

- asthma—a double-blind randomized placebo-controlled multicentre clinical trial [J]. Med Sci Monit, 2002, 8(4): 297-304.
- [8] XIONG J H, HU G X, ZHOU S H. Effect of ambroxol injection on pharmacokinetics of doxophylline in rats [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药学杂志), 2009, 18(5): 278-282.
- [9] ZHOU Q W. Rational use of aminophylline under the instruction of pharmacokinetic theory [J]. Chin Pharm(中国药房), 2010, 21(40): 3781-3782.
- [10] CHAE J W, BAEK I H, KWON K I. Effect of decursin on the pharmacokinetics of theophylline and its metabolites in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(2): 248-285.
- [11] ZHOU M Y, CHEN Q C, FU Y Z, et al. Study on pharmacokinetics of aminophylline in rat [J]. Chem Bio(化学与生物工程), 2011, 28(10): 72-74.

收稿日期: 2014-11-28

基于近红外光谱的疏血通注射液浸提过程总固体含量分析

倪开岭¹, 吴春艳², 刘雪松^{2*}(1.牡丹江友搏药业有限责任公司, 黑龙江 牡丹江 157011; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 建立一种快速测定疏血通注射液浸提过程中总固体含量的近红外光谱法。方法 以水蛭和地龙 2 种药材浸提过程为例, 采用偏最小二乘法(PLS)建立总固体含量的近红外光谱分析校正模型, 实现对总固体含量的快速测定。结果 近红外光谱在一阶导数结合 Karl Norris 平滑滤波处理下, 建模效果最佳。水蛭总固体含量校正集相关系数(R)为 0.810 8, 校正集和验证集预测误差均方根(RMSEC、RMSEP)分别为 0.583 和 0.495, 交叉验证误差均方根(RMSECV)为 0.81, 校正集和验证集相对偏差(RSEC、RSEP)分别为 6.11% 和 5.25%; 地龙总固体含量校正集 R 值为 0.975 5, RMSEC 和 RMSEP 分别为 1.10 和 1.85, RMSECV 为 1.61, RSEC 和 RSEP 分别为 4.68% 和 7.80%。结论 近红外光谱可用于快速测定疏血通注射液浸提过程中总固体含量, 有望推广应用于中药浸提过程的在线质量控制。

关键词: 近红外光谱; 疏血通注射液; 浸提过程; 总固体含量

中图分类号: R917 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2015)08-0970-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.018

Quantitative Analysis of Total Solid Content in Lixivating Process of Shuxuetong Injection Using Near-infrared Spectroscopy

NI Kailing¹, WU Chunyan², LIU Xuesong^{2*}(1.Mudanjiang Youbo Pharmaceutical Co., Ltd., Mudanjiang 157011, China;
2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for total solid content determination of Shuxuetong injection in lixivating process based on near-infrared spectroscopy. **METHODS** Taking the lixiviating process of *Hirudo* and *Earthworm* for examples, the quantitative calibration models for the total solid content were established by partial least squares (PLS). And the established PLS calibration models were used to rapidly analyze the total solid content in lixiviating process of Shuxuetong injection. **RESULTS** Optimal models were obtained when raw spectra were processed with first derivative combined with Karl Norris smoothing. The correlation coefficient of total solid content was 0.810 8 for lixiviating process of *Hirudo*. Root mean square error of calibration and prediction were 0.583 and 0.495, respectively. Root mean square error of cross validation was 0.81, and relative standard errors of calibration and prediction was 6.11% and 5.25%, respectively. The correlation coefficient of total solid content was 0.975 5 for lixiviating process of *Earthworm*. Root mean square error of calibration and prediction were 1.10 and 1.85, respectively. Root mean square error of cross validation was 1.61, and relative standard errors of calibration and prediction was 4.68% and 7.80%, respectively. **CONCLUSION** NIR spectroscopy was successfully applied to determine total solid content in lixiviating process of *Hirudo* and *Earthworm*. It can be used for the quality control in manufacturing process of Shuxuetong Injection.

KEY WORDS: near infrared spectroscopy; Shuxuetong injection; lixiviating process; total solid content

作者简介: 倪开岭, 男, 硕士, 高级工程师 Tel: 13763606977
Tel: (0571)88208621 E-mail: liuxuesong@zju.edu.cn

*通信作者: 刘雪松, 男, 博士, 研究员

疏血通注射液是动物类中药注射剂，以水蛭和地龙为原药材制成。其生产工艺包括浸提、绞磨、冻融、离心和膜过滤等过程，采用现代生物提取技术制备，包括“反复冻融”、“分子筛过滤”、“热压处理”等技术。目前，疏血通注射液的物质基础研究已分离、鉴定出3类共34种单体化合物，主要包含多肽、糖肽、内源性小分子等化学成分^[1]。这些可溶性物质在溶剂蒸干时以固体形式残留下来，形成了总固体物质。本研究利用近红外(NIR)光谱技术快速分析水蛭和地龙2味药材在浸提过程中的总固体含量。

NIR光谱技术具有快速无损和实时在线分析的优势^[2-3]，已成为现代中药生产关键质量属性快速评价技术。近年来，近红外技术越来越多的被应用于中药产业，尤其是制药过程的在线检测研究^[4]。本研究以总固体含量为分析指标，考察疏血通注射液浸提过程中总固体含量的变化，同时建立总固体含量近红外定量分析模型。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Antaris傅立叶变换近红外光谱仪(美国Thermo Nicolet)，配有相应的透射件和信号采集以及Result、TQ Analyst等数据处理软件。

1.2 材料

实验用的浸提过程样品来源于实际生产线上人工取样。疏血通注射液的浸提过程工艺由水蛭浸提和地龙浸提独立并同时进行。在常压下，控制温度<10℃，各用0.9%生理盐水浸泡24 h。考虑到浸提刚开始的可溶性物质浓度较低，故在浸提开始一段时间后开始取样，每隔1 h取样1次，取样7批，批号分别为140305，140306，140307，140308，140309，140310，140311。水蛭浸提过程取样共计122个，地龙浸提取样共计133个。

2 方法

2.1 总固体含量测定

取洁净的扁形瓶编号后置于105℃下烘至恒重(2次烘干后重量差距<5 mg)，称重并记录(X_0)。用10 mL移液管移取10 mL上清液于对应编号的扁形瓶中，置烘箱105℃条件下烘干至恒重(相邻2次称重差值<5 mg)，计为 X_1 。按下式计算总固体含量(Y)： $Y(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})=(X_1-X_0)/10$ 。

2.2 近红外光谱采集

采集水蛭、地龙浸提过程样品的近红外光谱。

所采集的光谱吸光度数据格式为Absorbance，设光谱扫描范围4 000~10 000 cm⁻¹，扫描次数32，分辨率8 cm⁻¹，光纤透射式探头光程2 mm，以空气为参比。每个样品采集3张近红外光谱后取平均光谱作为该样品的光谱图。水蛭和地龙的近红外原始光谱图较相似，水蛭所有样品的近红外原始光谱图见图1。

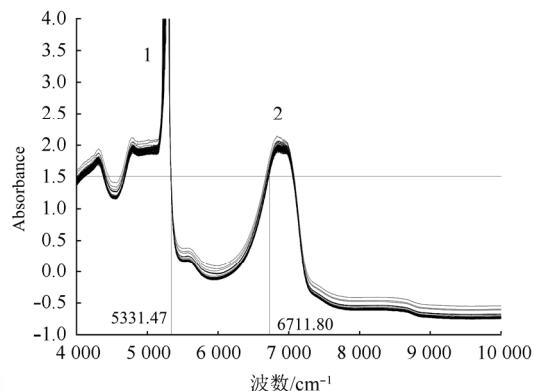


图1 所有水蛭样品的近红外原始光谱

1—水峰的吸收谱带5 154.64 cm⁻¹；2—水峰的吸收谱带6 944 cm⁻¹。

Fig. 1 Original NIR absorbance spectra of all Hirudo samples

1—the wavebands of water at 5 154.64 cm⁻¹; 2—the wavebands of water at 6 944 cm⁻¹.

2.3 数据处理方法及模型评价

选择合适的波段，在适宜的光谱预处理基础上，采用偏最小二乘法(partial least square, PLS)建立近红外光谱数据与总固体含量之间的定量校正模型。以相关系数(R)、校正集和验证集预测误差均方根(root mean square error of calibration and prediction, RMSEC and RMSEP)、校正集和验证集相对偏差(relative standard errors of calibration and prediction, RSEC 和 RSEP)及交叉验证误差均方根(root mean square error of cross validation, RMSECV)考察模型性能。所涉及的模型参数 R 值、RMSEC值、RMSEP值、RSEC值、RSEP值和RMSECV值的计算方法参考相应文献^[5-6]。RMSEC值、RMSEP值和RMSECV值越小越接近越好，且要求RMSECV值<2倍RMSEC值^[7]。 R 值越大越好，RSEC和RSEP越小越好，本研究对于所建模型的评价标准是验证集 R 值>0.9且RSEP<10%。

3 结果和讨论

3.1 总固体含量测定结果

浸提过程中所采集样品的总固体含量测定结

果见图2和图3。一共7批样品，为了便于分析，图2中只绘制了差异较明显的4批样品，图2中2图的相同点显示，同一批次样品的总固体含量虽不随浸提进程呈正相关，但是整体趋势是增大的。而且浸提开始9 h之后的总固体含量变化幅度不大，分析其主要原因是浸提过程在常压低温下且无任何搅拌等措施下进行。不同批次地龙浸提过程出现总固体含量存在较大差异现象，如批次140307和批次140310，主要原因在于不同批次间药材质量的差异。比较水蛭和地龙药材浸提终点的总固体含量，水蛭在 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右，而地龙却在 $31 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右，该差异主要是两者药材浸提时的形态不同所致，结果见图3。

3.2 模型的建立

3.2.1 异常点剔除 本研究采用样品的马氏距离、杠杆值和学生残差值来判别异常样品。

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^[8]。本研究马氏距离阈值设为样品集马氏距离平均值加上2倍标准差^[9]。如果某样品的马氏距离大于设定的阈值，则判该样品光谱异常。样品杠杆值(Leverage)表示样品对模型影响的重要程度，越接近或等于0越好，越接近1越不利于模型建立，可能为异常样品^[10]。学生残差值(Studentized residual)表示与样品值对应的样品浓度预测能力的好坏，若一个样品具有较高的学生残差值，则此样品为异常点^[11-12]。

图4A为126个水蛭浸提过程样品的马氏距离分布图，样品集马氏距离的平均值为1.02，阈值为1.74，由于T-10-308和T-20-307的马氏距离超过阈值，视为异常点剔除。图4B为水蛭浸提过程样品的杠杆值与学生残差相关图，T-23-307、T-18-305、T-17-309和T-19-309为离群点，其对应的学生残差值比较高，故视为异常点。通过马氏距离、样品杠杆值和学生残差值联合判别异常点，剔除T-10-308、T-20-307、T-23-307、T-18-305、T-17-309和T-19-309这6个样品。同理，图4C为133个地龙样品的马氏距离分布图，样品集马氏距离的平均值为1.05，阈值为1.83，由于T-16-309的马氏距离超过阈值，视为异常点剔除。图4D为地龙浸提过程样品的杠杆值与学生残差相关图，图中“1, 2, 3, 4, 5, 6”分别代表样品“T-22-305, T-23-310, T-9-309, T-16-309, T-19-311, T-11-308”，

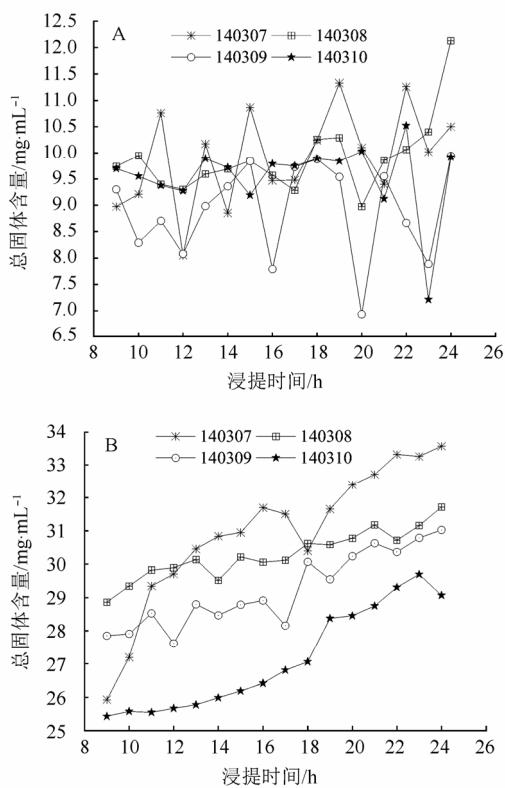


图2 浸提过程中总固体含量随时间变化趋势

A-水蛭；B-地龙。

Fig. 2 Time evolution of total solid content for four batches
A-Hirudo; B-Earthworm.

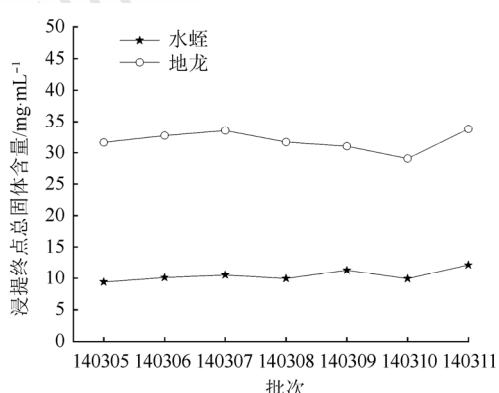


图3 水蛭、地龙7批浸提终点的总固体含量

Fig. 3 The terminal total solid content of lixiviating process for different batch Hirudo and Earthworm

从图中可知，除该6个点之外，其余样品比较集中。所以这6个样品为离群点，视为异常点。通过马氏距离、样品杠杆值和学生残差值联合判别异常点，剔除T-22-305, T-23-310, T-9-309, T-16-309, T-19-311和T-11-308这6个样品。

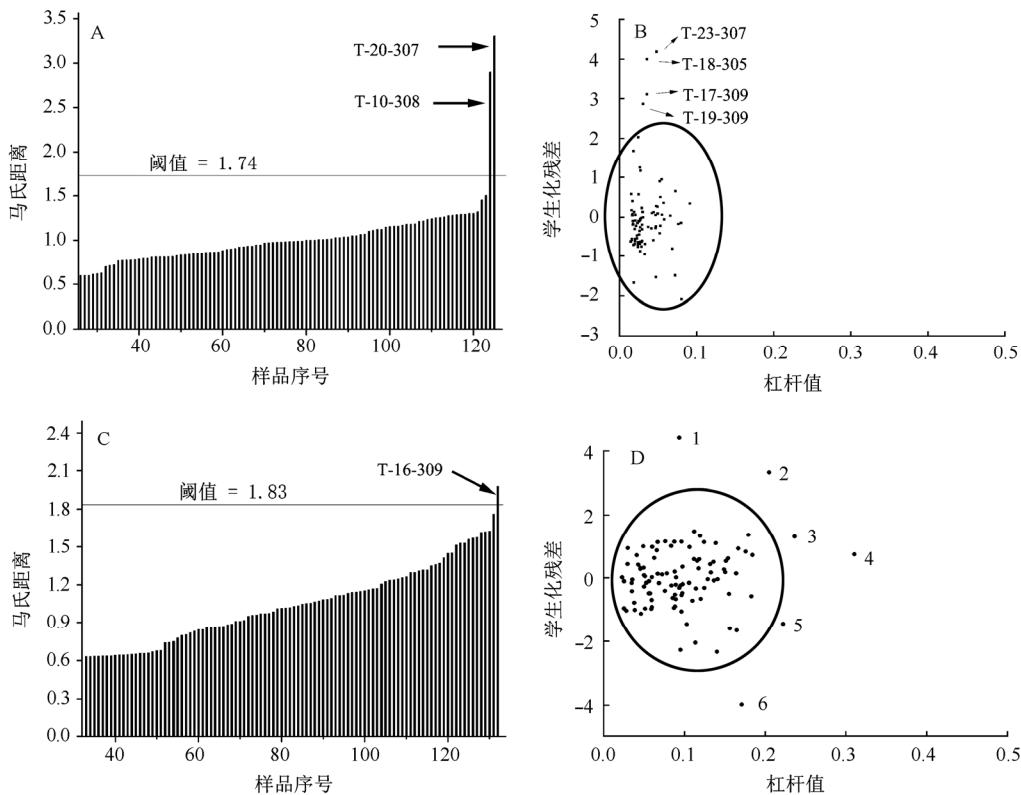


图 4 异常点判断

A-水蛭马氏距离分布图; B-水蛭杠杆值与学生残差相关图; C-地龙马氏距离分布图; D-地龙杠杆值与学生化残差相关图; 样品编号以“T-20-307”为例, “T-20”-浸提 20 h, “307”-批号 140307。

Fig. 4 Discrimination of outlier

A-the diagrams of Mahalanobis distance of *Hirudo*; B-Leverage & Studentized residual of *Hirudo*; C-the diagrams of Mahalanobis distance of *Earthworm*; D-Leverage & Standardized residual of *Earthworm*; Illustration for sample number, take “T-20-307” for an example, “T-20”-lixiviating time of 20 h, “307” -batch of “140307”.

3.2.2 波段选择 虽然 PLS 法可以处理全谱信息,但是采用全谱波段建模必然包含大量冗余信息,影响模型性能。因此有必要对波段进行筛选,以消除无关的干扰^[13]。由于浸提过程以盐水为溶剂,故样品含有大量的水。水分子中 OH 键在近红外光谱区的 $5\ 154.64\text{ cm}^{-1}$ 和 $6\ 944\text{ cm}^{-1}$ 附近有很强的吸收谱带,形成两大“水峰”^[14],即图 1 中“1”和“2”2 处。吸光度>1.5 的波长区域属于饱和吸收,此外 $9\ 200\sim10\ 000\text{ cm}^{-1}$ 波段光谱信息较少,没有显著的特征吸收,建模时应避开这些光谱区域^[14]。经筛选,水蛭浸提过程样品的原始光谱图在 $5\ 331.47\sim6\ 711.80\text{ cm}^{-1}$ 波段处有较明显差别,能够较好反映样品的特征性,因此选择该波段进行建模。地龙浸提过程样品的原始光谱图与水蛭的相似,避免重复,本文未呈现。

3.2.3 光谱预处理 本研究采用导数结合 Savitzky-Golay^[15]或 Karl Norris^[16]平滑滤波等预处理方法

建立模型。Karl Norris 平滑滤波与导数结合处理是一种导数滤波法,可以去掉高频噪音对信号的干扰。各种光谱预处理方法所得模型的 R 值等模型参数见表 1(R 值>0.75 的模型参数)。综合比较发现,水蛭、地龙原始光谱进行第 3 种预处理方法得到的模型具有较高的 R 值以及较低的 RMSEC 和 RMSEP。所以最佳模型的最佳预处理方法确定为一阶导数和 Karl Norris 平滑滤波处理。

3.2.4 最佳因子数确定 用于建模的因子数对保证模型预测稳定性非常重要。若因子数选取过小会导致模型信息量不够,出现“欠拟合”现象,但是过大易出现“过拟合”现象。所以在采用 PLS 法建立模型时,需要对因子数进行合理选择,确定最佳因子数。采用留一交叉验证法,考察了因子数对内部交叉验证均方差(RMSECV)的影响,当 RMSECV 值最小时,其对应的因子数确定为最佳因子数。以水蛭浸提过程为例,如图 5 所示在建

模波段为 $5\ 331.47\sim6\ 711.80\text{ cm}^{-1}$ 和最佳预处理方法下，最佳因子数确定为8，此时RMSECV值最小为0.81。

表1 浸提过程总固体含量在不同预处理方法下的模型参数

Tab. 1 Parameters of calibration models with different pretreatments for total solid content of lixiviating process

预处理方法	R	RMSEC	RMSEP	RMSECV	Factors
1	0.783 1	0.624	0.528	0.81	6
水蛭	2	0.776 5	0.632	0.515	6
	3	0.810 8	0.583	0.495	8
	4	0.944 7	1.79	3.24	10
地龙	5	0.918 5	2.16	4.10	10
	3	0.979 6	1.10	1.85	10

注：1—原始光谱；2—无导数+Savitzky-Golay 平滑滤波；3—一阶导数+Karl Norris 平滑滤波；4—一阶导数+Savitzky-Golay 平滑滤波；5—二阶导数+Karl Norris 平滑滤波。

Note: 1-original spectra; 2-Savitzky-Golay smoothing; 3-first derivative combined with Karl Norris smoothing; 4-first derivative combined with Savitzky-Golay smoothing; 5-second derivative combined with Karl Norris smoothing.

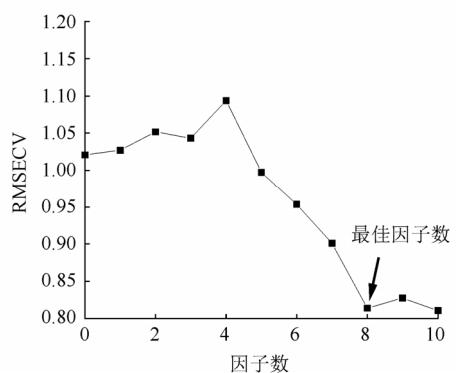


图5 最佳因子数和交叉验证试验

Fig. 5 Number of factors versus values of RMSECV

3.2.5 总固体含量模型建立 所有样品随机分为校正集和验证集，剔除异常点、确定最佳建模波段和预处理方法，建立定量校正模型。水蛭浸提过程剔除6个异常点，选取80个样品组成校正集，在最优波段 $5\ 331.47\sim6\ 711.80\text{ cm}^{-1}$ 和最佳预处理方法一阶导数结合Karl Norris平滑滤波处理下，采用8个因子数，用PLS法建立水蛭浸提过程总固体含量的近红外定量校正模型，如图6A所示，R值为0.810 8，RMSECV为0.81，RMSEC为0.583，RSEC为6.11%。地龙浸提过程剔除7个异常点，选取96个样品组成校正集，在最优波段 $6\ 763.77\sim5\ 357.28\text{ cm}^{-1}$ 和最佳预处理方法一阶导数结合Karl Norris平滑滤波处理下，采用10个因子数，

建立了最佳总固体含量校正模型，如图6B所示，R值为0.975 5，RMSECV为1.61，RMSEC为1.10，RSEC为4.68%。

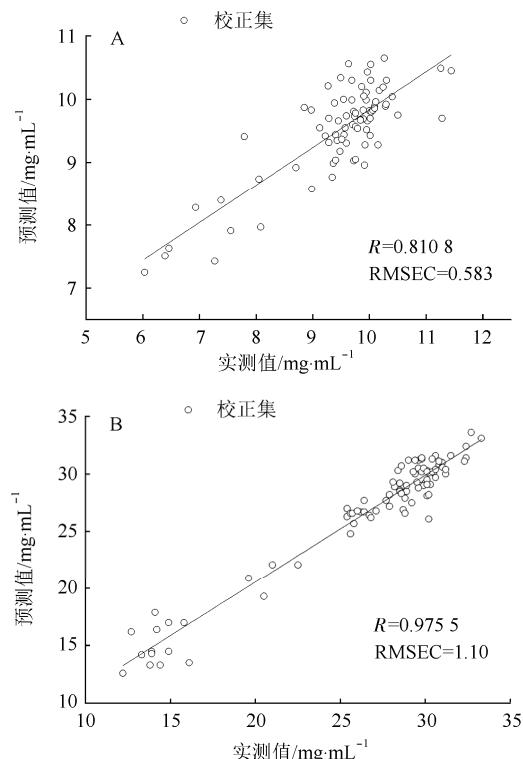


图6 校正集样品的实测值与预测值的相关图

A—水蛭；B—地龙。

Fig. 6 Correlation between NIR predicted and actually-measured values for calibraton set
A—Hirudo; B—Earthworm.

3.2.6 浸提过程总固体含量预测 用所建模型分别对剩余的样品(水蛭36个、地龙30个)进行预测，验证集样品总固体含量预测值与实测值的相关图见图7。水蛭、地龙浸提总固体含量验证集的RSEP分别为5.25%、7.80%，都控制在10%以内，能够满足中药生产过程实时分析的精度要求。由图8可知模型所获得的近红外预测值与总固体含量实测值基本一致。

4 结论

本研究针对疏血通注射液浸提过程中，水蛭和地龙药材的总固体含量变化，建立了一种基于近红外光谱的快速分析方法，所建的总固体含量PLS模型预测结果令人满意，验证集R值分别为0.907 5、0.974 4，RMSEP值分别为0.495、1.85，RSEP值分别为5.25%、7.80%，符合R值>0.9且RSEP<10%的要求，能够满足中药从生产过程中实时分析的精度要求。

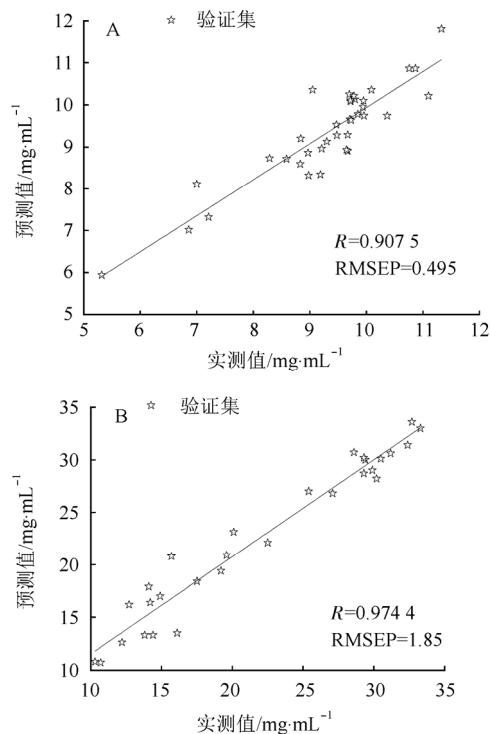


图 7 验证集样品总固体含量预测值与实测值的相关图
A-水蛭; B-地龙。

Fig. 7 Correlation between NIR predicted and actually-measured values for prediction set
A-Hirudo; B-Earthworm.

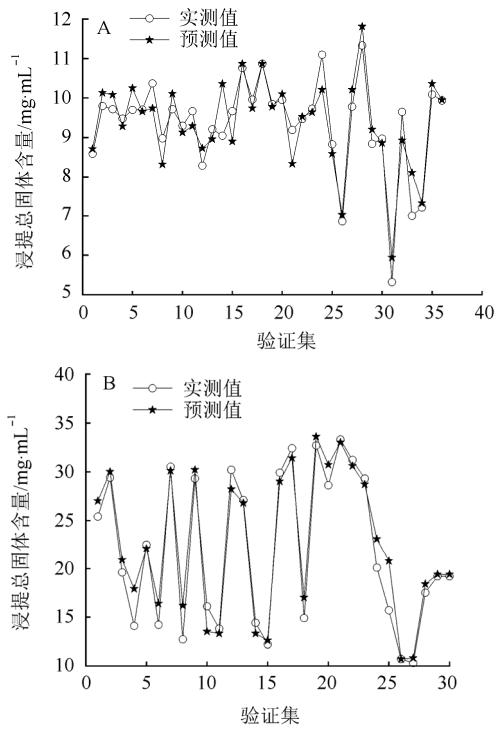


图 8 浸提过程近红外预测值和实测值趋势对照图
A-水蛭; B-地龙。

Fig. 8 Comparison of NIR predicted and actually-measured values for prediction set of *Hirudo* and *Earthworm*
A-Hirudo; B-Earthworm.

REFERENCES

- [1] WANG M, ZHANG J. Relevance between quality craft and safe medicament of Shuxuetong injection [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(18): 2818-2819.
- [2] YANG P P, CONG X D, CAI B C. Determination of curcumin-meglumine co-crystal by near-infrared spectroscopy rapidly [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(8): 991-994.
- [3] NIU C, YANG N, LI Y J, et al. Rapid determination of cefalexin granules by NIR [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(7): 874-877.
- [4] JIN Y, DING H Y, WU Y J, et al. Near-infrared spectroscopy on-line and real-time monitoring of extraction process of Xuebijing Injection [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(7): 1214-1221, 1234.
- [5] BLANCO M, BANO R G, BERTRAN E. Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy [J]. Talanta, 2002, 56(1): 203-212.
- [6] XIANG D, BERRY J, BUNTZ S, et al. Robust calibration design in the pharmaceutical quantitative measurements with near-infrared (NIR) spectroscopy: Avoiding the chemometric pitfalls [J]. J Pharm Sci, 2009, 98(3): 1155-1166.
- [7] NIU X Y, SHEN F, YU Y F, et al. Analysis of sugars in Chinese Rice Wine by fourier transform near-infrared spectroscopy with partial least-squares regression [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(16): 7271-7278.
- [8] MIN S G, LI N, ZHANG M X. Outlier diagnosis and calibration model optimization for near infrared spectroscopy analysis [J]. Spectroscop Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1205-1209.
- [9] LIU Q, LUO C B, CHEN S J, et al. An outlier diagnosis on near infrared spectroscopy analysis of ndf content in corn silage feeds [J]. Spectroscop Spectral Anal(光谱学与光谱分析), 2007, 27(8): 1514-1518.
- [10] RICHARD G, BRERETON. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003: 47-49
- [11] COOK R D, WEISBERG S. Residuals and influence in regression [M]. Chapter 2. New York: Chapman and Hall, 1982.
- [12] WANG J J, LIANG Y Z, WANG F. Simultaneous determination of tar, nicotine and carbon monoxide in smoking by partial least squares and fourier transform near infrared transmission spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2005, 33(6): 793-797.
- [13] LIU Y Y, HU C Q. Progress and application of spectralwavelength selection methods in NIR analytical technique [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(5): 968-975.
- [14] STREEFLAND M, VAN HERPEN P F, VAN DE WATERBEEMD B, et al. A practical approach for exploration and modeling of the design space of a bacterial vaccine cultivation process [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 104(3): 492-504.
- [15] RICHARD G, BRERETON. Chemometrics: Data Analys is for the Laboratory and Chemical Plant [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003: 132.
- [16] JIN S Y, CHEN H Z. Near-infrared analysis of the chemical composition of rice straw [J]. Ind Crops Prod, 2007, 26(2): 207-212.

收稿日期: 2014-12-15