

丹参水提液的纳滤浓缩工艺考察

时浩¹, 李存玉¹, 瞿其扬¹, 段煜¹, 彭国平^{1,2}, 金芳^{3*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023;
3. 国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038)

[摘要] 目的: 摸索丹参水提液的纳滤浓缩工艺。方法: 选择热不稳定成分丹酚酸 B 为检测对象, 采用 HPLC 测定丹酚酸 B 保留率, 检测波长 281 nm, 流动相乙腈(A)和 1% 冰乙酸(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~15% A; 20~50 min, 15%~40% A)。以丹酚酸 B 保留率和膜通量为指标, 通过单因素试验分析截留相对分子量、操作压力、吸附特征等因素对丹参水提液浓缩工艺的影响。结果: 丹酚酸 B 的保留率随着膜相对分子量减小而增大, 受压力、浓缩倍数的影响较小; 膜通量与压力、截留相对分子量呈正相关, 随着浓缩倍数的增大而减小; 孔径 300 Da 纳滤膜对丹酚酸 B 的保留率 99.5%, 膜通量 12 L·m⁻²·h⁻¹, 对丹参药材中其他成分无明显影响, 且浓缩效率高。结论: 纳滤浓缩适用于含热不稳定类成分的药液浓缩, 效率高且成分损失少。

[关键词] 丹酚酸 B; 纳滤工艺; 丹参; 膜通量; 保留率

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0043-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170043

Analysis of Nanofiltration Enrichment Process of Extract Solution of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

SHI Hao¹, LI Cun-yu¹, QU Qi-yang¹, DUAN Yu¹, PENG Guo-ping^{1,2}, JIN Fang^{3*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China; 3. Center for Drug Evaluation, Beijing 100038, China)

[Abstract] **Objective:** To find out nanofiltration enrichment process of extract solution of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. **Method:** Taking salvianolic acid B as detection object, HPLC was employed to determine retention rate of salvianolic acid B with mobile phase of acetonitrile (A) -1% acetic acid (B) for gradient elution (0-20 min, 5% -15% A; 20-50 min, 15% -40% A) and detection wavelength at 281 nm. With retention rate and membrane flux of salvianolic acid B as indexes, effects of operating pressure, adsorption characteristics and other factors on concentration process were investigated by single factor tests. **Result:** Retention rate of salvianolic acid B increased with decreasing of aperture and unchanged with change of pressure and cycles of concentratin. Membrane flux was positively correlated with intercept relative molecular weight and pressure, decreased as concentration ratio increased. Retention rate of salvianolic acid B was 99.5% when nanofiltration membranes aperture was 300 Da, membrane flux was 12 L·m⁻²·h⁻¹, this process had no obvious influence to other ingredients in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* with high concentration efficiency. **Conclusion:** Nanofiltration concentration is useful for concentrating liquid including thermal instability class ingredients, it has high efficiency and low losses of active ingredients.

[Key words] salvianolic acid B; nanofiltration process; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; membrane flux; retention rate

[收稿日期] 20140610(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373980); 南京中医药大学青年自然科学基金项目(13XZR24)

[第一作者] 时浩, 在读硕士, 从事中药化学研究, Tel: 025-86798186, E-mail: shihao8659@163.com

[通讯作者] * 金芳, 主任药师, 从事中药学研究, Tel: 010-68585566, E-mail: jinf@cde.org.cn

丹参归心、肝经,药性微寒,味苦,无毒,具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦的功效^[1]。该药味已被广泛用于中药制剂品种,如以丹参为主要原材料的注射剂——丹参川芎注射液、丹参注射液、复方丹参注射液等^[2];但由于丹参中含有不稳定性主要活性成分——酚酸类成分,加热极易分解,而这些制剂在生产中均存在加热浓缩工艺,致使有效成分损失较大且无法避免。纳滤是一种介于超滤和反渗透之间的膜分离过程,可截留相对分子质量 200 ~ 1 000 Da 的有机物,而药材中有效成分的相对分子质量大都介于 100 ~ 1 000 Da^[3],因此纳滤适于中药有效成分的精制和浓缩^[4-5]。与传统热浓缩相比,纳滤浓缩具有节能、可连续操作、生物活性保存完好、便于自动化等优点,非常适用于中药制剂的浓缩,但该技术在中药制剂生产中应用尚处于起步阶段,类似的研究较少。本实验采用 3 种不同孔径纳滤膜处理丹参提取液,通过 HPLC 测定丹酚酸 B 保留率,以丹酚酸 B 保留率和膜通量为评价指标,确定最佳纳滤浓缩工艺,为中药有效成分的浓缩提供新方法。

1 材料

XX8200230 型蠕动泵(美国密理博公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),FA2204 型电子天平(上海安亭电子仪器厂)。纳滤膜(聚酰胺复合膜,截留相对分子质量 150,300,600 Da,南京拓钰医药科技有限公司),卷式超滤膜(聚醚砜,截留相对分子质量 300 kDa,南京拓钰医药科技有限公司),卷式微滤膜(聚偏氟乙烯,孔径 0.2 μm,南京拓钰医药科技有限公司)。丹参采自安徽亳州,批号 2014021001,经南京中医药大学中药鉴定教研室吴启南教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;原儿茶酸、丹参素钠、丹酚酸 B 对照品(中国食品药品检定研究院,纯度均 > 98%,批号分别为 110809-201205,110855-201311,111562-200807),乙腈、乙酸为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参水提液的制备^[6] 称取丹参药材 1 kg,分别加 12,10 倍量水直接煎煮 2 次,煎煮时间分别为 1 h 和 40 min,收集提取液约 20 L。

2.2 丹参水提液的纳滤工艺 取丹参水提液于 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,经 0.2 μm 微滤滤过去除丹参提取液中固体颗粒物质;通过 300 kDa 超滤膜超滤以去除大分子物质,得超滤透过液作为原料

液进行纳滤浓缩试验,同时收集微滤前液和微滤透过液。将原药液分为 3 份,每份 2 L,分别用不同孔径纳滤膜进行纳滤操作,在不同压力下收集纳滤前液、纳滤透过液和纳滤浓缩液进行测定。

2.3 丹酚酸 B 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Thermo scientific C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,检测波长 281 nm,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,流动相乙腈(A)和 1% 冰乙酸(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% ~ 15% A; 20 ~ 50 min, 15% ~ 40% A)。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸、丹参素钠、丹酚酸 B 对照品适量,加 75% 甲醇制成适应质量浓度的混合对照品溶液。

2.4 膜参数的测定 微滤、超滤膜对丹酚酸 B 的透过率按 $T_1 = C_1/C_2 \times 100\%$ 计算,式中 T_1 表示丹酚酸 B 的透过率, C_1 表示微滤、超滤前药液中丹酚酸 B 的质量浓度, C_2 表示滤液中丹酚酸 B 质量浓度。纳滤膜对丹酚酸 B 的保留率按 $T_2 = (1 - C_3/C_4) \times 100\%$ 计算,式中 T_2 表示丹酚酸 B 的保留率, C_3 表示纳滤前药液中丹酚酸 B 质量浓度, C_4 表示滤液中丹酚酸 B 质量浓度。膜通量为单位时间单位面积内通过纳滤膜的液体体积,按 $J = Q/TS$ 计算,式中 J 表示纳滤膜通量, Q 表示透析液体积, T 表示浓缩时间, S 表示纳滤膜面积。纳滤膜对丹酚酸 B 吸附率按 $X = (1 - C_5/C_6) \times 100\%$ 计算, X 表示丹酚酸 B 的吸附率, C_5 表示纳滤前药液中丹酚酸 B 质量浓度, C_6 表示平衡液中丹酚酸 B 质量浓度。

2.5 药液前处理对丹酚酸 B 的影响 超滤前处理选用微滤膜孔径 0.2 μm 和超滤膜孔径 300 kDa 在 200 kPa, 25 °C 条件下进行过滤,收集滤前液和滤液,计算透过率分别为 99.8%, 99.4%;膜通量依次为 50, 45 L·m⁻²·h⁻¹。结果表明 0.2 μm 微滤膜和 300 kDa 超滤膜对丹酚酸 B 透过率均很高,适用于丹参水提液纳滤浓缩的前处理。

2.6 不同孔径纳滤膜对丹酚酸 B 的影响 在 400 kPa, 25 °C 条件下,比较不同孔径(150, 300, 600 Da)纳滤膜对丹酚酸 B 保留率和膜通量的影响,结果保留率分别为 99.7%, 99.5%, 71.4%,膜通量依次为 8, 12, 24 L·m⁻²·h⁻¹,表明随着孔径增大丹酚酸 B 的保留率在降低,膜通量则在升高。截留相对分子质量 600 Da 纳滤膜虽然膜通量最大,但丹酚酸 B 损失较多,而 150 Da 纳滤膜与 300 Da 纳滤膜对丹酚酸 B 的截留率相差不大,但后者膜通量大。

2.7 不同压力对纳滤影响 在固定温度(25 °C)和

相同原药液条件下,比较不同压力下将丹酚酸 B 提取液浓缩 10 倍的膜通量和截留率,结果见表 1,表明随着操作压力的增大膜通量逐渐增大,但丹酚酸 B 的截留率无明显影响。膜通量随着操作压力的增加基本上呈线性变化,但压力从 400 ~ 500 kPa 变化趋于平缓,又因压力过大容易产生浓差极化,故选择压力差为 400 kPa。

表 1 不同孔径纳滤膜在不同压力下的丹酚酸 B 膜通量
 $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$

压力/kPa	150 Da	300 Da	600 Da
100	2.3	3.1	8.6
200	3.5	5.0	13.3
300	5.1	7.5	17.1
400	8.0	12.0	20.0
500	9.0	11.0	21.0

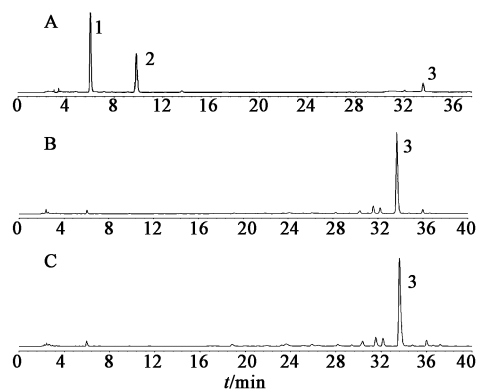
2.8 纳滤膜对丹酚酸 B 吸附作用的影响 在固定压力(400 kPa)和温度(25 ℃)条件下进行纳滤操作,药液循环平衡一定时间,让纳滤膜充分吸附饱和,取纳滤操作前药液和充分平衡完药液进行测定,计算 3 种不同孔径(150,300,600 Da)纳滤膜对丹酚酸 B 吸附率依次为 0.37%,0.31%,0.35%,膜通量分别为 8,12,20 $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$,结果表明 TFC 材质纳滤膜对丹酚酸 B 的吸附率较小,适用于丹酚酸 B 浓缩。

2.9 浓缩液与原药液色谱图比较 在 400 kPa,25 ℃条件下进行纳滤操作,选择 300 Da 纳滤膜将丹酚酸 B 提取液浓缩一定倍数,取纳滤操作前药液和浓缩液进行色谱图对比,见图 1。结果表明纳滤浓缩不仅使得丹酚酸 B 保留率高,丹参中其他成分保留率也高,而且成分间比例未发生明显变化,提示纳滤浓缩适用于丹酚酸 B 和丹参中其他成分。

3 讨论

丹酚酸 B 含量随温度变化符合一级动力学方程。丹参水提液常规热浓缩随着温度升高,丹酚酸 B 损失严重^[7]。相对于传统热浓缩工艺,纳滤浓缩是一种物理过程,没有相变,具有高效、节能、成品活性成分保存良好等优点,而且本文选取纳滤膜对其具有很好的保存作用(截留率达 99%,吸附率 0.37%),说明纳滤浓缩工艺相对于传统浓缩工艺更适用于丹酚酸 B 的浓缩。

中药提取液含有大量相对分子质量较大的蛋白质、多糖、鞣质等成分,直接用纳滤浓缩会造成膜污染,降低膜通量,故本文提出微滤、超滤加纳滤工艺



A. 混合对照品;B. 纳滤前药液;C. 纳滤后浓缩液;
1. 原儿茶酸;2. 丹参素钠;3. 丹酚酸 B

图 1 丹参水提液 HPLC

模式,微滤可去除丹参提取液中固体颗粒物,超滤可去除大分子物质,而且对丹酚酸 B 基本无影响(微滤透过率 99.7%,超滤透过率 99.4%),有效提高了纳滤膜通量,降低膜污染,提高纳滤浓缩工艺的效率。

中药含有不少热不稳定有效成分,且不少被用于中药制剂中,例如金银花中绿原酸、青风藤中青藤碱、丹参中丹酚酸 B 等,均被广泛应用于中药制剂中。传统加热浓缩工艺避免不了对这些热不稳定成分造成损失。已有不少文献报道使用膜工艺对这些不稳定性成分进行浓缩^[4-5],结果发现使用纳滤浓缩可以避免有效成分损失,提高浓缩效率,进而提高中药制剂的质量,具有广泛应用前景。

[参考文献]

- [1] 李认书,李永强. 丹酚酸的研究进展[J]. 时珍国医国药,2003,14(6):371.
- [2] 沈建芳,汪红. 加热 pH 值对丹参中丹酚酸 B 稳定性的影响[J]. 中华中医药学刊,2010,28(7):1531.
- [3] 胡伟,李湘洲,孟维,等. 膜分离技术在植物有效成分分离与纯化中的应用进展[J]. 化学工程与装备,2009,6(6):95.
- [4] 潘方勇,谢鑫,王聪. 膜技术分离纯化金银花绿原酸的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(10):107.
- [5] 丁礼琴,刘力,徐德生. 纳滤在制药及食品中的应用进展[J]. 中成药,2008,30(8):1199.
- [6] 谢凯,赵磊磊,姜红宇,等. 近年来丹参提取工艺的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(10):68.
- [7] 林青,黄琳,肖晓丽,等. 丹参水提液中丹酚酸 B 湿热降解动力学研究[J]. 中国现代中药,2008,10(8):29.

[责任编辑 刘德文]