

银黄煎液多级膜分离物有效成分的含量及其体外抑菌作用

杨丽平, 孔焕宇*, 朱嘉, 宋庆慧, 郭武艳
(中国中医科学院骨伤科研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究银黄煎液及其五级膜截留液中黄芩苷等 3 个有效成分的含量变化和体外抑菌作用。方法: 采用多级膜分离方法按相对分子质量大小分离银黄煎液, HPLC 测定成分含量, 用金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌体外测试原液及各级分离物的最低抑菌浓度 (MIC)。结果: 抑菌作用由强到弱依次为 4 级、3 级、5 级、2 级、原液、1 级。结论: 膜分离方法可分段分离抑菌活性物质; 微滤后的银黄煎液各级膜分离物抑菌作用均比原液强。

[关键词] 银黄煎液; 多级膜分离; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 绿原酸; 体外抑菌

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0005-03

Research of Three Effective Composition and *in vitro* Effect of Bacteriostasis of Yinhuang Decoction by Multi-stage Membrane Filter

YANG Li-ping, KONG Huan-yu*, ZHU Jia, SONG Qing-hui, GUO Wu-yan

(Institute of Orthopedics and Traumatology China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To research Yinhuang decoction and its five stage membrane filter liquor, to analyze the content change of baicalin and other two kinds effective composition and *in vitro* effect of bacteriostasis. **Method:** Multi-stage membrane separation by molecular size was used to separate Yinhuang decoction. Ingredients were determined by HPLC. Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae were used to test the minimum inhibitory concentration (MIC) of source liquid and all levels filter liquor. **Result:** *In vitro* effect of bacteriostasis from high to low order was four, three, five, two, source, one level filter liquor. **Conclusion:** Membrane separation method can be used to isolate antimicrobial activity substances by section. The antibacterial effect of membrane filter liquor after microfiltration is stronger than source decoction.

[Key words] Yinhuang decoction; multi-stage membrane separation; baicalin; wogonoside; chlorogenic acids; bacteriostatic test *in vitro*

中药有效成分如黄酮类、苷类、生物碱等相对分子质量绝大多数在 1 000 以下, 而无效成分多在 5 万以上, 高相对分子质量杂质的存在降低了中药有效部位浓度^[1]。而膜分离技术是基于物质相对分子质量的差异利用机械筛分原理进行物质分离, 特别适用于中药体系, 它具有无相变、分离系数大、无二次

污染、可常温连续操作等优点, 在生物医药领域被广泛应用^[2]。但目前报道多限于除杂率和产品收率, 采用多级膜并研究分离物化学组成及药效作用的很少。我们先选择较简单的银黄方进行试验, 考察 5 级膜分离系统对中药复方分离的可行性及分离物的药效和物质基础差异。

1 材料

1.1 仪器 MF/UF/NF-2319 试验级膜分离机 (安得膜分离技术工程有限公司), 0.45 μm 微孔滤膜 (PVDF 型), 20 万相对分子质量超滤膜 (PVDF 型), 5 万相对分子质量超滤膜 (PS 型), 2 万相对分子质量超滤膜 (PES 型), 300 相对分子质量纳滤膜 (PS 加聚酰胺涂膜), Agilent Technologies1200 Series 型

[收稿日期] 20110123(001)

[基金项目] 国家自然科学基金课题 (30873456)

[第一作者] 杨丽平, 本科, 主管药师, 研究方向: 中药复方物质基础, Tel: 13520234531, E-mail: artin@163.com

[通讯作者] *孔焕宇, 本科, 研究员, 研究方向: 中药复方物质基础, Tel: 13701230629, E-mail: konghy55@163.com

高效液相色谱仪。

1.2 试药 金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georigi 的干燥根,均产自山东,经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定。黄芩苷对照品(110715-200815,中国药品生物制品检定所),绿原酸对照品(110753-200413,中国药品生物制品检定所),汉黄芩苷对照品(091126,上海友思生物技术公司)。水为高纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯。

1.3 菌种及培养基 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923(望京医院检验科),肺炎链球菌 ATCC 49619(中国药品生物制品检定所);MH 琼脂培养基(北京陆桥技术有限公司,批号 100329),MH 琼脂培养基(BD 公司,批号 225250);脱纤维无菌新鲜羊血(北京兰伯瑞生物技术有限责任公司,货号 LFSG-01A)。

2 方法与结果

2.1 银黄方原液的制备 按照药典银黄口服液黄芩苷和绿原酸的投料比例,本试验用黄芩的黄芩苷含量和金银花的绿原酸含量推算出黄芩和金银花的投药比例为 2:1。

取黄芩 3 kg、金银花 1.5 kg,按 12,8,8 倍加水量煎煮 3 次,每次煎煮时间分别为 20,10,10 min(水沸后投药计时),经 260 目筛过滤,合并水煎液,即得膜分离用的水煎液(原液)。

2.2 膜分离物的制备 原液先经过孔径为 0.45 μm 的微滤膜处理,再依次经过截留相对分子质量 20 万,5 万,2 万的超滤膜和 300~400 的纳滤膜,分别收集 1~5 级截留液,连续制备 3 批,测定黄芩苷、绿原酸、汉黄芩苷含量^[3]及干膏质量,见表 1。

表 1 膜分离液化学成分及干膏量(n=3)

样品	3 个成分总质量/mg	干膏质量/mg
原液	180.73	686.15
1 级截留液(微滤)	8.43	38.74
2 级截留液(20 万超滤)	4.74	15.41
3 级截留液(5 万超滤)	19.95	30.83
4 级截留液(2 万超滤)	17.68	24.01
5 级截留液(300 纳滤)	90.35	480.34

2.3 抑菌试验药物的配制 原液每克生药出于干膏 0.490 1 g,按 2.1 的方法推算出银黄口服液的生药质量浓度 0.334 5 g·mL⁻¹,以此设定抑菌试验药物

干膏质量浓度为 0.163 9 g·mL⁻¹。

低温减压浓缩、冷冻干燥原液及各级膜分离物成干膏状,分别称取一定量药物干膏,溶解稀释配成 0.163 9 g 干膏/mL 的 6 个供试品溶液,121 °C 高压灭菌 15 min。

2.5 抑菌试验 用 2 倍稀释法稀释供试品溶液至 10 个等比浓度,倒入培养基后的含药干膏质量浓度依次为 17.483,8.742,4.371,2.186,1.093,0.547,0.274,0.137,0.069,0.035 g·L⁻¹。肺炎链球菌的培养基是含 10% 无菌羊全血的 MH 琼脂培养基(BD 公司),两种菌均设一组不含药物的培养基作为阴性对照,分别点种菌龄 12 h 的 0.5 麦氏单位菌液,每个培养皿均匀点种 10 个 1 微升菌液的点,37 °C 培养 18 h 观察结果,以不出现细菌生长的第 1 个含药浓度为该药物最低抑菌浓度(MIC)。结果见表 2。

表 2 膜分离物体外最低抑菌浓度(MIC) g·L⁻¹

膜分离物	金黄色葡萄球菌	肺炎链球菌
原液	8.742	17.483
1 级截留液	17.483	17.483
2 级截留液	2.186	8.742
3 级截留液	0.547	4.371
4 级截留液	0.274	1.093
5 级截留液	1.093	4.371

由表 2 可以看出原液和各级截留液对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌均有抑制作用,但对前者的 MIC 均较低,说明金黄色葡萄球菌对银黄方更敏感。抑菌作用由强到弱依次为 4 级截留液、3 级截留液、5 级截留液、2 级截留液、原液、1 级截留液。

3 讨论

多级膜分离系统将银黄水煎液的组分按相对分子质量大小分段分离,1 级微滤膜主要截留固态微粒和细菌,2 级膜截留相对分子质量大于 20 万的纤维素、树胶等大分子杂质,活性物质主要分布在 3,4,5 级截留液中。从 6 个药整体抑菌趋势看,原液和一级截留液的抑菌作用弱,截留液抑菌作用强。

经研究发现,各种精油、酚类、生物碱和黄酮类物质是中药抑菌的主要成分,更多时候,中草药抑菌是多种成分,多个抑菌途径共同起作用的结果^[4]。从黄芩中分离的黄酮苷元及苷就有 40 多种^[5],金银花多糖也有抑菌活性^[6]。我们仅测定了复方中 3 个主要成分,其他有抑菌活性的成分有待进一步研究。银黄方中有效成分的相对分子质量均大于 300,所以孔径 300 的五级膜截留了绝大部分活性物质,尤

响应面法优化贯叶连翘中金丝桃素超声提取工艺

郭凯^{1,2}, 梁剑平^{1*}, 华兰英¹, 王学红¹, 石广亮³

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 新兽药工程重点实验室, 兰州 730050;
2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

[摘要] 目的:以贯叶连翘为原料,应用响应面法探求超声提取金丝桃素的最优工艺。方法:在对影响金丝桃素提取率的单因素系统考察的基础上,采用部分析因设计分析筛选以上因素,并应用响应面法对其显著因素进行研究和优化。结果:建立了超声提取贯叶连翘中金丝桃素的工艺数学模型。超声提取金丝桃素的最佳工艺条件为超声提取时间 36.15 min,丙酮/乙醇混合提取溶剂中丙酮体积分数为 68.14%,液料比为 11.87 mL·g⁻¹,此时金丝桃素提取率理论值可达到 1.454%。经验证,提取率为 1.44%,与理论值相符。主效应关系为超声提取时间 > 丙酮体积分数 > 液料比。结论:通过以上试验得到的提取工艺条件可靠,金丝桃素提取率远高于常规提取方法,可为金丝桃素的工业化放大生产提供了一定的理论依据。

[关键词] 贯叶连翘;金丝桃素;超声提取;部分析因设计;响应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0007-06

Optimization of Ultrasonic Extraction of Hypericin in *Hypericum perforatum* by Response Surface Methodology

GUO Kai^{1,2}, LIANG Jian-ping^{1*}, HUA Lan-ying¹, WANG Xue-hong¹, SHI Guang-liang³

(1. Key Laboratory of New Animal Medicine Project Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Pharmacology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China;
2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

[收稿日期] 20100808(001)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD31B05)

[第一作者] 郭凯,硕士研究生,从事中药提取工艺的研究,Tel:13659319252,E-mail:guook@live.cn

[通讯作者] *梁剑平,研究员,博士生导师,研究方向:新型中兽药的研发,Tel:13008781170,E-mail:liangjp100@sina.com

其是小相对分子质量的活性多糖,因为活性多糖的特性是水溶性 D-葡聚糖和具线性结构或尽可能短的分枝,较容易通过 2 万的 4 级膜而被 5 级膜截留。从 2 个药的“相对分子质量分布”看,文献报导相对分子质量小于 1 万的溶解性有机物在金银花中占 68.6%,在黄芩中占 56%^[7],本试验 5 级截留液汇聚的是 300 ~ 2 万的物质,所得干膏占总干膏的 70%。

[参考文献]

- [1] 程鹏,武超,华剑,等.超滤膜分离的技术原理及其在中药领域中的应用[J].中国医药指南,2010,11(8):47.
- [2] 陈铭祥,王定勇.天然产物提取分离新技术的研究进展

[J].中国医药导报,2009,22(6):9.

- [3] 郭武艳,孔焕宇,朱嘉.两种制备工艺的银黄方中有效成分的分析[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):6.
- [4] 苏显中,王河清,于敏.中草药体外抑菌作用的研究进展郑全喜[J].中国医药生物技术,2009,4(4):295.
- [5] 徐玉田.黄芩的化学成分及现代药理作用研究进展[J].光明中医,2010,25(3):544.
- [6] 林雄平,陈晓清,苏育才.金银花和苦丁茶多糖提取物抗菌活性研究[J].亚热带植物科学,2008,37(1):51.
- [7] 樊文玲,郭立玮,董洁.中药水提液中可溶性有机物分子量分布及其对陶瓷膜通量的影响[J].南京中医药大学学报,2004,20(5):295.

[责任编辑 全燕]