



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799224 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910229302.9

(22)申请日 2019.03.25

(71)申请人 贵州拜特制药有限公司

地址 550014 贵州省贵阳市白云区麦架镇
新材料产业园贵州拜特制药有限公司

(72)发明人 瞿海斌 潘坚扬 赵芳 薛捷
李白玲 李辉

(74)专利代理机构 北京联创佳为专利事务所
(普通合伙) 11362

代理人 张梅

(51)Int.Cl.

G01N 21/65(2006.01)

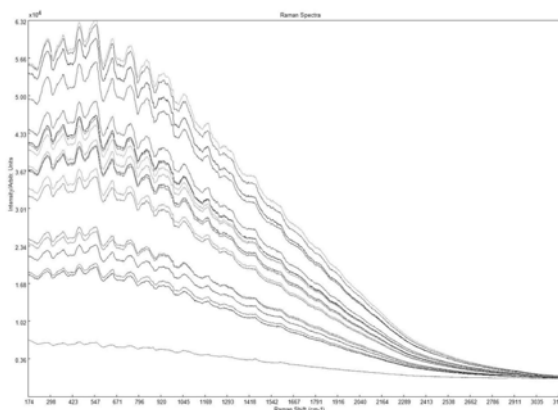
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法
及应用

(57)摘要

本发明公开了快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法及应用,该方法包括:(a)校正集样本的收集;(b)利用考马斯亮蓝法检测校正集样本中蛋白质的浓度;(c)校正集样本拉曼光谱的测定;(d)校正模型的建立;(e)待测样本的检测。本发明提供的基于拉曼光谱快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,操作简单、快速,与传统的蛋白质测定方法(化学显色法)相比,无需配制随行标曲,测定时间短;同时无需使用各项化学试剂与溶剂,具有环境友好性。实施例中丹参提取液的拉曼特征光谱与其中蛋白质浓度之间均存在较好的相关性,测量误差小于10%。本方法通过实时监测质量指标控制中药注射剂中间体的质量,进而保证中药注射剂的安全性及有效性。



1. 快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:通过测定待测中药提取液的蛋白质浓度的拉曼光谱数据,利用构建的校正模型计算得到其中蛋白质的浓度。

2. 根据权利要求1所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述方法是通过收集中药提取液校正样本,测定校正样本的拉曼光谱数据,并测定校正样本中蛋白质的浓度,根据建校正样本中蛋白质的浓度和与其对应的拉曼光谱数据建立校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

3. 根据权利要求2所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述方法是通过收集中药提取液校正样本,采用拉曼光谱技术测定校正样本的拉曼光谱数据,并采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质的作为参照值,采用偏最小二乘法或主成分回归法,分别建立校正样本中拉曼光谱数据与蛋白质浓度之间关系的校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

4. 根据权利要求3所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述校正样本的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将校正样本放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取校正样本拉曼光谱数据,其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述待测中药提取液的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将中药提取液放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取中药提取液的拉曼光谱数据,每个中药提取液的拉曼光谱需扣除暗电流,扫描3次,取平均光谱数据;其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述校正模型是应用化学计量学技术,使用多变量数据处理软件建立中药提取液中蛋白质浓度的多元校正回归模型,所述多变量数据分析法为主成分回归法或偏最小二乘法,采用留一法交叉进行内部验证确定最佳主成分数,所述校正模型的决定系数 ≥ 0.95 。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述建立校正模型还包括校正模型的验证,所述验证为:取未知提取液,测定其拉曼特征光谱数据,将其输入校正模型中,计算样本中蛋白质的浓度,与该样本按照考马斯亮蓝法测定的蛋白质浓度比较,要求测量误差小于10%。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

(a) 收集中药提取液校正样本;

(b) 校正样本蛋白质浓度参照值测定:采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质浓度;

(c) 校正样本拉曼光谱的测定:将校正集样品置于拉曼光谱仪配套的比色皿架中进行扫描,获取校正样本拉曼特征光谱数据;

(d) 建立校正模型:采用多变量数据分析方法,建立校正集样本中蛋白质浓度与对应的

拉曼特征光谱之间关系的数学模型,即为校正模型;

(e) 待测中药提取液检测:采集待测中药提取液的拉曼特征光谱数据,并将此光谱数据输入校正模型中,计算待测样本中蛋白质浓度。

9. 一种根据权利要求1-8任一项所述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法在丹参提取液中蛋白质浓度的快速测定的应用。

快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及涉及生产过程质量监测,特别是快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法及应用。

背景技术

[0002] 蛋白质为中药注射液中常见的一类杂质,测定其含量对控制中药注射液质量、保障中药注射液使用安全有重要意义。《中国药典》中所列举的蛋白质定量分析手段包括凯氏定氮法、福林酚试剂法、双缩脲法、考马斯亮蓝法、2,2'-联喹啉-4,二羧酸(BCA)法及紫外-可见分光光度法。以上方法适用对象不尽相同,紫外-可见分光光度法仅适用于纯化蛋白质的检测,凯氏定氮法灵敏度较低且复杂体系中干扰物较多,其余试剂法均需要显色试剂与样品反应后再以比色法进行进一步测定,操作复杂,耗时较长,对操作人员的水平有较高要求,且对环境有一定污染,复杂体系中其他非蛋白质类成分也可能对测定结果有干扰。

[0003] 拉曼光谱分析技术是一种以拉曼散射为基础的分子光谱分析方法,其信号来源于物质分子的振动和转动。拉曼光谱与分子红外光谱不同,极性分子和非极性分子都能产生拉曼光谱。拉曼光谱的应用范围遍及化学、物理学、生物学和医学等各个领域,拉曼光谱对于定性分析、定量分析和测定分子结构都有很大价值。拉曼光谱分析方法不需要对样品进行前处理,样品需求量少,在分析过程中具有操作简便、测定时间短、消耗化学品少、检测灵敏度高优点。

[0004] 拉曼光谱技术应用于中药制剂生产过程中中间体质量实时监测和快速检测的另一优势在于,样品的拉曼光谱受水的干扰极弱,在实际测量过程中几乎可以不用考虑水分子振动对样品光谱产生的影响,因此可以直接用于不经任何预处理的中药材提取液的快速检测。

[0005] 传统的蛋白质测定方法操作复杂、处理速度较慢,需要预处理与额外的试剂、溶剂,不符合绿色制造的理念,不利于药品中间体实时放行的实现。因此发明一种快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于,提供快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法。本发明操作简单、快速,无需预处理与额外的试剂、溶剂,符合绿色制造的理念,有利于药品中间体实时放行的实现;此外本发明的方法可有效解决中药注射液经精制处理后残留蛋白质的监测问题,使中药注射液的安全性得到保证,可用于中药注射液生产全过程中中间体蛋白质浓度的监测与控制。

[0007] 本发明的技术方案:快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,通过测定待测中药提取液的蛋白质浓度的拉曼光谱数据,利用构建的校正模型计算得到其中蛋白质的浓度。

[0008] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述方法是通过收集中药提

取液校正样本,测定校正样本的拉曼光谱数据,并测定校正样本中蛋白质的浓度,根据建校正样本中蛋白质的浓度和与其对应的拉曼光谱数据建立校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

[0009] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述方法是通过收集中药提取液校正样本,采用拉曼光谱技术测定校正样本的拉曼光谱数据,并采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质的作为参照值,采用偏最小二乘法或主成分回归法,分别建立校正样本中拉曼光谱数据与蛋白质浓度之间关系的校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

[0010] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述校正样本的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将校正样本放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取校正样本拉曼光谱数据,其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

[0011] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述待测中药提取液的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将中药提取液放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取中药提取液的拉曼光谱数据,每个中药提取液的拉曼光谱需扣除暗电流,扫描3次,取平均光谱数据;其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

[0012] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述校正模型是应用化学计量学技术,使用多变量数据处理软件建立中药提取液中蛋白质浓度的多元校正回归模型,所述多变量数据分析法为主成分回归法或偏最小二乘法,采用留一法交叉进行内部验证确定最佳主成分数,所述校正模型的决定系数 ≥ 0.95 。前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述建立校正模型还包括校正模型的验证,所述验证为:取未知提取液,测定其拉曼特征光谱数据,将其输入校正模型中,计算样本中蛋白质的浓度,与该样本按照考马斯亮蓝法测定的蛋白质浓度比较,要求测量误差小于10%。

[0013] 前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法中,所述方法包括以下步骤:

[0014] (a) 收集中药提取液校正样本;

[0015] (b) 校正样本蛋白质浓度参照值测定:采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质浓度;

[0016] (c) 校正样本拉曼光谱的测定:将校正集样品置于拉曼光谱仪配套的比色皿架中进行扫描,获取校正样本拉曼特征光谱数据;

[0017] (d) 建立校正模型:采用多变量数据分析方法,建立校正集样本中蛋白质浓度与对应的拉曼特征光谱之间关系的数学模型,即为校正模型;

[0018] (e) 待测中药提取液检测:采集待测中药提取液的拉曼特征光谱数据,并将此光谱数据输入校正模型中,计算待测样本中蛋白质浓度。

[0019] 一种前述的快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法在丹参提取液中蛋白质浓度的快速测定的应用。

[0020] 本发明采用考马斯亮蓝法测定校正集样本中的蛋白质浓度,依照《中国药典》2015

版第四部通则0731中所述方法,依据在酸性溶液中考马斯亮蓝G250与蛋白质分子中的碱性氨基酸(精氨酸)和芳香族氨基酸结合形成蓝色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线,采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。考马斯亮蓝法的干扰物质(去污剂、Triton X-100,十二烷基硫酸钠)理论上不应在中药提取液中存在,因此对于中药提取液中蛋白质浓度的测定而言具有较高的适用性。

[0021] (1) 酸性染色液的配制:取考马斯亮蓝G250 0.1g,加乙醇50ml溶解后,加磷酸100ml,加水稀释至1000ml,混匀,滤过,取滤液,即得。

[0022] (2) 对照品溶液的制备:取血清白蛋白对照品10mg,加水稀释至10ml,制成每毫升含蛋白质1mg的标准品母液;取标准品母液1ml,加水稀释至10ml,制成每毫升含蛋白质0.1mg的标准品溶液。

[0023] (3) 标准曲线的制作:精密量取(2)中所得标准品溶液0.0ml、0.1ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml分别置标记为0~6号的具塞试管中,加水至1.0ml后,再分别加入(1)中所得酸性染色液5.0ml,立即混匀,照紫外-可见分光光度法,在595nm波长处测定吸光度;同时以0号试管为空白。以对照品溶液浓度(x)与其相对应的吸光度(y)计算线性回归方程。

[0024] (4) 样品溶液的制备:精密称取校正集样本溶液0.5g,加水稀释至10mL,为样品稀释液。

[0025] (5) 样品溶液中蛋白质浓度的测定:精密量取(4)中所得样品稀释液1.0mL,同(3)项中测定操作,从线性回归方程中计算样品稀释液中的蛋白质浓度,乘以稀释倍数,即得校正集样本溶液中的蛋白质浓度。

[0026] 本发明采用拉曼光谱技术采集校正集样本特征光谱,获得样本溶液中化学物质的整体信息。拉曼光谱对于定性分析、定量分析和测定分子结构都有很大价值。拉曼光谱分析方法不需要对样品进行前处理,样品需求量少,在分析过程中具有操作简便、测定时间短、消耗化学品少、检测灵敏度高等优点。拉曼光谱技术应用于中药制剂生产过程中中间体质量实时监测和快速检测的另一优势在于,样品的拉曼光谱受水的干扰极弱,在实际测量过程中几乎可以不用考虑水分子振动对样品光谱产生的影响,因此可以直接用于不经任何预处理的中药材提取液的快速检测。

[0027] 所用拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%(探头端功率约为300mW),积分时间10000ms。将校正集样品溶液置于10mm光程的石英比色皿中,置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取样本的拉曼特征光谱数据。

[0028] 本发明应用化学计量学技术,使用多变量数据处理软件建立中药提取液中蛋白质浓度的多元校正回归模型。所述多变量数据分析法为主成分回归法(PCR法)或偏最小二乘法(PLS法)。采用留一法交叉进行内部验证确定最佳主成分数,当校正模型的决定系数到0.95以上,认为模型已经建立完成,即所建校正模型的决定系数 ≥ 0.95 。

[0029] 所述校正模型的建立还包括校正模型的验证,所述验证为:取未知蛋白质浓度的中药提取液,在上述过程中同样参数下测定其拉曼光谱,将其输入上述的校正模型中,计算中提取液中的蛋白质浓度,与该样本按照上述测定的蛋白质浓度比较,要求测量误差小于10%。作为验证集的样品蛋白质浓度需要落在相应校正集样本蛋白质浓度的变化范围之内。

- [0030] 上述校正模型可以根据实际需要,增加校正集和验证集,对模型不断更新与完善。
- [0031] 本发明通过收集一定数量的中药提取液样品作为校正样本集,以一定的采集方式扫描得到校正样本集的拉曼光谱图。以考马斯亮蓝法测定的样本蛋白质浓度结果作为参照值,应用偏最小二乘法或主成分回归法,建立中药提取液的拉曼光谱与蛋白质浓度之间关系的多元校正模型。按同样的方法测定未知蛋白质浓度的中药提取液的拉曼光谱,利用已构建的校正模型即可快速计算得到其中蛋白质的浓度。
- [0032] 本发明还提供了所述的方法在丹参提取液的蛋白质浓度测定中的应用。
- [0033] 与现有技术相比,本发明具备的有益效果包括:
- [0034] (1) 本发明提供的拉曼光谱快速测定中药提取液中蛋白质浓度的方法,与传统的蛋白质测定显色法相比,操作简单、快速,无需预处理与额外的试剂、溶剂,符合绿色制造的理念,有利于药品中间体实时放行的实现。
- [0035] (2) 所述方法可有效解决中药注射液经精制处理后残留蛋白质的监测问题,使中药注射液的安全性得到保证,可用于中药注射液生产全过程中间体蛋白质浓度的监测与控制,有潜力在中药制剂的生产过程中得到广泛的推广与应用。
- [0036] 以下为发明人具体实验过程:
- [0037] 恤彤注射液为由丹参素与盐酸川芎嗪为主要药效成分的复方注射液。丹参药材经提取、精制及超滤后所得的丹参提取液为中间体,其质量与最终恤彤注射液质量直接相关,测定其中相关物质的含量为必要的质量控制手段。
- [0038] 1. 校正集样本的收集:
- [0039] 在丹参提取液生产过程中,收集不同批次、不同处理过程的精制工艺中间体,所得溶液即为校正集样本。
- [0040] 2. 校正集样本中蛋白质浓度参照值的测定:
- [0041] 采用考马斯亮蓝法测定样本中的总蛋白质;
- [0042] 依照《中国药典》2015版第四部通则0731中所述方法,依据在酸性溶液中考马斯亮蓝G250与蛋白质分子中的碱性氨基酸(精氨酸)和芳香族氨基酸结合形成蓝色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线,采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。考马斯亮蓝法的干扰物质(去污剂、Triton X-100,十二烷基硫酸钠)在本法所测样本中均未含有,因此对于本法对象的蛋白质浓度的测定而言较为合适。
- [0043] (1) 酸性染色液的配制:取考马斯亮蓝G250 0.1g,加乙醇50ml溶解后,加磷酸100ml,加水稀释至1000ml,混匀,滤过,取滤液,即得。
- [0044] (2) 对照品溶液的制备:取血清白蛋白质10mg,加水稀释至10ml,制成每毫升含蛋白质1mg的标准品母液;取标准品母液1ml,加水稀释至10ml,制成每毫升含蛋白质0.1mg的标准品溶液。
- [0045] (3) 标准曲线的制作:精密量取(2)中所得标准品溶液0.0ml、0.1ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml分别置标记为0~6号的具塞试管中,加水至1.0ml后,再分别加入(1)中所得酸性染色液5.0ml,立即混匀,照紫外-可见分光光度法,在595nm波长处测定吸光度;同时以0号试管为空白。以对照品溶液浓度(x)与其相对应的吸光度(y)计算线性回归方程,标准曲线如图4所示。

[0046] (4) 样品溶液的制备:精密称取校正集样本溶液0.5g,以水稀释至10mL,为样品稀释液。

[0047] (5) 样品溶液中蛋白质浓度的测定:精密量取(4)中所得样品稀释液1.0mL,同(3)项中测定操作,从线性回归方程中计算样品稀释液中的蛋白质浓度,乘以稀释倍数,即得校正集样本溶液中的蛋白质浓度。

[0048] 3. 校正集样本拉曼光谱的测定:

[0049] 将校正集样品置于拉曼光谱仪配套的比色皿架中进行扫描,获取校正集样本拉曼特征光谱数据;

[0050] 所用拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%(探头端功率约为300mW),积分时间10000ms。将校正集样品溶液置于10mm光程的石英比色皿中,置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上进行光谱扫描,获取样本的拉曼特征光谱数据。

[0051] 4. 校正模型的建立:

[0052] 采用多变量数据分析方法,建立校正集样本中蛋白质浓度与对应的拉曼特征光谱之间关系的数学模型;

[0053] 用BWIQ™软件(美国B&W Tek Opto-Electronics)处理原始数据。

[0054] 拉曼光谱中包含了大量的样品信息,很难从中选出与特定理化性质相关的信息,而且不同样品的光谱差别很微小,用肉眼难以分辨;同时,仪器状态、样品状态与测量条件的差异造成拉曼光谱发生细微的平移或旋转。因此,在建立拉曼光谱校正模型时,用于消除光谱的无关信息和噪音的预处理方法就显得十分关键和必要。

[0055] 常用的光谱预处理方法有多种。均值中心化(Mean centering)、标准化(autoscaling)和归一化(Normalization)算法等用于降低直至消除一些冗余信息,从而在降低样品间相关性的同时,也能够增大样本之间的差异,进而达到提高模型的重现性和预测能力的效果;平滑处理算法如Savitzky-Golay卷积平滑(SG Smooth)、移动平均平滑(Moving Average Smooth,MAS)等是消除噪声常用的方法,其基本假设是光谱含有的噪声为零均值随机白噪声,若多次测量取平均值可降低噪声提高信噪比;傅里叶变换(Fourier Transform,FT)可以用于实现光谱的平滑、降噪、数据压缩、信息提取等;标准正态变换(Standard Normal Variate,SNV)用来减小颗粒大小不均匀和粒子表面非特异性散射的影响;多元散射校正(Multiplicative Scatter Correction,MSC)可消除漫反射光谱中由于样品的镜面反射及不均匀造成的噪声,消除光谱的基线漂移现象及光谱的不重复性;一阶导数(First-order derivative algorithm,1ST DA)及二阶导数算法(Second-order derivative algorithm,2nd DA)是光谱分析中常用的基线校正和光谱分辨预处理方法;正交信号校正(Orthogonal Signal Correction,OSC)可以有效地取出光谱数据中所包含的各种干扰噪声信号。由于仪器、样品和测量条件的变化,光谱的变异并没有规律可循,因此预处理并没有通用的组合方案。实际处理时,会依照一定的次序组合上述的几种方法用于具体情况具体分析。同时,光谱波长变量数量多,强度弱以及重叠严重等因素对预测结果也有不利影响,因此筛选合适的特征波段进行建模也是必要的预处理手段。

[0056] 最常使用的多元校正算法有多元线性回归(Multivariate Linear Regression,MLR)、主成分回归(Principle Component Regression,PCR)、偏最小二乘回归(Partial

Least Squares Regression, PLSR) 等。其中, 主成分回归 (PCR) 法是一种可以有效解决变量间共线性问题的建模方法, 该方法不是直接在Y矩阵和X矩阵之间建立联系, 而是对X矩阵中的信息进行重组后提取出对目标组分反映最准确的光谱信息, 综合重组变量可以将具有多重共线性的重叠信息分离出来, 同时又对光谱的信息进行了挑选, 将有用信息从干扰噪声中提取开来, 提高模型的精度和预测能力。PLSR算法是现今较为成熟、应用最广泛的回归算法, 在计算时不但对光谱数据矩阵X进行了分解, 而且对浓度矩阵Y也进行了主成分分析。

[0057] 对建立好的模型必须通过对预测集的样本的预测来判断校正模型的质量, 对应的模型性能评价指标有决定系数 (R^2)、内部交叉验证均方差 (Root mean square error of cross validation, RMSECV)、预测均方差 (Root mean square error of prediction, RMSEP) 来考察所建立的模型的性能和预测效果。

[0058] 对样本集拉曼光谱数据采用不同的预处理方法进行处理, 使用PLS法及PCR法建立丹参提取液特征光谱信息和蛋白质浓度之间的校正模型, 采用留一法全交叉法进行验证。不同模型的预处理方法组合、建模算法、主成分数、校正集的决定系数 R^2 及RMSECV以及验证集的RMSEP如表1所示。

[0059] 表1不同方法建模所得的丹参提取液特征光谱信息和蛋白质浓度之间的校正模型性能

预处理方法	算法	主成分数	R^2	RMSECV (mg/g)	RMSEP (mg/g)
无预处理	PLS	3	0.3714	0.1268	0.0355
SG	PLS	3	0.3189	0.1375	0.0589
MAS	PLS	3	0.3759	0.1293	0.0583
FT	PLS	3	0.3677	0.1292	0.0329
Wit 平滑法	PLS	3	0.3170	0.1366	0.0461
MAS+1 st DA	PLS	3	0.8716	0.1374	0.3018
[0060] MAS+2 nd DA	PLS	3	0.8351	0.1820	0.4062
MAS+SNV	PLS	4	0.7488	0.0789	0.0149
MAS+Mean Centering	PLS	1	0.3450	0.1272	0.0222
FT+SNV	PLS	4	0.8404	0.0628	0.0120
FT+Mean Centering	PLS	1	0.3443	0.1273	0.0223
SG+1 st DA+SNV	PLS	3	0.9361	0.0398	0.0553
SG+2 nd DA+SNV	PLS	2	0.6563	0.0935	0.0591
SNV+1 st DA	PLS	3	0.9414	0.0381	0.0887

	SG+1STDA+SNV+MAS	PLS	3	0.9684	0.0280	0.0554
	SNV+2 ND DA	PLS	3	0.8359	0.0651	0.1768
	Autoscaling	PLS	1	0.3347	0.1283	0.0250
	Rangescale	PLS	1	0.3396	0.1587	0.0646
	Rangescale+波长筛选 (175-1995)	PLS	4	0.9626	0.0323	0.0377
	SNV+1ST+波长筛选 (175-1995)	PLS	4	0.9467	0.0363	0.0873
	移动平滑窗 +Rangescale	PLS	1	0.3396	0.1587	0.0646
	移动平滑窗 +Rangescale+波长筛 选(175-1995)	PLS	4	0.9509	0.0356	0.0432
[0061]	SG+1 ST DA+SNV+MAS	PCR	5	0.5403	0.1068	0.0582
	SG+1 ST DA+SNV	PCR	6	0.6805	0.0889	0.0528
	SNV+SG+1 ST DA	PCR	5	0.6306	0.0956	0.0435
	Rangescale+波段筛选 (175-1995)	PCR	1	0.3437	0.1573	0.0659
	SG+1 ST DA	PCR	5	0.2886	0.2207	0.1634
	SG+2 ND DA	PCR	5	0.3020	0.3171	0.2667
	Mean Centering	PCR	1	0.3451	0.1273	0.0223
	Autoscaling	PCR	3	0.3368	0.1281	0.0250
	SNV	PCR	5	0.5482	0.1058	0.0437

[0062] 经多个预处理方法得到的模型性能的比较,证明依次经过SG平滑、一阶求导、标准正态、移动平均窗处理后的光谱可建立性能最为稳健的模型,其 R^2 、RMSECV最小、RMSEP较小,丹参提取液的拉曼光谱与蛋白质浓度之间存在非常好的相关性。以该定量校正模型预测的蛋白质浓度与考马斯亮蓝法测定的参照值之间的相关关系图参见附图4,由图可知以上模型预测值与参照值之间相关性良好,模型有较好的性能。

[0063] 5. 待测样本的检测:

[0064] 采集待测样品的拉曼特征光谱数据,并将此光谱数据输入“4”中所得校正模型中,计算待测样本中蛋白质浓度。表2为待测的3个样本的蛋白质浓度实测值与预测值。

[0065] 表2丹参提取液验证集样本蛋白质浓度实测值与预测值

样本编号	蛋白质浓度实测值 (mg/g)	模型预测值 (mg/g)
1	1.2480	1.3100
2	1.4310	1.4592
3	1.3610	1.4282

[0067] 通过预测结果与实测结果比较可知,本法所建模型对未知丹参提取液样品中的蛋白质浓度具有较好的预测能力。

[0068] 综上所述,本发明操作简单、快速,无需预处理与额外的试剂、溶剂,符合绿色制造的理念,有利于药品中间体实时放行的实现;此外本发明的方法可有效解决中药注射液经精制处理后残留蛋白质的监测问题,使中药注射液的安全性得到保证,可用于中药注射液生产全过程中间体蛋白质浓度的监测与控制。

附图说明

[0069] 图1为丹参提取液校正集样品的拉曼光谱图;

[0070] 图2为丹参提取液校正集样品经优选预处理后的光谱图;

[0071] 图3为考马斯亮蓝法测定血清白蛋白标准溶液中蛋白质浓度的线性回归曲线;

[0072] 图4为丹参提取液中蛋白质浓度的参照值与模型预测值之间的相关关系图。

具体实施方式

[0073] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不作为对本发明限制的依据。

[0074] 实施例。快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法,通过测定待测中药提取液的蛋白质浓度的拉曼光谱数据,利用构建的校正模型计算得到其中蛋白质的浓度。

[0075] 所述方法是通过收集中药提取液校正样本,测定校正样本的拉曼光谱数据,并测定校正样本中蛋白质的浓度,根据建校正样本中蛋白质的浓度和与其对应的拉曼光谱数据建立校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

[0076] 所述方法是通过收集中药提取液校正样本,采用拉曼光谱技术测定校正样本的拉曼光谱数据,并采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质的作为参照值,采用偏最小二乘法或主成分回归法,分别建立校正样本中拉曼光谱数据与蛋白质浓度之间关系的校正模型,将待测中药提取液的拉曼光谱数据输入构建的校正模型中,即可计算得到其中蛋白质的浓度。

[0077] 所述校正样本的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将校正样本放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获取校正样本拉曼光谱数据,其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

[0078] 所述待测中药提取液的拉曼光谱数据是通过拉曼光谱技术进行测定,将中药提取液放入10mm光程的石英比色皿中,并置于拉曼光谱仪配套的比色皿架上,进行光谱扫描,获

取中药提取液的拉曼光谱数据,每个中药提取液的拉曼光谱需扣除暗电流,扫描3次,取平均光谱数据;其中拉曼光谱仪激光波长785nm,拉曼位移范围173.7-3200.8 cm^{-1} ,分辨率4.5 cm^{-1} ,激光强度50%,积分时间10000ms。

[0079] 所述校正模型是应用化学计量学技术,使用多变量数据处理软件建立中药提取液中蛋白质浓度的多元校正回归模型,所述多变量数据分析法为主成分回归法或偏最小二乘法,采用留一法交叉进行内部验证确定最佳主成分数,所述校正模型的决定系数 ≥ 0.95 。所述建立校正模型还包括校正模型的验证,所述验证为:取未知提取液,测定其拉曼特征光谱数据,将其输入校正模型中,计算样本中蛋白质的浓度,与该样本按照考马斯亮蓝法测定的蛋白质浓度比较,要求测量误差小于10%。

[0080] 所述方法包括以下步骤:

[0081] (a) 收集中药提取液校正样本;

[0082] (b) 校正样本蛋白质浓度参照值测定:采用考马斯亮蓝法测定校正样本中蛋白质浓度;

[0083] (c) 校正样本拉曼光谱的测定:将校正集样品置于拉曼光谱仪配套的比色皿架中进行扫描,获取校正样本拉曼特征光谱数据;

[0084] (d) 建立校正模型:采用多变量数据分析方法,建立校正集样本中蛋白质浓度与对应的拉曼特征光谱之间关系的数学模型,即为校正模型;

[0085] (e) 待测中药提取液检测:采集待测中药提取液的拉曼特征光谱数据,并将此光谱数据输入校正模型中,计算待测样本中蛋白质浓度。

[0086] 上述快速检测中药提取液中蛋白质浓度的方法在丹参提取液中蛋白质浓度的快速测定的应用。

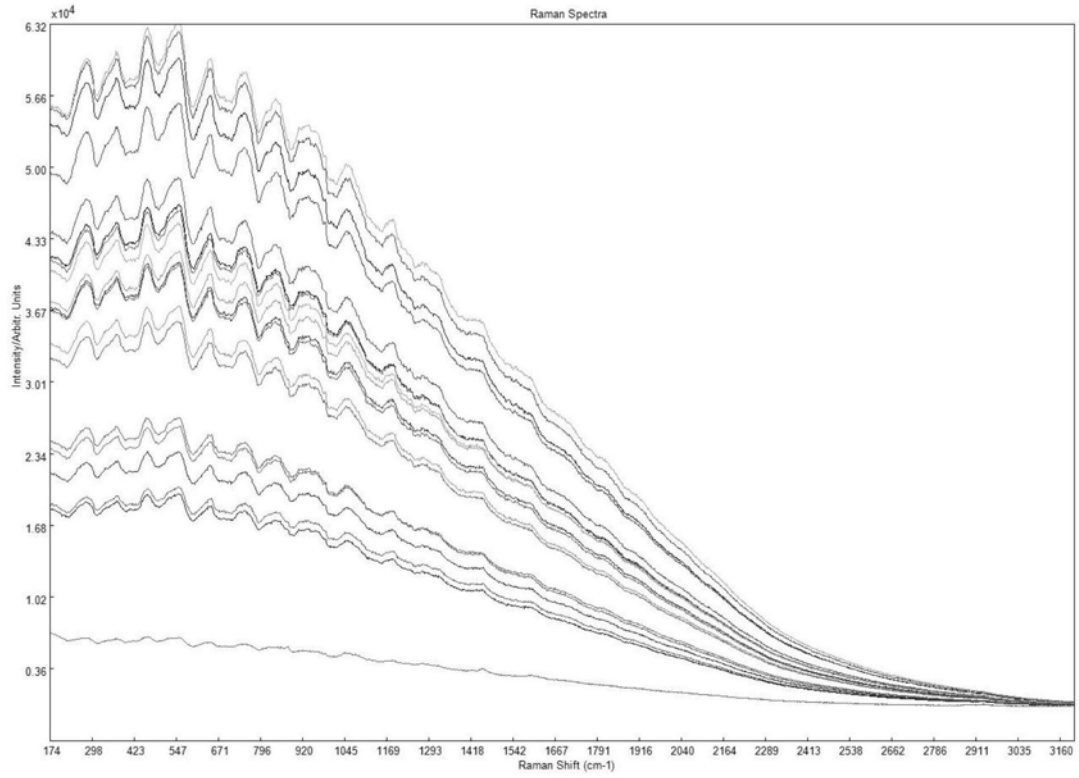


图1

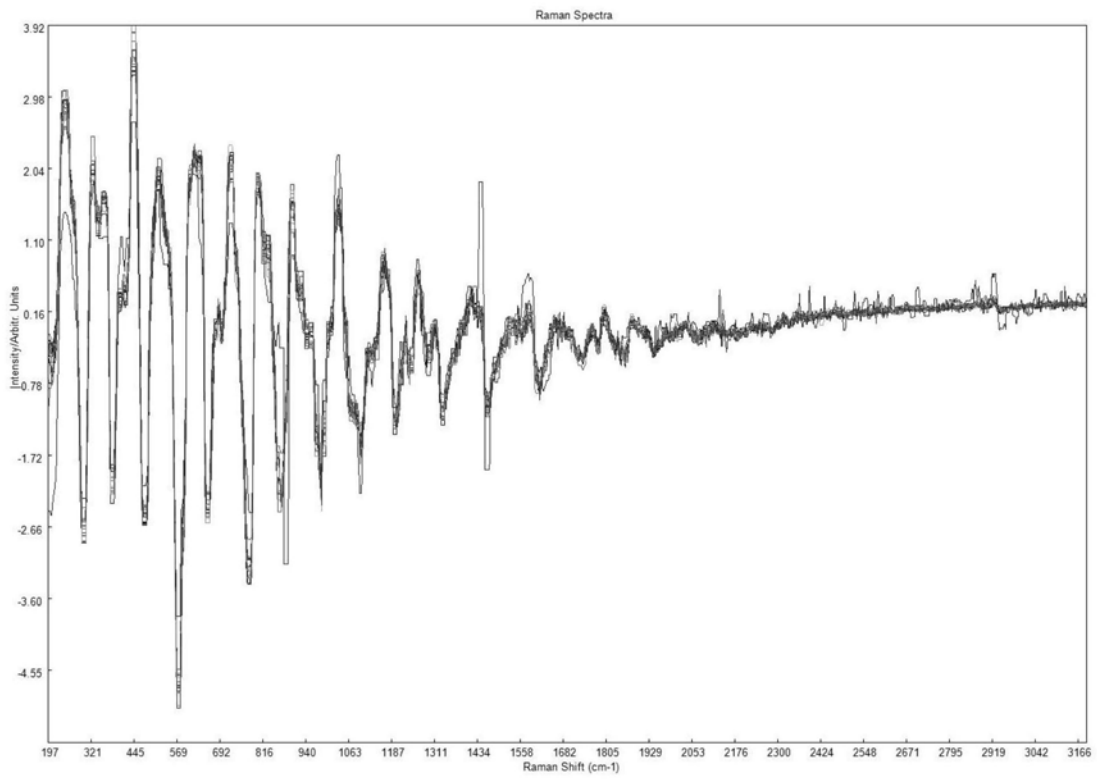


图2

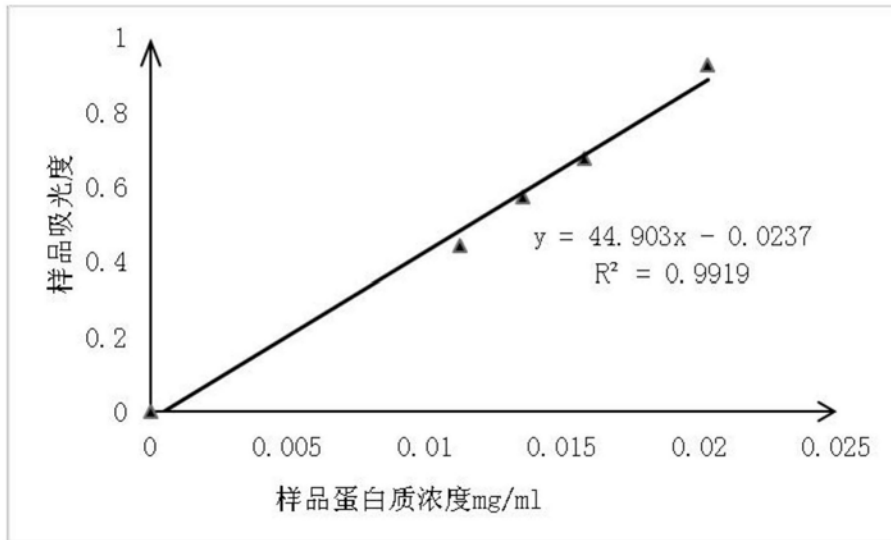


图3

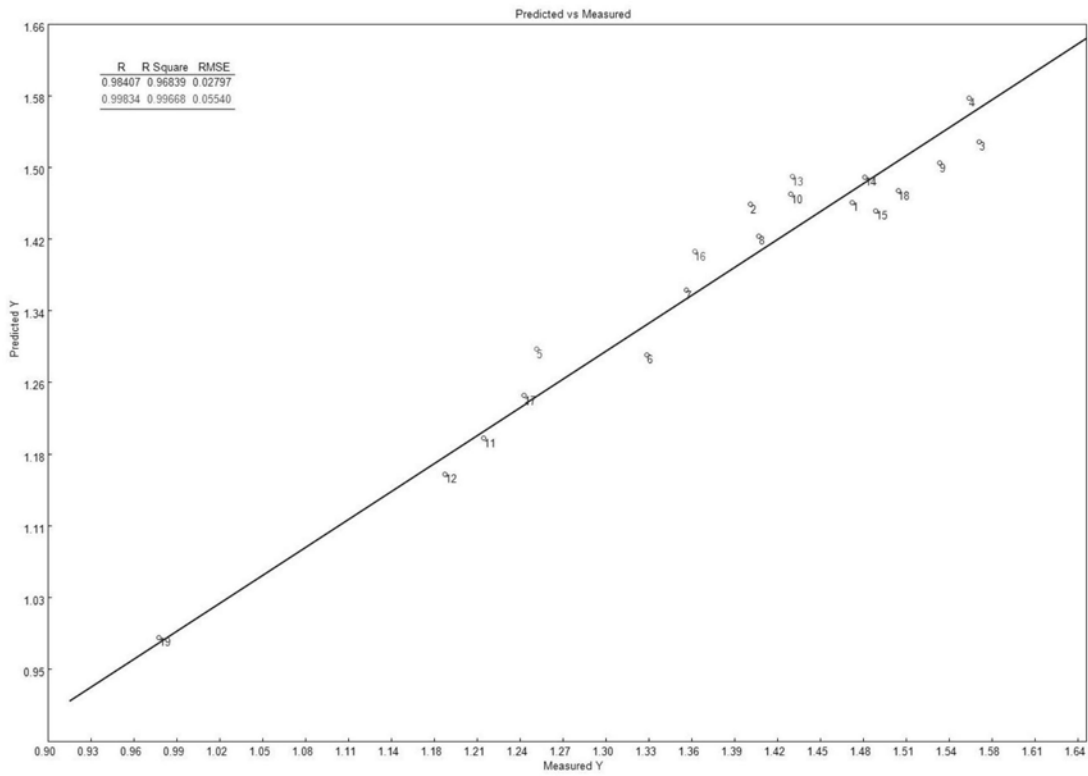


图4