

• 方药研究 •

4 种去大分子中药注射剂的稳定性研究*

云 宇^{1,2}, 侯肖霖¹, 殷 华¹, 柯 瑾¹, 段为钢^{1△}

(1. 云南中医学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明医科大学, 云南 昆明 650500)

摘要:目的 观察中药注射剂去大分子物质后, 澄明度方面的稳定性能否明显提高。方法 用不同孔径(3k、10k、30k)分子筛去除 4 种上市中药注射剂(清开灵注射液、双黄连注射液、丹参注射液和灯盏细辛注射液)大分子物质分别制备不同的去大分子中药注射剂。检查各去大分子注射液蛋白质和缩合鞣质杂质后, 分别取 10mL 4 种去大分子注射液和原液于 60℃恒温放置 30d, 动态观察其颜色变化, 以可见波长(400~800nm)吸收曲线下面积反映综合颜色变化。第 30 天取 0.5mL 用 30k 超滤膜截留沉淀, 拍照观察。结果 去大分子注射液的蛋白质和缩合鞣质杂质明显减少, 4 种不同条件去大分子中药注射剂的颜色明显浅于相应的原液, 在 30d 60℃恒温条件下其变色程度均较原液浅, 产生的沉淀明显较原液少。结论 去除大分子物质后, 这 4 种中药注射剂的稳定性得到明显改善。

关键词: 中药注射剂; 大分子物质; 稳定性; 澄明度; 吸收光谱

中图分类号: R286 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)04-0020-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.04.005

自从第一支中药注射剂“暴泼利尔”发明以来, 中药注射剂的临床应用越来越大, 其疗效得到业界和社会的认可, 为人民的健康事业做出了重大贡献^[1-2]。但随之而来的安全问题也越来越受到人们关注^[2]。大多数中药注射剂是根据中医药理论从口服制剂上升而来的灭菌注射制剂^[1], 因所含成分复杂, 稳定性也是导致中药注射剂储存后增加安全性风险的重要因素^[3-4]。

笔者前期根据中药的用药规律和口服药吸收机理推测中药注射剂的活性成分应该属于小分子类, 而大分子类物质则是导致安全性问题重要物质基础^[2,5,6]。实验研究也证实, 用分子筛去除大分子物质后, 中药注射剂的指纹图谱和有效性无明显改变, 但安全性得到明显提升^[1]。然而, 在去除大分子物质后, 中药注射剂残留的大分子物质如何, 其稳定将有什么变化尚不清楚。本研究以 4 种上市中药注射剂为对象, 用前期建立的高灵敏方法检查蛋白质和缩合鞣质等大分子物质^[7-8], 主要从外观性状上考察其稳定性, 为进一步的稳定性研究提供依据。

1 仪器与材料

清开灵注射液, 规格 10mL, 批号 1003272; 双黄连注射液, 规格 20mL, 批号 20100324; 丹参注射液, 规格 10mL, 批号 1005104; 灯盏细辛注射液, 规格 10mL, 批号 20130533; 均从市场购得。TECAN 多功能酶标仪(Infinity 200 Pro+)由奥地利 TECAN 公司生产。各种规格的分子筛(超滤离心管)以及 PVDF 膜(0.22μm)均为美国 Millipore 公司产品。

2 方法

2.1 样品制备

将上述 4 种中药注射液分别加入到 3k、10k、30k 无菌超滤离心管(规格 50mL)中, 于 4℃ 3 000rpm 离心截留制备超滤液, 即得各种去大分子注射液, 同时也获得富含大分子注射液。为了便于比较, 各注射液原野液置于离心管中进行离心操作。获得的样品保存在-40℃备用。

2.2 检查 4 种去大分子中药注射剂中的蛋白质和缩合鞣质

蛋白质检查: 参照文献[8]方法进行。将 PVDF 膜装载在一个孔径为 2mm 的滤器装置上, 用 40%

* 基金项目: 国家自然科学基金(81160495, 81560645)

收稿日期: 2016-06-28

作者简介: 云宇(1978-), 女, 海南文昌人, 副教授, 医学博士, 主要从事药理学研究。

△通信作者: 段为钢, E-mail: deardwg@126.com

甲醇溶液湿润 PVDF 膜后即用负压吸引方式让不同中药注射液 1mL 流经该孔中的 PVDF 膜形成一个吸附点。重新装载滤器并移动 PVDF,如法制备多个中药注射液吸附斑点。然后用 50%~100%DMSO 溶液洗涤 PVDF 膜上的斑点到无色或接近无色,用考马斯亮蓝染液对膜片进行染色。用凝胶成像仪拍照记录检查结果。

缩合鞣质检查:参照文献[7]方法进行。将 PVDF 膜用 10%的蛋清溶液包被过夜,自然晾干后装载在一个孔径为 2mm 的滤器装置上,用 40%甲醇溶液湿润 PVDF 膜后即用负压吸引方式让 1mL 不同中药注射液流经该孔中的 PVDF 膜形成一个直径约为 2mm 的吸附点。重新装载滤器并移动 PVDF,如法制备多个中药注射液吸附斑点。同时该方式平行用 PVDF 膜(未经蛋白包被)点样作为对照。然后用 50%~100% DMSO 溶液同等地洗涤这 2 张 PVDF 膜,当对照膜上的斑点到无色或接近无色后,直接用凝胶成像仪拍照记录检查结果。

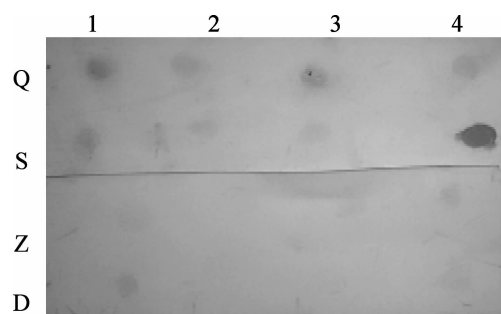
2.3 检查 4 种中药注射剂的热稳定性

取制备的各种去大分子注射液和原液 10mL,置于 15mL 无菌带盖试管中,于 60℃恒温烘箱^[9] 30d,每隔 3d 取 50 μ L,加入到透明 384 孔板中,用酶标仪扫描吸收光谱(400~800nm,2nm 步进),30d 累计测定 11 次。以吸收曲线的曲线下面积来反映样品颜色的总体变化,曲线下面积采用梯形法进行计算,即将曲线下面积根据波长间隔分割成多个梯形,先计算出每个梯形的面积然后将各个梯形的面积进行累加。第 30 日,各管取 500 μ L 样品置于截留分子量为 30K 的 1.5mL 超滤离心管中,3 000rpm 离心超滤,观察截留在滤膜上有色物质。

3 结果

3.1 4 种中药注射液去大分子物质后的蛋白质和缩合鞣质检查

图 1 结果表明,3 种中药注射剂(清开灵注射液、双黄连注射液和丹参注射液)的原液可见明显的蛋白质存在,去大分子后,蛋白质明显减少(清开灵注射液和双黄连注射液)甚至检查阴性(丹参注射液),以牛血清白蛋白组分 V 计,相对定量检查结果参见表 1。图 2 结果表明,双黄连注射液和丹参注射液的原液可见明显的缩合鞣质,去大分子处理后,缩合鞣质明显减少;而清开灵注射液和灯盏细辛注射液的原液检查为可疑阳性,去大分子处理后



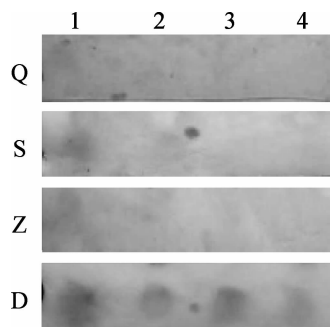
注:Q、S、Z、D 分别为清开灵注射液、双黄连注射液、灯盏细辛注射液和丹参注射液。1-4 分别表示原液和经 30K、10K 和 3K 分子筛处理后获得的去大分子注射液。

图 1 4 种去大分子中药注射液的蛋白质检查

表 1 4 种去大分子中药注射液的蛋白限量检查($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

	1	2	3	4
Q	≤ 137	≤ 46	≤ 46	≤ 46
S	≤ 46	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Z	≤ 5	≤ 5	≤ 5	≤ 5
D	≤ 15	≤ 5	≤ 5	≤ 5

注:Q、S、Z、D 分别为清开灵注射液、双黄连注射液、灯盏细辛注射液和丹参注射液。1-4 分别表示原液和经 30K、10K 和 3K 分子筛处理后获得的去大分子注射液。



注:Q、S、Z、D 分别为清开灵注射液、双黄连注射液、灯盏细辛注射液和丹参注射液。1-4 分别表示原液和经 30K、10K 和 3K 分子筛处理后获得的去大分子注射液。

图 2 4 种去大分子中药注射液的缩合鞣质检查

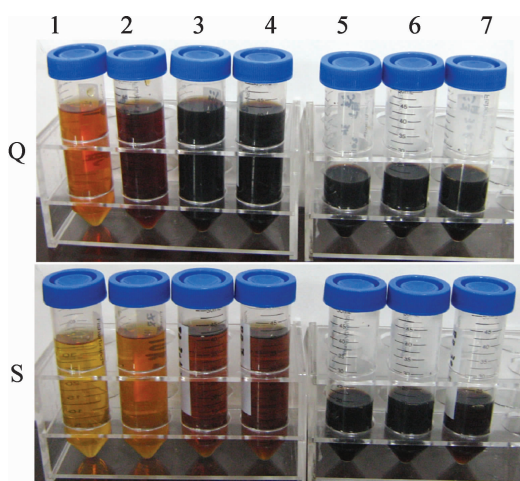
表 2 4 种去大分子中药注射液的缩合鞣质限量检查($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

	1	2	3	4
Q	≤ 70	≤ 35	≤ 35	≤ 35
S	≤ 70	≤ 35	≤ 35	≤ 35
Z	≤ 70	≤ 35	≤ 35	≤ 35
D	≤ 220	≤ 70	≤ 70	≤ 70

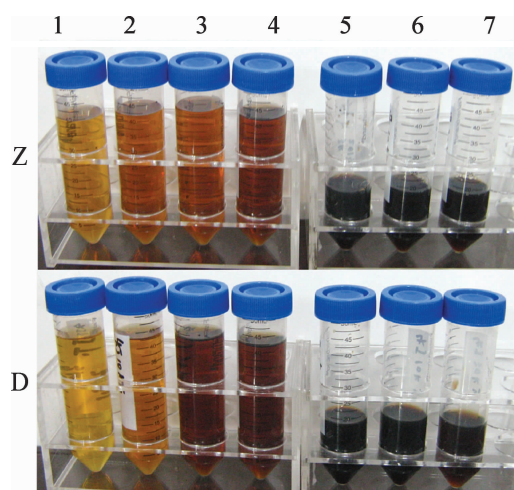
注:Q、S、Z、D 分别为清开灵注射液、双黄连注射液、灯盏细辛注射液和丹参注射液。1-4 分别表示原液和经 30K、10K 和 3K 分子筛处理后获得的去大分子注射液。

检查阴性,以缩合焦性没食子酸计,相对定量检查结果参见表 2。

3.2 4 种中药注射液去大分子物质后的颜色变化 经不同分子筛截留后得到不同的去大分子注



射液,以 3K 截留的去大分子注射液颜色较浅,透明度较高;其次是 10K 截留和 30K 截留获得的去大分子注射液(见图 3)。对富含大分子注射液来说,虽未见沉淀但颜色似酱油不透明(见图 3)。



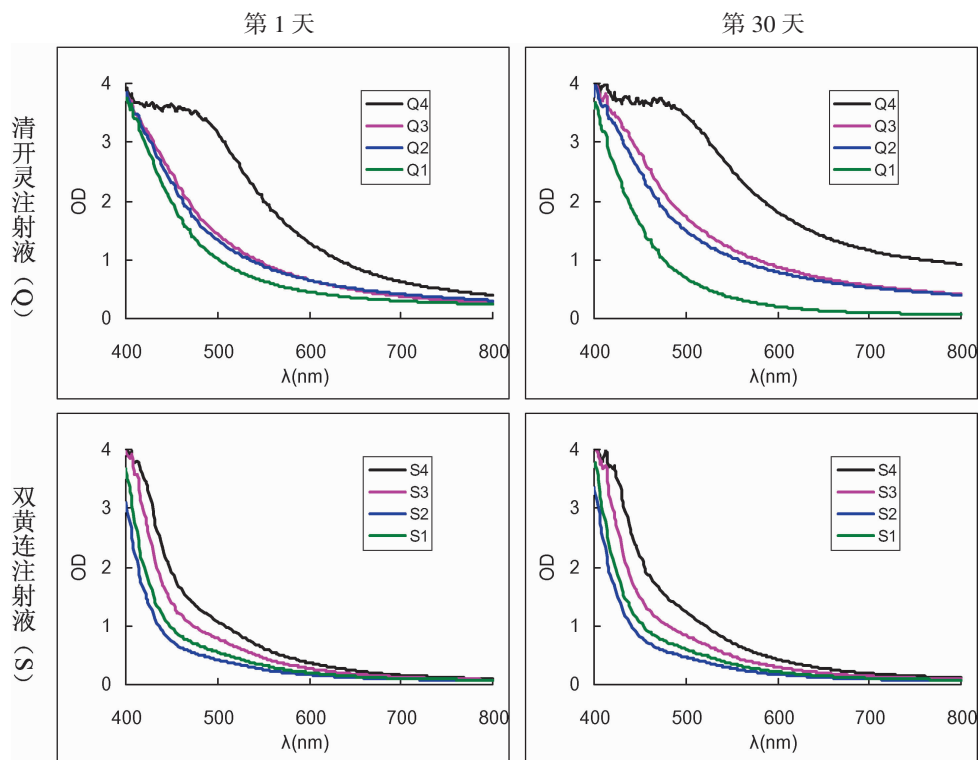
Q、S、Z、D 分别为清开灵注射液、双黄连注射液、灯盏细辛注射液和丹参注射液。1-3 分别表示经 3K、10K 和 30K 分子筛处理后获得的去大分子注射液;4 为中药注射剂原液;5-7 分别表示经 3K、10K 和 30K 分子筛处理后获得的富含大分子注射液,大分子物质得到 10 倍富集。

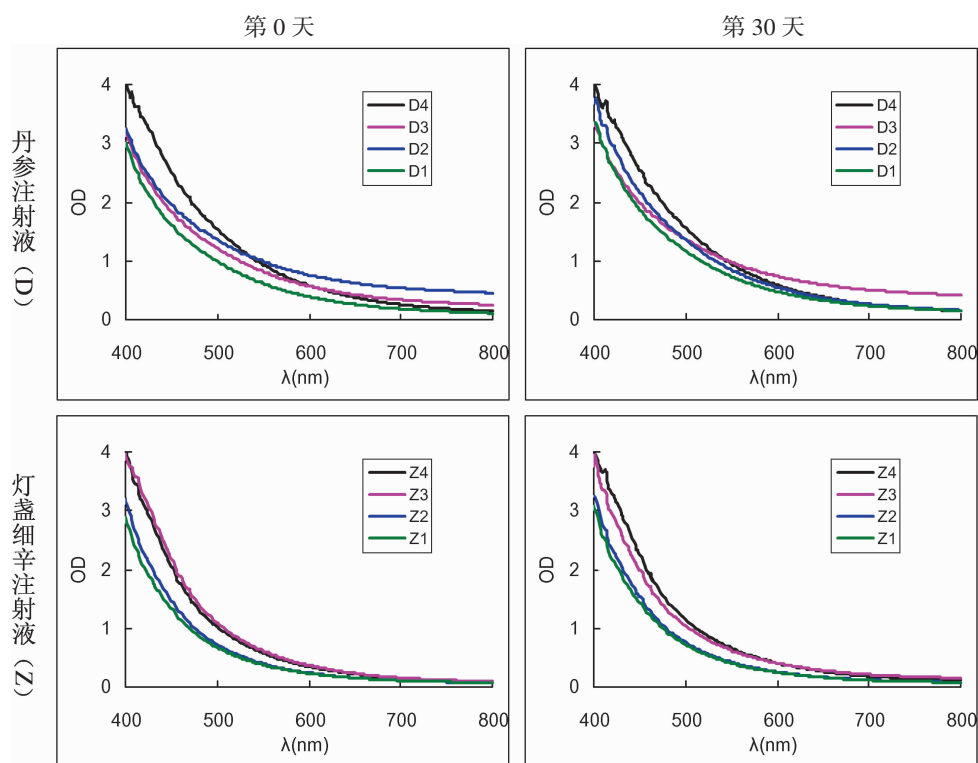
图 3 去大分子和富含大分子的中药注射液

3.3 4 种去大分子中药注射液的热稳定性考察

去大分子注射液的颜色(可见吸收光谱)均较原液淡,且与去大分子的程度存在关联,在热稳定

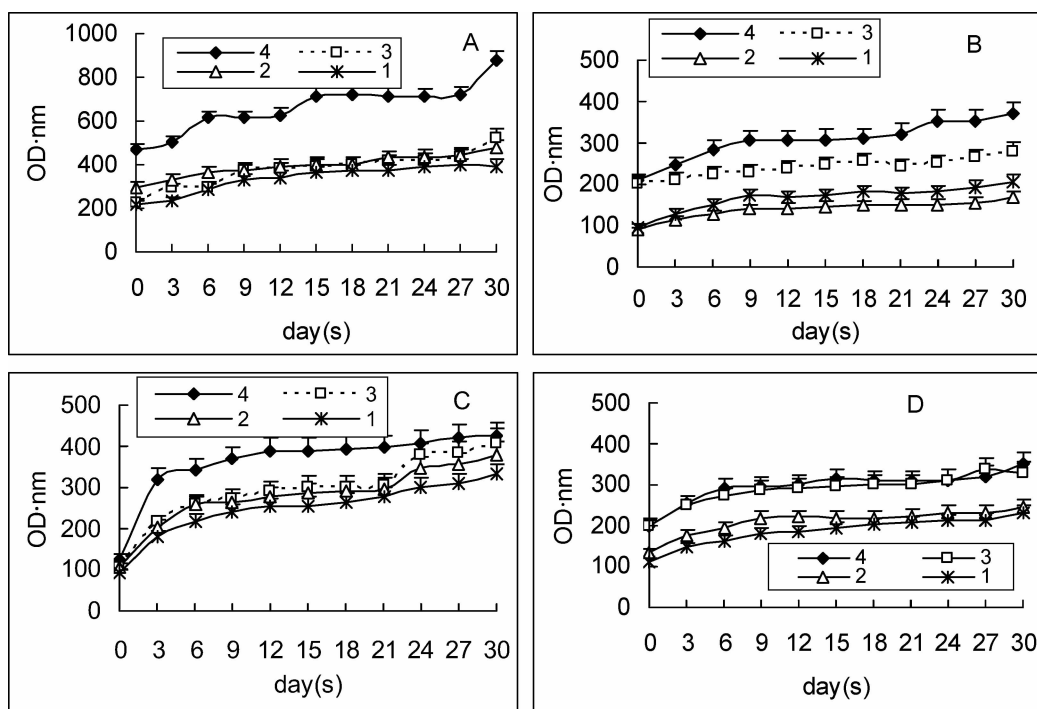
实验中,4 种中药注射液的吸收光谱均发生明显红移(第 0 天和第 30 天的可见吸收曲线参见图 4)。图 5 表明,在第 0 天与原液相比,各去大分子中药注射





1、2、3 分别表示经 3k、10k 和 30k 分子筛截留后所得的去大分子注射液;4 表示原注射液

图4 4种中药注射液去大分子物质后的热稳定性吸收曲线图



A、清开灵注射液;B、双黄连注射液;C、丹参注射液;D、灯盏细辛注射液。1、2、3 分别表示经 3k、10k 和 30k 分子筛截留后所得的去大分子注射液;4 表示原注射液。

图5 4种中药注射液去大分子物质后的热稳定性曲线图(原始曲线下面积 OD·nm)

液吸收曲线的曲线下面积均有缩小,支持图 3 的变化规律。随着实验的进行,各样品的颜色不断变深,但仍然以原液的颜色较深。其中清开灵注射液原液在第 15 天出现明显的浑浊,而不同去大分子的清开灵注射液则在 18d 后出现浑浊。实验过程中其它 3 种注射液出现浑浊的程度较轻。经过 30d 60℃处理,不同去大分子注射液与原液相比,颜色仍较浅(图 6);经超滤膜截留后,原液出现的有色颗粒沉淀最多,其次是 30k 孔径去大分子的注射液样品,其余各组均未见明显颗粒沉淀,如图 7 所示。

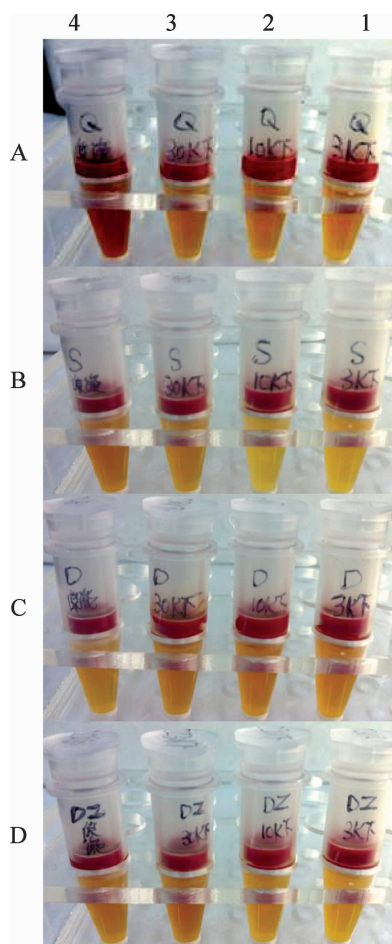


图 6 4 种中药注射液去大分子后在 60℃处理 30d 后的透明度变化

4 讨论

前期的理论^[2,5]和实践研究^[1,7]表明大分子物质是中药注射剂导致安全性问题的主要物质基础,去除大分子物质后能在保证物质基础和主要功效不变的

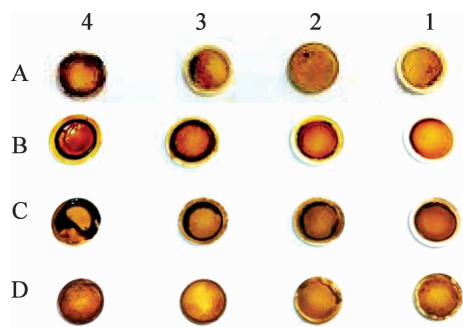


图 7 4 种中药注射液去大分子后在 60℃处理 30d 后的经 30k 超滤膜截留的沉淀

前提下提高中药注射剂的安全性。本研究证实分子筛的确能在一定程度上去除大分子物质如蛋白质和缩合鞣质,而且还能增强中药注射剂的稳定性。

中药注射剂稳定性问题既可以表现在宏观方面,也可以表现在微观方面。在宏观方面主要是中药注射剂颜色变深,产生沉淀或浑浊,澄明度下降,研究较易,也是《中国药典》的必查项目。在微观方面主要是有效成分的降低和杂质的生成,研究较为复杂。尽管 1999 年就有一线药检部门提出要重视中药注射剂的澄明度问题^[10],但中药注射剂在储存过程的澄明度问题依然不可忽视^[11]。

由于中药注射剂的颜色不存在特定波长的吸收,变色过程中,吸收基本上呈现从短波向长波延伸的趋势(也称红移)。传统的中药注射剂色泽描述和稳定性考察时均采用定性的方式描述,缺乏定量参考。在本研究中,笔者引入可见吸收光谱的曲线下面积作为颜色的综合深度,由此比较各注射液样品的颜色变化且能较好的定量。在波长扫描过程中,只要不出现饱和吸收,认为在评价中药注射剂颜色变化时,该方法较单一波长法更具有优势。

在加速试验的温度选择方面,笔者参考文献^[9]方法选择 60℃。主要考虑中途要反复开盖取样检测,开盖过程中可能会遭受微生物污染而干扰后续观察,而 60℃环境具有较好的抗微生物污染能力。最后用超滤膜截留有色颗粒再观察,有利于结果判断,因为中药注射剂有颜色,加速试验后颜色还会加深,离心可以在离心管底部富集沉淀,但将沉淀截留在超滤膜表面观察起来更为直观。

为了观察中药注射剂稳定实验过程中内在

质量变化,有采用 HPLC 指纹图谱进行检测的报道^[9,12]。由于中药注射剂稳定性下降能通过变色和浑浊(沉淀)反映。本研究也的确观察到该现象,故用澄明度指标足以反映出不同中药注射液的稳定性变化。

因此,本研究选用简单而直观的方法研究了4种不同去大分子中药注射液和原液的稳定性变化,通过60℃为期30d的加速实验发现,4种去大分子中药注射剂的澄明度变化均优于原注射液,从而确证去除大分子物质后有利于提高中药注射剂的稳定性。

参考文献:

- [1] 柯瑾,张陆勇,殷华,等. 大分子物质对中药注射剂的安全性影响[J]. 中成药,2014,36(4):855-859.
- [2] 段为钢,张陆勇. 提高中药注射剂安全性的技术策略[J]. 中成药,2012,34(11):2201-2205.
- [3] 王萌,任晓亮,刘虹. 中药注射剂稳定性研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(6):1294-1297.
- [4] 黄江虹. 影响中药注射剂稳定性的相关因素研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1271-1272.
- [5] 段为钢,李奇峰,柯瑾. 中药注射剂有效性及“毒性”的物质基础分析[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版),2011,32(8):56-57,60.
- [6] 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.
- [7] 段为钢,柯瑾,李奇峰,等. 蛋白质包被 PVDF 膜吸附法检查中药注射剂缩合鞣质[J]. 中成药,2011,33(11):1916-1919.
- [8] Duan W., Li Q., Ke J. Detection of Trace Protein in Chinese Materia Medica Injections by Use of Polyvinylidene Fluoride Membrane [J]. Conference on Environmental Pollution and Public Health (CEPPH2011), 2011:19-21.
- [9] 任永申,张萍,杜晓曦,等. 基于 HPLC 指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究 [J]. 中草药,2008,39(6):837-841.
- [10] 方兴华,沈伟群. 应重视中药注射剂的澄明度质量[J]. 中国药业,1999,8(3):28-29.
- [11] 聂宗生. 中药注射剂澄明度的影响因素分析及对策[J]. 中国医药指南,2013,11(14):666-667.
- [12] 胥勤,余建军,熊晓明,等. 不同增溶剂的参麦注射液稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):30-33.

(编辑:徐建平)

Stability of Traditional Chinese Medicine Injection Was Improved by Removing Macromolecules

YUN Yu^{1,2}, HOU Xiaolin¹, YIN Hua¹, KE Jin¹, DUAN Weigang¹

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
2. Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe stability of Traditional Chinese Medicine Injection (TCMI) when the macromolecular substances were removed. **Methods** Four TCMI (Qingkailing Injection, Shuanghuanlian Injection, Danshen Injection and Dengzhanxin Injection) approved by China Food and Drug Administration (CFDA) were introduced in the study. Protein and condensed tannin in the macromolecule-free injections were tested. The macromolecular substances were removed with molecular sieves of different pores (3k, 10k, and 30k), and different TCMI free of macromolecules were obtained. Ten milliliter of samples including different TCMI free of macromolecules and the original TCMI was added into tubes with lids and kept at 60℃ for 30 days. The visible absorption spectrum of the sample was scanned with a multi-plate reader (from 400-800nm), and the area under the spectrum was calculated to evaluate its clarity. On the 30th day, 0.5mL sample was drawn, and the macromolecular substances and precipitation were trapped on a sieve (30 k). **Results** The macromolecule-free injections contained less protein and condensed tannin. The color of TCMI free of macromolecules was much lighter than that of the original one, the clarity of TCMI free of macromolecules was better than that of the original one also during the 30 days, and precipitation in the TCMI free of macromolecules trapped on the sieve was much less. **Conclusion** The stability of the TCMI free of macromolecules is better than that of the original one.

KEY WORDS: traditional Chinese medicine injection; macromolecules; stability; clarity; absorption spectrum