

热毒宁注射液金银花和青蒿（金青）醇沉过程中多指标的近红外快速检测

杜文俊¹, 刘雪松^{1*}, 陶玲艳¹, 金叶¹, 陈勇¹, 吴莎², 吴建雄^{3,4}, 毕宇安^{3,4}, 萧伟^{3,4*}

1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058

2. 北京中医药大学, 北京 100029

3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

4. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 应用近红外光谱(NIR)透射法对热毒宁注射液大生产中金银花和青蒿(金青, LA)醇沉过程绿原酸(chlorogenic acid, CA)质量浓度和固含量进行快速检测, 提高醇沉过程质量控制水平。方法 制备金青醇沉过程样品, 以 HPLC 法和烘干法为对照分析方法, 分别测定 CA 质量浓度和固含量, 运用偏最小二乘(PLS)法分别建立 NIR 光谱与 CA 质量浓度和固含量之间的定量校正模型, 并对醇沉过程的未知批次中的 CA 质量浓度和固含量进行预测。结果 所建立的 CA 质量浓度和固含量模型的相关系数(R)均达到 0.980, 采用独立的验证集对模型进行验证, 验证集预测误差均方根(RMSEP)分别为 0.541 和 0.218, 相对预测偏差(RSEP)均小于 8%。结论 研究表明 NIR 分析技术可实现热毒宁注射液醇沉过程中 CA 质量浓度和固含量 2 个关键质控指标的快速检测, 结果准确可靠。

关键词: 近红外光谱; 热毒宁注射液; 金银花; 青蒿; 偏最小二乘法; 质量控制; 醇沉; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0061-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.013

Multi-indicators rapid determination in alcohol precipitation of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Artemisiae Annuae Herba* in Reduning Injection by near-infrared spectroscopy

DU Wen-jun¹, LIU Xue-song¹, TAO Ling-yan¹, JIN Ye¹, CHEN Yong¹, WU Sha², WU Jian-xiong^{3,4},
BI Yu-an^{3,4}, XIAO Wei^{3,4}

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

4. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective Near-infrared (NIR) spectroscopy was used to rapidly determine the concentration of chlorogenic acid (CA) and soluble solid content in alcohol precipitation of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Artemisiae Annuae Herba* (LA) in Reduning Injection, so as to increase the level of quality control of alcohol precipitation process. **Methods** The LA samples of alcohol precipitation were collected. The PLS algorithm was used to establish NIR models between spectra and concentration of CA and total solid content, and the concentration of CA and soluble solid content in unknown batch were predicted. **Results** The correlation coefficients (R) of NIR models were above 0.980 in calibration sets. The R of verification model was above 0.980, the root mean square error of prediction (RMSEP) for CA and soluble solid content were 0.541 and 0.218, respectively, and the relative standard errors (RSEP) for CA and soluble solid content were no more than 8%. **Conclusion** The results demonstrate that NIR could determine the concentration of CA and soluble solid content in alcohol precipitation of Reduning Injection rapidly and accurately.

Key words: near-infrared spectroscopy; Reduning Injection; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Artemisiae Annuae Herba*; partial least squares; quality control; alcohol precipitation; HPLC

收稿日期: 2014-08-12

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 杜文俊 (1990—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向为制药全程质量控制及过程分析。Tel: 15158076090 E-mail: phar2009@163.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)85522009 E-mail: wzzh-nj@163.net

刘雪松, 男, 研究员, 博士, 研究方向为制药全程质量控制及过程分析。Tel: 13958199997 E-mail: liuxuesong@zju.edu.cn

热毒宁注射液由金银花、青蒿、栀子3味药材制备而成,具有疏风解表、清热解毒的功效,用于治疗上呼吸道感染所致的高热等症^[1],为原国家二类新药。其中金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thumb. 的干燥花蕾或带初开的花,具有宣散风热、清热解毒的功效,用于各种热性病,如身热、发疹、发斑、热毒疮痈、咽喉肿痛等^[2]。青蒿为菊科蒿属植物青蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分,具有抗菌、抗病毒、解热、益气等功效^[3]。

在热毒宁注射液实际生产过程中,金银花和青蒿(金青, LA)的水提浓缩液合并后需要经过醇沉过程,除去蛋白质、鞣质、多糖等杂质,醇沉过程对金青提取液的纯化至关重要。目前,金青醇沉过程缺乏快速有效的过程技术(PAT)^[4]和质量控制方法。故对金青醇沉过程引入过程分析技术,实现醇沉过程中关键质控指标的快速检测。

近红外光谱(near-infrared, NIR)技术是目前发展最快和最具有前景的过程分析技术之一,具有样品处理简单、无损耗、分析快速、无需试剂消耗等特点,已经陆续用于化学成分的定量测定^[5-7]、制药过程的在线检测和监控^[8-9]、中药材的产地鉴别^[10-11]等。根据目前的研究进展情况来看,NIR技术是最有希望在中药生产过程中实现工业化应用的一种过程分析技术。

本研究尝试将NIR分析技术引入热毒宁注射液金青醇沉过程中,采用偏最小二乘(PLS)法建立该过程中绿原酸(chlorogenic acid, CA)质量浓度和固含量2个关键质控指标的定量校正模型,实现金青醇沉过程中CA质量浓度与固含量的快速检测,建立一种快速无损、高效便捷的醇沉过程关键质控指标的测定方法,为中药醇沉过程在线监测提供实验依据和技术保障。

1 仪器与材料

ANTARIS II 傅里叶变换近红外光谱仪,Thermo Nicolet 公司,配有液体透射检测器,2 mm 内径的石英比色皿,采样系统及 Result TQ Analyst 8.0 等数据处理软件;Dragonmed 移液枪,上海瑞亿仪器有限公司;精宏 DZF-6021 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;FA2004 电子天平,上海越平科学仪器有限公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司。

金青提取浓缩液来自江苏康缘药业股份有限公司热毒宁注射液生产车间,批号为 Z121701、Z121702、Z121703、Z122501、Z122502、Z122503;绿原酸对照品,批号 110753-200413,质量分数>98%,中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇,Tedia 公司;分析纯甲醇,南京化学试剂有限公司;分析纯冰醋酸,国药集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品收集

从热毒宁生产车间取经过冷藏静置的金青浓缩液6批,每批取1 L至醇沉罐中,在室温条件下,分别加入95%乙醇,蠕动泵体积流量设置在30 mL/min,并开启搅拌桨,搅拌速率为300 r/min,加醇过程持续80 min,使含醇量达75%。期间每5分钟取样1次,每批醇沉液收集17个样本,共收集102个样品。

2.2 NIR 采集

在室温条件下,以空气为背景,使用 Nicolet ANTARIS II 近红外光谱仪采集金青醇沉液样品的 NIR 光谱。光谱采集条件:光谱扫描范围 4 000~10 000 cm^{-1} ,扫描次数为32次,分辨率为8 cm^{-1} ,光程为2 mm 内径的石英比色皿。所得金青醇沉液的光谱图见图1。

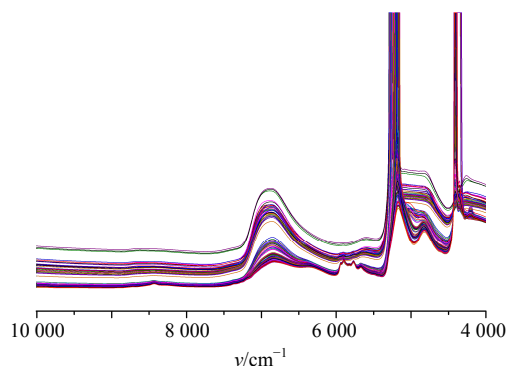


图1 金青醇沉过程原始 NIR 图

Fig. 1 Raw NIR spectra of alcohol precipitation of LA

2.3 固含量测定

固含量的测定参照《中国药典》2010年版的方法^[12]。醇沉液静置24 h,精密量取一定体积的上清液置已烘干至恒定质量的扁形瓶(2次烘干后质量差距小于5 mg,扁形瓶质量记作 X_0),称定质量,记作 X_1 ,置烘箱于105 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干至恒定质量,记作 X_2 ,按下式计算。

$$\text{固含量} = (X_2 - X_0) / (X_1 - X_0)$$

2.4 绿原酸定量测定

2.4.1 HPLC 分析色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-1% 冰醋酸水溶液 (20:80); 进样量为 10 μL; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 327 nm。

2.4.2 标准曲线绘制 准确称取 25 mg 的 CA 对照品于 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇定容至刻度, 作为储备液。用移液管分别精密吸取储备液 1 mL 置 100、50、25、10 mL 的量瓶中, 同时精密吸取储备液 2、4 mL 置 10 mL 量瓶中, 并用 50% 甲醇稀释至刻度, 得到不同质量浓度的对照品溶液, 分别进样分析。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。所得标准曲线方程为 $Y=32.48X-112.24$, $R^2=0.9999$ 。结果表明 CA 在 10.11~1 011.20 μg/mL 线性关系良好。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密吸取 1 mL 醇沉液置蒸发皿中水浴烘干后, 用少量 50% 甲醇溶解后转移至 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过即得。

2.5 模型性能评价指标

运用 Thermo Nicolet 公司的 TQ Analyst 软件中的偏最小二乘 (PLS) 法建立金青醇沉过程中的 CA 质量浓度和固含量 2 个关键质控指标的 NIR 定量分析模型, 剔除异常样本, 选择合适的建模波段, 以交互验证误差均方根 (RMSECV) 为指标, 运用留一交互验证法确定最佳 PLS 主因子数。模型对校正集样本和验证集样本的预测误差分别用校正集预测误差均方根 (RMSEC) 和验证集预测误差均方根 (RMSEP) 来考察。当模型相关系数 (R) 越接近 1, 说明模型越稳定, 分析准确度越高。当 RMSEC 和 RMSEP 较小且彼此接近时, 模型具有较高的预测能力。同时以相对预测偏差 (RSEP) 来考察模型的预测误差。

2.6 定量测定结果

6 批金青醇沉样品中 CA 质量浓度和固含量的测定结果见图 2。从图中可以看出, 金青醇沉过程中 CA 质量浓度和固含量均随着乙醇的不断加入呈下降的趋势, 且不同批次间由于蠕动泵体积流量不稳定及搅拌均匀程度的差异导致 CA 质量浓度和固含量的差别较大。故通过 NIR 等过程分析技术对金青醇沉过程关键质控指标进行在线监测, 从而及时调整工艺参数对保证不同批次醇沉液的稳定性和一致性具有重要作用。

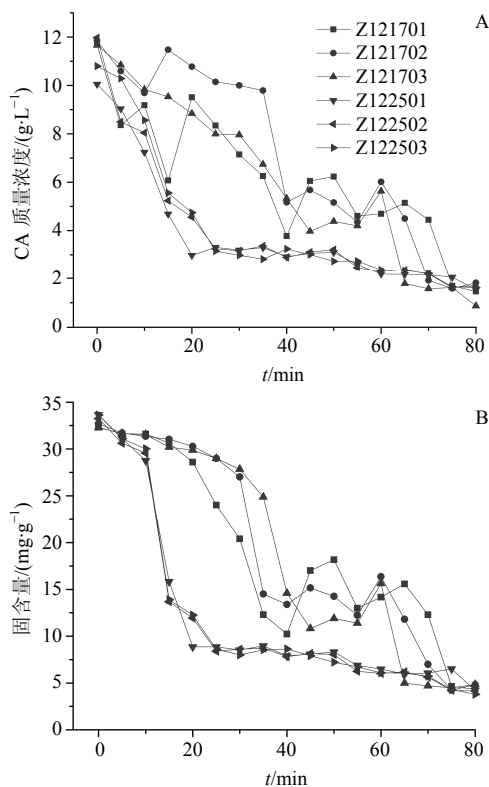


图2 金青醇沉过程中 CA 质量浓度 (A) 和固含量 (B) 变化曲线

Fig. 2 Evolution curves of concentration of CA (A) and soluble solid content (B) in alcohol precipitation of LA

2.7 NIR 建模参数优化

2.7.1 异常点剔除 在建模过程中, NIR 易受多种因素影响, 如测量环境的改变, 仪器的误差操作, 光的散射, 波长的漂移等, 均会导致异常样品的产生。异常样品 (outlier) 的存在将影响 NIR 模型的适用性和预测准确性, 必须将其从校正集中剔除。本研究分别采用样品的杠杆值 (leverage) 和学生化残差 (studentized residual) [13] 及马氏距离 (Mahalanobis distance) 判断异常样品。

光谱的马氏距离是指样本光谱与标准光谱集的平均光谱之间的距离, 采用肖维勒准则 [14] 在 95% 置信限下计算样本的马氏距离, 结果见图 3, 共有 4 个样本的马氏距离值超出了阈值, 故建模前将这 4 个样本剔除。

样品杠杆值表示样品对模型影响的重要程度, 杠杆值越接近 0 越有利于模型建立。学生化残差值表示与样品值对应的样品浓度预测能力的优劣, 若一个样品有较高的残差值, 那么说明此样品的分析区域并没有在校正集方法建立的模型内。当一个样品的杠杆值和残差值均较高时, 应视为异常样品予

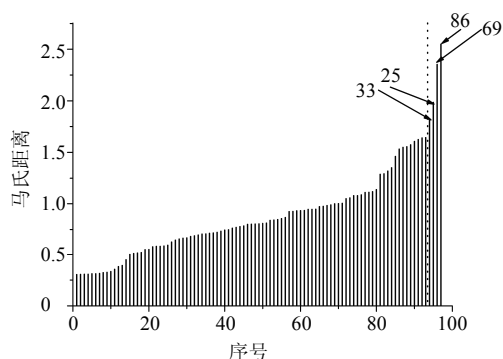


图3 马氏距离异常光谱判别

Fig. 3 Discrimination of spectral outlier by Mahalanobis distance

以剔除, 结果见图4, 对于CA质量浓度模型, 4、69、85号样本有较高的杠杆值和残差值; 而在固含量模型中, 25、69、86号样本为异常样本, 建模前将这些样本剔除。

2.7.2 光谱预处理 环境的变化(温度、湿度等)会引起光谱基线漂移, 光的散射和随机噪声等均会对光谱产生影响, 所以建模前有必要对光谱进行预处理, 以消除噪音和基线漂移的影响, 提高模型的预测精度。导数处理消除信号中含有的低频背景和常数项, 有效净化图谱信息, 放大特征吸收光谱信息, 但同时会引入噪声, 降低信噪比。而平滑处理可以降低随机噪声频率, 故两者结合可得到较好的光谱预处理结果。

本研究通过交互验证法比较了不同预处理方法对模型性能的影响, 包括一阶导数(1st)、二阶导数

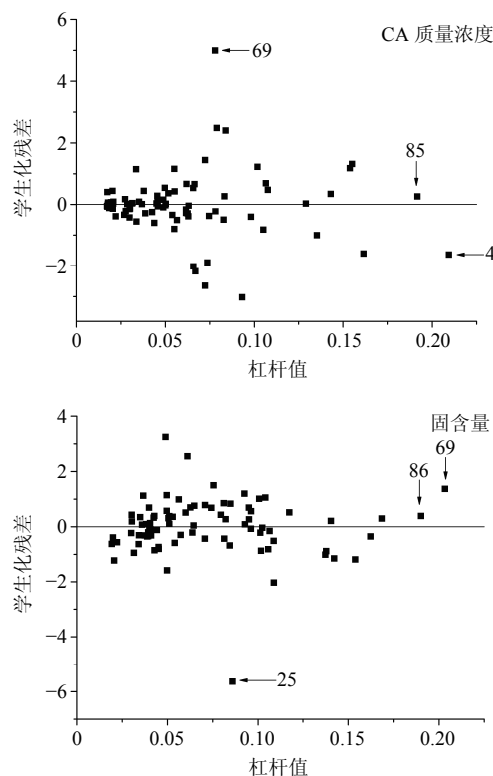


图4 样本杠杆值与学生化残差的相关关系

Fig. 4 Relationship between sample leverage and studentized residual

(2nd)、Savitzky-Golay(S-G)平滑、Karl-Norris(K-N)平滑等光谱预处理方法。不同预处理方法的建模效果见表1, 结果显示CA质量浓度和固含量建模时均选用1st和K-N平滑结合的预处理方法建模效果最优。

表1 不同光谱预处理方法对模型性能影响

Table 1 Influence of different pretreatment methods on performance of calibration model

预处理方法	CA 质量浓度			固含量		
	RMSECV	RMSEC	R	RMSECV	RMSEC	R
1 st	0.651	0.593	0.978 6	0.487	0.396	0.998 2
2 nd	0.738	0.679	0.963 2	0.593	0.484	0.997 8
1 st +S-G	0.643	0.564	0.976 9	0.395	0.335	0.998 9
1 st +K-N	0.615	0.538	0.985 4	0.378	0.305	0.999 5
2 nd +S-G	0.742	0.554	0.971 4	0.524	0.497	0.997 1
2 nd +K-N	0.735	0.542	0.981 3	0.486	0.437	0.998 4

2.7.3 波长的选择 NIR全谱信息包含噪音等冗余信息, 且不同建模指标与NIR的响应波段也有差别, 因此有必要在建模前对光谱波段进行筛选, 以改善模型性能, 提高模型运算速度和精度。从图1中可看出4 000~4 500 cm⁻¹由于光纤吸收含有较多噪

音, 不适合用于建模; 9 000~10 000 cm⁻¹波段光谱信息较少, 没有显著的特征吸收, 建模时不建议采用该波段。4 500~5 400 cm⁻¹为水分子羟基组合频峰形成的大吸收峰, 掩盖了其他物质的吸收, 也不建议采用该波段建模。

排除上述建模波段后,同时通过 1st 和 K-N 平滑处理后的光谱(图 5)可发现,样品在 5 500~6 200 cm^{-1} 和 7 100~7 300 cm^{-1} 吸光度存在较大差异。本研究通过交互验证分别考察了这 2 个波段对 CA 质量浓度和固含量校正模型性能的影响,结果见表 2。可以看出,同时采用 5 500~6 200 cm^{-1} 和 7 100~7 300 cm^{-1} 建模得到的校正模型性能较好。

2.8 定量模型的建立

运用 TQ Analyst 软件,经过异常点的剔除,光谱预处理和波段选择后以 Z121703 批次为验证集,剩余批次为校正集,运用 PLS 建立 NIR 定量校正模型。校正集样品的 NIR 预测值和实测值的相关性图见图 6,表明模型相关性较好。所得 CA 质量浓度模型和固含量模型 R 分别为 0.985 4、0.999 5,

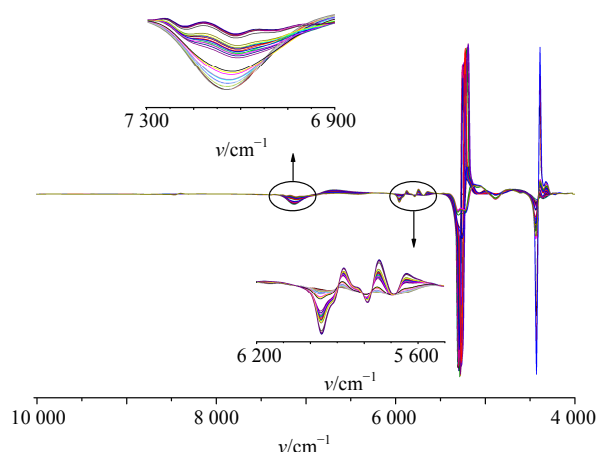


图 5 一阶导数和 K-N 平滑后光谱图

Fig. 5 Spectra pretreated by first order derivative and K-N smoothing filter

表 2 光谱波段选择对校正模型性能的影响

Table 2 Influence of NIR spectra wavelength ranges on performance of PLS models

v/cm^{-1}	CA 质量浓度			固含量		
	RMSECV	RMSEC	R	RMSECV	RMSEC	R
5 500~6 200	0.618	0.553	0.983 5	0.391	0.349	0.999 4
7 100~7 300	0.617	0.548	0.983 8	0.387	0.328	0.999 2
5 500~6 200+7 100~7 300	0.615	0.538	0.985 4	0.378	0.305	0.999 5

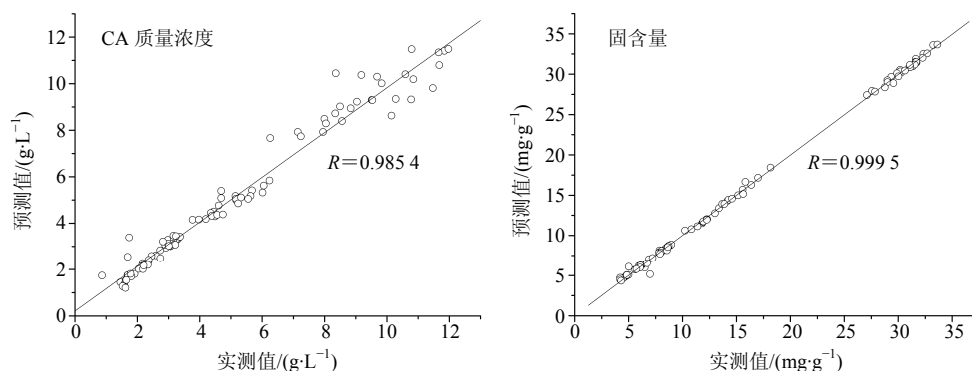


图 6 校正集样本 NIR 预测值和实测值线性相关性

Fig. 6 Correlation of NIR predicted value and measured value for calibration set

RMSEC 分别为 0.553、0.305,表明所建的 NIR 模型性能良好。

2.9 定量模型的验证

用所建立的模型对验证集(批号 Z121703)的 CA 质量浓度和固含量进行预测,模型预测结果见图 7,可见 CA 质量浓度和固含量的 NIR 预测值和实测值十分接近,且变化趋势基本一致。RMSEP 分别为 0.541、0.218,且相对预测偏差 RSEP 分别为 7.78%、1.01%,均在 8%以内,能够满足中药实

际生产过程中分析精度要求。

3 讨论

本研究建立了热毒宁注射液金青醇沉过程中 CA 质量浓度和固含量 2 个关键质控指标的 NIR 快速检测方法,所建立的 NIR 模型的 R 在 0.980 以上, RMSEC 和 RMSEP 小于 0.60,且较为接近,RESP 在 8%以内,模型性能良好,可实时监测金青醇沉过程中 CA 质量浓度和固含量的变化,同时获得生产过程关键质控数据,并及时调整工艺参数,从而

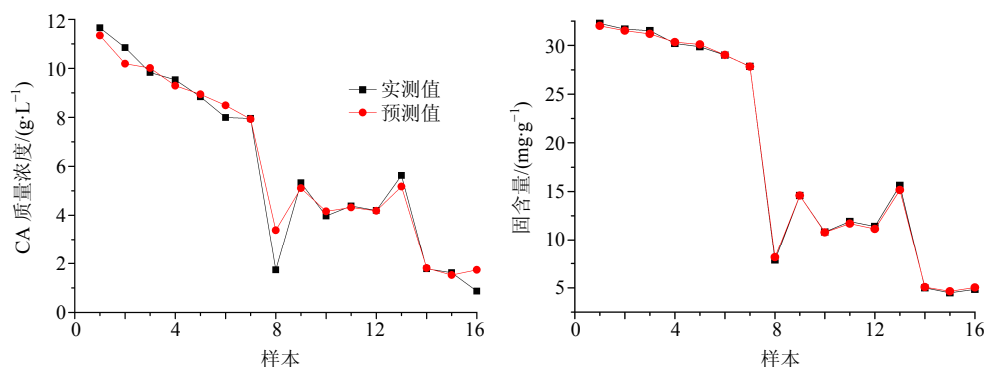


图7 验证集中CA质量浓度和固含量NIR预测值与实测值的相对趋势

Fig. 7 Relative trend of NIR predicted value and measured value of concentration CA and soluble solid content for validation set

实现生产过程质量在线检测与自动化控制。同时为NIR技术在中药制药的醇沉过程质量控制和在线检测提供新的技术支持。

参考文献

- [1] 萧伟, 凌娅, 毕宇安, 等. 热毒宁注射液的GC/MS指纹图谱[J]. 中国天然药物, 2007, 5(2): 127-129.
- [2] 刘恩荔, 李青山. 金银花的研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(3): 331-334.
- [3] 张丽勇, 林秀梅, 战月, 等. 不同方法提取青蒿挥发油成分分析及抗菌活性比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 60-63.
- [4] Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry, PAT: A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance [S/OL]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070305.pdf>. 2004.
- [5] 刘绍光, 张雯雯, 华一卉, 等. NIRS法用于药物共晶质量控制的研究[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2683-2687.
- [6] Chuang K Y, Hu Y P, Yang I C, *et al.* Integration of independent component analysis with near infrared spectroscopy for evaluation of rice freshness [J]. *J Cere Sci*, 2014, 60(1): 238-242.
- [7] 韩海帆, 张路, 张淹, 等. NIRS法快速测定复方阿胶浆中总黄酮、总皂苷和可溶性固形物[J]. 中草药, 2013, 44(17): 2397-2403.
- [8] Kona R K, Qu H B, Mattes R, *et al.* Application of in-line near infrared spectroscopy and multivariate batch modeling for process monitoring in fluid bed granulation [J]. *Int J Pharm*, 2013, 452(1/2): 63-72.
- [9] 魏惠珍, 张五萍, 毛红梅, 等. 近红外光谱法在白芍提取物纯化过程中快速质量控制研究[J]. 中草药, 2013, 44(9): 1128-1133.
- [10] Chen Y, Xie M Y, Yan Y, *et al.* Discrimination of *Ganoderma lucidum* according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 618(2): 121-130.
- [11] 司南, 杨柳, 王宏洁, 等. 近红外光谱法鉴别怀地黄药材道地性的研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 542-546.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [13] Cook R D. *Residuals And Influence In Regression* [M]. New York: Chapman and Hall, 1982.
- [14] Taylor J R. *An Introduction to Error Analysis: the Study of Uncertainties in Physical Measurements* [M]. Sausalito: University Science Books, 1997.