

## 基于近红外光谱分析技术的注射用益气复脉（冻干）红参醇提过程在线监测

徐敏<sup>1</sup>, 张磊<sup>2,3</sup>, 岳洪水<sup>2,3</sup>, 鞠爱春<sup>2,3\*</sup>

1. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402

3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402

**摘要:** **目的** 利用近红外光谱分析技术建立注射用益气复脉（冻干）主要原料红参醇提过程中 3 种单体皂苷——人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 的定量模型, 实现提取过程中关键指标的快速检测。**方法** 在线采集红参醇提过程的近红外光谱, 以超高效液相色谱 (UPLC) 法测定提取过程药液中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 的量为参考值, 采用偏最小二乘法建立光谱与测定值之间的定量校正模型, 进而对提取过程进行在线分析。**结果** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Re 的建模波段均为 9 403.7~7 498.3 cm<sup>-1</sup> 和 6 102~5 446.3 cm<sup>-1</sup> 组合波段; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的建模波段为 5 774.1~5 446.3 cm<sup>-1</sup>。人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 定量模型的交叉验证决定系数 (R<sup>2</sup>) 分别为 99.40、99.44、99.41, 交叉验证均方根误差分别为 5.18、2.77、11.00。**结论** 所建立的 3 种单体皂苷定量模型预测性能良好, 能够有效测定红参醇提过程中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 的量。

**关键词:** 注射用益气复脉（冻干）; 近红外光谱分析技术; 红参; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 在线监测

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 03- 0462 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.019

## Online monitoring the extraction process of *Radix Ginseng Rubra* for Yiqi Fumai Lyophilized Injection based on near infrared spectroscopy

XU Min<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>2,3</sup>, YUE Hongshui<sup>2,3</sup>, JU Aichun<sup>2,3</sup>

1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300402, China

3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300402, China

**Abstract: Objective** To establish quantitative models to rapidly detect three ginsenoside monomer, which are ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub>, during extraction process of *Radix Ginseng Rubra* based on Near Infrared Spectroscopy (NIR). **Methods** NIR spectra of extraction process were collected online and the contents of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub> were determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC). And then the quantitative calibration models were established between the spectra and the measured values by using Partial Least Squares (PLS) algorithm, to analyse extraction process online. **Results** The optimal wave number of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Re were all in the range of 9 403.7–7 498.3 cm<sup>-1</sup> and 6 102–5 446.3 cm<sup>-1</sup>, and the optimal wave number of Rb<sub>1</sub> was in the range of 5 774.1–5 446.3 cm<sup>-1</sup>. The internal cross-certification decision coefficient (R<sup>2</sup>) of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub> were 99.40, 99.44, 99.41 respectively, and RMSECV were 5.18, 2.77, 11.00, respectively. **Conclusion** The results demonstrated that three quantitative models were satisfactory, which could effectively and rapidly detect the contents of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub> in the extraction process of *Radix Ginseng Rubra*.

**Key words:** Yiqi Fumai Lyophilized Injection; near infrared spectroscopy (NIR); *Radix Ginseng Rubra*; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Re; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; online monitoring

注射用益气复脉（冻干）源自古方生脉散，是一种新型冻干粉针剂，由红参、麦冬、五味子 3 种药材组成，具有益气复脉，养阴生津之功效<sup>[1-2]</sup>。红参提取物是注射用益气复脉（冻干）的原料药之

收稿日期: 2018-01-03

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目 (17PTSJJC00090); 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室

第一作者: 徐敏 (1995—), 女, 硕士, 主要研究方向为药物分析和中药质量控制。Tel: (022)86342042 E-mail: xmhyc2012@163.com

\*通信作者: 鞠爱春 (1973—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

一,由红参药材经过提取、浓缩、醇沉、过滤等多道工序制得,主要药效成分为多种单体皂苷,包括人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 等<sup>[3]</sup>。提取工艺作为该制剂生产过程的起点,直接关系到药材的利用率和提取液中有效成分的量。目前在生产上,红参醇提过程的开始和结束都由提取温度和提取时间控制,且长时间固定不变。在主要依靠固定参数管理生产过程的模式下,无法实时监测和纪录提取过程中与药品质量相关的关键指标的变化,容易引起批次之间质量的不稳定<sup>[4]</sup>。因此,亟需建立一种在线快速检测方法,对其进行更为严格的控制。

近红外光谱技术作为一种常用的过程分析技术,由于其快速、无损、样品处理简单等特点,已被成功应用于食品、化工、制药等领域<sup>[5-8]</sup>。近年来,随着化学计量学的发展以及中药现代化的推进,近红外光谱技术在中药制药过程的研究也越来越多,包括原料药材的鉴别、有效组分的含量测定和工艺单元的在线监测等<sup>[9-12]</sup>。注射用益气复脉(冻干)制备工艺复杂,生产周期长,仅通过成品检验只能保证产品质量满足现有的标准,无法进一步提高产品质量<sup>[13]</sup>。目前针对注射用益气复脉(冻干)生产过程质量控制方法研究的报道较少,且未出现将近红外光谱分析技术应用于其在线监测的研究。所以,本文以注射用益气复脉(冻干)组方药材红参提取过程为研究对象,采用近红外光谱技术建立醇提过程中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 3 个关键指标的定量校正模型,探讨所建模型在实际生产过程在线监测中的应用,为建立适合于中药生产过程监测的方法提供思路。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有紫外检测器和 Empower 色谱工作站;MATRIX-F 型傅里叶变换型近红外光谱仪(德国 Bruker 公司),配有 OPUS 数据处理软件(版本 7.5);UF-TOC 超纯水机;DK-S28 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

### 1.2 试药

红参醇提药液,天津天士力之骄药业有限公司提供(共 10 批,批号 S1~S10);人参皂苷 Re 对照品(批号 110754-201525)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对照品(批号 110703-201529)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品(批号 110704-201424),均购自中国食品药品检定研究

院;甲醇、乙腈均为色谱纯(Merck 公司产品),磷酸为色谱纯(天津市光复精细化工研究所),水为自制超纯水。

## 2 方法

### 2.1 提取过程样本的收集

所有数据均采集于注射用益气复脉(冻干)商业批次生产过程。根据该药品生产工艺,红参单独加无水乙醇进行提取,共提取 3 次,第 1 次回流提取 3 h,第 2 次回流提取 3 h,第 3 次回流提取 3 h。

利用近红外光谱技术监测提取工序,醇提过程每 1 min 采集 1 次近红外光谱,并按一定的时间间隔收集提取过程获得的药液,用超高效液相色谱法(UPLC)作为参考方法检测提取药液中 3 种人参皂苷的量。共进行 10 批次实验。

### 2.2 近红外光谱的在线采集

光谱采集模式为透射,光程为 2 mm,以内部空气作为参比,分辨率为 8 cm<sup>-1</sup>,扫描范围 10 000~4 000 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 32 次。采集装置见图 1。

### 2.3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 的含量测定

色谱条件:Waters BEH HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈(A)-0.05% 磷酸(B),洗脱梯度见表 1;柱温:30 °C;体积流量:0.5 mL/min;检测波长:203 nm;进样量:1 μL。

表 1 洗脱梯度时间表

Table 1 Timetable of gradient elution

t/min	A/%	B/%
0	19	81
6	19	81
10	22	78
11	22	78
12	24	76
14	30	70
18	32	68
20	33	67
21	98	2
23	19	81
25	19	81

供试品溶液制备:精密称取提取过程收集的药液(第一煎 5.0 g;第二煎 10.0 g;第三煎 10.0 g),置于玻璃蒸发皿中,80 °C 水浴加热挥发至无醇味,然后加入 30% 甲醇复溶,定容到 10 mL。将样品上预先处理好的商品大孔树脂柱(80 目,柱内径 6~

8 mm, 高约 2 cm), 柱顶端上样, 速度约为 1 mL/min, 后用 2 mL 甲醇碱溶液冲洗 (0.5 mol/L NaOH 的 30% 甲醇溶液), 弃去洗脱液, 再用 5 mL 30% 甲醇, 分两次 (2、3 mL) 冲洗, 弃去洗脱液, 最后用甲醇冲洗, 收集洗脱液到 5 mL 容量瓶中至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件进样分析。对照品及提取液样品的色谱图见图 2。

### 2.4 数据处理

应用 OPUS 7.5 软件选择最优建模波段和最适光谱预处理方法, 结合偏最小二乘算法 (PLS) 建立近红外光谱图与待测组分含量间的定量模型, 并以内部交叉验证决定系数 ( $R^2$ )、交叉验证均方根误差 (RMSECV) 和相对分析误差 (RPD) 作为模型评价指标。将建立的定量校正模型应用于实际生产中, 实时反映醇提过程药液中 3 种单体皂苷的量。

## 3 结果

### 3.1 光谱特征分析

红参提取过程样品原始的近红外光谱图见图 3, 5 200  $\text{cm}^{-1}$  附近处出现的强吸收峰是由 O-H 合频振动产生的, 6 000~5 500  $\text{cm}^{-1}$  之间出现的吸收峰是乙醇溶液近红外光谱的典型特征。

### 3.2 光谱预处理

在原始近红外光谱采集过程, 环境变化 (温度、湿度等)、仪器状态以及测量条件等都会对建模结果产生影响, 通过预处理可以优化光谱信息, 消除无关变量的干扰, 改善模型的性能。本实验通过 OPUS 软件进行建模, 对比了不同预处理方法及其

组合对人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、Re 和  $\text{Rb}_1$  定量校正模型的影响, 结果见表 2。由表 2 可知, 采用不同的光谱预处理方法得到的  $R^2$ 、RMSECV 和 RPD 值有显著不同。最终, 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  和  $\text{Rb}_1$  的原始光谱选择“一阶导数+矢量归一化”预处理, Re 的原始光谱选择“减去一条直线”预处理, 能够达到较准确的定量效果。

### 3.3 建模波段筛选

近红外光谱是含氢基团的倍频与合频吸收, 不同波段所包含的信息各不相同。尽管 PLS 算法可以处理全谱信息, 但建模波段过宽, 必然会包含大量冗余信息, 影响最终模型的预测精度, 因此有必要选择建模波段, 以消除噪音, 提取相关信息。采用 OPUS 软件自动优选人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、Re 和  $\text{Rb}_1$  的特征波段, 结果见表 3。

### 3.4 主因子数的选择

采用 PLS 法建立定量模型时, 需要对主因子数进行选择, 在校正集样本一致的前提下, 合适的主因子数既能提高模型的预测能力, 又能避免出现“过拟合”现象。本实验通过留一法交叉验证最佳主因子数, 结果见图 4。图 4 反映了主因子数对于模型 RMSECV 的影响, 随着主因子数的增加, 模型性能不断提高。因此, 最终选择人参皂苷  $\text{Rg}_1$  的最佳主因子数为 7, 人参皂苷 Re 和  $\text{Rb}_1$  的最佳主因子数均为 9。

### 3.5 定量模型建立

光谱数据经过预处理和筛选建模波段后, 采用

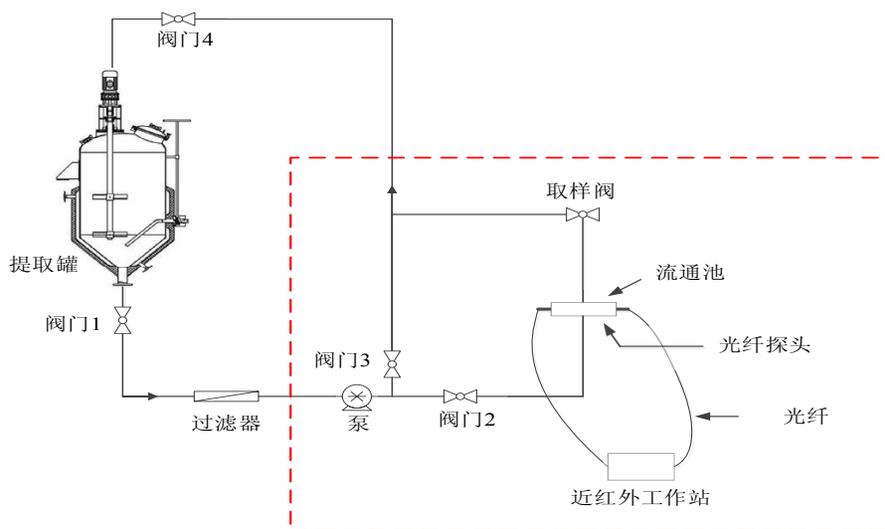
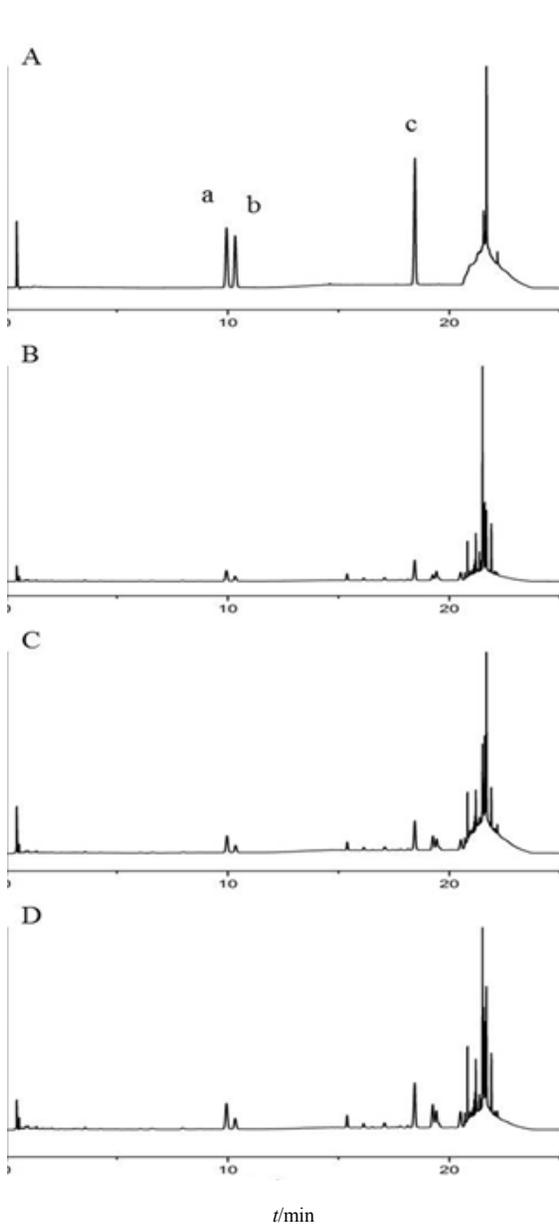


图 1 提取过程近红外光谱采集装置图

Fig. 1 Near infrared acquisition device of extraction process



a-人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; b-人参皂苷 Re; c-人参皂苷 Rb<sub>1</sub>  
a- ginsenoside Rg<sub>1</sub>; b- ginsenoside Re; c- ginsenoside Rb<sub>1</sub>

图2 对照品(A)及样品一煎(B)、二煎(C)、三煎(D) UPLC图

Fig.2 UPLC of reference substance(A), sample of first extract (B), second extract (C), and third extract (D)

偏最小二乘算法分别建立人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 的定量校正模型, 最终3个指标定量模型的各项参数汇总见表4, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 模型的决定系数 R<sup>2</sup> 分别为 99.40、99.44 和 99.41, RMSEC 值分别为 5.18、2.77、11.00。3个指标成分校正集样品中近红外预测值和参考值相关图见图5, 从图中可以看出人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re 和 Rb<sub>1</sub> 的预测值和参

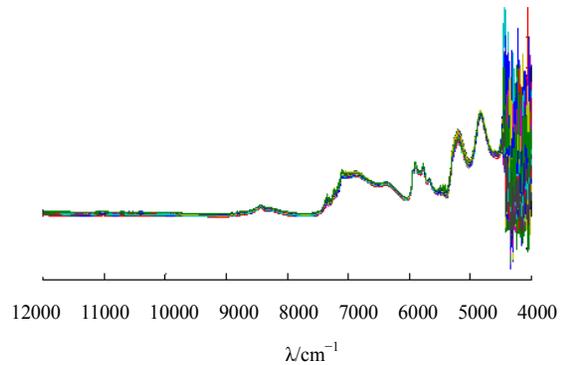


图3 红参提取过程原始近红外光谱图  
Fig.3 Original near infrared spectrogram of extraction process

考值均匀地分布在拟合直线的两边, 相关性良好。

### 3.6 质控指标的在线分析

将所建立的人参皂苷 Re、Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 这3个指标的定量模型应用到实际生产中, 并在提取过程中取样, 将模型预测结果与实际测定的参考值进行比较, 3个质控指标近红外预测值和真实值的相关图见图6。从图中可以看出, 3种单体皂苷的近红外模型预测值与参考值吻合良好, 该模型能够准确预测提取过程各指标成分的变化, 但其中人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 定量模型的预测性能要明显优于人参皂苷 Re 的定量模型。

## 4 讨论

### 4.1 建模样本的选择

由于近红外光谱技术是一种间接分析方法, 定量校正模型中的样本分布范围会直接影响模型的准确性。本实验收集了多个生产批次的注射用益气复脉(冻干)样本数据进行建模, 样品范围比较广, 时间跨度较长, 具有一定的代表性。研究表明, 根据偏最小二乘算法建立的模型预测性能良好, 能够用于实际生产过程中红参醇提的在线监测。

### 4.2 建模波段的优选

近红外光谱是 C-H、O-H、N-H 等含氢基团振动的合频和倍频吸收, 谱带较宽, 吸收峰重叠严重, 且光谱中包含了大量的冗余信息。因此, 光谱范围的选择对所建模型的精确度影响很大。本实验在机器自带 OPUS 软件自动筛选特征波段的基础上, 还采用间隔偏最小二乘法对最佳建模波段进行了筛选。通过一系列数据处理分析, 结果表明采用软件自动筛选波长所建的模型具有更小的 RMSEC 和更大的 R<sup>2</sup> 值, 模型的准确度更高, 所以最终确定使用

表 2 不同预处理方法的建模结果

Table 2 Results of different pretreatment methods

光谱预处理方法	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>			人参皂苷 Re			人参皂苷 Rb <sub>1</sub>		
	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD
最小-最大归一化	99.24	5.84	11.40	99.38	2.90	12.80	99.35	11.60	12.40
减去一条直线	99.32	5.52	12.10	<b>99.44</b>	<b>2.77</b>	<b>13.30</b>	99.31	11.90	12.00
多元散射校正	99.25	5.79	11.50	99.38	2.91	12.70	99.34	11.70	12.30
矢量归一化	99.24	5.83	11.50	99.38	2.90	12.70	99.33	11.70	12.20
一阶导数	99.33	5.47	12.20	99.31	3.07	12.00	99.29	12.10	11.80
一阶导数+SNV	<b>99.40</b>	<b>5.18</b>	<b>12.90</b>	99.33	3.03	12.20	<b>99.41</b>	<b>11.00</b>	<b>13.00</b>
一阶导数+MSC	99.30	5.59	12.00	99.30	3.10	11.90	99.32	11.90	12.10
一阶导数+减去一条直线	99.11	6.30	10.60	99.33	3.02	12.20	99.25	12.40	11.50

表 3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 建模最优波段

Table 3 Optimal spectral regions of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub>

指标成分	波段范围/cm <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	RMSECV
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	9 403.7~7 498.3、6 102~5 446.3	99.40	5.18
人参皂苷 Re	9 403.7~7 498.3、6 102~5 446.3	99.44	2.77
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	5 774.1~5 446.3	99.41	11.00

表 4 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 定量模型参数

Table 4 Optimal modeling parameters of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re and Rb<sub>1</sub>

指标成分	最佳预处理方法	最佳谱区/cm <sup>-1</sup>	最佳主因子数	R <sup>2</sup>	RMSECV
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	一阶导数+SNV	9 403.7~7 498.3、6 102~5 446.3	7	99.40	5.18
人参皂苷 Re	减去一条直线	9 403.7~7 498.3、6 102~5 446.3	9	99.44	2.77
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	一阶导数+SNV	5 774.1~5 446.3	9	99.41	11.00

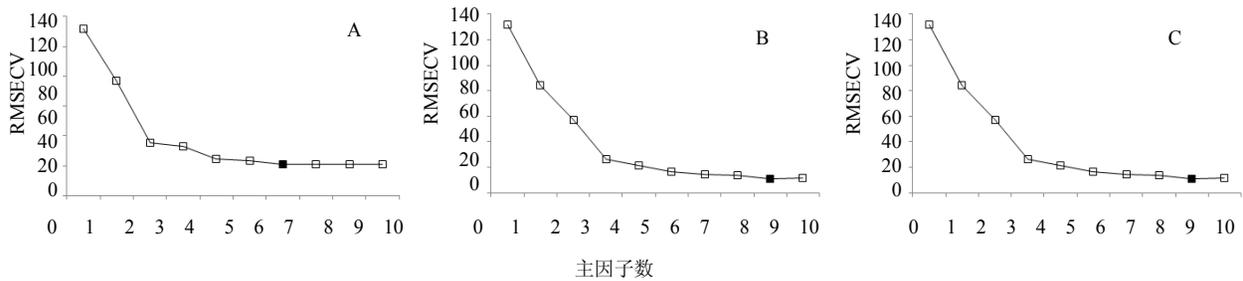


图 4 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (A)、Re (B)、Rb<sub>1</sub> (C) 的主因子数与 RMSECV 关系图

Fig. 4 Diagram of main factor and RMSECV of ginsenoside Rg<sub>1</sub>(A), Re(B) and Rb<sub>1</sub>(C)

OPUS 软件优选建模特征波段。

### 4.3 模型的更新

定量模型是近红外光谱技术在线分析的关键，模型的精确度直接影响分析结果的优劣。在模型应用于实际生产的过程中，为保证模型的持续有效，需要定期对模型进行维护和更新。本实验由于时间的限制，仅初步探讨了所建模型在实际生产过程中

的应用，在模型的后续使用过程中，可以进行更深入的探讨与研究，以不断更新。

红参提取工艺环节流程较长，生产过程中不稳定因素多，很难通过对个别变量的单独控制来实现提高产品质量的目的。目前在生产过程中缺乏有效的在线检测手段，无法即时反馈过程数据，对生产过程进行调控。本实验将近红外光谱分析技术用于

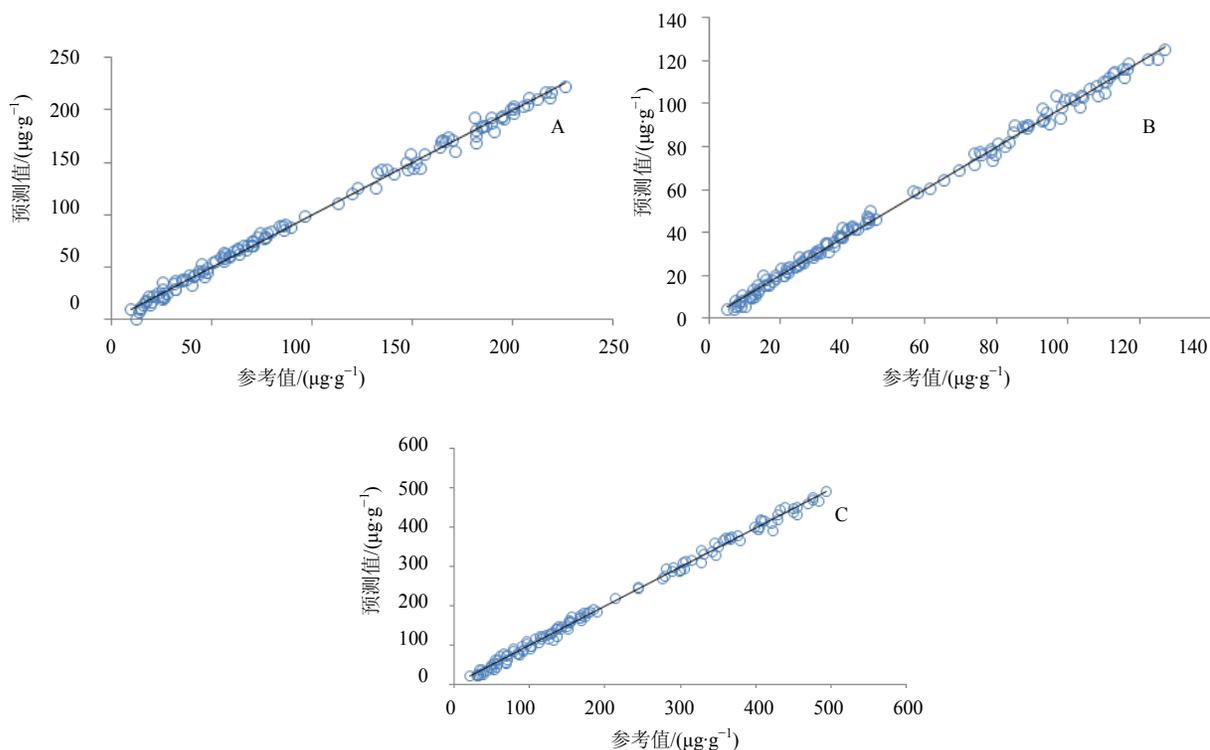


图 5 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (A)、Re (B)、Rb<sub>1</sub> (C) 的 NIR 预测值与参考值相关图

Fig. 5 Relationship figure between predicted value and measured value in calibration set of ginsenoside Rg<sub>1</sub>(A), Re(B) and Rb<sub>1</sub>(C)

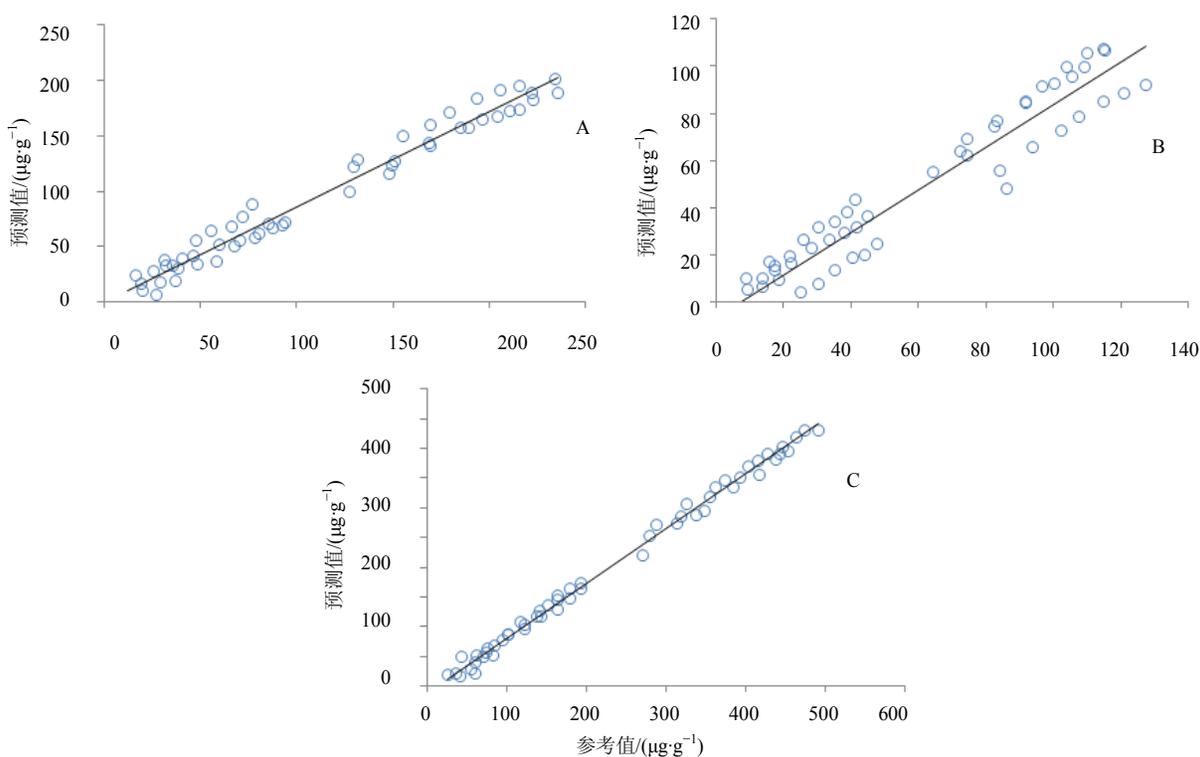


图 6 提取过程人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (A)、Re (B)、Rb<sub>1</sub> (C) 预测值与参考值相关图

Fig. 6 Relationship figure between predicted value and measured value in extraction process of ginsenoside Rg<sub>1</sub>(A), Re(B) and Rb<sub>1</sub>(C)

红参醇提的工业化生产, 基于偏最小二乘算法建立了醇提过程中3种人参皂苷  $Rg_1$ 、 $Re$  和  $Rb_1$  含量的快速测定方法, 通过 OPUS 分析软件对光谱预处理方法和建模波段进行优选, 排除了噪音和冗余信息的干扰, 提高了模型的稳健性和预测性, 可准确、无损地对红参醇提过程中3种人参皂苷实时快速测定, 进而实现对红参醇提过程的在线质量监测, 提高了生产效率和产品质量, 同时为近红外光谱技术应用用于其他中药生产过程的在线监测提供依据。这种与生产工艺紧密结合的技术改进会给企业带来直接的经济效益, 也是企业科研的主攻方向。

#### 参考文献

- [1] 刘伟爽, 王保和. 益气复脉注射剂临床研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(1): 194-196.
- [2] 李晓阳, 杨志欣. 注射用益气复脉(冻干)研究概况 [J]. 黑龙江科技信息, 2016(6): 79.
- [3] 何珊珊, 岳洪水, 宋丽丽, 等. 注射用益气复脉(冻干)HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 390-393.
- [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] 褚小立, 陆婉珍. 近5年我国近红外光谱分析技术研究与应用进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2595-2605.
- [6] 张捷, 侯义宏, 畅晓晖, 等. 基于近红外免疫层析技术的食源性副溶血弧菌快速检测方法研究 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(5): 282-287.
- [7] Baughman E. Process Analytical Technology [M]. Oxford: Blackwell, 2005: 1-12.
- [8] De Bleye C, Chavez P F, Mantanus J, et al. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 69: 125-132.
- [9] 聂黎行, 张焯, 胡晓茹, 等. 近红外光谱法结合模式识别技术快速无损鉴别天然牛黄、体外培育牛黄和人工牛黄 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1897-1903.
- [10] 臧鹏, 陈斌, 严衍禄. 短波近红外光谱法测定葛根中总异黄酮含量 [J]. 时珍国医国药, 2007(11): 2614-2615.
- [11] 王永香, 郑伟然, 米慧娟, 等. 热毒宁注射液青蒿金银花浓缩过程近红外快速定量检测方法的建立 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 102-108.
- [12] Wu Y, Jin Y, Li Y, et al. NIR spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for on-line and real-time monitoring of an extraction process [J]. Vibrat Spectro, 2012(58): 109-118.
- [13] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中9种成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3537-3544.