

【评价方法学】

建立UPLC-MS/MS方法测定麦冬皂苷D和麦冬皂苷D'及临床风险评估

姚泓^{1,2}, 卢建秋^{1,3}, 徐焕华^{2,4}, 杨亮², 聂窈², 倪毓浩², 姜腊², 汤响林², 马增春²,
王宇光², 高月^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 军事科学院军事医学研究院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850

3. 北京中医药大学 图书馆, 北京 100029

4. 天津中医药大学 中药学院, 天津 301617

摘要: 目的 建立测定含麦冬注射液中麦冬皂苷D(OPD)和麦冬皂苷D'(OPD')含量的UPLC-MS/MS方法, 评价不同厂家不同批次该注射液的质量的均匀性, 为该药临床的安全性评估提供实验依据。方法 色谱采用ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱; 体积流量为0.3 mL/min; 进样量为2 μL; 质谱采用电喷雾离子源(ESI), 负离子检测模式(-), 通过多反应监测(MRM)同时对注射液中OPD和OPD'进行定量分析。结果 该注射液中OPD和OPD'在50~10 000 ng/mL线性关系均良好, *r*均大于0.995 7; 专属性, 精密度, 重复性和稳定性良好。结论 不同厂家注射液样本之间存在一定的质量差异, 同一样本中OPD和OPD'以一定比例共存; OPD和OPD'混合给药对红细胞的溶血作用远高于OPD'单独给药, OPD'最高理论平均血药浓度虽未达溶血率浓度警戒线, 但临床使用仍可能具有一定风险并对机体产生不良反应, 应给予高度重视。

关键词: UPLC-MS/MS; 麦冬皂苷; 定量分析; 风险评估

中图分类号: R282.71, R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)06-1135-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.014

Established UPLC-MS / MS method to determinate ophiopogonin D and ophiopogonin D' and clinical risk assessment

YAO Hong^{1,2}, LU Jianqiu^{1,3}, XU Huanhua^{2,4}, YANG Liang², NIE Yao², NI Yuhao², JIANG La², TANG Xianglin²,
MA Zengchun², WANG Yuguang², GAO Yue²

1. School of traditional Chinese medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3. Library, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

4. School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To establish a simultaneous quantitative analytical method of ophiopogonin D (OPD) and ophiopogonin D' (OPD') in the tested sample contains *Ophiopogon japonicas* based on ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), assessed of the quality homogeneity of different factory and different batches injections, to provide the data reference for its clinical safety assessment from a hemolytic perspective around the OPD' toxic effects. **Method** The chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid in water and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL/min, and the injection volume was 2 μL. The two components were detected using an electrospray ionization source in negative ionization mode (ESI-) and quantified by multiple reaction monitor (MRM) scanning at the same time. **Result** The OPD and OPD' both had good linear relationship in

收稿日期: 2018-11-23

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501004)

第一作者: 姚泓, 女, 硕士研究生。Tel: (010)66932318 E-mail: jpyaohong@126.com

*通信作者: 高月, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药理学。Tel: (010)66931312 E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

range of 50—10 000 ng/mL, the value of " r " was all more than 0.995 7, the specificity, linearity, precision, repeatability, stability and durability of the method were all good. **Conclusion** The qualities of different factory of the injection have differences in various degrees, OPD and OPD' co-exist in a certain proportion in the same sample, though the theory highest average blood drug concentration not a cordon of hemolysis rate, clinical application still likely to have a certain risk and adverse effects on the body which should be given high attention.

Key words: UPLC-MS/MS; *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.; quantitative determination; risk assessment

麦冬为百合科植物麦冬(沿阶草)*Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根,具有润肺清心、泻热生津、化痰止咳之功效,对肺燥干咳、阴虚癆嗽、喉痹咽痛、津伤口渴、内热消渴、心烦失眠、肠燥便秘等症有显著疗效^[1-4],在现代药物开发中常与其他中药配伍加工制备为各种不同剂型的中成药^[5]。现代药理学研究表明,麦冬皂苷D(OPD)是麦冬中主要的药效成分,具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗心肌肥大、抗心律失常、抗心肌缺血等多种药理活性^[6-12]。然而本实验室近期研究中发现,麦冬中与OPD结构相近且互为同分异构体的麦冬皂苷D'(OPD')对心脏具有明显毒性。

研究发现^[13],OPD只有在浓度高达120 $\mu\text{mol/L}$ 以上会对人肝癌HepG2细胞产生抑制作用($P < 0.01$),而麦冬中的另一个成分OPD',则在2 $\mu\text{mol/L}$ 时就能对HepG2细胞产生明显抑制作用($P < 0.001$),细胞存活率仅为41%,且细胞的存活率随着OPD'作用时间的延长逐渐降低,毒性反应愈加明显,具有明显的细胞量-时-毒的正相关性。同时还发现^[14],OPD'浓度5 $\mu\text{mol/L}$ 时即可使大鼠心肌H9C2细胞形态发生皱缩,细胞核数目减少,活性氧簇(ROS)含量升高,线粒体膜电位下降,诱导释放炎症因子并诱导细胞凋亡,细胞存活率显著下降。且在动物水平上^[15],OPD'可造成大鼠心脏损伤,表现为肌酸激酶(CK)活性升高、白细胞聚集、动脉血管变薄、心肌纤维断裂、肌浆大面积溶解、心肌坏死、心脏收缩功能障碍等,作用强于阳性药物阿霉素。除此之外,通过血浆生化分析以及组织病理切片显示,OPD'还对肝脏、肾脏造成一定程度的功能受损。

OPD(效)和OPD'(毒)同来源于麦冬药材然而却对心脏的作用毒效迥异,目前的整体研究状况缺乏对麦冬及含麦冬中成药如参麦注射液、参附注射液及生脉饮中OPD'毒性的关注和重视^[16-17],2015年版《中国药典》也未对麦冬中的OPD和OPD'含量进行分别控制,仅以麦冬总皂苷不得少于0.12%作为麦冬饮片的质量控制标准^[18],不足以揭示麦冬总皂苷中二者含量到底存在何种联系以及二者共存下

的总体毒效反应。因此,本研究以麦冬注射液为例,围绕OPD'毒性问题,以目前市场在售7家药企该中成药各批次总共21个样本为研究对象,建立UPLC-MS/MS方法对OPD和OPD'的含量进行测定,对其进行质量均匀性分析,并尝试从溶血性研究角度结合其临床不良反应的发生对其进行风险评估,以期麦冬饮片及含麦冬中成药中OPD'的限量标准的制定提供参考,为后续OPD'的毒性实验与临床不良反应剂量相结合提供实验依据。

1 材料

LC-20AD型液相色谱仪(日本岛津公司)串联AB SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS质谱系统(美国SCIEX公司);BS110S型十万分之一天平购自德国Sartorius公司;XH-89型旋涡振荡器购自浙江乐成电器厂;KQ-250DE型医用数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;Microfuge22R台式微量冷冻离心机购自美国Becakman公司。

乙腈,色谱级,美国Thermo Fisher公司;甲酸,色谱级,美国Dikma公司;纯净水,屈臣氏集团有限公司;其他试剂均为分析级。对照品OPD和OPD'均购自上海一飞生物科技有限公司(批号:F059758、F581298);受试样品分别购自A公司(批号:16110632、161216D1、151019F2,OB1~OB3),B公司(批号:1704271、1704262、1705232,OB4~OB6),C公司(批号:1701104、1701103、1801102,OB7~OB9),D公司(批号:17070205004、17050405006、17050405007,OB10~OB12),E公司(20170807、20180402、20180307,OB13~OB15),F公司(1705014、1703064、1703054,OB16~OB18),G公司(170305、170907、170908,OB19~OB21)。

2 方法

2.1 UPLC条件

ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱条件为:0~2 min, 50%~65% B; 2~3 min, 65%~75%B; 3~4 min, 75%~85%B; 4~

5 min, 85%~100%B; 体积流量为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$; 进样量为 2 μL 。

2.2 MS条件

电喷雾电离源(ESI), 负离子模式(-); 多反应离子监测(MRM)模式; 离子源喷雾电压(IS)-4 500 V; 离子化温度(TEM) 600 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器气体(GS1) 60 kPa; 辅助气体(GS2) 60 kPa; 气帘气(N_2) 30 kPa; 碰撞室射出电压(CXP)-13 V; 去簇电压(DP)-90 V; 射入电压(EP)-10 V。OPD 和 OPD' 母离子及碎裂子离子均为: m/z 899.5 $\rightarrow$ 721.3; 保留时间分别为 3.86、4.12 min。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液的配制 分别精密称取 OPD 和 OPD' 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 并以此作为母液, 依次稀释至标准曲线中 sd1~sd8 标准曲线点, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密移取不同厂家不同批次麦冬注射液样本 200 μL , 加入 200 μL 甲醇, 涡旋混匀, 超声提取 10 min 后, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进样测定。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性 取不含麦冬的阴性对照溶液, 混合对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”下色谱和质谱条件测定, 由图 1 可知, 不含麦冬的阴性对照样品未在相应位置检测到干扰成分, 该方法具有专属性。

3.1.2 线性关系考察 将稀释后的一系列混合对照品溶液按照上述色谱和质谱条件进行分析, 以相

应峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 绘制标准曲线, 得到 OPD 的线性回归方程 $Y=603.62X+1.06\times 10^5$ ($r>0.998\ 7$) 和 OPD' 的线性回归方程 $Y=188.55X+7\ 121.06$ ($r>0.995\ 7$), OPD' 和 OPD 线性范围均为 50~10 000 ng/mL。连续稀释混合标准溶液, 按信噪比(S/N)=3 计算出二者检测限(LOD), 分别为 1 ng/mL 和 8 ng/mL; 按信噪比(S/N)=10 计算出二者定量限(S/N)=10, 分别为 5 ng/mL 和 25 ng/mL。

3.1.3 精密度试验 制备低、中、高 3 种质量浓度(150、1 400、6 000 ng/mL)的 OPD 和 OPD' 混合对照品溶液, 1 d 内重复进样 6 次考察日内精密度, 连续 3 d 分别进样考察日间精密度, 其峰面积的相对标准偏差(RSD)分别在 1.30%~3.99% 和 2.20%~4.53%。

3.1.4 重复性试验 取该注射液样品(批号 1705014), 按照“2.3.2”项方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析并记录峰面积, 经计算供试品溶液中 OPD 和 OPD' 的 RSD 值分别为 0.66% 和 1.33%。

3.1.5 稳定性试验 取该注射液样品(批号 1705014), 按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液, 在室温下 4 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 进行测定分析, 结果 OPD 和 OPD' 的稳定性在 86.71%~104.19%, 表明供试品溶液在室温下 4 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 内稳定。

3.1.6 基质效应与回收率试验 精密移取该注射液样品(批号 1705014), 精密加入适量对照品溶液, 按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液, 再按“2.1”和“2.2”下色谱和质谱条件测定, 记录峰面积, 计算供试品样品中 OPD 和 OPD' 的回收率和基质效应, 结果显示二者回收率的 RSD 值范围为 1.09%~3.02%, 基质效应的 RSD 值范围为 0.73%~2.63%。

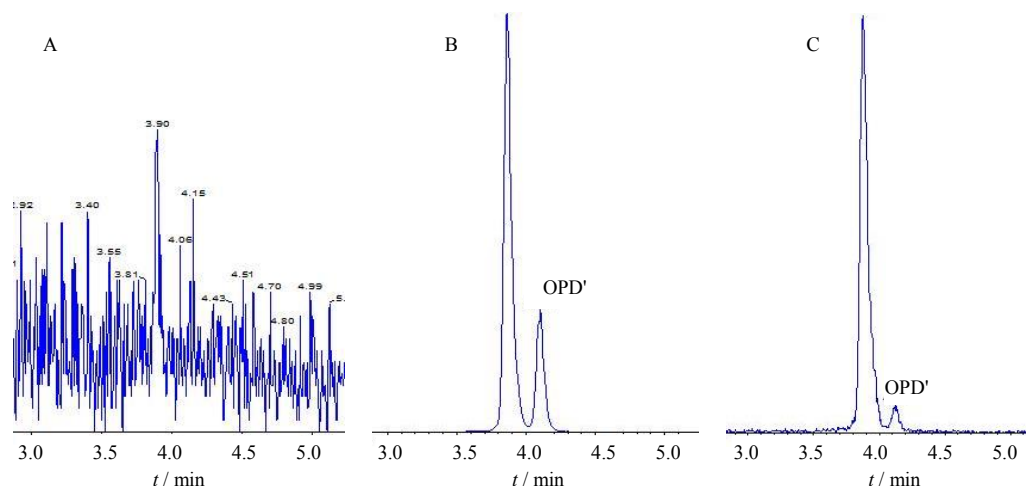


图1 阴性对照(A)、混合对照品溶液(B)、供试品溶液(C)色谱图

Fig.1 Chromatogram of negative control solution of Ginseng Radix (A), mixed standard solution (B), test solution (C)

3.1.7 耐用性考察 耐用性考察参数如表1所示,每次只改变其中一个参数,其他参数同方法中一致,分别进样测定并计算RSD,结果显示RSD均小于2.0%,表明本系统中柱温、流速和色谱柱在一定变化范围内对浓度影响在可接受范围内,本方法耐用性良好。

3.2 样品中OPD和OPD'的测定结果

取不同厂家不同批次的麦冬注射液样品,按照上述“2.3.2”项的方法制备得到供试品溶液,然后以“2.1”“2.2”项的色谱和质谱条件测定,记录峰面积,分别计算供试品溶液中OPD和OPD'的质量分数,结果见表2。

3.3 统计分析

以本实验建立的UPLC-MS/MS方法测得的该受试样品中OPD和OPD'的含量作为评价指标,采用SAS 8.2统计分析软件最短距离法对21批次样品进行聚类分析,结果见图2。聚类结果显示部分厂家生产的样本趋于聚为一类,如B、C、F、G 4个厂家样本分别聚为一类,其余厂家样本相互之间差异不明显。统计分析结果表明不同厂家受试样品样本之间存在一定的质量差异。

3.4 基于溶血性研究的风险评估

该受试样品广泛用于治疗冠心病、休克等急危重症^[19-22],以静脉滴注方式给药,药物中原型成分直

接作用于血液及身体各个组织器官,除具有发挥疗效快的优点之外,缺少了首关效应也对药物本身复杂成分的毒效作用带来了极大的不确定性。据相关文献资料报道^[23-24],该受试样品临床不良反应时有发生,涉及人体多个系统器官,对心血管系统、呼吸系统、中枢及外周神经系统、胃肠系统、皮肤及其附件均可造成损害。

该受试样品中OPD'成分以静脉滴注直接进入血液,缺少被消化系统内苷键水解酶代谢为苷元的过程^[25],不仅对心脏等靶器官存在潜在的毒性作用,还可能对血液中的红细胞造成一定程度的溶血现象。原国家食品药品监督管理总局2005年发布的《中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则》中明确规定^[26],受试物对健康新西兰白兔红细胞溶血率大于5%表明有溶血发生,本实验后期研究发现,OPD'在10 μg/mL时溶血率为16.68%,已构成溶血现象,当OPD与OPD'均以10 μg/mL混合给药,溶血加剧并高达44.91%,远大于OPD'单独给药(图3)。

由该药说明书中用法用量一栏可知,静脉滴注一次20~100 mL,根据实际测得最高含量结果,F厂家含有OPD' 394.9 ng/mL,则每人每次用药最高入血量为100 mL×394.9 ng/mL=39.49 μg,以成人平均

表1 OPD和OPD'的耐用性试验结果($n=6$)
Table 1 Results of durability for OPD and OPD'($n=6$)

条件	化合物	变动因素	浓度/(ng·mL ⁻¹)	平均浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
柱温(°C)	OPD	35	106.23	107.48	1.14
		40	108.67		
		45	107.54		
	OPD'	35	134.65	133.23	0.94
		40	132.75		
		45	132.30		
	OPD	0.24	105.60	105.31	0.38
		0.30	105.49		
		0.36	104.85		
体积流量(mL/min)	OPD'	0.24	131.10	132.38	0.93
		0.30	132.50		
		0.36	133.55		
	OPD	Agilent	105.54	105.82	1.36
		BEH C ₁₈	104.55		
		T ₃	107.38		
	OPD'	Agilent	129.25	130.90	1.18
		BEH C ₁₈	132.31		
		T ₃	131.15		

表2 21个批次样品中OPD和OPD'的量($n=3$)

Table 2 Determination results of OPD and OPD' in 10 batches of Shenmai Injection ($n=3$)

厂家	批号	OPD/(ng·mL ⁻¹)	OPD'/(ng·mL ⁻¹)
A	16110632	155.75	31.02
	161216D1	141.35	17.19
	151019F2	231.75	73.05
B	1704271	934.50	259.35
	1704262	610.50	177.85
	1705232	555.50	164.70
C	1701104	N/A	N/A
	1701103	1.27	N/A
	1801102	N/A	N/A
D	17070205004	2.60	N/A
	17050405006	95.80	15.84
	17050405007	N/A	N/A
E	20170807	5.33	6.38
	20180402	102.40	49.40
	20180307	93.20	N/A
F	1705014	1565.50	217.35
	1703064	2020.00	394.90
	1703054	1520.00	286.00
G	170305	102.40	N/A
	170907	105.60	N/A
	170908	102.40	N/A

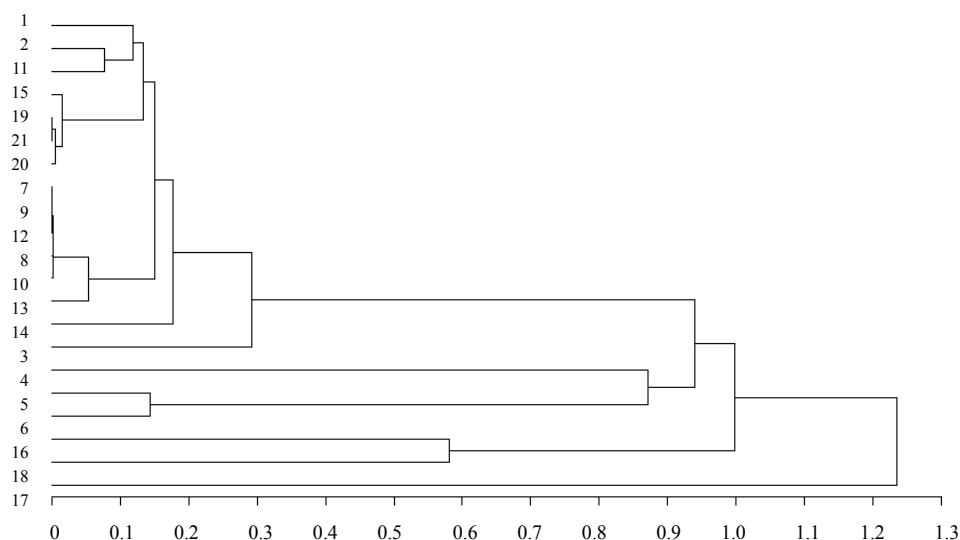


图2 21批次样品中OPD和OPD'的聚类分析结果

Fig.2 Hierarchical clustering analysis of OPD and OPD' in 21 batches samples

血液体积3.5 L计算,单次用药人体血液中OPD'理论平均浓度为39.49 $\mu\text{g}/3.5 \text{ L}=11.28 \mu\text{g}/\text{L}$,但静脉滴注给药方式存在局部血药浓度大于理论平均血药浓度问题,提示该受试样品的不良反应可能与OPD'

的含量有关。

4 讨论

本实验建立了UPLC-MS/MS法同时测定该受试样品中OPD和OPD'含量,该方法对OPD和OPD'

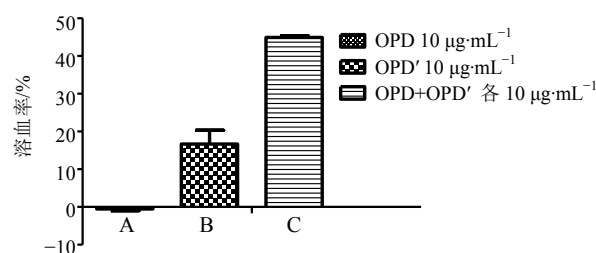


图3 OPD和OPD'对红细胞的溶血作用

Fig. 3 Hemolytic effect to red blood cells of OPD and OPD'

的检测限分别为1 ng/mL和8 ng/mL,能够满足分析需要。结合含量测定和聚类分析对样本间和样本内进行分析:相同厂家样本趋于聚为一类,样品的质量与生产厂家、生产批号之间有明显关联性,各厂家对于该药的原料药的选择以及制备工艺未实现统一标准化;大部分样品中OPD的含量是OPD'的3~5倍,OPD含量较高的B、F厂家中,OPD'的含量也相应较高,而OPD含量较低的C、D、G厂家中,OPD'的含量也相应偏低,甚至低于仪器检测限,提示OPD和OPD'以某种稳定比例存在。

该受试样品导致的临床不良反应损害是否直接与OPD'的心脏毒性及溶血作用有关尚待进一步研究,但对OPD'心脏毒性及溶血作用的重视刻不容缓。本实验以一种中成药为例,围绕OPD'的溶血作用,尝试对该药进行风险评估,提出应全面有效控制麦冬及含麦冬中成药的质量,建议结合不同剂型用药方式的特点,在质量标准中分别明确制定有效成分的定量测定及毒性成分的限量控制。

参考文献

- [1] 骆健. 沙参麦冬汤加减治疗慢性支气管炎的临床疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2015, 15(7): 18-19.
- [2] 彭婉, 马骁, 王建, 等. 麦冬化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(2): 477-488.
- [3] 李建强. 人参麦冬散治疗阴虚火旺型失眠49例[J]. 中医临床研究, 2012, 04(7): 85-86.
- [4] 赵希明, 蔡德光, 马红英, 等. 沙参麦冬汤治疗功能性便秘80例临床观察[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(23): 1257-1257.
- [5] 许敏. 生脉饮复方有效部位纯化工艺初探及麦冬药材的质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [6] 蒋凤荣, 张旭, 洪艳丽, 等. 麦冬皂苷D对过氧化氢造模的HUVEC保护作用机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 08(9): 1646-1648.
- [7] 武晓群. 沙参麦冬汤和麦冬皂苷D延缓衰老的作用及机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [8] 黄小燕, 王宇光, 王怡, 等. 麦冬皂苷D通过上调CYP2J2/EETs抗Ang II诱导的内皮细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2018, 42(2): 377-384.
- [9] 王远. 麦冬皂苷D诱导CYP2J产生抗心肌肥大机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [10] 王远, 王宇光, 马增春, 等. 麦冬皂苷D通过降低自噬抑制血管紧张素II诱导的心肌肥大[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10): 1370-1376.
- [11] 孟晨, 袁彩华, 张晨晨, 等. 麦冬皂苷D通过减轻内质网应激对阿霉素所致心肌损伤产生保护作用[J]. 药理学学报, 2014, 49(8): 1117-1123.
- [12] 油文亭. 麦冬皂苷D通过CYP2J3/EETs系统发挥心肌保护作用的分子机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [13] 黄小燕, 王宇光, 李晗, 等. 基于人孕烷X受体调控CYP3A4转录表达的麦冬皂苷D和麦冬皂苷D'的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2302-2306.
- [14] 任思嘉, 徐焕华, 李明, 等. 麦冬皂苷D'对大鼠心肌细胞H9c2的细胞毒性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(4): 325-331.
- [15] 任思嘉. 麦冬皂苷D'致心脏毒性的发现及其机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- [16] 邝婷婷, 谭德, 张艺, 等. 中药麦冬药材及其制剂的质量评价研究进展[C]//全国药用植物化学与中药新药研发技术创新研讨会, 2010.
- [17] 姚令文. 麦冬的化学成分及质量控制研究[D]. 北京: 中国药品生物制品检定所, 2004.
- [18] 中国药典[S]. 2015.
- [19] 李震, 翟玉峰, 冀叶, 等. 参麦注射液防治局部肿瘤放疗不良反应的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 213-215.
- [20] 李盼, 王婷, 付姝菲, 等. 基于Meta分析的参附、参麦注射液临床作用比较[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2949-2959.
- [21] 齐延伟, 吴忠荣, 马振刚, 等. 参麦注射液辅助治疗急性ST段抬高型心肌梗死溶栓的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 195-198.
- [22] 张国勇, 王双虎, 张青莲, 等. 参麦注射液对大鼠细胞色素P450酶亚型活性的影响[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2482-2487.
- [23] 崔盈盈, 吴嘉瑞, 谭迪, 等. 基于关联规则的参麦注射剂不良反应流行病学特点研究[J]. 药物流行病学杂志, 2018, 27(3): 160-168.
- [24] 刘洋, 肖隆灏, 李霖, 等. 2007—2017年参麦注射液的不反应文献分析[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(12): 2523-2528.
- [25] 沈岚, 徐德生, 冯怡, 等. 大鼠肠内菌对麦冬皂苷D'代谢的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 618.
- [26] 中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则[S]. 2005.