



NIR 对真伪枸橼酸西地那非片快速定性定量分析

孟 昱¹, 王世盛¹, 蔡 蕊¹, 李 梅², 孟庆刚², 赵伟杰*¹

(1. 大连理工大学 精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116012;
2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:应用近红外光谱技术建立对枸橼酸西地那非片的定量及定性分析方法. 通过对 162 个样品进行近红外光谱分析, 分别采用偏最小二乘和第一范围标定法建立定量和定性模型, 并将定量分析结果与 HPLC 定量结果进行对比. 所建定量分析模型, 主成分数为 4, R^2 为 98.91%, RMSECV 为 1.54. 该模型对预示集枸橼酸西地那非的平均回收率为 100.14%, 近红外光谱分析法处理结果与 HPLC 法处理结果无显著差异. 定性分析模型组间选择性为 5.09, 对 42 批真伪样品判错率为 0. 结果显示, 所建方法可对真伪枸橼酸西地那非片进行快速准确的定性及定量分析.

关键词: 近红外; 漫透射; 枸橼酸西地那非片; 偏最小二乘
中图分类号: O657.39 **文献标志码:** A

0 引言

枸橼酸西地那非片(万艾可 VIAGRA)为治疗阴茎勃起功能障碍(ED)的口服药, 目前市场上出现了仿冒“万艾可”及非法添加了西地那非的“保健品”, 这些“保健品”成分、含量不明, 人们误服后会导致诸多副作用, 严重危害身体健康. 现有的枸橼酸西地那非定量分析方法为高效液相色谱法, 每个样品的分析时间约为 10 min, 较为费时; 定性分析方法主要为红外光谱法^[1], 需溴化钾压片, 操作复杂, 不适合市场监测时的快速分析. 近红外光谱分析技术具有快速、无损、可多成分同时测定的特点, 在医药领域的原辅料、制剂^[2,3]、生产过程^[4]、清洁验证等定性定量分析方面应用广泛^[5,6]. 本文应用近红外漫透射光谱建立鉴别真伪枸橼酸西地那非片的定性、定量分析方法, 并对其主成分进行含量分析.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

实验材料及仪器如下: 枸橼酸西地那非原料

药、4 种辅料和枸橼酸西地那非片(大连辉瑞制药有限公司生产), 仿冒产品 102 批(非大连辉瑞制药有限公司生产); MPA 型近红外光谱仪(德国 Bruker 公司), 配有 OPUS 软件、样品转轮、漫反射模块、漫透射模块、RT-PbS 检测器和 InGaAs 检测器; Waters 高效液相色谱仪、PDA 检测器; Waters Symmetry (5 μm , 150 mm \times 3.9 mm, i. d.) 色谱柱; 梅特勒 AG245 型天平. 甲醇 Merck(色谱级)、纯水 Millipore(色谱级)、三乙胺 Merck(色谱级). 标准品: 枸橼酸西地那非(批号 00151-QCS-20).

1.2 近红外光谱采集

仪器条件: 光谱分辨率为 8 cm^{-1} , 样品扫描次数为 32, 背景扫描次数为 32, 扫描范围为 12 000~4 000 cm^{-1} .

1.2.1 原料与辅料的近红外漫反射光谱采集
将原料药与 4 种辅料样品分别放入样品瓶, 厚度大于 10 mm, 保证漫反射光信号完全反射, 采用漫反射方式扫描并采集光谱数据, 见图 1 和 2.

从枸橼酸西地那非及 4 种辅料的近红外漫反射光谱图中, 可以区分出枸橼酸西地那非的特征峰位置及其主要贡献的波长范围, 为进一步利用

漫透射对其进行定量和定性分析及预处理工作提供依据。

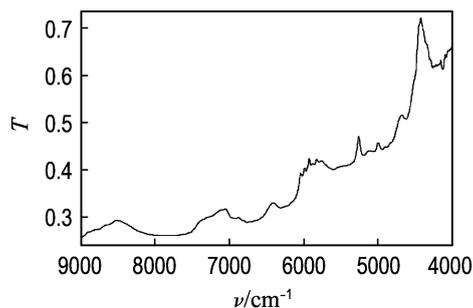


图1 枸橼酸西地那非的近红外漫反射光谱

Fig. 1 The near infrared diffuse reflectance spectroscopy of Sildenafil Citrate

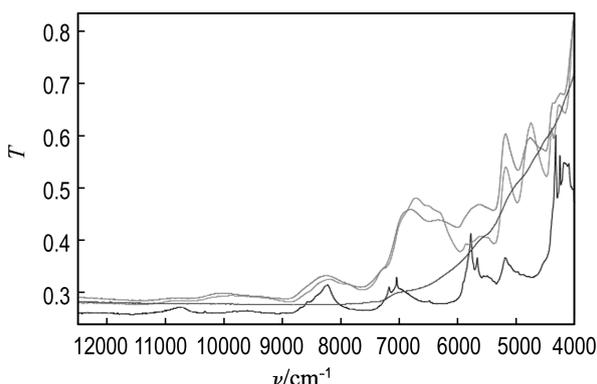


图2 枸橼酸西地那非片中4种辅料的近红外漫反射光谱

Fig. 2 The near infrared diffuse reflectance spectroscopy of 4 adjuvants from Sildenafil Citrate tablets

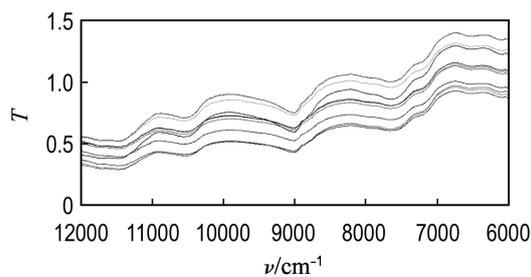
1.2.2 枸橼酸西地那非片的近红外漫透射光谱采集 对枸橼酸西地那非片的定量及定性分析采用固体漫透射方式采集近红外光谱. 真品和仿冒品枸橼酸西地那非片的近红外漫透射光谱见图3,由图可以明显看出其区别。

1.3 HPLC 测定实际样品中西地那非含量

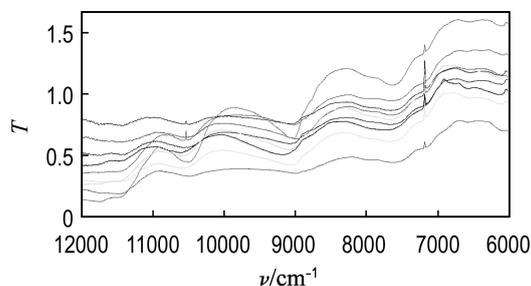
流动相:0.05 mol/L 三乙胺(磷酸调 pH 3.0 ± 0.1)、甲醇、乙腈的体积比为 58 : 25 : 17,0.45 μm 膜过滤,脱气. 柱温 30 °C,检测波长 290 nm,流速 1.0 mL/min,进样体积 20 μL. 用外标法计算枸橼酸西地那非片中西地那非的含量。

精密称取枸橼酸西地那非标准品 35.0 mg 置于 50 mL 的容量瓶中,用流动相溶解、定容,取 4 mL,流动相定容 100 mL 得标准溶液. 取标准溶液 6、4、3、2、1 mL,分别定容至 100 mL,配制成系列溶液,进样检测. 得线性方程 $y = 0.867 3x +$

0.019 6,线性范围 33.6 ~ 2.8 μg, $r = 0.999 8$ 。



(a) 真品



(b) 仿冒品

图3 枸橼酸西地那非片近红外漫透射光谱

Fig. 3 The near infrared diffuse transmission spectroscopy of Sildenafil Citrate tablets

样品溶液:将采集近红外光谱数据后的枸橼酸西地那非片分别置于 250 mL 的容量瓶中,加入 10 mL 乙腈使之崩解,再加入 50 mL 流动相,摇臂振动 30 min,流动相定容,滤得滤液,移取 5 mL 滤液,流动相定容 100 mL 得样品溶液。

1.4 数据处理

(1) 定性分析

将 120 张光谱图(真品 40 张,仿冒品 80 张)用定性分析软件建立分析模型,并在建模前应用矢量归一化、一阶导数、二阶导数等预处理方法对光谱进行预处理,从而选出最优的光谱预处理方法和波数范围. 定性分析时用标准算法、因子法和第一范围标定法 3 种基本算法分析处理模型,使模型具有良好的选择性。

(2) 定量分析

从收集到的 6 批枸橼酸西地那非片样品中,每批随机抽取 10 片作为测试样品,与市场收集的 102 批仿冒样品进行近红外光谱扫描及用 HPLC 测定活性物质含量(作为建模的参考值),得 162 张近红外光谱图. 根据样品含量分布,从 162 片中选出 80 片作为训练集,进行建模. 应用 OPUS 软件提供的交叉检验进行模型检验,建立枸橼酸西

地那非片的定量模型,采用各种光谱预处理方法处理后,得建模的最佳频率范围、最佳主成分数及最佳交叉验证均方根误差(RMSECV)。

2 结果与讨论

2.1 近红外定性分析

2.1.1 定性模型预处理方法选择 近红外光谱

采集过程中,由于受检测环境条件、样品均匀性、仪器状态等因素影响,光谱基线往往会产生偏差或漂移,需在建模前将原始光谱进行预处理。常用的预处理方法有矢量归一化、一阶导数、二阶导数等,不同预处理方法对原始光谱图的选择性 S 见表 1。

表 1 不同光谱预处理选择性

Tab. 1 The selectivities of different spectral pretreatments

ν/cm^{-1}	S			
	原始光谱	矢量归一化	一阶导数	二阶导数
5 701.2~12 004.9	0.295 223	0.485 881	0.384 860	0.402 328
5 915.5~10 486.5	0.212 739	0.851 420	0.689 958	0.756 870
6 970.2~9 010.7	0.169 083	0.876 453	0.711 813	0.801 088
5 959.4~7 981.3	0.129 574	1.009 008	0.742 680	0.796 564

选择性 S 的计算公式为

$$S = D/(T_1 + T_2) \quad (1)$$

由式(1)可知, S 是平均光谱之间距离 D 与阈值 T_1 与 T_2 之和的比率。 $S < 1$:交叉; $S = 1$:类之间有接触; $S > 2$:完全分开。由此可见预处理方法中的矢量归一化和二阶导数 9 点平滑得到比较大的选择性,且波数范围在 6 970.2~9 010.7 cm^{-1} 和 5 959.4~7 981.3 cm^{-1} 的结果较好。

由于矢量归一化仅是对光谱进行去矢量处理,而仿冒产品具有较大不确定性,在 6 970.2~9 010.7 cm^{-1} 选择二阶导数 9 点平滑会有更好的适用性。

2.1.2 定性模型分析方法选择 本文采用二阶导数 9 点平滑分别在波数范围 6 970.2~9 010.7 cm^{-1} 和 5 959.4~7 981.3 cm^{-1} 内用标准算法、因子法和第一范围标定法分析处理模型,结果见表 2,可以看出应用第一范围标定法处理所得 S 最大,选择性最好。

表 2 不同分析方法的选择性

Tab. 2 The selectivities of different analysis methods

ν/cm^{-1}	S		
	标准算法	因子法	第一范围标定法
6 970.2~9 010.7	0.801 025	0.748 888	3.850 762
5 959.4~7 981.3	0.796 580	0.629 748	3.052 673

2.1.3 定性模型分析方法优化 由 2.1.1 和 2.1.2 得到在 6 970.2~9 010.7 cm^{-1} 波长范围内采用二阶导数 9 点平滑和第一范围标定法所得模型较好,但由于仿冒样品来源比较复杂,改变平滑点数可以降低光谱的差异,增大方法的阈值可以增加模型的适用性,最终选用在 6 970.2~9 010.7 cm^{-1} 波长范围内采用二阶导数 17 点平滑和第一范围标定法处理模型,在阈值为 2 时,方法选择性为 5.087 820,完全可以满足要求。

2.1.4 定性分析结果 仿冒品与真品图谱(见图 3)的差异,分析是由有效成分含量、所用辅料及压片工艺方面的不同所致。采用本文建立的定性模型,对建库以外的 20 个真品与 22 个仿冒品进行定性分析,均能唯一分辨,误判率为 0,说明该定性模型适用于对真、伪枸橼酸西地那非片的鉴别。

2.2 近红外定量分析

2.2.1 PLS 主因子数的选择和交叉验证 采用 PLS 方法建立定量分析模型时,主成分数的选择直接关系到模型的实际预测能力。主因子数过少,不能充分反映样品光谱信息;主因子数过多则会将一些噪音信息掺入计算,降低模型的预测能力。本实验应用 OPUS 软件提供的交叉检验进行模型检验,考察主成分数对 RMSECV 的影响。当 RMSECV 最小时,所选主因子数最佳。

从表3可看出,没有经光谱预处理的RMSECV最小,结果最好,但一阶导数法能消除光谱的变异,故虽其RMSECV略大于表中前两种方法所得结果,仍应选取一阶导数法处理光谱,

使其具有更好的适用性.经一阶导数法处理后的预测值和真值见图4,其 R^2 为98.91,RMSECV为1.54,结果较好.

表3 不同PLS光谱预处理方法所得结果

Tab.3 The results of different PLS spectroscopy pretreatment methods

光谱预处理方法	最佳主成分数	频率范围/ cm^{-1} (维数)	优化(RMSECV)
无	5	7 502.5~6 098.4	0.932
直线差减法	3	7 502.5~6 098.4	1.01
一阶导数法	4	7 502.5~6 098.4	1.11
矢量归一法	4	7 502.5~6 800.4	1.29
最小-最大归一法	2	7 502.5~6 098.4	1.40
多元散射校正法	2	7 502.5~6 098.4	2.23
一阶导数法	3	12 493.8~5 446.5	2.24
二阶导数法	3	12 493.8~5 446.5	2.24
一阶导数法+直线差减法	4	12 493.8~5 446.5	2.28

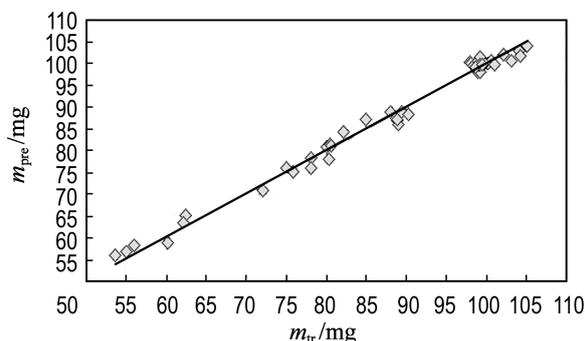


图4 训练集样品的预测值与真值相关性

Fig.4 The correlation between predicted and true values of samples in training set

2.2.2 定量分析结果 从组建训练集剩下的样品中,随机选取20个样品,组建预测集.含量测定结果见表4.

由表4可见,回收率的平均值为100.14%,极接近100%,且回收率相对标准偏差小,可见近红外方法与HPLC法无显著性差异,说明该模型具有良好的精确度和准确性.

2.3 样品收集

本实验所用样品中,6批真品直接取自辉瑞(大连)GMP车间,跟实际情况一致;102批仿冒品来自于市场(药店、机场免税店等).样品来源广泛使得所建模型实用性强,对市售样品的检测结果准确度高.

表4 PLS交叉检验建模对预测集的预测结果

Tab.4 The prediction results of prediction set by cross validation modeling using PLS

预测样品序号	HPLC结果/%	NIR预测值/%	回收率/%
1	100.25	100.30	100.05
2	98.10	97.83	99.72
3	101.19	99.95	98.77
4	99.10	99.88	100.79
5	97.66	96.88	99.20
6	99.74	100.90	101.16
7	99.33	100.51	101.19
8	98.26	97.99	99.73
9	100.19	100.20	100.01
10	100.35	100.60	100.25
11	67.25	66.71	99.65
12	89.64	98.03	100.80
13	112.00	111.88	99.88
14	100.15	99.07	98.72
15	90.63	90.64	100.01
16	77.75	77.94	101.19
17	80.84	81.91	101.06
18	100.30	100.90	100.60
19	98.44	98.51	100.07
20	88.49	88.34	99.85

注:回收率平均值为100.14%;其相对标准偏差为0.75%

3 结 论

枸橼酸西地那非片仿冒品系指非大连辉瑞制药有限公司生产的商品名为“万艾可”的药品,应用本文建立的定性、定量模型可快速准确鉴别样品的真伪及枸橼酸西地那非含量,经检测发现,102批仿冒品中均含有枸橼酸西地那非,含量与真品枸橼酸西地那非标准(100 mg/片)相差较大,所用辅料及压片工艺也与真品有差异。

参考文献:

[1] 汪 洁,彭 茗,刘 瑾. 西地那非原料及其中成药制剂的红外光谱鉴别[J]. 中南药学, 2004, 2(3): 144-146

[2] 王 娜,杨 欣,佐 燕. 近红外漫反射光谱法测定红霉素肠溶片中红霉素 A 的含量[J]. 药物分析, 2007, 27(3):335

[3] 严衍禄,赵龙莲,韩东海,等. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005

[4] AMADOR-HERNANDEZ J, FERNANDEZ-ROMERO J M, LUQUE DE CASTRO M D. Near infrared thermal lens spectrometry for the real-time monitoring of supercritical fluid extraction [J]. *Talanta*, 1999, 49(4):813-823

[5] 芦永军. 近红外光谱分析技术及其在药物工业中的应用[J]. 光谱分析, 2003(5):30-34

[6] 陆婉珍,袁洪福,徐广通,等. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2000

Quantitative and qualitative analysis of true or counterfeit Sildenafil Citrate tablets using near infrared spectroscopy

MENG Yu¹, WANG Shi-sheng¹, CAI Rui¹, LI Mei²,
MENG Qing-gang², ZHAO Wei-jie^{*1}

(1. State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;
2. Pharmaceutical Academy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Quantitative and qualitative analysis of Sildenafil Citrate tablets using near infrared spectroscopy (NIR) was developed. 162 samples were analyzed using near infrared spectroscopy. The mathematical models of quantitative and qualitative analysis were developed by partial least square (PLS) and scaling to first range method, respectively. The quantitative results between HPLC and NIR were compared. The optimal rank of calibration set is 4, the correlation coefficient (R^2) of the training set validated by cross-validation is 98.91%, RMSECV is 1.54. The quantitative analysis model was used to determine the samples used for validation, and the average recovery rate of Sildenafil Citrate is 100.14%. There is no significant difference between NIR and HPLC method. The selectivity between two groups is 5.09, and mistaken judgment rate of 42 samples is 0. The results show that the method established can be applied to quantitative and qualitative analysis of Sildenafil Citrate tablets.

Key words: near infrared; diffuse transmission; Sildenafil Citrate tablets; PLS