

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 139.
- [2] Choi J G, Kang S Y, Kim J M, et al. Antinociceptive effect of *Cyperus rhizoma* and *Corydalis tuber* extracts on neuropathic pain in rats [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012, 16 (6): 387-392.
- [3] 颜晶晶, 俸 珊, 何丽娜, 延胡索乙素对映体对人肝微粒体细胞色素 P450 酶抑制作用机制研究 [J]. *中草药*, 46 (4): 534-540.
- [4] Cao F L, Shang G W, Wang Y, et al. Antinociceptive effects of intragastric DL-tetrahydropalmatine on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 100(1): 199-204.
- [5] 冯 静, 于宗渊, 杨洪军, 等. 延胡索中生物碱成分的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 124-127.
- [6] 张 悦, 张溪桐, 王 冰, 等. 鸦胆子油胃内滞留海藻酸钙凝胶微球的制备及处方工艺考察 [J]. *中药材*, 2014, 37 (11): 2077-2081.
- [7] 张晓冲. 姜黄素胃内漂浮微球的研制 [D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [8] 王群星, 熊雪丰, 何三民, 等. 延胡索乙素胃漂浮微球的体外漂浮及释药特征评价 [J]. *中国现代应用药学*, 2015, 32(9): 1093-1097.
- [9] 徐 敏, 付晓泰, 朱正勇, 等. 中药浸膏中延胡索乙素的热稳定性的研究 [J]. *中成药*, 2007, 29(5): 746-747.
- [10] Kumares S S, Anandrao R K, Tejraj M A. Development of hollow microspheres as floating controlled-release systems for cardiovascular drugs: preparation and release characteristics [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2001, 27(6): 507-515.
- [11] Madan M K, Nita M, Lakshmi K G, et al. Multiunit floating drug delivery system of rosiglitazone maleate: development, characterization, statistical optimization of drug release and *in vivo* evaluation [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2009, 10(3): 887-899.

Box-Behnken 响应面法优化川芎水提液纳滤工艺

李存玉^{1,2}, 马 赞¹, 刘奕洲¹, 李红阳¹, 彭国平^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 目的 通过 Box-Behnken 响应面法优化川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 水提液纳滤工艺。方法 在单因素试验基础上, 以纳滤膜截留分子量、提取液质量浓度、pH 值为影响因素, 阿魏酸截留率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化工艺。结果 最佳条件为纳滤膜截留分子量 100 Da, 提取液质量浓度 20.58 μg/mL, pH 值 7.69, 阿魏酸截留率达 93.00%, 与实测值 (91.23%) 接近。结论 该方法合理可行, 可用于纳滤川芎水提液。

关键词: 川芎; 水提液; 纳滤; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)02-0296-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.012

Optimization of nanofiltration of *Ligusticum chuanxiong* aqueous extract by Box-Behnken response surface method

LI Cun-yu^{1,2}, MA Yun¹, LIU Yi-zhou¹, LI Hong-yang¹, PENG Guo-ping^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center for Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the nanofiltration of *Ligusticum chuanxiong* Hort. aqueous extract by Box-Beh-

收稿日期: 2016-04-26

基金项目: 国家自然科学基金 (81503258, 81373980); 江苏省自然科学基金青年基金 (BK20151005); 江苏省中医药局科技项目 (YB2015009)

作者简介: 李存玉 (1985—), 男, 博士, 讲师, 从事中药制药工艺研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: licunyuok@163.com

* 通信作者: 彭国平 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药制药工艺研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@

hnken response surface method. **METHODS** In addition to the influencing factors of molecular weight cut-off of nanofiltration membrane, extract concentration and pH value, the evaluation index of fumatic acid retention rate was taken into account for the process optimization by Box-Behnken response surface method on the basis of single factor test. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 100 Da for molecular weight cut-off of nanofiltration membrane, 20.58 $\mu\text{g/mL}$ for extract concentration, and 7.69 for pH value. The retention rate of fumatic acid reached 93.00%, approximating the measured value (91.23%). **CONCLUSION** This reasonable and feasible method can be used for the nanofiltration of *L. chuanxiong* aqueous extract.

KEY WORDS: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; aqueous extract; fumatic acid; nanofiltration; Box-Behnken response surface method

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 具有活血行气, 祛风止痛的功效^[1], 相关制剂广泛应用于临床, 如新生化颗粒、速效救心丸等^[2-3]。川芎指标成分阿魏酸(结构见图1)是肉桂酸的衍生物, 也是代表性酚酸类成分, 其热稳定性差, 丙烯酸结构长时间加热时易氧化分解^[4], 故在制剂生产中大多通过低温减压的方式降低其氧化分解程度。

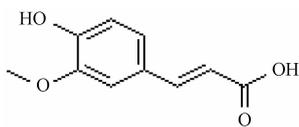


图1 阿魏酸结构

Fig.1 Structure of fumatic acid

纳滤技术作为反渗透分离的延伸, 具有分离过程无热效应、能耗低、操作方便、不产生二次污染等优点^[5], 但目前该技术应用于中药浓缩尚处于初步阶段。本实验根据其优势^[6], 在单因素试验基础上, 以纳滤膜截留分子量、提取液质量浓度、pH值为影响因素^[7], 阿魏酸截留率为评价指标^[10], 应用 Box-Behnken 响应面法^[8-9]优化川芎水提液纳滤工艺, 以期含有热敏性成分中药的相关处理提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料 纳滤膜(聚酰胺复合膜, 截留相对分子质量100、450、800 Da, 南京拓钰医药科技有限公司)。川芎购自安徽亳州(批号2015081001), 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 符合《中国药典》2015年版相关项下要求。阿魏酸提取物(批号20151101, 含有量 $\geq 95\%$)购自南京泽朗医药科技有限公司; 阿魏酸对照品(批号110773-201313, 含有量 $\geq 98\%$)购自中国食品药

品检定研究院。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为纯化水。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置 VWD 检测器(美国 Agilent 公司); TNZ-1 纳滤分离设备(南京拓钰医药科技有限公司); SDHC8E15-210 苏泊尔电磁炉(浙江苏泊尔股份有限公司); 不锈钢煎药桶(50 L)。

1.3 方法

1.3.1 溶液制备

1.3.1.1 对照品溶液 精密称取阿魏酸对照品 0.018 20 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(1.820 mg/mL)。

1.3.1.2 川芎水提液 称取川芎 10 kg, 加入 10、8 倍纯化水提取 2 次, 每次 1 h, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 合并滤液, HPLC 法测定其含量。《中国药典》2015 年版(一部)中规定, 川芎中阿魏酸含量不得低于 0.1%, 当水提 2 次, 每次 10 倍量时, 水提液中其含量在 50 $\mu\text{g/mL}$ 左右, 再通过加入阿魏酸提取物或稀释川芎水提液, 使得其在 15~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 可满足试验设计要求。

1.3.2 样品检测

1.3.2.1 色谱条件^[1] Thermo Scientific C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-1% 冰醋酸(30 : 70); 检测波长 321 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2.2 线性关系考察 精密吸取“1.3.1.1”项下对照品溶液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL, 置于 20 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 在“1.3.2.1”项色谱条件下检测。以峰面积为纵坐标(Y), 溶液质量浓度为横坐标(X)进行回归, 得回归方程为 $Y = 10.22X + 21.43$ ($r = 0.9993$), 表明阿魏酸在 9.1~182 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

1.3.3 纳滤浓缩 取川芎水提液 2 L, 调节溶液环

境,选择纳滤膜,组装系统。将提取液置于纳滤系统中循环平衡,待阿魏酸在纳滤膜中的吸附-解吸达到平衡时,取样平衡液,将溶液进行纳滤浓缩,以浓缩液体积在200 mL左右,膜通量出现明显衰减时为纳滤终点,取样纳滤液。

1.3.4 截留率计算 精密吸取“1.3.3”项下平衡液和纳滤液,在“1.3.2.1”项色谱条件下测定阿魏酸峰面积,按下式计算阿魏酸截留率。

$$R(\%) = \left(1 - \frac{A_N}{A_P}\right) \times 100\%$$

式中, R 为截留率, A_N 为纳滤液中阿魏酸峰面积, A_P 为平衡液中阿魏酸峰面积。

1.3.5 单因素考察 取川芎水提液适量,选择提取液平衡体积、温度、压力作为影响因素,对川芎水提液纳滤浓缩效果进行单因素试验,具体见表1。

表1 单因素设计结果

Tab. 1 Results of single factor design

单因素	固定条件
提取液平衡体积(1,2,4,8,16,32 L)	温度 20 °C, 压力 1.0 MPa
温度(5,20,40 °C)	压力 1.0 MPa, 提取液平衡体积 32 L
压力(0.5,1.0,1.5 MPa)	温度 20 °C, 提取液平衡体积 32 L

注:阿魏酸质量浓度均为0.1 mg/mL,纳滤膜截留分子量均为100 Da

1.3.6 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上,通过 Design-Expert 8.05 软件,以纳滤膜截留分子量(A)、提取液质量浓度(B)、pH值(C)为影响因素,-1、0、1为变量水平,进行3因素3水平试验,见表2。

表2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	因素		
	A 截留分子量/Da	B 提取液/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C pH值
-1	100	15	4.0
0	450	82.5	6.0
1	800	150	10.0

2 结果

2.1 单因素试验

2.1.1 提取液平衡体积 由图2可知,当阿魏酸与纳滤膜接触时,出现可吸附现象;当平衡体积达到4 L时,阿魏酸峰面积开始出现转折上升,表明此时解吸大于吸附;达到8 L时,峰面积逐步稳定,表明此时吸附-解吸达到平衡,阿魏酸截留率趋于稳定。

2.1.2 温度 由图3可知,在纳滤过程中随着温度升高,纳滤膜通量增加,但阿魏酸截留率呈下降趋势,可能影响浓缩效果。

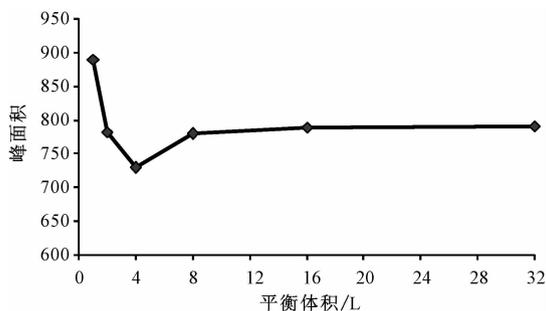


图2 提取液平衡体积对阿魏酸峰面积的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effect of extract's equilibrium volume on the peak area of fumalic acid ($n=3$)

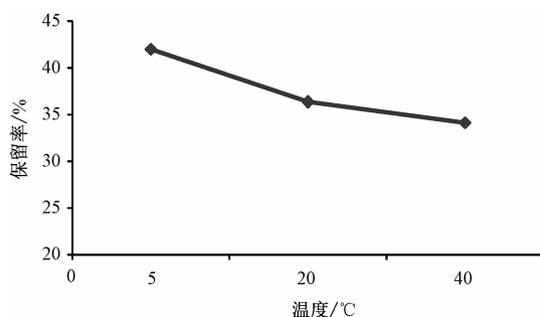


图3 温度对阿魏酸截留率的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of temperature on the retention rate of fumalic acid ($n=3$)

2.1.3 压力 压力与纳滤浓缩效率有关,压力越大,通量越高。由图4可知,压力升高,阿魏酸截留率呈缓慢升高趋势,表明压力与其截留率成正比,但影响较小。

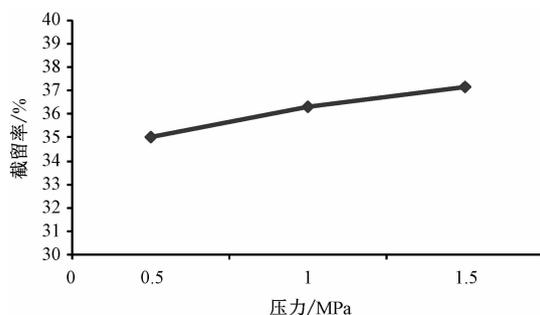


图4 压力对阿魏酸截留率的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Effect of pressure on the retention rate of fumalic acid ($n=3$)

2.2 工艺优化

2.2.1 Box-Behnken 响应面试验设计 固定提取液平衡体积16 L,温度20 °C,压力1.0 MPa作为纳滤浓缩条件,阿魏酸截留率(Y)为评价指标,每组平行3次,截留率取平均值。设计与结果见表

3, 方差分析见表4。

表3 试验设计与结果 (n=3)

Tab. 3 Design and results of tests (n=3)

编号	A	B	C	Y 阿魏酸截留率/%	
				实测值	预测值
1	1	-1	0	18.27	16.34
2	0	-1	1	68.35	70.54
3	1	0	-1	8.04	7.48
4	0	0	0	31.20	32.18
5	1	1	0	15.06	17.81
6	0	1	1	71.02	68.53
7	0	0	0	35.20	32.18
8	-1	1	0	51.94	53.87
9	-1	0	-1	22.13	22.39
10	0	0	0	35.27	32.18
11	0	0	0	30.13	32.18
12	-1	-1	0	61.78	59.03
13	-1	0	1	93.90	96.46
14	0	-1	-1	18.26	20.75
15	1	0	1	32.88	32.62
16	0	1	-1	21.27	19.08
17	0	0	0	29.09	32.18

通过 Design-Expert 8.05 软件对数据进行回归拟合, 得到回归模型为 $Y = 15.97356 + 0.044292A - 0.21476B - 2.96418C + 7.01587 \times 10^{-5}AB - 0.017475AC - 6.2963 \times 10^{-4}BC - 1.6449 \times 10^{-6}A^2 + 1.05043 \times 10^{-3}B^2 + 1.94025C^2$, 方差分析见表4。由表可知, F 值为 88.96, 多元相关系数为 0.9913, 预测相关系数为 0.9144, 调整相关系数为 0.9802, 表明模型拟合度较好; $P < 0.0001$, 表明该模型高度显著, 可用于响应值预测。

表4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	9 008.51	9	1 000.95	88.96	<0.0001
A	3 100.78	1	3 100.78	275.57	<0.0001
B	6.79	1	6.79	0.60	0.4627
C	4 922.80	1	4 922.80	437.50	<0.0001
AB	10.99	1	10.99	0.98	0.3560
AC	598.54	1	598.54	53.19	0.0002
BC	0.029	1	0.029	0.002	0.9610
A ²	0.17	1	0.17	0.015	0.015
B ²	96.45	1	96.45	8.57	0.0221
C ²	253.61	1	253.61	22.54	0.0021
残差	78.77	7	11.25	—	—
失拟项	45.39	3	15.13	1.81	0.2846
误差项	33.38	4	8.34	—	—
总和	9 087.27	16	—	—	—

2.2.2 响应曲面分析 见图5。由图5A可知, pH 值为 6.0 时, 提取液质量浓度和纳滤膜截留分子量对阿魏酸截留率无明显交互影响; 质量浓度不变, 随着截留分子量逐渐增加, 截留率下降明显, 符合

孔径筛分理论; 截留分子量不变, 随着质量浓度增加, 截留率未出现明显变化。由图5B可知, 在提取液质量浓度为 82.5 μg/mL 时, 纳滤膜截留分子量和 pH 值对阿魏酸截留率的交互影响明显; 截留分子量不变, 随着 pH 值增加, 阿魏酸逐步离子化, 由于纳滤膜表面的电荷效应^[11-13]而使得其截留率升高; pH 值不变, 随着截留分子量增加, 截留率下降, 也符合孔径筛分理论。由图5C可知, 纳滤膜截留分子量 450 Da 时, 提取液质量浓度和 pH 值对阿魏酸截留率无明显交互影响; 质量浓度不变, 随着 pH 逐渐增加, 由于纳滤膜表面的电荷效应而使得截留率上升; pH 值不变, 随着质量浓度增加, 截留率无明显变化。

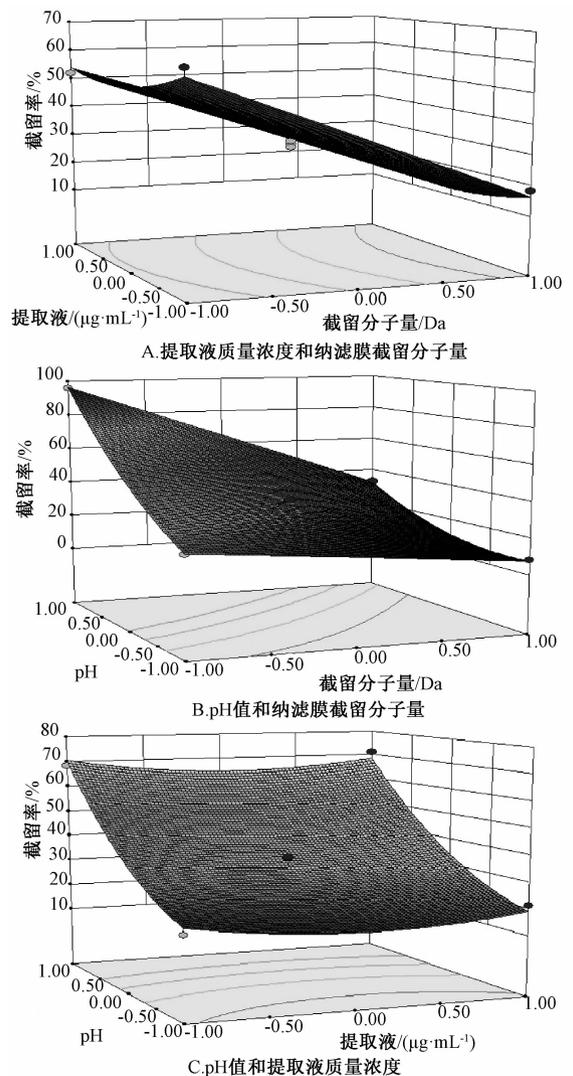


图5 响应面图

Fig. 5 Response surface diagrams

通过 Design-Expert 8.05 软件的响应优化功能对结果进行优化, 得到川芎水提液最优纳滤工艺为

纳滤膜截留分子量 100 Da, 提取液质量浓度 20.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 值 7.69, 阿魏酸截留率为 93.00%。再进行验证试验, 平行 3 批, 结果见表 5, 可见实测值 (91.23%) 与预测值 (93.00%) 较接近。

表 5 验证试验结果 ($n=3$)

Tab. 5 Results of verification tests ($n=3$)

编号	阿魏酸截留率/%	平均值/%	RSD/%
1	91.37		
2	89.10	91.23	2.27
3	93.23		

3 讨论和结论

川芎中主要含有苯酞内酯、生物碱、挥发油、酚类及有机酸, 其中酚酸及苯酞内酯类成分大多属于热不稳定性物质。由于阿魏酸的结构及相对分子质量均较小, 故以其为指标成分评价纳滤截留性能时, 可以用于纳滤工艺优化。该成分在酸性至中性溶液环境中, 主要以游离态或部分离子态的形式存在, 故进行纳滤浓缩时大多依靠膜分子筛分效应来进行分离, 随着溶液 pH 值升高, 其大多以解离态存在, 而且复合聚酰胺材质纳滤膜表面带负电, 其与膜表面电荷效应增强, 难以通过纳滤膜, 从而使得截留率升高, 增加纳滤效果。

在实际纳滤浓缩操作过程中, 由于药材质量差异, 导致其水提液中指标性成分浓度不稳定, 经单因素试验发现, 浓度对截留率不产生明显影响。本实验 Box-Behnken 采用响应面法^[14], 对纳滤浓缩参数进行优化, 发现模型拟合程度高, 误差小, 可用于实际预测, 得到最佳条件为纳滤膜截留分子量 100 Da, pH 值 7.69, 提取液质量浓度 20.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阿魏酸截留率为 93.00%, 与实测值 (91.23%) 吻合。另外, 阿魏酸在高截留率前提下, 川芎主要成分也可以得到较好保留, 表明该方法合理可行, 可为含有热敏性成分的中药制剂生产提供了新

思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 40-41.
- [2] 尚远宏, 刘 圆, 石圣洪, 等. 新生化颗粒的质量标准研究[J]. 中成药, 2007, 29(3): 393-396.
- [3] 周 鸿, 黄含含, 张静泽, 等. 川芎-当归药对研究进展 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 184-188.
- [4] 陈 勇, 程智勇, 韩凤梅. 当归注射液的质量探讨 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2000, 22(3): 278-281.
- [5] 普文英, 张卫东. 纳滤-新型的分离小分子有机物的膜技术 [J]. 中国药房, 2000, 11(5): 234-236.
- [6] 李存玉, 钱 祥, 杨泽秋, 等. 基于纳滤技术的消癌平注射液中的钾离子去除工艺优化 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 294-297.
- [7] 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: 463-467.
- [8] 高义霞, 景红艳, 姜祖君, 等. 响应面分析法优化乳苣总黄酮提取工艺的研究 [J]. 中药材, 2010, 33(4): 621-624.
- [9] 潘亚磊, 翟运坤, 牛银波, 等. 响应面分析法优化杜仲总木脂素提取工艺 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 182-185.
- [10] 徐晓芳, 孙东东, 李 祥, 等. 川芎水提部位化学成分的上PLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 382-386.
- [11] 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.
- [12] Kumar V S, Hariharan K S, Mayya K S, et al. Volume averaged reduced order Donnan Steric Pore Model for nanofiltration membranes [J]. *Desalination*, 2013, 322: 21-28.
- [13] Blumenschein S, Böcking A, Kätzel U, et al. Rejection modeling of ceramic membranes in organic solvent nanofiltration [J]. *J Membr Sci*, 2016, 510: 191-200.
- [14] 何 超, 索绪斌, 张 涵, 等. 响应曲面法优化鲜地龙可溶性蛋白提取工艺 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 758-762.