

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

沈金晶, 龚行楚, 潘坚扬, 瞿海斌*

(浙江大学药学院, 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 该研究采用设计空间法优化金银花水提液的石灰乳沉淀工艺。该工艺的评价指标为6种有机酸总纯度和单位质量药材提取出的6种有机酸量。通过加权标准偏回归系数法筛选出碱液滴加速度、调碱pH、静置时间和静置温度为4个关键工艺参数。采用逐步回归法建立工艺评价指标与关键工艺参数的定量模型。通过Monte Carlo算法计算出基于概率的设计空间并进行验证。结果表明,在设计空间内操作能够保证石灰乳沉淀工艺品质稳定。该研究推荐石灰乳沉淀工艺操作空间为:碱液滴加速度 $1.00 \sim 1.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,调碱pH 11.5~11.7,静置时间1.0~1.1 h,静置温度 $10.0 \sim 20.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

[关键词] 金银花; 石硫醇法; 石灰乳沉淀; 质量源于设计; 设计空间

Optimization of lime milk precipitation process of *Lonicera Japonica* aqueous extract based on quality by design concept

SHEN Jin-jing, GONG Xing-chu, PAN Jian-yang, QU Hai-bin *

(Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] Design space approach was applied in this study to optimize the lime milk precipitation process of *Lonicera Japonica* (*Jinyinhua*) aqueous extract. The evaluation indices for this process were total organic acid purity and amounts of 6 organic acids obtained from per unit mass of medicinal materials. Four critical process parameters (CPPs) including drop speed of lime milk, pH value after adding lime milk, settling time and settling temperature were identified by using the weighted standardized partial regression coefficient method. Quantitative models between process evaluation indices and CPPs were established by a stepwise regression analysis. A design space was calculated by a Monte-Carlo simulation method, and then verified. The verification test results showed that the operation within the design space can guarantee the stability of the lime milk precipitation process. The recommended normal operation space is as follows: drop speed of lime milk of $1.00\text{-}1.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, pH value of 11.5-11.7, settling time of 1.0-1.2 h, and settling temperature of $10\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$.

[Key words] *Lonicera Japonica*; lime milk-sulfuric acid-ethanol method; lime milk precipitation process; quality by design; design space

金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花,具有清热解毒、疏散风热之功效^[1]。金银花提取物可用于制备痰热清注射液和茵栀黄胶囊等多种中药,其质量控制常采用

包含新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 等酚酸类成分的含测方法和特征图谱^[2]。

金银花提取物制备过程常采用石硫醇法。石硫

[收稿日期] 2017-01-04

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-SH-48)

[通信作者] * 瞿海斌,教授,Tel:(0571)88208428,Fax:(0571)88208428,E-mail:quhb@zju.edu.cn

[作者简介] 沈金晶,硕士研究生,E-mail:sjinger@foxmail.com

醇法分为石灰乳沉淀和硫酸溶解 2 个过程,先向金银花水提液中加入石灰乳,使有机酸形成钙盐沉淀,过滤收集沉淀;随后加入乙醇使沉淀混悬,再加硫酸使有机酸溶出,得到有机酸的醇溶液和硫酸钙沉淀。该法操作简单,自 20 世纪 70 年代起就已用于注射液的生产^[3],但该法有机酸收率较低,批次间一致性差,已有文献报道中也缺乏系统的工艺研究。

近年来,质量源于设计(quality by design, QbD)理念在制药领域获得了日益广泛的关注和应用。该理念强调对药品及其生产工艺的理解,要求采用知识管理和风险管理,依靠原料质控和生产过程质控来控制药品质量。QbD 理念实施时常采用设计空间法(design space approach),该法能够提供稳健生产的工艺参数范围,确保产品质量的一致性,目前已用于提取、醇沉、水沉和柱色谱等工艺的参数优化^[4-10]。

本研究基于 QbD 理念,采用设计空间法优化金银花水提液石灰乳沉淀工艺,以加权标准偏回归系数法筛选关键工艺参数^[11],建立工艺评价指标和关键工艺参数的定量模型,利用 Monte Carlo 算法获得基于概率的设计空间并进行验证。

1 材料

pH 计(S40 SevenMulti, 瑞士 Mettler-Toledo 公司);低温恒温槽(THD-1008W, 宁波天恒仪器厂);旋转蒸发仪(R-200, 德国 BUCHI 公司);恒温水浴槽(B-490, 德国 BUCHI 公司);注射泵(LSP02-1B, 保定兰格恒流泵有限公司);数显测速电动搅拌器(JJ-1A, 常州润华电器有限公司);磁力搅拌器(85-1, 杭州仪表电机有限公司);精密电子天平(XS105 DualRange, 瑞士 Mettler-Toledo 公司);电热恒温鼓风干燥器(DHG-9146A, 上海精宏实验设备有限公司);高效液相色谱仪(1260, 德国 Agilent 公司),配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、OpenLAB ChemStation 工作站。

金银花药材由上海凯宝药业股份有限公司提供(产地河南封丘县,批号 160302);用于标准曲线配置的新绿原酸对照品(纯度 > 99%, 140106),绿原酸对照品(纯度 > 99%, 140311),隐绿原酸对照品(纯度 > 99%, 140224),咖啡酸对照品(纯度 > 99%, 140219),异绿原酸 B 对照品(纯度 > 99%, 140309),异绿原酸 A 对照品(纯度 > 99%, 140221),异绿原酸 C 对照品(纯度 > 99%, 130428)均购自上海融禾医药科技有限公司;用于加样回收

样品配置的新绿原酸对照品(纯度 > 99%, 160904),绿原酸对照品(纯度 > 99%, 160927),隐绿原酸对照品(纯度 > 99%, 160917),咖啡酸对照品(纯度 > 99%, 161021),异绿原酸 B 对照品(纯度 > 99%, 160925);异绿原酸 A 对照品(纯度 > 98%, 161026),异绿原酸 C 对照品(纯度 > 98%, 161020)均购自上海融禾医药科技有限公司;氢氧化钙(分析纯,建德市新安江重钙厂);盐酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);色谱纯乙腈、甲醇均购自 Merck 公司;去离子水由水超纯水系统(Milli-Q, 德国 Millipore 公司),每日新制。

2 方法

2.1 金银花水提浓缩液制备及石灰乳沉淀步骤

称取 150 g 金银花药材,分别加 2.25 L 水和 1.50 L 水煎煮 2 次,第 1 次煎煮 1 h,第 2 次煎煮 0.5 h,滤过,合并滤液,将滤液浓缩至 450 mL,冷冻储存备用。

用磁力搅拌器在冰浴条件下配置一定浓度石灰乳,配完后继续搅拌备用。浓缩液在常温下解冻后摇匀,量取约 100 mL 至 250 mL 烧杯中,在机械搅拌下用注射泵以一恒定速度滴加石灰乳,加完后继续搅拌 30 min,再将烧杯用保鲜膜密封,在低温恒温槽中静置一定时间。将烧杯取出后立即抽滤,收集沉淀后称重。取部分沉淀分析有机酸含量及固含量,其余冷冻保存。

2.2 分析方法及方法学验证

沉淀和浓缩液中有有机酸含量采用 HPLC 测定^[12]。沉淀样品的前处理方法如下:取钙盐沉淀约 12 g,用 50 mL 乙醇混悬,加入 6% 的盐酸溶液将 pH 调至 1.0,使钙盐沉淀基本溶解,抽滤,取 5 mL 滤液浓缩至干,用 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶,进行 HPLC 分析。

HPLC 分析条件:色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以 0.1% 甲酸-水溶液为流动相 A,0.1% 甲酸-乙腈溶液为流动相 B,进行梯度洗脱,0 ~ 25 min, 8% B, 25 ~ 30 min, 8% ~ 19% B, 30 ~ 60 min, 19% B, 60 ~ 61 min, 19 ~ 90% B, 61 ~ 65 min, 90% B;检测波长 325 nm;流速 1 mL · min⁻¹;进样量 10 μL;柱温 25 °C。

对照品溶液配制方法如下:精密称取新绿原酸对照品 5.08 mg,绿原酸对照品 5.63 mg,隐绿原酸

对照品 4.94 mg, 咖啡酸对照品 11.72 mg, 异绿原酸 B 对照品 4.89 mg, 异绿原酸 A 对照品 4.91 mg, 异绿原酸 C 对照品 4.87 mg, 以 50% 甲醇超声溶解并定容至 5 mL 量瓶, 作为标准曲线最高浓度溶液, 逐步稀释至标准曲线各浓度溶液。

加样回收率样品制备方法: 精密称取新绿原酸对照品 3.79 mg, 绿原酸对照品 35.61 mg, 隐绿原酸对照品 6.98 mg, 咖啡酸对照品 0.45 mg, 异绿原酸 B 对照品 6.74 mg, 异绿原酸 A 对照品 8.06 mg, 异绿原酸 C 对照品 9.47 mg, 以 50% 甲醇超声溶解并定容至 25 mL 量瓶, 作为加样回收对照品储备液。取金银花提取液 1 mL, 共 9 份, 精密称定, 分别加入 0.6, 1.0, 1.4 mL 加样回收对照品储备液, 以 50% 甲醇超声溶解并定容至 5 mL, 配成 80%, 100%, 120% 浓度的加样回收样品, 每个浓度样品平行制备 3 份, 进行 HPLC 分析。

总固体含量测定采用质量法^[13]。取钙盐沉淀约 2 g 或浓缩液约 0.5 mL, 精密称量, 然后置于已恒重的称量瓶内, 在鼓风干燥箱内 105 °C 干燥 3 h, 放

入干燥器内冷却至室温, 再次称量。根据样品干燥后质量计算样品中总固体含量。

2.3 试验设计

2.3.1 工艺评价指标 为考察金银花水提液中的有机酸转移到钙盐沉淀情况, 将每 1 g 药材提取出的新绿原酸量 (Y_1)、绿原酸量 (Y_2)、隐绿原酸量 (Y_3)、异绿原酸 B 量 (Y_4)、异绿原酸 A 量 (Y_5)、异绿原酸 C 量 (Y_6) 作为工艺评价指标。

同时, 为考察金银花水提液中杂质除去程度, 将以上 6 种有机酸的总纯度 (Y_7) 也作为工艺评价指标, 计算公式如下。

$$\text{总有机酸纯度} = \frac{\text{样品中6种有机酸总量}}{\text{样品总固体量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.2 关键工艺参数筛选 采用 Plackett-Burman 设计考察碱液滴加速度、调碱 pH、调碱搅拌速度、石灰乳质量浓度、石灰乳搅拌速度、静置时间、静置温度等 7 个工艺参数对金银花石灰乳沉淀过程的影响, 各因素和相应水平见表 1, 具体条件见表 2。试验设计由 JMP11 (美国 SAS 公司) 完成。

表 1 因素及相应水平

Table 1 Coded and uncoded values of factors

水平	X_1 碱液滴加速度 / mL · min ⁻¹	X_2 调碱 pH	X_3 静置时间 / h	X_4 静置温度 / °C	X_5 调碱搅拌速度 / r · min ⁻¹	X_6 石灰乳质量浓度 / %	X_7 石灰乳搅拌速度 / r · min ⁻¹
-1	0.25	11.5	1	10	250	10	300
0	0.75	12	2	20	350	15	450
1	1.25	12.5	3	30	450	20	600

表 2 Plackett-Burman 设计及结果

Table 2 Plackett-Burman designed experiments and results

No.	参数							评价指标						
	X_1 / mL · min ⁻¹	X_2	X_3 / h	X_4 / °C	X_5 / r · min ⁻¹	X_6 / %	X_7 / r · min ⁻¹	Y_1 / mg	Y_2 / mg	Y_3 / mg	Y_4 / mg	Y_5 / mg	Y_6 / mg	Y_7 / %
S1	1.25	11.5	1.0	10.0	450	20	600	0.95	4.80	2.01	1.01	1.32	3.77	6.39
S2	0.75	12.0	2.0	20.0	350	15	450	1.07	5.46	2.40	1.29	1.36	4.59	6.74
S3	0.25	12.5	3.0	10.0	250	20	600	0.69	4.42	1.48	0.86	0.98	3.34	4.17
S4	1.25	11.5	1.0	10.0	250	10	600	0.90	4.56	1.76	1.04	1.47	4.03	6.59
S5	0.25	12.5	1.0	10.0	450	20	300	0.92	6.43	2.12	1.19	1.45	5.13	5.81
S6	0.75	12.0	2.0	20.0	350	15	450	1.12	5.81	2.46	1.18	1.38	4.41	7.06
S7	1.25	12.5	3.0	30.0	450	20	600	0.68	3.68	1.32	0.81	0.79	2.78	3.43
S8	0.25	12.5	1.0	30.0	250	10	600	0.74	4.92	1.66	1.13	1.24	4.77	4.97
S9	0.25	11.5	1.0	30.0	250	20	300	0.94	3.94	1.74	1.09	1.32	4.09	6.40
S10	0.25	11.5	3.0	10.0	450	10	300	0.88	4.80	1.95	1.04	1.49	4.56	6.86
S11	1.25	12.5	3.0	10.0	250	10	300	0.92	5.60	2.00	0.96	1.12	3.74	4.67
S12	0.25	11.5	3.0	30.0	450	10	600	0.67	2.92	1.30	0.66	0.80	2.22	4.13
S13	1.25	12.5	1.0	30.0	450	10	300	0.72	4.57	1.51	0.83	0.96	3.16	4.06
S14	1.25	11.5	3.0	30.0	250	20	300	0.83	3.40	1.55	0.65	0.72	1.91	3.78

2.3.3 石灰乳沉淀工艺建模 采用 Box-Behnken 设计研究石灰乳沉淀过程关键工艺参数和工艺评价指标的定量关系。调碱搅拌速度固定为 400 r ·

min⁻¹, 石灰乳浓度固定为 20%, 石灰乳搅拌速度固定为 450 r · min⁻¹。其他参数见表 3, 试验设计由 Design Expert 8. 0. 6(美国 Stat-Ease 公司)完成。

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Box-Behnken designed experiments and results

No.	关键参数				评价指标						
	X_1 /mL · min ⁻¹	X_2	X_3 /h	X_4 /°C	Y_1 /mg	Y_2 /mg	Y_3 /mg	Y_4 /mg	Y_5 /mg	Y_6 /mg	Y_7 /%
B1	0.75	11.5	2.0	30.0	1.22	4.92	2.13	1.96	1.26	4.82	8.59
B2	0.25	11.5	2.0	20.0	1.14	4.93	2.03	1.86	1.27	4.70	7.87
B3	0.25	12.0	2.0	30.0	0.95	4.84	1.74	1.77	1.09	4.55	6.08
B4	0.75	12.0	2.0	20.0	1.10	5.47	1.94	1.74	1.09	4.36	6.13
B5	0.75	12.0	2.0	20.0	1.18	6.06	2.08	1.85	1.19	4.73	6.79
B6	1.25	12.0	1.0	20.0	1.33	7.05	2.38	2.03	1.32	5.31	7.12
B7	0.75	11.5	3.0	20.0	1.39	5.71	2.39	2.07	1.42	5.18	8.13
B8	1.25	11.5	2.0	20.0	1.36	5.78	2.33	2.03	1.40	5.03	8.37
B9	0.75	12.0	3.0	30.0	1.10	4.97	1.99	1.81	0.98	4.31	6.03
B10	0.75	12.0	1.0	10.0	1.49	7.63	2.69	2.26	1.47	6.22	10.10
B11	0.75	12.0	3.0	10.0	1.14	5.88	1.93	1.54	0.83	3.45	5.95
B12	1.25	12.5	2.0	20.0	0.68	5.29	1.48	1.48	0.79	4.12	4.71
B13	0.75	12.5	1.0	20.0	0.97	7.86	2.25	1.93	1.14	5.47	6.96
B14	0.75	12.5	2.0	30.0	0.70	5.14	1.46	1.60	0.85	4.73	5.60
B15	0.75	12.0	2.0	20.0	1.14	5.59	1.93	1.66	1.09	4.24	6.26
B16	0.25	12.5	2.0	20.0	0.80	5.86	1.68	1.89	1.15	5.37	5.65
B17	0.75	11.5	1.0	20.0	1.39	6.33	2.37	2.15	1.54	5.40	9.70
B18	0.75	12.5	2.0	10.0	0.93	7.13	1.98	1.64	1.02	4.83	6.24
B19	1.25	12.0	2.0	10.0	1.51	7.12	2.59	1.91	1.24	4.70	8.28
B20	0.75	12.0	2.0	20.0	1.26	6.01	2.17	1.86	1.22	4.75	7.24
B21	0.25	12.0	1.0	20.0	1.28	6.13	2.17	1.93	1.35	5.01	7.99
B22	0.75	12.5	3.0	20.0	0.70	5.49	1.45	1.59	0.96	4.62	4.81
B23	1.25	12.0	3.0	20.0	1.19	5.64	1.99	1.76	1.11	4.50	6.60
B24	1.25	12.0	2.0	30.0	1.38	5.83	2.32	1.90	1.07	4.39	6.27
B25	0.25	12.0	3.0	20.0	1.01	4.98	1.76	1.62	1.10	4.17	6.34
B26	0.75	11.5	2.0	10.0	1.34	5.68	2.05	1.89	1.45	4.82	9.10
B27	0.75	12.0	1.0	30.0	1.23	5.85	2.08	1.79	1.15	4.49	6.46
B28	0.25	12.0	2.0	10.0	1.12	5.70	1.90	1.73	1.25	4.58	7.26

2.3.4 数据处理 标准偏回归系数法能体现出工艺参数对所有评价指标的综合影响^[11,14], 因此本研究采用该法筛选关键工艺参数。首先对工艺评价指标 $Y_1 \sim Y_7$ 采用下式进行标准化处理。

$$Y'_k = \frac{Y_k - \bar{Y}_k}{SD_k} (k=1, 2, \dots, 7) \quad (2)$$

其中 Y_k 为实测值, Y'_k 为工艺评价指标标准化后的值, \bar{Y}_k 为工艺评价指标平均值, SD_k 为该工艺评价指标实测值的标准差。随后, 通过多元线性回归建立工艺参数和关键评价指标的定量模型, 如下式所示。

$$Y'_k = a_{0,k} + \sum_{i=1}^7 a_{x_i,k} X_i \quad (3)$$

其中 $a_{0,k}$ 为常数项, x_i 为工艺参数编码值, 为参数 X_i 对指标 Y_k 的标准偏回归系数。然后将各标准偏回归系数的绝对值加权求和。作者认为单位质量药材提取出的有机酸量和总有机酸纯度同等重要, 各占 1/2 权重, 因此加权标准偏回归系数绝对值之和采用下式计算。

$$A_{x_i} = \frac{1}{12} \times \sum_{k=1}^6 |a_{x_i,k}| + \frac{1}{2} \times a_{x_i,7} \quad (4)$$

其中为参数 X_i 对 7 个工艺评价指标的偏回归系数加权之和, 取加和值较大的前 4 项对应的参数

作为关键工艺参数。

关键工艺参数与工艺评价指标之间的数学模型采用下式计算。

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{j=1}^4 b_j x_j^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} x_i x_j \quad (5)$$

其中, b_0 为常数项, b_i, b_j, b_{ij} 为偏回归系数。采用逐步回归法简化方程, 模型移入或移除特定项的 P 设定为 0.10。多元线性回归和逐步回归均采用 Design-Expert 8.0.6 (美国 Stat-Ease 公司) 计算。

采用模拟重复试验结果的 Monte Carlo 法计算设计空间^[7,9], 由 Matlab R2014a (美国 MathWorks 公司) 自编程序进行计算。假设在某特定工艺条件下, 多次重复试验所得工艺评价指标的值符合正态分布, 其平均值与试验结果相同, 相对标准偏差根据中心点相对标准偏差确定。计算时随机模拟各指标的值, 通过逐步回归法建模并预测, 统计不同工艺参数组合下预测结果的达标情况, 取达标概率大于或等于 0.80 的组合为设计空间。计算中将关键工艺参数变化步长设为 0.02, 模拟次数为 15 000 次。

3 结果与讨论

3.1 有机酸含量测定分析方法学验证

根据本研究样品的实际情况, 对文献[12]方法进行方法学验证, 标准曲线及线性范围考察结果见表 4, 加样回收考察结果见表 5, 对照品及提取液样品 HPLC 图见图 1。各有机酸 80%, 100%, 120% 浓度的平均回收率在 97.70% ~ 106.2%, RSD 均小于 3.5%, 证明该分析方法准确、可靠, 可用于本研究中样品有机酸的含量测定。

表 4 金银花中 7 种有机酸的线性范围

Table 4 Linear ranges of 7 organic acids in Lonicera Japonica

化合物	回归方程	线性范围/ $g \cdot L^{-1}$	R^2
新绿原酸	$Y = 32.470X - 35.5$	0.003 25 ~ 1.02	0.999 9
绿原酸	$Y = 33.029X - 160.8$	0.003 60 ~ 1.13	0.999 7
隐绿原酸	$Y = 30.335X - 135.1$	0.003 16 ~ 0.988	0.999 7
咖啡酸	$Y = 55.318X + 58.26$	0.007 50 ~ 1.170	0.999 6
异绿原酸 B	$Y = 34.924X - 127.1$	0.003 14 ~ 0.978	0.999 8
异绿原酸 A	$Y = 39.696X - 159.3$	0.003 13 ~ 0.982	0.999 8
异绿原酸 C	$Y = 33.136X - 171.6$	0.003 12 ~ 0.974	0.999 7

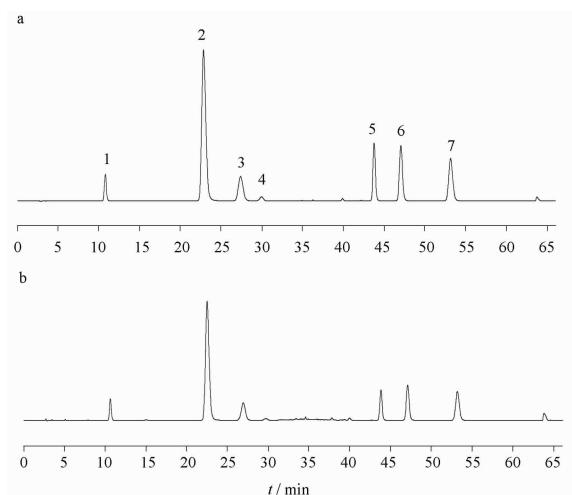
3.2 关键工艺参数筛选

Plackett-Burman 设计所得结果见表 2。单位质量药材提取出的绿原酸量、异绿原酸 B 量、异绿原酸 A 量、异绿原酸 C 量分别为 2.92 ~ 6.43, 0.65 ~ 1.078 ·

表 5 金银花中 7 种有机酸加样回收率 ($n=3$)

Table 5 Recoveries of 7 organic acids in Lonicera Japonica ($n=3$) %

化合物	浓度水平			RSD
	80%	100%	120%	
新绿原酸	100.9	101.2	100.7	1.2
绿原酸	101.4	101.9	101.6	0.97
隐绿原酸	99.25	100.5	100.4	1.1
咖啡酸	102.8	106.2	103.9	3.2
异绿原酸 B	97.70	98.47	98.57	0.91
异绿原酸 A	98.14	98.25	98.24	0.69
异绿原酸 C	100.7	100.3	100.5	0.86



a. 对照品; b. 提取液样品; 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. 咖啡酸; 5. 异绿原酸 B; 6. 异绿原酸 A; 7. 异绿原酸 C。

图 1 对照品及样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of references and sample

1.29, 0.72 ~ 1.49, 1.91 ~ 5.13 mg, 与纯化前的 18.1, 1.49, 3.70, 5.40 mg 相比均明显减少, 说明这 4 种成分在纯化过程中损失较大。已有文献报道新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸在强碱性条件下易发生降解转化^[15-16], 所以推测有机酸损失主要原因为石灰乳加入后有机酸产生降解。总有机酸纯度在 3.43% ~ 7.06%, 而浓缩液中为 8.38%, 也有明显下降。

公式(4)中各指标相应的模型标准偏回归系数及其绝对值之和值见表 6。由表可知, 碱液滴加速度 (X_1)、调碱 pH (X_2)、静置时间 (X_3)、静置温度 (X_4) 的偏回归系数绝对值之和大于另外 3 项, 因此认为它们是石灰乳沉淀过程关键工艺参数。

3.3 关键工艺参数的影响规律

Box-Behnken 设计所得结果见表 3, 并以公式

表6 标准偏回归系数值及其加权绝对值之和

Table 6 Standardized partial regression coefficients and the sums of their weighed absolute values

工艺参数	标准偏回归系数							加权标准偏回归系数绝对值之和
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	
X_1	0.087	-0.070	-0.025	-0.286	-0.274	-0.407	-0.217	0.205
X_2	-0.293	0.447	-0.051	0.124	-0.182	0.201	-0.447	0.332
X_3	-0.278	-0.377	-0.271	-0.551	-0.565	-0.553	-0.457	0.445
X_4	-0.395	-0.615	-0.507	-0.402	-0.611	-0.486	-0.490	0.496
X_5	-0.114	0.030	0.007	-0.083	-0.005	-0.021	0.006	0.025
X_6	0.105	-0.060	0.011	-0.024	-0.154	-0.126	-0.082	0.081
X_7	-0.345	-0.296	-0.300	-0.106	-0.137	-0.145	-0.122	0.172

(5)建立工艺评价指标与关键工艺参数的定量模型。模型的偏回归系数及方差分析结果见表7。各模型的 R^2 在0.80~0.88,说明模型能解释大部分变异。除异绿原酸C指标外,调碱pH对其他指标都有显著影响;静置时间对所有指标均有显著影响;除

异绿原酸A和异绿原酸C指标外,静置温度对其他指标都有显著影响。除纯度外,碱液滴加速度和调碱pH的交互作用对其他指标均有显著影响;除新绿原酸和绿原酸指标外,静置时间和静置温度的交互作用对其他指标均有显著影响。

表7 模型偏回归系数及方差分析

Table 7 Estimated parameter values and ANOVA analysis results of the models

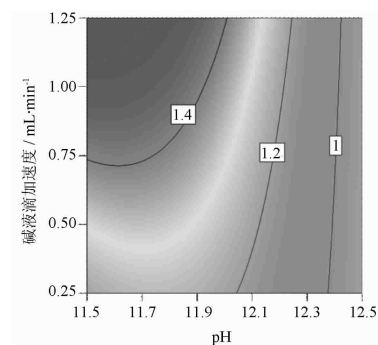
指标	常量	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1X_2	X_2X_3	X_2X_4	X_3X_4	X_2^2	X_3^2	X_4^2	R^2	R^2_{adj}	
Y_1	1.212	0.095 (0.0016) ¹⁾	-0.255 (<0.0001)	-0.099 (0.0012)	-0.079 (0.0069)	-0.089 (0.0660)				-0.161 (0.0002)			0.88	0.85	
Y_2	5.71	0.357 (0.0014)	0.285 (0.0075)	-0.68 (<0.0001)	-0.632 (<0.0001)	-0.354 (0.0449)	-0.438 (0.0158)	-0.307 (0.0786)			0.415 (0.0038)		0.88	0.83	
Y_3	2.046	0.15 (0.0022)	-0.249 (<0.0001)	-0.203 (0.0001)	-0.118 (0.0115)	-0.126 (0.0985)	-0.203 (0.0118)	-0.149 (0.0540)	0.165 (0.0348)	-0.119 (0.0484)	0.114 (0.0567)		0.87	0.79	
Y_4	1.797		-0.154 (<0.0001)	-0.141 (<0.0001)		-0.147 (0.0024)			0.184 (0.0003)		0.076 (0.0805)		0.83	0.79	
Y_5	1.197		-0.202 (<0.0001)	-0.13 (<0.0001)	-0.073 (0.0026)	-0.122 (0.0035)			0.116 (0.0050)				-0.058 (0.0541)	0.89	0.85
Y_6	4.494			-0.473 (<0.0001)		-0.394 (0.0066)			0.644 (<0.0001)	0.353 (0.0022)	0.234 (0.0313)		0.80	0.75	
Y_7	7.022		-1.481 (<0.0001)	-0.871 (<0.0001)	-0.658 (0.0003)				0.929 (0.0018)				0.87	0.85	

注:1)括号内为各回归系数相应的 P 。

由于工艺参数对新绿原酸量、隐绿原酸量、异绿原酸B量、异绿原酸A量和异绿原酸C量的影响规律类似,因此以新绿原酸量为例进行说明。新绿原酸量等高线图见图2,结合偏回归系数的数值,见表7,可知:碱液滴加速度越快,调碱pH越低,静置时间越短,静置温度越低,新绿原酸量越高。

绿原酸量等高线图见图3,碱液滴加速度越快,调碱pH越高,静置时间越短,静置温度越低,绿原酸量越高。

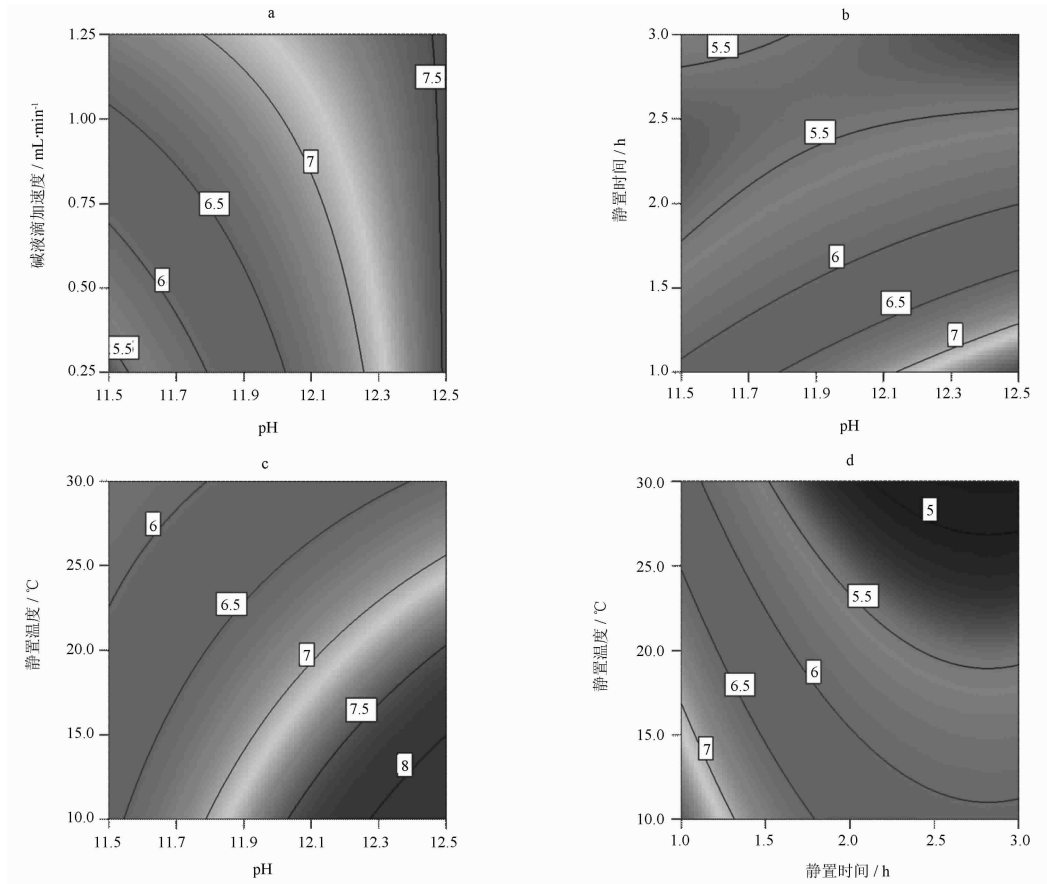
纯度等高线图见图4,结合表7中偏回归系数的数值可知:调碱pH越低,静置时间越短,静置温度越低,总有机酸纯度越高。



静置时间1 h,静置温度20℃。

图2 新绿原酸量等高线图

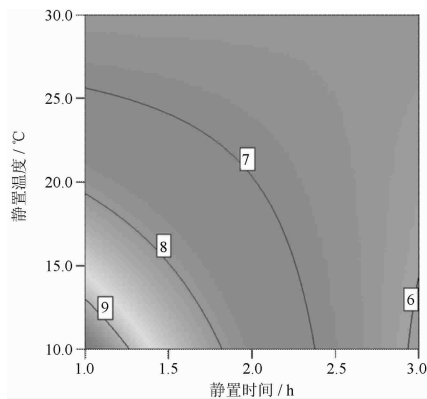
Fig. 2 Contour plot of the amount of neochlorogenic acid



a. 静置时间 1 h, 静置温度 20 °C; b. 碱液滴加速度 1.25 mL · min⁻¹, 静置温度 20 °C; c. 碱液滴加速度 1.25 mL · min⁻¹, 静置时间 1 h; d. 碱液滴加速度 1.25 mL · min⁻¹, pH 12.0。

图3 绿原酸量等高线图

Fig. 3 Contour plot of the amount of chlorogenic acid



碱液滴加速度 1.25 mL · min⁻¹, pH 12.0。

图4 总有机酸纯度等高线图

Fig. 4 Contour plot of total organic acid purity

3.4 设计空间及验证

工艺评价指标的可接受范围及达标概率见表8。通过 Monte Carlo 算法计算得到设计空间,见图

5。为便于操作,推荐设计空间内操作空间为:碱液滴加速度 1.00 ~ 1.25 mL · min⁻¹, 调碱 pH 11.5 ~ 11.7, 静置时间 1.0 ~ 1.1 h, 静置温度 10.0 ~ 20.0 °C。该操作空间内工艺评价指标的最低达标概率为 0.800。

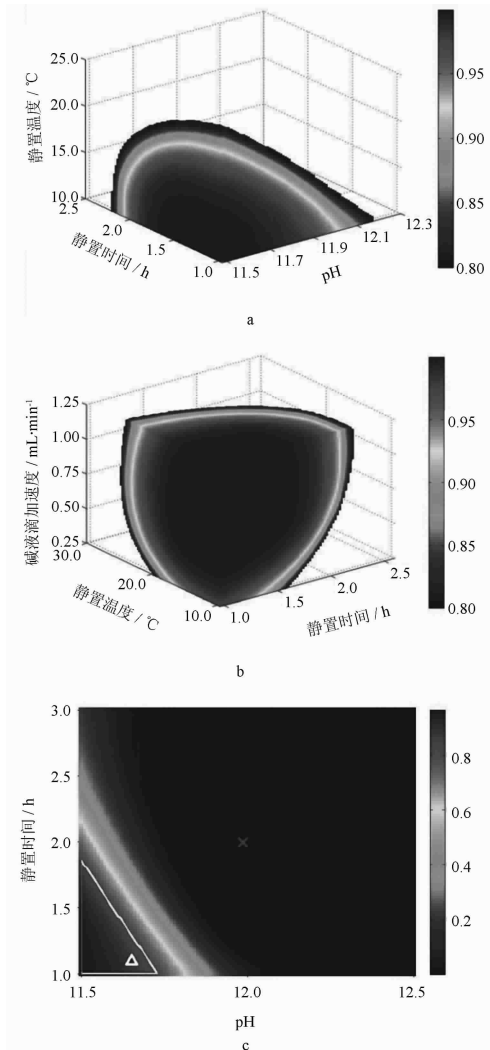
表8 工艺评价指标下限及达标概率要求

Table 8 Lower limits of process CQAs and the acceptable probability

工艺指标	下限
总有机酸纯度	8.30%
新绿原酸	1.00 mg
绿原酸	5.00 mg
隐绿原酸	1.50 mg
异绿原酸 B	1.50 mg
异绿原酸 A	1.00 mg
异绿原酸 C	4.60 mg

注:设计空间可接受概率为 0.80。

为验证设计空间的准确性,分别在设计空间内、外取一点进行验证,记为 V_1, V_2 。验证点实验条件及结果见图 5,表 9。由验证结果可知,实测值与预测值基本符合,证明模型预测性能良好。设计空间内验证点完全达标,而设计空间外验证点的总有机酸纯度和异绿原酸 C 量不能达标,说明在设计空间内操作能保证石灰乳沉淀工艺品质稳定可靠。



a. 碱液滴加速度为 $1.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; b. pH 11.5; c. 碱液滴加速度 $1.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 静置温度 $20 \text{ }^\circ\text{C}$; Δ . 设计空间内验证点; \times . 设计空间外验证点; 彩条指所有指标均达标的概率值。

图 5 设计空间和验证点

Fig. 5 Design space and conditions of verification experiments

4 结论

本研究通过设计空间法优化金银花水提液石灰乳沉淀工艺。首先确定工艺评价指标为纯度、单位

表 9 验证点实验条件及结果 ($n=3$)

Table 9 Conditions and results of verification experiments ($n=3$)

试验条件及工艺指标	V_1	V_2
达标概率	0.87	0.01
是否在设计空间内	是	否
碱液滴加速度/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	1.25	1.25
调碱 pH	11.64	11.99
静置温度/ $^\circ\text{C}$	20.0	20.0
静置时间/h	1.1	2.0
纯度/%	$8.72 \pm 0.41(8.87)^{1)}$	$8.22 \pm 0.76(6.70)$
新绿原酸/mg	$1.44 \pm 0.06(1.56)$	$1.45 \pm 0.21(1.23)$
绿原酸/mg	$6.14 \pm 0.11(6.78)$	$6.05 \pm 0.38(6.05)$
隐绿原酸/mg	$2.38 \pm 0.19(2.55)$	$2.47 \pm 0.32(2.11)$
异绿原酸 B/mg	$2.05 \pm 0.05(2.20)$	$1.97 \pm 0.14(1.73)$
异绿原酸 A/mg	$1.49 \pm 0.08(1.55)$	$1.32 \pm 0.07(1.13)$
异绿原酸 C/mg	$4.96 \pm 0.21(5.58)$	$4.59 \pm 0.26(4.42)$

注:¹⁾括号内为预测值。

质量药材提取出的新绿原酸量、绿原酸量、隐绿原酸量、异绿原酸 B 量、异绿原酸 A 量和异绿原酸 C 量;随后,通过加权标准偏回归系数法筛选出碱液滴加速度、调碱 pH、静置时间和静置温度为 4 个关键工艺参数;再采用逐步回归法建立工艺评价指标与关键工艺参数的定量模型;最后,通过 Monte Carlo 算法计算出基于概率的设计空间并验证。验证结果证明在该工艺参数设计空间内操作能够保障石灰乳沉淀过程质量稳定。为便于操作,推荐金银花水提液石灰乳沉淀工艺的操作空间为:碱液滴加速度 $1.00 \sim 1.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 调碱 pH $11.5 \sim 11.7$, 静置时间 $1.0 \sim 1.1 \text{ h}$, 静置温度 $10.0 \sim 20.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

[参考文献]

- [1] 王芳, 蒋跃平, 王晓良, 等. 金银花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1378.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015:1152.
- [3] 高海谦. 影响提取黄芩甙收率的因素[J]. 中国药学杂志, 1979(10): 439.
- [4] 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, 154(2): 309.
- [5] 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.
- [6] Gong X, Chen H, Pan J, et al. Optimization of *Panax notoginseng*

- seng* extraction process using a design space approach[J]. Sep Purif Technol, 2015, 141: 197.
- [7] Gong X, Li Y, Chen H, 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, Zhang Y, Pan J, et al. Optimization of the ethanol recycling reflux extraction process for saponins using a design space approach[J]. PLoS ONE, 2014, 9(12): e114300.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 严斌俊, 郭正泰, 瞿海斌, 等. 丹红注射液醇沉关键工艺参数筛选方法[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1672.
- [12] 李文龙, 张文明, 薛东升, 等. 测定金银花中6种有机酸类化合物含量的一种新方法[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2012, 41(1): 13.
- [13] 中国药典. 四部[S]. 2015: 202.
- [14] 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(18): 3193.
- [15] 朱鹏, 苗潇磊, 陈勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学[J]. 药学学报, 2016(1): 122.
- [16] Narita Y, Inouye K. Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions[J]. J Agr Food Chem, 2013, 61(4): 966.

[责任编辑 孔晶晶]