

• 药剂与工艺 •

基于质量源于设计理念的丹参浓缩膏石硫工艺优化研究

李文竹¹, 张禄权², 李白玲², 张庆捷², 赵芳¹, 陈泽麒¹, 瞿海斌^{1*}

1. 浙江大学药学院 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

2. 贵州拜特制药有限公司, 贵州 贵阳 550008

摘要: **目的** 基于质量源于设计理念优化了丹参川芎嗪注射液前处理过程中丹参浓缩膏的石硫工艺。**方法** 使用鱼刺图法对丹参浓缩膏石硫工艺涉及的各个参数进行了初步风险评估, 筛选出了9个潜在关键工艺参数(critical process parameter, CPP), 即石灰乳质量分数、加石灰乳速度、搅拌速度、加石灰乳后搅拌时间、硫酸质量分数、加酸速度、加酸后搅拌时间、静置时间和静置温度。采用 Plackett-Burman (PB) 实验设计法对9个潜在 CPP 进行进一步筛选, 确定了石灰乳质量分数、加石灰乳后搅拌时间、加酸后搅拌时间和静置时间为石硫工艺的 CPP。采用中心复合实验设计法建立 CPP 和关键质量属性之间的偏最小二乘回归模型, 根据石硫上清液中各指标需要达到的水平, 通过计算获得基于概率的设计空间。**结果** 推荐的石硫工艺操作空间为石灰乳质量分数 12.0%~13.0%, 加石灰乳后搅拌时间 40~50 min, 加酸后搅拌时间 30~35 min, 静置时间 16~20 h。**结论** 在设计空间内进行操作有助于提高石硫工艺中间体质量一致性, 本研究对实际工业生产具有一定参考价值。

关键词: 质量源于设计; 丹参; 丹参川芎嗪注射液; 石硫工艺; 设计空间法; 鱼刺图法; 丹参浓缩膏; 风险评估; 关键工艺参数; Plackett-Burman 实验设计; 中心复合实验设计; 关键质量属性; 质量一致性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2302-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.008

Optimization of lime milk-sulfuric acid process of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* aqueous concentrate based on quality by design concept

LI Wen-zhu¹, ZHANG Lu-quan², LI Bai-ling², ZHANG Qing-jie², ZHAO Fang¹, CHEN Ze-qi¹, QU Hai-bin¹

1. Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Guizhou Baite Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550008, China

Abstract: **Objective** To optimize the lime milk-sulfuric acid process of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR) aqueous concentrate in the pretreatment of the manufacture of Danshen Chuanxiongqin Injection (DCI) based on the quality by design (QbD) concept. **Methods** Fishbone diagram method was applied to conduct preliminary risk assessment of various process parameters in lime milk-sulfuric acid process of SMRR aqueous extracts. Nine potential critical process parameters (CPP), including mass fraction of lime milk, flow rate of the lime milk addition, stirring speed, stirring time after lime milk addition, mass fraction of sulfuric acid, flow rate of the acid addition, stirring time after acid addition, standing time, and standing temperature, were identified. Plackett-Burman (PB) experiment design method was used to further screen the nine potential CPPs. As the result, the mass fraction of lime milk, stirring time after lime milk addition, stirring time after acid addition, and the standing time were filtered as CPPs of the lime milk-sulfuric acid process. A partial least squares regression models of critical process parameters and critical quality attributes were established using the central composite design and the design space methodology. **Results** The recommended operation space of the lime milk-sulfuric acid process in the pretreatment of the manufacture of DCI was as follow: mass fraction of lime milk of 12.0%—13.0%, stirring time after lime milk addition of 40—50 min, stirring time after acid addition of 30—35 min, and standing time of 16—20 h. **Conclusion**

收稿日期: 2019-01-11

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201011-002)

作者简介: 李文竹(1996—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药科学与工程。Tel: 13372573887 E-mail: 11819027@zju.edu.cn

*通信作者 瞿海斌, 博士生导师, 从事中药制药过程质量控制研究。Tel: (0571)88208428 E-mail: quhb@zju.edu.cn

Operation in the design space is helpful to improve the consistency of lime milk-sulfuric acid process. This study is of valuable reference to actual industrial production.

Key words: quality by design; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; Danshen Chuanxiongqin Injection; lime milk-sulfuric acid purifying process; design space; fishbone diagram; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* aqueous concentrate; risk assessment; critical process parameters; Plackett-Burman design; central composite design; critical quality attribute; quality consistency

丹参川芎嗪注射液 (Danshen Chuanxiongqin Injection, DCI) 是由丹参素及盐酸川芎嗪配伍制成的复方制剂, 临床上主要用于闭塞性脑血管疾病及其他缺血性心血管疾病^[1-8]。DCI 的制备工艺主要是将丹参饮片经过提取、浓缩、碱沉酸溶、醇沉等一系列的单元操作后获得丹参素含量较高的丹参提取液。碱沉酸溶处理法简称石硫法, 是用石灰乳和硫酸处理中药水提液, 从而制备中药注射剂的一种方法^[9]。目前, 石硫工艺优化方法尚未得到系统的研究, 相应研究几乎未见报道, 仅有沈金晶等^[10]采用设计空间法优化了金银花水提液的石灰乳沉淀工艺, 后续酸溶工艺仍待研究。质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念现已广泛应用于化学药和生物药生产工艺的研究开发^[11], QbD 理念也在中药生产工艺研究中得到了应用^[12-20]。本研究基于 QbD 理念, 应用风险分析、试验设计等方法研究 DCI 制备过程中的石硫工艺, 建立关键工艺参数 (critical process parameter, CPP) 的设计空间。

1 仪器与试药

1.1 仪器

85-1 磁力搅拌器, 杭州仪表电机有限公司; XS105、AB204-N 型电子分析天平、SevenMulti pH 型综合测试仪, 梅特勒-托利多上海有限公司; SE6001 型电子天平, 奥豪斯仪器有限公司; Cary60 型紫外-可见分光光度计, Agilent 科技有限公司; Milli-Q 型超纯水机, 美国 Millipore 公司; JJ-IA 型数显测速电动搅拌器, 常州润华电器有限公司; BT300-2J 型蠕动泵, 保定兰格恒流泵有限公司; J-26XPI 型高速离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司; DNP-9272 型电热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, Thermo Fisher 科技有限公司; Waters Acquity™ UPLC 超高效液相色谱仪, Waters 科技有限公司; Agilent1100 型高效液相色谱仪, 配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、ChemStation 工作站, Agilent 科技有限公司。

1.2 试药

丹参提取液浓缩液, 批号 R030109304, 贵州拜

特制药有限公司提供; 对照品丹参素钠 (salvianic acid A sodium, DSS, 批号 171027)、原儿茶醛 (protocatechuic acid, PA, 批号 171129)、迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA, 批号 171000)、紫草酸 (lithospermic acid, LA, 批号 170825)、丹酚酸 B (salvianolic acid B, SaB, 批号 171102)、丹酚酸 A (salvianolic acid A, SaA, 批号 170920) 均购自上海融禾医药科技有限公司; 氢氧化钙 (批号 20170714)、硫酸 (批号 20171201)、D-葡萄糖对照品 (批号 20141121), 均购自国药集团化学试剂有限公司; 苯酚, 批号 B1408006, 美国阿拉丁工业公司; 乙腈、甲醇、甲酸、乙酸为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; 去离子水由纯化水系统 (Milli-Q Synthesis, Millipore 公司) 制备得到。

2 方法

2.1 丹参石硫工艺流程

准确称取丹参提取液浓缩液 150.0 g 于 1 000 mL 烧杯中, 用蠕动泵以设定的速度向浓缩液中加入设定质量分数的石灰乳 (石灰乳加入量以氢氧化钙计, 共含氢氧化钙 30 g), 过程中使用电动搅拌器将料液以设定速度持续搅拌。加入石灰乳后继续搅拌一定的时间使料液混合均匀并充分反应。搅拌结束后向碱沉反应液中以设定的速度滴加设定质量分数的硫酸溶液 (硫酸溶液加入量以硫酸计, 共含硫酸 40.14 g), 加酸结束后再搅拌相应的时间使料液混合均匀并充分反应。将结束搅拌后的反应混合物置于恒温培养箱中以设定温度静置一定的时间, 此后将混合物置于 6 000 r/min 的高速离心机内离心 15 min, 获得上清液即为石硫工艺样品。

2.2 工艺风险分析

采用鱼刺图法筛选潜在 CPP。鱼刺图法分析丹参提取液的石硫工艺如图 1 所示。从图 1 可看出, 影响石硫过程的工艺参数主要涉及以下几个方面: 酸碱、环境以及工艺操作方式。根据实际生产经验分析和预实验结果, 初步筛选出石灰乳质量分数 (x_1)、加石灰乳速度 (x_2)、搅拌速度 (x_3)、加石灰乳后搅拌时间 (x_4)、硫酸质量分数 (x_5)、加酸速度 (x_6)、加酸后搅拌时间 (x_7)、静置时间 (x_8) 和

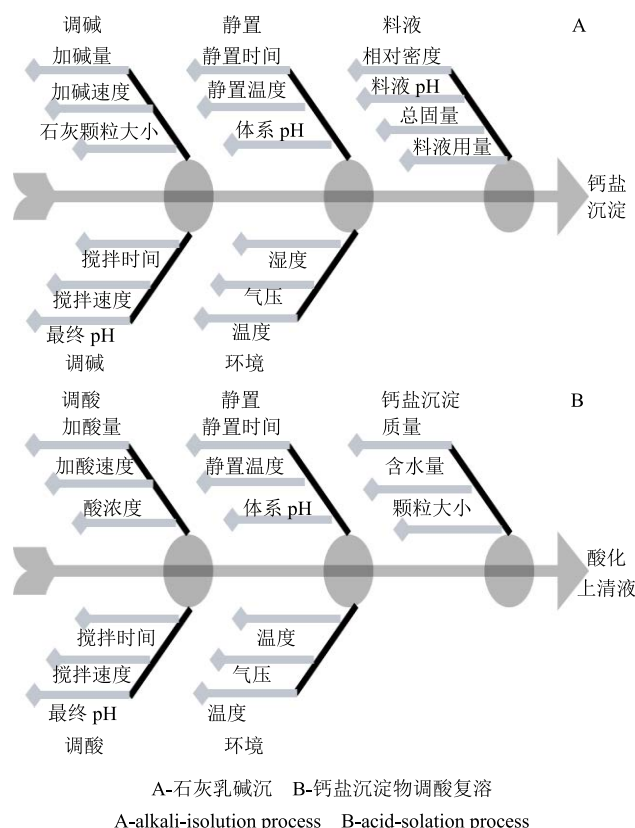


图 1 丹参提取液石硫工艺鱼刺图

Fig. 1 Fishbone diagram of process parameters for lime milk-sulfuric acid process

静置温度 (x_9) 9 个潜在 CPP。

2.3 工艺关键评价指标的选择与分析方法

选择单位石硫工艺样品中 6 种含量较高的酚酸 (DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA) 含量、总糖含量以及总固体含量作为工艺的关键评价指标。

2.3.1 各丹参酚酸含量分析方法 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 含量的分析采用 HPLC 与紫外检测器联用 (HPLC-UV) 法。

(1) 混合对照品储备液的制备: 分别精密称取 DSS、PA、RA、LA、SaB 和 SaA 对照品适量, 加含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液溶解, 制成混合对照品储备液, 储备液中 DSS、PA、RA、LA、SaB 和 SaA 的质量浓度分别为 1.206、1.112、1.111、0.526、0.853、1.134 mg/mL。

(2) 供试品溶液的制备: 精密称取石硫工艺样品 1.0 g 于 10 mL 量瓶中, 用含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液稀释至刻度, 混匀, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为供试品溶液, 备用。

(3) HPLC 分析条件: 色谱柱为 Waters CortecsTM C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 以 0.4% 甲酸

水溶液为流动相 A, 0.4% 甲酸乙腈溶液为流动相 B, 进行梯度洗脱: 0~10 min, 2%~9% B; 10~23 min, 9%~16% B; 23~36 min, 16%~19% B; 36~46 min, 19%~23% B; 46~51 min, 23%~40% B; 51~52 min, 40%~90% B; 检测波长 280 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 3 μL; 柱温 40 °C。色谱条件见图 2。

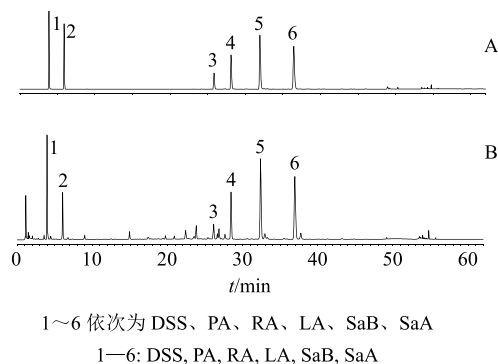


图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC-UV 图谱
Fig. 2 HPLC-UV chromatogram of mixed reference substances (A) and test sample (B)

(4) 线性关系考察: 用含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液逐级稀释对照品储备液, 制成质量分数分别为其 30%、21%、11.5%、3.3%、1.1% 的混合对照品溶液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按 HPLC-UV 分析条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量分数为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: DSS $Y=2\,893.475 X+10.691$, $r^2=1.000\,0$, 线性范围 23.16~2 068.00 μg/mL; PA $Y=17\,422.873 X+0.632$, $r^2=1.000\,0$, 线性范围 1.67~148.70 μg/mL; RA $Y=7\,218.866 X-0.470$, $r^2=0.999\,4$, 线性范围 1.69~151.10 μg/mL; LA $Y=5\,063.301 X-0.458$, $r^2=0.999\,3$, 线性范围 1.21~107.70 μg/mL; SaB $Y=4\,156.916 X-2.093$, $r^2=0.999\,4$, 线性范围 1.75~156.30 μg/mL 和 SaA $Y=10\,802.214 X-5.825$, $r^2=0.999\,4$, 线性范围 1.12~99.80 μg/mL。

(5) 进样精密度试验: 精密吸取混合对照品储备液, 连续进样 6 次, 按 HPLC-UV 分析条件进行测定, 记录 HPLC-UV 色谱峰面积, 得到 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 6 种化合物峰面积的 RSD 分别为 0.19%、0.16%、0.18%、0.22%、0.26%、0.38%, 表明仪器精密度良好。

(6) 日内精密度试验: 制备 6 份供试品溶液, 按 HPLC-UV 分析条件进行测定, 记录 HPLC-UV 图, 并计算供试品溶液中 6 种化合物的质量分数,

得到 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 6 种化合物质量分数的 RSD 分别为 0.15%、0.16%、0.96%、0.37%、0.32%、0.18%，表明日内精密度良好。

(7) 稳定性试验：制备 1 份样品溶液，室温下放置 0、2、5、7、10、12、15、17、20、25 h 分别进样分析，记录 HPLC-UV 图，并计算供试品溶液中 6 种化合物的质量分数，得到 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 6 种化合物质量分数的 RSD 分别为 0.12%、0.64%、0.40%、0.52%、0.51%、1.08%，表明供试品溶液在室温下 25 h 内稳定。

(8) 重现性试验：制备 9 份样品溶液，分别于 3 台不同的高效液相色谱仪 Agilent 1100 HPLC、Waters UPLC Acquity™、Thermos Ultimate 3000 UHPLC 上进行分析，记录 HPLC-UV 图，使用随行标准曲线计算丹参提取液中 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 6 种化合物的质量分数，结果其 RSD 分别为 1.13%、1.51%、1.07%、3.15%、1.88%、0.50%，说明该方法的重现性良好。

(9) 加样回收率试验：分别精密量取 9 份已测定的同一批次石硫工艺样品 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中，分别加入相当于样品中各指标成分质量分数 80%、100%、120% 的对照品溶液各 3 份，用含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液稀释至刻度。按 HPLC-UV 分析条件进行测定，记录 HPLC-UV 图，计算质量分数并计算加样回收率。DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 的平均加样回收率分别为 101.2%、100.5%、102.9%、102.9%、102.5%、107.7%，RSD 分别为 0.92%、0.87%、2.05%、0.97%、0.71%、1.01%。

(10) 样品测定：精密称取石硫工艺样品 1.0 g 用含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液稀释至 10 mL，混匀，10 000 r/min 离心 10 min，按 HPLC-UV 分析条件进行测定，使用随行标准曲线计算丹参提取液中 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA 6 种化合物的质量分数。

2.3.2 固形物含量测定方法 称取上清液适量，置于已干燥至恒定质量的称量瓶中，于 105 °C 烘箱内干燥至恒定质量，称定其质量^[21]，计算上清液固形物含量。

上清液固形物含量 = 恒质量后固体质量 / 样品质量

2.3.3 总糖含量测定方法 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量^[21]。

2.3.4 物质含量计算 丹参提取液浓缩膏经石硫工艺处理后上清液所含的 6 种酚酸总量、总固体量以

及总糖量分别按照以下公式计算。

酚酸总量 = 上清液酚酸含量 × 上清液总质量 / 浓缩液总质量

总固体含量 = 上清液固形物含量 × 上清液总质量 / 浓缩液总质量

总糖含量 = 上清液总糖含量 × 上清液总质量 / 浓缩液总质量

2.4 Plackett-Burman (PB) 实验筛选 CPP

2.4.1 试验设计 采用 PB 设计考察上述 9 个潜在 CPP ($x_1 \sim x_9$) 对石硫工艺的影响，从而筛选出 CPP。各个参数及参数的设定水平见表 1，其中参数水平是根据实际生产的可操作范围确定；筛选试验中各实验的具体工艺条件见表 1。

2.4.2 PB 实验工艺参数筛选数据处理 采用加权多元线性回归系数法^[22]筛选对结果影响较大的参数。该方法的步骤：第一，将 CPP 的评价指标按公式 (1) 进行标准化处理；第二，建立工艺参数和评价指标之间的多元线性回归模型，模型用公式 (2) 表示；第三，考虑到丹酚酸为丹参提取物的主要活性成分，因此在筛选 CPP 时重点考虑各工艺参数对各类酚酸的影响，以各酚酸在标准样品（此处为实验的中心点）中的含量作为权重，其与相关系数的乘积作为该指标调整后的相关系数（adjusted correlation coefficient, ACC），以同一工艺参数在各指标模型中 ACC 的绝对值之和，综合评价该工艺参数对生产工艺的影响程度。

$$Y' = (Y - \bar{Y}) / s \quad (1)$$

Y 为关键工艺评价指标的测量值， Y' 为关键工艺评价指标标准化后的值， $\bar{Y}$ 为该评价指标的平均值， s 为该评价指标的标准差

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^9 a_i x_i \quad (2)$$

a_0 是常数项， x_i 为工艺参数的水平值， a_i 为该工艺参数的偏回归系数

通过以上的计算方式，能将对酚酸含量影响较大的工艺参数筛选出来，继而进行后续的工艺优化试验。

2.4.3 PB 筛选实验结果 单位浓缩液经石硫法处理后各物质含量如表 1 所示。各指标相应的回归系数及权重系数见表 2，其中，对指标模型影响不显著的回归系数未在表中列出。由表 2 可知，总固体与总糖在石硫工艺中的变化仅受石灰乳质量分数与静置时间的影响，其他各工艺参数均在一定程度上

表 1 丹参石硫工艺 PB 实验设计的参数及水平和实验条件及结果

Table 1 Parameters and levels, experimental condition and results of PB design for lime milk-sulfuric acid process

序号	工艺参数								
	$x_1/\%$	$x_2/(\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$	$x_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	x_4/min	$x_5/\%$	$x_6/(\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$	x_7/min	x_8/h	$x_9/^\circ\text{C}$
1	20.7 (+1)	42 (+1)	200 (-1)	50 (+1)	60 (+1)	30 (+1)	20 (-1)	14 (-1)	20 (-1)
2	12.7 (-1)	42	500 (+1)	20 (-1)	60	30	50 (+1)	14	20
3	20.7	14 (-1)	500	50	40 (-1)	30	50	22 (+1)	20
4	12.7	42	200	50	60	10 (-1)	50	22	50 (+1)
5	12.7	14	500	20	60	30	20	22	50
6	12.7	14	200	50	40	30	50	14	50
7	20.7	14	200	20	60	10	50	22	20
8	20.7	42	200	20	40	30	20	22	50
9	20.7	42	500	20	40	10	50	14	50
10	12.7	42	500	50	40	10	20	22	20
11	20.7	14	500	50	60	10	20	14	50
12	12.7	14	200	20	40	10	20	14	20
13	16.7 (0)	28 (0)	350 (0)	35 (0)	50 (0)	20 (0)	35 (0)	18 (0)	35 (0)
14	16.7	28	350	35	50	20	35	18	35
15	16.7	28	350	35	50	20	35	18	35

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	总糖	总固体	DSS	PA	RA	LA	SaB	SaA
1	235.7	468.3	8.729 9	0.609 2	0.873 7	4.448 7	7.749 5	3.342 9
2	298.7	541.2	8.883 2	0.632 7	1.002 3	3.673 0	11.046 1	2.137 7
3	203.7	348.5	7.747 4	0.459 0	0.690 8	4.506 4	4.847 1	1.764 0
4	251.6	456.5	8.668 5	0.589 4	0.923 1	4.394 3	8.555 0	3.597 5
5	262.5	478.3	8.994 0	0.572 0	0.875 5	4.371 4	7.912 3	2.612 7
6	271.8	515.7	9.950 5	0.612 3	0.970 4	4.902 4	8.707 0	3.696 1
7	193.1	381.5	7.447 1	0.561 4	0.799 2	3.954 0	7.474 6	3.115 0
8	221.7	407.0	7.769 5	0.584 1	0.875 2	3.955 9	8.635 0	3.553 8
9	222.6	436.4	8.714 0	0.601 2	0.883 5	4.628 3	7.783 9	2.977 2
10	416.7	525.6	10.449 9	0.638 0	0.969 4	5.376 6	7.835 2	2.807 3
11	300.1	528.2	9.719 3	0.585 8	0.838 4	4.360 9	7.368 1	1.452 1
12	285.0	502.7	10.000 8	0.654 1	1.035 7	5.275 6	9.591 1	3.153 3
13	207.2	400.6	8.125 1	0.585 1	0.856 5	4.471 2	7.624 3	2.740 4
14	233.7	395.1	8.130 2	0.569 9	0.839 7	4.679 0	7.127 4	3.224 6
15	198.2	410.5	8.327 9	0.589 1	0.867 1	4.697 4	7.524 7	3.288 9

影响了酚酸含量在工艺过程中的变化。从表 3 可知, x_1 、 x_4 、 x_7 、 x_8 4 个参数的调整后回归系数绝对值之和大于其他工艺参数, 即这 4 个参数会对石硫工艺中酚酸的变化有显著影响, 其中 x_1 及 x_8 对工艺中固形物及总糖的变化也有显著影响。因此本研究将 x_1 、 x_4 、 x_7 、 x_8 这 4 个工艺参数视作石硫工艺的 CPP, 并设计实验对其进行进一步的优化研究。这一筛选结果与沈金晶等^[10]所报道的一致。

2.5 CPP 的优化

2.5.1 关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 的确定 由表 1 可知, 总糖含量占总固体含量的 50% 左右, 两者变化规律一致, 总固体量的变化在一定程度上可以代表总糖量的变化, 因此优化实验中不再将总糖含量列入 CQA。

石硫工艺中, 丹参水提浸膏经石灰乳处理后, 体系 pH 值达到 12~13, 此时 SaB 发生大量降解,

表 2 丹参石硫工艺 PB 筛选实验各评价指标多元线性回归模型的 r^2 、回归系数及指标的权重系数

Table 2 r^2 values, regression coefficients, and weight coefficient of indicators for regression models of PB design for lime milk-sulfuric acid process

参数	回归系数							
	DSS	PA	RA	LA	SaB	SaA	总固体	总糖
x_1	-0.63	-0.55	-0.79	-0.39	-0.61	—	-0.61	-0.57
x_2	—	0.39	0.31	—	0.36	0.33	—	—
x_3	—	—	—	—	—	-0.84	—	—
x_4	0.32	—	—	0.39	-0.46	—	—	—
x_5	—	—	—	-0.63	—	—	—	—
x_6	—	-0.30	—	-0.39	—	—	—	—
x_7	-0.39	-0.35	—	-0.31	—	—	—	—
x_8	-0.45	-0.54	-0.46	—	-0.44	—	-0.54	-0.54
x_9	—	—	—	—	—	—	—	—
r^2	0.79	0.83	0.90	0.81	0.83	0.70	0.66	0.59
权重系数	1.23	0.09	0.13	0.69	1.11	0.46	0.00	0.00

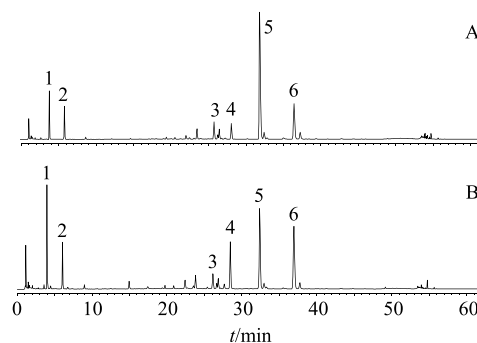
表 3 丹参石硫工艺 PB 筛选实验各工艺参数的原始及调整后回归系数绝对值之和

Table 3 Sum of absolute values of original and adjusted regression coefficients of process parameters for lime milk-sulfuric acid process

参数	回归系数绝对值之和	调整后回归系数绝对值之和
x_1	4.15	1.87
x_2	1.39	0.63
x_3	0.84	0.39
x_4	1.17	1.17
x_5	0.63	0.43
x_6	0.69	0.30
x_7	1.05	0.73
x_8	2.43	1.15
x_9	0.00	0.00

同时伴随 SaB 降解产物如 DSS 的大量形成^[23]。如图 3 所示,丹参水提浸膏中主要含有的物质为 SaB;经石硫法处理后,样品中 DSS 及 PA、LA 等成分的峰面积占比显著提高,而 SaB 的峰面积占比相较于提取液而言显著降低,证明石硫工艺导致丹参水提浸膏中各类酚酸的组成发生了较大的改变。因此优化实验引入 Pearson 相关系数(R_P)作为 CQA 之一。

综上所述,选择单位石硫工艺样品中的 6 种酚酸(DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA)的含量、总固体含量和 R_P 作为石硫工艺样品的 CQA。



1~6 依次为 DSS、PA、RA、LA、SaB、SaA
1—6: DSS, PA, RA, LA, SaB, SaA

图 3 丹参水提浸膏 (A) 和丹参水提浸膏经石硫工艺处理所得上清液 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of SMRR extract concentrate (A) and supernatant obtained from lime milk-sulfuric acid process (B)

2.5.2 实验设计 采用中心复合设计 (central composite design, CCD) 法研究丹参提取液石硫工艺的 CPP (x_1 、 x_4 、 x_7 、 x_8) 与 CQA 之间的定量关系。工艺参数水平设定与实验设计见表 4。

2.5.3 CCD 优化实验数据处理 R_P 是用于衡量石硫上清液与 DCI 中各酚酸组成比例的相似性指标。所得 R_P 越接近 1, 表明该样品中各酚酸组成比例与 DCI 中各酚酸组成比例越接近^[24]。 R_P 计算见式 (3) 与 (4)。建立丹参提取液石硫工艺 CPP 和 CQA 的定量关系, 以式 (5) 表示。

$$P_{k,i} = \text{样品中指标性成分 } i \text{ 的质量/样品总固体含量} \quad (3)$$

$$R_P = \sum_{i=1}^n [(P_{k,i} - \bar{P}_k) / s_k] [(P_{f,i} - \bar{P}_f) / s_f] / (n-1) \quad (4)$$

n 为指标性成分数, $P_{k,i}$ 为第 k 个中间体中指标性成分的纯度, $\bar{P}_k$ 为第 k 个中间体所有指标性成分纯度的均值, s_k 为第 k 个中间体所有指标性成分纯度的标准差, $P_{f,i}$ 为最终产品中指标性成分 i 的纯度, $\bar{P}_f$ 为第最终产品中所有指标性成分纯度的均值, s_f 为最终产品中所有指标性成分纯度的标准差

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

b_0 是常数, b_i 、 b_{ii} 与 b_{ij} 为回归系数, Y 是丹参石硫工艺评价指标, X_i 、 X_j 是 CPP, 模型方程中移入或移除特定项的 P 值设定为 0.10

在此基础上采用 MODDE 12.1 软件 (Umetrics 公司) 提供的 Monte Carlo 方法计算获得设计空间, 概率设计空间的计算参数设置如下: 模拟设定点的分辨率为 32, 每个点计算模拟次数为 10 000 次, 每

表 4 丹参提取液石硫工艺的 CCD 实验参数水平设计及结果

Table 4 Experimental condition and result of CCD design for lime milk-sulfuric acid process

序号	CPP				质量分数/(mg·g ⁻¹)							R_p
	$x_1/\%$	x_4/min	x_7/min	x_8/h	DSS	PA	RA	LA	SaB	SaA	固含量	
1	12 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	14 (-1)	7.653	0.834 3	0.993 7	4.577	10.645	4.077	397.2	0.857 0
2	18 (+1)	30	10	14	5.161	0.561 8	0.670 1	3.124	7.132	2.822	268.4	0.854 3
3	12	60 (+1)	10	14	8.517	0.827 4	0.933 1	5.380	8.216	3.985	386.7	0.841 3
4	18	60	10	14	7.801	0.708 1	0.828 2	5.069	7.138	3.625	352.6	0.823 1
5	12	30	40 (+1)	14	7.713	0.825 8	0.978 0	4.757	10.599	4.020	402.5	0.852 3
6	18	30	40	14	7.155	0.731 0	0.860 7	4.385	8.163	3.410	352.1	0.862 5
7	12	60	40	14	10.250	1.049 9	1.260 8	6.413	12.562	5.226	508.9	0.855 0
8	18	60	40	14	8.206	0.747 6	0.862 0	5.448	6.915	3.721	366.3	0.800 5
9	12	30	10	28 (+1)	7.339	0.821 6	0.977 8	4.305	10.791	4.111	389.4	0.853 1
10	18	30	10	28	5.000	0.539 1	0.648 1	2.859	7.321	2.674	338.2	0.859 1
11	12	60	10	28	7.868	0.815 8	0.917 7	4.899	8.767	3.828	391.3	0.857 0
12	18	60	10	28	7.473	0.692 2	0.798 2	4.800	6.597	3.528	340.2	0.820 8
13	12	30	40	28	7.348	0.799 1	0.952 0	4.205	10.767	3.939	388.3	0.858 8
14	18	30	40	28	6.741	0.697 3	0.838 3	3.951	8.652	3.408	342.5	0.868 2
15	12	60	40	28	8.019	0.816 5	0.923 0	4.954	8.654	3.844	393.7	0.858 1
16	18	60	40	28	7.355	0.704 9	0.817 8	4.600	7.261	3.364	344.1	0.848 0
17	9 (-2)	45 (0)	25 (0)	21 (0)	8.917	0.955 5	1.073 4	5.251	10.189	4.553	429.6	0.870 6
18	21 (+2)	45	25	21	6.425	0.613 2	0.724 0	4.071	6.548	3.056	299.3	0.845 8
19	15 (0)	15 (-2)	25	21	6.408	0.742 4	0.912 0	3.355	11.381	3.575	369.3	0.839 6
20	15	75 (+2)	25	21	8.466	0.776 7	0.866 9	5.520	6.888	3.847	378.7	0.799 8
21	15	45	0 (-2)	21	6.978	0.796 5	0.925 1	3.702	10.076	3.709	369.8	0.873 0
22	15	45	55 (+2)	21	8.025	0.787 0	0.916 6	5.092	8.379	3.704	375.8	0.848 7
23	15	45	25	7 (-2)	7.833	0.765 3	0.882 8	5.101	7.856	3.706	367.0	0.835 7
24	15	45	25	35 (+2)	7.817	0.774 5	0.881 8	4.682	7.775	3.765	365.2	0.860 5
25	15	45	25	21	7.670	0.766 6	0.904 1	4.715	9.112	3.730	368.9	0.860 6
26	15	45	25	21	7.877	0.774 3	0.906 5	4.918	8.423	3.837	376.9	0.853 5
27	15	45	25	21	7.817	0.767 6	0.891 9	4.867	8.207	3.706	374.3	0.854 0
28	15	45	25	21	7.678	0.760 3	0.889 6	4.800	8.301	3.781	366.5	0.853 5
29	15	45	25	21	7.940	0.786 1	0.897 6	4.865	8.013	3.767	372.4	0.855 7
30	15	45	25	21	7.964	0.790 6	0.907 5	4.929	8.094	3.752	380.7	0.853 7

个工艺评价指标以 5% 作为失败概率的最大值。小于或等于该概率的工艺参数组合被包含在设计空间之内。

2.5.4 石硫工艺 CPP 和 CQA 之间回归模型的建立
 CCD 设计优化实验结果见表 4。在实验设计的工艺条件下, 每单位丹参提取浓缩膏经石硫工艺处理后, 所得工艺中间体中, 含总固体的量为 268.4~508.9 mg/g, 含 DSS、PA、RA、LA、SaB 及 SaA 的质量分数分别为 5.000~10.250 mg/g、0.539~1.050 mg/g、0.648~1.261 mg/g、2.859~6.413 mg/g、

6.548~12.563 mg/g、2.674~4.553 mg/g, R_p 的分布范围则为 0.799 8~0.873 0。各指标分布范围较宽, 说明实验设计的 CPP 变化范围较为合理。

本研究需要建立一个多指标优化模型, 且各指标之间有一定的相关性, 因此选择偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 回归模型更为合适。采用 MODDE 12.1 软件 (Umetrics 公司) 建立 PLS 回归模型, 经显著性分析, 得到模型的回归系数及 r^2 见表 5。4 个工艺参数的回归系数对 8 个指标的 PLS 模型均有显著性意义, 证明了模型的合理性。

表 5 丹参提取液石硫工艺的中心复合实验各评价指标 PLS 模型的回归系数、 r^2 和调整后的 r^2

Table 5 Partial regression coefficients, r^2 values and adjusted r^2 values of coefficients for PLS models in milk-sulfuric acid process

指标	回归系数							R_P
	总固体	DSS	PA	RA	LA	SaB	SaA	
x_1	-30.860	-0.561	-0.079	-0.289	-0.280	-1.103	-0.311	0.006
x_4	8.497	0.587	0.024	0.520	0.520	-0.642	0.074	0.009
x_7	9.341	0.306	0.021	0.246	0.246	0.135	0.036	—
x_8	-4.182	-0.202	-0.014	-0.205	-0.205	-0.103	—	0.005
x_4^2	—	—	—	—	-0.080	0.188	—	-0.007
x_7^2	—	—	—	—	-0.088	0.206	—	—
x_1x_4	—	—	—	—	—	—	0.136	—
x_1x_7	—	—	—	—	—	—	0.087	—
x_4x_7	—	—	—	—	—	—	-0.070	—
x_1x_8	8.179	—	—	0.014	—	0.182	—	—
x_4x_8	-9.497	-0.145	—	—	—	-0.235	—	—
x_7x_8	-11.130	-0.125	-0.014	-0.018	—	-0.168	—	—
r^2	0.852	0.832	0.804	0.733	0.874	0.765	0.902	0.683
r_{adj}^2	0.805	0.788	0.763	0.677	0.841	0.659	0.875	0.632

2.6 设计空间的计算

2.6.1 CQA 的范围设置 综合考虑有效成分的保留量、杂质的去除量以及石硫工艺中间体与工艺终产品的相似度的提高程度，对单位浓缩液经石硫工艺后上清液中总固体含量设置上限，对含量较高的 DSS、LA、SaB 及 SaA 含量设置下限，对 R_P 设置下限，据此标准，石硫工艺中间体的 CQA 范围设置如表 6 所示。

2.6.2 设计空间 采用 MODDE 12.1 软件 (Umetrics 公司) 提供的 Monte Carlo 方法^[25-27]，按表 6 设置计算参数，计算得到的设计空间如图 3 所示。从表 5 回归模型计算结果可知， X_1 与 X_2 在绝大多数指标模型中的回归系数绝对值相对较大，因此可以认为石灰乳质量分数及加石灰乳后搅拌时间为对石硫工艺影响最为显著的 2 个工艺参数，因此在

图 4 中以石灰乳质量分数与加石灰乳后搅拌时间主要坐标轴表示设计空间。

图 4 中颜色由绿至红的渐变表示相应工艺条件下，响应值不符合要求的概率（失败概率）由 1% 逐渐增大，数字为工艺参数落在相应区域时，CQA 未能达标的概率。本研究将各工艺指标的失败概率小于等于 5% 的区域作为设计空间（图 4 中绿色、黄色区域），并从其中选取便于实际操作的区域作为实际生产可以参考的操作空间。

最终选择的操作空间为石灰乳质量分数 12.0%~13.0%，加石灰乳后搅拌时间 40~50 min，加酸后搅拌时间 30~35 min，静置时间 16~20 h（参数落图 4 中白框范围）。

2.6.3 设计空间的验证 为了验证设计空间，在设计空间内与设计空间外各选择 4 个点进行实验验证，8 个验证点的各参数条件及结果见表 7。

由验证实验结果可知，设计空间内实验点所得石硫上清液指标均达标，而设计空间外实验点所得上清液中个别总固体含量超过最高限度， R_P 未达到最低标准，说明在设计空间内操作能保证较好的工艺品质。各实验点预测值和实测值相接近，说明模型预测能力良好。

3 讨论

本研究首次基于 QbD 理念优化了丹参川芎嗪注射液前处理过程中丹参浓缩膏的石硫工艺，联用

表 6 石硫工艺中间体的 CQA 范围设置及达标概率要求

Table 6 Bounds of CQAs and acceptable probability

关键质量属性	单位	最小值	最大值	提取液质量 达标概率/%
总固体量	mg·g ⁻¹		450	95
DSS	mg·g ⁻¹	7.5		95
LA	mg·g ⁻¹	4.0		95
SaB	mg·g ⁻¹	8.5		95
SaA	mg·g ⁻¹	3.5		95
R_P	—	0.83		95

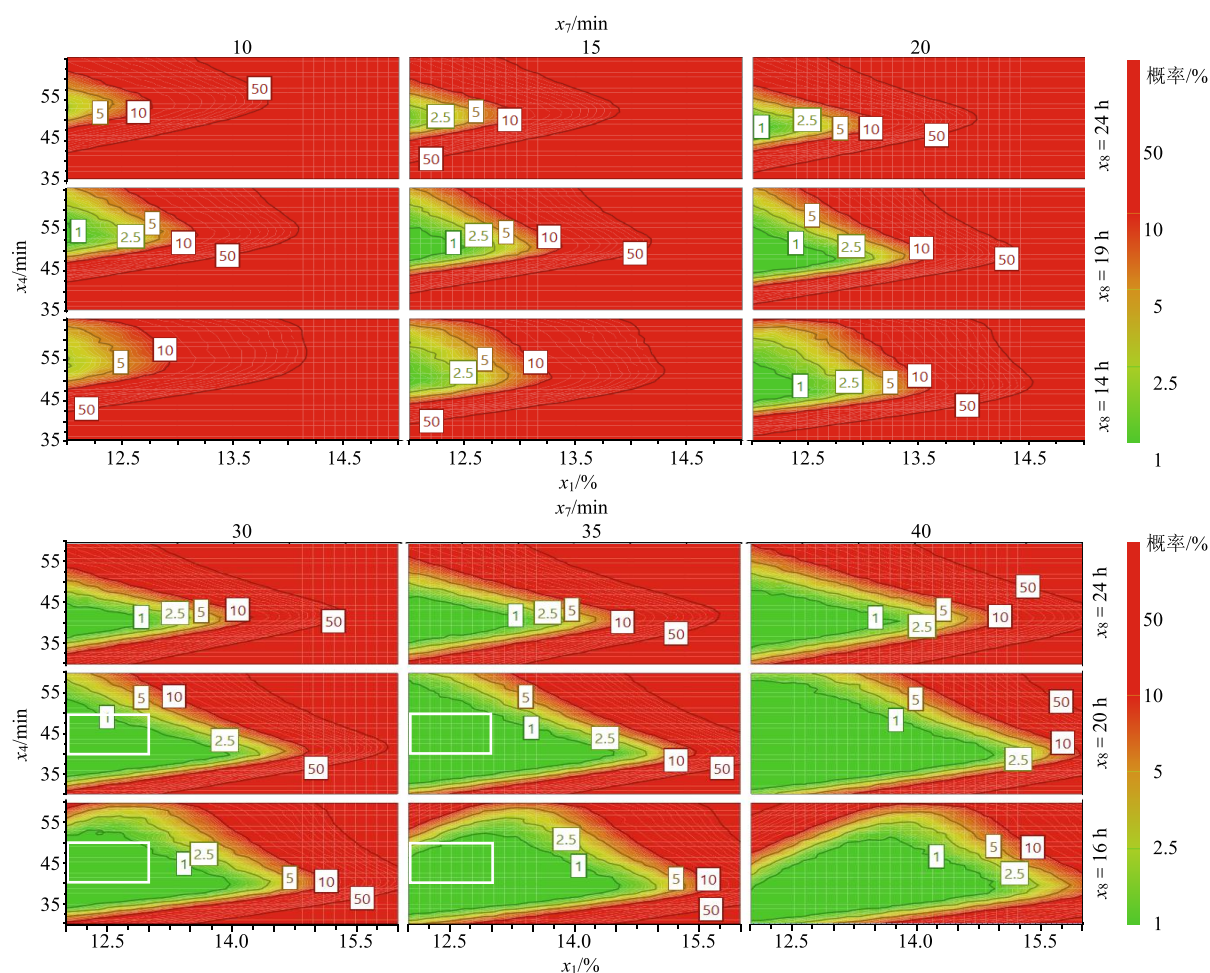


图 4 丹参石硫工艺的概率设计空间图

Fig. 4 Design spaces for lime milk-sulfuric acid process

表 7 验证点实验条件及结果

Table 7 Conditions and results of verification experiments

验证点	CPP				总固体量/(mg·g ⁻¹)		DSS/(mg·g ⁻¹)	
	x ₁ /%	x ₄ /min	x ₇ /min	x ₈ /h	预测值	实测值	预测值	实测值
1	13.5	44.7	48.7	16.5	424.5±17.8	407.4	8.701±0.454	8.289
2	13.0	42.0	32.5	15.0	411.1±13.1	404.9	8.256±0.312	8.098
3	14.0	48.0	40.0	15.0	415.6±14.9	420.1	8.601±0.379	8.518
4	12.0	50.0	32.5	19.5	419.4±11.3	418.9	8.657±0.289	8.539
5	12.0	53.0	30.5	23.7	404.7±12.2	393.5	8.521±0.303	8.285
6	10.0	20.2	30.5	23.7	414.0±20.9	417.2	7.669±0.520	7.627
7	12.0	18.0	48.7	16.5	414.9±26.0	434.9	7.659±0.656	7.111
8	10.0	32.0	54.2	17.0	461.6±25.9	464.2	8.911±0.637	8.295
验证点	LA/(mg·g ⁻¹)		SaB/(mg·g ⁻¹)		SaA/(mg·g ⁻¹)		R _P	
	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值	实测值
1	5.268±0.320	5.062	10.091±1.120	9.005	3.824±0.238	3.866	0.856 0±0.023 0	0.946 2
2	5.211±0.218	5.103	9.624±0.764	9.272	3.946±0.152	3.897	0.857 3±0.023 2	0.855 5
3	5.389±0.221	5.541	9.320±0.816	8.508	3.823±0.186	3.947	0.851 3±0.023 1	0.837 2
4	5.470±0.212	5.535	9.520±0.673	8.938	3.988±0.160	4.037	0.856 8±0.023 2	0.842 8
5	5.409±0.216	5.233	9.040±0.708	8.810	3.969±0.145	4.063	0.856 4±0.023 2	0.850 5
6	4.131±0.390	4.215	12.130±1.292	12.273	4.573±0.340	3.981	0.860 9±0.026 1	0.850 8
7	4.094±0.499	4.038	12.434±1.746	11.490	4.186±0.411	3.808	0.848 5±0.026 5	0.864 9
8	5.026±0.495	4.964	12.664±1.711	11.678	4.185±0.466	4.291	0.865 4±0.024 2	0.857 4

了鱼刺图法、PB 实验设计法及加权回归系数法作为该工艺的关键参数筛选方法。同时,引入了 R_p 作为化学组成变化较大的工艺环节的关键评价指标,采用 CCD 实验设计法建立 CPP 和 CQA 间的数学模型,确定石硫上清液中各个 CQA 的优化目标,最后计算获得基于指标失败概率的设计空间并确定操作空间。本研究的结果对丹参川芎嗪注射液的实际生产具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 王 瑜. 丹参川芎嗪注射液的临床应用研究进展 [J]. 天津药学, 2015, 27(4): 53-55.
- [2] 任良强, 吴 忠, 廖 旺, 等. 丹参川芎嗪注射液联合替格瑞洛治疗不稳定型心绞痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(8): 1921-1927.
- [3] 杨 倩, 吕莉莉, 孙 蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2606-2613.
- [4] 马仙红, 张 瑜. 银杏达莫与丹参川芎嗪注射液治疗老年急性心肌梗死的临床对照研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1449-1452.
- [5] 王 军, 张文胜, 裴效瑞, 等. 丹参川芎嗪注射液联合利伐沙班治疗下肢深静脉血栓的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12): 3335-3339.
- [6] 陈世春, 谢保城, 田 浩, 等. 丹参川芎嗪注射液辅助治疗慢性阻塞性肺病疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5211-5219.
- [7] 许珍晶. 丹参川芎嗪注射液治疗后循环缺血性眩晕的临床评价 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(9): 1334-1337.
- [8] 李 婷, 王 煜, 张 立, 等. 丹参川芎嗪注射液联合阿托伐他汀治疗急性脑梗死的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(10): 1872-1875.
- [9] 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂 (第十四册) [S]. 1997.
- [10] 沈金晶, 龚行楚, 潘坚扬, 等. 基于质量源于设计理念的金银花水提液石灰乳沉淀工艺优化研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1074-1082.
- [11] Yu L X, Amidon G, Khan M A, *et al.* Understanding pharmaceutical quality by design [J]. *AAPS J*, 2014, 16(4): 771-783.
- [12] 韩天燕, 付亭亭, 费文玲, 等. 基于质量源于设计理念的仙曲片薄膜包衣工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2564-2570.
- [13] 徐 冰, 史新元, 吴志生, 等. 论中药质量源于设计 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1015-1024.
- [14] 张娟娟, 孙 巍, 王 萍, 等. 基于分析方法质量源于设计 (AQbD) 的复方丹参滴丸皂苷指纹图谱开发方法初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 3992-3997.
- [15] 龚行楚, 陈 滕, 瞿海斌. 基于质量源于设计理念的中成药二次开发研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1031-1036.
- [16] 张俊鸿, 何 雁, 许 燕, 等. 基于质量源于设计理念的咳嗽颗粒喷雾干燥工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2061-2066.
- [17] Gong X, Chen H, Pan J, *et al.* Optimization of *Panax notoginseng* extraction process using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015, 141: 197-206.
- [18] 张小飞, 邢传峰, 果秋婷. 基于质量源于设计 (QbD) 理念优化穿心莲内酯固体脂质纳米粒 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 194-200.
- [19] Chen T, Gong X, Chen H, *et al.* Chromatographic elution process design space development for the purification of saponins in *Panax notoginseng* extract using a probability-based approach [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(2): 306-315.
- [20] Zhang L, Yan B, Gong X, *et al.* Application of quality by design to the process development of botanical drug products: A case study [J]. *Aaps Pharmscitech*, 2013, 14(1): 277-286.
- [21] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [22] 刘爽悦, 沈金晶, 李文龙, 等. 3 种关键工艺参数辨识方法的比较研究 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3193-3198.
- [23] Gong X, Huang S, Pan J, *et al.* Modeling of degradation kinetics of salvianolic acid B at different temperatures and pH values [J]. *Chin J Chem Eng*, 2017, 25(1): 68-73.
- [24] 宋鸿碧, 陆 帆, 雷后康. 维生素 D 血清水平与妊娠期糖尿病的相关性研究 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(33): 121-124.
- [25] Gong X, Li Y, Chen H, *et al.* Design space development for the extraction process of Danchong Injection using a Monte Carlo simulation method [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128236.
- [26] Gong X, Chen H, Chen T, *et al.* Unit operation optimization for the manufacturing of botanical injections using a design space approach: A case study of water precipitation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104493.
- [27] Chen T, Gong X, Chen H, *et al.* Process development for the decoloration of *Panax notoginseng* extracts: A design space approach [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(2): 346-355.