近红外光谱法快速测定复方感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚的含量

符国成[1]，李贱娥[1]，陆美清[1]，李　柯[2*]，梁雪娟[2*]
（1. 华润三九（郴州）制药有限公司，湖南郴州 423000；2. 湖南省中医药研究院，湖南长沙 410013）

摘要：建立了近红外光谱（NIRS）法快速测定复方感冒灵待分装颗粒中对乙酰氨基酚（**1**）的含量。本研究共收集了232个复方感冒灵颗粒样品，采用高效液相色谱（HPLC）法测定其中**1**的含量，并通过积分球漫反射方式收集颗粒的NIRS，运用偏最小二乘法（PLS）建立了**1**含量的NIRS定量分析模型。随后，采用不同的光谱波段、主因子数及预处理方法对模型进行优化。结果显示，在建立的优化模型中，交叉验证均方根误差（RMSECV）及R^2分别为0.259、0.965 8；预测集的验证集均方根误差（RMSEP）及R分别为0.253、0.999 2。上述试验证实了NIRS与PLS结合能够成功用于监测复方感冒灵待分装颗粒中**1**的含量。所建立的近红外光谱快速检测方法具有模型性能好、预测精度高、快速分析、无损的优点。该方法的应用能够大幅提高复方感冒灵颗粒的生产流转效率。

关键词：近红外光谱；复方感冒灵颗粒；对乙酰氨基酚；含量；快速分析
中图分类号：O657.33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)12-1768-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.12.012

Rapid Determination of Paracetamol in Compound *Ganmaoling* Granules by Near Infrared Spectroscopy

FU Guocheng[1], LI Jian'e[1], LU Meiqing[1], LI Ke[2*], LIANG Xuejuan[2*]
(*1. Huarun 39 (Chenzhou) Pharmaceutical Co., Ltd., Chenzhou 423000; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013*)

ABSTRACT: A near infrared spectroscopy (NIRS) method was established to rapidly determine the content of paracetamol (**1**) in compound *Ganmaoling* granules to be packaged. Two hundred and thirty-two samples of compound *Ganmaoling* granules were collected and the content of **1** was determined by HPLC. The NIRS spectra of the granules were collected by integrating sphere diffuse reflection, and a quantitative analysis model of NIRS for **1** content was established using partial least squares (PLS). And different spectral bands, principal factor numbers, and preprocessing methods were investigated to optimize the model. The results showed that in the established optimal model, the root mean square error of cross validation (RMSECV) and R^2 were 0.259 and 0.965 8, respectively. The root mean square error of prediction (RMSEP) and R value of the validation set were 0.253 and 0.999 2, respectively. The above experiment confirmed that the combination of NIRS and PLS could be successfully applied to monitor **1** content in the the compound *Ganmaoling* granules to be packaged. The established near infrared rapid detection method has the advantages of good model performance, high prediction accuracy, quick analysis, and non-destructive testing. The application of this method can significantly improve the production and circulation efficiency of compound *Ganmaoling* granules.

Key Words: near infrared spectroscopy; compound *Ganmaoling* granules; paracetamol; content; rapid analysis

复方感冒灵颗粒系由六味中药及3种化学药组成的复方制剂，用于风热感冒之发热、微恶风寒、头身痛、口干而渴、鼻塞涕浊、咽喉红肿疼痛、咳嗽、痰黄黏稠之症，临床疗效确切。复方感冒灵颗粒为中成药大品种，全国有5家企业生产，其中包括华润三九（郴州）制药有限公司。复

收稿日期：2023-06-27
基金项目：湖南省自然科学基金项目(2020JJ9005)
作者简介：符国成(1980—)，男，副主任药师，从事药品质量控制研究。
通信作者：梁雪娟(1989—)，女，副研究员，从事中药标准化研究。
E-mail：guole18888@163.com
李　柯(1980—)，男，副研究员，从事中药创新药物的研究与开发。
E-mail：17848689@qq.com

方感冒灵颗粒所含对乙酰氨基酚（paracetamol，**1**）是常用的解热镇痛药，对发热、咽痛、全身酸痛等治疗效果明显，且安全性高[1]。现有药品标准［国家药典委员会药典业发（1998）第115号文所附质量标准和原国家食品药品监督管理总局国家药品标WS3-B-2384-97—2017］采用滴定法测定**1**含量，这种定量方式耗时烦琐且误差较大[2]。目前多采用HPLC法对感冒灵颗粒中的**1**含量进行测定，虽然精度得到有效提高，但将HPLC法应用于中间体待包装颗粒的质量控制过程时，需进行样品前处理，且分析检验时间较长[3]，每批次至少需等待2.5 h，导致生产包装过程不能快速流转。为解决该问题，需在待包装颗粒中间体制剂质量控制时引入一种快速又无损的检测方法；而近红外光谱分析法恰好具备该方面的优势[4—7]。

本研究以复方感冒灵颗粒为研究对象，利用近红外光谱技术结合化学计量学，以**1**含量作为其关键质量指标，建立定量校正模型，然后进一步验证该模型的预测能力。该方法的应用可为加快复方感冒灵颗粒的生产流转提供快捷的检验方法[8]，满足更快速的检验需求，使中间体质量控制水平能更好地匹配生产产能，以期为药品连续生产的在线快速检测提供可靠依据。

1 仪器与试药

e2695-2489型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；LC-20AT型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；Tango-R型近红外光谱仪（美国布鲁克公司）；XS205型电子天平、ME2045型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）。

1对照品（中国食品药品检定研究院，含量99.9%，批号100018-202111）；96个批次的232个复方感冒灵颗粒样品取自华润三九（郴州）制药有限公司生产车间整粒完成后、内包装之前的颗粒；甲醇（分析纯、色谱纯），水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定复方感冒灵颗粒中**1**的含量

2.1.1 色谱条件

色谱柱Kromasil C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇（分析纯）和水（体积比20∶80）混合液，等度洗脱；检测波长273 nm；流速1.0 mL/min；柱温30 ℃；进样量5～10 μL。

2.1.2 溶液配制

对照品溶液：精密称取**1**对照品，加入甲醇（分析纯），溶解并制成质量浓度为1.6 mg/mL的**1**对照品溶液①，摇匀即得。同法制备质量浓度为2.1 mg/mL的**1**对照品溶液②，用于加样回收率试验。

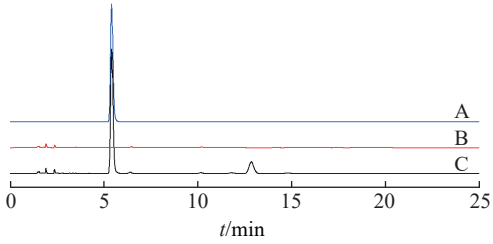
供试品溶液：取复方感冒灵颗粒样品约3.5 g，研细，置具塞锥形瓶中，精密加甲醇（分析纯）25 mL后，精密称定，超声处理10 min，放冷至室温，再次精密称定后，加甲醇（分析纯）补足损失的质量，摇匀并滤过，取续滤液即得。

阴性样品溶液：同复方感冒灵颗粒的制备工艺，制备缺**1**的颗粒，照供试品溶液制备方法，制成阴性样品溶液。

2.1.3 方法学验证

2.1.3.1 专属性考察

取“**2.1.2**”项下对照品溶液①、阴性样品溶液、供试品溶液，分别按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析，并记录色谱图，结果如图1所示。供试品溶液的色谱图中，在与对照品溶液色谱图相应的位置，有相同保留时间的1个色谱峰出现；阴性样品溶液色谱图中，在与对照品溶液色谱图、供试品溶液色谱图相应的位置，未有色谱峰出现。上述结果表明处方中的其他成分对**1**的含量测定不产生干扰，方法专属性良好。



A—对照品溶液；B—阴性样品溶液；C—供试品溶液。

图1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatogram

2.1.3.2 线性试验

取**1**对照品约250 mg，精密称定，置50 mL

量瓶中，加甲醇（分析纯）溶解并定容，摇匀，得对照品贮备液；精密量取上述对照品贮备液 1、2、3、4、5、6 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇（分析纯）定容，摇匀，分别制成 **1** 质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的线性试验溶液。分别吸取线性试验溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析，记录 **1** 的峰面积。分别以对照品质量浓度（c）为横坐标，以峰面积（A）作为纵坐标绘制标准曲线。所得回归方程为 A=5 102 498.353 7c+358 974.200 0，R^2 为 0.999 4，说明 **1** 在 0.5 ～ 3.0 mg/mL 内线性关系良好。

2.1.3.3　精密度试验

取“**2.1.2**”项下对照品溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析，连续进样 5 次。结果显示，峰面积 RSD（n=5）为 0.9%，表明仪器精密度良好，符合定量要求。

2.1.3.4　重复性试验

取 6 份复方感冒灵颗粒样品（批号 180957N），按“**2.1.2**”项下供试品溶液配制方法，平行制备 6 份供试品溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析，计算 **1** 含量。结果显示，含量的 RSD（n=6）为 0.6%，表明方法的重复性良好，符合定量要求。

2.1.3.5　稳定性试验

取“**2.1.3.4**”项下的供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、16、24、32、40、48 h 时取样，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析，测定 **1** 的峰面积，进行稳定性考察。结果显示，峰面积 RSD（n=10）为 0.9%，表明供试品溶液在 48 h 内，**1** 的稳定性良好。

2.1.3.6　加样回收率试验

取已研细的同批次复方感冒灵颗粒粉末，精密称定，共 9 份，置锥形瓶中，每份约 1.75 g，并分别精密加入 **1** 对照品溶液② 8、10、12 mL，各 3 份，再分别对应加入甲醇（分析纯）17、15、13 mL，各 3 份，精密称定；超声处理 10 min，放冷，再精密称定，用甲醇（分析纯）补足减失的质量，摇匀，滤过；取续滤液，即得加标供试品溶液。分别吸取 **1** 对照品溶液②、加标供试品溶液各 10 μL，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样分析、测定，计算加样回收率。结果显示，**1** 的平均加样回收率（n=9）为 100.5%，RSD 为 0.7%，说明该方法准确可靠，可用于复方感冒灵颗粒中 **1** 的含量测定。

2.2　近红外光谱的采集

取复方感冒灵颗粒粉末 10 g，于样品杯内，均匀平铺，采用积分球漫反射方式采集 NIR，以空气为参比，分辨率为 8 cm^{-1}；扫描次数为 32 次；扫描范围选择 10 000 ～ 4 000 cm^{-1}，空气相对湿度（50±10）%，扣除背景，每批样品重复采取 3 次后取平均光谱，结果如图 2 所示。

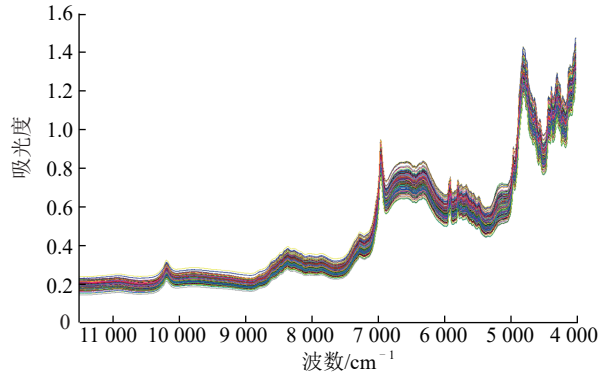


图 2　待包装复方感冒灵颗粒 NIR 图谱

Fig.2　NIR Spectra of Compound *Ganmaoling* Granules to be Packaged

2.3　样本集的划分

207 个样本使用马氏距离判别法[4]剔除 23 个异常样本后，剩余 184 个样本。均匀选择其中的 106 个样本组成校正集（其中含量最大值、含量最小值和含量平均值分别为 102.4%、95.30%、98.88%），其余 78 个样本组成的验证集（其中含量最大值、含量最小值和含量平均值分别为 102.2%、95.20%、98.89%）含量范围处在校正集样本含量范围之内。

2.4　复方感冒灵颗粒中 **1** 含量近红外定量模型的优化与建立

2.4.1　光谱预处理方法的选择

采用 OPUS 8.5 软件建立 **1** 的定量预测模型。为减少仪器、温度、湿度等条件对光谱图产生的影响，分别采用一阶导数、矢量归一化法（SNV）、一

阶导数 +SNV 方法对近红外光谱进行前处理[9]；再根据 OPUS 8.5 软件推荐的波段，选择 8 个主因子数，结合偏最小二乘（PLS）法建模。以校正集均方根误差（RMSEC）、验证集均方根误差（RMSEP）、交叉验证均方根误差（RMSECV）、内部交叉验证决定系数（R^2）作为指标评价模型的预测准确性，以确立理想的校正模型。

结果如表 1 所示，不同预处理方法的建模效果差异明显，大部分方法均提高了模型的预测效果。4 种预处理方法中，一阶导数 +SNV 方法相比于原始光谱，建模校正集、验证集和交叉验证集的偏差最低，决定系数 R^2 最接近 1，最终选择采用一阶导数与 SNV 相结合的预处理方法处理光谱数据。

2.4.2 建模波段的选择

近红外光谱的全光谱波段中除有效信息外，还包含大量影响模型预测效果的冗余信息。为排除无效信息、提高分析方法的准确度，有必要对建模波段进行筛选。因此，分别选择 4 组不同的光谱范围，即 9 400 ～ 7 500 cm^{-1}、6 100 ～ 4 248 cm^{-1}；9 400 ～ 7 500 cm^{-1}、4 248 ～ 4 000 cm^{-1}；9 400 ～ 7 500 cm^{-1}、7 500 ～ 6 100 cm^{-1}；9 400 ～ 7 500 cm^{-1} 作为 **1** 的建模波段。结果显示，**1** 在 9 400 ～ 7 500 cm^{-1} 与 6 100 ～ 4 248 cm^{-1} 时所建的模型预测效果较优，其 RMSCP 与 RMSECV 均最小且相近，R 值均大于 0.95。结果如表 2 所示。其中，9 400 ～ 7 500 cm^{-1} 包含的—CH=CH 基团特征峰与 **1** 中苯环一致，6 100 ～ 4 248 cm^{-1} 包含的—OH 与—NH 特征峰，与 **1** 中酰胺键与酚羟基一致。

2.4.3 近红外光谱分析模型 PLS 主因子数的确定

主因子数对模型的建立有很大影响，过少则建模信息不全，出现“欠拟合”现象，预测能力不足；过多则会带入大量无关信息（如噪声），出现“过拟合”现象，使预测能力下降[9—11]。

本研究通过内部交叉验证的方法，考察了主因子数对 RMSECV 的影响。RMSECV 值越小，预测准确度越高。以影响模型的主因子数为横坐标，RMSECV 为纵坐标作图（图 3）。根据上述已优化好的相关成分的定量校正模型，选取使 RMSECV 较低的主因子数，比较其交叉验证集的相关系数和均方差，确定各成分的优化模型。结果显示，当因子数为 8 时，RMSECV 为 0.259，R^2 为 0.965 8，相对分析误差（relative percent deviation，RPD）为 5.41，可满足建模要求。其后再增加因子数，RMSECV 值趋于平缓，且因子数越大，模型计算量增大，适应性减弱，因此选择 **1** 的主因子数为 8，作为定量分析参数使用。

2.4.4 近红外定量模型的建立

利用 OPUS 8.5 红外分析软件，将复方感冒灵

表 1 不同光谱预处理方法所得的 1 含量预测模型对比

Tab.1 Comparison of Predictive Models of **1** Content by Different Spectral Pretreatment Methods

预处理方法	校正集		验证集		交叉验证集	
	RMSEC	R^2	RMSEP	R^2	RMSECV	R^2
无预处理	0.548	0.863 1	0.782	0.786 5	0.622	0.802 3
一阶导数法	0.205	0.980 9	0.315	0.908 8	0.294	0.956 0
SNV法	0.361	0.940 5	0.485	0.802 3	0.468	0.888 5
一阶导数+SNV法	0.169	0.987 0	0.273	0.950 7	0.259	0.965 8

表 2 不同光谱区段对模型的影响

Tab.2 Influences of Different Spectral Sections on the Model

波数范围	维度	校正集		验证集		交叉验证集	
		RMSEC	R^2	RMSEP	R^2	RMSECV	R^2
9 400～7 500 cm^{-1}、6 100～4 248 cm^{-1}	8	0.169	0.987 0	0.273	0.950 7	0.259	0.965 8
9 400～7 500 cm^{-1}、4 248～4 000 cm^{-1}	8	0.393	0.928 6	0.759	0.833 9	0.797	0.824 8
9 400～7 500 cm^{-1}、7 500～6 100 cm^{-1}	7	0.361	0.939 1	0.623	0.802 3	0.630	0.797 2
7 500～6 100 cm^{-1}	6	0.732	0.745 9	0.581	0.815 6	0.597	0.888 0

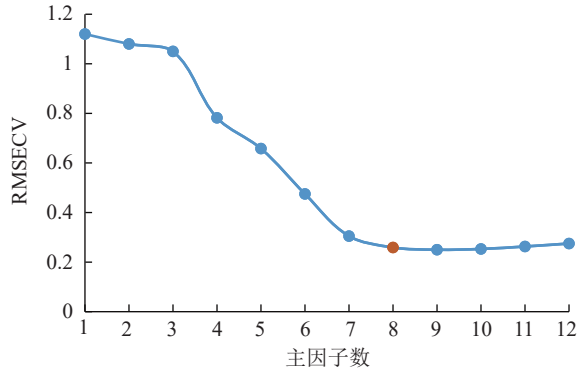


图 3　主因子数影响复方感冒灵颗粒 1 含量预测模型 RMSECV 的变化曲线

Fig.3　The Change Curve of RMSECV in Prediction Model of the **1** Content in Compound *Ganmaoling* Granules Affected by the Number of Main Factors

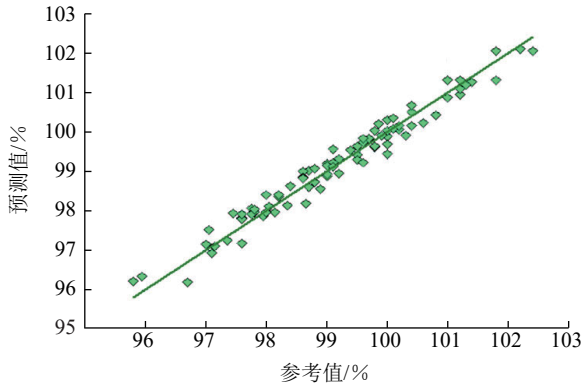


图 4　1 含量的近红外光谱定量模型建立

Fig.4　Establishment of NIR Quantitative Model for **1** Content

待包装颗粒的近红外图谱经一阶导数 +SNV 预处理后，在 9 400 ～ 7 500 cm^{-1}、6 100 ～ 4 248 cm^{-1} 波段选取 8 个主成分数，进行建模，结果如图 4 所示。建立的优化模型中，RMSECV 为 0.259，R 为 0.982 7。说明模型预测的准确性较高，样品光谱与 **1** 含量之间存在良好的相关性。

2.5　定量模型的外部验证

为验证校正模型的准确性及可行性，除采用了模型自身参数进行内部的交叉验证之外，还需要采用没有参与建模的 25 个预测集样品对模型进行外部检验。表 3 列出了预测集对模型外部验证的结果。其中预测集的 RMSEP 为 0.253，R 为 0.999 2。

将近红外模型预测值与 HPLC 测定值进行比较，结果显示两者偏差小于 1.0%，表明近红外光谱法与 HPLC 测定法的测定结果不存在显著性差异。使用相对分析误差（RPD）对预测精度进行评价，得到 RPD 为 5.04，大于 5，说明预测效果好 [12]，所建定量模型可用于实际检测。

2.6　模型重复性评价

准确称取同批复方感冒灵颗粒粉末 10 g，共 6 份，按“**2.2**”项下方法采集光谱数据，输入模型，测得其平均值（n=6）为 99.53%，RSD 为 0.6%。

3　讨论

NIRS 技术以快速、无损、操作简便、无污染等

表 3　近红外定量模型对预测集样品 1 含量的预测结果

Tab.3　The Prediction Results of **1** Content of Samples in Prediction Set by NIR Quantitative Model

编号	HPLC测定值/%	预测均值/%	相对偏差/%	编号	HPLC测定值/%	预测均值/%	相对偏差/%
1	98.11	98.15	0.04	14	99.80	99.84	0.04
2	100.45	100.37	－0.08	15	100.05	100.07	0.02
3	97.40	97.35	－0.05	16	97.03	96.99	－0.04
4	97.15	97.18	0.03	17	100.40	100.34	－0.06
5	98.80	98.75	－0.05	18	99.06	99.05	－0.01
6	98.50	98.49	－0.01	19	97.20	97.24	0.04
7	98.85	98.94	0.09	20	98.15	98.19	0.04
8	97.50	97.56	0.06	21	99.45	99.43	－0.02
9	97.14	97.17	0.03	22	97.70	97.66	－0.05
10	99.95	100.00	0.05	23	99.70	99.78	0.08
11	99.40	99.33	－0.07	24	100.70	100.78	0.08
12	101.00	100.96	－0.03	25	97.03	96.99	－0.04
13	98.10	98.05	－0.05				

优势，已被广泛应用于快速评价药品的质量[13—15]。其可实时监控生产过程中药效成分含量的变化情况，尤其适合在线分析，实现中药生产过程的实时检测与优化控制，因而被越来越多地应用于中药生产过程的质量控制[10]。本研究进一步扩展了NIRS技术在中药在线检测中的应用，对于推进中药产业智能制造和中成药质量保障具有重要的现实意义。

通过采用NIRS结合PLS法，建立了复方感冒灵待分装颗粒中**1**的NIRS定量分析模型，结果显示模型的预测精度较高，基本能准确地预测复方感冒灵颗粒中**1**的含量，实现了**1**的快速测定。该方法简便、快捷，与目前实验室所用的液相法相比，检测周期从每批2.5 h缩短至每批10 min，大幅减少了产品等待放行的时间，加快了复方感冒灵颗粒的生产流转。

为了满足样品代表性的技术要求，在NIRS的优化过程中，对样品混合、取样方式、取样量等进行了优化。结果确定的方法为：在待测复方感冒灵颗粒样品进行近红外扫描前，取200 g置封口袋中，混匀后将取样袋平铺在操作台，使样品摊匀平铺，再打开封口，用药勺在前端划线取样。这种方式的效果较好，且10 g取样量条件所得的近红外测定结果比50 g取样量条件下的检测结果更接近HPLC测定值。

参考文献：

[1] 吴文洁, 刘 陈, 刘黎明, 等. 复方感冒灵颗粒抗流感相关药效作用研究[J]. 中国现代中药, 2022, **24**(8): 1487-1493.

[2] 陈 丹, 李 柯, 符国成, 等. 复方感冒灵颗粒HPLC指纹图谱建立及化学成分鉴定[J]. 中成药, 2019, **41**(9): 2057-2062.

[3] 谷亦平, 乔 戈, 杨 园. HPLC法测定感冒灵颗粒和复方感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏含量[J]. 药物分析杂志, 2021, **41**(2): 338-344.

[4] 杨 越, 杨留长, 纪晓亮, 等. 近红外光谱法快速测定柴胡提取过程中的药效成分[J]. 分析测试学报, 2020, **39**(11): 1311-1319.

[5] 王小亮, 张秉华, 邓玉龙, 等. 诺氟沙星胶囊近红外在线质量控制初探[J]. 中国药业, 2022, **31**(14): 83-88.

[6] 尚献召, 孟昭平, 李德坤, 等. 近红外光谱技术在注射用益气复脉(冻干)生产过程分析系统中的应用进展[J]. 药物评价研究, 2021, **44**(11): 2314-2321.

[7] 张永超, 徐芳芳, 张 欣, 等. 腰痹通胶囊4种中间体粒径的近红外光谱通用定量模型研究[J]. 中草药, 2021, **52**(1): 55-64.

[8] 刘雪松, 陈佳善, 陈国权, 等. 近红外光谱法结合自动化控制系统在感冒灵颗粒浓缩过程中的在线检测技术研究[J]. 药学学报, 2017, **52**(3): 462-467.

[9] 蔡佳良, 李蕾蕾, 姬生国. 近红外光谱法快速测定广藿香中水分含量[J]. 医药导报, 2012, **31**(11): 1468-1470.

[10] 付 赛, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 近红外光谱丸剂关键辅料炼蜜水分的快速测定[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, **39**(8): 2590-2594.

[11] 赖秀娣, 林晓菁, 龚 雪, 等. 近红外光谱法快速测定穿心莲中穿心莲内酯的含量[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(9): 1300-1305.

[12] YIN L, ZHOU J, CHEN D, *et al*. A review of the application of near-infrared spectroscopy to rare traditional Chinese medicine [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2019, **221**: 117208.

[13] MA H, SHAO Y, CHEN J, *et al*. Maintaining the predictive abilities of near-infrared spectroscopy models for the determination of multi-parameters in White Paeony Root [J]. *Infrared Phys Technol*, 2020, **109**: 103419.

[14] GAO L, ZHONG L, ZHANG J, *et al*. Water as a probe to understand the traditional Chinese medicine extraction process with near infrared spectroscopy: a case of *Danshen* (*Salvia miltiorrhiza Bge*) extraction process [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2020, **244**: 118854.

[15] 褚小立, 史云颖, 陈 瀑, 等. 近五年我国近红外光谱分析技术研究与应用进展[J]. 分析测试学报, 2019, **38**(5): 603-611.