

基于二值化图像结合像元统计法的扑尔敏片剂 近红外成像检测参数优化研究

周璐薇, 吴志生*, 史新元, 徐曼菲, 张 乔, 乔延江*

北京中医药大学, 国家中医药管理局中药信息工程重点研究室,
北京市中药基础与新药研究重点实验室, 北京 100102

摘 要 研究药物领域中近红外成像检测参数对高光谱数据质量的影响, 建立检测参数优化方法。以扑尔敏片剂为研究对象, 采用近红外化学成像技术, 考察光谱分辨率、空间分辨率、扫描次数和扫描高度等因素, 采用 L₉(3⁴) 正交表设计, 优化近红外成像检测参数; 采用二值化图像法和像元统计法对高光谱数据进行定量分析, 测定扑尔敏片剂表面马来酸氯苯那敏含量。以高效液相色谱法作为参考方法, 精密测定片剂中马来酸氯苯那敏含量。两种方法测定的含量差值绝对值为考察指标, 优化最佳检测条件。结果表明, 扑尔敏片剂的高光谱数据最佳检测条件: 空间分辨率 25 μm×25 μm, 扫描高度-5340(Z 值, 精确聚焦), 光谱分辨率 16 cm⁻¹, 扫描次数 16 次。该研究首次优化近红外成像扫描高度参数对高光谱数据质量的影响, 优化近红外成像扫描高度等检测参数可用于指导扑尔敏片及其他药物近红外成像数据采集和方法建立。

关键词 近红外化学成像; 检测参数优化; 扑尔敏片; 扫描高度

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2014)10-2821-06

引 言

近红外化学成像(near infrared chemical imaging, NIR-CI)技术将传统的近红外光谱技术与成像技术相结合, 同时获取样品的光谱和空间信息^[1]。其采集的数据是一个三维数据矩阵($X \times Y \times \lambda$), 二维空间(X 和 Y)代表样品中化学组分的空间分布, 一维波长(λ)代表各化学组分的性质, 即物质的光谱吸收。目前, 采用降维方法, 将三维数据展开为二维数据($XY \times \lambda$)^[2]。然后, 采用二维分析方法进行数据分析, 可视化样品的组分分布, 生成近红外化学成像图。

该技术保留了近红外光谱技术的优势, 如快速, 无损, 无污染等^[3]。目前, NIR-CI 已运用到西药制剂的生产过程中^[4-8]。Ma 和 Anderson 采用不同空间分辨率和光谱分辨率, 采集混合过程中二元体系的近红外成像图^[9]。结果表明, 采用较低的空间分辨率和光谱分辨率获取的高光谱(hyperspectra)数据, 包含丰富的空间和化学信息, 能够反映混合过程中二元体系均匀度的变化。此外, 采用较低的分辨率可以采集更大面积的近红外成像图, 扩大二元体系监控和评价范

围, 分析结果更具有代表性。在制粒过程中, Slobodan 等采用 NIR-CI 技术, 参数空间分辨率 25 μm×25 μm, 光谱分辨率 16 cm⁻¹, 扫描次数 16 次, 成功测定颗粒大小并可视化颗粒形状^[10]。Maurer 等则采用该技术监测片剂的包衣过程, 设定采集参数空间分辨率 80 μm×80 μm, 光谱分辨率 10 nm, 扫描次数 16 次。采集样品的近红外成像图, 通过相关数据分析, 成功测定包衣厚度, 可视化包衣层, 并评价包衣厚度的均匀性^[11]。因此, 近红外成像检测参数直接影响高光谱数据的质量并进一步影响相关空间、化学信息的获取。在保证不丢失样本信息的情况下, 应尽量选择较低的分辨率, 节省采样时间。

然而, 针对药物片剂的特点, 还未有 NIR-CI 检测参数优化的报道, 特别是未将扫描高度列入参数优化。马来酸氯苯那敏(chlorpheniramine maleate, CPM)是 H₁ 受体拮抗剂, 在临床上用于缓解感冒症状和治疗过敏性疾病^[12]。本研究采用扑尔敏片剂为载体, 考察近红外成像检测参数对高光谱数据质量的影响, 优化检测参数, 为扑尔敏片剂及其他药物近红外高光谱数据的采集提供方法指导。

收稿日期: 2014-05-28, 修订日期: 2014-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81303218)和北京中医药大学自主选题项目(2014JYBZZ-XS083)资助

作者简介: 周璐薇, 1990 年生, 北京中医药大学硕士研究生 e-mail: zlw900511@163.com

* 通讯联系人 e-mail: yjqiao@263.net; wzs@bucm.edu.cn

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Spectrum Spotlight 400/400N 傅里叶变换近红外/红外光谱成像仪(PerkinElmer 公司, 英国), 16×1 阵列 MCT 检测器。1100 型高效液相色谱仪, 包括四元泵, 柱温箱, 真空脱气机, 自动进样器, 二极管阵列检测器和 HP 色谱工作站(Agilent 公司, 美国)。旋转式压片机(信源制药机械有限公司, 上海)。电子天平(德国赛多利斯集团, SI-4001)。马来酸氯苯那敏(济南浩化实业有限责任公司), 预胶化淀粉(上海卡乐康包衣技术有限公司), 微晶纤维素(北京凤礼精求商贸责任有限公司), 硬脂酸镁(上海国药集团化学试剂有效公司)。乙腈(美国 Fisher Scientific 公司, 色谱纯), 磷酸二氢铵(北京化工厂, 分析纯), 磷酸(美国 Fisher 公司, 色谱纯), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。马来酸氯苯那敏对照品由中国食品药品检定研究院提供(批号: 100047-200606)。

1.2 扑尔敏片剂的制备

按照处方(马来酸氯苯那敏, 4%, w/w ; 预胶化淀粉, 50%, w/w ; 微晶纤维素, 45.5%, w/w ; 硬脂酸镁, 0.5%, w/w)比例称取马来酸氯苯那敏及相关辅料, 采用等量递增法进行混合。精密称取 0.500 g 混合均匀的粉末进行压片(参数条件: 压力 60 kN, 填充厚度 5.00 mm, 片剂厚度 2.0 mm)。

1.3 马来酸氯苯那敏含量 HPLC 法测定

取扑尔敏片剂, 粉碎并用流动相溶解, 定容至 100 mL。采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按照《中华人民共和国药典》2010 版 2 部中, 马来酸氯苯那敏片项下高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)测定马来酸氯苯那敏含量。

色谱条件: C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm , Dikma); 流动相: 乙腈: 水: 磷酸(20: 80: 0.1, φ); 检测波长: 262 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μL 。

1.4 基于扑尔敏片剂的近红外成像检测参数优化

1.4.1 正交试验设计

采集扑尔敏片剂表面的高光谱数据, 以光谱分辨率、空间分辨率、扫描次数和扫描高度为考察因素, 每个因素设立 3 个水平(见表 1), 采用 L₉(3⁴)正交表, 试验安排见表 3。其中, 根据片剂厚度设定三个扫描高度, 分别为仪器自动聚焦(Z 值: -5 144), 精确聚焦(Z 值: -5 340), 模糊聚焦(Z 值: -5 250)。

Table 1 Parameter level of orthogonal-test

	光谱分辨率/cm ⁻¹	空间分辨率/ μm	扫描次数	扫描高度/Z
1	16	6.25×6.25	8	-5 144
2	32	25×25	16	-5 340
3	64	50×50	32	-5 250

1.4.2 高光谱数据的获取和预处理

采用高反射标准白板(99% Spectralon TM, 英国

PerkinElmer 公司)扣除背景干扰。采用漫反射方式, 采集片剂表面的高光谱数据($R=R_{\text{样品}}/R_{\text{背景}}$, Spotlight 400 软件, 英国 PerkinElmer 公司)。然后, 将原始漫反射数据(R)转换为吸光度值数据(A)。

将采集的高光谱数据进行降维, 得到二维光谱数据。对二维光谱数据进行噪音消除、扣除空气中二氧化碳和水分子干扰、归一化、标准化(normalizing)、Savitzky-Golay (SG)平滑, 一阶导数(first derivative, 1D)等^[13]预处理, 消除片剂表面粗糙程度和背景噪声等因素对光谱数据的影响。

采用 Hyper View 软件和 Spectrum Image 软件(英国 PerkinElmer 公司)进行数据处理。其余各计算程序均自行编写, 采用 MATLAB2009b 软件工具(美国 MATLAB 公司)运算。

2 结果与讨论

2.1 扑尔敏片剂中马来酸氯苯那敏含量 HPLC 法测定结果

马来酸氯苯那敏色谱图如图 1 所示。第一个峰和第二个峰分别代表马来酸和氯苯那敏。采用氯苯那敏峰面积计算, 进行含量测定。氯苯那敏回归方程为 $y=892.8x-13.06$, $R^2=0.9999$ 。结果表明, 氯苯那敏在 0.203 1~2.031 0 μg 范围内具有良好的线性关系。

采用 HPLC 法为参考方法, 精密测定样品 1 的含量为 3.96%(峰面积 334.4 mAU·s), 样品 2 的含量为 3.99%(峰面积 337.2 mAU·s)。扑尔敏片剂中马来酸氯苯那敏平均含量为 3.98%。

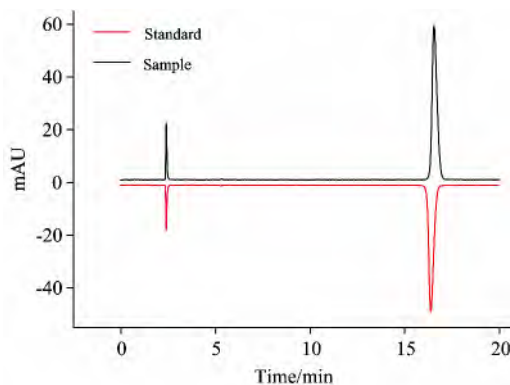


Fig 1 Chlorpheniramine maleate chromatogram

2.2 马来酸氯苯那敏空间分布成像图的获取

2.2.1 纯物质成像图和纯物质光谱的获取

采用 1.2 项下压片参数条件, 分别制备纯马来酸氯苯那敏、纯预胶化淀粉和纯微晶纤维素片。分别采集马来酸氯苯那敏、预胶化淀粉和微晶纤维素片表面的近红外成像图。采用降维方式, 从成像图中求得各组分的纯物质光谱, 如图 2(a)所示。

2.2.2 马来酸氯苯那敏空间分布的辨识

按照表 3 中试验设计, 采用不同检测参数, 采集马来酸氯苯那敏片剂表面的近红外成像图(图 3)。采集的近红外成像图是多元混合体系的吸收光谱, 从原始成像图中难以直接

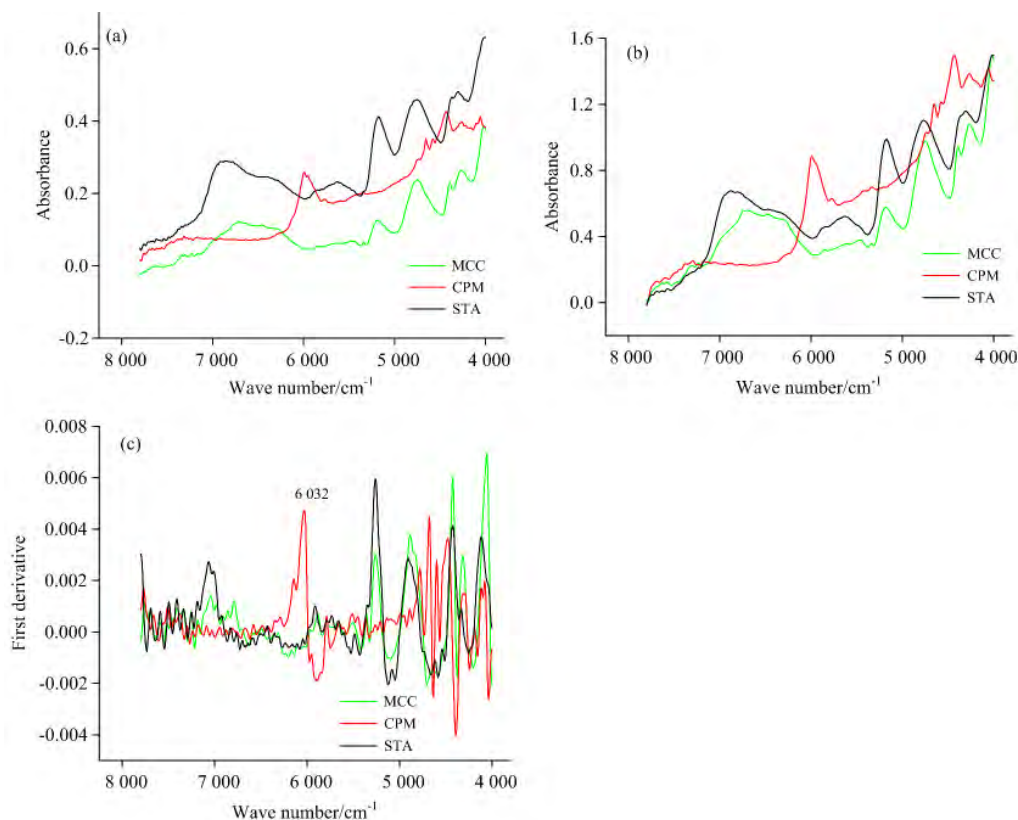


Fig 2 Raw and preprocessed spectra of three major ingredients

(a): Raw spectra; (b): Spectra preprocessed by SG smoothing and normalizing; (c): Spectra preprocessed by SG smoothing and 1D. MCC: Microcrystalline cellulose; CPM: Chlorpheniramine maleate; STA: Pregelatinized starch

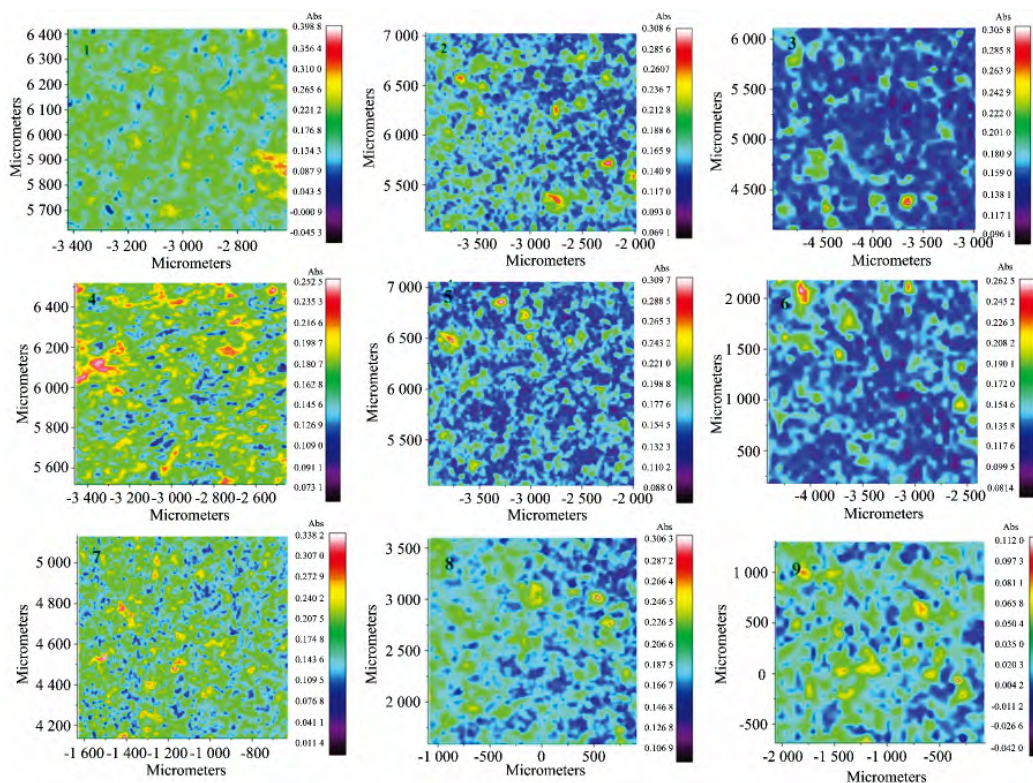


Fig 3 Raw images obtained from the surface of chlorpheniramine maleate tablet under the different detection parameters (1~9 represented the number of orthogonal experimental design in Table 3)

分辨马来酸氯苯那敏的化学信息。原始光谱易受片剂表面粗糙程度、空气中二氧化碳和水分等因素影响。因此,对降维后的光谱数据进行 SG 平滑、标准化和一阶导数等预处理。

图 2(c)显示经过 SG 平滑和一阶导数处理后的各纯物质光谱。如图所示,在 $6\ 032\ \text{cm}^{-1}$ 处,马来酸氯苯那敏有显著特征吸收。因此,采用特征通道法,辨识样品中马来酸氯苯那敏的空间分布。图 4 是样品在 $6\ 032\ \text{cm}^{-1}$ 波数处的近红外成像图,其中一阶导数值较大的红色区域代表马来酸氯苯那敏的空间分布。

2.3 二值化图像结合像元统计法测定片剂表面马来酸氯苯那敏含量

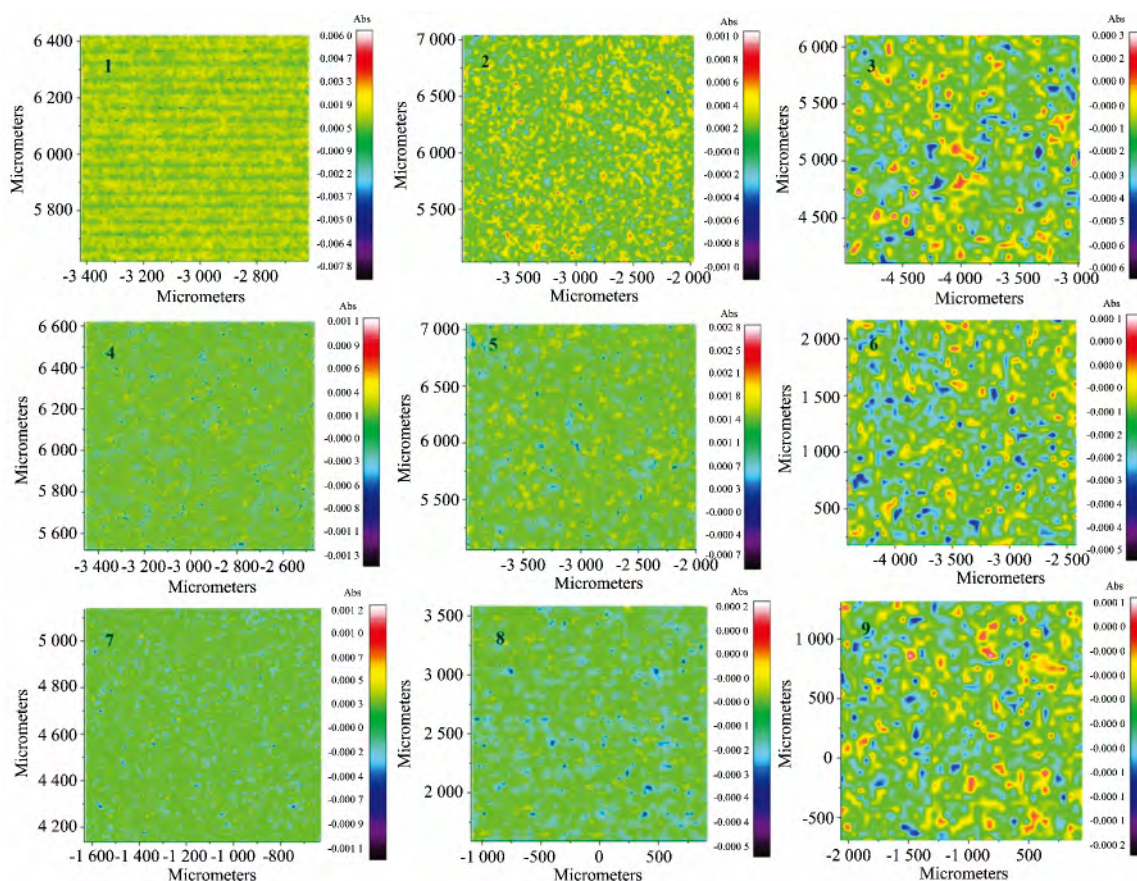


Fig 4 Distribution images of chlorpheniramine maleate on the tablet surface at $6\ 032\ \text{cm}^{-1}$ under the different detection parameters (1-9 represented the number of orthogonal experimental design in Table 3)

2.4 正交试验分析结果及验证

采用二值化图像法和像元统计法对高光谱数据进行定量分析,测定扑尔敏片剂表面马来酸氯苯那敏含量。HPLC 法作为参考方法,精密测定片剂中马来酸氯苯那敏含量。以 HPLC 与 NIR-CI 测定的含量差值绝对值为考察指标,进行正交试验分析,结果如表 3 所示,方差分析结果见表 4。

表 3 结果表明,影响因素大小顺序为空间分辨率 > 扫描高度 > 光谱分辨率 > 扫描次数,并且空间分辨率有显著性影响。由于选择差值的绝对值作为考察指标,实验结果差值越小,说明 NIR-CI 的检测参数越优化。因此,最佳组合为

采用特征通道法辨识了马来酸氯苯那敏的空间分布。然而,肉眼难以区分成像图中颜色的深浅,无法准确分析片剂表面马来酸氯苯那敏的分布。因此,采用二值化图像方法,设定阈值,获取马来酸氯苯那敏的二值化图像(图 5)。图 5 中白色区域代表马来酸氯苯那敏空间分布,样品中其他所有组分产生的吸收均被当成未感兴趣区域(图中黑色)。

采用像元统计分析,计算图 5 中白色区域面积占总面积的比例,测定样品表面马来酸氯苯那敏含量(表 2)。分别采集扑尔敏片表面的高光谱数据,采用样品 1 的相关图像为代表阐释方法学分析。

$B_2D_2A_1C_2$, 即空间分辨率 $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$, 扫描高度 Z 值 = $-5\ 340$ (精确聚焦), 光谱分辨率 $16\ \text{cm}^{-1}$, 扫描次数 16 次。

以确定的最佳检测参数采集 3 片扑尔敏片剂上、下表面的高光谱数据,进行 2.3 项下相关处理。采用像元统计法测定各片剂上、下表面的马来酸氯苯那敏含量,计算均值,并按照 1.3 项下的 HPLC 法精密测定片剂中马来酸氯苯那敏含量。像元统计法测定马来酸氯苯那敏平均含量为 4.24%, HPLC 法精密测定的马来酸氯苯那敏平均含量为 4.39%, RSD 值为 2.46%, 说明该 NIR-CI 的检测参数条件稳定可行。

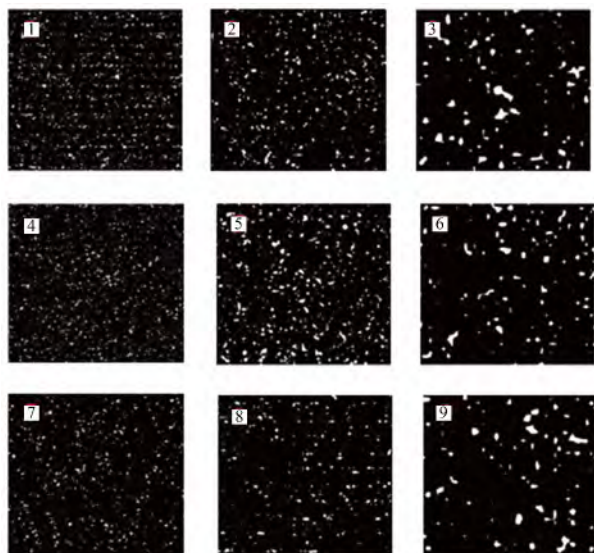


Fig 5 Binary images of chlorpheniramine maleate tablets obtained under the different detection parameters (1-9 represented the number of orthogonal experimental design in Table 3)

Table 2 Content of CPM on the tablet surface determined by statistical measurement

试验号	含量 1/%	含量 2/%	含量均值/%
1	3.26	3.64	3.45
2	4.10	3.83	3.96
3	4.86	4.24	4.55
4	3.21	3.36	3.29
5	3.67	3.77	3.72
6	4.40	4.51	4.46
7	3.20	3.59	3.40
8	3.62	3.86	3.74
9	4.27	4.56	4.42

3 结论

以扑尔敏片为载体,以光谱分辨率、空间分辨率、扫描次数和扫描高度为考察因素,采用 L₉(3⁴) 正交表设计,优化近红外成像检测参数。采用特征通道法辨识片剂活性成分马来酸氯苯那敏的空间分布,并采用二值化图像法和像元统计法对高光谱数据进行定量分析,测定扑尔敏片表面马来酸

Table 3 Orthogonal experimental design and data analysis

试验号	光谱分辨率 /A	空间分辨率 /B	扫描次数 /C	扫描高度 /D	差值
1	1	1	1	1	0.53
2	1	2	2	2	0.02
3	1	3	3	3	0.57
4	2	1	2	3	0.70
5	2	2	3	1	0.26
6	2	3	1	2	0.48
7	3	1	3	2	0.59
8	3	2	1	3	0.24
9	3	3	2	1	0.44
均值 1	0.373	0.607	0.417	0.410	
均值 2	0.480	0.173	0.387	0.363	
均值 3	0.423	0.497	0.473	0.503	
极差	0.107	0.434	0.086	0.140	

Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
光谱分辨率	0.017	2	0.187	$p > 0.1$
空间分辨率	0.304	2	3.350	$p < 0.1$
扫描次数	0.012	2	0.132	$p > 0.1$
扫描高度	0.030	2	0.331	$p > 0.1$

$$F_{0.1(2, 8)} = 3.110$$

氯苯那敏含量。以 HPLC 方法作为参考方法,精密测定片剂中马来酸氯苯那敏含量。计算两种方法测定马来酸氯苯那敏含量差值的绝对值,作为考察指标,优化最佳检测条件。

正交试验分析结果表明,近红外成像检测参数影响因素大小顺序为空间分辨率(极差: 0.434) > 扫描高度(0.140) > 光谱分辨率(0.107) > 扫描次数(0.086),且空间分辨率有显著性影响($p < 0.1$)。最佳检测条件为:空间分辨率 25 μm × 25 μm ,扫描高度—5340(Z 值,精确聚焦),光谱分辨率 16 cm^{-1} ,扫描次数 16 次。

最终,采用优化的 NIR-CI 检测参数,测定马来酸氯苯那敏平均含量为 4.24%,HPLC 法精密测定的马来酸氯苯那敏平均含量为 4.39%,说明该 NIR-CI 的检测参数条件稳定可行。选择合适的近红外成像检测参数,获取有效、真实反映样本特征的高光谱数据。首次报道优化近红外成像扫描高度参数对高光谱数据质量的影响,优化的检测参数可用于指导扑尔敏片及其他药物近红外成像数据采集和方法建立。

References

- [1] Katherine A B. Process Analytical Technology. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2010. 187.
- [2] Lewis E N, Schoppelrei J, Lee E. Spectroscopy, 2004, 19(4): 26.
- [3] Ozaki Y. Analytical Sciences, 2012, 28(6): 545.
- [4] Gendrin C, Roggo Y, Collet C. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48(3): 533.
- [5] Gowen A A, O'Donnell C P, Cullen P J, et al. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 69(1): 10.
- [6] Roza J, Zarow A, Zhou B, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(11): 4888.
- [7] Rosas J G, Armenta. S, Cruz. J, et al. Analytica Chimica Acta, 2013, 787: 173.

- [8] Franch-Lage F, Amigo J M, Skibsted E, et al. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 411: 27.
- [9] Ma H, Anderson C A. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2009, 15(3): 137.
- [10] SaSic S. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 73.
- [11] Maurer L, Leuenberger H. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 370(1): 8.
- [12] Kirkegaard J, Secher C, Mygind N. *Allergy*, 1982, 37(3): 203.
- [13] Vidal M, Amigo J M. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2012, 117: 138.

Research on NIR-CI Parameters Optimization of Chlorpheniramine Maleate Tablets Based on Binary Image and Statistical Measurement

ZHOU Lu-wei, WU Zhi-sheng*, SHI Xin-yuan, XU Man-fei, ZHANG Qiao, QIAO Yan-jiang*

Beijing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of TCM-Information Engineering of State Administration of TCM, Beijing Key Laboratory for Basic and Development Research on Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract The optimization method was established to investigate the effect of near infrared chemical imaging (NIR-CI) detection parameters on hyperspectral data quality. In order to optimize the detection parameters, chlorpheniramine maleate (CPM) tablets were chosen as examples and the L9(3⁴) orthogonal-test design was adopted to research the effects of spectral resolution, spatial resolution, scan times and scan height. Binary image coupled with statistical measurement was proposed to quantitatively analyze hyperspectral data and determine the content of CPM on the tablet surface. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used as reference method for accurate CPM determination. The absolute value of the difference between CPM contents obtained from NIR-CI and HPLC was chosen as index. The result demonstrated that the optimum parameters for acquiring hyperspectral data were: 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ (spatial resolution), 5340 (scan height, the value of Z, precise focus), 16 cm^{-1} (spectral resolution) and 16 (scan times). The influence of scan height on hyperspectral data was firstly investigated. The optimized parameters could be applied to CPM tablets and other drugs for NIR-CI data acquisition and methodology establishment.

Keywords Near infrared chemical imaging; Optimization of detection parameters; Chlorpheniramine maleate tablet; Scan height

* Corresponding authors

(Received May 28, 2014; accepted Jul. 30, 2014)

敬告读者——《光谱学与光谱分析》已全文上网

从 2008 年第 7 期开始在《光谱学与光谱分析》网站(www.gpxygpx.com)“在线期刊”栏内发布《光谱学与光谱分析》期刊全文,读者可方便地免费下载摘要和 PDF 全文,欢迎浏览、检索本刊当期的全部内容;并陆续刊出自 2004 年以后出版的各期摘要和 PDF 全文内容。2009 年起《光谱学与光谱分析》每期出版日期改为每月 1 日。

《光谱学与光谱分析》期刊社