

近红外光谱技术用于正天丸混合过程终点的判断

陈红英¹, 李琼娅¹, 陈佳乐², 栾连军², 代瑶霞¹

(1. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110;

2. 浙江大学药学院, 杭州 310058)

[摘要] 目的:利用近红外光谱(near-infrared spectroscopy, NIR)技术分析正天丸的混合过程,建立一种快速判断混合终点的方法,以提高混合过程的均匀度和混合效率。方法:采用在线取样采集正天丸混合过程中粉末的 NIR,计算不同时间点混合均匀度,利用主成分分析(principal component analysis, PCA)结合马氏距离判断粉末混合终点。采用 HPLC 测定不同混合时间点芍药苷含量以验证定性判断结果,检测波长 235 nm,流动相 0.05% 磷酸-乙腈梯度洗脱。结果:随着混合时间的延长,粉末混合均匀度增大,20 min 后达 97% 以上;PCA-马氏距离判断结果显示 20 min 后,到校正光谱的马氏距离基本保持不变(<1.0),提示混合达到均匀状态,定量验证结果显示 20 min 后芍药苷含量的 RSD 趋于稳定。结论:近红外光谱技术可用于判定正天丸的混合过程终点,为其他大品种制剂的研究提供了参考。

[关键词] 正天丸; 近红外光谱; 混合终点; 马氏距离; 主成分分析

[中图分类号] R283.6;R944.2;R284.1;O433.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0013-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120013

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160405.1534.002.html>

[网络出版时间] 2016-04-05 15:34

End Point Judgment of Blending Process of Zhengtian Pills by Near Infrared Spectroscopy

CHEN Hong-ying¹, LI Qiong-ya¹, CHEN Jia-le², LUAN Lian-jun², DAI Yao-xia¹

(1. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid method was established to judge the end point of blending process of Zhengtian pills by near-infrared spectroscopy, which was in order to improve blending efficiency of this preparation. **Method:** Near-infrared spectroscopy of blending samples were collected, then blending uniformity was calculated at different time. Principal component analysis (PCA) combined with Mahalanobis distance was used to identify the end point of blending process. HPLC was employed to determine the content of paeoniflorin in order to verify judgment. **Result:** Blending uniformity of powders increased with blending time extended. After 20 min, blending uniformity reached more than 97%. PCA-Mahalanobis distance results showed that distance remained below 1.0 and kept unchanged basically, suggesting that blending process reached the end point. Quantitative validation results showed that RSD of paeoniflorin content tended to stable after 20 min. **Conclusion:** Near-infrared spectroscopy technology can be used to determine the end point of blending process of Zhengtian pills.

[Key words] Zhengtian pills; near-infrared spectroscopy; end point of blending process; Mahalanobis distance; principal component analysis

正天丸是华润三九医药股份有限公司独家品种 (国药准字 Z44020711), 2007 年以来名列全国中药

[收稿日期] 20160119(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09201022)

[第一作者] 陈红英, 硕士, 高级工程师, 从事新药制剂研究, Tel:0755-83360999, E-mail:2215183393@qq.com

头痛药销量第一,年销售额 >4 亿元。正天丸由白芍、钩藤、川芎等 15 味药材粉碎成细粉后混合制丸而成,其混合过程是该丸剂生产的关键环节,混合的均匀性对产品质量影响很大,同时该品种各药材细粉比重的差异较大,纤维性强,不容易混匀。传统的混合过程检测方法需要消耗较长时间,难以实时反映混合过程瞬间变化趋势并及时有效地反馈至混合过程。近年来,近红外技术已被广泛应用于中药材生产过程的在线监控^[1-5]等领域,在中药固体制剂混合过程的成功应用也有报道^[6-8]。但目前并无针对正天丸混合过程终点快速判断的研究,本实验利用近红外光谱技术考察正天丸混合过程中均匀度变化,利用主成分分析法结合马氏距离判断其混合终点,并利用 HPLC 测定不同时间点芍药苷含量以验证定性判定的准确性。马氏距离法相对于传统的移动窗标准偏差法,计算方法更简便,且不需要在短时间内多次取样就可以达到研究目的。通过近红外光谱技术与 HPLC 合用,实现正天丸混合过程的在线质量监控并及时判断混合终点,对提高正天丸生产过程中质量控制技术水平和改善该产品的质量稳定性具有重要意义。

1 材料

Antaris II 型傅立叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司),JYNU75-75 型超微粉碎机(青岛捷怡纳机械科技有限公司),YYH-6000 型一维运动混合机(常州市震华干燥设备有限公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。芍药苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15090711),水为超纯水,乙腈和磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 在线取样 将正天丸原药材混合粉碎后进入一维混合机,每批约 1 800 kg,物料填充度 40%,混合时间总计 30 min,取样时间点分别为 0,10,20,30 min。为保证样品的代表性,每个时间点分别在混合罐的上中下、前中后设置 14 个取样点;每批次得到 56 份样品,重复 3 个批次(批号分别为 1412054H,1412057H,1412056H),共计 168 份样品。

2.2 光谱采集 采集混合粉末的漫射光谱,采集时取混合过程样品粉末于样品槽中,利用漫反射积分球采集近红外光谱,以空气为参比,扫描数 32 次,分辨率 8 cm⁻¹,扫描光谱 4 000 ~ 10 000 cm⁻¹;每个样品重复采集 3 次,保存平均光谱,数据保存格式为 1/logR。样品装载量、紧实程度等均会影响吸光度,

实验中使粉末靠自身重力,填充于样品槽中,与槽边沿齐平,尽量减少因人为因素造成的误差。

2.3 混合均匀度的计算 混合均匀度(T)一般用变异系数(coefficient of variation, CV)来表示, T 越大说明均匀度越高^[9]。

$$RSD_j = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x}_j)^2 / n - 1}}{\bar{x}_j} \times 100\%$$

$$CV = \sum_j RSD_j$$

$$T = 100\% - CV$$

式中 $x_{i,j}$ 表示第 i 个样本的第 j 条光谱, \bar{x}_j 表示第 j 条光谱的平均吸光度, n 为样本数 14, m 为光谱点数 2 074, RSD_j 为第 j 个点的吸光度的相对标准差。3 个批次各 4 个取样点的光谱计算见表 1。结果显示在未混合之前,粉末的 T 已较大,但均匀程度参差不齐,随机性较大,未达到稳定状态。随着混合时间的延长, T 不断增大,批次 1412054H 在混合 10 min 后, T 就已达到了稳定状态,而另 2 个批次样品在 20 min 后 T 趋于稳定。

表 1 混合过程中 3 批正天丸不同时间点的光谱混合均匀度
Table 1 Blending uniformity of Zhengtian pills at different time point of blending process

批号	0 min	10 min	20 min	30 min
1412054H	88.49	98.25	98.10	98.04
1412057H	96.40	96.03	97.42	97.41
1412056H	93.38	97.40	97.94	98.08

2.4 主成分-马氏距离法判断终点 近红外光谱的马氏距离常用作判别分析的一种手段^[10]。由于光谱矩阵含有庞大的数据点,造成计算的复杂程度增大,主成分分析法可实现对多变量数据的降维,通过图形的方式表现出来,能更直观地表现样本的分类聚集情况^[11]。利用主成分分析得到降维后的数据矩阵,计算到平均光谱的马氏距离(D)^[12]。

$$T_{n \times f} = X_{n \times m} \times P_{m \times f}$$

$$D^2 = (T_i - \bar{T}) \times M^{-1} \times (T_i - \bar{T})'$$

式中 X 为光谱矩阵, P 为载荷矩阵, n 为样品数, m 为变量数, f 为主成分数, M 为主成分分析中得分矩阵的协方差矩阵, T_i 为样本 i 的得分向量, \bar{T} 为 n 个样品的平均光谱。光谱采集过程中由于环境温度等的变化会引起光谱的波动,适当的光谱预处理可提炼有效信息,增加信噪比。选用一阶导数 + Norris 平滑对原始光谱进行预处理,以消除环境的影响,增大光谱信噪比。一阶导数是最常用的光谱

预处理方法,而一阶导数处理后噪声也会相对增大,所以与 Norris 平滑联用以达到最佳效果。光谱预处理结果见图 1。理论上来说光谱全波段都可以用于分析,但会造成计算复杂程度的增加,高效快速的近红外分析技术应该选择合适有效波段用于定量、定性分析。由图 1 可知,在波段 $7\ 600 \sim 10\ 000\ \text{cm}^{-1}$,近红外吸收值较小,预处理后吸收接近 0。为简化分析难度,选取 $4\ 000 \sim 7\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 进行分析。

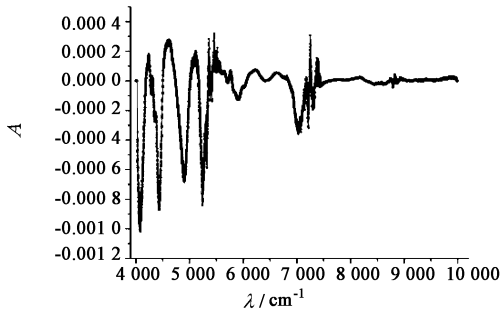


图 1 经一阶导数 + Norris 平滑预处理后正天丸混合过程光谱
Fig. 1 Spectroscopy of Zhengtian pills in blending process after first-order derivative + Norris smoothing pretreatment

对混合样品光谱进行主成分分析,见图 2。可初步反映粉末过程中的均匀浓度状态。混合 0 min,即混合之前的样品点分散程度大,随着混合时间的增加,样品光谱的第一和第二主成分值增大并聚集在一定范围,20 min 后样品光谱基本聚集在一起。

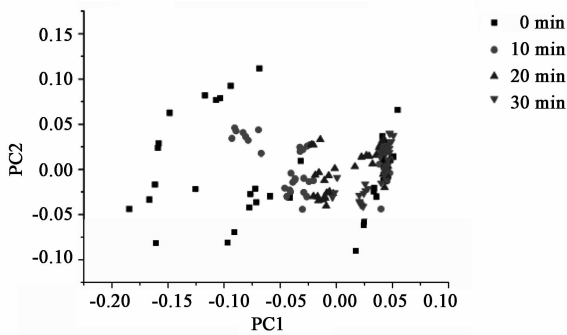


图 2 混合过程中正天丸样本的主成分得分
Fig. 2 PCA score plot of Zhengtian pills in blending process

以混合 30 min 为校正光谱,计算其他混合时间点样本光谱到其平均光谱的马氏距离,见图 3。从马氏距离的计算结果发现随着混合时间的增加,距离校正光谱的马氏距离逐渐减小,尤其在混合 10 min 后减小尤为明显,而在混合 20 min 后马氏距离基本维持在 < 1.0 ,说明粉末混合 20 min 的状态与混合 30 min 的相似,粉末已达到均一稳定的状态,可认定为混合终点。

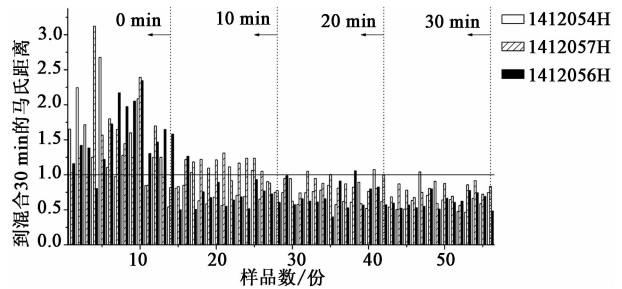


图 3 正天丸混合样品到混合 30 min 光谱的马氏距离
Fig. 3 Mahalanobis distances of Zhengtian pills samples spectrum blending 30 min

2.5 芍药苷的含量测定^[13]

2.5.1 色谱条件 XBridge Shield RP18 色谱柱 ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$),进样量 $10\ \mu\text{L}$,柱温 $30\ ^\circ\text{C}$,流速 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 $235\ \text{nm}$,流动相 0.05% 磷酸 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 26 min, 10% B; 26 ~ 30 min, 10% ~ 80% B; 30 ~ 33 min, 80% B)。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 $11.03\ \text{mg}$,加甲醇定容至 $10\ \text{mL}$,得储备液。精密吸取该储备液 $1\ \text{mL}$,加甲醇定容至 $100\ \text{mL}$,得 $10.37\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药苷对照品溶液,避光保存。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密称取混合过程样品 $1\ \text{g}$,精密加入稀乙醇 $15\ \text{mL}$,超声 $0.5\ \text{h}$,放冷,用稀乙醇补足失重。取适量样品溶液于 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中,于 $13\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $10\ \text{min}$,取上清液,即得。

2.5.4 阴性样品溶液的制备 按处方称取除白芍药材以外的 14 味药材,按制法项制备缺白芍的阴性样品,按 2.5.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.5.5 精密度、重复性与稳定性考察 取混合 30 min 样品,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项下条件连续进样 6 次,计算芍药苷峰面积的 RSD 0.7% ,表明仪器精密度良好。取混合均匀样品粉末 6 份,各约 $1\ \text{g}$,精密称定,按 2.5.3 项下方法制备,按 2.5.1 项下条件测定,计算芍药苷峰面积的 RSD 1.4% ,表明该方法重复性良好。取混合 30 min 样品的供试品溶液,分别于制备后 0, 3, 6, 12, 18, 24 h 进样测定,结果芍药苷含量的 RSD 1.4% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取已知芍药苷含量的样品约 $0.5\ \text{g}$,共 6 份,分别精密加入 $1.337\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药苷对照品溶液 $1\ \text{mL}$,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项下条件测定,结果平均加样回收率 97.6% ,RSD 1.9% 。

2.5.7 样品测定 按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项下条件测定 3 批样品在不同混合时间不同取样点样本中芍药苷的含量,见图 4。计算批号 150715H,150716H,150717H 样品在 0 min 时,芍药苷含量的 RSD 分别为 28.4%,47.5%,31.5%;在 10 min 时,RSD 依次为 7.1%,3.7%,4.0%;在 20 min 时,RSD 依次为 4.1%,3.9%,3.2%;在 30 min 时,RSD 依次为 3.9%,3.3%,3.7%。结果显示混合 0 min 时,不同样品间芍药苷含量差别较大,说明粉末未达到均匀状态,随着混合的进行,芍药苷含量波动趋于平缓,并控制在一定范围内,说明粉末在逐渐被混匀。混合 20 min 后,RSD 稳定在 <5.0%,混合 20 min 的样品中芍药苷含量与混合 30 min 样品的 RSD 相近,说明粉末在混合 20 min 后的状态与混合 30 min 的状态相同,已达到了均一稳定的状态,可认为是混合终点,与近红外光谱法、马氏距离法定性判断的结果一致。

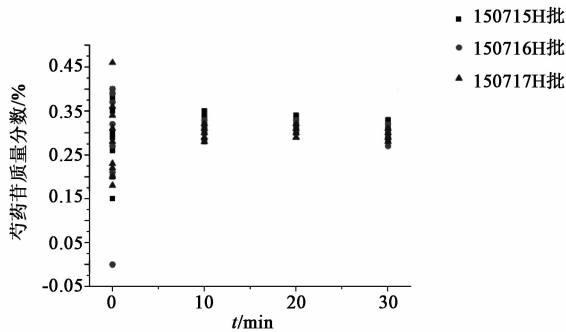


图 4 正天丸混合过程中芍药苷的质量分数分布

Fig.4 Distribution of content of paeoniflorin from Zhengtian pills in blending process

3 讨论

采用光谱均匀度能够初步反映混合过程中粉末的均一性变化,但不能作为判断混合终点的依据。结合马氏距离法可进一步反应光谱之间的差异,马氏距离越小,则光谱之间差异越小,认为样品之间(化学成分)无明显差异。同时为了进一步验证定性判断的结果,芍药苷含量的定量验证指标得到了相同的结果,RSD 在 20 min 后达到稳定值。

研究过程中发现,正天丸混合过程前,各样品的均匀度就已达到相对较高的程度,原因是正天丸原药材采用混合粉碎的方式,在进入混合罐之前已有初步的混合,可提高混合效率,缩短混合时间。因此结合混合过程的研究结果,认为混合时间不需要 30 min,而只需 20 min 就能够达到混合要求。

本文采用近红外光谱技术结合主成分分析法、

马氏距离法用于分析正天丸粉末的混合过程,不仅可以快速判断混合终点,而且可以有效节约检测时间,降低混合过程中取样的劳动强度。该方法能够实现实时获得粉末在混合过程中的变化信息,包括物理状态及定量指标,为优化正天丸的混合时间提供了参考,并对中药粉末混合过程在线检测具有重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] Chan C O, Chu C C, Mok D K W, 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 ultraviolet spectrometric detection [J]. Anal Chim Acta, 2007, 592(2): 121-131.
- [2] 刘绍勇,薛东升,潘建超,等. 基于近红外光谱技术的连翘药材质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 681-685.
- [3] 陈晨,李文龙,瞿海斌,等. 近红外透反射光谱法用于复方苦参注射液渗漉过程在线检测[J]. 中草药, 2013, 44(1): 47-51.
- [4] 李蕾蕾,王海霞,林萍,等. 近红外光谱技术在枇杷叶水分含量测定中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 104-107.
- [5] 卢慧娟,贾灿潮,曹庆玺,等. 近红外光谱技术快速测定夏枯草中水溶性浸出物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 43-46.
- [6] 金叶,杨凯,陈木洲,等. 微型近红外仪用于众生丸粉末混合过程的在线监测研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2963-2966.
- [7] 丁海樱,金叶,刘雪松,等. 中药粉末混合过程近红外在线检测研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(14): 1151-1155.
- [8] 吴莎,刘启安,吴亚男,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 53-56.
- [9] 王毅,李胜群,胡立中,等. 烟草混合均匀度评价方法的研究[C]. 郑州:中国烟草学会工业专业委员会烟草工艺学术研讨会, 2006.
- [10] 刘心如,张利平,王建福,等. 可见-近红外漫反射光谱技术对羊毛和羊绒的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(8): 2092-2095.
- [11] 赵海霞,武建. 浅析主成分分析方法[J]. 科技信息, 2009(2): 87.
- [12] 陈斌,邹贤勇,朱文静. PCA 结合马氏距离法剔除近红外异常样品[J]. 江苏大学学报:自然科学版, 2008, 29(4): 277-279.
- [13] 唐安玲,郑琰,宋英,等. 芍药苷在疏经防痛胶囊水提液和浓缩液中热稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 24-26.

[责任编辑 刘德文]