

直接多肽反应在预测注射用曲克芦丁过敏反应中的应用

张 琪, 于德志, 李会轻, 高 倩, 杨 钊

青岛市食品药品检验研究院/国家药品监督管理局海洋中药质量研究与评价重点实验室(山东青岛 266071)

【摘要】目的 建立直接多肽反应试验(DPRA)的致敏检测方法,对发生药品不良反应(ADR)聚集性信号的注射用曲克芦丁的致敏性进行评价。**方法** 运用HPLC法,测定注射用曲克芦丁涉ADR批次和正常批次对半胱氨酸多肽(Cys)和赖氨酸多肽(Lys)的消耗量。**结果** 涉ADR批次及正常批次制剂,与Cys和Lys均不发生共洗脱,采用1:10 Cys和1:50 Lys模型预测,各批次之间的数据结果差异较小,依模型预测判定各批次致敏性均为阴性。**结论** 各批次注射用曲克芦丁DPRA方法预测结果均为阴性,基于该方法原理分析,初步判定涉ADR批次注射用曲克芦丁发生临床ADR聚集性信号原因应与小分子半抗原无关,同时探讨了该方法用于预测致敏成分是否为小分子半抗原的可行性。

【关键词】 注射用曲克芦丁; 药品不良反应; 直接多肽反应试验; 过敏反应; 半抗原

Application of direct peptide reactivity assay in predicting allergic reaction of troxerutin for injection

Qi ZHANG, De-Zhi YU, Hui-Qing LI, Qian GAO, Zhao YANG

Qingdao Institute of Food and Drug Control / NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Marine Chinese Medicine, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Corresponding author: Qi ZHANG, Email: zqlovelife@126.com

【Abstract】Objective The sensitization detection method of direct peptide reactivity assay (DPRA) was established to evaluate the sensitization of troxerutin for injection with adverse drug reaction (ADR) aggregation signal. **Methods** To determine the consumption of cysteine polypeptide (Cys) and lysine polypeptide (Lys) in ADR batch and normal batch of troxerutin for injection by HPLC. **Results** There were no co-elution occurs neither Cys nor Lys in the ADR batch and normal batch preparations, the model of 1:10 Cys and 1:50 Lys was used. There was little difference in the data between batches. According to the model prediction, the sensitization of each batch was negative. **Conclusion** The prediction results of DPRA method for each batch of troxerutin for injection were negative. Based on the principle analysis of this method, it is preliminarily determined that the cause of clinical ADR aggregation signal of troxerutin for injection in ADR batch should be independent of small molecule hapten. At the same time, the feasibility of this method to predict whether the sensitizing component is small

molecule hapten was discussed.

【Keywords】 Troxerutin for injection; Adverse drug reaction; Direct peptide reactivity assay; Allergic reaction; Hapten

曲克芦丁是从槐米等植物中提取芦丁,经羟乙基化制成的半合成黄酮类化合物,有防止血栓形成、改善微循环、增加血氧含量、降低毛细血管通透性等作用^[1-2],广泛用于治疗缺血性脑血管病、静脉炎以及血管通透性增高所致的水肿等,近年也有报道^[3-4]用于治疗骨关节炎等症。鉴于其临床应用广泛且是天然产物来源的性质,故其用药安全受到更多关注。前期某省发布注射用曲克芦丁临床药品不良反应(ADR)聚集性信号报告,相继3个批号发生不同程度寒战发热,体温升高至36.7~39.3℃不等,部分病例伴随过敏性休克,血压降低至无法测出,偶见有呼吸困难症状等。监管部门怀疑该品种存在热原反应风险,监督抽样进行药品检验,按该品种现行质量标准^[5]测试细菌内毒素(凝胶法),各涉ADR批次均低于标准规定限值,且质量标准规定的其他项目也均符合规定。

本实验室对涉ADR的3批次和正常的3批次注射用曲克芦丁进行了一系列质量安全性再评价。前期对该6批次制剂进行了内毒素动态浊度法研究,发现各批次制剂的细菌内毒素含量虽均在规定的限值以下,但涉ADR的3批次样品中有2批次内毒素含量高于3批正常样品10倍左右,且接近于限值,存在较明显的质量风险差异^[6]。在此基础上,基于ADR报告提及的过敏性休克及呼吸困难症状,采用药典方法^[7]进行豚鼠主动过敏反应研究,结果均为阴性,但不排除存在方法灵敏度不足的情况。

为此,本研究采用较灵敏的、测试评价化合物致敏性的经济合作与发展组织(OECD)化妆品体外替代试验:直接多肽反应试验方法(DPRA)^[8],对注射用曲克芦丁进行了致敏性预测研究,该方法将受试物与半胱氨酸多肽(Cys)和赖氨酸多肽(Lys)共同孵育后,采用HPLC法测定残留多肽含量,计算多肽消耗百分比,判定受试物是否具有致敏性^[9]。该法近年多次用于中药注射液过敏反应的预测^[10],本次研究报道旨在通过其方法原理为该质量分析提供更多的评价思路借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);BT125D型电子天平(Sartorius北京公司);GNP-9050型隔水式恒温培养箱(上海三发科学仪器有限公司);TDZ4-WS型离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

1.2 试剂

半胱氨酸多肽(Cys, Ac-RFAACAA-COOH,批号:P200413-YS472063,纯度99.35%)、赖氨酸多肽(Lys, Ac-RFAAKAA-COOH,批号:P200413-YS107617,纯度99.32%)均购自吉尔生化(上海)有限公司;肉桂醛(CAS:104-55-2,批号:L750T16,纯度98%)购自北京百灵威科技有限公司;乙腈、三氟乙酸为色谱纯;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸铵、氨水均为化学纯。

注射用曲克芦丁(规格:0.1g/瓶,涉ADR批号:ADR-007、ADR-206、ADR-407,正常批号:NORM-106、NORM-107、NORM-207)由国内某药企提供。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的制备

2.1.1 多肽储备液制备

称取Cys,用pH 7.5磷酸盐缓冲液配成约0.667 0 mmol·L⁻¹的Cys储备液。称取Lys,用pH 10.2醋酸铵缓冲液配成约0.667 0 mmol·L⁻¹的Lys储备液。pH 7.5磷酸盐缓冲液及pH 10.2醋酸铵缓冲液配制参照国家药品监督管理局2019年发布的化妆品安全技术规范^[11]。

2.1.2 多肽标准溶液的制备

Cys标准溶液:取半胱氨酸多肽储备液1 700 μL+乙腈300 μL配成0.567 0 mmol·L⁻¹的a液,再用稀释剂A(含20%乙腈的pH 7.5磷酸盐缓冲液)稀释成0.283 5, 0.141 8, 0.070 9, 0.035 4, 0.017 7 mmol·L⁻¹的b、c、d、e、f液。

Lys标准溶液:取Lys储备液1 700 μL+乙腈300 μL配成0.567 0 mmol·L⁻¹的a液,再用

稀释剂 B (含 20% 乙腈的 pH 10.2 醋酸铵缓冲液) 稀释成 0.283 5, 0.141 8, 0.070 9, 0.035 4, 0.017 7 mmol · L⁻¹ 的 b、c、d、e、f 液。

2.2 阳性对照与受试物的配制

2.2.1 称样

试验当天配制肉桂醛阳性对照和受试物溶液, 浓度均为 100 mmol · L⁻¹ (表 1)。

按标准要求, 经预试, 最终选择溶剂为乙腈 / 水 (V: V=3: 2), 溶解情况良好。

2.2.2 受试物 HPLC 样品溶液制备

1: 10 半胱氨酸多肽样品溶液 (0.5 mmol · L⁻¹ 多肽 +5 mmol · L⁻¹ 样品): 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +200 μL 乙腈 +50 μL 100 mmol · L⁻¹ 的样品溶液; 样品对照: 750 μL pH 7.5 磷酸盐缓冲液 +200 μL 乙腈 +50 μL 100 mmol · L⁻¹ 的样品溶液; 空白对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +250 μL 乙腈; 溶剂对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +200 μL 乙腈 +50 μL 乙腈 / 水 (V: V=3: 2); 阳性对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +200 μL 乙

腈 +50 μL 100 mmol · L⁻¹ 的肉桂醛溶液。

1: 50 赖氨酸多肽样品溶液 (0.5 mmol · L⁻¹ 多肽 +25 mmol · L⁻¹ 样品): 750 μL 赖氨酸多肽储备液 +250 μL 100 mmol · L⁻¹ 的样品溶液; 样品对照: 750 μL pH 10.2 醋酸铵缓冲液 +250 μL 100 mmol · L⁻¹ 的样品溶液; 空白对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +250 μL 乙腈; 溶剂对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +250 μL 乙腈 / 水 (V: V=3: 2); 阳性对照: 750 μL 半胱氨酸多肽储备液 +250 μL 100 mmol · L⁻¹ 的肉桂醛溶液。

按上述方法配制液相待测溶液, 平行 3 份。

2.3 受试物孵育 24 h 反应前后观察

受试物与多肽混合后, 温度 25℃ 条件下, 避光孵育 24 h, 在反应结束后 1 h 内用 HPLC 法测定。实际试验中孵育样品前后观察, 发现孵育开始前样品混合无沉淀, 但孵育 24 h 后瓶内有少许淡黄色沉淀, 该颜色系由曲克芦丁制剂引入 (曲克芦丁制剂呈淡黄色), 离心 (400 × g) 后进样。

表1 试验当天称样配制 100 mmol · L⁻¹ 的样品溶液

Table 1. Preparation of 100 mmol · L⁻¹ samples solution on test day

样品信息	理论称量 (mg)	实际称量 (mg)	溶剂 (乙腈: 水)	定容体积 (mL)	溶解情况
肉桂醛	67.40	67.60/67.45	3: 2	5	易溶
NORM-106	482.76	482.62/482.43	3: 2	5	溶解
NORM-107	482.76	482.54/482.90	3: 2	5	溶解
NORM-207	482.76	482.41/482.60	3: 2	5	溶解
ADR-007	482.76	482.74/482.82	3: 2	5	溶解
ADR-206	482.76	482.84/482.77	3: 2	5	溶解
ADR-407	482.76	482.56/482.92	3: 2	5	溶解

2.4 HPLC 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 保护柱: Phenomenex SecurityGuard™ Guard Cartridge Kit (柱芯: C₁₈, 4 mm × 3.0 mm); 柱温: 30℃; 检测波长: 220 nm; 流动相 A: 1 000 μL 三氟乙酸加入 1 L 纯水中, 流动相 B: 850 μL 三氟乙酸加入 1 L 乙腈中; 进样量: 5 μL (根据情况在 3~10 μL 之间调整), 梯度洗脱程序见表 2。

2.5 数据处理

多肽消耗百分比计算公式: 多肽消耗百分比 = (1 - 样品多肽峰面积均值 / 溶剂对照多肽峰面积均值) × 100%。

表2 HPLC 梯度洗脱程序

Table 2. HPLC gradient elution procedure

时间 (min)	流速 (mL · min ⁻¹)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.5	90	10
10	0.5	80	20
12	0.5	10	90
14	0.5	10	90
15	0.5	90	10
22	0.5	90	10

2.6 结果

2.6.1 半胱氨酸多肽、赖氨酸多肽试验条件确认

6 批次制剂分 3 次测试，每次随行标准曲线见表 3，Cys、Lys 均符合系统适用性及样品测试有效性要求（参照 OECD 文件^[8]或化妆品安全技术规范^[11]），试验条件成立。

2.6.2 测试样品多肽消耗值及致敏判定

各批次注射用曲克芦丁与 Cys 和 Lys 均不发生共洗脱，根据 OECD 文件^[8]或化妆品安全技术规范^[11]，应采用 1:10 Cys 和 1:50 Lys 模型判定。样品 Cys 和 Lys 消耗百分比分别按“2.5”项下公

式计算，具体消耗值及致敏性判定结论见表 4。

表 4 中肉桂醛阳性对照组按消耗 Cys 和 Lys 数据的最低值计入判定仍为强反应阳性，且阳性对照组 3 次随行数据均符合系统适用性要求，试验条件成立。从测试值看，100 mmol·L⁻¹ 浓度条件下，涉 ADR 批次及正常批次 DPRA 试验结果的最终结论均为阴性，批间数据无明显异常，且均极少消耗多肽，即该方法测得数据未能区分涉 ADR 批次及正常批次致敏性差异，其数据仅可作为后续评价分析参考。

进一步分析该方法及数据结果，基于 DPRA 试验是利用亲电性的小分子化合物与蛋白质中许多

表3 半胱氨酸多肽、赖氨酸多肽试验条件确认 (n=3)

Table 3. Confirmation of test conditions for cysteine polypeptide and lysine polypeptide (n=3)

多肽	样品信息	标准曲线	r	阳性对照	对照A	对照B、C RSD (%)	对照C	制剂消耗值 SD (%)
				消耗值/SD (%)	平均肽浓度 (mmol·L ⁻¹)		平均肽浓度 (mmol·L ⁻¹)	
Cys	NORM-106	Y=2 715.3X+12.412	0.999 9	70.91/1.08	0.51	0.07	0.48	1.91
	ADR-407							1.92
	NORM-207	Y=2 835.6X+12.042	0.999 8	77.22/0.69	0.49	0.02	0.45	0
	NORM-107							0
	ADR-007	Y=2 768.7X+12.520	0.999 9	79.21/1.58	0.50	0.02	0.48	1.31
	ADR-206							1.61
Lys	NORM-106	Y=2 447.9X+7.862 3	0.999 8	41.95/3.12	0.50	0.02	0.49	0.56
	ADR-407							0.37
	NORM-207	Y=2 446.0X+17.503	1.000 0	41.39/3.9	0.50	0.01	0.49	0.54
	NORM-107							0
	ADR-007	Y=2 501.2X-0.067 8	0.999 9	40.77/5.0	0.40	0.02	0.49	0.91
	ADR-206							0.14

注：对照A、B为空白对照；对照C为溶剂对照

表4 各批次制剂多肽消耗值及致敏判定

Table 4. Peptide consumption value and sensitization judgement in batches of preparations

样品名称	预测模型 (Cys+Lys)			结论	最终结论
	Cys消耗值 (%)	Lys消耗值 (%)	Cys+Lys平均消耗值 (%)		
阳性对照	70.91	40.77	55.84	高级	阳性
NORM-106	1.59	0.57	1.08	最低级	阴性
NORM-107	0	0	0	最低级	阴性
NORM-207	0	0.69	0.34	最低级	阴性
ADR-007	1.98	0.08	1.03	最低级	阴性
ADR-206	2.69	0.52	1.60	最低级	阴性
ADR-407	2.82	0.22	1.52	最低级	阴性

具有亲核性的氨基酸侧链结合,模拟半抗原活化致敏这一过程的原理分析^[12],本次 DPRA 试验均为阴性的预测结果,可认为注射用曲克芦丁发生类过敏性休克不良反应或与小分子半抗原无关。

3 讨论

前期发现该 6 批次注射用曲克芦丁内毒素含量虽均符合规定,但涉 ADR 的 3 批次样品中 2 批次的内毒素含量高于同测的 3 批正常样品 10 倍左右,批间确实存在明显的质量风险差异^[6],基本与临床监测 ADR 病例数相符,除有寒战、发热等表现外,数例出现过敏性休克及呼吸困难症状,不排除其存在全身性过敏反应风险,因此有必要评价其是否存在致敏性。

大多数化学致敏原(半抗原)都具有亲电性,能够与氨基酸的亲核中心共价结合,而赖氨酸的 ϵ -NH₂ 基团和半胱氨酸的 -SH 基团都具有相较于其他氨基酸较强的亲核性^[13]。DPRA 方法正是利用了这个原理,亲电小分子半抗原与皮肤蛋白质多肽中的氨基酸残基的亲核基团结合成免疫复合物,启动免疫过敏。DPRA 已被选定为 OECD 认可并颁布的预测化妆品原料是否具有皮肤致敏性的一项成熟的替代方法^[8]。近年来有研究^[14]表明该方法可以用于预测化学致敏原的全身过敏反应,尤其是呼吸道的过敏反应。也有利用 DPRA 方法对中药注射剂、植物提取物等进行致敏性评价的研究^[10,15],可见该方法具有较高的研究及应用潜力。

DPRA 方法作为体外替代试验有局限性,不能完全反映体内代谢活化的过程^[13],且存在对测试物溶解性及浓度要求较高等问题^[16],但近年该方法不断优化,OECD 也对该方法进行了多次修订,我国 2019 年也把该方法纳入化妆品原料变态反应的评价标准^[11]。梅承翰等^[17]综述了 DPRA 方法具有高准确度、高灵敏度和操作相对简便等优点,且经过研究者们不断优化和改进后拓宽了应用范围,可用于对 pre/pro- 半抗原进行致敏性评价,降低了对待测物的浓度要求,但仍提示不能完全替代动物实验。

本次研究测试数据显示 6 批次注射用曲克芦丁 DPRA 致敏判定均为阴性。曲克芦丁制剂处方相对简单,为曲克芦丁 100 g 与甘露醇 30 g,加注射用水至 2 400 mL,分装制成 1 000 支。其中曲克芦丁含量约为 76.92%,符合 DPRA 试验

对样品组成的要求。曲克芦丁相对分子质量为 742.69,甘露醇相对分子质量为 182.172,均在 1 000 以下,其质量标准中控制有关物质的相对分子质量也在 1 000 以下。鉴于 DPRA 试验在设计之初就是模拟了半抗原化这一过程,即具有亲电性的小分子化合物能够与皮肤蛋白中的亲核中心共价结合,从而启动致敏反应^[18-19]。且 OECD 指导原则中所列验证的 10 种熟练物质,其相对分子质量均在 30.03~220.35 范围内^[8],故该方法已验证适用于小分子过敏原及其代谢产物致敏性进行半抗原筛选预测。结合其原理以及测试结果分析,DPRA 致敏结果阴性正说明涉 ADR 批次注射用曲克芦丁过敏性休克等致敏效应与小分子半抗原无关,或者说与质量标准质控成分无关。

鉴于注射用曲克芦丁属于中药注射剂,其主要成分曲克芦丁来源于槐米等植物提取的芦丁经羟乙基化合而成,除羟乙基衍生物外,或存在许多其他不明成分杂质,生产中虽然通过一些工艺控制纯度及杂质限度,但因其天然产物来源特性,仍可能引入环境内毒素诸如蛋白质、多糖、鞣质等大分子的全抗原致敏成分,法定质量标准中并无大分子物质质控指标。近年中药注射剂临床不良反应事件频发,其中大分子物质含量控制不到位是一个很大的风险因素^[20-22],另本次研究分析排除了小分子半抗原风险,提示后续研究中涉 ADR 批次注射剂可考虑从大分子物质如多糖、蛋白等维度分析。同时本研究基于 DPRA 方法原理分析,认为该方法用于预测致敏成分是否为小分子半抗原具有可行性。

参考文献

- 曹婉鑫,唐瑶,陈洋.曲克芦丁药理作用的研究进展[J].中国食物与营养,2015,21(9):73-75.[Cao WX, Tang Y, Chen Y. Research advancement of pharmacological function of troxerutin [J]. Food and Nutrition in China, 2015, 21(9): 73-75.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-9577.2015.09.020.
- 付远清.曲克芦丁的药理性质及临床应用概况[J].中国医药指南,2012,10(7):59-60.[Fu YQ. Pharmacological properties and clinical application of troxerutin[J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(7): 59-60.] DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2012.07.037.
- Tobias LTT, Gomes SCG, Borges LL, et al. Troxerutin as a potential thrombin inhibiting drug[J]. Hematol

- Transfus Cell Ther, 2020, 42(S2): 100–101. DOI: 10.1016/j.htct.2020.10.170.
- 4 Xue X, Chen Y, Wang Y, et al. Troxerutin suppresses the inflammatory response in advanced glycation end-product-administered chondrocytes and attenuates mouse osteoarthritis development[J]. *Food Funct*, 2019, 10(8): 5059–5069. DOI: 10.1039/c9fo01089k.
 - 5 国家药品标准 WS1-XG-028-2014[S]. 2014.
 - 6 于德志, 方选, 张琪, 等. 注射用曲克芦丁发生临床ADR后动态浊度法测定细菌内毒素含量[J]. *中国药品标准*, 2021, 22(2): 187–191. [Yu DZ, Fang X, Zhang Q, et al. Determination of bacterial endotoxin in troxerutin for injection by kinetic turbidimetric method after clinical ADR occurred[J]. *Drug Standards of China*, 2021, 22(2): 187–191.] DOI: 10.19778/j.chp.2021.02.018.
 - 7 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 183.
 - 8 OECD. Test Guideline No. 442C In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) [S/OL]. (2022-06-30) [2022-11-25]. https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en#page11.
 - 9 耿雪, 张雷, 徐玉文, 等. 采用 in silico 和 in chemico 技术评价对氨基酚的皮肤致敏性[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(8): 1495–1500. [Geng X, Zhang L, Xu YW, et al. Evaluation of skin sensitizing potential of p-aminophenol by in silico and in chemico techniques[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 39(8): 1495–1500.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2019.08.20.
 - 10 张劲松, 桑晶, 孙叶丹, 等. 直接肽段结合方法在中药注射剂过敏反应预测中的应用[J]. *中国药品标准*, 2016, 17(4): 268–271. [Zhang JS, Sang J, Sun YD, et al. The application of direct peptide reactivity assay for sensitization prediction of Chinese medicine injection[J]. *Drug Standards of China*, 2016, 17(4): 268–271.] DOI: CNKI:SUN:YPBZ.0.2016-04-006.
 - 11 国家药品监督管理局. 关于将化妆品中游离甲醛的检测方法等 9 项检验方法纳入化妆品安全技术规范(2015 年版) 的通告(2019 年第 12 号)[Z]. 2019.
 - 12 丁诗璇, 李小林, 曲栗, 等. 直接多肽反应试验在化妆品检测中的应用[J]. *用化学品科学*, 2018, 41(11): 19–24. [Ding SX, Li XL, Qu L, et al. Application of direct peptide reactivity assay on cosmetics[J]. *Detergent & Cosmetics*, 2018, 41(11): 19–24.] DOI: CNKI:SUN:RYHX.0.2018-11-005.
 - 13 Troutman JA, Foertsch LM, Kern PS, et al. The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 122(2): 422–436. DOI: 10.1093/toxsci/kfr101.
 - 14 Lalko JF, Kimber I, Gerberick GF, et al. The direct peptide reactivity assay: selectivity of chemical respiratory allergens[J]. *Toxicol Sci*, 2012, 129(2): 421–431. DOI: 10.1093/toxsci/kfs205.
 - 15 柯逸晖, 陈璇, 程树军, 等. 直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测皮肤致敏物的探讨[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(6): 611–617. [Ke YH, Chen Y, Cheng SJ, et al. Preliminary study for integrating DRPA with h-CLAT topredict skin sensitizers[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2016, 24(6): 611–617.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.011.
 - 16 Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, et al. A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions[J]. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(11): 1348–1360. DOI: 10.1002/jat.3139.
 - 17 梅承翰, 庄慧敏, 刘师卜, 等. 直接肽反应试验及其研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(6): 556–559. [Mei CH, Zhuang HM, Liu SB, et al. Direct peptide reaction test and it's research progress[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2018, 13(6): 556–559.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2018.06.014.
 - 18 Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, et al. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 81(2): 332–343. DOI: 10.1093/toxsci/kfh213.
 - 19 Gerberick GF, Vassallo JD, Foertschl M, et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 97(2): 417–427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064.
 - 20 段为钢, 张陆勇. 中药注射剂大分子杂质与类过敏反应: 线索与原理[J]. *云南中医学院学报*, 2020, 43(1): 93–97. [Duan WG, Zhang LY. The relationship between macromolecular impurities in traditional Chinese medicine injection and anaphylactoid reaction: the clues and principles[J]. *Journal of Yunnan University of Chinese Medicine*, 2020, 43(1): 93–97.] DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.01.0016.

- 21 柯瑾, 张陆勇, 殷华, 等. 大分子物质对中药注射剂的安全性影响 [J]. 中成药, 2014, 36(4): 855-859. [Ke J, Zhang LY, Yin H, et al. Effect of macromolecular substances on the safety of traditional Chinese medicine injection[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(4): 855-859.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2014.04.044.
- 22 李辉, 马仕洪, 王兰, 等. 中药注射剂安全性及其无菌保障体系的现状与思考 [J]. 中成药, 2022, 44(9):

2939-2943. [Li H, Ma SH, Wang L, et al. Current situation and reflection on the safety and sterile protection system of traditional Chinese medicine injections[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(9): 2939-2943.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.034.

收稿日期: 2022 年 10 月 14 日 修回日期: 2023 年 04 月 07 日
本文编辑: 周璐敏 钟巧妮