

基于序贯分析策略的丹红注射液与临床常用输液溶媒配伍稳定性及安全性评价*

王安婧^{1,2}, 朱越^{1,2}, 韩诗晴¹, 韩柱¹, 诸葛慧^{1,2}, 贾小转^{1,2}, 王迎超^{1,2}, 杨振中^{1,2**}

(1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江大学智能创新药物研究院, 杭州 310018)

摘要 目的: 基于“理化性质-主要成分含量-指纹图谱相似度-类过敏反应”的序贯分析策略, 评价丹红注射液与临床常用输液溶媒 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液在不同配伍条件下溶液的稳定性及安全性。方法: 根据临床使用情况, 将丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液分别按 20 mL: 100 mL、30 mL: 100 mL、40 mL: 100 mL 和 30 mL: 250 mL、40 mL: 250 mL 的比例进行配伍, 在室温条件下 10 h 内, 分别观察和检测各溶液在配伍后不同时间点的性状、渗透压、不溶性微粒和 pH; 测定溶液在配伍后不同时间点的各主要成分含量; 计算配伍后不同时间点各溶液 HPLC 指纹图谱和 ¹H NMR 指纹图谱的相似度; 采用 RBL-2H3 细胞脱颗粒体外类过敏反应检测体系, 评价各配伍溶液的安全性。结果: 配伍 10 h 内溶液性状、渗透压、不溶性微粒含量、pH 无明显变化, 主要成分含量无显著差异, HPLC 和 ¹H NMR 指纹图谱均有良好的相似度, 且配伍溶液无明显致 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用。结论: 本研究从物理、化学、生物角度综合评价, 表明在 30 mL: 250 mL ~ 40 mL: 100 mL 浓度范围内, 丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液在配伍 10 h 内溶液均有良好的稳定性和安全性, 可为临床使用提供参考。

关键词: 丹红注射液; 溶媒配伍; 含量测定; 指纹图谱; 类过敏反应; 序贯分析; 稳定性研究; 安全性评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)03-0493-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.15

Stability and safety evaluation of Danhong injection with different clinical solvents based on sequential analysis*

WANG An-jing^{1,2}, ZHU Yue^{1,2}, HAN Shi-qing¹, HAN Zhu¹, ZHUGE Hui^{1,2},
JIA Xiao-zhuan^{1,2}, WANG Ying-chao^{1,2}, YANG Zhen-zhong^{1,2**}

(1. College of pharmaceutical sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Innovation Institute for Artificial Intelligence in Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Objective: Based on a sequential analysis method of “physicochemical properties – main component content – fingerprint similarity – anaphylactoid reaction”, the stability and safety of Danhong injection with commonly used clinical solvents 0.9% sodium chloride and 5% glucose injections were evaluated. **Methods:** According to the clinical application, Danhong injection was mixed with 0.9% sodium chloride injection or 5% glucose

* 浙江省自然科学基金华东医药企业创新发展联合基金资助项目(LHDMZ22H280001); 吉林省科技发展计划项目(20200708094YY)

** 通信作者 Tel: (0571) 88208426; E-mail: yangzz@zju.edu.cn

第一作者 Tel: 15713542991; E-mail: 22219038@zju.edu.cn

injection in the ratios of 20 mL: 100 mL, 30 mL: 100 mL, 40 mL: 100 mL and 30 mL: 250 mL, 40 mL: 250 mL, respectively. Then, they were placed at room temperature within 10 h. The properties, osmotic pressure, insoluble particles and pH value in the solutions were observed or measured at different time points. The contents of the main components at different time points were determined. The HPLC and ^1H NMR fingerprints at different time points were analyzed by similarity evaluation. The *in vitro* anaphylactoid reaction assay of RBL-2H3 cell degranulation was used to evaluate the safety of the mixture solutions. **Results:** The properties, osmotic pressure, insoluble particles and pH value of solutions were stable within 10 h after mixing, and there was no significant difference in the contents of the main components. The HPLC and ^1H NMR fingerprints showed good similarity, and the mixture solutions didn't induce obvious degranulation in RBL-2H3 cells. **Conclusion:** In this study, the comprehensive evaluation from the physical, chemical and biological perspectives showed that in the concentration range of 30 mL: 250-40 mL: 100 mL, Danhong injection combined with 0.9% sodium chloride injection or 5% glucose injection had good stability and safety within 10 h, which provides evidences for the clinical practice.

Keywords: Danhong injection; solvent compatibility; content determination; fingerprint; anaphylactoid reaction; sequential analysis; stability research; safety evaluation

中药注射液结合中医药理论与现代生产工艺,突破传统给药方式,具有剂量准确、起效迅速、生物利用度高等优势,目前被广泛应用于临床^[1]。然而,随着中药注射液使用的增加,其临床不良反应亦时有报道。在众多引起不良反应的原因中,溶媒种类、药物浓度、药物配制后的存放时间是普遍存在的影响因素^[2]。已有研究报道中药注射液与溶媒配伍使用可能导致不溶性微粒增多、所含成分改变等从而影响药液的质量,质量改变的药液进入人体可能会对机体造成一定风险^[3]。因此,中药注射液与输液溶媒配伍稳定性、安全性的研究将有助于其临床正确合理的使用,从而更有效地发挥中药注射液独特的疗效。

丹红注射液是由中药丹参、红花经现代工艺制备得到的红棕色澄明液体,是临床上常用的中药注射液,其主要组成及效用成分为酚酸类、黄酮类等^[4-5]。依据丹红注射液说明书,静脉滴注1次20~40 mL,溶媒首选5%葡萄糖注射液100~500 mL;若伴有糖尿病等特殊状况时,改用0.9%氯化钠注射液。目前,关于丹红注射液配伍溶液的研究仅考察了pH、不溶性微粒和主要成分含量,难以全面地反映配伍后溶液的稳定性及安全性。因此,构建符合临床需求、更为全面的丹红注射液与溶媒配伍合理性评价方法具有重要的意义。

本研究基于“理化性质-主要成分含量-指纹

图谱相似度-类过敏反应”的序贯分析策略,评价丹红注射液与0.9%氯化钠注射液和5%葡萄糖注射液在不同配伍条件下10 h内溶液的稳定性及安全性。首先,对配伍溶液的性状、渗透压、不溶性微粒、pH进行检测,从常见理化指标角度分析配伍稳定性;其次,考察了配伍溶液中总酚和5种主要成分含量的稳定性;通过综合运用HPLC指纹图谱和 ^1H NMR指纹图谱,分析配伍溶液中的各类成分含量及比例的稳定性。由于中药注射液成分复杂,与溶媒配伍后引起临床类过敏反应的因素较多,本研究采用RBL-2H3细胞脱颗粒体外类过敏检测体系评价丹红注射液与溶媒配伍后的安全性。基于上述序贯分析,旨在从物理、化学、生物角度综合评价丹红注射液与临床常用溶媒配伍后溶液的质量,为其临床安全用药、合理配伍提供依据,为规范其静脉用药调配提供参考。

1 材料

1.1 仪器

STY-1渗透压测定仪和GWJ-16微粒检测仪(天大天发科技有限公司),S40K型酸度计(Mettler公司),SC-4000A型澄明度检测仪(上海黄海药检仪器有限公司),Cary 60 UV-Vis分光光度计和Agilent 1100型高效液相色谱仪(Agilent公司),JEOL 500M超导核磁共振波谱仪(日本电子株式会社),Milli-Q超纯水制备系统(Millipore公司),Tecan In-

finite M1000 型多功能酶标仪 (Tecan 公司)。

1.2 药品与试剂

丹红注射液(批号 22071041; 10 mL·支⁻¹)由山东丹红制药有限公司提供, 5% 葡萄糖注射液(批号 W22021005、N22032406; 规格: 100 mL、250 mL)、0.9% 氯化钠注射液(批号 G222070802、N22050103; 规格: 100 mL、250 mL)购自四川科伦药业有限公司。

对照品丹参素钠(批号 110855-201915)、原儿茶醛(批号 110810-201909)、4-香豆酸(批号 112037-202102)、迷迭香酸(批号 111871-202007)、丹酚酸 B(批号 111562-201917)均购自中国食品药品检定研究院; 色谱纯三氟乙酸购自北京百灵威科技有限公司; 色谱纯冰醋酸购自国药集团化学试剂有限公司, 色谱纯甲醇和乙腈购自 Merck 公司, 氘代水(氘代度 99.9%)购自青岛腾龙微波科技有限公司, DMEM 基础培养基(货号 319-005-CL)、DMEM 无酚红培养基(货号 319-051-CL)购自 MUTILCELL 公司; Triton™ X-100(货号 T8787)、Compound 48/80(货号 C2313)、4-nitrophenyl *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide(货号 N9376)购自 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

RBL-2H3 细胞: 为小鼠嗜碱性白血病细胞, 由杭州美森细胞生物科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 配伍溶液配制

根据丹红注射液说明书, 该品每次可用 20~40 mL, 用 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液 100~500 mL 稀释后静脉滴注。根据临床常用剂量,

本实验考察 2 种溶媒各 5 个配伍(20、30、40 mL 丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液 100 mL 或 5% 葡萄糖注射液配伍, 丹红注射液 30、40 mL 与 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 或 5% 葡萄糖注射液配伍)的稳定性 and 安全性。配制好的成品溶液置于室温条件下, 考察不同时间点性状、渗透压、不溶性微粒和 pH 等理化性质, 测定主要成分含量, 分析指纹图谱相似度并检测其类过敏反应。

2.2 理化性质检测

实验在室温自然光下进行, 分别于配伍后 0、4、10 h 取样, 测定溶液的性状、渗透压、不溶性微粒和 pH。其中渗透压、不溶性微粒和 pH 的测定分别参照渗透压摩尔浓度测定法(2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)四部 0632^{[6]85})、不溶性微粒检查法(2020 年版《中国药典》四部 0903^{[6]125})和 pH 测定法(2020 年版《中国药典》通则 0631^{[6]84})进行检测。观察发现配伍溶液均为黄色澄明液体, 10 h 内始终保持澄清透明, 无浑浊和可见异物的产生。以丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液按照低浓度(30 mL:250 mL)、中浓度(20 mL:100 mL)、高浓度(40 mL:100 mL)进行配伍后所得溶液为例, 其渗透压、pH 和不溶性微粒的测定结果见表 1、2。配伍 10 h 内渗透压摩尔浓度和 pH 均无明显变化, 不溶性微粒个数虽有变化, 但溶液每 1 mL 含 10 μ m 及其以上的不溶性微粒未超过 25 粒, 含 25 μ m 及其以上的不溶性微粒未超过 3 粒。以上结果表明丹红注射液与 5% 葡萄糖注射液和 0.9% 氯化钠注射液在配伍 10 h 内有较稳定的渗透压、pH, 且不溶性微粒含量、性状均无显著变化。

表 1 丹红注射液与 5% 葡萄糖注射液、0.9% 氯化钠注射液不同配伍 10 h 内渗透压和 pH 测定结果

Tab. 1 Osmotic pressure and pH value of Danhong injection mixed with 5% glucose injections and 0.9% sodium chloride injection in different ratios within 10 h

丹红注射液用量 (dosage of Danhong injection)/mL	溶媒 (solvent)		渗透压 (osmotic pressure)/(mOsmol·kg ⁻¹)				pH			
	种类 (kind)	用量 (dosage)/mL	0 h	4 h	10 h	RSD/ %	0 h	4 h	10 h	RSD/ %
20	5% 葡萄糖注射液	100	263	261	266	0.96	5.908	5.806	5.759	1.3
30	(glucose injections)	250	254	270	275	4.1	5.770	5.784	5.766	0.16
40		100	254	260	256	1.2	5.828	5.844	5.812	0.27
20	0.9% 氯化钠注射液	100	272	283	294	3.9	5.747	5.783	5.746	0.37
30	(sodium chloride injection)	250	277	288	298	3.7	5.769	5.789	5.762	0.24
40		100	273	272	280	1.6	5.770	5.804	5.773	0.33

表2 丹红注射液与5%葡萄糖注射液、0.9%氯化钠注射液不同配伍10 h内不溶性微粒(粒·mL⁻¹)测定结果(n=3)

Tab.2 Number of insoluble particles in Danhong injection mixed with 5% GS and 0.9% NS in different ratios within 10 h

丹红注射液用量 (dosage of Danhong injection)/mL	溶媒(solvent)		≥10 μm			≥25 μm		
	种类(kind)	用量(dosage)/mL	0 h	4 h	10 h	0 h	4 h	10 h
20	5%葡萄糖注射液 (5% glucose injections)	100	20.5	19.1	19.6	1.5	0.5	0.6
30		250	12.7	9.0	9.2	0.8	0.4	0.9
40		100	16.0	17.1	15.5	1.6	1.3	1.4
20	0.9%氯化钠注射液 (sodium chloride injection)	100	6.3	18.8	14.3	0.3	0.6	0.7
30		250	20.5	7.3	20.3	1.3	0.7	1.3
40		100	18.8	21.5	15.9	1.1	2.0	0.9

2.3 主要成分含量测定

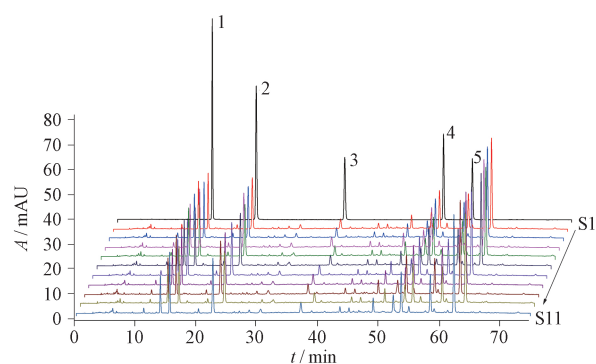
2.3.1 总酚 精密称定丹参素钠对照品,加适量超纯水制成1.000 mg·mL⁻¹的储备液。分别取配好的储备液适量,加超纯水制成20.00、30.00、40.00、50.00、60.00、70.00 μg·mL⁻¹的系列丹参素钠对照品溶液。在25℃时,按照紫外-可见分光光度法(2020年版《中国药典》四部0401^{[6]39}),在280 nm的波长处测定吸光度,绘制标准曲线。依据系列丹参素钠对照品溶液测定结果绘制得到的标准曲线方程计算各样本中总酚含量,每1 mL含总酚以丹参素钠(C₉H₉O₅Na)计,具体结果见表3。各配伍溶液不同测试时间点的总酚含量的RSD < 2.4%,表明各配伍溶液在室温下放置10 h总酚含量稳定。

2.3.2 丹参素、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸和丹酚酸B 色谱条件:采用Kromasil 100-5-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为0.05%三氟乙酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~65 min,98%A→70%A;65~75 min,70%A;75~76 min,70%A→98%A),流速为0.8 mL·min⁻¹,柱温为40℃,检测波长为288 nm,进样量为5 μL。

对照品溶液制备:分别取对照品丹参素钠、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸和丹酚酸B适量,置棕色量瓶中,精密称定,加入含0.2%醋酸的10%甲醇水溶液配制备用的混合对照品溶液(丹参素钠、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸、丹酚酸B质量浓度分别为250.0、30.00、10.00、30.00、40.00 μg·mL⁻¹)。

在上述色谱条件下,分别记录不同稀释梯度的混合对照品溶液和室温条件下0、4、10 h时经处理后的各配伍溶液的色谱图,其HPLC谱图如图1所示,经与对照品比对,确定图中标注为1~5的5个特征峰分别为丹参素钠、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸

和丹酚酸B。依据各系列对照品溶液得到相应标准曲线方程,分别计算得到丹参素、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸和丹酚酸B含量,具体结果见表3。各配伍溶液不同测试时间点上上述主要成分含量的RSD小于4.6%,表明配伍溶液在室温下放置10 h丹参素、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸、丹酚酸B含量较稳定。



1. 丹参素钠(sodium danshensu) 2. 原儿茶醛(protocatechualdehyde)
3. 4-香豆酸(*p*-coumaric acid) 4. 迷迭香酸(rosmarinic acid)
5. 丹酚酸B(salvianolic acid B)

S1. 对照品(reference substances) S2~S4. 20、30、40 mL丹红注射液与100 mL 5%葡萄糖注射液配伍(20、30、40 mL Danhong injection; 100 mL 5% glucose injections) S5~S6. 30、40 mL丹红注射液与250 mL 5%葡萄糖注射液配伍(30、40 mL Danhong injection; 250 mL 5% glucose injection) S7~S9. 20、30、40 mL丹红注射液与100 mL 0.9%氯化钠注射液配伍(20、30、40 mL Danhong injection; 100 mL 0.9% sodium chloride injection) S10~S11. 30、40 mL丹红注射液与250 mL 0.9%氯化钠注射液配伍(30、40 mL Danhong injection; 250 mL 0.9% sodium chloride injection)

图1 对照品及丹红注射液与5%葡萄糖注射液、0.9%氯化钠注射液不同配伍溶液的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of reference substances and Danhong injection mixed with 5% glucose injections and 0.9% sodium chloride in different ratios

表 3 丹红注射液与 5% 葡萄糖注射液、0.9% 氯化钠注射液不同配伍 10 h 内主要成分含量测定结果 (n = 3)

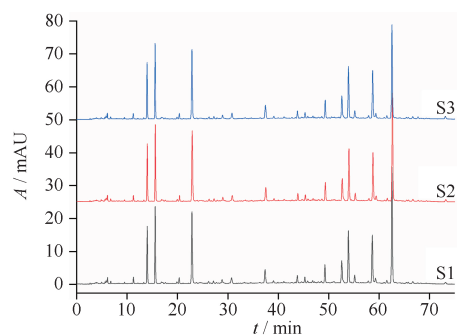
Tab.3 Content of main components in Danhong injection mixed with 5% glucose injections and 0.9% sodium chloride injection in different ratios within 10 h

丹红注射液用量 (dosage of Danhong injection)/mL	溶媒(solvent)		时间 (time)/ h	含量(content)/(μg · mL ⁻¹)					
	种类 (kind)	用量 (dosage)/ mL		总酚 (total phenolic acid)	丹参素 (Dahensu)	原儿茶醛 (protocatech- ualdehyde)	4-香豆酸 (p-coumaric acid)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	丹酚酸 B (salvianolic acid B)
20	5% 葡萄糖注射液 (5% glucose injections)	100	0	2 482	186.8	37.97	6.140	46.00	82.29
			4	2 443	188.2	38.28	6.317	46.25	81.62
			10	2 404	190.0	38.39	6.162	46.71	80.92
			RSD/%	1.6	0.86	0.57	1.6	0.78	0.84
30	5% 葡萄糖注射液 (5% glucose injections)	250	0	1 582	150.8	24.41	3.357	28.71	49.74
			4	1 568	144.8	23.34	3.220	27.51	47.74
			10	1 556	144.2	23.29	3.202	27.33	47.43
			RSD/%	0.82	2.5	2.7	2.6	2.7	2.6
40	5% 葡萄糖注射液 (5% glucose injections)	100	0	4 138	329.3	66.38	10.67	79.43	135.1
			4	4 071	316.6	63.87	10.20	76.57	132.3
			10	4 001	314.7	64.33	10.15	77.27	131.5
			RSD/%	1.7	2.5	2.1	2.8	1.9	1.4
20	0.9% 氯化钠注射液 (0.9% sodium chloride injection)	100	0	2 311	189.3	38.65	6.088	45.94	80.15
			4	2 415	189.2	38.52	6.256	46.45	78.44
			10	2 404	190.7	38.16	6.175	46.62	78.17
			RSD/%	2.4	0.45	0.66	1.4	0.77	1.4
30	0.9% 氯化钠注射液 (0.9% sodium chloride injections)	250	0	1 514	150.2	24.13	3.295	28.28	49.12
			4	1 517	139.9	22.48	3.079	26.43	45.69
			10	1 509	146.4	23.54	3.222	27.71	47.60
			RSD/%	0.28	3.6	3.6	3.4	3.4	3.6
40	0.9% 氯化钠注射液 (0.9% sodium chloride injection)	100	0	4 114	325.1	65.52	10.29	80.33	133.0
			4	4 146	320.5	64.71	10.41	80.35	132.2
			10	4 071	310.9	63.04	9.920	77.61	128.1
			RSD/%	0.92	2.3	2.0	2.5	2.0	2.0

2.4 指纹图谱检测

2.4.1 色谱指纹图谱检测 色谱条件同“2.3.2”项,各配伍溶液均在 0、4、10 h 取样进行 HPLC 指纹图谱检测,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(国家药典委员会)对各色谱数据进行分析处理,以各配伍 0 h 谱图为参照,通过 Mark 峰匹配计算色谱指纹图谱相似度。结果显示指纹图谱相似度均为 1.000,说明在 10 h 内各配伍溶液主要化学成分总体稳定。以丹红注射液最高配伍浓度为例(40 mL:100 mL),其与 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液配伍后不同时间点 HPLC 指纹图谱分别见图 2、3。

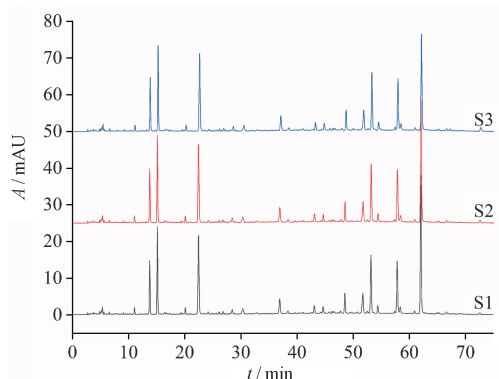
2.4.2 核磁共振指纹图谱检测 核磁分析样品的制备:取室温条件下 0、4、10 h 时的各配伍溶液样本



S1. 配伍 0 h(0 h after mixing) S2. 配伍 4 h(4 h after mixing) S3. 配伍 10 h(10 h after mixing)

图 2 40 mL 丹红注射液与 100 mL 5% 葡萄糖注射液配伍后 10 h 内色谱指纹图谱

Fig.2 Fingerprints of HPLC within 10 h after 40 mL Danhong injection mixed with 100 mL 5% glucose injection



S1 ~ S3. 同图 2 (Same as Fig. 2)

图 3 40 mL 丹红注射液与 100 mL 0.9% 氯化钠注射液配伍后 10 h 内色谱指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of HPLC within 10 h after 40 mL Danhong injection mixed with 100 mL 0.9% sodium chloride injection

450 μ L, 加氘代水 50 μ L 后混匀, 转移至核磁管中, 加封, 分别采集 ^1H NMR 数据。

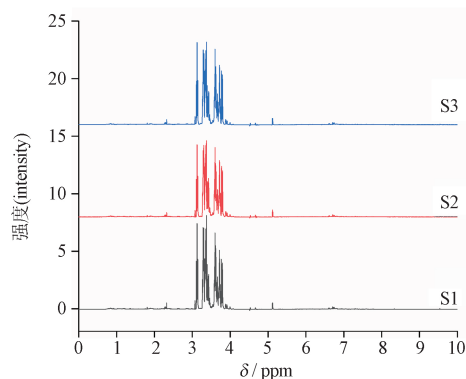
核磁共振波谱条件: 以 90% H_2O + 10% D_2O 锁场, 用预饱和脉冲序列压制水峰; 主要参数: 谱宽 10 kHz; 扫描次数 8 次; 延迟时间 1 s; 增益 46。采用 MetresNova 软件手动进行傅里叶变换、相位与基线校正、定标。

将所得核磁共振指纹图谱数据 Normalization 处理, 运用夹角余弦法计算各溶液配伍后 4、10 h 时所采集谱图与 0 h 采集谱图的相似度, 结果显示各谱图相似度均大于 0.97, 表明不同配伍时间点溶液在化学成分含量和比例上无明显差异。以丹红注射液最高配伍浓度为例 (40 mL:100 mL), 其与 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液配伍后不同时间点 ^1H NMR 指纹图谱分别见图 4、5。

2.5 β -氨基己糖苷酶释放率测定

取生长状况良好的 RBL-2H3 细胞, 均匀接种于 96 孔板, 接种密度为 2×10^4 个 \cdot 孔 $^{-1}$, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。实验设置对照组 (5% 葡萄糖注射液或 0.9% 氯化钠注射液)、阳性药组 (C48/80, 90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和不同配伍溶液组, 其中各配伍 10 h 后溶液均用无酚红无血清 DMEM 培养基 (避免血清和酚红对 β -氨基己糖苷酶测定的影响) 稀释至 5%, 同时以 1% Triton X-100 裂解细胞设为总酶孔, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h。

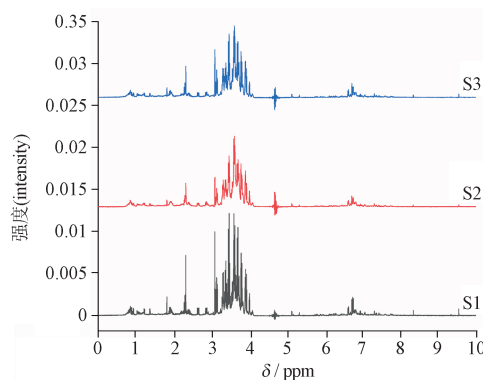
取细胞上清和裂解液, 在 96 孔板中进行实验, 设置实验组和空白组。实验组每孔均加入待测上清



S1 ~ S3. 同图 2 (Same as Fig. 2)

图 4 40 mL 丹红注射液与 100 mL 5% 葡萄糖注射液配伍后 10 h 内 ^1H NMR 指纹图谱

Fig. 4 Fingerprints of ^1H NMR within 10 h after 40 mL Danhong injection mixed with 100 mL 5% glucose injection



S1 ~ S3. 同图 2 (Same as Fig. 2)

图 5 40 mL 丹红注射液与 100 mL 0.9% 氯化钠注射液配伍后 10 h 内 ^1H NMR 指纹图谱

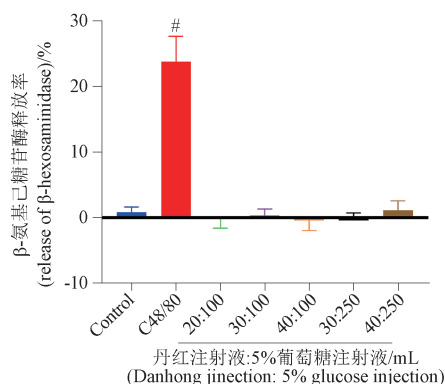
Fig. 5 Fingerprints of ^1H NMR within 10 h after 40 mL Danhong injection was mixed with 100 mL 5% sodium chloride injection

或裂解液 50 μ L, 空白组每孔单独加入对应 50 μ L 空白对照溶液、阳性药、配伍 10 h 后试样本底, 立即加入 β -氨基己糖苷酶底物 (用 pH 4.5 的柠檬酸盐缓冲液配成 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液) 50 μ L, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。然后每孔加入碳酸钠/碳酸氢钠的缓冲液 (pH 10) 100 μ L 终止反应, 酶标仪 405 nm 处测定吸光度, 按下式计算 β -氨基己糖苷酶释放率。

$$\beta\text{-氨基己糖苷酶释放率}\% = (A_{\text{上清}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{裂解}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

前期实验结果表明, RBL-2H3 细胞在 5% 丹红注射液作用下细胞存活率超过 75%, 故选取该浓度进行实验。如图 6、7 所示, 与对照组比较, 阳性药 C48/80 作用后可致 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷

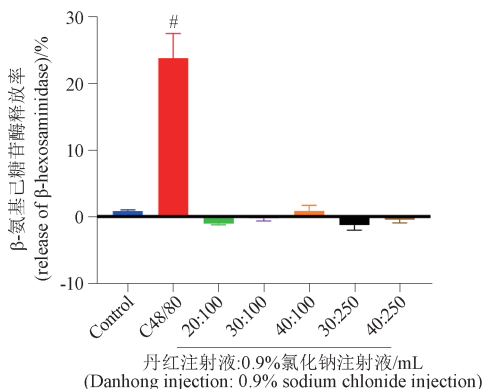
酶释放率显著升高,而丹红注射液配伍溶液各给药组与对照组相比未引起 β -氨基己糖苷酶释放率显著增加,表明在该条件下,丹红注射液与溶媒配伍 10 h 后的溶液无明显致敏作用。



注 (note): control 为 5% 葡萄糖注射液 (5% glucose injection) 与对照组相比[#] $P < 0.05$ ([#] $P < 0.05$ versus control)

图 6 丹红注射液与 5% 葡萄糖注射液配伍 10 h 后 β -氨基己糖苷酶释放率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 The results of β -hexosaminidase release rate after mixing Danhong injection with 5% glucose injections in 10 h



注 (note): control 为 0.9% 氯化钠注射液 (0.9% sodium chloride injection) 与对照组相比[#] $P < 0.05$ ([#] $P < 0.05$ versus control)

图 7 丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液配伍 10 h 后 β -氨基己糖苷酶释放率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 The results of β -hexosaminidase release rate after mixing Danhong injection with 0.9% sodium chloride injection in 10 h

3 讨论

丹红注射液是临床治疗心脑血管疾病的常用药物之一,现代研究表明,丹红注射液有活血化瘀、通脉舒络的作用^[7],在冠心病、心绞痛、心肌梗塞、瘀血型肺心病、缺血性脑病和脑血管栓等的治疗过程中均

有良好的临床效果^[8-10]。在静脉滴注过程中,合理选择配伍溶媒是十分重要的环节,目前临床常用溶媒主要有 5% 葡萄糖注射液、0.9% 氯化钠注射液等。本文基于“理化性质-主要成分含量-指纹图谱相似度-类过敏反应”的序贯分析策略,对丹红注射液与临床常用输液溶媒 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液配伍后进行多指标分析,综合评价丹红注射液配伍溶液的稳定性 and 安全性。

医师在临床用药时,常常只关注药品的功能主治,根据临床使用习惯选择溶媒,忽视溶媒配伍后的理化性质,使得不良反应发生的概率大大增加。目前注射液配伍溶液常见的稳定性检测指标有性状、pH、渗透压、不溶性微粒等。本研究将丹红注射液与临床常用输液溶媒 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液按照一定比例配伍,观察其在配伍后 10 h 内理化性质的稳定性。结果表明,丹红注射液各配伍溶液在室温下放置 10 h 均有良好的性状、渗透压稳定性。静脉输液时,pH 一般控制在 4~9 范围内,若超出此范围,易诱发行血性静脉炎和血小板聚集^[11]。丹红注射液与溶媒配伍 10 h 内 pH 较稳定。不溶性微粒是引起热原反应、炎症反应、肉芽肿及血管栓塞甚至癌症的主要原因,本文测量结果发现,每 1 mL 含 10 μm 及以上的不溶性微粒未超过 25 粒,每 1 mL 含 25 μm 及以上的不溶性微粒未超过 3 粒^[12]。

中药注射液配伍后主要成分含量的变化直接影响注射剂的质量和其临床有效性。在丹红注射液与临床常用输液溶媒 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液配伍 10 h 内,分析主要成分含量变化,发现各配伍溶液中总酚、丹参素、原儿茶醛、4-香豆酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量均无明显变化,说明 10 h 上述各配伍溶液内主要成分含量有良好的稳定性。

运用指纹图谱对丹红注射液各配伍溶液不同观测时间点的化学成分进行整体性评价,揭示各化学成分的相对关系。HPLC 指纹图谱可反映丹红注射液主要药效物质在各配伍溶液中含量和比例的变化情况。相比 HPLC 指纹图谱,¹H NMR 指纹图谱具有样品预处理简单、无损、分析速度快、对检测成分无偏向性的优势,可反映糖类、氨基酸类等成分的含量变化^[13]。研究发现,配伍后溶液的 HPLC 和¹H NMR 指纹图谱均有较高的相似度,表明配伍 10 h 内溶液化学成分含量和比例未发生明显变化,有良好的化学稳定性。

丹红注射液不良反应累及系统、器官的前 3 位

分别是皮肤及其附件、神经系统和循环系统,主要不良反应为潮红、皮疹、头痛、头晕、胸闷、心悸、恶心、呼吸困难、发热等^[14]。鉴于中药注射剂引起的变态反应以类过敏反应为主,本研究采用 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型,以 β -氨基己糖苷酶释放率作为丹红注射液配伍溶液在室温放置 10 h 后的类过敏反应检测指标,以 C48/80 作为阳性药刺激细胞过敏性介质及细胞因子释放剂,模拟体内、外细胞脱颗粒过程及临床反应^[15]。在测试条件下,各配伍溶液作用组中 β -氨基己糖苷酶释放率与对照组相比无明显增加,故本研究未发现丹红注射液与 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液配伍 10 h 后溶液会引起类过敏反应。

综合而言,本研究对丹红注射液与常用溶媒配伍后 0、4、10 h 3 个测试时间点溶液的理化性质、主要成分含量、指纹图谱相似度、类过敏反应进行序贯分析,从物理、化学、生物角度综合评价,发现配伍后 10 h 丹红注射液与临床常用输液溶媒 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液在 30 mL; 250 mL ~ 40 mL; 100 mL 浓度范围内均有较好的配伍稳定性和安全性,为丹红注射液的临床配伍应用提供了参考。

参考文献

- [1] 王秋婷, 苗秋丽, 张杰, 等. 不同溶媒对中药注射剂稳定性和安全性的影响[J]. 中成药, 2019, 41(1): 233
WANG QT, MIAO QL, ZHANG J, *et al.* Effects of different solvents on stability and safety of traditional Chinese medicine injection [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2019, 41(1): 233
- [2] 魏戌, 谢雁鸣. 中药注射剂不良反应的影响因素与发生机制分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(18): 2748
WEI X, XIE YM. Influencing factor and mechanism analysis of adverse drug reaction in traditional Chinese medicine injection [J]. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(18): 2748
- [3] 石浩强, 许倍铭, 葛覃. 从溶媒的选择谈安全使用中药注射剂[J]. 中国药房, 2012, 23(43): 4125
SHI HQ, XU BM, GE Q. Discussion on safe use of TCM injection from the choice of menstruum [J]. *China Pharm*, 2012, 23(43): 4125
- [4] 李瑞吉, 王婷婷, 刘金辉, 等. 丹红注射液在体外抑制血小板聚集的生物活性测定法研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(10): 1763
LI RJ, WANG TT, LIU JH, *et al.* Research on bioassay method of Danhong injection in inhibiting platelet aggregation *in vitro* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(10): 1763
- [5] XU LL, SHANG ZP, BO T, *et al.* Rapid quantitation and identification of the chemical constituents in Danhong injection by liquid chromatography coupled with orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1606: 460378
- [6] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020
- [7] 那坤, 武亮, 李滢, 等. 舒血宁注射液、丹红注射液、丹参酮 II_A 磺酸钠注射液治疗冠心病不稳定性心绞痛的临床疗效分析研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(10): 1268
NA K, WU L, LI Y, *et al.* Clinical curative effect analysis of Shuxuening injection, Danhong injection, tanshinone II_A sulfonic acid sodium injection in the treatment of coronary heart disease unstable angina [J]. *J Basic Chin Med*, 2015, 21(10): 1268
- [8] ZHANG GX, ZHANG YY, ZHANG XX, *et al.* Different network pharmacology mechanisms of Danshen-based Fangjis in the treatment of stable angina[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 952
- [9] FENG X, LI Y, WANG Y, *et al.* Danhong injection in cardiovascular and cerebrovascular diseases: pharmacological actions, molecular mechanisms, and therapeutic potential [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 62
- [10] 张宇航, 杨静, 吴宿慧, 等. 基于抗凝血活性的丹红注射液生物效价测定方法的建立[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2348
ZHANG YH, YANG J, WU SH, *et al.* Quality evaluation of Danhong injection based on anticoagulant biological potency [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(8): 2348
- [11] 童彤, 徐光宏, 丁海文, 等. 5 种输液调配的注射用尖吻蝮蛇血凝酶成品输液稳定性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(5): 515
TONG T, XU GH, DING HW, *et al.* Compatibility stability of *Hemocoagulase agkistrodon* for injection with 5 infusion solutions [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, 43(5): 515
- [12] 徐帆, 梁晓方, 苏莉, 等. 注射剂配伍稳定性研究方法学分析与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(10): 840
XU F, LIANG XF, SU L, *et al.* Analysis and evaluation of methodology for the stability of injection compatibility [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2009, 29(10): 840
- [13] 张弘弛, 刘瑞, 巴德方, 等. 恒山黄芪¹H-NMR 指纹图谱的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 47
ZHANG HC, LIU R, BA DF, *et al.* ¹H-NMR fingerprint of Hengshan *Astragalus membranaceus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(1): 47
- [14] 李学林, 唐进法, 孟菲, 等. 10409 例丹红注射液上市后安全性医院集中监测研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(20): 2783
LI XL, TANG JF, MENG F, *et al.* Study on 10409 cases of post-marketing safety Danhong injection centralized monitoring of hospital [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(20): 2783
- [15] 周大铮, 肖辉, 万梅绪, 等. RBL-2H3 细胞脱颗粒模型评价注射用丹参多酚酸的安全性[J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2403
ZHOU DZ, XIAO H, WAN MX, *et al.* Evaluate safety of Salvianolic Acid for Injection with RBL-2H3 cell degranulation model [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(11): 2403

(本文于 2023 年 7 月 11 日收到)