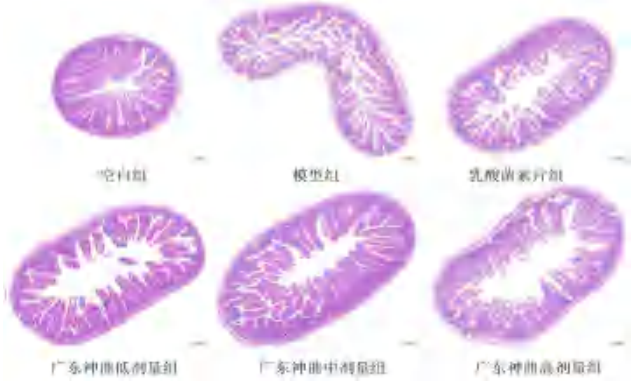


图 3　各组小鼠十二指肠外观形态（HE 染色，×40）

Fig 3　Histomorphology of mouse duodenum in each group（HE staining，×40）

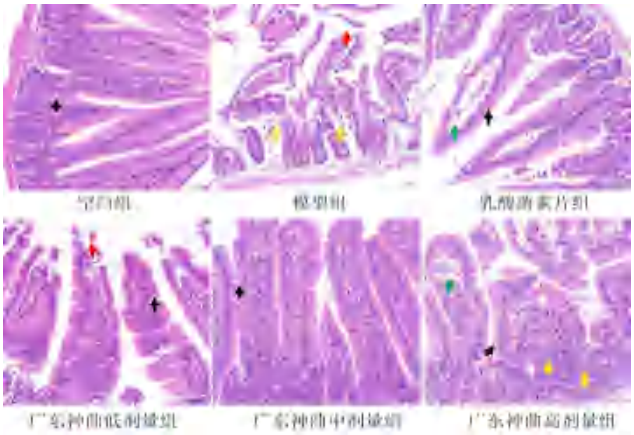


图 4　各组小鼠十二指肠组织病理切片（HE 染色，×200）

Fig 4　Histopathological sections of mouse duodenum in each group（HE staining，×200）

注：绿色箭头指示固有层细胞异常；黑色箭头指示杯状细胞。

Note：The green arrow indicates the abnormal lamina propria cells and the black arrow indicates the goblet cells.

与空白组比较，模型组的小鼠血清中 GAS、5-HT、SP 水平显著下降（$P < 0.01$）；与模型组比较，广东神曲各剂量组和乳酸菌素片组小鼠的 GAS、5-HT、SP 水平均有不同程度的上升（$P < 0.01$）。

表 4　各组小鼠血清 GAS、5-HT 及 SP 含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

Tab 4　Serum GAS，5-HT，and SP in mice（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

组别	GAS/（ng·mL^{-1}）	5-HT/（ng·mL^{-1}）	SP/（ng·mL^{-1}）
空白组	45.86±5.24	57.50±12.06	267.53±30.68
模型组	38.17±6.62**	43.31±9.04**	220.98±27.42**
广东神曲低剂量组	45.06±4.14$^{\triangle\triangle}$	57.95±10.43$^{\triangle\triangle}$	250.37±40.37$^{\triangle\triangle}$
广东神曲中剂量组	49.16±9.78$^{\triangle\triangle}$	57.27±6.77$^{\triangle\triangle}$	251.13±23.26$^{\triangle\triangle}$
广东神曲高剂量组	44.69±2.53$^{\triangle\triangle}$	57.42±10.55$^{\triangle\triangle}$	265.40±19.15$^{\triangle\triangle}$
乳酸菌素片组	49.54±5.55$^{\triangle\triangle}$	58.43±7.71$^{\triangle\triangle}$	250.68±30.06$^{\triangle\triangle}$

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

2.2.3　Western blot 法测定 Cx43、BDNF 蛋白表达

取降结肠段 2 ～ 3 cm，用 PBS 液冲洗后，对结肠组织进行组织蛋白提取、BCA 法定量后，按浓缩胶 50 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳；在 300 mA 冰水混合浴中转膜 70 min。将膜浸没在封闭液中室温封闭 1 h。用 5% 脱脂牛奶稀释孵育一抗（β-actin 1∶6000、Cx43 1∶1000、BDNF 1∶2000）和加入稀释 HRP 标记的二抗（1∶50 000 稀释），滴加 ECL 液在暗室中曝光、显影、定影。用 IPWIN60 软件分析，蛋白的相对含量以蛋白灰度值 /β-actin 灰度值表示，结果见图 5。与空白组比较，模型组小鼠结肠中的 Cx43 和 BDNF 蛋白表达均显著降低（$P < 0.01$）；经广东神曲和乳酸菌素片治疗后 Cx43 和 BDNF 蛋白有不同程度的升高，与模型组比较，广东神曲中剂量组和乳酸菌素片组 Cx43 蛋白表达升高（$P < 0.05$），乳酸菌素片组 BDNF 蛋白表达升高（$P < 0.05$），其余组别各项指标变化不显著。

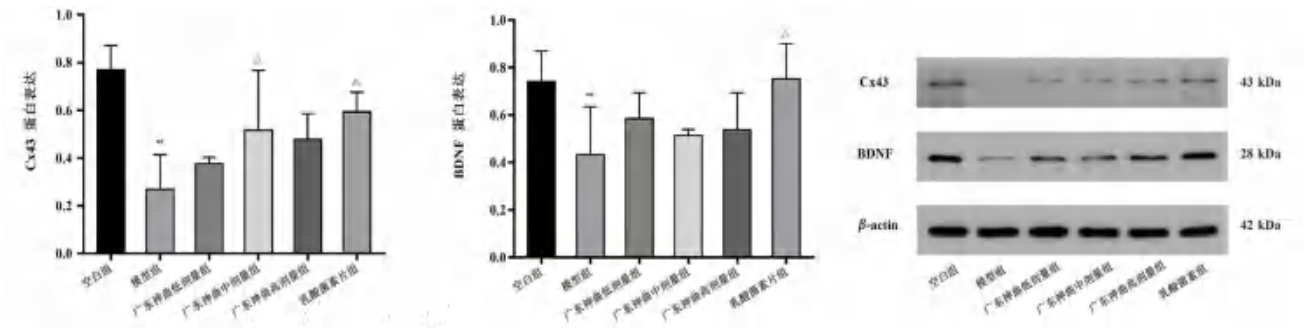


图 5　各组小鼠结肠组织 Cx43、BDNF 蛋白的表达水平

Fig 5　Cx43 and BDNF protein expression in the colon tissue of mice in each group

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$。

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

2.3　统计方法

使用 SPSS 20.0 软件进行数据处理，符合正态分布的计量资料用均值 ± 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　讨论

食积高发于 3 ～ 6 岁儿童，是一种饮食不当停滞于胃脘的胃肠疾病，多表现为纳差、腹胀、便秘 [2]。本研究中食积鼠也出现纳少腹胀，胃肠积气现象，病理切片也证实食积小鼠胃肠黏膜造成损伤，出现组织水肿、炎症细胞浸润等。食积在现代医学中被称为“功能性消化不良”，以消化酶、促胃动力药物治疗为主，存在时效短、服用次数多、影响椎体外系等局限 [10]。广东神曲在山楂、麦芽等传统消食药基础上，加以陈皮、青皮等理气健脾，辅以紫苏叶、荆芥等解表药和泽泻、茯苓等渗湿药，共奏祛风解表，消食化积，解暑化湿之效，作用温和，不良反应少。

调查显示，约 60% 的积滞患者存在情绪敏感、紧张、焦虑等现象 [11]。不良情绪被脑 - 肠轴感知后，交感神经兴奋增强而迷走神经受到抑制，胃肠动力降低，此轴可加速脑肠肽的生成，提高胃肠道的敏感性，以致食积，与情志影响脾胃的中医观点一致 [11]。胃肠激素、胃肠神经肽及神经肽等都是脑肠肽，包括 GAS、胃动素（motilin，MTL）、SP、5-HT、血管活性肠肽（vasoactive intestinal peptide，VIP）、生长抑素（somatostatin，SS）、胆囊收缩素（cholecystokinin，CCK）等 [12-13]。

GAS 是由胃窦细胞和 G 细胞分泌的促进胃酸分泌、胃肠蠕动的脑肠肽，也通过自 / 旁、神经内分泌途径，增加肠黏膜组织营养，促进其增殖 [14-15]。食积者 GAS 水平低于正常人，可引起胃、肠推进减慢，消化道功能紊乱 [16-17]。机体中 90% 的 5-HT 是由肠道中的肠嗜铬细胞合成、分泌并发挥作用的，分布于黏膜下层、肠肌间神经

丛，可使肠道平滑肌收缩，引起胃肠道蠕动，达到消食作用[18]。SP是常见的脑肠肽，主要分布于中枢神经系统及肠神经系统，具有促进胃肠道平滑肌收缩、抑制胃酸分泌、促进胃蛋白酶分泌的作用[19]。本研究表明，广东神曲可上调食积小鼠GAS、5-HT和SP水平，促进胃肠平滑肌运动，调节胃肠动力。同时，广东神曲通过脑-肠轴协调中枢神经系统及肠神经系统，可缓解食积“源头”情志不疏、精神紧张等问题。

此外，Cx43作为胃肠运动功能活动整合协调的主要结构之一，作为肠道网络的重要功能型缝隙连接通道蛋白[20]，Cx43的缺失或减少均可导致胃肠道动力不足[21]。BDNF是一种神经营养因子，在胃体黏膜固有层及胃窦固有层也有表达[22]。研究发现，BDNF可改变胃迷走神经分布和胃内神经肌肉传导，提高肠道动力；可通过调控5-HT、SP等递质来影响肠道运动，还可能具备神经递质的性质，增强胃肠运动功能[23-24]。本研究中，模型组Cx43和BDNF蛋白表达均显著下调，治疗后广东神曲中剂量组和乳酸菌素组Cx43蛋白表达上调，乳酸菌素组BDNF蛋白表达上调，其余组Cx43和BDNF蛋白均有上调趋势但不显著，其原因考虑与广东神曲药效缓和，小鼠的胃肠动力还未完全恢复至正常有关。

综上，广东神曲能够改善胃肠黏膜绒毛损伤、减轻组织水肿、炎性细胞浸润、下调损伤评分，使胃肠逐步恢复正常生理功能；上调脑-肠轴中GAS、5-HT、SP的激素水平和Cx43、BDNF的蛋白表达水平，以促进胃肠平滑肌收缩、抑制胃酸分泌，达到消食化滞作用，且疗效与乳酸菌素片相当。本实验初步探究广东神曲治疗食积与脑肠肽的关联，后续将进一步探索其下游相关神经递质、蛋白涉及的靶点和信号通路等，分析广东神曲对肠道菌群的影响，建立“脑-肠-菌”轴联络网，探究广东神曲治疗食积的作用机制。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部 . 药品标准 - 中药成方制剂（第 19 册）[S]. 1998：26.

[2] 梁昊，曾逸笛，肖晓霞，等 . 食积病证治汇补 [J]. 中国中医基础医学杂志，2018，24（3）：303-304，346.

[3] 徐燕芳，童宝燕，王玉宗，等 . 黄芪香砂六君子汤治疗功能性消化不良临床疗效及其对脑肠肽的影响 [J]. 湖北中医杂志，2022，44（6）：12-15.

[4] 孙静莹，王婷，徐瑶，等 . 焦山楂及其焦香气味协同对食积大鼠消化液及脑肠肽的影响 [J]. 华西药学杂志，2022，37（1）：32-36.

[5] 张春红，刘华，张莹，等 . 健脾消积颗粒对脾胃湿热型功能性消化不良患儿的临床疗效及对脑肠肽水平的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（4）：1031-1036.

[6] 吴晓芳，甘国兴，冯伟勋，等 . 五磨饮对脾虚气滞证功能性消化不良大鼠脑肠肽的影响 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（7）：814-820.

[7] 何云山，谭周进，惠华英 . 食滞胃肠泄泻动物模型制备思路与评价指标 [J]. 湖北中医药大学学报，2020，22（3）：121-125.

[8] Chiu CJ，Mcardle AH，Brown R. Intestinal mucosal lesion in low flow states [J]. Arch Surg，1970，101（4）：478-483.

[9] 仇亚男，沈明勤，林剑军 . 平胃舒胶囊对大鼠胃黏膜损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（11）：202-205.

[10] 张银敏，王明明 . 小儿积滞治疗概述 [J]. 中医药导报，2015，21（9）：92-94.

[11] 邹萌 . 小儿积滞证型与中医体质的相关性研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2021.

[12] 刘秦浪，孙林梅，孙慧，等 . 从脑肠轴探讨功能性便秘伴情绪异常发病机制的研究进展 [J]. 世界中医药，2022，17（4）：579-582，589.

[13] 赵志英，杨志华，霍曼，等 . 基于脑 - 肠轴理论探讨小儿厌食的发病机制 [J]. 中医临床研究，2022，14（4）：60-62.

[14] 林博，韩冉，张万宇，等 . 苓桂术甘汤对老年脾胃气虚型功能型消化不良患者胃蛋白酶原、胃泌素及血液流变学的影响 [J]. 现代生物医学进展，2022，22（10）：1884-1888.

[15] Khajeh S，Tohidkia MR，Aghanejad A，et al. Phage display selection of fully human antibody fragments to inhibit growth-promoting effects of glycine-extended gastrin 17 on human colorectal cancer cells [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol，2018，46（sup2）：1-9.

[16] 卞理，窦志华 . 大黄水提物对食积症模型小鼠胃肠运动及血清胃动素、胃泌素水平的影响 [J]. 甘肃中医药大学学报，2018，35（5）：20-23.

[17] 闫立地，翟祖欢，刘畅，等 . 四磨汤联合金双歧对食积小鼠治疗作用的研究 [J]. 扬州大学学报（农业与生命科学版），2021，42（1）：58-61，67.

[18] 郝晓冬，段志军 . 五羟色胺信号系统与胃肠道疾病的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志，2017，25（19）：1697-1704.

[19] 甄建华，李晓菲，于河，等 . 食积因素对昆明小鼠血清 IgA 及肺脏与结肠组织 SIgA、SP、VIP 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（9）：3862-3865.

[20] 刘佳丽，陈萌，张冬梅，等 . Cx43 在调节胃肠运动障碍机制中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展，2016，16（23）：4577-4581.

[21] 张国山 . 从 ICC 超微结构及其细胞内、外 Ca^{2+} 的变化研究电针足三里对 FD 大鼠胃肠动力障碍的调节机制 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2015

[22] 王东伟，吴捷 . 脑肠肽与儿童功能性消化不良相关性研究进展 [J]. 中国实用儿科杂志，2021，36（1）：70-74.

[23] 刘婷，马靖，孙月婷，等 . 基于 BDNF/TrkB 信号通路探讨徐氏醒脾开胃方治疗餐后不适综合征湿浊中阻证的作用机制 [J]. 时珍国医国药，2022，33（4）：907-909.

[24] 贺建祯 . 胃肠积热大鼠肠道物理特性及其生物学机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-06）

桃红四物汤通过上调 FTH1 抑制铁死亡治疗子宫异常出血

黄荣[1, 2]，张艳艳[1]，刘晓闯[1*]，程瑶[1, 2]，张明媚[1, 2]，刘剑桥[1, 2]，刘睿[1, 2]（1. 安徽中医药大学第一附属医院，合肥 230031；2. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012）

摘要：目的 考察桃红四物汤通过调节 FTH1 调控铁死亡对子宫异常出血大鼠的影响。**方法** 雌性大鼠随机分为怀孕组，药物流产组，桃红四物汤高（18 g•kg^{-1}）、中（9 g•kg^{-1}）、低（4.5 g•kg^{-1}）剂量组与益母草颗粒组（4.5 g•kg^{-1}）。采用药物不完全流产法复制大鼠子宫异常出血模型，记录大鼠子宫异常出血量；HE 染色法进行大鼠子宫组织病理研究；透射电镜观察子宫组织线粒体形态；免疫组织化学检测子宫组织铁蛋白水平；蛋白质印迹法检测大鼠子宫组织中转铁蛋白受体 1（TfR1）、铁蛋白重链（FTH1）表达水平；酶联免疫吸附法及生化检测法检测大鼠子宫内膜组织中活性氧（ROS）、还原型谷胱甘肽（GSH）和 Fe^{2+}的含量。**结果** 与怀孕组相比，药物流产组大鼠子宫出血量及出血时间显著升高，子宫组织病理损伤严重，大鼠子宫内膜组织中出现线粒体皱缩、嵴减少、膜密度增加等铁死亡特征，TfR1 蛋白表达水平显著升高，FTH1 蛋白表达水平显著降低，ROS 和 Fe^{2+}含量显著增加（$P < 0.05$）。桃红四物汤干预后，与药物流产组相比大鼠子宫出血量及出血时间显著缩短，子宫组织病理损伤及线粒体形态显著改善，TfR1 蛋白表达水平显著降低，FTH1 蛋白表达水平显著升高，ROS 和 Fe^{2+}含量显著降低（$P < 0.05$）。**结论** 桃红四物汤能够有效减少 SD 大鼠子宫异常出血，发挥抗氧化作用；其作用机制可能与上调 FTH1，调控铁代谢有关。

关键词：桃红四物汤；子宫异常出血；铁死亡；铁代谢；线粒体

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2275-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.002

Effect of Taohong Siwu decoction against abnormal uterine bleeding in rats by inhibiting ferroptosis via up-regulating FTH1

HUANG Rong[1, 2], ZHANG Yan-yan[1], LIU Xiao-chuang[1*], CHENG Yao[1, 2], ZHANG Ming-mei[1, 2], LIU Jian-qiao[1, 2], LIU Rui[1, 2] (1. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230031; 2. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of Taohong Siwu decoction (TSD) on abnormal uterine bleeding (AUB) in rats by inhibiting ferroptosis. **Methods** Female rats were randomly divided into a pregnant group, a medical abortion group, a TSD high-dose group (18 g • kg^{-1}), a TSD medium-dose group (9 g • kg^{-1}), a TSD low-dose group (4.5 g • kg^{-1}) and a leonurus granule group (4.5 g • kg^{-1}). The rat model of AUB was established with incomplete medical abortion. The duration and quantity of AUB were recorded. The uterine tissue of rat was pathologically assessed by hematoxylin-eosin (HE). The mitochondrial morphology of the uterine tissue was observed by transmission electron microscopy. The level of ferritin was detected by immunohistochemistry. The expression levels of transferrin receptor 1 (TfR1) and ferritin heavy chain 1 (FTH1) in the rat uterus were detected by Western blot. The content of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and Fe^{2+} in the rat endometrial tissue was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and biochemical detection. **Results** Compared with the pregnancy group, the duration and quantity of AUB in the medical abortion rats were significantly increased. The rat uterine in the medical abortion group was injured histopathologically.

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104513）；中药复方安徽省重点实验室项目（No.2019AKLCMF02）。

作者简介：黄荣，女，在读硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：hr12142022@163.com *通信作者：刘晓闯，男，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事中药制剂和药理学研究，email：zyyxcliu@ahtcm.edu.cn

Mitochondrial shrinkage, cristae reduction, and membrane density increased and other ferroptosis characteristics were observed in the rat endometrial tissue. The level of TfR1 protein expression was increased, but FTH1 protein expression level was decreased. The level of ROS and Fe^{2+} content was significantly increased in the medical abortion group ($P < 0.05$). After the TSD intervention, compared with the medical abortion group, the duration and quantity of AUB were significantly decreased. The uterine histopathological and mitochondrial morphology was significantly improved. The level of TfR1 protein expression was decreased, while FTH1 protein expression was significantly increased ($P < 0.05$). The level of ROS and Fe^{2+} content was significantly decreased. **Conclusion** TSD can effectively reduce the AUB in rats and exert its antioxidant effect. The mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis by up-regulating FTH1.

Key words: Taohong Siwu decoction; abnormal uterine bleeding; ferroptosis; iron metabolism; mitochondria

近年来，药物流产是终止妊娠反应较为有效的措施，且安全方便[1]。有关报道称，米非司酮配伍米索前列醇是经典的药物流产药，完全流产率可达 90% ～ 95%[2]。其中前者通过竞争性结合孕激素抗体（PR）、拮抗孕酮（P）活性，并诱导绒毛蜕膜细胞凋亡，而后者可兴奋子宫肌层，促进宫颈松弛扩张，两者结合可促进绒毛蜕膜细胞凋亡、出血、剥脱，继而激活节律性宫缩，促进宫颈扩张软化而终止妊娠[3]。然而，药物流产尚存在流产不完全，从而导致子宫异常出血或诱发盆颈炎等问题[4]。药物流产引起的子宫异常出血发生机制极其复杂，目前临床上的药物治疗效果并不十分理想[5]。因此，探寻子宫异常出血的发生机制，并进一步研发治疗子宫异常出血的药物仍是当前亟需解决的问题。

铁死亡是近年来发现的一种新型的细胞死亡方式[6]，其主要的形态特征是线粒体皱缩，嵴消失，膜密度增加[7]。当细胞内铁代谢平衡失调，铁通过芬顿反应会产生大量的活性氧（ROS），从而诱发铁死亡。铁对生物体的生存是必不可少的，然而细胞中的游离铁水平必须受到严格的控制。转铁蛋白受体 1（TfR1）和铁蛋白都是调节细胞内铁水平因子。TfR1 是一种跨膜糖蛋白，主要介导将细胞外铁离子从细胞外运到细胞内，调控细胞内铁离子平衡。铁蛋白主要功能为储存、吸收与释放铁离子[8]。铁蛋白中最主要的是铁蛋白重链（FTH1），可催化储存铁，具有强力的铁氧化酶活性，可催化亚铁离子[9]。有研究表明，铁死亡发生在多种子宫疾病中，与子宫内膜癌和子宫内膜异位症都有关[10]。因此，靶向铁死亡已经逐渐成为减轻子宫疾病的一个重要手段。研究表明，抑制铁水平的升高可增强子宫内膜对铁死亡的抵抗能力[11]。在子宫异常出血中，仍未有足够的证据表明铁水平变化可以通过调节铁死亡来发挥子宫异常出血保护作用，因此 FTH1 途径在调节子宫异常出血中的作用仍有待研究。

桃红四物汤（TSD）是中医活血化瘀的经典方剂，由白芍、熟地黄、当归、川芎、桃仁和红花六味药组成，具有养血、活血、化瘀的作用[12]。桃红四物汤被广泛用于治疗产后血瘀证和虚证所致的妇女疾病，现代药理研究表明其还具有调节抗氧化和抗炎活性的功能[13]。在子宫异常出血中，桃红四物汤能否通过调节铁代谢和抵抗脂质氧化发挥对铁死亡的抑制作用尚未见报道。因此，本实验研究桃红四物汤通过调节 FTH1 来调控铁死亡对大鼠子宫异常出血的影响，并对其作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物

健康雌性 SD 大鼠 60 只（SPF 级），8 周龄，体重（240±20）g [济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK（lu）2019-0003]，在适宜湿度、22 ～ 24 ℃环境中饲养。本研究通过安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核批准，伦理审查批号 2022047。

1.2 试药与仪器

熟地黄（批号：2202173，河南）、白芍（批号：2202101，安徽）、川芎（批号：2101211，四川）、红花（批号：2205073，新疆）、当归（批号：200702，甘肃）、桃仁（批号：201113，河北）均购自安徽普仁中药饮片有限公司，经安徽中医药大学第一附属医院韩燕全主任中药师分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、菊科植物红花

Carthamus tinctorius L. 的干燥花、伞形科植物当归 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根、蔷薇科植物桃 *Purnus persica*（L.）Batsch 的干燥成熟种子；米非司酮（武汉九珑人福药业有限责任公司，规格：25 mg/ 盒，批号：39211107）；米索前列醇（华润紫竹药业有限公司，规格：0.2 mg/ 片，批号：43201205）；益母草颗粒（株洲千金药业股份有限公司，规格：14 g/ 袋，批号：20210113）；75% 乙醇（河南华阳药业有限公司）；抗体 TfR1（ab269513）、FTH1（ab75973）、GAPDH 抗体（英国 Abcam）；ROS 试剂盒（上海碧云天）；还原型谷胱甘肽（GSH）试剂盒（南京建成生物工程研究院）；组织铁试剂盒（日本 DOJinDo）。

RT-6100 酶标分析仪（深圳雷杜有限公司），GL-88B 漩涡混合器（海门其林贝尔仪器制造公司），DK-420 电热恒温水槽（上海三发科学仪器有限公司），CytoFLEX 流式细胞仪（BECKMAN），JW3021HR 离心机（安徽嘉文有限公司），紫外可见分光光度计（UV-1800，上海菁华科技仪器有限公司），EPS300 电泳仪（上海天能科技有限公司），JS-M6P 自动曝光仪（上海培清科技有限公司）。

2 方法

2.1 桃红四物汤的制备

取桃仁 150 g、红花 100 g、熟地黄 200 g、白芍 150 g、当归 150 g、川芎 100 g，加入 10 倍量总药材质量的 75% 乙醇回流提取 2 h，滤过，滤渣用 8 倍量 75% 乙醇继续回流提取 2 h，合并两次滤液，旋转蒸发浓缩至 470 mL，得高剂量含生药量 1.8 g·mL^{-1} 煎剂，并用蒸馏水稀释得中剂量含生药量 0.9 g·mL^{-1} 以及低剂量含生药量 0.45 g·mL^{-1} 的药液。

2.2 造模及给药

SD 大鼠雌性 60 只，雄性 30 只，2∶1 夜间合笼。清晨采用阴道涂片观察精子。发现精子记为妊娠第 1 日，将怀孕雌鼠随机分为怀孕组，药物流产组，桃红四物汤低、中、高剂量组（4.5、9、18 g·kg^{-1}），益母草颗粒组（4.5 g·kg^{-1}），每组 10 只。妊娠第 7 日早上灌胃给予米非司酮（8.3 mg·kg^{-1}）、晚上灌胃给予米索前列醇（100 μg·kg^{-1}），在大鼠阴道内塞入棉球（85 ～ 90 mg），当棉球上出现血迹时，即判断大鼠不完全流产模型复制成功，连续收集出血棉球至第 14 日，将出血棉球于－ 20 ℃保存。自第 8 日起，怀孕组、药物流产组给予等量生理盐水；桃红四物汤低、中、高剂量组（4.5、9、18 g·kg^{-1}）以及益母草颗粒组（4.5 g·kg^{-1}），连续给药 7 d。

2.3 样本采集

在灌胃给药第 6 日后，所有大鼠禁食 12 h，于第 7 日给药 1 h 后，大鼠腹主动脉麻醉，剖腹取子宫，左侧 4% 多聚甲醛固定，右侧置于液氮速冻后转移至－ 80 ℃冰箱保存。

2.4 子宫指数、出血时间及出血量检测

精密称取子宫湿重和大鼠体重，按如下公式计算子宫指数：子宫指数＝子宫湿重（mg）/ 大鼠体重（g）。记录大鼠模型复制成功开始至子宫出血完全停止的情况，统计子宫出血持续的时间。采用 Alkaline Hematin Photometric 法测定子宫出血量。

2.5 子宫病理组织观察

选取左侧子宫，切取大鼠子宫组织，自上 1/3 处向下取子宫组织中段约 1 cm 大小子宫组织 1 块，4% 多聚甲醛固定 48 h，放置到 4% 多聚甲醛中固定，然后依次常规行脱水包埋、切片烤片、脱蜡、染色（苏木素 - 伊红）、脱水封片等，显微镜下观察子宫组织的病理变化。

2.6 透射电镜观察线粒体形态

取子宫组织切成约 1 mm×1 mm×1 mm 组织块，使用戊二醛固定，用梯度浓度的乙醇进行脱水处理，用环氧树脂包埋组织块，将包埋后的组织块置 40 ℃的烘箱中，12 h 后将烘箱温度调至 60 ℃，继续放置 48 h，然后进行切片、染色。最后使用透射电镜观察线粒体形态，拍照并采集图像。

2.7 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡至水，1% 柠檬酸钠抗原修复，3%H_2O_2 室温孵育 5 ～ 10 min，PBS 清洗，5 min×3 次，封闭液封闭 30 min，置兔多抗 FTH1（ab75973）4 ℃ 孵育过夜，PBS 清洗，5 min×3 次。滴加山羊抗兔（ZB-2301），37 ℃孵育 1 h，PBS 清洗，5 min×3 次。苏木素复染，封片。避光 4 ～ 5 min 即可拍片。

2.8 ROS 和 GSH 含量的测定

用镊子取出子宫组织块，与预冷的生理盐水混合制成 10% 组织匀浆，离心 10 min 后取上清液待测。检测时按照试剂盒说明书配制工作液，按顺序加入相应的工作液和待测样品，混合后的样品离心后分别在 525、405 nm 处检测 ROS、GSH 的吸光度值，并根据试剂盒说明书提供的公式计算 ROS、GSH 的含量。

2.9 Fe^{2+} 含量的测定

取“2.8”项下上清液，按照试剂盒说明书中的比例加入工作液，使得子宫内膜组织中 Fe^{2+} 的与双吡啶结合形成粉红色的络合物，Fe^{2+} 含量与颜色的深浅成正比。在 520 nm 处检测 Fe^{2+} 的吸光度值，并根据试剂盒说明书提供的公式计算 Fe^{2+} 含量。

2.10 Western blot 法检测蛋白表达

用蛋白质印迹法测定大鼠子宫组织内膜中铁死亡相关蛋白质转铁蛋白受体 TfR1、FTH1 的表达。取子宫内膜组织将其制成组织匀浆，离心 30 min 后取上清液待测。样品经凝胶电泳、转膜、封闭后，置于 TfR1（1∶2 000）、FTH1（1∶1000）、GAPDH（1∶2000）一抗中孵育过夜，随后在二抗中孵育 2 h，最后与显影液充分接触，并采用凝胶成像系统采集条带图像，进行灰度扫描、分析。

2.11 统计方法

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间两两比较采用单因素方差分析（Student-Newman-Keuls 检验），$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 桃红四物汤对子宫异常出血指数、出血时间和出血量的影响

如图 1 所示，与怀孕组相比，药物流产组大鼠子宫指数显著下降，出血时间延长，出血量增加。与药物流产组相比，桃红四物汤和益母草颗粒治疗组显著缩短了出血时间和子宫出血量，结果表明桃红四物汤和益母草颗粒显著降低子宫异常出血症状。

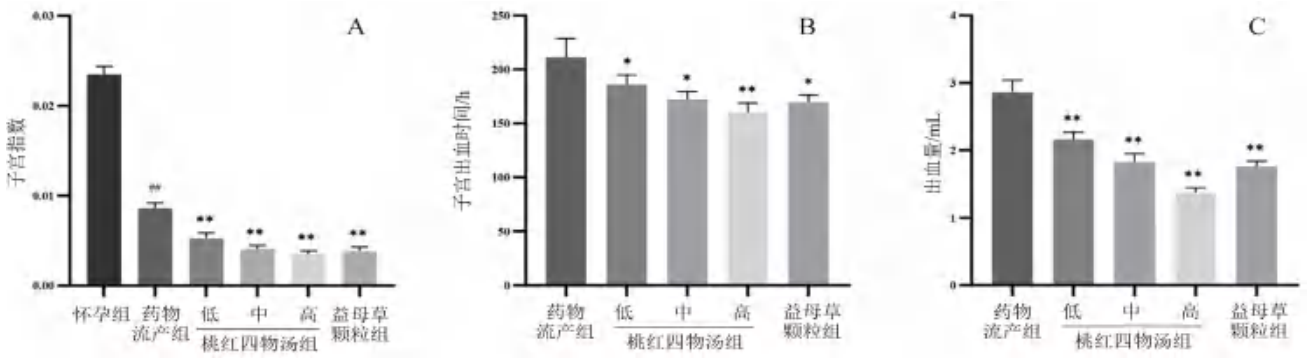


图 1 桃红四物汤对子宫指数（A），子宫出血时间（B）和出血量（C）的影响

Fig 1 Effect of Taohong Siwu decoction on the uterine index（A），the duration of abnormal uterine bleeding（B）and the amount of uterine bleeding（C）in rats

注：与怀孕组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与药物流产组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2 桃红四物汤对子宫组织肉眼形态及子宫内膜病理组织学影响

如图 2 所示，在怀孕组中，发现胚胎的子宫呈玫瑰色结节增大，周围血供丰富，大鼠子宫内膜组织和细胞膜、细胞核结构完整，排列整齐，均未见炎性细胞。药物流产组子宫内膜损伤严重，出现暗红色残留和瘀血，细胞排列不规则且细胞肿胀变形，可见较多炎性细胞，以及蜕膜细胞脱落；桃红四物汤组和益母草颗粒组子宫内膜损伤明显缓解，周围少量充血和瘀斑，且炎性细胞显著减少。

3.3 桃红四物汤对子宫内膜组织中线粒体形态的影响

如图 3 所示，怀孕组大鼠子宫内膜中的线粒体形状规则，轮廓清晰；药物流产组子宫内膜中的线粒体皱缩，嵴减少，膜密度增加，呈典型的铁死亡特征；使用桃红四物汤给药后，线粒体皱缩的情况得到改善，嵴明显增加。

3.4 桃红四物汤上调子宫内膜组织中 FTH1 的表达

蛋白质印迹法结果表明，与怀孕组相比，药物流产组大鼠子宫内膜组织中 FTH1 蛋白表达水平显著降低；使用不同剂量的桃红四物汤给药后，大鼠子宫内膜组织中 FTH1 蛋白表达水平相较于药物流产组显著升高。其免疫组织化学结果也与其一致，详见图 4。

3.5 桃红四物汤对大鼠子宫内膜组织中的 ROS、GSH 和 Fe^{2+}含量的影响

如图 5 所示，相较于怀孕组，药物流产组大鼠子宫内膜组织中 ROS 和 Fe^{2+}的含量显著升高，GSH 的含量则显著降低；使用不同浓度桃红四物汤处理后，与药物流产组相比，ROS、Fe^{2+}的含量显著降低，GSH 的含量则显著升高。

3.6 桃红四物汤对子宫内膜组织中铁死亡相关蛋白表达的影响

如图 6 所示，相较于怀孕组，药物流产组大鼠子宫内膜组织中 TfR1 蛋白表达水平显著升高；使用不同剂量桃红四物汤给药后，与药物流产组相比，TfR1 蛋白表达水平则显著降低。

4 讨论

近年来，子宫异常出血在临床上的发病率逐年升高，其严重的致死率已经给社会造成了极大的影响[14]。米非司酮引起的不完全流产是药物流产常见的不良反应，会导致瘀血内停，妊娠物留在子宫内，延缓子宫内膜的修复[15]。根据国际妇产科联合会的分类标准，诱发子宫异常出血的原因主要分为息肉、

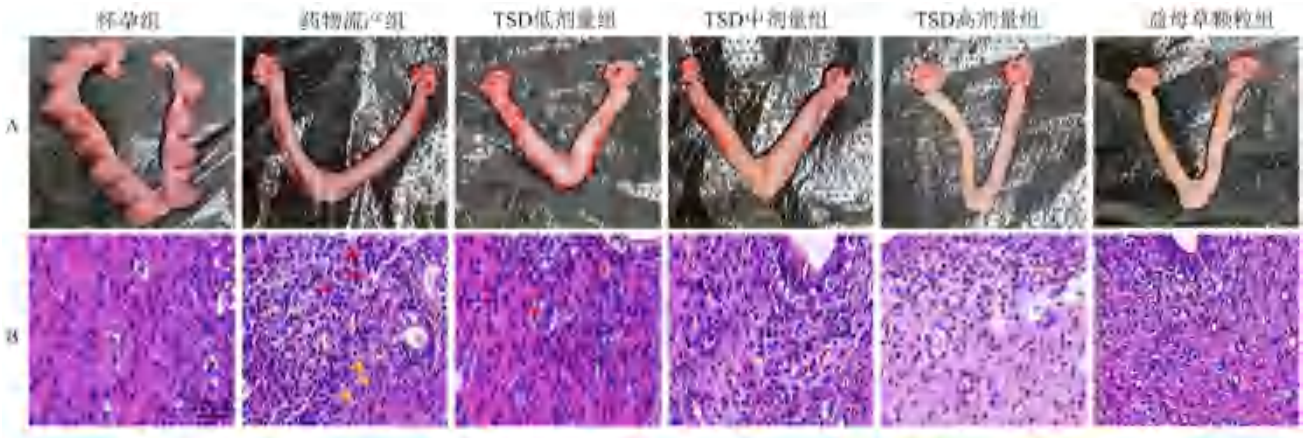


图 2　桃红四物汤对子宫内膜肉眼形态（A）及子宫病理组织（B）的影响（HE，×400）

Fig 2　Effect of Taohong Siwu decoction on gross morphology（A）of the endometrium and pathological tissue（B）of the uterus（HE，×400）

注（Note）：黄色箭头代表炎性细胞；红色箭头代表蜕膜细胞（Yellow arrows indicate infiltration of inflammatory cells；red arrows indicate necrotic decidual cells）。

图 3　桃红四物汤对大鼠子宫内膜线粒体的保护作用（×20）

Fig 3　Protective effect of Taohong Siwu decoction on the rat endometrial mitochondria in rats（×20）

注（Note）：红色箭头指向线粒体（The red arrow points to the mitochondria）。

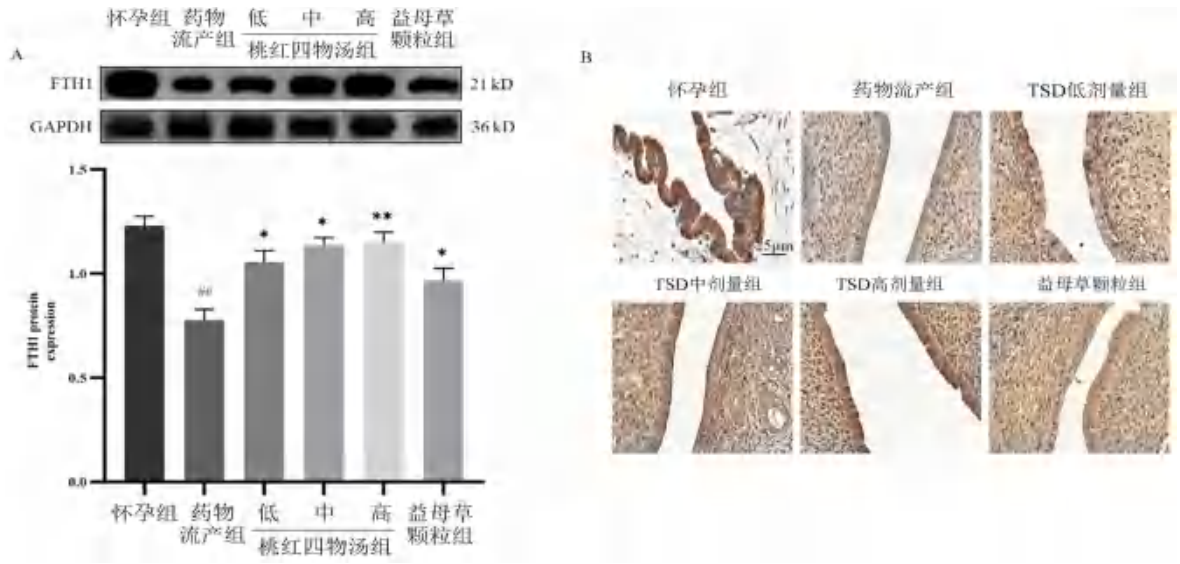


图 4　桃红四物汤对 FTH1 蛋白表达水平及免疫组化的影响

Fig 4　Effect of Taohong Siwu decoction on the expression level of FTH1 protein and histoimmunogical results

注：与怀孕组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与药物流产组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

子宫腺肌症、平滑肌瘤、恶性肿瘤、凝血功能障碍、子宫内膜、医疗性及其他。涉及的病理机制主要有子宫内膜细胞凋亡、炎症、缺氧、组织分解等[16]。可见，炎症亦可导致子宫内膜出血。研究发现，在大鼠子宫内膜中确有炎性细胞浸润的现象，我们推测大鼠子宫异常出血可能与炎症细胞浸润进而激活基质金属蛋白酶，诱发子宫内膜破裂有关。

桃红四物汤具有较好的养血调经、祛瘀生新的作用。现代药效学研究表明[17]，桃红四物汤具有雌激素样作用，可抑制炎症及缓解疼痛，加速

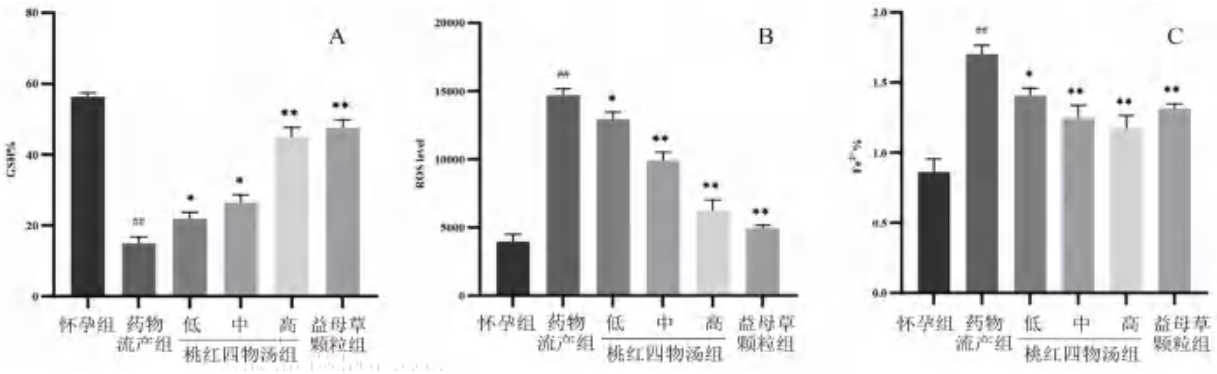


图 5 桃红四物汤逆转药物流产对子宫异常出血大鼠子宫 ROS（A）、GSH（B）、Fe^{2+}（C）水平的影响

Fig 5 Effect of Taohong Siwu decoction on the levels of ROS (A), GSH (B) and Fe^{2+} (C) in the uterus of rats with abnormal uterine bleeding

注：与怀孕组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与药物流产组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

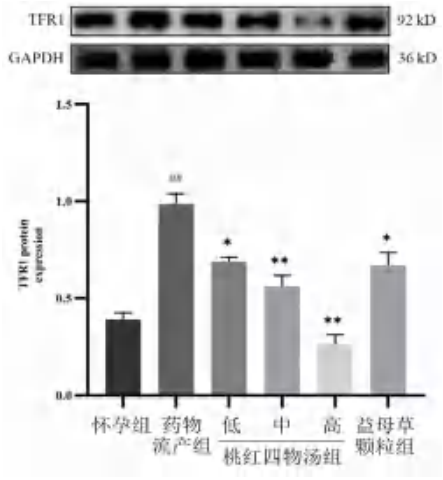


图 6 桃红四物汤对子宫内膜铁死亡相关蛋白质表达的影响

Fig 6 Effect of Taohong Siwu decoction on the protein expression related to ferroptosis in the endometrium

注：与怀孕组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与药物流产组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

子宫内膜剥脱；提高凝血作用，改善局部微循环，有利于流产后子宫内膜的恢复[18]。其中，血管内皮生长因子具有调控血管生成的作用，病理情况下，可促进微血管扩张，增加血管通透性，引起子宫内膜血管过度增生，导致子宫异常出血，桃红四物汤具有改善血管内皮生长因子功能[19]。

益母草颗粒与桃红四物汤作用相似，是临床治疗子宫异常出血的一线药物，因此本文选择益母草颗粒作为阳性对照。在本研究中，经药物流产后，子宫指数降低，血管通透性增加，子宫出血时间和出血量较怀孕组显著增加，可诱发机体全身炎性反应和氧化应激反应，释放大量的炎症介质，引起炎症细胞进入子宫内膜，破坏细胞组织，导致蜕膜和绒毛的降解和坏死[20]；与药物流产组比较，桃红四物汤可使大鼠的子宫出血时间和出血量均显著减少，可促进大鼠子宫内膜修复，使蜕膜细胞和炎性细胞数量均少于药物流产组，这表明桃红四物汤对不完全性流产模型大鼠子宫有保护作用，并能促进子宫内膜修复。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式，实质是细胞内铁超载导致的 ROS 大量蓄积，细胞膜发生脂质过氧化反应，并最终造成细胞死亡[21]。近年来研究表明，脂质过氧化、铁超载、氧化应激等均是导致铁死亡的关键因素[22]。其典型的形态学特征包括线粒体嵴减少或消失、细胞膜皱缩、线粒体膜密度增加等[23]。本研究发现，怀孕组和药物流产组中子宫线粒体皱缩明显，线粒体嵴减少或消失，符合铁死亡线粒体的特征性表现；经桃红四物汤治疗后，线粒体嵴增多，线粒体形态恢复正常。在应激条件下，铁通过与细胞膜上的 TfR1 结合内吞进入胞内，Fe^{3+}在胞内被还原成 Fe^{2+}，Fe^{2+}在胞内的过度累积会通过芬顿反应促进氧自由基、氧化应激产物 ROS 的生成，ROS 的积聚进而导致子宫内膜组织发生铁死亡[24]。同时，在本研究中，经桃红四物汤给药后，大鼠子宫内膜组织中 TfR1 蛋白的表达水平显著下调，Fe^{2+}和 ROS 的含量均明显下降。这可能是 TfR1 蛋白表达降低影响了胞内铁离子的运输能力，进而抑制了大鼠子宫异常出血铁死亡过程中胞内铁离子的过度累积和脂质过氧化物的生成。

铁蛋白是由多个亚基组成的蛋白分子，一个铁蛋白分子中可储存多个铁原子[25]。铁蛋白主要功能是分离和储存细胞内大量多余的亚铁，当细胞处于铁缺乏时，会限制铁蛋白的翻译，进而导致其在细胞内的铁蛋白水平降低；反之，当细胞内铁超载时，铁蛋白的合成会升高，从而能够储存更多的铁，保护细胞免受铁超载的影响。铁蛋白最重要的作用是为细胞提供铁缓冲能力，例如 ROS 生成、蛋白质聚集和铁超载。铁蛋白主要包括 FTH1 和铁轻链蛋白，这两条链对于维持铁的动态平衡和防止铁超载

至关重要[26]。本研究以 FTH1 作为主要研究对象，探究桃红四物汤如何通过靶向 FTH1 调控铁死亡。由研究报道，FTH1 通过 6-羟基多巴胺中的铁蛋白噬体抑制铁死亡治疗帕金森病[27]。本研究发现：经药物流产后 ROS 和 Fe^{2+}含量显著升高，GSH 含量降低，FTH1 蛋白质表达水平降低，TfR1 蛋白表达水平升高，经桃红四物汤治疗后，大鼠子宫内膜组织中的 FTH1 蛋白表达水平显著升高，TfR1 蛋白表达水平显著降低，GSH 含量升高，ROS 和 Fe^{2+}含量显著降低。这些结果表明 FTH1 可能参与桃红四物汤对子宫异常出血大鼠铁死亡的抑制作用。

综上所述，本研究通过动物模型探究桃红四物汤可抑制铁死亡改善子宫异常出血，而调控 FTH1 通路是抗氧化作用的重要机制。本研究为桃红四物汤改善子宫异常出血提供了新的思路和方法。但未在细胞模型上进行研究，后续将从细胞层面进一步验证，进行更深入的机制研究。

参考文献

[1] Fiala C，Danielsson-Gemzell K. Review of medical abortion using mifepristone in combination with a prostaglandin analogue [J]. Contraception，2006，74（1）：66-86.

[2] Kruse B，Poppema S，Creinin MD，et al. Management of side effects and complications in medical abortion [J]. Am J Obstet Gynecol，2000，183（2）：65-75.

[3] Baulieu EE. RU 486（Mifepristone）：a short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996 [J]. Ann N Y Acad Sci，1997，828：47-58.

[4] Livingstone M，Fraser IS. Mechanisms of abnormal uterine bleeding [J]. Hum Reprod Update，2002，8（1）：60-67.

[5] Doraiswami S，Johnson T，Rao S，et al. Study of endometrial pathology in abnormal uterine bleeding [J]. J Obstet Gyn India，2011，61（4）：426-430.

[6] Jiang XJ，Stockwell BR，Conrad M. Ferroptosis：mechanisms，biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2021，22（4）：266-282.

[7] Zhang Y，Sun C，Zhao CX，et al. Ferroptosis inhibitor SRS 16-86 attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury [J]. Brain Res，2019，1706（3）：48-57.

[8] Park E，Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation [J]. Cell Death Dis，2019，10：822-832.

[9] Du J，Wang TT，Li YC，et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin [J]. Free Radical Bio Med，2019，131：356-369.

[10] Dou Y，Kawaler EA，Zhou DC，et al. Proteogenomic characterization of endometrial carcinoma [J]. Cell，2020，180（4）：729-748.

[11] Kong N，Chen XY，Feng J，et al. Baicalin induces ferroptosis in bladder cancer cells by downregulating FTH1 [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（12）：4045-4054.

[12] Ma Q，Li PL，Hua YL，et al. Effects of tao-hong-si-wu decoction on acute blood stasis in rats based on a LC-Q/TOF-MS metabolomics and network approach [J]. Biomed Chromatogr，2018，32（4）：e4144.

[13] Xia WW，Hu SS，Wang MM，et al. Exploration of the potential mechanism of the tao hong si wu decoction for the treatment of postpartum blood stasis based on network pharmacology and in vivo experimental verification [J]. J Ethnopharmacol，2021，268：113641.

[14] Marnach ML，Laughlin-Tommaso SK. Evaluation and management of abnormal uterine bleeding [J]. Mayo Clin Proc，2019，94（2）：326-335.

[15] Wang XZ，Wang T，Wang YZ，et al. Research progress on classical traditional chinese medicine Taohong Siwu decoction in the treatment of coronary heart disease [J]. Biomed Pharmacother，2022，152：113249.

[16] Jain V，Chodankar R，Maybin J，et al. Uterine bleeding：how understanding endometrial physiology underpins menstrual health [J]. Nat Rev Endocrinol，2022，18（5）：290-308.

[17] 贵刚，陈文培，黄浩欣，等 . 妇血安片对药物流产不全致子宫出血大鼠的作用及其机制 [J]. 中药材，2015，38（11）：2381-2385.

[18] 王继陈，韩岚，张艳艳，等 . 桃红四物汤调节不完全流产大鼠子宫组织氧化应激诱导的细胞凋亡作用研究 [J]. 中南药学，2019，17（3）：409-414.

[19] Adini A，Adini I，Chi ZL，et al. A novel strategy to enhance angio-genesis in vivo using the small VEGF-binding peptide PRIP [J]. Angiogenesis，2017，20（3）：399-408.

[20] Shao CL，Cui GH，Guo HD. Effects and mechanisms of Taohong Siwu decoction on the prevention and treatment of myocardial injury [J]. Front Pharmacal，2022，13：816347.

[21] Zhang YY，Zuo CJ，Han L，et al. Uterine metabolomics reveals protection of Taohong Siwu decoction against abnormal uterine bleeding [J]. Front Pharmacol，2020，11：507113.

[22] Kagan VE，Mao G，Qu F，et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis [J]. Nat Chem Biol，2017，13（1）：81-90.

[23] Jiang X，Stockwell BR，Conrad M. Ferroptosis：mechanisms，biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2021，22（4）：266-282.

[24] Tang D，Kang R，Livesey KM，et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy [J]. J Cell Biol，2010，190（5）：881-892.

[25] Masaldan S，Clatworthy SAS，Gamell C，et al. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis [J]. Redox Biol，2018，14：100-115.

[26] Hou W，Xie YC，Song XX，et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. Autophagy，2016，12（8）：1425-1428.

[27] Tian Y，Lu J，Hao XQ，et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of Parkinson's disease [J]. Neurotherapeutics，2020，17（4）：1796-1812.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-20）

不同产品转移因子对免疫功能低下小鼠免疫功能的调控及多肽图谱分析

古红婷[1]，邝莹[1]，陈垒[1*]，刘涛[2*]（1. 赣南医学院 药学院，江西 赣州 341000；2. 江西赣南海欣药业股份有限公司，江西 赣州 341000）

摘要：目的 研究不同转移因子对环磷酰胺诱导的免疫功能低下小鼠的调控作用，并分析其多肽图谱。**方法** 采用腹腔注射环磷酰胺（50 mg • kg^{-1}）诱导免疫功能低下模型，模型小鼠随机分为正常组、模型组、转移因子卫材组、转移因子海欣组和转移因子精优组。灌胃给药 15 d 后，检测分析小鼠的胸腺 / 脾脏指数，全血白细胞数，血 T 淋巴细胞（CD3$^+$）百分比，淋巴细胞增殖反应和巨噬细胞的吞噬能力。通过 LC-MS/MS 联用技术，对转移因子的多肽图谱进行表征。**结果** 转移因子给药后能有效预防环磷酰胺诱导的脾指数和外周血白细胞数降低，增加血 T 淋巴细胞百分比，提高淋巴细胞的增殖能力和巨噬细胞的吞噬功能。且不同转移因子产品免疫调节功能表现出一定的差异。LC-MS/MS 分析也显示不同产品多肽图谱存在较大差异。**结论** 转移因子能有效改善环磷酰胺损伤小鼠的免疫功能；不同转移因子产品的免疫调节功能和多肽组成存在差异，有必要提升质控方法和标准以保证药品的一致性。

关键词：转移因子；免疫功能；环磷酰胺；多肽成分；LC-MS
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2282-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.003

Regulation of different transfer factors on the immune function in immunocompromised mice and polypeptide profiling

GU Hong-ting[1], KUANG Ying[1], CHEN Lei[1*], LIU Tao[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Gannan Medical Institute, Ganzhou Jiangxi* 341000; 2. *Jiangxi Gannan Haixin Pharmaceutical Co., Ltd., Ganzhou Jiangxi* 341000)

Abstract: Objective To determine the regulation of different transfer factors on the immune function in immunocompromised mice induced by cyclophosphamide (CTX), and related peptide profiling. **Methods** Immunocompromised mice were induced by intraperitoneal injection of CTX (50 mg • kg^{-1}). After intragastric administration for 15 days, thymus/spleen index, peripheral blood leukocyte numbers, T lymphocyte (CD3$^+$) percentage, lymphocyte proliferation and phagocytosis of macrophages were measured. The polypeptide profile was characterized by LC-MS/MS. **Results** After the administration of transfer factors, the decrease in the spleen index and leukocyte count induced by CTX were prevented effectively. The percentage of T lymphocyte was increased, while lymphocytes proliferation and phagocytosis of macrophage were enhanced. Meanwhile, the immunomodulatory function of different products showed certain differences. LC-MS/MS also showed that polypeptide profiles of different products presented significant differences. **Conclusion** Transfer factors can effectively improve the immune function compromised by CTX in mice. Due to the differences in immunomodulatory function and peptide composition of different transfer factors, it is important to improve the quality control and standard to ensure drug consistency.

Key words: transfer factor; immune function; cyclophosphamide; polypeptide component; LC-MS

基金项目：国家自然科学基金地区项目（No. 82160777，No. 82260803）。

作者简介：古红婷，女，硕士研究生，主要从事中药抗炎与免疫药理学工作，email：844018752@qq.com *通信作者：陈垒，男，博士，主要从事中药抗炎与免疫药理学工作，email：kuangsunlight@163.com；刘涛，男，硕士，主要从事免疫学工作，email：lthk2006@126.com

免疫系统具有识别自己和排除异己的功能，从而维持机体内环境的稳定[1]。转移因子（transfer factor，TF）是淋巴细胞分泌的一类多肽类小分子物质，具有提高机体免疫功能的作用。研究发现，外源性的转移因子具有无热原、无抗原性、无毒副作用、无种属差异等优点，是广泛应用的一种免疫增强剂。临床可用于辅助治疗某些抗生素难以控制的病毒性或霉菌性胞内感染，亦可作为恶性肿瘤的辅助治疗[2-4]。

研究表明，转移因子主要由多肽、氨基酸和多核苷酸组成。转移因子对某些蛋白酶和磷酸二酯酶敏感，接触后活性丧失，而对 DNA 酶、RNA 酶表现出耐受[5]。大量研究认为多肽是转移因子中的主要免疫活性成分[6]，作为“信使”转移供体的免疫应答效应，对受体起到“细胞因子”样的免疫调节作用[7]。转移因子成分复杂，相应的免疫调节功能也表现出多样化，对固有免疫应答和适应性免疫应答均表现出调控作用，相关机制仍在不断探讨中[5，8]。转移因子的质量优劣直接影响其临床用药的安全性和有效性，因此相关产品的质量控制也显得尤为重要[9-10]。

环磷酰胺可通过 DNA 烷基化破坏 DNA 合成，从而非特异性杀伤淋巴细胞，抑制机体的免疫应答效应[11-12]。本研究采用小鼠腹腔注射环磷酰胺制备免疫功能低下模型小鼠，通过灌胃转移因子治疗后，检测分析转移因子对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用，并对 3 种不同转移因子产品的免疫活性及多肽组成差异进行分析。

1 材料与方法

1.1 试药

转移因子（批号：20040601，赣南海欣药业；批号：20201004，长春精优药业；批号：F201241，辽宁卫材药业；规格均为 10 mg/10 mL）；环磷酰胺（上海源叶生物科技有限公司）；FITC 标记的抗小鼠 CD3 ＋抗体和 FITC 标记的荧光微球（Thermo Scientific）；刀豆蛋白 A（Concanavalin A，ConA，美国 Sigma 公司）；CCK-8 试剂盒（上海碧云天生物科技有限公司）；胎牛血清和 RPMI-1640 培养基（Gibco 公司）。

1.2 动物与仪器

雄性 SPF 级 BALB/C 小鼠 [20 ～ 25 g，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0004]；EDTA 抗凝管（2 mL，BD 公司）；血液分析仪（DxH 600 Coulter）；流式细胞仪（BD FACS Canto Ⅱ）；全波长多功能酶标仪（ThermoVarioskan Flash）；质谱仪为 Q-Exactive HF X（Thermo Fisher Scientific，San Jose，CA）。

1.3 分组与给药

50 只 BALB/C 小鼠随机分成 5 组（10 只 / 组），即对照组（Control）、模型组（Model）、转移因子辽宁卫材组（WC）、转移因子赣南海欣组（HX）和转移因子长春精优组（JY）。转移因子以 10 mL • kg^{-1} 剂量灌胃给药 15 d。同时在第 9 日时腹腔注射环磷酰胺（50 mg • kg^{-1}）诱导小鼠免疫功能低下，连续注射 3 d。

1.4 免疫器官指数和白细胞数的测定

在给药后第 16 日，称量小鼠体重。用 EDTA 抗凝管，通过摘眼球进行取血，全自动血细胞分析仪检测分析白细胞数。取血完成后，小鼠脱颈椎处死，分离脾脏和胸腺，称重。按以下公式计算脾指数和胸腺指数：脾（胸腺）指数（mg • g^{-1}）＝脾（胸腺）重量 / 体重[11-12]。

1.5 血液 T 淋巴细胞百分比的分析

通过 EDTA 抗凝后，各组小鼠取血 100 μL 加入 2 mL 的 EP 管中，然后加入 CD3-FITC 荧光标记抗体 1 μL，混匀后避光 25 min。抗体孵育结束后加入 2 mL 红细胞裂解液，涡旋混匀，再次避光孵育 10 min，然后 3000 r • min^{-1} 离心 5 min，弃上清液。最后加入 500 μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪分析测定外周血总白细胞中 T 淋巴细胞百分比[11-12]。

1.6 小鼠淋巴细胞增殖能力的检测

小鼠颈椎脱臼处死后，75% 乙醇进行消毒。然后分离脾脏，用注射器内芯轻轻将脾研碎，经 200 目筛网过滤制成单细胞悬液。用细胞计数仪计数脾细胞，调整细胞浓度为 3×10^6 个 • mL^{-1}。将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中，每孔 1 mL，一孔加 50 μL ConA 液（相当于 5 μg•mL^{-1}），另一孔作为对照，然后置细胞培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h，每孔轻轻吸取上清液 100 μL 转移至 96 孔板，同时加入 10 μL CCK-8 溶液，继续培养 4 h。最后在 570 nm 波长下用酶标仪测定光密度值（*OD*）。用加 ConA 孔的 *OD* 值减去不加 ConA 孔的 *OD* 值表示淋巴细胞的增殖能力[11-12]。

1.7 荧光微球吞噬实验检测巨噬细胞吞噬功能

实验结束前 4 日给每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% 绵羊红细胞激活巨噬细胞，实验当日颈椎脱臼处死小鼠，腹腔注射含小牛血清的 Hank’s 液 3 mL/ 只，轻轻按揉腹部，然后将腹壁剪开一个小口，吸取腹腔洗液 2 mL 用 75 μm 筛网过滤

至 EP 管内，调整巨噬细胞数为（4 ～ 6）×10^5 个 • mL^{-1}。然后移液枪吸取 1 mL 腹腔洗液于 6 孔培养板中，加入已经预调理过的荧光微球（1×10^7 个 / 孔），37 ℃二氧化碳细胞培养箱避光孵育 120 min，孵育结束后弃上清液，用 1.0 mL PBS 轻轻洗涤 2 次，去上清液后再加入 4 ℃ PBS 0.3 mL，用细胞刮刮下贴壁细胞，轻轻吹打混匀后经 75 μm 筛网过滤后进行流式细胞仪分析。每份样本采集 5000 个巨噬细胞，吞噬百分率（%）=（吞噬荧光微球的细胞数 / 巨噬细胞总数）×100% [13-14]。

1.8　转移因子多肽图谱分析

样品采用 C18 固相萃取柱纯化后，复溶于含 0.1% 甲酸的 2% 乙腈溶液。高速离心后，通过 UHPLC（UltiMate 3000，Thermo）进行分析。样品首先进入 trap 柱富集并除盐，随后与自装 C18 柱（75 μm 内径，3 μm 柱料粒径，25 μm 柱长）串联。以含 0.1% 甲酸的 2% 乙腈作为流动相 A，以含 0.1% 甲酸的 98% 乙腈作为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 5 min，5%B；5 ～ 45 min，5% ～ 25%B；45 ～ 50 min，25% ～ 35%B；50 ～ 52 min，35% ～ 80%B；52 ～ 54 min，80%B；54 ～ 60 min，5%B），流速为 300 mL • min^{-1}。经液相分离的肽段通过 nanoESI 源离子化后进入到串联质谱仪 Q-Exactive HF X 进行 DDA（Data Dependent Acquisition）模式检测。主要参数设置：离子源电压设置为 1.9 kV；一级质谱扫描范围 350 ～ 1500 *m*/*z*；分辨率设置为 60 000；二级质谱起始 *m*/*z* 固定为 100；分辨率 15 000。二级碎裂的母离子筛选条件为：电荷 2 ＋到 6 ＋，峰强度超过 10 000 的强度排在前 30 的母离子。离子碎裂模式为 HCD，碎片离子在 Orbitrap 中进行检测。

1.9　统计学分析

实验结果以平均值 ± 标准误差（SEM）表示，通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据统计分析，组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett’s 多组比较分析方法，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　不同产品转移因子对小鼠免疫器官和外周血中白细胞总数的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠脾指数明显降低（$P < 0.001$）；而转移因子能在一定程度上增加小鼠的脾指数。赣南海欣组和长春精优组相比模型组，脾指数差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。同时，与对照组比较，模型组小鼠胸腺指数降低，但差别无统计学意义。与模型组比较，3 种转移因子的差异无统计学意义（$P > 0.05$）。此外，与对照组比较，模型组小鼠白细胞数降低，而转移因子能不同程度地提升小鼠外周血中白细胞数。与模型组比较，赣南海欣组和长春精优组小鼠外周血中白细胞数明显升高（$P < 0.05$）。提示转移因子能增加环磷酰胺诱导的小鼠免疫器官指数和白细胞数降低，且赣南海欣组和长春精优组效果更佳。

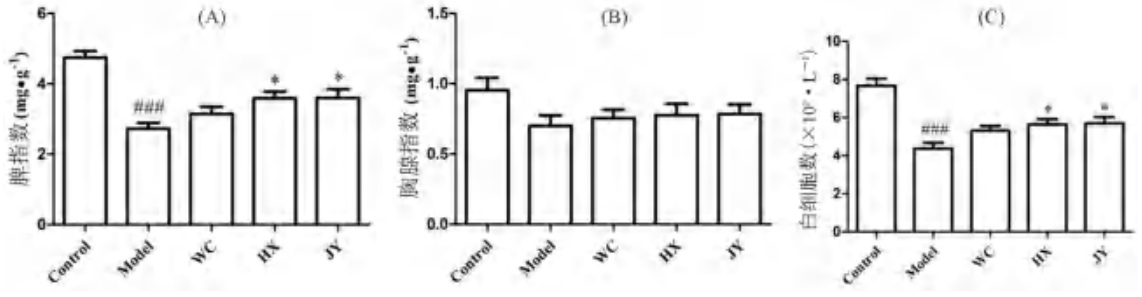


图 1　转移因子对脏器指数和全血白细胞数的影响

Fig 1　Effect of transfer factors on the organ index and whole blood leukocyte count

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

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

2.2　不同产品转移因子对外周血白细胞中 T 淋巴细胞百分率的影响

图 2 结果表明，与对照组比较，模型组小鼠外周血 T 淋巴细胞百分率显著降低（$P < 0.001$）。而给予转移因子后，小鼠 T 淋巴细胞百分率则不同程度的上调。与模型组比较，赣南海欣组和长春精优组 T 淋巴细胞百分率明显升高（$P < 0.05$）。而辽宁卫材组，虽然能上调 T 淋巴细胞百分率，但差异无统计学意义。以上结果表明，转移因子具有上调外周血白细胞中 T 淋巴细胞百分率的作用。

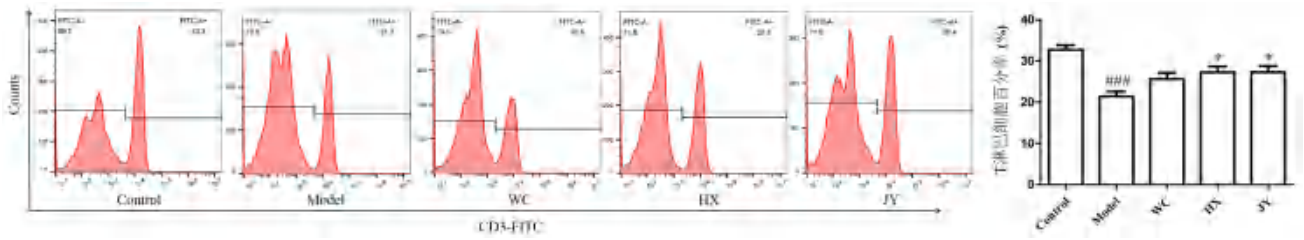


图 2　转移因子对 T 淋巴细胞百分率的影响

Fig 2　Effect of transfer factors on the percentage of T lymphocytes

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

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

2.3　不同产品转移因子对淋巴细胞增殖能力的影响

刀豆蛋白刺激脾淋巴细胞增殖结果显示（见图 3），与对照组比较，模型组小鼠淋巴细胞的增殖能力显著降低（$P < 0.001$）。与模型组比较，赣南海欣组则能增强小鼠脾淋巴细胞的增殖能力（$P < 0.05$）。而辽宁卫材组和长春精优组虽能一定程度地提升脾淋巴细胞增殖能力，但差异无统计学意义。以上结果表明，转移因子具有促进脾淋巴细胞增殖的作用。

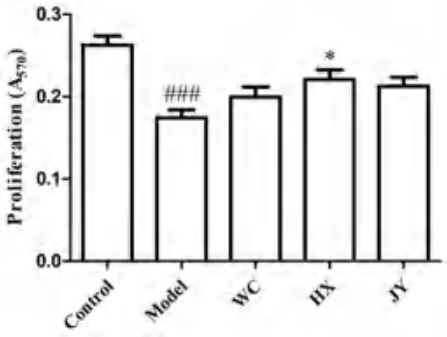


图 3　转移因子对脾淋巴细胞增殖能力的影响

Fig 3　Effect of transfer factors on the proliferation of splenic lymphocytes

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

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

2.4　不同产品转移因子对巨噬细胞吞噬功能的影响

从图 4 可以看出，与对照组相比，环磷酰胺可显著抑制巨噬细胞的吞噬功能（$P < 0.001$），降低其对荧光微球的吞噬。与模型组比较，赣南海欣组和长春精优组巨噬细胞的吞噬能力上调（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；辽宁卫材组虽能提高巨噬细胞的吞噬能力，但差异无统计学意义。以上结果表明转移因子有增强免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能的作用。

2.5　转移因子多肽图谱分析

通过 LC-MS/MS 液质分析，结合多肽数据库检索 [uniprot_pig_filtered.fasta（104924 sequences）]，从辽宁卫材组中鉴定了约 2000 条多肽序列，从赣南海欣组中鉴定了约 2700 条多肽序列，从长春精优组中鉴定了约 4800 条多肽序列。转移因子肽段长度如图 5A 所示，大多数肽段的相对分子量在 1000 ～ 3000，少数相对分子量在 3000 以上。辽宁卫材组相比其他组，肽段较小，主要分布在 8 ～ 16 个氨基酸序列之间。赣南海欣组和长春精优组多肽长度分布较为近似，且肽段较长，主要分布在 10 ～ 18 个氨基酸序列之间。转移因子代表性的 LC-MS 总离子流图如图 5B 所示。

以鉴定的多肽组分作为变量进行主成分分析（PCA），结果如图 5C 所示，多维信息被压缩到二维平面，主成分 1 和主成分 2 分别占到总方差的 45.3% 和 16.7%，每一个散点代表一个转移因子样品。从图 5C 中可以得知，转移因子样品根据多肽组成，被明显地分为 3 个区域，即同一厂家不同批次的转移因子多肽组成基本相似，批间差异较小，具有较强的一致性。而不同厂家的转移因子则在多

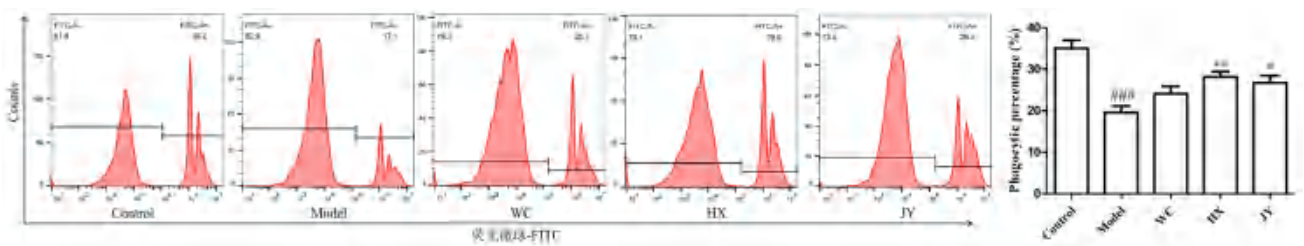


图 4　转移因子对巨噬细胞吞噬能力的影响

Fig 4　Effect of transfer factors on the phagocytosis ability of macrophages

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

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

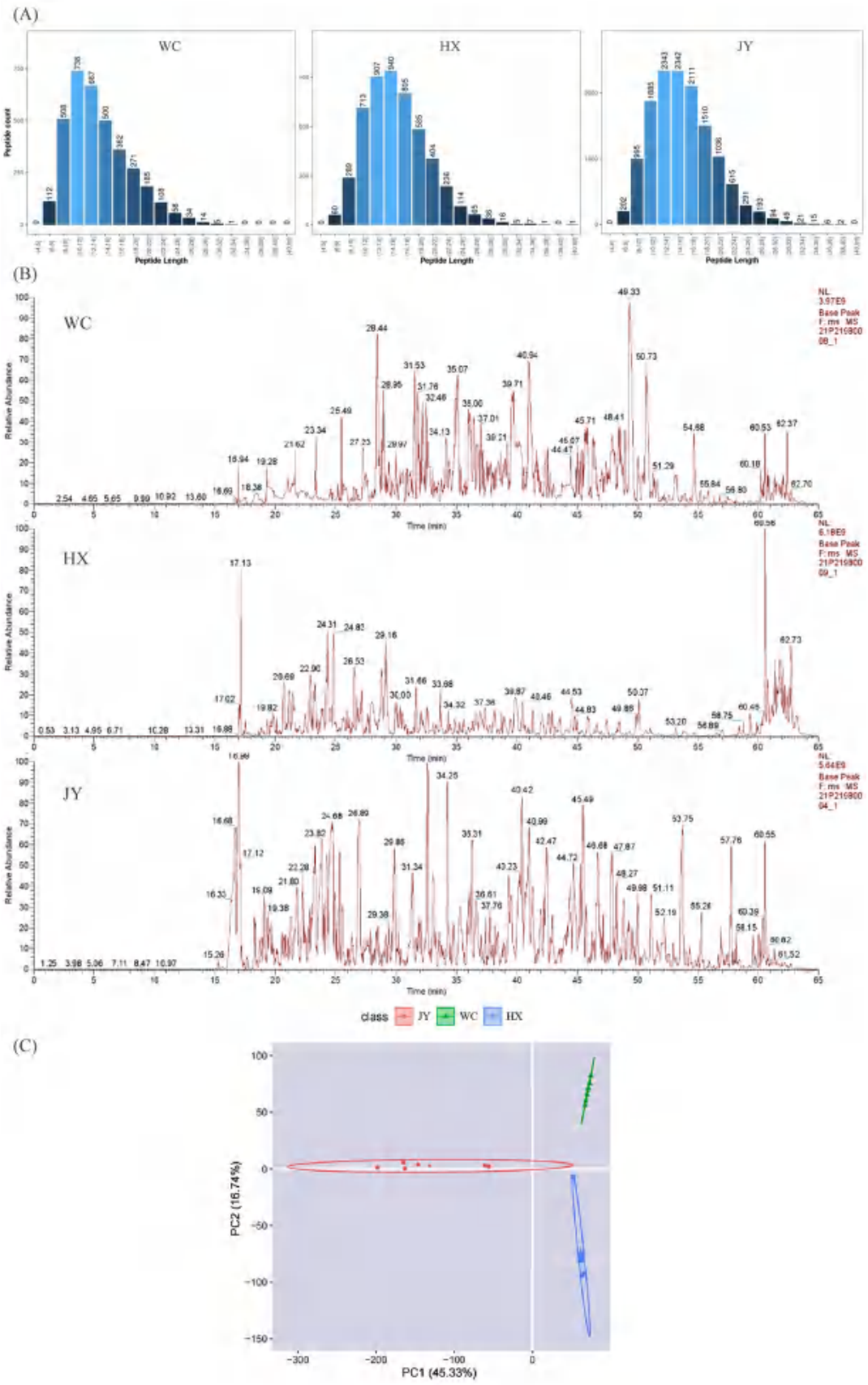


图 5　转移因子多肽图谱分析

Fig 5　Polypeptide profiling of transfer factor

A. 肽段长度分布（distribution of peptide length）；B. 代表性总离子流图（representative total ion current chromatogram）；C. 主成分分析（principal component analysis）

肽组成上存在较大差异。说明通过揭示转移因子的活性成分，提升相应的质量标准，对于转移因子临床用药的安全性和有效性具有重要意义。

3 讨论

免疫系统由免疫器官（骨髓、胸腺、脾脏等），免疫细胞（T 细胞、B 细胞、单核巨噬细胞等）和免疫分子（细胞因子、补体、抗体等）所组成，通过相互作用与配合，执行对外源异物和自身坏死组织的杀灭与清除 [11]。脾脏是机体最大的外周免疫器官，是机体体液免疫和细胞免疫应答场所。胸腺的主要功能是 T 淋巴细胞成熟的场所，执行机体细胞免疫功能 [12]。机体免疫功能受损或被抑制后，常伴随免疫器官质量和免疫细胞数量的下降 [14-15]。因此，免疫器官指数和白细胞数量是衡量机体免疫水平的重要指标 [16]。本研究结果表明，转移因子能显著增加免疫低下模型小鼠的脾脏指数以及白细胞数；增加模型小鼠外周血 T 淋巴细胞百分比，促进淋巴细胞增殖，促进巨噬细胞对荧光微球的吞噬作用。研究显示不同转移因子产品之间免疫活性存在一定的差异，与辽宁卫材组比较，赣南海欣和长春精优组的免疫调节作用较优。造成这一结果的原因可能是制备工艺的不同：赣南海欣是在生理条件下通过反复冻融破碎细胞提取 [17]，辽宁卫材是在酸性条件下通过反复冻融提取 [18]。其次可能也与转移因子的原材料有关，猪脾脏原料的不一致也可能会导致免疫活性差异。

药物成分是药物发挥生物学功能的物质基础。大量研究认为，多肽是转移因子的主要免疫活性成分 [5-6]。因此，本研究通过 LC-MS/MS，对转移因子中的多肽成分进行分析。从样品中采集到了大量的质谱信息，并通过数据库检索，对其中部分多肽序列进行了表征和鉴定。结果表明，转移因子是一个极其复杂的混合体系，含有大量的多肽成分。对比转移因子的化学轮廓，我们发现不同产品的转移因子其多肽组成存在较大的差异，这可能是造成免疫活性差异的直接原因。本研究通过 LC-MS/MS，建立了转移因子的化学轮廓，并通过数据库检索，阐明了转移因子的部分多肽组成，揭示了不同转移因子产品多肽组成存在较大的差异。

目前市场主要通过福林酚法和地衣酚法对转移因子的质量进行监控，方法受辅料添加物干扰大，专属性不强 [9-10]。且尽管总多肽和总核糖结果保持一致，但是无法对有效成分进行具体的含量测定。因此，阐明转移因子确切的活性多肽成分，并以此开发建立新的质量评价体系对于转移因子的质量控制具有重要意义。

参考文献

[1] 周光炎 . 免疫学原理 [M]. 北京：科学出版社，2013：10-54.

[2] Oliveira GCR，Di NF，Couto RM，et al. Use of transfer factor in immunosuppressed surgical patients [J]. Rev Col Bras Cir，2017，44（5）：452-456.

[3] 康丽，唐云丽，雷超兰 . 转移因子口服液联合阿奇霉素序贯疗法治疗肺炎支原体肺炎患儿及对肺泡灌洗液 MPO，GM-CSF 的影响 [J]. 临床和实验医学杂志，2021，20（11）：1174-1178.

[4] Tang ZL，Ruan JL，Cai SQ. Transfer factor for the treatment of necrobiotic xanthogranuloma [J]. Dermatol Ther，2022，35（12）：e15894.

[5] Macias AE，E Guaní-Guerra. Transfer factor：myths and facts [J]. Arch Med Res，2020，51（7）：1-10.

[6] 黄迪海，盛晓丹，刘霞，等 . 兽用鸡源和猪源转移因子与免疫活性相关的多肽分析 [J]. 中国兽药杂志，2022，56（5）：10-19.

[7] 李晓梅 . 转移因子研究现状 [J]. 家禽科学，2018，286（8）：57-59.

[8] Kempová V，Zaoviová M，Kajanová I，et al. Obstacles and limitations of transfer factor biological activity assay design [J]. Acta Virologica，2020，64（3）：271-275.

[9] 于妮娜，薛美玲，杨静，等 . 一测多评法测定转移因子口服液中核糖核酸的含量 [J]. 北方药学，2019，16（7）：8-9，131.

[10] 黄青，鲁素雅，陆益红，等 . 转移因子注射剂质量评价与研究 [J]. 中国药学杂志，2015，50（13）：1146-1152.

[11] 李向辉，黄慧，周延州，等 . 刺五加多糖纳米乳对免疫抑制小鼠的免疫增强作用 [J]. 中国兽医杂志，2022，58（4）：96-100.

[12] Meng D，Yang YH，Li LX，et al. Immunomodulatory effects of Blaps rynchopetera extract [J]. Acta Cir Bras，2022，37（2）：e370205.

[13] Yang S，Ma YX，Lou XC，et al. The role of TNF-α in the phagocytosis of largemouth bass（Micropterus salmoides）leukocytes [J]. Fish Shellfish Immunol，2023，132：108488.

[14] 张伟云，王玉，王旭东，等 . 蛹虫草对小鼠细胞免疫及巨噬细胞吞噬功能影响 [J]. 长春工业大学学报（自然科学版），2019，4（6）：534-539.

[15] 李向辉，黄慧，周延州，等 . 刺五加多糖纳米乳对免疫抑制小鼠的免疫增强作用 [J]. 中国兽医杂志，2022，58（4）：96-100.

[16] 张毓婷，陈健文，董睿敏 . 六苓扶正方对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫增强作用 [J]. 中国药师，2019，22（4）：660-664.

[17] 何利剑，兰飞，淦秀英，等 . 一种含猪脾多肽及核糖口服液：CN109731010A [P]. 2019.

[18] 贾天亮，郑桂荣，梁爱葵 . 一种转移因子溶液及其制备方法：CN104095879A [P]. 2014.

（收稿日期：2023-02-10；修回日期：2023-05-18）

华中五味子根皮乙酸乙酯部位化学成分研究

李睿[1]，黄仕其[2]，张子龙[2]，张东东[2]，邓翀[2]，宋小妹[2]，王薇[2*]（1.杨凌示范区药品检验监测评价中心，陕西 杨凌 712100；2.陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 研究华中五味子根皮乙酸乙酯部位的化学成分。**方法** 运用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 以及半制备液相色谱等各种现代色谱分离技术进行分离纯化，根据化合物的波谱数据和理化性质进行结构鉴定。**结果** 从华中五味子根皮 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位中共分离得到 12 个化合物，分别鉴定为 henricine B（**1**）、7*R*，8*S*- 二氢去氢双松柏醇（**2**）、桑黄酮（**3**）、南五味子酸（**4**）、五内酯甲（**5**）、烟酰胺（**6**）、2，3- 二羟基丙基 -16- 羟基十六烷酸酯（**7**）、对羟基苯乙醇（**8**）、4- 羟基 -3- 甲氧基 - 苯甲酸（**9**）、4- 羟基 - 苯甲酸（**10**）、2- 羟基 - 苯甲酸（**11**）、3- 甲氧基 -4- 羟基苯 -1-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**12**）。**结论** 化合物 **3**、**6**、**7**、**11**、**12** 为首次从该植物中分离鉴定。

关键词：华中五味子；根皮；化学成分；木脂素；三萜

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2288-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.004

Chemical constituents from the ethyl acetate fraction of the root bark of *Schisandra sphenanthera*

LI Rui[1], HUANG Shi-qi[2], ZHANG Zi-long[2], ZHANG Dong-dong[2], DENG Chong[2], SONG Xiao-mei[2], WANG Wei[2*] (1. *Drug Inspection, Monitoring and Evaluation Center in Yangling Demonstration Area, Yangling Shaanxi* 712100; 2. *School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from the ethyl acetate fraction of the root bark of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. **Methods** The compounds were isolated and purified by various modern chromatographic techniques such as silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC, and their structures were identified by spectral data and physicochemical properties. **Results** Totally 12 compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of 80% ethanol extract of the root bark of *Schisandra sphenanthera.* Their structures were identified as henricine B (**1**), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (**2**), kuwanon C (**3**), kadsuric acid (**4**), schisanlactone A (**5**), nicotinamide (**6**), 2, 3-dihydroxypropyl-16-hydroxyhexadecanoate (**7**), 2- (4-hydroxyphenyl)-ethanol (**8**), 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (**9**), 4-hydroxy-benzoic acid (**10**), 2-hydroxy-benzoic acid (**11**) and tachinoside (**12**). **Conclusion** Compounds **3**, **6**, **7**, **11** and **12** have been isolated from this plant for the first time.

Key words: *Schisandra sphenanthera*; root bark; chemical constituent; lignan; triterpene

华中五味子为五味子科（Schisandraceae）五味子属的落叶木质藤本植物，主要分布于陕西、湖北、河南、湖南等地，为我国传统中药五味子的代用品，也被称为“南五味子”。现代研究表明，华中五味子化学成分主要为木脂素、三萜和黄酮类化合物等，具有抗肿瘤、免疫调节、中枢神经保护、抗病毒等药理作用[1-7]。华中五味子的根皮在秦巴山区也被称为“长胜七”，具有健脾化湿、

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82174111）；陕西中医药大学学科创新团队项目（No. 2019-YL12）；陕西中医药大学科技创新团队项目（No.2023-CXTD-05）。

作者简介：李睿，女，硕士，主要从事中药质量评价研究，email：512266238@qq.com *通信作者：王薇，女，教授，硕士研究生导师，主要从事中药药效物质及炮制机理研究，email：270468361@qq.com

涩精止泻等功效，主要用于治疗消化不良，肺虚咳嗽等症，在民间应用广泛，是陕西秦岭特色中药“太白七药”之一[8]。目前对于华中五味子的研究主要集中在茎叶和果实部位，而根皮部位的研究相对空白。因此，课题组运用多种色谱学手段和现代波谱学技术对华中五味子植物的根皮部位进行系统研究。与课题组前期从华中五味子根皮 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位鉴定了大量的木脂素类、简单苯丙素类和萜类成分等[8-11]，本研究从华中五味子根皮 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位分离得到 12 个化合物中主要为酚类成分（见图 1）。化合物分别鉴定为 henricine B（**1**）、7*R*，8*S*-二氢去氢双松柏醇（**2**）、桑黄酮（**3**）、南五味子酸（**4**）、五内酯甲（**5**）、烟酰胺（**6**）、2，3- 二羟基丙基 -16- 羟基十六烷酸酯（**7**）、对羟基苯乙醇（**8**）、4- 羟基 -3- 甲氧基 - 苯甲酸（**9**）、4- 羟基 - 苯甲酸（**10**）、2- 羟基 - 苯甲酸（**11**）、3- 甲氧基 -4- 羟基苯 -1-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**12**）。

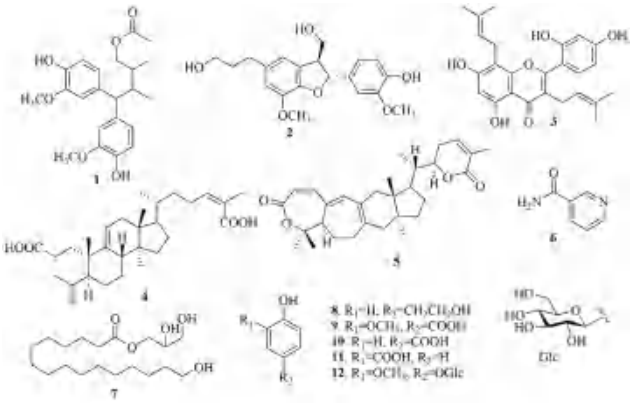


图 1　化合物 **1** ～ **12** 的结构

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **12**

1　仪器与试药

Burker AVANCE 400、AVANCE 600 型核磁共振波谱仪（瑞士 Burker 公司）；6550Q-TOF 质谱仪（美国 Agilent Technology）；WFH-203 三用紫外分析仪（上海精科实业有限公司）；Sephadex LH-20（美国 GE 公司）；岛津 LC-6AD 型半制备液相色谱仪（含紫外可见光检测器 SPD-20A，岛津）；CAPCELL PAK C-18 MG Ⅱ半制备色谱柱（10 mm×250 mm，5 μm）；KQ-250E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；BT-125D 电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；N-1100 旋转蒸发器（上海 EYELA 仪器有限公司）；DK-824 电热恒温水浴锅（上海精宏实验设备）；SHB-Ⅱ循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸公司）；薄层色谱用硅胶 GF_{254}、柱色谱用硅胶（100 ～ 200 目和 200 ～ 300 目）（青岛海洋化工厂有限公司）；色谱纯甲醇、乙腈（天津科密欧公司）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

华中五味子药材于 2019 年 9 月采自陕西秦岭太白山，经陕西中医药大学王薇教授鉴定为五味子科五味子属华中五味子（*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils）的根皮。标本保存于陕西中医药大学药用植物标本室（编号 20190904）。

2　提取与分离

干燥的华中五味子根皮（15 kg），80% 乙醇加热回流提取 3 次，每次投料 5 kg，80% 乙醇 30 L，每次煎煮时间 1.5 h。减压回收乙醇得到粗浸膏，分散于水，使用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇依次萃取，得到乙酸乙酯萃取部位 450 g。乙酸乙酯部位经正相硅胶柱色谱，二氯甲烷 - 甲醇（1∶0 ～ 0∶1）梯度洗脱，得到 14 个组分（SSE1 ～ SSE14）。SSE4 组分通过正相硅胶柱色谱（石油醚 - 乙酸乙酯梯度洗脱），得到 4 个组分（SSE4.1 ～ SSE4.4），SSE4.1 组分通过 Sephadex LH-20 凝胶（二氯甲烷 - 甲醇＝ 1∶1 洗脱），洗脱组分直接结晶得到化合物 **4**（400 mg）；SSE5 组分通过正相硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱），得到 3 个组分（SSE5.1 ～ SSE5.3），SSE5.1 组分通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 1∶1 洗脱）得到 3 个组分（SSE5.1.1 ～ SSE5.1.3）。SSE5.1.2 组分通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 1∶1 洗脱），洗脱组分直接结晶出化合物 **5**（240 mg）；SSE5.1.3 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（43∶57）洗脱得到化合物 **1**（6 mg，t_R ＝ 25.6 min）。SSE6 组分通过正相硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱），得到 3 个组分（SSE6.1 ～ SSE6.3），SSE6.2 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（38∶62）洗脱得到化合物 **2**（16 mg，t_R ＝ 26.4 min），SSE6.3 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（34∶66）洗脱得到化合物 **3**（9 mg，t_R ＝ 18.7 min）。SSE8 组分通过正相硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱），得到 5 个组分（SSE8.1 ～ SSE8.5），SSE8.3 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（甲醇洗脱）得到 3 个组分（SSE8.3.1 ～ SSE8.3.3），SSE8.3.3 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（32∶68）洗脱得到化合物 **12**（8 mg，t_R ＝ 15.2 min）。SSE10 组分通过正相硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱），得到 6 个组分（SSE10.1 ～ SSE10.6）。SSE10.1 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（23∶77）洗脱得到化合物 **9**（8 mg，t_R ＝ 13.5 min）和 **7**（6 mg，

t_R = 38.2 min）；SSE10.3 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（20∶80）洗脱得到化合物 **10**（9 mg，t_R = 22.6 min）；SSE10.6 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（15∶85）洗脱得到化合物 **8**（18 mg，t_R = 16.2 min）和 **6**（11 mg，t_R = 32.4 min），基线部位 SSE10.6.1 组分通过半制备液相色谱，乙腈 - 水（13∶87）反复洗脱得到化合物 **11**（8 mg，t_R = 25.3 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：389.2（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.89（1H，d，*J* = 2.0 Hz，H-2），6.70（1H，d，*J* = 8.1 Hz，H-5），6.80（1H，dd，*J* = 8.1，2.0 Hz，H-6），4.12（1H，m，H-7a），3.66（1H，d，*J* = 11.2 Hz，H-7b），1.83（1H，m，H-8），0.99（3H，d，*J* = 6.9 Hz，CH_3-9），1.30（3H，s，CH_3-11），6.84（1H，d，*J* = 2.0 Hz，H-2'），6.68（1H，d，*J* = 8.1 Hz，H-5'），6.74（1H，dd，*J* = 8.1，2.0 Hz，H-6'），3.52（1H，d，*J* = 11.5 Hz，H-7'），2.31（1H，m，H-8'），0.73（3H，d，*J* = 6.9 Hz，CH_3-9'），3.82（3H，s，-OCH_3），3.81（3H，s，-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：138.7（C-1），113.0（C-2），148.9（C-3），145.5（C-4），116.2（C-5），121.3（C-6），64.4（C-7），37.4（C-8），16.9（CH_3-9），176.1（C-10），21.6（CH_3-11），138.2（C-1'），112.7（C-2'），148.8（C-3'），145.4（C-4'），116.0（C-5'），121.3（C-6'），57.1（C-7'），42.0（C-8'），13.6（CH_3-9'），56.3（-OCH_3），56.4（-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[12]，故鉴定化合物 **1** 为 henricine B。

化合物 **2**：白色粉末（甲醇），$[\alpha]_D^{20}$ − 4.20（*c* 0.05，MeOH），ESI-MS *m/z*：361.2（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.95（1H，d，*J* = 6.6 Hz，H-2），6.76（1H，d，*J* = 8.1 Hz，H-5），6.82（1H，dd，*J* = 8.1，2.0 Hz，H-6），5.49（1H，d，*J* = 6.3 Hz，H-7），3.47（1H，dd，*J* = 6.0，12.6 Hz，H-8），3.57（2H，t，*J* = 6.5 Hz，CH_2-9），6.73（2H，s，H-6'，H-2'），2.62（2H，t，*J* = 7.9 Hz，CH_2-7'），1.81（2H，m，CH_2-8'），3.35（2H，m，CH_2-9'），3.85（3H，s，3-OCH_3），3.81（3H，s，3'-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：134.8（C-1），110.5（C-2），149.1（C-3），147.5（C-4，C-4'），116.1（C-5），119.7（C-6），88.9（C-7），55.4（C-8），64.9（CH_2-9），136.9（C-1'），114.1（C-2'），145.2（C-3'），129.9（C-5'），117.9（C-6'），32.8（CH_2-7'），35.8（CH_2-8'），62.2（CH_2-9'），56.7（3-OCH_3），56.3（3'-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[13]，故鉴定化合物 **2** 为 7*R*，8*S*- 二氢去氢双松柏醇。

化合物 **3**：黄色油状（甲醇），ESI-MS *m/z* 423.2（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.14（1H，s，H-6），4.64 ～ 4.24（2H，m，CH_2-9），5.19（1H，m，H-10），3.21 ～ 3.07（2H，m，CH_2-14），5.16（1H，m，H-15），1.64（6H，s，CH_3-12，17），1.47（6H，s，CH_3-13，18），6.50（1H，s，H-3'），6.47（1H，d，*J* = 8.0 Hz，H-5'），6.74（1H，d，*J* = 8.4 Hz，H-6'）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：161.1（C-2），121.7（C-3），183.9（C-4），103.7（C-4a），157.8（C-5），98.5（C-6），166.0（C-7），105.7（C-8），161.8（C-8a），24.7（CH_2-9），124.7（C-10），132.7（C-11），25.9（CH_3-12，17），17.7（CH_3-13，18），23.1（CH_2-14），123.0（C-15），132.6（C-16），113.8（C-1'），156.8（C-2'），102.9（C-3'），162.6（C-4'），108.6（C-5'），134.2（C-6'）。以上数据与文献报道一致[14]，故鉴定化合物 **3** 为桑黄酮。

化合物 **4**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：471.3（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：5.38（1H，d，*J* = 5.4 Hz，H-11），0.72（3H，s，CH_3-18），1.09（3H，s，CH_3-19），0.94（3H，d，*J* = 6.5 Hz，CH_3-21），5.96（1H，t，*J* = 7.6 Hz，H-24），1.87（3H，s，CH_3-27），0.81（3H，s，CH_3-28），1.79（3H，s，CH_3-29），4.89（1H，br s，H-30a），4.75（1H，br s，H-30b）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：33.6（C-1），37.3（C-2），178.2（C-3），149.0（C-4），50.6（C-5），29.8（C-6），27.5（C-7），44.0（C-8），144.0（C-9），43.6（C-10），119.8（C-11），38.8（C-12），48.3（C-13），45.1（C-14），34.8（C-15），28.9（C-16），52.1（C-17），15.2（CH_3-18），29.1（CH_3-19），37.0（C-20），18.7（CH_3-21），27.6（C-22），27.9（C-23），144.2（C-24），128.4（C-25），171.6（C-26），21.0（CH_3-27），18.7（CH_3-28），23.7（CH_3-29），114.3（CH_2-30）。以上数据与文献报道一致[15-16]，故鉴定化合物 **4** 为南五味子酸。

化合物 **5**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：465.3（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.88（1H，d，*J* = 12.2 Hz，H-1），5.76（1H，d，*J* = 12.0 Hz，H-2），2.48（1H，m，H-5），0.83

（3H，s，CH_3-18），6.41（1H，s，H-19），1.05（3H，d，J = 6.6 Hz，CH_3-21），4.53（1H，dt，J = 13.1，3.7 Hz，H-22），6.77（1H，d，J = 6.5 Hz，H-24），1.87（3H，s，CH_3-27），1.15（3H，s，CH_3-28），1.54（3H，s，CH_3-29），1.40（3H，s，CH_3-30）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：145.7（C-1），117.5（C-2），168.7（C-3），82.2（C-4），50.2（C-5），32.0（C-6），26.3（C-7），152.1（C-8），130.4（C-9），142.2（C-10），27.7（C-11），31.4（C-12），46.0（C-13），52.9（C-14），29.4（C-15），26.3（C-16），47.3（C-17），16.2（CH_3-18），146.2（C-19），40.9（C-20），14.0（CH_3-21），82.0（C-22），24.3（C-23），140.8（C-24），128.6（C-25），169.6（C-26），16.9（CH_3-27），27.7（CH_3-28），27.5（CH_3-29），28.9（CH_3-30）。以上数据与文献报道一致[17-18]，故鉴定化合物 **5** 为五内酯甲。

化合物 **6**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：123.1（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：9.02（1H，d，J = 2.3 Hz，H-2），8.21（1H，m，H-4），7.55（1H，dd，J = 8.0，4.9 Hz，H-5），8.61（1H，m，H-6）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：149.5（C-2），131.4（C-3），137.3（C-4），125.1（C-5），152.8（C-6），169.8（C-7）。以上数据与文献报道一致[19]，故鉴定化合物 **6** 为烟酰胺。

化合物 **7**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：347.3（$[M+H]^+$）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：173.3（C-1），34.0（C-2），25.9（C-3），28.9 ～ 29.7（C-4 ～ C-13），32.9（C-14），24.9（C-15），61.3（C-16），69.9（C-1'），65.9（C-2'），63.2（C-3'）。以上数据与文献报道一致[20]，故鉴定化合物 **7** 为 2，3-二羟基丙基 -16- 羟基十六烷酸酯。

化合物 **8**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：139.1（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.70（2H，d，J = 8.5 Hz，H-2，H-3），7.03（2H，d，J = 8.5 Hz，H-4，H-5），3.68（2H，t，J = 7.2 Hz，H-1'），2.71（2H，t，J = 7.2 Hz，CH_2-2'）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：116.11（C-1），130.8（C-2，C-3），130.9（C-4，C-5），156.7（C-6），39.4（C-1'），64.5（CH_2-2'）。以上数据与文献报道一致[21]，故鉴定化合物 **8** 为对羟基苯乙醇。

化合物 **9**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：169.0（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.57（1H，d，J = 1.9 Hz，H-2），6.84（1H，d，J = 8.7 Hz，H-5），7.56（1H，m，H-6），3.89（3H，s，-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：123.1（C-1），115.8（C-2），148.6（C-3），152.6（C-4），113.8（C-5），125.2（C-6），56.4（-OCH_3），170.0（-COOH）。以上数据与文献报道一致[22]，故鉴定化合物 **9** 为 4- 羟基 -3- 甲氧基 - 苯甲酸。

化合物 **10**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：139.0（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.88（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2，H-6），6.82（2H，d，J = 8.8 Hz，H-3，H-5）。以上数据与文献报道一致[23]，故鉴定化合物 **10** 为 4- 羟基 - 苯甲酸。

化合物 **11**：棕色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：139.0（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：8.02（2H，d，J = 7.8 Hz），7.58（1H，t，J = 7.2 Hz），7.46（1H，t，J = 7.6 Hz）。以上数据与文献报道一致[24]，故鉴定化合物 **11** 为 2- 羟基 - 苯甲酸。

化合物 **12**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z*：303.1（$[M+H]^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.80（1H，d，J = 2.7 Hz，H-2），6.69（1H，d，J = 8.6 Hz，H-5），6.58（1H，dd，J = 8.6，2.7 Hz，H-6），4.75（1H，d，J = 7.2 Hz，H-1'），3.51 ～ 3.33（4H，m，H-2' ～ H-5'），3.90（1H，dd，J = 12.0，2.0 Hz，H-6'a），3.69（dd，J = 12.0，5.6 Hz，1H，H-6'b），3.83（3H，s，-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：152.8（C-1），103.7（C-2），149.2（C-3），142.9（C-4），115.9（C-5），109.9（C-6），103.7（C-1'），74.9（C-2'），78.0（C-5'，C-3'），71.5（C-4'），62.6（CH_2-6'），56.3（-OCH_3）。以上数据与文献报道一致[25]，故鉴定化合物 **12** 为 3- 甲氧基 -4- 羟基苯 -1-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷。

4 讨论

近年来对于华中五味子的研究目前主要集中在茎叶和果实部位，而根皮部位的研究相对空白。华中五味子在民间被广泛用于治疗消化不良，肺虚咳嗽等症。课题组从华中五味子根皮的 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位中共分离鉴定了 12 个化合物，包括 2 个木脂素类成分，1 个黄酮类成分，2 个三萜类成分，5 个酚类成分和 2 个其他类成分。其中化合物 **1** 为华中五味子中少见的含有酯基的木脂素类成分；化合物 **2** 为特殊的新木脂素类成分；化合物 **3** 为华中五味子中少见的 C-8 位存在异戊烯基取代的黄酮类化合物；化合物 **4** 和 **5** 为少见的三萜，在华中五味子的根皮中含量颇丰，可直接从洗脱液中结晶得到。此外，化合物 **3**、**6**、**7**、**11**、**12** 为首次从该植物中分离鉴定，进一步丰富了华中五味子的化合物库。

参考文献

[1] Huang SQ，Zhang DD，Li YZ，et al. *Schisandra sphenanthera*：a comprehensive review of its botany，phytochemistry，pharmacology，and clinical applications [J]. Am J Chinese Med，2021，49（7）：1577-1622.

[2] 蒋艳 . 华中五味子化学成分及生物活性的研究 [D]. 武汉：中南民族大学，2011.

[3] 刘海涛，李兴博，张进，等 . 华中五味子果实石油醚部位化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（11）：1597-1601.

[4] 黄泽豪，秦路平 . 华中五味子藤茎的化学成分研究 [J]. 中草药，2016，47（19）：3374-3378.

[5] 周英 . 五味子科化学分类及五味子属药用植物资源利用研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2002.

[6] 王艳美 . 南五味子果实化学成分研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2016.

[7] 梁成钦 . 三种五味子科植物的化学成分和生物活性研究 [D]. 昆明：云南大学，2013.

[8] 刘媛媛，田煦莹，周益刚，等 . 华中五味子中简单苯丙素类化学成分研究 [J]. 陕西中医药大学学报，2022，45（4）：27-31.

[9] 张东东，黄仕其，刘媛媛，等 . 华中五味子根皮中 1 个新的菖蒲烯类倍半萜 [J]. 中草药，2022，53（14）：4270-4275.

[10] 黄仕其 . 华中五味子化学成分及体外生物活性研究 [D]. 咸阳：陕西中医药大学，2022.

[11] Huang SQ，Liu YY，Li YZ，et al. Dibenzocyclooctadiene lignans from the root bark of *Schisandra sphenanthera* [J]. Phytochem Lett，2021，45（7）：137-141.

[12] Liu HT，Xu LJ，Peng Y，et al. Two new lignans from *Schisandra henryi* [J]. Chem Pharm Bull，2009，57（4）：405.

[13] Hanawa F，Shiro M，Hayashi Y. Heartwood constituents of *Betula maximowicziana* [J]. Phytochemistry，1997，45（3）：589-595.

[14] 甄攀，倪刚，郭伟强，等 . 川桑枝条的药用化学成分分离鉴定 [J]. 蚕业科学，2016，42（2）：307-312.

[15] Li RT，Han QB，Zhao AH，et al. Micranoic acids A and B：two new octanortriterpenoids from *Schisandra micrantha* [J]. Chem Pharm Bull（Tokyo），2003，51（10）：1174-1176.

[16] Li H，Wang L，Miyata S，et al. Kadsuracoccinic acids A-C，ring-A seco-lanostane triterpenes from *Kadsura coccinea* and their effects on embryonic cell division of xenopus laevis [J]. J Nat Prod，2008，71（4）：739-741.

[17] Chen YG，Qin GW，Xie YY. A novel triterpenoid lactone，schiprolactone A，from *Schisandra propinqua* [J]. Chinese J Chem，2001，19（3）：304-307.

[18] Liu JS，Huang MF，Arnold GF，et al. Schisanlactone A，a new type of triterpenoid from a *Schisandra sp*. [J]. Tetrahedron Lett，1983，24（23）：2351-2354.

[19] 王知斌，郭江涛，杨春娟，等 . 八仙花叶化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2013，38（5）：709-713.

[20] Jing Y，Zhang YF，Shang MY，et al. Chemical constituents from the roots and rhizomes of *Asarum heterotropoides* var. mandshuricum and the in vitro anti-inflammatory activity [J]. Molecules，2017，22（1）：125.

[21] Lou H，Yuan H，Yamazaki Y，et al. Alkaloids and flavonoids from *peanut skins* [J]. Planta Med，2001，67（4）：345-349.

[22] Delita N，Elya B，Hanafi M. Isolation and identification of chemical compounds from *Garcinia fruticosa* Lauterb stem bark extract [J]. Pharmacognosy J，2020，12（6s）：1641-1652.

[23] 张艳婷 . 南五味子的化学成分及其木脂素类化合物的结构改造研究 [D]. 昆明：云南大学，2008.

[24] 刘亭，蒋礼，何燕玲，等 . 大风子正丁醇部位化学成分的研究 [J]. 中成药，2018，40（9）：2017-2020.

[25] 王丽娜，金梦莹，冯丹，等 . 地榆水溶性化学成分研究（Ⅱ）[J]. 中草药，2019，50（13）：3017-3023.

（收稿日期：2023-01-16；修回日期：2023-03-08）

黄甲软肝颗粒对阿尔茨海默病的药效学研究

张诗涵[1, 2]，马四补[1]，张丽艳[1]，于婷[2]，唐海姣[2]，王宗权[2*]，华杰[3*]（1. 贵州中医药大学，贵阳 550025；2. 盈科瑞（横琴）药物研究院有限公司，广东 珠海 519031；3. 浙江维康药业股份有限公司，浙江 丽水 323000）

摘要：目的 探讨黄甲软肝颗粒治疗阿尔茨海默病的药理作用。**方法** 选取 8 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组，40 只 APP/PS1 小鼠随机分为模型组，多奈哌齐组（3 mg·kg^{-1}），黄甲软肝颗粒低、中、高剂量组（1.16、2.32、4.64 g·kg^{-1}）。采用 Y 迷宫、新物体识别和 Morris 水迷宫测试小鼠认知功能及记忆损伤的情况，同时取材检测各小鼠脑内海马组织中 Aβ、pTau/Tau、BACE、GSK3β 蛋白表达的变化，通过 HE 染色、尼氏染色等观察神经元排列及结构变化。**结果** 与模型组比较，黄甲软肝高剂量组自发交替比率和目标象限穿越次数显著升高。与正常对照组比较，模型组小鼠在目标象限停留时间显著下降，黄甲软肝各剂量组均显著高于模型组。与模型组比较，黄甲软肝中、高剂量组小鼠 Aβ 蛋白表达显著降低；各剂量组小鼠 pTau/Tau 蛋白表达显著降低，海马 BACE、GSK3β 蛋白表达差异无统计学意义，各剂量组均显著逆转了 Aβ 沉积显现，尼氏小体均有所增加。**结论** 黄甲软肝颗粒具有显著抗阿尔茨海默病作用。

关键词：黄甲软肝颗粒；阿尔茨海默病；药效学；APP/PS1 模型小鼠

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2293-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.005

Pharmacodynamics of Huangjia Ruangan granules for Alzheimer’s disease

ZHANG Shi-han[1, 2], MA Si-bu[1], ZHANG Li-yan[1], YU Ting[2], TANG Hai-jiao[2], WANG Zong-quan[2*], HUA Jie[3*] (1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang* 550025; 2. *Yingkerui (Hengqin) Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Zhuhai Guangdong* 519031; 3. *Zhejiang Weikang Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui Zhejiang* 323000)

Abstract: Objective To determine the pharmacological effect of Huangjia Ruangan granules on Alzheimer’s disease (AD). **Methods** Eight C57BL/6J mice were selected as the normal control group. While 40 APP/PS1 mice were randomly divided into a model group, a Donepezil group (3 mg·kg^{-1}), Huangjia Ruangan granule low, medium and high dose groups (1.16, 2.32, and 4.64 g·kg^{-1}). Y-maze, new object recognition and Morris water maze were used to test the cognitive function and memory impairment of the mice. The protein expression changes of Aβ, pTau/Tau, BACE and GSK3β in the hippocampus of each mouse brain were detected. The arrangement and structural changes of neurons were observed by HE staining and Nishi staining. **Results** The behavioral test showed that compared with the model group, the spontaneous alternating rate and the number of target quadrant crossing were significantly increased in the high-dose group. Compared with the normal control group, the residence time in the target quadrant of the model group decreased, and the low, medium and high dose groups were significantly higher than those in the model group. Compared with the model group, Aβ protein expression of mice in the medium and high dose groups decreased; pTau/Tau protein expression decreased in each dose groups of Huangjia Ruangan granules. There were no significant differences in the expression of BACE and GSK3β in the hippocampus among all groups. Aβ deposition was

基金项目：广东省重点领域研发计划项目（No.2019B020201006）；国家“重大新药创制”科技重大专项项目（No.2017ZX09301017）；首届中国横琴科技创业大赛项目。

作者简介：张诗涵，女，在读硕士研究生，主要从事中药及民族药质量控制及新药研究，email：1012574692@qq.com ***通信作者：**王宗权，男，高级工程师，主要从事中药新药研发工作，email：wangzongquan@ykrskj.com；华杰，女，工程师，主要从事药品研发、质量控制、生产工艺研究，email：1107783507@qq.com

significantly reversed in each dose groups of Huangjia Ruangan granules. As to histomathological changes, the arrangement and structure of neurons in the mice did not change obviously, and the Nishi bodies in each dose groups of Huangjia Ruangan granules increased as compared with the model group. **Conclusion** Huangjia Ruangan granules have obvious anti-AD effect.

Key words: Huangjia Ruangan granule; Alzheimer's disease; pharmacodynamics; APP/PS1 mouse model

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD），是老年人群中较为常见的一种神经系统退行性疾病[1]，其主要病理特征是脑萎缩、淀粉样斑块和神经原纤维缠结[2]。临床上大多表现为记忆减退、语言功能衰退、定时和定位障碍、情绪失控及行为失调等，以致患者生活无法自理，甚至会危及生命[3-5]。黄甲软肝颗粒处方来源于临床，由鳖甲、灵芝、黄芪、丹参、葛根、三七、柴胡、赤芍、鸡骨草、叶下珠 10 味中药组成，具有益气疏肝、活血软坚、清热利湿的作用[6]。现代药理研究发现，该方中多味药具有免疫调节、抗氧化、抗衰老、保护神经系统等作用[7-11]。本研究基于 APP/PS1 模型小鼠，探讨黄甲软肝颗粒对 AD 的药效学作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 APP/PS1 模型小鼠 40 只，雄性 C57BL/6J 小鼠 8 只，6 月龄，SPF 级，体重 20 ～ 22 g [实验动物生产许可证号：SCXK（苏）2018-0002]。动物饲养于广州中医药大学国际中医药转化医学研究所动物房。动物房通风良好，温度 22 ～ 24 ℃、相对湿度 55% ～ 60%，昼夜 12 h 交替照明，自由摄食饮水。

1.2 试药

黄甲软肝颗粒 [批号：20190616，盈科瑞（横琴）药物研究院有限公司]。多奈哌齐 [国药准字 H20070181，规格：10 mg/ 片，卫材（中国）药业有限公司]；4% 多聚甲醛通用型组织固定液（Biosharp）；尼氏染色液（碧云天生物技术公司）；SDS、BSAAlbumin Fraction V（德国 BioFroxx）；Acrylamide、Bis-acrylamide（美国 Amresco）；吐温 -20（批号：C10399888，上海麦克林生化科技有限公司）；BCA 试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司）；RIPA 裂解液（Strong）、SDS-PAGE 蛋白电泳上样缓冲液（5×）（康为世纪生物科技有限公司）；PMSF、HRP- 山羊抗兔 IgG（武汉博士德生物工程有限公司）；Prestained Protein Ladder、蛋白 Maker（美国赛默飞世尔科技公司）；PVDF 膜（0.45 μm）（IPVH00010，Immobilon-P Membrane）；Tau 抗体、p-Tau（ser396）抗体、Amyloid Beta A4 抗体、BACE 抗体、GSK3β 抗体、GAPDH 抗体、超敏性 ECL 发光液（美国 Affinity 公司）。

1.3 仪器

RM2016 型病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；Nikon DS-U3 型成像系统、Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜（日本尼康公司）；PB3033N 型分析天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；TSY-B 型摇床（武汉塞维尔生物科技有限公司）；Enspire 2300 型多功能酶标仪（德国 PerkinElmer 公司）；164-5052 型垂直电泳仪（美国 BIO-RAD 公司）；KH19A 型高速低温离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）。

2 方法

2.1 分组、模型复制及给药

适应性饲养一周后，将 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组（control），40 只 APP/PS1 小鼠按照体重随机分为 5 组，即模型组（Model），多奈哌齐组（Positive），黄甲软肝颗粒低（HJ-L）、中（HJ-M）和高（HJ-H）剂量组，每组 8 只。各给药组分别灌胃给予相应的受试药物（10 mL • kg^{-1}），按体表面积比换算小鼠临床等效剂量，黄甲软肝颗粒低、中和高剂量组分别按照每日 1.16、2.32、4.64 g • kg^{-1} 的剂量灌胃给予黄甲软肝颗粒水溶液（药物溶于水），多奈哌齐组按照每日 3 mg • kg^{-1} 的剂量灌胃给予多奈哌齐，正常对照组和模型组分别灌胃给予等体积饮用水，每日 1 次，连续 13 周。每日观察小鼠的活动状态；每 4 d 称取一次小鼠重量。

2.2 Y 迷宫实验

为了评估小鼠对新异环境的探索能力，于给药的第 12 周后进行 Y 迷宫实验。Y 迷宫由 3 等长臂组成（50 cm×18 cm×35 cm），臂间夹角 120 度，中间有一活动的隔板，其内部均为黑色。

将小鼠置于 Y 迷宫随机一臂末端，任其在 6 min 内自由探索，行为变化由摄像系统记录，记录指标如下：① 总进臂次数，动物进入迷宫臂的次数（以小鼠四只脚均进入臂为进臂一次标准）。② 轮流（交替）一次，依次连续进入 Y 迷宫全部三个

臂一次。③ 最大轮流次数，总进臂次数－2。自发交替比率＝总轮流次数 / 最大轮流次数 ×100%。每次实验结束后，用 75% 乙醇清洗箱体，以确保当前小鼠的行为不受影响。

2.3 新物体识别实验

实验分为适应期、训练期和测试期。第 1 日为适应期：小鼠被放置在没有任何物体的测试箱中，适应 5 min。第 2 日为训练期和测试期：在训练期期间，两个相同的玩具（A 和 B）被放置在实验装置中间，5 min 自由探索物体，记录探索两个物体的情况。测试期：休息 5 h 后，将与 A、B 大小颜色都不相同的玩具 C 替换玩具 B。把小鼠放入箱子，自由探索 5 min。记录小鼠在两个物体周围的探索时间。每次实验结束后，用 75% 乙醇清洗箱体，以确保当前小鼠的行为不受影响。

2.4 Morris 水迷宫实验

给药 12 周后进行 Morris 水迷宫实验，水池内倒入奶粉水溶液使池水成不透明乳白色，水至水面高出平台 2 cm 处，水温保持至 22 ～ 24 ℃。将水池随机分为 4 个象限，平台位于第四象限区的中央。第 1 日进行适应性训练；第 2 ～ 6 日进行定位航行实验，以小鼠入水后找到平台的时间作为逃避潜伏期观测指标；第 7 日拆除平台，记录 60 s 内小鼠的运动轨迹及穿越平台的次数。

2.5 样品采集、处理

行为学实验结束后，禁食不禁水 12 h，以 10% 水合氯醛 350 mg • kg^{-1} 腹腔注射进行麻醉。从腹主动脉取血，常温下静置 2 h 后，4 ℃、3000 r • min^{-1} 离心，取上清液分装，－ 80 ℃保存。各组中取 4 只小鼠直接断头取脑，剥离海马，液氮速冻，用于 Western blot 法测定蛋白含量；另外 4 只小鼠用 4% 多聚甲醛溶液进行心脏灌流后，分离大脑，4% 多聚甲醛固定，用于硫黄素 S 染色、HE 染色及尼氏染色。

2.6 硫磺素 S 染色

将 4% 多聚甲醛固定液中的全脑组织 4 ℃过夜固定后，蔗糖溶液梯度脱水。冰上取脑，吸水纸吸干多余水分，切除小脑和前额叶皮质，将平切面水平置于冰冻托上。采用 OCT 包埋剂进行包埋并速冻，切片厚度为 30 μm。保留眉毛状海马区域的切片，置于细胞保护液中－ 20 ℃保存。

用毛笔将脑片平铺在制好的滴加 0.01 mol • L^{-1} PBS 的明胶片上，烘箱 37 ℃烘烤 1.5 h。取出切片后用免疫组化笔围绕组织片画圈，在组织上滴加 0.01 mol • L^{-1} PBS 洗 3 次，每次 5 min；轻轻甩干 PBS 溶液后滴加 75% 乙醇新鲜配制的 0.5% 硫磺素 S，避光孵育 10 min；轻轻甩干后依次进行 0.01 mol • L^{-1} PBS 洗 3 次 /5 min（避光）、75% 乙醇分化 3 次 /5 min（避光）；使用含荧光猝灭剂的封片剂进行封片。在荧光显微镜观察各组切片中的左右海马区（×40）进行观察。脑切片的染色中 Thioflavin S 阳性的斑块代表纤维性 Aβ 沉积。使用 Image J 软件进行计数（沉积所占脑区面积百分比）分析。

2.7 Western blot 法检测海马组织 Aβ、pTau/Tau、BACE、GSK3β 蛋白表达

称取小鼠海马组织约 20 mg，加入含有蛋白磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液匀浆；离心后上清液采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度，计算出以每孔 35 μg/15 μL 的上样量进行样品变性。按计算出的比例混匀样品上清、5×Loading Buffer 及 RIPA，水浴处理使样品充分变性，－ 80 ℃冻存备用。经 SDS-PAGE 电泳、转膜，以 5% 脱脂奶封闭 2 h 后，取出，用 1×TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，用一抗稀释液按比例配制一抗，5% BSA 配制二抗。加入一抗充分覆盖 PVDF 膜，4 ℃孵育过夜。第 2 日 1×TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。室温下二抗 1 h，用 1×TBST 洗涤 4 次，每次 5 min。将混匀后的 ECL 发光液铺于含目的条带的 PVDF 膜上，置于 Chemi DOC XRS ＋成像系统中显影，分析条带灰度值。

2.8 组织病理学观察

2.8.1 苏木素 - 伊红（HE）染色法观察脑组织病理变化 取脑组织石蜡切片脱蜡至水，采用 HE 染色，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。于光学显微镜下镜检，观察脑组织病理变化。

2.8.2 尼氏染色 取脑组织石蜡切片，甲苯胺蓝染液染色 10 min，95% 乙醇分化（脑组织分化至尼氏体着深蓝色，肥大细胞呈紫红色，背景呈浅蓝色或无色）。烘箱吹干，二甲苯透明数分钟，封片。在显微镜下镜检，并进行图像采集分析。选取海马 DG 区和 CA1 区相同部位 ×400 的图像观察神经元的一般形态。

2.9 统计学处理方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理。服从正态分布的计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 来表示；若方差齐则使用单因素方差分析（One-way ANOVA）中的 Dunnett 检验，若方差不齐则采用单因素方差分析中的 Dunnett’s T3 或 Games-Howell 检验。非正态分布的计量数据以中位数和四分位数 [Md（P25，P75）] 来表示；采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis H 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠认知功能及记忆损伤的影响

3.1.1　Y 迷宫实验　结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠自发交替比率显著下降（$P < 0.01$）；与模型组比较，阳性药多奈哌齐组和黄甲软肝高剂量组小鼠自发交替比率显著升高（$P < 0.05$），见图 1。

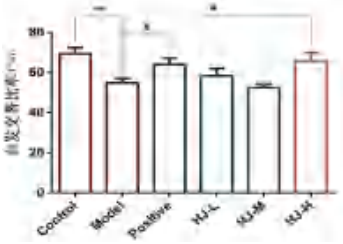


图 1　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠自发交替比率的影响（$n = 8$，$^{**}P < 0.01$，$^{\#}P < 0.05$）

Fig 1　Effect of Huangjia Ruangan granules on the spontaneous alternation ratio of APP/PS1 model mice（$n = 8$，$^{**}P < 0.01$，$^{\#}P < 0.05$）

3.1.2　新物体识别实验　结果显示，各组小鼠在新物体识别实验中的新物体探索时间与总时间比值、新旧物体探索时间差与总时间比值差异均无统计学意义，见图 2。

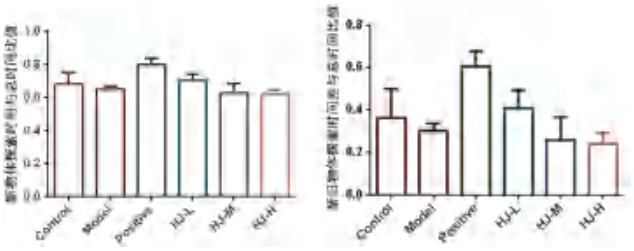


图 2　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠新物体认知功能的影响（$n = 8$）

Fig 2　Effect of Huangjia Ruangan granules on the cognitive function of new objects in APP/PS1 model mice（$n = 8$）

3.1.3　Morris 水迷宫实验　结果显示，与正常对照组比较，APP/PS1 模型小鼠目标象限穿越次数显著下降（$P < 0.01$）；与模型组比较，黄甲软肝高剂量组小鼠目标象限穿越次数显著升高（$P < 0.05$）。在目标象限停留时间的指标中可见，与正常对照组比较，APP/PS1 模型小鼠显著下降（$P < 0.05$），黄甲软肝低、中、高剂量组均显著高于模型组（$P < 0.05$，$P < 0.01$），阳性药组未见显著变化，见图 3。

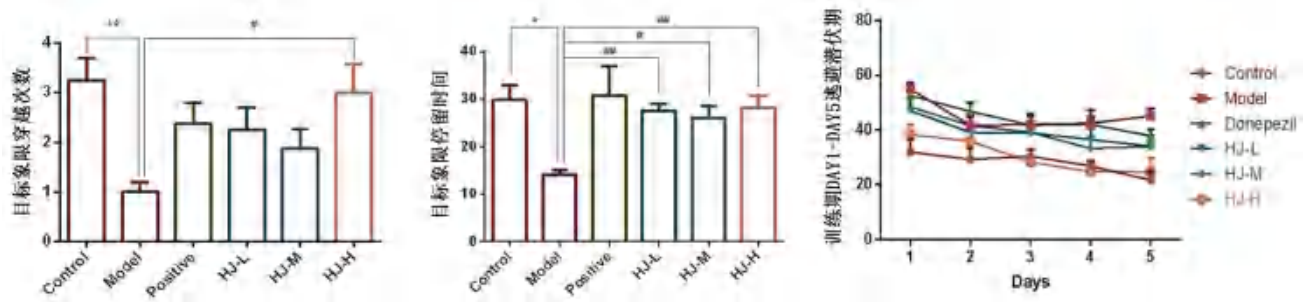


图 3　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠记忆损伤的影响（$n = 8$，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 3　Effect of Huangjia Ruangan granules on the memory impairment in APP/PS1 model mice（$n = 8$，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

3.2　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马组织 Aβ、pTau/Tau、BACE、GSK3β 蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠海马区 Aβ 蛋白表达显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，黄甲软肝中、高剂量组小鼠 Aβ 蛋白表达显著降低（$P < 0.01$），见图 4。与正常对照组比较，APP/PS1 模型小鼠海马区 pTau/Tau 蛋白表达显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠 pTau/Tau 蛋白表达显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$），见图 5。各组小鼠海马 BACE 蛋白表达差异无统计学意义，见图 6。各组小鼠海马 GSK3β 蛋白表达差异无统计学意义，见图 7。

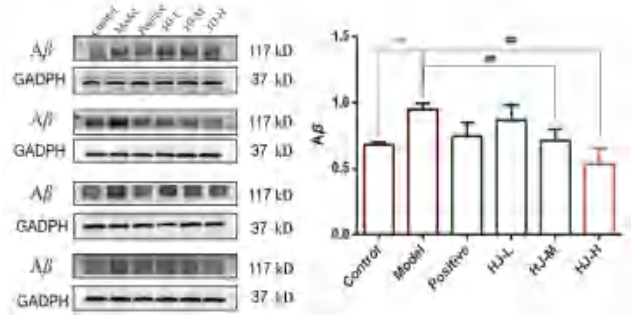


图 4　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马 Aβ 蛋白表达的影响（$n = 4$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 4　Effect of Huangjia Ruangan granules on the expression of Aβ protein in hippocampus of APP/PS1 model mice（$n = 4$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#\#}P < 0.01$）

3.3　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马组织 Aβ 蛋白沉积的影响

与正常组比较，APP/PS1 模型小鼠左、右测海马区 Aβ 沉积面积所占海马面积百分比显著升高；与模型组比较，各给药组均显著逆转了 Aβ 沉积显现，见图 8 ～ 9。

3.4　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马组织病理变化的影响

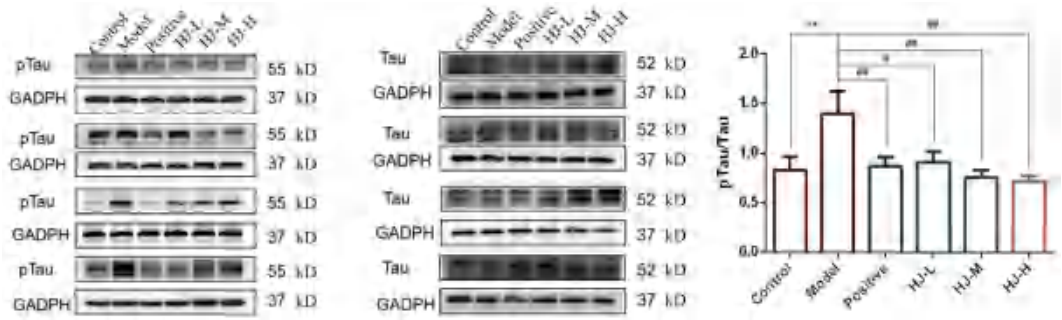


图 5　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马 pTau/Tau 蛋白表达的影响（$n = 4$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 5　Effect of Huangjia Ruangan granules on the expression of pTau/Tau protein in hippocampus of APP/PS1 model mice（$n = 4$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

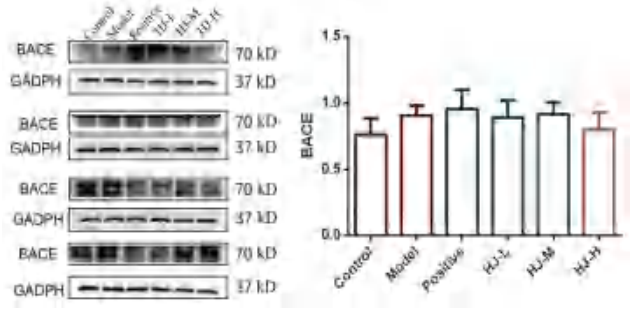


图 6　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马 BACE 蛋白表达的影响（$n = 4$）

Fig 6　Effect of Huangjia Ruangan granules on the expression of BACE protein in hippocampus of APP/PS1 model mice（$n = 4$）

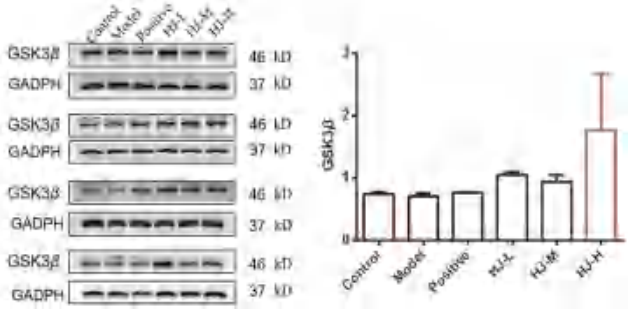


图 7　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马 GSK3β 蛋白表达的影响（$n = 4$）

Fig 7　Effect of Huangjia Ruangan granules on the expression of GSK3β protein in hippocampus of APP/PS1 model mice（$n = 4$）

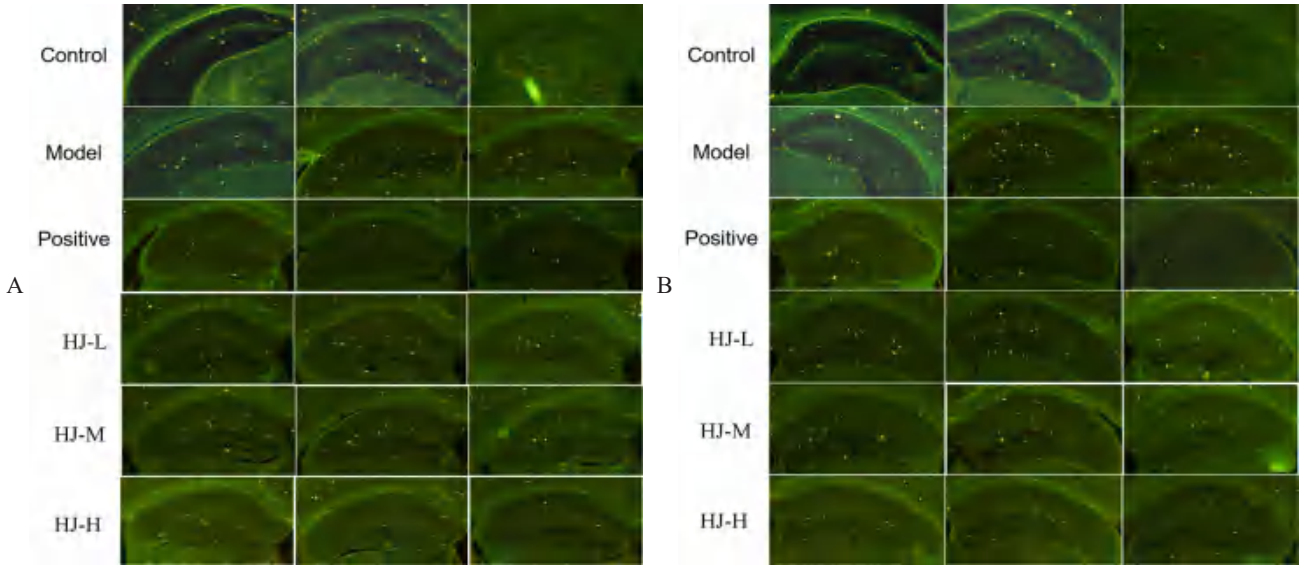


图 8　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠左侧（A）和右侧（B）海马 Aβ 沉积的影响（$n = 3$）

Fig 8　Effect of Huangjia Ruangan granules on Aβ deposition in the left（A）and right（B）hippocampus of APP/PS1 model mice（$n = 3$）

3.4.1　HE 染色　每组小鼠左（见图 10A）、右（见图 10B）侧海马分别选取齿状回 DG 区和 CA1 区，观察神经元排列及结构变化。结果显示，神经元未见明显变化。

3.4.2　尼氏染色　每组小鼠左（见图 11A）、右（见图 11B）侧海马分别选取齿状回 DG 区和 CA1 区，观察神经元排列及结构变化。结果显示，模型组海马的 DG 区和 CA1 区的尼氏小体数量减少，多奈哌齐和黄甲软肝颗粒低、中、高剂量的尼氏小体相比于模型组均有所增加。

4　讨论

AD 是最常见的神经系统变性疾病，目前，AD 的发病机制尚未明确，国内外研究较认可的发病机制有 β- 淀粉样蛋白沉积假说、基因突变学

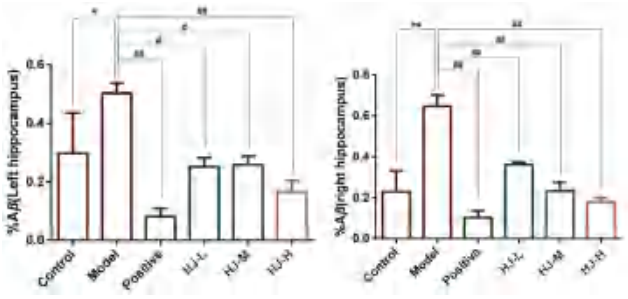


图 9　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠海马 Aβ 沉积的影响（n = 3）（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

Fig 9　Effect of Huangjia Ruangan granules on Aβ deposition in hippocampus of APP/PS1 model mice（n = 3）（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）

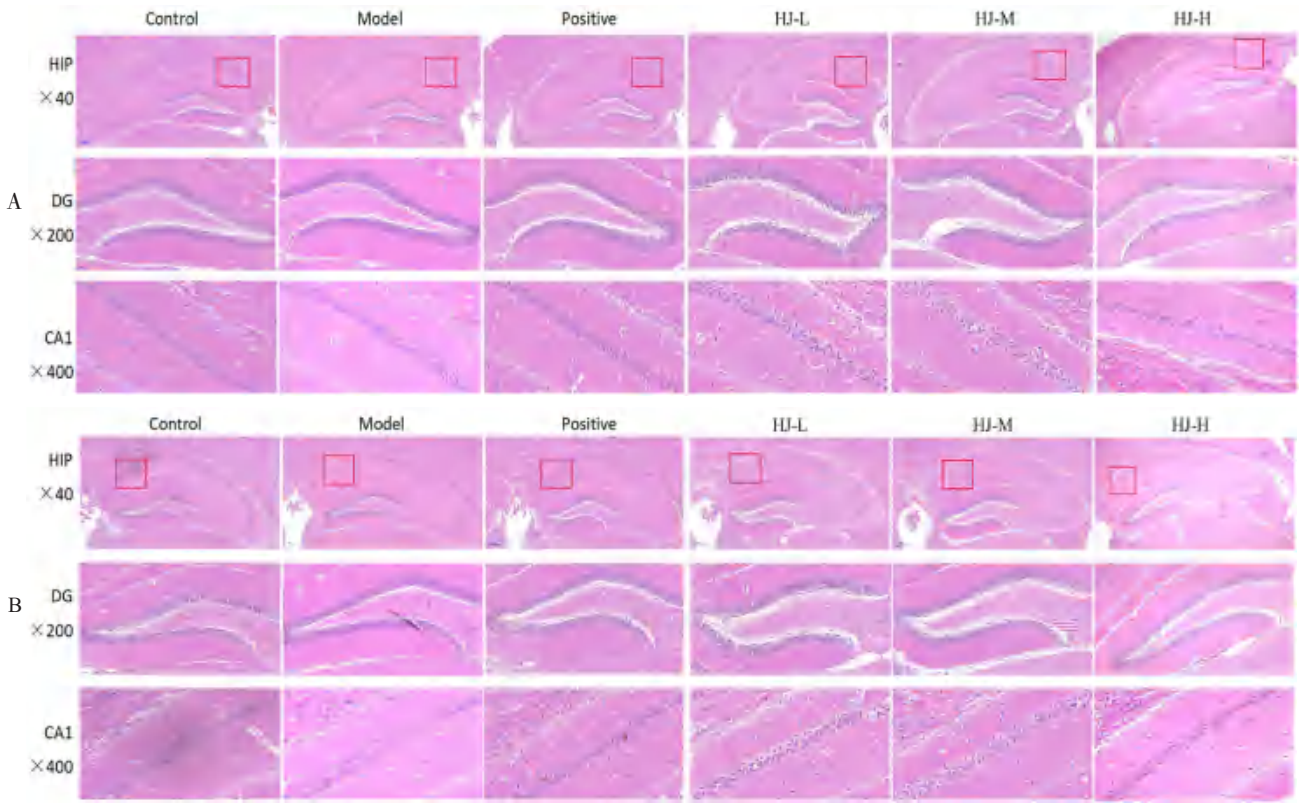


图 10　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠左侧（A）和右侧（B）海马组织病理学的影响

Fig 10　Effect of Huangjia Ruangan granules on the histopathology of the left（A）and right（B）hippocampus in APP/PS1 model mice

说和胆碱能损伤学说等[12]。研究表明 AD 与 β- 淀粉样蛋白沉积及 Tau 蛋白聚集密切相关[13]。AD 的主要临床表现为记忆力下降、认知障碍、行为和情绪的异常（躁动、抑郁和精神错乱等）[14]。本实验采用 Y 迷宫、新物体识别和 Morris 水迷宫测试小鼠认知功能及记忆损伤的情况，同时取材检测小鼠脑内海马组织中 Aβ、pTau/Tau、BACE、GSK3β 蛋白表达的变化，通过 HE 染色、尼氏染色等观察神经元排列及结构变化，采用 SPSS 22.0 统计分析软件进行数据处理，来研究黄甲软肝颗粒对 AD 的药效学作用。结果发现黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠的记忆能力及认知功能表现出显著的改善效果，同时可以逆转 APP/PS1 模型小鼠海马组织中 Aβ 蛋白表达和 Aβ 沉积的升高，对海马中 Tau 的磷酸化也有显著的抑制作用，而对 BACE 和 GSK3β 的蛋白表达未产生显著影响。在本研究结果中可见，黄甲软肝颗粒高剂量组的效果优于黄甲软肝颗粒其余剂量组。组织病理学变化中，小鼠的神经元排列、结构等未发生显著改变，而神经元尼氏小体在模型小鼠中出现了减少，给药后有所缓解。有研究表明，灵芝多糖肽可减少海马 Aβ 的沉积，同时减轻海马线粒体和神经突触的损伤[15]；而丹参酮可以保护海马神经元和海马内胆碱能纤维，减少 Aβ 沉积，改善大鼠学习记忆的功能[16]；葛根素能够抑制 Aβ 的沉积[17]，同时可能通过降低 GSK-3β 活性水平，来抑制 Tau 蛋白磷酸化水平[18]，从而参与 AD 的治疗。结合本实验研究及现有研究结果，推测黄甲软肝颗粒可以通过方中多种成分减少 Aβ 沉积和降低 Tau 蛋白磷酸化水平，从而改善小鼠学习记忆能力，改善小鼠 AD 病症。

综上可知，黄甲软肝颗粒充分发挥了中药复方多成分、多靶点的优势，从多个途径改善小鼠 AD 病症，延迟疾病的进程，对 AD 治疗药物的研究具有重要意义。

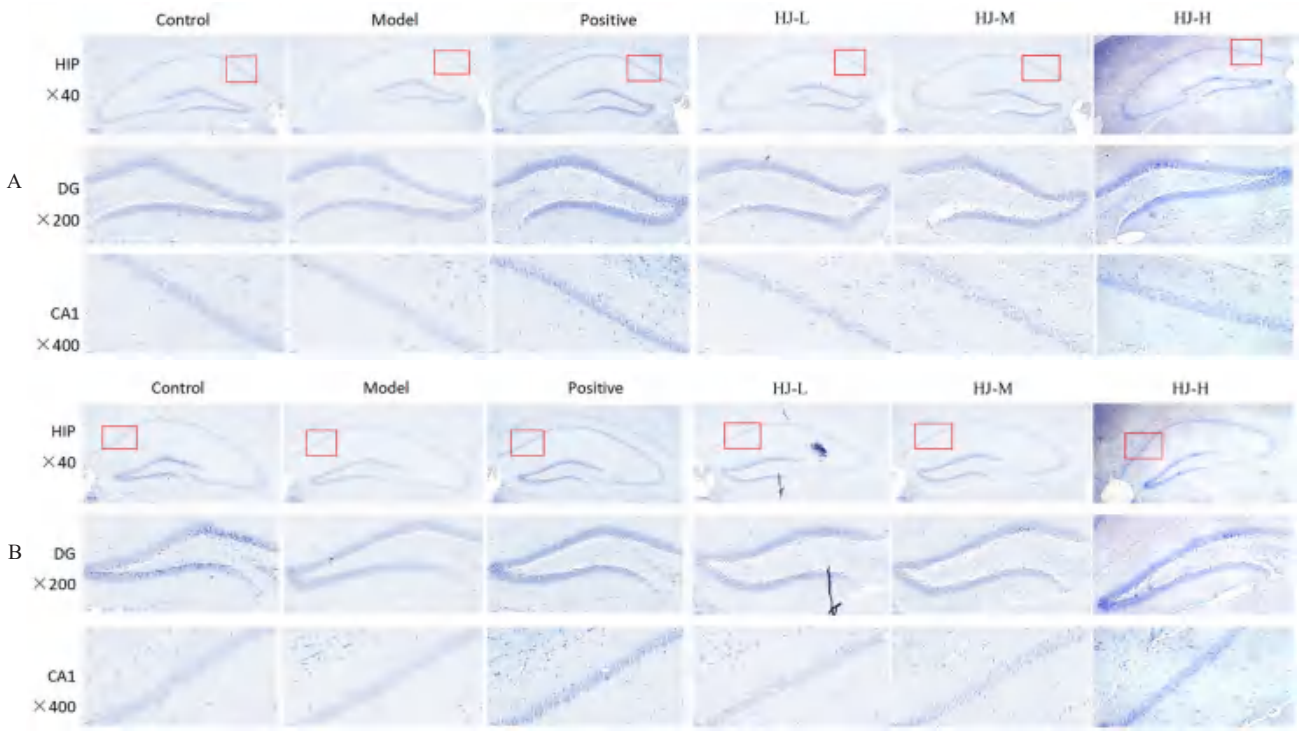


图 11　黄甲软肝颗粒对 APP/PS1 模型小鼠左侧（A）和右侧（B）海马尼氏小体的影响

Fig 11　Effect of Huangjia Ruangan granules on the left (A) and right (B) hemanisomes in APP/PS1 model mice

参考文献

[1] 李丽娟，肖轩盛，郑焱 . 阿尔茨海默病研究进展 [J]. 科技导报，2021，39（20）：69-79.

[2] Liu PP，Xie Y，Meng XY，et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer’s disease [J]. Signal Transduct Tar Ther，2019，4（1）：29-50.

[3] 田文国，王春芳，陈金鹏，等 . 中药抗阿尔茨海默病的作用及其机制研究进展 [J]. 中草药，2022，53（10）：195-3208.

[4] 汪睿彤，刘珏 . 阿尔茨海默病的流行病学研究进展 [J]. 中国慢性病预防与控制，2021，29（9）：707-711.

[5] 任汝静，殷鹏，王志会，等 . 中国阿尔茨海默病报告 2021[J]. 诊断学理论与实践，2021，20（4）：317-337.

[6] 王彩云，卢敬光，朱国元，等 . 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术研究黄甲软肝颗粒及其中间体物质基础 [J]. 亚太传统医药，2022，18（5）：43-51.

[7] 刘耀晨，张铁军，郭海彪，等 . 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2021，52（9）；2733-2745.

[8] 邹玉莲，甘陈灵，李鹏 . 灵芝多糖现代药理学研究进展 [J]. 海峡药学，2018，30（8）：28-30.

[9] 李宜培，王雪银，陈洁，等 . 灵芝多糖肽对阿尔茨海默病大鼠 β 淀粉样蛋白含量和 tau 蛋白过度磷酸化的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2015，29（9）：862-865.

[10] 马艳春，胡建辉，吴文轩，等 . 黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报，2022，50（4）：92-95.

[11] 崔璀，吕颖捷 . 鳖甲及其配伍药对现代药理学研究与临床应用述评 [J]. 中医药学报，2018，46（3）：114-116.

[12] 陈效威 . *N*-（4- 硝基苯）氧乙基异锥丝明盐酸盐制备工艺及抗阿尔兹海默症药效学研究 [D]. 兰州：兰州理工大学，2017.

[13] 刘宗鑫，王晋平，谢荣鑫，等 . 中医药治疗阿尔茨海默病的概况及展望 [J]. 海南医学，2022，33（7）：926-929.

[14] 刘宝惠，黄华轼，陈凤贤，等 . 续断 - 牛膝药对治疗阿尔茨海默病体内药效研究 [J]. 湖北中医杂志，2022，44（6）：16-21.

[15] 杨红梅，王黎，陈洁，等 . 灵芝多糖肽对 Alzheimer 样大鼠海马 Aβ 含量和超微结构的影响 [J]. 中成药，2009，31（8）：1186-1189.

[16] 李龙宣，茹立强 . 丹参酮对海马内注射 β- 淀粉样肽后大鼠学习记忆障碍的影响 [J]. 中国老年学杂志，2003，23（5）：294-297.

[17] 郭珂一，周峥宇，赵幸娟 . 葛根素对阿尔茨海默病果蝇的神经保护作用及机制 [J]. 新乡医学院学报，2022，39（6）：513-518.

[18] 余玉玲 . 葛根素对 AD 及 2 型糖尿病模型大鼠脑内 Tau 蛋白磷酸化水平的影响及部分机制的研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2017.

（收稿日期：2023-02-06；修回日期：2023-03-27）

缬草的化学成分研究

但林蔚，高天慧，吴国庆，张化为，姜祎，王薇，张东东，李玉泽*，宋小妹*（陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 研究败酱科缬草属植物缬草 *Valeriana officinalis* L. 的化学成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、MCI 柱色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和 SP-HPLC 等方法对缬草 80% 乙醇提取物正丁醇部位与水部位进行分离纯化，根据理化性质和 NMR、MS 等波谱技术鉴定化合物结构。**结果** 从缬草中分离得到 20 个化合物，分别鉴定为 valerol A（**1**）、pinoresinol-4-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl（1 → 2）-*β*-*D*-glucopyranoside（**2**）、junipetrioloside A（**3**）、coniferin（**4**）、eugenyl *β*-rutinoside（**5**）、xiecaoside E（**6**）、benzyl primeveroside（**7**）、3-caffeoylquinic acid methyl ester（**8**）、对羟基苯甲醛（**9**）、vanillic acid（**10**）、吲哚 -3- 甲醛（**11**）、thymine DNA nucleotides（**12**）、蔷薇酸（**13**）、熊果酸（**14**）、*δ*-hederin（**15**）、蔗糖（**16**）、正十四烷酸甲酯（**17**）、1-*t*-butoxyoctane（**18**）、硬脂酸（**19**）、2，5- 二甲基 -3- 己酮（**20**）。**结论** 化合物 **3** 为从败酱科植物中首次分离得到，化合物 **2**、**4**、**7**、**12**、**16** 为从缬草属植物中首次分离得到，化合物 **6**、**8**、**15** 为从缬草中首次分离得到。

关键词：缬草；化学成分；分离鉴定
中图分类号：R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2300-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.006

Chemical compositions of *Valeriana officinalis* L.

DAN Lin-wei, GAO Tian-hui, WU Guo-qing, ZHANG Hua-wei, JIANG Yi, WANG Wei, ZHANG Dong-dong, LI Yu-ze*, SONG Xiao-mei* (*School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical compositions of *Valeriana officinalis* L. **Methods** The *n*-butanol part and water part of the 80% ethanol extract of *Valeriana officinalis* L. was systematically separated by silica gel column chromatography, MCI column chromatography, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and SP-HPLC. The structures were identified by NMR, MS and other spectra analysis combined with physical and chemical properties. **Results** The structures of 20 compounds were identified as valerol A (**1**), pinoresinol-4-O-*α*-*L*-rhamnopyranosyl (1 → 2)-*β*-*D*-glucopyranoside (**2**), junipetrioloside A (**3**), coniferin (**4**), eugenyl *β*-rutinoside (**5**), xiecaoside E (**6**), benzyl primeveroside (**7**), 3-caffeoylquinic acid methyl ester (**8**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**9**), vanillic acid (**10**), indole-3-carboxaldehyde (**11**), thymine DNA nucleotides (**12**), rosolic acid (**13**), ursolic acid (**14**), *δ*-hederin (**15**), sucrose (**16**), *N*-tetradecanoic acid methyl ester (**17**), 1-*t*-butoxyoctane (**18**), stearic acid (**19**), and 2, 5-dimethyl-3-hexanone (**20**). **Conclusion** Compound **3** has been first isolated from Valerianaceae, compounds **2**, **4**, **7**, **12** and **16** have been first isolated from genus *Valeriana*, and compounds **6**, **8** and **15** have been first isolated from this plant.

Key words: *Valeriana officinalis* L.; chemical composition; isolation and identification

基金项目：陕西省科技厅自然科学基础研究计划项目（No.2021JQ-744）；陕西中医药大学学科创新团队项目（No.2019-YL12）；陕西中医药大学创新团队项目（No.2023-CXTD-05）。

作者简介：但林蔚，男，在读硕士研究生，主要从事中草药药效物质基础研究，email：857128908@qq.com *通信作者：李玉泽，男，讲师，主要从事中草药药效物质基础研究，email：lyz1990yeah@163.com；宋小妹，女，教授，主要从事中草药药效物质基础研究，email：songxiaom@126.com

缬草药材为败酱科缬草属植物缬草 *Valeriana officinalis* L. 的根及根状茎 [1]，性温，味辛、苦，又名大救驾、小救驾等，具有镇静、理气安神、止痛解痉的功效，临床常用于治疗心悸失眠，癫痫，心神不安，还多用于抗抑郁、抗焦虑等精神疾病治疗 [2-3]。近代研究表明缬草在抗病毒、抗菌方面有较好的活性 [4-6]，其化学成分主要含有萜类、黄酮类和木脂素等 [7-9]。

近年来，对缬草的系统分离研究主要集中在乙酸乙酯部位，对缬草水部位等大极性成分的研究较少，为了进一步发掘缬草中的化学成分，探索水部位及正丁醇部位中的化学成分类型，本试验对此进行了系统研究，现报道如下。

1　材料

LC-6AD 型半制备液相色谱仪（岛津公司）；柱色谱硅胶（青岛海湾精细化工有限公司）；薄层硅胶板（烟台江友硅胶发展有限公司）；Sephadex LH-20（Pharmacia 精细化工有限公司）；YMC-Pack Pro C_{18} 半制备色谱柱（250 mm×10 mm，5 μm）；AVANCE 型核磁共振波谱仪（Burker 公司）；DLSB series 型低温冷凝循环泵（郑州长城科工贸公司）；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

缬草购自陕西秦岭太白，经陕西中医药大学药学院杨新杰副教授鉴定为败酱科植物缬草属植物缬草 *Valeriana officinalis* L. 的干燥根及根茎。

2　提取与分离

缬草药材 10.0 kg 粉碎成粗粉并用 80% 乙醇回流提取 3 次，每次 1.5 h。合并提取液后减压浓缩得总浸膏（1.2 kg），总浸膏与水混悬后用石油醚（60 ～ 90 ℃）萃取，取水层，加入水饱和正丁醇萃取，萃取液减压浓缩后得到缬草正丁醇部位（289.0 g）和水部位（790.0 g）。

将水部位用 D101 大孔吸附树脂柱色谱进行分离提纯，依次用 H_2O，10%、20%、30%、50%、90% 乙醇进行梯度洗脱，经薄层色谱检测后合并相似组成分洗脱液并回收溶剂，得到 8 个组分（Fr.1 ～ 8）。Fr.3（6.03 g）经硅胶柱色谱与半制备液相色谱分离提纯得到化合物 **1**（25.7 mg）；Fr.4（27.1 g）经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及半制备液相分离提纯得到化合物 **2**（25.6 mg）、**4**（32.5 mg）、**5**（7.1 mg）、**6**（13.9 mg）和 **7**（7.2 mg）；Fr.2（6.25 g）经硅胶柱色谱与半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **3**（9.2 mg）、**8**（10.2 mg）、**16**（8.6 mg）和 **20**（9.6 mg）；Fr.6（9.32 g）经硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 1∶0 → 0∶1）纯化合并后得 4 个组分（Fr.6.1 ～ 6.4），其中 Fr.6.2 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱与半制备色谱分离纯化得到化合物 **9**（11.2 mg）、**17**（12.7 mg）和 **20**（10.6 mg）；Fr.1 经硅胶柱色谱与半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **15**（8.6 mg）。

将正丁醇部位用硅胶柱色谱进行分离提纯，用二氯甲烷 - 甲醇（80∶1 ～ 5∶1）梯度洗脱，得到 8 个组分（Fr.9 ～ Fr.16）。Fr.12（5.2 g）经硅胶柱色谱分离提纯，用二氯甲烷 - 甲醇（40∶1 ～ 5∶1）梯度洗脱，得到 4 个组分 Fr.12.1 ～ Fr.12.4。Fr.12.3 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **11**（8 mg）和 **13**（13 mg）；Fr.12.4 经半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **14**（13 mg）。Fr.13（13.2 g）经 MCI 柱色谱与半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **10**（8 mg）和 **18**（22 mg）；Fr.11（23.2 g）经硅胶柱色谱分离纯化得到 6 个组分 Fr.11.1 ～ Fr.11.6；Fr.11.2 再经硅胶柱色谱与半制备液相色谱分离纯化得到化合物 **19**（2.1 mg）。

分离所得化合物结构见图 1。

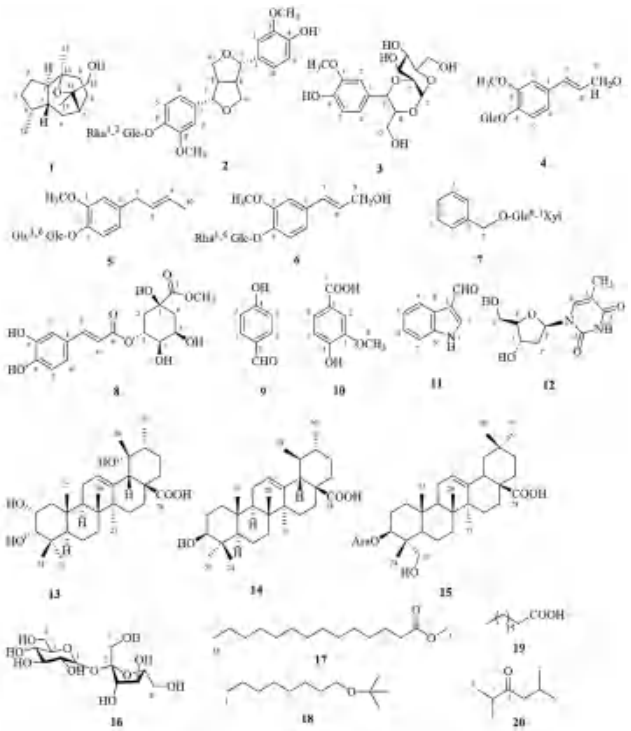


图 1　缬草中分离化合物结构

Fig 1　Structures of constituents isolated from *Valeriana officinalis* L.

3　结构鉴定

化合物 **1**：无色油状物，ESI-MS *m/z* 261.2（$[M + Na]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：1.69 ～ 1.72（1H，m，H-1），1.39 ～ 1.41（1H，m，H-2a），1.53 ～ 1.55（1H，m，H-2b），1.01 ～ 1.06（1H，m，H-3a），2.00 ～ 2.02（1H，m，H-3b），

2.09～2.11（1H，m，H-4），2.03～2.04（1H，m，H-5），1.33～1.36（1H，m，H-6a），1.97～1.99（1H，m，H-6b），1.97～1.99（1H，m，H-7），2.05～2.07（1H，m，H-8a），1.56～1.58（1H，m，H-8b），1.58～1.59（1H，m，H-9a），1.64～1.67（1H，m，H-9b），3.18（1H，d，J＝10.4 Hz，H-12a），3.59（1H，d，J ＝ 10.4 Hz，H-12b），1.25（3H，s，H-13），0.78（1H，d，J＝6.8 Hz，H-14），1.12（1H，s，H-15）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：50.2（C-1），28.4（C-2），32.2（C-3），33.1（C-4），42.2（C-5），33.4（C-6），32.2（C-7），24.3（C-8），35.4（C-9），74.9（C-10），77.0（C-11），69.6（C-12），23.4（C-13），18.7（C-14），28.3（C-15）。数据与文献[10]对照基本一致，故鉴定化合物 **1** 为 valerol A。

化合物 **2**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 689.2（[M＋Na]$^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.03（1H，d，J ＝ 2.0 Hz，H-2），7.14（1H，d，J ＝ 8.3 Hz，H-5），6.93（1H，dd，J ＝ 2.0 Hz，J ＝ 8.3 Hz，H-6），4.71（1H，d，J ＝ 4.0 Hz，H-7），3.13（1H，m，H-8），4.24（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-9a），3.87（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-9b），6.94（1H，d，J ＝ 1.9 Hz，H-2'），6.76（1H，d，J ＝ 8.1 Hz，H-5'），6.80（1H，dd，J ＝ 1.9 Hz，J ＝ 8.1 Hz，H-6'），4.76（1H，d，J＝3.8 Hz，H-7'），3.20（1H，m，H-8'），4.22（1H，m，H-9'a），3.86（1H，m，H-9'b），4.87（1H，d，J ＝ 7.5 Hz，H-1''），3.68（1H，dd，J ＝ 9.1 Hz，J ＝ 7.8 Hz，H-2''），3.35-3.50（3H，m，H-3''～5''），3.82（1H，m，H-6''a）3.67（1H，dd，J ＝ 4.1 Hz，J ＝ 12.1 Hz，H-6''b），5.01（1H，d，J ＝ 1.4 Hz，H-1'''），3.94（1H，m，H-2'''），3.87（1H，m，H-3'''），3.40（1H，m，H-4'''），3.37（1H，m，H-5'''），1.25（1H，d，J＝6.8 Hz，H-6'''），3.85（3H，s，H-3-OCH_3），3.86（3H，s，H-3'-OCH_3），^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：137.6（C-1），111.7（C-2），151.1（C-3），147.7（C-4），118.2（C-5），120.2（C-6），87.3（C-7），55.5（C-8），72.9（C-9），133.9（C-1'），111.1（C-2'），149.3（C-3'），147.5（C-4'），116.2（C-5'），119.9（C-6'），87.6（C-7'），55.7（C-8'），72.8（C-9'），103.0（C-1''），78.4（C-2''），78.2（C-3''），71.5（C-4''），78.0（C-5''），62.6（C-6''），98.2（C-1'''），71.5（C-2'''），71.7（C-3'''），68.7（C-4'''），75.1（C-5'''），18.0（C-6'''），56.9（C-3-OCH_3），56.6（C-3'-OCH_3）。数据与文献[11]对照基本一致，故鉴定化合物 **2** 为 pinoresinol-4-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl（1→2）-*β*-*D*-glucopyranoside。

化合物 **3**：褐色粉末，ESI-MS *m/z* 376.1（[M＋NH_4]$^-$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.96（1H，d，J ＝ 1.9 Hz，H-2），6.76（1H，d，J ＝ 8.1 Hz，H-5），6.84（1H，dd，J＝1.9 Hz，J＝8.1 Hz，H-6），4.43（1H，d，J＝9.5 Hz，H-7），3.79（1H，m，H-8），3.38（1H，m，H-9a），3.45（1H，m，H-9b），4.59（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-1'），3.14～3.90（5H，m，H-2'～5'），3.70（1H，dd，H-6'a），3.90（1H，dd，H-6'b），3.85（3H，s，H-3-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：129.5（C-1），112.4（C-2），149.4（C-3），149.1（C-4），116.4（C-5），122.0（C-6），80.3（C-7），82.7（C-8），62.2（C-9），99.8（C-1'），75.1（C-2'），80.8（C-3'），71.9（C-4'），79.8（C-5'），62.6（C-6'），56.4（C-OCH_3）。数据与文献[12]对照基本一致，故鉴定化合物 **3** 为 junipetrioloside A。

化合物 **4**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 341.1（[M－H]$^-$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.07（1H，d，J ＝ 2.0 Hz，H-2），7.10（1H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-5），6.94（1H，dd，J ＝ 2.0 Hz，J ＝ 8.4 Hz，H-6），6.54（1H，d，J ＝ 16.1 Hz，H-7），6.27（1H，m，H-8），4.21（1H，d，J ＝ 5.7 Hz，H-9），4.91（1H，d，J＝7.9 Hz，H-1'），3.32～3.86（6H，m，H-2'～6'），3.87（3H，s，H-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：133.8（C-1），111.5（C-2），150.9（C-3），147.7（C-4），118.0（C-5），120.8（C-6），131.4（C-7），129.0（C-8），63.8（C-9），102.8（C-1'），75.0（C-2'），77.9（C-3'），71.4（C-4'），78.2（C-5'），62.6（C-6'），56.8（C-OCH_3）。数据与文献[13]对照基本一致，故鉴定化合物 **4** 为 coniferin。

化合物 **5**：白色无定型粉末，ESI-MS *m/z* 495.1（[M ＋ Na]$^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.82（1H，d，J＝2.0 Hz，H-3），6.74（1H，d，J＝8.2 Hz，H-5），7.05（1H，d，J＝8.2 Hz，H-6），3.34（2H，m，H-7），5.96（1H，m，H-8），5.04（2H，m，H-9），1.20（3H，d，J ＝ 6.2 Hz，H-10），4.32（1H，d，J ＝ 6.9 Hz，H-1'），3.34～3.81（4H，m，H-2'～5'），3.99（1H，dd，J ＝ 1.8 Hz，J ＝ 11.0 Hz，H-6'a），3.60（1H，d，J ＝ 11.0 Hz，H-6'b），4.79（1H，d，J ＝ 7.4 Hz，H-1''），3.31～3.81（6H，m，H-2''～6''），3.87（3H，s，H-3-OCH_3）；

^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：144.9（C-1），149.4（C-2），114.5（C-3），135.2（C-4），120.8（C-5），117.0（C-6），39.4（C-7），137.6（C-8），112.8（C-9），16.6（C-10），101.7（C-1'），73.6（C-2'），75.5（C-3'），70.8（C-4'），76.5（C-5'），66.4（C-6'），100.7（C-1"），71.0（C-2"），72.7（C-3"），73.6（C-4"），68.4（C-5"），62.9（C-6"），55.3（C-OCH_3）。数据与文献[14]对照基本一致，故鉴定化合物 **5** 为 eugenyl β-rutinoside。

化合物 **6**：白色无定型粉末，ESI-MS *m/z* 489.2（$[M+H]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.07（1H，d，J = 1.6 Hz，H-2），7.05（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5），6.97（1H，dd，J = 1.6 Hz，J = 8.4 Hz，H-6），6.55（1H，d，J = 15.9 Hz，H-7），6.29（1H，dd，J = 5.7 Hz，J = 15.9 Hz，H-8），4.21（2H，dd，J = 1.5 Hz，J = 5.8 Hz，H-9），4.84（1H，d，J = 7.4 Hz，H-1'），3.44（1H，m，H-2'），3.47（1H，m，H-3'），3.31～3.81（2H，m，H-4' ～ 5'），4.00（1H，m，J = 1.7 Hz，J = 9.5 Hz，H-6'a），3.54（1H，m，H-6'b），4.69（1H，d，J = 1.7 Hz，H-1"），3.77（4H，m，H-2" ～ 5"），1.20（3H，d，J = 1.5 Hz，H-6"），3.82（3H，s，H-3-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：133.9（C-1），111.4（C-2），147.6（C-3），150.9（C-4），118.1（C-5），120.8（C-6），131.3（C-7），129.0（C-8），63.8（C-9），102.8（C-1'），75.0（C-2'），77.0（C-3'），71.6（C-4'），78.0（C-5'），57.0（C-6'），102.2（C-1"），72.2（C-2"），72.4（C-3"），74.1（C-4"），70.0（C-5"），18.0（C-6"），56.8（C-OCH_3）。数据与文献[15]对照基本一致，故鉴定化合物 **6** 为 xiecaoside E。

化合物 **7**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 423.2（$[M+Na]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.42（2H，d，J = 6.9 Hz，H-2，6），7.31（3H，m，H-3-5），4.92（1H，d，J = 11.9 Hz，H-7a），4.66（1H，d，J = 11.9 Hz，H-7b），4.34（1H，d，J = 7.3 Hz，H-1'），3.21 ～ 3.86（3H，d，H-2' ～ 4'），3.87（1H，dd，J = 12.4 Hz，J = 3.2 Hz，H-5'），4.12（1H，dd，J = 11.5 Hz，J = 2.2 Hz，H-6'a），3.76（1H，dd，J = 11.4 Hz，J = 5.8 Hz，H-6'b），4.36（1H，d，J = 8.0 Hz，H-1"），3.21 ～ 3.86（4H，m，H-2" ～ 5"）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：139.2（C-1），129.3（C-2，6），129.2（C-3，5），128.7（C-4），71.9（C-7），103.4（C-1'），74.2（C-2'），77.9（C-3'），71.7（C-4'），77.0（C-5'），69.5（C-6'），105.2（C-1"），72.4（C-2"），75.1（C-3"），69.5（C-4"），66.7（C-5"）。数据与文献[16]对照基本一致，故鉴定化合物 **7** 为 benzyl primeveroside。

化合物 **8**：白色无定型粉末，FAB-MS *m/z* 367.1（$[M-H]^-$），^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.12 ～ 1.73（4H，overlapped，H-2，6），3.88（1H，m，H-3），3.88（1H，m，H-4），5.01（1H，m，H-5），6.98（1H，d，J = 1.9 Hz，H-2'），6.74（1H，d，J = 8.2 Hz，H-5'），6.94（1H，dd，J = 8.2 Hz，J = 1.9 Hz，H-6'），7.38（1H，d，J = 15.8 Hz，H-7'），6.11（1H，d，J = 15.9 Hz，H-8'），3.56（3H，s，H-7-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：73.0（C-1），37.2（C-2），66.9（C-3），69.3（C-4），71.0（C-5），35.1（C-6），173.6（C-7），125.3（C-1'），114.6（C-2'），145.1（C-3'），148.5（C-4'），115.9（C-5'），121.3（C-6'），145.7（C-7'），113.8（C-8'），165.4（C-9'），51.8（7C-OCH_3）。数据与文献[17]对照基本一致，故鉴定化合物 **8** 为 3-caffeoylquinic acid methyl ester。

化合物 **9**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 123.0（$[M+H]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：7.74（2H，d，J = 7.9 Hz，H-2，6），6.92（2H，d，J = 7.9z Hz，H-3，5），9.79（1H，s，H-CHO）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：129.8（C-1），132.7（C-2，6），116.3（C-3，5），162.3（C-4），29.9（C-CHO）。数据与文献[18]对照基本一致，故鉴定化合物 **9** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **10**：白色针晶，ESI-MS *m/z* 167.3（$[M-H]^-$），提示分子式为 $C_8H_8O_4$。mp 215 ～ 217 ℃ dec，ESI-MS *m/z* 169.4（$[M-H]^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：7.46（1H，brs，H-2），6.68（1H，brd，J = 8.5 Hz，H-5），7.43（1H，d，J = 8.5 Hz，H-6），3.75（3H，s，-OCH_3）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：122.6（C-1，6），114.3（C-2），148.0（C-3），146.5（C-4），113.5（C-5），170.5（C-7），55.6（-OCH_3，C-8）。数据与文献[19]报道一致，故鉴定化合物 **10** 为 vanillic acid。

化合物 **11**：黄色油状物，ESI-MS *m/z* 146.1（$[M+H]^+$），提示分子式为 C_9H_7NO。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：10.06（1H，s，CHO），8.32（1H，d，J = 8.5 Hz，H-4），7.86（1H，d，J = 3.2 Hz，H-2），7.43（1H，dd，J = 7.6，J = 1.5 Hz，H-7），7.30（1H，m，H-5），7.31（1H，m，H-6）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：185.3（3-CHO）136.6（C-2），136.6（C-9），127.2（C-

8），124.6（C-6），123.4（C-4），122.3（C-5），120.6（C-3），111.1（C-7）。数据与文献[20]一致，故鉴定化合物 **11** 为吲哚 -3- 甲醛。

化合物 **12**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 243.1（$[M+H]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：7.70（1H，s，H-6），6.18（1H，t，J = 6.8 Hz，H-1'），2.07（2H，m，H-2'），4.22（1H，m，H-3'），3.74（1H，m，H-4'），3.57（2H，m，H-5'），1.77（3H，s，H-5-CH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：150.4（C-2），163.8（C-4），109.3（C-5），136.1（C-6），83.7（C-1'），41.2（C-2'），70.4（C-3'），87.2（C-4'），61.3（C-5'），12.2（5-CH_3）。数据与文献[21]对照基本一致，故鉴定化合物 **12** 为 thymine DNA nucleotides。

化合物 **13**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 486.3（$[M-H]^-$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：3.94（1H，dt，J = 11.6 Hz，J = 3.6 Hz，H-2），3.36（1H，m，H-3），5.33（1H，t，J = 4.2 Hz，H-12），1.02（3H，s，H-23），0.82（3H，s，H-24），0.88（3H，s，H-25），1.02（3H，s，H-26），1.36（3H，s，H-27），1.23（3H，s，H-29），0.96（3H，m，H-30）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：42.3（C-1），67.3（C-2），79.9（C-3），41.2（C-4），49.4（C-5），19.2（C-6），34.1（C-7），39.2（C-8），48.3（C-9），39.5（C-10），27.2（C-11），129.3（C-12），140.2（C-13），43.1（C-14），29.5（C-15），26.5（C-16），49.4（C-17），55.2（C-18），73.5（C-19），43.5（C-20），24.6（C-21），39.1（q，C-22），29.2（C-23），22.3（C-24），17.6（C-25），16.5（C-26），24.8（C-27），181.2（C-28），27.2（C-29），16.8（C-30）。数据与文献[22]报道基本一致，故鉴定化合物 **13** 为蔷薇酸。

化合物 **14**：白色针晶，ESI-MS *m/z*：458.3（$[M+H]^+$），10% 硫酸 - 乙醇显粉红色（105 ℃）。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：3.45（1H，dd，J = 5.2 Hz，H-3），5.49（1H，d，J = 10.6 Hz，J = 6.2 Hz，H-12），2.64（1H，d，J = 11.2 Hz，H-18），1.23（3H，s，H-23），0.98（3H，s，H-24），1.04（3H，s，H-25），1.04（3H，s，H-26），1.22（3H，s，H-27），0.94（3H，d，J = 5.6 Hz，H-29），1.02（3H，d，J = 5.6 Hz，H-30）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：39.3（C-1），28.1（C-2），78.3（C-3），39.2（C-4），55.9（C-5），18.6（C-6），33.9（C-7），39.2（C-8），48.1（C-9），36.9（C-10），23.6（C-11），125.6（C-12），140.0（C-13），42.3（C-14），29.1（C-15），24.8（C-16），48.2（C-17），53.5（C-18），39.1（C-19），39.2（C-20），31.3（C-21），37.4（C-22），28.7（C-23），16.6（C-24），17.3（C-25），17.3（C-26），23.6（C-27），179.9（C-28），15.5（C-29），21.3（C-30）。数据与文献[23]报道一致，故鉴定化合物 **14** 为熊果酸。

化合物 **15**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 605.3（$[M+H]^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：1.98 ～ 0.80（2H，m，H-1 ～ 3），1.98 ～ 0.80（2H，m，H-5 ～ 7），1.98 ～ 0.80（1H，m，H-9），1.98 ～ 0.80（1H，m，H-11），5.20（1H，m，H-12），1.98 ～ 0.80（2H，m，H-15 ～ 16），2.72（1H，dd，J = 13.2 Hz，J = 3.3 Hz，H-18），1.58（2H，m，H-19），1.98 ～ 0.80（2H，m，H-21 ～ 22），3.20（2H，m，H-23），0.57（3H，s，H-24），0.88（3H，s，H-25），0.70（3H，s，H-26），1.10（3H，s，H-27），0.88（3H，s，H-29），0.88（3H，s，H-30），4.18（1H，d，J = 6.9 Hz，H-1'），3.30（1H，m，H-2'），3.40（1H，m，H-3'），3.60（1H，m，H-4'），3.65（1H，m，H-5'a），3.44（1H，m，H-5'b）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：37.9（C-1），25.5（C-2），80.1（C-3），42.3（C-4），46.2（C-5），17.2（C-6），32.7（C-7），38.9（C-8），47.2（C-9），36.0（C-10），23.1（C-11），121.7（C-12），143.4（C-13），41.3（C-14），27.3（C-15），23.0（C-16），46.0（C-17），41.3（C-18），46.0（C-19），30.2（C-20），33.3（C-21），32.0（C-22），62.9（C-23），12.9（C-24），15.6（C-25），16.8（C-26），25.5（C-27），175.2（C-28），32.7（C-29），23.4（C-30），104.6（C-1'），71.1（C-2'），72.7（C-3'），67.4（C-4'），64.9（C-5'）。数据与文献[24]对照基本一致，故鉴定化合物 **15** 为 δ-hederin。

化合物 **16**：无色结晶，ESI-MS *m/z* 341.2（$[M-H]^-$），^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：5.15（1H，d，J = 3.8 Hz，H-1），3.40（1H，dd，J = 9.8 Hz，J = 3.8 Hz，H-2），3.67（1H，m，H-3），3.34（1H，d，J = 9.7 Hz，H-4），3.77（1H，m，H-5），3.74（1H，m，H-6），3.62（1H，m，H-1'a），3.52（1H，m，H-1'b），4.09（1H，d，J = 8.3 Hz，H-3'），4.01（1H，d，J = 7.9 Hz，H-4'），3.81（1H，m，H-5'），3.74（2H，m，H-6'）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：94.0（C-1），73.2（C-2），74.9（C-3），71.2（C-4），73.8（C-5），62.9（C-6），62.8（C-1'），103.8（C-2'），78.0（C-3'），76.3（C-4'），83.3（C-5'），64.6（C-6'）。数据与文献[25]对照基本一致，故

鉴定化合物 **16** 为蔗糖。

化合物 **17**：无色油状物，ESI-MS *m/z* 243.2（[M ＋ H]$^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：3.66（3H，s，H-1），2.30（2H，t，J ＝ 7.6 Hz，H-4），1.62（2H，m，H-5），1.26（16H，m，H-6 ～ 13），1.26（2H，m，H-14），1.26（2H，m，H-15），0.88（3H，t，J ＝ 6.7 Hz，H-16）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：51.6（C-1），174.6（C-3），34.3（C-4），25.2（C-5），29.9（C-6～13），32.1（C-14），22.9（C-15），14.3（C-16）。数据与文献 [26] 对照基本一致，故鉴定化合物 **17** 为正十四烷酸甲酯。

化合物 **18**：无定型粉末，ESI-MS *m/z* 187.2（[M ＋ H]$^+$），提示分子式为 $C_{12}H_{26}O$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.82（1H，d，J ＝ 8.2 Hz，H-3），3.35（1H，s，H-4），3.16（2H，s，H-5），2.22（2H，m，H-6），2.11（2H，m，H-7），2.02（2H，m，H-8），2.14（2H，m，H-9），2.01（2H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-10）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：13.9（C-1），28.7（C-2），29.0（C-3），22.1（C-4），25.2（C-5），28.4（C-6），30.2（C-7），31.2（C-8），61.2（C-9），73.6（C-10）。数据与文献 [27] 报道一致，故鉴定化合物 **18** 为 1-*t*-butoxyoctane。

化合物 **19**：无色粉末，ESI-MS *m/z* 283.1（[M － H]$^-$），提示分子式为 $C_{18}H_{36}O_2$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.33（2H，t，J ＝ 7.3 Hz，H-2），1.64（2H，m，H-3），1.26 ～ 1.32（28H，m，H-4 ～ 15），1.26 ～ 1.32（2H，m，H-16），1.26 ～ 1.32（2H，m，H-17），0.87（3H，dd，J ＝ 7.0 Hz，H-18）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：179.5（C-1），33.9（C-2），24.3（C-3），29.3 ～ 29.9（C-4 ～ 15），31.9（C-16），22.5（C-17），14.2（C-18）。数据与文献 [28] 报道一致，故鉴定化合物 **19** 为硬脂酸。

化合物 **20**：无色油状物，ESI-MS *m/z* 129.1（[M ＋ H]$^+$），^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：0.97（3H，d，J ＝ 6.9 Hz，H-1），2.20（1H，m，H-2），2.24（2H，d，J ＝ 7.1 Hz，H-4），2.08（1H，m，H-5），0.92（6H，d，J ＝ 6.6 Hz，H-6，8），0.96（3H，d，J ＝ 6.9 Hz，H-7）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：19.1（C-1），30.2（C-2），173.6（C-3），43.3（C-4），25.9（C-5），22.6（C-6，8），17.4（C-7）。数据与文献 [29] 对照基本一致，故鉴定化合物 **20** 为 2，5- 二甲基 -3- 己酮。

4　讨论

本试验对缬草 80% 乙醇提取物正丁醇部位与水部位进行化学成分研究，从中分离并鉴定出 20 个化合物，其中化合物 **3** 为从败酱科植物中首次分离得到，化合物 **2**、**4**、**7**、**12**、**16** 为从缬草属植物中首次分离得到，化合物 **6**、**8**、**15** 为从缬草植物中首次分离得到，丰富了缬草的化合物库，进一步阐明了缬草大极性部位的化学成分组成，为缬草药材后续研究提供物质及理论基础。

参考文献

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1980.

[2] 樊浩，严淑婷，梁小飞，等 . 缬草化学成分及生理活性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（12）：172-175.

[3] 孟繁旭，李美阳 . 缬草挥发油的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 农业与技术，2022，42（1）：28-30.

[4] 李文杰，李美阳 . 药用植物缬草的研究进展 [J]. 北方园艺，2019（12）：139-145.

[5] 任晓娜，刘宇良，于航，等 . 缬草、龙脑精油的抑菌活性 [J]. 热带农业科学，2018，38（10）：74-78.

[6] 魏桂民，李德文，王少铭，等 . 缬草研究进展 [J]. 农技服务，2016，33（12）：18-19.

[7] 左月明，王亚芳，张忠立，等 . 缬草中木脂素类化学成分研究 [J]. 中药材，2018，41（5）：1091-1094.

[8] 左月明，严欢，张忠立，等 . 缬草苯丙素类化学成分研究 [J]. 时珍国医国药，2017，28（7）：1545-1547.

[9] 左月明，徐元利，张忠立，等 . 缬草中黄酮类化学成分研究 [J]. 中药材，2017，40（6）：1331-1334.

[10] Wang PC，Ran XH，Chen R，et al. Sesquiterpenoids and lignans from the roots of *Valeriana officinalis* L. [J]. Chem Biodivers，2011，8（10）：1908-1913.

[11] Yuan Z，Wang W，Tang L，et al. Lignan and flavonoid glycosides from *Urtica laetevirens* Maxim. [J]. J Nat Med，2009，63（1）：100-101.

[12] Gilles C，Joseph V，Albert J，et al. Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea* [J]. Phytochemistry，1997，45（8）：1679-1682.

[13] Sugiyama M，Nagayama E，Kikuchi M. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus asiaticus* [J]. Phytochemistry，1993，33（5）：1215-1219.

[14] 史伟，陈凌云 . 五花血藤化学成分的研究 [J]. 云南中医学院学报，2014，37（3）：25-27.

[15] Wang CF，Xiao Y，Yang BY，et al. Isolation and screened neuroprotective active constituents from the roots and rhizomes of *Valeriana amurensis* [J]. Fitoterapia，2014，96：48-55.

[16] 廖矛川，陈凤，张雨馨，等 . 石菖蒲正丁醇部位化学成分研究 [J]. 中南民族大学学报（自然科学版），2016，35（1）：64-66，74.

[17] Peng LY，Mei SX，Jiang B，et al. Constituents from *Lonicera japonica* [J]. Fitoterapia，2000，71（6）：713-715.
[18] 陈颖志，肖朝江，颜宇洁，等 . 无茎黄芪根的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（15）：6-11.
[19] Yuan X，Wen HX，Cui YL，et al. Phenolics from *Lagotis brevituba* Maxim [J]. Nat Prod Res，2017，31（3）：362-366.
[20] Liao JH，Hu XJ，Yuan CM，et al. A new indole alkaloid from the fruits of capparis masaikai [J]. Asian J Chem，2014，26（14）：4504-4506.
[21] 刘艳，荣晓惠，谭金燕，等 . 洋金花叶中黄酮类和生物碱类化学成分研究 [J]. 中草药，2021，52（14）：4141-4152.
[22] Yuan C，Huang L，Suh JH，et al. Bioactivity-guided isolation and identification of antiadipogenic compounds in shiya tea（leaves of adinandra nitida）[J]. J Agr Food Chem，2019，67（24）：6785-6791.
[23] Katsumi E，Oshima N，Kagawa N，et al. Changes in the extracted amounts and seasonally variable constituents of diospyros kaki at different growth stages [J]. J Nat Med，2021，75（1）：105-115.
[24] Atsuyoshi N，Masaya I，Yuusuke S，et al. Effects of flavonoids and triterpene analogues from leaves of *Eleutherococcus sieboldianus*（Makino）Koidz.‘Himeukogi’in 3T3-L1 preadipocytes [J]. Molecules，2017，22（4）：671-676.
[25] 倪建成，卢柱华，莫舒云，等 . 巴戟天化学成分的研究 [J]. 中成药，2021，43（5）：1212-1216.
[26] Chinta SP，Goller S，Uhl G，et al. Identification and synthesis of branched wax type esters，novel surface lipids from the spider argyrodes elevatus（Araneae：Theridiidae）[J]. Chem Biodivers，2016，13（9）：1202-1220.
[27] Mahammed KA，Murthy P，Raju KM. A convenient synthesis of tert-butyl ethers under microwave condition [J]. Indian J Chem B，2008，47（4）：575-578.
[28] 尹爱武，黄赛金 . 野山楂茎化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2012，24（7）：897-899.
[29] 陈颖志，肖朝江，颜宇洁，等 . 无茎黄芪根的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（15）：6-11.

（收稿日期：2023-06-07；修回日期：2023-06-25）

微芯片电泳技术鉴定金银花和山银花

董露[1]，石晶[1]，李丽潇[2]，李胜男[1]，林书俊[1]，宋静远[1]，郭怀忠[1*]（1. 河北大学药学院，河北省药物质量分析控制重点实验室，河北 保定 071002；2. 岛津企业管理（中国）有限公司，上海 200233）

摘要：目的 利用微芯片电泳技术对金银花和不同基原山银花进行鉴定。**方法** 根据忍冬科植物的基因序列变异位点分别设计出金银花和山银花的特异性聚合酶链式反应（PCR）引物，运用等位基因特异聚合酶链式反应（AS-PCR），对各药材的 DNA 进行特异性扩增，并应用全自动微芯片电泳技术对扩增产物进行分析。**结果** 使用金银花 PCR 引物时，金银花可扩增出约 468 bp 的特征性 DNA 片段，而不同基原的山银花几乎没有该片段；使用山银花 PCR 引物时，不同基原的山银花均扩增出约 331 bp 的特征性 DNA 片段，而金银花几乎没有该片段。**结论** 本方法可对金银花和不同基原的山银花进行快速准确的鉴定，为中药 DNA 分子鉴定技术的拓展应用提供参考。

关键词：微芯片电泳；等位基因特异聚合酶链式反应；鉴定；金银花；山银花
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2306-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.007

Identification of *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* by microchip electrophoresis technology

DONG Lu[1], SHI Jing[1], LI Li-xiao[2], LI Sheng-nan[1], LIN Shu-jun[1], SONG Jing-yuan[1], GUO Huai-zhong[1*] (1. *College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Analysis and Control, Baoding Hebei* 071002; 2. *Shimadzu Enterprise* (*China*) *Co., Ltd., Shanghai* 200233)

基金项目：河北省自然科学基金项目（No. H2021201018，No. H2016201221）；河北省创新能力提升计划（No.20567605H）。
作者简介：董露，女，硕士，主要从事中药分析与质量控制研究，email：donglu_532706018@qq.com *通信作者：郭怀忠，男，教授，主要从事中药质量控制及其药效学研究，email：ghuaizh@aliyun.com

Abstract: Objective To identify *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* of different origins by microchip electrophoresis technology. **Methods** Specific polymerase chain reaction (PCR) primers of *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* were first designed according to the gene sequence variation of *Lonicera*, and the allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) was used to specifically amplify the extracted DNAs of the Chinese medicinal materials, respectively. Automated microchip electrophoresis technology was used to analyze the amplification products. **Results** *Lonicerae japonica flos* generated a characteristic DNA fragment around 468 with using *Lonicera* PCR primers, while *Lonicerae flos* of different origins did not have such fragment. *Lonicerae flos* generated characteristic DNA fragment around 331 bp with *Lonicerae flos* PCR primers, while *Lonicerae japonica flos* did not have this fragment. **Conclusion** The method is suitable for the rapid and accurate identification of *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* of different origins, and can provide reference for the development and application of DNA molecular identification of traditional Chinese medicine.

Key words: microchip electrophoresis; allele-specific polymerase chain reaction; identification; *Lonicerae japonica flos*; *Lonicerae flos*

金银花源自忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花，主要包括有机酸、黄酮、三萜皂苷、环烯醚萜苷、挥发油等成分，具有抗炎解热、抗病毒、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、保护肝脏及肺脏等药理作用[1]。山银花为忍冬的近缘种红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的干燥花蕾或初开的花，主要成分为绿原酸，其在抗病毒、抗菌方面优于金银花[2]，两者功效有相似之处，但又不完全相同。历史上山银花曾经作为金银花使用，直到 2005 年版《中国药典》才将两者区分开来，但目前仍存在将山银花作为金银花种植、入药的情况[3-4]。山银花的不同基原植物中，灰毡毛忍冬与金银花相似度最高，普通鉴定手段难以区分[5]。

目前，研究主要根据药材原植物和饮片的形态特征、显微特征和化学成分等对金银花和山银花进行鉴定[6-9]，效果较理想。鉴别方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、核磁共振氢谱法、傅里叶变换红外光谱法[10]、高光谱成像技术法等。Cai 等[11]建立了超快速液相色谱 - 三重四极杆 / 线性离子阱质谱（UFLC-QTRAP-MS/MS）结合多元统计分析的综合质量评价方法，为金银花和山银花的质量控制提供了全面的信息，但其分析成本较高。

近年来，DNA 分子标记技术发展迅速，具有稳定以及不受环境因素、样品形态、材料部位影响的特点。目前报道的 DNA 分子鉴别方法包括限制性片段长度多态性（RFLP）分子标记，随机扩增多态性 DNA（RAPD）分子标记及遗传多样性分析，简单重复序列区间多态性（ISSR）分子标记及遗传多样性分析，DNA 条形码技术等[12]。DNA 条形码技术主要包括单位点条形码、多位点条形码、超级条形码、元条形码、微型条形码、复合条形码（宏条形码），这些技术的应用进一步实现了对道地药材及其混伪品的有效鉴定，具有较高的准确性和时效性[13-14]，DNA 测序技术也有应用[15]，但尚未普及。等位基因特异聚合酶链式反应（AS-PCR）具有操作简便快速、成本较低等优点。苏雪蓉等[16]采用 AS-PCR 法鉴别炮制辅料鳖血和常见掺伪品，取得了良好效果。

微芯片电泳是在毛细管电泳的基础上发展起来的，具有功能集成度高、样品用量少、分离速度快、灵敏度高、试剂消耗量少等优点，可实现自动化的高通量分析。目前，微芯片电泳的研究主要应用于医疗、环境、农业等领域[17]。刘杰等[18]通过 PCR 结合微芯片电泳检测的方法，根据宽体金线蛭、日本医蛭和菲牛蛭 3 个品种的线粒体同源序列，分别设计了水蛭样品的特异性引物，建立了三重 PCR 鉴别 3 个品种水蛭药材的方法。微芯片电泳技术可以快速分析 PCR 产物，较常规的琼脂糖凝胶电泳和 DNA 分子测序来说具有一定的优势。

本研究将 AS-PCR 与微芯片电泳技术相结合，对金银花和山银花进行鉴定，探讨微芯片电泳在中药鉴定中的应用潜力，以期建立更加简便可靠，且通用性好的中药易混品分子鉴定方法。

1 材料

1.1 仪器

MCE-202 MultiNA 微芯片电泳仪 [岛津企业管理（中国）有限公司]；朗基 L96G/Y 基因扩增仪（杭州朗基科学仪器有限公司）；JY600C 电泳仪和 JY-SCZ2 ＋电泳槽（北京市六一仪器厂）；Tanon-1600 凝胶成像仪（北京百金泰生物科技有限公司）；LS-C35L 立式压力蒸汽灭菌器（江阴滨江医疗设备厂）；天寒 TH-86-150-WA-860C 超低温冰箱（北京天地精仪科技有限公司）；AG-204 电子分析天平（精度：0.1 mg，瑞士 METTLER TOLEDO）；TG16-W 微量高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）。

1.2 试药

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit（日本 TaKaRa BIO 公司）；灭菌蒸馏水、2×Utaq PCR MasterMix、DNA marker 和 loading buffer（北京庄盟国际生物基因科技有限公司）；琼脂糖，上、下游引物 [生工生物工程（上海）股份有限公司]；三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠、冰醋酸（均为分析纯，天津市光复科技发展有限公司）；乙醇（医用规格，石家庄新宇三阳实业有限公司）；溴化乙锭（EB，Sigma-Aldrich）。金银花（山东）、灰毡毛忍冬（贵州）、红腺忍冬（山东）和黄褐毛忍冬（云南）均经河北大学药学院周程艳副教授鉴定。

2 方法

2.1 变异位点的选择和特异性引物的设计

从 GenBank 数据库中查找忍冬科植物叶绿体 DNA 的 *trnF-trnL* 间隔区基因序列。通过 Blast 进行比对分析，发现忍冬科植物间的序列区别较小，金银花 *trnF-trnL* 序列中 625 位为 G，其他植物均为 A。根据此变异位点设计引物，金银花的目的产物长度为 468 bp，各基原山银花的目的产物长度为 331 bp。利用 Primer Premier 5.0 设计引物，引物序列见表 1。

表 1 金银花和山银花特异性引物序列

Tab 1 Sequence of specific primer of *Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos*

引物	序列（5’-3’）
trnL	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
trnF	ATTTGAACTGGTGACACGAG
Jyh-F	GTTGACTGTCCTGTGTTGGT
Jyh-R	GGATGAGAAATATAACGAATTTAG
Syh-F	TTTATCCTTTTTTTGTTAGCGGTTGA
Syh-R	CTATCCCGACCATTCCC

注：*trnL*、*trnF*. 通用引物；*Jyh-F*、*Jyh-R*. 金银花上游引物、下游引物；*Syh-F*、*Syh-R*. 山银花上游引物、下游引物。

Note：*trnL*，*trnF*. universal primer；*Jyh-F*，*Jyh-R*. forward primer and reverse primer for *Lonicerae japonica flos*；*Syh-F*，*Syh-R*. forward primer and reverse primer for *Lonicerae flos*.

2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit 试剂盒提取各药材中的总 DNA。称取 100 mg 干燥药材，－ 80 ℃冷冻过夜后，粉碎，快速研磨成细粉，置于 1.5 mL 离心管中，按照试剂盒流程进行操作，最后将洗脱的 DNA 保存在试管中。

PCR 反应体系体积为 20 μL，其中 10.0 μL 2×Utaq PCR MasterMix，primer 各 0.8 μL，DNA 模板 2.0 μL，灭菌水 6.4 μL。反应程序为 95 ℃预变性 30 s 后，94 ℃变性 30 s，61 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，35 个循环，最后 72 ℃循环后保持 7 min。

2.3 DNA 的测定

2.3.1 通用引物扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析　以各药材提取的 DNA 作为模板，采用通用引物 *trnL* 和 *trnF* 对所有样品进行扩增，以扩增条带的有无来检测模板 DNA 的质量。PCR 反应结束后，取 5 μL 扩增溶液与 1 μL 6×loading buffer 混匀，依次点入琼脂糖凝胶的胶孔中，约 40 min 后，待条带迁移至凝胶 2/3 处停止电泳，EB 染色 30 min，放入凝胶成像系统观察、成像。

2.3.2 特异性扩增产物的微芯片电泳分析　使用微芯片电泳系统对各药材特异性引物扩增产物进行检测。根据理论产物片段大小，实验中选用 DNA-500 试剂盒进行测定，SYBR Gold 荧光染料进行染色，采用发光二极管（LED）激发的荧光检测器采集荧光信号。根据分析序列依次放置分离缓冲液、Marker 溶液、Ladder 溶液和样品溶液，启动程序进行分析。

3 结果与讨论

3.1 模板 DNA 检测结果

通过琼脂糖凝胶电泳分析，各药材提取的 DNA 经扩增后均得到约 420 bp 长度的片段，证明所提取的 DNA 模板均可用于进行下一步实验。

3.2 微芯片电泳分析结果

利用微芯片电泳对各药材的 PCR 扩增产物进行分离分析，如图 1 所示。使用金银花特异性引物扩增时，金银花扩增出 475 bp 的 DNA 片段，且信号较强，如图 1A 所示；灰毡毛忍冬能扩增出 465 bp 的 DNA 片段，信号较弱，红腺忍冬和黄褐毛忍冬几乎没有近似该 bp 值的扩增产物，如图 1D、1F、1H 所示。使用山银花特异性引物扩增时，金银花能扩增出 480 bp 的 DNA 片段，但信号非常弱，接近于零，如图 1B 所示；灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬分别扩增出

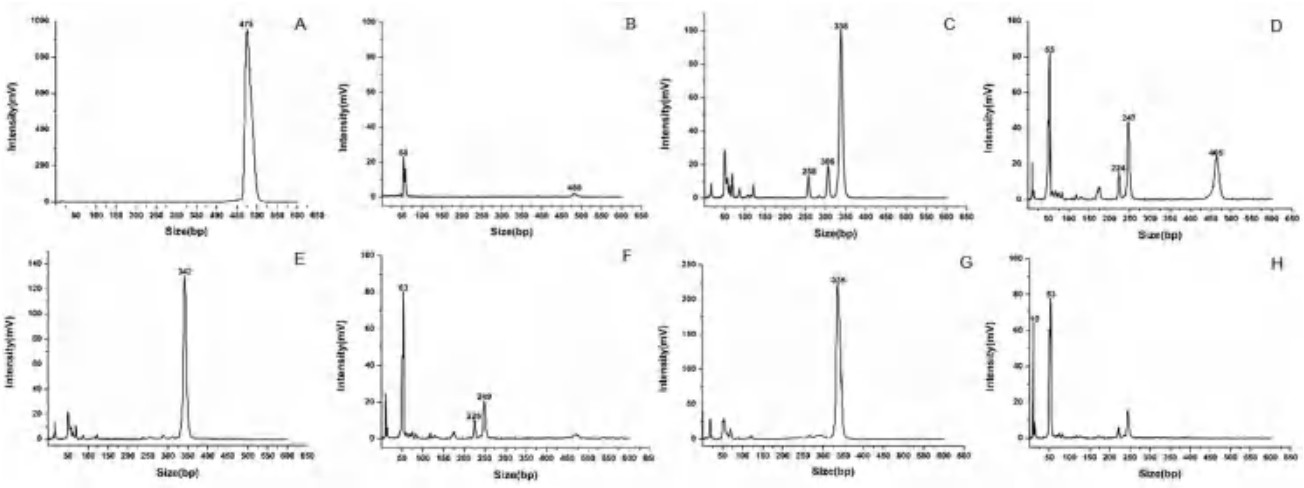


图 1　各药材扩增产物的微芯片电泳图

Fig 1　Microchip electrophoretograms of the amplified products of various medicinal materials

A. 金银花与金银花引物（*Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae japonica flos* primers）；B. 金银花与山银花引物（*Lonicerae japonica flos* and *Lonicerae flos* primers）；C. 灰毡毛忍冬与山银花引物（*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. and *Lonicerae flos* primers）；D. 灰毡毛忍冬与金银花引物（*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. and *Lonicerae japonica flos* primers）；E. 红腺忍冬与山银花引物（*Lonicera hypoglauca* Miq. and *Lonicerae flos* primers）；F. 红腺忍冬与金银花引物（*Lonicera hypoglauca* Miq. and *Lonicerae japonica flos* primers）；G. 黄褐毛忍冬与山银花引物（*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S.C. Cheng and *Lonicerae flos* primers）；H. 黄褐毛忍冬与金银花引物（*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S.C. Cheng and *Lonicerae japonica flos* primers）

338 bp、342 bp、336 bp 的 DNA 片段，且信号较强，如图 1C、1E、1G 所示。使用微芯片电泳测定，实测 bp 值一般会与理论值存在 5% 的相对误差，可见测定误差均在允许范围内。

结果表明，使用金银花特异性 PCR 引物时，金银花能扩增出特征性的 468 bp 的 DNA 片段，各基原山银花在此处没有或仅有较小的近似 bp 值的 DNA 片段；使用山银花特异性 PCR 引物时，灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬都可扩增出特征性的 331 bp 的 DNA 片段，而金银花几乎没有。说明所设计的两对基因引物可以专属性地鉴定金银花和不同基原的山银花。而通过整体对比不同基原山银花扩增产物的微芯片电泳谱图，发现红腺忍冬和黄褐毛忍冬的相似性很高，推测该两种基原的山银花与灰毡毛忍冬相比，在进化上亲缘关系较近。

由图 1 可见，采用金银花的特异性引物对灰毡毛忍冬 DNA 进行扩增时，可以得到信号较强的 465 bp 的 DNA 片段。与其他基原的山银花相比，灰毡毛忍冬的外观性状与金银花最为相似，特异性引物设计和 PCR 扩增条件仍需进一步完善，以提高鉴定的专属性。除金银花引物扩增金银花得到单一的 DNA 片段目标峰外，设计的其他引物扩增产物中均含有除目标峰外的非特异性扩增产物峰，尤其是灰毡毛忍冬扩增后得到的峰较多。推断可能是由于引物在其他非目标位点也引起一些 DNA 聚合反应，也可能是由于引物 3’末端不匹配碱基造成的错配延伸 [19]。但从另一方面考虑，明显不同的多峰现象也可以提高易混药材鉴定的专属性。此外，由于华南忍冬现已基本退出山银花的主流市场，本研究未能搜集到华南忍冬样品进行分析，相关问题有待进一步探讨。

为了保证结果的重复性，本研究优化并严格控制样品 DNA 的提取条件和 PCR 程序，并且在微芯片电泳分析 PCR 产物的操作过程中，采用低片段和高片段内标物（Lower marker 和 Upper marker）校正谱峰对应的片段长度，并通过测定 Ladder 所建立的 DNA 片段长度对迁移时间的工作曲线计算谱峰 bp 值，从而提高了品种鉴定的准确度和重复性。

叶绿体 DNA 是被子植物细胞核外的又一遗传体系，较核基因组简单，一般为母系单亲遗传。叶绿体 DNA 的编码区高度保守，但其非编码区（基因间隔区和内含子）的进化速度较快，且极少发生重组，进化路线独立，适用于种间和亚种水平的物种鉴定研究 [20]。

4　结论

本文采用微芯片电泳技术分析 PCR 产物，实现了金银花和不同基原山银花的有效鉴定，该方法操作简便、选择性好、分辨率高，为金银花和山银花的复方制剂提供了一种有效的分析手段。

参考文献

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

[2] 杨倩茹，赵媛，郝江波，等 . 金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2016，41（7）：1204-1211.

[3] 张卫，黄璐琦，李超霞，等 . 金银花品种的本草考证 [J]. 中国中药杂志，2014，39（12）：2239-2245.

[4] 李克杰，石路德，周洪雷 . 金银花质量研究进展 [J]. 食品与药品，2022，24（2）：178-182.

[5] 肖美凤，刘文龙，周晋，等 . 金银花和山银花的研究现状及质量控制的关键问题 [J]. 中草药，2018，49（20）：4905-4911.

[6] 叶捷，陈娟红 . 金银花与山银花的性状差异及鉴别方法 [J]. 临床合理用药杂志，2020，13（22）：109-110.

[7] 康帅，张继，王亚丹，等 . 金银花与山银花的生药学鉴别研究 [J]. 药物分析杂志，2014，34（11）：1913-1921.

[8] 陆顺瑶，谢培山，梁育珍，等 . 金银花和山银花的薄层色谱指纹图谱分析 [J]. 中药新药与临床药理，2021，32（1）：103-108.

[9] Gu LF，Xie XQ，Wang B，et al. Chemical pattern recognition for quality analysis of *Lonicerae japonicae flos* and *Lonicerae flos* based on ultra-high performance liquid chromatography and anti-SARS-CoV2 main protease activity [J]. Front Pharmacol，2022，12：810748.

[10] Tang YQ，Li L，Lin TF，et al. Discrimination and prediction of *Lonicerae japonicae flos* and *Lonicerae flos* and their related prescriptions by attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate statistical analysis [J]. Molecules，2022，27（14）：4640.

[11] Cai ZC，Wang CC，Chen CH，et al. Quality evaluation of *Lonicerae japonicae flos* and *Lonicerae flos* based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with multivariate statistical analysis [J]. Phytochem Analysis，2021，32（2）：129-140.

[12] 蔡芷辰，刘训红，王程成，等 . 金银花分子生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（6）：1272-1278.

[13] 张国林，邢以文，薛满 . DNA 条形码等分子鉴定技术与动植物类中药材的鉴定 [J]. 中国现代中药，2021，23（2）：381-388.

[14] Zhu S，Liu QZ，Qiu SM，et al. DNA barcoding：an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances [J]. Chin Med-UK，2022，17（1）：112.

[15] 徐石勇，赵新，张富丽，等 . 基于焦磷酸测序分析技术的金银花掺伪鉴别方法研究 [J]. 生物技术进展，2020，10（6）：637-645.

[16] 苏雪蓉，谢颖，娄悦，等 . AS-PCR 法鉴别炮制辅料鳖血和常见掺伪品的研究 [J]. 南京中医药大学学报，2022，38（10）：953-960.

[17] 杨明鹏，黄哲，谢洋，等 . 微芯片电泳研究进展及其在离子检测中的应用 [J]. 分析化学，2018，46（5）：631-641.

[18] 刘杰，解盈盈，过立农，等 . 微芯片电泳结合多重 PCR 法在中药材水蛭品种特异性鉴定中的应用 [J]. 药物分析杂志，2020，40（3）：429-435.

[19] 邱道寿，刘晓津，王军，等 . TAT PTD-Tachyplesin 融合基因的重叠延伸 PCR 法合成 [J]. 安徽农业科学，2013，41（4）：1438-1441.

[20] 赵志浩，王杰，李振山，等 . 灰枣和酸枣叶绿体 *trnL-trnF* 基因序列分析 [J]. 河南科学，2013，31（11）：1883-1886.

（收稿日期：2023-02-11；修回日期：2023-04-25）

茅岩莓提取物治疗放射性口腔溃疡的作用研究

唐梓宁[1, 2]，彭冬冬[1, 2]，刘学武[1, 2]，唐海亮[1, 2]，陈相池[1, 2]，张妙红[1, 2]，章泽恒[3*]（1. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司，长沙　410331；2. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室，长沙　410331；3. 湖南省药品审评与不良反应监测中心，长沙　410001）

摘要：目的　采用 X 射线复制大鼠放射性口腔溃疡模型，对茅岩莓提取物治疗放射性口腔溃疡的效果进行评价。**方法**　SD 大鼠 60 只，雌雄各半，随机分为正常对照组，模型对照组，金因肽组（5000 IU • kg^{-1}），茅岩莓提取物低、中、高（16、32、64 mg • kg^{-1}）剂量组，每组 10 只。各组大鼠按 15 Gy 剂量采用 X 射线照射大鼠口部及内侧口腔黏膜，复制放射性口腔溃疡模型。分别于造模后 24 h 进行药物干预，2 次 • d^{-1}，连续 14 d。每日对各组动物进行一般临床观察，定期监测体重、摄食量及口腔黏膜评分，末次给药后采集各组大鼠口腔黏膜，检测口腔黏膜组织中 IL-6、TNF-α、IL-1β 的含量，并进行组织病理学检查。**结果**　金因肽和低、中、高剂量茅岩莓提取物均可提高动物体重增长率和摄食量；金因肽和中、高剂量茅岩莓提取物可显著降低口腔黏膜评分和 IL-6 表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$），减轻口腔黏膜病变程度；金因肽和高剂量茅岩莓提取物可显著降低口腔黏膜组织 IL-1β 表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡具有修复作用，其作用可能与调节口腔黏膜炎症因子的水平相关。

关键词：放射性口腔溃疡；茅岩莓提取物；炎症因子

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2311-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.008

Effect of thatch berry extract on radioactive oral ulcer

TANG Zi-ning[1, 2], PENG Dong-dong[1, 2], LIU Xue-wu[1, 2], TANG Hai-liang[1, 2], CHEN Xiang-chi[1, 2], ZHANG Miao-hong[1, 2], ZHANG Ze-heng[3*] (1. *Hunan Prima Drug Research Center Co., Ltd., Changsha* 410331; 2. *Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha* 410331; 3. *Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Reaction Monitoring, Changsha* 410001)

Abstract: Objective　To replicate the rat radioactive oral ulcer model with X-rays and evaluate the effect of thatch berry extract on radioactive oral ulcer. **Methods**　Totally 60 SD rats, 30 males and 30 females, were randomly divided into a normal control group, a model control group, a Gene Time group, and low (16 mg • kg^{-1}), medium (32 mg • kg^{-1}) and high (64 mg • kg^{-1}) dose groups of thatch berry extract (10 rats in each group). Rats in each group were irradiated with X-rays at a dose of 15 Gy in the mouth and medial oral mucosa to replicate the radioactive oral ulcer model. Pharmacological intervention was administered 24 h after the modelling, twice daily for 14 days. The rats in each group were observed daily, and their body weight, food intake and oral mucosa scores were monitored regularly. After the last dose, the rats in each group were euthanized by bleeding from the abdominal aorta, and the levels of IL-6, TNF-α and IL-1β in the oral mucosa tissues were measured and histopathologically examined. **Results** Gene Time and all doses of thatch berry extract increased body weight growth rate and food intake. Gene Time, medium and high doses of thatch berry extract significantly reduced the oral mucosal score and IL-6 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced the degree of oral mucosal lesions. Gene Time and high doses of thatch berry extract significantly reduced oral mucosal score and IL-1β expression

基金项目：湖南省重点研发计划项目（No.2020DK2003）。

作者简介：唐梓宁，男，硕士，主要从事新药药效与安全性评价方面的研究，email：tangzininga@163.com　*通信作者：章泽恒，男，副主任中药师，主要从事临床药理学和药品监督管理方面的研究，email：719563428@qq.com

($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The repairing effect of thatch berry extract might be related to the modulation ofllevels of inflammatory factors in the oral mucosa.

Key words: radioactive oral ulcer; thatch berry extract; inflammatory factor

放射性口腔溃疡是常见癌症头颈部恶性肿瘤的常见并发症，在放射治疗头颈部恶性肿瘤的过程中，放射线损伤口腔黏膜、腮腺、唾液腺等口腔分泌腺体，直接或间接地破坏口腔正常环境，进而导致放射性口腔溃疡的发生[1-2]。该病主要表现为口腔黏膜红斑、溃疡并伴随疼痛，间接导致患者摄入减少而带来体重下降，不仅严重影响患者的生活质量，且极易继发感染，对患者的生命造成严重威胁[3-4]。

茅岩莓为葡萄科植物显齿蛇葡萄，其主要有效成分为蛇葡萄素和二氢杨梅素等黄酮类化合物，是土家族民间习用的一种食疗药物[5]。大量研究表明，茅岩莓具有抑菌、消炎、镇痛等作用[6-8]。早在 1996 年有报道称，茅岩莓在民间可作为茶饮防治口腔炎症[9]。陈立峰等[10]使用茅岩莓总黄酮涂抹口腔黏膜溃疡新西兰兔，结果证明茅岩莓总黄酮可明显减轻口腔黏膜溃疡炎症，同时促进溃疡愈合。虽然已有大量文献证明茅岩莓对口腔溃疡具有修复功能，但其对放射性口腔溃疡的作用效果还未见报道。本研究利用茅岩莓的药理学作用，将其提取物采用涂抹方式作用于大鼠放射性口腔溃疡模型，并选用重组人表皮生长因子外用溶液作为阳性对照药，通过观察动物一般生理指标（体重、摄食量）和口腔黏膜评分，检测口腔黏膜组织匀浆液细胞因子以及组织病理学检查，探究茅岩莓提取物对治疗大鼠放射性口腔溃疡的作用效果，为临床使用提供科学理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只，雌雄各半，8 周龄，体重 180 ～ 220 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号：SCXK（湘）2019-0004]。饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 SPF 级动物房 [SYXK（湘）2020-0015]，饲养环境室温为 24 ～ 26 ℃，相对湿度 40% ～ 60%，12 h 昼夜循环饲养，喂食普通饲料，自由进食、饮水。实验操作均经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理审查委员会批准 [审批号：IACUC-2022（3）025]。

1.2 试药与仪器

茅岩莓提取物（批号：20210302，由湖南普瑞玛药物研究中心有限公司药学研究部采用水浸泡法制备[11]，HPLC 测得其浓缩液中二氢杨梅素质量浓度为 320 mg • mL^{-1}）。

重组人表皮生长因子外用溶液（金因肽，深圳市华生元基因工程发展有限公司，批号 20210407），适用于烧伤创面、残余小创面、各类慢性溃疡创面（包括血管性、放射性、糖尿病性溃疡）以及供皮区新鲜创面等。

X-RAD225 型生物学 X 射线辐照仪 [汇佳生物科技（上海）有限公司]；台式高速冷冻离心机（湖南湘立）；Spectra Max i3x 型多功能酶标仪（奥地利美谷光子公司）；DFC 420C 型病理成像系统（德国 Leica）；BX43 ＋ MD50 型生物显微镜＋数码成像系统（日本奥林巴斯公司）；炎症因子检测 ELISA 试剂盒（黄石市艾恩斯生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 放射性口腔溃疡模型制备及药物处理

SPF 级 SD 大鼠 60 只，按体重与性别随机分为 6 组，分别为正常对照组、模型对照组、金因肽组（2000 IU • mL^{-1}，大鼠平均体重按 200 g 计，折算至大鼠给药剂量为 5000 IU • kg^{-1}）、茅岩莓提取物低、中、高剂量组（给药质量浓度分别为 6.4、12.8、25.6 mg • mL^{-1}，大鼠平均体重按 200 g 计，折算至大鼠给药剂量分别为 16、32、64 mg•kg^{-1}），每组 10 只。除正常对照组外，各组大鼠按 5 mL • kg^{-1} 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉后，使用 15 Gy 剂量采用 X 射线照射（源皮距 FSD ＝ 40.0 cm，剂量率为 2.5 Gy•min^{-1}）大鼠口部及内侧口腔黏膜，6 min/ 只，其余部位采用 5 mm 的铅皮遮住，照射后每只动物灌胃给予 4 mL 0.9% 氯化钠注射液。各组动物于造模 24 h 后进行给药，茅岩莓提取物各剂量组及金因肽组分别使用消毒棉签蘸取 0.5 mL 相应药物均匀涂抹在大鼠口腔溃疡处，2 次 • d^{-1}，连续给药 14 d；正常对照组和模型对照组按相同给药方法给予 0.9% 氯化钠注射液。

2.2 检测指标

2.2.1 一般临床观察 每日观察动物口腔黏膜的变化和动物一般行为活动，于 D7、D14 记录各组动物摄食量情况，于 D4、D7、D10、D14 对各组动物称重，计算体重增长率，体重增长率＝（当日体重－给药前体重）/ 给药前体重。

2.2.2 口腔黏膜评分[12] 于 D4、D7、D10、D14 根据 RTOG 急性放射损伤分级标准对各组动物口腔黏膜进行评分。评分标准，0 级：无；1 级：

红斑 / 溃疡，计 1 分；2 级：红斑破溃，计 2 分；3 级：融合红斑、水肿、溃疡（≥ 1/2 黏膜），计 3 分；4 级：出血、坏死，计 4 分。

2.2.3　口腔黏膜细胞因子检测　末次给药后各组大鼠按 60 mg • mL^{-1} 腹腔注射舒泰 50 麻醉后实施腹主动脉放血安乐死，取左侧口腔黏膜组织，按 1∶9（g/mL）加入 0.9% 氯化钠注射液，高速匀浆，制成口腔黏膜匀浆液，4 ℃下 3000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液，ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-6、TNF-α、IL-1β 的含量。

2.2.4　组织病理学检查　取右侧口腔黏膜组织置于 10% 中性甲醛溶液固定 24 h，HE 染色，镜下观察口腔黏膜组织病理学变化，同时对溃疡黏膜组织病理变化进行量化评分，参考文献[13-14]并结合模型实际情况设计评分标准：口腔黏膜上皮受损、糜烂，上皮细胞排列紊乱；炎症细胞浸润；血管充血，红细胞外渗；黏膜组织水肿。对上述 4 项组织病理学指标进行量化积分，分为无、轻度、中度、重度 4 级，分别计 0、1、2、3 分。

2.3　统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多个样本间的比较采用单因素方差分析，根据方差齐性检验，方差齐及不齐时分别使用 LSD 法和 Tamhane’s T2 分析。等级资料以频数计，采用等级资料秩和检验进行统计。$P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　一般体征观察

造模后 D1 模型动物口腔可见红肿，D3 摄食减少，自主活动减少并伴有流涎，造模后 D4 ～ D10 动物口腔黏膜泛白，形成一定的假膜，并伴有流涎。金因肽给药 D4 肉眼观察口腔溃疡症状有明显的改善，茅岩莓提取物中、高剂量组连续给药 1 周，动物摄食量较之前有明显增加，且流涎也有相应的改善，随着给药时间的延长，各组动物口腔溃疡症状均有不同程度的改善，其中茅岩莓提取物高剂量组对放射性口腔溃疡症状改善作用最为明显。

3.2　对摄食量及体重的影响

如图 1 所示，与正常对照组相比，模型对照组大鼠体重增长较缓慢；与模型对照组相比，其余给药组大鼠体重明显增加，其中金因肽组和茅岩莓提取物高剂量组动物体重增长更为明显。如图 2 所示，与正常对照组相比，造模后大鼠摄食量显著降低（$P < 0.01$）；与模型对照组相比，各给药组大鼠摄食量均无统计学意义，但随着给药时间的延长及茅岩莓提取物浓度的提高，各组大鼠摄食量均呈不同程度增长趋势。

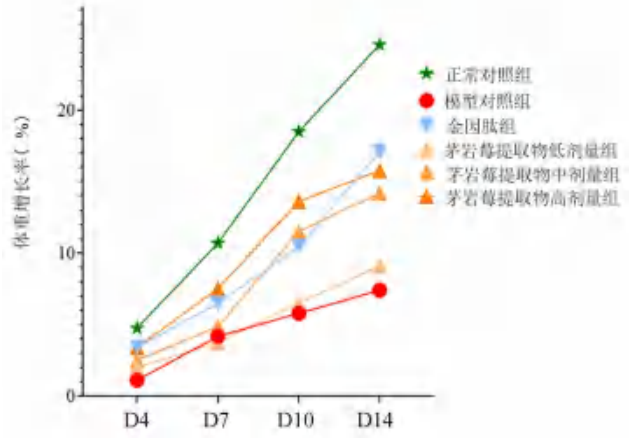


图 1　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠体重增长率的影响

Fig 1　Effect of thatch berry extract on the weight growth in rats with radioactive oral ulcer

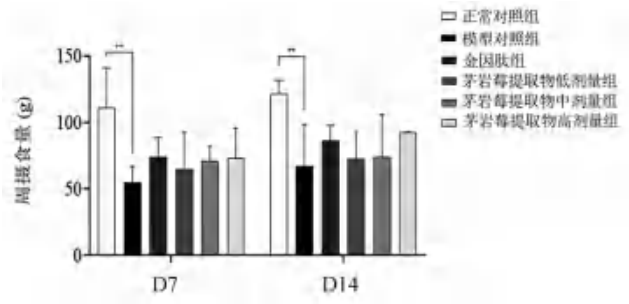


图 2　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠周摄食量的影响

Fig 2　Effect of thatch berry extract on weekly food intake in rats with radioactive oral ulcer

注：与正常对照组比较，$^{++}P < 0.01$。

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

3.3　对口腔黏膜评分的影响

如图 3 所示，正常对照组未进行造模处理，因此不同时期口腔黏膜评分均为 0 分；与模型对照组比较，金因肽组于给药 D4、D7 评分显著降低（$P < 0.01$），茅岩莓提取物低剂量组于给药 D14 评分显著降低（$P < 0.01$），茅岩莓提取物中、高剂量组于给药 D7、D10、D14 评分均显著降低（$P < 0.01$）。

3.4　对口腔黏膜细胞因子的影响

如图 4 所示，与正常对照组比较，模型对照组 TNF-α、IL-6 及 IL-1β 水平均显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与模型对照组比较，金因肽组、茅岩莓提取物中、高剂量组 IL-6 水平均显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），金因肽组、茅岩莓提取物高剂量组 IL-1β 水平均显著降低（$P < 0.01$）。

3.5　口腔黏膜组织病变的影响

如表 1 及图 5 所示，正常对照组动物镜下观察可见口腔黏膜上皮细胞完整，未见出血和溃疡

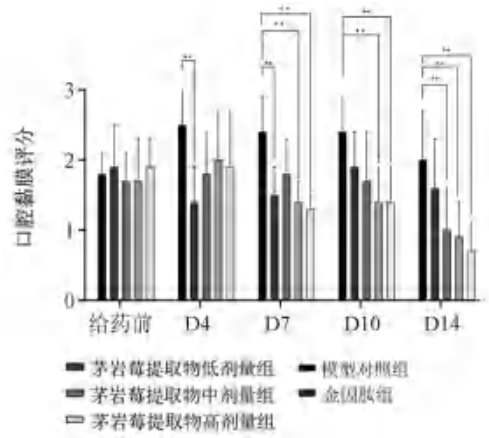


图 3　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠口腔黏膜评分的影响

Fig 3　Effect of thatch berry extract on oral mucosal scoring in rats with radioactive oral ulcer

注：与正常对照组比较，$^{++}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

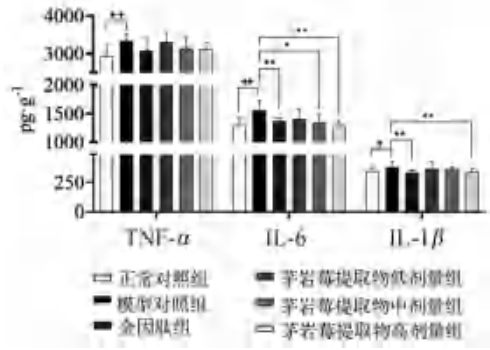


图 4　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠口腔黏膜细胞因子的影响

Fig 4　Effect of thatch berry extract on oral mucosal cytokines in rats with radioactive oral ulcer

注：与正常对照组比较，$^{+}P < 0.05$，$^{++}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

病灶，且未见炎症细胞浸润；模型对照组动物镜下观察可见口腔黏膜上皮坏死脱落，局部溃疡灶，伴有出血，同时固有层少量炎症细胞浸润；造模后给予相应剂量的金因肽、茅岩莓提取物，口腔黏膜病变较模型对照组均具有不同程度的减轻。与正常对照组比较，模型对照组口腔黏膜病变评分显著增加（$P < 0.01$）；与模型对照组比较，金因肽组和茅岩莓提取物中、高剂量组口腔黏膜病变评分显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

4　讨论与结论

放射性口腔溃疡是电离辐射毒性所致的正常组织损伤，于 1980 年被认定为癌症患者放疗副作用[15]。虽然放疗技术不断更新，放射性口腔

表 1　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠口腔黏膜组织病变评分的影响

Tab 1　Effect of thatch berry extract on the score of oral mucosal tissue lesions in rats with radioactive oral ulcer

组别	实际给药剂量	病理评分
正常对照组	—	1.53±0.45
模型对照组	—	$10.48\pm2.48^{++}$
金因肽组	5000 IU·kg^{-1}	$6.53\pm2.24^{*}$
茅岩莓提取物低剂量组	16 mg·kg^{-1}	8.34±3.42
茅岩莓提取物中剂量组	32 mg·kg^{-1}	$7.34\pm1.63^{*}$
茅岩莓提取物高剂量组	64 mg·kg^{-1}	$5.84\pm1.15^{**}$

注：与正常对照组比较，$^{++}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

图 5　茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡大鼠口腔黏膜组织病变的影响（HE，×100）

Fig 5　Effect of thatch berry extract on pathological sections of oral mucosa in rats with radioactive oral ulcer（HE，×100）

A. 正常对照组（normal control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 金因肽组（Gene Time group）；D. 茅岩莓提取物低剂量组（low-dose group of thatch berry extract）；E. 茅岩莓提取物中剂量组（medium-dose group of thatch berry extract）；F. 茅岩莓提取物高剂量组（high-dose group of thatch berry extract）

溃疡的症状较以往常规放疗已有明显减轻，但该病仍可导致患者口腔疼痛、吞咽困难、体重减轻及深部黏膜溃疡，部分患者由于不能耐受口腔黏膜炎带来的痛苦进而更换或中断放疗方案，导致局部肿瘤的控制在很大程度上受到限制[16-19]。有文献报道称，茅岩莓及其提取物含有多种活性成分，以二氢杨梅素为代表的黄酮类成分含量之高在植物界中极为罕见，具有明显的抗病毒、抑菌及抗炎等抗感染生物活性，且对口腔溃疡的修复具有积极影响[20]。本研究使用 X 射线成功复制放射性口腔溃疡模型，模型大鼠临床表现为摄食量减少，体重增长迟缓，黏膜出现不同程度溃疡；使用金因肽及不同浓度茅岩莓提取物处理大鼠口腔后，各给药组大鼠的体重和摄食量均不同程度提高，口腔黏膜评分均呈降低趋势，其中高剂量组茅岩莓提取物效果尤为显著，提示适宜剂量的茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡具有修复作用。

在放射性口腔溃疡的发生发展过程中，炎症因子不仅可以直接破坏黏膜组织，还可调节宿主免疫及炎症反应进程，加重炎症反应[21]。TNF-α、IL-6 及 IL-1β均为介导放射性口腔溃疡的重要介质[22-24]。其中 TNF-α是常见的促炎症因子，主要由活化的 T 细胞产生，为黏膜受损时机体最早作出应答的介质之一，可与 IL-1β协同触发炎症级联反应，诱导 IL-6 等多种炎症因子的产生[4, 25]。Bossi 等[26]研究发现，放疗患者 TNF-α、IL-6 及 IL-1β的唾液水平显著升高，与放射性口腔溃疡严重程度成正相关。本研究结果显示，辐照后模型大鼠的黏膜组织中 IL-6、IL-1β和 TNF-α水平均显著提高，结合镜下观察可见口腔黏膜上皮坏死脱落，局部溃疡灶，伴有出血，同时固有层炎症细胞浸润，模型组大鼠病变程度及黏膜组织炎症因子趋势与文献[26]报道基本一致。近年来研究证明茅岩莓及其有效成分二氢杨梅素可以通过抑制 TNF-α、IL-6 及 IL-1β等表达水平，来发挥抗炎作用，改善炎症病变过程[20, 27]。本研究发现涂抹金因肽和不同浓度的茅岩莓提取物后大鼠口腔黏膜病变程度明显减轻，金因肽和中、高剂量茅岩莓提取物不同程度地降低组织中 IL-6 和 IL-1β水平，提示适宜剂量的茅岩莓提取物可降低口腔黏膜组织中炎症因子的表达含量。

本研究发现茅岩莓提取物对 X 射线致大鼠口腔溃疡具有明显抗炎和修复作用，且高剂量作用效果更为明显。有文献报道茅岩莓提取物中有效成分二氢杨梅素可通过抑制 NF-κB 介导的炎症信号通路减轻动物机体的炎症反应，结合参考文献[27]及本研究结果，我们认为茅岩莓提取物的潜在机制为通过抑制 NF-κB 的活化来抑制 TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症因子的表达水平，修复口腔黏膜组织，防治放射性口腔溃疡[28-29]。在后续实验中我们将深入探究茅岩莓对放射性口腔溃疡多途径、多靶点抗炎的作用机制，为药物研发、疾病预防和临床指导用药等方面提供参考。

综上所述，通过研究茅岩莓提取物对各组大鼠体征、体重、摄食量、口腔黏膜评分、口腔黏膜细胞因子及口腔黏膜组织病变等指标影响的结果显示，不同剂量的茅岩莓提取物对放射性口腔溃疡均具有修复作用，其作用可能与调节口腔黏膜炎症因子的水平相关。

参考文献

[1] Taghipour M，Sheikhbahaei S，Marashdeh W，et al. Use of 18F-fludeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography for patient management and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma：a review [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg，2016，142（1）：79-85.

[2] 陆叶，沈红梅 . 放射性口腔炎的治疗进展 [J]. 临床与病理杂志，2017，37（6）：1269-1275.

[3] Mead GM. Management of oral mucositis associated with cancer chemotherapy [J]. Lancet，2002，359（9309）：815-816.

[4] Gruber S，Bozsaky E，Roitinger E，et al. Early inflammatory changes in radiation-induced oral mucositis：effect of pentoxifylline in a mouse model [J]. Strahlenther Onkol，2017，193（6）：499-507.

[5] 张元忠，陈桂芝，陈刚 . 土家族药茅岩莓的生药学研究 [J]. 中国民族医药杂志，2004，10（2）：17-18.

[6] 陈立峰，陈莉萍，徐琳本，等 . 显齿蛇葡萄总黄酮对口腔常见致病菌抑菌作用的研究 [J]. 中南药学，2003，1（2）：83-86.

[7] 钟正贤，周桂芬，陈学芬，等 . 藤茶总黄酮药理作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技，2004，11（4）：224-225.

[8] 何桂霞，杜方麓，杨伟丽，等 . 藤茶总黄酮清除氧自由基与抗脂质过氧化作用 [J]. 中药材，2003，26（5）：338-340.

[9] 宋纬文，戴巧玲，黄梅娥，等 . 民间草药“藤茶”的初步调查 [J]. 湖南中医杂志，1996，12（5）：41.

[10] 陈立峰，陈莉萍，徐琳本，等 . 显齿蛇葡萄总黄酮对兔口腔黏膜溃疡的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2007，21（1）：49-54.

[11] 邵佩，蹇顺华，庄虎，等 . 不同藤茶提取物的理化指标、成分分析及抗氧化活性评价 [J]. 中国食品添加剂，2022，33（10）：251-257.

[12] 陈钰，郭群依，王颖慧，等 . 局部应用 rhGM-CSF 治疗化疗后口腔粘膜炎疗效观察 [J]. 上海第二医科大学学报，2002，22（1）：58-60.

[13] Mesquita KC，Dantas TS，De Barros Silva PG，et al. Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats：role of interleukin（IL）-1β，-6 and-10 and CD8/CD30 cells：influence of abatacept treatment on oral wound healing：experimental model on rats [J]. Life Sci，2020，243：117243.

[14] 郑蕾，李国芳，杨盼盼，等 . 益气养阴生肌方对大鼠口腔溃疡创面愈合的作用及 PTEN/AKT/GSK3β通路的机制研究 [J]. 中药药理与临床，2021，37（3）：157-162.

[15] Maria OM，Eliopoulos N，Muanza T. Radiation-induced oral mucositis [J]. Front Oncol，2017，7：89.

[16] 李凯新，陈媛媛，陈明，等 . 放射性口腔黏膜炎的研究进展 [J]. 中华放射医学与防护杂志，2016，36（11）：875-880.

[17] 王璇，姜桂春 . 放射性口腔黏膜炎患者心理痛苦现状及其影响因素分析 [J]. 中国护理管理，2020，20（10）：1487-1491.

[18] Trotti A，Bellm LA，Epstein JB，et al. Mucositis incidence，severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy：a systematic literature review [J]. Radiother Oncol，2003，66（3）：253-262.

[19] 高燕 . 影响放射性口腔黏膜炎的有关因素及口腔健康相关生活质量分析 [D]. 太原：山西医科大学，2020.

[20] 张云坤，李娟，黄丹，等 . 中药藤茶化学成分及抗感染作用研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（6）：2012-2022.
[21] 郭俊兵，黄伟安，牛艳红，等 . 白细胞介素 -6 在大鼠放射性口腔黏膜炎中的表达及意义 [J]. 临床医学工程，2011，18（5）：649-651.
[22] 沈红梅，黄杰，金从国，等 . 急性放疗致口腔炎患者唾液和外周血炎症细胞因子的变化及意义 [J]. 天津医药，2012，40（11）：1103-1106.
[23] Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis：novel insights and opportunities [J]. J Surg Oncol，2007，5（9 Suppl 4）：3-11.
[24] Meirovitz A，Kuten M，Billan S，et al. Cytokines levels，severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer——a prospective pilot study [J]. J Radiat Oncol，2010，5：16.
[25] Sand FL，Thomsen SF. Efficacy and safety of TNF-*α* inhibitors in refractory primary complex aphthosis：a patient series and overview of the literature [J]. J Dermatol Treat，2013，24（6）：444-446.
[26] Bossi P，Bergamini C，Miceli R，et al. Salivary cytokine levels and oral mucositis in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation therapy [J]. Ijrobp，2016，96（5）：959-966.
[27] Hou XL，Tong Q，Wang WQ，et al. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin，a flavonoid from ampelopsis grossedentata，via inhibiting the activation of NF-*κ*B and MAPK signaling pathways [J]. J Nat Prod，2015，78（7）：1689-1696.
[28] Weng L，Zhang H，Li X，et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF-*κ*B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia [J]. Int Immunopharmacol，2017，44：1-8.
[29] Wu J，Zhao FT，Fan KJ，et al. Dihydromyricetin inhibits inflammation of fibroblast-like synoviocytes through regulation of nuclear factor-*κ*B signaling in rats with collagen-induced arthritis [J]. J Pharmacol Exp Ther，2019，368（2）：218-228.

（收稿日期：2023-01-06；修回日期：2023-03-20）

薰衣草挥发油香薰吸入给药助睡眠作用及机制探究

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 探讨薰衣草挥发油吸入助睡眠作用及其作用机制。**方法** 实验动物随机分为空白对照组、氯苯丙氨酸模型组（300 mg·kg^{-1}）、地西泮对照组（2.5 mg·kg^{-1}）及薰衣草挥发油低剂量组（4 μL）、中剂量组（8 μL）、高剂量组（16 μL）；采用自制熏香仪加热熏香给药，1次·d^{-1}，1 h/次，连续 7 d。观察熏香吸入后小鼠行为学变化并进行评价；同时采用酶联免疫吸附测定法（ELISA）测定动物脑内海马区谷氨酸（Glu）、γ-氨基丁酸（$GABA_A$）、五羟色胺（5-HT）以及腺苷（AD）等神经递质水平，并对 $GABA_A$/Glu 值进行评估；采用免疫印迹法（Western blot）检测熏香对谷氨酸受体（GluR1）及囊泡谷氨酸转运蛋白（VGluT1）表达的影响。**结果** 薰衣草挥发油各组熏香吸入均可显著提高失眠模型小鼠入睡效率和时长（$P<0.05$，$P<0.01$）；熏香中剂量组可显著减少失眠模型小鼠活动路程且增加静止时间（$P<0.05$，$P<0.01$），熏香高剂量组可减少失眠模型小鼠活动路程和运动速度（$P<0.05$，$P<0.01$），且增加静止时间（$P<0.01$）；可显著升高 Glu、$GABA_A$、5-HT 及 AD 的递质水平（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），同时上调 $GABA_A$ 与 Glu 的比值（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；可显著升高海马组织中 GluR1 及 VGluT1 相关蛋白的表达。**结论** 薰衣草挥发油熏香吸入具有助睡眠的作用，作用机制可能与调控神经递质的分泌、$GABA_A$/Glu 分泌平衡以及影响 Glu 合成代谢和转运有关。

关键词：薰衣草；挥发油；助睡眠；$GABA_A$/Glu 平衡
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2316-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.009

基金项目：全国中药特色技术传承人才培训项目（国中医药人教函 [2019]43 号）；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，硕士，副研究员，主要从事中药药效及机制研究，email：gongbao0112@aliyun.com

Sleep-enhancing effect and its mechanism of essential oil of lavender incense inhalation

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 University*, *Haikou* 570100; 2. *College of Pharmacy*, *Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046; 3. *Hainan Provincial Key Laboratory of Resources 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 sleep-enhancing effect of inhalation of essential oil in lavender and its mechanism. **Methods** The experiment included a blank group, a chlorophenylalanine group (300 mg • kg $^{-1}$), a diazepam group (2.5 mg • kg $^{-1}$), 3 lavender essential groups (4, 8, and 16 μL). The essential oil in lavender was inhaled in the incense cable once a day (1 hour for each time) for 7 days. The sleep aid experiment was conducted to assess the sleep quality, and the autonomic activities of mice in each group were tested. Indexes such as glutamate (Glu), gamma aminobutyric acid ($GABA_A$), 5-hydroxytryptamine (5-HT), adenosine (AD) and the ratio of $GABA_A$ and Glu were evaluated by ELISA, and the protein expressions of GluR1 and VGluT1 in the hippocampus were determined by Western blot. **Results** Essential oil in lavender significantly improved the sleeping duration and efficiency ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The middle dose lavender group reduced the total distance and increased the resting time ($P < 0.05$), while the high dose group reduced the total distance and average velocity ($P < 0.05$) and increased the resting time ($P < 0.01$). Inhalating the essential oil from lavender increased the level of 5-HT, Glu, $GABA_A$ and AD ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), upregulated $GABA_A$/Glu ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and increasesd the protein expressions of GluR1 and VGluT1. **Conclusion** Inhaling the essential oil of the lavender significantly improves sleep, whose mechanism may be related to adjusting the balance of $GABA_A$/Glu and synthetic metabolism of Glu.

Key words: lavender; essential oil; sleep-enhancing; $GABA_A$/Glu balance

失眠目前已成为困扰很多人的临床常见疾病之一，内在情志变化或外在工作压力等多种原因均可引起人们的睡眠障碍[1]，长期失眠可诱发代谢性疾病、精神类疾病等，严重影响了人们的身心健康和生活质量[2]，目前临床上治疗失眠常用的镇静催眠药存在较多不良反应，如嗜睡、依赖性、停药反跳等，一直是现代药学研究中亟待解决的难题[2-3]。现代研究认为在影响睡眠的因素中，大脑皮质及海马谷氨酸（Glu）、γ- 氨基丁酸（$GABA_A$）、5- 羟色胺（5-HT）等神经递质水平及其相应的受体蛋白的功能调控起到一定的作用[4-5]。

薰衣草为唇形科植物狭叶薰衣草 *Lavandula angustifolia* Mill 的干燥地上部分，主要成分为挥发油，主要应用于芳香疗法和一些化妆品配方中。国外早有报道称熏点吸入薰衣草挥发油或以薰衣草挥发油为主的复方精油进行芳香疗法可以改善睡眠质量，减少失眠患者快速入睡时间[6]。此外有临床报道薰衣草及其全草制剂具有治疗神经衰弱、失眠、改善认知功能障碍的作用[7]，且制剂已被收载于中华人民共和国《药品标准》维吾尔药分册和《维吾尔药材标准》[8]。虽然薰衣草挥发油具有助睡眠的作用受到大家广泛认可，但目前对于薰衣草挥发油如何改善睡眠质量的研究报道较少，其作用机制也未得到明确阐释。

本研究采用自制熏香装置，模拟传统芳香疗法，通过加热薰衣草挥发油吸入的方式，观察薰衣草挥发油对失眠模型小鼠协同巴比妥钠睡眠状况以及行为学的影响，此外检测薰衣草挥发油熏点吸入后，失眠模型小鼠体内 5-HT 等神经递质水平变化以及与 Glu 能系统代谢和转运相关蛋白如谷氨酸受体（GluR1）及囊泡谷氨酸转运蛋白（VGluT1）表达的影响，初步探究薰衣草挥发油吸入给药对睡眠

的作用及机制，期待为临床治疗失眠提供参考。

1 材料

1.1 仪器

自制熏香仪（50 cm×50 cm×40 cm 长方体，其内部放置 1 个 20 cm×20 cm×20 cm 镂空的圆柱体结构，中间可放置电子熏香加热器）；RD-1118-CO-M4 型小鼠自主活动仪（上海欣软信息科技有限公司）。1510-04123 型微孔板分光光度计（赛默飞世尔科技上海有限公司）。

1.2 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[6]制备薰衣草挥发油；戊巴比妥钠（批号：2017012301，美国默克公司）；地西泮片（批号：20200921，太原市振兴制药有限责任公司）；Glu、$GABA_A$、5-HT 以及腺苷（AD）试剂盒（批号分别为：DRE30136、DRE31429、DRE31214、DRE31229，北京博胜经纬科技有限公司）；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（批号：HP201501，武汉赛维尔生物科技有限公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号：BL522A，北京兰杰柯科技有限公司）；GluR1 一抗、山羊抗兔二抗（批号分别为：AF2473、A0208，碧云天生物技术有限公司）；VGluT1 一抗（批号：bs-11267R，北京博奥森生物技术有限公司）；氯苯丙氨酸（批号：A841909，麦克林公司）。

1.3 实验动物

SPF 级雄性昆明小鼠 48 只，体重 18～22 g［海南省药物研究所有限公司，许可证号：SCXK（琼）2020-0004）］；SPF 级动物饲养室中常规饲养，环境温度维持（25±1）℃，环境湿度维持（50±5）%，日夜光照时间为 12 h/12 h，饲养 3 d 适应期后开始实验。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 分组造模及给药 实验动物随机分为空白对照组，模型组（300 mg·kg^{-1}），地西泮对照组（2.5 mg·kg^{-1}），薰衣草挥发油低、中、高剂量组（4、8、16 μL），共 6 组，每组 8 只小鼠；地西泮组按照剂量进行腹腔注射，除空白组外，其余各组均按照剂量注射氯苯丙氨酸（300 mg·kg^{-1}）建立失眠模型，连续 2 d。参照文献报道[4, 9-10]，动物如出现体重减轻，毛发凌乱、光泽消失且具有一定强攻击性等情况，则判断造模成功。薰衣草挥发油各剂量组动物置薰香仪中进行熏香，1 h/ 次，连续给药 7 d。

2.1.2 薰衣草挥发油熏点吸入对失眠模型小鼠的睡眠观察 各组动物按“2.1.1”项下方法分组、造模和给药，第 5 日后，除空白组外，其余各组腹腔注射戊巴比妥钠（50 mg·kg^{-1}），观察动物睡眠情况，并用计时器记录动物翻正反应消失及恢复时间，记录时间精确到秒（s）。

2.1.3 薰衣草挥发油熏点吸入对失眠模型小鼠自主活动的观察 第 6 日给药 1 h 后，将各组动物放置于动物自主活动仪内，待自由活动 3 min 后，利用自主活动计算机在线处理系统记录各组动物 10 min 内在整个活动区域运动的总路程以及平均速度，组间实验间隔期间，使用消毒酒精对活动仪场箱进行擦拭，保持箱底清洁。实验过程中保持周边环境安静。

2.1.4 ELISA 法对各组小鼠脑组织海马相关神经递质水平测定 末次给药后 1 h，将小鼠脱颈椎处死，在冰块上取出脑组织，用医用 NaCl 溶液冲洗，滤纸擦干称取重量。剥离脑中海马组织，加入 4 ℃的医用 NaCl 混合匀浆，以 3000 r·min^{-1} 的低温离心机离心 15 min，离心液保存于－20 ℃低温冰箱内。根据试剂盒测定方法制作标准曲线，并计算各组样品中 Glu、$GABA_A$、5-HT、AD 各递质的水平情况。

2.1.5 Western blot 法对脑内海马体相关蛋白表达的测定 将小鼠海马体脑组织从全脑中分离，加入 0.9% NaCl 溶液匀浆，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，进行配胶后，上样并电泳后，转膜至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后，加 1∶2000 的一抗 β-actin，1∶1000 的 GluR1 以及 1∶1000 的 VGluT1。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。

2.1.6 统计学处理及数据分析 实验结果均采用“均数 ± 标准差”（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理，并使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制成柱形图展示。

2.2 结果

2.2.1 薰衣草挥发油熏香对小鼠睡眠的影响 结果显示，与空白组比较，模型组小鼠睡眠潜伏期显著延长且睡眠时长显著减少，说明造模成功；与模型组比较，薰衣草挥发油高、中、低剂量组均能显著减少失眠小鼠的入眠时间，增加小鼠睡眠时长，说明薰衣草挥发油熏香可以改善小鼠的睡眠质量（见图 1）。

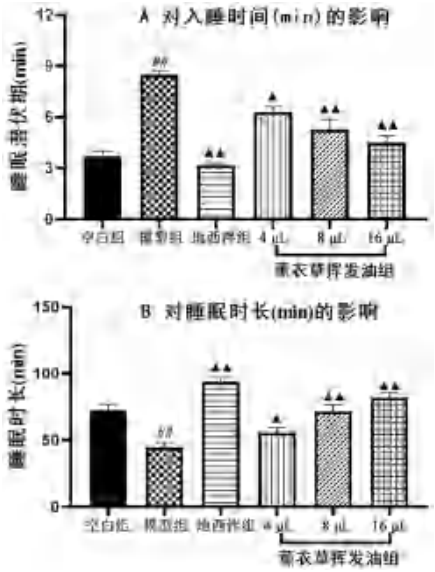


图 1　薰衣草熏香吸入对失眠小鼠睡眠状况的观察

Fig 1　Effect of inhalation essential oil of lavender incense on sleep of mice

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

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

2.2.2　薰衣草挥发油熏香对小鼠自主活动的影响　从结果可以看出，与空白组比较，模型组小鼠的运动总路程、平均运动速度及静止时间差异有统计学意义，说明造模成功；与模型组比较，薰衣草挥发油低剂量组差异无统计学意义，而中剂量组能显著减少模型小鼠运动总路程，增加小鼠静止时间；高剂量组能减少模型小鼠运动总路程和降低平均运动速度，显著增加小鼠静止时间。说明薰衣草挥发油熏香吸入可改善模型小鼠的自主活动行为（见图 2）。

2.2.3　薰衣草熏香对小鼠脑组织海马相关神经递质的水平影响　从结果可以看出，与空白组比较，模型组小鼠脑组织海马的 Glu、$GABA_A$、$GABA_A$/Glu、5-HT 与 AD 含量均有所降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；与模型组比较，薰衣草挥发油各组均能升高 Glu、5-HT、$GABA_A$ 与 AD 水平，上调 $GABA_A$/Glu 平衡值，说明薰衣草挥发油熏香可以调节脑组织中神经递质分泌水平，其发挥助睡眠的作用机制可能与调控 $GABA_A$/Glu 分泌平衡有关（见图 3）。

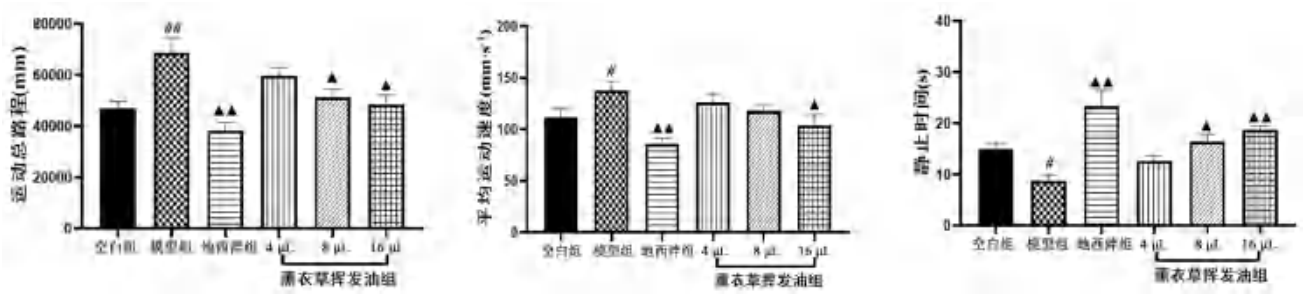


图 2　薰衣草挥发油熏香吸入对小鼠自主活动的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig 2　Effect of inhalation essential oil of lavender incense on autonomous activities of mice（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；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，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$.

2.2.4　薰衣草挥发油熏香对脑内海马体 GluR1 和 VGluT1 蛋白表达的影响　结果发现，造模组小鼠脑组织中的 GluR1 和 VGluT1 蛋白量均下降较为明显，而地西泮组与薰衣草挥发油中、高剂量组的 GluR1 和 VGluT1 表达量明显增加。说明薰衣草挥发油熏香后可增加 GluR1 和 VGluT1 的蛋白表达（见图 4）。

3　讨论

利用氯苯丙氨酸制作失眠模型同时使用戊巴比妥钠诱导睡眠实验，是目前睡眠药效研究中经常用到的方法[11，9]，主要考察给药后对失眠模型动物睡眠潜伏期和睡眠时间的影响[12-13]。考察小鼠给药前后行为学的变化是用于检测药物镇静催眠作用的经典实验之一[5]。研究结果表明薰衣草挥发油高、中、低剂量组均能显著缩短失眠小鼠的入睡时间，同时增加小鼠睡眠时长，说明薰衣草挥发油熏香吸入可以改善小鼠的睡眠质量。薰衣草挥发油中、高剂量组能显著减少模型小鼠运动路程，增加小鼠静止时间，说明薰衣草挥发油熏香吸入可改善模型小鼠的自主活动行为。

睡眠的生理机制非常复杂，目前多数报道认为是由中枢神经系统参与睡眠 - 觉醒的调控，并由大脑皮质及海马 Glu、$GABA_A$、5-HT、AD 等神经递质以及细胞因子等物质参与。当睡眠出现紊乱时，会出现 5-HT、Glu、AD 等神经递质水平紊乱、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴功能失调等状况[14]。研究还表明，大脑皮质及海马区域内起到兴奋和抑制作用的神经递质在分泌水平上存

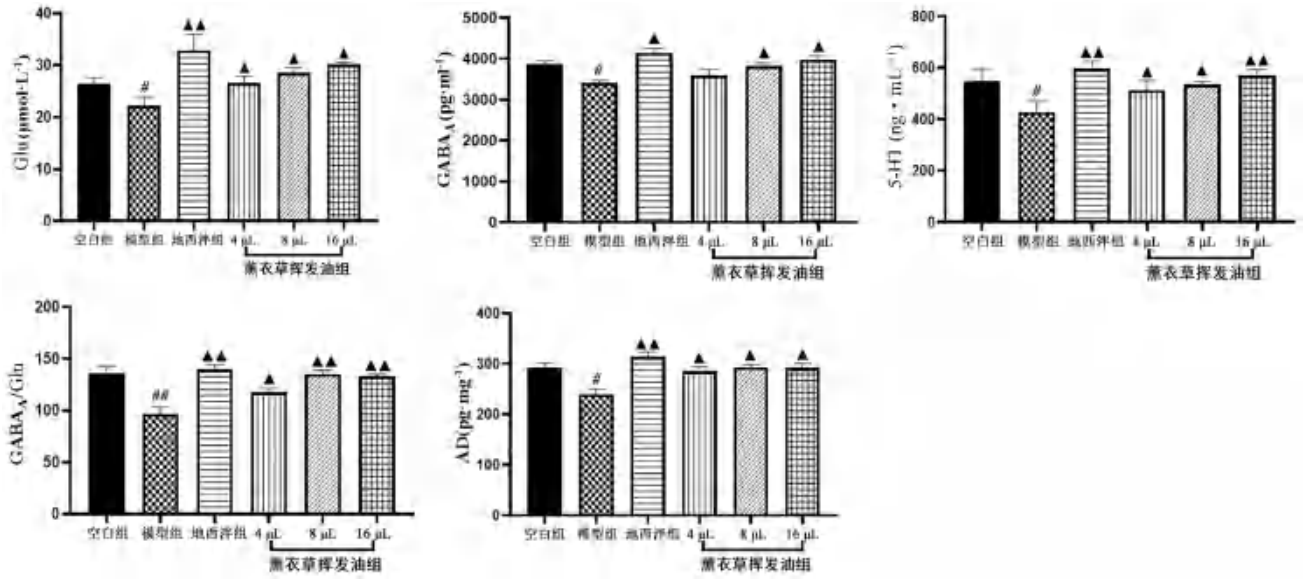


图 3 薰衣草挥发油熏香对脑组织中神经递质水平的影响

Fig 3 Effect of inhalation essential oil of lavender incense on the neurotransmitter levels in the brain tissue

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；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，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$.

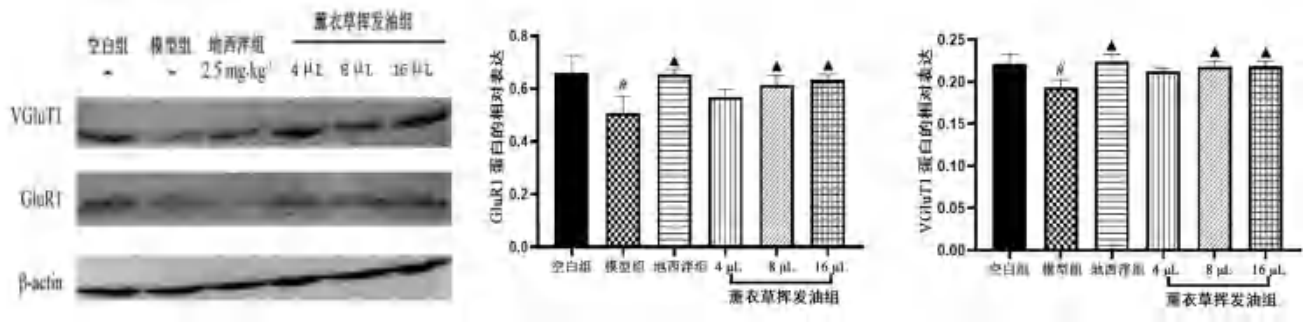


图 4 薰衣草挥发油熏香后对小鼠脑组织中 GluR1 及 VGluT1 蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of inhalation essential oil of lavender incense on the expression of neurotransmitter proteins

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

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

在一定的平衡关系，其在调节睡眠中发挥了重要作用[4]，临床研究也已证实，具有高危神经精神障碍疾病的患者，其脑内 $GABA_A$/Glu 会显著降低[15]。5-HT 神经递质对调节睡眠、痛觉等生理功能有一定影响，其水平降低可出现不同程度的失眠[16]。AD 是细胞代谢途径的重要组成部分，也是睡眠稳态的重要生理介质[17]，涉及睡眠 - 觉醒周期，学习，记忆和情绪等[18]。同时研究发现 Glu 能神经元的激活可促进 AD 递质的分泌，对调控胞外 AD 递质的积累有一定影响[19-20]。因此 Glu、$GABA_A$、5-HT、AD 等神经递质的水平高低以及 $GABA_A$/Glu 的平衡均在睡眠 - 觉醒节律中起到重要的作用，观察其含量的高低对睡眠状况起到一定的指导意义[21]。本研究发现，薰衣草挥发油各组均能升高 Glu、$GABA_A$、5-HT 与 AD 分泌水平，同时上调 $GABA_A$/Glu 平衡值，说明薰衣草挥发油熏香可以调节脑组织中神经递质分泌水平，其发挥助睡眠的作用机制可能与调控 GABA /Glu 分泌平衡有关。

VGluT1 是影响谷氨酸能神经递质转运的主要蛋白之一[22]，其表达的强弱对体内 Glu 水平的高低有一定影响，因此本实验选择与影响 Glu 兴奋传递及转运相关的 GluR1 和 VGluT1 进行考察，结果表明，薰衣草挥发油中、高剂量组均能提高脑组织中 GluR1 及 VGluT1 水平，表明薰衣草挥发油助睡眠的作用可能是通过影响蛋白的表达，调控 Glu 的递质水平，进而间接调控 $GABA_A$/Glu 平衡发挥的。

当今社会生活节奏较快，失眠人群逐年增多，由于治疗药物不良反应的存在，人们迫切希

望通过调理情绪、芳香疗法等多手段加以改善。本研究结果表明，薰衣草挥发油通过熏香吸入的方式可产生促睡眠的作用。可为其通过芳香疗法在临床上治疗失眠症提供理论支持。

参考文献

[1] Glidewell RN，Mcpherson BE，Orr WC. Insomnia and anxiety：diagnostic and management implications of complex interactions [J]. Sleep Med，2015，10（1）：93-99.

[2] Roth T，Drake C. Evolution of insomnia：current status and future direction [J]. Sleep Med，2004，5（Suppl 1）：S23-S30.

[3] Magalhaes AC，Holmes KD，Dale LB，et al. CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT2 receptor signaling [J]. Nat Neurosci，2010，13（5）：622-629

[4] 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.

[5] 王灿红，陈细钦，弓宝，等 . 沉香薰香吸入给药镇静促睡眠作用及机制研究 [J]. 中国药学杂志，2022，57（19）：1628-1635.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

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

[10] 徐飞飞，田雅娟，李钦青，等 . 酸枣仁 - 茯苓 - 党参水提物对小鼠睡眠的改善作用及机制研究 [J]. 食品工业科技，2021，42（11）：300-308.

[11] Stino FK. Divergent selection for pentobarbital-induced sleeping times in mice [J]. Pharmacology，1992，44（5）：257.

[12] 林芳，陈静文，张志麒，等 . 睡菜提取物对小鼠急性毒性及镇静催眠活性研究 [J]. 食品研究与开发，2019，40（11）：31-35.

[13] 赵仁云，郑竹宏，丁玉婷，等 . 栀子厚朴汤对失眠模型小鼠行为学及脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 国际药学研究杂志，2018，45（6）：436-442.

[14] 郑竹宏 . 百合地黄汤治疗失眠的作用机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2019.

[15] Quiones GM，Mayeli A，Yushmanov VE，et al. Reduced GABA/glutamate in the thalamus of individuals at clinical high risk for psychosis [J]. Neuropsychopharmacol，2021，46（6）：1133-1139.

[16] 王桂叶，杨坤丽，李东亮 . 探讨 5-HT 在睡眠 / 觉醒周期中的作用 [J]. 中国继续医学教育，2017，9（5）：198-200.

[17] 任重阳，陈贵海，张梅 . 腺苷系统对睡眠调节作用的研究进展 [J]. 中华神经科杂志，2018，51（8）：634-637.

[18] Peng WL，Wu ZF，Song K，et al. Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergicneurons [J]. Science，2020，369（6508）：eabb0556.

[19] Xu H，Wang Z，Zhu L，et al. Targeted neurotransmitters profilingidentifies metabolic signatures in rat brain by LC-MS/MS：application in insomnia，depression and Alzheimer’s disease [J]. Molecules，2018，23（9）：1-14

[20] 宋鹃，彭婉玲，武照伐，等 . 基底前脑谷氨酸能神经元参与睡眠稳态因子腺苷的动态调控 [A]// 中国睡眠研究会第十二届全国学术年会论文汇编 [C]. 中国睡眠研究会，2020.

[21] 张飞燕，李晶晶，周莹，等 . 安神类中药及其有效成分对神经递质镇静催眠机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2016，41（23）：4320-4327.

[22] 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.

（收稿日期：2022-12-06；修回日期：2023-02-06）

安神助眠药茶活性成分含量测定及安全性评价

王楠，高太祥，张洪雄，赵峰，裴晓丽*，王瑞*（山西中医药大学中药与食品工程学院，山西 晋中 030619）

摘要：目的 建立安神助眠药茶活性成分含量测定方法，并评价安神助眠药茶作为药茶开发利用的安全性。**方法** 采用 HPLC 法测定安神助眠药茶中酸枣仁皂苷 A 及斯皮诺素的含量，采用紫外分光光度法测定总多糖的含量。小鼠急性毒性实验和 30 d 喂养实验按照食品安全性毒理学评价程序和方法进行。**结果** 安神助眠药茶中酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素总含量为 1.094 mg•g^{-1}，总多糖的含量为 13.68 mg•g^{-1}；安神助眠药茶对小鼠急性毒性最大剂量为 960 g•kg^{-1}，按急性毒性分级，属无毒级；30 d 喂养实验表明安神助眠茶对大鼠的血液生化指标、脏器指数等指标无不良影响。解剖后观察心、肝、脾、肺、肾均未见组织病理学改变。**结论** 建立的药茶活性成分含量测定方法简便、准确，重复性良好，在本研究条件下，安神助眠药茶符合食品安全性评价标准的要求。

关键词：安神助眠药茶；含量测定；急性毒性；30 d 喂养实验；安全性
中图分类号：R284.1，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2322-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.010

Content determination and safety evaluation of active ingredients in Anshen Zhumian medicinal tea

WANG Nan, GAO Tai-xiang, ZHANG Hong-xiong, ZHAO Feng, PEI Xiao-li*, WANG Rui* (*School of Chinese Medicine and Food Engineering*, *Shanxi University of Chinese Medicine*, *Jinzhong Shanxi* 030619)

Abstract: Objective To determine the content of active ingredients and to evaluate the safety of Anshen Zhumian medicinal tea. **Methods** The content of jujube saponin A and spinotin in Anshen Zhumian medicinal tea was determined by HPLC. The content of total polysaccharides in Anshen Zhumian medicinal tea was determined by ultraviolet spectrophotometry. Acute toxicity test and 30-day feeding test in mice were conducted according to the procedures and methods of toxicological evaluation of food safety. **Results** The total content of jujube saponin A and spinotin was 1.094 mg • g $^{-1}$, and the content of polysaccharide was 13.68 mg • g $^{-1}$. The maximum acute toxicity dose of Anshen Zhumian medicinal tea in mice was 960 g • kg $^{-1}$, which belonged to non-toxic level according to acute toxicity classification. The 30-day feeding test showed that the tea had no obvious adverse effects on the blood biochemical indexes and organ indexes in rats. No histopathological changes were observed in the heart, liver, spleen, lung and kidney after the dissection. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality evaluation of medicinal tea. Under the conditions in this study, Anshen Zhumian medicinal tea met the requirements of safety evaluation standards.

Key words: Anshen Zhumian medicinal tea; content determination; acute toxicity; 30-day feeding test; safety

基金项目：山西中医药大学科技创新能力培育计划“太行本草”专项基础和应用研究项目（No.2022PY-TH-26）；山西中医药大学科技创新能力培育计划“成果转化引导专项”项目（No.2020PY-ZH-09）；山西中医药大学 2020 年度科技创新能力培育计划“山西药茶的研制和开发”项目（No.2020PY-YC-10）；晋药综合开发利用协同创新中心项目（No.2017-JYXT-15）；山西省地产中药品质评价技术创新中心 [晋科函〔2022〕168 号]。

作者简介：王楠，女，硕士，主要从事中药质量标准研究，email：wangnan19990911@163.com *通信作者：王瑞，女，硕士研究生导师，教授，主要从事中药质量控制与体内过程研究，email：wrgreentea@163.com；裴晓丽，女，高级实验师，主要从事中药分析研究，email：peixl@sina.com

随着时代发展不断加快，人们生活压力愈来愈大，失眠是现代社会中非常普遍的一种现象。失眠是现代人亚健康状态的一种表现。失眠又称“不寐”，主要以不能正常入睡影响体力精力为特征，给患者带来极大痛苦与心理负担[1]。近年来，由于药茶具有冲泡简单方便、疗效显著、副作用少及不会产生药物耐药性等特点，成为改善或治疗失眠、焦虑的研究热点[2]。

安神助眠药茶由百合、酸枣仁、紫苏、山楂四味药组成，均为药食同源目录（2022 年版）所收载品种。基于课题组前期实验和研究发现，安神助眠茶中四味药联用具有清心安神助眠之功效，可起到较好的抗疲劳、改善焦虑、提高睡眠质量等作用。方中百合为君药，有补养心阴、清除内热的功效，常用于治疗虚烦、失眠多梦、心悸、精神恍惚等情况。酸枣仁为臣药，可养血补肝、宁心安神。佐以紫苏叶疏肝解郁、宽胸下气。山楂生用，消食健胃、行气散瘀。安神助眠茶中主要含有多糖类、皂苷类、黄酮类、有机酸等成分，化学成分丰富多样。其中，百合和酸枣仁是方中起安神助眠之功效的主要药物。百合中的百合多糖是其重要生物活性成分之一，具有抗氧化以及免疫调节等作用[3]。查阅相关文献发现这些药理作用有利于睡眠的改善[4]。酸枣仁中含有黄酮类以及皂苷类成分[5]，其中酸枣仁皂苷和斯皮诺素是其发挥镇静作用的主要有效成分，具有很好的助眠作用[6]。此外，紫苏中含有的多糖有助于清除人体产生的某些疲劳代谢物质，缓解疲劳[7]，也有助于改善睡眠。基于对药茶中改善睡眠活性成分的分析，本文建立了关于酸枣仁皂苷 A、斯皮诺素、总多糖含量测定方法，测定了药茶中主要活性成分含量。同时对安神助眠药茶急性及长期毒性进行系统考察，可为其临床应用的安全性提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明小鼠 40 只，体重 18 ～ 20 g，雌雄各半；SPF 级 SD 大鼠 80 只，体重 90 ～ 100 g，雌雄各半 [斯贝福生物技术有限公司，动物合格证号为 110324220102650167，动物许可证号 SCXK（京）2019-0010]。

动物均饲养于山西中医药大学动物房内，雌雄分笼饲养，适应性饲养一周。在饲养过程中，12 h 昼夜交替，可自由获取食物与水。垫料每 2 日更换一次。

1.2 试药

乙腈（色谱纯，纯度≥ 99.9%，北京百灵威科技有限公司）；斯皮诺素对照品（批号：72063-39-9）、酸枣仁皂苷 A 对照品（批号：55466-04-1）（纯度均≥ 98%，上海诗丹德标准技术服务有限公司）；葡萄糖对照品（批号：RS0525-1000，纯度≥ 99.4%，成都普思生物科技股份有限公司）；水为娃哈哈纯净水；甲醇、磷酸、苯酚、浓硫酸等均为分析纯。

百合（批号：220401）、紫苏（批号：200401）、山楂（批号：211102）、酸枣仁（批号：211202）（山西元和堂中药有限公司，经山西中医药大学裴香萍教授鉴定为正品）。

1.3 仪器

肌酐（CREA）试剂盒、尿素氮（UREA）试剂盒（脲酶法）、谷丙转氨酶（ALT）试剂盒、谷草转氨酶（AST）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

AB135-S 电子天平（十万分之一，瑞士 METTLER 公司）；FA224 型天平（万分之一，上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；HC-2518 高速离心机（科大创新股份有限公司中佳分公司）；CT-100 旋转蒸发仪（JULABO）；ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器（奥泰科技有限公司）；Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters2998 紫外检测器（美国沃特世科技公司）；DZTW-SKM 型数显恒温电热套（鄄城华鲁电热仪器有限公司）；KQ5200V 超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司）；SHZ-D（Ⅲ）循环水式真空泵（巩义市予华仪器有限公司）；TU-1810 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限公司）。

2 方法

2.1 安神助眠药茶中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 含量测定

2.1.1 色谱条件

① 斯皮诺素：Atlantis t3 C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），PDA 检测器；检测波长 335 nm，流速 1 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 10 μL，梯度洗脱程序见表 1。

② 酸枣仁皂苷 A：Atlantis t3 C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），蒸发光散射检测器；流速 1 mL·min^{-1}，检测器温度 100 ℃，进样量 10 μL，梯度洗脱程序见表 2。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取百合 3 g，酸枣仁、紫苏、山楂各 1 g，加 9 倍量的水，提取 3 次，每次 1.5 h，合并滤液，浓缩，定容至 100 mL，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

表 1　斯皮诺素梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution procedure for spinotid

时间 /min	流动相 A（乙腈）/%	流动相 B（0.01% 磷酸水溶液）/%
0 ～ 4	5 → 12	95 → 88
4 ～ 8	12 → 22	88 → 78
8 ～ 15	22 → 25	78 → 75
15 ～ 20	25 → 45	75 → 55
20 ～ 25	45 → 5	55 → 95
25 ～ 30	5	95

表 2　酸枣仁皂苷 A 梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution procedure for jujube saponin A

时间 /min	流动相 A（乙腈）/%	流动相 B（水）/%
0 ～ 9	20 → 25	80 → 75
9 ～ 10	25 → 40	75 → 60
10 ～ 15	40	60
15 ～ 20	40 → 20	60 → 80

2.1.3　对照品溶液的制备　分别精确称定对照品斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 适量，加入甲醇配制成 1 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。

2.1.4　线性关系考察　精密称取两种对照品适量，分别用 70% 甲醇进行溶解，依次稀释得到斯皮诺素的质量浓度分别为 0.0124、0.0246、0.0491、0.0983、0.1899、0.3930 mg • mL^{-1}，酸枣仁皂苷 A 质量浓度分别为 0.0225、0.0435、0.0846、0.1661、0.3500、0.7000 mg • mL^{-1}。分别以对照品质量浓度和质量浓度对数为横坐标，峰面积和峰面积对数为纵坐标，进行线性回归计算，斯皮诺素的线性方程为 $y = 1\times10^{7}x + 1.456\times10^{4}$，$r = 0.9998$，线性范围为 0.0124 ～ 0.3930 mg • mL^{-1}；酸枣仁皂苷 A 的线性方程为 $y = 1.446x + 6.731$，$r = 0.9995$，线性范围为 0.0225 ～ 0.7000 mg • mL^{-1}。对照品及供试品色谱图见图 1。

2.1.5　精密度实验　分别取两种对照品溶液适量重复进样 6 次，记录其峰面积，计算 *RSD* 值分别为 1.1%、1.8%，结果表明仪器精密度良好。

2.1.6　稳定性实验　取供试品溶液适量，在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样，测定峰面积并计算 *RSD* 值，分别为 1.1% 和 1.7%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7　重复性实验　取相同的供试品平行制备 6 份，进样分析，测定峰面积，计算含量的 *RSD* 值分别为 1.6% 和 1.1%，表明方法重复性较好。

2.1.8　加样回收实验　取已知含量的供试品，平行制备 9 份，分别加入低、中、高浓度的对照品溶液适量后混匀，在“2.1.1”项色谱条件下测定，计算回收率，斯皮诺素低、中、高浓度的平均回收率分别为 92.7%、93.7%、95.9%，*RSD* 均＜ 2%；酸枣仁皂苷 A 低、中、高浓度的平均回收率分别为 92.2%、92.0%、93.4%，*RSD* 均 ＜ 2%，表明方法准确度良好。

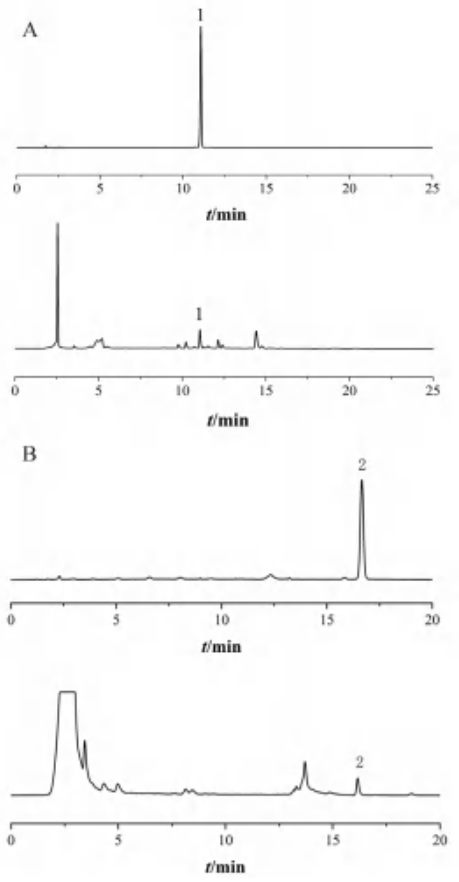


图 1　斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of spinosin and jujube saponin A

A. 斯皮诺素对照品和供试品溶液（spinotin and test solution）；B. 酸枣仁皂苷 A 对照品和供试品溶液（jujube saponin A and test solution）；1. 斯皮诺素（spinotin）；2. 酸枣仁皂苷 A（jujube saponin A）

2.2　安神助眠茶中总多糖含量的测定

2.2.1　对照品溶液的制备　取无水葡萄糖对照品适量，精密称定，加蒸馏水配成 0.04 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　取安神助眠药茶溶液 50 mL，浓缩至约 10 mL，放冷，加入 40 mL 的无水乙醇，3000 r • min^{-1} 离心 5 min，残渣用 80% 乙醇进行洗涤，离心并重复 2 次，用水洗涤残渣，定容至 20 mL，作为总多糖的供试品溶液。

2.2.3　线性关系考察　精密吸取上述对照品溶液 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mL 于试管中，分别加水补足至 10 mL，精密加入 6% 的苯酚溶液 1 mL，涡旋后匀速加入 98% 浓硫酸 5.0 mL，混匀，静置至室温。以空白试剂作为参比溶液，在 490 nm 波长下测定吸光度，以对照品溶液质量浓

度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。总多糖的线性方程为 $y = 50.757x - 0.2073$，$r = 0.9992$，线性范围为 0.008 ～ 0.018 mg • mL^{-1}。

2.3　急性毒性实验

安神助眠茶处方中的 4 味中药均为药食同源目录（2022 年版）所收载品种，没有毒性，为研究配伍后安神助眠药茶的毒性情况，采用最大耐受量法，给予小鼠最大给药剂量与最大灌胃体积后连续观察 14 d[8]。

按照 3∶1∶1∶1 的重量比称取适量的百合、酸枣仁、紫苏和山楂，加 9 倍量蒸馏水浸泡 30 min，加热至沸腾后回流提取 1.5 h，6 层纱布过滤，稍冷却后过滤并保存所得药液。重复上述操作 2 次，合并 3 次滤液。即得安神助眠药茶溶液。

取适量安神助眠药茶溶液浓缩至 1.2 g • mL^{-1}，小鼠灌胃可承受的最大体积 0.4 mL/10 g，一次性灌胃的最大给药剂量为 48 g • kg^{-1}。

40 只小鼠（雌雄各半）随机分成给药组和空白组，禁食不禁水 24 h，给药组小鼠分 2 次按最大灌胃体积灌服安神助眠茶，每次间隔 6 h，空白组则以等体积的生理盐水灌胃。灌胃后 30 min 内观察各组小鼠行为及活动情况，连续观察 14 d，每日上午 10：00 称重。实验结束后将小鼠处死，解剖后观察各组织器官的变化，主要脏器是否发生病变，计算脏器指数[9]。

2.4　30 d 喂养实验

80 只大鼠（雌雄各半）随机分为低、中、高剂量组和空白组，灌胃剂量按照 60 kg 成人与 250 g 大鼠换算。给药量分别为低剂量组（5 g•kg^{-1}，0.25 g • mL^{-1}）、中剂量组（10 g • kg^{-1}，0.5 g • mL^{-1}）、高剂量组（20 g • kg^{-1}，1 g • mL^{-1}）（分别相当于人临床摄入剂量的 50、100、200 倍），空白组按同等剂量灌胃生理盐水，连续给药 30 d[10]。

2.4.1　一般情况观察　每周进行一次体重测定并根据体重换算灌胃剂量，给药期间每日对大鼠的毛发、行为、粪便等情况进行观察。

2.4.2　血液学检查　腹主动脉采血 2 mL 置于 EDTA 抗凝管中，对血液学指标红细胞（RBC）、白细胞（WBC）、血小板（PLT）、血红蛋白（HB）等指标进行检测。

2.4.3　血液生化指标检测　腹主动脉采血 5 mL，静置 30 min 后，3500 r • min^{-1} 离心 15 min，吸取上层透明血清，采用试剂盒对大鼠 ALT、AST、CREA、BUN 等血液生化指标进行检测。

2.4.4　脏器系数测定　实验结束后，对大鼠进行解剖，取其主要脏器，进行脏器指数的计算。

2.4.5　病理学观察　实验结束后处死大鼠，肉眼观察各组织器官有无异常情况[11]。

2.5　统计方法

实验得到的数据结果采用 SPSS 的单因素方差分析进行分析，采用 GraphPad Prism 8.0 绘制统计图，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义[12]。

3　结果与讨论

3.1　含量测定结果

经过测定，样品中酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素总含量为 1.094 mg • g^{-1}，*RSD* 值为 1.6%。样品中总多糖含量为 13.68 mg•g^{-1}，*RSD* 值为 0.73%。

3.2　小鼠急性毒性实验

3.2.1　小鼠体重变化情况　实验观察期间，所有小鼠皮毛光洁、行动自如、精神状态良好，饮食饮水正常、排泄物未见异常。两组小鼠均未死亡。灌胃剂量按照 60 kg 成人与 20 g 小鼠的表面积折算法进行换算。经计算发现小鼠每日合计最大灌胃剂量为 96 g • kg^{-1}，相当于人临床日服量（100 mg • kg^{-1}）的 960 倍。实验期间，各组小鼠体重均增加，具体结果见表 3。

表 3　安神助眠茶对小鼠体重的影响 (g，$n = 10$)

Tab 3　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the body mass of mice (g，$n = 10$)

组别	0 d		7 d		14 d	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
空白组	29.20±1.32	25.80±1.23	33.84±2.95	29.83±1.86	37.58±1.71	30.02±1.31
给药组	27.10±0.99	27.50±2.46	31.55±2.26	30.18±3.02	37.48±1.20	31.24±2.27

3.2.2　小鼠脏器指数　脱颈处死后，解剖小鼠观察所有器官未见异常，与对照组相比，给药组小鼠脏器指数差异没有统计学意义，结果见图 2。

3.3　大鼠 30 d 喂养实验

3.3.1　一般情况　实验期间，各组大鼠生长情况正常，毛发颜色正常，饮食与饮水情况正常，排泄物无异常。

3.3.2　体重变化情况　实验期间，各剂量组大鼠体重均增加，各剂量雌性大鼠总增重范围在（103.2±4.32）g 至（113.5±21.92）g，雄性大鼠的增重范围在（153.3±12.74）g 至（164.3±9.00）g，结果见图 3。高剂量雌性大鼠体重由（95.40±6.19）g 增

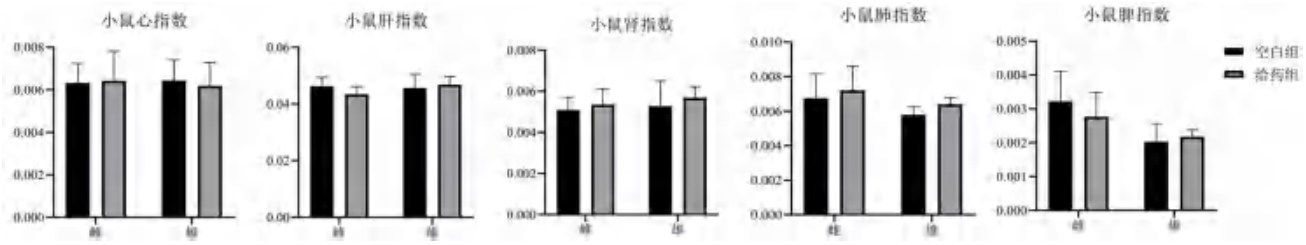


图 2　安神助眠药茶对小鼠脏器指数的影响

Fig 2　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the organ index

长至（219.00±20.1）g，体重增长率为 128.8%，与空白组相比，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），其余各组大鼠体重与对照组相比，差异均无统计学意义。

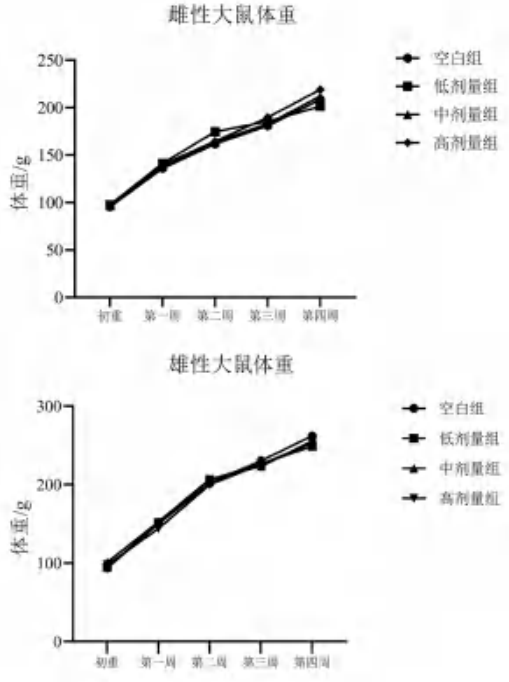


图 3　安神助眠药茶对大鼠体重的影响

Fig 3　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the body mass of rats

3.3.3　脏器指数　结果见图 4，与空白组相比，给药各组大鼠各脏器指数差异无统计学意义。

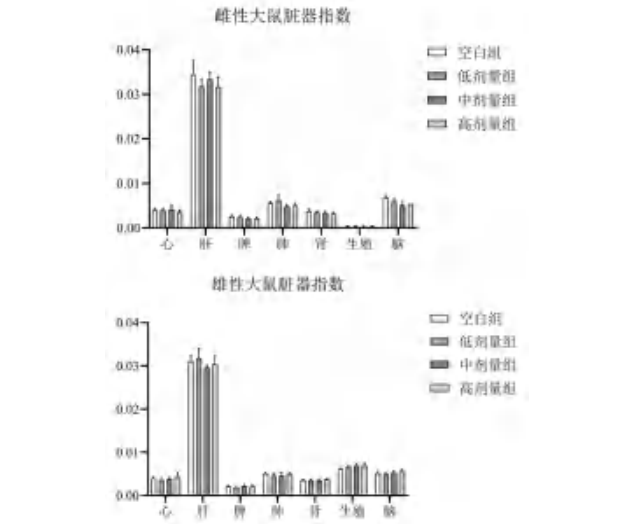


图 4　安神助眠药茶对大鼠脏器指数的影响

Fig 4　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the organ index of rat

3.3.4　血常规检测结果　结果见表 4，与空白组相比，中剂量组雌性大鼠红细胞数量偏低，高剂量组雄性大鼠红细胞含量偏低，中剂量组雄性大鼠血红蛋白含量偏高（$P < 0.05$），但均在正常值范围内。各剂量组雄鼠和雌鼠其他血常规指标与空白组相比差异均无统计学意义。

3.3.5　血液生化指标检测结果　与空白组相比，各剂量组大鼠各检查指标差异均无统计学意义。结果见图 5。

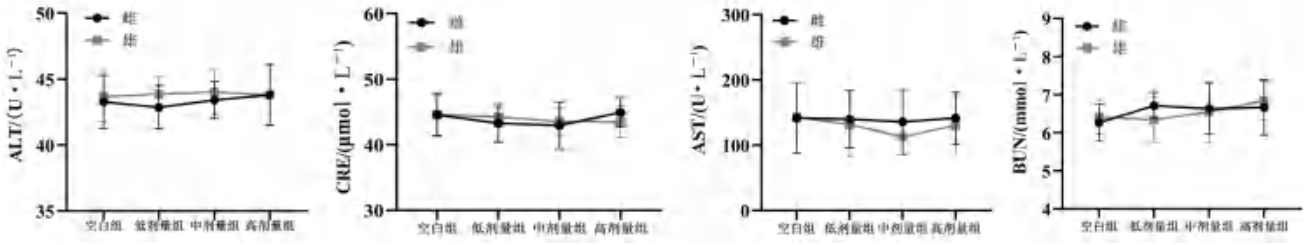


图 5　安神助眠药茶对大鼠血液生化指标的影响

Fig 5　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the blood biochemical parameters of rats

4　讨论

本文建立了 HPLC 测定安神助眠药茶中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 含量的方法，建立了 UV 测定药茶中总多糖含量的方法，并考察了安神助眠药茶的安全性。

急性毒性实验结果显示，小鼠的健康状况良好，没有异常死亡情况发生。按照现有的中药毒性和安全性测试方法，中药的安全性的判定标准是小鼠可以耐受成人剂量的 100 倍以上即可。经过计算在本条件下，安神助眠药茶在成人临床日

表 4　安神助眠药茶对大鼠血常规指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 4　Effect of Anshen Zhumian medicinal tea on the blood routine parameter of rats（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

性别	组别	红细胞 /（$\times10^{12}\cdot L^{-1}$）	白细胞 /（$\times10^{9}\cdot L^{-1}$）	血红蛋白 /（$g\cdot L^{-1}$）	血小板 /（$\times10^{9}\cdot L^{-1}$）	淋巴细胞 /（$\times10^{9}\cdot L^{-1}$）	中性细胞 /（$\times10^{9}\cdot L^{-1}$）
雌	空白组	7.99±0.37	6.91±1.70	152.10±5.71	1400.50±325.39	7.21±1.29	0.77±0.18
	低剂量组	7.97±0.36	6.94±1.63	143.90±17.34	1394.38±81.82	7.01±1.00	0.76±0.12
	中剂量组	7.21±1.07*	7.07±1.86	143.85±15.70	1478.43±265.08	7.05±1.63	0.77±0.06
	高剂量组	8.16±0.18	7.02±1.53	150.75±4.33	1489.75±279.05	7.10±0.53	0.78±0.19
	F	4.144	0.009	1.155	0.302	0.036	0.029
	P	0.014	0.999	0.342	0.823	0.991	0.993
雄	空白组	8.46±0.35	7.60±2.83	156.70±5.04	1535.00±127.31	7.76±1.50	0.91±0.36
	低剂量组	8.51±0.28	7.32±1.93	155.90±3.12	1499.70±337.73	7.37±1.54	0.87±0.30
	中剂量组	8.21±0.38	7.72±1.87	161.00±7.43*	1465.90±135.23	7.62±1.83	0.90±0.14
	高剂量组	7.98±0.85*	7.21±1.50	155.90±5.87	1410.20±270.52	7.28±1.10	0.86±0.16
	F	3.747	0.149	2.877	0.479	0.131	0.062
	P	0.015	0.929	0.043	0.699	0.941	0.979

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$。

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

用量的 960 倍下对小鼠没有产生明显的毒性作用，证明该药茶是可以安全使用的。

评价药物安全性的重要基础指标之一是 30 d 喂养实验 [13-15]。从生长情况及体重变化情况来看，安神助眠药茶不会影响动物的正常生长及发育。脏器指数可以反映出外界影响后脏器水肿或萎缩等情况，从结果来看，药茶对脏器没有不良影响。

药茶在人体代谢的主要器官是肝和肾，ALT 和 AST 是血液生化指标中反映肝脏功能好坏的重要指标，UREA 和 CREA 则是反映肾脏功能好坏的重要指标 [16]，本文检验结果表明药茶对以上血液生化指标无影响，因此可以判定安神助眠药茶对肝、肾无毒性。血液学指标检查可以反映细胞数量是否异常。实验后，血常规检查结果未见异常变化，说明药茶对血液学指标无影响。综上，在实验条件下，安神助眠药茶没有毒副作用，临床使用安全可靠。

参考文献

[1] 罗芳丽，申治富，廖伯年，等 . 中医药治疗亚健康失眠的研究进展 [J]. 黔南民族医专学报，2022，35（3）：232-235.

[2] 方艺洁，彭伟 . 药食两用中药材治疗失眠的作用机制及应用研究进展 [J]. 食品与药品，2022，24（5）：498-504.

[3] 张靖，彭鼎，陈凯，等 . 百合多糖免疫活性研究进展 [J]. 中国动物传染病学报，2021，29（3）：114-118.

[4] 余思佳，徐建雄 . 微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及抗氧化性能的影响 [J]. 中国比较医学杂志，2016，26（6）：28-31.

[5] 张婷，张岩，王文彤，等 . 酸枣仁中黄酮成分及其药理作用研究进展 [J]. 天津药学，2018，30（1）：69-74.

[6] 黄之镨，马伟光 . 酸枣仁及活性物质的药理研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2018，27（3）：57-60.

[7] 赵奕栋，孙文豪，陈天源，等 . 紫苏叶有效成分药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药，2022，54（8）：79-82.

[8] 贺程蓓 . 梦萦口服液的研究与开发 [D]. 晋中：山西中医药大学，2020.

[9] 乐暾，牟华明，李晶，等 . 金鸡毛草水提取物大鼠 30 天喂养毒性研究 [J]. 中国药物警戒，2018，15（8）：449-451.

[10] Wang DH，Wang MY，Shen WH，et al. Analysis of chemical compounds and toxicological evaluation of *Forsythia suspensa* leaves tea [J]. Food Sci Biotechnol，2021，30（2）：305-314.

[11] 王晓林，戴鹂莹，邸松，等 . 刺芒参胶囊活性成分含量测定及安全性评价 [J]. 食品与机械，2020，36（4）：102-109，206.

[12] 闫玺镁 . 基于酸枣仁汤的中药保健品宁心安神口服液研究与开发 [D]. 晋中：山西中医药大学，2020.

[13] 李霄，荀健，王雪媛，等 . 中药茳芒提取物急性及亚慢性毒性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（7）：61-64.

[14] 黄蕊芳，艾尔肯·塔西铁木尔，熊进，等 . 昆仑雪菊水提物急性毒性和 30 d 喂养实验 [J]. 毒理学杂志，2019，33（1）：84-86.

[15] 李倩，朱贲贲，王巍嵩 . 金锦香提取物毒理学安全性评价 [J]. 中南药学，2019，17（11）：1813-1818.

[16] 鄢鹏飞，田瑞，王雪儿，等 . 富硒油菜粉急性毒性研究及 30 天喂养实验 [J]. 湖北民族大学学报（自然科学版），2021，39（4）：391-397.

（收稿日期：2023-02-26；修回日期：2023-04-19）

姜黄素介孔缓释载药系统制备工艺优化及其体外抗肿瘤活性研究

胡宪龙，苏厚霖，邱圣楷，张倩，熊炜*，李颖*（深圳大学医学部药学院，广东 深圳 518000）

摘要：目的 制备姜黄素纳米介孔缓释载药系统并对其制备工艺进行优化，评价载药系统的相关表征及缓释性能。**方法** 采用动态吸附法制备姜黄素纳米介孔缓释载药系统，以载药率和包封率作为评价指标，以正交设计优化处方及工艺。通过扫描电镜、透射电镜、粒径等方法进行表征。最后对姜黄素纳米介孔载药系统的溶解度与累积溶出率进行考察。以 MTT 法考察姜黄素和姜黄素纳米介孔载药系统对 A549 细胞和 MCF-7 细胞的体外细胞毒性。使用 Dil 和 Hoechst-33258 染色 A549 细胞，考察细胞摄取能力。**结果** 最优制备工艺：药物载体 - 投料比为 5∶1，载药温度为 30 ℃，溶剂为 80% 乙醇。此条件下制备的载药系统载药量为 78.17%，包封率为 98.23%。体外溶出实验结果表明姜黄素纳米介孔载药系统在一定时间内具有缓释作用。姜黄素纳米介孔载药系统不仅对 A549 和 MCF-7 细胞的抑制率均高于姜黄素，而且还具有更优异的摄取能力。**结论** 所制备的姜黄素纳米介孔缓释载药系统具有较高的包封率和载药量，相较于游离姜黄素具有更高的溶解度、体外溶出、体外细胞毒性和摄取能力。

关键词：姜黄素；MCM-41；介孔材料；载药量；理化表征
中图分类号：R943，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2328-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.011

Optimization of the preparation of curcumin mesoporous sustained-release drug loading system and its in vitro antitumor activity

HU Xian-long, SU Hou-lin, QIU Sheng-kai, ZHANG Qian, XIONG Wei*, LI Ying* (*School of Pharmacy, Shenzhen University Medical School, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong* 518000)

Abstract: Objective To optimize the preparation of curcumin nano-mesoporous sustained release drug delivery system and evaluate the relevant characterization and sustained release performance of the system. **Methods** The curcumin nano-mesoporous drug loading system was prepared by dynamic adsorption method, the drug loading rate and encapsulation rate were used as evaluation indicators, and the prescription and process were optimized by factor orthogonal design. Characterization was conducted by methods such as scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and particle size. Finally, the solubility and cumulative dissolution rate of curcumin nano-mesoporous drug carrier system were determined. The in vitro cytotoxicity of curcumin and curcumin nano mesoporous drug loading system on A549 cells and MCF-7 cells was investigated by MTT. A549 cells were stained using Dil and Hoechst-33258 to determine cell uptake capacity. **Results** The optimized preparation was as follows: the drug carrier-feeding ratio was 5∶1, the temperature was 30 ℃, and the solvent was 80% ethanol. The curcumin nano-mesoporous drug loading system prepared under this condition had an average drug loading of 78.17% and an average encapsulation rate of 98.23%.

基金项目：深圳大学高水平大学建设项目（No.86000000210）；深圳市高等院校稳定支持计划面上项目（No.2020081122323500）；广东省自然科学基金 - 面上项目（No.2022A1515010481）；广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金 - 青年基金项目（No.2021A1515110961）；深圳大学新进教师科研启动项目（No.860000002111304）。

作者简介：胡宪龙，男，硕士研究生，主要从事纳米药物递送系统的研究，email：xianlonghu1998@163.com *通信作者：李颖，女，讲师，主要从事提高难溶性药物口服吸收的制剂技术以及超临界流体技术等研究，email：li.ying@szu.edu.cn；熊炜，男，助理教授，主要从事纳米递药系统研究，email：bearsteven@163.com

The in vitro dissolution showed that the curcumin nano-porous drug delivery system had a sustained release effect within certain time. The curcumin nano-mesoporous drug loading system not only had a higher inhibition rate on A549 and MCF-7 cells than the curcumin group but also a better uptake ability. **Conclusion** The curcumin nano-mesoporous sustained-release drug loading system has a high encapsulation rate and drug loading, and it has better solubility, in vitro dissolution, in vitro cytotoxicity, and uptake ability than free curcumin.

Key words: curcumin; MCM-41; mesoporous material; drug loading; physicochemical characterization

姜黄素（curcumin，Cur）是从姜黄根茎中提取得到的多酚类化合物[1]，具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等药理活性[2]。凭借复杂的抗肿瘤机制，姜黄素对多种肿瘤细胞具有抑制作用[3]，如防治胰腺癌、乳腺癌、结直肠癌的研究已经进入临床试验阶段，而对头颈癌、肺癌、胃癌、前列腺癌的体内外实验都显示出明显的抑制作用[4]。然而，姜黄素的水溶性差、代谢快、生物利用度低、穿透性和靶向性差，这些缺陷极大地限制了其有效利用，阻碍了它的临床发展[3-4]。因此，亟需利用现代药剂学手段对姜黄素进行多种剂型改造，其中关于姜黄素的新型纳米制剂研究引起了国内外专家的广泛关注。为包裹和保护姜黄素不被降解，提高生物利用度，降低毒副作用，进一步优化治疗效果，基于纳米制剂的方法如脂质体[5]、胶束[6]、纳米粒[7]、纳米囊[8]等得到了广泛应用。

相较于脂质体、胶束等传统的有机药物载体，无机载体由于其良好的物理稳定性，易于表面功能化等优势，在纳米药学领域显示出日益显著的地位[9]。介孔二氧化硅（mesoporous silica nanoparticles，MSN）作为应用最为广泛的无机纳米材料之一，具有可修饰的介孔结构、高比表面积、大孔容、改善难溶药物溶解度等特点[10]。这些特性使 MSN 作为纳米载体材料具有独特的优势，可以封装各种治疗药物，并将这些药物输送到所需的位置，重要的是，其制造方法简单、可扩展、成本低且可控[11]。姜黄素与 MSN 材料复合可使姜黄素以纳米级的形态被负载于介孔材料孔隙内表面，使姜黄素难以相互接触团聚，此外，纳米级的粒径和巨大的比表面积，可显著提高姜黄素的溶出度及生物利用度[12]。

虽然关于姜黄素 - 介孔二氧化硅（Cur-MSN）已有文献报道，但大多侧重其作用机制、功能修饰及对肿瘤的治疗等，缺乏对 Cur-MSN 制备处方工艺及抗肿瘤效果的研究。因此，本文在前期研究的基础上，对关键的制备处方和工艺进行优化，制备出具有缓释能力的 Cur-MSN，并有效提高了姜黄素的溶解度，解决了难溶性药物生物利用度低、给药难的问题。最后验证了 Cur-MSN 体外抗肿瘤效果和摄取能力。

1 仪器与试药

Agilent1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；磁力搅拌器（德国 Wiggens 公司）；X- 射线衍射仪（德国 Bruker AXS）；差示扫描量热仪（德国 Netzsch 公司）；广角静态动态同步激光散射仪（英国 Mastersizer 2000 公司）；透射电镜 JEM-1230（日本 NIPPON TEKON 公司）；扫描电子显微镜（日本日立公司）；冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；透析袋 MD44（美国 Viskase 公司）；酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；超高分辨率激光扫描显微镜 ZEISS-LSM880（德国 CARL ZEISS 公司）。

姜黄素原料药（深圳菲斯生物科技有限公司）；MCM-41（介孔二氧化硅，上海甄准生物科技有限公司，批号：L1694765）；乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；三乙胺、十二烷基硫酸钠（分析纯，上海麦克林生化科技有限公司）；四甲基偶氮唑蓝（MTT，碧云天生物技术有限公司）；Dil 细胞膜红色荧光探针（深圳瑞鑫生物科技有限公司）；Hoechst 33258（上海睿铂赛生物科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 姜黄素介孔缓释载药系统的制备

参照文献[13]采用动态吸附法制备：称取一定量的姜黄素和 MSN 溶解于 100 mL80% 乙醇，在磁力搅拌器上搅拌一定时间后用 0.22 μm 滤膜过滤，滤渣经纯水洗涤、干燥，即得姜黄素介孔缓释载药系统。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 对照品储备液的配制 精密称取姜黄素对照品 5.0 mg，溶解于 50 mL 量瓶中，以流动相定容，得到 0.10 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。

2.2.2 色谱条件 流动相：乙腈 -0.2% 磷酸 -

三乙胺＝50∶50∶0.1（pH＝3.2）；流速：1 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长：450 nm；进样量：10 μL；色谱柱：ZORBAX SB-C18 柱（5 μm，4.6 mm×250 mm）。

2.2.3　专属性考察　分别精密移取 10 μL 姜黄素对照品溶液和姜黄素原料药溶液，进样测定，将两个样品的色谱图进行对比，结果见图 1，姜黄素对照品溶液和原料药溶液均有明显的色谱保留峰，表明在该色谱条件下能够准确检测出样品中姜黄素的含量。

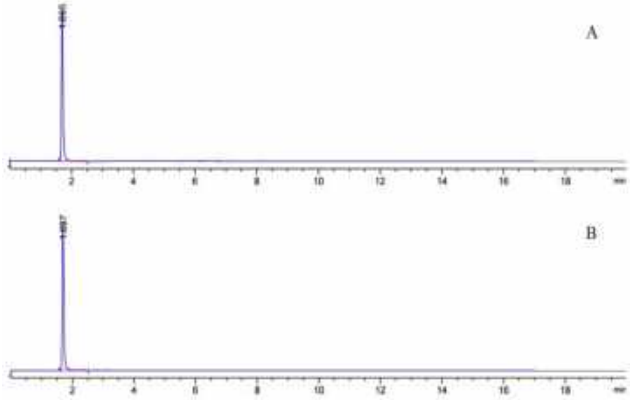


图 1　姜黄素对照品（A）和原料药（B）的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of curcumin reference（A）and active pharmaceutical ingredient（B）

2.2.4　标准曲线的绘制　精密移取对照品储备液适量，用流动相配成 4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、20.0、30.0、40.0 μg·mL^{-1} 的系列质量浓度的对照品溶液，进样测定，以质量浓度为 X 轴，以峰面积为 Y 轴，绘制标准曲线，线性方程为 $Y = 59.88X - 19.64$（$R^2 = 0.9991$），表明姜黄素在 4 ～ 40 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.2.5　稳定性考察　精密称取 5.0 mg 姜黄素对照品，配制成 8.0 μg·mL^{-1} 姜黄素对照品溶液，分别在制备后 0、2、4、12、24 h 进样测定，测得峰面积的 *RSD* 值为 0.23%（$n = 5$），结果表明姜黄素在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6　重复性考察　精密称取 5.0 mg 姜黄素对照品，平行配制 5 份 8.0 μg·mL^{-1} 姜黄素对照品溶液，进样测定，结果峰面积的 *RSD* 值为 0.28%（$n = 5$），表明方法重复性良好。

2.3　载药量和包封率的测定

载药结束后取 0.05 mL 滤液于 10 mL 量瓶中，流动相定容，进样测定。通过标准曲线测得滤液中姜黄素的残余含量，计算 Cur-MSN 的载药量、包封率。

2.4　Cur-MSN 制备工艺处方优化

2.4.1　制备工艺条件的筛选　精密称取适量姜黄素和 MSN，依次改变载药时间、投料比、载药速率、载药温度、溶剂和孔径等条件，每个条件下平行制备 3 组 Cur-MSN，测定其包封率和载药量，结果见图 2。

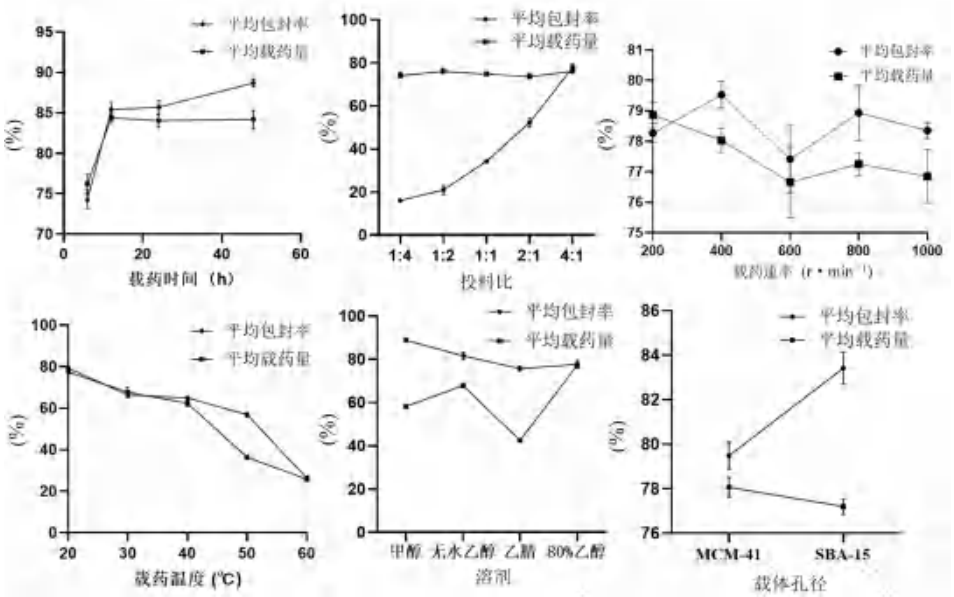


图 2　不同因素对包封率、载药量的影响

Fig 2　Effect of different factors on the encapsulation efficiency and drug loading capacity

2.4.2　优化制备工艺　根据单因素实验考察结果，选取对 Cur-MSN 制备结果影响较大的 3 个条件（投料比、载药温度、溶剂）作为考察因素，并各选取 3 个水平（见表 1），以载药量、包封率为评价指标进行正交实验设计以优化制备工艺，运用 Minitab 2019 软件进行分析（见表 2）。由方差分析可以看出，

投料比（A）对 Cur-MSN 具有显著影响（$P < 0.05$），载药温度（B）和溶剂（C）对 Cur-MSN 影响不大。综上可知，载药温度和溶剂条件对 Cur-MSN 影响不大，本着绿色环保低毒的原则，综合分析均值响应表（见表 3），最终确定优化条件应为 $A_3B_2C_3$。即姜黄素和 MSN 投料比为 5∶1，温度为 30 ℃，溶剂为 80% 乙醇。按照最优处方平行制备 3 组 Cur-MSN，其平均载药量为 78.17%，平均包封率为 98.23%。

表 1　方差分析因素水平表

Tab 1　Factor and level for ANOVA

水平	因素		
	投料比	载药温度 /℃	溶剂
1	2∶1	20	甲醇
2	4∶1	30	乙醇
3	5∶1	40	80% 乙醇

表 2　优化制备工艺实验结果

Tab 2　Optimal preparation process test results

组别	投料比	载药温度	溶剂	载药量 /%	包封率 /%
1	1	1	1	46.80	94.69
2	1	2	2	47.13	94.25
3	1	3	3	47.43	94.41
4	2	1	2	62.04	92.22
5	2	2	3	64.89	97.42
6	2	3	1	64.79	96.63
7	3	1	3	77.43	98.33
8	3	2	1	77.50	96.76
9	3	3	2	72.44	91.08

表 3　均值响应表

Tab 3　Mean response table

水平	A	B	C
1	70.79	78.58	79.53
2	79.67	79.66	76.53
3	85.59	77.8	79.98
Delta	14.8	1.86	3.46
排秩	1	3	2

2.5　表征

2.5.1　扫描电镜分析　使用扫描电镜观察被测物形貌、晶体的规整性、颗粒分散状况及大小等信息。图 3 显示，姜黄素粉末微观结构呈现晶体颗粒状；MSN（MCM-41）微观结构为球形，且颗粒形状规则，排列整齐有序；姜黄素与 MSN 物理混合物微观结构呈现晶体与球形颗粒掺杂，整个体系杂乱无章；Cur-MSN 微观结构颗粒大小均匀，聚集成团，图中虽未见明显姜黄素晶体结构，但仍有些许小姜黄素晶体存在，完全不同于物理混合物，即姜黄素已包载入 MSN 中，且存在部分姜黄素附着于 MSN 表面。

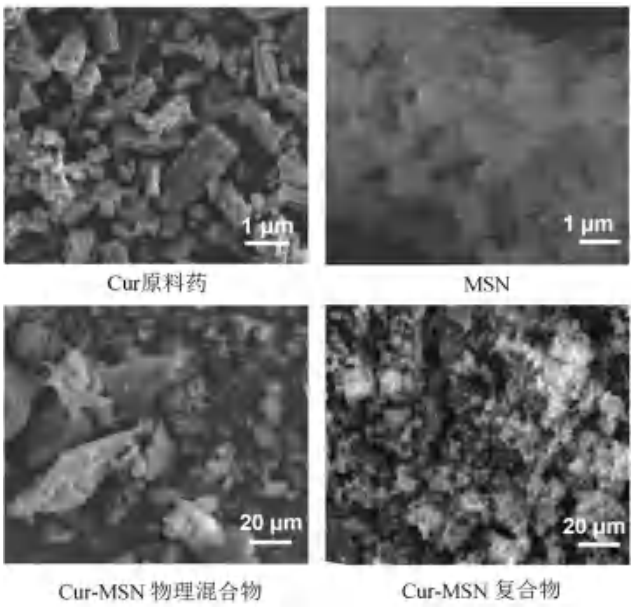


图 3　Cur-MSN 扫描电镜结果图

Fig 3　Scanning electron microscope results of Cur-MSN

2.5.2　透射电镜分析　分别精密移取姜黄素、MSN（MCM-41）、物理混合物和 Cur-MSN 溶液 10 μL，将其滴在干净的铜网上，静置一段时间后用滤纸吸去多余的液体。然后加入 1% 的磷钨酸进行负染，待样品干燥后在透射电镜下观察外观形态并拍照，见图 4。结果显示，姜黄素在透射电镜下聚集成伞状或花瓣状，单个晶体形貌为针状或柳叶状，其长度在 0.2 μm 左右；MSN 在透射电镜下排列紧密有序，孔径属纳米级；姜黄素与 MSN 物理混合物混杂成堆，没有明显规律；MSN 负载姜黄素后，在上方中部依稀可见细小颗粒状，大小在纳米级，且其孔径并未受药物影响，颗粒中颜色较深物质推测为姜黄素，在物体左面颜色较深为长条形物质推测为团聚而成的姜黄素。

2.5.3　激光粒度检测分析　姜黄素的平均粒径为 17.378 μm；MSN 的平均粒径为 18.080 μm；姜黄素与 MSN 的物理混合物的平均粒径为 45.709 μm，且具有姜黄素和 MSN 的双粒径峰，这是由于在单纯的物理混合物体系内，姜黄素和 MSN 会发生吸附而聚集；Cur-MSN 的平均粒径为 10.000 μm。复合物平均粒径小于 MSN 平均粒径，因此可以推测 MSN 在正常情况下易于团聚，而 Cur-MSN 粒度均匀，分散性较好（见图 5）。

2.5.4　差示扫描量热分析　图 6A 显示姜黄素从 183.8 ℃开始相变，从 180.8 ℃开始玻璃化转变；图 6B 显示 MSN 在 68.3 ℃开始相变；图 6C 显示姜黄素与 MSN 物理混合物从 184.5 ℃开始相变，从 180.8 ℃开始玻璃化转变，其在 68 ℃左右

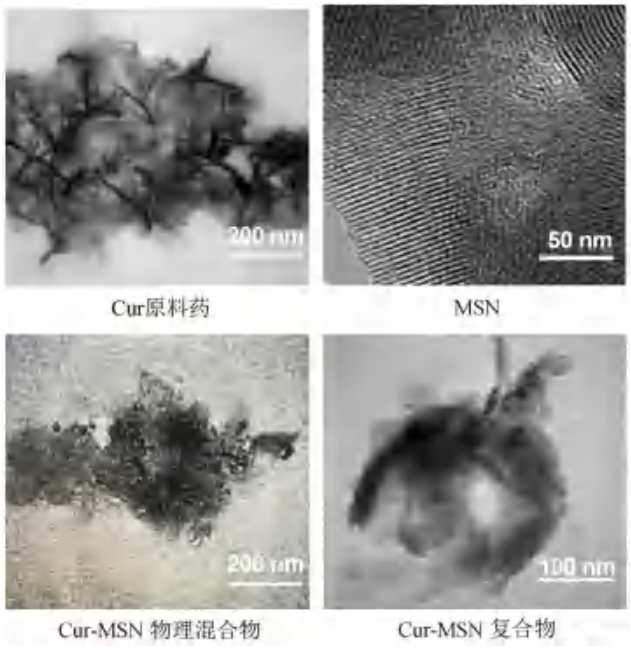


图 4　Cur-MSN 透射电镜结果图

Fig 4　Transmission electron microscope results of Cur-MSN

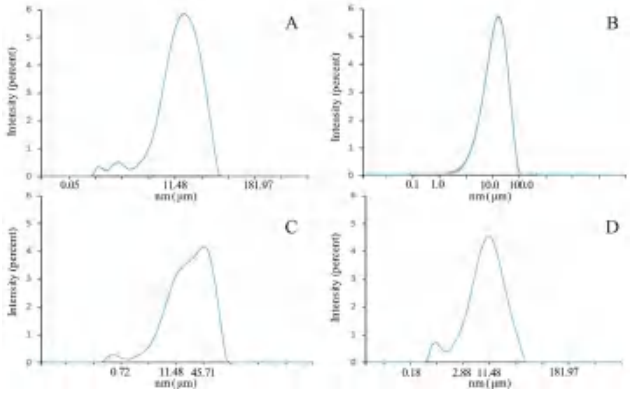


图 5　Cur-MSN 激光粒度分析结果图

Fig 5　Laser particle size analysis of Cur-MSN

A. 姜黄素组（curcumin group）；B. MSN 组（MSN group）；C. 姜黄素与 MSN 物理混合物组（curcumin and MSN physical mixture group）；D. Cur-MSN 组（Cur-MSN group）

有 DSC 波峰，认为存在 MSN 未与姜黄素产生联系；图 6D 显示 Cur-MSN 从 185.5 ℃开始相变，从 182.2 ℃开始玻璃化转变。Cur-MSN 相变温度不同于姜黄素和物理混合物，认为复合物粉末中无姜黄素晶体存在，姜黄素已包载于 MSN 中。

2.6　溶解度和累积溶出率测定

2.6.1　溶解度实验　取过量姜黄素原料药、姜黄素与 MSN 物理混合物、Cur-MSN 分别溶于 10 mL 0.2% SDS 水溶液中超声得到饱和溶液，置于 25 ℃恒温振荡器内振摇 24 h 使其达到溶解平衡。将样品于 15 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 1 mL 适当稀释后测姜黄素含量。结果在 0.2% SDS 溶液中，姜黄素平均溶解度为（2.56±0.15）μg • mL^{-1}；姜黄素和 MSN 物理混合物溶解度（6.02±0.27）μg • mL^{-1}；Cur-MSN 溶解度为（6.95±0.19）μg • mL^{-1}。可见，MSN 能显著增加姜黄素在 0.2% SDS 溶液中的溶解度。

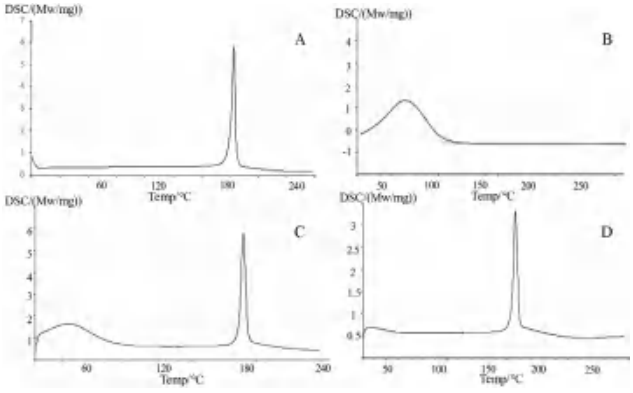


图 6　Cur-MSN 差示扫描量热分析

Fig 6　Differential scanning calorimetry of Cur-MSN

A. 姜黄素组（curcumin group）；B. MSN 组（MSN group）；C. 姜黄素与 MSN 物理混合物组（curcumin and MSN physical mixture group）；D. Cur-MSN 组（Cur-MSN group）

2.6.2　累积溶出率实验　准确称量姜黄素原料药、姜黄素与 MSN 物理混合物、Cur-MSN 分别装入透析袋（3500 Da），浸没在 500 mL 含 0.2%SDS 水溶液中，于 37 ℃下恒温振荡，定时（第 10、20、30、45、60、120、180、240 min）取样 1 mL 测含量，并补加等量 0.2%SDS 溶液，计算累积释放度。图 7 表明，在 0.2%SDS 溶液中 4 h 内，姜黄素累积释放度在 20% 左右；姜黄素和 MSN 物理混合物累积释放度在 25% 左右且在 20 min 接近溶解平衡，溶出程度略大于原料药；Cur-MSN 累积释放度在 55% 左右且在 60 min 接近平衡，释放程度为姜黄素原料药的近 3 倍。可见，MSN 能够增强难溶药物姜黄素在 0.2%SDS 溶液中的释放度。

2.7　体外细胞毒性

采用 MTT 法考察药物和制剂的体外毒性，并选择 A549 和 MCF-7 细胞作为体外细胞模型。将细胞以 5000 个 / 孔的密度铺于 96 孔板中，37 ℃培养箱中培养 12 h 使其贴壁生长，弃去原培养基并补加 100 μL 含不同质量浓度药物或载药制剂的培养基，继续孵育 24 h 后每孔加入 100 μL MTT 溶液（0.5 mg • mL^{-1}），孵育 4 h。弃去 MTT 溶液，加入相同体积的 DMSO 溶解蓝紫色晶体，在 570 nm 波长下测定吸光度值并计算细胞存活率，以未经药物处理的细胞作为对照。细胞存活率（%）＝加药组吸光度 / 空白组吸光度 ×100%。结果表明，Cur-MSN 较游离姜黄素对 MCF-7 和 A549 细胞具有明显细胞毒性，A549 细胞对 Cur-MSN 更敏感，见图 8 及表 6。

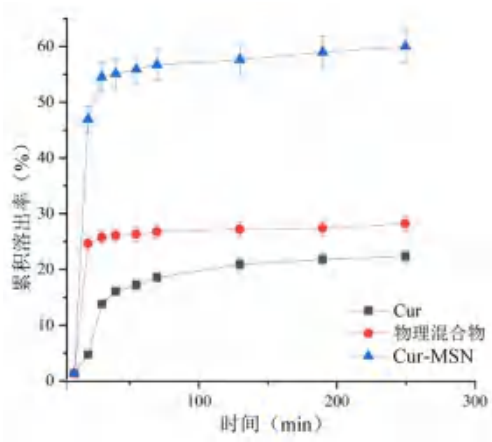


图 7　姜黄素累积溶出率

Fig 7　Cumulative dissolution rate of curcumin

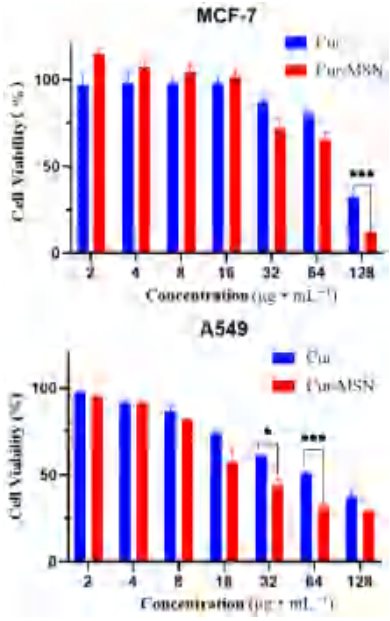


图 8　姜黄素和 Cur-MSN 对 MCF-7 细胞、A549 细胞的抑制率

Fig 8　Inhibition of curcumin and Cur-MSN on MCF-7 cells and A549 cells

表 6　Cur、Cur-MSN 对 MCF-7 细胞和 A549 细胞的 IC_{50}

Tab 6　IC_{50} of curcumin，Cur-MSN on MCF-7 cells and A549 cells

细胞	IC_{50} /(μg·mL^{-1})	
	Cur	Cur-MSN
MCF-7	74.35	65.28
A549	37.41	14.74

2.8　细胞摄取

取细胞以 5×10^4 个·mL^{-1} 的密度接种于 1 mL 激光共聚焦显微镜专用培养皿中，孵育 24 h 至细胞贴壁后，移去原来的培养液后用无菌 PBS 洗涤，加入 1 mL 含有 10 μg·mL^{-1} 姜黄素的药物培养液，继续孵育 2 h。移去含药的细胞培养液，用无菌 PBS 多次冲洗细胞，用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min 后用无菌 PBS 冲洗，加入 200 μL Dil（10 μg·mL^{-1}）试剂避光染色细胞膜 20 min；用无菌 PBS 冲洗 3 次，再加入 200 μL Hoechst-33258（20 μg·mL^{-1}）试剂，避光室温染色细胞核 20 min；再用无菌 PBS 冲洗 3 次后，将培养皿置于激光共聚焦显微镜中拍照，结果见图 9。姜黄素因能促进肿瘤细胞凋亡和侵袭肿瘤组织而对多种肿瘤细胞具有很强的细胞毒性。因此，增强肿瘤细胞靶向并能使药物在胞内释放的药物运输系统能显著增强其治疗效果。细胞经药物孵化 2 h 后，Cur-MSN 组的荧光亮度明显高于姜黄素组，说明姜黄素原料药经 MSN 载体包载后增强了细胞对其的内吞能力。

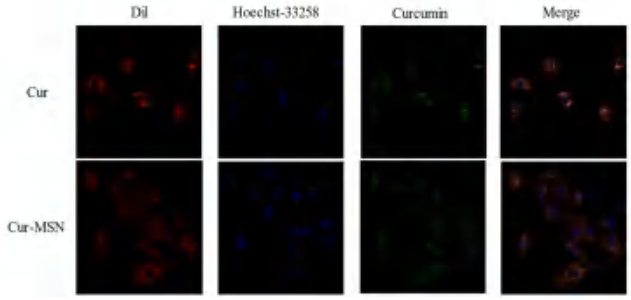


图 9　A549 细胞对姜黄素和 Cur-MSN 的摄取

Fig 9　Uptake of curcumin and Cur-MSN by A549 cells

3　讨论

文献报道，在药物研发领域中，超过 40% 的药物由于水溶性和生物利用度低，导致其临床应用受限 [14-15]。近年来，姜黄素作为一种几乎没有副作用的天然抗肿瘤药物吸引了众多科研工作者的关注，但由于其自身水溶性差、生物利用度低等原因使其抗肿瘤效果并不理想 [16]。因此，寻找合适的方法解决姜黄素水溶性差的缺陷是当下的主要挑战之一。介孔材料作为一种载药性能强、生物相容性好的材料，对难溶性药物具有强吸附性，因此可以作为疏水性药物的优良载体 [17]。

本研究以姜黄素为模型药物，制备基于介孔材料的纳米药物载药系统，通过单因素实验系统地考察各制备指标，正交实验分析优化制备工艺，得到具有较高载药率和高包封率的药物 - 载体复合物。通过表征证明了 MSN 对姜黄素的有效负载，最后考察了 Cur-MSN 的溶解度与累积溶出率，结果表明，与常规的 Cur-MSN 纳米粒载药系统 [12] 和载姜黄素的中空二氧化硅 [18] 相比，Cur-MSN 具有更高的包封率和载药量。难溶性药物具有生物利用度低、体外活性差等缺陷，但 MSN 能够显著增强难溶性药物姜黄素的溶解度与累积溶出率，从而实现了提高姜黄素生物利用度的目的。

此外，相较于游离姜黄素，Cur-MSN 对 A549 细胞和 MCF-7 细胞具有更强的体外细胞毒性和摄取能力，证明姜黄素介孔载药系统具有提高抗肿瘤活性和细胞摄取能力的优势。

虽然 MSN 作为药物载体具有众多优势，但仍然存在一些亟待解决的问题。一方面，目前仍然没有建立完整的 MSN 的生物安全评价体系，尤其是体内生物学效应的评价仍然处于初级阶段。另一方面，MSN 在人体内的吸收、分布、代谢的具体过程尚不明确。相信随着现代生物学技术的进步，MSN 的生物安全性问题一定可以在不久的将来得到解决，对更多的难溶性药物早日实现临床应用奠定基础。

参考文献

[1] Giordano A，Tommonaro G. Curcumin and cancer [J]. Nutrients，2019，11（10）：2376.

[2] Tomeh MA，Hadianamrei R，Zhao X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents [J]. Int J Mol Sci，2019，20（5）：1033.

[3] Brahmkhatri VP，Sharma N，Sunanda P，et al. Curcumin nanoconjugate inhibits aggregation of *N*-terminal region（Aβ-16）of an amyloid beta peptide [J]. New J Chem，2018，42（24）：19881-19892.

[4] 王艳艳，赵文轩，孟丽园，等 . 含游离蛋黄卵磷脂的姜黄素自纳米乳的制备及体外质量评价 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1496-1502.

[5] Wang FL，Ye X，Zhai DD，et al. Curcumin-loaded nanostructured lipid carrier induced apoptosis in human HepG2 cells through activation of the DR5/caspase-mediated extrinsic apoptosis pathway [J]. Acta Pharm，2020，70（2）：227-237.

[6] Yusuf H，Rahmawati RA，Syamsur RM，et al. Curcumin micelles entrapped in eudragit S-100 matrix：a synergistic strategy for enhanced oral delivery [J]. Future Sci OA，2021，7（4）：FS O677.

[7] Huang YK，Hu L，Huang S，et al. Curcumin-loaded galactosylated BSA nanoparticles as targeted drug delivery carriers inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration [J]. Int J Nanomedicine，2018，13：8309-8323.

[8] Hanafy N，Leporatti S，El-Kemary M. Mucoadhesive curcumin crosslinked carboxy methyl cellulose might increase inhibitory efficiency for liver cancer treatment [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2020，116：111119.

[9] 李钦，原永芳，杨刚 . 冬凌草甲素 - 介孔二氧化硅固体分散体的制备及体外性质评价 [J]. 中南药学，2021，19（10）：2013-2017.

[10] Miguel M，María VR. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery [J]. Adv Funct Mater，2020，30（2）1902634.

[11] Tang FQ，Li LL，Chen D. Mesoporous silica nanoparticles：synthesis，biocompatibility and drug delivery [J]. Adv Mater，2012，24（12）：1504-1534.

[12] 李娜，林燕喃，蓝志良，等 . 姜黄素介孔二氧化硅纳米粒载药系统的制备及其载药性能 [J]. 福建医科大学学报，2018，52（1）：19-23.

[13] 何黎黎，袁志翔，郑云，等 . 姜黄素 - 介孔二氧化硅纳米粒固体分散体的制备与表征 [J]. 中草药，2016，47（13）：2283-2287.

[14] My TK，Vo TV，Lee BJ，et al. Encapsulation of solid dispersion in solid lipid particles for dissolution enhancement of poorly water-soluble drug [J]. Curr Drug Deliv，2018，15（4）：576-584.

[15] Wenzel T，Stillhart C，Kleinebudde P，et al. Influence of drug load on dissolution behavior of tablets containing a poorly water-soluble drug：estimation of the percolation threshold [J]. Drug Dev Ind Pharm，2017，43（8）：1265-1275.

[16] Ma'Mani L，Nikzad S，Kheiri-Manjili H，et al. Curcumin-loaded guanidine functionalized PEGylated I3ad mesoporous silica nanoparticles KIT-6：a practical strategy for the breast cancer therapy [J]. Eur J Med Chem，2014，83：646-654.

[17] Chen MY，Yang G，Wu FH，et al. Preparation and in vitro dissolution study of mesoporous silica nanoparticles loading breviscapine [J]. China Pharmacist，2020，23（3）：457-461.

[18] 史巧，黄星月，吴凯，等 . 载姜黄素的介孔二氧化硅及中空介孔二氧化硅的制备及释药性能研究 [J]. 中国药师，2021，24（7）：209-214.

（收稿日期：2023-02-13；修回日期：2023-05-08）

抗菌肽 LL37 固体脂质纳米粒的制备、优化和评价

王芳[1]，厉祯[2]，淦新悦[1]，沈敏华[2*]（1. 上海健康医学院创面防治研究所，上海　201318；2. 同济大学附属东方医院口腔科，上海　200120）

摘要：目的　制备搭载抗菌肽 LL37 的固体脂质纳米粒（LL37-SLNs），对配方进行优化、表征和评价。**方法**　采用“乳化蒸发 - 低温固化”的方法制备 17 个批次的 LL37-SLNs，以硬脂酸、软磷脂和表面活性剂 Myrj52 作为自变量，平均粒径和包封率作为因变量，通过 Box-Behnken 试验设计优化配方，并进行表征和评价。**结果**　通过 Design Expert 12.0 软件对回归方程分析得到最佳配方为硬脂酸 300 mg、软磷脂 150 mg、Myrj52 250 mg。对优化后的 LL37-SLNs 进行表征和评价，结果显示载药量为（2.92±0.06）%，包封率为（86.87±0.26）%，平均粒径为（221.7±1.3）nm，Zeta 电位为（－ 30.4±0.2）mV，多分散指数为（0.233±0.012）。在透射电镜下观察其外观规则，粒径均一。LL37-SLNs 的体外释药曲线表现出良好的缓释能力，体外抗菌活性研究显示出持久的抗菌特性，且在－ 20 ℃可稳定储存 60 d。**结论**　LL37-SLNs 配方合理，颗粒分布均一、稳定，包封率佳，体外释放和抗菌活性良好。

关键词：抗菌肽；LL37；固体脂质纳米粒；响应面法
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2335-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.012

Preparation, optimization and evaluation of antimicrobial peptides LL37-SLNs

WANG Fang[1], LI Zhen[2], GAN Xin-yue[1], SHEN Min-hua[2*] (1. *Institute of Wound Prevention and Treatment, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai* 201318; 2. *Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai* 200120)

Abstract: Objective　To prepare, optimize, characterize and evaluate the solid lipid nanoparticles carrying the antimicrobial peptide LL37 (LL37-SLNs). **Methods**　Totally 17 batches of LL37-SLNs were prepared by an emulsification and low-temperature solidification method. The LL37-SLNs formulations were optimized by Box-Behnken experiment design, with stearic acid, soft phospholipids and surfactant Myrj52 as the independent variables, while the average particle size and encapsulation efficiency as the dependent variables. LL37-SLNs were characterized and evaluated. **Results**　The regression equation was obtanined by Design Expert 12.0 software and the optimized formulation was 300 mg stearic acid, 150 mg soft phospholipids, and 250 mg surfactant (Myrj52). LL37-SLNs were prepared according to the optimized formulation. The drug loading rate was (2.92±0.06) %, the encapsulation rate was (86.87±0.26) %, the average particle size was (221.7±1.3) nm, the Zeta potential was (－ 30.4±0.2) mV, and the PDI was (0.233±0.012). The optimized formation was spherical with uniform size. In vitro, LL37-SLNs showed good slow release rate and sustained antibacterial activity, and were stable at － 20 ℃ for 60 days. **Conclusion**　The formulation of LL37-SLNs is reasonable, with homogeneous and stable distribution, good release rate and antibacterial activity.

Key words: antimicrobial peptide; LL37; solid lipid nanoparticle; response surface method

基金项目：上海市卫健委临床专项基金项目（No. 20194Y0127）；上海市高校教师产学研践习计划项目（No. A3-2601-20-311001-20）；上海健康医学院校级科研基金项目（No. E3-0200-22-201006-10）。

作者简介：王芳，女，博士，讲师，主要从事生物大分子活性研究，email：wangf_18@sumhs.edu.cn　*通信作者：沈敏华，女，博士，主治医师，主要从事口腔疾病的研究，email：shmh1934@163.com

抗菌肽（antimicrobial peptides，AMPs）是一类具有杀菌作用的阳离子多肽[1]。根据结构特征的不同，AMPs可分为防御素（defensin）家族、组织蛋白酶抑制素（cathelicidin）家族和富含组氨酸蛋白家族等。LL37是cathelicidin家族中唯一人源抗菌肽，在宿主免疫防御中发挥重要作用。其分子结构中带正电荷的亲水区域通过静电引力吸附在带负电荷的细菌胞膜上，而疏水亲脂的α-螺旋结构可插入到细菌胞膜的脂质双分子层中形成跨膜孔道，破坏细菌生物膜，降低细菌的黏附性，从而发挥抗菌和抗感染的作用[2]。LL37可通过影响口腔中变异链球菌的吸附，从而减少牙菌斑的形成，减少龋坏，也可以通过发挥抗菌及中和脂多糖的作用来缓解牙周炎症[3]。目前对LL37在口腔健康方面的研究仍停留在临床样本分析和体外实验阶段，其在实际应用中仍有一些局限性。LL37作为多肽类化合物，在生物介质中的稳定性较弱，易被酶水解消化，例如在口腔中易被病原菌分泌的蛋白酶（如牙龈素或dentilisin）降解[2]。此外，LL37破坏细菌胞膜的同时，也会破坏人体正常细胞膜，造成潜在的细胞毒性[3]。因此，将LL37封装在纳米材料中是克服这些问题的一种有发展前景的新兴策略。

固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticles，SLNs）是一种以室温下为固态的天然或合成的脂质或类脂（如卵磷脂、三酰甘油等）为基质，将药物包裹于类脂核中或镶嵌于类脂核的表面，制成粒径50～1000 nm的纳米颗粒给药体系[4]。SLNs作为药物传递系统载体，具有毒性低、生物相容性好、可生物降解、物理化学存储稳定等多种优点[5]。研究表明，SLNs搭载具有抗肿瘤特性的姜黄素，可有效降低其毒性，并表现出良好的生物相容性[6-7]。在牙科无痛手术中，Nidhi等[8]开发了一种负载双氯芬酸（diclofenac，Dic）的SLNs用于长效释放，术后镇痛效果可延长至24 h。SLNs作为药物递送系统，不仅可降低药物的毒性，还可提高药物的驻留时间，从而提高其生物利用度。

本研究旨在开发一种新型的LL37药物递送系统，用于抑制口腔常见病原菌在病灶的增殖和定殖，以预防和治疗病原菌介导的牙周炎症。本文拟采用“乳化蒸发-低温固化”的方法制备不同配方的LL37-SLNs，以粒径和包封率为响应值，利用Box-Behnken实验设计脂质（硬脂酸、卵磷脂）和表面活性剂的配方比例，优化后获得最佳配方并进行验证和表征。通过体外释放研究和抗菌活性研究评价优化后的LL37-SLNs配方，为进一步开展动物体内药效学评价实验奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1260 Infinity II Prime HPLC（美国Agilent）；透射电镜1230（日本Jeol）；Zetasizer 3000HS型Zeta电位测量仪（美国Marlven）；LS230激光粒度仪、Avanti J26XP高速冷冻离心机（美国Beckman Coulter）；Forma －80 ℃超低温冰箱（美国Thermo）；Delta1-24/LSC冷冻干燥机（德国Christ）；AL-204型电子天平（上海申胜生物有限公司）；88-1型恒温磁力搅拌器（上海志威电器有限公司）；DL-360D智能超声波清洗器（上海之信仪器有限公司）；XW-80A涡旋混合器（上海医科大学仪器厂）；BS-1E全温摇床培养箱（上海高致精密仪器有限公司）。

1.2 试药

LL37（杭州固拓生物科技有限公司，AR）；硬脂酸（AR）、磷钨酸钠（AR）、卵磷脂（BR）（上海化学试剂公司）；聚氧乙烯（40）硬脂酸酯（Myrj52，美国Sigma公司，AR）；氯仿（国药集团化学试剂有限公司，AR）；磷酸盐缓冲液[pH 6.8 PBS，生工生物工程（上海）股份有限公司]；*P. gingivalis* ATCC 33277（中国微生物菌种保藏中心）；脑心浸出液肉汤（brain heart infusion，BHI）、脱纤维羊血（青岛高科技工业园海博生物技术有限公司）。

2 方法

2.1 空白SLNs和LL37-SLNs的制备

按照表1的配方称取适量硬脂酸和卵磷脂，超声溶解在10 mL氯仿中作为油相，称取适量表面活性剂Myrj52溶解在30 mL ddH_2O中作为水相，以75 ℃、600 r·min^{-1}的速度搅拌。将75 ℃预热的油相分散到水相中，继续以75 ℃、1200 r·min^{-1}搅拌混合物以形成纳米乳液。直到总体积蒸发减少到5 mL时，快速加入10 mL冷水并在冰浴中以1200 r·min^{-1}的速度继续搅拌2 h，收集乳液，即得空白SLNs。使用相同的方法制备LL37-SLNs，在油相中添加10 mg LL37。收集乳液后，在4 ℃、20 000 r·min^{-1}离心2 h，并用30 mL ddH_2O洗涤以去除过量的表面活性剂和未包埋的药物，重复两次。最后，空白SLNs和LL37-SLNs真空冷冻干燥24 h，－20 ℃保存备用。

2.2 实验设计

在LL37-SLNs的制备中，油相中的硬脂酸和软磷脂（卵磷脂）的比例以及水相中表面活性剂

的含量对 LL37-SLNs 的粒径分布和包封率都至关重要 [9-10]。因此选择硬脂酸（A）、软磷脂（B）和表面活性剂 Myrj52（C）的用量作为自变量，平均粒径和包封率作为因变量，在单因素实验的基础上，确定了 3 个自变量的低、中、高水平（见表 1），在 Design Expert 软件中进行基于 Box-Behnken 的三因素三水平实验设计。

表 1　Box-Behnken 实验设计的因素和水平

Tab 1　Factor and level of Box-Behnken design

水平	因子		
	A/mg	B/mg	C/mg
－1	100	50	150
0	200	100	200
1	300	150	250

2.3　粒径分布和 Zeta 电位的测定

使用 LS230 激光粒度仪和 Zetasizer 3000HS 型 Zeta 电位测量仪进行平均粒径（PD）、Zeta 电位（ZP）和多分散指数（PDI）的测定。纳米颗粒在 25 ℃下分布在 ddH_2O 中，并在 173° 反向散射下测定，以确保测量的最佳信噪比和再现性，分散剂折射率为 1.330。

2.4　包封率和载药量的测定

精密移取同一批次新制 LL37-SLNs 2 mL，20 000 r • min^{-1} 离心 120 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜，采用 HPLC 法 [11] 测定 LL37 含量，记为 $W_{游}$。另精密移取新制 LL37-SLNs 2 mL，加入少量甲醇超声至充分破乳，转移置 10 mL 量瓶中定容。取适量样品于 20 000 r • min^{-1} 离心 20 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜，测定 LL37 含量，记为 W。配方中加入的脂质总量＋药物质量记为 $W_{总}$。按下列公式计算 LL37-SLNs 的包封率和载药量。

包封率（%）＝（$W - W_{游}$）/W×100%；

载药量（%）＝（$W - W_{游}$）/$W_{总}$×100%。

2.5　微观形态

通过透射电镜观察 LL37-SLNs 和空白 SLNs 的形态和结构。两种 SLNs 分别溶于 ddH_2O 中，制备成 1 mg • mL^{-1} 的悬浮液。将一滴溶液滴在铜网格上，并用 1% 磷钨酸钠负染 2 min，自然晾干后，使用透射电镜进行观察。

2.6　体外释药

测定 LL37-SLNs 在体外模拟环境中的释放速度，以了解载药纳米颗粒对药物的缓释作用。取 2 mL LL37-SLNs 置于透析袋，两端扎紧，再放置在含有 50 mL pH 6.8 的 PBS 缓冲液的容器中，以保证药物释放在漏槽条件下进行。37 ℃、100 r • min^{-1} 震荡，分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5、4、6、8、10、12、24、36 h 取样 1 mL，同时补充等体积等温的缓冲液，测定 LL37 含量并绘制释放曲线。以游离 LL37 作为阳性对照，每组平行重复 3 次。

2.7　抗菌活性研究

牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*，*P. gingivalis*）在含 10% 脱纤维羊血的 BHI 培养基中培养至对数期，稀释菌液至 1×10^7 CFU • mL^{-1}。96 孔板每孔加入 100 μL 的菌液，然后分别加入 10 μL 的 pH 6.8 的 PBS、LL37（50 μg • mL^{-1}）、空白 SLNs（2 mg • mL^{-1}）和 LL37-SLNs（2 mg • mL^{-1}），37 ℃孵育，分别于 0、2、4、8、12、24、36 h 在 600 nm 处检测 *OD* 值，绘制抗菌活性曲线。每组平行重复 3 次。

2.8　稳定性研究

将同批次 LL37-SLNs 冻干粉末分别储存在－20 ℃、－4 ℃和室温下，放置 60 d 后测定 LL37-SLNs 的包封率，以新制 LL37-SLNs 冻干粉作为对照。每个温度设定 3 个重复。

3　结果与讨论

3.1　基于 Box-Behnken 实验设计的优化模型的建立

根据三因素三水平的 Box-Behnken 实验分析，共制备了 17 批次的 LL37-SLNs，测定并记录平均粒径和包封率，结果见表 2。

表 2　Box-Behnken 实验设计和结果

Tab 2　Experimental design and results

No.	硬脂酸 /mg	软磷脂 /mg	表面活性剂 Myrj52/mg	包封率 /%	粒径 /nm
1	100	50	200	63.49	209.5
2	300	50	200	75.09	244.9
3	100	150	200	58.06	197.9
4	300	150	200	81.82	242.3
5	100	100	150	67.91	194.2
6	300	100	150	85.23	249.7
7	100	100	250	72.24	211.4
8	300	100	250	89.50	240.6
9	200	50	150	66.21	230.6
10	200	150	150	61.59	208.9
11	200	50	250	68.98	214.7
12	200	150	250	72.34	237.1
13	200	100	200	73.37	284.1
14	200	100	200	74.29	293.3
15	200	100	200	74.26	289.5
16	200	100	200	73.34	287.2
17	200	100	200	73.97	286.4

3.2　模型分析

3.2.1　包封率分析　利用 Design Expert 12.0 软件对表 2 进行二次元回归拟合，得到包封率对硬脂酸、软磷脂和表面活性剂 Myrj52 的二次多项回归方程：$R_1 = 73.85 + 8.74A + 0.0050B + 2.77C + 3.04AB -$

$0.015AC + 1.99BC + 3.6A^2 - 7.84B^2 + 1.27C^2$。回归模型方差分析显示，回归模型 P 值（< 0.0001）极显著，缺失值的 P 值（0.0576）大于 0.05，不显著，表明模型和实验值拟合度良好（见表 3）。通过对 P 值的检验，硬脂酸、软磷脂和表面活性剂 Myrj52 的二次项对响应值的影响显著。回归诊断显示模型相关系数为 $R^2 = 0.9954$，调整后 $R^2 = 0.9894$。3D 响应面（见图 1）可以看出当表面活性剂含量不变时，包封率随着硬脂酸含量的增加而增大，这是因为脂质含量的增多，可提高 SLNs 的包封率 [12]。

表 3 不同变量对包封率及粒径影响的方差分析

Tab 3 ANOVA for the effect of different factors on encapsulation efficiency and particle size

变异来源	自由度	包封率				粒径			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1031.56	114.62	167.58	< 0.0001	18 875.92	2097.32	179.79	< 0.0001
A	1	611.45	611.45	894.01	< 0.0001	3382.53	3382.53	289.96	< 0.0001
B	1	0.0002	0.0002	0.0003	0.9868	22.78	22.78	1.95	0.2050
C	1	61.16	61.16	89.43	< 0.0001	52.02	52.02	4.46	0.0726
AB	1	36.97	36.97	54.05	0.0002	20.25	20.25	1.74	0.2291
AC	1	0.0009	0.0009	0.0013	0.9721	172.92	172.92	14.82	0.0063
BC	1	15.92	15.92	23.28	0.0019	486.20	486.20	41.68	0.0003
A^2	1	54.70	54.70	79.99	< 0.0001	4217.78	4217.78	361.56	< 0.0001
B^2	1	258.51	258.51	377.97	< 0.0001	4529.85	4529.85	388.32	< 0.0001
C^2	1	6.79	6.79	9.92	0.0162	4440.53	4440.53	380.66	< 0.0001
残差	7	4.79	0.6839			81.66	11.67		
失拟项	3	3.92	1.31	6.03	0.0576	32.96	10.99	0.9023	0.5142
纯误差	4	0.8665	0.2166			48.70	12.18		
总和	16	1036.35				18957.58			

3.2.2 粒径分析 利用 Design Expert 12.0 软件对表 2 进行二次元回归拟合，得到平均粒径对硬脂酸、软磷脂和表面活性剂 Myrj52 的二次多项回归方程：$R_2 = 288.1 + 20.56A - 1.69B + 2.55C + 2.25AB - 6.58AC + 11.03BC - 31.65A^2 - 32.8B^2 - 32.47C^2$。粒径是影响 SLNs 性质的关键因素，粒径小且粒径分布窄的 SLNs 具有较好的理化性质 [13]。回归模型方差分析显示，回归模型 $P < 0.0001$，极显著，缺失值的 P 值（0.5142）大于 0.05，不显著，表明模型和实验值拟合度良好（见表 3）。通过对 P 值的检验，硬脂酸、软磷脂和表面活性剂 Myrj52 的二次项对响应值的影响显著。回归诊断显示模型相关系数为 $R^2 = 0.9957$，调整后 $R^2 = 0.9902$。3D 响应面（见图 1）可以直观地反映这种关系。

3.3 配方优化和验证

包封率是纳米制剂质量控制的一个重要指标，SLNs 的粒径大小对制剂的稳定性、药物释放以及体内吸收具有关键作用 [14]。LL37-SLNs 的配方优化按照包封效率最大化，粒径分布最小化进行，通过 Design Expert 12.0 软件获得最优配方为：硬脂酸 300 mg、软磷脂 150 mg、表面活性剂 250 mg，预测包封率为 87.42%，平均粒径为 219.3 nm。按照最优配方制备 3 个批次的 LL37-SLNs，结果显示载药量为（2.92±0.06）%，包封率为（86.87±0.26）%，平均粒径为（221.7±1.3）nm，其中包封率和平均粒径的实验值与预测值的 *RSD* 均小于 2%，表明模型拟合良好，预测度高。

3.4 微观形态

经配方优化后制得的 LL37-SLNs 和空白 SLNs 在透射电镜下观察其形态和结构，结果显示，外观为规则的球形或类球形，分散良好无聚集，粒径分布较均一（见图 2）。

3.5 粒径和 Zeta 电位的测定

如图 3 所示，LL37-SLNs 的平均粒径为（221.7±1.3）nm，Zeta 电位为（－30.4±0.2）mV，PDI 为（0.233±0.012）。优化后的 SLNs 显示出更聚集的粒径分布，结合透射电镜的结果，优化后的纳米粒均一性良好。Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标，电位越高，表明颗粒表面带有越多的正电荷或负电荷，颗粒表面的电荷会相互排斥，从而达到整个体系的稳定性。水相中颗粒分散稳定性的分界线一般认为在 ±30 mV，如果所有颗粒都带有高于＋ 30 mV 或者低于－ 30 mV 的 Zeta 电位，则该分散体系更稳定 [15]。而优化后 LL37-SLNs 的 Zeta 电位低于－ 30 mV，表明该批次的 LL37-SLNs 具有更稳定的分散体系。

3.6 体外释药

采用透析袋法评价 LL37-SLNs 的体外释放时

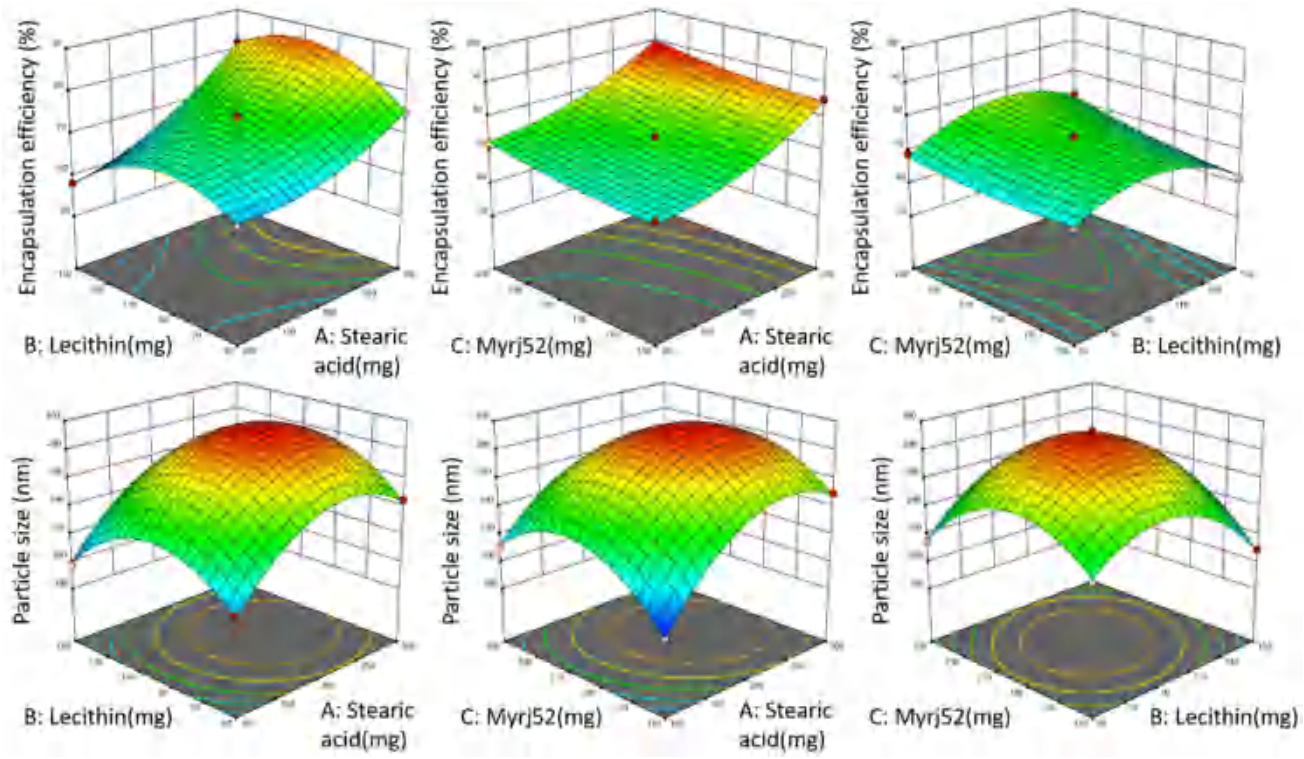
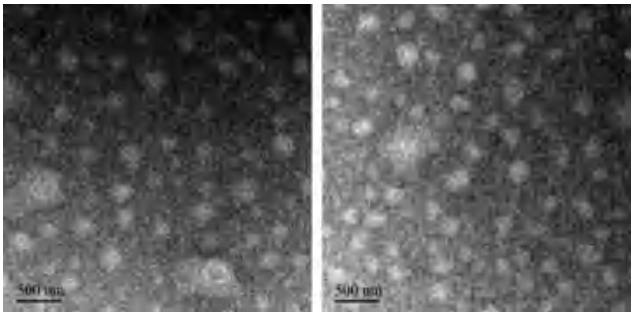


图 1　三因素的交互作用对响应值的影响

Fig 1　Effect of interaction of the three factors on the response values



A　　B

图 2　LL37-SLNs（A）和空白 SLNs（B）的透射电镜图

Fig 2　TEM image of LL37-SLNs（A）and SLNs（B）

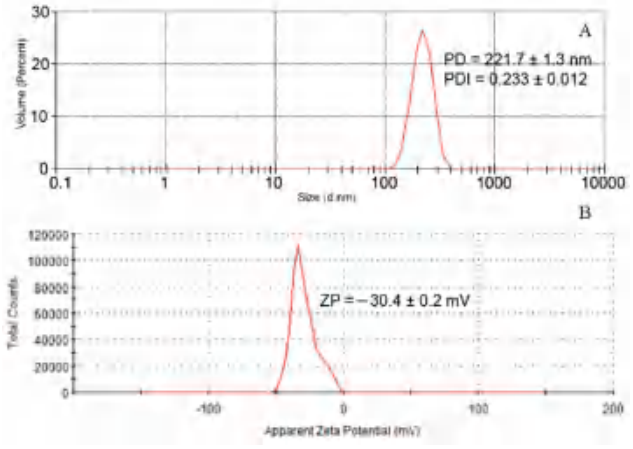


图 3　LL37-SLNs 粒径分布图（A）和 Zeta 电位分布图（B）

Fig 3　Particle size distribution（A）and Zeta potential distribution（B）of LL37-SLNs

间和效率。LL37-SLNs 的作用是抵抗宿主口腔定殖病原菌的增殖，所以选择口腔固有 pH 值，即采用 pH 6.8 的 PBS 为释放介质。参照《中国药典》2020 年版中有关缓释制剂或控释制剂的测定方法，以累积释放百分率为纵坐标，取样时间为横坐标，绘制释放曲线如图 4。结果显示，游离 LL37 在 6 h 累积释放率可达到 95%。而 LL37-SLNs 在 6 h 内累积释放率仅（42.1±0.42）%，与游离 LL37 相比，差异显著（$P < 0.0001$）。可见，LL37-SLNs 在体外实验中没有突释现象，在 6 h 后继续缓慢释放，12 h 的累积释放率达到（63.9±0.36）%，24 h 的累积释放率为（88.1±0.60）%，36 h 的累积释放率达到（95.7±0.58）%，这与 Das 等 [16] 的研究结果一致。由此可见，LL37-SLNs 的体外释放表现出缓慢、持续的特征，有利于延长龈下给药后与病灶内病原菌相互作用的时间。

3.7　抗菌活性研究

P. gingivalis 是牙周炎发病的关键病原菌，通过将共生体转化为营养不良的微生物群落来引发破坏性炎症，破坏局部微生态的动态平衡，从而导致牙周炎症的发生 [17]。LL37-SLNs 抑制口腔病原菌 *P. gingivalis* 的活性研究如图 5 所示。与对照和空白 SLNs 相比，游离 LL37 和 LL37-SLNs 均表现出良好的抗菌活性。与游离 LL37 不同的是，LL37-SLNs 抑制 *P. gingivalis* 增殖的活性持续时

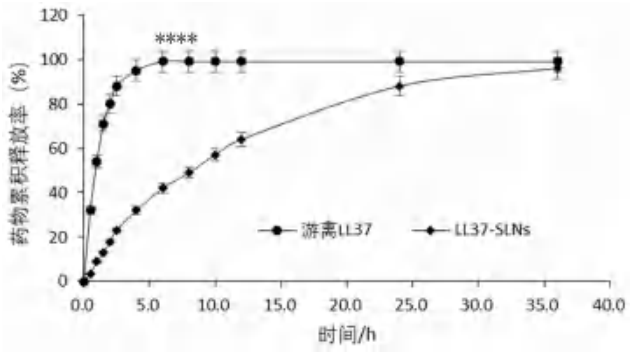


图 4 游离 LL37 和 LL37-SLNs 的体外释放曲线（$^{****}P < 0.0001$）

Fig 4 In vitro release profiles of free LL37 and LL37-SLNs（$^{****}P < 0.0001$）

间较长，推测是由于 SLNs 对 LL37 的长效释放形成的。这种缓释行为可增加 LL37 在病灶的作用时间，提高其生物利用度。在 36 h 的抗菌活性实验中，LL37-SLNs 的抗菌活性明显高于其他组（$P < 0.0001$），表明 SLNs 的制备过程不但没有影响 LL37 的抗菌活性，反而增加了 LL37 的抗菌活性。

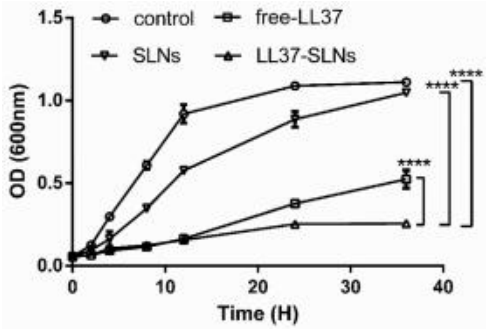


图 5 LL37-SLNs 的抗菌活性

Fig 5 Antibacterial activity of LL37-SLNs against *P. gingivalis*

注：与 LL37-SLNs 组比较，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the LL37-SLNs group，$^{****}P < 0.0001$.

3.8 稳定性研究

在不同温度条件下储存 60 d 后，用 ddH_2O 复溶 LL37-SLNs 冻干粉末，测定的包封率如图 6 所示。－ 20 ℃的储存条件对 LL37-SLNs 的影响最小，与新制 LL37-SLNs 冻干粉相比，差异没有统计学意义（$P = 0.30$）。－ 4 ℃和室温下存储的 LL37-SLNs，其包封率出现了明显的下降（$P < 0.0001$），尤其是室温下，包封率由（86.88±0.26）% 下降到（74.95±0.67）%，由此可见，新制 LL37-SLNs 冻干后最好在－ 20 ℃条件下存储。

4 结论

LL37 属于 cathelicidin 家族的一员，在抵御病原体入侵中发挥重要作用。实验证实 LL37 可在炎症组织角质细胞和中性粒细胞中过度表达，是人类固有的一种宿主防御肽，具有广泛的生理

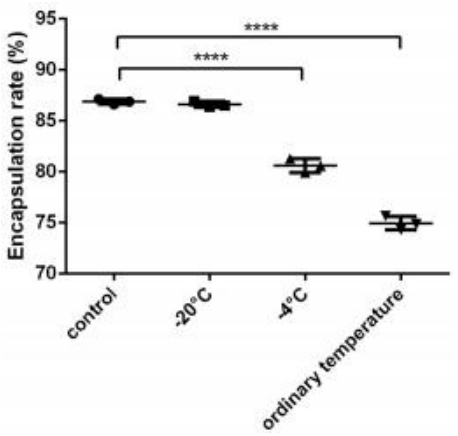


图 6 储存温度对 LL37-SLNs 包封率的影响

Fig 6 Effect of storage temperature on encapsulation efficiency of LL37-SLNs

注：与对照组比较，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the control group，$^{****}P < 0.0001$.

活性，包括抗病毒、抗真菌、抗细菌、与内毒素结合特性，是炎症反应的调节剂，并通过影响细胞增殖和分化促进伤口愈合 [18-20]。LL37 及其衍生肽在防止生物膜形成和耐多药细菌感染方面也表现出强大的功能，其机制是通过缓解感染来维持上皮屏障的完整性 [21]。

近年很多新型功能材料的出现和研究，为龈上刮治和根面平整术（scaling and root planning，SRP）后病原菌再聚集造成的牙周炎的辅助治疗提供了思路。SLNs 由活性药物分子以及固体脂质、乳化剂和 / 或助乳化剂组成，具有可降解、低毒性和生物相容性好等特点 [27]。本研究选择 SLNs 作为药物缓释介质，采用“乳化蒸发 - 低温固化”的方法制备负载抗菌肽 LL37 的 SLNs，以达到对 LL37 的长效释放。该方法需要合适的固体脂质基质、优化制备条件来获得负载 LL37 的 SLNs。Box-Behnken 实验设计是一种通过数学模型来筛选最优处方的方法，已在药剂开发中广泛应用 [22]。在本实验中，随着硬脂酸含量的增加，包封率逐渐增大，但随着脂质总含量的增加，粒径也随之增大，同时表面活性剂 Myrj52 含量的增加，并没有得到更高的包封效率。这可能是由于多肽本身很难被包裹，特别是由于载体系统的脂类成分的疏水性，因此多肽有吸附到表面的倾向 [23]。为了获得理想的配比，制备了 17 个批次、不同配方的 LL37-SLNs，通过二次多项方程的回归拟合，得到最优配方。在口腔正常 pH 范围内，研究了 LL37-SLNs 的释放速度和抗菌活性。持久的体外释放曲线和良好的抗菌活性表明 LL37 以活性形式被包裹在 SLNs 中，其制备过程中没有显著降低 LL37 的活性。与 LL37-SLNs 对 *P.*

gingivalis 的抑制曲线相比，游离 LL37 在 6 h 后活性明显降低，这与游离 LL37 的释放曲线相吻合。这种早期的突释以及暴露在细菌培养环境中被蛋白酶水解而丧失活性，使得游离 LL37 不能维持较长时间的抗菌活性[24]。而 SLNs 制剂的搭载很好地解决了这一问题，不仅可将易被分解的 LL37 包裹在纳米粒内部，防止 LL37 被病灶内蛋白酶降解，还可提高 LL37 的驻留时间，提高与病原菌的作用时间，从而强化抗菌作用。

综上所述，本研究通过 Box-Behnken 实验设计优化配方，获得了粒径均一、包封率佳、长效抗菌、性质稳定的 LL37-SLNs，为进一步开展其在动物体内药效学评价奠定了实验基础。

参考文献

[1] 周舒文，王程，邱琳，等 . 面向临床应用的抗菌肽：递送和剂型 [J]. 科学通报，2021，66（26）：3365-3366.

[2] Jourdain ML，Velard F，Pierrard L，et al. Cationic antimicrobial peptides and periodontal physiopathology：a systematic review [J]. J Periodontal Res，2019，54（6）：589-600.

[3] Rashki S，Safardoust-Hojaghan H，Mirzaei H，et al. Delivery Ll37 by chitosan nanoparticles for enhanced antibacterial and antibiofilm efficacy [J]. Carbohydrate Polymers，2022，291：119634.

[4] Garanti T，Alhnan MA，Wan K. Rgd-decorated solid lipid nanoparticles enhance tumor targeting，penetration and anticancer effect of asiatic acid [J]. Nanomedicine，2020，15（16）：1567-1583.

[5] Uppuluri CT，Ravi PR，Dalvi AV. Design，optimization and pharmacokinetic evaluation of piribedil loaded solid lipid nanoparticles dispersed in nasal in situ gelling system for effective management of Parkinson’s disease [J]. Int J Pharm，2021，606：120881.

[6] Wang J，Wang HY，Zhu RR，et al. Anti-Inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in Il-1 B transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. Biomaterials，2015，53：475-483.

[7] He XL，Zhu YJ，Wang M，et al. Antidepressant effects of curcumin and Hu-211 coencapsulated solid lipid nanoparticles against corticosterone-induced cellular and animal models of major depression [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：4975-4990.

[8] Nidhi M，Patro MN，Kusumvalli S，et al. Development of transmucosal patch loaded with anesthetic and analgesic for dental procedures and in vivo evaluation [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：2901-2920.

[9] 李津，王沛，周燕，等 . 卡马西平固体脂质纳米粒的制备及其药动学研究 [J]. 中南药学，2017，15（6）：772-776.

[10] 赵义军，叶晓楠，林春盛，等 . 白屈菜红碱固体脂质纳米粒的制备及其体外释放研究 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2348-2353.

[11] Fumakia M，Ho EA. Nanoparticles encapsulated with Ll37 and serpin a1 promotes wound healing and synergistically enhances antibacterial activity [J]. Mol Pharm，2016，13（7）：2318-2331.

[12] Pham TT，Jaafar-Maalej C，Charcosset C，et al. Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2012，94：15-21.

[13] Jadhav SA，Brunella V，Sapino S，et al. Poly（*N*-isopropylacrylamide）based hydrogels as novel precipitation and stabilization media for solid lipid nanoparticles（SLNS）[J]. J Colloid Interface Sci，2019，541：454-460.

[14] 高洋洋，丁瑞，王寅飞 . 人参皂苷 -Rg_5 固体脂质纳米粒的制备与抑瘤活性研究 [J]. 西北药学杂志，2021，36（6）：961-967.

[15] 刘谋斌，常建忠 . 光滑粒子动力学方法中粒子分布与数值稳定性分析 [J]. 物理学报，2010，59（6）：3654-3662.

[16] Das S，Ng WK，Tan RBH. Are nanostructured lipid carriers（NLCS）better than solid lipid nanoparticles（SLNS）：development，characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNS and NLCS? [J]. Eur J Pharm Sci，2012，47（1）：139-151.

[17] Kuboniwa M，Houser JR，Hendrickson EL，et al. Metabolic crosstalk regulates porphyromonas gingivalis colonization and virulence during oral polymicrobial infection [J]. Nat Microbiol，2017，2（11）：1493-1499.

[18] Darveau RP. Periodontitis：a polymicrobial disruption of host homeostasis [J]. Na Rev Microbiol，2010，8（7）：481-490.

[19] Hajishengallis G，Chavakis T，Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy [J]. Periodontology，2020，84（1）：14-34.

[20] Kinane DF，Stathopoulou PG，Papapanou PN. Periodontal diseases [J]. Nat Rev Dis Primers，2017，3（1）.

[21] Haisma EM，de Breij A，Chan H，et al. Ll-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant staphylococcus aureus from thermally wounded human skin equivalents [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（8）：4411-4419.

[22] Tavares LM，Santos RVJ，Palma AJ，et al. Design of experiments（Doe）to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems [J]. Eur J Pharm Biopharm，2021，165：127-148.

[23] Prombutara P，Kulwatthanasal Y，Supaka N，et al. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity [J]. Food Control，2012，24（1-2）：184-190.

[24] Da SMP，Daroit DJ，Da SN，et al. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of listeria monocytogenes in milk [J]. Food Microbiol，2010，27（1）：175-178.

（收稿日期：2023-02-27；修回日期：2023-04-28）

基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术的青海枸杞“柴杞 1 号”化学成分分析

乔亚玲[1, 2]，孟昭军[3]，刘亚蓉[2]，宋霞[2]，林鹏程[1, 4*]（1.青海民族大学药学院，西宁 810007；2.青海省药品检验检测院，西宁 810016；3.德令哈林生生物科技开发有限公司，青海 德令哈 817000；4.青海省青藏高原植物化学重点实验室，西宁 810007）

摘要：目的 利用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱法（UPLC-Q-Orbitrap-MS）技术分析青海枸杞“柴杞 1 号”的化学成分。**方法** 采用 Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），以 0.1% 甲酸溶液 -0.1% 甲酸乙腈为流动相，梯度洗脱，流速 0.5 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 5 μL。采用电喷雾离子源（ESI），正、负离子模式进行检测，根据精确相对分子质量及碎片信息，结合数据库匹配和相关文献进行结构鉴定。**结果** 鉴定出青海枸杞“柴杞 1 号”中的 60 个化学成分，包括 22 个萜类化合物，9 个黄酮类化合物，6 个生物碱类化合物，2 个酚类化合物，5 个脂肪酰类化合物，5 个苯丙素类化合物，3 个氨基酸衍生物，3 个脂肪酸类化合物，1 个脂类化合物和 4 个其他化合物。**结论** 该方法简便、快速、准确，可为青海枸杞“柴杞 1 号”的药效物质基础研究提供参考。

关键词：柴杞 1 号；超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱法；化学成分
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2342-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.013

Chemical constituents of *Lycium barbarum* “Chaiqi 1” from Qinghai based on UPLC-Q-Orbitrap-MS

QIAO Ya-ling[1, 2], MENG Zhao-jun[3], LIU Ya-rong[2], SONG Xia[2], LIN Peng-cheng[1, 4*] (1. *College of Pharmacy*, *Qinghai University of Nationalities*, *Xining* 810007; 2. *Qinghai Drug Inspection and Testing Institute*, *Xining* 810016; 3. *Delingha Linsheng Biotechnology Development Co.*, *Ltd.*, *Delingha Qinghai* 817000; 4. *Key Laboratory of Phytochemistry in the Qinghai-Tibet Plateau*, *Xining* 810007)

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents of *Lycium barbarum* “Chaiqi 1” from Qinghai by ultraperformance liquid chromatography quadrupole electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS). **Methods** The analysis was performed on the Waters UPLC BEH C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid water solution-0.1% formic acid acetonitrile, with gradient elution at the flow rate of 0.5 mL • min^{-1}, column temperature of 30 ℃ and injection volume of 5 μL. The electrospray ionization (ESI) was used for the detection in both positive and negative ion modes. The structure was identified according to the precise relative molecular weight and fragment information, and combined with database matching and related literature. **Results** Totally 60 chemical constituents of *Lycium barbarum* “Chaiqi 1” were detected, including 22 terpenoids, 9 flavonoids, 6 alkaloids, 2 phenols, 5 fatty acylates, 5 phenylpropanes, 3 amino acid derivatives, 3 fatty acid compounds, 1 lipid compound and 4 other compounds. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which provides reference for the basic research of pharmacodynamic substances of *Lycium barbarum* “Chaiqi 1” from Qinghai.

Key words: Chaiqi 1; UPLC-Q-Orbitrap-MS; chemical constituent

基金项目：青海省科技计划项目（No.2020-SF-C32）。

作者简介：乔亚玲，女，在读博士研究生，主管药师，主要从事藏药功效及成分的研究，email：649483729@ qq.com *通信作者：林鹏程，男，教授，博士研究生导师，主要从事中藏药的研究与开发，email：qhlpc@126.com

枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实，具有滋补肝肾，益精明目的功效[1]。现代研究表明枸杞子具有抗炎[2]、降压[3]、抗肺癌[4]、护肝[5]、降血糖[6]、抗衰老[7]等多种药理作用。枸杞子中含有多糖类[8]、黄酮类[9]、生物碱类[10]、苯丙素类[11]等化合物。目前对枸杞子化学成分的研究主要集中在成分的变化规律[12-14]、含量测定[15-17]和提取工艺[18-19]等方面。

青海枸杞“柴杞 1 号”是青海海西州农业科学研究所以海西野生红枸杞 *Lycium chinense* Miller 为父本，宁杞 1 号为母本，通过杂交选育获得的枸杞优良品种（良种编号：S-SV-LB-001-2013），是目前青海柴达木地区主要种植品种之一。目前，关于“柴杞 1 号”的化学成分研究报道极少[20]。为进一步明确其化学成分，本研究运用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱法（UPLC-Q-Orbitrap-MS）对青海枸杞“柴杞 1 号”进行成分分析，推断其化学结构，为其药效物质基础、质量控制研究和资源利用提供一定的参考。

1 材料

Vanquish 超高效液相色谱仪，Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪，Heraeus Fresco17 离心机（赛默飞世尔科技）；Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪（密理博公司）；KQ600DB 型超声波清洗器（东莞市科桥超声波设备有限公司）；BSA224S-CW 型万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；XS105DU 型十万分之一电子天平（上海梅特勒 - 托利多有限公司）；HM100 刀式研磨仪（北京格瑞德曼仪器设备有限公司）。

乙腈（色谱纯，德国 Merck）；无水乙醇（分析纯，天津）；甲酸（色谱纯，美国 Fisher）；蒸馏水（屈臣氏）。青海枸杞“柴杞 1 号”（产地：青海，德令哈林生生物科技开发有限公司）。将枸杞子研碎，过 80 目筛，备用。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取青海枸杞“柴杞 1 号”粉末 1.0 g，精密称定，置于 250 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 100 mL 50% 乙醇，称定重量，超声处理 45 min（100 W，25 kHz），放冷，用 50% 乙醇补足重量，摇匀，过滤，即得。

2.2 色谱条件

Waters UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温为 30 ℃；流动相为 0.1% 甲酸溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 11 min，15% ～ 75%B；11 ～ 12 min，75% ～ 98%B；12 ～ 14 min，98%B；14 ～ 14.1 min，98% ～ 15%B；14.1 ～ 16 min，15%B）；流速为 0.5 mL • min^{-1}；进样量为 5 μL。

2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源（ESI），离子化模式为正负离子模式，喷雾电压为 5500 V（正离子）或－4000 V（负离子），离子传输管温度为 350 ℃，雾化器温度为 350 ℃，碰撞能量为 16、32、48 V，鞘气流量为 35 Arb，辅助气体流量为 15 Arb，全扫分辨率 60 000，MS/MS 分辨率 15 000。采用 Xcalibur 软件根据 IDA 采集方式获取 MS 和 MS/MS 数据，扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1500，每个周期筛选前 4 名，并进一步采集相应的 MS/MS 数据。

2.4 数据分析

吸取青海枸杞“柴杞 1 号”供试品溶液，按“2.2”和“2.3”项下条件测定，记录色谱图，用于结构解析。结合 OpenMS 软件、PubChem 和 BioTree 生物科技有限公司的 BioTree 中药数据库，同时查阅国内外文献，通过对主要色谱峰的精确相对分子质量比对，结合质谱碎片信息对各色谱峰进行指认和归属，最后进行结构推断。

3 结果

3.1 结构鉴定

对青海枸杞“柴杞 1 号”化学成分进行分析，其总离子流图见图 1。推断出青海枸杞“柴杞 1 号”中 60 个化合物的结构，包括 22 个萜类化合物，9 个黄酮类化合物，6 个生物碱类化合物，2 个酚类化合物，5 个脂肪酰类化合物，5 个苯丙素类化合物，3 个氨基酸衍生物，3 个脂肪酸类化合物，1 个脂类化合物和 4 个其他化合物，结果见表 1。

3.2 化合物的质谱裂解特征分析

3.2.1 萜类 共鉴定出 22 个萜类化合物，包括地芰普内酯、异考布松、莪术烯醇、岚香酮酸等。以地芰普内酯为例，正离子模式下其准分子离子峰为 *m/z* 197.1171 $[M+H]^+$，其特征离子有 $[M-H_2O]^+$ *m/z* 179.1072，$[M-H_2O-CO_2]^+$ *m/z* 135.1171，$[M-H_2O-CH_2O_2]^+$ *m/z* 133.1010，$[M-H_2O-CH_2O_2-C_2H_2]^+$ *m/z* 107.0852，结合 PubChem 数据库及 BioTree 中药数据库信息，该化合物碎片与地芰普内酯裂解碎片相似度高，推测为地芰普内酯，其二级质谱图及可能的裂解途径见图 2。

3.2.2 生物碱 共鉴定出 6 个生物碱类化合物，包括崀蓉碱、甜菜碱、消旋山莨菪碱等。以崀蓉碱为例，正离子模式下其准分子离子峰为 $[M+H]^+$ *m/z* 290.1748，其特征离子有 $[M-C_9H_{10}O_3]^+$ *m/z* 124.1134，$[M-C_9H_{10}O_3-NH_2CH_3]^+$ *m/z* 93.0702，结合

表 1 青海枸杞“柴杞 1 号”中化学成分鉴定结果

Tab 1 Identification result of chemical constituents in Qinghai *Lycium barbarum* “Chaiqi 1”

No.	*t*/min	离子峰	测定值（*m/z*）	误差 / $\times10^{-6}$	分子式	主要二级碎片离子（*m/z*）	化合物	结构类型
1	0.54	$[M+H]^+$	182.0812	1.00	$C_9H_{11}NO_3$	136.0762，165.0550，123.0442，119.0501，182.0812	酪氨酸 [21]	氨基酸衍生物
2	0.61	$[M-H]^-$	164.0717	1.57	$C_9H_{11}NO_2$	164.0717，147.0440，72.0103，75.0091，165.0392	苯丙氨酸 [21]	氨基酸衍生物
3	0.74	$[M-H]^-$	122.0250	0.18	$C_6H_5NO_2$	122.0250，94.0304，123.0092，95.0142，66.0340	烟酸 [22]	生物碱
4	0.91	$[M-H]^-$	177.0191	0.82	$C_9H_6O_4$	177.0191，133.0302，105.0352，141.8691，149.0252	七叶草素	苯丙素类
5	1.19	$[M+H]^+$	132.1018	1.38	$C_6H_{13}NO_2$	86.0972，132.1018，44.0502，133.0641，69.0704	异亮氨酸 [21]	氨基酸衍生物
6	1.60	$[M-H]^-$	463.0879	0.22	$C_{21}H_{20}O_{12}$	300.0282，463.0879，301.0373，271.0250，255.0282	金丝桃苷 [23]	黄酮类
7	1.93	$[M-H]^-$	593.1515	0.83	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1515，285.0412，284.0323，255.0282，594.1523	5，7- 二羟基 -2-（4- 羟基苯基）-3-[3，4，5- 三羟基 -6-[（3，4，5- 三羟基 -6- 甲基氧杂 -2- 基）氧甲基] 氧杂环 -2- 基] 氧色烯 -4- 酮	黄酮类
8	1.94	$[M+H]^+$	287.0565	0.16	$C_{15}H_{10}O_6$	287.0565，153.0180，288.1573，195.1024，193.1532	山柰酚 [24]	黄酮类
9	2.21	$[M+H]^+$	197.1171	0.69	$C_{11}H_{16}O_3$	197.1171，179.1072，135.1171，133.1010，107.0852	地芰普内酯	萜类
10	2.22	$[M+H]^+$	146.0602	1.35	C_9H_7NO	146.0602，118.0661，147.0440，91.0544，119.0502	3- 甲酰基吲哚 [25]	生物碱
11	2.63	$[M+H]^+$	281.1368	0.82	$C_{15}H_{20}O_5$	281.1368，62.6302，81.0322，282.1391，98.1992	（1*β*，4*α*，5*α*，6*β*，8*α*，10b）-1，10：4，5- 二环氧基 -6- 羟基 -7（11）- 吉马烯 -12，8- 内酯	萜类
12	2.90	$[M+H]^+$	193.0494	2.23	$C_{10}H_8O_4$	193.0494，133.0292，178.0273，150.0311，135.0431	东莨菪内酯 [23]	苯丙素类
13	3.05	$[M+H]^+$	151.1117	2.05	$C_{10}H_{14}O$	43.0181，109.1012，151.1117，67.0544，42.0342	百里酚	酚类
14	3.18	$[M+H]^+$	177.0547	1.91	$C_{10}H_8O_3$	177.0547，186.0562，137.9871，145.0282，178.1213	7- 羟基 -4- 甲基香豆素	苯丙素类
15	3.37	$[M-H]^-$	301.0354	2.79	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0354，151.0037，178.9988，121.0296，107.0142	槲皮素 [24]	黄酮类
16	4.03	$[M+H]^+$	267.1578	3.04	$C_{15}H_{22}O_4$	267.1578，268.0758，71.0491，109.1013，249.1508	2，8- 二羟基 -5，5，8- 三甲基 -11- 氧杂四环 [7.3.1.0^{1,9}.0^{3,7}] 十三烷 -10- 酮	萜类
17	4.04	$[M-H]^-$	271.0614	1.49	$C_{15}H_{12}O_5$	271.0614，151.0038，119.0512，107.0138，93.0352	柚皮素 [26]	黄酮类
18	4.09	$[M-H]^-$	269.0449	0.32	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0449，51.7322，54.9740，50.8587，69.3592	染料木素	黄酮类
19	4.34	$[M-H]^-$	299.0561	0.48	$C_{16}H_{12}O_6$	284.0322，299.0561，256.0370，134.8938，162.8389	山柰素	黄酮类
20	4.54	$[M+H]^+$	341.1361	0.29	$C_{20}H_{20}O_5$	341.1361，81.0702，130.7181，259.3660	8- 异戊烯基柚皮素	黄酮类
21	4.68	$[M+H]^+$	251.1616	1.56	$C_{15}H_{22}O_3$	251.1616，59.0490，252.1626，233.1512，145.1014	1- 羟基乙酰丙酮	萜类
22	4.89	$[M+NH_4]^+$	266.1726	1.44	$C_{15}H_{20}O_3$	266.1726，267.1771，161.0612，73.3370，93.0328	6- 羟基 -5a- 甲基 -3，9- 二亚甲基十氢萘并 [1，2-b] 呋喃 -2（3H）酮	萜类
23	4.91	$[M+H]^+$	263.1254	2.39	$C_{15}H_{18}O_4$	263.1254，264.1302，65.4400，217.1261，161.0972	羟基薯含薯素	生物碱
24	4.93	$[M+H]^+$	265.1418	2.94	$C_{15}H_{20}O_4$	265.1418，266.1730，68.0781，81.0702，247.1332	1a，5，7a- 三甲基 -2，2a，6，6a，7a，8，9，9a- 八氢双氧萘 [4，5：8，9] 环十烷 [1，2-b] 呋喃 -4（1aH）- 酮	萜类
25	5.89	$[M-H_2O+H]^+$	453.3361	1.90	$C_{30}H_{46}O_4$	453.3361，121.1018，454.3402，50.3720，149.1331	齐齐贝烷酸	萜类
26	6.79	$[M+HCOO]^-$	315.2541	0.34	$C_{17}H_{34}O_2$	315.2541，316.2602，165.8361，57.5972，62.9120	棕榈酸甲酯 [27]	脂肪酰类
27	7.23	$[M-H]^-$	283.0613	1.08	$C_{16}H_{12}O_5$	283.0613，268.0390，52.3112，160.8421，304.8543	千层纸素 A	黄酮类
28	7.25	$[M-H]^-$	293.2116	1.42	$C_{18}H_{30}O_3$	293.2116，79.9560，221.1532，236.1071，220.1462	9- 羟基十八烷 -10，12，15- 三烯酸	—
29	7.48	$[M+H]^+$	249.1488	0.81	$C_{15}H_{20}O_3$	249.1488，231.1382，179.0701，121.1012，69.0703	1*β*- 羟基丙氨酸内酯	萜类
30	7.52	$[M+H]^+$	335.2190	0.02	$C_{20}H_{30}O_4$	335.2190，336.2168，195.0991，151.9803，107.0852	7- 羟基 -1，4a- 二甲基 -9- 氧代 -7- 丙基 -2，2，3，4b，4，5，6，10a- 八氢菲 -10- 羧酸	萜类

续表 1

No.	*t*/min	离子峰	测定值（*m/z*）	误差 / $\times10^{-6}$	分子式	主要二级碎片离子（*m/z*）	化合物	结构类型
31	7.58	$[M+H]^+$	347.2560	0.12	$C_{22}H_{34}O_3$	347.2560，58.0561，348.2587，58.9980，97.2068	2- 羟基 -6-（8- 十五烯基）苯甲酸	酚类
32	8.47	$[M+H]^+$	422.2907	1.60	$C_{24}H_{39}NO_5$	422.2907，124.0389，67.0542，423.2951，71.0848	塔拉萨敏	萜类
33	8.91	$[M+H]^+$	219.1743	1.56	$C_{15}H_{22}O$	219.1743，67.0542，91.0538，93.0702，81.0704	（＋）-4，11- 欧德斯马二烯 -3- 酮	萜类
34	9.09	$[M-H]^-$	233.1543	1.18	$C_{15}H_{22}O_2$	233.1543，234.1581，52.2902，70.0762，67.8804	莪术烯醇	萜类
35	9.27	$[M+H]^+$	407.2772	0.61	$C_{24}H_{38}O_5$	407.2772，130.0501，147.0768，84.0437，129.0650	（6b，7b，13*R*）-6，7- 二乙酰氧基 -8，14- 乳酸二烯 -13- 醇	萜类
36	9.28	$[M-H]^-$	221.1544	1.61	$C_{14}H_{22}O_2$	221.1544，222.1590，206.1302，59.0144，205.1238	异考布松	萜类
37	9.67	$[M+H]^+$	279.2315	1.96	$C_{18}H_{30}O_2$	67.0542，81.0702，95.0861，279.2315，109.1010	*α*- 亚麻酸 [28]	脂肪酰类
38	9.78	$[M+H]^+$	219.1743	1.53	$C_{15}H_{22}O$	219.1743，57.0702，203.1432，121.1018，135.1172	吉马酮	萜类
39	9.90	$[M+H]^+$	405.2617	1.84	$C_{24}H_{36}O_5$	405.2617，406.2701，71.0852，293.1379，83.0103	赤芝酮 C	萜类
40	10.04	$[M+NH_4]^+$	298.2739	0.35	$C_{18}H_{32}O_2$	57.0702，299.2561，298.2739，71.0862，81.0704	大風子酸	脂肪酸类
41	10.31	$[M+H]^+$	118.0863	2.80	$C_5H_{11}NO_2$	118.0863，59.0730，119.0902，58.0639，44.0503	甜菜碱 [19]	生物碱
42	10.32	$[M-H]^-$	279.2319	0.37	$C_{18}H_{32}O_2$	279.2319，59.0562，111.5934，193.5850	亚油酸 [28]	脂肪酰类
43	10.90	$[M+H]^+$	463.3024	1.30	$C_{27}H_{42}O_6$	463.3024，51.4792，464.3031，111.0422，127.0369	赤芝酸 M	萜类
44	11.04	$[M+H]^+$	357.2996	1.11	$C_{21}H_{40}O_4$	69.0701，265.2522，247.2401，121.1018，339.2904	油酸甘油单酯	酯类
45	11.25	$[M-H]^-$	255.2329	0.45	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2329，256.2351，106.0408，119.0507，72.2512	棕榈酸 [28]	脂肪酰类
46	11.52	$[M-H]^-$	255.2329	0.49	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2329，256.2343，61.9889，54.5478，106.0413	异棕榈酸	脂肪酸类
47	11.89	$[M+H]^+$	447.3091	0.16	$C_{27}H_{42}O_5$	447.3091，448.3162，179.1068，293.2089，114.0742	12- 酮孔菌素	萜类
48	11.95	$[M+H]^+$	377.2671	0.29	$C_{23}H_{36}O_4$	377.2671，89.0601，195.1217，71.0852，57.0689	[12]- 姜辣二酮	—
49	12.05	$[M+H]^+$	455.3518	0.35	$C_{30}H_{46}O_3$	455.3518，315.2339，50.5961，69.0702，289.1816	岚香酮酸	萜类
50	12.52	$[M-H]^-$	279.2323	2.51	$C_{18}H_{32}O_2$	279.2323，280.2368，106.0408，61.9890，65.0136	亚麻酸 [28]	脂肪酰类
51	12.86	$[M+H]^+$	591.4262	0.40	$C_{35}H_{58}O_7$	411.3608，591.4262，81.0703，335.1487	沙丁甾醇 3- 葡萄糖苷	萜类
52	12.90	$[M-H]^-$	355.1583	0.76	$C_{21}H_{24}O_5$	355.1583，116.9289，100.9337，84.9386，99.9261	芸香素	苯丙素类
53	12.99	$[M-H]^-$	281.2486	2.24	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2486，282.2528，106.0407，65.0141，66.0102	顺式十八碳烯酸	脂肪酸类
54	13.05	$[M+H]^+$	455.3514	1.36	$C_{30}H_{46}O_3$	455.3514，50.5949，107.0851，437.3402	灵芝酸 Y	萜类
55	13.14	$[M+H]^+$	517.3495	1.06	$C_{31}H_{48}O_6$	517.3495，263.1228，518.3469，111.0802	植醇酸	萜类
56	13.55	$[M+H]^+$	324.3259	0.37	$C_{21}H_{41}NO$	324.3259，86.0956，325.3292，71.0848，57.0690	*N*-（14 甲基十六烷基）吡咯烷	—
57	15.32	$[M+H]^+$	274.1438	0.88	$C_{16}H_{19}NO_3$	274.1438，124.1120，93.0701，84.9586，125.9876	（2*E*）-piperamide-C5：1	—
58	15.52	$[M+H]^+$	306.1696	1.25	$C_{17}H_{23}NO_4$	306.1696，140.1068，122.0969，306.8904，278.8957	消旋山莨菪碱	生物碱
59	15.57	$[M-H]^-$	191.0346	1.91	$C_{10}H_8O_4$	176.0102，191.0346，102.9487，146.9392，58.9589	异莨菪亭 [29]	苯丙素类
60	15.97	$[M+H]^+$	290.1748	0.68	$C_{17}H_{23}NO_3$	290.1748，124.1134，93.0702，291.1770，72.7301	莨菪碱	生物碱

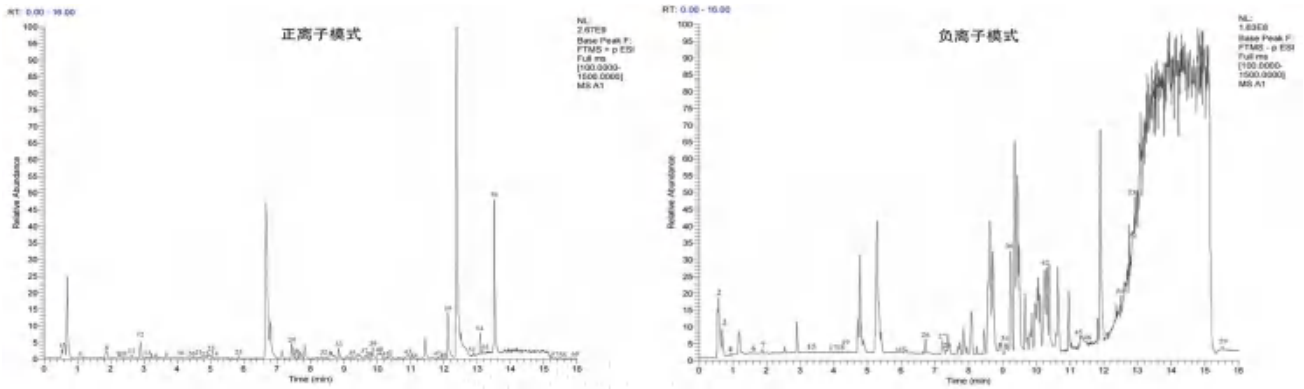


图 1　青海枸杞“柴杞 1 号”UPLC-Q-Orbitrap-MS 分析的 TIC 图

Fig 1　Total ion current chromatograms of *Lycium barbarum* “Chaiqi 1” from Qinghai

PubChem 数据库及 BioTree 中药数据库信息，该化合物碎片与崀菪碱裂解碎片相似度高，推测为崀菪碱，其二级质谱图及可能的裂解途径见图 3。

3.2.3　苯丙素类　共鉴定出 5 个苯丙素类化合物，包括东莨菪内酯、异莨菪亭、7- 羟基 -4- 甲基香豆素等。以东莨菪内酯为例，正离子模式下其准分子离子峰

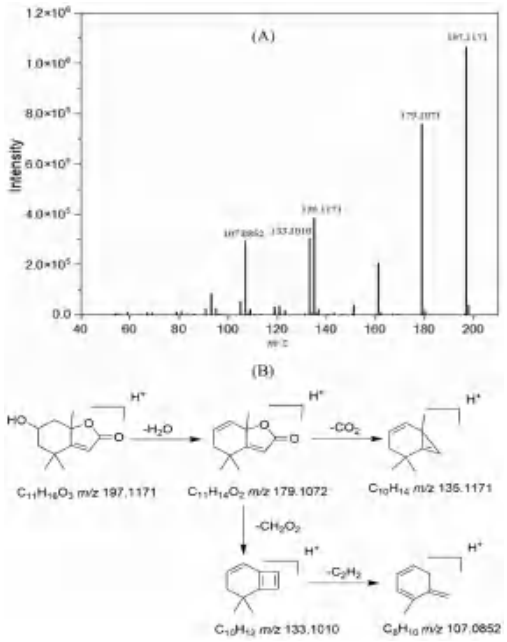


图 2　地芰普内酯二级质谱图（A）及其可能的裂解途径（B）

Fig 2　MS/MS spectrum（A）and fragmentation pathways（B）of loliolide

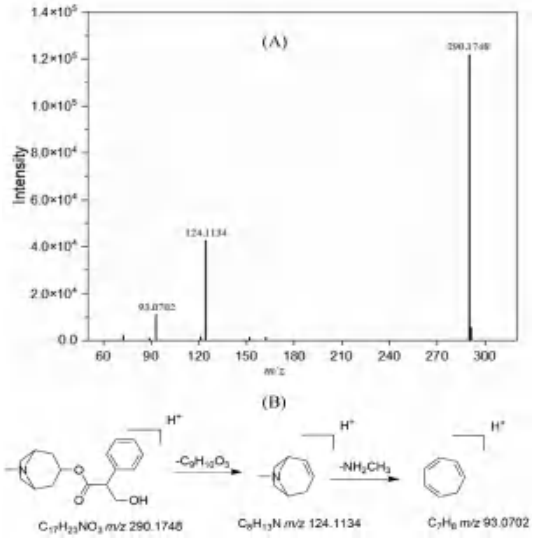


图 3　崀荢碱二级质谱图（A）及其可能的裂解途径（B）

Fig 3　MS/MS spectrum（A）and fragmentation pathways（B）of hyoscyamine

为 $[M+H]^+$ *m/z* 193.0494，其特征离子有 $[M\text{-}CH_3]^+$ *m/z* 178.0273，$[M\text{-}CH_2O\text{-}CO]^+$ *m/z* 135.0431，$[M\text{-}CH_3\text{-}CO\text{-}OH]^+$ *m/z* 133.0292，结合 PubChem 数据库及 BioTree 中药数据库信息，该化合物碎片与东崀荢内酯裂解碎片相似度高，推测为东崀荢内酯，其二级质谱图及可能的裂解途径见图 4。

3.2.4　黄酮类　共鉴定出 9 个黄酮类化合物，包括槲皮素、柚皮素、山柰素等。以槲皮素为例，负离子模式下其准分子离子峰为 $[M\text{-}H]^-$ *m/z* 301.0354，其特征离子有 $[M\text{-}C_8H_6O_3]^-$ *m/z* 151.0037，$[M\text{-}C_8H_6O_5]^-$ *m/z* 121.0296，$[M\text{-}C_9H_7O_5]^-$ *m/z* 107.0142，$[M\text{-}C_7H_6O_2]^-$

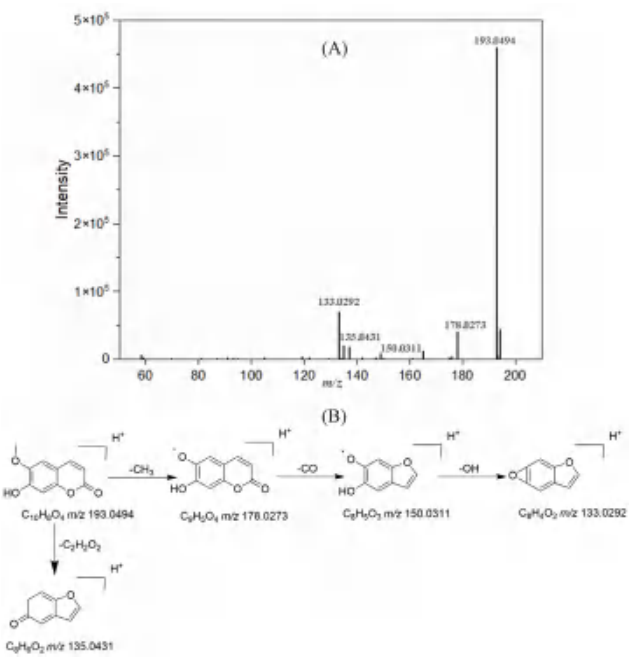


图 4　东崀荢内酯二级质谱图（A）及其可能的裂解途径（B）

Fig 4　MS/MS spectrum（A）and fragmentation pathways（B）of scopoletin

m/z 178.9988 结合 PubChem 数据库及 BioTree 中药数据库信息，该化合物碎片与槲皮素裂解碎片相似度高，推测为槲皮素，其二级质谱图及可能的裂解途径见图 5。

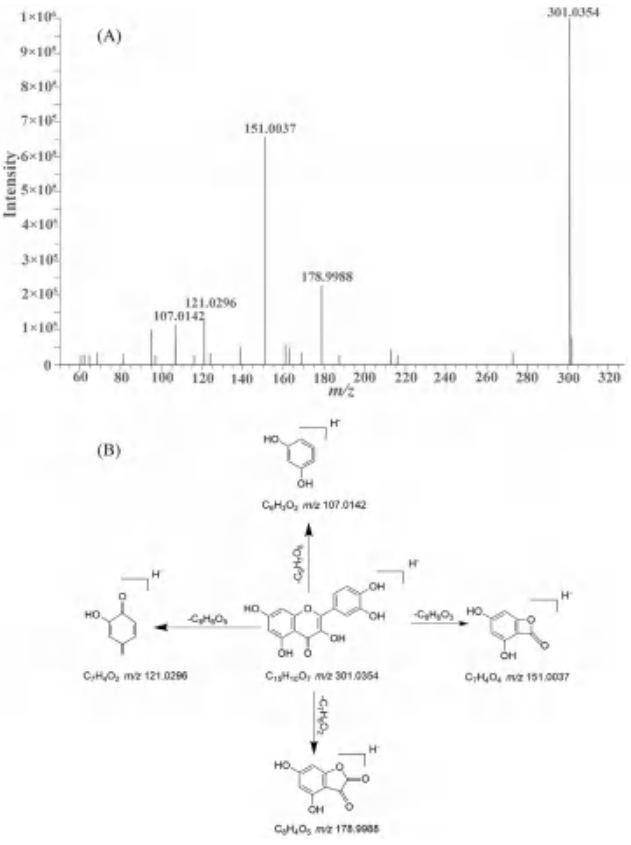


图 5　槲皮素二级质谱图（A）及其可能的裂解途径（B）

Fig 5　MS/MS spectrum（A）and fragmentation pathways（B）of quercetin

4 结论

本研究基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 法技术结合各数据库，分析鉴定了青海枸杞“柴杞 1 号”提取物中的化学成分，共鉴定出 60 个化合物的结构，除酪氨酸、亚油酸、异崀荇亭等 17 个化合物已报道过，其余芸香素、消旋山莨菪碱、地芰普内酯等 43 个化合物为首次报道。同时，分析了萜类、生物碱类、苯丙素类及黄酮类代表成分的质谱裂解机制。本研究阐明了青海枸杞“柴杞 1 号”的化学物质基础，丰富了该药材的成分信息，可为青海枸杞“柴杞 1 号”的质量评价及产品开发提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：260.

[2] Peng YJ，Yan YM，Wan P，et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [J]. Free Radic Biol Med，2019，136：96-108.

[3] Zhang XY，Yang XP，Lin YH，et al. Anti-hypertensive effect of *Lycium barbarum* L. with down-regulated expression of renal endothelial lncRNA sONE in a rat model of salt-sensitive hypertension [J]. Int J Exp Pathol，2015，8（6）：6981-6987.

[4] Zhang LL，Gong YJ，Zhang L，et al. Gou Qi Zi inhibits proliferation and induces apoptosis through the PI3K/AKT1 signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Front Onco，2022，12：1034750.

[5] Liu H，Zhou X，Huang SW，et al. Lycium Barbarum polysaccharides and wolfberry juice prevent DEHP-induced hepatotoxicity via PXR-regulated detoxification pathway [J]. Molecules，2021，26（4）：859.

[6] 万凤奇 . 枸杞多糖调节肝脏葡萄糖产生和抗糖尿病肾炎的作用研究 [D]. 北京：中国科学院大学（中国科学院近代物理研究所），2022.

[7] 熊磊 . 枸杞多酚提取物抗衰老活性及其作用机制研究 [D]. 广州：华南理工大学，2021.

[8] Tian XJ，Liang TS，Liu YL，et al. Extraction，structural characterization，and biological functions of *Lycium barbarum* polysaccharides：a review [J]. Biomolecules，2019，9（9）：389.

[9] Yan YF，Wang YB，Jiang YM，et al. Structure identification of a polysaccharide purified from Lycium barbarium fruit [J]. J Biol Macromol，2016，82：696-701.

[10] Han BH，Park JH，Park MH，et al. Studies on the alkaloidal components of the fruits of *Lycium chinense* [J]. Arch Pharm Res，1985，8：249-252.

[11] Inbaraj BS，Lu H，Kao TH，et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. J Pharm Biomed，2010，51（3）：549-556.

[12] 述小英，尹跃，安巍，等 . 不同品种枸杞果实功能营养成分比较分析 [J]. 西北林学院学报，2017，32（1）：157-164.

[13] 李赫，陈敏，马文平，等 . 不同成熟期枸杞中类胡萝卜素含量的变化规律 [J]. 中国农业科学，2006，39（3）：599-605.

[14] 刘兰英，康迎春，李晓莺，等 . 枸杞果实不同发育阶段主要活性成分变化研究 [J]. 食品研究与开发，2016，37（3）：1-4.

[15] 娄涛涛，金玲，陀扬凌，等 . 基于黑果枸杞药材指标性成分的含量测定研究 [J]. 亚太传统医药，2017，13（7）：23-26.

[16] 吴有锋，谭亮，沈建伟，等 . 柴达木枸杞中 17 种氨基酸的测定与分析 [J]. 食品工业科技，2017，38（1）：281-286.

[17] 欧阳华学，黎源倩，肖全伟 . 高效液相色谱法同时测定枸杞中单糖和低聚糖的含量 [J]. 四川大学学报医学版，2007，38（6）：1040-1042.

[18] 周慧吉，殷梦龙，汤健俭 . 枸杞酸提取纯化工艺的研究 [J]. 食品工业，2018，39（6）：45-50.

[19] 茅玉炜，余家齐，王渐鸿，等 . 枸杞子酒炖炮制前后化学成分变化研究 [J]. 中南药学，2018，16（4）：478-484.

[20] 王汉 . “柴杞 1 号”果实发育期抗坏血酸代谢酶及其基因表达变化 [D]. 青海：青海师范大学，2021.

[21] 杨春霞 . 黑果枸杞与红果枸杞氨基酸含量的差异性研究 [J]. 食品研究与开发，2017，38（4）：34-37.

[22] 曹江平，周继梅，邸宏伟，等 . 枸杞中烟酸提取方法研究 [J]. 应用化工，2016，45（8）：1525-1527.

[23] Lu WY，Jiang QQ，Shi HM，et al. Partial least-squares-discriminant analysis differentiating Chinese wolfberries by UPLC-MS and flow injection mass spectrometric（FIMS）fingerprints [J]. J Agric Food Chem，2014，62（37）：9073-9080.

[24] 刘海彬，张炜，陈元涛，等 . 高效液相色谱法同时测定枸杞中槲皮素、山柰酚和异鼠李素 [J]. 分析试验室，2015，34（11）：1336-1338.

[25] 胡梦雅，张文静，刘云，等 . 北方枸杞中生物碱类成分研究 [J]. 中国中药杂志，2023，48（6）：1546-1552.

[26] Yang TT，Hu YH，Yan YM，et al. Characterization and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of flavonoids from the fruits of *Lycium barbarum* [J]. Foods，2022，11（3）：306.

[27] 沈宏林，向能军，高茜，等 . 枸杞子脂肪酸成分的 GC/MS 分析 [J]. 质谱学报，2009，30（2）：99-104.

[28] 王雪娇，马滢，张志龙 . 气相色谱法测定靖远枸杞中的脂肪酸 [J]. 现代食品，2020，（14）：207-209.

[29] 高凯，汤海峰，陆云阳，等 . 宁夏枸杞子乙酸乙酯部分的化学成分研究 [J]. 中南药学，2014，12（4）：324-327.

（收稿日期：2023-02-18；修回日期：2023-05-16）

干燥方法对五味消毒饮浸膏粉质量属性的影响

张英俊[1]，吴样明[2]，饶小勇[1, 3]，况穹穹[2]，何雁[1]，江婷[1]，张尧[3*]，罗晓健[1, 3*]（1. 江西中医药大学，南昌 330004；2. 江中药业股份有限公司，南昌 330096；3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心，南昌 330006）

摘要：目的 优选经典名方五味消毒饮的干燥方法。**方法** 分别采用冷冻干燥、喷雾干燥、带式干燥、减压干燥 4 种方法制备五味消毒饮浸膏粉，以 5 个一级指标和 11 个二级指标构建的浸膏粉物理指纹图谱及指标成分含量为评价指标，比较不同干燥方法对五味消毒饮浸膏粉物理性质和指标成分的影响。**结果** 喷雾干燥与冷冻干燥浸膏粉的指标成分与煎煮液最为相似，明显优于带式干燥、减压干燥，且喷雾干燥浸膏粉流动性、可压性最好。**结论** 不同干燥方法对五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱及指标成分均有较大影响，其中喷雾干燥制备的浸膏粉流动性、可压性最优且不影响指标成分含量，因此本研究认为喷雾干燥更适用于五味消毒饮浸膏粉的产业化生产。

关键词：经典名方；五味消毒饮；干燥方法；物理指纹图谱；指标成分
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2348-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.014

Effect of drying methods on the quality attribute of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction

ZHANG Ying-jun[1], WU Yang-ming[2], RAO Xiao-yong[1, 3], KUANG Wan-wan[2], HE Yan[1], JIANG Ting[1], ZHANG Yao[3*], LUO Xiao-jian[1, 3*] (1. *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Jiangzhong Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Nanchang* 330096; 3. *The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparations in Chinese Herbal Medicine*, *Nanchang* 330006)

Abstract: Objective To optimize the drying method of classic popular prescription Wuwei Xiaodu decoction. **Methods** The extract powder of Wuwei Xiaodu decoction was prepared by freeze drying, spray drying, belt drying and vacuum drying. The fingerprints of the extract powder constructed by 5 first level indicators and 11 second level indicators and index component content were used as evaluation indicators to compare the effect of different drying methods on the fingerprints and index component of the extract powder of Wuwei Xiaodu decoction. **Results** The index composition of spray drying and freeze drying extract powder were the most similar to that of decoction, obviously superior to belt drying and vacuum drying. Extract powder by spray drying has the best fluidity and compressibility. **Conclusion** Different drying methods have great impact on the physical fingerprints and index components of Wuwei Xiaodu decoction extract powder. The spray drying extract powder has the best fluidity and compressibility and does not affect the index component content. Spray drying is more suitable for the industrial production of Wuwei Xiaodu decoction extract powder.

Key words: classical prescription; Wuwei Xiaodu decoction; drying method; physical fingerprint; index component

基金项目：江西省中医药中青年骨干人才（第一批）培养计划项目（赣中医药科教字 [2020]2 号）；江西省主要学科和技术带头人培养计划 - 领军人才项目（No. 20204BCJ22032）。

作者简介：张英俊，女，在读硕士研究生，主要从事中药药剂研究，email：1295373514@qq.com *通信作者：罗晓健，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药固体制剂研究，email：Luoxj98@126.com；张尧，男，工程师，主要从事中药固体制剂研究，email：54625886@qq.com

五味消毒饮是 2018 年发布的《古代经典名方目录（第一批）》中的一首[1]，剂型为汤剂，传统汤剂在服用方式和保存方面存在诸多不便，颗粒剂因其携带方便、便于服用的特点而备受消费者喜欢[2]。干燥是颗粒剂制备工艺中必不可少的步骤，是保证现代制剂与传统中医临床药用物质关键质量属性一致性的关键[3]。目前，中药浸膏粉常见的干燥方法有冷冻干燥、喷雾干燥、带式干燥和减压干燥[4-6]，不同干燥方法因其干燥原理的不同对中药浸膏粉的成分特性及理化性质有较大的影响[7-8]。本研究以五味消毒饮浸膏粉的物理指纹图谱和指标成分含量为评价指标，分析 4 种干燥方法制备的浸膏粉理化性质的差异，从而确定最佳的干燥方法，以期为五味消毒饮干燥方法的选择及后续制剂成型工艺研究提供指导。

1　材料

1.1　仪器

R-1012 旋转蒸发仪（郑州长城科工贸公司）；B-290 喷雾干燥机（瑞士 Buchi 公司）；LCJ-30F 冷冻干燥机（北京松源华兴科技发展有限公司）；MJY5-2 型真空带式干燥机（上海敏杰制药机械有限公司）；DKF-6060 型真空干燥箱（上海新苗制造有限公司）；Mastersizer3000 激光粒度仪（美国马尔文仪器有限公司）；动态多蒸气吸附仪（DVS，英国 SMS 公司）；JZ-7 型粉体振实密度仪、JL-A3 型粉体特性测试仪（成都精新粉体测试设备有限公司）。

1.2　试药

金银花（批号：W201905060242，产地山东平邑）、野菊花（批号：W201904030065，产地湖北麻城）、蒲公英（批号：W202011200113，产地湖北枣阳）、紫花地丁（批号：W201904030074，产地河北安国）、天葵子（批号：W201904290154，产地湖北荆门）（江西江中中药饮片公司，经江西中医药大学刘勇教授鉴定均符合《中国药典》2020 版一部项下的相关要求）。绿原酸（批号：110753-202018，含量：96.1%）、秦皮乙素（批号：110741-201708，含量：99.9%）、咖啡酸（批号：110885-201703，含量：99.7%）、蒙花苷（批号：111528-201911，含量：98.5%）、菊苣酸（批号：111752-201703，含量：97.6%）（中国食品药品检定研究院）。紫草氰苷（批号:RFS-Z02901908023，纯度＞ 94%）、新绿原酸（批号：RFS-X01401903029，纯度＞ 98%）、单咖啡酰酒石酸（批号：RFS-D06002003023，纯度＞ 98%）、隐绿原酸（批号：RFS-Y06701903029，纯度＞ 98%）、异绿原酸 A（批号：RFS-Y06802109007，纯度＞ 98%）、异绿原酸 B（批号：RFS-Y06911812012，纯度＞ 98%）、异绿原酸 C（批号：RFS-Y07011805016，纯度＞ 98%）（成都瑞芬思生物科技有限公司）。乙腈、甲醇（色谱级，赛默飞有限公司）；三氟乙酸（色谱级，阿拉丁）；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　五味消毒饮煎煮液的制备

按照五味消毒饮处方组成以及剂量换算，按处方比例（金银花 11.19 g，野菊花、蒲公英、紫花地丁、天葵子各 4.48 g）称取 35 倍量药材，加水 21 000 mL，武火煮沸后文火煎煮 40 min，趁热过滤（200 目纱布双层），药渣如上述方法再煎，过滤，合并滤液，得五味消毒饮煎煮液，将煎煮液于 60 ℃旋转蒸发至密度为 1.06、1.17 g • cm^{-3}（60 ℃），得五味消毒饮浓缩液。

2.2　干燥方法与条件

将按表 1 方法得到的五味消毒饮浸膏粉粉碎（25 ℃，RH ≤ 30%），过 80 目筛，置于干燥器内，备用。

表 1　干燥方法与条件

Tab 1　Drying methods and conditions

干燥方法	药液密度 /（g • cm^{-3}）	干燥条件
冷冻干燥	1.06	－ 50 ℃预冻 4 h，按梯度升温至 35 ℃，在 35 ℃保持 24 h，真空度－ 0.05 MPa，干燥时间 48 h
喷雾干燥	1.06	进风温度 130 ℃，压缩空气比 100%，进料速度 10%，雾化压力 0.4 MPa，干燥时间 2.5 h
带式干燥	1.17	一区、二区、三区加热温度 100 ℃，四区冷却温度 30 ℃，履带速度 20 Hz，真空度－ 0.1 MPa，干燥时间 1.5 h
减压干燥	1.17	温度 60 ℃，托盘尺寸（32 cm×22 cm×2 cm），真空度为－ 0.1 MPa，干燥时间 96 h

2.3　五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱研究

根据五味消毒饮浸膏粉的粉体学特性，将其物理指纹图谱的一级指标划分为均一性、堆积性、可压缩性、流动性和稳定性 5 个方面[9-10]，采用 D_{90}、粒径分布宽度（*Span*）、粒径范围（*Width*）、堆密度（D_b）、振实密度（D_{bt}）、颗粒间孔隙度（I_e）、压缩度（*C*）、休止角（θ）、豪斯纳比（*IH*）、含水量（*HR*）和吸湿性（*H*）作为 11 个二级指标，

构建五味消毒饮浸膏粉的物理指纹图谱。

2.3.1 物理指纹图谱的测定

① 粒径及粒度分布：取浸膏粉适量于激光粒度仪干法测定盘中，测定 D_{10}、D_{50}、D_{90}，并计算 *Span* 和 *Width*。$Span = (D_{90} - D_{10})/D_{50}$；$Width = D_{90} - D_{10}$。

② 密度：取浸膏粉适量装入量筒容器中，称定重量 *m*，记录体积 V_1，然后在粉体振实密度仪所设定的条件下（振动频率：300 r·min^{-1}；振动时间 3 min）振动，直到容器中粉末体积不再减少，记录体积 V_2，计算堆密度（D_b）和振实密度（D_{bt}）。$D_b = m/V_1$；$D_{bt} = m/V_2$。

③ θ：取浸膏粉适量，从固定不变的高度通过漏斗，自由落在下方的水平金属板上，形成一个圆锥体，当圆锥体高度不再增加时量取其高度 *h*，计算 θ。$\theta = arctan(h/r)$。

④ *IH*、*C*、I_e[11]：$IH = D_{bt}/D_b$；$C(\%) = (D_{bt} - D_b)/D_{bt} \times 100\%$；$I_e = (D_{bt} - D_b)/(D_{bt} \times D_b)$。

⑤ *HR*：按照《中国药典》2020 年版第四部水分测定法第二法（烘干法）测定[12]。

⑥ *H*：称取 30 ～ 50 mg 浸膏粉置于动态多蒸气吸附仪样品盘上，试验温度为 25 ℃，相对湿度为 80%，仪器自动计算吸湿过程的吸湿质量变化率，以质量变化率≤ 0.002 mg 判定为吸湿平衡，记录其吸湿平衡含水量。

2.3.2 五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱指标转化

由于各二级指标数值、量纲存在差异，直接分析会影响评价结果的准确性，因此，根据药典标准以及浸膏粉性质检测的经验知识确定了各物理性指标的可能数值范围，对各指标测定结果进行标准化处理至同一尺度，将转换后的数值控制在 0 ～ 10[13-14]，各指标数值范围及标准化转换公式如表 2 所示，转化后结果如表 3 所示。

表 2 二级指标数值范围及转换公式

Tab 2 Value range and conversion formula of secondary indicators

一级指标	二级指标	数值范围	转化公式
均一性	D_{90}/μm	0 ～ 200	$10 - x/20$
	Span	8 ～ 1	$(40 - 10x)/3$
	Width/μm	200 ～ 1	$10 - x/20$
堆积性	D_b/(g·cm^{-3})	0 ～ 1	$10x$
	D_{bt}/(g·cm^{-3})	0 ～ 1	$10x$
可压性	I_e	0 ～ 2	$5x$
	C/%	0 ～ 60	$x/6$
流动性	θ/°	0 ～ 60	$10 - x/6$
	IH	3 ～ 1	$(30 - 10x)/2$
稳定性	*HR*/%	0 ～ 10	$10 - x$
	H/%	0 ～ 40	$10 - x/4$

表 3 五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱指标转化结果

Tab 3 Conversion of physical fingerprint index of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction

干燥方法	D_{90}	*Span*	*Width*	D_b	D_{bt}	I_e	*C*	θ	*IH*	*HR*	*H*
冷冻干燥	3.01	8.75	3.52	3.10	5.40	6.70	6.96	2.39	6.40	5.09	0.58
喷雾干燥	6.27	2.23	6.41	4.10	7.80	5.70	7.85	3.23	5.55	5.16	0.50
带式干燥	1.41	9.67	2.02	5.80	9.00	3.10	5.91	3.08	7.25	6.35	0.04
减压干燥	2.30	9.35	2.77	5.90	9.60	3.30	6.49	2.74	6.80	4.54	1.59

2.3.3 五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱构建及评价 当上述 11 个物理性指标的标准化转换值均为 10 时，用线段将测定的各指标标准化转换值连接起来，构成不规则的十一边形，即为五味消毒饮浸膏粉的物理指纹图谱，如图 1 所示。物理指纹图谱评价方法包括直观评价法和相似度评价法[15]。直观评价法是将不同干燥方法浸膏粉的物理指纹图谱叠加，可以直观地展示不同干燥方法浸膏粉在各物理指标上的相似或差异程度。由图 2 可以看出，4 种浸膏粉 *C*、θ 指标水平较为集中，*IH*、*HR*、*H* 指标水平存在较小的差异，而 D_{90}、*Span*、*Width*、D_b、D_{bt}、I_e 指标水平差异较大，其中带式干燥、减压干燥浸膏粉物理指纹图谱形状最为相似，说明两者物理性质相似。

基于五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱，将不同干燥方法浸膏粉物理指纹图谱进行相似度评价，从整体角度评价浸膏粉的相似性。采用 SPSS 21.0 软件计算 Pearson 相关系数，比较不同干燥方法浸膏粉的相似度，相似度绝对值越接近 1，表明浸膏粉的物理性质越相近[16]。由表 4 可知，喷雾干燥与冷冻干燥、带式干燥、减压干燥浸膏粉的物理指纹图谱相似度分别为 0.360、0.238、0.262，均低于 0.40，表明喷雾干燥与其他干燥浸膏粉物理性质相比存在较大差异；带式干燥与减压干燥浸膏粉的物理指纹图谱相似度为 0.962，表明两种浸膏粉物理性质最接近，这与直观评价法（叠加物理指纹图谱）的结果是一致的。

2.4 指标成分含量测定

2.4.1 色谱条件 采用迪马 -C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），流动相乙腈（A）-0.05% 三氟乙

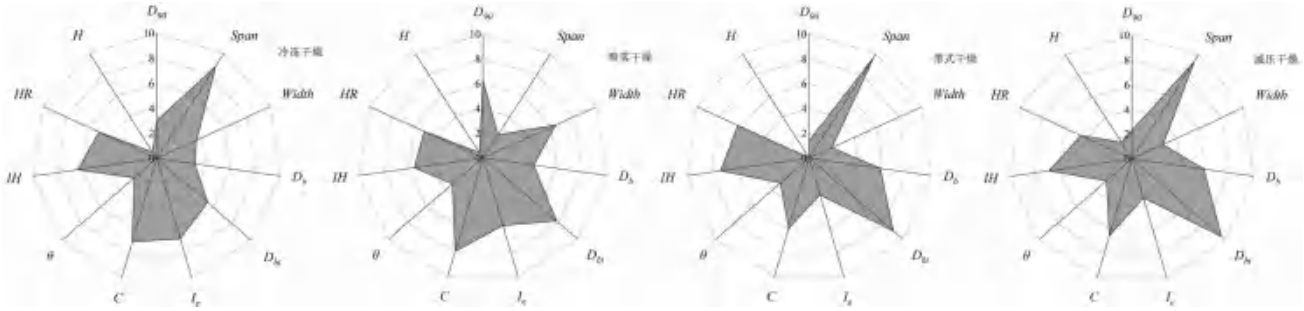


图 1　五味消毒饮浸膏粉物理指纹图谱雷达图

Fig 1　Radar image of physical fingerprint of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction

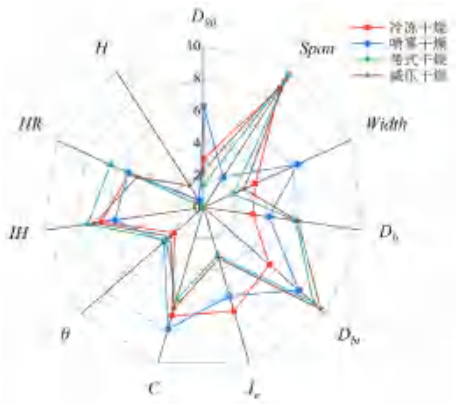


图 2　五味消毒饮浸膏粉叠加物理指纹图谱雷达图

Fig 2　Radar image of superimposed physical fingerprint of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction

表 4　物理指纹图谱相似度结果

Tab 4　Physical fingerprint similarity

干燥方法	冷冻干燥	喷雾干燥	带式干燥	减压干燥
冷冻干燥	1.000			
喷雾干燥	0.360	1.000		
带式干燥	0.756	0.238	1.000	
减压干燥	0.721	0.262	0.962	1.000

酸（B），梯度洗脱（0 ～ 27 min，90%B；27 ～ 30 min，90% ～ 86%B；30 ～ 31 min，86% ～ 75%B；31 ～ 58 min，75%B；58 ～ 65 min，10%B；65 ～ 80 min，90%B），进样量 10 μL，柱温 30 ℃，检测波长 320 nm，流速 1 mL • min^{-1}。

2.4.2　混合对照品溶液的制备　精密称定绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷对照品适量，置于 25 mL 量瓶中，50% 甲醇溶解并稀释，即得质量浓度分别为 0.6368、0.1282、0.0438、0.1243 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4.3　供试品溶液的制备　精密吸取“2.1”项下的煎煮液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加入纯水稀释至刻度，混匀，离心（10 000 r • min^{-1}，10 min），0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.4.4　阴性样品溶液的制备　按处方配比，分别称取缺蒲公英，缺金银花，缺野菊花，缺紫花地丁，缺蒲公英、野菊花，缺野菊花、金银花，缺蒲公英、金银花，缺紫花地丁、蒲公英，缺蒲公英、金银花、野菊花的其他饮片，按五味消毒饮基准样品制备工艺制成煎液，再按“2.4.3”项下方法制得阴性样品溶液。

2.4.5　方法学考察

① 专属性：分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样分析。结果表明，各指标成分在上述色谱条件下均分离良好，且阴性样品溶液无干扰。由图 3 可知，绿原酸来自金银花、野菊花、蒲公英；咖啡酸来自金银花、野菊花、蒲公英；秦皮乙素来自紫花地丁，蒙花苷来自野菊花。

② 线性关系考察：精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液分别稀释成系列浓度梯度的对照品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X），绘制标准曲线，进行线性回归，结果见表 5。

表 5　指标成分线性关系

Tab 5　Linearity of indicator components

成分	回归方程	线性范围 /（mg • mL^{-1}）	r
绿原酸	$Y = 3.04\times10^4X - 6.60\times10^4$	0.0199 ～ 0.6368	0.9999
秦皮乙素	$Y = 2.50\times10^4X - 1.75\times10^4$	0.0040 ～ 0.1282	0.9999
咖啡酸	$Y = 5.62\times10^4X - 2.37\times10^4$	0.0014 ～ 0.0438	0.9999
蒙花苷	$Y = 2.20\times10^4X - 1.68\times10^4$	0.0039 ～ 0.1243	0.9999

③ 精密度：取混合对照品溶液连续进样 6 次，测定各指标成分峰面积。绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸和蒙花苷峰面积 *RSD* 分别为 0.22%、0.22%、0.34%、0.30%，表明仪器精密度良好。

④ 稳定性：精密吸取“2.4.3”项下方法制备的供试品溶液，分别放置 0、2、4、8、12、24 h，进样测定，结果绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸和蒙花苷峰面积 *RSD* 分别为 0.22%、0.23%、1.2%、0.28%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

⑤ 重复性：按“2.4.3”项下方法制备供试品

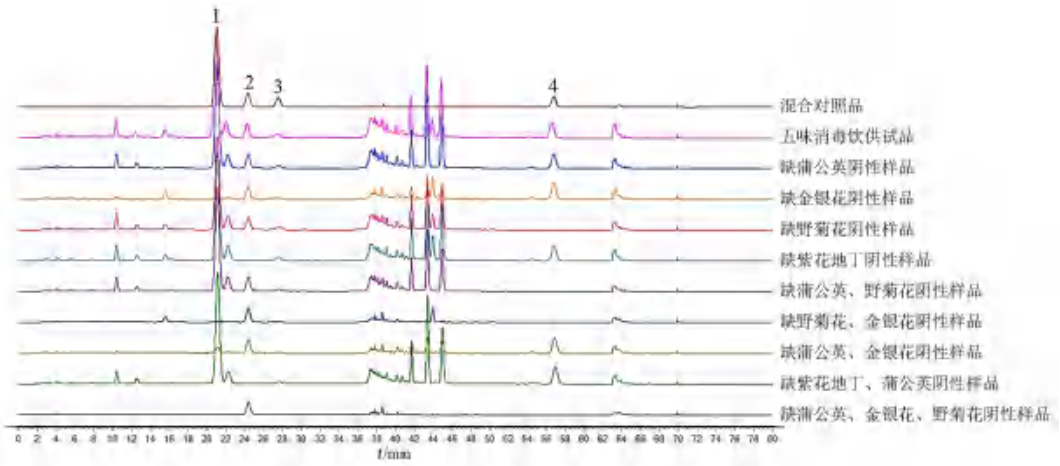


图 3　五味消毒饮专属性考察 HPLC 图

Fig 3　HPLC chromatogram of exclusive investigation of Wuwei Xiaodu decoction

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 秦皮乙素（aesculetin）；3. 咖啡酸（caffeic acid）；4. 蒙花苷（buddleoside）

溶液 6 份，进样测定，结果绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸和蒙花苷峰面积 *RSD* 分别为 0.94%、1.1%、0.85%、1.3%，表明该方法重复性良好。

⑥ 加样回收试验：精密吸取“2.4.3”项下供试品溶液 2.5 mL，分别按照已知各指标成分含量的 1∶0.5、1∶1、1∶1.5 比例精密加入混合对照品溶液，每个浓度平行 3 份，进样测定，测定各指标成分含量。计算得到绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、蒙花苷低、中、高浓度的平均加样回收率在 92.80%～109.29%，*RSD* 值在 0.040%～2.0%，均符合规定。

2.4.6　五味消毒饮浸膏粉含量测定　取 4 种干燥方法所得浸膏粉适量，制备成供试品溶液，进样测定，每份样品平行 3 份，指标成分转移率以浓缩液（以 100% 计）中的含量为比较对象，结果见表 6。

表 6　干燥方法对五味消毒饮浸膏粉指标成分转移率的影响 (%)

Tab 6　Effect of drying methods on the index component transfer rate of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction (%)

干燥方法	绿原酸	秦皮乙素	咖啡酸	蒙花苷
冷冻干燥	100.11	99.29	100.00	100.26
喷雾干燥	98.41	96.41	97.37	97.78
带式干燥	93.38	92.92	87.46	93.64
减压干燥	85.44	87.11	54.10	89.22

由表 6 可知，干燥方法对五味消毒饮浸膏粉指标成分含量有显著影响，转移率由高到低依次为冷冻干燥＞喷雾干燥＞带式干燥＞减压干燥，冷冻干燥、喷雾干燥对样品成分保留率最高，而带式干燥、减压干燥其指标成分转移率下降，分析原因可能是绿原酸分子中含有的邻二酚羟基结构不稳定，受到高温加热、光照变化易分解，造成提取率降低 [17]；咖啡酸性质不稳定，且在高温和光照条件下易被氧化降解 [18]；而刘承萍等 [19] 研究中也提到蒙花苷含量随烘干温度升高和时间延长而损失增大，而采用喷雾干燥能较好地保留蒙花苷成分。

2.5　指纹图谱

2.5.1　色谱条件　采用迪马 -C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），流动相乙腈（A）-0.05% 三氟乙酸（B），梯度洗脱（0～4 min，95%～90%B；4～21 min，90%～85%B；21～46 min，85%～80%B；46～51 min，80%～75%B；51～75 min，75%B），进样量 10 μL，柱温 25 ℃，检测波长 260 nm，流速 1 mL • min^{-1}。

2.5.2　混合对照品溶液的制备　精密称定紫草氰苷、新绿原酸、单咖啡酰酒石酸、绿原酸、隐绿原酸、秦皮乙素、咖啡酸、菊苣酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、蒙花苷对照品适量，置于 25 mL 量瓶中，50% 甲醇溶解稀释，即得质量浓度分别为 0.0047、0.0203、0.0102、0.2715、0.0511、0.0335、0.0105、0.0084、0.0285、0.0717、0.0647、0.0169 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.5.3　供试品溶液的制备　按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液。

2.5.4　方法学考察　将绿原酸峰定为参照峰，分别计算精密度、重复性、稳定性试验项下各共有峰相对保留时间及相对峰面积 *RSD*。结果各峰相对保留时间 *RSD* ＜ 0.50%，相对峰面积 *RSD* ＜ 3.0%，符合指纹图谱研究要求，说明仪器精密度和方法重复性良好，且供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5　五味消毒饮浸膏粉指纹图谱测定　取 4 种干燥方法所得浸膏粉适量，制备成供试品溶液，按照“2.5.1”项下色谱方法进行指纹图谱测定，将各批样品色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012A 版）”，以煎煮液样品色谱图为参照图谱，利用中位数法，时间窗宽度为 0.1 min，通过多点校正、色谱峰匹配，将其他样品色谱峰与参照图谱进行自动匹配生成叠加图谱，结果见图 4。

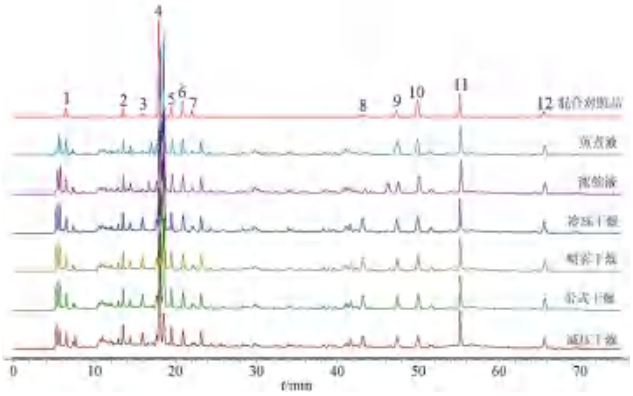


图 4　干燥方法对五味消毒饮浸膏粉指纹图谱的影响

Fig 4　Effect of drying methods on fingerprint of extract powder of Wuwei Xiaodu decoction

1. 紫草氰苷（lithosprmoside）；2. 新绿原酸（neochlorogenic acid）；3. 单咖啡酰酒石酸（caftaric acid）；4. 绿原酸（chlorogenic acid）；5. 隐绿原酸（cryptochlorogenic acid）；6. 秦皮乙素（aesculetin）；7. 咖啡酸（caffeic acid）；8. 菊苣酸（cichoric acid）；9. 异绿原酸 B（isochlorogenic acid B）；10. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid A）；11. 异绿原酸 C（isochlorogenic acid C）；12. 蒙花苷（buddleoside）

由表 7 可知，冷冻干燥、喷雾干燥浸膏粉与煎煮液图谱相似度＞0.97，指纹图谱相似度良好，说明五味消毒饮浸膏经过冷冻干燥、喷雾干燥所得样品质量较稳定均一[20]。带式干燥、减压干燥浸膏粉的指纹图谱与煎煮液图谱或与其他样品的指纹图谱相似度较低，原因可能是减压干燥时间过长，温度过高，导致五味消毒饮中的酚酸类成分因高温加热发生降解[21]，含量下降，进而造成指纹图谱相似度下降。

表 7　指纹图谱相似度分析结果

Tab 7　Fingerprint similarity

干燥方法	煎煮液	浓缩液	冷冻干燥	喷雾干燥	带式干燥	减压干燥
煎煮液	1.000					
浓缩液	0.978	1.000				
冷冻干燥	0.979	0.971	1.000			
喷雾干燥	0.977	0.971	0.998	1.000		
带式干燥	0.964	0.956	0.987	0.992	1.000	
减压干燥	0.848	0.840	0.875	0.888	0.938	1.000

3　讨论

浸膏粉是中药制剂工艺的关键中间体，具有化学成分复杂、有效成分不明确的特点[22]。采用有限的化学属性指标对浸膏粉进行分析评价存在一定局限，应关注其整体的理化性质研究。物理指纹图谱可从物理状态层面整体评价中药浸膏粉质量，并可作为对中药浸膏粉含量测定或 HPLC 指纹图谱评价的补充，从而较为全面地对中药浸膏粉质量进行控制[23]。因此本研究在分析五味消毒饮不同干燥方法浸膏粉性质差异时，从表征浸膏粉的物理属性以及与生产工艺相关的物理指标中进一步筛选易测定、可重复、稳定的关键质量属性，再结合化学属性指标，建立了更高效的联合质量控制评价方法[16]。

本研究通过测定五味消毒饮不同干燥方法所得浸膏粉的物理指纹图谱和指标成分含量，可以对浸膏粉的质量属性进行综合表征评价，从而加深对干燥过程的理解。喷雾干燥与冷冻干燥浸膏粉的指标成分含量与煎煮液最为接近，明显优于带式干燥、减压干燥，喷雾干燥浸膏粉流动性、可压性最好，提示在后续制剂中可选择干法制粒，可有效提高效率。且喷雾干燥技术大大简化并缩短了中药提取液到制剂成品或半成品的生产工艺和干燥时间，提高了生产效率[24]。综合考虑五味消毒饮浸膏粉的质量和生产效率，本研究认为喷雾干燥较其他干燥方法具有一定优势。

参考文献

[1] 国家中医药管理局 . 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL].（2018-04-13）[2022-08-14]. http：//www. satcm. gov. cn/kejisi/zhengcewenjian/2018-04-16/7107. html.

[2] 陈江平，徐东婷，李玲，等 . 干燥方式对桃核承气汤浸膏粉物理指纹图谱及指标成分的影响 [J]. 药品评价，2022，19（13）：779-784.

[3] 单家明，孟岩，杨元丰，等 . 不同干燥方法下小承气汤物质基准化学成分的比较 [J]. 中国新药杂志，2022，31（5）：483-490.

[4] 罗益远，钱旭武，沙秀秀，等 . 基于 UPLC-QTOF-MS 结合多元统计的不同干燥方法白术中化学成分差异分析 [J]. 中国药学杂志，2022，57（10）：784-790.

[5] 李珂昕，蔡敬民，胡勇，等 . 干燥方法对蓝莓果粉品质的影响 [J]. 中国南方果树，2019，48（6）：98-102.

[6] 李向军，王世华，安军永，等 . 参芪益气固本片干燥方法考察 [J]. 中国试验方剂学杂志，2011，17（16）：23-25.

[7] 李明月，常丽静，韦花花，等 . 不同干燥方式黄芪提取物理化性质及 HPLC-ELSD 指纹图谱的比较 [J]. 中成药，2022，44（9）：3068-3075.

[8] Radojcin M，Pavkov I，Kovaevi DB，et al. Effect of selected drying methods and emerging drying intensification technologies on the quality of dried fruit：a review [J]. Processes，2021，9（1）：132.
[9] 张毅，徐冰，孙飞，等 . 中药提取物粉末物理指纹谱研究及应用 [J]. 中国中药杂志，2016，41（12）：2221-2227.
[10] 伍蕊嗣，刘涛，覃盼盼，等 . 热毒宁注射液物理指纹谱研究及应用 [J]. 中国中药杂志，2017，42（3）：505-509.
[11] Wan SL，Yang R，Zhang H，et al. Application of the SeDeM expert system in studies for direct compression suitability on mixture of Rhodiola extract and an excipient [J]. Aaps Pharmscitech，2019，20（3）：105.
[12] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：114.
[13] 李鹏程，刘涛，张文文，等 . 基于 QbD 理念的黄槐片制备工艺及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药，2018，49（7）：1576-1582.
[14] Gu M，Sun H，Dai C，et al. SeDeM expert system：a review and new perspectives [J]. J Pharm Biopharm Res，2019，1（1）：36-47.
[15] 滕凯旋，傅豪，王中昌，等 . 基于物理指纹图谱的养胃颗粒浸膏质量一致性评价方法 [J]. 中草药，2022，53（3）：712-719.
[16] 张前亮，罗铮，邓雯，等 . 丹参破壁饮片物理属性的质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（23）：145-152.
[17] 李云聪，王艳芳，李佳，等 . 甜叶菊绿原酸类成分稳定性研究 [J]. 中国食品添加剂，2021，32（9）：73-78.
[18] 李双，才凤，李杨，等 . 蒲公英滴眼液中咖啡酸的稳定性研究 [J]. 辽宁大学学报，2013，40（2）：174-175.
[19] 刘承萍，曾元儿，高峰 . 野菊花中蒙花苷的热稳定性研究 [J]. 今日药学，2011，21（2）：88-90.
[20] 杨晓琴，吴亿晗，白俊毅，等 . 五味消毒饮口服液 HPLC 指纹图谱的建立及 6 种指标性成分定量测定 [J]. 中草药，2017，48（24）：5151-5157.
[21] 吕海涛，赵玉君，邓锐，等 . 海金沙提取物中香豆酸和咖啡酸的测定及稳定性研究 [J]. 齐鲁药事，2008（5）：305-307.
[22] 王瑜婷，徐东婷，邓桂海，等 . 干燥方式对黄连浸膏粉物理指纹图谱和有效成分的影响 [J]. 广东药科大学学报，2022，38（1）：63-69，74.
[23] 张煜皓，王雅雯，宿军慧，等 . 中药粉体物理指纹图谱研究进展 [J]. 分析测试学报，2021，40（1）：139-148.
[24] 孙兴，刘建，阮佳，等 . 干燥工艺对黄芪桂枝五物汤粉体的物理指纹图谱和有效成分影响研究 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（3）：296-300.

（收稿日期：2023-03-08；修回日期：2023-05-08）

基于系统药理学解析林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的作用机制

赵晓昂，王云，李友明，田纪祥*（中国中医科学院中药研究所，北京 100700）

摘要：目的 初步探讨林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的物质基础和作用机制。**方法** 采用组合效应系数方法评估林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳协同增效作用；通过小鼠负重游泳实验评估林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的功效，并测定与疲劳相关的多个体内指标，探索抗疲劳可能的作用机制；通过液相 - 质谱联用主要成分和入血成分分析，结合网络药理学初步解析林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的可能作用机制与药效物质基础。**结果** 林下山参联合米糠脂肪烷醇的组合效应系数在 0.6 ～ 0.8，具有中等协同增效作用；林下山参联合米糠脂肪烷醇可以延长小鼠力竭游泳的时间，降低血浆中尿素氮和乳酸的含量和脑组织中 5- 羟色胺的含量，升高肝糖原和肌糖原的储备水平。成分分析表明，共有 9 个主要原形成分吸收入血。进一步通过网络药理学分析发现，其主要通过干预 Serotonergic synapse 通路发挥抗疲劳功效，4 个入血的人参皂苷及三十二碳脂肪烷醇、三十碳脂肪烷醇、二十八碳脂肪烷醇可能是抗疲劳的药效成分。**结论** 林下山参联合米糠脂肪烷醇可以通过调控多靶点、多途径实现抗疲劳功效，为两者的进一步开发和应用提供依据。

关键词：林下山参；米糠脂肪烷醇；抗疲劳；系统药理学；作用机制
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2354-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.015

作者简介：赵晓昂，女，主管药师，主要从事新药及保健食品研发，email：xazhao@icmm.ac.cn *通信作者：田纪祥，男，硕士，副研究员，主要从事中药新药及保健食品研发，email：jxtian@icmm.ac.cn

Anti-fatigue mechanism of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol based on system pharmacology

ZHAO Xiao-ang, WANG Yun, LI You-ming, TIAN Ji-xiang* (*Institute of Chinese Materia Medica*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700)

Abstract: Objective To preliminarily determine the functional material basis and anti-fatigue mechanism of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol. **Methods** The combination index was used to evaluate the synergistic effect of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol on fatigue. The anti-fatigue effect of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol was evaluated by a loading swimming experiment. Multiple indexes related to anti-fatigue were determined to explore the underlying mechanism. The anti-fatigue mechanism and effective compounds of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol were determined by liquid chromatography-mass spectrometry based chemical constituents, absorbed components analysis, and network pharmacology. **Results** The combination indexes of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol ranged 0.6 ～ 0.8, indicating moderate synergism. Mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol prolonged the exhaustive swimming time of the mice, reduced the content of urea nitrogen and lactic acid in the serum as well as 5-hydroxytryptamine in the brain tissue, and increased the reservation levels of liver glycogen and muscle glycogen, indicating anti-fatigue effect. Component analysis identified 9 main prototypes in the blood sample. Further network pharmacology analysis indicated that mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol exerted an anti-fatigue effect mainly through regulating the serotonergic synapse signaling pathways. Four ginsenosides in the plasma and thirty-two fatty alkanol, thirty triacontanol, twenty-eight ctacosanol could be active against fatigue components. **Conclusion** The anti-fatigue effect of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol follows "multiple targets, multiple pathways" action mode, which may provide the theoretical basis for further development and applications of both drugs.

Key words: mountain cultivated ginseng; rice bran fatty alkanol; anti-fatigue; system pharmacology; mechanism of action

林下山参（mountain cultivated ginseng，MCG）习称“籽海”，为播种在山林野生状态下，随自然方式生长十年之后才采挖的五加科（Araliaceae）人参属 *Panax* L. 人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎 [1-2]，具有和野山参相似的品质，并被列入了《中国药典》的药品名录。其含有皂苷、挥发油、多糖、蛋白、无机元素等多种活性成分，具有抗运动性疲劳 [3]、免疫调节 [1]、抗血管新生 [4]、抗肿瘤 [5]、改善认知障碍 [6]、抗氧化 [7]、抗炎 [8] 等多种活性。

米糠脂肪烷醇主要来源于米糠油脂，是以米糠为原料制的米糠蜡，经皂化、提取、过滤等工艺制成的十二个碳原子以上蜡状固体的饱和一元醇，其主要成分为二十八碳脂肪烷醇、三十碳脂肪烷醇、三十二碳脂肪烷醇，并于 2017 年列入新资源食品原料目录 [9]。其中二十八碳脂肪烷醇作为国际上公认的缓解体力疲劳的物质 [10]，具有增强机体耐力、缓解机体疲劳、升高机体基础代谢率、增强免疫力、提高反应灵敏度、降血脂等多种功效 [11]。

本研究的目的是探索林下山参联合米糠脂肪烷醇的抗疲劳攻效，及其抗疲劳可能的作用机制与药效物质基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性小鼠，体重为 18 ～ 22 g [北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2021-0006]。SPF 级 SD 雄性大鼠，体重为 180 ～ 220 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010]。

1.2 试药

林下山参 [辽宁上药好护士药业（集团）有限公司，批号：2021070]，米糠脂肪烷醇（北京山青医药技术有限公司，批号：MKWC-2020080901）。

以林下山参与米糠脂肪烷醇比例为 50∶3 为原料自制成混合物。乳酸检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒、糖原检测试剂盒、5-羟色胺检测试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司），乙腈、甲酸（色谱纯，ThermoFisher Scientific），无水乙醇（分析纯，天津大茂化学试剂厂），纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。对照品人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Rg_1（批号分别为 110704-202230、110703-202235，中国食品药品检定研究院，纯度均＞ 93%）。

1.3 仪器

UltiMate 3000-Q-Orbitrap（美国 Fisher 公司）：配有 UltiMate 3000 超高效液相色谱仪、Q-Exactive 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱仪、DAD 检测器、Xcalibur 质谱工作站；BSA2202S 电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；KQ5200E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm，Water 公司）。

2 方法

2.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳协同增效研究

2.1.1 小鼠负重游泳实验 取小鼠分为空白对照组（生理盐水）、米糠脂肪烷醇组（10 ～ 120 mg•kg^{-1}）、林下山参组（25 ～ 800 mg • kg^{-1}）、林下山参联合米糠脂肪烷醇（林下山参：42.5 ～ 480 mg • kg^{-1}；米糠脂肪烷醇：2.5 ～ 40 mg • kg^{-1}），每组 6 只。小鼠每日灌胃 1 次，灌胃体积约为 0.3 mL/20 g，连续灌胃 30 d，每周进行两次时长约为 10 min 的游泳训练。末次灌胃 0.5 h 后，在各组小鼠尾根部负荷 5% 体重的铅皮，并将各组小鼠依次置于水温为（25±1）℃ 的自制游泳箱中游泳。观察各组小鼠游泳状况并记录小鼠自游泳开始至力竭的时间（水淹没鼻尖至再次浮出水面超过 10 s），即为小鼠力竭游泳时间。

2.1.2 组合效应系数（combination index，*CI*）计算 通过文献方法 [12] 评估林下山参配伍米糠脂肪烷醇的配伍增效作用，*CI* 值计算方程如下。

$$D = D_m \times f_a / (1 - f_a)^{1/m} \quad (1)$$

$$CI = D_{1x}/D_1 + D_2/D_{2x} + \alpha \times D_1 \times D_2 / (D_{1x} \times D_{2x}) \quad (2)$$

方程（1）中 D 是给药剂量（mg • kg^{-1}）；D_m 相当于 ED_{50}（mg • kg^{-1}）；f_a 是相对空白对照组效应百分率（%）。方程（2）中 D_{1x} 和 D_{2x} 分别代表单独给药米糠脂肪烷醇剂量（mg • kg^{-1}）和林下山参剂量（mg • kg^{-1}）；D_1 和 D_2 分别代表两个药物配伍组合中的米糠脂肪烷醇剂量（mg • kg^{-1}）和林下山参剂量（mg • kg^{-1}）。α 是系数，如果两个药是排他性作用，则 $\alpha = 0$；如果两个药是非排他作用，则 $\alpha = 1$。ED_{50} 采用四参数 Logistic 拟合计算。

2.2 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物抗疲劳功效研究

2.2.1 小鼠负重游泳实验 取小鼠 50 只，分为 5 组，每组 10 只，分别为空白对照组（生理盐水），阳性药对照组（红景天 0.87 g • kg^{-1}，按药典人用剂量折算），林下山参米糠联合米糠脂肪烷醇混合物高剂量组（0.36 g • kg^{-1}）、中剂量组（0.18 g • kg^{-1}）和低剂量组（0.09 g • kg^{-1}）。其他同“2.1.1”项下方法操作。

2.2.2 小鼠血浆中乳酸和尿素氮的测定 负重游泳小鼠吹干后休息恢复 0.5 h，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，沿腹中线解剖小鼠，找到并分离出腹主动脉，用注射器从腹主动脉抽取血液，于 4 ℃以 4000 r • min^{-1} 离心 10 min，分离得到血浆，－ 80 ℃储存备用。后严格按照试剂盒的操作流程，测定各小鼠血浆中的乳酸和尿素氮的浓度。

2.2.3 活性指标检测 小鼠腹主动脉采血后，解剖摘取肝脏、骨骼肌以及脑组织，用预冷的生理盐水冲洗，用滤纸吸干水分后精密称取重量。严格按照试剂盒的操作流程，测定各小鼠的肝糖原、肌糖原和脑组织中 5-羟色胺的含量。

2.3 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 检测林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物中的主要化学成分及入血成分

2.3.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物提取液的制备 参考文献中的人参皂苷和米糠脂肪烷醇可溶解的溶剂 [13-14]，确定采用 95% 乙醇（主要提取米糠脂肪烷醇）和 50% 乙醇（主要提取人参皂苷）分步提取。称取林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物粉末 2 g，置于锥形瓶中，先加入 10 倍量的 95% 乙醇，超声（功率 200 W，频率 40 kHz）提取 30 min，残渣再用 10 倍量的 50% 乙醇，超声（功率 200 W，频率 40 kHz）提取 30 min。合并提取液后，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液注入液质分析。

2.3.2 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物含药血浆样品制备 取 60 g 的混合物粉末，用 600 mL 95% 乙醇超声提取 30 min 后，残渣再用 600 mL 50% 乙醇超声（功率 200 W，频率 40 kHz）提取 30 min。合并提取液后，60 ℃旋转蒸发法至一定体积，加入 0.5%CMC-Na 溶液，混匀，配成 50 mL 生药浓度为 0.6 g • mL^{-1} 混悬液。

大鼠首次灌胃 5 mL 药物混悬液，间隔 2 h 后灌胃第二次，于第二次灌胃结束后 0.5、1、1.5、

2 h，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后，腹主动脉采血，空白对照组随行给予生理盐水。采用文献血样品处理方法 [15]，将收集的各时间点血液样品合并，于 4 ℃以 4000 r • min^{-1} 离心 10 min，分离得到血浆后，加入同体积冰乙腈，涡旋 2 min，于 4 ℃下以 8000 r • min^{-1} 离心 10 min。吸取上清液，氮气吹干后，用甲醇复溶，于 4 ℃下以 10 000 r • min^{-1} 离心 10 min。取上清液，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液注入液质分析。空白血浆处理方法同上。

2.3.3 色谱条件 色谱柱：ACQUITY BEH C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 0.5 min，85%B；0.5 ～ 1 min，85%→ 80%B；1 ～ 6 min，80%B；6 ～ 13 min，80%→ 70%B；13 ～ 23 min，70%→ 65%B；23 ～ 24 min，65%→ 62%B；24 ～ 27 min，62%→ 40%B；27 ～ 31 min，40%→ 5%B；31 ～ 32 min，5%→ 85%B；32 ～ 35 min，85%B）；柱温 40 ℃；流速 0.45 mL • min^{-1}；进样量 2 μL（血浆样品为 5 μL）。

2.3.4 质谱条件 采用电喷雾电离源（HESI），正、负离子检测模式；质量扫描范围 *m/z* 100 ～ 1500；喷雾电压＋ 3.8 kV（正离子模式）、－ 3.2 kV（负离子模式）；鞘气压力 35 Pa；辅助气压力 15 Pa；辅助气温度 300 ℃；离子传输管温度 350 ℃；采用 Full MS/dd-MS^2 扫描模式，Full MS 分辨率 70 000，dd-MS^2 分辨率 17 500；碰撞能量 20、40、60 eV。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物主要入血成分作用靶标的预测 将经 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 液质联用解析所得主要入血成分的二维结构用 ChemDraw 绘制并保存为 .sdf 格式。进而运用 MedChem Studio 软件，依据化合物结构相似性的特点，与 DrugBank 数据库中已知靶点明确的小分子进行相似性打分，获取主要入血成分的潜在的作用靶标（人源）。为保障预测结果的可靠性，相似性打分的临界值设定为 0.6。

2.4.2 与疲劳相关的已知疾病靶标的收集 以“fatigue”为英文关键词，以在线人类孟德尔遗传数据库（OMIM）为疾病靶标的背景数据库，检索与疲劳相关的人源基因，获取与疲劳相关的已知疾病靶标。

2.4.3 蛋白 - 蛋白相互作用（PPI）网络构建 将林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物主要入血成分的潜在作用靶标与疾病靶标取交集，获得重复靶标。去重复后，将成分潜在作用靶标和疾病靶标导入到 String 数据库，种属选择“Homo Sapiens”进行 PPI 分析，默认的置信度为 0.4，获取 PPI 关系。将 PPI 导入到 Cytoscape 3.6.0 版本，采用 Network Analysis 插件进行拓扑结构特征值的计算，主要包括 Degree Centrality（DC）、Betweenness Centrality（BC）、Closeness Centrality（CC）。选取 DC、BC、CC 均大于相应中位数的节点作为关键靶标，进而得到关键靶标的核心网络关系。

2.4.4 关键靶标功能与通路富集分析 将关键靶标导入到 DAVID 6.8 数据库，背景选择人源，提交关键基因列表，获取关键靶标功能 [主要包括细胞组成（CC）、分子功能（MF）和生物过程（BP）] 与通路富集分析（KEGG）结果，明确基因在每个生物学过程中可能发挥的作用和药理机制。经筛选获得林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物抗疲劳过程的潜在关键通路，并运用 Cytoscape 3.6.0 绘制“主要成分 - 关键靶标 - 关键通路”相互作用网络，将林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物的生物学效应进行可视化展示。

2.5 统计学方法

ED_{50} 四参数 Logistic 拟合采用 JMP 11.0.0 软件计算，抗疲劳效分析采用 GraphPad Prism 9.0.0 统计学软件进行处理。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳协同增效研究

3.1.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇的排他性研究 方程（1）两侧取对数，分别绘制 2 个药单用和配伍给药的剂量 - 效应百分率线性拟合图。如图 1A 所示，3 条给药的剂量 - 效应线性拟合线有相交的趋势，这表明两个药的配伍组合效应作用可能属于排他性机制 [12]，因此计算 *CI* 值时，α 设置为 0。

3.1.2 林下山参联合米糠脂肪烷醇的协同增效研究 如图 1B 所示，在 f_a 小于 10% 时（图中第 1 个点），计算 *CI* 值为 0.84，显示两者有轻微的协同增效作用。f_a 在 30% ～ 80% 时（图中第 2 ～ 5 点），显示林下山参与米糠脂肪烷醇配伍具有中等协同增效作用（*CI* 在 0.6 ～ 0.8）[12]。这说明两者配伍具有合理性。

3.2 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物的抗疲劳功效

3.2.1 林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物对小鼠力竭游泳时间的影响 如图 2A 所示，与空白对

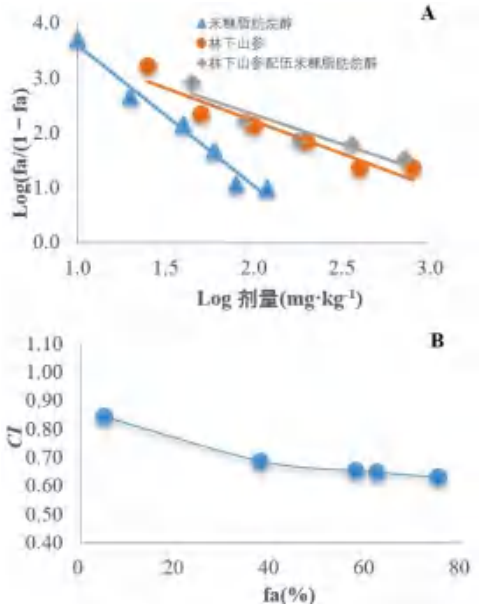


图 1　林下山参联合米糠脂肪烷醇的排他性（A）及 *CI* 关系（B）

Fig 1　Exclusive compatibiliy（A）and *CI*（B）of effect of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol

照组相比，混合物中剂量组和高剂量组小鼠力竭游泳时间显著延长（$P < 0.05$），且具有一定的剂量依赖性，说明林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物具有缓解负重游泳小鼠疲劳的功效。

3.2.2　其他体内药效指标测定结果　如图 2B ～ F 所示，相较于空白对照组，林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物低、中、高三个剂量组小鼠游泳后血浆乳酸和尿素氮含量均有所下降，肝糖原和肌糖原含量均有所升高，脑组织中 5- 羟色胺含量有所降低（见图 2），在中、高剂量组差异具有统计学意义。说明林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物具有降低血浆中尿素氮和乳酸、增加肝糖原和肌糖原含量和降低脑中 5- 羟色胺含量的作用，从而提高机体耐力，起到抗疲劳的作用。

3.3　林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物化学成分及入血成分解析

如表 1 所示，从混合物中共鉴定了 21 个主要化学成分，均来自于林下山参，其中 9 个成分能

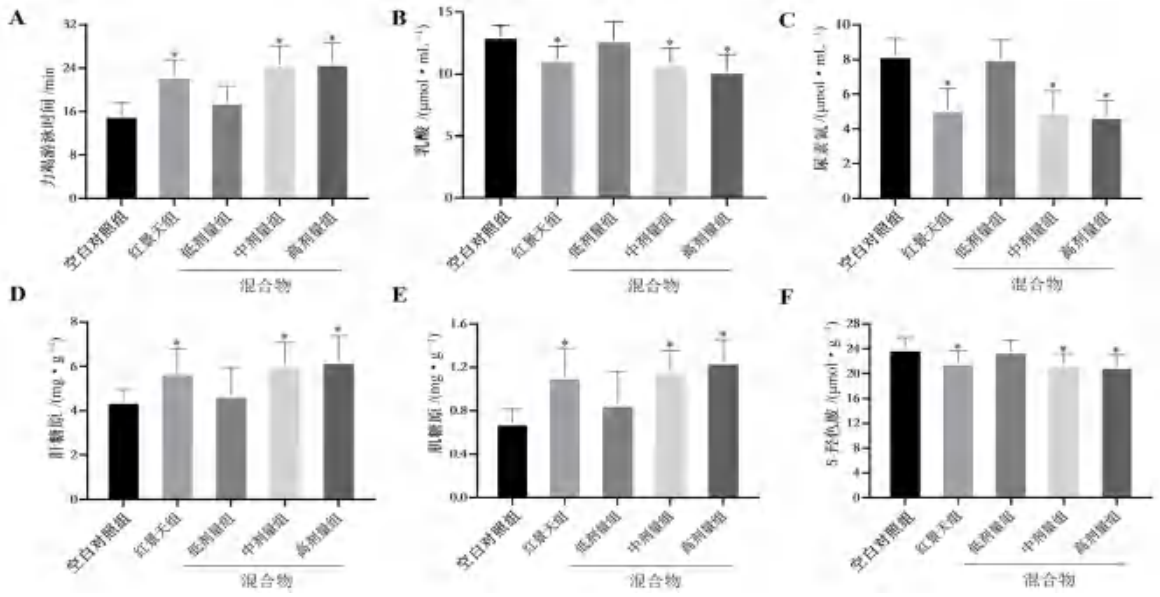


图 2　林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物的抗疲劳功效

Fig 2　Anti-fatigue effect of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol

够吸收入血。而米糠脂肪烷醇的 3 个主要成分在质谱上无响应，推测该类成分浓度低未检出。可能的原因是这类成分在 95% 乙醇溶液中溶解性不好，另外，这类成分不适合用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 液质联用技术分析，适合用气相色谱结合软电离的方式检测。鉴于此，后续网络药理学分析中，我们在 9 个入血成分的基础上，加入米糠脂肪烷醇的 3 个主要成分（二十八碳脂肪烷醇、三十碳脂肪烷醇、三十二碳脂肪烷醇）进行预测，以提高预测结果的全面性和准确性。

3.4　网络药理学作用机制解析

3.4.1　林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物成分潜在靶标预测结果　根据 12 个化合物的二维结构信息，预测得到 243 个林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物成分潜在靶标。

3.4.2　疲劳相关的疾病靶标　通过 OMIM 数据库检索，获得 57 个疲劳相关的疾病靶标。

3.4.3　网络构建与分析　去重复后，得到 295 个靶标并提交到 String 数据库。经 String 数据库分析后共导出 1992 对相互作用关系。将 1992 对相互作用关系导入到 Cytoscape 3.6.0，计算每个节点在该相互作用网络中的拓扑结构特征值，选取同时

表 1　林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物化学成分及入血成分 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 解析

Tab 1　Identification of chemical constituents and absorbed components of mountain cultivated ginseng and rice bran fatty alkanol by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS

No.	保留时间 / min	电离模式	理论值	实测值	误差 / $\times10^{-6}$	分子式	碎片离子	鉴定结果	吸收入血
1	5.41	$[M+HCOO]^-$	1007.5421	1007.5430	0.888	$C_{48}H_{82}O_{19}$	961.5384，799.4913，637.4302，475.3774	人参皂苷 Re_2	否
2	5.52	$[M+HCOO]^-$	1007.5421	1007.5435	1.374	$C_{48}H_{82}O_{19}$	961.5384，799.4913，637.4302，475.3774	人参皂苷 Re_3	否
3	6.07	$[M+HCOO]^-$	933.5340	977.5324	0.848	$C_{47}H_{80}O_{18}$	931.5276，799.4827，191.0562	人参皂苷 Noto-R_1	否
4	8.09	$[M+HCOO]^-$	845.4893	845.4913	2.386	$C_{42}H_{72}O_{14}$	845.4919，799.4849，637.4320，475.3821，161.0456	人参皂苷 Rg_1*	是
5	8.60	$[M+HCOO]^-$	991.5472	991.5491	1.865	$C_{48}H_{82}O_{18}$	945.5439，783.4932，637.4333，475.3794	人参皂苷 Re	是
6	11.41	$[M+HCOO]^-$	887.5000	887.5007	0.927	$C_{44}H_{74}O_{15}$	841.4940，781.4748，619.4200，161.0454	人参皂苷 6’-acetyl-Rg_1	否
7	14.06	$[M+HCOO]^-$	845.4893	845.4910	2.031	$C_{42}H_{72}O_{14}$	799.4857，637.4333，475.3797	人参皂苷 Rf	是
8	14.98	$[M+HCOO]^-$	815.4787	815.4807	2.333	$C_{41}H_{70}O_{13}$	769.4748，637.4352，475.3789，161.0463	三七皂苷 R_2	否
9	15.87	$[M+HCOO]^-$	1285.6423	1285.6427	0.309	$C_{59}H_{100}O_{27}$	1239.6373，1107.5769，459.3831	人参皂苷 Ra_3	否
10	15.89	$[M+HCOO]^-$	829.4944	829.4965	2.486	$C_{42}H_{72}O_{13}$	783.4908，637.4315，475.3788，161.0450	人参皂苷 Rg_2	否
11	16.01	$[M+HCOO]^-$	1153.6000	1153.6008	0.681	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1107.5962，945.5328，783.4839，179.0563	人参皂苷 Rb_1*	是
12	16.82	$[M-H]^-$	1193.6019	1193.5966	−3.579	$C_{50}H_{98}O_{31}$	1149.6068，1107.5963，945.5394	丙二酰人参皂苷 Rb_1	否
13	16.86	$[M+HCOO]^-$	1123.5894	1123.5909	1.300	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1077.5852，783.4816，621.4368	人参皂苷 Rc	是
14	17.54	$[M+HCOO]^-$	683.4361	683.4361	−0.569	$C_{36}H_{62}O_9$	637.4327，475.3793，405.0987，161.0451	人参皂苷 Rh_1	否
15	17.59	$[M+HCOO]^-$	1123.5894	1123.5906	0.979	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1077.5851，783.4852，621.4316	人参皂苷 Rb_2	是
16	17.86	$[M-H]^-$	955.4908	955.4891	−0.593	$C_{48}H_{76}O_{19}$	955.4913，793.4380，569.3845，455.3530	人参皂苷 Ro	是
17	17.99	$[M+HCOO]^-$	1123.5894	1123.5902	0.650	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1077.5845，783.4919，621.4359	人参皂苷 Rb_3	是
18	18.31	$[M-H]^-$	1193.5950	1193.5933	−1.390	$C_{57}H_{94}O_{26}$	1089.5840，945.5439，783.4905，621.4376	人参皂苷 M-Rb_1	否
19	18.72	$[M-H]^-$	1163.5844	1163.5824	−1.714	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5947，1077.5841，945.5411	人参皂苷 M-Rb_2	否
20	19.60	$[M+HCOO]^-$	991.5472	991.5430	−4.227	$C_{48}H_{82}O_{18}$	945.5433，783.4897，621.4370，161.0453	人参皂苷 Rd	是
21	20.78	$[M-H]^-$	1031.5432	1031.5398	2.224	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5535，945.5431，927.5325	丙二酰人参皂苷 Rd	否

注（Note）：*通过对照品比对（*Comparison by reference substances）。

满足 DC ＞ 11、BC ＞ 0.002 476、CC ＞ 0.367 292 的节点，共获得 97 个关键靶标，包括 89 个林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物成分靶标，6 个疾病靶标和 2 个成分与疾病共有靶标。

将 97 个关键靶标输入到 DAVID 数据库，进行 GO 和 KEGG 预测分析。选取差异具有统计学意义（P ＜ 0.05）的前 10 条注释列表和前 10 条通路列表用于机制分析，发现关键核心靶点参与到多个生物学反应过程，主要包括神经系统调控、心肌收缩以及离子通道运输等。

BP 指的是基因产物组成的生物学过程和途径。由图 3A 可以看出，关键靶标基因的产物主要调控的生物学途径包括钙离子跨膜运输、细胞呼吸、平滑肌细胞增殖等。CC 指的是基因产物在亚细胞水平上的定位。由图 3B 可以看出，关键靶标基因的产物主要定位于电压门控钙通道复合体、线粒体内膜、细胞质等。MF 指的是基因产物的分子活性。由图 3C 可以看出，关键靶标基因的产物主要聚集在钙离子通道活性、RNA 聚合酶Ⅱ转录因子活性、血红素结合等。经 KEGG 通路富集分析，筛选得到差异具有统计学意义的排名前 10 的通路，如图 3D 所示。分析发现，关键核心靶标主要聚集的通路主要分布在神经信号传导（serotonergic synapse、inflammatory mediator regulation of TRP channels、cholinergic synapse、circadian entrainment）、心肌收缩（cardiac muscle contraction、renin secretion、adrenergic signaling in cardiomyocytes、vascular smooth muscle contraction）、离子通道运输（calcium signaling pathway、thermogenesis）等 3 个模块，如图 4 所示。

4　讨论

本文首先以小鼠负重游泳实验为功效模型，采用 *CI* 方法评估发现林下山参联合米糠脂肪烷醇具有抗疲劳协同增效作用。小鼠功效实验表明林下山参联合米糠脂肪烷醇可延长小鼠游泳时间，降低血浆中尿素氮、乳酸的含量和脑组织 5-羟色胺的含量，可升高肝糖原和肌糖原的储备水平，表明两者联用具有一定的抗疲劳功效。而后，通过成分分析、入血成分分析及网络药理学的方法进一步揭示了林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物抗疲劳的作用成分和潜在作用机制，发现林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物主要通过调控

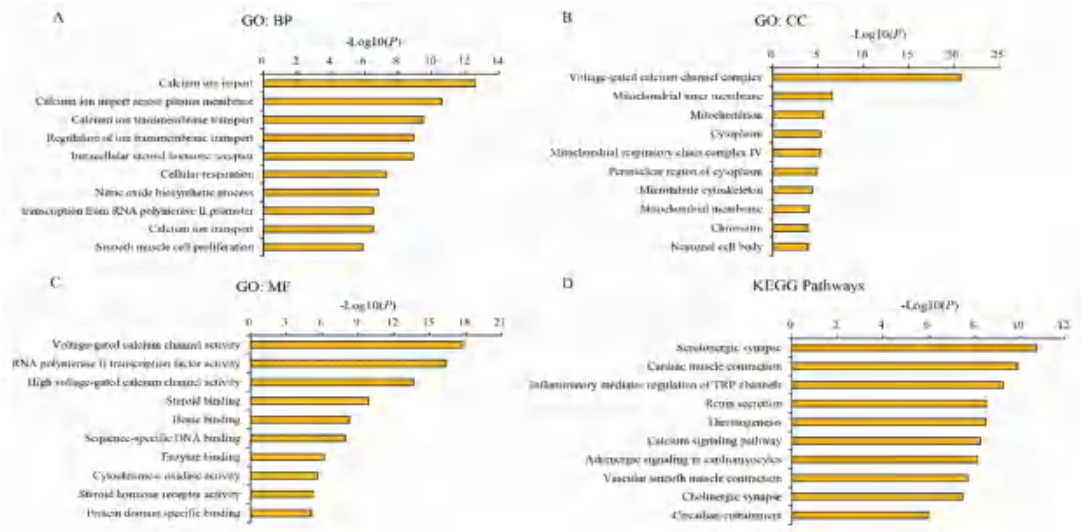


图 3　关键靶标的基因功能注释和通路富集分析结果

Fig 3　GO term performance and pathway enrichment analysis of the major hubs

A. 基因功能注释：生物学过程 [GO term performance：biological process（BP）]；B. 基因功能注释：亚细胞水平定位 [GO term performance：cellular component（CC）]；C. 基因功能注释：分子功能 [GO term performance：molecular function（MF）]；D. KEGG 通路富集（pathway enrichment analysis by KEGG）

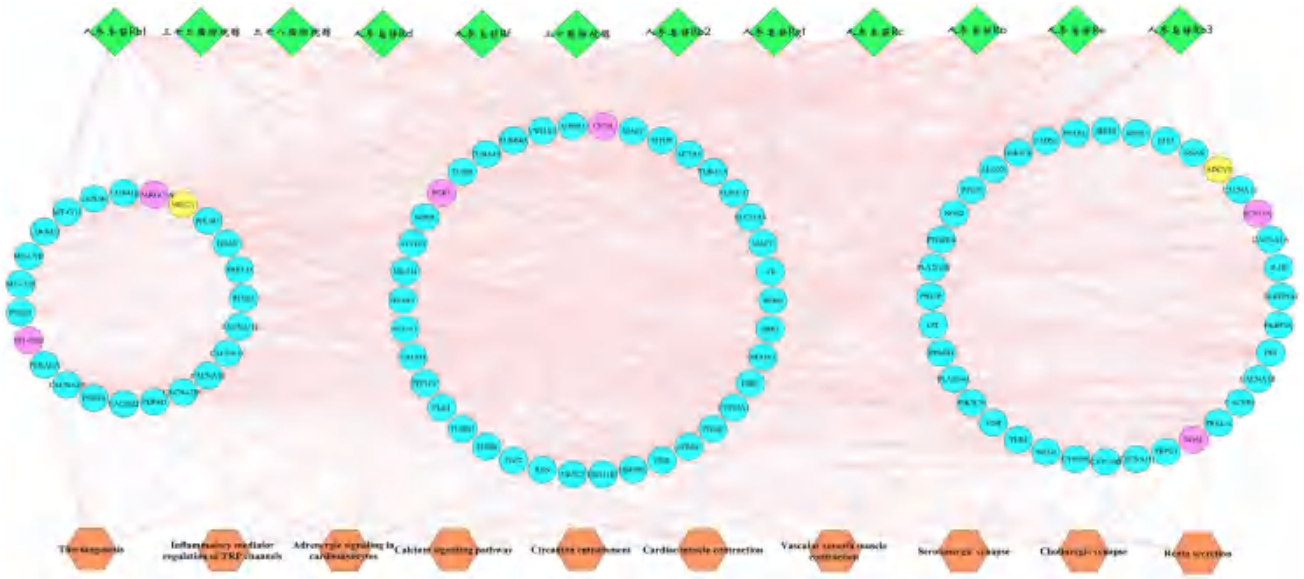


图 4　“成分 - 靶标 - 通路”关系网络图

Fig 4　“Chemicals-Targets-Pathways”network

Serotonergic synapse 通路发挥抗疲劳作用（见图 5），与药效结果中 5- 羟色胺给药处理后含量降低结果一致，其主要作用靶标为 VGCC、ADCY5、HRAS、PRKACA 和 PLA2G4A，主要活性成分为人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rb_1、人参皂苷 Rb_2、人参皂苷 Rb_3、三十二碳脂肪烷醇、三十碳脂肪烷醇和二十八碳脂肪烷醇。

5- 羟色胺是脑内广泛存在的一种抑制性神经递质，其在由耐力运动导致的中枢疲劳过程中发挥着关键作用 [16-17]。大脑中 5- 羟色胺含量升高，会诱导中枢疲劳 [18]。不同人群对 5- 羟色胺的转运能力与适应能力存在差异，从而导致中枢疲劳程度感知差异 [19]。另外临床研究表明，中枢系统中 5- 羟色胺含量及受体敏感性会改善术后中枢疲劳的发生率 [17]。目前，关于中药可通过干预 5- 羟色胺相关通路发挥抗疲劳作用已有相关文献报道，如仙鹤草 [20]、人参养荣汤 [21]、黄精多糖 [22]、海豹油软胶囊 [23] 等。因此，结合网络药理学、文献分析及实验研究，林下山参联合米糠脂肪烷醇混合物可能通过调控 5- 羟色胺相关通路发挥抗疲劳作用。后续我们将结合系统的分子生物学实验来验证具体的调控基因或蛋白，深入阐明混合物作用于 5- 羟色胺相关通路的调控机制及靶点。

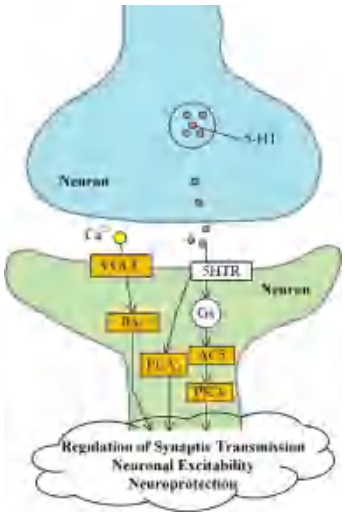


图 5　Serotonergic synapse 通路

Fig 5　Serotonergic synapse pathway

注（Note）：橙黄色标记靶点为主要作用靶标（Targets with yellow highlights are main targets）。

参考文献

[1] 文涛，王文思，杨鸿武，等 . 林下山参冻干粉对小鼠的免疫调节作用 [J]. 中国卫生检验杂志，2019，29（18）：2181-2184.

[2] 常相伟，赵颖，李德坤，等 . 林下山参化学成分及鉴别评价研究进展 [J]. 中草药，2016，47（11）：1982-1991.

[3] 郑超楠，南极星，郭建鹏，等 . 林下山参水提液缓解运动性疲劳的研究 [J]. 食品工业科技，2012，33（18）：352-354.

[4] Kim JS，Yoo JM，Park JE，et al. Anti-angiogenic effect of mountain ginseng in vitro and in vivo：comparison with farm-cultivated ginseng [J]. Mol Med Rep，2021，24（2）：615.

[5] Kim J，Yoo JM，Kim JS，et al. Anticancer effect of mountain ginseng on human breast cancer：comparison with farm-cultivated ginseng [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：2584783.

[6] Tu TT，Sharma N，Shin EJ，et al. Treatment with mountain-cultivated ginseng alleviates trimethyltin-induced cognitive impairments in mice via IL-6-dependent JAK2/STAT3/ERK signaling [J]. Planta Med，2017，83（17）：1342-1350.

[7] Kim YJ，Lee Y，Kim J，et al. Physicochemical characteristics and anti-oxidant activities of farm-cultivated and mountain-cultivated ginseng seeds [J]. Food Sci Biotechnol，2018，27（5）：1257-1264.

[8] Kim TH，Ku SK，Lee IC，et al. Anti-inflammatory effects of kaempferol-3-*O*-sophoroside in human endothelial cells [J]. Inflamm Res，2012，61（3）：217-224.

[9] 陈丽娥，董晓尉，徐广伟，等 . 米糠脂肪烷醇中高级脂肪烷醇检测方法的研究 [J]. 食品安全导刊，2021，20：66-68，73.

[10] 李金岭 . 米糠脂肪烷醇及其在运动饮料中的应用展望 [J]. 粮食与饲料工业，2018（2）：12-15.

[11] 李赫宇，王钰，张东星，等 . 气相色谱法测定米糠脂肪烷醇中二十八烷醇和三十烷醇的含量 [J]. 食品研究与开发，2020，41（11）：179-183.

[12] 潘福璐，冀艳华，于国华，等 . 茶多酚与 α- 葡萄糖苷酶结合动力学特征研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（18）：4472-4481.

[13] 陈肇娜，吴丽荣，李丝红 . 超声提取法测定三七片中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量 [J]. 海峡药学，2022，34（9）：54-56.

[14] 袁莉，李曹慧，李立军，等 . 从米糠蜡中提取二十八烷醇和三十烷醇混合物 [J]. 湖南理工学院学报（自然科学版），2022，35（4）：18-22.

[15] 陈洪娇，杨文宁，尹仁芳，等 . 基于序贯代谢方法的痛风定胶囊体内代谢分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（24）：160-170.

[16] 程明晨，季苇 . 5- 羟色胺与多巴胺的关系及对运动疲劳的影响 [J]. 当代体育科技，2016，6（12）：159-160.

[17] 张蕴琨 . 运动性中枢疲劳的影响因素及其机制研究进展 [J]. 体育科研，2013，34（3）：33-40.

[18] Meeusen R，Watson P，Hasegawa H，et al. Central fatigue：the serotonin hypothesis and beyond [J]. Sports Med，2006，36（10）：881-909.

[19] Maluchenko NV，Schegolkova JV，Kulikova MA，et al. Gender effects on association of serotonin transporter gene polymorphism with symptoms of central fatigue [J]. Bull Exp Biol Med，2009，147（4）：462-465.

[20] 康林之，罗云，邵峰，等 . 仙鹤草不同提取物对小鼠运动性疲劳及耐缺氧能力的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（19）：2094-2097.

[21] 陈楚杰，潘华山，赖秋媛，等 . 人参养荣汤对大鼠运动中枢性疲劳的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2019，36（5）：719-723.

[22] 李明 . 黄精多糖对运动疲劳大鼠抗氧化及神经递质的影响 [J]. 食品科技，2014，39（9）：227-230.

[23] 于雪，向飞军，张谨 . 海豹油软胶囊抗慢性疲劳作用机制初步研究 [J]. 中草药，2012，43（10）：2017-2019.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-06）

恩格列净片的体外溶出行为一致性评价研究

王晶萍[1, 2]，夏颖[1*]，李耕[1]，严菲[1]，陈民辉[1*]，冯芳[2]（1.江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；2.中国药科大学，南京 211198）

摘要：目的 建立恩格列净片的溶出度测定方法，并通过相似因子 f_2 法评价仿制制剂与参比制剂的溶出曲线相似性。**方法** 色谱柱为 Agilent Zorbax RX-C8（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为水 - 乙腈 - 三氟乙酸（70∶30∶0.05），流速为 1.5 mL • min^{-1}，检测波长为 275 nm。4 种溶出介质分别为 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水，溶出介质体积为 900 mL，采用桨法，转速为 50 r • min^{-1}，分别测定恩格列净片的溶出曲线，并比较仿制制剂与参比制剂体外溶出行为的相似性。**结果** 方法学验证结果均符合检测要求。12 批恩格列净片仿制制剂与参比制剂在 4 种溶出介质中的溶出行为均相似。**结论** 本研究为恩格列净片溶出曲线测定的方法选择提供了思路，同时也为恩格列净片的质量一致性评价提供参考。

关键词：恩格列净片；高效液相色谱法；溶出曲线；相似性；一致性评价
中图分类号：R927，R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2362-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.016

Consistency of dissolution behaviors of empagliflozin tablets in vitro

WANG Jing-ping[1, 2], XIA Ying[1*], LI Geng[1], YAN Fei[1], CHEN Min-hui[1*], FENG Fang[2] (1. *Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing* 210019; 2. *China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198)

Abstract: Objective To establish a method to determine the dissolution of empagliflozin tablets, and to evaluate the similarity of dissolution curves of mimetic and reference preparations by f_2 factor. **Methods** Chromatographic column was Agilent Zorbax RX-C8 (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was water-acetonitrile-trifluoroacetic acid (70∶30∶0.05), the flow rate was 1.5 mL • min^{-1}, and the wavelength was 275 nm. The dissolution media were hydrochloric acid solution (pH 1.0), acetate buffer (pH 4.5), phosphate buffer (pH 6.8) and water. Paddle method was used with the volume of dissolution media at 900 mL and rotating speed at 50 r • min^{-1}. The dissolution curves of empagliflozin tablets were measured, respectively. The similarity of in vitro dissolution behaviors of mimetic and reference preparations was compared. **Results** The methodology validation met the detection requirements. The dissolution behavior of 12 batches of empagliflozin tablets in four dissolution media were similar to those of reference preparation. **Conclusion** This study provides ideas for the selection of dissolution curve determination methods of empagliflozin tablets, and a reference for their quality consistency evaluation.

Key words: empagliflozin tablet; HPLC; dissolution curve; similarity; consistency evaluation

恩格列净是一种钠葡萄糖共转运体 2（SGLT-2）的抑制剂，它不同于传统降糖药均集中在提高内源性胰岛素分泌或提高机体周围组织胰岛素抵抗的作用机制，而是一类作用机制独立于 β 细胞的非胰岛素依赖的新型口服降糖药，恩格列净通过抑制 SGLT-2 转运体有效减少肾脏对葡萄糖的重吸收，降低肾糖阈，促进尿糖排泄。除了降低血糖作用外，它还能减轻体重，改善内脏肥胖、

基金项目：2020 年度药品监管科学科研计划（No.202022）。

作者简介：王晶萍，女，在读硕士研究生，主要从事化学药品质量检验研究，email：1259564298@qq.com *通信作者：夏颖，女，主管药师，主要从事化学药品质量研究，email：953400276@qq.com；陈民辉，男，主任药师，主要从事化学药品质量标准，email：18912966990@189.cn

与代谢综合征相关的各种代谢异常及心血管疾病和肾脏并发症等，且恩格列净是目前选择性最好的 SGLT-2 抑制药。恩格列净片由美国礼来公司和德国勃林格殷格翰公司合作研发，2014 年 5 月 3 日欧盟委员会首次批准上市，2014 年 8 月 1 日获得美国食品药品监督管理局（FDA）的批准，2017 年获批进入中国市场，2020 年 7 月国内仿制药开始获批上市 [1-5]。恩格列净片作为口服给药途径的固体制剂，其活性成分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等，故恩格列净在体内的溶出和溶解对其吸收具有重要影响。

体外溶出度与溶出曲线作为药品生产企业控制药品质量及其生物利用度的重要指标，可间接反映药物在体内的溶出速率与程度。各国药典均未收载恩格列净片的溶出度测定方法，本研究参照国家药品监督管理局发布的《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》，结合药物本身性质建立溶出测定方法。传统溶出曲线考察通常耗时耗力，工作量巨大，试验中采用 DNS 全自动溶出仪，可实现溶出杯自动清洗、溶出介质自动注入、自动投样、自动取样、自动过滤，可以进行连续多批次样品的无人操作自动运行，实现了溶出度测试的全自动，可在夜间无人时进行操作，提高了工作效率。为了证明使用全自动溶出仪试验结果的可靠性，本研究对 SOTAX 自动溶出仪与 DNS 全自动溶出仪试验结果进行比较，并采用 DNS 全自动溶出仪对市售恩格列净片 4 个厂家的国产制剂各 3 批与原研制剂分别在 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水 4 种溶出介质中进行溶出曲线考察，为该品种仿制药质量和疗效一致性评价和改进提供参考依据 [6-11]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

RT-J3000 ＋ DS-3000 型全自动溶出仪（日本 DNS）；AT7 smart 型自动溶出仪（瑞士 SOTAX）；XA205 型电子分析天平（瑞士 METTLER TOLEDO）；1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent）；Vanquish 高效液相色谱仪（德国 Thermo）。

1.2 试药

恩格列净对照品（德国勃林格殷格翰，批号：0007；含量：99.9%）；恩格列净片参比制剂（规格：10 mg/ 片，A 厂，批号：101450）；恩格列净片仿制制剂（规格：10 mg/ 片，B 厂，批号：2112702、2201701、21087461；C 厂，批号：D211206K72、D211102K72、D210701K71；D 厂，批号：211025302、211109102、220113302；E 厂，批号：154211102、154220203、154211203）；盐酸、醋酸钠、冰醋酸、磷酸二氢钾和氢氧化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；三乙胺（色谱纯，阿拉丁）；磷酸（色谱纯，国药集团化学试剂有限公司）；乙腈（色谱纯，Merck）；超纯水，自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax RX-C8 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为水 - 乙腈 - 三氟乙酸（70∶30∶0.05）；流速为 1.5 mL•min^{-1}；检测波长为 275 nm；柱温为 40 ℃；进样量为 80 μL。在此色谱条件下，4 种不同溶出介质中理论板数按恩格列净峰计算均不低于 4000，拖尾因子均小于 1.5，分离度均大于 2。

2.2 溶出介质的配制

pH 1.0 盐酸溶液：量取盐酸 9 mL 溶解于 1000 mL 脱气纯化水中，搅拌均匀，即得；pH 4.5 醋酸盐缓冲液：精密称取乙酸钠 2.99 g，加水溶解，加入冰醋酸 1.596 mL，加水稀释至 1000 mL，搅拌溶解，摇匀，即得；pH 6.8 磷酸盐缓冲液：精密称取磷酸二氢钾 6.8 g 和氢氧化钠 0.94 g，加水稀释至 1000 mL，搅拌溶解，摇匀，即得；水：取纯化水，脱气，即得。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液 取恩格列净对照品约 55 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加水 - 乙腈（70∶30）溶解并稀释至刻度作为对照品储备液；精密量取对照品储备液 2 mL，置 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为各介质下对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 照溶出度与释放度测定法 [《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法]，分别以 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水各 900 mL 作为溶出介质，转速为 50 r•min^{-1}，依法操作，于 5、10、15、30 和 45 min 时取溶液适量（10 mL）滤过，并及时回补同体积溶出介质，弃去初滤液，取续滤液作为各介质下供试品溶液。

2.3.3 空白辅料溶液 按 E 厂家制剂处方的配比制备空白辅料溶液。

2.4 两种溶出仪的比较

取参比制剂分别用 AT7 smart 型 SOTAX 自动溶出仪和 RT-J3000 ＋ DS-3000 型 DNS 全自动溶出仪进行溶出曲线试验，参照“2.1”项下色谱条件及“2.3”项下方法制备溶出介质为 pH 6.8 磷酸盐缓冲液的对照品溶液和供试品溶液，计算各取样时间点的累积溶出量。两种溶出仪得出的溶出曲线比较图见图 1，结果显示无明显差异。

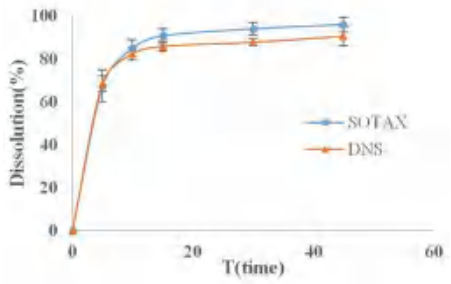


图 1　两种溶出仪测得恩格列净参比制剂在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的溶出曲线

Fig 1　Dissolution curves of reference preparation empagliflozin tablet measured by two dissolution instruments under the condition of pH 6.8 phosphate buffer solution

2.5　*方法学考察*

2.5.1　专属性试验　精密量取“2.3”项下溶出介质为 pH 6.8 磷酸盐缓冲液的对照品溶液、供试品溶液和空白辅料溶液各 80 μL，进样测定，记录色谱图，结果见图 2。供试品溶液主峰与对照品溶液主峰的保留时间一致，空白辅料对本品的主峰无干扰，专属性较好。

2.5.2　线性关系考察、定量限和检测限　精密量取“2.3.1”项下对照品储备液适量，用 4 种不同溶出介质分别配制成含恩格列净质量浓度约为 1.1、5.5、11、16.5、22、27.5、33 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液，并将配制的线性溶液逐步稀释，以信噪比 *S*/*N* ≈ 10 的溶液为定量限溶液（LOQ），*S*/*N* ≈ 3 的溶液为检测限溶液（LOD）。分别精密量取上述线性溶液各 80 μL，进样测定，记录色谱图，以峰面积（*y*）对溶液质量浓度（*x*）进行线性回归。结果恩格列净浓度在 1.0989 ～ 32.967 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，相关系数 *r* 均为 1.000（见表 1）。4 种溶出介质中的定量限质量浓度均为 110 ng • mL^{-1}，检测限质量浓度均为 33 ng • mL^{-1}，检测灵敏度符合检测要求。

2.5.3　精密度试验　取“2.3.1”项下对照品溶液连续进样 6 次，记录色谱图，计算峰面积的 *RSD*，结果 pH 1.0 盐酸溶液中的 *RSD* 为 0.60%，pH 4.5 醋酸盐缓冲液中的 *RSD* 为 0.20%，pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的 *RSD* 为 0.10%，水中的 *RSD* 为 0.20%，表明方法检测精密度符合要求。

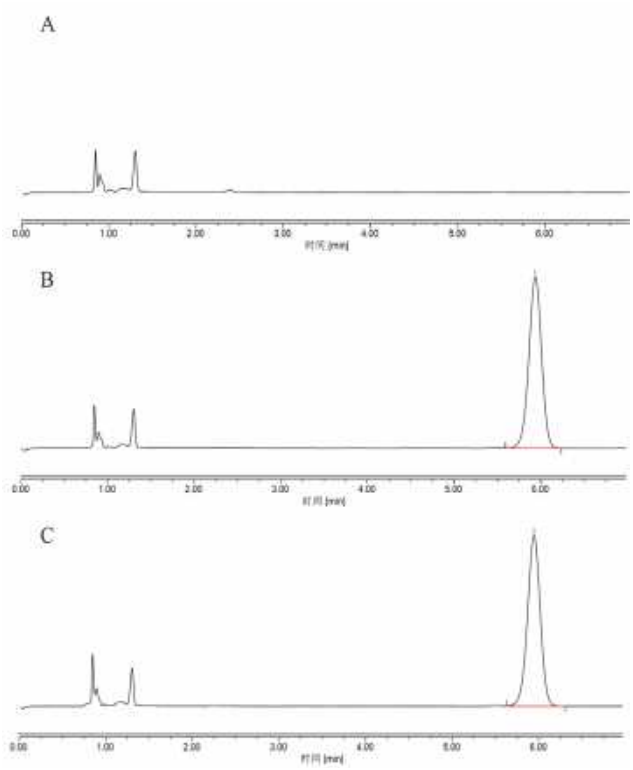


图 2　空白辅料（A）、恩格列净对照品溶液（B）和恩格列净片供试品溶液（C）色谱图

Fig 2　Chromatogram of blank（A），empagliflozin reference solution（B）and empagliflozin tablet sample solution（C）

表 1　恩格列净线性方程

Tab 1　Linear equation of empagliflozin

溶出介质	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	标准曲线方程	*r*
pH 1.0 盐酸溶液	1.0989 ～ 32.967	$y = 0.1919x - 0.0067$	1.000
pH 4.5 醋酸盐缓冲液	1.0989 ～ 32.967	$y = 0.1945x + 0.0082$	1.000
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	1.0989 ～ 32.967	$y = 0.1877x + 0.0091$	1.000
水	1.0989 ～ 32.967	$y = 0.1887x + 0.0049$	1.000

2.5.4　稳定性试验　取放置在室温条件下的 4 种介质的对照品溶液和供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 取样测定，计算峰面积的 *RSD* 均为 0.20%（$n = 6$）。由此判定对照品溶液和供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

2.5.5　回收试验　按恩格列净片标示含量的 50%、100%、150%，分别精密量取“2.3.1”项下对照品储备液 1、2、3 mL 置 100 mL 量瓶中，每个水平浓度各 3 份，每份中加入相当于 E 厂家制剂处方配比的空白辅料量，分别加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度，摇匀滤过，作为供试品溶液；因恩格列净在 4 种介质中的线性结果十分相似，为非 pH 依赖型，且药物本身溶解度高，故本试验只在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中进行加样回收试验。分别精密量取

上述溶液各 80 μL，进样测定，按外标法计算恩格列净片的回收率。结果不同浓度水平的恩格列净回收率均在 98.17% ～ 99.75%，回收率 *RSD* 均小于 1.0%（n = 3），表明该方法准确度良好。

2.5.6　滤膜吸附试验　取“2.3.2”项下供试品溶液，比较离心和弃去初滤液 1、2、4 和 6 mL 后的测定结果，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，考察滤膜吸附情况。结果显示弃去初滤液 2 mL 后基本无吸附，结果见表 2。此次试验中弃去初滤液体积为 8.5 mL。

表 2　滤膜吸附试验结果

Tab 2　Filter membrane adsorption test results

方法	主峰峰面积	与离心比较 /%
弃去初滤液 1 mL	1.9317	97.2
弃去初滤液 2 mL	1.9828	99.8
弃去初滤液 4 mL	1.9939	100.4
弃去初滤液 6 mL	1.9793	99.7
离心	1.9869	/

2.6　溶出曲线的绘制

取恩格列净片的 1 批参比制剂和 12 批仿制制剂，按“2.3.2”项下方法操作，计算各取样时间点的累积溶出量，并以时间（min）为横坐标，平均累积溶出度（%）为纵坐标绘制溶出曲线，结果见图 3 ～ 6。在 4 种介质中，B、C、D 厂的样品批间差异均较小，显示出其稳定的处方生产工艺，而在 4 种介质中 E 厂的 3 批样品中有一批次的最终溶出量均略低于其他两批次，说明该批次与其他批次存在一些差别。各介质中各厂家产品的最终溶出量有所不同，C 厂和 E 厂的最终溶出量均略高于 A、B、D 厂。不同的辅料会产生不同的影响，C 厂的制剂其辅料用量最少，对溶出量的影响最小；E 厂的用量与其他厂家一致，但其最终溶出量略高于 A、B、D 厂，说明其辅料对溶出量的影响较小。

2.7　溶出曲线的相似性评价

FDA 在 1999 年的口服固体药物生物利用度和生物等效性研究指南中首次推荐使用相似因子法来评价溶出度，其认为相似因子 f_2 可作为评价工艺和处方中辅料改变时制剂溶出曲线间的差异性评价参数，以及参比制剂与受试制剂间溶出曲线的差异性评价参数，被推荐为比较两条溶出曲线相似性的首选方法，故本研究在四种溶出介质中，对 4 个厂家的仿制制剂取 3 批与 1 批参比制剂进行溶出曲线比较，采用相似因子法计算各生产厂家制剂的相似因子 f_2，结果见表 3。结果表明，这 4 个厂家的仿制制剂与 A 厂的参比制剂在 pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水中的溶出行为均相似。

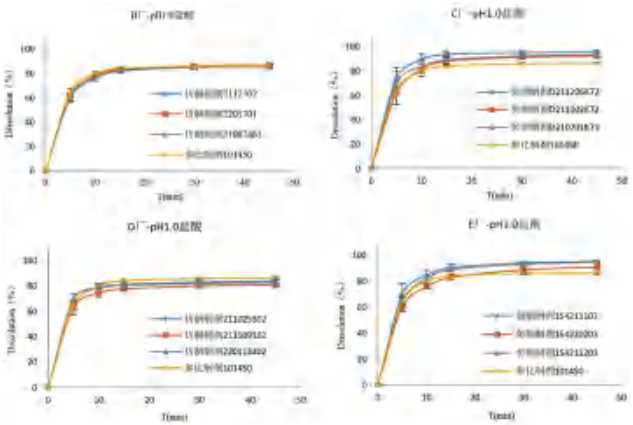


图 3　恩格列净片在 pH 1.0 溶出介质中的溶出曲线

Fig 3　Dissolution curve of empagliflozin tablets in pH 1.0 dissolution medium

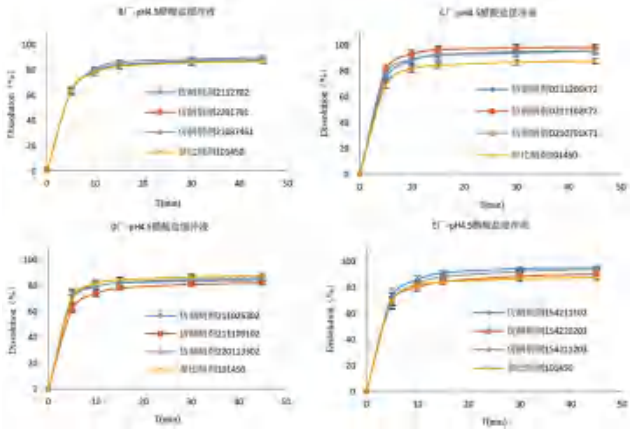


图 4　恩格列净片在 pH 4.5 溶出介质中的溶出曲线

Fig 4　Dissolution curve of empagliflozin tablets in pH 4.5 dissolution medium

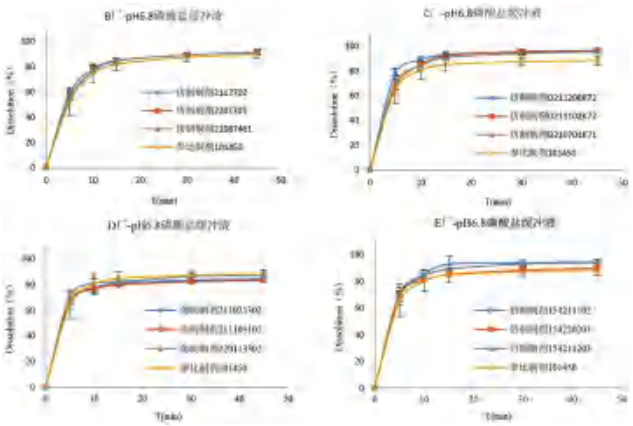


图 5　恩格列净片在 pH 6.8 溶出介质中的溶出曲线

Fig 5　Dissolution curve of empagliflozin tablets in pH 6.8 dissolution medium

3　讨论

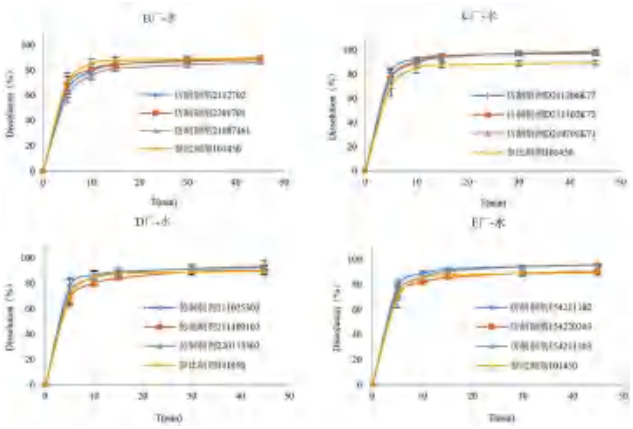


图 6　恩格列净片在水介质中的溶出曲线

Fig 6　Dissolution curve of empagliflozin tablets in water medium

本次试验对溶出转速（50 r • min $^{-1}$ 和 75 r • min $^{-1}$）进行考察，结果表明药物在转速为 50 r • min $^{-1}$ 时溶出行为明显慢于 75 r • min $^{-1}$，且 75 r • min $^{-1}$ 条件下药物在 5 min 时溶出量均在 85% 以上，50 r • min $^{-1}$ 的转速更具有区分力；糖尿病患者 80% 以上为中老年患者，胃动力较弱，故综合考虑选择 50 r • min $^{-1}$ 转速进行溶出曲线的研究。

D 厂家的样品在水中 45 min 溶出量略高于其他 3 种介质，说明酸碱度、离子强度会对其辅料产生一定的影响，影响最终的溶出量。其他 4 个厂家的制剂在 4 种溶出介质中的溶出曲线几乎一致，说明所用辅料对酸碱度、离子强度均不敏感，其产品在不同酸碱体内环境下有相同的溶出，为处方工艺改进提供参考。

表 3　各厂家仿制制剂的相似因子 f_2 结果

Tab 3　Similarity factor f_2 of mimetic preparations of various manufacturers

生产厂家	规格 /（mg/ 片）	批号	相似因子 f_2			
			pH 1.0 介质	pH 4.5 介质	pH 6.8 介质	水
B	10	2201701	82.8	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		2112702	73.2	67.7	60.6	64.0
		21087461	71.9	66.2	54.5	52.5
C	10	D211206K72	50.6	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		D211102K72	75.5	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		D210701K71	64.8	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
D	10	220113302	71.3	74.2	69.4	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		211025302	72.3	72.4	74.2	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		211109102	65.1	54.7	70.3	70.4
E	10	154220203	72.5	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		154211102	62.5	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）
		154211203	74.8	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）	$Q \geqslant 85\%$（15 min）

综上所述，采用 HPLC 测定恩格列净片的溶出度的方法切实可行，且在 4 种溶出介质中，恩格列净片仿制制剂与参比制剂的溶出曲线相似度均较好，体外溶出行为基本一致。

参考文献

[1] 付子康，李海英，李屏 . 钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂治疗 2 型糖尿病合并冠心病的研究进展 [J]. 中国全科医学，2022，25（12）：1493-1499.

[2] 唐玥，韩宇博，隋艳波，等 . 钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制药与代谢综合征的相关机制及临床研究状况 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（5）：471-475.

[3] Rizos CV，Filippatos TD，Elisaf MS. Pharmacokinetic drug evaluation of empagliflozin plus linagliptin for the treatment of type 2 diabetes [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2018，14（1）：117-125.

[4] Munir KM，Davis SN. Differential pharmacology and clinical utility of empagliflozin in type 2 diabetes [J]. Clin Pharmacol，2016，20（8）：19-34.

[5] 匡泽民，王聪水，余振球 . 新型降糖药物恩格列净 [J]. 新药述评及论坛，2017，26（10）：1097-1100.

[6] 黄美容，王欣，曹阳，等 . 腺苷钴胺胶囊仿制药与原研药的溶出度一致性评价 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（2）：187-191.

[7] 游隽，盛孔胜，黄萍 . 替吉奥仿制药与原研药的体外一致性评价 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（5）：604-608.

[8] 刘鑫洋，秦杰琛，董艳萍，等 . 非布司他片有区分力溶出度检测法的建立及溶出曲线相似性评价 [J]. 中国医药工业杂志，2022，53（1）：119-124.

[9] 舒歆彤，姚晓敏，罗艳，等 . 来曲唑片溶出曲线测定方法开发 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（7）：955-959.

[10] 尹婕，金方方，南楠，等 . 劳拉西泮片具有区分力溶出度方法的建立和溶出曲线相似性评价 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（8）：1069-1077.

[11] 张妮，马群，蔡正军，等 . 醋酸甲羟孕酮片溶出曲线方法的研究 [J]. 中南药学，2020，18（5）：796-800.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-10）

响应面法优化苓桂术甘汤的提取工艺

胡晓红，刘冬涵，杨雪颖，杨天姿，白洁*，杜守颖*（北京中医药大学 中药学院，北京 102401）

摘要：目的 优选经典名方苓桂术甘汤的提取方法。**方法** 以特征图谱相似度、肉桂酸含量、甘草苷含量、甘草酸含量、出膏率为综合考察指标，单因素筛选提取工艺参数，包括提取方法、加水倍量、提取时间、提取次数 4 个因素，进一步利用 Box-Behnken 中心组合试验和 Design-Expert 8.0.6 软件统计分析，优化苓桂术甘汤的提取工艺条件。**结果** 苓桂术甘汤的最佳提取工艺条件为：加水倍量 5 倍；回流时间 1 h；提取次数 1 次。此时，处方量干膏粉中肉桂酸含量为 0.05 g，甘草苷含量为 0.13 g，甘草酸含量为 0.34 g，均在基准样品质量标准范围内。与基准样品特征图谱相似度为 0.995，出膏率为 18.72%。**结论** 苓桂术甘汤提取工艺稳定，所得制剂中间体——干膏粉与基准样品质量属性较接近，可为后续开发研究奠定基础。

关键词：经典名方；苓桂术甘汤；响应面法；特征图谱；肉桂酸；甘草苷；甘草酸
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2367-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.017

Optimization of the extraction of Linggui Zhugan decoction by Box-Behnken response surface methodology

HU Xiao-hong, LIU Dong-han, YANG Xue-ying, YANG Tian-zi, BAI Jie*, DU Shou-ying* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102401)

Abstract: Objective To optimize the extraction of Linggui Zhugan decoction. **Methods** The extraction parameters, including extraction method, water addition, extraction time and extraction times, were selected by single-factor screening with the similarity of characteristic profiles, cinnamic acid content, glycyrrhizin content, glycyrrhizic acid content and paste yield as the comprehensive indexes. The extraction was optimized with Box-Behnken central combination experiment and statistically analyzed with Design-Expert 8.0.6 software. **Results** The optimum extraction conditions for Linggui Zhugan decoction included adding 5 times of water, 1 h reflux, and 1 extraction times. At this time, the prescription of dry paste powder contained 0.05 g cinnamic acid, 0.13 g glycyrrhizin and 0.34 g glycyrrhetinic acid, all within the quality standard of the reference sample. The similarity with the characteristic profile of the substance benchmark was 0.995 and the paste yield was 18.72%. **Conclusion** The extraction of Linggui Zhugan decoction is stable and the resulting preparation intermediate, dried paste powder, is close to the quality properties of the reference sample, which lays the foundation for further development study.

Key words: classical prescription; Linggui Zhugan decoction; response surface methodology; characteristic spectrum; cinnamic acid; glycyrrhizin; glycyrrhizic acid

经典名方苓桂术甘汤出自东汉张仲景所著的《金匮要略》[1]，为《古代经典名方目录（第一批）》[2]的第十九方，由茯苓、桂枝、白术、甘草组成，能温阳化饮，健脾利湿，主治中阳不足之痰饮，现代临床常用于心力衰竭、慢性支气管炎、眩晕、冠心病、高血压等症的治疗[3-7]。

经典名方开发为现代制剂的核心是确保制剂各关键质量属性符合基准样品质量标准要求，但

作者简介：胡晓红，女，硕士研究生，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：m18228301065@163.com *通信作者：杜守颖，女，教授，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：dushouying@263.net；白洁，女，副教授，主要从事中药新剂型与新技术研究，email:baijie22811@163.com

现代制剂与基准样品提取方法的不同会造成提取液成分的变化，干燥方法的差异将致使挥发性成分产生差异。如何兼顾制剂中挥发性成分及水提成分与基准样品的一致性是经典名方开发所面临的严峻挑战。根据 2020 年版《中国药典》相关药味检测规定，本方确定指标性成分为桂皮醛、甘草苷、甘草酸。桂枝、白术主要活性成分为挥发油类 [8]，桂皮醛包含于其中 [9]，浓缩干燥过程中可能造成损失，故补充肉桂酸为指标性成分。采用水蒸气蒸馏法提取挥发性成分后，以 β-环糊精包合是最常采用的稳定化方法 [10]，故对方中挥发性成分进行了包合。前期对芳香水溶液体积及包合方法进行了考察，已确定无论桂枝、白术单提还是合提，当收集芳香水溶液 100 mL 时，制得的包合物中挥发性成分含量均在基准样品质量标准规定范围内。而提取工艺中加水倍量、提取时间、提取次数等是影响关键质量属性的重要因素，故本课题对提取工艺中各因素进行考察，并通过 Box-Behnken 设计进一步对提取工艺进行优化，以期获得与基准样品质量标准最为接近的提取工艺。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Fisher U3000 高效液相色谱仪 [DAD 检测器，CM7.2 色谱工作站，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；赛多利斯 BSA224S 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；HH-6 型电热恒温水浴锅、MH-2000 可调式电热套 2000 mL（北京科伟永兴仪器有限公司）；DZF-6051 型真空干燥器（北京利康达圣科技有限公司）；G20 型医用离心机（北京白洋医疗器械有限公司）。

1.2 试药

茯苓饮片 [批号：20200901，产地安徽岳西，为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos*（*Schw.*）Wolf 的干燥菌核]；桂枝饮片（批号：20190521，产地广西平南，为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝）；白术药材（批号：20181101，产地浙江磐安，为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎）；甘草药材（批号：20200901，产地内蒙古鄂尔多斯，为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根和根茎）。茯苓饮片购买于岳西保宝亚中药材专业合作社，甘草药材购买于宁夏昊翔中药材有限公司，桂枝饮片、白术药材由神威药业集团有限公司提供，白术、甘草饮片为试验室小试炮制。

甘草苷（批号：111610-201607）、甘草酸铵（批号：110731-201720）、肉桂酸（批号：110786-201604）（中国食品药品检定研究院）。乙腈、甲醇、磷酸（Fisher 公司，色谱级）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2 方法与结果

2.1 制备方法

2.1.1 基准样品的制备 [11] 称取饮片茯苓 55.2 g、桂枝 41.4 g、白术 41.4 g、甘草 27.6 g 于陶瓷锅中，加水 1200 mL，武火 14 min 转文火至沸，文火煎煮 50 min，水煎液调整体积至 600 mL。精密移取水煎液 10 mL 至西林瓶中，预冷冻 12 h 后，－ 80 ℃冷冻干燥 72 h，即得苓桂术甘汤全方基准样品。

2.1.2 干膏粉的制备 以处方量称取饮片，水蒸气蒸馏制备芳香水溶液后过滤，药渣加水回流提取，合并两次滤液为提取液，提取液经常压浓缩后，60 ℃减压干燥 72 h，研细后过五号筛，制备为苓桂术甘汤全方干膏粉。

2.1.3 阴性样品的制备 取缺桂枝处方饮片、缺甘草处方饮片，按照“2.1.2”项下干膏粉的制备方法，分别制备缺桂枝的阴性样品、缺甘草的阴性样品。

2.1.4 单提样品的制备 取桂枝、甘草对照药材，按照“2.1.2”项下方法分别制备桂枝、甘草单提样品。

2.2 特征图谱方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱：CAPCELL PAK C18 MG S-5 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.05% 磷酸水（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，3%A；5 ～ 21 min，3% ～ 19%A；21 ～ 26 min，19%A；26 ～ 36 min，19% ～ 24%A；36 ～ 46 min，24% ～ 36%A；46 ～ 56 min，36% ～ 51%A；56 ～ 70 min，51% ～ 95%A；70 ～ 75 min，95%A），流速为 1 mL•min^{-1}，DAD 全波长检测（观测波长 220 nm），柱温 30 ℃，进样量 20 μL。理论塔板数以甘草苷峰计不得小于 44 000。

2.2.2 基准样品供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下基准样品，精密移取 20 mL25% 甲醇于 30 mL 西林瓶中，密封，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，静置放冷，10 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，制备供试品溶液。

2.2.3 干膏粉供试品溶液的制备 取“2.1.2”项下干膏粉 0.50 g，精密称定，精密加入 20 mL25% 甲醇，超声（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min 使溶解，冷

却至室温，补足失重，10 000 r·min^{-1}离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，制备供试品溶液。

2.2.4　阴性样品溶液的制备　取“2.1.3”项下阴性样品按“2.2.3”项下方法处理，制备阴性样品溶液。

2.2.5　方法学考察　对特征图谱方法进行方法学研究，结果精密度、重现性、稳定性（24 h）考察中特征图谱相似度分别大于 0.94、0.98 与 0.98，表明特征图谱方法学符合要求。

2.3　*指标性成分含量测定方法*

2.3.1　色谱条件　肉桂酸含量测定色谱条件同“2.2.1”项下，在此色谱条件下，理论塔板数以肉桂酸计不得小于 240 000。

甘草苷、甘草酸含量测定色谱条件[12]：CAPCELLPAK C18 MG S-5 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈 -0.05% 磷酸水，梯度洗脱（0 ～ 8 min，19% 乙腈；8 ～ 35 min，19% ～ 50% 乙腈；35 ～ 36 min，50% ～ 100% 乙腈；36 ～ 40 min，100% ～ 19% 乙腈），流速 1 mL·min^{-1}，检测波长 237 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。理论塔板数以甘草苷计不得小于 8000。

2.3.2　对照品溶液的制备

① 肉桂酸对照品溶液：精密称取肉桂酸对照品 10.40 mg（含量：98.8%）以 70% 甲醇溶解，以 25% 甲醇稀释为系列质量浓度肉桂酸对照溶液。

② 甘草苷、甘草酸混合对照品溶液：精密称取甘草苷对照品 10.09 mg（含量：93.1%），甘草酸铵对照品 21.54 mg（含量 97.7%，甘草酸含量＝甘草酸铵含量 /1.0207），用 70% 甲醇溶解，以 25% 甲醇稀释为系列质量浓度的甘草苷、甘草酸对照品溶液。

2.3.3　基准样品供试品溶液的制备　取基准样品（过四号筛）约 0.2 g，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，精密加入 25% 甲醇至刻度，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷后，用 25% 甲醇定容至刻度，摇匀，即得供试品溶液。

2.3.4　干膏粉供试品溶液的制备　取“2.1.2”项下全方干膏粉，按“2.2.3”项下方法制备全方样品溶液。取“2.1.3”项下阴性样品，同法制备缺桂枝的阴性样品溶液，缺甘草的阴性样品溶液。取“2.1.4”项下单提样品，同法制备桂枝、甘草单提样品溶液。

2.3.5　方法学考察　根据 2020 年版《中国药典》分析方法验证指导原则，进行肉桂酸、甘草苷、甘草酸含量测定方法学考察，结果见图 1 及表 1。表明仪器精密度、供试品溶液稳定性（24 h）、重复性、加样回收率、方法专属性及线性关系均符合要求。

表 1　含量测定方法学考察

Tab 1　Methodological investigation of content determination

指标成分	线性关系		*RSD*/%			加样回收率（*RSD*）/%
	回归方程	相关系数	精密度	重现性	稳定性	
肉桂酸	$Y = 1.5672X + 0.0018$	0.9999	2.8	2.4	2.8	98.78（2.9）
甘草苷	$Y = 0.3646X + 0.3703$	1.000	0.46	0.95	2.8	98.74（1.6）
甘草酸	$Y = 0.0927X + 0.4099$	0.9999	0.42	2.3	0.75	103.81（0.63）

2.4　*出膏率测定方法*

2.4.1　基准样品出膏率　移取全方水煎液 200 mL 至蒸发皿中浓缩至稠膏，真空干燥 72 h，即得苓桂术甘汤基准样品干膏，测定其出膏率。

2.4.2　干膏粉出膏率　称取处方量饮片，按提取方法制备提取液，常压浓缩至适宜体积后转移至已知重量蒸发皿中，水浴浓缩为稠膏，60 ℃减压干燥 72 h，冷却至室温后称定重量，计算出膏率。

2.5　*基准样品质量标准*

15 批基准样品对照图谱、桂枝饮片、白术饮片、甘草饮片对照图谱见图 2。其中，2、3、4、5、6、7、9、10、11、15 号峰为甘草特有峰，7 号峰为甘草苷。1、8、12、13（肉桂酸）、14（桂皮醛）号峰为桂枝特有峰。16 号峰为白术特有峰。

基准样品质量标准规定处方量基准样品肉桂酸含量在 0.03 ～ 0.06 g，甘草苷含量在 0.13 ～ 0.24 g，甘草酸含量在 0.19 ～ 0.35 g，出膏率在 8.85% ～ 16.43%。

2.6　*单因素考察*

2.6.1　工艺路线　苓桂术甘汤提取工艺为水蒸气蒸馏法提取芳香水溶液 100 mL 后回流提取制得提取液，芳香水溶液以 *β*- 环糊精为辅料，通过磁力搅拌进行包合，制备为包合物，提取液浓缩干燥为干膏，包合物与干膏混合后共同制备为现代制剂。

本文以单因素法考察两种工艺。工艺一：桂枝、白术以水蒸气蒸馏后加入茯苓、甘草回流。工艺二：茯苓、桂枝、白术、甘草共同水蒸气蒸馏后回流。结果工艺一特征图谱、指标性成分更佳，故确定提取路线为工艺一。

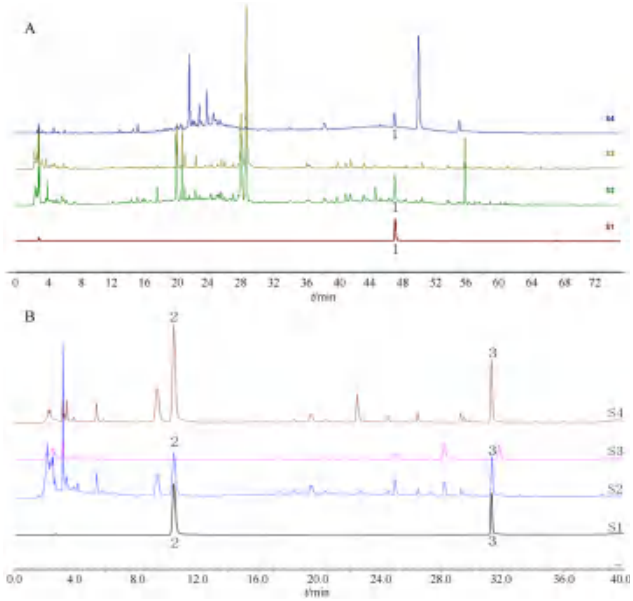


图 1　肉桂酸（A）及甘草苷、甘草酸（B）的专属性色谱图

Fig 1　Specificity chromatogram of cinnamic acid（A）, glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid（B）

S1. 对照品（standard）；S2. 全方样品（sample of the whole formula）；S3. 阴性样品（negative sample）；S4. 单提样品（single extract samples）；1. 肉桂酸（cinnamic acid）；2. 甘草苷（glycyrrhizin）；3. 甘草酸（glycyrrhizinic acid）

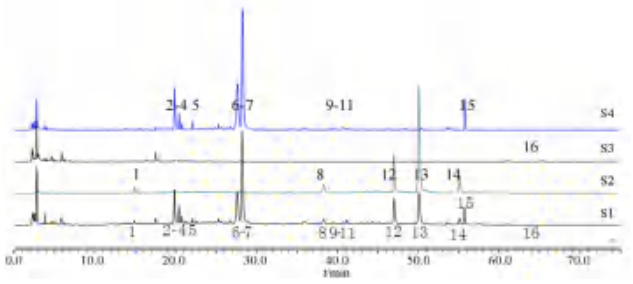


图 2　苓桂术甘汤的对照图谱

Fig 2　Cross reference chromatogram of Linggui Zhugan decoction

S1. 基准样品（benchmark sample）；S2. 桂枝饮片（Cinnamomum cassia）；S3. 白术饮片（Atractylodes nacrocephala）；S4. 甘草饮片（Glycyrrhize glabra）

2.6.2　工艺参数　结合经验与文献确定影响提取工艺的因素包括加水倍量、提取时间、提取次数。随着提取次数的增加，末次提取液中成分含量逐渐降低，故确定提取次数水平为 1 ～ 3 次 [13]。

以肉桂酸含量、甘草苷含量、甘草酸含量结合出膏率为考察指标，固定回流时间为 1 h，加水倍量为 5、10、15、20 倍进行考察，确定加水倍量低水平为 5 倍，高水平为 10 倍。固定加水倍量为 5 倍，对回流时间 1、1.5、2、3 h 进行考察，确定回流时间低水平为 1 h，高水平为 1.5 h。

2.7　响应面法优化提取工艺

2.7.1　Box-Behnken 设计　根据 Box-Behnken 试验设计原理 [14]，优化选取加水倍量（A）、提取时间（B）和提取次数（C）3 个影响因素，设计 3 个水平 17 个试验点进行响应面分析，其中包括 12 个析因点，5 个中心点，试验设计因素及水平见表 2。

表 2　响应面试验设计因素及水平

Tab 2　Response surface design factor and level

水平	因素		
	加水倍量（A）/ 倍	提取时间（B）/h	提取次数（C）/ 次
－1	5	1	1
0	7.5	1.25	2
1	10	1.5	3

2.7.2　Box-Behnken 试验结果　不同试验水平下所得特征图谱与基准样品相似度在 0.976 ～ 0.994，相似度均较好。为尽可能客观地反映各因素对提取工艺的影响，本研究以指标性成分含量及出膏率为评价指标，计算干膏粉中各指标与基准样品对应实物的差值，设置指标的权重系数为 1/4，以综合评分的形式对提取工艺进行考察。不同试验水平所得干膏粉中指标性成分含量、出膏率及综合评分见表 3。

2.7.3　回归模型方差分析　采用 Design-Expert 8.0.6 软件对结果进行模型拟合，结果见表 4，根据拟合分析结果选择二阶多项式模型进行方程拟合。

对拟合模型进行 ANOVA 方差分析，失拟值有统计学意义，故剔除对模型影响最小的因素 B^2，此时模型方差分析结果如表 5，回归方程模型有统计学意义，失拟值无统计学意义，表明此模型有效可靠。模型相关系数 $R^2 = 0.9893$，说明该模型可以解释 98.93% 响应值的变化；调整决定系数 $R^2adj = 0.9787$，说明该模型可信度较好。拟合模型回归方程为：综合评分 $= 3.27 + 0.21A + 0.064B + 0.72C - 0.075AB - 0.03AC - 0.067BC + 0.038A^2 - 0.3C^2$。

该模型中，因素 A、C、C^2 的 $P < 0.05$，表明加水倍量和提取次数对综合评分的影响显著，且 3 个因素对综合评分的影响顺序为提取次数＞加水倍量＞提取时间。

2.7.4　响应面曲线的分析　不同交互因素与综合评分的响应面分析见图 3。AC 及 BC 的响应面图坡度较陡，表明加水倍量与提取次数、提取时间与提取次数交互作用较强，对综合评分的影响显著，AB 的响应面图坡度略平缓，表明加水倍量与提取时间的交互作用略弱，对综合评分的影响较小。

表 3　响应面试验结果

Tab 3　Response surface test

实验编号	加水倍量	提取时间	提取次数	肉桂酸 /g	甘草苷 /g	甘草酸 /g	出膏率 /%	综合评分
1	0	－1	1	0.06	0.35	0.61	27.33	3.77
2	－1	－1	0	0.05	0.21	0.46	23.98	2.86
3	0	0	0	0.05	0.26	0.56	25.75	3.34
4	0	0	0	0.06	0.27	0.56	25.25	3.22
5	0	0	0	0.05	0.22	0.48	25.55	3.26
6	1	0	1	0.06	0.23	0.55	27.75	3.83
7	0	0	0	0.06	0.27	0.59	25.43	3.27
8	1	1	0	0.05	0.29	0.54	26.77	3.60
9	1	－1	0	0.06	0.25	0.55	26.48	3.52
10	－1	0	－1	0.05	0.16	0.36	21.22	2.13
11	0	1	1	0.06	0.26	0.60	26.97	3.66
12	0	1	－1	0.05	0.17	0.36	21.89	2.30
13	1	0	－1	0.05	0.16	0.39	22.68	2.51
14	－1	1	0	0.05	0.21	0.47	25.49	3.24
15	－1	0	1	0.06	0.24	0.55	26.70	3.57
16	0	0	0	0.06	0.27	0.57	25.42	3.27
17	0	－1	－1	0.05	0.15	0.32	21.30	2.14

表 4　多种模型拟合分析

Tab 4　Fitting analysis of various models

模型	*P*	回归模型拟合度（R^2）
线性模型	＜ 0.0001	0.8817
二因素交互关系模型	0.7973	0.8605
二阶多项式模型	0.0014	0.9756
三阶多项式模型	0.0353	0.9940

表 5　回归模型方差分析结果

Tab 5　ANOVA results of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	4.94	8	0.62	92.69	＜ 0.0001
A- 加水倍量	0.34	1	0.34	51.75	＜ 0.0001
B- 提取时间	0.033	1	0.033	4.88	0.0581
C- 提取次数	4.13	1	4.13	620.89	＜ 0.0001
AB	0.022	1	0.022	3.38	0.1033
AC	0.0036	1	0.0036	0.54	0.4831
BC	0.018	1	0.018	2.74	0.1366
A^2	0.005 937	1	0.005 937	0.89	0.3726
C^2	0.38	1	0.38	57.09	＜ 0.0001
残差	0.053	8	0.006 656	—	—
失拟值	0.046	4	0.011	6.12	0.0537
净失误	0.007 48	4	0.001 87	—	—
总差	4.99	16	—	—	—

2.8　提取工艺预测

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对提取工艺进行优化，将综合评分的最小值设置为 0，得到最优工艺预测为桂枝、白术收集 100 mL 芳香水后与茯苓、甘草加入 5.0 倍水，回流 60 min 提取一次，此条件下的理论综合评分为 1.845。

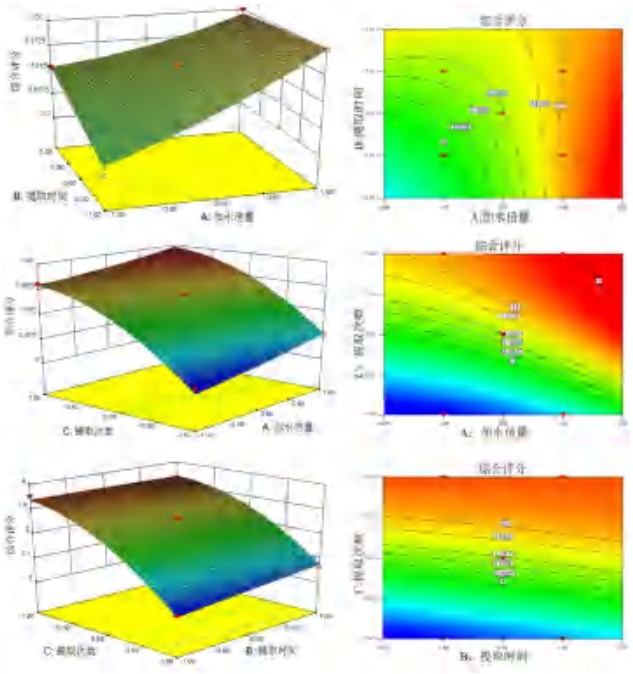


图 3　各因素交互作用对综合评分影响的响应面图和等高线图

Fig 3　Response surface and contour map of the effect of each factor interaction on the comprehensive score

2.9　预测提取工艺验证

取处方饮片按预测工艺条件提取后制为干膏粉进行验证，重复 3 次。验证试验测得的处方量干膏粉中肉桂酸、甘草苷、甘草酸含量分别为 0.05、0.13、0.34 g，出膏率为 18.72%，综合评分为 1.498。综合评分较响应面法预测值更低，同

时可保证处方量干膏粉中肉桂酸、甘草苷、甘草酸含量在基准样品质量标准规定范围内。所得特征图谱与基准样品相似度为 0.995，相似度好。单因素试验发现甘草苷含量随加水倍量、提取时间的减小而下降，甘草苷含量仅略高于基准样品质量标准下限，故为确保中间体干膏粉与基准样品较为一致，确定提取方法为桂枝、白术收集 100 mL 芳香水后与茯苓、甘草加入 5 倍水，回流 60 min 提取 1 次。

3 讨论与结论

制剂与传统汤剂药用物质的一致性是经典名方开发的核心思想 [14]，而基准样品有效成分含量、特征图谱等是衡量制剂与中医临床所使用的药用物质是否一致的标准 [15]。本文以特征图谱相似度、肉桂酸含量、甘草苷含量、甘草酸含量、出膏率为指标对提取工艺进行了优化筛选。优化后工艺特征图谱相似度、指标成分含量均符合基准样品质量标准要求。茯苓在特征图谱中无特征峰，故将筛选工艺所得制剂按文献方法 [11] 对方中茯苓特征图谱进行考察，与对照图谱相似度均大于 0.90，符合基准样品质量标准要求。

苓桂术甘汤制备中间体干膏粉的过程中，桂枝、白术中的挥发性成分在干燥过程中会损失，故本研究先以水蒸气蒸馏法收集了芳香水溶液以制备中间体包合物，以保障在最终制得成品与基准样品的一致性。而由于在回流前进行了芳香水溶液的收集，以致工艺出膏率略高于基准样品质量标准。在后续研究中，可对在保证中间体干膏粉成分与基准样品一致的条件下降低出膏率的方法进行考察，以达到基准样品质量标准要求。

参考文献

[1] 汉・张仲景述，晋・王叔和集 . 金匮要略方论 [M]. 北京：人民卫生出版社，1994：38.
[2] 国家中医药管理局 . 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. [2022-10-20]. http：//www.satcm.gov.cn/kejisi/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html.
[3] 王璐瑶，邓哲，肖苏萍，等 . 苓桂术甘汤的现代临床应用与分析 [J]. 中国药物警戒，2021，18（11）：1066-1069，1074.
[4] 刘芳 . 苓桂术甘汤加减治疗慢性支气管炎的疗效观察 [J]. 光明中医，2017，32（22）：3252-3254.
[5] 王娟，齐锡友，谢春荣，等 . 李祥舒主任医师应用加味苓桂术甘汤治疗良性发作性位置性眩晕的临床观察 [J]. 光明中医，2019，34（6）：850-851.
[6] 齐泉，范秀风 . 苓桂术甘汤加味治疗冠心病 60 例 [J]. 实用中医内科杂志，2013，27（1）：30-31.
[7] 王吉元，李树斌，谢相智，等 . 加味苓桂术甘汤联合替米沙坦治疗老年肥胖型高血压疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志，2017，26（17）：1898-1900.
[8] 彭安堂，李佳佳，魏艳婷，等 . 经典名方苓桂术甘汤中挥发油提取工艺优选 [J]. 中国药业，2021，30（1）：41-44.
[9] 徐锋，王德健，曾南 . 桂枝挥发油化学成分的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（3）：532-541.
[10] 孔云，刘黎瑶，熊倩，等 . 肉桂醛 - 羟丙基（β）环糊精包合物的处方工艺研究 [J]. 天津农学院学报，2020，27（1）：70-75.
[11] 刘冬涵，薛宇涛，罗菊元，等 . 经典名方苓桂术甘汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中国中药杂志，2019，44（24）：5421-5428.
[12] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S].2020：88.
[13] 刘蕾蕾，刘冬涵，张紫薇，等 . Box-Behnken 响应面法优化芍药甘草汤的提取工艺 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1113-1119.
[14] 廖正根，袁其里，梁新丽，等 . 经典名方苓桂术甘汤制剂提取工艺研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（4）：830-836.
[15] 陈蒙，林龙飞，刘宇灵，等 . 经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量测定 [J]. 中草药，2019，50（17）：4152-4157.

（收稿日期：2023-04-21；修回日期：2023-06-13）

基于高效液相色谱 - 串联质谱和分子网络联合应用技术快速鉴定川黄柏和关黄柏中的化学成分

李道政，鄂环宇，丁国钰*（沈阳医学院，沈阳　110000）

摘要：目的　通过高效液相色谱 - 串联质谱和分子网络整合技术联合应用的快速分析方法分别鉴定川黄柏与关黄柏中的化学成分。**方法**　采用 Agilent C_{18} 色谱柱（100 mm×4.5 mm，1.8 μm），流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱。通过三重四极杆 - 飞行时间串联质谱检测数据，根据 MS/MS 碎片模式的相似性创建分子网络，在正离子模式下，将拥有相似结构的分子簇运用 MSDIAL 软件筛选出来。最后结合保留时间信息、高分辨质谱精确相对分子质量和 MS/MS 碎片信息，并根据相关文献和分子网络进行比对，分别对川黄柏、关黄柏中化学成分进行快速准确鉴定。**结果**　在川黄柏、关黄柏中共鉴定出 22 种化学成分，并通过质谱的积分面积确定了两者的相对峰面积比例为 2.08∶1。通过分子网络分析发现川黄柏中存在很多响应较低的未被鉴定出的生物碱类成分，而木兰花碱同系物多出现于关黄柏中，并且关黄柏中的巴马汀的离子响应较川黄柏更高。**结论**　该方法可为关黄柏、川黄柏的质量控制、基准物质以及药效物质研究提供参考，同时也可用于两者化学成分的快速定性分析。

关键词：高效液相色谱 - 串联质谱；分子网络；川黄柏；关黄柏；化学成分
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2373-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.018

Rapid identification of components in Phellodendri Chinensis Rupr and Phellodendri Amurensis Schneid with HPLC-MS and molecular network

LI Dao-zheng, E Huan-yu, DING Guo-yu* (*Shenyang Medical College*, *Shenyang*　110000)

Abstract: Objective　To rapidly identify the chemical compositions in Phellodendri Chinensis Rupr (PC) and Phellodendri Amurensis Schneid (PA) with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) and molecular network. **Methods**　Agilent C_{18} column (100 mm×4.5 mm, 1.8 μm) was used with 0.1% formic acid water (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase for gradient elution. Detection data by quadrupole-time of flight-mass spectrometry were collected in the positive ion mode, and molecular network was created according to the similarity of MS/MS fragmentation modes. MSDIAL software was used to screen molecular clusters with similar structures. Finally, the chemical compositions of PC and PA were confirmed according to the retention time, accurate molecular weight of high resolution mass spectrometry and MS/MS multi-stage fragments. **Results**　Totally 22 chemical constituents were identified in PC and PA. The relative proportion of alkaloids in PC and PA was 2.08∶1 by integral area of mass spectrum. Molecular network found many unknown alkaloids with low response in PC. There were more magnoflorine homologues in PA, and the ion response of palmatine in PA was higher than that in PC. **Conclusion**　This method can provide reference for the quality control and pharmacodynamic substances of PC and PA, and rapid qualitative analysis of chemical components of traditional Chinese medicine.

Key words: HPLC-MS; molecular network; Phellodendri Chinensis Rupr; Phellodendri Amurensis Schneid; chemical component

基金项目：辽宁省教育厅面上项目（No. LJKZ1138）；2021 年沈阳医学院大学生科研项目（No.20219033）。
作者简介：李道政，女，主要从事中药抗特应性皮炎药理机制研究，email：20932998589qq.com　*通信作者：丁国钰，男，讲师，主要从事中药抗特应性皮炎药理机制研究，email：guoyuding@mail.nankai.edu.cn

黄柏是芸香科植物黄檗或黄皮树的干燥树皮，本属植物有 4 种，我国有 2 种及 1 变种，其中 2 种分别为黄檗（*Phellodendron amurense* Rupr.，PA）、黄皮树（*Phellodendron chinense* Schneid.，PC），两者均被纳入 2020 年版《中国药典》，作为中药黄柏的来源，习称为“川黄柏”和“关黄柏”，1 变种为秃叶黄皮树（*Phellodendron chinense* Schneid.var. *glabriusculum* Schneid.）[1-2]。四川、湖北、贵州、云南、陕西、广西等地主产川黄柏，辽宁、吉林、黑龙江、河北、内蒙古等地主产关黄柏 [3-4]。黄柏的化学成分最早由日本学者对日本产黄柏进行研究后报道，从中分离得到小檗碱和少量巴马汀，此后，其他化学成分的相关报道也陆续发表 [1，3，5-6]。

生物碱类是黄柏的主要化学成分及药用成分。此外，黄柏化学成分还包括柠檬苦素、酚酸类、萜类、木脂素类、甾醇及其苷类等 [5-10]。本研究通过建立高效液相色谱 - 串联质谱（HPLC-MS）和分子网络整合技术联合应用的快速分析方法分别鉴定川黄柏与关黄柏化学成分 [5，7，11-18]。结构相似的分子簇通过 MSDIAL 进行筛选，然后根据文献和全球天然产物社会分子网络（GNPS）数据库比对，并结合保留时间信息、相对分子质量和 MS/MS 碎片信息，快速、准确地鉴定川黄柏和关黄柏的化学成分 [15-17，19-21]，以期为川黄柏、关黄柏进一步的质量控制、基准物质研究以及药效物质研究等提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 6530B 四极杆飞行时间串联质谱系统（ESI 电喷雾接口等）、Agilent 1260 高效液相色谱仪系统 [配有四元泵（G1311C）、在线脱气机（G1322A），自动进样器（G1229A），柱温箱（G1316A）]（美国安捷伦科技有限公司）。十万分之一电子分析天平（北京赛多利斯仪器有限公司）；超声波清洗器（北京中晟名科技有限公司，100 W）；0.22 μm 微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）。

1.2 试药

川黄柏、关黄柏（同仁堂药店有限公司，经沈阳医学院药物分析教研室卢方晋老师鉴定为植物芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮和芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮）。乙腈、甲醇（Sigma-aldrich，质谱纯）；甲酸 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司，质谱纯]；水为屈臣氏纯净水。

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent C_{18} 色谱柱（4.5 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱 [0 ～ 20 min，10%B；20 ～ 25 min，40% ～ 70%B；25 ～ 30 min，70% ～ 100%B），柱温：40 ℃，流速：0.6 mL·min^{-1}；进样量：5 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源（ESI），离子模式：ESI^{+}，MS 扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1000，MS/MS 扫描范围 *m/z* 50 ～ 1000；干燥气温度为 350 ℃，干燥气流速为 8 L·min^{-1}；鞘气温度：400 ℃，鞘气流速：11 L·min^{-1}；喷嘴电压：300 V，Fragmentor：150 V；碰撞电压梯度（V）设置：Mass：50（Z1，10；Z，25；Z，35）；Mass：1000（Z1，60；Z，230；Z，330）。

2.3 样品溶液制备

取关黄柏和川黄柏各 30 g，用 300 mL 50% 乙醇溶液，煮沸，醇提 3 次，将得到的醇提液进行旋蒸后冷冻干燥，粉碎处理后得到关黄柏和川黄柏基准样品。精密称取上述粉末各 10 mg，加入 1 mL 50% 甲醇溶液进行超声溶解后取上清液，使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤得到关黄柏和川黄柏样品溶液。

2.4 分子网络构建过程

通过 HPLC-MS 得到川黄柏、关黄柏数据，用 Analysis Base File Converter 软件把原始数据转成 abf 格式文件，采用 MSDIAL 软件进行峰识别、峰提取、峰面积提取等处理，在数据可视化中选择分子网络图谱，以 Similarity cut off [%]：25 为条件输出数据；以 Similarity cut off [%]：25 为条件从“Export”中选择“Molecular spectrum networking export”导出分子网络图谱数据，进行汇总整理，最后运用 Cytoscape 软件可视化分析结果。提取液中所有未知化合物与标准化合物之间的结构相似度在分子网络图中可以直观显示出来，其中每一个化合物用一个节点表示，化合物之间的相关性用节点与节点之间的连线来表示；结构类似的化合物分子会在一个分子网络中聚集成簇；不同的质谱响应可用节点的大小表示。

2.5 质谱分析

质谱数据通过 Qualitative Analysis B.06.00 软件处理分析，通过相对保留时间、分子离子峰等数据比对，初步进行推测，再结合文献报道、GNPS 数据库中相同或类似成分的 MS^2 碎片离子进行对比分析，保证准确鉴定。

3 结果与讨论

3.1 关黄柏与川黄柏中化学成分分析

根据文献 [11，13-14] 与相关数据库等参考处理川

黄柏，关黄柏提取物后，共获得 22 个有效离子峰。在正离子模式下通过文献和 GNPS 数据库比对，并结合保留时间信息、高分辨质谱精确相对分子质量和 MS/MS 碎片信息等，关黄柏共鉴定出化合物 21 种，川黄柏共鉴定出化合物 12 种，见图 1。

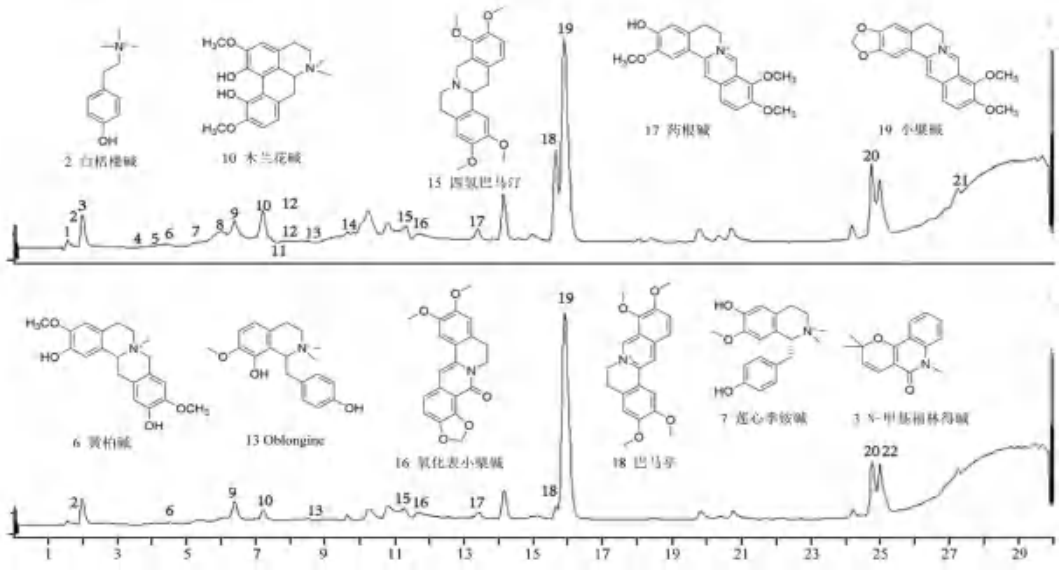


图 1　关黄柏（A）和川黄柏（B）在正离子模式下的基峰图

Fig 1　Base peak ion chromatogram of PA（A）and PC（B）by positive ion mode

3.2　*川黄柏、关黄柏中生物碱类成分质谱裂解规律研究*

川黄柏和关黄柏的 HPLC-MS 基峰色谱图中共出现 22 个峰，见表 1。通过与已发表的文献和数据库以及已知生物碱的裂解途径的对比，确定峰 **6**、**7**、**10**、**13**、**14**、**15**、**17**、**18**、**19** 分别为黄柏碱、莲心季铵碱、木兰花碱、oblongine、蝙蝠葛任碱、药根碱、巴马汀和小檗碱共 8 种生物碱，其碎片裂解规律见图 2。

3.2.1　原小檗碱类生物碱　此类生物碱主要发生小分子取代基的裂解与丢失，其母核一般不进行裂解，低于 *m/z* 200 的产物离子很少存在。当 $[M-CH_4]^+$、$[M-CH_3]^+$和 $[M-2CH_3]^+$为其特征碎片离子时，取代基会包含 2 个及以上的甲氧基；当特征碎片离子为 $[M-CH_2O]^+$时，取代基中含有亚甲二氧基；当取代基包含羟基时，容易产生失去 1 分子水的碎片离子。

小檗碱的分子式为 $C_{20}H_{18}NO_4^+$，准分子离子为 *m/z* 336.1236，特征碎片离子包括 *m/z* 320 $[M-H-CH_3]^+$和 *m/z* 292 $[M-H-CH_3-CO]^+$，这两个离子碎片说明此化合物中有可被检测出来的相邻的甲氧基；*m/z* 306 $[M-CH_2O]^+$和 *m/z* 278 $[M-CH_2-CO]^+$，表明有 1 个亚甲二氧基存在于此化合物中。结合一级质谱信息及参考文献 [22]，确定化合物 **19** 为小檗碱，见图 2A。

药根碱的准分子离子为 *m/z* 338.1392，特征碎片离子包括 *m/z* 320 $[M-H_2O]^+$，表明此化合物有可能含有羟基；*m/z* 322 $[M-H-CH_3]^+$、*m/z* 294 $[M-H-CH_3-CO]^+$，表明有可被检测出来的邻甲氧基存在于此化合物中。结合一级质谱信息及参考文献 [11, 14, 22]，确定化合物 **17** 为药根碱，见图 2B。

巴马汀的准分子离子为 *m/z* 352.1549，其特征碎片离子为 *m/z* 336 $[M-H-CH_3]^+$、*m/z* 320 $[M-2H-2CH_3]^+$和 *m/z* 292 $[M-H-CH_3O-CO]^+$，表明该化合物含有 2 对邻甲氧基。结合一级质谱信息及参考文献 [11, 14]，确定化合物 **18** 为巴马汀，见图 2C。

3.2.2　四氢原小檗碱类生物碱　此类生物碱与原小檗碱类生物碱相比，RDA 裂解易发生在其母核之中，并在质谱中不断丢失一些取代基，因此 *m/z* 高于 200 的产物离子很少。RDA 裂解产生一个高丰度的含氮片段，这是四氢小檗碱型生物碱的特征片段，特征离子为 *m/z* 192，脱去 1 个甲氧基后产生 *m/z* 177 碎片。结合一级质谱信息及参考文献 [11-14]，确定化合物 **6** 为黄柏碱，见图 2D。

3.2.3　四氢苄基异喹啉生物碱　苄基异喹啉类生物碱容易中性丢失 $NH(CH_3)_2$ 取代基，然后连续丢失一些小分子或者发生 α 裂解，与阿朴啡类生物碱的裂解途径有相似之处。不同的是，苄基异喹啉类生物碱会发生母核骨架断裂，因其没有大 π 共轭系统，根据苄基所连接基团的不同，能够形成不同的特征碎片 *m/z* 107、137、151；有时会形成 1 个偶数的碎片峰，在母核上的氮原子没有丢失的情况下。结合一级质谱信息及参考文献 [12, 14]，确定化合物 **7** 和 **13** 分别为为莲心季铵

表 1 HPLC-MS 鉴别川黄柏、关黄柏中化学成分

Tab 1 Identification of compounds in PC and PA Decoction extract based on HPLC-MS

No.	来源	t_R/min	化合物名称	分子式	理论值 /（*m/z*）	测定值 /（*m/z*）	碎片离子 /（*m/z*）	离子模式
1	PA	1.56	*D*-galactopyranose	$C_6H_{12}O_6$	180.0634	203.0521		$[M+Na]^+$
2	PA&PC	1.97	白栝楼碱	$C_{11}H_{18}NO^+$	180.1388	180.1372	121	$[M+H]^+$
3	PA	2.07	*N*- 甲基福林得碱	$C_{15}H_{15}NO_2$	241.1103	259.1389	393，371，167	$[M+NH_4]^+$
4	PA	3.53	unknown			314.1758		
5	PA	4.14	alpha-humulene	$C_{15}H_{24}$	204.1878	227.1749		$[M+Na]^+$
6	PA&PC	4.44	黄柏碱	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1705	342.1704	192，177	$[M+H]^+$
7	PA	5.50	莲心季铵碱	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.1756	314.1766	298，192/237，209，175	$[M+H]^+$
8	PA	5.95	木兰花碱同分异构体	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1705	342.1686	297，265，237	$[M+H]^+$
9	PA&PC	6.41	木兰花碱同分异构体	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1705	342.169	192，177	$[M+H]^+$
10	PA&PC	7.21	木兰花碱	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1705	342.1689	191，179	$[M+H]^+$
11	PA	7.47	unknown			227.1748		
12	PA	7.82	unknown			314.1754		
13	PA&PC	8.47	oblongine	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.1756	314.1751	269，143，192	$[M+H]^+$
14	PA	9.78	蝙蝠葛任碱	$C_{21}H_{26}NO_4^+$	356.1862	356.1852	311，279	$[M+H]^+$
15	PA&PC	11.30	四氢巴马汀	$C_{21}H_{25}NO_4$	355.1784	356.1899	191，179	$[M+H]^+$
16	PA&PC	11.60	氧化表小檗碱	$C_{20}H_{17}NO_5$	351.1107	352.1177		$[M+H]^+$
17	PA&PC	13.42	药根碱	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	338.1392	338.1391	294	$[M+H]^+$
18	PA&PC	15.64	巴马汀	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	352.1549	352.1538	336，320，292	$[M+H]^+$
19	PA&PC	15.89	小檗碱	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	336.1236	336.1231	320，292	$[M+H]^+$
20	PA&PC	24.77	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256.2402	274.2738		$[M+NH_4]^+$
21	PA	27.09	硬脂酸	$C_{18}H_{36}O_2$	284.2715	302.3054		$[M+NH_4]^+$
22	PC	25.32	2- 十五烷酮	$C_{15}H_{30}O$	226.2297	244.2635	318	$[M+NH_4]^+$

碱和 oblongine，见图 2E、2F。

3.2.4 阿朴啡类生物碱 此类生物碱与其他生物碱在结构上有着较大的差异，阿朴啡类生物碱不会形成低 *m/z*、高丰度的碎片离子，只有侧链会发生断裂与重组。如果生物碱的结构中存在氮甲基，则大概率会发生（CH_3）$_2$NH 或 CH_3NH_2 取代基的中性丢失，产生 $[M+H-45]^+$或 $[M+H-31]^+$的特征碎片离子。

化合物 **14** 的准分子离子为 *m/z* 356.1862，*m/z* $[M-CH_3O]^+$、$[M-(CH_3)_2NH]^+$的离子片段为阿朴啡类生物碱蝙蝠葛碱的特征，见图 2G。

化合物 **10** 的准分子离子为 *m/z* 342.1705，在二级质谱图中发现由（CH_3）$_2$NH 中性丢失形成的 *m/z* 297 $[M+H-45]^+$碎片峰，*m/z* 282、265、237 离子可能是由 *m/z* 297 离子连续失去甲基、羟基自由基和 1 分子 CO 形成的，结合一级质谱信息、参考文献 [11-12，14]，推测化合物 **10** 为木兰花碱，见图 2H。

3.3 基于 MS/MS 关联的分子网络分析川黄柏、关黄柏中生物碱类成分

GNPS 是通用和分子网络，化合物的 MS/MS 碎片模式相似性创建，其可视化网络图是通过计算每个化合物 MS^2 的相似性创建的，以反映串联质谱试验中捕获分子的聚类关系和多样性。本研究分别对所采集的高分辨质谱的正负离子数据构建 GNPS 分子网络，利用 GNPS 的聚类信息筛选并快速分析结构相似的化学成分。

黄柏中共鉴定出 22 个相关化合物。其中关黄柏鉴定出 13 种成分，有 12 种生物碱；川黄柏鉴定出 9 种成分，有 8 种生物碱。在 Similarity cut off [%]：25 为参数的条件下，以鉴定出的 22 个生物碱类化合物绘制分子网络图。黄柏生物碱的 MS/MS 数据经分子网络处理并可视化分析如图 3 所示。发现川黄柏中很多响应较低的未知生物碱类成分，而关黄柏中存在较多的木兰花碱同系物，并且关黄柏中的巴马汀的离子响应高于川黄柏。

两种黄柏的主要成分是生物碱，但总生物碱类成分含量差异较大。川黄柏中总生物碱含量的质量分数可达 2.69% ～ 7.93%，包括小檗碱、药根碱、巴马汀、黄柏碱和木兰花碱；关黄柏总生物碱含量的质量分数为 1.20% ～ 2.93%，相对偏低。其中所含生物碱以小檗碱型最具有代表性，在结构分类上包括原小檗碱型、阿朴菲型、单萜吲哚型、喹啉型等 [9]。川黄柏中小檗碱的含量高达 2.05% ～ 7.78%，而关黄柏中含量则为 0.45% ～ 1.37%，两者相差约 6 倍 [9]。

对质谱进行峰面积统计发现，川黄柏中小檗碱的质谱响应是关黄柏的 1.33 倍，关黄柏中巴马汀的质谱响应是川黄柏的 9 倍，川黄柏中木兰花

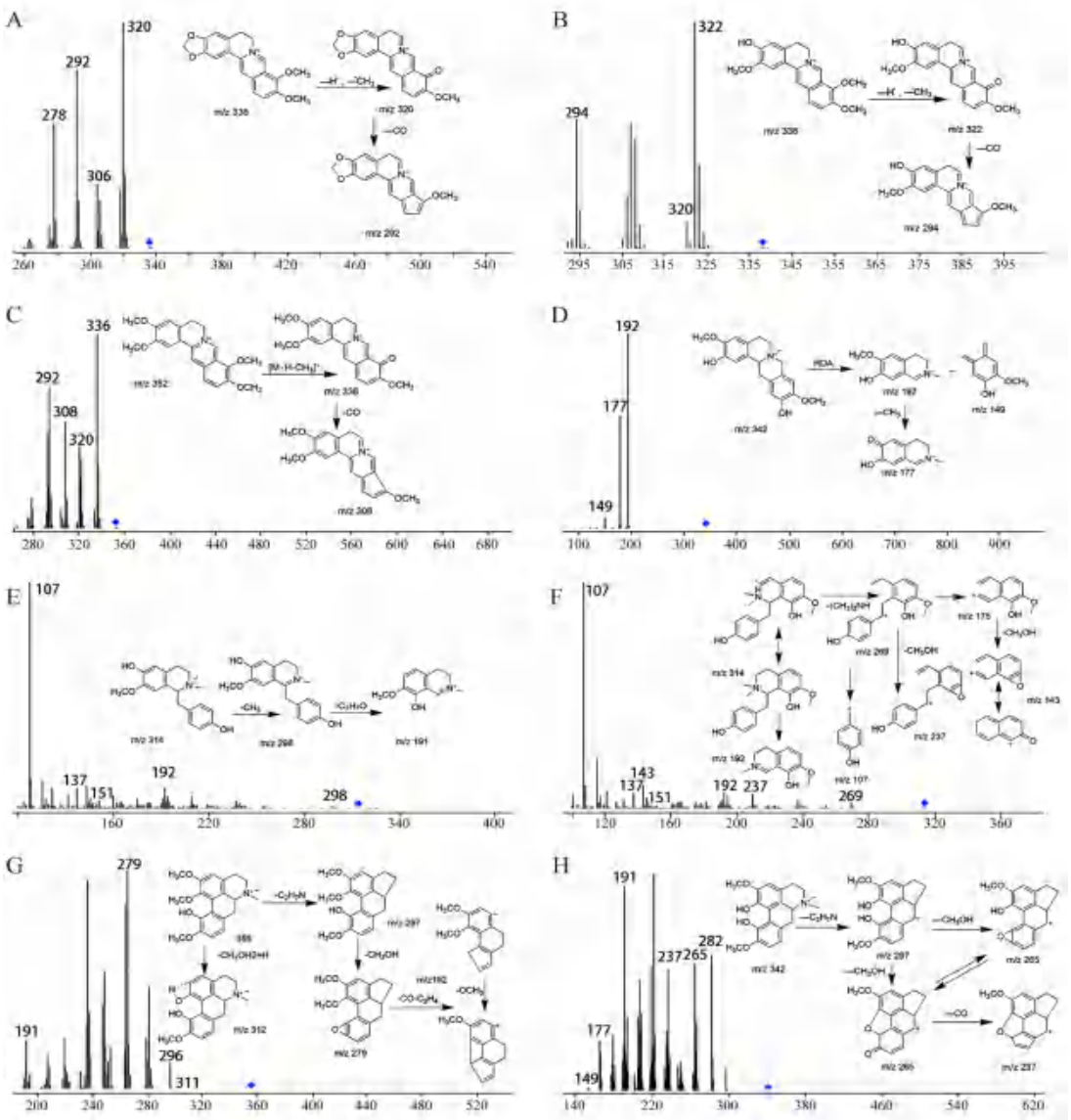


图 2　黄柏中不同生物碱的 MS^2 谱图和碎裂途径

Fig 2　MS^2 spectrum and fragmentation pathways of compounds in PA and PC

A. 小檗碱（berberine）；B. 药根碱（jatrorrhizine）；C. 巴马汀（palmatine）；D. 黄柏碱（phellodendrine）；E. 莲心季铵碱（lotusine）；F.oblongine；G. 蝙蝠葛任碱（menisperine）；H. 木兰花碱（magnoflorine）

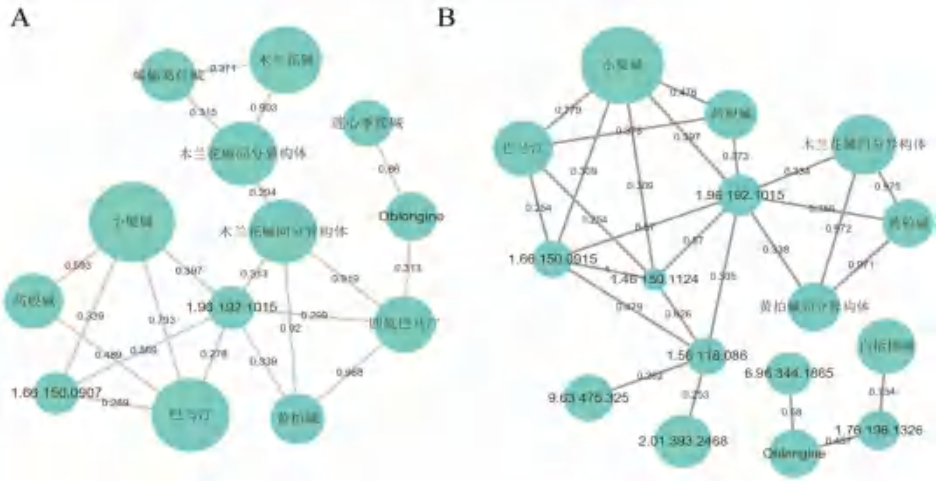


图 3　正离子模式下关黄柏（A）和 川黄柏（B）的 MS/MS 关联的分子网络图

Fig 3　Molecular network of MS/MS correlation of PC（A）and PA（B）in the positive ion mode

碱的质谱响应是关黄柏是 3.63 倍，见表 2。

表 2 川黄柏、关黄柏中小檗碱、巴马汀、木兰花碱的色谱峰面积
Tab 2 Chromatographic peak areas of magnoflorine，palmatine，and berberine in PC and PA

黄柏	小檗碱	巴马汀	木兰花碱
川黄柏	195 610 189.2	5 552 490.76	19 258 235
关黄柏	146 321 449.1	53 034 933.62	5 302 146.89
峰面积比	1.33	0.10	3.63

4 结论

本研究建立了 HPLC-MS 结合分子网络整合技术的快速分析方法，分别对川黄柏和关黄柏的化学成分进行鉴定。

结果共鉴定出 22 种化学成分，关黄柏中共鉴定出化合物 21 种，川黄柏中共鉴定出化合物 12 种，通过质谱的积分面积确定了两者的相对峰面积比例为 2.08∶1。值得注意的是，本研究还筛选出 8 种未鉴定出的生物碱成分，这些未知成分与川黄柏、关黄柏化学成分“种子”节点具有相似碎片，并获得了高质量的一级和二级质谱信息，对川黄柏、关黄柏中新化合物研究具有重要指导价值。

参考文献

[1] 冯媛，牛敏格，张清清 . 关黄柏化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药，2021，23（8）：1486-1498.

[2] 李先宽，冯杉，郑艳超，等 . 黄柏与关黄柏的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 药物评价研究，2019，42（5）：1033-1037.

[3] 王玲，杜潇，祝华莲，等 . 黄柏有效成分的药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药，2022，54（4）：77-81.

[4] 王荣 . 川黄柏的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 临床合理用药杂志，2020，13（1）：173-174.

[5] 陈志鸿 . 川黄柏、关黄柏及其标准提取物的质量控制研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2020.

[6] 梁凤兰，赵海洲，练益成，等 . TLC 法快速辨别与真伪鉴定川黄柏和关黄柏 [J]. 肇庆学院学报，2017，38（5）：44-51.

[7] 崔杏，陈瑞，郑萍，等 . UPLC-Q-TOF MS^E 方法快速分析黄柏的化学成分 [J]. 广州化工，2017，45（16）：105-107.

[8] 何巧玉，刘静，李春霞，等 . 基于网络药理学和指纹图谱的黄柏质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2021，52（16）：4931-4941.

[9] 张冠英，董瑞娟，廉莲 . 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报，2012，29（10）：812-821.

[10] 张倩 . 关黄柏与川黄柏质量标准的研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2009.

[11] Hu YM，Su GH，Stephen Cho-Wing Sze，et al. Quality assessment of Cortex Phellodendri by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr，2010，24（4）：438-453.

[12] Yan XX，Hang SB，Ting YX，et al. Identification and analysis of alkaloids in cortex Phellodendron amurense by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry coupled with photodiode array detection [J]. J Sep Sci，2014，37（13）：1533-1545.

[13] Li YB，Zhang TJ，Zhang XL，et al. Chemical fingerprint analysis of Phellodendri Amurensis Cortex by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics [J]. J Sep Sci，2010，33（21）：3347-3353.

[14] Zhu SL，Dou SS，Liu Xu，et al. Qualitative and quantitative analysis of alkaloids in Cortex Phellodendri by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. Chem Res Chin Univ，2011，27（1）：38-44.

[15] 权建野，范斌，刘安，等 . 基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS^n 和分子网络技术快速鉴定吴茱萸汤中化学成分 [J]. 中国中药杂志，2023，48（1）：71-81.

[16] 阮振靓，邓欣祺，陈倩，等 . 基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS 和分子网络技术快速鉴定五味子中联苯环辛二烯型木脂素类化学成分 [J]. 中南药学，2022，20（3）：499-506.

[17] 张雨婷，王春国，邓欣祺，等 . 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS^n 和分子网络技术快速鉴定灯盏细辛注射液的化学成分 [J]. 质谱学报，2022，43（3）：287-299.

[18] 赵希娟，刘青桥，邢天天 . 柑橘种子类柠檬苦素的分析及质谱裂解途径——基于 UPLC-Q-TOF-MS 的新方法 [J]. 西南大学学报（自然科学版），2018，40（11）：20-29.

[19] 程桃芳，金慧子，刘昌孝，等 . LC-MS/MS 分子网络及其对中药研究的启发 [J]. 中草药，2018，49（2）：265-273.

[20] 徐旭耀，黄秋儿，黄惠玲 . 高效液相色谱法测定柑橘皮中柠檬苦素 [J]. 理化检验（化学分册），2012，48（6）：696-698，704.

[21] 李斌，吕文军 . TLC 法和 HPLC 法分析关黄柏与川黄柏区别 [J]. 黑龙江医药，2009，22（1）：31-33.

[22] 黄飞飞，王荣，陈玥，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的分子网络技术快速分析夏天无生物碱 [J]. 质谱学报，2021，42（3）：228-240.

（收稿日期：2023-01-17；修回日期：2023-03-28）

基于富勒烯高渗透性磁性纳米递药系统的构建及其磁热性能考察

邓晓兰[1]，王思琴[1]，李馥伶[1]，陈晓亮[1]，侯廷幸[2]，朱文全[2*]（1. 海口市人民医院药学部，海口　570208；2. 齐齐哈尔医学院药学院，齐齐哈尔　161006）

摘要：目的　采用一步水热合成法制备 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统并考察其磁热性能。**方法**　选择富勒烯（C_{60}）作为超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒的载体，采用一步水热合成法制备 C_{60}/Fe_3O_4 纳米载体；通过吸附法装载阿霉素（Dox）构建了 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统；采用傅里叶变换红外光谱仪、透射电镜（TEM）和马尔文粒度分析仪等方法对纳米载体进行结构表征；利用红外热成像仪考察不同功率、浓度、质量分数以及介质对 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统磁热性能的影响；采用 CCK-8 法检测不同浓度 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 对 4T1 细胞活力的影响，通过流式细胞测量术检测细胞凋亡情况。**结果**　表征显示成功制备 C_{60}/Fe_3O_4 纳米载体，且载药后粒径由 44.61 nm 增至 61.85 nm，载药量 6.21%，包封率 74.09%。30 mg·mL^{-1} 的 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 分散液在外加磁场（210 V，350 W）作用下于 6 min 内升温达到 42 ～ 46 ℃的目标温度范围。在模拟不同 pH 的体内环境中，$C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 磁性纳米递药系统在肿瘤弱酸性条件下的升温效果优于生理盐水以及弱碱性体液环境。$C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 对 4T1 细胞无明显毒性，通过磁热疗作用显著抑制细胞增殖（$P < 0.05$），$C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 使细胞凋亡率显著增加（$P < 0.01$）。**结论**　制备的 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统在交变磁场中，C_{60}/Fe_3O_4 分散液的升温效果与其浓度、Fe_3O_4 质量分数和磁场功率成正相关；细胞实验证实其具备较好的生物安全性，且在外加磁场作用下，$C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 通过磁热疗效应与 Dox 协同作用可显著诱导 4T1 细胞凋亡。

关键词：富勒烯；Fe_3O_4 纳米颗粒；磁热性能；热疗

中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2379-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.019

High-permeability magnetic nano-drug delivery system based on fullerene and its magnetocaloric properties

DENG Xiao-lan[1], WANG Si-qin[1], LI Fu-ling[1], CHEN Xiao-liang[1], HOU Ting-xing[2], ZHU Wen-quan[2*] (1. *Department of Pharmacy, Haikou People's Hospital, Haikou*　570208; 2. *School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Qiqihar*　161006)

Abstract: Objective　To prepare C_{60}/Fe_3O_4-Dox magnetic nano-drug delivery system by one-step hydrothermal synthesis and determine its magnetocaloric properties. **Methods**　Fullerene (C_{60}) was selected as the carrier of superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles, and C_{60}/Fe_3O_4 nanocarriers were prepared by one-step hydrothermal synthesis. C_{60}/Fe_3O_4-Dox magnetic nanodrug delivery system was constructed by loading doxorubicin (Dox) through adsorption. The structure of nanocarriers was characterized by Fourier transform infrared spectrometer, transmission electron microscope (TEM) and Malvern particle size analyzer. The effect of different power, concentrations, mass fraction and media on the magnetothermal properties of C_{60}/Fe_3O_4-Dox was determined with an infrared thermographic camera. The effect of different concentrations of $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox on the viability of 4T1 cells was detected

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81873172）。

作者简介：邓晓兰，女，硕士，主要从事药理学及临床药学方面的研究，email：517301411@qq.com　*通信作者：朱文全，男，副教授，主要从事新型药物制剂研发，email：zhuwenquan1984@126.com

by CCK-8 method, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** The characterization showed that C_{60}/Fe_3O_4 nanocarriers were successfully prepared, and the particle size after the drug loading increased from 44.61 nm to 61.85 nm, with drug loading of 6.21%. The encapsulation efficiency was 74.09%. $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox dispersion at 30 mg • mL $^{-1}$ was heated up to the target temperature range of 42 ～ 46 ℃ within 6 minutes under the action of an external magnetic field (210 V, 350 W). $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ had no obvious toxicity to 4T1 cells. The cell proliferation was significantly inhibited by magnetic hyperthermia ($P < 0.05$), and $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox significantly increased the cell apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusion** C_{60}/Fe_3O_4-Dox magnetic nano-drug delivery system has been established. In the alternating magnetic field, the heating effect of C_{60}/Fe_3O_4 dispersion is positively correlated with its concentration, Fe_3O_4 mass fraction and magnetic field power. Cell experiments have confirmed that it is biologically safe, and under the action of an external magnetic field, $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox can significantly induce the apoptosis of 4T1 cells through the synergistic effect of magnetothermal effect and Dox.

Key words: fullerene; Fe_3O_4 nanoparticle; magnetocaloric property; heat treatment

富勒烯（C_{60}）因其良好的生物相容性、容易发生反应的活性表面以及作为纳米级别颗粒所具有的大比表面积、小尺寸效应等特性而被广泛应用于生物医药领域的药物载体研究当中[1]。C_{60} 为一种非极性分子，本身具有亲油性，可以直接透过生物体内的组织细胞膜使其具备高渗透性。同其他纳米材料一样，C_{60} 也可以经过修饰重组成纳米颗粒，它通过增强的渗透和滞留效应（enhanced permeability and retention）优先积聚在肿瘤组织中[2]。

磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒是一种常用的磁靶向物质，常用于磁记录材料、磁流体材料、催化剂、磁性传感器、磁性高分子微球等[3]。除此之外，因为磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒的毒性低和生物相容性良好，近年来也被广泛应用在生物技术领域和医学领域当中[4]。磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒具有性质稳定、靶向性质强、药物负载率高以及释放速度可控等诸多特点，所以在药物靶向治疗方面，磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒可作为有效的载药载体[5]，在负载药物成分后可以通过外加磁场的作用直达病灶，从而减少药物对其他器官组织的不良反应[6]。

以磁性纳米材料作为基础的磁性靶向递药系统相较于传统的化疗药物具有更明确的靶向性、更强的缓释性、更好的生物利用度等诸多优点[7]。人体组织内正常细胞有序生长，血管畅通无阻，温度耐受性良好，高于 47 ℃发生损伤。但在肿瘤组织中，肿瘤细胞无序生长，血管杂乱、血流淤滞，散热性差。大部分肿瘤细胞致死温度在 42 ～ 46 ℃[8]。磁感应热疗克服了传统热疗方法的局限性，通过控制温度对肿瘤细胞造成不可逆的热损伤，定向杀死肿瘤细胞，而对非病变部位的健康细胞却不产生损伤，相比于传统的放射治疗和化疗药物等治疗肿瘤的方法具有低毒高效的治疗效果[9]。本研究采用以高装载性能的 C_{60} 为载体，将超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒装载于 C_{60} 上，通过 C_{60} 的高渗透载体作用来实现磁性纳米材料及药物的有效递送。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠乳腺癌 4T1 细胞（上海钰博生物科技有限公司）。

1.2 仪器

AL-204 型电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；CFO 型送风型定温干燥箱（天津市华北仪器有限公司）；KQ-600V 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；傅里叶变换红外光谱仪（Thermo Scientific 公司）；ZS-90 纳米粒度仪（英国马尔文仪器有限公司）；STG-500W 交流调压电源（浙江广伐电气有限公司）；TEM 透射电子显微镜 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；CT-100 磁场发生器（力田磁电科技有限公司）；VarioCAM HD head 880 红外热成像仪（德国英福泰克红外传感与测量技术公司）；全自动酸度计（美国奥豪斯仪器有限公司）；CO_2 培养箱（美国 Thermo 公司）；Tecan Safire 2 酶标仪（瑞士 Tecan 有限公司）；FACS Calibur 流式细胞（美国 BD 公司）。

1.3 试药

高纯 C_{60}（国药集团化学试剂有限公司，纯度：99.9%）；磁性 Fe_3O_4 纳米粒（上海麦克林生化科

技有限公司）；阿霉素（Dox，广州博丰化工科技有限公司）；氯化钠注射液（哈尔滨三联药业股份有限公司）；磷酸二氢钾（天津市科密欧化学试剂有限公司）；氢氧化钠（天津市福晨化学试剂厂）；RPMI 1640 培养基 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；Biochannel 胎牛血清（南京生航生物技术有限公司）；EDTA[默克生命科学技术（南通）有限公司]；CCK-8 试剂盒（美国 APExBIO）；细胞周期与凋亡检测试剂盒、Hoechst 33258 染色液（碧云天生物技术公司）；Annexin FITC/PI 凋亡检测试剂盒（大连美仑生物技术有限公司）。

2　方法与结果

2.1　C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物的制备

采用一步水热合成法 [10-14] 制备含不同 Fe_3O_4 质量分数的 C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物。具体制备步骤：称取不同质量 C_{60} 置于加有 50 mL 纯化水的烧杯中，放入超声清洗机内超声 30 min 左右直至成为分散均匀的分散液。按不同 Fe_3O_4 质量比（10%、20%、30%、40%、50%、60%）加入分散液中，并将混合分散液倒入聚四氟乙烯内胆中，放入超声清洗器内继续超声 40 min。再将内胆和高压反应釜装配好，马弗炉中 120 ℃反应 3 h 后关闭电炉，待其自然冷却至室温，将混合物进行抽滤，抽滤后得到的固体置于 45 ℃的烘箱中烘干，即得不同 Fe_3O_4 质量分数的 C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物。

2.2　C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物的结构表征

2.2.1　磁铁吸附法　分别将相同质量的 C_{60}、磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒、C_{60}∶Fe_3O_4 质量比例为 2∶1 的混合物以及 C_{60}/50%Fe_3O_4 复合物置于 10 mL 规格的西林瓶中，采用外源磁铁贴近瓶身考察磁性。结果见图 1A，C_{60} 无磁性不会被磁铁所吸引，沉于瓶底无变化；Fe_3O_4 因其富有磁性被吸附至玻璃壁上，并且呈现放射型磁锥状；混合物中两者互不影响，C_{60} 沉于瓶底而 Fe_3O_4 被吸至玻璃壁；复合物则全部被吸至玻璃壁上，呈现放射型磁锥状。由此可得，一步水热合成法成功制备出 C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物。

2.2.2　红外光谱法　分别将“2.2.1”项下 4 种物质与 KBr 在干燥环境下按 1∶100 质量比例混合，研磨均匀后进行压片，采用傅里叶变换红外光谱仪在 400 ～ 4000 cm^{-1} 内进行红外光谱测定，分辨率为 1 cm^{-1}。结果见图 1B，除去 2350 cm^{-1} 附近未能完全扣除空气背景中的二氧化碳双吸收峰，以及 3400 cm^{-1}、1640 cm^{-1} 两处因吸附空气中水分子而产生变形振动的杂质峰后，可观察到 C_{60} 的特征吸收峰在 1110 cm^{-1} 处由 C-O 键产生的伸缩振动峰，而 Fe_3O_4 在 578 cm^{-1} 处有明显的 Fe-O 的伸缩振动红外吸收峰。但两者混合物中仅显示了 Fe_3O_4 这一较强的红外吸收峰，可能是由于未结合的两种物质因峰强度不同发生掩盖。复合物 C_{60}/Fe_3O_4 的红外光谱中同时显示出 Fe_3O_4 与 C_{60} 的特征吸收峰，表明磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒被成功地沉积在石墨烯上，也与 C_{60}/Fe_3O_4 的透射电镜（TEM）图结果一致。

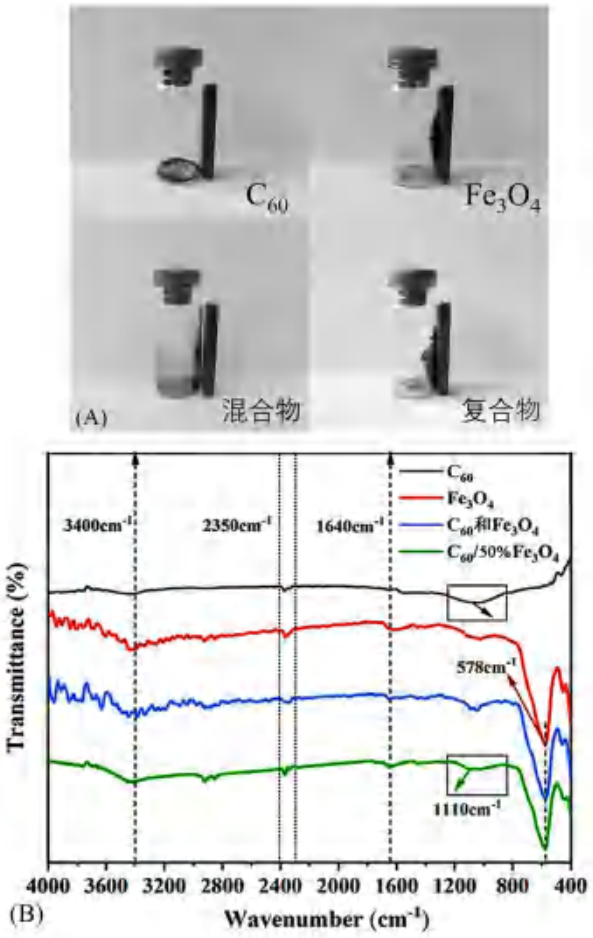


图 1　磁铁吸附实验对比图（A）和红外光谱图（B）

Fig 1　Magnet absorption experiments（A）and infrared spectra（B）

2.3　C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统的制备、表征及载药性能研究

2.3.1　采用吸附法制备 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统　① 称取一定量的 C_{60}/Fe_3O_4 磁性纳米载体复合材料置于 100 mL 锥形瓶中，加入 20 mL 磷酸缓冲溶液（PBS，0.02 mol • L^{-1}，pH 7.4），再分别加入 100 μL 质量浓度为 1 mg • mL^{-1} 的 *N*- 羟基琥珀酰亚胺（NHS）PBS 溶液和 1- 乙基 -（3- 二甲基氨基丙基）碳化二亚胺（EDC）PBS 溶液，室温下充分活化 C_{60}/Fe_3O_4 中含氧基团（＞ 4 h）；② 用磁铁分离未活化的复合物，倒出缓冲液，将活化后的 C_{60}/Fe_3O_4 用 PBS 溶液洗涤 2 次；③ 加入一定浓度的 Dox 盐酸盐水溶液，水浴中静置 6 h；④ 用磁铁分离，得到载药

复合物和上层溶液，以 2 mL 去离子水洗涤载药复合物 2 次，将载药复合物于 60 ℃真空干燥 12 h 即得。

2.3.2　C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统的 TEM 及粒径表征　取少量的粉末样品放入收集管，以无水乙醇作为超声分散媒介，超声分散 30 min。采用滴管吸出少量的溶液滴加在铜网格栅上后测量，加速电压为 200 kV。TEM 如图 2 所示，复合物纳米粒子的分散性良好，磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒均匀地分布在 C_{60} 上，没有发生明显团聚，且载药 Dox 前后粒径大小有所增加。采用马尔文粒度分析仪进行检测，结果见图 2C，C_{60}/Fe_3O_4 的粒径为（44.61±2.76）nm（PDI：0.122），而 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 的粒径为（61.85±5.98）nm（PDI：0.158），推测尺寸的变化可能与 Dox 融入 C_{60} 的蜂窝状结构有关。

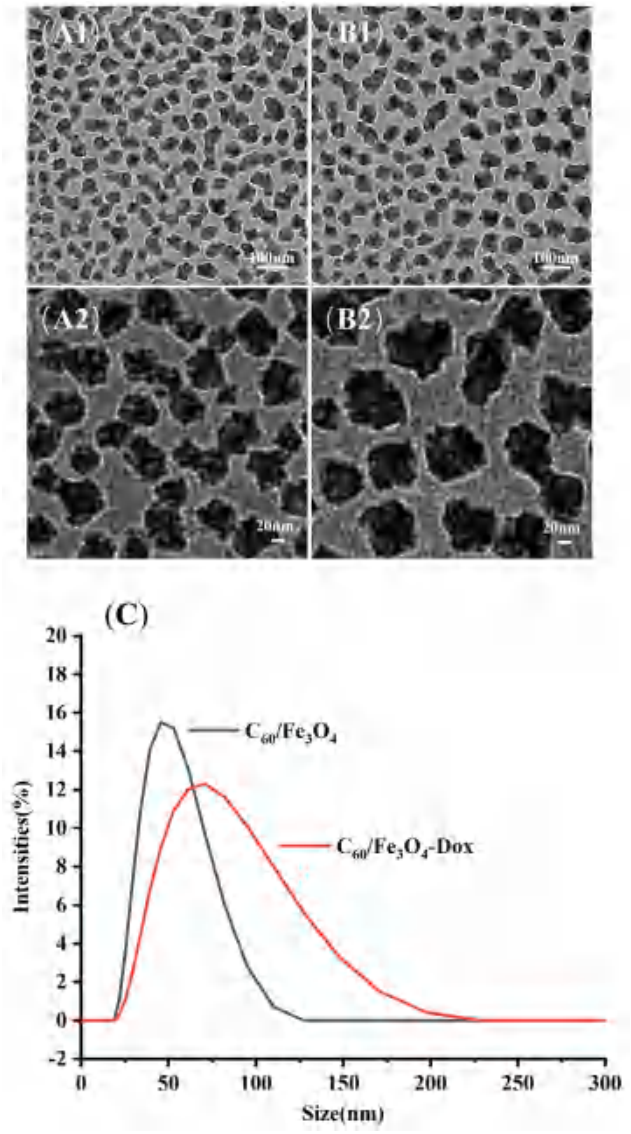


图 2　C_{60}/Fe_3O_4（A1/A2）和 C_{60}/Fe_3O_4-Dox（B1/B2）的透射电镜图和粒径分布图（C）

Fig 2　TEM images of C_{60}/Fe_3O_4（A1/A2）and C_{60}/Fe_3O_4-Dox（B1/B2）and particle sizes（C）

2.3.3　C_{60}/Fe_3O_4-Dox 磁性纳米递药系统载药量及包封率的测定　采用紫外可见分光光度计测定 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 载药样品供试液中 Dox 的吸光度值，将测定结果代入标准曲线方程，计算复合物溶液中 Dox 的浓度，依照载药量及包封率的公式可计算上述载药复合物的载药量为 6.21%，包封率为 74.09%，公式如下：

载药量（%）＝载药复合物中 Dox 的质量 / 载药复合物的总质量 ×100%

包封率（%）＝载药复合物中 Dox 的质量 / 投入 Dox 的总质量 ×100%。

2.4　*各药物递送系统的磁热性能考察*

2.4.1　不同功率的交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米颗粒分散液升温效果　将 10 mg Fe_3O_4 纳米颗粒同 1 mL 纯化水加入试管中，超声至均匀分散液，待其冷却至室温，放入交变磁场中，调节交流调压电源，依次测试不同功率下（90 V、150 W，120 V、200 W，150 V、250 W，180 V、300 W，210 V、350 W，240 V、400 W）Fe_3O_4 分散液的升温情况。采用热成像仪分别于 30、60、90、120、150、180 s 时间点拍摄并测定试管内溶液温度。同法测定 20 mg、30 mg Fe_3O_4 纳米颗粒加 1 mL 纯化水。结果如图 3 所示，不同功率下升温效果 240 V、400 W ＞ 210 V、350 W ＞ 180 V、300 W ＞ 150 V、250 W ＞ 120 V、200 W，可见 Fe_3O_4 纳米颗粒的分散液升温效果与交变磁场所用功率成正相关；且在 180 s 内，在磁场 210 V、350 W 内的 3 组不同质量浓度 Fe_3O_4 分散液升温速率较为稳定，且达到 42 ～ 46 ℃的目标温度范围。

2.4.2　不同质量分数的 C_{60}/Fe_3O_4 复合物分散液置于同一交变磁场中的升温效果　按“2.4.1”项下方法测定质量浓度为 30 mg·mL^{-1} 的 6 种不同质量分数复合物分散液在 210 V、350 W 同一交变磁场中的升温情况。由图 4A 可得，6 min 内复合物分散液升温效果：$C_{60}/10\%Fe_3O_4$ ＜ $C_{60}/20\%Fe_3O_4$ ＜ $C_{60}/30\%Fe_3O_4$ ＜ $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ ＜ $C_{60}/50\%Fe_3O_4$ ＜ $C_{60}/60\%Fe_3O_4$。分析得出 C_{60}/Fe_3O_4 复合物分散液于交变磁场中的升温效果与 Fe_3O_4 质量分数成正相关；且 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 分散液升温达到 42 ～ 46 ℃的目标温度范围，$C_{60}/50\%Fe_3O_4$ 与 $C_{60}/60\%Fe_3O_4$ 所达温度过高。图 4B 红外热成像图可直观地观察到不同质量分数复合物的升温变化过程。

2.4.3　C_{60}/Fe_3O_4-Dox 药物递送系统分散液于同一交变磁场中的升温效果

①不同浓度：考察 5 种 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 药物递

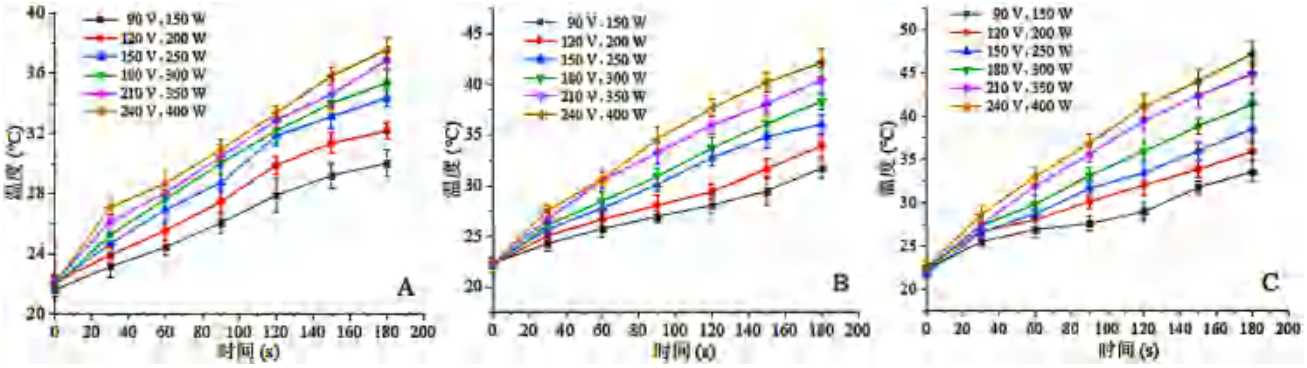


图 3　不同质量浓度 Fe_3O_4 分散液在不同功率磁场条件下的温度 - 时间升温曲线图

Fig 3　Temperature-time heating curves of Fe_3O_4 dispersion liquid at different concentrations under different power magnetic field conditions

A.10 mg • mL^{-1}；B. 20 mg • mL^{-1}；C. 30 mg • mL^{-1}

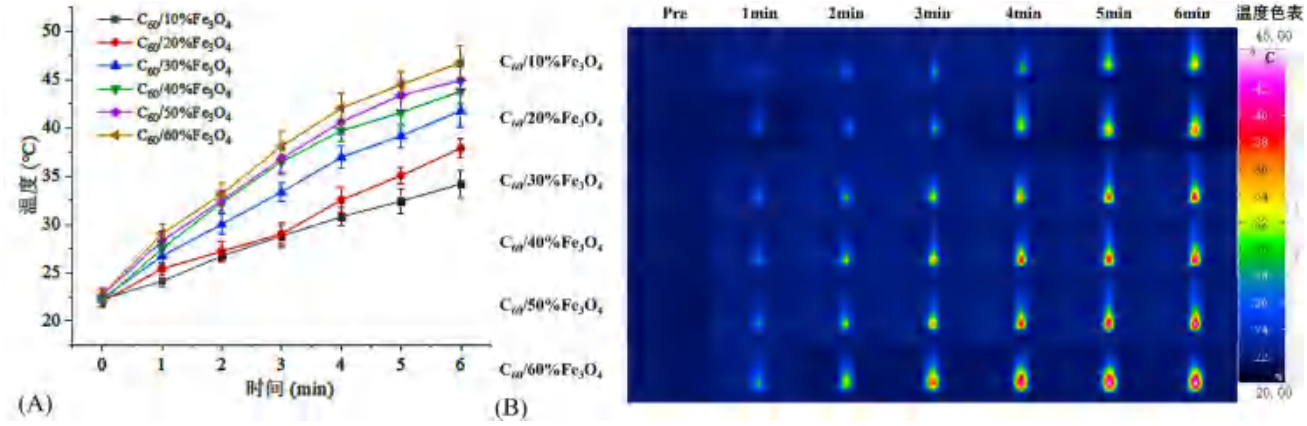


图 4　C_{60}/Fe_3O_4-Dox 在交变磁场中的温度 - 时间升温曲线图（A）及红外热成像图（B）

Fig 4　Temperature-time heating curves（A）and infrared thermogram（B）of C_{60}/Fe_3O_4-Dox in alternating magnetic field

送系统分散液浓度（5、10、20、30、50 mg•mL^{-1}）的 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 磁性纳米递药系统的升温效果，方法同“2.4.2”项下。由图 5A 可直观对比 5 组不同浓度的 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 药物递送系统分散液升温过程，当达到 40 ℃及其以上时，颜色呈现红色到紫红色至白色的过渡变化。在 6 min 内功率为 210 V、350 W 的磁场条件下，升温效果 50 mg • mL^{-1} ＞ 30 mg • mL^{-1} ＞ 20 mg • mL^{-1} ＞ 10 mg • mL^{-1} ＞ 5 mg • mL^{-1}，可分析出其升温效果与分散液质量浓度成正相关，其中质量浓度为 30 mg • mL^{-1} 升温至 42 ～ 46 ℃的目标温度，证实 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 药物载体装载药物 Dox 后不会对其磁热性能造成太大影响。

② 不同 pH：测定在模拟的不同体液环境中的升温效果。将 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 分别用 1 mL 生理盐水（pH 7.0），PBS 缓冲液（pH 6.5）（模拟肿瘤弱酸性环境）与 PBS 缓冲液（pH 7.4）（模拟体内弱碱性环境）3 种不同介质配备质量浓度为 30 mg • mL^{-1} 分散液，考察方法同“2.4.2”项下。结果见图 5B，$C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 分散液在不同的 pH 环境中，弱酸性的升温情况优于生理盐水以及弱碱性环境。

2.4.4　$C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 药物递送系统对 4T1 细胞的磁热疗作用　将 4T1 细胞分别于 30 mg • mL^{-1} 的 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 和 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 分散液孵育 8 h，然后放置于 210 V、350 W 磁场条件下 6 min。如图 6 所示，在无磁场的情况下，用 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 孵育的 4T1 细胞的细胞扩散形态正常，由于 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 的生物相容性，没有发生细胞凋亡。相反，部分 4T1 细胞与游离 Dox 和 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 孵育时呈球形，说明化疗导致 4T1 细胞凋亡。在外加磁场条件下，经游离 Dox 孵育的 4T1 细胞与未加磁场时的细胞形态相似，表明对 Dox 分子没有磁热效应。而 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 空白载体和 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 递药系统孵育的 4T1 细胞在 6 min 后呈球形，说明 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 纳米载体和 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 递药系统的磁热作用可显著诱导细胞凋亡。

2.5　$C_{60}/40\%Fe_3O_4$ 空白载体及 $C_{60}/40\%Fe_3O_4$-Dox 药物递送系统的体外安全性评价 [15]

2.5.1　CCK-8 法检测细胞活性　将 4T1 细胞按照 8×10^3 个 / 孔的密度铺 96 孔板，培养过夜使其贴壁生长。吸弃旧培养液，加入配制好的游离药物和制

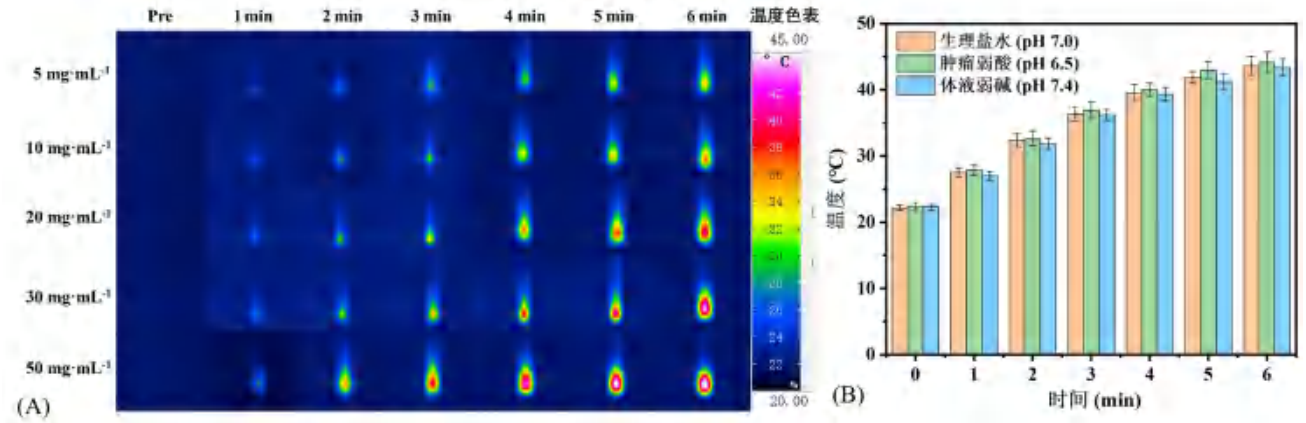


图 5　C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox 在交变磁场中的红外热成像图（A）及分散在不同 pH 缓冲液中的温度 - 时间图像（B）

Fig 5　Infrared thermogram of C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox in alternating magnetic field（A）and temperature-time diagram dispersed in a series of pH buffer solutions（B）

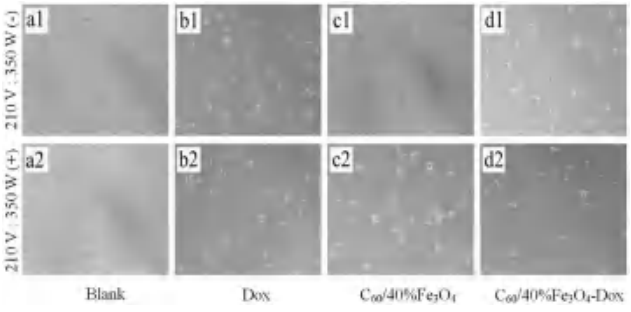


图 6　磁热疗诱导各组细胞凋亡显微图

Fig 6　Microscopic images of cell apoptosis induced by magnetic hyperthermia in each group

a. 空白（blank）；b. Dox；c. C_{60}/40%Fe_3O_4；d. C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox

剂组，以无处理细胞作为空白组，每组设置 5 个复孔。给药培养处理 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，继续放培养箱 1 h 后，立即用酶标仪测定吸光度值（λ = 570 nm），计算各组 IC_{50} 值。结果见图 7，显示 C_{60}/40%Fe_3O_4 生物安全性良好，且在 210 V、350 W 交变磁场下制剂组 C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox 对细胞的杀伤力显著提高，且随着实验组中 Dox 浓度的增加而增加，有明显的剂量依赖性。与空白组相比较，游离 Dox 组、C_{60}/40%Fe_3O_4 组和制剂组 C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox 对 4T1 细胞均具有显著抑制效果（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

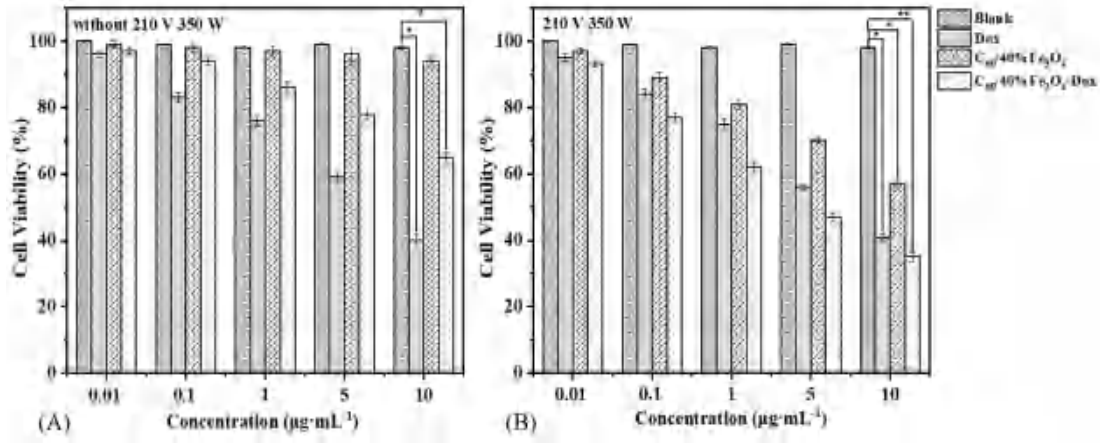


图 7　无外加磁场（A）及外加 210 V、350 W 交变磁场（B）各组细胞活性

Fig 7　Cell activity of groups without applied magnetic field（A）and with 210 V，350 W alternating magnetic field（B）

注（Note）：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

2.5.2　流式细胞术检测细胞凋亡　将 4T1 细胞按照 4×10^5 个 / 孔的密度铺 6 孔板贴壁生长，吸弃旧培养液，将空白组、游离药物组和制剂组按照规定的时间给药处理后，每孔用细胞用 PBS 清洗 3 遍，离心，去上清液，按照凋亡试剂盒操作后，立即采用流式细胞仪进行细胞检测。实验与 CCK-8 结果一致（见图 8），与空白组相较，在 210 V、350 W 交变磁场下，制剂组 C_{60}/40%Fe_3O_4-Dox 对细胞的作用显著高于游离 Dox 组和 C_{60}/40%Fe_3O_4 组。

3　讨论

本研究中，将 C_{60} 与磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒通过一步水热合成法制备得到 C_{60}/Fe_3O_4 纳米载体复合

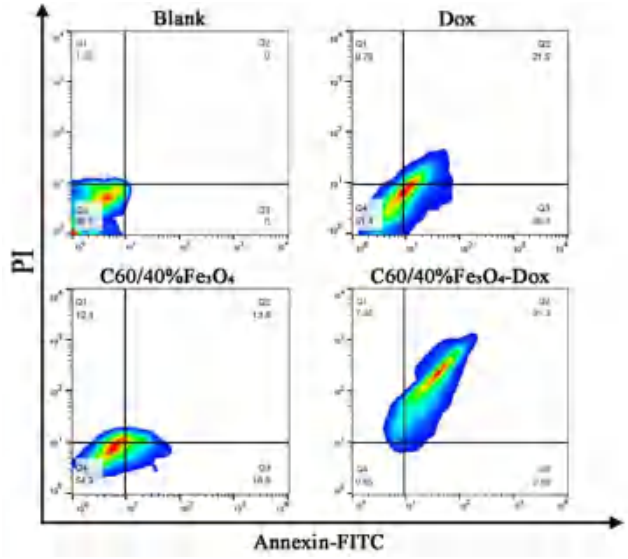


图 8　流式细胞仪细胞凋亡图谱

Fig 8　Flow cytometry map of cell apoptosis

物，通过红外光谱法、TEM 和粒径测定等表征手段验证其复合物结构及表观形貌。依据磁性材料在交变磁场中会产热升温的特性，利用红外热成像仪对由磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒产生的磁热效应以及功率、浓度及介质对磁热性能的影响进行研究，结果发现：将磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒与 C_{60} 共载制备成 C_{60}/Fe_3O_4 载体复合物后，磁热效应依旧呈现良好形势；经筛选不同条件得出：210V、350 W 交变磁场升温速率稳定效果好；在 6 min 内，30 mg • mL^{-1} 的 C_{60}/40%Fe_3O_4 分散液升温达到 42 ～ 46 ℃杀灭肿瘤细胞而不损伤正常细胞的目标温度范围。

模拟不同体液环境升温效果发现，分散液在纯化水与生理盐水中的升温过程几乎一样，证明 Na^+ 与 Cl^- 粒子不影响其磁热性能；而肿瘤弱酸性条件下的升温情况会比生理盐水以及弱碱性体液环境中升温效果更好，可能是因为磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒比普通 Fe_3O_4 颗粒具有更大的比表面积，其水化表面键位浓度高，表面酸碱反应更为显著，H^+ 发生表面吸附有关 [16]。在磁热疗诱导细胞凋亡的实验中，C_{60}/Fe_3O_4 纳米载体和 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 递药系统的磁热作用可显著诱导细胞凋亡，安全性评价显示 C_{60}/Fe_3O_4 空白载体对细胞的增殖及凋亡均无明显毒副作用。

综上所述，本文研究制备得到了 C_{60}/Fe_3O_4 纳米复合物，探索了 C_{60} 作为 Fe_3O_4 载体的可能性，还初步研究了其作为药物载体的应用，构建了 C_{60}/Fe_3O_4-Dox 药物递送系统，并考察磁热性能，为进一步探究 C_{60} 作为载体进行磁热抗肿瘤奠定基础。

参考文献

[1] 熊大艳，刘万云 . 水溶性富勒烯作为药物载体在生物医学上的应用 [J]. 宜春学院学报，2018，40（9）：12-16.

[2] 张雪莹 . 内包金属铁的富勒烯的功能化修饰及磁性能研究 [D]. 太原：太原理工大学，2011.

[3] Wang FJ，Yang Y，Ling Y，et al. Injectable and thermally contractible hydroxypropyl methyl cellulose/Fe_3O_4 for magnetic hyperthermia ablation of tumors [J]. Biomaterials，2017，8（3）：14-27.

[4] 常娟娟，李波，刘文，等 . Fe_3O_4 磁性纳米复合材料的制备及载药性能 [J]. 化工进展，2016，35（S1）：265-269.

[5] 刘庆祖，杨慧恺，刘建恒，等 . 磁性纳米材料在肿瘤靶向化疗中的研究进展 [J]. 解放军医学院学报，2020，41（12）：1252-1255，1269.

[6] 王国斌，肖勇，陶凯雄，等 . 纳米级四氧化三铁的药物动力学和组织分布研究 [J]. 中南药学，2005，3（1）：5-7.

[7] Zhang J，Ruan M. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer：core-shell nanoparticle carrier and drug release response [J]. Acta Biomater，2007，3（6）：11-36.

[8] 陈明义，田京 . 超顺磁性氧化铁纳米颗粒在肿瘤靶向治疗中的应用进展 [J]. 天津医药，2013，41（6）：617-620.

[9] 朱顺涛，贺美娥，杨广令，等 . 磁热治疗的最新研究进展 [J]. 上海师范大学学报（自然科学版），2019，48（5）：536-549.

[10] 张明慧，崔石岩，刘凤春，等 . 石墨烯 -TiO_2 复合材料可见光催化降解乙黄药 [J]. 金属矿山，2020，5（2）：129-133.

[11] Yang X，Zhang X，Ma Y，et al. Superparamagnetic graphene oxide-Fe_3O_4 nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers [J]. J Mater Chem，2009，19（18）：2710-2714.

[12] Zhang Y，Chen B，Zhang LM. Controlled assembly of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on graphene oxide [J]. Nanoscale，2011，3（4）：1446-1450.

[13] 赵原壁，邱祖民，黄佳英 . 磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒用作靶向药物载体的制备及分析（英文）[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering，2008，4（3）：451-455.

[14] 兰徐东，万静 . 石墨烯 /Fe_3O_4 复合粉体材料的制备及吸波加热性能研究 [J]. 西南民族大学学报（自然科学版），2018，44（6）：596-601.

[15] 赵子明，戚大石，韩瑾，等 . 乳铁蛋白修饰的壳聚糖磁性纳米粒的制备、表征及海马神经细胞摄取 [J]. 中南药学，2014，12（12）：1175-1178.

[16] 赵子粉，邵慧萍，孙森 . 酸碱度对 Fe_3O_4 磁性流体性能的影响 [J]. 功能材料，2014，5（6）：6107-6110.

（收稿日期：2023-06-05；修回日期：2023-08-02）

综述

芍药苷的心脏保护作用及作用机制研究进展

邵庆瑞，张小军，零伟德，李姮，李健哲*（广西中医药大学附属瑞康医院 药学部，南宁 530011）

摘要：芍药苷是从传统中药芍药干燥根中提取的有效成分。现代药理研究表明，芍药苷能够通过抗心肌细胞氧化、抑制心肌细胞凋亡、抑制心肌炎症、调节自噬、调节 MAPK 及 PI3K/Akt 等信号转导通路发挥心脏保护作用。然而目前尚无有关芍药苷心脏保护作用机制的系统梳理。本文综述了国内外有关芍药苷心脏保护作用及作用机制的研究进展，为芍药苷的心血管药物研发提供参考。

关键词：芍药苷；心脏保护作用；机制
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2386-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.020

Advances in cardioprotective effect of paeoniflorin and related mechanism

SHAO Qing-rui, ZHANG Xiao-jun, LING Wei-de, LI Heng, LI Jian-zhe* (*Department of Pharmacy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning* 530011)

Abstract: Paeoniflorin is extracted from dried roots of traditional Chinese medicine paeoniflorin. Modern pharmacological studies have shown that paeoniflorin can exert cardioprotective effect by anti-cardiomyocyte oxidation, inhibiting cardiomyocyte apoptosis and inflammation, and regulating autophagy, and signal transduction pathways such as MAPK and PI3K/Akt. However, there is no systematic analysis of the cardioprotection mechanism of paeoniflorin. This paper reviewed the research progress in the cardioprotective effect and mechanism of paeoniflorin at home and abroad, aiming to provide reference for the research and development of cardiovascular drugs.

Key words: paeoniflorin; myocardia protective effect; mechanism

当今社会，冠状动脉粥样硬化性心脏病、慢性心力衰竭、心肌梗死等心脏疾病发病率高、死亡率高，已成为影响人类健康的重大难题。积极探索防治心脏疾病的有效方法和药物已刻不容缓。中药可以通过多靶点、多层次的整合机制干预心脏疾病的治疗，具有良好的临床疗效，达到缓解患者临床症状、提高生活质量、改善远期预后的目的[1]。

白芍、赤芍是毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，这两种中草药药用历史悠久，具有通经活络、散瘀止痛等功效，用于月经不调、自汗盗汗、症瘕腹痛等病症[2]。芍药苷（paeoniflorin，PEF）是从芍药中提取得到的一种单萜糖苷类化合物，是中药白芍、赤芍的主要成分之一[3]。研究发现，PEF 对心脏疾病具有广谱的药理作用，包括抗炎、抗凋亡、抗氧化应激和抑制血小板聚集、血栓形成等[4-6]。现本文综述了国内外关于 PEF 心脏保护作用及其作用机制方面的相关研究，以期为临床更好地利用 PEF 治疗心脏疾病以及心血管新药的研发提供理论支持。

1 抗心肌细胞氧化作用

1.1 降低氧自由基水平

氧化应激是心血管疾病产生的一个重要因素。当机体受到有害刺激时，体内产生活性氧

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81460613）；广西自然科学基金项目（No.2015GXNSFAA139115；No.2018GXNSFAA281083）；广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题（No.20212203）。

作者简介：邵庆瑞，女，副主任药师，主要从事中药临床药学方面的研究，email：shaoqingrui123@126.com *通信作者：李健哲，男，主任药师，主要从事医院药学管理方面的研究，email：lijianzhe20035@126.com

（reactive oxygen species，ROS）、氧自由基等氧化产物，过量的氧化产物在体内堆积损伤细胞的抗氧化系统，导致细胞损伤，这一过程称为氧化应激[7]。PEF是一种天然抗氧化剂，具有很强的抗氧化作用，能保护细胞或机体免受各种氧化应激损伤。

在过氧化氢或阿霉素诱导的H9c2心肌细胞损伤模型以及大鼠心肌缺血再灌注损伤模型中，PEF预处理能降低ROS活性并减少ROS产生，提示PEF对心肌的保护作用可能与清除氧自由基，抑制细胞膜脂质过氧化，从而增强心肌细胞膜的稳定性有关[8-10]。徐晓燕等[11-12]研究发现PEF减少异丙肾上腺素诱导大鼠的心肌组织中胶原纤维的产生，提高心肌超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）活性，说明PEF对大鼠心肌纤维化的干预作用可能与其降低体内氧化应激反应从而减轻氧化损伤有关。此外，PEF还可逆转异丙肾上腺素诱导的心肌肥大，可能是通过降低心肌组织中ROS水平，进而下调心肌营养素-1（cardiotrophin-1，CT-1）蛋白的表达实现的[13]。

1.2 调节一氧化氮及诱导型一氧化氮合酶含量

一氧化氮（nitric oxide，NO）是一种调节心血管系统功能重要的细胞信使分子，也是重要的内皮源性舒张因子[14]。低氧可以诱导大鼠肺动脉高压与右心室肥厚指数显著增高，肺小动脉管壁增厚，血清NO水平降低，而PEF可调节内皮素-1（endothelin，ET-1）/NO的失衡，降低ET-1水平，升高NO水平，从而改善血管内皮舒缩功能[15]。

诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）是一种催化酶，参与了NO的合成。过量的NO会直接引起细胞毒性，导致过氧化作用，造成组织损伤[16]。在小鼠急性心肌梗死和缺血再灌注损伤模型中，PEF处理可下调iNOS活性和蛋白表达水平，减少NO产生，表明PEF通过调控iNOS来保护心脏损伤[17-18]。

1.3 活化腺苷A1受体

心脏细胞中分布着四种亚型的腺苷受体，其中A1腺苷受体主要存在于神经细胞和心肌细胞中。心脏中的A1腺苷受体主要分布于窦房结、心房肌、房室结等细胞表面，在心肌细胞的功能调控方面发挥重要的调节作用，对血管舒张、心脏自律性、传导性及心肌收缩力和交感神经系统均有影响[19]。A1腺苷受体敏感性很高，可干预组织细胞的氧化应激反应及自由基代谢，具有重要的心血管调节保护作用。研究发现，PEF减轻脓毒症小鼠心肌组织脂质过氧化损伤，而PEF的这种心脏保护作用可以通过腺苷A1受体特异性抑制剂DPCPX的预处理来消除，这表明PEF可能通过激活A1受体对脓毒症小鼠具有抗氧化损伤作用[20]。

2 抑制心肌细胞凋亡

线粒体是细胞凋亡调控的中心环节，是B淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）基因家族蛋白调控内凋亡途径的靶点，Bcl-2家族蛋白通过与其他凋亡蛋白的协同作用，调控线粒体结构与功能的稳定性，发挥着细胞凋亡“主开关”的作用。Bcl-2家族包括两类蛋白质：抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡Bcl-2相关X蛋白（bcl-2 associated X protein，Bax）[21]。抑/促凋亡蛋白比例失衡导致线粒体内膜通透性改变，释放细胞色素C（cytochrome C，Cyt C）至胞质中，促进凋亡执行蛋白天冬氨酸半胱氨酸酶-3（aspartate cysteinase-3，Caspase-3）的表达，从而导致心肌细胞凋亡[22]。

细胞实验研究表明，PEF可有效抑制阿霉素诱导H9c2心肌细胞的细胞毒性和细胞凋亡的发生，这可能是通过抑制细胞内ROS的产生，下调microRNA-1的过表达、进而上调其下游靶基因抗凋亡因子Bcl-2的表达来实现的[23]。此外，PEF可通过减少心肌细胞内线粒体Cyt C释放和抑制Caspase-3活性来抑制细胞凋亡的发生，即通过抑制线粒体凋亡途径来发挥其保护作用[24-25]。动物实验研究表明，在大鼠2型糖尿病模型或心肌缺血再灌注损伤模型中，PEF通过降低促凋亡基因*Bax*和*Caspase-3*表达、上调抗凋亡蛋白Bcl-2表达来增加心肌细胞存活率[26-30]。由此可见，线粒体有可能成为PEF治疗心脏疾病的药物作用靶点。

3 抑制心肌炎症

炎症反应是机体抵抗外来刺激的一种保护机制，当炎性介质产生过多时，对机体及其细胞会产生极大损害，而血管反应则是炎症反应的中心环节。炎症反应介导了心血管系统疾病如动脉粥样硬化等，因此抗炎也是治疗心血管系统疾病的一大策略[18]。研究表明，PEF具有较强的抗炎作用，能减轻心肌炎症反应性损伤从而发挥心肌保护作用。体内动物实验发现，PEF预处理可显著抑制心肌缺血再灌注大鼠、脂多糖诱导心肌损伤小鼠及心肌梗死大鼠的肿瘤坏死因子-*α*（tumor necrosis factor-*α*，TNF-*α*）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）等炎症因子表达水平，减轻炎症反应程度，有效发挥了对心肌细胞的保护性作用，减轻心功能不全[13，17，25，31-32]。此外，PEF能

减缓心肌梗死大鼠的心室重构过程中炎症级联反应，抑制了心室重构的持续发展。

4 调节自噬

自噬是细胞特有的生命现象，当细胞受到一些外界因素（如生长因子缺乏、缺血缺氧）和细胞内因素（如衰老、细胞器损伤）等刺激时，细胞开始启动泛素 - 蛋白酶体系统和自噬 - 溶酶体途径来清除胞内异常物质。在病理状态下，胞内聚集的异常蛋白质主要通过自噬 - 溶酶体途径，而胞内一些可溶性成分主要通过泛素 - 蛋白酶体系统来清除。自噬相关分子 Beclin-1 和 Cathepsin B 是自噬的重要标志，其中 Beclin-1 是调节自噬体形成和成熟的重要的自噬分子，Cathepsin B 是一种在溶酶体系统中参与细胞代谢、多肽合成和蛋白质降解的蛋白酶 [33]。李凤等 [29-30] 研究发现，PEF 预处理可改善缺血再灌注损伤大鼠心肌组织的病理形态，下调自噬相关蛋白 Beclin-1 与 Cathepsin B 水平，增强溶酶体功能，改善心肌超微结构，减少线粒体自噬现象，说明 PEF 能够通过调控自噬相关蛋白抑制细胞自噬以提高心肌细胞的存活率，在一定程度上减轻心肌缺血再灌注损伤。

5 调节信号转导通路

5.1 对 MAPK 信号通路的影响

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase，MAPK）是存在于生物体内的一类蛋白激酶，是体内的一种信号转导通路，主要起到调节细胞生长和增殖的作用，从细胞表面接收信号传递到细胞核内部。MAPK 家族包括 p38 MAPK、细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）、c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK），介导着细胞的生理活动 [34]。心肌细胞在缺血、能量供给障碍和氧化应激等因素的影响下均可产生损伤，从而使 MAPK 通路的蛋白表达升高 [35]。

研究发现，在缺氧复氧 H9c2 心肌细胞、脓毒症小鼠或心肌缺血再灌注大鼠等模型中，PEF 可降低 MAPK 家族成员蛋白磷酸化水平，抑制心功能障碍、减轻大鼠心肌损伤，其机制可能是调节 MAPKs 信号通路的活化来实现心肌保护作用 [19，26，36]。p38 MAPK 是一个重要的炎症信号通路，在心肌细胞增殖、凋亡和肥厚方面起着重要的作用 [37]。许多研究表明，PEF 能够抑制心功能不全大鼠的 p38 MAPK 磷酸化水平，减轻心肌炎症和纤维化，促进心室重构，改善心功能 [25，38-40]。

5.2 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）信号通路是一个信号转导酶家族，协调各种细胞内信号，介导细胞增殖、分化、凋亡等反应。PI3K/Akt 信号通路有许多下游效应因子，其中 Akt 是该信号转导的中心环节。κ 基因结合核因（nuclear factor-k-gene binding，NF-κB）是一种重要的信号整合器，控制许多促炎细胞因子的产生。PI3K/AKT 信号通路在 NF-κB 调控中发挥核心作用 [41]。研究表明，PEF 可能通过激活 PI3K/Akt 通路而抑制 NF-κB 的表达，从而减轻脂多糖诱导的脓毒性休克小鼠的心功能损伤，保护心肌细胞免受损害 [42]。此外，PEF 预处理可降低心肌缺血再灌注损伤大鼠的 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平，而 PEF 的这种作用可被 PI3K-Akt 抑制剂 LY294002 和 ERK1/2 抑制剂减弱，但不能完全消除，说明 PEF 介导的心肌保护作用部分是依赖于 PI3K/Akt 途径的激活而实现的 [27]。

5.3 对 *TRPV1*/CaMK/CREB/CGRP 信号通路的影响

瞬时受体电位香草酸 1（transient receptor potential vanillin 1，*TRPV1*）是一种表达在感觉神经纤维上的非选择性阳离子通道。药理学研究表明，*TRPV1* 发挥的心血管保护作用与其合成释放的降钙素基因相关肽（calcitonin gene related peptide，CGRP）有关 [43-44]。激活的 *TRPV1* 通道增加了细胞内钙离子浓度，从而激活 Ca^{2+} / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶（calcium pantothenate，CaMK），进一步磷酸化下游的环磷酸腺苷效应元件结合蛋白（cAMP response element binding，CREB）。CGRP 是心脏感觉神经末梢释放的神经递质，具有正性肌力及潜在的血管舒张作用，改善了心肌缺血后的心功能。CaMK 介导的 CGRP 上调与转录因子 CREB 的磷酸化有关。Han 等 [45] 利用链脲佐菌素介导的糖尿病小鼠建造心肌梗死模型，发现用 PEF 可减轻心脏组织损伤，增加 CGRP 浓度，*TRPV1* 基因敲除减弱了 PEF 介导的心脏保护作用，而选择性的 CaMK 抑制剂 KN-93 增加了组织损伤并降低血清中 CGRP 活性，增加了 CREB 磷酸化，从而保护糖尿病小鼠免受心肌缺血性损伤，说明 PEF 保护心肌的作用机制可能是通过 *TRPV1*/CaMK/CREB/CGRP 途径实现的。

5.4 对 Src/VE-cadherin 通路的影响

Src 蛋白家族是具有蛋白酪氨酸激酶（protein tyrosine kinase，PTK）活性的蛋白质，参与体内多条信号通路。一般情况下，细胞 Src 呈低表达，当受到病原体刺激时，Src 可被磷酸化而激活，调控 p38MAPK 上游激酶，引发一系列生物学效应。近年来的研究表明，心脏微血管内皮细胞

（cardiac microvascular endothelial cells，CMECs）表面 Src/ 血管内皮钙黏蛋白（vascular endothelium -cadherin，VE-cadherin）通路可通过调节 CMECs 通透性参与心肌保护 [46]。洪秀芳等 [47-48] 研究发现，PEF 能抑制脓毒症大鼠 CMECs 细胞中 Src 磷酸化蛋白表达，减少 VE-cadherin 降解，增加细胞表面 VE-cadherin 表达，进而改善 CMECs 的通透性，使内皮细胞间连接更加紧密，降低心脏微血管内皮通透性，提示 PEF 可能通过抑制 Src/VE-cadherin 通路改善 CMECs 细胞通透性，实现对脓毒症性心肌损伤的保护作用。

5.5 对 AMPK*α* 通路的影响

腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate-activated protein kinase，AMPK）是一种重要的酶促能量平衡和调控的信号通路，发挥细胞内能量感应器的作用。AMPK 是一个由 *α*、*β*、*γ* 3 个亚基构成的异三聚体蛋白，*α* 亚基起催化作用，*α* 亚单位中的数个位点（苏氨酸 172、苏氨酸 258、丝氨酸 485 等）均可被磷酸化，其中苏氨酸 172 位点被磷酸化在 AMPK 活性的调节中起重要作用。研究证实 AMPK 活化后具有抗炎和抗凋亡的作用 [49]。高宇勤等 [50] 建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型，用 PEF 预处理后能够减少大鼠心肌梗死面积及心肌酶水平，促进 AMPK*α* 蛋白和磷酸化 pAMPK*α* 的表达水平，说明 PEF 可能通过干预 AMPK*α* 信号通路来发挥心肌保护作用。

5.6 对 cAMP-PKA通路的影响

环磷酸腺苷 - 蛋白激酶 A（cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A，cAMP-PKA）信号通路为最早发现的细胞内信息传递系统之一，其通路的信息传递过程主要包括：外部信号通过结合细胞膜上特异性受体，激活 G 蛋白及腺苷酸活化酶，进而促进三磷酸腺苷（ATP）转化为 cAMP，cAMP 可激活 PKA 以及下游蛋白 CREB 参与调节细胞的代谢、基因表达、细胞生长和分裂等 [51]。王建发等 [52] 研究 PEF 对心肌梗死大鼠的保护作用机制，结果表明 PEF 预处理后明显改善心肌细胞核固缩、碎裂、坏死，减小心肌梗死面积，心肌组织中 cAMP、pPKA、pCREB 的表达水平显著上调，表明 PEF 对心肌梗死大鼠心肌细胞的保护作用机制可能是通过调节 cAMP-PKA 信号通路实现的。

5.7 对 TGF-*β*1/Smads 通路的影响

转化生长因子 -*β*1（transforming growth factor-*β*1，TGF-*β*1）被认为是心肌纤维化的关键调节因子，可影响细胞生长、凋亡和分化，增加胶原和基质蛋白的产生，维持成纤维细胞的活力。Smads 家族蛋白在将 TGF-*β* 信号从细胞表面受体传导至细胞核的过程中起关键作用，且不同的 Smad 介导不同的 TGF-*β* 家族成员的信号转导。TGF-*β*1/Smads 信号通路是器官纤维化最重要的信号通路 [53]。研究发现，PEF 预处理可降低心脏重构大鼠或急性心肌梗死大鼠的心肌组织胶原蛋白沉积，抑制 TGF-*β*1 和 Smad3 的蛋白表达，表明 PEF 可能通过抑制 TGF-*β*1/Smads 通路，减少胶原产生，从而减轻心室重塑，改善心功能 [54-55]。

6 小结与展望

综上所述，PEF 发挥心脏保护作用的机制十分复杂，在体内和体外心脏系统疾病模型中，PEF 可通过多途径、多靶点、多环节实现对损伤心肌的保护。PEF 心脏保护机制的研究可以为 PEF 药物的研制提供科学依据。但现阶段研究主要集中于动物实验和细胞实验，缺乏 PEF 及其制剂在心血管疾病应用的临床研究资料。基于 PEF 潜在的心脏保护效应，结合既往的研究结果，今后需不断完善，不断探索，深入诠释 PEF 治疗心血管疾病的作用机制，以期为心血管疾病患者提供帮助。

参考文献

[1] 毛静远，赵志强，王贤良，等 . 中医药治疗心血管疾病研究述评 [J]. 中医杂志，2021，62（3）：185-188.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：108.

[3] 冯伟科，郭平 . 芍药苷药理作用研究进展 [J]. 山东中医杂志，2019，38（1）：105-108.

[4] Wang JS，Huang Y，Zhang S，et al. A protective role of paeoniflorin in fluctuant hyperglycemia-induced vascular endothelial injuries through antioxidative and anti-inflammatory effects and reduction of PKC *β*1 [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：5647219.

[5] Wu WL，Qiu CF，Feng XW，et al. Protective effect of paeoniflorin on acute cerebral infarction in rats [J]. Curr Pharm Biotechnol，2020，21（8）：702-709.

[6] Wang YM，Zhu Y，Lu SD，et al. Beneficial effects of paeoniflorin on osteoporosis induced by high-carbohydrate，high fat diet-associated hyperlipidemia in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，498（4）：981-987.

[7] Quintana-Villamandos B，Delgado-Baeza E. Does the ADMA/DDAH/NO pathway modulate early regression of left ventricular hypertrophy with esmolol? [J]. Med Hypotheses，2016，87：44-47.

[8] 杨艳娜，金在顺，杨光 . 芍药苷对 H_2O_2 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中华临床医师杂志，2017，11（5）：762-765.

[9] Li JZ，Yu SY，Wu JH，et al. Paeoniflorin protects myocardial cell from doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase [J]. Can J Physiol Pharmacol，2012，90（12）：1569-1575.

[10] 王微，刘畅，应达时，等 . 芍药苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床，2016，32（6）：52-56.
[11] 徐晓燕，王薇，王蕾 . 芍药苷对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌重构的干预作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2017，31（5）：485.
[12] 焦敏，侯琳琳，王薇 . 芍药苷对异丙肾上腺素致大鼠心肌重构作用的影响及机制 [J]. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）学报，2022，43（4）：256-260.
[13] 李健哲，余术宜 . 芍药苷对异丙肾上腺素诱导心肌成纤维细胞增殖和胶原产生的影响及其机制研究 [J]. 中国现代医学杂志，2013，23（16）：47-52.
[14] Leopold JA，Maron BA. Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. Int J Mol Sci，2016，17（5）：761.
[15] 王贞丽，姜萍，李丙华，等 . 芍药苷对大鼠低氧性肺动脉高压的防治作用及其抗氧化机制研究 [J]. 中国海洋药物，2022，41（4）：51-58.
[16] 包钰婷，郭在培，王小雪，等 . 芍药苷抗氧化应激机制研究进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2017，3306：374-377.
[17] Chen C，Du P，Wang J. Paeoniflorin ameliorates acute myocardial infarction of rats by inhibiting inflammation and inducible nitric oxide synthase signaling pathways [J]. Mol Med Rep，2015，12（3）：3937-3943.
[18] Qian GQ，Ding JJ，Zhang XZ，et al. Preconditioning with glycyrrhizic，ferulic，paeoniflorin，cinnamic prevents rat hearts from ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide pathway [J]. Pharmacogn Mag，2015，11：292-296.
[19] 詹桂兰 . 芍药苷通过 A1 腺苷受体调节 MAPKs 通路及 Bcl-2 表达抑制脓毒症小鼠心功能障碍的作用研究 [D]. 广州：暨南大学，2016.
[20] 刘兴 . 芍药苷通过 A1 腺苷受体对脓毒症小鼠心功能保护作用的研究 [D]. 广州：暨南大学，2015.
[21] Beatrice DO，Julia M，Jochen HM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok [J]. Neurochem Int，2017，109：162-170.
[22] Liu LF，Qian ZH，Qin Q，et al. Effect of melatonin on oncosis of myocardial cells in the myocardial ischemia/reperfusion injury rat and the role of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Genet Mol Res，2015，14（3）：7481-7489.
[23] Li JZ，Tang XN，Li TT，et al. Paeoniflorin inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating microRNA-1 expression [J]. Exp Ther Med，2016，11（6）：2407-2412.
[24] 谭娜，范旰，邵庆瑞，等 . 芍药苷对阿霉素诱导心肌细胞凋亡的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床，2020，36（3）：101-105.
[25] Wang SJ，Dong J，Lu HM，et al. Paeoniflorin improves myocardial injury via p38 MAPK/NF-κB p65 inhibition in lipopolysaccharide-induced mouse [J]. Ann Transl Med，2021，9（18）：1449-1459.
[26] Wu FB，Ye BH，Wu XD，et al. Paeoniflorin on rat myocardial ischemia reperfusion injury of protection and mechanism research [J]. Pharmacology，2019，105（5/6）：281-288.
[27] Ma HG，Hao JP，Liu HH，et al. Peoniflorin preconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting myocardial apoptosis：risk pathway involved [J]. Appl Biochem Biotech，2022，194：1149-1165.
[28] 李姗姗，田春雨，张国伟，等 . 芍药苷对 2 型糖尿病模型大鼠心肌损伤的改善作用及机制研究 [J]. 中国药房，2021，32（23）：2846-2853.
[29] 李凤 . 芍药苷预处理对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡及自噬的调控作用 [D]. 长春：吉林大学，2019.
[30] Zhao CG，Yin MF，Li F，et al. Mechanisms of Paeoniflorin against myocardial ischemia reperfusion injury based on network pharmacology [J]. Mater Express，2021，11（11）：1505-1515.
[31] 高宇勤，郝霁萍，刘美林，等 . 芍药苷预处理通过干预 NF-κB 信号通路对在体大鼠 MIRI 发挥保护作用 [J]. 陕西医学杂志，2015，44（12）：1581-1582.
[32] 况军，陈豫民，王巍 . 芍药苷对小鼠急性心肌梗死后心室重构的影响 [J]. 职业与健康，2016，32（9）：1196-1199.
[33] Man SM，Kanneganti TD. Regulation of lysosomal dynamics and autophagy by CTSB/cathepsin B [J]. Autophagy，2016，12（12）：2504-2505.
[34] Ashraf M，Ebner M，Wallner C，et al. A P38mapk/mk2 signaling pathway leading to redox stress，cell death and ischemia/reperfusion injury [J]. Cell Commun Signal，2014，12：2-13.
[35] 江辰阳 . 镉致大鼠神经细胞凋亡的线粒体途径及 NAC 的保护作用 [D]. 扬州：扬州大学，2014.
[36] 凌文培 . 芍药苷对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用及 MAPK 信号通路的影响 [D]. 长春：吉林大学，2021.
[37] Shao YX，Xu XX，Wang K，et al. Paeoniflorin attenuates incipient diabetic nephropathy in streptozotocin induced mice by the suppression of the Toll-like receptor-2 signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther，2017，11：3221-3233.
[38] Liu X，Chen K，Zhuang YX，et al. Paeoniflorin improves pressure overload-induced cardiac remodeling by modulating the MAPK signaling pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. Biomed Pharmacother，2019，111：695-704.
[39] Chen H，Dong Y，He X，et al. Paeoniflorin improves cardiac function and decreases adverse postinfarction left ventricular remodeling in a rat model of acute myocardial infarction [J]. Drug Des Dev Ther，2018，12：823-836.
[40] Liu M，Feng J，Du Q，et al. Paeoniflorin attenuates myocardial fibrosis in isoprenaline-induced chronic heart failure rats via inhibiting P38 MAPK pathway [J]. Current Medical Science，2020，40（2）：307-312.
[41] Dong M，Hu N，Hua Y，et al. Chronic Akt activation attenuated lipopolysaccharide induced cardiac dysfunction via Akt/GSK3β-dependent inhibition of apoptosis and ER stress [J]. Biochim Biophys Acta，2013，1832（6）：848-863.
[42] Zhai JH，Guo Y. Paeoniflorin attenuates cardiac dysfunction in endotoxemic mice via the inhibition of nuclear factor-kB [J]. Biomed Pharmacother，2016，80：200-206.
[43] Chen C，Sun Y，Luo YJ，et al. Paeoniflorin Promotes non-rapid eye movement sleep via adenosine A1 receptors [J]. J Pharmacol Exp Ther，2016，356（1）：64-73.

[44] Wang YL，Wang JX，Hu XX，et al. Antidepressant-like effects of albiflorin extracted from Radix paeoniae Alba [J]. J Ethnopharmacol，2016，179：9-15.
[45] Han F，Zhou DC，Yin X，et al. Paeoniflorin protects diabetic mice against myocardial ischemic injury via the transient receptor potential vanilloid 1/calcitonin gene-related peptide pathway [J]. Cell Biosci，2016，6（1）：290-308.
[46] 程燕，陈志明，李莉，等 . 黄芪多糖对脓毒症大鼠心脏功能及炎症因子水平的影响 [J]. 浙江中医药大学学报，2018，42（5）：354-359.
[47] 洪秀芳，李莉，杨舟鑫，等 . 芍药苷干预对脓毒症大鼠心肌损伤的影响 [J]. 中华内科杂志，2022，61（6）：652-658.
[48] 洪秀芳，李莉，郭冬阳，等 . 芍药苷能通过调节 Src/ 血管内皮 - 钙黏蛋白通路改善心脏微血管内皮细胞通透性 [J]. 中华危重病急救医学，2020，32（1）：83-87.
[49] Liu X，Chhipa RR，Nakano I，et al. The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent anti-glioma agent [J]. Mol Cancer Ther，2014，13（3）：596.
[50] 高宇勤，郝霁萍，赵国平 . 芍药苷预处理激活 AMPKα 对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 海南医学，2015，26（15）：2185-2188.
[51] Favaro E，Granata R，Miceli I，et al. The ghrelin gene products and ex-endin-4 promote survival of human pancreatic islet endothelial cells in hyper-glycaemic conditions，through phosphoinositide-3-kinase/Akt，Extracellular signal-related kinase（ERK）1/2 and Camp/protein kinase A（PKA）signaling pathways [J]. Diabetologia，2012，55（4）：1058-2070.
[52] 王建发，赵国安 . 芍药苷通过 cAMP-PKA 信号通路对心肌梗死大鼠保护作用的实验研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志，2018，10（4）：479-483.
[53] Zhao SL，Li MF，Ju WZ，et al. Serum level of transforming growth factor beta 1 is associated with left atrial voltage in patients with chronic atrial fibrillation [J]. Indian Pacing Electrophysiol J，2018，18（3）：95-99.
[54] Liu M，Ai J，Feng J，et al. Effect of paeoniflorin on cardiac remodeling in chronic heart failure rats through the transforming growth factor β1/Smad signaling pathway [J]. Cardiovasc Diagn Ther，2019，9（3）：272-280.
[55] 闫娜，杨妮，董晗，等 . 芍药苷通过抑制 TGF-β1/Smad3 通路对急性心肌梗死后心室重塑的作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2022，31（5）：624-629.

（收稿日期：2022-12-24；修回日期：2023-02-01）

芜菁的化学成分和生物活性研究进展

王证德[1, 2]，平措绕吉[3]，刘莹[1, 2]，陈飞腾[1, 2]，夏秋蕊[1, 2]，海梅荣[1, 2*]（1. 云南农业大学 农学与生物技术学院，昆明 650201；2. 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心，昆明 650201；3. 西藏昌都市类乌齐县利美藏医院，西藏 昌都 855600）

摘要：芜菁主要含有黄酮类、苯丙素类、多糖类等成分，药理研究表明其粗提物或纯化合物具有抗缺氧、抗氧化、抗肿瘤和保肝等多种药理活性。本文通过检索中国知网、PubMed 等数据库，对近 20 年国内外有关芜菁化学成分及其药理活性的最新研究进展进行综述，以期为芜菁植物资源的合理开发和利用提供参考。

关键词：芜菁；化学成分；药理活性；作用机制
中图分类号：R284.2，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2391-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.021

Research progress in chemical constituents and biological activities of *Brassica rapa* L.

WANG Zheng-de[1, 2], Ping-cuo-rao-ji[3], LIU Ying[1, 2], CHEN Fei-teng[1, 2], XIA Qiu-rui[1, 2], HAI Mei-rong[1, 2*] (1. *Agronomy and Biotechnology College of Yunnan Agricultural University*, *Kunming* 650201; 2. *Innovation and Utilization of Chinese Herbal Medicine Germplasm in Southwest China National Local Joint Engineering Research Center*, *Kunming* 650201; 3. *Limei Tibetan Hospital*, *Leiwuqi County*, *Changdu Tibet* 855600)

基金项目：蔓菁、红景天等药用植物种质资源保护及栽培技术研究（No. KX132020033）。
作者简介：王证德，男，在读硕士研究生，主要从事药用植物资源化学与开发利用，email：2536555797@qq.com *通信作者：海梅荣，女，教授，主要从事作物生理生态研究，email：2250029499@qq.com

Abstract: The main components of *Brassica rapa* L. include flavonoids, phenylpropanoids, polysaccharides and so on. Pharmacological studies have shown that crude extracts or pure compounds from *Brassica rapa* L. possess anti-hypoxia, anti-oxidation, anti-cancer and liver protection and other pharmacological activities. This paper reviewed the latest research progress in the chemical constituents and pharmacological effect of *Brassica rapa* L. at home and abroad in the past 20 years by searching databases such as CNKI and PubMed, to provide reference for the rational development and utilization of plant resources of *Brassica rapa* L. .

Key words: *Brassica rapa* L.; chemical composition; pharmacological activity; mechanism

芜菁（*Brassica rapa* L.），是十字花科（Brassicaceae）芸薹属（*Brassica*）两年生草本植物。起源于欧洲的地中海沿岸及阿富汗、巴基斯坦等地，欧洲、亚洲和美洲均有栽培，在中国的南北方均有栽培[1]。芜菁在我国不同地区有不同的称谓，如在四川称为“圆根”，温州称其为“盘菜”，山东、河北、内蒙一带称为“芜菁”，新疆地区叫“恰玛古”，而在西藏地区的芜菁俗称“芜根”，藏语叫“妞玛”[2]。芜菁具有悠久的药、食、饲三用历史。藏医经典著作《四部医典》《晶珠本草》《藏药晶镜本草》《中华本草·藏药卷》《藏药志》《中华藏本草》等中均记载了芜菁的历史运用。《四部医典》记载，芜菁味甘性温，化味甘，块根“祛风”、生“赤巴”，滋补，解毒，治“培根病”“龙病”“虚弱”，具有清热解毒、滋补增氧功效；种子解毒，具有缓解各种食物中毒等功效[3]。目前，芜菁的营养成分、化学成分以及生物活性均被广泛研究。在营养成分方面，芜菁营养丰富，含有碳水化合物、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素和胡萝卜素等多种营养成分[4]；在化学成分方面，芜菁中含有多糖、皂苷、黄酮、硫代葡萄糖苷、酚酸类、挥发油等多种类型的化学成分[5-8]；在生物活性方面，芜菁在抗肿瘤、抗氧化、抗缺氧、抗炎、提高免疫力等方面显示出良好的潜在药用活性。虽有对芜菁的化学成分和生物活性综述报道，但未能详述从芜菁分离得到的化学成分及其发挥生物活性作用的机制[9]。本文详细综述了近 20 年芜菁在植物化学和药理活性与机制方面的研究进展，以期为其进一步研究提供参考。

1 芜菁的化学成分成分

1.1 黄酮类化学成分

黄酮类化合物是植物在长期自然选择过程中产生的一些次级代谢产物，广泛存在于植物、牧草、水果和药用植物中[10]。帕丽达·阿布利孜等[11]用紫外可见分光光度法测得芜菁中总黄酮平均含量为 2.805%。芜菁中分离得到的黄酮类化合物 32 个，其化合物名称和结构见图 1[8，12-18]。

1.2 苯丙素类和酚类化学成分

研究显示，芜菁中含有较丰富的苯丙素类和酚类化合物，Sousa 等[19]利用高效液相色谱分析了芜菁叶片中的化合物，发现其含有较为丰富的酚酸类化合物，如咖啡酸、香豆酸类等。从芜菁中分离得到的苯丙素类和酚类化合物共 45 个，其名称和结构见图 2[2，13，15，17-18，20-21]。

1.3 多糖类化学成分

多糖是一种天然高分子化合物，广泛存在于生物体中，具有丰富的生物活性。芜菁多糖是芜菁的主要活性成分之一，其干燥块茎的总多糖含量在 9.10% ～ 16.32%[6]。乔丽洁等[22]通过水提醇沉的方法提取粗多糖后，采用 DEAE-650 纤维素柱对芜菁粗多糖洗脱，得到芜菁精制多糖平均含量为 581 mg·g^{-1}。唐伟敏等[23]采用 IR、MS、NMR 等技术对芜菁多糖检出 7 种糖基，其摩尔比为半乳糖醛酸∶甘露糖∶阿拉伯糖∶半乳糖∶葡萄糖∶鼠李糖∶葡萄糖醛酸 ＝ 67.73∶17.19∶10.20∶3.19∶1.11∶0.34∶0.23。Li 等[24]采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）柱前衍生化高效液相色谱法（HPLC）检测芜菁样品，分析 BRPs 多糖（*Brassica rapa* L polysaccharides）的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、无水葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖，摩尔比为 0.0096∶0.39∶1∶39∶0.33∶0.16。李雅双等[25]对芜菁多糖（WJdp4-b）的结构进行解析。结果表明 WJdp4-b 单糖组成为鼠李糖（Rha）、阿拉伯糖（Ara）、甘露糖（Man）、葡萄糖（Glc），各单糖的摩尔比为 1.0∶1.0∶10∶9.0。结构分析发现 WJdp4-b 为多分支结构，分子的主体是由 Glc 构成，连接方式为：Glc 以 1→3 链接构成了 WJdp4-b 的主链，在 Glc 的 6 位处有分支，每 17 个 Glc 有 12 个分支；支链由 Ara 以 1→4 或 1→5 连接，Man 的 1→3、1→6 连接构成，Rha 和 Glc 构成了末端。Cao 等[26]分离得到的 BRP-1 多糖（*Brassica rapa* L polysaccharide-1）由 Man 和 Glu 组成，摩尔比为 7.62∶1，其主干为→6）-*α*-*D*-Glup-（1→4-*β*-*D*-Glup-

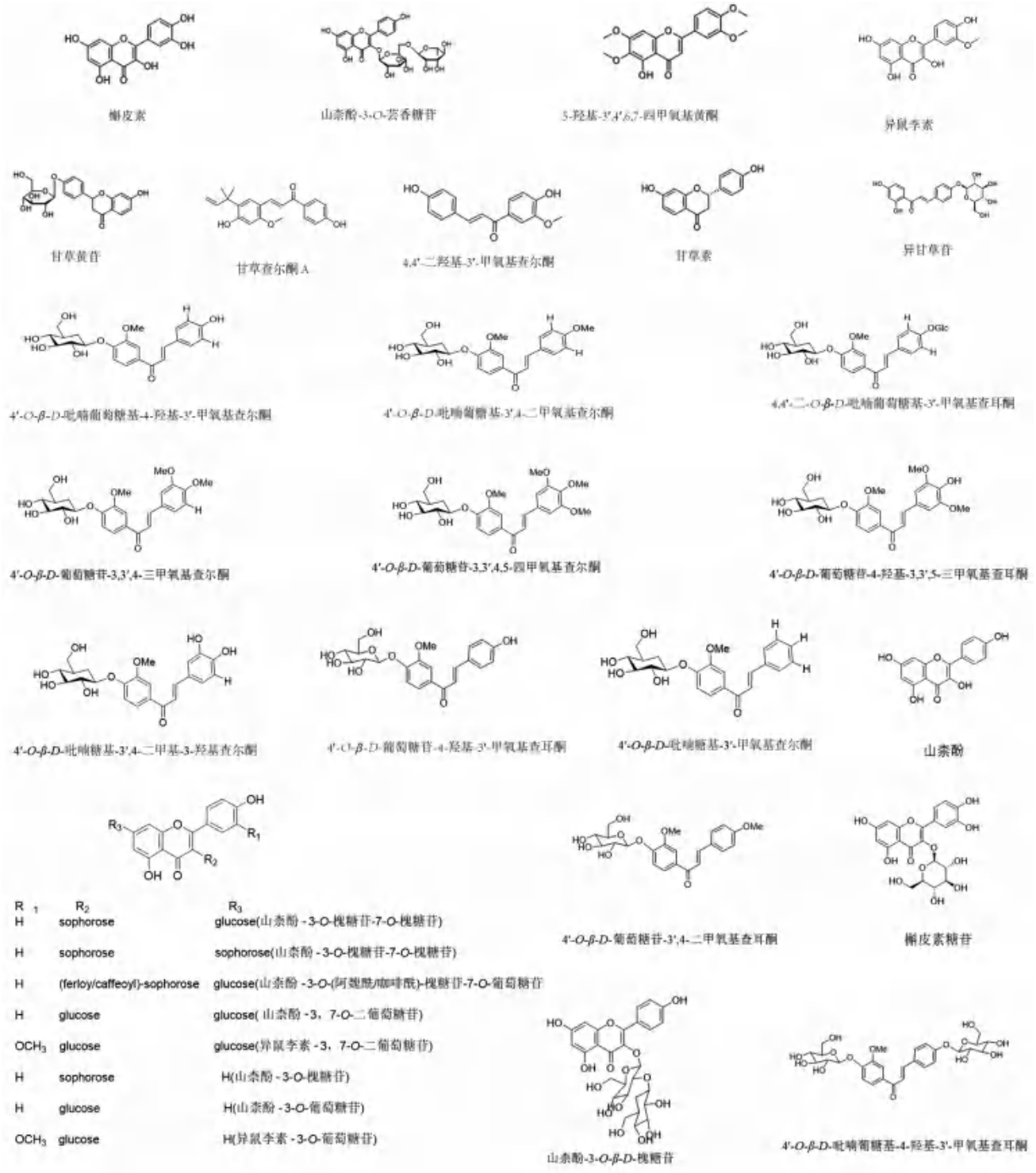


图 1　芜菁的黄酮类化合物

Fig 1　Flavonoids of *Brassica rapa* L.

（1 → 2）-*α*-*D*-Manp-（1 → 2）-*α*-*D*-Glup-（1 →，分支为 [T-*α*-*D*-Manp-（1]n →。

1.4　硫代葡萄糖苷类化学成分

硫代葡萄糖苷（芥子油苷）是十字花科植物中一类重要的含氮和硫的次生代谢物，具有较强的抑菌和抗肿瘤活性 [27]。王辉等 [28] 通过 HPLC 法在 20 份芜菁材料中共同检测到 8 种硫苷，其中以脂肪族硫苷的含量最高，占总硫苷含量的 85% 以上；吲哚族硫苷次之；芳香族硫苷的含量最低。Antonious 等 [29] 采用葡聚糖凝胶、离子交换色谱等手段纯化了硫代葡萄糖苷，并测得其含量为 1.5 ～ 28 mmol • kg $^{-1}$。陈新娟等 [30] 研究发现芜菁中的硫苷主要为 4- 戊烯基硫苷、顺 -2- 羟基 -3- 丁烯基硫苷、3- 丁烯基硫苷、苯乙基硫苷。

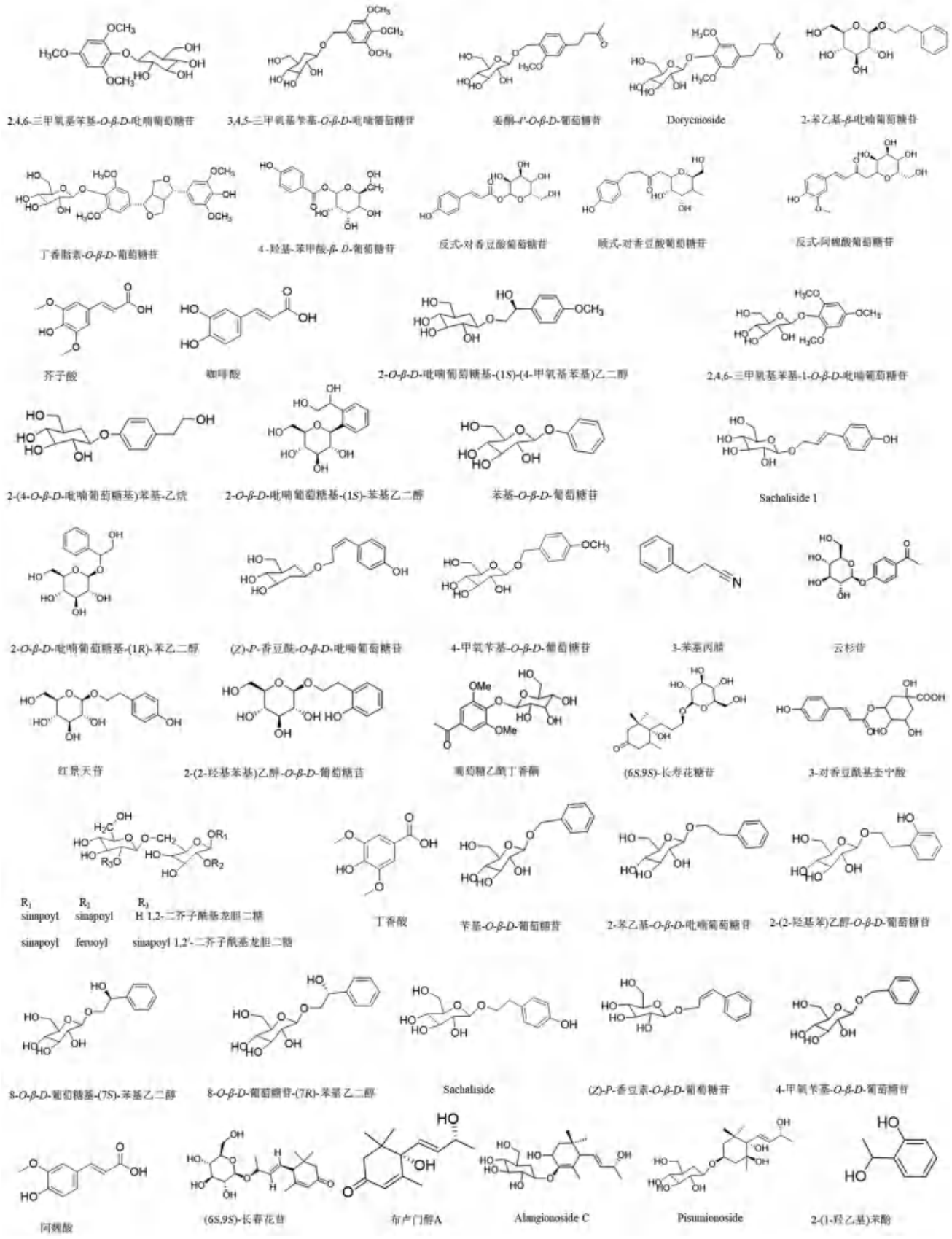


图 2 芜菁的苯丙素类和酚类化学成分

Fig 2 Phenylpropanoids and phenolic compounds of *Brassica rapa* L.

1.5 其他类化合物

除以上化合物，芜菁还含有他类化合物，如萜类、甾醇类、挥发油等。如马彦玲[8]从芜菁中分离得到三萜类化合物熊果酸、齐墩果酸、β-谷

甾醇、软脂酸单甘油酯、邻苯二甲酸二丁酯。此外还有吲哚 -3- 乙腈、4- 甲氧基吲哚 -3- 乙腈、吲哚 -3- 醛、腺苷、3β，20*E*-ergosta-5，20（22-dien-3-ol）[13]、芸苔素 A[31]。Fernandes 等 [32] 研究发现，芜菁中的有机酸包括苹果酸、莽草酸、乌头酸、柠檬酸等，其含量在 36 ～ 51 g • kg^{-1}；Taveira 等 [33] 采用顶空固相微萃取（HS-SPME）结合气相色谱 - 离子阱质谱联用（GC/IT-MS）分析芜菁叶中的挥发性成分，共检测出醇类、醛类、酯类、烯萜类等 64 种化合物。Hua 等 [34] 从芜菁中分离得到新化合物（2-methoxy-5-methyl-1，4-dioxan-2-yl）methyl acetate。叶挥发油中含有 48 种挥发性成分，占总挥发性成分的 94.0% ～ 96.6%。主要成分为 3- 丁烯基异硫氰酸酯（1.4% ～ 29.2%）、4- 戊烯基异硫氰酸酯（8.2% ～ 23.5%）、2- 甲基 5- 己腈（1.3% ～ 16.8%）、2- 苯乙基异硫氰酸酯（7.0% ～ 13.7%）、叶绿醇（6.1% ～ 23.5%），芜菁叶挥发油以含硫和含氮化合物含量高为特征。从芜菁中分离得到的其他类化合物见图 3[8，13，18，32，34]。

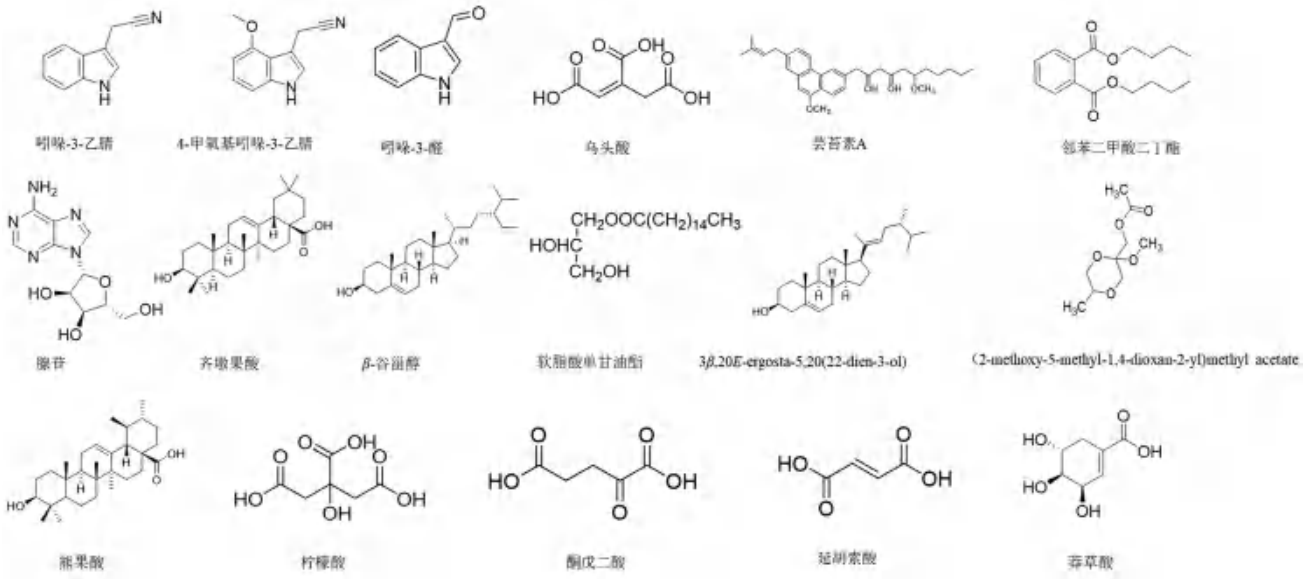


图 3　芜菁的其他类化学成分

Fig 3　Other chemical constituents of *Brassica rapa* L.

2　芜菁的生物活性及作用机制

2.1　抗缺氧活性及作用机制

长期居住平原的人进驻高原后，由于缺氧会使人体发生一系列的高原缺氧反应，如人体动脉血氧分压下降，心、肺功能的储备能力下降，组织细胞缺氧，从而导致机体活动能力下降 [35]。近年来多项研究表明芜菁具有抗缺氧活性，例如，食用 7 d 芜菁可能有助于提高健康人群的缺氧耐受，这可能是由于芜菁能够改善氧的吸收和输送，增强机体抗氧化能力，增加平均红细胞血红蛋白浓度 [36]。体外抗缺氧活性评价表明，芜菁多糖是一种新型的潜在抗缺氧药物 [37]。邝婷婷 [3] 研究证明了芜菁多糖能够提升急性高原低氧大鼠血清中超氧化物歧化酶（SOD）、还原型谷胱甘肽（GSH）的水平，降低丙二醛（MDA）、氧化型谷胱甘肽（GSSG）和乳酸脱氢酶（LDH）的含量，减少大鼠脑组织神经元细胞的凋亡，降低 Caspase-3、Bax 蛋白的表达，激活 HIF-lα/microRNA 210/ISCU1/2（COX10）信号通路，改善线粒体的功能，达到抗高原低压缺氧的脑保护作用。芜菁中分离得到单体化合物也具有抗缺氧作用，例如芜菁中的反式 - 对香豆素葡萄糖对物理缺氧条件下的细胞具有保护作用 [2]。从芜菁分离得到的（2-methoxy-5-methyl-1，4-dioxan-2-yl）methyl acetate 在氧糖剥夺 / 再灌注损伤的 HT22 细胞模型中，通过激活 PI3K/Akt 通路对产生抗缺氧保护作用 [34]。

2.2　抗氧化活性及作用机制

人体主要有两条抗氧化损伤的防线：一是酶途径，基于体内的 SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽等抗氧化酶的自然防御机制；二是非酶途径，由食物或补充剂中富含的抗氧化物质所提供的外部支持 [38]。正常情况下，人体内的自由基处于不断产生和不断消除的动态平衡中，但如果自由基产生过多或消除过慢时，就会造成机体在分子、细胞及组织水平的损伤，加速机体的衰老，诱发疾病 [39]。许多研究表明芜菁具有抗氧化活性，如从芜菁花中分离得到的布卢门醇 A、8-*O*-β-*D*- 吡喃葡萄糖基 -（7*R*）- 苯基乙二醇、（*E*）- 对香豆酰基 -*O*-β-*D*- 吡喃葡萄糖苷、丁香树脂醇吡喃葡萄

糖苷表现出良好的 DPPH 自由基清除活性，IC_{50} 分别为 47.30、45.17、48.70、39.47 μmol • L^{-1} [32]。杨保求等 [40-41] 研究发现芜菁皂苷有一定的清除自由基的作用，并且能够显著提高小鼠体内 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的活性，降低 MDA 的含量，进而表明芜菁皂苷具有提高小鼠抗氧化能力的作用。动物实验提示芜菁多糖 BRP-80（*Brassica rapa* L-80）在体内具有抗氧化活性 [42]。以上结果说明芜菁具有作为一种新的天然抗氧化剂来源的潜力。

2.3 保肝活性及作用机制

随着经济的发展和生活方式的改变，全球酒精消耗量逐年递增，与之相关肝的发病率也在逐年攀升 [43]。研究表明，芜菁在治疗肝脏相关问题方面有一定的作用 [44]。例如 Li 等 [24] 研究发现芜菁多糖预处理能显著降低小鼠血清中谷丙转氨酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）和谷草转氨酶（AST）的酶活性，提高肝脏中 SOD 和 GSH-Px 的活性，降低 MDA 的浓度，显著抑制肿瘤坏死因子（TNF-α）、白细胞介素（IL）-1β 和 IL-6 的表达，下调四氯化碳（CCl_4）诱导的肝组织 Caspase-3 的表达，芜菁多糖通过下调 JAK2/STAT3 信号通路，调节细胞凋亡和炎症反应对 CCl_4 诱导的肝损伤产生肝保护作用。其他一些研究结果也证实了芜菁具有抗肝损伤的能力，如口服芜菁提取物对 *D*- 半乳糖胺致实验性肝损伤大鼠血清 AST、ALT 和 LDH 酶活性明显降低 [45]；芜菁根乙醇提取物对顺铂所致大鼠肝损伤具有保护作用 [46]。以上研究足以说明芜菁在治疗肝损伤上的应用潜力。

2.4 抗肿瘤活性与作用机制

癌症是全球最严重的健康问题，2020 年全球新发癌症病例 1929 万例，死亡病例 996 万例 [47]。近年来研究发现芜菁具有抗肿瘤活性，例如从芜菁中分离得到的新的菲衍生物 brassicaphenanthrene A 和二芳基庚烷类化合物 6-paradol 和反式 -6-shogaol 对人类癌症细胞株 HCT-116、MCF-7 和 HeLa 均表现出较高的生长抑制活性 [48]。Adila 等 [49] 研究发现芜菁正丁醇馏分通过增加活性氧（ROS）和以线粒体膜电位降低和细胞色素 C 的释放为特征的线粒体功能障碍，显著诱导 A549 肺腺癌细胞的细胞周期停滞和凋亡，从而促进 Caspase-3 和多聚（ADP- 核糖）聚合酶的加工，并明显抑制 A549 细胞的体外迁移。这些结果表明芜菁正丁醇馏分通过增加 ROS 产生和线粒体依赖的凋亡途径抑制 A549 细胞增殖。Reziyamu 等 [50] 研究发现芜菁多糖也能通过线粒体途径促使肺癌 A549 细胞凋亡。以上研究证明了芜菁可作为治疗肺癌的潜在候选药物。

2.5 抗炎活性与作用机制

炎症是人体对有害刺激（包括病原体、受损细胞或病毒）的复杂生物反应的一部分。然而，以血管扩张、促炎分子产生、细胞因子释放和白细胞聚集为特征的过度炎症反应是有害的 [51-52]。体外和体内实验表明，芜菁根乙酸乙酯部位通过抑制 NF-κB 活性发挥其抗关节炎和抗炎特性 [53]。芜菁中分离得到的 arvelexin 通过抑制 IκB 激酶的激活，抑制 NF-κB 调控的促进炎症基因表达，从而降低脂多糖诱导的小鼠的血清中一氧化氮（NO）和炎症细胞因子水平 [54]。在卵清蛋白诱导法诱导小鼠哮喘炎症模型中，芜菁提取物（125 ～ 500 mg • kg^{-1}）能有效降低血清中卵清蛋白（IgE）的特异性和支气管肺泡灌洗液（BALF）中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平。芜菁提取物抑制 BALF 中炎性细胞浸润，改善肺顺应性和气道阻力，还能显著降低 ERK、p38MAPK、IκB-α 和 NF-κB 的磷酸化表达水平，剂量依赖性激活 JNK。这说明芜菁提取物在抑制卵清蛋白诱导的哮喘方面是有效的 [55]。

2.6 促进骨质生长与作用机制

骨质疏松是人体常见的一种疾病，其发病原因多样、发病机制复杂，临床上用于治疗的药物不良反应多。因此亟需寻找一种治愈率高、不良反应少的药物 [56]。研究发现芜菁油能通过调节骨质疏松大鼠的成骨细胞特异性转录因子（Osterix）、大鼠组织蛋白酶 K（CathK）和 TNF-α 的信使核糖核酸（TNF-α mRNA）的水平，升高钙、磷、骨碱性磷酸酶（BALP）和维生素 D 水平，从而促进骨质疏松大鼠的骨形成，明显增强股骨轴皮质骨和股骨头小梁骨的厚度，表现出治疗骨质疏松症的潜力 [57]。Jaehoon 等 [58] 的研究同样证实了芜菁具有促进骨形成的作用。

2.7 免疫调节活性与作用机制

芜菁具有提高人体免疫力活性，如芜菁花提取物在脂多糖刺激的外周血单个核细胞（PBMCs）中，通过减弱 COX-2、iNOS、IL-6、TNF-α 和 NF-κB 基因表达的上调表现出免疫调节活性 [59]。生物活性检测结果显示，较高剂量（400 μg•mL^{-1}）的 BRNP-1 和 BRNP-2 多糖通过刺激 RAW264.7 巨噬细胞增殖、NO 释放和细胞因子（IL-6、TNF-α）分泌。这些结果表明 BRNP-1 和 BRNP-2 多糖可能增强巨噬细胞介导的免疫反应 [60]。

2.8 降血糖活性与作用机制

Sihem 等 [61] 认为芜菁水提物可以激活糖尿病受损的 AKT 信号通路，调节 ERK1/2 活性，可能

对 2 型糖尿病及其并发症的预防具有重要意义。Hassanzadeh-Taheri 等 [62] 研究认为芜菁叶及根茎提取物可作为糖尿病肾病患者易于获取的膳食来源。从芜菁中分离得到的查尔酮 A 通过氢键（Gln1372、Asp1420、Gln1372、Arg1510）、疏水作用（Tyr1251、Tyr1251、Trp1355、Phe1560、Ile1587、Trp1355、Phe1559、Phe1559）和 *π-π* 堆积作用（Trp1355）与 *α*- 葡萄糖苷酶的活性位点（对接 score ＝－ 52.88）进行对接表现出 *α*- 葡萄糖苷酶的活性，该研究为芜菁作为抗糖尿病候选药物的新资源提供了有价值的信息 [13]。从芜菁花中分离得到 2-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -（1*S*）-（4- 甲氧基苯基）乙二醇等 9 个化合物具有抑制 *α*- 葡萄糖苷酶活性 [20]。酶抑制动力学研究表明芜菁的新化合物 2-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖 -（1*S*）-（4- 甲氧基苯基）乙二醇和 2-（4-*O*-*β*-*D*- 阿洛糖）苯基 - 乙醇通过非竞争性抑制 *α*- 葡萄糖苷酶活性，能与麦芽糖糖苷酶形成稳定复合物，深入 Nt- 麦芽糖糖苷酶和 Ct- 麦芽糖糖苷酶狭窄的 -1 位底物结合位点，占据底物结合位点从而抑制酶活性；选择性地抑制醛酮还原酶家族醛糖还原酶的活性，可减小对该家族其他酶的影响。这些研究结果表明，芜菁花缓解血糖快速升高和预防持续高血糖导致的慢性并发症的发生发展方面具有一定的价值，有望成为多靶点防治糖尿病及其慢性并发症的重要膳食来源，为芜菁花的进一步研究和功能性食品开发提供理论依据 [63]。

2.9 神经保护作用与作用机制

芜菁分离得到的芸苔素 A 通过 Nrf2 介导 HO-1 表达对谷氨酸诱导的神经毒性具有保护作用。如芸苔素 A 提高了细胞谷胱甘肽和谷氨酰胺半胱氨酸连接酶基因的表达，引起 Nrf2 核转位，抗氧化反应元件 ARE 启动子活性增加。Nrf2 还通过 PI3K/Akt 和 JNK 调节通路介导芸苔素 A 诱导的 HO1。这说明芜菁中天然成分芸苔素 A 具有神经保护作用 [31]。从芜菁中得到的 4'-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -4- 羟基 -3，3'，5- 三甲氧基查尔酮对神经母细胞瘤细胞具有显著的选择性抗肿瘤作用。它通过抑制 Rb 的磷酸化和 E2F 的释放，抑制 S 期转换，诱导细胞周期阻滞在 G_1 期，同时该化合物通过 Caspase 途径诱导细胞凋亡 [64]。此外，4'-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡糖基 -3'，4- 二甲氧基查耳酮显著增加 PC12 细胞外信号调节 ERK1/2 蛋白，p38MAPK 和 JNK/SAPK 的磷酸化形式，但不影响 Akt，这可能介导了明显的神经突起生长 [16]。这些发现表明芜菁可能具有开发神经治疗药物的潜力。

2.10 其他活性与作用机制

除上述多种生物活性外，芜菁还具有抑菌、护肾等活性。从芜菁中分离得到的 4'-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖 -4- 羟基 -3- 甲氧基查尔酮和 4'-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖 -3，4- 二甲氧基查尔酮使 NOX 酶失活，抑制细胞内 ROS 的产生来抑制细胞内 Ca^{2+} 的升高，并对抗原（Ag）刺激的 RBL-2H3 细胞脱颗粒表现出抑制作用 [17]。王建玲等 [65] 通过定性定量的抑菌实验，验证了芜菁子挥发油对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌均有一定的抑制作用，可能与其中含有异硫氰酸酯类和腈类化合物有关。Kim 等 [66] 研究表明芜菁根的乙醇提取物减弱了氧化应激，对顺铂诱导的肾毒性具有保护作用。

3 结语

芜菁作为药、食、饲三用植物，它的多糖类、硫代葡萄糖苷类、黄酮类、苯丙素类化合物等多种活性成分具有抗缺氧、抗氧化、保肝、抗炎、促进骨质生长、提高免疫力等活性。虽然芜菁具有较大的药用潜力，但从目前发表的研究成果来看，对芜菁生物活性研究仍有不足。首先，芜菁的生物活性主要体现对粗提物的研究，而有关纯的单体化合物的生物活性研究较少；其次，芜菁的物质基础研究还不够深入，主要表现在新化合物的挖掘；最后，毒性和使用禁忌研究尚不明确。因此需要加强芜菁的化学成分研究，揭示新化合物的结构，并通过药理研究阐述其在体内的作用机制，芜菁将有望开发成为一种具有改善患者生活质量的药物制剂或保健食品。

参考文献

[1] 马菁 . 新疆恰玛古中类黄酮提取、纯化及微胶囊化的研究 [D]. 石河子：石河子大学，2010.

[2] 楚秉泉 . 西藏芜菁的抗缺氧功能成分分离及其作用机制研究 [D]. 杭州：浙江大学，2017.

[3] 邝婷婷 . 基于 HIF-1*α* 信号通路和代谢组学研究藏药蔓菁多糖抗高原低氧的作用机制 [D]. 成都：成都中医药大学，2019.

[4] 王文宁 . 蔓菁营养成分分析及其改善小鼠肠道菌群的研究 [D]. 郑州：郑州大学，2018.

[5] 李卫红 . 晋南蔓菁化学成分分析及蛋白质的含量测定 [J]. 农产品加工，2016（13）：48-50.

[6] 杨永东 . 藏药蔓菁多糖的制备、组分分析及抗急性低压缺氧损伤作用的研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2013.

[7] 陈新娟，周胜军，杨悦俭，等 . 3 个芜菁品种硫代葡萄糖苷含量的比较研究 [J]. 浙江农业科学，2009（2）：415-417.

[8] 马彦玲 . 芜菁子化学成分的基础研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2011.

[9] 李雅双，连路宁，阿西娜，等 . 芜菁化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 时珍国医国药，2013，24（9）：2247-2249.

[10] 程新燕 . 植物中黄酮类化合物的提取工艺及药理活性研究进展 [J]. 广西医科大学学报，2016，33（6）：1075-1076.

[11] 帕丽达·阿布利孜，海力茜·陶尔大洪，古娜娜·对山别克 . 正交设计优选维药恰玛古总黄酮的提取工艺 [J]. 光谱实验室，2013，30（2）：684-688.
[12] Annalisa R，Pamela V，Laura I，et al. HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops（*Brassica rapa* L. *Subsp*. *sylvestris* L.）[J]. J Agric Food Chem，2006，54（4）：1342-1346.
[13] Paul S，Zhang X，Yang Y，et al. Chemical constituents from Turnip and their effects on *α*-glucosidase [J]. Phyton-Int J Exp Bot，2020，89（1）：131-136.
[14] Hun JR，Qian W，Gyeong CJ，et al. Isolation and identification of flavonoids from the roots of brassica rapa ssp [J]. J Appl Biol Chem，2013，56（1）：23-27.
[15] 缪奔杰 . 芜青花化学成分及抗氧化活性研究 [D]. 扬州：扬州大学，2017.
[16] Atsuyoshi N，Hirokazu K，Hiroyuki T，et al. Neurite outgrowth of PC12 cells by 4'-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-3'，4-dimethoxychalcone from *Brassica rapa* L.'hidabeni' was enhanced by pretreatment with p38MAPK inhibitor [J]. Neurochem Res，2013，38（11）：2397-2407.
[17] Itoh T，Ninomiya M，Nozawa Y，et al. Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L.'hidabeni' suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells [J]. Bioorg Med Chem，2010，18（19）：7052-7057.
[18] Fernandes F，Valentão P，Sousa C，et al. Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip（*Brassica rapa* var. *rapa* L.）[J]. Food Chem，2007，105（3）：1003-1010.
[19] Sousa C，Taveira M，Valentão P. Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds：a comparative study [J]. Food Chem，2008，110（4）：953-961.
[20] Chun-Chao Z，Jie S，Jia C，et al. Phenolic glycoside constituents from Brassica rapa flowers and their *α*-glucosidase inhibitory activity [J]. Nat Prod Res，2019，33（23）：3398-3403.
[21] Robin，Arora S，Vig AP. Inhibition of DNA oxidative damage and antimutagenic activity by dichloromethane extract of *Brassica rapa* var. *rapa* L. seeds [J]. Ind Crops Prod，2015，74：585-591.
[22] 乔丽洁，程煜凤，阿依夏古丽·巴斯卡，等 . 芜菁精制多糖的提取、鉴别及含量测定 [J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（12）：4115-4120.
[23] 唐伟敏，金露，谢亮华，等 . 芜菁多糖的分离纯化、化学结构及其抗疲劳动物试验研究 [J]. 中国食品学报，2018，18（12）：22-31.
[24] Li OY，Yang HL，Wang WX，et al. Brassica rapa polysaccharides ameliorate CCl_4-induced acute liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and oxidative stress [J]. Chem Biodivers，2019，17（1）：1002-1007.
[25] 李雅双，刘杰，包瑛，等 . 芜菁水溶性多糖的结构分析 [J]. 食品与发酵工业，2015，41（8）：175-180.
[26] Cao WY，Wang CX，Mayhesumu X，et al. Isolation，structural elucidation，antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharides of *Brassica rapa* L [J]. Molecules，2022，27（9）：3002.
[27] 李鲜，陈昆松，张明方，等 . 十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究进展 [J]. 园艺学报，2006（3）：675-679.
[28] 王辉，武剑，徐东辉，等 . 芜菁叶片中硫代葡萄糖苷的主要构成及含量 [J]. 江苏农业学报，2012，28（6）：1413-1417.
[29] Antonious GF，Kasperbauer MJ，Byers ME. Light reflected from colored mulches to growing turnip leaves affects glucosinolate and sugar contents of edible roots [J]. Photochem Photobiol，1996，64（3）：605-610.
[30] 陈新娟，周胜军，杨悦俭，等 . 3 个芜菁品种硫代葡萄糖苷含量的比较研究 [J]. 浙江农业科学，2009（2）：415-417.
[31] Hwan L，Wonmin K，Anisuzzaman C，et al. Brassicaphenanthrene A from *Brassica rapa* protects HT22 neuronal cells through the regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression [J]. Mol Med Rep，2019，21（1）：493-500.
[32] Fernandes F，Valentão P，Sousa C，et al. Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip（*Brassica rapa* var. *rapa* L.）[J]. Food Chem，2007，105（3）：1003-1010.
[33] Taveira M，Fernandes F，de Pinho PG，et al. Evolution of *Brassica rapa* var. *rapa* L. volatile composition by HS-SPME and GC/IT-MS[J]. Microchem J，2009，93（2）：140-146.
[34] Hua HY，Zhu HK，Liu C，et al. Bioactive compound from the Tibetan turnip（*Brassica rapa* L.）elicited anti-hypoxia effects in OGD/R-injured HT22 cells by activating the PI3K/AKT pathway [J]. Food Funct，2021，12：2901-2913.
[35] 石路，王旭萍 . 红景天对高原缺氧环境下人体运动前后血流动力学的作用 [J]. 高原医学杂志，2017，27（2）：42.
[36] Chu BQ，Chen C，Li JJ，et al. Effects of Tibetan Turnip（*Brassica rapa* L.）on promoting hypoxia-tolerance in healthy humans [J]. J Ethnopharmacol，2016，195：246-254.
[37] Xie Y，Jiang SP，Su DH，et al. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from Brassica rapa L [J]. Int J Biol Macromol，2010，47（4）：528-533.
[38] Luo JM，Zhang C，Liu R，et al. Ganoderma lucidum polysaccharide alleviating colorectal cancer by alteration of special gut bacteria and regulation of gene expression of colonic epithelial cells [J]. J Funct Foods，2018，47：127-135.
[39] 冯欢欢，赵祥升，杨美华，等 . 芳香药用植物的抗氧化活性成分及其药理作用研究进展 [J]. 中南药学，2014，12（6）：557-562.
[40] 杨保求，马飞军，蒲云峰 . 新疆芜菁皂苷的体内抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发，2016，37（16）：6-9，10.
[41] 杨保求，唐琪，蒲云峰 . 恰玛古皂苷的提取及清除自由基活性的研究 [J]. 中国果菜，2015，35（10）：18-21.
[42]Zhao WJ，Zhang WY，Liu L，et al. Fractionation，characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L [J]. Process Biochem，2021（16）：163-175.
[43] 沈佳妍，徐婧淇，刘淼，等 . 天然黄酮类化合物改善酒精性肝病作用及机制的研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（2）：371-381.
[44] Igarashi K，Mikami T，Takahashi Y，et al. Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from Atsu-

mi-kabu（*Red Turnip*，*Brassica*，*campestris* L.）leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2008，72（3）：80-82.

[45] Choi HJ，Han MJ，Baek NI，et al. Hepatoprotective effects of *Brassica rapa*（Turnip）on d-galactosamine induced liver injured rats [J]. Saengyak Hakhoe Chi，2006，37（4）：258-265.

[46] Mohajeri D，Doustar Y，Mousavi G. Protective and antioxidant activities of turnip root ethanolic extract against cisplatin induced hepatotoxicity in rats [J]. Majallah-i taḥqīqāt-i ʿulūm-i pizishkī-i Zāhidān，2012，13（9）：8-15.

[47] 世界癌症日：乳腺癌超肺癌成全球第一大癌 [J]. 临床研究，2021，29（2）：4.

[48] Wu Q，Cho JG，Yoo KH，et al. A new phenanthrene derivative and two diarylheptanoids from the roots of *Brassica rapa* ssp. campestris inhibit the growth of cancer cell lines and LDL-oxidation [J]. Arch Pharm Res，2013，36：423-429.

[49] Adila A，Qiuyan C，Shanshan C，et al. N-butanol subfraction of *Brassica rapa* L. promotes reactive oxygen species production and induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via mitochondria-dependent pathway [J]. Molecules，2018，23（7）：1687.

[50] Reziyamu W，Jie B，Zhan L，et al. Biological activity of *Brassica rapa* L. polysaccharides on RAW264.7 macrophages and on tumor cells [J]. Bioorg Med Chem，2019，28（7）：115330.

[51] 陈为歌，李寿斌 . 肿瘤坏死因子 -*α* 与神经根炎症研究进展 [J]. 脊柱外科杂志，2007（1）：58-60.

[52] 刘霜，徐勇 . 炎症小体与肾脏炎症研究进展 [J]. 西南军医，2015，17（3）：311-314.

[53] Shin JS，Yun CH，Chung KS，et al. Standardized ethyl acetate fraction from the roots of *Brassica rapa* attenuates the experimental arthritis by down regulating inflammatory responses and inhibiting NF-*κ*B activation [J]. Food Chem Toxicol，2014，66：96-106.

[54] Shin JS，Noh YS，Lee YS，et al. Arvelexin from *Brassica rapa* suppresses NF-kappaB-regulated pro-inflammatory gene expression by inhibiting activation of IkappaB kinase [J]. Br J Pharmacol，2011（1）：164.

[55] Dai YL，Shao GL，Wang F. Extract of *Brassica rapa* suppresses ovalbumin-induced asthma by down-regulating NF-κB and p38 MAPK activity [J]. Bangl J Pharmacol，2015，10（1）：106-114.

[56] 熊义博 . 中药丹参治疗骨质疏松的作用及其机制 [J]. 医学信息，2020，33（9）：44-46.

[57] El-Makawy AI，Ibrahim FM，Mabrouk DM，et al. Efficiency of turnip bioactive lipids in treating osteoporosis through activation of Osterix and suppression of Cathepsin K and TNF-*α* signaling in rats [J]. Environ Sci Pollut Res，2020，27（17）：20950-20961.

[58] Jaehoon J，Heajin P，Hanbit H，et al. Effects of glucosinolates from Turnip（*Brassica rapa* L.）root on bone formation by human osteoblast-like MG-63 cells and in normal young rats [J]. Phytother Res，2015，29（6）：902-909.

[59] Badriyah A，Alzahraa MF，AET，et al. Antimicrobial activity of *Brassica rapa* L. flowers extract on gastrointestinal tract infections and antiulcer potential against indomethacin-induced gastric ulcer in rats supported by metabolomics profiling [J]. J Inflamm Res，2021，14：7411-7430.

[60] Zhuo-Er C，Reziyamu W，Jin-Hu J，et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L [J]. J Agric Food Chem，2017，65（44）：9685-9692.

[61] Sihem B，Leila S，Boualem S，et al. Glucotoxicity induced oxidative stress and inflammation in vivo and in vitro in psammomys obesus：involvement of aqueous extract of *Brassica rapa* rapifera [J]. Evid Based Complementary Altern Med，2016，2016：3689208.

[62] Hassanzadeh-Taheri M，Hosseini M，Hassanpour-Fard M，et al. Effect of turnip leaf and root extracts on renal function in diabetic rats [J]. Orient Pharm Exp Med，2016，16（4）：279-286.

[63] 沈杰 . 芜青花和雪里蕻化学成分及生物活性研究 [D]. 扬州：扬州大学，2021.

[64] Suzuki T，Kurita M，Nakayama T，et al. 4’-*O*-*β*-*D*-Glucopyranosyl-4-hydroxy-3，3'，5-trimethoxychalcone derived from *Brassica rapa* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in neuroblastoma cells [J].J Pharmacol Ther Res，2018，2（3）：6-12.

[65] 王建玲，刘素辉，段矗，等 . 芜菁子挥发油、多糖的组成及挥发油抗菌活性的研究 [J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（4）：1207-1214.

[66] Kim Y，Kim Y，Oh Y，et al. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells and rats [J]. Biol Pharm Bull，2006，29（12）：2436-2441.

（收稿日期：2023-02-23；修回日期：2023-03-31）

细胞膜仿生纳米颗粒靶向治疗肺部炎症性疾病的研究进展

卢佩珊[1, 2]，李佳宁[1, 2]，吴婉华[1, 2]，欧阳岁东[1*]（1.广东医科大学东莞第一附属医院广东省医学分子诊断重点实验室，广东 东莞 523808；2.广东医科大学医学技术学院，广东 东莞 523808）

摘要：肺部炎症性疾病目前是人类健康的主要威胁之一，目前肺部炎症性疾病的治疗面临着局部药物浓度不足、肺部清除速度快以及诱发意外炎症的风险等问题。细胞膜仿生纳米载体作为最近出现的新递送策略越来越受到研究者的关注。由于不同的细胞膜修饰载体分别具有循环时间长、生物相容性好、靶向性强等特点，近年来被大量应用于肺部炎症性疾病的治疗。本文主要介绍了细胞膜仿生纳米颗粒递送的制备方法，天然细胞膜包被纳米颗粒治疗肺部炎症性疾病以及在肺部炎症性疾病中的临床试验，并展望了细胞膜仿生纳米技术所面临的挑战和前景。本综述有望为细胞膜仿生纳米颗粒治疗肺部炎症性疾病的潜在应用提供新思路。

关键词：细胞膜；仿生纳米颗粒；药物递送系统；肺部炎症性疾病

中图分类号：R945 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2400-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.022

Research progress in cell membrane biomimetic nanoparticles for pulmonary inflammatory diseases

LU Pei-shan[1, 2], LI Jia-ning[1, 2], WU Wan-hua[1, 2], OU YANG Sui-dong[1*] (1. *Guangdong Key Laboratory of Medical Molecular Diagnosis*, *The First Dongguan Affiliated Hospital*, *Guangdong Medical University*, *Dongguan Guangdong* 523808; 2. *College of Medical Technology*, *Guangdong Medical University*, *Dongguan Guangdong* 523808)

Abstract: Pulmonary inflammatory diseases are currently one of the major threats to human health. However, current treatments for pulmonary inflammatory diseases face problems such as insufficient local drug concentration, rapid lung clearance, and possible unintended inflammation. Recently, cell membrane biomimetic nanocarriers have attracted much attention as a new delivery strategy. Because cell membrane modification carriers have the characteristics of long circulation time, good biocompatibility, and strong targeting, they have been widely used in the treatment of pulmonary inflammatory diseases in recent years. This review summarized the preparation of cell membrane-coated biomimetic nanoparticle delivery, natural cell membrane coated nanoparticles for treatment of lung inflammatory diseases and clinical trials in lung inflammatory diseases. Challenges and prospects in cell membrane-coating biomimetic nanotechnology were also included to provide a new idea for the potential application in treating pulmonary inflammatory diseases with cell membrane-coated biomimetic nanoparticles.

Key words: cell membrane; biomimetic nanoparticle; drug delivery system; pulmonary inflammatory disease

肺部炎症性疾病主要包括肺部感染性疾病（肺炎、脓毒症等）和肺部非感染性疾病（哮喘、慢性阻塞性肺疾病和囊性纤维化等），是目前主要威胁人类健康的疾病之一。特别是 COVID-19 流行病的发生更是引发了人们对肺部炎症性疾病治疗的关注[1-3]。传统的肺部炎症性疾病治疗由于受到靶部位

基金项目：广东省自然科学基金面上项目（No.2021A1515011045）；广东医科大学“两校结对合作科研团队”项目（No.4SG22261G）；广东省中医药局面上项目（No.20221412）；广东省基础与应用基础研究基金 - 粤莞联合地区培育项目（No.2022A1515140075）。

作者简介：卢佩珊，女，研究生，主要从事呼吸道疾病机制和药物开发研究，email：lupeishan123123@163.com *__通信作者__：欧阳岁东，男，副研究员，主要从事呼吸道的免疫学机制和药物开发研究，email：ouyangsd@gdmu.edu.cn

药物浓度不足、细胞特异性靶向缺乏及肺生物屏障等限制而导致传统药物治疗效率低下[4]。

近年来随着纳米技术在医学领域的发展和应用，基于纳米材料的药物递送方法在各种疾病治疗中发挥着重要作用[5-7]。纳米递药系统可通过改善药物的溶解度，提高药物的稳定性和生物利用度等方式来增加载药量和药物利用率，从而达到提高病灶部位药物浓度的目的。然而，表面不经修饰的外源性纳米药物颗粒均会被网状内皮系统的巨噬细胞识别并吞噬，这使得大部分纳米颗粒都富集在肝、脾，在体内没有长循环作用，也不能较好地到达靶向部位，这些缺陷限制了其在临床的广泛应用[8]。

为了克服上述缺点，细胞膜仿生纳米载体作为一种潜在的递送策略被提出[9]。从天然细胞（红细胞、血小板、肿瘤细胞、干细胞、免疫细胞、细菌等）中收集完整的细胞膜，然后通过覆盖表面来伪装纳米颗粒。在这种递送策略中，某些细胞固有的靶向能力有利于核心纳米颗粒的定向传输，而无需额外考虑它们的特性。构建的细胞膜包被纳米颗粒保留了核心纳米颗粒的各种特性和固有的靶向能力。同时，天然细胞膜可保护纳米颗粒在药物制备和递送过程中的完整性和功能。由于不同天然细胞膜具有各自的优缺点，因而针对不同的需求应当采用相应的细胞膜修饰策略。本文主要介绍了细胞膜仿生纳米颗粒递送的制备方法，天然细胞膜包被纳米颗粒治疗肺部炎症性疾病以及在肺部炎症性疾病中的临床试验，并展望了细胞膜仿生纳米技术所面临的挑战和前景。

1　细胞膜仿生纳米颗粒的制备与表征

细胞膜仿生纳米颗粒主要由功能性核心纳米颗粒和具有生物活性的细胞膜涂层组成。功能性纳米颗粒作为核心发挥治疗作用，而细胞膜涂层发挥包封、保护和靶向等作用，将功能性核心纳米颗粒递送至病变部位以发挥作用。细胞膜仿生纳米颗粒的制备首先通过低渗裂解、超声、反复冻融、匀浆器破碎等不同方法将从不同来源的细胞中分离出细胞膜，然后经过一系列差速超离心挤压得到细胞膜膜泡。分离的细胞膜膜泡通过挤压、超声、电穿孔与核心纳米颗粒融合得到膜包覆纳米颗粒，或通过将细胞与纳米颗粒一起孵育后细胞分泌出含有外源性纳米颗粒的囊泡[10-15]。本文将这些不同制备方法的原理和优缺点进行归纳总结，详见表 1。

表 1　细胞膜与纳米颗粒融合方式的优缺点

Tab 1　Advantages and disadvantages of cell membrane and nanoparticle fusion

融合方式	原理	优点	缺点	参考文献
挤压	物理挤出，其中纳米颗粒和纯化的膜通过多孔膜共挤出	保留细胞膜的双层结构，尽量减少膜蛋白的损失和损坏	机械力破坏膜结构并使其在纳米颗粒核心周围重整	[9，14]
超声	超声波能量提供的破坏力使核壳纳米结构自发形成	比挤压融合更少的材料损失	破坏膜结构	[14]
电穿孔	使用电穿孔微流控芯片，通过电场作用，瞬时提高细胞膜的通透性，从而吸收纳米颗粒	与挤压、超声相比，具有更完整细胞膜涂层和良好的稳定性	对膜表面的结构与活性有损害	[12，15]
活细胞包装	细胞与氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒或量子点在无血清培养基中孵育时，细胞可以分泌含有外源性纳米颗粒的囊泡	能够包装具有不同形状和化学成分的纳米颗粒，同时提供生物相容性良好的外壳	细胞膜来源的囊泡大小和功能不能被有效控制	[12-13]

膜包被的仿生纳米药物制备后需要对其进行表征分析。通过验证细胞膜的化学结构、形态、理化特性及表面蛋白的完整性，保持细胞膜与其在源细胞的形态及功能方面的一致，以确保膜包被工艺设计的合理性及可行性。一般常用透射电镜及扫描电子显微镜观察仿生纳米颗粒的形态及壳 - 核结构[16]；动态光散射和 Zeta 电位用于观察粒子直径和带电情况[17]；SDS-PAGE 凝胶电泳、Western blot 则用于检测细胞膜上特征性蛋白表达情况[18]。通常制备的范围在 20 ～ 200 nm 的纳米粒子以及细胞膜仿生纳米载体被认为是合适的。目前，用于肺靶向的膜仿生制剂粒径一般在 100 ～ 300 nm。

2　细胞膜包被纳米颗粒的分类及治疗肺部炎症性疾病研究

膜仿生纳米制剂的性质在很大程度上由细胞膜上的功能蛋白决定，不同来源的细胞膜涂层材料由于具有不同的膜蛋白、聚糖和脂质等成分而拥有不同功能。红细胞膜、免疫细胞膜、间充质干细胞膜、血小板膜都可以利用自身特性逃避免疫系统的识别，而细菌膜囊泡、肿瘤细胞膜反而能刺激免疫应答。因此，人们可以根据不同需求选择不同的细胞膜进行包被，从而实现生物靶向治疗。目前已有不同种类细胞（例如红细胞、血小板、肿瘤细胞、干细胞、免疫细胞和细菌等）制备的仿生膜纳米载体用于肺部炎症性疾病的治疗。

2.1　红细胞膜包被的纳米颗粒

红细胞膜的纳米载药系统除了逃避免疫系统的识别，其比较明显的优势就是可以延长药物在体内的循环时间。红细胞膜上的自我识别蛋白

CD47 等免疫标记分子，可助其有效躲避巨噬细胞等的吞噬作用，延长其在血液中的循环时间，因此红细胞膜具有良好的生物相容性及非免疫原性等特点，为制备长循环纳米颗粒提供了必备的条件 [19]。研究表明，红细胞膜包裹的纳米颗粒在体内的半衰期可达 40 h[20]。

目前已有研究将人类红细胞膜涂覆在聚合物纳米粒上制备仿生毒素纳米海绵（RBC-NS）以充当细菌毒素诱饵，吸收和中和溶血毒素，用于治疗细菌感染诱发的急性肺损伤。静脉注射 RBC-NS 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的全分泌毒素蛋白有强中和能力，可显著降低全分泌蛋白导致的致死率，改善肺损伤症状 [21]。

然而，作为药物载体，红细胞膜的主要缺点是它们的靶向能力比较差。改进肺靶向能力的红细胞膜修饰是一种潜在的解决方案，但面临着改变脂质双层和膜蛋白的挑战，这可能会对它们的生物相容性产生不利影响。

2.2 *血小板膜包被的纳米颗粒*

血小板膜与红细胞膜相似，同样具有延长血液循环时间的特点。此外，P- 选择素可介导血小板与肿瘤细胞中 CD44 分子特异性结合，从而展现出对肿瘤细胞的天然亲和性，使其具有肿瘤靶向能力 [22]。

Jin 等 [23] 开发了血小板膜涂层纳米颗粒系统，将小檗碱输送到炎症性肺部，从而缓解过敏性哮喘的炎症。之后，Jin 等 [24] 又将姜黄素和白藜芦醇利用血小板膜包被成纳米颗粒治疗急性肺损伤，发现血小板膜包被的纳米药物可以降低肺血管通透性和减少促炎因子的产生，从而减轻肺部炎症。

虽然血小板膜在肺部肿瘤和肺部炎症的治疗中已经显示出免疫逃逸和趋炎性的优势，但仍有一些问题需要克服，比如血小板非常敏感，因此构建血小板膜作为药物载体可能会导致血栓形成或出血。此外，血小板在体外容易聚集，使得血小板膜包覆纳米粒的稳定性成为一大挑战。

2.3 *免疫细胞膜包被的纳米颗粒*

免疫细胞是一种有核、无色、球形的血细胞，负责保护身体免受感染，吞噬外来入侵者，修复组织损伤。免疫细胞膜仿生纳米载体具有主动靶向和免疫逃逸能力，显示出作为肺部炎症和肺部肿瘤靶向治疗载体的潜力 [25]。目前，从巨噬细胞和中性粒细胞中提取的细胞膜是肺靶向递送应用最广泛的免疫细胞膜。

2.3.1 巨噬细胞膜包被的纳米颗粒　在肺部受到感染或损伤时，巨噬细胞能迅速被激活且被招募至肺泡和呼吸道中，并且巨噬细胞膜表面的 α4 整合素能识别肿瘤细胞膜表面表达的血管细胞黏附分子（VCAM-1），从而能实现靶向识别肿瘤 [26]，这些特性使得它成为细胞膜仿生纳米粒设计中最受欢迎的细胞膜来源之一。

在慢性肺部疾病如肺纤维化和哮喘中，分离 M2 巨噬细胞衍生的外泌体膜包裹聚乳酸羟基乙酸共聚物（PLGA）纳米粒，通过静脉注射进入体内后靶向肺炎症部位的 M2 巨噬细胞，通过基因递送抑制 M2 巨噬细胞的转分化，可治疗小鼠过敏性哮喘 [27]。Tan 等 [28] 利用巨噬细胞膜包被的 PLGA 纳米药物可以中和多种促炎因子，有效抑制巨噬细胞和中性粒细胞的活化，从而减少 COVID-19 患者血清中中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）的形成，也能减轻新型冠状病毒感染小鼠的肺部炎症并减少病毒载量。Lu 等 [29] 介绍了利用巨噬细胞膜包裹千金藤素的脂质体纳米载体，其能够靶向肺部并在炎症部位积聚，可以稳定并持续释放药物，提供更好的生物相容性和长期循环，同时显著减轻了急性肺损伤的程度。

2.3.2 中性粒细胞膜包被的纳米颗粒　中性粒细胞可通过黏附因子（LFA-1-ICAM-1、L- 选择素 -CD44 和 β1 整合素 -VCAM-1）与循环肿瘤细胞相互作用，准确地靶向迁移到肿瘤炎症部位和血液中循环的肿瘤细胞，具有趋化性。受到中性粒细胞对炎症组织靶向特性的启发，Wang 等 [30] 将中性粒细胞膜包被司帕沙星纳米颗粒用于治疗肺部炎症。与不修饰的纳米药物相比，中性粒细胞膜包被的纳米颗粒在准确的肺部炎症靶向和更高的生物相容性方面表现出更显著的优势。

目前，使用免疫细胞膜的主要限制是它们的免疫原性，因为在免疫细胞中表达的主要组织相容性复合体很可能被它们的细胞膜遗传 [31]。

2.4 *肿瘤细胞膜包被的纳米颗粒*

炎症与癌症有着密切的联系。在癌症发生过程中，炎症往往是癌症发展的先兆，正是致癌性的改变导致了促肿瘤性炎症的发生，而且肿瘤的血管生成和转移也与炎症有关。肿瘤细胞膜富含选择素、整合素、CD47、免疫激活相关的肿瘤抗原等多种功能蛋白，使其具有许多独特性，比如免疫逃逸、抗细胞死亡和延长循环时间等 [32]。由于肿瘤细胞膜仿生纳米粒具备同源肿瘤靶向和逃脱免疫监测的能力使其受到越来越多的关注。

He 等 [33] 利用癌细胞膜修饰的二氧化硅纳米颗粒负载 miR495 和阿霉素，以克服癌细胞耐药性，实现有效的肺癌治疗。近年来，有研究发现具有天然亲肺性的转移性乳腺癌外泌体包裹的地塞米松聚合物纳米粒，经静脉注射后可有效治疗

气管滴注脂多糖诱导的急性肺损伤，减轻肺部炎症反应，从而将肿瘤细胞源生物膜材料扩展到非肿瘤的肺部炎症疾病中[34]。

然而，肿瘤细胞膜仿生纳米技术应用到临床上时，不仅要考虑到不同患者的肿瘤类别差异，更要考虑到患者的个体差异以给予个性化治疗。使用肿瘤细胞膜诱导肿瘤发生的潜在风险也限制了这种递送策略的临床应用[35]。

2.5 间充质干细胞（MSC）膜包被的纳米颗粒

MSC 具有强大的肿瘤归巢和炎症诱导迁移的固有能力，且在静脉给药时 MSC 会被肺部血管系统的滤过功能拦截，从而迁移至肺部损伤区域[36]。这一特性赋予了 MSC 出色的肺部靶向能力，非常适用于肺部炎症性疾病的靶向治疗。但使用 MSC 治疗肺部炎症性疾病具有诱发肺微栓塞的潜在风险[37]。因而，在利用 MSC 炎症诱导迁移的优势的同时应避免直接使用 MSC 的潜在风险，使得 MSC 膜的仿生纳米粒子开发为一种替代选择。Bandeira 等[38]研究发现干细胞衍生的纳米囊泡颗粒可以降低卵清蛋白（OVA）诱导的气道炎症，从而可作为治疗哮喘等过敏性疾病的候选药物。Yang 等[39]展示了用 MSC 膜包被 PLGA 纳米颗粒用于靶向肺肿瘤治疗的优势。MSC 膜涂层有效地提高了肿瘤细胞的细胞摄取，PLGA 纳米颗粒具有肿瘤靶向性，从而提高了对肿瘤细胞的杀伤能力。

MSC 膜包被虽然具有肿瘤和炎症靶向的优势，但其在血液中的循环时间比红细胞膜短。此外，与红细胞相比，大量获取 MSC 相对不方便[40]。

2.6 细菌膜包被的纳米颗粒

细菌膜外囊泡（OMVs）是一种由细菌分泌的 20 ～ 250 nm 的封闭的小泡结构，是细菌外膜出芽形成的，具备外膜及周质的成分。OMVs 中含有大量的免疫原性抗原和各种病原体相关分子模式，因此对于引发机体免疫反应起着重要作用。Gao 等[41]报道使用金黄色葡萄球菌胞外囊泡包裹抗菌药物的 PLGA 纳米粒，不仅在体外提高了被金黄色葡萄球菌感染的巨噬细胞的内化效率，并且在金黄色葡萄球菌菌血症小鼠模型中，细菌膜仿生纳米颗粒能明显提高对肺器官感染的疗效。Li 等[42]也报道了利用高机械压力驱动克雷伯菌通过小间隙诱导人工出芽并产生自组装的细菌仿生囊泡，这些细菌仿生囊泡显示出刺激体液和细胞免疫反应对抗耐药细菌的双重功能，并在小鼠模型中诱导了针对耐药性肺炎克雷伯菌感染的有效防御。

虽然 OMVs 易于在体外扩展，具有大规模生产的优势，但 OMVs 表面含有脂多糖和毒力因子会导致过度的免疫激活并导致生物安全问题，这阻碍了其在临床上的进一步应用[43]。

2.7 杂合膜包被的纳米颗粒

为了克服天然细胞膜的一些局限性，增强膜仿生载体的特性，通过融合不同细胞膜获得混合膜，使得载体可以充分发挥不同细胞膜的关键蛋白和特定功能，整合各种细胞膜的优点，从而在有效性和安全性方面更具优势。例如用 RAW264.7 和 4T1 细胞的融合膜制备载有阿霉素的杂合膜 PLGA 纳米颗粒，用于治疗乳腺癌肺转移[44]。这种由巨噬细胞和肿瘤细胞杂交的膜仿生制剂具有比肿瘤细胞更高的摄取能力，其肺部分布增加，能有效治疗肺肿瘤转移。通过基因工程表达某一特定功能蛋白制备基因修饰膜包被的纳米颗粒也可用于肺部炎症治疗。比如炎症内皮细胞通过上调 VCAM-1 的表达来募集免疫细胞。Zhang 等[45]利用这一特性构建过表达 $\alpha4\beta1$ 整合素（VLA-4）的 C1498 细胞，并提取载有基因修饰的膜包被载有地塞米松的纳米颗粒，用于治疗肺部炎症，结果发现制备的细胞膜仿生制剂在体外实验中对过表达 VCAM-1 的靶细胞具有更高的亲和力；与未转染 VLA-4 的 C1498 细胞膜包被的载药纳米颗粒相比，过表达 VLA-4 的 C1498 细胞膜包被的载药纳米颗粒在肺部的积累显著增加，可以有效消除肺部炎症。

表 2 总结归纳了不同细胞膜修饰的纳米颗粒在治疗肺部炎症性疾病中的应用和优缺点。

3 细胞膜包被仿生纳米递送系统在肺部炎症性疾病中的临床试验

在研究纳米载药系统治疗肺部炎症性疾病的过程中，给药途径的不同会影响药物的生物利用度，也会影响药物的药代动力学特征以及药效发挥的速度，因而，选择合适的给药途径在新药研发过程中是十分重要的环节。目前，治疗肺部炎症性疾病的主要给药途径有口服、静脉注射、吸入给药等，它们在临床应用中各有优缺点。口服给药具有无痛、无创伤、成本低、患者依从性更好等优势，但会经胃产生首过消除效应，药物会损失一部分才被消化吸收[46]。静脉注射是将大剂量药物送入体内的常用方法，由于药物被纳米材料包裹，能减轻静脉注射的首过消除效应，控制药物的释放，但经静脉途径的全身给药需经过血液循环并穿过肺生理屏障，最后到达肺部的药物浓度会降低[47]。而吸入给药的方式能直接靶向肺部，不需要经过全身循环，没有首过消除效应，到达靶向部位的药物浓度更高，但缺点在于

表 2 不同细胞膜修饰的纳米颗粒在治疗肺部炎症性疾病中的特点

Tab 2 Characteristics of different cell membrane-coated nanoparticles for pulmonary inflammatory diseases

细胞膜修饰	肺部疾病应用	优势	缺陷	参考文献
红细胞膜	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染	延长循环时间	靶向性差	[18-20]
血小板膜	过敏性哮喘、急性肺损伤	延长循环时间、肿瘤靶向性、炎症靶向性	易形成血栓	[21-23]
免疫细胞膜	过敏性哮喘、新型冠状病毒感染、急性肺损伤、肺部炎症	肿瘤靶向性、炎症靶向性	具有免疫原性，易引发免疫反应	[24-30]
肿瘤细胞膜	非小细胞肺癌、急性肺损伤	延长循环时间、肿瘤靶向性	易诱发免疫反应	[31-34]
干细胞膜	过敏性哮喘、肺肿瘤	肿瘤靶向性、炎症靶向性	细胞膜大量提取困难	[35-39]
细菌膜	金黄色葡萄球菌菌血症、克雷伯菌感染	增强机体免疫反应	存在免疫系统过度激活的风险	[40-42]

纳米颗粒很容易被黏液层、支气管肺泡液和吞噬细胞在传导气道和肺泡中阻塞并且给药的体积有限制，小鼠如吸入大量液体到气道中容易发生窒息，最重要的是部分药物从肺上皮的快速吸收会导致不良反应[48]。

目前关于利用纳米药物治疗肺部炎症性疾病的临床试验主要集中在肺癌和感染性肺部疾病上。纳米药物制剂用于肺癌临床试验的示例有：含有喜树碱的聚合物纳米颗粒 CRLX101（NCT01380769），含有多西紫杉醇的 BIND-014 纳米颗粒（NCT01792479），含有紫杉醇的白蛋白稳定纳米颗粒（NCT00077246），以及 NC-6004 胶束纳米粒子与顺铂（NCT02240238）[49-50]。这些用于肺癌患者的纳米颗粒制剂均是通过静脉给药。相比之下，非恶性肺部炎症性疾病的临床试验大多使用吸入或鼻内途径来递送封装在纳米颗粒中的治疗剂。例如：吸入阿米卡星脂质体纳米颗粒（阿米卡星脂质体吸入混悬液）被开发用于治疗支气管扩张症（NCT00775138），慢性铜绿假单胞菌感染（NCT01315678），脓肿分枝杆菌（NCT03038178）和非结核分枝杆菌感染（NCT01315236）[51-52]。在分枝杆菌感染患者中，阿米卡星脂质体改善了痰液转化和肺功能，同时显示出有限的全身毒性[51]。此外，含有阿米卡星的脂质体纳米颗粒在囊性纤维化和铜绿假单胞菌感染患者中表现出耐受性、安全性和有效性[52]。

在过敏性支气管肺曲霉菌病（NCT02273661）和侵袭性肺曲霉菌病（NCT00391014）患者中测试了含有两性霉素 B（AmBisome）的吸入脂质体纳米颗粒的治疗效果，而含有环孢素 A 的脂质体纳米颗粒用于开发肺移植患者闭塞性细支气管炎综合征的新疗法（NCT01650545）。吸入的脂质体环孢素 A 耐受性良好，可改善肺移植受者的肺功能，而且没有全身毒性[53]。由捕获细菌毒素的脂质体组成的 CAL02 纳米颗粒经静脉注射用于严重肺炎球菌肺炎的治疗方法，显示出良好的安全性、耐受性和中和细菌毒素的功效[54]。基于脂质体包裹 mRNA 的纳米载体递送技术发展制备的 COVID-19 mRNA 疫苗在预防 COVID-19 中发挥了重要作用，多期临床试验结果显示脂质体包裹 mRNA 制备的 mRNA 疫苗可以有效抵御 COVID-19 以及防止 COVID-19 患者重症化和死亡[55-56]。

在肺部炎症性疾病中，细胞膜仿生纳米颗粒与临床相关的研究还主要停留在取患者的标本进行体外研究的阶段，如 COVID-19 患者血清诱导的中性粒细胞胞外陷阱（NETs）形成，而巨噬细胞膜包被的纳米颗粒能抑制 NETs 的形成[28]。但也有改良过的纳米颗粒用于健康的志愿者来试验纳米载药系统，采用离子向凝胶技术制备了负载姜黄素的藻酸盐 - 聚山梨酯 80 纳米颗粒，结果显示与姜黄素混悬液相比，食用姜黄素纳米混悬液后姜黄素的口服生物利用度增加了 5 倍[46]。姜黄素作为一种抗炎药物已有研究应用到肺部炎症性疾病上，因此，使用改良后的载药纳米颗粒在解决了天然膜包被的生物安全性问题后，或可用于临床。

4 总结与展望

标准药代动力学通常规定剂量增加对应于治疗效果和药物毒性的增加。与传统的剂量配方相比，将药物封装在纳米载体中不仅可以延长循环半衰期、增加靶向特异性，同时还可以降低药物代谢速率和药物毒性。细胞膜仿生纳米体系具有一定的天然优势，使用这些单独的细胞膜仿生载体，能够拥有一种源自患者的药物输送系统，从而实现个性化的纳米医学。然而，由于各种天然细胞膜的特性不同，当治疗不同疾病的肺部炎症时应当根据疾病特点选择合适的细胞膜修饰方式。如肺部非感染性炎症引起的炎症应用中性粒细胞膜、血小板膜、巨噬细胞膜能对炎症部位起靶向作用；病毒或细菌感染引起的肺部炎症可用仿生毒素纳米海绵（RBC-NS）吸收溶血素，或 OMVs 激发出更强的免疫反应；当肿瘤引起肺部炎症时可用肿瘤细胞膜、干细胞膜这类能靶向肿瘤的细胞膜。

尽管纳米仿生药物递送前景广阔，但细胞膜仿生纳米颗粒递送策略在临床应用之前还面临一系列

亟需解决的问题。首先，细胞膜仿生纳米制剂的生物安全性值得进一步研究；其次，功能性表面蛋白在体外条件下经常失活，使得细胞膜仿生纳米载体的应用受到规模化生产的阻碍；最后，目前大部分研究都是在小鼠身上进行的。当应用于人类时，小鼠和人类之间细胞膜蛋白的异质性可能对该策略的有效性和安全性产生不利影响。

虽然从实验室到临床应用仍有许多问题需要解决，但细胞膜仿生纳米药物的天然优势和丰富的细胞膜来源为其工业化生产和在个体化精准医学中的实施提供了坚实的基础。相信随着细胞膜仿生纳米系统创新研究的不断深入发展，细胞膜仿生药物递送系统必将推动靶向精准医疗迈入新的阶段。

参考文献

[1] Britto CJ，Brady V，Lee S，et al. Respiratory viral infections in chronic lung diseases [J]. Clin Chest Med，2017，38（1）：87-96.

[2] Mao YS，Yang D，He J，et al. Epidemiology of lung cancer [J]. Surg Oncol Clin N Am，2016，25（3）：439-445.

[3] Zhu N，Zhang DY，Wang WL，et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China，2019 [J]. N Engl J Med，2020，382（8）：727-733.

[4] Mukherjee D，Bhatt S. Biocomposite-based nanostructured delivery systems for the treatment and control of inflammatory lung diseases [J]. Nanomedicine（London，England），2022，17（12）：845-863.

[5] Fei Q，Bentley I，Ghadiali SN，et al. Pulmonary drug delivery for acute respiratory distress syndrome [J]. Pulm Pharmacol Ther，2023，79：102196.

[6] Das KPJC. Nanoparticles and convergence of artificial intelligence for targeted drug delivery for cancer therapy：current progress and challenges [J]. Front Med Technol，2022，4：1067144.

[7] Pontes AP，Welting TJM，Rip J，et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery in osteoarthritis [J]. Pharmaceutics，2022，14（12）：2639.

[8] 陈莹，平其能 . 口服载药纳米粒的研究进展 [J]. 药学进展，2004，28（10）：451-455.

[9] Hu CM，Zhang L，Aryal S，et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2011，108（27）：10980-10985.

[10] Tian H，Luo ZY，Liu LL，et al. Cancer cell membrane-biomimetic oxygen nanocarrier for breaking hypoxia-induced chemoresistance [J]. Adv Funct Mater，2017，27（38）：1703197.

[11] Sun HP，Su JH，Meng QS，et al. Cancer cell membrane-coated gold nanocages with hyperthermia-triggered drug release and homotypic target inhibit growth and metastasis of breast cancer [J]. Adv Funct Mater，2017，27（3）：1604300.

[12] Rao L，Cai B，Bu LL，et al. Microfluidic electroporation-facilitated synthesis of erythrocyte membrane-coated magnetic nanoparticles for enhanced imaging-guided cancer therapy [J]. ACS Nano，2017，11（4）：3496-3505.

[13] Andriola Silva AK，Di Corato R，Pellegrino T，et al. Cell-derived vesicles as a bioplatform for the encapsulation of theranostic nanomaterials [J]. Nanoscale，2013，5（23）：11374-11384.

[14] Copp JA，Fang RH，Luk BT，et al. Clearance of pathological antibodies using biomimetic nanoparticles [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2014，111（37）：13481-13486.

[15] 赵静，刘艳，解军波，等 . 中药纳米递药系统的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（5）：134-137 + 276.

[16] Chen HY，Deng J，Wang Y，et al. Hybrid cell membrane-coated nanoparticles：a multifunctional biomimetic platform for cancer diagnosis and therapy [J]. Acta Biomater，2020，112：1-13.

[17] Li SY，Cheng H，Qiu WX，et al. Cancer cell membrane-coated biomimetic platform for tumor targeted photodynamic therapy and hypoxia-amplified bioreductive therapy [J]. Biomaterials，2017，142：149-161.

[18] Oldenborg PA，Zheleznyak A，Fang YF，et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells [J]. Science，2000，288（5473）：2051-2054.

[19] Sun D，Chen J，Wang Y，et al. Advances in refunctionalization of erythrocyte-based nanomedicine for enhancing cancer-targeted drug delivery [J]. Theranostics，2019，9（23）：6885-6900.

[20] Hu CM，Fang RH，Zhang LF. Erythrocyte-inspired delivery systems [J]. Adv Healthc Mater，2012，1（5）：537-547.

[21] Chen YJ，Zhang Y，Chen MC，et al. Biomimetic nanosponges suppress in vivo lethality induced by the whole secreted proteins of pathogenic bacteria [J]. Small，2019，15（6）：e1804994.

[22] Naor D，Nedvetzki S，Golan I，et al. CD44 in cancer [J]. Crit Rev Clin Lab Sci，2002，39（6）：527-579.

[23] Jin H，Li JL，Zhang MY，et al. Berberine-loaded biomimetic nanoparticles attenuate inflammation of experimental allergic asthma via enhancing IL-12 expression [J]. Front Pharmacol，2021，12：724525.

[24] Jin H，Luo RX，Li JN，et al. Inhaled platelet vesicle-decoyed biomimetic nanoparticles attenuate inflammatory lung injury [J]. Front Pharmacol，2022，13：1050224.

[25] Li BW，Wang F，Gui LJ，et al. The potential of biomimetic nanoparticles for tumor-targeted drug delivery [J]. Nanomedicine（Lond），2018，13（16）：2099-2118.

[26] Chen Q，Zhang XH，Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs [J]. Cancer Cell，2011，20（4）：538-549.

[27] Pei WY，Li XQ，Bi RL，et al. Exosome membrane-modified M2 macrophages targeted nanomedicine：treatment for allergic asthma [J]. J Control Release，2021，338：253-267.

[28] Tan QQ，He LJ，Meng XJ，et al. Macrophage biomimetic nanocarriers for anti-inflammation and targeted antiviral treat-

ment in COVID-19 [J]. J Nanobiotechnol，2021，19（1）：173.

[29] Lu CH，Zheng JP，Ding YN，et al. Cepharanthine loaded nanoparticles coated with macrophage membranes for lung inflammation therapy [J]. Drug Deliv，2021，28（1）：2582-2593.

[30] Wang KY，Lei YT，Xia DL，et al. Neutrophil membranes coated，antibiotic agent loaded nanoparticles targeting to the lung inflammation [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2020，188：110755.

[31] Oroojalian F，Beygi M，Baradaran B，et al. Immune cell membrane-coated biomimetic nanoparticles for targeted cancer therapy [J]. Small，2021，17（12）：e2006484.

[32] Khaldoyanidi SK，Glinsky VV，Sikora L，et al. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo-and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions [J]. J Biol Chem，2003，278（6）：4127-4134.

[33] He JY，Gong CL，Qin J，et al. Cancer cell membrane decorated silica nanoparticle loaded with miR495 and doxorubicin to overcome drug resistance for effective lung cancer therapy [J]. Nanoscale Res Lett，2019，14（1）：339.

[34] Holay M，Zhou JR，Park J，et al. Organotropic targeting of biomimetic nanoparticles to treat lung disease [J]. Bioconjugate Chemistry，2022，33（4）：586-593.

[35] Lei W，Yang C，Wu Y，et al. Nanocarriers surface engineered with cell membranes for cancer targeted chemotherapy [J]. J Nanobiotechnol，2022，20（1）：45.

[36] Nystedt J，Anderson H，Tikkanen J，et al. Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells [J]. Stem Cells，2013，31（2）：317-26.

[37] Wu HH，Jiang XC，Li YS，et al. Engineering stem cell derived biomimetic vesicles for versatility and effective targeted delivery [J]. Adv Funct Mater，2020，30（49）：2006169.

[38] Bandeira E，Jang SC，Lasser C，et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived nanovesicles in experimental allergic airway inflammation [J]. Respir Res，2023，24（1）：3.

[39] Yang N，Ding YP，Zhang YL，et al. Surface functionalization of polymeric nanoparticles with umbilical cord-derived mesenchymal stem cell membrane for tumor-targeted therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2018，10（27）：22963-22973.

[40] Liang HX，Huang K，Su T，et al. Mesenchymal stem cell/red blood cell-inspired nanoparticle therapy in mice with carbon tetrachloride-induced acute liver failure [J]. ACS Nano，2018，12（7）：6536-6544.

[41] Gao F，Xu LL，Yang BQ，et al. Kill the real with the fake：eliminate intracellular staphylococcus aureus using nanoparticle coated with its extracellular vesicle membrane as active-targeting drug carrier [J]. ACS Infect Dis，2019，5（2）：218-227.

[42] Li WR，Hu Y，Zhang QS，et al. Development of drug-resistant klebsiella pneumoniae vaccine via novel vesicle production technology [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2021，13（28）：32703-32715.

[43] Naskar A，Cho H，Lee S，et al. Biomimetic nanoparticles coated with bacterial outer membrane vesicles as a new-generation platform for biomedical applications [J]. Pharmaceutics，2021，13（11）：1887.

[44] Gong CA，Yu XY，You BM，et al. Macrophage-cancer hybrid membrane-coated nanoparticles for targeting lung metastasis in breast cancer therapy [J]. J Nanobiotechnol，2020，18（1）：92.

[45] Park JH，Jiang Y，Zhou JR，et al. Genetically engineered cell membrane-coated nanoparticles for targeted delivery of dexamethasone to inflamed lungs [J]. Sci Adv，2021，7（25）：eabf7820.

[46] Govindaraju R，Karki R，Chandrashekarappa J，et al. Enhanced water dispersibility of curcumin encapsulated in alginate-polysorbate 80 nano particles and bioavailability in healthy human volunteers [J]. Pharm Nanotechnol，2019，7（1）：39-56.

[47] Wei YM，Zhao L. Passive lung-targeted drug delivery systems via intravenous administration [J]. Pharm Dev Technol，2014，19（2）：129-136.

[48] Abdelaziz HM，Gaber M，Abd-Elwakil MM，et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy：nanoparticles，microparticles，nanocomposites and nanoaggregates [J]. J Control Release，2018，269：374-392.

[49] Tagami T，Ozeki T. Recent trends in clinical trials related to carrier-based drugs [J]. J Pharm Sci，2017，106（9）：2219-2226.

[50] Xu XY，Ho W，Zhang XQ，et al. Cancer nanomedicine：from targeted delivery to combination therapy [J]. Trends Mol Med，2015，21（4）：223-232.

[51] Siegel S，Clock JA，Hoeft J，et al. Open-label trial of amikacin liposome inhalation suspension in *M. Abscessus* lung disease [J]. Am J Respir Crit Care Med，2018，197：A7669.

[52] Bilton D，Pressler T，Fajac I，et al. Amikacin liposome inhalation suspension for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis [J]. J Cyst Fibros，2020，19（2）：284-291.

[53] Iacono A，Wijesinha M，Rajagopal K，et al. A randomised single-centre trial of inhaled liposomal cyclosporine for bronchiolitis obliterans syndrome post-lung transplantation [J]. ERJ Open Res，2019，5（4）：00167-2019.

[54] Laterre PF，Colin G，Dequin PF，et al. CAL02，a novel antitoxin liposomal agent，in severe pneumococcal pneumonia：a first-in-human，double-blind，placebo-controlled，randomised trial [J]. Lancet Infect Dis，2019，19（6）：620-630.

[55] Rauf A，Abu-Izneid T，Khalil AA，et al. Nanoparticles in clinical trials of COVID-19：an update [J]. Int J Surg，2022，104：106818.

[56] Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine：first approval [J]. Drugs，2021，81（4）：495-501.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-06）

L- 天冬酰胺酶在肿瘤中的研究进展

江媛媛，孙立*（中国药科大学新药筛选中心，江苏省药效研究与评价服务中心，南京　210009）

摘要：氨基酸代谢与细胞氧化应激、细胞增殖和细胞凋亡等多种细胞过程相关，参与糖尿病、衰老、肿瘤等生理病理过程。*L*- 天冬酰胺酶（*L*-asparaginase，*L*-ASP）是氨基酸代谢途径中的关键酶，能够水解天冬酰胺生成天冬氨酸和氨，参与细胞增殖、凋亡、迁移以及侵袭等生物过程。研究表明，*L*- 天冬酰胺酶影响白血病、乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、肝癌等多种肿瘤的发生和发展。本文主要从 *L*- 天冬酰胺酶的结构、酶学作用、与其他药物联用对多种肿瘤治疗的潜力进行综述。

关键词：*L*- 天冬酰胺酶；肿瘤；天冬氨酸；联合用药

中图分类号：R979　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2407-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.023

Research progress of *L*-asparaginase in tumor

JIANG Yuan-yuan, SUN Li* (*New Drug Screening Center, Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing* 210009)

Abstract: Amino acid metabolism is related to various cellular processes such as oxidative stress, cell proliferation and cell apoptosis, and is involved in some physiological and pathological processes such as diabetes, aging and tumor. *L*-asparaginase (*L*-ASP) is a crucial enzyme in amino acid metabolism, which can hydrolyze asparagine to produce aspartic acid and ammonia, and participate in the cell proliferation, apoptosis, migration, invasion and other biological activities. Studies have shown that *L*-ASP is closely related to the occurrence and development of leukemia, breast cancer, gastric cancer, lung cancer, pancreatic cancer, liver cancer and others. This article mainly reviewed the structure, enzymatic role of *L*-ASP and its potential combination with other drugs for various tumors.

Key words: *L*-asparaginase; tumor; aspartate; combination therapy

恶性肿瘤是威胁人类健康与生命的“元凶”之一。遗传因素、环境因素等使人类基因组、代谢改变产生的遗传多样性[1]，导致增殖信号异常激活，从而诱导血管生成，使肿瘤细胞异常增殖。研究表明肿瘤细胞的代谢在肿瘤的发生发展及细胞增殖、凋亡、迁移等信号通路中起关键作用[2]。因此，对于肿瘤的发生发展及代谢重编程的机制探讨成为药物研发的关键。谷氨酰胺和天冬酰胺等是正常细胞和肿瘤细胞生长所必需的营养物质[3]，而肿瘤细胞对其需求增加，促进肿瘤的进展。因此，靶向肿瘤细胞代谢可能是治疗肿瘤的有效途径。

1　*L*- 天冬酰胺酶的结构与作用机制

L- 天冬酰胺酶（*L*-asparaginase，*L*-ASP），又名门冬酰胺酶或天门冬酰胺酶，能特异水解天冬酰胺的酰胺键，催化天冬酰胺生成天冬氨酸和氨[4]。该水解过程通过两步乒乓反应机制生成，首先，酶活性中心的羟基对底物 *β*- 羰基的 C 原子进行亲核攻击，形成 *β*- 天冬酰胺酶中间体，然后，在水分子的存在下生成天冬氨酸和氨[5]。该酶广泛存在于植物、动物和微生物中，临床应用的天冬酰胺酶主要由大肠埃希菌发酵产生，包括 *L*- 天冬酰胺酶Ⅰ和 *L*- 天冬酰胺酶Ⅱ，两者都由 4 个相同亚基组成，每个亚基含有 326 个氨基酸残基，包括 N 端和 C 端 *α*/*β* 结构域[6]（见图 1）。但只有后者具有抗肿瘤活性，可能是发挥相关功能时具有不同的亚细胞定位，*L*- 天冬酰胺酶Ⅰ主要存在于胞质中，而 *L*- 天冬酰胺酶Ⅱ分泌到细胞周

作者简介：江媛媛，女，硕士研究生，主要从事肿瘤药理学研究，email：1114265784@qq.com　*通信作者：孙立，女，研究员，主要从事肿瘤药理学研究，email：sunli@cpu.edu.cn

质中。其抗肿瘤机制为：正常细胞能合成天冬酰胺以满足自身生长，而肿瘤细胞则需要依靠宿主供给，支持其快速增殖，*L*- 天冬酰胺酶可通过降低体内天冬酰胺水平而抑制肿瘤生长。由于体内抗天冬酰胺酶抗体的产生，使得在治疗肿瘤中出现肝脏和肾脏毒性、中枢神经系统功能障碍、胰腺炎、高血糖等毒副作用 [5]。

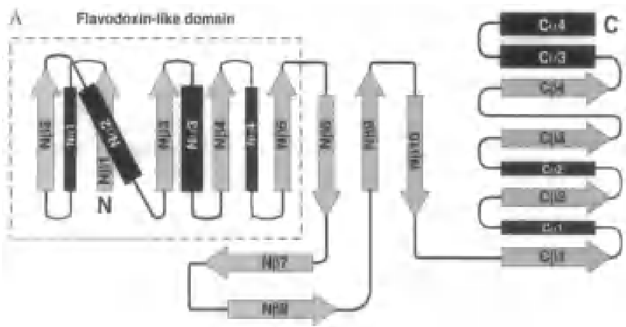


图 1　*E.coli L*-ASP Ⅱ亚基中的结构域 [6]

Fig 1　Domains of *E.coli L*-ASP Ⅱ subunit[6]

2　*L*- 天冬酰胺酶在肿瘤中的研究（见表 1）

目前研究表明，*L*- 天冬酰胺酶在恶性肿瘤中的作用机制复杂。一方面，*L*- 天冬酰胺酶降低肿瘤生长所必需的营养物天冬酰胺，诱导肿瘤细胞凋亡，抑制肿瘤细胞增殖；另一方面，*L*- 天冬酰胺酶通过降低天冬酰胺水平，抑制免疫系统来减弱对肿瘤细胞的杀伤能力。

2.1　*L*- 天冬酰胺酶在白血病中的抗肿瘤研究

白血病是由突变的祖细胞异常增殖并抑制正常白细胞生成，导致贫血和造血功能障碍，严重影响骨髓及淋巴系统的恶性肿瘤 [7]。急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）成人的五年总生存率约为 40%，而儿童的五年总生存率约为 90%[8]。正常人体中谷氨酰胺与天冬氨酸反应生成天冬酰胺满足细胞正常生长的需求，而白血病细胞因基因突变不能或很少能合成天冬酰胺，必须依靠血液中的天冬酰胺以支持肿瘤细胞快速生长，因此，临床上用 *L*- 天冬酰胺酶使患者血液中的天冬酰胺减少，肿瘤细胞的蛋白合成受阻，抑制其增殖，以达到治疗白血病的目的。目前，*E.coli*、*Erwinia chrysanthemi* 等来源的 *L*- 天冬酰胺酶被广泛用于 ALL 的治疗 [9]。为延长药物作用时间 [10]，降低毒副作用，提高疗效，通常使用类固醇、长春新碱和 *L*- 天冬酰胺酶的联合用药或改变药物的剂型，如聚乙二醇化 [11]。

表 1　*L*-ASP 在肿瘤中的研究及作用机制

Tab 1　Research and mechanism of *L*-ASP in tumor

药物	肿瘤	作用机制	文献
L- 天冬酰胺酶	白血病	蛋白合成受阻，抑制肿瘤细胞增殖	[8-11]
	乳腺癌	诱导细胞凋亡，促进细胞转移	[17-18]
	胃癌	引起细胞周期阻滞，诱导细胞凋亡；破坏线粒体膜的完整性，导致 DNA 损伤	[27]
L- 天冬酰胺酶与 AKT 抑制剂联合用药	肺癌	抑制 AKT-PI3K-ATF4 通路	[18，34]
包埋在红细胞的 *L*- 天冬酰胺酶制剂	胰腺癌	抑制蛋白质合成，导致肿瘤细胞死亡	[37]
L- 天冬酰胺酶与酪氨酸激酶抑制剂联合用药	肝癌	诱导氧化应激，促进肿瘤细胞死亡	[41]

一项临床研究（NCT01643408）对 30 例大肠埃希菌衍生的 *L*- 天冬酰胺酶过敏的 ALL 或淋巴母细胞淋巴瘤（lymphoblastic lymphoma，LBL）患者，静脉注射 Erwinaze（菊欧氏杆菌来源的 *L*- 天冬酰胺酶），以评估 Erwinaze 的毒性。实验结果显示，过敏反应发生率为 37%，胰腺炎发生率为 7%，血栓发生率为 3%[12]。还有部分出现恶心、呕吐等胃肠道不良反应。为了降低毒副反应，使用新型荧光假单胞菌表达生产的重组 Erwinia 天冬酰胺酶（JZP-458），对大肠埃希菌衍生的天冬酰胺酶无免疫交叉反应。为了评估 JZP-458 的安全性、耐受性和药代动力学（pharmacokinetics，PK），对健康成年志愿者进行了一项随机临床Ⅰ期研究 [13]。通过肌内注射或静脉注射给药，在每种给药途径最高剂量（肌内注射 25 mg • m^{-2} 和静脉注射 37.5 mg • m^{-2}）下，JZP-458 在给药后 72 h 达到 100% 的血清天冬酰胺酶活性水平≥ 0.1 IU • mL^{-1}。所有剂量水平均耐受良好，无意外不良事件和严重不良事件，也没有 3 级或更高级别的不良事件 [13]。基于药代动力学和安全性数据，儿童肿瘤基因协会开展的Ⅱ期、Ⅲ期临床试验研究（NCT04145531），试图评价 JZP-458 对 ALL/LBL 患者的疗效和安全性。该试验分为 A 和 B 部分，分别探索了 JZP-458 肌内注射和静脉注射的可行性，A 部分研究结果表明 JZP-458 以 25、25、50 mg • m^{-2} 剂量（每周一、周三、周五）肌内注射的给药方案在 ALL/LBL 患者中是有效且可耐受的 [14]，该试验中无特殊不良事件的报道。B 部分试验尚在进行中。

2.2　*L*- 天冬酰胺酶在乳腺癌中的抗肿瘤研究

乳腺癌是全球最常见的癌症之一[15]，根据临床亚型的不同，治疗分为内分泌治疗、化疗和靶向人表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）的治疗。由于三阴性乳腺癌（triple negative breast cancer，TNBC）缺乏雌激素受体、孕激素受体和 HER2，对常规的治疗反应不佳，并且具有高侵袭性、易复发、预后较差等临床特征[16]。大多数乳腺癌并不会死于原发癌，通过血液循环系统形成继发性病灶是乳腺癌患者死于疾病的主要原因[17]。因此一些肿瘤细胞对某些特定氨基酸如天冬酰胺的需求增加为开发抗肿瘤药物及潜在靶点提供了可能[18]。Simon Knott 团队发现通过用 *L*-天冬酰胺酶治疗[17]，或者限制饮食中的天冬酰胺，以及抑制天冬酰胺合成酶来促进 *L*-天冬酰胺酶的分解、限制摄入量，或者阻止其合成可减少肿瘤细胞的转移，但对乳腺癌原发性肿瘤的增殖影响较小；相反，增加天冬酰胺的摄入量可促进乳腺癌转移。

细菌产生的 *L*-天冬酰胺酶可引起广泛的不良反应，如发热、白细胞减少、胰腺炎、神经系统疾病等[19]，而大肠埃希菌和菊欧氏杆菌产生的 *L*-天冬酰胺酶具有较好的抗肿瘤活性，其中，来自大肠埃希菌的 *L*-天冬酰胺酶更易实现批量生产，如已有研究表明该酶能够阻止实体瘤的发展[20]。又有研究发现一种新型酵母，解脂耶罗维亚酵母 *Yarrowia lipolytica* 产生的 *L*-天冬酰胺酶能够通过诱导乳腺癌和肺癌细胞凋亡来介导其抗增殖作用[18]。流式细胞术及 4'，6-二脒基 -2-苯基吲哚（4'，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色显示 *L*-天冬酰胺酶处理后 A549 和 MCF-7 细胞凋亡增加，细胞核固缩变小、染色加深；划痕实验提示 *L*-天冬酰胺酶处理可抑制肿瘤细胞的迁移。

2.3 *L*-天冬酰胺酶在胃癌中的抗肿瘤研究

胃癌是全球五大癌症之一[21]，占全球癌症死亡总数的 8% 以上[22]。对胃癌的治疗临床上以手术和化疗为主。术前准确的诊断和有效治疗手段的选择直接影响胃癌患者的预后。研究表明幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，HP）感染是胃癌的主要诱因之一[23]，严重时发展为胃癌晚期，危及患者生命。转录因子 ATF/CREB 家族具有保守的碱性亮氨酸拉链结构域[24]，已有研究表明该家族的一些成员在癌症进展中起重要作用，如转录激活因子 6（activating transcription factor 6，ATF6）在促进宫颈癌的增殖、迁移中起重要作用；转录激活因子 3（activating transcription factor 3，ATF3）能够下调细胞外信号调节激酶（extra cellular regulated protein kinases，ERK）和磷酯酰肌醇 -3- 激酶（phosphatidylinositol 3 kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT）信号通路而抑制黑色素瘤的增殖[25]；而在喉癌中敲低 ATF3，可能通过下调周期蛋白 D1，抑制喉鳞状细胞癌细胞的增殖。2021 年 Heather R Christofk 研究团队[26]发现天冬酰胺能促进肿瘤的增殖。线粒体的呼吸对于正常细胞以及肿瘤细胞的增殖都有不可或缺的作用，除了提供代谢所需的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）外[26]，还为快速增殖的肿瘤细胞提供了生物合成原料如氨基酸等。呼吸链受到抑制时，外源性添加天冬酰胺而不是天冬氨酸，可逆转由电子传递链（electron transport chain，ETC）抑制导致的细胞增殖抑制、转录激活因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1（mammalian target of rapamycin complex 1，mTORC1）依赖的嘌呤、嘧啶核苷酸的合成。呼吸链抑制剂与 *L*-天冬酰胺酶联合用药或呼吸链抑制剂与天冬酰胺饮食限制能抑制肺癌、乳腺癌等多种异种移植皮下瘤模型的生长。为临床联合用药提供了依据。还有研究提示天冬酰胺是胃癌细胞 AGS 生长所必需的，*L*-天冬酰胺酶可引起胃癌细胞的 G_0/G_1 期阻滞，导致细胞凋亡；破坏线粒体膜的完整性，从而引起 DNA 损伤[27]。

如今研究人员已经在胃癌中对呼吸链抑制剂和 *L*-天冬酰胺酶进行了探索，相信会有越来越多关于 *L*-天冬酰胺酶与其他药物联用治疗胃癌的研究。

2.4 *L*-天冬酰胺酶在肺癌中的抗肿瘤研究

2022 年，我国大约新增了 400 多万癌症患者，约 300 万患者死亡[28]。其中死亡最多的是肺癌。诱导肿瘤发生发展包括许多因素，如辐射[29]、细菌[30]、病毒[31]、生物化学致癌物等[32]。大多数致癌物通过诱导 DNA 损伤或者突变，刺激参与细胞增殖、分化等信号通路来促进肿瘤的发展[33]。Gwinn 等[34]研究显示 *KRAS* 突变的非小细胞肺癌通过抑制 AKT-PI3K-ATF4 轴促进天冬酰胺合成酶、mTORC1 的激活来促进肿瘤生长。单独使用 AKT 抑制剂 MK-2206、*L*-天冬酰胺酶以及联合用药在裸小鼠 H460 异种移植模型上证实了，与单一用药或者溶剂对照相比，两者联合用药显著抑制了肿瘤的生长。这与之前研究显示 *L*-天冬酰胺酶能抑制肺癌细胞的生长不一致[18]，可能是因为 *L*-天冬酰胺酶处理后，使肿瘤细胞

通过 AKT-PI3K-NRF2-ATF4 轴，激活下游关键靶基因天冬酰胺合成酶（asparagine synthetase，ASNS），导致 *L*- 天冬酰胺酶耐药，然后下游调控肿瘤细胞增殖的关键靶基因天冬酰胺合成酶（asparagine synthetase，ASNS）激活，导致 *L*- 天冬酰胺酶耐药。

有研究揭示了天冬酰胺合成酶与肺癌增殖与转移的关系，发现天冬酰胺合成酶催化生成的内源性天冬酰胺能促进肿瘤细胞的增殖与转移[35]，而当天冬酰胺合成酶丧失代谢功能后，可与 AKT1 结合，激活糖原合成酶激酶 -3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK3β），从而稳定 GSK3β 和 β- 连环蛋白（β-catenin）复合体，促进肿瘤转移。

2.5 *L*- 天冬酰胺酶在胰腺癌中的抗肿瘤研究

胰腺癌因死亡率高、恶性程度高、治疗方法有限等俗称“癌症之王”，五年生存率低至 5%[36]。快速增殖的肿瘤细胞对能量和营养物的需求不断增加。因此，营养限制也被认为是癌症治疗的另一个有效策略。临床样本显示与正常组织相比，胰腺癌细胞中天冬酰胺合成酶（asparagine synthetase，ASNS）下调，提示降低患者体内天冬酰胺水平可能是一种治疗胰腺癌的方法[37]。Dufour 等[37] 发现 *L*- 天冬酰胺酶在体外对胰腺癌细胞 SW1990 具有抗肿瘤作用，于是该作者利用 SW1990 细胞皮下移植瘤模型，考察包埋在红细胞的 *L*- 天冬酰胺酶在体内是否具有类似的结果，结果显示，给药 4 周后，与对照组相比，给药组的中位肿瘤体积减少 44%[37]。Ⅰ期临床试验（NCT01523808）试图评估 GRASPA（包埋在红细胞内的 *L*- 天冬酰胺酶，又称 eryaspase）对晚期或转移性胰腺癌的最大耐受剂量，结果显示其具有良好的耐受性。Ⅱ期临床试验（NCT02195180）评估了 eryaspase 联合化疗在二线治疗晚期胰腺癌患者的疗效和安全性。符合条件的患者以 2∶1（实验组：n = 95，对照组：n = 46）的比例随机接受 eryaspase 联合吉西他滨或 mFOLFOX6（mFOLFOX6：奥沙利铂、亚叶酸钙、5- 氟尿嘧啶化疗方案）治疗，或单独接受吉西他滨或 mFOLFOX6 治疗。该研究以 ASNS 低表达患者的总生存期（over all survival，OS）和无进展生存期（progression-free-survival，PFS）为终点，次要终点包括整个人群的总生存期和无进展生存期、疾病控制率、治疗依从性、安全性和生活质量等。研究结果显示实验组的 ASNS 低表达患者的总生存期和无进展生存期延长至 6.2 个月，而没有接受 eryaspase 治疗的总生存期为 4.9 个月，且耐受性良好。在实验组中最常见的不良反应是谷氨酰转移酶升高、中性粒细胞减少和身体恶化，发生率分别为 17.2%、12.9%、12.9%[38]。

2.6 *L*- 天冬酰胺酶在肝癌中的抗肿瘤研究

肝细胞癌是最常见的原发性肝癌，主要发生在我国，是第二大致死肿瘤[39]，具有发病率高、预后差等特点。乙肝病毒感染、肝硬化、脂肪肝、饮酒等病因及饮食习惯均可诱发。由于肝癌患者早期无明显症状，许多患者发现时已发展成晚期肝癌，严重影响患者的健康，带来巨大的经济压力。因此，迫切需要提高治疗水平。Okuda 等[40] 研究发现 *L*- 天冬酰胺酶能抑制 SNU387 和 SNU398 两株肝癌细胞株，而对其他细胞无明显效果，可能是因为 SNU387 和 SNU398 的 ASNS 表达水平较高，谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase，GS）表达水平低。但是，2-（2- 甲氧基 -4- 硝苯基）-3-（4- 硝苯基）-5-（2，4- 二磺基苯）-2H- 四唑单钠盐（WST-8）实验、活性氧实验以及实时荧光定量 PCR 结果显示 Huh6 细胞在用 *L*- 天冬酰胺酶和酪氨酸酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitor，TKI）处理后能显著抑制细胞增殖，上调活性氧（reactive oxygen species，ROS）表达，且药物联合指数（*CI*）＜ 1，提示两者具有协同作用。Huh6 裸小鼠皮下移植瘤模型结果表明 *L*- 天冬酰胺酶联合酪氨酸激酶抑制剂 Len 治疗后，显著抑制相对肿瘤体积以及 Ki67 表达。综上，*L*- 天冬酰胺酶与酪氨酸激酶抑制剂联合使用可能通过诱导氧化应激，促进肿瘤细胞死亡。此外，还有研究提示 *L*- 天冬酰胺酶为淋巴肉瘤[9]、喉癌[41]、结直肠癌[42]、子宫内膜癌[43] 的治疗提供可能。

3 *L*- 天冬酰胺酶在免疫中的研究

免疫系统由细胞、器官和组织及其激活过程中产生的物质组成[44]。在保护宿主免受感染及癌变中起重要作用，包括先天性免疫系统和适应性免疫系统；后者主要由 B 淋巴细胞介导的体液免疫和由 T 淋巴细胞介导的细胞免疫组成。免疫疗法已成为手术、化疗、放疗后的另一种一线抗癌疗法[44]。根据免疫原性又将肿瘤又分为“热”肿瘤和“冷”肿瘤[45]，只有存在活跃的免疫细胞浸润的“热”肿瘤如黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌[46] 用免疫抑制剂治疗具有较好疗效，而“冷”肿瘤无或仅有极少的免疫原性，则不可用免疫抑制剂治疗，包括胶质母细胞瘤[47]、卵巢癌、前列腺癌和胰腺癌等[48] 肿瘤。

清华大学江鹏团队的研究显示天冬酰胺（Asn）在体内外能显著增强 $CD8^+$ T 细胞的激活、增殖和免疫应答以及对肿瘤的杀伤能力[49]。并且 ^{15}N-Asn 同位素示踪等实验阐述了可能的机制为，天冬酰胺直接与淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶（lymphocyte-specific protein tyrosine kinase，LCK）结合，激活 LCK 磷酸化位点 Tyr394（Y394），从而激活 LCK 信号，并通过磷酸化其底物 zeta 链相关蛋白 -70（zeta-associated protein-70，ZAP70）而促进 T 细胞的激活和功能[50]。相反，*L*- 天冬酰胺酶处理降低了 LCK 和 ZAP70 的磷酸化水平。研究还发现通过减少天冬酰胺、给予 *L*- 天冬酰胺酶或者给予 Na^+ 依赖性谷氨酰胺载体 2（alanine-ser-ine-cysteine transporter 2，ASCT2）的抑制剂来减少天冬酰胺的摄取，均可抑制 $CD8^+$ T 细胞的活性和抗肿瘤反应[48]，这与先前的研究 Asn 促肿瘤的结果相反[11]。可能因为江鹏团队在裸小鼠成瘤前减少 Asn 的摄入，更偏向于对免疫细胞及免疫疗法的探索[49]，这与以往侧重于对肿瘤本身增殖及转移的研究不同[17]，为 *L*- 天冬酰胺酶在免疫治疗中提供了研究思路与方向。

4 总结与展望

已经有大量的研究证实 *L*- 天冬酰胺酶可用于治疗 ALL 等恶性肿瘤，虽然研究初步证实 *L*- 天冬酰胺酶与其他药物联用可能对乳腺癌、胰腺癌、胃癌等有效，但是这还需要更多严谨的临床前试验验证。以往癌症主要以手术、放疗和化疗为主，随着高通量测序、形态学等方法的发展与应用使癌症实现了精准诊断；抗体类药物、小分子药物、靶向药物以及免疫检查点抑制剂等的出现，使个体化精准治疗成为可能。

总之，*L*- 天冬酰胺酶是一类有效的抗肿瘤药物，通过与临床化疗药物联用能够更大程度地发挥其药效；探究对 *L*- 天冬酰胺酶治疗敏感的肿瘤细胞，预测并验证关键生物标志物及参与肿瘤发生发展的关键信号通路等可更有效地指导 *L*- 天冬酰胺酶的临床使用。

参考文献

[1] Hanahan D，Weinberg RA. Hallmarks of cancer：the next generation [J]. Cell，2011，144（5）：646-674.

[2] Xia LZ，Lin JG，Tan SM，et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response [J]. Mol Cancer，2021，20（1）：28.

[3] Cha YJ，Kim ES，Koo JS. Amino acid transporters and glutamine metabolism in breast cancer [J]. Int J Mol Sci，2018，19（3）：907.

[4] Saeed H，Ali H，Soudan H，et al. Molecular cloning，structural modeling and production of recombinant Aspergillus terreusl. asparaginase in Escherichia coli [J]. Int J Biol Macromol，2018，106：1041-1051.

[5] Pokrovskaya M，Pokrovsky V，Aleksandrova S，et al. Molecular analysis of *L*-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions [J]. Pharmaceutics，2022，14（3）：599.

[6] 韦玉军，陈建华，吴梧桐 . *E. coli L*- 天冬酰胺酶结构与功能及其纯化工艺 [J]. 药学进展，2005，29（9）：397-404.

[7] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2019 [J]. CA Cancer J Clin，2019，69（1）：7-34.

[8] Douer D，Stock W，Boissel N，et al. Optimizing use of *L*-asparaginase-based treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood Rev，2022，53：100908.

[9] Pieters R，Hunger SP，Boos J，et al. *L*-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia：a focus on Erwinia asparaginase [J]. Cancer，2011，117（2）：238-249.

[10] Raetz EA，Salzer WL. Tolerability and efficacy of *L*-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Hematol Oncol，2010，32（7）：554-563.

[11] Kato M，Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Int，2018，60（1）：4-12.

[12] Vrooman LM，Kirov II，Dreyer ZE，et al. Activity and toxicity of intravenous erwinia asparaginase following allergy to *E. coli*-derived asparaginase in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer，2016，63（2）：228-233.

[13] Lin T，Choi MR，Jenkin J，et al. A randomized phase Ⅰ study to evaluate the safety，tolerability，and pharmacokinetics of recombinant erwinia asparaginase（JZP-458）in healthy adult volunteers [J]. Clin Transl Sci，2021，14（3）：870-879.

[14] Maese L，Lon ML，Choi MR，et al. Recombinant Erwinia asparaginase（JZP458）in acute lymphoblastic leukemia：results from the phase 2/3 AALL1931 study [J]. Blood，2023，141（7）：704-712.

[15] Harbeck N，Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet，2017，389（10074）：1134-1150.

[16] Yin L，Duan JJ，Bian XW，et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. Breast Cancer Res，2020，22（1）：61.

[17] Knott SRV，Kim SY，Soto M，et al. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer [J]. Nature，2018，554（7692）：378-381.

[18] Mazloum-Ravasan S，Madadi E，Mohammadi A，et al. *Yarrowia lipolytica L*-asparaginase inhibits the growth and migration of lung（A549）and breast（MCF7）cancer cells [J]. Int J Biol Macromol，2021，170：406-414.

[19] Duval M，Suciu S，Ferster A，et al. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies：results of a

randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial [J]. Blood，2002，99（8）：2734-2739.
[20] Tallal L，Tan C，Oettgen H，et al. *E. coli L*-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children [J]. Cancer，1970，25（2）：306-320.
[21] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2018，68（6）：394-424.
[22] Alipour M. Molecular mechanism of helicobacter pylori-induced gastric cancer [J]. Gastrointest Cancer，2021，52（1）：23-30.
[23] Crowe SE. Helicobacter pylori infection [J]. N Engl J Med，2019，380（12）：1158-1165.
[24] Wang ML，Lu YD，Wang HZ，et al. High ATF4 expression is associated with poor prognosis，amino acid metabolism，and autophagy in gastric cancer [J]. Front Oncol，2021，11：740120.
[25] Zu TJ，Wang D，Wang SS，et al. ATF-3 expression inhibits melanoma growth by downregulating ERK and AKT pathways [J]. Lab Invest，2021，101（5）：636-647.
[26] Krall AS，Mullen P，Surjono F，et al. Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth [J]. Cell Metab，2021，33（5）：1013-1026.
[27] Sindhu R，Manonmani HK. *L*-asparaginase induces intrinsic mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells and impedes tumor progression [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，503（4）：2393-2399.
[28] Xia C，Dong XS，Li H，et al. Cancer statistics in China and United States，2022：profiles，trends，and determinants [J]. Chin Med J（Engl），2022，135（5）：584-590.
[29] Grimes DR. Radiofrequency radiation and cancer：a review [J]. JAMA Oncol，2022，8（3）：456-461.
[30] Vogelmann R，Amieva MR. The role of bacterial pathogens in cancer [J]. Curr Opin Microbiol，2007，10（1）：76-81.
[31] Chen CJ，Hsu WL，Yang H，et al. Epidemiology of virus infection and human cancer [J]. Recent Results Cancer Res，2014，193：11-32.
[32] Birkett N，Bird M，Zielinski J，et al. Overview of biological mechanisms of human carcinogens [J]. Toxicol Environ Health B Crit Rev，2019，22（7-8）：288-359.
[33] Basu AK. DNA damage，mutagenesis and cancer [J]. Int J Mol Sci，2018，19（4）：970.
[34] Gwinn DM，Lee A，Simpson DR，et al. Oncogenic KRAS regulates amino acid homeostasis and asparagine biosynthesis via ATF4 and alters sensitivity to *L*-asparaginase [J]. Cancer Cell，2018，33（1）：91-107.
[35] Cai DJ，Zhang ZY，Li L，et al. Asparagine synthetase regulates lung-cancer metastasis by stabilizing the β-catenin complex and modulating mitochondrial response [J]. Cell Death Dis，2022，13（6）：566.
[36] Malvezzi M，Carioli G，Bertuccio P，et al. European cancer mortality predictions for the year 2017，with focus on lung cancer [J]. Ann Oncol，2017，28（5）：1117-1123.
[37] Dufour E，Gay F，Aguera K，et al. Pancreatic tumor sensitivity to plasma *L*-asparagine starvation [J]. Pancreas，2012，41（6）：940-948.
[38] Hammel P，Fabienne P，Mineur L，et al. Erythrocyte-encapsulated asparaginase（eryaspase）combined with chemotherapy in second-line treatment of advanced pancreatic cancer：an open-label，randomized phase IIb trial [J]. Eur J Cancer，2020，124：91-101.
[39] Zhou M，Wang HD，Zeng XY，et al. Mortality，morbidity，and risk factors in China and its provinces，1990—2017：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet，2019，394（10204）：1145-1158.
[40] Okuda K，Umemura A，Yano K，et al. Enhanced antitumor effect in liver cancer by amino acid depletion-induced oxidative stress [J]. Front Oncol，2021，11：758549.
[41] El-Gendy MMAA，Awad M，El-Shenawy FS，et al. Production，purification，characterization，antioxidant and antiproliferative activities of extracellular *L*-asparaginase produced by Fusarium equiseti AHMF4 [J]. Saudi J Biol Sci，2021，28（4）：2540-2548.
[42] Hinze L，Degar J，Labrosse R，et al. Exploiting the therapeutic interaction of WNT pathway activation and asparaginase for colorectal cancer therapy [J]. Cancer Discov，2020，10（11）：1690-1705.
[43] Shinde AK. *L*-asparaginase：aspiring for better outcomes in endometrial cancer [J]. BJOG，2018，125（13）：1704.
[44] Abbott M，Ustoyev Y. Cancer and the immune system：the history and background of immunotherapy [J]. Semin Oncol Nurs，2019，35（5）：150923.
[45] Ramos RN，Piaggio E，Romano E. Mechanisms of resistance to immune checkpoint antibodies [J]. Handb Exp Pharmacol，2018，249：109-128.
[46] Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors [J]. Immunother Cancer，2018，6（1）：157.
[47] Tian L，Xu B，Chen YQ，et al. Specific targeting of glioblastoma with an oncolytic virus expressing a cetuximab-CCL5 fusion protein via innate and adaptive immunity [J]. Nat Cancer，2022，3（11）：1318-1335.
[48] Galon J，Bruni D. Approaches to treat immune hot，altered and cold tumours with combination immunotherapies [J]. Nat Rev Drug Discov，2019，18（3）：197-218.
[49] Wu J，Li G，Li L，et al. Asparagine enhances LCK signalling to potentiate $CD8^+$ T-cell activation and anti-tumour responses [J]. Nat Cell Biol，2021，23（1）：75-86.
[50] Raynor JL，Chi H. LCK senses asparagine for T cell activation [J]. Nat Cell Biol，2021，23（1）：7-8.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-06）

清除脑内衰老细胞治疗阿尔茨海默病的研究进展

边宇航[1]，张凌[1]，王丹[2]，陈靖[1]，梁喜才[1]，王威丽[3]，弓彦[1]，吴运谱[1]，宁天一[1*]，王春田[1*]（1. 辽宁中医药大学，沈阳　110847；2. 沈阳市食品药品检验所，沈阳　110000；3. 辽宁省药品检验检测院，沈阳　110032）

摘要：阿尔茨海默病（AD）是一种与年龄和衰老相关的进行性认知障碍，发病隐匿且不可逆，已成为全球重大健康和社会经济问题。细胞衰老是影响 AD 进程的重要因素，而随着研究的不断深入，Senolytic 和 Senomorphic 等疗法可通过清除衰老细胞（SCs）达到治疗 AD 的目的。故笔者对衰老诱发 AD 的机制及清除 SCs 治疗 AD 的研究进展进行阐述，为 AD 防治及 SCs 清除剂的研发提供新的思路。

关键词：阿尔茨海默病；衰老细胞；衰老细胞清除剂
中图分类号：R739.41　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2413-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.024

Review of theoretic methods for Alzheimer’s disease by removing the senescent brain cells

BIAN Yu-hang[1], ZHANG Ling[1], WANG Dan[2], CHEN Jing[1], LIANG Xi-cai[1], WANG Wei-li[3], GONG Yan[1], WU Yun-pu[1], NING Tian-yi[1*], WANG Chun-tian[1*] (1. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110847; 2. *Shenyang Institute for Fool and Drug Control*, *Shenyang* 110000; 3. *Liaoning Inspection*, *Examination & Certification Centre*, *Shenyang* 110032)

Abstract: Alzheimer’s disease (AD) is a degenerative cognitive condition associated with aging and senescence disorder with an insidious and irreversible onset which has become a significant global health and socio-economic issue. The progression of AD is significantly influenced by cellular senescence. As research continues, Senolytic and Senomorphic therapies for AD work well by clearing the senescent cells. Therefore, the author elaborated on the mechanism of senescence-induced AD and removal of the senescent cells for AD, to provide new insight for preventing and treating AD.

Key words: Alzheimer’s disease; senescent cell; senescent cell scavenger

阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）是一种高发的中枢神经系统退行性疾病，致病过程复杂，目前尚无改善的有效办法。作为一种典型的退行性疾病，患者会出现活动能力下降、记忆力减退和知识逐渐丧失，给家庭和社会带来了沉重的负担[1]。衰老是 AD 的关键危险因素，衰老细胞（senescent cells，SCs）促进了 AD 的发生与发展，而细胞衰老的程度也在 AD 进展中逐步增加[2]。研究证明，在基因或药理学上清除脑内 SCs 可以减少 Aβ 聚集、抑制 Tau 蛋白过度磷酸化、抑制星形胶质细胞增生、促进神经元与突触再生，从而改善 AD 模型小鼠的记忆能力，达到治疗效果[3-6]。虽然清除 SCs 在治疗 AD 中发挥了积极的作用，但脑内 SCs 诱发 AD 的机制仍未明确，本综述旨在总结该领域近年的研究成果，探讨靶向清除 SCs 对治疗 AD 的发展前景。

1　SCs 诱发 AD 的相关机制

细胞衰老在 1960 年首次被提出，以永久性增殖停滞为显著特征，是对内源性和外源性应激的反应，包括 DNA 损伤、端粒功能障碍、癌基因激活和细胞器应激，并与肿瘤抑制、组织修复、胚胎发生和器官衰老等过程有关[7]。而编码细胞周

基金项目：2022 国家级大学生创新创业训练计划项目（No. 202210162011）；2022 辽宁省级大学生创新创业训练计划项目（No. S202210162005）。

作者简介：边宇航，女，主要从事中医学研究，email：3386796487@qq.com　*通信作者：宁天一，女，实验师，主要从事神经药理学研究，email：ningtianyi@126.com；王春田，男，教授，主要从事中西医结合基础研究，email：lxc1005m@163.com

期蛋白依赖性激酶 $p15^{INK4B}$、$p16^{INK4A}$ 和肿瘤抑制蛋白 ARF 的 INK4/ARF 基因位点是衰老生长停滞的关键效应器，也是衰老相关疾病易感性的基因组热点，尤其是 AD[8]。除此之外，AD 与衰老相关分泌表型（senescence associated secretory phenotype，SASP）的激活相关，衰老放大了神经细胞内源性增殖停滞的影响，并导致组织再生受损、记忆功能障碍等 [9]。因此，阐明 SCs 诱发 AD 的机制对于 AD 的防治有着重要意义。

1.1 衰老的神经干细胞

神经干细胞（neural stem cells，NSCs）是维持组织在生理转换和组织损伤过程中稳态的关键，SCs 生长停滞在干细胞区，则会损害 NSCs 的再生能力 [10]。衰老的 NSCs 其增殖和产生新神经元的能力急剧下降，又无法被免疫系统清除，大量积累并形成了丰富的 SASP，而且衰老的神经元还会诱导正常的神经元衰老，甚至导致小胶质细胞、星形胶质细胞的衰老 [11]。如此循环，衰老的 NSCs 会逐渐增加，加速 AD 的发生。研究表明，NSCs 衰老主要由 $p16^{INK4A}$/ 视网膜母细胞瘤相关蛋白（retinoblastoma-associated protein，Rb）和细胞周期抑制蛋白（p53）p21/Rb 信号通路共同介导 [12-13]。因此，阻断 $p16^{INK4A}$/Rb 和（p53）p21/Rb 信号通路对延缓 NSCs 衰老，治疗 AD 具有潜在研究价值。此外，DNA 损伤同样能促进小鼠 NSCs 的衰老，导致干性基因表达的缺失，以及向星形胶质细胞分化的转录谱特征 [14]。

1.2 SCs 与淀粉样蛋白 -β（amyloid-β，Aβ）

Aβ 的聚集被认为是 AD 发病的重要触发因素。在 AD 患者和小鼠模型中，Aβ 减少了少突胶质前体细胞（oligodendrocyte precursor cells，OPCs）的增殖，并使其呈现出衰老样表型，其特征是细胞周期抑制蛋白 p21/ 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A（cyclin dependent kinase inhibitor 1A，CDKN1A）、$p16^{INK4}$/CDKN2A 蛋白和 SA-β-gal 活性的上调 [15]。有研究将培养的 OPCs 直接暴露于 Aβ，结果观察到 OPCs 与 Aβ 斑块有空间相关性，并证明了 Aβ 可以直接诱发 OPCs 衰老 [15]。此外，Aβ 可通过下调 SIRT1/NRF2 通路，影响小胶质细胞发挥吞噬作用和产生活性氧（reactive oxygen species，ROS），而衰老的小胶质细胞 CD38 表达增加，进一步导致了 AD 模型的代谢紊乱 [16-17]。

1.3 SCs 与 Tau

脑内 SCs 的积累可引起 Tau 蛋白异常磷酸化和神经纤维缠结沉积，加速了 AD 早期 Tau 蛋白的扩散 [18]。研究表明，在 Tau 转基因小鼠模型中，发现了 $p16^{INK4A}$ 阳性的星形胶质细胞和小胶质细胞的累积 [19]。Bussian 等 [20] 研究表明，使用抗衰老药物 Navitoclax 可直接杀死 Tau 基因突变小鼠脑内的 SCs，成功阻止了 Tau 蛋白在神经元中形成絮状物并改善了小鼠的大脑萎缩和记忆衰退。可见，Tau 蛋白异常磷酸化与大脑细胞衰老存在着一定的联系，而从清除 SCs 入手则是治疗 AD 的一个全新的角度。

1.4 SCs 与炎症

SCs 主要通过以下两种方式引起组织的慢性炎症：① 通过旁分泌协同效应放大 SASP，从而加剧炎症反应 [21]；② 衰老会导致免疫功能受损，从而使得 SCs 的清除率降低，SCs 的逐渐积累进一步加剧了炎症 [22]。研究表明，TREM2 及 APOE 通路对神经炎性斑块的协同激活加速了小胶质细胞衰老，导致局部炎症反应增强 [23]。另有临床证据表明，轻度认知障碍阶段已经存在神经炎症，早期神经炎症可能是由大脑中 SCs 积累所驱动的 [24]。

2 清除脑内 SCs 的药物

SCs 清除剂（如 Senolytics，Senomorphics 与自然杀伤细胞）的研发已经成为 AD 早期预防和后期治疗的新策略，也是一种有潜力的选择 [25]。临床研究表明，间歇给予抗衰老药物可以减少 Tau 积累和神经炎症 [26]，同时减轻 Aβ 诱导的 OPCs 衰老，从而保持神经元和突触的密度，以改善患者的记忆与认知缺陷 [15]。故接下来将分别探讨 Senolytics，Senomorphics 与自然杀伤细胞清除 SCs 治疗 AD 的机制和临床研究进展。

2.1 Senolytics 疗法

Senolytics 是一类选择性清除 SCs 的药物，能通过干扰 SCs 信号通路，使 SCs 抗凋亡通路（SCAP）暂时性失效，且可以抑制 SASP 分泌。代表药物有达沙替尼、槲皮素、非瑟酮、Navitoclax 和强心苷等 [27]，其研究进展汇总见表 1。

2.1.1 达沙替尼和槲皮素　Kirkland 等 [28] 首次发现达沙替尼＋槲皮素能够特异性靶向 SCs。在细胞水平，达沙替尼可以抑制细胞炎症，促进炎症细胞凋亡；槲皮素能抑制炎性细胞因子合成和释放，缓解海马神经元炎症损伤，促进自噬，改善血管性痴呆大鼠学习记忆功能 [29]。达沙替尼＋槲皮素联合用药，可以选择性杀死衰老的前脂肪细胞和内皮细胞，但是对正常细胞无显著影响。在快速老化 SAMP10 小鼠中，给予达沙替尼＋槲皮素治

表 1 Senolytics 药物研究进展

Tab 1 Progress of Senolytics

Senolytics 药物	作用机制及药理作用	研究进展
达沙替尼＋槲皮素	IL-6 水平↓，P16 水平↓，Tau 蛋白的积累↓，神经炎症↓，保留神经元和突触密度，步态速度↑，衰老的 OPC↓，小胶质细胞活化↓，Aβ 斑块大小↓，认知水平↑，尿液中的 SASP 因子↓	Ⅱ期（NCT04063124）治疗 AD 的安全性和可行性研究 Ⅱ期（NCT04785300）治疗 AD 的研究 Ⅱ期（NCT05422885）缓解衰老过程中的进行性问题和神经功能障碍 Ⅱ期（NCT04685590）治疗 AD 的安全性和可行性研究
Navitoclax（ABT-263/ABT-199）	BCL-2、BCL-xL、BCL-W 抑制剂	临床前动物模型
强心苷	Na^+/K^+ ATPase、BCL-2、BCL-xL、BCL-W 抑制剂	临床前动物模型
地高辛	SCs↓	临床前动物模型

注：↓. 抑制或下降，↑. 增强或增加。

Note：↓ means restrain or decline，↑ means intensifier or increase.

疗能明显减少 SCs 数量、抑制 SASP 分泌并改善模型小鼠的运动和认知功能 [30]。研究表明，达沙替尼＋槲皮素清除 SCs 的机制包括干扰 Ephrin 依赖性受体信号通路、PI3K-AKT 信号通路，促进 SCs 凋亡等从而发挥广谱的清除 SCs 作用 [31]。

值得关注的是，已经有多个达沙替尼＋槲皮素针对治疗 AD 的临床试验完成登记，并且Ⅰ期临床试验报告表明，在 11 d 内给予三剂达沙替尼＋槲皮素足以阶段性清除 SCs，因此不需要连续用药。由于是间歇给药，其不良反应得到有效控制，安全性更有保障 [32]。

2.1.2 Navitoclax Navitoclax（ABT-263）是一种有效的 BCL-xL、BCL-2 和 BCL-w 抑制剂，也是一种有效的 Senolytics 药物。研究表明，给予 PS19 小鼠灌胃 ABT-263 后，不仅可抑制 SASP 的产生，而且还能通过诱导细胞凋亡，选择性地清除 SCs[33]。此外，ABT-263 还能减轻创伤性脑损伤诱导的造血系统过早衰老，并使正常年龄小鼠的衰老 NSCs 恢复活力 [34]。但 Navitoclax 属于第一代 BCL-2 抑制剂，其血小板毒性大，早已终止开发，取代的是 Venetoclax（ABT-199，维奈克拉），其药效更强，不良反应更少。但维奈克拉是否能通过清除 SCs 治疗 AD 仍有待进一步验证。

2.1.3 其他 Senolytics 药物 强心苷（cardiac glycosides，CGs）是一类具选择性强心作用的药物，又称强心配糖体，临床上主要用于治疗慢性心功能不全，此外又可治疗某些心律失常，尤其是室上性心律失常 [35]。研究表明，CGs 可作为具有 Senolytic 活性的化合物家族的药物之一，CGs 通过靶向 Na^+/K^+ ATP 酶泵，使细胞内的电化学梯度不平衡，进一步导致去极化和酸化。而 SCs 呈现轻微去极化的质膜和较高浓度的 H^+，更容易受到 CGs 的作用。同时 CGs 的增效作用也有效消除衰老引起的肺纤维化 [36]。此外，地高辛（digoxin）可通过诱导 SCs 死亡达到清除 SCs 的目的 [36]。可见，CGs 和地高辛可能是针对年龄相关疾病的有效治疗药物。

2.2 Senomorphics 疗法

Senomorphics（又被称为 SASP 抑制剂）通过选择性抑制 SASP 因子为 AD 的治疗提供了一条可能的途径 [37]。Senomorphics 可清除 SCs 分泌的 SASP 成分，以减弱 SCs 对组织的影响，而不是直接杀死 SCs，这个疗法的优点之一是可以在不影响细胞总数的情况下达到理想的治疗效果 [38]。代表药物主要有雷帕霉素、二甲双胍、辛伐他汀和 SB203580 等，其研究进展汇总见表 2。

2.2.1 雷帕霉素 研究发现哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）抑制剂雷帕霉素（RAPA）可以延长小鼠的寿命，对死亡率为 90% 的衰老小鼠灌胃 RAPA，可以使雌性小鼠的寿命延长 14%，雄性小鼠的寿命延长 9%[39]。在 AD 治疗中，RAPA 可以通过增强自噬来消除 AD 小鼠的 Aβ 积累，减少 Tau 过度磷酸化和清除神经原纤维缠结（NFT），从而改善小鼠认知能力 [40]。RAPA 还可通过调控 mTOR/p70S6K 信号通路，降低 STZ 诱导小鼠的 Tau 磷酸化和 Aβ 水平以及线粒体异常和认知障碍 [41]。此外，RAPA 能减少 SCs 对高脂喂养 ApoE-/- 小鼠组织的影响，不但能延长小鼠的生存时间，而且对机体无明显毒性 [42]。RAPA 治疗 AD 已在临床开展试验，这为治疗 AD 提供了更积极的选择。

2.2.2 二甲双胍 二甲双胍已经被证明对衰老相关的疾病具有治疗作用，并对衰老的关键途径均具有调节作用 [43]。其机制包括：① 激活自噬，增加老年受试者 $CD4^+$ T 细胞的自噬水平，清除受损细胞从而延缓衰老 [44]；② 激活 AMPK，参

表 2 Senomorphics 药物研究进展

Tab 2 Progress of Senomorphics

Senomorphics 药物	作用机制及药理作用	研究进展
雷帕霉素	mTOR↓，临床前 AD 认知评估组合 5（PACC5）分数↑，临床痴呆量表总和（CDR-SOB）分数↓，功能评估量表（FAS）分数↓，老年抑郁量表 15 项（GDS-15）分数↓，步态速度↑，握力↑，Aβ↓，脑葡萄糖代谢能力↑，脑容量↑	Ⅱ期（NCT04629495）对 AD 和认知健康的影响 Ⅰ期（NCT04200911）对认知、年龄的影响
二甲双胍	自噬水平↑，AMPK↑，FCSRT 结果改善↑，AD 认知复合评分（PACC-ADCS）结果改善↑，AD 受累区域大脑皮质厚度改善↑，白质高信号体积改善↑，SUVR↓，Aβ↓，神经炎症↓，内侧和下侧颞叶皮质的 Tau SUVR↓，$A\beta_{42/40}$ 比例↓，使用 Simoa 测定法测定的血浆总 Tau 蛋白↓，海马区皮质厚度改善↑	Ⅱ期（NCT04098666）预防 AD Ⅰ期（NCT03757910）预防 AD Ⅱ期（NCT01965756）对痴呆所致认知、生理、生化和生物标志物影响的随机安慰剂对照交叉试验研究 Ⅱ期（NCT00620191）预防 AD

注：↓. 抑制或下降，↑. 增强或增加。

Note：↓ means restrain or decline，↑ means intensifier or increase.

与 ATP 合成与分解的酶的活性，减少能量消耗，调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子，增加线粒体的生物合成；调节 SIRTs 表达，通过调控细胞线粒体的代谢延缓衰老的作用[45]；③抑制 SASP 分泌，通过能抑制 TH17 分泌白介素 17（IL-17），从而减轻 SASP 分泌，达到清除 SCs 的目的[46]。除此之外，二甲双胍能降低 APP/PS1 小鼠脑内的 Aβ 水平，调节突触可塑性，降低小鼠的氧化应激和神经炎症的水平，从而改善 APP/PS1 小鼠的神经功能障碍[47]。总体来看二甲双胍表现出优秀的抗衰老作用，为后续开发清除 SCs 治疗 AD 提供一个可行思路。

2.3 其他药物

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）作为氧化还原反应的辅酶，是能量代谢的中心分子。NAD^+的水平会随着衰老而降低，并且会导致线粒体功能降低、氧化应激、DNA 损伤，进而导致慢性炎症和认知水平障碍[48]。而烟酰胺单核苷酸（NMN）和烟酰胺核糖苷（NR）作为 NAD^+的补充剂可以上调 APP/PS1 双转基因小鼠脑中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α（PGC-1α）介导的 β- 分泌酶 1（BACE-1）泛素化，从而阻止大脑中 Aβ 的生成，并能清除 SCs，减轻 DNA 的损伤和神经炎症，进而达到治疗 AD 的效果[49]。此外，临床研究表明，给予患者 NAD^+补充剂后，线粒体功能明显得到改善，氧化水平明显降低，认识能力明显改善。这是一个令人振奋的临床结果，并且新的临床研究也已启动，以更精准地研究其用药的安全性和精准性[50]。目前正在开展的临床研究见表 3。

表 3 NMN/NR 药物研究进展

Tab 3 Progress of NMN/NR

作用机制	研究进展
线粒体功能↑，年龄相关导致的异常↓，受试动物模型和患者的 NAD^+水平↑，氧化水平↓，抗氧化剂谷胱甘肽（GSH）↑，认知状态↑，AD 合作研究 - 日常生活活动（ADCS-ADL）评分↑，PHQ-9 评分↓，神经精神病学调查问卷（NPI-Q）评分↓，情绪、行为、神经认识能力↑，胰岛素抵抗↓	Ⅱ期（NCT04044131）对 AD 和 PD 患者的功效、耐受性和安全性影响 Ⅰ期（NCT04430517）对轻度认知障碍和轻度 AD 患者生物能量代谢、氧化应激和认知的影响

注：↓. 抑制或下降，↑. 增强或增加。

Note：↓ means restrain or decline，↑ means intensifier or increase.

3 总结与展望

随着人口老龄化的加快，AD 已经成为影响老年人生存质量的疾病之一，而脑内细胞衰老会导致 AD 的发生发展。清除 SCs 已经是治疗 AD 的热门方向。临床应用的抗衰老药物主要分为 Senolytics 和 Senomorphics 两大类，这两类药物在治疗 AD 方面均表现出巨大的潜能，其中达沙替尼和槲皮素能靶向性清除 SCs 从而治疗 AD，现已逐步开始进行Ⅱ期临床试验。然而考虑到神经细胞的不可再生性，采用清除 SCs 分泌的有害物质这一治疗方法更加安全可靠。此外，在临床试验中，动物和人类的 SCs 差异又会使得这一问题更加复杂化。SCs 之间的差异性使得为 SCs “量身定做” 清除疗法变得比较困难，多数学者认为仍需持续关注。综上，清除 SCs 在治疗 AD 中取得了一系列新的进展，防治 AD 或许将成为一个可以实现的目标。

参考文献

[1] Tatulian SA. Challenges and hopes for Alzheimer's disease [J]. Drug Discov Today，2022，27（4）：1027-1043.

[2] Liu RM. Aging，cellular senescence，and Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci，2022，23（4）：1989.

[3] Han XJ，Zhang TY，Liu HH，et al. Astrocyte senescence and Alzheimer's disease：a review [J]. Front Aging Neur，9（12）：148.

[4] Lagoumtzi SM，Chondrogianni N. Senolytics and senomorphics：natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases [J]. Free Radic Biol Med，2021，171：169-190.

[5] Musi N，Valentine JM，Sickora KR，et al. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain [J]. Aging Cell，2018，17（6）：e12840.

[6] Liu C. The role of mesenchymal stem cells in regulating astrocytes-related synapse dysfunction in early Alzheimer's disease [J]. Front Neurosci，2022，16：927256.

[7] Zhu XD，Chen ZY，Shen WY，et al. Inflammation，epigenetics，and metabolism converge to cell senescence and ageing：the regulation and intervention [J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6（1）：245.

[8] Gorgoulis V，Adams PD，Alimonti A，et al. Cellular senescence：defining a path forward [J]. Cell，2019，179（4）：813-827.

[9] Ziegler-Waldkirch S，Friesen M，Loreth D，et al. Seed-induced Aβ deposition alters neuronal function and impairs olfaction in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Mol Psychiatry，2022，27（10）：4274-4284.

[10] Guerrero A，de Strooper B，Arancibia-Cárcamo IL. Cellular senescence at the crossroads of inflammation and Alzheimer's disease [J]. Trends Neurosci，2021，44（9）：714-727.

[11] Tahami Monfared AA，Byrnes MJ，White LA，et al. The humanistic and economic burden of Alzheimer's disease [J]. Neurol Ther，2022，11（2）：525-551.

[12] Fong BC，Chakroun I，Iqbal MA，et al. The Rb/E2F axis is a key regulator of the molecular signatures instructing the quiescent and activated adult neural stem cell state [J]. Cell Rep，2022，41（5）：111578.

[13] Hashimoto M，Takeichi K，Murata K，et al. Regulation of neural stem cell proliferation and survival by protein arginine methyltransferase 1 [J]. Front Neurosci，2022，16：948517.

[14] Di Micco R，Krizhanovsky V，Baker D，et al. Cellular senescence in ageing：from mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2021，22（2）：75-95.

[15] Zhang PS，Kishimoto Y，Grammatikakis I，et al. Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model [J]. Nat Neurosci，2019，22（5）：719-728.

[16] An Y，Li Y，Hou Y，et al. Alzheimer's amyloid-β accelerates cell senescence and suppresses the sirt1/nrf2 pathway in human microglial cells [J]. Oxid Med Cell Longev，2022，2022：3086010.

[17] Hu YR，Huang Y，Xing SL，et al. Aβ promotes CD38 expression in senescent microglia in Alzheimer's disease [J]. Biol Res，2022，55（1）：10.

[18] Frontzkowski L，Ewers M，Brendel M，et al. Earlier Alzheimer's disease onset is associated with tau pathology in brain hub regions and facilitated tau spreading [J]. Nat Commun，2022，13（1）：4899.

[19] Baker DJ，Wijshake T，Tchkonia T，et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders [J]. Nature，2011，479（7372）：232-236.

[20] Bussian TJ，Aziz A，Meyer CF，et al. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline [J]. Nature，2018，562（7728）：578-582.

[21] Gao L，Yang WY，Qi H，et al. Unveiling the anti-senescence effects and senescence-associated secretory phenotype（SASP）inhibitory mechanisms of Scutellaria baicalensis Georgi in low glucose-induced astrocytes based on boolean network [J]. Phytomedicine，2022，99：153990.

[22] Herdy JR，Traxler L，Agarwal RK，et al. Increased post-mitotic senescence in aged human neurons is a pathological feature of Alzheimer's disease [J]. Cell Stem Cell，2022，29（12）：1637-1652.

[23] Ji CY，Wei C，Li MN，et al. Bazi Bushen capsule attenuates cognitive deficits by inhibiting microglia activation and cellular senescence [J]. Pharm Biol，2022，60（1）：2025-2039.

[24] Salech F，SanMartín CD，Concha-Cerda J，et al. Senescence markers in peripheral blood mononuclear cells in amnestic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci，2022，23（16）：9387.

[25] Wu YH，Shen SW，Shi YF，et al. Senolytics：eliminating senescent cells and alleviating intervertebral disc degeneration [J]. Front Bioeng Biotechnol，2022，10：823945.

[26] Gonzales MM，Garbarino VR，Marques Zilli E，et al. Senolytic therapy to modulate the progression of Alzheimer's disease（SToMP-AD）：a pilot clinical trial [J]. J Prev Alzheimers Dis，2022，9（1）：22-29.

[27] Kirkland JL，Tchkonia T. Senolytic drugs：from discovery to translation [J]. J Intern Med，2020，288（5）：518-536.

[28] Kirkland JL，Tchkonia T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents [J]. Exp Gerontol，2015，68：19-25.

[29] 唐森，方建，高立功，等 . 基于 PINK1/Parkin 通路研究槲皮素减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤的作用机制 [J]. 中草药，2022，53（20）：6529-6535.

[30] Ota H，Kodama A. Dasatinib plus quercetin attenuates some frailty characteristics in SAMP10 mice [J]. Sci Rep，2022，12（1）：2425.

[31] Gasek NS，Kuchel GA，Kirkland JL，et al. Strategies for targeting senescent cells in human disease [J]. Nat Aging，2021，1（10）：870-879.

[32] Hickson LJ，Langhi Prata LGP，Bobart SA，et al. Senolytics decrease senescent cells in humans：preliminary report from a clinical trial of dasatinib plus quercetin in individuals with diabetic kidney disease [J]. EBioMedicine，2019，47：446-456.

[33] Chang JYH，Wang YY，Shao LJ，et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice [J]. Nat Med，2016，22（1）：78-83.

[34] Rysanek D，Vasicova P，Kolla JN，et al. Synergism of BCL-2 family inhibitors facilitates selective elimination of senescent cells [J]. Aging（Albany NY），2022，14（16）：6381-6414.

[35] 张棋凯，石蕾，骆慧颖，等 . 强心苷类化合物诱导肿瘤细胞自噬的研究进展 [J]. 中南药学，2018，16（1）：82-86.

[36] Martin N，Soriani O，Bernard D. Cardiac glycosides as senolytic compounds [J]. Trends Mol Med，2020，26（3）：243-245.

[37] Birch J，Gil J. Senescence and the SASP：many therapeutic avenues [J]. Genes Dev，2020，34（23-24）：1565-1576.

[38] Mongelli A，Atlante S，Barbi V，et al. Treating senescence like cancer：novel perspectives in senotherapy of chronic diseases [J]. Int J Mol Sci，2020，21（21）：7984.

[39] Harrison DE，Strong R，Sharp ZD，et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice [J]. Nature，2009，460（7253）：392-395.

[40] Cai Z，Yan LJ. Rapamycin，autophagy，and Alzheimer’s disease [J]. J Biochem Pharmacol Res，2013，1（2）：84-90.

[41] Ding YT，Liu H，Cen MF，et al. Rapamycin ameliorates cognitive impairments and Alzheimer’s disease-Like pathology with restoring mitochondrial abnormality in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Neurochem Res，2021，46（2）：265-275.

[42] Koju N，Qin ZH，Sheng R. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in redox balance and diseases：a friend or foe? [J] Acta Pharmacol Sin，2022，43（8）：1889-1904.

[43] Barzilai N，Crandall JP，Kritchevsky SB，et al. Metformin as a tool to target aging [J]. Cell Metab，2016，23（6）：1060-1065.

[44] Bharath LP，Agrawal M，McCambridge G，et al. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation [J]. Cell Metab，2020，32（1）：44-55.

[45] Wu LF，Zhou B，Oshiro-Rapley N，et al. An ancient，unified mechanism for metformin growth inhibition in C. elegans and cancer [J]. Cell，2016，167（7）：1705-1718.

[46] Induri SNR，Kansara P，Thomas SC，et al. The gut microbiome，metformin，and aging [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2022，62：85-108.

[47] Lu XY，Huang S，Chen QB，et al. Metformin ameliorates Aβ pathology by insulin-degrading enzyme in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：2315106.

[48] Nadeeshani H，Li J，Ying T，et al. Nicotinamide mononucleotide（NMN）as an anti-aging health product-promises and safety concerns [J]. J Adv Res，2021，37：267-278.

[49] Braidy N，Liu Y. Can nicotinamide riboside protect against cognitive impairment? [J] Curr Opin Clin Nutr Metab Care，2020，23（6）：413-420.

[50] Hong WQ，Mo F，Zhang ZQ，et al. Nicotinamide mononucleotide：a promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD^+ metabolism [J]. Front Cell Dev Biol，2020，8：246.

（收稿日期：2023-01-17；修回日期：2023-04-19）

中药资源开发与利用

民族药血满草的本草考证

黄江丽，王葳，彭登庭，王文静*（云南中医药大学，昆明　650000）

摘要：血满草（*Sambucus adnata* Wall.）最早记载于《植物名实图考》中，是少数民族治疗风湿痹痛、骨关节炎、骨折等常用药物。本文在查阅历代古籍和现代相关记载的基础上，对血满草的名称、性味归经、功效主治、炮制及毒性进行考证。结果表明，现代以“血满草”为正名，来源于忍冬科接骨木属植物，关于性味归经、功能主治、炮制方法与毒性的记载和描述，古今基本一致。本文通过系统考证血满草的名称、性味、功效主治、炮制及毒性，可为血满草的开发及合理利用提供理论支持。

关键词：血满草；本草考证；民族药；性味归经；功效主治

中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2419-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.025

Herbal textual research on *Sambucus adnata* Wall.

HUANG Jiang-li, WANG Wei, PENG Deng-ting, WANG Wen-jing* (*Yunnan University of Chinese Medicine*, *Kunming*　650000)

Abstract: *Sambucus adnata* Wall. was first recorded in an *Illustrated Book of Plants*. It is a commonly used medicine for the treatment of rheumatic arthralgia, osteoarthritis, fracture and so on. This study investigated the name, the property and flavor, efficacy and indications, processing method and toxicity of *Sambucus adnata* Wall by reviewing the ancient Chinese herbal books and modern relevant records. The results showed that the name of “Xue Man Cao” was formally used in modern times, which originated from *Sambucus* of Caprifoliaceae. The property and flavor, efficacy and indications, processing method and toxicity were basically the same as the ones in ancient times. We hope to provide theoretical support for the value development and rational use of *Sambucus adnata* Wall.

Key words: *Sambucus adnata* Wall.; herbal textual; ethnic medicine; property and flavor; efficacy and indication

血满草（*Sambucus adnata* Wall.）为忍冬科接骨木属植物，又名接骨药、接骨丹、大血草、血管草等，作为彝族、傣族、白族等少数民族的习用药物，彝、藏、傣等少数民族常用于治疗风湿痹痛、跌打损伤、骨折、黄疸、荨麻疹和水肿等[1]。现代药理研究表明该属植物的提取物及单体化合物具有骨保护、抗炎镇痛、抗真菌、抗氧化、抗血栓、肝保护等药理活性，主要成分为木脂素类、黄酮类、萜类化合物等[2]。历代本草典籍对血满草的记载较少，但对其同属植物如接骨木、接骨草、陆英、蒴藋等的记载较多，且血满草常作为其同属植物的异名被记载，此外，血满草资源丰富，广泛分布于我国滇、川、藏、宁、贵、甘、陕等地[3]，由于不同地方、不同民族对血满草的称呼、指代不一，药品混用的情况也随之出现。本文对血满草的名称、性味归经、炮制及毒性进行考证，为血满草的现代药理学研究及深入利用开发提供文献依据。

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160744）。

作者简介：黄江丽，女，硕士研究生，主要从事中药化学研究，email：2941232342@qq.com　*通信作者：王文静，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药活性成分与质量评价研究，email：notoww@163.com

1 名称考证

血满草首载于清代《植物名实图考》[4]，出现在湿草类“水英”条下的按语中，记“滇南有草，绝类蒴藿而实黑，茎中有红汁，俗名血满草，浸脚气湿肿甚效”。在清代《植物名实图考长编 22 卷》[5]“蒴藿”条下描述为，“按诸说多以陆英、蒴藿为一物，但主治不同。今滇南有一种全类陆英而结子黑色，破其茎有红汁，俗呼血满草，浸腿脚治肿痹极效，或即陆英也”，表明在当时血满草与陆英、蒴藿之间的区分是模糊的，且在此后的许多典籍中记载陆英词条下陆英的别名中也有一为血满草；而在《临床中药辞典》[6] 中记载的血满草则为忍冬科多年生直立草本植物红山花的全草或根。

通过历代本草典籍记载可知，除了陆英、蒴藿外，血满草异名繁多，清代以后的本草记载大多数是以其茎中有红汁而得名（见图 1），如血管草、大血草；部分别名则是与其他功效或形态相似的中药存在重复的情形，如别称接骨丹、接骨草、接骨木。接骨丹在《云南中草药选》[7] 中收录，源自山茱萸科植物鞘柄木；接骨草在《中医单方应用大全》[8] 中记载其基源为豆科植物舞草的枝叶，在《中药别名辞典》[9] 中记载为荨麻科植物庐山楼梯草的全草，在《秦岭巴山天然药物志》[10] 中记载为山茱萸科植物齿裂鞘柄木的根皮，在《云南中草药续集》[11] 中记载的接骨草为唇形科野芝麻属的宝盖草；接骨木首次出现在唐代《新修本草》记载中，《本草图经》[12] 中首次释名因“接骨以功而名”。

A B

图 1 原植物（A）及茎的横切图（B）

Fig 1 Original plants（A）and cross section of stem（B）

综上可知，血满草的异名除了与其他植物在形态的异同而得名外，大多数的别名与其具有接骨、活血、祛风湿等疗效有关，本草记载中主要以血满草为正名，汉代医家对血满草的使用较少，其在少数民族医师中被广泛应用，由于各地习俗文化的不同，对血满草的称呼也大有差异（见表 1）。

在多个民族对血满草的称呼中，有本草把彝族的“斯赤列”称为接骨木，在《云南白药王曲焕章传奇》中记载，当年曲焕章先生在上山采药途中不幸被猎人打猎用的铁夹子夹住，腿部受了伤，彝族草医用一种当地俗称“斯赤列”的草药捣碎后用酒调制外敷于伤口处，曲焕章先生称该植物为接骨木 [30]。在当时斯赤列，血满草，接骨木三者的关系都还不是很明确，经考证，除《四川省医药卫生志》[31] 和《彝族医药史》[32] 两册中记载的“斯赤列”为接骨木外，其余都为忍冬科植物血满草。

2 性味归经及功效考证

2.1 性味归经

综合历代本草记载，《宁夏中药志》中记载其淡、微苦、微温，《云南中草药》《云南常用中药草单验方荟萃》《中国民族药炮制集成》《中药大辞典》《中国民族民间特异疗法大全》中记载其性味辛、甘、温，在《云南白族医药》中记载其甘、酸、温 [22]；除《云南中草药选》《云南天然药物图鉴 第 1 卷》《全国中草药汇编》《云南民族药志》《怒江流域民族医药》《彝药本草》《德昂族药集》记载其性味为辛、涩、温外，其余本草均认为血满草的味辛，性温。除在《宁夏中药志》《澜沧县常见药用植物》记载其归脾肾经外，在其他本草中尚未找到相关记载。

2.2 功效主治

有关其主治功效的记载最早见于清代《植物名实图考》中“水英”条下，有“浸脚气湿肿甚效”之功，其余的古籍中并未有血满草功效的相关记载，直至近代汉人将血满草载于《云南中草药选》[7] 后才出现关于血满草功效的相关记载，即用于治疗风湿痹痛；跌打损伤、小儿麻痹；骨折；水肿；急、慢性肾炎；大肠下血，脱肛；风寒头痛；皮肤瘙痒、脚跰溃烂；痈肿疔毒；肝炎等病（见表 2）。

除上述记载的用法外，彝族用此药的独特之处，是配小鸡治骨折的方法，具体用法在《彝医植物药》[19]“野核桃”条下治骨折一方中记载：“野核桃、瓦布友（紫葳科植物两头毛）、斯赤列（血满草）、爬地草、以及活小鸡，共舂烂、捣绒，包敷伤处，以夹板固定，三日一换”。此法汉、藏皆未用。而彝医普遍使用，获得了较好的疗效，但对于其现代研究的机制尚未有报道。

表 1　血满草在各民族医药中的名称

Tab 1　Name of *Sambucus adnata* Wall. in the medicine of various nationalities

民族	名称	本草专著	作者	成书时间	文献
傣族	牙勒介	《德宏民族药录》	李荣兴	1990	[13]
	芽沙板、沙板	《中国傣医传统经方整理与研究》	西双版纳傣族自治州民族医药研究所，西双版纳傣族自治州傣医医院	2013	[14]
藏族	玉勾相那保	《中国藏药》	青海省药品检验所，青海省藏医药研究所	1996	[15]
	尤格兴那博，尤格兴那保	《中华本草藏药卷》	国家中医药管理局《中华本草》编委会	1999	[16]
彝族	尔借取	《云南民族药大辞典 上》	郑进，张超，钱子刚	2019	[17]
	榆古兴那布	《彝族医药学》	关祥祖	1993	[18]
	斯赤列、赤列	《彝医植物药》	李耕科	1990	[19]
	诺拉配	《彝药本草 上》	张之道	2018	[20]
白族	除蒿	《白族药用植物图鉴》	姜北	2017	[21]
	汪红	（玉龙）《云南白族医药》	刘毅	2010	[22]
哈尼族	咖汤魁爬啊周	《中国少数民族民间验方精选》	罗日泽	2004	[23]
纳西族	莽沙	《云南民族药录》第 2 卷	朱兆云	2009	[24]
	满沙	《云南天然药物图鉴》	朱兆云	2003	[25]
景颇族	Suinebyap gvup	《德宏民族药录》	李荣兴	1990	[13]
阿昌族	随毛的尼切	《德宏民族药录》	李荣兴	1990	[13]
德昂族	牙勒介	《德宏民族药录》	李荣兴	1990	[13]
基诺族	可雌	《基诺族医药》	杨世林	2001	[26]
拉祜族	接骨草、接骨丹、吸风草、资哈马	《拉祜族常用药》	思茅地区民族传统医药研究所	1987	[27]
傈僳族	石莲俄	《怒江中草药》	云南省怒江傈僳族自治州卫生局	1991	[28]
	塞拉喔	《云南民族药志》第 2 卷	朱兆云	2009	[24]
	石来俄	《怒江流域民族药》	周元川，郑进	2010	[29]
怒族	Fi（肺，意为出血的草）	《怒江流域民族药》	周元川，郑进	2010	[29]
佤族	考江然	《云南民族药大辞典 上》	郑进，张超，钱子刚	2019	[17]
布朗族	牙沙八	《云南民族药志》第 2 卷	朱兆云	2009	[24]

3　炮制方法及毒性考证

在《彝医植物药》[19] 及《中国彝族药学》[45] 中“斯赤列”词条下记“骨折：夏季采摘血满草新鲜叶子，熬水吃。无叶时，摘取茎皮或挖根，熬汤服。同时，以叶、树皮舂绒外敷”。关于血满草的炮制，历代本草除了生用外，醋炙和酒制是比较常见的方式，在《中国民族药炮制集成》[35] 记载了有关血满草醋炙及酒制的方法：① 醋炙：取生药饮片，置锅内炒热后，淋入米醋，不断翻炒至微黄，取出，放凉备用，用于治疗水肿；② 酒炒：取血满草鲜品捣烂，加白酒炒热后，外敷患处，用于治小儿麻痹症，跌打损伤等。酒味甘、苦、辛，性温，论酒性热，能通经脉，行药势，称酒制能增加血满草活血行血功能；而醋炙可引药入肝，增强疏肝解郁、散瘀止痛中药的作用，降低峻下逐水中药的毒性 [46]。除了醋制和酒制外，其他本草记载都为净制：取其鲜品晾干备用或直接洗净用鲜品。

关于其毒性，历代本草均认为血满草无毒或未收载其毒性情况，在历代本草中记载其使用方法包括外敷和内服两种（见表 2）。王文静等 [47] 从血满草水提物及醇提物的药理实验中评价了血满草的安全性和抗炎镇痛作用，结果表明灌胃注射给予小鼠超过临床用量 600 倍的血满草水提物及醇提物均未见明显毒性。可见，现代研究与近代医者们对血满草的使用方法是吻合的。

4　小结

血满草始载于《植物名实图考》中，在古代典籍及现代研究的记载都较少，但在少数民族间使用广泛，且其资源丰富，少数民族医师常取其茎皮、根、叶等各部位作为治疗骨病的常用药物，用于治疗风湿痹痛、风湿性关节炎、水肿等多种疾病，疗效甚好，其现代药理研究也表明血满草的水提物及二氯甲烷提取物都具有较好的抗骨质疏松活性 [48]。因其植物形态及多数异名与接骨木属的其他植物存在重复及混用的情况，本文就历代典籍记载其异名及各民族间的俗名进行梳理，确定血满草为其正名，本草古籍对血满草的性味

表 2 血满草各典籍中记载的性味归经、功效主治及用法

Tab 2 Property and flavor，efficacy and indications recorded in various ancient books of *Sambucus adnata* Wall.

出处	名称	性味归经	主治及用法	参考文献
《云南中草药选》	血满草	辛、甘、温	① 风湿痹痛：血满草适量，煎水洗患处；② 跌打损伤、小儿麻痹：先用梅花针刺患处，再用鲜血满草茎叶舂细，酒炒外包；③ 骨折：鲜血满草全草适量，捣烂，加酒或开水调敷；④ 水肿：血满草嫩叶，根皮 9 ～ 15 g，同豆腐煮服	[7]
《云南常用中草药单验方荟萃》	血满草	辛、甘、温	水煎服，10 ～ 15 g；外用捣敷；急、慢性肾炎：本品根 15 g、酒瓶花根 30 g、山皮条 12 g、石椒草 12 g，水煎服	[34]
《中国民族药炮制集成》	血满草	辛、甘、温	急性水肿、慢性肾炎、风湿疼痛、风疹瘙痒、小儿麻痹后遗症、扭伤、骨折；用量为 9 ～ 15 g；外用适量	[35]
《中药大辞典》	血满草	辛、甘、温	内服：煎汤，3 ～ 5 钱；或炖肉；外用：捣敷。 ① 风湿痹痛：血满草适量；煎水外洗患处；② 跌打损伤、小儿麻痹：先用梅花针刺患处，再用鲜血满草茎叶适量舂细，酒炒外包；③ 骨折：鲜血满草全草适量，捣烂，加酒或开水调敷；④ 水肿：血满草嫩叶、根皮 3 ～ 5 钱，同豆腐然服；⑤ 急、慢性肾炎：血满草五钱，酒瓶花根 1 两，山皮条、石椒草各 4 钱，水煎服；⑥ 大肠下血，脱肛：血满草、黑锁梅根、芒种花根，煮猪肉吃	[36]
《中国民族民间特异疗法大全》	血满草	辛、甘、温	① 水肿：血满草 30 g，细荨麻 15 g，树芭蕉 20 g，煎水内服，同时也熬一部分药水外洗；② 风寒头痛：血满草 20 g，细荨麻 15 g，鸡爪菜 15 g，红火炭 3 个，水煎内服，同时也用药水洗头部	[37]
《云南中草药选》	血满草	辛、涩、温	用鲜根皮及叶共捣烂外敷 风湿性关节炎，慢性腰腿痛，急性扭伤，血肿，水肿，每用 5 钱至 1 两，煎服，或煎水外洗患部	[7]
《云南天然药物图鉴 第 1 卷》	血满草	辛、涩、温	用于风湿跌打，腰背酸痛、产后腰酸腹痛	[25]
《全国中草药汇编》	血满草	辛、涩、温	① 风湿性关节炎，慢性腰痛，扭伤瘀血肿痛，水肿；② 跌打损伤；③ 骨折，用法用量 3 ～ 5 钱；外用适量，鲜根皮或全草捣烂敷患处	[40]
《云南民族药志》第 2 卷	血满草	辛、涩、温	15 ～ 25 g，外用适量，全草捣烂敷患处	[24]
《怒江流域民族医药》	血满草	辛、涩、温	水肿病：将大量植株铺在火塘上烘热后，患者睡在上面治疗；烘热外包止各种疼痛	[29]
《彝药本草》	诺拉配	辛、涩、温	① 风湿痹痛：用根泡酒服，煮吃 30 ～ 50 g，泡酒 50 ～ 100 g；②水肿：带血茎杆煮水豆腐吃	[39]
《德昂族药集》	血满草	辛、涩、温	骨折：用量 15 ～ 25 g，外用适量，鲜根皮或全草捣烂敷患处	[40]
《云南中药志 1》	血满草	辛、温	① 风湿痹痛；② 跌打损伤、小儿麻痹：先用梅花针刺患处，再用鲜血满草茎叶适量舂细，酒炒外包；③ 骨折：血满草鲜根皮及叶适量，捣烂外敷；④ 水肿：血满草 15 ～ 30 g，水煎服或煎水洗患处	[41]
《白族惯用植物药》	血满草	辛、温	① 跌打损伤、小儿麻痹：血满草 15 ～ 25 g，水煎服，或血满草鲜品适量，煮水洗；小儿麻痹：血满草 20 g，血满草适量，酒炒外包。② 骨折：血满草适量，外包接骨（洱源）。③ 皮肤瘙痒、脚跟溃烂：血满草叶适量，煮水搽洗患处	[42]
《澜沧县常见药用植物》	血满草	辛，温，归脾、肾经	祛风，利水，活血，通络；用于急、慢性肾炎，风湿疼痛，风疹痒，小儿麻后遗症，慢性腰腿痛，扭伤瘀痛，骨折	[43]
《宁夏中药志》	血满草	淡、微苦、微温，归脾、肾经	① 跌打损伤：血满草 15 ～ 30 g，水煎服；或用鲜品捣敷，亦可煎水洗患处；② 痈肿疔毒：鲜血满草适量，捣烂，和鸡蛋清调敷患处	[44]
《基诺族医药》	可雌	—	① 小儿麻痹：取 15 ～ 30 g 水煎服；② 骨折：鲜品适量配方捣烂包患处；③ 肝炎：取根 20 ～ 25 g 煎水服	[26]

归经与功能主治，炮制方法及毒性的记载与现代基本相同，具有历史连贯性。

本文通过对血满草系统本草考证，明确血满草的名称、功效主治、加工炮制及毒性，以期为血满草正本清源提供依据，为其临床应用提供参考。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会 . 中华本草 [M]. 上海：上海科技出版社，1999：540.

[2] 王泽玲，韩立峰，郝佳，等 . 接骨木属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药，2023，45（6）：1936-1943.

[3] 杨增明，杨树娟 . 傣药血满草研究综述 [J]. 中国民族医药杂志，2007（10）：57-58.
[4] （清）吴其浚著 . 植物名实图考 [M]. 北京：商务印书馆，1957.
[5] （清）吴其浚著 . 植物名实图考长编 [M]. 22 卷 . 北京：商务印书馆，1959.
[6] 郭国华 . 临床中药辞典 [M]. 长沙：湖南科学技术出版社，1994：238.
[7] 昆明军区后勤部卫生部 . 云南中草药选 [M]. 昆明：昆明军区后勤部卫生部，1970：286.
[8] 黄国健，程革，丁仁祥 . 中医单方应用大全 [M]. 北京：中国医药科技出版社，1998：229.
[9] 李文瑞，李秋贵 . 中药别名辞典 [M]. 北京：中国科学技术出版社，1994：377.
[10] 李世全 . 秦岭巴山天然药物志 [M]. 西安：陕西科学技术出版社，1987：598.
[11] 云南省卫生局 . 云南中草药续集 [M]. 昆明：云南人民出版社，1975：556.
[12] 唐慎微 . 证类本草重修政和经史证类备急本草 [M]. 北京：华夏出版社，1993：422，423.
[13] 李荣兴 . 德宏民族药名录 [M]. 芒市：德宏民族出版社，1990.
[14] 西双版纳傣族自治州民族医药研究所，西双版纳傣族自治州傣医医院 . 中国傣医传统经方整理与研究 [M]. 昆明：云南民族出版社，2013.
[15] 青海省药品检验所，青海省藏医药研究所 . 中国藏药 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1996.
[16] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草藏药卷 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1999.
[17] 郑进，张超，钱子刚 . 云南民族药大辞典上 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2019：1110.
[18] 关祥祖 . 彝族医药学 [M]. 昆明：云南民族出版社，1993：694.
[19] 李耕科，贺延超 . 彝医植物药 [M]. 成都：四川民族出版社，1990.
[20] 张之道 . 彝药本草上 [M]. 昆明：云南科技出版社，2018：158.
[21] 姜北 . 白族药用植物图鉴 [M]. 北京：中国中医药出版社，2017：171.
[22] 刘毅，郑进 . 云南白族医药 [M]. 昆明：云南科技出版社，2010.
[23] 罗日泽，罗东波 . 中国少数民族民间验方精选 [M]. 南宁：广西民族出版社，2004.
[24] 朱兆云，高丽 . 云南民族药志（第 2 卷）[M]. 昆明：云南民族出版社，2009.
[25] 朱兆云 . 云南天然药物图鉴（第 1 卷）[M]. 昆明：云南科学技术出版社，2003：194.
[26] 杨世林 . 基诺族医药 [M]. 昆明：云南科学技术出版社，2001：158.
[27] 思茅地区民族传统医药研究所 . 拉祜族常用药拉祜文、汉文对照 [M]. 昆明：云南民族出版社，1987：183.
[28] 云南省怒江傈僳族自治州卫生局 . 怒江中草药 [M]. 昆明：云南科学技术出版社，1991：210.
[29] 周元川，郑进 . 怒江流域民族医药 [M]. 昆明：云南科技出版社，2010：338.
[30] 王喆，冯德胜 . 云南白药王曲焕章传奇 [M]. 昆明：云南教育出版社，2012：28.
[31] 欧阳彬 . 四川省医药卫生志 [M]. 成都：四川科学技术出版社，1991.
[32] 李耕冬，贺延超 . 彝族医药史 [M]. 成都：四川民族出版社，1990：109.
[33] 云南省卫生局革命委员会 . 云南中草药 [M]. 昆明：云南人民出版社，1971：354.
[34] 刘毅，陈羲之 . 云南常用中草药单验方荟萃 [M]. 昆明：云南科学技术出版社，2007.
[35] 田华咏 . 中国民族药炮制集成 [M]. 北京：中医古籍出版社，2000：204.
[36] 江苏新医学院 . 中药大辞典上 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1977：930.
[37] 张力群 . 中国民族民间特异疗法大全 [M]. 太原：山西科学技术出版社，2006.
[38]《全国中草药汇编》编写组 . 全国中草药汇编 [M]. 北京：人民卫生出版社，1976：322.
[39] 云南龙润药业有限公司 . 彝药本草 [M]. 昆明：云南科学技术出版社，2006.
[40] 方茂琴 . 德昂族药集 [M]. 芒市：德宏民族出版社，2014.
[41] 黎光南 . 云南中药志 [M]. 昆明：云南科学技术出版社，1990：271.
[42] 姜北，段宝忠 . 白族惯用植物药 [M]. 北京：中国中医药出版社，2014：200.
[43] 黄璐琦，朱有勇 . 澜沧县常见药用植物 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2018：294.
[44] 邢世瑞 . 宁夏中药志（下）[M]. 银川：宁夏人民出版社，1991：424.
[45] 杨本雷 . 云南省彝族医药研究所 . 中国彝族药学 [M]. 昆明：云南民族出版，2004：546.
[46] 刘静静，魏永利，辛义周，等 . 中药醋炙增效减毒机理的现代研究进展 [J]. 药学研究，2019，38（8）：474-476，493.
[47] 王文静，王军，张森，等 . 血满草提取物抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药药理与临床，2010，26（5）：82-84.
[48] 郑梅梅，郑俭彬，江自鲜，等 . 两种斯赤列提取物促进成骨细胞的增殖与分化 [J]. 中国组织工程研究，2023，27（11）：1677-1682.

（收稿日期：2023-02-25；修回日期：2023-03-29）

药物分析与检验

UPLC-MS/MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中的一种基因毒性杂质

侯继鹏，时晓燕，张业华，王凯，郝贵周*，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 UPLC-MS/MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中的基因毒性杂质 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯。**方法** 色谱柱采用 ACQUITY BEH C_{18} 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm），流动相为 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈（60∶40），等度洗脱。采用电喷雾电离源（ESI），正离子模式采集，多反应监测（MRM）模式。**结果** 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯在 0.0771 ～ 1.5410 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，平均回收率在 104.4% ～ 108.2%，*RSD* 均小于 5%。定量限与检测限分别为 0.0771、0.0231 ng • mL^{-1}。**结论** 建立的方法准确、简便、快速、灵敏度高、专属性强，能有效测定酮咯酸氨丁三醇中 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的含量，为酮咯酸氨丁三醇的质量控制提供参考。

关键词：酮咯酸氨丁三醇；基因毒性杂质；2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯；超高效液相色谱 - 串联质谱

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2424-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.026

A genotoxic impurity in ketorolac tromethamine determined by UPLC-MS/MS

HOU Ji-peng, SHI Xiao-yan, ZHANG Ye-hua, WANG Kai, HAO Gui-zhou*, ZHANG Gui-min*

(*National Engineering Research Center of Chiral Drugs*, *Lunan Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective To determine genotoxic impurity 2-[4-benzoyl-1- (2-chloroethyl)-*1H*-pyrrol-2-yl] ethyl acetate in ketorolac tromethamine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The ACQUITY BEH C_{18} column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) was used, and the analysis was conducted in the isocratic elution mode with 0.1% formic acid solution-acetonitrile (60∶40) as the mobile phase. Electron spray ionization (ESI), positive ion mode acquisition and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used. **Results** It was linear for 2-[4-benzoyl-1-(2-chloroethyl)-*1H*-pyrrol-2-yl] ethyl acetate at 0.0771 ～ 1.5410 ng • mL^{-1}, and the average recovery was 104.4% ～ 108.2%, with *RSD* ＜ 5%. The quantification limit and the detection limit were 0.0771 and 0.0231 ng • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The method is accurate, simple, rapid, sensitive and specific, which can effectively determine the 2-[4-benzoyl-1-(2-chloroethyl)-*1H*-pyrrol-2-yl] ethyl acetate in ketorolac tromethamine, and provide a reference for the quality control of ketorolac tromethamine.

Key words: ketorolac tromethamine; genotoxic impurity; 2-[4-benzoyl-1- (2-chloroethyl)-*1H*-pyrrol-2-yl] ethyl acetate; UPLC-MS/MS

作者简介：侯继鹏，男，硕士，主要从事药物质量研究，email：houjipeng1985@126.com *通信作者：郝贵周，男，高级工程师，主要从事新药研究与开发，email：haoguizhou@lunan.cn；张贵民，男，研究员，主要从事新药研究与开发，email：lunanzhangguimin@163.com

酮咯酸氨丁三醇是一种可供注射给药的非甾体抗炎药物[1]，主要用于缓解中度至重度的术后疼痛、与外伤有关的急性肾绞痛和与恶性肿瘤有关的内脏疼痛等，其通过抑制前列腺素的合成而达到止痛、抗炎和退热作用，并且没有成瘾性[2-5]。

根据酮咯酸氨丁三醇的结构和工艺路线，其合成过程可能会引入工艺杂质 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯[6-7]。该杂质的结构中含有基因毒性警示结构氯代烷基，具有潜在的基因毒性[8]。根据国际人用药品技术要求协调会（ICH）M7 中关于遗传毒性杂质的限度要求，保守控制基因毒性杂质毒理学关注阈值（TTC）为每日 1.5 μg，酮咯酸氨丁三醇的每日最大给药剂量为 40 mg，故 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的限度须≤ 3.75×10^{-5}[9]。目前尚未见该杂质的相关检测报道，所以为了严格控制酮咯酸氨丁三醇的质量，有必要对该杂质进行检测。

目前基因毒性杂质因控制限度较低，一般在痕量检测水平，常规的 HPLC 法已无法满足其检测灵敏度要求，且抗干扰能力差，分析时间较长，无法一次完成定性定量的检测，容易出现假阳性结果[10]。UPLC-MS/MS 法样品洗脱使用超高压系统和小颗粒填料色谱柱，大大缩短运行时间；在定量分析中采用多反应监测（MRM）技术，可同时监测定量、定性离子对，进一步排除检测结果中的假阳性，检测专属性更强、灵敏度更高[11-16]。故本研究建立了 UPLC-MS/MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中的基因毒性杂质 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的含量，并对建立的方法进行全面的方法学考察，以期为酮咯酸氨丁三醇的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

Vanquish TSQ Altis 型超高效液相色谱 - 质谱联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；十万分之一电子天平 MS105DU（瑞士 Mettler Toledo 公司）；Milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）。

酮咯酸氨丁三醇（山东新时代药业有限公司，含量＞ 98.0%，批号分别为 506190401、506190601、506181201、506181001、506200101）；2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯对照品（加拿大 Toronto Research Chemicals 公司，含量：96.6%，批号：9-AQL-114-1）；乙腈为色谱纯，甲酸为质谱级；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ACQUITY BEH C_{18} 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；流动相 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈（60∶40），等度洗脱；流速 0.2 mL•min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI），正离子模式采集，MRM 模式；喷雾电压 3500 V；离子传输管温度 325 ℃；雾化温度 275 ℃；2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的定量离子对 *m/z* 320.11 → 105.05；定性离子对 *m/z* 320.11 → 274.13。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 精密称量 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯对照品适量，加入 40% 乙腈溶液溶解并定量稀释，制成 7.71 ng • mL^{-1} 的对照品储备液；精密量取对照品储备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用 40% 乙腈溶液定容，摇匀，过滤，即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取酮咯酸氨丁三醇适量，用 40% 乙腈溶液溶解并定量稀释，制成 20 μg • mL^{-1} 的溶液，过滤，即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

取空白溶液（40% 乙腈溶液）和 “2.2” 项下的对照品溶液、供试品溶液，分别按 “2.1” 项下条件进样测定。结果 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的保留时间为 4.667 min，空白溶液及供试品溶液不干扰其测定，见图 1。

2.4 线性关系考察

精密量取 “2.2” 项下对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1、1.5、2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用 40% 乙腈溶液定容，摇匀，作为系列浓度线性溶液，按 “2.1” 项下条件进样测定，记录色谱图。以质量浓度 *c*（ng • mL^{-1}）为横坐标，峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。得标准曲线方程为 $A = 1.723\times10^{5}c - 71.88$，$r = 0.9998$，表明其在 0.0771 ～ 1.5410 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.5 定量限和检测限

取 “2.2” 项下对照品溶液，逐级稀释至定量限 [（信噪比）*S/N* = 10] 和检测限（*S/N* = 3）浓度，分别按 “2.1” 项下条件进样测定。结果显示，定量限与检测限分别为 0.0771、0.0231 ng•mL^{-1}。

2.6 精密度和重复性试验

精密量取 “2.2” 项下对照品溶液，共 6 份，按

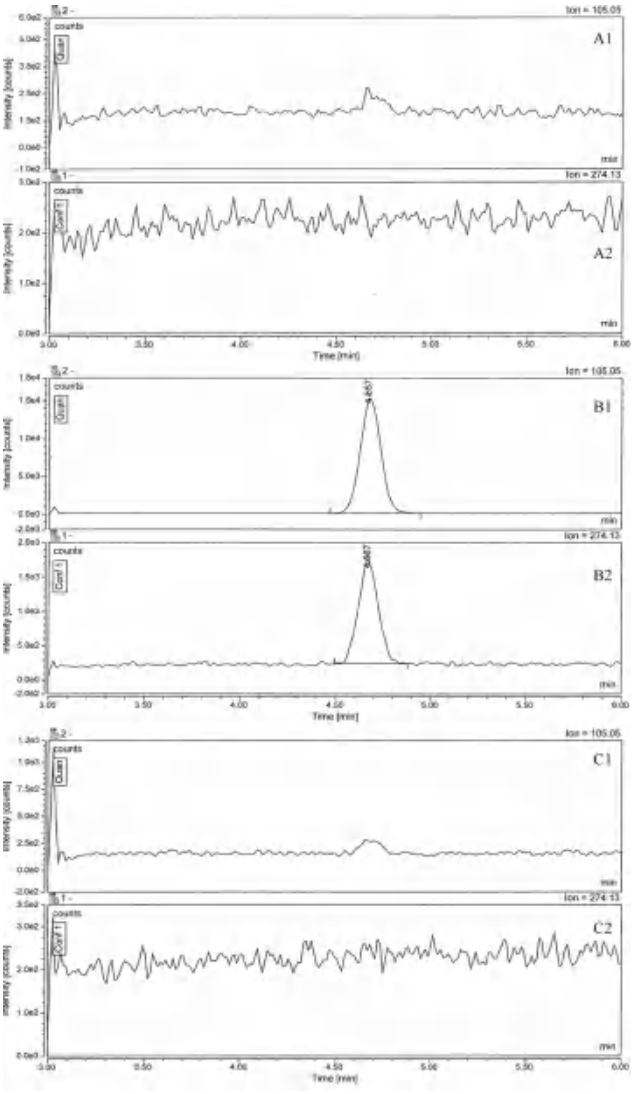


图 1　典型色谱图

Fig 1　Typical chromatograms

A1. 空白溶液（定量）(blank solution，quantification)；A2. 空白溶液（定性）(blank solution，qualitative)；B1. 对照品溶液（定量）(reference solution，quantification)；B2. 对照品溶液（定性）(reference solution，qualitative)；C1. 供试品溶液（定量）(sample solution，quantification)；C2. 供试品溶液（定性）(sample solution，qualitative)

“2.1”项下色谱条件进样测定，计算得 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯峰面积 *RSD*（n ＝ 6）为 2.5%，说明方法的精密度好。

精密称取酮咯酸氨丁三醇（批号：569190401）适量，用 40% 乙腈溶液溶解并定量稀释制成 0.2 mg • mL^{-1} 的溶液，精密量取上述溶液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加入“2.2”项下对照品储备液 1 mL，用 40% 乙腈溶液定容，摇匀，即得重复性试验溶液，平行配制 6 份，按“2.1”项下条件进样测定。结果显示，2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯含量的 *RSD*（n ＝ 6）为 0.82%，说明方法的重复性好。

2.7　稳定性试验

取新配制的对照品溶液及供试品溶液，于室温放置，分别在 0、1、2、4、6、8 h，按“2.1”项下条件进样测定，记录色谱图。结果显示，对照品溶液中的 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯峰面积 *RSD*（n ＝ 6）为 8.0%；供试品溶液中，2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯在各时间点均未检出，说明对照品溶液和供试品溶液于室温放置 8 h 稳定。

2.8　回收试验

精密称定酮咯酸氨丁三醇（批号：569190401）适量，加入 40% 乙腈溶液溶解并定量稀释制成 0.2 mg • mL^{-1} 的溶液，精密量取上述溶液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，共 9 份，分别加入“2.2”项下对照品储备液 0.5、1、1.5 mL，每个浓度平行制备 3 份，用 40% 乙腈溶液定容，摇匀，制成低、中、高浓度回收试验溶液，按“2.1”项下条件分别进样测定，计算平均回收率。结果显示平均回收率在 104.4% ～ 108.2%，*RSD* 均小于 3%，表明本方法准确度良好。

2.9　耐用性试验

取“2.6”项下重复性试验溶液，通过改变“2.1”项下色谱质谱条件，即柱温（±2 ℃），流速（±0.02 mL • min^{-1}），初始流动相比例（±1%），喷雾电压（±100 V）进行试验。结果显示，2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯含量的 *RSD* 均小于 5%，说明方法耐用性良好。

2.10　样品中杂质含量的测定

取 5 批酮咯酸氨丁三醇，按“2.2”项下方法配制供试品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，结果见表 1。

表 1　样品中杂质的含量

Tab 1　Content of impurity in samples

批号	含量 /（×10^{-6}）
506190401	未检出
506190601	未检出
506181201	未检出
506181001	未检出
506200101	未检出

3　讨论

基因毒性杂质 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的结构中含有杂原子氮，故采用 ESI 离子源，正离子检测模式，流动

相中采用 0.1% 甲酸溶液，能够促进杂质在质谱中的电离；根据质谱仪器优化的离子对，经比较，选择响应较高的 *m*/*z* 320.11 → 105.05 为定量离子对，以 *m*/*z* 320.11 → 274.13 为定性离子对。

因 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的质谱响应较高，根据化合物的限度要求，考虑降低酮咯酸氨丁三醇的进样浓度进行方法优化。当酮咯酸氨丁三醇的进样浓度较高时，容易对质谱的离子源造成污染，导致仪器噪音增大、灵敏度降低；同时也会对杂质的检测造成较大的基质效应，影响回收率测定。经过不断摸索，当酮咯酸氨丁三醇质量浓度为 20 μg • mL^{-1} 时，能消除酮咯酸氨丁三醇的基质效应，同时提高杂质的回收率，保证了杂质的检测准确性。同时对于杂质的检测采用定量和定性两对离子进行检测，降低了样品中假阳性的效果，进一步保证了检测结果的准确性。

试验中，通过改变流动相中乙腈的比例，最终选择 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈（60∶40）为流动相，使 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯和酮咯酸氨丁三醇能够较好地分离。在该色谱条件下，酮咯酸氨丁三醇的出峰时间约为 1.6 min，为防止质谱离子源污染，本研究采用切换阀控制 3 ～ 6 min 进入质谱，对杂质进行采集。

本文建立了 UPLC-MS/MS 法测定酮咯酸氨丁三醇中基因毒性杂质 2-[4- 苯甲酰基 -1-（2- 氯乙基）-1*H*- 吡咯 -2- 基] 乙酸乙酯的含量，建立的方法准确、简便、快速、灵敏度高、专属性强，可为酮咯酸氨丁三醇的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 李利华，裴奇，谢昭明，等 . 高效液相色谱法测定酮咯酸氨丁三醇胶囊含量及含量均匀度 [J]. 中南药学，2006，4（5）：348-350.

[2] 陈新谦，金有豫，汤光 . 新编药物学 [M]. 18 版，北京：人民卫生出版社，2019：191.

[3] Staquet MJ. A double-blind study with placebo control of intramuscular ketorolac tromethamine in the treatment of cancer pain [J]. J Clin Pharmacol，1989，29（11）：1031-1036.

[4] Oosterlinck W，Philp NH，Charig C，et al. A double-blind single dose comparison of intramuscular ketorolac tromethamine and pethidine in the treatment of renal colic [J]. J Clin Pharmacol，1990，30（4）：336-341.

[5] Kathy M，Mcevor GK. Ketorolac，an injectable nonnarcotic analgesic [J]. Am J Hosp Pharm，1991，48（1）：168-169.

[6] 樊中心，刘银燕 . 酮咯酸氨丁三醇盐的合成 [J]. 中国医药工业杂志，2001，32（5）：202-203.

[7] 朱驹，张万年，吕加国，等 . 镇痛药酮咯酸合成方法的改进 [J]. 中国药物化学杂志，1995，5（3）：223-225.

[8] 马磊，马玉楠，陈震，等 . 遗传毒性杂质的警示结构 [J]. 中国新药杂志，2014，23（18）：2106-2111.

[9] ICH. M7（R1）. Assessment and control of DNA reactive（mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2021-07-25]. https：//www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m7-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential.

[10] 孙建合，侯继鹏，时晓燕，等 . UPLC-MS/MS 法测定依托度酸中的基因毒性杂质 2- 乙基苯肼 [J]. 中国医药工业杂志，2022，53（4）：564-571.

[11] 钱建钦，张云峰，王建，等 . UHPLC-MS 法测定 2 种硫酸氢氯吡格雷晶型中的基因毒性杂质对甲苯磺酸甲酯 [J]. 药物分析杂志，2017，37（11）：1994-1999.

[12] 石小娜，侯玲君，赵龙山 . HPLC-MS/MS 法同时测定吲哚布芬中 4 个基因毒性杂质 [J]. 药物分析杂志，2022，42（2）：312-319.

[13] 石小娜，张志英，王立爽，等 . LC-MS/MS 法测定盐酸法舒地尔中 2 种基因毒性杂质的含量 [J]. 中国新药杂志，2021，30（13）：1236-1241.

[14] 张薇，陈夷花，郑枫 . 长春西汀中对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的 LC-MS/MS 法测定 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（12）：1334-1336.

[15] 李倚天，梅芊，刘英 . UPLC-MS/MS 法测定利奈唑胺中的一种基因毒性杂质 [J]. 中南药学，2022，20（5）：1172-1175.

[16] 刘峰，赵荣丽，王璐 . UPLC-MS/MS 法测定利奈唑胺及其中间体（*S*）-*N*-（2- 乙酰氧基 -3- 氯丙基）乙酰胺中的遗传毒性杂质（*S*）-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇 [J]. 中南药学，2021，19（7）：1439-1443.

（收稿日期：2023-01-20；修回日期：2023-03-13）

乳酸质量分析

周颖[1, 2]，刘雁鸣[1, 2*]，郑金凤[1, 2]，赵勇[1, 2]，刘杨[1, 2]，谢莹莹[1, 2]，张悦[1, 2]，蒋赟[1, 2]，石蓉[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 对药用辅料乳酸的质量及现行质量标准进行评价和分析，为该品种的安全监管和质量标准完善提供参考。**方法** 对抽检样品进行法定检验，开展了旋光性、乳酸单体、聚合体和有关物质、残留溶剂、有机酸和糖、元素杂质、氯化物、乙醚不溶物及影响因素试验等探索性研究。**结果** 法定检验结果显示，20 批乳酸中 2 批不合格，合格率 90.0%。建立了液相色谱法测定有关物质，部分样品有关物质检出量较高；乳酸中残留溶剂、有机酸和糖、元素杂质和氯化物的控制较好；现行标准缺失对旋光性、乳酸单体、有关物质及乙醚不溶物的控制；起始原料的质量是决定成品乳酸质量的重要因素。**结论** 乳酸总体质量一般，建议生产企业选择杂质更少的原料，优化生产工艺，建议修订现行质量标准，同时药监部门应加强对生产企业药用辅料使用的监管。

关键词：乳酸；药用辅料；质量分析；质量标准提高
中图分类号：R917，R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2428-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.027

Quality assessment of lactic acid

ZHOU Ying[1, 2], LIU Yan-ming[1, 2*], ZHENG Jin-feng[1, 2], ZHAO Yong[1, 2], LIU Yang[1, 2], XIE Ying-ying[1, 2], ZHANG Yue[1, 2], JIANG Yun[1, 2], SHI Rong[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 standard of excipient lactic acid, to provide reference for its safety supervision and standard improvement. **Methods** The samples were examined with statutory testing method. Exploratory studies were performed for optical activity, lactic acid monomers, polymers and related substances, residual solvents, organic acids and sugars, element impurities, cyanide, ether insoluble substances and influence factors. **Results** The statutory test showed two out of the 20 batches of lactic acid did not meet the quality standard and the pass rate was 90.0%. A liquid chromatography method was established for the determination of related substances, and the detected amount of related substances in some products was relatively high. The quantity of residual solvents, organic acids, sugars, element impurities and cyanide in lactic acid was contraolled well. The current standard lacked the control standard for optical activity, lactic acid monomer, related substances and ether insoluble substances. The quality of raw materials is key to the quality of lactic acid. **Conclusion** The quality of lactic acid is generally acceptable. Manufacturers should choose raw materials with fewer impurities and optimize the production technology to improve the quality of lactic acid. Supervision of the use of excipients should be strengthened.

Key words: lactic acid; drug-excipient; quality assessment; standard improvement

乳酸为 2-羟基丙酸及其缩合物的混合物，由于分子结构的不对称性，根据其旋光性可以将乳酸分为左旋型 *L*-乳酸、右旋型 *D*-乳酸和外消旋型的 *DL*-乳酸，人体只能分解自身产生或摄入的 *L*-

基金项目：湖南省自然科学基金 - 科药联合基金项目（No.2022JJ80014）。
作者简介：周颖，女，副主任药师，主要从事药品药用辅料检验检测，email：519315503@qq.com *通信作者：刘雁鸣，女，主任药师，主要从事药品药用辅料研究，email：ymliu68@yahoo.com.cn

乳酸，如过量摄入 *D*- 乳酸、*DL*- 乳酸会产生酸中毒等代谢紊乱症状，因此医药行业原辅料均为 *L*- 乳酸。乳酸为药辅同源，可作为消毒防腐剂、pH 调节剂、助溶剂等，用于注射剂、口服剂和外用制剂，一般无毒，不能与氧化剂、碘化物和白蛋白配伍 [1-2]。

乳酸为 2021 年国家药品抽检计划“包材辅料专项”品种之一。通过国家局数据库查询 [3]，查询到原料药批准文号 3 个，辖区药用辅料批文 5 个。本次研究使用企业抽样，有效抽样 20 批，涉及生产企业 6 家。乳酸现行标准为《中国药典》2020 年版二部（以下简称 ChP2020），USP2021、EP10.0、JP Ⅹ Ⅶ均有收载 [4-7]。经文献检索 [8-13] 和生产企业调研，药用乳酸以食品添加剂为原料，主要采用活性炭、离子交换或短程分子蒸馏精制工艺生产。食品添加剂乳酸采用玉米淀粉等为糖源，经微生物发酵、提取纯化生产，发酵液中含副产物有机酸、残糖等，食品添加剂乳酸的标准为 GB1886.173-2016[14]。本研究按照现行标准对所有样品进行检验，并对国内外乳酸标准的项目设置和控制限度进行比对分析，结合乳酸生产工艺，围绕乳酸的有效性、安全性、稳定性及质量标准的可控性等开展了一系列研究，客观评价国内乳酸的质量现状，分析影响产品质量的主要因素，并对现行质量标准提出修订建议。

1　仪器与试药

Waters e2695 高效液相色谱仪，配有 DAD 检测器（沃特世公司）；LC-20A 高效液相色谱仪，配有 RID-10A 示差折光检测器、LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪（岛津公司）；Agilent 1260 高效液相色谱仪，配有紫外检测器；Agilent 7890A 气相色谱仪（安捷伦公司）；iCAPQc 电感耦合等离子体质谱分析仪（赛默飞公司）；UV-2550 紫外分光光度计（岛津公司）；WZZ-2B 旋光仪（上海精科）；AUW220D 电子天平（岛津公司）；MS205DU 电子天平（梅特勒公司）；*L*-（＋）乳酸对照品（Sigma-Aldrich，纯度：93.3%）；乳酸（*DL*）对照品（LGC DR EHRENSTORFER，纯度：89.9%）；草酸、柠檬酸、冰醋酸、富马酸、*D*- 葡萄糖、*D*- 木糖对照品（中国食品药品检定研究院，纯度分别为 100.0%、97.0%、99.9%、99.9%、100.0%、99.9%）；砷、镉、钴、镍、钒多元素标准溶液（国家有色金属及电子材料分析测试中心，质量浓度 100 μg • mL $^{-1}$）；汞、铅单元素标准溶液（国家有色金属及电子材料分析测试中心，质量浓度 1000 μg • mL $^{-1}$）；酒石酸、己二酸、磷酸、硝酸均为优级纯；甲醇、乙腈均为色谱纯；纤维二糖、乙醇、乙醚均为分析纯；纯化水；20 批乳酸样品（A 企业 9 批、B 企业 6 批、C 企业 2 批、D 企业 1 批、E 企业 1 批、F 企业 1 批）。

2　方法与结果

2.1　法定检验

乳酸现行标准为 ChP2020，包括性状、相对密度、鉴别、颜色、氯化物、硫酸盐、[枸橼酸、草酸、磷酸或酒石酸]、易碳化物、还原糖、炽灼残渣、钙盐、铁盐、重金属、砷盐及含量测定。按照现行标准对 20 批乳酸样品进行检验，18 批合格，合格率 90.0%，2 批不合格，不合格率为 10.0%。企业 E1 批样品性状和颜色不符合规定，企业 C1 批样品相对密度和含量测定不符合规定。部分项目检测结果分析如下。

2.1.1　相对密度　20 批样品依法测定，企业 C1 批样品相对密度测定结果为 1.192，不符合规定（标准规定：1.20 ～ 1.21），另 19 批样品相对密度在 1.204 ～ 1.208，符合规定，且不同生产企业不同批次样品相对密度差异较小。

2.1.2　炽灼残渣　20 批样品依法测定，炽灼残渣测定结果在 0.001% ～ 0.059%，远低于限度（标准规定：不得过 0.1%），乳酸中炽灼残渣控制较好。

2.1.3　含量测定　20 批样品依法测定，其中 19 批乳酸含量结果在 85.8% ～ 89.4%，符合规定 [限度为 85.0% ～ 92.0%（g/g）]；企业 C1 批乳酸含量结果为 81.2%，不符合规定。不同批次样品乳酸含量有差异。按生产企业统计分析，样品批次大于 6 的企业 A 和企业 B 的样品的乳酸含量无显著差异，结果见表 1。

表 1　乳酸的含量测定结果

Tab 1　Content determination of lactic acid

生产企业	批次	结果范围 /%	平均值 /%
企业 A	9	87.4 ～ 88.2	87.9
企业 B	6	87.9 ～ 89.4	88.9
企业 C	2	81.2 ～ 89.2	85.2
企业 D	1	88.5	
企业 E	1	85.8	
企业 F	1	88.6	

2.2　探索性研究

2.2.1　旋光性　食品添加剂乳酸的标准 GB 1886.173-2016 控制 *L*- 乳酸占总乳酸含量不得少于 97%，EP10.0 的（*S*）- 乳酸质量标准控制（*S*）- 异构体不得少于 95%，JP Ⅹ Ⅶ的 *L*- 乳酸质量标准设置了比旋度检查。医药行业原辅料只用 *L*- 乳酸，

但 ChP2020 未对 *L*-乳酸的量进行控制。EP 和 JP 的方法均为通过旋光度的测定间接反映样品中 *L*-乳酸的量，GB 方法通过手性色谱柱将 *L*-乳酸和 *D*-乳酸拆分后直接测定 *L*-乳酸的量。分别参照两种方法对乳酸的旋光性进行考察。

参照 JP 方法测定，20 批乳酸样品比旋度为 －48.0° ～ －51.4°（JP 规定限度：－46° ～ －52°）。参照 GB 方法测定，采用液相色谱法、手性色谱柱，20 批乳酸样品 *L*-乳酸占总乳酸含量在 99.5% ～ 99.9%（GB 规定限度：不得少于 97%）。比旋度和 *L*-乳酸占总乳酸含量两个项目所采用的方法均能对 *L*-乳酸的光学活性进行检测，方法均可行，从检验经济学角度，建议标准增订比旋度检查。

2.2.2　乳酸单体、聚合体及有关物质　现行标准中乳酸定义为 2-羟基丙酸及其缩合物的混合物，乳酸在高浓度下会发生聚合反应，生成乳酸聚合体。除乳酸单体外，乳酸中聚合体的种类和量及其他有机杂质情况尚不清楚，国内外标准也未见对乳酸单体或聚合体的量、有关物质进行控制，故有必要开展探索性研究。

建立了 HPLC 法测定乳酸中单体、聚合体及有关物质的方法。色谱条件：采用 Inertsil ODS-3（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱；以 0.1% 磷酸为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱：0 ～ 5 min，98%A；5 ～ 25 min，98% ～ 65%A；25 ～ 30 min，65%A；30 ～ 31 min，65% ～ 98%A；31 ～ 40 min，98%A；检测波长 210 nm；柱温 30 ℃；流速 1.0 mL·min^{-1}；进样量 20 μL。通过液相色谱质谱联用技术，对乳酸单体、乳酸二聚体、乳酸三聚体和乳酸四聚体进行了确认，典型色谱图见图 1。

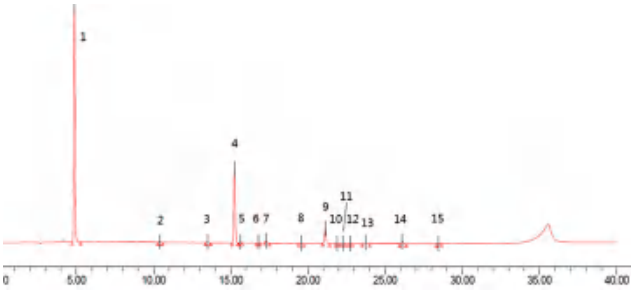


图 1　乳酸单体、聚合体及有关物质典型 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of the lactic acid monomers，polymers and related substances

1. 乳酸单体（lactic acid monomer）；4. 乳酸二聚体（lactic acid dimer）；9. 乳酸三聚体（lactic acid trimer）；14. 乳酸四聚体（lactic acid tetramer）

按面积归一化法计算，20 批样品中乳酸单体及乳酸二聚体、三聚体、四聚体的聚合体总和、其他杂质总量（有关物质）的结果见表 2。乳酸单体含量在 58.2% ～ 71.5%，均值 61.1%，乳酸二聚体、三聚体和四聚体总和在 27.2% ～ 39.3%，均值 37.0%，有关物质含量在 0.8% ～ 3.6%，均值 1.9%。不同批次乳酸样品中乳酸单体、聚合体总量及有关物质含量差异均较大。样品批次大于 6 的两家企业中，企业 A 样品乳酸单体、聚合体总量及有关物质含量的均值分别为 61.3%、36.8%、1.9%，企业 B 样品分别为 59.6%、38.6%、1.7%，结果相差不大，说明两企业乳酸单体、聚合体及有关物质控制水平相当，且企业内批间差异较小，生产工艺稳定性均较好。企业 D 的有关物质含量为 0.8%，杂质最少，而企业 E 和企业 F 的乳酸中有关物质含量分别为 3.6%、3.2%，杂质含量较高，提示生产企业应关注有关物质的控制问题。现行标准中并未对乳酸有关物质进行控制，建议标准中增订有关物质检查项，提高标准的科学性及对药物安全性的控制。

表 2　乳酸中单体、聚合体及有关物质的含量测定结果 (%)

Tab 2　Content of monomers，polymers and related substances in lactic acid (%)

样品	乳酸单体	乳酸二聚体	乳酸三聚体	乳酸四聚体	聚合体总量	有关物质
企业 A1	61.3	27.7	7.3	1.5	36.5	2.2
企业 A2	61.3	27.7	7.2	1.6	36.5	2.2
企业 A3	61.5	28.2	7.4	1.5	37.1	1.4
企业 A4	60.9	28.2	7.5	1.8	37.5	1.6
企业 A5	61.3	27.9	7.4	1.6	36.9	1.8
企业 A6	61.6	27.9	7.2	1.5	36.6	1.8
企业 A7	61.5	27.6	7.2	1.6	36.4	2.1
企业 A8	61.1	27.9	7.2	1.5	36.6	2.3
企业 A9	61.5	28.1	7.4	1.5	37.0	1.5
企业 B1	59.9	28.7	7.9	1.8	38.4	1.7
企业 B2	59.7	28.8	8.0	1.8	38.6	1.7
企业 B3	59.9	28.6	7.9	1.8	38.3	1.8
企业 B4	59.2	29.2	8.2	1.8	39.2	1.6
企业 B5	59.5	29.0	8.1	1.8	38.9	1.6
企业 B6	59.6	28.6	7.9	1.8	38.3	2.1
企业 C1	58.2	29.0	8.4	1.9	39.3	2.5
企业 C2	71.5	22.6	4.0	0.6	27.2	1.3
企业 D	60.1	29.2	8.1	1.8	39.1	0.8
企业 E	63.2	26.0	6.1	1.1	33.2	3.6
企业 F	58.5	28.5	8.0	1.8	38.3	3.2

乳酸现行标准中含量测定方法为滴定法，原理是用过量氢氧化钠将乳酸中聚合体全部水解成乳酸单体后，再用硫酸滴定液返滴定，实际测得的是乳酸中单体和聚合体的总和，无法反映乳酸单体的量，为加强对有效性的控制，建议标准增

订乳酸单体检查。

2.2.3　残留溶剂　乳酸的微生物发酵生产过程中可能产生甲醇、乙醇等有机副产物，分离提取乳酸的工艺如采用酯化水解法可能使用甲醇和乙醇与乳酸成酯。EP10.0 注射用乳酸标准控制甲醇不得过 0.005%。从药物的安全性出发，对工艺中可能涉及到的残留溶剂进行考察，建立气相色谱法测定乳酸中甲醇和乙醇的量。色谱条件：DB-624 色谱柱（30 m×0.32 mm，1.8 μm）；起始温度为 40 ℃，维持 5 min，以 20 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 200 ℃，维持 4 min；进样口温度为 250 ℃；FID 检测器，检测器温度为 250 ℃；顶空平衡温度为 90 ℃，平衡时间为 30 min。采用建立的方法测定 20 批乳酸样品，均未检出甲醇，仅企业 B3 样品检出 0.001% 乙醇，且检出的乙醇量远低于 ChP2020 四部通则 0861 残留溶剂测定法规定的限度（乙醇限度为 0.5%，甲醇限度为 0.3%）[15]，说明目前乳酸生产工艺能较好地控制甲醇和乙醇残留。

2.2.4　有机酸和糖　乳酸发酵液是一种成分非常复杂的体系，伴随产物乳酸生成的同时还有副产物有机酸、残糖（主要是葡萄糖、木糖和纤维二糖）等，现行标准对还原糖和枸橼酸、草酸、磷酸或酒石酸进行了控制，但均为化学反应通过试验，未准确定量。为明确乳酸中可能含有的有机酸和糖的类型及量，建立了高效液相色谱法同时测定乳酸中 10 种有机酸和糖类含量的方法，包括草酸、磷酸、柠檬酸、酒石酸、冰醋酸、己二酸、富马酸、*D*- 葡萄糖、*D*- 木糖、纤维二糖。色谱条件：采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H（300 mm×7.8 mm，9 μm）色谱柱；以 5 mmol • L^{-1} 硫酸为流动相；RID-10A 示差折光检测器；柱温 55 ℃；流速 0.6 mL • min^{-1}；进样量 10 μL。采用建立的方法测定 20 批乳酸样品，上述 10 种有机酸和糖均未检出。结果表明目前各乳酸生产企业的生产、提取和精制工艺能有效去除乳酸发酵液中的有机酸副产物和残糖，生产工艺控制较好。

2.2.5　元素杂质　元素杂质的控制是药品整体控制策略的一部分，用以确保药品中元素杂质水平不超过允许日暴露量（PDE）值。《ICH Q3D（R2）：元素杂质指导原则》[16] 指出原料药和辅料中的元素杂质被引入到药品中的可能性应在风险评估中反映。药用辅料乳酸为天然植物来源，食品添加剂乳酸采用玉米淀粉等为糖源，经微生物发酵、提取纯化生产，药用辅料乳酸以食品添加剂乳酸为原料，主要采用活性炭、离子交换或短程分子蒸馏精制工艺生产，生产工艺中涉及多次纯化工艺，且无有意添加的元素杂质，初步评估元素杂质安全风险较低，参考 “ICHQ3D 表 5.1” 建议关注的主要元素为 1 类（砷、镉、铅、汞）、2A 类元素（钴、镍、钒），采用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法测定样品中这 7 种元素含量。20 批乳酸样品测定结果表明：样品中均未检出汞，砷、镉、钴、镍、钒含量较低，均低于 ICHQ3D 推荐的最低限度的 30%PDE，上述元素杂质风险较低；铅的含量在 0.0095 ～ 0.2076 μg • g^{-1}，均值 0.0552 μg • g^{-1}，均低于 ICHQ3D 推荐的最低限度的 PDE（0.5 μg • g^{-1}），但企业 A 有 6 批样品铅含量高于 0.18 μg • g^{-1}，高于最低限度的 30%PDE，测定结果见表 3。ChP2020 乳酸标准收载了重金属和砷盐检查项，根据 ICHQ3D 指导原则，结合对乳酸的元素杂质风险评估结果，认为可不在标准中单独设置砷检查项，保留重金属检查项，可有效地控制乳酸中的元素杂质。

表 3　乳酸中元素杂质的测定结果

Tab 3　Content of element impurities in lactic acid

元素	元素杂质含量 /（μg • g^{-1}）				最低 PDE
	最小值	最大值	平均值	最低 PDE	给药途径
砷	ND	0.0406	0.0100	0.2	吸入
镉	ND	0.0009	0.0002	0.2	注射
汞	ND	ND	ND	0.1	吸入
铅	0.0095	0.2076	0.0552	0.5	吸入
钴	ND	0.0361	0.0024	0.3	吸入
镍	ND	0.1543	0.0189	0.6	吸入
钒	ND	0.0096	0.0020	0.1	吸入

注（Note）：ND 表示未检出（ND means not detected）。

2.2.6　氰化物　生产乳酸的原料如玉米淀粉、马铃薯等糖源中可能残存氰化物。食品添加剂乳酸的标准 GB 1886.173-2016 和 JP Ⅹ Ⅶ乳酸标准均对氰化物的残留量进行了控制。GB 标准中氰化物检查方法与 ChP2020 年版四部通则 0806 氰化物检查法第二法 [15] 相同，限度为不得过 1 mg • kg^{-1}。参照上述方法对 20 批乳酸样品中氰化物进行考察，结果氰化物均远小于 1 mg • kg^{-1}，残留风险较小，安全性较好。

2.2.7　乙醚不溶物　EP10.0 中收载了乙醚不溶物检查，参照 EP10.0 的方法，对 20 批乳酸样品中乙醚不溶物进行考察，结果 19 批样品均符合规定，企业 E 样品不符合规定。为更严格和全面地控制乳酸中的杂质，建议标准中增订乙醚不溶物检查。

2.2.8　影响因素试验　参照 ChP2020 四部通则 9001 原料药物与制剂稳定性试验指导原则 [15]，进行影响

因素试验考察，以性状、相对密度、颜色、*L*-乳酸占总乳酸含量、乳酸单体、乳酸聚合体及有关物质项作为评价指标，采用现行标准方法和探索性研究中建立的非标方法进行测定，测定结果显示：高温条件放置 30 d 和光照条件放置 10 d 后，各评价指标结果未发生明显变化；高湿条件放置 10 d 后，乳酸的性状、颜色、*L*-乳酸占总乳酸含量及有关物质基本无变化，相对密度变小（1.206 → 1.197），乳酸单体含量增高（60.9% → 65.6%），乳酸二聚体、三聚体及四聚体的聚合体总量降低（37.3% → 32.6%）。影响因素结果提示乳酸对高温和光照较稳定；但因乳酸具引湿性，高湿条件放置后，乳酸浓度降低，会使乳酸相对密度降低，部分乳酸聚合体会发生水解生成乳酸单体，故在贮藏过程中应注意湿度对样品的影响。

3 讨论

本次国家药品抽检采取法定检验结合探索性研究的模式对乳酸从质量现状、质量影响因素到现行质量标准的可行性等方面进行了较全面的分析和评价。

3.1 质量状况

由法定检验可知，20 批样品按现行标准检验，企业 C 和企业 E 各有 1 批样品不符合规定，合格率为 90.0%，总体质量情况一般。探索性研究结果显示，乳酸中残留溶剂、有机酸和糖、元素杂质、氰化物等杂质残留控制较好，但企业 F 样品的有关物质较高，企业 E 样品的有关物质和乙醚不溶物杂质均较高，提示生产企业应重点关注，其产品质量和生产工艺有待提高。2 批次乳酸不符合药用要求，提示药品生产企业应采购符合药用要求的药用辅料用于药品生产，加强对药品生产和质量控制的管理，同时药监部门应加强对生产企业药用辅料使用的监管。

3.2 影响乳酸质量的因素分析

食品添加剂乳酸由微生物发酵法生产，乳酸发酵液的提取纯化工艺是影响食品添加剂乳酸质量的关键技术因素。药用乳酸起始原料为食品添加剂乳酸，生产企业采用的工艺均为精制工艺，主要分为三类，工艺一为活性炭脱色，工艺二为活性炭脱色并经离子交换柱纯化，工艺三为短程分子蒸馏，精制工艺相对简单。对探索性研究如有关物质、残留溶剂、有机酸和糖、元素杂质、氰化物、乙醚不溶性等项目的检验结果，按采用不同精制工艺分类进行比对分析，结果提示起始原料的质量是决定成品乳酸质量的重要因素；若采用相同食品添加剂乳酸为起始原料，经短程分子蒸馏工艺精制得到的乳酸有关物质、元素杂质等杂质更少，质量更优。建议药用乳酸生产企业选择杂质量少、质量更好的食品添加剂乳酸为原料，优化生产工艺，如采用短程分子蒸馏精制工艺，生产符合药用要求的优质辅料乳酸。

3.3 现行质量标准有待完善

根据标准检验及探索性研究结果，认为现行标准基本可行，但仍有欠缺，如现行标准定义中未对乳酸的旋光性进行规定，未控制乳酸的旋光性或 *L*-乳酸的量；缺少对有关物质的控制；现行标准滴定法实测的是乳酸中单体和聚合体的总量，无法对乳酸单体进行控制等，标准需进一步提高和完善。因此提出对乳酸标准进行修订的建议：定义中增订对旋光性和制法的规定，增订比旋度、乳酸单体、有关物质和乙醚不溶物检查，加强对乳酸有效性和安全性的控制；依据对乳酸的元素杂质风险评估结果，建议标准删除砷检查项，提高标准的科学性。

参考文献

[1] Paul JS，Walter GC，Colin GG. Handbook of Pharmaceutical Excipients [M]. 8 edition. USA：Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association，2017：502-504.

[2] 王玲玲，郭振辉 . *D*-乳酸的生化特性及其临床研究进展 [J]. 广东医学，2011，32（23）：3144-3147.

[3] 国家药品监督管理局 [EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/.

[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：831.

[5] USP2021 [S]. 2021.

[6] EP10.0 [S]. 2017：3050-3051.

[7] JP Ⅹ Ⅶ [S]. 2016：1131-1132.

[8] 罗明生，高天惠 . 药剂辅料大全 [M]. 2 版 . 成都：四川科学技术出版社，2016：1107.

[9] 汪多仁 . *L*-乳酸的开发与应用进展 [J]. 发酵科技通讯，2011，40（2）：46-50.

[10] 曾炜，陈丰秋，詹晓力 . 乳酸的生产技术及其研究进展 [J]. 化工进展，2006，25（7）：744-749.

[11] 王国英，史高峰，李春雷，等 . *L*（＋）-乳酸提取纯化新工艺 [J]. 离子交换与吸附，2009，25（2）：158-166.

[12] 王甲卫，李政，谭天伟 . 从发酵液中萃取 *L*-乳酸的工艺 [J]. 生物加工过程，2008，6（1）：56-59.

[13] 刘唱 . 基于 La_2O_3 的富糖微藻水解制备乳酸及机理研究 [D]. 上海：上海大学，2018.

[14] 中华人民共和国国家标准 . GB 1886.173-2016 [S]. 2016.

[15] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：110-111，116-120，457-460.

[16] 国家药品监督管理局药品审评中心 . ICH Q3D（R2）：元素杂质指导原则 [EB/OL]. https：//www. cde. org. cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/0，2022.4.26.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-10）

一测多评法同时测定羌活胜湿汤中 6 种成分的含量

田欢[1]，祁庆瑞[2]，翟秉涛[2]，赵锋[1]，岳宝森[1*]，张维英[1*]（1. 西安市中医医院药剂科，西安　710021；2. 陕西中医药大学药学院，西安　712046）

摘要：目的　建立一测多评法（QAMS）同时测定羌活胜湿汤中绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵的含量。**方法**　采用 COSMOSIL Packed Column $5C_{18}$-MS-Ⅱ色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈 -0.2% 甲酸水溶液为流动相，梯度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 254 nm。**结果**　各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好（R^2 ＞ 0.999）。以甘草酸铵为参照物，绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的校正因子分别为 0.6155、0.1310、0.4729、0.2063、0.0969，并计算各成分含量，同时采用外标法（ESM）测定 6 个成分的含量，两种方法测定的结果差异无统计学意义。**结论**　建立了羌活胜湿汤中绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵 6 个成分的 QAMS 测定方法，该法可用于羌活胜湿汤的质量控制。

关键词：一测多评法；羌活胜湿汤；含量测定；甘草酸铵
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2433-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.028

Simultaneous determination of 6 components in Qianghuo Shengshi decoction by quantitative analysis of multi-components by single markers

TIAN Huan[1], QI Qing-rui[2], ZHAI Bing-tao[2], ZHAO Feng[1], YUE Bao-sen[1*], ZHANG Wei-ying[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Xi'an*　710021; 2. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xi'an*　712046)

Abstract: Objective　To establish a quantitative analysis of multi-components by single markers (QAMS) to determine the content of chlorogenic acid, coenoside, ferulic acid, ligustratus I, 5-*O*-methylvesamitol side and ammonium glycyrrhizate in Qianghuo Shengshi decoction. **Methods**　The determination was performed on COSMOSIL Packed Column $5C_{18}$-MS-Ⅱ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% formic acid as the mobile phase in gradient elution. The volume flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 254 nm. **Results**　In the linear range, all components had good linearity (R^2 ＞ 0.999). With ammonium glycyrrhizate as the internal standard, the correction factors of chlorogenic acid, cohorin, ferulic acid, ligustrine I and 5-*O*-methylvesamitol side were 0.6155, 0.1310, 0.4729, 0.2063 and 0.0969, respectively. The content of the 6 components was also determined by the external standard method (ESM). The results of QAMS and ESM had no significant difference. **Conclusion**　The QAMS method of chlorogenic acid, coenoside, ferulic acid, ligustratus I, 5-*O*-methylvesamitol side and ammonium glycyrrhizate in Qianghuo Shengshi decoction has been established. QAMS can be used for the quality control of Qianghuo Shengshi decoction.

Key words: quantitative analysis multi-components by single marker; Qianghuo Shengshi decoction; content determination; ammonium glycyrrhizate

基金项目：陕西省科技厅自然科学基础研究计划项目（No. 2022JQ-932）；陕西省中医药管理局“秦药”开发重点科学研究项目（No. 2021-02-22-010）

作者简介：田欢，女，硕士，中药师，主要从事中药复方物质基础研究，email：18149412681@163.com　*通信简介：岳宝森，男，硕士，主任药师，主要从事中药复方制剂及质量控制研究，email：1057561423@qq.com；张维英，女，硕士，主管药师，主要从事中药配方颗粒质量控制研究，email：395988977@qq.com

羌活胜湿汤是 2018 年由国家药品监督管理局发布的首批《古代经典名方目录》中的一首，由金代医家李东恒所创，首录于《内外伤辨惑论》[1]，全方由羌活、独活、藁本、防风、甘草、蔓荆子、川芎 7 味药组成，用于治疗湿邪痹阻手足太阳经脉等病证，现代临床常用于治疗关节炎、颈椎病、偏头痛、腰痛等，应用广泛，疗效确切 [2-7]。通过古籍记载分析，羌活胜湿汤主治病症与中医的“痹症”相似，均为风寒湿邪痹阻人体肌表、经脉引起的肢体关节及肌肉酸痛、麻木、屈伸不利等。

目前，有关羌活胜湿汤的研究主要集中在临床观察，化学成分分析相对较少，有学者采用液质联用技术，对羌活胜湿汤的化学成分进行分析，共分析鉴定出 141 个化合物 [8]；还有学者建立了羌活胜湿汤单味药及复方汤剂 HPLC 指纹图谱 [9]。中药成分复杂，多指标成分质量评价已成为趋势，但多指标成分含量测定需要多种对照品，而一测多评法（quantitative analysis of multi-components by single marker，QAMS）仅需测定 1 个成分含量，即可计算出多个成分的含量，可以在很大程度上节约对照品的用量，从而降低检测成本，而且可以克服某些对照品难以分离、短缺等问题 [10-12]。本课题组前期已经进行了羌活胜湿汤的物质基准量值传递规律及指纹图谱研究，现拟以甘草酸铵为参照物，建立其余 5 种成分的校正因子，并将 QAMS 与外标法（external standard method，ESM）的含量测定结果进行对比，验证 QAMS 的准确性及可行性。

1 仪器与试药

LC-20A 型高效液相色谱仪系统（日本岛津）；FW-100 型高速万能粉碎机（北京市永光明医疗仪器有限公司）；LD2-4X 型台式低速离心机（陕西德祥实验设备有限公司）；CQ-150A-DST 型超声波清洗机（上海跃进医用光学器械厂）；电热恒温水浴锅（上海科恒实业发展有限公司）；十万分之一分析天平、千分之一精密天平（上海赞维衡器有限公司）。

绿原酸（批号：110753-201817，纯度：96.80%）、升麻素苷（批号：111522-201913，纯度：94.60%）、阿魏酸（批号：110773-201915，纯度：99.40%）、洋川芎内酯Ⅰ（批号：21012506，纯度：99.68%）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（批号：111523-201811，纯度：97.40%）、甘草酸铵（批号：110731-202021，纯度：96.20%）（中国食品药品检定研究院）。乙腈（色谱纯，德国默克）；甲醇、甲酸（分析纯，天津市天力化学试剂有限公司）；纯净水（娃哈哈集团有限公司）。

分别收集羌活、独活、防风、川芎、藁本、蔓荆子、炙甘草各 3 个不同产地的饮片，随机组合形成 15 批羌活胜湿汤复方，编号为 S1 ～ S15，具体信息见表 1。各中药饮片均经西安市中医医院刘麦娥副主任中药师鉴定为正品，羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang. 的干燥根茎和根、独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim.f. biserrata Shan et Yuan. 的干燥根、防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata*（Turcz.）Schischk. 的干燥根、川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、藁本为伞形科植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 的干燥根茎和根、蔓荆子为马鞭草科植物蔓荆 *Vitex trifolia* L. 的干燥成熟果实、炙甘草为豆科植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 的干燥根和根茎的炮制品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

COSMOSIL Packed Column 5C_{18}-MS-Ⅱ色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈为流动相 A，0.2% 甲酸水溶液为流动相 B，按表 2 程序进行梯度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 10 μL；检测波长 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别取绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵对照品适量，精密称定，加甲醇溶解制成质量浓度分别为 232.00、72.50、275.40、54.00、33.00、675.00 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取羌活、独活各 4.0 g，防风、川芎、藁本、炙甘草 2.0 g，蔓荆子 1.2 g，过 60 目筛，加水 700 mL，武火煮沸后，转文火煎至约 350 mL，趁热过滤，将滤液浓缩至 100 mL，精密量取 4 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇 5 mL，加蒸馏水至刻度，定容，称重，超声 30 min，放冷，称重，用 50% 甲醇补足失重，离心 5 min（2000 r·min^{-1}），取上清液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取滤液，即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

① 专属性考察：取“2.2”及“2.3”项下的对照品溶液和供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，见图 1，各成分分离度良好。

表 1　15 批羌活胜湿汤随机组合信息

Tab 1　Random combination information of 15 batches of Qianghuo Shengshi decoction samples

批次	羌活	独活	防风	川芎	藁本	蔓荆子	炙甘草
S1	四川阿坝州	四川锦阳	内蒙古巴彦托海旗	四川都江堰	陕西商洛	浙江金华	甘肃民勤
S2	甘肃武威	四川锦阳	内蒙古巴彦托海旗	四川彭山	湖北鹤峰	浙江平阳	陕西榆林
S3	四川阿坝州	湖北巴东	内蒙新巴尔虎旗	四川彭山	辽宁海州	浙江平阳	陕西榆林
S4	甘肃武威	湖北巴东	内蒙古巴彦托海旗	四川什邡	陕西商洛	浙江平阳	陕西榆林
S5	甘肃武威	甘肃平凉	内蒙古阿荣旗	四川都江堰	辽宁海州	浙江金华	甘肃民勤
S6	四川阿坝州	湖北巴东	内蒙古阿荣旗	四川彭山	辽宁海州	广西贵港	新疆巴楚
S7	青海祁连	四川锦阳	内蒙古阿荣旗	四川彭山	辽宁海州	浙江平阳	陕西榆林
S8	四川阿坝州	湖北巴东	内蒙新巴尔虎旗	四川都江堰	辽宁海州	广西贵港	新疆巴楚
S9	四川阿坝州	湖北巴东	内蒙古巴彦托海旗	四川都江堰	辽宁海州	广西贵港	陕西榆林
S10	青海祁连	甘肃平凉	内蒙古阿荣旗	四川都江堰	陕西商洛	广西贵港	新疆巴楚
S11	甘肃武威	四川锦阳	内蒙古阿荣旗	四川彭山	湖北鹤峰	广西贵港	陕西榆林
S12	四川阿坝州	四川锦阳	内蒙古阿荣旗	四川彭山	湖北鹤峰	广西贵港	新疆巴楚
S13	青海祁连	四川锦阳	内蒙古阿荣旗	四川彭山	湖北鹤峰	广西贵港	甘肃民勤
S14	四川阿坝州	甘肃平凉	内蒙新巴尔虎旗	四川什邡	陕西商洛	浙江金华	甘肃民勤
S15	甘肃武威	湖北巴东	内蒙古巴彦托海旗	四川什邡	辽宁海州	浙江金华	新疆巴楚

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution program

时间 /min	流动相 A. 乙腈 /%
0 ～ 5	12
5 ～ 30	12 ～ 14
30 ～ 45	14 ～ 20
45 ～ 60	20 ～ 40
60 ～ 65	40 ～ 50
65 ～ 75	50 ～ 65
75 ～ 77	65 ～ 12

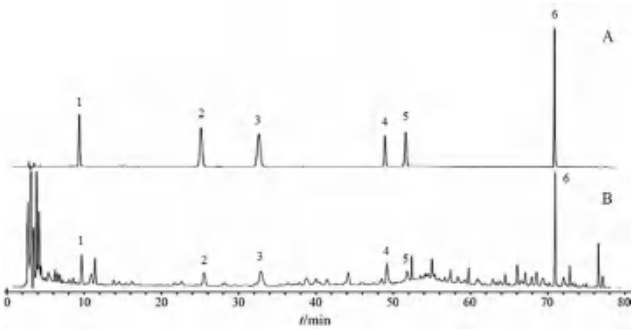


图 1　混合对照品（A）及样品（B）的高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of mix control (A) and sample (B)

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 升麻素苷（prim-*O*-glucosylcimifugin）；3. 阿魏酸（ferulic acid）；4. 洋川芎内酯Ⅰ（serotonin Ⅰ）；5. 5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷（5-*O*-methylvisammioside）；6. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhetate）

② 线性关系考察：精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL，分别置于 1 mL 量瓶中，加甲醇定容。按“2.1”项下色谱条件分别进样 10 μL，记录各指标成分峰面积，以各指标成分的峰面积为纵坐标（y），质量浓度为横坐标（x），分别绘制标准曲线，结果见表 3。

表 3　6 种成分的线性关系考察结果

Tab 3　Linearity of 6 components

成分	回归方程	R^2	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
绿原酸	$y = 9.999\times10^3x + 5.008\times10^4$	0.9992	23.20 ～ 232.00
升麻素苷	$y = 4.682\times10^4x + 4.955\times10^4$	0.9992	7.25 ～ 72.50
阿魏酸	$y = 1.323\times10^4x + 1.855\times10^4$	0.9999	27.54 ～ 275.40
洋川芎内酯Ⅰ	$y = 3.053\times10^4x + 7.076\times10^3$	0.9999	5.40 ～ 54.00
5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷	$y = 6.470\times10^4x + 1.210\times10^4$	0.9999	3.30 ～ 33.00
甘草酸铵	$y = 6.279\times10^3x + 2.409\times10^4$	0.9999	67.50 ～ 675.00

③ 精密度试验：精密量取“2.2”项下对照品溶液，连续进样 6 次，计算得绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵峰面积的 *RSD* 值分别为 0.97%、0.15%、0.17%、0.030%、0.13%、0.47%，表明仪器精密度良好。

④ 稳定性试验：取样品 S1，按“2.2”项下方法制备，分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，计算得绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵峰面积的 *RSD* 值分别为 3.0%、0.35%、0.57%、2.7%、3.8%、1.4%，表明羌活胜湿汤供试品溶液在 24 h

内能够保持稳定。

⑤ 重复性试验：取样品 S1 6 份，按“2.2”项下方法制备，进样测定，记录各指标成分的峰面积，计算得绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵峰面积的 *RSD* 值分别为 3.4%、1.0%、0.40%、3.7%、1.5%、1.3%，表明该方法重复性良好。

⑥ 加样回收试验：取 9 份已知含量的羌活胜湿汤样品溶液，精密称定，分别按高、中、低浓度精密加入混合对照品溶液适量，每个浓度平行制备 3 份供试品溶液，连续进样，记录各指标成分峰面积，计算得绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵低、中、高浓度的平均加样回收率分别在 97.29% ～ 99.11%、104.13% ～ 104.56%、101.93% ～ 103.50%、95.49% ～ 96.60%、96.82% ～ 104.15%、100.51% ～ 101.11%，*RSD* 值均小于 4.0%，符合方法学要求。表明方法准确度良好。

2.6 校正因子（$f_{s/i}$）的建立

2.6.1 不同进样体积 $f_{s/i}$ 的考察 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别进样 1、2、4、6、8、10 μL，记录各成分的峰面积，以甘草酸铵为参照物，通过多点法，分别计算绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的校正因子，计算公式如下，计算结果见表 4。

$$f_{s/i} = f_s/f_i = (A_s/C_s) / (A_i/C_i)$$

式中 A_s 为甘草酸铵的峰面积，C_s 为甘草酸铵的浓度，A_i 为待测组分 *i* 的峰面积，C_i 为待测组分 *i* 的浓度。

表 4 不同进样体积对校正因子的影响

Tab 4 Effect of different injection volume on relative correction factor

进样体积 /μL	相对校正因子				
	$f_{绿原酸}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{洋川芎内酯Ⅰ}/f_{甘草酸铵}$	$f_{5\text{-}O\text{-}甲基维斯阿米醇苷}/f_{甘草酸铵}$
1	0.6028	0.1292	0.4677	0.2053	0.0963
2	0.6026	0.1301	0.4742	0.2071	0.0969
4	0.6160	0.1300	0.4738	0.2065	0.0970
6	0.6087	0.1305	0.4759	0.2069	0.0974
8	0.6428	0.1318	0.4740	0.2064	0.0973
10	0.6198	0.1342	0.4719	0.2054	0.0968
平均值	0.6155	0.1310	0.4729	0.2063	0.0969
RSD/%	2.5	1.4	0.60	0.37	0.40

2.6.2 不同仪器及色谱柱的考察 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 10 μL，考察不同仪器及色谱柱对校正因子的影响，结果见表 5，表明不同仪器和色谱柱对各校正因子无明显影响。

表 5 不同仪器、色谱柱对校正因子的影响

Tab 5 Effect of different instruments and chromatographic columns on relative correction factor

仪器	色谱柱	相对校正因子				
		$f_{绿原酸}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{洋川芎内酯Ⅰ}/f_{甘草酸铵}$	$f_{5\text{-}O\text{-}甲基维斯阿米醇苷}/f_{甘草酸铵}$
岛津 LC-20A	Packed Column 5 C_{18}-MS-II	0.6155	0.1310	0.4729	0.2063	0.0969
岛津 LC-20A	InertSustain C_{18}	0.6368	0.1349	0.4777	0.2029	0.0977
岛津 LC-20A	HyPURITY C_{18}	0.6289	0.1344	0.4831	0.1967	0.1045
安捷伦 -1260	Packed Column 5 C_{18}-MS-II	0.6175	0.1386	0.4763	0.2071	0.0963
安捷伦 -1260	InertSustain C_{18}	0.6322	0.1323	0.4758	0.2086	0.0963
安捷伦 -1260	HyPURITY C_{18}	0.6235	0.1333	0.4749	0.2013	0.0978
平均值		0.6257	0.1341	0.4768	0.2038	0.0983
RSD/%		1.3	2.0	0.73	2.2	3.2

2.6.3 不同柱温的考察 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，分别考察 25、30、35 ℃柱温对校正因子的影响，*RSD* 值均小于 3.0%，结果见表 6，表明柱温对各校正因子无明显影响。

2.6.4 不同流速的考察 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，分别考察流速为 0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL·min^{-1} 时对相对校正因子的影响，*RSD* 值均小于 3.5%，结果见表 7，表明流速对各校正因子无明显影响。

2.7 QAMS 与 ESM 法样品测定结果分析

取 15 批羌活胜湿汤样品，按“2.3”项下方法

表 6　不同柱温对校正因子的影响

Tab 6　Effect of different column temperature on relative correction factor

柱温 /℃	相对校正因子				
	$f_{绿原酸}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{洋川芎内酯I}/f_{甘草酸铵}$	$f_{5\text{-}O\text{-}甲基维斯阿米醇苷}/f_{甘草酸铵}$
25	0.6294	0.1332	0.4792	0.2122	0.0992
30	0.6277	0.1318	0.4752	0.2021	0.0967
35	0.6607	0.1344	0.4771	0.2051	0.0949
平均值	0.6393	0.1331	0.4771	0.2065	0.0969
RSD/%	2.9	0.99	0.42	2.5	2.2

表 7　不同流速对校正因子的影响

Tab 7　Effect of different flow velocity on relative correction factor

流速 /mL	相对校正因子				
	$f_{绿原酸}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{升麻素苷}/f_{甘草酸铵}$	$f_{洋川芎内酯I}/f_{甘草酸铵}$	$f_{5\text{-}O\text{-}甲基维斯阿米醇苷}/f_{甘草酸铵}$
0.8	0.6321	0.1325	0.4432	0.2062	0.0988
0.9	0.6377	0.1335	0.4786	0.2051	0.0961
1.0	0.6262	0.1310	0.4700	0.2004	0.0970
1.1	0.6217	0.1347	0.4742	0.2023	0.0955
1.2	0.6137	0.1323	0.4831	0.2017	0.0981
平均值	0.6263	0.1328	0.4698	0.2031	0.0971
RSD/%	1.5	1.1	3.3	1.2	1.4

制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，分别采用 ESM 法和 QAMS 法计算各指标成分的含量及相对误差，结果见表 8，表明两种方法得到的结果差异无统计学意义。

3　讨论

3.1　内参物的选择

本研究在前期试验的基础上，建立了同时测定羌活胜湿汤中指标成分绿原酸、升麻素苷、阿魏酸、洋川芎内酯Ⅰ、5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵 6 种成分的 QAMS 含量测定方法，其中选择含量最高、易于辨识且较稳定的甘草酸铵作为内参物。

3.2　色谱条件的优选

为保证待测化合物良好的分离度，本试验对流动相梯度程序和检测波长分别进行了考察优选。首先采用 PDA 检测器的高效液相色谱仪对样品进行全波长扫描，在 254 nm 左右主要吸收峰强度较大，245 nm 之前基线不稳，因此考察了 250、254、260、270 nm 下的色谱图（见图 2），在 254 nm 时各待测峰分离度最好，峰面积相对最大；为提高洋川芎内酯Ⅰ和 5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷与相邻色谱峰的分离度，本试验尝试了多个流动相梯度，最后确定为“2.1”项下的梯度洗脱程序。

3.3　QAMS 法与 ESM 法的对比

本试验收集了 15 批不同产地的羌活胜湿汤饮片样品，分别采用 ESM 法和 QAMS 法测定 6 个指标性成分含量，对比结果发现，两种方法的含量测定结果差异无统计学意义，验证了 QAMS 法的准确性及可行性，可用于羌活胜湿汤的质量控制。

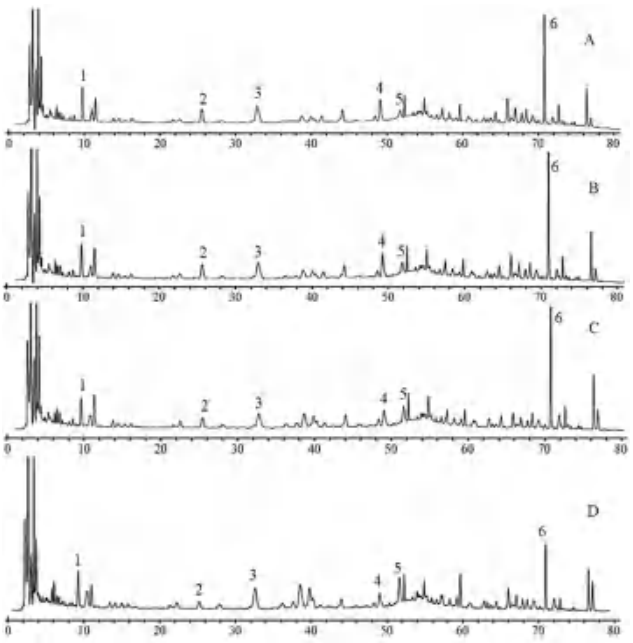


图 2　不同波长下羌活胜湿汤高效液相色谱图

Fig 2　HPLC chromatograms of Qianghuo Shengshi decoction at different wavelengths

A. 250 nm；B. 254 nm；C. 260 nm；D. 270 nm；1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 升麻素苷（prim-*O*-glucosylcimifugin）；3. 阿魏酸（ferulic acid）；4. 洋川芎内酯Ⅰ（serotonin Ⅰ）；5. 5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷（5-*O*-methylvisammioside）；6. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhetate）

表 8 15 批羌活胜湿汤各成分含量测定结果

Tab 8 Content of 15 batches of Qianghuo Shengshi decoction

批号	绿原酸			升麻素苷			阿魏酸		
	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%
S1	0.5514	0.5530	0.14	0.0914	0.0923	0.50	0.4512	0.4507	0.060
S2	0.6350	0.6418	0.53	0.0953	0.0952	0.01	0.5057	0.5087	0.30
S3	0.5766	0.5711	0.48	0.0943	0.0958	0.77	0.5672	0.5701	0.25
S4	0.6363	0.6251	0.89	0.1014	0.1022	0.39	0.7165	0.7309	0.99
S5	0.6167	0.6094	0.59	0.0918	0.0921	0.21	0.4177	0.4132	0.54
S6	0.6452	0.6067	3.1	0.0927	0.0932	0.28	0.6666	0.6680	0.11
S7	0.5279	0.5380	0.96	0.0935	0.0962	1.4	0.5259	0.5373	1.4
S8	0.6319	0.6225	0.75	0.0901	0.0893	0.41	0.6223	0.6255	0.26
S9	0.6683	0.6649	0.25	0.0892	0.0886	0.33	0.6134	0.6244	0.88
S10	0.5226	0.5269	0.40	0.0981	0.0998	0.84	0.6133	0.6121	0.09
S11	0.5135	0.5221	0.84	0.1027	0.1047	0.97	0.5184	0.5191	0.070
S12	0.5296	0.5273	0.21	0.0946	0.0956	0.55	0.6873	0.6965	0.66
S13	0.4991	0.4951	0.41	0.0954	0.0959	0.27	0.6146	0.6170	0.20
S14	0.6579	0.6517	0.47	0.0988	0.0994	0.28	0.5088	0.5037	0.51
S15	0.6638	0.6363	2.1	0.0971	0.0979	0.41	0.5799	0.5821	0.19

批号	洋川芎内酯Ⅰ			5-*O*- 甲基维斯阿米醇苷			甘草酸铵
	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%	（ESM）
S1	0.0929	0.0933	0.23	0.0509	0.0505	0.42	1.2712
S2	0.1078	0.1091	0.59	0.0517	0.0515	0.26	1.2083
S3	0.1272	0.1286	0.56	0.0528	0.0523	0.48	1.3704
S4	0.1601	0.1619	0.58	0.0649	0.0654	0.38	1.1543
S5	0.1015	0.1017	0.070	0.0592	0.0588	0.34	1.4767
S6	0.1433	0.1442	0.30	0.0668	0.0663	0.34	1.5085
S7	0.1201	0.1206	0.21	0.0467	0.0469	0.16	1.2247
S8	0.0951	0.0951	0.03	0.0560	0.0554	0.48	1.4761
S9	0.0956	0.0968	0.62	0.0479	0.0477	0.23	1.0952
S10	0.1054	0.1050	0.19	0.0513	0.0513	0.050	1.7868
S11	0.1373	0.1391	0.64	0.0790	0.0796	0.36	1.3757
S12	0.1235	0.1251	0.62	0.0573	0.0571	0.17	1.2993
S13	0.1326	0.1337	0.42	0.0648	0.0646	0.19	1.5079
S14	0.1699	0.1711	0.34	0.0611	0.0603	0.68	1.5727
S15	0.1533	0.1554	0.68	0.0617	0.0615	0.21	1.4403

参考文献

[1] 李东垣 . 内外伤辨惑论 [M]. 田翠时，校注 . 北京：中国医药科技出版社，2011.

[2] 张攀，王勤俭，徐冬康，等 . 羌活胜湿汤加减联合臭氧注射、射频热凝靶点穿刺术治疗神经根型颈椎病风寒痹阻型临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（1）：1053-1056.

[3] 王庆超 . 羌活胜湿汤治疗膝关节骨性关节炎临床观察 [J]. 光明中医，2021，36（23）：3937-3940.

[4] 熊雨墨，李瑛，马毅，等 . 除湿解毒汤合羌活胜湿汤加减治疗急性痛风性关节炎（湿热蕴结证）的临床研究 [J]. 中国中医急症，2021，30（6）：1053-1056.

[5] 杨小纯，金玥，蔡悦 . 羌活胜湿汤加减方对强直性脊柱炎患者脊柱功能及急性时相反应物指标的影响 [J]. 实用医学杂志，2021，37（18）：2423-2427.

[6] 谭志强 . 基于古今文献探讨羌活胜湿汤方义衍变及临床应用 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2021.

[7] 董燕，侯西娟，李莎莎，等 . 经典名方羌活胜湿汤的古代文献分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（17）：1-5.

[8] 蔡信福，徐雅，刘和平，等 . 基于液质联用技术的经典名方羌活胜湿汤标准煎液的化学成分分析 [J]. 中国中药杂志，2022，47（2）：343-357.

[9] 梁慧慧，文雯，余格，等 . 羌活胜湿汤的质量稳定与传递规律研究 [J]. 时珍国医国药，2020，31（1）：75-78.

[10] 陈江平，余欣彤，黎桃敏，等 . 一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种成分的含量 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2626-2630.

[11] 王智民，钱忠直，张启伟，等 . 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志，2011，36（6）657-658.

[12] 程玉钏，王玉娥，贺石麟，等 . 一测多评法建立调脾和中颗粒中 6 种有效成分的含量测定方法 [J]. 中国新药杂志，2022，31（12）：1223-1229.

（收稿日期：2023-01-11；修回日期：2023-03-28）

电感耦合等离子体质谱法测定氟马西尼注射液中金属元素的含量

吴秋云，陈民辉，曹玲（江苏省食品药品监督检验研究院，南京　210019）

摘要：目的　建立氟马西尼注射液中多种金属元素检测的电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法。**方法**　选用钪（Sc）、钇（Y）、铟（In）、铋（Bi）作为内标，ICP-MS 法同时测定氟马西尼注射液中镁（Mg）、铬（Cr）、铜（Cu）、锌（Zn）、砷（As）、锑（Sb）、镉（Cd）、铅（Pb）8 种元素的含量。**结果**　对于所测元素，标准曲线相关系数 $r \geq 0.9997$，加样回收率在 86.0% ～ 106.3%，重复性试验 *RSD* 在 2.6% ～ 4.8%（$n = 6$）。**结论**　该方法简便、快速、准确、灵敏度高，可用于日常监测氟马西尼注射液中金属元素的含量。

关键词：电感耦合等离子体质谱法；氟马西尼注射液；金属元素
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2439-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.029

Content of metallic elements in Flumazenil injection by ICP-MS

WU Qiu-yun, CHEN Min-hui, CAO Ling (*Jiangsu Insitite for Food and Drug Control, Nanjing* 210019)

Abstract: Objective　To determine multiple metallic elements in Flumazenil injection by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Methods**　Sc, Y, In, and Bi were used as the internal standard. The content of Mg, Cr, Cu, Zn, As, Sb, Cd, and Pb in Flumazenil injection were determined by ICP-MS. **Results**　The correlation coefficient of the calibration curve was no less than 0.9997 for all the analyzed elements. The recovery ranged from 86.0% to 106.3%. *RSD* of the repeatability test ranged from 2.6% to 4.8% ($n = 6$). **Conclusion**　The method is simple, rapid, accurate and sensitive. It is suitable for the determination of multiple metallic elements in Flumazenil injection.

Key words: inductively coupled plasma mass spectrometry; Flumazenil injection; metallic elements

氟马西尼是苯二氮䓬类药物的拮抗剂，它能竞争性抑制苯二氮䓬类药物与 γ- 氨基丁酸（GABA）受体特异性位点的结合，以阻断其中枢作用。氟马西尼用于全凭静脉麻醉术后催醒的临床研究显示，该药物对手术患者催醒作用良好，能够使患者在较短时间内迅速苏醒，具有较好的应用价值。近年来，随着国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）对药品制剂中元素杂质的关注，元素杂质已经成为药品中必须研究的项目 [1]。目前我国药典中原料药的重金属检测大都采用比色法，控制方法单一，结果无法区分金属元素种类及具体含量。而制剂中的元素杂质一般只通过其原料来控制，少有单独控制项目。为进一步提高制剂工艺水平，控制其在制备、运输、储存中有可能引入的元素杂质污染，加强对制剂中元素杂质的控制势在必行。元素杂质的检测方法主要有原子荧光法、原子吸收光谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱（ICP-AES）法和电感耦合等离子体 - 质谱（ICP-MS）法 [2-3]，其中，ICP-MS 法是目前公认的检测元素杂质最有效的方法之一，其所具备的灵敏度高、线性范围广、检测限低、可多元素同时检测等优点，使其被广泛应用 [4]。氟马西尼原料标准重金属项目检查限度为 20 ppm[5]。氟马西尼注射液现行标准有《中国药典》2020 年版二部，YBH03522006、YBH10102008、YBH04512009、YBH04492009、YBH00162013 及 YBH01342018，均无元素杂质控制项目。考虑到原辅料中的元素杂质虽然有单独控制，但可能会在制剂中产生叠加效应，以及在生产工艺中有可能引入元素杂质，故此根据 ICH Q3D 指导原则 [6] 和《中国药典》2020 年版四部通

作者简介：吴秋云，女，副主任药师，主要从事药物分析工作，email：723144678@qq.com

则[7]，选取测定了镁（Mg）、铬（Cr）、铜（Cu）、锌（Zn）、砷（As）、锑（Sb）、镉（Cd）、铅（Pb）8 种元素杂质。其中，Pd 中毒可严重影响中枢神经系统，As 及 Cd 有明确的致癌、致畸、致突变作用[8]，且会在人体内蓄积。Mg、Zn、Cr、Cu 虽为人体必需的微量元素，但当其蓄积一定量或价态改变时对人体亦有毒害作用[9-10]。本文针对氟马西尼注射液这一品种采用 ICP-MS 测定 8 种金属元素的含量，现报道如下 。

1 仪器与试药

7700x 电感耦合等离子体质谱仪，ICP-MS 调谐液（1 μg·L^{-1}）（美国 Agilent 公司）。

65% 硝酸（优级纯，美国 Merck），实验用水为超纯水，符合 GB/T 6682—2008 一级水要求。Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn、铋（Bi）、铟（In）、钪（Sc）、钇（Y）单元素标准溶液（1000 μg·mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心批号依次为 20C021-2、20B036-4、20C013-5、20C010-4、20C008-5、20C002-7、211001-2、20C019-3、218004-2、217003、198003、20B019）。

11 家企业生产的氟马西尼注射液 86 批，规格均为 0.1 mg∶1 mL。

2 方法与结果

2.1 金属元素及其内标元素的选择

本品为安瓿玻璃瓶包装的水性基质注射剂，考虑到玻璃中金属元素的迁出及常见有害金属元素的控制，拟测定 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的含量，以相近质量数的元素 Bi、In、Sc、Y 为内标。目标元素与内标元素见表 1。

表 1 分析同位素与内标同位素

Tab 1 Analytical and internal standard isotope

分析同位素	内标同位素
^{24}Mg	^{45}Sc
^{52}Cr	^{45}Sc
^{66}Zn	^{89}Y
^{75}As	^{89}Y
^{63}Cu	^{89}Y
^{111}Cd	^{115}In
^{121}Sb	^{115}In
^{208}Pb	^{209}Bi

2.2 仪器分析参数

射频功率为 1550 W，等离子体氩气流量、辅助气流量、载气流量分别为 15.0、0.8、0.8 L·min^{-1}。蠕动泵速为 0.3 r·s^{-1}，样品提升时间为 45 s，稳定时间为 30 s，采用氦气模式，重复测定 3 次。内标溶液采取在线共进方式。

ICP-MS 调谐液调试仪器结果显示，仪器主要参数质量轴、灵敏度、分辨率、双电荷、氧化物等均符合规定。

2.3 溶液的制备

精密量取 8 种待测元素标准溶液各 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用 5% 硝酸溶液稀释至刻度，摇匀，精密量取 5 mL，置 50 mL 量瓶中，用 5% 硝酸溶液稀释至刻度，摇匀，作为标准储备液。分别精密量取储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 置 100 mL 量瓶中，用 5% 硝酸稀释至刻度，摇匀，得到含 8 种元素质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100 ng·mL^{-1} 的标准曲线溶液。另取 4 种内标元素标准液各 1 mL，置 200 mL 量瓶中，用 5% 硝酸稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用 5% 硝酸溶液稀释至刻度，摇匀，作为内标溶液。

精密量取氟马西尼注射液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，用 10% 硝酸溶液稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。以 5% 硝酸溶液为空白溶液。

2.4 线性关系考察

取“2.3”项下标准曲线溶液进行测定，以元素质量浓度（x）和响应值（y）作线性回归，结果见表 2，表明各元素在各自浓度范围内与响应值均呈现良好线性关系。

表 2 线性回归方程

Tab 2 Regression equation

元素	线性回归方程	范围 /（ng·mL^{-1}）	相关系数（r）
Cd	$y = 0.045x - 0.006$	1 ～ 100	1.000
Pb	$y = 0.133x + 0.175$	1 ～ 100	1.000
As	$y = 0.019x - 0.006$	1 ～ 100	0.9999
Mg	$y = 0.045x + 0.094$	1 ～ 100	0.9997
Zn	$y = 0.037x + 0.061$	1 ～ 100	1.000
Sb	$y = 0.081x - 0.014$	1 ～ 100	0.9999
Cu	$y = 0.331x + 0.038$	1 ～ 100	1.000

2.5 检测限与定量限

取空白溶液连续进样 11 次，计算标准偏差（*SD*），按 3 倍标准偏差（3*SD*）所对应的待测元素为检测限，10 倍标准偏差（10*SD*）所对应的待测元素质量浓度为定量限。结果 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的检测限分别为 0.328、0.066、0.011、0.032、0.089、0.054、0.028、0.59 ng·mL^{-1}，定量限分别为 1.095、0.220、0.036、0.108、0.296、0.180、0.093、0.196 ng·mL^{-1}。

2.6 精密度试验

精密量取标准储备液 2.0 mL，置 100 mL 量瓶中，用 5% 硝酸溶液稀释至刻度，连续进样 6 次。结果 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的 *RSD* 分别为 0.90%、1.0%、1.2%、0.80%、0.90%、3.3%、1.0%、2.0%。

2.7 重复性试验

精密量取已知含量的样品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，分别精密加入标准储备液 0.2 mL，用 5% 硝酸溶液稀释至刻度，平行制备 6 份。结果 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的 *RSD* 分别为 4.8%、3.1%、2.6%、2.8%、4.1%、3.0%、2.9%、3.3%。

2.8　回收试验

精密量取已知含量的样品 5 mL，置 10 mL 量瓶中，分别精密加入标准储备液 0.1、0.2、0.5 mL，用溶剂稀释至刻度，各浓度平行配制 3 份作为供试品溶液，进样测定，结果 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的回收率均在 86.0% ～ 106.3%。

2.9　稳定性试验

取“2.8”项下加标浓度为 20 ng·mL^{-1} 的供试品溶液，分别于 0、2、4、6、16 h 进样测定，结果 Mg、As、Cu、Cd、Cr、Pb、Sb、Zn 的 *RSD* 分别为 3.5%、2.6%、1.8%、2.7%、3.9%、3.3%、5.1%、4.4%，表明加标供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.10　样品测定

按“2.1”项下方法对 11 个厂家的 86 批样品进样测定，结果见表 3。根据试验结果，86 批次氟马西尼注射剂样品中 As、Sb、Pd、Cd 这四类有害元素的量均小于 0.1 mg·L^{-1}，未超过国家药品包装容器（材料）标准（YBB 标准）中对玻璃样品的限度规定。本品最大用量为 1 mg，即 10 mL。依据 ICH Q3D 中元素杂质每日允许暴露量（PDE）计算，8 种元素浓度均低于其限度值。

表 3　样品中 8 种金属元素的含量 (ng·mL^{-1})

Tab 3　Content of 8 metallic elements in samples (ng·mL^{-1})

生产单位	Mg	Cr	Cu	Zn	As	Cd	Sb	Pb
A 企业（10 批）	41.10	2.91	1.75	53.78	0.92	0.17	2.67	4.65
B 企业（10 批）	2.22	0.85	0.26	0.14	0.36	0.24	0.20	0.16
C 企业（12 批）	8.21	9.64	1.13	1.63	1.84	0.96	0.05	4.36
D 企业（3 批）	24.03	2.56	12.71	4.34	3.49	0.98	2.40	22.65
E 企业（5 批）	6.06	1.77	0.90	2.53	0.69	1.10	0.02	42.75
F 企业（12 批）	39.71	3.38	2.47	107.13	0.86	1.00	0.06	13.13
G 企业（12 批）	1.98	2.07	0.77	0.87	1.63	0.92	0.05	6.54
H 企业（6 批）	66.52	7.68	5.91	102.59	0.76	0.96	0.22	35.80
I 企业（7 批）	53.64	6.58	2.10	177.11	0.75	1.10	0.69	43.76
J 企业（8 批）	51.62	3.26	1.66	41.80	6.10	1.00	0.16	14.02
K 企业（1 批）	7.56	2.56	0.68	4.80	0.98	0.85	0.04	3.63

3　讨论

随着中国加入 ICH 及 ICH Q3D 元素杂质指导原则的实施，元素杂质已逐渐成为人们的关注热点。元素杂质在药品生产过程中广泛存在，可能作为催化剂或制剂专门添加，也可能作为污染源由原料、辅料、生产设备、包材等引入[11-12]。注射液的元素杂质暴露风险比口服制剂更高。本次试验涉及 11 家企业，结果可从一定程度上反映氟马西尼注射液这个品种目前的元素杂质水平。Cu、Cr、As、Sb、Cd 这 5 种元素含量都较低，且企业间差异不大，说明引入风险较低。Mg 和 Zn 是环境元素，企业间差异较大，可能是由于生产工艺和包材不同引入。不同企业间 Pb 含量差异较大，可能是由于不同企业的原辅料来源不同；同企业不同批次间 Pb 含量差异较大，分析可能是由于采用了不同批次的原辅料，其中两家企业产品中的 Pb 含量已接近 50% 限度值，需要加强控制。由此可见不同的生产工艺和原辅料对氟马西尼注射液中的元素杂质浓度水平存在显著影响，建议企业在内控时增加元素杂质检测项目，尤其是更换不同批次原辅料时，监测元素杂质含量的变化可以实时掌握工艺波动，对于保证氟马西尼注射液的用药安全有重大意义。本品为注射液，配制样品溶液时采取直接稀释法。该前处理方法简单易操作，适合大批量样品的多种元素快速筛选检验，实现元素杂质风险的日常监测。

参考文献

[1] 田阔，董云霞，段成军，等 . ICP-MS 法测定硫酸氢氯吡格雷片中金属元素含量 [J]. 中南药学，2020，18（1）：121-124.

[2] 朱俐，赵瑜，姚尚辰，等 . 药物中元素杂质检测技术研究最新进展 [J]. 分析测试学报，2020，39（4）：547-554.

[3] 解原，黄雯孝，黄浩 . 电感耦合等离子体发射光谱法测定高纯稀散金属中杂质元素研究进展 [J]. 化学分析计量，2019，28（6）：134-138.

[4] 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体质谱法检测药品中元素杂质的研究进展 [J]. 理化检验 - 化学分册，2022，58（3）：361-372.

[5] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：912.

[6] ICH Guideline Q3D on Elemental Impurities [M]. EMA/CHMP/ICH/353369/2013，2016.

[7] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：43-47.

[8] 黄强燕，薛平 . 仿生提取 -ICP-MS 法测定痹祺胶囊中可溶性重金属的含量 [J]. 中南药学，2020，18（11）：1895-1898.

[9] 牛芸民，杨天林 . 若干重要微量金属元素的生物化学功能及其与人体健康的关系 [J]. 微量元素与健康研究，2014，31（2）：78-80.

[10] 邱婧，王湘波，李瑞莲，等 . ICP-MS 法测定湖南特色中成药中的重金属及有害元素及相关风险评价 [J]. 中南药学，2019，17（11）：1909-1913.

[11] 刘芳芳，王章伟，方礼，等 . 注射用丹酚酸 A 中 11 种元素杂质含量测定方法的建立 [J]. 中国药师，2022，25（1）：162-166.

[12] 陈小英，薛晓文，妙苗，等 . 长春西汀注射剂及其原料和辅料中 15 种微量元素的测定 [J]. 西北药学杂志，2021，36（5）：717-724.

（收稿日期：2023-01-11；修回日期：2023-03-29）

太行菊的性状及显微鉴别研究

柴天川[1]，段吉平[2]，段琼[2*]，苏静[3]，王彦刚[4]（1. 河北省中医院，石家庄 050011；2. 河北省药品医疗器械检验研究院，石家庄 050227；3. 石家庄市市场监督管理局，石家庄 050000；4. 北京中医药大学第三附属医院，北京 100029）

摘要：目的 研究太行菊的性状和显微特征，为其原植物鉴别和药材质量标准提供参考。**方法** 采用性状及显微鉴定方法对太行菊根、茎、叶柄的横切面及粉末的显微特征进行研究。**结果** 太行菊的茎细圆柱状，弧状弯曲；叶二回羽状全裂，末回裂片狭窄；头状花序总苞浅盘状，具舌状花和管状花，冠毛芒片状且全部集中在瘦果背面顶端。根、茎及叶柄横切面可见油管，非腺毛呈 T 型，可见鞋底状腺鳞；花粉粒近球形，外壁表面具刺状突起，具 3 孔沟。**结论** 获得了太行菊的性状及显微特征，可为其物种鉴别和药材质量标准制订提供依据。

关键词：太行菊；性状鉴别；显微鉴别
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2442-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.030

Morphological and microscopic identification of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih

CHAI Tian-chuan[1], DUAN Ji-ping[2], DUAN Qiong[2*], SU Jing[3], WANG Yan-gang[4] (1. *Hebei Hospital of Chinese Medicine*, *Shijiazhuang* 050011; 2. *Hebei Institute for Drug and Medical Device Control*, *Shijiazhuang* 050227; 3. *Administration for Market Regulation of Shijiazhuang*, *Shijiazhuang* 050000; 4. *The Third Hospital of Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029)

Abstract: Objective To determine the morphological and microscopic characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih, and provide basis for the authenticity and quality standard for medicinal materials. **Methods** The morphological characteristics, the root, stem, common petiole and the powder microscopic characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih were studied by morphological and microscopic identification. **Results** The stem of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih was slender cylindric and bent; the leaf was bipinnatisect, and the last lobes were narrow. The involucre of capitulum was flat disciform, with the ray flower and tubular flower. The pappus was flat aristiform and growed at the back of the seed top. The microscope showed that the oil pipe was seen in the cross-section of root, leaf and leafstalk. Non-glandular hairs looked like T letter and landular scales looked like shoe soles. The shape of pollen grains was subsphaeroidal, with spinose projection and three colporates on the exine. **Conclusion** The morphological and microscopic characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih can be used for the species identification and quality standard of medicinal materials.

Key words: *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih; morphological identification; microscopic identification

太行菊 [*Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih] 为菊科太行菊属多年生草本植物，为中国特有种，列入《国家重点保护野生植物名录（第一批）》Ⅱ级、《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》近危和国家第 2 批珍稀濒危保护植物[1]。太行菊主要分布于山西省（陵川、晋城、平顺），河南省（济源、沁阳、

基金项目：河北省中医药管理局科研计划项目（No.2020009）；河北省中医药管理局科研计划项目（No.2021007）；河北省中药制剂产业技术研究院项目（No.SC2021003）。

作者简介：柴天川，男，主任药师，主要从事中药制剂研发、中药资源的研究工作，email：690903chai@163.com *通信作者：段琼，女，主管药师，主要从事中药鉴定的研究工作，email：451298226@qq.com

博爱、焦作、修武县、辉县、林州），河北省（武安、磁县、涉县、邢台）等地区，常见于干燥山坡、岩石上和悬崖峭壁的石缝中[2-4]。《河南植物志》和植物智 [www.iplant.cn] 记载，河南省的部分地区将太行菊的头状花序作为中药材野菊 [*Chrysanthemum indicum* Linnaeus]、菊花 [*Dendranthema morifolium*（Ramat.）Tzvel.] 的代用品，用于清肝明目、清热润喉[3, 5]；当地百姓还把太行菊的头状花序泡茶饮用或入食食用。因太行菊全株富含挥发油，枝叶香气浓烈且适宜，干品的香气持久，因此多地将太行菊全株作为芳香料使用，用以制作线香、香包挂件、枕头或坐垫的填充物等。

目前对太行菊的研究主要是关于植物分类学、基因测序和转录、种质资源、培育种植、化学成分分析及药理活性研究等方面[6-8]；研究表明，太行菊全株主要含有黄酮类、多酚类、挥发油等成分，动物实验显示其具有抗氧化、降血糖、抑菌、抗病毒等药理活性[9-13]。因此，太行菊作为菊科的重要野生资源，不但具有较高的生态价值，且具有较大的经济与药用价值，头状花序和地上部分作为其药用部位，值得进一步深入研究和开发利用。因太行菊的稀缺性，目前尚未见太行菊性状和显微鉴别的相关研究，因此，本文对太行菊的性状和显微鉴别特征进行研究，以期为该品种的鉴别和药材质量标准提供参考。

1 材料

OLYMPUS BX51 生物显微镜，DP72 数码成像系统（日本奥林巴斯）；徕卡冰冻切片机（CM1950，德国徕卡）；尼康单反数码相机（D810，日本尼康公司）；甘油、水合氯醛均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

太行菊共 5 批，分别采集于山西省阳城县蟒河、河南省济源市山里泉、河南省博爱县青天河、山西省平顺县通天峡、河北省邯郸市涉县，由河北省药品医疗器械检验研究院中药室段吉平研究员鉴定为菊科太行菊属植物太行菊 [*Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih] 全草。

2 方法

2.1 植物形态特征

对太行菊新鲜全株的根、茎、叶、花等进行肉眼观察，记录其形态特征并拍照。

2.2 药材性状鉴别

对太行菊干燥全株不同部位的形状、大小、颜色、质地、断面特征、气味等进行肉眼观察，重点观察太行菊的入药部位（地上部分和头状花序），记录其性状特征并拍照。

2.3 横切面显微鉴别

取太行菊的根、茎和叶柄，软化，用切片机切片，切片厚度 10 ～ 12 μm，置于载玻片上，水合氯醛试液透化，盖上盖玻片，置于生物显微镜下观察，照相并记录横切面组织显微特征。

2.4 粉末显微鉴别

取干燥的太行菊全株，粉碎，粉末过四号筛，挑取少量粉末置于载玻片上，滴加水合氯醛试液并在酒精灯下加热透化，盖上盖玻片，置于生物显微镜下观察，照相并记录粉末显微特征。

3 结果

3.1 植物形态特征

太行菊为多年生草本或亚灌木。根：根直伸，木质化。茎：茎基部木质，单一或数条丛生，茎高 10 ～ 15 cm，淡紫红色或褐色，被贴伏的短柔毛。叶：基部叶卵形、宽卵形或椭圆形，二回羽状全裂，一回侧裂片 2 ～ 3 对；叶柄长 1 ～ 3 cm。茎叶与基部叶同形。全部叶的末回裂片披针形、长椭圆形或斜三角形，宽 1 ～ 2 mm，全部叶两面被短柔毛。头状花序：头状花序单生或 2 个生于枝顶；总苞浅盘状，直径约 1.5 cm，总苞片约 4 层，中外层线形和披针形，内层长椭圆形，中外层外面被稍密的短柔毛，内层无毛或几无毛；舌状花粉红色或白色，舌状线形，顶端 3 浅裂；管状花黄色，顶端 5 齿裂。果：瘦果有 3 ～ 5 条纵肋；冠毛芒片状，4 ～ 6 个，大小和长短差异较大，全部芒片集中在瘦果背面顶端，腹面无芒片（见图 1）。

3.2 药材性状特征

3.2.1 地上部分　本品全株高约 14 cm，类小灌木状。太行菊茎：太行菊的茎常多条，近簇生于根头部，细长圆柱状，斜升，多为弧形弯曲；当年生嫩茎多少被贴伏的短柔毛，老茎的毛脱落；干燥茎质地硬脆，易折断，断面不整齐；茎表面黄褐色至灰黑色，表皮易脱落，皮部棕红色，木部黄白色至灰白色；气芳香，味淡。太行菊叶：叶生于当年新抽出的嫩茎上，老茎无叶；干燥叶卵形、宽卵形或椭圆形，长 2.5 ～ 3.5 cm，二回羽状全裂，一回侧裂片 2 ～ 3 对，末回裂片 1 ～ 3 对，末回裂片披针形、长椭圆形或斜三角形，宽 1 ～ 2 mm；全部叶两面多少被短柔毛，叶柄长 1 ～ 3 cm；叶灰绿色至暗绿色，易碎；气芳香，味淡（见图 2）。

3.2.2 头状花序　本品头状花序的舌状花一层，约 20 枚，干燥时黄白色；瘦果长 1.2 mm；气芳香，味苦；其余特征均同太行菊新鲜原植物的相应部

位（见图 3）。

图 1　太行菊原植物图

Fig 1　Plant diagram of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih

图 2　太行菊药材图（地上部分）

Fig 2　Medicinal materials of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih（aboveground part）

3.3　横切面显微特征

3.3.1　根横切面　根类圆形，直径约 1.5 mm。木栓层厚，细胞 9 ～ 12 列，排列紧密，长方形，径向直径 18 ～ 32 μm；切向直径 18 ～ 41 μm；皮层疏松，有多数裂隙；油管于韧皮部外散在，直径 11 ～ 52 μm；韧皮部 4 ～ 15 层，细胞压扁；形成层不明显。木质部导管多散在（见图 4 ～ 6）。

3.3.2　茎横切面　茎类圆形，具棱角，直径约 1.3 mm。外表皮可见非腺毛，表皮细胞含有棕红色内含物，外被角质层；下皮层为 4 ～ 7 层细胞，细胞圆形或类方形，排列紧密；皮层细胞皱缩；韧皮部外方可见纤维束；形成层不明显；木质部呈环状；髓部为厚壁细胞，厚壁细胞壁孔沟明显（见图 7 ～ 9）。

图 3　太行菊药材图（头状花序）

Fig 3　Medicinal materials of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih（capitulum）

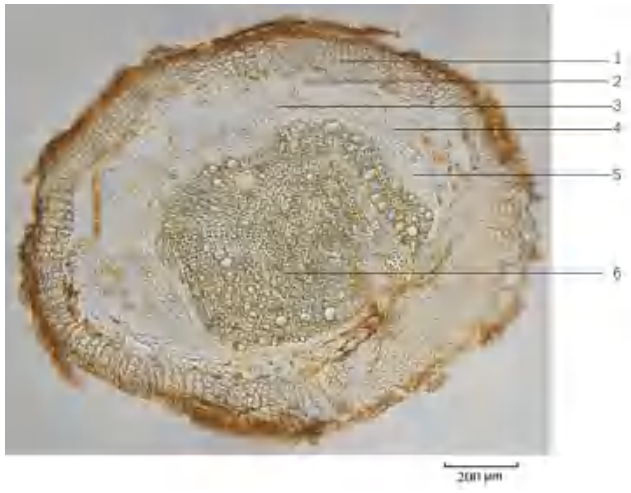


图 4　太行菊根横切面图

Fig 4　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih root

1. 木栓层（cork）；2. 裂隙（crevice）；3. 油管（vittae）；4. 皮层（cortex）；5. 韧皮部（phloem）；6. 木质部（xylem）

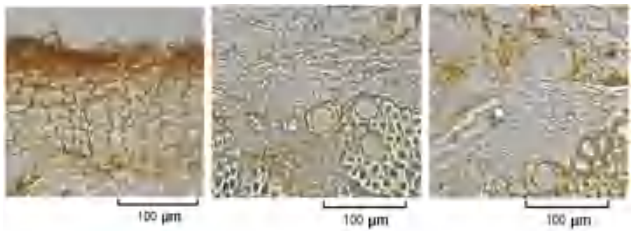


图 5　太行菊根横切面图（局部）

Fig 5　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih root（Partial part）

A. 木栓层（cork）；B. 韧皮部（phloem）；C. 油管（vittae）

3.3.3　叶柄横切面　叶柄类三角形，直径 0.7 ～ 0.9 mm。表皮可见非腺毛，表皮细胞外被角质层，角质层厚；皮层为 4 ～ 7 层细胞，细胞圆形或椭

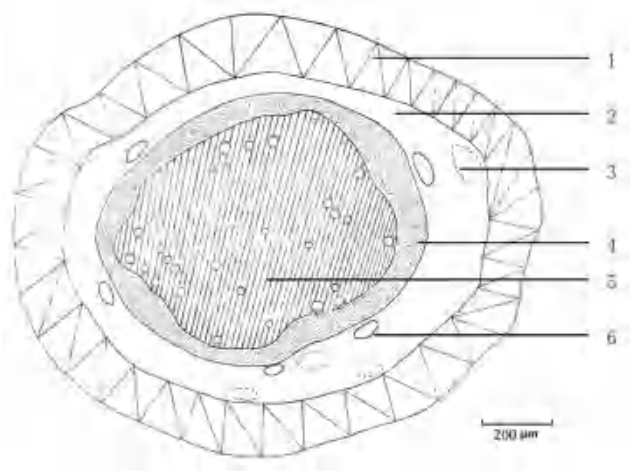


图 6　太行菊根横切面简图（×100）

Fig 6　Schematic diagram of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih root（×100）

1. 木栓层（cork）；2. 皮层（cortex）；3. 裂隙（crevice）；4. 韧皮部（phloem）；5. 木质部（xylem）；6. 油管（vittae）

图 7　太行菊茎横切面图

Fig 7　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih stem

1. 表皮（epidermis）；2. 下皮层（subcortexn）；3. 皮层（cortex）；4. 油管（vittae）；5. 韧皮部（phloem）；6. 木质部（xylem）；7. 髓（pith）；8. 纤维束（fiber bundle）

图 8　太行菊茎横切面图（局部）

Fig 8　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih stem（Partial part）

A. 表皮（epidermis）；B. 油管（vittae）；C. 髓（pith）

圆形；维管束 3 个，外韧型；油管散生于维管束旁（见图 10 ～ 12）。

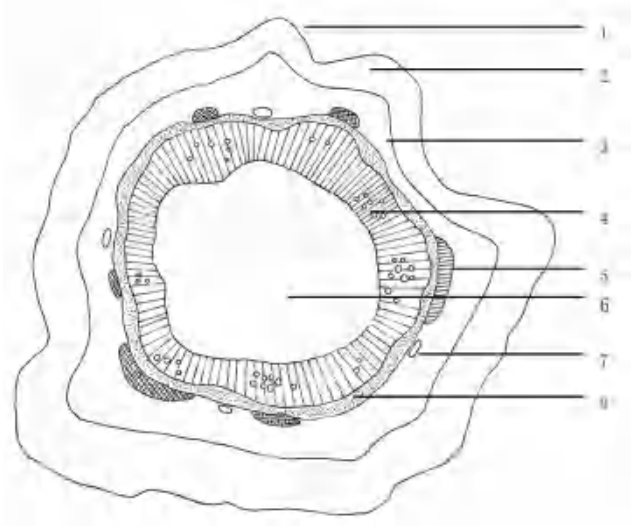


图 9　太行菊茎横切面简图（×100）

Fig 9　Schematic diagram of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih stem（×100）

1. 表皮（epidermis）；2. 下皮层（subcortexn）；3. 皮层（cortex）；4. 木质部（xylem）；5. 纤维束（fiber bundle）；6. 髓（pith）；7. 油管（vittae）；8. 韧皮部（phloem）

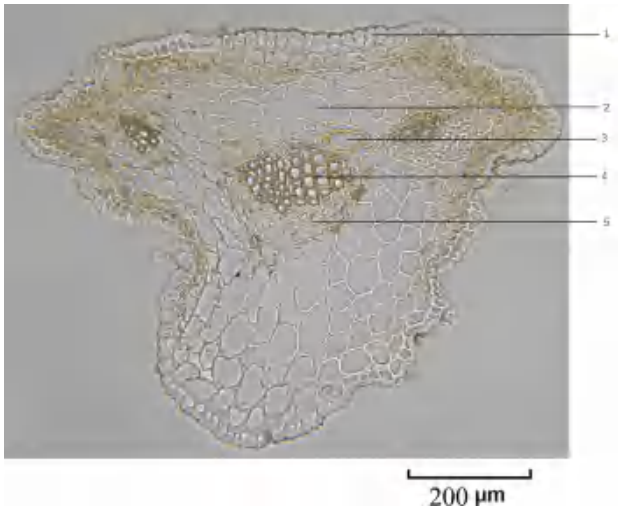


图 10　太行菊叶柄横切面图

Fig 10　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih petiole

1. 表皮（epidermis）；2. 皮层（cortex）；3. 油管（vittae）；4. 维管束（木质部）[vascular bundle（xylem）]；5. 维管束（韧皮部）[vascular bundle（phloem）]

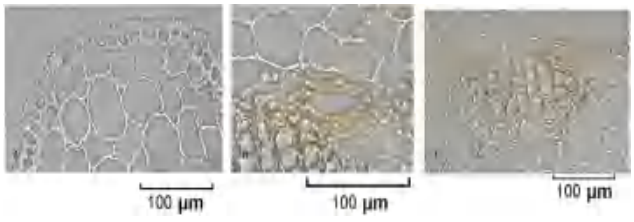


图 11　太行菊叶柄横切面图（局部）

Fig 11　Detailed view of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih petiole（partial part）

A. 表皮（epidermis）；B. 油管（vittae）；C. 维管束（vascular bundle）

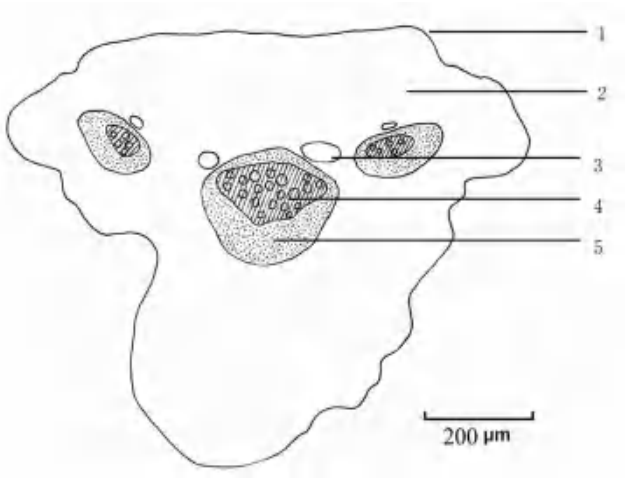


图 12　太行菊叶柄横切面简图（×100）

Fig 12　Schematic diagram of cross-section of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih petiole（×100）

1. 表皮（epidermis）；2. 皮层（cortex）；3. 油管（vittae）；4. 维管束（木质部）[vascular bundle（xylem）]；5. 维管束（韧皮部）[vascular bundle（phloem）]

3.4　粉末显微特征

本品粉末淡褐色。腺鳞头部多细胞或单细胞，多细胞腺鳞头部呈鞋底状。非腺毛 T 型，柄极短。茎表皮细胞呈长条形、不规则形或长椭圆形，大小不一，排列紧密，细胞有棕红色内含物。叶表皮气孔不定式。茎下皮层细胞类长方形。薄壁细胞类长方形。髓部厚壁细胞纹孔及孔沟明显。纤维多呈束，壁薄。具缘纹孔导管多见。花冠表皮细胞扁平，排列紧密；花粉粒近球形，直径约 30 μm，花粉粒外壁表面具刺状突起，具 3 孔沟（见图 13 ～ 14）。

4　结论

通过对太行菊的性状及显微鉴别研究发现，太行菊具有以下特征：太行菊的茎细瘦、木质化、短且弧曲，此点与菊科其他品种有差别。太行菊冠毛呈芒片状、大小和长短不等且全部生长在瘦果背面顶端，而菊科菊属植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat.、野菊 *Chrysanthemum indicum* Linnaeus 的瘦果均无冠毛，太行菊冠毛的形态特征和着生部位与菊科其他品种明显不同。太行菊头状花序直径 2 ～ 3.5 cm，野菊的头状花序直径 1.5 ～ 2.5 cm，菊的头状花序直径 3 ～ 15 cm。就新鲜的头状花序的大小而言，野菊明显小于太行菊，太行菊明显小于菊；另外，野菊的舌状花为黄色，太行菊的舌状花为浅黄色或白色。太行菊全株具类似侧柏的香气，香气特异，此点也与菊科其他品种不同。从显微特征来看：太行菊与菊

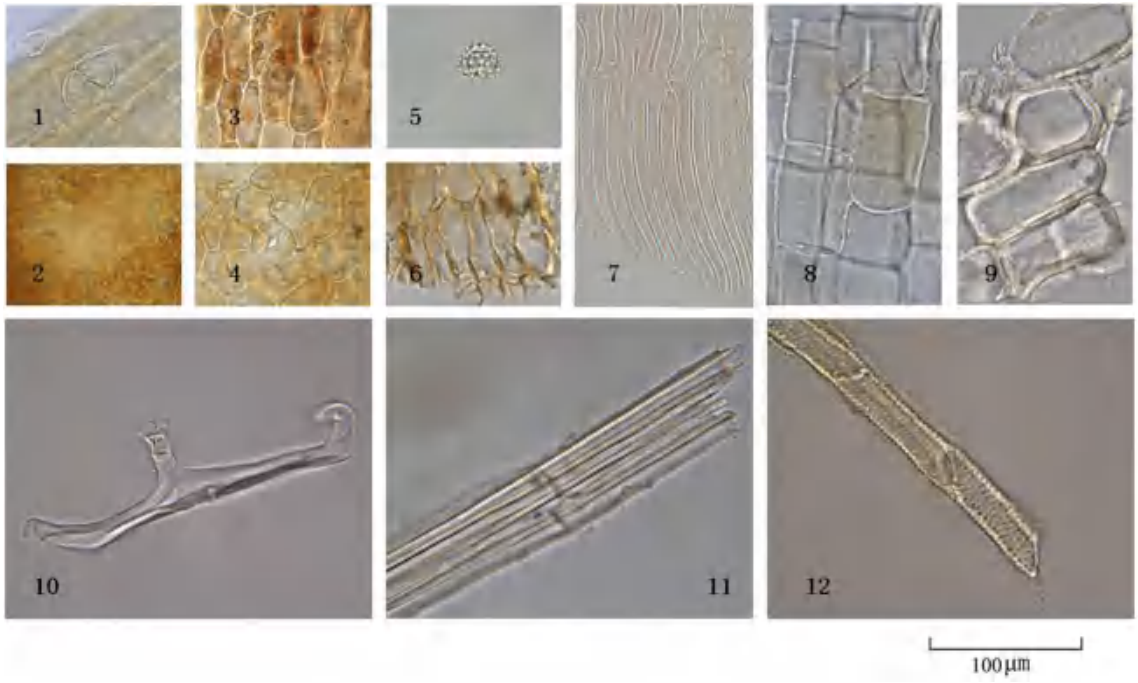


图 13　太行菊粉末显微特征详图

Fig 13　Detailed view of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih powders

1. 茎表面腺鳞（头部多细胞）[stem surface glandular scale（multicellular head）]；2. 茎表面腺鳞（头部单细胞）[stem surface glandular scale（unicellular head）]；3. 茎表皮（stem epidermis）；4. 叶表面气孔（stoma of leaf epidermis）；5. 花粉粒（pollen）；6. 茎下皮层细胞（stem subcortex cell）；7. 花冠表皮（corolla epidermis）；8. 薄壁细胞（parenchyma cell）；9. 髓厚壁细胞（pith sclerenchyma cell）；10. T 型非腺毛（T-type nonglandular hair）；11. 纤维束（fiber bundle）；12. 导管（vessel）

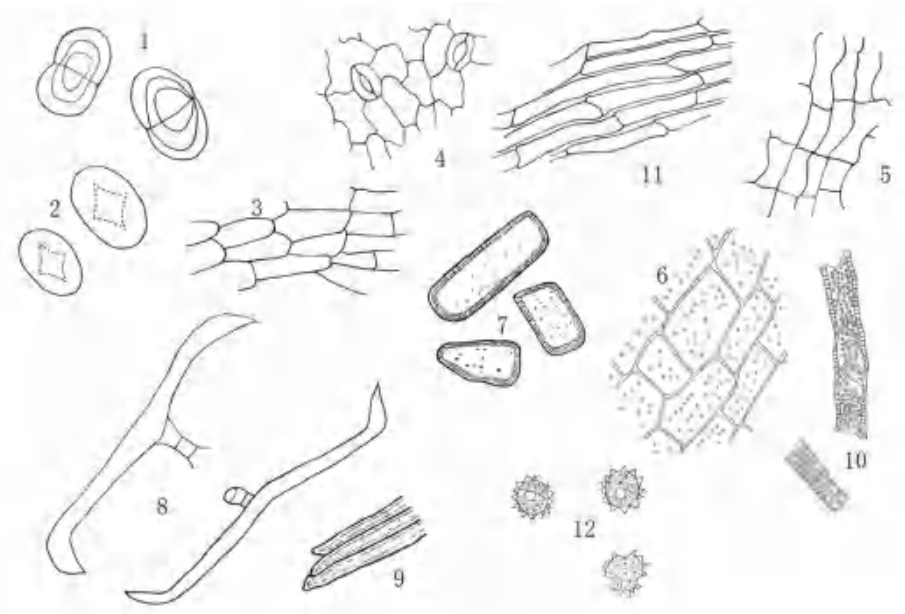


图 14　太行菊粉末显微特征简图（×40）

Fig 14　Characteristic view of *Opisthopappus taihangensis*（Ling）Shih powders（×40）

1. 茎表面腺鳞（头部多细胞）[stem surface glandular scale（Multicellular head）]；2. 茎表面腺鳞（头部单细胞）[stem surface glandular scale（unicellular head）]；3. 茎表皮（stem epidermis）；4. 叶表面气孔（stoma of leaf epidermis）；5. 茎下皮层细胞（stem subcorlex cell）；6. 薄壁细胞（parenchyma cell）；7. 髓厚壁细胞（pith sclerenchyma cell）；8. T 型非腺毛（T-type nonglandular hair）；9. 纤维束（fiber bundle）；10. 导管（vessel）；11. 花冠表皮（corolla epidermis）；12. 花粉粒（pollen）

的 T 形毛两臂近等长，野菊 T 形毛的两臂为一长一短；菊与野菊的花冠表皮细胞垂周壁为波状弯曲、平周壁有细密的放射状条纹，太行菊花冠表皮细胞垂周壁平直或微弯曲、平周壁条状排列而无放射状条纹。太行菊的根、茎及叶柄横切面可见油管，非腺毛呈 T 型，可见鞋底状腺鳞；花粉粒近球形，外壁表面具刺状突起，具 3 孔沟；以上综合性状特征可作为鉴定依据。本研究可为太行菊原植物、药用部位（头状花序和地上部分）的鉴定及质量标准的制订提供参考依据。

参考文献

[1] 张光明 . 太行菊 [J]. 生物学通报，2019，54（2）：37
[2] 山西植物志编辑委员会 . 山西植物志 [M]. 第四卷 . 北京：中国科学技术出版社，2004.
[3] 丁宝章，王遂义 . 河南植物志 [M]. 第三册 . 郑州：河南科学技术出版社，1997.
[4] 河北植物志编辑委员会 . 河北植物志 [M]. 第三卷 . 石家庄：河北科学技术出版社，1991.
[5] 刘莹，孙跃枝，田转运 . 太行菊的生物学特性及保护利用 [J]. 湖北农业科学，2012，51（17）：775-3776.
[6] 梁芳，张燕，郝平安，等 . 太行菊 NAC 转录因子基因 OpNAC1 的克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种，2018，16（11）：3477-3486.
[7] 许蕊 . 林州市太行菊生产中的主要问题及对策分析 [J]. 现代园艺，2021，44（8）：184-185.
[8] 白凤麟 . 太行菊组织培养技术初探 [J]. 种子科技，2020，38（24）：1-3，11.
[9] 薛淑娟，杨江凯，陈随清 . GC-MS 结合保留指数法解析太行菊挥发油的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（15）：120-128.
[10] 葛水莲，陈建中，刘娜，等 . 太行菊总黄酮抗氧化活性及稳定性研究 [J]. 食品科技，2019，44（10）：241-245.
[11] 葛水莲，陈建中，刘娜，等 . 响应面优化大孔树脂纯化太行菊总黄酮及其降糖活性 [J]. 食品工业，2020，41（5）：107-111.
[12] 张钰倩，刘君锋，张靖楠 . 太行菊提取物的抑菌作用研究 [J]. 生物技术世界，2016（1）：15，18.
[13] 于琨，张小龙，赵婷，等 . 太行菊提取物对乙型肝炎病毒的抑制作用 [J]. 药物评价研究，2016，39（1）：61-65.

（收稿日期：2023-01-19；修回日期：2023-03-28）

景参浓缩丸高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种成分的含量测定

杨玉畅，许煜晨，刘曼婷，胡盼祥，王开心，董晓旭，尹兴斌，倪健*，曲昌海*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 建立景参浓缩丸高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，并对丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷进行含量测定。**方法** 采用 Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为甲醇 -0.1% 磷酸水，梯度洗脱；检测波长 278 nm；流速 1.0 mL·min^{-1}；柱温 35 ℃；进样量 10 μL，根据 11 批样品的色谱图数据建立景参浓缩丸的指纹图谱并确立共有峰；通过 HPLC 法测定基准样品中丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷的含量。**结果** 11 批景参浓缩丸的 HPLC 图谱中有 23 个共有峰，相似度＞ 0.99，指认了其中红景天苷、特女贞苷、丹酚酸 B、柳穿鱼叶苷、柚皮苷、新橙皮苷、丹参酮Ⅰ、隐丹参酮、丹参酮$ⅡA$ 9 个色谱峰成分；所建立的 3 种指标成分含量测定方法稳定性、重复性、线性关系、加样回收率良好，符合要求。**结论** 所建立的景参浓缩丸 HPLC 指纹图谱和指标成分的含量测定方法具有良好的稳定性和重复性，可为景参浓缩丸质量控制提供参考。

关键词：景参浓缩丸；指纹图谱；柚皮苷；新橙皮苷；丹酚酸 B

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2448-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.031

HPLC fingerprints of Jingshen compact pills and content determination of three components

YANG Yu-chang, XU Yu-chen, LIU Man-ting, HU Pan-xiang, WANG Kai-xin, DONG Xiao-xu, YIN Xing-bin, NI Jian*, QU Chang-hai* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Jingshen compact pills, and to determine the content of salvianolic acid B, salidroside, and specnuezhenide in the pills. **Methods** Agilent Eclipse Plus C_{18} (4.6 mm× 250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.1% phosphoric acid as the mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was 278 nm, the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the injection volume was 10 μL, and the temperature was 35 ℃. **Results** In the HPLC fingerprint, 23 common peaks were marked. The similarity of the 11 sample batches was greater than 0.99. Totally 9 column peaks were identified: salidroside, specnuezhenide, salvianolic acid B, pectolinarin, naringin, neohesperidin, tanshinoneⅠ, cryptotanshinone, and tanshinone $ⅡA$. **Conclusion** The characteristic fingerprints can be used for the quality control of Jingshen compact pills.

Key words: Jingshen compact pill; fingerprint; salidroside; specnuezhenide; salvianolic acid B

景参浓缩丸由酒女贞子、丹参、山楂、大蓟、神曲、枳实、三七共 7 味中药组成，方中酒女贞子为君药，具有滋补肝肾的功效，山楂、丹参、三七为臣药，大蓟、枳实、神曲为佐使药，共同配伍发挥活血祛瘀、通经止痛的作用[1]。山楂、神曲皆有行气消食、化浊降脂的功效，两者同用显著缓解患者食积不化的症状[2]。丹参中主要药理成分丹酚酸 B 具有抗氧化[3-4]、降血压[5]、清除氧自由基、抑制

基金项目：北京市自然科学基金面上项目（No.7202123）。

作者简介：杨玉畅，男，硕士，主要从事药物制剂新技术及递药系统研究，email：yyc980276877@163.com *通信作者：曲昌海，男，副研究员，主要从事药物制剂新技术及递药系统研究，email：quchanghai@bucm.edu.cn；倪健，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：njtcm@263.net

细胞凋亡[6]、降血糖[7]等作用，有潜力成为临床治疗动脉粥样硬化候选用药[8]。枳实中含有的柚皮苷具有调节血脂[9]、抗炎、抗氧化[10]等药理作用。新橙皮苷对于人体内糖脂代谢具有良好的调节作用[11]。

景参浓缩丸作为中药复方制剂，化学成分相对复杂，具有有效成分多、杂质多、含量差异大、作用机制复杂等特点，因此，对于其中物质基准的控制相对困难。而中药指纹图谱作为一种质量评价方法，能够对中药复方的主要成分、组成特征进行整体性评价，具有科学性、规范性等特点[12-13]。因此，本研究采用高效液相色谱法（HPLC）建立了景参浓缩丸的指纹图谱，并同时测定其中 3 种成分的含量，以期为相关制剂的开发与研究提供思路。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱仪（Thermo Fisher 公司）；MS105DU 型电子分析天平（0.01 mg，瑞士梅特勒·托利多仪器有限公司）；ZDHW 型调温电热套（北京市中兴伟业仪器有限公司）；SS-1022 型高速多功能粉碎机（武义海纳电器有限公司）；JY6002 型电子分析天平（0.01 g，上海衡平仪器仪表厂）；DZF-6050 型真空干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；KQ-3200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；RE-52A 型旋转蒸发器（上海振捷试验设备有限公司）。

1.2 试药

柚皮苷（批号：110722-202116，纯度：93.5%）、新橙皮苷（批号：11857-201804，纯度 99.4%）、特女贞苷（批号：11926-201605，纯度：93.3%）、丹酚酸 B（批号：11562-201917，纯度 96.6%）、红景天苷（批号：110818-201708，纯度：98.8%）、柳穿鱼叶苷（批号：111728-201703，纯度：99.6%）、丹参酮Ⅰ（批号：110867-201607）、丹参酮ⅡA（批号：110766-202022，纯度：98.9%）、隐丹参酮（批号：110852-201807，纯度：99.0%）（中国食品药品检定研究院）。乙腈、甲醇（色谱纯，Fisher 公司）；水为高纯水，其他化学试剂均为分析纯。

三七（批号：YG014-190910，北京盛世龙药业有限公司）；山楂（批号：190302，安徽宏信药业发展有限公司）；酒女贞子（批号：20201204）、枳实（批号：20210103）、丹参（批号：20200301）（安国市奉义药业集团有限公司）；大蓟（批号：C2542102001）、神曲（批号：C4832101001）（河北荷花池药业有限公司）。所有药材经北京亚东生物制药有限公司研究助理王丽飞鉴定，符合《中国药典》2020 年版规定。

11 批景参浓缩丸，自制，编号依次为 S1 ～ S11。

2 景参丸指纹图谱分析

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱（4.6 mm× 250 mm，5 μm）；流动相为甲醇（A）-0.1% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 30 min，5% ～ 27%A；30 ～ 72 min，27% ～ 40%A；72 ～ 90 min，40% ～ 65.5%A；90 ～ 120 min，65.5% ～ 94%A），流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 278 nm，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。理论板数按红景天苷峰计算应不低于 8000。

2.2 供试品溶液制备

取景参浓缩丸样品适量，放入高速粉碎机内粉碎成细粉，精密称定 1 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 70% 甲醇，称重，超声处理 30 min 后，再次称重，70% 甲醇补足失重，混匀。滤过，取续滤液即得。

2.3 混合对照品溶液

精密称取各对照品适量，加 70% 甲醇制成含红景天苷 0.070 mg·mL^{-1}、特女贞苷 0.250 mg·mL^{-1}、柳穿鱼叶苷 0.231 mg·mL^{-1}、丹酚酸 B 0.100 mg·mL^{-1}、丹参酮ⅡA 0.219 mg·mL^{-1}、丹参酮Ⅰ 0.310 mg·mL^{-1}、隐丹参酮 0.260 mg·mL^{-1}、柚皮苷 0.211 mg·mL^{-1}、新橙皮苷 0.201 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4 单味药材供试品溶液的制备

称取各单味药材适量，粉碎成细粉，按处方量精密称定，按“2.2”项下方法制备单味药材供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 按“2.2”项下方法制备景参浓缩丸（S1）供试品溶液，连续进样 6 针，因丹酚酸 B 保留时间适中，分离度高，故以 12 号峰丹酚酸 B 为参照峰，计算得 23 个共有峰相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，相对保留时间的 *RSD* 均小于 1.0%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 按“2.2”项下方法平行制备景参浓缩丸（S1）供试品溶液 6 份。按“2.1”项下色谱方法进样测定，以 12 号峰丹酚酸 B 为参照峰，计算得 23 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 *RSD* 分别小于 5.0% 和 1.0%，表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备景参浓缩丸（S1）供试品溶液，按“2.1”项下色谱方法在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，计算得 23 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 *RSD* 分别小于 3.0% 和 1.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 景参丸指纹图谱的建立及分析

2.6.1 对照指纹图谱的建立 按“2.2”项下制备方法，制备 11 批景参浓缩丸供试品溶液，按

照“2.1”项下色谱方法进样测定，将得到的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012）”，设置 S1 图谱为参照图谱，经过多点校正后进行全谱峰匹配（时间窗为 0.2 min）用中位数法生成景参浓缩丸指纹图谱的共有模式。选择吸收较强、稳定性好、特征较明显的色谱峰为共有峰，标定了 23 个共有峰，生成对照图谱，见图 1。11 批景参浓缩丸样品的指纹图谱见图 2。

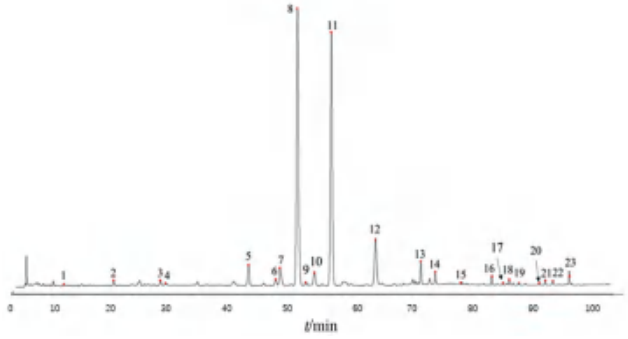


图 1　景参浓缩丸对照指纹图谱

Fig 1　Reference fingerprint of Jingshen compact pills by HPLC

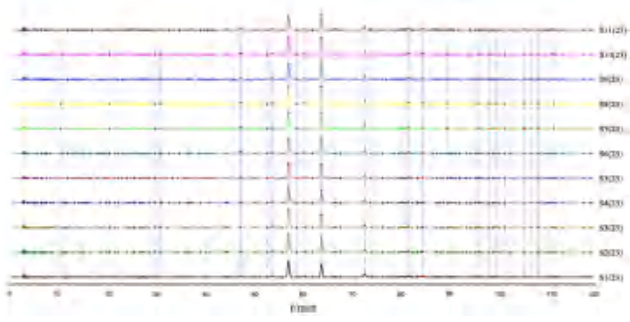


图 2　十一批景参浓缩丸样品的 HPLC 指纹图谱

Fig 2　HPLC fingerprint of 11 batches of Jingshen compact pills

2.6.2　主要色谱峰的指认　相同色谱条件下，将对照品、样品的色谱峰保留时间及色谱图进行比对，指认了 9 个色谱峰：2 号峰为红景天苷，8 号峰为柚皮苷，9 号峰为特女贞苷，11 号峰为新橙皮苷，12 号峰为丹酚酸 B，14 号峰为柳穿鱼叶苷，20 号峰为丹参酮Ⅰ，21 号峰为隐丹参酮，23 号峰为丹参酮ⅡA（见图 3）。

2.6.3　共有峰归属　取各单味药材供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图及共有峰出峰时间，对景参浓缩丸指纹图谱的色谱峰进行归属。由图 4 可见，23 个共有峰中，14 号峰来源于大蓟；12、20、21、22、23 号峰来源于丹参；1、2、9 号峰来源于酒女贞子；4 号峰来源于山楂；3、5、6、7、8、10、11、13、15、16、17、18 号峰来源于枳实；19 号峰共同来源于丹参、枳实、酒女贞子、三七。经查阅文献，神曲主要药效成分为淀粉酶、青蒿素等成分[14]，

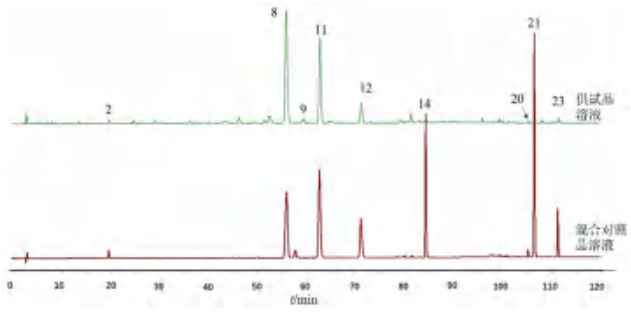


图 3　混合对照品溶液与供试品溶液的色谱图

Fig 3　HPLC chromatogram of reference solution and sample solution

2. 红景天苷（salidroside）；8. 柚皮苷（naringin）；9. 特女贞苷（specnuezhenide）；11. 新橙皮苷（neohesperidin）；12. 丹酚酸 B（salvianolic acid B）；14. 柳穿鱼叶苷（pectolinarin）；20. 丹参酮Ⅰ（tanshinoneⅠ）；21. 隐丹参酮（cryptotanshinone）；23. 丹参酮$ⅡA$（tanshinone ⅡA）

而青蒿素仅在 203 nm 处有较弱末端吸收，因此在此吸收波长下，神曲未有共有峰归属。

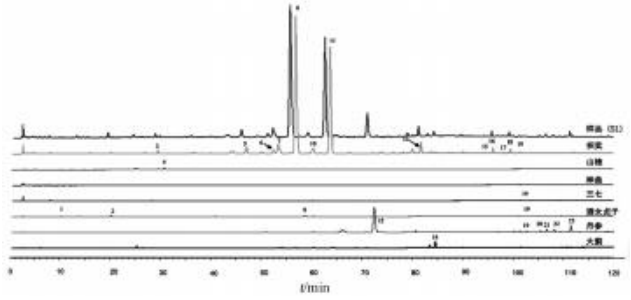


图 4　单味药材溶液与供试品溶液的 HPLC 图

Fig 4　HPLC chromatogram of single medicinal materials and the sample

2.6.4　相似性评价　对 11 批样品指纹图谱进行相似度评价，结果显示其与对照图谱的相似度均大于 0.99，各批间样品相似度均大于 0.97，说明景参浓缩丸制备工艺稳定，不同批次中的化学成分种类差异不大，结果见表 1。

2.7　聚类分析（CA）

以相似度为变量，通过 SPSS 20.0 软件运用组间对比法对 11 批景参浓缩丸相似度进行系统聚类分析。结果显示，11 批景参浓缩丸样品可以划分成 2 类，第一类为 S1 ～ S4；第二类为 S5 ～ S11，见图 5。

2.8　主成分分析（PCA）

将 22 个共有峰的峰面积采用 Z-Score 标准化处理后导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析，结果如图 6 所示。模型建立结果显示，本研究提取 2 个主成分，累计方差贡献值达到 76.6%，提示这 2 个主成分（成分一代表峰 3、4、7、15、16、17、18；成分二代表峰 5、10、11、12、19、20、21、22、23）能够代表其中绝大部分信息。11 批

表 1　11 批景参浓缩丸相似度评价结果

Tab 1　Similarity of HPLC fingerprint for 11 batches of Jingshen compact pill

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
S1	1.000	1.000	0.999	0.999	0.990	0.991	0.991	0.983	0.984	0.986	0.984	0.995
S2	0.981	1.000	1.000	1.000	0.991	0.992	0.992	0.984	0.985	0.987	0.985	0.995
S3	0.999	0.973	1.000	1.000	0.990	0.991	0.990	0.983	0.983	0.986	0.983	0.995
S4	0.999	1.000	0.974	1.000	0.990	0.991	0.990	0.982	0.983	0.985	0.983	0.994
S5	0.990	0.991	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999
S6	0.991	0.992	0.991	0.991	0.971	1.000	1.000	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999
S7	0.991	0.992	0.990	0.990	1.000	0.986	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
S8	0.983	0.984	0.983	0.982	0.999	0.998	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	0.997
S9	0.984	0.985	0.983	0.983	0.999	0.998	0.999	0.994	1.000	1.000	1.000	0.997
S10	0.986	0.987	0.986	0.985	1.000	0.999	0.999	1.000	0.991	1.000	1.000	0.998
S11	0.984	0.985	0.983	0.983	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	0.997
R	0.995	0.995	0.995	0.994	0.999	0.999	0.999	0.997	0.997	0.998	0.997	1.000

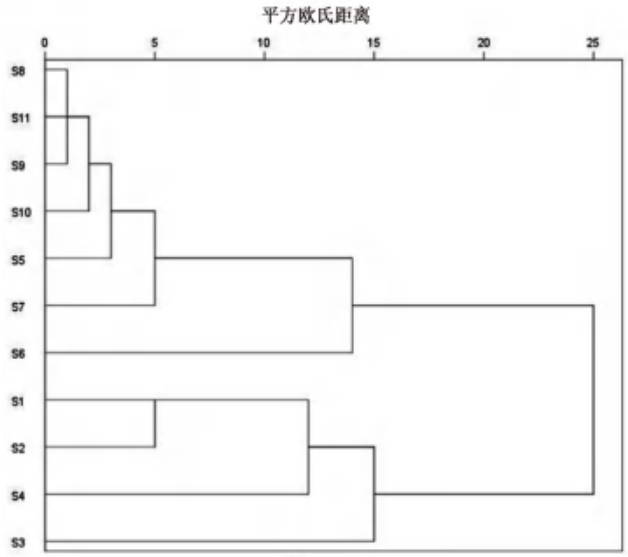


图 5　11 批景参浓缩丸的聚类分析树状图

Fig 5　Cluster analysis of 11 batches of Jingshen compact pill

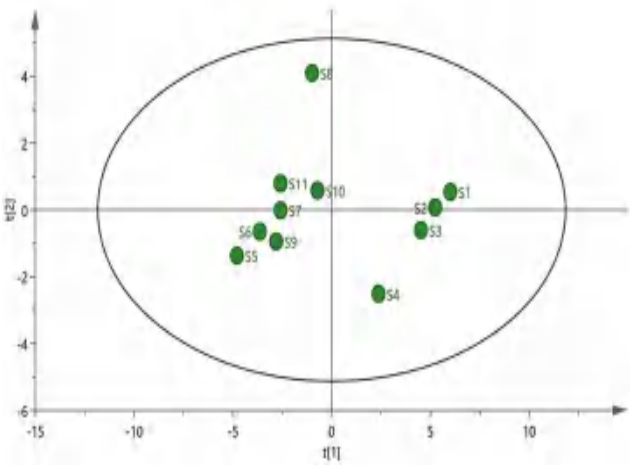


图 6　主成分分析得分图

Fig 6　Principal component analysis score

景参浓缩丸样品可分为两类，其中 S1 ～ S4 是一类，S5 ～ S11 是一类，结果与聚类分析结果一致。表明不同批次含量样品各成分含量存在差异。

2.9　正交偏最小二乘法 - 判别分析（PLS-DA）

采用 PLS-DA，并筛选变量重要性投影（VIP），结果如图 7 所示。由 PLS-DA 得分图（见图 7A）可知，11 批景参浓缩丸被分为两类，其中 S1 ～ S4 是一类，S5 ～ S11 是一类，与聚类分析、主成分分析结果一致。VIP 图（见图 7B）显示，峰 8（柚皮苷）、峰 11（新橙皮苷）的 VIP 值分别为 1.05、1.09，提示柚皮苷与新橙皮苷等成分可能是影响景参浓缩丸的特征成分。

3　含量测定

新橙皮苷与柚皮苷为影响景参浓缩丸样品质量的特征成分，而丹酚酸 B 作为丹参中主要水溶性成分，是景参浓缩丸活血通经、祛瘀止痛的主要活性成分[15]。因此，建立同时测定这 3 种成分的液相方法。

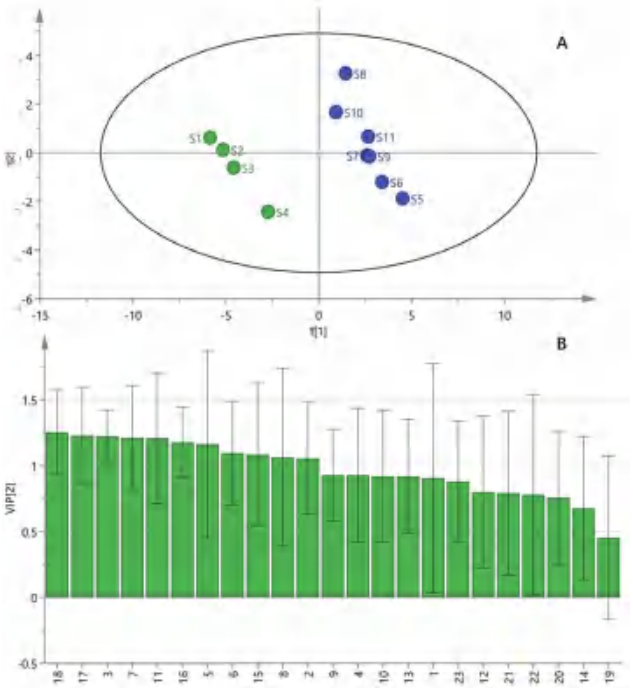


图 7　11批景参浓缩丸 PLS-DA 得分图（A）及各共有峰的 VIP 图（B）

Fig 7　Score scatter plot of PLS-DA analysis（A）and VIP plot（B）of 11 batches of Jingshen compact pill

3.1　色谱条件

Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱（4.6 mm× 250 mm，5 μm）；流动相为甲醇（A）-0.1% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 30 min，5% ～ 27%A；30 ～ 72 min，27% ～ 40%A；72 ～ 90 min，40% ～ 65.5%A；90 ～ 120 min，65.5% ～ 94%A），流速 1.0 mL・min^{-1}，检测波长 278 nm，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。

3.2　溶液的配制

称取丹酚酸 B、新橙皮苷、柚皮苷对照品适量，加 70% 甲醇制成质量浓度分别为 0.5593、0.8558、0.9826 mg・mL^{-1} 的混合对照品溶液，摇匀，即得。供试品溶液配制方法同“2.2”项下。

3.3　专属性试验

取空白对照（70% 甲醇）、供试品和对照品溶液适量，按“3.1”项下色谱条件进样测定，在丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷对照品的保留时间上，对照品均有相应色谱峰出现，空白溶剂无干扰，结果见图 8。

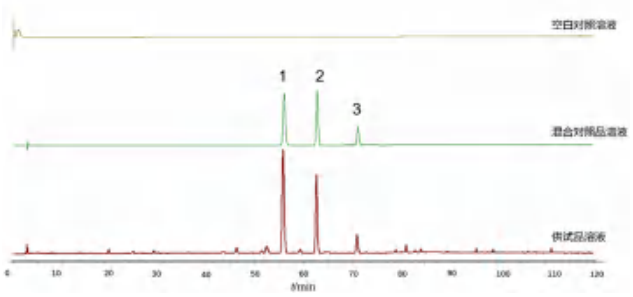


图 8　景参浓缩丸色谱图

Fig 8　HPLC chromatogram of Jingshen compact pill

1. 柚皮苷（salidroside）；2 新橙皮苷（specnuezhenide）；3. 丹酚酸 B（salvianolic acid B）

3.4　线性关系考察

吸取“3.2”项下混合对照品溶液适量，用 70% 甲醇稀释，制成一系列不同质量浓度的混合对照品溶液，进样测定，以质量浓度为横坐标（*X*），以峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归分析，结果见表 2。

表 2　线性关系考察结果

Tab 2　Linearity of Jingshen compact pill

成分	回归方程	*r*	范围 /（μg・mL^{-1}）
丹酚酸 B	$y = 16.32x - 2.357$	0.9994	27.97 ～ 279.66
柚皮苷	$y = 58.24x - 1.114$	0.9999	49.13 ～ 419.30
新橙皮苷	$y = 51.45x - 1.013$	0.9999	42.79 ～ 427.92

3.5　精密度试验

取“3.2”项下混合对照品溶液，进样测定，连续进样 6 次，结果显示 3 种成分的峰面积 *RSD* 均＜ 1%，表明仪器具有良好的精密度。

3.6　稳定性试验

取同一批景参浓缩丸供试品溶液（S1），在制备后 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 按“3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示 3 种成分含量的 *RSD* 均＜ 3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.7　重复性试验

取供试品溶液适量，按“3.1”项下色谱条件进样测定。结果显示 3 种成分的 *RSD* 均＜ 3%，表明该方法重复性良好。

3.8　加样回收试验

取含量已知样品（S1）共 6 份，每份精密称定 1 g，分别加入已知含量的 100% 的丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷的对照品，按“3.3”项下方法平行制样后，进样测定。结果表明，丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷的平均回收率在 98.99% ～ 105.01%，*RSD* 均＜ 3.0%，表明方法准确度良好。

3.9　样品含量测定

取 11 批景参浓缩丸样品，按“2.2”项下方法进行制备，并进样测定，计算浓缩丸中丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷的含量，结果见表 3。

表 3　11 批浓缩丸含量测定 (mg・g^{-1})

Tab 3　Content of 3 batches of Jingshen compact pill (mg・g^{-1})

批号	丹酚酸 B 含量	柚皮苷含量	新橙皮苷含量
2008001	18.70	31.60	20.15
2011002	16.92	35.19	22.52
2011003	16.59	34.75	21.81
2011004	15.22	33.29	20.77
2011005	14.07	28.61	23.93
2011006	15.70	28.92	23.81
2011007	15.00	30.80	25.62
2103001	17.10	30.81	28.35
2103002	15.84	29.51	26.96
2103003	15.62	31.34	27.81
2105004	15.74	28.28	25.74
平均值	16.05	31.19	24.32
RSD/%	7.72	7.63	11.56

3.10　含量测定成分的聚类分析

对 11 个批次景参浓缩丸进行系统聚类分析（cluster analysis，CA）。结果显示，以平方欧氏距离为 10 计算样品相似程度，11 批景参浓缩丸样品可以划分成两类，第一类为 S1 ～ S4；第二类为 S5 ～ S11（见图 9）。

4　讨论与结论

4.1　色谱条件考察

基于现有的文献报道 [16] 及 2020 年版《中国药典》，试验考察了乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 磷酸、乙腈 -0.01% 磷酸作为流动相；比较了 Agilent Eclipse

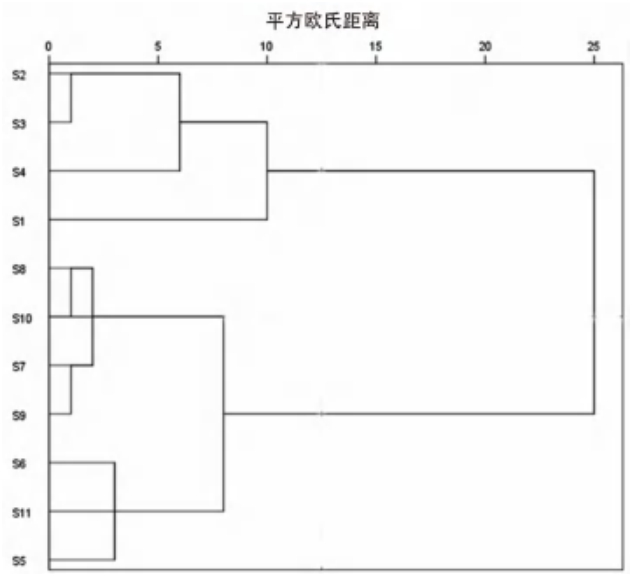


图 9　11 批景参浓缩丸的聚类分析树状图

Fig 9　Cluster analysis of 11 batches of Jingshen compact pill

Plus C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）和 Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）的分离效果；考察了 UltiMate 3000 高效液相色谱仪与岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪之间的差别，以及在 203 nm 和 278 nm 波长下色谱峰的吸收强度。经过对比发现，选择本文色谱方法时，色谱峰有良好的峰形和分离度，基线较为平稳，方法具有耐用性。

4.2　指纹图谱的相似度评价

11 批景参浓缩丸样品与对照图谱的相似度均大于 0.99，各批间样品相似度均大于 0.97，说明各不同产地、不同批次供试品之间的化学成分种类差异较小，制备工艺稳定，产品一致性良好。对 11 批景参浓缩丸的相似度和 3 种含测指标成分进行聚类分析，结果均显示 S1 ～ S4 被归为一类，S5 ～ S11 被归为一类。可能是由于不同批次景参浓缩丸样品制备时投料用饮片不同，导致有效成分含量具有一定差异，且枳实、丹参饮片中有效成分含量的差异对于聚类分析结果影响最大，这提示我们要加强饮片市场的质量检测力度，以期保证不同批次药品质量的均一稳定。

4.3　用于景参浓缩丸整体重控制的分析

本研究利用高效液相色谱法，通过优化供试品溶液的提取方法和色谱条件，建立了包括丹酚酸 B、柚皮苷、新橙皮苷等 23 个共有峰的指纹图谱测定方法，并且采用了化学分析方法考察不同批次景参丸样品的区别，结果表明，丹酚酸 B、新橙皮苷、柚皮苷含量较高，对不同批次景参浓缩丸差异性影响较大，并且这 3 种有效成分的药理活性均与景参浓缩丸活血祛瘀、通经止痛的治疗理念紧密相关，因此，对它们进行含量测定，可为景参浓缩丸的治疗标准研究提供参考。

综上所述，本研究建立了景参浓缩丸的指纹图谱以及方中 3 种成分的含量测定方法，能够对景参浓缩丸生产过程中的物质基准进行有效控制，对于景参浓缩丸工业化生产具有指导意义 [17]。

参考文献

[1] 白杰，蔡梦如，张志勤，等 . 景参丸中红景天苷和丹酚酸 B 含量测定方法的建立及干燥工艺考察 [J]. 上海中医药大学学报，2022，36（1）：20-26.

[2] 耿亚，马月香，许海玉，等 .《中药成方制剂》含山楂方剂用药规律研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（15）：2932-2937.

[3] Xiao Z，Liu W，Mu YP，et al. Pharmacological effects of salvianolic acid B against oxidative damage [J]. Front Pharmacol，2020，11：572373.

[4] Zhang Q，Liu J，Duan H，et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling：an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. J Adv Res，2021，34：43-63.

[5] 周才杰，刘江琦，高晗，等 . 丹酚酸 B 对原发性高血压大鼠的降压作用机制研究 [J]. 中药新药与临床药理，2013，24（4）：374-379.

[6] 任正肖，张颖颖 . 丹酚酸 B 的化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 山东化工，2019，48（13）：74-75，82.

[7] Bai Y，Bao X，Mu Q，et al. Ginsenoside Rb_1，salvianolic acid B and their combination modulate gut microbiota and improve glucolipid metabolism in high-fat diet induced obese mice [J]. Peer J，2021，9：e10598.

[8] 张一凡，丁洁，杜敏，等 . 丹酚酸 B 对小鼠动脉粥样硬化病变和巨噬细胞胞葬作用的影响及其机制 [J]. 吉林大学学报（医学版），2022，48（3）：561-567.

[9] 杨新荣，窦霞，李国峰，等 . 柚皮苷药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（10）：3226-3240.

[10] Bharti S，Rani N，Krishnamurthy B，et al. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin：a review [J]. Planta Med，2014，80（6）：437-451.

[11] 阎优优 . 新橙皮苷的体内外糖脂代谢调节作用及其机制研究 [D]. 杭州：浙江大学，2014.

[12] 南俊伶，王超众，闫广利，等 . 山豆根药材 UPLC-UV 及 3 种成分含量测定研究 [J]. 中南药学，2022，20（4）：910-915.

[13] 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.

[14] 王海凤，李季静 . HPLC 法测定复方青蒿安乃近片中青蒿素的含量 [J]. 首都食品与医药，2016，23（10）：74-75.

[15] 高兵 . 丹参的药理作用及临床应用分析 [J]. 中国现代药物应用，2018，12（1）：196-197.

[16] 高宇明，谢艳，张亚琴，等 . 不同产地丹参质量评价及指纹图谱研究 [J]. 亚太传统医药，2020，16（9）：77-81.

[17] 代云桃，靳如娜，吴治丽，等 . 基于标准汤剂（物质基准）的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（2）：164-174.

（收稿日期：2023-02-02；修回日期：2023-04-28）

多潘立酮片有关物质检测方法优化和一致性评价研究

王发，李继，杜玮，妙苗，刘雪峰，乔荣霞*（陕西省食品药品检验研究院，西安 710065）

摘要：目的 优化多潘立酮片有关物质检测方法，并与原研药进行有关物质一致性评价研究。**方法** 采用资生堂 MG C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，流动相为甲醇 -0.5% 乙酸铵溶液 -0.5% 乙酸铵溶液（用冰乙酸调节 pH 值为 4.5），梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 285 nm，柱温为 35 ℃。已知杂质为加校正因子的自身对照法，未知杂质为不加校正因子的自身对照法。取 62 批样品置于温度 40 ℃、相对湿度 75% 条件下放置 6 个月，分别于第 1、3、6 个月取样测定有关物质。**结果** 在建立的色谱条件下，主峰与已知杂质峰及其他未知杂质峰分离良好，各已知杂质的线性关系良好，回收率为 93.15% ～ 107.53%。62 批次样品中，有 42 批次样品中检出基因毒性杂质 1-（3- 氯丙基）-1，3 二氢苯并咪唑 -2- 酮（杂质 G），其他单个杂质量均≤ 0.16%，杂质总量≤ 0.45%。在加速 6 个月过程中，所有样品杂质 A、杂质 C 均有增大趋势，其他杂质无明显变化。**结论** 该方法灵敏度高，专属性好，可用于多潘立酮片中有关物质的分析研究。

关键词：多潘立酮片；有关物质；高效液相色谱；一致性评价

中图分类号：R917，R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2454-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.032

Optimization of content determination of related substances and consistency evaluation of related substances in domperidone tablets

WANG Fa, LI Ji, DU Wei, MIAO Miao, LIU Xue-feng, QIAO Rong-xia* (*Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an* 710065)

Abstract: Objective To optimize the determination of related substances in domperidone tablets, and compare the consistency of related substances with the original preparation. **Methods** The separation was performed on Shiseido MG C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with gradient elution of the mobile phase consisting of methanol-0.5% ammonium acetate solution-0.5% ammonium acetate solution (pH 4.5). The flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the detection wavelength was 285 nm, and the column temperature was 35 ℃. The known impurities was quantitatively determined by main component self-comparing with relative response factors. The unknown impurities were determined by main component self-comparing method without relative response factor. The reference preparations and self-developed preparations were placed at 40 ℃ and 75% relative humidity for 6 months, and samples were taken in the 1st, 3rd and 6th month to determine the content of related substances. **Results** The main peak was well separated from the known impurity peaks and other degraded impurity peaks, and the linearity of the known impurities was good. The recoveries of the known impurities were between 93.15% and 107.53%. Genotoxic impurity G was detected in 42 of the 62 sample batches. Other single impurity content was no more than 0.16% and the content of total impurity was no more than 0.45%. In the process of 6 months acceleration impurity A and impurity C increased, while other impurities had no obvious change. **Conclusion** The method is sensitive and specific, which can be used for the study of related substances in domperidone tablets and quality consistency evaluation.

Key words: domperidone tablet; related substance; HPLC; consistency evaluation

基金项目：陕西省重点研发计划（No. 2021SF-304）。

作者简介：王发，男，副主任药师，主要从事药品的分析检验研究和质量标准研究工作，email：wangf1974@126.com *通信作者：乔荣霞，女，主任药师，主要从事药品、食品的分析检验研究和质量标准研究工作，email：1260862639@qq.com

多潘立酮是一种苯丙咪唑类衍生物，是作用较强的多巴胺受体拮抗剂，通过松弛肌间神经丛的突触后胆碱能神经元，对多巴胺起抑制作用，临床多用于治疗各种原因引起的恶心、呕吐及促进胃肠蠕动以缓解消化不良、腹胀、嗳气等症状[1-3]。国外现行药典均未收载多潘立酮片质量标准，欧洲药典 EP 和日本药局方 JP 收载有多潘立酮原料药的质量标准。国内 21 个生产企业的多潘立酮片分别执行 6 个质量标准[4-9]，所有质量标准均采用高效液相色谱法控制有关物质。但在检验中发现：一是现行药典标准的色谱峰记录时间为主峰保留时间的 2 倍，实际在主峰保留时间 2.5 倍附近有无法有效分离的较大杂质峰（杂质 D 和杂质 E）流出，导致检验结果低；二是各生产企业注册标准有关物质的色谱条件、同一已知杂质的校正因子、单个杂质和杂质总量的限度不一致；三是通过对多潘立酮合成路线分析，发现合成起始物 1-（3- 氯丙基）-1，3 二氢苯并咪唑 -2- 酮（以下简称杂质 G），可能残留在成品中，其结构式见图 1。该杂质结构与欧盟发布的基因杂质警示结构芳胺酰化物相似，可能为基因毒性杂质，应引起重视，但现行的多潘立酮原料及片剂的质量标准中均未进行专项控制。为解决以上问题，本文参考欧洲药典[10]多潘立酮原料药有关物质测定方法和相关文献[11-18]，优化了高效液相色谱法的色谱条件，对 EP 规定的 6 个已知杂质及潜在的基因毒性杂质 G 均进行有效分离，并通过校正因子的测定，建立了加校正因子的主成分自身对照法对多潘立酮片有关物质进行定量计算，对 62 批样品中的有关物质进行检测并进行一致性评价。

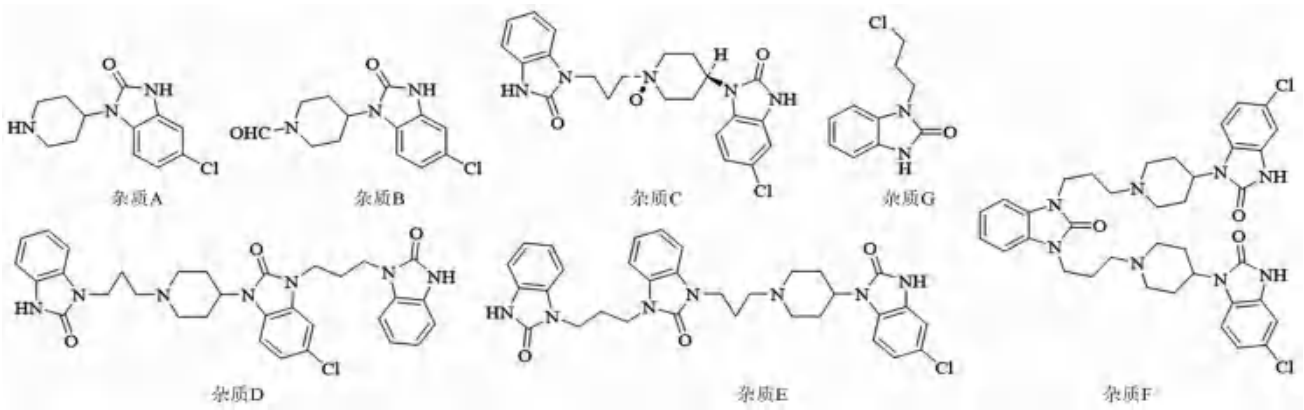


图 1 杂质 A ～ G 结构式

Fig 1 Mass spectrometry of impurity A ～ G

1 材料

戴安 U3000 高效液相色谱仪；METTLER XPE105 电子天平（精度：0.01 mg）、METTLER ME204 电子天平（精度：0.1 mg）、METTLER S210K 多参数测量酸度计（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）。

多潘立酮（批号：100304-201103，含量：99.7%）、氟哌利多（批号：100085-201102，含量：100.0%）（中国食品药品检定研究院），杂质 A（批号：PROF-0001.262.1，含量：99.2%）、杂质 B（批号：COCS-0103.097.1，含量：99.0%）、杂质 C（批号：WVLA-0054.045.1，含量：98.8%）、杂质 D（批号：LVDS-0004.042.1，含量：99.7%）、杂质 E（批号：JAN-050-004.AB.74，含量：99.7%）、杂质 F（批号：EXTE-4912.617.1，含量：99.5%）（西安杨森制药有限公司）；对照品杂质 G [华东医药（西安）博华制药有限公司，批号：DP20201002T0601，含量：99%]。21 家企业生产的多潘立酮片规格均为 10 mg，共计 62 批。其中西安杨森制药有限公司 3 批样品为原研地产化参比制剂。甲醇、*N*，*N*- 二甲基甲酰胺（DMF）为色谱纯，水为高纯水，乙酸铵和冰乙酸均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件和系统适用性

色谱柱为资生堂 MG C18（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A 为甲醇，流动相 B 为 0.5% 乙酸铵溶液，流动相 C 为 0.5% 乙酸铵溶液（用冰乙酸调节 pH 值为 4.5），按表 1 进行梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 285 nm，柱温为 35 ℃，进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

① 溶剂：甲醇 -DMF（1∶2）。

② 供试品溶液：取本品细粉适量（约相当于多潘立酮 50 mg），置 10 mL 量瓶中，加溶剂溶解后稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，作为供试品溶液。

③ 对照溶液：精密量取供试品溶液适量，用溶剂定量稀释制成每 1 mL 中约含 12.5 μg 的溶液。

表 1　流动相梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution program of mobile phases

时间 /min	流动相 /%		
	A	B	C
0	52	48	0
12	52	48	0
13	55	45	0
40	55	45	0
41	55	0	45
60	55	0	45
61	52	48	0
70	52	48	0

④ 对照品溶液：取多潘立酮杂质 A ～ G 和多潘立酮对照品各约 25 mg，精密称定，分别置 25 mL 量瓶中，用溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀。分别精密量取杂质 A ～ F、多潘立酮对照品溶液各 5 mL，杂质 G 0.5 mL 同置 50 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 2.5 mL，置 20 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀。

⑤ 系统适用性溶液：取多潘立酮对照品约 50 mg，置 10 mL 量瓶中，加 30% 过氧化氢溶液 2 mL，室温放置 2 h，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀。

2.3　*方法学验证*

2.3.1　专属性　取溶剂、对照品溶液、系统适用性溶液和供试品溶液各 10 μL，分别进样测定，结果显示溶剂对测定无干扰，各杂质峰分离符合要求，系统适用性溶液中杂质 C 和多潘立酮分离度均符合系统适用性要求。

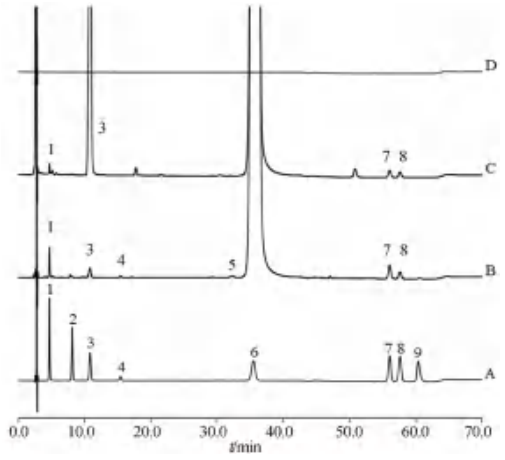


图 2　专属性色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram for specificity

A. 对照品溶液（reference solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 系统适用性溶液（system suitability solution）；D. 溶剂（solvent）；1. 杂质 A（impurity A）；2. 杂质 B（impurity B）；3. 杂质 C（impurity C）；4. 杂质 G（impurity G）；5. 未知杂质 1（unknown impurity 1）；6. 多潘立酮（domperidone）；7. 杂质 D（impurity D）；8. 杂质 E（impurity E）；9. 杂质 F（impurity F）

2.3.2　线性关系考察　分别精密量取“2.2”项下对照品储备液 0.25、0.5、1.0、1.25、2.5 和 5 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加稀释剂稀释制成系列浓度的对照品溶液。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程，结果见表 2。

表 2　已知杂质线性与范围

Tab 2　Linear ranges of the known impurities

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	定量限 /（μg • mL^{-1}）	检测限 /（μg • mL^{-1}）
多潘立酮	$Y = 1.662\times10^{4}x - 7.273\times10^{3}$	0.9998	2.54 ～ 50.70	0.51	0.10
杂质 A	$Y = 1.499\times10^{4}x - 455.27$	0.9999	2.53 ～ 50.54	0.51	0.10
杂质 B	$Y = 1.332\times10^{4}x - 301.77$	0.9999	2.49 ～ 49.82	0.50	0.10
杂质 C	$Y = 1.417\times10^{4}x - 1.299\times10^{3}$	0.9999	2.52 ～ 50.50	0.50	0.10
杂质 D	$Y = 1.483\times10^{4}x - 2.738\times10^{3}$	0.9999	2.49 ～ 49.78	0.50	0.10
杂质 E	$Y = 1.587\times10^{4}x - 4.447\times10^{3}$	0.9999	2.53 ～ 50.62	0.51	0.10
杂质 F	$Y = 1.348\times10^{4}x - 1.095\times10^{4}$	0.9987	2.54 ～ 50.74	0.51	0.10
杂质 G	$Y = 1.638\times10^{4}x - 849.41$	0.9999	0.25 ～ 5.02	0.25	0.10

2.3.3　精密度　取对照品溶液，连续进样 6 次，测得各峰面积 *RSD* 均小于 1.5%，保留时间 *RSD* 均小于 1.2%，表明本方法精密度良好。

2.3.4　重复性　制备供试品溶液 6 份，进样分析，检出杂质含量的 *RSD* 均小于 3.0%，表明本方法重复性良好。

2.3.5　检测限和定量限　取线性对照品溶液逐级稀释，进样分析，测得定量限（*S/N* 大于 10）和检测限（*S/N* 大于 3），结果见表 2。

2.3.6　回收试验　取供试品（规格：10 mg，平均装量 0.1025 g）20 片，研细，精密称取 6 份，每份约 0.25 g，分别置 10 mL 量瓶中，按 100% 限度浓度加入对照品溶液适量，按外标法计算回收率，结果杂质 A ～ G 的回收率均在 93.15% ～ 107.53%，*RSD* 在 0.70% ～ 1.8%。

2.3.7　校正因子和相对保留时间的测定　取线性对照品溶液，分别选用资生堂 MG C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）柱、安捷伦 SB C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）柱、ACE Excel C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）柱，进样测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，以标准曲线法计算 7 个杂质相对于主峰的相对校正因子，结果见表 3。

表 3　各杂质校正因子和相对保留时间

Tab 3　Response factor and relative retention time of each impurity

组分	项目	色谱柱			平均值	*RSD*/%
		1	2	3		
杂质 A	校正因子	1.11	1.16	1.13	1.13	2.2
	相对保留时间	0.13	0.15	0.16	0.15	7.9
杂质 B	校正因子	1.12	1.26	1.27	1.26	0.82
	相对保留时间	0.23	0.23	0.25	0.24	5.1
杂质 C	校正因子	1.17	1.18	1.19	1.18	0.76
	相对保留时间	0.31	0.29	0.31	0.30	3.8
杂质 D	校正因子	1.12	1.11	1.11	1.11	0.60
	相对保留时间	1.63	1.82	1.83	1.79	6.2
杂质 E	校正因子	1.05	1.03	1.04	1.04	1.1
	相对保留时间	1.67	1.87	1.83	1.79	5.9
杂质 F	校正因子	1.23	1.23	1.25	1.24	1.0
	相对保留时间	1.80	2.02	1.94	1.92	5.9
杂质 G	校正因子	1.00	1.01	1.01	1.01	0.63
	相对保留时间	0.44	0.41	0.47	0.44	6.1

2.4　样品测定

取 21 家企业的样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。供试品溶液色谱图中如有杂质峰，各已知杂质按校正后的峰面积计算（乘以校正因子）：杂质 A ～ F 不得大于对照溶液主峰面积（0.25%），杂质 G 不得大于对照溶液主峰面积的 0.1 倍（0.025%），其他杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.8 倍（0.2%）。结果杂质 A 均有检出，检出量在 0.01% ～ 0.14%；杂质 B 仅有 1 家企业检出，检出量均小于 0.02%；杂质 C 均有检出，检出量在 0.004% ～ 0.06%；杂质 D 均有检出，检出量在 0.01% ～ 0.15%；杂质 E 均有检出，检出量在 0.03% ～ 0.16%；杂质 F 有 18 家企业有检出，检出量在 0.003% ～ 0.05%；杂质 G 有 18 家企业 42 批次检出，检出量在 0.005% ～ 0.04%；各企业杂质总量在 0.14% ～ 0.45%。以上结果与杂质对照品外标法计算结果基本一致。

2.5　有关物质一致性评价

2.5.1　有关物质结果比较　西安杨森制药有限公司 3 批参比制剂样品，均检出已知杂质 A、C、D 和 E，杂质 B、F、G 均未检出，杂质总量约为 0.2%，批间一致性良好。其他 20 家企业样品主要杂质和参比制剂一致，均为杂质 A、C、D 和 E，除 2 家通过仿制药一致性评价的企业外，其余 18 家企业样品均检出基因毒性杂质 G，杂质总量也均比参比制剂高。由于各企业所用原料药厂家不同，故杂质水平存在一定差异，但原研制剂、部分通过仿制药一致性评价的企业样品，在基因毒性杂质和总杂控制上优于其他企业。

2.5.2　加速试验结果比较　取 62 批样品置于温度 40 ℃、相对湿度 75% 条件下放置 6 个月，分别于第 1、3、6 个月取样测定有关物质。加速试验 3 次检测结果表明，原研参比制剂与其他仿制药在加速 6 个月过程中，两者所有样品杂质 A、杂质 C 均有增大趋势，其他杂质无明显变化。

3　讨论

3.1　溶剂的选择

参照 EP 标准，使用 DMF 作溶剂时，发现会检出未知杂质 1（相对保留时间约为 0.90），该杂质随放置时间增加而逐渐增多。虽然标准中要求供试品溶液临用新制，但该杂质过快的增加对试验控制存在风险。选取 3 批次样品，分别用 DMF 和甲醇 -DMF（1∶2）作溶剂制备供试品溶液，照本文色谱条件分别于 0、70、210、350、700 min 进样检测该未知杂质计算含量，结果采用甲醇 -DMF（1∶2）作溶剂时，该杂质迅速稳定，稳定后的结果与 DMF 做溶剂时临用新制进样结果相近，因此选用甲醇 -DMF（1∶2）作为溶剂。

3.2　杂质来源和限度

采用本文色谱条件，对各企业使用的多潘立酮原料进行有关物质测定，分析比对各企业制剂和其提供原料药的色谱图和各杂质含量，多潘立酮片的杂质主要是由多潘立酮原料药引入的，多潘立酮原料药中杂质水平是影响多潘立酮片有关物质的关键。结合多潘立酮原料药强制破坏试验和合成工艺，多潘立酮原料中 7 个已知杂质来源和产生途径如下：杂质 A、杂质 B 为合成中间体；杂质 C 为成品在精制、烘干、储藏过程中氧化产生的杂质；杂质 D、E 和 F 为合成多潘立酮粗品的副反应产物；杂质 G 是合成多潘立酮原料的起始物料残留到成品中的。

杂质 G 的结构式与欧盟发布的基因杂质警示结构芳胺酰化物相似，使用基因毒性评估软件 Derek 和 Sarah 对该杂质进行综合评估，可能具有基因毒性，需要重点监控。根据国际人用药物注册技术要求协调会（ICH）基因杂质控制指导原则，按照多潘立酮片治疗期 1 ～ 10 年，每日最大用药 40 mg，计算毒性物质限量限度为 0.025%。参考多潘立酮片现行各质量标准有关物质项下限度，结合样品测定结果，拟定杂质 A ～ F 均不得过 0.25%，杂质 G 不得过 0.025%，单个未知杂质不得过 0.2%，杂质总和不得过 1.0%。

3.3　国内企业制剂杂质控制现状

从检测结果看，国内 21 家企业多潘立酮片杂质控制良好，杂质总量均小于 0.5%。但对于基因毒性杂质 G 的控制存在一定差距，62 批次样品，有 9 家企业共计 17 批次样品的产品杂质 G 含量高于 0.025%，但现行标准均未对其进行控

制，存在安全隐患。企业要加强对多潘立酮原料药的质量监控，重点关注原料来源；在制剂的生产过程中要重点关注制粒和压片等环节的温度、控制样品裸露在空气中的时间等问题。21 家生产企业中，1 家企业为原研地产化企业，还有 3 家企业为通过一致性评价企业，测定结果也显示这 4 家企业样品在杂质控制和批间稳定性优于其他企业，建议其他企业对生产工艺进行优化，提高生产工艺稳定性，缩小同原研药和通过一致性评价企业的差距。

参考文献

[1] 赵建平 . 多潘立酮的临床应用及注意事项 [J]. 中国实用医药，2014，9（3）：148-149.

[2] 瞿海英 . 多潘立酮的临床药理及应用 [J]. 健康之路，2018，17（7）：253.

[3] 吴晓卫，杨耀芳，朱建萍，等 . 多潘立酮片门诊用药评价及智能化知识库的作用 [J]. 中国全科医学，2021，24（7）：869-874.

[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：477-479.

[5] 国家药品监督管理局 . 国家药品监督管理局标准 YBH06202009 [S]. 2009.

[6] 国家药品监督管理局 . 国家药品监督管理局标准 YBH00352012 [S]. 2012.

[7] 国家药品监督管理局 . 国家药品监督管理局标准 YBH06512020 [S]. 2020.

[8] 国家药品监督管理局 . 国家药品监督管理局标准 YBH07212020 [S]. 2020.

[9] 国家药品监督管理局 . 国家药品监督管理局标准 YBH06492019 [S]. 2019.

[10] EP [S]. 10.0th Volume Ⅱ . 2458-2460.

[11] 王发，郭欢迎，王嫦鹤，等 . HPLC 法测定盐酸氯己定的有关物质和含量 [J]. 中国药师，2021，24（8）：586-589.

[12] 章为，蒋涛，刘雁鸣，等 . 盐酸艾司洛尔注射液的有关物质及其质量评价研究 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2611-2615.

[13] 王宁，崔建兰，于思源，等 . 多潘立酮的新合成工艺研究 [J]. 中北大学学报，2021，42（2）：159-163.

[14] 王戈，刘英慧，袁波 . 国产多潘立酮原料及其片剂有关物质现状观察 [J]. 中国药物评价，2013，30（2）：79-81.

[15] 伍小勇，康娟娟，张晓丹，等 . 多潘立酮片评价性抽验结果及分析 [J]. 中国药业，2015，24（14）：79-81.

[16] 耿晶，吕玲燕，冯星月，等 . 超高效液相色谱串联质谱法测定不同厂家生产的多潘立酮片中多潘立酮的含量 [J]. 中国医药导报，2019，16（7）：33-36.

[17] 纪宏宇，曲福军，刘红梅，等 . 高效液相色谱法测定人血浆中多潘立酮的浓度 [J]. 中国药师，2011，14（1）：80-81.

[18] 王冬，卢丹，张兴哲 . 超高效液相色谱 - 质谱联用法测定多潘立酮的含量 [J]. 中国药物评价，2019，36（2）：97-100.

（收稿日期：2023-01-06；修回日期：2023-03-09）

离子色谱法测定聚乙二醇 6000 中有机酸和无机阴离子

谢莹莹[1, 2, 3]，赵勇[1, 3]，肖菁[1, 3]，石蓉[1, 3]，尹林高[1, 3]，张悦[1, 3*]，郑金凤[1, 3*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；2. 湖南省药品审核查验中心，长沙 410001；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点试验室，长沙 410001）

摘要：目的 建立离子色谱法测定聚乙二醇 6000 中的 10 种有机酸和无机阴离子含量。**方法** 采用 IonPac AS11-HC（250 mm×4 mm，9 μm）分析柱，以 KOH 淋洗液进行梯度洗脱，柱温 30 ℃，流速 1.0 mL·min^{-1}，进样量 25 μL，选择电导检测器进行测定，外标法定量。**结果** 在该色谱条件下，10 种有机酸和无机阴离子的峰面积与质量浓度的线性关系良好（$r \geq 0.999$），平均回收率为 93.4% ～ 100.6%，*RSD* 为 0.60% ～ 2.6%。**结论** 本方法检出限低、重现性好，可用于聚乙二醇 6000 中有机酸和无机阴离子含量的控制。

关键词：聚乙二醇 6000；有机酸；无机阴离子；离子色谱法

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2458-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.033

基金项目：湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目（No.2021JJ80044）。

作者简介：谢莹莹，女，工程师，试验员，主要从事药用辅料检验检测，email：276468687@qq.com *通信作者：张悦，女，主管药师，试验员，主要从事药用辅料检验检测，email：873813723@qq.com；郑金凤，女，副主任药师，主要从事药品研究工作，email：332410419@qq.com

Determination of organic acids and inorganic anions in polyethylene glycol 6000 by ion chromatography

XIE Ying-ying[1, 2, 3], ZHAO Yong[1, 3], XIAO Jing[1, 3], SHI Rong[1, 3], YIN Lin-gao[1, 3], ZHANG Yue[1, 3*], ZHENG Jin-feng[1, 3*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Hunan Drug Inspection Center*, *Changsha* 410001; 3. *Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology*, *NMPA, Changsha* 410001)

Abstract: Objective To determine 10 organic acids and inorganic anions in polyethylene glycol 6000 by ion chromatography. **Methods** Ion chromatography was performed on IonPac AS11-HC column (250 mm×4 mm, 9 μm) in gradient elution with KOH solution. The column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, and the injection volume was 25 μL. All of the target compounds were detected by conductivity detection and quantified by the external standard method. **Results** Under this chromatographic condition, 10 organic acids and inorganic anions showed good linearity ($r \geqslant 0.999$) within the test concentration. The average recoveries were at 93.4% ～ 100.6% and the *RSDs* were at 0.60% ～ 2.6%. **Conclusion** The method has low detection limit and good reproducibility, which can be used to determine the content of organic acids and inorganic anions in polyethylene glycol 6000.

Key words: polyethylene glycol 6000; organic acid; inorganic anion; ion chromatography

聚乙二醇 6000 为药用辅料，作为软膏基质和润滑剂等，可用于口服剂和外用制剂[1-2]。本品主要由环氧乙烷与水或乙二醇，以氢氧化钠或氢氧化钾为催化剂，在聚合釜内进行加成聚合得到的，完成聚合反应后得到的产品，反应后处理包括中和、吸附、脱水、过滤、精馏等过程，其中工业上常用聚乙二醇 6000、酒石酸、盐酸、稀硫酸、磷酸等进行中和反应[3-5]。《中国药典》2020 年版采用酸度对聚乙二醇 6000 的有机酸和无机酸进行了控制[6]，但 2022 年国家药品抽检本品法定检验过程中发现有 2 批同一厂家的样品酸度超出限度，为找出酸度不合格的原因及明确聚乙二醇 6000 中可能含有的有机酸及无机盐类型，参考相关文献[7-10]，拟建立离子色谱法（IC）测定聚乙二醇 6000 中 10 种有机酸及无机阴离子的含量，并评价国内市场收集的 59 批聚乙二醇 6000 的总体重。

1 材料

Thermo ICS-5000 型离子色谱仪（美国赛默飞世尔有限公司），配置有电导检测器；工作站为 Chromeleon 7.2；ML204 型电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司，精度：0.1 mg）。

甲酸（批号：101414-202104，纯度：100.0%）、草酸（批号：101097-201702，纯度：100.0%）、柠檬酸（批号：111679-201602，纯度：97.0%）、冰醋酸（批号：190079-202002，纯度：99.9%）对照品（中国食品药品检定研究院）；酒石酸对照品（批号：20180923，R 化学试剂有限公司，纯度：100.0%）；*L*-乳酸对照品（批号：LRAC 7354，纯度：93.3%，Sigma-Alorich 公司）；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}）（北京北方伟业计量技术研究院）；水为自制超纯水。59 批聚乙二醇 6000 样品详细信息见后文。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：IonPac AG11-HC 保护柱（50 mm×4 mm，4 μm）和 IonPac AS11-HC 阴离子分析柱（250 mm×4 mm，9 μm）；柱温：30 ℃；流速：1.0 mL • min^{-1}；电导检测器；进样量：25 μL；流动相：KOH 淋洗液，梯度洗脱（0 ～ 12 min，0.8 mmol • L^{-1}；12 ～ 35 min，0.8 → 25 mmol • L^{-1}；35 ～ 45 min，25 → 50 mmol • L^{-1}；45 ～ 55 min，50 → 60 mmol • L^{-1}；55 ～ 60 min，60 → 0.8 mmol • L^{-1}）。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取供试品 1 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2　对照品溶液的制备　取氟离子、乳酸根、乙酸根、甲酸根、氯离子、酒石酸根、硫酸根、草酸根、磷酸根、柠檬酸根对照品各适量，加水溶解，并逐步稀释得到表 1 中的混合对照品溶液。

表 1　10 种组分的混合对照品溶液 (μg・mL^{-1})

Tab 1　Mixed reference solution of 10 ions (μg・mL^{-1})

组分	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
氟离子	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
乳酸根	1.39	2.78	4.18	5.57	6.97
乙酸根	4.04	8.09	12.14	16.19	20.23
甲酸根	9.62	19.24	28.86	38.48	48.10
氯离子	4.00	8.00	12.00	16.00	20.00
酒石酸根	3.99	7.98	11.97	15.96	19.96
硫酸根	4.00	8.00	12.00	16.00	20.00
草酸根	4.36	8.73	13.10	17.47	21.84
磷酸根	4.00	8.00	12.00	16.00	20.00
柠檬酸根	4.48	8.97	13.46	17.95	22.44

2.3　系统适用性试验

取空白溶剂（水）、供试品溶液、对照品溶液（STD3）各 25 μL，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果显示，空白溶剂中含有少量氯离子和硫酸根离子，10 种有机酸及无机阴离子与相邻色谱峰基本达到基线分离（见图 1）。

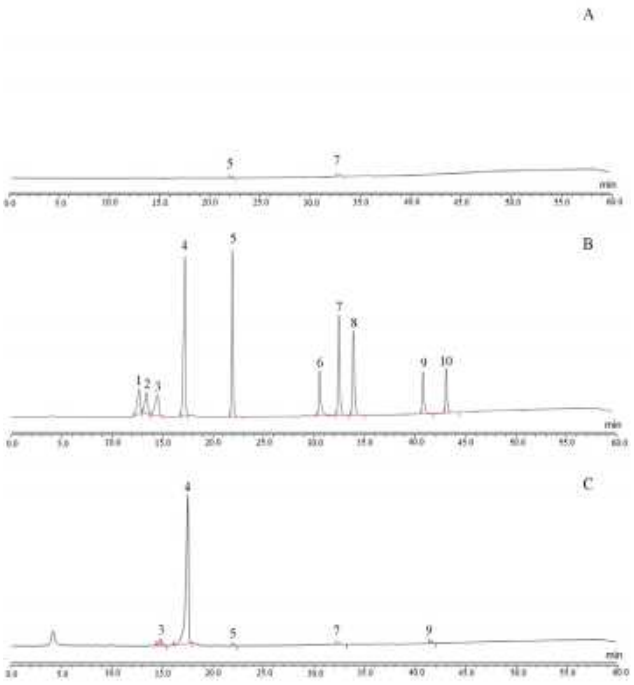


图 1　空白溶剂（A）、对照品（B）和供试品溶液（C）色谱图

Fig 1　IC chromatogram of blank solvent (A), reference (B) and test solution (C)

1. 氟（fluorine）；2. 乳酸（lactic acid）；3. 乙酸（glacial 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）

2.4　线性关系的考察

取“2.2.2”项下标准工作溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，扣除空白溶剂中氯离子与硫酸根离子峰面积，以浓度和相应的峰面积计算回归方程，结果见表 2。

表 2　各组分线性关系

Tab 2　Linearity of various constituents

组分	回归方程	r	范围 /（μg・mL^{-1}）
氟离子	$Y = 0.4483X + 0.129$	0.9994	1.00 ～ 5.00
乳酸根	$Y = 9.242X + 0.0147$	1.000	1.39 ～ 6.97
乙酸根	$Y = 0.0913X + 0.1175$	0.9994	4.04 ～ 20.23
甲酸根	$Y = 0.1299X + 0.4401$	0.9994	9.62 ～ 48.10
氯离子	$Y = 0.2585X + 0.052$	0.9997	4.00 ～ 20.00
酒石酸根	$Y = 0.0901X + 0.2301$	1.000	3.99 ～ 19.96
硫酸根	$Y = 0.1895X + 0.117$	1.000	4.00 ～ 20.00
草酸根	$Y = 0.1587X + 0.214$	0.9994	4.36 ～ 21.84
磷酸根	$Y = 0.0847X - 0.0196$	1.000	4.00 ～ 20.00
柠檬酸根	$Y = 0.0651X + 0.0906$	0.9994	4.48 ～ 22.44

2.5　精密度试验

取“2.2.2”项下 STD3 标准工作溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，结果氟离子、乳酸根、乙酸根、甲酸根、氯离子、酒石酸根、硫酸根、草酸根、磷酸根、柠檬酸根峰面积 *RSD* 分别为 4.3%、1.3%、0.18%、0.55%、0.96%、1.1%、2.0%、2.3%、0.93%、0.79%。

2.6　重复性试验

取同一批样品（批号：103320211106）共 6 份，按“2.2.1”项下方法平行制备，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，扣除空白溶剂中氯离子与硫酸根离子峰面积，计算，结果仅检出乙酸根和甲酸根，含量分别为 0.058%、0.0043%，*RSD* 分别为 1.6%、4.0%。

2.7　稳定性试验

取供试品溶液和“2.2.2”项下的 STD3 溶液在室温（25 ℃）放置 0、2、4、8、12、24 h 后立即测定，结果 10 种组分峰面积的 *RSD* 均小于 5%，说明供试品溶液、对照品溶液在制备 24 h 内稳定。

2.8　定量限、检测限

取“2.2.2”项下 STD1 适量，逐级稀释，并进样测定，以信噪比 *S/N* ＝ 10 和 *S/N* ＝ 3 时各对照品的量为定量限和检测限，结果见表 3。

2.9　回收试验

取同一批样品（批号：103320211106）共 6 份，精密称定，置 50 mL 量瓶中，分别依次加入氟离子、乳酸根、乙酸根、甲酸根、氯离子、酒石酸根、硫酸根、草酸根、磷酸根、柠檬酸根对照品各适

表 3　各组分平均回收率、检测限及定量限

Tab 3　Recovery，detection limit and quantitative limit

组分	平均回收率 /%	*RSD*/%	检测限 /（μg • mL^{-1}）	定量限 /（μg • mL^{-1}）
氟离子	96.7	1.0	0.0054	0.018
乳酸根	96.5	0.60	0.033	0.11
乙酸根	93.4	1.9	0.035	0.11
甲酸根	95.8	2.2	0.012	0.040
氯离子	99.3	2.6	0.0036	0.012
酒石酸根	97.4	1.3	0.013	0.045
硫酸根	100.1	1.7	0.0060	0.020
草酸根	100.6	1.4	0.0084	0.028
磷酸根	99.4	1.9	0.014	0.048
柠檬酸根	99.0	1.4	0.017	0.056

量，用水稀释并定容至刻度，平行制备；分别精密量取上述溶液各 25 μL 进行测定，计算回收率，结果见表 3。

2.10　样品测定

取 59 批聚乙二醇 6000 样品各适量，分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液进样测定，扣除空白溶剂中氯离子与硫酸根离子峰面积，计算样品中有机酸和无机阴离子含量，检出乳酸、乙酸、甲酸、磷酸 4 种组分，其他 6 种组分均未检出；结果见表 4。

2.11　酸度、酸根离子含量相关性分析

参考 ChP2020 四部通则 0631 pH 值测定法 [6] 进行聚乙二醇 6000 酸度的测定，结果见表 4。对酸度、酸根离子含量的相关性进行 SPSS 分析，结果显示酸度与甲酸根离子含量呈显著相关性（$P < 0.05$），与其他酸根离子无明显相关性，表

表 4　样品检验结果

Tab 4　Sample determination

厂家	批号	乳酸根 /%	乙酸根 /%	甲酸根 /%	磷酸根 /%	酸度	厂家	批号	乳酸根 /%	乙酸根 /%	甲酸根 /%	磷酸根 /%	酸度
A	20210104	ND	0.013	0.19	0.0051	3.3	C	103320211202	ND	0.063	0.0017	ND	5.7
A	20210703	ND	ND	0.000 57	ND	5.8	D	FS211009174	0.024	ND	0.0010	ND	6.2
A	20210201	ND	0.000 18	0.0024	0.0033	6.3	D	FS210322067	0.026	ND	0.0011	ND	5.9
A	20210801	ND	ND	0.0029	0.0031	6.4	D	FS210802127	0.035	ND	0.0024	ND	4.7
A	20210904	ND	ND	0.0072	0.0051	6.0	D	FS210802127	0.034	ND	0.0023	ND	4.6
A	20201106B-2	ND	ND	0.0026	0.0031	6.4	D	FS211207224	0.025	ND	0.0027	ND	5.5
A	20210701B-1	ND	ND	0.034	ND	4.5	D	FS211101195	0.024	ND	0.0023	ND	5.6
A	20201205B-2	ND	ND	0.0071	0.0034	4.9	D	FS211101195	0.017	ND	0.0044	ND	5.0
A	20201205A-1	ND	ND	0.0013	0.0026	6.4	D	FS211101188	0.026	ND	0.0024	ND	5.6
A	20210802B-1	ND	ND	0.11	ND	3.5	E	HTFP20211024-001	0.044	ND	0.0016	ND	5.5
A	20210901B-1	ND	ND	0.0026	0.0043	6.7	E	HTFF20211224-001	0.034	0.0089	0.056	ND	5.5
A	20210402B-1	ND	ND	0.0026	0.0038	6.3	F	PL20211003	0.042	ND	0.0019	ND	5.0
A	20210801	ND	ND	0.0035	0.0034	6.1	G	20211201	0.032	ND	0.0017	ND	6.0
A	20201106B-1	ND	ND	0.0020	0.0029	6.3	H	20211017	ND	0.087	0.023	ND	5.5
A	20211201	0.019	ND	0.000 67	ND	6.0	I	LMA0T30	ND	0.048	0.0083	ND	5.1
A	20211202	0.017	ND	0.000 85	ND	6.0	I	LD80V46	ND	0.0025	0.0040	ND	5.4
A	20190301	ND	ND	0.000 79	ND	6.1	J	211117674Z	0.090	0.034	0.025	ND	5.2
B	20211003	ND	0.032	0.0020	ND	5.2	K	C12602842	ND	0.090	0.030	ND	5.1
B	20210903	ND	0.031	0.0027	ND	5.3	L	10229666	0.039	ND	ND	ND	6.5
B	20201103	ND	0.023	0.0032	ND	5.5	M	0285C	ND	ND	0.0030	0.0064	6.7
B	20211101	ND	0.029	0.0037	ND	5.2	M	6ZYMB-IF	ND	ND	0.0023	0.0065	6.7
B	20210901	ND	0.031	0.0020	ND	5.3	M	Z7VNG-JW	ND	ND	0.000 81	0.0072	6.9
B	20211101	ND	0.030	0.0022	ND	5.2	N	TF58210701	ND	ND	0.0078	ND	6.0
C	103320211106	ND	0.057	0.0043	ND	6.1	N	TF58210901	ND	ND	0.0093	ND	6.1
C	103320210305	ND	0.064	0.000 77	ND	6.5	N	TF58211201	ND	ND	0.0094	ND	6.1
C	103320211104	ND	0.066	0.0017	ND	5.7	O	BNL682	ND	0.16	0.0019	ND	5.9
C	103320211104	0.017	ND	0.0010	ND	5.7	P	B2210061	ND	0.027	0.0015	ND	5.6
C	103320211104	ND	0.065	0.0025	ND	5.7	Q	25322-68-3	ND	0.026	0.0026	ND	5.5
C	103320211202	ND	0.064	0.0013	ND	5.7	R	20200723	ND	0.028	0.0012	ND	5.8
C	103320211201	ND	0.061	0.0027	ND	6.0							

注（Note）：ND 表示未检出（ND means not detected）。

明甲酸根离子在 pH 值的表现中占主导影响因素。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本试验选择常用的 IonPac AS19、AS11 和 AS11-HC 进行试验。结果显示，IonPac AS11-HC 分析柱进行分离时，分离效果最好，且峰形好、灵敏度高。故选用高容量、强亲水性的 IonPac AS11-HC 为色谱柱。

同时，结合各种组分在色谱柱的保留特性，对不同时间段的淋洗液浓度进行研究；首先，本研究考察了不同初始浓度 0.60、0.80、1.0 mmol • L^{-1} 下各组分的分离情况，结果 0.80、1.0 mmol • L^{-1} 为初始浓度时，弱保留组分的分离效果较好，故选择 0.80 mmol • L^{-1} 为初始淋洗浓度。保留时间 35 min 后仅有两个组分，对比分析了最高淋洗浓度 45、50、55 mmol • L^{-1} 条件下，两种强保留组分的分离情况。结果最高淋洗浓度为 45 mmol • L^{-1} 时，由于淋洗浓度较低，组分出峰时间拖后；最高淋洗浓度 55 mmol • L^{-1} 时，出峰快，但分离度不高；最高淋洗浓度为 50 mmol • L^{-1} 时，灵敏度和分离度均最好，因此，选择 50 mmol • L^{-1} 为最高淋洗浓度。

分别设置 KOH 淋洗液流速为 0.8、1.0、1.2 mL • min^{-1}，考察各组分的出峰时间及分离情况。流速越低，分离时间越长，弱保留组分出峰时间滞后，分离效果不佳；流速过快，仪器系统压力越高，压力过大易损害色谱柱的固定相，从而影响色谱柱使用寿命；综合考虑，选择 KOH 淋洗液流速为 1.0 mL • min^{-1} 进行试验。

3.2 结果分析

本研究结果显示，59 批样品中主要检出乳酸根、乙酸根、甲酸根、磷酸根等酸根离子，其中乳酸根来源于工艺中加入乳酸作为中和剂；磷酸根离子来源于工艺中加入的磷酸盐调节 pH，与 A 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 [11-12]：聚乙二醇 6000 是以乙二醇为起始剂，与环氧乙烷进行加成聚合反应；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，引起产品 pH 下降。

由酸度、酸根离子含量相关性分析可知，甲酸根离子在 pH 值的表现中占主导影响因素；分析原因可能为乳酸根离子、磷酸根离子在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相关性。A 企业 2 批样品不合格，主要与其生产工艺有关，通过企业自查分析发现工艺中加入的缓冲盐远低于其他生产企业，提示该企业需优化生产工艺以确保产品的稳定性。

参考文献

[1] 熊皓舒，张凯旋，李瑶瑶，等 . 基于多元统计分析的药用辅料聚乙二醇 6000 质量控制方法研究 [J]. 药物分析杂志，2021，41（2）：329-337.
[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] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：84，802.
[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剂和硫酸盐的含量 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1643-1647.
[10] 岳超，陈万勤，刘柱，等 . 电导抑制 - 离子色谱法测定红毛丹果壳中多种有机酸和阴离子的含量 [J]. 分析试验室，2021，40（7）：847-851.
[11] 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-US，2012，101（9）：3305-3318.
[12] Han S. Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol [J]. Polymer，1997，38（2）：317-323.

（收稿日期：2023-02-20；修回日期：2023-04-06）

离子色谱法测定布洛芬原料药中 2-氯丙酸根及 2，2-二氯丙酸根的含量

邢雪敏，刘葵葵，李欣，刘梦瑶，张琳*（山东省药学科学院 山东省化学药物重点实验室 山东福瑞达医药集团有限公司 山东省黏膜与皮肤给药技术重点实验室，济南　250101）

摘要：目的　建立离子色谱法测定布洛芬原料药中 2-氯丙酸根及 2，2-二氯丙酸根的含量。**方法**　采用 Thermo Dionex IonPac AS18（4 mm×250 mm）色谱柱，以 20 mmol • L^{-1} 氢氧化钾溶液为淋洗液，流速为 1.0 mL • min^{-1}，进样体积为 25 μL；采用抑制电导检测法，抑制电流为 52 mA。**结果**　2-氯丙酸根离子在 0.004 86 ～ 4.86 μg • mL^{-1} 内，2，2-二氯丙酸根离子在 0.0400 ～ 4.00 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系；2-氯丙酸根离子、2，2-二氯丙酸根离子平均回收率分别为 104.4%、101.6%，*RSD* 分别为 0.40%、1.8%。**结论**　本方法简便、准确、快速，适用于布洛芬原料药中 2-氯丙酸根及 2，2-二氯丙酸根的含量测定。

关键词：离子色谱法；布洛芬；2-氯丙酸根；2，2-二氯丙酸根；含量测定
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2463-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.034

Content determination of 2-chloropropionate and 2, 2-dichloropropionate in ibuprofen by ion chromatography

XING Xue-min, LIU Kui-kui, LI Xin, LIU Meng-yao, ZHANG Lin* (*Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences*, *Shandong Key Laboratory of Chemical Drug*, *Shandong Freda Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd.*, *Shandong Key Laboratory of Mucosa and Transdermal Drug Delivery Technology*, *Jinan* 250101)

Abstract: Objective　To determine the content of 2-chloropropionate and 2, 2-dichloropropionate in ibuprofen by ion chromatography. **Methods**　Thermo Dionex IonPac AS18 (4 mm×250 mm) column was used with the mobile phase consisting of 20 mmol • L^{-1} KOH at 1.0 mL • min^{-1} and the injection volume was 25 μL. Suppressed conductivity detector was used with 52 mA suppression current. **Results**　A good linearity was shown when the sample of 2-chloropropionate was within the range of 0.004 86 ～ 4.86 μg • mL^{-1} and 2, 2-dichloropropionate within the range of 0.0400 ～ 4.00 μg • mL^{-1}. The average recovery of 2-chloropropionate and 2, 2-dichloropropionate was 104.4% and 101.6% with *RSD* of 0.40% and 1.8%, respectively. **Conclusion**　The method is convenient, accurate and fast, which can be used for the content determination of 2-chloropropionate and 2, 2-dichloropropionate in ibuprofen.

Key words: ion chromatography; ibuprofen; 2-chloropropionate; 2, 2-dichloropropionate; content determination

布洛芬是一种常用的非甾体抗炎镇痛药，临床应用主要是解热、镇痛、抗炎，其效果确切，不良反应少，与阿司匹林、对乙酰氨基酚并列成为解热镇痛的三大支柱药物[1-3]。

布洛芬正常的合成工艺都是以异丁基苯为基础原料，其合成方法有许多种，包括环氧羧酸酯

基金项目：山东省重点研发计划（No.2021ZDSYS07）。
作者简介：邢雪敏，女，工程师，主要从事化学药物分析工作，email：1216286814@qq.com　*通信作者：张琳，女，高级工程师，主要从事化学药物分析工作，email：25144123@qq.com

法、氧化法、肟化法、环氧丙烷重排法、转位重排法、烯烃加氢法等[4-6]。国内普遍采用从异丁基苯出发，通过 1，2- 芳基转位重排法进行生产。它使用的最初材料是异丁基苯，使用催化剂和 2- 氯代丙酰氯发生傅克酰化反应，然后通过缩酮化、催化重排、水解反应、酸化反应等得到产品[7]。2- 氯代丙酰氯作为布洛芬合成的起始物料，可在反应进程中引入工艺杂质，控制原料中氯丙酸根的含量，对布洛芬原料的质量控制有着重大意义。

本研究建立了离子色谱法对布洛芬原料中的 2- 氯丙酸根离子和 2，2- 二氯丙酸根离子进行定量分析[8-13]，以期为布洛芬原料的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

Dionex ICS-5000$^+$型离子色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BT125D 型十万分之一电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；2，2- 二氯丙酸钠对照品（北京坛墨质检科技有限公司，批号：5542007，100 μg • mL^{-1}）；2- 氯丙酸对照品（TCI，批号：20NQK-IP，纯度＞ 98%）；布洛芬原料（企业 A，批号：20220501、20220502、20220503，含量均＞ 99.0%）；乙醇为色谱纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Thermo Dionex IonPac AS18（4 mm × 250 mm）；淋洗液：20 mmol • L^{-1} 氢氧化钾溶液；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测器：电导检测器，检测方式：抑制电导检测（电导池有效容积：1 μL，信号范围：0 ～ 500 μS，温度：室温）；抑制电流：52 mA；柱温：30 ℃；分析时间：30 min；进样体积：25 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 ① 2- 氯丙酸对照品溶液：精密称取 2- 氯丙酸对照品适量，用 10% 乙醇水稀释制成每 1 mL 含 4 μg 的溶液，摇匀；② 2，2- 二氯丙酸钠对照品溶液：精密量取 2，2- 二氯丙酸钠对照品适量，用 10% 乙醇水稀释制成每 1 mL 含 4 μg 的溶液，摇匀；③ 混合对照品溶液：取 2- 氯丙酸对照品溶液和 2，2- 二氯丙酸钠对照品溶液适量，制成每 1 mL 各含 2 μg 的溶液，摇匀。

2.2.2 供试品溶液 取布洛芬原料 65 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 10% 乙醇水溶解并稀释至刻度，摇匀，微孔滤膜过滤待用。

2.3 专属性试验

精密量取空白溶液（10% 乙醇水）和 “2.2” 项下的混合对照品溶液、供试品溶液各 25 μL，进样测定，记录色谱图，见图 1。结果表明 10% 乙醇水溶液对分析无干扰，混合对照品溶液中杂质间分离度大于 5，本方法的专属性良好。

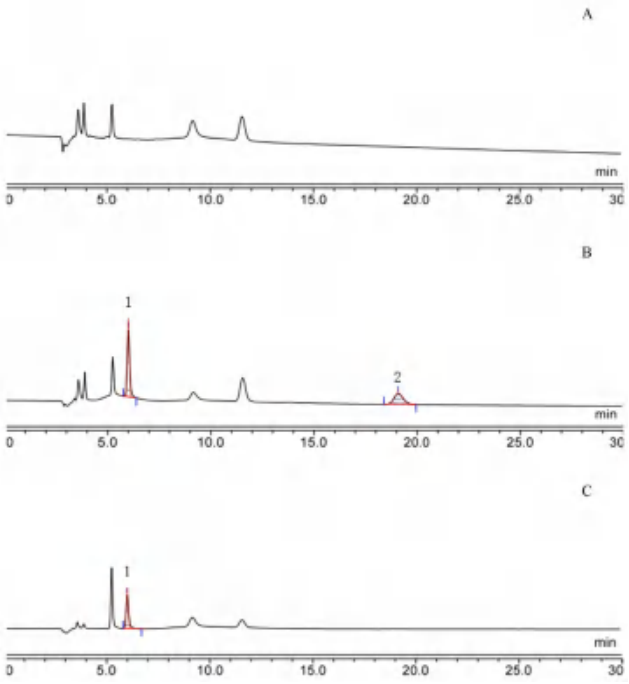


图 1 专属性试验色谱图

Fig 1 Ion chromatograms of specific test

A. 空白溶液（blank solution）；B. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）；1. 2- 氯丙酸根（2-chloropropionate）；2. 2，2- 二氯丙酸根（2，2-dichloropropionate）

2.4 进样精密度试验

取 “2.2” 项下混合对照品溶液 25 μL，连续进样 6 次。结果 2- 氯丙酸根峰面积的 *RSD* 为 0.20%，2，2- 二氯丙酸根峰面积的 *RSD* 为 1.0%，表明仪器进样精密度良好。

2.5 方法精密度试验

照 “2.2” 项下方法制备供试品溶液 6 份，依法测定。结果 6 份样品中 2，2- 二氯丙酸根均未检出，2- 氯丙酸根平均含量 0.08%，*RSD* 为 7.8%，表明本方法的重复性良好。按照上述样品配制方法，同一仪器、不同时间、不同人员平行测定 6 份，结果 2，2- 二氯丙酸根均未检出，2- 氯丙酸根平均含量为 0.08%，*RSD* 为 8.8%，表明中间精密度良好。

2.6 线性关系考察

取 2- 氯丙酸对照品和 2，2- 二氯丙酸钠对照品各适量，用 10% 乙醇水定量稀释成系列溶液，分别进样，以离子浓度 *C* 为横坐标，对应的峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。结果表明，2- 氯

丙酸根在 0.004 86 ～ 4.86 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系，A ＝ 0.0577C － 0.0022，r ＝ 0.9996；2，2-二氯丙酸根离子在 0.0400 ～ 4.00 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系，A ＝ 0.0334C － 0.0006，r ＝ 0.9998。

2.7　定量限与检测限

取“2.2”项下对照品溶液逐级稀释，依法测定，记录峰面积。当信噪比为 10∶1 时，得 2-氯丙酸根定量限为 4.08 ng • mL^{-1}，2，2-二氯丙酸根定量限为 0.04 μg • mL^{-1}；当信噪比为 3∶1 时，得 2-氯丙酸根检测限为 0.73 ng • mL^{-1}，2，2-二氯丙酸根检测限为 0.01 μg • mL^{-1}。

2.8　加样回收试验

取布洛芬原料 13 mg，精密称定，共 6 份，分别置 10 mL 量瓶中，加入 2-氯丙酸对照品和 2，2-二氯丙酸钠对照品溶液适量（相当于含对照品各 20 μg），用 10% 乙醇水稀释至刻度，摇匀，进样测定。结果 2-氯丙酸根平均回收率为 104.4%，*RSD* 为 0.40%（n ＝ 6）；2，2-二氯丙酸根平均回收率为 101.6%，*RSD* 为 1.8%（n ＝ 6），表明方法准确度良好。

2.9　溶液稳定性试验

取“2.2”项下供试品溶液、混合对照品溶液分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，计算峰面积 *RSD*。结果供试品溶液、混合对照品溶液在 12 h 内各峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，表明溶液稳定性良好。

2.10　耐用性考察

取“2.2”项下混合对照品溶液，分别调整流速、柱温、淋洗液浓度等条件，依法测定，考察 2-氯丙酸根和 2，2-二氯丙酸根峰之间的分离度。变动因素及分离度考察结果见表 1。结果表明，在色谱条件微小变动下，分离度无明显变化，方法耐用性良好。

2.11　样品测定

取 3 批布洛芬原料，分别采用本法测定 2-氯丙酸根和 2，2-二氯丙酸根的含量，结果见表 2。

3　结论

本方法能有效分离 2-氯丙酸根和 2，2-二氯丙酸根，且操作简单快捷，准确可靠，能够满足实验室测定布洛芬原料中 2-氯丙酸根离子和 2，2-二氯丙酸根离子的要求。

表 1　耐用性试验结果

Tab 1　Durability test

耐用性研究项目	考察的耐用性范围	分离度结果
/	标准条件	23.3
流速	0.95 mL • min^{-1}	23.8
	1.05 mL • min^{-1}	23.1
柱温	25 ℃	22.6
	35 ℃	24.0
淋洗液氢氧化钾浓度	19 mmol • L^{-1}	23.5
	21 mmol • L^{-1}	23.1

表 2　3 批样品的含量测定结果

Tab 2　Content of 3 batches of sample

批号	2-氯丙酸 /%	2，2-二氯丙酸 /%
20220501	0.08	未检出
20220502	0.03	未检出
20220503	0.02	未检出

参考文献

[1] Kantor TG. Ibuprofen [J]. Ann Intern Med，1979，91（6）：877-882.

[2] 张娇 . 布洛芬的临床研究进展 [J]. 中国药业，2010，19（5）：63-64.

[3] 李鑫，薛沁冰，辛国松，等 . 布洛芬颗粒的全面质量检测与分析 [J]. 哈尔滨商业大学学报（自然科学版），2017，33（3）：260-263，267.

[4] 许炎森 . 布洛芬的合成工艺研究 [J]. 医药化工，2018，44（4）：186.

[5] 于凤丽，赵玉亮，金子林 . 布洛芬合成绿色化进展 [J]. 有机化学，2003，23（11）：1198-1204.

[6] 曹崇，何鑫，李馨阳，等 . 布洛芬的合成新方法 [J]. 中国药物化学杂志，2017，27（6）：446-447，458.

[7] 张霄鹏，徐志 . 布洛芬的合成及应用研究进展 [J]. 国外医药（抗生素分册），2020，41（5）：404-410.

[8] 彭俊文，陈建平，布仁，等 . 离子色谱在药物分析中的应用进展 [J]. 中南药学，2016，14（3）：290-294.

[9] 刘晓锋，黄克建，李璐 . 离子色谱法检测爆炸残留物中的氯酸根和高氯酸根 [J]. 广西科学院学报，2010，26（3）：268-269.

[10] 王淼，顾小燕，李耕，等 . 离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量 [J]. 中南药学，2022，20（12）：2897-2900.

[11] 张雅军，陈忠兰，王青，等 . 离子色谱法测定盐酸莫西沙星中氯离子含量 [J]. 中国药品标准，2021，22（3）：235-237.

[12] 李欣，陈红，张亿 . 离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质 [J]. 中国药房，2017，28（30）：4288-4291.

[13] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：480-483.

（收稿日期：2023-02-20；修回日期：2023-04-27）

一测多评法同时测定刺五加配方颗粒中 6 种成分的含量

黄贵发，黎桃敏，林嘉明，张兰兰，王文丽，陈灶树，施文婷*，张正（广东一方制药有限公司，广东省中药配方颗粒企业重点试验室，广东 佛山 528244）

摘要：目的 利用一测多评（QAMS）法同时测定刺五加配方颗粒中原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷和刺五加苷 E 的含量。**方法** 采用 UPLC 法，以紫丁香苷作为内参物，计算原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、刺五加苷 E 的相对校正因子，并考察各成分相对校正因子的耐用性；同时利用相对校正因子计算各成分含量并与外标一点法（ESM）实测值进行比较。**结果** 在一定线性范围内，原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、刺五加苷 E 的相对校正因子分别为 0.788、2.358、2.229、2.718、2.558，重复性较好。QAMS 法计算所得 12 批刺五加配方颗粒中原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、刺五加苷 E 的含量与 ESM 法实测值无显著性差异。**结论** 该方法准确可行，可节约对照品及检测成本，同时测定刺五加配方颗粒中 6 种成分的含量，为刺五加配方颗粒的多指标成分质量控制提供参考。

关键词：刺五加配方颗粒；一测多评法；相对校正因子；含量测定；紫丁香苷
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2466-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.035

Simultaneous determination of the content of 6 components in acanthopanax senticosus formula granules by QAMS method

HUANG Gui-fa, LI Tao-min, LIN Jia-ming, ZHANG Lan-lan, WANG Wen-li, CHEN Zao-shu, SHI Wen-ting*, ZHANG Zheng (*Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule*, *Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective To determine the content of protocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, syringin and eleutheroside E in acanthopanax senticosus formula granules by quantitative analysis of multi-components with single markers (QAMS) method. **Methods** The relative correction factor of protocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and eleutheroside E was calculated by UPLC, with syringin as the internal reference, and the durability of relative correction factor was investigated. At the same time, the content was determined with one point external standard method (ESM) and the relative correction factor was compared with that of QAMS method. **Results** Within a certain linear range, the relative correction factor of rotocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and eleutheroside E was 0.788, 2.358, 2.229, 2.718 and 2.558, respectively, with good repeatability. There was no significant difference between the content of rotocatechuic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and eleutheroside E in the 12 batches of acanthopanax senticosus formula granules determined by QAMS method and ESM. **Conclusion** QAMS method is accurate and feasible, and can save the cost of reference substance and detection, which can be used for the simultaneous determination of 6 components in acanthopanax senticosus formula granules, providing a reference for the quality control of multi-index components of acanthopanax senticosus formula granules.

Key words: acanthopanax senticosus formula granule; quantitative analysis on multi-components with a single marker method; relative correction factor; content determination; syringin

基金项目：佛山市科技创新项目（No.2120001002309）；国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目（No.2019-00902-1-2）。
作者简介：黄贵发，男，主要从事中药配方颗粒制备工艺与质量标准研究，email：1446189538@qq.com *通信作者：施文婷，女，硕士，主要从事中药制剂工艺研究，email：2030558601@qq.com

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus*（Rupr. et Maxim.）Harms 的干燥根和根茎或茎，味辛、微苦，性温，具有益气健脾、补肾安神的功效[1]。刺五加中含有苷类、有机酸、黄酮等多种成分，其中刺五加苷类成分包括刺五加苷 A、刺五加苷 B、刺五加苷 E、紫丁香苷等[2-5]，具有神经元保护、改善心脑血管活性等作用[3]；有机酸类主要是原儿茶酸、绿原酸等化合物，具有抗菌、抗炎等药理作用[2]；黄酮类主要有槲皮素、芦丁和金丝桃苷等，具有调节血脂等作用[5-6]。

刺五加配方颗粒质量标准的文献研究已有报道，但仅对单一指标成分进行定量测定[7]。2021 年 11 月 17 日广东省药监局颁布的刺五加配方颗粒质量标准含量测定项下只规定了紫丁香苷成分[8]，而中药所含组分复杂，具有多靶点协同的特点[9-10]，单一成分的定量分析模式难以满足中药现代化对产品整体重控制的需求。一测多评（QAMS）法是一种多指标质量评价的新模式，不仅能实现多成分的同步测定，还能解决对照品消耗量大和检测成本高的问题[11]。因此，本研究采用 QAMS 对刺五加配方颗粒进行多指标的质量控制，以紫丁香苷为内参物，建立其与原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、刺五加苷 E 的相对校正因子并进行含量测定，以期为刺五加配方颗粒的质量控制与评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Waters H-Class 型超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Thermo Vanquish 型超高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 科技公司）；XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；JJ2000B 型百分之一天平（常熟市双杰测试仪器厂）；Milli-Q Direct 型超纯水系统（德国 Merck 公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

原儿茶酸（纯度：97.7%，批号：110809-201906）、绿原酸（纯度：96.3%，批号：110753-202119）、紫丁香苷（纯度：95.2%，批号：111574-201605）、刺五加苷 E（纯度：97.9%，批号：111713-201804）（中国食品药品检定研究院），新绿原酸（纯度：98.0%，批号：DSTDX001503）、隐绿原酸（纯度：98.0%，批号：DST220104-035）（成都德思特生物技术有限公司）；乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司），磷酸为色谱纯（天津市科密欧化学试剂有限公司），水为超纯水，其余试剂均为分析纯。12 批刺五加配方颗粒（编号：C1 ～ C12，每 1 g 配方颗粒相当于饮片 9.1 g，广东一方制药有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[8]

色谱柱：Waters UPLC T3 Column（100 mm×2.1 mm，1.6 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 磷酸溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 2 min，2%A；2 ～ 7 min，2% → 3%A；7 ～ 17 min，3%A；17 ～ 25 min，3% → 5%A；25 ～ 28 min，5% → 7%A；28 ～ 39 min，7% → 18%A；39 ～ 41 min，18% → 95%A；41 ～ 45 min，95%A；45 ～ 46 min，95% → 2%A；46 ～ 55 min，2%A）；流速：0.4 mL·min^{-1}；柱温：35 ℃；检测波长：220 nm；进样量：1.0 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷和刺五加苷 E 对照品适量，精密称定，加入 30% 甲醇制成每 1 mL 分别含 30.287、104.076、115.127、119.462、153.034、102.795 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取刺五加配方颗粒适量，研细，取约 0.3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 30% 甲醇 25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用 30% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液及供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 1，供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应的保留时间处有相同的色谱峰，且空白溶剂无干扰，表明该方法专属性良好。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量，加入 30% 甲醇稀释成系列浓度的混合对照品溶液，进样测定，记录色谱图。以对照品溶液质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，结果见表 1，各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液连续进样 6 次，记录色谱图。计算得原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷、刺五加苷 E 的峰面积 *RSD* 分别为 0.58%、0.65%、0.64%、0.68%、0.68%、0.75%，表明仪器精密度良好。

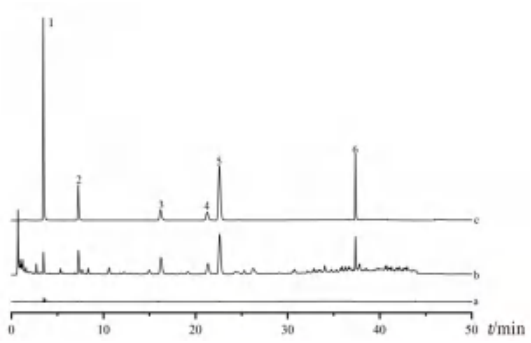


图 1 刺五加配方颗粒专属性试验 UPLC 色谱图

Fig 1 UPLC chromatogram of specificity test for acanthopanax senticosus formula granule

1. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；2. 新绿原酸（neochlorogenic acid）；3. 绿原酸（chlorogenic acid）；4. 隐绿原酸（cryptochlorogenic acid）；5. 紫丁香苷（syringin）；6. 刺五加苷 E（eleutheroside E）；a. 空白溶剂（blank solution）；b. 供试品溶液（test solution）；c. 混合对照品溶液（mixed reference solution）

表 1 刺五加配方颗粒中 6 种成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 6 components in acanthopanax senticosus formula granules

组分	回归方程	r	线性范围 /（μg • min^{-1}）
原儿茶酸	$Y=1.507\times10^4X+1.656\times10^4$	1.000	1.514 ～ 30.287
新绿原酸	$Y=5.540\times10^3X+2.908\times10^3$	0.9999	5.204 ～ 104.076
绿原酸	$Y=5.596\times10^3X+1.322\times10^3$	0.9999	5.756 ～ 115.127
隐绿原酸	$Y=4.863\times10^3X+4.158\times10^2$	0.9999	5.973 ～ 119.462
紫丁香苷	$Y=1.215\times10^4X+8.764\times10^3$	0.9999	7.652 ～ 153.034
刺五加苷 E	$Y=4.693\times10^3X+2.215\times10^3$	0.9999	5.140 ～ 102.795

2.4.4 重复性试验 取同一份刺五加配方颗粒（编号：S4），研细，精密称定，平行 6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定，记录色谱图。计算得原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷、刺五加苷 E 的含量 *RSD* 分别为 0.84%、0.89%、0.96%、0.97%、0.82%、0.92%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液（编号：S4），分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，记录色谱图。计算得原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷、刺五加苷 E 的峰面积 *RSD* 分别为 0.89%、0.90%、0.99%、0.92%、0.95%、1.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收试验 精密称取已知含量的配方颗粒（编号：S4）约 0.15 g，共 9 份，分为 3 组，分别按高、中、低浓度精密加入混合对照品溶液适量，按“2.3”项下方法制备，进样测定，计算回收率。结果原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、紫丁香苷和刺五加苷 E 的平均回收率均在 95% ～ 105%，*RSD* 均小于 5.0%，表明该方法能够准确测定刺五加配方颗粒中 6 种成分的含量。

2.5 相对校正因子 f 的测定及其耐用性考察

2.5.1 相对校正因子 f 的测定 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 2.0 μL 进样测定，记录色谱峰峰面积。以紫丁香苷为内参物，按公式 $f=(A_m\times C_s)/(A_s\times C_m)$ [12-13]（式中 A 代表峰面积，C 代表质量浓度，s 代表内参物，m 代表其他待测成分）分别计算得原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和刺五加苷 E 的 f，结果见表 2。

表 2 各成分相对校正因子

Tab 2 Relative correction factor of each component

进样量 /μL	相对校正因子（以紫丁香苷为内参物）				
	原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	刺五加苷 E
0.2	0.784	2.349	2.248	2.754	2.548
0.4	0.786	2.351	2.237	2.721	2.552
0.6	0.787	2.354	2.231	2.707	2.550
0.8	0.788	2.356	2.224	2.714	2.558
1.0	0.789	2.379	2.217	2.704	2.562
1.2	0.789	2.359	2.225	2.713	2.564
2.0	0.792	2.358	2.222	2.711	2.574
均值	0.788	2.358	2.229	2.718	2.558
RSD/%	0.32	0.42	0.47	0.62	0.36

2.5.2 仪器、色谱柱对 f 的影响 以紫丁香苷为内参物，考察 Agilent 1290 型、Thermo Vanquish 型、Waters H-Class 型 3 种超高效液相色谱仪，以及 Waters CORTECS UPLC T3（100 mm×2.1 μm，1.6 μm）、Waters ACQUITY UPLC BEH C18（100 mm×2.1 μm，1.7 μm）、Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18（100 mm×2.1 μm，1.8 μm）3 种色谱柱对各成分 f 的影响，结果见表 3。各成分 f 的 *RSD* 均小于 3.0%，表明仪器及色谱柱对各成分的 f 无显著影响。

2.5.3 柱温对 f 的影响 采用 Waters H-Class 型超高效液相色谱仪和 ACQUITY UPLC BEH C18（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱，在不同柱温 30、35、40、45 ℃条件下，精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，进样测定，结果见表 4。各成分 f 的 *RSD* 均小于 3.0%，表明柱温对 f 无显著影响。

2.5.4 体积流量对 f 的影响 采用 Waters H-Class 型超高效液相色谱仪和 ACQUITY UPLC BEH C18（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱，在不同体积流量 0.30、0.35、0.40、0.45 mL • min^{-1} 条件下，精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液进样测定，计算各成分的 f 值，结果见表 5。各成分 f 的 *RSD* 均小于 3.0%，表明体积流量对各成分的 f 无明显影响。

2.5.5 待测成分色谱峰定位 建立 QAMS 法的目的是通过用一种对照品实现对多种待测成分的

表 3　不同色谱系统和色谱柱对 *f* 的影响

Tab 3　Effect of different chromatographic systems and columns on the *f* value

仪器及色谱柱		原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	刺五加苷 E
Agilent 1290	CORTECS UPLC T3	0.789	2.379	2.217	2.704	2.562
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.783	2.357	2.218	2.722	2.524
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.776	2.341	2.166	2.715	2.532
Thermo Vanquish	CORTECS UPLC T3	0.831	2.421	2.346	2.955	2.652
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.767	2.345	2.293	2.740	2.580
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.775	2.344	2.273	2.738	2.691
Waters H-Class	CORTECS UPLC T3	0.787	2.301	2.215	2.705	2.590
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.783	2.285	2.217	2.711	2.537
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.780	2.300	2.280	2.759	2.551
平均值		0.786	2.341	2.247	2.750	2.580
RSD/%		2.3	1.8	2.4	2.9	2.2

表 4　不同柱温对 *f* 的影响

Tab 4　Effect of different column temperatures on the *f* value

柱温 /℃	原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	刺五加苷 E
30	0.780	2.282	2.218	2.683	2.520
35	0.783	2.285	2.218	2.705	2.532
40	0.784	2.290	2.216	2.720	2.553
45	0.785	2.294	2.198	2.696	2.563
平均值	0.783	2.288	2.213	2.701	2.542
RSD/%	0.28	0.23	0.44	0.58	0.77

表 5　不同体积流量对 *f* 的影响

Tab 5　Effect of different volume flow rates on the *f* value

体积流量 / mL·min^{-1}	原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	刺五加苷 E
0.30	0.787	2.302	2.252	2.691	2.568
0.35	0.786	2.300	2.234	2.705	2.554
0.40	0.788	2.297	2.231	2.745	2.537
0.45	0.790	2.299	2.230	2.710	2.523
平均值	0.788	2.300	2.237	2.713	2.546
RSD/%	0.22	0.09	0.46	0.85	0.77

同步测定，而对待测成分色谱峰的准确定位是实现 QAMS 的前提[14-15]。精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，进样测定，采用相对保留时间定位法，以紫丁香苷色谱峰为参照峰对待测成分色谱峰进行定位，分别考察 Agilent 1290 型、Thermo Vanquish 型、Waters H-Class 型 3 种超高效液相色谱仪以及 Waters CORTECS UPLC T3、Waters ACQUITY UPLC BEH C18、Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18 这 3 种色谱柱对相对保留时间的影响，结果见表 6 及图 2。各成分相对保留时间的 *RSD* 均小于 5.0%，表明采用相对保留时间定位法对待测成分色谱峰进行准确定位是可行的。

2.6　样品含量测定

取 12 批刺五加配方颗粒样品适量，按“2.3”项下方法制备，进样测定，记录各色谱峰保留时间。分别采用 ESM 和 QAMS 计算各成分的含量，并将所得结果进行比较，结果见表 7。原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和刺五加苷 E 含量的相对

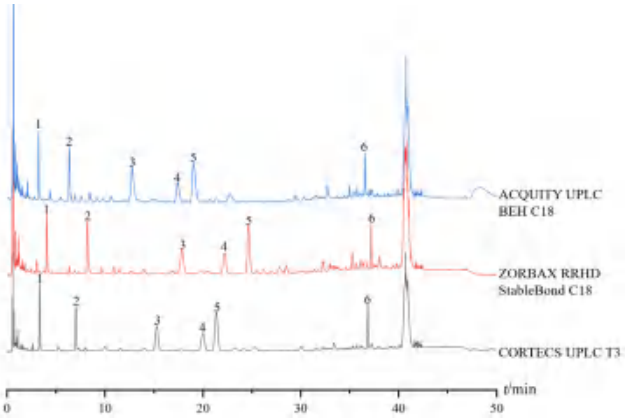


图 2　刺五加配方颗粒不同色谱柱 UPLC 色谱图

Fig 2　UPLC chromatogram of different chromatographic columns of acanthopanax senticosus formula granules

偏差（*RD*）分别为 0.35%～0.42%、0.29%～0.31%、−0.21%～−0.19%、−0.65%～−0.62%、0.27～0.29%，表明 QAMS 计算值与 ESM 实测值之间无显著差异。同时配对 *t* 检验结果显示，两种方法测得刺五加配方颗粒含量之间的差异无统计学意义，说明该 QAMS 可用于刺五加配方颗粒的多成分质量评价。

3　讨论

广东省药监局颁布的刺五加配方颗粒质量标准特征图谱项下色谱条件可检测出紫丁香苷、原儿茶酸、绿原酸等苷类和有机酸物质，故本文选取紫丁香苷、刺五加苷 E、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸这 6 个成分为检测成分，照特征图谱项下色谱条件进行多指标成分含量测定，探究 QAMS 在刺五加配方颗粒质量控制中应用的可行性。本研究通过方法学考察、相对校正因子耐用性考察、待测目标成分色谱峰的准确定位以及 QAMS 计算结果与 ESM 实测值的对比，确定本文所用方法结果准确、可行，重复性良好，可用于刺五加配方颗粒中 6 种成分的同时测定，为其质量控制提供参考。

表 6 仪器和色谱柱对相对保留时间的影响

Tab 6 Effect of instrument and chromatographic column on relative retention time

仪器及色谱柱		相对保留时间				
		原儿茶酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	刺五加苷 E
Agilent 1290	CORTECS UPLC T3	0.153	0.321	0.717	0.941	1.654
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.161	0.320	0.672	0.942	1.672
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.158	0.316	0.671	0.941	1.668
Thermo Vanquish	CORTECS UPLC T3	0.147	0.336	0.720	0.977	1.535
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.147	0.317	0.692	0.964	1.565
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.164	0.361	0.689	0.963	1.546
Waters H-Class	CORTECS UPLC T3	0.160	0.335	0.718	0.935	1.704
	ACQUITY UPLC BEH C18	0.162	0.332	0.753	0.914	1.677
	ZORBAX RRHD StableBond C18	0.164	0.329	0.736	0.908	1.646
平均值		0.157	0.330	0.708	0.943	1.630
RSD/%		4.3	4.3	4.0	2.4	3.9

表 7 刺五加配方颗粒中 6 种成分含量测定结果 (%)

Tab 7 Content determination of six components in Acanthopanax senticosus formula granules (%)

化合物	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
原儿茶酸	0.0765	0.0759	0.0759	0.0753	0.0714	0.0709	0.1226	0.1217	0.1241	0.1231	0.0982	0.0975
新绿原酸	0.3419	0.3399	0.3386	0.3366	0.3274	0.3255	0.4376	0.4350	0.4454	0.4427	0.4042	0.4018
绿原酸	0.4390	0.4407	0.4350	0.4367	0.4173	0.4189	0.4885	0.4905	0.4970	0.4990	0.5322	0.5344
隐绿原酸	0.3806	0.3854	0.3760	0.3809	0.3532	0.3577	0.4873	0.4936	0.4974	0.5038	0.4515	0.4573
紫丁香苷	0.4763	/	0.4724	/	0.4567	/	0.3726	/	0.3803	/	0.4081	/
刺五加苷 E	0.3866	0.3844	0.3837	0.3815	0.3617	0.3597	0.2297	0.2284	0.2370	0.2357	0.3964	0.3943
P 值	0.803		0.794		0.789		0.673		0.688		0.727	

化合物	C7		C8		C9		C10		C11		C12	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
原儿茶酸	0.1008	0.1001	0.0592	0.0587	0.1080	0.1072	0.1000	0.0993	0.0925	0.0918	0.0934	0.0927
新绿原酸	0.4035	0.4011	0.2074	0.2062	0.2601	0.2585	0.3951	0.3927	0.3061	0.3043	0.3086	0.3067
绿原酸	0.5327	0.5348	0.2107	0.2115	0.3654	0.3669	0.5200	0.5221	0.4099	0.4116	0.4129	0.4145
隐绿原酸	0.4508	0.4566	0.2185	0.2213	0.2861	0.2897	0.4428	0.4485	0.3548	0.3594	0.3581	0.3626
紫丁香苷	0.4068	/	0.3340	/	0.3768	/	0.4057	/	0.4817	/	0.4864	/
刺五加苷 E	0.3965	0.3943	0.2436	0.2422	0.3731	0.3710	0.3951	0.3929	0.3943	0.3921	0.3962	0.3939
P 值	0.746		0.901		0.913		0.753		0.807		0.845	

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：215-216.

[2] 叶恒，孙帅婷，葛会奇 .HPLC 法同时检测刺五加叶中原儿茶酸、绿原酸、刺五加苷 E、金丝桃苷及槲皮苷的含量 [J]. 辽宁科技学院学报，2019，21（2）：18-20.

[3] 白云，刘莉莉，刘萍，等 . 刺五加的研究进展 [J]. 黑龙江科技信息，2014（21）：72，40.

[4] 侯雅竹，李志君，毛静远，等 . 中药刺五加心血管药理研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2017，15（20）：2546-2549.

[5] 高彦宇，李文慧，寇楠，等 . 刺五加化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息，2019，36（2）：113-116.

[6] 张宇航，邱智东，傅超美，等 . 刺五加化学成分药动学特性及其体内代谢过程研究进展 [J]. 食品工业科技，2020，41（16）：334-339，345.

[7] 谭沛，郑晓英，黄俊忠，等 . 刺五加配方颗粒质量标准研究 [J]. 中国药业，2017，26（24）：11-14.

[8] 广东省药品检验所 . 关于发布柏子仁配方颗粒等 92 个品种为广东省中药配方颗粒质量标准的通告（2021 年第 7 号）[EB/OL].[2021-11-17]. https：//gdidc.gd.gov.cn/gdidc/notice/pub/content/post_3666403.html.

[9] 王迪，俞佳，詹固，等 . 液质联用技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（2）：68-71.

[10] 胡瑞雪，梁元昊，徐文丽，等 . 一测多评法在中药中的应用及研究进展 [J]. 药物分析杂志，2019，39（11）：1968-1979.

[11] 王宏伟，申玉华，姜英子 . 一测多评（一标多测）质量评价模式在中药分析领域中的应用 [J]. 智慧健康，2019，5（8）：13-14，27.

[12] 李静，李耀磊，于健东，等 . 一测多评法结合特征图谱的新疆紫草质量控制研究 [J]. 药物分析杂志，2020，40（7）：1209-1216.

[13] 田甜，陈镜楼，黄徐英，等 . 高效液相色谱一测多评法同时测定木丹颗粒中 9 种成分 [J]. 医药导报，2022，41（3）：388-395.

[14] 张敏，刘莉，王洪凤，等 . “一测多评” 法在银翘散质量控制中的应用 [J]. 贵州医科大学学报，2019，44（5）：568-572，577.

[15] 燕霞，朱雪妍，何颂华，等 .HPLC- 一测多评法同时测定壮药罗汉茶中 6 种黄酮类成分及多元统计分析 [J]. 中国药房，2021，32（20）：2485-2491.

（收稿日期：2023-02-15；修回日期：2023-04-17）

医院药学

HPLC-MS/MS 法同时测定儿童微量血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤浓度

秦亚彬，姜锡娟，张古英，赵宜乐*（河北省儿童医院药学部，石家庄　050031）

摘要：目的　建立液相色谱 - 串联质谱（HPLC-MS/MS）法同时检测人血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤浓度，并用于费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病患儿的治疗药物监测。**方法**　分别以稳定同位素伊马替尼 -D8 和甲氨蝶呤 -D3 为内标，取 10 μL 血浆样本经甲醇沉淀蛋白，采用 Phenomenex Kinetex EVO C18（30 mm×2.1 mm，2.6 μm）色谱柱分离，流动相为水（含 0.05% 甲酸）和乙腈，梯度洗脱；流速为 0.5 mL • min^{-1}，进样体积为 1 μL。质谱分析条件：电喷雾离子源正离子模式，多反应监测（MRM）扫描分析，离子通道分别为 *m/z* 488.2 → 401.2（达沙替尼）和 *m/z* 502.5 → 394.2（伊马替尼 -D8）；*m/z* 455.1 → 308.2（甲氨蝶呤）和 *m/z* 458.1 → 311.1（甲氨蝶呤 -D3）。**结果**　达沙替尼的线性范围在 0.5 ～ 200 ng • mL^{-1}（r ＞ 0.9900），定量下限（LLOQ）为 0.5 ng • mL^{-1}；甲氨蝶呤的线性范围在 5 ～ 2000 ng • mL^{-1}（r ＞ 0.9900），LLOQ 为 5 ng • mL^{-1}。达沙替尼和甲氨蝶呤的批内与批间精密度、准确度、提取回收率、基质效应、稳定性均符合方法学要求。**结论**　本方法操作简便、灵敏、准确，只需要微量血浆，适用于费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病患儿的治疗药物监测。

关键词：达沙替尼；甲氨蝶呤；液相色谱 - 串联质谱法；儿童；治疗药物监测
中图分类号：R917，R979.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2471-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.036

Simultaneous determination of dasatinib and methotrexate in children with small volume of plasma by HPLC-MS/MS

QIN Ya-bin, JIANG Xi-juan, ZHANG Gu-ying, ZHAO Yi-le* (*Department of Pharmacy*, *Hebei Children's Hospital*, *Shijiazhuang* 050031)

Abstact: Objective　To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method to simultaneously determine dasatinib and methotrexate in human plasma, and to use the method in clinical therapeutic drug monitoring of dasatinib and methotrexate in children with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. **Methods**　Imatinib-D8 and methotrexate-D3 were separately used as the internal standards and the 10 μL plasma samples were used to precipitate protein by methanol. Then, the analytes were gradiently eluted on a Phenomenex Kinetex EVO C18 column (30 mm×2.1 mm, 2.6 μm) by HPLC-MS/MS. The mobile phase consisted of water (0.05% formic acid) and acetonitrile. The flow rate was 0.5 mL • min^{-1} and the injection volume 1 μL. The mass detection was performed in positive ionization mode with electrospray ionization source. Ions monitored in the multiple reaction monitoring mode were *m/z* 488.2 → *m/z* 401.2 for dasatinib, *m/z* 502.5 → *m/z* 394.2 for imatinib-D8 (internal standard) and *m/z* 455.1 → 308.2 for methotrexate, *m/z* 458.1 → 311.1 for methotrexate-d3 (internal standard), respectively. **Results**　The linearity of dasatinib in human plasma

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：秦亚彬，男，主管药师，主要从事治疗药物监测研究，email：qinyabinqq@163.com　*通信作者：赵宜乐，男，副主任药师，主要从事医院药学和治疗药物监测研究，email：yile_zhao@yeah.net

was at 0.5 ～ 200 ng • mL^{-1} (r ＞ 0.9900), lower limit of quantification (LLOQ) was 0.5 ng • mL^{-1}. The linearity of methotrexate in human plasma was at 5 ～ 2000 ng • mL^{-1} (r ＞ 0.9900), LLOQ was 5 ng • mL^{-1}. The intra-day and inter-day precision, accuracy, extraction recovery rate, matrix effect, and stability of dasatinib and methotrexate all met the methodological requirements. **Conclusion** This HPLC-MS/MS method, which needed small volume of plasma is simple, sensitive and accurate. It is approved appropriate and practical for simultaneously monitoring dasatinib and methotrexate in children with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia.

Key words: dasatinib; methotrexate; HPLC-MS/MS method; children; therapeutic drug monitoring

费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病（Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia，Ph^+ ALL）是一种高危的急性淋巴细胞白血病。酪氨酸激酶抑制剂（TKI）的成功研发改善了 Ph^+ ALL 患者的生存期[1]。达沙替尼是第 2 代酪氨酸激酶抑制剂，临床研究显示其用于 Ph^+ ALL 患儿有较好的临床疗效[2-3]，尤其适用于对伊马替尼耐药的患者。达沙替尼血药浓度与其临床治疗效果和不良反应有相关性[4]。甲氨蝶呤（MTX）是抗叶酸类药物，多用于急性淋巴细胞白血病等肿瘤化疗，其不良反应的发生频率和严重程度与血药浓度有关[5]。在临床实践中，Ph^+ ALL 患儿有同时联用达沙替尼和甲氨蝶呤化疗的可能。另有研究显示，达沙替尼和甲氨蝶呤有相互作用[6]，所以监测两者的血药浓度很有必要。

近年来，HPLC-MS/MS 法因其灵敏度高，且可以同时检测多种药物等优点，被广泛应用于治疗药物监测（TDM）中[7-8]。通过查阅文献，发现国内尚无使用 HPLC-MS/MS 同时检测血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤浓度的方法，本研究尝试建立同时检测达沙替尼和甲氨蝶呤浓度的 HPLC-MS/MS 法，并用于费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病患儿的 TDM，为临床合理用药及研究达沙替尼和甲氨蝶呤相互作用提供方法学基础。

1 材料

1.1 仪器

Jasper HPLC 液相色谱仪和 Triple Quad 4500MD 三重四极杆串联质谱仪（美国 AB SCIEX），R20 型低温高速离心机（北京白洋医疗器械有限公司），MIX-2500 型涡旋混合器（杭州佑宁仪器有限公司），Explorer 型十万分之一电子分析天平（Ohaus 公司）。

1.2 试药

甲氨蝶呤对照品（批号：100138-201704，纯度：99.4%，中国食品药品检定研究院）；内标甲氨蝶呤 -D3（纯度＞ 98.0%，批号：H17M9Q56012，上海源叶生物有限公司）；达沙替尼标准品（纯度≥ 98.0%，批号：T17F7T9770，上海源叶生物有限公司）；伊马替尼 -D8（纯度：98.4%，批号：I267987，加拿大 TRC 公司）；甲酸（色谱纯，美国 MREDA 司）；乙酸铵、乙腈、甲醇（色谱纯，赛默飞世尔科技有限公司）。水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Phenomenex Kinetex EVO C18（30 mm×2.1 mm，2.6 μm）；流动相 A 为水（含 0.05% 甲酸），流动相 B 为乙腈；梯度洗脱（0 ～ 0.3 min，97%A；0.3 ～ 1.1 min，97% ～ 5%A；1.1 ～ 3.8 min，5%A；3.8 ～ 3.81 min，5% ～ 97%A；3.81 ～ 5.0 min，97%A）；柱温：45 ℃；自动进样器温度：8 ℃；流速：0.5 mL • min^{-1}；进样体积：1 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾（ESI）离子源，正离子模式。喷雾气：60 psi，辅助加热气：60 psi，气帘气：35 psi，碰撞气：6 psi。离子源电压：4500 V，离子源温度：750 ℃；多反应监测扫描分析。达沙替尼离子通道选择为 m/z 488.2 → 401.2，CE 为 40 eV，内标伊马替尼 -D8 m/z 502.5 → 394.2，CE 为 39 eV；甲氨蝶呤离子通道选择为 m/z 455.1 → 308.2，内标甲氨蝶呤 -D3 m/z 458.1 → 311.1，CE 分别为 15 eV、30 eV。

2.3 溶液配制

2.3.1 对照品和内标溶液的配制 准确称取甲氨蝶呤 10.3 mg 和达沙替尼 5 mg，用甲醇 - 水（V/V ＝ 1 ∶ 1）分别于 50 mL 量瓶和 500 mL 量瓶中溶解，稀释至刻度，超声助溶，获得储备液。用甲醇 - 水（V/V ＝ 1 ∶ 1）对储备液进行逐级稀释得到甲氨蝶呤质量浓度为 0.1、0.2、1、2、10、20 和 40 μg • mL^{-1} 的标准曲线工作液，达沙替尼质量浓度为 10、20、100、200、1000、2000 和 4000 ng • mL^{-1} 的标准曲线工作液，－ 80 ℃冷冻保存。

准确称取 1.0 mg 伊马替尼 -D8 及 1.0 mg 甲氨蝶呤 -D3，用甲醇分别于 500 mL 量瓶中溶解，稀释至刻度，超声助溶，获得 2 μg • mL^{-1} 的储备液，－ 80 ℃保存。用时制成伊马替尼 -D8 和甲氨蝶呤 -D3 质量浓度均为 100 ng • mL^{-1} 的混合内标工作液。

2.3.2 标准曲线和质控血浆样品制备 在离心管中精密加入 50 μL 甲氨蝶呤和 50 μL达沙替尼各

浓度标准曲线工作液，用 900 μL 空白血浆进行稀释，制成混合血浆样品，达沙替尼质量浓度分别为 0.5、1、5、10、50、100 和 200 ng • mL^{-1}；甲氨蝶呤质量浓度分别为 5、10、50、100、500、1000 和 2000 ng • mL^{-1}。另取空白血浆适量，加入储备液，分别配制成达沙替尼质量浓度为 1.5、7.5 和 150 ng • mL^{-1} 及甲氨蝶呤质量浓度为 15、75 和 1500 ng • mL^{-1} 的低、中、高混合质控样品。

2.4　血浆样品前处理

精密吸取 10 μL 血浆样品于 1.5 mL 离心管中，加入 10 μL 内标和 90 μL 甲醇，涡旋振荡 1 min，12 000 g 离心 10 min，取上清液转移至进样瓶。

2.5　方法学验证

2.5.1　专属性　观察不同来源的血浆对达沙替尼和甲氨蝶呤血药浓度测定的干扰情况。取 6 份不同来源的空白血浆、质控样品和临床样本，按“2.4”项下方法处理后进样分析，结果见图 1，血浆中的内源性物质不干扰达沙替尼和甲氨蝶呤的测定，达沙替尼及伊马替尼 -D8（IS）的保留时间分别为 1.17 min 和 1.16 min；甲氨蝶呤及甲氨蝶呤 -D3（IS）的保留时间均为 1.06 min。

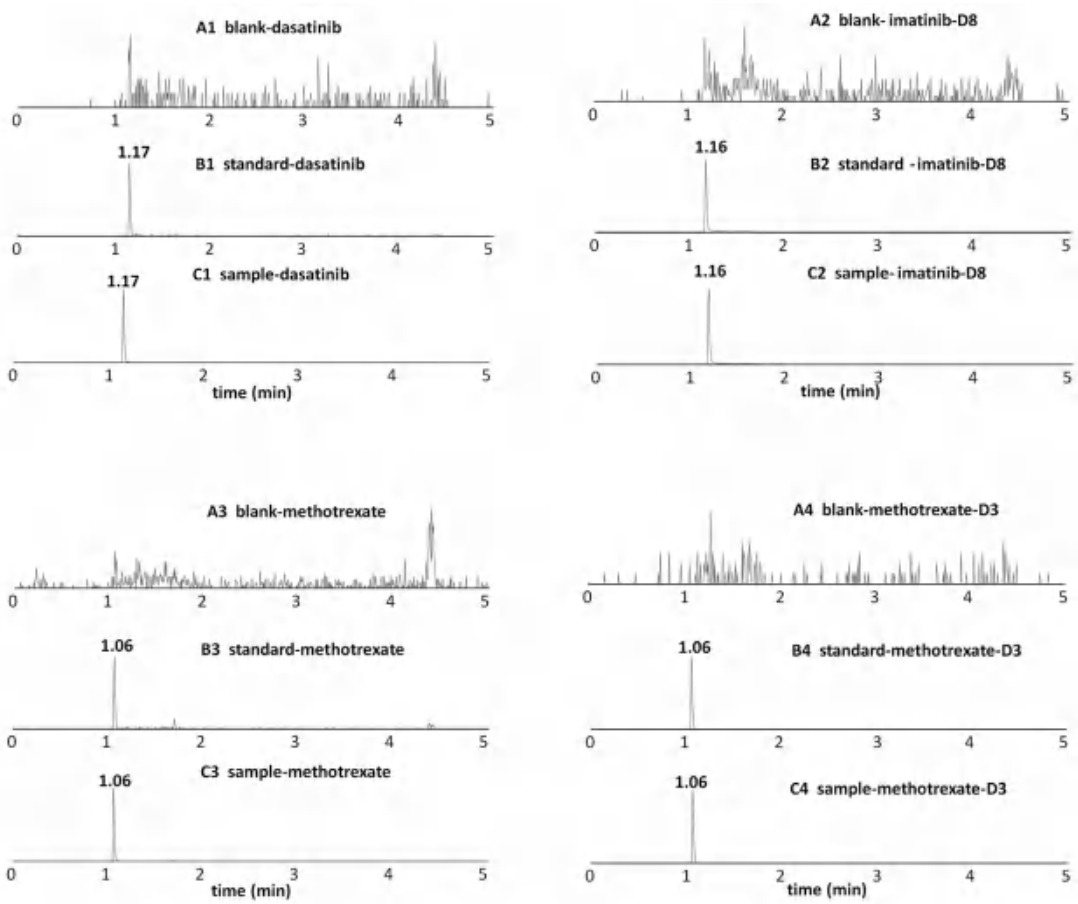


图 1　达沙替尼和甲氨蝶呤 LC-MS/MS 分析的色谱图

Fig 1　LC-MS/MS chromatograms of dasatinib and methotrexate

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋标准溶液（blank plasma spiked with standard solution）；C. 患者血浆样品（plasma sample）

2.5.2　标准曲线与定量下限　按“2.3”项下方法制备得到含药标准曲线样本，进样检测。以质量浓度为横坐标（X），以样品峰与内标物峰面积比值为纵坐标（Y），用最小二乘法进行回归分析，权重为 $1/\chi^2$。达沙替尼回归方程分别是 $Y_1 = 0.067\,42X - 0.002\,17$（$r = 0.9983$）；$Y_2 = 0.062\,39X + 0.001\,46$（$r = 0.9961$）及 $Y_3 = 0.1838X + 0.003\,883$（$r = 0.9947$），线性范围均在 0.5 ～ 200 ng • mL^{-1}，定量下限均为 0.5 ng • mL^{-1}，符合定量要求。甲氨蝶呤回归方程分别是 $Y_1 = 0.009\,00X + 0.001\,01$（$r = 0.9951$）；$Y_2 = 0.008\,41X + 0.004\,89$（$r = 0.9987$）及 $Y_3 = 0.009\,01X + 0.004\,88$（$r = 0.9980$），线性范围均在 5 ～ 2000 ng • mL^{-1}，定量下限均为 5 ng • mL^{-1}，符合定量要求。

2.5.3　精密度与准确度　将低、中、高浓度质控样品和定量下限均按“2.4”项下方法处理，每个浓度平行操作 5 份，连续 3 d 测样。计算日内、日间精密度与准确度，结果见表 1。

表 1 精密度及准确度结果

Tab 1 Accuracy and precision

分析物	理论值 /（ng·mL^{-1}）	批内（n = 5）		批间（n = 15）	
		准确度 /%	精密度 *RSD*/%	准确度 /%	精密度 *RSD*/%
达沙替尼	0.50	105.20	7.2	104.80	7.3
	1.50	102.53	3.8	104.22	5.7
	7.50	98.37	3.8	104.95	6.9
	150.00	92.68	5.8	98.65	7.3
甲氨蝶呤	5.00	105.56	2.7	99.45	10
	15.00	108.97	4.2	105.62	6.6
	75.00	103.61	5.5	106.42	7.4
	1500.00	90.47	4.0	93.82	7.7

2.5.4 提取回收率和基质效应 按“2.3.2”项下方法配制低、中、高 3 个浓度的质控样品，每个浓度平行 5 份，按“2.4”项下方法进行操作，进样检测，记录峰面积；另取空白血浆，按“2.4”项下方法进行操作，不加内标，向获得的上清液中加入内标及相应的低、中、高浓度对照品溶液，每个浓度平行 5 份，进样检测，计算相应峰面积比值，即为提取回收率。

取 6 份不同来源的空白血浆，按“2.4”项下方法进行处理，不加内标，向获得的上清液中加入适量的低、高浓度对照品溶液及内标，进样检测，并与空白溶剂添加相应浓度样品的检测结果进行比较，计算相应浓度的峰面积百分比，即为基质因子。将待测物的基质因子除以内标的基质因子得内标归一化的基质因子。计算得低、高浓度的各化合物的内标归一化基质效应因子及其变异系数（*CV*）。结果见表 2。

表 2 各待测药物在人血浆中的提取回收率和基质效应

Tab 2 Recovery and matrix effect of compounds

分析物	理论值 /（ng·mL^{-1}）	提取回收率（n = 5）		基质效应（n = 6）	
		平均值 /%	*RSD*/%	平均值 /%	*CV*/%
达沙替尼	1.50	83.78	4.4	100.52	14
	7.50	93.53	7.6	—	—
	150.00	92.36	2.1	108.60	14
甲氨蝶呤	15.00	82.37	9.8	100.83	12
	75.00	93.53	7.6	—	—
	1500.00	88.24	6.3	100.10	6.1

2.5.5 残留效应 按照先进样上限浓度血浆样品，后空白血浆样品的顺序进样检测残留，要求高浓度样品之后在空白样品中的残留应不超过定量下限的 20%，并且不超过内标的 5%。结果显示达沙替尼和甲氨蝶呤均没有残留。

2.5.6 稀释可靠性 配制质量浓度分别为达沙替尼 1 μg·mL^{-1} 和甲氨蝶呤 10 μg·mL^{-1} 的对照样品溶液，以 10 倍体积空白血浆稀释上述样品，平行操作 5 份，进样检测，准确度和精密度均在 15% 之内。

2.5.7 稳定性 对影响稳定性的储存条件（如室温 24 h 保存、3 次冻融循环、－ 20 ℃冷冻保存 2 周及样品处理后自动进样器 8 h 的稳定性）进行考察，并与初始值比较。结果如表 3 所示，达沙替尼和甲氨蝶呤在以上条件下均稳定。

表 3 达沙替尼和甲氨蝶呤稳定性结果（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

Tab 3 Stability of dasatinib and methotrexate（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

分析物	理论浓度 /（ng·mL^{-1}）	实测浓度 /（ng·mL^{-1}）			
		室温放置 24 h	自动进样器放置 8 h	3 次冻融循环	－ 20 ℃ 保存 2 周
达沙替尼	1.50	1.59±0.10	1.58±0.12	1.57±0.12	1.52±0.10
	150.00	156.96±11.74	140.44±7.32	146.96±7.66	158.00±8.86
甲氨蝶呤	15.00	16.58±0.95	15.00±0.59	16.58±0.95	15.25±0.67
	1500.00	1651.94±40.49	1467.75±89.84	1651.94±40.49	1559.26±112.51

2.6 方法学应用

应用本方法对 6 例一直服用达沙替尼同时进行大剂量甲氨蝶呤化疗的 Ph^+ ALL 患儿进行血药浓度测定，其中男性 4 例，女性 2 例，年龄 7 ～ 13 岁。具体用药方案为口服达沙替尼 80 mg/（m^2·d），连续给药达稳态，同时甲氨蝶呤静脉输注 3.0 ～ 5.0 g·m^{-2}。样本采血时间点为甲氨蝶呤静脉输注 48 h 后，同时达沙替尼服药前 1 h 左右。血药浓度测定结果见表 4。

3 讨论

3.1 色谱及质谱条件优化

在色谱及质谱条件优化过程中，流动相中添加少量的酸可以有效改善峰形，增加达沙替尼和甲氨蝶呤的质谱响应。另外，离子源温度对达沙替尼灵敏度有明显影响，增加离子源温度可以有效提高达沙替尼的灵敏度，本方法最终选择设置到最高温度 750 ℃。本研究先尝试使用甲醇作为有机相，但达沙替尼有明显残留，后改为乙腈并延长洗脱时间，解决了残留问题。

3.2 方法先进性

① 样本前处理选择甲醇作为沉淀剂，只需一步简单的沉淀蛋白，处理简单，便于操作。同时采用同位素内标，可以减少基质效应的干扰，从而有良好的准确度和精密度。② 本方法中达沙替尼的定量下限为 0.5 ng·mL^{-1}，甲氨蝶呤的定量下限为 5 ng·mL^{-1}，比已有的 LC-MS/MS 法更

表 4　Ph^+ ALL 患儿基本情况及血药浓度结果

Tab 4　Drug administration and trough concentration of Ph^+ ALL patient

No.	性别	年龄 / 岁	给药种类	用药方案	血药浓度
1	女	9	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	3.05 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	5.0 g • m^{-2}	0.16 μmol • L^{-1}
2	男	11	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	4.31 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	3.0 g • m^{-2}	0.09 μmol • L^{-1}
3	女	13	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	29.94 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	5.0 g • m^{-2}	0.06 μmol • L^{-1}
4	男	7	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	2.67 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	5.0 g • m^{-2}	0.19 μmol • L^{-1}
5	男	7	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	＜ 0.5 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	5.0 g • m^{-2}	0.21 μmol • L^{-1}
6	男	8	达沙替尼	80 mg/（m^2 • d）	＜ 0.5 ng • mL^{-1}
			甲氨蝶呤	3.0 g • m^{-2}	0.12 μmol • L^{-1}

低[9-11]，可满足临床 TDM 检测需求，也可用于达沙替尼和甲氨蝶呤的相互作用研究。③ 针对性强，可同时测定达沙替尼和甲氨蝶呤的血药浓度，满足实验室的实际需求。④ 儿童患者血管细小，不易采血，而本方法只需要微量血浆（10 μL），对儿童患者较友好。

3.3　达沙替尼和甲氨蝶呤血药浓度监测的临床意义探索

由于个体差异，有人输注大剂量甲氨蝶呤时会发生延迟排泄，在体内蓄积，进而引起不良反应[12]。达沙替尼血药浓度也具有明显的个体间差异。以往研究显示较低的谷浓度（＜ 2.5 ng • mL^{-1}）可以避免胸腔积液等不良反应[13]。在一项体外研究中，达沙替尼通过影响 SLCO1B1 转运蛋白来抑制甲氨蝶呤摄取，因此怀疑它会延迟甲氨蝶呤消除[6]。另有一项回顾性研究显示同时接受达沙替尼和甲氨蝶呤的患者中甲氨蝶呤的清除率更慢，且部分患者表现出不良反应[6]。达沙替尼和甲氨蝶呤可能会有一定相互作用。

本研究选取了 6 名同时接受达沙替尼和甲氨蝶呤治疗的患者进行血药浓度监测。从结果可以看出达沙替尼的血药浓度个体差异较大，其中一位患者达沙替尼血药浓度达到 29.94 ng • mL^{-1}，患者伴有轻微的肾损伤，而甲氨蝶呤未发现有延迟排泄的情况。使用达沙替尼和甲氨蝶呤药物的患者有必要进行常规 TDM，以提高药物安全性和有效性。

本研究建立了同时测定儿童血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤的 HPLC-MS/MS 法，该法采用稳定同位素内标法，快速、准确、采血量少、专属性强，也可应用于单独的达沙替尼或甲氨蝶呤日常 TDM 工作。

参考文献

[1] Foà R，Chiaretti S. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia [J]. N Engl J Med，2022，386（25）：2399-2411.

[2] Shen SH，Chen XJ，Cai JY，et al. Effect of dasatinib vs imatinib in the treatment of pediatric philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia [J]. JAMA Oncol，2020，6（3）：358-366.

[3] Slayton WB，Schultz KR，Kairalla JA，et al. Dasatinib plus intensive chemotherapy in children，adolescents，and young adults with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia：Results of Children’s Oncology Group Trial AALL0622 [J]. J Clin Oncol，2018，36：2306-2314.

[4] Ccristopher LJ，Cui D，Wu C，et al. Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans [J]. Drug Metab Dispos，2008，36（7）：1357-1364.

[5] 刘加涛，孙小珊，宋帅，等 . 全自动二维液相色谱法测定甲氨蝶呤血药浓度及其临床应用 [J]. 中南药学，2022，20（2）：366-370.

[6] Ramsey LB，Mizuno T，Vinks AA，et al. Delayed methotrexate clearance in patients with acute lymphoblastic leukemia concurrently receiving dasatinib [J]. Pediatr Blood Cancer，2019，66（5）：e27618.

[7] 姚远，卢伟，吕光辉，等 . UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 5 种抗真菌药物的血药浓度 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1590-1594.

[8] 方平飞，谭亲友，李焕德，等 . HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 3 种抗结核药物的浓度 [J]. 中南药学，2010，8（11）：805-808.

[9] 程芳，李强，王静林，等 . HPLC-MS/MS 法用于达沙替尼血药浓度监测 [J]. 医药导报，2022，41（12）：1850-1854.

[10] 董维冲，赵晓晓，张学琴，等 . LC-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] 秦亚彬，李瑞宏，刘少卿，等 . HPLC-MS/MS 法快速检测儿童患者血浆中甲氨蝶呤和万古霉素的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（1）：111-114.

[12] 孙培卓，薛胜楠 . 血药浓度监测在大剂量甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病中的应用及临床意义 [J]. 医学理论与实践，2023，36（2）：282-283.

[13] Wang XN，Amit R，Andreas H，et al. Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib：retrospective exposure-response analysis of a phase Ⅲ study [J]. Clin Pharmacol，2013，5：85-97.

（收稿日期：2023-06-02；修回日期：2023-07-04）

失效模式与效应分析在高血压患者慢病药学服务中的效果评价

张凤怡[1]，钱巧[1]，马红[1]，王淼晶[1]，杨文学[2]，王超璠[3]，翟爱琴[4]（南京医科大学第四附属医院，1.药剂科；2.心内科；3.江苏省医药价格和招标采购管理中心；4.医务部，南京 210031）

摘要：目的 探讨失效模式与效应分析（FMEA）模式在南京医科大学第四附属医院高血压慢病药学服务中的应用效果。**方法** 选取心内科入院诊断为原发性高血压，于 2021 年 1 月—6 月出院的患者 130 例为对照组，于 2021 年 7 月—12 月出院的患者 130 例为干预组。对照组按照常规方法进行高血压慢病药学服务并在出院第 3、6 个月进行随访。干预组在对照组的基础上运用 FMEA 模式进行慢病药学服务改进工作。对比两组患者的临床结局和人文效果。**结果** 干预组患者的血压达标例数、依从性、高血压疾病及用药认知评分和生活方式改善例数均高于对照组（$P < 0.05$），在出院后第 3、6 个月随访时，干预组药物治疗相关问题以及不良反应发生率均低于对照组（$P < 0.05$）。**结论** 该院在高血压慢病药学服务实施中应用 FMEA，分析各类风险失效模式，制订慢病药学服务过程改进措施，提高了用药安全性和药学服务质量。

关键词：失效模式与效应分析；慢病药学服务；高血压患者；依从性
中图分类号：R95，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2476-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.037

Effect evaluation of failure mode and effect analysis for pharmaceutical care of hypertensive patients

ZHANG Feng-yi[1], QIAN Qiao[1], MA Hong[1], WANG Miao-jing[1], YANG Wen-xue[2], WANG Chao-fan[3], ZHAI Ai-qin[4] (1. *Department of Pharmacy*, 2. *Department of Internal Medicine-Cardiovascular*, 3. *Jiangsu Provincial Medical Price and Tendering Procurement Management Center*, 4. *Medical Administration Division*, *The Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210031)

Abstract: Objective To evaluate the application of failure mode and effect analysis (FMEA) in the pharmaceutical care of patients with chronic hypertension in the Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University. **Methods** Totally 130 patients with primary hypertension admitted to the Department of Cardiology and discharged from January to June 2021 were selected as the control group. Another 130 patients discharged from July to December 2021 were selected as the intervention group. The control group was provided with hypertension and chronic disease pharmaceutical care according to the routine and was followed up at the 3rd and 6th months after the discharge. The intervention group used the FMEA to improve the chronic disease pharmaceutical service in addition to service for the control group. The clinical outcomes and humanistic effects of the two groups were compared. **Results** The number of patients in the intervention group who reached standard blood pressure, compliance, hypertensive disease score, medication cognitive score and lifestyle improvement was more than that in the control group ($P < 0.05$). At the follow-up of 3 and 6 months after the discharge, the incidence of treatment related problems and adverse reactions in the intervention group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** FMEA in the implementation of pharmaceutical care for patients with chronic diseases such as hypertension, improves drug safety and pharmaceutical care quality.

Key words: failure mode and effect analysis; pharmaceutical care for chronic disease; hypertensive patient; compliance

基金项目：南京药学会 - 常州四药医院药学科研基金（No.2021YX027）。
作者简介：张凤怡，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学、药理学研究，email：148350367@qq.com

高血压是发病率最高、并发症最多的常见慢性疾病（简称慢病）之一，长期控制不良的高血压状态对心血管器官可产生严重损害。中国高血压调查数据表明，18 岁及以上人群高血压的知晓率、治疗率和控制率分别为 51.5%、46.1% 和 16.9%，较往年虽然有所提高，但总体仍处于较低水平 [1]。研究显示，由医师、药师、护理人员组成的慢病管理团队对高血压患者进行全面系统化管理，对长期血压控制、并发症减少及生活质量改善具有重要作用 [2]。失效模式与效应分析（failure mode andeffect analysis，FMEA）是一种前瞻性的管理工具，通过分析风险指数较高的失效模式潜在原因，实施改进措施以减少风险事件发生，近年广泛运用于医疗机构药事管理提升中 [3-4]。本研究运用 FMEA 模型，分析南京医科大学第四附属医院（以下简称“该院”）高血压慢病药物服务全流程，识别风险因素并制订可操作性改进措施，旨在提高患者药物治疗安全性及依从性。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取心内科入院诊断为原发性高血压 [5]，于 2021 年 1 月—6 月出院的 130 例患者为对照组，于 2021 年 7 月—12 月出院的 130 例患者为干预组。纳入标准：需要接受降压药物治疗者；具有基本读写能力，沟通交流无障碍；患者签署知情同意书，接受药学服务，并按要求能配合随访者。排除标准：存在急性脏器受损或恶性肿瘤并发症；认知功能障碍不能配合评估测试的患者。

1.2　方法

对照组按照常规方法进行高血压慢病药学服务，开展药学查房，患者新入院时进行高血压健康教育，协助临床参与治疗方案制订，住院期间对患者开展治疗方案、用药安全性、患者依从性等药学监护和用药教育，出院时进行宣教，并在出院第 3、6 个月时进行随访。干预组在对照组的基础上运用 FMEA 模型，参照美国医疗风险管理协会《医疗机构 FMEA 最佳推荐使用策略指南》中的相关方法 [6]，进行慢病药学服务改进工作，具体方案如下：

组建团队：参与慢病药学服务相关学科组成团队，由心内科临床药师任组长，以临床药学、心内科医师、护理、质控办、医务部不同部门的具有中级以上职称的医务人员组成 FMEA 干预小组。团队成员在项目开展前经过培训，能够熟练掌握运用 FMEA 的相关流程和实施细则。

制订流程：经 FMEA 干预小组讨论并参考高血压药学服务工作流程 [7]，制订风险管理流程：① 药学查房（次流程：入院评估）；② 药学监护（次流程：适应证、治疗效果、安全性、依从性）；③ 健康生活方式管理（次流程：生活方式指导、健康随访）。

风险识别与评估：经过小组成员查找文献，结合实际工作讨论整理出高血压慢病药学服务流程中的失效模式及潜在的失效原因 [8-9]，并对每一项风险等级分别进行评分，由严重度（severity，S）、发生频度（occurrence，O）和检测度（detection，D）组成，各分为 5 个层级，等级均为 1 ～ 5 分，见表 1。取平均值计算风险优先系数（risk priority number，RPN），RPN ＝ S×O×D，其值越高表明该流程的风险越大，应该重点加强改进 [10]。针对失效原因 PRN 值整合制订改进措施，评价两组患者的临床结局、人文效果 [11-12]。

表 1　FMEA 风险等级评价标准

Tab 1　FMEA risk level evaluation standard

分值	S	O	D
1	无影响：对患者用药安全性和有效性无影响	极低：发生的比率≤ 1/1000	极易发现
2	轻度影响：可能影响患者用药的有效性，但无安全隐患	低：发生的比率为 1/500 ～ 1/1000	易发现
3	中度影响：影响患者用药的有效性，可能存在安全性问题	中等：略有可能发生，发生的比率为 1/200 ～ 1/100	采取一定措施可以发现
4	严重影响：影响患者用药的有效性和安全性	高：可能发生，发生的比率为 1/50 ～ 1/10	难以发现
5	极度影响：影响患者的身体健康或生命安全	极高：很可能发生，发生的比率≤ 1/5	极难发现或无法发现

1.3　评价指标

1.3.1　临床结局　以血压达标率、治疗药物相关问题（drug-related problems，DRPs）、不良反应发生率为评价指标。血压达标率参照我国降压目标值，计算达标例数 [13]。使用欧洲药学监护网络（Pharmaceutical Care Network Europe，PCNE）分类系统对 DRPs 进行分类，统计患者 DRPs 例数 [14]。

1.3.2　人文效果　以患者依从性、患者对高血压疾病及用药认知、生活方式改善为评价指标。以 Morisky 用药依从性量表（Morisky medication adherence scale 8-item，MMAS-8）评价患者依从性，量表总分为 8 分（得分＜ 6 为依从性差，6 ～ 8 分为

依从性中等，8 分为依从性好）[15]。通过设计包括高血压疾病认知、健康管理认知、药物用法用量认知、治疗时间认知和不良反应认知在内的评分量表，评价患者对高血压疾病及用药认知程度，量表总分为 10 分。生活方式以改善吸烟、饮酒、高盐高脂饮食、体力活动、体重指数（BMI）为改善内容，统计患者改善例数。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行处理。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 t 检验；计数资料以率（%）表示，采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基本情况比较

本研究共纳入患者 260 例，至 2022 年 6 月干预组随访研究结束，干预组患者失联 3 例。入组时两组患者在性别、年龄、不良生活习惯、合并基础疾病、是否使用保健品等计数资料差异无统计学意义（$P > 0.05$），在 BMI、入院血压、使用药物种类数等计量资料差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 2。

表 2 两组患者基本情况比较

Tab 2 Basic conditions of 2 groups of patients

项目	干预组	对照组	χ^2/t	P
性别			0.062	0.803
男	74	72		
女	56	58		
年龄			1.057	0.304
＜ 60 岁	52	44		
≥ 60 岁	78	86		
BMI/（kg・m^{-2}）	24.97±4.12	25.09±4.54	0.392	0.532
不良生活习惯			2.149	0.542
吸烟	30	23		
饮酒	11	11		
高盐高脂饮食	25	33		
其他	3	4		
合并基础疾病			2.604	0.107
糖尿病	26	34		
血脂异常	11	19		
高尿酸血症	5	6		
冠心病	103	105		
脑梗死	3	40		
心律失常	18	13		
肾功能不全	11	18		
合并疾病≤ 1 种	74	61		
合并疾病＞ 2 种	56	69		
入院基础血压				
收缩压	146.84±20.16	147.98±12.36	1.167	0.281
舒张压	91.75±20.69	91.89±14.05	0.360	0.549
入院平均使用药物种类数 / 种	5.04±2.66	5.66±2.38	2.482	0.115
≤ 3	92	103		
＞ 3	38	27		
使用保健品			1.356	0.244
是	88	79		
否	42	51		

2.2 风险评估结果及改进措施

RPN 值最高的风险事件为药学监护流程中单次给药剂量过大、给药间隔过短产生剂量相关性不良反应和患者自行更改治疗方案（随机加用或停用药物），RPN 均为 48。高血压慢病药学服务各流程失效模式的潜在风险原因及具体改进措施详见表 3。

2.3 FMEA 实施后两组患者临床效果比较

经过实施 FMEA 干预组患者血压达标例数在住院期间和随访 3、6 个月均高于对照组，出院 3、6 个月后血压达标率较住院时下降，干预组为 76.15% 和 66.92%，高于对照组的 50% 和 41.57%（$P < 0.05$）。不良反应发生率在两组患者住院期间组间无明显差异（$P > 0.05$）；3、6 个月随访时，干预组分别为 13.84% 和 16.15%，显著低对照组的 22.31% 和 36.92%（$P < 0.05$）（见表 4）。

2.4 FMEA 实施后两组患者 DRPs 汇总比较

住院期间两组患者存在 DRPs 例数相近（$P > 0.05$），3、6 个月随访时干预组患者 DRPs 为 41 和 56，显著低于对照组的 59 和 74（$P < 0.05$），随出院后时间延长，患者在自行调整用药剂量、未按正确时间或者间隔用药、联合用药不适宜方面 DRPs 较多（见表 5）。

2.5 FMEA 实施后两组患者人文效果比较

实施 FMEA 后，干预组患者的依从性、高血压疾病及用药认知评分和生活方式改善例数均高于对照组（$P < 0.05$），在出院后 3、6 个月随访时，两组患者的人文效果较住院时均有进行性降低。干预组患者依从性在住院期间与出院 3 个月随访时无显著差异（$P > 0.05$），与出院 6 个月时明显下降（$P < 0.05$）。两组患者高血压疾病用药认知及生活方式改善在出院 3、6 个月后较住院期间均有进行性降低（$P < 0.05$），见表 6。

3 讨论

3.1 该院高血压慢病药学服务主要风险因素

FMEA 管理模式中，高危失效模式的确定和原因分析可直接影响到改进方案的建立，十分重要。该院 RPN 值最高的风险事件为药学监护流程中安全性和依从性环节，如单次给药剂量过大、给药间隔过短产生剂量相关性不良反应和患者自行更改治疗方案（随机加用或停用药物）等。对各类潜在失效模式进行针对性改进，有利于提

表 3　高血压慢病药学服务 FMEA 模式分值及改进措施

Tab 3　FMEA model score of pharmaceutical care for hypertension and its improvement measures

主流程	子流程	失效模式	潜在失效原因	潜在风险				改进措施
				S	O	D	RPN	
药学查房	入院评估	患者用药安全认知评估不到位	患者未能准确提供生活方式、既往病史、家族疾病等相关信息	2	3	2	12	①设计规范化评估路径，诊断明确前提下，患者伴发疾病、既往病史和检查结果、生活方式等情况采用勾选便于记录的形式，并评估心血管危险因素对患者进行心血管综合风险分层；②入院通过药学问诊设计表格获得患者用药信息，住院期间反复多次确认用药史；③询问患者高血压的确诊时间，既往最高血压值，使用血压计类型、监测频率等。指导患者正确测量血压，确认血压是否达标
			患者未能准确提供既往用药药物相关信息	2	3	3	18	
			患者血压测量方式不正确	3	2	2	12	
药学监护	适应证	治疗适应证不适宜	无适应证用药	3	2	2	12	①住院期间密切关注患者的病情进展，每日进行医嘱审核，对用药适宜性进行评估，对药物的选择、用药建议、监护方案等及时与医师沟通，减少不必要的药物治疗与药物相互作用；②通过制订医师沟通计划单，讨论或更改用药方案；③重点关注存在合并症、特殊人群等患者，评价降压药遴选合理性，进行个体化治疗；④与临床共同约定患者用药剂量与间隔，对长效、中效及短效药物制订给药方案与剂量；⑤记录住院期间患者每日血压波动曲线
			重复用药	3	3	2	18	
			需要联合用药增加疗效	3	3	2	18	
			有更加适宜有效的药物	2	2	2	8	
	治疗效果	治疗疗效不佳	患者对药物产生耐受	2	2	3	12	
			给药剂型或者用法不适宜	3	2	3	18	
			给药剂量过低，疗程过短，给药间隔时间太长，无法产生预期疗效	3	3	2	18	
			药物存在相互作用疗效降低	3	3	3	27	
	安全性	患者存在用药安全隐患	发生了与剂量无关的不良反应	3	3	3	27	①掌握各类降压药的常见药品不良反应与处置措施，告知患者识别所用药物的常见药品不良反应，如有疑似发生药物不良反应及时处置；②梳理医院心血管用药禁忌证，判断治疗方案患者是否存在用药禁忌；③参照《中国老年人潜在不适当用药判断标准（2017 年版）》分析患者是否有潜在用药不适当情况；④患者静脉给药期间，充分告知患者及护理人员控制输液滴速，并多次观察；⑤多次确认患者口服药用药时间，避免患者产生用药间隔、剂量错误；⑥对患者进行健康宣教，如使用保健品及时与临床医师沟通
			药物对患者存在使用禁忌	4	2	3	24	
			存在药物相互作用导致不良反应	4	3	3	36	
			给药方案更换频繁	3	3	3	27	
			存在潜在的不适当用药因素	3	3	4	36	
			单剂量给药速度过快	3	4	3	36	
			单次给药剂量过大、给药间隔过短产生剂量相关性不良反应	4	4	3	48	
			患者使用不适宜的保健品	3	3	4	36	
	依从性	患者依从性不佳	患者使用药物方式错误	3	3	3	27	①制订患者用药教育清单，详细讲解患者所用药物治疗作用、用法用量、注意事项；②掌握患者用药时间，评估患者用药过程，告知患者勿擅自更改用药方案；③对于价格相对昂贵的治疗药物，优先遴选国家集采药品替代
			患者自行更改治疗方案（随机加用或停用药物）	4	4	3	48	
			患者忘记服药	3	3	2	18	
			价格因素导致患者不能坚持用药	2	3	3	18	
			患者不能自行用药，需要他人辅助	2	3	1	6	
健康生活方式管理	生活方式指导	患者存在不良生活方式	患者存在烟酒不良嗜好无法戒掉	4	3	3	36	①对患者进行入院及出院健康宣教，包括饮食及体重控制、适当锻炼、限制饮酒和戒烟等，让患者知晓可从生活方式改善中获益；②注意与患者沟通方式，用尽可能通俗语言，避免引起患者不必要焦虑，对患者及陪护进行心理疏导
			患者高盐高脂饮食无法调整	3	3	3	27	
		患者心理状态不佳	患者情绪不稳定，住院期间不能配合治疗	2	2	2	8	
	健康随访	随访失效	患者不配合随访	3	3	1	9	注意随访方式，根据不同患者制订随访方案
			患者失去联系	2	2	1	4	

高药学服务规范性和效率。本研究中干预组和对照组患者平均用药种类数分别为（5.04±2.66）和（5.66±2.38），存在多重用药患者发生 DRPs 风险增加的问题[16]。住院期间，两组患者发生不良反

表 4 FMEA 实施后两组患者临床效果比较

Tab 4 Clinical effect between 2 groups after FMEA implementation

时间	项目	对照组（n = 130）	干预组（n = 130）	χ^2/t	P
住院期间	血压达标 /n（%）	99（76.15）	118（90.77）	10.059	0.002
	不良反应发生率 / n（%）	11（8.46）	14（1.77）	0.398	0.528
出院 3 个月随访	血压达标 / n（%）	65（50.00）	99（76.15）	19.090	0.000
	不良反应发生率 / n（%）	29（22.31）	18（13.84）	3.143	0.076
出院 6 个月随访	血压达标 n（%）	54（41.57）	87（66.92）	16.875	0.000
	不良反应发生率 / n（%）	48（36.92）	21（16.15）	14.382	0.000

表 5 FMEA 实施前后患者 DRPs 汇总比较

Tab 5 Summary of patient DRPs of the 2 groups after FMEA implementation

DRPs 分类	住院期间		出院随访 3 个月后		出院随访 6 个月后	
	对照组（n = 130）	干预组（n = 130）	对照组（n = 130）	干预组（n = 130）	对照组（n = 130）	干预组（n = 130）
药物遴选不适宜	4	5	6	4	7	5
无适应证用药	2	3	3	3	5	5
联合用药不适宜	5	8	7	6	12	10
用药剂型不当	2	1	4	4	5	4
给药剂量不适宜	7	6	5	5	5	3
给药频次不适宜	3	4	7	4	8	5
患者自行调整用药剂量	3	3	9	5	11	8
患者未按正确时间或者间隔用药	5	4	10	6	13	10
患者用药方法错误	2	1	8	4	8	6
合计 /n（%）	33（25.38）	35（26.92）	59（43.84）	41（32.31）	74（56.92）	56（43.08）
χ^2/t	0.08		5.265		4.985	
P	0.778		0.022		0.026	

表 6 FMEA 实施后两组患者人文效果比较

Tab 6 Humanistic effect between 2 groups after FMEA implementation

时间 / 项目	对照组（n = 130）	干预组（n = 130）	χ^2/t	P
住院期间				
依从性（评分，$\bar{x}\pm s$）	5.43±2.52	6.56±0.66	102.120	0.000
高血压疾病及用药认知（评分，$\bar{x}\pm s$）	8.42±0.40	9.55±1.13	196.562	0.000
生活方式改善 / n（%）	107（82.31）	124（95.38）	11.217	0.001
出院 3 个月随访				
依从性（评分，$\bar{x}\pm s$）	4.27±0.68*	6.38±1.57	262.937	0.000
高血压疾病及用药认知（评分，$\bar{x}\pm s$）	6.52±1.33*	7.37±0.80*	39.577	0.000
生活方式改善 / n（%）	78（60.00）*	101（77.69）*	9.486	0.002
出院 6 个月随访				
依从性（评分，$\bar{x}\pm s$）	4.12±1.40*	5.25±1.72*	69.919	0.000
高血压疾病及用药认知（评分，$\bar{x}\pm s$）	4.15±2.41*	6.71±0.69*	174.674	0.000
生活方式改善 / n（%）	54（41.53）*	67（51.54）*	2.613	0.106

注（Note）：与组内住院期间相比，*P < 0.05（Compared with the hospitalization period within the group，*P < 0.05）。

应和 DRPs 例数无显著性差异；出院 3、6 个月随访时，干预组患者 DRPs 以及不良反应发生率低于对照组。DRPs 主要集中在自行调整用药剂量、未按正确时间或者间隔用药及联合用药不适宜等方面，且随出院后时间延长而增加。随访过程中药师发现多数老年患者缺乏医务人员的直接管理监督，随意停药换药现象在对缺乏用药合理性意识和疾病认识的患者中较为普遍。同时，老年患者受限于记忆力及反应力衰退，更易出现 DRPs，对老年高血压患者慢病随访管理更具有难度。临床药师在随访时对患者进行有效沟通和教育，注重随访频率及及时性，能够提升药学服务满意度[17]。

3.2 运用 FMEA 改进慢病药学流程及效果

药学服务的质量主要取决于药师在慢病管理团队中的工作任务和权利，药师与临床和患者之间建立的信任和沟通影响着药学服务的主要结局[18]。临床药师主导的慢病药学服务模式仍有提升空间，药学监护过程有待改进，其专业水平和

临床治疗方案制订、讨论的参与度需要进一步提高[19]。实施 FMEA 后，干预组患者的依从性、对高血压疾病及用药认知和生活方式的改善均高于对照组。在出院第 3、6 个月随访时，干预组的临床结局与人文效果均较对照组明显改善，表明患者面对面直接而持续接受药学服务效果优于间接随访，对药师建立了信任且主观获益更多，临床结局改善程度更大[20]。研究过程中，面对患者的出院随访，临床药师的沟通方式和工作细致认真程度、专业知识储备还需提高。给药方案不当和患者的依从性低，影响治疗疗效及用药安全性。将 FMEA 运用于药师主导的高血压慢病管理中，从前瞻性管理角度分析药学服务潜在的失效模式，明确服务流程和改进，同时能够制订改进失效风险较高的措施。后期 FMEA 仍继续提升，如细化药学服务各类流程，制订切实可行的高血压患者药物治疗管理路径，在持续性应用中不断完善[21]。

参考文献

[1] 中国高血压防治指南修订委员会 . 中国高血压防治指南（2018 年修订版）[J]. 中国心血管病杂志，2019，24（1）：24-56.

[2] 韩爽，武丹威，白颖，等 . 药师主导的慢病管理对出院老年高血压患者血压影响的多中心随机对照试验 [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（5）：38-42.

[3] 赵艺，杨玉琴，荀艳 . 基于 FMEA 法的医院药事质控管理风险评估及改进措施研究 [J]. 中国社会医学杂志，2020，37（4）：346-349.

[4] 赵越，李金贵，张浩，等 . 失效模式与效果分析法用于医院药事管理效果评价 [J]. 中国药业，2022，31（17）：30-33.

[5]《中国高血压防治指南》修订委员会 . 中国高血压防治指南（2018 年修订版）[J]. 中国心血管杂志，2019，24（1）：24-56.

[6] American Society for Healthcare Risk Management. Strategies and tips for maximizing failure mode and effect analysis in an organization [J]. J Healthc Risk Manag，2002，22（3）：9-12.

[7] 杨雅麟，武丹威，韩爽，等 . 药师主导的高血压病管理工作流程探讨 [J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（2）：76-79.

[8] 王莉梅，王雪莹，夏恪迪 . 基于失效模式与效应分析法的临床药学服务风险研究 [J]. 中国医院管理，2016，36（9）：63-65.

[9] 柴劲，王莉梅，刘行梅，等 . 运用 FMEA 法的临床药师绩效考核方式的可行性评价 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（18）：2344-2348.

[10] Lin S，Wang N，Ren B，et al. Use of failure mode and effects analysis（FMEA）for risk analysis of drug use in patients with lung cancer [J]. Int J Environ Res Public Health，2022，19（23）：15428.

[11] 李慧馨，蔡俊，吴秋惠，等 . 药物治疗管理服务在老年慢病患者中的人文效果评价 [J]. 中国现代应用药，2021，38（8）：1002-1007.

[12] 张旭，临床药学在慢病高血压个体化治疗中的应用效果分析 [J]. 中国实用医药，2021，16（34）：181-183.

[13] 孙英贤 . 中国医师协会关于我国高血压诊断标准及降压目标科学声明 [J]. 中华高血压杂志，2018，26（2）：107-109.

[14] Pharmaceutical Care Network Europe（PCNE）. Classification for Drug related problems（V9.1）. [EB/OL]. [2023-2-3]. https：//www. pcne. org/working-groups/2/drug-related-problem-classification.

[15] 俞吉，冉烁，徐玲 . Morisky 用药依从性量表 8 条目在老年慢性病患者用药评价中的应用 [J]. 临床药物治疗杂志，2020，18（11）：63-66.

[16] 吴汀溪，余俊先，邢云利，等 . 利用欧洲药学监护网络分类系统对老年慢病患者用药分析 [J]. 医药导报，2020，39（2）：168-171.

[17] 梅玉虹，田海玉，周戈耀，等 . 住院患者视角下三甲医院临床药学服务开展现状和效果的影响因素研究 [J]. 中国药事，2022，36（2）：185-193.

[18] 张瑞雪，刘清扬，闫素英 . 药师主导以临床指标为主要结局的药物治疗管理研究文献分析 [J]. 中国药师，2021，24（11）：2089-2094.

[19] 崔力，席晓宇，姚东宁，等 . 我国三级医院临床药学服务现状及问题研究：（三）临床药学服务开展现状分析 [J]. 中国药学杂志，2018，53（10）：837-842.

[20] Hirsch JD，Steers N，Adler DS，et al. Primary care-based，pharmacist-physician collaborative medication-therapy management of hyper-tension：a randomized，pragmatic trial [J]. Clin Ther，2014，36（9）：1244-1254.

[21] 高血压患者药物治疗管理路径编写委员会 . 高血压患者药物治疗管理路径专家共识 [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（1）：1-24.

（收稿日期：2023-02-03；修回日期：2023-03-26）

万古霉素血药浓度危急值与急性肾损伤相关性分析

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

摘要：目的 分析万古霉素血药浓度危急值及急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）的相关影响因素。**方法** 收集 2020 年 1 月至 2021 年 12 月期间万古霉素谷浓度出现危急值报告的病例，对患者原患疾病，病原学检查，治疗前、危急值出现时、停药 / 减量后的肾功能指标尿素氮（Bun）和肌酐（Cr），危急值时间，用药情况，疗效等相关临床资料进行统计分析。**结果** 研究期间共 136 例患者合并反馈危急值报告 241 例次，万古霉素谷浓度的平均危急值为 29.40 μg·mL^{-1}；患者平均年龄为（66.77±16.27）岁，主要收治科室为重症医学科、肾移植中心以及肾内科；感染部位以肺部感染比例最高，39 例（28.67%）；病原学送检率为 99.26%，其中 91 例（66.91%）培养结果为 2 种及以上病原体；使用万古霉素后出现危急值的时间为（4.89±2.72）d，用药疗程为（8.11±5.03）d；113 例（83.09%）患者联用一种以上抗菌药物，包括亚胺培南西司他丁钠、替加环素等；反馈危急值报告时，33 例（24.26%）患者发生 AKI，患者的 Bun 和 Cr 水平相较于使用万古霉素前出现显著升高（$P < 0.05$），及时停药 / 调整药物剂量后，Bun 和 Cr 水平出现不同程度的降低；单因素方差分析比较 AKI 组与非 AKI 组，发现万古霉素谷浓度、联合使用亚胺培南西司他丁钠在影响肾功能指标方面差异有统计学意义（$P < 0.05$）；在接受万古霉素治疗过程中，46 例（33.82%）痊愈，25 例（18.38%）出现好转，65 例（47.80%）无效。**结论** 合并使用亚胺培南西司他丁钠的患者更易诱发万古霉素相关 AKI，监测万古霉素血药浓度危急值有助于及时调整给药方案，提高万古霉素用药安全。

关键词：万古霉素；治疗药物监测；危急值；急性肾损伤
中图分类号：R978.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2482-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.038

Correlation between critical blood concentration of vancomycin and acute kidney injury

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

Abstract: Objective To analyze the critical value of vancomycin blood concentration and related influencing factors for acute kidney injury (AKI). **Methods** From January 2020 to December 2021, the patient cases with critical values of vancomycin trough concentration were collected. The clinical data of the patients were analyzed, including the original diseases, etiological examination, renal function indicators of urea nitrogen (Bun) and creatinine (Cr) before the treatment, and after drug withdrawal/dose reduction time when the critical values appeared, the critical values, time of medication, and efficacy. **Results** Totally 136 patients complicated 241 feedback critical value reports during the study period, and the critical value of vancomycin trough concentration was 29.40 μg·mL^{-1} on average. The mean age of the patients was (66.77±16.27) years. The main departments included Critical Care Department, Kidney Transplantation Center and Nephrology Department. The proportion of lung infection was the highest (39 patients, 28.67%). The pathogen detection rate was 99.26%, among which 91 patient cases (66.91%) had cultured two or more pathogens. The time of critical value of vancomycin was (4.89±2.72)

基金项目：常州市科技基础设施建设计划 - 常州市临床药学重点实验室（No.CM20223005）；常州市“十四五”卫生健康高层次人才培养工程（No.KY20221389）。

作者简介：高航，男，硕士，药师，主要从事药理学研究，email：13145221204@163.com *通信作者：胡楠，女，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事治疗药物监测与药物基因检测的研究，email：hn_324@163.com

days, and the course of vancomycin was (8.11±5.03) days. Totally 113 patients (83.09%) received more than one antibiotics, including imipenem cilastatin sodium, tigecycline, etc. When the critical value was reported, 33 patients (24.26%) developed AKI, and the levels of Bun and Cr of patients were significantly increased compared with before vancomycin administration ($P < 0.05$). The levels of Bun and Cr were decreased to varying degrees after timely drug withdrawal/dose adjustment. Single factor analysis of variance was used to compare the AKI group and non-AKI group. The trough concentration of vancomycin and the combination of imipenem and cilastatin sodium had significant effects on the renal function indexes ($P < 0.05$). In the course of vancomycin treatment, 46 patients (33.82%) recovered, 25 (18.38%) improved, and 65 (47.80%) had no effect. **Conclusion** Patients treated with imipenem and cilastatin sodium combination are more likely to develop vancomycin-related AKI. Monitoring the critical value of vancomycin blood concentration helps adjust the dosing regimen in time and improve the safety of vancomycin use.

Key words: vancomycin; therapeutic drug monitoring; critical value; acute kidney injury

万古霉素是一种糖肽类抗菌药物，20 世纪 50 年代开始应用于临床，主要用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，以及其他细菌所导致的感染[1]。万古霉素血药浓度是否达标是治疗感染成功的关键因素，也是减少不良反应、降低病原菌产生耐药和取得良好临床疗效的必要条件，故万古霉素在临床应用时需进行治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）[2]。多项研究统计，接受万古霉素相关治疗的患者中急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）的发生率为 5% ～ 43%，另有文献表明万古霉素导致肾毒性的风险随着万古霉素暴露时间和谷浓度的增加而增加[3]。为了减少万古霉素所致的 AKI 的发生率，将血药谷浓度监测结果超过推荐质量浓度 20 μg·mL^{-1} 设为危急值，当出现危急值时，检测人员应立即对危急值进行复核并第一时间反馈给临床科室，根据患者病情及时调整用药剂量。故在万古霉素使用过程中，应通过万古霉素稳态血药谷浓度的监测使药物浓度维持在推荐的范围之内，以安全合理地使用[4]。本研究对我院近两年使用万古霉素后反馈危急值报告患者的病例资料、监测结果及 AKI 相关影响因素进行统计分析。

1　资料与方法

1.1　临床资料

通过 HIS 系统搜集我院 2020 年 1 月至 2021 年 12 月期间使用万古霉素进行 TDM 以及反馈危急值报告患者的病历，收集患者姓名、年龄、性别、住院号、收治科室以及监测日期。两年内共 136 例患者的 241 例次血清万古霉素浓度反馈危急值报告（＞ 20 μg·mL^{-1}），从反馈危急值报告的患者病历中收集感染部位、病原学检查、万古霉素用药方案（即剂量、剂量调整、联合用药情况、用药疗程）、危急值时间、肾功能指标 [尿素氮（Bun）和肌酐（Cr）] 以及临床疗效等信息。

1.2　血清万古霉素浓度

采用均相酶放大免疫法检测血药浓度，使用的仪器和试剂包括全自动生化分析仪（型号 Viva-E，美国西门子医学诊断产品有限公司），离心机（型号 5417R，德国 eppendorf 公司），万古霉素测定试剂盒（美国西门子医学诊断产品有限公司，操作按照试剂盒说明书进行）。起始谷浓度为万古霉素稳态血药浓度，即在第 4 剂给药前的 30 min 内进行监测。对于重症患者，如需要在达到稳态血药浓度前进行评估，则可在开始治疗后的 24 h 内进行检测以及评估。调整剂量后需要再次检测谷浓度，直至患者在新的剂量方案中达到稳态血药浓度（至少在第 4 剂后进行测定）。

1.3　万古霉素临床疗效

按有效、好转、无效三级标准实施评价。有效：临床症状基本消退，如体征、实验室及病原学检查。好转：用药后病情有所改善，体征、实验室及病原学检查有一项或两项恢复正常。无效：用药后临床症状无改善或加重。

1.4　AKI 评估

根据肾脏疾病改善总体结果（KDIGO）临床实践指南定义 AKI[5]，如果肌酐在 48 h 内上升 26.5 μmol·L^{-1}，或者血肌酐在 7 d 内上升到基线值的 1.5 倍，则患者被诊断为 AKI。本研究中的基线血肌酐是在万古霉素给药前测定的。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件统计分析临床数据，所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，计数资料采用 χ^2 检验，

计量资料采用 t 检验，当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　万古霉素 TDM 危急值报告

我院 2020 年 1 月至 2021 年 12 月期间万古霉素谷浓度出现危急值报告的患者共 136 例，共反馈危急值报告 241 例次。出现危急值频率占万古霉素 TDM 检测总例数的 24.69%（241/976）。患者的特征如表 1 所示。万古霉素谷浓度危急值的平均值为 29.40 μg • mL^{-1}，其中分布在 20 ～ 30 μg • mL^{-1}、30 ～ 40 μg • mL^{-1} 以及 40 ～ 50 μg • mL^{-1} 内的分别有 153 例次、56 例次和 32 例次（见图 1A）。患者危急值报告出现次数见图 1B。

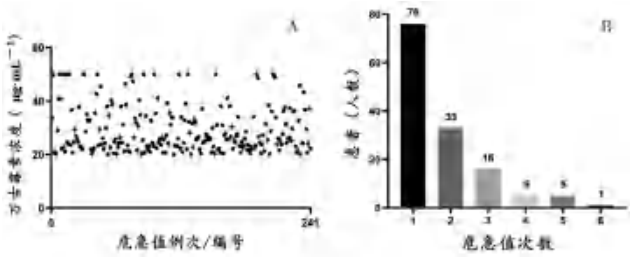


图 1　危急值报告

Fig 1　Critical value report

A. 危急值例次（critical value cases）；B. 危急值次数（number of critical values）

2.2　感染部位及病原学检查

疾病的感染部位主要以肺部感染为主，部分患者合并有高血压、肾功能不全等。135 例患者进行病原学送检，送检率为 99.26%，其中 91 例（66.91%）培养结果为两种及以上病原体；病原学送检标本主要有痰液、尿液、血样、粪便、引流液、脓液等。相关检查结果见表 2。

2.3　万古霉素与其他抗菌药物联用情况

笔者对 136 例患者的抗菌药物联用情况进行了统计，单独使用万古霉素抗感染的有 23 例（16.91%），联合用其他抗菌药物的 113 例（83.09%）。其中联用一种抗菌药物的 59 例（43.38%），联用两种抗菌药物的 36 例（26.47%），联用三种及以上的 18 例（13.24%）。联用抗菌药物中使用频率最多的为亚胺培南西司他丁钠，占比 50.00%，相关抗菌药物联用情况见表 3。

2.4　万古霉素相关急性肾损伤危险因素分析

根据临床实践指南定义，对 136 例患者使用万古霉素前后是否出现 AKI 进行分析诊断，结果发现发生 AKI 的患者有 33 例（24.26%），未发生 AKI 的患者有 103 例（75.74%），从而分组得到 AKI 组与非 AKI 组。由表 4 可知，两组患者在性别、年龄、平均日剂量、平均用药疗程以及联合使用哌拉西林钠他唑巴坦钠 / 替加环素等因素差异无统计学意义（$P > 0.05$），但是两组患者在谷浓度、Bun 和 Cr 以及联合使用亚胺培南西司他丁钠方面差异有统计学意义（$P < 0.05$）。此外，出现危急值时，患者的

表 1　接受万古霉素 TDM 并反馈危急值报告患者的特征

Tab 1　Characteristics of patients who received vancomycin TDM and reported critical values

特征	例数	比例 /%
患者总数	136	25.14
反馈危急值报告例次	241	24.69
男性 / 女性	82/54	1.52
年龄分布 / 岁	14 ～ 99（66.77±16.27）	
＜ 18	1	0.74
18 ～ 40	10	7.35
40 ～ 60	36	26.47
60 ～ 80	65	47.79
＞ 80	24	17.65
收治科室		
重症医学科	51	37.50
肾移植中心	13	9.56
肾内科	11	8.09
骨关节科	6	4.41
心内科	5	3.68
其他	50	36.76
Bun/（mmol • L^{-1}）	9.73±5.11	
Cr/（μmol • L^{-1}）	96.47±44.85	
剂量		
平均日剂量 /g	1.66±0.66	
＜ 1	18	13.24
1 ～ 2	94	69.11
＞ 2	24	17.65
危急值出现时间 /d		
平均时间	4.89±2.72	
＜ 5	104	76.47
＞ 5	32	23.53
疗程 /d		
平均用药疗程	8.11±5.03	
＜ 7	68	50.00
7 ～ 14	56	41.18
＞ 14	12	8.82

表 2　感染部位与病原学检查结果

Tab 2　Sites of infection and results of etiological examination

感染部位	n（%）	病原学检查	n（%）
肺部感染	39（28.67）	金黄色葡萄球菌（包含 MRSA）	32（23.53）
泌尿道感染	32（23.53）	肺炎克雷伯杆菌	28（20.59）
混合感染	26（19.12）	白色念珠菌	25（18.38）
心血管系统感染	19（13.97）	屎肠球菌	18（13.24）
骨和关节感染	9（6.62）	铜绿假单胞菌	15（11.03）
呼吸道感染	7（5.15）	纹带棒杆菌	13（9.56）
腹腔感染	4（2.94）	大肠埃希菌	12（8.82）
		嗜麦芽寡养单胞菌	10（7.35）
		表皮葡萄球菌	9（6.62）

表 3　万古霉素与其他抗菌药物联用情况

Tab 3　Combination of vancomycin and other antibiotics

抗菌药物名称	n（%）
亚胺培南西司他丁钠	68（50.00）
替加环素	15（11.03）
头孢哌酮钠舒巴坦钠	8（5.88）
头孢他啶阿维巴坦钠	7（5.15）
哌拉西林钠他唑巴坦钠	27（19.85）
阿米卡星	2（1.47）
庆大霉素	1（0.74）
两性霉素 B	1（0.74）

Bun 和 Cr 水平都显著性的升高（$P < 0.05$）；停药 / 调整用药剂量后 2 ～ 3 d 再次检测患者的 Bun 和 Cr 水平，Bun 的水平显著性降低，Cr 的水平也出现一定程度的降低，结果如图 2 所示。

表 4　AKI 组与非 AKI 组的单因素分析

Tab 4　Univariate analysis of the AKI group and the non-AKI group

变量	分组		P 值
	非 AKI 组（$n = 103$）	AKI 组（$n = 33$）	
基本资料			
性别男 /n（%）	59（61.46）	22（66.67）	0.593
年龄 / 岁	64.49±16.81	67.94±12.83	0.430
谷浓度 /（μg・mL^{-1}）	28.70±8.12	33.00±9.04	0.008
平均日剂量 /g	1.71±0.68	1.53±0.53	0.09
平均用药疗程 /d	8.58±5.32	7.12±4.35	0.12
Bun/（mmol・L^{-1}）	9.67±5.36	23.53±12.23	0.001
Cr/（μmol・L^{-1}）	91.68±43.67	205.95±98.90	0.001
联合用药 /%			
亚胺培南西司他丁钠	45（46.88）	21（63.64）	0.006
哌拉西林钠他唑巴坦钠	17（17.71）	8（24.24）	0.066
替加环素	12（12.50）	3（9.10）	0.168

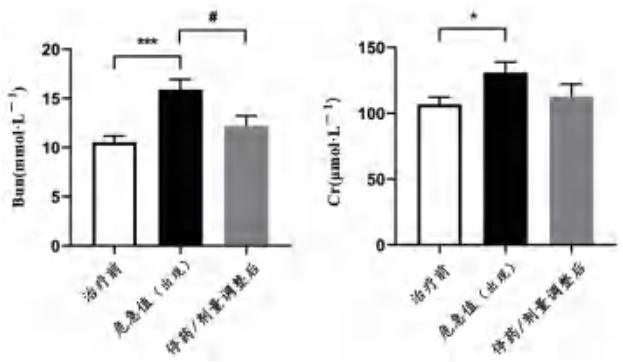


图 2　万古霉素治疗前、危急值出现时以及停药 / 剂量调整后的肾功能指标

Fig 2　Renal function indicators before vancomycin treatment，at critical levels，and after the withdrawal/dose adjustment

注：与治疗前比较，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$；与危急值（出现）比较，$^{\#}P < 0.05$。

Note：Compared with before the treatment，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$；compared with critical value（appear），$^{\#}P < 0.05$.

2.5　临床疗效

在接受万古霉素治疗过程中，136 例患者中 46 例（33.82%）痊愈，25 例（18.38%）出现好转，65 例（47.80%）无效。其中治疗无效的患者中，包括出现危急值报告停药改用其他抗菌药物的患者，临床医师据患者病情经验用药失败然后根据病原学检查调整其他药物的患者以及家属放弃治疗的患者。

3　讨论

我院两年内共 136 例患者万古霉素谷浓度达到危急值，患者特征多为高龄、肾功能异常、患有基础疾病以及病情危重，收治科室主要为重症医学科、肾移植中心和肾内科，因此老年患者以及肾功能不全患者，对万古霉素进行 TDM 尤其必要。在本研究中，出现危急值患者万古霉素常规剂量的用药方案占 50.88%。万古霉素作为有抗菌药物后效应的时间依赖性抗菌药物 [6-7]，其抗感染效果与血清药物谷浓度密切相关。临床中万古霉素主要通过经验性给药方法给药，往往导致大部分患者达不到治疗谷浓度 [8]。纳入研究分析的 136 例反馈危急值报告的患者中，113 例患者首次使用万古霉素就出现谷浓度超出治疗窗的事件，占比为 83.09%，存在肾毒性风险，提示在临床治疗中，临床医师应适时调整用药剂量，使药物达到有效治疗浓度。

笔者根据万古霉素、危急值、AKI 和 TDM 等关键词进行文献检索，发现对于万古霉素危急值报告相关的文献很少。有研究表明，万古霉素相关的肾毒性通常是可逆的，在肾损害发生后及时停用万古霉素或调整剂量，残留损害的发生率较低 [9]。另外根据 Elyasi 等 [10] 的文献综述，44% ～ 75% 的肾毒性患者在停用万古霉素后一周内恢复。本研究显示，76.47% 的患者用药 5 d 内万古霉素高于正常值，文献报道肾毒性发生在万古霉素治疗开始后 4.3 ～ 17 d[11-12]。这样在肾毒性出现的初始阶段，监测报告就会第一时间反馈给临床医师，临床医师在得知血药浓度危急值后，与临床药师会诊，综合考虑患者病情制订有效的方案，并且督促临床医师定期复查血药浓度，直至危急值预警解除。这样早期可最大可能避免药物蓄积浓度升高导致的肾功能持续性损伤，且肾功能也会在调整用药剂量后得到改善和恢复。相应地，在反馈危急值报告时的谷浓度分布以及患者出现危急值次数方面也体现了危急值报告的重要性，患者的谷浓度主要分布在 20 ～ 30 μg・mL^{-1}，说明万古霉素药物浓度蓄积尚在初始阶段，大部分患者仅需减量或停药即可在短时间内恢复到目标谷浓度，大大减少肾毒性发生的风险。另外，

76 例（55.88%）患者只反馈过一次危急值报告，33 例（24.26%）患者反馈两次，仅有少部分患者反馈四到五次，说明大部分出现危急值的患者调整用药剂量后，血药谷浓度迅速恢复到正常范围。

联合用药方面，统计分析的 136 例患者中，23 例（16.91%）患者单独使用万古霉素，113 例（83.09%）患者联合一种及以上抗菌药物，其中联合 3 种及 3 种以上抗菌药物的患者大部分病情危重，感染多种病原菌。联用的抗菌药物中亚胺培南西司他丁钠比例最高，两者协同治疗可以广泛覆盖革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、非典型菌和厌氧菌，研究结果显示联用亚胺培南西司他丁钠对肾功能指标方面差异有统计学意义，可能是通过改变肾脏对万古霉素的处置过程影响肾毒性的进展，另外合用肾毒性药物是万古霉素引起肾毒性的独立风险因素，最常报告的可能是氨基糖苷类抗菌药物[13]，哌拉西林钠他唑巴坦钠[14-15]。其中 30 例（22.06%）患者接受了肾毒性抗菌药物，值得注意的是，这类患者主要集中在重症医学科和肾移植中心，临床医师为控制其感染，仍不得不采用与肾毒性的抗菌药物联合治疗，从而可能增加 AKI 的发生率。本研究中，当患者万古霉素谷浓度高于危急值时，33 例患者发生 AKI，其中 23 例（69.70%）来自重症医学科、肾移植中心以及肾内科，说明这类患者是万古霉素引发 AKI 的主要对象，当患者出现 AKI 时，临床医师应根据患者病情减量或停药后给予辅助药物，并提醒临床给予患者定期监测血药浓度及肾功能。

以往大部分报道是基于万古霉素 TDM 与 AKI 及其相关影响因素的研究，本研究的特点是以万古霉素危急值报告为基础，分析总结万古霉素谷浓度超出安全范围时患者的相关临床情况。本文的研究分析表明高于危急值的万古霉素谷浓度意味着更高的万古霉素暴露，且合并使用亚胺培南西司他丁钠可能会增加万古霉素 AKI 发生的风险。监测万古霉素血药浓度危急值有助于及时调整给药方案，提高万古霉素用药安全，这些结果具有特殊的临床意义。此外，本文的不足之处可能在于样本量有限，未来将通过进一步收集临床资料和相关文献，通过肾功能相关评价指标和相关的实验设计，对与亚胺培南西司他丁钠合用增加肾毒性这一方面进行探讨和研究。

参考文献

[1] Mohr JF，Murray BE. Point：vancomycin is not obsolete for the treatment of infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis，2007，44（12）：1536-1542.

[2] Fawley J，Napolitano LM. Vancomycin enema in the treatment of clostridium difficile infection [J]. Surg Infect，2019，20（4）：311-316.

[3] Vanhal SJ，Paterson DL，Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter [J]. Antimicrob Agents Ch，2013，57（2）：734-744.

[4] 何笑荣，刘志鹤，季双敏，等 . 中国患者人群中万古霉素的群体药代动力学研究及药效预测 [J]. 药学学报，2014，49（11）：1528-1535.

[5] Inker LA，Astor BC，Fox CH，et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD [J]. Am J Kidney Dis，2014，63（5）：713-735.

[6] Hassoun A，Linden PK，Friedman B. Incidence，prevalence，and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment [J]. Crit Care，2017，21（1）：211.

[7] Liu C，Bayer A，Cosgrove SE，et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children：executive summary [J]. Clin Infect Dis，2011，52（3）：285-292.

[8] Ye ZK，Chen YL，Chen K，et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin：a guideline of the division of therapeutic drug monitoring，Chinese pharmacological society [J]. J Antimicrob Ch，2016，71（11）：3020-3025.

[9] Yahav D，Abbas M，Nassar L，et al. Attention to age：similar dosing regimens lead to different vancomycin levels among older and younger patients [J]. Age Ageing，2019，49（1）：26-31.

[10] Elyasi S，Khalili H，Dashti KS，et al. Vancomycin-induced nephrotoxicity：mechanism，incidence，risk factors and special populations. A literature review [J]. Eur J Clin Pharmacol，2012，68（9）：1243-1255.

[11] Kullar R，Leonard SN，Davis SL，et al. Validation of the effectiveness of a vancomycin nomogram in achieving target trough concentrations of 15 ～ 20 mg/L suggested by the vancomycin consensus guidelines [J]. Pharmacotherapy，2011，31（5）：441-448.

[12] Minejima E，Choi J，Beringer P，et al. Applying new diagnostic criteria for acute kidney injury to facilitate early identification of nephrotoxicity in vancomycin-treated patients [J]. Antimicrob Agents Ch，2011，55（7）：3278-3283.

[13] Cano EL，Haque NZ，Welch VL，et al. Incidence of nephrotoxicity and association with vancomycin use in intensive care unit patients with pneumonia：retrospective analysis of the IMPACT-HAP database [J]. Clin Ther，2012，34（1）：149-157.

[14] Luther MK，Timbrook TT，Caffery AR，et al. Vancomycin plus piperacillin-tazobactam and acute kidney injury in adults：a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care Med，2018，46（1）：12-20.

[15] 李星洁，范亚新，赵锦锦，等 . 哌拉西林 - 他唑巴坦相关肾毒性的研究进展 [J]. 中国感染与化疗杂志，2022，22（2）：235-240.

（收稿日期：2023-03-01；修回日期：2023-05-16）

多黏菌素 B 治疗多重耐药和泛耐药菌所致医院获得性肺炎老年患者的观察

苏晶，刘志青，杨悦，陈琳（中南大学湘雅二医院老年医学科，中南大学衰老与老年疾病研究所，长沙　410011）

摘要：目的　观察多黏菌素 B 治疗多重耐药（MDR）和泛耐药（XDR）菌所致医院获得性肺炎老年患者的疗效及不良反应。**方法**　回顾性分析 2018 年 1 月至 2023 年 3 月在中南大学湘雅二医院老年医学科和呼吸与危重症医学科收治的 117 例静脉滴注多黏菌素 B 治疗的 MDR 和 XDR 菌所致医院获得性肺炎老年患者，收集临床资料，根据临床治疗效果分为有效组和无效组，用 Logistic 回归分析影响老年肺炎患者疗效的因素；根据多黏菌素 B 治疗后是否出现急性肾损伤（AKI）分为 AKI 组和无 AKI 组，Logistic 回归分析 AKI 的影响因素。**结果**　117 例患者，平均年龄（74.4±8.9）岁，53 例治疗有效，有效率 45.3%。高急性生理学与慢性健康状况评分系统Ⅱ（APACHE Ⅱ）评分、鲍曼不动杆菌感染、使用血管活性药物、多黏菌素 B 疗程＜ 7 d 为疗效不佳的影响因素。不良反应主要为肾损伤（43 例），AKI 发生率为 36.8%，高 APACHE Ⅱ评分、多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg 和基础血肌酐值是多黏菌素 B 治疗后出现 AKI 的危险因素。**结论**　足疗程给药能够提高多黏菌素 B 治疗老年肺炎患者的有效率，多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg 会增加肾损伤的风险。

关键词：多黏菌素 B；医院获得性肺炎；老年；疗效；不良反应
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2487-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.039

Patients with hospital acquired pneumonia induced by multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria

SU Jing, LIU Zhi-qing, YANG Yue, CHEN Lin (*Department of Geriatrics, Institute of Aging and Geriatrics, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410011)

Abstract: Objective　To observe the clinical efficacy and side effect of polymyxins B in elderly patients with hospital acquired pneumonia induced by multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria. **Methods**　Clinical data of 117 elderly patients with hospital acquired pneumonia Diseases treated with intravenous infusion of polymyxin B in the Department of Geriatrics and Department of Pulmonary and Critical Care of the Second Xiangya Hospital, Central South University from Jan 2018 to Mar 2023 were retrospectively analyzed. Patients were divided into an effective group and an ineffective group according to the therapeutic effect. Logistic regression was used to analyze the factors affecting the therapeutic effect of senile pneumonia patients. Patients were grouped according to whether there was acute kidney injury after polymyxin B treatment. Logistic regression analyzed the factors that affected the kidney function. **Results**　The average age of 117 patients was (74.4±8.9) years old. The drug was effective in 53 patients (45.3%). High APACHE Ⅱ score, infection with acinetobacter baumannii, the use of vasoactive drugs and the course of polymyxin B less than 7 days were factors for less effective clinical treatment. Totally 43 patients (36.8%) experienced. High APACHE Ⅱ score, daily dose of polymyxin B ≥ 150 mg and base serum creatinine value were independent risk factors for acute kidney injury after polymyxin B treatment.

作者简介：苏晶，女，主管护师，主要从事老年呼吸疾病研究，email：503633@csu.edu.cn　*通信作者：杨悦，女，副主任医师，主要从事老年呼吸疾病研究，email：502646@csu.edu.cn

Conclusion Adequate treatment period of polymyxins B can improve the clinical efficacy in elderly patients with hospital acquired pneumonia, but daily dose of polymyxin B ≥ 150 mg increases the risk of renal injury.

Key words: polymyxin B; hospital acquired pneumonia; old age; efficacy; adverse reaction

多黏菌素类抗菌药物于 20 世纪 50 年代末问世，但因为肾功能损害等不良反应被其他有效且更安全的新药取代。目前多重耐药菌感染已被世界卫生组织列为威胁人类健康的主要问题之一，多黏菌素 B 因其在治疗多重耐药革兰氏阴性菌所致感染的良好作用重新受到重视[1-2]。肺炎是老年人常见病、多发病，容易出现多重耐药菌感染，死亡率高，使用多黏菌素常是无奈之举。增龄是肾功能减退的危险因素，重症患者是发生急性肾损伤（AKI）的高危人群，对老年患者需特别关注肾功能情况。本文纳入的病例均为多重耐药和泛耐药菌所致医院获得性肺炎老年危重症患者，回顾分析了多黏菌素 B 的使用情况，总结疗效，关注安全性，供临床用药参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

纳入 2018 年 1 月至 2023 年 3 月在中南大学湘雅二医院老年医学科和呼吸与危重症医学科住院的医院获得性肺炎老年患者 117 例，多种抗菌药物治疗无效后静脉滴注多黏菌素 B（雅乐，注射用硫酸多黏菌素 B，50 万单位，上海上药第一生化药业有限公司）治疗，细菌培养结果证实均为多重耐药（MDR）或广泛耐药菌（XDR）。纳入标准：年龄≥ 65 岁；患者至少使用了 2 d 多黏菌素 B；病历记录完整，有多黏菌素 B 治疗前 1 d 和治疗后至少 2 次（48 h、7 d）肾功能检查结果记录。排除标准：病情危重，生存时间少于 7 d；治疗前、后资料不完整；严重免疫抑制的患者（如获得性免疫缺陷综合征、器官移植术后、肿瘤放化疗后、服用免疫抑制剂和糖皮质激素大于 1 个月）；多黏菌素 B 治疗前肾功能不全患者。本研究经中南大学湘雅二医院伦理委员会批准 [（2023）伦审【临研】第（K029）号]。

1.2 收集资料

利用电子病历系统查阅患者的基本信息：年龄，性别，合并症（糖尿病、高血压病、慢性肾病、心脏病、脑卒中和慢性肺部疾病：慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、陈旧性肺结核），急性生理学与慢性健康状况评分系统Ⅱ（APACHE Ⅱ）评分，住院天数；抗菌药物应用情况：多黏菌素 B 负荷剂量，日剂量，疗程以及联用的其他抗菌药物、肾毒性药物（万古霉素、氨基糖苷类、复方磺胺甲噁唑）、袢利尿剂、血管活性药物（去甲肾上腺素、多巴胺）、糖皮质激素（甲基强的松龙），静脉用药联合雾化治疗；其他处理：入住重症病房（ICU）、机械通气、连续性肾脏替代治疗（CRRT）；使用多黏菌素 B 治疗前、后体温，血常规，肝肾功能，降钙素原（PCT），C 反应蛋白（CRP），影像学检查结果；病原学培养和药敏信息；不良反应上报记录和病程记录中不良反应记载。

1.3 主要观察指标

临床治疗效果评价和不良反应评价是主要观察指标。临床治疗有效定义为：患者使用多黏菌素 B 治疗后，临床症状、生命体征、炎症指标均好转，影像学未进展，并由医院两位有资质的主治及以上医师判断[3]。不良反应评价指观察有无肾功能损害、皮肤色素沉着、肝损伤等。将血清肌酐在 48 h 内升高≥ 26.5 μmol • L^{-1} 或 7 d 内比基线水平升高≥ 1.5 倍的诊断为 AKI[4-5]。谷丙转氨酶、谷草转氨酶升高 2 倍及以上为急性肝功能损害。

1.4 分组

根据临床治疗效果分为有效组和无效组，分析影响老年肺炎患者疗效的因素；根据用药后有无 AKI 进行分组，分为 AKI 组和无 AKI 组，分析发生 AKI 的危险因素。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。定性变量使用绝对数和百分比表示，采用卡方检验。正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验；非正态分布的计量资料用四分位间距表示，采用非参数检验。用 Logistic 回归方法分析变量与临床疗效的关系及引起 AKI 的危险因素，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般资料和微生物学特征

117 例患者，平均年龄（74.4±8.9）岁，男性 87 例（74.4%），女性 30 例（25.6%），平均住院天数 25（13，38）d。具体情况见表 1。

表 1　老年医院获得性肺炎患者的一般临床资料 (n = 117)

Tab 1　Clinical data of elderly patients with HAP (n = 117)

变量	数值
总数（n）	117
平均年龄 / 岁	74.4±8.9
年龄分布 [n（%）]	
＜ 75 岁	58（49.6）
≥ 75 岁	59（50.4）
性别 [n（%）]	
男	87（74.4）
女	30（25.6）
平均住院天数 /d	25（13，38）
APACHE Ⅱ评分 / 分	16.6±3.5
入住 ICU[n（%）]	90（76.9）
高血压病 [n（%）]	66（56.4）
糖尿病 [n（%）]	38（32.5）
慢性肾病 [n（%）]	8（6.8）
心脏病 [n（%）]	52（44.4）
脑卒中 [n（%）]	7（6.0）
慢性肺部疾病 [n（%）]	
慢性阻塞性肺疾病	40（34.2）
支气管扩张	10（8.5）
陈旧性肺结核	11（9.4）
病原学结果 [n（%）]	
鲍曼不动杆菌	45（38.5）
肺炎克雷伯菌	24（20.5）
铜绿假单胞菌	13（11.1）
肺炎克雷伯菌＋铜绿假单胞菌	8（6.8）
嗜麦芽窄食单胞菌	7（5.9）
鲍曼不动杆菌＋肺炎克雷伯菌	1（0.8）
鲍曼不动杆菌＋嗜麦芽窄食单胞菌	3（2.5）
阴沟肠杆菌	3（2.5）
鲍曼不动杆菌＋铜绿假单胞菌	2（1.7）
鲍曼不动杆菌＋奇异变形杆菌	1（0.8）
肺炎克雷伯菌＋洋葱伯克霍尔德菌属	1（0.8）
大肠埃希菌	1（0.8）
其他	3（2.5）

2.2　多黏菌素 B 用药分析

2.2.1　用法用量　117 例患者中 88 例（75.2%）患者使用了负荷剂量 2.0 ～ 2.5 mg • kg^{-1}，29 例（24.8%）未给予负荷剂量；110 例（94.0%）按 1.25 ～ 1.50 mg•kg^{-1}维持剂量，每 12 h 给药一次，用药合理。日剂量为 50 ～ 200 mg，见表 2。

表 2　注射用多黏菌素 B 的每日用量

Tab 2　Daily dosage of polymyxin B injection

日剂量 /mg	数量 [n（%）]
＜ 100	8（6.8）
100 ～ 149	54（46.2）
≥ 150	55（47.0）

2.2.2　用药疗程　8 例用药疗程小于 3 d（为 2 d），32 例为 3 ～ 6 d，51 例为 7 ～ 14 d，14 d 以上的 26 例，注射多黏菌素 B 的用药疗程中位数为 7（5，14）d。

2.2.3　联合使用抗菌药物及其他用药、治疗情况

静脉用药中 21 例（17.9%）予单药治疗，96 例（82.1%）联合其他抗菌药物治疗，其中 58 例联合 1 种抗菌药物，38 例联合 2 种抗菌药物。联合使用抗菌药物前 3 位的分别是美罗培南、头孢他啶阿维巴坦、头孢哌酮钠舒巴坦钠。联合抗菌药物中具有肾毒性抗菌药物 34 例，其中氨基糖苷类 18 例，万古霉素 12 例，复方磺胺甲噁唑 4 例。57 例（48.7%）患者静脉用药的同时联合使用雾化多黏菌素 B 给药，见表 3。

表 3　联合使用抗菌药物情况

Tab 3　Combined antibiotics

联用药物	例数
美罗培南	42
头孢他啶阿维巴坦	20
头孢哌酮钠舒巴坦钠	19
哌拉西林钠他唑巴坦钠	11
替加环素	5
左氧氟沙星	3
氨基糖苷类	18
万古霉素	12
复方磺胺甲噁唑	4

使用糖皮质激素 91 例（77.8%），血管活性药物 77 例（65.8%），袢利尿剂 93 例（79.5%）。CRRT13 例（11.1%），机械通气 102 例（87.2%），其中无创机械通气 29 例，有创机械通气 73 例。

2.3　疗效

使用多黏菌素 B 后，53 例（45.3%）患者临床治疗有效。有效组和无效组两组患者性别、年龄、合并症、白细胞、血肌酐、多黏菌素 B 使用负荷剂量比例及联合雾化吸入比例、日剂量≥ 150 mg 比例、糖皮质激素及袢利尿剂用药比例、机械通气比例差异无统计学意义（均 P ＞ 0.05）。两组在是否静脉联合使用其他抗菌药物方面差异无统计学意义，但无效组单用多黏菌素 B 和联用 1 种抗菌药物的比例较有效组低，联用两种抗菌药物的比例较有效组高。与治疗有效组相比，无效组 APACHE Ⅱ评分、尿素、CRP、PCT 和乳酸脱氢酶（LDH）的水平、鲍曼不动杆菌感染比例、使用血管活性药物比例和 CRRT 比例更高（均 P ＜ 0.05），血清白蛋白、联用肾毒性抗菌药物比例、患者用药疗程≥ 7 d 比例更低（均 P ＜ 0.05）。详见表 4。

将单因素分析中有意义的因素纳入多因素 Logistic 回归分析中，APACHE Ⅱ评分（OR = 0.896，95%CI：0.821 ～ 0.978，P = 0.014）、使用血管活性药物（OR = 0.149，95%CI：0.046 ～ 0.482，P = 0.001）、鲍曼不动杆菌感染（OR = 0.182，95%CI：

0.062 ～ 0.536，P ＝ 0.002）是疗效不佳的影响因素，多黏菌素 B 用药疗程≥ 7 d（OR ＝ 4.122，95%CI：1.469 ～ 11.565，P ＝ 0.007）是增强疗效的影响因素（见表 5）。

表 4　治疗有效组和无效组比较

Tab 4　Comparison between the effective group and the ineffective group

	无效组（n ＝ 64）	有效组（n ＝ 53）	$t/z/\chi^2$ 值	P 值
性别 [n（%）]			0.91	0.44
男	47（73.4）	40（75.5）		
女	17（26.6）	13（24.5）		
平均年龄 / 岁	74.8±8.4	73.8±9.6	0.63	0.53
年龄分组 [n（%）]			0.01	0.92
＜ 75 岁	32（50.0）	26（49.1）		
≥ 75 岁	32（50.0）	27（50.9）		
高血压 [n（%）]	35（54.7）	31（58.5）	0.93	0.64
糖尿病 [n（%）]	24（37.5）	13（24.5）	2.25	0.13
慢性肾病 [n（%）]	5（7.8）	3（5.7）	0.21	0.65
慢性阻塞性肺疾病 [n（%）]	19（29.7）	21（39.6）	1.27	0.26
心脏病 [n（%）]	31（48.4）	21（39.6）	0.91	0.34
脑卒中 [n（%）]	4（6.3）	3（5.7）	3.00	0.08
APACHE Ⅱ评分 / 分	17.8±6.0	15.9±5.3	4.18	0.02
鲍曼不动杆菌 [n（%）]	36（56.3）	16（30.2）	7.98	0.005
肺炎克雷伯菌 [n（%）]	11（17.2）	23（43.4）	9.67	0.002
铜绿假单胞菌 [n（%）]	8（12.5）	15（28.3）	4.58	0.032
嗜麦芽窄食单胞菌 [n（%）]	6（9.4）	4（7.5）	0.12	0.73
使用负荷剂量 [n（%）]	45（70.3）	42（79.2）	1.21	0.27
日剂量≥ 150 mg [n（%）]	25（39.1）	30（56.6）	2.85	0.10
用药时长 /d	10.6±8.3	12.1±5.7	0.66	0.51
用药时长≥ 7 d[n（%）]	30（46.9）	47（88.7）	22.52	＜ 0.001
联合雾化多黏菌素 B[n（%）]	30（46.9）	27（50.9）	0.19	0.66
联合其他抗菌药物数 [n（%）]			6.95	0.03
0 种	8（12.5）	13（24.5）		
1 种	29（45.3）	29（54.7）		
2 种	27（42.2）	11（20.8）		
联合其他抗菌药物 [n（%）]	56（87.5）	40（85.5）	2.85	0.15
糖皮质激素	49（76.6）	42（79.2）	0.12	0.73
血管活性药物	51（79.7）	26（49.1）	12.09	0.001
袢利尿剂	54（84.4）	39（73.6）	2.07	0.17
肾毒性抗菌药物	10（15.6）	24（45.3）	12.37	0.001
CRRT[n（%）]	11（17.2）	2（3.8）	5.28	0.04
呼吸支持治疗 [n（%）]			0.27	0.87
吸氧	9（14.1）	6（11.3）		
无创通气	15（23.4）	14（26.4）		
有创通气	40（62.5）	33（62.3）		
白细胞计数（$\times10^9 \cdot L^{-1}$）	11.7±7.7	11.1±4.7	0.56	0.58
中性粒细胞计数（$\times10^9 \cdot L^{-1}$）	10.5±7.4	9.5±4.5	0.91	0.37
中性粒细胞比值 /%	84.4±11.4	82.4±9.0	1.07	0.28
血清总蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	58.6±7.9	58.7±9.9	0.09	0.93
血清白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	29.0±4.1	31.1±6.1	2.15	0.03
血清尿素 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	11.23（7.20，21.32）	8.83（6.14，13.64）	2.13	0.03
血清肌酐 /（$\mu mol \cdot L^{-1}$）	66.3（46.5，109.4）	65.0（49.2，77.0）	0.86	0.38
CRP/（$mg \cdot L^{-1}$）	99.1（49.6，157.0）	68.1（13.1，125.8）	2.23	0.02
PCT/（$\mu g \cdot L^{-1}$）	0.72（0.21，3.18）	0.18（0.09，0.43）	5.03	0.001
LDH/（$U \cdot L^{-1}$）	323.9（248.6，463.2）	272.3（197.5，315.3）	3.14	0.002
PaO_2/mmHg	82.7±25.5	87.5±23.3	1.04	0.30
$PaCO_2$/mmHg	49.2±17.6	44.3±10.1	1.79	0.08

注：PaO_2 为动脉血氧分压；$PaCO_2$ 为动脉血二氧化碳分压。

Note：PaO_2 is the partial pressure of arterial oxygen；$PaCO_2$ is the partial pressure of arterial carbon dioxide.

表 5　多因素 Logistic 回归分析影响疗效的因素

Tab 5　Multivariate Logistic regression analysis of risk factors for efficacy of clinical treatment

变量	*B*	*SE*	*Wald*	*P* 值	*OR*	95%*CI*	
						下限	上限
APACHE Ⅱ评分	－0.110	0.045	6.022	0.014	0.896	0.821	0.978
使用血管活性药物	－1.903	0.599	10.106	0.001	0.149	0.046	0.482
用药疗程≥ 7 d	1.416	0.526	7.239	0.007	4.122	1.469	11.565
鲍曼不动杆菌感染	－1.704	0.551	9.570	0.002	0.182	0.062	0.536

2.4　多黏菌素 B 不良反应

117 例患者中共有 45 例出现不良反应，发生率为 38.5%，其中主要为 AKI 43 例，AKI 发生率为 36.8%，肝功能损伤 1 例，皮肤色素沉着 1 例。

AKI 组和无 AKI 组年龄、性别、合并症、致病菌种类、多黏菌素 B 治疗前血清白蛋白、血 CRP、PCT、LDH、尿素、多黏菌素 B 使用负荷剂量比例、联合使用抗菌药物比例、联用肾毒性抗菌药物比例、使用血管活性药物、袢利尿剂、糖皮质激素比例、联合雾化治疗比例、CRRT 和机械通气比例差别无统计学意义（均 $P > 0.05$）。与无 AKI 组相比，AKI 组 APACHE Ⅱ评分、基础血肌酐值更高，使用多黏菌素 B 疗程更长，多黏菌素 B 使用 7 d 以上比例、日剂量≥ 150 mg 比例更高（均 $P < 0.05$）（见表 6）。

将单因素分析中有意义的因素纳入多因素 Logistic 回归分析中，APACHE Ⅱ评分（*OR* ＝ 1.154，95%*CI*：1.022 ～ 1.303，*P* ＝ 0.020）、多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg（*OR* ＝ 4.873，95%*CI*：1.448 ～ 16.400，*P* ＝ 0.011）和基础血肌酐值（*OR* ＝ 1.031，95%CI：1.009 ～ 1.052，*P* ＝ 0.005）是多黏菌素 B 治疗后出现 AKI 的独立影响因素（见表 7）。

3　讨论

本研究回顾分析了多黏菌素 B 治疗 MDR 和 XDR 所致医院获得性肺炎老年患者的过程及临床结局指标，探讨多黏菌素的治疗意义以及不良反应发生情况，为老年肺炎患者临床后续选择药物提供支持。

研究显示高 APACHEⅡ评分、鲍曼不动杆菌感染、使用血管活性药物、多黏菌素 B 用药疗程＜ 7 d 为疗效不佳的影响因素。不良反应主要为肾损伤，高 APACHEⅡ评分、多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg 和基础血肌酐值是多黏菌素 B 治疗后出现 AKI 的危险因素。

耐药革兰氏阴性菌感染已经严重威胁人类健康，老年人为肺炎高发人群，肺炎是老年人的主要死亡原因之一，多黏菌素 B 在其他药物治疗无效的革兰氏阴性杆菌感染的挽救性治疗方案中扮演着重要的角色。研究纳入的医院获得性肺炎老年患者，均为在多种广谱抗菌药物治疗效果不佳后使用多黏菌素 B 治疗，75 岁以上患者超过半数，APACHEⅡ评分、多种用药和生命支持治疗说明了病情的危重。多黏菌素 B 的使用根据药品说明书和参考国内外指南 [6-8]，75.2% 的患者给予了负荷剂量，94.0% 的患者每日维持用药合理。整体来说，患者用药选择及用法比较规范。

多黏菌素的疗效报道不一，与感染部位、致病菌和联合用药等有关，有效率多在 45.88% ～ 51.70%[9-12]。李迪彬等 [13] 用多黏菌素 B 联合替加环素治疗 71 例泛耐药肺炎克雷伯菌所致肺炎，第 7 日总有效率为 52.1%，治疗结束时总有效率为 71.8%。在邢佳等 [14] 的研究中，多黏菌素 B 联合常规抗感染药物治疗 82 例 MDR 感染肺炎，有效率 90.2%，细菌清除率 96.65%。本研究治疗有效率 45.3%，低于一般人群，但对于老年肺炎患者还是显示出了较好的疗效。

APACHE Ⅱ评分是临床普遍运用评价重症患者危重程度的指标，是影响患者死亡的独立危险因素。本研究结果表明，高 APACHE Ⅱ评分是影响疗效的危险因素。

分析显示使用血管活性药物是影响疗效的不利因素。血管活性药物为危重症患者常用药物，本研究中 77 例使用了去甲肾上腺素或 / 和多巴胺。对于重症患者越早开始循环干预，越有益于早达到并维持合适的全身和肾脏灌注，去甲肾上腺素仍然是目前维持血压的首选药物，如果一种药物的最大剂量不能改善循环目标，则应增加另一种药物。去甲肾上腺素用于休克治疗比大剂量多巴胺明显减少不良反应，但也有研究去甲肾上腺素治疗可以改善全身循环，并可短暂改善肾功能，但也可能加重肾髓质缺血，进而导致肾衰竭 [15]。杨向红等 [16] 在老年危重患者院内获得性耐碳青霉烯类肺炎的研究中也发现使用血管活性药

表 6 AKI 组和无 AKI 组临床特点比较

Tab 6 Clinical characteristics between acute kidney injury group and non acute kidney injury group

项目	无 AKI 组（n = 74）	AKI 组（n = 43）	$t/z/\chi^2$ 值	P 值
性别 [n（%）]			1.77	0.18
男	52（70.3）	35（81.4）		
女	22（29.7）	8（18.6）		
平均年龄 / 岁	74.6±9.4	73.9±9.6	0.38	0.71
年龄分组 [n（%）]			0.25	0.61
＜ 75 岁	38（51.4）	20（46.5）		
≥ 75 岁	36（48.6）	23（53.5）		
高血压 [n（%）]	43（58.1）	23（53.5）	0.91	0.63
糖尿病 [n（%）]	24（32.4）	14（30.2）	0.06	0.81
慢性肾病 [n（%）]	6（8.1）	2（4.7）	0.51	0.70
慢性阻塞性肺疾病 [n（%）]	21（28.4）	19（44.2）	3.02	0.08
心脏病 [n（%）]	31（41.9）	21（48.8）	0.531	0.56
卒中 [n（%）]	4（5.4）	3（7.0）	0.12	0.71
APACHE Ⅱ评分 / 分	15.7±5.5	18.3±6.8	2.18	0.03
鲍曼不动杆菌 [n（%）]	32（43.2）	20（46.2）	0.12	0.73
肺炎克雷伯菌 [n（%）]	22（29.7）	12（27.9）	0.04	1.00
铜绿假单胞菌 [n（%）]	15（20.3）	8（18.6）	0.05	0.83
嗜麦芽窄食单胞菌 [n（%）]	7（9.5）	3（7.0）	0.21	0.64
多黏菌素 B 使用负荷量 [n（%）]	52（70.3）	35（81.4）	1.77	0.18
日剂量≥ 150 mg[n（%）]	27（37.0）	28（66.7）	9.41	0.002
用药时长 /d	9.4±7.3	14.6±10.8	2.32	0.02
用药疗程≥ 7 d[n（%）]	43（58.1）	34（79.1）	5.31	0.02
联合雾化多黏菌素 B[n（%）]	34（45.9）	23（53.5）	0.62	0.45
联合其他抗菌药物数量 [n（%）]			1.87	0.39
0 种	13（17.6）	8（18.6）		
1 种	40（54.1）	18（41.9）		
2 种	21（28.4）	17（39.5）		
联合其他肾毒性药物 [n（%）]			5.87	0.12
无	55（74.3）	28（65.1）		
万古霉素	4（5.4）	8（18.6）		
氨基糖苷类	13（17.6）	5（11.6）		
复方磺胺甲噁唑	2（2.7）	2（1.7）		
血管活性药物 [n（%）]	46（62.2）	31（72.1）	1.19	0.28
袢利尿剂 [n（%）]	57（77.0）	36（83.7）	0.75	0.48
CRRT[n（%）]	10（13.5）	3（7.0）	1.18	0.37
糖皮质激素 [n（%）]	54（73.0）	37（86.0）	2.67	0.10
呼吸支持治疗 [n（%）]			4.44	0.11
吸氧	12（16.2）	3（7.0）		
无创通气支持	21（28.4）	8（18.6）		
有创通气支持	41（55.4）	32（74.4）		
血清总蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	58.9±9.3	59.3±8.1	0.34	0.73
血清白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	30.4±5.0	29.2±5.4	1.23	0.22
血清尿素 /（$mmol \cdot L^{-1}$）	9.9（6.8，17.1）	10.7（6.4，14.1）	0.27	0.79
血清肌酐 /（$\mu mol \cdot L^{-1}$）	59.0（46.5，81.2）	76.0（49.0，110.0）	2.57	0.01
CRP/（$mg \cdot L^{-1}$）	86.5（26.6，134.8）	79.9（22.5，165.5）	0.13	0.89
PCT/（$\mu g \cdot L^{-1}$）	0.33（0.11，1.98）	0.32（0.14，0.91）	0.46	0.65
LDH/（$U \cdot L^{-1}$）	299.2（250.5，396.2）	265.9（193.0，337.8）	1.63	0.06
PaO_2/（mmHg）	85.0（70.0，96.5）	79.0（66.0，96.0）	0.99	0.32
$PaCO_2$/（mmHg）	47.0±14.4	46.9±15.6	0.01	0.95

物（OR = 25.545，95%CI：9.743 ～ 52.242）是肺炎克雷伯菌血流感染死亡的独立危险因素，认为去甲肾上腺素等缩血管为主的血管活性药物的使用，更容易加重脏器的缺血，增加死亡风险。

研究结果还显示鲍曼不动杆菌感染为疗效不佳的影响因素。感染率与年龄相关[17-18]。鲍曼不动杆菌大多是广泛耐药株，中国细菌耐药监测网的监测数据显示，鲍曼不动杆菌感染对碳青霉烯

表 7　多因素 Logistic 回归分析 AKI 危险因素

Tab 7　Multivariate Logistic regression analysis of risk factors for acute kidney injury

变量	*B*	*SE*	*Wald*	*P* 值	*OR*	95% *CI*	
						下限	上限
APACHE Ⅱ评分	0.143	0.062	5.374	0.020	1.154	1.022	1.303
基础血肌酐值	0.030	0.011	7.870	0.005	1.031	1.009	1.052
多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg	1.584	0.619	6.542	0.011	4.873	1.448	16.400

类抗菌药物的耐药率从 2005 年的 31% 逐年上升至 2019 年的 79%，在本研究中，52 例（44.4%）检出鲍曼不动杆菌，其中 40 例（76.9%）碳青霉烯耐药。多黏菌素和替加环素是近年来治疗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的一线药物，即使与其他抗菌药物联合使用，临床疗效仍不确切 [19]。

为了达到最佳的临床结果，美国 IDSA/ATS 制定的 HAP/VAP 指南 [20] 强烈建议进行为期 7 d 的抗菌治疗。我们的研究结果也显示≥ 7 d 的用药时长和疗效独立相关。叶冰等 [21] 在分析多黏菌素 B 治疗泛耐药鲍曼不动杆菌感染疗效时，发现使用多黏菌素 B 用药时间≥ 7 d 获得了更高的细菌清除率及总有效率，这说明多黏菌素 B 的给药疗程是决定其疗效的一大重要因素，在临床中需考虑到足疗程给药。

在现有的文献报道中，多黏菌素 B 主要的不良反应是肾毒性、神经毒性、皮肤色素沉着等 [22]，以肾毒性最常见，系统评价和荟萃分析发现，多黏菌素 B 所致的 AKI 发生率为 38%（95%*CI*：32% ～ 44%），并且高龄是发生肾毒性的独立危险因子 [23-24]，患者基础肌酐值越高，用药后 AKI 发生的风险也越高 [25-26]。在发达国家重症监护室 AKI 的发病率为 39.3%，死亡率为 30.8%；在发展中国家的发病率为 35.1%，死亡率为 54.8%[27]。一项纳入了欧洲多中心 ICU 1177 例脓毒症患者的前瞻性队列研究结果显示，AKI 的发病率为 51%，病死率为 41%，即使在没有严重脓毒症或脓毒性休克的患者中，AKI 也很常见 [28]。

本研究中 AKI 发生率为 36.8%。多因素 Logistic 回归分析发现高 APACHE Ⅱ评分，多黏菌素 B 日剂量≥ 150 mg 和基础血肌酐值是 AKI 的独立影响因素。

Azad 等 [29] 的研究中多黏菌素 B 诱导肾毒性的主要途径是浓度依赖性和时间依赖性，陈丽娟等 [7] 研究显示高剂量多黏菌素 B（≥ 2.50 万 U • kg^{-1} • d^{-1}）与 AKI 的发生独立相关。不少临床研究发现，日剂量≥ 150 mg 是多黏菌素 B 诱发 AKI 的危险因素，肾毒性的发生主要与日剂量有关，当日剂量＜ 150 mg 时，AKI 发生率为 32.0%；当日剂量为 150 ～ 199 mg 时，AKI 发生率为 54.0%；当日剂量≥ 200 mg 时，AKI 发生率为 44.8%[23]。

肾脏是容易衰老的器官之一，增龄带来肾功能减退，研究也显示了基础血肌酐值是 AKI 的独立影响因子。且老年人各种合并症多，糖尿病和高血压是导致肾脏病发病和死亡的首要原因，纳入人群合并糖尿病和高血压的比例分别为 32.5%、52.4%。研究显示多黏菌素 B 主要通过非肾途径清除，尿中的原形药物＜ 1%，肾功能不会影响多黏菌素 B 血浆浓度 [6]。国内共识建议发生肾毒性时多黏菌素 B 无需调整剂量，肾功能多数在停药后可恢复 [8]。但最近的一项荟萃分析表明，发生 AKI 的患者部分会逐步发展为不可逆的慢性肾脏病（CKD）直至终末期肾病。一篇纳入 82 项研究（包括 200 多万例患者）的荟萃分析显示，AKI 患者发生 CKD 的风险较非 AKI 人群明显增加 [27]，本研究部分患者因多黏菌素 B 疗效差放弃治疗，故未能追踪到停药后肾功能的变化，无法了解肾功能是否恢复。

本研究对象均为危重症的老年患者，用药和器官支持治疗等非常复杂。基础疾病、严重感染、多重用药均为影响肾功能的因素，研究结果显示高 APACHE Ⅱ评分是发生 AKI 的危险因素，虽然并未显示包括肾毒性抗菌药物在内的其他药物与 AKI 的明显相关性，但老年人是药源性肾损害的高危人群 [30]，感染引起的肾功能不全可能是暂时的，肾毒性抗菌药物可能通过有效的抗感染治疗改善肾功能，但在老年患者是慎用的 [28]，需权衡利弊。糖皮质激素、血管活性药物、袢利尿剂均为危重症患者救治的常用药，特别是血管活性药物，本研究中显示其是影响多黏菌素 B 疗效的因素，虽然研究结果未显示和 AKI 的相关性，但不同的血管活性药物对肾脏影响有差异，在选择时也需注意。

综上所述，本研究中多黏菌素 B 治疗 MDR 和 XDR 所致老年医院获得性肺炎有较好的疗效，鉴于本研究观察的是多黏菌素 B 治疗前肾功能正常的人群，故认为多黏菌素 B 在这部分患者是可以推荐的，建议至少 7 d 的足疗程给药，期间密切观察肾功能变化。日剂量 150 mg 以上会增加 AKI 的风险，有必要摸索更适合老年人的剂量，减少肾损伤发生。

本研究存在以下的局限性：为单中心的回顾性研究，且研究对象数量少，研究结果仍需要更大规模的临床研究来证实；观察指标为临床治疗效果，未能观察死亡率，未能对肾功能变化进行较长时间的追踪观察；因多黏菌素 B 在肾功能不全的患者中使用人数较少，未纳入本研究。

参考文献

[1] Velkov T，Thompson PE，Azad MAK，et al. History，chemistry and antibacterial apectrum [J]. Adv Exp Med Biol，2019，1145：15-36.

[2] Nang SC，Azad MAK，Velkov T，et al. Rescuing the last-line polymyxins：achievements and challenges [J]. Pharmacol Rev，2021，73（2）：679-728.

[3] Zeng HH，Zeng ZH，Kong XL，et al. Effectiveness and nephrotoxicity of intravenous polymyxin B in chinese patients with MDR and XDR nosocomial pneumonia [J]. Front Pharmacol，2021，11：579069.

[4] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury [J]. Nephron Clin Pract，2012，120（4）：c179-c184.

[5] 闫钢风，张俊琦，王一雪，等 . 抗菌药物不良反应及重要脏器损伤的判断 [J]. 中国小儿急救医学，2022，29（5）：326-329.

[6] Tsuji BT，Pogue JM，Zavascki AP，et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins：endorsed by the American college of clinical pharmacy（ACCP），European society of clinical microbiology and infectious diseases（ESCMID），infectious diseases society of America（IDSA），international society for anti-infective pharmacology（ISAP），society of critical care medicine（SCCM），and society of infectious diseases pharmacists（SIDP）[J]. Pharmacotherapy，2019，39（1）：10-39.

[7] 陈丽娟，吴晓丽，杨康群，等 . 多黏菌素 B 对多重耐药革兰阴性细菌感染的疗效与肾毒性分析 [J] . 中华全科医师杂志，2021，20（9）：997-1002.

[8] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会，中华医学会呼吸病学分会，中华医学会重症医学分会，等 . 中国多黏菌素类抗菌药物临床合理应用多学科专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44（4）：292-310.

[9] 李蒙，彭龙希，蓝高爽，等 . 基于临床治疗指南及共识的住院患者多黏菌素 B 应用分析与评价 [J]. 中国药房，2023，34（6）：730-734.

[10] 刘红，王小华，邵敏，等 . 我院 104 例患者多黏菌素 B 临床应用的回顾性分析 [J]. 中国新药杂志，2022，31（18）：1858-1864.

[11] 郭婷婷，朱丽 . 85 例注射用硫酸多黏菌素 B 用药合理性评价与分析 [J]. 中国抗生素杂志，2021，46（11）：1063-1068.

[12] 刘昌伟，胡立芬，汪燕燕，等 . 多黏菌素 B 治疗耐碳青霉烯革兰阴性菌脓毒症的疗效和肾毒性 [J]. 上海医药，2022，43（13）：26-28，50.

[13] 李迪彬，郝谦谦，令狐海瑞，等 . 多黏菌素 B 联合替加环素对泛耐药肺炎克雷伯菌所致肺炎的临床疗效 [J]. 国际生物医学工程杂志，2022，45（1）：31-35.

[14] 邢佳，宋雅妹，宋竹翠，等 . 多黏菌素治疗多药耐药革兰阴性杆菌感染肺炎的效果 [J]. 中华医院感染学杂志，2021，31（21）：3264-3268.

[15] 晁彦公，中国重症超声研究组 . 脓毒症急性肾损伤时血管活性药物的选择 [J]. 临床荟萃，2019，34（7）：599-603.

[16] 杨向红，何方，吕智全，等 . 老年危重病患者院内获得性耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌血流感染预后的相关因素 [J]. 中华老年医学杂志，2020，39（5）：530-534.

[17] 邓小娟，蒋翠云，贝宁，等 . 老年医院感染耐碳青霉烯鲍氏不动杆菌分布及耐药基因 [J]. 中华医院感染学杂志，2021，31（16）：2416-2420.

[18] 邹亚宁，蒋军广，崔永亮，等 . 老年人耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌支气管 - 肺感染的临床特点及药敏分析 [J] . 国际呼吸杂志，2019，39（10）：728-733.

[19] 王子璇，俞蕙 . 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌抗菌药物治疗的现状及进展 [J] . 中华传染病杂志，2022，40（10）：636-640.

[20] Kalil AC，Metersky ML，Klompas M，et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia：2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American thoracic society [J]. Clin Infect Dis，2016，63（5）：e61-e111.

[21] 叶冰，翁钦永，陈影，等 . 多黏菌素 B 治疗泛耐药鲍曼不动杆菌感染的临床分析 [J]. 福建医科大学学报，2019，53（6）：405-408.

[22] Pogue JM，Tam VH. Toxicity in patients [J]. Adv Exp Med Biol，2019，1145：289-304.

[23] 李颖，邓阳，张毕奎 . 多黏菌素 B 的药动学和药效学与肾毒性的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33（8）：633-640.

[24] Sisay M，Hagos B，Edessa D，et al. Polymyxin-induced nephrotoxicity and its predictors：a systematic review and meta-analysis of studies conducted using RIFLE criteria of acute kidney injury [J]. Pharmacol Res，2021，163：105328.

[25] Nation RL，Rigatto MHP，Falci DR，et al. Polymyxin acute kidney injury：dosing and other strategies to reduce toxicity [J]. Antibiotics（Basel），2019，8（1）：24.

[26] Min KL，Son ES，Kim JS，et al. Risk factors of colistin safety according to administration routes：intravenous and aerosolized colistin [J]. PLoS One，2018，13（11）：e0207588.

[27] 张辉，潘斌斌，万辛 . 急性肾损伤转化为慢性肾脏病的机制 [J]. 中华老年医学杂志，2023，42（2）：234-238.

[28] 徐丽，孙鹏 . 脓毒症相关性急性肾损伤的识别和管理 [J]. 中华危重病急救医学，2023，35（2）：221-224.

[29] Azad MA，Akter J，Rogers KL，et al. Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells [J]. Antimicrob Agents Chemother，2015，59（4）：2136-2143.

[30] 魏珊，刘英莉 . 老年人药源性肾损害的原因及全 - 专联合预防策略的探讨 [J]. 中国全科医学，2021，24（17）：2140-2147.

（收稿日期：2023-06-12；修回日期：2023-07-26）

环泊酚与丙泊酚用于无痛胃肠镜疗效与安全性的 Meta 分析

韩俊萍[1]，沈珠[1]，罗兴献[2]，朱江[3]，潘杰[1*]（1. 苏州大学附属第二医院药学部，江苏　苏州　215004；2. 清华大学药学院，北京　100084；3. 苏州大学附属第二医院麻醉科，江苏　苏州　215004）

摘要：目的　系统评估环泊酚与丙泊酚用于无痛胃肠镜镇静的疗效和安全性。**方法**　计算机检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、中国知网、万方、维普数据库自建库至 2022 年 9 月 30 日发表的关于环泊酚与丙泊酚用于无痛胃肠镜患者的随机对照临床试验，采用 RevMan 5.3 软件进行 Meta 分析。**结果**　共纳入 5 项研究，涉及 808 例患者。Meta 分析结果显示，环泊酚与丙泊酚组在镇静有效率（*RR* ＝ 1.01，95%*CI*：0.99 ～ 1.03，*P* ＝ 0.39）、麻醉诱导时间（*WMD* ＝ 0.38，95%*CI*：－ 0.10 ～ 0.87，*P* ＝ 0.12）、苏醒时间（*WMD* ＝ 0.88，95%*CI*：－ 0.53 ～ 2.28，*P* ＝ 0.22）、医师满意率（*RR* ＝ 1.05，95%*CI*：0.96 ～ 1.14，*P* ＝ 0.26）和患者满意率（*RR* ＝ 1.07，95%*CI*：0.96 ～ 1.19，*P* ＝ 0.24）方面差异无统计学意义。环泊酚组麻醉后离院时间（*WMD* ＝ 1.87，95%*CI*：0.71 ～ 3.04，*P* ＜ 0.05）略长于丙泊酚组。在主要不良反应发生率方面，与丙泊酚相比，环泊酚用于无痛胃肠镜具有更低的注射痛（*RR* ＝ 0.09，95%*CI*：0.05 ～ 0.15，*P* ＜ 0.05）、心动过缓（*RR* ＝ 0.10，95%*CI*：0.06 ～ 0.16，*P* ＜ 0.05）、呼吸抑制（*RR* ＝ 0.22，95%*CI*：0.11 ～ 0.42，*P* ＜ 0.05）发生率。**结论**　相比于丙泊酚用于无痛胃肠镜检查，环泊酚镇静有效率、麻醉诱导时间、苏醒时间、医患满意率相当，注射痛、心动过缓、呼吸抑制的发生率更低，可作为无痛胃肠镜镇静较好的药物治疗选择。

关键词：环泊酚；丙泊酚；无痛；胃肠镜；Meta 分析

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2495-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.040

Meta-analysis of the efficacy and safety of ciprofol and propofol used in painless gastrointestinal endoscopy

HAN Jun-ping[1], SHEN Zhu[1], LUO Xing-xian[2], ZHU Jiang[3], PAN Jie[1*] (1. *Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Soochow University*, *Suzhou Jiangsu* 215004; 2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084; 3. *Department of Anesthesiology*, *The Second Affiliated Hospital of Soochow University*, *Suzhou Jiangsu* 215004)

Abstract: Objective　To determine the efficacy and safety of ciprofol and propofol in painless gastrointestinal endoscopy patients. **Methods**　The databases of PubMed, Cochrane Library, Embase, CNKI, WanFang and VIP database were retrieved for randomized controlled trials (RCT) of ciprofol and propofol used in painless gastrointestinal endoscopy from inception to September 30, 2022. Meta-analysis was conducted with RevMan 5.3 software. **Results**　Totally 5 articles involving 808 patients were included. The meta-analysis showed no significant difference in the sedation success rate [*RR* ＝ 1.01, 95%*CI*: 0.99 ～ 1.03, *P* ＝ 0.39], anesthesia induction time [*WMD* ＝ 0.38, 95%*CI*: － 0.10 ～ 0.87, *P* ＝ 0.12], wake-up time [*WMD* ＝ 0.88, 95%*CI*: － 0.53 ～ 2.28, *P* ＝ 0.22], doctor satisfaction [*RR* ＝ 1.05, 95%*CI*: 0.96 ～ 1.14, *P* ＝ 0.26] and patient satisfaction [*RR* ＝ 1.07, 95%*CI*: 0.96 ～ 1.19, *P* ＝ 0.24]. The departure time in the ciprofol group was slightly longer than that in the propofol group [*WMD* ＝ 1.87, 95%*CI*: 0.71 ～ 3.04, *P* ＜ 0.05]. In terms of major adverse

基金项目：苏州市民生科技 - 医疗卫生应用基础研究项目（No. SYSD2020182）。

作者简介：韩俊萍，女，硕士，主管药师，主要从事疼痛药物治疗管理方面的研究，email：hanjp0311@163.com　*通信作者：潘杰，男，硕士，主任药师，主要从事药物治疗管理方面的研究，email：panzy1122@163.com

reactions, ciprofol had lower incidence of injection pain [*RR* = 0.09, 95%*CI*: 0.05 ～ 0.15, *P* < 0.05], bradycardia [*RR* = 0.10, 95%*CI*: 0.06 ～ 0.16, *P* < 0.05], and respiratory depression [*RR* = 0.22, 95%*CI*: 0.11 ～ 0.42, *P* < 0.05]. **Conclusion** In painless gastroenteroscopy, the sedation success rate, anesthesia induction time, wake-up time, doctor and patient satisfaction of ciprofol are similar to those of propofol, while ciprofol has lower incidence of injection pain, bradycardia and respiratory depression. Ciprofol can be used as a better option for sedation in painless gastrointestinal endoscopy.
Key words: ciprofol; propofol; painless; gastrointestinal endoscopy; meta-analysis

胃肠镜检查是目前临床上常见的一种检查方式，对于消化道疾病的诊断和治疗具有独特的优势。然而，胃肠镜检查具有侵入性，患者在检查过程中容易出现难以忍受的不适感，从而影响了胃肠镜检查的顺利开展。为利于操作并提高患者舒适度，临床上建议患者通过无痛方式进行胃肠镜检查。丙泊酚是无痛胃肠镜镇静的重要药物，具有麻醉起效快、苏醒时间短的优势，然而，丙泊酚的治疗指数较窄，患者可能很快转为较深度镇静，可导致呼吸暂停、气道梗阻、低氧血症、低血压等[1]。

环泊酚是我国自主研发并拥有自主知识产权的创新药，于 2020 年 12 月经国家药品监督管理局批准上市。环泊酚属于短效 γ- 氨基丁酸 A 型（GABAA）受体激动剂，其作用机制是通过增强 γ- 氨基丁酸（GABA）介导的氯离子内流而产生镇静或麻醉作用，目前已通过审批的适应证包括：消化道内镜检查术镇静和成年患者全身麻醉诱导[2]。目前环泊酚用于无痛胃肠镜检查的时间并不长，相比于传统镇静药物丙泊酚是否具有明显优势尚需探究。因此，本研究通过对环泊酚用于无痛胃肠镜检查开展循证医学研究，以期为临床用药提供更多的循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

以 PubMed、Embase、Cochrane Library、中国知网（CNKI）、万方（WanFang）数据库、维普（VIP）数据库为检索来源。中文以“环泊酚”“丙泊酚”“胃镜”“肠镜”“胃肠镜”“消化内镜”为检索词；英文以“ciprofol”“cipepofol”“HSK3486”“propofol”“gastroscopy”“colonoscopy”“gastrointestinal endoscopy”“gastroenteroscopy”作为检索词并同时结合自由词且限定“randomized controlled trial”或“clinical trial”进行检索。筛选有关环泊酚和丙泊酚用于无痛胃肠镜检查的随机对照试验（RCT）。检索时间为数据库建库至 2022 年 9 月 30 日。

1.2 纳入标准

① RCT；② 干预措施：试验组为环泊酚，对照组为丙泊酚，均可联合或不联合阿片受体激动剂，但其他干预措施在两组间相同；③ 研究对象：需要接受麻醉的无痛胃镜、肠镜、胃肠镜患者，年龄、性别、国籍不限；④ 结局指标：镇静有效率，镇静有效的定义为顺利完成胃肠镜检查且未使用其他镇静补救药物以及在首次给药 15 min 内追加镇静药物≤ 5 次[2]；主要不良反应（ADR）发生率，如低血压、心动过缓、注射痛、呼吸抑制等；麻醉相关时间指标，如麻醉后诱导时间、苏醒时间和离院时间；满意度情况，如医师满意率和患者满意率。

1.3 排除标准

① 重复文献、病例报告、个案报道、文献综述、试验方案、动物实验、基础研究试验及非随机对照试验；② 未公开发表的研究或无法获取全文的文献；③ 文献不能提供有效数据以进行综合分析；④ 结局指标不符合本研究要求。

1.4 文献筛选及资料提取

两名研究者独立检索文献并使用统一的提取表提取资料，再交叉核对，如遇分歧通过讨论或由第三名研究者协助解决。提取内容包括文献作者、发表年份、操作方式、研究人群例数、年龄、干预措施和结局指标。采用 Cochrane 风险偏倚评估工具[3]评价文献质量，评价内容包括随机序列产生，分配隐藏，是否对受试者、操作者及结果评价者实施盲法，结局数据的完整性，选择性报告研究结果及其他偏倚，结果包括低偏倚风险、偏倚风险不清楚和高偏倚风险三种表述。

1.5 统计学处理

Meta 分析由软件 RevMan 5.3 版完成。计数资料的效应指标采用风险比（*RR*）表示，计量资料的效应指标采用加权均数差值（*WMD*）表示，同时计算 95% 可信区间（*CI*）。采用卡方检验判断各纳入研究结果间的异质性，若 $P > 0.10$，且 $I^2 < 50\%$，表明同质性较好，宜采用固定效应模型分析。若 $P < 0.10$ 或 $I^2 > 50\%$ 表明统计上具

有异质性，采用随机效应模型分析数据。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　文献检索结果

通过检索获得 96 篇相关文献，删除相关重复性文章，根据纳入、排除标准，并且充分阅读摘要以及全文内容，最终纳入 5 篇文献，共计 808 例患者。文献筛选流程如图 1 所示。

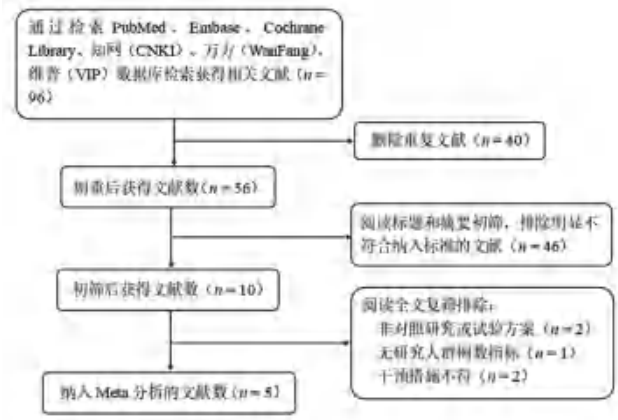


图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Screening process of the eligible literatures

2.2　纳入文献的基本特征和质量评价

纳入随机对照临床试验的一般情况见表 1。对纳入的研究进行偏倚风险评估，其中 5 项研究 [4-8] 报道了随机序列的产生，1 项研究 [6] 说明了分配隐藏的具体方法，2 项研究 [5-6] 报道了对研究者和受试者施盲，无其他偏倚，偏倚风险评估结果见图 2。

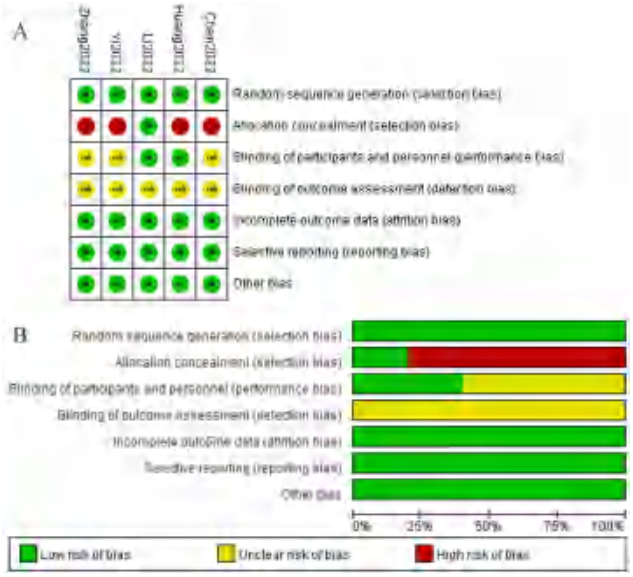


图 2　纳入文献的风险偏倚总结图（A）和百分比评估图（B）

Fig 2　Risk of bias graph（A）and percentage evaluation chart（B）of the included studies

表 1　纳入研究文献的基本特征

Tab 1　Basic characteristics of the included studies

第一作者及发表年份	操作方式	环泊酚组			丙泊酚组			结局指标
		例数 /n	年龄 / 岁	干预措施	例数 /n	年龄 / 岁	干预措施	
Chen 2022[4]	胃肠镜	47	41.22±11.63	环泊酚 0.4 mg • kg^{-1} iv	49	43.20±12.29	丙泊酚 1.5 ～ 2 mg • kg^{-1} iv	②⑥⑦⑧⑨
黄凤南 2022[5]	胃肠镜	82	47±13	环泊酚 0.4 mg • kg^{-1} ＋舒芬太尼 0.1 μg • kg^{-1} iv	82	46±10	丙泊酚 1.5 mg • kg^{-1} ＋舒芬太尼 0.1 μg • kg^{-1} iv	①②③⑥⑦⑨
Li 2022[6]	胃镜和肠镜	144	43.8±11.8	环泊酚 0.4 mg • kg^{-1} iv	145	44.1±11.3	丙泊酚 1.5 mg • kg^{-1} iv	①②③④⑤⑥⑦⑧⑨
易强林 2022[7]	胃镜	79	69.6±2.8	环泊酚 0.2 mg • kg^{-1} ＋舒芬太尼 0.1 μg • kg^{-1} iv	80	70.1±2.9	丙泊酚 1 mg • kg^{-1} ＋舒芬太尼 0.1 μg • kg^{-1} iv	①②③④⑤⑥⑦⑧⑨
张俊伟 2022[8]	胃肠镜	50	58.12±4.26	环泊酚 0.3 ～ 0.4 mg • kg^{-1} iv	50	58.44±4.25	丙泊酚 1 ～ 2 mg • kg^{-1} iv	①②③④⑤⑦

注（Note）：iv. 静脉注射（intravenous injection）；① 镇静有效率（sedation success rate）；② 注射痛发生率（incidence of injection pain）；③ 低血压发生率（incidence of hypotension）；④ 心动过缓发生率（incidence of bradycardia）；⑤ 呼吸抑制发生率（incidence of respiratory depression）；⑥ 麻醉诱导时间（anesthesia induction time）；⑦ 苏醒时间（wake-up time）；⑧ 离院时间（discharge time）；⑨ 满意度情况（satisfaction）。

2.3　Meta 分析结果

2.3.1　镇静有效率的比较　在纳入的研究中，有 4 篇文献 [5-8] 报道了环泊酚对比丙泊酚用于无痛胃肠镜检查的镇静有效率。异质性检验（$P>0.01$，$I^2<50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在镇静有效率方面结果差异无统计学意义（$RR=1.01$，95%CI:0.99 ～ 1.03，$P=0.39$），见图 3。

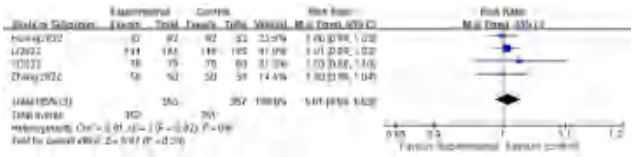


图 3　环泊酚和丙泊酚组镇静有效率的比较

Fig 3　Sedation success rate between ciprofol and propofol

2.3.2　不良反应发生率的比较

① 注射痛：5 篇文献 [4-8] 报道了环泊酚与丙泊酚镇静的注射痛不良反应发生例数。异质性检

验（$P > 0.01$，$I^2 < 50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在注射痛不良反应发生率方面结果差异具有统计学意义（$RR = 0.09$，95%CI：0.05 ～ 0.15，$P < 0.05$），环泊酚组注射痛的发生率低于丙泊酚组，见图 4。

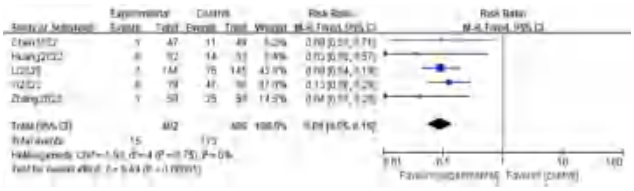


图 4　环泊酚和丙泊酚组注射痛不良反应发生率的比较

Fig 4　Incidence of injection pain between ciprofol and propofol

② 低血压：4 篇文献 [5-8] 报道了环泊酚与丙泊酚镇静的低血压不良反应发生例数。异质性检验（$P < 0.01$，$I^2 > 50\%$）提示各研究间存在统计学异质性，故用随机效应模型分析。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在低血压不良反应发生率方面结果差异无统计学意义（$RR = 0.63$，95%CI：0.30 ～ 1.31，$P = 0.22$），见图 5。

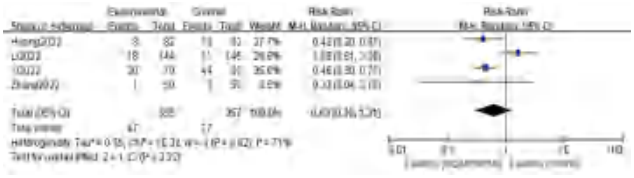


图 5　环泊酚和丙泊酚组低血压不良反应发生率的比较

Fig 5　Incidence of hypotension between ciprofol and propofol

③ 心动过缓：3 篇文献 [6-8] 报道了环泊酚与丙泊酚镇静的心动过缓不良反应发生例数。异质性检验（$P > 0.01$，$I^2 < 50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组之间在心动过缓不良反应发生率方面结果差异具有统计学意义（$RR = 0.10$，95%CI：0.06 ～ 0.16，$P < 0.05$），环泊酚组心动过缓的发生率低于丙泊酚组，见图 6。

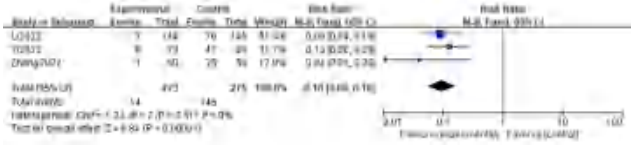


图 6　环泊酚和丙泊酚组心动过缓不良反应发生率的比较

Fig 6　Incidence of bradycardia between ciprofol and propofol

④ 呼吸抑制：3 篇文献 [6-8] 报道了环泊酚与丙泊酚镇静的呼吸抑制不良反应发生例数。异质性检验（$P > 0.01$，$I^2 < 50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组之间在呼吸抑制不良反应发生率方面结果差异具有统计学意义（$RR = 0.22$，95%CI：0.11 ～ 0.42，$P < 0.05$），环泊酚组呼吸抑制的发生率低于丙泊酚组，见图 7。

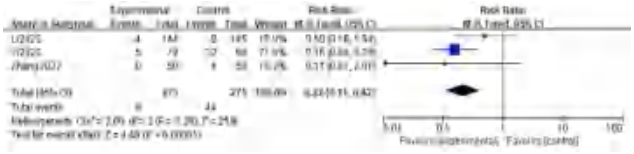


图 7　环泊酚和丙泊酚组呼吸抑制不良反应发生率的比较

Fig 7　Incidence of respiratory depression between ciprofol and propofol

2.3.3　麻醉相关时间指标比较

① 诱导时间：4 篇文献 [4-7] 报道了环泊酚和丙泊酚麻醉诱导时间情况。异质性检验（$P < 0.01$，$I^2 > 50\%$）提示各研究间存在统计学异质性，故用随机效应模型分析。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在麻醉诱导时间方面结果差异无统计学意义（$WMD = 0.38$，95%CI：－ 0.10 ～ 0.87，$P = 0.12$），见图 8。

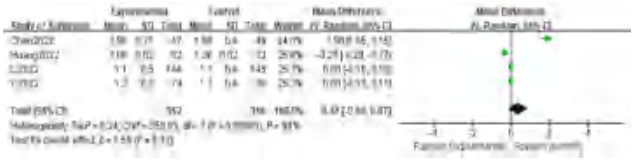


图 8　环泊酚和丙泊酚组麻醉诱导时间的比较

Fig 8　Induction time between ciprofol and propofol

② 苏醒时间：5 篇文献 [4-8] 报道了环泊酚和丙泊酚麻醉诱导后苏醒时间情况。异质性检验（$P < 0.01$，$I^2 > 50\%$）提示各研究间存在统计学异质性，故用随机效应模型分析。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在苏醒时间方面结果差异无统计学意义（$WMD = 0.88$，95%CI：－ 0.53 ～ 2.28，$P = 0.22$），见图 9。

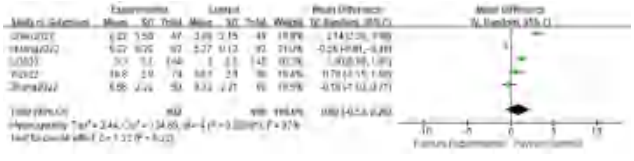


图 9　环泊酚和丙泊酚组麻醉后苏醒时间的比较

Fig 9　Wake-up time between ciprofol and propofol

③ 离院时间：3 篇文献 [4, 6-7] 报道了环泊酚和丙泊酚组麻醉恢复后离院时间情况。异质性检验（$P < 0.01$，$I^2 > 50\%$）提示各研究间存在统计学异质性，故用随机效应模型分析。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组之间在麻醉恢复后离院时间方面结果差异具有统计学意义（$WMD = 1.87$，95%CI：0.71 ～ 3.04，$P < 0.05$），环泊酚组麻醉恢复后离院时间长于丙泊酚组，见图 10。

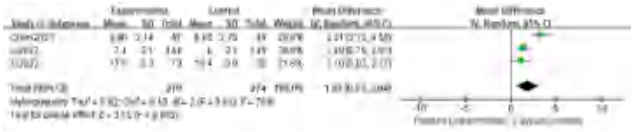


图 10　环泊酚和丙泊酚组麻醉恢复后离院时间的比较

Fig 10　Discharge time between ciprofol and propofol

2.3.4　满意度指标比较

① 医师满意率：2 篇文献 [5, 7] 报道了医师满意度。异质性检验（$P > 0.01$，$I^2 < 50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在医师满意率方面结果差异无统计学意义（$RR = 1.05$，95%CI：0.96 ～ 1.14，$P = 0.26$），见图 11。

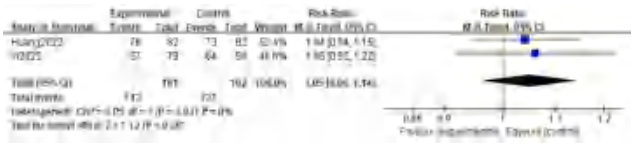


图 11　环泊酚和丙泊酚组医师满意率的比较

Fig 11　Doctor satisfaction rate between ciprofol and propofol

② 患者满意率：2 篇文献 [5, 7] 报道了患者满意度。异质性检验（$P > 0.01$，$I^2 < 50\%$）提示各研究间不存在统计学异质性，故采用固定效应模型。结果显示，环泊酚治疗组与丙泊酚对照组在患者满意率方面结果差异无统计学意义（$RR = 1.07$，95%CI：0.96 ～ 1.19，$P = 0.24$），见图 12。

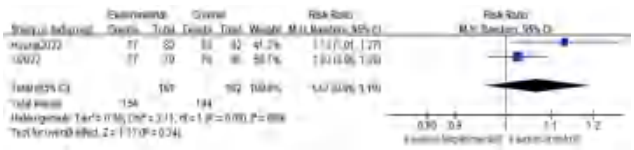


图 12　环泊酚和丙泊酚组患者满意率的比较

Fig 12　Patient satisfaction rate between ciprofol and propofol

2.4　发表偏倚分析

本研究纳入文献小于 10 篇，因此不予进行漏斗图分析。为了检验 Meta 分析结果的稳定性，本研究采用敏感性分析对纳入文献进行偏倚性检验，逐个剔除单个研究重新进行分析，得到的合并效应量点估计值在原效应量 95%CI 内，提示发表偏倚可能性较小。

3　讨论

无痛胃肠镜是一种在麻醉状态下进行的一种常规的胃肠镜检查，麻醉状态下能提高患者的耐受力、缩短检查和处理时间、降低不良反应、降低患者疼痛和其他并发症的发生 [9]，体现了安全快速的特点。无痛胃镜检查通常在门诊实施，周转速度快，因而选择起效快、持续时间短、恢复快的麻醉药物更加有利于临床工作的进行。丙泊酚是无痛胃肠镜镇静的重要药物，具有良好的药代动力学特征，并且可以快速起效和消除，是诱导和维持静脉麻醉的重要药物 [10]。环泊酚是一种新型的静脉麻醉药，与丙泊酚的作用机制类似，在人体内的主要代谢途径是通过 UDP- 葡糖醛酸基转移酶和细胞色素 P450 酶代谢为无药理学活性的代谢物，无催眠作用且无毒性 [11]。

本次 Meta 分析从镇静有效率、不良反应发生率、麻醉相关时间指标和满意率等方面对环泊酚和丙泊酚用于无痛胃肠镜进行了分析比较，结果显示，环泊酚组在主要不良反应发生率方面如注射痛、心动过缓、呼吸抑制发生率方面优于丙泊酚组，麻醉恢复后离院时间略长于丙泊酚组，而镇静有效率、麻醉诱导时间、苏醒时间、医师满意率和患者满意率方面比较差异无统计学意义。

环泊酚和丙泊酚组患者镇静有效率差异无统计学意义，可能是因为两者具有相似的分子结构和药代动力学 [12]。两组患者均有低血压、心动过缓、呼吸抑制发生，但环泊酚组患者心动过缓、呼吸抑制发生率较低，提示其对循环和呼吸的影响可能小于丙泊酚 [13]。此外，环泊酚组患者注射痛发生率较丙泊酚组明显降低。有研究表明，在成人麻醉诱导期间，丙泊酚注射疼痛的发生率为 28% ～ 90%，甚至更严重，在儿童中的发生率为 30% ～ 90%[14]。注射疼痛不仅影响诱导期间的血流动力学，还影响患者的身心健康。有研究认为丙泊酚乳液包括水合状态和脂质包绕状态，注射痛主要由水合状态中丙泊酚的浓度较高引起 [15]，而环泊酚具有比丙泊酚更高的脂溶性，乳液中游离分子的浓度明显低于丙泊酚，可能是其注射痛降低的原因。患者离院时间受多种因素影响，无痛胃肠镜患者离院时应意识清醒，生命体征平稳，并且无明显不适感。本研究中，环泊酚组患者离院时间长于丙泊酚组可能与环泊酚的消除半衰期略长于丙泊酚有关，但其临床意义有限。

本研究的局限性在于，环泊酚上市时间较短，纳入的 RCT 研究有限，未来需要更多的 RCT 研究进一步证实本研究结论；纳入的大部分文献未说明分配隐藏和盲法，质量整体不高；纳入的文献中环泊酚和丙泊酚的使用剂量和复合药物略有不同，可能带来一定的偏倚风险。

综上所述，环泊酚相比于丙泊酚用于无痛胃肠镜检查，镇静有效率、麻醉诱导时间、苏醒时间、医患满意率相当，注射痛、心动过缓、呼吸抑制发生率更低，环泊酚可作为无痛胃肠镜镇静较好的药物治疗选择。

参考文献

[1] Haytural C，Aydınlı B，Demir B，et al. Comparison of propofol，propofol-remifentanil，and propofol-fentanyl administrations with each other used for the sedation of patients to undergo ERCP [J]. Biomed Res Int，2015，2015：465465.

[2] “环泊酚临床应用指导意见”专家小组 . 环泊酚临床应用指导意见 [J]. 中华麻醉学杂志，2021，41（2）：129-132.

[3] 谷鸿秋，王杨，李卫 . Cochrane 偏倚风险评估工具在随机对照研究 Meta 分析中的应用 [J]. 中国循环杂志，2014，29（2）：147-148.

[4] Chen XQ，Guo P，Yang L，et al. Comparison and clinical value of ciprofol and propofol in intraoperative adverse reactions，operation，resuscitation，and satisfaction of patients under painless gastroenteroscopy anesthesia [J]. Contrast Media Mol Imaging，2022，2022：9541060.

[5] 黄凤南，崔珊珊，徐城，等 . 环泊酚联合小剂量舒芬太尼在门诊无痛胃肠镜检查中的麻醉效果与安全性研究 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志，2022，43（6）：616-620.

[6] Li JX，Wang X，Liu J，et al. Comparison of ciprofol（HSK3486）versus propofol for the induction of deep sedation during gastroscopy and colonoscopy procedures：a multi-centre，non-inferiority，randomized，controlled phase 3 clinical trial [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2022，131（2）：138-148.

[7] 易强林，莫怀忠，胡慧，等 . 环泊酚与丙泊酚在老年患者无痛胃镜检查中的比较 [J]. 临床麻醉学杂志，2022，38（7）：712-715.

[8] 张俊伟，胡艳辉，李之明 . 环泊酚在无痛胃肠镜麻醉中的应用研究 [J]. 中国现代药物应用，2022，16（16）：35-38.

[9] Devlin JW，Skrobik Y，Gélinas C，et al. Clinical practice guidelines for the prevention and management of pain，agitation/sedation，delirium，immobility，and sleep disruption in adult patients in the ICU [J]. Crit Care Med，2018，46（9）：e825-e873.

[10] Khan BA，Guzman O，Campbell N，et al. Comparison and agreement between the Richmond Agitation-Sedation Scale and the Riker Sedation-Agitation Scale in evaluating patients’eligibility for delirium assessment in the ICU [J]. Chest，2012，142（1）：48-54.

[11] Bian Y，Zhang H，Ma S，et al. Mass balance，pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous HSK3486，a novel anaes thetic，administered to healthy subjects [J]. Br J Clin Pharmacol，2021，87（1）：93-105.

[12] Liao J，Li M，Huang C，et al. Pharmacodynamics and pharmaco kinetics of HSK3486，a novel 2，6-disubstituted phenol derivative as a general anesthetic [J]. Front Pharmacol，2022，13：830791.

[13] Abad-Santos F，Gálvez-Múgica MA，Santos MA，et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single bolus of propofol 2% in healthy volunteers [J]. J Clin Pharmacol，2003，43（4）：397-405.

[14] Schumi J，Wittes JT. Through the looking glass：understanding non-inferiority [J]. Trials，2011，12：106.

[15] Desousa KA. Pain on propofol injection：causes and remedies [J]. Indian J Pharmacol，2016，48（6）：617-623.

（收稿日期：2023-02-09；修回日期：2023-03-28）

欢迎订阅 2023 年《中南药学》杂志

《中南药学》杂志是由湖南省食品药品监督管理局主管，湖南省药学会主办，中南大学湘雅二医院承办的国内外公开发行的药学综合性学术期刊。国际刊号：ISSN 1672-2981；国内刊号：CN43-1408/R。《中南药学》是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊，被美国 CA、波兰 IC、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、解放军医学图书馆数据库、中文生物医学期刊文献数据库（CMCC）和中国生物医学期刊引文数据库（CMCI）等收录。

本刊内容涵盖药剂、药理、药分、药化、生化药物、中药及天然药物、药事管理、医院药学等研究领域。主要栏目有研究论文、综述、中药定量指纹图谱与中药标准制剂专题、药物分析与检验、新药之窗、药物与临床、药事管理、药品不良反应、临床药师在临床、医院药学等。本刊面向全国高、中及基层医药工作者，欢迎广大医药工作者投稿和订阅。

本刊为月刊，大 16 开本，印刷装帧精美，每月 20 日出版，定价 25.00 元 / 本。如需订阅，可到当地邮局（邮发代号为 42-290）或直接汇款至杂志社订购（开户行：中国银行长沙市分行杏林支行；开户名：中南药学杂志社；账号：600257351940），全年订价 300 元。本刊通信地址：湖南省长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内《中南药学》杂志社，邮编：410011；电话：（0731）82258487/84895602；传真：（0731）82258487。

临床药师在临床

1 例达格列净致多次酮症酸中毒及酮症患者的药学监护及文献分析

唐棠[1]，赵珩[2]，王瑞凤[2]，周翠松[3*]（解放军东部战区总医院，1. 临床药学科；2. 内分泌科；3. 医疗保障中心药剂科，南京　211000）

摘要：本文报道了 1 例达格列净引起的血糖正常的酮症酸中毒的病例，患者先后 4 次服用达格列净片 10 mg qd 后出现糖尿病酮症或酮症酸中毒，均经补液、胰岛素降糖等对症处理后好转。临床药师对该病例进行关联性评价及文献分析，探讨达格列净致糖尿病酮症及酮症酸中毒的原因，以加强用药监护，促进临床合理用药。

关键词：达格列净；正常血糖的酮症酸中毒；药物不良反应

中图分类号：R453.2；R969.3　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2501-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.041

达格列净为钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 -2（SGLT-2）抑制剂，可通过抑制肾脏 SGLT-2 的活性，减少肾脏对葡萄糖的重吸收，增加尿糖的排泄而降低血糖[1]。其具有良好的安全性和耐受性，常见的不良反应有尿道感染、生殖系统感染、低血糖、肾功能不良事件、血容量不足等，此外还报道有糖尿病酮症酸中毒（diabetic ketoacidosis，DKA）、骨折和截肢等[2]。DKA 是糖尿病严重的并发症之一，应尽早识别，否则极易危及生命。DKA 发病机制较复杂，加重胰岛素缺乏或增加胰岛素抵抗的因素可诱发，常见诱因有感染、胰岛素使用不当、体内代谢负荷剧增、应激状态和药物等[3]。本文报道了 1 例服用达格列净多次致 DKA 及酮症的病例并进行文献分析，以期为临床安全合理用药提供参考。

1　病例资料

患者，女，24 岁，2022 年初感多饮、多食、体重下降，就诊于当地医院，查血糖升高，诊断为“2 型糖尿病”，予以二甲双胍 0.5 g tid 联合达格列净 10 mg qd 治疗。

2022 年 3 月 18 日因着防护服大量出汗未及时补充水分，出现恶心、呕吐，就诊于外院，查随机血糖 23.99 mmol • L^{-1}↑，尿酮体＋＋＋＋，血气分析示 pH 7.27，予以泮托拉唑 40 mg qd 抑酸护胃、胰岛素泵持续泵入门冬胰岛素降糖、补液及纠正电解质紊乱等治疗后好转，后调整降糖方案为二甲双胍 0.5 g tid 及达格列净 10 mg qd 口服、洛塞那肽 10 μg bid 皮下注射。

3 月 29 日，患者再次出现呕吐伴腹胀腹痛、乏力，查随机血糖 8.4 mmol•L^{-1}↑，尿酮体＋＋＋，血气分析示 pH 7.33，予以小剂量胰岛素静脉输注降糖、补液等对症治疗后酮体转阴，后予以胰岛素泵持续皮下注射门冬胰岛素控制血糖，血糖控制良好后调整降糖方案为吡格列酮二甲双胍 1 片 bid 及达格列净 10 mg qd 口服、洛塞那肽 10 μg bid 皮下注射出院。

4 月 11 日，患者再次出现呕吐，于外院查血糖 7.4 mmol•L^{-1}↑，尿酮体＋＋，血气分析示 pH 7.39，予以泮托拉唑 40 mg qd 抑酸护胃等对症治疗，小剂量胰岛素静脉滴注、补液等促进酮体排出，好转后调整降糖方案为二甲双胍 1.0 g tid 口服、洛塞那肽 10 μg bid 皮下注射。后患者自行停用洛塞那肽，加用达格列净 10 mg qd（商品名：安达唐，阿斯利康制药有限公司，规格：10 mg，批号：2110104）。

5 月 13 日因再次出现恶心呕吐，伴腹痛，就诊于我院急诊，查随机血糖 8.2 mmol • L^{-1}↑，血酮体 1.0 mmol • L^{-1}，尿酮体＋＋＋，血气分析示 pH 7.42，诊断为糖尿病酮症，予以停用达格列净，经兰索拉唑 30 mg qd 静脉滴注护胃、甲氧氯普胺 10

基金项目：国家自然科学基金项目（编号：82004138）。

作者简介：唐棠，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：tangselina@163.com　*通信作者：周翠松，女，主管药师，主要从事临床药学、药物制剂研究，email：zhoucuisong2009@163.com

mg 肌内注射止吐、小剂量胰岛素连续静脉滴注降糖、补液及纠正电解质紊乱等对症处理后酮体消失。

患者为进一步诊治，于 5 月 16 日收住我院内分泌科。近一个月因腹部不适等，体重下降约 10 kg，有脂肪肝病史 3 年，多囊卵巢综合征病史 1 年，否认其他慢性病史；否认手术史、外伤史、输血史；否认食物、药物过敏史；无吸烟、饮酒史。入院检查：体温（T）36.5 ℃，呼吸频率（R）18 次•min^{-1}，心率（P）77 次 • min^{-1}，血压（BP）125/76 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），身高 158 cm，体重 85 kg，体重指数（BMI）34.05 kg • m^{-2}。查体腹部可见白纹，后颈部及腋下腹股沟处可见黑棘皮征，余未见明显异常。入院诊断为：2 型糖尿病、肥胖症、多囊卵巢综合征、脂肪肝。

入科后，给予二甲双胍片 0.5 g tid 降糖，5 月 17 日辅助检查提示，超声：脂肪肝、甲状腺右叶滤泡囊肿（TI-RADS 超声分级 2 级）；糖化血红蛋白：7.3%；血生化：三酰甘油 1.79 mmol • L^{-1}↑，高密度脂蛋白胆固醇 0.76 mmol • L^{-1}↓，谷氨酰转肽酶 48 U • L^{-1}↑，钾 3.0 mmol • L^{-1}↓，葡萄糖 7.0 mmol • L^{-1}↑。当日因血糖控制不佳加用吡格列酮 15 mg qd 降糖、氯化钾缓释片 1 g tid 补钾。5 月 18 日加用利拉鲁肽 0.6 mg qd。5 月 20 日辅助检查提示，糖耐量试验：空腹血糖 7.0 mmol • L^{-1}、胰岛素 12.1 mIU • L^{-1}、C 肽 2.16 ng • mL^{-1}；60 min 血糖 10.17 mmol • L^{-1}、胰岛素 48.7 mIU • L^{-1}↑、C 肽 5.84 ng • mL^{-1}；120 min 血糖 10.5 mmol • L^{-1}↑、胰岛素 68.6 mIU • L^{-1}↑、C 肽 7.97 ng•mL^{-1}↑。复查血气：pH 7.41，血钾 3.6 mmol • L^{-1}，葡萄糖 8.8 mmol • L^{-1}，二氧化碳分压 40 mmHg；血生化：谷氨酰转肽酶 33 U • L^{-1}。患者血糖控制良好，予以出院，嘱其内分泌科随诊。8 月 12 日临床药师随访，患者血糖控制良好，无明显不适，未再发生 DKA 及酮症。

2 讨论

2.1 不良反应的发生与怀疑药物的关联性评价

患者于 2022 年 1 月确诊 2 型糖尿病，使用二甲双胍、达格列净等降糖治疗。患者先后 4 次发生 DKA 及酮症，虽降糖方案略有调整，但均有达格列净用药史。药物的使用过程与不良反应的发生有明确的时间相关性。以 Naranjo 评分表 [4] 分析怀疑药物达格列净与本次不良反应的关联性（见表 1），结果为 8 分，为很可能相关。此外，结合患者用药史：二甲双胍、洛塞那肽在糖尿病酮症缓解后仍在继续使用，故其与该不良反应发生及持续时间无明确的时间相关性。

表 1 Naranjo 评分表

相关问题	Narnajo 评分分值			案例
	是	否	未知	评分
1. 该不良反应之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出现	＋2	－1	0	＋2
3. 停药或应用拮抗剂不良反应是否改善	＋1	0	0	＋1
4. 再次用药，不良反应是否复现	＋2	－1	0	＋2
5. 其他原因是否也可引起该不良反应	－1	＋2	0	0
6. 给予安慰剂，不良反应是否复现	－1	＋1	0	0
7. 血药浓度是否为中毒浓度	＋1	0	0	0
8. 不良反应轻重程度是否于剂量增减有关	＋1	0	0	0
9. 患者之前使用该药或相似药物是否发生类似的不良反应	＋1	0	0	＋1
10. 该不良反应是否经过客观检查证实	＋1	0	0	＋1
总分值				8

注：总分≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能；≤ 0 分为可疑。

2.2 SGLT-2 抑制剂致 DKA 的机制及特点

通常，DKA 伴有血糖的明显升高（＞ 16 mmol • L^{-1}），达格列净作用于肾脏，降低肾糖阈，故其引起的 DKA 可仅表现为血糖的轻至中度升高，称为血糖正常的酮症酸中毒（euglycemic diabetic ketoacidosis，euDKA）[5]。本文报道的患者 3 月 29 日、4 月 11 日和 5 月 13 日发生酮症时，血糖均为轻至中度升高。目前，达格列净引起 euDKA 的机制尚不明确：服用达格列净的患者因葡萄糖从尿液排出增加，体内胰岛素分泌或外源性胰岛素注射用量减少 [6]，外周组织无法利用葡萄糖，从而促进脂类分解，酮体产生增加。同时，SGLT-2 抑制剂还可直接作用于胰岛 α 细胞，导致胰高糖素的分泌增加，促进糖异生 [7]。此外，该药可促进尿钠、尿糖的排出，产生渗透性利尿作用，导致循环容量减少，进而增加 DKA 发生风险。研究表明，达格列净这类药物还可降低肾小球滤过率，肾脏对于酮体的清除减少，导致酮体蓄积 [8]。

既往研究提示，SGLT-2 抑制剂引起的 DKA 病例中，女性多于男性 [9-11]。虽不同年龄的患者均可能发生此不良反应，但中老年患者糖尿病的病程较长，胰岛 β 细胞功能相对较差，故发生 DKA 的风险更高 [12]。从发生时间看，此不良反应多发生于达格列净的使用初期，50% 的患者发生在 1 个月内 [13]。

2.3 危险因素分析

达格列净相关的 DKA 发生率＜ 0.1%[14]，但具有很高的危险性。因此，用药前应进行全面的评估，具有高危因素的患者避免使用：任意原因的胰岛素

缺乏如胰岛素减量或停用、胰岛素泵故障等；饮食相关的原因如低碳水化合物饮食、酗酒、胃肠镜检查和围术期禁食等；容积减少 / 脱水如呕吐、腹泻等胃肠疾病；急性感染；危重症如重大创伤等；药物因素如糖皮质激素、违禁药品等 [15]。本文报道的患者服用达格列净半年，先后于 2022 年 3 月 18 日、3 月 29 日、4 月 11 日和 5 月 13 日发生 DKA 或酮症。临床药师分析，本例患者胰岛功能尚可，首次发生 DKA 是因着防护服大量出汗未及时补充水分，体内容积迅速减少所致。后于外院调整降糖方案加用洛塞那肽，该药为胰高糖素样肽 -1（GLP-1）受体激动剂，胃肠道不适如食欲下降、恶心、呕吐等为其常见不良反应 [16]。经询问，患者使用洛塞那肽早期胃肠道反应严重，这可能再次导致机体脱水，于 3 月 26 日及 4 月 11 日诱发酮症。本次入院后，经临床药师了解，患者近期因个人减重需求，开始低碳水饮食，5 月 13 日发生酮症则与此密切相关。

2.4 临床药师药学监护

本例患者入院后，临床药师分析其多次发生 DKA、酮症原因，告知今后应避免使用达格列净。达格列净引起的 DKA 虽较罕见，但随着该药在临床的广泛使用，相关报道也逐渐增加，医务人员应引起重视。作为临床药师，应在使用该药前，识别具有高危因素的患者，建议避免使用。同时告知所有使用达格列净的患者：一旦出现恶心、呕吐、乏力等不适，应及时监测尿酮体、血酮，警惕 euDKA；加强饮食、生活方式宣教，避免低碳水饮食、酗酒等；对于联合使用 GLP-1 受体激动剂、二甲双胍等易引起胃肠道反应药物的患者，更需加强药学监护；如需手术，应至少提前 2 d 停用达格列净 [17]；如确诊达格列净相关的酮症、DKA，应尽快停药并避免再次使用。

3 小结

达格列净为临床使用广泛的 SGLT-2 抑制剂。针对该药引起的 euDKA 不良反应，临床药师应充分认识其发病机制及特点，掌握相关的危险因素，并在工作中积极开展药学监护，协助临床医师更加安全合理的使用达格列净。

参考文献

[1] Ding S，Guo LX. Mechanism of sodium-glucose cotransporter and related drugs [J]. Chin J Diabetes Mellitus，2016，8（5）：319-320.

[2] 李鑫，李焕德 . 一类全新机制的 2 型糖尿病治疗药物 SGLT2 抑制剂 [J]. 中南药学，2018，16（3）：289-296.

[3] 陈家伦 . 临床内分泌学 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2014：1107-1111.

[4] Naranjo CA，Shear NH，Lanctot KL，et al. Advances in the diagnosis of adverse drug reactions [J]. J Clin Pharmacol，1992，32（10）：897-904.

[5] Goldenberg RM，Berard LD，Cheng AYY，et al. SGLT2 inhibitor-associated diabetic ketoacidosis：clinical review and recommendations for prevention and diagnosis [J]. Clin Ther，2016，38（12）：2654-2664.

[6] Daniele G，Xiong J，Solis-Herrera C，et al. Dapagliflozin enhances fat oxidation and ketone production in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care，2016，39（11）：2036-2041.

[7] Bonner C，Kerr-Conte J，Gmyr V，et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion [J]. Nat Med，2015，21（5）：512-517.

[8] Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus [J]. Annu Rev Med，2015，66（1）：255-270.

[9] Lane S，Paskar D，Hamed S，et al. When guidelines fail：euglycemic diabetic ketoacidosis after bariatric surgery in a patient taking a sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor：a case report [J]. A A Pract，2018，11（2）：46-48.

[10] Peters AL，Buschur EO，Buse JB，et al. Euglycemic diabetic ketoacidosis：a potentia l complication of treatment with sodium-glucose cotransporter 2 inhibition [J]. Diabetes Care，2015，38（9）：1687-1693.

[11] Burke KR，Schumacher CA，Harpe SE. SGLT2 inhibitors：a systematic review of diabetic ketoacidosis and related risk factors in the primary literature [J]. Pharmacotherapy，2017，37（2）：187-194.

[12] 谈仪炯，丁晓颖，申婷婷，等 . 21 例达格列净致糖尿病酮症不良反应分析 [J]. 中南药学，2020，18（12）：2084-2088.

[13] 蔡俊，刘思敏，李慧馨，等 . 达格列净致正常血糖酮症酸中毒文献分析 [J]. 中国药物警戒，2020，17（11）：808-812.

[14] Lee IH，Ahn DJ. Dapagliflozin-associated euglycemic diabetic ketoacidosis in a patient with type 2 diabetes mellitus：a case report [J]. Medicine（Baltimore），2020，99（21）：e20228-e20233.

[15] Danne T，Garg S，Peter AL，et al. International consensus on risk management of diabetic ketoacidosis in patients with type 1 diabetes treated with sodium-glucose cotransporter（SGLT）inhibitors [J]. Diabetes care，2019，42（6）：1147-1154.

[16] 中华医学会内分泌学分会，中华医学会糖尿病学分会 . 胰高糖素样肽 -1（GLP-1）受体激动剂用于治疗 2 型糖尿病的临床专家共识 [J]. 中华内科杂志，2020，59（11）：836-846.

[17] Anderson SL. Dapagliflozin efficacy and safety：a perspective review [J]. Ther Adv Drug Saf，2014，5（6）：242-254.

（收稿日期：2022-11-02；修回日期：2023-02-05）

对 1 例免疫治疗期间发生结肠炎的肝癌患者的药物治疗管理

栾伟，古今*（北京大学首钢医院药剂科，北京 100144）

摘要：免疫治疗已成为肝癌系统治疗的重要组成部分，能进一步提高肿瘤治疗预后，但由此产生的免疫相关不良反应（irAEs）正成为困扰临床用药的棘手问题。本文报道了 1 例肝癌患者，在应用特瑞普利单抗联合仑伐替尼治疗期间出现免疫相关结肠炎。临床药师通过查阅文献，逐个分析药物，有效参与到患者停药、治疗及重启的药物治疗管理中。

关键词：肝癌；特瑞普利单抗；结肠炎；药物治疗管理

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2504-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.042

Drug therapy for a patient with liver cancer complicating with colitis during immunotherapy

LUAN Wei, GU Jin* (*Department of Pharmacy, Peking University Shougang Hospital, Beijing* 100144)

Abstract: Immunotherapies are an important part of systemic therapies for liver cancer, to improve the prognosis of tumor treatment. However, clinicians hesitate to use these drugs due to immune-related adverse events. This paper reported a case of severe immune-related colitis in a patient with liver cancer during the treatment of toripalimab combined with lenvatinib. By searching literature and analyzing each drug, clinical pharmacists effectively involved in the therapy management on drug discontinuation and resumption.

Key words: liver cancer; toripalimab; colitis; drug therapy management

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤，其中肝细胞癌（本文中简称肝癌）占 75% ～ 85%，为主要病理类型[1]。我国人口约占世界的 20%，而超过 50% 的肝癌新发病例和死亡病例出现在中国[2]。肝癌的系统治疗药物匮乏，2007 年，索拉非尼首先被批准用于肝癌一线治疗，直到 2018 年，REFLECT 研究奠定了仑伐替尼的一线地位[3]。近年来，免疫治疗为肝癌患者治疗带来新的突破，免疫检查点抑制剂（immune-checkpoint inhibitors，ICIs）包括抗程序性细胞死亡受体 1（anti-programmed cell death-1，anti-PD-1）或抗程序性细胞死亡受体 - 配体 1（anti-programmed cell death ligand-1，anti-PD-L1）和抗细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4（anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4，anti-CTLA-4），通过重新激活自身免疫系统发挥抗肿瘤效应，但该类药物的使用可引起免疫相关不良反应（immune-related adverse events，irAEs），可累及全身各器官，严重者导致治疗中断，甚至死亡。本文报道了 1 例临床药师参与的原发性肝癌患者应用免疫药物特瑞普利单抗治疗期间出现免疫相关性结肠炎（immune-related colitis，IMC）的病例，通过有效的药物治疗管理，取得了良好的抗肿瘤治疗效果。

1 病例介绍

患者，男，51 岁，2022 年 6 月 15 日凌晨无明显诱因出现腹泻，呈水样，后便鲜血，有血块，自诉量约 300 mL，伴下腹痛，无发热，就诊于肝胆胰外科。患者有慢性乙型病毒性肝炎病史，长期口服恩替卡韦胶囊（0.5 mg qd）。2021 年 12 月 18 日甲胎蛋白 1436 ng·mL^{-1}，腹部增强 CT

基金项目：首颐医疗科技发展基金项目（No. SGYYZ202014）。

作者简介：栾伟，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：luanwei1123@163.com *__通信作者__：古今，女，主任药师，主要从事医院药学工作，email：gujin301@163.com

提示肝硬化，肝 S2/3、S4/8 交界处占位，考虑原发性肝癌。于 2022 年 3 月 12 日至 5 月 25 日予特瑞普利单抗注射液（240 mg q3w）联合甲磺酸仑伐替尼胶囊（12 mg qd）治疗，共 4 个周期。5 月 17 日腹部增强 CT 提示病变较前缩小，强化减低，复查甲胎蛋白 330.9 ng • mL^{-1}，疗效评估部分缓解（PR）。

入院查体：T 36.9 ℃，P 85 次 • min^{-1}，R 18 次 • min^{-1}，BP 126/78 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），下腹部压痛，无反跳痛。便轮状病毒阴性。腹盆腔 CT 平扫示结直肠炎症改变，肝脏占位。诊断为下消化道出血、结直肠炎、肝恶性肿瘤、慢性乙型病毒性肝炎。

2 诊疗经过

6 月 16 日血常规示白细胞（WBC）14.6×10^{9} • L^{-1}↑，中性粒细胞百分比（NEUT%）80.3%↑，血小板（PLT）90×10^{9} • L^{-1}↓，凝血 D- 二聚体（D-dimer）23.6 mg • L^{-1}↑，便常规示黏液样便，便中带血，红细胞（RBC）15 • HP^{-1}↑，WBC 20 • HP^{-1}↑。消化科会诊考虑肠道感染可能性大，缺血性结肠炎不除外，予注射用厄他培南抗感染，蒙脱石散、地衣芽孢杆菌活菌胶囊止泻和调节肠道菌群治疗。临床药师考虑甲磺酸仑伐替尼胶囊增加患者便血风险，建议停用，医师同意。6 月 18 日患者仍间断腹痛，伴下腹坠胀感，排黏液血便，8 ～ 10 次 • d^{-1}，粪便培养、艰难梭菌、巨细胞病毒筛查均为阴性，C 反应蛋白（CRP）90.69 mg • L^{-1}↑，腹部增强 CT 提示横结肠、降结肠、乙状结肠及直肠肠壁增厚、水肿，临床药师考虑 IMC 可能性大，建议加用激素治疗。6 月 19 日开始口服醋酸泼尼松龙片（40 mg qd），用药 3 d 后，患者大便次数减少至 4 ～ 6 次 • d^{-1}，无血便，腹痛缓解，血常规示 WBC 3.7×10^{9} • L^{-1}，NEUT% 53.9%，凝血 D-dimer 6.8 mg • L^{-1}↑，CRP 24.04 mg • L^{-1}↑。6 月 24 日，大便次数持续减少，无腹痛，患者要求出院，嘱其逐渐减停激素用量。

7 月 15 日，患者已停用激素，大便 1 ～ 2 次 • d^{-1}，成形软便，无腹痛、便血，因肝癌再次入院就诊。医师考虑暂不适宜手术，既往免疫联合靶向治疗有效，最好继续用药。临床药师结合患者不良反应严重程度及指南推荐，认为可以尝试原治疗方案，密切关注消化道症状。另外，在梳理患者用药过程中发现，患者口服升血小板胶囊期间大便次数略有增加，自上次入院后未再服用。临床药师查阅药品说明书及相关文献发现确有升血小板胶囊引起缺血性结肠炎的报道，因此，向医师建议长期停用升血小板胶囊，医师采纳。患者于 7 月 25 日至 9 月 5 日继续特瑞普利单抗注射液联合甲磺酸仑伐替尼胶囊治疗共 3 周期，期间无腹痛、便血，大便正常，并最终行手术治疗。

3 讨论

3.1 药物相关结肠炎分析

患者因急性腹泻伴黏液血便、腹痛入院，WBC、CRP 均升高，影像学提示结肠炎，首先考虑肠道感染可能，但粪便病原学筛查阴性，经验性抗菌药物治疗效果差，排除肠道感染。

药物方面，患者已联合应用特瑞普利单抗和仑伐替尼 4 周期，共 12 周，其他合并用药包括恩替卡韦、升血小板胶囊等。临床药师作如下分析：

① 怀疑药物——特瑞普利单抗：ICIs 在抗肿瘤的同时，会增强机体免疫活性，诱导产生 irAEs，发生率为 74% ～ 90%，严重程度≥ 3 级的不良反应达 14% ～ 55%[4]，上市后的 ICIs 药物不良事件上报数据显示结肠炎为报告最多的不良反应类型 [5]，anti-CTLA-4 相关结肠炎的发生率要明显高于 anti-PD-1/L1（5.7% ～ 9.1% *vs* 0.7% ～ 1.6%）[6]。随着国内以 anti-PD-1 为主导的抗肿瘤免疫药物应用不断增多，个案及回顾性研究 [7-8] 均报道该类药物可诱发 IMC，首次治疗至结肠炎起病时间为 27 ～ 198 d，中位时间为 44 d，多数为广泛性结肠受累，激素为治疗 2 级及以上结肠炎的首选药物，上述特征与患者相符。

② 药物鉴别——升血小板胶囊：该药说明书中提到消化道不良反应为腹胀、腹泻、恶心、呕吐，有便血个例报告，患者也自诉服用该药后大便次数略有增多，但无腹痛、便血。文献报道升血小板胶囊可致缺血性结肠炎，以腹痛、腹泻、便血为主要表现，诱发原因主要与其所含成分青黛对肠道的刺激有关，通常在停药后 1 ～ 3 d 内可自行缓解 [9-11]，而本例患者在 6 月 15 日即已停用升血小板胶囊，6 月 18 日仍有腹痛、腹泻、便血，并呈加重趋势，直至 6 月 19 日应用激素后症状改善，两者在临床表现上存在明显差异，因此不考虑升血小板胶囊相关结肠炎，但不排除特瑞普利单抗与升血小板胶囊同时使用期间，后者有加重腹泻及结肠炎的可能。

③ 药物鉴别——仑伐替尼：该药作为多靶点酪氨酸激酶抑制剂，常见不良反应为高血压、腹泻、食欲减退等，查阅国内外文献，仅有一篇国

外的个案报道了仑伐替尼用药后引起结肠炎[12]，以腹痛为单一表现，无腹泻及便血，因此，该患者由仑伐替尼引起的结肠炎可能性很小。

总结特瑞普利单抗 IMC 关联性评价：① 该患者在免疫治疗第 4 周期后出现腹泻、结肠炎，用药与不良反应发生时间具有相关性；② ICIs 诱发结肠炎的机制明确，相关案例文献报道较多，且特瑞普利单抗说明书中也有提示肠炎不良反应；③ 排除肠道感染，对于干扰不良反应药物认定的升血小板胶囊和仑伐替尼，通过发病机制、临床转归及发病率分析，进而排除；④ 患者在停用免疫药物，并应用激素抑制免疫后，腹痛、腹泻、便血明显改善；⑤ 虽然药物再激发阳性是判断药物不良反应“肯定”关联性评价的必要条件，但再激发阴性并不能排除药物不良反应的可能性，据统计[13]，ICIs 因 IMC 停用后重启，结肠炎复发率约为 34%。综上，该患者考虑为特瑞普利单抗引起的 IMC，药物不良反应 Naranjo 评分[14]为 6 分，即很可能，详见表 1。

表 1　特瑞普利单抗致 IMC 的 Naranjo 评分

Tab 1　Naranjo score of IMC caused by toripalimab

	Naranjo 评分			得分
	是	否	未知	
1. 该不良反应之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出现	＋2	－1	0	＋2
3. 停药或应用拮抗剂不良反应是否改善	＋1	0	0	＋1
4. 再次用药，不良反应是否复现	＋2	－1	0	－1
5. 其他原因是否也可引起该不良反应	－1	＋2	0	＋2
6. 给予安慰剂，不良反应是否复现	－1	＋1	0	0
7. 血药浓度是否为中毒浓度	＋1	0	0	0
8. 不良反应轻重程度是否于剂量增减有关	＋1	0	0	0
9. 患者之前使用该药或相似药物是否发生类似的不良反应	＋1	0	0	0
10. 该不良反应是否经过客观检查证实	＋1	0	0	＋1
总分值				6

注：判断标准为：≥ 9 分，肯定；5 ～ 8 分，很可能；1 ～ 4 分，可能；≤ 0 分，不可能。

Note：Probability judgment as follows：definite ≥ 9，probable 5 to 8，possible 1 to 4，doubtful ≤ 0.

3.2　IMC 的处理原则

2 级及以上 IMC（腹泻≥ 4 次 • d^{-1}，伴腹痛、便血等结肠炎表现）需停用 ICIs，并给予糖皮质激素作为一线治疗，如泼尼松 1 ～ 2 mg/（kg • d），若激素治疗 72 h 无效或加重，在激素治疗基础上考虑加用生物制剂，如英夫利昔单抗或维得利珠单抗。待不良反应缓解至≤ 1 级后，可在 4 ～ 6 周内逐渐减停激素。根据 NCI-CTCAE v5.0 不良反应分级，该患者 IMC 分级为结肠炎 2 级，腹泻 3 级，参考国内外指南推荐[15-16]，暂停特瑞普利单抗第 5 周期用药。考虑患者有肝硬化病史，存在肝功能不全，临床药师推荐具有直接活性的醋酸泼尼松龙片，无需肝脏代谢，患者自身对激素顾虑较多，但最终同意口服醋酸泼尼松龙片 40 mg • d^{-1}。此外，考虑升血小板胶囊和仑伐替尼有增加腹泻和出血的风险，均建议临床停用。患者在口服醋酸泼尼松龙片 5 d 后症状明显缓解，直至完全停用激素后无复发。

3.3　ICIs 重启与 IMC 复发的平衡

ICIs 的重新启用，指南推荐意见差异较大，ESMO 指南[17]认为 3 ～ 4 级不良反应需永久停用 ICIs，ASCO 指南[16]则认为 3 ～ 4 级不良反应需永久停用 anti-CTLA-4，但 3 级腹泻 / 结肠炎可谨慎应用 anti-PD-1/L1，而 SITC 指南[18]意见相对更加积极，在充分的风险及获益评估后，均可重新启用 ICIs。一项多中心的回顾性研究总结，再次启用 ICIs 后腹泻和结肠炎复发率为 34%，复发后的结肠炎总体可控，无相关死亡病例，复发的高危因素包括再次应用 anti-CTLA-4，首次结肠炎严重程度高、病程长等[13]。本例患者停用激素后，腹痛、腹泻、便血未再复发，临床专科评估其原发病及临床获益，认为仍有必要继续原方案治疗，患者本人也愿意尝试用药。根据前述结肠炎相关药物分析，临床药师建议首先完全停用升血小板胶囊，其次先口服甲磺酸仑伐替尼胶囊一周，无不适后再恢复特瑞普利单抗，医师采纳建议。患者后续恢复特瑞普利单抗联合仑伐替尼用药 3 次，未发生腹泻、腹痛及便血。本例患者能够成功恢复使用免疫联合靶向药物，分析原因，一方面，患者为结肠炎 2 级，激素治疗效果好，

不良反应消除快，另一方面，患者恢复用药仅 3 个周期，时间相对较短，此外，不排除停用升血小板胶囊后，避免了肠道刺激，减少叠加损伤。

3.4　临床药师促进 ICIs 合理、安全使用

irAEs 的临床表现、病理机制以及处理措施与化疗和靶向药物有很大不同，并且往往涉及全身各脏器，给肿瘤治疗带来了极大挑战。临床药师可借助其药学专业的优势，掌握这类药物不良反应特点，从药物评估、停药、治疗及药物重启入手，真正落实到患者的药物治疗管理上，提升肿瘤治疗获益和用药安全。

参考文献

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

[2] Zheng R，Qu C，Zhang S，et al. Liver cancer incidence and mortality in China：temporal trends and projections to 2030 [J]. Chin J Cancer Res，2018，30（6）：571-579.

[3] Kudo M，Finn RS，Qin S，et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma：a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. Lancet，2018，391（10126）：1163-1173.

[4] Arnaud-Coffin P，Maillet D，Gan HK，et al. A systematic review of adverse events in randomized trials assessing immune checkpoint inhibitors [J]. Int J Cancer，2019，145：639-648.

[5] Chen C，Wu B，Zhang C，et al. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors：an updated comprehensive disproportionality analysis of the FDA adverse event reporting system [J]. Int Immunopharmacol，2021，95：107498.

[6] Bellaguarda E，Hanauer S. Checkpoint inhibitor-induced colitis [J]. Am J Gastroenterol，2020，115（2）：202-210.

[7] 谭蓓，王汉萍，李玥，等 . 免疫检查点抑制剂相关结肠炎八例临床特征分析 [J]. 中华消化杂志，2021，41（5）：330-335.

[8] 郑君，曾涌，罗芝英，等 . 1 例肺癌患者使用替雷利珠单抗致免疫相关性肠炎的病例分析 [J]. 中南药学，2022，20（3）：717-718.

[9] 王彩花，金丹，张晗芸，等 . 升血小板胶囊致缺血性肠炎一例 [J]. 中华消化杂志，2014，34（10）：704-705.

[10] 武军，田字彬，徐永红，等 . 升血小板胶囊致重型缺血性结肠炎 1 例并文献复习 [J]. 世界华人消化杂志，2017，25（33）：3000-3004.

[11] 索宝军，周丽雅，丁士刚，等 . 青黛相关缺血性结肠黏膜损伤的内镜及临床特点分析 [J]. 中华内科杂志，2011，50（8）：646-649.

[12] Miyajima S，Tsuji K，Kito Y，et al. Colitis induced by lenvatinib in a patient with advanced hepatocellular carcinoma [J]. Clin J Gastroenterol，2021，14（1）：187-192.

[13] Abu-Sbeih H，Ali FS，Naqash AR，et al. Resumption of immune checkpoint inhibitor therapy after immune-mediated colitis [J]. J Clin Oncol，2019，37：2738-2745.

[14] 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.

[15] 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 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：1-116.

[16] Schneider B，Naidoo J，Santomasso B，et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy：ASCO guideline update [J]. J Clin Oncol，2021，39：4073-4126.

[17] Haanen JBAG，Carbonnel F，Robert C，et al. Management of toxicities from immunotherapy：ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis，treatment and follow-up [J]. Ann Oncol，2017，28（suppl4）：iv119-iv142.

[18] Brahmer JR，Abu-Sbeih 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：e002345.

（收稿日期：2023-01-06；修回日期：2023-04-11）

B 细胞水平监测在 1 例单剂量利妥昔单抗治疗特发性膜性肾病中的应用

房珊平，王艺霏，丁愉*（联勤保障部队大连康复疗养中心，辽宁 大连 116013）

摘要：1 例 63 岁男性肾病综合征患者，病理结果为膜性肾病Ⅱ期，首次使用利妥昔单抗后，患者因肾病综合征继发脑梗死，转专科治疗脑梗死而中断利妥昔单抗常规治疗。临床药师通过分析文献资料，发现利妥昔单抗耗竭 B 细胞的作用在个体间差异较大，综合考虑患者原发病、合并症及经济性等因素后，选择通过监测 B 细胞水平指导治疗，该患者实现临床部分缓解（尿蛋白较基线下降＞ 50% 且最终尿蛋白为 0.3 ～ 3.5 g • d^{-1}）且降低了治疗费用。

关键词：利妥昔单抗；特发性膜性肾病；给药间隔；B 细胞耗竭；血清抗磷脂酶 A2 受体

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2508-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.043

膜性肾病（membranous nephropathy，MN）是一种自身免疫性疾病，自身抗体识别肾小球足细胞靶抗原，从而导致电子致密免疫复合物的形成，激活补体，引起足细胞损伤，导致大量蛋白尿和低蛋白血症等临床症状。膜性肾病是成年人肾病综合征的常见病因，可导致严重的血栓并发症和肾衰竭 [1]。膜性肾病引起的持续性蛋白尿与 10 年内发展为终末期肾病相关，并增加死亡风险 [2]。临床常选用糖皮质激素、钙调磷酸酶抑制剂、细胞毒等药物治疗膜性肾病，近年来有研究使用利妥昔单抗进行治疗，清除 B 细胞效果良好，安全性较高，患者耐受性好 [3]。2021 年 KDIGO 肾小球疾病管理临床实践指南将利妥昔单抗作为进行性肾功能丧失中高风险膜性肾病患者的一线治疗药物，但目前利妥昔单抗治疗膜性肾病最佳的给药剂量、给药间隔、治疗疗程等仍有待明确。现通过 1 例利妥昔单抗治疗特发性膜性肾病的患者病例，对利妥昔单抗的剂量、给药频次以及用药后 B 细胞清除的持续时间等进行分析，以期为临床合理用药提供参考。

1 病例资料

患者，男性，63 岁，身高 165 cm，体重 65 kg，体重指数（BMI）：23.9 kg • m^{-2}，因“劳累后发现双下肢水肿，伴有尿中泡沫增多 1 个半月余”入院，于 2021 年 7 月 8 日行肾穿刺活检术，病理诊断：膜性肾病Ⅱ期。使用利妥昔单抗治疗，首剂给予利妥昔单抗注射液 600 mg（生产企业：Roche Diagnostics GmbH，规格：100 mg，批号：H0318），给药 6 d 后患者突发左侧肢体活动不灵，诊断：脑梗死，核磁示：右侧额顶叶及侧脑室旁异常信号，考虑亚急性期脑梗死 / 出血性转化，转神经内科行抗凝、改善循环、康复理疗等对症治疗 3 周，患者神经内科相关症状较前有所缓解。为进一步诊治肾病，以“膜性肾病”收入院。既往史：高血压 20 年，脑梗死 1 月余。入院查体：体温 36.8 ℃，脉搏 77 次 • min^{-1}，呼吸 18 次 • min^{-1}，血压 98 ～ 137 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。双下肢轻度水肿，左上肢肢体肌力 0 级，下肢肌力 3 级，左侧 Babinski 征阳性，余正常。辅助检查：行肾穿刺活检，病理回报：膜性肾病Ⅱ期。尿红细胞检查：250 个 • μL^{-1}↑，胸部 CT 示：双侧胸腔积液，颅脑磁共振示：脑内散在缺血灶，颅内多发动脉狭窄，双侧大脑前动脉为著，烟雾病待排除外，左侧大脑中动脉重度狭窄或闭塞。入院诊断：肾病综合征（膜性肾病），高血压 3 级（很高危），脑梗死（左侧肢体偏瘫），椎基底动脉供血不足，颈动脉硬化。

2 治疗过程

患者第一次入院后，血红蛋白 142 g • L^{-1}，血清白蛋白 17.9 g • L^{-1}↓，肌酐 91.8 μmol • L^{-1}，尿素 5.59 mmol • L^{-1}，eGFR-EPI 59.41 mL • min^{-1}↓，24 h 尿蛋白定量测定 5.43 g↑，血清抗磷脂酶 A2 受体抗体（anti-phospholipase A2 receptor，PLA2R-Ab）157.91 Ru • mL^{-1}↑。7 月 14 日在使用利妥昔

作者简介：房珊平，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：dlkflyzxkx@163.com *通信作者：丁愉，男，副主任药师，主要从事药事管理与临床药学工作，email：dlkflyzxkx@163.com

单抗前 30 min 给予异丙嗪注射 25 mg，地塞米松磷酸钠注射液 10 mg 预防过敏反应，接受第 1 剂利妥昔单抗 375 mg·m^{-2} 共计 600 mg，开始静脉滴注利妥昔单抗时给药速度为 50 mg·h^{-1}，最初 60 min 过后，每 30 min 增加 50 mg·h^{-1}，直至 300 mg·h^{-1} 完成输注。拟计划给药 4 次，一周 1 次。7 月 20 日患者突发脑梗死，需立即转往专科救治，因此仅接受 1 次利妥昔单抗的输注后未能按计划完成四剂方案。结合利妥昔单抗的药动学特点、文献资料及本例患者的情况，临床药师建议可考虑暂时临床观察，根据患者 CD20 ＋ B 细胞再增情况、PLA2R 抗体水平及尿蛋白缓解状况再选择第二次给药时机，医师接受建议。监测 CD20 ＋ B 细胞发现，首次给药 1 月余查患者外周循环血中 CD20 ＋ B 细胞：0，B 淋巴细胞：0.13%↓，B 细胞迅速被耗竭。期间患者定期于门诊复查，PLA2R 抗体 14.79 Ru·mL^{-1}，24 h 尿蛋白定量 3.6 g↑。4 个月后患者血红蛋白 145 g·L^{-1}，血清白蛋白 23.3 g·L^{-1}↓，24 h 尿蛋白定量 2.76 g↑，PLA2R 抗体 1∶10（＋），肌酐 62.8 μmol·L^{-1}，eGFR-EPI 105.6 mL·min^{-1}，查患者外周循环血中 CD20 ＋ B 细胞：0.01，B 淋巴细胞：0.94%↓。首次给药 5 个月后患者再次入院，因 24 h 尿蛋白定量 2.62 g↑，PLA2R 抗体仍显示阳性，给予第 2 剂利妥昔单抗注射液，继续监测 PLA2R 抗体及尿蛋白指标。1 个月后患者 PLA2R 抗体 7.09 Ru·mL^{-1}，24 h 尿蛋白定量测定 1.96 g↑达到临床部分缓解。后临床药师对患者进行 3 个月电话随访，患者仍维持临床部分缓解状态。

3 单剂量利妥昔单抗药物治疗方案讨论

3.1 利妥昔单抗持续耗竭 B 细胞的个体差异

利妥昔单抗的给药方案由早期用于淋巴瘤和类风湿关节炎等的治疗延续而来。2021 年 KDIGO 肾小球疾病管理临床实践指南中对于利妥昔单抗用于膜性肾病治疗方案的推荐剂量为：① 每次 375 mg·m^{-2}，每周 1 次，共 4 次；② 每次 1 g，间隔 2 周，共使用 2 次[4]，推荐方案的剂量、频次较为宽泛，导致临床制订利妥昔单抗治疗方案不易把握。由于利妥昔单抗价格昂贵、老年患者易出现感染等不良反应，使用时需权衡疗效、治疗负担、不良反应等因素[5]。目前有证据表明，在自身免疫性疾病中，小剂量、低频次使用利妥昔单抗具有良好的疗效，且不良反应更少，成本更低[6-7]。因此利妥昔单抗的给药方案有待进一步探讨及优化。

利妥昔单抗药动学个体变异度大，非霍奇金淋巴瘤患者的群体药动学显示其中位终末消除半衰期估计值为 22（6 ～ 52）d，在完成末次治疗后 3 ～ 6 个月血液中仍可检测到该药物。Turner-Stokes 等[8]对 19 例患者采用单次利妥昔单抗 375 mg·m^{-2} 的方案治疗活动性 ANCA 相关性血管炎（ANCA-associated vasculitis，AAV），耗竭 B 细胞（＜ 5 个·mL^{-1}）的中位时间为 13 d，3 个月后 89% 的患者 B 细胞耗竭，13 例患者（68%）B 细胞耗竭持续 18 周以上。B 细胞再增的中位时间为 9.2 个月。Katsuno 等[9]对 3 例难治性特发性膜性肾病给予利妥昔单抗治疗，1 例患者分别在 0 和 6 个月给予利妥昔单抗 500 mg，CD19 ＋ B 细胞耗竭持续至少 15 个月，初次治疗 11 个月后肾病综合征完全缓解；1 例患者给予利妥昔单抗 630 mg 单剂给药后，CD19 ＋ B 细胞耗竭达 26 个月；还有 1 例患者给予单剂利妥昔单抗 600 mg 后，CD19 ＋ B 细胞耗竭持续 5 个月后再次增加。

3.2 B 细胞水平监测在单剂量利妥昔单抗治疗特发性膜性肾病中的应用

有研究对 12 例患者给予 1 次利妥昔单抗 375 mg·m^{-2} 后，定期监测 CD20 ＋ B 细胞或 CD19 ＋ B 细胞，当 B 细胞计数≥ 5 个·mm^{-3} 时，则再给予 1 次剂量。仅 1 名患者需要第二次给药以耗竭 CD20 ＋ B 细胞。1 年随访中，B 细胞指导方案与对照组使用标准四剂方案相比，在实现临床缓解方面差异无统计学意义，但显著减少了治疗费用[10]。

研究显示，微小病变、局灶节段性肾小球硬化[11-12]和膜性肾病[13-14]中的 CD19 ＋ B 细胞与临床缓解的进展和持续时间密切相关。Ramachandran 等[15]报道了其治疗 109 名膜性肾病患者的临床经验，这些患者分别接受了利妥昔单抗 3 种不同剂量的方案（每周 375 mg·m^{-2}，连续 4 周；1 g，第 0 日和第 15 日；375 mg·m^{-2}，第 3 ～ 4 个月监测 CD19 ＋ B 细胞，当 CD19 ＋ B 细胞计数＞ 1% 时追加 1 剂利妥昔单抗）。3 种方案的应答差异无统计学意义，但接受监测 CD19 ＋ B 细胞给药方案的患者需要更低剂量的利妥昔单抗，可能有更好的安全性。提示基于 B 细胞指导利妥昔单抗用药，可能是利妥昔单抗治疗膜性肾病的有效方法。

3.3 PLA2R 抗体水平对临床缓解的预判

在原发性膜性肾病患者中，循环 PLA2R 抗体的系列评估可能有助于临床缓解的预判。PLA2R 抗体可预测机体对利妥昔单抗的疗效和

复发风险，特别是在最初的部分缓解后，较低的PLA2R抗体滴度很大程度预示着较高的缓解率和较短的缓解时间[16]。因此，定期监测PLA2R抗体滴度水平有助于临床缓解的预判。

4 小结

膜性肾病患者随着尿蛋白丢失及机体的代偿性合成，导致参与凝血过程及纤溶过程的多种调节蛋白发生改变，这些改变共同形成了促血栓形成环境[17]。本病例是1名特发性膜性肾病合并脑梗死的老年患者，考虑膜性肾病继发可能性大。单剂量利妥昔单抗治疗经验有限，临床药师查阅文献资料发现其用于治疗膜性肾病时，疗效及B细胞耗竭程度的个体差异较大，提示通过监测B细胞数量指导用药，有可能实现患者临床缓解且节约成本。为实现理想的给药策略，应用利妥昔单抗治疗时，应结合患者的临床指标，如B细胞计数、PLA2R抗体水平以及临床缓解程度等制订个体化给药方案，以提高药物治疗的获益和降低不良反应风险。目前利妥昔单抗治疗原发性膜性肾病的最佳剂量和给药间隔尚未确定，以往多为小样本量研究，单剂量、长周期给药间隔的有效性与安全性还需要更多证据支持，标准四剂量法的必要性有待进一步积累经验和临床验证。

参考文献

[1] Ronco P，Plaisier E，Debiec H. Advances in membranous nephropathy [J]. J Clin Med，2021，10：607.

[2] Kanigicherla DA，Short CD，Roberts SA，et al. Long-term outcomes of persistent disease and relapse in primary membranous nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant，2016，31：2108-2114.

[3] 吴慧仪，郑萍，黄欣，等 . 1 例难治性肾病综合征合并股骨头坏死及急性肾损伤患者免疫抑制剂治疗的用药分析 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2461-2465.

[4] KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases [J]. Kidney Int，2021，100（4S）：S1-S276.

[5] Vecchio LD，Allinovi M，Rocco P，et al. Rituximab therapy for adults with nephrotic syndromes：standard schedules or B cell-targeted therapy? [J]. J Clin Med，2021，10（24）：5847.

[6] Ferraro AJ，Day CJ，Drayson MT，et al. Effective therapeutic use of rituximab in refractory Wegener’s granulomatosis [J]. Nephrol Dial Transplant，2005，20（3）：622-625.

[7] Bagga A，Sinha A，Moudgil A. Rituximab in patients with the steroid-resistant nephroticsyndrome [J]. N Engl J Med，2007，356：2751-2752.

[8] Turner-Stokes T，Sandhu E，Pepper RJ，et al. Induction treatment of ANCA-associated vasculitis with a single dose of rituximab [J]. Rheumatology，2014，53（8）：1395-1403.

[9] Katsuno T，Ozaki T，Kim H，et al. Single-dose rituximab therapy for refractory idiopathic membranous nephropathy：a single-center experience [J]. Int Med，2017，56（13）：1679-1686.

[10] Cravedi P，Ruggenenti P，Sghirlanzoni MC，et al. Titrating rituximab to circulating B cells to optimize lymphocytolytic therapy in idiopathic membranous nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2007，2（5）：932-937.

[11] Kemper M，Gellermann J，Habbig S，et al. Long-term follow-up after rituximab for steroid-dependent idiopathic nephrotic syndrome [J]. Nephrol Dial Transplant，2012，27（5）：1910-1915.

[12] Ravani P，Magnasco A，Edefonti A，et al. Short-term effects of rituximab in children with steroid-and calcineurin-dependent nephrotic syndrome：a randomized controlled trial [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2011，6（6）：1308-1315.

[13] Cravedi P，Ruggenenti P，Sghirlanzoni MC，et al. Titrating rituximab to circulating B cells to optimize lymphocytolytic therapy in idiopathic membranous nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2007，2（5）：932-937.

[14] Ramachandran R，Bharati J，Rao I，et al. Persistent CD-19 depletion by rituximab is cost-effective in maintaining remission in calcineurin-inhibitor dependent podocytopathy [J]. Nephrology，2019，24（12）：1241-1247.

[15] Ramachandran R，Nayak S，Kumar V，et al. Rituximab in primary membranous nephropathy：a comparative study of three dosing regimens [J]. Nephrol Dial Transplant，2021，36（7）：1352-1354.

[16] Ruggenenti P，Debiec H，Ruggiero B，et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody titer predicts post-rituximab outcome of membranous nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol，2015，26（10）：2545-2558.

[17] Kerlin BA，Ayoob R，Smoyer WE. Epidemiology and pathophysiology of nephrotic syndrome-associated thromboembolic disease [J]. Clin J Am Soc Nephrol，2012，7（3）：513-550.

（收稿日期：2023-02-17；修回日期：2023-04-11）

临床药师参与小细胞肺癌合并 IgA 肾病治疗的药学实践

司倩，刘相端，高钟丽，陈楠，葛春丽（河南中医药大学第五临床医学院（郑州人民医院）药学部，郑州 450001）

摘要：以 1 例小细胞肺癌诱发 IgA 肾病的患者为例，临床药师通过查阅相关指南、文献，结合药物代谢特点，从患者出现蛋白尿的原因、肾病治疗药物的选择等方面进行分析，优化肾功能不全时抗肿瘤药物治疗方案及肾病合并症处理方案，使患者顺利完成了此次化疗，同时改善了患者肾脏并发症相关指标，确保患者用药安全、有效，为临床药师参与肿瘤患者合并肾功能不全的药学监护提供参考。

关键词：小细胞肺癌；IgA 肾病；安罗替尼；药学监护

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2511-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.044

世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）发布的 2020 年全球最新癌症负担数据显示，肺癌仍然是中国发病率和死亡率排名第一的肿瘤，分别占 2020 年中国癌症新发病率和死亡率的 17.9% 和 23.8%[1]。而小细胞肺癌约占所有肺恶性肿瘤的 13% ～ 15%，具有高度复发、早期转移和预后差的特点，Ⅳ期疾病占新诊断的 70% 以上 [2]。化疗和放疗仍然是小细胞肺癌治疗的主要方法。作用于血管内皮生长因子（VEGF）的小分子靶向药物安罗替尼，因破坏一氧化氮（NO）生成在使用过程中易引起高血压和蛋白尿的不良反应，对肾功能造成进一步损害，因此合并免疫球蛋白 A 肾病（IgA 肾病）的小细胞肺癌患者的治疗方案制订时需合理选择抗肿瘤药物。本文通过报道 1 例小细胞肺癌继发 IgA 肾病患者的治疗过程，旨在为临床药师参与特殊人群肿瘤患者的治疗并实施药学监护提供参考。

1　病例概况

患者男性，72 岁，身高 162 cm，体重 62 kg，体表面积 1.63 m^2，KPS 90 分。2018 年 9 月患者因“反复咳嗽”行胸部 CT 检查示肺占位，后行穿刺活检后病理示：小细胞肺癌。在外院行依托泊苷＋顺铂化疗 6 周期同时序贯胸部放疗 25 次。放疗结束后于 2020 年 4 月开始口服安罗替尼 12 mg d1 ～ 14 q21d 治疗，期间每 3 个月复查疗效评价为疾病稳定（SD），未见明显不良反应。2020 年 12 月 23 号复查尿常规示：尿蛋白质＋，尿红细胞 2 个 • μL^{-1}。既往高血压病史 10 年，最高 160/100 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），平素规律口服苯磺酸左旋氨氯地平片（5 mg qd），血压控制可。本次因“确诊小细胞肺癌 2 年 4 月余复查并治疗”于 2021 年 1 月 29 日入院。

入院查体：神志清，浅表淋巴结未扪及肿大，双肺呼吸音清，心肺听诊无异常，腹软，无压痛及反跳痛，双下肢无水肿。入院诊断：小细胞肺癌局限期，高血压 2 级（很高危）。

2　治疗经过

患者入院后继续给予安罗替尼胶囊（12 mg qd），2021 年 1 月 30 日检查肿瘤标志物示较前无明显变化，尿常规示：尿红细胞计数 8 个 • μL^{-1}，24 h 尿蛋白定量 2962.03 mg↑；肾功能肌酐 86 μmol • L^{-1}↑，尿酸 498 μmol • L^{-1}↑。因尿蛋白定量偏高，暂停口服安罗替尼胶囊。并行相关检查，排除多发性骨髓瘤、免疫相关性疾病等因素。暂给予黄葵胶囊（2.15 g tid）和氯沙坦钾片（50 mg qd）对症治疗。2 月 3 日查相关检查，血清免疫电泳及血清蛋白电泳阴性，尿本 - 周氏蛋白电泳阴性，抗心磷脂抗体阴性，核心抗体阴性，风湿免疫相关抗体检测阴性，抗中性粒细胞浆抗体测定阴性，其他涉及具体数值的检验结果见表 1。2 月 7 日查肾血管磁共振动脉血管成像（MRA）示：双侧动脉近段粥样硬化，右侧管腔呈轻 - 中度狭窄，左肾动脉近段管腔呈轻度狭窄。临床药师考虑患者双侧肾动脉狭窄，建议停用血管紧张素Ⅱ受体阻断剂（ARB）类药物氯沙坦片，换用百令胶囊（1 g tid）。

基金项目：河南省医学科技攻关计划联合共建项目（No. LHGJ20210709）。

作者简介：司倩，女，硕士，副主任药师，主要从事抗肿瘤药物临床治疗管理及药品不良反应监测管理，email：s5310123@163.com

表 1 患者相关检验及结果

Tab 1 Clinical test and results of the patient

检验日期	检验指标名称	检验结果
2 月 3 日	血游离轻链定量检测	κ：12.90 mg • L^{-1}
		λ：14.00 mg • L^{-1}
		κ/λ：0.92
2 月 5 日	尿微量白蛋白（MALB）	719.20 mg • L^{-1}↑
	尿转铁蛋白（uTRF）：	12.64 mg • L^{-1}↑
	尿免疫球蛋白 G（uIGG）	116.4 mg • L^{-1}↑
	尿 α1 微球蛋白（A1M）	128.8 mg • L^{-1}↑
	尿视黄醇结合蛋白（uRBP）	2.2 mg • L^{-1}↑
	尿 *N*- 乙酰 -*β*-*D*- 氨基葡萄糖苷（uNAG）	37.87 U • L^{-1}↑
	IgA	1.62 g • L^{-1}
	IgG	5.52 g • L^{-1}↓
	IgM	0.56 g • L^{-1}
	血同型半胱氨酸	25.6 μmol • L^{-1}↑
	抗肾小球基底膜抗体	IgG ＜ 2 AU • mL^{-1}
	三酰甘油	4.54 mmol • L^{-1}↑
	总胆固醇	7.14 mmol • L^{-1}↑
	高密度脂蛋白	1.55 mmol • L^{-1}
	低密度脂蛋白	3.85 mmol • L^{-1}↑
	补体 C4	42.6 mg • dL^{-1}↑
	补体 C3	156.4 mg • dL^{-1}↑
	类风湿因子	1.9 IU • mL^{-1}
	抗链球菌溶血素 O	31 IU • mL^{-1}

患者停用安罗替尼胶囊并应用黄葵胶囊和百令胶囊后尿蛋白情况好转，3 月 14 日复查尿常规及 24 h 尿蛋白定量示：尿潜血＋，尿蛋白＋，24 h 尿蛋白定量 1757.96 mg↑；复查肾功能示：血肌酐 89 μmol • L^{-1}↑，尿酸 573 μmol • L^{-1}↑，给予停用黄葵胶囊和百令胶囊。患者停用抗肿瘤治疗 1 月余，检查检验结果提示患者肾小管肾小球均有损伤，但尿蛋白不良反应分级为 2 级，临床药师建议重启安罗替尼胶囊 10 mg 治疗，因安罗替尼与别嘌醇存在药物相互作用，且别嘌醇在应用前需进行 *HLA-B* 基因检测，建议给予非布司他（40 mg qd）降尿酸治疗，注意监护尿蛋白和尿酸水平，同时注意监护安罗替尼可能导致的相关不良反应。

3 月 19 日，患者血压最高波动在 161/107 mmHg，患者已使用苯磺酸左氨氯地平片降压治疗，结合患者情况，临床药师建议加用特拉唑嗪片 2 mg qd 治疗。3 月 20 日患者肾活检病理回示：局灶增生性 IgA 肾病（光镜）。3 月 22 日查体血压 133/79 mmHg，肾功能血肌酐 67 μmol • L^{-1}，尿酸 465 μmol • L^{-1}↑，24 h 尿蛋白定量 618.34 mg↑。患者症状明显好转，继续以上治疗方案，于 4 月 2 日出院。

3 分析与讨论

3.1 肾损害原因及机制

血浆经肾脏形成原尿，蛋白经肾小球滤过后经肾小管上皮细胞重吸收。若滤出的蛋白不能完全被肾小管重吸收则会出现蛋白尿。肾小球滤过膜以及肾小管结构和功能异常是产生蛋白尿的主要原因。该患者 24 h 尿蛋白定量＞ 2.0 g，尿蛋白电泳未见异常，肾脏活检示：局灶增生性 IgA 肾病，但尿六联检查中尿微量白蛋白（MALB）、尿转铁蛋白（uTRF）、尿免疫球蛋白 G（uIGG）及尿 α1 微球蛋白（A1M）均偏高，提示患者肾小球和肾小管均有受损 [3]。

IgA 肾病是原发性肾小球肾炎的最常见病因，无肾脏病证据的患者肾活检中也可见 IgA 沉积 [4-5]。IgA 肾病大部分是原发性的，目前尚无有效的 IgA 肾病的诊断性生物标志物，一般考虑与免疫相关。同时需考虑肝硬化、乳糜泻、人类免疫缺陷病毒感染、淋巴瘤、小细胞肺癌、强直性脊柱炎等疾病因素导致的继发性 IgA 肾病 [6-11]。患者抗核抗体阴性、尿 - 本周氏蛋白检查阴性、风湿及免疫相关检查阴性，无乙肝及获得性免疫缺陷综合征等疾病，结合患者病史，排除多发性骨髓瘤及免疫性疾病导致的肾损害 [12]，不排除小细胞肺癌导致继发性 IgA 肾病的可能。

除疾病因素外，药物也可能会导致蛋白尿的发生。有研究表明：VEGF 在肾脏组织中广泛表达，起到维持肾小球内皮细胞结构和功能的作用，当其缺失或表达受到抑制时，对内皮细胞的保护作用降低，导致足细胞和裂孔隔膜损伤，使肾小球滤过膜的通透性增加，从而导致蛋白尿 [13-14]。患者治疗期间使用安罗替尼，可通过作用于 VEGF-A 而诱发蛋白尿。综上所述，该患者 IgA 肾病不排除小细胞肺癌诱发，治疗期间使用可能导致肾损害的药物需加强监护。

3.2 IgA 肾病合并小细胞肺癌抗肿瘤治疗方案的选择

目前无局限期小细胞肺癌维持治疗的标准方案，最新研究表明局限期小细胞肺癌同步放化疗后双免疫维持治疗未改善患者无进展生存期（PFS）[15]。有研究表明，安罗替尼对广泛期小细胞肺癌维持治疗效果确切，能在一定程度上提高生存质量 [16]，鉴于目前患者治疗有效，可继续使用安罗替尼维持治疗。

该患者治疗期间出现蛋白尿，24 h 尿蛋白定量 2962.03 mg，目前尚无有效预防和治疗抗血

管生成药物致蛋白尿的药物，国内专家共识推荐[17]：使用安罗替尼期间 24 h 蛋白尿水平＞ 2.0 g，应考虑暂停使用直至 24 h 蛋白尿定量＜ 2.0 g，后可考虑恢复使用。因此临床药师建议暂停使用安罗替尼，并给予降尿蛋白治疗，待 24 h 尿蛋白定量恢复至 2.0 g 以下再重启安罗替尼治疗。

3.3 IgA 肾病合并小细胞肺癌肾脏并发症治疗方案的选择

蛋白尿的药物治疗主要有血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）、ARB、免疫调节剂等西药以及黄葵、尿毒清、百令胶囊等中药。ACEI 和 ARB 类药物通过降低患者的血压和肾小球内压，减少尿蛋白的漏出，同时还可通过抑制肾小球系膜细胞的异常增殖，延缓肾小球硬化的程度，减少糖蛋白等细胞外基质蛋白的表达和沉积[18-19]。但 ACEI 类及 ARB 类药物在双侧肾动脉狭窄时禁用，因此在发现双侧肾动脉狭窄时临床药师建议停用氯沙坦片，换用百令胶囊等中成药对症治疗。

别嘌醇是高尿酸血症的一线治疗用药，因携带 *HLA-B*58：01* 基因型的患者使用别嘌醇治疗时严重皮肤不良反应的风险增加[20]，在使用前和增量过程中需注意监测；同时安罗替尼和别嘌醇均为 CYP3A4 酶抑制剂，两药合用可能会导致药物的代谢发生改变，从而导致药效增强或毒性增加。在无有效血药浓度监测的指导下，两药合用风险较大。因此临床药师建议将降尿酸药物调整为不经 CYP 酶代谢的非布司他治疗。

3.4 药学监护

安罗替尼常见的不良反应主要有高血压、蛋白尿、血栓栓塞及出血等，其中高血压和蛋白尿为其最常见的不良反应，应在启用安罗替尼治疗后每周监测 2 ～ 3 次血压；因该患者合并 IgA 肾病，建议患者每周进行一次尿常规检查，出现异常及时对症处理。提醒患者在治疗期间应定期复查血常规和肝肾功能，避免食用葡萄柚；因安罗替尼与其他药物存在可能的药物相互作用，同时服用其他药物时或若出现头痛、头晕、小便泡沫增多等异常症状时需告知医师或药师。患者同时服用非布司他降尿酸治疗，告知患者调整生活方式，不食富含嘌呤及其类似物的食物（如啤酒、白酒、虾、蟹、动物内脏、骨髓、奶制品等），并注意严密监测患者尿酸、肝功能、消化道反应、关节痛等指标或症状。

该患者在重新启用安罗替尼治疗后第 4 日出现血压升高，调整降压药物后血压恢复正常，第 8 日复查肾功能血肌酐正常，24 h 尿蛋白定量＜ 1.0 g，尿酸水平下降，建议患者出院后继续监测上述指标。

4 小结

小细胞肺癌诱发的 IgA 肾病临床鲜有报道，特殊患者在制订个体化抗肿瘤治疗方案时需评估肾功能等情况，若治疗方案选择不当可能会加重肾损伤，因此需要进行合理的药学监护。临床药师通过充分评估患者病情，从药物作用机制、药物代谢特点以及药物相互作用等方面综合评估，协助医师制订最佳的治疗方案，确保用药更安全、有效。

参考文献

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

[2] Pavan A，Attili L，Pasello G，et al. Immunotherapy in small-cell lung cancer：from molecular promises to clinical challenges [J]. J Immunother Cancer，2019，7（1）：205.

[3] Charlton JR，Portilla D，Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury blomarkers [J]. Nephrol Dial Transplant，2014，29（7）：1301-1311.

[4] Wyatt RJ，Julian BA. IgA nephropathy [J]. N Engl J Med，2013，368（25）：2402-2414.

[5] Suzuki K，Honda K，Tanabe K，et al. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan [J]. Kidney Int，2003，63（6）：2286-2294.

[6] McGuire BM，Julian BA，Bynon JS，et al. Brief communication：glomerulonephritis in patients with hepatitis C cirrhosis undergoing liver transplantation [J]. Ann Intern Med，2006，144（10）：735-741.

[7] Welander A，Sundelin B，Fored M，et al. Increased risk of IgA nephropathy among individuals with celiac disease [J]. J Clin Gastroenterol，2013，47（8）：678-683.

[8] D’Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome [J]. Semin Nephrol，2004，24（3）：179-196.

[9] Bergmann J，Buchheidt D，Waldherr R，et al. IgA nephropathy and Hodgkin’s disease：a rare coincidence. Case report and literature review [J]. Am J Kidney Dis，2005，45（1）：e16-e19.

[10] Champtiaux N，Lioté F，El Karoui K，et al. Spondyloarthritis-associated IgA nephropathy [J]. Kidney Int Rep，2020，5（6）：813-820.

[11] Yacoub G，Kosseifi SG，Shah LS，et al. IgA nephropathy and small cell lung carcinoma [J]. Tenn Med，2008，101（3）：35-37，40.

[12] 姜倩倩，吴小燕，王白莹. 多发性骨髓瘤合并肾损伤患者的临床特点及危险因素分析 [J]. 中华肾脏病杂志，

2020，36（2）：123-130.
[13] Eremina V，Sood M，Haigh J，et al. Glomerular-specific al terations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases [J]. J Clin Invest，2003，111（5）：707-716.
[14] Cosmai L，Gallieni M，Liguigli W，et al. Renal toxicity of anticancer agents targeting vascular endothelial growth factor（VEGF）and its receptors（VEGFRs）[J]. J Nephrol，2017，30（2）：171-180.
[15] Peters S，Pujol JL，Dafni U，et al. Consolidation nivolumab and ipilimumab versus observation in limiteddisease small-cell lung cancer after chemo-radiotherapy-results from the randomised phase Ⅱ ETOP/IFCT 4-12 STIMULI trial [J]. Ann Oncol，2022，33（1）：67-79.
[16] 梁雪峰，安玉姬，张卫华，等 . 广泛期小细胞肺癌一线化疗后安罗替尼维持治疗的临床观察 [J]. 临床肿瘤学杂志，2020，25（12）：1121-1124.
[17] 中国医师协会肿瘤医师分会，中国临床肿瘤学会血管靶向治疗专家委员会，中国抗癌协会肿瘤靶向治疗专业委员会 . 盐酸安罗替尼治疗晚期肺癌中国专家共识（2020版）[J]. 中华肿瘤杂志，2020，42（10）：807-816.
[18] 刘丽，王旭慧，袁易 . 抗高血压药盐酸贝那普利的研究进展 [J]. 中南药学，2016，14（6）：630-634.
[19] Croom KF，Curran MP，Goa KL，et al. Irbesartan：a review of its use in hypertension and in the management of diabetic nephropathy [J]. Drugs，2004，64（9）：999-1028.
[20] Wu R，Cheng YJ，Zhu LL，et al. Impact of *HLA-B*5801* allele and allopurinol-induced cutaneous adverse drug reactions：evidence from 21 pharmacogenetic studies [J]. Oncotarget，2016，7（49）：81870-81879.

（收稿日期：2023-02-15；修回日期：2023-04-03）

临床药师参与 1 例晚期结直肠癌患者抗血管生成药物个体化选择策略制订及药学监护实践

王家雪[1]，张瑞[1]，赵华叶[1]，胡鳞方[1]，蒋倩[2]，陈琦[1*]（1. 贵州省人民医院 药剂科，贵阳 550002；2. 四川省肿瘤医院药学部，成都 610041）

摘要：本文介绍临床药师参与 1 例晚期结直肠癌患者抗血管生成药物个体化选择策略制订，并进行用药监护及用药教育案例。临床药师基于患者的病理生理状态，应用循证药学方法，结合药物最新的有效性、安全性、经济性研究结果，为临床医师制订瑞戈非尼或呋喹替尼的个体化选择策略提供了数据支持。此外，临床药师通过对患者进行全程化用药管理，实现药物不良反应风险控制。

关键词：临床药师；结直肠癌；循证药学；药学监护
中图分类号：R97，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2514-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.045

结直肠癌是全球发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一[1]。近年来，我国结直肠癌发病率和死亡率均呈上升趋势，2020 年新发病例超 55 万，死亡病例超 28 万，分别位居恶性肿瘤的第三位和第五位[1-2]。多数结直肠癌患者确诊时已属中晚期，其 5 年生存率仅为 9.8% 到 17.7%[3-4]。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是一种具有高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，可在体内诱导血管新生，促进肿瘤的浸润与转移[5-6]。研究表明，阻断 VEGF 系统信号通路可以有效抑制转移性结直肠癌的生长和再转移[7-8]。目前，针对难治性转移性结直肠癌的三线抗血管生成治疗，瑞戈非尼和呋喹替尼获中国临床肿瘤学会（Chinese Society of Clinical Oncology，CSCO）结直肠癌指南同级推荐（均为Ⅰ级）[9]。然而，在实际临床诊疗中，如何个体化选择瑞戈非尼或呋喹替尼，仍是干扰临床医师和患者的治疗困境。本文结合临床药师参与 1 例难治性转移性直肠癌患者多程化疗后口服抗血管生成药物的选择及药学监护，探讨瑞戈非尼或呋

基金项目：贵州省高层次创新型人才“千层次”人才培养（No.GZSYQCC【2023】008）。
作者简介：王家雪，女，主管药师，硕士，主要从事临床药学方面的研究，email：wjjx1995@163.com *通信作者：陈琦，女，主任药师，主要从事临床药学、药事管理、药理学方面的研究，email：241081573@qq.com

喹替尼的个体化选择策略以及临床药师在参与药物治疗中的积极作用。

1　临床资料

1.1　病史摘要

患者，女，50 岁，身高 157 cm，体重 50 kg，体表面积 1.48 m^2，美国东部肿瘤协作组体能状态（ECOG PS）评分 1 分，疼痛评分（NRS）0 分。因确诊“乙状结肠与直肠交界区腺癌伴肝、肺转移多程治疗后 1 月余”入院。患者于 2021 年 11 月 25 日体检行胸部 CT 提示“双肺多发大小不等结节”；腹部彩超示“肝内实性占位”；行 PET-CT 检查提示“乙状结肠、直肠交界区肠壁增厚，双肺散在实性结节及肝脏多发低密度结节，代谢增高，多系结肠癌伴双肺、肝脏转移”；行肠镜示“直乙交界新生物”；病理示“距肛 10 cm 活检标本查见腺癌”；基因检测示“*KRAS* 突变，微卫星稳定，*NRAS* 及 *BRAF V600E* 未见突变”；完善相关辅助检查后明确诊断为乙状结肠与直肠交界区腺癌伴肝、肺转移（T3N2M1 Ⅳ期）。排除禁忌后患者于 2021 年 12 月 4 日起行 7 周期一线 mFOLFOX6 联合贝伐珠单抗靶向治疗，具体方案为：贝伐珠单抗 300 mg ivgtt d0 ＋奥沙利铂 150 mg ivgtt d1 ＋亚叶酸钙注射液 600 mg ivgtt d1 ＋氟尿嘧啶注射液 600 mg iv d1 ＋氟尿嘧啶注射液 3750 mg civ 46h；q3w。2022 年 3 月 3 日疗效评价为稳定。2022 年 4 月 13 日患者复查全腹 CT 定位增强示：腹膜后、左侧髂总动脉旁数枚稍大淋巴结，较前增大；肝内散在多个结节，部分较前增大，部分较前新增，考虑肝脏病灶新增，外科评估后不予手术。2022 年 4 月 22 日行二线 FOLFIRI 联合贝伐珠单抗靶向治疗，具体方案为：贝伐珠单抗 300 mg ivgtt d0 ＋伊立替康 270 mg ivgtt d1 ＋亚叶酸钙 600 mg ivgtt d1 ＋氟尿嘧啶 600 mg iv d1 ＋氟尿嘧啶 3500 mg civ 46h；q3w。化疗后出现骨髓抑制，血小板降低，血小板计数（PLT）$52\times10^9\cdot L^{-1}\downarrow$，给予重组人血小板生成素注射液治疗后好转。2022 年 5 月 3 日开始行肝脏病灶放疗，靶区剂量：GTV1/2 8Gy/F×5 次、GTV3 6Gy/F×6 次。2022 年 5 月 19 日行二线第 2 周期治疗，化疗方案同第 1 周期。化疗后再次出现骨髓抑制，PLT 降低，为 $47\times10^9\cdot L^{-1}\downarrow$，继续给予重组人血小板生成素注射液治疗后好转。2022 年 6 月 24 日患者血液分析示白细胞数（WBC）$4.14\times10^9\cdot L^{-1}$，中性粒细胞数（NEU）$2.61\times10^9\cdot L^{-1}$，血红蛋白 132 $g\cdot L^{-1}$，PLT $72\times10^9\cdot L^{-1}\downarrow$。2022 年 7 月 11 日患者为求进一步治疗来院，自发病以来患者精神睡眠食欲尚好，大小便正常，体重无明显改变。患者既往无糖尿病史、脑血管病史、出血史，有高血压家族史。

体格检查：体温（T）36.5 ℃，脉搏（P）90 次 $\cdot min^{-1}$，呼吸频率（R）18 次 $\cdot min^{-1}$，血压（BP）129/78 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。

入院诊断：直肠乙状结肠交界处腺癌伴肝、肺转移 9 周期化疗后靶向治疗后放疗后，化疗后骨髓抑制，血小板减少。

1.2　治疗经过

患者此次入院为二线 FOLFIRI 联合贝伐珠单抗治疗后骨髓抑制、血小板减少不耐受，行肝脏转移病灶放疗后续治疗。入院后复查腹部增强 CT 示：原发病灶较前增大，腹膜后及盆腔淋巴结增大，疗效评价为进展。尿常规示：尿蛋白（＋＋）；血生化示：谷丙转氨酶（ALT）52 IU $\cdot L^{-1}$，谷草转氨酶（AST）43 IU $\cdot L^{-1}$，WBC $4.54\times10^9\cdot L^{-1}$，NEU $2.61\times10^9\cdot L^{-1}$，血红蛋白 134 $g\cdot L^{-1}$，PLT $74\times10^9\cdot L^{-1}$，给予重组人血小板生成素注射液 15 000 U ih qd 治疗，共治疗 3 日。2022 年 7 月 13 日多学科会诊建议三线持续抗血管生成治疗。考虑到患者既往多程化疗联合贝伐珠单抗靶向治疗后进展，尿蛋白呈阳性，且具有高血压家族史，临床药师建议患者优先使用瑞戈非尼，起始用法用量为 80 mg po qd，待患者耐受后逐渐增量至 160 mg po qd，每一疗程前 21 日服药，28 日为一疗程，期间严密监测患者血压、尿蛋白、肝功能以及骨髓抑制缓解情况（见表 1）；临床医师采纳。2022 年 7 月 25 日，患者血生化结果示肝功能指标异常升高，ALT 173 IU $\cdot L^{-1}\uparrow$，AST 81 IU $\cdot L^{-1}\uparrow$，临床医师调整瑞戈非尼每日剂量为 80 mg，并给予多烯磷脂酰胆碱胶囊 456 mg po tid 保肝治疗。经临床药师问诊，患者平素服药不规律，且因 2022 年 7 月 22 日漏服瑞戈非尼，于次日自行加服一倍瑞戈非尼剂量（240 mg）。临床药师对患者进行进一步用药教育及随访。2022 年 8 月 1 日，患者复查血生化结果示肝功能较前好转，ALT 120 IU $\cdot L^{-1}\uparrow$，AST 62 IU $\cdot L^{-1}\uparrow$。2022 年 8 月 15 日，患者肝功能指标恢复正常。

2　分析讨论

2.1　口服抗 VEGF 药物个体化选择策略

本案例中，患者诊断为晚期直肠乙状结肠交界处腺癌伴肝、肺转移，一线贝伐珠单抗联合 mFOLFOX6 化疗后进展，二线更换为贝伐珠单抗联合 FOLFIRI 治疗。患者因多程联合化疗导致骨

表 1 药学监护记录

日期	血压 /mmHg	尿蛋白	PLT/（10^9・L^{-1}）	ALT/（IU・L^{-1}）	AST/（IU・L^{-1}）	瑞戈非尼 /mg	干预措施
2022-7-11	129/78	阳性（＋＋）	74	52	43	/	重组人血小板生成素
2022-7-13	128/76	/	72	48	46	80	注射液 15 000 U ih qd
2022-7-20	128/76	/	72	48	46	120	/
2022-7-23	/	/	/	/	/	240（前日漏服，次日自行加倍）	/
2022-7-25	136/84	阳性（＋＋）	73	173↑	81↑	120	多烯磷脂酰胆碱胶囊
2022-7-26	132/84	/	/	/	/	80	456 mg po tid（2022-7-
2022-8-1	/	阳性（＋＋）	72	120↑	62↑	80	25—2022-8-15）
2022-8-15	/	/	74	37	21	80	/
2022-8-22	130/77	阳性（＋＋）	70	46	24	120	/
2022-8-30	132/82	/	72	53	30	160	/

髓功能降低，二线治疗期间反复出现血小板减少不耐受，且疾病进展，多学科会诊评估可能存在化疗耐药及不耐受，计划三线口服瑞戈非尼或呋喹替尼持续抗血管生成治疗。目前，CSCO 结直肠癌诊疗指南中对于转移性结直肠癌患者的三线抗血管生成治疗，瑞戈非尼及呋喹替尼的推荐级别均为Ⅰ级[9]。然而，由于现行指南中缺乏对于以上药物的有效性、安全性、经济性等定性定量信息，临床医师在诊疗过程中往往无法根据指南直接制订针对不同转移性结直肠癌患者的抗血管生成药物个体化选择策略。临床药师基于循证药学，结合临床试验数据，分析治疗方案的有效性、安全性，并结合药品上市情况和医保支付情况评价经济性，协助临床医师制订个体化治疗方案。

2.1.1 有效性 多项基于随机对照试验的荟萃分析显示，瑞戈非尼或呋喹替尼单药治疗难治性转移性结直肠癌后的总生存期（overall survival，OS）及无进展生存期（progression-free survival，PFS）均差异无统计学意义（$P > 0.05$）[10-11]。此外，一项真实世界研究表明，中国转移性结直肠癌患者使用瑞戈非尼或呋喹替尼的治疗失败时间（time-to-treatment failure，TTF）及 OS 差异无统计学意义（$P > 0.05$）[12]。然而，通过对临床试验及真实世界研究结果进行进一步亚组分析发现，对于不同治疗背景的患者，瑞戈非尼及呋喹替尼的有效性有所差异。基于 CORRECT、CONCUR 及 FRESCO 研究，瑞戈非尼及呋喹替尼在中国获批上市，用于三 / 末线转移性结直肠癌治疗[13-15]。对 CORRECT 研究结果进一步分层分析发现，与安慰剂相比，瑞戈非尼能够显著改善既往接受过抗 VEGF（包括贝伐珠单抗）治疗患者的 OS（$P = 0.0052$）[15]。而 FRESCO 研究亚组分析结果表明，对于既往接受过抗 VEGF 治疗的患者，使用呋喹替尼与使用安慰剂的 OS 差异无统计学意义（$P = 0.066$）[16]。与呋喹替尼主要抑制 VEGFR1-3 相比，瑞戈非尼可通过同时阻断 VEGFR1-3、成纤维细胞生长因子受体、血小板衍生生长因子受体等多个靶点，全面抑制 VEGF 系统异常激活，这可能有利于克服因贝伐珠单抗引起的抗血管生成治疗耐药[17]。该患者既往 mFOLFOX6/FOLFIRI 联合贝伐珠单抗治疗 9 周期后进展，提示可能存在贝伐珠单抗耐药，三线瑞戈非尼可能有利于持续抗血管生成治疗生存获益。此外，该患者年仅 50 岁，同时伴有肝、肺转移，经外科评估不宜手术，且目前仅接受过一 / 二线共 9 周期化疗。经问诊，患者生存及治疗需求较为强烈，因此其三线治疗方案的制订还需考虑其对后续治疗的影响。一项纳入 366 名转移性结直肠癌患者的队列研究发现，转移性结直肠癌患者口服抗血管生成药物，其序贯治疗顺序可显著影响患者后续治疗生存获益，其中瑞戈非尼序贯呋喹替尼的中位 OS 为 28.1 个月，而呋喹替尼序贯瑞戈非尼的中位 OS 为 18.4 个月（$P = 0.024$）[12]。对于经外科评估不宜手术且合并肝转移的结直肠癌患者，联合肝动脉化疗栓塞术（transcatheter arterial chemoembolization，TACE）及肝动脉化疗灌注术（hepatic arterial infusion chemotherapy，HAIC）等局部治疗可提升患者治疗效果。国内两项单中心临床研究表明，瑞戈非尼联合 TACE 或 HAIC 可显著延长转移性结直肠癌伴肝转移患者的中位 OS 及 PFS（$P < 0.05$）[18-19]。而目前国内外尚无呋喹替尼联合肝脏局部治疗的临床研究结果发表。因此，三线使用瑞戈非尼可能为该患者后期序贯及联合局部治疗增加了潜在的选择性及生存获益。

2.1.2 安全性 在对有效性进行充分评估的基础上，临床药师对抗血管生成药物的安全性也进行了证据检索。由于作用机制相似，口服抗血管生成药物在抑制肿瘤新生血管形成及肿瘤再转移的同时，常导致高血压、蛋白尿、手足综合征（hand-foot syndrome，HFS）、肝损伤（AST、ATL、碱性磷酸酶或血胆红素升高）、疲劳、黏膜炎、皮疹等不良反应，但其不良反应的发生率及

严重程度各不相同。一项同时将瑞戈非尼及呋喹替尼用于难治性转移性结直肠癌的临床试验数据纳入统计分析的循证研究结果表明，相较于呋喹替尼，瑞戈非尼导致的手足皮肤反应（hand-foot skin reaction，HFSR）及 ALT 升高的风险更高，而呋喹替尼导致的高血压及蛋白尿的发生风险更高，两药导致血小板降低的风险差异无统计学意义[11]。同样，国内一项最新的观察性队列研究发现，与瑞戈非尼组（n = 260）相比，呋喹替尼组（n = 106）患者发生≥ 3 级高血压事件的概率更高（P = 0.03）[12]。相较于呋喹替尼导致的高血压，瑞戈非尼导致的 HFSR、肝损伤等相关不良反应可通过剂量滴定进行控制[20]。该患者基线肝功能正常，既往化疗未出现过皮疹、HFS 等皮肤不良反应，但其基线血压位于正常值高限且具有高血压家族史，尿蛋白阳性，持续抗 VEGF 治疗有血压显著升高及尿蛋白进行性升高的风险。因此，相较于瑞戈非尼，该患者使用呋喹替尼导致安全性事件的风险可能更高。

2.1.3 经济性 在肿瘤治疗的过程中，药物的经济性常常决定患者是否能够完成全周期用药。一项对比呋喹替尼与瑞戈非尼三线治疗转移性结直肠癌的药物经济学研究显示，与安慰剂相比，呋喹替尼的增量成本为 151 058 元，增量效用为 0.74 质量调整生命年（quality-adjusted life year，QALY），而瑞戈非尼相比安慰剂的增量成本为 226 657 元，增量效用为 0.79 QALY。相对于呋喹替尼，瑞戈非尼增加 0.05 QALY 需多花费 75 599 元[21]。然而，由于目前对比晚期结直肠癌患者使用瑞戈非尼及呋喹替尼的药物经济学研究较少，两者的经济性仍需在未来的临床实践中持续探索。根据最新国家医保谈判价格及报销政策，与使用常规剂量的呋喹替尼（5 mg）相比，使用常规剂量瑞戈非尼（160 mg）每月需多花费 1528 元。经问询患者，其经济条件较好，生存与治疗需求强烈，更倾向于选择瑞戈非尼用于三线抗血管生成治疗。

因此，根据以上有效性、安全性及经济性循证分析结果，综合患者治疗需求及经济状况，临床药师建议该患者三线选择瑞戈非尼进行持续抗血管生成治疗，并从最小剂量开始（80 mg qd），逐渐增加至最大剂量（160 mg qd），每周期前 21 日服药，28 日为一疗程，以控制瑞戈非尼相关不良反应。临床医师采纳该建议。

2.2 *药学监护与用药教育*

鉴于瑞戈非尼潜在的皮肤毒性、肝毒性、血液毒性、高血压及蛋白尿发生风险，临床药师评估并对该患者进行不良反应监护，通过定期追踪患者肝功能、血压、PLT 等检验检查结果，以早期识别并降低瑞戈非尼导致的重度药物性肝损伤、高血压、蛋白尿及 PLT 持续性减少等风险。此外，临床药师通过预防措施宣教以预防 HFSR，包括穿戴宽松的鞋袜避免手足摩擦及受压、避免接触高温物品、避免使用高温水洗手泡脚等。然而，临床药师初期未对患者进行详细的用药注意事项交代，导致患者未意识到定时服药的重要性，导致患者体内的瑞戈非尼浓度波动较大，诱发潜在的肝毒性。此外，患者因漏服药品，于次日自行补服超过安全剂量（160 mg）的药物剂量，致使其肝功能进一步受损[17]。临床药师对患者进行进一步详细的用药交代：瑞戈非尼主要由细胞色素 CYP3A4 和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A9 代谢，且为乳腺癌耐药蛋白（BCRP）的底物，嘱患者用药过程中应尽量避免与显著影响酶活性及同为 BCRP 底物的食物及药物合用，如葡萄柚汁、瑞舒伐他汀、伏立康唑等[17]；多烯磷脂酰胆碱胶囊需随餐服用，整粒吞服。随后，临床药师对患者进行持续随访，患者自此规律服药，最终肝功能逐渐恢复正常。

3 小结

本案患者因一线、二线化疗后疾病进展，骨髓抑制，血小板减少不耐受，三线需改服瑞戈非尼或呋喹替尼持续抗血管生成治疗。临床药师基于患者病理生理状态，充分应用循证方法，结合药物最新的有效性、安全性、经济性研究结果，为临床医师制订瑞戈非尼或呋喹替尼的个体化选择策略提供了数据支持。此外，临床药师通过对患者进行不良反应宣教及随访，并参与到患者抗肿瘤药物治疗的全过程管理中，有效降低了患者的用药风险。然而，本案例中临床药师致力于助力药物的个体化选择及不良反应风险控制，忽视了对患者进行最基本的服药注意事项宣教，造成患者未规律用药进而导致药物性肝损伤。提示临床药师在今后的工作中，除了协助临床医师制订个体化临床治疗方案，以及关注药物不良反应风险控制，还应充分重视患者用药细节，结合患者基本情况进行全面的用药教育，不断提升自身药学服务能力。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global Cancer Statistics 2020：GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Cao W，Chen HD，Yu YW，et al. Changing profiles

of cancer burden worldwide and in China：a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J（Engl），2021，134（7）：783-791.

[3] Siegel RL，Miller KD，Goding Sauer A，et al. Colorectal cancer statistics，2020 [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（3）：145-164.

[4] Sineshaw HM，Robbins AS，Jemal A. Disparities in survival improvement for metastatic colorectal cancer by race/ethnicity and age in the United States [J]. Cancer Causes Control，2014，25（4）：419-423.

[5] 张石革 . 抗血管内皮生长因子的药物研究进展与临床评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2014，14（11）：964-967.

[6] Neufeld G，Cohen T，Gengrinovitch S，et al. Vascular endothelial growth factor（VEGF）and its receptors [J]. Faseb J，1999，13（1）：9-22.

[7] Ferrara N，Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. Nat Rev Drug Discov，2016，15（6）：385-403.

[8] Cohen DJ，Hochster HS. Rationale for combining biotherapy in the treatment of advanced colon cancer [J]. Gastrointest Cancer Res，2008，2（3）：145-151.

[9] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）结直肠癌诊疗指南 2022 [M]. 北京：人民卫生出版社，2022.

[10] Chen JX，Wang JH，Lin H，et al. A comparison of regorafenib and fruquintinib for metastatic colorectal cancer：a systematic review and network meta-analysis [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2019，145（9）：2313-2323.

[11] Zhang Q，Wang QQ，Wang XC，et al. Regorafenib，TAS-102，or fruquintinib for metastatic colorectal cancer：any difference in randomized trials? [J]. Int J Colorectal Dis，2020，35（2）：295-306.

[12] Zhang Q，Chen MF，Wang ZH，et al. Efficacy and safety comparison of regorafenib and fruquintinib in metastatic colorectal cancer-an observational cohort study in the real world [J]. Clin Colorectal Cancer，2022，21（3）：e152-e161.

[13] Li J，Qin SK，Xu RH，et al. Effect of fruquintinib vs placebo on overall survival in patients with previously treated metastatic colorectal cancer：the FRESCO randomized clinical trial [J]. JAMA，2018，319（24）：2486-2496.

[14] Li J，Qin SK，Xu RH，et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer（CONCUR）：a randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2015，16（6）：619-629.

[15] Grothey A，Van Cutsem E，Sobrero A，et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer（CORRECT）：an international，multicentre，randomised，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet，2013，381（9863）：303-312.

[16] Xu RH，Qin SK，Guo WJ，et al. Subgroup analysis by prior anti-VEGF or anti-EGFR target therapy in FRESCO，a randomized，double-blind，phase Ⅲ trial [J]. Future Oncol，2021，17（11）：1339-1350.

[17] U. S. Food and Drug Administration. STIVARGA®（regorafenib）tablets，for oral use Initial U. S. Approval：2012 [EB/OL]. [2023-02-16]. https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2012/203085lbl. pdf.

[18] Cao G，Wang XD，Chen H，et al. Hepatic arterial infusion chemotherapy plus regorafenib in advanced colorectal cancer：a real-world retrospective study [J]. BMC Gastroenterol，2022，22（1）：328.

[19] Cao F，Zheng JP，Luo J，et al. Treatment efficacy and safety of regorafenib plus drug-eluting beads-transarterial chemoembolization versus regorafenib monotherapy in colorectal cancer liver metastasis patients who fail standard treatment regimens [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2021，147（10）：2993-3002.

[20] Xu XJ，Yu YY，Liu ML，et al. Efficacy and safety of regorafenib and fruquintinib as third-line treatment for colorectal cancer：a narrative review [J]. Transl Cancer Res，2022，11（1）：276-287.

[21] Guan X，Li HC，Xiong XM，et al. Cost-effectiveness analysis of fruquintinib versus regorafenib as the third-line therapy for metastatic colorectal cancer in China [J]. J Med Econ，2021，24（1）：339-344.

（收稿日期：2023-02-16；修回日期：2023-04-25）

药事管理

药物早期临床试验信息化建设应用与实践

陈元璐，谢朋飞，崔宏娣，龙辉，赵永刚，张永东*（1. 郴州市第一人民医院Ⅰ期临床研究室，湖南　郴州　423000；2. 南华大学医院管理研究所，湖南　郴州　423000）

摘要：目的　在药物临床试验中引入全过程电子信息化管理新模式，提高临床试验运行效率，为其他药物临床试验机构提供参考。**方法**　依照临床试验运行过程，介绍并分析临床试验信息化平台功能特点及优势，并对比传统手工模式管理成效。**结果**　电子信息化系统在不同的操作环节都比传统手工记录方式节省时间，在多个方面显示出了明显的优势。**结论**　在临床试验中采用电子信息化管理模式更有利于试验操作的规范性、及时性，并且提高药物临床试验的效率与质量。

关键词：临床试验；电子信息化；新模式
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2519-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.046

Informatization in early phase clinical trial: application and practice

CHEN Yuan-lu, XIE Peng-fei, CUI Hong-di, LONG-Hui, ZHAO Yong-gang, ZHANG Yong-dong*
(1. *Phase* Ⅰ *Clinical Trial Centre, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou Hunan* 423000; 2. *Research Institute of Hospital Management*, *University of South China*, *Chenzhou Hunan* 423000)

Abstract: Objective To introduce a new mode of whole-process electronic information management in drug clinical trials and improve the efficiency of clinical trials. **Methods** According to the clinical trial operation process, the functional characteristics and advantages of the clinical trial information platform were analyzed, and the management effect between the traditional manual mode and the new mode was compared. **Results** The electronic information system saved time as compared with the traditional manual recording method in different operation links and had obvious advantages in many aspects. **Conclusion** Electronic information management mode in clinical trials helps improve the standardization and timeliness of trial operation, and improve the efficiency and quality of clinical trials.
Key words: clinical trial; electronic informatization; new mode

药物早期临床试验是指研究药物在完成系统的临床前评价研究之后，为探究其在人体的药效学、不良反应及药动学特征等而开展的研究，是药物研发中的重要环节[1]。早期临床研究包括探索性临床研究及Ⅰ期临床研究。Ⅰ期临床研究还可分成以剂量爬坡为代表的Ⅰa期首次人体（first-in-human）临床研究、以食物影响为代表的Ⅰb期临床研究、以健康受试者为对象多次给药的Ⅰc期临床研究和以目标适应证患者为对象的Ⅰd期临床研究[2]。早期临床研究可为Ⅱ、Ⅲ期临床试验提供参考数据[3]，这一环节不仅关系到后续研发工作，对药物上市后的安全用药指导也具有重要的意义。

随着全国临床试验项目不断增长，国家相关

基金项目：国家卫健委重大新药创制科技重大专项课题（编号：2020ZX09201010）；南华大学医院管理研究所项目（编号：2020YYGL06）；郴州市科技发展计划项目（编号：yfzx201912）；郴州市第一人民医院院级科研项目（编号：N2019-025）。
作者简介：陈元璐，女，硕士，副主任药师，主要从事临床试验及临床药学研究，email：chenjiaodong@126.com　*通信作者：张永东，男，副主任药师，主要从事临床试验及临床药学研究，email：czsdyrmyyyqlc@163.com

部门及研究各方对临床试验的质量提出更高要求[4]，传统记录模式已无法满足研究者的需求。20 世纪 70 年代国外研究机构已将信息化系统引入药物临床试验[5]，近些年国内多家机构相继开发应用临床试验信息化管理系统[6-9]，2020 版《药物临床试验质量管理规范》（GCP）也对电子信息化系统应用提出了要求。笔者所在机构已经在临床试验中采用药物临床试验管理系统（CTMS），主要用于机构立项、伦理审查等。现结合早期药物临床研究采血点密集、受试者进入研究集中等特点，引入新的电子信息化系统，提高早期临床研究的质量与效率。目前，本机构早期临床研究使用的电子信息化系统主要有Ⅰ期 / 生物等效性（BE）临床试验全过程数据采集管理系统、临床研究电子文档管理系统、电子数据采集系统（EDC）、温湿度自动监测系统等。

本文主要介绍Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统、临床研究电子文档管理系统的应用情况，分享使用经验，为其他药物临床试验机构提供参考。

1 方法

依照电子信息化系统的主要功能，分析其特点及优势。收集笔者所在研究机构采用电子信息化系统及传统记录模式下的相关数据，比较电子信息化系统应用的管理成效。

2 结果

2.1 Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统

2.1.1 系统功能特点 Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统由管理端及采集端配合使用，涵盖试验全过程的数据记录与管理。

管理端依照临床试验开展的基本流程设置“导航菜单”，常用的功能见表 1。

采集端是“Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统”的数据“抓手”，在采集端产生的数据可以同步上传管理端。在实际操作中，通过扫码枪扫描受试者、采集管、冻存管条形码等采集操作时间、数量等信息，常用功能见表 2。

2.1.2 系统优势 Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统优势列举见表 3。

2.1.3 电子信息化系统应用成效

① 以某双盲试验受试者（20 例）签到、签退（共 4 次）及采血点（20 个）计时为例，比较纸质记录与电子信息化系统记录耗时差别，见表 4。

② 比较筛选期 3 种常见记录差错，见表 5。

2.2 临床研究电子文档管理系统

2.2.1 功能特点 管理员在项目启动前维护系统：① 导入已填写规则名的表格模板；② 设置角色名称、角色描述、角色文件权限及菜单权限；③ 编辑、描述规则名。根据对应工作职责分配账号，使用表格编辑、提交审核、审核表格等功能，通过审核的表格可直接打印，表格显示水印“controlled”字样，同时记录申请人、申请时间、审核人、审核时间、打印人、打印次数、打印时间等。菜单栏下各项功能见表 6。

2.2.2 系统优势 临床研究电子文档管理系统优势列举见表 7。

2.2.3 电子文档管理系统应用成效 以填写某药动学试验整套表格（60 张）基本信息为例，比较两种模式填写时间。

3 电子信息化系统在早期药物临床研究中的应用

早在 1999 年，美国食品药品监督管理局（FDA）开发并推出了电子数据采集系统（EDC）。该系统采用在线数据输入方式替代了传统纸质数据记录和手动输入方式，提高临床试验数据的准确性和可靠性，减少数据输入错误和重复工作，提高了数据处理和统计的效率和速度。在国际多中心临床试验中，主要运用的软件有 MEDIDATA 公司开发的 Medidata、Studybuilder 公司开发的 Studybuilder、Oracle 公司开发的 OracleClinical 和 PhaseForward 公司开发的 ClinTrial 等。上述系统涵盖网络招募受试者（e-patient）、电子化的试验全过程管理（e-trial）、监查（e-monitoring）、电子化的安全数据管理（e-safety）、在线教育帮助研究人员理解技术要求、设计细则和标准操作规程（e-educationore-training）以及电子注册提交工具（e-NDA）等应用方式[10]。

随着科技的应用和发展，我国现代药物研发和临床试验领域涌现了大量的信息技术应用系统，例如 CTMS、临床试验数据管理系统（CDMS）、医学影像系统（PACS）、生物样本管理系统等。

CTMS 应用广泛，用户按照角色配置系统，根据角色分配相应的权限及功能。用户与项目关联，有效保障项目的保密性及规范性。该系统涵盖立项审查、伦理审查、项目信息、研究日历、受试者管理、严重不良事件（SAE）管理、来访管理等 10 个功能模块。使用 CTMS 后，机构办立项审核、伦理上会审查周期明显缩短，工作效率显著提升[11]。

在早期药物临床研究中，研究者使用电子信息化系统记录试验数据方便、快捷、规范、完整[12-13]。对于采血点密集、统一处理样本、统一

表 1　Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统管理端主要功能

Tab 1　Main functions of the management terminals of the whole-process data acquisition system for phase Ⅰ /BE clinical trials

导航菜单	功能细分
人员管理	新增、编辑、删除、查看用户信息，为新用户分配账号
项目管理	
1. 申办方信息	新增申办方公司名称、电话、联系人信息
2. 合同研究组织（CRO）信息	新增 CRO 公司名称、电话、联系人信息
3. 项目信息	新增、编辑项目名称、项目编号、项目简称、批件号 / 备案号、方案编号、样品标签标题、生物样本检测公司、数据管理与统计分析公司、主要研究者信息及方案、知情同意书、原始病历、病例报告表的版本号、版本日期
4. 试验信息	新增、编辑试验名称、试验编号、试验类型、盲法类型、试验周期数、操作间隔时间、给药标签名前缀、计划入组例数、洗脱期、筛选号前缀等
5. 试验用药	新增、编辑、查看、删除试验用药的药品类型、药品名称、规格、给药途径、剂型、给药用法、最小（使用）单位、储存条件、批号、药品来源、生产日期、有效期、给药条件
6. 用户授权	添加研究人员，为研究者及 CRC 授予具体操作权限，此操作权限同时对应管理端、采集端的使用功能
试验配置	
1. 试验样品	配置信息：样品类型、样品标签名前缀、检测指标（PK/PD）、分装检测管、备份管数量、采集条件、移交条件、离心条件、分装条件、储存条件、离心时长，打印采集管、冻存管、冻存盒标签，标签与受试者条码进行匹配
2. 试验分组	选择试验分组类型：交叉分组、试验组、对照组等
3. 试验随机表	新增或编辑试验中将使用到的随机号
4. 筛选期配置	筛选期配置包括：问诊、体格检查、问卷调查、其他检查、入选标准、排除标准等
5. 入住期配置	入住期配置包括：问诊、体格检查、问卷调查、其他检查、入选标准、排除标准等
6. 试验期配置	试验期配置包括：问诊、体格检查、给药时间点、分组给药、采样时间点、采样时间段、生命体征监测时间点、心电图监测时间点、体位性低血压监测的时间点、其他检查时间点
7. 出组前配置	出组前配置包括：问诊、体格检查、其他检查
受试者管理	
1. 筛选期管理	筛选期管理包括：受试者登记、知情宣教、知情签署、人口学特征、体重指数（BMI）信息、问诊记录、体格检查、问卷调查、生命体征监测记录、特殊筛查、实验室检验、医院信息系统（HIS）检查、心电图监测、体位性低血压监测、其他检查记录、筛选期随访、筛查判断
2. 首次入住管理	首次入住管理包括：生命体征监测记录、特殊筛查记录、实验室检验、体格检查、问诊记录、问卷调查、心电图监测记录、BMI 信息、其他检查记录、入住筛查判断、出入院记录、（再次）筛查判断、入组操作
3. 入住期管理	入住期管理包括：生命体征监测记录、特殊筛查记录、实验室检验、体格检查、问诊记录、问卷调查、心电图监测记录、BMI 信息、其他检查记录、入住筛查判断、出入院记录
4. 试验期管理	试验期管理包括：给药准备（配伍）、给药记录、血样采集记录、尿样采集记录、粪样采集记录、生命体征监测记录、用餐记录、生活护理记录、住院观察记录、实验室检查、HIS 检查、体格检查、问诊记录、问卷调查、BMI 信息、心电图监测记录、血糖监测记录、心电监护记录、体位性低血压监测、其他检查记录、洗脱期随访
5. 出组前管理	出组前管理包括：生命体征监测记录、体格检查、心电图监测记录、实验室检验、HIS 检查、BMI 信息、问诊记录、问卷调查、其他检查记录、受试者随访
6. 其他管理	其他管理包括：实验室检验采集记录、受试者身份核验记录、受试者签到签退记录、受试者其他信息采集记录、受试者试验图片
7. 生活护理记录	新增 / 批量新增、编辑、查看、删除生活护理记录：随机号、入组顺序号、给药顺序号、受试者姓名、性别、护理时间、护理记录内容、（记录）研究者
8. 临床观察记录	新增 / 批量新增、编辑、查看、删除临床观察记录：随机号、入组顺序号、给药顺序号、受试者姓名、性别、观察记录、记录人、记录时间
9. 不良事件	编辑、删除、查看不良事件详情：受试者筛选号、随机号、姓名、性别、不良事件名称、开始及结束时间、不良事件采取的措施、严重程度、不良事件的特点、与研究药物关系、转归、记录人等信息
10. 合并用药	编辑、删除、查看合并用药详情：受试者筛选号、随机号、姓名、性别、药品名称、单次剂量、给药频率、给药途径、适应证、开始给药时间、结束给药时间、关联不良事件
11. 研究总结	新增、查看研究总结详情：筛选号、随机号、入组顺序号、给药顺序号、受试者姓名、性别、是否完成试验、完成时间 / 退出时间、未完成原因 / 未入组原因、总结人
12. 受试者数据打印	审核数据、打印标签（腕带、卡牌、尿检标签、检验 / 检查标签）、打印表格（登记信息表、筛选入选表、入组表、鉴认代码表、完成表）、打印研究病历及病历报告表

续表 1

导航菜单	功能细分
样品管理	
1. 样品冰箱	新增、编辑冰箱名称、型号、类型、存放温度、状态等信息，使用该功能打印冰箱标签，此标签上的条形码可以与冻存管关联，产生出入库记录。查看各冰箱所存放样品的项目方案编号、样品数量及相关信息：标签编码、名称、检测指标、时间点、随机号等
2. 样品信息	依据试验名称、周期号、使用类型（采集 / 检测 / 备份）、样品状况（正常、溶血、量少等）、采集点、随机号、标签编号、检测 / 备份管序号，预生成、新增、打印标签以及标签信息导出
3. 冻存盒信息	查看、新增、参照新增、编辑、删除冻存盒信息，冻存盒信息包括：编码、适用类型（检测 / 备份）、周期号、采样点等
4. 通用冻存盒信息	不与样本信息关联，只有编码、使用类型的简单信息
5. 样品移交	根据周期号、试验样品（PK/PD）、采样点、时间段查询、编辑、打印样品移交的信息详情：周期号、检测指标、样品交接信息（采集管编号）、样品数量、移交时间、移交人、接收人、移交条件
6. 样品离心	根据周期号、试验样品（PK/PD）、采样点、时间段、离心设备查询、编辑、打印样品离心信息详情：周期号、检测指标、样品离心信息（采集管编号）、样品数量、离心开始时间、离心结束时间、离心机编号及名称、离心人、核对人、离心条件、备注
7. 样品分装	根据周期号、试验样品（PK/PD）、采样点、时间段查询、编辑、打印样品分装信息详情：周期号、检测指标、样品离心信息（冻存管编号）、样品数量、分装开始时间、分装结束时间、操作人、核对人、分装条件、备注
8. 样品出入库	根据周期号、试验样品（PK/PD）、操作类型、操作冰箱、时间段查询、打印样品出入库详情：周期号、检测指标、采样点、样品信息（冻存管编号）、样品数量、冻存盒信息、冻存盒数、操作类型（出库、入库）、操作冰箱、操作开始时间、操作结束时间、操作人、核对人、备注
设备管理	
1. 基本信息	基本信息包括：新增、编辑、删除、详情、打印标签及使用记录
2. 开关机记录	开关机记录显示信息：设备类型、仪器设备编号、仪器设备名称、开机时间、开机人、关机时间、关机人
痕迹管理	
1. 试验痕迹	总览系统中修改、删除数据的痕迹：模块名、操作时间、操作者、操作者 IP 地址；查看痕迹的详情信息
2. 登录日志	登录日志显示登录情况：登录账号、登录方式（密码）、登录时间、登录 IP、描述（登录成功、密码错误、账号不存在）
系统管理	
1. 机构人员账号	机构人员账号模块含有更改业务角色、设置 Tags、解锁、重置密码、启用 / 停用功能
2. 申办方 /CRO 账号	申办方 /CRO 账号包括新增、解锁、重置密码、启用 / 停用功能
3. 项目 Html 模板	上传和下载 Html 模板
4. 项目相关配置	操作限制时间窗、样品管理相关配置、通用标签样式、入组条件、知情签署过程、是否需要核对人配置、BMI 配置、生命体征配置、特殊筛查项配置、用餐相关配置、出入院相关配置、血糖记录配置、生活护理记录配置、给药记录配置、心电图配置、心电监护配置、体位性低血压配置、实验室采样配置、样品采样配置、受试者登记配置、不良事件相关配置、受试者管理相关配置、实验室检验临床判断范围值配置
5. 授权分工项信息	授权分工项信息包括新增、编辑、删除授权分工信息：授权名、对应系统模块

表 2 Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统采集端主要功能

Tab 2 Main functions of the acquisition terminals of the whole-process data acquisition system for phase Ⅰ /BE clinical trials

试验阶段	数据记录
筛选期	登记、尿筛、酒精呼气、身高体重、生命体征、Lab 采样记录、心电图监测、体位性低血压、生活护理记录
入住期	入院、出院、尿筛、酒精呼气、身高体重、生命体征、心电监测、Lab 采样记录、生活护理记录
试验期	给药记录、血样记录、尿样记录、粪样记录、生命体征、Lab 采样记录、身高体重、签到、签退、用餐记录、生活护理记录、心电图监测、血糖监测、体位性低血压；样品处理包括：样品交接、样品预处理、样品离心、样品分装、管盒配对、样品入库、样品出库、发运出库
出组前	Lab 采样记录、身高体重、生命体征、心电图监测、签到、签退
其他	研究者指纹登记、研究者指纹验证、受试者指纹登记、受试者人脸登记、受试者身份核验、硬件测试、同步时间、设备开关机

管理受试者等情况具有明显优势，采血时间、出入库样本信息等细节也能详细记录。所记录数据实时上传，监查员可在线同步监查。系统提供多元化的查看方式，以满足研究者、监查员从多种角度掌握试验情况。受试者条码与样本条码像链条一样相互关联，避免差错。系统与 HIS、LIS 对接，检验结果直接导入，高效、准确。所有数据修订均留痕且可溯源。信息化数据自动备份，

表 3　Ⅰ期 /BE 临床试验全过程数据采集管理系统优势

Tab 3　Advantages of the whole-process data acquisition management system for phase Ⅰ /BE clinical trials

电子信息化系统	传统手工记录
根据权限授予研究者相应的使用模块，未授权功能不可操作	无有效措施
依次自动生成筛选号，多人同时工作，无筛选号重复分配情况	安排专人（协助）分配筛选号
自动生成受试者身份信息条形码标签，生成匹配的给药、采集管、冻存管条形码标签	无法自动生成，需手动打印
身高体重测量仪、血压及心率测量仪连接后，扫码即可记录时间、测量值，操作简单、快捷且可避免记录错误	手工记录
受试者身份条码、给药标签条码、采集管标签条码、冻存管盒标签条码相互匹配，匹配不成功时，予以语音提示，避免采集或分装血样时出现差错	人工比对
与实验室信息系统（LIS）系统对接，直接导入实验室检查结果；试验数据以数据包形式加密传输给数据统计部门，方便快捷，避免录入差错	手工录入 EDC
操作记录实时保存，系统每日自动备份，保障试验数据安全	存放于文件盒、档案柜中
可查看某一人的研究病历，了解从登记开始的全部记录；可在各个操作模块中集中查看某一试验所有人的记录。查看时可选择排序规则，按试验号或时间先后排序等	查看方式单一，无法智能排序
试验开展前，根据试验方案配置给药、采集血样、测量生命体征等计划时间点及时间窗。采集血样或测量生命体征时，系统自动提醒时间窗，时间数据产生后，系统计算是否超窗并显示结果	需人工提醒、人工计算
所有修改 / 删除的试验痕迹统一管理，可根据痕迹特点分类查看	逐一查找修改痕迹

表 4　签到、签退及采血记时情况 ($n = 3$，s)

Tab 4　Signing in，signing out and timing of blood collection ($n = 3$，s)

管理模式	签到 / 签退平均耗时	总耗时	采血计时平均耗时	总耗时
传统手工记录	12	960（16.0 min）	20	8000（133.3 min）
电子信息化系统	2	160（2.67 min）	2	800（13.3 min）

表 5　同时采取两种记录模式主要相关差错情况 (次)

Tab 5　Main errors in two recording methods (次)

差错类别	知情同意书时间记录差错	身份证号码记录差错	差错数总计
传统手工记录模式	6	5	11
电子信息化系统记录模式	0	0	0

确保数据安全。

临床试验电子信息化系统的应用缩短了药物研发周期和时间成本，为临床研究提供了高质量、高效率的工作工具[14]，将研究者从烦琐的手工记录中解放出来，有利于临床试验进一步发展[15]。

表 6　临床研究电子文档管理系统主要功能

Tab 6　Main functions of electronic document system in clinical research

菜单栏	显示信息	操作内容
项目管理	项目编号、项目名、组织、创建时间、创建人、最后编辑、状态	添加 / 删除试验项目的人员、添加模板文件、管理模板规则、预览及预览打印、编辑、删除、提交审核、下载、打印、通过审核、拒绝、退回（表格）
台账管理	文件名、版本、最后编辑、更新时间、打印份数、详情、状态、操作	预览、编辑、删除、下载、打印
用户管理	用户名、姓名、电话、组织、角色、创建时间、用户状态、操作	编辑、修改密码、删除
角色管理	角色名称、角色描述、创建时间、操作	编辑、删除、文件权限（预览、编辑、删除、下载、打印、可申请、可审核、可批准）、菜单权限
模块文件	文档名称、版本、审批流程、修改人员、创建时间、修改时间	上传、删除、重命名文件夹及表格模板；新建文件类型
规则管理	序号、规则名、规则类型、规则描述、操作	编辑、删除
日志管理	用户名、IP 地址、操作、时间	无

表 7　临床研究电子文档管理系统优势

Tab 7　Advantages of electronic document management system in clinical research

电子文档管理系统	传统方式
试验项目仅对该项目所添加的用户可见	不受限制
设置替换规则后，系统自动替换表格中的试验名称、方案编号、申办方、CRO、主要研究者、药物生产日期、生产厂家等信息，节省填写时间，并且只需确保替换规则内容正确，替换后的表格内容均正确，提高工作效率，减少差错	每个表格逐一填写
将表格分为受控表格和非受控表格，受控表格需通过审批后打印	不受限制
表格打印后自带水印、打印人、打印次数、打印时间	无记录
通过日志管理，追溯用户使用情况	无法追溯

参考文献

[1] Mishra A，Sarangi SC，Reeta K. First-in-human dose：current status review for better future perspectives [J]. Eur J Clin Pharmacol，2020，76（9）：1237-1243.

[2] 王振磊，向丽莎，李晓玉，等 . 辩论式教学在基于模型引导的创新药物早期临床研究设计教学中的应用 [J]. 教育教学论坛，2020（14）：240-242.

[3] 郭彩会，宋浩静，李亚静，等 . 信息管理系统在Ⅰ期临床试验质量控制中的作用 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（1）：104-109.

[4] 黄冰琳，方令平，郭锦华，等 . 基于中心化管理的药物临床试验药房信息化平台设计与实现 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（21）：2781-2786.

[5] 曹蓓，耿燕，李娟 . 浅谈伊柯夫 BEIS 系统在我院Ⅰ期临床研究中的应用和体会 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2018，23（12）：1431-1437.

[6] 李书珍，金香兰，余学杰，等 . 中医临床研究中电子化数据采集过程的质量控制探讨 [J]. 中国中医急症，2014，24（8）：1416-1417，1420.

[7] 程晓华，陈爽，吕农华，等 . 基于提高临床试验管理效率的全流程信息化管理系统研发探讨 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2015，20（3）：335-337.

[8] 孙悦，薛津怀，刘美君，等 . 构建满足动态监管要求的医院临床试验质量管理规范信息化管理系统 [J]. 中国新药与临床杂志，2016，35（5）：339-345.

[9] 曾婵，项玉霞，刘畅，等 . 临床试验管理信息系统设计与实践 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（5）：555-558.

[10] 王瑾，汶柯，王睿，等 . 临床试验电子数据采集系统的国内外现状和发展 [J]. 解放军药学学报，2013，29（4）：382-386.

[11] 余敏，刘巧，蔡学琪，等 . 药物临床试验管理系统在临床实践中的应用效果 [J]. 临床医学研究与实践，2019，4（25）：185-186.

[12] 易玲，张华，钱丽芳，等 . 全流程信息化管理在药物Ⅰ期临床试验中的探索应用 [J]. 中国新药与临床杂志，2017，36（3）：134-140.

[13] 张帧，李汉民，肖辉 . 基于全过程管理的Ⅰ期临床试验管理系统设计与实现 [J]. 中国卫生信息管理杂志，2022，19（1）：100-104，120.

[14] 姚贺之，李睿，高蕊，等 . Ⅰ期药物临床试验电子化管理系统刍议 [J]. 中药新药与临床药理，2019，30（5）：630-633.

[15] 孙雪，宋浩静，郭彩会，等 . 信息化系统对药物临床试验质量的影响 [J]. 中南药学，2019，17（6）：937-940.

（收稿日期：2023-01-26；修回日期：2023-04-21）

基于风险的药物临床试验方案偏离管理模式探讨

邱博，杜润璇，杨浩天，宋浩静，孙雪，丁琮洋，白万军，董占军*（河北省人民医院，石家庄 050051）

摘要：目的 分析药物临床试验实施中发生方案偏离的原因，探讨预防和改进措施，为提高临床试验的质量提供参考。**方法** 参照新版《药物临床试验质量管理规范》、人用药品注册技术要求国际协调会议（ICH）GCP 等法规对我院 2019 年 3 月至 2021 年 9 月结题的 47 项药物临床试验项目中出现的方案偏离进行统计分析，根据统计分析的结果探讨产生方案偏离的原因，并从研究者、申办者、受试者、机构和伦理监管等不同维度提出有效应对及预防措施。**结果** 经统计，所有项目共计上报方案偏离 458 例，其中试验药物相关偏离 188 例，占比 41.05%；检查 / 检验相关偏离 150 例，占比 32.75%；访视相关偏离 80 例，占比 17.47%；生物样本相关偏离 35 例，占比 7.64%；入 / 排相关偏离 5 例，占比 1.09%。**结论** 本研究分析了我院药物临床试验常见的方案偏离，从不同维度提出了应对和预防措施来有效降低方案偏离的发生，为提高我院药物临床试验质量提供借鉴。

关键词：药物临床试验；方案偏离；质量控制；改进措施

中图分类号：R97，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2023)09-2524-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.047

基金项目：河北省医学科学研究课题（No. 20230340）。

作者简介：邱博，男，副主任药师，主要从事药物临床试验管理方面的研究，email：qiubo47@126.com *通信作者：董占军，男，硕士研究生导师，主任药师，主要从事医院药事管理方面的研究，email：hbsrmyygcp@126.com

Risk-based management model of protocol deviation from drug clinical trials

QIU Bo, DU Run-xuan, YANG Hao-tian, SONG Hao-jing, SUN Xue, DING Cong-yang, BAI Wan-jun, DONG Zhan-jun* (*Hebei General Hospital, Shijiazhuang* 050051)

Abstract: Objective To determine the causes of protocol deviation in the implementation of drug clinical trials, explore the prevention and improvement measures, and provide reference for improving the quality of clinical trials. **Methods** Statistical analysis was conducted on protocol deviation in 47 drug clinical trials in our hospital from March 2019 to September 2021 according to the new version of *the Quality Management Practice for Drug Clinical Trials*, and the International Conference on Coordination of Technical Requirements for Registration of Drugs for Human Use (ICH) GCP and other regulations. The causes of protocol deviation were discussed. Effective counter measures and preventive measures were proposed by researchers, sponsors, subjects, institutions and ethical supervisions. **Results** Totally 458 protocol deviations were reported, 188 of which were related to experimental drugs, accounting for 41.05%. Totally 150 (32.75%) deviations were related to examinations/tests. There were 80 cases of visit-related deviations, accounting for 17.47%. The correlation deviation of biological samples included 35 cases (7.64%), and 5 cases of import/discharge deviations (1.09%). **Conclusion** This study proposes countermeasures and preventive measures from different dimensions to effectively reduce the protocol deviations, and provide reference for improving the quality of drug clinical trials in our hospital.

Key words: drug clinical trial; protocol deviation; quality control; improvement measure

药物临床试验是指任何在人体（受试者）进行的药物系统性研究，目的是研究试验药物的安全性和有效性[1]。药物临床试验必须遵循《药物临床试验质量管理规范》（GCP）原则，依从伦理委员会（Ethics Committee，EC）批准的试验方案，任何有意或无意偏离或违反 GCP 原则和试验方案的行为称之为方案偏离（protocol deviation，PD）[2-3]。

药物临床试验是研发过程的重要环节，保证试验数据的真实、有效、准确是临床试验顺利完成、价值体现的关键。虽然研究者按照方案要求去实施临床试验，但仍会导致 PD 的发生，从而影响试验数据的质量和受试者的安全。随着药品审评审批制度改革的深入和国家对药物临床试验监管的不断加强，PD 受关注的程度越来越高，申办者和药物临床试验机构及监管部门对 PD 的判定标准和处理方法也在不断发展[4]。本文针对药物临床试验中发生的 PD 进行统计分类，同时，探讨总结了药物临床试验中 PD 发生的原因，旨在提醒研究者，应加强研究方案的执行力度，做好药物临床试验的风险把控。

1　资料与方法

本文数据源于我院 2019 年 3 月至 2021 年 9 月结题的 47 项药物临床试验，对试验过程中上报 PD 的原因进行探讨，并提出相应的预防措施。数据采用 Excel 2019 软件进行描述性统计分析。

2　结果

2.1　PD 的类型分析

本研究共收集 458 例次 PD，上报频率最高的是试验药物相关偏离，其余依次为：检查 / 检验相关偏离、访视相关偏离、生物样本相关偏离和入 / 排标准相关偏离，详见表 1。各种类别的 PD 明细统计详见表 2。

表 1　PD 种类统计表

Tab 1　Statistical table of PD types

PD 类型	例次	占比 /%
试验药物相关偏离	188	41.05
检查 / 检验相关偏离	150	32.75
访视相关偏离	80	17.47
生物样本相关偏离	35	7.64
入 / 排相关偏离	5	1.09
总计	458	100.00

2.1.1　试验药物相关偏离　试验药物相关的 PD 共计 188 条，占比为 41.05%。导致此类 PD 的主要原因如下：① 受试者依从性差，主要体现在两个方面：未按方案要求的节点服药以及未按方案规定的剂量服药，出现漏服、多服的情况（共计 147 条，占此类 PD 的 78.19%）。② 受试者在试验期间有其他合并用药，影响试验药物的疗效和安全性判定。③ 受试者在试验期间未能妥善保管

表 2 PD 明细统计表

Tab 2 Statistical table of PD details

PD 类型	方案偏离明细	例次	此类别占比 /%	占全部比例 /%
试验药物相关偏离	受试者服药依从性差	147	78.19	32.10
	合并用药	22	11.70	4.80
	试验药物 / 包装 / 日志卡丢失	17	9.04	3.71
	药物发放延迟	2	1.07	0.44
检查 / 检验相关偏离	实验室检查缺失 / 超窗	99	66.00	21.61
	检查不符合方案规定	48	32.00	10.49
	检查项目错误	2	1.33	0.44
	入组前缺少必要检查	1	0.67	0.22
访视相关偏离	访视超窗	72	90.00	15.72
	访视缺失	8	10.00	1.75
生物样本相关偏离	样本采集超窗	21	60.00	4.59
	样本处理不规范	10	28.57	2.18
	样本超温	4	11.43	0.87
入 / 排相关偏离	不符合入选标准入选	2	40.00	0.44
	符合排除标准未排除	3	60.00	0.66

试验用药、药物的空包装或者服药日志卡，对后续的疗效判定产生影响。④ 信息系统原因：由于药品发放信息系统故障，导致电子处方未能及时开具，改用纸质处方，为保证库存量一致，信息系统恢复后，补开电子处方。

2.1.2 检查 / 检验相关偏离 检查 / 检验相关偏离的主要原因是检查 / 检验缺失，受试者依从性差，未按方案要求进行相应的检查 / 检验是导致缺失的主要原因（占此类 PD 的 66%）。此类 PD 的严重程度视项目而定。如某室性期前收缩项目需要排除尿妊娠阳性患者，受试者未进行尿妊娠检测就已入组并用药，补测后发现患者尿妊娠结果为阴性，缺失的尿妊娠检查不影响受试者入排及随机分组等情况，故属于常规 PD。除此之外，研究者对研究方案的不熟悉而导致的检查 / 检验错误或不符合方案规定是此类偏离的另一主要原因。

2.1.3 访视相关偏离 受试者访视超窗 / 缺失所造成的方案偏离共 80 条，占比 17.47%。其中 72 例次由于新冠疫情原因或访视日期与法定节假日重合，受试者依从性不佳导致的访视超窗。8 例次由于未能联系上受试者导致的电话访视缺失，此类偏离均未显著影响受试者权益和安全以及数据的科学性和完整性，故属于轻度 PD。

2.1.4 生物样本相关偏离 生物样本采集和处理是临床试验实施过程中极为关键的环节，其采集和处理的规范性直接影响临床试验的主要 / 次要疗效指标的科学性和准确性，进而影响受试者的权益。本次统计，生物样本相关偏离共 35 条，占比 7.64%。此类 PD 主要包括采集时间超窗、样本处理过程不规范（违背实验室手册）、样本运送过程中超温等。导致此类 PD 的原因主要如下：① 访视超窗导致生物样本采集超窗（共计 21 条，占此类 PD 的 60%）；② 被授权的研究者或临床研究协调员（clinical research coordinator，CRC）对生物样本采集相关标准操作规程（standard operating procedure，SOP）及实验室手册不熟悉，导致生物样本处理过程不规范（共计 10 条，占此类 PD 的 28.57%）；③ 样本采集后运送过程中超温（共计 4 条，占此类 PD 的 11.43%）。

2.1.5 入 / 排相关偏离 入 / 排相关偏离是指受试者在不符合入组标准或者符合排除标准的条件下，被研究者错误地纳入某试验项目的情况。此类偏离会影响受试人群的基线水平和统计集群的划分，从而影响试验结果的科学性。虽然此类 PD 相对较少，但严重程度高，一般属于重大 PD。本次统计的 458 条 PD 中，涉及入 / 排相关的 PD 共计 5 条，占比为 1.09%。导致此类 PD 的原因主要与研究者相关，研究者日常诊疗的问诊思维未能及时转换，加之对试验方案认知欠缺，审核入组时不够仔细是导致受试者误纳的主要原因。

2.2 *试验分期与 PD 的关系分析*

本文共收集 47 项药物临床试验，其中生物等效试验（BE）11 项、Ⅱ期临床试验 5 项、Ⅲ期临床试验 26 项、Ⅳ期 / 未分期临床试验 5 项，详见表 3。按试验的不同分期与 PD 之间的关系分析如下：

BE 试验主要以药代动力学参数分析为目的，生物样本采集点在达峰时间附近密集，采集时间窗窄，生物样本采集易超窗，本文统计的 BE 试验共发生 12 例次生物样本相关偏离，全部为生物样本采集超窗，PD 类型单一，与其他分期的临床试验差异大。除此之外，参与 BE 试验的医护人员均为专职的临床试验研究者，接受 GCP 培训程度高且意识较强，因此 PD 发生率明显低于其他分期的临床试验。其他分期临床试验共 36 项，不同类型 PD 的发生率详见表 3。本部分临床试验的实施主体为临床医师，大部分为兼职临床试验研究者，需在临床诊疗活动和临床试验不同的要求条件下转换角色。因此，此部分的 PD 类型较多，而且发生率明显高于 BE 试验，这对临床试验机构的监管和质控提出了新的课题。

2.3 *试验药物类型与 PD 的关系分析*

按试验药物的不同，可分为化学药品和生物制品临床试验。生物制品凭借特异性高、毒副作用相对较小等特点成为制药企业研发的热点，我院承接的生物制品临床试验数量逐年上升。生物制品有区别于化学药品的独特属性，储存条件要

表 3　不同试验项目 PD 明细统计表 [*n* (%)]

Tab 3　Statistic of PD details for different clinical trial types [*n* (%)]

项目	试验类型	PD 类型				
		试验药物相关偏离	检查 / 检验相关偏离	访视相关偏离	生物样本相关偏离	入 / 排相关偏离
试验分期	BE (11 项)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	12 (100)	0 (0.00)
	Ⅱ期 (5 项)	32 (43.24)	20 (27.03)	18 (24.33)	3 (4.05)	1 (1.35)
	Ⅲ期 (26 项)	122 (44.2)	94 (34.06)	40 (14.49)	18 (6.52)	2 (0.73)
	Ⅳ期 / 未分期 (5项)	34 (35.42)	36 (37.5)	22 (22.92)	2 (2.08)	2 (2.08)
试验药物类型	化学药品 (32 项)	114 (38.25)	102 (34.23)	57 (19.13)	23 (7.72)	2 (0.67)
	生物制品 (15 项)	74 (46.25)	48 (30.0)	23 (14.37)	12 (7.5)	3 (1.88)

求高，一般要求冷藏贮存 (2 ～ 8 ℃)，因此，生物制品临床试验在实施过程中易发生试验药物超温的现象。除此之外，近年来，皮下注射剂型和延长生物制品半衰期成为研发的重点。半衰期的延长和剂型的改变不仅可以减少给药频率，于临床试验而言，访视相关 PD 的发生率也随之降低。

3　PD 发生的主体分析及改进措施

3.1　研究者角度

在药物临床试验的各参与方中，研究者作为临床试验的实施者、临床试验质量及受试者安全和权益的直接责任人，是临床试验的关键主体，应在试验前评估试验在本机构的可行性。参照 ICH GCP，2020 年新版《药物临床试验质量管理规范》中对研究者的职责增加了新的要求：① 要求研究者具备承担临床试验的能力；研究者授权及监督职责；试验进展报告要求；试验记录和报告的要求；承担临床试验有关医学决策的人员要求。② 研究者在临床试验和随访期间应警惕受试者的其他疾病并关注合并用药；研究者对试验用药品的管理；研究者与受试者相关的临床医师的沟通；研究者对受试者退出的关注等 [5-6]。

在本研究中，研究者原因所致的偏离比例较高，因此降低由研究者引起的 PD 至关重要。笔者建议可以从以下两个维度减少 PD 的发生，① 事前培训：在项目启动前，应重点加强对研究者的专项培训，着重强调入 / 排标准、合并用药要求、试验药物给药剂量和调整要求、访视时间窗以及方案要求的检查 / 检验等。研究者熟悉并掌握方案后，才能更好地给受试者进行知情同意，受试者的服药、合并用药和访视的依从性才能大大提高，避免试验药物相关和访视相关 PD 的发生。② 事中规范：在项目实施过程中，研究者应及时根据机构办质控、监察及稽查等反馈的问题进行归纳总结。检查 / 检验相关的 PD 可通过规范实施的过程进行规避，例如，实验室检查的缺失或检查项目与方案不一致等容易出现的 PD 应加强关注，展开项目组内部质控和培训，避免后续继续出现此类 PD。

3.2　申办者角度

申办者作为临床试验的发起组织者和试验监查者，是临床试验中最重要的主体之一。2020 年新版《药物临床试验质量管理规范》中进一步突出了申办者的主体责任，申办者是临床试验数据质量和可靠性的最终责任人；申办者应加强受试者的保护，在方案制订时应明确保护受试者权益和安全 [7-8]。本研究中虽然申办方直接导致 PD 的比例并不高，但是入 / 排相关和访视相关的偏离可能是方案设计不严谨的外部体现，申办者不能完全摆脱干系。因此，在项目设计之初，召开方案讨论会尤为重要，听取不同分中心的意见，从而制订出优化的入 / 排标准和可行的方案。在项目运行阶段，申办方应定期汇总各分中心的 PD 情况，可一定程度规避此类 PD 的发生。

3.3　受试者角度

本研究结果显示，相当一部分 PD 是由于受试者依从性不佳导致的。受试者作为临床试验的受试对象，是临床试验风险的承担者，其参加临床试验是自愿的，有权在试验的任何阶段随时退出试验而不会遭到歧视或报复 [9]。受试者签署知情同意书时，研究者应充分告知受试者相关注意事项，并告知其按时来院随访的义务。只有进行了充分的知情同意，受试者服药 / 访视的依从性、试验药物包装和日志卡填写等受试者相关的 PD 发生率才可能降低。

3.4　机构监管角度

药物临床试验机构作为临床试验项目的监管方，应持续加强研究者培训，保证试验过程严格遵循法规和方案要求：① 加强研究者对相关法律法规和文件的学习，提升试验操作的严谨程度。② 本文统计结果发现，我院多数 PD 发生在试验开始阶段，主要原因是研究团队对方案的理解不足，因此要求申办者在本中心的启动会上加强方案的培训，尤其是对受试者筛选入组过程的监管，严格按照方案规定的入 / 排标准对受试者

进行筛选[10]，避免不符合入选标准的受试者进组和符合排除标准的受试者入组。只有研究者在熟知方案后，生物样本和入排相关的 PD 发生率方可降低。③ 机构办公室在临床试验实施的不同时期，根据项目开展进度分次质控，并对研究者定期进行培训。除此之外，机构办公室需对 PD 高发的关键环节在启动会时重点强调，并在后续的质控环节中重点关注，预防和减少 PD 的发生。

3.5 伦理监管角度

伦理委员会作为独立的监管部门，应健全临床试验项目的审批制度，严格按照审核流程进行审批，通过审批的试验方案应合理，于研究者和受试者而言均应具有较高的可执行性。通过的试验方案内容和知情同意等方面应具有科学性和合理性，对试验中可能出现的 PD 提前进行预分类，设立清晰的分类标准及处理方法。伦理委员会对临床试验的监管应贯穿整个试验，从试验启动到中期审查，到试验结束，并实时进行跟踪检查，以起到督促管理的作用[11-13]，降低 PD 的发生。

3.6 其他

机构应有效利用现有信息化手段，建立质量持续改进体系：① 完善药房 GCP 信息化系统，严格管控药物的保存、发放过程，使药物发放和回收全过程清晰可见，便于溯源查询。建立更加全面的受试者筛选系统并进行全国联网共享信息，及时掌控受试者用药史、治疗史及参与其他药物临床试验的记录。② 研究过程中通过电子数据采集系统（Electronic Data Capture System，EDC）、临床试验信息管理系统（Clinical Trial Management System，CTMS）等信息化、智能化工具对试验进程和文件进行全程监管[14]。使用风险管理和信息监测辅助手段，实时审查、监测和跟踪关键研究数据和 PD，力将 PD 的发生率和影响最小化。

4 讨论

通过对我院 2019 年 3 月至 2021 年 9 月结题的 47 项药物临床试验实施过程中产生 PD 的原因进行分析，并提出有效措施进行应对和预防，以降低在药物临床试验实施过程中 PD 的发生率，保证试验数据的科学性、真实性和有效性。PD 是影响药物临床试验数据科学性的重要因素，分析归纳 PD 发生原因采取相应措施应对和预防，能有效降低 PD 的发生，提供更加真实、可靠的试验数据，为新药研发上市提供参考。

参考文献

[1] 国家药品监督管理局 . 药物临床试验质量管理规范：2020 局令第 57 号 [EB/OL]. [2020-04-26]. https：//www. nmpa. gov. cn/zhuanti/ypzhcglbf/ypzhcglbfzhcwj/ 2020042616-2401243. html.

[2] 杨敏，程国华 . 药物临床试验各环节的质量管理 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（15）：1967-1971.

[3] 卜擎燕，谢立群，熊宁宁 . 临床试验中偏离方案的管理 [J]. 中国新药杂志，2012，21（18）：2121-2125.

[4] 王晓晖，陈静，李静，等 . 中国临床试验实施质量控制的发展与变革 [J]. 中国循证医学杂志，2018，18（8）：776-782.

[5] 高荣，吕术超，李秀丽，等 . 从药物临床试验数据核查看研究者的职责履行情况 [J]. 中国新药杂志，2019，28（20）：2508-2012.

[6] 张琼光，王洪，申鸽，等 . 从检查员视角看新修订《药物临床试验质量管理规范》对研究者的要求 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（23）：3300-3304.

[7] 高荣，王安娜，唐静，等 . 从药物临床试验数据核查看申办者的职责履行情况 [J]. 中国新药杂志，2019，28（8）：973-977.

[8] 张琼光，刘珊，余甜，等 . 从检查员视角看新修订《药物临床试验质量管理规范》对申办者的要求 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（24）：3379-3384.

[9] 叶丽君，蔡淑帆，林能明，等 . 某院抗肿瘤药物临床试验方案偏离的回顾性研究 [J]. 医药导报，2021，40（12）：1761-1765.

[10] 孙金，朱晓鹤，王珊，等 . 本院药物临床试验的质量监管模式 [J]. 中国新药与临床杂志，2015，34（12）：921-924.

[11] 廖红舞，郝纯毅，张雷，等 . 临床研究中方案违背的伦理审查策略 [J]. 中国医学伦理学，2019，32（6）：712-715.

[12] 肖爽，程金莲，朱雪琦，等 . 关于临床试验不依从方案问题的探讨 [J]. 中药新药与临床药理，2018，29（6）：832-835.

[13] 李骄，闫飞雪 . 医疗机构伦理委员会发展现状与问题思考 [J]. 中医药管理杂志，2021，29（3）：201-204.

[14] 孙雪，宋浩静，郭彩会，等 . 信息化系统对药物临床试验质量的影响 [J]. 中南药学，2019，17（6）：937-940.

（收稿日期：2023-05-09；修回日期：2023-06-26）

药学教育

基于科学引文数据库的临床药学教育研究文献计量学分析

郭琳娜，罗芬，颜苗，张毕奎，龚慧*（中南大学湘雅二医院，长沙　410011）

摘要：目的　总结 2002—2022 年国际临床药学教学研究的整体发展状况，为我国临床药学教育高质量发展提供参考。**方法**　检索科学引文数据库（Web of Science，WOS）2002—2022 年发表的临床药学教育研究文献，运用 Bibliometrix 软件对临床药学教育研究文献的发文量、国家 / 地区、机构、作者、期刊和关键词进行文献计量学分析。**结果**　筛选后共纳入 2067 篇论文进行分析。该领域产量最高的国家、机构、作者分别为美国、UNIV N CAROLINA 和 AUSTIN Z，中国发文量排名第 6。发文最多的期刊为 *American Journal of Pharmaceutical Education*。研究关键词主要集中在临床药学教育、药学服务、教育管理、药师干预和观念。**结论**　2002—2022 年间临床药学教育研究越来越受到学者的关注，美国、澳大利亚等发达国家的机构、期刊、学者引领着临床药学教育的发展。我国临床药学教育研究紧跟国际发展趋势，但仍需加强国际合作，进一步提升临床药学教育质量，提升学术影响力。

关键词：临床药学；教育；文献计量学；科学引文数据库
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2529-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.048

Bibliometrics of literatures on clinical pharmacy research based on scientific citation database

GUO Lin-na, LUO Fen, YAN Miao, ZHANG Bi-kui, GONG Hui* (*Second Xiangya Hospital, Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective　To summarize the overall development of international clinical pharmacy education from 2002 to 2022, and to provide reference for the high-quality clinical pharmacy education in China. **Methods**　Literatures on clinical pharmacy education by Web of Science (WOS) from 2002 to 2022 were retrieved. The number of publications, countries/regions, institutions, authors, journals and keywords of clinical pharmacy education literature were analyzed. **Results**　Totally 2067 papers were included. The countries, institutions and authors with the highest output in this field included the United States, UNIV N CAROLINA and AUSTIN Z. China ranked 6th in the number of publications. The journal with the most publications was the *American Journal of Pharmaceutical Education*. The research keywords mainly covered on clinical pharmacy education, pharmaceutical care, educational management, pharmacist intervention and concept. **Conclusion**　Clinical pharmacy education has attracted much attention among scholars in the past 20 years. Institutions, journals and scholars in developed countries such as the United States and Australia are leading roles in the development of clinical pharmacy education. China closely follows but still needs cooperation to further improve the quality of clinical pharmacy education and academic influence.

Key words: clinical pharmacy; education; bibliometrics; Web of Science

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81803830）；中南大学教育教学改革项目（No.2022jy166，No.2023JGB039）。
作者简介：郭琳娜，女，博士，主要从事生物药物研究，email：guolinna_001@163.com　*通信作者：龚慧，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：feelgonghui@csu.edu.cn

临床药学是随着医药科学的发展而兴起和发展的。临床药学的概念最先由美国学者提出，20世纪 50 ～ 60 年代，美国首先建立了“临床药学”这一新兴学科，把药学教育的重点从传统的“药”转向“人”。1957 年，Francke DE 首次提出在高等院校设置以生物科学为重点的“临床药学专业”临床药学博士（Pharm. D）课程教育[1]。1997 年美国药学教育委员会（American Council on Pharmacy Education，ACPE）宣布停止认证药学学士学位，支持采用 Pharm.D 作为唯一的药学学位[1]。由于美国药学届的成功实践，全球各国纷纷效仿，国际上普遍认为临床药学是未来医药学发展的必然趋势。临床药学概念自 1980 年引入我国大陆地区，随后临床药学培训、专业教育陆续展开。1989 年，四川大学华西药学院创办了我国第一个五年制“临床药学专业”。1998 年，因院系和专业调整，临床药学专业被取消；2006 年，国家重新恢复了临床药学专业设置。截至 2019 年，全国共有 498 所高校开设药品相关本科专业，其中 52 所全日制高校开设临床药学本科专业[2-3]。

随着我国医疗事业的快速发展，对临床药学的人才需求量不断攀升。临床药学教育是培养临床药学人才的主要渠道。如何培养高素质、专业型临床药学人才是临床药学教育的重点。临床药学教育的研究对于课程的合理设计、评价体系的完善和学习领域的更新具有重要的意义。本文从文献计量学的角度详细介绍了临床药学教育的相关研究进展，概述了文献的总体概况，并对引文进行了统计分析，进行了研究热点挖掘，分析了该领域的演变趋势，以期为临床药学教育工作者提供有价值的信息和建议。

1 资料与方法

1.1 资料来源

Web of Science（WOS）数据库是科学计量分析的主要数据库。本研究所检索的临床药学教育相关文献均来自于 WOS 数据库。检索式为 TS =（clinical pharmacy）AND TS =（education）。检索过程中采用发表时间和文献类型作为过滤条件，发表时间设定为 2002 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日，发表类型设定为研究型论文“article”。本研究不设置语言、期刊等其他的过滤器。

1.2 研究方法

通过 Bibliometrix 软件对数据进行分析并将其网络可视化。Bibliometrix 是基于 R 语言和 Bib-Excel 的开源软件包，是一种用于分析和可视化科学文献数据的工具，被广泛应用于学术研究，科学评价和科学政策等领域。Bibliometrix 安装运行环境为 R 4.2.2 版本的 RStudio 软件，Bibliometrix 的安装包版本为 4.0.1。研究内容包括从国家 / 地区、机构、论文来源期刊、作者及高频关键词等角度对 WOS 数据库获取与“clinical pharmacy”和“education”相关文献数据进行分析。

2 结果

2.1 年度论文发表数量

2002 年以来，临床药学教育研究国际发文量整体呈现上升趋势，2016 年以前，年度发文总量不足 100 篇，处于缓慢增长的阶段。2017 年以后，论文发表数量开始大幅增加，呈显著上升趋势，每年的发文量都在 100 篇以上，2021 年高达 300 篇，表明临床药学教育领域近年来开始受到关注和重视（见图 1）。

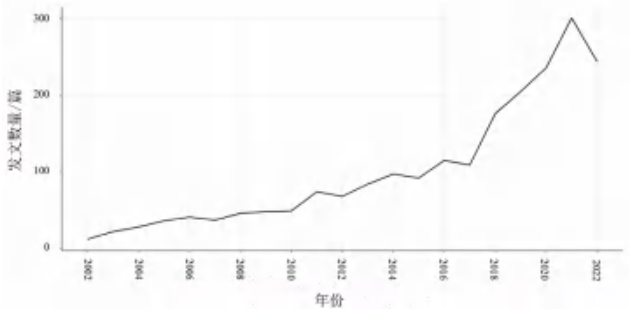


图 1 临床药学教育研究文献年度分布

Fig 1 Distribution publication of literatures on clinical pharmaceutical education

2.2 国家 / 地区分析

美国的临床药学教育论文产量居于首位，其产出占所有论文的 48%；其次为澳大利亚，占比为 6.2%；我国的发文量位居第 6，共 55 篇论文；马来西亚和新英格兰的国家间合作发文的比例较高。上述结果提示：各国临床药学教育研究发展水平存在差异，美国发文量远超其他各国。近年来发展中国家的临床药学教育快速发展，有四个发展中国家论文发表数量进入了前 10，并且在国际间合作发文方面表现出一定优势。

2.3 机构分析

美国的“UNIV N CAROLINA”以 99 篇论文发表量位居论文产量排名第一，论文产量前 10 的机构中，除 UNIV SYDNEY 和 MONASH UNIV 为澳大利亚大学外，其余均为美国的机构（见图 2）。机构分析结果与上述发文结果基本一致，前 10 的论文发表机构集中在美国和澳大利亚，其中美国仍具有绝对优势。根据 U.S.NEWS 2017 年评选，北卡罗来那大学（UNIV N CAROLINA）药学院排名全美第一，该学校的临床药学教育的学程规划、课程设置、教学理念及方法等值得借鉴和学习。

2.4 论文的来源期刊分析

表 1　临床药学教育研究发文国家分布

Tab 1　Countries with publication on clinical pharmaceutical education

国家	文章数	SCP	MCP	Freq	MCP Ratio
美国	1028	979	49	0.488	0.048
澳大利亚	130	108	22	0.062	0.169
加拿大	115	116	1	0.055	0.165
英国	113	82	31	0.054	0.274
沙特阿拉伯	62	45	17	0.029	0.274
中国	55	46	9	0.026	0.164
马来西亚	37	22	15	0.018	0.405
新西兰	25	16	9	0.012	0.360
巴西	23	19	4	0.011	0.174
西班牙	23	23	0	0.011	0.000

注：SCP. 表示该文章作者均来自同一国家；MCP. 表示该文章作者来自多个国家；Freq. 某国家发文量 / 所有国家发文量；MCP Ratio ＝ MCP/Articles，即该国发表文章中合著文章比例。

Note：SCP. Single Country Publications，indicating that the authors of this article are from the same country；MCP. Multiple Country Publications，indicating that the authors of the article are from multiple countries；Freq. The number of articles published by a country/the number of articles published by all countries；MCP Ratio ＝ MCP/Articles，the proportion of co-authored articles published in a country.

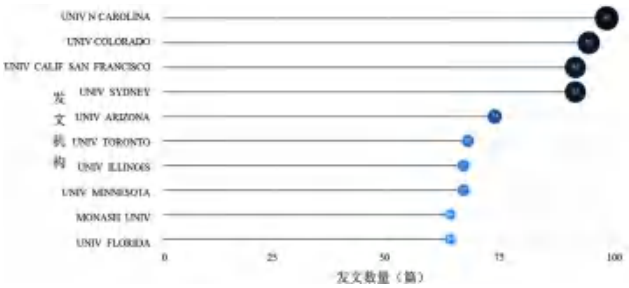


图 2　临床药学教育研究发文机构分布

Fig 2　Publication institutions of clinical pharmacy education research

从论文数量看，刊载论文最多的为 *American Journal of Pharmaceutical Education*，共 222 篇，其次为 *American Journal of Health-system Pharmacy*。刊文量排名前 10 的期刊处于 JCR 四分区的 Q2～4 区，大部分影响因子在 2 左右，见表 2。结果提示临床药学整体发文质量仍有待提高，该领域研究需要更多研究者的关注。

表 2　临床药学教育类文献发表期刊前 10 位

Tab 2　Top 10 published journals of clinical pharmaceutical education literature

期刊	排名	论文量	JCR 分区	IF（2022）
American Journal of Pharmaceutical Education	1	222	Q2	3.04
American Journal of Health-System Pharmacy	2	129	Q3	2.44
Currents in Pharmacy Teaching and Learning	3	120	—	—
Journal of The American Pharmacists Association	4	93	Q4	2.03
Pharmacy	5	68	—	2.02
International Journal of Clinical Pharmacy	6	57	Q4	2.30
Pharmacy Education	7	47	—	0.45
Annals of Pharmacotherapy	8	44	Q3	2.69
Journal of Interprofessional Care	9	44	Q3	2.21
Research in Social & Administrative Pharmacy	10	44	Q2	3.71

2.5　作者分析

发表临床药学教育研究论文最多的作者为 AUSTIN Z，共 11 篇，将每位作者的每年的发文量做了进一步分析，结果表明 AUSTIN Z 是前 10 位专家中最早开始临床药学教育研究的，而近年来研究成果较多的是 CUNNINGHAM S 和 WANG Y 教授团队（见图 3、4）。发文前 10 的作者主要来自美国、加拿大、英国等发达国家，主要关注药学服务态度、技能和实践等方面。该数据结果可为我国临床药学教育研究团队家的合作和交流提供线索，共同致力于新医疗背景下临床药学教育改革。

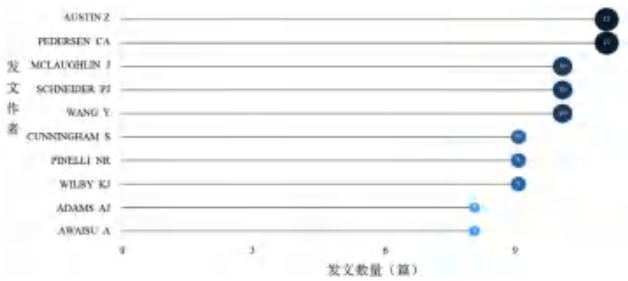


图 3　药学教育论文产量排名前 10 的作者

Fig 3　Top 10 authors in terms of the output of pharmaceutical education papers

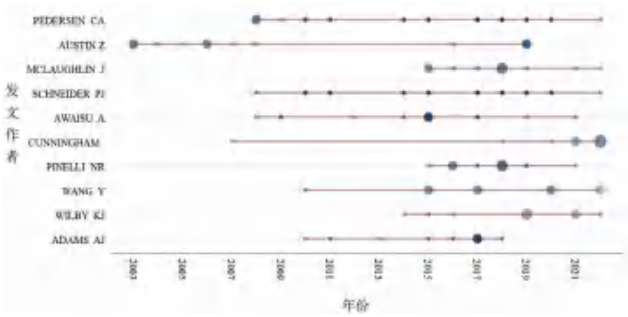


图 4　发文量前 10 的作者发表临床药学教育相关文献的时间分布

Fig 4　Time of the top 10 authors with most publications on clinical pharmacy education

2.6　论文的高频关键词分析

高频关键词体现了该领域的研究热点问题。图 5 显示了临床药学教育研究发展过程中的热门词汇，其中与教学相关词频高于 50 的有教育、服务、管理、学生、干预、观念等。频次排名前 20 位的关键词具体见图 5。

3　讨论

3.1　临床药学教育研究越来越受学者的关注

药学教育和培训是为药学工作人员提供相关药学服务的基础。药学教育的发展是多方面的研究和实践，最终优化和改善患者及公众的健康。从 2002 年开始，临床药学教育研究论文的发表量持续增加，且在 2017 年以后出现了大幅度增长，表明临床药学教育越来越受学者的关注。2015 年，美国“精准医疗计划”的启动掀起了全球精准医疗

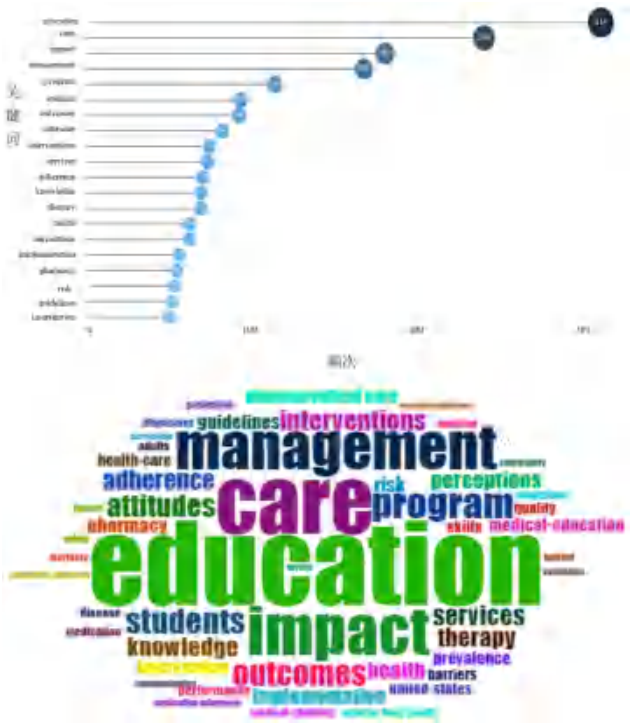


图 5　临床药学教育研究论文的高频关键词

Fig 5　High-frequency keywords in clinical pharmaceutical education research

的热潮 [4]，而国内外基于精准医疗要求下的药物研究也如火如荼地开展了起来。临床药师是精准用药的主力军，为适应精准医学发展要求，临床药师能力培养模式也需要探索和调整。2016 年开始，我国实行药品零加成政策，新政策的实施要求医院药学部门的主要工作从“以药品为中心”变为“以病人为中心”，从保障药品供应到促进合理用药，迎来了临床药学发展的新时期。然而临床药学人才培养在数量和质量上均不能适应经济社会发展和大众健康的需要，临床药学教育改革越来越受到学者关注，从而为临床药学的高质量发展提供保障。

3.2　全球临床药学教育发展不平衡

由于经济、基础设施或学术能力的不同，许多国家的本科和研究生药学教育处于不同的发展水平。美国是最早开展临床药学教育的，拥有大量的药学学院，在论文产量、发文机构、期刊等方面都有显著优势。澳大利亚和加拿大的药学学院以及这些国家的药学机构通过建立药学专业领域的期刊，专门改善药学服务和持续药学专业发展，为药学教育作出了巨大贡献。此外，沙特阿拉伯发文量也排在前 10，在发展中国家论文产量居第一。沙特阿拉伯近年来努力升级其国家药学教育课程，鼓励研究人员发表高质量的研究。沙特阿拉伯的大学还鼓励卡塔尔、约旦和黎巴嫩等阿拉伯国家的其他几所大学升级其药学教育系统，并更多地参与药学教育研究 [5-7]。除马来西亚、新西兰、英国、沙特阿拉伯，排名前 10 的国家的研究产出的国际合作较少。在高等教育国际化背景下，深化国际交流合作、提升国际竞争力成为临床药学人才培养的重要工作，发展中国家可多借鉴发达国家的经验，提升临床药学教学质量。

3.3　临床药学教育需要更多关注和投入

论文期刊的影响因子总体来说并不高，刊文量排名前 10 的期刊处于 JCR 四分区的 Q2 ～ 4 区，影响因子在 2 左右，说明这些期刊大多被引用较少，侧面反映了虽然临床药学教学论文的数量总体提升，但其质量和关注度还有待提升。20 年来，发表临床药学教育研究论文最多的作者是 11 篇，超过 10 篇的仅有 5 个作者，这表明目前对临床药学教学深入和持续研究的人员及团队还是缺乏的，有待更多的研究人员和团队关注和深耕临床药学教育领域。国内临床药学教育起步较发达国家晚，因此相关的研究成果产出相对更少，但同时也表明我国学者在临床药学教育的研究空间也更大，借鉴国外研究成果，探索适合我国国情的临床药学培养模式和教学方式等尤为重要与迫切。

3.4　临床药学教育研究主题以药学服务为主

关键词中教育、影响、项目、管理、结果、干预等多为对研究主题的行为或结果，其余关键词中排名靠前有服务、态度、依从性、观念等，结合搜索到的相关文献内容，这些关键词都与药学服务的研究主题相关。药学服务的理念是 20 世纪 90 年代由 Hepler 等 [8] 提出的，倡导药师将“以药品为中心”的实践模式转移到“以病人为中心”。之后，药学服务逐渐成为了全球药师的主要实践形式 [9]。20 世纪 90 年代中期，药学服务的理念传入中国，长海医院药学部胡晋红教授提出的“全程化药学服务”（integrated pharmaceutical care）概念获得普遍认同。药学服务包括用药前的宣传教育，用药过程中的顾问、监测及用药后的监测与评价 [3]。现阶段国内外，尤其是发展中国家，培养临床药学专业学生药学服务的意识和能力是临床教学教育的首要任务。因此，国内外越来越多关于临床药学专业学生药学服务态度、能力、药学服务障碍等调查研究 [10-11]，以及探索对药学服务能力提升的最佳教学方式，如基于问题的教学法（problem based learning，PBL）、基于案例的教学法（case based learning，CBL）、翻转课堂（flipped classroom）的教学法等，或各教学法结合教学，都是目前研究较多的教学方式 [12]。但目前关于临床药学专业学生的药学服务能力的

标准化考核和评判亟待建立，同时在实践中的教学还有待进一步加强。

3.5　国外临床药学教育对我国教育改进的启示

教育目标是培养具备复合能力的初级药师。培养模式大致为先进行 2 ～ 4 年大学预科学习，再完成 4 年药学专业课程的学习。另外，药学实践也是非常重要的一环，分为两个阶段：前 3 年为初级药学实践（IPPE），实践内容包括：医院药学实践、社区药房实践、药物咨询等，最后一年为学生提供在医疗机构不同科室临床实践的机会，为高级药学实践（APPE），教师可在多种实践场所为学生提供指导。美国的临床药学实践课程以学术课程为基础，同时又作为学术课程的补充，实践难度逐渐增加，让学生将课堂上所学的知识运用到药学实践中，培养学生临床思维和技能 [13]。相比之下，中国高校的临床药学实习主要集中在四、五学年，且理论知识和临床实践存在脱节，学生存在难以将所学知识运用到临床药学服务中的困境。提示我国临床药学教学培养方案需进一步优化，从而更好地培养学生的临床实践能力，满足临床需求。

随着医药行业的发展，对临床药学教育的要求正逐步提升，临床药学教育工作者通常需要兼顾教学、科研和临床实践等多个方面的教学任务，亟需在临床环境中创造性地利用教育资源并运用更有效的教学方法。与美国相比，中国开设的临床药学教育课程大体相同，但实践课程的教学方法和模式有所不同 [14]。PBL 法在美国药学教学中应用较多，让学生发挥领导作用，培养自主学习能力，有利于学生创新能力的形成。同样应用较多的还有翻转课堂的教学法，该方法中教学知识类的信息在课堂前就会给到同学们，课堂上则借助临床病例等让学生投入到批判性思考和讨论中，培养学生的批判性思维，复杂问题解决及沟通方面的能力 [12]。随着信息技术和人工智能融入教育，基于网络的学习（WBL），社交媒体、人工智能等也将是帮助学生高效学习的新方法。我国的药学专业教育长期以来是教学的主体，形成了“重理论、轻实践，重知识、轻能力”的教学理念和教育模式，在很大程度上影响了临床药学人才的培养，不能适应现阶段对临床药学人才的需求。欧美等国家临床药学教育注重将药学与医学相结合，这一点对药学专业来说极为重要，因此，需要大力深化临床药学教育改革。

3.6　小结

综上所述，本研究采用文献计量学方法对临床药学教育论文进行统计与分析，讨论总结了全球临床药学教育的现状与不足，并对相关工作的未来发展方向进行了展望。由于方法学限制，可能有部分未发表的实际工作未纳入统计分析范畴，本研究可能存在选择性偏倚，不能完全反映实际全貌，但本研究总体上可反映全球在该研究领域的宏观状况，为我国临床药学教育高质量发展提供参考。

参考文献

[1] 张楠森 . 从美国临床药学的发展引起的思考 [J]. 中国医院，2002，6（8）：46.

[2] 彭丽华，范骁辉，张翔南，等 . 国内临床药学教育发展现状及展望 [J]. 药学教育，2021，37（2）：1-6.

[3] 屈建，刘高峰，朱珠 . 中国医院药学学科发展史 [M]. 北京：中国科学技术出版社，2016.

[4] Collins FS，VarmusH. A new initiative on precision medicine [J]. N Engl J Med，2015，372（9）：793-795.

[5] Yousif MA，Ahmed SE，Mustafa AA，et al. Pharmacy education instruction：preference and practices，Saudi Students’ Perception [J]. Saudi Pharm J，2014，22：309-314.

[6] Aljadhey H，Yousef A，Yaser A，et al. Pharmacy education in Saudi Arabia：a vision of the future [J]. Saudi Pharm J，2017，25：88-92.

[7] Asiri Y. Pharmacy education in Saudi Arabia towards clinical teaching and practice [J]. Pharmacotherapy，2014，34：e239.

[8] Hepler CD，Strand LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care [J]. Am J Hosp Pharm，1990，47（3）：533-543.

[9] Berenguer B，La Casa C，de la Matta MJ，et al. Pharmaceutical care：past，present and future [J]. Curr Pharm Design，2004，10（31）：3931-3946.

[10] Awaisu A，Katoue M，Al-Taweel D，et al. Self-reported attitudes and perceived preparedness to provide pharmaceutical care among final year pharmacy students in Qatar and Kuwait [J]. Pharm Educ，2018，18：284-291.

[11] Boura F，Awaisu A，ElGeed H，et al. Pharmaceutical care education at pharmacy colleges in the Middle East and North Africa region：a systematic review [J]. J Clin Pharm Ther，2022，47（8）：1134-1148.

[12] Xiao CL，Ren H，Chen HQ，et al. Multidimensional evaluation of teaching strategies for pharmacology based on a comprehensive analysis involving 21 269 students [J/OL]. Front Pharmacol，2023，14：1145456.

[13] Wang LY，Yuan F. Discussion on education reform of clinical pharmacy major in Chinese universities under the new situation [J]. Pharm Edu，2018，34（4）：31-36.

[14] Li J，Li Z. Differences and similarities in clinical pharmacy practice in China and the United States：a narrative review [J]. Eur J Hosp Pharm，2018，25（1）：2-5.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-04-05）

药品不良反应

PD-1 抑制剂致甲状腺功能减退 2 例

温晓莉[1]，张晴[2]，唐翎[3, 4*]（1. 惠州市第三人民医院·广州医科大学附属惠州医院药学部，广东 惠州 516000；2. 深圳市萨米医疗中心药学部，广东 深圳 518000；3. 中南大学湘雅医院药学部，长沙 410008；4. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心，长沙 410008）

关键词：PD-1 抑制剂；免疫相关不良反应；甲状腺功能减退症
中图分类号：R979.1，R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)09-2534-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.049

程序性细胞死亡蛋白-1（programmed cell death protein-1，PD-1）抑制剂是一类新型抗肿瘤药物，通过调控免疫应答杀伤肿瘤，对多种恶性肿瘤有显著疗效[1]，但容易导致全身多个系统的免疫相关不良反应（immune-related adverse events，irAEs），其中包括内分泌腺体的功能紊乱。甲状腺容易受 PD-1 抑制剂治疗影响，甲状腺功能紊乱发生率达 10%[2-3]，且半数以上患者甲状腺功能损伤为不可逆，需终身激素替代治疗，甲状腺损伤的管理直接影响患者预后，因此需引起临床重视。现对 2 例使用不同 PD-1 抑制剂后引起甲状腺功能减退的病例进行分析讨论，以期提高医务人员对该类不良反应的认识，保证患者用药安全。

1 病例资料

病例 1：患者女，57 岁，2018 年 12 月因肝恶性肿瘤在全麻下行肝癌切除术＋胰周淋巴结清扫术。2019 年 8 月 25 日复查 CT 发现肝癌复发，予以甲磺酸仑伐替尼胶囊（8 mg po qd）＋注射用卡瑞利珠单抗（200 mg 静脉滴注 q2w）治疗，用药 9 个月后，患者出现严重口腔溃疡，极度乏力等症状，于 2020 年 6 月 1 日入院治疗，考虑药物不良反应，予停用仑伐替尼，单用免疫治疗 [注射用卡瑞利珠单抗（苏州盛迪亚生物医药有限公司，商品名：艾瑞卡，批准文号：国药准字 S20190027，批号：201908016A）200 mg 静脉滴注 q2w]，口腔溃疡明显好转。2020 年 7 月 2 日 PET-CT 提示：甲状腺密度弥漫减低，糖代谢轻度弥散增高：甲状腺肿？ 2020 年 7 月 13 日患者返回长沙治疗，确诊为甲状腺功能减退症，予以左甲状腺素钠片 50 μg qd 治疗。2021 年 9 月 15 日，患者入院治疗，实验室相关检查：甲状腺功能检查示，游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）2.41 pmol·L^{-1}↓，游离甲状腺素（FT_4）14.58 pmol·L^{-1}，促甲状腺素（TSH）61.32 mIU·L^{-1}↑，促甲状腺激素受体抗体（TRAb）0.91 IU·L^{-1}，过氧化物酶抗体（A-TPO）14.1 IU·L^{-1}，抗甲状腺球蛋白（A-TG）16.45 IU·mL^{-1}，甲状腺旁素（PTH）171.4 pg·mL^{-1}↑。诊断：① 2 型糖尿病伴多并发症，2 型糖尿病性视网膜病变，2 型糖尿病性周围神经病变，2 型糖尿病性肾病；② 肝恶性肿瘤（术后，靶向治疗）；③ 甲状腺功能减退症。入院后予以调整左甲状腺素钠片 100 μg qd 治疗，一个月后门诊复查甲状腺功能三项：FT_3 2.75 pmol·L^{-1}，FT_4 17.09 pmol·L^{-1}，TSH 16.02 mIU·L^{-1}，指标好转。

病例 2：患者男，63 岁，2019 年 4 月无明显诱因发现左前臂肿胀，逐渐增大明显，2019 年 7 月 2 日在广州某医院行“局部穿刺活检术”，病理回报“恶性间叶源肿瘤”，诊断“左前臂黏液脂肪瘤 pT2NOM”。于 2019 年 8 月予以手术切除并化疗（盐酸多柔比星脂质体＋异环磷酰胺）。化疗 2 周期后因严重脱发，三系减少，停止化疗。于 2021 年 11 开始在当地医院接受免疫治疗 [特瑞普利单抗注射液（苏州众合生物医药科技有限公司，国药准字 S20180015，批号：202110022A）240 mg 静脉滴注 q2w]。2022 年 8 月 5 日，因“发现血糖升高 10 年，全身乏力，眼睑水肿 2 个月”入当地医院内分泌科治疗。实验室相关检查：甲状腺功能检查示，FT_3 1.41 pmol·L^{-1}↓，FT_4 0.15

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金（No.2021JJ80085）。
作者简介：温晓莉，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：Wenxiaoli6068@163.com *通信作者：唐翎，女，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：tangling82@126.com

pmol·L^{-1}↓，TSH 49.89 mIU·L^{-1}↑，A-TPO 58.20 IU·mL^{-1}↑，A-TG ＜ 10 IU·mL^{-1}，PTH 4.26 pmol·L^{-1}，CK1066 U·L^{-1}↑，肌酸激酶同工酶（CKMB）12.6 ng·mL^{-1}↑；辅助检查：心脏彩超示左室壁对称性肥厚，二、三尖瓣轻度反流。左室收缩功能正常（EF 66%）。右室充盈异常（弛缓异常）。心包积液（少量）。诊断：① 2 型糖尿病伴多并发症，2 型糖尿病性周围神经病变，2 型糖尿病性肾病？② 左前臂黏液脂肪瘤 pT2NOM（术后，免疫治疗）；③ 甲状腺功能减退症。考虑特瑞普利单抗注射液致甲状腺功能减退症，且继发心包积液，给予左甲状腺素钠片 25 μg qd 起始治疗，后加至 50 μg qd，一个月后门诊复查甲状腺功能三项：FT_3 2.08 pmol·L^{-1}，FT_4 0.72 pmol·L^{-1}，TSH 21.02 mIU·L^{-1}，指标好转，眼睑无水肿，心脏彩超提示心包积液较前吸收。

2 分析讨论

2.1 不良反应的关联性分析

根据流行病学，接受 PD-1 抑制剂治疗的患者易发生甲状腺功能紊乱且以甲状腺功能减退多见，有症状者多表现为疲劳、厌食、便秘、心动过缓或体重增加等，症状和体征为非特异性，常见的表现是乏力、疲劳等[4-5]。根据国家药品监督管理局关于个例报告关联性评价的标准[6]，临床药师对 PD-1 引起甲状腺功能减退的关联性进行评价：

① 2 例患者使用 PD-1 抑制剂致发生免疫检查点抑制剂（ICPIs）相关甲状腺功能减退的时间，均符合其致病的潜伏期。ICPIs 相关甲状腺功能障碍发生的时间跨度大（用药后 1 周至停药后 2～3 年），高峰发病时间为用药后的几周至几个月内。2 例患者分别在使用 PD-1 抑制剂约 9 个月和 6 个月后出现乏力等相关症状，存在合理的时间关系。② 根据药品说明书，甲状腺功能减退为卡瑞利珠单抗和特瑞普利单抗已有的不良反应。病例中患者出现的症状、影像学检查、实验室检查均符合 PD-1 所引起的 ICPIs 相关甲状腺功能障碍表现，病例 2 甚至继发了心包积液，而心包积液是甲状腺功能减退症中罕见但严重的并发症之一[7]。③ 患者因疾病原因未停药，予以左甲状腺素钠片治疗后乏力、疲惫等症状均有好转。④ 患者合并使用的药物，没有引起甲状腺功能障碍的相关报道，基本可以排除合并用药的干扰。因此根据关联性评价标准和诺氏评估量表，评分均为 5 分，不良反应评价均为“很可能”。

2.2 不良反应的原因分析

2.2.1 PD-1 抑制剂引起甲状腺功能减退的机制 目前国内外对 PD-1 抑制剂引起甲状腺功能减退的机制尚无明确结论。相关研究表明，PD-1 抑制剂引起甲状腺损伤可能与患者基础甲状腺疾病、调节性 T 细胞功能、自身抗体情况、单核细胞免疫表型变化等因素相关[8-9]。一项回顾性队列研究表明：甲状腺不良反应发生率可能与 T 细胞、NK 细胞、单核细胞的数量和功能成正相关[10]。甲状腺正常组织通过表达 PD-L1 和 PD-L2 可识别并结合 T 淋巴细胞表面的 PD-1 信号，从而使正常甲状腺组织免于自身免疫反应。而使用 PD-1 抑制剂后，患者外周血中 T 细胞、自然杀伤细胞增多，产生过强的免疫反应，PD-1/PD-L1 信号通路被阻断，反噬性地增强局部免疫活性，从而诱导甲状腺自身免疫损害[11]。此外，PD-1 抑制剂还可诱发垂体前叶功能障碍，导致促甲状腺激素缺乏，继发中枢性甲状腺功能减退[12]。

2.2.2 不同 PD-1 抑制剂引起甲状腺功能减退的差异性 随着 PD-1 单抗类药物在国内应用广泛，不良反应也逐渐被重视。谢同济等[13]从 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的不同结构特点出发，通过 meta 分析发现不同的药物因结构差异而具有不同的不良反应，但同源的 PD-1 单抗虽具有不同结构特点，相关研究均提示甲状腺功能减退的发生风险在两种药物之间并无差异。另一项对 38 个随机对照研究的 meta 分析报告[14]的结果也显示，不同 PD-1 抑制剂之间甲状腺功能减退的发生率没有显著差异，肿瘤类型与 PD-1 抑制剂治疗甲状腺功能减退的发生率无显著相关性。卡瑞利珠单抗一系列临床研究证实，其总体不良反应，除了反应性皮肤毛细血管增生症（RCCEP）之外，与其他同类产品基本相似[15]。综上所述，不同 PD-1 抑制剂由于结构差异具有不同的不良反应，但引起甲状腺功能减退的发生率无明显差异，且与肿瘤类型无显著相关性。

2.2.3 甲状腺功能减退发生的相关因素 研究表明，由于 PD-1 在正常甲状腺组织表达，在接受免疫治疗后正常的甲状腺细胞受到细胞毒性 T 细胞的攻击，破坏甲状腺滤泡出现甲状腺功能障碍，其中甲状腺功能减退发生率最高，与目前临床试验及真实世界中观察相一致[16]。魏芬芬等[17]研究显示，患者性别、病种、病理类型、KPS 评分、疾病分期、病种、既往有无手术、放疗或靶向治疗、是否联合治疗、PD-1 单抗种类以及 PD-1 单抗治疗效果与 PD-1 单抗引起甲状腺功能异常的发生率无明显相关，而与既往化疗史、接受全身治疗线数有关。李崇映等[18]采用马尔科夫链 - 蒙特卡罗法（MCMC）实施网状 meta 分析，进一步表

明 PD-1 单抗的甲状腺功能减退发生率与给药剂量呈现明显相关性，且发生率随给药时间延长、给药剂量降低而逐渐降低。提示临床医师及药师应重点关注既往有化疗史以及多线治疗的患者，仔细斟酌给药剂量，在有效治疗的同时加强对 PD-1 单抗引起的免疫相关甲状腺不良事件的管理。

2.3 不良反应的处理建议

对于使用 PD-1 抑制剂导致甲状腺功能减退的患者，需结合甲状腺功能障碍的类型及临床症状判断能否继续使用 PD-1 抑制剂及是否需要给予药物治疗 [19]。若患者无临床症状，无需药物治疗并继续使用 PD-1 抑制剂，但应定期监测激素水平。若患者有临床症状，则应根据 TSH 水平，当 TSH 在 5 ～ 10 mIU • L^{-1} 时，结合症状和 TPOAb 情况决定是否治疗。若临床症状已影响日常生活或 TSH ＞ 10 mIU • L^{-1} 则应考虑接受药物治疗并暂停使用 PD-1 抑制剂。推荐治疗药物首选左甲状腺素钠，起始剂量为 25 ～ 50 μg • d^{-1} 或根据体重给予 1 ～ 1.6 μg/（kg • d），直至患者临床症状缓解，达到无症状或轻度症状时，若病情需要可继续使用 PD-1 抑制剂，并定期监测甲状腺功能 [20]。本文 2 例患者均接受了左甲状腺素钠治疗，症状好转后均重新使用了 PD-1 抑制剂治疗。

3 总结与体会

PD-1 抑制剂治疗已经迅速改变了肿瘤治疗的前景，然而其免疫相关不良反应也不容忽视。定期监测甲状腺功能有利于及早识别 PD-1 抑制剂引起的甲状腺疾病，尽早进行干预，临床医师和药师应提高对此类不良反应的警惕，对患者予以宣教、及早识别治疗，避免不良反应进一步加重，使患者更好地从这类免疫制剂中获益。

参考文献

[1] 秦叔逵，郭军，李进，等 . 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，2019：1-116.

[2] 万宝玉，邓鹏裔，王朋，等 . 抗 PD-1/PD-L1 单抗药物致甲状腺不良反应的研究进展 [J]. 华中科技大学学报（医学版），2021，50（2）：256-260.

[3] 中华医学会内分泌学分会免疫内分泌学组，免疫检查点抑制剂引起的内分泌系统免疫相关不良反应专家共识（2020）[J]. 中华内分泌代谢杂志，2021，37（1）：1-16.

[4] 赵爽，苗秋丽，宋燕青，等 . 特瑞普利单抗致甲状腺功能减退症 1 例分析 [J]. 中国药物警戒，2021，18（7）：697-699.

[5] 林常松，郭梓，莫朝晖，等 . Nivolumab 致甲状腺功能减退症 1 例 [J]. 中南大学学报（医学版），2019，44（2）：222-224.

[6] 国家药品监督管理局 . 个例药品不良反应收集和报告指导原则 [S]. 2018：17.

[7] Idriss S，Shaikhoun M，Ramineni S，et al. A rare case of rhabdomyolysis in a patient with pembrolizumab induced hypothyroidism [J]. J Endocr Soc，2021，5（Supplement_1）：A916-A917.

[8] 崔雯锦，胡欣，韦晓，等 . 免疫检查点抑制剂诱发甲状腺功能紊乱的研究进展 [J]. 国际内分泌代谢杂志，2021，41（1）：33-37.

[9] Hickmott L，De La Peña H，Turner H，et al. Anti-PD-L1 atezolizumab-induced autoimmune diabetes：a case report and review of the literature [J]. Target Oncol，2017，12（2）：235-241.

[10] Delivanis DA，Gustafson MP，Bornschlegl S，et al. Pembrolizumab-induced thyroiditis：comprehensive clinical review and insights into underlying involved mechanisms [J]. J Clin Endocrinol Metab，2017，102（8）：2770-2780.

[11] Chalan P，Di Dalmazi G，Pani F，et al. Thyroid dysfunctions secondary to cancer immunotherapy [J]. J Endocrinol Invest，2018，41（6）：625-638.

[12] Chang LS，Barroso-Sousa R，Tolaney SM，et al. Endocrine toxicity of cancer immunotherapy targeting immune checkpoints [J]. Endocr Rev，2019，40（1）：17-65.

[13] 谢同济，王守正，邢镨元 . 解析 PD-1/PD-L1 抑制剂分子结构差异与不良反应的相关性 [J]. 中国肺癌杂志，2020，23（7）：603-608.

[14] Barroso-Sousa R，Barry WT，Garrido-Castro AC，et al. Incidence of endocrine dysfunction following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（2）：173-182.

[15] 秦叔逵，马军，李进，等 . 卡瑞利珠单抗致反应性皮肤毛细血管增生症临床诊治专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志，2020，25（9）：840-848.

[16] Song W，Wang H，Tian Y，et al. Refractory solitary cervical lymph node metastasis after esophageal squamous cell carcinoma surgery and its successful treatment with immune checkpoint inhibitor：a case report and literature review [J]. Medicine，2020，99（10）：e19440.

[17] 魏芬芬，相丽，宋耕，等 . PD-1 单抗引起甲状腺功能异常的发生情况及相关因素研究 [J]. 临床肿瘤学杂志，2020，25（10）：930-934.

[18] 李崇映，杨建梅，余昉，等 . 免疫检查点抑制剂引起甲状腺功能减退的网状 meta 分析 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（18）：2269-2276.

[19] Arima H，Iwama S，Inaba H，et al. Management of immune-related adverse events in endocrine organs induced by immune checkpoint inhibitors：clinical guidelines of the Japan Endocrine Society [J]. Endocr J，2019，66（7）：581-586.

[20] Thompson JA，Schneider BJ，Brahmer J，et al. Management of immunotherapy-related toxicities，Version 1.2019 [J]. J Natl Compr Canc Netw，2019，17（3）：255-289.

（收稿日期：2023-02-10；修回日期：2023-04-17）

心力衰竭伴低钠血症患者使用托伐普坦致肝性脑病 1 例

郑晓圆[1]，谢芬[1]，过晶[2]，高秋芳[1]，李霞[1]，丁永娟[1*]（江南大学附属医院，1.药学部，2.心血管内科，江苏　无锡　214000）

关键词：心力衰竭；低钠血症；托伐普坦；肝性脑病
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2537-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.050

1　病例资料

患者，女性，88 岁，身高 162 cm，体重 64 kg，体重指数（BMI）24.39 kg • m^{-2}，20 年前因“Ⅲ度房室传导阻滞”植入心室抑制型（VVI）单腔起搏器，11 年前行心脏起搏器更换术，2 年前因胸闷气急就诊，诊断为：心功能Ⅱ级（NYHA 分级）。有高血压病史，近期服用小剂量沙库巴曲缬沙坦钠片降压协同改善心功能；有房颤病史，长期服用琥珀酸美托洛尔缓释片、地高辛治疗，未正规抗凝治疗；有白细胞、血小板减少症，长期间断服用利可君片治疗。有乙型肝炎病毒感染史；否认糖尿病、冠心病病史；有盆腔肿瘤术后病史；有青霉素、链霉素、先锋霉素、阿奇霉素过敏史。此次因 5 日前受凉后身体水肿开始加重，伴气喘、少尿、咳嗽咳黄黏痰前来就诊，急诊拟“急性心力衰竭”收住入院。

体格检查：体温 36.4 ℃，心率 60 次 • min^{-1}，心律不齐，呼吸 23 次 • min^{-1}，血压 108/46 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。双侧胸廓对称、无畸形，双肺呼吸音低，可闻及湿性啰音，伴呼气相哮鸣音，心界向左扩大，第一心音强弱不等，剑突下可闻及 4/6 级收缩期杂音，腹部软，全腹无压痛及反跳痛，全身水肿，下肢明显。

血常规：白细胞计数（WBC）3.59×10^{9} • L^{-1}，中性粒细胞比例（N%）76.1%↑，红细胞（RBC）3.73×10^{12} • L^{-1}↓，血红蛋白（Hb）111 g • L^{-1}，血小板计数（PLT）85×10^{9} • L^{-1}↓，C-反应蛋白（CRP）13.8 mg • L^{-1}↑；肝功能：总胆红素（TBIL）89.6 mmol • L^{-1}↑，白蛋白（ALB）31.7 g • L^{-1}↓，谷丙转氨酶（ALT）14 U • L^{-1}，谷草转氨酶（AST）28 U • L^{-1}，乙肝病毒抗原：阴性；肾功能：尿素氮（BUN）20.14 mmol • L^{-1}↑，肌酐（Cr）183 μmol • L^{-1}↑，尿酸（UA）505 μmol • L^{-1}↑；凝血功能：国际标准化比值（INR）1.38，D-二聚体（D-D）3.62 mg • L^{-1}↑，纤维蛋白（原）降解产物（FDP）10.6 μg • mL^{-1}↑；心功能：*N*-末端 B 型脑利钠肽前体（NT-pro BNP）1036 pg • mL^{-1}↑；电解质：血钾（K^{+}）5.64 mmol • L^{-1}↑，血钠（Na^{+}）128 mmol • L^{-1}↓，血氯（Cl^{-}）90.6 mmol • L^{-1}↓，血钙（Ca^{2+}）2.02 mmol • L^{-1}；心电图示起搏心律，VVI 模式；胸部 CT 示心影大，两侧胸水，右侧斜裂局部包裹，两肺散在索条影，右肺中叶局部肺不张；下腔静脉增宽，腹腔少量积液；两侧肩背部皮下水肿。

入院诊断：急性心力衰竭，心功能Ⅲ级（NYHA 分级），VVI 起搏器术后，持续性心房颤动，呼吸道感染，胸腔积液，肾功能不全，肝功能不全，高钾血症，低钠血症，白细胞减少症，血小板减少症，低蛋白血症。

2　诊疗过程

入院后给予注射用美罗培南 0.5 g ＋ 0.9% 氯化钠注射液 50 mL ivgtt q8h 抗感染治疗；利可君片 20 mg po tid 升白细胞；尿毒清颗粒 5 g po qid 联合复方 *α*-酮酸片 2.52 g po tid 改善肾功能；在心电监护下给予呋塞米片 20 mg po bid 长期治疗，并间断给予呋塞米注射液 20 ～ 100 mg iv 强化利尿；入院后持续给予盐酸多巴胺注射液 100 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 微泵注射，血压维持在 85 ～ 95/55 ～ 60 mmHg；治疗后全身浮肿有所缓解，但是腰背部浮肿仍明显，考虑患者白蛋白水平偏低，住院期间间断输注人血白蛋白 10 g 以改善胶体渗透压。入院第 8 日，考虑患者心率偏快，影响心室充盈，不利于纠正心力衰竭，将盐酸多巴胺注射液改为重酒石酸去甲肾上腺素注射液 10 mg ＋

基金项目：无锡市科技发展计划医疗卫生项目（No. N20202028）。
作者简介：郑晓圆，女，硕士，主要从事临床药学工作，email：541036810@qq.com　*__通信作者__：丁永娟，女，硕士，主任药师，主要从事医院药学与药事管理工作，email：2649570095@qq.com

0.9% 氯化钠注射液 50 mL 微泵注射维持血压。入院 21 日，患者水肿较前进展，复查电解质：Na^+ 130.1 mmol • L^{-1}↓、Mg^{2+} 0.91 mmol • L^{-1}、K^+ 3.46 mmol • L^{-1}↓、Cl^- 88.6 mmol • L^{-1}↓，肝功能：TBIL 54.0 mmol • L^{-1}↑。考虑患者心力衰竭终末期，传统利尿剂效果不佳，可能存在利尿剂抵抗，且患者合并低血钠，故加予托伐普坦片（浙江大冢制药有限公司，批号：200105S）起始剂量 7.5 mg po qd 治疗。服用托伐普坦 3 d，患者出现嗜睡，懒言语，查体不配合，24 h 尿量 900 mL，复查电解质：Na^+ 129.2 mmol • L^{-1}↓、K^+ 4.26 mmol • L^{-1}、Cl^- 88.9 mmol • L^{-1}↓。考虑保钠利尿效果不明显，予托伐普坦加量至 15 mg po qd 治疗。5 d 后患者出现呼之不应的精神症状，无扑翼样震颤，复查电解质：Na^+ 134.3 mmol • L^{-1}↓，K^+ 4.08 mmol • L^{-1}，肝功能：TBIL 76.4 mmol • L^{-1}↑。临床药师查阅托伐普坦相关资料，考虑该患者意识改变可能是由于服用托伐普坦导致的，故告知临床医师，急查血氨 223.00 μmol • L^{-1}↑，结合该患者既往 CT 提示门静脉增宽，提示肝性脑病。故停用托伐普坦，限制蛋白摄入，予乳果糖口服液 15 mL po tid 联合注射用门冬氨酸鸟氨酸 10 g ＋ 5% 葡萄糖注射液 250 mL ivgtt qd 降血氨对症治疗，并给予注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸 0.5 g iv bid 联合熊去氧胆酸胶囊 0.25 g po bid 护肝治疗。停药并对症处理 2 d，患者开始神志转清，对答切题，血氨 52 μmol • L^{-1}，下降至正常水平，患者未再出现以上精神症状。后期治疗后，患者感染得以控制，心力衰竭症状、肝肾功能有所好转，准予出院休养。

3 分析与讨论

3.1 肝性脑病的精神症状与托伐普坦关联性

该患者使用托伐普坦后出现了一系列精神症状，诊断为肝性脑病。首先，托伐普坦常见不良反应有口干、口渴、血钠升高、头晕、尿频等；重要不良反应有肾衰竭、血栓性疾病、高钠血症、肝损伤、肝性脑病等，故肝性脑病符合该药物已知的不良反应；患者服用托伐普坦 3 d，出现嗜睡、意识改变等症状，服药 5 d，精神症状加重，血氨升高，诊断为肝性脑病。停药并予对症处理 2 d 后，患者呼之不应的精神症状消失；该患者入院时胆红素明显升高，既往 CT 提示门静脉增宽，有感染乙型肝炎病毒史，且合并起搏器综合征——右心力衰竭，容易肝淤血，虽然未明确诊断肝硬化，但存在肝功能不全，是肝性脑病发生的基础。入院后持续使用呋塞米注射液利尿，虽然对于严重肝功能不全患者在使用传统利尿剂过程中也会出现肝性脑病 [1]，但住院前期未出现该症状，与使用托伐普坦有更强的时间关联性，采用诺氏（Naranjo）评估量表法评分为 5 分（见表 1），即该患者很可能是使用托伐普坦导致了肝性脑病的发生。

表 1 托伐普坦导致肝性脑病的诺氏不良反应评估量表

序号	相关问题	得分情况			记分
		是	否	未知	
1	该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
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	0
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
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
9	患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应	＋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					5

注：总分值≥ 9 分，表明药物与不良反应的因果关系为肯定；5 ～ 8 分为很可能有关；1 ～ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑的。

3.2 托伐普坦在临床应用中的利与弊

心力衰竭是大多数心血管疾病患者的终末阶段，水钠潴留伴随呼吸困难导致终末期心力衰竭患者反复住院，增加了巨大的医疗成本支出，该类患者的容量管理目前仍是临床面临的难点问题 [2-4]。因低钠血症与心力衰竭患者的不良预后独立相关，包括住院时间延长、病死率高以及心力衰竭再入院率高等 [5]，故合并低钠血症的心力衰竭患者的容量管理，面临更大的挑战。传统利尿剂会导致电解质包括 Na^+、K^+ 等的丢失，引

起电解质紊乱，且对于终末期心力衰竭患者容易存在利尿剂抵抗（见表 2），如果患者本身存在低钠血症、低蛋白血症，更容易出现利尿剂抵抗[6]。托伐普坦是一种新型利尿剂，可选择性地作用于肾脏血管加压素 V_2 受体，拮抗抗利尿激素与之结合，从而抑制了肾脏集合管对水的重吸收，促进尿液排泄，起到利水不利钠的作用，且托伐普坦不依赖于白蛋白发挥作用，目前临床上用于低钠血症和心力衰竭引起的体液潴留[7]。EVEREST 研究[8]表明，急性心力衰竭患者短期内（7 d）使用托伐普坦，能够升高血钠、减轻体重、缓解患者呼吸困难症状。对于终末期心力衰竭患者，常伴随肾功能受损，易出现利尿剂抵抗现象，即使增加袢利尿剂的用量，也无法达到预期的利尿效果，且大剂量利尿剂往往会加重肾脏的损害，而托伐普坦对肾功能影响小，肾功能轻度受损亦可以使用[9]。

表 2　托伐普坦与传统利尿剂（呋塞米）的对比

内容	袢利尿剂（呋塞米）	托伐普坦
作用机制及优势	作用于肾脏髓袢升支粗段，选择性阻断 Na-K-2Cl 共同转运载体，有强大的利尿作用	作用于肾脏集合管，选择性阻断集合管的血管加压素 V2 受体，利水不利钠，不会引起电解质丢失，不依赖白蛋白发挥作用
适应证	水肿性疾病包括充血性心力衰竭、肝硬化、肾脏疾病等；高血压；预防急性肾衰竭；高钾血症及高钙血症；稀释性低钠血症；抗利尿激素分泌过多症（SIADH）；急性药物毒物中毒	低钠血症（包括心力衰竭、肝硬化以及抗利尿激素分泌异常综合征）；心力衰竭引起的体液潴留
使用局限	容易存在利尿剂抵抗，对于肾功能不全的患者更易发生；容易引起电解质紊乱如低钾血症	升 Na 速度不宜过快，需在能监测电解质的医疗机构小剂量起始服用；存在肝毒性，使用疗程不超过 30 d；低容量性低钠血症、急性或严重症状性低钠血症不适用；该药通过 CYP3A4 代谢，也是 P- 糖蛋白的底物，与诸多药物存在相互作用
黑框警告	强效利尿剂可引起电解质紊乱，脱水，血容量不足，用药期间需严密监测	仅可在严密监测血清钠的医院起始使用；过快纠正低钠血症可能会引起渗透性脱髓鞘反应；存在严重肝损伤甚至肝移植的风险
不良反应	电解质紊乱的一系列症状；尿潴留；急性肾损伤；耳毒性；高尿酸血症；过敏，低血压等	高钠血症；肝损伤；肝性脑病；血栓性疾病；肾损伤，低血压，高尿酸血症等

相比传统利尿剂，托伐普坦的临床使用经验不足，对于该药物可能引起的严重不良反应及其使用局限，需引起医务人员的重视。该药品上市后有用于肝硬化导致的低钠血症伴腹水的适应证，目前国内的药品说明书也保留了此适应证。但是，2013 年 FDA 去除托伐普坦用于肝硬化患者的适应证，且增加黑框警告：该药物存在严重肝损伤风险，使用之前以及使用期间应该密切监测转氨酶和胆红素，如怀疑肝损伤或者肝损伤恶化，应立刻停用该药物。上述病例中，患者曾有乙型病毒肝炎感染史，既往 CT 提示肝门静脉增宽，合并顽固的低蛋白血症和血小板减少症，入院时查肝功能，胆红素高于 3 倍上限，虽然未明确诊断肝硬化，但是存在肝功能不全，应谨慎使用托伐普坦。START 研究[10]显示，在肝硬化患者中应用托伐普坦，肝性脑病的发生率约为 2.3%。Sakaida 等[11]报道了使用托伐普坦导致肝性脑病的发生率为 4.9%。该患者出现肝性脑病的可能原因：首先，该患者本身存在慢性肝功能不全，对蛋白质食物的耐受性差，蛋白在肠道被细菌分解，产生大量的氨，易发生肝性脑病；其次，托伐普坦使用 5 d 后，患者胆红素较前升高，进一步加重了肝功能的损害，并诱导了肝性脑病的发生；而且，该患者合并肾功能不全，加之前期持续利尿有可能存在血容量不足，诱发肾前性氮质血症，导致血氨升高，诱发了肝性脑病的发生[12]。综上，对于肝功能不全的患者，托伐普坦不适用或需慎用，且在使用过程中，应密切监测肝功能。

除此以外，该药物临床使用存在其他的局限性：① 研究表明，托伐普坦不适用于低容量性低钠血症、急性或严重症状性低钠血症，说明书中亦明确规定，低容量性低钠血症患者应禁用本品[13]；② 在慢性严重低钠血症中，过快纠正低钠血症（例如每 24 h 超过 12 mEq·L^{-1}）会导致渗透性脱髓鞘反应，表现为语言障碍、缄默症、情感变化、痉挛性四肢瘫痪、癫痫发作、甚至昏迷和 / 或死亡，故本品应从小剂量开始服用，且开始服用后至少 12 h 内，应监测一次血清 Na^+ 水平，次日起一周内，应每日监测血清 Na^+ 水平；③ 说明书中虽提示，中重度肾功能不全不需调整剂量，但 K-STAR 研究发现，肾功能轻度减退

患者，托伐普坦联合呋塞米较呋塞米加倍，能达到更好的利尿效果，但是严重肾功能受损时，例如血肌酐浓度＞ 221 μmol • L^{-1} 或者估算肾小球滤过率（eGFR）＜ 20 mL • min^{-1} 时，托伐普坦的作用减弱，不推荐使用[14]，该患者 eGFR 约为 16.52 mL • min^{-1}，使用效果欠佳；④ 该药物主要通过肝脏代谢酶 CYP3A4 代谢，也是 P- 糖蛋白的底物，故在应用过程中应避免合并使用强效 CYP3A4 抑制剂（如克拉霉素等）和 P- 糖蛋白抑制剂（如环孢素）等。

4 总结与体会

本病例为急性心力衰竭伴肝、肾功能不全的患者，入院后一直合并低钠血症且全身水肿难纠正，使用托伐普坦后导致肝性脑病发生的一个病例。该病例有很好的临床警示作用：托伐普坦适用于正常容量或者高容量性低钠血症的心力衰竭患者，短期使用，可以升高血清 Na^+ 水平，改善心力衰竭患者液体潴留、呼吸困难的症状；但是，该药物可能会导致严重的肝损伤，故在使用时，应严密监测肝功能；因严重肝功能不全的患者，可能诱发肝性脑病的发生，严重肾功能不全的患者使用效果不佳，故不推荐用于严重的肝肾功能不全患者；在使用过程中应控制血清 Na^+ 升高的速度，严密监测血清 Na^+ 水平，避免渗透性脱髓鞘反应的发生。

参考文献

[1] Wijdicks EF. Hepatic encephalopathy [J]. N Engl J Med，2016，375（17）：1660-1670.

[2] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global，regional，and national incidence，prevalence，and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries，1990 － 2016：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet，2017，390（10100）：1211-1259.

[3] Hao G，Wang X，Chen Z，et al. China hypertension survey investigators. prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China：the China hypertension survey，2012—2015 [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（11）：1329-1337.

[4] Taylor CJ，Ryan R，Nichols L，et al. Survival following a diagnosis of heart failure in primary care [J]. Fam Pract，2017，34（2）：161-168.

[5] Spasovski G，Vanholder R，Allolio B，et al. Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of hyponatraemia [J]. Intensive Care Med，2014，40（3）：320-331.

[6] 中国医师协会心力衰竭专业委员会，中华心力衰竭和心肌病杂志编辑委员会 . 心力衰竭容量管理中国专家建议 [J]. 中华心力衰竭和心肌病杂志（中英文），2018，2（1）：8-16.

[7] Rosner MH. Hyponatremia in heart failure：the role of arginine vasopressin and diuretics [J]. Cardiovasc Drugs Ther，2009，23（4）：307-315.

[8] Hauptman PJ，Burnett J，Gheorghiade M，et al. Clinical course of patients with hyponatremia and decompensated systolic heart failure and the effect of vasopressin receptor antagonism with tolvaptan [J]. J Card Fail，2013，19（6）：390-397.

[9] 陈少萍 . 托伐普坦在心力衰竭容量超负荷中的应用进展 [J]. 中国临床医学，2021，28（6）：1064-1068.

[10] Sakaida I，Terai S，Kurosaki M，et al. Real-world effectiveness and safety of tolvaptan in liver cirrhosis patients with hepatic edema：results from a post-marketing surveillance study（START study）[J]. J Gastroenterol，2020，55（8）：800-810.

[11] Sakaida I，Kawazoe S，Kajimura K，et al；ASCITES-DOUBLEBLIND Study Group. Tolvaptan for improvement of hepatic edema：a phase 3，multicenter，randomized，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Hepatol Res，2014，44（1）：73-82.

[12] 邢卉春 . 肝性脑病诊断治疗专家共识 [J]. 中国肝脏病杂志（电子版），2009，1（2）：46-55.

[13] Verbalis J，Goldsmith SR，Greenberg A，et al. Diagnosis，evaluation，and treatment of hyponatremia：expert panel recommendations [J]. Am J Med，2013，126（10 Suppl 1）：S1-S42.

[14] Tominaga N，Kida K，Inomata T，et al. Effects of tolvaptan addition to furosemide in normo-and hyponatremia patients with heart failure and chronic kidney disease stages G3b-5：a subanalysis of the K-STAR study [J]. Am J Nephrol，2017，46（5）：417-426.

（收稿日期：2023-05-04；修回日期：2023-05-29）

1 例糖皮质激素致肾病综合征患儿颅内深静脉血栓的案例分析

周敬强[1]，韩旭[3]，方玉婷[2*]（1. 淮南市妇幼保健院药剂科，安徽　淮南　232000；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）

关键词：糖皮质激素；颅内深静脉血栓；不良反应；药学监护
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)09-2541-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.051

肾病综合征（nephrotic syndrome，NS）是儿童常见的肾小球疾病，主要临床表现有水肿、大量蛋白尿、低蛋白血症和血尿。糖皮质激素（glucocorticoid，GC）是儿童 NS 的主要治疗药物，常见的不良反应有皮肤变薄、高血压、消化性溃疡、白内障、青光眼以及皮质功能亢进综合征等，但儿童颅内深静脉血栓（deep cerebral venous thrombosis，DCVT）[1-2] 不良反应的相关报道较少。DCVT 的临床表现多种多样，包括进行性头痛、恶心、呕吐、抽搐、意识障碍等，因其缺乏特异性而不易与其他常见疾病（如脑膜炎）区别，常常会被漏诊或误诊 [3]。本文中笔者就 1 例 NS 患儿在使用 GC 时出现的 DCVT 进行全面分析，以期为临床提供参考。

1　病例摘要

患儿，男，9 岁，身高 141 cm，体重 34 kg，因“确诊肾病综合征 1 月余，再发颜面部水肿 2 d”于 2022 年 3 月 15 日入院。既往有肾病综合征治疗史；否认食物、药物过敏史。入院查体：血压 102/62 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），神清，双眼睑及颜面部水肿，双下肢及双上肢凹陷性水肿。辅助检查：总胆固醇 6.44 mmol • L^{-1}↑，肌酐 62 μmol • L^{-1}，总蛋白 57.1 g • L^{-1}↑，白蛋白 39.3 g • L^{-1}，球蛋白 17.8 g • L^{-1}↓，尿微量白蛋白 57.40 mg • L^{-1}↑。入院诊断：NS。

诊疗经过：患儿 1 个月前确诊 NS，现再发颜面部水肿 2 d，近日复查尿蛋白＋＋＋，血白蛋白＜25 g • L^{-1}。2022 年 2 月 15 日至 3 月 15 日患儿足量激素治疗一度尿蛋白转阴，但调整泼尼松为 11 片晨起顿服，尿蛋白复阳，结合既往诊断及临床提示：激素肾病综合征高剂量激素依赖，考虑为难治性 NS。入院后予完善相关检查，拟行肾穿刺检查。住院后先予葡萄糖注射液 50 mL ＋甲泼尼龙琥珀酸钠（天津金耀药业，每瓶 40 mg，批号 220301D）48 mg qd 抗炎，利尿剂（氢氯噻嗪和螺内酯）利尿消肿，辛伐他汀降脂，低分子肝素钙抗凝等处理。原拟于 4 月 1 日行肾穿刺，术前常规停低分子肝素钙，检查示：D- 二聚体 7.57 μg • mL^{-1}↑，血浆纤维蛋白原 4.74 g • L^{-1}，纤维蛋白（原）降解产物 19.7 μg • mL^{-1}↑，总胆固醇（TC）7.73 mmol • L^{-1}↑，三酰甘油（TG）2.77 mmol • L^{-1}↑，低密度脂蛋白胆固醇 3.83 mmol • L^{-1}↑，极低密度脂蛋白胆固醇 1.99 mmol • L^{-1}↑，提示患者血液处于高凝状态。患儿于 4 月 1 日诉头痛显著、干呕，遂暂停肾穿刺。测眼压左侧 49 mmHg、右侧 44 mmHg，提示眼压明显升高，后行头颅 MRI 平扫增强及头颅 MRV ＋增强阅片，提示上矢状窦、大脑大静脉、直窦汇多发静脉血栓形成（见图 1）。予甘露醇降颅压，低分子肝素钙 3000 U q12h 抗凝，激素减量至甲强龙 25 mg，并加用他克莫司联合激素诱导缓解，减少激素负荷量。治疗后患儿生命体征平稳，头痛消失，眼压恢复正常，尿蛋白转阴，复查他克莫司质量浓度正常（6.3 ng • mL^{-1}），予以出院。

出院诊断：颅内 DCVT、NS（难治性）、双高眼压症。

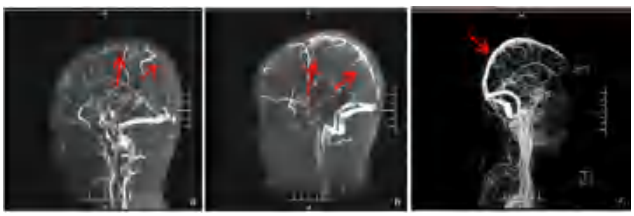


图 1　头颅 MRI 平扫增强及头颅 MRV ＋增强
a. 4 月 1 日治疗前颅脑上矢状窦、左侧横窦、左侧乙状窦及颈静脉球多发静脉血栓形成；b. 4 月 12 日给予激素减量，低分子肝素钙抗凝规范治疗后，双侧横窦及乙状窦充盈较好；c. 病情稳定后，低分子肝素钙改为利伐沙班序贯治疗后，上矢状窦、下矢状窦、直窦、窦汇双侧横窦及乙状窦充盈良好。

2　分析与讨论

2.1　不良反应关联性评价

2.1.1　患儿 DCVT 与 NS 的相关性分析　患者因

基金项目：2020 年高等学校省级质量工程项目（No.2020jyxm2312）。
作者简介：周敬强，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：fourson@qq.com　*通信作者：方玉婷，女，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：29144389@qq.com

口服剂量调整（11 片，qd）不足 2 周，且入院前也大剂量服用醋酸泼尼松（早 4 片，中 3 片，晚 4 片）一月余，而再次住院。入院后检查血小板计数：$132\times10^9\cdot L^{-1}$，总蛋白：41.3 g·$L^{-1}$，白蛋白 21.5 g·$L^{-1}$，球蛋白 19.8 g·$L^{-1}$，尿液总蛋白 / 尿液肌酐：8.753 g·$g^{-1}$，尿液总蛋白 17525 mg·$L^{-1}$。患者静脉滴注甲泼尼龙琥珀酸钠（48 mg·$d^{-1}$，3 d）重新诱导，后口服醋酸泼尼松片（40 mg·d^{-1}，2 d），再次检查血常规：血小板计数 $204\times10^9\cdot L^{-1}$，总蛋白 52.3 g·$L^{-1}$，白蛋白 28.9 g·$L^{-1}$，球蛋白 23.4 g·$L^{-1}$；尿液总蛋白 / 尿液肌酐：2.204 g·$g^{-1}$，尿液总蛋白 2775 mg·$L^{-1}$。对比两次住院情况的各项指标，可以看出患儿经过激素的大剂量应用，病情逐渐转归。患者白蛋白升高，尿液总蛋白 / 尿液肌酐降低，提示患者 NS 在好转，同时患儿血小板在正常范围，因此考虑 DCVT 与原发病 NS 相关性小。

2.1.2 该患儿 DCVT 的形成与药物的相关性分析 患儿住院期间，同时口服维生素 D 钙咀嚼片、骨化三醇胶囊、辛伐他汀片、L 谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒、氢氯噻嗪片、螺内酯片和醋酸泼尼松片，以及静脉注射甲泼尼龙琥珀酸钠。查阅相关文献和药品说明书，除了利尿剂和甲泼尼龙琥珀酸钠，其他药物发生 DCVT 的可能性基本可以排除。患儿因面部水肿，于 3 月 28 日服用氢氯噻嗪片（25 mg bid）和螺内酯片（20 mg bid），后因水肿减轻，减少利尿剂频次（bid 减至 qd）。在服药期间检测患儿尿量变化（3 月 28 日至 4 月 1 日， 尿 量 1240 mL、2500 mL、1760 mL、2390 mL、1580 mL），均在正常范围内，从临床表现来看，患儿水肿消退，患儿利尿剂剂量不大（氢氯噻嗪、螺内酯每日未达到 2 mg·kg^{-1}）且根据利尿情况进行了减量，患儿在使用利尿剂期间尿量在正常范围内，且患儿未出现眼窝凹陷等脱水情况，故利尿药引起 DCVT 可能小。应用《药品不良反应报告和监测管理办法》推荐的方法进行评估，因甲泼尼龙琥珀酸钠与不良反应发生时间关系密切，有药品说明书及文献报道血栓性事件佐证，认为该药物与不良反应的关联性为“很可能”。应用 Naranjo 评估量表进行评估达到 5 分（见表 1），考虑该患儿发生 DCVT 与 GC 关系为极有可能。

药师认为 GC 引发血液呈高凝状态，继而导致 DCVT 形成。且查阅大量文献资料后 [4-5]，药师发现国外也有 2 例关于儿童 NS 使用 GC 引发的 DCVT 的案例 [4]。

表 1 Naranjo 评分标准 [5] 及评分结果

相关问题	Naranjo 评分			GC 得分
	是	否	不知	
以前是否有关于此种不良反应确定的研究报告	＋1	0	0	＋1
此种不良反应是否发生于用药之后	＋2	－1	0	＋2
当停药或给予拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
有无其他原因（此药物以外）可以引起同样的不良反应	－1	＋2	0	－1
如给予安慰剂，此项不良反应是否会再度发生	－1	＋1	0	0
此药物在血液或其他体液中是否达到中毒剂量	＋1	0	0	0（否）
对于此患者，药物剂量与不良反应的程度是否成正向关系	＋1	0	0	＋1
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（否）
是否存在客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分值				5

注：总分值≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能；≤ 0 为可疑。

2.2 不良反应发生机制分析

DCVT 是指大脑内静脉、Rosenthal 基底静脉、Galen 静脉及侧支的血栓形成 [6]。多种诱发因素可导致 DCVT，如遗传性血栓栓塞病史、脱水、药物、妊娠、恶性肿瘤和自身免疫性疾病等 [7-8]。有研究表明 [9]，血栓形成的主要原因是 NS 患儿血液存在高凝状态。大剂量 GC 会导致高脂血症形成，而高脂血症会导致血栓的形成，血脂特别是富含有 TC 的脂蛋白水平与血液中的主要促凝物质，如组织纤溶酶原激活物（tPA）、血浆纤溶酶原激活物抑制物（PAI）、FIB 和Ⅴ Ⅱ因子的激活密切相关 [10]。Glueck 等 [11] 认为应用 GC 后血液中 tPA 活性降低，而 PAI 活性增高，使纤溶活性降低。此外，GC 可引起血浆 TG 水平升高，增加 PAI，减少 tPA，并通过抑制网状内皮系统，降低了网状内皮细胞的纤维蛋白溶解酶活性，造成血液高凝、低纤溶状态。患儿发病前期大剂量使用甲泼尼龙，导致 TG 明显升高，考虑 GC 造成血液高凝状态导致 DCVT。综

上所述，本例患儿导致 DCVT 的可能机制与其使用过量 GC 导致血液呈高凝状态有关。

2.3 不良反应处理效果评价

DCVT 一旦确诊，应积极给予抗凝治疗，并辅以降颅压和镇静治疗。有研究表明，在儿童中，在没有颅内出血的前提下，抗凝是首选的治疗方法 [12-13]。该患儿在常规治疗 2 周病情稳定后，改用口服利伐沙班序贯治疗。目前抗凝治疗在儿童 DCVT 中的研究较少，国际指南推荐 DCVT 急性期使用肝素或低分子肝素，急性期后改为华法林口服，但华法林在治疗过程中需要密切检测国际标准化比值（INR），而利伐沙班作为直接Ⅹa因子抑制剂以及凝血酶抑制剂成为新的治疗选择 [14-15]。利伐沙班说明书中虽然没有推荐用于 0 ～ 18 岁的儿童，但文献 [16-17] 提到对于儿童静脉血栓栓塞患者，推荐使用维生素 K 拮抗剂（VKA）、肝素或利伐沙班作为单药治疗，且通过是对静脉血栓栓塞患儿根据体重调节利伐沙班的方案与使用肝素和 VKA 标准抗凝方案的疗效和安全性进行对比，发现患儿利伐沙班 20 mg 当量剂量，并根据体重给予每日 1 次、2 次或 3 次（体重为≥ 30 kg 的儿童每日 1 次，体重为 12 ～ 30 kg 的儿童每日 2 次，体重为＜ 12 kg 的儿童每日 3 次），利伐沙班在治疗静脉血栓栓塞复发和临床相关出血风险同样较低。

利伐沙班为医师提供了一种治疗患儿的选择。以片剂或混悬剂的形式口服利伐沙班，不需要实验室监测或调整剂量，避免了频繁抽血和皮下注射带来的不便。

3　小结

通过对以上病例的分析，我们认识到 GC 对于儿童 NS 的治疗非常重要，但也要关注到 GC 所带来的不良反应。对于儿童患者，在使用 GC 治疗过程中，告知患儿家属如果发生头痛、头晕、呕吐现象，应立即向医师或临床药师反映，并及时监护有无 DCVT 的情况。本文旨在提醒临床医务工作者提高对 DCVT 的认识，尤其在 NS 状态，需要常规停用抗凝剂的情况下做肾脏穿刺时，要实时监测患儿的凝血指标，警惕其血液高凝状态。作为临床药师，在参与临床药物治疗的基础上，要协助临床医师进行药物疗效与不良反应的监护，同时向患者提供合理的用药咨询，积极发挥自身优势，与医师并肩作战。

参考文献

[1] 周建，钟旺旺，陈五研，等 . 颅内深静脉血栓形成的临床诊治 [J]. 中国临床解剖学杂志，2020，38（5）：523-527.

[2] 赵利，杨清成 . 颅内深静脉血栓形成的临床特点 [J]. 中国实用神经疾病杂志，2008，11（9）：83-84.

[3] Kumar P，Sasmal G，Mahto SK，et al. Deep cerebral vein thrombosis：a clinical masquerader [J]. J Clin Diag Res，2017，11（4）：OD16-OD18.

[4] Kerlin BA，Blatt NB，Fuh B，et al. Epidemiology and risk factors for thromboembolic complications of childhood nephrotic syndrome：a Midwest Pediatric Nephrology Consortium（MWPNC）study [J]. J Pediatr，2009，155（1）：105-110.

[5] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30（2）：239-245.

[6] Ferro JM，Canhão P，Stam J，et al. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis：results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis（ISCVT）[J]. Stroke，2004，35（3）：664-670.

[7] Schaller B，Graf R. Cerebral venous infarction：the pathophysiological concept [J]. Cerebrovasc Dis，2004，18（3）：179-188.

[8] Coutinho JM，Stam J，Canhao P，et al. Cerebral venous thrombosis in the absence of headache [J]. Stroke，2015，46（1）：245-247.

[9] 张莹，夏正坤 . 儿童原发性肾病综合征并发高凝状态与血栓栓塞的机制 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2012，21（1）：64-67.

[10] Glueck CJ，Freiberg R，Glueck HI，et al. Idiopathic osteonecrosis，hypofibrinolysis，high plasminogen activator inhibitor，high lipoprotein（a），and therapy with stanozolol [J]. Am J Hematol，1995，48（4）：213-220.

[11] Glueck CJ，Freiberg R，Tracy T，et al. Thrombophilia and hypofibrinolysis：pathophysiologies of osteonecrosis [J]. Clin Orthop Relat Res，1997（334）：43-56.

[12] 曹益瑞，吴波 .《中国颅内静脉系统血栓形成诊断和治疗指南 2015》解读 [J]. 中国现代神经疾病杂志，2016，16（11）：741-744.

[13] Jaffray J，Young G. Deep vein thrombosis in pediatric patients [J]. Pediatr Blood Cancer，2018，65（3）：e26881.

[14] 中国颅内静脉系统血栓形成诊断和治疗指南 [J]. 中华神经科杂志，2012，45（11）：818-823.

[15] Wasay M，Bakshi R，Kojan S，et al. Superior sagittal sinus thrombosis due to lithium：local urokinase thrombolysis treatment [J]. Neurology，2000，54（2）：532-533.

[16] 王乔宇，武明芬，柳鑫，等 . 2021 中国静脉血栓栓塞症防治抗凝药物的选用与药学监护指南 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（21）：2999-3016.

[17] Cohen O，Levy-Mendelovich S，Ageno W. Rivaroxaban for the treatment of venous thromboembolism in pediatric patients [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther，2020，18（11）：733-741.

（收稿日期：2022-12-10；修回日期：2023-02-14）

冠心病患者使用质子泵抑制剂致皮肤损害 1 例

高超，吴佳芸，吴超勇，汤献文*（北京中医药大学深圳医院（龙岗）心内科，广东 深圳 518172）

关键词：冠心病；质子泵抑制剂；皮肤损害
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2023)09-2544-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.09.052

急性冠状动脉综合征（acute coronary syndrome，ACS）是以冠状动脉粥样硬化斑块破裂或侵袭，继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组临床综合征，指南推荐 ACS 患者接受至少 12 个月的双联抗血小板治疗[1-2]，但是抗血小板药物有损伤消化道，导致消化道出血的不良反应，所以目前指南推荐在权衡心血管获益和消化道出血风险的基础上，对于消化道出血高风险患者，建议在长期双重抗血小板治疗基础上联用质子泵抑制剂（proton pump inhibitor，PPI）[3]。PPI 可抑制基础胃酸和由刺激引起的胃酸分泌，在 ACS 患者中被常态化应用，尤其是对硫酸氢氯吡格雷削弱作用最弱的兰索拉唑和雷贝拉唑，但是随着 PPI 应用的日趋广泛，其不良反应的报道也日渐增多，本文报道 1 例老年 ACS 患者在静脉使用 PPI 后出现了多形性红斑和表皮脱落这种少见的皮肤损害。

1 病例资料

患者男性，81 岁，因黑便 2 d 于 2022 年 7 月 9 日入院，1 个月前因急性心肌梗死于右冠状动脉植入支架 1 枚，既往有高血压病史（高血压 2 级），大量吸烟史 60 余年，术后至今规律口服抗血小板药物阿司匹林肠溶片和硫酸氢氯吡格雷片，配合阿托伐他汀钙片抗动脉粥样硬化，心肌梗死后血压偏低，故已停用降压药物，本次因排黑便收入我科。入院后查血红蛋白较 1 个月前下降 4 $g \cdot L^{-1}$，便潜血阳性，考虑急性消化道出血，因患者为高龄且近期有心肌梗死病史，消化内科会诊建议暂不行消化内镜检查，立即停用所有抗血小板药物，依据指南加用 PPI 抑酸护胃[4]：注射用奥美拉唑钠（丰原制药，批号：H20063761），40 mg ivgtt tid，继续每晚口服阿托伐他汀钙片 20 mg，配合静脉营养支持药物中长链脂肪乳注射液、脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖注射液。8：30 开始静脉滴注第一组，20：00 左右患者自述皮肤瘙痒，查体见左肩背部及左上肢肘关节尺侧局部多形性红斑，呈团块状、环状（见图 1），经查阅患者目前使用药物的说明书，阿托伐他汀钙片有皮疹、荨麻疹的不良反应，中长链脂肪乳注射液有皮肤潮红的不良反应，脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖注射液有皮疹、荨麻疹的不良反应，注射用奥美拉唑钠的皮肤相关不良反应更多，如皮炎、瘙痒、皮疹、荨麻疹，罕见脱发、光敏反应，而多形性红斑、Stevens-Johson 综合征（SJS）、中毒性表皮坏死溶解症（TEN）为非常罕见的不良反应，鉴于患者本次入院前长期口服阿托伐他汀钙片，同时结合患者皮肤损害的表现，考虑由注射用奥美拉唑钠引起的可能性大，故停用，继续给予阿托伐他汀钙片和静脉营养支持药物。第二日患者皮肤多形性红斑未见加重，但便潜血仍阳性，仍有抑酸护胃药物的使用指征。第三日起改为注射用兰索拉唑（百裕制药，批号：H20143293），30 mg ivgtt bid，当日未见皮肤新发红斑。但第四日晨起患者自觉后背刺痛，合并颊黏膜口腔溃疡一处，查体见后背部分表皮剥脱，暴露皮下组织（见图 2），皮肤科会诊考虑由 PPI 引起的可能性大，诊断为 PPI 相关多形性红斑、轻症 SJS，建议立即停用 PPI，患处外用糠酸莫米松乳膏、炉甘石洗剂、银离子抗菌功能性辅料覆盖以保护皮肤剥脱面，促进表皮再生，消化内科再次会诊建议改为组胺 H_2 受体拮抗剂西咪替丁注射液继续抑酸护胃，后续观察患者未见皮损面积进一步扩大，两周后所有皮损基本愈合或消退，遗留皮损边缘干燥脱皮。

2 讨论

PPI 类药物说明书中有明确标注多种皮肤相关不良反应，包括该患者出现的多形性红斑和表皮剥脱损害，关于表皮剥脱的不良反应有 SJS 和 TEN。SJS 和 TEN 是药物引起的迟发型超敏反应，

作者简介：高超，男，主治医师，主要从事心血管相关疾病的诊治，email：gaochao413203@163.com *通信作者：汤献文，女，主任医师，主要从事心血管相关疾病的诊治，email：1647662756@qq.com

图 1　使用奥美拉唑钠后的皮损表现

图 2　使用兰索拉唑后的皮损表现

是由免疫介导的不良反应，其特征是表皮广泛坏死和脱离。超过 90% 的患者的黏膜受到影响，通常在两个或多个不同的部位（眼部、口腔和生殖器）。根据受累皮肤的体表百分比，表皮受累小于 10% 被归类为 SJS；大于 30% 或更多被归类为 TEN，受累面积在 10% ～ 30% 被视为重叠 SJS/TEN。该患者在使用注射用奥美拉唑钠出现了皮肤红斑损害，在停用之后更改为兰索拉唑，后续又出现皮肤剥脱损害，在停用兰索拉唑后皮肤损害未见继续扩大，依据药品不良反应 / 事件可能性分析 Naranjo 评估量表 [5]，该不良反应由奥美拉唑和兰索拉唑引起的概率等级为很可能（见表 1），该患者受累皮肤的体表百分比小于 10%，应属于 SJS 的范畴。

国外有相关研究显示 PPI 在美国医疗体系内的处方量排名第三 [6]。在我国 PPI 早已成为临床最为广泛使用的药物之一，有小范围调研数据

表 1　药品不良反应 / 事件可能性分析 Naranjo 评估量表

相关问题	Naranjo 评分			得分（注射用奥美拉唑钠 / 注射用兰索拉唑）
	是	否	不知	
以前是否有关于此种不良反应确定的研究报告	＋1	0	0	＋1
此种不良反应是否发生于用药之后	＋2	－1	0	＋2
当停药或给予拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
有无其他原因（此药物以外）可以引起同样的不良反应	－1	＋2	0	＋2
如给予安慰剂，此项不良反应是否会再度发生	－1	＋1	0	0
此药物在血液或其他体液中是否达到中毒剂量	＋1	0	0	0
对于此患者，药物剂量与不良反应的程度是否成正向关系	＋1	0	0	0
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
是否存在客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分值				7

注：总分值≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能；≤ 0 为可疑。

显示我国 ICU 病房 PPI 使用率高达 95.63%，但是没有指征的医嘱占比高达 77.9%[7]，在心血管疾病领域，对于接受双联抗血小板药物的 ACS 患者，PPI 的实际使用率可能远远高于《质子泵抑制剂优化应用专家共识》推荐的使用率。国内有小样本的数据调查 PPI 的不良反应，边萌等 [7] 分析了 2014—2020 年我国 6 个城市重症医学科内 PPI 药物的应用现状，结论显示 PPI 不良反应主要累及皮肤系统（30.3%），其次分别为消化系统（25.0%）、神经系统（23.7%）、呼吸系统（13.2%）、其他（7.9%）。马静 [8] 通过回顾性分析 152 例使用 PPI 产生不良反应的患者临床资料，结果显示：奥美拉唑导致的不良反应最多，为 94 例（61.8%），泮托拉唑 26 例（17.1%），兰索拉唑 32 例（21.1%），患者年龄越大，PPI 不良反应越多。本例患者使用的第二代 PPI 兰索拉唑，同第一代 PPI 奥美拉唑一样，也有相似的皮肤不良反应。关于 PPI 导致皮肤不良反应的机制，有研究表明与Ⅰ型超敏反应（IgE 介导）有关，有针对兰索拉唑的研究显示，患者皮肤损害出现的时间、临床表现、皮肤过敏试验、类胰蛋白酶升高均支持 PPI 的皮肤不良反应为Ⅰ型超敏反应，而且兰索拉唑与其他 PPI 之间还存在交叉过敏反应 [9-10]。经查阅文献，国内报道的 PPI 皮肤不良反应多为轻症 [11-14]，停用药物对症治疗后可获缓解。国外有 PPI 致 TEN 的病例报道 [15]，严重的 SJS 和 TEN 除皮肤损害外，常伴有内脏受累及全身中毒症状，且易发生眼、皮肤、肾脏等严重并发症，病死率

较高，需要临床医师详细询问过敏史，在使用PPI过程中细心观察，一旦发生可疑PPI相关的皮肤不良反应，应立即对症处理，确保用药安全。

参考文献

[1] Neumann FJ，Sousa-Uva M，Ahlsson A，et al. ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization [J]. Eur Heart J，2019，40（2）：87-165.

[2] 中华医学会心血管病学分会，中华心血管病杂志编辑委员会 . 急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南（2019）[J]. 中华心血管病杂志，2019，47（10）：766-783.

[3] 中华医学会心血管病学分会，中华心血管病杂志编辑委员会 . 急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南（2019）[J]. 中华心血管病杂志，2019，47（10）：766-783.

[4] 刘晓辉，宋景春，张进华，等 . 中国抗血栓药物相关出血诊疗规范专家共识 [J]. 解放军医学杂志，2022，47（12）：1169-1179.

[5] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30（2）：239-245.

[6] Tasaka CL，Burg C，VanOsdol SJ，et al. An interprofessional approach to reducing the overutilization of stress ulcer prophylaxis in adult medical and surgical intensive care units [J]. Ann Pharmacother，2014，48（4）：462-469.

[7] 边萌，陈淑敏，史卫忠，等 . 2014—2020年我国六城市重症医学科质子泵抑制剂用药现状调查与分析 [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（2）：32-38.

[8] 马静 . 我院2019～2020年质子泵抑制剂不良反应的病例资料分析 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（14）：225-227.

[9] Turedi O，Sozener ZC，Kendirlinan R，et al. A case of pantoprazole anaphylaxis with cross reactivity to all proton pump inhibitors：finding a safe alternative [J]. Curr Drug Saf，2017，12（3）：198-200.

[10] 张啟智，张郁葱，向大雄，等 . 质子泵抑制剂临床应用的药物利用指数评价与分析 [J]. 中南药学，2018，16（4）：548-552.

[11] 兰艳，王雨来，卢振，等 . 兰索拉唑致多形性红斑1例 [J]. 中南药学，2019，17（11）：2011-2012.

[12] 李婵娟 . 奥美拉唑致多形性红斑一例 [J]. 山西医药杂志（下半月刊），2011，40（3）：276.

[13] 赵妍，康红军，孟庆义 . 临床少见的Stevens-Johson综合征一例并相关文献复习 [J]. 临床误诊误治，2014，27（6）：11-13.

[14] 孙忠，董佃良，高晓光，等 . 奥美拉唑的不良反应 [J]. 中国医药指南，2012，10（16）：70-71.

[15] Fracaroli TS，Miranda LQ，Sodré JL，et al. Toxic epidermal necrolysis induced by lansoprazole [J]. An Bras Dermatol，2013，88（1）：117-120.

（收稿日期：2023-01-26；修回日期：2023-03-08）

《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：https://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

中南药学审稿专家

（按姓名笔画排序）

丁劲松　丁　骁　丁莉坤　丁惠萍　于世慧　于海洋　马恩龙　马健雄　马瑞娟　王　玉
王立辉　王永军　王亚平　王　成　王　刚　王启斌　王　玮　王明仲　王春江　王　珊
王　赵　王　洪　王莉宁　王　峰　王淑梅　王朝辉　王　颖　文晓柯　文　锐　方平飞
方伟进　尹　桃　尹　焯　孔令提　孔维军　邓远雄　邓桂明　邓　晟　甘　勇　左笑丛
龙勤强　卢海儒　叶喜德　申月明　田雪松　史志华　白　勇　冯宇飞　冯炜炜　冯　星
冯素香　边　原　吕永宁　朱运贵　朱志红　朱荣华　朱　虹　朱　斌　伍参荣　向大雄
刘小伟　刘艺平　刘文虎　刘文辉　刘玉峰　刘芳群　刘丽华　刘应蛟　刘　宏　刘宏飞
刘茂柏　刘　畅　刘建平　刘剑敏　刘　娜　刘艳芳　刘晓慧　刘高峰　刘海林　刘梦扬
刘　检　刘　敏　刘塔斯　刘雁鸣　刘　斌　刘新义　刘　韶　江俊麟　江翊国　汤正义
汤海峰　许　喆　孙万阳　孙丙军　孙平华　孙　进　孙国祥　孙晓慧　孙铁民　孙　逸
严建业　劳海燕　苏　丹　苏玉文　苏薇薇　杜恩明　李文龙　李　芬　李　昕　李顺祥
李语玲　李　勇　李晓宇　李晓晖　李健和　李　娟　李乾斌　李　爽　李湘平　李新刚
杨志平　杨　波　杨相辉　杨树龙　杨星钢　杨　琳　杨献文　肖轶雯　肖贵南　肖　雪
肖朝江　吴成军　吴　昊　吴昊姝　邱玉玲　邱　宏　何江江　何　艳　何鸽飞　余自成
余　娜　谷福根　邹振兴　宋　程　张　川　张水寒　张　永　张永杰　张毕奎　张军民
张　岗　张妙红　张纯刚　张　凭　张奘之　张　俐　张洪文　张　峻　张程亮
阿卜杜拉·玉苏普　陈　力　陈卫东　陈　平　陈四保　陈礼峰　陈志永　陈志高　陈　英
陈国宁　陈治军　陈勇川　陈　琦　陈富超　陈　鹏　奉建芳　范国荣　林小伟　林丽美
林　菁　杭永付　易小清　罗开忠　罗　兰　罗　聪　金　卓　金　锐　金鹏飞　周冬初
周　权　周志旭　周　晋　郑杭生　郑稳生　屈　建　屈　健　孟宪生　赵龙山　赵立波
赵志刚　赵春杰　赵剑锋　赵　亮　赵家宏　赵　娣　赵瑞芝　赵　鹏　胡彦武　胡　楠
柳　芳　柳鹏程　段现来　段宣初　姜志平　姜　茹　姜　敏　姜　雷　姜德建　娄月芬
宫　建　祝德秋　贺　敏　秦红岩　秦绪军　袁　成　袁红梅　袁志翔　袁　易　贾王平
贾素洁　夏彬彬　夏道宗　原永芳　原海燕　柴　琴　倪　赞　徐文峰　徐必学　徐　珽
徐　硕　高会乐　高利臣　高德民　郭代红　郭　韧　郭怀忠　郭建军　郭海彪　郭　智
唐　芳　黄云峰　黄壮壮　黄　芳　黄　勋　黄胜阳　黄振鹏　梅升辉　曹东升　曹仕鹏
曹　伟　曹　玲　曹　蔚　龚力民　常福厚　麻兵继　章越凡　梁光平　梁　海　寇龙发
隋　峰　巢志茂　彭文兴　彭再梅　彭　亮　葛宇清　董亚琳　董得时　董德刚　蒋云生
蒋利和　蒋受军　蒋学华　蒋孟良　蒋　倩　蒋跃平　蒋德旗　韩立峰　韩晓芳　韩晓鹏
覃　丽　程　军　程忠哲　傅　强　舒　畅　鲁　琼　曾贵荣　温金华　谢　诚　谢奕丹
蒲位凌　蒙光义　睢大筵　蔡天革　蔡　宇　蔡洪鲲　蔡骅琳　裴　奇　廖端芳　廖德华
谭红胜　谭胜蓝　谭朝阳　肇丽梅　翟　青　缪明星　樊启猛　黎　苏　黎　敏　颜　苗
潘卫三　潘宏春　潘　昊　薄　涛　魏高文　魏　博

S·T·M
WJCI
WORLD JOURNAL CLOUT INDEX

科技期刊世界影响力指数（WJCI）报告（2022）

收录证书

This is certificate for

中南药学

（ISSN 1672-2981　CN 43-1408/R）

to be indexed in

World Journal Clout Index(WJCI) Report of Scientific and Technological Periodicals(2022)

项目联合研发单位 Project research units：

中国科学技术信息研究所Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.Ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals

国内统一刊号：CN 43-1408/R　广告经营许可证：4300004000764　邮发代号：42-290　定价：25.00元/册