

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.07.007

酶标仪法测定氨茶碱血药浓度的研究*

范子琪¹ 徐勤^{1Δ} 秦金保² 黄群² 吴昭瑜²

(1 桂林医学院药学院 广西 桂林 541001; 2 上海交通大学医学院附属第九人民医院血管外科 上海 200011)

摘要 目的:通过酶标仪法,建立一种研究氨茶碱在新西兰兔体内的药代动力学参数及房室模型的分析方法。**方法:**新西兰兔以剂量 15 mg/kg 静脉注射氨茶碱后,应用酶标仪法,测定在 274 nm 波长处吸光度值,采用直线相关与回归分析进行数据统计分析氨茶碱在体内的药代动力学参数、回收率实验及房室模型分析。**结果:**血清茶碱在浓度 5~30 μg/mL 范围内线性关系良好,回归方程为: $A=0.0013C+0.0074$, $r^2=0.991$ 。各浓度氨茶碱回收率均大于 90%,平均回收率为 95.83 ± 3.83 ,RSD 均小于 15%,回收效果良好。通过氨茶碱体内房室模型拟合得:二室模型拟合显示:由消除相,得外推线浓度线性回归方程: $\lg C=-0.1271t+1.0562$;由分布相,得残数浓度线性回归方程为: $\lg Cr=-0.5829t+1.030$,综合得其二室模型的药动力学方程为: $C=22.000e^{-1.342t}+11.381e^{-0.292t}$, $T_{1/2\alpha}=0.516\text{ h}$, $T_{1/2\beta}=2.369\text{ h}$ 。一室模型拟合显示:一室模型药动力学方程为: $\lg C=-0.2131t+1.315$,其药时方程为: $C=20.649e^{-0.491t}$, $T_{1/2}=1.412\text{ h}$;**结论:**可以用酶标仪法测定氨茶碱体内药代动力学相关参数,其回收率良好,体内代谢符合二室模型,消除半衰期较长。

关键词:氨茶碱;酶标仪法;血药浓度;房室模型**中图分类号:**R-33;R91;R969.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)07-1234-05

Study on Microplate Reader Method Analysis of the Aminophylline*

FAN Zi-qi¹, XU Qin^{1Δ}, QIN Jin-bao², HUANG Qun², WU Zhao-yu²

(1 College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541001, China; 2 Department of Vascular Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University, School of Medicine, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: A microplate reader method was established to study the pharmacokinetic parameters and compartment model analysis of aminophylline in New Zealand rabbits. **Methods:** After intravenous injection of aminophylline at a dose of 15 mg/kg in New Zealand rabbits, the absorbance at 274 nm was measured by microplate reader method. The pharmacokinetic parameters, recovery experiment and compartment model analysis of aminophylline in vivo were analyzed by linear correlation and regression analysis. **Results:** The linear relationship of serum theophylline was good in the range of 5~30 μg/mL. The regression equation is $A=0.0013C+0.0074$, $r^2=0.991$. The recovery rate of aminophylline for each concentration is more than 90%, the average recovery rate is 95.83 ± 3.83 , RSD is less than 15% and the recovery effect is good. The two-compartment model fitting showed that the linear regression equation of extrapolation concentration is obtained by eliminating the phase: $\lg C=-0.1271t+1.0562$. From the distribution phase, the linear regression equation of residual concentration is $\lg Cr=-0.5829t+1.030$, and the pharmacokinetic equation of two-compartment model is $C=22.000e^{-1.342t}+11.381e^{-0.292t}$, $T_{1/2\alpha}=0.516\text{ h}$, $T_{1/2\beta}=2.369\text{ h}$. The fitting of compartment model in aminophylline showed that the pharmacokinetic equation of one-compartment model is: $\lg C=-0.2131t+1.315$, and the drug-time equation is $C=20.649e^{-0.491t}$, $T_{1/2}=1.412\text{ h}$. **Conclusion:** The pharmacokinetic parameters of aminophylline in vivo can be determined by microplate reader method. The recovery rate is good. Its metabolism in body matches the double compartment model, and the elimination half-life is longer.

Key words: Aminophylline; Microplate reader method; Blood concentration; Compartment model**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R91; R969.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)07-1234-05

前言

氨茶碱(Aminophylline, Am)作为水溶性复盐,具有强心、利尿、扩张冠状动脉和松弛支气管平滑肌等药理作用^[1-3],其结构如图 1 所示。近年来,临床研究表明还可用来治疗肾病综合征以及肾缺血再灌注等疾病^[4,5],应用前景广泛。但由于不同给药剂量、个体差异,以及容易受到生理、联合用药、病理、环境等多

方面不定因素的影响^[6-9]。因此,只有合理监测氨茶碱血药浓度^[10,11],才能保证给药的安全性和有效性,并对指导氨茶碱的临床用药具有重要意义。目前,氨茶碱的体内分析方法主要有紫外分光光度法^[12,13]、荧光分光光度法^[14]、气相色谱法^[15]、高效液相色谱法^[16,17]、荧光偏振免疫法^[17,18]等,但还未见采用酶标仪进行过相关的测定。酶标仪是酶联免疫测定的常用仪器^[19-21],对物质含量测定的理论基础,服从朗伯-比尔定律。因此,本文应用酶

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81660668)

作者简介:范子琪(1994-),女,硕士,主要研究方向:纳米药物抗肿瘤研究,E-mail: fzzq9412@163.com

Δ 通讯作者:徐勤,博士,教授,硕士生导师。研究方向:化药、中药、民族药新药及制剂研发,E-mail: xqqincpu@126.com

(收稿日期:2020-08-23 接受日期:2020-09-18)

标仪法进行氨茶碱药动学参数的研究,分析其房室模型。

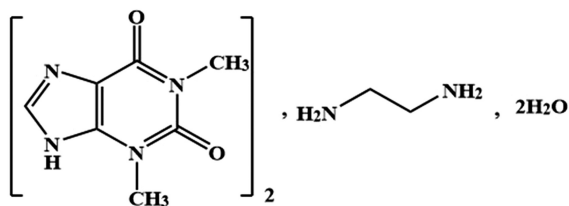


图1 氨茶碱化学结构式图

Fig. 1 Chemical structure of aminophylline

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

氨茶碱标准品(中国药品生物制品检定所),氨茶碱(上海晶纯试剂有限公司),氯仿、异丙醇、无水乙醇、HCl、NaOH 等均为广州化学试剂厂生产,50%葡萄糖注射液,0.9%氯化钠注射液均由广东大冢制药有限公司生产。新西兰兔(体重约 2.0 kg)由广东省医学实验动物中心提供。酶标仪(Multiskan FC,美国赛默飞公司),多管架自动平衡离心机(TDZ5-WS,赛特湘仪离心机仪器有限公司),电子分析天平(BSA224S,赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 氨茶碱标准曲线的制备 精密称取茶碱标准品 0.0051 g,用 0.1 mol/L NaOH 溶液配置成浓度为 0.5 mg/mL 的氨茶碱标准溶液。取氨茶碱标准液 5.0、10.0、15.0、20.0、30.0 和 50.0 μ L 于 10 mL 容量瓶中用 0.1 mol/L NaOH 溶液定容至 10 mL,使其终浓度为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.5 μ g/mL,以 0.1 mol/L NaOH 溶液为参比,测定各浓度氨茶碱在 274 nm 处的吸光度值,求得氨茶碱标准曲线。

1.2.2 血清氨茶碱标准曲线的制备 精密称取茶碱标准品 0.0752 mg,用 0.1 mol/L NaOH 溶液配置成浓度为 7.5 mg/mL 的氨茶碱标准溶液,给药时用等体积 50%的葡萄糖溶液稀释静脉注射。取 EP 管 6 只,各加入 0.5 mL 空白血清碱液(按血液样本处理,得到不含药物的血清处理碱液),备用。然后依次加入氨茶碱标准液 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 μ L,使其终浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 μ g/mL。以 0.1 mol/L NaOH 溶液为参比,测定各浓度液在 274 nm 处的吸光度值,求得血清中氨茶碱标准曲线。

1.2.3 提取回收率测试 取终浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 μ g/mL 的血清氨茶碱标准液,重复 3 次,将所测得的 OD 值代入血清氨茶碱标准曲线,换算成浓度 C,得各浓度的提取回收率。

1.2.4 给药及血液样品预处理 对新西兰兔称重,并固定在兔台上,耳缘去毛,以 15 mg/kg 的剂量耳缘静脉缓慢注射氨茶碱溶液(在 2 min 内),注射结束即开始计时。分别在给药前和给药后 5、10、20、30 min 和 1、2、3、4 h 取血 1.5 mL,放置 30 min 后,在 2500 r/min 转速下离心 10 min,得上层淡黄色血清。

1.2.5 血清样本处理及测定^[12,13,17] 将 1.2.4 预处理的血清样品,取 0.5 mL 血清置洁净离心管中,加 0.1 mol/L HCl 溶液 0.2 mL,精密加入氯仿-异丙醇(95:5)溶液 5 mL,振摇混合,离

心(2500 r/min) 10 min;吸取氯仿液(下层) 4.0 mL 置另一离心管中,加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 4.0 mL,振摇均匀,离心(2500 r/min) 10 min,吸取碱液(上层) 3~3.5 mL,供测定用。取一块洁净的空白 96 孔板,将按上述步骤得到的检测样本取 250 μ L 加入至 96 孔板,(以空白血清碱液为参照),在波长 274 nm 处检测吸光度值。

1.2.6 数据处理 应用 SPSS 25.0 统计软件进行数据统计处理,采用直线相关分析及一元线性回归分析对药物血药浓度及房室模型进行分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并利用 GraphPad Prism 8.3 作图。

2 结果

2.1 氨茶碱标准曲线

2.1.1 氨茶碱标准曲线的绘制 氨茶碱浓度为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.5 μ g/mL 的吸光度分别为 0.002、0.004、0.014、0.019、0.032、0.050。根据测定的吸光度值计算,以氨茶碱浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=0.0214C-0.0023$, $r^2=0.995$ 。结果表明,茶碱在浓度 0.25~2.5 μ g/mL 范围内线性关系良好,较稳定(见图 2)。

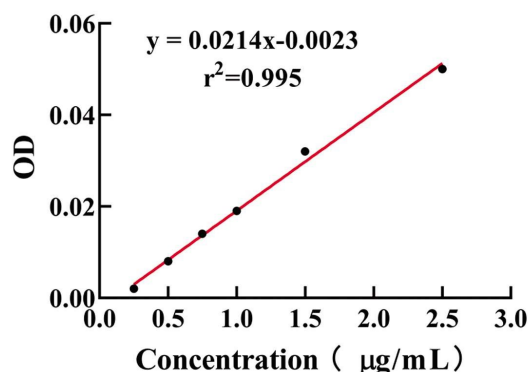


图2 氨茶碱标准曲线

Fig. 2 Standard curve of aminophylline

2.1.2 血清氨茶碱标准曲线的绘制 血清氨茶碱浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 μ g/mL 的吸光度分别为 0.014、0.020、0.028、0.031、0.038、0.047。根据测定的吸光度计算,以血清氨茶碱的浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=0.0013C+0.0074$, $r^2=0.991$ 。结果表明,血清茶碱在浓度 5~30 μ g/mL 范围内线性关系良好(见图 3)。

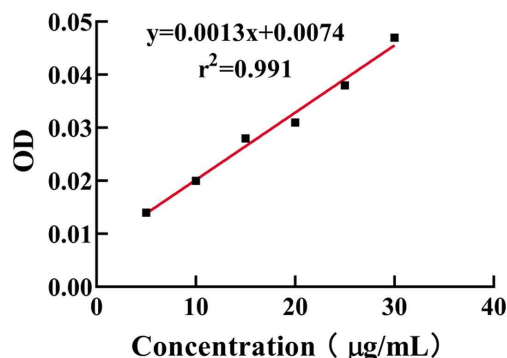


图3 血清氨茶碱标准曲线

Fig. 3 Standard curve of aminophylline in serum

2.2 回收率试验

通过计算各浓度提取回收率发现,各浓度氨茶碱回收率均

大于 90%,平均回收率为 95.83 ± 3.83 ,RSD 均小于 15%,回收效果良好,其回收率试验结果见表 1。

表 1 氨茶碱回收率(n=6)

Table 1 Recovery rate of aminophylline (n=6)

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measurement ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery rate (%)	Average recovery rate (%)	RSD (%)
5.0	4.53	90.6	95.83 ± 3.83	2.16
10.0	9.36	93.6		1.27
15.0	14.64	97.6		0.42
20.0	19.84	98.2		0.56
25.0	24.93	99.7		0.56
30.0	29.01	96.7		1.78

2.3 氨茶碱体内模型的拟合

2.3.1 不同取血时间氨茶碱吸光度及浓度变化 各时间点 5、10、20、30 min 和 1、2、3、4 h 的吸光度值为 0.048、0.033、0.030、

0.027、0.019、0.015、0.014、0.012。以时间为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制 A-t 曲线^[22,23];以时间为横坐标,以血清茶碱浓度为纵坐标,绘制 C-t 曲线(见图 4)。

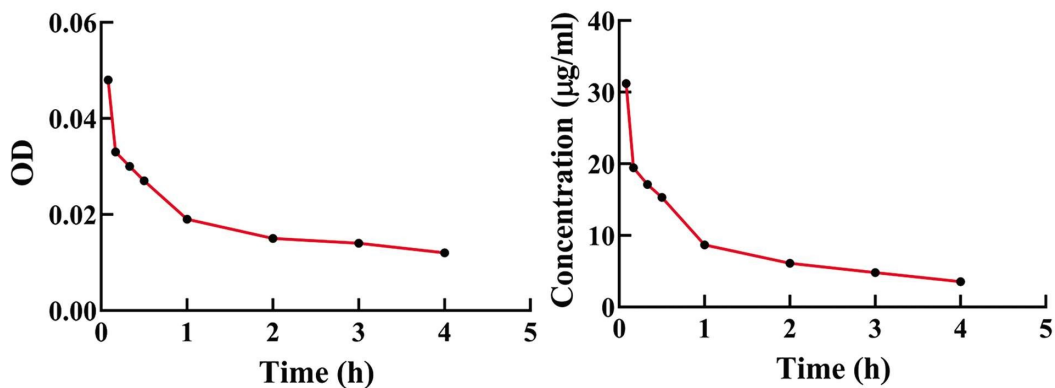


图 4 氨茶碱吸光度 - 时间(A-t)曲线和氨茶碱浓度 - 时间(C-t)曲线图

Fig. 4 Aminophylline absorbance-time curve (A-t) and aminophylline concentration-time (C-t) curve

2.3.2 氨茶碱二室模型的拟合 由图 4 可知,1 h 之后呈直线关系,为消除相。根据后 4 点,以 t 与 lgC 作线性回归,得回归方程 $\lg C = -0.1271t + 1.057$ 。由 "分布相" 相应时间的实测 C 减去外推线浓度得到参数浓度 Cr(见表 2),对分布相的时间 t 与

lgCr 作图(见图 5),并得到线性回归方程 $\lg Cr = -0.5829t + 1.030$;因此氨茶碱二室模型的药动学方程为: $C = 22.000e^{-1.342t} + 11.381e^{-0.292t}$, $T_{1/2\alpha} = 0.516 \text{ h}$, $T_{1/2\beta} = 2.369 \text{ h}$ 。

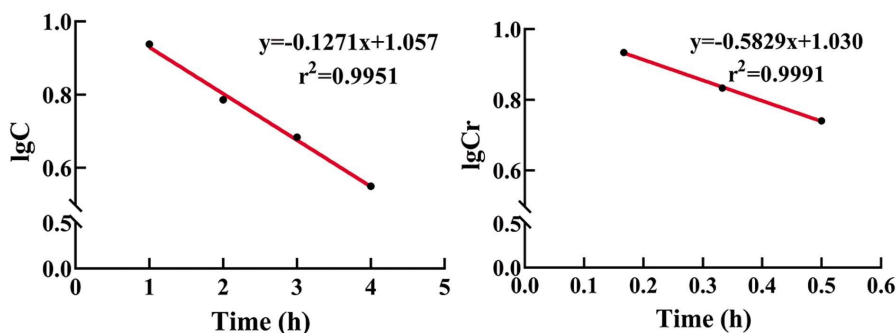


图 5 消除相末端 lgC-t 曲线和分布相末端 lgCr-t 曲线图

Fig. 5 LgC-t curve of elimination phase end and lgCr-t curve of the end of distributed phase.

2.3.3 氨茶碱一室模型的拟合 根据表 2,对 8 个取样点,按一室模型的药动学方程 $\lg C = \lg C_0 - Kt / 2.303$ 拟合,以 t 与 lgC 作线性回归,得回归方程为 $\lg C = -0.2131t + 1.315$ (见图 6)。因此氨茶碱一室模型的药时方程为: $C = 20.649e^{-0.491t}$, $T_{1/2} = 1.412 \text{ h}$ 。

3 讨论

目前,氨茶碱的研究主要集中在人、大鼠、家兔、犬以及猫等^[24-28]。氨茶碱的体内分析方法主要有紫外分光光度法、荧光分

表 2 静脉注射氨茶碱后的血药浓度和残留浓度

Table 2 Plasma concentration and Cr of aminophylline after intravenous injection

Time	LgC	C($\mu\text{g/mL}$)	Extrapolated line concentration	Residue concentration	lgCr
			Ce($\mu\text{g/mL}$)	Cr($\mu\text{g/mL}$)	
5 min	1.495	31.231	11.109	20.122	1.304
10 min	1.289	19.436	10.839	8.597	0.934
20 min	1.234	17.128	10.327	6.802	0.833
30 min	1.186	15.333	9.835	5.498	0.740
1.0 h	0.938	8.667			
2.0 h	0.786	6.103			
3.0 h	0.683	4.821			
4.0 h	0.549	3.538			

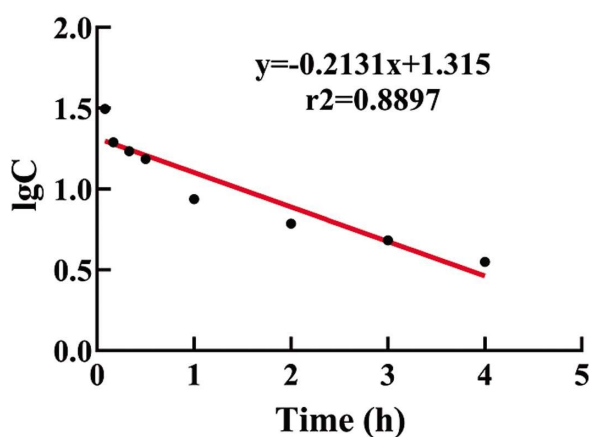


图 6 一室模型 lgC-t 图

Fig. 6 LgC-t diagram of one-compartment model

光光度法、高效液相色谱法和荧光偏振免疫法等。目前,有关酶标仪法对氨茶碱检测的方法还未见报道。酶标仪是酶联免疫测定的常用仪器,对物质含量测定服从朗伯-比尔定律,即物质在一定波长处的吸光度与浓度之间存在线性关系。用酶标仪进行分光光度法检测可方便快捷的进行高通量样品检测,不用更换、清洗及擦拭比色皿,测量快速,效率高,试剂用量少^[19,29]。酶标仪的样品池 96 孔板通常由聚苯乙烯制成,该材料在 400 nm 以上无紫外吸收,400 nm 以下具有较强紫外吸收。因此,本试验采用酶标仪法替代紫外分光光度法检测氨茶碱半衰期具可行性。从图 2、图 3 中可以清楚地反映出血清茶碱在浓度 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,为后续用酶标仪法测定药物半衰期提供可能。从图 3 中可以明显的反映出不同时间点血清氨茶碱浓度的变化,在 5 min~10 min 时,氨茶碱的浓度变化斜率最大,说明氨茶碱的分布、消除非常迅速;10 min~1 h,氨茶碱浓度的变化稳定,呈线性;可能影响因素有:(1)刚开始给药和采血使动物的状态波动较大,从而不能客观反映氨茶碱浓度变化情况;(2)第一个取样点的时间与给药时间间距太近,药物吸收分布不均。1 h 后氨茶碱浓度变化减小,说明 1 h 后,动物体内的氨茶碱量减少。从图 5、图 6 可知,应用不同的房室模型拟合测定半衰期具有不确定性,具体应用何种模型需进一步验证^[22]。

综上所述,本文采用酶标仪法测定氨茶碱在新西兰兔体内的血药浓度变化过程,阐明了氨茶碱在新西兰兔体内的代谢规

律。血清茶碱在浓度 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,新西兰兔静脉注射氨茶碱后,一室模型 $T_{1/2}=1.412\text{ h}$;二室模型 $T_{1/2\alpha}=0.516\text{ h}$ 、 $T_{1/2\beta}=2.369\text{ h}$ 。用酶标仪法测定茶碱血药浓度及半衰期,能明显反映氨茶碱血药浓度的变化过程,并可计算出其药动学方程及半衰期等药动学参数。

参考文献(References)

- [1] Lin CC, Chen WJ, Liaw SF, et al. Effects of Aminophylline on Airway Epithelial-mesenchymal Transition in Brown Norway Rats after Repeated Allergen Challenge[J]. *Exp Lung Res*, 2019, 45(1-2): 42-53
- [2] Anderson M. The properties of aminophylline [J]. *Emerg Nurse*, 2007, 15(7): 24-27
- [3] Da Silva PS, De Aguiar VE, Fonseca MC. Additive Diuretic Response of Concurrent Aminophylline and Furosemide in Children: a Case Series and a Brief Literature Review [J]. *J Anesth*, 2012, 26 (1): 118-123
- [4] Wu C, Lian Y, Guan D, et al. A Multicenter Clinical Study on Treating Post-Dural Puncture Headache with an Intravenous Injection of Aminophylline[J]. *Pain Physician*, 2016, 19 (5): E761-E765
- [5] Seo K, Choi JW, Kim DW, et al. Aminophylline Effect on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice [J]. *Transplant Proc*, 2017, 49 (2): 358-365
- [6] Cooney L, Sinha I, Hawcutt D. Aminophylline Dosage In Asthma Exacerbations in Children: A Systematic Review [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0159965
- [7] 李聪. 氨茶碱缓释片联合吸入用糖皮质激素治疗慢性支气管哮喘的疗效评价[J]. *首都食品与医药*, 2020, 27(14): 58
- [8] Palaksha MN, Mani TT, Manjunatha E, et al. Comparative Study of In-Vivo Effects of Glipizide and Metformin HCl on Plasma Concentration of Aminophylline in Healthy Rabbits [J]. *Asian J Pharm Res*, 2020, 10(2): 1-8
- [9] Yang XY, Zhao J, Shi J, et al. Investigation of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Different Doses of Aminophylline in Very Low Birth Weight Infants [J]. *Chinese J Contemp Pediatr*, 2015, 17(11): 1171-1175
- [10] Watanabe H, Nakano S, Nagai K, et al. Time-dependent Absorption of Theophylline in man [J]. *J Clin Pharmacol*, 1984, 24(11-12): 509-514
- [11] Kawai H, Kokubun S, Matsumoto, et al. Pharmacokinetic Study of

- Theophylline in Dogs after Intravenous Administration with and without Ethylenediamine [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000, 22(3): 179-184
- [12] 孙淑萍, 李胜利, 张从芬, 等. 双波长紫外分光光度法测定家兔隔室模型血清茶碱浓度及其药动学参数 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2013, 38(05): 597-600
- [13] 王孟良. 紫外分光光度法测定氨茶碱注射液含量结果的不确定度评定[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(12): 217-218
- [14] He W, Dou H, Li Z, et al. Investigation of the Interaction Between Five Alkaloids and Human Hemoglobin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Modeling [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 123: 176-186
- [15] Roberts G, Newsom D, Gomez K, et al. Intravenous Salbutamol Bolus Compared with an Aminophylline Infusion in Children with Severe Asthma: a Randomised Controlled Trial [J]. *Thorax*, 2003, 58(4): 306-310
- [16] Cotgreave IA, Caldwell J. Studies on Aminophylline Disposition I. A Rapid and Sensitive HPLC Assay for Ethylenediamine in Plasma and Urine [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 1983, 4(1): 53-62
- [17] 杨爱群, 曾佳, 陈永, 等. 两种测定氨茶碱血药浓度方法的准确度比较[J]. *解剖学研究*, 2008, 30(1): 18-20
- [18] Varshosaz J, Ghafghazi T, Raisi A, et al. Biopharmaceutical Characterization of Oral Theophylline and Aminophylline tablets. Quantitative Correlation Between Dissolution and Bioavailability Studies[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(2): 301-306
- [19] 范鹏, 蒋林东, 王小丹, 等. 紫外分光光度计与酶标仪测定盐酸川芎嗪含量的比较 [J]. *西南国防医药*, 2010, 20(07): 720-722
- [20] 曹菁, 薛莎, 张婉玉, 等. 酶标仪快速测定血必净注射液中总糖含量[J]. *中国处方药*, 2019, 17(02): 44-46
- [21] 陆丰荣, 曾玉梨, 李国樑, 等. 不同酶标板与加样量对多功能酶标仪测定结果影响[J]. *中国职业医学*, 2019, 46(2): 215-220
- [22] 李飞艳, 姚晓霞, 田文慧, 等. 青蒿素在 Wistar 大鼠体内的药代动力学研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2313-2315
- [23] Tang-Liu DD, Williams RL, Riegelman S. Nonlinear theophylline elimination[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1982, 31(3): 358-369
- [24] 王洋, 赵立春, 庞宇舟, 等. 不同剂量薯蓣皂苷元的大鼠体内药动学研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(03): 269-273
- [25] Yin B, Li J, Wang SL, et al. Studies on Pharmacokinetics and Bioavailability of Aminophylline in Partridge Chickens[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2016, 41(1): 19-25
- [26] Amponsah SK, Opuni KF, Antwi KA, et al. Effect of Aminophylline on the Pharmacokinetics of Amikacin in Sprague-Dawley Rats [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2019, 13(3): 251-254
- [27] Guenther-Yenke CL, McKiernan BC, Papich MG, et al. Pharmacokinetics of an Extended-release Theophylline Product in cats[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2007, 231(6): 900-906
- [28] Cavett CL, McKiernan BC, Reinhart JM. Pharmacokinetics of a Modified, Compounded Theophylline Product in Dogs [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2019, 42(6): 593-601
- [29] 余飞, 秦艳飞, 王洲, 等. 酶标仪法测定微孔板发酵液中林可霉素 [J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(1): 47-51
- [30] Ma YJ, Jiang DQ, Meng JX, et al. Theophylline: a review of population pharmacokinetic analyses [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2016, 41(6): 594-601

(上接第 1260 页)

- [27] Tan L, Song A, Ren L, et al. Effect of pioglitazone on skeletal muscle lipid deposition in the insulin resistance rat model induced by high fructose diet under AMPK signaling pathway [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(5): 1317-1323
- [28] Miao S, Dong X, Zhang X, et al. Detecting pioglitazone use and risk of cardiovascular events using electronic health record data in a large cohort of Chinese patients with type 2 diabetes [J]. *J Diabetes*, 2019, 11(8): 684-689
- [29] Le P, Chaitoff A, Rothberg MB, et al. Trends in pioglitazone use among U.S. adults with type 2 diabetes and suspected nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(2): 205-208
- [30] Gor D, Lee TA, Schumock GT, et al. Adherence and Persistence with DPP-4 Inhibitors Versus Pioglitazone in Type 2 Diabetes Patients with Chronic Kidney Disease: A Retrospective Claims Database Analysis[J]. *J Manag Care Spec Pharm*, 2020, 26(1): 67-75