

注射用芪红脉通配液除杂工艺研究

祝倩倩¹, 萧伟^{2*}, 孙永成², 徐连明², 王伟²

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 以注射用芪红脉通为研究对象, 确定制剂工艺超滤前最佳除杂技术。**方法** 考察冷藏、离心、活性炭吸附组合工艺对药液中杂质及有关物质的去除情况。以黄芪总皂苷、黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A (HSYA) 的质量浓度、固含物减少率、蛋白质质量浓度、有关物质检查结果等为评价指标, 确定除杂方法的可行性并优化工艺参数。**结果** 最佳工艺参数为冷藏 24 h, 离心时间 15 min、转速 5 000 r/min, 活性炭用量 0.3%、温度 40 ℃、吸附时间 30 min、原药液 pH 值。**结论** 冷藏、离心和活性炭吸附组合工艺除杂效果显著, 可有效去除树脂、蛋白质等杂质。

关键词: 芪红脉通; 中药注射剂; 除杂技术; 有关物质; 蛋白质

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)06-0000-00

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.000

Best impurity removal technology of Qihong Maitong Injection intermediates mixed liquid

ZHU Qian-qian¹, XIAO Wei², SUN Yong-cheng, XU Lian-ming², WANG Wei²

1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To determine the best impurity removal technology before ultrafiltration, taking Qihongmaitong injection as the research object. **Methods** To investigated the removal of impurities and related substances by the combined process of refrigeration, centrifugation, and activated carbon adsorption. Adopting the content of effectual ingredients, solids reduction efficiency, protein content and related substances inspection as the evaluation index to determine the feasibility of the method and optimize the process parameters. **Results** The experiment showed that the best process parameters were: refrigerated 24 h, centrifugated 15 min, speed 5 000 r/min, activated carbon dosage 0.3%, temperature 40 ℃, adsorpted time of 30 min, the original solution pH value. **Conclusion** The impurity effect of refrigeration, centrifugation and activated carbon adsorption is significant, which can effectively remove the resin, protein. and other impurity.

Key words: Traditional Chinese medicine injections; impurity removal technology; related substances; protein

近年来,膜分离作为一项高效分离技术,被广泛应用于中药注射剂的研究和生产实践。然而在实际操作过程中,由于中药煎煮液组分复杂,往往含有较多的可溶性杂质成分和相对分子质量较高的胶体,且药液黏滞性大,直接应用超滤技术会导致膜污染加剧,降低膜的使用寿命^[1-3]。完善有效的除杂技术可有效改善药液环境,减轻膜污染,提高中药注射剂的安全性和质量。

注射用芪红脉通为冻干粉针剂,由黄芪、红花两味药物组成,临床上用于治疗冠心病心绞痛。本实验以注射用芪红脉中间体配液为研究对象,考察冷藏、离心、活性炭吸附 3 种工艺组合对该中间体配液杂质的去除情况以及对中药注射剂中有关物质的去除效果。以指标成分黄芪总皂苷、黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A (hydroxy safflower yellow A, HSYA) 质量浓度以及固含物减少率为评价指标,

收稿日期: 2012-09-18

基金项目: 科技部重大新药创制项目“中药治疗心脑血管疾病有效成分组(群)的创新药物孵化基地”(2011ZX09401-097)

作者简介: 祝倩倩(1985—),女,河北石家庄市人,南京中医药大学 2010 级研究生,研究方向为中药新型制剂的研究与开发。

Tel: 15189025771 E-mail: nzyzqq@gmail.com

*通信作者 萧伟,研究员级高级工程师,博士。研究方向为中药新剂型的研究与开发。E-mail: wzhzh-nj@tom.com

对各除杂方法进行评价, 优选最佳工艺参数; 对该注射剂各制备环节进行有关物质检查, 检测树脂的去除情况。此外, 在注射剂有关物质检查项中蛋白质定性检查合格的前提下, 采用定量检测的方法, 考察各除杂工序前后蛋白质质量浓度的变化, 为植物大分子杂质的去除提供数据支持。以上研究将为后期超滤过程的优化设计提供实验依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Alltech ELSD—2000 蒸发光散射检测器; Waters 2695/2487 HPLC 色谱系统 (美国 Waters 公司); UV—2550 PC 紫外可见分光光度仪 (日本岛津公司); Mettler Toledo AB204—S 精密电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Mettler Toledo 实验室 pH 计 (深圳市怡华新电子有限公司); 高速冷冻离心机 Z36HK (德国哈默实验技术有限公司); 针用活性炭 (批号 F1205039, 上海活性炭厂有限公司); SHZ—III 循环水式真空泵 (南京科尔仪器有限公司)。

黄芪中间体 (批号 110501)、红花中间体 (批号 110601) 江苏康缘药业股份有限公司, 黄芪甲苷 (批号 110781-200613)、HSYA (111637-200905) 对照品, 中国食品药品鉴定研究院; 牛血清白蛋白 (批号 100151, 中国计量科学研究院); 考马斯亮蓝 G250 (国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯, 其他所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的测定

2.1.1 HSYA 的测定^[4]

(1) 对照品溶液的制备: 精密称取 60 °C 真空干燥 3 h 的 HSYA 对照品适量, 加水溶解并制成 0.2 mg/mL 的溶液, 即得。

(2) 供试品溶液的制备: 精密量取各除杂工序前后样品溶液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 即得。

(3) 色谱条件与系统适应性试验: 色谱柱为 Phenomenex ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (13:87); 检测波长为 400 nm, 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min。理论塔板数按 HSYA 峰计不低于 1 000。

(4) 线性关系考察: 取 HSYA 对照品适量, 精密称定, 加水制成 0.204 mg/mL 的溶液。按上述色谱条件分别进样 5、10、15、20、25 μL, 测定峰面

积, 将峰面积为纵坐标, HSYA 的质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=514\ 109.325\ X-206\ 547.7$, $r=0.999\ 1$; 线性范围为 1.02~5.10 μg。

(5) 样品测定: 分别精密吸取 HSYA 对照品和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 按外标法计算, 即得。

2.1.2 黄芪总皂苷的测定^[5]

(1) 对照品溶液的制备: 取黄芪甲苷对照品 10.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

(2) 供试品的制备: 精密吸取按“2.1.1”项下方法制备的各供试品溶液 10 mL, 以水饱和的正丁醇萃取 4 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇萃取液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 以 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL。

(3) 线性关系考察: 精密量取对照品溶液 0.0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 mL, 依次分别加入 50% 甲醇 0.75、0.60、0.45、0.30、0.15、0.0 mL, 再分别加入 8% 香草醛无水乙醇溶液 0.75 mL, 置冰水浴中, 加体积分数为 72% 硫酸溶液 7.5 mL, 摇匀, 放入 62 °C 水浴中, 保温 20 min, 置冷水浴中立即冷却, 在 540 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 同时以随行试剂作空白。以对照品进样质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=2.785\ 93\ X-0.009\ 26$, $r=0.999\ 9$, 表明黄芪甲苷在 0.08~0.4 mg/mL 呈良好的线性关系。

(4) 样品测定: 精密量取供试品溶液 0.75 mL, 照标准曲线制备项下的方法自“再加入 8% 香草醛无水乙醇溶液 0.75 mL”起, 依法操作, 测定 A 值。

2.1.3 黄芪甲苷的测定^[6]

(1) 对照品溶液的制备: 取黄芪甲苷对照品 10.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

(2) 供试品溶液的制备 精密量取各除杂工序前后样品溶液 1 mL, 加 25% 甲醇溶解并稀释至 5 mL, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 即得。

(3) 色谱条件与系统适应性试验: 采用高效液相 (HPLC) 与蒸发光散射监测器 (ELSD), 色谱柱为 Alltima C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (34:66); 体积流量 1.0 mL/min; 漂移管温度 105 °C; 载气流速 2.5 L/min。

(4) 线性关系考察: 精密称取黄芪甲苷对照品 10.0 mg, 加入甲醇使溶解并定容于 25 mL 量瓶中,

摇匀即得。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后，按上述色谱条件分别进样，进样量依次为 10、20、30、40、50 μL，每个质量浓度重复 3 次，测定峰面积。以黄芪甲苷质量浓度对数平均值与峰面积对数平均值进行线性回归，得回归方程 $Y=0.6465X-3.7012$ ， $r=0.9999$ ，表明黄芪甲苷在 4.0~20.0 μg 与峰面积呈良好线性相关。

(5) 样品测定：分别精密吸黄芪甲苷对照品溶液 10、15 μL，供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪测定，用外表两点法对数方程计算，即得。

2.2 固含物的测定

按《中国药典》2010 年版附录 X A 规定的浸出物测定方法进行测定，称定质量并计算。

2.3 有关物质检查

按《中国药典》2010 年版附录 IX S 规定的注射剂有关物质检查法进行测定。

2.4 蛋白质的测定

2.4.1 选用考马斯亮蓝法测定蛋白质的量^[7-8] 配制质量浓度为 100 μg/mL 的牛血清白蛋白溶液作为对照品溶液。分别精密移取 0、10、20、40、60、80、100 μL 对照品溶液至试管中，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250，混匀（轻摇匀，防治产生泡沫），静置 2 min，于波长 595 nm 处测定样本的 A 值，以蛋白质质量浓度 C (μg/mL) 为横坐标， A 值为纵坐标，进行线性回归，得回归方程 $Y=0.842801X+0.038$

58， $r=0.99843$ 。

2.4.2 样品的测定 精密移取待测样品 0.1 mL，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液，混匀，静置 2 min 后测其 A 值，计算蛋白质的量。

2.5 注射用芪红脉通配液除杂工艺流程

取黄芪、红花中间体适量，加注射用水使溶解，静置至室温，冷藏一定时间，滤过，随后将滤液进行离心，取上清液，加入适量用活性炭，加热搅拌一定时间，双层滤纸抽滤。分别对冷藏、离心、活性炭吸附 3 个工艺过程对应的评价指标进行测定，优化各工艺参数。

2.5.1 冷藏工艺 称取适量黄芪、红花中间体适量，平均分成 3 组，加注射用水，加热溶解。每组再平均分成 5 份，每份 50 mL，分别冷藏 0、12、24、36、48 h 后滤过，测定滤液中 HSYA、黄芪总皂苷、黄芪甲苷的量以及固含物减少率，对有关物质进行定性检查。结果表明，随冷藏时间增加指标成分的量均无明显变化，但固含物减少率逐渐增加，表明冷藏对杂质的去除有效，且冷藏 24 h 后，固含物的减少率趋于平缓，因此，确定药液冷藏时间为 24 h；在有关物质检查中，仅树脂项检查不合格，即溶液有乳光。且随冷藏时间的增加溶液乳光现象无明显降低，结果见表 1。

固含物减少率 = (未冷藏固含物质量 - 冷藏特定时间固含物质量) / 未冷藏固含物质量

表 1 冷藏工艺各指标比较 ($n=3$)

Table 1 Comparison of indexes in refrigeration process ($n=3$)

冷藏时间 / h	HSYA / (mg·mL ⁻¹)	黄芪总皂苷 / (mg·mL ⁻¹)	黄芪甲苷 / (mg·mL ⁻¹)	固含物减少率 / %	树脂检查
0	18.30	21.28	1.96	0.00	溶液有乳光
12	18.32	21.39	1.97	0.54	溶液有乳光
24	18.30	21.73	1.96	1.04	溶液有乳光
36	18.22	21.71	1.98	1.07	溶液有乳光
48	18.30	21.80	1.96	1.19	溶液有乳光

2.5.2 离心工艺^[9] 另取黄芪、红花中间体适量，加注射用水，加热使溶解，冷藏 24 h，滤过，待用。冷藏滤过后药液平行 2 组，每组平均分成 9 份，每份 100 mL，分别为 ① 未离心液；② 离心 10 min，3 000 r/min；③ 离心 10 min，5 000 r/min；④ 离心 10 min，8 000 r/min；⑤ 离心 10 min，10 000 r/min；⑥ 离心 15 min，3 000 r/min；⑦ 离心 15 min，5 000 r/min；⑧ 离心 15 min，8 000 r/min；⑨ 离心 15 min，10 000 r/min，离心后取上清液，测定滤液中 HSYA、

黄芪总皂苷、黄芪甲苷的量，固体物去除率，对有关物质进行检查。结果表明，在离心 15 min、转速 10 000 r/min 时固含物最低，但离心条件为 15 min、转速 5 000 r/min 时，固含物较低且指标成分占总固体量百分比最高，故最佳离心条件为 15 min、转速 5 000 r/min。有关物质检查中，离心后药液与离心前药液比较，树脂检查时溶液乳光现象略有改善，结果见表 2。

固含物减少率 = (离心前固含物质量 - 离心后固含物质量) / 离心前固含物质量

表 2 离心工艺各指标比较 (n=2)

Table 2 Comparison of indexes in centrifugation process (n=2)

试验号	离心速度 / (r/min)	处理时 间 / min	HSYA / (mg·mL ⁻¹)	黄芪总皂苷 / (mg·mL ⁻¹)	黄芪甲苷 / (mg·mL ⁻¹)	指标成分占总固 含物百分比 / %	固含物减 少率 / %	树脂检查
未离心液	0	0	16.90	21.96	1.86	41.77	0.00	溶液有乳光
1	3 000	10	16.03	20.35	1.79	39.39	0.58	乳光现象减轻
2	5 000	10	15.96	20.55	1.82	39.68	0.91	乳光现象减轻
3	8 000	10	16.11	20.23	1.86	39.60	1.05	乳光现象减轻
4	10 000	10	16.02	20.77	1.86	40.09	1.09	乳光现象减轻
5	3 000	15	16.16	20.61	1.86	40.02	0.98	乳光现象减轻
6	5 000	15	16.70	21.61	1.86	41.81	1.44	乳光现象减轻
7	8 000	15	16.68	21.13	1.84	41.41	1.76	乳光现象减轻
8	10 000	15	16.51	21.42	1.85	41.67	2.07	乳光现象减轻

量) / 离心前固含物质量

2.5.3 活性炭吸附工艺 活性炭吸附在注射剂中的应用非常广泛, 具有脱色、除热原、助滤、提高药液澄明度等效果。因此, 在超滤前对活性炭吸附工艺进行考察, 有助于进一步提高中药注射剂的质量和安全性。

(1) 正交试验优化活性炭吸附工艺: 活性炭吸附工艺优化选取了活性炭用量 (A)、温度 (B)、时间 (C)、pH 值 (D) 4 个主要影响因素, 以 3 种 (类) 指标成分质量分数的综合评分为评价指标, 设计 L₉(3⁴) 正交试验, 试验设计与结果见表 3, 方差分析见表 4。通过计算 HSYA 转移率、黄芪总皂苷转移率、黄芪甲苷转移率, 判断各指标成分受活性炭

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 111.290	2	2.239	—
B	6 924.187	2	13.951	—
D	1 176.280	2	2.370	—
C (误差)	496.310	2	—	—

F_{0.05}(2, 2)=19.00

吸附影响程度大小, 据此设定 3 种成分权重系数分别为 0.4、0.5 和 0.1。

综合评分 = HSYA 转移率 × 0.4 + 黄芪总皂苷转移率 × 0.5 + 黄芪甲苷转移率 × 0.1

由直观分析可知, 各因素对综合评分的影响顺序依次为 B > D > A > C; 方差分析结果表明各因素对综合评分的影响均不具有显著性, 最佳工艺为 A₂B₁C₂D₁, 即活性炭用量 0.3%、温度 40 °C、吸附时间 30 min、原药液的 pH 值。

(2) 验证试验: 称取适量中间体进行配液, 按最佳提取工艺条件平行进行 3 组试验, 结果表明, 指标成分转移率较高, 且具有良好的稳定性和重复性, 其中黄芪甲苷转移率大于 100%, 初步分析原因可能为药液本身偏弱酸性, 经加热后, 少量黄芪皂苷水解转化为黄芪甲苷所导致。对药液进行有关物质检查, 结果显示有关物质中各项检查均合格, 同时药液澄明度提高, 药液颜色变浅, 结果见表 5。

2.6 各工艺过程中蛋白质去除情况

中药注射剂大多为植物提取物, 其浸提物中往往含有多种植物大分子杂质^[10], 如蛋白质、鞣质、树脂等, 均是导致中药注射剂临床不良反应最敏感

表 3 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A / %	B / °C	C / min	D	综合评分
1	0.1	40	15	原药液	664.57
2	0.1	60	30	6.5	627.34
3	0.1	80	45	7.5	558.35
4	0.3	40	30	7.5	647.42
5	0.3	60	45	原药液	633.35
6	0.3	80	15	6.5	582.45
7	0.5	40	45	6.5	611.84
8	0.5	60	15	7.5	592.88
9	0.5	80	30	原药液	582.20
K ₁	1 850.26	1 923.83	1 839.90	1 880.12	
K ₂	1 863.22	1 853.57	1 856.96	1 821.63	
K ₃	1 786.92	1 723.00	1 803.54	1 798.65	
R	76.30	200.83	53.42	81.47	

表 5 验证试验

Table 5 Test of verification

试验号	HSYA 转移率 / %	黄芪总皂苷转移率 / %	黄芪甲苷转移率 / %	有关物质检查	药液性状
1	84.80	90.74	103.28	合格	澄明度显著提高, 颜色变浅
2	85.06	90.63	103.07	合格	澄明度显著提高, 颜色变浅
3	84.95	90.71	103.44	合格	澄明度显著提高, 颜色变浅

的一类物质, 因此, 在中药注射剂制备过程, 蛋白质的定量检测对提高中药注射剂的安全性具有重要意义。

采用考马斯亮蓝法对冷藏、活性炭吸附工艺前后蛋白质进行测定, 结果显示, 冷藏、活性炭吸附工艺对蛋白质的去除均有效, 冷藏对蛋白质的去除率更高, 结果见表 6。

表 6 各工艺过程蛋白质去除效果的比较

Table 6 Comparison of protein content on each process

试验组	预处理方法	蛋白质 / (mg·mL ⁻¹)	蛋白质去除率 / %
1 组	冷藏前	3.390	3.16
	冷藏后	3.283	
2 组	活性炭吸附前	3.136	2.30
	活性炭吸附后	3.064	

3 讨论

冷藏和离心工艺可有效去除中药水提液中的不溶性杂质; 冷藏和活性炭吸附可去除药液中的蛋白质, 且冷藏工艺蛋白质的去除率较活性炭高。

在树脂检测有乳光的情况下, 采用冷藏、离心和活性炭吸附组合, 可有效去除树脂, 提高中药制剂的安全性。

活性炭吸附对有关物质的去除和药液澄明度的提高有明显效果, 但由于本处方中指标成分受高温影响较为明显, 加上活性炭吸附本身对药物成分的吸附作用, 使得本实验中活性炭吸附优选的最佳温度为 40 °C。

本实验超滤前预处理工艺采用冷藏、离心和活

性炭吸附组合除杂, 除杂效果明显、指标成分损失小, 且操作简单、经济可行, 也进一步验证了药液预处理工艺的必要性, 并为下一步的超滤工艺奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 樊文玲, 郭立玮, 李 磊, 等. 超滤精制热毒宁处方水提液的预处理方法及其工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1793-1796.
- [2] 郭立玮. 中药制药工业对膜科学技术的重大需求与关键问题 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1849-1855.
- [3] 朱才庆, 余 华, 魏东芝, 等. 金钱通淋口服液不同预处理方法及对膜分离效果的影响 [J]. 中成药, 2005, 27(9): 1011-1015.
- [4] 孙永成, 郭传宝, 王 伟, 等. 大孔树脂使用次数对羟基红花黄色素 A 吸附率的影响 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2011, 13(4): 697-699.
- [5] 王培培, 许杜娟, 夏 泉. 黄芪皂苷的提取及含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 27-29.
- [6] 张金红, 周 晶, 吴志丽, 等. HPLC-ELSD 法测定黄芪及金芪降糖片中黄芪甲苷的含量 [J]. 天津医科大学学报, 2010, 16(1): 26-29.
- [7] 董 洁, 郭立玮, 文红梅, 等. 中药水提液中蛋白质含量测定方法研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 22(6): 40-43.
- [8] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究 [J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-41.
- [9] 魏舒畅, 袁文郡, 余 琰, 等. 红芪提取液的超滤纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2011, 33(4): 599-603.
- [10] 郭 青, 吴晓燕, 史清水, 等. 中药注射剂质量评价的有关研究思路、方法和建议 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 351-359.