

# 超滤法在益气回阳注射液制备工艺中的应用\*

袁小红, 胡学军, 钟燕珠

(广州中医药大学第二临床医院, 广州 510120)

**摘要:** 目的: 比较超滤法和活性炭吸附法在益气回阳注射液的制备工艺中对乌头类生物碱含量的影响。结果: 和活性炭吸附法相比, 超滤法大大减少了药液中乌头类总生物碱的损失。

**关键词:** 超滤法; 酸性染料比色法; 乌头类总生物碱

**中图分类号:** R283.6    **文献标识码:** D    **文章编号:** 1005-9903(2001)04-0013-03

益气回阳注射液, 是我院临床上用于治疗阳气暴脱、衰竭之休克的制剂, 由红参、熟附片、黄芪三味药组成, 具有益气扶正、回阳、救逆等作用。熟附子占生药量的 25%, 具有回阳救逆的功效, 其主要有效成分乌头类生物碱既是毒性成分又是有效成分, 在毒性限量范围内, 乌头类生物碱的提出应该是越多越好。原工艺中熟附子采用水提醇沉法提取, 活性炭吸附法除去杂质。实验表明<sup>[1]</sup> 活性炭对乌头类

生物碱有较大吸附作用。本实验以超滤法代替活性炭吸附法, 对经活性炭吸附法和超滤法处理的药液进行了质量考察。

## 1 仪器和试剂

UF-1 板框式超滤机(上海离心机械研究所); 聚砜酰胺超滤膜(分子量截留值为 1 万, 由上海离心机械研究所); 分光光度计(Spectronic Genesys™)。

盐酸, 氢氧化钠, 醋酸钠、醋酸、氯仿、氨水、三乙胺均为分析纯; 溴麝香草酚蓝: 北京市旭东化工厂, 批号 981108。乌头碱标准品, 中国药品生物制品检定所, 批号 720-9305。

收稿日期: 2001-01-18

基金项目: 广州中医药大学资助课题(NO: 98041)

实验所用药材均购自广州市药材公司,由本院药剂科提供,经鉴定黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *As-tragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;熟附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根加工品。

## 2 实验方法和结果

益气回阳注射液由红参、黄芪、熟附子组成,两种工艺中红参均单独用乙醇提取,附子和黄芪一起采用水提醇沉法提取,最后才将两种药液混合、配液。为减少红参对实验结果的干扰,本实验只考察附子和黄芪的提取液用不同方法处理后乌头类生物碱的变化而不是成品中乌头类总生物碱的含量变化。

**2.1 原工艺** 称取附子、黄芪药材,洗净后加水提取三次,过滤,合并三次药液浓缩后醇沉,静置 48h,滤过,回收乙醇至尽,加水至足量,加入 0.4% 活性炭,煮沸 15~ 20min,过滤,添加适量蒸馏水至足量,滤液灌封于盐水瓶中,100℃灭菌 1h,冷藏,备用。

**2.2 新工艺** 称取附子、黄芪药材,洗净后加水提取三次,过滤,合并三次药液浓缩后醇沉,静置 48h,滤过,回收乙醇至尽,加水至足量,进行二次超滤,收集超滤液至足量,灌封于盐水瓶中,100℃灭菌 1h,冷藏,备用。

**2.3 超滤的条件** 超滤膜:聚砜膜,分子量截留值为 1 万,耐受 pH 范围为 1~ 13;进口压力:0.05~ 0.10MPa,出口压力:0.03~ 0.08MPa。

**2.4 酸性染料比色法测定乌头类总生物碱的含量**<sup>[2]</sup>

**2.4.1 试剂的配制** 乌头碱标准品溶液的配制:精密称取乌头碱 17mg,加入 1mol/L 盐酸 0.2ml 使溶解,移入 10ml 容量瓶中,加入蒸馏水稀释,加入 1mol/L 氢氧化钠 0.2ml,定容至刻度,摇匀即得。

醋酸-醋酸钠缓冲液的配制(pH6):按《中华人民共和国药典》2000 版一部附录 XVD 项下配制;溴麝香草酚蓝指示剂:按《中华人民共和国药典》2000 版一部附录 XVE 项下配制。

### 2.4.2 测定方法

**2.4.2.1 测定波长的选择** 精密量取乌头碱标准溶液 1.00ml,置于已加入 5.00ml 醋酸-醋酸钠缓冲溶液的分液漏斗中,加入蒸馏水 2.00ml,溴麝香草酚蓝指示剂 2.00ml,混合均匀,稍置,分别加入 10.00ml 氯仿,振摇 3min,静置 1h,收集氯仿层,弃去初滤液,在可见光范围内,以试剂作为空白对照,测定其吸收

度,得最大吸收波长为 410nm。

**2.4.2.2 标准曲线的绘制** 精密量取乌头碱标准溶液 0.50ml、1.00ml、1.50ml、2.00ml、2.50ml,分别置于已加入醋酸-醋酸钠缓冲溶液 5.00ml 的分液漏斗中,各加入蒸馏水 2.50ml、2.00ml、1.50ml、1.00ml、0.50ml,溴麝香草酚蓝指示剂 2.00ml,以下操作同测定波长选择项下,以试剂作为空白对照,于 410nm 处测吸收度,以吸收度为纵坐标,生物碱量为横坐标,经统计学处理,得回归方程为:  $A = -0.01207 + 2.6438X$ ,  $r = 0.9993$ 。

### 2.4.3 样品中乌头类总生物碱的含量测定

**2.4.3.1 供试品溶液的制备** 精密量取样品 1 号(用 0.4% 活性炭处理的药液) 80ml 浓缩至 40ml 2 号样品(经二次超滤处理的药液) 20ml,用 10% 的氨水调 pH10 以上,用氯仿萃取 5 次,每次分别为 20ml、20ml、10ml、10ml、10ml,合并氯仿液,水浴挥干,残渣加入 1mol/L 盐酸 0.2ml,溶解,按乌头碱标准溶液配制项下制备,定容为 2ml,作为供试品溶液。

**2.4.3.2 供试品溶液中乌头类总生物碱的含量测定** 分别取供试液 2ml,加入蒸馏水 1.00ml,按标准曲线绘制项下测定方法测定吸收度,并计算含量,结果见表 1。

表 1 样品中乌头类生物总碱的含量测定结果(μg/ml)

批号	20000420	20000512	20000522	20000602	$\bar{x} \pm s$
样品 1	1.155	1.180	1.261	1.797	1.348 ± 0.302
样品 2	9.407	8.757	16.776	10.092	11.258 ± 3.719

注:所测定值为 5 次测定的平均值。经 t 检验,样品 2 与样品 1 相比,  $P < 0.001$

**2.4.4 加样回收试验** 精密量取已测定含量的药液(2000420) 15.0ml 各 5 分,分别加入乌头碱标准溶液(0.2mg/ml) 0.50ml、0.50ml、1.00ml、1.00ml、1.00ml,按供试品溶液的制备项下方法制备,按标准曲线绘制项下测定方法操作测定吸收度,计算回收率。结果见表 2。

表 2 样品中乌头类生物碱含量测定加样回收率

样品含量(μg)	加入标准品量(μg)	测得含量	回收率(%)	$\bar{x} \pm s$ (%)	CV(%)
141.11	100	240.21	99.1		
141.11	100	236.81	95.7		
141.11	200	348.77	103.83	100.69 ± 3.63	3.61
141.11	200	339.69	99.29		
141.11	200	352.17	105.53		

**2.4.5 显色稳定性试验** 取 1.00ml 乌头碱标准溶液同法处理后, 密封放置不同时间测定吸收度。在 2h 内吸收度均稳定。

我们在实验过程中发现, 酸性染料溴麝香草酚蓝指示剂不太稳定, 放置不同的天数, 呈现不同的颜色: 新鲜配制时呈靛蓝色, 放置三天以上呈绿色, 放置九天以上呈黄棕色。本实验考察了指示剂的稳定性, 结果表明, 随着放置天数的增加, 吸收值呈下降的趋势(见表 3)。因此, 为了保证实验的准确性, 指示剂必须新鲜配制。在 2h 内测定完成。

表 3 指示剂放置时间对吸收值的影响

指示剂放置时间(d)	标准品量(μg)	吸收值
0	200	0.816
1.5	200	0.790
5	200	0.542
9	200	0.517

### 3 讨论和小结

**3.1 益气回阳注射液**由红参、熟附子、黄芪三味药组成, 红参占其中的 50%, 具有大补元气、复脉固脱的作用, 为方中主药, 故在质量标准中对其进行含量测定。而熟附子在方中亦起重要的作用, 且因其主要有效成分乌头类生物碱既是毒性成分又是有效成分, 因此我们也对乌头类生物碱进行了含量测定, 结果发现在原工艺制备的样品中检测不到乌头类生物碱, 经过一系列的实验, 认为是由于原工艺中使用的活性炭对生物碱吸附较强所致<sup>[1]</sup>。所以我们拟对原工艺进行改进, 用超滤法代替活性炭吸附法, 在实验中除了比较两种样品的乌头类生物碱含量外, 对两种样品的质量标准也进行了检测, 均符合药典的要求, 人参皂甙的含量亦在规定范围之内。

**3.2 乌头类生物碱**分子量在 1000 以下, 有文献报道<sup>[4]</sup>用分子量截留值 1 万的超滤膜, 几乎对乌头类生物碱没有截留作用而大分子杂质被截留, 从而达

到分离的目的。实验结果证明, 超滤法对乌头类生物碱的截留作用较小, 与用活性炭吸附杂质的工艺相比, 乌头类生物碱含量大大提高, 其差异有显著性意义( $P < 0.001$ )。而乌头类药物的有效成分主要是生物碱, 这说明在制备益气回阳注射液的工艺中, 处理附子、黄芪药液用超滤法优于活性炭吸附法。其疗效比较有待于动物实验结果的进一步证实。

**3.3** 据文献<sup>[2]</sup>报道, 人参皂甙也可与酸性染料结合成有色物质。由于在本注射液的制备工艺中, 附子、黄芪用水一起提取而红参是另外用乙醇提取, 配液时才合并的。为避免红参对实验结果的干扰, 我们测定的是附子和黄芪的共煎提取液中的乌头类总生物碱(即不含有参)而不是成品的益气回阳注射液。

**3.4** 通过本实验, 我们得出初步的结论: 在制备益气回阳注射液的工艺中, 超滤法比活性炭吸附法能更好地保留乌头类总生物碱, 大大减少了乌头类总生物碱的损失。在实验中我们还用高效液相色谱法测定了新、旧工艺制备的益气回阳注射液中有毒生物碱的含量, 两者乌头碱的限量检查均符合药典标准, 其他两种双酯型生物碱的含量均极低, 提示注射液的毒性低(另文报道)。下一步我们拟从动物的急性毒性实验、药效学方面考察两种不同工艺制备的注射液的毒性和疗效的差别。

(本实验得到广州中医药大学化学分析教研室曾元儿教师的帮助, 在此谨表谢意!)

#### 参考文献:

- [1] 丘小惠. 活性炭对乌头类生物碱的吸附作用[J]. 广州中医药大学学报, 1997, 14(4): 268.
- [2] 李兰芳, 蓝庆荣. 参附注射液质控指标的研究—附子总生物碱的含量测定[J]. 现代应用药学, 1987, 4(1): 35.
- [3] 贺立中. 超滤技术在中药制剂中的应用[J]. 中成药, 1997, 19(9): 41.
- [4] 张宇. 应用超滤技术制备四逆汤口服液的研究[J]. 佳木斯医学院学报, 1992, 8(8): 12.