

杜仲翅果皮酶解提取液的超滤工艺优化[△]

谢玲^{1*},陶 菡^{1#},张学俊¹,张灵丽¹,贺扬洁¹,田运霞¹,吴巧灵¹,季 春²(1.贵州大学酿酒与食品工程学院/贵州省发酵工程与生物制药重点实验室,贵阳 550025;2.贵州大学药学院,贵阳 550025)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)13-1557-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.13.04

摘要 目的:优化杜仲翅果皮酶解提取液的超滤工艺。方法:采用单因素实验考察超滤膜截留分子量、料液温度、操作压力、操作频率、过膜时间、料液浓度、料液pH对杜仲翅果皮酶解提取液中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率和固形物去除率的影响。固定超滤膜截留分子量100 000、料液浓度7 g/L、料液pH 7,以料液温度、操作压力、操作频率、过膜时间为考察因素,以桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率和固形物去除率的综合得分为评价指标,采用Box-Behnken设计-响应面法对超滤工艺进行优化并验证。结果:杜仲翅果皮酶解提取液的最佳超滤工艺为料液温度35 ℃、操作压力0.5 MPa、操作频率35 Hz、过膜时间42 min。验证试验结果显示,杜仲翅果皮酶解提取液中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率和固形物去除率的综合得分为78.06% (RSD=1.43%, n=3),与预测值(77.18%)的相对误差为1.14%。结论:优化后的超滤工艺稳定、可靠,可用于杜仲翅果皮酶解提取液的超滤纯化。

关键词 杜仲翅果皮;超滤工艺;Box-Behnken设计;响应面法;桃叶珊瑚苷;京尼平苷酸;绿原酸

Optimization of Ultrafiltration Technology of Enzymatic Hydrolysate from *Eucommia ulmoides* Peel

XIE Ling¹, TAO Han¹, ZHANG Xuejun¹, ZHANG Lingli¹, HE Yangjie¹, TIAN Yunxia¹, WU Qiaoling¹, JI Chun²
(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Bio-Pharmaceutical/School of Liquor & Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrafiltration technology of enzymatic hydrolysate from *Eucommia ulmoides* peel. METHODS: The single factor test was adopted to investigate the effects of molecular weight of ultrafiltration membrane, liquid temperature, operating pressure, operating frequency, membrane filtration time, liquid concentration and pH on transfer rates of aucubin, geniposide and chlorogenic acid as well as solid removal rate in enzymatic hydrolysate from *E. ulmoides* peel. Setting the molecular cut off of fixed ultrafiltration membrane of 100 000, liquid concentration of 7 g/L, and pH value of 7, the ultrafiltration technology was optimized by Box-Behnken design response-surface methodology and validated with liquid temperature, operating pressure, operating frequency and membrane passing time as factors, using comprehensive scores calculated from transfer rates of aucubin, geniposide and chlorogenic acid as well as solid removal rate as indexes. RESULTS: The optimal ultrafiltration technology of enzymatic hydrolysate from *E. ulmoides* peel was as follows as liquid temperature of 35 ℃, operating pressure of 0.5 MPa, operating frequency of 35 Hz and membrane passing time of 42 min. Results of validation tests showed that the comprehensive scores of the transfer rates of aucubin, geniposide and chlorogenic acid as well as solid removal rate in enzymatic hydrolysate from *E. ulmoides* peel was 78.06% (RSD=1.43%, n=3), and its relative error with the predicted value (77.18%) was 1.14%. CONCLUSIONS: The optimized ultrafiltration technology is stable and reliable, and can be used for the ultrafiltration purification of enzymatic hydrolysate from *E. ulmoides* peel.

KEYWORDS *Eucommia ulmoides* peel; Ultrafiltration technology; Box-Behnken design; Response surface methodology; Aucubin; Geniposidic acid; Chlorogenic acid

△ 基金项目:国家重点研发计划课题(No.2017YFD0600702)

* 硕士研究生。研究方向:酶化学、天然产物化学。E-mail: xieling6994@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然产物生物提取技术。E-mail: taohanedu@126.com

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 属于被子植物门杜仲科 *Eucommiaceae*, 是我国重要的名贵中药材之一, 传统以杜仲皮入药外, 其叶、雄花、果实也具有很高的药用价值, 在《神农本草经》《本草纲目》《中国药典》中均有详细

记载^[1-2]。杜仲翅果皮是杜仲果实的皮,其中含有环烯醚萜类、酚酸类、萜类、甾体类、苯丙素类等活性成分^[3]。其中,苯丙素类化合物绿原酸具有抗菌、抗病毒^[4]、抗炎^[5]、抗肥胖^[6]、降血压^[7-8]、神经保护^[9]等药理作用,环烯醚萜类化合物桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸均具有保护神经、肝脏、心脏以及调节免疫、抗炎、抗肿瘤、降血糖等药理作用^[10-14]。

本课题组前期采用酶解法、水提法、醇提法分别提取杜仲翅果皮中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸等成分,发现采用酶解法提取上述成分的效果最好。相关研究发现,中药提取液中除了有效成分外,通常还含有无机盐、鞣质、蛋白质、多糖、淀粉、果胶等无效成分^[15-16]。本课题组在以酶解法提取杜仲翅果皮中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸等成分的过程中发现,该酶解提取液中同样含有上述无效成分,从而增加了该提取液的精制难度。

超滤膜法是基于选择透过原理的一种方法,可使相对分子质量小于超滤膜截留分子量的成分透过超滤膜,还可以截留90%以上的杂质(相对分子质量为1 000~300 000),如有机物、胶体、悬浮固体等,从而可以实现有效成分(相对分子质量通常小于1 000)与杂质的分离,达到精制的目的^[17]。该方法具有无相变、环保、高效、易实现自动化生产等特点,可保持有效成分的生物活性^[17-18]。因此,本文课题组根据预实验结果,设计了杜仲翅果皮酶解提取液的超滤纯化工艺流程(见图1)。

基于此,本课题组采用酶解法制备杜仲翅果皮的酶解提取液,并根据设计的超滤纯化工艺流程,以其主要活性成分桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率以及固形物去除率为指标,在单因素实验的基础上,采用Box-Behnken设计-响应面法优化该提取液的超滤工艺,

以期为其精制方法优化提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),SHA-C(A)型水浴恒温振荡器(绍兴市苏珀仪器有限公司),DLSB-5L/10型低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司),TG16.5型高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),A-10型超纯水仪(美国Millipore公司),BSA124S-CW型电子天平(德国Sartorius公司),HC-XS18-6X型高压型膜分离设备[包括聚醚砜卷式超滤膜UF1(截留分子量为10 000)、UF2(截留分子量为30 000)、UF3(截留分子量为100 000)],HC-4015型澄清小试设备(成都和诚过滤技术有限公司)。

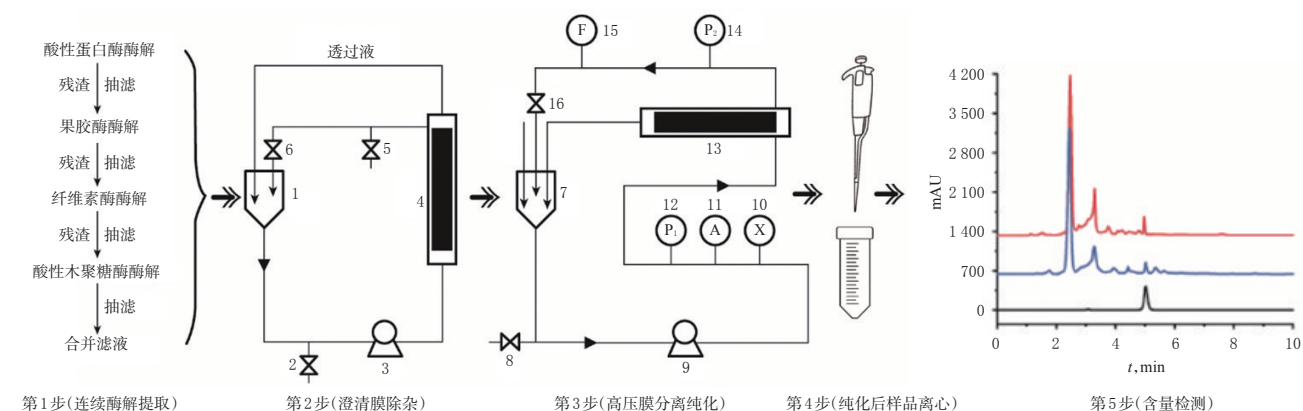
1.2 主要药品与试剂

本研究所用杜仲翅果皮购自山东贝隆杜仲生物工程有限公司,经贵州大学酿酒与食品工程学院张学俊教授鉴定为杜仲科植物杜仲*E. ulmoides* Oliv.的干燥翅果皮。其他药品与试剂有酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶(张家港大恒生物化工科技有限公司),酸性木聚糖酶(潍坊苏科汉生物工程有限公司),柠檬酸、柠檬酸钠(潍坊英轩实业有限公司),桃叶珊瑚苷对照品、京尼平苷酸对照品、绿原酸对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为SA9840、SG8110、SC8210,纯度均不低于98%);乙腈、甲醇为色谱纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 杜仲翅果皮酶解提取液的制备

称取杜仲翅果皮50.0 g至1 000 mL三角瓶中,加入经柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH 3.4)反复洗脱后的酸性蛋白酶液500 mL(酶含量为8%),置于53 ℃恒温水浴



注:1.循环罐;2.排污阀;3.循环泵;4.澄清膜元件;5.冲排阀;6.浓度调节阀;7.循环罐;8.放空阀;9.循环泵;10.蓄能器;11.安全阀;12.膜前压力表;13.膜元件;14.膜后压力表;15.变频器

Note: 1. circulation tank; 2. blow-down valve; 3. circulating pump; 4. clarification membrane element; 5. flushing valve; 6. concentration control valve; 7. circulation tank; 8. vent valve; 9. circulating pump; 10. accumulator; 11. safety valve; 12. pressure gauge in front of membrane; 13. membrane element; 14. pressure gauge behind membrane; 15. frequency converter

图1 超滤纯化工艺流程示意图

Fig 1 Flow chart of ultrafiltration purification process

中振荡8 h,再经过滤、抽滤后,得第1次滤液;将残渣回收至三角瓶中,加入经柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH 4.0)反复洗脱后的果胶酶液500 mL(酶含量为5%),置于50℃恒温水浴中振荡8 h,再经过滤、抽滤后,得第2次滤液;再将残渣回收至三角瓶中,加入经柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH 5.5)反复洗脱后的纤维素酶液500 mL(酶含量为5%),置于55℃恒温水浴中振荡8 h,再经过滤、抽滤后,得第3次滤液;再次将残渣回收至三角瓶中,加入经柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(pH 4.8)反复洗脱后的酸性木聚糖酶液500 mL(酶含量为6%),置于45℃恒温水浴中振荡8 h,再经过滤、抽滤后,得第4次滤液;合并上述4次滤液,即得25 g/L(以生药量计)的杜仲翅果皮酶解提取液。

2.2 杜仲翅果皮酶解提取液中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 参考文献[19]的方法并进行优化后进行测定。色谱柱为WondaSil C₁₈ Superb(4.6 mm×250 mm,5 μm);桃叶珊瑚苷的流动相为乙腈-水溶液(10:90, V/V),流速为0.8 mL/min,进样量为10 μL,柱温为25℃,检测波长为204 nm;京尼平苷酸的流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(16:84, V/V),流速为0.8 mL/min,进样量为10 μL,柱温为35℃,检测波长为238 nm;绿原酸的流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(24:76, V/V),流速为0.7 mL/min,进样量为15 μL,柱温为40℃,检测波长为330 nm。

2.2.2 单一对照品溶液制备 精密称取桃叶珊瑚苷对照品2.10 mg、京尼平苷酸对照品8.00 mg、绿原酸对照品1.71 mg,分别置于10 mL量瓶中,以50%甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为0.21、0.80、0.17 mg/mL的单一对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取“2.1”项下杜仲翅果皮酶解提取液适量,进行澄清膜除杂处理(如图1第2步所示,以预先除去提取液中的微生物、悬浮胶体、色素等杂质,下同);取澄清膜除杂处理后的溶液,进行高压膜分离纯化(如图1第3步所示),以制备超滤透过液;然后取超滤透过液适量,以8 000 r/min离心30 min,取上清液经0.45 μm微孔滤膜过滤,即得超滤后供试品溶液。另取适量杜仲翅果皮酶解提取液按上述“以8 000 r/min……过滤”方法操作,即得超滤前供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取“2.2.2”和“2.2.3”项下单一对照品溶液和超滤前后供试品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,超滤前后供试品溶液中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的理论板数均大于30 000,分离度均大于1.5,且超滤后上述成分色谱峰的峰形更好、分离度更大,说明超滤可以降低杂质对检测的干扰,详见图2。

2.2.5 线性关系考察 分别取“2.2.2”项下各单一对照

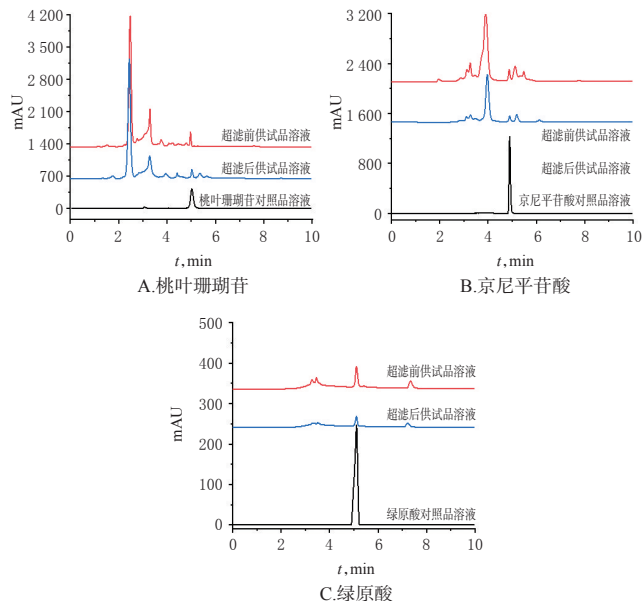


图2 专属性考察的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity tests

品溶液适量,分别以50%甲醇稀释,制成桃叶珊瑚苷质量浓度为0.001 0、0.025 0、0.050 0、0.075 0、0.100 0、0.120 0、0.150 0、0.210 0 mg/mL,京尼平苷酸质量浓度为0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.250 0、0.450 0、0.600 0、0.750 0、0.800 0 mg/mL,绿原酸质量浓度为0.000 5、0.001 0、0.002 0、0.007 5、0.010 0、0.015 0、0.020 0、0.030 0 mg/mL的系列对照品溶液。按照“2.2.1”项下的色谱条件进样分析,以质量浓度为横坐标(x, mg/mL)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,结果见表1。

表1 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的线性关系考察结果

Tab 1 Results of linear range of aucubin, geniposidic acid and chlorogenic acid

成分	线性回归方程	线性范围,mg/mL	相关系数(R ²)
桃叶珊瑚苷	y=17 023x+6.861 4	0.001 0~0.210 0	0.999 8
京尼平苷酸	y=5 589.8x+69.924	0.025 0~0.800 0	0.999 5
绿原酸	y=25 934x+10.108	0.000 5~0.030 0	0.999 2

2.2.6 精密度的考察 取“2.2.5”项下桃叶珊瑚苷质量浓度为0.075 0 mg/mL、京尼平苷酸质量浓度为0.250 0 mg/mL、绿原酸质量浓度为0.010 0 mg/mL的对照品溶液适量,分别按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸峰面积的RSD分别为1.07%、0.79%、0.86%(n=6),表明仪器的精密度的良好。

2.2.7 稳定性考察 取“2.2.3”项下超滤后供试品溶液6份,于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸峰面积的RSD分别为1.72%、1.26%、1.47%(n=6),表明超滤后供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 取“2.2.3”项下超滤后供试品溶液6份,按照“2.2.1”项下的色谱条件进样测定,记录峰面积,按标准曲线法计算含量。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的平均含量分别为37.73、86.87、5.51 μg/mL, RSD分别为1.95%、1.31%、1.78% (n=6),表明方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密量取“2.2.3”项下超滤后供试品溶液共18份(已知含桃叶珊瑚苷0.037 7 mg/mL、京尼平苷酸0.034 0 mg/mL、绿原酸0.005 6 mg/mL),每6份为一组,每组分别按桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸质量比约1:1.1加入对照品溶液(按“2.2.2”项下的方法,分别制备桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸质量浓度分别为0.035 0、0.030 0、0.005 0 mg/mL的对照品溶液),然后按“2.2.1”项下的色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的加样回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests of aucubin, geniposide acid and chlorogenic acid

成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
桃叶珊瑚苷	0.036 9	0.035 0	0.071 8	99.52	99.18	0.88
	0.038 3	0.035 0	0.072 7	98.47		
	0.037 0	0.035 0	0.072 0	100.09		
	0.037 2	0.035 0	0.072 2	99.97		
	0.038 2	0.035 0	0.072 5	97.88		
	0.038 7	0.035 0	0.073 4	99.13		
京尼平苷酸	0.034 2	0.030 0	0.064 5	100.95	101.91	1.34
	0.033 4	0.030 0	0.063 7	101.04		
	0.034 9	0.030 0	0.065 4	101.67		
	0.032 3	0.030 0	0.063 4	103.55		
	0.035 1	0.030 0	0.066 2	103.68		
	0.034 0	0.030 0	0.064 2	100.56		
绿原酸	0.004 8	0.005 0	0.009 7	96.28	96.36	1.69
	0.005 6	0.005 0	0.010 4	94.99		
	0.006 4	0.005 0	0.011 2	95.66		
	0.004 9	0.005 0	0.009 8	98.23		
	0.006 5	0.005 0	0.011 2	94.60		
	0.005 1	0.005 0	0.010 0	98.43		

2.3 杜仲翅果皮酶解提取液中固形物去除率和有效成分转移率的测定

2.3.1 固形物去除率 参考文献[20]的方法并调整后,精密吸取杜仲翅果皮酶解提取液、超滤透过液(取杜仲翅果皮酶解提取液,按“2.2.3”项下方法制备)各15 mL,置于干燥至恒重的培养皿中,在105 ℃烘箱中烘干至恒重,分别称定其质量,即得杜仲翅果皮酶解提取液的干膏质量和超滤透过液的干膏质量,然后计算杜仲翅果皮酶解提取液中固形物去除率[固形物去除率(%)=(1-超滤透过液干膏质量/杜仲翅果皮酶解提取液的干膏质量)×100%]。

2.3.2 有效成分转移率 参考文献[21-22]的方法进行测定。分别精密吸取杜仲翅果皮酶解提取液、超滤透过

液(取杜仲翅果皮酶解提取液,按“2.2.3”项下方法制备)适量,以8 000 r/min离心30 min,取上清液,经0.45 μm微孔滤膜过滤,按“2.2.1”项下的色谱条件进样测定,记录峰面积,根据标准曲线法计算杜仲翅果皮酶解提取液、超滤透过液中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的含量,然后计算3种有效成分的转移率[有效成分转移率(%)=超滤透过液中有效成分的含量/杜仲翅果皮酶解提取液中有效成分的含量×100%]。

2.4 单因素实验

本课题组通过预实验发现,在超滤工艺中,超滤膜截留分子量、料液温度、操作压力(膜过程透过性的主要影响因素)、操作频率(控制膜面流速的主要参数)、过膜时间、料液浓度、料液pH均能对有效成分的转移率和固形物去除率产生影响,故以桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率和固形物去除率的综合得分[参考文献[23],分别计算得桃叶珊瑚苷转移率(X_1)、京尼平苷酸转移率(X_2)、绿原酸转移率(X_3)、固形物去除率(X_4)的权重分别为0.285 6、0.291 5、0.207 2、0.215 6;并进行归一化处理,计算综合得分(0.285 6× X_1 +0.291 5× X_2 +0.207 2× X_3 +0.215 6× X_4),该分值越大表示超滤纯化的分离效果越佳]为指标,以超滤膜截留分子量、料液温度、操作压力、操作频率、料液浓度、料液pH为因素,进行单因素实验,结果见图3。

2.4.1 超滤膜截留分子量的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液1.5 L,固定料液浓度为25 g/L、料液pH为4、料液温度为25 ℃、操作压力为0.5 MPa、操作频率为35 Hz、过膜时间为30 min,考察不同超滤膜截留分子量[10 000(超滤膜为UF1)、30 000(超滤膜为UF2)、100 000(超滤膜为UF3)]的影响。结果,综合得分随超滤膜截留分子量的增大而增加,笔者推测这是因为超滤膜UF3截留分子量较大,在超滤过程中形成浓度极差化的程度较小,从而对有效成分的透过率影响较小,与范远景等^[24]的研究结果一致。由于超滤膜UF1、UF2综合得分低于UF3,且实验过程中发现,前两者用于杜仲翅果皮酶解提取液的超滤实验后清洗困难、其膜通量恢复率低,说明膜受到的污染程度较严重,因此选择超滤膜UF3进行后续优化。

2.4.2 料液温度的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液1.5 L,固定超滤膜为UF3、料液浓度为25 g/L、料液pH为4、操作压力为0.5 MPa、操作频率为35 Hz,过膜时间为30 min,考察不同料液温度(20、25、30、35、40、45 ℃)的影响。结果,料液温度在25~35 ℃范围内,综合得分逐渐增加,在35 ℃时达到最大值;继续增加料液温度,综合得分开始减小,推测这可能是因为大分子物质在大于35 ℃的条件下开始吸附、沉积于膜表面或堵塞膜孔,阻碍有效成分透过膜^[25-27]。因此,选择料液温度为35 ℃进行后续优化。

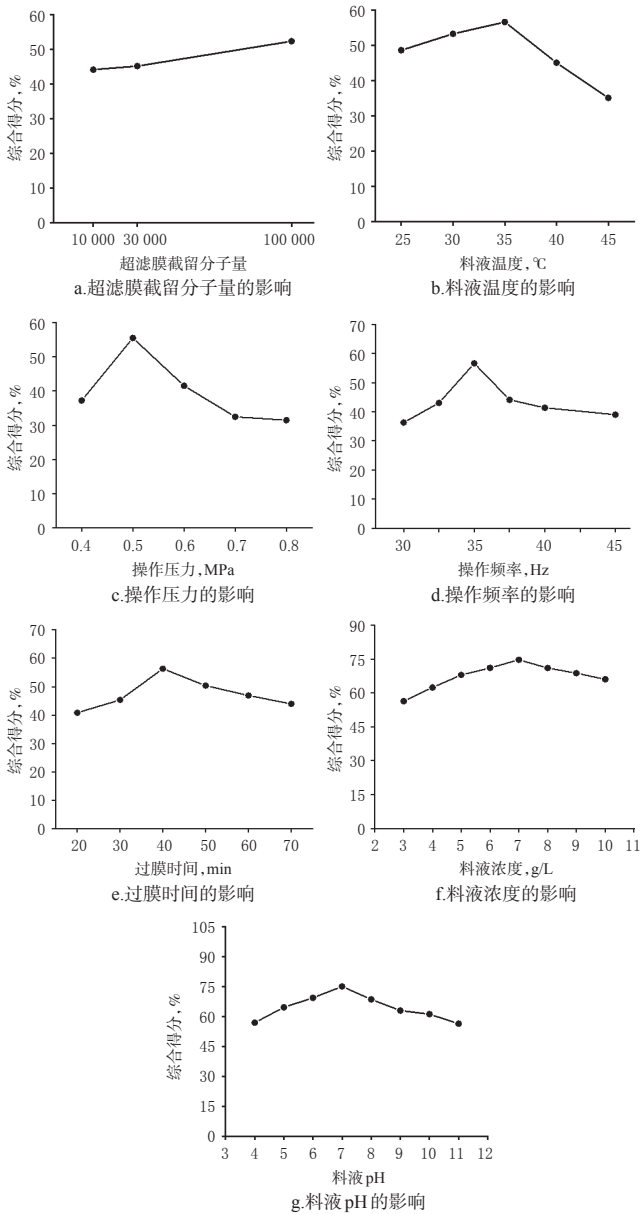


图3 单因素实验结果

Fig 3 Results of single factor tests

2.4.3 操作压力的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液 1.5 L, 固定超滤膜为 UF3、料液浓度为 25 g/L、料液 pH 为 4、料液温度为 35 ℃、操作频率为 35 Hz、过膜时间为 30 min, 考察不同操作压力(0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 MPa)的影响。结果, 综合得分随操作压力增大而先增加后减小, 在操作压力为 0.5 MPa 时综合得分达到最大, 这一变化与操作压力对膜过程透过性影响的一般规律相一致^[28]。因此, 选择操作压力为 0.5 MPa 进行后续优化。

2.4.4 操作频率的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液 1.5 L, 固定超滤膜为 UF3、料液浓度为 25 g/L、料液 pH 为 4、料液温度为 35 ℃、操作压力为 0.5 MPa、过膜时间为 30 min, 考察不同操作频率(30、32.5、35、37.5、40、45 Hz)的影响。结果, 当操作频率在 30~

35 Hz 范围内时, 综合得分随之增大而增加, 且在操作频率为 35 Hz 时达到最大; 但当操作频率超过 35 Hz 时, 综合得分反而开始减小, 说明膜面流速过大对有效成分的透过和固形物杂质的去除具有阻碍作用。因此, 选择操作频率为 35 Hz 进行后续优化。

2.4.5 过膜时间的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液 1.5 L, 固定超滤膜为 UF3、料液浓度为 25 g/L、料液 pH 为 4、料液温度为 35 ℃、操作压力为 0.5 MPa、操作频率为 35 Hz, 考察不同过膜时间(20、30、40、50、60、70 min)的影响。结果, 随着过膜时间的延长, 综合得分先增加后减小, 当过膜时间为 40 min 时, 综合得分达到最大; 当过膜时间继续增加时, 综合得分开始减小, 笔者推测这是因为膜表面截留的物质堵塞膜孔, 从而导致膜通量下降。因此, 选择过膜时间为 40 min 进行后续优化。

2.4.6 料液浓度的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液 1.5 L, 固定超滤膜为 UF3、料液温度为 35 ℃、料液 pH 为 4、操作压力为 0.5 MPa、操作频率为 35 Hz、过膜时间为 40 min, 考察不同料液浓度(3、4、5、6、7、8、9、10 g/L)的影响。结果, 料液浓度在 3~7 g/L 内逐渐增加时, 综合得分也随之增加; 当料液浓度为 7 g/L 时, 综合得分达到最大; 当继续增大料液浓度, 综合得分反而开始减小, 笔者推测这是因为更多无效成分与有效成分形成竞争透过关系, 破坏了膜表面的透过平衡, 影响了分离效果。因此, 选择料液浓度为 7 g/L 进行后续优化。

2.4.7 料液 pH 的影响 取“2.2.3”项下经澄清膜除杂处理后的溶液 1.5 L, 固定超滤膜为 UF3、料液浓度为 7 g/L、料液温度为 35 ℃、操作压力为 0.5 MPa、操作频率为 35 Hz、过膜时间为 40 min, 考察不同料液 pH(4、5、6、7、8、9、10、11)的影响。结果, 随着料液 pH 逐渐增大, 综合得分先增加后减小; 当料液 pH 为 7 时, 综合得分达到最大; 当 pH > 7 时, 综合得分开始减小。因此, 选择料液 pH 为 7 进行后续优化。

2.5 Box-Behnken 设计-响应面法优化杜仲翅果皮酶解提取液的超滤工艺

2.5.1 Box-Behnken 设计-响应面试验设计与结果 根据单因素考察结果可知, 料液浓度为 7 g/L、pH 为 7 时的料液环境有利于超滤分离的进行, 故设为固定值。固定超滤膜为 UF3, 同时, 以料液温度(A)、操作压力(B)、操作频率(C)、过膜时间(D)为自变量, 以综合得分为响应值, 采用 Design Expert 11.0 软件设计 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计-响应面试验, 综合评价各因素对响应值的影响。Box-Behnken 设计-响应面试验因素与水平见表 3, 试验设计与结果见表 4, 方差分析结果见表 5。

2.5.2 模型分析与预测 通过 Design-Expert 11.0 软件对试验结果进行多元回归拟合, 得二次多项回归模拟方

表3 Box-Behnken设计-响应面试验因素与水平

Tab 3 Factors and levels of Box-Behnken design-response surface test

水平	因素			
	A, °C	B, MPa	C, Hz	D, min
-1	30	0.4	32.5	30
0	35	0.5	35	40
1	40	0.6	37.5	50

表4 Box-Behnken设计-响应面试验设计与结果

Tab 4 Results of design and results of Box-Behnken design-response surface test

试验号	A	B	C	D	桃叶珊瑚苷转移率, %	京尼平苷酸转移率, %	绿原酸转移率, %	固形物去除率, %	综合得分, %
1	0	1	-1	0	87.31	74.54	49.66	61.38	70.19
2	0	1	1	0	78.56	73.85	46.99	52.63	65.05
3	1	0	1	0	85.18	73.91	46.03	59.25	68.19
4	0	0	-1	1	85.78	79.51	51.63	59.85	71.28
5	0	0	0	0	91.39	78.63	57.64	70.46	76.16
6	-1	0	0	-1	78.90	76.75	50.25	52.97	66.74
7	0	-1	-1	0	78.88	67.04	45.76	52.95	62.97
8	0	-1	1	0	79.64	71.87	44.99	53.71	64.60
9	-1	1	0	0	78.83	75.30	53.93	54.90	67.48
10	0	0	0	0	91.30	80.83	57.65	68.38	76.33
11	0	0	0	0	92.29	82.37	59.14	71.36	78.02
12	-1	-1	0	0	79.31	66.69	49.16	63.38	65.95
13	0	1	0	-1	88.28	73.91	53.03	66.35	72.06
14	0	0	-1	-1	82.49	70.44	49.14	56.56	66.47
15	0	1	0	1	86.78	74.51	51.63	61.85	70.54
16	0	-1	0	1	84.54	75.03	50.39	61.61	69.75
17	0	0	0	0	90.90	80.85	57.75	68.97	76.37
18	0	-1	0	-1	78.44	62.17	44.29	54.51	61.46
19	-1	0	-1	0	80.22	73.76	53.11	54.29	67.13
20	1	0	-1	0	78.02	66.75	44.87	55.09	62.92
21	1	1	0	0	88.42	65.61	42.27	62.49	66.62
22	0	0	1	1	83.20	75.93	49.05	56.27	68.20
23	-1	0	0	1	84.40	73.90	55.85	58.47	69.83
24	1	0	0	1	83.55	69.55	49.40	56.62	66.58
25	0	0	1	-1	85.46	69.21	51.31	51.53	66.33
26	1	0	0	-1	82.11	66.89	51.96	56.18	65.83
27	0	0	0	0	93.12	81.49	58.97	69.19	77.49
28	-1	0	1	0	77.75	65.48	48.60	53.82	62.97
29	1	-1	0	0	75.94	72.88	47.99	53.04	64.32

程:综合得分=76.87-0.47A+1.91B-0.468 3C+1.44D+0.192 5AB+2.36AC-0.585 0AD-1.69BC-2.45BD-0.735 0CD-5.93A²-5.21B²-5.71C²-3.36D²。结合表5结果可知,该响应值模型显著(P<0.05);失拟项P值为0.200 6,表示失拟项不显著(P>0.05),说明该回归模型对综合得分的拟合程度较好;一次项A、C对综合得分的影响不显著(P>0.05),B、D对综合得分的影响显著(P<0.05),影响大小排序为B>D>A>C;二次项A²、B²、C²、D²对综合得分的影响均显著(P<0.05),说明A、B、C、D对响应值的影响不是简单的线性关系。

2.5.3 两因素交互作用分析 响应面分析的曲面图可直观地反映响应值的变化趋势;二维等高线图可反映两因素的交互作用大小,中心圆越呈椭圆形则表示两因素

表5 Box-Behnken设计-响应面模型方差分析结果

Tab 5 Results of ANOVA of Box-Behnken design-response surface model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	586.75	14	41.91	29.87	<0.000 1
A	2.65	1	2.65	1.89	0.190 9
B	43.66	1	43.66	31.12	<0.000 1
C	2.63	1	2.63	1.88	0.192 4
D	24.91	1	24.91	17.75	0.000 9
AB	0.148 2	1	0.148 2	0.105 6	0.750 0
AC	22.23	1	22.23	15.84	0.001 4
AD	1.37	1	1.37	0.975 6	0.340 1
BC	11.46	1	11.46	8.17	0.012 7
BD	24.26	1	24.26	17.15	0.001 0
CD	2.16	1	2.16	1.54	0.235 0
A ²	227.93	1	227.93	162.44	<0.000 1
B ²	170.31	1	170.31	121.38	<0.000 1
C ²	211.51	1	211.51	150.74	<0.000 1
D ²	73.41	1	73.41	52.32	<0.000 1
R ²	0.947 9	1	0.947 9	0.914 0	
残差	19.64	14	1.40		
失拟项	16.89	10	1.69	2.45	0.200 6
纯误差	2.75	4	0.688 1		
总和	606.39	28			

的交互作用越明显^[29-30]。本研究通过Design-Expert 11.0软件对实验结果进行回归分析,得到三维响应面图,见图4。由图4a可知,AB两因素交互、其余2个因素取0水平时,随着料液温度和操作压力的增加,综合得分呈先增加后减小的变化趋势(与单因素实验得出的结果一致),且在中心点处达到最大值;结合表5的方差分析结果可知,AB交互作用对综合得分的影响不显著(P>0.05)。由图4b可知,AC两因素交互时,随着料液温度和操作频率的增加,综合得分先增加后减小,在中心处可达到最大值,该曲面坡度较陡,说明AC交互作用明显,且对综合得分的影响显著(P<0.05),与表5的方差分析结果一致。同理分析AD、BC、BD、CD的交互作用对综合得分的影响,结合表5的方差分析结果可知,AD、CD交互作用对综合得分的影响不显著(P>0.05),BC、BD交互作用对综合得分的影响显著(P<0.05),AC、BC、BD交互作用对实验结果的影响大小排序为BD>AC>BC。

2.6 杜仲翅果皮酶解提取液最佳条件确定及验证

通过对“2.5.2”项下回归模拟方程进行分析,得到最佳超滤工艺条件为料液温度34.681 °C、操作压力0.516 MPa、操作频率34.777 Hz、过膜时间41.721 min,其综合得分预测值为77.18%。考虑到超滤工艺实际可操作性,将各条件参数调整为料液温度35 °C、操作压力0.5 MPa、操作频率35 Hz、过膜时间42 min。

取杜仲翅果皮50.0 g,按“2.1”项下方法制备酶解提取液,然后按上述最佳工艺参数进行超滤处理,共平行制备3份,每份1.5 L,以验证优选的最佳超滤工艺。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的转移率和固形物

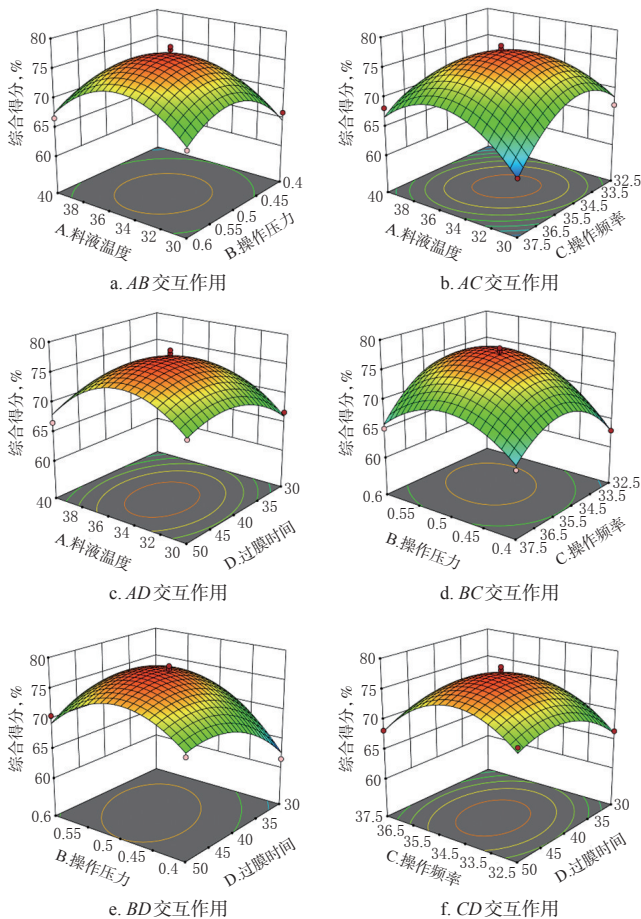


图4 两因素交互作用对综合得分影响的响应面图
Fig 4 Response surface of the effects of interaction of two factors on comprehensive score

去除率分别为 93.54% (RSD=1.43%, n=3)、82.36% (RSD=1.18%, n=3)、58.15% (RSD=1.48%, n=3)、70.89% (RSD=1.76%, n=3), 综合得分为 78.06% (RSD=1.43%, n=3); 与预测值(77.18%)相比较, 实测综合得分的相对误差为 1.14%, 说明该模型的回归方程与真实实验的拟合度高, 优化所得的最佳工艺具有可行性和可靠性。

2.7 杜仲翅果皮酶解提取液超滤前后的澄清度比较

取杜仲翅果皮酶解提取液和其经超滤后的溶液适量, 进行肉眼观察。结果, 杜仲翅果皮酶解提取液呈深褐色, 透明度较低; 经超滤后, 其溶液澄清、透明, 详见图5。

3 讨论

目前, 用于中药水提液“精制”的方法主要有絮凝法、醇沉法、大孔树脂吸附法和膜分离法等, 其中醇沉法周期长, 需要进行乙醇回收处理, 从而增加了纯化工艺的成本; 絮凝法和大孔树脂吸附法纯化的样品中可能有絮凝剂和树脂颗粒残留, 可能使制剂的安全性降低^[16]。超滤法属于膜分离法中的一种, 具有条件温和、除杂效果好、无相变、高效节能、可以阻截热原和细菌等特点^[16,31],

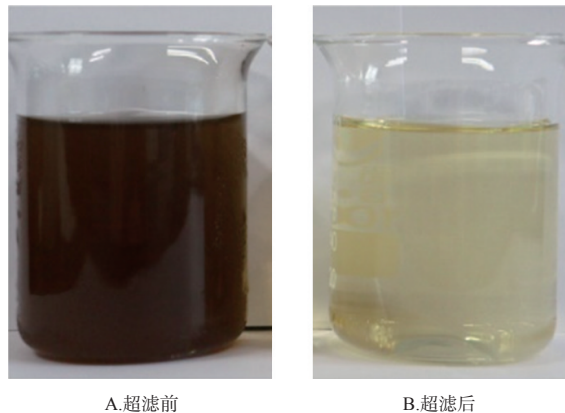


图5 杜仲翅果皮酶解提取液超滤前后的澄清度

Fig 5 Clarity of enzymatic hydrolysate from *E. ulmoides* peel before and after ultrafiltration

因此以该方法获得的精制提取液的稳定性较好, 可以为中药制剂的生产提供安全保障。

相关研究发现, 超滤膜抗污染能力差, 是导致膜通量衰减严重的重要原因^[32]。因此, 本研究进行超滤前, 对杜仲翅果皮酶解提取液进行了抽滤和澄清过滤除杂预处理, 以预先去除提取液中的颗粒、微生物、悬浮胶体等杂质。另外, 在以往的膜分离研究中, 多以膜通量为指标间接评价超滤效果^[33], 不能直接反映相应活性成分的转移情况, 因此本研究选择有效成分的转移率和固形物去除率作为杜仲翅果皮酶解提取液超滤工艺的评价指标。

本研究在单因素实验的基础上, 结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化了杜仲翅果皮酶解提取液的超滤工艺, 得到了料液温度、操作压力、操作频率、过膜时间与综合得分的回归模型, 并对两因素交互作用对综合得分的影响进行了分析, 得到各因素对超滤工艺的影响大小依次为操作压力 > 过膜时间 > 料液温度 > 操作频率。所得最佳工艺条件为: 料液温度 35 °C, 操作压力 0.5 MPa, 操作频率 35 Hz, 过膜时间 42 min; 该最佳工艺经验证后的综合得分为 78.06%, 与预测值的相对误差为 1.14%, 表示该模型的回归方程与真实实验的模拟度高; 且经肉眼观察后发现, 杜仲翅果皮酶解提取液超滤后样品的澄清度明显改善。

综上所述, 本研究优化后的超滤工艺稳定、可靠, 可用于杜仲翅果皮酶解提取液的超滤纯化。

参考文献

- [1] 董芬, 范田运, 张建新, 等. 杜仲叶的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(5): 679-682, 737.
- [2] 王晓瑞, 王黎坦, 朱海华, 等. 杜仲主要化学成分及保健作用与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(6): 2292-2303.
- [3] 刘聪, 郭非非, 肖军平, 等. 杜仲不同部位化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 497-512.

- [4] NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, et al. Chlorogenic acid (CGA) : a pharmacological review and call for further research[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 67-74.
- [5] BAGDAS D, GUL Z, MEADE J A, et al. Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(3): 216-228.
- [6] HIRATA T, KOBAYASHI T, WADA A, et al. Anti-obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(6): 1786-1791.
- [7] LANG C, LIU Z, TAYLOR H W, et al. Effect of *Eucommia ulmoides* on systolic blood pressure in the spontaneous hypertensive rat[J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(2): 215-230.
- [8] LEE G H, LEE H Y, CHOI M K, et al. *Eucommia ulmoides* leaf (EUL) extract enhances NO production in ox-LDL-treated human endothelial cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1164-1172.
- [9] KIM H Y, KIM J K, CHOI J H, et al. Hepatoprotective effect of pinoresinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112(1): 105-112.
- [10] TUNDIS R, LOIZZO M R, MENICHINI F, et al. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(4): 399-420.
- [11] VILJOEN A, MNCWANGI N, VERMAAK I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(14): 2104-2127.
- [12] POTOČNJAK I, MARINIĆ J, BATIČIĆ L, et al. Aucubin administered by either oral or parenteral route protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 142: 111472.
- [13] KIM Y M, SIM U C, SHIN Y, et al. Aucubin promotes neurite outgrowth in neural stem cells and axonal regeneration in sciatic nerves[J]. *Exp Neurobiol*, 2014, 23(3): 238-245.
- [14] 尹雪, 苏新云, 王秀华, 等. 原儿茶酸对帕金森病模型小鼠中脑和纹状体 D2DR、iNOS 和 TH 表达的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(6): 866-870.
- [15] 袁华, 邓良, 杨小俊, 等. 杜仲叶中绿原酸的提取纯化研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(2): 446-448.
- [16] 郭立玮, 邢卫红, 朱华旭, 等. 中药膜技术的“绿色制造”特征、国家战略需求及其关键科学问题与应对策略[J]. *中草药*, 2017, 48(16): 3267-3279.
- [17] 王玺, 仇萍, 彭晓珊, 等. 集成膜技术在中药制药工业中的应用研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(22): 1836-1841.
- [18] 郭立玮, 陆敏, 付廷明, 等. 基于中药复方小分子药效物质组“溶液结构”特征的膜分离技术优化原理与方法初探[J]. *膜科学与技术*, 2012, 32(1): 1-11.
- [19] 陈玉甫, 张学俊, 王明力, 等. 不同方法提取杜仲中桃叶珊瑚苷等 4 种高活性成分的比较研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(1): 10-15.
- [20] 徐益清, 杨辉, 罗友华, 等. 中药复方有效成分群在陶瓷膜分离过程中的迁移研究[J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1525-1530.
- [21] 聂林峰, 黄佳云, 何成华, 等. 膜技术富集脉络宁注射液生产废水中小分子药效成分的工艺优化研究[J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1804-1810, 1817.
- [22] 李淑芬, 姜忠义. 高等制药分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 123.
- [23] 王小艳, 向宇楠, 高洁, 等. 藏药四味姜黄汤中 10 种有效成分含量测定及其煎煮工艺优化[J]. *中国药房*, 2020, 31(8): 913-919.
- [24] 范远景, 马凌云, 徐晓伟, 等. 膜技术分离金银花绿原酸提取液工艺研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 43-46.
- [25] 邹节明, 阮征, 李建华, 等. 超滤技术分离中药有效成分的实验研究[J]. *中国医药学报*, 2003, 16(2): 76-81.
- [26] 闫治攀, 武瑞洁. 超滤膜分离技术在中药制剂生产中的应用进展[J]. *中成药*, 2018, 40(7): 1571-1575.
- [27] TARLETON E S, WAKEMAN R J. Understanding flux decline in crossflow microfiltration: part 1: effects of particle and pore size[J]. *Chemical Engin Res Design*, 1993, 71(4): 399-410.
- [28] 赵晓娟, 闫勇, 蔡跃明. 中草药领域中膜分离的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2004, 10(5): 64-65.
- [29] CUI F J, QIAN L S, SUN W J, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *volvarella volvacea*: process optimization and structural characterization[J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1706.
- [30] 杨大俏, 王锦旭, 李来好, 等. 响应面法优化褶牡蛎多糖多肽联产工艺[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 269-278.
- [31] 卢宝伟, 朱明, 王梦丽, 等. 新膜技术集成化在中药提取中的应用和研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 4006-4008.
- [32] 郭立玮, 唐志书, 朱华旭, 等. 膜分离及其集成技术对中药资源产业化过程的战略作用与核心价值[C]//中国-欧盟医药生物膜科学与技术研讨会论文集汇编. 北京: 中国蓝星(集团)总公司膜科学与技术编辑部, 2016: 12.
- [33] 魏学君, 陈占立, 孙长荣, 等. 无机陶瓷膜超滤精制连花清瘟颗粒的工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(1): 166-168.

(收稿日期: 2021-03-04 修回日期: 2021-04-06)

(编辑: 唐晓莲)