

# 丹参水提液的纯化工工艺研究

吴大章<sup>1,2</sup>, 刘世琪<sup>1,2\*</sup>, 吴品江<sup>2</sup>, 蒋巧梅<sup>2</sup>, 朱 宁<sup>2</sup>

(1 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司研究所, 重庆 408000; 2 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

**摘要:**目的 优选丹参水提液纯化工工艺。方法 以丹参提取液的浊度、鞣质以及有效成分的含量为指标, 优选两种絮凝澄清剂的用量和絮凝搅拌速度, 筛选出较佳参数; 对比研究醇水沉淀、絮凝结合乙醇沉淀、絮凝结合膜过滤3种纯化方法。结果 使用壳聚糖进行絮凝澄清处理后的丹参水提液上清液浊度低于用 ZTC1+ 10 型絮凝剂处理后的浊度, 并能够更好地减轻膜污染程度; 壳聚糖结合膜过滤法对丹参水提液的有效成分保留率较高, 收膏率相对较高, 浊度和鞣质含量无显著差异。结论 壳聚糖作为丹参水提液絮凝澄清剂效果优于 ZTC1+ 10 型絮凝剂, 壳聚糖结合膜过滤法纯化丹参水提液的综合评价指标优于其他两种方法。

**关键词:** 丹参; 纯化工工艺; 壳聚糖; ZTC1+ 10 絮凝剂; 膜分离

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0889-04

## Purifying process of water extract solution of Danshen

WU Da<sup>2</sup>zhang<sup>1,2</sup>, LIU Sh<sup>2</sup>qi<sup>1,2</sup>, WU Pin<sup>2</sup>jiang<sup>2</sup>, JIANG Qiao<sup>2</sup>mei<sup>2</sup>, ZHU Ning<sup>2</sup>

(1 Institute of Fuling Pharmaceutical Factory, Taiji Group, Chongqing 408000, China; 2 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**Abstract:** Objective To optimize the purifying process of Danshen water extract solution. Methods Taking the turbidity, content of tannin, and active components in the Danshen water extract solution as index, to optimize the better flocculant and its best flocculant stirring speed. The purifying effects of alcohol water sedimentation, flocculation binding alcohol water sedimentation, and flocculation binding membrane filtration were studied. Results The turbidity of the chitosan treated supernatant is lower than that of ZTC1+ 10 treated ones, and this treatment could mitigate the membrane fouling better. Chitosan binding membrane filtration had a better retention rate and higher yield of active components, and there was no significant difference in the turbidity and the tannin content. Conclusion Chitosan as the flocculant of the Danshen water extract solution is superior to ZTC1+ 10. Chitosan binding membrane filtration is more effective than alcohol sedimentation and flocculation binding alcohol water sedimentation in retaining the active components and comprehensive evaluation index.

**Key words:** Salviae miltiorrhiza Bunge; purifying process; chitosan; ZTC1+ 10 flocculant; membrane separation

丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 是中医临床常用的活血化瘀药。丹参水溶性成分的药理作用广泛, 具有改善微循环、抗血栓、促进组织恢复等多种活性<sup>[1]</sup>, 已用于多种中成药制剂, 如口服液、颗粒剂、气雾剂、注射液、注射用灭菌粉末等<sup>[2]</sup>。丹参口服液是由丹参单味药经过水提取、分离、纯化而成, 具有液体制剂的服用方便、吸收快、作用迅速等优点。但丹参水提液

中含杂质较高, 大都含有蛋白、脂肪、纤维、鞣质及胶体物质。传统的水提醇沉除杂方法, 生产成本低, 周期长, 絮凝澄清和膜分离技术结合应用可以部分地解决这些问题<sup>[3]</sup>。本研究通过对比传统的乙醇沉淀法、絮凝技术结合乙醇沉淀法以及絮凝澄清剂结合膜技术, 筛选出丹参水提液的合适的分离纯化工工艺。

### 1 仪器与试剂

D) 8401型多功能搅拌器(广州天利仪器厂);

\* 收稿日期: 2008-10-24

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金(07C26215100788)

作者简介: 吴大章(1976), 男, 重庆人, 成都中医药大学在读博士, 主管药师, 从事中药新剂型与新技术研究。

E-mail: wdz100@163.com

\* 通讯作者 刘世琪 Tel: (023) 72801079

Sartorius BP211D 十万分之一电子天平; Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 包括四元泵, 柱温箱, 自动进样器, 二级管阵列检测器; 岛津 UV) 1700 紫外分光光度计。

丹参药材购于重庆中药材市场, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定与 5 中国药典 2005 年版一部正品相符。壳聚糖、硫酸胍、六次甲基四胺(成都长征试剂公司); ZTC1+ 10、0 型絮凝剂(天津正天澄清技术有限公司); 没食子酸对照品、丹酚酸 B 对照品、丹参素钠对照品、原儿茶醛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为: 08319501、1115622 200302、1108552200507、1108102200205); 甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Fisher)。水为重蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

### 2 试验方法

2.1 丹参提取溶液的制备: 取丹参 1 000 g, 加 8 倍量水, 浸泡 2.5 h 后, 煎煮 1.5 h, 滤过, 滤渣再分别以 6 倍量水煎煮两次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 滤液浓缩后定容至 10 L, 备用。

2.2 丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛的测定<sup>[4]</sup>

2.2.1 色谱条件: Agilent 公司 Zorbax SB2C18 ODS 色谱柱(250 mm @4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 21% 冰乙酸(21 B 79); 检测波长: 281 nm; 体积流量: 1.0 mL/min。

2.2.2 对照品溶液的制备及线性关系考察: 精密称取原儿茶醛对照品 61.56 mg, 加甲醇至 100 mL(质量浓度 61.6 μg/mL)。精密称取丹酚酸 B 对照品 41.07 mg, 加甲醇至 25 mL(质量浓度 162.18 μg/mL)。精密称取丹参素对照品 41.55 mg, 加甲醇至 10 mL, 相当于丹参素的质量浓度为 0.455 mg/mL。分别吸取原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参素对照品溶液各 2、6、10、14、18、22 μL 注入液相色谱仪, 进样测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线。原儿茶醛:  $Y = 701.63 X - 11.39$ ,  $r = 0.9999$ ; 丹酚酸 B:  $Y = 171.53 X - 11.581$ ,  $r = 0.9999$ ; 丹参素:  $Y = 931.58 X - 21.42$ ,  $r = 0.9998$ 。表明原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参素分别在 0.065~1.44 μg, 0.33~3.58 μg, 0.91~10.01 μg 时, 峰面积与进样量线性关系良好。

2.2.3 测定法: 吸取各待测液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 10 μL 注入高效液相色谱仪测定, 即得。

2.3 浊度的测定<sup>[5]</sup>

2.3.1 标准曲线的绘制: 参照 GB 13200.9-1995 浊度的测定 6 中分光光度法。将硫酸胍和六次甲基四胺反应产生的浊度标准液稀释至不同质量浓度, 在 680

nm 测定吸光度, 以浊度单位 NTU(nephelometric turbidity units) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得标准曲线方程  $Y = 11.29 \times 10^{-3} X - 31.83 \times 10^{-4}$ ,  $r = 0.9999$ 。

2.3.2 样品测定: 取供试液于 680 nm 测定吸光度, 结果代入标准曲线方程计算浊度。

2.4 鞣质的测定

2.4.1 标准曲线的绘制: 精密称取没食子酸对照品 501.30 mg 置 100 mL 棕色量瓶中, 得 0.503 mg/mL 没食子酸对照品溶液。参照 5 中国药典 2005 年版一部附录 B 鞣质的测定方法进行。以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得标准曲线方程  $Y = 1341.6274 X + 0.0086$ ,  $r = 0.9998$ , 表明鞣质在 0.06~1.06 μg 与吸光度有良好的线性关系。

2.4.2 样品测定: 取待测液适量稀释 10 倍, 滤过, 续滤液即为供试溶液。参照 5 中国药典 2005 年版一部附录 B 鞣质的测定方法操作, 即得。

2.5 丹参提取液中各指标测定: 按照以上各指标的测定方法测定丹参提取液中各指标的量, 结果上清液浊度为 2035 NTU, 丹酚酸 B 质量浓度为 810.3 μg/mL, 丹参素质量浓度为 1170.0 mg/mL, 原儿茶醛质量浓度为 111.3 μg/mL, 鞣质质量浓度为 11.825 μg/mL, 收膏率为 53.16%。

2.6 壳聚糖澄清效果的考察

2.6.1 壳聚糖的配制: 取壳聚糖适量用 1% 醋酸配成 1% 的壳聚糖胶体溶液。

2.6.2 壳聚糖用量对澄清效果的影响: 分别取浓缩药液 6 份, 每份 100 mL, 分别按 0~2.0 g/L(以壳聚糖计) 的量加入 1% 壳聚糖胶体溶液, 并以 100 r/min 搅拌 10 min, 然后加水定容至 250 mL, 摇匀。常温静置 24 h 后取上清液测定浊度、指标成分保留率以及收膏率。结果见表 1。

指标成分保留率 = 絮凝后成分的质量浓度 / 絮凝前成分的质量浓度 @100%

鞣质剩余率 = 絮凝后鞣质的质量浓度 / 絮凝前鞣质的质量浓度 @100%

表 1 壳聚糖用量对絮凝效果的影响

Table 1 Effects of chitosan dosage on flocculation

壳聚糖用量/ (g#L <sup>-1</sup> )	干膏收 率/%	保留率/%			浊度/ NTU	鞣质剩 余率/%
		原儿茶醛	丹酚酸 B	丹参素		
0	53.0	100	100	100	1050	100
0.5	49.5	99.4	97.5	99.6	379	381.9
1.0	48.3	101	95.0	100.7	198	171.2
1.5	47.6	100.4	92.5	101.5	93	131.6
1.75	47.3	100.2	92.2	102.1	92.7	131.8
2.0	47.4	101.5	92.3	102.3	92	131.7

结果表明, 随壳聚糖用量的增加, 絮凝后上清液

浊度和鞣质显著下降, 指标成分丹参素和原儿茶醛质量浓度基本不变或略有上升, 与文献报道一致<sup>[6]</sup>。丹酚酸 B 质量浓度略有下降, 最低约为未处理时的 92%; 收膏率保持在 48% 左右, 略低于未处理时的 53%。用量 210 g/L 时, 上清液浊度和鞣质与 115 g/L 时基本相同, 所以壳聚糖最佳用量为 115 g/L。

21 61 3 搅拌速度对壳聚糖絮凝效果的影响: 以 115 g/L 的壳聚糖用量, 分别在不同搅拌速度对丹参提取液进行絮凝澄清操作, 其余操作同 21 61 2, 结果见表 2。

表 2 搅拌速度对壳聚糖絮凝效果的影响

Table 2 Effect of stirring speed on chitosan flocculation

搅拌速度	干膏收率/%	保留率/%			浊度/NTU	鞣质剩余率/%
		原儿茶醛	丹酚酸 B	丹参素		
50	48.5	99.2	90.3	98.2	95	15
100	47.7	100.4	92.5	99.6	92.6	13.9
150	47.4	101	93.0	100.7	91.8	13.2
200	49.6	100.4	92.7	101.5	93	14.6

21 7 ZTC1+ 10 型絮凝剂絮凝效果的考察

21 71 1 ZTC1+ 10 型絮凝剂的配制: 取 A 组分适量, 用水配成 1% 黏胶液; 取 B 组分适量, 用 1% 乙酸配成 1% 黏胶液, 并使其充分溶胀 24 h, 备用。

21 71 2 ZTC1+ 10 型絮凝剂用量对絮凝效果的影响: 分别取浓缩药液 6 份, 每份 100 mL, 分别按 0~116 g/L (以 ZTC 絮凝剂计) 的量先加入 B 组分胶体溶液, 以 100 r/min 搅拌 5 min, 加入相同量 A 组分胶体溶液, 再慢速搅拌 5 min (100 r/min)。加水定容至 250 mL, 摇匀, 常温静置 24 h, 取上清液测定浊度、指标成分保留率以及收膏率。结果见表 3。

表 3 ZTC1+ 10 型絮凝剂用量对絮凝效果的影响

Table 3 Effects of ZTC1+ 10 dosage on flocculation

ZTC1+ 10 用量(g/L)	干膏收率/%	保留率/%			浊度/NTU	鞣质剩余率/%
		原儿茶醛	丹酚酸 B	丹参素		
010	53.0	100	100	100	1020	100
014	52.9	101.4	97.5	100.6	309	36.9
018	51.8	101.6	95.0	100.9	98	18.2
112	52.6	102.4	89.5	101.5	94	14.5
114	52.3	101.8	87.2	101.1	93.7	14.4
116	52.7	101.3	87.3	101.5	93.8	14.6

研究表明, ZTC1+ 10 型絮凝剂随用量增加, 丹参素和原儿茶醛质量浓度基本不变; 上清液浊度及鞣质的量均显著下降, 丹酚酸 B 质量浓度随用量增加略有下降, 最低约为未处理时的 87%; 上清液固形物的量约为 53% 左右, 与未处理时基本相同。用量 116 g/L 时, 鞣质的量最低, 浊度与 112 g/L 用量差别很小, 从减少用量角度考虑, 以 112 g/L 为 ZTC1+ 10 型絮凝剂每组分最佳用量。

21 71 3 搅拌速度对 ZTC1+ 10 型絮凝剂絮凝效果的影响: 以每组分 112 g/L 的用量, 分别在不同搅拌速度对丹参提取液进行絮凝澄清操作, 其余操作同 21 71 2, 结果见表 4。

表 4 搅拌速度对 ZTC1+ 10 型絮凝效果的影响

Table 4 Effect of stirring speed on ZTC1+ 10 flocculation

搅拌速度	干膏收率/%	保留率/%			浊度/NTU	鞣质剩余率/%
		原儿茶醛	丹酚酸 B	丹参素		
50	52.5	101.2	88.3	98.2	95	15.0
100	52.4	100.5	89.5	101.7	93.6	14.3
150	52.7	101	89.0	101.0	91.8	14.2
200	53.2	100.3	87.7	100.5	96.5	14.6

从表 2, 4 可以看出, 不同的搅拌速度对两种絮凝剂的影响效果相似, 搅拌速度在 100~150 r/min 絮凝效果更佳。搅拌速度太低, 在絮凝剂加入的瞬间在溶液中形成局部沉淀从而包裹有效成分, 使有效成分的量降低, 搅拌速度太高使已产生的絮体被打碎重新分散从而沉淀生成不明显, 降低了絮凝效果。因此选择搅拌速度为 100~150 r/min。

21 8 两种絮凝剂最佳絮凝条件下的絮凝效果比较: 壳聚糖最佳絮凝条件为用量 115 g/L, 絮凝搅拌速度在 100~150 r/min; ZTC1+ 10 型絮凝剂最佳絮凝条件为每组分用量 112 g/L, 絮凝搅拌速度在 100~150 r/min。分别用两种絮凝剂的最佳絮凝条件进行 3 次重复试验, 结果见表 5。

表 5 两种絮凝剂最佳工艺的效果比较 (n=3)

Table 5 Comparison of optimum processes

between ZTC1+ 10 and chitosan (n=3)

絮凝剂	上清液浊度/NTU	丹酚酸 B/(mg·mL <sup>-1</sup> )	丹参素/(mg·mL <sup>-1</sup> )	原儿茶醛/(mg·mL <sup>-1</sup> )	鞣质/(mg·mL <sup>-1</sup> )	收膏率/%
壳聚糖	92	0.324	0.458	0.0445	0.25	52.4
ZTC1+ 10	95	0.305	0.462	0.0449	0.36	53.3

结果表明, 经两工艺处理后, 指标成分无明显差别, 但壳聚糖处理后的丹参提取液, 浊度和鞣质质量浓度均较低, 且壳聚糖用量少于 ZTC1+ 1 絮凝剂, 操作更为简单。因此, 选取壳聚糖絮凝作为丹参提取液微滤处理的前处理工艺较好。

21 9 絮凝对膜通量的影响: 分别将丹参提取液、壳聚糖及 ZTC1+ 10 型絮凝剂絮凝处理后的上清液进行膜过滤操作, 观测膜通量, 结果见图 1。

经壳聚糖絮凝处理的上清液膜通量最大, 初始膜通量为 1398 L/(m<sup>2</sup>·h), 稳定膜通量在 280 L/(m<sup>2</sup>·h) 左右; ZTC1+ 10 型絮凝剂絮凝处理后的上清液初始通量 1176 L/(m<sup>2</sup>·h), 稳定膜通量约为 180 L/(m<sup>2</sup>·h); 未处理的丹参提取液初始膜通量仅有 550 L/(m<sup>2</sup>·h), 约 10 min 后由于膜通量过小, 膜分

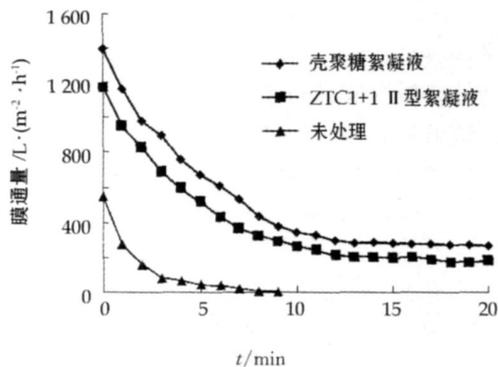


图 1 絮凝效果对膜通量的影响

Fig 1 Effects of flocculation on membrane flux

离无法继续进行。以上结果说明絮凝处理后可以较好地减轻膜污染,且壳聚糖处理后的效果优于 ZTC1+1 0 型絮凝剂。

2.10 纯化工艺对比研究:分别取浓缩药液 3 份,每份 1 000 mL,分为  $\tilde{N}$ 、 $\tilde{O}$ 、 $\tilde{O}$ 。 $\tilde{N}$  为原工艺,纯化方法为:供试液浓缩至 100 mL,加乙醇使含醇量达 60%,静置 24 h,滤过,滤液减压浓缩至稠膏状,加水稀释至 100 mL,冷藏 24 h,滤过;滤液再加乙醇使含醇量达 80%,静置 24 h,滤过,滤液减压浓缩至稠膏状,加水稀释至 100 mL,冷藏 24 h,滤过;滤液定容至 100 mL。 $\tilde{O}$  为絮凝结合乙醇沉淀法:加 11.5 g/L (以壳聚糖计) 的量加入 1% 壳聚糖胶体溶液,并以 100 r/min 搅拌 10 min,常温静置 24 h,滤过,滤液浓缩至 100 mL,加乙醇使醇含量达 80%,静置 24 h,滤过,滤液减压浓缩至稠膏状,加水稀释至 100 mL,冷藏 24 h,滤过,滤液定容至 100 mL。 $\hat{O}$  为絮凝结合膜过滤法:样品加 11.5 g/L (以壳聚糖计) 的量加入 1% 壳聚糖胶体溶液,并以 100 r/min 搅拌 10 min,常温静置 24 h,滤过,滤液通过粗滤膜滤过,滤液浓缩至 80 mL 通过精滤膜滤过,滤液定容至 100 mL。分别取  $\tilde{N}$ 、 $\tilde{O}$ 、 $\hat{O}$  工艺处理液测定浊度、指标成分保留率以及收膏率。结果见表 6。

表 6 纯化工艺对比研究结果表

Table 6 Comparison of purifying process

浓缩药液	干膏收率/%	保留率/%			浊度/NTU	鞣质剩余率/%
		原儿茶醛	酚酸 B	丹参素		
$\tilde{N}$	22.5	81.2	68.2	80.2	29	10.5
$\tilde{O}$	27.7	83.6	75.3	81.3	31.7	11.2
$\hat{O}$	30.2	92.1	79.6	89.5	32.5	11.6

结果表明,原工艺处理的水提液能够很好的降低干膏收率、增加澄明度、鞣质的量能够显著降低,但是有效成分的损失严重,生产工序较多,生产工时较长,乙醇用量大,生产成本很高;絮凝结合乙醇沉淀法在有效成分损失较少,降低乙醇用量,但干膏收

率和澄明度以及鞣质的量比原工艺稍差;絮凝结合膜过滤法能够很好的保持有效成分,整个工艺不用乙醇,能够较大的降低生产成本,但收膏率相对较高、浊度、鞣质的量与前两种工艺无显著性差异。因此,结合有效成分的保留率、生产成本等综合考虑,丹参水提液的纯化工艺采用絮凝结合膜过滤法,即丹参提取液用加 11.5 g/L 壳聚糖处理后通过两次膜滤过。

### 3 讨论

吸附澄清法是指在中药的提取液中加入絮凝剂(澄清剂),通过电中和和/吸附架桥作用,将体系中的悬浮物及胶体粒子除去,使体系的澄明度得以提高,减少服用剂量<sup>[5]</sup>壳聚糖和 ZTC 澄清剂,其作用机制是利用电荷和大分子的架桥作用,去除溶液中的鞣质、蛋白质、树胶等杂质,得到稳定、澄清的溶液。

本实验研究结果显示,絮凝温度在室温时最佳,如果温度过高可使絮凝作用过快,部分细小微粒还未来得及发生絮凝反应,无法沉降下来,在较低温度时,上清液澄明度都较低。各种絮凝剂澄清都有最佳的 pH 值范围。壳聚糖的最佳絮凝 pH 值范围为酸性,酸性环境下有利于壳聚糖长链分子的伸展,同时发挥吸附架桥和电中和作用。但在实验中,当调整 pH 值小于 4 时丹参提取液会发生浑浊并产生沉淀,故絮凝 pH 值不宜小于 4。

本实验结果显示,絮凝技术和膜技术结合的这种处理方法与醇沉工艺和絮凝技术结合乙醇沉淀技术比较,丹参几个主要有效成分的保留率较高,其他指标能够同时达到丹参口服液的要求,在该制剂除杂工艺中具有一定的适宜性,但絮凝技术结合膜技术处理对丹参口服液药效的影响有待于进一步研究。

研究结果表明,澄清剂结合膜过滤法较水醇法简化了工艺,缩短了生产周期,降低了生产成本,故在中药制剂中值得推广这一新技术。

### 参考文献:

- [1] 张婷,王超云,田京伟,等. 丹参素对脑损伤的保护作用[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1041-1043.
- [2] 陈峰,李泽友,刘明生. 丹参制剂的研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17(21): 1672-1677.
- [3] 丁启圣. 新型实用过滤技术[M]. 北京: 冶金工业出版社, 2000.
- [4] 李向军,刘敏彦,赵兴茹,等. 丹参水溶性成分提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 49.
- [5] 水质浊度的测定(GB 13200-91)[S]. 1991.
- [6] 陈昕. 壳聚糖作为中药水提液中絮凝澄清剂的研究[J]. 中医药研究, 2002, 18(6): 442-451.