

- 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}, 马贊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. 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，南京拓銳医药科技有限公司)。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 (南京拓銳医药科技有限公司)；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 °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 × 250 mm, 5 μm)；柱温 30 °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)。

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

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

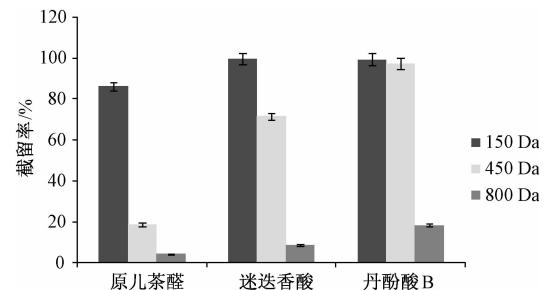


图1 pH 1.8下3种酚酸的纳滤截留率
Fig. 1 Nanofiltration rejection rates of three phenolic acids at pH 1.8

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。

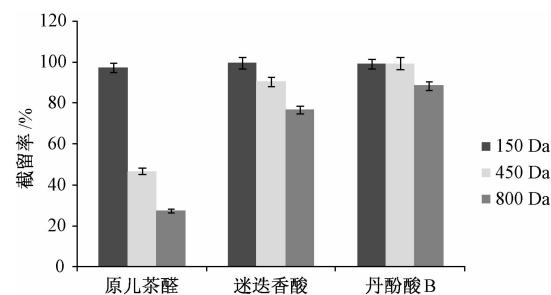


图2 pH 5.0下3种酚酸的纳滤截留率
Fig. 2 Nanofiltration rejection rates of three phenolic acids at pH 5.0

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 protocatechualdehyde 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 pK_a , 由于其结构中含有多个酚羟基或羧基, 存在多级电离, 故 pK_a 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 pK_a 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 赞, 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 赞, 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 娴. 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 赞, 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.