

· 中药工业 ·

杜仲中京尼平昔酸的精制工艺对比[△]

陈骁鹏*, 吴芸, 叶慧

江苏省泰州市食品药品检验所, 江苏 泰州 225300

[摘要] 目的: 探索并对比中药杜仲中京尼平昔酸的精制工艺。方法: 以京尼平昔酸为指标, 在明确跨膜压力差、pH 因素影响的基础上, 采用 Box-Behnken 中心组和设计建立数学模型, 考察膜孔径、跨膜压力差、pH, 优选杜仲提取液的浓缩工艺, 并与减压浓缩对比分析。结果: 优化京尼平昔酸钠滤浓缩工艺为膜孔径 400 Da, 跨膜压力差 1.40 MPa, pH 6.80, 京尼平昔酸平均截留率为(93.7 ± 1.8)%, 与理论截留率为 95.0% 相近, 且明显高于减压加热浓缩工艺。结论: Box-Behnken 响应面法设计优化的杜仲中京尼平昔酸的精制工艺, 工艺高效可行, 可以避免热处理引起的成分转化损失。

[关键词] 杜仲; 京尼平昔酸; 纳滤; 减压浓缩; 响应面法

[中图分类号] R282.71; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-2080-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191206001

Optimization of Concentrate Process of Geniposidic Acid from *Eucommia ulmoides*

CHEN Xiao-peng*, WU Yun, YE Hui

Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou 225300, China

[Abstract] **Objective:** To explore the optimum concentrate process of geniposidic acid from *Eucommia ulmoides*. **Methods:** Based on single factor test, nanofiltration membrane pore size, transmembrane pressure difference and pH were selected as independent variables, and the rejection of geniposidic acid was used as dependent variables. Response surface methodology of Box-Behnken Design was applied to optimize the nanofiltration concentrate process of geniposidic acid from *E. ulmoides*. Meanwhile, the concentrate efficiency of nanofiltration technology was compared with decompressing concentration. **Results:** The optimum nanofiltration concentrate conditions were nanofiltration membrane pore size 400, transmembrane pressure difference 1.4 MPa and pH 6.80, the rejection of geniposidic acid was (93.7 ± 1.8)% under the optimum conditions. The concentrate efficiency of nanofiltration was significantly better than that of the decompressing concentration. **Conclusion:** The geniposidic acid from *E. ulmoides* has been concentrated efficiently by the above optimized technology. The transformation loss of heat-sensitive ingredients can be avoided by nanofiltration technology.

[Keywords] *Eucommia ulmoides*; geniposidic acid; nanofiltration; decompressing concentration; response surface analysis

杜仲来源于杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 作为药食两用中药, 具有补肝肾、强筋骨、安胎的功能^[1], 在药品、保健品中应用广泛, 如杜仲降压片、参杞杜仲丸等^[2-4]。京尼平昔酸为杜仲中主要代表性药效成分, 可用于改善阿尔茨海默病患者的记忆能力^[5-6]。因该成分属于环烯醚萜苷类, 在提取精制过程中热稳定性差, 长时间热处理易分解, 目前多以低温、减压的方式降低其

氧化分解程度^[7]。

纳滤具有分离过程无热效应、效率高、不产生二次污染等技术优点^[8]。为了探索杜仲提取液中京尼平昔酸的浓缩精制工艺, 以纳滤膜孔径、pH、跨膜压力差为影响因子^[9-10], 基于单因素考察, 以京尼平昔酸截留率为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合设计建立数学模型, 优化纳滤浓缩工艺参数, 进而与常规热浓缩对比, 为热敏性环烯醚萜苷类成

[△] [基金项目] 泰州市市场监督管理局质量发展与能力提升项目(202008)

* [通信作者] 陈骁鹏, 副主任中药师, 研究方向: 药品检验与质量标准; E-mail: 7713339@qq.com

分的浓缩精制提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪、二极管阵列检测器(PDA)(美国Waters公司);FL-3206型直流增压泵(厦门优美沃电气有限公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);KH-250B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);MS205DU型电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.2 试药

杜仲药材购自泰州市中医院,批号:20190610010,经江苏省泰州市食品药品检验所叶慧副主任中药师鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮,符合《中华人民共和国药典》2015年版(一部)相关项下要求;京尼平苷酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111828-201001,纯度 $\geq 98\%$);聚酰胺纳滤膜(孔径分别为150、400、650 Da,星达膜科技有限公司);甲醇为色谱纯;水为纯化水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 京尼平苷酸的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-乙酸(24:75:1)^[11];检测波长:240 nm;柱温:25℃;流速:1 mL·min⁻¹;进样量:10 μL。

2.1.2 京尼平苷酸对照品溶液制备 精密称取京尼平苷酸对照品0.01060 g,置于10 mL量瓶中,加流动相溶液稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为1.06 mg·mL⁻¹的京尼平苷酸对照品溶液。

2.1.3 杜仲提取液制备 取杜仲饮片,加入10倍体积纯化水,提取2次,每次1 h,0.45 μm微孔滤膜滤过,合并滤液,得杜仲提取液,用于单因素考察、响应面法优化以及工艺对比。

2.1.4 线性关系考察 分别取京尼平苷酸对照品溶液0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL,分别置于10 mL的量瓶中,流动相稀释并定容至刻度,高效液相色谱仪检测,以峰面积为纵坐标(Y),对照品

溶液质量浓度为横坐标(X),得线性回归方程: $Y = 12\ 827X - 6\ 560.1$, $r = 0.999\ 4$ 。京尼平苷酸质量浓度为10.6~212.0 μg·mL⁻¹线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取质量浓度为21.2 μg·mL⁻¹的京尼平苷酸对照品稀释溶液,重复进样6次,按**2.1.1**项下色谱条件检测,计算京尼平苷酸峰面积积分值的RSD为1.35%。

2.1.6 稳定性试验 取杜仲提取液10 μL,分别于0、1、2、4、8、12、24 h进样,按**2.1.1**项下色谱条件检测,计算京尼平苷酸峰面积积分值RSD为1.67%,结果表明,杜仲提取液中京尼平苷酸在24 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 按**2.1.3**项下处理,平行制备5份杜仲提取液溶液,按**2.1.1**项下色谱条件检测,京尼平苷酸质量浓度的RSD为2.87%,表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取杜仲提取液(京尼平苷酸质量浓度为152.0 μg·mL⁻¹)6份,分别精密加入京尼平苷酸对照品适量,按**2.1.1**项下色谱条件进行定量测定,计算得平均回收率分别为98.70%,RSD为2.45%。

2.2 纳滤浓缩操作方法

采用耐压管路依次连接增压泵、压力表、纳滤膜套件、压力调节阀,取杜仲提取液置于储液罐中,调节增压泵转速提供纳滤分离压力,分别收集纳滤液及截留液,采用HPLC检测,计算分析杜仲提取液中京尼平苷酸的截留率。

2.3 减压浓缩操作方法

取杜仲提取液,采用旋转蒸发器减压浓缩,由原体积2.0 L浓缩至200.0 mL,分别考察70、75、80、85、90℃加热条件下,京尼平苷酸转移率,分析减压温度对成分影响。

2.4 计算方法

2.4.1 截留率计算 分别精密吸取杜仲提取液、纳滤液,按**2.4**项下的液相检测条件,采用HPLC测定并计算样品京尼平苷酸浓度,按式(1)计算京尼平苷酸截留率。

$$R = \left(1 - \frac{C_1}{C_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中,R为成分的截留率; C_1 为纳滤液中京尼平苷酸的浓度; C_0 为杜仲提取液中京尼平苷酸的浓度。

2.4.2 转移率计算 分别精密吸取杜仲提取液、减压浓缩液,按2.4项下的液相检测条件,采用HPLC测定并计算样品京尼平苷酸浓度,按式(2)计算京尼平苷酸转移率。

$$T = \frac{C_2 V}{C_0 V_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, T 为成分的转移率; C_2 为减压浓缩液中京尼平苷酸的浓度; V_0 为原溶液体积; V 为减压浓缩液体积。

2.5 单因素考察

2.5.1 跨膜压力差 膜分离的跨膜压力差与膜分离效率直接相关,采用膜孔径 400 Da、pH 5.0 为固定分离因素,考察跨膜压力差分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2.00 MPa 时,京尼平苷酸的截留率变化规律。从图 1 中可以得出,随着跨膜压力差的增加,京尼平苷酸截留率呈现出上升的趋势,其中压力差为 1.0~1.5 MPa 变化相对明显,随着压力差超过 1.5 MPa,京尼平苷酸截留率相对稳定,但是跨膜压力越大,膜通量越高,也与分离生产效率直接相关,但是也会加重浓差极化带来的膜污染,导致使用寿命缩短^[12],因此选择跨膜压力差 1.0~1.5 MPa 用于纳滤分离参数考察。

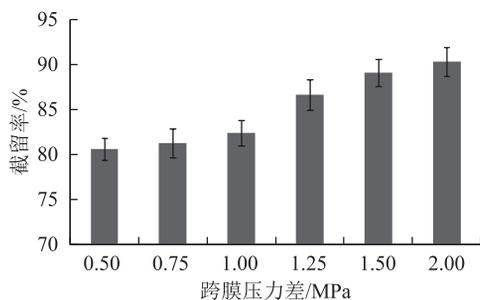


图 1 跨膜压力差对京尼平苷酸截留率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 pH 溶液 pH 与京尼平苷酸存在状态相关,根据纳滤分离的电荷排斥原理,结合纳滤膜的酸碱耐用性,采用膜孔径 400 Da,跨膜压力差 1.0 MPa 为固定分离因素,考察 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 对京尼平苷酸截留率的影响。

调节杜仲水提液 pH,改变目标成分京尼平苷酸的解离状态,从图 2 中可以看出,随着 pH 增加,京尼平苷酸截留率也随之升高,此时的分离行为是孔径筛分和电荷排斥共同作用的结果,也说明溶液中以离子形式存在的京尼平苷酸的比例也逐步增加,其中 pH 5.0~7.0 时变化相对明显,同时为了控制

碱性溶液环境下京尼平苷酸水解,选择 pH 5.0~7.0 进行响应面考察。

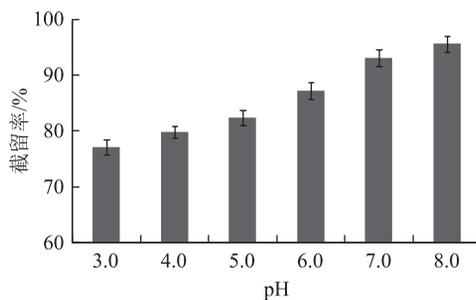


图 2 pH 对京尼平苷酸截留率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 Box-Behnken 响应面法优化纳滤浓缩工艺

在单因素试验结果的基础上,采用 Design-Expert 8.06 软件,以纳滤膜孔径、pH 和跨膜压力差作为变量,以 -1、0、1 代表变量水平,进行 Box-Behnken 设计三因素三水平试验方案,优化京尼平苷酸的纳滤浓缩工艺参数。

2.6.1 响应面试验设计与结果 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理^[13],基于单因素试验确定的因素考察范围,为保障结果的准确性,采取平行 3 次计算截留率平均值。选取膜孔径(A)、跨膜压力差(B)、pH(C)3 个因素,通过三因素三水平的响应面分析方法,通过 17 组试验考察不同组合参数对京尼平苷酸纳滤截留率的影响规律。所考察的因素水平及结果见表 1。

表 1 京尼平苷酸纳滤分离的响应曲面因素水平及结果

编号	A/Da	B/MPa	C	R/%
1	150(-1)	1.00(-1)	6.0(0)	90.9
2	400(0)	1.25(0)	6.0(0)	91.4
3	150(-1)	1.25(0)	5.0(-1)	91.3
4	150(-1)	1.25(0)	7.0(1)	95.8
5	650(1)	1.25(0)	7.0(1)	79.7
6	150(-1)	1.50(1)	6.0(0)	94.2
7	650(1)	1.25(0)	5.0(-1)	67.5
8	400(0)	1.25(0)	6.0(0)	87.4
9	650(1)	1.00(-1)	6.0(0)	64.8
10	400(0)	1.25(0)	6.0(0)	88.6
11	400(0)	1.00(-1)	7.0(1)	85.2
12	400(0)	1.25(0)	6.0(0)	90.7
13	400(0)	1.50(1)	5.0(-1)	87.4
14	650(1)	1.50(1)	6.0(0)	76.1
15	400(0)	1.50(1)	7.0(1)	95.6
16	400(0)	1.25(0)	6.0(0)	90.1
17	400(0)	1.00(-1)	5.0(-1)	82.2

利用 Design-Expert 8.06 软件,以京尼平苷酸截留率为响应值,对上述3个因素进行二次多项回归计算。

$$R = 89.64 - 10.15A + 3.77B + 3.49C + 2.00AB + 1.93AC + 1.30BC - 6.08A^2 - 2.06B^2 + 0.017C^2 \quad (3)$$

对该模型进行方差分析,结果见表2,膜孔径(A)、跨膜压力差(B)、pH(C)对于京尼平苷酸截留率影响差异有统计学意义,同时AB、AC因素交互作用显著。该模型回归F值为60.99, $P < 0.0001$ 说明该模型显著,可根据响应值预测京尼平苷酸截留率,且试验设计方案正确。该模型多元 $r = 0.9874$, 预测 $r = 0.9128$, 调整 $r = 0.9712$, 均接近1.0,说明模型对试验实际情况拟合较好。

表2 京尼平苷酸纳滤分离响应曲面二次回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Model	1 313.44	9	145.94	60.99	<0.0001
A	884.10	1	884.10	369.49	<0.0001
B	114.01	1	114.01	47.65	0.0002
C	97.30	1	97.30	40.66	0.0004
AB	16.00	1	16.00	6.69	0.0362
AC	14.82	1	14.82	6.19	0.0417
BC	6.76	1	6.76	2.83	0.1367
A ²	155.78	1	155.78	65.10	<0.0001
B ²	17.82	1	17.82	7.45	0.0029
C ²	0.001	1	0.001	0.0005	0.9821
残差	16.75	7	2.39		
失拟项	6.22	3	2.07	0.79	0.5605
误差项	10.53	4	2.63		
总和	1 330.18	16			

2.6.2 响应曲面分析 多元回归方程式所做的响应曲面图见图3~5。由此可对考察因素交互影响京尼平苷酸截留率进行分析与评价,以确定最佳因素水平范围。图3显示,在pH固定为6.0时,膜孔径和跨膜压力差对京尼平苷酸截留率的交互影响,在跨膜压力差不变的前提下,随着膜孔径增加,京尼平苷酸截留率呈现出下降趋势,此结果与膜分离原理中的筛分效应相符合。在pH 6.0时,京尼平苷酸在水提液中以离子态和分子态的状态共存,而随着孔径增大而出现截留率下降,说明此时分离是以孔径筛分为前提。

方差结果显示,膜孔径与pH存在交互作用,在跨膜压力差固定为1.25 MPa时,响应曲面图见图4,在膜孔径不变的前提下,随着pH增加,截留率呈现出一定的上升趋势,京尼平苷酸结构中的酸性官能

团逐步离子化,在荷负电性纳滤膜的电荷排斥下^[14-15],京尼平苷酸难以接近膜表面,从而引起截留率升高。跨膜压力差与溶液pH交互作用不明显,从图5的响应曲面可以看出几乎呈现平面状。

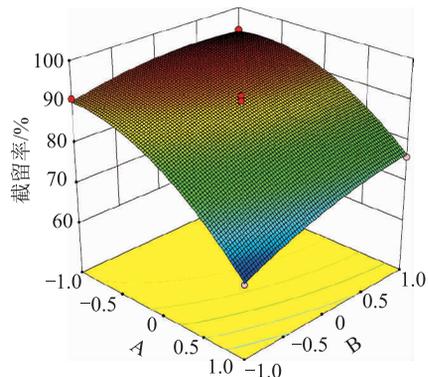


图3 膜孔径和跨膜压力差对京尼平苷酸截留率交互影响

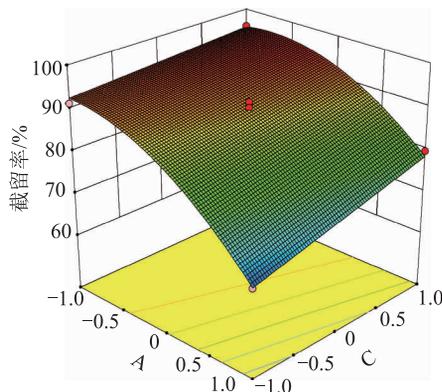


图4 膜孔径和pH对京尼平苷酸截留率交互影响

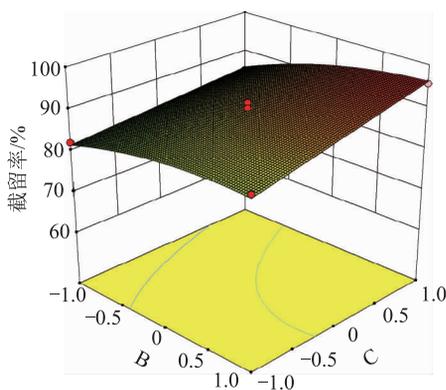


图5 跨膜压力差和pH对京尼平苷酸截留率交互影响

在保障京尼平苷酸截留率的前提下,保障膜分离效率,利用 Design-Expert 软件预测了最佳纳滤分离参数为膜孔径400 Da,跨膜压力差1.43 MPa,pH 6.83,结合实际分离参数的可操作性,调整为膜孔径400 Da,跨膜压力差1.40 MPa,pH 6.80。

2.6.3 纳滤分离工艺验证 根据响应曲面法优化出

的分离参数进行3次平行分离验证,在分离参数为膜孔径400 Da,跨膜压力差1.40 MPa, pH 6.80时,杜仲提取液中京尼平苷酸平均截留率为 $(93.7 \pm 1.8)\%$,与理论截留率为95.0%接近。结果表明,响应曲面法可用于杜仲提取液中京尼平苷酸的浓缩工艺优化。

2.7 工艺对比分析

对比纳滤浓缩和减压浓缩对尼平苷酸截留率或转移率的影响,结果见图6。随着减压浓缩温度升高,京尼平苷酸转移率呈现出下降趋势,其中温度高于80℃时转移率低于75%,成分损失明显。而纳滤的常温浓缩优势相对明显。通过常温化操作热敏性成分纳滤浓缩,可以有效避免因热处理成分氧化分解带来的损失。

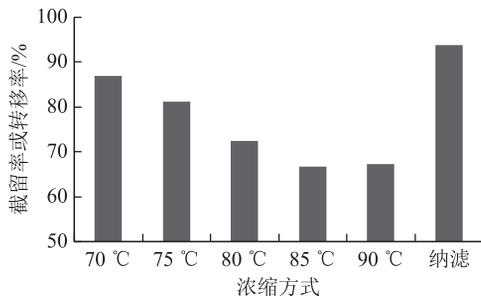


图6 浓缩方式对京尼平苷酸截留率或转移率的影响

3 讨论

现代研究发现,杜仲含有环烯醚萜类、木脂素类、苯丙素类、黄酮类、甾类和萜类等成分,其中京尼平苷酸属于环烯醚萜类,具有降血压、抗衰老及抗肿瘤药活性,而因环烯醚萜苷类成分加热易分解的客观现状,探索常温化的浓缩精制工艺,对于杜仲药材的深加工具有明确的实用价值。

Box-Behnken 响应曲面法通过在因素和响应值之间构建数学模型,对参数进行优化分析,所建立的基于纳滤分离技术的杜仲叶常温浓缩模型,拟合程度高、实验误差小,可用于实际预测。在进行参数水平摸索时,溶液 pH 不仅影响京尼平苷酸在杜仲水提液中的解离状态,在碱性条件也会促进氧苷碱的水解,因此需要在成分水解和离子化之间权衡,在保证离子化带来的电荷排斥效应提高截留率的同时,也要保障京尼平苷酸的稳定性。

在保证京尼平苷酸的稳定性、截留率,提升分离

效率,优化得到的纳滤分离参数为膜孔径400 Da,跨膜压力差1.40 MPa, pH 6.80,京尼平苷酸平均截留率为 $(93.7 \pm 1.8)\%$,与理论截留率为95.0%相近,说明采用响应曲面法优化杜仲提取液的浓缩工艺条件可行,且优于减压浓缩的生产效率。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:165-166.
- [2] 黄丽莉,段玉芳,杨春霞. 杜仲综合开发利用及产业化发展探讨[J]. 农学学报,2013,3(6):57-60.
- [3] 乌新平,王秀梅. 两种干燥方法对杜仲生物发酵人用保健品品质的影响[J]. 价值工程,2018,37(31):212-214.
- [4] 徐乐. 杜仲降压片质量控制方法研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2017.
- [5] 周张玖智,侯加卫,任盟乔,等. 京尼平苷酸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及脑内淀粉样蛋白沉积的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2019,37(3):382-388.
- [6] 胡振鑫,刘娅妮,叶蓁,等. 京尼平苷酸通过稳定微管促进脊髓损伤后轴突生长[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2019,35(5):551-558.
- [7] 魏学军,刘汇丽,何鑫. 产地加工对杜仲京尼平苷酸含量的影响[J]. 海峡药学,2016,28(3):55-57.
- [8] 吴鑫,李存玉,顾佳美,等. 纳滤技术在中药制药行业应用中的研究进展[J]. 中成药,2018,40(2):420-424.
- [9] 李存玉,马赞,吴晨曦,等. 响应面分析法优化金银花的纳滤浓缩工艺[J]. 中药材,2017,40(6):1389-1392.
- [10] 李存玉,马赞,刘奕洲,等. Box-Behnken 响应面法优化川芎水提液纳滤工艺[J]. 中成药,2017,39(2):296-300.
- [11] 董娟娥,马希汉. 反相高效液相色谱法同时分离测定杜仲雄花及其产品中的京尼平苷酸和绿原酸[J]. 色谱,2007,25(2):217-220.
- [12] 岳三峰. 纳滤过程浓差极化行为的 CFD 模拟与影响因素研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2018.
- [13] 刘怡,如扎哈布都拉,李露,等. Box-Behnken 响应面法优选心痛宁胶囊的水提工艺[J]. 中国现代中药,2019,21(2):208-212,221.
- [14] YAROSHCHUK A, BRUENING M L, BERNAL E E L. Solution-Diffusion-Electro-Migration model and its uses for analysis of nanofiltration, pressure-retarded osmosis and forward osmosis in multi-ionic solutions[J]. J Membr Sci, 2013,447(1):463-467.
- [15] 赵彦彦,袁其朋. 有机相纳滤分离过程中浓度、电荷、溶剂对溶质截留行为的影响[J]. 膜科学与技术,2006,26(5):31-35.

(收稿日期:2019-12-06 编辑:王笑辉)