

清开灵注射液溶血实验新方法与传统方法的比较研究

樊华*,康强,林鹏,王秀英(辽宁省食品药品检验所,沈阳 110023)

中图分类号 R943;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0608-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.11

摘要 目的:寻找一种更客观反映清开灵注射液溶血情况的方法。方法:通过体外肉眼观察(传统方法)与体内溶血实验(新方法)比较,评价9个生产企业18批清开灵注射液溶血情况。结果:体外肉眼观察法下18批供试品结果均为阴性,体内溶血实验下18批供试品中15批为阴性结果,3批为可疑阳性结果。体内、外溶血实验方法的结果一致率达83.3%。结论:清开灵注射液体内溶血实验结果与体外肉眼观察法结果存在相关性,且体内法优于体外法。

关键词 清开灵注射液;溶血实验;比较研究

Comparative Study on New Method and Traditional Methods for Hemolysis Test of Qingkailing Injection

FAN Hua, KANG Qiang, LIN Peng, WANG Xiu-ying (Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To find out a more objective method to reflect hemolysis of Qingkailing injection. METHODS: Hemolysis situation of 18 batches of Qingkailing injection from 9 manufacturers were evaluated through the in vivo hemolysis method and in vitro naked eye observation experiment. RESULTS: Hemolysis test of 18 batches of test samples were negative by in vitro naked eye observation method. Hemolysis test of 15 batches of test samples were negative by in vivo hemolysis method, and 3 batches of test samples were suspected as positive. The consistent rate of in vivo and in vitro hemolysis test was 83.3%. CONCLUSIONS: There is an correlation between in vivo hemolysis test and results of in vitro naked eye observation method for Qingkailing injection, and in vivo method is better than that of in vitro method.

KEYWORDS Qingkailing injection; Hemolysis test; Comparative study

清开灵注射剂是由胆酸、珍珠母(粉)、猪去氧胆酸、栀子、水牛角(粉)、板蓝根、黄芩苷和金银花制备的中药复方制剂,不仅具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍之功能,还具有抗细菌、抗真菌、抗病毒等作用。近几年,清开灵注射液临床应用中时有出现不良反应的报道^[1-3],主要有过敏性休克、过敏样反应、寒战、高热、胃肠道反应等。本研究从体内(新方法)、体外(传统方法)两方面进行了清开灵注射液溶血的研究及可能的溶血机制分析,以为该药品安全性质量评价提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

ES10K-1型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);80-1型电动离心沉淀机(上海手术器械厂);BD115型恒温培养箱(德国Binder公司);UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);ED型恒温水箱(德国Julabo公司)。

1.2 药品与试剂

清开灵注射液(A、B、C、D、E、F、G、H、I,9家公司各2批

次,规格:10 ml);N-乙酰苯肼(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20091013);微量游离血红蛋白(FHb)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

普通级日本大耳兔,♀♂兼用,体质量1.7~2.4 kg,由沈阳药科大学实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(辽)2009-0002];SPF级KM种小鼠,♀♂兼半,体质量18~22 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供[实验动物使用合格证号:SCXK(辽)2010-0001]。

2 方法

2.1 体外肉眼观察法^[4]

2.1.1 红细胞混悬液的制备 取兔血数毫升,放入盛有玻璃珠的锥形瓶中,振摇10 min,除去纤维蛋白原,使成脱纤血,加约10倍量的生理盐水,混匀,以离心半径为8 cm、3 000 r/min离心10 min,除去上清液,沉淀的红血球再用生理盐水洗涤2~3次,至上清液不显红色为止,将所得红细胞用生理盐水配

=====

5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells[J]. *Cancer*, 1999, 85 (2): 307.
[8] Xiong S, Yu B, Wu Y, et al. Preparation therapeutic efficacy and intratumoral localization of targeted daunorubicin liposomes conjugating folate-PEG-CHEMS[J]. *Biomed*

Pharmacother, 2011, 65(1): 2.
[9] El-Kamel AH. In vitro and in vivo evaluation of Fluronic 127-based ocular delivery system for timolol maleate[J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(1): 47.
[10] 胡静,李立.姜黄素药理作用研究现状[J]. *检验医学与临床*, 2007, 12(4): 186.

* 主管药师。研究方向:药品检验与毒理学。电话:024-25424739。E-mail:469345467@qq.com

(收稿日期:2013-07-03 修回日期:2013-10-14)

成2%的混悬液,即得。

2.1.2 实验方法 取试管6支,依次加入2%红细胞混悬液和生理盐水,混匀后于37℃恒温箱中放置30 min,分别加入不同量的样品(第6管为对照管),摇匀后置37℃恒温箱中,开始每隔15 min观察1次,1 h后再每隔1 h观察1次,共观察5次,以第3试管为准,本品在2 h内不得出现溶血和红细胞凝聚情况。清开灵注射液体外肉眼观察法溶血与凝聚实验加样表见表1。

表1 清开灵注射液体外肉眼观察法溶血与凝聚实验加样表
Tab 1 Application of sample in hemolysis and agglomeration test for Qingkailing injection by in vitro naked eyes observation method

溶液	试管编号					
	1	2	3	4	5	6
2%红细胞混悬液,ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水溶液,ml	2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
清开灵注射液,ml	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0

2.2 体内溶血实验

2.2.1 实验方法 实验分为11组,即阴性对照(等容生理盐水)组、阳性对照(*N*-乙酰苯肼质量分数为0.75%,0.5 ml/只)组与清开灵注射液①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨(生产企业依次为A、B、C、D、E、F、G、H、I,0.5 ml/只)组,小鼠尾静脉给药1次。24 h后眼眶静脉丛采血1.0~1.5 ml,以离心半径为8 cm、3 000 r/min离心10 min,分离血清,按试剂盒说明书操作,于510 nm波长处测定吸光度(*A*),计算FHb质量浓度(mg/L)。

2.2.2 结果判定 在阳性对照组FHb质量浓度与阴性对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),且超出阴性对照组($\bar{x} + 3s$)的前提下,若清开灵注射液组FHb质量浓度与阴性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),且动物健存,则判定为溶血实验结果阴性;若清开灵注射液组FHb质量浓度高于阴性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),则判定为溶血实验结果可疑阳性;若清开灵注射液组FHb质量浓度高于阴性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且超出阴性对照组($\bar{x} + 3s$),则判定为溶血实验结果阳性。

2.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 11.5软件进行统计。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体外肉眼观察法

9个生产企业18批供试品体外肉眼观察溶血与凝聚实验结果均为阴性。

3.2 体内溶血实验

9个生产企业中B、D和E公司各有1批供试品结果为可疑阳性,占总数的16.67%,分别占该企业的50%。清开灵注射液体内溶血实验FHb的质量浓度见表2;清开灵注射液体内、外溶血实验结果比较见表3。

4 讨论

溶血性实验是观察受试物是否引起溶血和红细胞凝聚等

表2 清开灵注射液体内溶血实验FHb质量浓度

Tab 2 FHb content of Qingkailing injection in the in vivo hemolysis test

生产企业	批号	质量浓度	<i>n</i>	FHb质量浓度,mg/L
阴性对照			9	47.38 ± 11.90
			9	70.23 ± 12.31
A	12031253	原液	10	57.71 ± 16.46
	12031351	原液	8	64.16 ± 19.71
B	111226	原液	10	66.47 ± 22.57*
	1201001	原液	9	68.84 ± 25.38
C	120303	原液	10	59.13 ± 21.39
	120203	原液	8	66.85 ± 29.11
D	12030701	原液	10	73.46 ± 19.05*
	12011105	原液	10	83.37 ± 39.04
E	12031007	原液	10	79.53 ± 22.49*
	12010604	原液	10	83.68 ± 33.93
F	101028	原液	8	49.88 ± 15.17
	110406	原液	9	83.74 ± 29.04
G	12010211	原液	10	59.64 ± 31.35
	11112911	原液	10	84.40 ± 38.52
H	210301A	原液	10	56.08 ± 17.92
	112105A	原液	10	63.58 ± 20.25
I	110622	原液	9	50.61 ± 16.27
	120113	原液	9	83.83 ± 33.59
阳性对照		0.75%	8	534.91 ± 106.02*
		0.75%	10	514.40 ± 124.38*

与阴性对照比较: * $P < 0.05$

vs. negative control: * $P < 0.05$

表3 清开灵注射液体内、外溶血实验结果比较

Tab 3 The results of inside and outside hemolysis test of Qingkailing injection

生产企业	批号	方法	
		体外法	体内法
A	12031253	-	-
	12031351	-	-
B	111226	-	±
	1201001	-	-
C	120303	-	-
	120203	-	-
D	12030701	-	±
	12011105	-	-
E	12031007	-	±
	12010604	-	-
F	101028	-	-
	110406	-	-
G	12010211	-	-
	11112911	-	-
H	210301A	-	-
	112105A	-	-
I	110622	-	-
	120113	-	-

注:“-”为阴性反应;“±”为可疑阳性反应

note:“-” means negative reaction; “±” means suspicious positive reaction

反应。因造成溶血反应的机制复杂,目前尚无全面的临床前溶血实验方法。近几年一些学者力求寻找一种更适合中药注射剂溶血性测定的方法^[5-8]。清开灵注射液因生产企业不同,

其颜色及深浅差异较大,常规体外肉眼观察法(传统方法)对结果判定存在干扰。为了排除非药物引起的影响因素,笔者研究采用体内溶血法(新方法)来评价其溶血情况。体内溶血法必须设立阳性、阴性对照组,*N*-乙酰苯肼作为溶血性贫血性实验模型已广泛应用于药理学实验研究中^[9-10],故笔者选取*N*-乙酰苯肼作为阳性对照,2次实验阳性对照组Fhb含量均高于阴性对照组($\bar{x}+3s$),说明实验成立,重复性较好。研究结果显示,体内、外溶血实验方法结果一致率达83.3%,说明两者间存在一定相关性;同时体内溶血实验结果可疑阳性率达16.6%。需要说明的是,由于各企业选取样本较少,本研究并不能判定一个企业产品质量的优劣;其中个别批次样品存在结果差异,提示可疑阳性样品临床应用可能存在相关安全风险。

由于溶血机制复杂,药物制剂引起的溶血反应可分为免疫性溶血和非免疫性溶血两类^[11]。清开灵注射液中的中药成分复杂,工艺烦琐,也可能存在因免疫反应引起的免疫性溶血。体外溶血只能评价药物在体外对血液稳态的影响,而体内溶血实验则可以真实反映药物代谢过程中复杂反应,客观评价受试物溶血情况;体外肉眼观察法观察时间为2~3 h,与清开灵注射液的体内作用时间不一致。文献报道清开灵注射液4~5 h仍具有较强的解热和抗炎作用^[12],且未排除药物的后遗效应及代谢产物的影响。体内溶血实验给药24 h后检测Fhb含量,与临床应用一致,能够较为准确、客观地反映药物在体内代谢而产生的溶血反应。因此,笔者认为体内溶血法更优于体外溶血法,其方法的可行性有待进一步验证。

参考文献

[1] 孙立恩.清开灵注射液致不良反应104例分析[J].中国药

房,2012,23(24):2 276.

- [2] 项海燕.清开灵注射液不良反应与临床合理应用探讨[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):199.
- [3] 钟邱,林凯,温坚.清开灵注射液致不良反应313例文献分析[J].中医药临床杂志,2012,24(8):723.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:1 110.
- [5] 袁雪涛,李昇刚,孙振平.对23种中药注射剂溶血与凝聚检查的探讨[J].中国药品标准,2010,11(6):430.
- [6] 国明,魏霞.丹红注射液溶血机制的初步实验研究[J].中国药事,2012,26(2):140.
- [7] 张德波,冯诚,罗洁,等.乳状液型注射液溶血与凝聚实验探讨[J].中国药品标准,2006,7(5):51.
- [8] 张剑锋,项峥,窦德强.血塞通注射液溶血检测方法研究[J].中国现代中药,2011,13(1):34.
- [9] 王艳伟,乔利,刘春芳,等.黄连对乙酰苯肼所致小鼠红细胞氧化性溶血的影响及作用机制[J].中国中药杂志,2010,35(18):2 449.
- [10] 杜先婕,宋林奇,谢人明,等.复方阿胶浆对乙酰苯肼所致小鼠溶血性贫血模型的实验研究[J].中成药,2009,31(5):790.
- [11] 国家食品药品监督管理局.药物研究技术指导原则[M].1版.北京:中国医药科技出版社,2005:227.
- [12] 黄良胜.清开灵注射液解热抗炎作用的实验研究[J].临床合理用药,2012,5(1C):6.

(收稿日期:2013-03-07 修回日期:2013-06-07)

国家卫生和计划生育委员会宣传司“构建和谐医患关系”媒体座谈会在京举行

本刊讯 2014年1月11日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫生计生委)宣传司与健康报社在京联合举行“构建和谐医患关系”媒体座谈会。国家卫生计生委副主任崔丽在座谈会上表示,构建和谐的医患关系,尤其需要加强正面宣传和舆论引导。一方面希望媒体能组织开展多种形式的医疗卫生科普及法律知识宣传活动,引导群众看病就医的合理预期,引导患者合法维权;另一方面希望媒体能够大力宣传医疗卫生系统救死扶伤的人道主义精神,营造尊医重卫的良好氛围。

崔丽指出,医患和谐对促进社会稳定与发展起着至关重要的作用。在过去的一年中,各媒体对国家卫生计生委的工作给予大力支持,在一些重大的公共卫生事件中发挥了积极的作用,使卫生计生工作取得了良好的社会效果。实现医患和谐的局面,要通过政府部门、医疗机构与医务人员、行业组织等多方共同努力,持续深化医改,健全全民医保体系,合理配置优质资源,建立分级医疗体系,改善人民群众就医感受。要依法严惩暴力伤害医务人员和患者人身财产安全的违法犯罪行为,强化医疗机构安全防范工作,加强医患矛盾纠纷排查化解,保障医患双方合法权益,维护正常的医疗秩序。要完善医疗纠纷调解处理机制,提高医疗纠纷人民调解成功率和满

意度。

与会媒体表示,构建和谐医患关系关键在深化医改,但新闻舆论引导作用越来越重要,没有媒体的参与医患关系恐怕很难真正改善。媒体将发挥建设性作用,既回避当前医疗卫生领域中存在的问题,同时做到理性发声,力求有序有力有效引导舆论,为构建和谐医患关系鼓与呼。希望国家卫生计生委建立更加灵活、更有时效性的新闻发布制度,对重大热点问题及突发事件做到及时回应;在重大选题的报道策划上跟媒体进行更多深入的合作;建立卫生计生系统专家库,为新闻媒体提供权威参考;多邀请跑口记者参与有关司局的专项重点调研,为媒体报道积累更接地气、更有价值的新闻素材。

崔丽表示,2014年,国家卫生计生委将紧紧围绕中央的重大决策部署和卫生计生中心工作和重点任务做好新闻宣传和信息发布。加强理论研究和宣传工作,加大健康促进推动力度,切实发挥好宣传工作的先行先导作用,为促进卫生计生事业改革发展营造良好的舆论氛围和社会环境。

座谈会由国家卫生计生委宣传司司长毛群安主持。国家卫生计生委医政医管局副局长郭燕红在会上介绍了“平安医院”建设工作进展情况。