

- 2008; 294.
- [4] 胥戈, 边宇. 柏子仁炮制历史沿革初探[J]. 中药饮片, 1992, 2(3): 18-21.
- [5] 叶定江, 原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 363.
- [6] 王昭云. 柏子仁用干燥箱制霜法简介[J]. 中药通报, 1987, 12(5): 29.
- [7] 李彦灵, 叶雪兰, 李卫民, 等. CO₂超临界制备的柏子仁油及柏子仁霜的安神功效研究[J]. 北方药学, 2011, 8(9): 30-31.
- [8] 张怀, 单国顺, 于晓黎, 等. 柏子仁制霜工艺比较研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1987-1989.
- [9] 徐新刚, 闫雪生, 张晶. 柏子仁生品及霜品中总皂苷的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 833-835.
- [10] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 530-533.
- [11] GB 5009.168-2016, 食品中脂肪酸的测定[S].
- [12] 李天庆. 中药“霜”药的概念、制法及应用[J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29(3): 70-73.
- [13] 孙付军, 宋卫国, 虞慧娟, 等. 不同含油量柏子仁药理学作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 1836-1838.
- [14] 孙付军, 陈慧慧, 王春芳, 等. 柏子仁皂苷和柏子仁油改善睡眠作用的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(5): 394-395.
- [15] 徐新刚, 付加雷, 闫雪生. 柏子仁和柏子仁霜中脂肪酸的GC-MS比较分析研究[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(9): 523-524.

蒜酶对同型半胱氨酸的催化裂解作用

哈密旦木·艾合买提江¹, 张婷婷¹, 任锐¹, 敬爽¹, 摆富叶¹, 李新霞^{1,2*}, 王艳^{1,2*}
(1. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 考察蒜酶对同型半胱氨酸的催化裂解作用。**方法** 采用 HPLC 法测定同型半胱氨酸含量, 分析蒜酶对同型半胱氨酸的催化动力学。**结果** 同型半胱氨酸在 10~160 μmol/L 范围内线性关系良好($r=0.9994$), 加样回收率 98.39%~101.26%, RSD 0.58%~1.61%。蒜酶可催化裂解同型半胱氨酸, 转化率达到 80% 以上, K_m 为 316.78 μmol/L, V_{max} 为 22.03 μmol/(L·min)。**结论** 蒜酶对同型半胱氨酸有催化裂解作用, 可为该酶类在心血管系统疾病预防和治疗中的应用提供可靠依据。

关键词: 蒜酶; 同型半胱氨酸; 催化裂解作用

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0545-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.039

同型半胱氨酸(Hcy)又称为高半胱氨酸,是体内蛋氨酸和半胱氨酸代谢的中间产物^[1],它是含硫氨基酸,血浆中存在2种形式,一种是还原型([H]-Hcy),结构中含有巯基;另一种是氧化型([O]-Hcy),其结构是还原型以二硫键所形成的,当血浆中其水平高于15 μmol/L时,即可诊断为高同型半胱氨酸血症^[2]。研究表明,高水平Hcy能够通过各种途径直接或间接的造成血管内皮细胞损伤,增强血小板功能活性,促使血栓形成,影响低密度脂蛋白的氧化过程,诱导和促进血管平滑肌细胞增殖^[3],现已被公认为是心脑血管疾病的独立危险因素之一^[4-5],并寻

找降低体内其水平的潜在药物对心血管系统疾病的诊断与防治具有重要意义。

大蒜及其制品在医药和保健品方面已得到普遍认可,具有降血脂、预防动脉粥样硬化、抗血小板聚集等多种药理作用^[6-8],在防治高同型半胱氨酸血症并冠心病、脑梗死等方面的临床及实验研究已有报道^[9-10]。蒜酶又称蒜氨酸裂解酶,是二聚体糖蛋白^[11],也是存在于大蒜中的内源酶,能裂解蒜氨酸C-S键,生成大蒜辣素和系列含硫化合物,从而表现出大蒜特性^[11],其适宜底物为S-烷基-L-半胱氨酸亚砷类化合物,Hcy结构与蒜酶的天然底物蒜氨酸结

收稿日期: 2021-04-07

基金项目: 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713);新疆医科大学博士科研启动基金(2019-13)

作者简介: 哈密旦木·艾合买提江(1994—),女(维吾尔族),硕士,从事现代药物分析技术及体内药物分析研究。Tel: 17690921361, E-mail: 2729349066@qq.com

* **通信作者:** 李新霞(1968—),女,博士,教授,从事现代药物分析及体内药物分析研究。Tel: (0991) 4365034, E-mail: lxx6668@163.com

王艳(1980—),女,博士,副教授,从事天然产物研究。E-mail: wangyan_1060@163.com

构相似,后者是否可通过催化裂解作用来降低前者水平值得探讨。本实验通过测定 Hcy 减少量,来探索蒜酶对其催化裂解作用。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(型号 LC-20AD-SPD-RID,日本岛津公司);紫外分光光度计(型号 UV-2550,日本岛津公司);低温高速离心机(型号 MULTIFUGE X3R,美国赛默飞世尔公司);分析天平(型号 AB153-S,瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂与药物 [H]-Hcy(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma Aldrich 公司);[O]-Hcy(纯度 $\geq 90\%$,上海源叶生物科技有限公司);三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);7-氟苯咪唑-4-硫酸铵盐(SBD-F)(美国 Sigma Aldrich 公司)。蒜酶(新疆埃乐欣药业有限公司,批号 201801001)。甲醇为色谱纯;磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠、盐酸、氢氧化钠、四硼酸钠、乙二胺四乙酸钠、三氟乙酸、冰乙酸、结晶乙酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 [H]-Hcy 对照品溶液 精密称取 [H]-Hcy 对照品 15 mg,置于 50 mL 量瓶中,磷酸盐缓冲液溶解定容,即得(浓度为 2 000 $\mu\text{mol/L}$),使用时用磷酸盐缓冲液稀释至所需浓度。

2.1.2 [O]-Hcy 试剂溶液 精密称取 [O]-Hcy 27 mg,置于 100 mL 量瓶中,磷酸盐缓冲液溶解,即得(浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$)。

2.1.3 蒜酶溶液 精密称取蒜酶适量,置于量瓶中,pH 7.0 磷酸盐缓冲液涡旋溶解,摇匀,即得。

2.2 [O]-Hcy 还原反应条件筛选 参考文献[12-13]报道,固定还原温度、还原时间分别为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

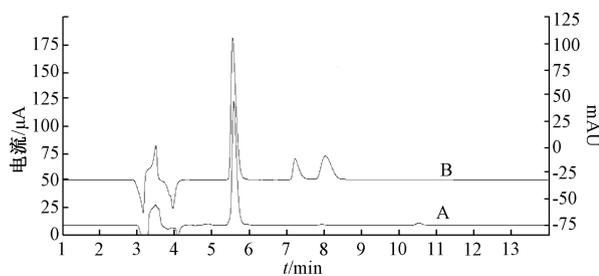
2.2.1 吸收波长 精密量取 [H]-Hcy 对照品溶液 2 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 pH 5.5 磷酸盐定容,在 200~800 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描。结果,Hcy 在 206 nm 处有最大吸收,但该处属于末端吸收,故确定 210 nm 作为检测波长。

2.2.2 色谱条件 XBridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相 0.04% 三氟乙酸;体积流量 0.8 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 210 nm;进样量 20 μL 。色谱图见图 1。

2.2.3 还原剂用量 取 10 mmol/L [O]-Hcy 溶液 2 mL,分别加入比例为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:12 的 100 mmol/L TCEP 还原剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min,反应液过 0.22 μm 微孔滤膜,在“2.2.2”项色谱条件下进样测定。结果,[H]-Hcy 峰面积随着还原剂剂量与 [O]-Hcy 比例增加升高,达到 1:8 后不再变化,故确定两者比例为 1:8。

2.3 [H]-Hcy 衍生化反应条件选择

2.3.1 检测波长 精密量取 1 mmol/L [H]-Hcy 1 mL,

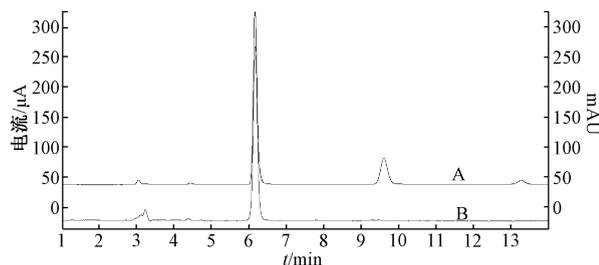


注: A 为 [H]-Hcy, B 为 [O]-Hcy 还原后。

图 1 [O]-Hcy 还原后 HPLC 色谱图

加不同比例 SBD-F 溶液,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 60 min 后立刻放入冰水浴中冷却 10 min,定容至 10 mL,扫描紫外吸收光谱,发现最大吸收波长为 384 nm。

2.3.2 色谱条件 XBridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相 pH 4.5 醋酸盐缓冲液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~16 min,2%~5%B);体积流量 0.8 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 384 nm;进样量 20 μL 。色谱图见图 2。



注: A 为 [H]-Hcy 衍生化后, B 为 [O]-Hcy 衍生化后。

图 2 [H]-Hcy、[O]-Hcy 衍生化后 HPLC 色谱图

2.3.3 衍生剂用量 取 0.2 mmol/L [H]-Hcy 1 mL,分别加入比例为 1:1、1:2、1:4、1:6 的 SBD-F 衍生化溶液,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 60 min 后冷却 10 min,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定。结果,当 [H]-Hcy 与 SBD-F 比例为 1:2 时衍生化反应可达到完全,故确定两者比例为 1:2。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 将 [H]-Hcy 对照品用磷酸盐缓冲液溶解,摇匀定容,得 320 $\mu\text{mol/L}$ 贮备液,磷酸盐缓冲液稀释至 10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$,分别量取适量,加入 SBD-F 工作液,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 60 min 后冷却 10 min,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定。以衍生化 [H]-Hcy 浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行测定,得方程为 $Y=6\,034.9X-73\,769$ ($r=0.999\,0$),在 10~160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。同时,检测限为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4.2 精密度试验 制备 [H]-Hcy 对照品溶液,同一天在“2.3.2”项色谱条件下进样测定 5 次,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度,测得两者 RSD 分别为 0.59%、0.83%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 制备6份 [H]-Hcy 对照品溶液,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,测得峰面积 RSD 为 0.9%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取 [H]-Hcy 对照品溶液适量,于 0、2、4、6、8、12、24 h 在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,测得峰面积 RSD 为 1.39%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取低、中、高浓度标准溶液各 3 份,加样后在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 [H]-Hcy 加样回收率试验结果 (n=3)

| 原有量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | 加入量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | 测得量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | 回收率/ % | RSD/ % |
|---|---|---|-----------|-----------|
| 54 | 20 | 74.03 | 99.17 | 0.58 |
| 54 | 40 | 94.51 | 101.26 | 1.08 |
| 54 | 80 | 104.03 | 98.39 | 1.61 |

2.5 蒜酶对 Hcy 的催化裂解作用 分别取 1 mmol/L [O]-Hcy 溶液 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mL,加入蒜酶溶液 0.4 mL,35 ℃ 水浴反应 10 min,分别加入 TCEP 溶液 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mL,37 ℃ 水浴反应 10 min,分别加入 SBD-F 贮备液 0.12、0.24、0.36、0.48、0.60、0.72 mL,70 ℃ 水浴反应 60 min 后冷却 10 min,作为供试品溶液;另以磷酸盐缓冲液替代蒜酶溶液加入反应体系,作为空白对照溶液,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,结果见表 2。由此可知,蒜酶可使 [H]-Hcy 含量在反应后有所降低,即对后者有一定的催化裂解作用。

表 2 蒜酶对 [O]-Hcy 溶液中 Hcy 的催化裂解作用 (n=3)

| 反应前[H]- Hcy 浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | 反应后[H]- Hcy 浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | [H]-Hcy 浓度 减少量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | 转化率/ % | RSD/ % |
|---|---|---|-----------|-----------|
| 20.75 | 15.31 | 5.44 | 26.22 | 0.36 |
| 57.10 | 44.83 | 12.05 | 21.28 | 0.99 |
| 68.09 | 56.27 | 11.82 | 17.36 | 0.88 |
| 91.86 | 80.17 | 11.65 | 12.73 | 2.09 |
| 105.91 | 95.68 | 10.23 | 9.66 | 1.99 |
| 118.23 | 109.40 | 8.83 | 7.47 | 1.92 |

取大鼠血浆 90 μL ,置于 EP 管中,加入 [O]-Hcy 10 μL 、0.6 mol/L 高氯酸 100 μL ,14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 100 μL ,加入蒜酶 400 μL ,35 ℃ 水浴反应 10 min,加入 TCEP 溶液 30 μL ,37 ℃ 水浴反应 10 min,加入 SBD-F 贮备液 430 μL ,70 ℃ 水浴反应 60 min 后冷却 10 min,作为供试品溶液;另以磷酸盐缓冲液代替蒜酶溶液加入反应体系,作为空白对照溶液,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,结果见表 3。由此可知,蒜酶也可催化裂解大鼠血浆中的 [O]-Hcy,转化率可达到 50%。

2.6 蒜酶/Hcy 催化动力学研究

2.6.1 反应时间对酶促反应的影响 精密量取蒜酶溶液

表 3 蒜酶对大鼠血浆中 Hcy 的催化裂解作用 (n=3)

| 时间 | 含量/ μg | 减少量/ μg | 转化率/% |
|-----|-------------------|--------------------|-------|
| 反应前 | 4.78 | — | — |
| | 4.60 | — | — |
| | 4.48 | — | — |
| 反应后 | 2.22 | 2.55 | 53.45 |
| | 2.23 | 2.36 | 51.45 |
| | 2.06 | 2.43 | 54.12 |

0.4 mL,精密加入 1 000 $\mu\text{mol/L}$ [O]-Hcy 溶液 0.1 mL,35 ℃ 水浴反应 5、10、15 min,按“2.5.1”项下方法处理,微孔滤膜过滤,取 20 μL ,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,计算 [H]-Hcy 含量,结果见表 4。由此可知,随着反应时间延长,转化率无明显变化,故选择反应时间为 10 min。

表 4 反应时间对酶促反应的影响 (n=3)

| 反应时间/min | 转化率/% | RSD/% |
|----------|-------|-------|
| 5 | 50.46 | 1.41 |
| 10 | 50.95 | 1.96 |
| 15 | 49.66 | 1.29 |

2.6.2 [O]-Hcy 与蒜酶比例对转化率的影响 精密量取 [O]-Hcy 0.1 mL、不同浓度蒜酶溶液 0.4 mL,35 ℃ 水浴反应 10 min,按“2.5.1”项下方法处理,微孔滤膜过滤,取 20 μL ,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,计算 [H]-Hcy 含量,结果见表 5。由此可知,[O]-Hcy 与蒜酶比例为 1:6.0 (即 6.0 U 蒜酶可催化裂解 1 μg [O]-Hcy) 时,转化率可达到 80% 以上。

表 5 [O]-Hcy 与蒜酶比例对转化率的影响 (n=3)

| [O]-Hcy 与蒜酶比例 | 转化率/% | RSD/% |
|---------------|-------|-------|
| 1:0.8 | 25.38 | 1.15 |
| 1:1.2 | 35.54 | 1.71 |
| 1:2.4 | 46.17 | 2.20 |
| 1:4.8 | 77.32 | 1.68 |
| 1:6.0 | 82.78 | 0.25 |
| 1:8.0 | 80.59 | 1.42 |
| 1:10.0 | 82.37 | 1.99 |

2.6.3 底物浓度对酶促反应初速度的影响 精密量取蒜酶溶液 0.4 mL,精密加入不同浓度 [O]-Hcy 溶液各 0.1 mL,35 ℃ 水浴反应 10 min,按“2.5.1”项下方法处理,微孔滤膜过滤,取 20 μL ,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定;另取 [H]-Hcy 对照品溶液,同法处理,在“2.3.2”项色谱条件下进样测定,计算含量,测定反应速度,以反应速度 V 对相应底物浓度作图,在直线范围内作趋势线,其斜率即为酶促反应的初速度 (V_0),结果见图 3~4。由此可知,当磷酸盐缓冲液 pH 为 5.5 时,在 0~129.25 $\mu\text{mol/L}$ 范围内 V_0 为 0.09 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$;pH 为 5.5 时,在 0~64.78 $\mu\text{mol/L}$ 范围内 V_0 也为 0.09 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

2.6.4 动力学常数测定 以反应速度倒数为纵坐标 (Y), [H]-Hcy 浓度倒数为横坐标 (X),采用双倒数作图法作

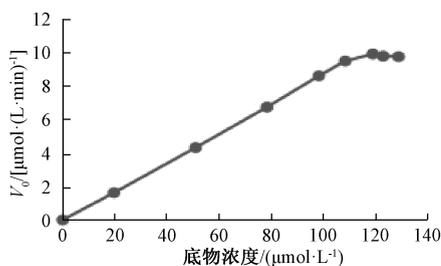


图3 底物浓度对酶促反应速度的影响 (pH 5.5)

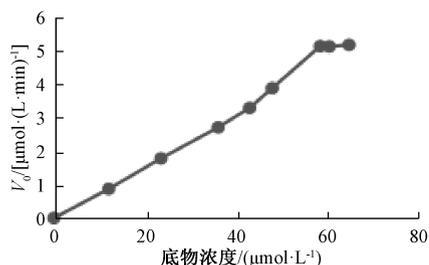


图4 底物浓度对酶促反应速度的影响 (pH 6.8)

图。结果,当磷酸盐缓冲液 pH 为 5.5 时, K_m 为 $4\ 710\ \mu\text{mol}/\text{L}$, V_{\max} 为 $384.62\ \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 回归方程为 $Y=12.248X-0.002\ 6$ ($r=0.999\ 7$); pH 为 6.8 时, K_m 为 $316.78\ \mu\text{mol}/\text{L}$, V_{\max} 为 $22.03\ \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 回归方程为 $Y=14.382\ X-0.045\ 4$ ($r=0.999\ 4$)。

3 讨论

研究蒜酶对 Hcy 催化裂解作用的前提是建立准确、可靠和简便的检测方法,目前有气相色谱质谱联用法、化学发光免疫法、HPLC 法等^[14-16],其中最常用的是 HPLC 法。由于血浆中 Hcy 的存在形式有氧化型、还原型及其蛋白结合物等,故其 HPLC 法测定的都是总 Hcy,首先加入还原剂使 [O]-Hcy 都转换成 [H]-Hcy,然后用巯基衍生物进行柱前衍生化,最后采用荧光检测器进行检测^[17]。本研究在参考相关文献的基础上,考虑到紫外检测器应用广泛、线性范围和检测灵敏度较高等优点,将 Hcy 还原、柱前衍生后采用紫外检测器检测,建立了 Hcy 的 HPLC 紫外检测方法。另外,血浆样品处理复杂,存在很多干扰因素,不利于快速筛选和研究蒜酶对 Hcy 的催化裂解作用,故又建立了体外筛选 Hcy 的体系和检测方法,人体血浆中 99% 为 [O]-Hcy,购买的 Hcy 试剂即为 [O]-Hcy,可实现这一体系。另外, Hcy 对照品为 [H]-Hcy,以其制作标准曲线后作为衍生化反应的反应物对样品的前处理条件(还原反应及衍生化反应)进行考察。为了更好地考察还原反应和衍生化反应,2 个反应分别采用了 2 种色谱条件,均能实现待测物与反应液中各成分的分离,该方法与血浆中 Hcy 的分析方法类似,但省去了血浆样品前处理的繁琐步骤,准确灵敏,快速简便,可作为体外筛选和评价预防和治疗高同型半胱氨酸药物的手段。

Hcy 升高作为心脑血管疾病的危险因素,正日益受到学者们的重视。本实验依据 Hcy 是氨基酸半胱氨酸的异种,

其结构与蒜酶最适底物蒜氨酸的结构具有相似性,探索蒜酶对同型半胱氨酸是否具有催化裂解作用,以已建立的 [H]-Hcy 的 HPLC 分析方法测定蒜酶与不同浓度 [O]-Hcy 反应前后 [H]-Hcy 的含量变化,发现该酶类具有一定的催化裂解作用,可使后者转化率 80% 以上。另外, Hcy 易溶于酸性溶液,故本实验首先用 pH 5.5 磷酸盐缓冲液研究体外蒜酶对 Hcy 的催化动力学,测得其 K_m 为 $4\ 710\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 。人体体液 pH 约在 7 左右,为了更接近该数值,本实验选择 pH 6.8 磷酸缓冲盐研究蒜酶对 Hcy 的催化动力学,测得其 K_m 为 $316.78\ \mu\text{mol}/\text{L}$,小于 pH 5.5 下的 K_m 值,表明蒜酶与 [O]-Hcy 的亲合力较好。

4 结论

本实验建立了 Hcy 的 HPLC 紫外检测方法,通过测定其减少量来探索蒜酶对同型半胱氨酸是否具有催化裂解作用,可为寻找降低体内 Hcy 的潜在药物在心血管系统疾病诊断与防治中的应用提供参考。

参考文献:

- [1] McCully K S. Chemical pathology of homocysteine. V. Thioethanimide, thioethinaco, and cystathionine synthase function in degenerative diseases[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2011, 41(4): 301-314.
- [2] 周燕利,王昭文. 血同型半胱氨酸、叶酸及维生素 B₁₂ 水平监测在脑卒中患者临床诊疗的有效性评价[J]. *中国临床保健杂志*, 2015, 18(3): 301-303.
- [3] Sharma S, Singh M, Sharma P L. Beneficial effect of insulin in hyperhomocysteinemia and diabetes mellitus-induced vascular endothelium dysfunction; role of phosphoinositide dependent kinase and protein kinase B[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 348(1-2): 21-32.
- [4] van Meurs J B, Dhonukshe-Rutten R A, Pluijm S M, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(20): 2033-2041.
- [5] 刘璐璐. 血浆同型半胱氨酸与冠心病及其危险因素的相关性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [6] 马丽娜,李峰杰,陈坚,等. 大蒜主要活性成分及药理作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(6): 760-763.
- [7] 陈坚. 药用大蒜近代研究进展(综述)[C] //中国药学会. 2013 年中国药学会大会暨第十三届中国药师周论文集. 南宁: 中国药学会, 2013: 1237-1252.
- [8] 闫森森,许真,徐蝉,等. 大蒜功能成分研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(5): 312-318.
- [9] 常全娥,赵立,苟萍. 大蒜活性物质对高血脂小鼠肝细胞的影响[J]. *新疆大学学报(自然科学版)*, 2013, 30(2): 224-228.
- [10] 常萍,刘德山,张维东. 大蒜素对高同型半胱氨酸血症大鼠自由基代谢的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(3): 221-224.
- [11] Weiner L, Shin I, Shimon L J, et al. Thiol-disulfide organization in alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium*

- sativum) [J]. *Protein Sci*, 2010, 18(1): 196-205.
- [12] 杨涛, 沈杰. 高效液相 (HPLC) 荧光法同时测定人血浆中4种硫醇物的浓度[J]. *复旦学报(医学版)*, 2014, 41(5): 679-684.
- [13] 何俊, 丁敏, 张晓清, 等. 高效液相色谱法同时测定血浆同型半胱氨酸及其相关硫醇物浓度方法的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(3): 203-206.
- [14] Han J C, Li G, Wang X C, et al. Determination of homocysteine in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, 34(6): 567-571.
- [15] Ivanov A V, Bulgakova P O, Virus E D, et al. Capillary electrophoresis coupled with chloroform-acetonitrile extraction for rapid and highly selective determination of cysteine and homocysteine levels in human blood plasma and urine [J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(20): 2646-2653.
- [16] Nolin T D, Mcmenamin M E, Himmelfarb J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life*, 2007, 852(1-2): 554-561.
- [17] 邬天凤, 赵世晶, 李文, 等. 高效液相色谱法同时测定小鼠肝脏中S-腺苷甲硫氨酸和S-腺苷同型半胱氨酸[J]. *卫生研究*, 2015, 44(4): 632-635.

连花清瘟制剂上市后临床再评价文献分析

张怡颖, 崔唐明, 许吉*

(上海中医药大学中医健康服务协同创新中心, 上海 201203)

摘要: 目的 对连花清瘟制剂上市后临床再评价文献进行分析。方法 整理 CNKI 中关于连花清瘟制剂上市后临床再评价的相关文献, 采用 CiteSpaceV 软件对作者、机构、关键词绘制知识图谱, 并对其有效性、安全性、经济性文献进行分析。结果 临床上连花清瘟制剂大多与其他药物联合使用; 除了与其说明书一致的适应症外, 可能的潜在适应症为甲型 H1N1、手足口病、带状疱疹等; 不良反应主要表现为胃肠道和皮肤症状; 缺少相关药物经济学评价文献。结论 连花清瘟制剂临床应用广泛, 有效性突出, 但其用法用量、适应症、联合用药、不良反应、特殊人群用药等信息仍需大量临床文献作进一步分析和评价。

关键词: 连花清瘟制剂; 上市; 临床再评价; 文献分析

中图分类号: R287

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0549-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.040

中成药上市后再评价的文献研究是通过获取、分析药品的相关研究文献, 对药品的有效性、安全性、经济性等进行基于文献证据的综合评估, 是中成药上市后临床再评价独立而又不可或缺的一部分^[1]。连花清瘟制剂是由银翘散合麻杏石甘汤化裁而来^[2], 目前有片剂、胶囊、颗粒3种剂型^[3]。近年来, 流行性感、甲型 H1N1 流感、手足口病、新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 等病毒性传染病高发^[4], 连花清瘟制剂表里双解, 清瘟解毒, 宣肺泄热, 具有抗病毒、抗菌、抗炎、解热、调节免疫等多种功效^[5], 多次在抗击病毒性传染病过程中发挥重要作用, 是中华人民共和国卫生部发布的《流行性感、诊断与治疗指南 (2011 版)》《人感染甲型 H1N1 流感诊疗方案 (2009

版)》推荐用药, 也被国家中医药管理局列入《2012 年乙型流感中医药防治方案》推荐用药, 是我国应对传染性公共卫生事件的代表药物^[6-8]。2020 年 1 月 27 日, 连花清瘟被列入国家卫生健康委订的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第四版)》^[9], 并在后面的诊疗方案中连续成为推荐药物。为了更好的指导临床用药, 发掘潜在优势病种, 促进中成药可持续发展, 本研究对连花清瘟制剂上市后临床再评价相关文献进行整理研究, 以期对药物再评价提供依据。

1 材料与方法

对 CNKI 中国学术期刊 (网络版) 中收录的国内公开发表的中文期刊进行主题检索, 检索词“连花清瘟” OR

收稿日期: 2021-04-07

基金项目: 国家重点研发计划专项项目 (2019YFC1709803); 国家自然科学基金项目 (81873183); 上海市中医药科技创新项目 (ZYKC201801012); 上海市教委预算内项目 (JYKY1807)

作者简介: 张怡颖 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为中医药信息学。Tel: 13401328600, E-mail: 1015271602@qq.com

* **通信作者:** 许吉 (1978—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中医药信息学。Tel: (021) 51322251, E-mail: xj1100@126.com