

利用拉曼光谱法建立硫酸软骨素滴眼液快速定性定量分析模型的研究

韩莹, 曾文珊, 阮玮婷, 李欣, 孔绮娴(广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要: 目的 利用拉曼光谱法建立硫酸软骨素滴眼液定性和定量快速分析模型, 并研究提高模型预测能力。方法 以硫酸软骨素标准拉曼光谱为参考光谱, 在 RFDI 软件中设置干扰光谱、谱段范围、预处理方式等参数, 建立定性分析模型; 选取代表性样品 23 批作为参考光谱, 关联硫酸软骨素含量测定数据以交叉检验方式建立定量分析模型。结果 利用所建定性模型测试硫酸软骨素滴眼液样品, 其中 39 批单方样品为通过, 4 批复方样品为不通过; 得到定量模型结果交叉验证均方根误差为 $1.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、相关系数为 0.985 4; 浓度范围为 $26.19 \sim 35.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 利用拉曼光谱法可建立硫酸软骨素滴眼液定性模型, 准确性高, 分析速度快; 依据可靠的实验室含量分析数据, 可以建立硫酸软骨素滴眼液定量模型快速分析主成分硫酸软骨素的含量, 在现场快速检测样品中得到实际应用。

关键词: 拉曼光谱; 硫酸软骨素滴眼液; 定性; 定量

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)22-2759-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.012

引用本文: 韩莹, 曾文珊, 阮玮婷, 等. 利用拉曼光谱法建立硫酸软骨素滴眼液快速定性定量分析模型的研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2759-2763.

Study on Rapid Qualitative and Quantitative Analysis Model of Chondroitin Sulfate Eye Drops by Raman Spectroscopy

HAN Ying, ZENG Wenshan, RUAN Weiting, LI Xin, KONG Qixian(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid qualitative and quantitative analysis model of chondroitin sulfate eye drops by Raman spectroscopy, and to improve the prediction ability of the model. **METHODS** The standard Raman spectra of chondroitin sulfate were used as reference spectra, and the interference spectra, spectral range and pretreatment methods were set up in RFDI software to establish the qualitative analysis model. Twenty-three batches of representative samples were selected as the reference spectra, and the quantitative analysis model was established by cross-examination based on the determination data of chondroitin sulfate content. **RESULTS** The established qualitative model was used to test chondroitin sulfate eye drops. Thirty nine batches of single samples passed and 4 batches of compound samples failed. The cross validation of the quantitative model results showed that the root mean square error was $1.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the correlation coefficient was 0.985 4, and the concentration range was $26.19 \sim 35.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** Raman spectroscopy can be used to establish a qualitative model of chondroitin sulfate eye drops with high accuracy and fast analysis speed. Based on reliable laboratory content analysis data, a quantitative model of chondroitin sulfate eye drops can be established to rapidly analyze the content of chondroitin sulfate, which can be used in rapid identification and determination.

KEYWORDS: Raman spectra; chondroitin sulfate eye drops; qualitative; quantitative

拉曼光谱是通过研究入射光与分子相互作用后所产生的散射光相对于入射光的频率变化, 与分子的振动频率间的相互关系, 从而对分子进行结构分析的检测技术。其优点在于快速、高效、可透过包装检测, 穿透力强, 适用于测定水溶液样品, 多用于定性分析^[1-4]。由于光谱学方法与化学计量学方法的紧密联系, 建立样品光谱与含量的数学模型来预测未知组分的含量, 也已广泛用于药品检测^[1], 因此可进一步研究拉曼光谱技术在定量分析中的应用。

硫酸软骨素是一类硫酸化的酸性黏多糖^[5], 中

国生产的药用硫酸软骨素从猪的喉骨、鼻中骨、气管等软骨组织中提取制得, 其眼用制剂硫酸软骨素滴眼液为非处方药滴眼剂, 用于补充泪液或保护角膜。硫酸软骨素滴眼液在现有国家药品标准中的鉴别方法为一般鉴别试验, 因许多药物含有相同的官能团而呈现相同的理化反应, 因此理化鉴别的专属性是相对有限的, 无法和拉曼光谱法相比。另外, 含量测定方法为比色法, 该方法专属性差、易受辅料干扰。利用拉曼光谱法对硫酸软骨素滴眼液进行定性和定量分析, 具有快速、

作者简介: 韩莹, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (020)26282338

E-mail: hanneying@126.com

专属、稳定、简便以及绿色环保,无需配制溶液等优势,可适用于现场筛查快速了解样品质量情况。

1 仪器与试剂

Metage OPAL-2800 型拉曼光谱仪(附有 5 mm 焦长光纤探头,避光样品仓)(英国 Metage Scientific),用于采集拉曼光谱时设置激光功率使用最大输出功率为 400 MW,积分时间为 100 s;拉曼药品快速鉴别(RFDI)软件 2015 年版、OPUS 7.0 版,用于拉曼光谱采集和模型建立。

硫酸软骨素钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140792-201702;含量:99.5%);硫酸软骨素滴眼液(规格:0.3%)来自 2018 年国家药品抽检,涉及 6 个生产企业共 39 批(编号 1~39),复方硫酸软骨素滴眼液涉及 2 个生产企业共 4 批(编号 40~43);硫酸软骨素钠原料及甘油、玻璃酸钠等辅料均由企业提供;水为超纯水;按处方自配 5 个企业阴性溶液各 1 批(编号 44~48)。

2 方法与结果

2.1 拉曼光谱数据采集

2.1.1 采集标准拉曼光谱图 将 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的硫酸软骨素钠对照品溶液、辅料水溶液、纯水分别置石英比色皿中,放入避光样品仓,使用光纤探头采集拉曼光谱,分别得到硫酸软骨素钠对照品溶液、辅料水溶液以及纯水的拉曼光谱图。利用 OPUS 光谱软件将硫酸软骨素对照品溶液的光谱与纯水的光谱做差减计算,得到硫酸软骨素的标准拉曼光谱图,见图 1。将辅料的拉曼光谱与纯水的光谱做差减,得到差减后的辅料拉曼光谱^[6]。

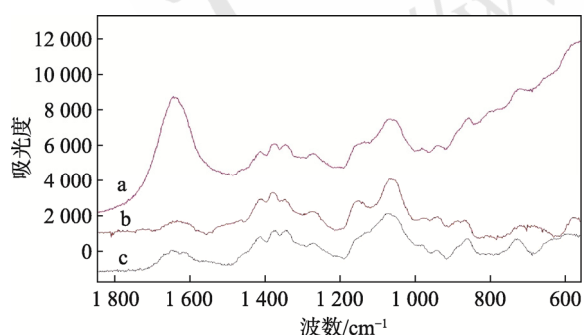


图 1 硫酸软骨素滴眼液样品的拉曼光谱图和差减计算后的拉曼光谱图

a-样品原始拉曼光谱图;b-硫酸软骨素的标准拉曼光谱图;c-差减纯水拉曼光谱后的样品拉曼光谱图。

Fig. 1 Raman spectra of chondroitin sulfate eye drops samples and Raman spectra after subtraction calculation
a-untreated Raman spectrum of the sample; b-standard Raman spectrum of chondroitin sulfate; c-Raman spectrum of the sample to subtract the pure water Raman spectrum.

2.1.2 采集样品拉曼光谱图 将样品置石英比色皿中,放入避光样品仓采集拉曼光谱,每个样品重复测量 3 次,检查测量的重复性,选一张光谱用于计算。得到样品硫酸软骨素滴眼液的拉曼光谱图,再与纯水光谱做差减处理,得到样品的拉曼光谱图,结果见图 1。

2.2 含量测定

所有样品的含量测定均按国家药品标准通过比色法测定,得到 39 批样品浓度范围为 $26.19\sim 35.85\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 拉曼快速定性分析

利用拉曼光谱法无损定性分析液体溶液原理是借助合适的化学计量学算法如经典最小二乘法,从无损分析的液体样品光谱中将来源于包装、水及其他辅料的部分有效扣除,提取出活性药物成分(active pharmaceutical ingredient, API)的光谱,从而与 API 的参考光谱进行对比判断药物的真伪^[7]。

在 RFDI 软件模型编辑模块中,建立硫酸软骨素滴眼液定性模型。以“硫酸软骨素的标准拉曼光谱图”作为参考光谱,选取光谱范围为 $1\,034.56\sim 1\,441.77\text{ cm}^{-1}$;添加“纯水的拉曼光谱”“玻璃酸钠的拉曼光谱”“甘油的拉曼光谱”作为干扰光谱;将定性阈值下限设定为 0.95,上限为 1;预处理选择基线校正中曲线校正。

将样品编号 1~45 作为测试光谱用于测试模型,与标准光谱进行相关性分析,其中编号 1~39 样品所得相关系数 >0.95 ,定性结果为通过;编号 40~48 样品所得相关系数 <0.95 ,定性结果为未通过。相关系数结果见表 1。将模型判断结果与实际情况对比,硫酸软骨素滴眼液 39 批均通过模型,复方硫酸软骨素滴眼液 4 批以及自配阴性溶液未能通过,说明模型能够准确识别待测样品,同时模型专属性较好。

2.4 定量分析模型的建立及验证

拉曼光谱法定量分析原理不是基于朗伯-比尔定律,而是遵循拉曼效应原理^[8],但在一定条件下,拉曼散射光的强度与物质浓度呈正比,因此也可以用于物质的定量分析^[9]。结合偏最小二乘法(partial least squares, PLS)可建立多元定量校正模型,PLS 是光谱多元定量校正最常用的一种分析方法,可应用于近红外、红外等波谱定量模型的建立,几乎成为光谱分析中建立线性定量校正模型的通用方法^[10]。

表 1 定性模型对测试光谱的识别结果

Tab. 1 Identify results of testing spectrum by qualitative model

编号	相关系数	识别结果	编号	相关系数	识别结果
1	0.994 9	通过	25	0.972 1	通过
2	0.997 9	通过	26	0.987 6	通过
3	0.997 5	通过	27	0.988 4	通过
4	0.997 8	通过	28	0.987 4	通过
5	0.999 1	通过	29	0.988 2	通过
6	0.999 0	通过	30	0.987 7	通过
7	0.999 1	通过	31	0.988 0	通过
8	0.998 0	通过	32	0.978 3	通过
9	0.997 4	通过	33	0.980 4	通过
10	0.998 9	通过	34	0.988 6	通过
11	0.998 7	通过	35	0.978 8	通过
12	0.997 7	通过	36	0.982 2	通过
13	0.976 7	通过	37	0.980 7	通过
14	0.973 8	通过	38	0.971 2	通过
15	0.976 2	通过	39	0.982 5	通过
16	0.964 6	通过	40	0.256 4	不通过
17	0.998 9	通过	41	0.270 2	不通过
18	0.996 0	通过	42	0.245 3	不通过
19	0.997 9	通过	43	0.765 1	不通过
20	0.986 2	通过	44	0.463 7	不通过
21	0.985 4	通过	45	0.727 8	不通过
22	0.983 4	通过	46	-0.688 9	不通过
23	0.986 8	通过	47	-0.596 4	不通过
24	0.971 3	通过	48	-0.421 6	不通过

2.4.1 线性范围考察 精密称取硫酸软骨素对照品适量,以超纯水配成系列浓度溶液后测定拉曼光谱图,浓度为 5, 15, 25, 30, 35, 45, 55 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为参考集样品,在 OPUS 软件中采用 PLS 方法进行拟合,结果见图 2,结果交叉验证预测均方根误差=0.359 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性回归方程

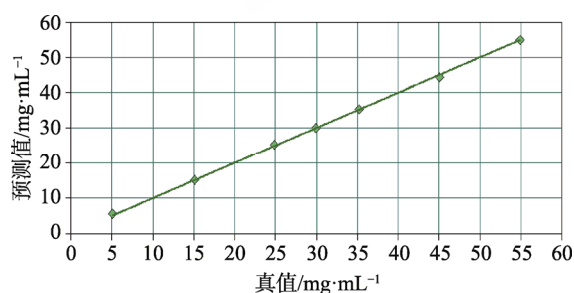


图 2 预测值与真值的线性关系示意图

Fig. 2 Linear relationship between predicted value and truth value

$y=0.988x+0.403(r=0.999\ 8)$ 。可见,硫酸软骨素的浓度在 5.04~54.9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,预测值与真值呈良好线性关系。

2.4.2 建立定量模型 将 39 批样品进行主成分因子化分析,根据因子得分分布情况以及涉及生产企业涵盖 3~4 批样品,以保证样品的代表性,最后选取 22 批样品(编号为 1~2, 6, 9~10, 12~13, 17~18, 20, 23, 25, 27~28, 30, 32, 34~39)作为建立定量模型的参考集。

将参考集样品光谱和法定检验结果进行 PLS 拟合。在特征谱段范围内利用 OPUS 软件定量两方法中参数优化功能,得到前 3 个排名参数设置,维数均为 4,预处理方法均为一阶导数加减去 1 条直线,因此选取均方根误差为最小的参数设置,谱段范围为 885.1~1 119.1 cm^{-1} 、1 273.8~1 507.8 cm^{-1} ,预处理方法为一阶导数加减去 1 条直线(平滑点数: 17),采用内部交叉验证的方法建立模型,得到模型预测均方根误差为 1.43 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性相关系数 r 为 0.985 4,结果见图 3。

另外,将剩下 17 批样品设立为单独的验证集样本,采用外部验证的方法进行建模,利用检验集方法检验得到模型预测均方根误差为 1.83 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性相关系数 r 为 0.946 9。通过比较交叉验证和外部验证,均能取得比较一致的结果,说明该模型参数设置较理想。

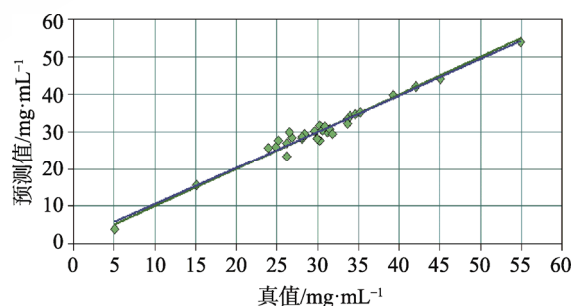


图 3 参考集预测值与真值的线性关系示意图

Fig. 3 Linear relationship between predicted value and truth value of the reference samples

2.4.3 重复性试验 在相同条件下,由同一个分析人员取硫酸软骨素滴眼液样品进行拉曼光谱测定 6 次,代入定量模型进行含量预测,结果在 29.92~30.92 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,计算重复性 RSD 为 0.4% (<2.0%),表明本方法重复性较好。

2.4.4 回收率试验 精密称取硫酸软骨素对照品适量，以超纯水配成浓度为 24, 30, 36 mg·mL⁻¹ 硫酸软骨素对照品溶液，每个浓度组平行 3 份，分别测定拉曼光谱，代入模型进行含量预测，计算回收率。低、中、高 3 种浓度的回收率在 99.6%~101.0%，RSD 分别为 0.3%、0.2%、0.2%。表明本方法准确度较好。

2.4.5 样品测定 将剩余 17 批样品作为测试光谱代入模型，得到浓度预测值，与样品检验报告中含量测定结果对比，结果见表 2。将法定检验检测结果与拉曼光谱法检测结果进行统计 *t* 检验，2 种方法测定的结果无显著性差异。

表 2 测试样品的浓度预测结果

Tab. 2 Concentration prediction results of testing samples mg·mL⁻¹

编号	真值	预测值	偏差
3	31.17	28.69	2.48
4	30.54	30.27	0.26
5	27.75	29.64	-1.89
7	31.17	28.78	2.39
8	30.87	28.58	2.29
11	27.42	29.29	-1.87
14	30.54	28.71	1.83
15	33.06	32.30	0.76
16	31.50	28.27	3.23
19	33.99	34.20	-0.21
21	29.94	28.23	1.71
22	29.94	29.59	0.35
24	27.75	28.74	-0.98
26	25.86	27.09	-1.23
29	26.49	28.76	-2.27
31	35.85	32.47	3.38
33	33.36	35.33	-1.97

3 讨论

3.1 拉曼光谱法在硫酸软骨素滴眼液定性分析中的应用

比较硫酸软骨素钠对照品和样品差减前后的拉曼光谱(图 1)，可见对照品和样品有共同的拉曼特征峰，谱段范围为 910~1 450 cm⁻¹，说明可利用拉曼光谱对硫酸软骨素进行定性分析。另外，由于样品 API 溶于水后，晶型、颗粒度等信息消失，因此拉曼光谱定性分析时通常不区分厂家，采用一个品种建立一个模型的方式，但应在建模之前

尽量收集不同厂家的辅料信息，保证模型中含有这些辅料的光谱。如样品成分中含有辅料甘油，用模型测试得到相关系数为 0.918 9，小于设置的阈值，为不通过，若在干扰光谱中设置甘油的标准拉曼光谱后，样品则能够通过模型。

但对于复方硫酸软骨素滴眼液，模型验证为“否”，推测与复方中主成分浓度较低仅为 1 mg·mL⁻¹ 以及其他成分如牛磺酸、尿囊素等干扰有关，因此本次建模只适用硫酸软骨素滴眼液。模型能够将复方硫酸软骨素滴眼液区分，也说明模型具有良好的专属性，能够准确识别单方样品。

3.2 定量模型预测能力依赖于实验数据的准确度

光谱定量分析是一个二级分析方法，光谱分析所能得到的准确度，不能超过在建模时所用测定组成或性质方法的准确度^[1]，因此建模时实验数据越准确模型预测能力会更好。样品法定质量标准含量测定方法为比色法，以氨基葡萄糖为对照品，含硫酸软骨素以氨基葡萄糖(C₆H₁₃O₅N)计算，每 1 mL ≥ 8.0 mg。方法专属性较差、对照品选择不合理、操作繁琐、灵敏度低、无上限控制、测得含量需经折算不反映样品真实含量。在探索性研究中拟定标准采用直接进样高效液相色谱法，以硫酸软骨素钠为对照品，按外标法计算，含硫酸软骨素钠[H₂O(C₁₄H₁₉NNa₂O₁₄S)_x]应为标示量的 90.0%~110.0%。方法较简便，专属性高。利用 HPLC 测定实验数据代入建模中，发现模型预测能力有所提高，得到模型交叉验证预测均方根误差为 0.959 mg·mL⁻¹(*r*=0.993 7)。

本研究以 2018 年国家评价抽检中收集到的硫酸软骨素滴眼液作为研究对象，利用拉曼光谱建立快速定性定量分析模型，同时对模型进行验证，验证结果满意，保证模型的专属性和准确性。所建模型可实现样品的快速检测，为药监部门加强药品科学监督管理提供新的监管思路。

REFERENCES

- [1] 邹文博, 尹利辉, 胡昌勤. 拉曼光谱与近红外光谱技术在药品快速分析中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(3): 416-420.
- [2] PATEL B D, MEHTA P J. An overview: Application of Raman spectroscopy in pharmaceutical field [J]. Curr Pharm Anal, 2010, 6(2): 131-141.
- [3] GALA U, CHAUHAN H. Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and

- development [J]. Expert Opin Drug Discov, 2015, 10(2): 187-206.
- [4] FENG Y C, HU C Q. Research progress in using near infrared for monitoring drug quality [J]. Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析), 2014(5): 1222-1228.
- [5] YE X H, SHEN Y L, SHEN L H, et al. Application and development of Raman spectroscopy in food and pharmaceutical analysis [J]. China Pharm(中国药业), 2017, 26(1): 1-5.
- [6] LAI Q N, GAN S, SHI X G, et al. Study on influence factors of qualitative identification for levofloxacin hydrochloride injection [J]. Food Drug(食品与药品), 2016, 18(4): 239-246.
- [7] CHEN L, YUAN M Y, MING J, et al. Quantitative models of Raman spectroscopy for five kinds of traditional Chinese medicine containing CaCO_3 based on an improved siPLS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(18): 3608-3615.
- [8] ZHAO Y, JI N, YIN L H, et al. Establishment of a Raman database for non-invasive and rapid screening of liquid injectables [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(7): 1263-1273.
- [9] YU G L, ZHAO X, ZHANG T M. Structural character and quality control of chondroitin sulfate [J]. Food Drug(食品与药品), 2010, 12(3): 153-157.
- [10] CHU X L, XU Y P, LU W Z. The study of use of partial least squares in spectroscopy qualitative analysis [J]. Mod Instruments(现代仪器), 2007, 13(5): 13-15, 6.
- [11] 胡昌勤, 冯艳春. 近红外光谱法快速分析药品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- 收稿日期: 2019-07-26
(本文责编: 沈倩)