

ZTC1 + 1- II 型澄清剂对远志总皂苷提取液纯化效果的影响

戴兵¹, 李梅², 高鹏¹, 代龙^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省莱阳卫生学校, 山东烟台 264000)

[摘要] 目的: 优选远志总皂苷提取液的澄清工艺。方法: 以固形物去除率和细叶远志皂苷保留率为评价指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察药液质量浓度、加入温度、搅拌速度及澄清剂加入量对远志总皂苷提取液澄清工艺的影响。采用 HPLC 测定细叶远志皂苷含量, 流动相甲醇-0.05% 磷酸溶液 (65:35), 检测波长 210 nm。结果: 最佳澄清工艺为提取液浓缩至 0.125 g·mL⁻¹, 保温搅拌加入 B 组分, 用量 0.8 g·L⁻¹, 间隔 2 h 后保温搅拌加入 A 组分, 用量 0.4 g·L⁻¹, 两组分水浴温度 80 ℃, 保温时间 20 min, 搅拌速度 90 r·min⁻¹, 搅拌时间 10 min; 细叶远志皂苷保留率 84.56%, 固形物去除率 21.97%。结论: ZTC1 + 1- II 型澄清剂用于澄清远志总皂苷提取液的效果良好。

[关键词] 远志; 总皂苷; ZTC 澄清剂; 正交试验; 单因素试验; 细叶远志皂苷

[中图分类号] R283.3; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0012-04

[doi] 10.11653/syfy2014040012

Influence of ZTC1 + 1- II Clarifier on Purification Effect of Extracts of Total Saponins from Polygalae Radix

DAI Bing¹, LI Mei², GAO Peng¹, DAI Long^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. Laiyang Health School, Yantai 264000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize clarification process of extracts of total saponins from Polygalae Radix

[收稿日期] 20130714(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-015)

[第一作者] 戴兵, 在读硕士, 从事中药制剂工艺及质量标准研究, Tel:13793155751, E-mail:daibing0118@163.com

[通讯作者] * 代龙, 教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel:0531-68684868, E-mail:dailongdailong@263.net

芍药内酯苷含量增加。药理试验发现芍药苷可抑制副交感神经兴奋, 降低平滑肌张力和抑制其运动, 从而抑制胃肠道的运动^[5]; 白芍总苷对大鼠结肠炎具有良好的保护作用^[6]。灶心土具有温中止血、止呕、止泻的功效, 白芍经灶心土炮制后健脾止泻功效得以增强, 推测灶心土中微量元素是土白芍发挥药效的物质基础; 另外在炒制过程中, 灶心土起到了良好的传热作用, 使白芍外观性状良好。

[参考文献]

[1] 吴巧凤, 来平凡, 陈京, 等. 杭白芍生品与炮制品中药药甙、苯甲酸和元素含量的对比分析[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(5): 299.

[2] 由会玲, 严玉平, 高艳芝, 等. 芍药及不同炮制品中药药苷含量的比较研究[J]. 四川中医, 2009, 27(6): 54.

[3] 刘素香, 黎阳, 丰晶, 等. 不同炮制方法对白芍质量的影响[J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 125.

[4] 黄山君, 杨琪伟, 石燕红, 等. 一测多评法测定白芍中芍药苷与芍药内酯苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 780.

[5] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100.

[6] 高崇凯, 吴雁, 王勇, 等. 白芍总苷粉针剂的抗炎镇痛作用[J]. 中国新药药理与临床药理, 2002, 13(3): 163.

[责任编辑 仝燕]

with ZTC1+1-II clarifier. **Method:** With solids removal rate and retention rate of tenuifolin as indexes, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize clarification process of extracts of total saponins from *Polygalae Radix* by taking the concentration of extracts, reaction temperature, stirring speed and dosage of ZTC1+1-II clarifier as factors. HPLC was adopted to determine the content of tenuifolin with mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid (65:35) and detection wavelength of 210 nm. **Result:** Optimal clarification process was concentrated extracts to $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, added component B with dosage of $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ by insulation stirring, then added component A with dosage of $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ after two hours, bath temperature of two components were $80 \text{ }^\circ\text{C}$, stirring speeds were $90 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, insulation time and stirring time were 20 and 10 min, respectively; Retention rate of tenuifolin and solids removal rate were 84.56% and 21.97%, respectively. **Conclusion:** ZTC1+1-II natural clarify agents had good clarification effect on extracts of total saponins from *Polygalae Radix*.

[**Key words**] *Polygalae Radix*; total saponins; ZTC1+1-II clarifier; orthogonal test; single factor test; tenuifolin

远志味辛、苦,性温^[1],具有镇咳祛痰、益智、降压、抗衰老等药理活性^[2]。其主要有效成分为皂苷类化合物,多采用醇沉法^[3]、大孔吸附树脂法^[4-5]精制纯化,但存在成本高、操作复杂等不足。本实验选择 ZTC1+1-II 天然澄清剂纯化远志皂苷类成分,在单因素试验基础上,通过正交试验优选纯化工艺,为远志总皂苷的工业化生产提供参考。

1 材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),飞鸽牌 TDL-5-A 型离心机(上海安亭仪器厂),79-1 型磁力加热搅拌器(金坛市科兴仪器厂)。ZTC1+1-II 型澄清剂(天津振天成科技有限公司惠赠),远志饮片(购于山东省中医院中药房,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根),细叶远志皂苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 20121026,经 HPLC 检测纯度 $\geq 98\%$),甲醇为色谱纯,水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 远志提取液的制备 称取远志饮片 500 g,加 10 倍量水煎煮提取 3 次,提取时间分别为 2,1.5,1.5 h,放冷,合并提取液,粗滤,浓缩至生药质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即得,放置备用。

2.2 澄清剂溶液的配制 称取 ZTC 澄清剂 A 组分 10 g,用少量水搅成糊状,加入去离子水共 1 L,溶胀 24 h,搅拌,用脱脂棉过滤,即得 1% 黏胶液;称取 ZTC 澄清剂 B 组分 10 g,用少量 1% 乙酸溶液溶解并搅成糊状,加入 1% 乙酸溶液共 1 L,溶胀 24 h,脱脂棉过滤,即得 1% 黏胶液。

2.3 固形物去除率的测定 精密量取澄清处理前、后的提取液各 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干, $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重,迅速置于干燥器中冷却,30 min 后精密称重,计算固形物去除率。

$$\text{固形物去除率} = (\text{澄清前固形物质量} - \text{澄清后固形物质量}) / \text{澄清前固形物质量} \times 100\%$$

2.4 细叶远志皂苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 采用 Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, $5 \mu\text{m}$),流动相甲醇-0.05% 磷酸溶液(65:35),检测波长 210 nm,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取细叶远志皂苷对照品 4.47 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密吸取远志提取液 10 mL 置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣充分转移置圆底烧瓶中,加 10% 氢氧化钠溶液 50 mL,加热回流 2 h,放冷,用盐酸调节 pH 4~5,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 50 mL,合并正丁醇液,水浴蒸干,残渣加甲醇适量使溶解,充分转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.5 单因素试验考察

2.5.1 组分加入顺序 取远志提取液 2 份,每份 50 mL,水浴加热至 $80 \text{ }^\circ\text{C}$,提取液 1 中先加入 B 组分再加入 A 组分,提取液 2 中先加入 A 组分再加入 B 组分,先加入组分量均为 10%,后加入组分量均为 5%,两组分均保温搅拌加入($80 \text{ }^\circ\text{C}$, $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min),间隔时间 2 h,静置 8 h 后离心($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),收集上清液 10 mL,按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,结果见表 1,故确定加入次序为先 B 后 A。

表 1 各组分加入顺序对澄清效果的影响

加入顺序	药液状态	沉淀状态	细叶远志皂苷保留率/%	固形物去除率/%
先 B 后 A	澄清透明, 浊度小	颗粒状, 不易搅散	72.20	16.92
先 A 后 B	较澄清, 浊度稍大, 有黏稠感	絮状, 易搅散	49.38	4.15

2.5.2 澄清剂加入量 取远志提取液 6 份, 每份 50 mL, 分别按比例加入澄清剂 (B, A 组分的用量组合分别为 4%, 2%; 6%, 3%; 8%, 4%; 10%, 5%; 12%, 6%; 14%, 7%), 絮凝条件等其他操作同

2.5.1 项, 结果固形物去除率分别为 8.21%, 13.46%, 16.67%, 16.92%, 16.18%, 15.33%, 细叶远志皂苷保留率依次为 83.14%, 80.27%, 78.34%, 72.20%, 65.48%, 59.05%, 表明澄清剂加入量对澄清效果影响较大, 随 B 组分加入量增多, 细叶远志皂苷含量降低, 而固形物去除率先增大后平稳直至下降趋势。因为絮凝剂加入过少, 与悬浮颗粒碰撞几率低, 不利于吸附产生架桥; 絮凝剂加入过多, 对颗粒产生了过度吸附作用, 链形的絮凝剂分子难以在溶液中很好地伸展而影响其架桥能力。

2.5.3 药液质量浓度 取远志提取液 7 份, 每份 100 mL, 稀释或浓缩至生药质量浓度分别为 1/12, 0.1, 0.125, 1/7, 1/6, 0.2, 0.25 g·mL⁻¹, 各加入 10% B 组分和 5% A 组分, 其余操作同 **2.5.1 项**下, 结果固形物去除率分别为 17.15%, 16.92%, 15.88%, 14.26%, 13.51%, 9.08%, 8.38%, 细叶远志皂苷保留率依次为 77.45%, 72.20%, 70.35%, 68.27%, 65.44%, 53.17%, 51.34%, 显示药液质量浓度对澄清效果影响较大, 药液质量浓度越低越有利于成分的保留及澄清。

2.5.4 加入温度、保温时间及间隔时间 取远志提取液适量, 选择加入温度分别为 60, 70, 80, 90 °C, 其余操作同 **2.5.1 项**, 结果固形物去除率分别为 13.94%, 15.75%, 16.92%, 11.31%, 细叶远志皂苷保留率依次为 63.47%, 68.16%, 72.20%, 72.58%。保温时间分别为 0, 20, 30, 40 min, 其余操作同 **2.5.1 项**下, 结果固形物去除率分别为 11.32%, 16.88%, 16.92%, 17.13%, 细叶远志皂苷保留率依次为 66.22%, 71.48%, 72.20%, 73.52%。间隔时间分别为 0, 1, 2, 4, 6 h, 其余操作同 **2.5.1 项**下, 结果固形物去除率分别为 7.18%, 9.56%, 16.92%, 17.24%, 17.53%, 细叶远志皂苷保留率依次为 71.21%, 71.85%, 72.20%, 73.44%, 69.16%。结果显示澄清剂加入温度对澄清效果影响较显著, 温度低, 药液黏度增大, 颗粒间

碰撞几率降低, 电中和及吸附架桥作用减弱, 絮凝作用不充分; 温度过高, 高分子链收缩, 絮凝剂高分子老化, 也将影响其絮凝作用; 而水浴保温 20 min, 间隔 2 h 即可达到最佳澄清效果。

2.5.5 搅拌速度和搅拌时间 取远志提取液适量, 选择搅拌速度分别为 30, 60, 90, 120 r·min⁻¹, 其余操作同 **2.5.1 项**下, 结果固形物去除率分别为 15.74%, 16.88%, 17.26%, 16.92%, 细叶远志皂苷保留率依次为 71.58%, 74.16%, 73.15%, 72.20%。选择搅拌时间分别为 5, 10, 20, 30 min 其余操作同 **2.5.1 项**下, 结果固形物去除率分别为 15.74%, 16.88%, 17.26%, 16.92%, 细叶远志皂苷保留率依次为 71.58%, 74.16%, 73.15%, 72.20%。结果显示搅拌速度对澄清效果影响较显著, 搅拌主要目的为使絮凝剂与药液充分混合接触, 生成初级絮体, 搅拌速度过快, 流体剪切力破坏絮体, 不利于后续架桥网捕, 且难以靠自身重力沉降, 悬浮于药液中不利于药液澄清; 搅拌速度过慢, 不利于形成架桥, 大分子团块包裹细叶远志皂苷, 使其含量下降。

2.6 正交试验优选澄清工艺 在单因素试验基础上, 选择澄清剂用量、药液质量浓度、加入温度、搅拌速度为考察因素, 以细叶远志皂苷保留率 (X) 及固形物去除率 (Y) 的综合评分为评价指标, 权重系数分别为 0.6, 0.4, 综合评分 = (X_i/X_{max}) × 0.6 + (Y_i/Y_{max}) × 0.4 (i = 1 ~ 9), 采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验方案, 先加入 B 组分再加入 A 组分, 均搅拌 10 min, 保温 20 min, 加入间隔时间 2 h, 其他操作同 **2.5.1 项**, 因素水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 远志总皂苷提取液澄清工艺正交试验因素水平

水平	A 澄清剂 加入量 (B-A)/%	B 药液 质量浓度 /g·mL ⁻¹	C 加入温度 /°C	D 搅拌速度 /r·min ⁻¹
1	6:3	1/8	70	60
2	8:4	1/7	80	90
3	10:5	1/6	90	120

表3 远志总皂苷提取液澄清工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	细叶远志皂苷保留率/%	固形物去除率/%	综合评分/%
1	1	1	1	1	71.47	15.92	83.31
2	1	2	2	2	75.28	16.07	86.37
3	1	3	3	3	71.54	13.47	78.53
4	2	1	2	3	82.61	17.56	94.64
5	2	2	3	1	66.87	20.28	88.57
6	2	3	1	2	75.39	16.15	86.61
7	3	1	3	2	78.70	15.66	88.05
8	3	2	1	3	66.26	16.28	80.24
9	3	3	2	1	65.44	13.51	74.18
K_1	248.21	266.00	250.16	246.06			
K_2	269.82	255.18	255.19	261.03			
K_3	242.47	239.32	255.15	253.41			
R	27.35	26.68	5.03	14.97			

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	138.662	2	24.859	<0.05
B	120.048	2	21.522	<0.05
C(误差)	5.578	2	1.000	
D	37.354	2	6.697	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

直观分析表明各因素对澄清效果的影响程度为 $A > B > D > C$, 最佳澄清工艺组合 $A_2B_1C_2D_2$ 。以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析, 结果表明 B, A 因素对澄清效果的影响差异具有显著性, D 因素则无显著性差异, 结合单因素试验结果, 确定最佳工艺为 $A_2B_1C_2D_2$ 。

2.7 验证试验 取远志浓缩液 3 份, 分别按优选的工艺条件絮凝, 结果细叶远志皂苷保留率分别为 84.75%, 85.26%, 83.68%, 固形物去除率分别为 22.34%, 21.62%, 21.95%, 表明该工艺稳定可行, 故确定 ZTC1+1-II 型澄清剂对远志总皂苷提取液的澄清工艺为将提取液浓缩至 $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 保温搅拌加入 B 组分, 用量 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 间隔 2 h 后保温搅拌加入 A 组分, 用量 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 两组分水浴温度 $80 \text{ }^\circ\text{C}$, 保温时间 20 min, 搅拌速度 $90 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌时间 10 min。

3 讨论

ZTC1+1-II 型天然澄清剂作用原理^[6]为利用电荷及“架桥”“再架桥”作用。澄清剂加入过多会对颗粒产生过度吸附作用, 搅拌速度过快则不利于后续架桥网捕, 澄清剂加入过少或搅拌速度过慢又

不利于形成架桥; 药液浓度越低, 黏度越小, 絮凝剂分子在药液中分散速度加快、絮凝充分, 但浓度过低, 药液量偏大, 为保证絮凝剂与悬浮颗粒充分碰撞产生架桥, 澄清剂用量宜相应增大且不利于后续离心或浓缩等操作。现有文献只考察 3~4 种因素^[7-8], 为了探索各种因素的影响并得到较好的絮凝效果, 本文全面考察了澄清剂用量、加入温度、保温时间、间隔时间、搅拌速度、搅拌时间等因素, 并通过正交试验优化出澄清工艺。

远志总皂苷酸水解不稳定^[9], 所得苷元多而杂, 采用碱水解法均可转化为二级次生苷细叶远志皂苷^[10], 能较准确地反应总皂苷保留率。除絮凝法外, 曾同时考察采用醇沉法除杂, 发现二者澄清效果相当, 但絮凝法更加经济易行, 可代替醇沉法, 也可作为大孔树脂纯化前处理方法以减少树脂污染。

[参考文献]

- [1] 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: 146.
- [2] 蒋勇, 屠鹏飞. 远志研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(8): 759.
- [3] 祁金龙, 张嫡群, 耿红梅, 等. 醇沉和大孔树脂联用精制远志小丸的实验研究[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1000.
- [4] 刘友平, 万德光, 鄢丹, 等. 大孔吸附树脂纯化远志总皂苷工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 89.
- [5] 王颖莉, 韩毅丽, 董磊, 等. 吸附树脂纯化远志总皂苷的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(5): 903.
- [6] 张萍, 吴月国, 刘骅. ZTC1+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.
- [7] 唐湘乡, 李兰林. II 型 ZTC1+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.
- [8] 刘卫红, 吴冬梅, 张娜娜, 等. ZTC1+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.
- [9] Pelletier S W, Nakamura S, Soman R. Constituents of *Polygala* species: The structure of tenuifolin, a prosapogenin from *P. senega* and *P. tenuifolia* [J]. Tetrahedron, 1971, 27(19): 4417.
- [10] 董晓兵, 李军, 董婷霞, 等. 远志皂苷标准品 Tenuifolin 的制备[C]. 武汉: 2006 海峡两岸暨 CSNR 全国第七届天然药物资源学术研讨会, 2006.

[责任编辑 仝燕]