

基于等温滴定量热技术的清开灵注射液临床联合用药相互作用表征研究

鄢丹¹, 陈龙虎^{1,2}, 冯雪¹, 邱玲玲¹, 闫琰¹, 张萍¹, 杜晓曦³, 肖小河^{1*}

1. 解放军第302医院全军中药研究所, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 国家食品药品监督管理局 药品评价中心, 北京 100045

摘要: **目的** 建立一种揭示中西药注射剂临床联合用药相互作用表征的新方法。**方法** 以清开灵注射液为模式药, 分别加入注射用头孢唑肟钠与5%葡萄糖注射液(简称葡萄糖液), 采用等温滴定量热法(ITC)分别考察药物间相互作用, 以热力学参数吉布斯自由能(ΔG)、焓变(ΔH)、熵变(ΔS)判断溶合反应类型, 通过对比不同注射剂混合前后化学指纹图谱特征信息对结果进行佐证。**结果** 清开灵注射液与头孢唑肟钠滴定过程中测得 $|\Delta H| > T|\Delta S|$, 为焓驱动反应, 且释放热量较大, 提示两者之间的相互作用以化学反应为主, 内在物质发生改变。清开灵注射液与5%葡萄糖液溶合时 $|\Delta H| < T|\Delta S|$, 为熵驱动反应, 且反应活性谱显示放热较少, 提示两者之间的相互作用以物理反应为主, 活性成分仅被溶解稀释, 未发生质变。上述结果也得到了化学指纹图谱的佐证。**结论** ITC具有简便快捷、高灵敏度等优势, 可用于清开灵注射液临床联合用药相互作用表征的研究, 也为其他中西药注射剂联合用药的相容性评价提供了参考。

关键词: 清开灵注射液; 头孢唑肟钠注射液; 葡萄糖注射液; 药物相互作用; 等温滴定量热法

中图分类号: R969.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)11-2217-05

Characterization of interaction in Qingkailing Injection with clinic administration based on isothermal titration calorimetry

YAN Dan¹, CHEN Long-hu^{1,2}, FENG Xue¹, QIU Ling-ling¹, YAN Yan¹, ZHANG Ping¹, DU Xiao-xi³, XIAO Xiao-he¹

1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Center for Drug Reevaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100045, China

Abstract: **Objective** To establish a new method used for revealing the characterization of interaction between Chinese and Western medicinal injections. **Methods** Isothermal titration calorimetry (ITC) was applied to evaluating the interaction in Qingkailing Injection (QKLI, as mode drug) with Ceftizoxime Sodium Injection (CSI) and 5% Glucose Injection (5% GI). The diversification of Gibbs free energy (ΔG), enthalpy (ΔH), and entropy (ΔS) were determined to judge the reaction types of colliquesation procedures of different injections. Meanwhile, the fingerprints of QKLI before and after combined with the various injections were compared to validate the results. **Results** During the titration procedure of QKLI and CSI, $|\Delta H| > T|\Delta S|$, that was to say the reaction was enthalpy-driving. And the reactive profile indicated that a great deal of heat gave out during the procedure. Obviously, chemical reactions happened and the internal component changed. On the other side, the reaction of QKLI combined with 5% GI was entropy-driving, because $|\Delta H| < T|\Delta S|$. The reactive profile showed there was only a little heat released. So non-chemical reactions happened and the major ingredients did not change. In addition, the results of ITC were validated by the fingerprints. **Conclusion** ITC, with the virtue of convenience, speediness as well as high-sensitivity, could be utilized to evaluate the interaction in QKLI with clinic administration. Meanwhile, ITC could be applied to the evaluation on compatibility of other kinds of Chinese and Western medicinal injection combination.

Key words: Qingkailing Injection (QKLI); Ceftizoxime Sodium Injection (CSI); Glucose Injection (GI); drug interaction; isothermal titration calorimetry (ITC)

收稿日期: 2012-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173542, 81274078); 北京市自然科学基金资助项目(7112128); 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开发基金资助项目(ZYCD028)

作者简介: 鄢丹, 四川渠县人, 中药学博士, 副研究员, 主要从事中药生物质量评价方法的研究。E-mail: yd277@126.com

***通讯作者** 肖小河 Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com

中药注射剂临床应用较为广泛,疗效确切,然而近年来其不良反应事件频发,其中联合用药不当是主要原因之一。现用于评价不同注射剂之间相互作用的方法主要有肉眼观察法、不溶性微粒检测法^[1-2]、pH 值测定法^[3-4]、渗透压检测法^[5]、高效液相色谱(HPLC)法^[6-7]等,这些方法大多存在主观性强、操作复杂、相关性不强,以及难以反映药物相互作用过程的信息等不足。因此,建立中药注射剂联合用药客观灵敏、指示价值良好的新的评价方法显得尤为重要。

不同注射剂联合用药的相互作用无论是物理反应还是化学反应均与分子结合过程能量(热量)变化有关,因此可通过监测分子间相互作用的热力学参数揭示其反应类型表征。等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)可连续、动态监测物质的分子间相互作用的动力学过程,并可依据热力学参数(吉布斯自由能变化 ΔG 、反应焓变 ΔH 、熵变 ΔS 及反应常数 K 等)判别相互作用的反应类型(物理反应、化学反应)^[8-9]。目前该技术已成功应用于生物化学、酶促反应等分子过程监测^[10-16]。

清开灵注射液主要用于治疗热病神昏、中风偏瘫、急性上呼吸道感染以及肺炎等^[17-18],常与其他抗生素或输液配伍使用^[19]。但因其药味组成复杂,联合用药缺乏充足有效的科学依据,因而导致临床上不良反应事件发生^[20]。本实验以清开灵注射液为模式药,分别配伍注射用头孢唑肟钠、5%葡萄糖注射液(简称葡萄糖液),采用 ITC 法,通过测定两组药物相互滴定过程中产生的反应活性谱图以及热力学参数,判断反应类型;同时辅以化学指纹图谱进行验证,以客观地揭示其相互作用表征的内在规律,为减少中药注射剂临床不良反应提供实验支持。

1 材料

1.1 药品与试剂

清开灵注射液(批号 010705A),10 mL/支,北京中医药大学药厂;注射用头孢唑肟钠(批号 B200908009),哈药集团制药总厂;5%葡萄糖注射液(批号 100210119),石家庄四药有限公司。甲醇,色谱纯,美国 Fisher 公司;注射用灭菌水(批号 100518),北京市永康药业有限公司。

1.2 仪器

NANO ITC^{2G} 等温滴定量热仪(最低检测限为 0.1 nJ,基线稳定性为 20 nW,25 °C 时温度波动 ± 0.000 2

°C,工作温度为 2~80 °C,响应时间 12 s),美国 TA 公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;BS210S 型电子天平,北京 Startorius 有限公司。

2 方法

2.1 ITC 检测

2.1.1 供试品溶液的制备 取清开灵注射液适量,加注射用灭菌水溶解,使其终浓度为 1.24 mmol/L(以黄芩苷计),头孢唑肟钠加注射用灭菌水溶解至浓度为 616 mmol/L(以头孢唑肟钠计),葡萄糖液开瓶即用,浓度为 280 mmol/L。

2.1.2 检测条件及操作过程 在样品池中注满被滴定溶液(清开灵注射液),恒温至 25 °C,控制搅拌速率为 300 r/min,待仪器自动平衡后,记录 60 s,分别滴定头孢唑肟钠和葡萄糖液,各连续滴定 25 滴,每滴 4 μ L,间隔时间为 350 s。

2.1.3 数据处理 在滴定过程中,用 Launch NanoAnalyzea 软件采集数据,滴定结束后,将实验用样品浓度输入,Launch NanoAnalyzea 软件自动对反应活性谱进行计算、拟合,可得到 2 种注射剂溶合的热力学参数 ΔH 及平衡常数 K ,计算 ΔG 及 ΔS ^[21-22]。

$$\Delta S = -R \ln K \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

R 为气体常数, T 为绝对温度

2.2 HPLC-DAD 指纹图谱检测

2.2.1 供试品溶液的制备

(1) 清开灵稀释液制备:取清开灵注射液 1 支,精密移取 2.5 mL 至 10 mL 量瓶中,用注射用灭菌水稀释定容至刻度,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品液 S1。

(2) 清开灵注射液与头孢唑肟钠混合液制备:取头孢唑肟钠一瓶,溶于注射用灭菌水,稀释至 0.1 mg/mL,过 0.22 μ m 微孔滤膜,滤液备用。分别取等体积 S1 与头孢唑肟钠溶液,混合,制成样品 S2。

(3) 清开灵注射液与葡萄糖液混合液制备:取葡萄糖液,过 0.22 μ m 微孔滤膜,滤液备用。分别取等体积 S1 与葡萄糖液溶液混合,制成样品 S3。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Platinum EPS C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),柱温 25 °C,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 255 nm,流动相 A 为 0.5% 乙酸水溶液,流动相 B 为甲醇。线性梯度洗脱:0 min, 5% B; 15 min, 12% B; 50 min, 75% B; 55 min,

75% B; 75 min, 90% B^[23]。

3 结果

3.1 ITC 检测

清开灵注射液与头孢唑肟钠、葡萄糖液的相容性与反应活性谱分别见图 1、2。图 1-a、图 2-a 中曲线为两种注射剂滴定结果，为扣除滴定液与样品池中溶媒（注射用灭菌水）相互作用产生的热量，测定了头孢唑肟钠、葡萄糖液与无菌水的滴定反应。扣除背景信息后，对滴定峰进行积分，得到的滴定过程热量变化图谱见图 1-b、图 2-b。两组注射剂混合液溶合的热力学参数见表 1。

从反应活性图谱可见，清开灵注射液与头孢唑肟钠滴定放热较多（图 1-b），而与葡萄糖液滴定放热较少（图 2-b），提示前者有化学键的断裂或生成，而后者主要发生了物理反应。由表 1 可见，扣除滴定注射剂对溶剂的作用后，清开灵注射液与头孢唑肟钠反应的 ΔG 为负值，由此可以判断 2 种注射剂溶合时发生了自发反应^[24]。公式(2)显示 ΔG 由 ΔH 及 $-T\Delta S$ 2 个因素决定，这 2 个因素对 ΔG 贡献的大小决定了反应的类型。若 $|\Delta H| > T|\Delta S|$ ，则该反应为焓驱动反应，即为化学反应；若 $|\Delta H| < T|\Delta S|$ ，则该反应为熵驱动反应，即为物理反应。清开灵注射液与头孢唑肟钠滴定过程中 $|\Delta H| > T|\Delta S|$ ，因此可以推断这 2 种注射液溶合后，发生了化学反应，其物质基础发生了改变。而清开灵注射液与葡萄糖液融合过

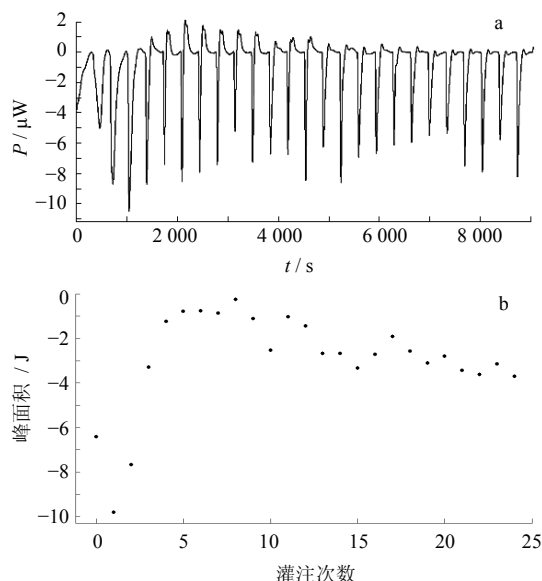


图 1 清开灵注射液与头孢唑肟钠滴定过程 (a) 和热量变化 (b) 图谱

Fig. 1 Illustration of QKLI interaction with CSI titration (a) and heat variation (b)

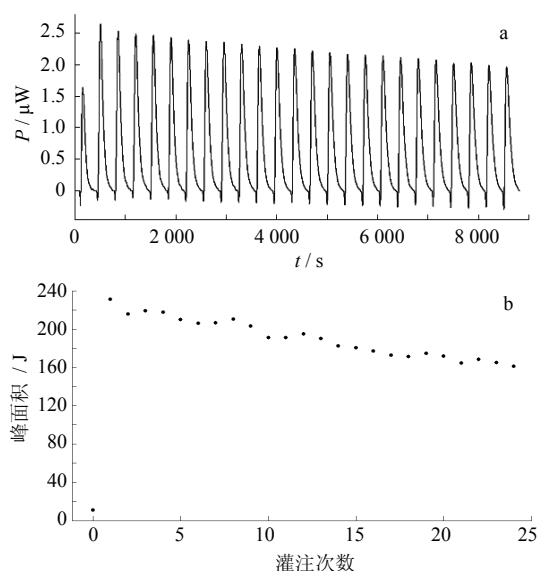


图 2 清开灵注射液与葡萄糖液滴定过程 (a) 和热量变化 (b) 图谱

Fig. 2 Illustration of QKLI interaction with 5% GI titration (a) and heat variation (b)

表 1 清开灵注射液与头孢唑肟钠或葡萄糖液相互作用的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of QKLI interaction with CSI and 5% GI

样 本	K	$\Delta H /$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta G /$ kJ	$\Delta S /$ (kJ·K ⁻¹)	$-T\Delta S /$ kJ
清开灵注射液 + 头孢唑肟钠	1.69×10^6	-67.24	-35.55	0.106	31.69
清开灵注射液 + 葡萄糖液	2.46×10^8	-21.34	5.22	0.089	26.56

程中 $|\Delta H| < T|\Delta S|$ ，为熵驱动反应，且反应活性谱显示滴定过程中平均放热较少，表明为物理反应。

3.2 指纹图谱检测

3.2.1 清开灵注射液与头孢唑肟钠配伍前后指纹图谱分析 由图 3 可见，清开灵注射液与头孢唑肟钠混合后，谱峰变化较大，个别谱峰的峰高降低（图 3-A），有的谱峰消失或保留时间改变（图 3-B），同时又有新的谱峰产生（图 3-C）。由此推断，清开灵注射液与头孢唑肟钠混合过程中发生了化学反应，原有的一些成分在反应过程中减少或消失，并产生了新的化合物。

3.2.2 清开灵注射液与葡萄糖液配伍前后指纹图谱分析 由图 4 可见，清开灵注射液与葡萄糖液混合前后的指纹图谱几乎完全重合，可见二者配伍后未发生化学反应。

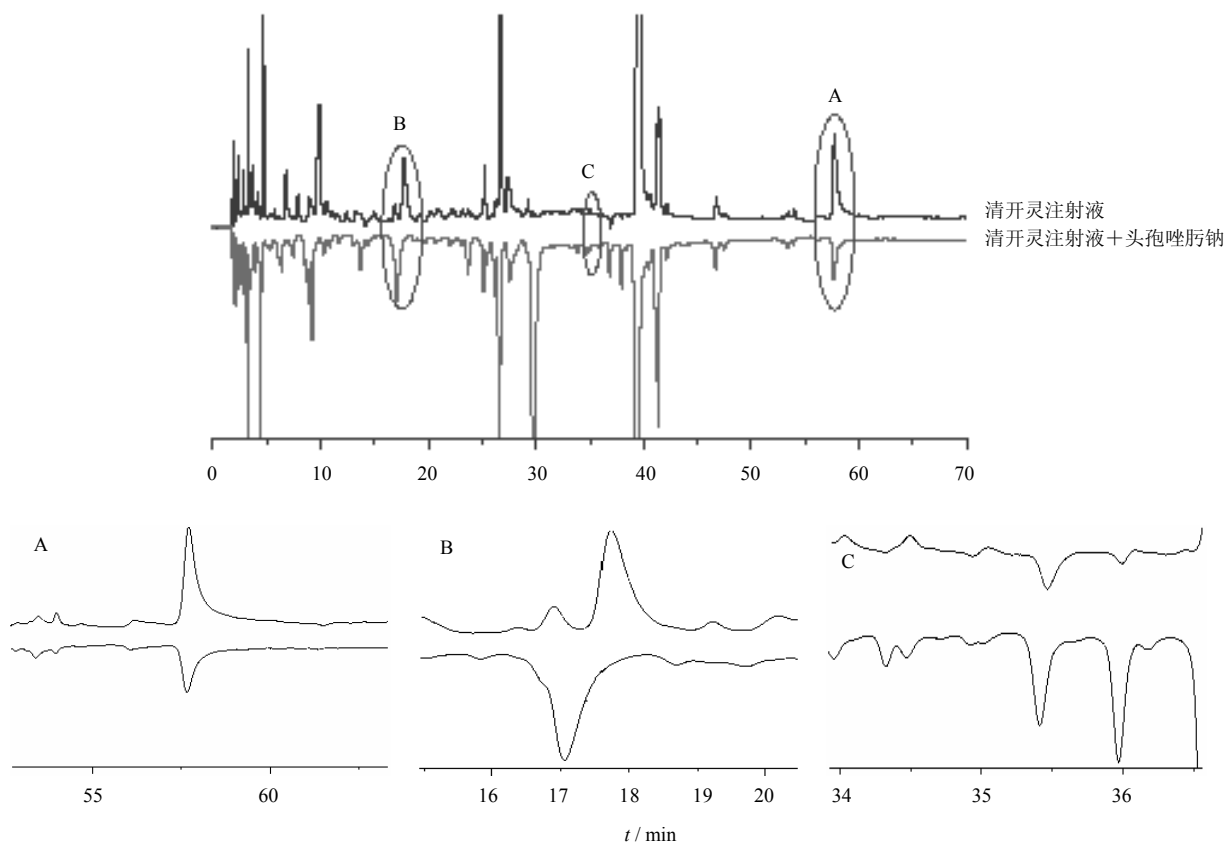


图3 清开灵注射液与头孢唑肟钠混合前后的 HPLC-DAD 指纹图谱

Fig. 3 HPLC-DAD fingerprint of QKLI before and after mixing with CSI

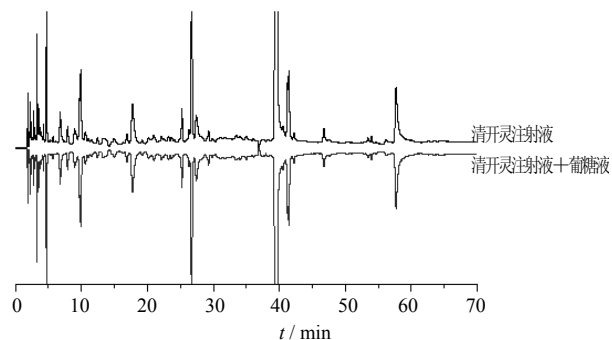


图4 清开灵注射液与葡萄糖液混合前后的 HPLC-DAD 指纹图谱

Fig. 4 HPLC-DAD fingerprint of QKLI before and after mixing with 5% GI

4 讨论

本实验以清开灵注射液为模式药,应用 ITC 法分别考察其与头孢唑肟钠或葡萄糖液合用的相互作用,并以化学指纹图谱进行佐证。ITC 法检测结果表明,清开灵注射液与头孢唑肟钠之间发生了焓驱动反应,即发生了化学变化,其内在物质发生了质

变;而清开灵注射液与葡萄糖液混合后,发生的反应为熵驱动反应,即物理变化,其有效成分并未改变。两组实验的化学指纹图谱与 ITC 法检测结果一致。

头孢唑肟钠的母核是四元的内酰胺环与六元的氢化噻嗪环骈合而成,分子结构中 C-2 与 C-3 的双键以及内酰胺环形成一个较大的共轭体系^[25],且因四元环本身张力较大,可能被清开灵注射液中的亲核试剂(如绿原酸、胆酸、咖啡酸等含羧基的成分)进攻而导致开环,生成其他物质。反应中伴随着化学键的断裂与生成,因此在热力学图谱上可检测到较明显的热量变化。葡萄糖分子中的半缩醛羟基可能与清开灵注射液中某些成分发生脱水反应生成苷,但在室温和中性环境下,葡萄糖较稳定,且空间位阻过大,该反应难以发生,半缩醛羟基只能和一些带有羟基、氨基或巯基的分子形成分子间氢键,该过程不存在化学键断裂,故放热较少。

中药注射剂成分大多源于天然物质提取物,并含有各种辅料,成分特别复杂,而现有的化学方法难以反映合用药物间相互作用时所有的化学信息。ITC 法可以直接测定两种注射剂混合后的热量变

化,通过图谱和热力学数据直观、准确地反映出注射剂内在物质之间可能发生的微观变化,在无须知道注射剂内在物质的具体种类与性质条件下,即可通过滴定反应的参数判断反应类型,尤其适用于物质基础不是很明确的药物,能弥补化学方法的不足。ITC 具有简便快捷、灵敏度高、实时在线、反映过程信息等特点,因此也可以在其他中西药注射剂联合用药安全性评价研究中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 范治云,程春雷,刘琦,等.对丹参注射液不溶性微粒检查的不确定度的评定[J].中国药事,2008,22(3): 235-236.
- [2] 韦曦,吕超志,杨荔,等.中药注射剂与输液配伍的不溶性微粒变化[J].中国中药杂志,2007,32(14): 1477-1180.
- [3] 张俊松,戚燕,王晓利,等.注射液奥美拉唑溶液配伍稳定性研究[J].中国药师,2007,10(4): 352-354.
- [4] 张信平,潘洁.注射用炎琥宁与利巴韦林注射液配伍的稳定性[J].中国医院药学杂志,2006,26(4): 494-495.
- [5] 陆进,李淑芳,马秉智,等.头孢替安与3种输液的配伍稳定性[J].中国医院药学杂志,2008,28(11): 934-936.
- [6] 胡昌勤,许明哲,马越,等.含丹参的中药注射液中过敏性杂质的检测[J].药学学报,2008,43(5): 518-522.
- [7] 李永吉,董立财,王艳宏,等.双黄连粉针与常见注射剂配伍稳定性考察[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6): 114-116.
- [8] 谭非.诺酮药物与生物大分子相互作用的研究[D].杭州:浙江大学,2005.
- [9] Wu B, Wang L S, Gao P J. The study on configuration and conformation of *p*-nitrophenyl-cellobiose combined to exocellobiohydrolase[J]. *Sci China Ser C*, 2008, 6: 35-43.
- [10] 刘敏,孙德志,林瑞森,等.人血清蛋白与季铵盐双分子表面活性的相互作用[J].化学学报,2007,65(2): 123.
- [11] George I M, Peter L P. Protein interactions with urea and guanidinium chloride: A calorimetric study[J]. *J Mol Biol*, 1992, 226(2): 491-504.
- [12] Wesley E. Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis[J]. *Chem Rev*, 1997, 97(5): 1233-1236.
- [13] Stephanie L, Ernesto F. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry[J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2001, 11(5): 560-563.
- [14] Matthew J T, Javier G. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? [J]. *Anal Biochem*, 2001, 296(2): 179-183.
- [15] Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, et al. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21655-21659.
- [16] Clemens S, Achim B, Gleb B, et al. Structure of TPR DomainPeptide Complexes[J]. *Cell*, 2000, 101(2): 199-204.
- [17] 郭姗姗,王意忠,张毅,等. BN大鼠和豚鼠对清开灵注射液致速发型过敏反应的比较[J].药学学报,2009,44(8): 852-857.
- [18] 周雪梦,陆春妮,元文宝,等.清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒作用[J].中草药,2011,42(7): 1351-1356.
- [19] 解静平,景洪军,张卫兵,等.清开灵注射液与临床常用抗生素、维生素配伍的可行性考察[J].中国药事,1999,13(2): 127-130.
- [20] 沈国萍.清开灵注射液与4种抗生素配伍前后不溶性微粒的变化[J].临床合理用药,2009,2(19): 37-39.
- [21] 王冬冬,孙德志,李林尉,等.5-氟尿嘧啶与牛血清白蛋白的相互作用[J].物理化学报,2007,23(10): 1627-1630.
- [22] Hiroyasu O, Adrian V C, Dong X, et al. Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: The binding thermodynamics of amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease[J]. *Protein Sci*, 2002, 11(8): 1908-1916.
- [23] 武彦舒,金城,张倩,等.清开灵注射液中10种有效成分的同时测定及其质量相关性研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(11): 3112-3114.
- [24] 李月生,夏翔翔,李新怀,等.微量热技术在生命科学研究中的应用[J].化工时刊,2007,21(7): 64-65.
- [25] 郑虎.药物化学[M].北京:人民卫生出版社,2005.