

PVDF 膜吸附染色法检测中药注射剂微量蛋白*

李奇峰, 柯 瑾, 段为钢[△], 卢国勋, 吕小满

(云南中医学院, 云南昆明 650500)

〔摘 要〕目的: 建立一种快速、灵敏的中药注射剂微量蛋白质检测方法。方法: 将样品点在 PVDF 膜上, 用甲醇脱去杂色, 经 0.25% 考马斯亮蓝染色液染色, 脱色液甲醇-水-冰醋酸 (4.5:4.5:1) 脱去背景色, 通过斑点颜色深浅判断蛋白质限量。结果: 当上样量为 1 μ L 时, 可以检测出浓度为 12 μ g/mL (12 ng) 的蛋白质, 灵敏度高于药典磺基水杨酸法。结论: 本法操作简单、具有较强的抗干扰能力, 灵敏度高于现行《中国药典》磺基水杨酸比浊法, 可以用于中药注射剂蛋白质限量的控制。

〔关键词〕中药注射剂; 过敏反应; 蛋白质; PVDF 膜; 考马斯亮蓝

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2010)06—0043—03

1 前言

中药注射剂 (Chinese Materia Medica injections, CMMI) 系指药材经提取、纯化后制成的供注入体内的溶液、乳状液及供临用前配制成溶液的粉末或浓溶液的无菌制剂。CMMI 药效迅速、作用可靠已经是不争的事实, 而同时 CMMI 的不良反应也时常发生, 甚至还很严重, 使其安全性问题受到了业界甚至公众的广泛关注^[1]。根据专家学者的分析, 中药注射剂发生最多的不良反应为过敏反应, 由于大多中药注射剂具有生物提取物的特征, 中药注射剂可能含有的蛋白质类成分是导致安全性问题的中药成分之一^[1-2]。本研究试图建立灵敏度高、抗干扰能力强的蛋白质检测方法, 推动中药注射剂质量标准的提高。

2 材料

凝胶成像系统 ChemiDoc RX 由美国 Bio-Rad 公司产品, AB204-S 电子分析天平为 Mettler-Toledo 公司产品, Centrifuge 5415D 高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品, UV-1600 型紫外可见分光光度计为北京瑞利分析仪器公司产品。

PVDF 膜 (孔径 0.22 μ m) 为美国 MilliPore 公司产品, 焦性没食子酸 (分析纯) 由天津风船化

学试剂科技有限公司生产, BSA (牛血清白蛋白组分 5) 购自北京鼎国生物技术有限责任公司 (配制成梯度浓度, 用 0~9 分别表示浓度为 9mg/mL, 3mg/mL, 1mg/mL, 0.33mg/mL, 0.1mg/mL, 37 μ g/mL, 12 μ g/mL, 4 μ g/mL, 1.3 μ g/mL, 0 μ g/mL), 5-磺基水杨酸 (分析纯) 由天津风船化学试剂科技有限公司生产, 考马斯亮蓝 R (CBB) (分析纯) 由天津科密欧化学试剂有限公司生产。其它试剂为国产分析纯。所用的水为 MilliPore 超纯水系统制得, 符合三蒸水标准。

清开灵注射液 (批号: 090214)、丹参注射液 (批号: 20080405)、双黄连注射液 (批号: 090113311) 和灯盏细辛注射液 (批号: 20080914), 均从市场购得。

3 方法和结果

3.1 建立 PVDF 膜吸附染色检测蛋白方法, 确定检测限及抗注射剂本身颜色干扰实验

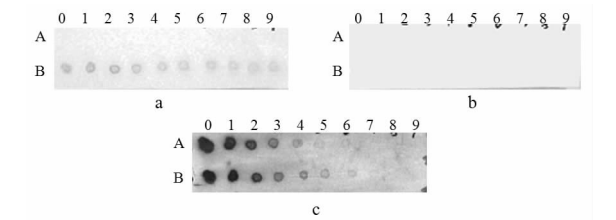
将 PVDF 膜做好标记用甲醇浸润 10 秒, 取 1 μ L 用 PBS (KCl, 0.2 g; KH_2PO_4 , 0.2g; NaCl, 8.0g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.08g; 加三蒸水到 1 000mL, pH7.2) 配制的梯度 BSA 溶液点样到 PVDF 膜上, 另用丹参注射液配制梯度 BSA 溶液,

* 基金项目: 云南省教育厅重点项目 (NO: 08Z0039, 2010C164)

收稿日期: 2010—09—05

作者简介: 李奇峰 (1977~), 男, 云南昆明人, 讲师, 主要从事中药药性的研究工作。[△]通讯作者: 段为钢, Email: deardwg@126.com。

也点样在同一张 PVDF 膜上。随后用甲醇漂洗后浸入 0.25% 考马斯亮蓝染色液中染色 5min，然后在脱色摇床上用脱色液（甲醇：水：冰醋酸 = 4.5 : 4.5 : 1）10mL 洗脱 3 次，每次 5min，脱去背景色，随后用凝胶成像系统拍照，观察各斑点的颜色变化，结果如图 1。

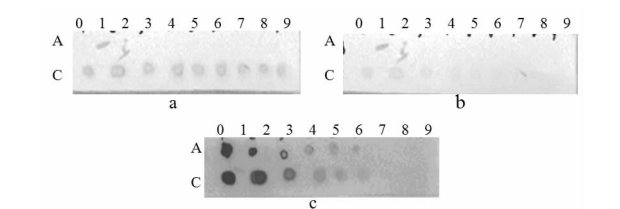


a：为点样后风干拍片；b：甲醇洗涤后风干拍片；c：染考马斯亮蓝并脱色后风干拍片。a、b、c 中的 A 组为 PBS 配制的 BSA 溶液，B 组为用丹参注射液配制的 BSA 溶液。上样量为 1 μ L。

图 1 PVDF 膜吸附染色法检测限与抗丹参注射液颜色干扰实验结果

从图 1 可见，PBS 配制的 BSA 无色（图 1 a A 组），风干后不留痕迹（图 1 b A 组），但丹参注射液配制的 BSA 溶液点样后有色（图 1 a B 组）。但经过甲醇漂洗后，PVDF 膜片均无色（图 1 b）。染色后 A 组和 B 组均可见斑点 6（图 1c）。可见，本法的限量约为 12 μ g/mL（12ng）。同时，丹参注射液颜色对本法干扰较小，检测限量仍约为 12 μ g/mL（12ng）。

依照同样的方法用双黄连注射液进行抗干扰实验，结果表明本法对双黄连注射液的颜色也有较强的抗干扰能力，检测的限量也为 12 μ g/mL（12ng）（结果如图 2 所示）。如法累计进行 5 次限量检测，确定本法的检测限约为 12 μ g/mL（12 ng）。

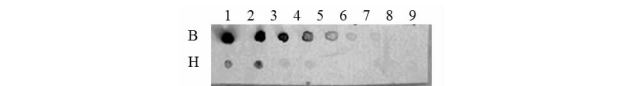


a 为点样后图；b 为甲醇洗涤后图；c 为染色脱色后图。A 组为标准蛋白溶液（用 PBS 配制），C 组为用双黄连注射液配制的蛋白溶液。上样量 1 μ L。

图 2 PVDF 膜吸附染色法检测限与抗双黄连注射液颜色干扰实验结果

3.2 PVDF 膜吸附染色法与磺基水杨酸比浊法的检测限比较

用 PBS 配制 18mg/mL 的 BSA 溶液，然后用 3 倍梯度进行稀释，配置系列 BSA 溶液。此系列 BSA 溶液与 30% 磺基水杨酸（按 2010 年药典一部配制）^[3] 按体积比 1 : 1 进行混合，充分振摇后 10 000 $\times$ g 离心 6min，取上清液在同一张 PVDF 膜上点样，用本法检测蛋白限量，结果见图 3。



B 组为 PBS 配制的 BSA 溶液，H 组为磺基水杨酸沉淀相应浓度 BSA 溶液后的上清液。上样量 1 μ L。

图 3 PVDF 膜吸附染色法检测磺基水杨酸法去蛋白上清液中的残留蛋白结果

可见，按照药典方法用 30% 磺基水杨酸沉淀蛋白质后，上清液中依然能够检测到蛋白质，参照点推测点 H2 经磺基水杨酸沉淀后其上清中的蛋白质浓度高于 100 μ g/mL。

将样品与 30% 磺基水杨酸溶液充分混合置于 10mL 具塞比色管或试管中，在黑色背景下观察沉淀情况，结果见表 1。

表 1 标准蛋白溶液磺基水杨酸发沉淀比浊

编号	1	2	3	4	5	6	7
蛋白浓度/（ μ g/mL）	1 000	333	111	37	12	4	0
2mL 体积看沉淀（试管）*	+	+	+	+/-	-	-	-
10mL 体积横向看沉淀（10mL 比色管）	+	+	+	+	+/-	-	-
10mL 体积纵向看沉淀（10mL 比色管）	+	+	+	+	+	+/-	-

* 为药典推荐的观察体积。注：+，可见沉淀；-，未见沉淀；+/-，不好确定。

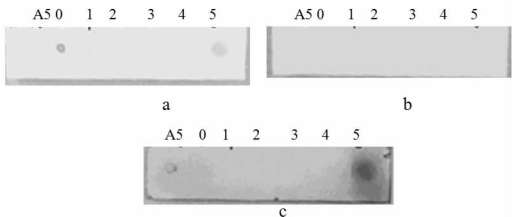
由于 2010 年版药典检测采用 2mL 体系，以肉眼观察判断，检测蛋白质的限量 $\geq$ 37 μ g/mL，达不到文献报道方法的检测限量 10 μ g/mL，^[4]而本法的

限量为 $\geq$ 12 μ g/mL，灵敏度高干药典方法。

3.3 PVDF 膜吸附染色法抗鞣质干扰实验

用 PBS 配制焦性没食子酸（109.2mg/mL），

于室温下放置 30d 以上 (不避光), 当吸光度 > 1.5 ($\lambda = 420\text{nm}$, $d = 1\text{cm}$) 后, 将经过 $6\,000 \times g$ 离心 5min 后的焦性没食子酸母液按照 3 倍梯度稀释法配制梯度溶液, 直接点到 PVDF 膜上, 同时点 BSA 溶液于膜上, 另外将用足量焦性没食子酸母液处理后的蛋白溶液 (1mg/mL 的 BSA 溶液 0.1mL 与 109.2mg/mL 的焦性没食子酸充分混合) 上清液 ($10\,000 \times g$ 离心 5min) 也点于膜上, 经本法显色后结果见图 4。

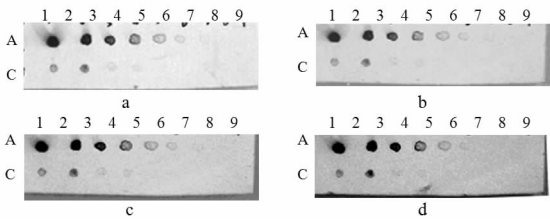


a 为点样后图; b 为甲醇洗涤后图; 图 c 为染色脱色后图。
A5 为 $37\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 溶液, 点 0~4 的鞣质浓度依次为 109.2mg/mL、36.4mg/mL、12.1mg/mL、4mg/mL、点 5 为蛋白质 1mg/mL (0.1mL) 与足量 (1mL) 焦性没食子酸 (109.2mg/mL) 处理后的上清液。点样量 $1\mu\text{L}$ 。
图 4 PVDF 膜吸附染色法抗鞣质干扰实验结果

从图 4 可见, 中药注射剂中的常见有色成分缩合鞣质点样后可被甲醇洗净 (图 4b), 用本法染色后, 无蛋白点仍不显色 (图 c 点 0~4)。说明膜吸附染色检测法具有抗鞣质干扰能力。点 5 也表明鞣质可以和一定量的蛋白质在溶液中共存。

3.4 PVDF 膜吸附染色法显色稳定性检验

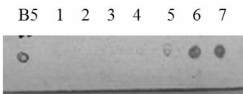
将染色后的 PVDF 膜室温避光放置 30d、60d、150d 后重拍, 结果见图 5。



a 为 10 号膜 0d 拍片; b 为 10 号膜室温避光放置 30d 拍片; c 为 10 号膜室温避光放置 60d 拍片; d 为室温避光放置 150d 后拍片
图 5 PVDF 膜吸附染色法显色稳定性结果

对比结果可以说明膜吸附染色法检测蛋白质准确可靠, PVDF 膜对蛋白质亲和力强, CBB 对蛋白质显色稳定性好, 且可以长时间存放而不褪色, 有利于实验结果长期存档。

3.5 模拟 CMMI 生产过程, 验证其蛋白质残存
CMMI 工艺中常采用水醇法或醇水法以去除蛋白质等物质, 常用 80% 的乙醇, 现考察 80% 乙醇处理中药提取物可能的蛋白质残留。配制 80% 乙醇 1mL, 加入 BSA10mg 充分振摇混合 (10min 以上), $10\,000 \times g$ 下离心 5min, 取不同体积的上清液于 7 支 1.5mL 试管中, 体积依次为 $1\mu\text{L}$, $3\mu\text{L}$, $9\mu\text{L}$, $27\mu\text{L}$, $8\mu\text{L}$, $243\mu\text{L}$, $729\mu\text{L}$, 依次编号为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7。将这 7 支试管置于通风柜中风干。风干后各加入 $1\mu\text{L}$ PBS 充分振摇, 离心后获得点样样品。另以 $37\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准 BSA 溶液为对照, 采用本法进行检测, 结果见图 6。

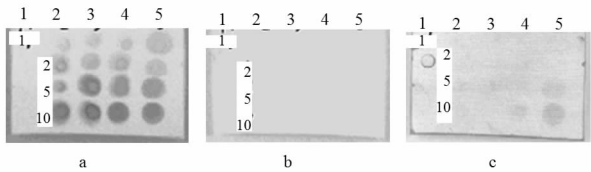


点 1~7 分别为蛋白质 80% 乙醇上清液浓缩 1、3、9、27、81、243、729 倍; 点 B5 处 BSA 浓度为 $37\mu\text{g}/\text{mL}$ 。上样量 $1\mu\text{L}$ 。
图 6 PVDF 膜吸附染色法检测 80% 乙醇中的蛋白残留结果

图 6 中点 5 可见明显斑点。由此推测, 在 CMMI 生产过程中传统的“水煮醇沉”工艺并不能将蛋白质完全除去, 原始蛋白质浓度可能高达 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.6 中药注射剂成品蛋白质残留检查

将清开灵注射液、丹参注射液、双黄连注射液和灯盏细辛注射液冷冻干燥, 再用三蒸水制备相当于原溶液浓度 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍的溶液样品, 将不同浓度的样品点在同一张 PVDF 膜上, 依 3.1 中处理方法处理, 染色结果见图 7。



a 为点样后风干结果; b 为甲醇洗涤后结果; c 为染色脱色后结果。
点 1~1 为 $37\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 样品; 2 列为丹参注射液; 3 列为灯盏细辛注射液; 4 列为双黄连注射液, 5 列为清开灵注射液。从上往下“1, 2, 5, 10 行”分别表示 1, 2, 5, 10 倍浓度。上样量 $1\mu\text{L}$ 。
图 7 PVDF 膜吸附染色法检测 4 种中药注射剂蛋白残留结果

从图 7 可见,丹参和灯盏细辛注射液在浓缩 10 倍内不易检测出蛋白存在,而清开灵浓缩 5 倍即可检出蛋白(蛋白含量 $\geq 8\text{ }\mu\text{g/mL}$),双黄连浓缩 10 倍可见蛋白斑点 $\geq 4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。这与这 4 种中药注射剂过敏反应的临床报道大体一致^[5-6]。

4 讨论

目前测定蛋白质含量的常用方法主要有凯氏定氮法、紫外吸收法、双缩脲法、Folin-酚试剂法(Lowry 法)、考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue, CBB)染色法,也有用银染法的报道^[7-9]。这些方法多属于半微量分析;其中 CBB 染色法、银染法适用于低浓度蛋白质溶液含量的测定,前者测定限量为 10~100 $\mu\text{g/mL}$,后者测定限量为 0.15~20 $\mu\text{g/mL}$ 。由于蛋白质是一类分子,且中药注射液均具有较深的颜色,干扰也很大,甚至药典采用的磺基水杨酸比浊法也不能避免全部干扰^[3]。

PVDF 膜对蛋白质有极强的选择性亲和力,亲和后用普通方法很难将蛋白质洗脱下来;而且 PVDF 膜韧性好,耐酸、碱和甲醇等有机溶剂,样品点样后,可用甲醇浸泡洗涤把膜上亲和力不强的非蛋白成分去除,从而可以克服或减弱中药注射剂中其他有色物质的颜色干扰。CBB 对蛋白质显色也具有一定的特异性,而且灵敏度高,溶液法检测可达 10 $\mu\text{g/mL}$,这样就为蛋白质微量检测提供有效方法。PVDF 膜吸附蛋白和 CBB 对蛋白质显色这两项技术在分子生物学方面并不罕见,但是将这两项技术有机地结合起来用于蛋白质限量检测尚未见报道。从我们的实验结果看,将这两项技术有机结

合而产生的 PVDF 膜吸附染色法检测微量蛋白不但灵敏度高(高于现行药典方法),而且具有较强的抗干扰能力;不仅如此,本方法耗材少,经济实用,操作也简便,因而具有较强的实用性。

[参考文献]

[1] 徐春. 关注中药注射剂的不良反应 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3 (4): 302-304.

[2] 段为钢. 中药注射剂安全性的技术思考 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32 (6): 12-13.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社. 2010: 附录 60.

[4] 张耀廷, 郭岩, 辛暨华, 等. 应用磺基水杨酸法测定蛋白含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14 (4): 247-248.

[5] 栾家杰, 陈玲, 汪平君. 中药注射剂不良反应文献定量评价与分析 [J]. 中国药事, 2009, 23 (7): 700-705.

[6] 王奇, 赖世隆, 温泽淮, 等. 2002 年版《国家基本药物目录》中药注射剂类药品不良反应文献调查分析 [J]. 药物警戒, 2007, 4 (3): 137-141, 161.

[7] 曾祝伦, 张莲. BECKMAN CX3 DELTA 检测脑脊液和尿液总蛋白的应用与评价 [J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29 (4): 540-543.

[8] 王颖, 王家瑞. 不同方法检测尿、脑脊液蛋白结果的比较 [J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10 (2): 199-200.

[9] 蒋开龙. 双试剂磺基水杨酸法检测脑脊液蛋白 [J]. 川北医学院学报, 2004, 19 (4): 135-136.

(编辑: 迟 越)

Detection of Trace Protein in Chinese Materia Medica Injections by Dot Blotting

LI Qi - feng, KE Jin, DUAN Wei - gang[△], LU Guo - xun, LV Xiao - man
(Yunnan University of TCM, Kunming, Yunnan 650500, China)

[ABSTRACT] The main aim is to develop a sensitive method to detect trace protein in Chinese Materia Medica injections. A sample of 1 μL was dotted on a PVDF membrane, and the membrane was washed with methanol to remove the color of the dot. Then, the membrane was stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue solution for at least 30 sec. After the stained membrane was washed with a mixed solution with methanol - water - acetic acid (4.5:4.5:1) to lower the background, a blot containing trace protein would appear. The color intensity of the blot was related to the protein content. This method was able to detect protein ($>12\text{ }\mu\text{g/mL}$) in 1 μL sample, with high sensitivity and few interferences. Compared with the method of sulfosalicylic precipitation adopted by China Pharmacopoeia of 2010 edition, this method is more feasible. Also, the method is helpful to control protein content in Chinese Materia Medica injections.

[KEY WORDS] chinese materia medica injections; protein; PVDF membrane; coomassie brilliant blue