

# 刺五加注射液致敏物质检测及去除方法\*

范能全

(重庆市药品检验所,重庆 401121)

**摘要:**为探讨刺五加注射液中致敏物质的检测方法及去除手段,采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA法)检测刺五加注射液中的致敏物质,同时考察超滤工艺对刺五加注射液大分子物质的截留效果。结果表明,被检测的3个厂家的刺五加注射液中致敏物质均在限度内,各含量无显著性差异,分子量为10 000 D的超滤膜能够显著截留刺五加注射液中的致敏物质。研究认为,间接ELISA法可以检测刺五加注射液中的致敏物质,超滤技术能够有效地去除刺五加注射液中的致敏物质。本研究不但提供了检测刺五加注射液中致敏物质含量的参考方法,还探讨了利用超滤技术去除中药注射液致敏物质的技术手段,从而为刺五加注射液生产工艺的改进提供了新的思路。

**关键词:**酶联免疫吸附试验;超滤技术;刺五加注射液;致敏物质

**中图分类号:**Q503;R927.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1672-6693(2011)01-0068-03

刺五加(*Acanthopanax senticosus*(Rupér. et Maxim.) Harms)为五加科植物刺五加的干燥根及根茎或茎,含有皂苷、多糖、黄酮等多种活性成分,具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳等药理作用<sup>[1]</sup>。刺五加药材经过“水煮醇沉”法制成的刺五加注射液,在治疗脑血管疾病、冠心病、植物神经功能紊乱等疾病上,应用广泛,疗效显著。但由于其含有多种成分,提取工艺纯化程度无法将植物蛋白等致敏物质完全除掉,直接影响产品的质量,容易引起不良反应的发生<sup>[2]</sup>。随着刺五加注射液在临床上大量的应用,其不良反应(ADR)的报道逐年增多,其中过敏反应是刺五加注射液的主要ADR,主要表现为呼吸困难、过敏性哮喘、过敏性休克等。然而有关导致刺五加注射液ADR原因的研究尚较少见<sup>[3]</sup>。

有研究资料表明,刺五加药材所含的刺五加抗原,具有很强的免疫原性和引发速发型过敏反应的特性<sup>[2]</sup>。由于现有提取工艺不完善,不能完全去除刺五加注射液中残留的植物蛋白等大分子物质,导致临床应用中容易发生过敏反应,存在较大的安全隐患,因此必须寻找有效的方法检测出过敏性杂质,并采用合适的技术手段将其尽可能除去。本研究采用间接ELISA法检测刺五加注射液中的致敏物质,并研究了超滤工艺对刺五加注射液大分子物质的截留效果;同时,结合研究结果本文还探讨了优化刺五

加注射液纯化工艺的可能方向,以期提高该药剂的生产质量,获得更好的临床治疗效果<sup>[4,5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验样品

实验所用刺五加注射液具体情况如表1所示。

表1 实验用刺五加注射液

批号	生产商	规格
080821	黑龙江乌苏里江制药有限公司	20 mL/安瓿
080824	黑龙江乌苏里江制药有限公司	20 mL/安瓿
080811	黑龙江乌苏里江制药有限公司	100 mL/玻璃瓶
080517	黑龙江乌苏里江制药有限公司	100 mL/玻璃瓶
20080707	黑龙江珍宝岛制药有限公司	20 mL/安瓿
20080404	黑龙江珍宝岛制药有限公司	20 mL/安瓿
071106211	黑龙江多多药业有限责任公司	20 mL/安瓿
080622221	黑龙江多多药业有限责任公司	20 mL/安瓿

### 1.2 实验试剂

包被液(0.005 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6);样本稀释液(NaCl 8.0 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9 g,加水至1 L);洗涤液(同上,另加1 mL Tween-20);刺五加标准抗原(4 g·L<sup>-1</sup>);特异性刺五加抗体(5 g·L<sup>-1</sup>,均由中国药品生物制品检定所抗生素室提供);封闭液(牛血清白蛋白干粉1 g,加样本稀释液至20 mL);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体

\* 收稿日期 2010-03-17 修回日期 2010-09-19

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB1382)

作者简介:范能全,男,工程师,硕士,研究方向为药物分析及新药药理。

IgG(蛋白含量  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , Santa Cruz Biotechnology 公司); TMB(四甲基联苯胺)-过氧化氢尿素底物缓冲液(Sigma 公司)终止液( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ); Gel buffer(Tris 36.33 g, SDS 0.3 g, 加水至 100 mL, pH 8.4); 阳极缓冲液(Tris 12.1 g, pH 8.9); 阴极缓冲液(Tris 6.05 g, Tricine 8.96 g, SDS 0.5 g, 加水至 500 mL, pH 8.0); 银染固定液(40%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 0.05%  $\text{HCHO}$ ); 还原剂( $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ); 0.1%  $\text{AgNO}_3$ ; 显影液(3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.004%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ); 定影液( $2.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸)。

### 1.3 主要实验仪器

酶标仪(安图 2010); 多道加样枪(Hamilton 公司); COSTAR 96 孔酶标板(型号 2592); Sartorius Vivaspin 500  $\mu\text{L}$  超滤管(Sartorius 公司, 截流分子量 10 000 D); 电泳仪(Bio-Rad 公司); 台式高速离心机(型号 H1650-W, 长沙湘仪离心机仪器有限公司); 微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

### 1.4 试验步骤

1.4.1 间接 ELISA 法 取 0.1 mL 包被液, 加 0.9 mL 待检样品后取 100  $\mu\text{L}$  包被于酶标板中,  $4^\circ\text{C}$  过夜; 每孔加 200  $\mu\text{L}$  洗涤液, 然后加 200  $\mu\text{L}$  5% 的白蛋白封闭液, 孵育洗涤后加 100  $\mu\text{L}$  兔刺五加抗体溶液, 再孵育洗涤后加 100  $\mu\text{L}$  羊抗兔辣根过氧化物酶抗体溶液, 最后每孔加 100  $\mu\text{L}$  兔刺五加抗体溶液和 100  $\mu\text{L}$  底物溶液, 孵育后加 50  $\mu\text{L}$  底物终止液, 在 450 nm 测定吸光值( $\text{OD}_{450}$ )<sup>[2]</sup>。

1.4.2 超滤电泳 取实验样品 500  $\mu\text{L}$  置于超滤管中,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下超滤 4 min, 分别收集超滤浓缩液和滤出液, 然后将 3 种溶液分别进行 Tricine SDS-PAGE 电泳, 取下电泳胶清洗后加入固定液漂洗, 还原剂漂洗,  $\text{AgNO}_3$  漂洗, 最后用显影液显色至获得足够的条带, 加入定影液浸泡即可<sup>[2]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 间接 ELISA 法结果

相关结果如表 2 所示。研究采用空白对照平均值加 5 倍标准差的和作为检测限。根据表 2 数据结果计算可知该值为 1.322。因此, 刺五加注射液样品的吸光值高于或等于 1.322 时, 判定为阳性; 低于 1.322 时, 判定为阴性。

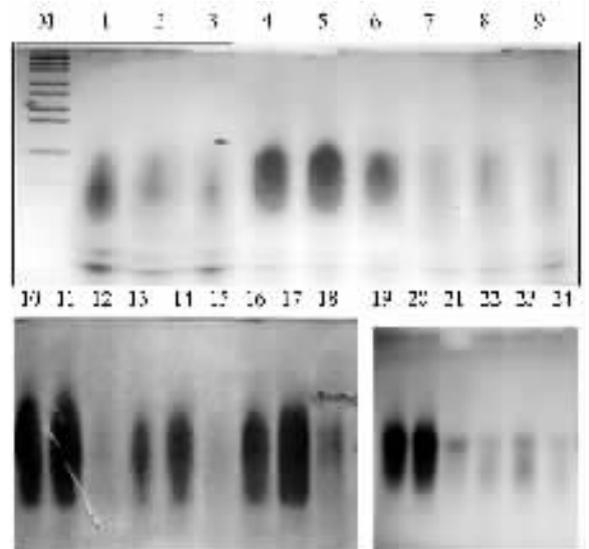
实验样品结果均呈阴性, 因此按照研究判定标准其中所含的致敏物质均在规定的限度范围内。但不同厂家、同一厂家不同批次、以及不同的样品包装之间的数据均有差异, 但差异不显著。

表 2 刺五加注射液间接 ELISA 法实验结果

批号	$\text{OD}_{450}$				平均值	结论
080821	1.259	1.188	1.121	1.237	1.201	阴性
080824	1.089	1.079	1.128	1.130	1.106	阴性
080811	1.165	1.148	1.176	1.355	1.211	阴性
080517	1.126	1.046	1.217	0.896	1.071	阴性
20080707	1.120	0.843	0.805	0.810	0.894	阴性
20080404	0.863	0.722	0.871	0.838	0.824	阴性
071106211	1.090	1.148	1.229	1.282	1.187	阴性
080622221	1.055	1.266	1.254	1.124	1.175	阴性
	0.921	0.987	0.874	0.758		
空白对照	0.712	0.888	0.927	1.020	0.874 $\pm$ 0.089 6	
	0.785	0.979	0.849	0.888		
	0.804	0.849				

### 2.2 超滤电泳结果

电泳结果见图 1。本研究结果判定标准定义为: 同一个批次的样品, 如果第 1、3 条带差别不明显, 第 2 条带相对而言颜色不太深, 表明该生产厂家的过滤工艺效果较好, 临床发生不良反应的几率较低, 产品的安全性相对较高。从图 1 可见, 由于各个厂家采用的过滤工艺互不相同, 故电泳图谱也有所差异, 不同厂家、同一厂家不同批次、安瓿包装和玻璃瓶包装的样品之间的大分子含量差异较大。但全部实验样品在经过截留分子量为 10 000 D 的超滤膜后, 容易导致不良反应的大分子物质均呈数量级明显减少。



每个液样品有 3 条带, 从左至右依次为样品原液、超滤后的浓缩液和滤出液; M: 标准分子量标记; 1~3: 样品 080821; 4~6: 样品 080811; 7~9: 样品 080824; 10~12: 样品 080517; 13~15: 样品 20080707; 16~18: 样品 20080404; 19~21: 样品 071106211; 22~24: 样品 080622221。

图 1 刺五加注射液超滤电泳试验结果

### 3 讨论

超滤膜由一种极薄的半渗透聚醚砜材料构成,它能够有效地截流大分子,允许小分子物质通过。中药注射液大部分有效成分的分子量均小于 10 000 D,因此选用截流量为 10 000 D 的超滤膜对中药注射液的主药成分影响不大。虽然选择截留分子量越小的超滤膜越可靠,但如果截流分子量太小,可能会对主药的含量造成影响。所以,本研究采用截流量为 10 000 D 的超滤膜。超滤膜不仅可以去除大分子物质,还可以除热原、除菌、除异物和微粒,特别是对中药注射液的澄清度有明显的改善作用<sup>[6-7]</sup>。本研究还发现,不同厂家或同一厂家不同批号的刺五加注射液样品的颜色各不相同,超滤后,溶液颜色不仅变为大致相同,而且澄清度也比超滤前有了很大的提高。

刺五加药材中所含的刺五加抗原,具有很强的免疫原性和引发速发型过敏反应的能力。造成刺五加注射液临床中发生过敏反应的主要原因,可能与其中残留的植物蛋白等大分子物质有关。间接 ELISA 法试验和超滤电泳试验结果综合说明了刺五加注射液生产厂家产品中还存在一定的大分子物质,过滤工艺均还有待改进。同时这也说明了超滤工艺在中药注射液生产工艺中的重要性。因为中药

注射液中有许多的成分是未知的,只有通过过滤工艺将容易导致不良反应的物质降到最低,才能保证临床用药的安全<sup>[8]</sup>。随着膜分离技术的发展,超滤技术可以广泛地用于去除中药注射液中的致敏物质,有效地消除安全隐患,为中药注射液生产工艺的改进提供了新思路,有很强的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 范丽静,蒋晓红,姚国恩.刺五加注射液研究进展[J].中成药,2003,25(6):488.
- [2] 于风平,胡昌勤,崔生辉,等.刺五加注射液中过敏性杂质的分析[J].中国药学杂志,2008,43(5):384-387.
- [3] 楼福乐,毛伟国,陆晓峰,等.超滤技术在制药工业中除热原的应用[J].膜科学与技术,1999,19(3):8-12.
- [4] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [5] Cao Z X, Zhang L H. Improvement of preparation of chuan-hu-ning injector[J]. Pharm J Chin PLA,2002,18(5):316-317.
- [6] Aoac. Peer-verified methods policies and procedures: aoac peer-verified methods program[R]. Arlington: AOAC,1998.
- [7] Sun L Y, Chen X M, Sun L P. Improvement of preparation of ciwujia injector[J]. Chin Pharm News,2000(6):27-29.
- [8] Chen M L. Preparation and pharmacology of ciwujia injector[J]. Strait Pharm,1994,1:63.

## Methods of the Test and the Elimination of Bacterial Endotoxin in Ciwujia Injection

FAN Neng-quan

(Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to research the methods of measurement and elimination of bacterial endotoxin in ciwujia injection by using ultrafiltration. The ELISA was used to determine the content of bacterial endotoxin of ciwujia injection and the sorption effect of ultrafiltration on ciwujia injection was measured. The results showed that the bacterial endotoxin in ciwujia injections from three different companies were within the limit of Chinese standard. No significant difference of contents was found among the three groups. The bacterial endotoxin of ciwujia injection was significantly eliminated by 10 000 dalton ultrafiltration. The results suggest that ELISA method can be used to determine the bacterial endotoxin in ciwujia injections and Ultrafiltration technology can effectively eliminate the bacterial endotoxin of ciwujia injection. The results of the present study not only supplied the methods to determine the concentration of the endotoxin in ciwujia injection, but also found the technical way to eliminate the bacterial endotoxin in ciwujia injection by using ultrafiltration, which could supply some new ideas about how to improve the technology in the production of ciwujia injection.

**Key words:** ELISA test; ultrafiltration technology; ciwujia injection; bacterial endotoxin

(责任编辑 方兴)