

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2024.04.002

· 实验研究 ·

超滤工艺对香丹注射液有效成分的影响分析

张小军

广东雷允上药业有限公司, 广东云浮 527300

摘要 **目的** 明确香丹注射液中有效成分在不同超滤条件下的差异, 确定香丹注射液超滤工艺的最优条件。**方法** 采用正交试验设计, 以超滤装置进出口压力差、药液温度、药液 pH 值和超滤膜的截留分子量为因素, 以香丹注射液中丹参素与原儿茶醛平均透过率为指标, 评估超滤工艺各试验条件下香丹注射液有效成分的差异。**结果** 正交试验结果显示, 丹参素和原儿茶醛平均透过率最高的超滤工艺条件为超滤膜截留分子量 30 KDa, 超滤装置进出口压力差 0.08 MPa, 药液 pH 值 9.0, 药液温度 20 °C。丹参素及原儿茶醛平均透过率方差分析结果显示, 除超滤膜截留分子量外, 均 $P > 0.05$ 。**结论** 丹参素和原儿茶醛 2 种成分的超滤工艺影响因素基本一致, 超滤膜的截留分子量对香丹注射液有效成分有显著的影响, 其余因素的影响不显著。优化后超滤工艺对香丹注射液中有效成分影响较小, 相对稳定, 适用性强。

关键词 超滤; 香丹注射液; 丹参素; 原儿茶醛; 正交设计; 透过率

中图分类号 R284.1 **文献标志码** A

Analysis of the Effect of Ultrafiltration Process on the Effective Components of Xiangdan Injection

ZHANG Xiaojun

Guangdong Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Yunfu 527300, China

Abstract **Objective** To clarify the differences in effective components of Xiangdan injection under different ultrafiltration conditions, and to determine the optimal conditions for the ultrafiltration process of Xiangdan injection. **Methods** The orthogonal experimental design was adopted, with the pressure difference between the inlet and outlet of the ultrafiltration device, the temperature of the medication, the pH value of the medication, and the molecular weight of the ultrafiltration membrane as factors. The average transmittance of Danshensu and Protocatechualdehyde in Xiangdan injection were used as the indicators, the differences in the effective components of Xiangdan injection under various experimental conditions of ultrafiltration process were evaluated. **Results** The results of the orthogonal experimental showed that the ultrafiltration process conditions with the highest average transmittance of Danshensu and Protocatechualdehyde were as follows: the molecular weight of the ultrafiltration membrane was 30 KDa, the pressure difference between the inlet and outlet of the ultrafiltration device was 0.08 MPa, the pH value of the medication was 9.0 and the temperature of the medication was 20 °C. The results of variance analysis of the average transmittance of Danshensu and Protocatechualdehyde showed that except for the molecular weight of the ultrafiltration membrane, all $P > 0.05$. **Conclusion** The factors affect the ultrafiltration process of Danshensu and Protocatechualdehyde were basically the same. The molecular weight of the ultrafiltration membrane has a significant influence on the effective components of Xiangdan injection, while the influence of other factors was not significant. The optimized ultrafiltration process has little effect on the effective components of Xiangdan injection, was relatively stable, and has strong applicability.

Key words ultrafiltration; Xiangdan injection; Danshensu; Protocatechualdehyde; orthogonal design; transmittance

香丹注射液是由丹参和降香 2 味药材制备而成的中药注射剂,临床上多用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等疾病的治疗^[1-2]。香丹注射液有效成分为酚酸类化合物,包括丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、迷迭香酸等,该类成分分子量较小,水溶性较好,多用于香丹注射液的质量评估^[3]。超滤工艺是一种借助不同物质分子量差异对中药提取液实现分离提纯操作的技术,目前中药注射液生产过程中多采用超滤工艺对热原、大分子蛋白、鞣质、细菌等进行有效滤除,减少不良反应发生,但该过程亦存在有效成分损失的风险^[4-5]。因此,本研究以香丹注射液中丹参素和原儿茶醛有效成分的平均透过率为指标,筛选出香丹注射液超滤工艺的最优工艺参数,并验证其适用性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超滤设备:中空纤维膜(PS,截留分子量为 3 KDa、10 KDa、30 KDa,厦门膜天膜科技有限公司),Millipore 蠕动泵。高效液相色谱仪(含有在线脱气机、二元泵、自动进样器、PDA 检测器,Waters),万分之一电子天平(上海梅特勒)。

原儿茶醛(protocatechuic aldehyde,批号 110703-201913,纯度 96.9%)、丹参素钠(Salvianic acid A sodium,批号 110704-202021,纯度 95.7%)均购自中国食品药品检定研究院。丹参提取物中间体(自制,20220203),降香提取物中间体(自制,20220507),乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),磷酸为色谱纯(Honeywell,M2220),水为纯净水(娃哈哈股份有限公司)。

1.2 正交试验

1.2.1 正交试验设计

以正交试验法,考察超滤过程中的主要影响因素对香丹注射液中有效成分含量的影响,主要影响因素包括超滤装置进出口压力差(A)、药液温度(B)、药液 pH 值(C)和超滤膜的截留分子量(D)。每个因素设定 3 个水平,各因素水平表见表 1。

表 1 各因素水平表

水平	A(MPa)	B(°C)	C	D(KDa)
1	0.04	20	7.0	3
2	0.06	30	8.0	10
3	0.08	40	9.0	30

1.2.2 超滤前液制备

分别称取丹参提取物中间体、降香提取物中间体适量,混合均匀,用注射用水溶解,稀释至相应浓度,

即得香丹注射液超滤前液。将上述香丹注射液超滤前液加入适量 20% 氢氧化钠溶液调节 pH 至相应数值,置于水浴锅在相应温度下保温存放,即得各试验条件下超滤前液。

1.2.3 超滤操作

取注射用水预处理超滤系统,依次按表 1 试验条件更换超滤膜、设定超滤装置进出口压力差,平衡系统 20 min,加入各试验条件下超滤前液适量,进行超滤试验,分别于 V_0 (超滤开始)、 $V_{1/3}$ (超滤体积 1/3 总体积)、 $V_{2/3}$ (超滤体积 2/3 总体积)3 个点取样。

1.3 含量测定

1.3.1 色谱条件

色谱柱选用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(2.1 mm×100 mm,1.8 μ m),流动相 A 为 0.05% 磷酸水溶液,流动相 B 为乙腈溶液,按表 2 进行梯度洗脱;流速为 0.4 mL/min,检测波长为 280 nm,柱温为 40 °C,进样量为 2 μ L。洗脱条件见表 2。

表 2 液相系统洗脱条件

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	93	7
1.8	79	21
6.0	75	25
8.0	65	35
8.5	10	90
10.5	10	90
11.0	93	7
12.0	93	7

1.3.2 对照品溶液制备

分别称取原儿茶醛和丹参素钠对照品适量,精密称定,置入 50 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声使其溶解,定容至刻度,作为单标对照品储备溶液。分别精密量取各单标对照品储备溶液适量,置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制备混合对照品储备溶液。

1.3.3 供试品溶液制备

精密移取各点超滤液或超滤前液 2 mL,置于 50 mL 容量瓶,甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

1.4 计算平均透过率

动态透过率 $V_0(V_{1/3}, V_{2/3})$ (%) = 超滤液 $V_0(V_{1/3}, V_{2/3})$ 中丹参素或原儿茶醛总含量 ÷ 截留液 $V_0(V_{1/3}, V_{2/3})$ 中丹参素或原儿茶醛总含量 × 100%。

平均透过率(%) = (V_0 透过率 + $V_{1/3}$ 透过率 + $V_{2/3}$ 透过率) ÷ 3。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行正交设计资料的方差分析 (F 检验); 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正交试验设计

丹参素和原儿茶醛平均透过率最高的超滤工艺条件为 $D_3A_3C_3B_1$ (序号 3), 即超滤膜截留分子量为 30

KDa, 超滤装置进出口压力差为 0.08 MPa, 药液 pH 值为 9.0, 药液温度为 20 ℃。见表 3。

2.2 丹参素平均透过率方差分析

经 F 检验, 与 $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 相比, 除 D 因素外, 均 $P > 0.05$ 。见表 4。

2.3 原儿茶醛平均透过率方差分析

经 F 检验, 与 $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 相比, 除 D 因素外, 均 $P > 0.05$ 。见表 5。

表 3 香丹注射液有效成分影响 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表及结果

序号	A(MPa)	B(℃)	C	D(KDa)	平均透过率(%)	
					丹参素	原儿茶醛
1	0.04	40	9.0	3	98.22	77.89
2	0.06	30	9.0	10	98.48	89.32
3	0.08	20	9.0	30	100.12	96.45
4	0.08	40	8.0	10	98.29	93.42
5	0.04	30	8.0	30	99.21	93.19
6	0.06	20	8.0	3	97.12	75.89
7	0.06	40	7.0	30	98.58	87.13
8	0.08	30	7.0	3	98.84	78.42
9	0.04	20	7.0	10	98.02	87.89
K_1	295.45	295.26	295.44	294.18		
K_2	294.18	296.53	294.62	294.79		
K_3	297.25	295.09	296.82	297.91		
R	3.07	1.44	2.20	3.73		
J_1	258.97	260.23	253.44	232.20		
J_2	252.34	260.93	262.50	270.63		
J_3	268.29	258.44	263.66	276.77		
R	15.95	2.49	10.22	44.57		

K_1 、 K_2 、 K_3 表示每个因素 3 个水平下的丹参素平均透过率总和; J_1 、 J_2 、 J_3 表示每个因素 3 个水平下的原儿茶醛平均透过率总和; R 表示同一水平下 3 个因素丹参素平均透过率/原儿茶醛平均透过率的极差。

表 4 丹参素平均透过率方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	均方	F (临界值)	P (显著性)
A	21.573	2	10.783	6.692	> 0.05
B	3.462	2	1.627	1.000	> 0.05
C	7.029	2	3.623	2.283	> 0.05
D	75.384	2	39.241	25.154	< 0.05
误差	3.264	2	1.632		

表 5 原儿茶醛平均透过率方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	均方	F (临界值)	P (显著性)
A	109.248	2	54.411	5.145	> 0.05
B	21.429	2	10.723	1.000	> 0.05
C	107.824	2	53.679	5.032	> 0.05
D	1 227.852	2	613.765	57.298	< 0.05
误差	21.489	2	10.732		

3 讨论

本研究在 200~400 nm 全波长扫描情况下分析混合对照品溶液,综合丹参素和原儿茶醛 2 种有效成分紫外吸收情况;结果显示,丹参素和原儿茶醛 2 种有效成分在波长 210 nm 条件下紫外吸收强且基线平稳,故最终选用 210 nm 进行有效成分含量测定。试验过程比较甲醇、乙腈作为有机相,添加不同比例磷酸水溶液作为水相时,供试品溶液中丹参素及原儿茶醛 2 种有效成分的分离情况;结果显示,0.05% 的磷酸水溶液-乙腈溶液为流动相,通过调整梯度条件,分析用时仅为 12 min,分离效果良好。故本研究所选用含量测定方法检测结果准确,检测效率高,用于超滤工艺筛选具有较高可靠性。

中药注射液生产工艺多采用水提醇沉、醇提水沉、石墨吸附等方式进行纯化,以期减少中药注射液不良反应发生的可能性,但此类工艺无法实现对植物蛋白、鞣质等成分的去除^[6]。超滤技术为膜分离技术之一,借助分子量差异,实现中药注射剂的有效除杂操作^[7]。香丹注射液中原儿茶醛、丹参素有效成分为小分子物质,通过超滤工艺优化,可实现有效成分的保留和杂质的有效去除。本研究结果显示,丹参素和原儿茶醛 2 种成分在超滤工艺过程中平均透过率存在差异,但影响因素基本一致,其影响因素大小为 $D > A > C > B$,其中丹参素受各因素影响较小,平均透过率范围在 97.12%~100.12%,均大于 97%;原儿茶醛各因素之间平均透过率差异较大,其中超滤膜的截留分子量过小则降低药液透过率,降低有效成分含量。

本研究正交结果显示,药液温度对丹参素和原儿茶醛的影响较小,故将其列为误差项。分析结果发现,超滤膜的截留分子量对丹参素和原儿茶醛平均透过率有显著影响,其余因素对平均透过率无明显影响。综上,确定优化后超滤工艺条件为 $D_3 A_3 C_3 B_1$,即超滤膜的截留分子量为 30 KDa,超滤装置进出口压力差为 0.08 MPa,药液 pH 值为 9.0,药液温度为 20 °C。为保证优化后超滤工艺稳定性,选取 3 批丹参提取物中间体和降香提取物中间体按优化后超滤工艺条件开展试验,计算香丹注射液中丹参素和原儿茶醛 2 种有效成分的平均透过率,结果分别为 99.42%、

99.81%、99.53% 和 97.43%、97.21%、97.05%。提示优化后超滤工艺 2 种有效成分平均透过率相对稳定,且均高于试验条件筛选时各有效成分平均透过率。可见,优化后超滤工艺对香丹注射液中有有效成分影响较小且相对稳定。

本研究综合考虑超滤过程中超滤膜的截留分子量、超滤装置进出口压力差、药液 pH 值、药液温度各工艺参数,结果明确超滤过程中超滤膜的截留分子量对有效成分具有明显影响,而超滤装置进出口压力差、药液 pH 值、药液温度对超滤液质量影响较小,优化后的超滤工艺条件为生产应用提供良好的科学依据。但本研究中尚未对超滤膜材质以及超滤膜材质对其余有效成分影响进行考察,下一步应进一步开展研究。

综上所述,丹参素和原儿茶醛 2 种成分的超滤工艺影响因素基本一致,超滤膜的截留分子量对香丹注射液有效成分有显著的影响,其余因素的影响不显著。优化后超滤工艺对香丹注射液中有有效成分影响较小,相对稳定,适用性强。

参 考 文 献

- [1] 管珂,周颖,李文庭,等. 香丹注射液与 3 种输液配伍后丹参素钠等 6 种有效成分的稳定性研究[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(12): 1134-1137.
- [2] 高添,杨凌鉴,盛鑫康,等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 的香丹注射液化学成分分析[J]. 中成药, 2019, 41(2): 345-352.
- [3] 庞菲,王弯弯,郝瑞瑞,等. 香丹注射液中致类过敏反应成分筛选及机制初探[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6500-6508.
- [4] 李响明,丁艳谱,孙胜斌,等. 黄芪注射液超滤工艺优化研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(3): 323-327.
- [5] 洪烨,李存玉,顾佳美,等. 双黄连注射液生产过程中超滤膜完整性的快速检测[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1203-1206.
- [6] 姜国志,丁艳谱,赵玉欣,等. 舒血宁注射液超滤工艺的优化研究[J]. 中医药学报, 2017, 45(2): 89-93.
- [7] 张强,李景剑. 超滤膜分离技术在中药制剂生产中的应用[J]. 广东化工, 2023, 50(4): 120-123.

(收稿日期:2024-05-10)