

基于存在状态定量计算模型研究丹参注射液的醇沉精制机制

李存玉^{1,2,3}, 林亚娟⁴, 李明明⁵, 章 莲¹, 李 硕¹, 彭国平^{1,2,3}, 支兴蕾^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023
2. 江苏省经典名方工程研究中心, 江苏 南京 210023
3. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023
4. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210023
5. 江苏神龙药业有限公司, 江苏 东台 224200

摘要: 目的 基于成分存在状态定量计算模型, 分析丹参注射液 (Danshen Injection, DI) 的醇沉工艺中酚酸类成分的传递规律。方法 以 DI 中水溶性酚酸类成分丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 为检测指标, 基于纳滤传质数学模型, 收集膜通量、截留率数据, 拟合溶质传质系数, 以分子态单体成分为参照, 构建成分存在状态定量计算模型, 进而分析中间体密度 1.05、1.15、1.25 g/mL 时, 指标性成分醇沉至 75%、85% 的转移率与成分存在状态及相对分子质量的相关性, 以期阐明醇沉精制机制。结果 存在状态定量计算幂函数方程的相关性系数均大于 0.99, DI 中间体的密度为 1.05~1.25 g/mL 时, 丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 分子态比例分别为 1.14%~5.25%、66.70%~80.25%、10.51%~19.11%、1.13%~11.44%, 对密度-分子态比例-醇沉转移率进行相关性分析, 醇沉体积分数由 75% 增加至 85%, 转移率下降比例排序为丹参素钠>丹酚酸 B>迷迭香酸>原儿茶醛, 成分存在状态为影响醇沉转移率的主导因素, 且与成分相对分子质量存在一定相关性。结论 构建了 DI 中间体中酚酸类成分分子状态定量计算方法, 初步阐明醇沉精制机制, 有助于制剂醇沉工艺的标准化控制。

关键词: 存在状态; 丹参; 丹参注射液; 醇沉; 丹参素钠; 原儿茶醛; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 纳滤; 幂函数方程

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)20-6431-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.015

Alcohol-precipitation mechanism of Danshen Injection based on molecular state quantitative calculation model

LI Cun-yu^{1,2,3}, LIN Ya-juan⁴, LI Ming-ming⁵, ZHANG Lian¹, LI Shuo¹, PENG Guo-ping^{1,2,3}, ZHI Xing-lei¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Province Engineering Research Center of Classical Prescription, Nanjing 210023, China
3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China
4. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
5. Jiangsu Shenlong Pharmaceutical Co., Ltd., Dongtai 224200, China

Abstract: Objective To explore the transfer rules of phenolic acids in the alcohol precipitation process of Danshen Injection (DI) based on molecular state quantitative calculation model. **Methods** In the experiment, sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid and salvianolic acid B were selected as indexes for exploring the alcohol-precipitation mechanism. Based on the mathematical model of nanofiltration mass transfer, membrane flux and rejection were collected to calculate the solute mass transfer coefficients, and the quantitative calculation model of molecular state was established with molecular monomer components as reference of DI. Furthermore, the correlation among the transfer rate, molecular state and molecular weight was analyzed with the densities of 1.05, 1.15, 1.25 g/mL of concentrated solution under the alcohol precipitation of 75% and 85%. **Results** The power

收稿日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274106); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20211303); 江苏省 333 高层次人才培养工程; 2021 年度康缘中药学院创新创业项目 (kxyyc06); 2022 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (103152022105)

作者简介: 李存玉 (1985—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为膜分离原理及产业应用。

Tel: (025)86798186 E-mail: 300632@njucm.edu.cn

*通信作者: 支兴蕾 (1981—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药皂苷类超滤分离机制研究。

Tel: (025)86798186 E-mail: 300040@njucm.edu.cn

function equation of molecular state quantitative calculation was set up successfully with the regression coefficients ($R^2 > 0.99$), as the density of intermediate in DI was 1.05—1.25 g/mL, the molecular proportions of sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid and salvianolic acid B were 1.14%—5.25%, 66.70%—80.25%, 10.51%—19.11% and 1.13%—11.44%, respectively. The correlation analysis of “density- molecular state ratio- alcohol precipitation transfer rate” showed that alcohol precipitation concentration increased from 75% to 85%, and the decreasing rate of transfer rate was in the order of sodium danshensu > salvianolic acid B > rosmarinic acid > protocatechualdehyde. Therefore, the molecular state of phenolic acids was the main factor which affected the transfer rate of alcohol precipitation, and the relative molecular weight was correlated with the transfer rate. **Conclusion** The quantitative calculation method of molecular state was established for phenolic acids in the intermediate of DI, and the refining mechanism of alcohol precipitation was preliminarily expounded which was helpful for standardized control of preparation alcohol precipitation process.

Key words: molecular state; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; Danshen Injection; alcohol-precipitation; sodium danshensu; protocatechuic aldehyde; rosmarinic acid; salvianolic acid B; nanofiltration; power function equation

中药制药过程工艺参数的标准化控制有利于提升制剂质量的均一性^[1-2], 2015 年国家中医药管理局发布中药标准化行动, 旨在促进中药产业提升标准化水平, 切实提高中药产品质量。醇沉是中药制剂生产中常用的精制技术, 根据成分溶解度的差异去除杂质, 保留有效成分。在实际生产过程中, 通过数字化控制乙醇加入速度、溶液搅拌转速保障制剂批次间的一致性, 但是醇沉引起质量均一性的差异仍是制药行业难以解决的技术难题^[3-5]。

中药成分的溶解度与存在状态直接相关, 以离子态、缔合态、复合态等形式存在的中药成分, 在醇沉过程中损失明显。在明确有效成分存在状态的前提下, 精准化调节醇沉参数, 将有助于提升制剂质量的均一性。目前, 用于分析成分结构的红外光谱、扫描电镜、差示热分析等分析技术难以获取原溶液环境下的成分真实存在状态^[6-8]。纳滤截留相对分子质量为 100~1000, 以电荷、孔道位阻为主要分离效应, 适用于荷电中药成分的常温化精制, 前期研究发现溶质存在状态决定纳滤分离行为, 且分离过程中传质系数与溶质质量浓度呈幂值相关^[9], 基于成分存在状态与限域环境传质行为的相关性, 构建存在状态定量计算模型, 探索中药制剂醇沉工艺机制。丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 是丹参注射液 (Danshen Injection, DI) 中的指标性成分, 相对分子质量、pKa 呈现出一定的梯度性, 且醇沉过程中的转移率存在明显差异, 参考 DI 制法中醇沉环节“丹参提取液密度 1.15~1.28 g/mL 时, 分别醇沉至含醇量为 75%、85%”的工艺参数, 以 4 种成分丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 为考察指标, 分析“密度-成分状态-成分转移率”的相关性, 以期探索中药制剂醇沉技术的内在作用机制提供研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, VWD 检测器, 美国 Agilent 公司; 10-13 型密度计, 规格 1.0~1.3 g/L, 衡水耀华器械仪表厂; TNZ-1 型纳滤分离设备、Fog-machine 型中压泵, 南京拓钰医药科技有限公司; Buchi R-300 型旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; MS105 型十万分之一电子天平、AL204 型万分之一电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 集团; PB-10 pH 计, 德国 Sartorius 公司; NDJ-5S 型黏度计, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; Millipore Direct-Q5 型纯水/超纯水一体机, 美国 Millipore 公司。

1.2 材料

1812 型复合聚酰胺纳滤膜, 截留相对分子质量 800, 星达 (泰州) 膜科技有限公司; 丹参饮片 (批号 180201) 购自安徽省金芙蓉中药饮片厂, 经南京中医药大学药学院严辉教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎; 对照品丹参素钠 (批号 110855-201915, 质量分数 97.8%)、原儿茶醛 (批号 110810-201007, 质量分数 98.2%)、迷迭香酸 (批号 111871-201102, 质量分数 98.6%)、丹酚酸 B (批号 111562-201615, 质量分数 96.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 提取物丹参素钠 (批号 FY1784, 质量分数 ≥98%)、原儿茶醛 (批号 FY1784, 质量分数 ≥98%)、迷迭香酸 (批号 FY1143, 质量分数 ≥98%) 和丹酚酸 B (批号 FY1167, 质量分数 ≥95%), 均购自南通飞宇生物科技有限公司; 甲醇、乙腈、三氟乙酸为色谱纯; 乙醇、盐酸为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 DI 中间体 参照 DI 制法, 取丹参 9.0 kg 加

水煎煮3次,第1次2h,第2、3次各1.5h,合并煎液,滤液减压浓缩至所考察的密度,即得。

2.1.2 混合对照品溶液 精密称取干燥至恒定质量的丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸B对照品适量,置于5 mL棕色量瓶中,加10%甲醇溶液制成含丹参素钠0.420 mg/mL、原儿茶醛0.152 mg/mL、迷迭香酸0.196 mg/mL和丹酚酸B1.105 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 提取物溶液 参照不同密度时DI中间体中指标性成分质量浓度和黏度,分别精密称取干燥至恒定质量的丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸B提取物,超纯水超声溶解,加入蔗糖调节溶液黏度,即得4种成分的提取物溶液。

2.2 样品检测

2.2.1 色谱条件 Agilent 1260型高效液相色谱仪; Thermo Scientific C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱: 0~10 min, 10%~20%乙腈; 10~40 min, 20%~45%乙腈; 体积流量1.0 mL/min; 进样量10 μL; 柱温30 ℃; 检测波长280 nm。色谱图见图1。

2.2.2 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL置于5 mL棕色量瓶中,10%甲醇稀释至刻度,高效液相色谱仪检测,以峰面积为纵坐标(Y),指标性成分质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程: 丹参素钠 $Y=1119X+517.67$, $R^2=0.9992$; 原儿茶醛 $Y=1420.1X-459.4$, $R^2=0.9995$; 迷迭香酸 $Y=5252X+4551.3$, $R^2=0.9992$; 丹酚酸B $Y=2204.7X-8596.4$, $R^2=0.9996$; 结果表明丹参素钠在8.4~168.0 μg/mL、原儿茶醛在3.04~60.80 μg/mL、迷迭香酸在3.92~78.40 μg/mL、丹酚酸B在22.1~442.0 μg/mL线性关系良好。

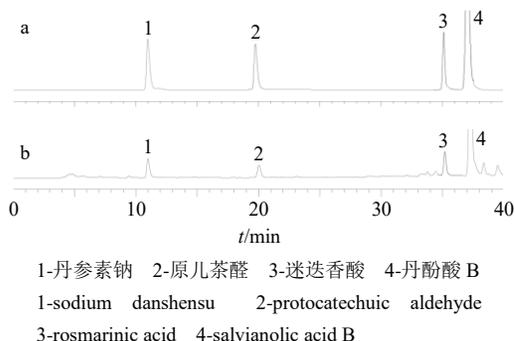


图1 混合对照品(a)与提取物溶液样品(b)的HPLC图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (a) and extract solution (b)

2.2.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL,重复进样6次,按“2.2.1”项下色谱条件检测,色谱峰峰面积积分值的RSD分别为丹参素钠1.06%、原儿茶醛0.61%、迷迭香酸0.86%、丹酚酸B0.72%。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取按“2.1.1”项下方法处理的DI中间体溶液10 μL,分别于0、1、2、4、8、12、24 h进样,按“2.2.1”项下色谱条件检测,色谱峰峰面积积分值的RSD分别为丹参素钠1.10%、原儿茶醛0.96%、迷迭香酸1.02%、丹酚酸B1.65%,结果表明DI中间体在24 h内稳定。

2.2.5 重复性试验 按“2.1.1”项下方法平行制备5份DI中间体溶液,按“2.2.1”项下色谱条件检测,各成分质量浓度的RSD分别为丹参素钠1.52%、原儿茶醛1.16%、迷迭香酸1.44%、丹酚酸B2.05%。

2.2.6 加样回收率试验 精密吸取DI中间体溶液6份,分别精密加入混合对照品适量,按“2.2.1”项下色谱条件进行定量测定,计算得平均回收率分别为丹参素钠101.06%、原儿茶醛102.50%、迷迭香酸98.85%、丹酚酸B97.21%,其RSD分别为1.64%、1.32%、1.95%、2.18%。

2.3 密度对成分转移率的影响

为了探索密度对醇沉过程中指标性成分转移率的影响规律,取DI中间体,分别采用减压浓缩(80 ℃)至密度1.05、1.15、1.25 g/mL,分别醇沉至含醇量为75%、85%,静置12 h,取上清液检测并分析丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸B的转移率。

$$\text{转移率} = \frac{C_{\text{上清}} V_{\text{上清}}}{(C_{\text{原}} V_{\text{原}})}$$

$C_{\text{上清}}$ 、 $C_{\text{原}}$ 分别为醇沉上清液和原液中指标性成分质量浓度, $V_{\text{上清}}$ 、 $V_{\text{原}}$ 分别为醇沉上清液和原液体积

醇沉至含醇量75%和85%时,指标性成分转移率见表1。随着乙醇体积分数和DI中间体密度的升高,丹参中4种酚酸类成分的转移率表现为原儿茶醛>迷迭香酸>丹酚酸B>丹参素钠。根据指标性成分的解离常数(原儿茶醛7.56>迷迭香酸4.01>丹参素钠3.82>丹酚酸B2.77),相对分子质量(丹酚酸B>迷迭香酸>丹参素钠>原儿茶醛),结合DI中间体溶液pH4.85~5.16,其中原儿茶醛主要以分子态形式存在,丹参素钠、迷迭香酸、丹酚酸B主要以离子态形式存在,醇沉引起的成分转移率变化存在状态均的相关性表现出离子态转移率低于分子态,且与相对分子质量存在相关性。

表 1 DI 中间体密度对醇沉工艺中酚酸类成分转移率的影响

Table 1 Effect of DI intermediate density on transfer rate of phenolic acids in alcohol precipitation process

密度/ (g·mL ⁻¹)	75%醇沉转移率/%				85%醇沉转移率/%			
	丹参素钠	原儿茶醛	迷迭香酸	丹酚酸 B	丹参素钠	原儿茶醛	迷迭香酸	丹酚酸 B
1.05	72.25	94.41	86.76	73.50	46.23	90.75	77.16	52.08
1.15	53.88	91.05	81.90	67.71	39.81	86.70	68.87	47.62
1.25	42.30	81.61	74.27	56.27	27.06	72.25	56.22	31.60

2.4 存在状态的定量拟合

将 1812 型复合聚酰胺纳滤膜装入纳滤分离设备中，通过管路依次连接中压泵、压力表、纳滤分离设备、截留阀。取 DI 中间体 0.45 μm 微孔滤膜滤过，滤液采用超纯水稀释 2、4、8 倍，根据成分的一级解离常数 pKa (丹参素钠 3.82、原儿茶醛 7.56、丹酚酸 B 2.77，迷迭香酸 4.01^[10])，调节单体成分溶液 pH 低于 pKa 2 个酸度值，使得成分分子态比例 ≥99%。分别将提取物溶液置于储液罐中，通过管路连接储液罐和纳滤液端，并进行纳滤分离，调节中压泵转速和截留阀，控制跨膜压力差为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 MPa，收集相应溶质质量浓度和跨膜压力差下的膜通量 (J_v)，待储液罐中溶质质量浓度相对稳定时，取样平衡液并收集纳滤液，HPLC 检测平衡液及纳滤液中溶质质量浓度，根据式 (1) 计算截留率 (R_o)。

$$R_o = 1 - C_{\text{纳滤}} / C_{\text{平衡}} \quad (1)$$

根据溶质传质系数 (k) 与 R_o、J_v 的相关性，拟合 ln[(1-R_o)J_v/R_o] 与 k 的线性方程^[11]，如式 (2) 所示。收集并计算溶质初始质量浓度 (C₀) 下的 k、R_o、J_v，根据式 (3) 拟合 k 与 C₀ 的幂函数方程。

$$\ln[(1-R_o)J_v/R_o] = \ln(DK/\delta) + J_v/k \quad (2)$$

1/k 为斜率，ln(DK/δ) 为截距，DK 为膜传质性能常数，δ 为膜厚度

$$k = aC_0^n \quad (3)$$

a 为相关系数，n 为幂值

以单体成分构建的分子态溶质质量浓度与传质系数的幂函数方程为参照，对系列密度的 DI 中间体进行纳滤分离，拟合 k 与 C₀ 的幂函数方程。对比单体成分与 DI 中间体相同 k 值时，根据式 (3) 计算中间体目标成分相较于单体成分分离环境下的质量浓度 (C_丹)，根据式 (4) 计算成分分子态比例。

$$\text{分子态比例} = 1 - C_{\text{丹}}/C_0 \quad (4)$$

2.4.1 丹参素钠的分子态定量拟合 如图 2 所示，在密度为 1.05 g/mL 时，丹参素钠单体及提取物的 ln[(1-R_o)J_v/R_o] 和 J_v 线性关系良好，相关性系数均大于 0.98，其中单体成分的相关性数据点中，质量浓度为 48.60 μg/mL 相对分散，在丹参素钠的单一溶液中，溶质质量浓度对传质系数影响强于中间体。根据计算得到的传质系数，拟合与溶质质量浓度的幂函数方程，结果见表 2，相关性系数均大于 0.99，丹参素钠以分子态形式存在的比例为 5.25%。

如图 3 所示，密度升高至 1.15 g/mL，丹参素钠质量浓度对传质系数的影响程度下降，单体成分的 ln[(1-R_o)J_v/R_o] 和 J_v 相关性数据更为集中，丹参素钠及中间体的 ln[(1-R_o)J_v/R_o] 和 J_v 线性关系、质量浓度与传质系数的幂函数方程，结果见表 3，相关性系数均大于 0.99。计算得到丹参素钠在 DI 中间

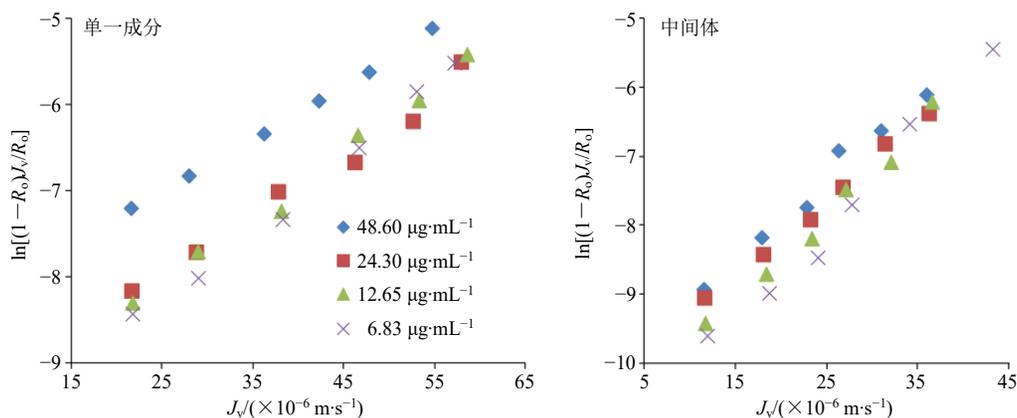


图 2 密度 1.05 g·mL⁻¹ 时丹参素钠 ln[(1-R_o)J_v/R_o] 对 J_v 的相关性

Fig. 2 Correlation of ln[(1-R_o)J_v/R_o] and J_v of sodium danshensu at density of 1.05 g·mL⁻¹

表2 密度 1.05 g·mL⁻¹ 时丹参素钠传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 2 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of sodium danshensu at density of 1.05 g·mL⁻¹

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
48.60	16.05	10.20	$k=10.509\ 0\ C_0^{0.109\ 5}$	$k=5.039\ 1\ C_0^{0.181\ 2}$	5.25
24.30	14.53	9.01	$R^2=0.998\ 2$	$R^2=0.997\ 8$	
12.65	12.97	7.90			
6.83	11.83	7.18			

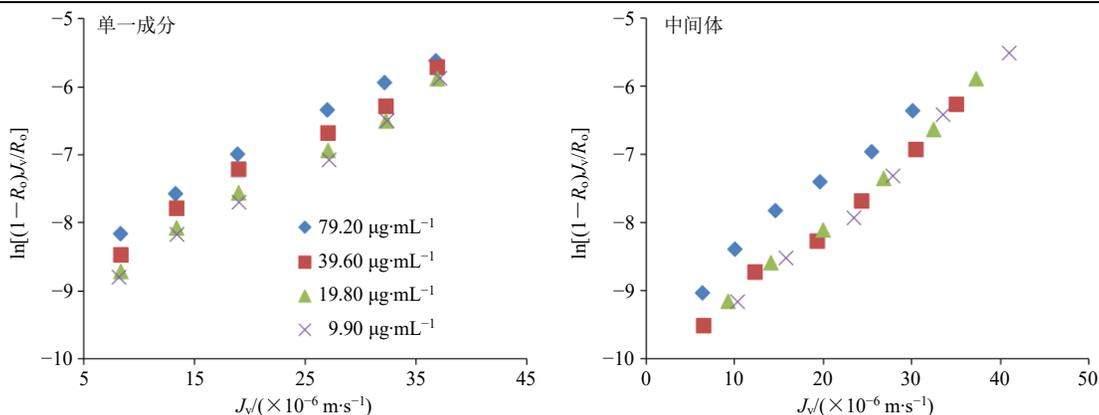


图3 密度 1.15 g·mL⁻¹ 时丹参素钠 ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 3 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of sodium danshensu at density of 1.15 g·mL⁻¹

表3 密度 1.15 g·mL⁻¹ 时丹参素钠传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 3 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of sodium danshensu at density of 1.15 g·mL⁻¹

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
79.20	11.34	9.48	$k=9.465\ 4\ C_0^{0.041\ 9}$	$k=7.384\ 4\ C_0^{0.057\ 7}$	1.40
39.60	11.10	9.14	$R^2=0.990\ 8$	$R^2=0.995\ 4$	
19.80	10.70	8.81			
9.90	10.42	8.40			

体中分子态比例为 1.40%。

密度升高至 1.25 g/mL, ln[(1-R₀)J_v/R₀]和 J_v 线性方程成立 (图 4), 相关性系数均大于 0.98, 且溶质质量浓度与传质系数的幂函数方程的相关性系数也均大于 0.99, 丹参素钠以分子态形式存在的比例为 1.14%, 结果见表 4。

随着 DI 中间体密度由 1.05 g/mL 升高至 1.25 g/mL, 同时存在丹酚酸类成分的氧化分解, 丹参素钠的质量浓度也随之升高 48.6~126.6 μg/mL, 以分子态形式存在的比例为 5.25%~1.14%, 结合表 1 中醇沉引起的转移率变化, 以离子态、缔合态等形式存在的丹参素钠随着乙醇质量浓度的增加, 溶解度下降, 引起转移率下降。

2.4.2 原儿茶醛的分子态定量拟合 如图 5 所示, 在密度为 1.05 g/mL 时, 原儿茶醛在醇沉过程中的转移率优于其他 3 种指标性成分, 与其存在状态和相对分子质量等因素相关, 结果见表 5; 在 DI 中间体密度为 1.05 g/mL 时, ln[(1-R₀)J_v/R₀]和 J_v 线性关系良好 (R²>0.98)。相较于原儿茶醛单体溶液, 在不同溶质质量浓度环境下, 中间体纳滤分离时的传质系数拟合数据相似。从表 5 中可以看出, 中间体中原儿茶醛传质系数变化程度低于单体溶液。结合表 1 中原儿茶醛醇沉转移率均大于 90%, 说明以分子态 (80.25%) 形式存在的原儿茶醛易溶于高体积分数乙醇中, 且相对分子质量低不易被醇沉物包裹。

随着密度增加至 1.15 g/mL, 丹酚酸类成分因

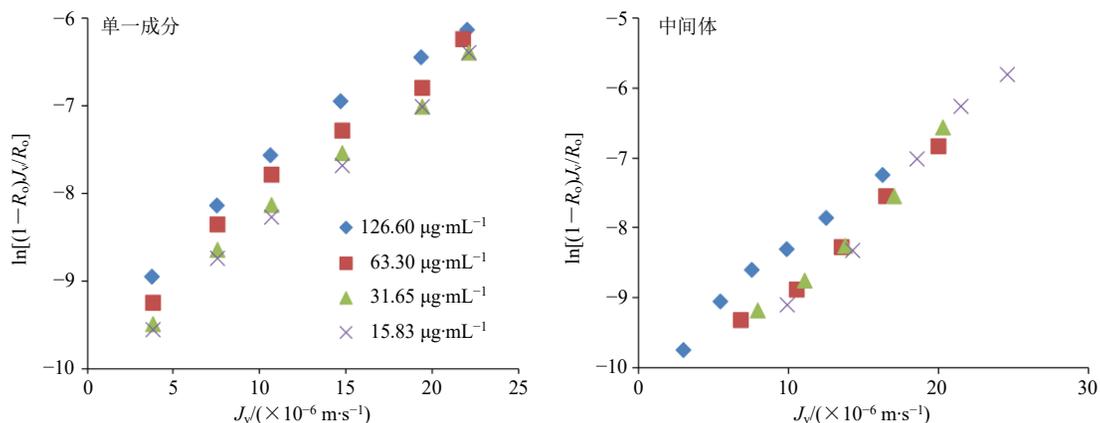


图4 密度 1.25 g·mL⁻¹时丹参素钠 ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 4 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of sodium danshensu at density of 1.25 g·mL⁻¹

表4 密度 1.25 g·mL⁻¹时丹参素钠传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 4 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of sodium danshensu at density of 1.25 g·mL⁻¹

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
126.60	6.63	5.52	$k=5.445\ 0\ C_0^{0.040\ 6}$	$k=3.286\ 2\ C_0^{0.106\ 7}$	1.14
63.30	6.44	5.07	$R^2=0.999\ 7$	$R^2=0.990\ 5$	
31.65	6.27	4.81			
15.83	6.09	4.39			

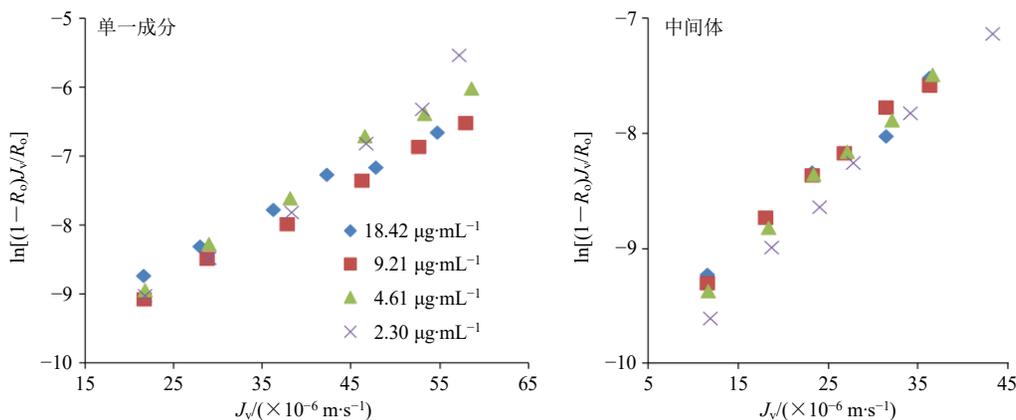


图5 密度 1.05 g·mL⁻¹时原儿茶醛 ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 5 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of protocatechuic aldehyde at density of 1.05 g·mL⁻¹

表5 密度 1.05 g·mL⁻¹时原儿茶醛传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 5 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of protocatechuic aldehyde at density of 1.05 g·mL⁻¹

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
18.42	16.08	15.27	$k=8.948\ 5\ C_0^{0.206\ 1}$	$k=11.847\ C_0^{0.086\ 1}$	80.25
9.21	14.33	14.25	$R^2=0.991\ 2$	$R^2=0.996\ 1$	
4.61	12.47	13.57			
2.30	10.46	12.72			

热处理水解，引起原儿茶醛质量浓度的升高，在进行 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 和 J_v 线性拟合时，原儿茶醛在单体及中间体溶液中表现出相似的分选行为（图6），且传质系数也相对接近（表6），在传质系数线性方程和幂函数方程均成立的前提下 ($R^2 > 0.98$)，醇沉至75%及85%时，原儿茶醛转移率下降均低于5%，且此时分子态比例为78.50%，说明原儿茶醛在醇沉过程中转移率与其分子态比例息息相关。

在密度为 1.25 g/mL 的溶液环境下，原儿茶醛单体溶液的 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 和 J_v 相关性数据点较中

间体分散（图7），但相关性系数均大于 0.98。随着原儿茶醛质量浓度的升高，传质系数呈现上升趋势，符合限域空间的溶解-扩散理论^[12]，结果见表7。以单体成分为参照，拟合出中间体中原儿茶醛的分子态比例为 66.70%。

DI 中间体密度由 1.05 g/mL 升高至 1.25 g/mL，分子态形式存在原儿茶醛比例为 80.25%~66.70%，结合表1中醇沉转移率变化规律，原儿茶醛的醇沉机制是以相对分子质量为前提，分子状态为主导的精制过程。

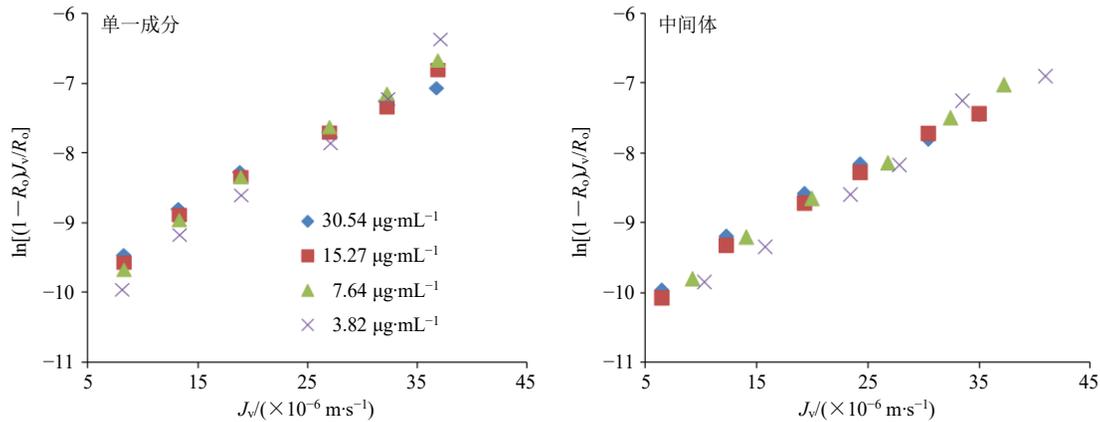


图6 密度 1.15 g·mL⁻¹ 时原儿茶醛 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 对 J_v 的相关性

Fig. 6 Correlation of $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ and J_v of protocatechuic aldehyde at density of 1.15 g·mL⁻¹

表6 密度 1.15 g·mL⁻¹ 时原儿茶醛传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 6 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of protocatechuic aldehyde at density of 1.15 g·mL⁻¹

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	传质系数/($\times 10^{-6}\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
30.54	12.36	11.72	$k=6.874\ 0\ C_0^{0.171\ 7}$	$k=8.837\ 0\ C_0^{0.080\ 9}$	78.50
15.27	10.93	10.95	$R^2=0.998\ 1$	$R^2=0.992\ 6$	
7.64	9.84	10.37			
3.82	8.61	9.90			

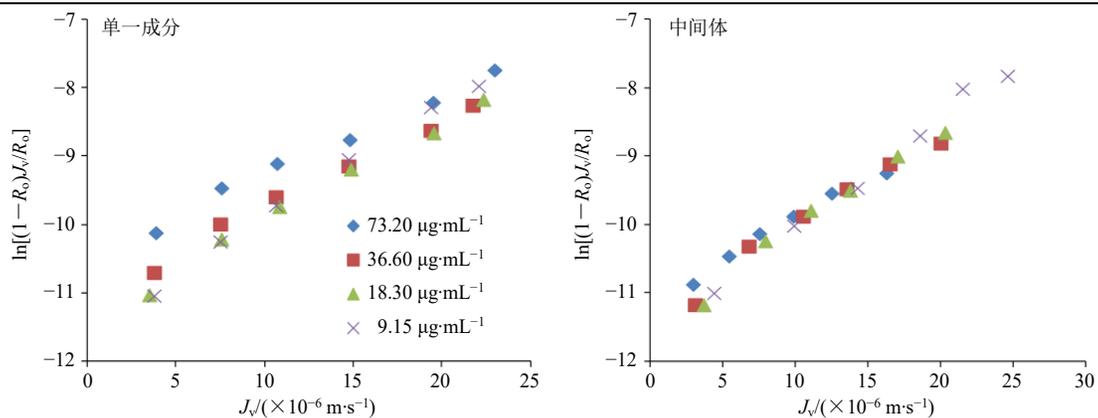


图7 密度 1.25 g·mL⁻¹ 时原儿茶醛 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 对 J_v 的相关性

Fig. 7 Correlation of $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ and J_v of protocatechuic aldehyde at density of 1.25 g·mL⁻¹

表 7 密度 1.25 g·mL⁻¹时原儿茶醛传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 7 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of protocatechuic aldehyde at density of 1.25 g·mL⁻¹

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
73.20	8.48	8.18	$k=4.1797 C_0^{0.1677}$	$k=4.5864 C_0^{0.1334}$	66.70
36.60	7.74	7.35	$R^2=0.9902$	$R^2=0.9973$	
18.30	6.90	6.76			
9.15	5.98	6.18			

2.4.3 迷迭香酸的分子态定量拟合 结果见图 8, 密度为 1.05 g/mL 的迷迭香酸单体和 DI 中间体, 进行 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 和 J_v 进行线性拟合, 相关性系数均大于 0.98。对比图 8 中的散点分布特征, 中间体较单体成分相对分散, 在相同黏度环境下, 中间体溶液的膜通量明显偏低。以迷迭香酸单体溶液为参照, 拟合溶质质量浓度与传质系数的幂函数方程, 结果见表 8, 相关性系数均大于 0.99, DI 中间体在质量浓度为 0.580 mg/mL 时, 迷迭香酸以分子态形式存在的比例为 19.11%。

密度增加至 1.15 g/mL, 膜通量均呈现下降趋势, $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 和 J_v 相关性系数均大于 0.95 (图 9), DI 中间体在密度 1.15 g/mL 时, 迷迭香酸在不同质量浓度下的相关性数据点存在一定差异, 从表 9 中

也可看出, 随着中间体溶液的稀释, 迷迭香酸的传质系数相对稳定。迷迭香酸在中间体质量浓度为 0.63 mg/mL 时, 迷迭香酸以分子态形式存在的比例为 14.60%。

在密度为 1.25 g/mL 的溶液环境下, 在浓差极化效应的作用下, 迷迭香酸单体及 DI 中间体的膜通量和跨膜压力差的线性关系降低 (图 10), 膜通量进一步的下降, 但 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 和 J_v 相关性系数均大于 0.92, 且传质系数与溶质质量浓度的幂函数方程均成立 (表 10), 以分子态形式存在的迷迭香酸比例为 10.51%。

对表 1 中醇沉过程中迷迭香酸的转移率进行相关性分析, 随着 DI 中间体密度的增加, 迷迭香酸分子态比例为 19.11%~10.51%, 分子态比例的降低,

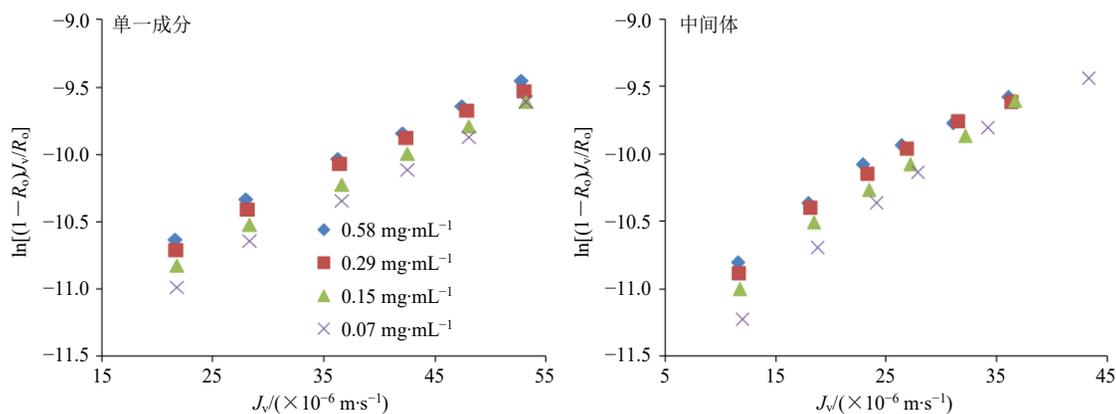


图 8 密度 1.05 g·mL⁻¹时迷迭香酸 $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ 对 J_v 的相关性

Fig. 8 Correlation of $\ln[(1-R_0)J_v/R_0]$ and J_v of rosmarinic acid at density of 1.05 g·mL⁻¹

表 8 密度 1.05 g·mL⁻¹时迷迭香酸传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 8 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of rosmarinic acid at density of 1.05 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
0.580	26.88	20.33	$k=29.5700 C_0^{0.1676}$	$k=21.1710 C_0^{0.0687}$	19.11
0.290	24.39	19.57	$R^2=0.9923$	$R^2=0.9948$	
0.145	21.05	18.48			
0.073	19.05	17.64			

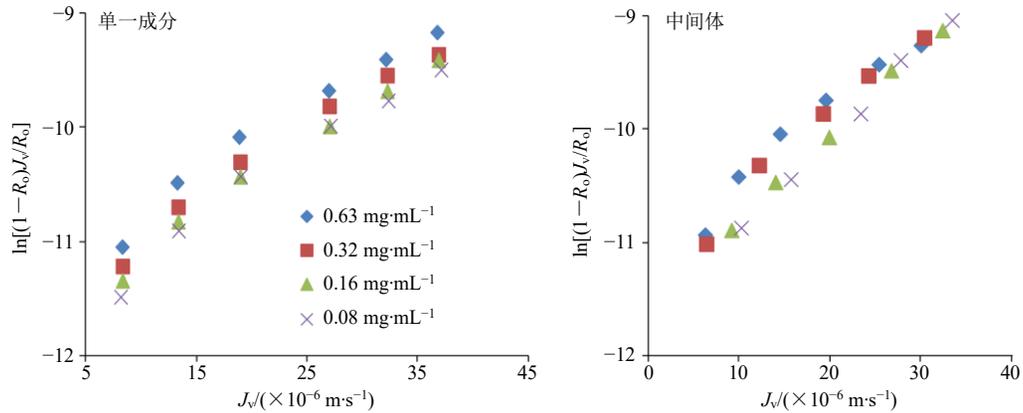


图9 密度 1.15 g·mL⁻¹时迷迭香酸 ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 9 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of rosmarinic acid at density of 1.15 g·mL⁻¹

表9 密度 1.15 g·mL⁻¹时迷迭香酸传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 9 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of rosmarinic acid at density of 1.15 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
0.63	16.29	14.84	$k=16.627\ 0\ C_0^{0.046\ 2}$	$k=15.043\ 0\ C_0^{0.027\ 4}$	14.60
0.32	15.72	14.60	$R^2=0.996\ 6$	$R^2=0.997\ 5$	
0.16	15.31	14.29			
0.08	14.77	14.03			

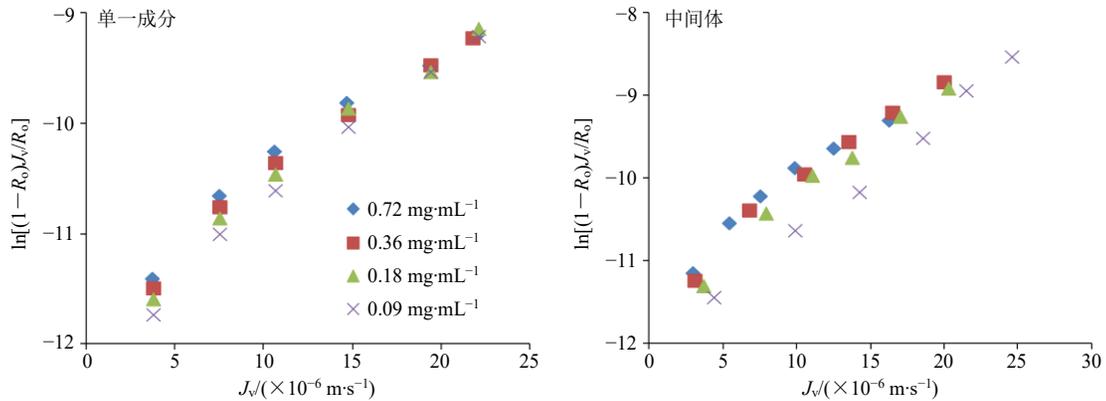


图10 密度 1.25 g·mL⁻¹时迷迭香酸 ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 10 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of rosmarinic acid at density of 1.25 g·mL⁻¹

表10 密度 1.25 g·mL⁻¹时迷迭香酸传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 10 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of rosmarinic acid at density of 1.25 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
0.72	8.76	7.44	$k=8.986\ 0\ C_0^{0.078\ 1}$	$k=7.523\ 0\ C_0^{0.033\ 3}$	10.51
0.36	8.31	7.26	$R^2=0.998\ 6$	$R^2=0.993\ 3$	
0.18	7.83	7.13			
0.09	7.46	6.93			

75%醇沉转移率由 86.76%下降至 74.27%，85%醇沉转移率由 77.16%下降至 56.22%。

2.4.4 丹酚酸 B 的分子态定量拟合 结果见图 11，

对密度为 1.05 g/mL 溶液环境下的丹酚酸 B ln[(1-R₀)J_v/R₀]和 J_v 进行线性关系计算，相关性系数均大于 0.98，从图 11 中可以看出，单体较中间体溶液的

数据点分散,说明质量浓度对丹酚酸 B 单体的传质系数影响相对明显。以丹酚酸 B 单体溶液为参照,拟合溶质质量浓度与传质系数的幂函数方程,结果

见表 11,DI 中间体中以分子态形式存在的丹酚酸 B 比例为 11.44%,此时在 75%及 85%醇沉的转移率分别为 73.5%、52.08%。

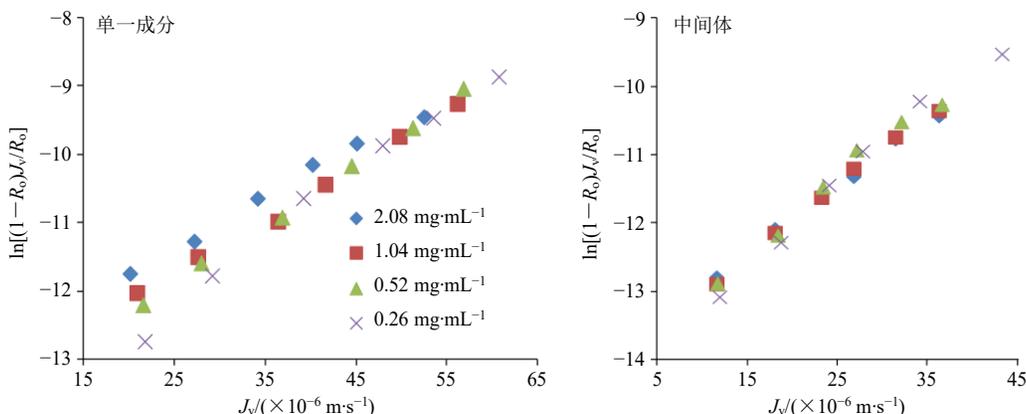


图 11 密度 1.05 g·mL⁻¹时丹酚酸 B ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 11 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of salviolic acid B at density of 1.05 g·mL⁻¹

表 11 密度 1.05 g·mL⁻¹时丹酚酸 B 传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 11 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of salviolic acid B at density of 1.05 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
2.08	13.62	10.41	$k=12.399\ 0\ C_0^{0.142\ 7}$	$k=9.668\ 0\ C_0^{0.093\ 2}$	11.44
1.04	12.66	9.63	$R^2=0.992\ 3$	$R^2=0.994\ 9$	
0.52	11.31	9.08			
0.26	10.17	8.56			

随着溶液密度由 1.05 g/mL 增加至 1.15 g/mL 时,丹酚酸 B 单体及中间体溶液的线性方程及幂函数方程均成立 (R²>0.98),结果见图 12。且 DI 中间体中丹酚酸 B 的分子态比例为 9.43%,相对稳定(表 12)。相应的醇沉中的转移率变化也均小于 6%,说明密度增加,丹酚酸 B 分子态比例出现轻微下降,也引起了醇沉过程中转移率的相应下降。

DI 中间体的密度增加至 1.25 g/mL 时,丹酚酸 B 单体及中间体溶液的线性方程及幂函数方程均成立 (R²>0.98),结果见图 13。丹酚酸 B 的分子态比例由 11.44%下降至 1.13%(表 13)。在 DI 中间体的浓缩过程中,因热处理丹酚酸 B 转化为原儿茶醛、丹参素钠等成分^[13],引起质量浓度下降,会减轻醇沉带来的成分损失。但相较于密度 1.05 g/mL,丹酚

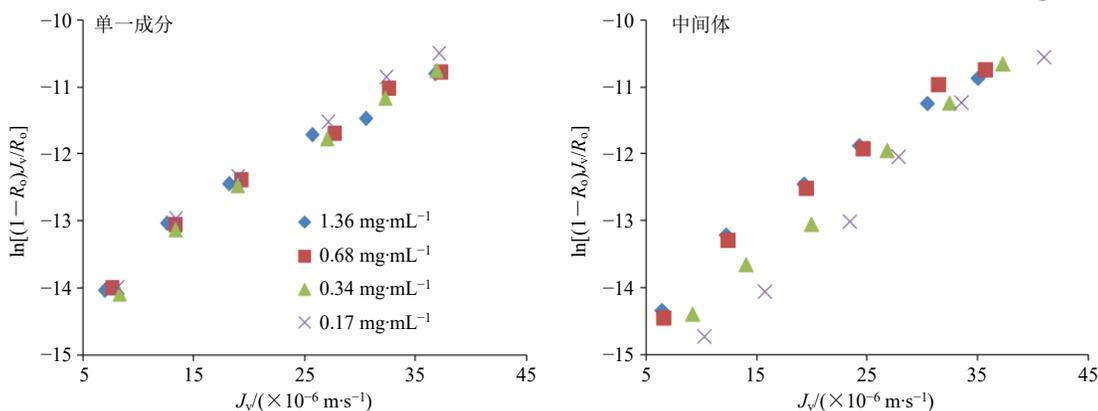


图 12 密度 1.15 g·mL⁻¹时丹酚酸 B ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 12 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of salviolic acid B at density of 1.15 g·mL⁻¹

表 12 密度 1.15 g·mL⁻¹ 时丹酚酸 B 传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 12 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of salvianolic acid B at density of 1.15 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
1.36	9.75	8.46	$k=9.580 0 C_0^{0.063 3}$	$k=8.219 0 C_0^{0.090 6}$	9.43
0.68	9.37	7.92	$R^2=0.998 7$	$R^2=0.999 7$	
0.34	8.96	7.46			
0.17	8.55	7.00			

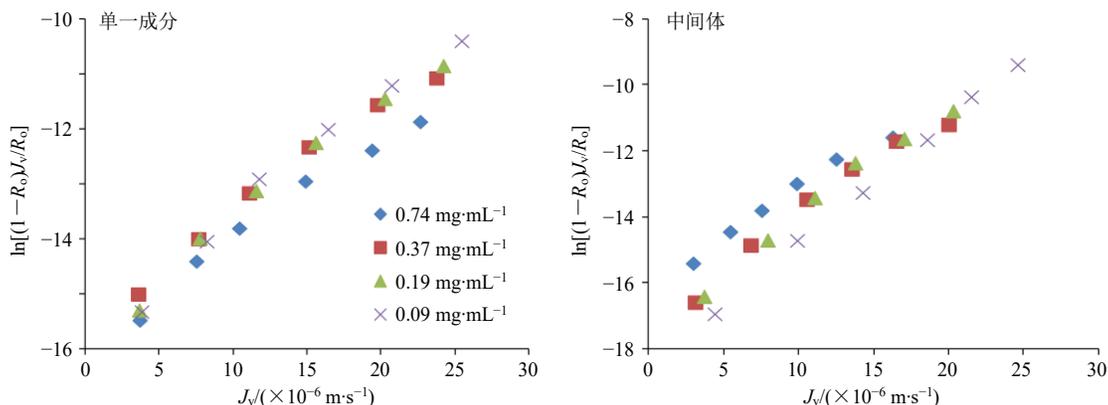


图 13 密度 1.25 g·mL⁻¹ 时丹酚酸 B ln[(1-R₀)J_v/R₀]对 J_v 的相关性

Fig. 13 Correlation of ln[(1-R₀)J_v/R₀] and J_v of salvianolic acid B at density of 1.25 g·mL⁻¹

表 13 密度 1.25 g·mL⁻¹ 时丹酚酸 B 传质系数、幂函数方程及分子态比例

Table 13 Mass transfer coefficient, power function equation and molecular state percent of salvianolic acid B at density of 1.25 g·mL⁻¹

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	传质系数/(×10 ⁻⁶ m·s ⁻¹)		幂函数方程		分子态 比例/%
	单一成分	中间体	单一成分	中间体	
0.74	5.43	3.44	$k=5.594 0 C_0^{0.098 3}$	$k=3.544 0 C_0^{0.118 3}$	1.13
0.37	5.09	3.11	$R^2=0.997 5$	$R^2=0.991 3$	
0.19	4.71	2.93			
0.09	4.44	2.67			

酸 B 在 75%和 85%醇沉的转移率下降均超过 17%，说明丹酚酸 B 分子态比例下降改变其在醇沉液中的溶解度，促进了不溶物对丹酚酸 B 的吸附和包裹，导致转移率明显下降。

根据 DI 中间体中 4 种指标成分“密度-分子态比例-醇沉转移率”的相关性，醇沉浓度由 75%增加至 85%，按照转移率下降比例，丹参素钠>丹酚酸 B>迷迭香酸>原儿茶醛，与分子态比例直接相关，呈现出分子态比例下降，醇沉转移率下降的规律，说明存在状态为影响生产工序间成分传递规律的主导因素。其次，在分子态比例相对接近的迷迭香酸和丹酚酸 B 中，醇沉转移率迷迭香酸>丹酚酸 B，中间体中迷迭香酸增加，丹酚酸 B 下降，但丹酚酸

B 醇沉损失更为明显，说明在相对分子质量偏低的迷迭香酸在醇沉液中溶解度更高，可以减轻醇沉损失。在密度为 1.25 g/mL 时，DI 中间体溶液中丹参素钠和丹酚酸 B 分子态比例接近，随着醇质量浓度增加至 85%，丹参素钠转移率同比下降 36.03%，丹酚酸 B 下降 43.80%，因此在醇沉过程中，成分存在状态主导醇沉转移率。

3 讨论

临床上 DI 常用于治疗冠心病、心绞痛，其中丹参中的酚酸类成分为主要药效成分^[4]，在丹参提取、浓缩过程中，丹酚酸类成分因热处理分解成丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸，中间体中成分含量也随之升高。在纳滤分离不同密度下的中间体溶液

时,丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸的传质系数并未随着质量浓度升高而增加,表现出与溶解-扩散分离模型不相符的分离现象。而随着DI中间体的密度增加,膜通量明显下降直接改变了溶质的传质行为,引起传质系数下降。同时,上述3种成分的截留率也呈下降趋势,溶质的传质行为符合纳滤溶解-扩散分离模型。

醇沉是中药制药精制的常用技术手段^[15],在生产过程中通过调节剂中间体的密度、温度、pH等参数控制指标性成分转移率的差异^[16-18],而与转移率息息相关的成分存在状态,因缺少检测分析手段,无法真正意义上实现醇沉过程的标准化控制,引起生产批次间质量的差异性。本实验基于纳滤传质数学模型,围绕“密度-成分状态-成分转移率”的相关性,为中药酚酸类成分醇沉前溶液中存在状态定量计算方法提供了研究策略,为中药制药醇沉参数的精准化控制提供技术支撑,从而提升制剂质量的均一性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊诗慧,邱婷,王学成,等.基于质量标志物(Q-Marker)的中药制剂质量过程控制方法与策略[J].中草药,2021,52(9):2534-2540.
- [2] 伍振峰,林瑞华,王学成,等.基于中药制药工程质量观的质量控制模式研究[J].中国中药杂志,2022,47(1):271-278.
- [3] Fernando I P S, Dias M K H M, Madusanka D M D, et al. Step gradient alcohol precipitation for the purification of low molecular weight fucoidan from *Sargassum siliquastrum* and its UVB protective effects [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 26-35.
- [4] 丁鸿,徐芳芳,杜慧,等.基于决策树算法的热毒宁注射液金银花青蒿醇沉过程质量控制研究[J].中草药,2021,52(19):5836-5844.
- [5] 蒋美林,张学瑜,邵峰,等.醇料比对双黄连制剂醇沉效果及沉淀物形态影响[J].中草药,2020,51(19):4954-4959.
- [6] Ishida T, Kitagaki R, Watanabe R, et al. A study of molecular architectural dynamics of crosslinked urethane during photo-aging by two-dimensional infrared correlation spectroscopy [J]. *Polym Degrad Stab*, 2020, 179: 109242.
- [7] Mai N N S, Otsuka Y, Goto S, et al. Effects of polymer molecular weight on curcumin amorphous solid dispersion; at-line monitoring system based on attenuated total reflectance mid-infrared and near-infrared spectroscopy [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 61: 102278.
- [8] Kwon B, Mandal T, Elkins M R, et al. Cholesterol interaction with the trimeric HIV fusion protein gp41 in lipid bilayers investigated by solid-state NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(16): 4705-4721.
- [9] 李存玉,蒋佳丽,邹雨岑,等.基于传质数学模型研究丹参-枳实复方中成分存在状态与纳滤分离机制[J].中草药,2021,52(15):4544-4551.
- [10] 李存玉,吴鑫,马赞,等.夏枯草中迷迭香酸的纳滤分离行为及富集工艺对比[J].中药材,2018,41(8):1947-1949.
- [11] 李存玉,支兴蕾,李贺敏,等.生物碱类成分的纳滤传质行为与分子结构的相关性[J].药学报,2018,53(12):1963-1967.
- [12] Cabrera M I, Luna J A, Grau R J A. Modeling of dissolution-diffusion controlled drug release from planar polymeric systems with finite dissolution rate and arbitrary drug loading [J]. *J Membr Sci*, 2006, 280(1/2): 693-704.
- [13] 彭九嫚,柴尧,潘旻,等.丹参中酚酸类成分在不同工艺条件下转化关系[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(5):67-70.
- [14] 郝晨伟,李正翔,张铭慧,等.丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展[J].中草药,2021,52(13):4096-4106.
- [15] Tai Y N, Shen J C, Luo Y, et al. Research progress on the ethanol precipitation process of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 84(2020).
- [16] 徐芳芳,毕宇安,王振中,等.过程分析技术在中药注射剂生产过程中的应用研究进展[J].中草药,2016,47(14):2563-2567.
- [17] Gong X C, Wang S S, Li Y, et al. Separation characteristics of ethanol precipitation for the purification of the water extract of medicinal plants [J]. *Sep Purif Technol*, 2013, 107: 273-280.
- [18] Gong X C, Li Y, Qu H B. Removing tannins from medicinal plant extracts using an alkaline ethanol precipitation process: A case study of Danshen Injection [J]. *Molecules*, 2014, 19(11):18705-18720.

[责任编辑 郑礼胜]