

# 痰热清注射液质量关键影响因素辨识方法初探

李文龙<sup>1</sup>, 潘建超<sup>2</sup>, 薛东升<sup>2</sup>, 刘绍勇<sup>2</sup>, 瞿海斌<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学药学院药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058;

2. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 201401)

**[摘要]** 为辨识痰热清注射液配液过程中影响最终产品质量的关键因素,采集了24个实际生产批次中5种中药提取物的近红外漫反射光谱,记录了配液过程中的31个操作参数,作为自变量;记录最终产品的总含固量和灯检合格率,作为因变量。采用偏最小二乘回归方法建立了定量校正模型,得到自变量和因变量之间的相关系数。所得总含固量和灯检合格率定量校正模型的校正相关系数分别为0.911 9,0.873 8,交叉验证的相关系数分别为0.724 2,0.795 0。根据相关系数筛选出4个与总含固量相关性较强的因素,8个与灯检合格率相关性较强的因素,并结合生产经验,对这些因素的实际意义进行了分析。该文所建方法对配液过程中影响痰热清注射液最终产品的因素进行了初步辨识,结果合理,可推广应用于解决类似问题。

**[关键词]** 近红外光谱; 痰热清注射液; 配液过程; 影响因素分析; 过程分析技术

## Primary exploration of key influential factors recognition method of Tanreqing injection

LI Wen-long<sup>1</sup>, PAN Jian-chao<sup>2</sup>, XUE Dong-sheng<sup>2</sup>, LIU Shao-yong<sup>2</sup>, QU Hai-bin<sup>1\*</sup>

(1. Pharmaceutical Informatics Institute, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Kaibao Pharmacy Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

**[Abstract]** To recognize the key influential factors during the liquid preparation process of Tanreqing injection, the near infrared (NIR) spectra of the raw materials and the operating parameters of 24 batches of physical manufacturing were recorded as independent variables, and the total soluble solids contents and the light inspection acceptance rate of the final products were collected as dependent variables. The calibration models were developed using the partial least-square regression (PLSR) method, and the correlation coefficients between the independent variables and the dependent variables were calculated. For the quantitative models, the correlation coefficients for the calibration and inner cross validation of total soluble solids contents and the light inspection acceptance rate reached 0.911 9, 0.724 2 and 0.873 8, 0.795 9, respectively. Using the correlation coefficients diagrams, several key influence factors were preliminarily determined, and the physical significance were analyzed combined with production experience. This work demonstrated that NIR spectroscopy with PLSR algorithm could be used for the key influential factors recognition during the liquid preparation process of Tanreqing injection and can be popularized to solve similar problems.

**[Key words]** near infrared spectroscopy; Tanreqing injection; liquid preparation process; key influential factors recognition; process analytical technology

痰热清注射液是由熊胆粉、山羊角、黄芩、连翘、金银花5种药材制得,主治风湿肺热病属痰热阻肺症,主要用于治疗急性支气管炎、慢性支气管炎急性

发作以及上呼吸道感染<sup>[1-3]</sup>,2009年卫生部公布的《甲型H1N1流感诊疗方案(2009试行版第三版)》中,痰热清注射液被列为重症与危重症辩证治疗方

**[收稿日期]** 2017-01-24

**[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-SH-48)

**[通信作者]** \*瞿海斌, Tel: (0571) 88208428, E-mail: quhb@zju.edu.cn

**[作者简介]** 李文龙, 讲师, 助理研究员, 主要从事中药质量控制技术研究和中药制药过程分析技术, E-mail: wshlwl@zju.edu.cn

案治疗药物,疗效显著。痰热清注射液的生产过程中,先将以上5种药材分别进行提取或水解、分离、纯化,制成纯度较高的提取物,然后采用提取物进行配液,制得注射液成品。配液过程环节较多,操作复杂,是影响痰热清注射液质量的关键过程,笔者实验室以近红外(near infrared, NIR)光谱为主要的技术工具,对这一过程所用的提取物质量及过程监控方法进行了系统研究<sup>[4-9]</sup>,发现提取物质量和配液过程直接影响成品质量,需要进行更为深入的研究。

痰热清注射液成品的总含固量和灯检合格率是2个重要的质量指标,关系到产品的质量一致性和经济效益,但配液过程中影响这2个指标的关键影响因素却不够清晰,有待进行明确辨识,以便实施精确控制。Henriksen H C等<sup>[10]</sup>通过试验设计的方法分别研究了原料与过程变量对纸浆和奶酪产品质量的影响,采用近红外光谱的主成分得分值反映原料信息,结合蒸煮配方、蒸煮时间和切片质量等工艺参数,预测了纸浆的卡伯值;Jørgensen K等<sup>[11]</sup>则采用傅里叶变化中红外(FT-IR)光谱的主成分得分值反映原料信息,结合蛋白质含量、凝乳时间、发酵剂添加,凝固物切割等工艺参数,对干酪粉(一种表征产量损失的参数)进行预测。类似方法对于中药产品质量参数的预测及其影响因素辨识具有一定的借鉴意义。但由于痰热清注射液配液过程操作步骤多、时间长、成本高,很难通过试验设计和实验室模拟的方法获取数据,而实际的批生产记录中则记录了较多的工艺参数数据,具有信息挖掘的加之。本文采集了24个批次的配液过程数据,包括5种提取物的NIR漫反射光谱和配液过程中的多项工艺参数,将各种提取物光谱的关键主成分得分值与各项工艺参数进行归一化处理,建立回归模型,对痰热清注射液成品的总含固量和灯检合格率进行预测,初步辨识出了影响这2个质量参数的主要因素。

## 1 材料

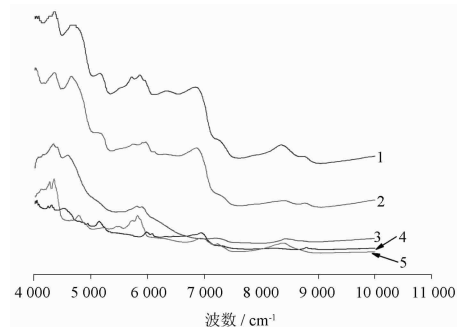
Antaris II型傅立叶变换型近红外光谱仪(Antaris II FT-NIR, Thermo fisher公司, USA),配有积分球漫反射光谱采集配件和TQ analyst (V8.0, Thermo fisher公司, USA)数据分析软件。PHSJ-3F型实验室pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);全自动异物灯检机(卫材株式会社,日本);ME104型电子天平(Mettler-Toledo公司,瑞士)。

痰热清注射液24个实际生产批次所用的熊胆

粉、山羊角、黄芩、连翘、金银花提取物取样,每个批次采集10g样品,用于光谱采集。

## 2 方法

**2.1 样品光谱采集** 采集24个批次所用到的5种提取物的样品,利用Antaris II型傅立叶变换型近红外光谱仪采集样品的NIR漫反射光谱。仪器采用积分球漫反射配件采集光谱,以仪器内置背景为参比,样品光谱采集温度控制在25℃,波数4 000~1万 $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,分辨率4 $\text{cm}^{-1}$ 。5种提取物样品的代表性NIR漫反射光谱见图1。



1. 黄芩提取物;2. 金银花提取物;3. 连翘提取物;4. 山羊角提取物;5. 熊胆粉提取物。

图1 5种中药材提取物的代表性NIR漫反射光谱

Fig. 1 The near infrared diffuse reflectance spectra of the five kinds of traditional Chinese medicine extracts

**2.2 相关生产工艺参数** 采集各批次所用各种提取物的质量、各种提取物单独配液及总混时的脱色时间和温度、静置时间和保温温度、NaOH用量及配液后的pH、丙二醇及活性炭用量、三级滤芯老化程度、超滤时药液压力及温度等,共31种。由于痰热清注射液属于中药保护品种,部分工艺涉及保密,此处对其具体生产过程不作详细描述。

**2.3 痰热清注射液成品的质量分析** 24个批次的痰热清注射液成品的总含固量采用干燥失重法测得<sup>[12]</sup>,成品采用全自动异物灯检机进行检查,灯检合格率数据由上海凯宝药业股份有限公司质量部根据实际的灯检结果数据进行统计分析而得。

**2.4 数据处理** 方法包括NIR漫反射光谱数据的主成分分析(principal component analysis, PCA)、工艺参数的标准化和偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)方法。分别采用TQ analyst (V8.0, Thermo fisher公司, USA)、Minitab

(V14, Minitab 公司, 美国) 和 The Unscrambler (V7.5, CAMO 公司, 挪威) 软件进行数据处理。

### 3 结果与讨论

**3.1 中药提取物原料光谱的主成分分析** 中药提取物物质基础复杂, 采用单一或某些化学成分的含量难以充分反映提取物的综合信息, 而 NIR 光谱信息丰富, 不仅能够反映样品的组成信息, 而且能够反映样品的物理状态, 近年来被广泛应用于中药提取物的质量控制上<sup>[13-15]</sup>。但 NIR 光谱变量之间信号重叠现象较为严重, 数据的相关性较强, 不利于进行直接分析, 需要进行一定的数据处理。本文利用 TQ Analyst 数据处理软件对黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘 5 种中药提取物 NIR 漫反射光谱进行主成分分析。进行主成分分析之前, 根据前期研究经验, 选用多元散射校正 (multiplicative scatter correction, MSC), Savitzky-Golay 平滑和一阶导数对样品光谱数据进行预处理, Savitzky-Golay 平滑选用 7 点 3 阶数据平滑。目的在于消除散射效应, 以及样品背景颜色和其他因素常导致的光谱位移或漂移<sup>[5]</sup>。进行主成分分析后, 分别提取各种提取物光谱的前 5 个主成分得分值作为自变量。对于这 5 种中药提取物而言, 前 5 个主成分都反映了 95% 以上的光谱变化信息, 可代替原始光谱对提取物原料进行表征。

**3.2 数据标准化** 本项研究采集了痰热清注射液配液过程中所用到的 31 种工艺操作参数, 这些参数无论是数值, 还是单位都有很大的不同, 为了保证这些过程变量具有可比性, 在建模之前需对其进行标准化处理。标准化处理的目的是消除不同量纲的参数对建模过程产生的影响, 标准化处理采用 Minitab 数据处理软件进行, 方法是对各变量扣除平均值后除以该变量对应的标准偏差, 经过标准化处理后的数据用于建立模型。

**3.3 回归模型的建立与验证** 利用 The Unscrambler 数据处理软件建立 PLSR 模型, 以 5 种中药提取物 NIR 漫反射光谱的主成分得分值和过程工艺参数变量作为输入变量, 以产品的总含固量和灯检合格率作为输出变量, 建立定量回归模型。由于本文仅采用了 24 个批次的生产过程数据, 样本量相对较少, 因此以留一法交叉验证 (leave-one-out cross validation, LOO-CV) 结果对模型进行评价, 该方法每次将 1 个样本作为测试样本, 而其他样本作为训练集样本, 多次循环, 直至每个样品都被预测 1 次, 统计

预测结果, 得到相应的统计值, 该方法比较适用于样本量较小时对模型性能进行评价<sup>[16-18]</sup>。以总含固量和灯检合格率回归模型为例, 将中药提取物 NIR 漫反射光谱的主成分得分值和过程工艺参数变量进行标准化处理后, 采用偏最小二乘方法进行降维, 之后分别采用前 9 个和 4 个潜变量 (latent variables, LVs) 建立模型, 模型的校正相关系数 ( $R_c$ ) 分别为 0.911 9, 0.873 8, 交叉验证的相关系数 ( $R_{cv}$ ) 分别为 0.724 2, 0.795 0; 校正集预测偏差 (root mean square of calibration, RMSEC) 分别为 1.51%, 0.14%, 交叉验证预测偏差 (root mean square error of cross validation, RMSECV) 分别为 1.62%, 0.19%。痰热清注射液总含固量和灯检合格率 2 种质量指标真实值与模型预测值的相关图见图 2。

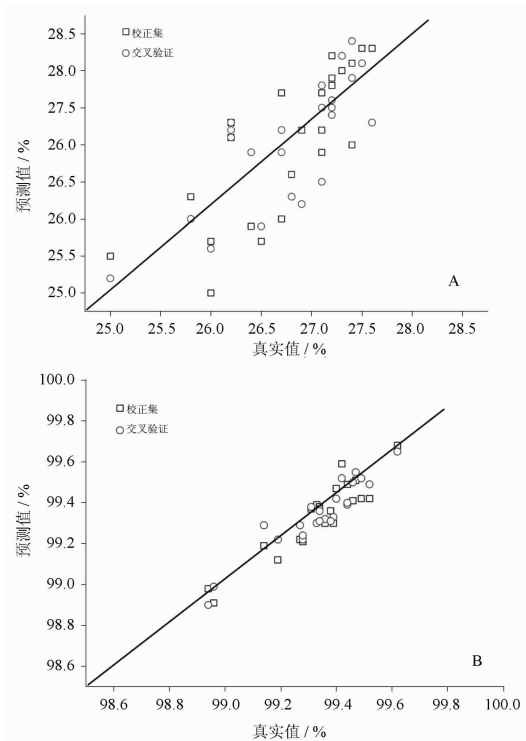


图2 痰热清注射液总含固量(A)和灯检合格率(B)的真实值与模型预测值的相关图

Fig. 2 Correlation between reference and prediction results for PLSR models of total soluble solids contents (A) and the light inspection acceptance rate (B)

不同于基于试验设计的实验室模拟试验, 本文所用数据来自实际生产, 因此无论是提取物质量 (某些不同配液批次所用到的提取物为同一批次),

还是实际操作参数,变化均较小;而且由于痰热清注射液配液过程受提取物原料和诸多过程变量和偶然因素的影响,有些工艺参数无法进行准确、实时地记录。同时,实际生产批次的产品质量波动较小,不利于得到理想的建模效果,因此模型预测的精度不能达到很高,但可清晰地观察到产品质量与所考察的因素之间存在明显的相关性。

### 3.4 痰热清注射液各质量参数的影响因素分析

分别计算各种变量与总含固量和灯检合格率之间的皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient),绘制输入变量与输出变量的相关系数图,见图3,可以发现,总含固量受第10,27,34,46变量影响较大,这4个变量分别对应着熊胆粉提取物 NIR 漫反射光谱的第5个主成分、黄芩提取物配液过程中 NaOH 的用量、山羊角单配液的二次脱色温度和总混液的脱色温度。说明总含固量受熊胆粉提取物质量的影响,具体影响方式尚不清晰;黄芩配液过程中 NaOH 的用量是影响固含量一个重要因素,推测原因,可能是由于黄芩提取物中的主要成分为黄芩苷,而黄芩苷在碱性条件下溶解性能较好,如果 pH 达不到所需的范围,则会出现溶解不充分的现象,导致存在难溶性颗粒,因此 NaOH 的用量会影响到最终产品的总含固量;山羊角提取物单配液的脱色是利用活性炭吸附后过滤,以除去山羊角提取物中的难溶性杂质,由于山羊角提取物来自动物药材,大分子杂质相对其他几种提取物较多,因此只有山羊角提取物的单配过程需要进行2次脱色,而活性炭的吸附性能受温度影响较大,因此,最终的固含量也会受山羊角单配液的2次脱色温度的影响;同理,总混液的脱色温度也是影响产品总含固量的一个重要因素。

灯检合格率主要取决于成品中可见异物的含量,可见异物是导致中药注射剂不良反应的重要因素之一,灯检不合格的产品必须报废。由于原料因素,痰热清注射液生产成本较高,灯检合格率是影响产品经济效益的一个重要因素,也是关乎产品安全性的一个重要指标,因此是厂方最为关注的问题<sup>[19]</sup>。研究发现,该项指标受第9,21,32,37,40,42,50,56输入变量的影响较大,这8个输入变量分别对应着熊胆粉提取物 NIR 漫反射光谱的第4个主成分、连翘提取物 NIR 漫反射光谱的第1个主成分、山羊角配液过程中 NaOH 的用量、连翘提取物的用量、金银花与连翘提取物混合溶液的 pH、熊胆粉

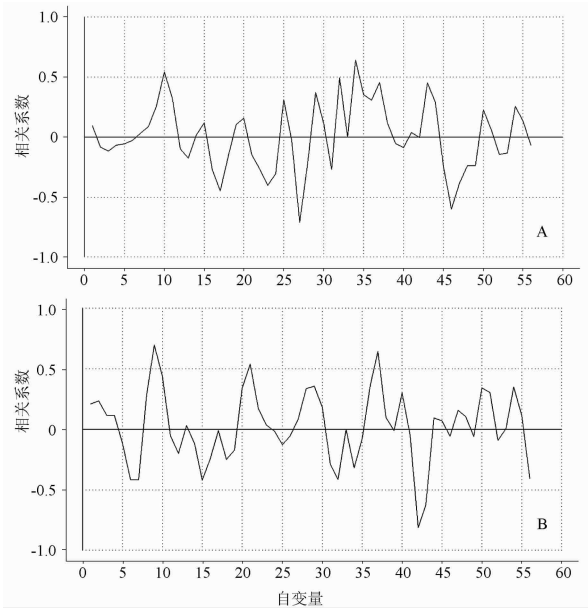


图3 痰热清注射液的含固量(A)和灯检合格率(B)与输入变量的相关系数

Fig. 3 Correlation coefficient diagrams of the input variables with the total soluble solids contents (A) and the light inspection acceptance rate (B)

提取物的用量、总混液超滤温度和最终产品的 pH。表明痰热清注射液中可见异物主要来自熊胆粉提取物和连翘提取物,与金银花和山羊角提取物也存在一定的关系,但与黄芩提取物无显著相关,这是因为黄芩提取物中黄芩苷含量大都在 95% 以上纯度较高,而其他几种提取物纯度相对较低,成分较为复杂,难以进行较为严格的控制;可见异物受多个 pH 调节操作步骤的影响,pH 不同,中药提取物中各种物质的溶解效果也不同;超滤时药液的温度也是一个重要影响因素,这是因为超滤膜的过滤性能受温度影响显著,同时温度不同,各种物质的溶解性能也不同。

以痰热清注射液灌装前的 pH 这一工艺参数为例,在 24 批生产记录中,其波动情况见图 4, pH 在  $8.26 \pm 0.13$ 。由于 pH 是影响各种化学成分溶解度的主要因素,因此也是导致可见异物含量出现波动的重要因素,因此,如果能在工艺许可的条件下,对最终 pH 进行一次调节,进一步缩小最终产品 pH 的波动范围,则对于提高产品的批次一致性和减少可见异物,都将具有一定的意义。

综上所述,为了确保痰热清注射液产品中总含固量稳定和尽可能减少可见异物,提高痰热清注射液的灯检合格率,需要针对涉及到的中药提取物进

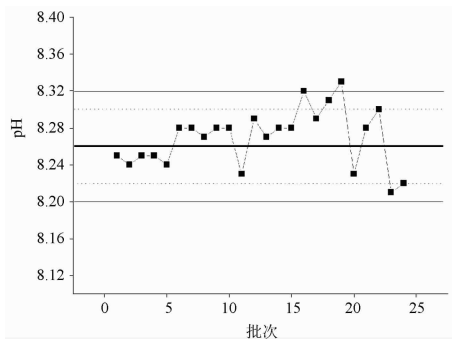


图4 24批生产记录中最终配液的pH

Fig. 4 The pH values change chart of the 24 batches of final products

行更为严格的质量控制;同时采取一定措施,重点控制影响较大的工艺参数,确保其稳定。这也是本研究的工业意义所在。当然,限于本文所采用的样品量,以上影响因素对最终产品质量的影响方式及其定量关系,仍有待进一步研究。

#### 4 结论

本文研究利用5种中药提取物原料的NIR漫反射光谱数据结合痰热清注射液配液过程的31个工艺参数建立了痰热清注射液成品品质参数的预测模型,通过因果分析排查了关键的工艺参数,初步辨识了痰热清注射液总含固量和灯检合格率2个主要质量参数的关键影响因素。所得结果提示配液过程的操作者在操作过程中,必须针对这些关键因素进行更为严格的控制,以确保最终产品的各项品质参数达标、稳定,提高产品的安全性和质量一致性。该方法需要对生产现场的原始数据进行准确记录,为使模型更为稳健,预测效果更为理想,因果关系更为明确,需要进行长期的数据积累,并探索更为高效的数据挖掘技术。但本研究结果表明,可以利用该方法对影响产品质量的关键工艺参数进行初步辨识,从而更具针对性地对痰热清注射液配液过程实施精准控制。鉴于其他中药制剂,尤其是中药注射剂的生产也存在类似的共性问题,因此,本文所提出的方法也可为其他中药注射液品种的相关研究提供参考。

#### [参考文献]

[1] 谢鹏扬,谢雁鸣,王连心,等. 注册登记研究在痰热清注射液适应病证及用药特征分析中的应用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(18): 3571.

[2] Wu T, Yang X, Zeng X, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of acute respiratory tract infections [J]. Respir Med, 2008, 102: 1093.

[3] Lv Y, Li D, Liu X, et al. Clinical observation on Tanreqing injection curing 158 sufferers of wind-heat cough [J]. Acta Chin Med Pharm, 2008, 36: 20.

[4] Li W, Xing L, Fang L, et al. Application of near infrared spectroscopy for rapid analysis of intermediates of Tanreqing injection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3): 350.

[5] 李文龙,徐金钟,刘绍勇,等. 近红外漫反射光谱法测定5种中药提取物中水分含量的研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10):1602.

[6] 李文龙,刘绍勇,薛东升,等. 近红外漫反射光谱法快速测定熊胆粉提取物中熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(19):1500.

[7] 李文龙,薛东升,刘绍勇,等. 近红外光谱法用于痰热清注射液总混中间体的快速判别[J]. 中成药, 2010, 12(32):112.

[8] Li W, Wang Y, Qu H, et al. Near infrared spectroscopy as a tool for the rapid analysis of the Honeysuckle extracts [J]. Vib Spectrosc, 2012, 62:159.

[9] Li W, Han H, Cheng Z, et al. A feasibility research on the monitoring of traditional Chinese medicine production process using NIR-based multivariate process trajectories [J]. Sens Actuators B Chem, 2016, 231:313.

[10] Henriksen H C, Næs T, Rødbotten R, et al. Simultaneous modelling of process variables and raw material properties as measured by NIR: a case study from cellulose production [J]. Chemometr Intell Lab, 2005, 77(1/2): 238.

[11] Jørgensen K, Næs T. A design and analysis strategy for situations with uncontrolled raw material variation [J]. J Chemometr, 2004, 18(2): 45.

[12] 中国药典. 二部[S]. 2010.

[13] 邵平,王钧,王星丽,等. 近红外漫反射光谱技术快速无损识别灵芝和云芝提取物研究[J]. 核农学报, 2015, 29(3):499.

[14] Huck C, Abel G, Popp M, et al. Comparative analysis of naphthodianthrone and phloroglucine derivatives in St. John's Wort extracts by near infrared spectroscopy, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis [J]. Anal Chim Acta, 2006, 580(2): 223.

[15] 李文良,弥宏,窦英,等. 近红外漫反射光谱法对蛇床子SFE萃取产物的质量监控[J]. 吉林大学学报:理学版, 2006, 44(4): 645.

[16] Chan C, Chu C, Mok D, et al. Analysis of berberine and total alkaloid content in Cortex Phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection [J]. Anal Chim Acta, 2007, 592: 121.

[17] Geladi P, Kowalski B. Partial least-squares regression: a tutorial [J]. Anal Chim Acta, 1986, 185:1.

[18] Slaughter D, Barrett D, Boersig M. Nondestructive determination of soluble solids in tomatoes using near infrared spectroscopy [J]. J Food Sci, 1996, 61:695.

[19] 谭乐俊,王萌,朱彦. 中药注射剂的不良反应研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3889.

[责任编辑 孔晶晶]