

ZTC 1 + 1- II 型澄清剂处理黄瑞香叶水提液的工艺优选

董刚¹, 刘海燕¹, 韩柳¹, 程颜彬², 李平亚¹, 卢丹^{1*}

(1. 吉林大学再生医学科学研究所, 长春 130021; 2. 白求恩医科大学制药厂, 长春 130012)

[摘要] 目的: 优选 ZTC 1 + 1- II 型澄清剂处理黄瑞香叶水提液的工艺条件。方法: 以祖师麻甲素保留率和固形物去除率为指标, 通过单因素试验考察药液质量浓度、温度、搅拌速度、水浴保温时间、澄清剂组份加入顺序和加入量对澄清效果的影响。采用 HPLC 测定祖师麻甲素含量, 流动相甲醇-0.5% 乙酸(25:75), 检测波长 327 nm。结果: 最佳澄清工艺为药液生药质量浓度 0.1 g·mL⁻¹, 温度 80 ℃, 加入 B 组份溶液后加入 A 组份溶液, 加入量分别为 6%, 3%, 搅拌速度 100 r·min⁻¹, 水浴保温时间 10 min; 祖师麻甲素保留率 74.29%, 固形物去除率 38.80%。结论: ZTC 1 + 1- II 型澄清剂处理黄瑞香叶提取液的澄清效果良好, 优选的澄清工艺稳定可行。

[关键词] ZTC 1 + 1- II 型澄清剂; 黄瑞香叶; 澄清工艺; 祖师麻甲素

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0023-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000012.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:09

Optimization of Clarification Process for Water Extract of *Daphne giraldii* Leaves by ZTC 1 + 1- II Type Clarifying Agent

DONG Gang¹, LIU Hai-yan¹, HAN Liu¹, CHENG Yan-bin², LI Ping-ya¹, LU Dan^{1*}

(1. Institute of Frontier Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Pharmaceutical Factory of Bethune Medical University, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize clarification process of water extract of *Daphne giraldii* leaves by ZTC 1 + 1- II type clarifying agent. **Method:** With retention rate of daphnetin and solid removal rate as indexes, single factor tests were adopted to optimize clarification process by taking extract concentration, reaction temperature, stirring speed, bath soaking time, adding order and amount of clarifying agents as factors. HPLC was adopted to determine the content of daphnetin with detection wavelength at 327 nm and mobile phase of methanol-0.5% acetic acid (25:75). **Result:** Optimal clarification process was as follows: concentrated water extract to 0.1 g·mL⁻¹, reaction temperature at 80 ℃, added 6% of B component, then added 3% of A component, stirring speed of 100 r·min⁻¹, bath soaking time for 10 minutes; Under these conditions, retention rate of daphnetin and solid removal rate were 74.29% and 38.80%, respectively. **Conclusion:** Clarification effect of ZTC 1 + 1- II type clarifying agent for water extract of *D. giraldii* leaves is effective, and this optimized process was stable and feasible.

[Key words] ZTC 1 + 1- II type clarifying agent; *Daphne giraldii* leaves; clarification process; daphnetin

[收稿日期] 20130813(005)

[基金项目] 吉林省科技支撑计划重点项目(20120928)

[第一作者] 董刚, 在读硕士, 从事中药化学成分及其生物活性的研究, Tel:18844093264, E-mail:donggang3264@sina.com

[通讯作者] * 卢丹, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分及其生物活性的研究, Tel:0431-85619803, E-mail:ludan@jlu.edu.cn

ZTC 1 + 1 - II 型澄清剂是一种以天然多糖等为原料制成的天然高分子物质,安全、无毒,属于一种新型的食品添加剂,由 A, B 两组份组成,一组份起主絮凝作用,另一组份起辅助絮凝作用,大大加快了澄清过程,比传统澄清剂快 2 ~ 5 倍。ZTC 1 + 1 - II 型澄清剂澄清原理是第一组份加入后,在不同可溶性大分子间“架桥”连接,使分子迅速增大;第二组份在第一组份所形成复合物的基础上再“架桥”,使絮状物尽快形成沉淀以便除去。该方法对蛋白质、多糖及可溶性固体物的一次清除率 > 70%, 二次清除率 > 90%, 优于传统的水提醇沉法^[1-2]。本实验采用单因素试验考察温度、澄清剂加入量等对黄瑞香叶水提液澄清工艺的影响,为 ZTC 1 + 1 - II 型澄清剂的推广提供实验依据。

1 材料

PTHW 型电热套(郑州长城科工贸有限公司), HJ-6 型多头磁力加热搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), TGL-16-aR 型离心机(上海安亭科学仪器厂), GZX-9076MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters), FA1104N 型分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司), RCT-3200 型超纯水机(长春莱博帕特科技发展有限公司)。

黄瑞香采自太行山,经吉林大学药学院生药教研室张晋敏教授鉴定为黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche 的叶;ZTC 1 + 1 - II 型澄清剂(天津振天成科技有限公司),祖师麻甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110900-201006),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

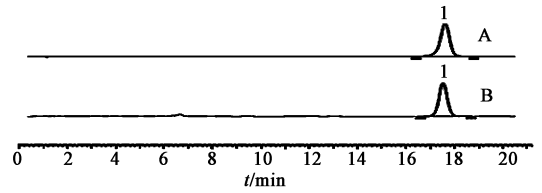
2 方法与结果

2.1 药液的制备 取黄瑞香叶 100 g,加 10 倍量水提取 3 次,提取时间依次为 2, 1, 1 h, 过滤,合并滤液^[3],浓缩,加水至 1 L,即得 0.1 g·mL⁻¹浓缩液(简称药液),备用。

2.2 澄清剂溶液的配制 称取澄清剂 A 组份 1 g,加适量水搅拌成糊状,加水至 100 mL,搅拌均匀,溶胀 24 h,双层纱布过滤,即得 A 组份溶液。称取澄清剂 B 组份 1 g,将水换成 1% 乙酸溶液同法制备 B 组份溶液。

2.3 祖师麻甲素的含量测定

2.3.1 色谱条件 XAqua C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸(25:75),检测波长 327 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 祖师麻甲素

图 1 黄瑞香叶水提液 HPLC

2.3.2 对照品溶液配制 精密称取祖师麻甲素对照品适量,加 85% 甲醇制成 0.1 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液配制 量取药液 25 mL,水浴加热至 80 °C,加入 B 组份溶液 1.5 mL,以 100 r·min⁻¹ 的速度搅拌,80 °C 水浴保持 10 min,加入 A 组份溶液 0.75 mL,以 100 r·min⁻¹ 的速度搅拌,80 °C 水浴保持 10 min,取出,室温静置 12 h,12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,即得。

2.3.4 标准曲线绘制 精密吸取祖师麻甲素对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用 85% 甲醇定容至刻度,得系列对照品溶液,分别精密吸取 20 μL,按 2.3.1 项下方法测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 3.55 \times 10^3 X - 2.27 \times 10^5$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.2 ~ 2.0 μg。

2.3.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液连续进样 6 次,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果峰面积的 RSD 0.87%,说明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批黄瑞香叶,按 2.3.3 项下方法平行制备 6 个供试品溶液,依次按 2.3.1 项下方法测定,结果祖师麻甲素含量的 RSD 0.13%,表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一批样品制得的供试品溶液,分别于 0, 4, 10, 24, 36, 48 h 各进样 10 μL,结果祖师麻甲素峰面积的 RSD 0.3%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的黄瑞香叶粗粉 9 份,分别加入祖师麻甲素对照品适量,按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取各供试溶液 10 μL,按 2.3.1 项下方法测定,结果见表 1。

2.4 澄清工艺单因素试验考察

2.4.1 澄清剂 A, B 加入顺序 量取药液 4 份,每份 25 mL,等分为 2 组,水浴加热至 80 °C,第 1 组先加入 B 组份溶液 1.5 mL 于 80 °C 水浴保持 10 min,再加入 A 组份溶液 0.75 mL 于 80 °C 水浴保持

10 min;第2组先加入A组份溶液1.5 mL于80℃水浴保持10 min,再加入B组份溶液0.75 mL于80℃水浴保持10 min。取出,室温静置12 h,12 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液,结果显示第一组溶液为澄清,加入絮凝剂后沉淀状态为大团块状;而第二组溶液较为澄清,加入絮凝剂后沉淀为疏松片状。根据王玲等^[4]研究确定评价标准和计算方法,结果祖师麻甲素平均保留率分别为73.84%,70.63%,固形物平均去除率依次为38.80%,37.76%,说明澄清剂的加入次序对溶液影响较大,确定加入次序为先加入B组份溶液再加入A组份溶液。

祖师麻甲素保留率 = 澄清后的祖师麻甲素质量 / 澄清前祖师麻甲素质量 × 100% ;

固形物去除率 = (澄清前固形物质量 - 澄清后固形物质量) / 澄清前固形物质量 × 100%

2.4.2 澄清剂加入量 量取药液10份,每份25 mL,等分为5组,水浴加热至80℃,加入B组份溶液于80℃水浴保持10 min,加入A组份溶液于80℃水浴保持10 min,取出,室温静置12 h,12 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液,计算祖师麻甲素保留率和固形物去除率,结果见表2,综合考虑,确定A组份溶液加入量3%,B组份溶液加入量6%。

表1 祖师麻甲素加样回收率试验

No.	称样量/g	样品中质量/mg	加入量/mg	实测量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.507 9	6.868 9	5.0	12.02	102.95	101.12	1.36
2	0.496 2	6.710 6	5.0	11.77	101.15		
3	0.482 8	6.529 4	5.0	11.52	99.81		
4	0.504 1	6.817 5	6.9	13.60	98.26		
5	0.514 6	6.959 6	6.9	14.01	102.15		
6	0.525 7	7.109 6	6.9	14.09	101.21		
7	0.530 2	7.170 5	8.5	15.80	101.58		
8	0.530 9	7.179 9	8.5	15.77	101.06		
9	0.528 9	7.152 9	8.5	15.81	101.89		

表2 澄清剂加入量对黄瑞香水提液澄清效果的影响(n=2)

组别	加入量/%		澄清情况	沉淀情况	平均保留率/%	平均去除率/%
	B组份	A组份				
1	2	1	不澄清	分散小片状沉淀	66.62	37.03
2	4	2	较澄清	疏松片状沉淀	70.37	38.49
3	6	3	澄清	大团块状沉淀	74.16	38.92
4	8	4	澄清	大团块状沉淀	71.08	38.63
5	10	5	较澄清	大团块状沉淀	69.24	37.94

注:加入量指体积分数。

2.4.3 温度 量取药液10份,每份25 mL,等分为5组,水浴加热至所需温度,A,B组份溶液加入量分别为0.75,1.5 mL,除水浴温度不同外,其他条件同**2.4.2**项,计算祖师麻甲素保留率和固形物去除率,结果见表3,表明第5组祖师麻甲素回收率和固形物去除率均高于第4组,但无显著性差异,故确定加入澄清剂时温度80℃^[5-6]。

2.4.4 药液质量浓度 量取水提液5份,分别浓缩至一定生药质量浓度,每个质量浓度量取药液2份,每份25 mL,A,B组份溶液加入量分别为0.75,1.5 mL,其他条件同**2.4.2**项,计算祖师麻甲素保留率

和固形物去除率,结果见表4,确定药液生药质量浓度0.1 g·mL⁻¹。

表3 加入澄清剂时温度对黄瑞香水提液澄清效果的影响(n=2)

组别	澄清温度/℃	澄清情况	沉淀情况	平均保留率/%	平均去除率/%
1	50	不澄清	分散小片状沉淀	69.51	36.94
2	60	较澄清	分散小片状沉淀	70.66	37.16
3	70	较澄清	疏松片状沉淀	72.56	37.68
4	80	澄清	大团块状沉淀	73.25	38.22
5	90	澄清	大团块状沉淀	73.28	38.26

表 4 药液生药质量浓度
对黄瑞香叶水提液澄清效果的影响 (n=2)

组别	生药质量浓度 /g·mL ⁻¹	澄清情况	沉淀情况	平均保 留率/%	平均去 除率/%
1	1:3	不澄清	分散小片状沉淀	63.76	36.19
2	1:5	不澄清	分散片状沉淀	67.92	37.11
3	1:8	较澄清	疏松片状沉淀	69.49	37.60
4	1:10	澄清	大团块状沉淀	74.27	38.59
5	1:12	澄清	大团块状沉淀	74.32	38.62

2.4.5 搅拌速度 量取药液 6 份, 每份 25 mL, 等分为 3 组, 水浴加热至 80 ℃, 加入 B 组份溶液 1.5 mL, 在加热匀速搅拌器上保持 10 min, 加入 A 组份溶液 0.75 mL, 在加热匀速搅拌器上保持 10 min, 搅拌速度分别为 50, 100, 150 r·min⁻¹, 其他条件同 2.4.2 项。结果发现 3 组溶液均为澄清, 加入絮凝剂后沉淀状态均为大团块状, 祖师麻甲素平均保留率分别为 73.52%, 74.31%, 73.49%, 固形物平均去除率依次为 38.16%, 38.64%, 38.28%, 说明搅拌速度过快会使絮凝沉淀物分散破坏, 影响澄清效果, 故确定搅拌速度 100 r·min⁻¹。

2.4.6 水浴保温时间 量取药液 6 份, 每份 25 mL, 等分为 3 组, 考察水浴保温时间 (5, 10, 15 min) 对澄清效果的影响, 搅拌速度 100 r·min⁻¹, 其他条件同 2.4.2 项。结果显示 3 组溶液均为澄清, 加入絮凝剂后沉淀状态均为大团块状, 祖师麻甲素平均回收率分别为 68.68%, 74.19%, 74.21%, 固形物平均去除率分别为 37.94%, 38.65%, 38.58%, 故确定水浴保温时间 10 min。

2.5 验证试验 量取药液 4 份, 每份 25 mL, 按优选的澄清工艺进行处理, 结果祖师麻甲素平均保留率 74.29%, RSD 0.04%, 固形物平均去除率 38.80%, RSD 0.09%, 说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

黄瑞香叶水提液的纯化多采用水提醇沉法, 即在黄瑞香叶水提液中加入 95% 乙醇使含醇量至 75%, 静置 12 h 使沉淀, 取上清液回收乙醇, 该过程中很难控制乙醇加入量且成本较高、耗能高, 不适合工业化生产。与中药水提醇沉工艺相比, ZTC 1+1-II 型澄清剂的澄清过程操作简单, 产生的絮状物便于除去, 缩短了生产周期, 适用于工业化生产。同时该法不使用乙醇, 减少了浓缩药液与回收乙醇的能源消耗, 工艺成本约为乙醇法的 1/6, 降低了生产成本^[7-9]。

[参考文献]

[1] 张萍, 吴月国, 刘骅. ZTC 1+1-II 澄清剂用于中药水提液澄清[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2): 113.

[2] 颜红. 天然澄清剂在中药水提液澄清工艺中的应用[J]. 中医药导报, 2005, 11(1): 80.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 971.

[4] 王玲, 周稚川, 高晓黎. 小儿清热止咳口服液澄清工艺比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 55.

[5] 王海宁, 谢印芝, 樊飞跃. 壳聚糖及 ZTC 1+1-II 澄清剂对大青叶提取液的澄清工艺研究[J]. 中国药房, 2008, 19(21): 1625.

[6] 刘卫红, 吴冬梅, 张娜娜, 等. ZTC 1+1 天然澄清剂在赤芍药材除杂工艺中应用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 45.

[7] 邓亚宁, 刘文娟, 李艳艳, 等. ZTC II 澄清剂对鬼针草提取液澄清效果的研究[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(2): 185.

[8] 管玉珠, 余兰, 毕凌. 祖师麻中瑞香素提取工艺比较[J]. 兰州医学院学报, 2000, 26(2): 9.

[9] 唐湘乡, 李兰林. II 型 ZTC 1+1 天然澄清剂在黄精多糖纯化中的应用研究[J]. 中南药学, 2012, 10(9): 666.

[责任编辑 全燕]