

双黄连注射剂中黄芩苷致敏原性的研究

曾姣丽¹, 贺福元^{1,2*}, 唐昱¹, 段晓鹏¹, 王海琴¹, 谢相贵¹, 包小燕¹

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学药学院中药药性与药效国家重点中医药管理局重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 研究双黄连注射剂中黄芩苷的致敏原性。方法: 通过运用酶联免疫双抗夹心和免疫指纹图谱 2 种方法结合对双黄连注射剂中黄芩苷的致敏原性进行研究。结果: 运用酶联免疫双抗夹心法检测黄芩苷的致敏性, 结果呈阳性反应; 运用免疫指纹图谱法检测黄芩苷的致敏性, 致敏率为 86.28%。结论: 通过运用以上方法结合确定了双黄连注射剂中黄芩苷为致敏原, 建立了快速筛查中药注射剂中致敏原的分析方法。

[关键词] 黄芩苷; 致敏原; 酶联免疫; 指纹图谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0102-05

Study of Allergenicity of Baicalin in Shuanghuanglian Injection

ZENG Jiao-li¹, HE Fu-yuan^{1,2*}, TANG Yu¹, DUAN Xiao-peng¹, WANG Hai-qin¹,
XIE Xiang-gui¹, BAO Xiao-yan¹

(1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Traditional

[收稿日期] 20110816(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073142); 湖南省教育厅重点项目(09A068); 湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2055)

[第一作者] 曾姣丽, 在读硕士研究生, 主要从事中药药剂及其质量控制研究, Tel: 0731-5381372, E-mail: zengjiaoli295 @ 163. com

[通讯作者] * 贺福元, 教授, 硕士生导师, Tel: 13787213681, E-mail: pharmsharking@ tom. com

- [7] 欧阳婷, 麦曦, 夏红英, 等. 柳叶蜡梅叶挥发油化学成分 GC-MS 分析 [J]. 南昌大学学报, 2010, 34 (1): 77.
- [8] 史小娟, 潘心禾, 张新风, 等. 柳叶蜡梅叶挥发性成分的提取及 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1995, 33(2): 171.
- [9] 熊义权, 肖纯, 龙秀娟. 蜡梅属植物叶、花化学成分及药理性质研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 8, 15.
- [10] Vasconcelos J M J, Silva A M S, Cavaleiro J A S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* Subsp. Maritima [J]. Phytochemistry, 1998, 49 (5): 1421.
- [11] 孙丽仁, 何明珍, 冯育林, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1214.
- [12] 陈靖, 张朝凤, 张勉. 卷茎蓼地上部分化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3165.
- [13] 张援虎, 何丽, 关焕玉, 等. 追风伞中黄酮类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (14): 1824.
- [14] 张雷红, 江永南, 罗懿斌, 等. 宽叶大戟中黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 366.
- [15] 王梦月, 卫莹芳, 李晓波. 荨麻抗风湿活性部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1300.
- [16] Kim J E, Jung M J, Jung H A, et al. A new kaempferol 7-O-triglucoside from the leaves of *Brassica juncea* L. [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25: 621.
- [17] Zhang X F, Thuong P T, Jin W Y, et al. Antioxidant activity of anthraquinones and flavonoids from flower of *Reynoutria sachalinensis* [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (1): 22.
- [18] 胡军, 屠鹏飞, 果德安, 等. 秦岭大黄化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 1997, 12(4): 153.
- [19] Roberta R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26(9): 1231.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] Objective: To study the allergenicity of baicalin in Shuanghuanglian injection. **Method:** The allergenicity of baicalin in Shuanghuanglian injection was studied by using combination of two methods of double-antibody sandwich ELISA and immune fingerprint. **Result:** The allergenicity of baicalin was detected by using double-antibody sandwich ELISA; the result is positive; the allergenicity of baicalin was detected by using immune fingerprint; its sensitization rate was 86.28%. **Conclusion:** Baicalin was determined as allergen in Shuanghuanglian injection by using the above method, which can establish a method of analysis to screen allergens rapidly in traditional Chinese medicine injection.

[Key words] baicalin; sensitogen; enzyme linked immunosorbent assay(ELISA); fingerprint

中药注射剂改变了中医中药传统的给药方式,结合注射剂剂量准确、疗效迅速的剂型优点,给临床使用中药带来了更广阔的前景^[1]。但是,近年来中药注射剂引起不良反应的病例报道逐渐增多,不良反应发生速度较快,病情发展迅速,容易造成死亡。中药注射剂的安全性问题,引起了相关政府、企业和科研人员的空前关注^[2]。由于中药注射剂的不利反应以过敏性反应^[3-4]最为明显和突出,因此,建立准确、早期、快速的中药过敏反应检测方法势在必行。

双黄连注射剂为临床上常用的中药抗菌药物,是较早获批的一批注射剂中具有代表性中药注射剂。黄芩苷在众多中药注射剂中均存在,有着广泛的药理作用,但是它又可能是双黄连注射剂引起过敏反应的主要成分^[5]。因此,本文以双黄连注射剂中有效成分黄芩苷为例,通过运用ELISA原理与指纹图谱差异性分析相结合技术,综合多方面信息来确定双黄连注射剂中黄芩苷是否为致敏原。

1 材料

ELX-800 型酶标仪(美国 BIO-TEK), Biophotometer 型核酸蛋白分析仪(德国 Eppendorf 公司), TU-1900 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司), VE-180 型电泳槽, EPS300 型电泳仪(上海天能科技有限公司)。

黄芩苷单体(泽朗植提, 98%), 牛血清蛋白(北京鼎国生物技术责任有限公司), 二乙基氨基乙基纤维素(DEAE52, 批号 090504, Whatman 进口分装), Page Ruler Unstained Protein Ladder(批号 00028137, Fermentas), Tris 丙烯酰胺(Acry)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)(国药试剂化学试剂厂), 过硫酸铵(AP)(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂), 十二烷

基磺酸钠(SDS)(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂), 包被缓冲液 CBS(0.05 mol·L⁻¹, pH 9.6 的碳酸盐缓冲液), 封闭液(含 10 mL·L⁻¹ BSA 的 CBS), 样品稀释液 PBS(0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液), 洗涤缓冲液 PBST(含 0.5 mL·L⁻¹ 聚山梨醇酯 20 的 PBS), 其他试剂均为分析纯。

健康雄性新西兰大白兔, 由湖南中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(湘)2009-0012。

2 方法

2.1 实验设计 将实验分成黄芩苷组、双黄连注射剂组、空白组。黄芩苷组: 合成黄芩苷全抗原后注射动物; 双黄连注射剂组: 使用双黄连注射剂直接注射动物。空白组: 使用生理盐水注射动物, 作空白对照。

2.2 方法

2.2.1 抗原的合成 取黄芩苷单体 22.3 mg, 用 2 mL 吡啶溶解, 称取 NaIO₄ 10.7 mg, 加 1 mL 蒸馏水溶解, 将配制好的 NaIO₄ 溶液加入黄芩苷溶液, 室温搅拌反应 20 min, 加入 1 mL 分析纯的乙二醇, 室温搅拌反应 5 min, 称取 16.25 mg BSA(牛血清蛋白), 加入 pH 7.4 的 PBS(磷酸)缓冲溶液 2 mL 溶解, 将配制好的 BSA 溶液加入到以上反应液中, 4 ℃, 静置过夜, 加入 1 mL 新配制的 0.05 mol·L⁻¹ NaHB₄ 水溶液, 室温反应 3 h, 反应液加入 0.01 mol·L⁻¹ 的 pH 7.4 PBS 透析, 每 6 h 换液 1 次, 透析 2 d。透析后, 离心分离, 弃去沉淀, 溶液冷冻干燥后得到淡黄色的固体粉末。

2.2.2 抗血清的制备 黄芩苷组: 取 1 g·L⁻¹ 的黄芩苷抗原溶液(用生理盐水溶解) 2 mL, 加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后对动物进行基础免疫, 即于兔背部多点注射, 每只兔注射 2 mL(1 mg)。20 d 后, 以黄芩苷抗原溶液加等量体积弗氏不完全

佐剂进行加强免疫,剂量与基础免疫相同。每隔 2 周免疫 1 次,共加强免疫 4 次,第 4 次免疫后 7 d,对家兔的耳缘静脉采血,于 4 °C 冰箱中静置过夜,3 000 r·min⁻¹离心后,取上清过 DEAE-52 色谱柱纯化,得纯化 IgG 抗体。用改良过碘酸钠法^[7]对其进行酶的标记,得酶标抗体 IgG,经方阵滴定其工作浓度为 1:1 000。

双黄连注射剂组:取 2 mL 双黄连注射液和 2 mL 弗氏完全佐剂混合的乳化剂背部脊柱两侧多点皮内注射动物进行免疫,免疫程序同上,末次免疫后 7 d 取血。4 °C 静置过夜,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上层血清过 DEAE-52, Sephadex G-200 色谱柱纯化,得纯化抗体 IgE。

空白组:取 2 mL 生理盐水 2 mL 弗氏完全佐剂混合的乳化剂背部脊柱两侧多点皮内注射动物进行免疫,免疫程序同上,末次免疫后 7 d 取血。4 °C 静置过夜,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上层血清过 DEAE-52, Sephadex G-200 色谱柱纯化,得纯化抗体 IgE。

2.2.3 双黄连注射剂中黄芩苷过敏原特异性 IgE 的检测

2.2.3.1 酶联免疫双抗夹心法检测黄芩苷在双黄连注射液中的致敏原性 检测步骤:①包被:正常注射双黄连注射液免疫动物所产生的 IgE 抗体,注射生理盐水免疫动物产生的 IgE 抗体做空白对照,4 °C 过夜。②分别向酶标板中加入含 50 μL 的黄芩苷全抗原溶液,室温恒温孵育 1.5 h;③洗涤:倾出孔中液体,向酶标板中每孔加入 250 μL 的洗涤液,静置 5 min 后拍干,重复 3 次;④向酶标板中每孔加入以上标记的酶标抗体溶液 100 μL,室温恒温孵育 1.5 h;⑤洗涤:倾出孔中液体,向酶标板中每孔加入 250 μL 的洗涤液,静置 5 min 后拍干,重复 3 次;⑥加底物量:每孔加 100 μL 四甲替联苯胺;⑦终止:每孔加 2 mol·L⁻¹ 硫酸 50 μL 终止反应;⑧检测:用酶标仪测定吸光度,并观察酶标孔中溶液的颜色变化。

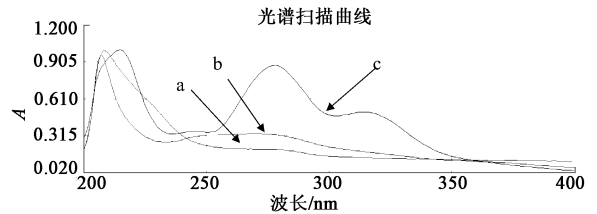
2.2.3.2 免疫指纹图谱法检测黄芩苷在双黄连注射液中的致敏原性 检测步骤:①包被:正常注射双黄连注射液免疫动物所产生的 IgE 抗体,注射生理盐水免疫动物产生的 IgE 抗体做空白对照,4 °C 过夜。②次日弃去孔内溶液,用洗涤液洗 4 次,每次 3 min。每孔加入双黄连注射液 100 μL,加酶标板的一列共 8 孔,并设一列孔为空白对照。用封口膜封好,置 37 °C 孵育 1 h。③将反应后的双黄连注射液吸出,合并待处理后供试品用 HPLC 检测。

供试品处理:取样品 400 μL 于离心管中,加入 1 600 μL 氯仿-异丙醇(9:1)混合有机溶剂萃取,涡流混合 2 min,离心 10 min,取有机溶剂层,低于 40 °C 水浴挥干,最后用 2 mL 甲醇定容。反应前双黄连注射液和抗原抗体反应后的注射液均用此法前处理得供试品。

3 结果与分析

3.1 抗原合成的鉴定

3.1.1 紫外扫描鉴定(UV) 用紫外扫描仪法鉴定黄芩苷与载体蛋白的偶联是否成功。在 200 ~ 400 nm 分别测定其吸收值,根据反应前后紫外吸收光谱的变化,判断偶联是否成功,结果见图 1。



a. 牛血清蛋白; b. 蛋白质偶联物; c. 黄芩苷
图 1 牛血清蛋白、黄芩苷牛血清蛋白偶合物、黄芩苷的紫外吸收曲线

由图 1 可以看出蛋白质偶联物的紫外吸收光谱不同于黄芩苷与牛血清蛋白的紫外吸收光谱,黄芩苷有 2 个最大吸收波长,即 273, 313 nm,牛血清蛋白的最大吸收为 278 nm,偶联物的最大吸收波长 276 nm,结合物的紫外光谱明显具有黄芩苷和牛血清蛋白叠加的特征,并且相同质量浓度的结合物 and 标准蛋白的紫外光谱相比较,吸光度明显增高。由于偶联产物经充分透析后完全排除了未结合牛血清蛋白的黄芩苷小分子,推测其原因只能是与蛋白结合,导致结合物吸光度增加。

3.1.2 红外扫描鉴定(IR) 将黄芩苷、黄芩苷人工抗原和牛血清蛋白用溴化钾压片后进行红外光谱扫描。

将黄芩苷、黄芩苷人工抗原和 BSA 的红外光谱对比可知:①黄芩苷人工抗原在 2 500 ~ 3 400 cm⁻¹ 和 1 300 ~ 1 600 cm⁻¹ 出现了与 BSA 相类似的吸收峰,这是 BSA 中氨基酸的特征峰,说明合成的黄芩苷人工抗原中含有 BSA。②黄芩苷人工抗原出现了黄芩苷在 3 400 cm⁻¹ 的羟基特征吸收峰,并且在 1 000 ~ 1 300 cm⁻¹ 出现了黄芩苷与 BSA 偶联后的 C-N 伸缩振动吸收峰,而 BSA 的 IR 中并无此吸收峰,进一步说明黄芩苷人工抗原合成成功。见图 2。

3.2 抗血清效价的测定

3.2.1 间接 ELISA^[8] 测定黄芩苷抗体 IgG 效价

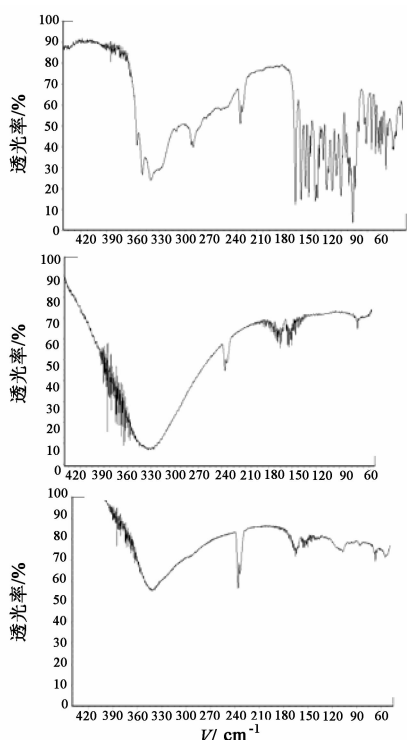


图2 黄芩苷、牛血清蛋白 BSA、黄芩苷人工抗原红外图谱

取包被抗原 100 μL 加包被缓冲液稀释至 20 mL 得稀释后的包被抗原,将其置 96 孔免疫板 100 μL /孔,室温过夜;PBST(含体积分数 0.05% 聚山梨醇酯 20 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液)洗板 4 次后加入质量分数 1% 封闭液 200 μL /孔,室温封闭 1 h;PBST 洗板 4 次后加入 100 μL /孔梯度稀释的抗血清 IgG (IgG 稀释倍数分别为 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000),并设置阴性对照,室温孵育 1 h;PBST 洗板 4 次后加入酶标二抗 100 μL /孔,室温孵育 40 min;PBST 洗板 4 次后加入邻苯二胺底物体系 200 μL /孔,室温显色反应 15 min;加入 2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 浓硫酸 50 μL /孔终止反应,酶标仪于 450 nm 波长处测吸光度。根据反应液在波长 450 nm 处测的吸光度,计算抗体效价为 1:8 000。

3.2.2 双黄连注射剂组和空白组的抗体 IgE 效价测定 按照 ELISA 试剂盒说明书操作,酶标仪检测兔血清,KC junior 软件输出数据,换算血清稀释倍数。具体操作步骤:①对照品的稀释与加样:在酶标包被板上设标准品孔 10 孔,按说明书稀释后各孔加样量都为 50 μL 。②加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂)、待测样品孔。③温育:用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。④洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。⑤加酶:每孔加

入酶标试剂 50 μL ,空白孔除外。⑥温育:用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。⑦洗涤。⑧显色:每孔先加入显色剂 A 50 μL ,再加入显色剂 B 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。⑨终止:每孔加终止液 50 μL ,终止反应。⑩测定:以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。测得结果双黄连注射剂组血清 IgE 含量远远高于空白组,结果表明双黄连注射液免疫致敏成功。

3.3 双黄连注射剂中黄芩苷致敏原性的筛查结果

3.3.1 酶联免疫双抗夹心法检测黄芩苷在双黄连注射液中的致敏原性结果 根据反应液在波长 450 nm 处测的吸光度,黄芩苷抗体的孔吸光度远远大于空白孔,显阳性;另外黄芩苷抗体的孔颜色强于空白孔(无色),初步判断黄芩苷是双黄连注射剂的致敏原。

3.3.2 免疫指纹图谱法检测黄芩苷在双黄连注射液中的致敏原性结果 系统适应性条件: C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈-1% 醋酸水溶液,梯度洗脱 0 min(8:92)~15 min(15:85)~25 min(25:75)~35 min(70:30)~40 min(80:20)~45 min(8:92);UV 检测波长 0~15 min,324 nm;15~45 min,274 nm;流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。见图 3~6。

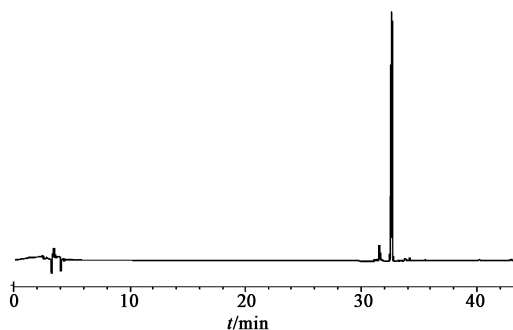


图3 黄芩苷对照品图谱

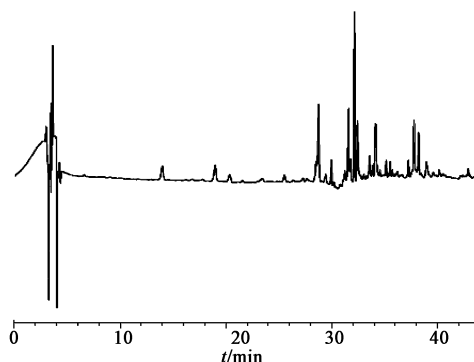


图4 反应前双黄连注射液的 HPLC

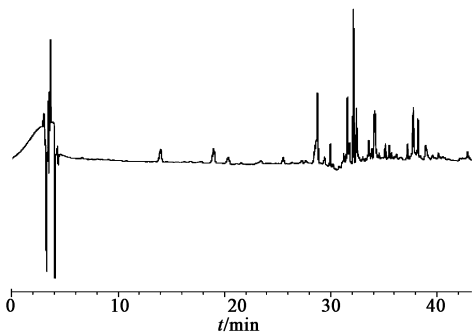


图 5 反应后空白组的 HPLC

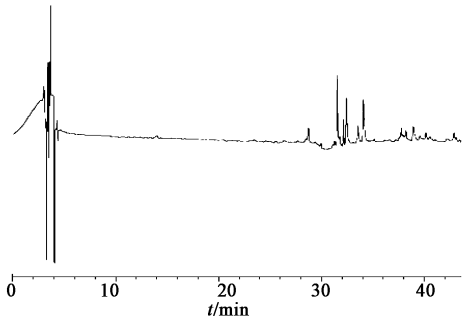


图 6 反应后实验组的 HPLC

精密吸取萃取的反应前双黄连注射液供试品和抗原抗体反应后双黄连注射液供试品,在上述色谱条件下,分别进样 10 μL,得到 HPLC 图谱。特征峰面积与致敏率计算:

$$\text{致敏率} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A 是原双黄连注射剂指纹图谱峰面积,B 是吸附后双黄连注射剂指纹图谱峰面积。通过采用指纹图谱分析方法,根据双黄连注射剂加入前后对比特征峰的缺失来确定黄芩苷是否为致敏性成分。根据表 1 数据可以看出双黄连注射剂空白组黄芩苷反应的前后峰面积几乎不变,实验组双黄连注射剂的黄芩苷的峰致敏率为 86.28%。通过免疫指纹图谱法检测,进一步证明了黄芩苷是双黄连注射剂的致敏原。

表 1 特异性 IgE 对双黄连注射剂中黄芩苷特征峰的吸附影响

组别	出峰时间 /min	峰面积/mAU		致敏率 /%
		原注射剂	吸附后	
空白	32.145	62.947	64.901	-0.03
实验	32.146	62.947	8.637	86.28

4 结论与讨论

中药注射剂为中药多成分群制剂,如果按单成分的研究方法进行研究,其工作量巨大,较难找到致敏性成分,目前研究起来比较困难,但总体思路如

下:将中药多成分分离制成芯片,然后将经中药制剂免疫后的血清进行酶联免疫反应,根据酶联免疫反应的颜色深浅进而确定中药成分,由于可能会出现阳性反应,所以还需结合免疫指纹图谱法将经中药制剂免疫后的血液中的 IgE 分离出来,采用抗原与抗体的特异反应,用 IgE 抗体去结合中药制剂中的致敏成分,只要比较分析中药制剂原成分指纹图谱与反应后指纹图谱的缺失差异,并根据缺失差异程度就能锁定中药制剂多成分中的致敏原性成分。

本文运用 ELISA 原理与指纹图谱差异性分析相结合技术,利用固相载体包埋 IgE 抗体,采用双黄连注射剂黄芩苷抗原与酶标抗体免疫反应;包埋 IgE 抗体来捕获双黄连注射剂的致敏原 HPLC 指纹图谱差异分析,首次建立了一套比较全面的综合方法来检测双黄连注射剂中的有效成分黄芩苷是否为致敏原。经检测,运用酶联免疫双抗夹心法检测黄芩苷的致敏性,呈阳性反应;运用酶联免疫指纹图谱法检测黄芩苷的致敏性,致敏率为 86.28%,证明了黄芩苷为双黄连注射剂的致敏原。

本文方法与传统免疫检测方法比较具有快速、灵敏、专一、简便的优点,为检测中药注射剂中的致敏原及 IgE 的分析提供了一种崭新的方法,为消除中药注射剂致敏原,保证临床安全用药提供了有益的参考。

[参考文献]

- [1] 冯宇飞,吕邵娃,王艳宏,等. 中药注射剂安全性问题分析及对策[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):278.
- [2] 张惠霞,陈建玉,宋成. 3414 例中药注射剂不良反应分析[J]. 药物警戒, 2006, 3(4): 232.
- [3] 董立财,王艳宏,吕邵娃,等. 中药注射剂致敏物质筛选方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):237.
- [4] 杨华,赵艳娇,耿凤英,等. 838 例中药注射剂不良反应分析[J]. 实用药物与临床, 2007, 10(4):228.
- [5] 谢奕如,汤丹灵,蓝妮初. 中药注射剂致过敏性休克 132 例文献分析[J]. 光明中医, 2008, 23(10):1607.
- [6] 童路. 双黄连注射剂的不良反应与成分间的关系[J]. 中成药, 1997, 19(4):47.
- [7] 武建国. 实用临床免疫学检验[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1989:97.
- [8] 王庭欣,赵志磊,李小亭,等. 罗丹明 123 人工抗原的合成及抗体的酶联免疫检测[J]. 食品科学, 2010, 31(2):211.

[责任编辑 邹晓翠]