

香丹注射液超滤工艺的优化研究

王正宽^{1,2}, 曹光环^{1,2}, 曹苗苗^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 考察香丹注射液制剂过程中超滤工艺对原儿茶醛、丹参素钠的透过率和除杂率的影响, 评价香丹注射液制备过程中超滤工艺的适用性并进行膜超滤过程优化设计。 **方法** 采用正交试验方法, 以药液温度、pH 值、超滤膜截留相对分子质量和膜进出口压差作为影响因素, 通过检测超滤前后药液中原儿茶醛、丹参素钠的量和药液固含量, 优选超滤过程的工艺参数。 **结果** 药液温度、pH 值和进出口压差 3 个因素对原儿茶醛、丹参素钠综合透过率和除杂率无显著影响, 而超滤膜截留相对分子质量因素对其有显著的影响 ($P < 0.01$)。 **结论** 优选的超滤工艺适用性好。

关键词: 超滤工艺; 正交试验; 原儿茶醛; 丹参素钠; 透过率; 除杂率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)21-2988-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.009

Optimization of ultrafiltration technology for Xiangdan Injection

WANG Zheng-kuan^{1,2}, CAO Guang-huan^{1,2}, CAO Miao-miao^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To explore the effect of ultrafiltration technology in the preparation of Xiangdan Injection on transmittance and impurity removal rates of protocatechuic aldehyde (PA) and sodium danshensu (SD), to evaluate its applicability, and to optimize the ultrafiltration technology. **Methods** Taking the solution temperature, pH value, intercept relative molecular weight of ultrafiltration membrane, membrane import and export pressure difference of ultrafiltration membrane as influence factors, the process parameters of the ultrafiltration were optimized by detecting the contents and solid contents of PA and SD before and after the ultrafiltration. **Results** The three factors of temperature, pH value, and import and export pressure difference have no significant influence on the transmittance of PA and SD, and the removal rate of impurity. The intercept relative molecular weight of ultrafiltration membrane has the significant influence ($P < 0.01$). **Conclusion** The optimized ultrafiltration conditions are feasible for the preparation of Xiangdan Injection.

Key words: ultrafiltration technology; orthogonal test; protocatechuic aldehyde; sodium danshensu; transmittance rate; impurity removal rate

香丹注射液为棕色澄明液体, 由水蒸气蒸馏的降香饱和水溶液与丹参水提液配制而成, 具有活血化瘀、通脉养心、改善心肌缺血缺氧等药理作用^[1], 临床用于胸闷心绞痛慢性肝炎和肾功能不全等症^[2]。丹参中水溶性的酚酸类成分, 大多为小分子物质, 主要为原儿茶醛、丹参素, 其是治疗心血管系统疾病的主要成分^[3], 且水溶性成分较二萜醌类更能显著增加冠脉血流量和抑制血小板聚集等作用^[4]。

中药注射液中鞣质、蛋白质等大分子物质是导致临床使用中出现药物不良反应的一个不可忽视的原因, 为了尽可能除去大分子物质等杂质, 提高香丹注射液质量稳定性, 降低不良反应发生率^[5], 笔者采用超滤技术对香丹注射液灌装前的药液进行终端超滤研究, 以超滤过程中原儿茶醛、丹参素钠综合透过率和除杂率为综合评价指标, 评价超滤技术在香丹注射液生产过程中的适应性, 并对超滤工艺

收稿日期: 2013-05-03

基金项目: 国家“重大新药创制”——现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 王正宽, 男, 工程师, 主要从事中药新技术新工艺研究。Tel: 13511566160 E-mail: wangzk781@126.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337 13905136437 E-mail: wzzhz-nj@163.net

进行优化研究。超滤技术过程简单高效、无相变、节能、无二次污染,在中药成分的分离、纯化和精制中发挥重要作用,尤其能显著提高中药注射液的安全性、稳定性及质量可控性^[6]。本研究室在超滤工艺方面进行了较多研究^[7-8]。

1 仪器与试药

超滤设备:中空纤维膜(PS,截留相对分子质量3 000、10 000、30 000,北京旭邦膜有限公司);Waters 2695 HPLC 色谱仪[沃特世科技(上海)有限公司(Waters)];Millipore 蠕动泵(美国密理博 Millipore 公司),AG—135 型电子分析天平(梅特勒-托利多上海有限公司)。

原儿茶醛(批号 110810-201007)、丹参素钠(批号 11085-200809)对照品均购自中国药品生物制品检定所;丹参中间体(自制,批号 121101),降香中间体(自制,批号 121101),甲醇为色谱纯,水为注射用水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 香丹注射液中原儿茶醛、丹参素钠的测定^[9]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.5%冰醋酸水溶液(90:10);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 280 nm;柱温 25 ℃;进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥 12 h 的丹参素钠对照品 26.38 mg 和原儿茶醛对照品 12.10 mg,置同一 50 mL 量瓶中,加流动相适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对

照品储备液。精密吸取该储备液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取样品 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 固含量的测定

按《中国药典》2010 年版附录 X A 规定的浸出物测定方法进行测定,称定质量并计算。

2.3 超滤工艺研究

2.3.1 试验样品制备 取丹参、降香中间体适量,混合均匀,加注射用水调整至规定体积,即得香丹注射液超滤前药液,备用。

2.3.2 正交试验设计^[10] 根据影响中药注射液超滤效果的主要因素^[11],本实验主要考察 4 个因素,分别为药液 pH 值(A)、药液温度(B)、超滤膜截留相对分子质量(C)、超滤过程膜进出口压差(D),每个因素选择 3 个水平,采用 L₉(3⁴) 正交设计,考察超滤工艺过程药液中原儿茶醛、丹参素钠的平均透过率和平均除杂率,采用综合评分(综合评分=平均透过率×0.5+除杂率×0.5,在该品种工艺再评价研究过程中,指标成分的透过率与除杂率均为影响产品是否合格的 2 个主要指标,故予其相同的权重)综合评价超滤工艺的条件。因素水平见表 1。

按表 1 因素水平,将药液均分成若干份,分别加 20% NaOH 溶液适量调 pH 值至规定值,调碱后的药液存放在相应温度的水浴锅中进行保温存放。由于超滤设备有一定的死体积,超滤系统中会有一些的水液,因此,超滤之前应进行超滤系统的平衡,

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计及综合评价结果

Table 1 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test and comprehensive evaluation

试验号	A	B / ℃	C	D / MPa	平均透过率 / %	平均除杂率 / %	综合评价 / %
1	9.0 (1)	40 (1)	3 000 (1)	0.03~0.05 (1)	95.6	54.2	74.9
2	9.0 (1)	30 (2)	10 000 (2)	0.05~0.07 (2)	96.6	55.8	76.2
3	9.0 (1)	20 (3)	30 000 (3)	0.07~0.09 (3)	98.4	49.8	74.1
4	8.0 (2)	40 (1)	10 000 (2)	0.07~0.09 (3)	99.5	52.0	75.8
5	8.0 (2)	30 (2)	30 000 (3)	0.03~0.05 (1)	98.2	48.7	73.5
6	8.0 (2)	20 (3)	3 000 (1)	0.05~0.07 (2)	99.5	51.6	75.6
7	7.0 (3)	40 (1)	30 000 (3)	0.05~0.07 (2)	99.0	47.4	73.2
8	7.0 (3)	30 (2)	3 000 (1)	0.07~0.09 (3)	99.6	52.0	75.8
9	7.0 (3)	20 (3)	10 000 (2)	0.03~0.05 (1)	97.0	56.9	77.0
K ₁	225.20	223.90	226.30	225.40			
K ₂	224.90	225.50	229.00	225.00			
K ₃	226.00	226.70	220.80	225.70			
R	0.37	0.93	2.73	0.23			

取试验用药液适量,置于已用注射用水处理过的超滤系统中,超滤循环平衡 20 min。按照表 1 对各试验药液进行超滤实验,药液超滤后在超滤液体积为原液总体积 1/3 时 ($V_{1/3}$)、超滤液体积为原液总体积 2/3 时 ($V_{2/3}$) 2 个超滤点,超滤液分别取样,测定样品中原儿茶醛与丹参素钠的总量,同时检测超滤前后各试验药液固含量的变化情况,计算平均透过率和平均除杂率。

2 个超滤点综合透过率(综合透过率为超滤过程中相应的超滤点原儿茶醛、丹参素钠二者整体透过率)=超滤液($V_{1/3}$ 、 $V_{2/3}$)中原儿茶醛与丹参素钠总量/超滤前相应体积药液中原儿茶醛与丹参素钠总量

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

平均除杂率=(超滤前药液的固含量-超滤后药液的固含量)/超滤前药液的固含量

超滤过程中原儿茶醛、丹参素钠的平均透过率以及除杂率结果分别见表 2,正交试验结果见表 1,方差分析结果见表 3。

表 2 超滤过程中 2 个超滤点原儿茶醛、丹参素钠综合透过率及超滤前后除杂率

Table 2 Overall transmittance rate of PA and SD at two ultrafiltration points during ultrafiltration and impurity removal rate before and after ultrafiltration

试验号	透过率 / %			除杂率 / %		
	$V_{1/3}$	$V_{2/3}$	平均值	$V_{1/3}$	$V_{2/3}$	平均值
1	95.8	95.3	95.6	55.8	52.5	54.2
2	96.7	96.4	96.6	56.8	54.7	55.8
3	98.9	97.8	98.4	50.6	48.9	49.8
4	99.3	99.6	99.5	52.5	51.5	52.0
5	97.9	98.5	98.2	50.1	47.3	48.7
6	99.8	99.2	99.5	51.6	51.5	51.6
7	99.2	98.8	99.0	47.6	47.2	47.4
8	99.6	99.5	99.6	51.6	52.4	52.0
9	97.8	96.2	97.0	56.5	57.3	56.9

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.22	2	2.62	
B	1.32	2	16.00	
C	11.64	2	141.59	$P<0.01$
D(误差)	0.08	2	1.00	

$F_{0.05(2,2)}=19.00$ $F_{0.01(2,2)}=99.00$

2.3.3 结果分析 直观分析可知,香丹注射液在各组试验超滤过程中指标成分的平均透过率 95.6%~99.6%,超滤前后除杂率 47.4%~56.9%,综合评价结果在 74.1%~77.0%,可知以平均透过率及除杂率为综合考察指标,极差值大小及趋势显示,因素影响大小顺序为膜截留相对分子质量>药液温度>药液 pH 值>超滤过程膜进出口压差。

根据正交试验结果和方差分析可知,超滤过程中考虑到进出口压差(D 项)对原儿茶醛、丹参素钠透过率以及除杂率影响最小,将其列为误差项。A、B、C、D 4 因素经方差分析,药液 pH 值、药液温度、超滤过程中膜进出口压差 3 因素对原儿茶醛、丹参素钠透过率以及除杂率影响较小,而超滤膜截留相对分子质量对其有显著影响($P<0.01$)。综合考虑,确定优选的超滤参数方案为 $A_3B_3C_1D_3$,超滤前药液调节 pH 值为 7.0,在 20℃保温条件下采用相对分子质量为 3 000 的膜进行超滤,过程中保持进出口压差在 0.07~0.09 MPa。

2.3.4 工艺验证试验 为考察优选出的超滤工艺条件的稳定性,按该工艺条件重复 3 次,分别测定药液中原儿茶醛与丹参素钠平均透过率和平均除杂率,并计算综合评分。结果平均透过率为 99.1%、99.5%、98.8%,平均除杂率分别为 56.7%、55.9%、56.2%,综合评分分别为 77.9%、77.7%、77.5%。验证结果显示优化工艺条件所得的香丹注射液超滤物综合评分高于优化实验时的任何一组,而且综合评分比较接近,提示所得超滤工艺条件不但可行而且比较稳定,说明该工艺可行。

3 讨论

中药注射液中鞣质、蛋白质等这些大分子物质是导致临床使用中出现药物不良反应的一个不可忽视的原因,传统的水提醇沉法很难处理这些物质^[12],采用超滤技术可使这些相关物质达标。香丹注射液中原儿茶醛、丹参素钠均为水溶性酚酸类成分,相对分子质量小,分子结构较为简单,比较适宜采用超滤技术进行精制,超滤过程中指标成分的综合透过率较高且除杂效果较好,综合评价结果为香丹注射液在超滤过程中受药液温度、药液 pH 值、超滤过程中膜进出口压差 3 个因素的影响较小,而选择不同截留相对分子质量的超滤膜对指标成分的透过率以及除杂效果影响较大,以上试验研究为进一步优化香丹注射液的超滤工艺提供了客观的科学依据。

笔者在本实验过程中只考察了不同相对分子质量的中空纤维膜(PS)对原儿茶醛、丹参素钠透过率以及超滤过程中除杂率的影响,并没有就不同材质的超滤膜和其他成分的相互作用进行考察,需有待进一步研究,通过实验发现香丹注射液的超滤适应性很好,下一步实验研究的重点将是不同材质膜对香丹注射液中其他相关成分的超滤适应性研究。

参考文献

- [1] 尹永芹,朱俊访,沈志滨,等.神经网络分析香丹注射液抗心肌缺血有效成分的谱效相关性研究[J].中草药,2009,40(8):1284-1287.
- [2] 李静.香丹注射液穴位注射治疗肾性蛋白尿30例[J].中医药信息,2009,26(1):37-38.
- [3] 胡凤国,邓永建.丹参水溶性成分的研究进展[J].基层中药杂志,2000,14(2):49-50.
- [4] 李尚珠,周宇,黄平平,等.动脉硬化性闭塞症血瘀型白细胞游走能力的变化和原儿茶醛对其影响[J].中国中西医结合外科杂志,2001,7(3):169-172.
- [5] 钟露苗,赵胜利.178例香丹注射液不良反应报告分析[J].药物警戒,2006,3(6):353-355.
- [6] 张跃珍,林军.超滤技术在中药液体制剂中的应用[J].中国药房,2007,18(9):704-705.
- [7] 王永香,刘涛,王振中,等.活血通络注射液超滤工艺的膜污染及清洗研究[J].中草药,2011,42(5):913-915.
- [8] 祝倩倩,萧伟,王振中,等.注射用芪红脉通微滤液的超滤工艺适用性研究[J].中草药,2013,44(9):1117-1121.
- [9] 尹萌,孟月兰,闻珣毓,等.不同厂家香丹注射液中丹参素钠和原儿茶醛含量的比较[J].中国医院用药评价与分析,2010,10(10):903-905.
- [10] 张同星,尹楠,李红阳,等.超滤工艺对风痛宁注射液中有有效成分的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(11):2374-2375.
- [11] 魏舒畅,袁文珺,余琰,等.红芪提取液的超滤纯化工艺研究[J].中成药,2011,33(4):599-603.
- [12] 史亦丽,李美英,朱倩,等.复方丹参注射液的质量考核研究[J].中国药学杂志,2002,37(4):300-302.