

科學研究論文選編

2

沈陽藥學院

1963年10月

长效制剂的研究

I. 长效维生素B₁₂注射剂的研究

顧学裘 陈瑞龙 李煥秋 楊金岭* 等

(沈阳药学院药剂学教研室)

一、緒 言

維生素 B₁₂ 系于1948年由 Riches 氏^[1]等首先从肝脏中提得, 以后又从鏈霉素、金霉素及新霉素等抗菌素的培养廢液和污泥中得到^[2]。由于自然界中維生素 B₁₂ 的含量极微, 目前工业上尚未能大量生产, 因此价格昂贵。

維生素 B₁₂ 在临床上常用以治疗恶性貧血和作为肝脏疾患时的輔助治疗剂, 应用颇为广泛, 大多以注射剂的形式給药, 据文献报导^[3, 4], 正常人体对維生素 B₁₂ 的需要量不大, 每天注射1~3r 或口服5~50r 即已足够, 但口服后多数均在消化道中破坏, 而注射給药后, 血药濃度虽可于短時間內达最高峰, 但經8小时后在尿中排出90~95%, 20~40小时內可完全排出^[5, 6], 而且增加注射剂量后同时相应的增加排泄量, 并不能补偿其損失^[7], 采用在体内停留時間較維生素B₁₂ 为长的羥基鈷胺以代替維生素B₁₂, 亦不能克服此缺点, 因此貧血及肝脏疾患等慢性病患者在应用維生素 B₁₂ 注射剂治疗时, 常需每天一次并长期用药, 一个疗程常常达到数周或数月之久, 致使患者感到麻煩和痛苦。为克服注射剂应用上的缺点, 国外文献曾有长效維生素 B₁₂ 注射剂的报导, 如在維生素 B₁₂ 溶液中加入較高濃度的甘油明胶为阻滯剂, 制成凝胶状注射剂以延緩吸收^[8], Thompson 氏^[9]应用維生素B₁₂与鞣酸及鋅盐結合成不溶于水的复合物而制得混悬型长效注射剂, Schwartz 氏^[7]等将維生素 B₁₂与鞣酸結合, 再混悬于注射用油及单元硬脂酸鋁基質中制成长效油性混悬注射剂, 法国专利文献^[10, 11]应用羥基鈷胺与烟酸、琥珀酸及天冬酸等結合以达长效目的。但目前在国内关于长效維生素 B₁₂ 注射剂尚未見有研究和生产, 有鉴于此, 作者等曾对长效維生素 B₁₂ 注射剂进行了研究, 采用硫辛酸及醋酸鋅与維生素 B₁₂ 結合成不溶于水的复合物制成长效混悬型注射剂, 此外又根据磷酸鋅吸附維生素 B₁₂ 而延緩吸收的原理制成了长效注射剂, 应用普通維生素 B₁₂ 注射剂为对照进行了动物試驗, 并对此二种长效注射剂的急性毒性作了观察。

二、实 驗 部 分

1. 长效維生素 B₁₂ 注射剂的制备:

作者等采用二种方法制备长效維生素 B₁₂ 注射剂, 一为将維生素 B₁₂ 与有机弱酸結

* 本院药理学系1963年应届毕业生。参加工作的还有吳子豪、毕殿洲、朱玉霞、彭澤媛、赵淑琴、陈世仁、馬洪升、張汝芳、时繼会。

合，生成不溶于水的复合物以延长药效，一为应用磷酸鋅吸附維生素 B₁₂ 以延长药效，其制备过程分述如下：

(1) 复合型长效注射剂：鉴于維生素 B₁₂ 可与某些有机弱酸結合生成不溶于水的复合物而延长药效，为此作者等曾应用褐藻酸，鞣酸及硫辛酸等进行試驗，发现褐藻酸与維生素 B₁₂ 不产生复合，鞣酸与維生素 B₁₂ 虽可結合成不溶于水的复合物，但制成的注射剂性質不稳定，在貯藏期間由于鞣酸的氧化变质而使注射剂的色澤逐渐由淡紅色轉变成暗棕色，虽在注射剂中加入 EDTA 以防止微量金属离子对于鞣酸的影响及减少安瓿中空气的容量，均未获滿意結果。而应用硫辛酸与維生素 B₁₂ 复合在有鋅盐存在的条件下可制得不溶于水的复合物，且其性質较为稳定，可制成注射剂，其組成如处方 I：

处方 I：

1900r/ml 維生素 B ₁₂ 溶液	3ml
10mg/ml 硫辛酸鈉溶液	3ml
0.3% 醋酸鋅溶液	3ml
10% 明胶溶液	1ml
甘 油	0.4ml

其配制方法为先配制硫辛酸鈉溶液，取10%碳酸鈉溶液 1ml 加入硫辛酸 100mg 振搖使其溶解，加水稀釋至10ml，过滤备用。另取1900r/ml 的維生素 B₁₂ 溶液 3ml 置小燒杯內，加入上述已配好的10mg/ml 硫辛酸鈉溶液 3ml，在不断振搖下滴加0.3%醋酸鋅溶液3ml，即生成微細的維生素 B₁₂ 复合物沉淀，再加入甘油 0.4ml 搖勻，放置12小时后加10%明胶溶液1ml 混勻，以 1ml 的安瓿灌封，于100°C 灭菌30分鐘即得。成品为淡紅色的混悬液，可作肌肉注射，其中維生素 B₁₂ 的含量为500r/ml。

(2) 吸附型长效注射剂：据报导利用某些胶体顆粒吸附主药以延緩主药在体内的吸收，亦可达到长效目的，如应用磷酸鋁的吸附作用可使丙酸睾丸酮注射剂延效^[12]，而应用磷酸鋅則可延长 ACTH 的作用^[13]。因此作者等試用新生态的磷酸鋁及磷酸鋅对維生素 B₁₂ 进行吸附試驗，发现磷酸鋁作用不够理想（粒子較粗），而磷酸鋅則較好，經試驗后确定其处方如下：

处方 I：

1.5% 磷酸鈉溶液	10ml
1.5% 醋酸鋅溶液	10ml
1.5% 明胶溶液	10ml
維生素 B ₁₂ 結晶	15mg

其配制方法为先將維生素 B₁₂ 溶于醋酸鋅溶液中，加入 1.5% 明胶溶液 5ml 混合，以1ml 安瓿灌封，于100°C 灭菌30分鐘，得安瓿甲。

另將1.5% 磷酸鈉溶液 10ml 与1.5% 明胶溶液 5ml 混合，以2ml 安瓿灌封（装量为 1 ml），于100°C 灭菌30分鐘，得安瓿乙。

应用时以注射器抽取安瓿甲中溶液注入安瓿乙中混勻，即生成粒子較細，分布均匀的混悬型注射液，可供肌肉注射，其中維生素 B₁₂ 含量为 500r/ml。

2. 維生素 B₁₂ 分析方法的探討：

为探求简单易行的血液中維生素 B_{12} 的含量測定法，以供动物試驗之需，作者等曾对下列三种分析方法作了探討：

(1) 比色法：Mitra 氏等^[16] 改进了 Sharif 氏^[15] 用亚硝基紅盐比色測定維生素 B_{12} 的方法，認為此法简单易行，作者等曾按 Mitra 氏等提出的方法进行試驗，結果在維生素 B_{12} 濃度为 $100\sim 600\text{r/ml}$ 时，其呈色情况符合朗伯——比尔定律，与原著結果相符，但在 100r/ml 以下时其呈色反应不符合朗伯——比尔定律，故本法只适用于維生素 B_{12} 純品及制剂的分析，而在血药濃度測定时，血中維生素 B_{12} 含量常在 $0\sim 0.25\text{r/ml}$ 之間，以此法不能測定，故未予采用。

(2) 比浊法：Majs 氏等^[16] 提出应用比浊法測定維生素 B_{12} 的含量，但原著所用菌种为大腸杆菌变种 113—3，据国内文献报导^[17] 以大腸杆菌变种 44110—1 进行測定亦可获較好結果，作者等曾应用大腸杆菌变种 44110—1 为菌种，对比浊法进行了試驗，結果証明維生素 B_{12} 对 44110—1 菌种的生长刺激具有一定的規律性，而且檢出的灵敏度亦較高（可檢出 $0\sim 0.3\text{mr/ml}$ 左右），适合于微量維生素 B_{12} 的分析，但其重复性較差，且实验誤差較大，条件不易控制。

(3) 杯碟法：此法为目前被广泛采用的維生素 B_{12} 定量法，作者等按文献报导^[17] 的方法以大腸杆菌变种 44110—1 为菌种，并改用直徑 8 毫米的打孔器在琼脂平面上打孔，用以代替不銹鋼管进行了試驗，結果証明采用此法时不但重复性較好，且实验条件較比浊法易于控制，灵敏度亦符合作血药濃度測定的要求，故采用了此法作为檢品中維生素 B_{12} 含量的測定，并按以下方法处理血液及制作标准曲綫：

抽取健康家兔血液 1ml ，加草酸鉀溶液一滴为抗凝剂，置干燥試管中，加入已知濃度的标准維生素 B_{12} 生理盐水溶液，然后以生理盐水稀釋至 2ml ，在离心机中以 3500 轉/分速度离心沉淀 30 分鐘，分离血浆，取血浆 1ml 于干燥試管中加蒸餾水 1ml 及 5% 偏磷酸溶液 2ml 混勻，以使蛋白質沉淀，再以同上速度离心 15 分鐘，即得血清，取血清 2ml 于干燥試管中，加醋酸緩冲液 0.2ml ($\text{pH } 4.63$) 及 0.12% 氰化鉀溶液 1.8ml 混勻，于沸騰水浴中放置 10 分鐘，取出放冷，用 1N 氫氧化鈉溶液調节 pH 至 $6.8\sim 7.0$ ，将此液以滴管定量地加于已制好的含菌琼脂平面的杯碟中以供測定。作者等在制备标准曲綫时采用了下述各种濃度的标准維生素 B_{12} 溶液， $0.001, 0.004, 0.007, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25\text{mr/ml}$ ，分別加入血液中，按上述方法处理得血清后，分別滴加于杯碟中，在 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 培养 18 小时，測定其生长圈直徑，然后制得标准曲綫如图 1：

3. 动物試驗：

为观察上述两种維生素 B_{12} 注射剂的延效作用及其对粘膜的刺激与机体的毒性，作者等进行了动物試驗。

(1) 延效作用的观察：

以健康家兔为对象，普通維生素 B_{12} 注射剂（濃度为 500r/ml ）为对照，进行試驗，以观察給药后不同時間内家兔血液中維生素 B_{12} 的含量，从而推测其延效效果，具体方法如下：

取健康家兔編号后，先分別抽取血液 1ml 以作空白校正，然后分別在后腿肌肉一次注射 500r/ml 濃度的普通維生素 B_{12} 注射剂及长效維生素 B_{12} 注射剂（处方 I 及处方 II） 1ml ，

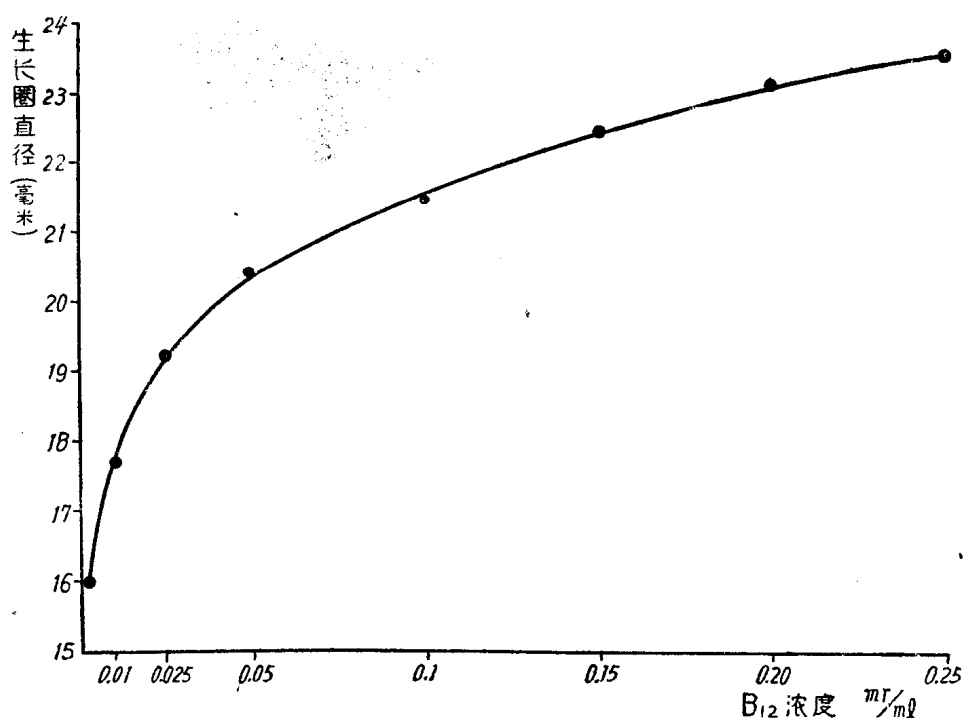


图 1

每隔一定时间由耳静脉抽血 1ml (抽血时间最初为注射后 1, 2, 4, 6 小时各抽一次, 以后每隔 6 小时抽一次, 共抽 5 天, 然后改为每隔 24 小时抽血一次, 直至血中维生素 B₁₂ 浓度降至其自然含量为止), 以生理盐水稀释 8 倍, 按照杯碟法测定维生素 B₁₂ 含量, 所述血液的处理方法进行处理 (但不再加标准维生素 B₁₂ 溶液), 获得血清后, 以制好的杯碟进行培养, 18 小时后取出, 测量生长圈直径, 自标准曲线上查得其浓度, 乘以稀释倍数, 即得不同时间内血药浓度, 以血药浓度为纵座标, 时间为横座标作图, 普通维生素 B₁₂ 注射剂及长效注射剂所得结果如图 2:

(2) 对家兔眼结膜刺激性的观察:

采用体重 1.5kg 以上的家兔, 于实验前先观察其眼结膜情况, 然后分别以处方 I 及处方 II 注射剂 0.2ml 滴入其右眼, 同时于左眼滴入等量蒸馏水作对照, 于滴药同时压住鼻泪管以免药液顺鼻泪管流失, 滴药后每隔五分钟观察一次, 连续观察四十分鐘, 结果未发现该二种注射剂对家兔眼结膜及巩膜有充血等刺激现象。

(3) 急性毒性试验:

为观察上述二种长效注射剂对机体有无毒性, 以便能试用于临床, 作者等选用健康的小白鼠为试验动物, 作了急性毒性试验。

处方 I 用 500r/ml 的成品试验时, 以小鼠腹腔注射所能允许的最大容积给药 (25mg/kg), 其死亡率仅为 20%, 若将处方 I 提高浓度制成浓注射剂时, 则有一部分硫辛酸单独析出, 影响注射剂质量, 故无法求得其中半数致死量 (LD₅₀), 即以 500r/ml 的成品供作试验, 一次腹腔注射于二组小白鼠体内, 给药后连续观察五天并计算其死亡率, 所得结

表 2 处方 I 注射剂毒性试验结果

组 别	小 鼠 (只) 数	剂 量 (mg/Kg)	死 亡 数 (只)	死 亡 率 (%)
1	10	10.0	0	0
2	10	14.1	3	30
3	10	19.9	5	50
4	10	28.0	6	60
5	10	39.5	9	90

三、討 論

1. 根据一次给药后在家兔体内血药浓度的持续时间观察, 普通维生素 B_{12} 注射剂在给药后一小时血药浓度即出现高峰(800mr/ml), 但迅即直线下降, 4小时后降至240mr/ml左右, 以后仍逐渐下降, 至42小时降至家兔血液中自然含量。

硫辛酸- B_{12} 长效注射剂(处方I)于给药后一小时亦出现高峰(850mr/ml), 于6小时内迅速下降, 但以后又逐渐上升, 至36小时又出现280mr/ml左右的高峰, 以后则比较平稳地维持在240mr/ml左右, 至144小时方开始缓缓下降, 至216小时降至血中自然含量。

磷酸锌- B_{12} 长效注射剂(处方II)于给药后一小时亦出现高峰(620mr/ml), 在6小时内亦迅速下降, 但以后又重新上升至170mr/ml左右, 而且平稳地维持至90小时始逐渐下降, 于136小时后降至家兔血中自然含量。

将三者结果进行比较, 可见普通维生素 B_{12} 注射剂于给药后血药浓度迅即达高峰, 但又迅速下降, 42小时即降至家兔血中的自然含量, 而硫辛酸- B_{12} 注射剂(处方I)在给药后一小时, 血药浓度上升至高峰, 6小时内有下降趋势, 但6小时后又有所上升, 在240mr/ml左右可平稳地维持较长时间, 于216小时才降至血中自然含量。磷酸锌- B_{12} 长效注射剂(处方II)于给药后一小时血药浓度亦上升至高峰, 6小时内亦有下降趋势, 但6小时后又有所回升, 在180mr/ml左右平稳地维持较长时间, 于90小时后逐渐下降, 136小时降至家兔血中自然含量。由此可见二种长效维生素 B_{12} 注射剂给药后的血药浓度与普通维生素 B_{12} 注射剂有明显区别, 证实此二种长效注射剂在家兔体内均有长效作用, 而其中以硫辛酸- B_{12} 长效注射剂(处方I)的效果较好。

2. 两种长效注射剂在家兔体内给药后其血药浓度于最初6小时内与普通维生素 B_{12} 注射剂相似, 在一小时内上升至高峰, 以后迅速下降, 但在6小时后则又逐渐回升, 且比较平稳地维持较长时间, 此种现象可解释为在此二种长效维生素 B_{12} 注射剂中所含的主药除有一部分与硫辛酸及锌盐复合生成复合物或被磷酸锌胶体微粒吸附而具延效作用外, 尚有一部分为不复合或不被吸附的普通维生素 B_{12} 存在于溶液中, 这部分主药与普通注射剂相似, 于注射后立即被机体吸收, 很快排泄, 因而形成给药后一小时血药浓度较高, 以后又迅即下降的情况, 而此后由于复合部分或被吸附部分的逐渐释放和吸收, 因

此又使血药浓度重新回升，而且比较平稳地维持较长时间。

为进一步证实上述推测是否符合，作者等曾用离心方法除去处方Ⅰ及处方Ⅱ中的沉淀，应用比色法测定其残留于溶液中的单体维生素 B_{12} 含量，结果为处方Ⅰ中尚残留单体维生素 B_{12} 76%于溶液中，而处方Ⅱ尚遗留86%于溶液中。以此结果与上述推测对照，情况基本符合。

3. 通过对粘膜刺激作用的观察和急性毒性试验，证明该二种长效注射剂对粘膜均无刺激性，且其毒性亦极微小，处方Ⅰ注射剂的半数致死量(LD_{50})为21.46mg/kg，与一般成人常用量相差距离极大，而处方Ⅱ注射剂虽因不能制得浓注射剂而未求得其 LD_{50} ，但根据以最大容积给予小白鼠腹腔注射后的结果观察，应用剂量为20mg/kg时死亡率为0%，而处方Ⅱ注射剂应用剂量为19.9mg/kg时死亡率为50%，故处方Ⅰ的毒性似较处方Ⅱ更低。

4. 硫辛酸系1955年经国际维生素学会公认为新的B族维生素之一，对于治疗急性及慢性肝炎，增强肝脏功能等均有较好效果，而维生素 B_{12} 注射剂亦常于肝脏疾患时作辅助治疗之用，因此硫辛酸— B_{12} 长效注射剂（处方Ⅰ）除可使维生素 B_{12} 的作用延长外，尚具有硫辛酸的综合作用，适于肝病患者。

5. 磷酸锌— B_{12} 注射剂（处方Ⅱ）由于分甲乙二个安瓿灌装，故在应用时有其灵活性，当需用长效注射剂时，可于临用时将二者等量混合，在不需应用长效注射剂时，亦可将安瓿甲单独供肌肉注射，此时主药含量为1000r/ml，其效果与普通维生素 B_{12} 注射剂相似。

四 结 论

1. 作者等试制了二种长效维生素 B_{12} 注射剂，根据家兔单次给药后血药浓度测定结果，证明该二种长效注射剂在家兔体内均具有延效作用，如以给药后血药浓度降至家兔血中维生素 B_{12} 自然含量为止进行计算，则普通维生素 B_{12} 注射剂为42小时，硫辛酸— B_{12} 长效注射剂（处方Ⅰ）为216小时，磷酸锌— B_{12} 长效注射剂为136小时，其延效时间与普通维生素 B_{12} 注射剂比较分别为其五倍及三倍。

2. 通过对家兔眼结膜刺激性的观察及急性毒性试验，证明此二种长效注射剂对粘膜均无刺激作用，且其毒性极小，其动物的半数致死量与一般成人常用剂量比较相差距离颇大。

3. 以上实验结果可供进一步作临床试验时的参考。

本实验中对家兔眼结膜刺激性及急性毒性试验由本院药理研究室程秀娟、于庆海同志进行；杯碟法含量测定工作曾由本院药厂化验室高淑范同志协助，谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Riches, E. L. et al., Science, 1948, 107, 396.
- [2] 维生素 B_{12} 分析方法文献总结，沈阳药学院内部资料，1958年。
- [3] Smith, E. L., Vitamin B_{12} , 1960年版160页。

- [4] Remington's practice of pharmacy, 11th. Ed. 1956, p. 1117.
- [5] 佐桥佳一: B₁₂ とAPF (日文), 日本东京南江堂书店, 1955年版161頁.
- [6] Meyer, C. L. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73, 505.
- [7] Schwartz, M. et al., Lancet, 1962, 2, №.7267, 1181.
- [8] Philadelphia Ampoule Laboratories, J. Am. Pharm. Ass. Pract.
Ed., 1957, 18, 181.
- [9] Thompson, R. E., U. S. Pat., 1960, Jan. 5. №.2,920,015.
(自 C. A., 1960, 54, 12504.)
- [10] C. A., 1963, 53, 1318d.
- [11] C. A., 1963, 53, 1319h.
- [12] Carlinfanti, E. et al., Lancet, 1949, 253, 479.
- [13] Homan, J. D. et al., Lancet, 1954, 236, 541.
- [14] Mitra, R. K. et al., Indian J. Pharm., 1962, 21 (1), 152.
- [15] Sharif, M. A. H., Pakistan J. Sci. Ind. Research, 1958, 1, 160.
- [16] C. A., 1959, 53, 6343d.
- [17] 高俊德等, 药化学报, 1956, 4, 209.

硫辛酸注射液稳定性的观察

顧学裘 陈瑞龙 王桂英* 楊建新**等

(沈阳药学院药剂学教研室)

一、緒 言

硫辛酸系1946年由Guirard氏^[1]从肝脏及酵母中所发现的一种具有高度生物活性的物质。1951年Reed^[2,3]开始自酵母中提取其结晶,并又自40吨牛肝中提得结晶30mg^[4]。1954年Bullock氏等^[5]通过人工合成方法确定了其化学结构,翌年经国际维生素学会讨论确定其为B族维生素中之一种^[6],其后各国学者对其药理作用进行了广泛的研究,证明其对改善各种肝病所引起的新陈代谢障碍,增强肝脏的解毒机能,对抗肝性昏迷及消除肝病的其他自觉症状方面均有较好的效果,此外并可治疗重金属及四氯化碳,苯胺等所引起的中毒,妊娠恶阻,糖尿病性神经炎等症^[7,8]。

由于硫辛酸在医疗上的功效,目前国内外均进行人工合成,并将其制成各种制剂以供应用,其中以注射剂更被广泛采用。但目前国内生产的硫辛酸注射剂由于原料的质量及工艺过程的差异,尚存在一些问题,如PH值较高,注射时疼痛,贮藏期较短等。为了能根据国产原料的质量情况进一步提高硫辛酸注射液的质量,筛选较好的处方,探求合理的工艺过程,以便制成较稳定的注射液,作者等选择了几个处方,配成注射液后对其稳定性作了初步观察。

二、实验部分

(一) 注射液的制备

1. 原料:

试制所用硫辛酸系国营新华制药厂产品,为淡黄色微细结晶,熔点为59°C。

其他药品除三乙醇胺系工业品,甘氨酸为化学纯品外,其余均为药典品或A. R. 品。

2. 处方及配制方法:

硫辛酸不溶于水,需制成盐类或加入助溶剂方能制得水溶性注射液,而其溶液性质不稳定,易受光、热、氧气及二氧化碳等因素的影响而变质,根据国外资料报导^[9-11],在配制硫辛酸注射剂时一般均加入助溶剂,稳定剂或在惰性气体下灌封;国内生产时一般均将其溶于碳酸氢钠溶液中制成注射液,或将其钠盐制成粉末安瓿供用,但这些产品其溶液的pH值大多在9.0以上,肌肉注射时甚为疼痛。作者等根据以上情况及将来生产

* 沈阳药学院药厂

** 本院1963年药系应届毕业生。参加工作的还有王玉寅,郭玉芝,裴秀芬,李慧英,杨克齐。

的可能性，参考国内外生产资料设计了数个处方，分别配制成注射液并作了比较。所用处方及配制过程如下：

处方1：硫辛酸 5.0
 碳酸氢钠 4.8
 注射用水 加至 1000.0

将碳酸氢钠溶于注射用水200ml中，加入硫辛酸搅拌使其全溶后，加入活性炭0.1%，于100°C热处理40分钟，滤去活性炭，滤液于3—5°C冰箱中冷藏一周后取出，用垂熔玻璃漏斗过滤，加注射用水稀释至1000ml，再加活性炭0.1%，搅拌15分钟，用漏斗过滤至滤液经灯检合格后，灌封于2ml耐硷安瓿中，以流通蒸汽灭菌30分钟即得，含量为5mg/ml。

处方2：硫辛酸 5.0
 半胱氨酸 0.6
 磷酸氢二钠 19.03
 磷酸二氢钠 11.13
 注射用水 加至 1000.0

以注射用水溶解二种磷酸盐后，加入硫辛酸搅拌使溶，再加入半胱氨酸溶解后，加注射用水至1000ml，加入活性炭0.1%搅拌15分钟，反复过滤至滤液经灯检合格后，灌封于2ml耐硷安瓿中，以流通蒸汽灭菌30分钟。含量为5mg/ml。

处方3：硫辛酸 5.0
 磷酸氢二钠 9.30
 磷酸二氢钠 0.26
 注射用水 加至 1000.0

将二种磷酸盐先溶于注射用水200ml中，再加入硫辛酸搅拌使溶，其余各步操作过程如处方1。

处方4：硫辛酸 5.0
 磷酸氢二钠 9.30
 磷酸二氢钠 0.26
 氨水 适量
 注射用水 加至 1000.0

将二种磷酸盐溶于注射用水200ml中，加入硫辛酸搅拌溶解，加入活性炭0.1%，加热煮沸五分钟，过滤，滤液在3—5°C冰箱中冷藏二天，取出后迅速过滤，滤液加注射用水至1000ml，加活性炭0.1%，搅拌15分钟，反复过滤至灯检合格后，用氨水调节pH至8.6—8.8，以2ml耐硷安瓿灌封，流通蒸汽灭菌30分钟。含量为5mg/ml。

处方5：硫辛酸 5.0
 三乙醇胺 3.0
 EDTA—2Na 1.0
 氯化钠 5.0
 注射用水 加至 1000.0

将硫辛酸混悬于注射用水200ml中，加入三乙醇胺，攪拌至硫辛酸溶解，加入氯化鈉及EDTA—2Na攪拌使溶，并加注射用水至1000ml，用氨水調节pH至8.7，加入活性炭0.1%，攪拌15分鐘后，反复过滤至滤液灯檢合格后，灌封于2ml耐硷安瓿中，流通蒸汽灭菌30分鐘。含量为5mg/ml。

处方6：硫辛酸 5.0
甘氨酸 6.75
氫氧化鈉 0.40
注射用水 加至 1000.0

将甘氨酸及氫氧化鈉溶于200ml注射用水中，加入硫辛酸攪拌使溶，于3—5℃冰箱中冷藏一周后，加入活性炭0.1%攪拌15分鐘，过滤，滤液用注射用水稀釋至1000ml，反复过滤至灯檢合格后，灌封于2ml耐硷安瓿中，流通蒸汽灭菌30分鐘。含量为5mg/ml。

(二) 注射液灭菌前后澄明度的观察：

澄明度为评价注射液质量的重要项目之一，试制的注射液如澄明度不合要求，即不能投入生产，因此作者等对上述六种处方所配制的注射液首先按药品规范1959年版所载注射液澄明度检查法^[12]及卫生部“关于修订国产注射液澄明度检查及判断标准的通知”^[13]所规定的要求进行灭菌前后澄明度及色泽变化的观察，以作为初步筛选，然后再作进一步的考查。各种注射液灭菌前后澄明度及色泽变化如表1：

表1 各种不同处方硫辛酸注射液灭菌前后色泽及澄明度变化

处方号码	澄 明 度		色 泽	
	灭 菌 前	灭 菌 后	灭 菌 前	灭 菌 后
1	澄 明	澄 明	无 色	无 色
2	澄 明	有多量微細小白点	无 色	浅黄 (放置后色轉深)
3	澄 明	澄 明	无 色	无 色
4	澄 明	澄 明	无 色	无 色
5	澄 明	有絮状沉淀	微 黄 色	微 黄 色
6	澄 明	有微細白点及白油	无 色	无 色

根据检查结果，处方1，3及4所配制的注射液于灭菌前后澄明度均屬合格，色泽亦无变化，故較为良好，可作进一步考查。处方2所制注射液在灭菌后有多量小白点澄明度不合格，且色泽亦逐渐变黄。处方5、6所制注射液灭菌后有絮状沉淀或有白油，澄明度均不合格。

(三) 貯藏期間質量变化的观察

将上述灭菌后经澄明度检查合格的处方1，3，4三种注射液于配制后分別测定其灭菌前后的pH值，并用中和滴定法测定硫辛酸的含量，然后分別于室温避光保存及在3—5℃冰箱中各貯藏三个月，取出后再作澄明度、pH值檢查及硫辛酸含量测定。以观察在不同条件下貯存三个月后三种注射液的质量变化，其結果如表2：

表2 三种注射液灭菌前后及在不同条件下贮存后的质量变化

检查项目 处方号码	澄 明 度			PH值				硫 辛 酸 含 量					
	貯 藏 前	貯藏三个月后		灭 菌 前	灭 菌 后	貯三個月后		灭菌前	灭菌后	貯藏三个月后		灭菌前后 含量变化	室温貯藏 前后含量 变化
		室 温	冰 箱			室 温	冰 箱			室 温	冰 箱		
1	澄明	澄 明	澄 明	9.12	9.03	8.02	7.78	82.64%	73.27%	67.20%	72.36%	9.37%	6.07%
3	澄明	有极少 白点	有微細 白点	7.08	7.03	6.79	6.75	101.82%	98.67%	85.47%	85.13%	3.15%	13.20%
4	澄明	澄 明	澄 明	8.68	8.68	8.40	8.45	99.78%	97.62%	97.29%	96.94%	2.16%	0.33%

* 由于在灌注的管路中存有较多注射用水因稀释而使含量降低

(四) 毒性試驗

据文献报导^[3]硫辛酸系生理作用物质(维生素),故毒性极小,对大白鼠之LD₅₀系以160—270mg/kg之大量以腹腔注射给药。每天对大白鼠以75mg/kg之剂量皮下注射,連續40天,或每天对小白鼠以15mg/kg腹腔注射,連續60天,結果均无任何异常现象产生。国内资料^[4]亦报导,以硫辛酸鈉注射液按临床最高剂量(20mg/天)以成人体重为50kg計算,換算成动物体重所需之剂量后再增大100倍,肌肉注射連續给药30天,对小白鼠,大白鼠及家兔均未引起毒性反应。为慎重起见,作者等将处方1及处方4所制成的注射液,按南京药学院实验药厂关于硫辛酸注射液急性毒性試驗的方法进行了試驗^[5],即按成人剂量10mg/天計算,經体重換算后增大900倍,腹腔注射于小白鼠体内,于四小时内死亡不超过半数者为合格。同时亦用下列方法作了試驗,即以0.25mg硫辛酸注射液(相当于5mg/ml的注射液0.5ml)腹腔注射于小白鼠体内,于48小时内无一只死亡者为合格。用上述二种方法进行毒性試驗后所得結果分別見表3及表4:

表3 按成人剂量900倍經体重折算后给药結果

处方号码	小 鼠 数	給药量 (mg)	四小时内死亡数	死 亡 百 分 率
1	10	0.36	2	20%
4	10	0.36	4	40%

表4 按0.25mg给药后結果

处方号码	小 鼠 数	給药量 (mg)	四十八小时内死亡数	死 亡 百 分 率
1	15	0.25	0	0%
4	15	0.25	0	0%

三、討 論

1. 于注射液制备过程中发现热处理(100°C)及冷藏(3—5°C)后过滤均有

助于使制得的注射液澄明度較好，此可能系由于在加热及冷藏后使易产生沉淀的物質沉淀而滤除之故，但据Wagner氏^[6]等研究，硫辛酸在光照及受热情况下其中的1—2二硫戊环易于开环，开裂后处于非环状态的分子就倾向于聚合而形成聚合体，因此加热时间过长对硫辛酸本身不利，一般以直火煮沸五分鐘即可。冷藏时间过长則影响生产周期，一般冷藏二天即可，如处方4所制注射液即按上述加热及冷藏条件操作，所得成品的澄明度符合要求。

2. 由于硫辛酸注射液易受二氧化碳的影响而改变pH值，甚至使成品澄明度不合格，故在熔封安瓿时火焰应在安瓿頸部拦腰熔封，勿使安瓿頸口置于火焰中，以免燃烧时产生的二氧化碳被封入安瓿而影响質量。

3. 在試制的六种不同处方硫辛酸注射液中，通过灭菌前后澄明度及色澤变化初选，只有处方1、3、4三种注射液在灭菌后色澤及澄明度均无变化，初步符合注射液的要求，进一步将该三种注射液通过室溫及冰箱貯藏三月后测定pH值及含量变化的考查表明，从pH值变化情况来看，处方1由于系将硫辛酸直接溶解于碳酸氢鈉溶液中而不加其他附加剂，故成品的pH值較高，在灭菌及經貯藏后pH值不稳定，有逐步下降趋势。处方2系将硫辛酸溶于磷酸盐緩冲液中制成，故其pH值在灭菌及貯藏后变化較小，但因在緩冲液中溶入了酸性的硫辛酸，致使其pH值較原来降低（磷酸盐緩冲液原来pH=8.6，溶入硫辛酸后降至7.08），經室溫及冰箱貯藏后pH值分別降至6.79与6.75，均在7.0以下，因而注射液經貯藏后析出白点，澄明度不合格。处方4系将硫辛酸溶于磷酸盐緩冲液后再以氨水調节pH至8.68，然后灌封，在灭菌及貯藏期間由于磷酸盐的緩冲作用而使注射液的pH值变化极微。

从含量变化情况来看，三种注射液經灭菌及貯藏后含量均有所下降，但处方不同則下降的程度亦各不相同，应用流通蒸汽灭菌后，处方1中硫辛酸含量由82.64%降为73.27%，損失9.37%，而应用磷酸盐緩冲液配制的注射液（处方3，4），灭菌后含量損失較小，处方3由101.82%降为98.67%損失3.15%，处方4由99.78%降为97.62%，損失2.16%。如以室溫貯藏后的含量变化进行分析，則处方1經三个月貯藏后含量損失6.07%，处方3損失达13.20%，处方4損失仅0.33%，故灭菌后及貯藏后注射液的pH值及含量变化以处方4較为微小。

綜上所述，在試制的注射液中以处方4所得成品較为稳定，灭菌后及貯藏后pH值及含量变化均較微小，澄明度亦合格。处方1所得成品次之，灭菌及貯藏后pH值及含量变化大于处方4，但澄明度仍良好。其余各处方所得注射液均不符合要求。

4. 毒性試驗的結果表明，按处方1及处方4所配制的二种注射液对小鼠均无急性毒性。

5. 处方4系以磷酸盐緩冲液配制，故所得成品不仅pH值及含量变化較小，且其pH值稳定地保持在8.40—8.68左右，由于其pH值較一般硫辛酸注射液为低，故可减少肌肉注射时的疼痛。

四、結 論

1. 作者等觀察了六種不同處方的硫辛酸注射液的穩定性，通過滅菌前後澄明度檢查作為初選，並進行了室溫及冰箱貯藏後質量變化的考查，結果以處方4（含磷酸鹽緩沖液）所制注射液於滅菌及貯藏後其pH值及含量變化較為微小，澄明度亦符合要求。處方1（硫辛酸溶於碳酸氫鈉溶液中）所得注射液次之，其餘各處方所配注射液不符合要求。

2. 對處方1及處方4所制注射液進行急性毒性試驗的結果表明，此二種注射液均無急性毒性。

3. 上述結果可供生產硫辛酸注射液時參考。

本實驗系在本院藥廠注射劑車間進行，硫辛酸的含量測定系由本院藥廠化驗室分析。

參 考 文 獻

- [1] Guirard, B. M., Arch. Biochem. 1946, 9, 381.
- [2] Reed, L. J., J. Biol. Chem., 1951, 192, 859.
- [3] Reed, L. J., Science, 1951, 93, 114.
- [4] Reed, L. J., Chem. and Eng. News, 1958, April 21.
- [5] Bullock, M. W. et al., J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1828.
- [6] 柴田長夫，藥局（日），1959, 10（5），611—14.
- [7] 和田，綜合臨床（日），1958, 7（10），111.
- [8] 相澤，日本醫事新報，1958, №1809, 7.
- [9] Ger. Pat., 1,047,991, Dec. 31, 1958.
- [10] Ger. Pat., 1,056,784, May, 1959.
- [11] Japan Pat., 15,298. July 27, 1959.
- [12] 藥品規範，上海科技出版社，1959年版，附錄6頁。
- [13] 中華人民共和國衛生部（63）衛藥政字第98號文件“關於修訂國產注射液澄明度檢查及判斷標準的通知”。
- [14] 山東省藥檢所，強肝靈（二硫辛酸）注射液毒性實驗報告，1962.8.
- [15] 南京藥學院實驗藥廠，硫辛酸注射液資料。
- [16] Wagner, A. F. et al., J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5079.

不同年齡人參藥理作用的比較

袁文學 桂綠荷 李綺云 李繼榮

(沈陽藥學院 沈陽藥物研究所)

人參為中醫臨床上常用的重要補養藥。我國東北地區栽培人參一般在5—8年采收，在此期間人參根部發育已達適當程度，此後生長率降低^[1,2]。在應用方面，習慣上認為人參的生長年齡越長質量越好。一般地講，人參的質量優劣應當取決於其生物活性物質含量的高低。但是，人參的生物活性物質在化學方面目前尚未研究清楚，難於用化學的方法直接進行分析檢驗。因此，我們認為目前人參質量的優劣，主要需由其藥理作用強弱來考慮。

近年來，蘇聯和日本學者曾利用人參的某些藥理作用對野生和栽培人參、人參的不同溶媒提出物、不同年齡人參，不同加工人參以及不同產地人參進行過生物檢定或初步比較^[3-5]。我們根據人參具有多方面藥理作用的特點^[3,6]，利用人參對動物活動能力的影響、對離體心臟的作用、人參的抗利尿作用、對動物性活動的影響以及對離體腸管的作用比較了國產4年、7年和14年三種年齡栽培人參的作用。目的在於研究三種不同年齡人參生物活性強度的變化，為選定人參的合理采收年齡提供依據。

材料和方法

人參(*Panax ginseng* C. A. Meyer)系1962年10月采自遼寧省寬甸縣人參場栽培的4年、7年和14年的人參。

製備人參制剂之前，首先刷去新鮮人參根外表的泥土，置於100°C蒸汽中蒸15分鐘。然後風干，再於60°C條件下鼓風干燥至可隨意折斷之程度。取經上述處理干燥後的人參，切去蘆頭和須根，用20%乙醇按中國藥典法製成1:1的制剂，實驗時稀釋成所需之濃度。

實驗中所用的人參劑量均按原生藥去水分的重量折算。各部分實驗的對照組動物均給予人參制剂相應濃度的乙醇溶液在動物活動能力實驗中人參制剂用0.2%乙醇稀釋，故給予0.2%的乙醇，其它實驗均用20%乙醇。

1. 動物活動能力實驗

仿旋轉軸法^[7]設計了一種適用於小白鼠被動活動的旋轉管裝置(圖1)，同時可用16只動物進行實驗。

實驗用體重20—30克的小白鼠，雌雄不限。實驗前首先要訓練、選擇動物。

訓練動物時不給動物任何負重，將不負重的動物置於旋轉管上，以17轉/分的慢速使動物跑動半小時和26轉/分的快速跑動半小時，連續跑動1小時，淘汰在1小時內掉落5次的動物；剩餘的動物為經訓練合格的動物。

經過訓練合格的動物在實驗前還要進行一次選擇。一般動物在訓練後的次日進行選擇。選擇時給動物尾根部縛以6克重的鉛塊，以慢速半小時快速15分鐘強迫動物在旋轉管上跑動45分鐘，淘汰45分鐘內掉落5次的動物，剩餘動物作為實驗備用動物。

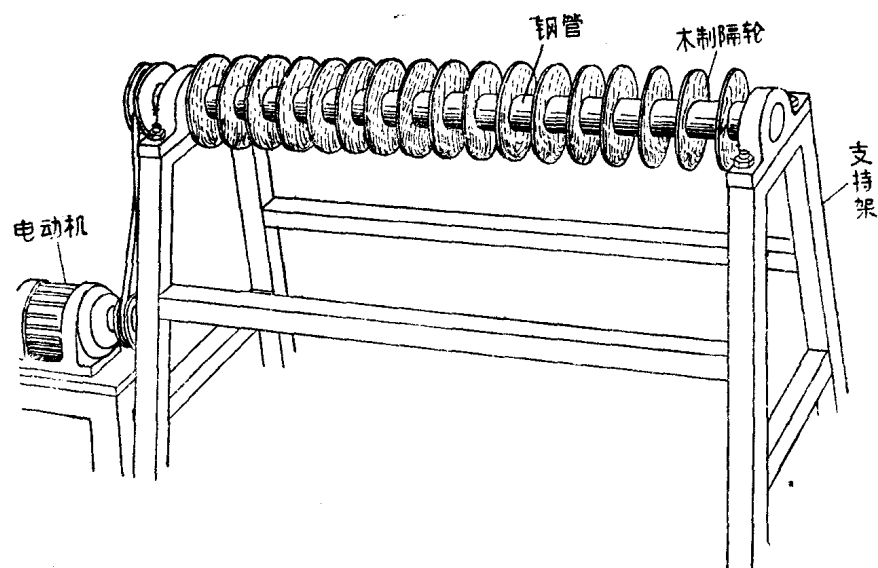


图1 旋轉管裝置

經過訓練和选择的动物一般在1—3天以后进行实验，在实验时还要根据实验的要求淘汰一部分动物。每只动物在实验中重复使用不超过3次，每只动物每次实验的间隔时间至少1周。

实验时先以慢速1小时和随后改为快速1小时使负重的动物在旋轉管上持续跑动，淘汰慢速1小时至快速后15分钟，亦即合计75分钟内掉落5次的动物，剩余的动物继续在旋轉管上跑动，选用120分以内掉落5次的动物进行实验，分别记录每个动物在旋轉管上持续跑动的时间作为第1次跑动时间。每只实验动物在掉落5次后均休息1小时，各个动物在其休息后的半小时分别给予药物。给药后的半小时再以快速不限时间地使动物进行第二次跑动，直至每只动物掉落5次为止，分别记录各个动物第二次跑动时间。实验中均以各组动物第二次平均跑动时间与第一次平均跑动时间的百分比表示动物的活动能力，以比较药物的作用。

2. 离体心脏实验

按八木氏法进行实验。选用体重70—90克的蟾蜍，雌雄不限。实验中以药物刚刚引起心脏收缩幅度增大的浓度做为最小作用浓度，以平均最小作用浓度比较药物的作用。

3. 抗利尿实验

用收集鼠群尿量的方法进行实验。小白鼠体重20—25克，雌雄不限。实验前不控制食物和饮水。实验时首先压迫动物下腹部排空膀胱中的积尿，然后给药。给药后立即腹腔注射蒸馏水1毫升/只，将每5只动物放入一收尿装置中，随时用1毫升注射器吸取尿液，每小时记录一次，以两小时内动物的平均尿量比较药物的作用。

4. 动物性活动实验

采用阴道涂片法^[9]进行实验。实验用成熟雌性未孕小白鼠，体重20—25克。实验过程中每天涂片一次，观察给药前后动物动情期的变化，以给药前各组动物动情期天数占给药前观察天数的百分数与给药后各组动物动情期天数占给药后观察天数的百分数差值