

水苏碱在乙醇中的纳滤分离行为

李存玉^{1,2}, 李贺敏¹, 支兴蕾¹, 刘莉成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** 研究水苏碱在乙醇中的纳滤分离行为。**方法** 以乙醇体积分数、pH 值、膜孔径为影响因素, 水苏碱截留率为评价指标, 响应面法分析各因素对截留行为的影响, 膜通量衰减系数表征膜溶胀行为, 综合评价水苏碱在乙醇中的分离行为。**结果** pH 值递增 (3~7) 时, 水苏碱截留率呈先下降后升高的趋势, 并随着乙醇体积分数提高而加剧, 在 30% 时最明显, 而且衰减系数绝对值与其呈正相关。**结论** 水苏碱作为两性化合物, 其存在状态决定了在乙醇中的纳滤分离行为。等电点时该成分的电荷排斥效应弱于解离态, 同时在膜分离层溶胀的综合作用下产生多样的分离行为。

关键词: 水苏碱; 乙醇; 纳滤分离行为; 响应面法

中图分类号: TQ028.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)06-1223-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.005

Nanofiltration separation behaviors of stachydrine in ethanol

LI Cun-yu^{1,2}, LI He-min¹, ZHI Xing-lei¹, LIU Li-cheng¹, 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)

KEY WORDS: stachydrine; ethanol; nanofiltration separation behaviors; response surface method

以乙醇为代表的有机溶剂在中药制药领域中应用广泛, 但衍生出的提取物、萃取物、洗脱部位在进行精制纯化时, 高温处理所带来的成分转化会严重影响目标产物质量, 同时因回收溶剂比例变化而难以循环利用, 造成资源浪费、环境污染^[1]。1993 年高从堦院士首次提出常温化精制的纳滤分离技术^[2], 其截留分子量在 100~1 000 Da 之间, 分离特点与超滤、微滤有所不同, 因其膜材质表面的荷电性, 分离过程为电荷、位阻、溶解-扩散效应等多种效应综合的结果^[3-4], 但针对有机溶液环境下中药成分的纳滤精制研究尚处于探索阶段^[5]。水苏碱是益母草中主要药效成分^[6], 在光照和长时间加热下均会降解, 影响制剂质量的同时也造成药用资源的浪费, 在对其进行色谱分离时制得

以乙醇为洗脱液的中间体, 大多采取低温减压回收来控制成分的降解, 但生产效率偏低。本实验探索纳滤技术对乙醇中水苏碱富集的适用性, 并结合膜面溶胀特征阐明该成分的分离规律, 为明确有机溶液环境下纳滤分离机制提供参考依据。
1 材料
1.1 试药 复合聚酰胺纳滤膜 (孔径 150、475、800 Da, 南京拓鈺医药科技有限公司)。盐酸水苏碱对照品 (批号 110773-201313, 中国食品药品检定研究院)。益母草提取物 (自制, 益母草饮片加水提取后色谱分离制备得到, 水苏碱含量 > 70%)。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。
1.2 仪器 TNZ-1 型纳滤分离设备 (南京拓鈺医药科技有限公司); e2695 高效液相色谱仪 (美国

收稿日期: 2018-05-29
基金项目: 国家自然科学基金 (81503258, 81603307); 国家中药标准化行动计划项目 (ZYBZH-C-JS-34); 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

Waters 公司)；ELSD 6000 检测器（美国 Alltech 公司)；MS105 电子天平〔十万分之一，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司〕。

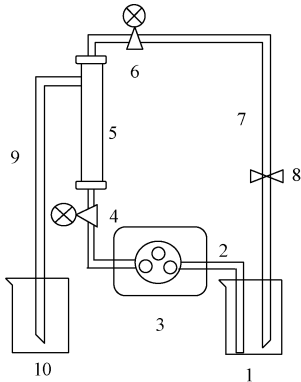
2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸水苏碱对照品 3.60 mg，置于 5 mL 量瓶中，流动相超声溶解，定容至刻度，即得（每 1 mL 含 0.72 mg 该成分）。

2.1.2 供试品溶液 益母草提取物用不同体积分数乙醇配制成 5.0%、17.5%、30.0%，其中盐酸水苏碱质量浓度为 105.0 μg/mL。

2.2 纳滤分离 采用前期建立的方法^[7]，按照图 1 组装纳滤膜、中压泵等纳滤装置，设置操作压力为 1.0 MPa。将纳滤膜置于分离系统中，纳滤分离初始阶段需要药液在纳滤膜中循环平衡，排除因膜材质对成分吸附的干扰，待盐酸水苏碱与膜组件之间的吸附、解吸附达到平衡时，从储液罐中取样平衡液，进而开始纳滤，纳滤液罐收集纳滤液，待样品纳滤分离至无法维持系统分离时，关闭纳滤系统，纳滤液中取样纳滤液。



注：1~10 分别为储液罐、进液管、中压泵、进液压力表、纳滤膜、截留液压力表、截留液、调速阀、纳滤液、纳滤液罐

图 1 纳滤分离设备
Fig. 1 Nanofiltration separation equipment

2.3 盐酸水苏碱含量测定

2.3.1 色谱条件^[8] Waters Xbridge Hilic 色谱柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相乙腈-0.2% 冰醋酸（80：20）。蒸发光散射检测器参数为漂移管温度 80 ℃，气体体积流量 2.0 L/min；体积流量 0.8 mL/min。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1、2、5、10、20 μL，在“2.3.1”项色谱条件下进行测定。以峰面积（Y）、进样量（X）取对数进行回归，得方程为 $Y = 0.56X + 4.60$ ($R^2 = 0.9995$)，

在 0.72~14.4 μg 范围内线性关系良好。

2.4 截留率计算 取纳滤分离制备的纳滤液（ C_1 ）及平衡液（ C_2 ），测定峰面积并取对数后代入“2.3.2”项下回归方程，计算盐酸水苏碱含量，按照式（1）计算截留率（R）。

$$R = (1 - \frac{C_1}{C_2}) \times 100\% \tag{1}$$

2.5 水苏碱分离数据积累 应用 Design-Expert 8.06 软件^[9]，考察乙醇体积分数（A）、pH 值（B）、膜孔径（C）对盐酸水苏碱纳滤分离行为的影响，以截留率（Y）为评价指标。因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B pH 值	C 膜孔径/Da
-1	5	3	150
0	17.5	7	475
1	30	11	800

2.6 纳滤分离层溶胀分析 为了排除膜污染带来的干扰，在操作压力 1.0 MPa 条件下分别选择空白水溶液及 5%、7.5%、30% 乙醇，考察膜面因溶胀带来的通量衰减变化，见式（2）、（3）。其中， J_0 为初始通量，单位 m/s； J_t 为单位时间 t 时的膜通量，单位 m/s； m 为膜通量衰减系数。

$$J_t = J_0 \cdot t^m \tag{2}$$

$$\lg J_t = \lg J_0 + m \lg t \tag{3}$$

3 结果

3.1 纳滤分离数据积累 根据响应面分析原理^[10-11]，为保障实验结果的准确性和稳定性，每组平行 3 次，取平均值，结果见表 2。

表 2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	Y 截留率/%
1	-1	-1	0	95.22
2	0	0	0	39.68
3	0	1	1	55.55
4	0	0	0	34.04
5	-1	0	-1	81.87
6	1	0	-1	70.42
7	0	1	-1	94.42
8	1	0	1	33.57
9	0	0	0	38.26
10	0	-1	-1	96.56
11	1	-1	0	96.29
12	1	1	0	91.48
13	0	-1	1	70.61
14	-1	1	0	82.32
15	0	0	0	39.34
16	-1	0	1	35.14
17	0	0	0	42.67

3.2 模型拟合 对各因素进行二次多项回归拟合，得方程为 $Y = 39.44 - 7.26A - 4.77B - 19.04C + 2.43AB + 2.96AC - 3.23BC + 20.52A^2 + 38.28B^2 + 2.20C^2$ ，方差分析见表3。由表可知，各因素影响程度依次为 $C > A > B$ ； $P < 0.000\ 1$ ，表明模型极显著；多元相关系数 $R^2 = 0.985\ 7$ ，预测 $R^2 = 0.824\ 8$ ，调整 $R^2 = 0.967\ 3$ ，表明模型拟合度良好。

表3 方差分析
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	10 387.03	9	1 154.11	53.65	<0.000 1
A	224.38	1	224.38	10.43	0.014 5
B	168.42	1	168.42	7.83	0.026 6
C	2 686.47	1	2 686.47	124.88	<0.000 1
AB	16.36	1	16.36	0.76	0.412 1
AC	24.40	1	24.40	1.13	0.322 2
BC	41.73	1	41.73	1.94	0.206 3
A ²	854.67	1	854.67	39.73	0.000 4
B ²	6 170.66	1	6 170.66	286.84	<0.000 1
C ²	20.74	1	20.74	0.95	0.361 9
残差	150.59	7	21.51	—	—
失拟项	111.60	3	37.20	3.82	0.114 3
纯误差	38.99	4	9.75	—	—
总和	10 537.62	16	—	—	—

3.3 因素分析 图2显示，在固定膜孔径、乙醇体积分数时，随着pH值逐渐升高，截留率呈先下降后升高的趋势，并在30%乙醇中最明显，推测水苏碱两性结构中碱性、酸性基团解离状态不同，pH增加时碱性基团阳离子首先过渡至化合物等电点，然后在碱性环境中羧基解离成阴离子，再结合纳滤分离的电荷效应^[12]；在固定pH值、乙醇体积分数时，截留率随着孔径增加而降低，分离规律符合孔径筛分规律；在固定pH值、膜孔径时，乙醇体积分数对截留率的影响呈不同的调节规律，在酸碱极端环境下，乙醇可增强纳滤膜截留效率，但在中性至弱碱条件下，反而会促进成分纳滤透过。

表2、图2显示，水苏碱中的羧基在强碱性条件下以钠盐形式存在，与纳滤膜电荷排斥效应明显，在475 Da纳滤中的截留率高于80%，乙醇体积分数从5%升至30%时，截留率由82.32%升至91.48%；在酸性条件下，水苏碱以盐酸盐形式存在，乙醇体积分数从5%升至30%时，截留率由95.22%升至96.29%，推测碱性条件下该成分可能未完全解离，纳滤分离时产生的电荷排斥效应弱于酸性条件。

3.4 膜溶胀分析 表4显示，随着乙醇体积分数增加，衰减系数绝对值也随之升高，相较于水溶液环境，乙醇体积分数增加至5%时单位时间内膜通

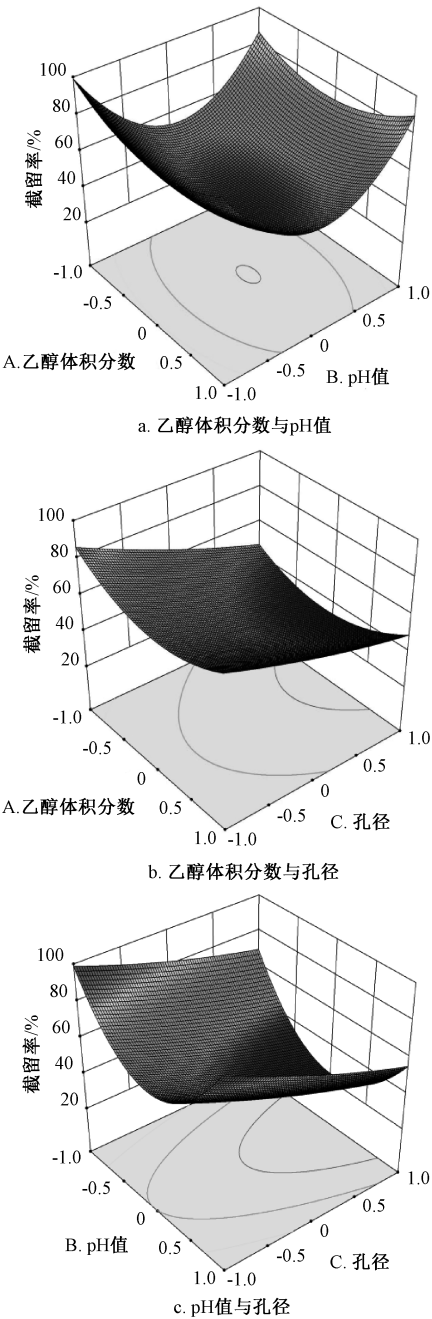


图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

量衰减明显，随着其升高通量衰减加剧，但超过17.5%后衰减系数相对稳定，表明膜溶胀程度已趋于稳定^[13]。

表4 不同乙醇体积分数下纳滤膜衰减系数
Tab. 4 Decay coefficients of nanofiltration membranes under different ethanol concentrations

乙醇/%	衰减系数	R ²
0	-0.020 8	0.998 1
5	-0.049 3	0.992 8
17.5	-0.093 6	0.999 2
30	-0.095 4	0.991 7

4 讨论

随着溶液环境由水逐步向有机相过渡,成分状态、膜面分离层物化性质、成分的跨膜传质行为均发生变化,进而引起分离行为变化^[14-15]。其中,在酸、碱性条件下乙醇体积分数增加引起的水苏碱截留率升高,表现出不同程度“强化”截留率的行为,而且其升高程度并不完全是由膜面溶胀引起的。同时表2显示,在150 Da纳滤膜中,pH 7.0下乙醇体积分数从5%升高至30%时,截留率由81.87%降低至70.42%,即乙醇体积分数升高引起膜溶胀加剧,水苏碱截留率反而下降,与上述结果相悖,推测两性生物碱纳滤跨膜传质机制可能与成分存在状态相关。

纳滤分离的经典模型大多基于水溶液环境建立,其适用性有待于验证,本实验中水苏碱纳滤截留行为随着乙醇体积分数、pH值变化的现象仅靠电荷效应、位阻效应等分离模型无法得到有效解释。对水苏碱存在状态进行分析,发现随着溶液pH由酸性向碱性环境的过渡,该成分呈现出酸、碱性基团解离-游离的转换状态,当两性基团正负电荷数值相等时,即为等电点。由此推测,酸、碱性条件下水苏碱在乙醇中的解离基团随着溶剂体积分数升高,其溶解度逐步降低,而游离态基团溶解度变化随之相反,从而表现出类表面活性剂性质,并通过分子间缔合团聚的形式在溶液中存在,故在纳滤过滤时“强化”截留率是由膜面溶胀和分子团聚综合引起的。另外,在水苏碱等电点附近呈电中性状态,由于乙醇可降低分子间表面能,促进多分子团聚态状态向低分子团聚态或单分子态转移,而且此时单分子、低分子团聚态水苏碱比例高于水溶液环境,故此时“削弱”截留率的行为可能是由存在状态结构大小、膜面溶胀引起的。

对水苏碱跨膜传质过程进行分析,推测在含有乙醇的水溶液环境中,等电点时水苏碱可能更容易接近膜分离层而通过纳滤膜,同时因分子间作用力差异,乙醇与复合聚酰胺材质作用力大于水分子,推测纳滤膜表面乙醇体积分数可能稍高于溶液内部。因此,解离态水苏碱因溶解度与乙醇体积分数呈反比,并在膜面电荷排斥的协同作用下难以进入膜分离层,从而呈现出高截留率现象。

有机溶剂的合理回收和循环利用有助于中药制药企业实现节能减排,但分离机制有待于进一步完善。本实验对两性化合物水苏碱在乙醇中的纳滤分离行为进行分析,今后将结合分离规律建立纳滤传

质模型,从而为提升化学成分在有机溶液环境中的适用性、研制耐有机溶剂纳滤膜提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 段金璇,宿树兰,郭盛,等. 中药资源产业化过程废弃物的产生及其利用策略与资源化模式[J]. 中草药, 2013, 44(20): 2787-2797.
- [2] Avram A M, Morin P, Brownmiller C, et al. Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration[J]. *Food Bioprod Process*, 2017, 106: 91-101.
- [3] Vezzani D, Bandini S. Donnan equilibrium and dielectric exclusion for characterization of nanofiltration membranes[J]. *Desalination*, 2002, 149(1-3): 477-483.
- [4] 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.
- [5] Mello B C B S, Petrus J C C, Hubinger M D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration[J]. *J Food Eng*, 2010, 96(4): 533-539.
- [6] 周超,何轶,张聿梅,等. HPLC-MS同时测定益母草制剂中盐酸水苏碱与盐酸益母草碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1876-1879.
- [7] 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.
- [8] 李存玉,马赟,刘奕洲,等. 超滤-纳滤联用优化益母草生物碱的浓缩工艺[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 100-106.
- [9] Hanafi R S, Lämmerhofer M. Response surface methodology for the determination of the design space of enantiomeric separations on cinchona-based zwitterionic chiral stationary phases by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1534: 55-63.
- [10] 李莉,张赛,何强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [11] Pietrogrande M C, Bacco D. GC-MS analysis of water-soluble organics in atmospheric aerosol: response surface methodology for optimizing silyl-derivatization for simultaneous analysis of carboxylic acids and sugars[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 689(2): 257-264.
- [12] 李存玉,马赟,刘莉成,等. 中药枳实中辛弗林存在状态与其纳滤传质过程的相关性[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4598-4603.
- [13] 赵彦彦. 有机相纳滤分离特性研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2005.
- [14] Chau J, Basak P, Kaur J, et al. Performance of a composite membrane of a perfluorodioxole copolymer in organic solvent nanofiltration[J]. *Sep Purif Technol*, 2018, 199: 233-241.
- [15] Lively R P, Sholl D S. From water to organics in membrane separations[J]. *Nat Mater*, 2017, 16(3): 276-279.