

草珊瑚浸膏的絮凝和膜分离纯化研究

朱才庆^{1,2}, 余 华^{1*}, 张 锐¹, 范其坤¹, 熊胜泉¹, 魏东芝^{2*}

(1. 江西省药物研究所, 江西 南昌 330029; 2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:目的 探讨草珊瑚浸膏的不同预处理方法及对膜分离效果的影响。方法 采用各种预处理方法初步比较, 通过 ZTC₁₊₁III 型壳聚糖、明矾絮凝的正交试验设计进一步试验, 以与异秦皮啶相关的各种指标考察各种预处理方法的效果及对膜分离效果的影响。结果 与 ZTC₁₊₁III 型壳聚糖、明矾的最佳絮凝工艺相比, 微滤预处理后超滤膜分离草珊瑚浸膏的膜通量及异秦皮啶透过率最大, 运行时间最短, 干膏中异秦皮啶的质量分数最高。结论 微滤是草珊瑚浸膏膜分离纯化新工艺中较为理想的预处理方法。

关键词: 草珊瑚浸膏; 预处理; 膜分离; 异秦皮啶

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253 2670(2006)01 0045 04

Application of flocculation and membrane separation in purification of Caoshanhu extract

ZHU Cai-qing^{1,2}, YU Hua¹, ZHANG Rui¹, FAN Qi-kun¹, XIONG Sheng-quan¹, WEI Dong-zhi²

(1. Institute of Materia Medica of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: **Objective** To investigate the different pretreatments of Caoshanhu extract and their effects on the downstream process, membrane separation. **Methods** Based on the index related to isofraxidin, the different pretreatment methods of Caoshanhu extract were evaluated and their effects on membrane separation downstream were analyzed by the comparison of different pretreatments and further orthogonal test of ZTC₁₊₁III, chitosan, and KAl(SO₄)₂ · 12H₂O. **Results** After the pretreatment of microfiltration, both the best membrane flux and the highest percentage of isofraxidin filtered through the membrane were obtained and the time used was the least, and the ratio of isofraxidin to insoluble substances was tip top in all pretreatment methods in comparison to other methods, such as ZTC₁₊₁III, chitosan, and KAl(SO₄)₂ · 12H₂O methods. **Conclusion** Microfiltration is a better pretreatment method in preparation of Caoshanhu extract.

Key words: Caoshanhu extract; pretreatment; membrane separation; isofraxidin

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 为金粟兰科植物, 又名肿节风、九节茶。药理研究表明, 草珊瑚具有抗菌消炎、抑制流感病毒、抗肿瘤、促进骨折愈合及镇痛等多种活性^[1~3]。血康口服液是由草珊瑚浸膏醇沉后制成的制剂, 临床上用于血热妄行、皮肤紫斑、原发性及继发性血小板减少性紫癜等疾病的治疗^[4]。传统制备工艺水提醇沉法存在产品黏度大、色泽深、长期放置易产生絮凝物等问题, 因此, 采用膜分离技术改造传统工艺具有重要的实际应用价值。

膜分离技术具有常温操作、无相变、能耗低等其他分离纯化手段无法比拟的优点, 在中药制药中的应用目前有许多报道^[5~7], 然而成功应用于实际生

产的不是很多, 其主要问题是中药成分相当复杂, 易造成膜堵塞、通量不高、有效成分损失大、使用寿命低。为了解决这些问题, 在膜分离前对中药药液进行预处理是十分重要的。实验探讨了草珊瑚浸膏不同预处理方法及对膜分离效果的影响。

1 材料

TP10—20 型中空纤维超滤装置及截留相对分子质量为 2×10^4 聚砜膜组件(天津膜天膜工程技术有限公司); M₃ 型百万分之一电子天平(瑞士 Mettler 公司); GL—20B 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); 高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司)。

异秦皮啶(中国药品生物制品检定所); ZTC₁₊₁

* 收稿日期: 2005-03-28

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2001BA701A05); 江西省重大科技攻关项目(赣科发计字[2002]64号)

作者简介: 朱才庆(1973—), 男, 江西信丰人, 工学博士, 现为华东理工大学与江西省药物研究所联合培养博士后, 研究方向为天然药物有效成分的分离纯化。Tel: (0791) 8105994 Fax: (0791) 8101739 E-mail: zhucqing@sohu.com

* 通讯作者 余 华 Tel: (0791) 8106317 E-mail: jxyuhua@sina.com

III型和IV型(天津正天成澄清技术有限公司);中药专用壳聚糖(上海卡博工贸有限公司);明胶(温州医药采购供应站);明矾(天津市大茂化学试剂厂);草珊瑚浸膏(由江西天施康中药股份有限公司馈赠)。

2 方法和结果

2.1 ZTC₁₊₁III型絮凝工艺的正交设计: 血康口服液的质量控制指标之一是异秦皮啶, 因此本研究中主要采用 HPLC 法监测与异秦皮啶相关的一些指标^[8]。首先对低温静置、纸浆滤过、3 000 r/min 低速离心、10 000 r/min 高速离心、5% 明胶和 ZTC₁₊₁III和IV型絮凝预处理草珊瑚浸膏的效果进行了考察。结果表明, 相对于低温静置而言, 各种预处理方法都有一定效果, 清液中可溶性固形物即干膏中的异秦皮啶(以异秦皮啶/干膏表示, 下同)都有不同程度增加, 其中 ZTC₁₊₁III型(先A 后B)絮凝后的最高, 异秦皮啶的质量分数达 2. 074 mg/g。

根据初步实验结果, 就浸膏质量浓度、A 组分加入量、A 与B 组分体积比3 因素对 ZTC₁₊₁III(由A、B 两种成分组成, 且先加组分的量需多于后加组分)絮凝效果的影响进行了进一步考察, 正交试验结果及直观分析见表 1, 方差分析见表 2。结果表明, 以清液干膏中异秦皮啶为考察指标时, 各因素对异秦皮啶/干膏没有显著性影响, 影响因素主次关系依次为 C> B> A, 较好的方案为 A₂B₃C₂。

表 1 ZTC₁₊₁III絮凝剂预处理草珊瑚浸膏

正交试验结果及直观分析

Table 1 Results and visual analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by ZTC₁₊₁III

试验号	A 浸膏质量浓度/ (生药 g · mL ⁻¹)	B A 组 分/mL	C A B/ (mL · mL ⁻¹)	D (空白)	异秦皮啶/干 膏/(mg · g ⁻¹)
1	1(0. 657)	1(2)	1(4 1)	1	1. 644
2	1	2(4)	2(4 2)	2	1. 656
3	1	3(6)	3(4 3)	3	1. 840
4	2(0. 985)	1	2	3	1. 928
5	2	2	3	1	1. 788
6	2	3	1	2	1. 741
7	3(1. 970)	1	3	2	1. 493
8	3	2	1	3	1. 611
9	3	3	2	1	2. 054
I	1. 713	1. 688	1. 557	1. 829	
II	1. 819	1. 685	2. 105	1. 630	
III	1. 719	1. 878	1. 658	1. 793	
R	0. 106	0. 193	0. 214	0. 199	

2.2 壳聚糖絮凝工艺的正交设计: 壳聚糖是中药制药中常用的絮凝剂, 本研究就浸膏质量浓度、pH 值、温度、絮凝剂用量 4 个因素对 1% 壳聚糖(溶解于 1% 醋酸溶液)絮凝效果也进行了考察, 结果见表 3 和 4。结果显示, 以异秦皮啶/干膏为考察指标时,

壳聚糖用量、药液 pH 值、温度为主要影响因素, 各因素主次关系依次为: B> C> D> A。由于浸膏质量浓度为生药 1. 970 0. 657 g/mL 相差很小, 因此考虑到工作效率, 选择较好的实验方案为 A₁B₃C₃D₁。

表 2 ZTC₁₊₁III絮凝剂预处理草珊瑚浸膏

正交试验结果的方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by ZTC₁₊₁III

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0. 021	2	0. 313	P> 0. 05
B	0. 073	2	1. 090	P> 0. 05
C	0. 077	2	1. 149	P> 0. 05
D(空白)	0. 067	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19. 0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99. 0$

表 3 壳聚糖絮凝草珊瑚浸膏的正交试验结果及直观分析

Table 3 Results and visual analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by chitosan

试验号	A 浸膏质量浓度/ (生药 g · mL ⁻¹)	B 1%壳聚 糖/mL	C pH 值	D 温 度/	异秦皮啶/干膏 (/mg · g ⁻¹)
1	1(1. 970)	1(5)	1(4)	1(25)	1. 391
2	1	2(15)	2(5)	2(50)	1. 635
3	1	3(25)	3(6)	3(80)	1. 658
4	2(0. 985)	1	2	3	1. 436
5	2	2	3	1	1. 724
6	2	3	1	2	1. 485
7	3(0. 657)	1	3	2	1. 476
8	3	2	1	3	1. 380
9	3	3	2	1	1. 900
I	1. 561	1. 434	1. 418	1. 672	
II	1. 548	1. 580	1. 657	1. 532	
III	1. 585	1. 681	1. 619	1. 491	
R	0. 024	0. 247	0. 238	0. 180	

表 4 壳聚糖絮凝草珊瑚浸膏正交试验结果的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by chitosan

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0. 002 11	2	1. 000	
B	0. 092 36	2	43. 771	P< 0. 05
C	0. 098 52	2	46. 690	P< 0. 05
D(空白)	0. 053 72	2	25. 459	P< 0. 05

$F_{0.05}(2, 2) = 19. 0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99. 0$

2.3 明矾絮凝的正交试验设计: 明矾也是常用的絮凝剂, 对其絮凝草珊瑚浸膏的效果进行了考察, 正交设计结果及方差分析分别见表 5 和 6。以异秦皮啶/干膏为指标, 所考察的 4 因素都没有显著性影响, 影响因素主次关系为 B> C> A> D, 较好的絮凝方案为 A₁B₁C₂D₃, 即浸膏质量浓度为生药 0. 657 g/mL、明矾用量 1 mL、药液 pH 值为 7、温度 80 。

2.4 优化絮凝工艺的验证试验: 通过正交设计获得了各絮凝剂的最佳絮凝方案, 采用最佳方案絮凝

100 mL 草珊瑚浸膏药液, 2 次平行试验结果见表 7, 同时列出了 0.2 μm 微滤膜预处理(操作参数为: 压力 0.08 MPa、温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、进料体积流量 2.8 L/min)的结果。可知, 就上清液中干膏(折算成相同的生药质量浓度)比较, 明矾的絮凝能力最强, 而微滤的除固效果也较好; 就异秦皮啶/干膏比较, 明矾预处理的最高, 而其他 3 种预处理方法得到的结果则相当。

表 5 明矾絮凝草珊瑚浸膏的正交试验结果及直观分析

Table 5 Results and visual analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

试验号	A 浸膏质量浓度/ (生药 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	B 明矾溶 液/ mL	C pH 值	D 温 度/ $^{\circ}\text{C}$	异秦皮啶/干膏 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	1(0.657)	1(1)	1(5)	1(25)	1.977
2	1	2(3)	2(7)	2(50)	1.887
3	1	3(5)	3(8.5)	3(80)	1.542
4	2(0.985)	1	2	3	2.072
5	2	2	3	1	1.152
6	2	3	1	2	1.085
7	3(1.970)	1	3	2	1.437
8	3	2	1	3	1.469
9	3	3	2	1	1.454
I	1.802	1.829	1.510	1.528	
II	1.436	1.503	1.804	1.470	
III	1.453	1.360	1.377	1.694	
R	0.366	0.469	0.427	0.224	

表 8 不同预处理方法对草珊瑚浸膏药液膜分离效果的影响

Table 8 Effects of different pretreatment methods on membrane separation efficiency of Caoshanhu extract

预处理 方法	膜分离前药液		透过液			运行时间/ min	平均膜通量/ ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^2$)	异秦皮 啶膜透 过率/%
	异秦皮啶/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	异秦皮啶/干膏/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	体积/ mL	异秦皮啶/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	异秦皮啶/干膏 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
ZTC ₁₊₁ III	0.125	1.70	1 570	0.074	0.947	101	52.8	48.9
	0.181	2.46	1 070	0.099	1.158	105	34.0	30.8
壳聚糖	0.102	1.38	1 520	0.072	1.028	117	43.5	56.6
明矾	0.110	1.34	1 550	0.062	0.944	91	56.8	46.0
高速离心	0.134	1.22	1 550	0.070	1.144	105	49.2	42.5
微滤	0.122	1.18	1 540	0.087 5	1.347	85	60.4	58.1

透过率也增加。从膜通量看, 微滤预处理后的超滤运行时间最短, 速率最快, 达 60.4 $\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{m}^2)$, 异秦皮啶膜透过率也最高, 而且异秦皮啶/干膏与膜分离前相比有增加, 而其他预处理方法的稍有下降。明矾预处理后膜分离效果仅次于微滤, 不过其预处理后的药液在放置过程中, 仍然不断有絮状物产生。

3 讨论

鉴于中药药液的特点, 利用膜技术分离时先对提取液进行预处理是十分必要的。絮凝实验结果表明, 不同絮凝剂絮凝草珊瑚浸膏能力是不同的, 主要影响因素也有一定的差别, 因素主次关系也有很大的变化, 这主要与絮凝剂自身的化学特性有关。利用

表 6 明矾絮凝草珊瑚浸膏正交试验结果的方差分析

Table 6 Variance analysis of orthogonal test of Caoshanhu extract pretreated by $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.256	2	3.122	$P > 0.05$
B	0.346	2	4.220	$P > 0.05$
C	0.287	2	3.500	$P > 0.05$
D	0.082	2		

表 7 不同预处理方法处理草珊瑚浸膏最佳工艺验证试验 ($n=2$)

Table 7 Validation tests of optimized pretreatments of Caoshanhu extract ($n=2$)

絮凝剂	最优 工艺	浸膏质量浓度/ (生药 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	上清液/ mL	异秦皮啶/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	干膏/ g	异秦皮啶/干膏/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
ZTC ₁₊₁ III	A2B3C2	0.985	94.5	0.247	12.554	1.861
壳聚糖	A1B3C3D1	1.980	107.7	0.306	23.761	1.832
明矾	A1B1C3D3	0.657	92.9	0.161	7.272	2.005
微滤		0.985	1 745.0	0.190	179.950	1.842

2.6 不同预处理方法对膜分离效果的影响: 对不同方法预处理后的草珊瑚浸膏(起始体积为 1 900 mL)进行了膜分离研究(操作参数与上述的微滤相同), 结果见表 8(其中微滤和壳聚糖为 2 次平行试验结果)。可知, 超滤效果与药液质量浓度有很大关系, 同为 ZTC₁₊₁III 絮凝处理, 药液质量浓度较高时, 膜通量很低; 适当稀释后, 膜通量增加, 异秦皮啶膜

正交设计考察的 3 种絮凝剂中, 絮凝剂用量、药液 pH 值及絮凝时的药液温度对壳聚糖的絮凝效果有显著性影响, 而这 3 个因素对明矾的絮凝效果则无显著性影响。ZTC₁₊₁III 絮凝草珊瑚浸膏时与其组分的加入顺序有很大的关系, 表明絮凝剂的絮凝效果与药液的种类有关, 不同的提取液呈现不同的特点。

膜分离是以压力差和浓度差为驱动力的。膜的操作参数相同时, 药液质量浓度高驱动力也大, 然而本研究结果显示质量浓度高时膜通量却较低, 表明药液质量浓度高很容易造成膜堵塞, 而稀释后则在一定程度上改善膜分离的效果。相比较而言, 微滤是超滤前预处理草珊瑚浸膏较好的方法。与絮凝剂或

直接离心相比,微滤在原理上有着本质上的不同,它是以相对分子质量大小为基准的分离手段,一些大于截留相对分子质量的物质通过微滤后基本上被除去,所以微滤透过液更有利于后一步的超滤膜分离。而絮凝是靠絮凝剂与药液中相关分子的相互作用而使一些物质絮凝沉降,然而并不是药液中所有的大分子都会与絮凝剂相互作用而被沉降,仍然留在药液中的一些物质极易造成膜污染,导致膜通量下降过快,而高速离心也存在这样的问题。不过,与其他分离方法相比,微滤-超滤整个工艺中异秦皮啶保留率并不是最高的,这主要与微滤预处理时膜组件及导管中滞留了一些药液有关。

References

- [1] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advances in studies on chemical constituents and its quality control of whole plant of *Sarcandra glabra* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (8): a-X II-X IV.
- [2] The Searching Panel of *Herba Sarcandrae* in Guixi Sanitary Bureau, Jiangxi Province. The study of *Herba sarcandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1972, 3 (6): 41.
- [3] Wang J, Yan F, Shen X, et al. Experimental research on anti-tumor function of *Herba Sarcandrae* [J]. *Zhejiang J Chin Tradit Med* (浙江中医杂志), 1999 (10): 450-451.
- [4] Li Y B, Jiang C L, Bo H, et al. Advance on curing IFP by Chinese traditional medicine [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1995, 12 (2): 6-9.
- [5] Liu H Q, Qu L B, Jia J F. Study on ultrafiltration membrane technology for preparing Shengmai Oral Liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (4): 209-211.
- [6] Luo F L, Liang G M, Liu Z Y, et al. Exploration of application of large pore size ultrafiltration membrane in Chinese medicine production [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23 (8): 556-559.
- [7] Li S Z, Wu L L, Chen W. New process and its equipment for production of TCM oral liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (12): 120-122.
- [8] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.

竹黄无性型菌株产竹红菌素的研究

陈佳佳, 李兆兰, 焦庆才*

(南京大学生命科学学院 药物生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 获得能稳定产生竹红菌素的竹黄无性型菌株, 通过人工培育获得其活性成分竹红菌甲素。方法 通过组织分离, 从野生竹黄子座中分离筛选出无性型菌株 0258, 进行人工条件下的发酵培养。对其发酵产物进行提取、分离和纯化, 通过理化性质测定和波谱 (UV/VIS, IR, MS) 技术进行结构鉴定。结果 从竹黄子实体分离筛选到一株无性型菌株 0258, 其能产生稳定的竹红菌甲素。结论 首次获得稳定产生竹红菌素的竹黄无性型菌株, 解决了竹黄人工培育的种源问题, 使竹红菌素的工业化生产成为可能。

关键词: 竹黄; 竹红菌甲素; 无性型; 波谱分析

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0048-03

Hypocrellins produced by anamorphosis fermentation of *Shiraia bambusicola*

CHEN Jia-jia, LI Zhao-lan, JIAO Qing-cai

(Pharmaceutic Biotechnology State Key Laboratory, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **Objective** To obtain anamorphosis of *Shiraia bambusicola* producing the component, hypocrellin A effectively. **Methods** A strain was isolated from the fruit of *S. bambusicola* by separating its hypha and was cultured by solid-state fermentation. One of the pure chemical compounds isolated from the stroma of wild *S. bambusicola* was studied on the basis of UV/VIS, IR, MS spectrometric analysis and physicochemical constants. **Results** The pigment is proved to be hypocrellin A. The isolate was determined as the stable anamorphosis strain 0258 of *S. bambusicola*. **Conclusion** A anamorphosis strain of *S. bambusicola* is obtained and precisely appraised for the first time. This study will provide basis for the future massively industrialized hypocrellin production.

Key words: *Shiraia bambusicola* P. Henn; hypocrellin A; anamorphosis; spectrometric analysis

收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 国家技术创新基金资助项目 (02CJ-13-01-16)

作者简介: 陈佳佳 (1982—), 女, 江苏苏州人, 南京大学生物系硕士研究生, 主要从事微生物次生活性代谢产物的研究。

Tel: (025) 66813587 E-mail: njucjj@126.com