

超滤工艺对丹参注射液中有效成分的影响研究

熊海伟, 彭国平, 过科家, 居玲玲, 文红梅*
(南京中医药大学中医药研究院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 采用正交试验法, 研究超滤工艺对丹参注射液有效成分的影响。方法: 以丹参素钠、原儿茶醛为检测指标, 观察其有效成分超滤前后的成分变化, 并采用正交试验法考察不同孔径聚砜膜(PS膜)、操作压力、操作温度以及原液浓度对有效成分透过率的影响。结果: 正交结果显示, 超滤膜的孔径对丹参素钠和原儿茶醛的动态透过率有显著的影响, 此外, 聚砜膜对丹参素钠和原儿茶醛还有微量的吸附作用。结论: 该研究为丹参注射液的工艺优化提供参考。

[关键词] 丹参注射液; 丹参素钠和原儿茶醛; 超滤工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)12-0034-04

丹参是活血化瘀的要药, 丹参的有效成分主要分为脂溶性和水溶性的成分两大类。丹参注射剂是用其水溶性部位。研究表明其水溶性成分主要是丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸等, 这些成分多具有酚酸性结构^[1]。具有提高冠心血流量, 降低心肌耗氧, 降低血压, 预防动脉粥样硬化, 保护缺血心肌等作用^[2]。

采用超滤膜对各类中药成分适用性的研究过程中发现丹参有效成分的透过率受诸多因素的影响^[3], 为了能更好地将膜分离技术用于中药注射液, 本实验根据丹参注射液的不同规格(小针剂、粉针、大输液)的需要, 以丹参注射液中有有效成分(丹参素钠、原儿茶醛)为研究对象, 采用正交试验法考察超滤工艺对丹参水溶性有效成分的影响, 为丹参注射液的工艺优化提供客观的技术指导。

1 仪器与试剂

中空纤维聚砜膜(PS膜)(截留分子量值分别为10 000、30 000、50 000, 天津膜天膜工程技术有限公司生产), Millipore 蠕动泵(Masterflex I/P 美国 Millipore 公司), Agilent 1100 液相色谱系统: 四元泵、DAD 检测器(美国安捷伦公司)。

丹参药材: 购于南京市药材公司, 经本校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。

丹参原液提取: 称取丹参药材 5 kg, 分别加 10.8 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并 2 次上清液后浓缩至 2 L, 加入 95% 乙醇约 8 L, 静置, 滤取上清液, 回收乙醇至 2 L。再加 95% 乙醇约 16 L, 静置, 滤取上清液, 加入 20% NaOH 溶液 100 mL, 放置 12 h, 减压回收至无醇味, 加水配成 5 000 mL(原液浓度为 1 g 生药/mL)。

原儿茶醛对照品(批号: 110749-200511)、丹参素钠对照品(批号: 110736-200526)均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇(江苏汉邦科技有限公司)为色谱纯; 水为重蒸馏水; 醋酸(南京化学试剂一厂)为分析纯。

2 方法和结果

2.1 正交实验设计^[4] 为了能够更确切地反映膜分离工艺条件, 结合丹参水溶性成分的特点, 采用生产上常用的中空纤维聚砜膜(PS膜)对丹参原液进行膜分离研究, 将原液配制成不同的浓度(与粉针、小针、大输液相近的浓度), 以正交试验法, 主要考察了膜分离过程中的四个主要影响因素, 分别为: 超滤过程中的操作压力(A)、操作温度(B)、原液的浓度(C)和超滤膜的截留分子量(D)。每个因素选择 3 个水平, 各因素水平表见表 1。

2.2 原液的制备 取丹参原液适量, 加蒸馏水分别稀释成浓度为 0.7 g 生药/mL、0.2 g 生药/mL 和 0.06 g 生药/mL 的溶液。分别留样 5 mL, 作为丹参原液

[收稿日期] 2007-11-19

[基金项目] 国家“十一五”攻关项目“中药现代提取分离技术研究”(2006BAI06A04-04); 江苏高校高新技术产业发展项目“膜分离技术用于中药注射剂的产业化研究”(JHB05-27)

[通讯作者] * 文红梅, Tel: (025) 86798269; E-mail: plum_wen@sina.com

$V_{原液}$ 的供试品, 供 HPLC 色谱分析。

表 1 因素水平表

因素水平	操作压力 MP		操作温度 °C		原液浓度 g 生药/mL	膜孔径 D
	A	B	B	C		
1	0.02	15	0.70	10k		
2	0.04	30	0.20	30k		
3	0.06	45	0.06	50k		

2.3 膜分离过程的操作方式以及取样方法 每次取适量的丹参原液置于已用蒸馏水处理过的膜分离装置中, 开泵预平衡, 超滤液和截留液返回循环药液, 待药液循环平衡 1 h 后, 开始收集超滤液, 进行超滤, 直至药液全部滤过。考虑到实际的生产情况, 超滤时将截留液返回循环药液中, 这部分混合液统称为滤前液。

取样方式 分别在超滤开始, 超滤液体积为原液体积的 1/3 和超滤液体积为原液体积的 2/3 3 个时间点, 精密吸取超滤液和滤前液各 5 mL, 将三个时间点收集的超滤液 ($V_{0超滤液}$ 、 $V_{1/3超滤液}$ 、 $V_{2/3超滤液}$) 和滤前液 ($V_{0滤前液}$ 、 $V_{1/3滤前液}$ 、 $V_{2/3滤前液}$) 样品作为供试品, 供 HPLC 色谱分析。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: phenomenex C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) (费罗门公司, 美国), 流动相: 甲醇 (A)-1% 冰醋酸溶液 (B) 梯度洗脱, 梯度洗脱程序如下:

时间 (min)	甲醇 (%)	1% 醋酸 (%)
0	2	98
15	8	92
35	45	55
45	60	40
60	80	20

流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 280 nm, 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量: 10 μ L

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠对照品适量, 加甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.28 mg 的溶液, 作为丹参素钠对照品溶液; 精密称取原儿茶醛对照品适量, 加甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.05 mg 的溶液, 作为原儿茶醛对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取 2.2 项下制得的供试品, 作为丹参注射液的低、中、高浓度的原液的供

试品溶液; 取 2.3 项下制得的供试品, 作为超滤液和滤前液的供试品溶液。

2.4.4 测定法 精密吸取各供试液 10 μ L 注入高效液相色谱仪中分析, 计算各供试品中丹参素钠和原儿茶醛的浓度。

2.4.5 实验结果 动态透过率 1(2,3) (%) = 超滤液 $V_{0超滤液}$ ($V_{1/3超滤液}$ 、 $V_{2/3超滤液}$) 中有效成分的浓度 \div 滤前液 $V_{0滤前液}$ ($V_{1/3滤前液}$ 、 $V_{2/3滤前液}$) 中有效成分的浓度 \times 100%

动态吸附率 1(2,3) (%) = [原液 $V_{原液}$ 中有效成分浓度 - 滤前液 $V_{0滤前液}$ ($V_{1/3滤前液}$ 、 $V_{2/3滤前液}$) 中有效成分浓度] \div 原液 $V_{原液}$ 中有效成分浓度 \times 100%

平均动态透过率 (%) = [动态透过率 1 (%) + 动态透过率 2 (%) + 动态透过率 3 (%)] \div 3

平均动态吸附率 (%) = [动态吸附率 1 (%) + 动态吸附率 2 (%) + 动态吸附率 3 (%)] \div 3

以丹参有效成分的平均动态透过率、平均动态吸附率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 计算正交结果见表 2, 方差分析见表 3~ 表 6。

2.5 结果与讨论

2.5.1 直观分析 丹参素钠和原儿茶醛动态透过率影响因素大小顺序为 $D > A > C > B$, 膜孔径是主要的影响因素, 其次是操作压力。其中丹参素钠膜分离过程的动态透过率均大于 90%, 受各类因素影响较小。而原儿茶醛受膜孔径的影响略大。超滤膜对丹参素钠动态吸附率的影响因素大小顺序为 $C > D > A > B$, 原儿茶醛动态吸附率的影响因素大小顺序为 $D > C > A > B$, 原液浓度和膜孔径是影响两者吸附的主要因素。

2.5.2 方差分析 根据正交试验结果, 考虑到温度对丹参有效成分透过率无显著影响, 将其列为误差项。结果表明 A, B, C, D 因素对丹参素钠和原儿茶醛的动态透过率都有一定的影响, 其中因素 D (膜孔径) 有较显著的影响。膜管的使用温度为 5~ 45 $^\circ\text{C}$, 一般选择室温 30 $^\circ\text{C}$ 时为操作温度。原液浓度对丹参素钠的动态吸附率有显著的影响, 而膜孔径对原儿茶醛动态吸附率影响最大。所以丹参注射液 (小针剂) 的膜分离过程可以参照 0.7 g 生药/mL 原液的研究结果, 考虑使用 $A_3B_2C_1D_3$ 为最佳工艺; 丹参滴注射液 (大输液) 的膜分离过程可以参照 0.06 g 生药/mL 原液的研究结果, 考虑使用 $A_1B_2C_3D_3$ 为最佳工艺。

表 2 L₉(3⁴) 正交实验设计表及结果

实验号	操作压力	操作温度	原液浓度	膜孔径	平均动态透过率%		平均动态吸附率%	
	(MP)	(°C)	(g 生药/mL)	D	丹参素钠	原儿茶醛	丹参素钠	原儿茶醛
	A	B	C					
1	0.02	15	0.7	10k	97.46	78.38	6.32	21.77
2	0.02	30	0.2	30k	97.10	91.19	8.28	13.10
3	0.02	45	0.06	50k	104.05	93.63	0.52	14.74
4	0.04	15	0.2	50k	98.68	93.91	4.76	11.51
5	0.04	30	0.06	10k	91.64	63.83	-3.42	92.76
6	0.04	45	0.7	30k	96.94	93.78	9.97	12.96
7	0.06	15	0.06	30k	96.95	84.98	1.20	44.63
8	0.06	30	0.7	50k	102.30	93.26	4.95	12.54
9	0.06	45	0.2	10k	94.45	59.37	2.78	44.44
<i>J</i> ₁	298.61	293.09	296.7	283.55				
<i>J</i> ₂	287.25	291.04	290.23	290.98				
<i>J</i> ₃	293.70	295.43	292.63	305.03				
<i>R_J</i>	11.36	4.40	6.47	21.48				
<i>K</i> ₁	263.21	257.26	265.42	201.58				
<i>K</i> ₂	251.52	248.29	244.47	269.95				
<i>K</i> ₃	237.61	246.78	242.44	280.80				
<i>R_K</i>	25.6	10.48	22.98	79.21				
<i>X</i> ₁	15.12	12.279	21.24	5.679				
<i>X</i> ₂	11.31	9.81	15.819	19.449				
<i>X</i> ₃	8.931	13.269	-1.701	10.23				
<i>R_X</i>	6.189	3.459	22.941	13.77				
<i>Y</i> ₁	49.611	77.91	47.271	158.97				
<i>Y</i> ₂	117.231	118.401	69.051	70.689				
<i>Y</i> ₃	101.61	72.141	152.13	38.79				
<i>R_Y</i>	67.62	46.26	104.859	120.18				

表 3 丹参素钠动态透过率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 临界值	<i>P</i> (显著性)
A	21.600	2	10.8	6.683	—
B	3.232	2	1.616	1.000	—
C	7.128	2	3.564	2.205	—
D	79.318	2	39.659	24.541	*
误差 B	3.232	2	1.616		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$, * $P < 0.05$ (以下同)

表 4 原儿茶醛动态透过率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 临界值	<i>P</i> (显著性)
A	109.418	2	54.409	5.099	—
B	21.457	2	10.7285	1.000	—
C	107.900	2	53.95	5.029	—
D	1229.776	2	614.888	57.314	*
误差 B	21.457	2	10.7285		

表 5 丹参素钠动态吸附率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 临界值	<i>P</i> (显著性)
A	6.500	2	3.25	3.070	—
B	2.117	2	1.054	1.000	—
C	95.841	2	47.921	45.272	*
D	32.814	2	16.407	15.500	—
误差 B	2.117	2	1.054		

表 6 原儿茶醛动态吸附率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 临界值	<i>P</i> (显著性)
A	835.605	2	417.803	1.972	—
B	423.636	2	211.818	1.000	—
C	2041.364	2	1020.682	4.819	—
D	2583.800	2	1291.9	6.099	—
误差 B	423.636	2	211.818		

2.5.3 讨论 丹参原液在低浓度(0.06 g 生药/mL)时,发现超滤液中原儿茶醛的含量反而高于滤前液

中的含量,推测可能是由于聚砜膜材质(PS膜)对丹参中原儿茶醛有一定的吸附作用。在高浓度时,由于滤前液中有效成分含量高,微量的成分吸附不明显。所以在计算其成分透过率时,采用的是超滤液和原液中成分含量的比值,并采用校正因子对数据进行了校正,以减小吸附作用对试验结果的影响。

[参考文献]

[1] 杜冠华,张均田.丹参现代研究概况与进展(续一)

[J].医药导报,2004,23(6):355-359.

[2] 赵敏.丹参注射液临床应用研究进展[J].中国乡村医药杂志,2004,11(4):44-45.

[3] 郭立玮,金万勤,彭国平.21世纪的植物药深加工现代化技术——膜分离[J].南京中医药大学学报,2000,16(2):65-67.

[4] 孔焕宇,杨丽平,陈玉武,等.复方中药银黄口服液有效成分膜分离工艺及正交实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(3):1-3.