

超滤膜截留分子量对双黄连口服液超滤效果的影响 及与醇沉法的比较

李淑莉, 刘振丽, 宋志前

(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超滤效果的影响, 并与醇沉法进行比较。方法: 采用超滤法(膜截留分子量 2 万、7 万) 和乙醇沉淀法纯化双黄连口服液。以金银花有效成分绿原酸保留率、杂质多糖和鞣质的清除率、干浸膏粉量以及膜通量变化为指标, 对两种膜超滤效果进行对比, 并与乙醇沉法进行比较。结果: 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 2 万膜最好, 其次为 7 万膜, 醇沉最差; 去除鞣质无明显差异; 干浸膏粉量 7 万膜与醇沉相差不大, 均高于 2 万膜; 两种膜通量衰减程度相差不大, 但 7 万膜由于孔径大, 超滤等量药液所需时间缩短一倍。结论: 选择适宜的超滤膜截留

收稿日期: 2004-12-01

基金项目: 国家中医药管理局课题(No. 0203ZP63)

通讯作者: 刘振丽, Tel: 64014411-2592, E-mail: zhenli.liu@sina.com。

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; 双黄连口服液

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)05-0003-03

超滤是一种膜分离技术,其原理是以选择性透过膜为分离介质,在外界压力作用下,原料侧组分选择性地透过膜,以达到分离、纯化的目的。采用的膜截留分子量范围为 0.6~10 万,多数采用 2 万、5 万膜^[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,未见系统的研究报道。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。

双黄连口服液由金银花、黄芩、连翘组成,具有清热解毒的功效。本文采用二种截留分子量的超滤膜,对双黄连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。

1 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,并经中国中医研究院谢宗万教授鉴定,绿原酸对照品(批号:0753-9607),购于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。

2 方法与结果

2.1 超滤样品的制备及膜通量的测定 依双黄连口服液处方称取药材一定量,分别加 10 倍、8 倍量水,煎煮 2 次,每次 1.5h。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(3000r·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 3/4V₀、V₀ 时,向料槽中加入 1/4V₀ 的蒸馏水,直至超出液总体积为 1.25V₀。当超出液总体积为 3/4V₀、V₀、1.25V₀ 时,取超出液一定量测定绿原酸含量。

在超滤过程中,按一定时间间隔测定 5 分钟内超出液的体积,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。

2.2 醇沉样品的制备 按药典方法^[2]制备双黄连口服液。

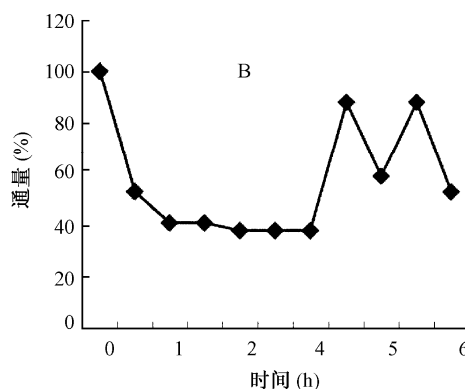
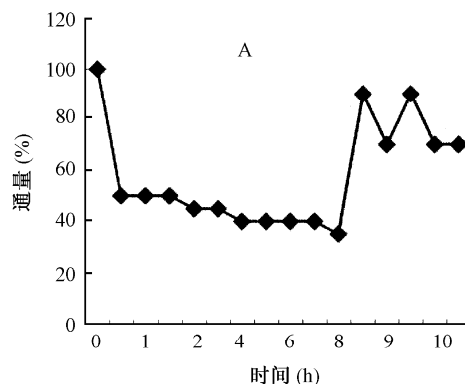


图 1 超滤过程膜通量的变化

A. 膜截留分子量 2 万; B. 膜截留分子量 7 万

注:在超出液为 3/4 V₀、V₀ 时,分别向料槽中加入 1/4 V₀ 的蒸馏水。2 万膜为第 8h、9h;7 万膜为第 4h、5h

2.3 绿原酸含量测定^[2]

2.3.1 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 0.6mL/min。

2.3.2 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 1mL 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 = 4794.97X - 27.67, r = 0.9999,进样量在 0.082~0.607μg 呈良好的线性关

系。

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

2.3.4 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%。

2.3.5 供试品中绿原酸含量测定 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。

2.4 超滤及醇沉前后干浸膏粉得率测定 分别精密量取一定体积的超滤和醇沉法制备的口服液, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 $^{\circ}$ C 干燥 3 h, 移置干燥器中, 冷却 30 min, 迅速精密称定重量, 计算干浸膏粉得率。结果见表 2。

2.5 多糖测定^[3]

2.5.1 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 5mg, 置 5mL 容量瓶中, 加水制成每 1mL 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 μ L, 置于 5 个 10mL 容量瓶中, 分别加入蒸馏水 1.98、1.96、1.94、1.92、1.90mL 使总体积为 2mL 再加苯酚试液 1mL, 摇匀, 迅速加浓 H₂SO₄ 5mL, 摇匀后静置 5min, 置于沸水浴中加热 15min, 取出冷却至室温。另取 10mL 容量瓶, 加水 2mL、苯酚 1mL、浓 H₂SO₄ 5mL, 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: $A = 0.0082X + 0.0004$, $r = 0.9996$, 表明在 0.02 ~ 0.1mg 呈良好的线性关系。

2.5.2 供试品溶液的制备 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, 药渣挥干, 加水煎煮, 滤过, 定容, 得供试品溶液。

2.5.3 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 2.5.1 项下自“加苯酚试液 1mL”, 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。

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 超滤及醇沉双黄连口服液绿原酸含量测定结果(mg/g 金银花)

纯化方法	超出原液体积		
	3/4 倍	等体积	1.25 倍
2 万膜超滤	9.21	11.07	13.85
7 万膜超滤	9.42	12.39	13.86
乙醇沉淀	—	10.64	—

表 2 超滤及醇沉后各指标测定结果 (%)

纯化方法	干浸膏粉得率	多糖			鞣质		
		前	后	清除率	前	后	清除率
2 万膜	13.0	—	3.3	75.2	—	3.2	65.6
7 万膜	19.1	13.3	4.7	64.7	9.3	3.1	66.7
醇沉	18.0	—	6.2	53.4	—	3.0	67.7

3 讨论

从试验结果看, 采用超滤法纯化双黄连口服液, 膜截留分子量 2 万与 7 万膜比较, 有效成分绿原酸的含量无明显差异, 均高于乙醇沉淀法的保留率(表 1)。去除多糖以 2 万膜最好, 其次为 7 万膜, 再为醇沉; 去除鞣质相差不大; 干浸膏得率 7 万膜与醇沉相差不大, 均高于 2 万膜(表 2)。说明去除杂质以 2 万膜为好。两种膜通量衰减程度相差不大, 在超滤后 1h 至超出四分之三药液膜通量维持恒定。但 7 万膜由于孔径大, 超滤等量药液所需时间为 6h, 而 2 万膜需要 11h。

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]。但目前对超滤法的研究, 多限于实验室小试水平, 最终将超滤法应用于大生产纯化工艺, 还有需要解决的问题。

多糖测定中, 供试品先以 80% 乙醇回流, 除去小分子糖及苷类对多糖测定的干扰, 然后水提取测定。

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.
- [2] 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 405, 152, 附录 57.
- [3] 杨桦, 贾旭, 易红. 藏药蕨麻中多糖的含量测定研究[J]. 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] 付小菊, 陈德成. 超滤法和水醇法制备清热解毒口服液的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 590.
- [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.