

基于 QbD 理念的三七总皂苷定量分析方法持续改进研究

戴胜云¹, 徐冰^{1,2*}, 史新元^{1,2}, 徐翔³, 孙英强³, 乔延江^{1,2*}

- (1. 北京中医药大学 中药信息工程研究中心, 北京 100029;
2. 北京市科委 中药生产过程控制与质量评价北京市重点实验室, 北京 100029;
3. 山东步长制药股份有限公司, 山东 菏泽 274000)

[摘要] 该文提出基于质量源于设计(QbD)的中药分析方法持续改进策略。以三七总皂苷(PNS)5种皂苷类成分的超高效液相色谱(UPLC)定量分析方法开发为例,完成分析方法从HPLC到UPLC的转换。在UPLC开发中,采用Plackett-Burman设计和Box-Behnken设计理解关键方法参数(CMP)与关键方法属性(CMA)之间的关系,建立贝叶斯概率设计空间;优选稳健色谱条件为初始乙腈20%,等度时间10 min,梯度变化速率 $6\% \cdot \text{min}^{-1}$,分析时间17 min,采用Accuracy profile进行方法学验证。在相同的分析目标(ATP)下,从色谱条件、CMP辨识结果、CMP-CMA关系模型、系统适用性等方面对PNS的HPLC和UPLC定量分析性能的一致性进行比较,结果表明UPLC可缩短分析时间、提高关键峰对分离度、色谱系统适用性满足要求,UPLC可替代HPLC进行PNS定量分析。

[关键词] 质量源于设计; UPLC; 持续改进; 贝叶斯设计空间; 三七总皂苷

Continual improvement of quantitative analytical method development of *Panax notogineng* saponins based on quality by design

DAI Sheng-yun¹, XU Bing^{1,2*}, SHI Xin-yuan^{1,2}, XU Xiang³, SUN Ying-qiang³, QIAO Yan-jiang^{1,2*}

- (1. *Research Center of Traditional Chinese Medicine Information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;*
- Beijing Key Laboratory for Production Process Control and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing Municipal Sciences & Technology Commission, Beijing 100029, China;*
- Shandong Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Heze 274000, China)*

[Abstract] This study is aimed to propose a continual improvement strategy based on quality by design (QbD). An ultra high performance liquid chromatography (UPLC) method was developed to accomplish the method transformation from HPLC to UPLC of *Panax notogineng* saponins (PNS) and achieve the continual improvement of PNS based on QbD, for example. Plackett-Burman screening design and Box-Behnken optimization design were employed to further understand the relationship between the critical method parameters (CMPs) and critical method attributes (CMAs). And then the Bayesian design space was built. The separation degree of the critical peaks (ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re) was over 2.0 and the analysis time was less than 17 min by a method chosen from the design space with 20% of the initial concentration of the acetonitrile, 10 min of the isocratic time and $6\% \cdot \text{min}^{-1}$ of the gradient slope. At last, the optimum method was validated by accuracy profile. Based on the same analytical target profile (ATP), the comparison of HPLC and UPLC including chromatograph method, CMA identification, CMP-CMA model and system suitability test (SST) indicated

[收稿日期] 2017-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403112); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-45)

[通信作者] *徐冰,副教授, Tel: (010)84738650, E-mail: xubing@bucm.edu.cn; *乔延江,教授,博士生导师, Tel: (010)84738661, E-mail: yjqiao@263.net

[作者简介] 戴胜云,博士研究生,研究方向为中药质量与工艺控制, Tel: (010)84738650, E-mail: daishengyun1228@163.com

that the UPLC method could shorten the analysis time, improve the critical separation and satisfy the requirement of the SST. In all, HPLC method could be replaced by UPLC for the quantity analysis of PNS.

[Key words] quality by design; UPLC; continual improvement; bayesian design space; *Panax notoginseng* saponins

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科植物,具有散瘀止血、消肿止痛之功效^[1]。三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)为三七主根或根茎经加工制成的总皂苷提取物,已收录在《中国药典》2015年版一部^[2]。药典中 PNS 5种皂苷类成分的含量测定采用 HPLC,乙腈-水梯度洗脱,流速 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。该法分析时间长,流速大、流动相消耗大,系统背压偏高,峰型也不尽理想。笔者曾尝试采用质量源于设计(quality by design, QbD)方法提高 PNS 分析方法性能。第1次方法改进时采用色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),将流速降低到 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,但分析时间没有变化^[3]。第2次方法改进选择色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}, 2.5 \mu\text{m}$),流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分析时间缩减到 36 min,关键分离度为 1.60,基本达到色谱分离的要求^[4]。

超高效液相色谱(ultra high performance liquid chromatography, UPLC)具有高效、灵敏、快速的优点。本次研究中以三七总皂苷 UPLC 开发为例,完成分析方法从 HPLC 到 UPLC 的转换,期望缩短分析时间,减少有机溶剂消耗,并实现 PNS 分析方法的持续改进。在 PNS 的 UPLC 开发中,首先定义分析目标(analytical target profile, ATP),然后采用风险评估(risk evaluation)辨识关键方法属性(critical method attributes, CMAs)和键方法参数(critical method parameters, CMPs),采用回归模型建立 CMAs 和 CMPs 关系模型,基于模型开发分析方法设计空间(design space, DSp),最后基于 DSp 优化分析条件。方法开发完成后,以 CMPs-CMAs 关系模型的准确性和系统适用性是否改变为判断标准,为评价分析方法改进的有效性,为新分析方法的应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪,包括四元泵处理器、样品处理器、柱温箱、TUV 检测器及 Empower 色谱工作站(Waters 公司);AG135 型电子分析天平($1/1$ 万, Sartorius 公司);BT25S 型电子分析天平($1/10$ 万, Sartorius 公司);KQ-100 型超声波清洗器

(昆山市超声仪器有限公司, 100 W, 40 KHz)。

三七总皂苷提取物(批号 ZL20141208, 质量分数 $>80\%$)购自南京泽朗生物科技有限公司;三七皂苷 R_1 (批号 10745-201318, 纯度 $\geq 98\%$);人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-201530, 纯度 $\geq 98\%$);人参皂苷 Re(批号 110754-201525, 纯度 $\geq 98\%$);人参皂苷 Rb_1 (批号 110704-201424, 纯度 $\geq 94.2\%$)和人参皂苷 Rd(批号 111818-201302, 纯度 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱级,乙腈为质谱级(赛默飞世尔科技有限公司);水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 数据分析软件

Design-Expert V 8.0 (Stat-Ease 公司), Sigmaplot 12.5 (Aspire Software Intl., Ashburn, VA, USA), Matlab 2009a (Mathworks 公司), 数据处理程序自行编写, JMP (SAS 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Acquity UPLC BEH 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$);流动相为乙腈-水先等度后梯度洗脱,检测波长 203 nm,进样量 $2 \mu\text{L}$,流速、柱温、梯度洗脱程序由试验设计确定。

2.2 供试品溶液的制备

称取三七总皂苷提取物约 25 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用 70% 甲醇定容至刻度线,摇匀, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,续滤液备用。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取三七总皂苷中 5 种对照品适量,加 70% 甲醇溶解,分别从 5 种对照品中取一定量配制混合对照品,其中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Rd 的质量浓度分别为 $0.2517, 1.266, 0.2323, 1.2601, 0.2934 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 Plackett-Burman 设计

Plackett-Burman 设计是部分析因设计用于筛选的备选设计。主要针对因素数较多且未确定众因素相对于响应变量的显著性时采用的试验设计方法,能用最少实验次数筛选出因素的主效应,从众多考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素供进一步研究。

2.4.1 参数设定 选取柱温(*A*)、梯度变化速率(*B*)、流速(*C*)、等度时间(*D*)、初始乙腈浓度(*E*)为考察因素。根据预试验结果,为每个因素设定 2 个水平进行,见表 1。梯度洗脱见表 2。

表 1 Plackett-Burman 设计参数水平

Table 1 Parameters and levels used in the Plackett-Burman design

水平	<i>A</i> 柱温 /°C	<i>B</i> 梯度变化速率 /% · min ⁻¹	<i>C</i> 流速 /mL · min ⁻¹	<i>D</i> 等度时间 /min	<i>E</i> 初始乙腈浓度 /%
-1	22	5	0.2	8	18
1	26	7	0.4	12	22

表 3 Plackett-Burman 设计及结果

Table 3 The summary of the Plackett-Burman design

No.	<i>A</i> 柱温 /°C	<i>B</i> 梯度变化速率 /% · min ⁻¹	<i>C</i> 流速 /mL · min ⁻¹	<i>D</i> 等度时间 /min	<i>E</i> 初始乙腈 浓度/%	分析 时间 /min	分离度
1	22	5	0.4	12	18	20.4	2.59
2	26	7	0.4	8	22	13.43	0
3	26	7	0.2	8	18	14	0
4	26	5	0.2	8	18	16.4	0
5	26	5	0.4	12	18	20.4	2.52
6	26	5	0.2	12	22	19.6	1.16
7	22	5	0.2	8	22	15.6	1.31
8	22	7	0.2	12	22	17.43	0
9	26	7	0.4	12	22	17.43	0
10	22	7	0.4	8	18	14	0
11	22	7	0.2	12	18	18	0
12	22	5	0.4	8	22	15.6	0.5

采用最小二乘法进行效应筛选模型拟合,分别得到 2 个关键方法属性与 5 个潜在关键方法参数 Pareto 分析图,见图 1。图中黑色条框代表参数与响应成负相关关系,白色条框代表参数与响应成正相关关系,当 $P < 0.05$ 时说明参数对响

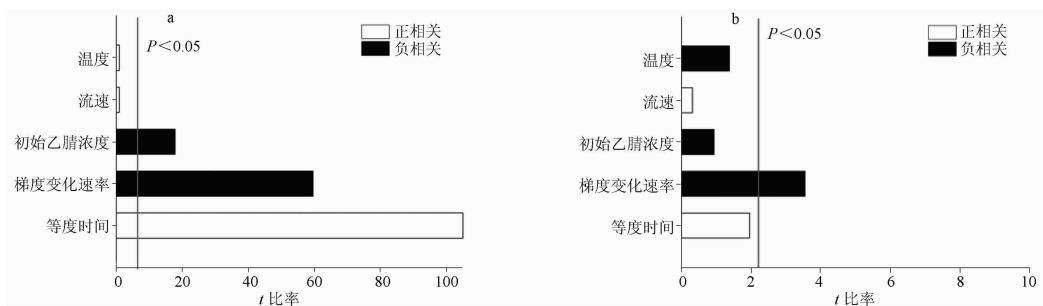
表 2 Plackett-Burman 设计梯度洗脱

Table 2 Gradient elution of the Plackett-Burman design

<i>t</i> /min	乙腈/%	水/%
0 ~ <i>D</i>	<i>E</i>	100 - <i>E</i>
<i>D</i> ~ <i>F</i> [$F = (60 - E)/B$]	60	40

2.4.2 Plackett-Burman 设计结果与分析 将设定的参数水平输入 JMP 软件的 DOE 筛选试验设计中,选择 Plackett-Burman 设计,共 12 次,得到一个设计表。响应变量选取人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 的分离度和分析时间共 2 个指标进行考察。根据试验设计进行,并将结果输入响应中,见表 3。

应值影响明显,该参数为关键方法参数。对分析时间而言,初始乙腈浓度、梯度变化速率和等度时间模型 $P < 0.05$,故可作为关键方法参数;同样,梯度变化速率为关键分离度的关键方法参数。



a. 以分析时间为响应值;b. 以分离度为响应值。

图 1 Plackett-Burman 设计因素 Pareto 分析

Fig. 1 Pareto chart showing the effect and the direction of parameters affecting

此外,通过最小二乘法模型运算得到因素刻画图,见图2。该图为动态演示图,主要体现2个方面,一方面是因素之间是否存在相互作用,通过移动其中任何一个因素,若其他因素斜率发生改变则表明涉及因素间的交互作用,这一部分是 Pareto 图分析不能体现的内容;另一方面是参数对响应值影响的重要程度,主要通过观察预测迹的斜率。本实验中,未发现各因素间存在交互作用,而等度时间和梯

度变化速率对2个响应值具有一定的斜率且均较明显,初始乙腈浓度对2个响应值具有一定的斜率但不及前2个因素明显,流速和温度对2个响应值影响不明显。因此,综合考虑5个因素对各响应值的影响,等度时间、初始乙腈浓度和梯度变化速率为关键方法参数进行进一步的考察,而影响较小的因素则选择一个常用值,如柱温选择室温 25 ℃,流速 0.4 mL · min⁻¹ 进行后续实验。

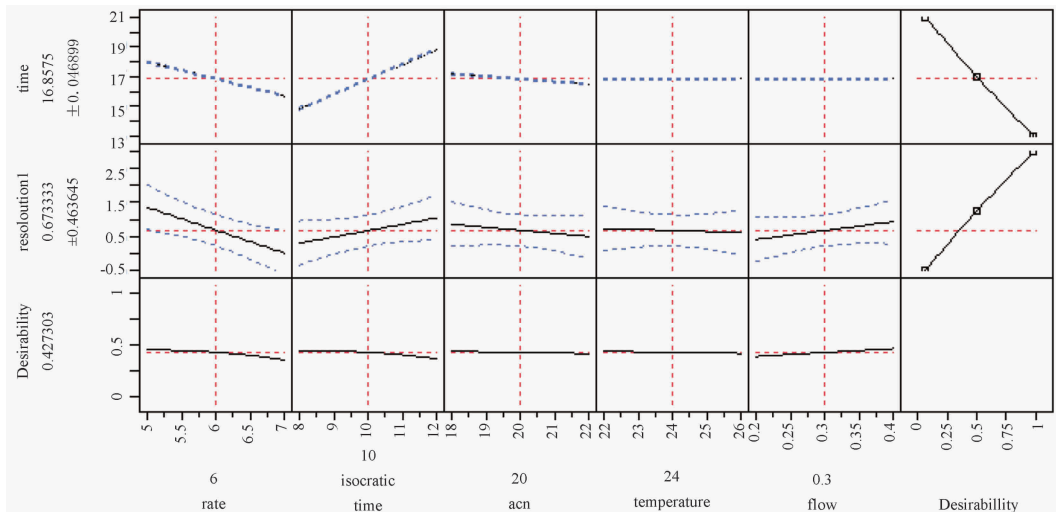


图2 Plackett-Burman 设计因素刻画图

Fig. 2 The factor profiling figure of the Plackett-Burman design

2.5 Box-Behnken 试验设计

Box-Behnken 设计与析因设计相比,可以明显减少实验次数,提高实验效率,降低实验的成本。

2.5.1 参数设定 根据 Plackett-Burman 设计考察结果,选择梯度变化速率、等度时间、初始乙腈浓度为因素进行实验。因素水平、Box-Behnken 因素设计见表4。

表4 Box-Behnken 因素设计

Table 4 Parameters and levels used in the Box-Behnken design

水平	梯度变化速率 /% · min ⁻¹	等度时间 /min	初始乙腈浓度 /%
-1	5	8	18
0	6	10	20
1	7	12	22

2.5.2 Box-Behnken 设计结果与分析 将表4中的内容输入 Design Expert8.0.6 软件的 Box-Behnken

响应面试验设计中,共17次实验,见表5。以人参皂苷 R_g和人参皂苷 R_e间的分离度、分析时间为关键方法属性进行优化。

根据结果,分别以分析时间和分离度为响应值,建立响应值与3个关键影响参数梯度变化速率、初始乙腈浓度和等度时间之间的二项式模型,模型 $P < 0.05$,具有显著性,并且模型决定系数 R^2 分别为 0.999 9, 0.878 1,表明模型拟合程度良好,可以解释关键影响因素与关键方法属性之间的相互关系。

2.6 设计空间开发及其可靠性研究

Box-Behnken 试验设计是响应面设计中的一种,而设计空间又是在 Box-Behnken 试验设计数据上建立的,故可认为设计空间的建立是基于预测响应面^[5]。由于建立色谱方法时往往会牵涉到多个色谱参数和多个响应,因而设计空间应该是多个响应面的综合。然而 Peterson^[6]提出,这样由多个响应变量建立的设计空间有2个主要缺点,将直接导致设计空间的不可靠,其中一个缺点是模型参数

表 5 Box-Behnken 设计及结果

Table 5 Design of Experiments and the results for the Box-Behnken design

No.	运行 次序	梯度变 化速率 / $\% \cdot \text{min}^{-1}$	等度 时间 /min	初始乙 腈浓度 / $\%$	分析 时间 /min	分离度
1	4	5	10	18	18.4	1.69
2	15	7	10	18	16	1.32
3	16	5	10	22	17.6	0
4	17	7	10	22	15.43	0
5	8	5	8	20	16	2.15
6	5	7	8	20	13.71	2.15
7	10	5	12	20	20	2.15
8	6	7	12	20	17.71	2.13
9	1	6	8	18	15	0
10	13	6	8	22	14.33	0
11	11	6	12	18	19	2.48
12	7	6	12	22	18.33	0
13	2	6	10	20	16.67	2.16
14	14	6	10	20	16.67	2.16
15	9	6	10	20	16.67	2.18
16	3	6	10	20	16.67	2.17
17	12	6	10	20	16.67	2.14

不确定性,另一个缺点是没有考虑多元回归模型误差向量的相关结构。因此,在建立设计空间时,有必要同时考虑这 2 个缺点来确保设计空间的可靠性,这样才能满足 ICH Q8 指南中对设计空间定义中的“保证质量”这一项要求, Bayesian 理论恰好能同时考虑模型参数的不确定性和数据结构的相关性。根据 Bayesian 理论, Bayesian 后验预测概率可以通过下式来计算^[7]。

$$Pr(y \in A | x, \text{data}) \quad (1)$$

其中, x 是过程参数向量, y 是响应值向量, A 是具有规定阈值的可接受范围, data 是实验数据, Pr 代表响应值在可接受范围内的概率,故设计空间可以用下式表示。

$$\{x; Pr(y \in A | x, \text{data}) \geq \pi\} \quad (2)$$

其中, π 表示能“确保质量”的设计空间预定义可靠性的概率。那些不确定因素对模型响应的影响应用 Monte Carlo 仿真模拟来估计。

在建立贝叶斯设计空间之前,首先要确定分析目标。本实验中,选择 2 个分析目标:①实现三七总皂苷中 5 种皂苷的基线分离,尤其是人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re ;②缩短分析时间,提高分析效能,基于贝叶斯概率可建立一个多目标设计空间。

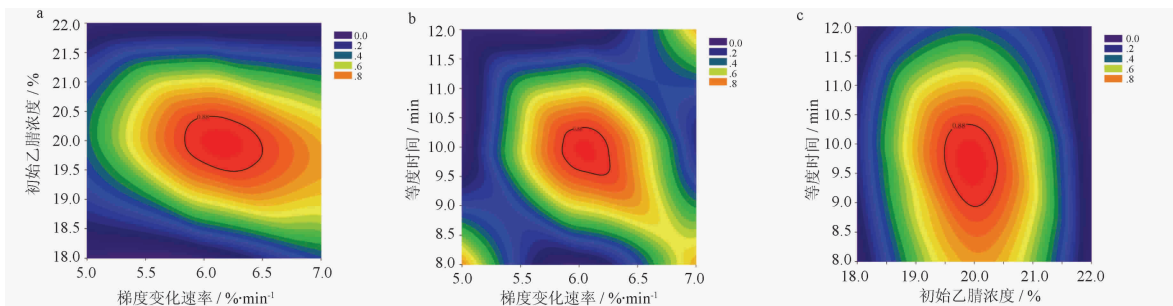
根据分析目标,选择关键分离度 (R_{crit}) 和分析时间 (t) 作为三七总皂苷色谱分离的关键方法属性,该多变量设计空间可以用下式表示。

$$DS = \{x_0 \in X | E_\theta [Pr(R_{crit} > \lambda_1, t > \lambda_2) | \theta] \geq \pi\} \quad (3)$$

其中, x_0 是整个实验区域 X 中的一个点, λ_1 和 λ_2 是关键分离度与分析时间的可接受阈值, π 为要求达到的质量水平的贝叶斯概率值, θ 为模型评估参数的数据集, Pr 和 E 代表概率的估计值和数学期望值。

一般而言,关键分离度 R_{crit} 至少应该大于 1.5,而对于分析时间 t ,考虑到中药的复杂性和 UPLC 特点,将其设置为 17 min,设计空间就是理论上的稳健区域,区域中预测标准值高于可接受阈值并且尽可能至少达到此阈值^[8]。此外,利用网格搜索法在整个实验范围内进行贝叶斯联合后验概率的计算,满足 2 个分析目标的贝叶斯后验预测概率通过对每个网格进行 1 万次的 Monte Carlo 仿真模拟计算得到^[8-10]。

目前并没有一个针对色谱分析公认的概率阈值,故在本研究中选择 88% 作为 π 的基本标准建立设计空间,见图 3,图中设计空间用黑线条描绘出来,设计空间内表示同时满足关键分离度和分析时间 2 个目标要求的概率至少大于 88%,颜色越深,概率越大。



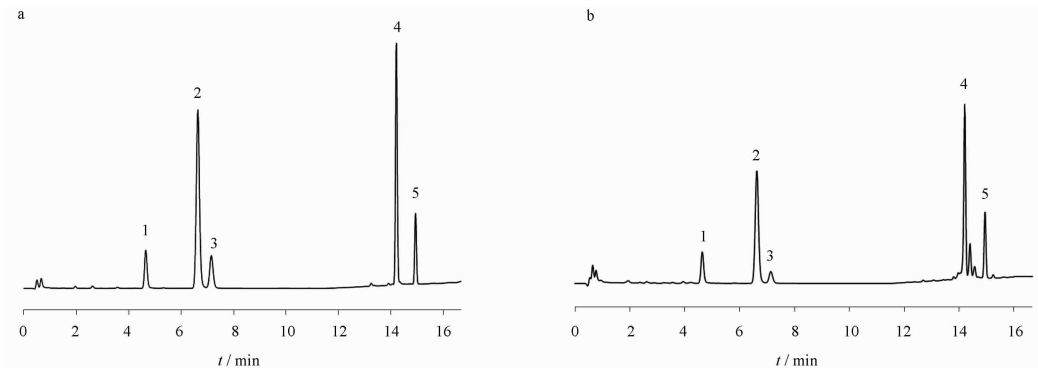
a. 梯度变化速率为横坐标,初始乙腈浓度为纵坐标;b. 梯度变化速率为横坐标,等度时间为纵坐标;c. 初始乙腈浓度为横坐标,等度时间为纵坐标。

图 3 贝叶斯设计空间

Fig. 3 Bayesian design space

通过对三七总皂苷色谱分析过程的优化,采取 Bayesian 概率评价设计空间的可靠性,最后优化得到的分析方法的预测结果为 10 min 的等度时间,6

% · min⁻¹ 的梯度变化速率和 20% 的初始乙腈浓度,此时可以实现三七总皂苷中 5 个成分的完全分离,见图 4。



a. 混合对照品; b. 样品; 1. 三七皂苷 R₁; 2. 人参皂苷 R_{g1}; 3. 人参皂苷 R_e; 4. 人参皂苷 R_{b1}; 5. 人参皂苷 R_d。

图 4 三七总皂苷 UPLC 图

Fig. 4 The chromatograms of the sample and standard solution by the developed method

2.7 方法验证

选择 Accuracy profile^[11] 进行方法验证,分 3 d 进行,选择 4 个样品浓度,每个浓度进行 3 次重复,一共进行 3 × 4 × 3 次,即 36 次实验。三七总皂苷样品的 4 个质量浓度分别是 1.25, 2.5, 3.0, 5.0 g · L⁻¹。每个浓度分别重复 3 次,实验分 3 d 考察方法的中间精密度。根据全析因设计和 β-期望容许区间计算 Accuracy Profile 中各个参数的值,验证试验采用 matlab 自行编写的程序进行计算。

2.7.1 真实性 真实性代表总误差理论中的系统误差,分别用每个浓度 3 d 重复 3 次数据的相对偏差表示。5 个成分相对偏差都小于 5%,这说明优化后方法的真实性可接受,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_d 方法验证的结果见表 6 ~ 10。三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_d 4 个成分的相对偏差都小于 3%,而人参皂苷 R_e 前 2 个浓度水平的相对偏差分别为 3.5%, 3.2%,这可能因为人参皂苷 R_e 含量较低,测量时存在偏差会比其他 4 个成分稍大。

2.7.2 精密度 精密度与总误差理论中的偶然误差有关,包括 2 个方面,分别是重复性和中间精密度,二者都用 RSD 表示。5 个成分在 4 个浓度水平的重复性和中间精密度的 RSD 都小于 2%,意味着优化后方法的偶然误差在可接受范围内,见表 6 ~ 10。

表 6 优化后方法对三七皂苷 R₁ 分析的 accuracy profile 验证

Table 6 Validation results of the UPLC method for the analysis of notoginsenoside R₁ in the *Panax notogineng* saponins

质量浓度 /g · L ⁻¹	真实性 /%	重复性 /%	中间精 密度/%	准确度 ¹⁾ /%
0.094 61	-0.103 6	0.17	0.59	[-1.96, 1.75]
0.189 2	0.369 9	0.14	0.99	[-2.89, 3.63]
0.232 9	1.396	0.08	0.59	[-0.57, 3.36]
0.378 4	0.851 6	0.18	0.73	[-1.48, 3.18]

注:¹⁾90%β-期望最低和最高容许区间相对误差(表 7 ~ 10 同)。

表 7 优化后方法对人参皂苷 R_{g1} 分析的 accuracy profile 验证

Table 7 Validation results of the UPLC method for the analysis of ginsenoside R_{g1} in the *Panax notogineng* saponins

质量浓度 /g · L ⁻¹	真实性 /%	重复性 /%	中间精 密度/%	准确度 ¹⁾ /%
0.374 2	-2.931	0.11	0.19	[-2.9, -2.0]
0.748 4	-3.314	0.088	0.21	[-3.3, -2.1]
0.921 4	-1.229	0.051	0.20	[-1.2, 0.65]
1.497	-2.316	0.10	0.22	[-2.3, -1.1]

2.7.3 准确性 准确性代表着误差理论中偶然误差与系统误差值之和,即总误差。三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_d 5 个成分在 90%β 容许区间内并且可接受限

表 8 优化后方法对人参皂苷 Re 分析的 accuracy profile 验证

Table 8 Validation results of the UPLC method for the analysis of ginsenoside Re in the *Panax notogineng* saponins

质量浓度 /g · L ⁻¹	真实性 /%	重复性 /%	中间精 密度/%	准确度 ¹⁾ /%
0.039 16	-3.5	0.31	0.45	[-4.6, -2.5]
0.078 32	-3.2	0.17	0.46	[-4.6, -1.8]
0.096 41	-0.65	0.16	0.45	[-2.0, 0.68]
0.156 6	-1.3	0.14	0.61	[-3.3, 0.62]

表 9 优化后方法对人参皂苷 Rb₁ 分析的 accuracy profile 验证Table 9 Validation results of the UPLC method for the analysis of ginsenoside Rb₁ in the *Panax notogineng* saponins

质量浓度 /g · L ⁻¹	真实性 /%	重复性 /%	中间精 密度/%	准确度 ¹⁾ /%
0.448 7	-0.40	0.45	-2.0	[-2.0, 1.2]
0.897 4	-2.9	0.90	-3.4	[-3.4, -2.5]
1.105	-0.45	1.1	-0.71	[-0.71, -0.20]
1.795	-2.6	1.8	-4.1	[-4.1, -1.0]

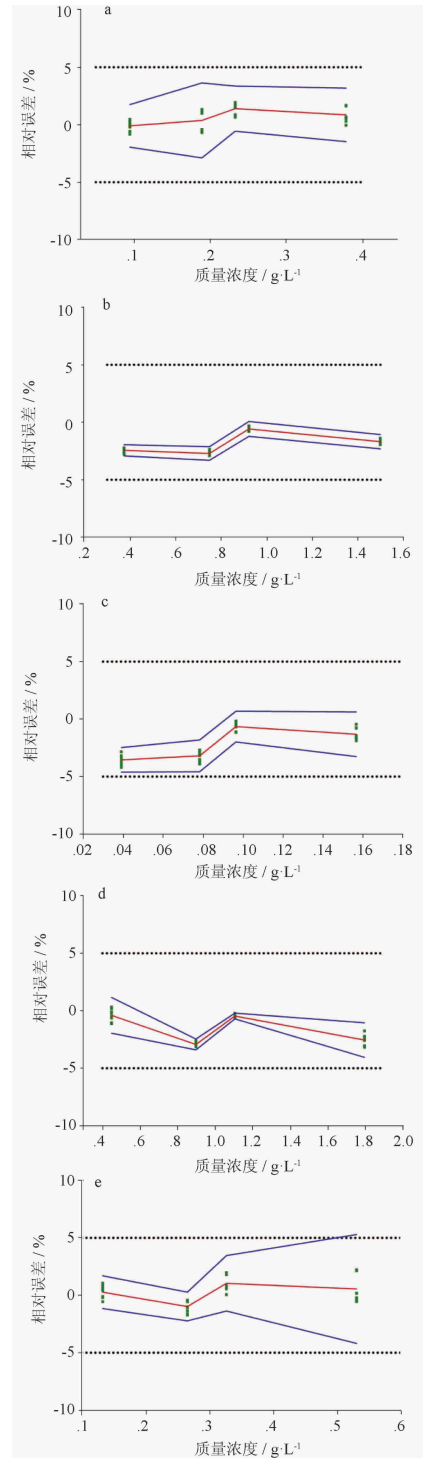
表 10 优化后方法对人参皂苷 Rd 分析的 accuracy profile 验证

Table 10 Validation results of the UPLC method for the analysis of ginsenoside Rd in the *Panax notogineng* saponins

质量浓度 /g · L ⁻¹	真实性 /%	重复性 /%	中间精 密度/%	准确度 ¹⁾ /%
0.132 4	0.132 4	0.27	0.39	[-1.2, 1.7]
0.264 8	0.264 8	-0.98	0.40	[-2.2, 0.28]
0.326 0	0.326 0	1.0	0.19	[-1.4, 3.5]
0.529 7	0.529 7	0.55	0.22	[-4.2, 5.3]

为 5% 的准确性,见表 6 ~ 10,轮廓图见图 5。除人参皂苷 Rd 以外,其他 4 个成分在设置的 4 个浓度水平都分布在可接受范围内,说明优化后的方法其准确性在设定的样品浓度范围内是可以接受的。但人参皂苷 Rd 则在第 4 个浓度水平处超过了 5% 可接受限,说明其浓度范围比其他 4 个成分浓度范围窄。此外,优化后方法在对三七总皂苷中 5 个成分进行分析时,不同成分的分析范围不一样,但方法准确性可接受。三七皂苷 R₁ 的分析范围为 0.094 61 ~ 0.378 4 g · L⁻¹,人参皂苷 Rg₁ 为 0.374 2 ~ 1.497 g · L⁻¹,人参皂苷 Re 为 0.039 16 ~ 0.156 6 g · L⁻¹,人参皂苷 Rb₁ 为 0.448 7 ~ 1.795 g · L⁻¹,人参皂苷

Rd 为 0.132 4 ~ 0.493 2 g · L⁻¹。



a. 三七皂苷 R₁; b. 人参皂苷 Rg₁; c. 人参皂苷 Re; d. 人参皂苷 Rb₁; e. 人参皂苷 Rd; 绿色点为每个浓度每次试验的相对误差,红色实线为相对偏差,蓝色折线表示 90% β-期望容许区间,黑色点直线为 ±5% 可接受限。

图 5 三七总皂苷中 5 种成分方法验证 accuracy profile 图
Fig. 5 Accuracy profiles of the five components

2.7.4 最低定量限 每个成分的最低定量限(limit of qualification, LOQ)也可从准确性轮廓图中看出,准确性轮廓限制线与90% β -容许区间限制线的交叉点即为最低定量限。从试验设计的浓度来看,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 和人参皂苷 R_d 5个成分的最低定量限分别为0.094 61, 0.374 2, 0.039 16, 0.448 7, 0.132 4 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.7.5 线性 为了考察方法的线性,对36次实验数据采取线性回归模型拟合方式得到5个成分的线性方程,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 和人参皂苷 R_d 的线性方程分别为 $Y = 49.28 + 1.510 \times 10^6 X$, $Y = -1.359 + 1.706 \times 10^6 X$, $Y = -0.4795 + 1.849 \times 10^6 X$, $Y = 0.9179 + 1.313 \times 10^6 X$ 和 $Y = 1.907 \times 10^4 + 1.570 \times 10^6 X$,此5个成分线性方程对应的相关系数均大于0.999 5,表明方法的线性良好。

2.8 方法持续改进前后定量分析性能比较

在相同的分析目标(ATP)下,从色谱条件、CMP辨识结果、CMP-CMA关系模型、系统适用性等方面对笔者前期建立的三七总皂苷HPLC分析^[3,4]和UPLC分析的性能进行比较,见表11。UPLC中选择色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m)进行方法开发,人参皂苷 R_{g_1} 和 R_e 之间的分离度有较大改善,达到2.10以上,同时分析时间缩短到17 min,见图6。从CMP-CMA关系模型角度来看,采用的试验设计方法一致,关键影响参数一致,模型 R^2 符合要求,而设计空间的阈值更高,说明改进以后方法的稳健性更高,更能够满足预定义目标。本次改进方法同样经过accuracy profile方法学验证,真实性、中间精密度、重复性、分析总误差和线性均符合要求。因此,改进后的分析方法同样满足药典中PNS的定量分析要求,利于三七总皂苷质量控制,应用QbD工具提高了分析方法开发的效率和可靠性。

表11 分析方法转换前后各个阶段涉及的因素对比

Table 11 Comparison of HPLC and UPLC from different phase

类别	项目	HPLC	UPLC	
色谱条件	色谱柱	4.6 mm \times 75 mm, 2.5 μ m	2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m	
	流动相	乙腈-水	乙腈-水	
	检测波长/nm	203	203	
	梯度变化速率/ $\% \cdot \text{min}^{-1}$	1.6	6	
	等度时间/min	20	10	
	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	0.8	0.4	
	柱温/ $^{\circ}\text{C}$	23	25	
	进样量/ μL	5	2	
	CMP-CMA 关系模型	关键影响参数	梯度变化速率, 等度时间, 初始乙腈浓度	梯度变化速率, 等度时间, 初始乙腈浓度
		分离度模型 R^2	0.999 9	0.999 9
分析时间模型 R^2		0.969 1	0.878 1	
设计空间阈值/ $\%$		80	88	
系统适应性	拖尾因子	0.96	1.03	
	选择性	1.10	1.09	
	塔板数	10 270	13 240	
	关键分离度	1.6	2.0	
	分析时间/min	36	17	
方法学	真实性/ $\%$	± 5	± 3	
	中间精密度/ $\%$	5	3	
	重复性/ $\%$	5	3	
	AP可接受限/ $\%$	± 10	± 5	
	线性	0.998 0	0.999 8	

注:分析目标为缩短分析时间,提高分离效果。

3 总结

本研究建立了UPLC测定三七总皂苷中三七皂

苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 和人参皂苷 R_d 5种皂苷的Bayes概率设计空间,该方

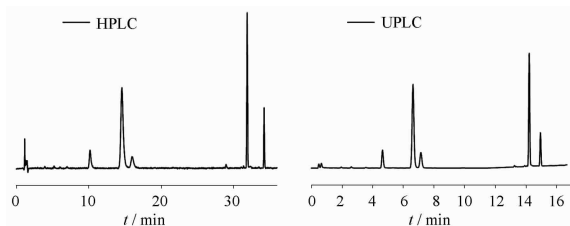


图6 方法转换前后色谱图对比

Fig. 6 Comparison of the chromatograms of HPLC and UPLC

法一改常规单因素考察建立操作条件单一的色谱方法,而是基于科学和风险管理原则开发色谱方法的设计空间,增加了对三七总皂苷色谱分析过程的理解,设计空间内色谱条件的改变不会引起分析性能的改变,提高了色谱方法的稳健性。

QbD 希望在药品监管和药品分析中取得一个平衡,实现监管者、分析者和使用者三者之间共赢^[12]。本研究在前期研究基础上对分析方法进行持续改进,提出采用 CMPs-CMAs 关系模型的拟合和预测指标,以及关键分离度、选择性、塔板数等系统适用性指标,评价持续改进效果和改进前后分析性能的一致性,更大程度提高方法的可靠性和可维护性,既满足监管要求,又有利于新技术的应用。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 11.
 [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 393.
 [3] Dai S Y, Xu B, Luo G, et al. Application of design of experi-

ment and design space (DOE-DS) methodology for the HPLC separation of Panax Notoginseng Saponins[J]. Open Chem Eng J, 2015, 9: 47.

- [4] Dai S Y, Zhang Y, Xu B, et al. Robust design space development for HPLC analysis of five chemical components in *Panax notoginseng* saponins [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2016, 39(10):504.
 [5] Peterson J J. A Bayesian approach to the ICH Q8 definition of design space [J]. J Biopharm Stat, 2008, 18(5): 959.
 [6] Peterson J J. A posterior predictive approach to multiple response surface optimization [J]. J Qual Technol, 2004, 36(2): 139.
 [7] Dai S Y, Xu B, Zhang Y, et al. Establishment and reliability evaluation of the design space for HPLC analysis of six alkaloids in *Coptis chinensis* (Huanglian) using Bayesian approach [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(9): 697.
 [8] Debrus B, Lebrun P, Ceccato A, et al. Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2011, 691(1): 33.
 [9] Lebrun P, Govaerts B, Debrus B, et al. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods [J]. Chemom Intell Lab Sys, 2008, 91(1) 4.
 [10] Debrus B, Lebrun P, Ceccato A, et al. A new statistical method for the automated detection of peaks in UV-DAD chromatograms of a sample mixture [J]. Talanta, 2009, 79(1): 77.
 [11] Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles [J]. J Chromatogr A, 2007, 1158: 174.
 [12] 徐冰,史新元,吴志生,等.论中药质量源于设计[J].中国中药杂志,2017,42(5):1015.

[责任编辑 孔晶晶]