

法探讨[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(4): 276-279.

[11] 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: 1380-1381.

[12] 罗丽佳, 李小芳, 罗 丹, 等. 银黄口腔崩解片的制备工艺研究及体外评价[J]. 中药与临床, 2015, 6(2): 34-39.

[13] 赵俊霞, 孙彩霞, 苏建春. 星点设计-效应面法优化广金钱草总黄酮固体分散体微孔渗透泵控释片处方[J]. 中草药, 2014, 45(21): 3081-3086.

[14] 孔圆圆. 盐酸氟西汀崩解片的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2015.

基于调节解离状态的丹参酚酸纳滤分离机制

李存玉^{1,2}, 马 赟¹, 陈铭佳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. 南京中医药大学, 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** 通过调节成分解离状态, 研究丹参酚酸的纳滤分离机制。**方法** 以原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 截留率为指标, 酸碱滴定法计算三者 pKa。改变溶液酸碱度, 调节游离-解离比例和溶质浓度, 考察成分解离状态、浓度与纳滤分离行为的相关性。**结果** 原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 的 pKa 分别为 7.56、4.01、2.77, 当溶液 pH 为 1.8 时, 三者均以游离态分子存在, 纳滤分离以分子筛分为主; 随着 pH 升高, 溶质逐步解离, 呈现出以 Donnan 效应为主的纳滤分离机制。同时, 受溶解-扩散效应影响, 降低溶质浓度可提高其截留率。**结论** 丹参酚酸的纳滤分离机制是由分子筛分、Donnan 效应等多种作用综合的结果, 在明确溶质解离状态的前提下, 将有助于提升纳滤技术在中药产业中的应用。

关键词: 丹参; 原儿茶醛; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 纳滤分离; 解离状态

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)12-2517-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.014

Nanofiltration separation mechanism of phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* based on regulating dissociated state

LI Cun-yu^{1,2}, MA Yun¹, CHEN Ming-jia¹, 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 University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

KEY WORDS: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; protocatechuic aldehyde; rosmarinic acid; salvianolic acid B; nanofiltration separation; dissociated state

纳滤是一种介于超滤和反渗透之间的压力驱动膜分离过程, 具有分离过程无热效应、能耗低、不产生二次污染的优点^[1], 在食品、医药、电子等行业的应用日趋广泛, 如水处理、蛋白纯化、热敏性成分浓缩等^[2-3]。纳滤技术的分离特点近似机械筛分, 但由于纳滤膜材质的核电荷性, 从而产生多样性的分离行为, 因此纳滤分离机制包括道南效

应、溶解-扩散模型、细孔模型、电荷模型、立体位阻模型等^[4-6]。中药提取液中成分复杂多样, 同时其存在状态也呈现出游离、解离、团聚等多种形式^[7], 故纳滤在中药分离精制过程中的具体机制尚待进一步明确, 从而促进该技术在中药产业中的应用推广。

丹参中富含水溶性酚酸类成分, 在制药过程中

收稿日期: 2017-02-06
基金项目: 国家自然科学基金 (81503258, 81603307); 江苏省自然科学基金青年基金 (BK20151005); 江苏省高校自然科学基金 (17KJB360010)

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, 博士, 教授, 从事中药成分分离精制及新药研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@126.com

由于热效应容易发生氧化分解^[8], 已有研究表明, 纳滤对丹参酚酸的浓缩富集技术有明显优势^[9-10]。丹参中的主要酚酸类成分为丹酚酸 B (718.62 Da)、迷迭香酸 (360.31 Da)、原儿茶醛 (138.12 Da) 等, 其结构均为多酚酸, 而且分子量递减。本实验拟采用酸碱滴定来评价该类成分的游离-解离比例, 从而选择不同截留分子量的纳滤膜进行分离数据积累, 分析酚酸解离状态与其纳滤分离规律的相关性, 进一步探讨相关机制。

1 材料与仪器

1.1 材料 纳滤膜 (聚酰胺复合膜, 截留相对分子质量 150、450、800 Da, 南京拓鈺医药科技有限公司)。丹参购自安徽亳州, 批号 2014021001, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 符合 2015 年版《中国药典》相关项下要求。迷迭香酸 (批号 110809-201205, 含有量 $\geq 98\%$)、原儿茶醛 (批号 110855-201311, 含有量 $\geq 98\%$)、丹酚酸 B (批号 111562-200807, 含有量 $\geq 98\%$) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。原儿茶醛 (批号 160825, 含有量 $\geq 98\%$)、迷迭香酸 (批号 160530, 含有量 $\geq 98\%$)、丹酚酸 B (批号 161010, 含有量 $\geq 98\%$) 提取物均购自南京泽朗生物科技有限公司。甲醇、乙酸为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪, 配置 Waters 2489 紫外/可见光检测器 (美国 Waters 公司); TNZ-1 型纳滤膜分离设备 (南京拓鈺医药科技有限公司); KH-250B 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); JSC-1000 型电子天平 (凯丰集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取干燥至恒重的原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 即得 (3 种成分质量浓度分别为 0.962、0.724、1.014 mg/mL)。

2.1.2 原儿茶醛水溶液 精密称取原儿茶醛提取物适量, 纯化水稀释定容至 2 L, 即得 (质量浓度为 0.265 mg/mL)。

2.1.3 迷迭香酸水溶液 精密称取迷迭香酸提取物适量, 纯化水稀释定容至 100 mL, 即得 (质量浓度为 0.088 mg/mL)。

2.1.4 丹酚酸 B 水溶液 精密称取丹酚酸 B 提取

物适量, 纯化水稀释定容至 100 mL, 即得 (质量浓度为 1.891 mg/mL)。

2.1.5 丹参水提液 丹参用 10 倍量水煎煮提取 2 次, 每次分别为 1.5、1 h, 提取液合并, 0.5 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 pKa 测定^[11] 由于丹参中的酚酸为多元弱酸, 而且多级解离对酸碱度影响较小, 故按照一元弱酸的 pKa 测定方法。精密量取 3 种酚酸水溶液 20 mL, 置于洁净干燥的烧杯中, 0.100 7 mol/L 氢氧化钠溶液滴定, 每滴加 1 mL 记录 1 次 pH 值, 绘制 pH 值-氢氧化钠体积曲线, 待曲线斜率接近 1.0 时, 将滴加量调整为每 0.2 mL 记录 1 次 pH 值, 直至曲线斜率趋于无穷大, 即为滴定终点, 重复 3 次, 计算 pKa。

2.3 纳滤分离

2.3.1 游离态酚酸 酸碱滴定法计算原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 的 pKa, 10% 盐酸调节丹参提取液 pH 至 1.8, 以保证上述 3 种成分溶液环境中的游离态比例在 90% 以上, 再分别采用截留相对分子质量 150、450、800 Da 的纳滤膜进行分离。根据前期预试验结果^[1], 为保障结果的准确性和稳定性, 控制操作温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$, 压力 1.0 MPa, 待成分与纳滤膜之间吸附-解吸附大致平衡时, 取平衡液开始纳滤, 待原溶液体积低于 200 mL 时, 停止纳滤, 取纳滤液。

2.3.2 解离态迷迭香酸和丹酚酸 B 酸碱滴定法计算迷迭香酸和丹酚酸 B 的 pKa, 10% 氢氧化钠溶液调节丹参提取液 pH 至 5.0, 以保证上述 3 种成分溶液环境中的解离态比例在 90% 以上, 按“2.3.1”项下方法进行纳滤分离。

2.3.3 解离态原儿茶醛 由于丹酚酸 B 在 pH 大于 6.5 时容易分解成原儿茶醛、丹酚酸 D 等, 从而影响实验结果^[12], 故原儿茶醛采用单一成分提取物进行纳滤分离研究, 酸碱滴定法计算其 pKa, 10% 氢氧化钠溶液调节丹参提取液 pH 至 8.5, 按“2.3.1”项下方法进行纳滤分离。

2.3.4 浓度对纳滤分离的影响 丹参水提液用纯化水稀释 2、10 倍, 10% 盐酸调节丹参提取液 pH 至 1.8, 采用截留相对分子质量 150、450、800 Da 的纳滤膜进行分离, 按“2.3.1”项下方法进行纳滤分离。

2.4 色谱条件^[13] Thermo Scientific 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 286 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相甲醇-1%

乙酸，梯度洗脱（程序见表 1）；进样量 10 μL：

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	甲醇/%	1% 乙酸/%
0	10	90
22	30	70
50	55	45
60	10	90

2.5 截留率计算 精密吸取“2.3”项下平衡液、纳滤液，在“2.4”项色谱条件下采用 HPLC 法测定，按式（1）计算原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 截留率（ R 为成分截留率， A_N 为纳滤液中成分峰面积， A_p 为平衡液中成分峰面积）。

$$R = (1 - \frac{A_N}{A_p}) \times 100\%$$

(1)

2.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，在“2.4”项色谱条件下检测。以峰面积为纵坐标（ Y ），对照品溶液质量浓度为横坐标（ X ）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	线性方程	R	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
原儿茶醛	$Y = 7.26X - 16.88$	0.999 1	9.62 ~ 192.4
迷迭香酸	$Y = 11.44X - 27.30$	0.999 5	7.24 ~ 144.8
丹酚酸 B	$Y = 11.34X - 1.41$	0.999 1	10.14 ~ 202.8

2.7 pKa 计算 表 3 显示，3 种酚酸类成分的酸性依次为丹酚酸 B > 迷迭香酸 > 原儿茶醛，丹参水提液 pH 值在 4.0 ~ 5.0 范围内，此时原儿茶醛主要以游离态的形式存在，迷迭香酸呈现出游离态和解离态共存的状态，丹酚酸 B 主要以解离态的形式存在。

表 3 成分解离状态与 pH 的相关性

Tab. 3 Correlation between component dissociated state and pH

成分	pKa	游离 90% 时的 pH	解离 90% 时的 pH
原儿茶醛	7.56	6.61	8.51
迷迭香酸	4.01	3.06	4.96
丹酚酸 B	2.77	1.82	3.72

2.8 丹参水提液的纳滤分离

2.8.1 pH 1.8 图 1 显示，3 种酚酸类成分随着纳滤膜截留相对分子质量增加，其截留率下降，以原儿茶醛最明显，其次是迷迭香酸和丹酚酸 B。同时，在三者均以游离分子态形式存在的前提下，其分离以分子筛分为主。

2.8.2 pH 5.0 当迷迭香酸和丹酚酸 B 均解离成

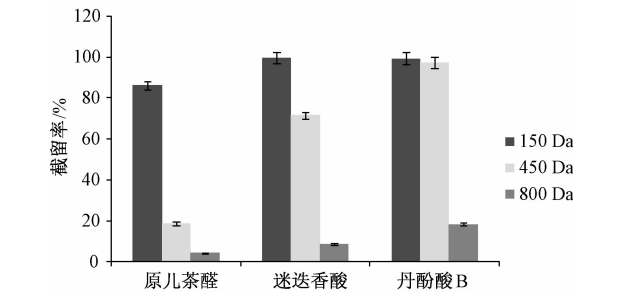


图 1 pH 1.8 下 3 种酚酸的纳滤截留率

Fig. 1 Nanofiltration rejection rates of three phenolic acids at pH 1.8

离子态时，其在系列截留相对分子质量纳滤膜中的截留率均明显升高，其中在 800 Da 纳滤膜中的截留率均大于 76%，表明两者在接近纳滤膜表面时除了孔径筛分效应外，以阴离子状态存在的酚酸与荷负电的纳滤膜之间 Donnan 效应逐步增强，在双重效应下提高了成分的截留率。图 2 显示，原儿茶醛的截留率较在 pH 1.8 下有所提高，但表现出的分离行为仍以孔径筛分效应为主。

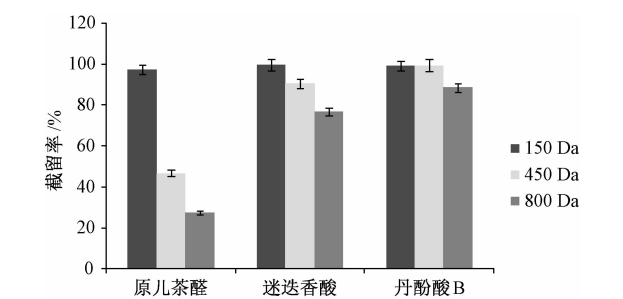


图 2 pH 5.0 下 3 种酚酸的纳滤截留率

Fig. 2 Nanofiltration rejection rates of three phenolic acids at pH 5.0

2.8.3 pH 8.5 原儿茶醛纳滤截留率明显升高，但随着纳滤膜截留相对分子质量增加而有所降低，此时成分相对分子质量远小于纳滤膜截留相对分子质量，因此其纳滤分离机制以 Donnan 效应为主^[14]。见表 4。

表 4 pH 8.5 下原儿茶醛纳滤截留率

Tab. 4 Nanofiltration rejection rates of protocatechuic aldehyde at pH 8.5

截留相对分子质量/Da	截留率/%
150	98.70
450	87.22
800	36.55

2.8.4 浓度对纳滤分离的影响 表 5 显示，丹参水提液分别稀释 2、10 倍后，3 种酚酸的截留率均表现出一定的升高趋势，其解离状态均以游离态形

式存在。在排除孔径筛分及 Donnan 效应的前提下，可能与纳滤“溶解-扩散模型”相关，溶质浓度降低时，其扩散系数随之降低，从而难以透过纳滤

膜，并呈现出截留率升高的结果。因此，在中药精制分离时，可以选择性地调节溶质浓度，以达到目的性分离。

表 5 浓度对 3 种酚酸纳滤截留率的影响

Tab. 5 Effects of concentration on the nanofiltration rejection rates of three phenolic acids

截留相对分子质量/Da	截留率/%					
	原儿茶醛		迷迭香酸		丹酚酸 B	
	稀释 2 倍	稀释 10 倍	稀释 2 倍	稀释 10 倍	稀释 2 倍	稀释 10 倍
150	87.07	91.65	99.16	99.27	99.01	99.29
450	18.48	23.81	73.42	80.44	97.42	98.56
800	5.11	7.26	10.57	18.83	19.69	24.61

3 讨论

丹参中的水溶性成分以酚酸为主，前期研究表明，采用纳滤精制时可不破坏有效组分比例，而且能够提高分离效率，同时溶液酸碱性与成分截留行为呈现出一定的相关性。本实验测定了 3 种酚酸的 pKa，由于其结构中含有多个酚羟基或羧基，存在多级电离，故 pKa 计算复杂繁琐，同时 3 种酚酸均为弱酸，故假设为一元弱酸进行滴定计算，根据所计算出的 pKa 调节成分解离状态，通过纳滤分离数据可以较好地进行表征和验证。另外，改变成分解离状态以调节纳滤分离行为时，将有助于实现该类成分的目的性精制分离。

纳滤分离的 Donnan 效应、分子筛分、溶解-扩散模型等均可用于解释成分的分离行为，但由于中药成分结构多样，而且分离模型适用性不同，导致纳滤技术在中药产业中的应用具有局限性。由于中药成分在溶液中均以多种状态存在，如解离、游离、缔合等，因此解释其分离行为的纳滤模型也存在多样性，当丹参酚酸以游离态形式存在时，纳滤分子筛为其主导作用；当其以解离态形式存在时，酚酸负离子与纳滤膜之前的电荷效应增强，纳滤 Donnan 效应在成分分离中占主要地位^[15]；在其他因素不改变的前提下，酚酸浓度的改变将直接影响其扩散系数，从而影响分离效果。然而，中药复杂溶液环境中包含了多样的存在状态，故需要在明确主体存在状态的前提下分析其分离机制，这将有助于提升纳滤技术在中药产业中的应用。

参考文献:

[1] 李存玉, 马 赟, 龚柔佳, 等. 响应面分析法耦合调节 Donnan 效应优化苦参提取液的纳滤浓缩工艺[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3395-3400.

[2] Conidi C, Cassano A, Caiazzo F, *et al.* Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes[J]. *J Food Eng*, 2017,

195: 1-13.

[3] Song Y, Li T, Zhou J, *et al.* Analysis of nanofiltration membrane performance during softening process of simulated brackish groundwater[J]. *Desalination*, 2016, 399: 159-164.

[4] Yaroshchuk A, Martínez-Lladó X, Llenas L, *et al.* Solution-diffusion-film model for the description of pressure-driven transmembrane transfer of electrolyte mixtures: One dominant salt and trace ions[J]. *J Membr Sci*, 2011, 368(1-2): 192-201.

[5] 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.

[6] Lapointe J F, Gauthier S F, Pouliot Y, *et al.* Fouling of a nanofiltration membrane by a β -lactoglobulin tryptic hydrolysate; impact on the membrane sieving and electrostatic properties[J]. *J Membr Sci*, 2005, 253(1-2): 89-102.

[7] 彭国平. 中药制药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 195-197.

[8] 张 军, 王凤云, 詹丽玲, 等. 丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 789-790.

[9] 李存玉, 马 赟, 李贺敏, 等. 消癌平注射液提取浓缩工艺的优化[J]. 中成药, 2016, 38(8): 1712-1715.

[10] 司丹丹, 顾正荣, 徐 伟, 等. 黄芪提取液纳滤浓缩的实验研究[J]. 中成药, 2007, 29(12): 1854-1857.

[11] 范晓燕, 于 媛, 徐 嫔. 酸碱指示剂离解常数的测定[J]. 实验室科学, 2007(2): 89-90.

[12] 朱金墙, 闫 晨, 康立源. 丹酚酸 B 的稳定性及其降解机理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(12): 113-115.

[13] 李存玉, 马 赟, 陈 涛, 等. 基于纳滤分离优势优化丹参注射液的生产浓缩工艺[J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(6): 543-545.

[14] 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.

[15] Luo J, Zeuner B, Morthensen S T, *et al.* Separation of phenolic acids from monosaccharides by low-pressure nanofiltration integrated with laccase pre-treatments[J]. *J Membr Sci*, 2015, 482: 83-91.