

4种常用蛋白质测定方法用于中药注射剂中大分子蛋白检测的适用性研究

王雪^{1,2}, 张伟^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 探究4种常用蛋白质测定方法用于中药注射剂中大分子蛋白检测的适用性。**方法** 比较磺基水杨酸法、考马斯亮蓝法、福林酚(Lowry)法、体积排阻色谱(SEC)法的灵敏度、专属性,并将4种方法分别用于测定5种市售中药注射剂中的大分子蛋白,比较测定结果。**结果** 磺基水杨酸法灵敏度不高,考马斯亮蓝法和Lowry法的专属性较差,SEC法灵敏度高且专属性好。以SEC法测定5种市售中药注射剂样品,均未检出大分子蛋白。**结论** SEC法可用于中药注射剂中大分子蛋白测定。

关键词: 中药注射剂; 蛋白质; 考马斯亮蓝法; 磺基水杨酸法; 福林酚法; 体积排阻色谱法

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)15-2228-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.009

Determinatoin of macromolecule protein in Chinese materia medica injection

WANG Xue^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the feasibility of four methods for macromolecule protein determination in Chinese materia medica (CMM) injection. **Methods** The sensitivity, specificity, and protein test results of sulfosalicylic acid, Coomassie brilliant blue, Lowry, and size exclusion chromatograph (SEC) methods on five kinds of CMM injections were compared. **Results** Sulfosalicylic acid method had low sensitivity, Coomassie brilliant blue and Lowry methods had poor specificities, and SEC method had high sensitivity and good specificity. No protein was detected in five kinds of CMM injection by SEC. **Conclusion** SEC is suitable for the determinatoin of macromolecule protein in CMM injection.

Key words: Chinese materia medica injection; protein; Coomassie brilliant blue method; sulfosalicylic acid method; Lowry method; size exclusion chromatograph method

中药注射剂是我国的特有制剂,是传统中药的创新剂型,与其他药物剂型相比,具有生物利用度高、作用迅速等特点,尤其在治疗急重症方面具有优势。随着中药注射剂在临床上应用的日益广泛,不良反应的报道也随之增多,其安全性问题引起了人们的关注^[1-2],而中药注射剂中可能残存的蛋白质等大分子物质可能是导致其不良反应的重要因素之一。《中国药典》2010年版一部收录的中药注射剂蛋白质检查方法为磺基水杨酸法,以有无沉淀反应来进行判定,但该方法灵敏度不高,且偶有假阳性

情况出现,如在以牛纤维蛋白原为对照的试验研究中,分别采用鞣酸试液和30%磺基水杨酸检查的检出限均为102.6 μg/mL^[3],未能对中药注射剂中的蛋白质进行有效的控制,因此,必须寻找一种快速、灵敏的检测方法来控制中药注射剂中的大分子蛋白的量。

目前,分析领域广泛用于蛋白质测定的方法主要有考马斯亮蓝法、凯氏定氮法、双缩脲法、福林酚(Lowry)法、紫外吸收法、磺基水杨酸法、体积排阻色谱(SEC)法等^[4],鉴于各方法的优缺点,

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: 国家重大新药创制项目(2013ZX09402203)

作者简介: 王雪(1983—),女,硕士,工程师,从事药品质量标准研究。Tel: 13961382410 E-mail: wangxue815@126.com

*通信作者 萧伟,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

可考虑将其应用到中药注射剂中大分子蛋白质的检测,为提高中药注射剂质量提供技术支持。如何实现中药注射剂中大分子蛋白质的准确、灵敏、快速检验,有必要开展进一步的考察。本研究综合上述各方法的测定原理、灵敏度、适用范围及中药注射剂自身特点,选取磺基水杨酸法、考马斯亮蓝法、Lowry法和SEC法,进行中药注射剂中大分子蛋白测定适用性的对比研究,并以市售5种中药注射剂进行验证。

1 仪器和试剂

Omega Macrosep超滤浓缩离心管,聚醚砜膜,15 mL样品量,截留相对分子质量1 000, PALL公司; UV-2550紫外分光光度计,日本岛津公司; H1850R高速冷冻离心机,长沙湘仪检测设备有限公司。

考马斯亮蓝 G-250、Lowry 储备液、磺基水杨酸、聚山梨酯-80、甘油、1,2-丙二醇、亚硫酸氢钠、鞣酸等均为分析纯试剂。

标准蛋白质:牛血清白蛋白,中国食品药品检定研究院,质量分数100%,批号140619-201120;核糖核酸酶 A, Sigma 公司,质量分数100%,批号031M7013V;人胰岛素, Amresco 公司,活力27.5 U/mg,批号11070738-201106;胸腺肽 $\alpha 1$, Amresco 公司,质量分数99.0%,批号110321050-2011106。

清开灵注射液,批号11022411,河北神威药业有限公司;丹香冠心注射液,批号1204003,上海中西制药有限公司;丹参注射液,批号120514,浙江康恩贝制药股份有限公司;热毒宁注射液(批号110610、110801、120202)、银杏二萜内酯葡胺注射液(批号110601、121101、130301),江苏康缘药业股份有限公司;均为市售产品。

2 方法与结果

2.1 各储备液的配制

2.1.1 磺基水杨酸溶液的制备 称取30 g磺基水杨酸,加水使溶解,定容至100 mL,需临用新配。

2.1.2 考马斯亮蓝 G-250 溶液的制备 精密称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg,加入95%乙醇50 mL,再加入85%磷酸100 mL,用蒸馏水定容至1 000 mL,滤过,备用。

2.1.3 Lowry 试剂的制备 取2 mol/L Lowry 储备液和水,以体积为1:16的配比配制,混匀,放入冰箱内避光保存,备用。

2.1.4 碱性铜试剂的制备 取氢氧化钠10 g,碳酸

钠50 g,加水400 mL使溶解,作为甲液;取酒石酸钾0.5 g,加水50 mL使溶解,另取硫酸铜0.25 g,加水30 mL使溶解,将两液混合作为乙液,临用前,合并甲、乙液,并加水至500 mL,现配现用。

2.1.5 鞣酸试液的制备 取鞣酸1 g,加乙醇1 mL,加水溶解并稀释至100 mL,摇匀,即得。需临用新配。

2.2 对照品溶液的配制

分别精密称取牛血清白蛋白、核糖核酸酶 A、胸腺肽 $\alpha 1$ 对照品适量,水溶解并制成质量浓度分别为1.10、1.06、0.84 mg/mL的溶液,作为母液,置于冰箱内保存。另精密称取人胰岛素对照品适量,加0.025%三氟乙酸溶解并制成质量浓度为1.07 mg/mL的溶液,作为母液,置于冰箱内保存。

2.3 供试品溶液的制备

分别取聚山梨酯-80、甘油、1,2-丙二醇、亚硫酸氢钠、鞣酸适量,加水使溶解并制成质量分数分别为1%、15%、50%、0.1%、0.005%的溶液,作为各辅料的供试品溶液,备用;分别取市售5种注射液(共9批)各1 mL,分别加水稀释至10 mL,摇匀,作为各市售注射液的供试品溶液,备用。

2.4 测定方法

2.4.1 磺基水杨酸法^[5] 取各注射液供试品溶液1 mL置于不同比色管中,加新配制的30%磺基水杨酸溶液1 mL,混匀,放置5 min,观察是否出现浑浊。注射液中如含有遇酸能产生沉淀的成分,可改加鞣酸试液1~3滴,观察是否出现浑浊。

2.4.2 考马斯亮蓝法^[6] 取各注射液供试品溶液1 mL置于不同比色管中,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液5 mL,摇匀,静置5 min,在595 nm处测定吸光度(A)值。取牛血清白蛋白对照品适量,用水溶解并制成浓度分别为59.0、35.4、23.6、3.0、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,作为系列对照品溶液,各取1 mL置于不同比色管中,按供试品溶液方法测定A值,以标准曲线法计算。

2.4.3 Lowry 法^[5] 取各注射液供试品溶液1 mL置于不同比色管内,加入1 mL碱性铜试剂,摇匀,再各加入4 mL Lowry 试剂,立即混匀,置55 °C水浴中准确反应5 min,置冷水浴10 min,在650 nm的波长处测定A值。取牛血清白蛋白对照品适量,用水溶解并制成浓度分别为118.0、94.4、23.6、11.8、5.9 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,作为系列对照品溶液,各取1 mL分别置于不同比色管中,按供试品溶液方法操作,

测定 A 值, 以标准曲线法计算。

2.4.4 SEC 法^[7] TSK G2000SWxl 凝胶色谱柱 (300 mm×7.8 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液 (30:70) 为流动相; 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长 214 nm; 柱温 30 °C。精密量取胸腺肽 α1 对照品溶液和各注射液供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 将先于胸腺肽 α1 保留时间的色谱峰所对应的物质视为大分子蛋白质, 按照峰面积归一化法计算。

2.5 专属性考察

2.5.1 辅料干扰验证考察 以注射剂中常用辅料聚山梨酯-80、甘油、1,2-丙二醇、亚硫酸氢钠及鞣酸进行考察, 按上述方法测定, 结果以磺基水杨酸法测定, 5 种辅料均未产生浑浊, 说明此 5 种辅料对磺基水杨酸法测定蛋白质无明显干扰; 以考马斯亮蓝法测定, 聚山梨酯-80、鞣酸、1,2-丙二醇均有一定的吸收, 干扰较大, 甘油和亚硫酸氢钠干扰较小, 可以忽略; 以 Lowry 法测定, 聚山梨酯-80 产生浑浊, 甘油、1,2-丙二醇、亚硫酸氢钠及鞣酸均有较大的干扰; 以 SEC 法测定, 均无明显干扰。

2.5.2 小分子物质干扰验证考察 以 5 种注射液的小分子物质部分进行考察。取 5 种市售注射液各 1 mL, 分别置于超滤浓缩离心管 (截留相对分子质量 1 000) 内, 再各加入 4 mL 水, 于 10 °C、6 000 r/min 的条件下, 离心浓缩至 1 mL 以下, 取小分子部分的离心液定容至 10 mL, 摇匀, 作为各注射液的小分子物质供试品溶液。取此供试品溶液按上述 4 种方法分别测定, 结果以考马斯亮蓝法测定, 热毒宁、丹参、丹香冠心、清开灵注射液的小分子部分均有较大吸收, 干扰严重, 银杏二萜内酯葡胺注射液的小分子部分无明显干扰; 以 Lowry 法测定, 5 种注射液的小分子部分均有极大吸收, 若以此法测定中药注射液中蛋白质的大分子蛋白质的质量浓度, 所得结果将会与真实值相差极大。以磺基水杨酸法测定, 除清开灵注射液外, 均未出现浑浊现象, 而清开灵注射液的小分子部分则出现黄色浑浊, 有文献报道^[8]清开灵注射液中含有胆酸和黄酮类化合物, 遇酸会产生沉淀, 故另取清开灵注射液小分子样品 1 mL, 加鞣酸试液 3 滴, 未出现浑浊, 即 5 种注射液的小分子部分无明显干扰。以 SEC 法测定, 均无明显干扰。

2.6 灵敏度考察

取牛血清白蛋白、核糖核酸酶 A、人胰岛素、

胸腺肽 α1 对照品溶液母液适量, 分别用水稀释成一系列不同质量浓度的溶液, 按上述各测定方法进行考察, 结果: 磺基水杨酸法检测核糖核酸酶 A、人胰岛素及胸腺肽 α1 并不灵敏, 且加入量达到 500 μg 左右时, 仍未能检出; 牛血清白蛋白可以检出, 当加入量在 31.0 μg 时, 可以看到沉淀, 但加入量在 24.8 μg 时, 未能看到沉淀, 故认为磺基水杨酸法测定牛血清白蛋白的检测限为 31.0 μg, 该法测定核糖核酸酶 A、人胰岛素及胸腺肽 α1 不灵敏。以考马斯亮蓝法测定, 胸腺肽 α1 无明显的吸收峰; 牛血清白蛋白、核糖核酸酶 A、人胰岛素的检测限依次分别为 1.5、5.3、1.7 μg/mL。以 Lowry 法测定, 牛血清白蛋白、人胰岛素、核糖核酸酶 A、胸腺肽 α1 的检测限依次为 4.2、13.4、10.6、7.0 μg/mL。以 SEC 法测定, 牛血清白蛋白、人胰岛素、核糖核酸酶 A、胸腺肽 α1 均有较好的响应, 以人胰岛素考察该方法的灵敏度, 其检测限为 0.03 μg。

2.7 市售样品中大分子蛋白质测定

由于考马斯亮蓝法和 Lowry 法的专属性较差, 故以磺基水杨酸法和 SEC 法进行测定。结果以磺基水杨酸法测定, 丹香冠心、丹参、热毒宁、银杏二萜内酯葡胺注射液在加入 30%磺基水杨酸溶液后均未出现浑浊现象, 而清开灵注射液则出现黄色浑浊, 加鞣酸试液 3 滴后, 未出现浑浊, 即 5 种注射液均未检出大分子蛋白质。以 SEC 法测定, 5 种注射液均未检出大分子蛋白质。

3 讨论

3.1 从灵敏度和专属性方面考察方法的可行性

以牛血清白蛋白、核糖核酸酶 A、人胰岛素、胸腺肽 α1 4 种对照品进行的灵敏度考察结果可以看出, 4 种方法的灵敏度顺序为 SEC 法>考马斯亮蓝法>Lowry 法>磺基水杨酸法。其中磺基水杨酸法的灵敏度不高, 有可能造成假阴性结果; SEC 法的灵敏度较高, 可以检测到纳克级别。从灵敏度方面考察, SEC 法最好, 考马斯亮蓝法和 Lowry 法次之。

以注射剂中常用辅料聚山梨酯-80、甘油、1,2-丙二醇、亚硫酸氢钠及鞣酸进行的专属性考察结果可以看出, 5 种辅料对磺基水杨酸法和 SEC 法无明显干扰; 聚山梨酯-80、1,2-丙二醇及鞣酸对考马斯亮蓝法有一定的干扰, 而甘油和亚硫酸氢钠对其无明显干扰; 5 种辅料对 Lowry 法均有较大干扰, 极易造成假阳性结果。

综合4种方法的灵敏度和专属性考虑, SEC法要明显优于另外3种方法, 考马斯亮蓝法、磺基水杨酸法和Lowry法若用于中药注射剂中大分子蛋白质的检测均存在一定弊端, 易造成假阳性或假阴性结果。

3.2 从样品方面比较方法的可行性

以市售样品的小分子物质部分进行干扰验证考察, 其对磺基水杨酸法和SEC法均无明显干扰; 而对考马斯亮蓝法(除银杏二萜内酯葡胺注射液外)和Lowry法的干扰极大, 若应用于中药注射剂中大分子蛋白质的测定, 极易出现假阳性结果。

4 结论

由于中药注射剂中成分复杂且大部分带有颜色, 造成考马斯亮蓝法和Lowry法的专属性较差, 易产生假阳性的结果, 磺基水杨酸法由于灵敏度的限制, 致使其所得结果的准确性降低, 可能出现假阴性结果。综合灵敏度和专属性考察结果, SEC法用于中药注射剂中大分子蛋白质的检测相对更为可行。

参考文献

- [1] 司继刚, 郑雪, 赵群. 2014年淄博市中心医院中药注射剂超说明书用药情况分析 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 718-721.
- [2] 张嶝, 屈哲, 霍桂桃, 等. 中药注射剂诱发过敏性反应的临床前安全性评价 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 241-244.
- [3] 郭青, 吴晓燕. 中药注射剂中蛋白质检查药典方法的假阳性原因探究 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 219-223.
- [4] 王爱军, 王凤山, 王友联, 等. 低浓度蛋白质含量测定方法的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 78-80.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 王文华, 杨志和, 臧文生, 等. 螺旋霉素中蛋白含量的测定方法 (Bradford法) 及验证 [J]. 广州化工, 2010, 38(4): 137-138.
- [7] 王雪, 李家春, 张伟, 等. 体积排阻色谱法测定热毒宁注射液中高分子物质 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1412-1415.
- [8] 齐菲, 侯连兵. 清开灵注射液与常用注射液配伍的稳定性 [J]. 医药导报, 2006, 25(6): 583-584.