

NIRS 法用于药物共晶质量控制的研究

刘绍光^{1,2}, 张雯雯^{1,2}, 华一卉^{1,2}, 迟宗良^{1,2}, 丛晓东^{1,2*}, 蔡宝昌¹

1. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省省级药学类工程实践教学基地, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 建立一种基于近红外光谱(NIRS)的药物共晶质量控制方法,以大黄酸赖氨酸(大赖酸)共晶为例进行研究。**方法** 采用积分球漫反射附件采集大赖酸共晶光谱,结合偏最小二乘回归(PLS)算法,建立NIRS定量分析模型,用于考察在不同环境因素以及湿法制粒过程中共晶降解状况。**结果** 大赖酸共晶校正模型的相关系数(r)、校正集均方差(RMSEC)、预测均方差(RMSEP)、交互验证均方差(RMSECV)分别为0.999 5、0.009 3、0.011 0、0.012 0。高温和光照情况下,大赖酸共晶质量分数变化(<1%)基本稳定;在高湿和制粒过程,质量分数发生了一定的变化(<3%),但变化不显著。**结论** 建立的近红外定量分析模型在质量控制方面快速、无损、简便,结果准确可靠;大赖酸共晶在不同环境因素和模拟制粒过程中能基本保持稳定。

关键词: 大黄酸赖氨酸共晶; 稳定性; 共晶质量控制; 近红外光谱; 偏最小二乘回归

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)19-2683-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.010

Study on quality control of pharmaceutical cocrystal by NIRS

LIU Shao-guang^{1,2}, ZHANG Wen-wen^{1,2}, HUA Yi-hui^{1,2}, CHI Zong-liang^{1,2}, CONG Xiao-dong^{1,2}, CAI Bao-chang¹

1. Research Center of TCM Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Provincial Pharmaceutical Engineering Practice Teaching Base in Zhejiang, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To establish a method for the quality control of pharmaceutical cocrystal based on NIRS, using rhein-lysine (lysirein) cocrystal as a case study. **Methods** Integrating sphere diffuse reflectance accessory combining partial least squares regression algorithm to establish an analytical method for the content of rhein-lysine cocrystal, and the model was used to study environmental factors, as well as wet mixing and granulating process eutectic degradation conditions. **Results** The correlation coefficients (r), root mean square error of calibration (RMSEC), root mean square error of prediction (RMSEP), and root-mean-squares error of cross-validation (RMSECV) of the proposed models were 0.999 5, 0.009 3, 0.011 0, and 0.012 0; Under high temperature and light conditions, the content of rhein-lysine cocrystal remained roughly constant (content change < 1%). Under high humidity and wet granulation process, there were some changes in cocrystal concentration, content change < 3%, but it was not significant. **Conclusion** The proposed method is fast, non-destructive, simple, and accurate; Rhein-lysine cocrystal in environmental factors and modeling granulation process remains stable.

Key words: rhein-lysine cocrystal; stability; quality control of cocrystal; NIRS; partial least squares regression method

科学研究和临床医学中, 候选药物最佳固体形态的确定对药物的疗效有举足轻重的作用, 药物共晶是一种新的固体形态, 为最佳的固体形态选择提供依据^[1], 其定义是活性药物成分(active pharmaceutical ingredient, API)和共晶形成物

(cocrystal former, CCF)在氢键或其他非共价键的作用下结合而成的晶体, 其中API和CCF室温下为固体^[2-3]。由于通过非共价键形式结合, 共晶在保存过程中会受到温度、光照、环境湿度等因素影响, 可能降解; 而制剂的湿法制粒过程中, 共晶是否会

收稿日期: 2013-05-31

基金项目: 大黄附子汤里散寒作用的物质基础研究(81073022); 浙江省中医药科技计划项目(2009CB008)

作者简介: 刘绍光(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分及质量标准研究。Tel: 18814858779 E-mail: kekunuli11@126.com

*通信作者 丛晓东 Tel: (0571)87195886 E-mail: congxiaodong19@aliyun.com

经得起水的冲击,也亟待考察。另外,共晶在液体状态下会发生解离,解离大小由解离常数 K_{sp} 决定^[4],故在液体状态下,共晶的定量测定非常困难。因此寻找一种合适方法用以共晶的定量测定及其质量控制具有十分重要的意义。

近红外光谱(NIRS)是一种快速、非破坏性的方法^[5-6],固体药物可通过积分球模式无需预处理直接测定^[7],相比其他检测技术,能在不破坏非共价键情况下进行整体测定,可能适用于共晶的定量测定。本实验以大黄酸赖氨酸共晶(简称大赖酸,lysirein,结构见图1)为例,拟通过建立NIRS通用性定量模型,研究在环境因素(高温、高湿、强光)条件下和模拟湿法制粒过程中水的影响条件下药物共晶降解情况,以探索在这些因素下共晶的稳定性状况,为大赖酸共晶原料药保存及其制剂的开发奠定一定基础。

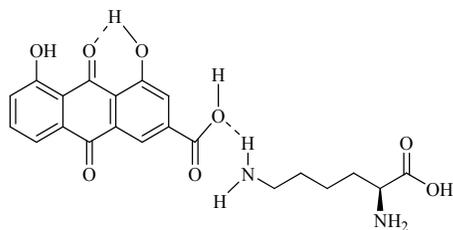


图1 大黄酸赖氨酸共晶的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of lysirein

1 仪器与材料

Antaris II型近红外光谱仪(Thermo Fisher公司)及TQ Analyst 8.0数据处理软件;DZF-6050真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);Mettler Toledo XS105DU电子分析天平(上海梅特勒托利多科技仪器有限公司),RXZ380B智能型人工气候箱(宁波江南仪器厂)。

大赖酸为本实验室自制(批号20130515,按文献方法^[8]定量检测,质量分数 $\geq 99.85\%$);大黄酸购自江阴南极星生物制品有限公司(按文献方法^[9]纯化,质量分数 $\geq 99.80\%$);赖氨酸购自南京泽朗医药科技有限公司(质量分数 $> 99.0\%$);水为超纯水,二氯甲烷、甲醇、 KNO_3 均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取大赖酸粗粉溶于55%乙醇,重结晶,滤过,于55℃减压干燥,粉碎,过80目筛,即得大赖酸样品。按1:1的化学计量比取大黄酸和赖氨酸,混

匀,得物理混合物。用电子分析天平准确称取一定量的大赖酸样品粉3份,分别加入物理混合物,使得大赖酸的质量分数分别约为100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、0%,混匀,过5号筛,即得60批次样品,编号20130515-01~20130515-60,备用。

2.2 NIRS 采集

取上述不同质量分数大赖酸样品各0.5g,装于西林瓶中,于55℃减压干燥24h,然后统一装入样品杯中,垫实,采集NIRS。采样方式:积分球漫反射,采集条件:分辨率 8 cm^{-1} ,扫描次数64次,扫描范围 $10\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,数据格式为 $\log(1/R)$,每个样品采集3张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯。

2.3 NIRS 模型建立

2.3.1 波段选择 分别取大黄酸、赖氨酸、大黄酸和赖氨酸的物理混合物和大赖酸共晶样品适量,制备NIRS漫反射光谱图。由图2可见,物理混合可以反映大黄酸和赖氨酸整个光谱特性,物理混合与大赖酸共晶在图谱划线区域($5\ 500\sim 4\ 500\text{ cm}^{-1}$)存在较大差异。推断是因为该区域是 $-\text{COOH}$ 与 $-\text{NH}$ 近红外特征区域,而二者分别是大黄酸和赖氨酸特征性基团,结合形成共晶后,由于结合位点位于 $-\text{COOH}$ 与 $-\text{NH}$ 处,振动光谱在相应位置存在差异导致。将扫描图谱及相关数据信息导入TQ Analyst 8.0分析软件,经软件优化和NIRS理论分析,确定光谱区域为 $4\ 763\sim 4\ 006\text{ cm}^{-1}$ 、 $6\ 251\sim 5\ 264\text{ cm}^{-1}$ 、 $10\ 000\sim 7\ 135\text{ cm}^{-1}$ 。

2.3.2 模型优化 从制备的60批次样品中,依据质量分数分布,随机选取50批样品为校正集,10批样品为验证集,建立偏最小二乘回归法(PLS)分析模型。然后通过标准正态变换(SNV)对光谱数据进行校正,以校正集均方差(RMSEC)、预测均方差(RMSEP)、相关系数(r)为参考,尝试用一阶导数、二阶导数、SG平滑、Norris平滑等预处理方法,进行模型优化,得到模型预处理结果,见表1。根据表1结果,一阶导数+SG平滑的处理效果最为理想,这是因为一阶导数可校正基线漂移,增加图谱分辨率,SG平滑可以很好地消除基线噪音的缘故。

通过交互验证均方差(RMSECV)和预测残差平方和(PRESS),对主因子数进行评估。当主因子

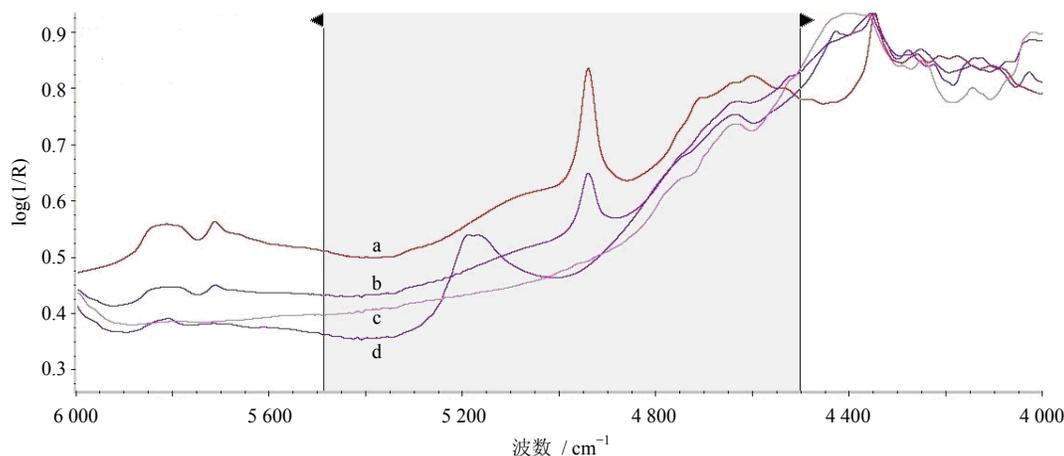


图 2 赖氨酸 (a)、大黄酸与赖氨酸 (1 : 1) 的物理混合物 (b)、大黄酸 (c) 和大赖氨酸 (d) 的 NIRS 图
Fig. 2 NIRS spectra of lysine (a), physical mixture in stoichiometry of 1 : 1 (b), rhein (c), and lysirein (d)

表 1 模型不同预处理效果的影响

Table 1 Effect of different pretreatments on model

预处理方法	<i>r</i>	RMSEC	RMSEP
原始光谱	0.999 0	0.012 4	0.099 7
原始光谱+SG 平滑	0.999 0	0.012 4	0.099 7
一阶导数	0.999 3	0.010 6	0.011 7
一阶导数+SG 平滑	0.999 5	0.009 3	0.011 0
一阶导数+Norris 平滑	0.999 0	0.012 3	0.012 9
二阶导数	0.999 1	0.011 6	0.012 5
二阶导数+SG 平滑	0.999 2	0.010 9	0.012 7
二阶导数+Norris 平滑	0.999 3	0.010 2	0.010 0

数选择 3 个时, PRESS 值和 RMSECV 处于最小, RMSECV 为 0.012 0, 且不会处于过拟合状态。综上所述, 最终决定选择一阶导数+SG 平滑和主因子数为 3 为最优模型组。定量模型见图 3。

2.4 NIRS 模型验证

2.4.1 精密度考察 随机选取其中 1 批次样品 (批号 20130515-55) 重复测量 6 次 NIRS, 用建立的大赖氨酸定量分析模型计算得到大赖氨酸的量, 考察方法的精密度, 结果其 RSD 为 0.90%。

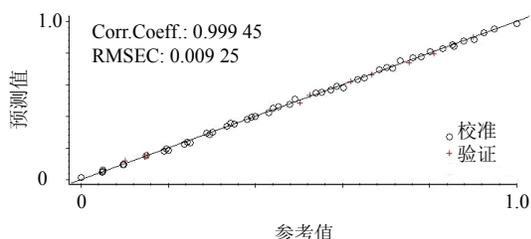


图 3 大赖氨酸 NIRS 预测值与参考值之间的相关图
Fig. 3 Correlation diagrams between NIRS-predicted values and reference values of lysirein

2.4.2 准确性考察 用建立的模型测定预测样品集中 10 批样品的量, 考察模型预测结果的准确性和可靠性。将预测值与实际值相比, 结果见表 2。NIRS 法的平均偏差为 0.13%, 最大偏差为 1.60%。利用 SPSS 20.0 软件, 将预测集样品的 NIRS 结果与理论结果在 95%可信区间内进行配对 *t* 检验, 实验结果与理论结果无显著性差异。

表 2 准确性考察结果

Table 2 Accuracy of established NIRS models

序号	实际值 / %	预测值 / %	偏差 / %
1	55.21	55.23	0.02
2	15.31	15.88	0.57
3	20.06	18.55	-1.51
4	24.99	23.76	-1.23
5	30.22	30.11	-0.11
6	35.09	35.16	0.07
7	40.05	40.09	0.04
8	45.35	46.49	1.14
9	50.30	48.70	-1.60
10	68.47	69.81	1.34

2.4.3 稳定性考察 随机选取其中 1 批次样品 (批号 20130515-55), 于 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 测定 NIRS, 用模型分析其中大赖氨酸的量, 考察其稳定性。结果其 RSD 为 0.96%。说明模型具有良好稳定性。

以上结果表明, NIRS 结合 PLS 建立的大赖氨酸定量分析模型, 精密度、稳定性、准确性符合要求, 可应用于大赖氨酸质量控制过程, 实现大赖氨酸的快速、在线检测。

2.5 模型的应用

2.5.1 高温实验 精密称取大赖酸粉末(过 80 目筛) 10 份, 每份各 0.4 g, 放置于西林瓶中(厚度 \leq 10 mm), 加塞, 置密封洁净容器中, 在 60 °C 条件下放置 10 d, 分别于 0、1、3、5、10 d 取样, 放置干燥器中, 待降至室温后, 扫描光谱, 调用建立的大赖酸定量分析模型, 计算样品中大赖酸的量, 所得结果见表 3。

2.5.2 高湿实验 精密称取大赖酸粉末(过 80 目筛) 10 份, 每份各 0.4 g, 放置于西林瓶中(厚度 \leq 10 mm), 置恒湿密闭容器中, 于 25 °C、相对湿度(90 \pm 5)%条件下放置 10 d, 分别于 0、1、3、5、10 d 取样, 60 °C 减压干燥 2 h, 放置干燥器中, 待降至室温后, 扫描光谱, 调用建立的大赖酸定量分析模型, 计算样品中大赖酸的量, 结果见表 4。

表 3 高温实验结果

Table 3 Results of high temperature test

放置时间 / d	与初始量比值 / %		平均值 / %
0	—	—	—
1	99.89	100.80	100.35
3	99.84	99.84	99.84
5	98.75	100.00	99.37
10	99.77	99.46	99.61

表 4 高湿实验结果

Table 4 Results of humidity test

放置时间 / d	与初始量比值 / %		平均值 / %
0	—	—	—
1	100.00	100.00	100.00
3	99.54	99.96	99.75
5	96.91	98.86	97.89
10	97.39	97.29	97.34

2.5.3 光照实验 精密称取大赖酸粉末(过 80 目筛) 10 份, 每份各 0.4 g, 放置于西林瓶中(厚度 \leq 10 mm), 加塞, 置人工气候箱内, 于照度(4 500 \pm 500) lx 条件下放置 10 d, 分别于 0、1、3、5、10 d 取样; 扫描光谱, 调用建立的大赖酸定量分析模型, 计算样品中大赖酸的量, 结果见表 5。

2.5.4 模拟湿法制粒条件 取适量样品粉末(过 80 目筛), 置于蒸发皿中, 加水, 搅拌, 至符合“轻握成团、轻触即散”的标准, 称质量, 计算其含水量为 25%, 作为制粒时的液体黏合剂的加入量。

精密称取大赖酸粉末(批号 20130515, 过 80 目筛) 10 份, 每份各 0.2 g, 精密量取水适量加入其中(含水量约 25%), 搅拌至成小颗粒, 加塞, 干燥器中避光放置, 分别于 0、0.5、1、2、4 h 取样; 样品于 60 °C 减压干燥 2 h, 干燥器中放置, 降至室温后, 扫描光谱, 调用建立的大赖酸定量分析模型, 计算样品中大赖酸的量, 结果见表 6。

表 5 光照实验结果

Table 5 Results of light test

放置时间 / d	与初始量比值 / %		平均值 / %
0	—	—	—
1	100.15	100.64	100.39
3	99.84	98.86	99.35
5	99.80	99.79	99.80
10	99.38	98.83	99.10

表 6 湿法制粒结果

Table 6 Wet granulation results

放置时间 / h	质量分数 / %		平均值 / %
0	99.09	98.77	98.93
0.5	99.52	99.76	99.64
1	98.64	99.76	99.20
2	98.69	98.69	98.69
4	98.25	99.32	98.79

用建立的大赖酸 NIRS 定量分析模型考察了高温、高湿、光照以及以水为黏合剂制粒过程中大赖酸的量变化。结果表明, 高温和光照情况下, 大赖酸的量基本稳定, 质量分数变化 $<$ 1%, 在高湿和制粒过程, 可能由于水的参与, 质量分数发生了一定的变化, 但并不显著, 质量分数变化 $<$ 3%。可见大赖酸共晶在环境因素和模拟湿法制粒过程中基本能保持稳定。

3 讨论

研发共晶的主要目的是通过新晶体的形成而调整药物理化性质, 从而获得知识产权保护, 延长原有药物的市场周期^[10]。近几年国内外均有共晶文献报道^[11-14], 但均没有涉及共晶的质量控制方面。由于同一物质内, 分子空间排列和相互间作用(氢键的作用尤为重要)的差异, 会使分子的振动-转动能级发生变化, 导致振动光谱的峰形、峰高和峰强等产生差异^[15], 利用这些差异, 可通过光谱学方法对共晶进行定量检测。

本课题组前期制备2种新共晶,分别是大黄酸精氨酸(简称大精酸, argirein)和大赖酸,其活性成分均为大黄酸,该类共晶对糖尿病肾病、糖尿病心肌病、糖尿病睾丸病等糖尿病并发症均有较好的疗效,其分子药理学作用靶点分别为内质网应激(ERS)^[16-18]、NADPH氧化酶^[19]和长寿基因(p66shc)^[20-21]。

本研究以大赖酸共晶为研究对象,结合PLS建立了大赖酸固体样品NIRS定量检测模型,模型的趋势预测效果良好。结合模型又进一步研究了该共晶在环境因素和湿法制粒过程中可能产生的降解情况,结果提示,此类共晶可以耐受环境及湿法制粒过程带来的不利影响。但由于条件受限,操作过程中未对可能发生晶型转化带来的影响有待考察和深入研究。

参考文献

- [1] 李润妍,丛海峰,毛会林,等.卡马西平-糖精共晶的制备与分析研究[J].中国科技论文在线精品论文,2011,4(7):667-672.
- [2] Qiao N, Li M, Schlindwein W, et al. Pharmaceutical cocrystals: An overview [J]. *Int J Pharm*, 2011, 419(1/2): 1-11.
- [3] Zhang G C, Lin H L, Lin S Y. Thermal analysis and FTIR spectral curve-fitting investigation of formation mechanism and stability of indomethacin-saccharin cocrystals via solid-state grinding process [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66: 162-169.
- [4] Gao Y, Zu H, Zhang J. Enhanced dissolution and stability of adefovir dipivoxil by cocrystal formation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(4): 483-490.
- [5] Li W, Qu H. Rapid quantification of phenolic acids in *Radix Salvia Miltorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transfective mode [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(4): 425-431.
- [6] 白新涛,霍宝军,张博,等.近红外光谱法快速检测黄芪注射液中黄芪甲苷和总固体量[J].中草药,2012,43(11):2189-2193.
- [7] Li X, Fang D, Cong X, et al. Application of fourier transform near-infrared spectroscopy combined with high-performance liquid chromatography in rapid and simultaneous determination of essential components in crude radix scrophulariae [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2012, 13(4): 1428-1435.
- [8] Chi Z L, Wang M M, Lin Y, et al. Fourier transform near-infrared spectroscopy used for purity determination of rhein-L-arginine cocrystal (argirein) [J]. *Anal Sci*, 2013, 29(6): 661-664.
- [9] 华一卉,单琪媛,丛晓东,等.共晶法在天然植物成分的提取纯化中的应用——以大黄酸为例[J].中华中医药学刊,2013,31(4):727-730.
- [10] 马坤.药物共晶的筛选技术及热力学研究进展[J].药学进展,2010,34(12):529-534.
- [11] 闻聪,金方.药物共晶在药学中的应用[J].中国新药杂志,2007,16(15):1167-1171.
- [12] 陈嘉媚,吴传斌,鲁统部.超分子化学在药物共晶中的应用[J].高等学校化学学报,2011,32(9):1996-2009.
- [13] Luu V, Jona J, Stanton M K, et al. High-throughput 96-well solvent mediated sonic blending synthesis and on-plate solid/solution stability characterization of pharmaceutical cocrystals [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 356-364.
- [14] Patel J R, Carlton R A, Needham T E, et al. Preparation, structural analysis, and properties of tenoxicam cocrystals [J]. *Int J Pharm*, 2012, 436(1/2): 685-706.
- [15] 马乐伟,杜葳,赵春顺.药物晶型定量分析方法的研究进展[J].药科学报,2011,46(8):896-903.
- [16] Shi F H, Wu Y, Dai D Z, et al. Hepatosteatosis and hepatic insulin resistance are blunted by argirein, an anti-inflammatory agent, through normalizing endoplasmic reticulum stress and apoptosis in diabetic liver [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(6): 916-927.
- [17] Shi F H, Cheng Y S, Dai D Z, et al. Depressed calcium-handling proteins due to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the diabetic heart are attenuated by argirein [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013, 386(6): 521-531.
- [18] Cong X D, Ding M J, Dai D Z, et al. ER stress, p66shc, and p-Akt/Akt mediate adjuvant-induced inflammation, which is blunted by argirein, a supermolecule and rhein in rats [J]. *Inflammation*, 2012, 35(3): 1031-1040.
- [19] Hu C, Cong X D, Dai D Z, et al. Argirein alleviates diabetic nephropathy through attenuating NADPH oxidase, Cx43, and PERK in renal tissue [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2011, 383(3): 309-319.
- [20] Cheng Y S, Cong X D, Dai D Z, et al. Argirein alleviates corpus cavernosum dysfunction by suppressing pro-inflammatory factors p66Shc and ER stress chaperone Bip in diabetic rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(1): 94-101.
- [21] Cong X D, Wu Y, Dai D Z, et al. Activation of AQP4, p66Shc and endoplasmic reticulum stress is involved in inflammation by carrageenan and is suppressed by argirein, a derivative of rhein [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(8): 1138-1145.