

· 论著 ·

水合氯醛有关物质分析方法优化与稳定性检测

宋开超, 方夏琴, 李 鹤, 郝玉梅, 谭晓川, 郑稳生 (北京协和医学院、中国医学科学院药物研究所, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050)

[摘要] 目的 建立水合氯醛中有关物质检查方法, 提高水合氯醛相关产品的质量标准与控制限度。方法 建立水合氯醛三氯甲烷与卤代羧酸的检测方法, 并通过稳定性监控水合氯醛的杂质变化。结果 经对比研究, 本文建立的有关物质方法可满足相关法规要求, 同一方法可准确检测原料及其制剂中的 4 种杂质。结论 本文为水合氯醛及其制剂的质量标准提升提供技术支持, 通过水合氯醛杂质检测以及本品在高温、光照的稳定性对比, 对实施制剂研究与生产过程中的杂质监控非常必要, 可更大程度保障人民群众用药安全。

[关键词] 水合氯醛; 三氯甲烷; 卤代羧酸; 有关物质; 稳定性

[文章编号] 2097-2024(2023)07-0422-06

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202106092

Analysis method optimization and stability test of related substances of chloral hydrate

SONG Kaichao, FANG Xiaqin, LI He, HAO Yumei, TAN Xiaochuan, ZHENG Wensheng (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing City Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quality control method for detecting impurities in chloral hydrate raw materials, improve the quality standards and control limits of raw materials. **Methods** The determination methods of chloroform and halogenated carboxylic acid in chloral hydrate were established to monitor the change of impurities in chloral hydrate through stability. **Results** The research and establishment of chloroform and halogenated carboxylic acid methods met the requirements of relevant regulations for analytical methodology verification, which could accurately detect four impurities in raw materials and preparations by one method. **Conclusion** The study provides technical support for the improvement and optimization of the quality standards of chloral hydrate and preparations. It is very necessary to implement the impurity monitoring in preparation research and production process by the chloral hydrate impurity detection and the stability comparison of this product at high temperature and light, which could largely promote the safety of medication.

[Key words] chloral hydrate; chloroform; halogenated carboxylic acid; related substances; stability

水合氯醛, 又称水合三氯乙醛, 具有镇静、催眠、抗惊厥等作用, 临床上以溶液口服或灌肠方式给药。但水合氯醛稳定性较差, 临床使用制成溶液制剂有效期很短, 其主要的杂质有三氯甲烷、甲酸、氯乙酸等, 其中三氯甲烷是原料生产与储存过程中比较重要的降解杂质^[1]。国内较多数的文献对水合氯醛及其制剂的稳定性研究采用滴定法或紫

外法^[2-3], 此方法准确度差, 专属性不足, 不能准确评估水合氯醛及其制剂的质量状况。目前, 《中国药典》以及国外各国药典收载的水合氯醛及其制剂的质量标准中有关的检查方法专属性均较低^[4-7]。

各国药典中鉴别、酸度、炽灼残渣与溶液澄清度是水合氯醛药物的基本理化分析项, 醇合三氯乙醛则为控制本品合成过程中产生的一种杂质。水合氯醛在生产、运输过程中可能产生的降解杂质有甲酸、三氯甲烷、氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸等, 现有的法定标准对此部分降解产物未进行控制, 有关物质项存在缺失。本文旨在对主要降解产物进行定量检测, 如甲酸、三氯甲烷、氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸进行检测方法开发, 其中, 水合氯醛通过碳碳键断裂降解成等比例甲酸、三氯甲烷, 检测甲酸或检测三氯甲烷均可。

[基金项目] 十三五科技重大专项重大新药创制项目 (2018ZX09721003-009-004; 2018ZX09721003-009-006)

[作者简介] 宋开超, 博士研究生, 研究方向: 新型经皮给药制剂关键技术, Email: Kaichao_song@163.com

[通信作者] 方夏琴, 助理研究员, 研究方向: 新型经皮给药制剂关键技术, Email: fangxiaqin@163.com; 郑稳生, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中、西药物新制剂及新释药系统技术与开发, Email: zhengwensheng@imm.ac.cn

三氯甲烷主要采用气相、气质色谱法^[8-10]进行检查,氯乙酸等卤代羧酸可采用液相色谱法和离子色谱法^[11-13]分析,水合氯醛专属性较强的检测方法为气相色谱法^[10-14]。因卤代羧酸具有沸点高、强极性特点,不易气化,无法直接进样进行气相色谱分析,需进行衍生化处理,故本文将卤代羧酸检测方法与三氯甲烷检测方法分别开发建立。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo trace 1300 GC(赛默飞气相色谱仪);电子天平 ME-204E(梅特勒科技);三氯甲烷(北京通广试剂公司);氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸(标准品, CATO);正庚烷(fisher);甲醇、硫酸、硫酸钠;水合氯醛(青岛宇龙海藻药业,批号 20190403)。

1.2 色谱条件

色谱柱温: 40 °C 保持 3 min;以 5 °C/min 的速度升至 80 °C,以 20 °C/min 升至 160 °C,再以 30 °C/min 升至 250 °C;进样口温度: 150 °C;检测器: ECD, 温度 280 °C;色谱柱: DB-5.625 30 m×0.25 mm, 0.25 μm;进样体积 1 μl。

1.3 供试品与对照品溶液配制

分别确定水合氯醛检测三氯甲烷和卤代羧酸的样品处理方法,详见表 1。

2 结果与讨论

2.1 卤代羧酸检测分析方法验证

2.1.1 系统适用性试验

按照图 1 方法,配制用于氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸检测的对照品溶液,并按照“1.2 色谱条件”进样检测,结果如下。

对照品溶液浓度分别为氯乙酸 9.95 μg/ml,二

氯乙酸 13.49 μg/ml,三氯乙酸 9.45 μg/ml,连续进样 5 针,氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸的保留时间分别为 4.33、5.89 和 7.38 min,各峰面积 RSD 分别为 0.75%、1.00%、1.00%,满足系统适用性要求。衍生化转化目标物更容易被气化,氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸经衍生化后分别以氯乙酸乙酯、二氯乙酸乙酯、三氯乙酸乙酯形式被检测。

2.1.2 线性关系考察

分别取氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸对照品适量,加甲醇溶解稀释制成浓度为 10 μg/ml 的储备液,分别取储备液适量置具塞试管中,按照表 1 衍生化处理,取正庚烷层,即得各自的工作曲线样品溶液,按照“1.2 色谱条件”进样检测,以峰面积为纵坐标,相应卤代羧酸浓度为横坐标,进行线性回归。结果见表 2,并按照信噪比大于 3 和大于 10 分别规定检测限和定量限。

将上述信噪比满足定量限的各对照品溶液连续进样 5 针,氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸峰面积 RSD 分别为 5.27%、1.94%、1.15%,显示各目标物的定量限浓度下检测精密度满足要求(RSD<15%)。

2.1.3 重复性试验

按表 1 前处理方法进行配制供试品溶液和对照品溶液,平行取 6 份供试品溶液,连续采集,记录并计算各供试品溶液中氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸的含量,氯乙酸均未检出,二氯乙酸含量 RSD 为 4.43%,三氯乙酸含量结果 RSD 为 4.56%,按照本方法进行卤代羧酸含量检测,含量结果 RSD 均小于 6%。按照《中国药典》2020 年版“通则 9101 分析方法验证指导原则”要求^[15],本供试品中卤代羧酸的含量(10 ppm)重复性要求 RSD 小于 6%。本方法重复性满足要求。

表 1 三氯甲烷与卤代羧酸检测样品前处理方法

溶液名称	前处理1	前处理2
供试品溶液(测定卤代羧酸)	/	称取水合氯醛约 10 mg,置 50 ml 具塞试管中,精密加入甲醇 2 ml, 20% 的硫酸乙醇溶液 2 ml(V/V),无水硫酸钠 0.1 g,密塞,漩涡使溶解,置 50 °C 水浴加热 40 min,取出后迅速冲凉,精密加入 4 ml 正庚烷,漩涡混匀,加入 20 ml 水,振摇,静置 20 min,分层,取上清液即得。
卤代羧酸对照品溶液	/	分别称取氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸适量,分别用甲醇配制成浓度为 100 μg/ml 的储备液,取 1 ml 置 10 ml 量瓶中,用甲醇定容至刻度即得;取上述溶液各 1 ml,置 50 ml 具塞试管中,精密加入 1 ml 甲醇, 20% 的硫酸乙醇溶液 2 ml(V/V),无水硫酸钠 0.1 g,密塞,漩涡使溶解,置 50 °C 水浴加热 40 min,取出后迅速冲凉,精密加入 4 ml 正庚烷,漩涡混匀,加入 20 ml 水,振摇,静置 20 min,分层,取上清液即得各对照品溶液。
供试品溶液(测定三氯甲烷)	称取水合氯醛约 10 mg,置 10 ml 具塞试管中,加甲醇溶液完全,定容后过滤取续滤液即得。	称取水合氯醛约 100 mg,置 10 ml 具塞试管中,加入饱和氯化钠溶液 0.35 ml,氯化钠 0.5 g,正己烷 5 ml,密塞,振摇提取,静置 20 min,取正己烷层,取续滤液即得。
三氯甲烷对照品溶液	称取三氯甲烷适量,甲醇溶解至 60 μg/ml 即得。	称取三氯甲烷适量,用正己烷配置成浓度为 20 μg/ml 的储备液;取 1 ml 置 10 ml 量瓶中,用正己烷定容至刻度即得。

2.1.4 准确度试验

采用加样回收率进行方法准确度考察,精密称取 10 mg 水合氯醛原料药 10 份,分别置 10 个 50 ml 锥形瓶中,编号 1~3 加入混合对照品溶液 1.2 ml,编号 4~6 加入混合对照品溶液 1 ml,编号 7~9 加入混合对照品溶液 0.8 ml,上述混合对照品溶液中,氯乙酸浓度为 9.95 $\mu\text{g/ml}$,二氯乙酸浓度为 13.49 $\mu\text{g/ml}$,三氯乙酸浓度为 9.45 $\mu\text{g/ml}$,第 10 份

不加混合对照品溶液,同步取样混合对照品 1 ml 置 50 ml 锥形瓶中,得到 11 份样品,按照表 2 衍生化处理,取正庚烷层进样检测,结果如表 3。

按照本方法进行卤代羧酸含量检测准确度试验,回收率结果符合相关要求。按照《中国药典》2020 年版“通则 9101 分析方法验证指导原则”要求,本供试品中卤代羧酸的含量(10 ppm)回收率限度要求为 80%~115%。本方法准确度满足要求。

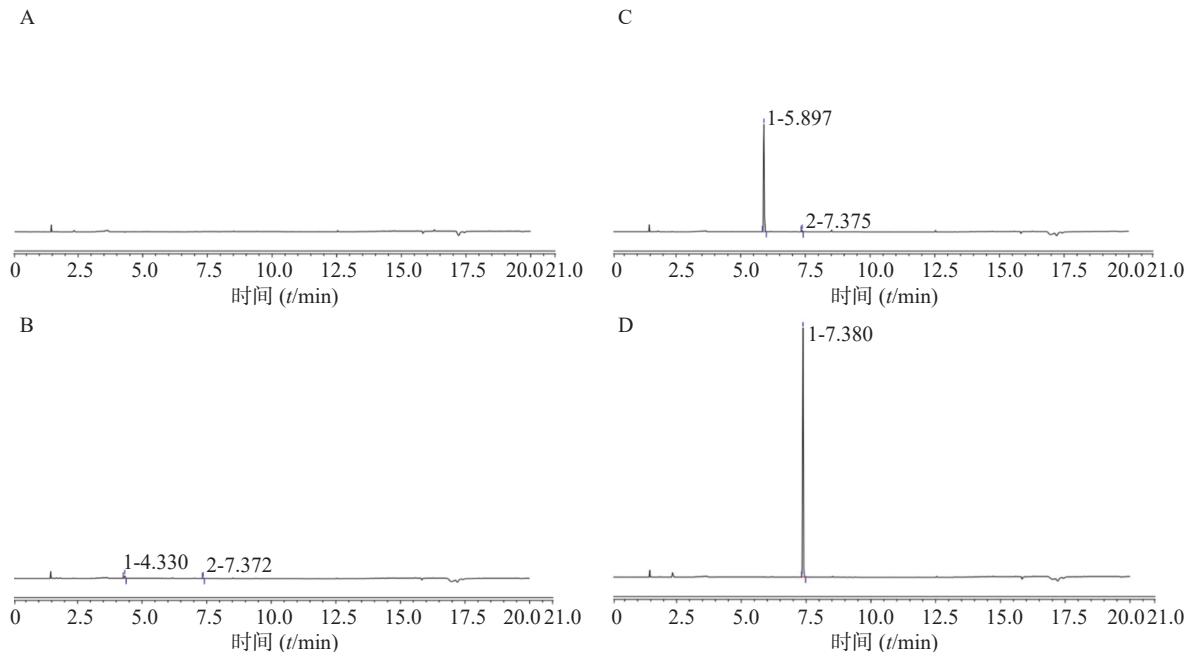


图 1 衍生化方法 GC 色谱图
A.正庚烷;B.氯乙酸;C.二氯乙酸;D.三氯乙酸。

表 2 氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸线性试验结果

样品名称	线性方程	回归系数 r	线性范围($\mu\text{g/ml}$)	检测限($\mu\text{g/ml}$)	定量限($\mu\text{g/ml}$)
氯乙酸	$Y=0.0042X+0.0002$	0.9997	0.25~5	0.025	0.05
二氯乙酸	$Y=0.1106X+0.005$	0.9998	0.125~2.5	0.05	0.125
三氯乙酸	$Y=0.32X+0.0164$	0.9998	0.0625~2.5	0.01	0.0625

表 3 氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸准确度试验结果

编号	原有量(m/mg)	加入量($m/\mu\text{g}$)			测得量($m/\mu\text{g}$)			回收率(%)		
		氯乙酸	二氯乙酸	三氯乙酸	氯乙酸	二氯乙酸	三氯乙酸	氯乙酸	二氯乙酸	三氯乙酸
1	10.23	3.00	3.00	3.00	3.14	2.88	3.11	104.5	95.45	95.82
2	10.17	3.00	3.00	3.00	2.72	2.85	2.99	90.64	94.35	91.75
3	9.97	3.00	3.00	3.00	2.61	2.70	3.35	86.99	89.44	103.7
4	10.00	2.50	2.50	2.50	2.46	2.38	2.51	98.25	94.44	91.13
5	9.95	2.50	2.50	2.50	2.13	2.44	2.50	85.09	96.70	90.44
6	10.08	2.50	2.50	2.50	2.52	2.35	2.48	100.9	93.22	89.86
7	10.11	2.00	2.00	2.00	1.71	1.89	2.03	85.53	93.40	89.49
8	9.88	2.00	2.00	2.00	1.82	1.86	2.05	91.01	91.88	90.83
9	10.01	2.00	2.00	2.00	1.78	1.88	2.09	88.82	92.87	92.85

2.1.5 稳定性试验

取“2.1.1”项下的各对照品溶液,分别于 24 h 内不同时间进样检测,结果显示氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸峰面积 RSD 分别为 4.0%、2.1%、1.6%,表明本方法样品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2 三氯甲烷检测方法学验证

2.2.1 专属性考察

分别按照表 1 中两种前处理方式配制对照品溶液、供试品溶液。前处理 1 测定色谱图见图 2,前处理 2 测定色谱图见图 3。在上述色谱条件下,两种前处理使用的正己烷和甲醇均不干扰三氯甲烷的测定,三氯甲烷保留时间约为 2.5 min。

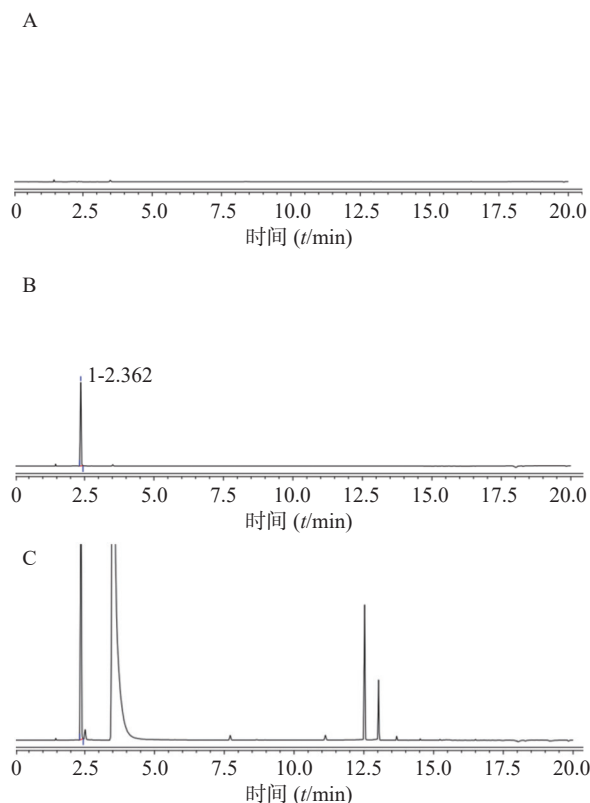


图 2 三氯甲烷检测色谱图 (前处理 1)

A. 甲醇; B. 对照品; C. 供试品。

2.2.2 重复性与系统适用性试验

分别按照前处理 1 和前处理 2 方法制备 6 份供试品;另取三氯甲烷对照品适量,分别用甲醇溶解稀释至 60 $\mu\text{g/ml}$;用正己烷溶解稀释至 2 $\mu\text{g/ml}$ 。将以上供试品与对照品,按照“1.2 色谱条件”进样检测,结果见表 4。

因水合氯醛对热不稳定,熔点低 57 $^{\circ}\text{C}$,在高温条件下碳碳键断裂产生三氯甲烷和甲酸,直接进样或顶空进样均可导致水合氯醛降解而使检测结果偏高,不能反映其实际三氯甲烷含量。而且依据

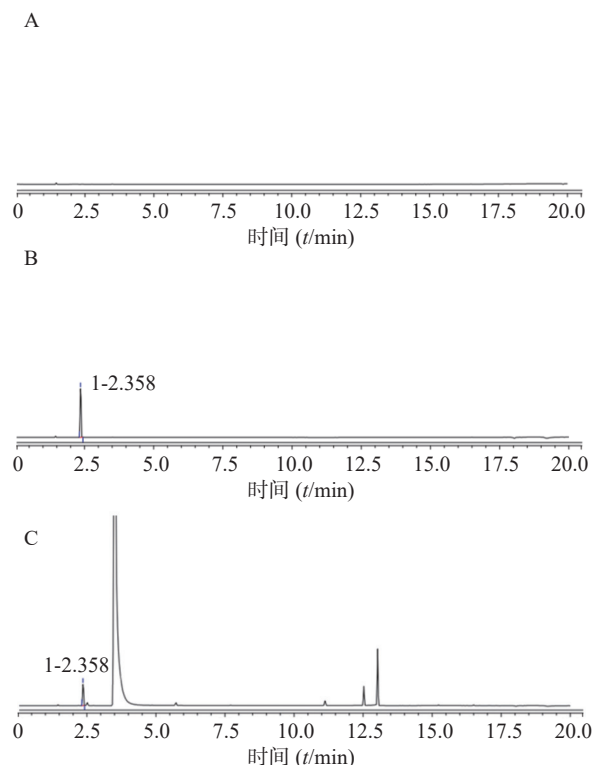


图 3 三氯甲烷检测色谱图 (前处理 2)

A. 正己烷(溶剂); B. 对照品; C. 供试品。

表 4 三氯甲烷检测方法重复性试验

样品名称	前处理方法1		前处理方法2	
	峰面积	含量(%)	峰面积	含量(%)
对照品溶液	1.5129	/	0.2863	/
供试品1	0.7824	3.19	0.0608	0.00212
供试品2	1.4486	5.91	0.0616	0.00215
供试品3	1.6091	6.56	0.0596	0.00208
供试品4	0.6147	2.51	0.0582	0.00203
供试品5	0.8345	3.40	0.0653	0.00228
供试品6	1.0321	4.21	0.0679	0.00237
RSD(%)		37.46		5.89

ICH Q3C(R6)残留溶剂指导原则,三氯甲烷属于药品生产中应限制使用的溶剂(二类溶剂),其限度要求是 60 ppm(即残留上限 0.006%),结合本品原料药检测结果与重复性结果,前处理方法 2 检测结果准确真实。

连续进样 5 针正己烷配制的三氯甲烷对照品溶液,峰面积 RSD 为 2.45%,表明本法的系统适用性试验结果良好。

2.2.3 线性与范围

精密称取三氯甲烷对照品,用正己烷溶解稀释至 20 $\mu\text{g/ml}$,分别取其中 0.2、0.4、0.8、1.0、1.5 ml 置 10 ml 量瓶,用正己烷稀释至刻度即得工作曲线

样品,按照“1.2 色谱条件”进样,以峰面积为纵坐标,相应浓度为横坐标进行线性回归,得线性方程 $Y=0.1094X+0.0222$, $r=0.9998$,表明三氯甲烷在浓度 0.2408~3.011 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性良好。将三氯甲烷对照品溶液逐级稀释,得 0.02、0.001 $\mu\text{g/ml}$ 进样分析,信噪比分别为 14 和 4,分别为定量限和检测限。

2.2.4 三氯甲烷检测准确度试验

取水合氯醛原料药,按表 2 中前处理方法 2 配制,平行 9 份,编号 1~3 加入 0.6 ml 对照品溶液,编号 4~6 加入对照品储备液 0.5 ml,编号 7~9 加入对照品储备液 0.6 ml,分别置 10 ml 离心管中,加入饱和氯化钠 0.5 ml,氯化钠 0.5 g,4.4 ml 正己烷,振摇溶解,静置 30 min,分别取正己烷层进样检测,结果见表 5。

表 5 三氯甲烷检测准确度试验

样品编号	加入量($\text{m}\mu\text{g}$)	检测值($\text{m}\mu\text{g}$)	本底值($\text{m}\mu\text{g}$)	回收率(%)
供试品1	1.2042	2.30	1.19	91.53
供试品2	1.2042	2.18	1.19	81.70
供试品3	1.2042	2.39	1.19	99.71
供试品4	10.79	11.77	1.81	92.32
供试品5	10.79	11.60	1.81	90.71
供试品6	10.79	11.79	1.81	92.46
供试品7	12.948	13.25	1.81	88.29
供试品8	12.948	12.81	1.81	84.94
供试品9	12.948	14.04	1.81	94.41

按照本方法进行三氯甲烷含量检测的准确度试验,回收率符合《中国药典》相关要求。

2.2.5 三氯甲烷检测溶液稳定性

取三氯甲烷对照品、水合氯醛原料药,按表 2 中前处理方法 2 进行配制对照品溶液、供试品溶液,按“1.2 色谱条件”进样检测,考察 24 h 内不同时间样品的稳定性,结果显示供试品与对照品稳定性均小于 5.0%,稳定性良好。

2.3 水合氯醛稳定性试验

水合氯醛具有较强的挥发性和引湿性,在高温条件下挥发与降解性能均增强,结合《中国药典》2020 年版药品稳定性试验技术要求,对本品进行影响因素试验与加速试验考察。将水合氯醛置样品瓶(封口)中,分别置温度 25 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 75%,温度 40 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 75%,温度 60 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 60% 以及温度 25 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 60%、光照强度 4500 lx 条件下考察,并于不同时间点检测杂质含量变化,结果见表 6。

表 6 水合氯醛稳定性试验结果

放置条件	时间(t/d)	检测结果(%)			
		三氯乙酸	二氯乙酸	三氯甲烷	氯乙酸
温度 25 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 75%	10	0.001	0.003	0.004	未检出
	30	0.001	0.003	0.004	未检出
温度 40 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 75%	10	0.001	0.003	0.152	未检出
	30	0.001	0.003	0.323	未检出
温度 60 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 60%	10	0.001	0.004	0.546	未检出
	30	0.001	0.004	0.871	未检出
温度 25 $^{\circ}\text{C}$ /湿度 60%、 光照强度 4500 lx	10	0.001	0.003	0.045	未检出
	30	0.001	0.003	0.151	未检出

以上数据显示,水合氯醛原料受温度和光照影响较大,主要的降解产物为碳碳键断裂的水解产物三氯甲烷,卤代羧酸未有明显的改变。三氯甲烷是主要的降解产物,其中三氯甲烷为二类毒性溶剂,但目前水合氯醛的国内外法定标准中均无三氯甲烷的含量检测和限度要求,且水合氯醛本身具有较大的毒性,则其降解产物的限度仍需结合长期稳定性结果和临床使用的安全性、有效性进行综合评估。另本次试验采用称量瓶封口存放,密封性不佳,会加速水合氯醛的挥发水解,本品应室温避光密封保存;在制剂研发和存储运输过程中,应严格控制温度与光照影响。

3 结论

本文建立了气相色谱法测定水合氯醛原料药中杂质三氯甲烷、氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸。利用检测目标物的理化性质,采用不同前处理方法进行三氯甲烷、卤代羧酸的检测,色谱峰形良好,方法简单、准确度高、重复性良好,可避免水合氯醛检测过程中的自身降解,准确高效的检测药物中杂质含量,满足目前市售原料及其制剂的检测需求。

本法中,三氯甲烷检测限浓度为供试品浓度的万分之 0.005(0.5 ppm);氯乙酸检测限浓度为供试品浓度的万分之 0.1(10 ppm);二氯乙酸检测限浓度为供试品浓度的万分之 0.2(20 ppm);三氯乙酸检测限浓度为供试品浓度的万分之 0.04(4 ppm)。本品多次检测以及稳定性试验中均未出现氯乙酸,说明本品中确无高于检出限的残留,也不易降解产生。

通过水合氯醛的稳定性实验发现,本品在温度、光照条件下均会发生降解,三氯甲烷为主要的降解产物,故进行本品相关制剂的研发、检测、生产和运输过程中需要严格控制生产工艺与储存条件,保证产品的质量稳定,保障用药安全性。

【参考文献】

- [1] 冯家星, 李惠民, 邢丽娜, 等. 水合氯醛溶液稳定性的影响因素及有效期预测[J]. 化工科技, 2020, 28(1): 37-40.
- [2] 张华, 石磊. 水合氯醛溶液中主成分稳定性考察[J]. 中国药师, 2014, 17(1): 168-169.
- [3] 叶丽杰, 邓岩辉, 戴莉菲. 水合氯醛胶囊测定适宜条件及影响因素[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 1786-1789.
- [4] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》2020年版(二部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 121.
- [5] United States Pharmacopeial Committee. United States Pharmacopeial. 2019(42)[S]. Maryland: The Pharmaceutical Association: 3345.
- [6] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia, 2020 (10.0)[S]. France: European Directorate for Quality Medicines: 2029.
- [7] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. The Japanese Pharmacopoeia, 2016 (17)[S]. Tokyo: The Ministry of Health, Labor and Welfare: 676.
- [8] 李沿飞, 魏农农, 苏敏. 气相色谱法检测盐酸氟西汀原料中氯仿和正己烷残留量[J]. 分析实验室, 2008, 27(8): 45-47.
- [9] 徐斌文. 工业废水, 废气中氯仿的气相色谱法测定[J]. 上海环境科学, 1991, 10(11): 3.
- [10] HAUTMAN D P, MUNCH D J. Development of US EPA method 551.1 [J]. *J Chromatogr Sci*, 1997, 35(5): 221-231.
- [11] 史作然, 单广波, 杨丽, 等. 水中二氯乙酸和三氯乙酸的测定方法[J]. 当代化工, 2019, 48(7): 1626-1629.
- [12] 卢晨晨, 景晓宁, 严拯宇. 卤代羧酸的分析方法研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(5): 126-127, 131.
- [13] 张桂芳, 隋红波, 宁文吉, 等. 生活饮用水中二氯乙酸和三氯乙酸的离子色谱电导测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1646-1647.
- [14] 陆峰, 向华. 顶空气相色谱法测定水中三氯乙醛[J]. 净水技术, 2006, 25(6): 71-73.
- [15] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》2020年版(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480.
- 【收稿日期】 2021-06-17 【修回日期】 2022-02-08
【本文编辑】 李睿旻

(上接第 402 页)

- [8] 李云香, 姚倩, 任玫, 等. 抗菌肽作用机制研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(9): 98-103.
- [9] LEE S C, PAN C Y, CHEN J Y. The antimicrobial peptide, epinecidin-1, mediates secretion of cytokines in the immune response to bacterial infection in mice[J]. *Peptides*, 2012, 36(1): 100-108.
- [10] SU B C, CHEN J Y. Epinecidin-1: an orange-spotted grouper antimicrobial peptide that modulates *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid-induced inflammation in macrophage cells[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 99: 362-367.
- [11] HUANG X Z, HU B C, YANG X D, et al. The putative mature peptide of piscidin-1 modulates global transcriptional profile and proliferation of splenic lymphocytes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 86: 1035-1043.
- [12] HUANG T C, CHEN J Y. Proteomic and functional analysis of zebrafish after administration of antimicrobial peptide epinecidin-1[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(2): 593-598.
- [13] HUANG H N, PAN C Y, SU B C, et al. Epinecidin-1 protects against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection and Sepsis in pyemia pigs[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 693.
- [14] PAN C Y, CHEN J C, SHEEN J F, et al. Epinecidin-1 has immunomodulatory effects, facilitating its therapeutic use in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4264-4274.
- [15] CHEN J Y, PAN C Y. Use of epinecidin-1 peptides and anti-lipopolysaccharide factor peptides for treating microbial infection: US8377867[P]. 2013-02-19.
- [16] HUANG H N, PAN C Y, CHEN J Y. Grouper (*Epinephelus coioides*) antimicrobial peptide epinecidin-1 exhibits antiviral activity against foot-and-mouth disease virus in vitro[J]. *Peptides*, 2018, 106: 91-95.
- [17] HUANG H N, PAN C Y, RAJANBABU V, et al. Modulation of immune responses by the antimicrobial peptide, epinecidin (Epi)-1, and establishment of an Epi-1-based inactivated vaccine[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3627-3636.
- [18] HUANG H N, CHUANG C M, CHEN J Y, et al. Epinecidin-1: a marine fish antimicrobial peptide with therapeutic potential against *Trichomonas vaginalis* infection in mice[J]. *Peptides*, 2019, 112: 139-148.
- [19] SU B C, LI C C, HORNG J L, et al. Calcium-dependent calpain activation-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress are required for cytotoxicity of epinecidin-1 in human synovial sarcoma SW982 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2109.
- [20] LUMPKINS K M, BOCHICCHIO G V, KELEDJIAN K, et al. Glial fibrillary acidic protein is highly correlated with brain injury[J]. *J Trauma*, 2008, 65(4): 778-782.
- [21] BATONI G, MAISETTA G, BRANCATISANO F L, et al. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(2): 256-279.
- [22] BOLATCHIEV A. Antimicrobial peptides epinecidin-1 and beta-defensin-3 are effective against a broad spectrum of antibiotic-resistant bacterial isolates and increase survival rate in experimental Sepsis[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(1): 76.
- [23] HUANG H N, RAJANBABU V, PAN C Y, et al. Use of the antimicrobial peptide Epinecidin-1 to protect against MRSA infection in mice with skin injuries[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 10319-10327.
- [24] SU B C, WU T H, HSU C H, et al. Distribution of positively charged amino acid residues in antimicrobial peptide epinecidin-1 is crucial for in vitro glioblastoma cytotoxicity and its underlying mechanisms[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 315: 108904.
- [25] TING C H, CHEN Y C, CHEN J Y. Nile tilapia fry fed on antimicrobial peptide Epinecidin-1-expressing *Artemia* cyst exhibit enhanced immunity against acute bacterial infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 81: 37-48.
- 【收稿日期】 2021-08-19 【修回日期】 2022-09-30
【本文编辑】 李睿旻