

近红外光谱法在线监测复方丹参滴丸料液中有效成分含量*

章顺楠¹, 杨海雷¹, 刘占强¹, 刘金平¹, 李文¹, 刘雪松^{2*}, 瞿海斌²

(1. 天士力制药股份有限公司, 天津 300410 2. 浙江大学药物信息学研究所, 杭州 310027)

摘要 目的: 研究复方丹参滴丸滴制料液中丹参素、原儿茶醛含量的快速分析方法, 及化料过程的均一性在线监测技术。方法: 以高效液相色谱分析值为参照, 创新采用近红外透反射光谱技术采集料液 NIR 光谱, 对光谱进行波长选择和预处理, 采用偏最小二乘回归建立校正模型, 并使用建立好的 PLSR 定量模型对料液的丹参素、原儿茶醛含量进行快速检测, 对化料过程均一性进行在线监测, 确定化料终点。结果: 模型性能良好, 丹参素、原儿茶醛的相关系数分别为 0.9929 和 0.9937, 验证集均方差分别为 0.368 和 0.159。NIR 光谱法可实时反映料液中采集点位置的成分含量变化, 并正确反映化料过程中料液均一状态。结论: 近红外透反射光谱技术可有效采集滴丸料液 NIR 光谱, 近红外光谱法可快速准确测定滴丸料液中成分含量, 可用于滴丸剂料液均一性的判断。

关键词: 近红外透反射光谱; 复方丹参滴丸; 在线监测; 滴制料液

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0192-05

On-line monitoring the contents of active components in the solution for Fufangdanshen dripping pills by near-infrared spectroscopy*

ZHANG Shun-nan¹, YANG Hai-lei¹, LIU Zhan-qiang¹, LIU Jin-ping¹, LIW en¹, LIU Xue-song^{2*}, QU Hai-bin²

(1. Tianjin Tasly Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300410, China 2. Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Objective To establish a rapid analysis method of determining the contents of Danshensu and protocatechuic aldehyde in the dripping solution of Fufangdanshen dripping pills and on-line monitoring the homogeneity of the blending process. **Method** Near-infrared (NIR) transreflectance spectroscopy was first used to collect NIR spectra of the dripping solution. With HPLC analysis values as reference, the partial least square regression (PLSR) calibration models were built after wavelength selection and multiplicative scatter correction (MSC) + 1st derivative pretreatment which were applied to on-line determine the contents of ingredients in the dripping solution of Fufangdanshen dripping pills and on-line monitor the homogeneity and end-point of the blending process. **Result** The PLSR calibration models of NIR spectral have high correlation coefficients (R) and low root mean square error of prediction (RMSEP). Danshensu $r = 0.9929$, RMSEP = 0.368. Protocatechuic aldehyde $r = 0.9937$, RMSEP = 0.159. The proposed method was successfully used in on-line monitoring the blending process of dripping solution. **Conclusion** NIR transreflectance spectroscopy is accurate, robust and can be used routinely to determine the contents of ingredients and the uniformity of distribution in the solution of dripping pills.

Key words near-infrared transreflectance spectroscopy; Fufangdanshen dripping pills; on-line monitoring; dripping solution

中药滴丸剂是将中药经过加工提取、纯化、浓缩并与适宜基质加热熔融混匀后, 再滴入不相混溶的冷凝剂中, 由于界面张力作用使液滴收缩并冷凝制成的球形或类球形制剂^[1]。由于具有疗效迅速、生

物利用度高、副作用小等特点, 在中药制剂中得到广泛应用^[2]。复方丹参滴丸是提取丹参、三七的有效成分再加入适量冰片而制成的纯中药滴丸剂, 可用

* 国家 "十五" 重大专项项目 (2001BA701A45) 资助

** 通讯作者 Tel: (0571) 88208621 E-mail: zsn@tasly.com

于冠心病、胸闷、心绞痛等心血管疾病的治疗^[3]。

由于滴丸规格小,浸膏必须在基质中形成均匀分散的料液后,才能进行滴制,需严格控制有效成分含量及均匀性。如果分散不均匀,不仅增加丸重、圆整度、外观等外在质量指标的不合格率,更影响单位剂量有效成分含量均一性等内在质量指标;如搅拌时间过长,易使料液变性产生不溶固形物,同样影响产品质量。目前生产中大多是按照经验对搅拌时间、料液均一性等进行判断,一旦出现质量问题损失难以弥补。因此,急需一种适宜有效的快速分析方法,可对料液化料过程进行在线监测,实现终点判断。

近红外 (near infrared NIR) 光谱分析技术是一种方便、快速、无损的绿色分析技术。NIR 光可以深入样品内部进行分析,其主要谱峰为有机物分子中 C-H、N-H 和 O-H 等含氢基团的倍频与合频振动吸收,光谱特性稳定,信息量大,能够反映样品的综合信息,可同时检测不同组分的含量^[4,5]。针对中药复方滴丸料液粘度大、颜色深且透光性差的实际监测难题,本文采用了透反射技术得以解决。以复方丹参滴丸的滴制生产过程为研究对象,使用 NIR 光谱技术对料液中有效成分含量进行快速测定,用偏最小二乘回归 (PLSR) 建立校正模型,实时考察料液混合均一性,并在中试滴丸机上实现化料过程的在线监测。

1 仪器与试剂

仪器: Antaris 傅立叶变换近红外光谱仪 (Thermo Nicolet), SabIR 光纤探头,透反射附件。该仪器配有软件包,Result 软件用于光谱采集,TQ Analyst 软件用于光谱处理和计算;WATERS2695 高效液相色谱仪,2487 紫外检测器 (Waters); AE240 电子天平 (Mettler), TD-01 型数字化中试滴丸机 (天士力)。

复方丹参滴丸浸膏、聚乙二醇 6000 (PEG6000)、冰片由天津天士力制药股份有限公司提供,对照品丹参素钠、原儿茶醛购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯 (Merck), 纯水,其余试剂均为分析纯。

配制不同有效成分含量的料液: 将复方丹参滴丸浸膏、PEG 6000、冰片先后加入烧杯中,熔融后搅拌,搅拌均匀后扫描液体 NIR 光谱图,冷却,取一定量料液进行 HPLC 分析。共使用 4 个批次复方丹参滴丸浸膏,得到 78 个样品。

2 料液 NIR 光谱采集

将透反射附件套在 SabIR 光纤探头上,固定光程,放入已搅拌均匀料液中至一定深度,采集光谱图。吸收度数据格式为: $\log(1/R)$, 采集光谱范围: $4000 \sim 10000 \text{ cm}^{-1}$, 扫描次数: 32, 分辨率: 8 cm^{-1} , 无衰减。每个样品采集 3 张光谱,取平均;每次扫描前搅拌料液,料液光谱见图 1。

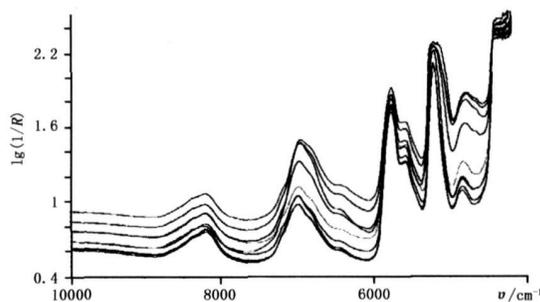


图 1 复方丹参滴丸料液 NIR 透反射光谱图

Fig 1 NIR transreflectance spectra of dripping solutions

在线监测化料过程均一性: PEG 6000 熔化后,同浸膏、冰片一起加入中试滴丸机化料罐中。将透反射附件套在 SabIR 光纤探头上,插入化料罐,开始搅拌,持续 60 min 每 1 min 获取 1 张光谱图。通过 PLSR 定量校正模型,对获取光谱图实时计算,得到丹参素、原儿茶醛含量值,判断料液是否搅拌均匀。

3 有效成分含量 HPLC 分析

HPLC 测量条件: Agilent SB-C₁₈ 分析柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (8:91:1); 进样体积 10 μL; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 281 nm; 柱温 30 °C^[6]。

根据保留时间定性,以峰面积定量,外标法计算。复方丹参滴丸料液中有效成分含量分布情况如表 1 所示。其中校正集及验证集样品中丹参素和原儿茶醛含量的 HPLC 分析值从低到高分布均匀,线性度良好。

表 1 校正集和验证集样品有效成分浓度分布 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 The contents of active components in calibration set and validation set

样品 (samples)	样品数 (numbers)	浓度范围 (concentration range)		平均值 (average)	
		丹参素 (Danshensu)	原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)	丹参素 (Danshensu)	原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)
校正集 (calibration set)	46	4.47~ 13.23	1.05~ 4.51	7.52	2.45
验证集 (validation set)	30	4.89~ 11.63	1.21~ 3.74	7.86	2.22

4 数据处理方法

样品随机分成校正集和验证集,并保证校正集样品浓度范围大于验证集,建立 NIR 光谱校正模型。将样品随机分成校正集(样品数为 46)和验证集(样品数为 30),2 个样品由于结果偏差较大,作为奇异点剔除。校正集样品用于校正模型的建立。选择用于建模的光谱区间,对光谱预处理方法进行比较,采用 PLSR 法建立 NIR 光谱定量校正模型。以内部交叉验证均方差 (RMSECV) 为指标选择建模参数优化模型结构,以预测均方差 (RMSEP) 考察模型的预测性能和推广能力,所有数据处理均在仪器自带的 TQ Analyst 软件中进行。

5 结果与讨论

5.1 建模区间选择 样品中物质含量的信息是通过 C-H、N-H 和 O-H 基团对 NIR 光谱吸收大小表现出来的,因此可以根据物质结构特征选择光谱区间。相关光谱法通过在每个波长处计算相关系数的方法产生相关光谱图,显示了不同波长处光谱信息与组分含量间的相关程度。本文用相关光谱法选择合适的光谱区间,并结合有效的光谱预处理方法对原始光谱图数据进行处理。在 C-H 键合频和一级倍频吸收附近选择丹参素的光谱区间为 $5152 \sim 4420 \text{ cm}^{-1}$ 、 $6850 \sim 5940 \text{ cm}^{-1}$;在 C-H 键合频、一级和二级倍频吸收附近选择原儿茶醛的光谱区间为 $8659 \sim 4624 \text{ cm}^{-1}$ 。样品的相关光谱见图 2。

5.2 光谱预处理方法选择 样品物理性质的不同会引起光谱基线和斜率的变化,一般在建立校正模型前需采用化学计量学方法对光谱进行预处理以消除这些影响。多重散射校正 (multiplicative scatter correction, MSC) 方法用于消除多重光谱偏差;一阶、二阶导数方法可以最大程度的降低光谱峰偏移和漂移,通常使用 Savitzky-Golay 方法对导数光谱进行平滑处理;标准正则变换 (standard normal variate, SNV) 技术可以有效降低不必要的光谱贡献以利于分析信号的解析,且不会产生噪声信号。预处理方法也可配合使用,本文在选定光谱区间,采用不同的预处理方法 (MSC, 一阶导数, 二阶导数, SNV, MSC

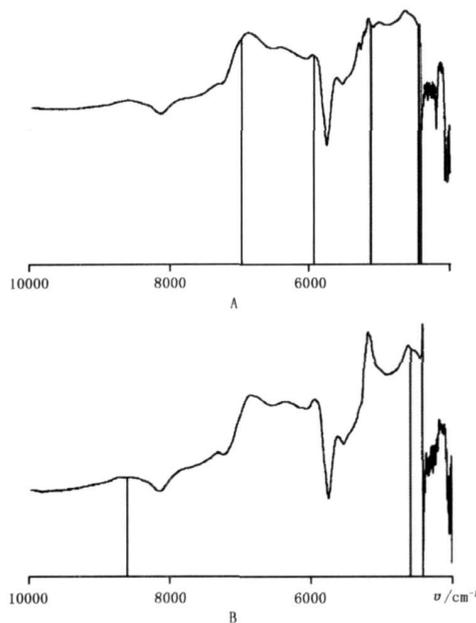


图 2 复方丹参滴丸料液有效成分相关光谱图

Fig 2 The correlation spectra of active components

A. 丹参素 (danshensu) B. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)

+ 一阶导数, MSC + 二阶导数) 进行比较寻找最优。每次选出 5 张光谱作交叉验证,其相关系数 (r) 及均方差 (RMSECV) 用来考察校正模型的性能。从表 2 可以清楚地看出,最适合 2 个模型的预处理方法均为 MSC + 一阶导数。

表 2 不同预处理方法校正模型结果

Tab 2 The results of PLSR models with different preprocessing methods

预处理方法 (preprocessing methods)	丹参素 (Danshensu)		原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)	
	r	RMSECV	r	RMSECV
无 (none)	0.9065	0.687	0.8876	0.414
一阶导数 (1st derivative)*	0.9317	0.592	0.9672	0.233
二阶导数 (2nd derivative)*	0.9219	0.633	0.9326	0.341
多元散射校正 (MSC)	0.9294	0.601	0.9399	0.302
标准正则变换 (SNV)	0.9379	0.564	0.9344	0.316
MSC + 一阶导数 (MSC + 1st derivative)*	0.9664	0.419	0.9849	0.153
MSC + 二阶导数 (MSC + 2nd derivative)*	0.9122	0.668	0.9288	0.348

* 导数法使用 savitzky-golay 13 点平滑 (derivative method with 13 points savitzky-golay smooth)

5.3 模型主因子数确定 采用 PLSR 建立定量校正模型时, 采用不同主因子数, 模型预测能力有较大的差异。在校正集样品一定的情况下, 因子数取得太少, 会导致建模信息不全, 模型预测能力太低; 反之, 因子数过多, 会导致模型过于复杂, 并可能在训练中出现过拟合现象。因此, 需要对使用的主因子数进行合理选择。本文采用交叉验证方法, 考察主因子数对 RMSECV 值的影响。图 3 为 RMSECV 值随主因子数变化的曲线图, 图中箭头所指位置为最优值。校正模型中丹参素和原儿茶醛采用的最优主因子数分别为 9 和 8。

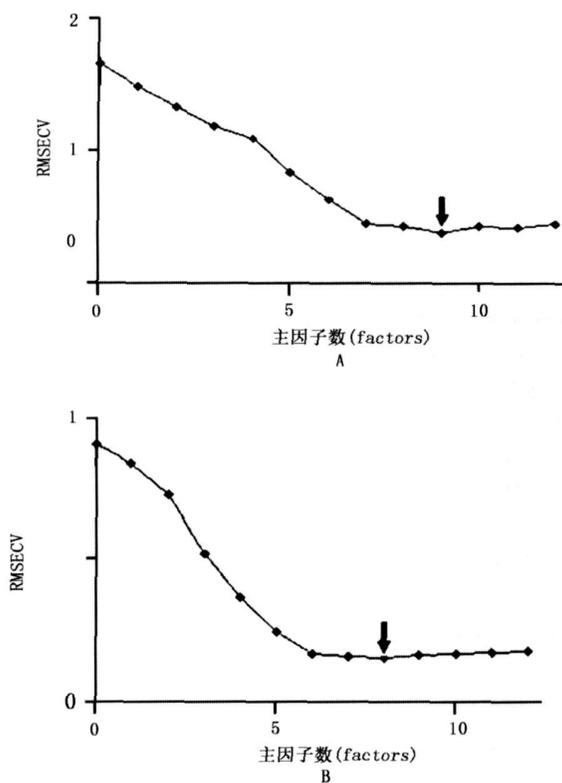


图 3 RMSECV 随 PLSR 主因子数变化图
Fig 3 The RMSECV value with different factors
A. 丹参素 (Dan shen su) B. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)

5.4 校正模型建立 丹参素和原儿茶醛分别在选定的光谱区间 ($5152 \sim 4420 \text{ cm}^{-1}$, $6850 \sim 5940 \text{ cm}^{-1}$ 和 $8659 \sim 4624 \text{ cm}^{-1}$), 经 MSC + 一阶导数预处理后, 使用 PLSR 法建立了最优校正模型, 结果见图 4。校正模型的相关系数分别达到了 0.9929 和 0.9937, 校正集均方差 (RMSEC) 为 0.193 和 0.098, 验证集均方差 (RMSEP) 则为 0.368 和 0.15%。光谱预测值与参照分析值间的相关性较高, 由此可见模

型性能较好。

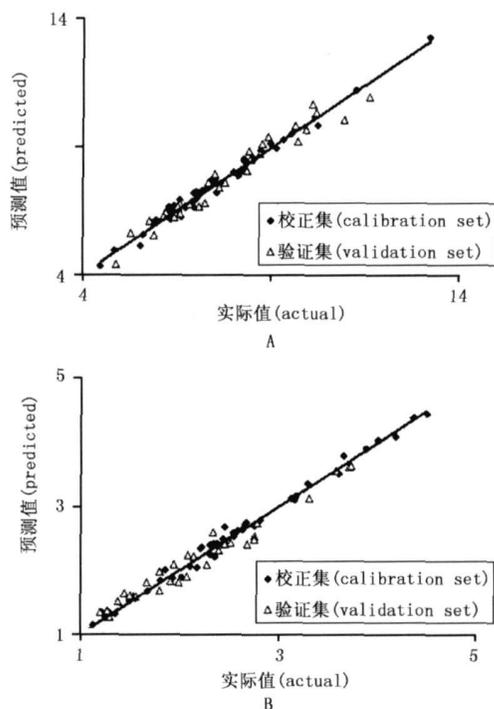


图 4 NR 校正模型预测值与真实值之间相关图
Fig 4 Correlation between NR predicted and actual values
A. 丹参素 (Dan shen su) B. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde)

5.5 在线监测化料过程均一性 在中试滴丸机上, 使用建立好的 PLSR 定量模型对料液的丹参素、原儿茶醛含量进行在线监测, 对化料过程均一性进行判断, 确定化料终点。通过 3 组试验 (图 5 No 1, No 2 No 3) 可以看出, NR 光谱法可实时反映采集点位置的成份含量变化。本文试验中达到均一状态后的料液, NR 光谱法的含量监测值与 HPLC 法测定值结果一致, 表明 NR 光谱法可正确反映化料的搅拌过程: 搅拌初期, 丹参素、原儿茶醛的含量开始增加且变化较大; 25 min 左右, 两者的含量基本保持稳定 (小幅波动在预测误差范围内); 此时料液已经分散均匀, 可进行滴制。本文试验中, 还采用了标准光谱图比较法进行化料过程均一性判定 (图 6)。即采用 HPLC 法判定料液达到均一后, 采集其标准光谱图, 将实时监测的光谱图与标准光谱图直接比较, 计算化料均一相似度, 当化料均一相似度达到设定值后即启动开关, 进行滴制。实际生产监测过程中, 可根据不同产品化料工艺需要, 选择采用含量判定法或相似度判定法, 当然也可以同时使用进行监测控制。

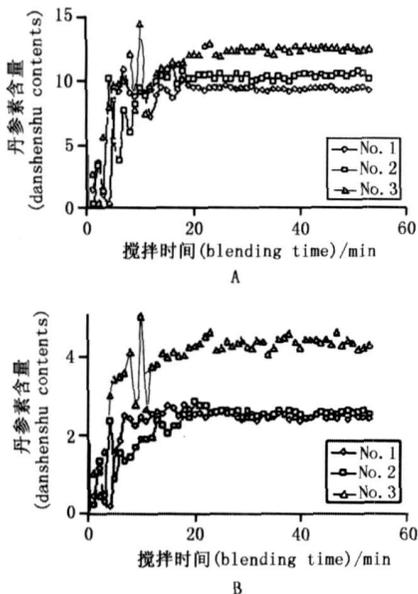


图5 中试滴丸机在线监测化料过程均一性
 Fig 5 The homogeneity of on-line monitoring the blending process on dripping machine

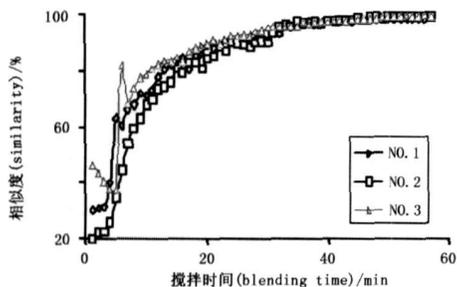


图6 光谱相似度法监测化料过程均一性
 Fig 6 The homogeneity of on-line monitoring the blending process by spectrum similarity

6 结论

本文将NR分析技术用于中药浸膏混合物的研究,对复方丹参滴丸料液中有效成分的含量进行及时分析,可精确、无损、有效地对化料过程料液均一性进行快速测定,并在中试生产设备上进行了验证。该方法使用透反射光纤技术,无需样品处理,校正模型性能良好。随着该模型在生产实际应用的展开,实际监测数据将不断地对模型进行再校正,将更加提高模型在滴丸剂生产中的适用性与稳定性。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): Appendix(附录) 10
- 2 ZHENG X in(郑鑫), QIU X iao- li(邱晓莉), Q N Shao- rong(秦少容), et al Progress of research on TCM dripping pill(中药滴丸剂的研究进展). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003 28 (4): 292
- 3 DING Ning(丁宁). Research progress and clinical applications of compound Danshen dripping pill(复方丹参滴丸的研究进展及临床应用). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2002 33(12): 1147
- 4 YANG Nan- lin(杨南林), CHENG Yi- yu(程翼宇), QU Hai- bin(瞿海斌). Quantitative determination of mannitol in Cordyceps Sinensis by using near infrared spectroscopy and artificial neural networks(用人工神经网络-近红外光谱法测定冬虫夏草中的甘露醇). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2003 31(6): 664
- 5 QU Hai- bin(瞿海斌), LU Quan(刘全), CHENG Yi- yu(程翼宇). Determination of the coptis extract alkaloids by using near- infrared diffuse reflectance spectroscopy(近红外漫反射光谱法测定黄连浸膏粉中生物碱含量). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 32 (4): 477
- 6 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 528

(本文于 2008年 9月 22日修改回)