

近红外光谱法测定芬布芬片中芬布芬的含量

1 仪器及材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪：（厂家：Thermo Fisher Scientific；型号：U3000；包括梯度泵 SR-3000、自动进样器 WPS-3000、柱恒温系统 TCC-3000、紫外检测器 VWD-3100、色谱工作站变色龙 6.8）

色谱柱：phenomenex Luna 5u C18(2)（5 μ m，250 \times 4.6mm）

近红外光谱仪：美国 JDSU MicroNIRTM 1700

天平（厂家：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；型号：XS205 DualRange 型十万分之一分析天平、AL104 型万分之一分析天平）

1.2 材料

芬布芬片（修正药业集团提供，生产批号：111201、111202、111203、111208、120301、120302、120303、120401、120501、121003、121004、121006、121201、121203、121204、121205、121206、121207、121209、130301）；

芬布芬对照品（购自中国药品生物制品检定所，供含量测定用）；

甲醇（色谱级）；冰醋酸（分析纯）；水为二次水

2 芬布芬含量测定方法学考察

2.1 色谱条件

色谱柱：phenomenex Luna 5u C18(2)（5 μ m，250 \times 4.6mm）；流动相：1.8%冰醋酸溶液-乙腈（56：44）为流动相；流速 1mL/min；等度洗脱；采集 30min；UV 检测器，检测波长为 280nm。进样量 10 μ l；柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.2 标准品溶液的配制

取芬布芬对照品 15mg，精密称定，置 10ml 量瓶中，加甲醇 3ml，超声 15 分钟使溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，精密量取 2ml 置 50ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜(0.45 μ l)滤过，取续滤液，即得。（稀释 250 倍 0.06mg/ml）

2.3 供试品溶液的制备

取本品1片，精密称定，研细，精密称取适量（约相当与芬布芬0.075g），置 50ml 量瓶中，加甲醇 30ml，超声 15 分钟使溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，

滤过，精密量取续滤液2ml置50ml量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜(0.45 μ l)滤过，取续滤液，即得。(稀释1250倍 0.06mg/ml)

2.4 标准曲线的绘制

在 2.1.1 色谱条件下，分别吸取对照品溶液 1.0 μ l、2.5 μ l、5.0 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l 进样，记录峰面积。以芬布芬的进样量 (μ g) 为横坐标，以相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得线性回归方程 $Y=0.0907X-0.0562$ ， $R^2=0.9999$ 。芬布芬的进样量在 60.04~1501 μ g 范围内，呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

在 2.1.1 色谱条件下，取对照品溶液适量，连续进样 6 针，求 RSD 为 0.09%，小于 3%，可见仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

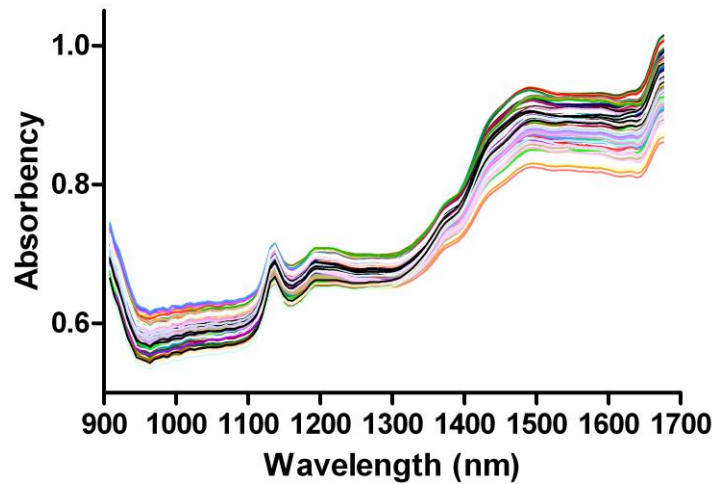
按 2.1.3 项方法制备供试品溶液，取同一份供试品溶液，在 2.1.1 色谱条件下，于 0，2，4，8，12，24 h 进样测定，求其 RSD 为 0.24%，小于 3%，可见样品放置 24h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批供试品（批号：121205）6 份，按 2.1.3 项方法制备供试品溶液，在 2.1.1 色谱件依次测定，求其 RSD 为 1.62%，小于 3%，可见该方法具有良好的重复性。

3 近红外光谱数据的采集

取芬布芬 20 批，每批中随机抽取 1 片药片，用近红外扫描仪(型号美国 JDSU MicroNIR1700) 进行近红外光谱数据采集。测量参数：漫反射，分辨率 12.5 cm^{-1} ，扫描次数 50 次，扫描范围 900~1700nm，每个样品重复扫描 5 次。20 批样品近红外光谱叠加见下图。



20 批样本 NIR 光谱图

4 芬布芬供试品溶液含量测定

按 2.1.3 项方法制备供试品溶液，在 2.1.1 色谱条件下，依次测定 20 批样品，平行测定两次。结果如：

不同批次芬布芬含量测定结果

序号	批号	片重 (g)	称样量 (g)	峰面积	浓度 (mg/mL)	含量 (g/片)
1	111201	0.2600	0.1302	52.012	0.0574	0.1435
				52.114	0.0575	
2	111202	0.2606	0.1305	54.440	0.0601	0.1500
				54.492	0.0601	
3	111203	0.2645	0.1302	53.309	0.0588	0.1496
				53.447	0.0590	
4	120301	0.2573	0.1303	50.758	0.0560	0.1384
				50.822	0.0561	
5	120302	0.2593	0.1302	53.268	0.0588	0.1471
				53.791	0.0594	
6	120303	0.2564	0.1307	53.305	0.0588	0.1444
				53.452	0.0590	
7	120401	0.2558	0.1301	50.808	0.0561	0.1381
				51.004	0.0563	
8	120501	0.2664	0.1303	50.964	0.0563	0.1441
				51.163	0.0565	
9	121003	0.2666	0.1308	52.935	0.0584	0.1491
				53.128	0.0586	
10	121004	0.2739	0.1308	54.775	0.0605	0.1585
				54.918	0.0606	
11	121006	0.2640	0.1301	52.703	0.0582	0.1477
				52.818	0.0583	

12	121201	0.2662	0.1307	53.018 53.142	0.0585 0.0587	0.1491
13	121203	0.2612	0.1306	52.256 52.374	0.0577 0.0578	0.1444
14	121204	0.2666	0.1305	50.995 51.046	0.0563 0.0563	0.1439
15	121205	0.2626	0.1300	52.853 52.929	0.0583 0.0584	0.1474
16	121206	0.2608	0.1304	54.033 54.237	0.0596 0.0599	0.1494
17	121207	0.2577	0.1304	54.034 54.184	0.0596 0.0598	0.1475
18	121208	0.2643	0.1301	53.457 53.574	0.0590 0.0591	0.1500
19	121209	0.2638	0.1304	55.543 55.647	0.0613 0.0614	0.1552
20	130301	0.2590	0.1301	52.027 52.068	0.0574 0.0575	0.1430

5 芬布芬片中芬布芬定量模型的建立

将样品芬布芬含量值和近红外光谱输入清华大学化学计量学分析系统, 进行数据处理, 建立定量校正模型, 实验中随机选取 20 批样品中的 17 批样品组成校正样品集, 所选的样品涵盖了所测样品含量的范围(0.1381g/片~0.1585g/片), 能代表组分的浓度信息, 其余 3 批样品作为检验样品集。

模型建立的相关数据表

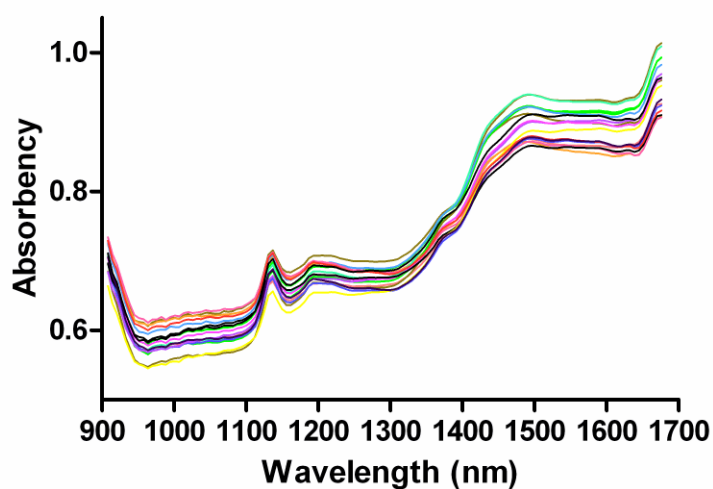
样本集	批号	含量 (g/片)
校正样本集	111201	0.1435
	111202	0.1500
	111203	0.1496
	120301	0.1384
	120302	0.1471
	120303	0.1444
	120401	0.1381
	120501	0.1441
	121003	0.1494
	121004	0.1585
	121006	0.1477
	121201	0.1491
	121203	0.1444
	121204	0.1439
	121205	0.1474

	121206	0.1494
	121207	0.1475
	121207	0.1475
	121207	0.1475
	121207	0.1475
	121207	0.1475
	121208	0.1500
	121208	0.1500
检验样本集	121208	0.1500
	121208	0.1500
	121208	0.1500
	130301	0.1430
	130301	0.1430
	130301	0.1430
	130301	0.1430
	130301	0.1430

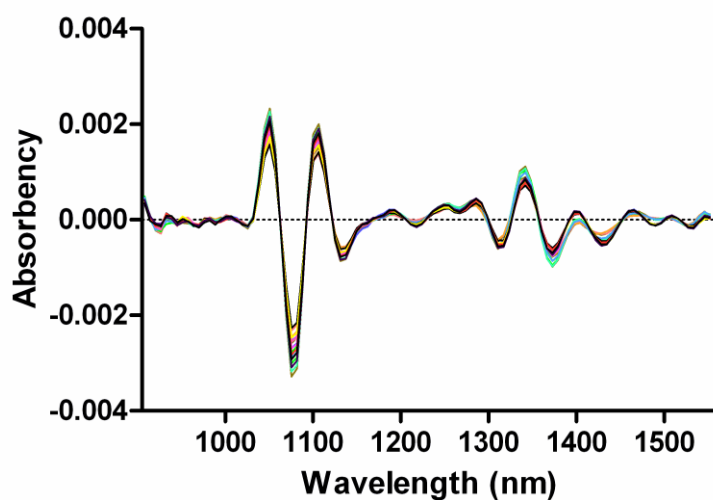
5.1 定量校正模型的建立

本实验中首先对光谱预处理进行优选，从 8 种谱图预处理方法中优选出二阶卷积求导为最佳谱图预处理方法；进而对波长选择方法进行优选，从 9 种波长选择方法中优选出迭代优化波长选择方法 1 为最佳波长选择方法；得出如下最佳模型。

5.1.1 谱图预处理



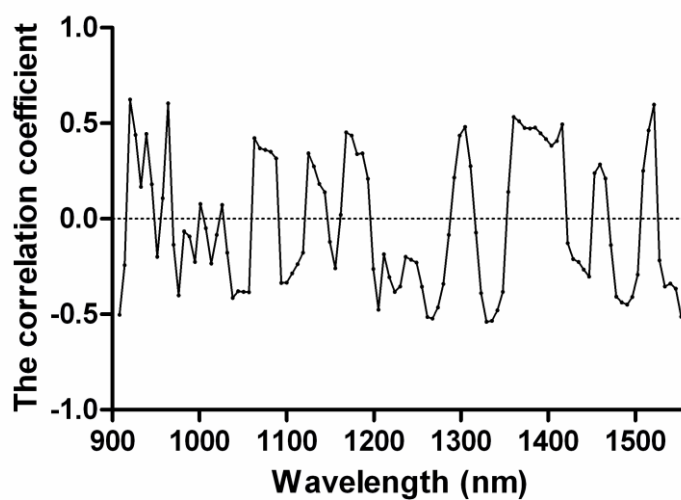
校正样本集原始谱图



校正样本集光谱预处理后谱图

(预处理方法选择：二阶卷积求导，窗口数：11，拟合次数：3)

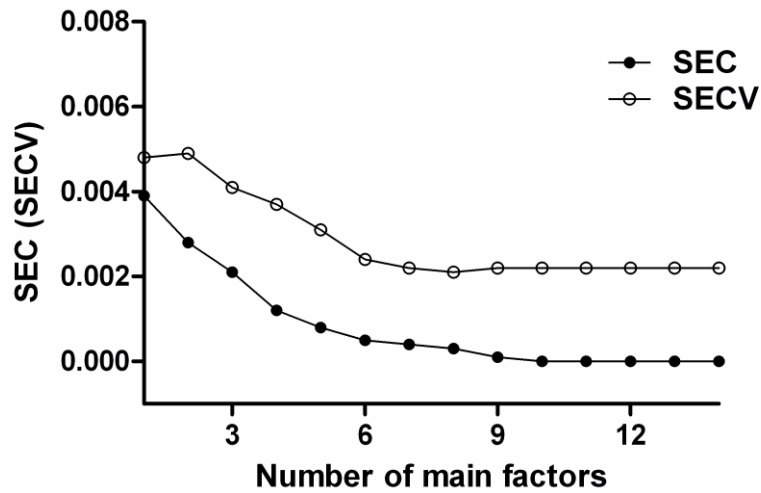
5.1.2 波长选择



波长选择方法

(自定义区间：起始位置 908.1，结束位置 1031.987097，点数 21；起始位置 1168.262903，
结束位置 1292.15，点数 21)

5.1.3 校正参数



SEC 和 SECV 变化趋势

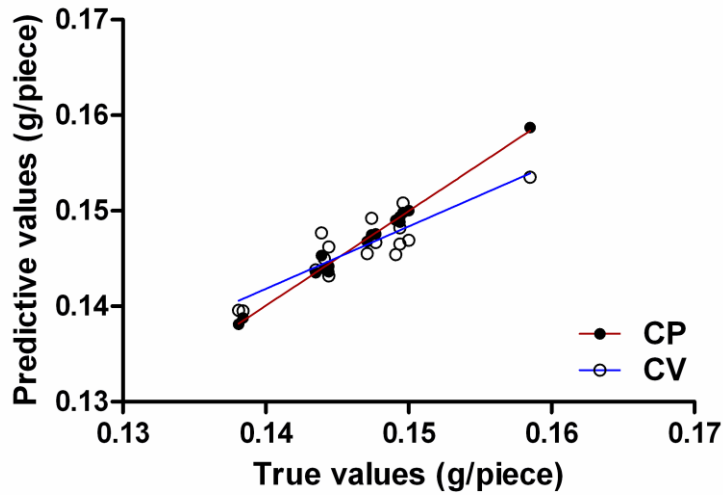
芬布芬最佳模型的校正参数

使用主因子数	SECV	SEC	预测-真实拟合方程	决定系数	偏移量
6	0.0024	0.0005	$y = 0.9902x + 0.0014$	99.0226	0.0004

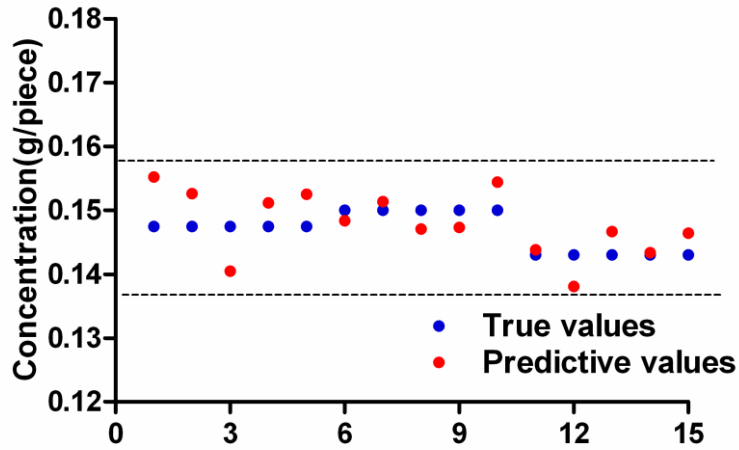
5.2 模型的交互验证

芬布芬最佳模型的交互验证

批号	真实值	预测值		偏差	
		校正预测	交互验证	校正预测	交互验证
111201-A-1	0.1435	0.1435	0.1438	0.0000	0.0003
111202-A-1	0.1500	0.1500	0.1469	0.0000	-0.0031
111203-A-1	0.1496	0.1498	0.1508	0.0002	0.0012
120301-A-1	0.1384	0.1388	0.1395	0.0004	0.0011
120302-A-1	0.1471	0.1468	0.1455	-0.0003	-0.0016
120303-A-1	0.1444	0.1442	0.1432	-0.0002	-0.0012
120401-A-1	0.1381	0.1381	0.1396	0.0000	0.0015
120501-A-1	0.1441	0.1439	0.1450	-0.0002	0.0009
121003-A-1	0.1494	0.1488	0.1465	-0.0006	-0.0029
121004-A-1	0.1585	0.1587	0.1535	0.0002	-0.0050
121006-A-1	0.1477	0.1476	0.1467	-0.0001	-0.0010
121201-A-1	0.1491	0.1490	0.1454	-0.0001	-0.0037
121203-A-1	0.1444	0.1436	0.1462	-0.0008	0.0018
121204-A-1	0.1439	0.1453	0.1477	0.0014	0.0038
121205-A-1	0.1474	0.1475	0.1492	0.0001	0.0018
121206-A-1	0.1494	0.1494	0.1482	0.0000	-0.0012



预测值 VS 真实值



预测值 VS 真实值含量范围

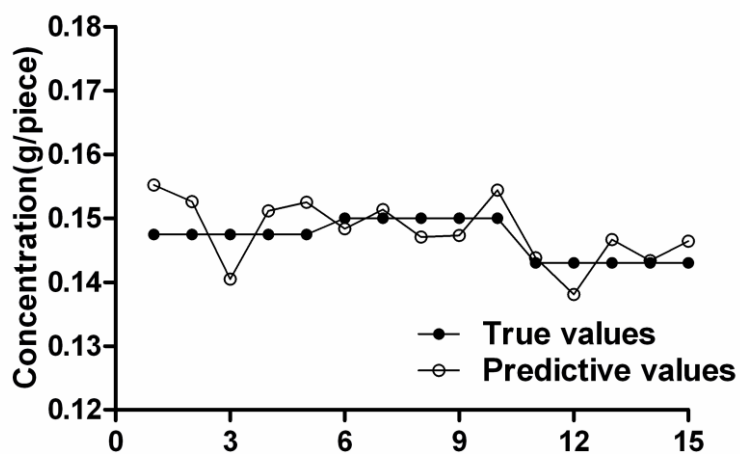
5.3 最优模型 NIR 在线验证

将其余 3 批验证集样品的近红外光谱输入校正模型，预测芬布芬的含量，并与高效液相法测定值进行比较，预测情况见下表，验证校正模型的准确性。

最终模型对检验样本集的预测

批号	真实值	预测值	绝对偏差	相对偏差%
121207-A-1	0.1475	0.1552	0.0077	5.20
121207-A-2	0.1475	0.1526	0.0051	3.44
121207-A-3	0.1475	0.1405	-0.0070	-4.76
121207-A-4	0.1475	0.1512	0.0037	2.49
121207-A-5	0.1475	0.1525	0.0050	3.37
121208-A-1	0.1500	0.1484	-0.0016	-1.04
121208-A-2	0.1500	0.1514	0.0014	0.96

121208-A-3	0.1500	0.1471	-0.0029	-1.90
121208-A-4	0.1500	0.1473	-0.0027	-1.77
121208-A-5	0.1500	0.1544	0.0044	2.96
130301-A-1	0.1430	0.1438	0.0008	0.55
130301-A-2	0.1430	0.1381	-0.0049	-3.44
130301-A-3	0.1430	0.1467	0.0037	2.57
130301-A-4	0.1430	0.1434	0.0004	0.27
130301-A-5	0.1430	0.1464	0.0034	2.37



最终模型对检验样本集的预测结果图

从上述结果可以得出，该模型可以准确地预测芬布芬药片中芬布芬的含量。

附：

芬布芬批次间的含量差异分析：

批号	片重 1 (g)	片重 2 (g)	片含量 (g)	含量%
111201	0.2600	0.2606	0.1435	55.19
111202	0.2606	0.2594	0.1500	57.57
111203	0.2645	0.2601	0.1496	56.55
120301	0.2573	0.2579	0.1384	53.79
120302	0.2593	0.2572	0.1471	56.73
120303	0.2564	0.2592	0.1444	56.34
120401	0.2558	0.2560	0.1381	53.98
120501	0.2664	0.2658	0.1441	54.09
121003	0.2666	0.2670	0.1494	56.03
121004	0.2739	0.2678	0.1585	57.86
121006	0.2640	0.2643	0.1477	55.94
121201	0.2662	0.2691	0.1491	56.02
121203	0.2612	0.2619	0.1444	55.27
121204	0.2666	0.2652	0.1439	53.96
121205	0.2626	0.2587	0.1474	56.13
121206	0.2608	0.2606	0.1494	57.29
121207	0.2577	0.2644	0.1475	57.25
121208	0.2643	0.2640	0.1500	56.74
121209	0.2638	0.2553	0.1552	58.83
130301	0.2590	0.2553	0.1430	55.22
AV	0.2624	0.2615	0.1470	56.0390
SD	0.0044	0.0042	0.0049	1.3997
CV	1.69%	1.62%	3.32%	2.50%