

中药醇沉前浓缩液质控指标的完善及标准建立——以党参醇沉为例

潘晶晶^{1,2}, 任丹丹^{1,2#}, 瞿海斌^{1,2,3}, 龚行楚^{1,2,3*}

1. 浙江大学药学院, 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058
2. 组分中药国家重点实验室浙江大学交叉创新中心, 浙江 杭州 310058
3. 浙江大学金华研究院, 浙江 金华 321016

摘要: **目的** 完善中药醇沉前浓缩液质控指标, 并建立浓缩液质量标准。**方法** 制备多批次党参浓缩液, 研究密度与浓缩液其他性质间的关系。将党参炔苷保留率、与乙醇充分混合的浓缩液质量百分比以及单位质量浓缩液产生沉淀质量作为醇沉工艺评价指标, 开展膜分散醇沉实验研究, 筛选浓缩液关键性质并建立其与上述评价指标的定量模型。基于所建模型, 采用预测误差传播的方法建立党参浓缩液的质量标准, 并进行实验验证。**结果** 浓缩液密度与固含量之间具有良好的线性关系。相比密度, 浓缩液黏度能更灵敏地体现出不同批次浓缩液的性质差异。筛选出浓缩液的黏度和固含量为浓缩液关键性质。建立的二阶多项式模型 R^2 大于 0.97。建立了不等式组作为浓缩液质量控制标准, 实验验证结果表明, 模型预测性能较好, 建立的党参浓缩液的质量标准较为可靠。**结论** 建议增加黏度作为浓缩液品质的控制指标, 并建立综合考虑密度和黏度的浓缩液质量标准, 通过放行控制提高醇沉工艺效果及批次间一致性。

关键词: 中药醇沉; 浓缩液质量控制; 党参; 黏度; 党参炔苷; 葡萄糖; 果糖; 蔗糖; 总黄酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6012-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.008

Improvement and establishment of concentrate quality standard of concentrate quality control index for ethanol precipitation process of traditional Chinese medicine: A case study of *Codonopsis Radix*

PAN Jing-jing^{1,2}, REN Dan-dan^{1,2}, QU Hai-bin^{1,2,3}, GONG Xing-chu^{1,2,3}

1. Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
2. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Innovation Center in Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
3. Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321016, China

Abstract: Objective To improve the quality control index of concentrate before ethanol precipitation of traditional Chinese medicine and establish the quality standard of concentrate. **Methods** Multiple batches of Dangshen (*Codonopsis Radix*) concentrates were prepared to study the relationship between density and other properties of the concentrates. The lobetyolin recovery, mass percentage of concentrate fully mixed with ethanol solution and precipitate mass generated per gram concentrate were used as indicators of ethanol precipitation process. The membrane dispersion ethanol precipitation experiments were carried out to screen the critical properties of concentrates. The quantitative models between the above evaluation indicators and critical properties of concentrates were established. Based on the established models, the quality standard of *Codonopsis Radix* concentrates was established by using a prediction error propagation method and verified by experiments. **Results** There was a good linear relationship between density and solid content of concentrate. Compared with density, viscosity of concentrate could more sensitively reflect the property differences of different batches of concentrates. The viscosity and solid content were selected as the critical properties of the concentrates. R^2 values of the established second-order polynomial models were greater than 0.97. The verification experimental results showed that the prediction performance

收稿日期: 2022-04-14

基金项目: 国家中医药管理局创新团队与人才支持计划项目 (ZYXCXTD-D-202002)

作者简介: 潘晶晶, 硕士研究生, 研究方向为中药制药工程。E-mail: 21819006@zju.edu.cn

*通信作者: 龚行楚, 副教授, 研究方向为中药质量控制。E-mail: gongxingchu@zju.edu.cn

#共同第一作者: 任丹丹, 硕士研究生, 研究方向为中药制药工程。E-mail: 22019007@zju.edu.cn

of the models was good, and the established quality standard of *Codonopsis Radix* concentrates was reliable. **Conclusion** It was recommended to increase the viscosity as a quality control index of concentrates. By establishing the quality standard of concentrates that comprehensively consider density and viscosity, batch-to-batch consistency of ethanol precipitation process is expected to be improved.

Key words: ethanol precipitation of traditional Chinese medicine; concentrate quality control; *Codonopsis Radix*; viscosity; lobetyolin; glucose; fructose; sucrose; total flavone

《中国药典》2020年版一部通过规定药材和饮片质量标准,规定“制法”项,规定部分中间体质量标准,以及规定制剂质量标准^[1],体现了对中成药质量的全流程控制。该质量控制思路与国际公认的药品“质量源于设计”理念不谋而合^[2],即通过加强原料、中间体和制药过程控制,提高药品质量的控制水平。但是,《中国药典》2020年版一部中对中间体标准的规定明显少于对药材和制剂质量标准规定。目前,学术界和产业界对制药中间体的质量标准研究较少。

浓缩液是中药生产中常见的中间体,后续经常是干燥、沉淀或者与其他物料混合等工艺^[3-5]。工业生产中大多以密度作为指标控制浓缩终点。但工业生产中也观察到密度相同的浓缩液,后续处理所得产液性质相差较大的情况。这提示仅以密度作为浓缩液质量指标可能是不够的。

醇沉是中药浓缩液的下游工艺之一,能部分除去糖、蛋白质和盐类等强极性成分^[6-8],具有成本低、易操作、安全性高、除杂能力强等优点^[9-10]。为减少醇沉中活性成分包裹损失,工业中常用“慢加快搅”或长时间静置的方法^[11]。课题组前期提出以“与乙醇充分混合的浓缩液质量比例”(well-mixing ratio, WMR)作为定量描述包裹现象的指标^[12]; WMR值越接近于100%,说明包裹现象越少。本课题组采用微混合器加醇,能有效减少包裹损失现象^[13]。张寒等^[14]和闫安忆等^[15]采用了偏最小二乘和逐步回归等方法建立浓缩液和醇沉工艺评价指标的定量关系,进而发现浓缩液中其他理化性质也可能是影响醇沉工艺评价指标的关键物料属性。如果增加其他指标控制浓缩液品质,会要求新指标能够快速低成本地测量,以确保工业应用的可行性。党参醇沉是参芪扶正注射液的重要纯化工艺^[16]。本实验以党参醇沉前的浓缩液为研究对象,测定多批次浓缩液的理化性质,研究密度与其他性质的关系。进一步根据浓缩液理化性质和醇沉工艺评价指标的关系,确定浓缩液的关键性质。最后采用预测误差传播的方法建立党参浓缩液的质量标准,并根据所得标准进

行浓缩液质量控制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Rotavapor R-200型旋转蒸发仪,瑞士Buchi公司; 2 PB-20005II型平流泵,北京兴达科技发展有限公司; CT3001F型齿轮泵,保定瑞福流体科技有限公司; 03-1型磁力搅拌机,杭州仪表电机有限公司; DHG-9146A型烘箱,上海精宏实验设备有限公司; DDBJ-350型便携式电导率仪,杭州启威仪器有限公司; Cary60型紫外可见分光光度计,美国Agilent公司; DMA5000M型密度测量仪、AMVn型黏度测量仪,奥地利Anton Paar GmbH公司; Milli-Q型超纯水系统,美国Millipore公司; Agilent 1100型高效液相色谱仪,配备G1314C型VWD检测器、Agilent 1260型高效液相色谱仪,配备G4260B型ELSD检测器,美国Agilent公司。

1.2 试剂与材料

对照品D-果糖(批号200519,质量分数>99.5%)、柠檬黄(批号201206,质量分数>95.0%)均购自上海阿拉丁试剂有限公司;对照品D-葡萄糖(批号200917)购自上海生工生物工程有限公司,质量分数>99.8%;对照品蔗糖(批号200620)购自上海Sigma-Aldrich公司,质量分数>99%;对照品党参炔苷(批号200311)、芦丁(批号190623)购自上海融禾医药科技有限公司,质量分数均>98%。三乙胺购自上海阿拉丁试剂有限公司;乙腈购自德国默克股份有限公司;95%乙醇购自浙江常青化工有限公司;超纯水由Milli-Q型超纯水系统制备。党参药材来源和批号见表1。

2 方法

2.1 膜分散微混合器

课题组前期设计制作了膜分散微混合器^[13],能够实现乙醇和浓缩液的连续高效混合。膜分散微混合器材质为聚四氟乙烯,其结构和具体尺寸见之前的工作^[13],采用了平均孔径为18 μm的不锈钢膜。

2.2 党参浓缩液的制备

党参药材和水分别按1:8、1:6的比例加热

表 1 党参药材来源、批号及所得浓缩液的编号

Table 1 Source and batch number of *Codonopsis Radix* and number of concentrates

批号	药材来源	浓缩液编号	批号	药材来源	浓缩液编号
191022	亳州元丰堂农副产品经销有限公司	N6	190816	甘肃岷县易盛德中药材有限责任公司	N3
191025	亳州元丰堂农副产品经销有限公司	N14	190825	甘肃岷县易盛德中药材有限责任公司	N7
190929	亳州元丰堂农副产品经销有限公司	N9	190908	甘肃岷县易盛德中药材有限责任公司	N10
191006	亳州元丰堂农副产品经销有限公司	N2	190827	甘肃岷县易盛德中药材有限责任公司	N12
200423	亳州永刚饮片厂有限公司	N1	191018	山西潞州参源堂党参销售店	N15
200331	亳州永刚饮片厂有限公司	N5	191025	山西潞州参源堂党参销售店	N4
191221	亳州永刚饮片厂有限公司	N8	191007	山西潞州参源堂党参销售店	N13
190805	甘肃岷县易盛德中药材有限责任公司	N11			

回流提取 2 次，每次提取 0.5 h，滤过后合并滤液，通过旋转蒸发仪进行浓缩制得密度约为 1.2 g/mL 的浓缩液。所得浓缩液的编号见表 1。

2.3 实验设计

选择 N1、N2、N8、N9、N12、N14 共 6 批党参浓缩液，只改变浓缩液固含量，进行膜分散微混合器醇沉实验，实验装置图如图 1 所示。

使用平流泵、齿轮泵分别将乙醇溶液及党参浓缩液泵入微混合器中。收集出口混合物于锥形瓶中并置于搅拌机上搅拌 5 min 后滤过，收集上清液。实验后，依次用 0.05% Na₂CO₃ 溶液和乙醇洗涤该装置。其中，各批次浓缩液固含量分别为 50%、55%、60%。

固定工艺条件如下：醇料比为 1.5 : 1.0，浓缩液体积流量为 60 mL/min，乙醇体积分数为 95%，搅拌时间为 5 min。具体实验条件如表 2 所示。

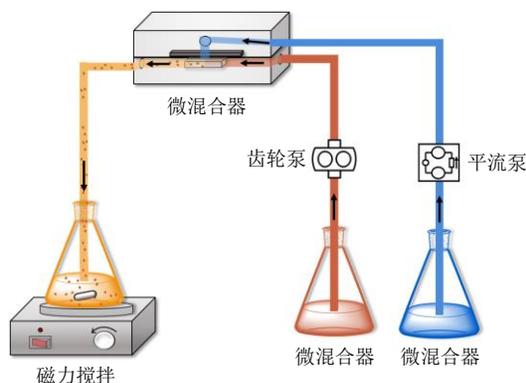


图 1 实验装置图

Fig. 1 Experimental device diagram

2.4 党参浓缩液中指标成分及相关物理参数的定量测定

2.4.1 党参炔苷含量测定

(1) 对照品溶液的制备：精密称取党参炔苷对照品适量，加 20% 乙腈溶解并定容至量瓶中，制成

表 2 不同性质浓缩液醇沉实验条件及结果

Table 2 Experimental conditions and results of ethanol precipitation of concentrates with different properties

编号	实验条件		实验结果			编号	实验条件		实验结果		
	浓缩液	浓缩液固含量/%	WMR/%	党参炔苷保留率/%	单位质量浓缩液产生沉淀质量/(g·g ⁻¹)		浓缩液	浓缩液固含量/%	WMR/%	党参炔苷保留率/%	单位质量浓缩液产生沉淀质量/(g·g ⁻¹)
1	N9	50	99.98	95.58	0.242	11	N12	55	99.95	93.57	0.461
2	N12	50	100.00	94.90	0.337	12	N2	55	99.15	93.08	0.499
3	N2	50	99.96	94.91	0.369	13	N14	55	98.45	90.57	0.519
4	N14	50	99.90	94.51	0.374	14	N1	55	98.28	90.39	0.562
5	N14	50	99.74	92.92	0.408	15	N8	55	98.16	89.10	0.614
6	N14	50	100.00	93.57	0.406	16	N9	60	85.67	84.09	0.366
7	N14	50	99.09	92.81	0.401	17	N12	60	84.02	78.24	0.605
8	N1	50	99.99	94.03	0.469	18	N2	60	81.81	76.04	0.666
9	N8	50	99.91	94.15	0.474	19	N1	60	80.07	73.45	0.716
10	N9	55	99.97	93.94	0.335						

0.465 mg/mL 党参炔苷对照品储备液。

(2) 供试品溶液的制备：精密量取适量党参醇沉上清液，加 20%乙腈溶解并定容至 2mL，摇匀，静置。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，取续滤液作为供试品溶液。

(3) 色谱条件：党参炔苷含量测定采用 HPLC 法^[15]。色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 10 μL ；检测波长 269 nm；流动相为乙腈-水 (20:80)，等度洗脱；体积流量为 1.0 mL/min。典型色谱图如图 2 所示。

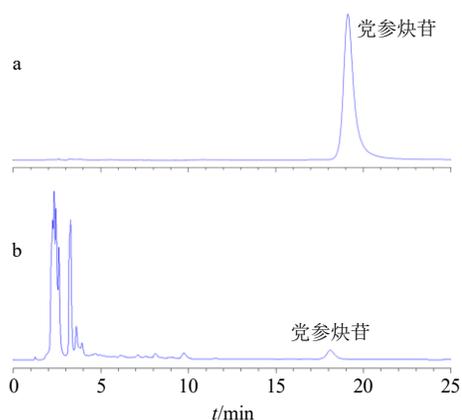


图 2 党参炔苷对照品 (a)、党参醇沉上清液 (b) 的典型 HPLC-UV 图

Fig. 2 Typical HPLC-UV chromatogram of lobetyolin reference substance (a) and *Codonopsis Radix* ethanol precipitation supernatant (b)

(4) 线性关系考察：精密量取党参炔苷对照品储备液，分别加入 20%乙腈稀释至 93.00、46.50、27.90、18.60、9.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照溶液，以上系列对照溶液进样检测后，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照溶液质量浓度为横坐标 (X) 制作标准曲线，测得党参炔苷的线性回归方程为 $Y=17.81 X-9.102$ ， $r=0.9997$ ，线性范围为 9.40~93.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在此范围内，党参炔苷质量浓度与峰面积线性关系良好。

(5) 精密度试验：取由党参醇沉上清液^[17]制备得到的供试品溶液，按“2.4.1 (3)”项下色谱条件重复进样 6 次，以党参炔苷峰面积计算精密度 RSD 为 1.3%，表明仪器的精密度良好。

(6) 重复性试验：用党参醇沉上清液^[17]分别制备 6 份供试品溶液，按“2.4.1 (3)”项下色谱条件进样检测，以党参炔苷质量浓度计算重复性 RSD 为 1.7%，表明该方法具有较好的重复性。

(7) 稳定性试验：取党参醇沉上清液^[17]制备得到的供试品溶液，分别于 0、3、6、9、12、15 h 按

“2.4.1 (3)”项下色谱条件进样检测，党参炔苷峰面积的 RSD 为 0.7%，表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

(8) 加样回收率试验：分别取已测定党参炔苷含量的由党参醇沉上清液^[17]制备得到的供试品 9 份，分为 3 组，每组 3 份。分别按照样品中质量与加入量之比为 1.0:0.8、1.0:1.0、1.0:1.2，精密加入党参炔苷对照品适量，加 20%乙腈定容至 2 mL，摇匀，静置，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液按“2.4.1 (3)”项下色谱条件进样检测，结果党参炔苷的平均加样回收率为 103.8%，RSD 为 1.56%，说明建立的分析方法准确，可用于党参炔苷含量的测定。

(9) 样品测定：将样品按“2.4.1 (2)”项中方法配制成供试品溶液，再按“2.4.1 (3)”项下色谱条件对样品进样检测，测定其中的党参炔苷含量。

2.4.2 葡萄糖、果糖和蔗糖含量测定

采用 HPLC-ELSD 法测定样品中葡萄糖、果糖和蔗糖的含量^[18]。

(1) 对照品溶液的制备：分别精密称取果糖、葡萄糖、蔗糖对照品适量，置 25 mL 量瓶中，用 85%乙腈超声溶解并定容，制成对照品贮备液。将贮备液定量稀释，制成系列不同质量浓度的混合对照品溶液。

(2) 供试品溶液的制备：分别取适量党参浓缩液以适量 85%乙腈为溶剂进行稀释定容。溶液经离心后，用 0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。

(3) 色谱条件：色谱柱为 XBridge BEH Amide 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；柱温为 34 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量为 0.9 mL/min，进样量为 5 μL 。流动相 A 为 0.3%三乙胺水溶液，流动相 B 是 0.3%三乙胺-乙腈溶液，梯度洗脱：0~37 min, 85%~76% B；37~38 min, 76%~60% B；38~48 min, 60%~100% B；后运行时间为 10 min。ELSD 操作参数如下：雾化器温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ ，蒸发器温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ ，气体体积流量为 1.8 L/min。典型色谱图如图 3 所示。

2.4.3 总黄酮含量测定 采用紫外分光光度法测定浓缩液中的总黄酮含量^[19]。定量移取浓缩液于 10 mL 容量瓶中，依次加入 5.0% NaNO₂ 溶液、10% Al(NO₃)₃ 溶液、1.0 mol/mL NaOH 溶液^[17]。用 50%乙醇定容至 10 mL，摇匀，于 510 nm 处测定其吸光度 (A) 值^[17]。以芦丁作为对照品，定量稀释后测定 A 值，以芦丁含量计算得样品中总黄酮含量。

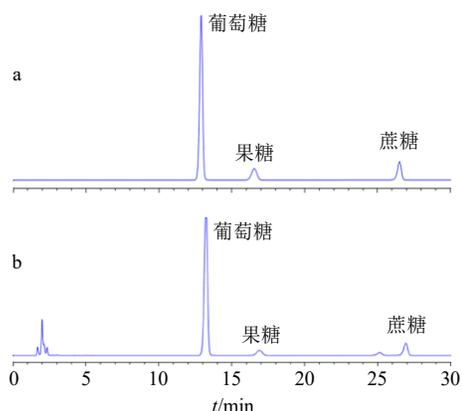


图 3 混合对照品 (a)、党参浓缩液 (b) 的典型 HPLC-ELSD 图

Fig. 3 Typical HPLC-ELSD chromatogram of reference substance (a) and *Codonopsis Radix* concentrates (b)

2.4.4 密度和黏度测定 浓缩液密度通过密度测量仪测定,不同固含量、不同温度下的浓缩液密度用 $\rho_{\text{温度}}^{\text{固含量}}$ 表示。浓缩液黏度通过黏度测量仪测定,使用落球黏度计,根据落球时间计算样品黏度。不同固含量、不同温度下的浓缩液黏度用 $\mu_{\text{温度}}^{\text{固含量}}$ 表示。

2.4.5 其他指标的测定

(1) 总固体含量测定:采用重量法^[13]。准确称取适量样品,置于恒定质量的称量瓶中,置于烘箱中,在 105 °C 下干燥至恒定质量后称定。重复 3 次。

(2) 电导率:将浓缩液用水稀释至总固含量为 2%,在 25 °C 下通过便携式电导率仪测量其电导率。

(3) 色素:以柠檬黄作为对照品,采用紫外可见分光光度计测定浓缩液中色素的含量^[20]。波长设置为 430 nm。浓缩液稀释后测定 A 值。以柠檬黄含量计算样品中色素含量。

2.5 数据处理

用课题组前期提出的 WMR 法表征醇沉过程中混合情况的好坏^[12]。WMR 值和党参炔苷保留率的计算方法分别见公式 (1)、(2)。

$$WMR = (m_1/m_0 + m_2S_2/m_0)/(S_0 + C_0/C_2 - 1) \quad (1)$$

$$\text{党参炔苷保留率} = m_2C_2/m_0C_0 \quad (2)$$

S_0 为总固体质量浓度, C_0 为党参炔苷的质量浓度, m_0 为醇沉中浓缩液用量, m_1 为乙醇溶液用量, m_2 为所得上清液的总质量, S_2 为上清液中总固体质量浓度, C_2 为上清液中党参炔苷质量浓度,浓缩液与乙醇混合越充分, WMR 值越接近 1

选择党参炔苷保留率、WMR 以及单位质量浓缩液产生沉淀质量作为醇沉工艺评价指标。采用多元线性回归法,用公式 (3) 建立工艺评价指标和浓缩液性质的定量模型,筛选出浓缩液关键性质。

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^{10} a_i X_i \quad (3)$$

Y 为平方根反正弦变化后的党参炔苷保留率、平方根反正弦变化后的 WMR 值、单位质量浓缩液产生沉淀质量, a_0 为常数项, a_i 为各项的偏回归系数, X_i 为浓缩液各性质

采用逐步回归法对模型进行简化,添加及删除模型中各项的显著性水平设为 0.1,模型中剩余的项认为是浓缩液关键性质。数据分析由 V 11.0.0 Design Expert (美国 Stat-Ease 公司) 软件完成。

用 2 阶多项式模型拟合工艺评价指标与关键浓缩液性质的定量模型,如公式 (4) 所示。通过向后逐步回归法简化方程, P 值设置为 0.10。

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_{c,i} + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_{c,i}^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_{c,i} X_{c,j} \quad (4)$$

b_0 为常数项, n 为浓缩液关键性质数目, b_i 、 b_{ii} 、 b_{ij} 为各项的偏回归系数, $X_{c,i}$ 、 $X_{c,j}$ 为浓缩液关键性质

3 结果

3.1 不同批次浓缩液的理化性质

不同来源、不同批号的党参药材制备所得 15 批党参浓缩液的理化性质见表 3。其中包括电导率 (Z_1 , 固含量 45%)、党参炔苷含量 (Z_2)、果糖含量 (Z_3)、葡萄糖含量 (Z_4)、蔗糖含量 (Z_5)、色素含量 (Z_6)、总黄酮含量 (Z_7)、密度 (固含量 45%, 25 °C, $\rho_{25\text{ °C}}^{45\%}$, Z_8)、黏度 (固含量 45%, 25 °C, $\mu_{25\text{ °C}}^{45\%}$, Z_9)。各批浓缩液中所测得的党参炔苷、葡萄糖、果糖、蔗糖、色素和总黄酮含量的总和为浓缩液总固体的 25.64%~73.00%,提示不同批次党参浓缩液化学组成相差较大。在相同温度和固含量下,15 批浓缩液密度的 RSD 为 1.078%,是所有指标中变化最小的,提示密度指标不适合用于体现不同批次药材所得浓缩液的差异。党参炔苷含量、蔗糖含量、色素含量和黏度的 RSD 均超过了 40%。

3.2 密度与浓缩液其他性质之间的关系

3.2.1 密度与浓缩液其他性质的相关性 计算了表 3 中浓缩液密度与浓缩液其他性质的 Pearson 相关系数,结果如表 4 所示。在检验水准 $\alpha=0.05$ 的情况下,认为浓缩液密度 (Z_8) 与电导率 (Z_1)、总黄酮含量 (Z_7) 均有正相关关系,与党参炔苷含量 (Z_2) 存在负相关关系。因为相关系数检验 P 值大于 0.05,所以认为浓缩液密度 (Z_8) 与果糖含量、葡萄糖含量、蔗糖含量、色素含量、黏度之间的线性相关关系不显著。

3.2.2 密度与浓缩液温度的关系 测定了 15 批浓缩

表3 浓缩液理化性质

Table 3 Physicochemical properties of concentrates

浓缩液	Z ₁ /(mS·cm ⁻¹)	Z ₂ /(μg·g ⁻¹)	Z ₃ /(mg·g ⁻¹)	Z ₄ /(mg·g ⁻¹)	Z ₅ /(mg·g ⁻¹)	Z ₆ /(mg·g ⁻¹)	Z ₇ /(mg·g ⁻¹)	Z ₈ /(g·mL ⁻¹)	Z ₉ /(mPa·s)
N1	20.08	341.8	306.9	79.50	56.27	4.138	3.709	1.216	101.88
N2	22.20	453.0	343.0	89.43	31.18	4.011	5.107	1.203	59.41
N3	19.91	313.8	324.8	96.86	49.39	1.635	3.632	1.205	46.43
N4	23.00	405.5	284.0	70.12	117.62	1.370	4.204	1.213	41.82
N5	21.10	431.5	174.1	56.64	19.49	1.962	3.803	1.210	101.45
N6	21.60	434.9	308.3	75.01	103.80	1.586	4.296	1.214	50.74
N7	18.61	684.0	379.6	61.14	147.60	1.584	5.276	1.209	78.30
N8	18.09	351.3	373.4	90.81	75.40	2.403	2.794	1.187	111.66
N9	24.00	18.5	585.9	136.72	0.00	1.526	5.875	1.226	19.36
N10	20.10	542.2	409.4	66.75	138.51	1.480	3.672	1.213	56.55
N11	19.44	391.3	336.7	102.21	49.21	3.876	4.444	1.187	59.80
N12	16.58	589.0	438.8	61.96	154.14	0.829	2.859	1.190	31.06
N13	21.40	144.2	504.1	106.94	56.36	2.916	6.029	1.232	38.41
N14	18.98	294.8	450.7	96.14	68.65	2.588	4.238	1.212	87.60
N15	20.40	137.2	444.5	92.97	60.17	2.380	4.112	1.217	41.32
平均值	20.37	368.9	377.6	85.54	75.18	2.286	4.270	1.209	61.72
标准差	1.93	175.6	99.9	21.41	47.14	1.040	0.960	0.013	28.17
RSD/%	9.50	47.59	26.45	25.02	62.70	45.51	22.49	1.078	45.64

表4 密度 (Z₈) 与浓缩液的部分其他性质的 Pearson 相关系数及其检验的 P 值

Table 4 Pearson correlation coefficient and P value between density (Z₈) and some other properties of concentrates

理化性质	Pearson 相关系数	P 值	理化性质	Pearson 相关系数	P 值
Z ₁	0.649	0.009	Z ₅	-0.237	0.395
Z ₂	-0.522	0.046	Z ₆	-0.064	0.821
Z ₃	0.338	0.218	Z ₇	0.642	0.010
Z ₄	0.279	0.315	Z ₉	-0.306	0.267

液密度与温度的关系, 结果如图4所示。浓缩液的密度与温度是线性关系, 且随温度的上升而下降。用线性公式 $y=c_0x+c_1$ 拟合, 结果如表5所示, 各方程 R^2 均大于 0.99, 拟合效果较好。

3.2.3 密度与浓缩液固含量的关系 选择理化性质相差较大的2批浓缩液 N1 和 N12, 改变固含量测定其密度, 结果见图5。可以看到, 浓缩液的密度随固含量的提高而增大, 相同固含量的不同批次浓缩液在相同温度下的密度差别较小。尝试用线性方程 $y=d_0x+d_1$ 拟合浓缩液密度与固含量, 得 $d_0=0.517\pm 0.009$, $d_1=0.973\pm 0.005$, $R^2=0.995$ 。从结果来看, 浓缩液固含量和密度之间的线性关系相当

好, 提示浓缩液固含量和密度指标在很大程度上可以相互替代。黄慧敏等^[21]研究浓缩液固含量和密度之间的关系时, 也得到类似结论。考虑到浓缩液密度大小受实验室温度影响, 所以后续实验中以固含量代替密度。

3.3 浓缩液关键性质筛选

不同性质浓缩液的醇沉实验结果如表2所示。由于 WMR 值、党参炔苷保留率均为百分率数据, 所以建模前将 WMR 值、党参炔苷保留率进行平方根反正弦变换。采用公式(3)对实验结果进行处理, 建立浓缩液性质与平方根反正弦变化后的 WMR 值 (Y_1)、平方根反正弦变化后的党参炔苷保留率 (Y_2) 和单位质量浓缩液产生沉淀质量 (Y_3) 的定量模型, 进而识别出浓缩液关键性质。

公式(3)是一个多元线性回归模型, 为了避免自变量之间的多重共线性现象, 与密度具有较高相关性的电导率、总黄酮和党参炔苷含量不参与建模。逐步回归后所得偏回归系数及方差分析结果如表6所示。各模型的显著水平 $P<0.0001$, 说明模型显著。模型 R^2 均大于 0.75, 说明可以解释大部分变异。根据模型结果可知, 浓缩液的关键性质为固含量和黏度。

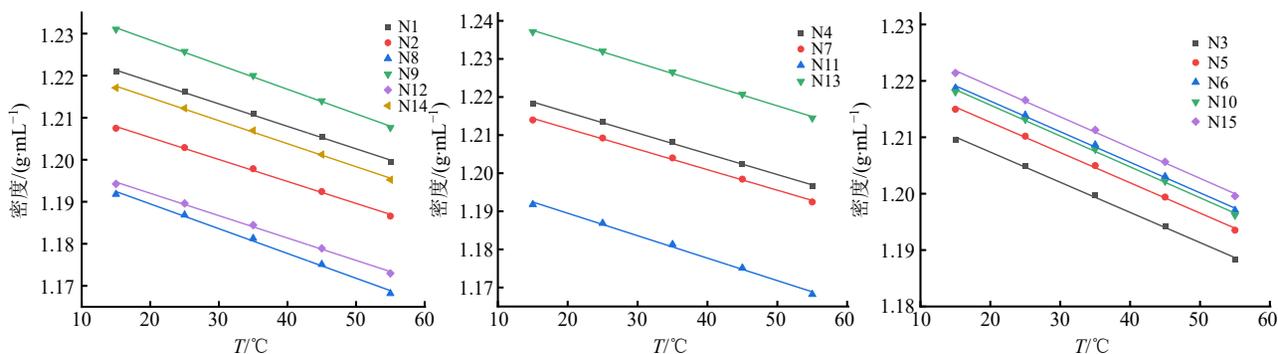


图4 浓缩液密度随温度变化

Fig. 4 Concentrate density changes with temperature

表5 密度随温度变化的拟合结果

Table 5 Fitting results of density and temperature

浓缩液	$c_0/(\times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{C}^{-1})$	$c_1/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R^2	浓缩液	$c_0/(\times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{C}^{-1})$	$c_1/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R^2
N1	-5.347 ± 0.136	1.229 ± 0.001	0.998 1	N9	-5.855 ± 0.121	1.241 ± 0.001	0.998 7
N2	-5.225 ± 0.140	1.216 ± 0.001	0.997 8	N10	-5.475 ± 0.134	1.226 ± 0.001	0.997 6
N3	-5.346 ± 0.137	1.218 ± 0.001	0.998 0	N11	-5.896 ± 0.227	1.201 ± 0.001	0.995 6
N4	-5.442 ± 0.130	1.227 ± 0.001	0.998 2	N12	-5.323 ± 0.145	1.203 ± 0.001	0.997 8
N5	-5.369 ± 0.125	1.223 ± 0.001	0.997 8	N13	-5.661 ± 0.254	1.246 ± 0.001	0.998 5
N6	-5.422 ± 0.138	1.227 ± 0.001	0.997 6	N14	-5.475 ± 0.133	1.226 ± 0.001	0.997 6
N7	-5.386 ± 0.140	1.222 ± 0.001	0.997 9	N15	-5.456 ± 0.139	1.230 ± 0.001	0.997 4
N8	-5.900 ± 0.227	1.202 ± 0.001	0.995 6				

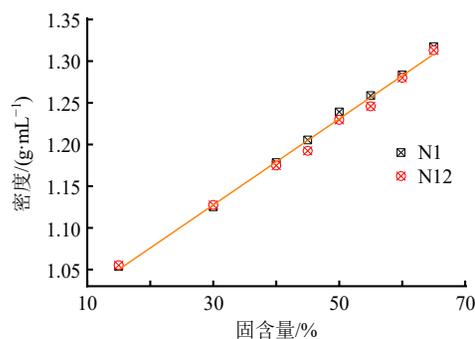


图5 浓缩液密度随固含量变化

Fig. 5 Concentrate density changes with solid content

密度变化能够较准确地体现出浓缩液中水含量变化，所以工业生产中以密度作为指标来控制浓缩终点是很合理的。考虑到密度与固含量的高相关性，表6中自然地筛选出固含量作为关键性质。但是从表6结果来看，仅以密度作为浓缩液质量指标是不够的。黏度同样是与醇沉效果相关的重要指标。考虑到黏度也可以采用在线黏度计测定，在实际工业生产中能够实现快速低成本的检测，所以建议工业生产中同时将密度和黏度作为浓缩液关键指标进行控制。

表6 多元线性回归模型的偏回归系数及方差分析

Table 6 Partial regression coefficient and variance analysis of multiple linear regression model

模型项	Y_1		Y_2		Y_3	
	偏回归系数	P 值	偏回归系数	P 值	偏回归系数	P 值
常量	3.372 8	-	2.592 2	-	-1.073 4	-
固含量	-	-	-0.000 7	0.032 0	0.002 5	<0.000 1
黏度	-0.036 0	<0.000 1	-0.023 8	<0.000 1	0.025 5	<0.000 1
R^2	0.789 3		0.833 6		0.853 1	
R_{adj}^2	0.776 9		0.812 8		0.833 6	
P 值	<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1	

3.4 浓缩液关键性质对膜分散党参醇沉工艺效果的影响

将浓缩液的黏度取自然对数，WMR 值、党参炔苷保留率进行平方根反正弦变换，采用公式(4)研究浓缩液固含量 (X_1)、浓缩液黏度的自然对数 (X_2) 与平方根反正弦变化后的 WMR 值 (Y_1)、平方根反正弦变化后的党参炔苷保留率 (Y_2)、单位质量浓缩液产生沉淀质量 (Y_3) 的定量关系，建模结果如表 7 所示。模型的 P 值均小于 0.05，说明模型显著；模型 R^2 均大于 0.90，说明可以解释大部分变

异。各指标的等高线图如图 6 所示。WMR 值和党参炔苷保留率随浓缩液固含量、浓缩液黏度的增加而降低，说明较大的浓缩液黏度及固含量都不利于浓缩液和乙醇的充分混合。单位质量浓缩液产生沉淀的质量随浓缩液固含量、浓缩液黏度的增加而增加，说明浓缩液黏度越大，其所含的不溶于乙醇的可沉淀物质越多。

3.5 浓缩液质量标准的建立

浓缩液是中药生产中重要的中间体，其质量影响后续的醇沉等精制过程，因此，建立浓缩液的质量

表 7 二阶多项式回归模型的偏回归系数及方差分析

Table 7 Partial regression coefficients and variance analysis of second-order polynomial regression models

模型项	Y_1		Y_2		Y_3	
	偏回归系数	P 值	偏回归系数	P 值	偏回归系数	P 值
常量	-13.240	-	-8.330	-	0.209	-
X_1	58.345	<0.000 1	36.389	<0.000 1	-0.499	<0.000 1
X_2	-0.044	0.000 8	0.215	<0.000 1	-0.286	<0.000 1
X_1X_2	-	-	-0.479	0.005 8	0.775	0.054 3
X_1^2	-56.826	<0.000 1	-33.744	<0.000 1	-	-
R^2	0.975 4		0.982 5		0.916 6	
R_{adj}^2	0.970 4		0.977 5		0.900 0	
P 值	<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1	

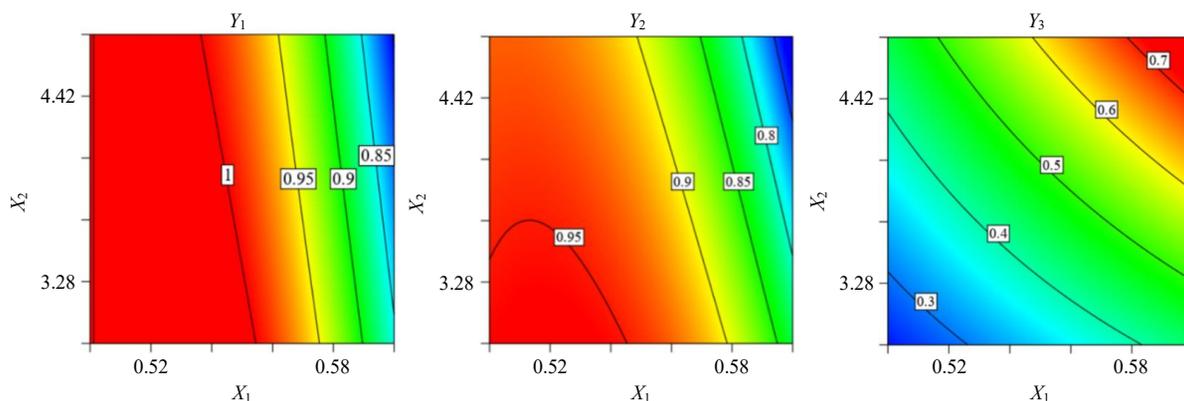


图 6 WMR 值 (Y_1)、党参炔苷保留率 (Y_2) 和单位质量浓缩液产生沉淀质量 (Y_3) 的等高线图

Fig. 6 Contour maps of WMR value (Y_1), lobetyolin recovery (Y_2) and precipitate mass generated per gram concentrate (Y_3)

量标准非常重要。本研究采用 WMR 值、党参炔苷保留率以及单位质量浓缩液产生沉淀质量为指标建立党参浓缩液的质量标准。以固含量和浓缩液黏度对平方根反正弦变化后的 WMR (Y_1)、平方根反正弦变化后的党参炔苷保留率 (Y_2)、单位质量浓缩液产生沉淀质量 (Y_3) 建模，所建立的模型如公式(5)所示。

$$Y_1 = -13.240 + 58.345 X_1 - 0.044 X_2 - 56.826 X_1^2$$

$$Y_2 = -8.330 + 36.389 X_1 + 0.215 X_2 - 0.479 X_1 X_2 - 33.744 X_1^2$$

$$Y_3 = 0.209 - 0.499 X_1 - 0.286 X_2 + 0.775 X_1 X_2 \quad (5)$$

采用预测误差传播的方法对浓缩液质量标准进行计算^[22]。假设残差服从均值为零的正态分布，正态分布的标准差与残差相同，即分别为 0.024 9、0.013 1、0.039 4。若要求 WMR 值大于 95% 的概率为 90%，党参炔苷保留率大于 90% 的概率为 90%，单位质量浓缩液产生沉淀质量大于 0.300 g/g 的概率为 90%，则根据公式(5)建立不等式组(6)。

$$Y_1 = -13.240 + 58.345 X_1 - 0.044 X_2 - 56.826 X_1^2 - Z_{0.1} \times$$

$$SD_{residual}^1 \geq 1.345$$

$$Y_2 = -8.330 + 36.389 X_1 + 0.215 X_2 - 0.479 X_1 X_2 - 33.744$$

$$X_1^2 - Z_{0.1} \times SD_{residual}^2 \geq 1.249$$

$$Y_3 = 0.209 - 0.499 X_1 - 0.286 X_2 + 0.775 X_1 X_2 - Z_{0.1} \times$$

$$SD_{residual}^3 \geq 0.300 \quad (6)$$

其中 $Z_{0.1}$ 为标准正态分布的临界值, 即 1.282。

将不等式组 (6) 化简得不等式组 (7)。

$$58.345 X_1 - 0.044 X_2 - 56.826 X_1^2 - 14.6169 \geq 0$$

$$36.389 X_1 + 0.215 X_2 - 0.479 X_1 X_2 - 33.744 X_1^2 - 9.5958 \geq 0$$

$$-0.499 X_1 - 0.286 X_2 + 0.775 X_1 X_2 - 0.1415 \geq 0 \quad (7)$$

符合不等式组 (7) 的为合格浓缩液, 应予以放行直接投入醇沉工艺, 不符合不等式 (7) 的为不合格浓缩液, 可在合规的情况下稀释后再投入醇沉工艺生产。使用 MATLAB (R2016a, 美国 The Math Works 公司) 依据不等式 (7) 做图, 浓缩液性质的具体可行范围如图 7 所示。

3.6 浓缩液质量控制的验证实验

选择编号为 N5、N11、N15 的浓缩液进行验证实验, 将 N5 浓缩液的固含量稀释至 55%, N15 浓缩液固含量稀释至 53%, N11 的浓缩液分别稀释至 52% 和 56%。进行 4 组验证实验 (V1~V4)。将浓缩液性质代入不等式组 (7), 固含量为 53% 的 N15、固含量为 52% 的 N11 满足不等式组 (7), 是合格浓缩液。固含量为 55% 的 N5、固含量为 56% 的 N11

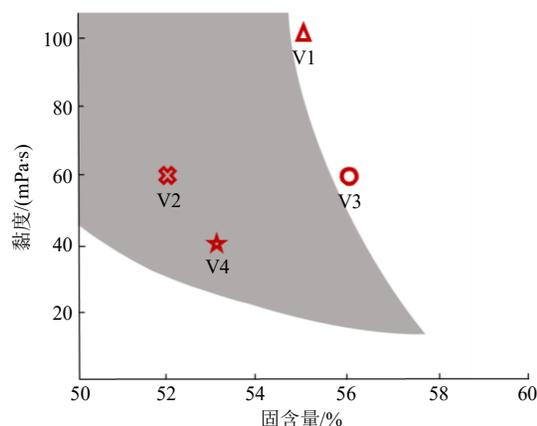


图 7 浓缩液性质的可行范围及验证点

Fig. 7 Feasible range and verification points of concentrate properties

不满足不等式组 (7), 为不合格浓缩液。验证实验条件及结果分别见表 8 及图 7 所示。从验证实验结果可知, 预测值和实验值接近, 说明所建模型有较好的预测性能。V1 和 V3 实验所得的党参炔苷保留率低于 90%, 未达到预设标准。V2 和 V4 的实验所得结果符合预设标准。说明采用不等式组 (7) 能够较好地控制浓缩液品质。

3.7 浓缩液黏度和浓缩液部分其他性质之间的相关性

表 9 列出了浓缩液黏度与浓缩液部分其他性质之间 Pearson 相关系数及 P 值。发现黏度 (Z_9) 与其

表 8 验证实验点条件及工艺指标考察结果

Table 8 Verification experimental points conditions and process index investigation results

试验点	是否满足不等式	浓缩液	浓缩液固含量/%	固含量 45%、25 °C 下黏度/(mPa·s)	党参炔苷保留率/%		WMR/%		单位质量浓缩液产生沉淀质量/(g·g ⁻¹)	
					实测值	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值
					V1	否	N5	55	101.45	87.51
V2	是	N11	52	59.80	93.77	93.84	100.21	99.76	0.430	0.428
V3	否	N11	56	59.80	87.48	88.90	97.49	97.13	0.531	0.535
V4	是	N15	53	41.32	93.82	93.65	100.35	99.79	0.419	0.409

表 9 浓缩液黏度 (Z_9) 与浓缩液部分其他性质之间 Pearson 相关系数及 P 值

Table 9 Pearson correlation coefficient and P value between viscosity and some other properties of concentrates

理化性质	Pearson 相关系数	P 值	理化性质	Pearson 相关系数	P 值
Z_1	-0.372	0.172	Z_5	-0.073	0.769
Z_2	0.291	0.293	Z_6	0.382	0.160
Z_3	-0.528	0.043	Z_7	-0.396	0.144
Z_4	-0.361	0.186	Z_8	-0.306	0.267

他测得的性质相关性不强 ($P > 0.1$)。表 3 中不同批次浓缩液黏度相差较大 ($RSD = 45.64\%$), 说明影响浓缩液黏度的可能是某些本实验中未检测的物质, 比如一些相对分子质量较大的成分。这也意味着浓缩液黏度提供了一些其他检测指标未能反映出来的信息, 检测黏度会有利于全面表征出不同批次浓缩液中固体成分的差异。

3.8 浓缩液固含量与黏度的关系

选择 2 批浓缩液 N1 和 N12, 改变固含量测定其黏度, 并尝试用指数型关系式 $y = f_0 \times e^{f_1 x}$ (f_0, f_1 为

常数项)进行拟合,拟合结果如图8和表10所示。浓缩液的黏度随固含量的增加而增大。在固含量较大时,黏度随固含量的增加上升明显。与浓缩液N12相比,浓缩液N1的黏度随固含量的增加上升较快。

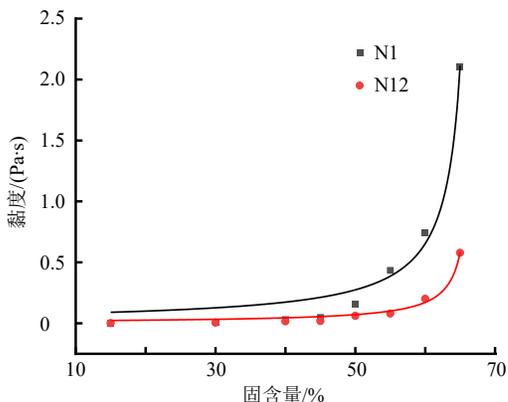


图8 浓缩液黏度随固含量变化

Fig. 8 Concentrate viscosity changes with solid content

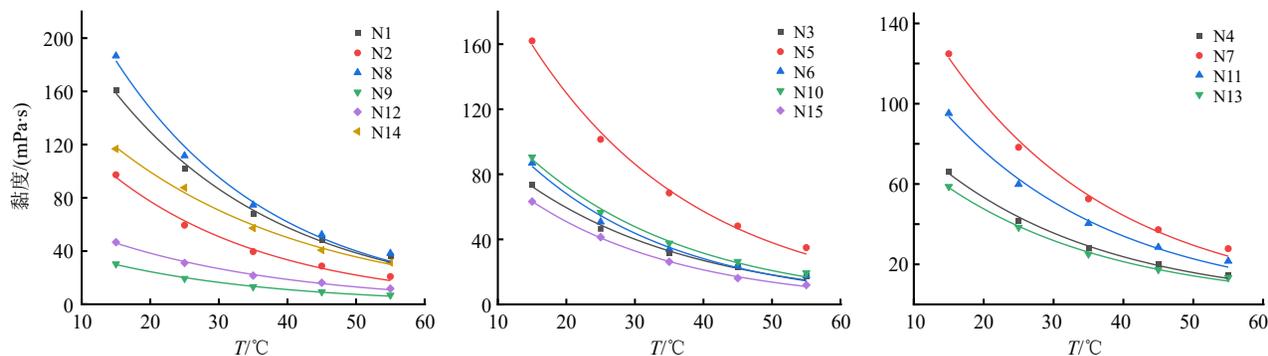


图9 浓缩液黏度随温度变化

Fig. 9 Concentrate viscosity changes with temperature

表11 黏度随温度变化的拟合结果

Table 11 Fitting results of viscosity and temperature

浓缩液	$g_0/(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$g_1/^\circ\text{C}^{-1}$	R^2	浓缩液	$g_0/(\text{mPa}\cdot\text{s})$	$g_1/^\circ\text{C}^{-1}$	R^2
N1	290.6 ± 14.0	-0.0404 ± 0.0020	0.9948	N9	54.3 ± 2.2	-0.0398 ± 0.0017	0.9962
N2	179.1 ± 10.8	-0.0420 ± 0.0025	0.9923	N10	166.5 ± 7.8	-0.0416 ± 0.0019	0.9953
N3	131.0 ± 7.2	-0.0395 ± 0.0022	0.9930	N11	171.7 ± 8.8	-0.0404 ± 0.0021	0.9940
N4	119.7 ± 5.6	-0.0404 ± 0.0019	0.9951	N12	78.9 ± 3.1	-0.0360 ± 0.0016	0.9958
N5	295.0 ± 13.4	-0.0409 ± 0.0018	0.9956	N13	106.4 ± 4.1	-0.0402 ± 0.0016	0.9967
N6	164.9 ± 12.3	-0.0442 ± 0.0032	0.9892	N14	197.3 ± 8.3	-0.0342 ± 0.0016	0.9949
N7	226.4 ± 11.4	-0.0408 ± 0.0021	0.9944	N15	122.1 ± 2.8	-0.0437 ± 0.0010	0.9990
N8	350.7 ± 21.8	-0.0434 ± 0.0026	0.9922				

测定了浓缩液的理化性质。发现相同温度和固含量下,密度的RSD是所有指标中变化最小的,提示密度不适合用于体现不同批次浓缩液的差异。研究了浓缩液各性质与密度的关系,用线性方程拟合获得了浓缩液密度与温度、固含量的定量关系。发现浓

表10 黏度随固含量变化的拟合结果

Table 10 Fitting results of viscosity and solid content

浓缩液批号	$f_0/(\text{mPa}\cdot\text{s})$	f_1	R^2
N1	0.0140 ± 0.0090	18.319 ± 1.007	0.9945
N12	0.0017 ± 0.0010	19.594 ± 1.072	0.9947

3.9 浓缩液黏度与温度的关系

测定了15批浓缩液黏度与温度的关系,结果如图9所示。浓缩液黏度随温度的上升而下降。用指数公式 $y=g_0 \times e^{g_1 x}$ (g_0 、 g_1 为常数项)拟合,结果如表11所示,各方程 R^2 均大于0.99,拟合效果较好。根据图9,当温度较低时,不同批次的浓缩液黏度相差较大;随着温度的升高,不同批次浓缩液黏度的差距变小。

4 讨论

本研究首先制备了不同批次的党参浓缩液,并

缩液固含量和密度间的线性关系很好。

改变浓缩液的固含量进行膜分散醇沉实验,将党参炔苷保留率、WMR值、单位质量浓缩液产生沉淀质量作为工艺评价指标,筛选确定浓缩液固含量及黏度为浓缩液关键性质。随后建立了浓缩液固

含量及黏度与工艺评价指标的定量模型,模型 R^2 均大于0.90。基于所建模型,采用预测误差传播的方法建立了浓缩液的质量标准,符合不等式组的为合格浓缩液,可予以放行投入醇沉工艺;不符合不等式组的为不合格浓缩液。浓缩液质量控制的验证实验结果表明,模型有较好预测性能,所制定的浓缩液质量标准较为可靠。浓缩液黏度随着固含量的增加而增加,随温度的提高而降低,与本研究检测的其他浓缩液理化性质相关性较小。目前工业生产中大多仅控制醇沉前浓缩液密度或体积,本研究建议增加黏度作为浓缩液品质的控制指标,从而能在药材批次变化时更好地表征出浓缩液质量差异。

本研究的不足之处包括:第一,在测定党参浓缩液时并未检测所有可能的指标,包括多糖含量和蛋白质含量等。如果获得更多指标进行分析,有可能使筛选得到的浓缩液关键性质改变。第二,中药种类多且成分复杂,不同中药水煎浓缩液的性质指标可能差异较大,黏度能否用于完善其他中药浓缩液的质量标准仍有待进一步考察。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 3-1902.
- [2] Pramod K, Tahir M A, Charoo N A, *et al.* Pharmaceutical product development: A quality by design approach [J]. *Int J Pharm Investig*, 2016, 6(3): 129-138.
- [3] Sun L Q, Wang S Y, Li Y J, *et al.* Impact of parameter fluctuations on the performance of ethanol precipitation in production of Re Du Ning Injections, based on HPLC fingerprints and principal component analysis [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(1): 73-80.
- [4] 念波, 石兴云, 刘静, 等. 应用响应面设计优化黄精速溶茶加工工艺 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2019, 34(2): 297-302.
- [5] 李星, 王雪慧, 蒋鹏娜, 等. 平喘颗粒提取工艺的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3150-3153.
- [6] 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.
- [7] Ku Y, Jansen O, Oles C J, *et al.* Precipitation of inulins and oligoglucoses by ethanol and other solvents [J]. *Food Chem*, 2003, 81(1): 125-132.
- [8] Boulet M, Britten M, Lamarche F. Dispersion of food proteins in water-alcohol mixed dispersants [J]. *Food Chem*, 2001, 74(1): 69-74.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 刘苗, 于筛成, 张虹, 等. 中药醇沉工艺及设备浅析 [J]. 中成药, 2007, 29(8): 1202-1204.
- [12] Tai Y N, Pan J J, Qu H B, *et al.* An index for quantitative evaluation of the mixing in ethanol precipitation of traditional Chinese medicine [J]. *Separations*, 2021, 8(10): 181.
- [13] Pan J J, Shao J Y, Qu H B, *et al.* Ethanol precipitation of *Codonopsis Radix* concentrate with a membrane dispersion micromixer [J]. *J Clean Prod*, 2020, 251: 119633.
- [14] 张寒, 闫安忆, 龚行楚, 等. 丹参注射液生产中一次醇沉上清液浓缩工艺质控指标研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1436-1440.
- [15] 闫安忆, 龚行楚, 瞿海斌. 一种中药醇沉前浓缩液关键质量控制指标的辨析方法 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1558-1563.
- [16] 罗雨. 近红外光谱法在参芪扶正注射液醇沉工艺质控中的应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [17] 许之麟. 基于 QbD 理念的党参水提醇沉工艺研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [18] Shao J Y, Cao W, Qu H B, *et al.* A novel quality by design approach for developing an HPLC method to analyze herbal extracts: A case study of sugar content analysis [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198515.
- [19] Chen Y J, Wang J, Wan D R. Determination of total flavonoids in three *Sedum* crude drugs by UV-Vis spectrophotometry [J]. *Pharmacogn Mag*, 2010, 6(24): 259-263.
- [20] 许之麟, 黄文华, 龚行楚, 等. 设计空间法优化党参一次醇沉工艺 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(22): 4411-4416.
- [21] 黄慧敏, 张爱玲, 温伍玖, 等. 基于近红外光谱技术的复方大黄汤浓缩液同步快速检测 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 126-132.
- [22] Gong X C, Guo J L, Pan J J, *et al.* The development of *Fructus Corni* quality standard considering the effects of processing [J]. *Chin J Chem Eng*, 2021, 29(1): 77-84.

[责任编辑 郑礼胜]