

基于中心复合序贯设计法丹参川芎嗪注射液水沉工艺优化

赵芳¹, 苟维², 刘飞², 张程益², 陈丽冰¹, 李文竹¹, 陈泽麒¹, 瞿海斌^{1*}

1. 浙江大学 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 (QbD) 理念和序贯设计法优化丹参川芎嗪注射液前处理过程中的水沉工艺。**方法** 研究联用了鱼刺图法及基于全局式序贯设计的中心复合实验法作为优化方法, 在基础实验设计中关键参数维度的轴向方向增加实验点, 再进行新的多元线性回归拟合, 最终得到了水沉工艺的设计空间并对其进行了验证, 同时给出了较为稳健且全面的操作空间。**结果** 根据设计空间, 推荐操作空间为水沉体系 pH 值为 3.1~3.4 时, 加水倍量 3.25~5.00, 静置时间为 7~17 h, 静置温度为 7 ℃。**结论** 首次在中药制药过程工艺优化中引入序贯设计法。相较于样本量巨大的均匀空间网格设计、正交设计等实验设计方法而言, 序贯设计在实现与前者同样的样本对可行域覆盖程度的基础上, 能够有效降低工艺优化实验的工作量, 避免样本与人力物力的浪费, 同时保证较高的模型预测性能。

关键词: 序贯设计; 中心复合设计; 丹参川芎嗪注射液; 水沉工艺; 设计空间; 丹参素; 原儿茶醛; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)01-0051-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.009

Optimization of water-precipitation process in pretreatment process of *Salviae Miltiorrhizae* (Danshen) and Ligustrazine Hydrochloride Injection based on sequential central composite design

ZHAO Fang¹, GOU Wei², LIU Fei², ZHANG Cheng-yi², CHEN Li-bing¹, LI Wen-zhu¹, CHEN Ze-qi¹, QU Hai-bin¹

1. Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

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

Abstract: **Objective** To optimize the water-precipitation in the pretreatment manufacture process of *Salviae Miltiorrhizae* (Danshen) and Ligustrazine Hydrochloride Injection (SMLHI) based on the quality by design (QbD) concept and the sequential design. **Methods** A design space was obtained by the global-type sequential design methodology combined with the fishbone-diagram risk analysis and central composite experiment based on global type sequential design method. The preliminary optimized zone of critical process parameters was extended in axial direction on the basis of the statistical result gained from the first central composite design. Then an updated multivariate linear regression model was fitted and a design space was delineated and verified. **Results** According to the design space, the recommended operation space of the water-precipitation was as follows: when the pH value of the material was between 3.1 and 3.4, 3.25—5.00 times of water adding into the solution was recommended, the standing time was 7—17 h and the standing temperature was 7 ℃. **Conclusion** This study introduces the sequential design into the process optimization of traditional Chinese medicine pharmaceuticals. Compared with the experimental design methods such as uniform space grid design and orthogonal design with a large number of samples, while samples cover the same feasible zone in a continuous operation form, sequential design methodology can effectively reduce the workload of the optimization experiment, avoid the waste of manpower and resources as well as guarantee the prediction ability of the fitting model.

Key words: sequential design; central composite design; *Salviae Miltiorrhizae* (Danshen) and Ligustrazine Hydrochloride Injection; water-precipitation; design space; tanshinol; protocatechuic aldehyde; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; salvianolic acid A

收稿日期: 2019-08-18

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

作者简介: 赵芳 (1993—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药制药工艺研究与优化。Tel: 18868819246 E-mail: z_fang@zju.edu.cn

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

序贯性实验设计策略是利用实验设计方法进行初始样本点的生成,然后采用序贯准则进行样本追加的一种实验设计方法^[1]。序贯设计与其他实验设计方法相比,其优点在于可以充分利用前一阶段建立的模型信息以设计后续追加样本实验,将后一阶段的实验安排在能提供最大信息量的实验点上,然后利用初始样本与追加样本的信息来拟合得到新的模型,如此迭代进行,直到模型精度达到要求时终止设计^[2-6]。基于质量源于设计(quality by design, QbD)进行中药制药工艺研究及优化的一般流程为①通过风险分析、单因子或析因设计等方法筛选关键工艺参数(critical process parameter, CPP);②通过响应曲面法等考察关键工艺参数对工艺性能指标的影响;③建立 CPP 与工艺关键质量属性(critical quality attribute, CQA)之间的数学模型;④确定工艺的最佳操作条件或设计空间(design space)^[7-13]。

由于实验中各工艺参数水平的变化范围往往由研究人员凭经验及工艺设备的可操作范围来确定,具有一定的随机性,有可能出现最佳操作条件落在所研究的参数空间之外的情况^[14-19]。在中药制药工艺研究中应用序贯设计,可以将已有的样本信息充分利用,基于前一阶段的不完全设计试验的统计结果,合理确定下一阶段的实验点,逐步实现工艺研究目标。

水沉工艺是中药注射剂生产中常用的分离纯化技术,该法利用有效成分与杂质在水中溶解度不一样的特性,使有效成分与一些水不溶性杂质在低温静置过程中分离开来。中药中含有的树脂、色素、鞣质等杂质,在水沉工艺中可被部分除去,从而达到精制的目的^[20-21]。本研究以丹参川芎嗪注射液(丹参素与盐酸川芎嗪的复方注射液,临床上疗效确切,应用广泛^[22-26])生产过程中丹参水沉工艺为研究对象,基于 QbD 理念^[27],使用鱼刺图风险分析法筛选关键工艺参数,以丹参水沉过程酚酸保留率、固体去除率作为关键工艺评价指标,建立 CPPs 和 CQAs 之间的定量模型,获得基于概率的设计空间,在此基础上确定工艺参数的操作空间,在该工艺范围内进行操作,能保证水沉后有效成分的保留率较高,同时杂质的去除率也较高,有助于保证丹参川芎嗪注射液的质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AB204-N、XS105 型分析天平, Mettler-Toledo

上海有限公司; Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司; Agilent1100 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技有限公司, 配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、ChemStation 工作站; THYD-1030W 低温恒温槽, 宁波天恒仪器厂; 5804 R 型冷冻离心机, Eppendorf 中国有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海精弘实验设备有限公司。

1.2 试剂

由石硫及醇沉处理后的丹参浸膏, 贵州康恩贝拜特制药有限公司提供, 批号 XT190501; 对照品丹参素钠(批号 171027, 质量分数 98.93%)、原儿茶醛(批号 171129, 质量分数 99.69%)、迷迭香酸(批号 171000, 质量分数 99.47%)、紫草酸(批号 170825, 质量分数 98.85%)、丹酚酸 B(批号 171102, 质量分数 99.15%)、丹酚酸 A(批号 170920, 质量分数 98.97%)均购自上海融禾医药科技有限公司; 乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; 去离子水由纯化水系统(Milli-Q Synthesis, Millipore 公司)制得。

2 方法

2.1 水沉工艺的操作流程

向一定质量的丹参浸膏中以预设倍量加入注射用水, 充分混合后使用 50%盐酸溶液或 10%氢氧化钠溶液调节 pH 值至设定值, 置于设定温度下一定时间; 将样品充分转移后在 $3\ 200\times g$ 离心力下高速离心 20 min, 分离沉淀与上清液。

2.2 工艺评价指标的选择与分析方法

丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 及丹酚酸 A 等成分被认为是丹参中具有生物活性的可追溯质量标志物^[28-31], 本研究选择这 6 个成分的保留率作为水沉工艺有效成分保留能力的指征。同时, 选择单位浓缩液固体去除量作为工艺除杂能力的指征。

采用恒重法测定单位浓缩液固体去除量。为防止脂类成分在高温条件下挥发, 从而影响总固体质量测定的准确度, 本研究将水沉工艺离心所得的水不溶性沉淀完全转移后, 于 $60\ ^\circ\text{C}$ 真空干燥烘箱中烘至恒定质量。

采用高效液相色谱与紫外检测器联用(HPLC-UV)法^[32]分析样品溶液中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 及丹酚酸 A 的含量。

HPLC 分析条件: 色谱柱为 Waters CortecsTM C₁₈ 柱($100\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $2.7\ \mu\text{m}$); 以 0.04%甲酸水

溶液为流动相 A, 0.04% 甲酸乙腈溶液为流动相 B, 进行梯度洗脱, 流动相梯度: 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 μ L; 柱温 40 $^{\circ}$ C。

标准曲线的制作方法: 分别精密称取丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 及丹酚酸 A 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, 其中储备液中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 及丹酚酸 A 的质量浓度分别为 2.074、1.029、1.003、1.028、1.044、1.047 mg/mL, 在此基础上按梯度逐级稀释, 依次进样。

供试品溶液的制备方法: 精密称取水沉工艺样品 2.0 g 于 5 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, 进样测定。

2.3 鱼刺图法筛选潜在关键工艺参数

鱼刺图分析法^[33-35]是常用的工艺风险分析方法。本研究根据项目风险可接受标准的要求, 对丹参川芎嗪注射剂生产过程前处理中的水沉工艺所使用的参数进行系统评估。水沉工艺参数分析鱼刺图如图 1 所示, 涉及参数主要为水沉物料、加水过程、搅拌过程、静置过程和操作环境 5 个方面。

在已有的中药制药前处理工艺研究中, 对水沉工艺优化的报道还较为缺乏。向采芹等^[36]研究了加水量、药液密度及静置时间对金钱草醇提水沉工艺的影响, 研究得出加水量及静置时间为对工艺影响较大的 CPP; 陈华丽^[37]研究了提取浓缩液的干物质含量、加水倍量、搅拌速度、水沉温度、水沉时间以及加水速度对三七醇提水沉工艺的影响, 最终确定高转速搅拌、浓缩液固含量一定的情况下, 加水

倍量为三七醇提水沉工艺的 CPP。

对丹参水沉工艺而言, 过程前期是浸膏与水的均匀混合过程, 因此加水量与浸膏量的比例为该混合过程的重要参数; 而加水过程中的加水方式、加水速率以及搅拌过程中的搅拌速率、搅拌时间、搅拌温度等, 在以较快转速迅速混匀的情况下, 并不影响混合的均匀程度, 因此以上参数并非水沉工艺的关键参数。在后续的静置过程中, 静置温度与静置时间均会影响混合液中难溶性固体沉淀的程度, 本研究将之视为过程的关键参数; 此外, 对于丹参提取物而言, 体系的 pH 值直接影响酚酸类物质的降解转化与鞣质的形成, 也将之认为是丹参水沉过程的关键参数。

综上, 本研究将浸膏的加水倍量、水沉混合体系的 pH 值以及静置过程的静置时间、静置温度确定为需要进一步通过实验设计来优化的 CPP。

2.4 数据处理方法

单位浓缩液的杂质去除率、有效成分保留率的计算见公式 (1)、(2)。

$$\text{杂质去除率} = \frac{\text{沉淀干质量}}{\text{丹参浸膏总固量}} \quad (1)$$

$$\text{有效成分保留率} = \frac{\text{上清液中有效成分质量分数} \times \text{上清液质量}}{\text{丹参浸膏中有效成分质量分数} \times \text{丹参浸膏质量}} \quad (2)$$

为描述丹参水沉关键工艺参数和工艺关键评价指标的关系, 采用多元线性回归法建立数学模型。数学模型的基本形式如式 (3) 所示。

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^4 a_{ii} X_i + \sum_{i=1}^4 a_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 a_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

其中, a_0 为常数, a_i 、 a_{ii} 与 a_{ij} 表示各项回归系数, Y 表示丹参水沉工艺评价指标, X_i 为关键工艺参数。在此基础上采用 MODDE 软件提供的 Monte Carlo 方法计算获得基于概率的设计空间。设计空间计算的参数设置: 分辨率为 64, 每个点计算模拟次数为 50 000 次, 每个工艺指标以 5% 作为失败概率的最大值。小于等于该概率的工艺参数组合属于设计空间之内。

所有计算由 Microsoft Office Excel 2018 (Microsoft, USA) 和 MODDE Pro 11.0.1 (MKS Umetrics, Sweden) 软件完成。

2.5 中心复合实验设计

采用中心复合设计法 (central composite design, CCD) 研究水沉工艺关键工艺参数和工艺评价指标之间的定量关系, 星点距离为 2, 中心点数量为 6。

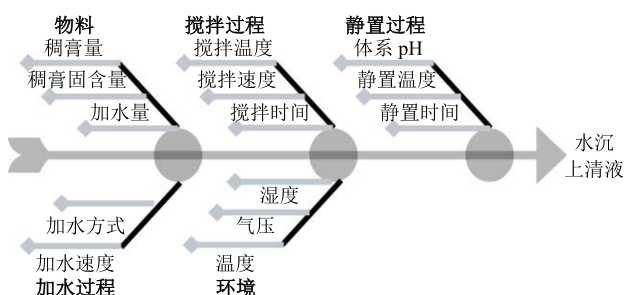


图 1 丹参水沉工艺鱼刺图分析

Fig. 1 Fishbone chart of process parameters for water-precipitation process

由于各批次生产工艺参数波动较大,在统计了丹参川芎嗪注射液的历史生产批次记录后得出以下结论:一般情况下,加水倍量(X_1)为 4.0~5.0,加水后的料液 pH 值(X_2)落于 3.3~3.5,静置温度(X_3 ,水沉温度不便于设置星点距离为 ± 2 的实验点,因为 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 将结冰, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无法起到冷藏目的,因此最终将温控水平设置为 1、3、4、7 $^{\circ}\text{C}$)低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$,静置时间(X_4)12~24 h。以此为依据,工艺参数水平设定和初始实验设计见表 1。实验结果见表 1。

在实验设计的工艺条件下,固体去除率介于 3.951%~6.447%;丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸及丹酚酸 B 在上清液中的保留率均高于 88.95%,绝大多数实验条件下酚酸损失率不超过 10%;丹酚酸 A 的保留率介于 76.43%~88.79%。通过数据分析,进一步确定参数设计范围内丹参水沉工艺的 CQA 为固体去除率与丹酚酸 A 保留率。

采用 MODDE 软件建立多元线性回归模型,经模型及系数显著性分析,得到模型的回归系数、决

表 1 丹参水沉工艺的初始 CCD 实验设计的因素及水平和实验结果

Table 1 Initial CCD experiment design table for water-precipitation process

序号	工艺条件				固体去除率/%	有效成分保留率/%					
	X_1	X_2	$X_3/^{\circ}\text{C}$	X_4/h		丹参素	原儿茶醛	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A
1	3.34 (-1)	3.2 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	4.799	98.54	94.65	92.16	91.75	92.53	81.52
2	5.56 (+1)	3.2	1	10	5.916	96.33	91.32	90.52	90.56	91.25	78.75
3	3.34	3.6 (+1)	1	10	5.518	97.29	94.28	92.29	92.30	93.39	82.90
4	5.56	3.6	1	10	4.974	96.70	92.71	93.23	94.04	94.54	86.07
5	3.34	3.2	7 (+1)	10	6.369	96.36	93.67	91.71	91.53	91.98	84.35
6	5.56	3.2	7	10	5.033	96.51	92.17	90.96	91.00	91.58	79.93
7	3.34	3.6	7	10	3.951	97.61	95.49	94.23	94.39	94.79	87.57
8	5.56	3.6	7	10	4.045	96.92	93.57	93.86	94.78	94.87	87.58
9	3.34	3.2	1	20 (+1)	5.623	96.85	93.94	90.58	90.46	90.83	80.49
10	5.56	3.2	1	20	5.043	96.07	91.82	89.23	89.53	89.98	76.43
11	3.34	3.6	1	20	4.794	97.45	95.38	92.58	93.23	93.33	83.15
12	5.56	3.6	1	20	4.239	97.65	94.34	93.60	94.69	94.87	84.78
13	3.34	3.2	7	20	5.747	96.87	94.75	90.38	90.16	90.33	78.99
14	5.56	3.2	7	20	6.447	96.66	92.98	90.74	91.09	91.48	80.45
15	3.34	3.6	7	20	4.443	97.20	95.96	93.37	93.68	93.75	85.08
16	5.56	3.6	7	20	4.288	97.29	94.76	93.92	94.72	94.80	85.71
17	2.23 (-2)	3.4 (0)	3	15 (0)	3.345	96.49	92.74	93.44	92.82	93.53	87.10
18	6.67 (+2)	3.4	4 (0)	15	4.503	97.73	93.73	94.18	94.49	95.42	84.46
19	4.45 (0)	3.0 (-2)	3	15	6.170	95.92	91.37	89.90	88.95	89.46	76.88
20	4.45	3.8 (+2)	4	15	4.077	97.91	95.90	94.71	95.15	95.52	88.79
21	4.45	3.4	1	15	4.686	97.00	94.27	91.85	92.20	92.75	80.59
22	4.45	3.4	7	15	5.420	96.40	94.41	92.21	92.56	93.23	83.53
23	4.45	3.4	4	5 (-2)	4.571	96.79	94.19	93.16	93.15	93.88	85.50
24	4.45	3.4	4	25 (+2)	4.261	97.50	95.92	93.03	93.49	93.71	83.29
25	4.45	3.4	4	15	4.707	97.21	95.20	93.14	93.36	94.04	83.85
26	4.45	3.4	4	15	5.224	96.03	93.98	91.91	92.09	92.68	82.50
27	4.45	3.4	4	15	4.687	97.07	95.04	92.87	92.97	93.56	82.91
28	4.45	3.4	4	15	4.881	96.76	94.89	92.82	92.91	93.34	82.93
29	4.45	3.4	4	15	5.349	97.08	95.22	92.95	93.27	93.65	83.45
30	4.45	3.4	4	15	5.016	96.25	94.41	92.12	92.37	92.81	82.42

定系数 (R^2) 以及调整 R^2 (R_{adj}^2) 见表 2。各参数中, pH 值对于固体去除率及丹酚酸 A 保留率的影响程度最大。静置时间对固体去除率无影响, 对丹酚酸 A 保留率有负面影响, 随着静置时间延长, 丹酚酸 A 保留率将会有一定程度的降低。从模型来看, 加水倍量及静置温度对固体去除率的直接影响不够明确, 同时考虑到加水倍量为控制较为便捷的易操作参数, 而 pH 值取决于物料属性、静置温度取决于设备能力, 其波动范围在实际生产中较难有更大的改变, 因此, 本研究在依据此模型提供的信息基础上, 进行了序贯实验设计, 扩展易改变参数 (加水倍量) 的设计范围, 进一步研究其对水沉工艺的影响。

表 2 丹参水沉工艺的中心复合实验各评价指标回归模型及模型参数

Table 2 R^2 values, regression coefficients, and weight coefficient of indicators for regression models of CCD experiment for water-precipitation process

项目	固体去除率	丹酚酸 A 保留率	项目	固体去除率	丹酚酸 A 保留率
X_1	0.010	0.170	X_3^2	0.270	-0.620
X_2	-0.790	0.790	X_1X_2	—	0.330
X_3	0.010	0.350	X_2X_3	-0.400	—
X_4	—	-0.260	常数	6.140	28.670
X_1^2	-0.210	0.240	R^2	0.736	0.880
X_2^2	0.250	0.160	R_{adj}^2	0.653	0.835

2.6 基于序贯设计法的扩展实验及丹参水沉工艺的回归模型更新

扩展加水倍量的考察范围, 同时选用与第 1 次 CCD 实验一致的 pH 值与静置温度水平, 进一步考察加水倍量 (X_1)、pH 值 (X_2) 及静置温度 (X_3) 对水沉工艺固体去除率的影响。同时, 考虑到静置时间对杂质去除率的影响不显著, 此处将静置时间固定为 15 h。序贯实验选用 CCD 实验设计, 工艺参数设置见表 3, 实验设计表及指标测定结果见表 3。其中, 序号 50、51 实验点为 MODDE 软件自动给出的实验设计扩充点, 用于提高 pH 极值条件下的模型拟合精度。汇总 51 个实验点的数据后, 重新建模, 获得更新后的丹参水沉 CPP 与 CQA 之间关系的回归模型。经标准化处理后, 模型的回归系数、 R^2 以及 R_{adj}^2 见表 4。

2 个指标模型的 R_{adj}^2 均大于 0.8, 说明模型能解释绝大部分变异。同时, 与“2.5”项所得模型相比,

表 3 丹参水沉工艺的扩展 CCD 实验设计的因素及水平和实验结果

Table 3 Sequential CCD experiment design table for water-precipitation process

序号	工艺条件			固体去除率/%	丹酚酸 A 保留率/%
	X_1	X_2	$X_3/^\circ\text{C}$		
31	1.68 (-1)	3.2 (-1)	1 (-1)	3.390	90.78
32	2.78 (+1)	3.2	1	5.174	81.07
33	1.68	3.6 (+1)	1	2.897	92.47
34	2.78	3.6	1	3.967	84.88
35	1.68	3.2	7 (+1)	2.384	94.89
36	2.78	3.2	7	4.215	86.87
37	1.68	3.6	7	2.033	95.54
38	2.78	3.6	7	3.301	88.24
39	1.13 (-2)	3.4 (0)	4 (0)	1.353	98.20
40	3.33 (+2)	3.4	4	4.157	83.04
41	2.23 (0)	2.9 (-2.5)	4	4.227	82.87
42	2.23	3.9 (+2.5)	4	2.521	91.85
43	2.23	3.4	1	3.993	85.52
44	2.23	3.4	7	3.139	90.12
45	2.23	3.4	4	3.360	87.80
46	2.23	3.4	4	3.377	88.04
47	2.23	3.4	4	3.493	88.14
48	2.23	3.4	4	3.631	83.11
49	2.23	3.4	4	3.419	88.63
50	4.30	2.9	7	5.561	78.16
51	3.00	2.9	3	5.824	76.43

表 4 丹参水沉工艺的中心复合实验各评价指标回归模型及模型参数

Table 4 R^2 values, regression coefficients, and weight coefficient of indicators for regression models of sequential CCD experiment

项目	固体去除率	丹酚酸 A 保留率	项目	固体去除率	丹酚酸 A 保留率
X_1	0.120	-0.100	X_3^2	0.270	—
X_2	-0.400	0.580	X_1X_2	—	0.120
X_3	-0.160	0.310	常数	4.470	17.050
X_4	—	-0.160	R^2	0.836	0.909
X_1^2	-0.310	0.300	R_{adj}^2	0.813	0.897
X_2^2	—	—			

序贯设计实验开展后, 固体去除率模型的 R_{adj}^2 由 0.653 提高至 0.813, 丹酚酸 A 保留率模型的 R_{adj}^2 由 0.835 提高至 0.897, 说明 2 个工艺指标回归模型

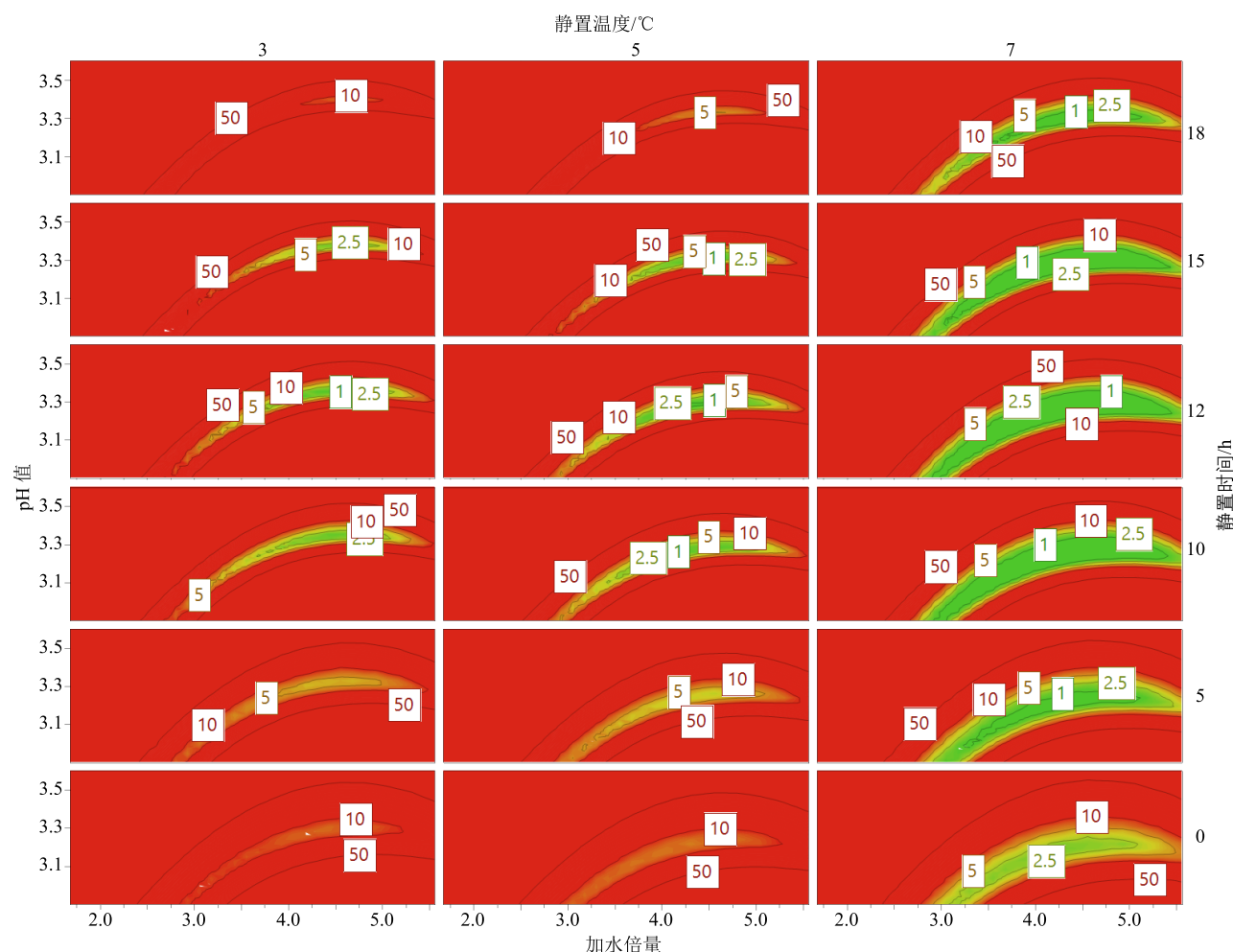
的性能均有提高。由表 4 中 2 个指标回归模型的各项系数可知,加水倍量及体系 pH 值对总固体去除率的影响程度较大,而 pH 值及静置温度对丹酚酸 A 的保留率影响程度较大;较低的 pH 值及较高的加水倍量有利于除去更多杂质,而此条件则不利于丹酚酸 A 在上清液中的保留。

2.7 设计空间的计算和验证

丹参提取物水沉工艺的主要目标是除去不溶于水的大分子鞣质等成分,因此在工艺参数优化时,首要保证杂质的去除率,进而保证产品的安全性。在此基础上,还需保证有效成分的保留率。丹参水沉工艺基本不影响丹酚酸 A 以外的其他主要丹参酚酸保留率,因此丹酚酸 A 的保留率限值在本环节中可作为辅助的工艺限制条件,保证工艺中间体的质量一致性。综上,为进一步提升工艺品质,根据所

有实验的指标值分布规律,设定以下水沉工艺评价指标标准:对水沉工艺的固体去除率与丹酚酸 A 保留率均设置最低限值,分别为 4.85%与 78%,模型设计空间内实验点质量失败概率设为 5%。据此标准,采用“2.6”项所得回归模型,用 MODDE 软件计算得到设计空间。

在工艺指标达标概率均 $\geq 95\%$ 的设计空间(工艺失败概率 $\leq 5\%$,图 2 中绿色区域)范围内选择具有较高可操作性的操作空间。结合实际生产需求,在不调节料液 pH 值的前提下,通过调整加水倍量、静置时间及静置温度来保证工艺过程达到设定标准,对于丹参川芎嗪注射液水沉工艺而言,水沉浸膏 pH 值一般约为 3.2,此时,较为稳健的推荐操作空间为:加水倍量 3.25~5.00,静置时间为 7~17 h,静置温度为 7 $^{\circ}\text{C}$ 。



白色“□”中数字为按该处相应工艺参数生产时,未达到工艺评价指标标准的概率
Index in the “□” means the failure rate for process here using corresponding parameters

图 2 丹参水沉工艺的概率设计空间图

Fig. 2 Design spaces for water-precipitation process

2.8 拟合模型与设计空间的验证

为验证拟合模型的准确性及设计空间的合理性,在“2.7”项所得设计空间内、外取点进行验证,具体验证点实验条件及实验结果见表 5。从验证实验结果可知,各验证实验指标实测值落与模型预测值范围内,说明所建模型有较好的预测性能;使用设计空间内参数进行操作的水沉工艺(V1~V3)质量指标均达标准,而使用设计空间外参数进行操作的水沉工艺(V4~V6)的固体去除率未达到最低标

准,说明使用设计空间内的工艺参数来指导生产能保证较好的工艺品质。

3 讨论

本研究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水沉工艺,联用了鱼刺图法、中心复合实验设计法及序贯实验设计法作为此工艺的优化方法,最终得到了水沉工艺的设计空间并对其进行了验证,同时给出了较为稳健的操作空间。

表 5 丹参水沉工艺设计空间的验证实验条件及结果

Table 5 Conditions and results of verification experiments for water-precipitation process

序号	加水倍量	pH 值	静置温度/℃	静置时间/h	固体去除率/%		丹酚酸 A 保留率/%	
					预测值	实测值	预测值	实测值
V1	5.18	3.35	7	16.7	5.14±0.30	5.00	82.59±0.92	82.70
V2	3.40	3.00	7	7.1	5.62±0.49	5.58	81.78±1.52	80.37
V3	4.68	3.42	3	5.0	5.09±0.46	5.27	83.14±1.43	82.92
V4	4.05	3.47	3	15.0	4.83±0.25	4.83	82.59±0.69	83.01
V5	3.51	3.45	3	15.0	4.60±0.24	4.82	83.39±0.67	83.01
V6	3.80	3.73	7	15.0	4.17±0.38	3.87	88.16±1.17	87.23

首先,本研究使用鱼刺图法对丹参提取液水沉工艺涉及的各个参数进行了初步风险评估,将浸膏的加水倍量以及水沉混合体系的 pH 值、静置时间、静置温度确定为需要进一步通过实验设计来优化的关键工艺参数。其次,采用 CCD 法进行实验设计,在此基础上建立水沉工艺 CPPs 和 CQAs 间的数学模型,确定水沉工艺各个 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。根据设计空间,丹参川芎嗪注射液前处理过程中丹参中间体水沉工艺的推荐操作空间为:水沉体系 pH 值为 3.1~3.4 时,加水倍量 3.25~5.00,静置时间为 7~17 h,静置温度为 7℃。

在实验设计过程中,由于可供参考的资料较少,研究人员基于实践经验设定了第 1 次实验设计的参数变化范围;此后,依据第 1 次实验设计的统计结果,基于序贯设计,给出了第 2 次实验设计的参数变化范围;最后,融合了 2 次实验的分析结果,进行统计,给出了最终的水沉工艺设计空间及操作空间。对于此类少有研究基础与参考资料的工艺研究而言,相较于直接使用样本量巨大的均匀空间网格设计、正交设计等实验设计方法,序贯设计法能有效降低工艺优化实验的工作量,避免人力物力的浪费,同时提高样本对可行域的覆盖程度,从而提高

模型的预测性能。

本研究首次在中药制药过程工艺优化中引入序贯设计法,科学设计各阶段样本构成,达到了最大化研究参数范围、充分利用样本信息进而提高模型精度的目的,对于中药制药工艺研究具有参考价值。

参考文献

- [1] Campaña A M G, Rodríguez L C, González A L, *et al.* Sequential response surface methodology for multiobjective optimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs [J]. *Ana Chim Acta*, 1997, 348(1): 237-246.
- [2] Shahmohammadi A, McAuley K C. Sequential model-based A- and V-optimal design of experiments for building fundamental models of pharmaceutical production processes [J]. *Comput Chem Eng*, 2019, doi: 10.1016/j.compchemeng.2019.06.029.
- [3] Robbins H. Some aspects of the sequential design of experiments [J]. *B Am Math Soc*, 1952, 58(5): 527-536.
- [4] Cookson J, Crossley J, Fagan G, *et al.* A final clinical examination using a sequential design to improve cost-effectiveness [J]. *Med Educ*, 2011, 45(7): 741-747.
- [5] Potvin D, DiLiberti C E, Hauck W W, *et al.* Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs [J]. *Pharm Stat*, 2008, 7(4): 245-262.
- [6] Keys A C, Rees L P. A sequential-design metamodeling strategy for simulation optimization [J]. *Comput Oper*

- Res, 2004, 31(11): 1911-1932.
- [7] Gong X C, Li Y, Chen H L, *et al.* Design space development for the extraction process of Danhong Injection using a Monte Carlo simulation method [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128236.
- [8] Gong X C, Chen H L, 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.
- [9] Gong X C, Zhang Y, Pan J Y, *et al.* Optimization of the ethanol recycling reflux extraction process for saponins using a design space approach [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114300.
- [10] 肖传学, 高展, 苏娟, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的穿心莲内酯结肠靶向微丸研究[J]. 中草药, 2019, 50(22): 5462-5469.
- [11] 赵芳, 龚行楚, 瞿海斌. 基于危害及可操作性分析的设计空间法优化红参醇提工艺[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1067-1073.
- [12] 张俊鸿, 何雁, 许燕, 等. 基于质量源于设计理念的风咳颗粒喷雾干燥工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2061-2066.
- [13] 张磊. 基于质量源于设计理念的丹参提取和醇沉工艺优化及控制方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [14] 陈桧, 李冰韶, 王永洁, 等. 设计空间法优化红花温浸提取工艺[J]. 中草药, 2018, 49(19): 4544-4551.
- [15] 申基琛, 王青青, 陈安, 等. 设计空间法优化银杏叶滴丸滴制工艺[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2479-2483.
- [16] 王星星, 张艳军, 朱秀辉, 等. 基于质量源于设计理念优化参蒲盆炎颗粒喷雾干燥工艺[J]. 中草药, 2019, 50(6): 1334-1340.
- [17] 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.
- [18] Gong X C, Chen H L, Pan J Y, *et al.* Optimization of *Panax notoginseng* extraction process using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015, 141: 197-206.
- [19] Chen T, Gong X C, Chen H L, *et al.* Process development for the decoloration of *Panax notoginseng* extracts: A design space approach [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(2): 346-355.
- [20] 张素萍. 中药制药生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [21] 徐莲英, 侯世祥. 中药制药工艺技术解析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [22] 刘彦超. 丹参川芎嗪联合阿托伐他汀对2型糖尿病合并颈动脉粥样硬化患者的血脂及颈动脉血流参数的影响[J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1794-1797.
- [23] 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.
- [24] 刘柳, 蒋超, 赵紫昊. 丹参川芎嗪注射液联合甲钴胺对糖尿病周围神经病变患者的治疗效果和对氧化应激反应的影响[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2670-2674.
- [25] 葛梦雪, 封亚丽, 张献献, 等. 丹参川芎嗪注射液联合常规用药治疗慢性心力衰竭的Meta分析[J]. 药物评价研究, 2019, 42(10): 2084-2091.
- [26] 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.
- [27] Yu L. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(4): 781-791.
- [28] Liang W Y, Chen W J, Wu L F, *et al.* Quality evaluation and chemical markers screening of *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Danshen) based on HPLC fingerprints and HPLC-MSⁿ coupled with chemometrics [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 478-485.
- [29] Liu C X, Guo D A, Liu L. Quality transitivity and traceability system of herbal medicine products based on quality markers [J]. *Phytomedicine*, 2018(1), 44: 247-257.
- [30] Zhang A H, Yu J B, Sun H, *et al.* Identifying quality-markers from Shengmai San protects against transgenic mouse model of Alzheimer's disease using chinmedomics approach [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45(1): 84-92.
- [31] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [32] 李文竹, 张禄权, 李白玲, 等. 基于质量源于设计理念的丹参浓缩膏石硫工艺优化研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2302-2311.
- [33] ICH and FDA, Guidance for Industry. Q9 quality risk management [EB/OL]. 2006-06-01, <https://www.fda.gov/media/71543/download>.
- [34] Patwardhan K, Asgarzadeh F, Dassinger T, *et al.* A quality by design approach to understand formulation and process variability in pharmaceutical melt extrusion processes [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(5): 673-684.
- [35] Wang L, Chen T, Zeng S S, *et al.* Quality by design study of the direct analysis in real time mass spectrometry response [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2014, 25(2): 278-285.
- [36] 向采芹, 侯丰爵, 冯建安, 等. 金钱草醇提水沉工艺的优化[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2308-2311.
- [37] 陈华丽. 三七醇提与水沉工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.