

基于 QbD 理念的丹参醇提工艺设计空间的建立与验证

罗 赣 徐 冰 刘 倩 李 洋 史新元 乔延江

(北京中医药大学中药信息工程研究中心,北京,100029)

摘要 目的:建立并验证丹参醇提工艺的设计空间。方法:以隐丹参酮、丹参酮 IIA 提取率为关键质量属性(CQA),以乙醇浓度、乙醇倍量、煎煮时间为关键工艺参数(CPP),采用中心点复合设计安排实验,基于二次多项式回归模型开发丹参醇提工艺设计空间。结果:方差分析结果显示模型的 P 值均小于 0.05,且失拟值均大于 0.1,表明该模型可以较好的描述 CQA 和 CPP 之间的关系。设计空间以 Overlay plot 展示,在加入 95% 置信区间后,可缩小设计空间范围并提高其可靠性。结论:基于质量源于设计(QbD)理念建立丹参醇提工艺设计空间可以提高工艺过程的稳健性和灵活性。

关键词 质量源于设计;丹参;乙醇提取;设计空间;过程稳健性

Establishment and Verification of Design Space of Ethanol Extraction Process of Salvia Miltiorrhiza based on Quality by Design

Luo Gan, Xu Bing, Liu Qian, Li Yang, Shi Xinyuan, Qiao Yanjiang

(Research Center of TCM information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To establish and verify the design space of ethanol extraction process of Salvia miltiorrhiza. **Method:** The extraction ratios of cryptotanshinone and Tanshinone IIA are identified as the critical quality attributes (CQAs), and ethanol concentration, ethanol amount, decoction time are identified as critical process parameters (CPPs). The central composite design is used for experimental arrangements, and the design space of ethanol extraction process of Salvia miltiorrhiza is established based on the quadratic polynomial regression model. **Result:** Since the p -values of both models are less than 0.05 and values of lack of fit are more than 0.1, the relationship between CQAs and CPPs could be well described by the two models. The reliability of design space, illustrated by overlay plot, is improved with the addition of 95% confidence. **Conclusion:** The robustness and flexibility of Salvia miltiorrhiza ethanol extraction process have been enhanced via the establishment of design space based on the quality by design (QbD) concept.

Key Words Quality by Design (QbD); Salvia miltiorrhiza; Ethanol extraction process; Design Space; Process robustness

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.11.006

人用药物注册技术标准国际协调会(ICH)于 2005 年出台的 ICH Q8^[1]中提出了“质量源于设计(Quality by Design, QbD)”的理念, QbD 是将科学的方法和风险管理理念应用于药品工艺开发和生产全过程。实施 QbD 的核心之一在于为制剂工艺建立设计空间。在 ICH Q8 中设计空间被定义为:可以确保产品质量的输入变量(例如原材料的质量属性)和工艺参数之间的多维组合与相互作用。

目前,设计空间已应用于化学药品的干燥^[2]、混合^[3]、制粒^[4]、包衣^[5]等生产过程,以及生物制品的菌苗培养^[6]等过程,但在中药制剂生产过程中的应用较少^[7-8]。本文以丹参醇提过程作为研究对象,“将质量源于设计”的理念和“设计空间”(Design space)的方法应用于中药提取过程,从设计层面保证丹参提取物的质量,利用响应面方法设计实验,建立基于 QbD 理念

的丹参醇提工艺设计空间并进行了验证。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪(美国安捷伦公司);电热套(北京中兴伟业仪器有限公司)、DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)、Sartorius BS210S 天平(德国赛多利斯公司)。

丹参饮片(购自北京本草方源药业有限公司,批号 20120402),对照品隐丹参酮、丹参酮 IIA(购自中国食品药品检定所,批号分别为 110852-200806 和 110766-200619),乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 丹参提取物制备 取丹参饮片 500 g,加乙醇回流提取 2 次,滤过,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩, 80℃ 干燥,粉碎成细粉。

基金项目:北京中医药大学自主选题项目“中药提取物化学、物理属性的全息快速评价研究”(编号:532/0100604295);2013 年省部级“中药基础与新药研究”重点实验室开放课题资助

作者简介:罗赣(1986—),男,北京中医药大学中药学院

通信作者:乔延江,男,博士,教授,博士生导师,主要从事中药信息学研究,北京市朝阳区北三环东路 11 号,邮编:100029, E-mail: yjqiao@263.net;徐冰,博士,讲师,研究方向为中药制药过程分析与控制,邮编:100102, E-mail: btcem@163.com

2.2 丹参药材中隐丹参酮和丹参酮 IIA 的含量测定

1) 对照品溶液的制备:精密称取隐丹参酮、丹参酮 IIA 适量,以甲醇为溶剂,配置成浓度为含隐丹参酮 30 μg/mL、丹参酮 IIA 130 μg/mL 的混合对照品溶液。

2) 供试品溶液的制备:取丹参粉末(过三号筛)约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,加热回流 1h,放冷,甲醇补足重量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

3) 色谱条件:Agilent SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 25℃,流速 1 mL/min,流动相为甲醇:水=75:25,检测波长 270 nm。

2.3 丹参醇提物中隐丹参酮和丹参酮 IIA 的含量测定

1) 对照品溶液的制备:同 2.2 项下“对照品溶液的制备”。

2) 供试品溶液的制备:取丹参醇提物约 10 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,滤过 0.45 μm 滤膜,取续滤液即得。

3) 色谱条件:Agilent SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 25℃,流速 1 mL/min,流动相为乙腈-0.026% 磷酸水溶液,梯度洗脱,梯度设置如表 1,检测波长为 270 nm。

表 1 梯度洗脱表

时间/min	A(乙腈)	B(0.026% 磷酸水溶液)
0~20	20→60	80→40
20~50	60→80	40→20

2.4 响应面实验设计

2.4.1 关键质量属性(CQA)和关键工艺参数(CPP)的确定:目标成分隐丹参酮(Y1)和丹参酮 IIA(Y2)的提取率作为 CQA,乙醇浓度(A,80%~100%),乙醇倍数(B,6~12 倍),煎煮时间(C,0.5~3 小时)作为 CPP。拟定工艺目标为隐丹参酮和丹参酮 IIA 的提取率分别大于 70% 和 50%。

2.4.2 中心点复合设计 利用 Design expert 8.0 软件安排 20 次实验(α 值选择 1,中心点重复 6 次)。因素水平如表 2 所示。

表 2 丹参醇提因素水平表(α=1)

因素	低水平	高水平	-α	+α
A 乙醇浓度(%)	80	100	80	100
B 乙醇倍数(倍)	6	12	6	12
C 煎煮时间(h)	0.5	3	0.5	3

3 结果与讨论

3.1 实验结果

3.1.1 丹参药材隐丹参酮和丹参酮含量测定结果

本批次药材中丹参中隐丹参酮含量为(2.9±0.00834) mg/g(n=3),丹参酮 IIA 含量为(4.7±0.0221) mg/g(n=3),药材质量符合药典要求。

3.1.2 提取率实验结果 根据中心点复合实验设计安排进行工艺操作,根据出膏率、丹参醇提物中隐丹参酮含量、丹参酮 IIA 含量计算隐丹参酮(Y1)、丹参酮 IIA 提取率(Y2),结果如表 3。

表 3 CCD 实验数据

实验	因素			响应值	
	A	B	C	Y1/%	Y2/%
1	90.00	9.00	1.75	80.78	64.35
2	80.00	6.00	0.50	87.03	70.72
3	90.00	6.00	1.75	72.41	50.82
4	100.00	12.00	0.50	81.64	61.31
5	100.00	6.00	0.50	88.91	66.46
6	90.00	9.00	1.75	81.86	57.85
7	100.00	12.00	3.00	73.04	58.48
8	90.00	9.00	1.75	53.79	36.35
9	90.00	9.00	1.75	77.11	59.20
10	80.00	12.00	3.00	40.36	26.04
11	90.00	9.00	1.75	58.82	42.63
12	100.00	9.00	1.75	82.41	63.47
13	90.00	12.00	1.75	57.76	38.08
14	80.00	12.00	0.50	48.41	34.29
15	80.00	9.00	1.75	75.70	56.79
16	90.00	9.00	3.00	70.30	47.60
17	90.00	9.00	0.50	87.50	59.79
18	90.00	9.00	1.75	68.60	47.82
19	80.00	6.00	3.00	53.53	38.28
20	100.00	6.00	3.00	79.50	60.06

表 4 方差分析表-Y1

变异源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	2855.6	9	317.29	3.27	0.0393
A	1009.6	1	1009.6	10.41	0.0091
B	642.64	1	642.64	6.63	0.0277
C	589.13	1	589.13	6.08	0.0334
AB	181.06	1	181.06	1.87	0.2017
AC	69.34	1	69.34	0.72	0.4175
BC	86.20	1	86.20	0.89	0.3679
A ²	42.33	1	42.33	0.44	0.5237
B ²	277.54	1	277.54	2.86	0.1215
C ²	39.08	1	39.08	0.40	0.5397
残差	969.36	10	96.94		
失拟值	272.61	5	54.52	0.39	0.8369
纯误差	696.75	5	139.35		
总计	3824.96	19			

3.2 模型的建立及评价

3.2.1 模型的建立 采用二次多项式模型对两个 CQA(Y1,Y2)及相应的 CPP(A,B,C)分别进行拟合,Y1 和 Y2 的的回归方程分别是:

Y1=430.6-7.896×A+1.616×B-43.66×C+

$$0.1586 \times A \times B + 0.2355 \times A \times C + 0.8753 \times B \times C + 0.03923 \times A^2 - 1.116 \times B^2 + 2.413 \times C^2$$

$$Y2 = 743.6 - 14.71 \times A - 3.180 \times B - 43.90 \times C + 0.1748 \times A \times B + 0.3146 \times A \times C + 0.9258 \times B \times C + 0.07459 \times A^2 - 0.9133 \times B^2 + 0.6536 \times C^2$$

二方程的拟合相关系数 R^2 分别是 0.7466 和 0.7595, 表明响应值 $Y1$ 和 $Y2$ 实际值与预测值之间具有较好的拟合度, 因此可以使用此模型来预测隐丹参酮和丹参酮 IIA 提取率的实际情况。

3.2.2 方差分析 方差分析结果以 $Y1$ 为例, 如表 4 所示。

可以看出, 对于 $Y1$ 和 $Y2$, 模型的 P 值均小于 0.05 (显著), 且失拟值均大于 0.1 (不显著), 表明所建模型可靠, 各因素与响应值之间的关系可以用此模型函数化。乙醇浓度 A , 乙醇倍量 B , 煎煮时间 C 的 P 值均小于 0.05, 表明 A 、 B 、 C 三个因素对 $Y1$ 、 $Y2$ 具有显著影响, 且影响程度排序均为 $A > B > C$ 。但 AB 、 AC 、 BC 的 P 值均小于 0.05, 表明 A 、 B 、 C 三个因素的交互作用对 $Y1$ 、 $Y2$ 的影响不显著。

3.3 响应面分析 以 $Y1$ 为例, 图 1 为隐丹参酮的提取率随乙醇浓度和乙醇倍量变化的响应面图, 图 2 为隐丹参酮的提取率随乙醇浓度和煎煮时间变化的响应面图。

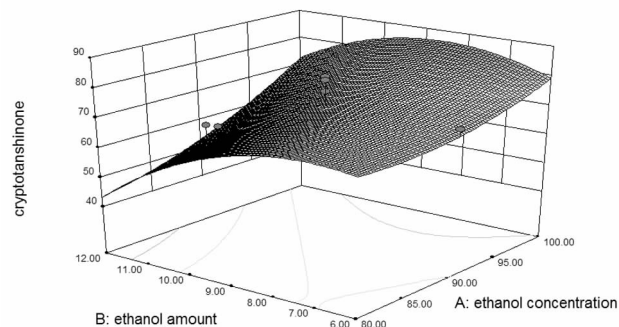


图 1 乙醇浓度和乙醇倍量对隐丹参酮 ($Y1$) 提取率影响的响应面图

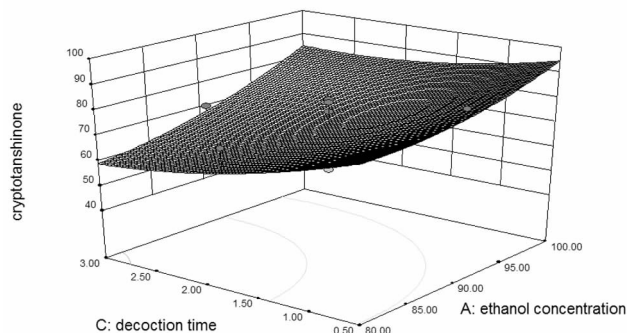


图 2 乙醇浓度和煎煮时间对隐丹参酮 ($Y1$) 提取率影响的响应面图

由上图可以直观的看出, 乙醇浓度 A 对于 $Y1$ 和 $Y2$ 的影响相比乙醇倍量 B 和煎煮时间 C 更大, 与方差分析结果一致。在规定的范围内, 乙醇浓度越高, 煎煮时间越短, 有效成分的提取率就越高, 这也符合了隐丹参酮和丹参酮 IIA 两种醇溶性成分遇热不稳定的特点^[9]。

3.4 设计空间的建立 在设定的参数空间内搜索同时满足两个目标 ($Y1 > 70\%$, $Y2 > 50\%$) 的所有因素组合, 即构成设计空间, 结果用 Overlay Plot 展示, 如图 3 所示。

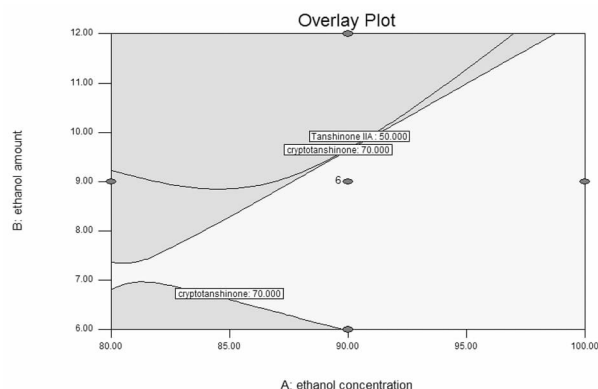


图 3 不带有置信区间的丹参醇提工艺的设计空间

由图 3 可以看出, 白色部分即为丹参醇提工艺的设计空间, 但由于模型的预测值与真实值之间存在一定差异, 所以设计空间的边界具有不确定性。为了应对设计空间边界的不确定性, 在定义设计空间时可加入置信水平 $\alpha = 0.05$ 的置信区间, 将设计空间优化, 结果应用 Overlay plot 展示, 如图 4 所示。

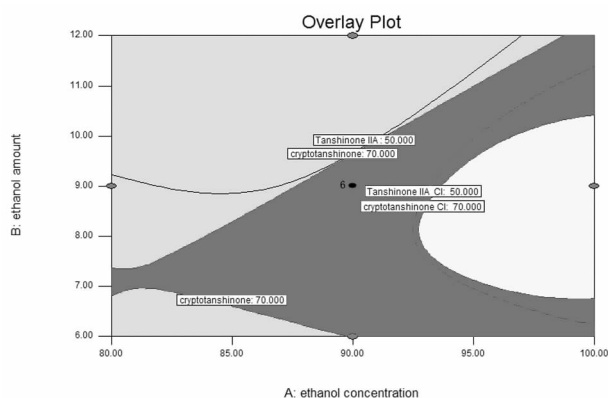


图 4 加入 95% 置信区间的丹参醇提工艺的设计空间

由图 4 可以看出, 白色部分即为优化后的设计空间, 即整个空间内所有的点的估计值都符合工艺目标要求 ($Y1 > 70\%$, $Y2 > 50\%$), 深灰色部分属于原有设计空间内不可靠的部分, 即此空间内的估计值有 5% 的概率无法满足原有的工艺目标要求。

3.5 验证实验 在图 4 中选取 5 个不同区域内的的点来做验证实验, 5 点的选取如表 5 所示。验证实验

结果如表 6 所示。

表 5 验证实验点的选取

实验	乙醇浓度	乙醇倍量	煎煮时间	实验点的说明
YZ1	80	10	2	Y1 < 70% 且 Y2 < 50%
YZ2	80	6	1.8	Y1 < 70% 且 Y2 < 50%
YZ3	100	6	0.5	Y1 > 70%, Y2 > 50%, 95% 置信区间外
YZ4	100	6.5	0.9	Y1 > 70%, Y2 > 50%, Y1 95% 置信区间外, Y2 95% 置信区间内
YZ5	100	8	0.5	Y1 > 70%, Y2 > 50%, 95% 置信区间内

表 6 设计空间验证实验结果

实验	Y1 (%)	Y2 (%)
YZ 1	27.33	23.08
YZ 2	26.25	21.37
YZ 3	67.18	58.06
YZ 4	61.91	50.52
YZ 5	70.65	62.56

由验证实验结果可知, YZ1、YZ2 和 YZ5 均符合预设要求。YZ3 和 YZ4 中 Y1 < 70%, Y2 > 50%, Y2 均符合预设要求而 Y1 却没有达到, 这表明由于 95% 置信区间的加入, 相比未加入 95% 置信区间, 设计空间边界的不确定性得到了较好的印证。

4 结论

本文采用中心点复合设计对丹参醇提工艺进行优化, 并构建了丹参醇提工艺的设计空间。加入 95% 置信区间后, 设计空间的范围有所缩小, 提高了设计空间的可靠性。实验结果表明, 基于 QbD 理念建立丹参醇提设计空间可提高工艺过程的稳健性和可靠性。

参考文献

[1] International Conference on Harmonisation, ICH Q8 (R2); Pharmaceutical Development, 2009.

[2] Pisano R, Fissore D, Barresi A A, et al. Quality by design: optimization of a freeze – drying cycle via design space in case of heterogeneous drying behavior and influence of the freezing protocol[J]. Pharmaceutical Development and Technology, 2013. 18 (1): 280 – 295.

[3] Martinez L, Antonio P, Lorenz L, et al. Use of near – infrared spectroscopy to quantify drug content on a continuous blending process: Influence of mass flow and rotation speed variations[J]. European Journal of Pharmaceutics, 2013, 84 (3): 606 – 615.

[4] Define Kayrak – Talay, Dale Steven, Wassgren Carl, et al. Quality by design for wet granulation in pharmaceutical processing: Assessing models for a priori design and scaling[J]. Powder Technology, 2013, 240: 7 – 18.

[5] Teckoe Jason, Mascaro Tracey, Farrell Thomas P, et al. Process Optimization of a Novel Immediate Release Film Coating System using QbD Principles[J]. AAPS Pharmscitech, 2013, 14 (2): 531 – 540.

[6] Streefland. M, Van Herpen PFG, Van de Waterbeemd B, et al. A practical approach for exploration and modeling of the design space of a bacterial vaccine cultivation process[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 104 (3): 492 – 504.

[7] 徐冰, 史新元, 乔延江, 等. 中药制剂生产工艺设计空间的建立[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (6): 924 – 929.

[8] 徐冰, 罗赣, 林兆洲, 等. 基于过程分析技术和设计空间的金银花醇沉加醇过程终点检测[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34 (10): 2284 – 2289.

[9] 翟学佳. 丹参药材热不稳定性考察及提取工艺优化[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29 (19): 1619 – 1622.

(2013 – 10 – 30 收稿)

(上接第 1282 页)

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2010 年版一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 389.

[2] 李国辉, 张录达, 杨建文, 等. 栽培和野生中药材灯盏花的近红外光谱鉴别模型[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27 (10): 1959 – 1961.

[3] 蒋受军, 刘丽娜, 朱斌, 等. 近红外光谱法测定注射用丹参 (冻干) 中丹参素、原儿茶醛及总酚含量的初步研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (7): 1094 – 1098.

[4] 金叶, 丁海樱, 吴永江, 等. 近红外光谱技术用于血必净注射液提取过程的在线检测研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (7): 1214 – 1221, 1234.

[5] Zhisheng Wu, Bing Xu, Min du, et al. Validation of a NIR quantification method for the determination of chlorogenic acid in Lonicera japonica solution in ethanol precipitation process[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 6: 1 – 6.

[6] 于宝珠, 辛明, 施朝晨, 等. 微型近红外分析仪用于药物制剂混合中的在线检测[J]. 中国药事, 2008, 22 (7): 560 – 563.

[7] 侯少瑞, 冯艳春, 胡昌勤. 近红外光谱法快速分析注射用头孢曲松钠

及其水分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (6): 936 – 941.

[8] Galvo R. K, Araujo M. C., José G. E., et al. A method for calibration and validation subset partitioning[J]. Talanta, 2005, 67 (4): 736 – 740.

[9] Blanco M, Peguero A. Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52 (1): 59 – 65.

[10] 戴传云, 高晓燕, 杨波, 等. 近红外光谱法测定双黄连口服液液中绿原酸和连翘苷的含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30 (2): 358 – 362.

[11] Joubert E, Manley M, Botha M. Use of NIRS for Quantification of Mangiferin and Hesperidin Contents of Dried Green Honeybush (Cyclopia genistoides) Plant Material [J]. Agricultural And Food Chemistry, 2006, 54 (15): 5279 – 5283.

[12] Fei Shen, Xiaoying Niu, Danting Yang, et al. Determination of Amino Acids in Chinese Rice Wine by Fourier Transform Near – Infrared Spectroscopy[J]. Agricultural And Food Chemistry, 2010, 58 (17): 9809 – 9816.

[13] 褚小立, 袁洪福, 陆婉珍. 近红外分析中光谱预处理及波长选择方法进展与应用[J]. 化学进展, 2004, 16 (4): 528 – 542.

(2013 – 10 – 30 收稿)