

超滤工艺对双黄连注射剂致敏性的影响*

陈伟,李存玉,彭国平,郑云枫,李贺敏,李红阳

(南京中医药大学药学院,210029)

摘要 目的 研究超滤工艺对双黄连注射剂致敏性的影响。方法 豚鼠 60 只,分为 6 组:0.9% 氯化钠注射液组、卵蛋白组、双黄连超滤液组、双黄连注射液组、双黄连超滤液加氢氧化铝组、双黄连超滤液加三氯化铝组,各 10 只。以各组 5-羟色胺变化水平为依据分析超滤工艺对双黄连注射剂致敏性的影响。结果 6 组豚鼠血浆 5-羟色胺升高率差异无统计学意义($P>0.05$)。5-羟色胺双黄连注射剂超滤前后溶液的致敏性没有明显变化。结论 双黄连注射液引起豚鼠过敏的因素不只是制剂中残留的一些大分子成分引起的,可能与注射剂中一些小分子成分有关。

关键词 双黄连注射剂;致敏;5-羟色胺;超滤

中图分类号 R286;R927.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)03-0292-03

Effect of Ultrafiltration on Sensitization of *Shuanghuanglian* Injection

CHEN Wei, LI Cun-yu, PENG Guo-ping, ZHENG Yun-feng, LI He-min, LI Hong-yang (College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

ABSTRACT Objective To study effects of ultrafiltration on sensitization of *shuanghuanglian* injection. **Methods** Injected on guinea pigs with *shuanghuanglian* injection after it was ultrafiltered and detected the 5-hydroxy tryptamine of guinea pig's plasma, contrasted with 0.9% sodium chloride injection group, egg protein group, *shuanghuanglian* injection group, *shuanghuanglian* ultrafiltrate add with aluminum hydroxide group, *shuanghuanglian* ultrafiltrate add with aluminum chloride group, analysed the 5-hydroxy tryptamine change levels of each group, which showed the effect of *shuanghuanglian* injection sensitization based on ultrafiltration. **Results** There was no significant difference sensitization before and after ultrafiltered. **Conclusion** The factors that caused the sensitization of guinea pigs were not just residual macromolecular components, it may be related to some micro molecular components in the injection.

KEY WORDS *Shuanghuanglian* injection; Sensitization; 5-hydroxy tryptamin; Ultrafiltration

双黄连注射液主要成分为金银花、黄芩、连翘,1992 年 12 月被国家中医药管理局指定为全国中医医院急诊科(室)首批急诊必备中成药,可供肌肉、静脉给药的无菌制剂。随着使用人群的增加,其不良反应的报道也日益增多^[1-3],其中不乏变态反应。变态反应的发生机制为:抗原第一次进入机体后,使浆细胞产生的 IgE 抗体附着于肥大细胞表面和嗜碱性粒细胞表面,抗原再次进入机体后,与附着于细胞表面的 IgE 接合,通过一系列的使细胞脱颗粒,释放 5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)^[4]、组胺等过敏递质。

生产工艺和制剂过程的不完善,制剂中会残留微粒、高分子蛋白质、鞣质和未除尽的杂质,为排除不溶

性微粒和大分子物质引发的变态反应,笔者采用超滤技术,可有效的去除制剂中不溶性微粒和大分子物质,以 5-HT 为检测指标,进一步明确制剂的过敏原。

1 材料与方法

1.1 实验材料 杂色豚鼠,由南京青龙山动物繁殖场提供,双黄连注射液(黑龙江多多药业有限责任公司,批号:080807211),卵蛋白、5-HT 均购于美国 Sigma 公司,水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20080329),Waters 510 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),EC2000 色谱工作站(大连依利特分析仪器有限公司),Waters 2645 电化学检测器(美国 Waters 公司)。

1.2 供试品溶液配制 卵蛋白溶液:取卵蛋白适量,用 0.9% 氯化钠注射液配制成浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的卵蛋白溶液。双黄连超滤液:取双黄连注射剂 100 mL,置超滤系统中,由于超滤设备有一定的死体积,超滤系统中会有一定量的水液,因此溶液在超滤之前首先进行平衡^[4-5],平衡循环>2 倍原溶液体积,原液经超滤膜超滤,待超滤完全后,取超滤液,灌封,沸水消毒 30 min。

1.3 动物实验方法 根据供试品进行动物分组,分别

收稿日期 2011-06-30 修回日期 2011-09-21

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目(30973972/C1911)

作者简介 陈伟(1987-),男,江苏扬州人,在读硕士,专业方向:中药化学,电话:(0)13701475561, E-mail:skylover86@sina.com。

通讯作者 彭国平(1963-),男,江苏常州人,研究员,博士生导师,专业方向:中药化学。电话:(0)13605186345, E-mail:guopingpeng@sohu.com。

为:0.9%氯化钠注射液组、卵蛋白组、双黄连注射液组、双黄连超滤液组、双黄连超滤液加氢氧化铝组、双黄连超滤液加三氯化铝组。

取杂色豚鼠 60 只,体质量 250 ~ 350 g,雄性,隔日每只每次肌内注射供试品 0.4 mL,皮下注射 0.1 mL,共 3 次,进行致敏。首次注射后第 21 天,以 10% 水合氯醛 3 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 麻醉豚鼠,颈动脉取血约 1 mL,肝素抗凝。腹腔注射供试品 0.5 mL 后进行攻击,于攻击后 15 和 30 min 分别颈动脉取血约 1 mL,肝素抗凝。血样 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清血浆,冷冻,留备检测。

1.4 双黄连注射液主要成分超滤行为检测 色谱条件:色谱柱:Kromasil C_{18} (4.6 mm \times 150 mm,5 μm);流速:1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相:甲醇-0.1%三氟乙酸,梯度洗脱见表 1;检测波长:230 nm。

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution program

时间/min	甲醇/%	0.1%三氟乙酸/%
0	20	80
~10	25	75
~15	50	50
~30	50	50

透过率 = $C_{\text{超}}/C_{\text{原}} \times 100\%$, $C_{\text{超}}$ 为超滤液中药液成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $C_{\text{原}}$ 为药液原液中成分的含量

($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2 结果

2.1 双黄连注射液有效成分的超滤研究 采用截留相对分子质量为 5 000 的超滤膜,注射剂中绿原酸、黄芩苷的透过率分别为 86.49% ,33.39% 。

2.2 豚鼠血浆中 5-HT 检测结果 由表 2,3 可知,0.9%氯化钠注射液致敏的豚鼠在攻击后 15,30 min 血浆中 5-HT 升高率均 $<0\%$;卵蛋白致敏的豚鼠在攻击后 15 min 血浆中 5-HT 升高率平均为 34.54% ,30 min 的升高率为 30.73% ,平均为 32.64% ;双黄连注射液致敏的豚鼠在攻击后 15 min 血浆中 5-HT 升高率平均为 19.31% ,30 min 的升高率为 43.51% ,平均为 31.41% ;双黄连超滤液致敏的豚鼠在攻击后 15 min 血浆中 5-HT 升高率平均为 20.75% ,30 min 的升高率为 30.97% ,平均为 25.86% 。

对卵蛋白组、双黄连注射液组、双黄连超滤液组数据分别于 0.9%氯化钠注射液组进行 t 检验,结果见表 3。

3 讨论

本研究结果表明,双黄连注射液及其超滤液对豚鼠的致敏性大致相同。采用截留相对分子质量为 5 000 的超滤膜处理双黄连注射液,绿原酸、黄芩苷的透过率分别为 86.49% ,33.39% ,黄芩苷由于其黄酮立体骨架,所以其透过率稍低。然而两者的相对分子质量均低于注射液中可能残留的大分子蛋白和不溶性

表 2 4 组豚鼠血浆 5-HT 水平变化

Tab.2 Changes of plasmic 5-HT levels of guinea pigs in the four groups

组别与时间	1	2	3	4	5	6	平均
卵蛋白组							
攻击前	61.69	59.77	62.33	72.36	43.53	46.97	57.78
攻击后 15 min	81.85	68.67	63.82	72.92	84.06	77.07	74.73
攻击后 30 min	76.84	66.65	69.20	80.24	61.67	83.50	73.02
双黄连注射液组							
攻击前	156.07	186.38	104.59	172.04	125.86	158.84	150.63
攻击后 15 min	217.90	214.55	166.18	138.93	124.01	202.06	177.27
攻击后 30 min	206.79	161.56	267.85	155.55	121.59	326.24	206.60
双黄连超滤液组							
攻击前	66.37	70.41	56.64	46.46	144.66	144.83	88.23
攻击后 15 min	98.14	74.22	63.49	73.72	133.04	157.16	99.96
攻击后 30 min	100.21	79.35	64.60	71.51	165.06	202.86	113.93
0.9%氯化钠注射液组							
攻击前	264.13	195.87	234.28	175.62	136.97	121.97	188.14
攻击后 15 min	249.59	206.62	188.68	153.09	123.05	100.82	170.31
攻击后 30 min	272.86	151.47	119.94	146.20	109.42	102.10	150.33

表 3 4 组豚鼠 5-HT 升高率
Tab. 3 Elevated rate of 5-HT levels of guinea pigs in the four groups

组别与时间	1	2	3	4	5	6	平均
卵蛋白组							
攻击后 15 min	32.68	14.89	2.39	0.77	93.11	64.08	34.54 ^{*1}
攻击后 30 min	24.56	11.51	11.02	10.89	41.67	77.77	30.73 ^{*1}
平均值	28.62	13.20	6.71	5.83	67.39	70.93	32.64 ^{*1}
双黄连注射液组							
攻击后 15 min	39.62	15.11	58.89	-19.25	-1.47	27.21	19.31
攻击后 30 min	32.50	-13.32	156.10	-9.58	-3.39	105.39	43.51 ^{*2}
平均值	36.06	0.90	107.49	-14.42	-2.43	66.30	31.41 ^{*2}
双黄连超滤液组							
攻击后 15 min	47.87	5.41	12.09	58.67	-8.03	8.51	20.75
攻击后 30 min	50.99	12.70	14.05	53.92	14.10	40.07	30.97 ^{*1}
平均值	49.43	9.05	13.07	56.30	3.03	24.29	25.86 ^{*1}
0.9% 氯化钠注射液组							
攻击后 15 min	-5.50	5.49	-19.46	-12.83	-10.16	-17.34	-8.67
攻击后 30 min	3.31	-22.67	-48.80	-16.75	-20.11	-16.29	-18.87
平均值	-1.10	-8.59	-34.13	-14.79	-15.14	-16.82	-13.77

与 0.9% 氯化钠注射液组比较, ^{*1}P<0.01, ^{*2}P<0.05

Compared with the 0.9% sodium chloride injection group, ^{*1}P<0.01, ^{*2}P<0.05

微粒, 此类大分子成分可以有效地被截留, 但由于超滤前后溶液的致敏性没有明显变化, 证明双黄连注射液引起豚鼠过敏的因素不只是制剂中残留的一些大分子成分引起的, 可能与注射剂中一些小分子成分有关。

参考文献

[1] 郑加嘉, 杨小娟. 注射用双黄连 2 176 例临床用药不良反应分析[J]. 中国实用医药, 2006, 1(1): 105-107.

[2] 宫涛, 刘洋, 张伯礼. 310 例双黄连注射剂不良反应分析[J]. 天津中医学院学报, 2003, 22(1): 49-50.

[3] 李永俊. 双黄连注射液不良反应 327 例分析[J]. 实用药物与临床, 2008, 11(1): 35-36.

[4] 尹楠, 李红阳, 彭国平, 等. 超滤法去除中药注射液中的细菌内毒素[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(12): 927-929.

[5] 龚启英, 黄建国, 徐辛明, 等. 过敏性紫癜患者血中 5-羟色胺含量的测定及临床意义[J]. 临床医学, 2009, 7(29): 84-85.

DOI 10.3870/yydb.2012.03.007

欢迎订阅 2012 年《医药导报》杂志

《医药导报》杂志系国家一级学会——中国药理学会等主办的医药专业期刊, 是国家科技部中国科技论文统计源期刊, 即中国科技核心期刊, 北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》中文核心期刊。已被美国《化学文摘》(CA)、《国际药学文摘》(IPA)、波兰《哥白尼索引》收录。是万方数据库、中文科技期刊数据库、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, 经国家新闻出版总署批准面向国内外公开发行。

设有“特约稿”“药物研究”“药物与临床”“药学进展”“用药指南”“新药介绍”“药物制剂与药品质量控制”“临床药师交流园地”“药物不良反应”“药事管理”“药师英语加油站”“作者·编者·读者”等栏目, 每期组编某类药物或某类疾病的药物治疗专栏。读者对象是临床医师、药师、医药院校师生和医药研究所的科技工作者及药品监督管理、医药工商企业经营工作者。《医药导报》为月刊, 每月 1 日出版, 每期 15.00 元, 全年 180.00 元整(含邮资), 欢迎广大读者积极到当地邮局订阅, 如错过邮局订阅时间, 可随时向本刊编辑部邮订。地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院《医药导报》编辑部, 邮政编码: 430030, E-mail: yydbzz@163.com。电话及传真: 027-83643083, 83666619。国内总发行: 湖北省邮政公司。邮发代号: 38-173。