

基于细胞响应谱的注射用双黄连（冻干）质量评控研究

马丽娜¹, 顾媛媛¹, 何 婷¹, 毛柳英¹, 郭媛媛¹, 赵 薇¹, 曹俊岭², 鄢 丹^{3*}, 肖小河^{4*}

1. 北京中医药大学东方医院 药学部, 北京 100078

2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700

3. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050

4. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 肝病医学部研究所, 北京 100039

摘要: **目的** 探究建立基于细胞响应谱的中药注射剂质量评控方法, 以最大限度预警中药注射剂质量波动, 保障中药注射剂临床用药安全。**方法** 收集注射用双黄连（冻干）不同批次正常样品和过期样品及临床发生不良反应样品, 同时制备 3 批特殊样品（光照、暴露、高温）。建立注射用双黄连（冻干）的细胞响应谱并提取关键参数, 进行相似度、聚类分析和主成分分析, 以筛选质量波动样品。**结果** 以大鼠嗜碱性细胞白血病 RBL-2H3 细胞为模式细胞, 注射用双黄连（冻干）正常样品为模式药物, 建立了注射用双黄连冻干细胞响应谱, 并提取脱附时间 (ΔT)、曲线下面积 (AUC)、抑制率 (I_{12} , I_{24})、相似度为特征参数, 进行量化分析, 通过细胞响应谱法在 25 批注射用双黄连（冻干）样品中共检出不合格样品 21 批, 细胞响应谱法不仅可有效区分正常样品和特殊样品, 而且还能将高温组、光照组和过期样品有效区分, 但是不能将开放环境组和不良反应组样品分开。**结论** 细胞响应谱方法能更全面、灵敏、准确地发现中药注射剂质量波动差异, 可作为制剂通则检查和化学指纹谱检测的有益补充, 提高中药注射剂产品质控水平。

关键词: 注射用双黄连（冻干）; 细胞响应谱; 质量波动; 预警; 中药注射剂; 安全性

中图分类号: R285.52 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-8127-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.017

Quality assessment and control of Shuanghuanglian Lyophilized Injection based on cell response spectrum

MA Li-na¹, GU Yuan-yuan¹, HE Ting¹, MAO Liu-ying¹, GUO Yuan-yuan¹, ZHAO Wei¹, CAO Jun-ling², YAN Dan³, XIAO Xiao-he⁴

1. Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

2. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

3. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

4. Institute of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: **Objective** To explore and establish a quality assessment and control method of traditional Chinese medicine (TCM) injections based on cell response spectrum, so as to maximize early warning of the quality fluctuation of TCM injections and ensure the safety of TCM injections. **Methods** Different batches of normal samples, expired samples and samples with adverse reaction in clinic of Shuanghuanglian Lyophilized Injection [注射用双黄连（冻干）, SHL] were collected, and three batches of special samples (light, exposure, high temperature) were prepared at the same time. The cell response spectrum of SHL was established and key parameters were extracted. Similarity, cluster analysis and principal component analysis were performed to screen the quality fluctuation samples. **Result** With RBL-2H3 cells as model cells and normal samples of SHL as model drug, the response spectrum of freeze-dried SHL was established, and characteristic parameters such as desorption time (ΔT), area under the curve (AUC), inhibition rate (I_{12} , I_{24}) and similarity were extracted for quantitative analysis. A total of 21 batches of unqualified samples were detected in 25 batches of SHL samples by cell

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费项目资助 (2022-JYB-XJSJJ-079); 中药毒性理论与安全用药传承创新团队 (ZYXCXTD-C-202005)

作者简介: 马丽娜, 博士, 助理研究员, 从事中药药理毒理与安全性评价研究。Tel: (010)67689957 E-mail: malina8512@163.com

*通信作者: 肖小河, 博士, 研究员, 从事临床中药学及中药安全性研究。Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy_302@126.com

鄢 丹, 博士, 主任药师, 从事临床中药学及合理用药研究。Tel: (010)66933322 E-mail: yd277@126.com

response spectrum method. Cell response spectrometry could not only effectively distinguish normal samples from special samples, but also distinguish high temperature group, light group and expired samples, but could not separate open environment group and adverse reaction group samples. **Conclusion** The cell response spectrum method can detect the quality fluctuation difference of TCM injections more comprehensively, sensitively and accurately, and can be used as a useful supplement for the inspection of preparation general rules and chemical fingerprint spectrometry, so as to improve the quality control level of TCM injections.

Key words: Shuanghuanglian Lyophilized Injection; cell response spectrum; quality fluctuation; early warning; traditional Chinese medicine injections; safety

注射用双黄连(冻干)是由金银花、连翘、黄芩提取物制成的一种中药注射剂,为中药抗菌抗病毒的著名方剂^[1],临床广泛用于治疗急性呼吸道感染,因其使用方便、疗效确切,被国家中医药管理局指定为全国中医治疗急诊的首批 15 种必备药物之一。然而,近年来随着其在临床的广泛使用,有关其不良反应报道日渐增多^[2-8],引起国家食品药品监督管理局广泛重视,先后 2 次因过敏性休克发布暂停销售或使用的不良反应通报^[9]。虽然很多学者分别从注射剂致敏成分^[10-14]、辅料^[15-17]及过敏/类过敏现象机制^[18-20]等不同角度对中药注射剂临床发生不良反应的可能原因进行了系统和深入的研究,但是依然无法避免临床不良反应的发生。

中药注射剂临床不良反应^[21-30],主要表现为过敏,尤其是类过敏,首次用药即可发生,即药物可通过静脉给药直接作用于肥大细胞引发脱颗粒效应,释放出组胺、 β -氨基己糖苷酶等大量过敏介质,从而导致系列症状的产生,且具有明显的剂量相关性。而中药注射剂因给药途径特殊,无首过效应,相对来说其全息成分可能直接作用于免疫细胞,为通过体外细胞实时动态监测,表征类过敏反应提供了可能,且可关联体内外试验结果。生物评价作为一种直接关联药物活性的评价方法,已越来越受到人们的重视,尤其适合类似中药复杂体系的质量控制。细胞响应谱法具有非侵入、无标记、实时在线、灵敏专属、定性定量、指纹特性等优点,能够让细胞在接近生理或病理条件下以活体状态进行细胞生物学特性监测,通过该技术可完整地呈现药物和细胞之间发生的系列生化反应。

因此,本研究在深入分析引发中药注射剂不良反应现象及原因的基础上,借鉴生物药品的质量管控模式,结合中药注射剂不良反应特点,引入可实时在线监测的细胞响应谱方法,通过相似度评价和聚类分析,考察不同批次产品间生物效应的一致性和稳定性,以补充常规制剂通则和化学指纹谱无法检测到的变化信息,探索建立基于细胞响应谱监测

的中药注射剂质量一致性预警方法,以减少中药注射剂临床不良反应/事件发生。

1 材料

1.1 细胞

大鼠嗜碱性细胞白血病 RBL-2H3 细胞购自中国科学院细胞库,采用 15% DMEM 高糖培养液在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度环境培养。

1.2 样品

正常双黄连样品(编号 NS1~NS5)、过期双黄连样品(编号 OD1~OD5)及临床导致过不良反应的双黄连样品(编号 AR1~AR5)由哈药集团中药二厂生产。其中过期样品按照药品说明书有效期,过期时间分别为 16、10、28、20、31 个月,不良反应样品为企业提供的临床上曾发生发热、皮疹等不良反应的样品。此外,为模拟双黄连(冻干)样品在运输储藏过程中可能出现的情况,同时制备了双黄连冻干粉特殊处理样品。高温加速变质样品(编号 TS1~TS5): 60 °C 恒温箱中放置 10 d;光照加速变质样品(编号 LS1~LS5): 光照强度(4500±500) Lx 的可调光源下持续照射 10 d;开放环境放置样品(编号 ES1~ES5): 开瓶放置于室温避光开放环境 10 d 制得(以上特殊处理所用样品均为同一批次的正常样品)。

1.3 试剂

DMEM 高糖培养基(批号 11995-065)、胎牛血清(批号 10099-141)、青霉素-链霉素(批号 15140-148)、0.25%胰酶(批号 25200-072)购自美国 Gibco 公司;PBS 缓冲液(批号 P1020-500)购自北京 Solarbio 科技有限公司;Compound 48/80(批号 073M4050V)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.4 仪器

培养瓶、培养板、冻存管、离心管、移液管(购美国 Corning 公司);xCELLigence 实时细胞电子传感系统(艾森生物有限公司);TC-10 型自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司);Synergy H1 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);NAPCO

5410 型二氧化碳培养箱（法国 JOUAN 公司）；SINCE 1889 型立式高压灭菌锅（重庆雅马拓科技有限公司）；超净工作台（北京冠鹏净化设备有限责任公司）；AB135-S 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；0.22 μm 针头式过滤器、Milli-Q 超纯水系统（美国 Millipore 公司）。

2 方法与结果

2.1 注射用双黄连（冻干）样品的细胞响应谱方法建立

2.1.1 供试品溶液的制备 取注射用双黄连（冻干）内容物，混匀，精密称取粉末适量，置棕色量

瓶中，加生理盐水制成 30 mg/mL 的溶液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.1.2 细胞接种浓度和给药时间的选择 细胞接种浓度和给药时间是影响体外细胞活性评价的重要因素。采用实时细胞电子传感系统监测不同浓度 RBL-2H3 细胞生长曲线（图 1-A）。结果显示，当接种浓度低于 2.5×10^5 个/孔时，细胞生长 36 h 后才能进入对数生长期，实验周期过长；当超过 2.5×10^5 个/孔时，细胞对数生长期时间过短，实验不易操作、重复性差、误差较大。因此，选择 2.5×10^5 个/孔作为 RBL-2H3 细胞优化接种浓度。

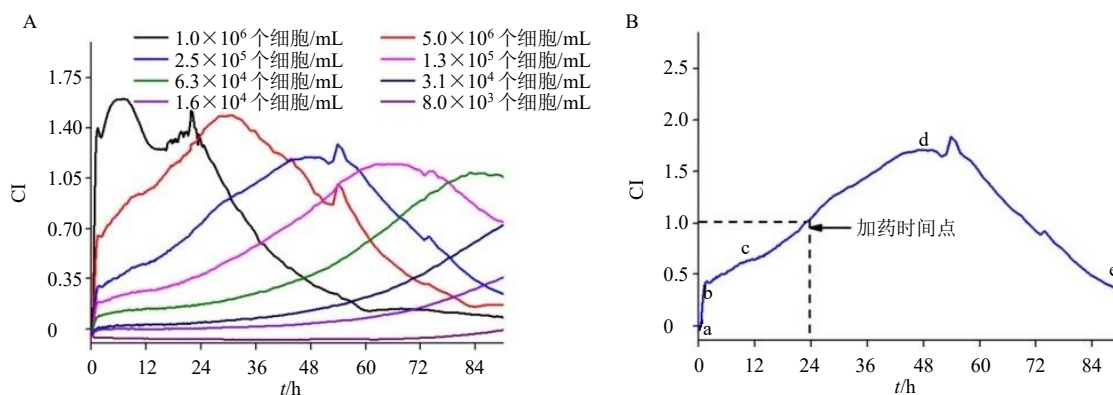


图 1 不同浓度 RBL-2H3 细胞增殖曲线 (A) 及特征曲线谱 (B)

Fig. 1 Proliferation curve (A) and characteristic curve (B) of RBL-2H3 cells at different concentrations

在体外细胞实验中，一般选择细胞敏感的对数生长期（cd 段）作为加药时间点，如图 1-B 所示，ab 段为 RBL-2H3 细胞快速贴壁产生的细胞指数（cell index, CI）响应曲线；随着溶液中细胞贴壁的完全，CI 值响应曲线出现暂时的停滞（bc 段），这期间也是细胞调整自身生理活动以适应外界环境的过程，准备进入指数生长期的前奏，经过一段时间的潜伏期后，细胞进入大量分裂的对数生长期（cd 段），CI 值响应呈线性增加趋势；在细胞生长的后期，培养液被消耗殆尽，细胞死亡，CI 值响应下降，CI 曲线重新回到基线（de 段）。因此，本研究结合上述原则，将 CI 值接近于 1 时的合适时间确定为给药时间，即细胞接种后 24 h 作为合适的加药时间点（图 1-B）。同时为减少实验误差、分析数据方便，采用实时在线检测仪进行数据处理时，将加药时间点的 CI 值归一化为 1。

2.1.3 注射用双黄连冻干溶液的细胞响应谱表征 取适量注射用双黄连（冻干）正常样品，设置系列质量浓度，检测其对 RBL-2H3 细胞作用，如图 2 所

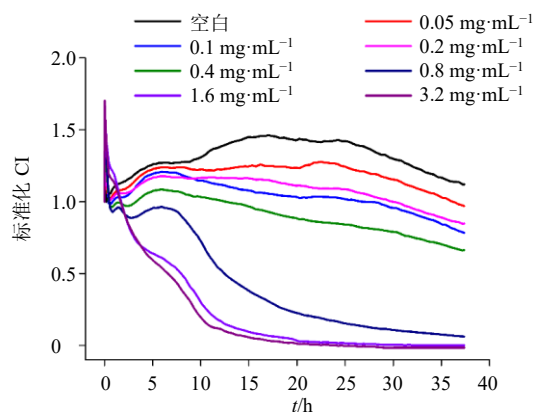


图 2 注射用双黄连（冻干）作用于 RBL-2H3 细胞的实时细胞响应谱

Fig. 2 Real-time cell response spectrum of RBL-2H3 cells treated with Shuanghuanglian Lyophilized Injection

示，注射用双黄连（冻干）正常样品，在 0.8~3.2 mg/mL 对 RBL-2H3 细胞的作用呈明显的时效关系，且 0.8 mg/mL 药效曲线变化稳定，故后续实验中选取 0.8 mg/mL 作为注射用双黄连（冻干）的给药质量浓度。

2.1.4 特征参数提取 为评价所得实时细胞响应谱中各曲线相似性,在课题组前期相关研究^[31-33]基础上,提取以下特征参数:

(1) 脱附时间 (ΔT): 即从加药开始到 CI 值接近于 0 的时间间隔^[34]。

$$\Delta T = t_{de} - t_{add} \quad (1)$$

t_{de} 表示 CI 值接近于 0 的时间点, t_{add} 表示给药的时间点

(2) 曲线下面积 (AUC)^[35]: 加药开始至 CI 值接近于 0 的曲线下面积。

(3) 抑制率: 药物作用于 RBL-2H3 细胞 12、24 h 后 CI 值。根据公式 (2) 计算细胞抑制率 (I_{12} 、 I_{24})。

$$I = (CI_B - CI_i) / CI_B \quad (2)$$

I 为抑制率, CI_B 为相应时间点空白组的 CI 值, CI_i 为相应时间点实验组的 CI 值

(4) 相似度: 采用夹角余弦法计算不同批次药物作用于 RBL-2H3 细胞所得细胞实时响应谱各曲线间相似度。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度实验 取同一供试品溶液,采用实时细胞分析系统同一通道连续进样 5 次,记录 CI 曲线。结果 ΔT 和 AUC 的 RSD 均小于 3%,各 CI 响应曲线相似度均大于 0.90,说明在本实验条件下

xCELLigence 实时细胞分析系统精密度良好。

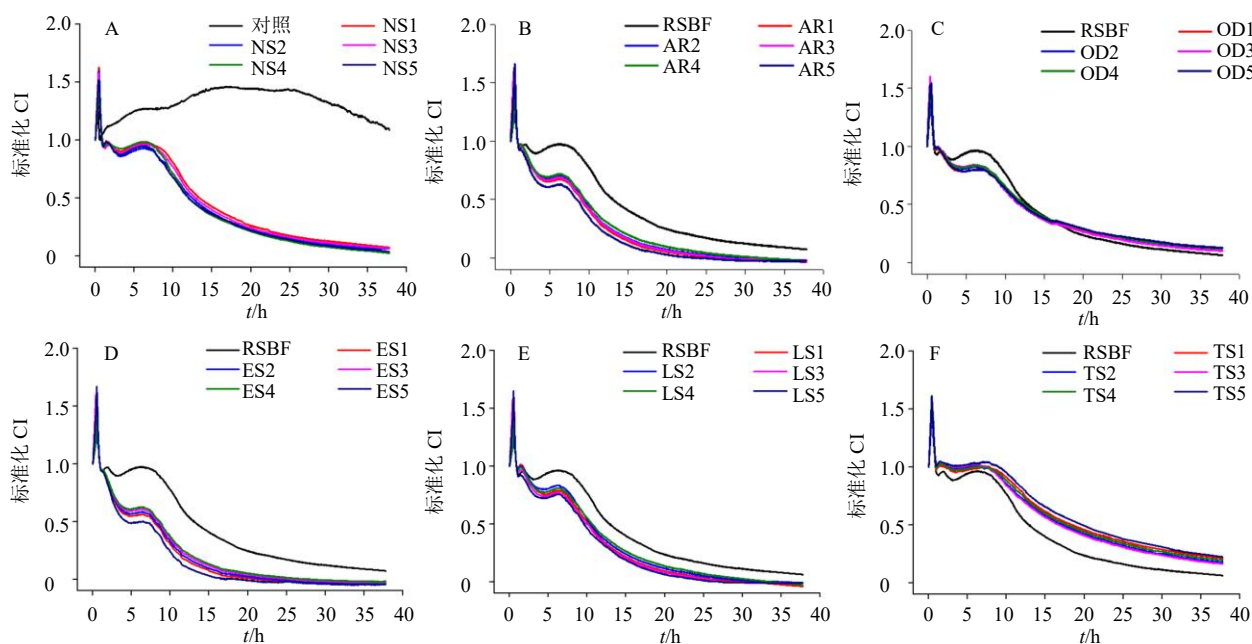
2.2.2 稳定性实验 取同一供试品溶液,采用实时细胞分析系统,分别于 0、1、2、4、8 h 检测其对 RBL-2H3 细胞作用,记录 CI 响应曲线,结果 ΔT 和 AUC 的 RSD 均小于 3%,各 CI 响应曲线相似度均大于 0.90,说明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.2.3 重复性实验 取同一批次样品,平行制备供试品溶液 6 份,采用实时细胞分析系统分别监测 6 份样品对 RBL-2H3 细胞作用,记录 CI 曲线,结果 ΔT 和 AUC 的 RSD 均小于 3%,各 CI 响应曲线相似度均大于 0.90,说明方法重复性良好。

2.3 不同注射用双黄连(冻干)样品细胞响应谱分析

分别将 5 批正常样品 (NS1~NS5),制成 0.8 mg/mL 供试品溶液,按照“2.1.3”项下方法,建立正常样品的细胞响应谱,如图 3-A 所示。提取特征图谱数据,使用平均数法拟合正常样品的标准对照细胞响应谱(reference standard biological fingerprint, RSBF)。

同法制备注射用双黄连(冻干)高温加速变质样品 (TS1~TS5)、光照加速变质样品 (LS1~LS5)、开放环境放置样品 (ES1~ES5) 及过期和不良反应样品溶液,采用实时细胞监测仪,建立特殊样品细胞响应谱,如图 3-B~F 所示。



A-正常样品 B-不良反应样品 C-过期样品 D-开放环境样品 E-光照加速变质样品 F-高温加速变质样品

A-normal samples B-adverse reaction samples C-expired samples D-open environment sample E-light accelerated metamorphic samples F-high temperature accelerated metamorphic samples

图 3 基于 RBL-2H3 细胞的注射用双黄连(冻干)细胞响应谱

Fig. 3 Cell response spectrum of Shuanghuanglian Lyophilized Injection based on RBL-2H3 cells

2.4 注射用双黄连（冻干）样品细胞响应谱结果分析

2.4.1 相似度分析 根据“2.1.4”项下方法提取相关参数： ΔT 、AUC、 I_1 、 I_2 、相似度。进行相似度分析，结果显示，正常组样品与标准细胞响应谱相比具有较高的相似度，均大于 0.98，而其他不合格样品相似度均低于 0.98（除过期组样品 OD2、OD3 和不良反应组 AR3、AR5 外），其中开放环境放置组样品（ES）和不良反应组样品（AR）相似度最低。因此以相似度大于 0.98 为评价标准，采用细胞响应谱方法在 25 批样品中共检出不合格样品 21 批，检出率为 84%，说明细胞响应谱方法能够有效区分正

常组样品和高温、光照、暴露及多数过期和不良反应注射用双黄连（冻干）样品。

2.4.2 聚类分析 以不同批次注射用双黄连（冻干）样品细胞特征图谱各项参数为指标，采用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件，对注射用双黄连（冻干）正常样品与特殊样品进行聚类分析，结果见图 4，正常组样品、高温样品、光照样品、过期样品均能够各自聚为一类，提示细胞特征谱所提取的参数不仅能够将正常样品和其他样品区分开，而且能够将高温组、光照组、过期组样品和其他组分别区分开，但是不能将开放环境组和不良反应组分开。

2.4.3 主成分分析 在聚类分析的同时，采用 SIMCA-P

表 1 注射用双黄连（冻干）样品细胞特征图谱参数提取

Table 1 Parameters from cell characteristic curve spectra of Shuanghuanglian Lyophilized Injection samples

样品	$I_1^a/\%$	$I_2^b/\%$	$\Delta T^c/\text{min}$	AUC ^d	相似度 ^e
NS1	58.70	87.90	41.473	16.336	0.986
NS2	61.40	88.50	41.586	15.631	0.982
NS3	59.20	88.30	40.938	16.071	0.991
NS4	61.70	89.20	40.326	15.572	0.981
NS5	61.60	88.40	40.158	15.751	0.982
RSBF	60.20	88.30	40.878	15.982	1.000
TS1	43.40	75.30	46.853	21.239	0.912
TS2	48.10	78.00	45.395	20.397	0.916
TS3	49.20	78.80	45.218	20.150	0.907
TS4	45.80	76.70	46.186	20.851	0.923
TS5	41.40	73.50	46.869	22.103	0.920
LS1	73.90	96.50	34.315	11.006	0.949
LS2	71.80	94.60	35.102	11.943	0.953
LS3	74.10	96.20	34.326	10.965	0.946
LS4	71.10	93.90	34.957	12.081	0.955
LS5	75.40	97.90	34.589	10.537	0.941
ES1	88.40	100.00	25.683	6.617	0.843
ES2	86.70	100.00	25.876	7.021	0.832
ES3	84.90	99.90	26.323	7.396	0.847
ES4	83.50	99.30	26.658	7.835	0.857
ES5	92.70	100.00	25.021	5.882	0.819
AR1	80.91	98.97	26.526	8.861	0.837
AR2	79.15	97.94	26.015	9.498	0.841
AR3	79.61	98.42	25.926	11.255	0.983
AR4	76.65	96.49	26.237	10.126	0.897
AR5	84.06	100.11	26.223	7.934	0.983
OD1	62.18	84.48	42.629	15.980	0.905
OD2	64.04	85.61	42.587	15.373	0.982
OD3	63.85	85.68	42.341	15.530	0.981
OD4	61.32	84.17	43.018	16.155	0.912
OD5	62.97	83.77	43.074	15.980	0.925

I_1^a : 注射用双黄连（冻干）作用 12 h 后对 RBL-2H3 的抑制率； I_2^b : 注射用双黄连（冻干）作用 24 h 后对 RBL-2H3 的抑制率； ΔT^c : 加入药物后细胞从平板上脱附所需的时间；AUC^d: 实时细胞响应曲线下的面积；相似性^e: 所有样本与 RSBF（代表性标准生物指纹）的相似性

I_1^a : Inhibition ratio of Shuanghuanglian Lyophilized Injection on RBL-2H3 after 12 h treatment; I_2^b : Inhibition ratio of Shuanghuanglian Lyophilized Injection on RBL-2H3 after 24 h treatment; ΔT^c : Time needed for cell desorption from the plate after drug addition; AUC^d: Area under the real-time cell response curves; Similarity^e: Similarity of all samples with RSBF (representative standard biological fingerprint)

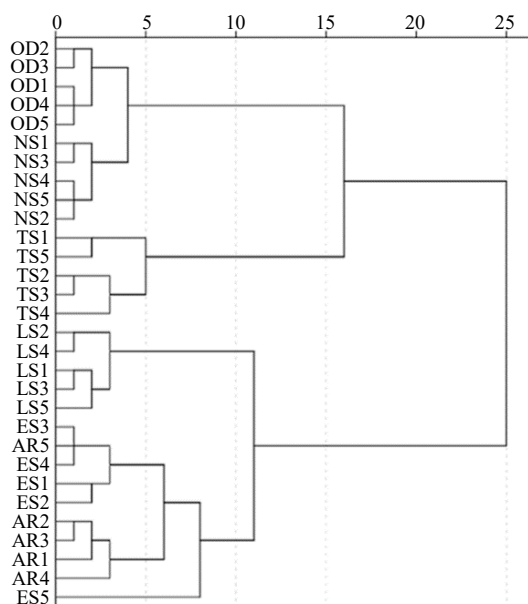


图 4 注射用双黄连（冻干）样品细胞响应谱聚类分析图
Fig. 4 Cluster analysis of cell response spectrum of Shuanghuanglian Lyophilized Injection samples

11.5 软件对细胞响应谱所提取参数进行相关分析，得到样品得分图（图 5）。结果显示，细胞响应谱方法可有效区分注射用双黄连（冻干）正常组与其他特殊样品（光照、高温、暴露、过期及不良反应组样品），但是亦不能有效区分开放环境组和不良反应组样品。

针对从细胞特征图谱中所提取的各项参数，借助主成分分析方法进一步挖掘其中蕴藏的特征信息，寻找其代表性评价指标。本研究对所提取的 I_1 、 I_2 、 ΔT 、AUC、相似度（分别以 $X_1 \sim X_5$ 代表，标准

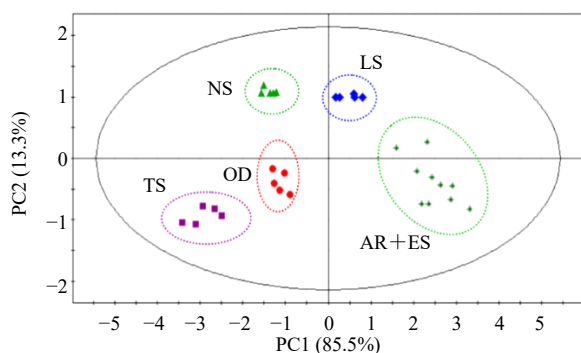


图 5 注射用双黄连（冻干）样品作用于 RBL-2H3 细胞的特征谱主成分得分图
Fig. 5 Principal component score of characteristic spectrum of RBL-2H3 cells treated with Shuanghuanglian Lyophilized Injection samples

化值用 $Z_1 \sim Z_5$ 表示）进行计算。由主成分分析的初始特征值和提取的载荷平方和可知，前 2 个主成分的特征值均大于 1，累积贡献率超过 85%。由成分载荷矩阵可知，提取了 2 个主成分，用 F 表示，其表达式如下：

$$C_1 = -0.987 Z_1 - 0.955 Z_2 + 0.982 Z_3 + 0.990 Z_4 + 0.666 Z_5$$

$$C_2 = 0.098 Z_1 + 0.287 Z_2 - 0.002 Z_3 - 0.124 Z_4 + 0.745 Z_5$$

系数的绝对值越大，则说明主成分与该参数的关系越密切。由上式可知，第 1 主成分与 I_1 、 I_2 、 ΔT 、AUC 关系密切，第 2 主成分与 I_2 和相似度关系较为密切。

3 讨论

本研究从注射剂质量控制角度出发，以注射用双黄连（冻干）为模式药，以具有肥大细胞许多生物学特性的 RBL-2H3 细胞为模式生物^[36-37]，建立了基于细胞响应谱的质量均一性评价方法，可以辨识暴露、高温、光照及部分过期和临床发生不良反应样品产生的质量差异，旨在模拟考察产品在生产、储存、运输过程中受光照和高温等因素影响导致的微小质量变化，为早期预警药源性不良反应提供技术参考。

采用建立的细胞响应谱方法，通过整体相似度分析发现，正常样品间相似度较高，特殊处理样品相似度普遍降低，提示该方法可将注射用双黄连（冻干）正常样品和特殊样品有效区分。这可能是由于一方面注射用双黄连（冻干）制剂临床不良反应多为过敏或类过敏反应^[2-5]，且其所含成分对 RBL-2H3 细胞模型敏感^[38-39]，即使细微的成分变化也可通过该方法有效表征，同时由于生物评价方法本身对生物信息变化敏感，这可能也是为何细胞响应谱法比化学指纹谱法更灵敏、全面的原因所在。本分析方法之所以能够有效区分不同样品，很重要的一点是对特殊参数的选择，本研究选择了 ΔT 、AUC、 I_1 、 I_2 和相似度，共 5 个代表性参数，这 5 个参数基本可全面细致地刻画整个细胞响应谱的变化。首先脱附时间主要是反映整个细胞的生存周期即生命的长度，而曲线下面积是借鉴血药浓度曲线下面积类似生命的厚度，12、24 h 2 个时间点的抑制率反映的是不同样品关键点的变化趋势，这 2 个时间点的选择可以根据实际情况进行调整，最后相似度是对整体变化趋势的一个量化表达，通过这 5 个参数不仅可描绘出整个曲线的轮廓，同时又能捕捉关键变化点，在这一点上，希冀给同行学者启示和参考。

此外,细胞响应谱实验前,通过常规制剂通则和化学指纹谱的内控检测,结果发现高温组和光照组样品可引起化学成分变化,而这种变化在细胞响应谱中也被充分体现并有效识别,这可能是由于双黄连制剂中所含的绿原酸类成分和黄芩苷类成分对光和热敏感。而临床发生不良反应的样品通过内检均未发现明显异常,但是通过细胞响应谱方法却可检出 5 批次中的 3 批样品波动,提示细胞响应谱法在直接关联临床有效性和安全性的检测中灵敏性强于常规制剂通则和化学指纹谱法。还有 2 批次不良反应样品未有效检出,可能是由于患者本身特异质或过敏体质发生的不良反应,而这种情况通过简单的体外检测可能依然无法有效检出,这也是本方法的局限性所在。还有 2 批过期样品未被检出,经追溯发现这 2 批样品过期时间相对较短,其中 OD2 为 5 批样品中过期时间最短的 10 个月,提示可能过期时间越长样品变化越大越易被检出。OD3(过期 28 个月)虽然过期时间较 OD1(过期 16 个月)和 OD4(过期 20 个月)长,但是在对样品进行前处理时,发现 OD3 样品的疏松度明显大于后 2 批样品,提示不同批次样品可能由于储存、运输环境差异造成的异常变化。另聚类分析发现该方法不能有效区分开放环境样品和不良反应组样品。可能是因为开放环境组样品在放置过程中受空气中氧气、水分、微生物污染等因素影响,其生物活性发生了较大变化,而这种变化可能与不良反应样品所诱导的细胞响应谱表现类似,即都跟生物敏感性相关,所以通过生物评价方法无法有效区分。

综上,注射用双黄连制剂对温湿度及光和热相对敏感,在生产、储存、运输过程中需特别注意,而细胞响应谱法可快速、灵敏、高通量地表征这些因素的变化,且可实现实时在线、量化、动态、全面地反映注射剂质控过程中的整体信息,有效弥补常规质控方法信息单一或灵敏性差的不足。但是该方法也存在常规体外实验不能有效反映机体整体情况的普遍性问题,但是该方法作为一种新的、直接关联临床不良反应的方法,可作为当前不良反应事件频发的中药注射剂质控方法的有效补充,有望与其他方法一起广泛应用于中药注射剂的质量控制与不良反应预警。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 孙启慧. 双黄连制剂抑菌抗病毒药效物质基础和组方

结构配伍及作用机理研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.

- [2] 成岚, 王莉, 袁强, 等. 双黄连注射剂不良反应文献评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(2): 140-147.
- [3] 方世平, 王燕平, 颜琳, 等. 双黄连注射剂不良反应 10 年系统性定量分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2005, 14(3): 148-151.
- [4] 李兆君. 73 例双黄连注射液不良反应的临床观察 [J]. 中国医药导报, 2008, 5(1): 63-64.
- [5] 林玲, 冯响熠. 19 例注射用双黄连(冻干)不良反应报告分析 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(3): 181-183.
- [6] 谭子方, 郭福, 张万宝, 等. 中药注射剂的不良反应探讨及预防措施 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(11): 949-951.
- [7] 李婉慧, 李辉, 李莉, 等. 2013—2017 年哈励逊国际和平医院儿科清热解毒类中药注射剂用药分析 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(3): 686-690.
- [8] 施凯莉. 2020 年某医院患儿清热解毒类中药注射剂使用情况与合理用药评价 [J]. 中医药管理杂志, 2023, 31(4): 40-42.
- [9] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理局发布 2012 年药品不良反应监测年度报告 [EB/OL]. (2013-03-14) [2023-09-05]. <http://www.sda.gov.cn>.
- [10] 周燕子, 陈锋, 王敏存, 等. 基于超分子“印迹模板”的鱼腥草注射剂致敏原研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 154-161.
- [11] 李月, 段金连, 白雯, 等. 大分子物质对中药注射剂外观颜色的影响 [J]. 中医药导报, 2018, 24(23): 43-48.
- [12] 胡婧文. 绿原酸在中药注射剂中是否产生致敏性的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 215-217.
- [13] 刘汉清, 靳洪涛, 王爱平. 中药注射剂致敏物质研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 502.
- [14] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 利用免疫芯片技术筛查中药注射剂致敏成分 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 23-25.
- [15] 鄢丹, 张少锋, 骆骄阳, 等. 符合中药注射剂特点的增溶辅料筛选模式与实践 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 833-836.
- [16] 孙会敏, 杨锐, 栾琳, 等. 聚山梨酯 80 质量分析与致敏原探究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1850-1855.
- [17] 张锐, 王玉, 邓向亮, 等. 聚山梨酯 80 化学组分对肥大细胞 RBL-2H3 溶酶体损伤的作用研究 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(5): 371-376.
- [18] 梁爱华, 易艳. 中药注射剂超敏反应评价和风险控制相关问题的思考 [J]. 药学进展, 2020, 44(10): 752-758.
- [19] 庞菲, 王弯弯, 郝瑞瑞, 等. 香丹注射液中致类过敏反应成分筛选及机制初探 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6500-6508.

- [20] 易艳, 田婧卓, 李春英, 等. 中药注射剂上市后非临床安全性再评价类过敏反应相关研究 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(2): 185-188.
- [21] 张璐芳, 路然, 付玉喜, 等. 中药注射剂药物不良反应报告及措施分析 [J]. 医学理论与实践, 2023, 36(15): 2648-2649.
- [22] 何洁, 张梦颖, 胡建新. 基于药物警戒系统分析中药注射剂不良反应发生特点 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35(3): 550-554.
- [23] 祝桂欣. 双黄连注射剂不良反应的原因及分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(40): 124.
- [24] 袁强, 王莉, 成岚, 等. 国家基本药物目录 (2004 年版) 33 种中药注射剂不良反应/不良事件文献分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(2): 132-139.
- [25] 崔盈盈, 吴嘉瑞, 张丹, 等. 基于数据挖掘的清热类中药注射剂不良反应流行病学特点研究 [J]. 药物流行病学杂志, 2017, 26(10): 675-682.
- [26] 梁伟坤, 邝俊健. 18 种中药注射剂不良反应/不良事件文献分析 [J]. 中国执业药师, 2011, 8(1): 4-9.
- [27] 李黎明, 金若敏, 李小月. 中药注射剂类过敏反应实验研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 187-190.
- [28] 范潇予, 林琳, 魏金锋, 等. 中药注射剂过敏类反应研究新思路 [J]. 毒理学杂志, 2018, 32(4): 327-331.
- [29] 叶正良, 周大铮, 岳洪水. 中药注射剂安全性研究的思考 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 296-297.
- [30] 张惠霞, 陈建玉, 宋成. 3414 例中药注射剂不良反应分析 [J]. 中国药物警戒, 2006, 3(4): 232-235.
- [31] 任永申. 基于生物热活性指纹图谱检测的中药注射剂质量控制与配伍反应评价方法研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [32] 闫琰. 主要基于生物响应的注射用益气复脉 (冻干) 质量波动及不良反应早期预警方法研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [33] 张倩. 基于生物热动力学表达的中药注射剂质量评价模式与方法的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
- [34] Liu X A, Luan Y, Guo A R, *et al.* Dynamic investigation of sensitivity and action mechanism of antitumor drug [J]. *Adv Mater Res*, 2011, 343/344: 476-482.
- [35] Pan T H, Huang B, Zhang W P, *et al.* Cytotoxicity assessment based on the AUC₅₀ using multi-concentration time-dependent cellular response curves [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 764: 44-52.
- [36] 樊孟. 中药注射剂致类过敏反应中肥大细胞脱颗粒及补体活化相关机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [37] 罗霞, 王青, 周联, 等. 几种常见中药注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 506-510.
- [38] 汪芳, 李存玉, 郑云枫, 等. 双黄连注射液 8 种主要成分对 RBL-2H3 细胞的影响 [J]. 中成药, 2016, 38(7): 1615-1617.
- [39] 彭博, 贺蓉, 徐启华, 等. 绿原酸对 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 912-917.

[责任编辑 李亚楠]