

不同材质及孔径超滤膜对麦冬皂苷类成分的影响

罗瑞芝¹, 张会梅¹, 苏小琴^{2,3}, 刘雪¹, 李德坤^{2,3}, 周大铮^{2,3}, 叶正良^{2,3}, 鞠爱春^{2,3}, 王辉^{4*}

1. 天津中医药大学, 天津 300190
2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402
3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402
4. 山东大学齐鲁儿童医院, 山东 济南 250022

摘要: 目的 考查不同材质及不同孔径的超滤膜对5种麦冬皂苷类成分的影响。方法 以麦冬皂苷C、麦冬皂苷D、麦冬皂苷D'、麦冬皂苷Ra、龙血苷F为考察指标, 利用HPLC-UV法测定其超滤前后变化, 考察不同材质及孔径的超滤膜对5种麦冬皂苷收率的影响以及各超滤阶段对麦冬皂苷类成分截留率的变化情况。结果 不同材质及不同孔径的超滤膜处理下, 麦冬皂苷类成分的收率不同; 聚醚砜材质超滤膜对各超滤阶段的麦冬皂苷类成分截留率变化趋势与纤维素质是一致的。结论 采用100 kDa的聚醚砜超滤膜, 可以使麦冬皂苷类成分的收率达到最高, 用50%乙醇进行等体积透析, 会对麦冬皂苷的收率有较大的改善。

关键词: 超滤; 麦冬皂苷; 麦冬; 收率; 截留率; 麦冬皂苷C; 麦冬皂苷D; 麦冬皂苷D'; 麦冬皂苷Ra; 龙血苷F

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)03-0457-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.018

Effect on saponins in *Ophiopogon japonicus* by ultrafiltration membranes of different materials and cut-off molecular weight

LUO Ruizhi¹, ZHANG Huimei^{1,2,3}, SU Xiaoqin^{2,3}, LIU Xue^{2,3}, LI Dekun^{2,3}, ZHOU Dazheng^{2,3}, YE Zhengliang^{2,3}, JU Aichun^{2,3}, WANG Hui⁴

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China
3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300402, China
4. Qilu Children's Hospital of Shandong University, Shandong 250022, China

Abstract: Objective To investigate the effect of the ultrafiltration membrane with different materials and different sizes on five saponins of *Ophiopogon japonicus*. **Methods** Using Ophiopogonin C, ophiopogonin D, ophiopogonin D', ophiopogonin Ra, and dracaenoside F as index, determine the change of the content before and after the ultrafiltration membrane to measure the effect on the yield of ophiopogonins by HPLC-UV, observe the influence of different materials and pore sizes of ultrafiltration membrane on yields of 5 kinds of saponins. **Results** The yield of ophiopogonins from Radix *Ophiopogonis* was different under different material and pore size. The variation trend of the retention rate of ophiopogonins in the ultrafiltration stage was consistent with that of cellulose. **Conclusion** Using 100kDa polyethersulfone ultrafiltration membrane will have the highest yield of ophiopogonins. Using 50% ethanol for equal volume dialysis can greatly improve the yield of *Ophiopogon japonicus* saponin.

Key words: ultrafiltration; ophiopogonin; *Ophiopogon japonicus*; yield; interception rate; ophiopogonin C; ophiopogonin D; ophiopogonin D'; ophiopogonin Ra; dracaenoside F

麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl 的干燥块根, 味甘、微苦, 性微寒, 归心、肺、胃经, 具有养阴生津、润肺止咳的功效^[1]。

麦冬中主要化学成分包括甾体皂苷、高异黄酮及多糖等^[2-3], 其中麦冬皂苷是发挥其生物活性的有效成分之一^[4]。常见的麦冬皂苷多为螺甾烷醇型甾体皂

收稿日期: 2018-01-22

第一作者: 罗瑞芝, 天津中医药大学博士在读。

*通信作者: 王辉, 山东大学齐鲁儿童医院。E-mail: 1950740817@qq.com

昔,少数为呋甾烷醇型甾体皂昔,其中螺甾烷醇型甾体皂昔昔元主要为鲁斯可皂昔元和薯蓣皂昔元。

超滤是以压力为推动力的膜分离技术之一,在中药行业中方兴未艾,它利用膜两侧的浓度/压力差,使药物透过选择性膜,达到与小分子物质分离的效果。该方法具有分离效率高、无相变、操作简便等优势,在中药注射剂生产工艺中广泛应用于除去大分子物质(多糖、蛋白质等)、提高药液澄明度、除菌等过程中^[5-7]。在生产过程中,由于中药成分复杂,超滤膜材质及规格的选择对中药成分的通量有重要影响,因此在采用超滤工艺时需要对具体成分进行适用性的研究^[8]。本文研究了不同材质及不同孔径的超滤膜对麦冬皂昔类成分收率的影响,明确超滤过程对5种麦冬皂昔的截留效果,为中药制剂中超滤工艺的优化及实际生产选择合适材质及孔径的超滤膜提供参考。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

麦冬提取物(由天津天士力之骄药业有限公司提供),麦冬皂昔 C、D、D' (纯度>98%,天津仕兰科技有限公司),麦冬皂昔 Ra (实验室自制,纯度>98%);龙血昔 F (实验室自制,纯度>98%)。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司);氢氧化钠、乙醇为分析纯;磷酸(色谱纯,天津市化学试剂一厂);超纯水自制。

1.2 实验仪器

Millipore LabScale™ TFF System 超滤装置、Millipore Pellicon XL Biomax50 10k/30k/50k/100k 50 cm² 超滤膜(美国 Millipore 公司)。Waters Alliance 高效液相色谱仪(2695 四元泵、2489 UV 检测器)(美国 Waters 公司)、ETTLER AL204 型万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)、梅特勒 XS105 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、MiLLi-Q 超纯水机、超声波清洗器(KQ5200 型,昆山市超声波仪器有限公司)、数显恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 麦冬皂昔的测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取麦冬皂昔 C、D、D'、Ra 和龙血昔 F 适量,甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中制得质量浓度分别为 0.653、0.811、0.649、1.28、1.43 mg/mL 的麦冬皂昔对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取适量麦冬提取液,过

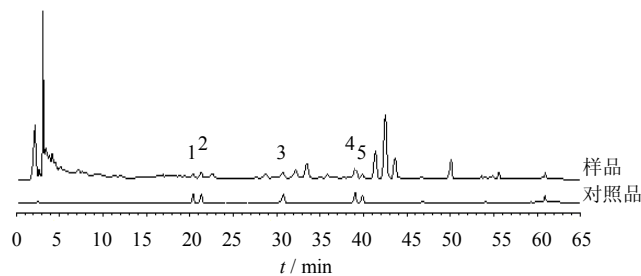
AB-8 大孔树脂柱,依次用 5BV 水、2BV 0.5 mol/L NaOH、2BV 30% 甲醇洗脱,弃液,再以 5BV 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,水浴蒸干,甲醇溶解分次转移至 2 mL 量瓶至刻度,混匀,即得。

2.1.3 色谱条件 Waters symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 1.0% 磷酸水为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱见表 1,柱温 30 °C,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 203 nm,进样量 20 μL。HPLC-UV 图谱见图 1。

表 1 麦冬皂昔液相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution of *Ophiopogonjaponicus*saponins

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	30	70
10	30	70
15	40	60
25	40	60
35	55	55
45	95	5
50	95	5
55	30	70
60	30	70



1-麦冬皂昔 C; 2-麦冬皂昔 Ra; 3-龙血昔 F; 4-麦冬皂昔 D; 5-麦冬皂昔 D'

1-ophiopogonin C; 2-ophiopogonin Ra; 3-dracaenaside F; 4-ophiopogonin D; 5-ophiopogonin D'

图 1 5 种麦冬皂昔的 HPLC-UV 图谱

Fig. 1 HPLC-UV print of 5 species of Saponins from *Ophiopogonjaponicus*

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取麦冬皂昔对照品溶液适量,加甲醇稀释成一系列浓度,按“2.1.3”项下色谱条件测定,记录色谱图及峰面积。以各对照品的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,见表 2,表明各成分在范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 20

表2 5种麦冬皂苷成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of five species of saponins from *Ophiopogon japonicus*

成分	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	r
麦冬皂苷 C	$Y=3\ 410\ 636 X-965$	0.032 65~0.653	0.999 7
麦冬皂苷 D	$Y=4\ 069\ 680 X-34\ 162$	0.040 55~0.811	0.999 9
麦冬皂苷 D'	$Y=3\ 867\ 541 X-18\ 230$	0.032 45~0.649	0.999 7
麦冬皂苷 Ra	$Y=2\ 727\ 697 X+23\ 828$	0.094~0.940	0.999 7
龙血苷 F	$Y=2\ 890\ 145 X-53\ 913$	0.100~1.000	0.999 5

μL, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样6次, 测得麦冬皂苷 C、麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 Ra 和龙血苷 F 的峰面积, RSD 值分别为 1.33%、1.62%、1.50%、1.92%、1.63%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取相同批次样品6份, 精密称定, 按“2.1.2”项下制备样品溶液, 进样量20 μL, 按“2.1.3”项下色谱条件测定。测得麦冬皂苷 C、麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 Ra 和龙血苷 F 的峰面积, RSD 值分别为 1.81%、1.99%、1.83%、1.41%、1.20%。结果表明本法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在配置后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 分别测得麦冬皂苷 C、麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 Ra 和龙血苷 F 的峰面积, RSD 值分别为 1.87%、1.87%、1.68%、1.39%、1.58%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的麦冬提取物样品6份, 每份约2.5 g, 精密称定, 各加入一定量的5种对照品, 按“2.1.2”项下处理, 按“2.1.3”项下色谱条件测定, 记录各色谱峰峰面积, 计算回收率及 RSD。结果麦冬皂苷 C、麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 Ra 和龙血苷 F 平均加样回收率分别为 96.5%、97.5%、98.5%、98.7%、98.0%, RSD 值分别为 2.07%、1.83%、1.92%、1.90%、1.86%, 表明该方法的准确度良好。

2.1.9 含量测定 分别吸取麦冬皂苷对照品、超滤前溶液及超滤渗透液供试品各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定样品中各麦冬皂苷的含量。

2.2 超滤条件

2.2.1 超滤原液的制备 取适量麦冬提取物, 超纯水溶解制成浓度为 1.96 g/mL 药液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 药液的超滤及取样 (1) 药液超滤 取以上样品溶液于超滤装置中, 超滤仪参数为泵速 1

r/min, 超滤膜入口端压力 165.47~330.95 kPa, 回流端压力 13.79 kPa, 入口体积流量为 3.6 mL/min。在上述超滤条件下用不同孔径 (1×10^4 、 3×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5) 聚醚砜超滤膜和 3×10^4 纤维素超滤膜进行超滤。(2) 药液取样 在上述超滤条件下用 1×10^5 聚醚砜超滤膜和 3×10^4 纤维素超滤膜进行超滤。在超滤体积浓缩倍数为 2、4、6、8、10 分别在回流端和渗透端取样。当体积浓缩倍数达到 10 时, 采用等体积补水的方式继续超滤, 分别在体积透析倍数为 1、2、3、4 时在回流端和渗透端取样测定。当水加完后用 50%乙醇继续超滤, 在体积透析倍数为 1、2 时在回流端和渗透端取样测定。

2.3 超滤前后麦冬皂苷变化

根据各超滤前后样品中皂苷含量及各样点的透过液和回流液皂苷含量的测定结果计算各单体皂苷的收率和各个时刻单体皂苷的超滤截留率。

单体皂苷 X 的收率 (Y_X) = (透过液中 X 的含量 × 透过液体积) / (滤前超滤原液 X 的含量 × 滤前超滤原液体积)

单体皂苷 X 的截留率 = 1 - 渗透端 X 的含量 / 回流端 X 的含量

体积浓缩倍数 = 某超滤阶段的体积 / 原超滤液的体积

透析倍数 = 透析液的体积 / 回流端残留体积

3 实验结果

3.1 不同超滤膜对麦冬皂苷收率的影响

每种超滤膜各平行做 2 次, 上述样品按 2.2 项下超滤条件对其进行超滤及麦冬皂苷含量的测定, 并按 2.3 项下方法计算收率, 结果见表 3。

由表 3 可知, 4 种不同截留分子量的聚醚砜材质超滤膜对麦冬皂苷 C 和 Ra 的收率均在 70% 以上, 优于龙血苷 F 和麦冬皂苷 D、D' 的收率。而麦冬皂苷 D 和麦冬皂苷 D' 的收率最小, 即使使用 1×10^5 的超滤膜, 其收率也不足 10%。且随着超滤膜截留分子量的增大, 各单体皂苷的收率明显得到改善。在同一孔径 (3×10^4) 条件下, 纤维素超滤膜对麦

冬皂苷类成分的收率要明显高于聚醚砜超滤膜。

3.2 超滤法对麦冬皂苷截留率的影响

按照以上色谱条件，测定各超滤取样点麦冬皂苷的含量，计算相应的截留率。结果见图 2。

由图 2 可以看出， 1×10^5 聚醚砜超滤膜对麦冬皂苷的截留率随体积浓缩倍数的增加而增加，各成分截留率大小为麦冬皂苷 D' > D > 麦冬皂苷 Ra > 麦冬皂苷 C > 龙血苷 F；在等体积补水阶段，麦冬皂苷类成分的截留率随透析倍数的增加而降低，麦冬

皂苷 C、Ra 和龙血苷 F 的收率达到 100%，说明补水透析后，超滤膜对麦冬皂苷类的收率增加；考虑麦冬皂苷 D、D' 的收率不好，采用 50% 乙醇等体积透析，由图可知麦冬皂苷的截留率降低，即收率升高，说明用 50% 乙醇等体积透析对麦冬皂苷类成分的收率有很大提高。

3×10^4 纤维素超滤膜对麦冬皂苷的截留率趋势图与图 2 一致，各成分截留率大小为麦冬皂苷 D' > D > 麦冬皂苷 Ra > 麦冬皂苷 C > 龙血苷 F。见图 3。

表 3 不同孔径及材质超滤膜对麦冬皂苷类成分收率的影响 (n=2)

Table 3 Effect of different pore size and material ultrafiltration membrane on the yield of Saponins from *Ophiopogon japonicus* (n=2)

超滤膜材质及孔径	麦冬皂苷类成分收率/%				
	麦冬皂苷 C	麦冬皂苷 Ra	龙血苷 F	麦冬皂苷 D	麦冬皂苷 D'
聚醚砜材质 1×10^4	74.39	83.30	43.24	2.24	6.21
聚醚砜材质 3×10^4	78.27	85.25	48.79	2.91	6.37
聚醚砜材质 5×10^4	83.56	92.16	53.03	3.71	6.55
聚醚砜材质 1×10^5	96.75	103.59	65.91	3.50	7.81
纤维素材质 3×10^4	84.70	100.24	54.32	4.24	7.41

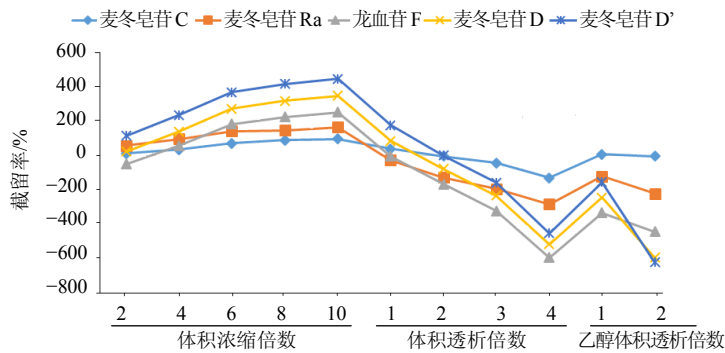


图 2 1×10^5 聚醚砜超滤膜对麦冬皂苷类成分在超滤过程中截留率的影响

Fig 2 Effect of 1×10^5 polyethersulfone ultrafiltration membrane on the interception rate of the Saponins of *Ophiopogon japonicus* during ultrafiltration

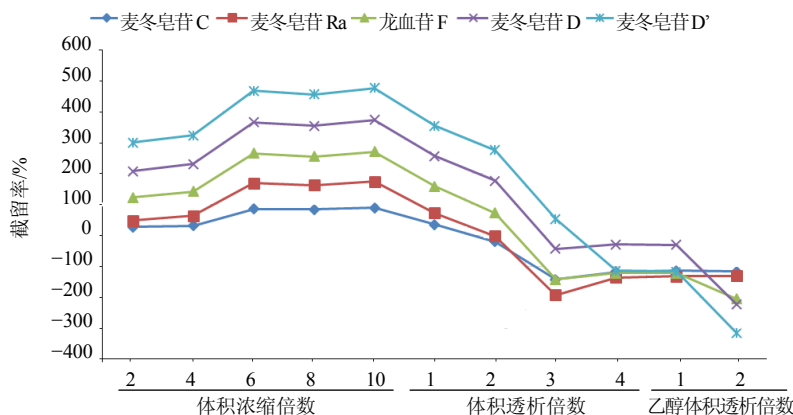


图 3 3×10^4 纤维素超滤膜对麦冬皂苷类成分在超滤过程中截留率的影响

Fig 3 Effect of 3×10^4 cellulose ultrafiltration membrane on the interception rate of the Saponins of *Ophiopogon japonicus* during ultrafiltration

4 讨论

实验结果表明,同一麦冬皂苷类成分在不同材质、不同孔径的超滤膜中,其收率不同。不同截留分子量的同种材质的超滤膜,随着超滤膜孔径的增加,麦冬皂苷类成分的收率随之增大。大孔径的超滤膜有利于麦冬皂苷类成分透过,从而提高其收率。相同截留分子量的相同材质超滤膜,麦冬皂苷收率也不同,这可能与皂苷物质的极性,分子间作用力不同有关,聚醚砜材质超滤膜对各超滤阶段的麦冬皂苷类成分截留率变化趋势与纤维素质材是一致的。相同截留分子量的不同材质超滤膜,纤维素超滤膜对麦冬皂苷类成分的收率大于聚醚砜超滤膜,这可能与聚醚砜材质和纤维素质材的超滤膜的亲水性不同所致。

从聚醚砜和纤维素的超滤膜对麦冬皂苷在各超滤阶段收率影响可以看出,随着体积浓缩倍数的增加,各麦冬皂苷类成分的收率降低,可能是大孔径的超滤膜截留了相对于分子量较小的皂苷类成分从而阻塞滤膜的孔径,使收率降低;在等体积补水阶段,随着透析倍数的增加,麦冬皂苷类成分的截留率降低,说明等体积补水可提高麦冬皂苷类成分的收率;50%乙醇等体积透析阶段,麦冬皂苷的收率有较大改善。

不同材质、不同截留分子量的超滤膜对5种麦冬皂苷成分的吸附性能有差异,综合来看,使用 1×10^5 聚醚砜超滤膜,可以使麦冬皂苷类成分的收

率达到最高。采用50%乙醇等体积透析,会对麦冬皂苷的收率有较大的改善,可增加透过率降低截留率,但是对制剂中大分子物质及蛋白质等的截留效果及对透明度的影响有待于进一步的实验研究。在制剂中,为了兼顾麦冬皂苷类成分的收率以及杂质的透过率,可以考虑使用大孔径的超滤膜,但同时应注意大孔径超滤膜对大分子量杂质的影响。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 白晶. 麦冬甙体皂苷和高异黄酮类成分的研究进展 [J]. 北京联合大学学报, 2014, 28(02): 9-12.
- [3] 张璐欣, 周学谦, 李德坤, 等. 麦冬多糖的化学组成、分析方法和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(02): 279-284.
- [4] 于晓文, 杜鸿志, 孙立, 等. 麦冬皂苷药理作用研究进展 [J]. 药学进展, 2014, 38(04): 279-284.
- [5] 李淑莉, 刘振丽, 宋志前. 超滤法在中药制剂纯化工艺中的应用研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(12): 898-902.
- [6] 孙中辉. 超滤法在中药制剂纯化工艺中的应用研究进展 [J]. 黑龙江科技信息, 2016(08): 125.
- [7] 潘晓鸥, 李健, 宋毅, 等. 超滤法在中药分离、纯化工艺中的应用进展 [J]. 华西医学, 2004, 19(2): 351-352.
- [8] 彭菲, 叶正良, 李德坤, 等. 不同材质及不同截留分子量超滤膜对人参皂苷类成分的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(05): 937-940.