

天然澄清剂 ZTC₁₊₁ 应用于参乌益气口服液的澄清工艺研究^Δ

刘秀华^{1*}, 孟令旭², 杨宝峰², 黄青^{1#} (1. 吉林省中医药科学院, 长春 130021; 2. 吉林省正和药业集团股份有限公司, 吉林通化 134000)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2263-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.33

摘要 目的: 研究天然澄清剂 ZTC₁₊₁ 应用于参乌益气口服液的最优澄清工艺。方法: 以药液浓度、澄清剂 (ZTC₁₊₁) 用量、搅拌速度为考察因素, 以人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 总提取转移率和药液澄清度的综合评分为考察指标, 采用正交试验法优化澄清条件。结果: 优选出的最优工艺为 ZTC₁₊₁ (A、B) 组合澄清剂加入量 1%B-1%A (4%:2%), 药液浓度 12 g/100 ml, 搅拌速度 2 000 r/min。验证试验结果表明, 与澄清前比较, 澄清后各指标均差异不大且较稳定 (人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 总提取转移率平均值为 70.8%, RSD=1.49%, n=3)。结论: 筛选的以 ZTC₁₊₁ 为澄清剂的优选澄清工艺对参乌益气口服液的澄清效果良好。

关键词 参乌益气口服液; ZTC₁₊₁; 澄清工艺; 正交试验; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁

Study on the Application of Natural Clarifying Agent ZTC₁₊₁ to the Clarification Technology of Shenwu Yiqi Oral Liquid

LIU Xiu-hua¹, MENG Ling-xu², YANG Bao-feng², HUANG Qing¹ (1. Jilin Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 2. Jilin Zhenghe Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jilin Tonghua 134000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the optimal clarification technology of Shenwu yiqi oral solution that uses natural clarifying agent ZTC₁₊₁. METHODS: With the drug liquid concentration, dosage of ZTC₁₊₁ and stirring speed as the investigated factors, and the total extraction transfer rate of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ and the comprehensive score of drug liquid clarity as the investigated indexes, the orthogonal design was adopted to optimize the clarification conditions. RESULTS: The optimal technology was as follows as ZTC₁₊₁ combination (A and B) clarifying agent of 1%B-1%A (4%:2%), drug liquid concentration of 12 g/100 ml, stirring speed of 2 000 r/min. The verification test showed that the indexes changed little and were relatively stable after clarification (the total extraction transfer rate of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ was 70.8%, RSD=1.49%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized clarification technology with ZTC₁₊₁ as the clarifying agent has a good effect on the clarification of Shenwu yiqi oral solution.

KEYWORDS Shenwu yiqi oral solution; ZTC₁₊₁; Clarification technology; Orthogonal test; Ginsenoside Rg₁; Ginsenoside Re; Ginsenoside Rb₁

参乌益气口服液由人参、红景天等4味药材组成, 具有益气补血、养心安神之功效。传统工艺多采用水提醇沉法除杂澄清, 但存在操作烦琐、工时长且药液澄明度差、贮存时间长、易出现浑浊等诸多瓶颈问题。天然澄清剂 ZTC₁₊₁ 是一种新型食品药品添加剂, 是一种专利产品, 由 A、B 两组分组成, 主要成分为淀粉酶及其复合酶。在药液中加入第一种组分后, 可在不同的可溶性大分子间“架桥”连接, 使分子迅速增大; 第二种组分再在第一种组分形成的复合物基础上再“架桥”, 使絮状物在原有基础上加快形成^[1]。其可除去溶液中的粗粒子及提取液中的淀粉、鞣质、黏液质、蛋白质等大分子杂质, 达到精制和提高制剂稳定性及澄明度的目的^[2]。该方法具有澄清周期短、有效成分损失少、工艺简单、成本低等特点^[3], 近年来逐步被应用于食品与医药行业。但其使用效果受到很多因素的

影响, 如澄清剂的加入量、药液浓度等^[4]。因此, 笔者选取参乌益气口服液为对象, 对其传统澄清工艺进行改进, 即采用 ZTC₁₊₁ 天然澄清剂, 设计正交试验, 以口服液中主要成分人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量和药液澄明度为考察指标, 优化其澄清工艺。

1 材料

1.1 仪器

LC-10ATvP 型高效液相色谱仪、SPD-10AvP 型紫外检测器 (日本岛津公司); 85-2A 型数显测速恒温磁力搅拌器 (金坛市荣华仪器制造有限公司); 80-2 型电动离心机 (金坛市金城国胜实验仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

口服液主要药材人参、红景天、首乌、酸枣仁 2014 年 1 月购于安徽亳州中药材市场, 经上海中医药大学崔亚君教授鉴定检验合格; ZTC₁₊₁ (天津正天成澄清技术有限公司, 其由 A、B 两种组分组成, A 组分为黄褐色可溶性固体粉末, 主要含淀粉酶; B 组分为浅黄色可溶性固体粉末, 主要含淀粉酶的复合酶, 使用前须将固体粉末制备成液体; 批号: 110928); 人参皂苷 Rg₁ 对照品 (批号: 110703-2011128, 纯度: 93.4%)、人参皂苷

Δ 基金项目: 吉林省科技发展计划-医药产业发展专项资助 (No. yyyz201122-2)

* 助理研究员。研究方向: 中药新药及中药保健食品开发。电话: 0431-86058629。E-mail: 59069765@qq.com

通信作者: 研究员。研究方向: 中药新药及中药保健食品开发。电话: 0431-86058629。E-mail: 690446841@qq.com

Re(批号:110754-201123,纯度:89.1%)、人参皂苷Rb₁(批号:110704-201122,纯度:92.9%)均来源于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 澄清剂液的制备

A组分溶液:取1g A组分,先用少量水搅成糊状,然后加水至100 ml,溶胀24 h,搅拌,用双层纱布过滤,即得1%黏胶液。B组分溶液:取1g B组分,用少量1%醋酸溶液溶解并搅拌成糊状,加1%醋酸溶液至100 ml,溶胀24 h,用双层纱布过滤,即得1%黏胶液^[5]。

2.2 样品药液的制备

取人参、首乌,加60%乙醇6倍药材量,回流提取2次,每次1.5 h,合并提取液、回收乙醇至无醇味,备用。再取红景天、酸枣仁加水6倍药材量,煎煮2次,每次煎煮时间分别为60、40 min,合并提取液并浓缩至适量,备用。

2.3 人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量测定^[6]

采用高效液相色谱法测定供试品中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量。

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱为ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温为30℃;以乙腈为流动相A,以水为流动相B进行梯度洗脱[洗脱条件:0~35 min,流动相A-流动相B(19%:81%);35~55 min,流动相A-流动相B(19%→29%:81%→71%);55~70 min,流动相A-流动相B(29%:71%);70~100 min,流动相A-流动相B(29%→40%:71%→60%)];检测波长为203 nm。理论板数按人参皂苷Rg₁峰计算应不低于6 000,按人参皂苷Re峰计算应不低于4 000,按人参皂苷Rb₁峰计算应不低于6 000。取“2.3.2”“2.3.3”项溶液进样分析,色谱见图1。

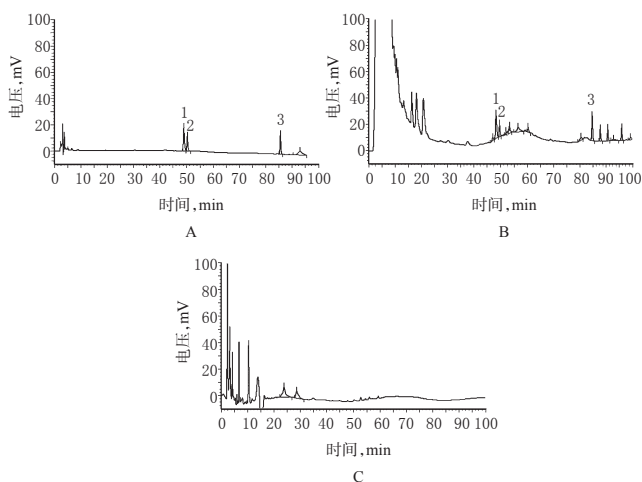


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性样品;1.人参皂苷Rg₁;2.人参皂苷Re;3.人参皂苷Rb₁

Fig 1 HPLC chromatography

A.control; B.sample; C.negative sample; 1.ginsenoside Rg₁; 2.ginsenoside Re; 3.ginsenoside Rb₁

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁对照品,加甲醇制成每1 ml分别含0.276、0.167、0.243 mg的混合

对照品溶液。

2.3.3 供试品、阴性样品溶液的制备 取制备好的药液及澄清剂液,按因素水平表操作,分别得一定量的反应液,浓缩至每1 ml约含人参药材0.1 g。精密吸取浓缩液10 ml,置于水浴锅上蒸干,残渣加水10 ml使溶解,加水饱和的正丁醇萃取3次,每次10 ml,合并正丁醇液,继续用3倍量的正丁醇饱和的氨试液洗涤1次;取正丁醇层,蒸干,残渣加甲醇10 ml使溶解,作为供试品溶液(R1~R9)。按处方比例取除人参外的其他药材,依工艺制备成阴性样品,同上制成阴性样品溶液。

2.3.4 标准曲线的绘制 精密吸取各质量浓度混合对照品溶液注入液相色谱仪,测定。以峰面积(y)为纵坐标、人参皂苷对照品的质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得到人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁回归方程分别为 $y=415\ 432.484x-18\ 182.61$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=15\ 473.198x-374\ 761.04$ ($r=0.999\ 6$)、 $y=309\ 270.03x-12\ 779.46$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁检测质量浓度线性范围分别为55.2~276.0、33.4~167.0、48.6~243.0 μg/ml。

2.3.5 方法学考察 按相关方法进行精密度、重复性、稳定性和回收率试验,结果均符合要求。

2.3.6 样品含量的测定 分别精密吸取对照品与供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,测定,按外标法计算含量。

2.4 澄清剂加入方法

ZTC₁₊₁的使用说明规定:在pH<4.8环境中,按先A后B的顺序添加;在pH>4.8环境中,按先B后A顺序添加。经测定药液的pH>4.8,按规定按先B后A顺序添加澄清剂,即:先加B组分,边加边搅拌,3~5 min稍搅拌可见混浊;再加入A组分,水浴使药液温度达到60℃,同时按一定速度搅拌。

2.5 澄清工艺筛选

经过单因素预试验分析和参考文献[7-8]方法,选择影响澄清效果的主要因素为澄清剂加入量(因素a,1%B:1%A)、药液浓度(因素b,g/100 ml)、搅拌速度(因素c,r/min)。每个因素设计3个水平,选用L₉(3⁴)正交表,以加入澄清剂后药液澄明度评分和人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁总提取转移率的加权综合评分为考察指标,综合评分总分为100分,其中澄明度为20分,人参皂苷总提取转移率权重为80,即综合评分=澄明度评分+人参皂苷总提取转移率×80%。人参皂苷总提取转移率=样品中人参皂苷含量实测值/人参药材总皂苷含量×100%。

澄明度评判标准:药液加入澄明剂后,贮藏于冰箱内冷藏48 h,观察澄明情况,药液有大量沉淀,且摇之不易散去计为0~4分;药液有沉淀,且摇之5 min以上才散去的计为5~8分;药液有沉淀,且摇之5 min内沉淀物散去的计为9~12分;药液有少量沉淀且摇之易散去的计为13~16分;药液无沉淀,略显澄明和澄明的计为17~20分。

因素与水平见表1、正交试验设计及结果见表2、方差分析结果见表3。

表3方差分析结果显示,a因素有显著性影响;表2结果可得出 $a_1>a_2>a_3$, $b_2>b_3>b_1$, $c_3>c_2>c_1$ 。结合表2和表3得出以下结论:应以 a_1 、 b_2 、 c_3 为最优沉淀条件,即将药液浓缩或稀释至每100 ml约含12 g生药量,调节并保持药液温度为

表1 因素与水平
Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	a(1%B:1%A)	b,g/100 ml	c,r/min
1	4%:2%	10	1 000
2	6%:3%	12	1 500
3	8%:4%	14	2 000

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Results of orthogonal design

试验序号	a	b	c	d	澄明度评分	人参皂苷R _g 、R _e 、R _b ₁ 总提取转移率,%	综合评分
1	1	1	1	1	20	53.2	62.56
2	1	2	2	2	20	66.3	73.04
3	1	3	3	3	17	70.2	73.16
4	2	1	2	3	18	49.3	57.44
5	2	2	3	1	19	60.4	67.32
6	2	3	1	2	17	52.5	59.00
7	3	1	3	2	17	47.4	54.92
8	3	2	1	3	18	42.3	51.84
9	3	3	2	1	15	41.8	48.44
K ₁	208.76	174.92	173.40	178.32			
K ₂	183.76	192.20	178.92	186.96			
K ₃	155.20	180.60	195.40	182.44			
R	53.56	17.28	22.00	8.64			

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
a	478.816 4	2	239.408	38.46	<0.05
b	51.713 4	2	25.856 7	4.15	
c	87.340 0	2	43.67	7.01	
误差	12.450 5	2	6.225	1	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

60℃,分别制备1%的ZTC₁₊₁组合澄清剂的A、B两组分溶液,以2 000 r/min的搅拌速度加入B组分溶液(加入量为药液体积的4%),加完后以同样的搅拌速度加入A组分溶液(加入量为药液体积的2%),持续搅拌10 min。

2.6 最优澄清工艺筛选的验证性试验

根据上述正交试验结果,再对a、b、c因素的水平进行3次追加试验,结果人参皂苷R_g、R_e、R_b₁总提取转移率和澄明度无明显变化,表明正交试验筛选的a₁b₂c₃为最优试验条件,详见表4。

表4 追加试验结果

Tab 4 Additional test results

试验次数	因素			人参皂苷R _g 、R _e 、R _b ₁ 总提取转移率,%		澄清情况
	a(1%B:1%A)	b,g/100 ml	c,r/min	加入澄清剂前	加入澄清剂后	
1	2%:1%	12	3 000	73.2	68.8	澄清
2	2%:1%	12	2 500	73.2	67.3	澄清
3	4%:2%	12	2 000	73.2	71.4	澄清

在此基础上,再以优选出的a₁b₂c₃进行3次验证性试验,结果

人参皂苷R_g、R_e、R_b₁总提取转移率分别为69.6%、71.6%、71.2%,平均值为70.8%(RSD=1.49%,n=3),即人参主要成分的保留量不受影响、澄明度达到要求,故所筛选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

在对参乌益气口服液的制备过程中,提取相关药材有效成分后不能达到澄清的状态;尤其是在除去某些影响澄清的元素蛋白质类所用的传统澄清剂多为有毒的有机溶剂,不但增加了成本,且操作复杂烦琐,极大地影响了中药制剂口服液的除杂效果^[9]。ZTC₁₊₁是从食品中提取的,其成分无毒、使用方便、稳定性好、成本低廉^[10],对有效成分无影响,保证了中药制剂中澄清纯化工艺的安全。但关于其在不同试验条件下对不同成分影响的研究目前还不够充分,故笔者以人参皂苷为参考指标,对参乌益气口服液整个澄清工艺中澄清剂的用量、加入顺序、药液浓度、搅拌速率等各项指标进行了优化,从而为ZTC₁₊₁在其他中药制剂澄清工艺中的应用提供了参考依据,也为其更广泛的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] 王丽娜,李妍,邢红红,等. ZTC₁₊₁ II天然澄清剂在菊芋多糖提纯中的应用[J].食品研究与开发,2012,33(3):61.
- [2] 王世宇,廖婉,付超美. ZTC₁₊₁天然澄清剂与大孔树脂联用在香菇多糖纯化中的作用[J].中国药房,2007,18(18):1 381.
- [3] 祝志贤,梁秋文,程婉玲. ZTC₁₊₁天然澄清剂在清开灵口服液制备工艺中的应用[J].药学实践杂志,2009,27(4):274.
- [4] 陈素燕,余天蓝. ZTC₁₊₁天然澄清剂在中药制剂工艺应用中的影响因素分析[J].亚太传统医药,2014,10(13):41.
- [5] 唐安福,崔恩忠,汤 溟. ZTC₁₊₁-III型澄清剂用于白芍提取液澄清工艺的研究[J].中国药业,2013,22(8):59.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:8.
- [7] 刘伟,刘志刚,罗明琳,等. ZTC₁₊₁-II用于复方土茯苓颗粒提取液的澄清工艺[J].中国医院药学杂志,2013,33(19):1 584.
- [8] 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.
- [9] 曹阳阳,郭斌. II型ZTC₁₊₁天然澄清剂在苜蓿多糖纯化中的应用[J].沈阳药科大学学报,2012,29(12):959.
- [10] 董宇,阎琪,金东明,等. ZTC₁₊₁ II型澄清剂在夏苓颗粒剂提取澄清工艺中的应用[J].中国卫生工程学,2013,12(6):495.

(收稿日期:2014-12-12 修回日期:2015-03-12)

(编辑:刘 萍)