

转移率= 过柱流出液中总鞣质质量/ 上柱前药液总鞣质质量 × 100%

结果表明, 随 HP20 型树脂使用次数的增多, 其对固公果根中鞣质的吸附纯化能力逐渐降低, 但降低程度不明显, 鞣质的质量分数下降了 3.6%, 回收率下降了 3.5%, 可见 HP20 树脂的吸附-解吸性能是较为稳定的, 故认为 HP20 型大孔吸附树脂对固公果根中鞣质的精制具有很好的重复使用性能。

表 6 使用次数对质量分数和转移率的影响

Table 6 Using times of resin on content and transferring rate

使用次数	质量分数/ %	转移率/ %
1	67.2	83.0
3	65.9	82.1
7	64.1	81.7
10	62.6	79.5

2.8 树脂的再生: 可选用 75% ~ 85% 乙醇对大孔吸附树脂再生。大孔吸附树脂每使用一次, 比上柱量约下降 5%。

### 3 讨论

固公果根是彝族民间常用药材, 疗效显著, 虽然

作为临床中药药剂的历史悠久, 但是其工艺方法依旧是传统的水提法, 此方法虽然简单, 但是存在较大缺点。本实验利用树脂法对固公果根中鞣质进行了分离纯化, 实验中使用试剂为乙醇和水, 安全无毒, 采用此方法具有简单, 适合大工业生产的特点, 并且所得干浸膏鞣质的质量分数达到 67.3%, 并且具有转移率高, 所得产品质量稳定等优点, 为固公果根有效活性部位的研究开发提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 任洁, 何广新. 苗药一回公果阿江制剂: “肠康胶囊” 的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1998(2): 41-42
- [2] 国家中成药标准汇编内科脾胃分册[S]. 肠舒片. WS 10615 (ZD 0615)-2002
- [3] 刘卫华. 谈中药鞣质成分在临床中的应用[J]. 黑龙江中医药, 2005(4): 55-56
- [4] 王丽敏, 卢春风, 路雅真, 等. 老鹳草鞣质类化合物的抗腹泻作用研究[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(5): 28-29.
- [5] 钟华玉, 张勉, 戴岳, 等. 大黄和生首乌鞣质含量对小鼠小肠推进的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2478-2479
- [6] 王春民, 刘刚, 费艳, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60
- [7] 刘岱琳, 董晋泉, 孙华庚, 等. 加纳籽中 5 羟甲基氨基酸的树脂纯化研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 60-63

## 丹参醇沉过程中丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率预测研究

俞翔<sup>1</sup>, 莫必琪<sup>2</sup>, 王治<sup>2</sup>, 瞿海斌<sup>1</sup>

(1 浙江大学 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058; 2 正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023)

**摘要:** 目的 建立丹参醇沉过程丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 回收率的预测模型。方法 采集 15 批丹参醇沉正常生产的操作参数, 测定浓缩液和醇沉液中的 5 种有效成分, 计算丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率。采用将醇沉操作参数和浓缩液有效成分的量相结合的方法建立 Stepwise MLR 回收率预测模型, 分析模型中各变量的重要性。结果 丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率预测模型相关系数均大于 0.95。结论 建立的丹参醇沉过程中有效成分回收率预测模型具有较好的预测能力, 有助于进一步了解醇沉过程, 提高丹参醇沉过程质量控制水平。

**关键词:** 丹参; 回收率; 醇沉; 丹参素; 丹酚酸 B; 丹酚酸 D

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0900-04

### Recovery prediction of danshensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D in danshen ethanol precipitation

YU Xiang<sup>1</sup>, MO Biqi<sup>2</sup>, WANG Zhi<sup>2</sup>, QU Haibin<sup>1</sup>

(1 Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

**Abstract: Objective** To develop recovery prediction models for danshensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D in danshen ethanol precipitation. **Methods** Recorded the operation parameters of 15 normal batches of danshen ethanol precipitation in one Chinese medicine plant and measured five active compo-

①收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划(NCET 06 0515); 浙江省重大科技专项重点项目(2008130041)

作者简介: 俞翔, 男, 硕士研究生。

\* 通讯作者 瞿海斌 E-mail: quhb@zju.edu.cn

ment contents in danshen concentrated liquid and danshen ethanol precipitated liquid, the Stepwise MLR recovery prediction models of dashensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D were developed based on an approach which combined the process parameters and the active component contents in danshen concentrated liquid. The importance of variables in the prediction models was analyzed later. **Results** The coefficient correlations of dashensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D recovery prediction models were all above 0.95. **Conclusion** The models developed for active component recovery prediction show a good predictability. Models can be used to help manufacturers to understand the ethanol precipitation process and improve the quality control ability of danshen ethanol precipitation.

**Key words:** danshen (*Salviae miltiorrhizae* Bunge); recovery; ethanol precipitation; danshensu; salvianolic acid B; salvianolic acid D

丹参注射液是应用最广泛的中药注射剂之一<sup>[1]</sup>,其有效成分主要为丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、丹酚酸 D 以及丹酚酸 A 等<sup>[2]</sup>。丹参注射液的生产工艺为传统的“水提醇沉”<sup>[3]</sup>,其中醇沉是继水提和浓缩后的第 3 个生产环节,也是关键单元之一。在醇沉过程中,丹参提取液中的各种有效成分往往伴随着杂质的沉淀而损失,因此醇沉过程质量控制的好坏将直接关系到丹参注射液产品质量的均一性,进而影响丹参注射液的安全性和有效性。目前,中药生产醇沉过程的研究主要为设备或工艺的定性分析<sup>[4,5]</sup>,而醇沉过程质量控制的研究报道很少。在丹参注射液的醇沉过程中,由于缺乏对原料质量、过程操作参数与醇沉液质量之间定量关系的研究,该过程的操作一直依赖于操作人员的长期生产经验,难以保证醇沉过程的质量。根据实验研究结果<sup>[6]</sup>及实际生产经验,在丹参注射液的醇沉过程中,浓缩液的密度、浓缩液的投料量、乙醇的加入方式与醇沉过程的丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率密切相关。为此,通过累积某工厂生产数据,本实验尝试建立一种丹参注射液生产醇沉过程有效成分回收率的预测方法,为工厂醇沉过程的质量控制提供参考。

## 1 实验材料

某药厂自制 1400 L 醇沉罐及工业用压缩空气气搅装置,密度计(浙江省余姚市方桥实验仪表厂),Agilent 1100 系列高效液相色谱(美国 Agilent)。

15 批浓缩液和醇沉液来自某药厂 2007 年 10 月—2007 年 11 月的生产批次,丹参素、丹酚酸 B、丹酚酸 D 对照品(实验室自制,质量分数在 95% 以上),乙醇为药用规格,乙腈为色谱纯,实验用水为 Milli-Q 纯化水。

## 2 方法和结果

### 2.1 丹参醇沉液制备及样品采集方法:在醇沉操作

前,将丹参浓缩液注入醇沉罐,压缩空气鼓泡搅拌 5 min,在醇沉罐底部取样 3 次,每次取 150 mL,混合均匀,30 °C 条件下测定浓缩液密度;取浓缩液 1~2 g 样品置于 25 mL 量瓶中用纯化水稀释至刻度,离心 10 min 后取上清液 1 mL,用 HPLC 法分析其中的丹参素、丹酚酸 D 和丹酚酸 B。

根据丹参浓缩液性状,生产者需凭借经验预先估判 75% 乙醇和 95% 乙醇的加入量。加入 75% 乙醇的目的是稀释丹参浓缩液,加入 95% 乙醇的目的是控制最终醇沉液表观乙醇体积分数和醇沉液体积。醇沉操作的过程为:在醇沉罐中恒速加入 75% 乙醇,待 75% 乙醇添加完毕后恒速加入 95% 乙醇,待酒精计显示醇沉液表观乙醇体积分数大于 75% 时停止加醇,在加醇过程中保持压缩空气鼓泡搅拌。加醇结束后静置 1 h。取醇沉液液面下 10 cm 处的溶液 70 mL 作为待分析样品并在 0~5 °C 冷藏 48 h。取待分析样品 2 mL 置于 10 mL 量瓶中用纯化水稀释至刻度,离心 10 min 后取上清液用于 HPLC 测定。

### 2.2 HPLC 分析丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D<sup>[7]</sup>

2.2.1 色谱条件:汉邦 C<sub>18</sub> 反相色谱柱:(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相条件:A 相:0.1% 甲酸水,B 相:乙腈。梯度洗脱程序:0~10 min(B 相 10%~20%),10~27 min(B 相 20%~33%),27~30 min(B 相 33%~70%);进样量:10 μL;体积流量 1 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 °C。

2.2.2 标准曲线的制备:精密称取丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 A、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 对照品各 6 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,用纯化水定容至刻度,摇匀,得到对照品储备溶液。取对照品储备溶液稀释成不同质量浓度的对照品溶液,按照上述 HPLC 分析条件进行分析。以质量浓度( $X$ , μg/mL)为横坐标,色谱峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线。5 个有效成分的回归方程分别为丹参素: $Y = 12.71 X + 8403.6$ ,  $r^2 =$

0.9998; 原儿茶醛:  $Y = 115.94X - 67.407, r^2 = 0.9999$ ; 丹酚酸 A:  $Y = 62.994X - 143.08, r^2 = 1$ ; 丹酚酸 B:  $Y = 21.787X - 21.957, r^2 = 1$ ; 丹酚酸 D:  $Y = 20.546X + 9.3197, r^2 = 0.9993$ 。

2.3 回收率计算方法: 考察丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率与过程变量及原料性质之间的关系。醇沉过程丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率的计算公式为:

$$\eta = \frac{C \times V}{m \times M} \times 100\% \quad (1)$$

其中  $C$  为醇沉液中有效成分的质量浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $V$  为醇沉液总体积 (L), 依照生产经验, 以 75% 乙醇加入量 ( $V_1$ ) 与 95% 乙醇加入量 ( $V_2$ ) 之和作为实际醇沉液总体积的近似;  $m$  为浓缩液中有效成分的质量分数;  $M$  为浓缩液投料量 (kg)

2.4 回收率预测模型建立方法: 对于中药制药和食品制造行业, 原料质量的差异是影响最终产品质量不可忽略的因素。因此, 在基于过程参数的过程模型中添加表征原料质量的指标可提高模型的预测精度<sup>[8,9]</sup>。这类模型一般可表述为:

$$y = f(X, Z) + \varepsilon \quad (2)$$

其中  $X$  表示表征原料质量的指标,  $Z$  表示过程变量,  $\varepsilon$  表示模型预测误差

考虑过程变量的两两交互作用, 结合测定的丹参浓缩液有效成分, 本实验将完整的有效成分回收率预测模型定义为:

$$\eta = a + b_1C_1 + b_2C_2 + b_3C_3 + b_4C_4 + b_5C_5 + c_1\rho + c_2M + c_3V_1 + c_4V_2 + c_{12}\rho M + c_{13}\rho V_1 + c_{14}\rho V_2 + c_{23}M V_1 + c_{24}M V_2 + c_{34}V_1 V_2 + \varepsilon \quad (3)$$

其中, 浓缩液中丹参素质量浓度  $C_1$ 、原儿茶醛质量浓度  $C_2$ 、丹酚酸 A 质量浓度  $C_3$ 、丹酚酸 B 质量浓度  $C_4$  和丹酚酸 D 质量浓度  $C_5$  为表征原料性质的指标; 浓缩液密度  $\rho$ 、浓缩液投料量  $M$ 、75% 乙醇加入量  $V_1$  和 95% 乙醇加入量  $V_2$  为过程可调变量;  $a$  为截距项,  $b_i, c_i$  和  $c_{ij}$  分别为模型系数,  $\varepsilon$  为模型误差

由于公式 (3) 中变量相对较多而样本量有限, 相关性不强的变量会影响到模型的稳健性, 本实验选择逐步多元线性回归 (Stepwise MLR) 方法建立预测模型。

所有 Stepwise MLR 计算均由 Minitab Release 14 (Minitab Inc.) 软件完成, 最终预测模型由 Unscrambler 9.6 软件 (CAMO Software) 给出。

2.5 丹参醇沉回收率计算结果: 根据公式 (1) 用工厂生产现场采集的工艺参数以及 HPLC 测定数据计算该 15 批次丹参醇沉过程丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率。从表 1 可知, 在丹参注射液正常生产的 15 批次醇沉液中, 丹参素回收率 ( $y_1$ )、丹

酚酸 B 回收率 ( $y_2$ ) 和丹酚酸 D 回收率 ( $y_3$ ) 分别在 31.9% ~ 44.5%、35.8% ~ 49.3% 和 23.0% ~ 24.9%, 不同批次各有效成分回收率的比值也存在较大差异。由此可见, 单纯凭经验操作无法保证各批次丹参醇沉过程中有效成分回收率的稳定性。

表 1 丹参醇沉的 3 种有效成分的回收率结果

Table 1 Recovery results of three active components in danshen ethanol precipitation

编号	$y_1/\%$	$y_2/\%$	$y_3/\%$	$y_1y_3$	$y_2y_3$
1	36.6	39.1	23.0	1.59	1.70
2	38.9	41.9	26.1	1.49	1.61
3	32.3	36.3	24.2	1.33	1.50
4	40.2	45.7	35.8	1.12	1.28
5	40.6	46.6	34.0	1.19	1.37
6	35.4	40.4	29.3	1.21	1.38
7	33.8	37.8	25.9	1.31	1.46
8	31.9	35.8	26.7	1.19	1.34
9	34.8	38.8	25.2	1.38	1.54
10	35.6	40.9	26.6	1.34	1.54
11	43.3	48.0	33.4	1.30	1.44
12	44.5	49.3	34.9	1.28	1.41
13	35.4	39.5	25.7	1.38	1.54
14	40.9	46.0	31.1	1.32	1.48
15	42.9	48.1	33.0	1.30	1.46

2.6 3 种有效成分回收率预测模型的建立和分析: 为保证预测模型和实际生产经验具有可比性, 使用 Stepwise MLR 方法时在模型中预先保留 95% 乙醇加入量这个过程参数, 并将进入和移出模型的置信度设为 0.15, 模型变量的显著性见表 2~4。

2.6.1 丹参素回收率模型: 通过公式 (3) 获得的丹参素回收率预测模型为  $y_1 = 141.33 - 95.99\rho + 1.00C_3 - 0.38C_4 + 0.01V_2 + 2.31 \times 10^{-5} V_1 V_2 + 0.01\rho M, r^2 = 0.99, \text{RMSEPC} = 0.51, \text{交叉验证 RMSEP} = 0.84$ 。预测模型的  $t$  检验结果见表 2, 可见丹参浓缩液密度、丹酚酸 A 质量浓度以及 75% 乙醇与 95% 乙醇的交叉相对与丹参素回收率的计算结果间有非常强的相关性。

表 2 丹参素回收率预测模型  $t$  检验结果

Table 2 Result of  $t$  test for dashensu recovery prediction model

变量项	$\rho$	$C_3$	$C_4$	$V_2$	$V_1V_2$	$\rho M$
$t$ 值	-13.170	4.290	-2.460	2.960	3.650	2.440
$P$ 值	0.000	0.003	0.040	0.018	0.007	0.041

2.6.2 丹酚酸 B 回收率模型: 通过公式 (3) 获得的丹酚酸 B 回收率模型为  $y_2 = 169.00 - 109.45\rho - 3.29C_2 - 0.42C_4 + 1.17C_3 + 0.0254V_1 + 0.0175V_2, R^2 = 0.99, \text{RMSEPC} = 0.53, \text{交叉验证 RMSEP} = 0.95$ 。预测模型的  $t$  检验结果见表 3。由显著性检验分析可知, 浓缩液密度、丹酚酸 A 质量浓度以及 95% 乙醇加

入量对丹酚酸 B 回收率的影响最为显著。

表 3 丹酚酸 B 回收率预测模型  $t$  检验结果

Table 3 Result of  $t$  test for salvianolic acid B recovery prediction model

变量项	$\rho$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$V_1$	$V_2$
$t$ 值	-13 970	-3.210	3.990	-2.420	3.270	4.420
$P$ 值	0.000	0.012	0.004	0.042	0.010	0.002

2.6.3 丹酚酸 D 回收率模型: 通过公式(3)获得的丹酚酸 D 回收率模型为  $y_3 = 178.93 - 135.22\rho + 0.42C_1 - 6.62C_2 + 0.0282V_1 + 0.0140V_2$ ,  $r^2 = 0.98$ , RMSEPC = 0.88, 交叉验证 RMSEP = 1.96。预测模型的  $t$  检验结果见表 4。可见浓缩液密度和浓缩液中原儿茶醛的量变化会非常明显地影响到丹酚酸 D 回收结果。尽管 95% 乙醇加入量的变化会影响到醇沉液的最终乙醇体积分数, 但对丹酚酸 D 回收率的调控能力十分有限。

表 4 丹酚酸 D 回收率预测模型  $t$  检验结果

Table 4 Result of  $t$  test for salvianolic acid D recovery prediction model

变量项	$\rho$	$C_1$	$C_2$	$V_1$	$V_2$
$t$ 值	-8.200	1.770	-3.820	2.950	1.750
$P$ 值	0.000	0.111	0.004	0.016	0.115

由上可知, 根据公式(3)建立的 3 个回收率预测模型, 其  $r$  均高于 0.95。从模型可知, 15 批次浓缩液投料量的波动(表 1)对有效成分回收率的影响不如另外 3 个过程变量显著, 说明在目前投料量范围内, 工厂可以适当提高投料量以减少乙醇的消耗, 并降低后续乙醇回收的能耗。由于建模所用的 15 批次醇沉数据均来自于生产现场, 因此建立的模型可用于指导工厂的醇沉过程。

从上述结果可以看出, 丹参浓缩液密度的改变是 3 种有效成分的回收率改变的主要原因之一, 是丹参醇沉过程的关键控制变量。3 个模型说明, 若丹参浓缩液密度在目前范围内波动, 依靠乙醇加入方式的改变不能消除浓缩液密度波动对醇沉质量波动所带来的影响。另外, 3 个模型也能说明, 中药

原料本身的质量差异对生产过程的质量控制来说是一个不可忽略的因素, 将合适的原料质量指标引入有效成分回收率预测模型, 可以提高模型预测能力。此外, 上述 3 个回收率模型包含的变量以及变量系数均有所不同, 这一结果提示, 醇沉过程中各种有效成分的损失机制并不相同而且比较复杂。尽管目前尚且无法阐明有效成分在醇沉过程中的损失机制, 但通过数理统计的方法, 能够发现某些规律的存在。利用这些规律, 生产者可以在生产中调整过程变量提高批次间醇沉结果的相似性。

### 3 结论

通过在过程模型中添加表征原料质量的参数, 本实验建立的丹参醇沉过程 3 种有效成分回收率的预测模型均具有较好的预测能力, 可用于指导丹参注射液生产中的醇沉操作。3 种有效成分的回收率预测模型量化了过程中各种因素对醇沉过程的影响, 有助于增加工厂对醇沉过程的了解, 有望改变目前粗放的操作模式, 提高醇沉过程的质量控制水平。

#### 参考文献:

- [1] 王桂蓉. 丹参注射液的药理作用与临床研究进展[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(10): 1473-1474
- [2] 张尊建, 李茜, 王伟. 丹参及丹参注射液指纹图谱的 HPLC-MS 研究[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1074-1076
- [3] 高福君, 仇法新. 浅谈影响中药醇沉的几个因素[J]. 山东中医杂志, 1999, 18(5): 226-227
- [4] 闫希军, 张立国, 黄靓. 醇沉速度对中药质量的影响[J]. 中成药, 2003, 25(4): 266-270
- [5] 肖琼, 沈平嫒. 中药醇沉工艺的关键影响因素[J]. 中成药, 2005, 27(2): 143-144
- [6] 王静. 过程分析技术在丹参注射液醇沉和养胃颗粒喷雾剂中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [7] Qu H B, Zhai X J, Shao Q. Simultaneous determination of seven active compounds in *Radix Salviae Miltiorrhizae* by temperature controlled ultrasound assisted extraction and HPLC[J]. *Chromatographia*, 2006, 66(1), 21-27
- [8] Skibsted E, Westerhuis J, Smilde A. Examples of NIR based real time release in tablet manufacturing[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2007, 43: 1297-1305.
- [9] Jorgensen K, Naes T. A design and analysis strategy for situations with uncontrolled raw material variation[J]. *J Chemometr*, 2004, 18(2): 45-52