

基于分析质量源于设计同时开发盐酸青藤碱制药过程 3 种物料的指纹图谱方法

颜佳乐¹, 邵艳妮^{1,3}, 仇萍², 丁丰^{1,3}, 龙宪军², 龚行楚^{1,3,4*}

1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058
2. 湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 怀化 418000
3. 浙江大学金华研究院, 浙江 金华 321016
4. 现代中药创制全国重点实验室, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 基于分析质量源于设计 (analytical quality by design, AQbD) 理念, 同时开发检测盐酸青藤碱制药过程 3 种物料的指纹图谱分析方法。方法 采用实验设计优化方法参数, 通过哑元 (dummy variables, 虚拟变量) 表征物料类型, 将物料类型纳入 AQbD 过程。建立定量模型, 建立方法可操作设计区域 (method operable design region, MODR) 并进行验证, 考察方法的耐用性及方法学, 应用于多批次物料进行相似度评价。结果 建立了关键方法参数 (critical method parameters, CMPs)、物料类型 (material type, MT) 与关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 之间的定量模型, 模型的 P 值均 < 0.0001 , R^2 均大于 0.80。优化获得了 MODR 并成功进行验证, 通过了方法学考察, 相对保留时间 RSD $< 0.40\%$, 相对峰面积 RSD $< 5.0\%$ 。除 YC10 批次药材、JH3 批次碱化液之外, 其余物料与对照图谱的相似度大于 0.95。所建立方法适用于盐酸青藤碱生产过程所涉及的药材、渗漉液、碱化液 3 种物料的指纹图谱相似度评价。结论 所建立的 HPLC 指纹图谱方法适用于检测 3 种盐酸青藤碱制药过程物料。建立分析方法的流程有望推广用于中药制药工业系列相关物料检测方法开发。

关键词: 青风藤; 盐酸青藤碱; 分析质量源于设计; 中间体; 指纹图谱; 关键方法参数; 关键质量属性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6154-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.006

Developing fingerprint analysis methods simultaneously for three materials in pharmaceutical process of sinomenine hydrochloride based on analytical quality by design

XIE Jiale¹, TAI Yanni^{1,3}, QIU Ping², DING Feng^{1,3}, LONG Xianjun², GONG Xingchu^{1,3,4}

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
2. Hunan Zhengqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Huaihua 418000, China
3. Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321016, China
4. National Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective Based on the concept of analysis quality by design (AQbD), to simultaneously develop fingerprint analysis methods for three materials in the pharmaceutical process of sinomenine hydrochloride. **Methods** Design of experiment was used to optimize method parameters. Dummy variables were used to represent material types, and the material type was included in the AQbD process. A quantitative model was established, and the method operating design region (MODR) was established and validated to investigate the robustness and methodology of the method, which was applied to evaluate the similarity of multiple batches of materials. **Results** A quantitative model was established between critical method parameters (CMPs), material type (MT), and critical quality attributes (CQAs), with all model P values being less than 0.0001 and R^2 values greater than 0.80. The MODR was optimized and successfully validated. The methodology was investigated with relative retention time RSD $< 0.40\%$ and relative peak area RSD generally $< 5.0\%$. Except for batch YC10 of medicinal material and batch JH3 of alkalized liquid, the similarity value to the reference fingerprint was greater than 0.95 for all other materials. The established method is suitable for the similarity evaluation of fingerprint

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ80084); 国家中医药管理局创新团队与人才支持计划 (ZYXCXTD-D-202002)

作者简介: 颜佳乐 (2000—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 12319006@zju.edu.cn

*通信作者: 龚行楚, 男, 副教授, 博士生导师, 从事中药制药过程与质量控制研究。E-mail: gongxingchu@zju.edu.cn

of three materials involved in the production process of sinomenine hydrochloride, including medicinal materials, percolation solutions, and alkalized solutions. **Conclusion** The HPLC fingerprint method established in this study is suitable for the analysis of three materials in the sinomenine hydrochloride pharmaceutical process. The process of establishing the analytical method in this study is expected to be promoted for the development of detection methods for related materials in the traditional Chinese medicine pharmaceutical industry.

Key words: *Sinomenii Caulis*; sinomenine hydrochloride; analytical quality by design; intermediates; fingerprint; critical method parameters; critical quality attributes

青风藤 *Sinomenii Caulis* 为防己科风龙属植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 和毛青藤 *S. acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. var. *cinereum* Rehd. et Wils. 的干燥藤茎, 收录于《中国药典》2020年版一部, 其味苦、辛, 性平, 具有通经络、祛风利湿的作用^[1]。青风藤的主要药理活性成分为生物碱, 尤以青藤碱为代表^[2-4]。青藤碱药用时多使用其盐酸盐以增大水溶性^[5]。

目前盐酸青藤碱的工业制备方法主要包括溶剂回流提取法与酸水提取法 2 大类^[6]。酸水提取法以盐酸水溶液为溶剂, 通过渗漉获得酸水提取液, 后续步骤包括石灰沉淀、萃取、调节 pH 值、浓缩、结晶等^[7-8]。整个生产过程涉及到的物料包括青风藤药材、渗漉液、碱化液、萃取液、原料药以及制剂。然而, 目前已有的含量测定方法多关注于药材^[9-11]、原料药或是制剂^[12-13], 缺乏对生产过程中间体的关注。为了能更好地实施盐酸青藤碱生产全过程质量控制, 有必要开发其生产中间体的检测方法^[14]。

分析质量源于设计 (analytical quality by design, AQbD) 近年来常用于指导建立分析方法。2022 年发布的人用药品技术要求国际协调理事会 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) Q14 文件对 AQbD 的实施提供了具体指导^[15]。AQbD 的实施步骤包括确定分析目标概况 (analytical target profile, ATP)、建立关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 和关键方法参数 (critical method parameters, CMPs), 通过实验设计 (design of experiment, DoE) 确定方法可操作设计区域 (method operable design region, MODR), 以及方法验证等^[15-17]。

相较于传统方法, 应用 AQbD 进行分析方法开发可更好地保证方法性能, 提高方法耐用性, 且在 MODR 内的参数变化无需报告, 这些优势都让 AQbD 在分析方法开发方面具有良好前景^[18-21]。

本研究基于 AQbD 建立盐酸青藤碱生产过程中

间体指纹图谱的分析方法。首先通过确定性筛选实验设计 (definitive screening design, DSD) 筛选并优化方法参数, 然后建立 CMPs、物料类型 (material type, MT) 与 CQAs 之间的定量模型; 接着建立并验证了 MODR, 再通过 Plackett-Burman 实验设计证明所建立的方法具有良好的耐用性; 最后对所开发的指纹图谱方法进行了方法学考察, 并将其应用于多种物料检测。

1 仪器、试剂与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; PURELAB Flex 1 型超纯水机, 英国 ELGA Lab Water 公司; LMDTC15 型超声波清洗机, 北京绿棉科技有限公司; XS105 型精密电子天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司。

甲酸铵, 色谱纯, 质量分数 99.0%, 上海吉至生化科技有限公司; 氨水, 色谱纯, 质量分数 $\geq 25\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 无水乙醇, 分析纯, 永华化学股份有限公司。超纯水由水纯化系统 (英国 ELGA 超纯水机) 制备。编号 YC1、YC7~YC10 青风藤药材为自购, 编号 YC2~YC6 青风藤药材由湖南正清制药集团股份有限公司提供, 经浙江大学药学院龚行楚副教授鉴定, 青风藤为防己科风龙属植物青藤 *S. acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎。编号 SL1~SL10 盐酸青藤碱中间体渗漉液、编号 JH1~JH10 盐酸青藤碱中间体碱化液由湖南正清制药集团股份有限公司提供。10 批次盐酸青藤碱中间体渗漉液、碱化液与 10 批次青风藤药材无对应关系, 中间体不来源于此 10 批次药材。样品相关信息见表 1、2。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 青风藤药材提取液 参照《中国药典》2020 年版青风藤条目下供试品溶液制备方法获得^[1]。具体方法为取青风藤粉末 (过三号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 20 mL,

表 1 不同批次青风藤药材信息

药材编号	批号	厂家
YC1	2021.3.3	安国药源商贸有限公司
YC2	J48	湖南正清制药集团股份有限公司
YC3	J9	湖南正清制药集团股份有限公司
YC4	J47	湖南正清制药集团股份有限公司
YC5	J30	湖南正清制药集团股份有限公司
YC6	J15	湖南正清制药集团股份有限公司
YC7	20200508	河北康安生物科技有限公司
YC8	211201	宝鸡市永嘉天然植物开发有限公司
YC9	200605	亳州市永刚饮片厂
YC10	210409	亳州市初见花开电子商务有限公司

表 2 不同批次盐酸青藤碱中间体信息

渗漉液编号	批号	碱化液编号	批号
SL1	YC-211003	JH1	YC-211003
SL2	YC-211008-1	JH2	YC-211008-1
SL3	YC-211011	JH3	YC-211011-1
SL4	YC-211101	JH4	YC-211101
SL5	YC-211102	JH5	YC-211102
SL6	YC-211007-1	JH6	YC-211007-1
SL7	YC-211012	JH7	YC-211012
SL8	YC-211010	JH8	YC-211010
SL9	YC-211004-1	JH9	YC-211004-1
SL10	YC-211009-1	JH10	YC-211009-1

密塞，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 20 kHz）20 min，放冷，再称定质量，用 70%乙醇补足缺失的质量，摇匀，滤过，取续滤液。精密移取 1 mL 药材提取液至 10 mL 量瓶中，使用甲醇稀释并定容至刻度线，充分混匀后经过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.1.2 盐酸青藤碱中间体渗漉液 精密移取 0.2 mL 渗漉液中间体至 10 mL 量瓶中，使用甲醇稀释并定容至刻度线，充分混匀后经过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.1.3 盐酸青藤碱中间体碱化液 精密移取 0.2 mL 碱化液中间体至 10 mL 量瓶中，使用甲醇稀释并定容至刻度线，充分混匀后经过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.2 实验设计

通过前期单因素优化实验，确定方法所用流动

相 A 相 1 mmol/L 甲酸铵溶液，使用氨水调节 pH 值，B 相为溶于 80%乙腈的 1 mmol/L 甲酸铵溶液，所加氨水与 A 相等量。因此，通过控制 A 相 pH 值即可达到同时控制两相的目的，实验设计中仅以 A 相 pH 值为方法参数。本研究中选择了能以较少实验次数考察较多参数的 DSD，所研究的分析方法参数及其对应水平见表 3。具体方法参数包括：A 相 pH 值 (X_1)、第 1 梯度结束时间 (X_2)、第 1 梯度结束 B 相比比例 (X_3)、第 2 梯度结束时间 (X_4)、第 2 梯度结束 B 相比比例 (X_5)、第 3 梯度结束时间 (X_6)、第 3 梯度结束 B 相比比例 (X_7)、柱温 (X_8)、体积流量 (X_9)。各因素对应水平设置参考单因素优化实验的结果，结合先验知识对各参数的取值范围进行了适当扩展，确保实验设计的因素水平覆盖到单因素优化中分离效果较好的参数组合。为了能考虑分析对象种类的影响，采用哑元 (dummy variables, 虚拟变量) 化方式加入 2 个物料类型参数 Z_1 和 Z_2 ，将青风藤药材提取液 (简称提取液) 记为 (0, 0)、盐酸青藤碱生产中间体渗漉液 (简称渗漉液) 记为 (1, 0)、盐酸青藤碱生产中间体碱化液 (简称碱化液) 记为 (0, 1)。指纹图谱方法优化与方法学考察所使用物料为固定批次，青风藤药材为 YC9，盐酸青藤碱中间体渗漉液为 SL3，盐酸青藤碱中间体碱化液为 JH3。分析条件的梯度洗脱程序见表 4。每次运行后，用初始流动相平衡 10 min。

表 3 DSD 因素及对应水平

代号	因素	单位	水平		
			-1	0	+1
X_1	A 相 pH 值	-	8.6	9.4	10.2
X_2	第 1 梯度结束时间	min	4	5	6
X_3	第 1 梯度结束 B 相比比例	%	18	20	22
X_4	第 2 梯度结束时间	min	11	12	13
X_5	第 2 梯度结束 B 相比比例	%	24	25	26
X_6	第 3 梯度结束时间	min	32	34	36
X_7	第 3 梯度结束 B 相比比例	%	29	30	31
X_8	柱温	$^{\circ}\text{C}$	30	35	40
X_9	体积流量	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.70	0.85	1.00

表 4 分析条件梯度洗脱程序

t/min	B/%	t/min	B/%	t/min	B/%
0	10	X_4	X_5	37	50
X_2	X_3	X_6	X_7	40	80

通过 Design Expert 12.0.1.0 软件生成 DSD 实验设计表，需要运行 24 次实验和复制的 3 次中心点实验。在此基础上对固定批次的 3 种物料均完成 27 组参数组合下的实验，共进行 81 次实验，具体实验设计条件见表 5。本研究的目的是开发适用于多种青藤碱中间体的指纹图谱分析方法，需要尽可能多

表 5 DSD 实验条件及对应响应值

Table 5 DSD experimental conditions and corresponding response values

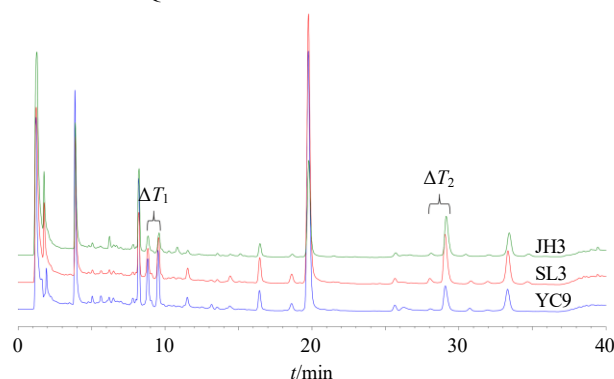
序号	X ₁	X ₂ /min	X ₃ %	X ₄ /min	X ₅ %	X ₆ /min	X ₇ %	X ₈ /°C	X ₉ /(mL·min ⁻¹)	Z ₁	Z ₂	N	ΔT ₁ /min	ΔT ₂ /min
1	8.6	4	18	11	26	36	31	30	1.00	0	0	11	0.547	0.000
2	10.2	4	18	13	24	34	31	30	1.00	0	0	16	0.209	0.481
3	10.2	4	22	11	25	36	29	40	1.00	0	0	20	0.120	1.300
4	10.2	4	22	13	26	32	29	30	1.00	0	0	25	0.364	0.940
5	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	0	23	1.087	0.571
6	8.6	4	22	13	26	32	31	35	0.70	0	0	22	0.587	0.000
7	9.4	4	18	11	24	32	29	30	0.70	0	0	22	1.122	0.747
8	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	0	17	1.070	0.000
9	10.2	6	22	13	24	32	29	40	0.70	0	0	21	0.086	0.765
10	10.2	4	18	11	26	32	30	40	0.70	0	0	18	0.210	0.641
11	10.2	5	22	11	26	36	31	30	0.70	0	0	18	0.000	0.388
12	10.2	6	18	11	24	36	29	35	1.00	0	0	24	0.644	0.986
13	8.6	6	20	11	26	32	29	30	1.00	0	0	11	0.456	0.000
14	8.6	6	18	13	25	32	31	30	0.70	0	0	24	2.041	0.000
15	8.6	4	22	12	24	36	29	30	0.70	0	0	19	0.813	0.000
16	8.6	4	22	11	24	32	31	40	1.00	0	0	5	0.404	0.000
17	10.2	6	22	11	24	32	31	30	0.85	0	0	19	0.133	0.581
18	10.2	6	18	13	26	36	29	30	0.70	0	0	26	0.508	0.761
19	10.2	4	20	13	24	36	31	40	0.70	0	0	17	0.218	0.564
20	8.6	6	18	11	24	36	31	40	0.70	0	0	21	1.409	0.000
21	8.6	5	18	13	24	32	29	40	1.00	0	0	4	0.595	0.000
22	8.6	6	22	13	24	36	30	30	1.00	0	0	11	0.418	0.000
23	9.4	6	22	13	26	36	31	40	1.00	0	0	15	2.176	0.491
24	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	0	17	1.250	0.350
25	8.6	4	18	13	26	36	29	40	0.85	0	0	11	0.930	0.000
26	10.2	6	18	12	26	32	31	40	1.00	0	0	26	0.091	0.841
27	8.6	6	22	11	26	34	29	40	0.70	0	0	19	1.527	0.000
28	8.6	4	18	11	26	36	31	30	1.00	1	0	20	1.125	0.000
29	10.2	4	18	13	24	34	31	30	1.00	1	0	30	0.555	0.259
30	10.2	4	22	11	25	36	29	40	1.00	1	0	23	0.117	1.197
31	10.2	4	22	13	26	32	29	30	1.00	1	0	27	0.322	0.765
32	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	1	0	22	1.298	0.574
33	8.6	4	22	13	26	32	31	35	0.70	1	0	26	1.321	0.000
34	9.4	4	18	11	24	32	29	30	0.70	1	0	21	1.490	0.801
35	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	1	0	17	1.176	0.000
36	10.2	6	22	13	24	32	29	40	0.70	1	0	25	0.000	0.773
37	10.2	4	18	11	26	32	30	40	0.70	1	0	20	0.000	0.687
38	10.2	5	22	11	26	36	31	30	0.70	1	0	24	0.000	0.671

表5 (续)

序号	X_1	X_2/min	$X_3/\%$	X_4/min	$X_5/\%$	X_6/min	$X_7/\%$	$X_8/^\circ\text{C}$	$X_9/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	Z_1	Z_2	N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$
39	10.2	6	18	11	24	36	29	35	1.00	1	0	26	0.275	1.305
40	8.6	6	20	11	26	32	29	30	1.00	1	0	12	1.111	0.000
41	8.6	6	18	13	25	32	31	30	0.70	1	0	28	2.754	0.000
42	8.6	4	22	12	24	36	29	30	0.70	1	0	24	1.738	0.000
43	8.6	4	22	11	24	32	31	40	1.00	1	0	8	0.494	0.000
44	10.2	6	22	11	24	32	31	30	0.85	1	0	21	0.150	0.564
45	10.2	6	18	13	26	36	29	30	0.70	1	0	32	0.859	1.077
46	10.2	4	20	13	24	36	31	40	0.70	1	0	23	0.103	0.657
47	8.6	6	18	11	24	36	31	40	0.70	1	0	23	1.707	0.000
48	8.6	5	18	13	24	32	29	40	1.00	1	0	9	0.480	0.000
49	8.6	6	22	13	24	36	30	30	1.00	1	0	12	0.926	0.000
50	9.4	6	22	13	26	36	31	40	1.00	1	0	17	1.504	0.452
51	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	1	0	19	1.364	0.478
52	8.6	4	18	13	26	36	29	40	0.85	1	0	12	0.827	0.000
53	10.2	6	18	12	26	32	31	40	1.00	1	0	28	0.131	0.796
54	8.6	6	22	11	26	34	29	40	0.70	1	0	19	1.303	0.000
55	8.6	4	18	11	26	36	31	30	1.00	0	1	14	0.888	0.000
56	10.2	4	18	13	24	34	31	30	1.00	0	1	21	0.704	0.203
57	10.2	4	22	11	25	36	29	40	1.00	0	1	20	0.137	0.978
58	10.2	4	22	13	26	32	29	30	1.00	0	1	26	0.368	0.974
59	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	1	21	1.310	0.598
60	8.6	4	22	13	26	32	31	35	0.70	0	1	21	1.367	0.000
61	9.4	4	18	11	24	32	29	30	0.70	0	1	20	1.464	0.786
62	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	1	16	1.263	0.000
63	10.2	6	22	13	24	32	29	40	0.70	0	1	22	0.000	0.532
64	10.2	4	18	11	26	32	30	40	0.70	0	1	19	0.000	0.738
65	10.2	5	22	11	26	36	31	30	0.70	0	1	23	0.000	0.672
66	10.2	6	18	11	24	36	29	35	1.00	0	1	21	0.128	1.445
67	8.6	6	20	11	26	32	29	30	1.00	0	1	12	1.122	0.000
68	8.6	6	18	13	25	32	31	30	0.70	0	1	23	2.748	0.000
69	8.6	4	22	12	24	36	29	30	0.70	0	1	21	1.598	0.000
70	8.6	4	22	11	24	32	31	40	1.00	0	1	7	0.483	0.000
71	10.2	6	22	11	24	32	31	30	0.85	0	1	18	0.144	0.533
72	10.2	6	18	13	26	36	29	30	0.70	0	1	29	0.484	1.082
73	10.2	4	20	13	24	36	31	40	0.70	0	1	20	0.124	0.412
74	8.6	6	18	11	24	36	31	40	0.70	0	1	21	1.772	0.000
75	8.6	5	18	13	24	32	29	40	1.00	0	1	7	0.483	0.000
76	8.6	6	22	13	24	36	30	30	1.00	0	1	9	0.952	0.000
77	9.4	6	22	13	26	36	31	40	1.00	0	1	15	1.396	0.523
78	9.4	5	20	12	25	34	30	35	0.85	0	1	16	1.343	0.434
79	8.6	4	18	13	26	36	29	40	0.85	0	1	11	0.841	0.000
80	10.2	6	18	12	26	32	31	40	1.00	0	1	25	0.000	0.846
81	8.6	6	22	11	26	34	29	40	0.70	0	1	18	1.361	0.000

地收集不同物料的色谱峰信息。色谱峰个数可以反映样品化学组成复杂程度, 评估样品之间的质量差异。0~6 min 的色谱峰主要为溶剂峰和大极性组分, 37 min 后的色谱峰则主要是一些弱极性成分。37 min 后对色谱柱的冲洗能够避免弱极性成分在色谱柱上的残留。考虑到青风藤主要活性成分更可能是中等极性成分^[22], 所以选择 6~37 min 内色谱峰个数 (N) 作为 CQAs 之一。

采用 Agilent Chem Station B.04.03 (美国 Agilent 公司) 软件在统一积分方法下对所得色谱图进行积分, 积分后对所有色谱图中 6~37 min 内的色谱峰个数进行统计得到 N 值。选取在前期的研究过程中较难实现分离的色谱峰, 构成 ΔT_1 与 ΔT_2 2 组保留时间差, 如图 1 所示。 ΔT_1 与 ΔT_2 分别能较好地反映色谱图前段与后段的分离效果, 易受到潜在 CMPs 的影响, 因此, 选择此 2 组峰之间的保留时间差作为 CQAs。



YC9 为青风藤药材提取液, SL3 为盐酸青藤碱中间体渗漉液, JH3 为盐酸青藤碱中间体碱化液。

YC9 is extract of *Sinomenii Caulis* medicinal materials, SL3 is percolating solution of sinomenine hydrochloride intermediate, and JH3 is alkalinizing solution of sinomenine hydrochloride intermediate.

图 1 优化后方法所得不同样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of different samples obtained by optimized method

2.3 数据处理方法

通过 Design Expert 12.0.1.0 软件对实验设计结果进行分析。采用公式 (1) 建立方法评价指标和物料类型参数及方法参数的定量模型。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 0.05, 模型中剩余的项认为是 MT 及 CMPs。

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^f b_i X_i + \sum_{k=1}^g c_k Z_k \quad (1)$$

Y 为某个 CQA, a_0 为常数项, b_i 、 c_k 为偏回归系数, f 为方法

参数数目, g 为物料类型参数数目, X_i 为方法参数, Z_k 为物料类型参数

采用公式 (2) 建立 CQAs 与 MT、CMPs 之间的定量模型。采用逐步回归法简化模型, 添加项和删除项的显著性水平设为 0.05。

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

b_0 为常数项, n 为 CMPs 数目, m 为 MT 数目, b_i 、 b_{ii} 、 b_{ij} 、 c_k 为各项的偏回归系数, $X_{c,i}$ 、 $X_{c,j}$ 为各 CMP, $Z_{c,k}$ 为 MT

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》计算色谱指纹图谱相似度, 采用 Design Expert 12.0.1.0 软件对实验设计结果进行分析, 采用 Matlab R2020b 软件计算 MODR。

3 结果

3.1 CMPs 的确定

DSD 的结果见表 5。根据公式 (1) 所建立模型的偏回归系数见表 6。 X_3 、 X_6 、 Z_2 对任何关键指标都没有影响。 X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_5 、 $X_7 \sim X_9$ 为 CMPs。表 6 中物料类型 Z_1 保留在模型中, 意味着物料类型影响色谱峰个数 N 。 Z_1 中提取液和碱化液的编号相同, 为“0”, 渗漉液为“1”, 因此这种区别体现于渗漉液与其他物料。结合表 5 中相同方法参数组合下的实验结果来看, 渗漉液的色谱峰个数 N 多于另外 2

表 6 多元线性回归模型的方差分析结果

Table 6 ANOVA results of multiple linear regression

方法参数及 物料类型	models		
	N	ΔT_1	ΔT_2
X_1	4.450 8**	-0.567 1**	0.481 3**
X_2	-	0.132 2*	-
X_3	-	-	-
X_4	-	-	-0.050 1*
X_5	1.015 2*	-	-
X_6	-	-	-
X_7	-	-	-0.110 3**
X_8	-0.293 9**	-	-
X_9	-17.676 8**	-1.110 0**	-
Z_1	2.925 9**	-	-
Z_2	-	-	-

“-”代表该项不显著, *代表该项 P 值小于 0.05, **代表模型项目 P 值小于 0.01。

“-” means item is not significant, * means P value of item is less than 0.05, ** means P value of model item is less than 0.01.

种物料。对于保留时间差 ΔT_1 与 ΔT_2 ，物料类型没有显著影响，说明所建方法能较好地分离各成分，这些成分在不同物料中保留时间稳定，时间差不受到物料类型的影响。

3.2 CMPs、MT 与 CQAs 的数学模型

采用公式 (2) 所建立 CMPs、MT 与 CQAs 之间的各定量模型偏回归系数及方差分析见表 7。模型的 P 值均 <0.0001 ，说明模型极显著；模型 R^2 均

大于 0.80，说明拟合效果较好且能解释数据的大部分变异。由表 7 可以看出 X_1 作为 CMP 对 3 个 CQAs 均有显著性影响 ($P < 0.01$)，同时与其他 CMPs 存在最多的交叉项。青风藤中富含生物碱类成分^[4]，流动相 pH 值可以调节其离子化程度，从而会影响其与固定相之间的相互作用，获得不同的分离效果。

以二维等高线图表达自变量和因变量之间的关系，如图 2~4 所示。每张等高线图除了所考察的 2

表 7 二项式回归模型偏回归系数及方差分析

Table 7 Partial regression coefficient and ANOVA of binomial regression model

模型项	偏回归系数			模型项	偏回归系数			模型项	偏回归系数		
	N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$		N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$		N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$
常数项	346.172 3*	-60.212 4*	44.082 3*	X_1X_2	-0.136 5**			X_1^2	-0.975 1**		
X_1	13.467 6**	16.397 6**	0.481 3**	X_1X_4	1.451 1**			X_5^2		-0.070 9**	
X_2	2.318 8**	-0.031 2**		X_1X_7	-1.674 5**			X_7^2		0.000 9*	
X_4	-13.049 4*	-0.521 0*	-2.862 4**	X_1X_9	28.072 8**	2.412 2**		X_9^2		0.130 6**	
X_5	-18.131 7**			X_2X_4		0.120 6**		R^2	0.899 5	0.846 7	
X_7			-1.953 3**	X_2X_8	-0.043 3*			R^2_{adj}	0.881 8	0.824 8	
X_8	-0.086 5**	-0.021 5**		X_4X_6			0.112 5**	模型 P 值	<0.0001	<0.0001	
X_9	-281.258 4**	-23.784 8**		X_4X_9					<0.0001	<0.0001	
Z_1	2.925 9**			X_5X_7	0.636 7**	0.073 7**					

*代表该项 P 值小于 0.05，**代表该项 P 值小于 0.01。

* means P value of item is less than 0.05, ** means P value of model item is less than 0.01.

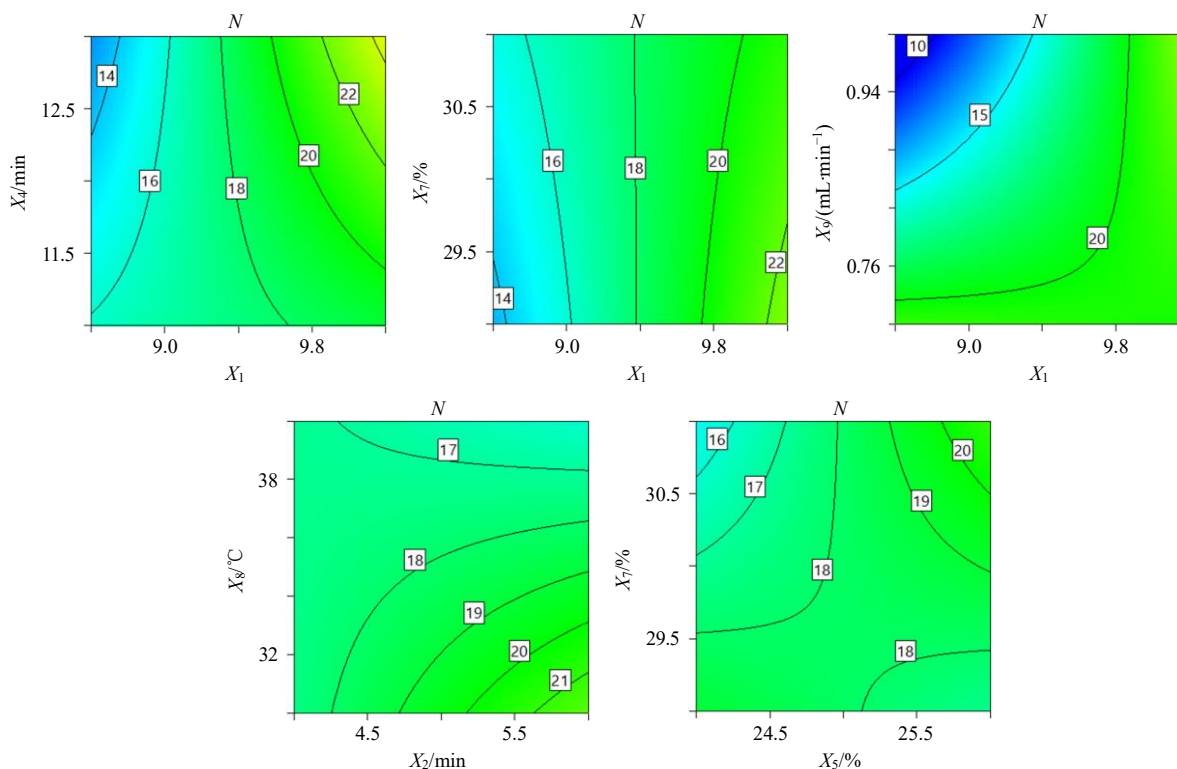


图 2 6~37 min 内色谱峰个数 N 等高线图

Fig. 2 Contour plot of number of chromatographic peaks N within 6 to 37 min

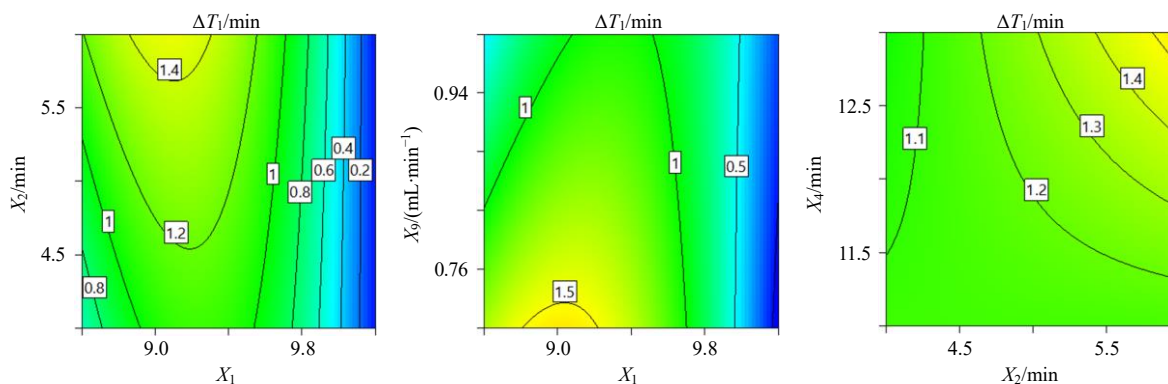


图3 保留时间差 ΔT_1 等高线图

Fig. 3 Contour plot of retention time difference ΔT_1

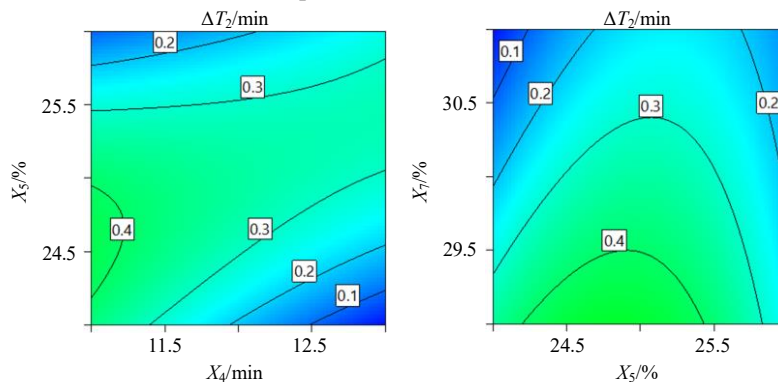


图4 保留时间差 ΔT_2 等高线图

Fig. 4 Contour plot of retention time difference ΔT_2

个参数外，固定其他方法参数水平为中心点水平，图4中 Z_1 为0。由图2可以看出，随着A相pH值 X_1 的增加，6~37 min内的色谱峰个数 N 增加。体积流量 X_9 增加时色谱峰个数 N 减少，说明高体积流量下色谱峰易出现重叠，不利于成分分离。柱温 X_8 越低，色谱峰个数 N 越多。由图3可知，A相pH值 X_1 在9.0左右有利于获得较高的出峰时间差 ΔT_1 ，但此时色谱峰个数 N 常常偏少，且无法获得满足风险要求的参数组合(图5、6)。低体积流量 X_9 下 ΔT_1 更大。由图4可知，为保证 ΔT_1 满足分离需要，第3梯度结束时B相比例 X_7 应尽可能低。

3.3 MODR的建立与验证

通过Matlab R2020b软件，采用基于穷举法-蒙特卡罗法计算MODR^[23]。用计算后不达标的概率值定量描述风险大小，并衡量MODR的可靠程度。计算中CMPs X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_5 、 $X_7 \sim X_9$ 的计算步长分别为0.01、0.04、0.04、0.02、0.02、0.05、0.005。模拟计算次数为1 000次，逐步回归的显著性水平设为0.05，设计空间可接受的最高风险设为0.10，对应可接受的最低达标概率为0.90。对于优化目标，设置色谱峰个数 N 下限为15， ΔT_1 下限为0.3 min，

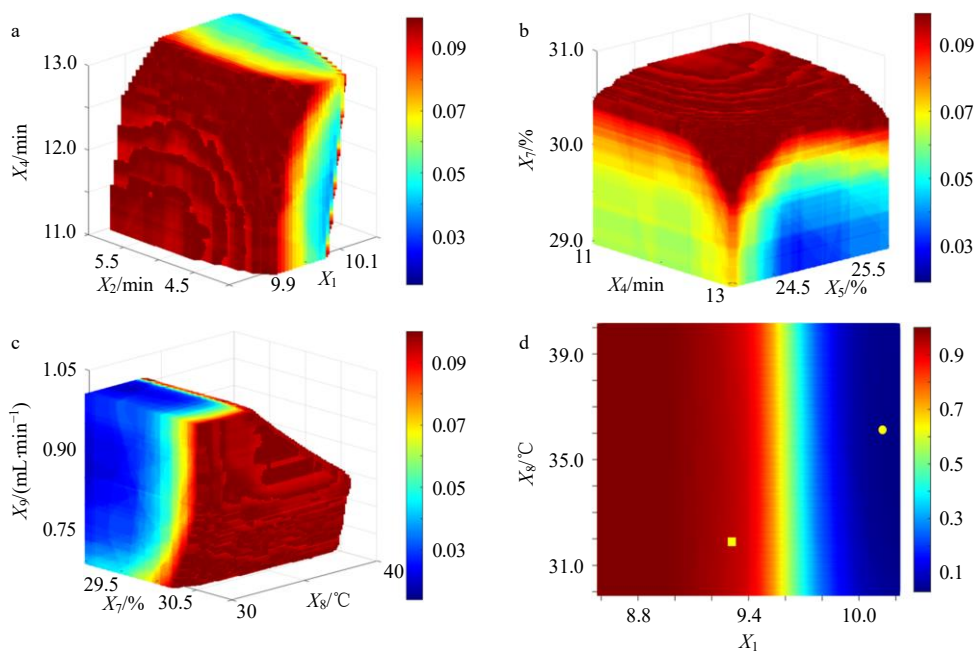
ΔT_2 下限为0.5 min。在“3.1”项中， Z_1 是模型中显著的物料哑元，因此针对不同的 Z_1 取值，分别计算得到MODR，分别见图5、6。图中不同的颜色代表在MODR内满足优化目标的风险值。对比图5、6可知，不同 Z_1 取值下建立的MODR形状相似，但所对应数值大小有所区别。

对于3种物料，选择在MODR内、外的同一点进行验证，即采用相同的分析方法分析不同物料，具体验证点见图5-d、6-d。MODR内、外的验证点，每个分析对象均重复3次，所得实验结果见表8。对于设计空间内的验证点，所获得的CQAs结果均满足所设置的优化目标。

采用均方根误差(root mean square error, RMSE)评价实验值与预测值的一致程度，其计算方法如公式(3)所示。色谱峰个数 N 、 ΔT_1 、 ΔT_2 的RMSE值分别为2.59个、0.02、0.04 min。总体而言，验证结果与图5-d、6-d上标记的参数组合对应的定量风险高低趋势一致，实验值与预测值较为一致，证明所建立的MODR较为可靠。

$$RMSE = [\sum(\hat{y}_i - y_i)^2/n]^{1/2} \quad (3)$$

\hat{y}_i 为预测值， y_i 为实验值， n 为实验样本数



a- $X_5=25\%$, $X_7=30\%$, $X_8=35\text{ }^\circ\text{C}$, $X_9=0.85\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; b- $X_1=10.1$, $X_2=5\text{ min}$, $X_8=35\text{ }^\circ\text{C}$, $X_9=0.85\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; c- $X_1=10.1$, $X_2=5\text{ min}$, $X_4=12\text{ min}$, $X_5=25\%$; d- $X_2=5\text{ min}$, $X_4=12\text{ min}$, $X_5=25\%$, $X_7=30\%$, $X_9=0.70\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; ■表示空间外验证点, ●表示空间内验证点; 图6同。
a- $X_5=25\%$, $X_7=30\%$, $X_8=35\text{ }^\circ\text{C}$, $X_9=0.85\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; b- $X_1=10.1$, $X_2=5\text{ min}$, $X_8=35\text{ }^\circ\text{C}$, $X_9=0.85\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; c- $X_1=10.1$, $X_2=5\text{ min}$, $X_4=12\text{ min}$, $X_5=25\%$; d- $X_2=5\text{ min}$, $X_4=12\text{ min}$, $X_5=25\%$, $X_7=30\%$, $X_9=0.70\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; ■ indicates out-of-space verification points, ● indicates in-space verification points; same as figure 6.

图5 $Z_1=0$ 时所得 MODR 图及验证图

Fig. 5 MODR diagram and verification diagram obtained when $Z_1=0$

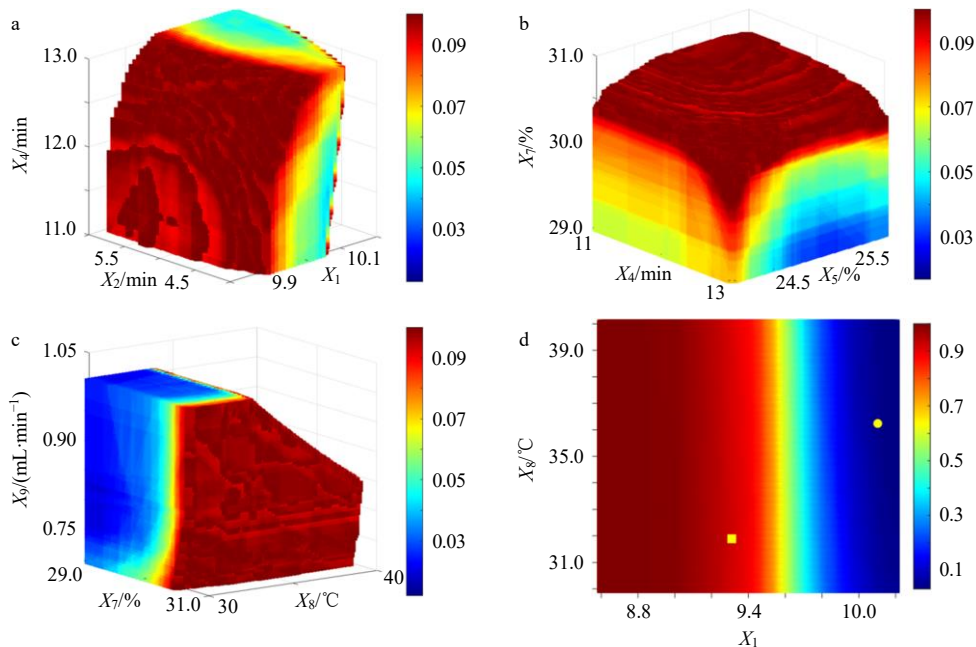


图6 $Z_1=1$ 时所得 MODR 图及验证图

Fig. 6 MODR diagram and verification diagram obtained when $Z_1=1$

3.4 方法学考察

3.4.1 指纹图谱分析方法具体条件 在计算得出的 MODR 内, 选择风险值最低的 CMPs 组合, 具体为 $X_1=10.1$, $X_2=5\text{ min}$, $X_4=12\text{ min}$, $X_5=25\%$, $X_7=$

30% , $X_8=36\text{ }^\circ\text{C}$, $X_9=0.70\text{ mL}/\text{min}$ 。该组合下具体条件为 Agilent Infinity Lab Poroshell HPH- C_{18} 色谱柱 ($100\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$); A 相为 $1\text{ mmol}/\text{L}$ 甲酸铵溶液, 用氨水调 pH 值至 10.1, B 相为溶于

表 8 MODR 验证实验结果

Table 8 Experimental results of MODR verification

物料	实验点	实验		N		$\Delta T_1/\text{min}$		$\Delta T_2/\text{min}$	
		次数	实验值	预测值	实验值	预测值	实验值	预测值	实验值
提取液	空间内	1	20	21	0.311	0.288	0.946	0.883	
		2	19	21	0.304	0.288	0.959	0.883	
		3	19	21	0.307	0.288	0.951	0.883	
	空间外	1	19	23	1.687	1.668	0.548	0.517	
		2	18	23	1.682	1.668	0.552	0.517	
		3	18	23	1.687	1.668	0.544	0.517	
渗漉液	空间内	1	25	24	0.309	0.288	0.938	0.883	
		2	25	24	0.308	0.288	0.948	0.883	
		3	25	24	0.302	0.288	0.954	0.883	
	空间外	1	23	26	1.687	1.668	0.534	0.517	
		2	23	26	1.687	1.668	0.538	0.517	
		3	25	26	1.684	1.668	0.542	0.517	
碱化液	空间内	1	21	21	0.304	0.288	0.889	0.883	
		2	22	21	0.302	0.288	0.903	0.883	
		3	22	21	0.298	0.288	0.913	0.883	
	空间外	1	20	23	1.683	1.668	0.535	0.517	
		2	20	23	1.684	1.668	0.544	0.517	
		3	21	23	1.681	1.668	0.539	0.517	

80%乙腈的 1 mmol/L 甲酸铵溶液,所加氨水与 A 相等量;进样量 20.0 μL ;检测波长 210 nm;柱温 36 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 0.70 mL/min;采用梯度洗脱,程序见表 9;后运行 10 min。在上述条件下,对青风藤药材、中间体渗漉液、中间体碱化液分别进行分析,所得典型色谱图见图 1。从图 1 可以看出,各样品分离效果均较好,指纹图谱整体能够反映样品信息。

表 9 梯度洗脱程序

Table 9 Gradient elution program

t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0	90	10	12	75	25	37	50	50
5	79	21	34	70	30	40	20	80

3.4.2 方法耐用性考察 分析方法的耐用性能够衡量分析方法在正常使用期间满足预期性能要求的能力,可通过刻意调整分析方法参数来进行测试。采用 Plackett-Burman 实验设计进行耐用性实验。在 MODR 所确定的范围内改变分析条件,包括 A 相 pH 值 (X_1 , 9.9~10.1)、第 1 梯度结束时间 (X_2 , 5~6 min)、第 2 梯度结束时间(X_4 , 11.5~12.5 min)、第 2 梯度结束 B 相比例 (X_5 , 24.5%~25.5%)、第

3 梯度结束 B 相比例 (X_7 , 29.5%~30.5%)、柱温 (X_8 , 34~38 $^{\circ}\text{C}$)、体积流量 (X_9 , 0.70~0.80 mL/min),研究了 7 种 CMPs 对 3 种 CQAs 的影响,具体实验方案见表 10,包含了 7 个因子,每个因子 2 个水平。

根据表 10 实验方案,在不同参数组合下分别对 3 种分析对象 (N 、 ΔT_1 、 ΔT_2) 进行检测,所得结果见表 11。获得的实验结果表明,在所有实验中,色谱峰个数 N 均大于 15, ΔT_2 均大于 0.5 min。在标准序 1、运行序 11 参数组合下的实验中,3 种物料的 ΔT_1 小于 0.3 min,分别为 0.292、0.296、0.297 min。尽管此参数组合下 ΔT_1 未达到优化目标,但此时 2 号峰与 3 号峰之间已实现基线分离,可用于指纹图谱。其余 ΔT_1 均大于 0.3 min,达到优化目标。综上所述,CMPs 的微小改变不影响 CQAs,不会对色谱峰的分离效果产生较大影响。本研究所建立的分析方法耐用性较好。

表 10 Plackett-Burman 实验设计方案

Table 10 Plackett-Burman DoE scheme

标准序	运行序	X_1	X_2/min	X_4/min	$X_5/\%$	$X_7/\%$	$X_8/^{\circ}\text{C}$	$X_9/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$
12	8	9.9	5	11.5	24.5	29.5	34	0.70
3	9	9.9	6	11.5	25.5	29.5	34	0.80
7	12	9.9	6	12.5	24.5	30.5	34	0.80
8	2	9.9	5	12.5	25.5	30.5	38	0.70
9	5	9.9	5	12.5	25.5	29.5	38	0.80
11	10	9.9	6	11.5	24.5	30.5	38	0.70
5	4	10.1	6	12.5	25.5	30.5	34	0.70
10	6	10.1	5	11.5	25.5	30.5	34	0.80
4	7	10.1	5	12.5	24.5	29.5	34	0.70
2	1	10.1	6	12.5	24.5	29.5	38	0.80
6	3	10.1	6	11.5	25.5	29.5	38	0.70
1	11	10.1	5	11.5	24.5	30.5	38	0.80

3.4.3 精密度考察 按照“2.1”项下方法,分别制备不同供试品溶液,按照“3.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以青藤碱为参照峰,计算不同物料中共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值。所有物料中共有峰相对出峰时间 RSD 均小于 0.30%,相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,证明仪器精密度良好。

3.4.4 重复性考察 按照“2.1”项下方法,每种物料分别平行制备 6 份供试品溶液,按照“3.4.1”项下色谱条件分别进样分析,以青藤碱为参照峰,计算不同物料中共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值。所有物料共有峰相对出峰时间 RSD 均小于

表 11 耐用性实验结果

Table 11 Results of robustness experiment

标准序	运行序	物料种类	N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$	标准序	运行序	物料种类	N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$	标准序	运行序	物料种类	N	$\Delta T_1/\text{min}$	$\Delta T_2/\text{min}$
12	8	提取液	20	0.675	0.989	9	5	提取液	17	0.867	0.827	4	7	提取液	16	0.318	1.063
		渗漉液	24	0.682	0.963			渗漉液	25	0.871	0.953			渗漉液	24	0.314	1.110
		碱化液	27	0.690	0.865			碱化液	23	0.864	0.851			碱化液	20	0.309	1.046
3	9	提取液	19	0.561	1.043	11	10	提取液	17	0.925	0.863	2	1	提取液	19	0.313	0.905
		渗漉液	23	0.567	0.955			渗漉液	24	0.930	0.846			渗漉液	24	0.326	0.929
		碱化液	23	0.576	0.876			碱化液	21	0.933	0.774			碱化液	22	0.330	0.879
7	12	提取液	17	0.594	1.039	5	4	提取液	18	0.322	0.878	6	3	提取液	18	0.304	1.054
		渗漉液	23	0.591	1.004			渗漉液	27	0.319	0.959			渗漉液	28	0.307	1.062
		碱化液	27	0.593	0.928			碱化液	23	0.325	0.885			碱化液	23	0.313	1.001
8	2	提取液	19	0.796	0.766	10	6	提取液	15	0.313	0.941	1	11	提取液	16	0.292	0.845
		渗漉液	26	0.817	0.845			渗漉液	23	0.308	0.939			渗漉液	24	0.296	0.887
		碱化液	21	0.825	0.778			碱化液	21	0.314	0.877			碱化液	21	0.297	0.830

0.40%，相对峰面积 RSD 均小于 5.0%，证明方法重复性良好。

3.4.5 稳定性考察 按照“2.1”项下方法分别制备不同供试品溶液，按照“3.4.1”项下色谱条件，分别在制备后 0、2、4、6、8、12、16、24 h 进样分析，以青藤碱为参照峰，计算不同物料中共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值。渗漉液中 3 号峰相对出峰时间 RSD 为 1.32%，2 号峰相对峰面积 RSD 为 16.76%，除此之外，所有物料的共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.20%，相对峰面积 RSD 均小于 5.0%，物料 24 h 内较为稳定。

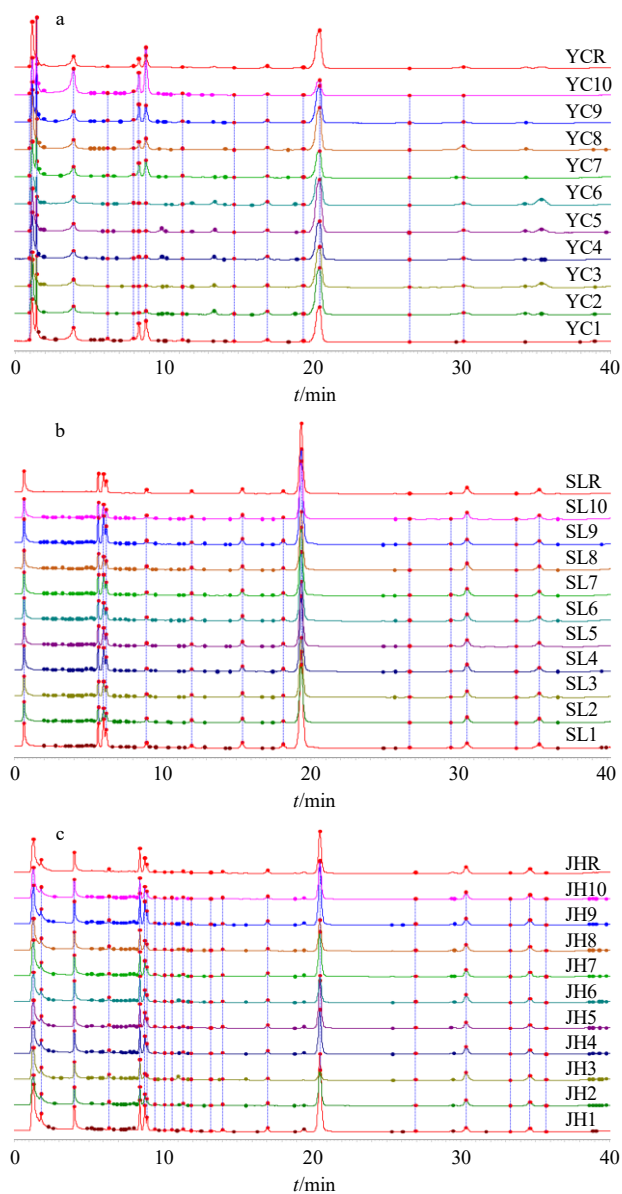
3.5 指纹图谱相似度测定

《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定，对于中药注射剂中药材、有效部位或中间体进行指纹图谱的共有指纹峰标定、共有指纹峰面积比值计算、非共有峰面积计算时，均要求“10 批次以上供试品”^[24]。参考该规定，对 3 种物料均收集 10 个批次，具体物料信息见表 1、2。将 10 批不同物料的原图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)”，均以第 1 批(YC1/SL1/JH1)为参照图谱，方法为中位数，时间窗为 0.1 min，生成对照图谱，所得各物料指纹图谱见图 7。对于提取液，YC10 与对照图谱相似度为 0.709，其余 9 批药材相似度在 0.977~0.990；YC10 批次药材与其他批次之间存在较大的差异，提示该批次青风藤投料用于工业生产可能不利于最终产品质量批间一致性。对于渗漉液，10 批次相似度在

0.995~1.000，提示渗漉液质量相对稳定，各批次之间的成分差异较小。对于碱化液，批次 JH3 与对照图谱的相似度为 0.874，其余 9 批次的相似度在 0.982~1.000；提示 JH3 批次在后续工艺控制中应更加注意控制工艺参数，以确保药品质量。

4 讨论

本课题组此前已开发了一种盐酸青藤碱原料药的杂质指纹图谱分析方法^[25]，基于将其转移至 HPLC 所得的方法进行进一步优化。对比了 Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱以及 Agilent Infinity Lab Poroshell HPH-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱，发现 Agilent Infinity Lab Poroshell HPH-C₁₈ 色谱柱具有更好的分离效果。对比了不同 A 相 pH 值，发现在 pH 值为 10.0 时具有更好的峰形和分离效果。对比了 B 相中氨水的加入量，发现 B 相中加入氨水，可以有效改善盐酸青藤碱色谱峰的峰形，同时缩减峰宽，因此选择向 B 相中加入与 A 相等量氨水，同时可以更好地控制梯度变化过程中整体流动相的氨水含量。对比了不同体积流量，发现 0.80 mL/min 体积流量下各物料能够实现更好地分离。此外还对洗脱梯度进行了优化，获得了初步 HPLC 指纹图谱分析方法。然而该方法的分离效果尚存不足，仍有部分色谱峰未能基线分离，因此采用实验设计进一步优化。在初步 HPLC 方法中，A 相 pH 值为 10.0，体积流量为 0.80 mL/min，而其他参数如表 3 中 0 水平所示。



a-青风藤药材提取液; b-盐酸青藤碱中间体渗漉液; c-盐酸青藤碱中间体碱化液; YC1~YC10、SL1~SL10、JH1~JH10 代表物料批次, YCR、SLR、JHR 分别为对照图谱。

a-extract of *Sinomenii Caulis* medicinal materials; b-percolating solution of sinomenine hydrochloride intermediate; c-alkalinizing solution of sinomenine hydrochloride intermediate; YC1—YC10, SL1—SL10, JH1—JH10 represent material batches, YCR, SLR, JHR are control fingerprints.

图7 多批次物料指纹图谱

Fig. 7 Fingerprints of multi-batch materials

5 结论

本研究通过单因素实验初步获得可用于青风藤药材、盐酸青藤碱中间体渗漉液、盐酸青藤碱中间体碱化液的 HPLC 指纹图谱分析方法, 并通过实验设计方法进一步优化, 建立了 MODR 并进行了验证, 通过 Plackett-Burman 实验设计证明所建立方法

具有良好的耐用性, 通过了方法学验证。应用本研究建立的分析方法分析了多批次原料以及中间体, 检测了其指纹图谱相似性, 证明本研究所建立的 HPLC 方法适用于盐酸青藤碱生产过程中 3 种物料的分析, 可用于表征物料质量, 为工业过程优化提供数据支持。然而, 本研究所建立的方法虽然能够通过相似度判断差异, 但用于控制仍然不够。例如, 在中间体存在差异的情况下, 后续工艺处理是否能够缩小差异, 或选择何种参数组合能够缩小差异, 仍需要进一步通过工艺研究确定。

本研究在测定指纹图谱相似度时各种物料批次均只选择了 10 批次, 在工业生产中应当收集更多批次的物料进行测定, 累积获得工业大数据以进一步挖掘生产规律。本研究所建立的方法可以判断不同批次物料间化学成分的一致性, 但是并未对具体的成分进行鉴定, 仍需进一步采用液质联用等技术确定各色谱峰对应的化学成分。此外, 本研究所建立方法未应用于碱化液之后的萃取液、粗品等其他中间体, 是因为萃取之后的中间体中杂质峰个数与其峰面积均大幅下降, 更适合采用流动相体系更简洁、溶剂消耗量更少、分析时间更短的其他分析方法。先验知识可以帮助确定潜在 CMPs, 单因素优化可以进一步验证因素的影响, 帮助在较小范围内确定最佳条件, 减少试验次数和资源消耗。将先验知识、单因素优化和 DoE 方法相结合, 有利于高效地优化分析方法条件。本研究应用哑元化方法将物料类型转换为哑元变量, 使得能够在回归分析等模型中使用这些变量进行建模和预测, 更好地解释物料类型对于 CQAs 的影响。本研究所采用的方法, 能够优化获得适用于多种物料分析的方法条件, 有利于降低分析方法开发成本, 缩短开发时间, 有利于研究药材-中间体制剂之间化学成分的量值传递规律^[14]。总的来看, 本研究建立分析方法的流程, 以及描述不同物料类型的方式, 均有望推广用于其他工业物料检测方法开发。

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: 204.
- [2] Jiang W, Fan W M, Gao T L, *et al.* Analgesic mechanism of sinomenine against chronic pain [J]. *Pain Res Manag*, 2020, 2020: 1876862.
- [3] Wang S W, Zhang L Z, Zhou Y H, *et al.* A review on pharmacokinetics of sinomenine and its anti-inflammatory

- and immunomodulatory effects [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110227.
- [4] 罗艳群, 沈小兰, 蔡三金, 等. 青风藤化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 898-911.
- [5] Ren D D, Xiang S S, Yan Y W, *et al.* Design and optimization of purification process of sinomenine hydrochloride [J]. *Chin J Chem Eng*, 2023, 55: 63-72.
- [6] 任丹丹. 基于绿色化学理念的盐酸青藤碱连续制造工艺研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
- [7] 仇萍, 文迎艺, 滕健, 等. 一种制备盐酸青藤碱的方法: 中国, CN102399187A [P]. 2012-04-04.
- [8] 陈迪钊, 彭祖仁, 张莉, 等. 一种青风藤中盐酸青藤碱的提取制备方法: 中国, CN110143920A [P]. 2019-08-20.
- [9] 任明军, 胡云飞, 朱永波, 等. 基于色谱指纹图谱和含量测定相结合的青风藤质量控制方法研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1338-1344.
- [10] 王丽丽, 王静楠, 许惠凤, 等. 高效液相色谱质谱联用技术同时测定青风藤生物碱的方法 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9): 5606-5609.
- [11] 王青青, 方明月, 刘双月, 等. HPLC 测定市售青风藤中青藤碱和木兰花碱含量 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(11): 1367-1371.
- [12] 胡明, 邹龙, 江星明, 等. HPLC 法测定骨刺康复丸中青风藤碱的含量 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(1): 86-88.
- [13] Chen Y R, Peng L, Wu H G, *et al.* Identification and quality control strategy of impurities in Zhengqing Fengtongning Injection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 219: 114970.
- [14] 颀佳乐, 兰婧, 曹智铭, 等. 元胡止痛口服液药材、中间体及制剂的定量指纹图谱方法研究 [J]. *分析测试学报*, 2023, 42(8): 984-991.
- [15] ICH Q14 (R1): Analytical Procedure Development [S]. 2022.
- [16] Dispas A, Avohou H T, Lebrun P, *et al.* 'Quality by Design' approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2018, 101: 24-33.
- [17] Tai Y N, Ren D D, Zhao W S, *et al.* Analytical quality by design oriented development of the UPLC method for analysing multiple pharmaceutical process intermediates: A case study of Compound Danshen Dripping Pills [J]. *Microchem J*, 2023, 187: 108438.
- [18] Lan J, Wu G L, Wu L L, *et al.* Development of a quantitative chromatographic fingerprint analysis method for sugar components of Xiaochaihu Capsules based on quality by design concept [J]. *Separations*, 2022, 10(1): 13.
- [19] Prabhu R C, Maruthapillai A, Senadi G C. Use of stage-wise AQbD and an orthogonality approach to develop a short-runtime method for the simultaneous quantification of bosentan and impurities using UPLC equipped with PDA and ESI-MS [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(9): 4175-4182.
- [20] Ding F, Liu S H, Wu G L, *et al.* A novel process for developing a quantitative chromatographic fingerprint analysis method based on analytical quality by design: A case study of Xiaochaihu Capsules [J]. *Microchem J*, 2023, 194: 109253.
- [21] Tome T, Žigart N, Časar Z, *et al.* Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: Overview and recent advances [J]. *Org Process Res Dev*, 2019, 23(9): 1784-1802.
- [22] Li D, Zhong Z F, Ko C N, *et al.* From mundane to classic: Sinomenine as a multi-therapeutic agent [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, doi: 10.1111/BPH.16267.
- [23] 邵静媛, 瞿海斌, 龚行楚. 2 种设计空间计算方法的比较研究: 达标概率法和多指标叠加法 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(10): 2074-2080.
- [24] 国家药品监督管理局关于印发中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行) 的通知 [EB/OL]. (2000-08-15) [2024-04-07]. https://law.pharmnet.com.cn/laws/detail_769.html.
- [25] 仇萍, 龚行楚, 张建, 等. 一种盐酸青藤碱原料药的杂质指纹图谱分析方法: 中国, CN114252522A [P]. 2022-03-29.

[责任编辑 郑礼胜]