

紫苏叶提取液的澄清纯化工艺优选

王柏强^{1,2*}, 刘福^{1,2#}, 何效平¹, 曾芝兰¹, 罗飞^{1,2}, 罗巧林^{1,2}(1.川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637000; 2.川北医学院药学院, 四川南充 637000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2684-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.29

摘要 目的: 优选紫苏叶提取液的澄清纯化工艺。方法: 比较3种澄清纯化方法即壳聚糖絮凝澄清、ZTC 1+1-II 絮凝澄清、水沉法对紫苏叶提取液中总黄酮保留率和固形物去除率的影响, 筛选出适宜的澄清纯化方法; 以总黄酮保留率和固形物去除率的综合评分为指标, 分别设计单因素和正交试验考察选定的澄清纯化方法中药液浓缩比、絮凝剂加入量、絮凝温度、搅拌速度等条件的最优值。结果: 3种方法中以壳聚糖絮凝澄清法较优; 最优澄清纯化工艺为药液浓缩比1:4、壳聚糖加入量1.0 g/L、絮凝温度60 ℃、搅拌速度100 r/min、搅拌时间4 min、静置时间12 h; 此工艺下总黄酮保留率为(85.1 ± 0.75)%、固形物去除率为(24.6 ± 1.33)% (n=5)。结论: 紫苏叶提取液的纯化除杂可选用壳聚糖絮凝澄清法, 优选的澄清纯化工艺条件稳定、可行。

关键词 紫苏叶提取液; 壳聚糖; ZTC 1+1-II; 澄清纯化工艺; 总黄酮; 正交试验

Optimization of Clarification and Purification Technology of *Perillae folium* Extract

WANG Baiqiang^{1,2}, LIU Fu^{1,2}, HE Xiaoping¹, ZENG Zhilan¹, LUO Fei^{1,2}, LUO Qiaolin^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2.College of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the clarification and purification technology of *Perillae folium* extract. METHODS: The effects of 3 clarification and purification methods as chitosan flocculation clarification, ZTC 1+1-II flocculation clarification, water precipitation on retention rate of total flavonoids and removal rate of solid of *Perillae folium* extract were compared to screen suitable clarification and purification technology. With the retention rate of total flavonoids and removal rate of solid as comprehensive evaluation index, single factor and orthogonal test were designed to investigate the optimal value of concentration proportion, the amount of the flocculant, flocculation temperature and whisking speed in optimal clarification and purification method. RESULTS: Among 3 methods, the chitosan flocculation clarification was the best with concentration proportion of 1:4, chitosan of 1.0 g/L, flocculation temperature at 60 ℃, whisking speed of 100 r/min, whisking time of 4 min, standing time of 12 h. Under the condition of optimal processing, the retention rate of total flavonoids was (85.1 ± 0.75)%, and the removal rate of solid was (24.6 ± 1.33)% (n=5). CONCLUSIONS: Chitosan flocculation can be used to effectively remove the impurity of *Perillae folium* extract, and optimized clarification and purification technology is stable and feasible.

KEYWORDS *Perillae folium* extract; Chitosan; ZTC 1+1-II; Clarification and purification technology; Total flavonoids; Orthogonal test

近年来,在中药的提取分离工艺中,实践证明采用传统的水提醇沉法或醇提水沉法精制中药提取液时,会造成有效成分的大量损失,且所制成品稳定性差。采用絮凝澄清技术可选择性除去一些无效成分,提高有效成分的保留率及成品质量稳定性^[1]。紫苏叶(*Perillae folium*)为唇形科植物紫苏[*Perilla frutescens* (L.) Britt.]的干燥叶(或带嫩枝),是一种药食两用植物^[2-3],主要含有紫苏醛、柠檬烯等挥发性成分,以及紫苏苷、木犀草素、芹菜苷和芹黄素等黄酮类化合物^[4]。黄酮类化合物具有清除人体中自由基和抗氧化作用,同时还具有调节血脂、抗菌、强身、益寿、美容养颜等功效^[5]。笔者在前期研究基础

上,以总黄酮保留率和固形物去除率为评价指标,分别采用壳聚糖絮凝澄清、ZTC 1+1-II 絮凝澄清、水沉法精制紫苏叶提取液,以筛选适宜的澄清工艺,并采用正交试验优化澄清工艺参数,旨在为紫苏叶及其相关制剂的澄清纯化工艺提供参考^[6]。

1 材料

1.1 仪器

760CRT 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); PHS-SB pH 计(成都瑞驰分析控制仪器有限公司); TP-114 电子分析天平(德国赛多利斯股份有限公司); SB-25-12DT 超声波提取器(宁波新芝生物科技股份有限公司)

技术出版社,1987:130.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 88、103、202、204.

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物制剂。电话: 0817-2262244。E-mail: 31618187@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 医院药学。电话: 0817-2262246。E-mail: nclf91@163.com

[10] 卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.124-2003 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S]. 2003-08-11.

[11] 张健, 臧传军, 裴慧, 等. 中药炮制工艺存在的问题文献分析与对策[J]. 中国药房, 2013, 24(39): 3744.

(收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-04-08)

(编辑: 刘萍)

司);HH-2 数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);HI303 磁力搅拌器(杭州汇尔仪器设备有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0080-200707,纯度: $>98\%$);紫苏叶[鲜紫苏叶于2011年7月采自四川省广安地区,经川北医学院药学院李生茂老师鉴定为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的叶];纤维素酶(上海伯奥生物科技有限公司,批号:20121227,活性: ≥ 15 U/mg);壳聚糖(上海华凯科技贸易公司,批号:110413);ZTC 1+1- II 型天然澄清剂(包括A、B两组分,天津振天成科技有限公司,批号:120726);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量的测定^[7]

精密称取干燥至恒质量的芦丁对照品 20 mg,加 70%乙醇溶解并定容至 50 ml 棕色量瓶中,即得 0.40 mg/ml 对照品溶液。精密量取对照品溶液 0(空白对照)、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 ml 分别置于 25 ml 量瓶中,用 70%乙醇稀释至 10 ml;加 5% 亚硝酸钠溶液 1 ml,摇匀,静置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 1 ml,摇匀,继续静置 6 min;加 4% 氢氧化钠溶液 10 ml,然后以 70%乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min。在空白对照调零后于 510 nm 波长处测吸光度(A)。以 A 为纵坐标、对照品溶液质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得回归方程: $c=2.810 3A-0.017 2$ ($r=0.999 7$)。结果表明,芦丁溶液检测质量浓度线性范围为 0.2~2.4 mg/ml。精密度考察结果中吸光度的 RSD=0.9%($n=5$);准确度考察中平均加样回收率为 99.3%(RSD=1.4%, $n=9$)。

测定法:精密吸取提取液 0.2 ml 置于 25 ml 量瓶中,按上述方法进行处理,测定吸光度,然后计算总黄酮的含量。

总黄酮保留率=澄清处理后药液中总黄酮的量/处理前药液中总黄酮的量 $\times 100\%$ 。

2.2 固形物去除率的测定^[8]

精密量取澄清处理前、后的提取液 50 ml,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃干燥至恒质量,迅速冷却,30 min 后精密称质量,计算固形物去除率[(澄清前固形物质量-澄清后固形物质量)/澄清前固形物质量 $\times 100\%$]。

2.3 紫苏叶提取液的制备

称取 100 g 干燥的紫苏叶粉末,加入 2 000 ml 70%乙醇,浸泡 15 min 后加入配制好的纤维素酶悬浮液(使酶质量浓度达到 0.25 mg/ml),调节 pH 至 5.0^[7],于 40 ℃恒温水浴锅中酶解 2 h,每隔 30 min 搅拌 1 次。待酶解完成后于 60 ℃超声(功率 600 W,频率 25 kHz)提取 30 min,抽滤,滤液浓缩至适量,即得。

2.4 澄清纯化方法的筛选

以总黄酮保留率和固形物去除率为评价指标,分别采用壳聚糖絮凝澄清、ZTC 1+1- II 絮凝澄清、水沉法对紫苏叶提取液进行澄清处理以筛选出最优的澄清纯化方法。

2.4.1 水沉法 量取药液浓缩比为 1:4 的样液 50 ml,置于锥形瓶中,搅拌下加入 4 倍量的纯化水,继续搅拌 5 min,静置 24 h 后过滤,滤液浓缩定容至 50 ml,测定各指标。

2.4.2 壳聚糖絮凝澄清法 取药液浓缩比为 1:4 的样液 50 ml,置于 100 ml 锥形瓶中,恒温 60 ℃下,按 1.0 g/L(即每 1 L 样液中含壳聚糖 1.0 g)的用量加入 1%壳聚糖溶液(称取壳聚糖粉末 1 g,加入 1%醋酸溶液 100 ml,待溶胀后用磁力搅拌器搅拌使之完全溶解,即得^[9]),于 100 r/min 速度下搅拌 4 min,静置 12 h,过滤,收集滤液定容至 50 ml,测定各指标。

2.4.3 ZTC 1+1- II 絮凝澄清法 取药液浓缩比为 1:4 的样液

50 ml,置于 100 ml 锥形瓶中,恒温 80 ℃下,100 r/min 速度搅拌下加入 4%药液体积的 A 组分黏胶液(浓度为 1%),每隔 0.5 h 左右搅拌 1 次;2 h 后,于 80 ℃同法加入 2%药液体积的 B 组分黏胶液(浓度为 1%),保温 10 min,0.5 h 后再搅拌 1 次;静置 6 h 过滤,收集滤液定容至 50 ml,测定各指标。

2.4.4 结果 不同澄清方法对紫苏叶提取液澄清纯化效果的影响见表 1。

表 1 不同澄清方法的澄清纯化效果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 The clarification and purification effects of different clarification methods($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

方法	总黄酮保留率	固形物去除率
水沉法	80.4 \pm 1.01	21.3 \pm 0.62
壳聚糖絮凝澄清法	85.1 \pm 0.75*	24.6 \pm 1.33*
ZTC 1+1- II 絮凝澄清法	84.2 \pm 0.91*	23.4 \pm 1.07*

注:与水沉法比较,* $P<0.05$

Note:vs. water precipitation method,* $P<0.05$

对上述 3 种澄清方法的数据结果采用 SPSS 17.0 软件进行处理,组间比较采用 *t* 检验。结果显示,与水沉法比较,壳聚糖絮凝澄清法、ZTC 1+1- II 絮凝澄清法在总黄酮保留率及固形物去除率上差异均有统计学意义($P<0.05$);后 2 种方法间紫苏叶提取液澄清纯化效果差异无统计学意义($P>0.05$)。由于 ZTC 1+1- II 絮凝澄清法处理过程相比壳聚糖絮凝澄清法稍显烦琐,故本文以下试验选用壳聚糖絮凝澄清法进行进一步的考察。

2.5 壳聚糖絮凝澄清纯化工艺考察

2.5.1 单因素试验 (1)药液浓缩比的考察。取药液浓缩比为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8(g/ml)的样液各 50 ml,分别置于 100 ml 锥形瓶中,水浴加热,恒温 60 ℃下,按 1.0 g/L 的用量加入 1%壳聚糖溶液,于 100 r/min 速度下搅拌 4 min,静置 12 h,过滤,收集滤液并定容至 50 ml,测定各指标。结果,各比例下总黄酮保留率分别为 79.4%、81.5%、84.7%、85.1%、85.3%,固形物去除率分别为 24.8%、23.6%、24.1%、22.5%、20.4%。由此可见,药液浓缩比对絮凝效果影响较大,药液浓缩比太高或太低均不利于药液的絮凝沉淀,前者澄清后总黄酮保留率较低,后者固形物去除率较低,并且药液体积量大会增加后续处理成本。综合考虑,选择药液浓缩比为 1:4 左右较合适。

(2)絮凝剂加入量的考察。取药液浓缩比为 1:4 的样液 50 ml,置于 100 ml 锥形瓶中,平行操作 6 份,水浴加热,恒温 60 ℃下,分别按 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 g/L 的用量加入 1%壳聚糖溶液,于 100 r/min 速度下搅拌 4 min,静置 12 h,过滤,收集滤液定容至 50 ml,测定各指标。结果,总黄酮保留率分别为 87.4%、86.6%、85.9%、85.4%、83.0%、82.5%,固形物去除率分别为 8.5%、15.3%、20.7%、24.6%、23.2%、22.7%。可见,絮凝剂加入量对澄清效果也有显著性影响。絮凝剂加入量较少时,絮凝剂不足以将所有胶体颗粒充分絮凝,导致固形物去除率低;随着絮凝剂加入量的逐渐增加,固形物去除率增大,样液的澄清度更好;当絮凝剂加入量升高至 1.0 g/L 后,澄清效果下降,总黄酮保留率呈下降趋势。综合考虑,选择絮凝剂加入量为 1.0 g/L。

(3)絮凝温度、搅拌速度、搅拌时间、静置时间的考察。①絮凝温度。取药液浓缩比为 1:4 的样液适量,选择絮凝温度分别为 20、40、60、80 ℃,其余操作同“2.5.1”(1)项,结果总黄酮保留率分别为 78.4%、83.6%、85.1%、84.4%,固形物去除率分别为 21.5%、23.9%、24.7%、23.6%。②搅拌速度。搅拌速度分别为 50、100、150、200 r/min,其余操作同“2.5.1”(1)项下,结果总黄酮保留率分别为 80.4%、84.2%、83.5%、81.6%,固形物去

除率分别为21.6%、23.8%、22.2%、20.4%。③搅拌时间。搅拌时间分别为2、4、6、8 min,其余操作同“2.5.1”(1)项下,结果总黄酮保留率分别为82.7%、84.4%、84.2%、83.8%,固形物去除率分别为22.5%、24.9%、24.3%、23.8%。④静置时间。静置时间分别为6、12、18、24 h,其余操作同“2.5.1”(1)项下,结果总黄酮保留率分别为83.7%、84.5%、84.3%、83.9%,固形物去除率分别为23.0%、24.3%、24.5%、24.8%。

上述结果显示,絮凝温度、搅拌速度对纯化效果影响较大。温度过低,胶体粒子与絮凝剂粒子碰撞的几率较小,从而使絮凝不充分;絮凝温度过高,易使絮凝分子老化,影响絮凝作用,导致体系透明度下降;同时,温度过高,也不利于一些热敏感物质的保护。搅拌时间和静置时间相对影响较小。适宜的搅拌时间,有利于澄清剂的絮凝而达到较好的澄清效果;搅拌时间过短,可使絮凝粒子与体系中微粒的接触几率减小,从而使絮凝不完全;搅拌时间过长,又易破坏已形成的絮体,降低絮凝效果。综合考虑,选择絮凝温度为60℃、搅拌速度为100 r/min、搅拌时间为4 min、静置时间为12 h。

2.5.2 正交试验 根据单因素试验结果,以总黄酮保留率(X_1)和固形物去除率(X_2)的综合评分^[10]作为评价指标[以总黄酮保留率(X_1)和固形物去除率(X_2)为指标,二者权重分别设定为0.7、0.3,综合评分= $(X_1/X_{1max} \times 0.7 + X_2/X_{2max} \times 0.3) \times 100$],选择絮凝剂加入量、药液浓缩比、絮凝温度、搅拌速度为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行考察。因素与水平见表2,试验安排与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(絮凝剂加入量),g/L	B(药液浓缩比),g/ml	C(絮凝温度),℃	D(搅拌速度),r/min
1	0.8	1:2	40	50
2	1.0	1:4	60	100
3	1.2	1:6	80	150

表3 正交试验安排与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal test

序号	因素				指标		综合评分
	A	B	C	D	$X_1, \%$	$X_2, \%$	
1	1	1	1	1	79.2	23.4	91.0
2	1	2	2	2	84.5	22.5	94.5
3	1	3	3	3	84.1	21.4	92.9
4	2	1	2	3	82.6	24.4	94.8
5	2	2	3	1	84.0	24.6	96.3
6	2	3	1	2	84.4	24.2	96.2
7	3	1	3	2	75.4	27.6	92.5
8	3	2	1	3	80.8	25.3	94.4
9	3	3	2	1	81.3	23.7	93.1
K_1	92.800	92.767	93.867	93.467			
K_2	95.767	95.067	94.133	94.400			
K_3	93.333	94.067	93.900	94.033			
R	2.967	2.300	0.266	0.933			

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	15.007	2	7.503	118.165	<0.05
B	7.980	2	3.990	62.835	<0.05
D	1.327	2	0.663	10.449	
C(误差)	0.127	2	0.063		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

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

由表3直观分析可知,各因素对壳聚糖絮凝澄清工艺的影

响大小顺序为A>B>D>C;方差分析结果表明因素A、B对澄清纯化工艺有显著影响($P<0.05$),因素C、D对澄清工艺无显著影响。综合考虑,确定最优壳聚糖絮凝澄清工艺为A₂B₂C₂D₂,即壳聚糖加入量为1.0 g/L、药液浓缩比为1:4、絮凝温度为60℃、搅拌速度为100 r/min。按优选的工艺条件进行5次验证试验:取药液浓缩比为1:4的药液50 ml,置于100 ml锥形瓶中,水浴加热恒温至60℃,按1.0 g/L的用量加入1%壳聚糖溶液,于100 r/min速度下搅拌4 min,静置12 h,过滤,收集滤液定容至50 ml,测定各指标。结果总黄酮保留率平均值为 $(85.1 \pm 0.75)\%$,固形物去除率平均值为 $(24.6 \pm 1.33)\%$,表明该澄清工艺条件稳定、可行。

3 讨论

中药提取液的精制传统上多采用醇提水沉法或水提醇沉法,一般操作是在提取液中加入高浓度乙醇或水,静置24 h甚至数天以去除杂质;有的还需反复多次沉淀,方能保证除杂完全。此工艺操作烦琐且工期长,有效成分损失较大。而壳聚糖、ZTC 1+1- II等絮凝剂可通过“吸附架桥”和“电中和”作用除去原液中较大的悬浮颗粒,利用天然胶体保护作用使样液尽快澄清的同时较多地保留样液中的成分。

在采用水沉法除杂时,总黄酮保留率低,药液中杂质沉淀速度慢,费时较长。壳聚糖与ZTC 1+1- II絮凝澄清法不仅使有效成分保留率高,而且澄清速度非常快,澄清液无乳光。就紫苏叶提取液而言,采用壳聚糖澄清剂或ZTC 1+1- II澄清剂精制提取液,二者对紫苏叶提取液澄清效果无明显差异。与水沉法相比,二者总黄酮保留率及固形物去除率明显更高。由于ZTC 1+1- II澄清剂包含A、B两种组分,操作工艺比壳聚糖澄清剂稍复杂,故根据工艺优化及综合评分,笔者选择壳聚糖絮凝澄清法为紫苏叶提取液的澄清除杂方法。试验结果表明,壳聚糖澄清剂可用于紫苏叶提取液的纯化除杂,在有效成分保留及去除固形物上显示了较好的效果。

参考文献

- [1] 秦腊梅,郎富和.絮凝剂在中药提取工艺过程中的应用研究[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(3):3.
- [2] 刘浏.紫苏叶的研究进展[J].中国医学创新,2012,9(6):162.
- [3] 刘大川,王静,刘贵华,等.紫苏叶中色素及黄酮类化合物提取工艺研究[J].粮食与油脂,2000(5):36.
- [4] 王玉萍,杨峻山,赵杨景,等.紫苏类中药化学和药理的研究概况[J].中国药学杂志,2003,38(4):250.
- [5] 李燕,曾庆华,陈利梅.正交试验法优选紫苏叶中总黄酮提取工艺[J].农业机械,2011(12):148.
- [6] 魏舒畅,冯晓莉,张英明,等.元胡提取液3种纯化方法的对比研究[J].中国药房,2010,21(39):3 691.
- [7] 王柏强,何效平,曾芝兰.酶法协同超声提取紫苏叶总黄酮工艺条件优化[J].中华中医药学刊,2015,33(7):1 741.
- [8] 戴兵,李梅,高鹏,等.ZTC 1+1- II型澄清剂对远志总皂苷提取液纯化效果的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(4):12.
- [9] 张俊侠,魏灿英,焦小珂,等.壳聚糖对小儿解表止咳口服液澄清效果的影响[J].中国药房,2014,25(15):1 389.
- [10] 刘伟,刘志刚,罗明刚,等.ZTC 1+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.

(收稿日期:2015-11-04 修回日期:2016-01-20)

(编辑:刘 萍)