

基于质量源于设计 (QbD) 理念研究参麦注射液醇提水沉工艺

陈泽麒¹, 赵芳¹, 袁玮², 张金华², 李红艳², 潘坚扬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. 大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000

摘要: **目的** 基于质量源于设计 (QbD) 理念以及满意度算法优化参麦注射液醇提水沉工艺。**方法** 使用危害及可操作性分析法对参麦注射液醇提水沉工艺进行风险评估, 筛选出乙醇体积分数、提取时间、醇料比为醇提关键工艺参数, 静置体系 pH 值、静置温度、静置时间为水沉关键工艺参数。采用 Box-Behnken 实验设计建立 2 个工艺环节的关键工艺参数和关键质量属性之间的多元线性回归模型, 根据各质量属性的合格标准计算获得基于概率的麦冬醇提与混合水沉工艺的设计空间并进一步用基于满意度函数的多指标优化算法优化确定最佳操作条件。**结果** 对麦冬的醇提工艺而言, 在设计空间范围内, 乙醇体积分数 89.0%、提取时间 110 min, 醇料比 2.99 时总体满意度最优, 满意度为 0.722。对混合水沉工艺而言, 当物料 pH 值为 4 左右时, 在 2.0 °C 静置 40 h 时工艺的总满意度最优, 满意度为 0.995; 当物料 pH 值为 5 左右时, 在 2.0 °C 静置 35 h 时工艺的总满意度最优, 满意度为 0.999。**结论** 基于 QbD 理念以及满意度算法确定的最佳条件有利于在保证产品质量的同时最大化降低生产成本, 本研究对指导中药的制药工艺研究与工业化生产具有参考价值。

关键词: 质量源于设计; 参麦注射液; 设计空间; 醇提水沉; 多指标优化

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)17-4433-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.010

Multi-index optimization of alcohol extraction and water precipitation processes of Shenmai Injection based on quality by design concept

CHEN Ze-qi¹, ZHAO Fang¹, YUAN Wei², ZHANG Jin-hua², LI Hong-yan², PAN Jian-yang¹, QU Hai-bin¹

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

2. Dali Pharmaceutical Co., Ltd., Dali 671000, China

Abstract: Objective The alcohol extraction and water precipitation processes of Shenmai Injection were optimized based on quality by design (QbD) concept and satisfaction algorithm. **Methods** Hazard and operational analysis method was applied to conduct risk assessment of various process parameters in alcohol extraction and water precipitation processes of Shenmai Injection. Ethanol concentration, extraction time and alcohol-material ratio were selected as the critical process parameters of alcohol extraction, and the material pH, temperature and time were selected as the critical process parameters of water precipitation. A multiple linear regression model of critical process parameters and critical quality attributes were established by using Box-Behnken design. A design space was delineated according to the level of each index. Finally, the optimum operating condition was determined by the multi-index optimization algorithm. **Results** Within the scope of the design space, when the alcohol concentration was 89.0%, the extraction time was 110 min, the alcohol-material ratio was 2.99, the desirability function of alcohol extraction of 0.722 was the best. When the material pH was about 4, the time was 40 h, the temperature was 2.0 °C, the desirability function of water precipitation of 0.995 was the best. When the material pH was about 5, the time was 35 h, the temperature was 2.0 °C, the desirability function of water precipitation of 0.999 was the best. **Conclusion** The optimal conditions were determined based on QbD and satisfaction algorithm were conducive to ensuring the product quality and reducing the cost of production. This study has reference value for the guidance of pharmaceutical process research and actual industrial production.

Key words: quality by design; Shenmai Injection; design space; alcohol extraction and water precipitation; multi-index optimization

收稿日期: 2020-04-03

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

作者简介: 陈泽麒 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药科学与工程。Tel: 18158506464 E-mail: chenzzq@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

参麦注射液源于传统中药名方“生脉散”，由红参和麦冬 2 味药材经乙醇提取、浓缩、水沉、配液等多步工艺制成^[1-2]。其中皂苷类成分是参麦注射液发挥广泛药理作用的极其重要的活性成分，其药理作用显著，在延缓衰老、改善学习记忆障碍、抗心脑血管疾病、抗肿瘤、抗炎和免疫调节等多方面均能发挥作用^[3-6]。

醇提水沉是中药注射剂生产中常用的分离纯化技术^[7]。在参麦注射液生产过程中，醇提水沉工艺分为红参的醇提工艺，麦冬的醇提工艺，红参、麦冬流浸膏水沉工艺。为保证参麦注射液的质量一致性与安全性，对其生产过程中的醇提水沉工艺进行深入的研究，确定可行且高效的控制策略至关重要。

生产过程中往往存在多个指标（如产品质量、生产效率、生产稳健性、经济效益等）需要进行优化。通常情况下，各个指标无法同时达到最优，需要在其间进行权衡，使各指标都能达到相对满意的水平。满意度函数法是一种常用的综合多个优化目标的方法，它将各响应指标的预测值分别通过各自的满意度函数转化成该指标的满意度，再将多个满意度合并成一个总体满意度，以便对得到的总体满意度函数进行单目标优化^[8]。在本研究中，要同时实现产品质量的最优化以及生产效益的最大化，需要同时对工艺的除杂能力、有效成分保留能力、生产效率、过程能耗做出决策优化。

在之前的工作中，已采用危害及可操作性分析与设计空间法对红参的醇提工艺进行优化^[9]。本研究在此基础上，基于质量源于设计（quality by design, QbD）的理念^[10-12]，应用风险分析^[13]、实验设计^[14]等方法研究参麦注射液醇提水沉过程，建立麦冬乙醇提取、红参和麦冬流浸膏水沉的设计空间。确定设计空间的范围后，利用多指标优化算法综合考察产品质量、生产能耗、生产效率，获得最佳工艺参数值。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AB204-N、XS105 分析天平，梅特勒-托利多上海有限公司；SE6001 电子天平，奥豪斯仪器有限公司；Milli-Q 超纯水机，美国 Millipore 公司；Agilent 1100 型高效液相色谱仪，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、ELSD 检测器、ChemStation 工作站；THD-1008W 低温恒温槽、ZCY-15B 数控超级恒温槽，宁波天恒

仪器厂；BL-240/241L 集成防爆冷柜，上海亿思科技实业有限公司；BT300-2J 恒流泵，保定兰格恒流泵有限公司；HG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；GM1.0A 隔膜真空泵，天津市津腾实验设备有限公司；JJ-1 增力电动搅拌机，金坛市杰瑞尔仪器有限公司；03-1 磁力搅拌机，杭州仪表电机有限公司。

1.2 试剂

麦冬，产地四川，批号 20141014，大理药业股份有限公司提供。红参流浸膏、麦冬流浸膏，产地云南大理，批号 150917，大理药业股份有限公司提供。葡萄糖对照品，批号 20141121，质量分数 $\geq 98\%$ ，购自国药集团化学试剂有限公司；果糖对照品，批号 B1625030，质量分数 $\geq 98\%$ ，购自阿拉丁试剂（上海）有限公司。蔗糖对照品，批号 WXBB0906V，质量分数 $\geq 98\%$ ，购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；亚油酸对照品，批号 SLBQ9359V，质量分数 $\geq 98\%$ ，购自 Sigma-Aldrich 公司；甲基麦冬二氢高异黄酮 A 对照品（批号 160109，质量分数 $\geq 98\%$ ）、甲基麦冬二氢高异黄酮 B 对照品（批号 160107，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Rg₁ 对照品（批号 140729，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Re 对照品（批号 140721，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Rb₁ 对照品（批号 140723，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Rc 对照品（批号 160507，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Rb₂ 对照品（批号 160323，质量分数 $\geq 98\%$ ）、人参皂苷 Rd 对照品（批号 140719，质量分数 $\geq 98\%$ ），均购自上海融禾医药科技发展有限公司。人参皂苷 Rf 对照品（质量分数 $\geq 98\%$ ）由吉林大学陈燕萍教授提供。无水乙醇购自上海凌峰化学试剂有限公司，去离子水由水纯化系统（Milli-Q，Milford 公司）制备，色谱纯乙腈购自 Merck 公司。

2 方法与结果

2.1 参麦注射液醇提和水沉工艺操作流程

2.1.1 麦冬的乙醇回流提取 准确称取 30 g 麦冬饮片，置于玻璃夹套提取罐中，加入一定量乙醇水溶液加热回流提取一定时间，滤过，收集滤液。相同条件下，每份饮片回流提取 2 次，合并滤液，密封后常温放置。

2.1.2 红参、麦冬流浸膏水沉 将红参、麦冬流浸膏分别按比例稀释成原药材 0.4 g/mL 的稀释液，混合后搅拌 20 min。取 100 mL 混合液，按设定的 pH 值将相应混合液以 NaOH 或 HCl 调至一定 pH 值后，

置于 120 mL 的恒温玻璃夹套反应器中。到达设定的静置时间后,通过低温高速离心(10 000 r/min, 4 ℃)使固液分离,得水沉上清液。

2.2 工艺风险分析

本实验使用危害与可操作性分析^[15](Hazard and Operability Analysis, HAZOP)法对麦冬回流醇提工艺与混合水沉工艺参数进行风险评估,辨识潜在在危害参数的风险高低,从而对工艺的众多参数进行筛选。由于在参麦注射液生产过程中,麦冬与红

参的提取工艺一致,因此本实验麦冬醇提工艺的风险分析结果参照赵芳等^[9]红参醇提工艺的分析结论,选择溶剂乙醇体积分数、提取时间及醇料比为麦冬醇提工艺的关键工艺参数。

通过鱼骨图(图 1)分析^[16],影响参麦注射液水沉过程的工艺参数主要涉及麦冬及红参流浸膏、搅拌、环境、静置 5 个方面。对以上参数进一步进行 HAZOP 风险分析,如表 1 所示,确定水沉的关键工艺参数(critical process parameters, CPP)。

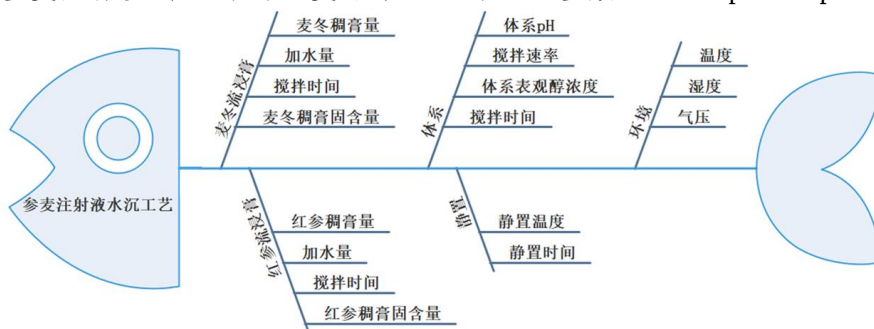


图 1 参麦注射液水沉工艺参数鱼骨图

Fig. 1 Fishbone diagram of process parameters for water precipitation processes of Shenmai Injection

本研究主要考察工艺参数对麦冬醇提水沉的影响,高风险潜在在危害参数如果控制不当,会导致不同批次参麦注射液中间体化学组分产生差异。因此,选择静置体系 pH 值、静置时间、静置温度为参麦注射液水沉工艺的关键工艺参数。

2.3 关键评价指标的选择

在麦冬醇提工艺研究中,选择单位质量药材中麦冬总皂苷、甲基麦冬二氢高异黄酮 A 及 B(黄酮 A、B)以及总固体提出量(总固量)等关键质量属性(critical quality attributes, CQA)值作为工艺的评价指标。此外,麦冬醇提液中含有大量的糖类成分,会直接影响注射液渗透压、固含量等参数^[17]。将苯酚-硫酸法^[18]测量麦冬醇提液中总糖量以及 HPLC-ELSD 法测量麦冬醇提液中果糖、葡萄糖、蔗糖及麦芽糖的总含量进行对比后发现,果糖、葡萄糖、蔗糖三者占总糖量的绝大部分。因此,同时将单位质量药材中果糖、葡萄糖、蔗糖提出量设为关键评价指标。随后的混合水沉工艺的目的,主要在于除去前序醇提工艺中随皂苷等有效成分一同提出的树脂、油脂等杂质。预试验结果表明,亚油酸是其中主要的油脂成分,其存在会影响制剂澄明度与稳定性;此外,水沉也可能在一定程度上造成皂苷的损失。为保证在杂质被充分去除的同时,有效成分能尽可能保留,本研究同时将人参皂苷 Rg₁、

Re、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 保留率以及亚油酸去除率作为评价指标。

2.4 分析及计算方法

采用文献报道的 HPLC-UV 法^[19]测定麦冬醇提液中甲基麦冬二氢高异黄酮 A 及 B 的含量;采用文献报道的 HPLC-ELSD 法^[20]测定麦冬醇提液中果糖、葡萄糖、蔗糖三种糖的含量;采用《中国药典》2015 年版中规定的高氯酸显色法^[18]测定麦冬总皂苷的含量,含麦冬总皂苷以鲁斯可皂苷元计;采用文献报道的 HPLC-UV 法^[21]测定水沉上清液中亚油酸的含量;采用药典规定的干燥法^[18]测定总固体含量;采用文献报道的 HPLC-UV 法^[22]测定水沉上清液中人参皂苷的含量。

数据的统计分析由 Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, USA) 软件完成;设计空间及满意度函数的计算由 MODDE Pro 11.0.1 (MKS Umetrics, Sweden) 和 python 3.7.4 软件完成。

2.5 麦冬醇提工艺优化

2.5.1 实验设计 本研究采用 Box-Behnken 实验设计方法研究麦冬醇提关键工艺参数和关键工艺评价指标之间的定量关系,以公式(1)表示。

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

a_0 是常数, a_i 、 a_{ii} 与 a_{ij} 为回归系数, Y 是工艺评价指标, X_i

表 1 参麦注射液水沉工艺 HAZOP 风险评估

Table 1 HAZOP risk assessment of water precipitation process of Shenmai Injection

潜在危害参数	引导词	偏差	原因	风险分析	整改措施
红参水料比	过大或过小	实际红参浸膏稀释后生药含量并不严格等于 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	量具精度、前序操作记录失误等导致实际红参浸膏稀释后生药质量分数在 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右波动	低风险	严格执行生产记录执行规则；经常检测电子天平的运行状态，使之保持良好精度
麦冬水料比	过大或过小	实际麦冬浸膏稀释后生药含量并不严格等于 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	量具精度、前序操作记录失误等导致实际红参浸膏稀释后生药质量分数在 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右波动	低风险	严格执行生产记录执行规则；经常检测电子天平的运行状态，使之保持良好精度
流浸膏搅拌时间	过大或过小	实际搅拌时间在 15 min 附近波动	工人计时误差、搅拌器实际运行误差等导致每批次搅拌时间并不完全等同	低风险	搅拌的主要作用是使料液与水混合均匀，因此只要两相混合均匀即可，对搅拌时间严格要求的意义不大
流浸膏搅拌速率	过大或过小	实际搅拌速率在设定值附近波动	搅拌器老化、电压不稳导致的功率不足、设置失误等外部原因导致的实际搅拌速率与设定值不同	低风险	经常检修设备，严格监测并控制搅拌器功率、搅拌速度、工厂电压，使搅拌器在不同批次中都保持稳定运转
混合后搅拌时间	过大或过小	实际搅拌时间在 20 min 附近波动	工人计时误差、搅拌器实际运行误差等导致每批次搅拌时间并不完全等同	低风险	使 2 种料液混合均匀即可，对搅拌时间严格要求的意义不大
混合后搅拌速率	过大或过小	实际搅拌速率在设定值附近波动	搅拌器老化、电压不稳导致的功率不足、设置失误等外部原因导致的实际搅拌速率与设定值不同	低风险	经常检修设备，严格监测并控制搅拌器功率、搅拌速率、工厂电压，使搅拌器在不同批次中都保持稳定运转
体系表观乙醇体积分数	过大或过小	实际过程乙醇体积分数会略有波动	设备加醇量会略有波动	中等风险	改进加醇方式，确保体系表观乙醇体积分数
静置时间	过大或过小	实际静置时间批次间并不完全一致	工人排班、储存罐不足等导致静置时间不足或静置太久	高风险	优选实际操作时静置时间的范围，严格按照优化范围进行生产
静置温度	过大或过小	实际静置温度批次间并不完全一致；同一批次静置过程的不同时间温度也不完全一致	供能设备、制冷设备、循环水、保温设备等状态不稳定导致的静置温度每批次之间有差异	高风险	优选实际操作时静置温度的范围，加强静置过程温度实时监测，严格按照优化范围进行生产
静置体系 pH 值	其他	每批次水沉液 pH 值不同	每批次使用物料不同导致的静置液 pH 值不同，对 pH 值敏感物质的沉降可能受到影响	高风险	采购时严格执行标准，选用质量上等、来源可靠的药材；根据设定要求保存，避免失效

是关键工艺参数，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 软件提供的 Monte Carlo 方法^[23-24]计算获得设计空间。概率设计空间的计算参数设置如下：分辨率设定为 16，每个点计算模拟次数为 5 000 次，每个工艺评价指标以 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。

工艺参数水平范围按实际生产设定，具体见表 2，实验设计见表 3。

2.5.2 麦冬醇提工艺 CPP 和 CQA 之间回归模型的建立 麦冬回流醇提优化实验结果见表 4。各工艺

表 2 参麦注射液麦冬醇提工艺 Box-Behnken 实验设计的因素及水平

Table 2 Parameters and levels of Box-Behnken experiment design for ethanol extraction process of Shenmai Injection

因素	符号	单位	水平		
			-1	0	+1
乙醇体积分数	X_1	%	85	90	95
提取时间	X_2	min	100	120	140
醇料比	X_3	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	2.5	3.0	3.5

评价指标的分布范围较宽，说明本实验设计关键工艺参数的范围设置较为合理。可以发现提出物中总糖质量占总固体质量的 41%~61%。

表 3 参麦注射液麦冬醇提工艺 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 3 Experimental condition and results of Box-Behnken experiments for ethanol extraction process of Shenmai Injection

序号	工艺条件			指标提出量/(mg·g ⁻¹ 药材)				指标提出量/(μg·g ⁻¹ 药材)		
	乙醇/%	提取时间/min	醇料比/(mL·g ⁻¹)	总固量	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦冬总皂苷	黄酮 A	黄酮 B
1	85	100	3.0	92.62	32.83	5.00	3.40	38.28	55.72	44.02
2	95	100	3.0	19.73	9.55	1.65	0.70	6.38	56.81	46.54
3	85	140	3.0	117.45	42.87	6.14	2.96	59.13	55.63	43.45
4	95	140	3.0	20.21	10.69	2.71	0.85	7.01	53.75	44.60
5	85	120	2.5	102.43	29.76	5.84	4.59	46.98	49.24	38.25
6	95	120	2.5	19.98	9.58	1.47	0.67	6.73	57.74	49.45
7	85	120	3.5	98.47	32.70	5.40	3.05	41.34	58.86	46.15
8	95	120	3.5	23.81	12.72	1.93	0.98	7.18	56.75	46.23
9	90	100	2.5	42.62	18.31	2.81	1.00	12.59	59.62	49.01
10	90	140	2.5	56.94	23.35	4.28	1.50	22.94	56.78	46.18
11	90	100	3.5	54.25	24.25	4.31	1.26	16.05	56.01	43.63
12	90	140	3.5	51.55	23.19	3.72	1.67	15.68	55.99	44.83
13	90	120	3.0	40.43	18.78	2.11	1.42	12.38	64.85	52.61
14	90	120	3.0	55.57	25.01	5.10	1.83	17.44	58.32	45.47
15	90	120	3.0	55.06	26.36	3.83	0.87	17.68	59.77	48.14
16	90	120	3.0	47.54	20.75	3.22	0.88	14.53	53.51	44.14
17	90	120	3.0	55.71	24.19	4.00	1.38	18.55	63.89	49.45

表 4 参麦注射液麦冬醇提工艺各指标模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of index models for ethanol extraction process of Shenmai Injection

项目	总固量	果糖	葡萄糖	蔗糖	总皂苷	黄酮 A	黄酮 B
常量	1.694 (0.000)	2.502 (0.000)	2.537 (0.000)	1.166 (0.000)	1.051 (0.000)	16.286 (0.000)	14.926 (0.000)
X ₁	-1.358 (0.000)	-1.321 (0.000)	-1.241 (0.000)	-1.200 (0.000)	-1.266 (0.000)	—	—
X ₂	0.153 (0.061)	—	—	—	0.250 (0.004)	—	—
X ₃	—	—	—	—	—	—	—
X ₁ ²	0.358 (0.084)	—	—	0.745 (0.001)	0.652 (0.000)	—	—
X ₁ X ₂	-0.202 (0.087)	—	—	—	-0.322 (0.007)	—	—
X ₁ X ₃	—	—	—	0.412 (0.032)	—	—	—
r ²	0.977	0.872	0.770	0.914	0.974	0.487	0.585

括号内为各回归系数相应的 P 值 “—” 处代表该因子对模型的影响不显著 (即 P ≥ 0.10), 表 7 同

The corresponding P values of each regression coefficient are in brackets “—” represent that the influence of this factor on the model is not significant (P ≥ 0.10), same as Table 7

采用 MODDE 软件建立各指标多元线性回归模型。经显著性分析, 得到的模型的回归系数、P 值以及 r² 见表 4。

总固体、果糖、葡萄糖、蔗糖提出量模型 r² 均大于 0.770, 说明了模型能够解释绝大部分变异。其中 X₁ 对上述物质提出量的相关系数都为负值, 说明随着乙醇体积分数提高, 提取物中总固体和糖类成分含量均减少, 可能原因是随着乙醇体积分数增加,

大分子及糖类成分溶解度降低。X₂ 对总固体提出量的相关系数为正值, 说明随着提取时间延长, 会提出更多固体物质, 可能的原因是随着提取时间延长, 更多大分子物质水解成小分子物质, 随后溶解在提取液中^[25]。X₃ 对各项指标均无直接的显著影响, 说明在实际生产中, 提取出麦冬饮片中相应有效物质的乙醇溶液的需求量远小于当前实际使用量。此外, 对于甲基麦冬高异黄酮 A 与 B 而言, 3 个工艺参数

对其提出量均影响不显著。可能原因是现有参数变动范围内,麦冬中含有的极少量黄酮(30~60 $\mu\text{g/g}$ 饮片)均已提取充分。

2.5.3 设计空间的计算 为进一步提升工艺品质,依据企业实际生产情况,设定以下提取工艺评价指标标准:对高异黄酮提取量不设限,对总皂苷提出量设置下限为 16 $\mu\text{g/g}$;对糖类成分提出量设置上限,果糖、葡萄糖、蔗糖提出量上限分别为 30、6、3 mg/g ;对总固体提出量设置上下限分别为 30、90 mg/g 。根据以上设定参数,用 MODDE Pro 11.0.1

软件提供的 Monte Carlo 方法计算麦冬醇提工艺设计空间,见图 2。

图 2 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。在工艺指标达标概率均 $\geq 95\%$ 的设计空间范围内选择最合适的操作空间。考虑关键工艺参数对麦冬醇提工艺指标的影响规律及对乙醇用量、能耗的考量,最终选择的操作空间为乙醇体积分数 88%~89%,醇料比 2.5~3.0 mL/g,提取时间 110~140 min。

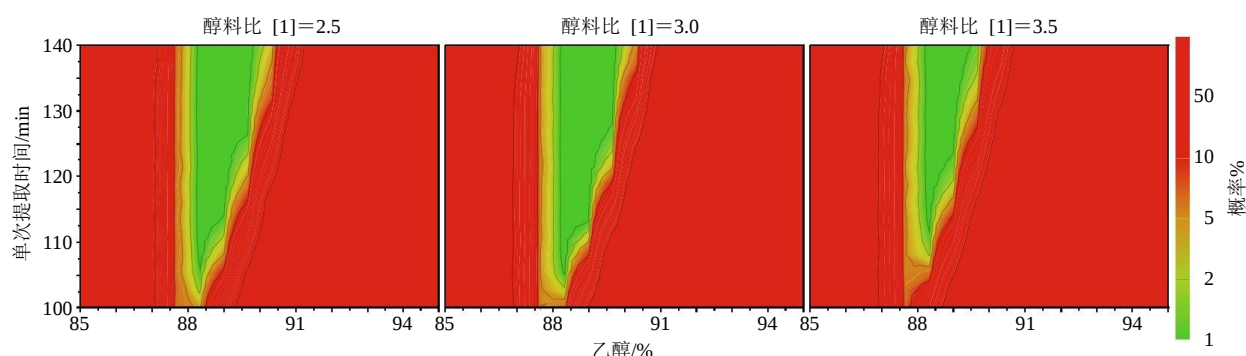


图 2 参麦注射液麦冬醇提工艺概率设计空间图

Fig. 2 Design spaces for ethanol extraction process of Shenmai Injection

2.6 参麦注射液水沉工艺优化

2.6.1 实验设计 参麦注射液水沉工艺 Box-Behnken 实验设计因素及水平见表 5,实验设计及结果见表 6。

2.6.2 水沉工艺 CPP 和 CQA 之间回归模型的建立 水沉工艺实验结果表明,人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rf 保留率均较高,而人参皂苷 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rd 在水沉过程中的损失较大。这是由于人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rf 为三醇型人参皂苷,极性高,水溶性好,而人参皂苷 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rd 为二醇型人参皂苷,低温下水溶性比三醇型人参皂苷低,在水沉过程中沉降较多,导致上清液中保留率较低。因此,最终仅将人参皂苷 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rd 经过水沉工艺后的保

表 5 参麦注射液水沉工艺 Box-Behnken 实验设计的因素及水平

因素	符号	单位	水平		
			-1	0	+1
静置体系 pH 值	X_4	—	2.8	4.8	6.8
静置时间	X_5	h	18	34	50
静置温度	X_6	$^{\circ}\text{C}$	1	3	5

留率作为 CQA。据此建立的各指标多元线性回归模型,经显著性分析,得到的模型回归系数、 P 值以及 r^2 见表 7。

4 个人参二醇型皂苷损失率及亚油酸去除率回归模型 r^2 均大于 0.926,说明模型能解释绝大部分变异。3 个工艺参数对二醇型人参皂苷保留率都有显著影响。在工艺参数设定范围内, X_4 的相关系数为负值,说明随着 pH 值增大,二醇型皂苷保留率的降低明显,损失量变大; X_5 的相关系数为负值,说明随着冷置时间的延长,二醇型皂苷保留率降低明显,损失量变大; X_6 的相关系数为正值,说明随着静置体系温度的增高,二醇型人参皂苷保留率会变高,即皂苷损失率降低。亚油酸在水沉中沉降规律与人参皂苷损失规律基本相反。

2.6.3 设计空间的计算 为进一步提升工艺品质,依据企业实际生产情况,设定以下工艺评价指标标准:对亚油酸的去除率设置下限为 55%,保证工序的除杂率;将人参皂苷 Rb_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rd 的保留率的下限值均设置为 50%,保证产品中人参皂苷的含量到达一定要求,从而保证制剂有效性。据此标准,计算设计空间,见图 3。

图 3 中颜色由绿至红的渐变表示相应工艺条件

表 6 参麦注射液水沉工艺 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 6 Experiment condition and results of Box-Behnken experiments for water precipitation process of Shenmai Injection

序号	工艺条件			人参皂苷保留率/%							亚油酸去除率/%
	静置体系 pH 值	静置时间/h	静置温度/℃	Rg ₁	Re	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	
1	2.8	18	3	98.73	98.31	97.42	90.62	89.64	89.63	85.01	22.23
2	6.8	18	3	96.92	97.07	93.85	77.64	73.29	69.99	81.94	24.47
3	2.8	50	3	99.24	98.65	98.21	87.11	85.61	85.48	78.88	32.44
4	6.8	50	3	95.87	96.52	92.63	65.57	59.10	54.08	71.28	44.53
5	2.8	34	1	99.05	99.66	98.93	92.79	91.87	91.81	88.10	21.81
6	6.8	34	1	91.84	96.62	88.27	63.69	58.12	53.82	68.50	44.19
7	2.8	34	5	99.79	99.83	99.91	98.91	98.89	98.83	99.05	4.85
8	6.8	34	5	98.97	99.15	98.58	93.64	92.46	91.40	95.34	4.79
9	4.8	18	1	95.54	94.91	91.18	64.43	58.06	52.77	67.26	61.70
10	4.8	50	1	94.09	93.37	89.37	50.26	41.30	34.66	52.91	98.07
11	4.8	18	5	97.47	97.90	96.34	88.08	85.83	83.77	90.46	22.01
12	4.8	50	5	98.20	98.92	96.79	83.67	80.25	76.94	86.78	30.26
13	4.8	34	3	96.64	96.12	89.52	65.11	58.10	52.67	69.15	64.65
14	4.8	34	3	96.20	95.62	87.39	60.90	53.03	47.60	64.27	76.19
15	4.8	34	3	96.04	95.49	86.98	59.07	50.74	44.92	62.62	79.59
16	4.8	34	3	96.04	95.47	87.56	60.22	52.35	46.74	63.73	77.74
17	4.8	34	3	96.20	95.70	88.14	62.16	54.41	48.61	66.42	68.15

表 7 参麦注射液水沉工艺各指标模型的方差分析

Table 7 Analysis of variance of index models for water precipitation process of Shenmai Injection

项目	亚油酸去除率	Rb ₁ 保留率	Rc 保留率	Rb ₂ 保留率	Rd 保留率
常量	2.522 (0.000)	4.061 (0.000)	2.975 (0.000)	2.372 (0.000)	4.946 (0.000)
X ₄	0.114 (0.189)	-0.398 (0.000)	-0.400 (0.000)	-0.412 (0.000)	-0.227 (0.007)
X ₅	0.234 (0.016)	-0.197 (0.007)	-0.195 (0.008)	-0.192 (0.008)	-0.233 (0.006)
X ₆	-0.512 (0.000)	0.538 (0.000)	0.521 (0.000)	0.504 (0.000)	0.634 (0.000)
X ₄ ²	-0.677 (0.000)	0.564 (0.000)	0.576 (0.000)	0.589 (0.000)	0.519 (0.000)
X ₆ ²	-0.289 (0.004)	0.283 (0.001)	0.290 (0.001)	0.282 (0.001)	0.334 (0.000)
X ₄ X ₆	—	0.195 (0.008)	0.186 (0.011)	0.185 (0.010)	0.150 (0.050)
r ²	0.926	0.965	0.965	0.966	0.954

下, 响应值不符合要求的概率(失败概率)由 1% 逐渐增大。在工艺指标达标概率均≥95%的设计空间范围内选择最合适的操作空间。考虑到料液的 pH 值并不能自由控制, 一般在 4~6 波动, 因此, 最终选择的操作空间为当料液 pH 值在 4 左右时, 静置时间控制在 30~40 h, 静置温度控制在 1~3.2 ℃; 当料液 pH 值在 5 左右时, 静置时间控制在 26~35 h, 静置温度控制在 2~3 ℃; 当料液 pH 值在 6 左右时, 静置时间控制在 36 h 左右, 静置温度控制在 2.5 ℃左右。

2.7 多指标优化算法优化研究

在设计空间范围内, 为了综合考虑产品质量、生产效率、生产能耗, 进一步利用多指标优化算法在设计空间范围内确定最佳工艺条件。

关键工艺指标满意度评价: 在设计空间范围内, 有效成分提出或保留越多越好, 满意度以公式(2)表示; 杂质成分提出或保留越少越好, 满意度以公式(3)表示。

$$dc_{QA} = (\text{工艺条件下提出率或保留率} - \text{工艺条件下提出率或保留率}_{\min}) / (\text{工艺条件下提出率或保留率}_{\max} - \text{工艺条件下提出率或保留率}_{\min})$$

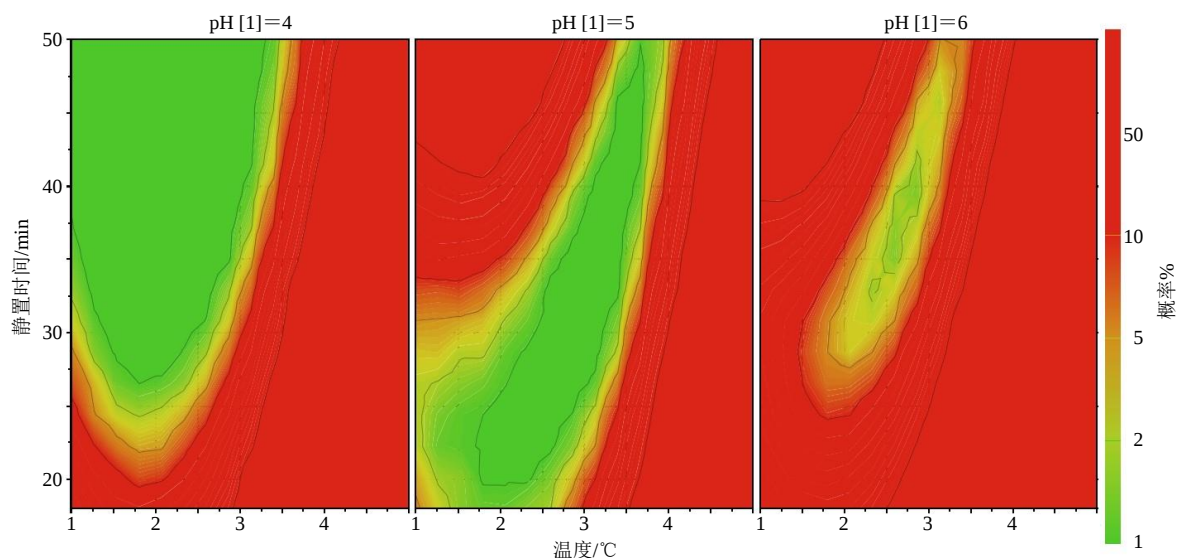


图 3 参麦注射液水沉工艺概率设计空间图

Fig. 3 Design spaces for water precipitation process of Shenmai Injection

下提出率或保留率_{min}), 工艺条件 $\in$ 设计空间 (2)

$d_{CQA} = (\text{工艺条件下提出率}_{\max} - \text{工艺条件下提出率}) / (\text{工艺条件下提出率}_{\max} - \text{工艺条件下提出率}_{\min})$, 工艺条件 $\in$ 设计空间 (3)

关键工艺参数满意度评价: 醇料比、提取时间、静置时间的降低以及静置温度升高可以减少生产能耗, 提高生产效率。考虑到乙醇体积分数对能耗影响相对较小, 而静置体系 pH 值实际生产过程中不能调控, 因此主要对醇料比、提取时间、静置时间、静置温度进行满意度评价, 醇料比、提取时间、静置时间满意度以公式 (4) 表示, 静置温度满意度以公式 (5) 表示。

$$d_{CPP} = (X_{\max} - X) / (X_{\max} - X_{\min}), X \in \text{设计空间} \quad (4)$$

$$d_{CPP} = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}), X \in \text{设计空间} \quad (5)$$

总体满意度评价: 产品质量在于药品生产中至关重要, 因此优先级最高; 提取时间、静置时间、醇料比不仅影响实际生产能耗, 也会影响生产效率, 因此优先级次之; 静置温度优先级最后。给与优先级较高的指标以更高的权重, 以公式 (6) (7) 表示。

$$\text{醇提 } D = [(d_{\text{总固}} d_{\text{果糖}} d_{\text{葡萄糖}} d_{\text{蔗糖}} d_{\text{总皂苷}})^{4/5} d_{\text{醇料比}} d_{\text{提取时间}}]^{1/6} \quad (6)$$

$$\text{水沉 } D = [(d_{Rb1} d_{Rc} d_{Rb2} d_{Rd} d_{\text{亚油酸}})^{4/5} d_{\text{静置时间}} d_{\text{静置温度}}^{1/2}]^{1/5.5} \quad (7)$$

通过多元线性回归模型及满意度评价公式, 用 python 3.7.4 在设计空间内寻找总体满意度最佳操作条件。对麦冬的醇提工艺而言, 在设计空间范围内, 乙醇体积分数 89.0%、提取时间 110 min, 醇料比 2.99 时总体满意度最优, 满意度为 0.722。

对混合水沉工艺而言, 当物料 pH 值为 4 左右

时, 在 2.0 °C 静置 40 h 时工艺的总满意度最优, 满意度为 0.995; 当物料 pH 值为 5 左右时, 在 2.0 °C 静置 35 h 时工艺的总满意度最优, 满意度为 0.999。

3 讨论

本研究以参麦注射液的生产过程为研究对象, 综合且系统地考察了水提醇沉这一中药注射液生产过程中常用的纯化工艺。首先, 基于 QbD 理念, 通过风险分析、实验设计及设计空间法优化了麦冬的醇提工艺及随后的水沉工艺, 确定了相应的操作空间以保障参麦注射液过程中间体的质量。随后, 进一步从商业化生产的实际情况出发, 综合考虑了产品质量、生产效率、生产能耗等对过程效益的影响, 利用基于满意度评价的多指标优化算法在操作空间的范围内确定了具有最高满意度的最佳生产条件。

本研究提出了一种基于 QbD 以及满意度算法的用于确定过程最优工艺参数的系统性工艺优化研究方法, 为工业生产规模下的中药生产过程提供了兼具保证产品质量与提高经济效益功能的控制策略。方法确定的最佳条件有利于在保证产品质量的同时最大化压缩生产成本, 在中药的制药工艺研究与商业化生产中具有较大的实际应用价值。

参考文献

- [1] 谈梦霞, 陈佳丽, 邹立思, 等. 不同加工麦冬中多元活性成分的含量测定及多元统计分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(6): 992-1002.
- [2] 吴茵, 魏欣, 张黎媛, 等. HPLC-MS/MS 法同时测

- 定参麦注射液 7 种主要有效成分 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2625-2630.
- [3] 童菊华, 庞小存, 王 威, 等. 杭麦冬与川麦冬中高异黄酮类成分和抗氧化活性的比较 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3091-3095.
- [4] Lu X, Tong W, Wang S, *et al.* Comparison of the chemical constituents and immunomodulatory activity of *Ophiopogonis Radix* from two different producing areas [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017(134): 60-70.
- [5] Singh D, Chaudhuri P K. Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins [J]. *Integ Med Res*, 2018, 7(1): 33-43.
- [6] 张国勇, 王双虎, 张青莲, 等. 参麦注射液对大鼠细胞色素 P450 酶亚型活性的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2482-2487.
- [7] 中药制药工艺与设计 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [8] Costa N R, Lourenço J, Pereira Z L. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions [J]. *Chemom Intell Lab Syst*, 2011(107): 234-244.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Yu L X. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(4): 781-791.
- [13] Su Q, Moreno M, Giridhar A, *et al.* A Systematic framework for process control design and risk analysis in continuous pharmaceutical solid-dosage manufacturing [J]. *J Pharm Innov*, 2017, 12(4): 327-346.
- [14] Goutte F, Guemguem F, Dragan C, *et al.* Power of experimental design studies for the validation of pharmaceutical processes: Case study of a multilayer tablet manufacturing process [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28(7): 841-848.
- [15] Dunjón J, Fthenakis V, Vilchez J A, *et al.* Hazard and operability (HAZOP) analysis. A literature review [J]. *J Hazard Mater*, 2010(173): 19-32.
- [16] 赵 芳, 苟 维, 刘 飞, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 51-58.
- [17] 黄 利, 葛 婷, 夏蕴琼, 等. HPLC-ELSD 同时测定丹参注射液中 4 种糖类成分的含量 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(6): 500-502.
- [18] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [19] 吴发明, 杨瑞山, 张思荻, 等. 高效液相色谱法同时测定麦冬中 3 个黄酮成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(8): 655-658.
- [20] 凌益平, 徐兵勇, 刘 武, 等. HPLC-ELSD 测定红参、麦冬及其制剂中糖的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(11): 1395-1399.
- [21] 杨会芳, 李德坤, 周大铮, 等. HPLC 法测定红参提取物中的 α -亚麻酸、亚油酸 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 523-526.
- [22] 潘坚扬, 程翼宇, 王 毅, 等. 9 种人参皂苷同时测定方法及在人参质量鉴别中的应用 [J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1565-1568.
- [23] 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.
- [24] Chen T, Gong X, Zhang Y, *et al.* Optimization of a chromatographic process for the purification of saponins in *Panax notoginseng* extract using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015(154): 309-319.
- [25] 张璐欣, 周学谦, 李德坤, 等. 麦冬提取工艺多糖变化规律研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(7): 1007-1011.