

近红外透反射光谱法用于复方苦参注射液渗漉过程在线检测

陈晨¹, 李文龙¹, 瞿海斌^{1*}, 王旭文², 王瑞珍²

1. 浙江大学 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

2. 山西振东制药股份有限公司, 山西 长治 047100

摘要: **目的** 利用近红外透反射光谱技术, 对复方苦参注射液渗漉液中多组分的量进行快速测定。**方法** 采用氧化槐果碱、氧化苦参碱的 HPLC 测定值, 总糖的苯酚-硫酸法测定值及固体总量的烘烤法测定值为对照值, 用偏最小二乘法建立近红外光谱与对照值之间的校正模型, 并对未知样品进行定量预测。**结果** 校正模型对氧化槐果碱、氧化苦参碱、总糖和固体总量 4 种组分的交叉验证均方根误差分别为 43.5、135.4、1 255.7 mg/L 和 150.7 mg/mL, 相关系数分别为 0.926 6、0.954 6、0.953 9 和 0.974 1。经外部验证, 预测均方根误差分别为 32.5、191.7、1 461.9 mg/L 和 164.0 mg/mL。**结论** 本方法方便、准确、可靠, 可用于中药渗漉过程的快速分析。

关键词: 近红外透反射光谱; 复方苦参注射液; 渗漉; 快速分析; 氧化槐果碱; 氧化苦参碱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)01-0047-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.010

Online control of percolation of Fufang Kushen Injection using near infrared transreflective spectroscopy

CHEN Chen¹, LI Wen-long¹, QU Hai-bin¹, WANG Xu-wen², WANG Rui-zhen²

1. Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Shanxi Zhendong Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 047100, China

Abstract: **Objective** To develop a fast analytical method for determining the multiple components in the percolation of Fufang Kushen Injection with near infrared transreflective spectroscopy. **Methods** The contents of oxysophocarpine and oxymalrine by HPLC, total sugar by phenol-sulfuric acid method, and total solids by baking method were used as reference values. Multivariate calibration models based on PLS algorithm were developed to correlate the near infrared spectroscopy and the corresponding values, and the unknown samples were quantitatively determined. **Results** The root mean square errors of cross-validation in calibration model for oxysophocarpine, oxymalrine, total sugar, and total solids were 43.5, 135.4, 1 255.7 mg/L, and 150.7 mg/mL, respectively, and the correlation coefficients were 0.926 6, 0.954 6, 0.953 9, and 0.974 1, respectively. External validation with external samples indicated that the root mean square errors of prediction were 32.5, 191.7, 1 461.9 mg/L, and 164.0 mg/mL, respectively. **Conclusion** The presented method is fast, accurate, and reliable, which could be used as a process analyzing method for the percolation process of Chinese materia medica.

Key words: near infrared transreflective spectroscopy; Fufang Kushen Injection; percolation; rapid analysis; oxysophocarpine; oxymalrine

在生产过程中引入过程分析技术是中药产业发展的主要方向, 其发展的前提是建立一种快速有效的分析方法。由于中药成分复杂, 难以进行快速测定, 导致目前很多中药生产环节仍然缺乏有效的过程分析方法, 无法实时监控生产过程中指标成分量

的变化, 进而使产品批次间的质量差异较大。因此, 研究适用于中药生产过程的快速分析方法, 将有助于实现中药生产过程的在线检测与实时控制, 对于推进中药产业技术创新和提高产品质量具有重要的现实意义。

收稿日期: 2012-04-20

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2008ZX09202-009)

作者简介: 陈晨 (1987—), 女, 湖北竹山人, 硕士, 研究方向为中药制药过程分析技术。Tel: 15972079162 E-mail: cenzi1987@163.com

*通信作者 瞿海斌 Tel: (0571)88208428 13958089718 E-mail: quhb@zju.edu.cn

网络出版时间: 2012-11-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121117.1459.008.html>

复方苦参注射液是由苦参和白土茯苓精制而成的纯中药制剂,渗漉是其生产过程中的重要提取环节,生产数据表明,药材中70%的有效成分在此过程中被提取出来。常规的分析方法是从罐底取样后进行HPLC测定,操作繁琐,分析周期长并且样品前处理复杂。因此,迫切需要研究一种快速有效的过程分析新方法。近红外光谱(near infrared spectroscopy, NIRS)技术是绿色、快速、非破坏性的检测分析技术^[1],已在制药领域广泛应用^[2-6]。透反射附件光纤探头可以同时获取透射和反射光的信息,采集的NIRS包含的信息更全面,因此广泛用于液体样品的检测^[7-8]。此外,通过光纤探头,可以方便地实现远距离分析、定位分析,尤其适用于生产过程的在线监测^[9]。

本实验将近红外透反射光谱技术应用于复方苦参注射液渗漉过程的快速分析,在渗漉过程中连续取样和分析,采用偏最小二乘法(partial least squares, PLS)^[10]建立了渗漉液主要成分的NIRS定量校正模型,可同时测定渗漉液中多种成分的量,为中药渗漉过程的实时快速监测提供了一种可靠的分析方法。

1 仪器与材料

Antaris 傅里叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Fisher),配有光纤采样系统、光谱采集软件 Result 和数据分析软件 TQ Analyst; 数据处理软件 Unscrambler 8.0; 长度2 m的石英光导纤维透射式探头(美国 Ocean Optics); 恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies),配有 G1311A 四元梯度泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱,

G1315B 二极管阵列检测器, LC ChemStation; 手提式粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司)。

色谱纯乙腈(德国默克); 磷酸、浓硫酸(衡州巨化); 超纯水(Millipore); 冰醋酸(江苏强盛化工); 苯酚(Bio Basic Inc. BBI); 戊烷磺酸钠(J&K Chemical); 氧化槐果碱对照品(批号 200301, 质量分数98.0%以上, 中国食品药品检定研究院); 氧化苦参碱对照品(批号 H0081, 质量分数98.0%以上, 上海融禾医药科技有限公司)。苦参 *Sophora Flavescentis Radix* (批号 20090327、20101004、20090512、20090604、20101123)和白土茯苓 *Smilacis Glabrae Rhizoma* (批号 20090425、20090428、20090813、20091004、20100306)由山西振东制药股份有限公司提供,由浙江大学药物信息研究所陈柳蓉副教授鉴定,分别为豆科苦参属植物苦参 *Sophora flavescentis* Ait. 的干燥根和百合科菝葜属植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 样品收集

模拟实际的生产工艺,取一定量的苦参和白土茯苓药材粉碎为粗粉,分别称取苦参粗粉70 g和白土茯苓粗粉30 g,加1 200 mL 1%醋酸-水溶液浸泡24 h后,将药粉装入渗漉装置中,压实,开始渗漉。漉液为600 mL 1%醋酸水溶液,渗漉时间约持续24 h,体积流量0.48 mL/min。在渗漉过程中每隔约1 h取样1次。对5次渗漉过程进行取样,共收集到120个样本。将前4次渗漉得到的样品组成校正集,第5次渗漉得到的样品组成验证集。采用TQ软件中的Dixon 检验法和杠杆值与残差t 检验准则剔除部分异常样品后,校正集和验证集的组成见表1。

表1 校正集和验证集样本组成

Table 1 Sample composition of calibration and validation sets

指 标	氧化槐果碱 / (mg·L ⁻¹)	氧化苦参碱 / (mg·L ⁻¹)	总糖 / (g·L ⁻¹)	固体总量 / (g·L ⁻¹)
校正集样本	11.3~522.4	11.6~1 948.9	0.622 4~15.620 4	95.0~2 660.0
验证集样本	205.5~436.6	362.5~1 197.9	0.516 9~13.104 3	127.5~2 215.0
校正集样本数	99	99	99	100
验证集样本数	16	16	13	20

2.2 样品定量测定

2.2.1 生物碱 HPLC 定量测定 色谱条件^[11]: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为0.04%磷酸-10 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~35 min, 3%~7% B;

35~50 min, 7% B; 50~60 min, 7%~10% B; 60~70 min, 10% B; 体积流量1.2 mL/min, 柱温30 ℃, 检测波长210 nm, 进样量5 μL。

对照品溶液制备: 精密称取氧化槐果碱和氧化苦参碱对照品适量, 加50%甲醇制成分别含氧化槐

果碱 2.002 g/L 和氧化苦参碱 5.414 g/L 对照品溶液。

供试品溶液制备:将收集到的渗漉液样品离心,取上清液备用。

方法学考察:对 HPLC 进行系统的方法学考察,结果氧化槐果碱线性范围 10.25~640.6 mg/L, 回归方程 $Y=8\,030 X+14.83$, $r^2=0.999\,9$; 精密度 RSD 为 0.22% ($n=6$), 重复性 RSD 为 0.40% ($n=6$), 稳定性 RSD 为 0.49% ($n=5$), 加样回收率为 101.9%, RSD 为 0.79% ($n=6$); 氧化苦参碱线性范围 25.99~1 624 mg/L, 回归方程 $Y=6\,416 X+38.78$, $r^2=0.999\,9$; 精密度 RSD 为 0.66% ($n=6$), 重复性 RSD 为 0.43% ($n=6$), 稳定性 RSD 为 0.36% ($n=5$), 加样回收率为 102.2%, RSD 为 0.77% ($n=6$)。可知建立的生物碱定量测定方法符合定量分析的要求, 具有较高的准确性。

2.2.2 总糖的测定 总糖的测定参照文献方法^[12]:精密称取 0.25 g 无水葡萄糖, 置 50 mL 量瓶中, 纯水定容, 摇匀备用。分别精密量取 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL 葡萄糖溶液置 25 mL 量瓶中, 配制成一系列质量浓度的葡萄糖溶液。精密量取葡萄糖溶液 1 mL 置具塞锥形瓶中, 加入 1 mg/g 的苯酚溶液 1 mL。在磁力搅拌下沿瓶壁缓缓加入 10 mL 浓硫酸。硫酸加完后再搅拌 2 min, 之后静置 1 h, 在 490 nm 处测定紫外吸光度 (A) 值, 以 A 值对质量浓度进行线性回归, 得回归方程。

精密量取渗漉液样品 1 mL 置具塞锥形瓶中, 照回归方程的制备方法, 自“加入质量浓度为 1 mg/g 的苯酚溶液 1 mL”起, 依法测定 A 值, 代入回归方程计算样品中总糖的质量浓度。

2.2.3 固体总量测定 固体总量测定参照《中国药典》2010 年版方法^[13]:精密量取一定体积渗漉液样品于干燥至恒定质量的玻璃称量瓶中, 置烤箱中于 105 °C 烘至恒定质量, 按下式计算。

$$C_x=100 W / V$$

C_x 为供渗漉液样品的固体总量 (g/mL), W 为渗漉液样品恒定后的质量 (g), V 为渗漉液样品的体积 (mL)

2.3 光谱采集

使用近红外光纤采集系统。采集光谱的相关参数:分辨率 8 cm^{-1} , 扫描次数 64 次, 增益为 4 $\times$, 扫描光谱波长范围 4 000~10 000 cm^{-1} 。采集的样品放置于西林瓶, 光谱仪的探头垂直伸入瓶中, 采用透反射的测样方式采集光谱。渗漉液样品原始 NIRS 见图 1。

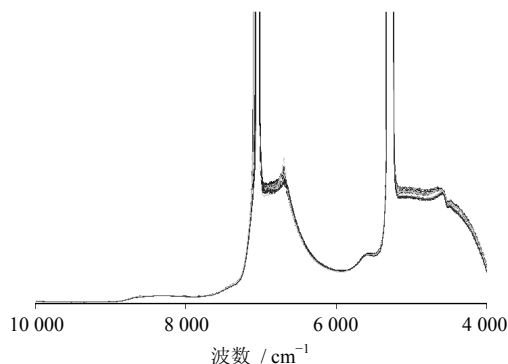


图1 渗漉液样品的 NIRS 原始光谱

Fig. 1 NIRS original spectra of percolation sample

2.4 数据处理

2.4.1 建模波段的选择 尽管 PLS 可以在全谱范围内建模, 但这样易引入过多冗余信息。对建模波段进行筛选, 不仅可以提取有效信息, 还可以提高计算速度。水分子在近红外谱区的 1 440 nm (6 941 cm^{-1}) 与 1 940 nm (5 155 cm^{-1}) 附近有较强吸收, 而其他分子在此波段处的吸收相对较弱, 因此, 对样品溶液进行近红外分析时, 需要扣除由水分子带入的吸收峰以减少干扰, 提高模型的精度。最终确定 5 388~6 572 cm^{-1} 为建模波段。

2.4.2 光谱预处理方法的选择 在近红外透反射光谱的采集过程中, 环境的微小变化 (如温度、湿度等), 随机噪声和样品背景干扰等因素都会对光谱产生影响, 导致校正结果出现偏差, 因此在对 NIRS 进行分析之前, 应对采集的原始光谱进行必要的预处理。本实验在选定的波段, 以相关系数 (correlation coefficient, R^2) 和交叉验证误差均方根 (root mean square error of cross validation, RMSECV) 为指标, 比较了不同的预处理方法对模型性能的影响, 结果见表 2。可以看出, 氧化槐果碱采用多重散射校正 (multiplicative scatter correction, MSC) 处理之后的光谱建模效果较好, 氧化苦参碱采用标准正则变换 (standard normal variate, SNV) 法处理之后的光谱建模效果较好, 而总糖和固体总量的最优光谱处理方法是 MSC 与 Savitzky-Golay 平滑滤波 (13 点 2 阶) 联合使用。

2.4.3 主成分数的确立 在采用 PLS 法建模的过程中, 选择合适的主成分数有利于充分提取有效信息, 提高模型的预测能力。主因子数过少会导致信息不全, 过多容易造成模型的过度拟合。本实验通过交叉验证法确定氧化槐果碱和氧化苦参碱模型的最佳主成分数为 3, 总糖和固体总量模型的最佳主成分

数是4。

2.4.4 校正模型建立 将所有光谱和各指标数据导入 Unscrambler 分析软件, 经过不同的光谱预处理后, 采用 PLS 方式进行计算, 建立定量校正模型,

预测值与校正值的相关图见图 2。校正模型对氧化槐果碱、氧化苦参碱、总糖和固体总量 4 种组分的 RMSECV 值分别为 43.5、135.4、1 255.7 mg/L 和 150.7 mg/mL, R^2 分别为 0.926 6、0.954 6、0.953 9、0.974 1。

表 2 不同预处理方法对 PLS 校正模型性能的影响

Table 2 Effects of different pretreatment methods on performance of PLS calibration models

预处理方法	氧化槐果碱		氧化苦参碱		总糖		固体总量	
	R^2	RMSECV	R^2	RMSECV	R^2	RMSECV	R^2	RMSECV
移动平滑	0.886 5	54.1	0.923 1	176.3	0.841 0	2.331 7	0.861 6	348.4
标准正态变换 (SNV)	0.926 4	43.6	0.954 6	135.4	0.944 0	1.383 7	0.968 8	165.3
1D ¹ +Norris ³	0.862 9	59.5	0.916 2	184.1	0.881 2	2.015 2	0.902 1	292.9
2D ² +Norris ³	0.795 1	72.7	0.851 0	245.4	0.775 8	2.768 7	0.805 5	412.9
多重散射校正 (MSC)	0.926 6	43.5	0.954 1	136.3	0.859 3	2.193 1	0.969 4	163.7
MSC+1D+Norris	0.924 4	44.1	0.953 1	137.6	0.940 7	1.424 0	0.969 6	163.1
MSC+2D+Norris	0.839 8	64.3	0.882 2	218.2	0.860 3	2.185 7	0.884 6	318.1
MSC+SG ⁴	0.920 0	45.4	0.934 9	162.2	0.953 9	1.255 7	0.974 1	150.7

1-一阶导数; 2-二阶导数; 3-Norris 平滑滤波, 段长为 9, 段间距为 5; 4-Savitzky-Golay 平滑滤波, 采用 2 次多项式 13 点平滑

1-first derivative; 2-second derivative; 3-Norris smooth filter, with segment length 9 and segment gap 5; 4-Savitzky-Golay smooth filter, using two-order polynomial and 13 points smoothing

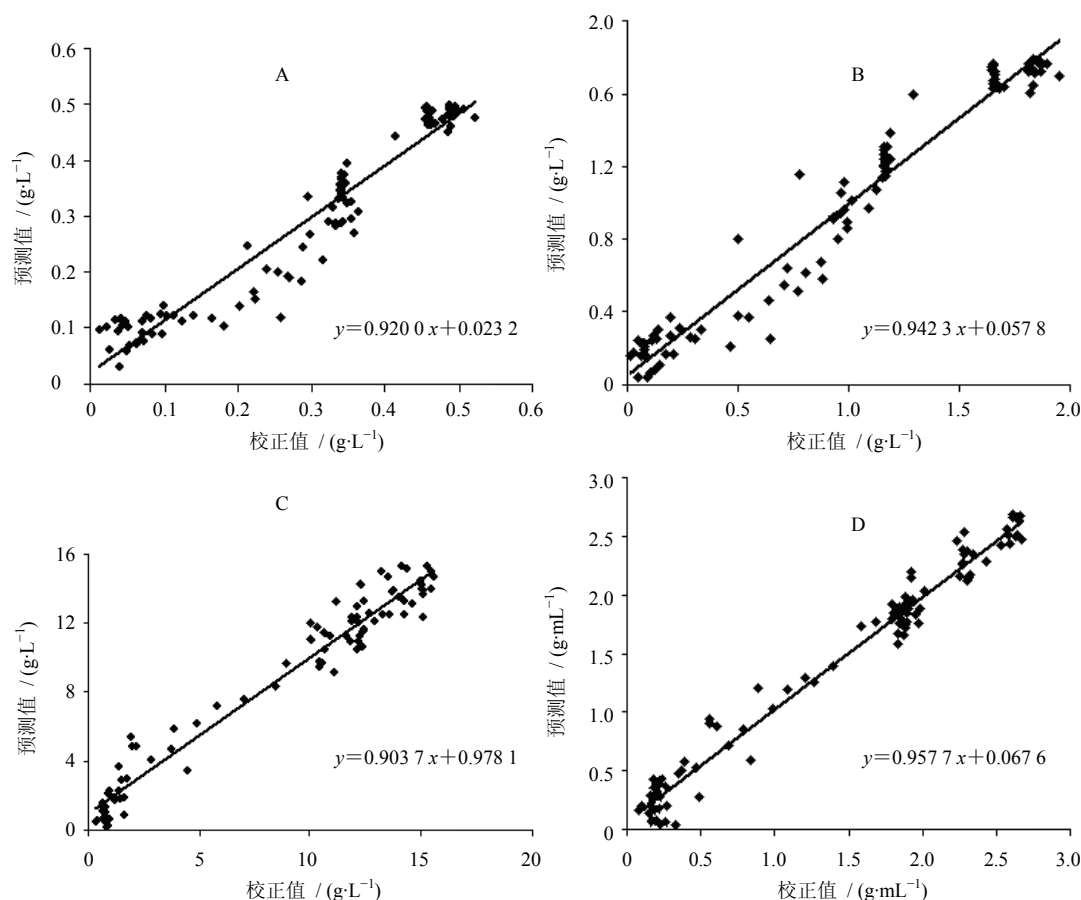


图 2 氧化槐果碱 (A)、氧化苦参碱 (B)、总糖 (C) 和固体总量 (D) 的校正集样品 NIRS 预测值与校正值之间的相关图

Fig. 2 Correlation between NIRS predicted and measured values for calibration models of oxysophocarpine (A), oxymalrine (B), total sugars (C), and total solids (D)

2.4.5 渗漉过程快速分析 将建立好的模型分别对第5次渗漉采集的样品中氧化槐果碱、氧化苦参碱、总糖质量浓度以及固体总量进行预测, 预测均方根误差 (root mean square errors of prediction, RMSEP) 值分别为 32.5、191.7、1 461.9 mg/L 和 164.0 mg/mL。NIR 预测的渗漉变化曲线见图 3, 可以看出总糖和

固体总量的预测值比较接近测定值, 而两种生物碱由于质量浓度较低因此预测偏差较大, 但仍然在实际应用要求的偏差范围之内。建立的 PLS 模型有较好的预测效果, 说明将 NIRs 分析技术用于苦参注射液渗漉过程中多种成分的快速检测是可行的。

采用本方法完成 1 次测量只需 1 min (64 次扫

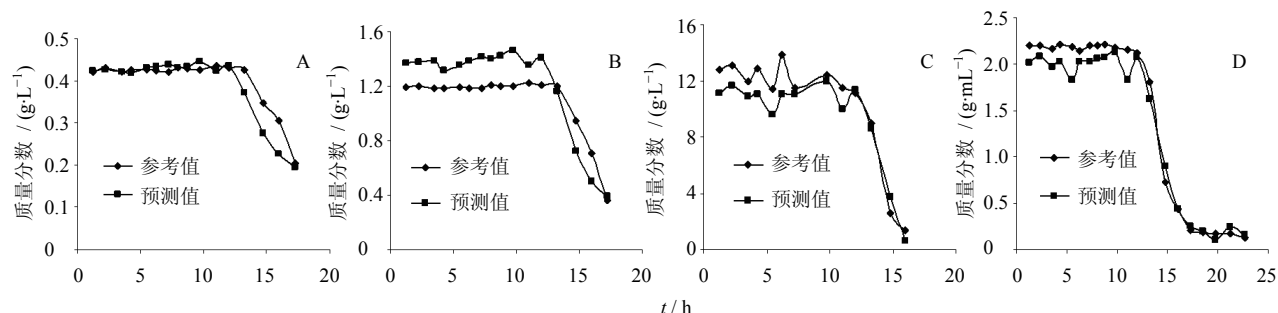


图3 NIRs 预测的渗漉过程中氧化槐果碱 (A)、氧化苦参碱 (B)、总糖 (C) 和固体总量 (D) 变化曲线

Fig. 3 Curves of oxysophocarpine (A), oxymalrine (B), total sugars (C), and total solids (D) in percolation process predicted with NIRs

描), 而 HPLC 完成 1 次测量至少需要 1.5 h, 总糖的比色法测定和固体总量的烘烤法测定耗时长且操作繁琐。因此采用 NIRs 分析技术不仅可以实现中药渗漉过程的实时监测, 而且其检测比常规方法更简便、更快速。

3 讨论

本实验将 NIRs 分析技术用于中药渗漉过程的研究, 对复方苦参注射液渗漉液中多组分的量同时进行快速测定, 效果较为满意。该方法使用透反射光纤技术, 无需样品处理, 简便、快速、无损, 弥补了常规分析方法的不足, 可推广应用于中药渗漉过程的在线分析。通过使用生产中的实际监测数据不断对模型进行完善和再校正, 将进一步提高模型在中药注射剂生产中的适用性与稳定性。

参考文献

- [1] 胡浩武, 耿 焰, 李胜华, 等. 近红外光谱技术在中药栀子渗漉液理化指标快速分析中的应用研究 [J]. 应用化工, 2011, 40(4): 725-727.
- [2] Peinado A, Hammond J, Scott A. Development, validation and transfer of a near infrared method to determine in-line the end point of a fluidized drying process for commercial production batches of an approved oral solid dose pharmaceutical product [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(1): 13-20.
- [3] Skibsted E T S, Westerhuis J A, Smilde A K, et al. Examples of NIR based real time release in tablet

manufacturing [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4): 1297-1305.

- [4] 张爱军, 戴 宁, 赵国磊. 丹参产业化提取中近红外在线检测技术的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 238-240.
- [5] 覃 锋, 杨辉华, 吕琳昂, 等. NIR 光谱结合 LLE-PLS 建模用于安神补脑液提取过程分析的研究 [J]. 中成药, 2008, 30(10): 1465-1468.
- [6] 叶华俊, 张学锋, 吴继明, 等. 新型在线近红外分析系统用于工业醋酸生产的实时监测 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(5): 1234-1237.
- [7] 李水芳, 单 杨, 朱向荣, 等. 近红外透反射光谱用于检测蜂蜜加入麦芽糖浆掺假 [J]. 食品科技, 2010, 35(12): 299-303.
- [8] 郭美兰, 孙正鹏, 张 超, 等. 近红外透反射光谱用于掺假牛奶的快速识别初探 [J]. 化学世界, 2010(5): 270-273.
- [9] 严衍禄, 赵龙莲, 韩东海, 等. 近红外光谱分析基础与应用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [10] 杨茂龙, 孙权森, 夏德深. 二维共轭正交偏最小二乘分析及图像识别应用 [J]. 计算机工程与应用, 2008, 44(29): 36-39.
- [11] 陈 晨, 瞿海斌, 郝润才, 等. 反相离子对色谱法同时测定复方苦参注射液中 4 种生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 78-81.
- [12] Gong X C, Wang S S, Qu H B. Solid-liquid equilibria of D-glucose, D-fructose and sucrose in the mixture of ethanol and water from 273.2 K to 293.2 K [J]. *Chin J Chem Eng*, 2011, 19(2): 217-222.
- [13] 中国药典 [S]. 三部. 2010.