

· 化学与分析 ·

近红外光谱对热毒宁注射液栀子萃取过程中的可行性分析

吴莎¹, 刘启安², 吴亚男², 吴建雄², 张广仁², 毕宇安², 王振中², 彭国平³, 萧伟^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102;

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;

3. 南京中医药大学药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的: 对近红外光谱(NIR)分析技术在热毒宁注射液栀子萃取过程中可行性进行分析研究。方法: 收集7批共147个栀子萃取液样品, 扫描NIR离线光谱, 测定栀子苷含量和固含量, 应用偏最小二乘法建立定量校正模型, 并用此模型进行预测。结果: 建立的栀子苷和固含量模型校正集 R^2 分别为0.987 2, 0.994 7, RMSEC分别为1.460 9, 2.367 7, 说明所建模型性能良好。该模型对20个栀子萃取液样品进行预测, 栀子苷和固含量的 R^2 分别为0.980 7和0.986 1, RMSEP分别为1.827 5和7.307 7, RSEP分别为3.08%和5.29%均小于6%, 能够满足中药生产过程中质量控制要求。结论: 建立的近红外离线定量模型可以准确预测栀子苷含量和固含量, 证实了NIR技术在热毒宁注射液栀子萃取过程应用的可行性。

[关键词] 近红外光谱; 热毒宁注射液; 栀子; 可行性; 偏最小二乘法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0053-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010053

Feasibility Study on Use of Near-infrared Spectroscopy for Monitoring Extraction Procedure of Gardeniae Fructus in Preparation of Reduning Injection

WU Sha¹, LIU Qi-an², WU Ya-nan², WU Jian-xiong², ZHANG Guang-ren², BI Yu-an², WANG Zhen-zhong², PENG Guo-ping³, XIAO Wei^{2*} (1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the feasibility of using Near-infrared (NIR) spectroscopy for quality control of liquid-liquid extraction procedure of Gardeniae Fructus in the preparation of reduning injection. **Method:** 147 extraction stream samples from seven batches were collected and NIR off-line spectra were acquired by Luminar 5030 spectrometer. The contents of geniposide (GS) and soluble solid content (SSC) were determined by the reference method. The partial least square (PLS) algorithm was used to build GS and SSC NIR models and predict the contents in prediction set. **Result:** The R^2 of the established GS and SSC models were 0.987 2 and 0.994 7 as well as the RMSEC was 1.460 9 and 2.367 7, which indicated the models had good performance. Besides, the predictive results of 20 samples were satisfactory. The R^2 was 0.980 7 and 0.986 1, the RMSEP was 1.827 5 and 7.307 7 and the RSEP was 3.08% and 5.29% for GS and SSC, respectively. Both of the RSEP values were lower than 6%, which can satisfy the quality control standard in the traditional Chinese medicine production process. **Conclusion:** The established models could precisely predict the content of GS and SSC. The results demonstrated that the NIR spectroscopy might be a suitable and alternative technology for monitoring the liquid-liquid extraction procedure of Gardeniae Fructus.

[Key words] near-infrared spectroscopy; reduning injection; liquid-liquid extraction; Gardeniae Fructus; feasibility; partial least square

[收稿日期] 20140829(018)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 吴莎, 在读博士, 从事中药质量控制及过程分析研究, Tel:13675292285, E-mail:wusha729@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 高级工程师, 博士, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-85522009, E-mail:wzhzh-nj@163.net

热毒宁注射液处方由金银花、青蒿、栀子组成,具有清热、疏风、解毒功效,临床上用于治疗上呼吸道感染^[1]。处方中栀子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效^[2]。栀子中主要含有环烯醚萜类、西红花酸类、有机酸类和黄酮类成分^[3-4],具有抗炎、镇痛、抗病毒等药理作用^[5-6]。

栀子萃取作为热毒宁注射液生产过程中的一个重要环节,可以有效分离富集栀子中的药效物质成分,同时除去蛋白质、多糖等水溶性杂质成分。但是,萃取过程容易受到多种工艺参数的影响,如萃取液的密度、萃取温度、萃取溶剂用量、萃取溶剂流速等^[7]。这些工艺参数的波动不仅会直接影响到下游生产单元的可控性,甚至可以进一步影响到热毒宁注射液成品质量的均一性、稳定性和安全性。因此,考虑将过程分析技术(PAT)引入热毒宁注射液栀子萃取过程,实现萃取中间体关键质控指标的快速定量检测。

近红外光谱法(NIR)作为应用最广泛的 PAT 技术,被广泛地应用于中药提取^[8-9]、醇沉^[10-11]、浓缩^[12-13]、大孔树脂纯化^[14]等众多过程质量分析研究中,实现对过程关键质量属性的实时在线监测。根据美国 FDA 的要求,NIR 技术在实际生产应用之前,需要进行可行性研究分析^[15]。因此,本研究应用偏最小二乘法(PLS)建立栀子萃取过程中栀子苷(GS)和固含量(SSC)两个关键质控指标的近红外离线分析模型,对 NIR 技术在热毒宁注射液栀子萃取生产环节的可行性进行分析。

1 材料

Luminar 5030 型 AOTF 近红外光谱分析仪(美国 Brimrose 公司,配有 InGaAs 检测器),SNAP 光谱信号采集软件、Unscrambler 7.8 数据处理软件(挪威 CAMO 软件公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),XP6 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),Milli-Q Academic 型纯水机(美国 Millipore 公司)。

栀子苷对照品(批号 110749-201115)购自中国食品药品检定研究院,乙腈(OCEANPAK 公司,色谱纯),甲醇(南京化学试剂有限公司,分析纯),水为超纯水,栀子萃取液来自江苏康缘药业有限公司热毒宁注射液生产车间。

2 方法与结果

2.1 样品收集 跟踪热毒宁注射液栀子萃取生产过程,从萃取液开始流出至萃取过程结束,每隔 20 min 取样 1 次,每批取样 21 个,共取样 7 批,获得

147 个样品。

2.2 近红外光谱采集 在室温条件下,光谱采集方式为投射法,光谱扫描范围 1 100 ~ 2 300 nm,波长增量 2 nm,扫描次数 300 次,光程 2 mm,分辨率 2 nm。栀子萃取液近红外光谱图见图 1。

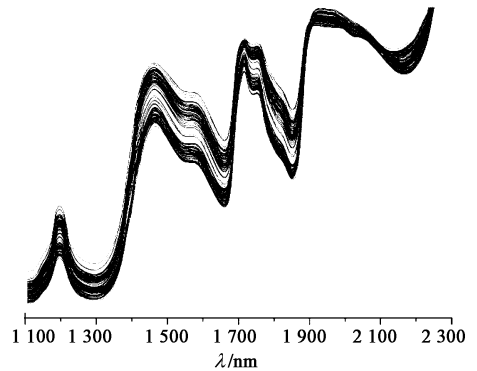


图 1 栀子萃取液原始近红外光谱

Fig. 1 Raw spectra of solution in the liquid-liquid extraction of Gardeniae Fructus

2.3 栀子苷 HPLC 测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(12:88),进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 238 nm。

2.3.2 标准曲线绘制 精密称取栀子苷对照品 35.58 mg,置 20 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到 1.779 g·L⁻¹的栀子苷对照品溶液。分别精密吸取 1,2,4,5,7,10 mL 上述溶液置 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇定容至刻度,摇匀,分别进样分析。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 6\ 786.7X + 30.593$ ($r = 1$),线性范围 0.177 9 ~ 1.779 g·L⁻¹。

2.3.3 供试品溶液制备 栀子萃取液样品离心,精密吸取上清液 1 mL 置 20 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,离心,上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 固含量测定 烘干至恒重的蒸发皿称重 X_0 ,精密吸取离心后的栀子萃取液样品 5 mL 至蒸发皿中,水浴蒸干后,105 °C 烘 6 h,取出置干燥器内冷却 30 min,迅速称重 X_1 。固含量按下式计算:

$$\text{固含量}(\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{X_1 - X_0}{5}$$

2.5 质控指标测定 7 批栀子萃取液样品 GS 和 SSC 含量变化见图 2。从图中可以看出,随着萃取时间的延长,GS 和 SSC 明显呈下降趋势,说明在

栀子萃取过程中,以 GS 为代表的有效成分不断地溶出分配进入萃取溶剂中,从而实现有效成分的富集。但是,不同生产批次间 GS 和 SSC 的含量间存在波动,可能是由栀子原药材的差异和萃取过程工艺参数变化引起的。因此,采用 NIR 技术对栀子萃取过程进行质量监控具有重要意义。

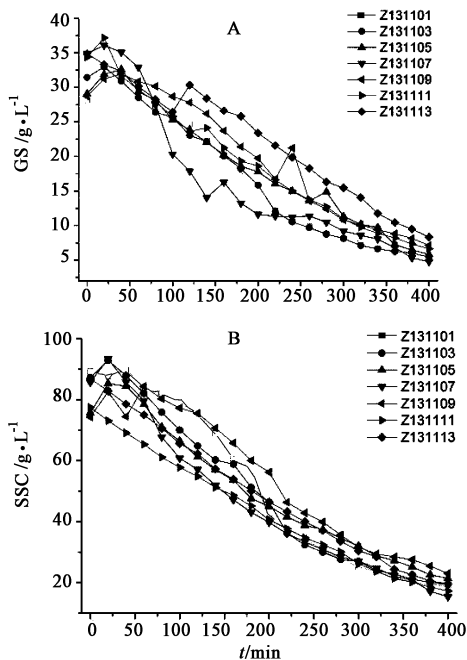


图 2 栀子萃取过程 GS(A) 和 SSC(B) 含量变化曲线
Fig. 2 Time evolution curves of GS (A) and SSC (B) during the liquid-liquid extraction process of Gardeniae Fructus

2.6 光谱预处理方法的选择 比较了原始光谱和不同光谱预处理方法,结果见表 1。模型 R^2 越接近 1,校正均方差 (RMSEC) 和内部交叉验证均方差 (RMSECV) 越小,模型性能越好。除了 2D 方法所得 GS 和 SSC 的模型 R^2 较低, RMSEC 和 RMSECV 较高外,其他方法所得模型没有太大差别。但是,1D + S-G 方法所得的模型具有最低的 RMSEC 和 RMSECV,因此,选择该方法建立 GS 和 SSC 模型。

表 1 不同光谱预处理方法对模型性能影响

Table 1 Influence of different pretreatments on calibration model

预处理方法	GS			SSC		
	R^2	RMSEC	RMSECV	R^2	RMSEC	RMSECV
Raw	0.981 3	1.777 3	1.953 1	0.993 4	2.613 6	2.927 1
1D	0.986 8	1.469 7	1.675 1	0.992 6	2.770 9	3.254 2
2D	0.972 1	2.157 9	2.317 8	0.991 6	2.954 9	4.366 8
1D + S-G	0.987 2	1.460 9	1.620 0	0.994 7	2.367 7	2.542 3
2D + S-G	0.987 3	1.468 6	1.843 8	0.994 6	2.368 3	3.062 9

2.7 异常样品的剔除 NIR 光谱在采集过程中易受到环境温湿度变化和噪音信号的干扰,导致异常样品的产生,从而干扰模型的预测性能,因此建模前必须剔除异常样品。图 3A 和图 3B 分别给出了 GS 和 SSC 校正集样本的三维空间分布图。由于定量分析的样品为同类样品,它们会因为光谱信息的相似性而分布在相对集中的主成分空间中,而远远偏离此空间的样品具有较高的 Residual 残差值则为异常样品。因此,样本 95,69,108,73 为 GS 模型的异常样品,样本 72,73,141 为 SSC 模型的异常样品。

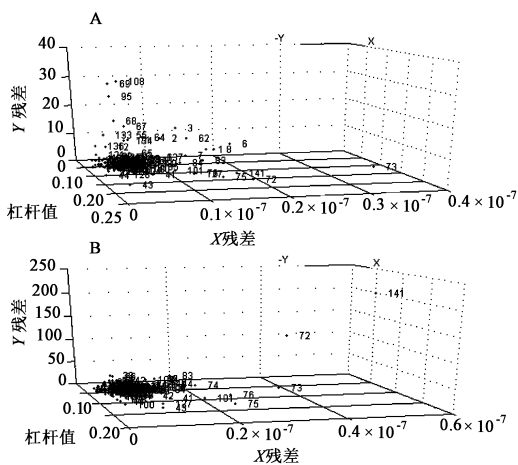


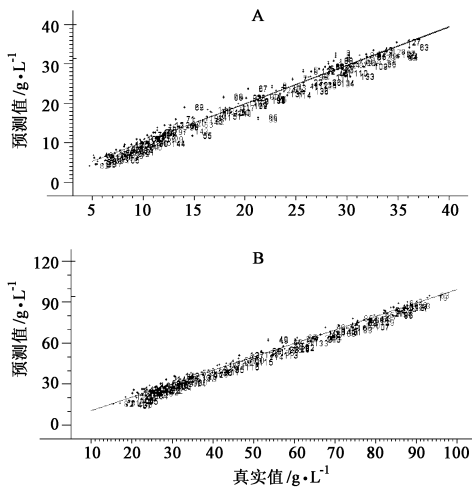
图 3 GS(A) 和 SSC(B) 校正集样品三维空间分布
Fig. 3 3D distribution graphs of GS calibration set (A) and SSC calibration set (B)

2.8 NIR 定量模型的建立 应用留一交叉验证法在 1 100 ~ 2 300 nm 波段建立 GS 和 SSC 的 PLS 定量校正模型,见图 4。GS 和 SSC 模型的校正集 R^2 分别为 0.987 2, 0.994 7, RMSEC 分别为 1.460 9, 2.367 7, 交叉验证集 R^2 分别为 0.984 2, 0.993 8, RMSEC 分别为 1.620 0, 2.542 3, 所建模型 R^2 较高,同时 RMSEC 和 RMSECV 较低,模型性能良好,可用于 GS 和 SSC 定量预测。

2.9 模型验证 另取 1 批栀子萃取液相样品 20 个作为验证集,将其 NIR 光谱导入校正模型,模型预测结果见图 5。GS 和 SSC 模型预测集 R^2 分别为 0.980 7, 0.986 1, RMSEP 分别为 1.827 5, 7.307 7, 且相对预测偏差 RSEP 分别为 3.08%, 5.29%, 均在 6% 以内,能够满足中药生产过程中质量控制分析要求。

3 结论

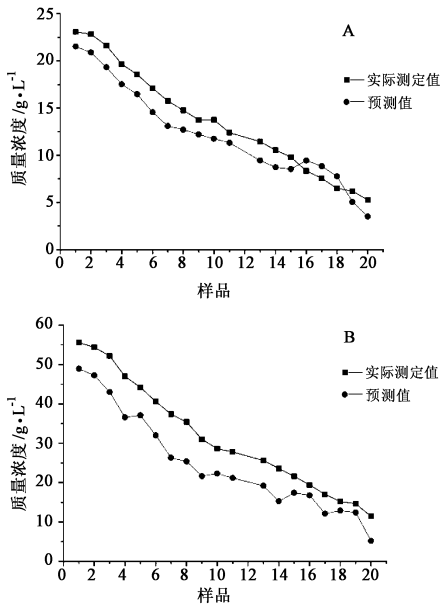
本实验建立了热毒宁注射液栀子萃取过程中栀子苷和固含量的近红外离线分析模型,应用该模型对 20 个未知样品的栀子苷和固含量进行定量预测,



A. GS; B. SSC

图4 校正集和交叉验证集样本 NIR 预测值和 HPLC 实测值相关性

Fig. 4 Correlation between NIR predicted value and HPLC measured value for calibration set (blue dot) and cross-validation set (red dot)



A. GS; B. SSC

图5 预测集样本 NIR 预测值和实测值相关性

Fig. 5 Correlation between NIR predicted value and HPLC measured value for prediction set

预测集 RSEP 分别为 3.08% 和 5.29%, 均小于 6%, 满足热毒宁注射液生产过程中质量分析精度要求。该结果证实了 NIR 技术在热毒宁注射液栀子萃取过程中应用的可行性, 为下一步在栀子萃取生产过程中实施 NIR 在线动态质量监控提供了研究基础。

[参考文献]

[1] 黄小民, 柳于介, 何煜舟, 等. 热毒宁注射液治疗急性

上呼吸道感染的临床研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(4): 470-473.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 231.

[3] 付小梅, 俞桂新, 王峥涛. 栀子的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 418-420.

[4] 徐燕, 曹进, 王义明, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子的中三类成分[J]. 药学学报, 2003, 38(7): 543-546.

[5] 孟祥乐, 李红伟, 李颜, 等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959-967.

[6] 王意忠, 崔晓兰, 高英杰, 等. 栀子提取物抗病毒试验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1176-1178.

[7] Cui Z W, Cai M Q, Song C F, et al. Effects of different pretreatments on dynamic countercurrent extraction of polysaccharides from *Ganoderma* [J]. Separation and Purification Technology, 2012, 85: 61-68.

[8] 陈雪英, 李页瑞, 陈勇, 等. 近红外光谱分析技术在赤芍提取过程质量监控中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1355-1358.

[9] 刘全, 瞿海斌, 程翼宇. 用于渗漉提取过程分析的中药有效组分近红外光谱快速测定法[J]. 化工学报, 2003, 54(11): 1586-1591.

[10] Huang H X, Qu H B. In-line monitoring of alcohol precipitation by near-infrared spectroscopy in conjunction with multivariate batch modeling [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 707: 47-56.

[11] Xu B, Wu Z S, Lin Z Z, et al. NIR analysis for batch process of ethanol precipitation coupled with a new calibration model updating strategy [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 720: 22-28.

[12] 陈雪英, 陈勇, 王龙虎, 等. 红花醇沉液浓缩除醇过程中多元质控指标的近红外快速检测[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2086-2092.

[13] 金叶, 吴永江, 刘雪松, 等. 蟾皮提取液浓缩过程中吡啶类生物碱等多指标近红外快速检测研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(9): 712-717.

[14] 刘桦, 叶晓岚, 杨光, 等. 近红外光谱分析技术在线监测积雪草药材活性成分的大孔树脂分离纯化过程[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(1): 98-101.

[15] Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry, PAT: A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance[EB/OL]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070305.pdf>, 2004.

[责任编辑 顾雪竹]