

表面响应曲面法优化牛磺罗定衍生化条件的研究

张宁¹, 雷勇¹, 任燕冬¹, 陈曦^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院药用植物研究所 北京 100193)

摘要 目的: 在单因素实验的基础上, 利用表面响应曲面法(RSM)对HPLC-UV法测定牛磺罗定含量中的牛磺罗定衍生化条件进行优化。方法: 以衍生化试剂不同的浓度、反应时间和反应温度为因子, 以反应后衍生化产物的量(用峰面积表示)为响应因子, 对衍生化条件进行优化。结果: 最佳衍生化条件是反应温度为100℃, 衍生化试剂浓度为20 g·L⁻¹, 反应时间为88 min。结论: 本方法结果准确可靠, 可应用于牛磺罗定的衍生化。

关键词: 曲面法; 牛磺罗定; 对甲基苯磺酰氯; 衍生化

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)-03-0479-05

Response surface methodology optimizing derivatization condition of taurolidine

ZHANG Ning¹, LEI Yong¹, REN Yan-dong¹, CHEN Xi^{2*}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Medicinal Plants, Beijing 100193, China)

Abstract Objective: On the base of the single factor investigation, response surface methodology was applied to optimize the derivatization condition of taurolidine. **Methods:** Different derivatization reagent concentrations, reaction time and reaction temperature were taken as factor. The amount of the derivative products (expressed by peak area) was taken as response factor. **Results:** The optimizing derivatization condition of taurolidine was as follows: the reaction temperature (100℃), the derivatization reagent concentration (20 g·L⁻¹), the reaction time (88 min). **Conclusion:** The method is accurate, reliable and can be applied to derivatize taurodilene.

Key words: response surface methodology; taurolidine; *p*-toluenesulfonyl chloride; derivatization

牛磺罗定是一种广谱非抗生素抗菌剂^[1,2], 临床上广泛用于治疗腹膜炎、预防术后感染等^[3]。近年来, 人们发现牛磺罗定不仅具有抗菌和抗微生物的作用, 而且还具有抗血栓^[4]的作用, 甚至低浓度的牛磺罗定溶液还能抑制大脑和胃肠道的肿瘤细胞的生长^[5,6], 牛磺罗定具有广阔的应用前景。

但是, 因其结构中缺紫外或荧光吸收基团, 无法使用HPLC进行检测。测定牛磺罗定的含量多采用衍生化法。Ruediger Stendel等人^[7]以丹磺酰氯衍生化后采用HPLC-ESI-MS/MS检测, Woolfson AD等人^[8]以NBD-Cl衍生化后采用HPLC-FLD检测等, 但存在着所需的衍生化试剂价格昂贵, 且质谱和荧光检测器普及率低等不足之处, 本人以价格低廉的对甲基苯磺酰氯衍生化牛磺罗定, 采用

HPLC-UV检测, 成功测得牛磺罗定片剂中牛磺罗定的含量。现对其衍生化条件进行优化。

目前大多数优化采用的是正交试验方案, 主要是因为正交试验设计能够科学合理地安排试验, 可同时考虑几种因素, 寻找最佳因素水平组合, 但它不能在给出的整个组合区域上找到因素和响应值之间的一个明确的函数表达式即回归方程。从而无法找到整个区域内因素的最佳组合和响应值的最优值。

表面响应曲面法以回归方法作为函数估算工具, 将在多因子试验中, 用多项式近似地把因子与试验结果的相互关系函数化, 可以快速有效地确定多因子系统的最佳条件。

本文基于表面响应曲面法, 对牛磺罗定和对甲基苯磺酰氯衍生化条件进行考察, 优化出最佳工艺参数。

* 通讯作者 Tel: (010) 62799771; E-mail: 91chenxi12@163.com

1 仪器与试剂

P680 高效液相色谱仪、UVD170u 紫外检测器(美国戴安公司);XH-C 型漩涡混合器(金坛市医疗仪器厂);KQ5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BC-W205 恒温水浴锅(上海贝凯生物化工设备有限公司)。

牛磺罗定、对甲基苯磺酰氯(化学纯)(购于 ACROS ORGANICS 公司);乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯,色谱分析用水为超纯水。

牛磺罗定片剂(自制):牛磺罗定 25 g,交联聚乙烯吡咯烷酮 6 g,羧甲淀粉钠 1 g,微晶纤维素 9 g,乳糖 7.5 g,阿司巴坦 0.5 g,硬脂酸镁 1 g,制成 100 片,即每片含牛磺罗定 250 mg。

2 方法

2.1 对照品与衍生化试剂溶液的制备 取牛磺罗定 25 mg 精密称定,溶于乙腈,制成浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用;取对甲基苯磺酰氯 100 mg,精密称定,溶于乙腈,制成浓度为 $320 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的衍生化试剂溶液,逐级稀释,分别制成浓度为 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,备用。

2.2 样品溶液配制 取经研磨后的牛磺罗定片剂粉末 50 mg,精密称定,置于 25 mL 的量瓶中,加乙腈适量,超声(功率 4 kW, 200 W)提取 30 min,用乙腈定容至刻度,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 4°C 保存,备用。

2.3 衍生化处理 用微量移液器分别移取对照品溶液或样品溶液与衍生化试剂溶液各 500 μL ,置于 10 mL 量瓶中,振荡 30 s,封口,放置水浴锅中反应。待反应完,取出冷却至室温,用乙腈稀释至刻度,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜,备用。

2.4 色谱条件 Agela Venusil C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$);流动相为乙腈-水 (30:70);流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 240 nm;柱温 30°C ;进样量 10 μL 。

2.5 方法学考察 取对照品溶液与 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的衍生化试剂溶液(比例 1:1)反应,自动进样 2, 4, 8, 16, 20 μL 进行液相色谱检测,以进样体积对峰面积进行线性回归,得峰面积在 10.21 ~ 103.01 Amu 之间的 ($r = 0.9995$) 线性关系良好;取上述衍生化后的溶液连续进样 6 针,得峰面积并计算出精密度 RSD 为 0.32% 表明仪器精密度良好;日内每隔 2 h 重复进样上述衍生化后溶液共 6 针,得峰面积并计算 RSD 为 1.2% 表明衍生化后产物在 12 h 内稳定性良好。

取对照品溶液,均分为 6 份,加入 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的衍生化试剂溶液(比例 1:1)反应,进样检测,得峰面

积并计算出 RSD 为 0.53% ,表明该实验重复性良好。平行取 6 份已知含量的样品溶液,加入相同量的牛磺罗定(以对照品溶液的体积换算),衍生化后进样检测,得回收率为 98.1% ~ 101.5% ,RSD 为 3.3% 表明此方法可行。

2.6 实验设计

2.6.1 单因素实验设计 主要考察不同的反应温度、反应时间和衍生化试剂浓度等因素对衍生化产物量的影响。

2.6.2 表面响应曲面法实验设计 根据单因素实验的结果,选择有显著影响因素的不同水平,实验设计以及数据分析采用 Statease 公司生产的软件 Design-Expert (version 6.0.10)。实验因素编码见表 1。

表 1 实验因素水平编码

Tab 1 Code of experiment factors and levels

因素 (independent variables)	水平(-1) (negative level)	水平(+1) (positive level)
反应温度 (reaction temperature) / $^\circ\text{C}$	80	100
衍生化试剂浓度 (derivatization reagent concentrations) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	5	20
反应时间 (reaction time) / min	30	90

3 结果

3.1 单因素影响实验

3.1.1 反应温度对衍生化产物量的影响 固定反应时间为 30 min 和衍生化试剂浓度为 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 温度设定在 $30 \sim 100^\circ\text{C}$ 之间研究温度对衍生化产物量的影响(以峰面积表示)。结果如图 1 所示,随着温度的升高,衍生化产物的量明显增加,但由于受水浴条件所限,所以最高温度仅考察到 100°C 。

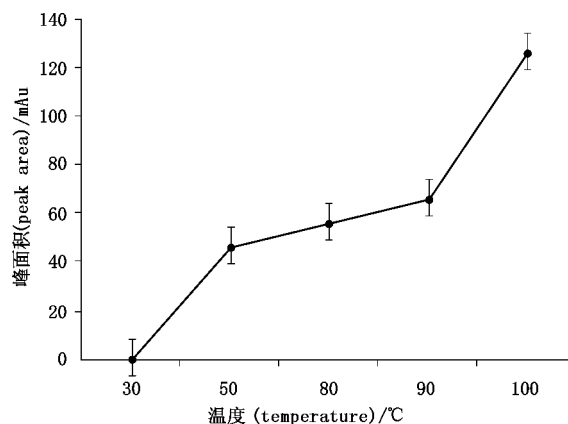


图 1 反应温度对衍生化产物量的影响

Fig 1 Effect of reaction temperature on the derivative products

3.1.2 反应时间对衍生化产物量的影响 固定反应温度为 80 ℃ 和衍生化试剂浓度为 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 时间设定在 5 ~ 210 min 之间考察反应时间对衍生化产物量的影响(以峰面积表示)。结果如图 2 所示, 随着反应时间的延长, 衍生化产物的量明显增加, 但当 60 min 以上时, 衍生化产物虽有增大, 却并不显著。

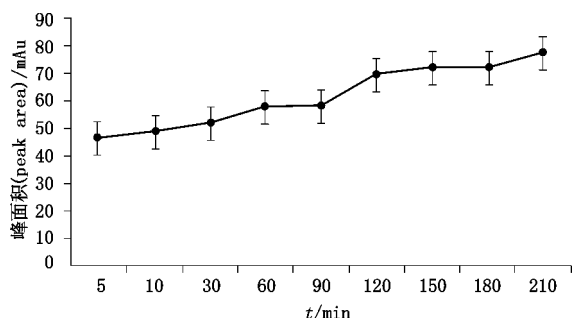


图 2 反应时间对衍生化产物量的影响
Fig 2 Effect of reaction time on the derivative products

3.1.3 衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响 固定反应温度为 80 ℃ 和反应时间为 30 min, 衍生化试剂浓度设定在 5 ~ $320 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间研究衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响(以峰面积表示)。如图 3 所示, 随着反应时间的延长, 衍生化产

物的量明显增加, 当衍生化试剂的浓度达到 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其衍生化产物的量比 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著增大, 但当浓度大于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 衍生化产物虽有增大, 却不显著。

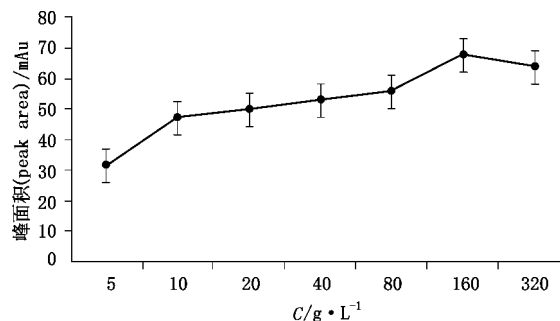


图 3 衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响
Fig 3 Effect of derivatization reagent concentrations on the derivative products

根据单因素实验的结果, 并结合实验效率及成本考虑, 本文考察温度 80 ~ 100 ℃, 时间 30 ~ 90 min, 衍生化试剂浓度 5 ~ $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 表面响应曲面法实验

3.2.1 响应值结果

以 Box - Benhnken 为中心组合的实验设计, 结果见表 2, 表 3(A 为温度; B 为浓度; C 为时间)。

表 2 实验设计与结果
Tab 2 Designs and results of experiment

序号 (NO.)	水平(level)			衍生化产物的峰面积 / $\text{mAu} \cdot \text{min}^{-1}$ (peak area of derivative products)	
	温度 (temperature) / $^{\circ}\text{C}$	浓度 (concentration) / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	时间 (time) / min	预测值 (expected)	实测值 (observed)
1	90	12.5	60	42.53	42.55
2	80	12.5	90	37.48	37.02
3	90	12.5	60	42.53	43.38
4	80	5	60	25.32	25.97
5	90	12.5	60	42.53	41.32
6	100	12.5	90	52.02	54.29
7	80	20	60	45.01	47.08
8	100	12.5	30	37.48	37.58
9	100	20	60	59.17	58.51
10	90	12.5	60	42.53	43.25
11	90	12.5	60	42.53	42.13
12	90	20	30	45.08	45.26
13	90	5	90	36.66	36.47
14	90	5	30	21.05	22.67
15	100	5	60	36.24	34.15
16	80	12.5	30	26.28	24.30
17	90	20	90	55.25	53.62

表3 回归方程系数显著性检验

Tab 3 Significance of regression equation coefficient test

模型中的系数项 (model term)	系数估计 (coefficient estimates)	自由度 (df)	P
常数项(constant term)	42.53	1	< 0.0001
A	6.27	1	< 0.0001
B	10.65	1	< 0.0001
C	6.45	1	< 0.0001
AB	0.81	1	0.4467
AC	1.00	1	0.3552
BC	-1.36	1	0.2202
A ²	-1.15	1	0.2801
B ²	0.055	1	0.9569
C ²	-3.07	1	0.0168

注(notes): $R^2 = 0.9827$; Adj $R^2 = 0.9604$

利用 Design - Expert 软件对表2 数据进行回归分析,得二次多元回归模型: $y = 42.53 + 6.27 * A + 10.65 * B + 6.45 * C + 0.81 * A * B + 11.00 * A * C - 11.36 * B * C - 11.15 * A^2 + 0.055 * B^2 - 3.07 * C^2$ ($R^2 = 0.9827$, y 为峰面积) 表明预测值与实测值拟合较好。由表3 可知,一次项 A、B 和 C 都比较显著;交互项都不显著;二次项中除了 C^2 显著外,其余均不显著。

3.2.2 响应曲面 从图4~6 可以看出,反应温度和衍生化试剂的浓度对衍生化产物量的影响最大,随着温度和衍生化试剂浓度的增加,衍生化产物的量也增大,说明他们之间呈正相关的关系;反应时间对衍生化产物的量也有较大的影响。

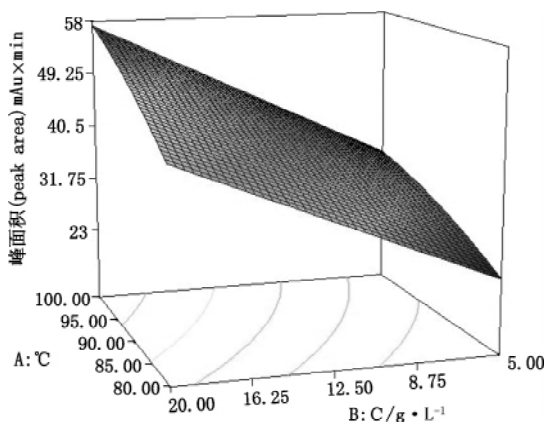


图4 反应温度和衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响的响应面
Fig 4 Response surface of the effects of temperature and concentrations of derivatization reagent on the derivative products

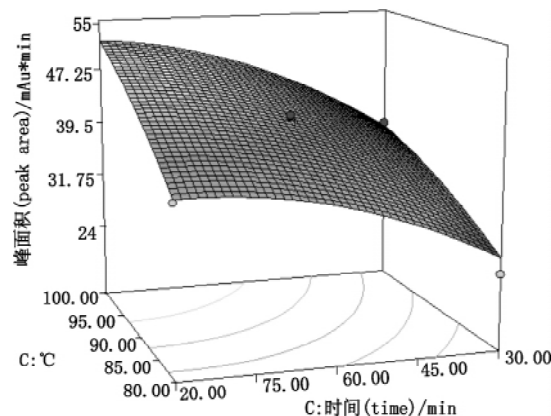


图5 反应时间和反应温度对衍生化产物量的影响的响应面

Fig 5 Response surface of the effects of temperature and time on the derivative products

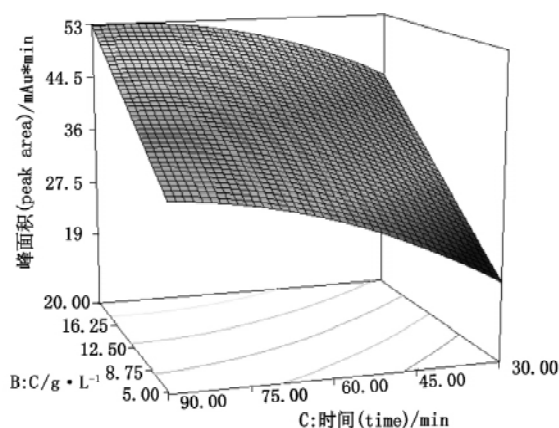


图6 反应时间和衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响的响应面

Fig 6 Response surface of the effects of time and concentrations of derivatization reagent on the derivative products

3.2.3 验证实验 利用该软件计算得到的最佳衍生化条件为反应温度 100 °C, 衍生化试剂浓度为 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应时间为 88 min, 衍生化产物的峰面积为 62.185 $\text{mAu} \times \text{min}^{-1}$, 以此条件重复实验 3 次, 得衍生化产物的平均峰面积为 62.05 $\text{mAu} \times \text{min}^{-1}$, 证明该条件下的衍生化产物的量均超过前面任一条件, 且与软件拟合出来的数值相关系数较好, 此软件可用于牛磺罗定衍生化条件的优化。

4 讨论

近年来, 随着抗生素的滥用, 几乎所有的常规抗生素都出现了相应的抗药性致病株系, 致病菌的耐药性问题将日益严重地威胁着人们的健康。与抗生素相比, 人们已经证实不管在体外还是临床, 牛磺罗定都没有诱使任何微生物耐药性的发生, 即细菌对牛磺罗定不产生耐药性, 牛磺罗定有望成为抗生素的替代品。

目前对牛磺罗定含量测定的研究主要集中在对

衍生化条件进行单因子考察,这种方法是在假设因素间不存在交互作用的前提下进行的。但是由于考察的因素间经常存在交互作用,使得该方法并非总能获得最佳的优化条件。本文首次将表面响应曲面法用于牛磺罗定衍生化条件的优化,获得良好的结果。经优化后的衍生化条件可明显提高牛磺罗定的最低检测限,弥补了 UV 检测牛磺罗定灵敏度低的缺点,使牛磺罗定的含量用 UV 检测成为现实。

参考文献

- 1 McCartney AC ,Browne MK. Clinical studies on administration of taurolidine in severe sepsis: a preliminary study. *Prog Clin Biol Res* , 1988 272: 361
- 2 Bieselt R. Surgical therapy of pleural empyema with tauroline [in German]. *Langenbecks Arch Chir* ,1997 382(4 Suppl. 1) : S42
- 3 Leaper DJ. Prevention of peritoneal adhesions after thermal injury using noxythiolin and taurolin. In: Bruckner WL ,Pfmann RW ,editors. A new concept in antimicrobial chem - otherapy for surgical infection. Baltimore: Urban Schwarzenberg ,1985. 115
- 4 Kaptanoglu L ,Kucuk H F ,Colak E *et al.* The effect of taurolidine on experimental thrombus formation. *Eur J Pharmacol* 2008 578(2 - 3) : 238
- 5 Calabresi P ,Goulette FA ,Darnowski JW. Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel anti - neoplastic agent. *Cancer Res* , 2001 61(18) : 6816
- 6 Stendel R ,Stoltenburg - Didinger G ,Brock M. The aminosulphonic acid derivative taurolidine induces apoptotic changes in brain tumour cells. *12th World Congress Neurosurgery* 2001 Sydney ,128
- 7 Stendel R ,Scheurer L ,Schlatterer K ,*et al.* Pharmacokinetics of taurolidine following repeated intravenous infusions measured by HPLC - ESI - MS/MS of the derivatives taurultame and taurinamide in glioblastoma patients. *Clin Pharmacokinet* 2007 46(6) : 513
- 8 Woolfson AD ,Gorman SP ,McCafferty DF *et al.* Assay procedures for taurolidine solutions using precolumn derivatizations and high - performance liquid chromatography with uorescence detection. *Int J Pharm* ,1989(49) : 135

(本文于 2010 年 4 月 4 日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E - mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑 - 送审 - 专家已审 - 待编辑处理稿件 - 退修 - 编辑加工完成 - 已刊出等。

20080580 号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后,登录此系统。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,并可在在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010 - 69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部