

应用质量源于设计的理念优化大鼠血浆中大黄蒽醌的分析方法

沈 熊¹, 陆继伟², 梁 健¹, 杨春欣¹, 吕迁洲^{1*}

(1. 复旦大学附属中山医院药剂科, 上海 200032; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 应用质量源于设计理念建立一种高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)用于测定大鼠血浆中5种大黄蒽醌。用 Plackett-Burman 设计考察流动相中甲醇含量、pH 值、流速、柱温和进样体积对色谱峰的分离度、理论塔板数、最末洗脱峰的保留时间和拖尾因子的影响。结果显示流动相中甲醇含量、流速和柱温对色谱系统的影响显著($p < 0.05$)。继而采用 Box-Behnken 设计结合响应面法考察上述三因素对分离度、保留时间和理论塔板数的影响。用 Derringer 渴求函数评价了响应值的综合作用。得出最优色谱条件为: 以甲醇-0.1% (v/v) 磷酸水溶液(81.4:18.6, v/v)为流动相等度洗脱, 流速 1.1 mL/min, 柱温 31 °C, 荧光检测激发波长为 440 nm, 发射波长为 540 nm。建立的模型显示良好的预测性。结果表明: 质量源于设计的理念可有效地应用于优化高效液相色谱分析方法。

关键词: 质量源于设计; Plackett-Burman 设计; Box-Behnken 设计; 响应面法; 高效液相色谱法; 荧光检测; 大黄蒽醌; 血浆

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)06-0561-06

Application of quality by design concept for the optimization of an analytical method for rhubarb anthraquinones in rat plasma

SHEN Xiong¹, LU Jiwei², LIANG Jian¹, YANG Chunxin¹, LÜ Qianzhou^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: A robust high performance liquid chromatography with fluorescence detection method (HPLC-FLD) was developed for the determination of five rhubarb anthraquinones in rat plasma using a quality by design approach. A Plackett-Burman design was utilized to screen the effects of methanol content, the pH value of mobile phase, the flow rate, column temperature, and injection volume on peak resolution, number of the theoretical plate, retention time of the last eluted peak, and tailing factor. The results showed that the methanol content in mobile phase, flow rate, and column temperature were statistically significant ($p < 0.05$). A Box-Behnken experimental design with response surface methodology (RSM) was then utilized to evaluate the effects of these three factors on the selected responses. Derringer's desirability function was used for the evaluation of the chromatographic goals. The optimum conditions for separation were as follows: an isocratic mobile phase consisting of methanol/0.1% H₃PO₄ (81.4/18.6, v/v), a flow rate of 1.1 mL/min, and a column temperature of 31 °C. The excitation and emission wavelengths were 440 nm and 540 nm, respectively. The proposed method showed good prediction ability. The results clearly showed that quality by design concept could be effectively applied to optimize the HPLC method.

Key words: quality by design; Plackett-Burman design; Box-Behnken design; response surface methodology; high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detection (FLD); rhubarb anthraquinones; plasma

* 通讯联系人. Tel: (021) 64041990, E-mail: lv.qianzhou@zs-hospital.sh.cn.

基金项目: 复旦大学附属中山医院学科扶持基金项目(中山2012).

收稿日期: 2012-12-05

蒽醌类化合物为大黄主要有效成分^[1],对其药代动力学的研究已有报道,其中血药浓度测定多采用高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[2]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[3]或超高效液相色谱法(UPLC)^[4]等;用高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)测定大黄药材中蒽醌的方法已有文献报道^[5],但用于测定血浆中大黄活性成分尚未见报道。HPLC-FLD具有比HPLC-UV灵敏度高、同时又比HPLC-MS/MS成本低的优点。

质量源于设计(quality by design, QbD)是由美国食品和药品管理局(FDA)引入的概念,药品设计决定最终质量的理念已逐渐为业界所接受^[6],并形成了与之对应的设计模式。其主要目的为:建立设计空间(即各种影响质量的关键因素及参数的范围组合和交互作用),并借此拓展出灵活的管理办法。QbD理念最初主要用于药品制备的工艺设计,近年来,建立设计空间的概念已逐渐应用于色谱分析等领域^[7-9]。鉴于此,本研究尝试采用QbD理念,用Plackett-Burman设计筛选影响色谱分离的主要因素,进而选用Box-Behnken设计-响应面法优化测定大鼠血浆中5种大黄蒽醌的HPLC-FLD方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与动物

Waters 高效液相色谱仪(1525 泵, 2707 自动进样器, 1500 柱温箱, 2475 荧光检测器, Breeze2 色谱工作站)。对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚均购自中国食品药品检定研究院, 甲醇为色谱纯, 实验用水为超纯水, 其余试剂为分析纯。大黄蒽醌提取物为自制。

清洁级 SD 大鼠, 体重 180 ~ 200 g, 由复旦大学实验动物科学部提供, 合格证号: SCXK(沪) 2009-0019, 实验前适应 1 周, 大黄蒽醌提取物适量口服灌胃给药。

1.2 色谱条件

根据文献^[1, 5], 采用 Luna C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国菲罗门公司), 流动相由 0.1% (v/v) 磷酸水溶液和甲醇组成, 等度洗脱, 荧光检测激发波长为 440 nm, 发射波长为 540 nm; 根据实验设计, 磷酸溶液 pH 值为 1.78 ~ 2.66, 甲醇在流动相中的体积分数为 78% ~ 84%, 流速 0.8 ~ 1.2 mL/min, 柱温 25 ~ 35 °C, 进样体积 10 ~ 30 μL。

1.3 溶液的配制和血浆样品的预处理

混合对照品溶液: 分别精密称取 5 种大黄蒽醌对照品适量至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释

至刻度, 置 4 °C 冰箱中保存, 作为贮备液。临用前分别吸取各贮备液适量置于同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即为大黄蒽醌衍生物的混合对照品溶液。

混合对照品血浆溶液: 向大鼠血浆样品(200 μL)中精密加入混合对照品溶液适量, 漩涡混匀, 即得。

血浆样品的预处理: 根据文献^[3], 以 3 倍体积的甲醇沉淀血浆蛋白, 漩涡混匀, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至 1.5 mL PE 管(聚乙烯管)中, 在恒温水浴(40 °C)氮气吹干。残渣加入 50 μL 流动相, 超声溶解, 以 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清液作为供试品溶液。

1.4 Plackett-Burman 实验设计

在预实验基础上, 考察 5 个色谱因素对 4 个色谱响应值的影响。5 个因素包括流动相中甲醇的体积分数、流速、柱温、磷酸溶液 pH 值、进样体积, 4 个响应值为最先洗脱色谱峰(芦荟大黄素)和相邻杂质间的分离度(R_1)和理论塔板数(n_1)、最末洗脱峰(大黄素甲醚)的保留时间(t_{R5})以及大黄酸的拖尾因子(T_2)。各因素及水平如表 1 所示。

表 1 Plackett-Burman 实验设计的色谱因素、水平及响应值
Table 1 Chromatographic factors and response variables for Plackett-Burman experimental design

Chromatographic factor	Levels	
	Low	High
Volume ratio of methanol/%	78	84
Flow rate/(mL/min)	0.8	1.2
Column temperature/ °C	25	35
pH	1.78	2.66
Injection volume/μL	10	30

1.5 Box-Behnken 设计-响应面法优化 HPLC 条件

保持以下色谱条件不变: 进样体积 20 μL, 激发波长 440 nm, 发射波长 540 nm, 0.1% (v/v) 磷酸 pH 值为 2.20。选取流动相中甲醇含量、流速和柱温, 分别记为 A、B、C, 进行 Box-Behnken 实验, 考察 A、B、C 三因素对响应值 R_1 、 n_1 和 t_{R5} 的影响。各因素取 3 水平, 分别记为 -, 0, +, 设计参数见表 2。

2 结果和讨论

2.1 实验设计方法的选择

系统适用性是验证一个 HPLC 系统正常运行、结果可靠的重要标准^[10]。此外, 溶剂用量、分析时间以及色谱柱使用寿命等也是分析工作者关注的事项^[11]。分析工作者须对此作出综合评价和取舍。色谱柱类型、流动相组成等因素及其交互作用决定

表2 Box-Behnken 优化实验设计的参数
Table 2 Optimization parameters for Box-Behnken experimental design

Run	Pattern (ABC)	A/%	B/(mL/min)	C/°C
1	--0	78	0.8	30
2	0-+	81	0.8	35
3	000	81	1	30
4	-0+	78	1	35
5	+0+	84	1	35
6	0--	81	0.8	25
7	-+0	78	1.2	30
8	0+-	81	1.2	25
9	-0-	78	1	25
10	+ +0	84	1.2	30
11	000	81	1	30
12	+ -0	84	0.8	30
13	+ 0-	84	1	25
14	000	81	1	30
15	0++	81	1.2	35

A: volume ratio of methanol; B: flow rate; C: column temperature.

了这些指标的优劣。系统适用性等硬性指标必须符合要求,而溶剂消耗等指标又可以根据个人习惯灵活掌握,这充分符合 QbD 理念。

传统的建立高效液相色谱分析的方法多采用单因素法^[12,13],其缺点是试验次数多,且不能考察因素之间的交互作用。肖文军等^[14]采用正交设计确定 HPLC 方法,该方法可以考察因素间的相互作用,但正交设计是建立在因素和响应值呈线性关系的基础上,当二者呈非线性关系时,预测性会受到影响。

响应面法(response surface methodology, RSM)是近年来常用的集数学和统计学方法于一体的优化方法,该方法常结合实验设计来测定最优值^[15]。最常用的实验设计为中心组合设计(central composite design, CCD)^[8]和 Box-Behnken 设计(BBD)^[9],这些方法不仅可以考察因素间的交互作用,而且适合探索二次方程的响应面及二次多项式模型。其中 BBD 实验次数较少,因此更为简便。同时,由于影响色谱系统的因素较多,因此有必要在响应面分析之前筛选出具有显著效应的因素。Plackett-Burman 设计(PBD)被广泛地用于因素-主效应的估计,PBD 可以利用最少的实验次数,快速而有效地筛选出对结果影响显著的因素^[9]。因此,本研究采用 PBD 筛选主要因素,并联用 BBD 优化 HPLC 方法。

2.2 预实验、考察因素及响应值的选择

本研究中流动相的磷酸溶液 pH 值在 1.78 ~ 2.66 之间,普通 HPLC 色谱柱的 pH 适用范围在 2 ~ 8 之间,因此考察了可在 pH 2 以下使用的几种色谱柱,结合分离度、保留时间等指标,最终选用 Luna

C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国菲罗门公司, pH 稳定性 1.5 ~ 10)。

本研究涉及各条件下 5 种大黄蒽醌的出峰顺序依次为:芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚,依次记为 1 ~ 5,结构式见图 1。随着流动相中甲醇体积分数的增大,化合物 3 的保留时间会迅速减小;当甲醇体积分数升高到 85% 时,化合物 2 和 3 的色谱峰出现部分重叠,其原因可能是由于化合物 3 含有 3 个羟基,当甲醇体积分数提高时,其与甲醇形成氢键的可能性也提高,从而加快了洗脱速率。以化合物 3 和 2 的分离度 $R_3 > 1.5$ 为标准,确定甲醇体积分数的最高水平为 84%;又以化合物 5 的出峰时间 < 30 min 为标准,确定甲醇体积分数的最低水平为 78%。

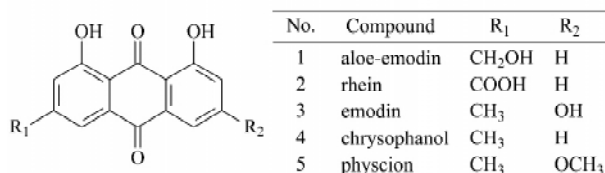


图1 5种测定物质的结构式
Fig. 1 Chemical structures of the five investigated compounds

根据文献^[1],确定流动相中磷酸溶液的体积分数为 0.1%,测得 pH 约为 2.20,因此分别取 pH 1.78 和 2.66 作为实验设计的“低”和“高”水平。

色谱系统的适用性试验通常包括理论塔板数、分离度、拖尾因子和重复性等 4 个参数^[16],本研究选取前三者作为响应值。此外,分析时间也是分析工作者经常考虑的因素,缩短分析时间,可以节约溶剂和提高工作效率,因此选取最末洗脱峰的保留时间 t_{R5} 作为第 4 个考察指标。

对于同时测定多个组分的色谱分析而言,考察每个组分对应的各响应值不仅工作量大,而且也没有必要。参考“木桶理论(Cannikin Law)^[17]”并结合预实验,本研究选取每一类指标中“最弱”的一项进行考察,当该项指标符合要求时,则同类指标均能符合标准。本研究中,化合物 1 的理论塔板数 n_1 最低,因此选取 n_1 以考察理论塔板数;大鼠血浆中的极性成分会影响最先洗脱的化合物 1 的分离,而其他相邻组分在本文所述条件下分离度均大于 1.5,因此选取化合物 1 和相邻杂质的分离度 R_1 考察分离度;同理选取化合物 2 考察拖尾因子(T_2)。

2.3 Plackett-Burman 实验设计

结果显示,具有显著意义($p < 0.05$)的色谱因素包括流动相中甲醇体积分数、流速和柱温。各因

素对拖尾因子 T_2 均无显著性影响 ($p > 0.05$) ,因此在接下来的实验中不再考察拖尾因子; 流动相中甲醇体积分数对其他 3 个响应值的影响最为显著。

2.4 Box-Behnken 实验设计

选择 R_1 、 n_1 及 t_{R5} 为响应值 ,对 A、B 和 C 3 个因素进行优化 ,建立因素和响应值关系的二次方程: $Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2$,其中 Y 为响应值 β_i 代表不同的

回归系数。应用统计分析软件 Design Expert 7.0 对数据进行多元回归和方差分析 结果如表 3 所示 ,可见因素 A 对 R_1 、 n_1 和 t_{R5} 均具有显著影响; 因素 B 对 t_{R5} 、因素 C 对 R_1 也有显著影响。为简化方程求解 ,在保证拟合度的前提下 ,进行了相应的方程简化 ,在 $p < 0.1$ 水平上拒绝无显著相关的项目后 ,诸响应值与实验因素的拟合方程列于表 4。

表 3 Box-Behnken 设计的方差分析结果
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) results for Box-Behnken design

Factor	R_1		n_1		t_{R5}	
	F	p	F	p	F	p
A	659.74	<0.0001*	15.75	0.0016*	77.14	<0.0001*
B	0.91	0.3850	1.10	0.3429	40.64	<0.0001*
C	39.73	0.0015*	3.79	0.1091	2.52	0.1408
AB	0.004	0.9511	0.075	0.7950		
AC	3.05	0.1414	0.74	0.4302		
BC	2.64	0.1649	0.23	0.6518		
A^2	13.05	0.0153*	17.87	0.0083*		
B^2	0.24	0.6467	4.88	0.0783		
C^2	0.75	0.4272	6.94	0.0463*		

* p -value is less than a priori value of 0.05 and is statistically significant.

表 4 Box-Behnken 设计的响应模型和统计参数
Table 4 Response models and statistical parameters obtained from ANOVA for Box-Behnken design

Response	Regression model	Model p -value	R_{adj}^2
R_1	$-56.31 + 1.48A + 1.06B + 0.24C - 0.003AC - 0.04BC - 0.01A^2$	<0.0001	0.9857
n_1	$-369069 + 8912.72A + 12663.63B + 780.73C - 55.67A^2 - 6542.66B^2 - 12.49C^2$	0.0021	0.8002
t_{R5}	$139.97 - 1.34A - 14.56B$	<0.0001	0.8799

建立响应面和等高线图(图 2)以直观分析各因素及其相互作用对响应值的影响。等高线图中曲线的弯曲程度反映模型的非线性程度。结果显示,当柱温恒定时,流动相中甲醇体积分数增大, R_1 呈近似线性的下降,而流速对 R_1 影响不明显; t_{R5} 随甲醇体积分数和流速的增大呈线性下降;结合表 4,各因素对 n_1 的影响呈二次多项式模式,而因素间的交互作用对其影响不显著($p > 0.05$)。

用 Derringer 渴求函数(desirability function) 评价各响应值的综合作用,其公式如下:

$$D = [d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times \dots \times d_n^{p_n}]^{1/n}$$

其中 p_i 为响应值的权重,本文权重取 1, n 为响应值的数目, d_i 为单个响应值的渴求函数。 D 值在 0 ~ 1 之间; D 值越接近 1 则说明所确定的最优条件越接近全局最优条件。本研究设响应值目标为: n_1

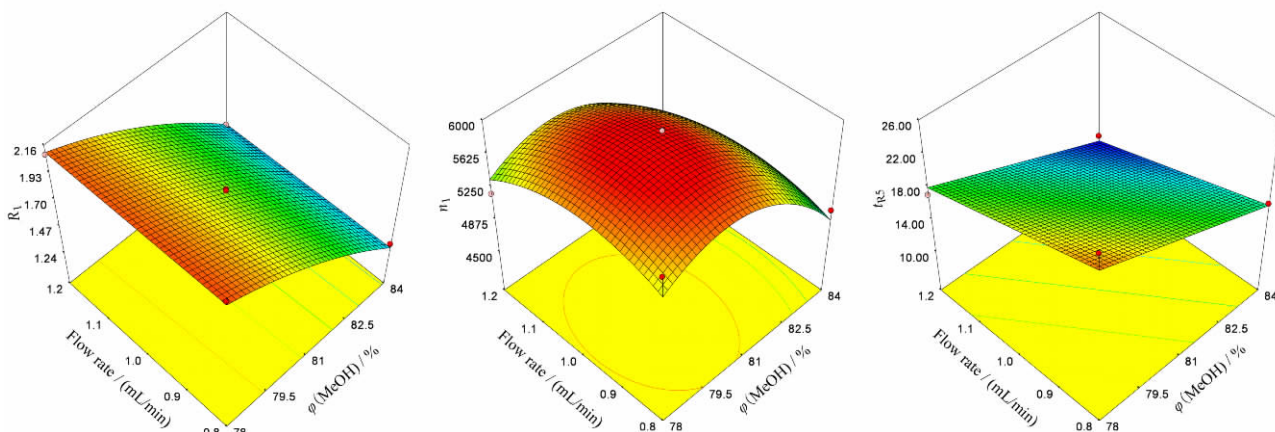


图 2 各考察因素对响应值影响的响应面(3D)和等高线图

Fig. 2 Response surfaces (3D) and contour plots showing the effects of examined factors on responses

>3000 , $R_1 > 1.5$, t_{RS} 取最小值,利用 Design-Expert 7.0 软件整合渴求函数计算的功能,得最大化总体渴求值(D)为 0.81,相对文献^[1]提高了 19.1%。因素的最佳水平组合为:流动相中甲醇体积分数为 81.4%,等度洗脱,流速为 1.1 mL/min,柱温为 31 °C。取供试品溶液按照最优条件重复进样 6 次,考察实测值与预测值的偏差,结果显示偏差不超过 5%,表明模型具有良好的预测性。

2.5 验证性实验

在优化的色谱条件下,考察了方法的系统适用

性。各色谱峰均能得到有效分离,见图 3。大鼠经大黄提取物给药后,血浆中能测到化合物 1~4,其中化合物 2 浓度最高,而化合物 5 的浓度低于检出限(LOD),与文献^[3]报道一致。首先出峰的化合物 1 与杂质峰的分离度不小于 1.5;理论塔板数按化合物 1 计不低于 3000。同一供试品溶液重复进样 6 次,5 种化合物峰面积的日内精密度(RSD)不超过 2.1%。制备各被测物质的标准曲线,其线性方程、相关系数(r)、LOD($S/N=3$)及线性范围见表 5。

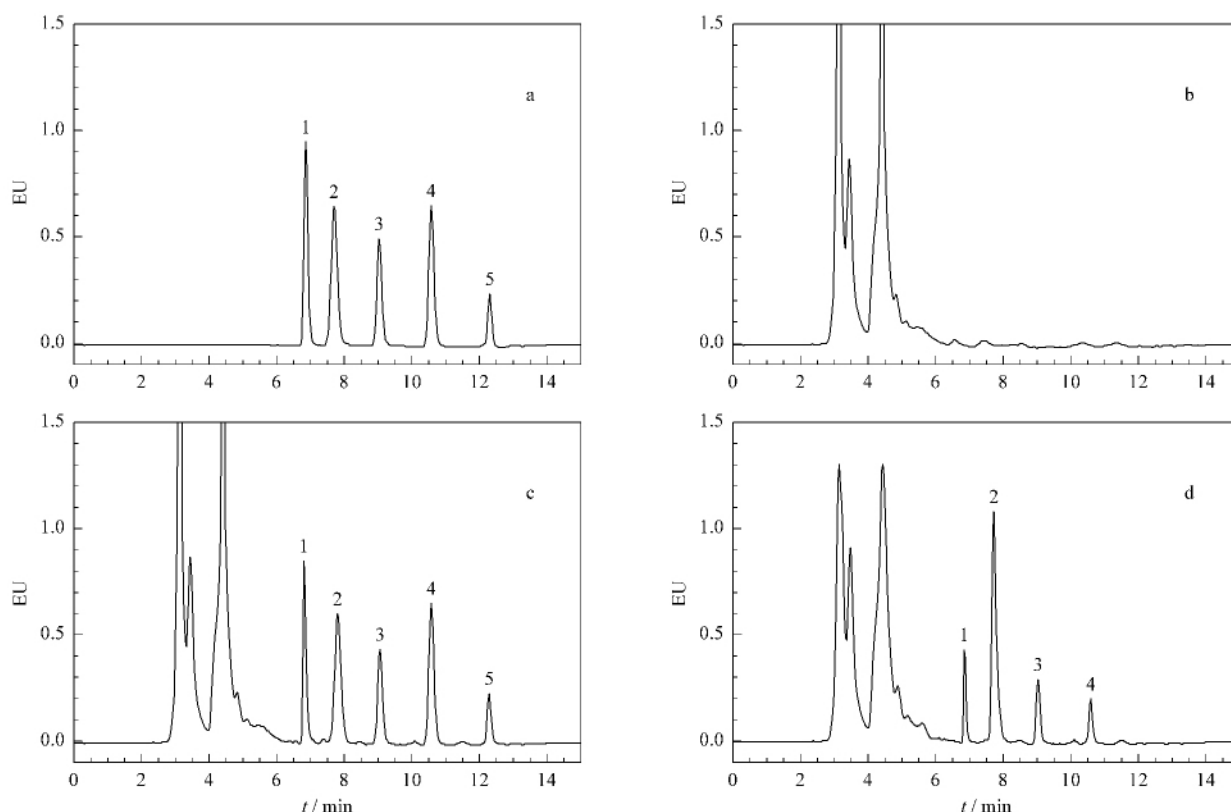


图 3 (a) 5 种大黄蒽醌混合对照品溶液、(b) 大鼠空白血浆溶液、(c) 大鼠空白血浆加对照品溶液及 (d) 大鼠经大黄提取物给药后血浆溶液的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) the mixed standards, (b) a blank plasma, (c) a plasma sample spiked with the mixed standards, and (d) a plasma sample after administration of rhubarb extract

1. aloemodin; 2. rhein; 3. emodin; 4. chrysophanol; 5. physcion.

表 5 血浆样品中 5 种测定物质的标准曲线、相关系数、线性范围及检出限($n=5$)
Table 5 Linear equations, correlation coefficients (r), linear ranges, and limits of detection (LODs) of the five analytes in plasma sample ($n=5$)

Analyte	Linear equation	r	Linear range/(mg/L)	LOD/($\mu\text{g/L}$)
Aloe-emodin	$Y=0.3958X+0.1065$	0.9990	0.11-21.00	5.00
Rhein	$Y=0.4015X+0.0512$	0.9992	0.08-15.00	4.50
Emodin	$Y=0.3769X+0.1805$	0.9991	0.08-16.00	10.00
Chrysophanol	$Y=0.4530X-0.0059$	0.9985	0.15-30.00	10.00
Physcion	$Y=0.3203X+0.2106$	0.9990	0.10-20.00	5.00

Y: peak area; X: mass concentration, mg/L.

3 结论

应用质量源于设计原理,采用实验设计的方法,

建立并优化高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠血浆中大黄蒽醌的方法。该方法准确可靠,通过实验设计建立的模型具有良好的预测性,表明质量源于

设计理念和实验设计的方法可有效地应用于优化高效液相色谱分析方法。

参考文献:

- [1] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: 22
- [2] Wang P, Miao S Y, Meng X L, et al. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica (王平, 缪舒益, 孟宪丽, 等. 中药药理与临床), 2009, 25(5): 47
- [3] Song R, Xu L, Xu F, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(45): 7144
- [4] Li J, Li H L, Xu S. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (李佳, 李红磊, 许珊. 中国实验方剂学杂志), 2011, 17(10): 94
- [5] He D X, Chen B, Tian Q Q, et al. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49: 1123
- [6] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Harmonised Tripartite Guideline, Q8, Pharmaceutical Development, Current Step 4 Version. (2009-08). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf
- [7] Monks K E, Rieger H J, Molnár I. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56: 874
- [8] Hadjmohammadi M, Sharifi V. J Chromatogr B, 2012, 880: 34
- [9] Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Faustino P J, et al. J Pharm Biomed Anal, 2012, 62: 61
- [10] Sun G X, Wu B, Bi K S. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 吴波, 毕开顺. 色谱), 2010, 28(9): 877
- [11] Lu J, Pang Y J, Li Y B, et al. Chinese Journal of Chromatography (陆军, 庞燕军, 李彦博, 等. 色谱), 2012, 30(6): 641
- [12] Tang X F, Zhen Q N, Fan Z M, et al. Chinese Journal of Chromatography (唐秀芳, 甄乾娜, 樊子勉, 等. 色谱), 2012, 30(6): 613
- [13] Zhang X X, Xiao Z Y, Zhang H Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (张晓旭, 肖志勇, 张红艳, 等. 色谱), 2012, 30(8): 792
- [14] Xiao W J, Li Q, Xiong X Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (肖文军, 李勤, 熊兴耀, 等. 分析化学), 2011, 39(9): 1459
- [15] Hibbert D B. J Chromatogr B, 2012, 910: 2
- [16] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1. Beijing: China Medical Science Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: Appendix VI D, Appendix 36
- [17] Tao R. Chongqing Medicine (陶蓉. 重庆医学), 2011, 40(26): 2699