

消癌平注射液提取浓缩工艺的优化

李存玉^{1,2}, 马 赞¹, 李贺敏¹, 陈 涛¹, 李红阳¹, 彭国平^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 采用充氮-纳滤耦合技术优化消癌平注射液的提取浓缩工艺。**方法** 以绿原酸及总酚酸为指标, 采用 HPLC 和紫外可见分光光度法分析两者含有量的变化, 比较常规方法与充氮-纳滤耦合技术的提取浓缩效果。**结果** 充氮提取后, 绿原酸及总酚酸的含有量分别提高了 33.68% 和 22.22%; 纳滤浓缩后, 两者分别提高了 174.73% 和 97.42%。**结论** 该技术重复性好, 可应用于中药制剂生产过程中的提取和浓缩, 尤其是对含有易氧化成分者。
关键词: 消癌平注射液; 绿原酸; 总酚酸; 提取浓缩工艺; 充氮-纳滤耦合技术; HPLC; 紫外可见分光光度
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)08-1712-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.011

Optimization of extraction and concentration process for Xiaoaiping Injection

LI Cun-yu^{1,2}, MA Yun¹, LI He-min¹, CHEN Tao¹, LI Hong-yang¹, PENG Guo-ping^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center for Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction and concentration process of Xiaoaiping Injection (an anti-tumor agent) by nitrogen pressurization-nanofiltration coupling technology. **METHODS** With chlorogenic acid and total phenolic acids as indices, their content changes were determined by HPLC and ultraviolet-visible spectrophotometry. The performances of conventional method and nitrogen pressurization-nanofiltration coupling technology in extraction and concentration were compared. **RESULTS** The contents of chlorogenic acid and total phenolic acids were increased by 33.68% and 22.22% due to the application of pressurized nitrogen, and the increasement reached at 174.73% and 97.42% respectively after the successive nanofiltration concentration. **CONCLUSION** With a good reproducibility, nitrogen pressurization-nanofiltration coupling technology can be used for the extraction and concentration of Chinese herbal preparations, especially for those containing easily-oxidized constituents.
KEY WORDS: Xiaoaiping Injection; chlorogenic acid; total phenolic acids; extraction and concentration process; nitrogen pressurization-nanofiltration coupling technology; HPLC; ultraviolet-visible spectrophotometry

提取浓缩是中药制药的基本环节, 多采用热处理方式进行, 对易氧化成分的影响明显。酚酸是一类含有酚环的有机酸, 在中药材中广泛分布, 如绿原酸、没食子酸、丹酚酸等, 大多具有抗炎、杀菌、抗氧化等活性^[1-2]。但其烯醇式结构加热时易氧化, 在常规提取浓缩中损失明显, 影响制剂质

量, 导致中药资源浪费。
膜分离是依靠压力为驱动力, 借助过滤媒介(滤膜)的截留相对分子质量大小来对混合体系实现目的性精制和分离的技术, 根据膜孔径大小, 可分为微滤、超滤、纳滤、反渗透, 其中纳滤的截留相对分子质量在 200 ~ 1 000 Da 之间, 具有无热效

收稿日期: 2015-12-23
基金项目: 国家自然科学基金 (81503258, 81373980); 江苏省自然科学基金青年基金 (BK20151005); 江苏省中医药局科技项目 (YB2015009)
作者简介: 李存玉 (1985—), 男, 博士, 讲师, 从事中药制药工艺研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: licunyuok@163.com
* 通信作者: 彭国平 (1963—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药成分分离精制及新药研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@sohu.com

应、操作压力低、通量高、无污染等技术优势，目前在制药、水处理、生物化工等诸多领域广泛应用^[3-5]。由于氮气化学性质稳定，具有抗氧化作用，故在注射剂、口服液生产中需要高纯氮气作“充氮”保护^[6]，防止药液与环境接触氧化，保障制剂品质。

消癌平注射液以萝藦科牛奶菜属植物通关藤为原料，在生产过程中采用水直接提取，进而加热浓缩，但以绿原酸为代表的酚酸类成分损失明显。为改善制药工艺，本研究选择“充氮提取-纳滤浓缩”与常规提取浓缩工艺比较（图 1），以绿原酸、总酚酸含量为指标，优选适用于含酚酸类成分中药制剂的提取浓缩工艺。

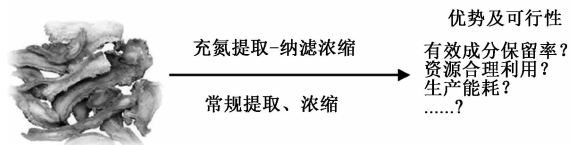


图 1 提取浓缩工艺的对比

Fig. 1 Comparison of extraction and concentrate processes

1 材料与方法

1.1 材料 通关藤饮片（批号 201205161，南京圣和药业有限公司）；高纯氮气（ $\geq 99.99\%$ ，南京天泽气体有限责任公司）；纳滤膜（300 ~ 500 Da，聚酰胺复合膜，星达 [泰州] 膜科技有限公司）。绿原酸对照品（批号 110753-200212，中国食品药品检定研究院）。乙腈、磷酸为色谱纯；十二烷基磺酸钠、铁氰化钾、三氯化铁为分析纯；水为超纯水。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪（配置 DAD 检测器，美国 Agilent 公司）；T6 新世纪型紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器设备有限公司）；TNZ-1 型纳滤分离设备（南京拓钰医药科技有限公司）；SDHC8E15-210 型苏泊尔电磁炉（浙江苏泊尔股份有限公司）；不锈钢煎药桶（50 L）。

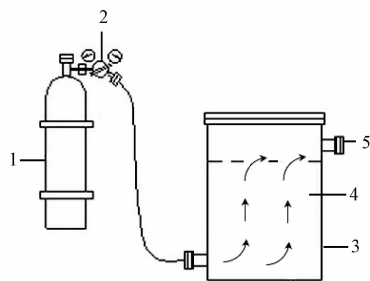
1.3 方法

1.3.1 通关藤饮片的提取

1.3.1.1 常规提取 取通关藤饮片 1 kg，按照《国家中成药标准汇编口腔肿瘤儿科分册》中消癌平注射液质量标准制法，加水提取 3 次（8、5、5 倍），提取时间分别为 1.5、1、0.8 h，提取液分别滤过，合并滤液，定容至 15 L，即得。

1.3.1.2 充氮提取 取通关藤饮片 1 kg，按照消癌平注射液质量标准制法，加水提取 3 次（8、5、

5 倍），提取时间分别为 1.5、1、0.8 h，提取前均充氮排氧（图 2）。通过管路将氮气瓶与提取罐相连，打开提取罐的排气阀和氮气瓶减压阀，使氮气进入药液中，调节充氮压力在 1.0 ~ 1.5 MPa 之间，充氮时间分别考察 1、5、10、20、30、40、50、60 min，达到充氮时间后即开始提取。提取液分别滤过，合并滤液，定容至 15 L，即得。



1. 氮气瓶 2. 减压阀 3. 提取罐 4. 药液 5. 排气阀

1. nitrogen cylinder 2. pressure reducing valve 3. extracting tank
4. solution 5. exhaust valve

图 2 充氮提取图

Fig. 2 Diagram of extraction by nitrogen pressurization

1.3.2 通关藤浓缩工艺

1.3.2.1 加热浓缩 取通关藤常规提取液 15 L，煎药桶常压加热浓缩，浓缩至 0.4 L，即得。

1.3.2.2 纳滤浓缩 根据前期研究^[7]，取通关藤充氮提取液 15 L，纳滤膜（300 ~ 500 Da）浓缩，操作压力 5 kg/cm²，温度 25 ℃，将进液端与截留液端均置于原液贮液罐中。当原液浓缩至 0.5 L 左右时，加入 3 倍量纯化水继续纳滤，重复 3 次，浓缩液定容至 0.4 L，即得。

1.3.3 绿原酸检测^[8-9]

1.3.3.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量，置于棕色量瓶中，加 50% 甲醇制成 0.204 mg/mL 对照品溶液，即得。

1.3.3.2 HPLC 色谱条件 Thermo scientific C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）；柱温 25 ℃；检测波长 327 nm；体积流量 1 mL/min；进样量 10 μL；流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液（9 : 91）。

1.3.3.3 线性关系 量取绿原酸对照品溶液适量，逐级稀释成系列质量浓度对照品溶液，吸取 10 μL，注入色谱仪测定。以峰面积为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 6\,648.3X + 0.323\,1$ （ $r = 0.999\,8$ ），表明在 5.1 ~ 204 μg/mL 范围内线性关系良好。

1.3.3.4 精密度试验 精密量取绿原酸对照品溶液适量，连续测定 6 次，测得绿原酸峰面积 RSD 为 0.80%，表明仪器精密度良好。

1.3.3.5 重复性试验 按“1.3.1.1”项下方法制备通关藤饮片提取液 6 份，测得绿原酸峰面积 RSD 为 1.86%，表明该方法重复性良好。

1.3.3.6 稳定性试验 精密量取绿原酸对照品溶液适量，分别于 0、2、4、8、12 h 测定，测得绿原酸峰面积 RSD 为 0.96%，表明绿原酸溶液在 12 h 内稳定。

1.3.3.7 回收率试验 精密量取通关藤饮片常规提取液 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加入绿原酸对照品溶液 0.5 mL，加水稀释至刻度，平行制备 6 份，测得平均回收率（ $n = 6$ ）为 98.8%，RSD 为 2.34%。

1.3.4 总酚酸检测^[10]

1.3.4.1 实验方法 精密量取待测样品 1 mL，置于 25 mL 量瓶中，精密加入无水乙醇 5 mL、0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2 mL、0.9% 铁氰化钾-0.6% 三氯化铁（0.9：1）混合溶液 1 mL，摇匀，暗处放置 5 min，0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度，摇匀，暗处放置 20 min。以上述乙醇管为空白，按照紫外-可见分光光度法（《中国药典》2010 年版一部附录 VA），在 720 nm 波长处分别测定吸光度 A，根据标准曲线计算总酚酸含量。

1.3.4.2 线性关系 精密量取绿原酸对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mL，按上述方法处理，少于 1 mL 时无水乙醇补足。以绿原酸质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 0.1152X - 0.0179$ （ $r = 0.9994$ ），表明在 10.2 ~ 204 μg/mL 范围内线性关系良好。

1.3.4.3 精密度试验 精密量取绿原酸对照品溶液 1 mL，置于 25 mL 量瓶中，按“1.3.4.1”项下方法显色和测定，连续 6 次，测得吸光度 RSD 为 0.71%，表明仪器精密度良好。

1.3.4.4 重复性试验 按“1.3.1.1”项下方法制备通关藤饮片提取液 6 份，按“1.3.4.1”项下方法显色和测定，测得吸光度 RSD 为 2.57%，表明该方法重复性良好。

1.3.4.5 稳定性试验 精密量取绿原酸对照品溶液 1 mL，置于 25 mL 量瓶中，按“1.3.4.1”项下方法显色，于 20、25、30、35、40、45、50 min 测定，测得样品在 20 ~ 30 min 内稳定。

1.3.4.6 回收率试验 精密量取通关藤饮片常规提取液 0.1 mL，置于 25 mL 量瓶中，加入绿原酸对照品溶液 2 mL，加水稀释至刻度，摇匀，平行 6 份，按“1.3.4.1”项下方法显色和测定，测得平均回收率（ $n = 6$ ）为 102.1%，RSD 为 2.11%。

1.4 样品测定

1.4.1 绿原酸 直接取样通关藤饮片提取液，精密量取浓缩液及充氮提取-纳滤浓缩液各 5 mL，置于 25 mL 量瓶中，纯化水稀释至刻度，摇匀，在“1.3.3.2”项条件下检测绿原酸峰面积，根据标准曲线计算其含量。

1.4.2 总酚酸 精密量取通关藤饮片提取液 0.5 mL，置于 25 mL 量瓶中，纯化水稀释至刻度，摇匀；精密量取浓缩液及充氮提取-纳滤浓缩液 0.5 mL，置于 25 mL 量瓶中，纯化水稀释至刻度，摇匀，得稀释液；精密量取稀释液 0.5 mL，置于 25 mL 量瓶中，纯化水稀释至刻度，摇匀。按“1.3.4.1”项下方法显色和测定，根据标准曲线计算总酚酸的含量。

2 结果

2.1 充氮时间对提取的影响 由图 3 可知，随着氮气逐步替换水溶液中的氧气时，绿原酸和总酚酸在提取液中的含量逐步升高，20 min 后基本处于恒定水平。因此在充氮提取时，均采用预充氮 20 min 后再进行加热提取。

2.2 常规提取与充氮提取比较 由表 1 可知，在平行操作前提下，充氮提取下绿原酸和总酚酸的含量均明显高于常规煎煮，分别增加了 33.68% 和 22.22%，表明在煎煮前通氮气排出溶液和提取环境中的氧气时，可以减弱通关藤中酚酸类成分的氧化，提高溶液稳定性。

表 1 两种提取工艺下绿原酸和总酚酸含量

Tab.1 Contents of chlorogenic acid and total phenolic acids under two extraction processes

成分	提取工艺		增加量/%
	常规提取	充氮提取	
绿原酸/(μg·mL ⁻¹)	7.63	10.20	33.68
总酚酸/(mg·mL ⁻¹)	4.05	4.95	22.22

2.3 加热浓缩与纳滤浓缩比较 由表 2 可知，浓缩至相同体积后，纳滤浓缩液中绿原酸及总酚酸的含量明显高于加热浓缩液，而且浓缩后成分均增加了 97% 以上。其中，纳滤浓缩液中绿原酸含量约为加热浓缩液的 3 倍。

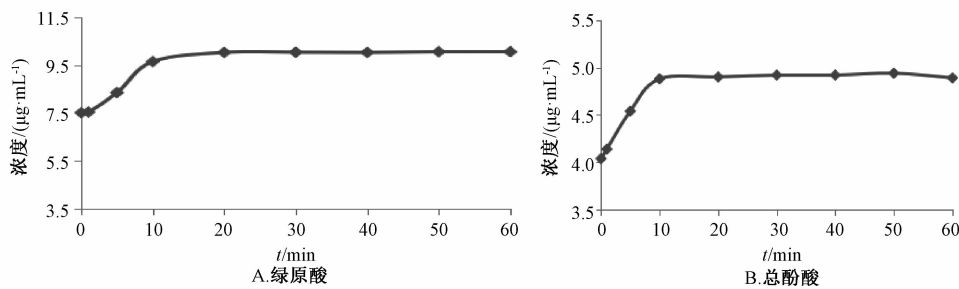


图 3 充氮时间对提取的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen pressurization time on extraction

表 2 两种浓缩方法下绿原酸和总酚酸的含有量

Tab. 2 Contents of chlorogenic acid and total phenolic acids under two concentration methods

成分	浓缩方法		增加量/%
	加热	纳滤	
绿原酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	137.42	377.53	174.73
总酚酸/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	90.64	178.94	97.42

2.4 通关藤提取浓缩工艺优化 由表 3 可知，采用抗氧化提取、无热效应浓缩制备的消癌平注射液中，绿原酸和总酚酸得到了较好的保留，而且方法重复性好，能耗低。

表 3 工艺优化结果

Tab. 3 Results of process optimizations

成分	编号			平均值	RSD/%
	1	2	3		
绿原酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	391.89	373.61	378.25	381.25	2.49
总酚酸/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	180.33	185.46	172.58	179.46	3.61

3 结论

氮气作为药用辅料，大多用于注射液、口服液等制剂成型时的抗氧化，此外还在中药材贮存中起防霉和保鲜作用，但在药材提取过程中的相关研究较少。本实验通过小试提取发现，通关藤提取液及浓缩液中酚酸类成分的含有量较常规加热提取浓缩明显升高，但尚需放大生产来验证其可行性。在中药制药车间工艺设计中，可以通过简易管路改造，在提取设备的药渣出口处增加氮气输送管路，实现含酚酸及易氧化成分中药材的抗氧化。

通关藤提取液在纳滤浓缩前，需要进行过滤处理，但常规过滤手段不能有效去除不溶性微粒、黏液质大分子等，导致在纳滤过程中浓差极化和膜通量衰减现象明显。若采用微滤或超滤进行预处理，在保留成分的同时，可以减轻膜污染，提高生产效率。另外，前期研究发现，微滤、超滤和纳滤技术在精制除杂、提升制剂品质、降低能耗等方面优势明显，通过与相关技术的有机耦合，将会逐步提升

中药制药水平。

目前，对含有易氧化成分药材的提取和浓缩工艺大多采用降低热处理温度以及缩短加热时间，但成分氧化分解将导致生产工艺参数可调节范围窄、制剂中间体质量不均一，直接影响终端产品质量。本研究发现，“充氮提取-纳滤浓缩”技术可有效降低消癌平注射液生产过程中绿原酸及总酚酸的氧化分解，而且重复性好，不仅降低了生产能耗，而且可有效提高资源利用率。

参考文献：

[1] 倪力军,贺 静,张立国,等. 丹酚酸提取物的 HPLC 图谱与其抗氧化活性关系研究[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2029-2033.

[2] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.

[3] 徐龙泉,彭黔荣,杨 敏,等. 膜分离技术在中药生产及研究中的应用进展 [J]. 中 成 药, 2013, 35 (9): 1989-1994.

[4] 胡立新,崔朝亮,程新华,等. 利用膜分离技术对牛初乳进行除菌浓缩的研究[J]. 食品科技, 2007(3): 90-92.

[5] 牟旭凤,白庆中,陈红盛,等. 聚合物辅助超滤/纳滤技术处理模拟放射性废水[J]. 给水排水, 2006, 32(S1): 174-177.

[6] 张丽坤,于海瑞. 活性炭和氮气对复方氨基酸注射液生产中色氨酸含量的影响 [J]. 黑龙江医药, 2009, 22 (6): 840-842.

[7] 李存玉,钱 祥,杨泽秋,等. 基于纳滤技术的消癌平注射液中钾离子去除工艺优化[J]. 中成药, 2015, 37(2): 294-297.

[8] 温瑞卿,李东辉,王 鑫. HPLC 法和聚类分析法探讨不同厂家消癌平片中绿原酸含量的一致性和稳定性[J]. 中成药, 2011, 32(11): 2021-2023.

[9] 温瑞卿,李东辉,韩 杰,等. 消癌平片中绿原酸测定的影响因素和优化研究 [J]. 中 成 药, 2012, 34 (4): 762-764.

[10] 付煜荣,张万明,陈 桂,等. 景天三七中没食子酸和总酚酸含量测定[J]. 中成药, 2009, 28(7): 1016-1018.