

## 含丹参的中药注射液中过敏性杂质的检测

胡昌勤<sup>1\*</sup>, 许明哲<sup>1</sup>, 马越<sup>1</sup>, 于风平<sup>1,2</sup>, 李进<sup>1</sup>, 王晨<sup>1</sup>, 崔生辉<sup>1</sup>

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 淄博市药品检验所, 山东 淄博 255000)

**摘要:** 模拟“水煮醇沉”工艺, 从丹参中制备出高度不均一的丹参残留蛋白混合物(蛋白含量约4%), 为丹参抗原; 用丹参抗原免疫家兔或豚鼠均可产生特异抗体。采用超滤等方法从丹参注射液和香丹注射液中提取到大分子抗原活性杂质。利用豚鼠主动过敏反应(ASA)模型和被动皮肤过敏反应(PCA)模型证明, 提取到的抗原活性杂质可以引发被丹参抗原致敏的动物的速发型过敏反应。利用丹参抗原免疫家兔得到的特异性抗体, 建立了检测中药注射液中残留的丹参抗原活性杂质的酶联免疫吸附试验(ELISA); 以残留蛋白计, 其线性范围为 0.08 ~ 5.12  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0.9906$ ), 检测限和定量限分别为 0.08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.4  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过对 308 批含丹参水溶性组分的中药注射剂的测定, 在其中 35 批(11.4%)样品中检出丹参抗原活性杂质; 说明目前丹参水溶性组分的提取工艺不能有效的保证彻底去除丹参抗原活性杂质, 这可能是导致临床过敏反应的原因之一。所建立的 ELISA 方法可以用于指导企业的工艺改造, 并可作为药品质量控制的有效方法。

**关键词:** 中药注射液; 丹参; 抗原活性杂质; 不良反应; 过敏反应

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)05-0518-05

## Determination of the allergic impurities in the parenteral injection of Chinese traditional medicines containing *Salvia miltiorrhiza*

HU Chang-qin<sup>1\*</sup>, XU Ming-zhe<sup>1</sup>, MA Yue<sup>1</sup>, YU Feng-ping<sup>1,2</sup>,  
LI Jin<sup>1</sup>, WANG Chen<sup>1</sup>, CUI Sheng-hui<sup>1</sup>

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;  
2. Zibo Institute of Drug Control, Zibo 255000, China)

**Abstract:** The residual protein mixture (the content is 4%, approximately), called *Salvia miltiorrhiza* antigen, was extracted from the *Salvia miltiorrhiza* crude materials by mimicking the alcohol-deposit extracts process. Both rabbits and guinea pigs sensitized by *Salvia miltiorrhiza* could produce specified antibodies. Large molecular antigenic impurities were extracted from the Danshen injection and Xiangdan injection using the centrifugal filtering method. The test results of active systemic anaphylaxis (ASA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs confirmed that the extracted antigenic impurities could induce the anaphylaxis reaction in the animals which were sensitized by the *Salvia miltiorrhiza* antigen. Using the specified antibody produced from rabbits which were sensitized by *Salvia miltiorrhiza*, ELISA test method was developed to test the residual *Salvia miltiorrhiza* antigenic materials contained in the parenteral Chinese traditional medicines. Calculated as residual protein, the linear range was 0.08 - 5.12  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0.9906$ ), the detection limit and quantization limit are 0.08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and 0.4  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. 308 batches of parenteral Chinese traditional medicines containing water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* were tested, and the *Salvia miltiorrhiza* antigenic impurities were spotted in 35 (11.4%) batches of samples. The test results show that the extracting process currently used can not remove the *Salvia miltiorrhiza* antigenic impurities completely, and this may

收稿日期: 2007-11-12.

\*通讯作者 Tel: 86-10-67095308, Fax: 86-10-65115148, E-mail: hucq@niecbp.org.cn

be one of the reasons for anaphylactic reaction in clinics. The proposed ELISA method can be used for improving the manufacture process and for routine quality control of drug products.

**Key words:** parenteral Chinese traditional medicines; *Salvia miltiorrhiza*; antigenic material; adverse effects; anaphylactic reaction

丹参在临床中主要用于对心血管疾病的治疗,已在肺心病、病毒性心肌炎、高血压的治疗中取得了良好的效果<sup>[1]</sup>。丹参的水溶性成分主要有丹参素、丹酚酸类化合物以及迷迭香酸和紫草酸等<sup>[2~5]</sup>。现代药理学研究证明,丹参素具有扩张肠系膜微动脉、抗血小板聚集、抗血栓形成、促进纤维蛋白降解及抗心肌缺血的作用<sup>[6]</sup>;丹酚酸类化合物具有较强的抗氧化作用<sup>[7]</sup>、对心血管系统的保护作用<sup>[8,9]</sup>和对脑缺血损伤的保护作用<sup>[10]</sup>。目前含丹参的中药注射剂有丹参注射液、香丹注射液和丹香冠心注射液。

根据国家药品评价中心的报告,含丹参的各种中药注射剂的药品不良反应(ADR)时常发生,主要ADR反应症状为过敏样反应(未发表资料)。然而,有关导致ADR原因的研究较少见。本文针对目前各类含丹参的中药注射剂主要采用“水煮醇沉”工艺的特点,发现药材中的植物蛋白等抗原活性杂质可能会残留到注射液中导致过敏反应的发生,这对探讨含丹参的中药注射剂的ADR反应具有重要意义。

## 材料与方法

**仪器及材料** 酶标仪为 Thermo 公司产品,高速离心机为 Beckman 公司产品,电泳仪为 BIO-RAD 公司产品;YM-10 离心超滤管(其标示的截留相对分子质量为 1 万)为 Millipore 公司产品;96 孔酶标板为天津天宇医用有机玻璃制品公司生产。

**试验动物** 新西兰兔(合格证号:SCXK(京 2005-0004)),4~5 个月龄,体重为 2~3 kg;DHP 豚鼠[合格证号:SCXK(京 2005-0004)],体重 250~350 g;雌雄不限,均由中国药品生物制品检定所试验动物繁育厂提供。

**试剂** 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、四甲基联苯胺(TMB)和过氧化尿素为 Sigma 公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG( $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品;其他化学试剂为国产分析纯试剂。

**药品** 丹参药材由中国药品生物制品检定所中药室提供;丹参注射液、香丹注射液和丹香冠心注射

液均为中国药品生物制品检定所 2006 年全国市场抽验样品,按相应的质量标准检验均符合规定。

**丹参抗原的制备** 参照部颁标准(W33-B-3289-98)中丹参水溶液的提取工艺制备丹参抗原。其制备流程如图 1 所示,取丹参中药材约 10 g,轻微破碎,水煮回流 2 h,过滤,滤液用乙醇沉淀,沉淀物用水复溶后冻干,制得丹参抗原。采用 Bradford 法<sup>[11]</sup>,以牛血清白蛋白(BSA)制备标准曲线,测定丹参抗原中的蛋白含量为 4%。

**注射剂中抗原活性杂质(攻击抗原)的制备** 采用半透膜透析法除去注射剂中的小分子物质,制备抗原活性杂质。注射液 10~20 mL 置透析袋中,在纯水 100 mL 中透析 48 h,期间换纯水 2 次;将透析袋中的溶液冷冻干燥,作为豚鼠 ASA 实验的攻击抗原。

注射液 2 mL 置 YM-10 离心超滤管中, $14\ 000 \times g$  离心 30 min,其滤液和膜截留部分分别作为 PCA 实验的攻击抗原。

**抗丹参抗原抗体的制备** 参照文献[12]的免疫方法,用丹参抗原免疫家兔制备兔抗丹参抗原血清。在抗血清 2 mL 中加饱和硫酸铵溶液至硫酸铵的饱和度为 50%,4℃静置 2 h, $12\ 000 \times g$  离心 30 min,弃上清液,沉淀溶于约 2 mL 水中;再加饱和硫酸铵溶液至硫酸铵的饱和度为 50%,4℃静置 2 h, $12\ 000 \times g$  离心 30 min,弃上清液,沉淀溶于适量的 PBS(pH 7.4)中,装入透析袋;以 100 倍的 PBS(pH 7.4)为透析液,4℃透析 24 h,其间更换 4 次透析液;纯化后的抗体转移到适当的容器中,采用经验公式  $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ 蛋白}) = A_{280 \text{ nm}} \times 1.45 - A_{260 \text{ nm}} \times 0.74$ ,将纯化的抗体用抗体稀释液( $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4)稀释成约  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,加入 0.1%  $\text{NaN}_3$  溶液防腐,备用。

**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析抗原** 参照文献[13],采用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, BIO-RAD 宽相对分子质量蛋白标准品(相对分子质量 6 500~20 000)为标准物,银染检测。

**豚鼠主动全身过敏反应(active systemic anaphylaxis, ASA)试验** 参考文献[14]。首次免疫腹腔注射丹参抗原-弗氏不完全佐剂等体积乳状

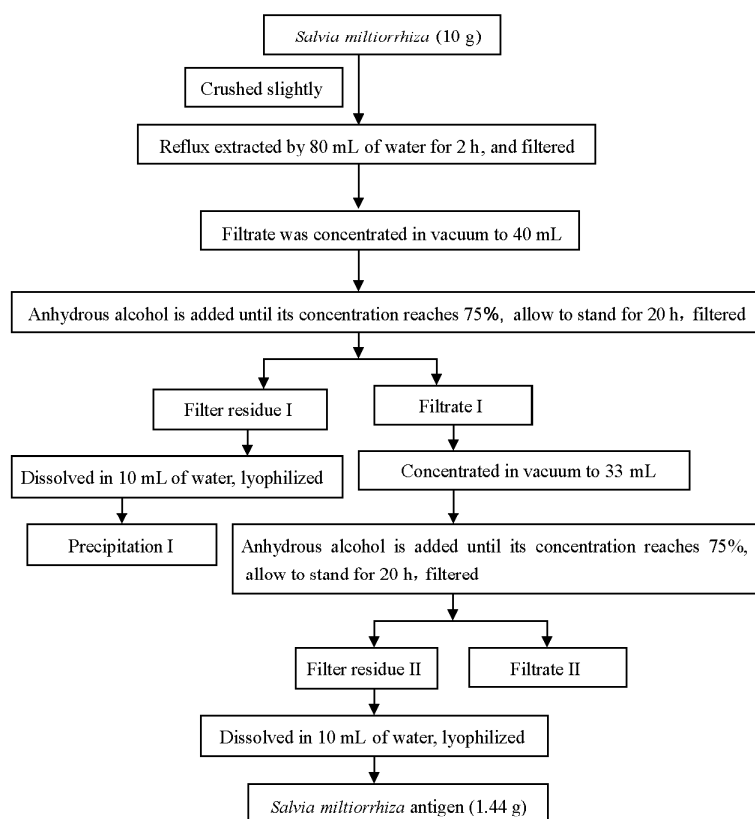


Figure 1 Process for preparation of *Salvia miltiorrhiza* antigen

液(含制备的丹参抗原  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 7 d 后用丹参抗原-完全弗氏佐剂等体积乳状液腹腔加强免疫, 剂量均为  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在第二次免疫后的 21 d 由豚鼠后肢小隐静脉注射攻击抗原, 实验组分别攻击含  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的由丹参注射液和香丹注射液中制备的抗原活性杂质, 以含  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  丹参抗原的伊文思兰溶液(0.1%)为阳性对照, 以 0.1% 伊文思兰溶液为阴性对照, 剂量均为  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重, 观察结果。

**豚鼠被动皮肤过敏(PCA)试验** 参考文献[14]方法。每只豚鼠分别转移兔抗丹参抗原血清  $0.1 \text{ mL}$ , 15 h 左右后攻击抗原, 观察结果。

**ELISA 试验** 采用常规 ELISA 法<sup>[12]</sup>。将包被液( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸盐缓冲液, pH 9.6)稀释的丹参抗原或样品包被在 96 孔聚乙烯酶标板上, 用 5% 小牛血清溶液(溶剂为 PBS 溶液, pH 7.4)封闭, 而后逐步加入 1:50 稀释的兔抗丹参血清(一抗)、 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 溶液(二抗)和 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  尿素底物缓冲液, 最后加  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸终止反应, 用酶标仪在 450 nm

处记录吸收度。

## 结果与讨论

### 1 含丹参的中药注射剂中抗原活性杂质的确证

丹参抗原系以丹参药材为原料, 模拟丹参水溶液生产中醇沉工艺不彻底得到的残留物。由于醇沉工艺的主要目的是去除植物蛋白, 得到的残留物又能与特异的 Bradford 蛋白反应试剂作用, 提示制备的丹参抗原主要为残留的植物蛋白; 经 SDS 电泳分析抗原是相对分子质量在 1~4 万的多重残留蛋白混合物。由香丹注射液和丹参注射液中制备的抗原活性杂质也能与 Bradford 试剂反应; 经 SDS 电泳分析其相对分子质量主要在 1~2 万。

以丹参抗原免疫豚鼠, 由 ASA 实验证明从丹参注射液和香丹注射液中制备的抗原活性杂质均具有引发速发型过敏反应的能力, 用 ELISA 实验强阳性的丹参注射液和香丹注射液作为攻击抗原, 得出阳性结果(表 1), 证明丹参注射液和香丹注射液中的抗原活性杂质为过敏性杂质。采用豚鼠 PCA 反应进一步验证豚鼠 ASA 实验的结果: 用 ELISA 实

验强阳性的丹参注射液和香丹注射液作为攻击抗原,可以引发豚鼠的 PCA 反应;采用超过滤去除了高分子抗原活性杂质的滤液为攻击抗原,PCA 反应呈阴性,而膜截留的高分子抗原活性杂质可以引发强阳性反应。由于采用从丹参药材中提取的丹参抗原免疫动物,丹参注射液和香丹注射液中的高分子抗原活性杂质可以引发致敏动物的过敏反应,提示注射液中的高分子抗原活性杂质为来源于丹参提取工艺残留的蛋白等高分子杂质混合物。

**Table 1** Test results of active systemic anaphylaxis (ASA) in guinea pigs

Group	Number of animal tested	Grade of ASA <sup>a</sup>		
		-	+	++
Positive control	3	0	0	3
Negative control	3	3	0	0
Antigen challenge 1st group (Xiangdan injection treated by semi-permeable membrane)	3	2	1	
Antigen challenge 2nd group (Danshen injection treated by semi-permeable membrane)	3	0	3	0
Antigen challenge third group (Xiangdan injection)	2	0	2	0
Antigen challenge fourth group (Danshen injection)	2	0	0	2

<sup>a</sup>Severity of ASA was graded as follows: negative (-), no anaphylactic reaction; positive (+), development of two or more symptoms, such as restlessness, chewing, rubbing nose, coughing, shaking and appearance of labored breathing or cyanosis; strongly positive (++), except the symptoms of positive, the skin reactions was evoked that obvious blue region appeared around the eye, ear, and mouth

## 2 检测含丹参中药注射液中抗原活性杂质的 ELISA 方法的建立

取丹参抗原用包被缓冲液溶解并倍比系列稀释包被,进行 ELISA 实验。以  $A_{450\text{ nm}}$  值为横坐标,抗原浓度的对数值为纵坐标,在  $2 \sim 128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  呈明显线性,回归方程为  $Y = 5.364 1A_{450\text{ nm}} - 0.236 2$ ,  $r^2 = 0.990 6$ 。分别按照阴性平均值 + 3 倍标准偏差和阴性平均值 + 10 倍标准偏差 ( $n \geq 20$ )<sup>[15]</sup> 计算方法的检测限和定量限约为  $0.25$  和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由于所制备的丹参抗原的蛋白含量仅为 4%,且其为相对分子质量大小不均一的多种残留蛋白混合物,理论上应仅有部分残留蛋白能产生特异性抗体,因此本方法对抗原活性杂质的检测限和定量限应远低于

于  $0.08$  和  $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用标示相对分子质量为 1 万的超滤离心管处理 ELISA 实验阳性样品。取截流的大分子溶液和小分子滤液分别再次包被进行 ELISA 实验;小分子滤液呈阴性,而截流的大分子溶液 ELISA 实验呈阳性。采用 HPLC 法分析滤液中的丹参水溶性组分,发现其与超滤前的样品一致。说明所建立的 ELISA 法特异地与中药注射液中残留的丹参抗原活性杂质作用;同时也进一步证明残留的丹参抗原活性杂质的相对分子质量大于 1 万。

## 3 对含丹参的中药注射液中抗原活性杂质的测定

采用 ELISA 法对 308 批含丹参的中药注射剂进行测定,其中 35 批 (11.4%) 样品中检出丹参抗原活性杂质 [96 批丹参注射液中 6 批 (6.3%) 样品阳性; 197 批香丹注射液中 31 批 (15.7%) 样品阳性; 15 批丹参冠心注射液中 1 批 (6.7%) 样品阳性], 2 批样品 (0.65%) 中的抗原活性杂质的含量大于  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (按提取的丹参抗原计)。以香丹注射液为例,比较不同企业及相同企业不同批次样品中丹参抗原活性杂质的残留情况: 31 家企业中的 18 个厂 28 批样品中检测出残留有丹参抗原活性杂质,制剂中残留有丹参抗原活性杂质具有随机性。提示目前的丹参水溶性组分的提取工艺,不能有效的保证彻底去除丹参抗原活性杂质。

## 结论

残留在丹参水溶性组分中的植物杂蛋白等高分子杂质,既可以诱导机体产生抗体,又可以引发机体的速发型过敏反应;目前的“水煮醇沉”提取丹参水溶性组分的生产工艺,不能有效的保证彻底去除丹参抗原活性杂质,因此在各种含丹参药材的中药注射剂中,可能残留有丹参抗原活性杂质,进而引起过敏反应;超滤技术是去除丹参抗原活性杂质的有效手段;而 ELISA 方法可以用于指导企业的工艺改造,并可作为药品质量控制的重要手段。

## References

- [1] Sugiyama A, Zhu BM, Takahara A, et al. Cardiac effects of *Salvia miltiorrhiza*/*Dalbergia odorifera* mixture, an intravenously applicable Chinese medicine widely used for patients with ischemic heart disease in China [J]. *Circ J*, 2002, 66: 182-184.
- [2] Zhang DC, Wu WL, Li XZ, et al. Studies on water soluble ingredients of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药研究)*, 1982, 1: 24-25.

- [3] Chen ZX, Gu WH, Huang HZ, et al. Studies on water soluble phenolic acid of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Pharm Bull (药学报), 1981, 16: 536-537.
- [4] Ai CB, Li LN. Structure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid from *Salvia miltiorrhiza* radix extract [J]. J Nat Prod, 1988, 51: 145.
- [5] Kelley CJ, Mahajan JR, Brooks C, et al. Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid [J]. J Org Chem, 1975, 40: 1804-1815.
- [6] Sun XM, Cai HJ, Song SY, et al. New pharmacological effects of Danshensu [J]. Chin Trad Herb Drugs (中草药), 1991, 22: 20-23.
- [7] Huang YS, Zhang JT. Antioxidative effect of three water-soluble components isolated from *Salvia miltiorrhiza* *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1992, 27: 96-100.
- [8] Yu WG, Xu LN. Effect of acetylsalvianolic acid A on platelet function [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1994, 29: 412-416.
- [9] Du GH, Qiu Y, Zhang JT. Protective effect of salvianolic acid A on ischemia-reperfusion induced injury in isolated rat heart [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1995, 30: 731-735.
- [10] Chen YH, Du GH, Zhang JT. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 21: 463-466.
- [11] Bradford MM. 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.
- [12] Zhu LP, Chen XQ. Experimental Method for Immunology Study (免疫学常用实验方法) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2000.
- [13] Wang JZ, Fan M. Protein Technological Manual (蛋白质技术手册) [M]. Beijing: Science Press, 2000: 77-100.
- [14] Hu CQ, Zhao JX, Jin SH. Streptomycin polymers induce the immediate hypersensitivity [J]. Acta Pharmacol Sin, 1989, 10: 424-428.
- [15] AOAC International. AOAC Peer Verified Methods, Policies and Procedures; AOAC Peer Verified Methods Program [R]. Arlington USA: AOAC International, 1998: 10.

### 《现代食品与药品杂志》更名为《今日药学》

经中华人民共和国新闻出版总署、广东省新闻出版局及广东省食品药品监督管理局批准，由广东省药学会主办的原《现代食品与药品杂志》于2008年第一期起正式更名为《今日药学》。