

复杂溶液环境下甘草皂苷的超滤分离机制研究

黄鹿鹿¹, 邵世洁¹, 彭国平^{1,2,3}, 李存玉^{1,2,3*}, 支兴蕾^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 江苏省经典名方研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 研究溶液环境对甘草皂苷超滤分离的影响规律, 结合成分状态探索其分离机制。 **方法** 以甘草提取液为研究对象, 选择膜通量、吸附率和透过率为考察指标, 分析 pH 值、温度、质量浓度等溶液环境因素对甘草皂苷超滤分离行为的影响, 结合扫描电子显微镜 (SEM) 物态表征, 推测甘草皂苷的超滤分离机制。 **结果** 随 pH 值升高, 甘草酸膜通量由 48.10 L/(m²·h) 增加至 55.20 L/(m²·h), 吸附率由 87.29% 减少至 32.05%, 透过率由 97.33% 降低至 81.18%; 甘草提取液膜通量由 47.47 L/(m²·h) 增加至 49.74 L/(m²·h), 吸附率由 99.34% 减少至 25.43%, 透过率由 89.52% 降低至 60.00%。随温度升高, 甘草酸膜通量由 45.99 L/(m²·h) 增加至 67.39 L/(m²·h), 吸附率约 40%、透过率约 80%; 甘草提取液膜通量由 38.94 L/(m²·h) 增加至 58.01 L/(m²·h), 吸附率约 30%、透过率约 68%。随着质量浓度升高, 甘草酸膜通量由 48.99 L/(m²·h) 降低至 42.51 L/(m²·h), 吸附率由 45.25% 减少至 20.18%, 透过率由 71.09% 降低至 60.01%; 甘草提取液膜通量由 49.56 L/(m²·h) 降低至 41.25 L/(m²·h), 吸附率由 40.60% 减少至 13.99%, 透过率由 73.96% 降低至 46.65%。其中, pH 值、温度、质量浓度对膜通量影响显著 ($P < 0.05$), pH 值、质量浓度显著影响甘草酸的吸附率、透过率 ($P < 0.05$)。相较于甘草酸单体, 甘草提取液中甘草酸的透过率、吸附率波动范围较小, 且膜通量相对稳定。对比单体和甘草提取液的 SEM 物态特征, 提取液中形成的多成分缔合物的尺寸小于甘草酸胶团, 是导致二者超滤分离行为差异的核心机制。 **结论** 通过系统地考察溶液环境对甘草皂苷的超滤分离行为的影响, 并结合微观物态特征分析其影响机制, 为中药复杂溶液体系下皂苷类成分的分离研究提供技术支撑。

关键词: 甘草; 甘草酸; 超滤; 溶液环境; 胶团; 物态特征; 甘草皂苷; 膜通量; 吸附率; 透过率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5803-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.007

Ultrafiltration separation mechanism of licorice saponins in complex solution environment

HUANG Lulu¹, SHAO Shijie¹, PENG Guoping^{1,2,3}, LI Cunyu^{1,2,3}, ZHI Xinglei¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Province Engineering Research Center of Classical Prescription, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the effect of solution environment on the ultrafiltration separation of glycyrrhizin and the separation mechanism combined with the composition state. **Methods** Taking licorice extract as the research object, the membrane flux, adsorption rate and transmittance were selected as the evaluation indexes to analyze the effects of solution environmental factors such as pH value, temperature and concentration on the ultrafiltration separation behavior of glycyrrhizin. Combined with the characterization of scanning electron microscopy (SEM), the ultrafiltration separation mechanism of glycyrrhizin was speculated. **Results** With the increase of pH value, the flux of glycyrrhizic acid increased from 48.10 L/(m²·h) to 55.20 L/(m²·h), the adsorption efficiency decreased from 87.29% to 32.05%, and the permeability decreased from 97.33% to 81.18%; The membrane flux of licorice extract increased from 47.47 L/(m²·h) to 49.74 L/(m²·h), the adsorption rate decreased from 99.34% to 25.43%, and the permeability decreased from

收稿日期: 2024-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274106); 国家自然科学基金资助项目 (81603307); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20211303)

作者简介: 黄鹿鹿 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: hlulu198486@163.com

*通信作者: 支兴蕾 (1981—), 女, 博士, 副教授, 主要从事膜分离原理研究。E-mail: 12317231@qq.com

李存玉 (1985—), 男, 博士, 副教授, 主要从事膜分离原理及产业化应用研究。E-mail: 300632@njucm.edu.cn

89.52% to 60.00%. The flux of glycyrrhizic acid increase from 45.99 L/(m²·h) to 67.39 L/(m²·h) with the increase of solution temperature, the adsorption rate was about 40% and the permeation rate was about 80%; The membrane flux of licorice extract increased from 38.94 L/(m²·h) to 58.01 L/(m²·h), the adsorption rate was about 30% and the permeability was about 68%. With the increase of the concentration of glycyrrhizic acid in the solution, the flux of glycyrrhizic acid membrane decreased from 48.99 L/(m²·h) to 42.51 L/(m²·h), the adsorption rate decreased from 45.25% to 20.18%, and the permeability decreased from 71.09% to 60.01%; The membrane flux of licorice extract decreased from 49.56 L/(m²·h) to 41.25 L/(m²·h), the adsorption rate decreased from 40.60% to 13.99%, and the permeability decreased from 73.96% to 46.65%. Among them, pH value, temperature, concentration have significant effects on the membrane flux ($P < 0.05$), and pH value, concentration of glycyrrhizic acid in the two solutions of the adsorption rate, permeability were significantly affected ($P < 0.05$). Compared with glycyrrhizic acid monomer, the transmittance and adsorption rate of glycyrrhizic acid in licorice extract fluctuated in a small range, and the flux was relatively stable. Comparing the electron microscopic state characteristics of the monomer and the licorice extract, the size of the multi-component association complex formed in the extract is smaller than that of the glycyrrhizic acid micelle, which is the core mechanism leading to the difference in ultrafiltration separation behavior between the two. **Conclusion** The effect of solution environment on the ultrafiltration separation behavior of glycyrrhizin was systematically investigated, and the influence mechanism was analyzed combined with the microscopic physical state characteristics, which provided technical support for the separation of glycyrrhizin in complex solution system of traditional Chinese medicine.

Key words: licorice; glycyrrhizic acid; ultrafiltration; solution environment; micelles; physical characteristics; licorice saponins; membrane flux; adsorption rate; transmittance

甘草作为中药处方调剂中的常用使药,具有调和药性等作用,含皂苷类、黄酮类、氨基酸类、香豆素类、多糖等多种化学成分^[1],而以液体制剂为代表的复方甘草口服液,在制药过程中采用超滤分离技术进行澄清化处理时,常出现甘草皂苷类成分分离行为与膜截留相对分子质量不一致现象,难以达到预期的分离效果^[2]。前期研究发现,与黄酮、多糖等成分的常规超滤效果相比,甘草皂苷异常的分离现象可能与其特殊的类表面活性作用有关,在其达到临界胶束浓度后,多以不同相对分子质量的胶粒、胶团形式存在,干扰膜分离效果^[3]。甘草皂苷表面活性作用造成的状态变化和分离差异受 pH 值、温度、浓度、其他成分等溶液环境因素影响^[4-6],但其影响趋势及其机制目前尚未清晰。超滤技术凭借高效、节能、无污染的优势,可提升制剂质量的稳定性和安全性^[7-8],在中药制药过程有较大的运用空间。为明确复杂溶液体系下环境因素对甘草皂苷的超滤分离规律,以其代表成分甘草酸为参照对象^[9],分析不同溶液环境下甘草提取液膜通量、甘草酸吸附率和透过率的变化,利用“溶液环境-微观物态-分离行为”的相关性,结合扫描电子显微镜进行微观表征,分析溶液环境对甘草酸超滤分离的影响规律,为中药皂苷类成分的超滤分离原理研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

New Classic MS105 型电子分析天平,十万分之一,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;1812 型聚酰

胺卷式超滤膜,膜截留相对分子质量 1 000、3 000、5 000,有效过滤面积为 0.30 m²,南京拓钰医药科技有限公司;PB-10 型酸度计,德国赛多利斯科学仪器有限公司;JDT-12A/JDB-12A 型膜分离设备,南京拓钰医药科技有限公司;Waters e2695 型高效液相色谱仪,PDA 检测器,美国 Waters 公司;Thermo Quattro S 型场发射环境扫描电子显微镜 (SEM),美国赛默飞公司。

1.2 试剂与药物

甘草饮片,批号 220930,苏州市春晖堂药业有限公司,经南京中医药大学严辉教授鉴定,为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎而制成的饮片。甘草酸,批号 E100747,质量分数 95%,萨恩化学技术上海有限公司;甘草酸对照品,质量分数≥98%,批号 P04A8F41091,上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯;水为纯化水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 超滤原液的制备

2.1.1 甘草酸溶液 称取甘草酸 0.05 g,加水制成质量浓度为 0.05 mg/mL 的药液,滴加 10% NaOH 溶液调节 pH 值至 9,超声 10 min,即得。

2.1.2 甘草提取液 称取甘草药材 500 g,分别加 10、8 倍量水常压煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液静置后抽滤,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 超滤实验

分别将甘草酸溶液、甘草提取液置于超滤系统

中, 调节分离压力, 待溶液循环平衡后, 平行测定膜通量 3 次, 收集原液、平衡液、滤液注入高效液相色谱仪进行甘草酸含量测定, 根据式 (1) ~ (3) 计算膜通量、吸附率、透过率。

$$\text{膜通量} = V/tA \quad (1)$$

$$\text{吸附率} = 1 - C_{\text{平衡}}/C_{\text{原液}} \quad (2)$$

$$\text{透过率} = C_{\text{超滤}}/C_{\text{平衡}} \quad (3)$$

V 为取样体积, t 是取样时间, A 是膜有效面积, $C_{\text{原液}}$ 、 $C_{\text{平衡}}$ 、 $C_{\text{超滤}}$ 分别为原液、平衡液、滤液中甘草酸的质量浓度

2.3 样品检测

2.3.1 色谱条件^[10-11] Hadera ODS-2 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 19%~50%乙腈; 8~15 min, 50%~60%乙腈; 15~20 min, 60%~19%乙腈; 检测波长为 250 nm; 柱温 25 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。甘草酸溶液和甘草提取液的色谱图见图 1。

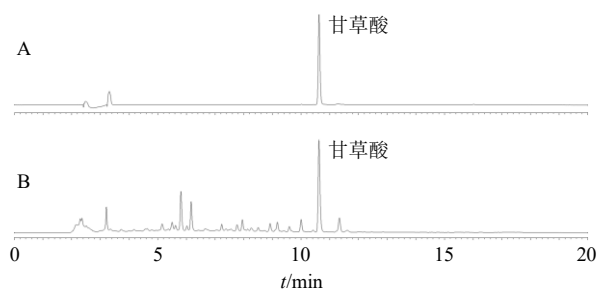


图 1 甘草酸溶液 (A) 和甘草提取液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of glycyrrhizic acid solution (A) and licorice extract solution (B)

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定甘草酸对照品 10.57 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 制成甘草酸质量浓度为 1.057 mg/mL 对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 分别在溶液超滤过程中收集原液、平衡液、滤液作为各个供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取甘草酸对照品溶液各 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.50 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 按“2.3.1”项下色谱条件进样检测, 以甘草酸峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=8\,132X+44\,949$, $R^2=0.999\,6$, 结果表明甘草酸在 10.57~582.50 μg/mL 线性关系良好。

2.4 超滤操作参数对甘草酸透过行为的影响

2.4.1 膜孔径 取甘草提取液, 分别选择截留相对分子质量为 1 000、3 000、5 000 的超滤膜, 操作温度为 25 ℃、操作压力为 0.1 MPa, 按“2.2”项下超

滤实验方法进行试验, 循环平衡 30 min, 测定并计算在不同膜孔径条件下的膜通量、吸附率和透过率。由表 1 可知, 膜孔径增加, 甘草酸膜通量、透过率升高, 符合孔径筛分理论^[12]。当膜孔径为 5 000 时, 吸附率为 24.58%, 透过率为 58.20%, 该透过率较高。

表 1 膜孔径对甘草酸超滤的影响

Table 1 Effect of membrane pore size on ultrafiltration separation of glycyrrhizic acid

膜孔径	膜通量/(L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附率/%	透过率/%
1 000	29.02	13.26	22.69
3 000	43.92	13.64	25.21
5 000	45.37	24.58	58.20

2.4.2 操作压力 按“2.4.1”项下方法及结果, 选择截留相对分子质量为 5 000 的超滤膜, 分别在 0.05、0.10、0.15、0.20 MPa 的压力条件下进行超滤实验。由表 2 可知, 随着压力升高, 甘草酸在膜面堆积, 引起不同程度的浓差极化, 使膜通量、吸附率、透过率增大。为操作方便考虑, 选择 0.1 MPa 开展后续试验。

表 2 压力对甘草酸超滤的影响

Table 2 Effect of pressure on ultrafiltration of glycyrrhizic acid

压力/MPa	膜通量/(L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附率/%	透过率/%
0.05	21.40	21.67	38.20
0.10	43.63	23.28	52.01
0.15	64.91	28.94	68.66
0.20	85.71	29.16	87.23

2.4.3 平衡体积 按“2.4.2”项下方法及结果, 在操作压力 0.1 MPa, 将超滤设备的进液端、截留端和滤液端置于提取液中, 当滤液端通量为原液体积的 2、4、8、16、32 倍体积时, 记录平衡时间, 计算甘草酸在不同平衡体积条件下的吸附率和透过率。分析表 3 可得, 平衡体积对甘草酸的吸附率和透过率无明显影响, 选择平衡 4 倍体积后取样, 数据稳定、时间适中。

表 3 平衡体积对甘草酸超滤的影响

Table 3 Effect of equilibrium volume on ultrafiltration of glycyrrhizic acid

平衡体积/倍	吸附率/%	透过率/%	平衡时间/min
2	25.39	63.25	9
4	25.64	63.24	19
8	27.05	64.94	37
16	27.66	65.46	75
32	28.27	64.84	150

2.5 单因素考察

2.5.1 溶液 pH 值 按“2.2”和“2.4”项下方法和结果,分别取甘草酸溶液、甘草提取液,根据甘草酸的解离常数,考察溶液 pH 值 2、3、4、5、6、7、8、9 对甘草酸超滤分离的影响。结果见表 4,随着 pH 值升高,甘草酸溶液的膜通量由 48.10 L/(m²·h)增加至 55.20 L/(m²·h),吸附率由 87.29%降低至 32.05%,透过率由 97.33%减少至 81.18%;甘草提取液的膜通量由 47.47 L/(m²·h)增加至 49.74 L/(m²·h),吸附率由 99.34%降低至 25.43%,透过率由 89.52%减少至 60.00%,当 pH 值为 9 时,该膜通量、吸附率、透过率均低于甘草酸溶液。这种变化趋势可能与甘草酸的存在状态有关。甘草酸的 pK_a 值为 2.76±0.70,当溶液 pH 值为 2~3 时,以非解离态存在,表面活性增强,吸附能力提高,大量甘草酸被超滤膜吸附;当 pH 值为 6~9 时,甘草酸完全解离,以解离态存在,表面活性减弱,吸附能力降低,膜吸附率降低^[13-14]。

表 4 pH 值对膜通量、吸附率、透过率的影响

pH 值	甘草酸溶液			甘草提取液		
	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%
2	48.10	87.29	97.33	47.47	99.34	89.52
3	50.76	79.01	90.87	47.51	99.14	90.21
4	51.50	59.39	86.06	47.43	42.40	83.29
5	51.46	43.33	88.23	47.01	38.31	76.04
6	52.02	39.56	86.57	49.57	22.76	74.93
7	53.35	34.02	78.52	49.74	28.06	61.36
8	53.84	31.64	81.28	49.48	28.28	75.64
9	55.20	32.05	81.18	49.34	25.43	60.00

2.5.2 溶液温度 分别取甘草酸溶液、甘草提取液,考察溶液温度 20、25、30、35、40 ℃对甘草酸超滤透过行为的影响。随温度升高,甘草酸溶液的膜通量由 45.99 L/(m²·h)增加至 67.39 L/(m²·h),吸附率约 40%、透过率约 80%;甘草提取液的膜通量由 38.94 L/(m²·h)增加至 58.01 L/(m²·h),吸附率约 30%、透过率约 68%,结果见表 5。由于温度升高,分子间运动加剧,氢键结构被破坏,分子间作用力削弱,溶液黏度降低^[15],更易于小分子物质透过,而甘草酸被膜孔限制,无法透过,因此,其透过率和吸附率均降低。

2.5.3 溶液质量浓度 根据其临界胶束质量浓度,

表 5 温度对膜通量、吸附率、透过率的影响

温度/ ℃	甘草酸溶液			甘草提取液		
	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%
20	45.99	44.46	77.05	38.94	29.64	67.05
25	48.40	41.60	82.96	40.00	28.88	65.67
30	56.46	41.77	76.63	45.65	29.54	67.72
35	59.76	40.82	81.32	52.62	29.38	69.74
40	67.39	42.48	79.33	58.01	28.52	68.67

对质量浓度 12.5、25.0、50.0、100.0、150.0、200.0、300.0、400.0 μg/mL 进行考察,测定并计算在不同质量浓度条件下甘草酸超滤的溶液膜通量、吸附率和透过率。结果见表 6,随质量浓度升高,甘草酸溶液的膜通量由 48.99 L/(m²·h)降低至 42.51 L/(m²·h),吸附率由 45.25%减少至 20.18%,透过率由 71.09%降低至 60.01%;甘草提取液的膜通量由 49.56 L/(m²·h)降低至 41.25 L/(m²·h),吸附率由 40.60%减少至 13.99%,透过率由 73.96%降低至 46.65%。膜通量随质量浓度增加而衰减,与溶液黏度增加、浓差极化^[16]、膜污染^[17]等问题加剧有关。吸附率降低并趋于稳定,说明膜对甘草酸的吸附具有饱和性。透过率随质量浓度增加呈分段式下降,这可能与甘草酸在质量浓度逐步增加时的状态变化有关,达到临界胶束质量浓度后,甘草酸形成胶束、胶粒、胶团,以不同大小的缔合态存在^[18]。

2.6 Box-Behnken 响应面试验设计与结果

为阐明不同溶液环境因素,对甘草酸的超滤分离影响规律,在单因素考察的基础上,根据 Box-

表 6 质量浓度对膜通量、吸附率、透过率的影响

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	甘草酸溶液			甘草提取液		
	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%	膜通量/ (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	吸附 率/%	透过 率/%
12.5	48.99	45.25	71.09	49.56	40.60	73.96
25.0	48.35	42.07	71.26	49.96	34.60	67.51
50.0	47.94	35.03	65.83	49.14	29.01	62.08
100.0	47.12	29.32	63.49	45.92	24.53	63.23
150.0	44.46	28.53	65.57	45.06	20.63	60.36
200.0	43.28	23.04	60.06	42.99	21.05	65.28
300.0	42.74	24.44	60.28	43.15	21.22	59.27
400.0	42.51	20.18	60.01	41.25	13.99	46.65

Behnken 中心组合设计原理, 选择 pH 值 (X_1)、温度 (X_2)、质量浓度 (X_3) 作为影响因素, 以 -1、0、+1 代表水平, 见表 7, 以膜通量、吸附率、透过率为考察指标, 考察其超滤分离时各因素间的交互作用及影响规律^[19]。分别对甘草酸、甘草提取液进行

16 组试验和分析, 以膜通量、吸附率和透过率为响应值, 结果见表 7。

2.7 模型方程的建立与显著性分析

2.7.1 膜通量 采用 Box-Behnken 中心组合设计拟合膜通量与因素变量的回归方程, 甘草酸溶液的膜

表 7 响应曲面设计及结果

Table 7 Response surface design and results

试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	甘草酸			甘草提取液		
				膜通量/($\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	吸附率/%	透过率/%	膜通量/($\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	吸附率/%	透过率/%
1	9 (+1)	30 (0)	0.20 (+1)	51.53	23.16	64.03	55.40	23.20	64.20
2	5 (0)	30 (0)	0.10 (0)	53.43	38.09	80.78	52.45	42.72	74.37
3	2 (-1)	20 (-1)	0.10 (0)	32.83	97.96	0.00	36.60	99.20	0.00
4	2 (-1)	30 (0)	0.01 (-1)	59.86	100.00	0.00	60.96	100.00	0.00
5	2 (-1)	30 (0)	0.20 (+1)	39.28	99.41	0.00	44.30	99.51	0.00
6	5 (0)	30 (0)	0.10 (0)	53.29	51.04	80.96	51.11	49.76	74.46
7	9 (+1)	30 (0)	0.01 (-1)	56.75	40.77	76.71	58.29	35.73	78.85
8	5 (0)	40 (+1)	0.01 (-1)	71.57	67.44	84.60	73.11	62.46	99.56
9	5 (0)	30 (0)	0.10 (0)	50.68	50.60	84.10	51.80	51.13	65.21
10	5 (0)	40 (+1)	0.20 (+1)	61.00	34.38	72.87	59.47	42.97	71.16
11	2 (-1)	40 (+1)	0.10 (0)	67.62	99.35	0.00	64.04	99.12	0.00
12	9 (+1)	20 (-1)	0.10 (0)	44.25	29.72	72.32	43.64	25.26	73.26
13	9 (+1)	40 (+1)	0.10 (0)	70.34	27.00	74.74	67.37	21.44	62.86
14	5 (0)	30 (0)	0.10 (0)	52.04	42.00	81.69	52.86	42.92	77.60
15	5 (0)	20 (-1)	0.20 (+1)	37.44	35.74	67.37	37.19	36.46	67.54
16	5 (0)	20 (-1)	0.01 (-1)	42.68	69.70	77.88	43.69	69.71	84.70

通量 = $52.36 + 2.91 X_1 + 14.17 X_2 - 5.20 X_3 - 2.17 X_1 X_2 + 3.84 X_1 X_3 - 1.33 X_2 X_3 + 0.041 3 X_1^2 + 1.36 X_2^2 - 0.543 6 X_3^2$, 方差分析结果见表 8, 方差分析可知该回归方程模型 $P < 0.000 1$, 模型显著, 失拟项不显著 ($P = 0.110 6 > 0.05$), 该模型成立, 可以用于分析考察因素与指标的作用规律。结果显示, 考察因素 X_1 、 X_2 、 X_3 均有显著影响, 3 者对膜通量的影响排序为 $X_2 > X_3 > X_1$, 考察因素 $X_1 X_3$ 间存在显著交互作用 ($P < 0.05$), 方程多元相关系数 $R^2 = 0.985 4$ 。

甘草提取液膜通量 = $52.05 + 2.35 X_1 + 12.86 X_2 - 4.96 X_3 - 0.927 5 X_1 X_2 + 3.44 X_1 X_3 - 1.79 X_2 X_3 + 1.12 X_1^2 - 0.257 5 X_2^2 + 1.57 X_3^2$, $R^2 = 0.998 6$, 方差分析结果见表 9, 该回归方程模型 $P < 0.000 1$, 模型显著, 失拟项不显著 ($P = 0.818 1 > 0.05$), 模型成立, 考察因素 X_1 、 X_2 、 X_3 均有显著作用, 3 者对膜通量的影响排序为 $X_2 > X_3 > X_1$, 因素 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 间存在显著交互作用 ($P < 0.05$)。

2.7.2 吸附率 拟合吸附率与变量的回归方程, 甘草酸溶液吸附率 = $45.43 - 34.51 X_1 - 0.618 8 X_2 -$

$10.65 X_3 - 1.03 X_1 X_2 - 4.25 X_1 X_3 + 0.225 0 X_2 X_3 + 16.05 X_1^2 + 2.03 X_2^2 + 4.36 X_3^2$, $R^2 = 0.964 7$, 方差分析结果见表 8, 该回归方程模型 $P = 0.001 1 < 0.05$, 模型显著, 失拟项不显著 ($P = 0.241 8 > 0.05$), 该模型成立, 考察因素 X_1 、 X_3 影响显著, 考察因素对吸附率的影响排序为 $X_1 > X_3 > X_2$ 。

甘草提取液中甘草酸的吸附率 = $46.63 - 36.53 X_1 - 0.580 0 X_2 - 8.22 X_3 - 0.935 0 X_1 X_2 - 3.01 X_1 X_3 + 3.44 X_2 X_3 + 13.17 X_1^2 + 1.46 X_2^2 + 4.81 X_3^2$, $R^2 = 0.977 9$, 方差分析结果见表 9, 该方程模型 $P = 0.000 3 < 0.05$, 模型显著, 失拟项不显著 ($P = 0.159 6 > 0.05$), 模型成立, 考察因素对吸附率的影响排序为 $X_1 > X_3 > X_2$, 其中 X_1 、 X_3 影响显著。

2.7.3 透过率 拟合透过率与考察因素变量的回归方程, 甘草酸溶液透过率 = $81.88 + 35.97 X_1 + 1.83 X_2 - 4.36 X_3 + 0.605 0 X_1 X_2 - 3.17 X_1 X_3 - 0.305 0 X_2 X_3 - 42.81 X_1^2 - 2.31 X_2^2 - 3.89 X_3^2$, $R^2 = 0.998 0$, 方差分析结果见表 8, 该回归方程模型 $P < 0.000 1$, 模型显著, 失拟项不显著 ($P = 0.140 4 > 0.05$), 模

表 8 甘草酸的方差分析
Table 8 Variance analysis of glycyrrhizic acid

方差来源	自由度	膜通量/(L·m ⁻² ·h ⁻¹)				吸附率/%				透过率/%			
		平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值
模型	9	1 983.22	220.36	44.94	<0.000 1	11 636.94	1 292.99	18.22	0.001 1	17 986.29	1 998.48	338.32	<0.000 1
X ₁	1	67.74	67.74	13.82	0.009 9	9 526.83	9 526.83	134.28	<0.000 1	10 353.61	10 353.61	1 752.73	<0.000 1
X ₂	1	1 605.46	1 605.46	327.45	<0.000 1	3.06	3.06	0.04	0.842 3	26.79	26.79	4.54	0.077 2
X ₃	1	216.42	216.42	44.14	0.000 6	907.81	907.81	12.80	0.011 7	152.43	152.43	25.80	0.002 3
X ₁ X ₂	1	18.92	18.92	3.86	0.097 1	4.22	4.22	0.06	0.815 4	1.46	1.46	0.25	0.636 3
X ₁ X ₃	1	58.98	58.98	12.03	0.013 3	72.42	72.42	1.02	0.351 3	40.20	40.20	6.80	0.040 2
X ₂ X ₃	1	7.10	7.10	1.45	0.274 1	0.20	0.20	0.00	0.959 1	0.37	0.37	0.06	0.810 2
X ₁ ²	1	0.01	0.01	0.00	0.971 5	1 030.09	1 030.09	14.52	0.008 9	7 329.50	7 329.50	1 240.79	<0.000 1
X ₂ ²	1	7.38	7.38	1.51	0.265 7	16.44	16.44	0.23	0.647 3	21.37	21.37	3.62	0.105 9
X ₃ ²	1	1.19	1.19	0.24	0.639 3	75.86	75.86	1.07	0.341 0	60.57	60.57	10.25	0.018 6
残差	6	29.42	4.90			425.69	70.95			35.44	5.91		
失拟项	3	24.48	8.16	4.96	0.110 6	301.84	100.61	2.44	0.241 8	28.42	9.47	4.05	0.140 4
纯误差	3	4.93	1.64			123.84	41.28			7.02	2.34		
总离差	15	2 012.64				12 062.63				18 021.73			

表 9 甘草提取液的方差分析
Table 9 Variance analysis of licorice extract

方差来源	自由度	膜通量/(L·m ⁻² ·h ⁻¹)				吸附率/%				透过率/%			
		平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值
模型	9	1 642.53	182.50	473.79	<0.000 1	12 097.39	1 344.15	29.56	0.000 3	17 476.28	1 941.81	36.93	0.000 1
X ₁	1	44.18	44.18	114.69	<0.000 1	10 672.61	10 672.61	234.74	<0.000 1	9 741.99	9 741.99	185.26	<0.000 1
X ₂	1	1 322.78	1 322.78	3 434.00	<0.000 1	2.69	2.69	0.06	0.815 9	8.16	8.16	0.16	0.707 2
X ₃	1	196.91	196.91	511.20	<0.000 1	540.55	540.55	11.89	0.013 7	453.16	453.16	8.62	0.026 1
X ₁ X ₂	1	3.44	3.44	8.93	0.024 4	3.50	3.50	0.08	0.790 8	27.04	27.04	0.51	0.500 3
X ₁ X ₃	1	47.40	47.40	123.06	<0.000 1	36.24	36.24	0.80	0.406 3	53.66	53.66	1.02	0.351 4
X ₂ X ₃	1	12.74	12.74	33.09	0.001 2	47.33	47.33	1.04	0.346 9	31.58	31.58	0.60	0.467 8
X ₁ ²	1	4.97	4.97	12.91	0.011 5	693.40	693.40	15.25	0.007 9	7 032.08	7 032.08	133.73	<0.000 1
X ₂ ²	1	0.27	0.27	0.69	0.438 4	8.48	8.48	0.19	0.680 9	37.18	37.18	0.71	0.432 7
X ₃ ²	1	9.83	9.83	25.51	0.002 3	92.59	92.59	2.04	0.203 5	91.44	91.44	1.74	0.235 4
残差	6	2.31	0.39			272.79	45.47			315.51	52.58		
失拟项	3	0.55	0.18	0.31	0.818 1	213.69	71.23	3.62	0.159 6	229.69	76.56	2.68	0.220 1
纯误差	3	1.76	0.59			59.10	19.70			85.82	28.61		
总离差	15	1 644.84				12 370.18				17 791.79			

型成立,考察因素 X₁、X₃ 具有显著性,考察因素对透过率的影响排序为 X₁>X₃>X₂, X₁X₃ 间存在显著交互作用 (P<0.05)。

甘草提取液中甘草酸的透过率=72.91+34.90 X₁+1.01 X₂-7.53 X₃-2.60 X₁X₂-3.66 X₁X₃-2.81 X₂X₃-41.93 X₁²+3.05 X₂²+4.78 X₃², R²=0.982 3, 方差分析结果见表 9, 该方程模型 P=0.000 1<0.05, 模型显著, 失拟项不显著 (P=0.220 1>0.05),

表明该模型成立,考察因素对透过率的影响排序为 X₁>X₃>X₂, 且 X₁、X₃ 具有显著性。

2.8 考察因素间的交互作用

通过单因素、Box-Behnken 响应法对考察因素的分析,结果表明 pH 值、温度、质量浓度等环境因素对甘草酸超滤分离的影响具有差异性,为进一步探究溶液环境对甘草酸超滤分离的影响规律,围绕对考察指标影响显著的交互作用展开分析。

2.8.1 pH 值与温度 pH 值与温度的交互作用仅对甘草提取液的膜通量具有显著性, pH 值与温度交互作用等高线见图 2。二者对甘草提取液膜通量的影响一致, 故可通过改变溶液 pH 值、温度条件协同调节膜通量, 提高超滤效率。

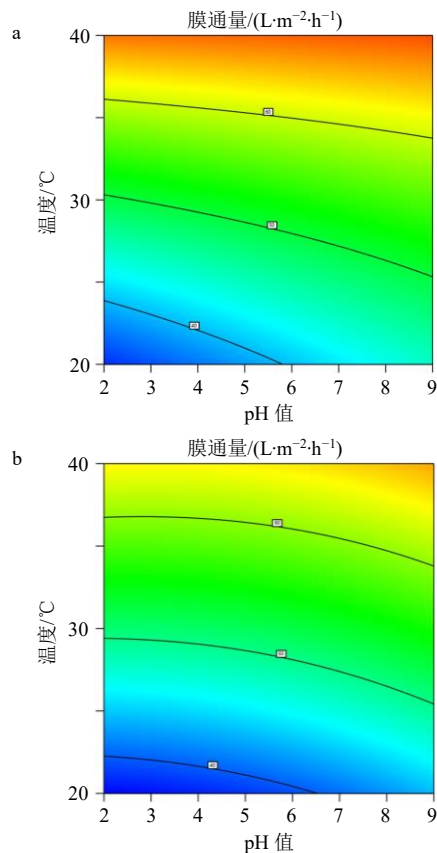


图 2 甘草酸 (a) 和甘草提取液 (b) 的膜通量的 pH 值与温度相关性等高线图

Fig. 2 Contour maps between pH value and temperature of membrane flux for glycyrrhizic acid (a) and licorice extract (b)

2.8.2 pH 值与质量浓度 二者对甘草酸溶液和甘草提取液的膜通量、透过率的影响趋势具有差异性, 表现为 pH 值增大, 膜通量增大, 而甘草酸质量浓度增加, 膜通量、透过率降低。pH 值与质量浓度交互作用等高线结果见图 3、4, pH 值与质量浓度的交互作用对甘草提取液的膜通量、甘草酸溶液的膜通量、透过率均具有显著性, 当 pH 值为 2~5 时, 成分质量浓度对膜通量的影响更为明显; 而当 pH 值为 5~9 时, 甘草酸盐分子间排斥增大, 分子团聚作用减弱, 临界胶束质量浓度提高, 能在一定范围内缓解浓差极化、膜污染引起的通量衰减, 改善甘草酸单体溶液的透过率。

2.8.3 质量浓度与温度 二者仅对甘草提取液膜通量的影响具有差异性。质量浓度与温度交互作用等

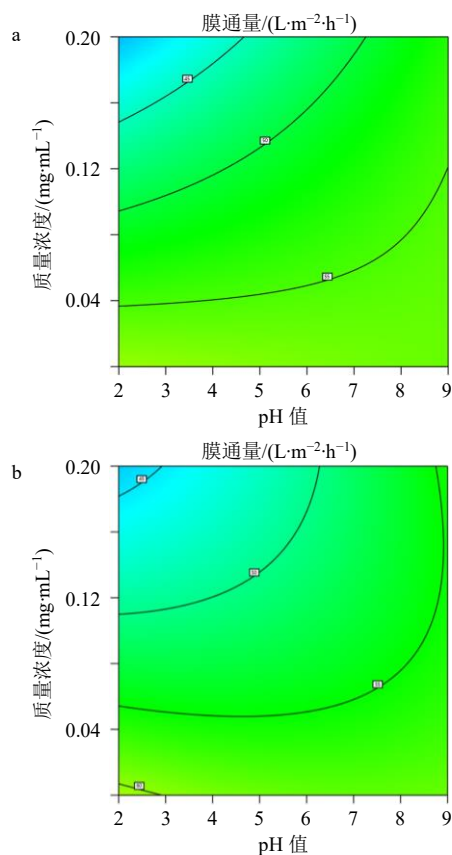


图 3 甘草酸 (a) 和甘草提取液 (b) 的膜通量的 pH 值与质量浓度相关性等高线图

Fig. 3 Contour maps between pH value and concentration of membrane flux for glycyrrhizic acid (a) and licorice extract (b)

高线见图 5, 质量浓度与温度的交互作用显著影响甘草提取液的膜通量。随质量浓度增大膜通量下降, 超滤操作时间延长, 可通过调节溶液温度恢复通量。

2.9 SEM 测定物态特征和甘草提取液微观形态分析

为进一步分析甘草酸在不同溶液体系下的存在状态, 将甘草酸单体和甘草提取液的冻干粉分别喷金溅射镀膜后, 采用 SEM 观察, 加速电压为 10 kV, 探针电流为 2.0 mA, 放大倍率为 20 000 倍^[20], 观察其颗粒微观形态。对比图 6 中电镜的微观物态特可以看出, 甘草酸在单体和提取液中的形态存在明显差异; 在甘草提取液中, 甘草酸多堆叠成不规则排序的复合颗粒; 而在甘草酸单体中, 甘草酸多缔合成球形胶团, 说明在甘草提取液的多成分共存体系下, 当甘草皂苷达到临界胶束质量浓度时, 其他成分会参与分子间缔合过程, 形成不规则杂化胶体, 且胶体尺寸小于甘草酸胶团, 从而引起其透过和吸附行为的差异。

3 讨论

本研究通过改变溶液 pH 值、温度、质量浓度

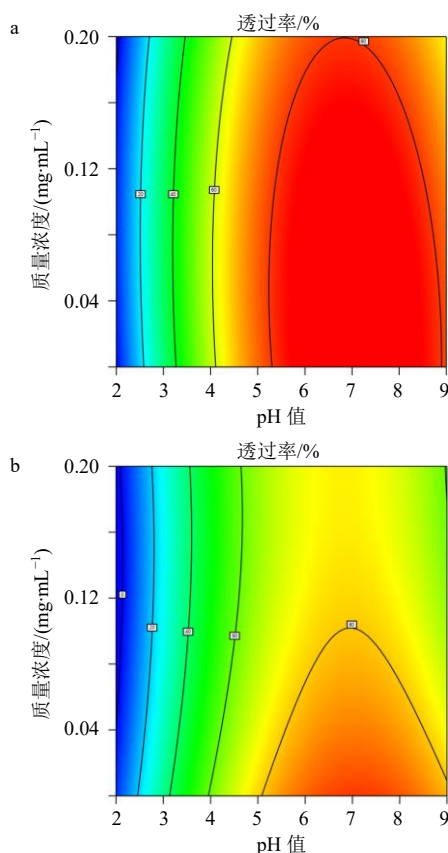


图 4 甘草酸 (a) 和甘草提取液 (b) 的透过率的 pH 值与质量浓度相关性等高线图

Fig. 4 Contour maps between pH and concentration of transmittance for glycyrrhizic acid (a) and licorice extract (b)

等参数,从工作效率、成分损失和获得角度出发、综合选取膜通量、吸附率、透过率作为评价指标,基于单因素考察基础,采用 Box-Behnken 响应法系统地分析各因素及其交互作用对 3 者的显著性,初步阐明溶液环境对甘草酸超滤分离的影响规律,有助于提升膜分离技术在中药制药的适用性。前期研究发现,膜对非解离态的甘草酸吸附严重,调节溶液 pH 值至 9,甘草酸可呈现离子型表面活性剂特点,膜吸附率显著降低。在膜孔径、压力、平衡体积参数恒定时,pH 值、温度、质量浓度等溶液环境因素对甘草酸的超滤分离行为均有显著影响,但影响规律各不相同。pH 值显著影响膜通量、吸附率、透过率,随 pH 值升高,膜通量加快,吸附率降低并趋于稳定。温度仅对膜通量影响显著,表现为膜通量随温度升高而增大,吸附率和透过率无变化。质量浓度对膜通量、膜吸附率、透过率均有显著影响,膜通量、吸附率、透过率 3 者均随浓度增加而下降,最终趋于稳定。温度影响其超滤行为的实质为液体黏度改变,pH 值、质量浓度则以甘草酸成分

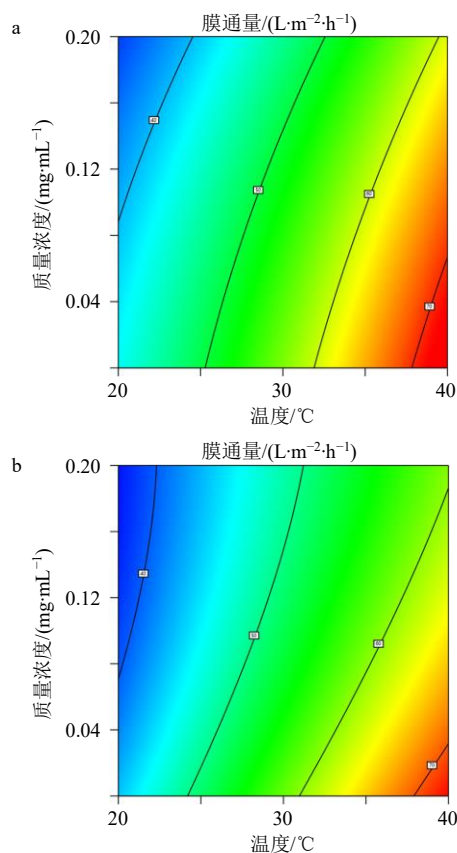


图 5 甘草酸 (a) 和甘草提取液 (b) 的膜通量的质量浓度与温度相关性等高线图

Fig. 5 Contour maps between concentration and temperature of membrane flux for glycyrrhizic acid (a) and licorice extract (b)

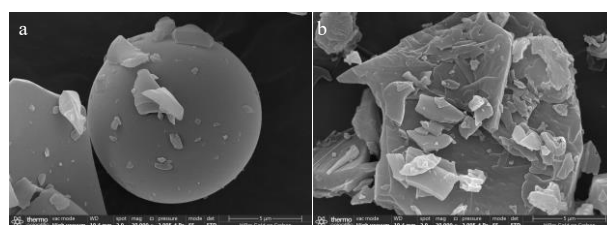


图 6 甘草酸溶液 (a) 和甘草提取液 (b) 冻干粉的 SEM 图 ($\times 20\,000$)

Fig. 6 SEM image of glycyrrhizic acid solution (a) and licorice extract (b) ($\times 20\,000$)

状态的变化影响分离效果。碱性条件下甘草酸的膜吸附率远低于酸性条件,能够有效减少其超滤分离的损失率。当质量浓度升高至临界胶束浓度后,甘草酸形成缔合态,可增大超滤膜孔径提升透过率。对各因素间的交互作用分析,发现其对膜通量和单体溶液的透过率具有显著影响作用,说明该交互作用可应用于提高膜通量和超滤效率。因此,在对含甘草酸等甘草皂苷类成分的中药溶液进行超滤时,

可通过测定质量浓度、调节温度、pH 值等参数,实现指标性成分的选择性透过或截留,也可调控超滤通量,提高分离效率。

对比甘草酸单体溶液和甘草提取液的超滤分离行为差异,甘草提取液中甘草酸的吸附率、透过率略低,pH 值、温度、质量浓度之间的交互作用对膜通量的影响更为显著,但这种交互作用对其透过率无显著性影响。甘草提取液的溶液环境复杂,甘草酸的超滤透过行为可能受到溶液中共存的黄酮类、多糖类等成分的影响。

电镜微观扫描结果表明,甘草酸在单体和提取液中以不同形态存在,说明黄酮类、多糖等成分会对甘草酸的存在状态产生干扰,如黄酮类成分与甘草酸可通过范德华力、氢键缔合作用,形成杂化胶团^[18],杂化胶团在溶液中的稳定性可能受 pH 值、温度、质量浓度影响,通过聚合或裂解转变为不同大小的胶团,这种微观物态的变化是影响二者超滤行为差异的内在原因,但对于复杂溶液环境下,黄酮、多糖、香豆素等多种成分影响其超滤分离的具体机制尚不清晰,因此,在分析上述成分和甘草皂苷之间的影响规律以及甘草皂苷分离行为时存在局限性,后续将围绕不同配比的多成分溶液环境和膜层材质探究并完善甘草皂苷的超滤分离机制。

由复杂溶液环境下甘草皂苷的超滤分离差异可知,溶液环境干扰中药成分的微观物态,进而影响中药制剂提取、分离、浓缩、精制等过程,最终影响产品质量的均一性和稳定性。从中药成分与溶液环境角度切入,分析溶液环境、微观物态和分离行为的相关性,推测溶液环境对成分超滤分离的影响规律,以期通过调控溶液环境参数,实现成分目的性分离、提升分离效率,使超滤技术更好地应用于中药制药产业。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 韩维维,方东军,李陆军,等.甘草化学成分及生物活性研究进展[J].化学工程师,2022,36(2):56-58.
- [2] 瞿其扬,李存玉,郑云枫,等.不同溶液体系中甘草酸的超滤分离规律研究[J].中成药,2015,37(12):2775-2778.
- [3] 李存玉,郑云枫,彭国平.面向一流专业人才培养的中药制药化学探究式实验教学:甘草酸缔合态[J].化学

教育:中英文,2023,44(6):90-94.

- [4] 李贺敏,李存玉,彭国平,等.温度、pH 对甘草酸溶液中内毒素团聚状态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):20-22.
- [5] 李存玉,吴鑫,顾佳美,等.丹参中酚酸类成分相对分子质量大小与纳滤传质系数的相关性[J].中国中药杂志,2018,43(7):1453-1458.
- [6] 李存玉,支兴蕾,牛学玉,等.基于成分状态分析溶液环境对三七总皂苷超滤分离行为的影响[J].中草药,2019,50(21):5246-5252.
- [7] 闫治攀,武瑞洁.超滤膜分离技术在中药制剂生产中的应用进展[J].中成药,2018,40(7):1571-1575.
- [8] 王玺,仇萍,彭晓珊,等.集成膜技术在中药制药工业中的应用研究进展[J].中国药学杂志,2020,55(22):1836-1841.
- [9] 肖先,李春燕,刘晓龙,等.甘草的主要化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2023,40(3):280-285.
- [10] 中国药典[S].一部.2020:88-89.
- [11] 徐建,康慧芬,杨惠琳,等.甘草中甘草酸的含量测定方法研究[J].山东化工,2018,47(21):81-83.
- [12] 叶淑青,伍清萍,郑雨君,等.基于临界分离效应的复杂溶液环境中丹酚酸 B、苦参碱纳滤分离规律[J].中成药,2021,43(2):314-320.
- [13] 马鸿雁,李霞,李楠,等.甘草及其活性成分的表面活性比较研究[J].现代药物与临床,2011,26(3):227-229.
- [14] 兰洁,杨明,韩丽,等.泡沫分离法与常规方法制备甘草酸粗品的比较[J].华西药学杂志,2007,22(1):25-27.
- [15] 刘剑洪,宋艳,张培新,等.酪蛋白溶液粘度的温度依赖性研究[J].深圳大学学报:理工版,2004,21(4):335-338.
- [16] 马宇,杨刚,邢卫红.圆盘式膜组件中浓差极化现象研究[J].南京工业大学学报:自然科学版,2016,38(6):86-92.
- [17] 朱明岩,陈胜林.超滤技术及超滤膜的污染与防治研究[J].机电信息,2018(35):14-19.
- [18] 杨璇,王妍,王宝华,等.甘草酸对葛根素增溶作用的实验研究[J].天津中医药,2015,32(5):304-307.
- [19] 李存玉,蒋佳丽,张永拓,等.Box-Behnken 设计结合通量衰减探索热毒宁注射液醇沉中间体的纳滤分离规律[J].中国中药杂志,2022,47(7):1881-1887.
- [20] 廖玉瑶.基于“药辅合一”的黄芩苷-甘草酸二铵胶束的构建与增效机制研究[D].北京:北京中医药大学,2022.

[责任编辑 郑礼胜]