

超滤和醇沉对艾可冲剂有效成分影响的对比实验

中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700) 刘振丽* 张 玲 张秋海 欧兴长 丁家欣

摘 要 采用反相高效液相色谱法,测定艾可冲剂超滤前后金银花中主要有效成分氯原酸、黄芩主要有效成分黄芩苷含量变化,并与水提醇沉法进行了比较。结果表明超滤法能更有效地保留有效成分。

关键词 高效液相色谱法 超滤 醇沉 金银花 氯原酸 黄芩 黄芩苷

艾可冲剂为新研制的治疗艾滋病的中药复方制剂。临床观察发现该药具有延长艾滋病患者的寿命,改善其生命质量等作用。免疫学研究表明,该药具有抗猴 STV 病毒,增强细胞和体液免疫功能的作用。本方由金银花、黄芩等数味中药组成,在制备过程中,采用超滤法纯化以除去杂质。为考察超滤对方中主要药物成分的影响,我们对超滤前后金银花中主要有效成分氯原酸、黄芩主要有效成分黄芩苷含量进行了测定,并与水提醇沉法进行了比较。

金银花 *Lonicera japonica* Thunb, 为常用的清热解毒药。其主要成分为氯原酸,分子量为 354.3,具有抗菌、抗病毒作用^[1]。黄芩主要有效成分黄芩苷,分子量为 446.4,具有抗菌、解热、抗炎作用^[2]。采用超滤(分子量截留值 1 万)可以除去它们中的多糖、蛋白质等大分子。

超滤是一种膜分离技术。根据体系中分子的大小和形状,通过膜孔的筛分作用,起到分离、纯化、浓缩或脱盐作用。近年来,中药制剂工艺中用超滤法研究报道很多,尤其是纯化注射液,取得了良好的效果^[3,4]。

1 仪器和材料

Waters 高效液相色谱仪;730 数据处理机;480 紫外可见检测器。

超滤器(天津纺织工学院生产),分子量截留值 1 万。

甲醇为光谱纯,其余溶剂为分析纯;氯原酸、黄芩苷对照品购于中国药品生物制品检定所;金银花购于济宁,黄芩购于承德。

2 实验方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 原溶液:按处方称取方中药材一定量,加入 10 倍量水 100℃ 煎煮 1.5 h,过滤,药渣再加入 8 倍量水煎煮 1 h,合并药液,离心,测量上清液体积,取出一定量药液(为 A),作为测定原液氯原酸、黄芩苷含量用。

将剩余药液平均分成 6 等份,3 份用作超滤,3 份用作醇沉。

2.1.2 醇沉溶液:将醇沉的 3 部分分别水浴浓缩至 1:1 体积,加入乙醇至含醇量 70%,冷藏 24 h,过滤,洗涤沉淀,洗涤液与滤液合并,分别测定体积,得到 3 部分醇沉液(为 B、C、D),作为测定醇沉液中氯原酸、黄芩苷含量用。

2.1.3 超滤液:根据以前的实验结果^[5],以 1.25 倍体积超滤得到 3 部分超滤液(为 E、F、G),测定体积,作为测定超滤液中氯原酸、黄芩苷含量用。

2.2 超滤及醇沉对氯原酸含量的影响

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取 105℃

* Address: Liu Zhenli, Institute of Basic Theory Research, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing
刘振丽 女,助研。1986 年毕业于北京中医药大学中药学院,一直从事中药有效成分的提取分离及中药新药质量标准的研究工作。曾承担国家自然科学基金青年课题“骨碎补中活性成分对关节软骨细胞功能影响的实验研究”,并参与多项国家级课题的研究工作。

恒重的氯原酸对照品 5 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇-水(1 : 1)溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.2 色谱条件:色谱柱:十八烷基键合硅胶 ODS 柱,3.9 cm×150 cm;流动相:甲醇-0.2 mol/L 醋酸钠缓冲溶液(pH3.6)(6.5 : 93.5);柱温:室温(20 ℃以上);流量:1 mL/min。检测波长:326 nm;0.1AUFS。

2.2.3 线性关系的考察:精密吸取对照品溶液 2、4、5、6、8 μL 依次进样,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,对照品重量 X 为横坐标,进行回归处理,计算得回归方程:Y = 12 848X - 114, r = 0.9994,表明对照品在 0.04 μg~4.0 μg 范围内具有良好的线性关系。

2.2.4 精密度实验:精密吸取上述对照品溶液 4 μL,连续重复进样 5 次,对照品峰面积积分值的相对标准偏差<2%。

2.2.5 色谱样品的制备:取 A~G 各 1 mL,稀释至 10 mL,用 millipore 0.5 μ 膜过滤后进样。

2.2.6 色谱测定:分别精密吸取对照品溶液与各供试品溶液 4 μL 进样,测定峰面积,按外标法计算,结果见表 1。

表 1 各供试品中氯原酸含量(n=3)

项目	氯原酸含量(%)	相当原液(%)	平均回收率(%)
原液 A	0.3072	100.0	100
醇沉 B	0.1665	54.2	
C	0.1946	63.4	59.2
D	0.1843	60.0	
超滤 E	0.2162	70.4	
F	0.2241	73.0	71.8
G	0.2184	71.1	

2.3 超滤及醇沉对黄芩苷含量的影响

2.3.1 对照品溶液的制备:精密称取 105 ℃恒重的黄芩苷对照品 4 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。

2.3.2 色谱条件:色谱柱:十八烷基键合硅胶 ODS 柱,3.9 cm×150 cm;流动相:甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钠-1%冰醋酸(28 : 72

: 1);柱温:室温(20 ℃以上);流量:1 mL/min;检测波长:280 nm;0.1 AUFS。

2.3.3 线性关系的考察:精密吸取对照品溶液 1、2、4、8、12 μL 依次进样,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值 Y 为纵坐标,对照品重量 X 为横坐标,进行回归处理,计算得回归方程:Y = 20 877X - 117, r = 0.9997,表明对照品在 0.07 μg~0.86 μg 范围内具有良好的线性关系。

2.3.4 精密度实验:精密吸取上述对照品溶液 4 μL,连续重复进样 5 次,对照品峰面积积分值的相对标准偏差<2%。

2.3.5 色谱测定:分别精密吸取对照品溶液与各供试品溶液 4 μL 进样,测定峰面积,按外标法计算,结果见表 2。

表 2 各供试品中黄芩苷含量(n=3)

项目	黄芩苷含量(%)	相当原液(%)	平均回收率(%)
原液 A	0.8351	100.00	100
醇沉 B	0.4459	53.4	
C	0.4535	54.3	54.9
D	0.4819	57.1	
超滤 E	0.6021	72.1	
F	0.5753	68.9	70.1
G	0.5612	69.4	

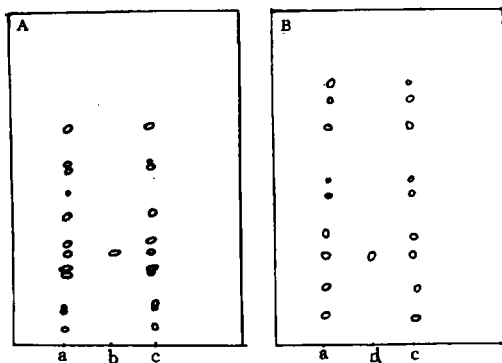
2.4 定性比较

2.4.1 供试品的制备:将相当于 1 g 金银花的水提醇沉液及超滤液蒸干,加入石油醚 40 mL,置水浴上回流 1 h,过滤,药渣加甲醇 30 mL 置水浴上回流 1 h,过滤,滤液蒸干,残渣加水 40 mL,使溶解,水溶液用正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用水洗涤 3 次,置水浴蒸干,残渣加 5 mL 甲醇溶解。

2.4.2 金银花定性比较:硅胶 GF₂₅₄-0.3% CMC-Na 薄层板,15 cm×20 cm,105 ℃活化 0.5 h,醋酸丁酯-甲酸-水(6 : 1 : 1)展开,点样 3 μL~5 μL,展开 12 cm~15 cm,取出,晾干,喷 10%硫酸乙醇液,110 ℃加热至显色明显,日光下观察,结果见图 1。

2.4.3 黄芩定性比较:硅胶 GF₂₅₄-0.3% CMC-Na 薄层板,15 cm×20 cm,105 ℃活

化 0.5 h, 氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(5:3:2:1)展开, 点样 3 μL ~5 μL , 展开 12 cm~15 cm 取出, 晾干, 日光下观察, 结果见图 1。



A-金银花 B-黄芩 a-水提醇沉
b-氯原酸 c-超滤液 d-黄芩苷

图 1 薄层层析图

3 结果及讨论

艾可冲剂方经超滤后, 氯原酸的平均回收率为 71.8%, 而醇沉为 59.2%。超滤后黄芩苷的平均回收率为 70.1%, 而醇沉为 54.9%, 从薄层结果看, 超滤与醇沉斑点无明显

差异。可见超滤法较水提醇沉法能有效地保留有效成分。

根据以前的实验结果^[5], 采用 1.25 倍体积超滤以确保完全。但超滤后处方金银花中氯原酸的回收率低于单味药金银花中氯原酸的回收率。因中药成分很复杂, 颗粒及粘液等易堵塞膜孔, 可以采用冷藏、离心、纸浆过滤等方法处理药液再超滤; 在超滤过程中采用短时反冲可以减少药液在膜上沉积; 超滤结束, 用热水清洗超滤器可达到良好的效果。

参考文献

- 1 林启寿. 中草药化学. 北京: 科学出版社, 1977: 145
- 2 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 111
- 3 中国人民解放军空军北京医院药局. 中草药, 1980; 11(6): 248
- 4 中国人民解放军空军北京医院药局. 中草药, 1981; 12(6): 8
- 5 刘振丽, 等. 中成药研究, 1996; 18(2): 4

(1997-07-07 收稿)

线叶菊总黄酮含量测定

内蒙古医学院(呼和浩特 010059) 乔俊缠* 陈 理 刘 涛 管艳艳**

摘 要 利用分光光度法测定了线叶菊地上部分及根部的总黄酮含量, 结果显示地上部分的含量明显高于根部。

关键词 线叶菊 分光光度法 总黄酮 含量测定

线叶菊 *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam., 又名兔子毛、兔毛蒿、西伯利亚艾菊、消疗草等, 是菊科线叶菊属植物, 全草入药, 可治疗传染病高热、疮痍肿痛、血瘀刺痛等症^[1,2]。研究证明该药对金葡萄、大肠和痢疾杆菌均有一定的抑制作用, 并有镇静作用及其它生理活性^[3,4]。据报道^[5], 线叶菊的抗菌

有效成分为兔毛蒿素、北美圣草素、万寿菊黄素 3,6-二甲醚等多种黄酮类化合物。为了给该药材的进一步研究和合理利用提供基础资料, 我们利用分光光度法对线叶菊地上部分和根部的总黄酮含量进行了测定。

1 仪器及实验材料

仪器: UV-120-02 型分光光度计。

* Address: Qiao Junchan, Inner Mongolla Medical College, Huhehaote

乔俊缠 男, 1983 年毕业于内蒙古大学生物学系, 学士学位。现任内蒙古医学院药理学系中草药教研室讲师。多年来一直从事医药学教育事业, 并致力于中草药鉴定和药用植物栽培技术的研究, 取得了显著成绩。参加了《内蒙古植物药志》和《中成药药理及临床》的编写工作, 发表学术论文 10 多篇, 其许多研究成果和项目具有系统性、实用性, 受到了药学界的好评和重视。

** 本院 1997 届毕业生