

两种膜截留分子量超滤及醇沉 对清热解毒口服液纯化效果的比较^{*}

□李淑莉 刘振丽^{**} 宋志前 付俊

(中国中医研究院基础理论研究所 北京 100700)

摘要:目的:考察超滤膜截留分子量对纯化效果的影响,并与醇沉法进行比较。方法:采用超滤法(膜截留分子量 20000、70000,称之 20000 膜、70000 膜,下同)和乙醇沉淀法纯化清热解毒口服液。以黄芩中黄芩苷、金银花中绿原酸保留率、杂质多糖和鞣质的清除率以及膜通量变化为指标,比较两种膜超滤效果,并与乙醇沉淀法比较。结果:黄芩苷、绿原酸保留率两种截留分子量的膜相差不大,但明显高于醇沉;去除多糖以 20000 膜最好,其次为 70000 膜,醇沉最差;去除鞣质以 70000 膜最好,其次为醇沉,20000 膜最差;70000 膜膜通量衰减小于 20000 膜,超滤等量药液所需时间缩短两倍。结论:选择适宜的超滤膜截留分子量可以达到纯化中药的效果。

关键词:超滤 醇沉 膜截留分子量 清热解毒口服液

超滤是膜分离科学的重要分支,根据体系中相对分子质量的大小和形状,通过膜孔的筛分、吸附等作用,进行分离、纯化、浓缩或脱盐。近年来,超滤法已用于多种中药有效成分的提取分离。中药制剂(包括注射液、口服液、颗粒剂等)采用的膜截留分子量的范围为 0.6~10 万,多数采用膜截留分子量为 2 万和 5 万的膜^[1]。而膜截留分子量对有效成分的保留率、杂质的清除效果及膜通量衰减的程度有

何影响,未见系统报道。在采用超滤法制备中药制剂中,选择适宜的膜截留分子量,除了可以最大限度地保留有效成分、去除杂质,满足中药纯化的需要,同时,又能减轻膜的污染,延长膜的使用寿命,缩短生产周期,降低成本。

清热解毒口服液由金银花、黄芩、连翘组成,具有疏风解表、清热散瘟等功效,为《中华人民共和国药典》2000 年版一部收录的中成药,采用水提醇沉工艺制备^[2]。本文采用 2 种截留分子量的超滤膜,

收稿日期:2004-12-15

修回日期:2005-01-06

^{*} 国家中医药管理局课题:超滤膜截留分子量与超滤效果关系的研究(编号:0203ZP63),负责人:刘振丽。

^{**} 联系人:刘振丽,副研究员,研究方向:中药有效成分提取分离及质量评价,Tel:010-64014411 转 2592, E-mail: zhenli-lin@sina.com。

52 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

对清热解毒口服液处方中的中药经水提取后进行超滤,比较有效成分的保留率、杂质清除率、膜通量的变化,并与醇沉法纯化效果进行比较。

一、仪器与材料

HP1100 高效液相色谱仪, HP 化学工作站, G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 恒温箱, G1314A VWD 检测器。752 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),真空干燥箱(ZK-82B 型,上海市实验仪器总厂),小型超滤装置(天津工业大学膜天公司提供),截留分子量 2 万、7 万超滤膜(上海原子核研究所膜分离技术公司);实验用药材购于北京燕京医药公司,经中国中医研究院谢宗万教授鉴定;黄芩苷对照品(批号 715-9204)、绿原酸对照品(批号 0753-9607 中国药品生物制品检定所),乙腈为色谱纯,其余溶剂均为分析纯。

二、方法与结果

1. 超滤样品的制备及膜通量的测定 依清热解毒口服液处方称取药材一定量,按药典工艺^[2]加水煎煮 2 次,第一次 1h,第二次 40min。加水后称定重量,煎煮后加水补足减失的重量,滤过,合并滤液,离心(3000rpm·min⁻¹)15min。取上清液一定量(V₀)分别采用截留分子量 2 万、7 万的超滤膜进行超滤。超滤过程中控制压力 0.1Mpa,温度 40±1℃。分别在超出液为 3/4 V₀、V₀ 时,向料槽中加入 1/4 V₀ 的蒸馏水,直至超出液总体积为 1.25 V₀。2 万膜为第 11h、14h;7 万膜为第 3h、4h 时加蒸馏水。当超出液总体积为 3/4 V₀、V₀、1.25 V₀ 时,取超出液一定量测定黄芩苷、绿原酸含量。

在超滤过程中,按一定时间间隔测定 5min 内超出液的体积,作为膜通量。以超滤开始时的膜通量为 100%,计算不同时间膜通量百分数。以时间为横坐标,膜通量百分数为纵坐标作图,结果见图 1。试验重复 2 次。

2. 醇沉样品的制备 按药典方法^[2]制备清热解毒口服液。

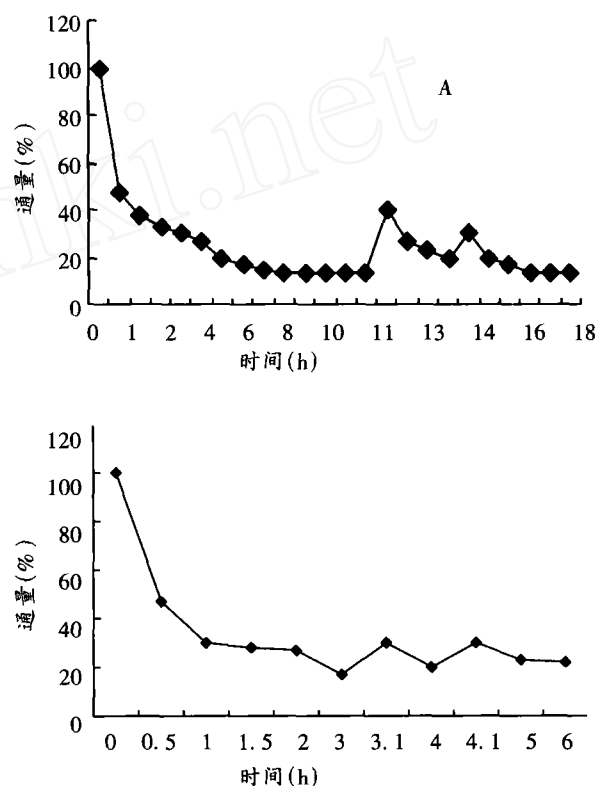


图 1 超滤过程膜通量的变化

3. 黄芩苷含量测定

(1) 色谱条件。色谱柱 Waters symmetry C₁₈ (3.0×150mm, 5(μm)), 流动相: 甲醇-0.6% 磷酸溶液(38:62), 检测波长: 276nm, 柱温 40℃, 流速 0.6 ml/min。

(2) 对照品溶液的制备和线性关系考察。精密称取黄芩苷对照品,加乙醇溶解并制成每 1 ml 含 0.054mg 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9μl, 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积积分值为纵坐标,黄芩苷量为横坐标,计算回归方程: $Y = 0.0001767X - 0.0056642$, $r = 0.9999$, $Y = 0.9999$, 进样量在 0.054~0.486μg, 呈良好的线性关系。

(3) 精密度试验。精密吸取对照品溶液 5μl, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 峰面积积分值的 RSD 为 1.88%。

(4) 回收率试验。精密吸取同一超滤液 5 份, 分

别精密加入黄芩苷对照品,进行含量测定,计算回收率为 98.8%,RSD 为 2.60%。

(5) 供试品中黄芩苷含量测定。精密吸取各超滤样品和醇沉样品一定量,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算含量。测定结果见表 1。

4. 绿原酸含量测定

(1) 色谱条件。色谱柱 Waters symmetry C₁₈ (3.0 × 150mm, 5μm), 流动相: 乙腈 - 0.4% 磷酸溶液 (5:95), 检测波长: 327nm, 柱温 40℃, 流速 0.6 ml/min。

(2) 对照品溶液的制备和线性关系考察。精密称取绿原酸对照品,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.082mg 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1、2.6、4.2、5.8、7.4μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积积分值为纵坐标,绿原酸量为横坐标,计算回归方程: $Y = 0.0002086x + 0.0057705$, $Y = 0.9999$, 进样量在 0.082 ~ 0.607μg 呈良好的线性关系。

(3) 精密度试验。精密吸取对照品溶液 5μl,按上述色谱条件重复进样 5 次,峰面积积分值的 RSD 为 1.65%。

(4) 回收率试验。精密吸取同一超滤液 5 份,分别精密加入绿原酸对照品,进行含量测定,计算回收率为 97.2%,RSD 为 1.20%。

5. 多糖测定

(1) 葡萄糖对照品溶液的制备和线性关系考察。

精密称取干燥恒重的葡萄糖对照品 5 mg,置 5 ml 容量瓶中,加水制成每 1 ml 含 1mg 的对照品溶液。分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 20、40、60、80、100 μl,置于 5 个 10 ml 容量瓶中,分别加入蒸馏水 1.98 ml、1.96 ml、1.94 ml、1.92 ml、1.90 ml,使总体

积为 2 ml,再加苯酚试液 1 ml,摇匀,迅速加浓 H₂SO₄ 5 ml,摇匀后静置 5min,置于沸水浴中加热 15min,取出冷却至室温。另取 10 ml 容量瓶,加水 2 ml、苯酚 1 ml、浓 H₂SO₄ 5 mL,同上步骤制成空白溶液,于紫外分光光度计 490nm 处测定吸收度。以吸收度为纵坐标,葡萄糖量为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程: $A = 0.0082X + 0.0004$, $r = 0.9996$ 。

(2) 供试品溶液的制备。参考文献方法^[3]。取纯化前及超滤和醇沉法制备的药液一定量,蒸干,加入 80% 乙醇回流提取 2h,药液弃去,药渣 80% 乙醇洗涤两次,挥干,加水煎煮,滤过,定容,得供试品溶液。

(3) 供试品溶液多糖含量测定。精密吸取各供试品溶液一定量,依(1)项下自“加苯酚试液 1 ml…”至“取出冷却至室温”,于 490nm 处测定吸收度,计算多糖含量。超滤与醇沉前、后多糖含量的差值占纯化前含量的百分数即为多糖的清除率。结果见表 2。

6. 鞣质测定

按药典附录方法测定^[2]。鞣质清除率的计算方法与多糖相同。结果见表 2。

表 1 超滤及醇沉清热解毒口服液黄芩苷、绿原酸保留率(%)

纯化方法	超出原液体积 3/4 倍		超出原液等体积		超出原液体积 1.25 倍	
	黄芩苷	绿原酸	黄芩苷	绿原酸	黄芩苷	绿原酸
2 万膜超滤	61.4	61.6	68.9	73.8	90.8	94.5
7 万膜超滤	64.0	68.4	74.7	82.9	93.3	96.6
乙醇沉淀			78.8	74.0		

以黄芩药材中黄芩苷、绿原酸含量为 100%。

表 2 超滤及醇沉纯化前后多糖、鞣质测定结果(%)

纯化方法	多糖			鞣质		
	纯化前	纯化后	清除率	纯化前	纯化后	清除率
2 万膜超滤		7.80	70.3		2.9	38.3
7 万膜超滤	26.2	8.70	66.8	4.7	2.1	55.3
乙醇沉淀		12.2	53.4		2.7	42.6

三、讨 论

从试验结果看,采用超滤法纯化清热解毒口服液,膜截留分子量2万与7万膜比较,黄芩苷的保留率分别为90.8%与93.3%,无明显差异,均高于乙醇沉淀法的保留率78.8%(表1)。去除多糖以2万膜最好,其次为7万膜,再为醇沉;去除鞣质以7万膜最好,其次为醇沉,再为2万膜;综合考虑去除杂质以7万膜为好。2万膜通量衰减程度高于7万膜,且由于7万膜孔径大,超滤等量药液所需时间为6h,而2万膜需要19h。

本试验结果表明,超滤法较醇沉法能更有效地保留有效成分,去除杂质。并且通过选择适宜的超滤膜,截留分子量7万膜可以实现比醇沉法更好的纯化效果。以往的研究也表明超滤法较醇沉法更能有效地保留有效成分^[4-5],并能提高口服液的稳定性和澄明度^[6-7]。

参考文献

- 1 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):898~900.
- 2 中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.
- 3 杨桦,贾旭,易红.藏药藏麻中多糖的含量测定研究.中草药,2001,32(1):29~31.
- 4 刘振丽,张秋海,欧兴长.超滤与醇沉对中研I号冲剂有效成分影响的对比研究[J].中草药,1998,29(7):451~454.
- 5 刘振丽,张秋海,欧兴长.超滤条件对中药四妙勇安汤超滤的影响[J].膜科学与技术,1999,19(2):554~556.
- 6 李淑莉,欧兴长,毛德法,等.超滤法与传统的醇沉法对黄连解毒汤纯化效果的比较研究.水处理技术,2000,26(1):21~22.
- 7 李十中,陈玮,李振花.不同制备工艺对中药有效成分的影响及药物成分分析[J].中草药,2000,31(9):668~669.

(责任编辑:刘维杰)

(上接第51页)

- 16 Meyring M, Chankvetadze B. Simultaneous separation and enantioseparation of thalidomide and its hydroxylated metabolites using high-performance liquid chromatography in common-size columns, capillary liquid chromatography and nonaqueous capillary electrochromatography[J]. J Chromatogr A, 2000, 876(1/2):157.
- 17 Annabelle S, Frinch C. Enantiomeric separations by capillary electrochromatography using a macrocyclic antibiotic chiral stationary phase

[J]. J Chromatogr A, 1999, 848(1/2):375.

- 18 Liu Z, Zou H, Ni J, et al. Open tubular capillary electrochromatography with adsorbed stationary phase[J]. Anal Chim Acta, 1999, 378:73.
- 19 林秀丽,李关宾,主沉浮,等.以L-白氨酸为手性选择剂用毛细管电泳法拆分12种手性药物[J].色谱,2001,19(2):109.
- 20 黄晓冬,邹汉法,毛希琴,等.原位分子印迹毛细管电色谱柱的制备及其对非对映异构体的分离[J].色谱,2002,20(5):437.
- 21 Schweitz L, Spiegel P, Nisson S. Molecule-imprinted microparticles for capillary electrochromatographic enantiomer separation of propranolol[J]. Analyst 2000, 125(11):1899.
- 22 Chirica G, Remacho VT. Silicate entrapped columns. New columns designed for capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis. 1999, 20(1):50.
- 23 陆豪杰,欧庆瑜.以衍生化聚硅氧烷为固定相的开管毛细管电色谱柱的研制[J].高等学校化学学报,2002,23(1):30.
- 24 Lin JM, Takagama T, Uchiyama K, et al. Capillary electrochromatographic separation of amino acid enantiomers using on-column prepared molecularly imprinted polymer[J]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15(9-10):1351.
- 25 Jelinek I, Spopek J, Smolkova-keulemansova E. Use of cyclodextrins in isotachopheresis: I. Effect of cyclodextrin on the isotachopheretic separation of related penicillins [J]. J Chromatogr A, 1987, 405:379.
- 26 Tnaka S, Kaneta T, Taga M, et al. Capillary tube isotachopheretic separation of catecholamines using cyclodextrin in the leading electrolyte[J]. J Chromatogr A, 1991, 587:364.
- 27 Wang EK. Analytical Chemistry in 21 Century [M]. Beijing: Science Press. 1999. 102.
- 28 Zhao S, Lifu YM. Quantification of amino acid enantiomers in single cells by capillary electrophoresis[J]. Cell Mol Biol, 2001, 47(7):1217.

(责任编辑:刘维杰 张志华)

广州启动优秀中医临床人才研修项目

广州市卫生技术鉴定与评估中心代表广州市卫生局与广州中医药大学签订协议,正式启动“广州市优秀中医临床人才研修项目”。

该项目共投入100万元,其中广州市卫生局投入60万元,培养对象所在单位共投入40万元,在广州市卫生系统内选拔20名中青年中医学术骨干进行为期3年的中医古籍和中医临床实践的培训,并利用大学的优势,委托广州中医药大学对培养对象进行选拔、培养和考核。培养方式包括跟师临床实践、自我钻研中医经典理论、参加培训班、外出进修和参加学术交流等。(文摘)

separation by taking capillary tubes for separation passage and high voltage electricity for motive force and in accordance with the difference of mobility and distribution behaviors of all the components of samples. It has unique merits in the separation and analysis of chiral drugs and is widely used in the areas of agriculture, medicine and chemical engineering. This article summarizes the application of capillary electrophoresis to the main modes of separation of chiral compounds in the last years. It can be foreseen that this technology will be applied more and more widely in the area of life science, and the analysis of monocells by capillary electrophoresis in particular is becoming a means of *in vivo* detection in pharmacology at the cellular level and in understanding the process of life.

Key Word: capillary electrophoresis, chiral drug, separation and analysis, summary.

Comparison of Purification Effects of Qingrejiedukoufuye (Heat – clearing and Detoxicating Oral Liquid) by Methods of Ultra – filtration and Alcohol Precipitation of Retain Molecular Weight of Two Membranes

Li Shuli, Liu Zhenli, Song Zhiqian and Fu Jun

(Institute of Basic Theories, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)

Objective: To investigate the impact of retain molecular weight of milipore filters on the effect of purification and compare it with the effect of purification made by the method of alcohol precipitation. **Method:** To purify Qingrejiedukoufuye (Heat – clearing and Detoxicating Oral Liquid) by the method of ultra – filtration (retain molecular weights 20000 and 70000 of membranes) and the method of alcohol precipitation. To compare the effect of ultra – filtration of the said two membranes by the way of taking for indexes the retention rate of baicalin in Radix Scutellariae and that of chrologenic acid and the clearance rate of impure polysaccharides and tannin of Flos Lonicerae as well as the change of membrane flux and compare it with the effect of alcohol precipitation. **Result:** For the retention rate of baicalin and chrologenic acid the difference of purification effect of the membranes with two retain molecular weights is small but notably larger than that from the method of alcohol precipitation; for the clearance rate of polysaccharides the purification effect from the membrane with 20000 of retain molecular weight is the best and then that from the membrane with 70000, while the purification effect from the method of alcohol precipitation is the worse; for the clearance rate of tannin the purification effect from the membrane with 70000 of retain molecular weight is the best and then that from the method of alcohol precipitation, while the purification effect from the membrane with 20000 falls worse; the attenuation rate of flux of the membrane with 70000 of retain molecular weight is lower than of the membrane with 20000 and the time needed for equivalent liquid medicine by the method of ultra – filtration reduces twice. **Conclusion:** The purification effects of Chinese drugs can be achieved by selecting appropriate retain molecular weight of milipore filters.

Key Words: Ultra – filtration, alcohol precipitation, retain molecular weight, Qingrejiedukoufuye (Heat – clearing and Detoxicating Oral Liquid)