

基于 QbD 理念的安宫牛黄丸整体混合 终点评价方法研究

刘晓娜¹, 郑秋生¹, 车晓青², 吴志生^{3*}, 乔延江^{3*}

(1. 滨州医学院 中西医结合学院, 山东 烟台 264003;

2. 烟台渤海制药集团有限公司 药物研究院, 山东 烟台 264003;

3. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 大品种中药-安宫牛黄丸混合终点判断是关键的技术问题。基于质量源于设计(QbD)理念的控制策略,研究提出一种整体混合终点的判断方法,为含矿物质中药混合提供方法学。采用激光诱导击穿光谱(LIBS)技术获得安宫牛黄丸混合中间体的光谱数据。结合移动窗相对标准偏差法(MWRSD)法,朱砂、雄黄和珍珠粉为整合研究指标,通过比较相邻混合时间光谱的差异,快速评价整体混合过程。雄黄、朱砂和珍珠粉3个药味的混合过程并非完全一致,但在混合的最后一个阶段,3个药味均达到了混合均匀;得到建议混合终点。采用 LIBS 过程技术建立的微区时序分析方法,实施过程控制。所建立的方法无需标准光谱库,具有分析快速、近似无损、无需复杂的样品前处理的等特点,为大品种中药制剂的质量研究提供新思路。

[关键词] 安宫牛黄丸; 混合终点; 激光诱导击穿光谱; 质量源于设计; 过程分析技术

Research on whole blending end-point evaluation method of Angong Niuhuang Wan based on QbD concept

LIU Xiao-na¹, ZHENG Qiu-sheng¹, CHE Xiao-qing², WU Zhi-sheng^{3*}, QIAO Yan-jiang^{3*}

(1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. Pharmaceutical Academy, Bohai Pharmaceutical Group Co., Ltd., Yantai 264003, China;

3. College of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] The blending end-point determination of Angong Niuhuang Wan (AGNH) is a key technology problem. The control strategy based on quality by design (QbD) concept proposes a whole blending end-point determination method, and provides a methodology for blending the Chinese materia medica containing mineral substances. Based on QbD concept, the laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) was used to assess the cinnabar, realgar and pearl powder blending of AGNH in a pilot-scale experiment, especially the whole blending end-point in this study. The blending variability of three mineral medicines including cinnabar, realgar and pearl powder, was measured by moving window relative standard deviation (MWRSD) based on LIBS. The time profiles of realgar and pearl powder did not produce consistent results completely, but all of them reached even blending at the last blending stage, so that the whole proposal blending end point was determined. LIBS is a promising Process Analytical Technology (PAT) for process control. Unlike other elemental determination technologies such as ICP-OES, LIBS does not need an elaborate digestion procedure, which is a promising and rapid technique to understand the blending process of Chinese materia medica (CMM) containing cinnabar, realgar and other mineral traditional Chinese medicine. This study proposed a novel method for the research of large varieties of traditional Chinese medicines.

[收稿日期] 2016-12-27

[基金项目] 北京市科技新星计划项目(xx2016050);北京中医药大学杰出青年基金项目(2015-JYB-XYQ-003);山东省高等学校优势学科人才团队培育计划项目

[通信作者] * 乔延江, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药信息学, E-mail: yjqiao@263.net; * 吴志生, 副研究员, 研究方向为中药生产过程分析与控制和中药无损检测与微区分析, E-mail: wzs@bucm.edu.cn

[作者简介] 刘晓娜, 讲师, 研究方向为中药关键质量属性快速评价与微区分析, E-mail: xiaonaliu5627@163.com

[Key words] Angong Niu Huang Wan; whole blending end-point; laser-induced breakdown spectroscopy; quality by design; process analytical technology

安宫牛黄丸是中医治疗高热症的“温病三宝”之一^[1],历来是中医用于治疗各类急证的必备要药。安宫牛黄丸处方的组分比较复杂,其中雄黄、朱砂比例均为10%,药味的比重差异较大,从而影响药效和安全性。粉末混合过程为动态变化的时间序列,其主要目的是确定混合终点,指导混合工艺优化^[2-3]。大品种中药-安宫牛黄丸混合终点判断是关键的技术问题。马群^[4]应用近红外在线分析技术检测安宫牛黄丸原粉混合终点,运用相似度匹配法判断混合终点;刘珊珊等^[5]采用近红外光谱结合移动窗标准偏差法对安宫牛黄丸的中试混合过程进行在线监测;并采用高效液相色谱法验证中间体中有效成分黄芩苷等成分的变化,验证了近红外在线分析技术指导混合终点判断的可靠性。目前尚未有针对矿物质中药的混合过程的研究,缺乏质量控制的有效方法,难以保证含矿物质中成药质量的稳定、均一。21世纪初,美国推出了Quality by Design“QbD(质量源于设计)”理念。QbD是一种系统的研究方法,强调对产品和工艺的理解,以及对工艺过程的控制^[6-7]。在制药行业,QbD的初始设计决定产品质量的理念已逐渐被业界认可。“质量可控、安全有效”是药品研发过程须遵循的首要原则。其中,质量可控又是安全有效的前提条件。激光诱导击穿光谱技术(laser-induced breakdown spectroscopy, LIBS)是新兴的微区多元素检测技术,是以激光脉冲作为激发源诱导产生激光等离子体的原子发射光谱^[8-10]。在解决多指标、多成分的中药分析时,LIBS区别于传统的元素分析技术,具有诸多的优势:快速、绿色、多元素检测及近似无损的特点^[11]。本研究基于QbD理念,采用LIBS过程分析技术评价安宫牛黄丸的整体混合过程,以朱砂、雄黄和珍珠粉3个药味为研究载体,通过LIBS技术在若干时间点代表性的采样获得混合过程的微区光谱。以特定元素砷(As)、汞(Hg)、钙(Ca)分析结果为断面,快速评价安宫牛黄丸的混合过程的微区时序特征,了解含矿物质中药粉末混合过程的规律,建立合理的质量评价方法,指导整合终点判断;确保含矿物质中药混合的均一性,为保证生产过程的工艺可控性提供了基础。

1 材料

黄芩、黄连、栀子、郁金、牛黄、水牛角浓缩粉、朱砂、雄黄、冰片和珍珠粉等药材均由北京同仁堂股份有限公司科学研究所提供。安宫牛黄丸混合中间体由北京中医药大学马群教授提供。模拟安宫牛黄丸的混合过程,并得到44个安宫牛黄丸混合中间体样品(0,1.5,2,3,4,5 min,每隔1 min取样至43 min)。

激光诱导击穿光谱采用LIBS实验系统,由北京市农林科学院,国家农业信息化工程技术研究中心友情提供;系统由激光器、光谱仪、三维精密运动平台、CCD探测器、信号延时器组成。光谱仪采用海洋光学公司(Ocean Optics)的HR 2000+,波长范围198~876 nm。FW-4/A红外压片机,天津市新天光分析仪器技术有限公司。

2 方法

2.1 安宫牛黄丸混合中间体的LIBS光谱采集

为防止激光击打时的粉末飞溅现象,分别取安宫牛黄丸混合中间体适量,采用红外压片机压制呈直径13 mm、厚度约1 mm的錠片,共制备44个錠片样品。光谱采集方式见图1,计算6个采样位点的平均光谱,即得到混合过程的微区时序光谱。

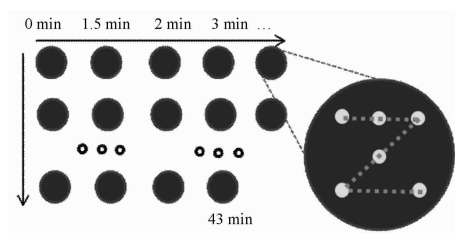


图1 混合过程中间样品制备及LIBS光谱采集位点

Fig. 1 The diagrammatic sketch of LIBS spectra collection

2.2 LIBS差谱法

珍珠的主要成分有碳酸钙。由于钙信号同时来自其他药味,故采用差谱法归属珍珠粉中Ca特征谱线。

2.3 安宫牛黄丸混合终点判断方法

采用移动窗标准相对偏差(moving window rela-

tive standard deviation, MWRSD)^[12-13] 进行中间体整合终点判断。MWRSD 选择混合中间体的 n 张连续的光谱,计算 n 张连续光谱中待测元素的特征谱线强度的相对标准偏差 (RSD),剔除原 n 条光谱中时间最早的光谱,补充一条新光谱,重新计算标准偏差,以此类推计算所有时序光谱数据,计算公式如下。

$$MWRSD = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_i)^2}{n-1}}}{\bar{A}_i} \times 100\% \quad (1)$$

A_i, A_{ij} 分别为 i, ij 时混合中间体的 LIBS 光谱中砷元素或汞元素的相对信号强度。此处选择移动窗口 $n = 3$; 每次增加 1 个样品,连续移动。最终得到混合过程中不同取样点中间体样品光谱的标准偏差。以 RSD 为纵坐标,混合时间为横坐标作图。RSD 越小,表明元素的特征谱线信号强度变化小,混合越均匀,提示混合终点。

2.4 数据处理和软件

采用 OOILIBS (Ocean Optics) 软件读取光谱数据;采用 ORIGIN 8 软件画图。

3 结果

3.1 安宫牛黄丸混合中间体的 LIBS 光谱

混合过程中 15 min 混合中间体的 LIBS 光谱见图 2。混合中间体的特征谱线除了 Ca, 钾 (K), 钠 (Na), 镁 (Mg), 锂 (Li), 碳 (C), 氢 (H), 氧 (O), 氮 (N), 等; 同时出现 As (228.816, 234.984, 616.979 nm) 和 Hg (253.651, 296.732, 313.123 nm)。谱中 590 ~ 610 nm 处受到基质效应影响,但并未影响 As, Hg 的特征谱线。225 ~ 260 nm 的局部放大图见图 3, As 228.816 nm, Hg 253.651 nm 处特征谱线未受到其他元素的干扰^[14-15]。因此,选择此处特征谱线,研究安宫牛黄丸混合过程中矿物药雄黄、朱砂的变化规律。

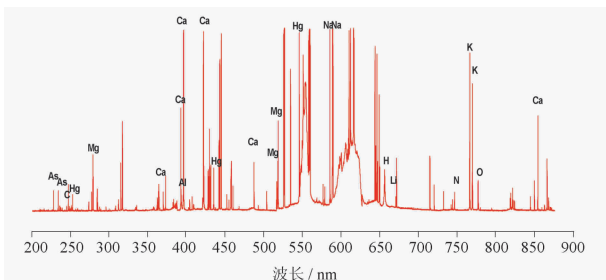


图 2 混合 15 min 混合中间体的 LIBS 光谱
Fig. 2 LIBS spectrum of AGNH blending intermediates at 15 min

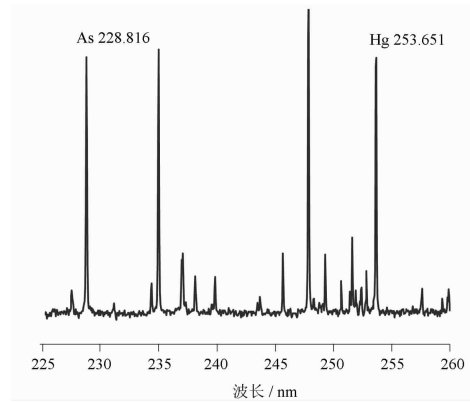
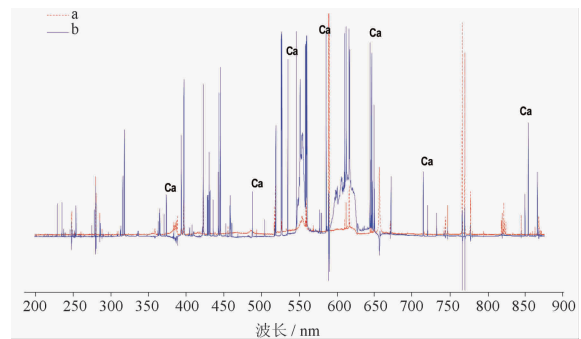


图 3 LIBS 光谱局部放大图
Fig. 3 The enlarged LIBS spectrum of AGNH

3.2 Ca 的 LIBS 差谱

Ca 的特征谱线有 315.839, 370.627, 373.668, 393.379, 396.829, 422.640, 430.228, 487.704, 534.970, 558.842, 585.802, 612.715, 616.231, 643.965, 646.284, 649.403, 714.852, 720.267, 732.426, 849.760, 849.760, 854.172 nm^[16-18]。Ca 同时来自于植物药材和珍珠粉,故将 30 min 混合中间体 LIBS 谱与 0 min 谱做差谱,然后比对 0 min 样本与差谱之间的光谱差异,见图 4,最终选定特征谱线 393.379, 585.746, 643.965, 854.172 nm 为珍珠粉中 Ca 的光谱信号。



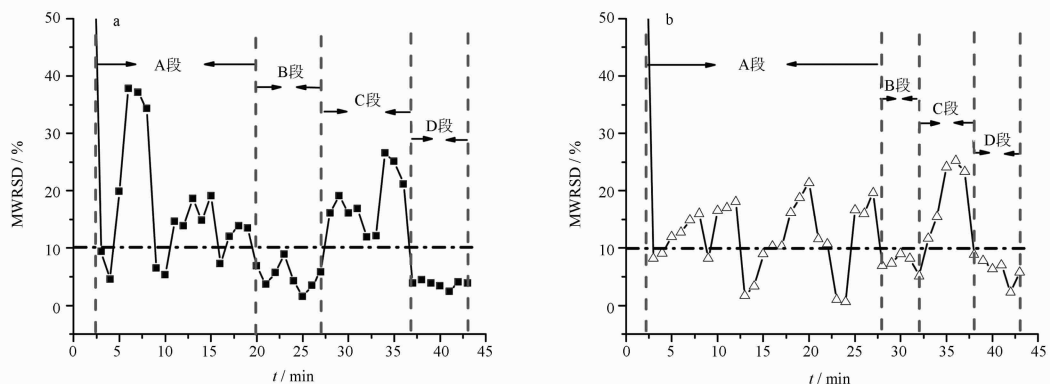
a. 0 min; b. 差谱。
图 4 安宫牛黄丸混合中间体 LIBS 图与差谱图
Fig. 4 The original spectrum and difference spectrum

3.3 安宫牛黄丸整体混合终点判断

3.3.1 朱砂和雄黄混合终点判断 采用 MWRSD 法对 LIBS 实验数据进行处理,设定 10% 为阈值。将混合过程进行划分时段,As 和 Hg 在不同的特征谱线处的 MWRSD 变化趋势图见图 5。图 5 (a) 划

分4个阶段,在混合的前20 min, Hg 53.651 nm 处的 MWRSD 变化剧烈;随着混合的进行, B 段(20 ~ 27 min) MWRSD 相对较平稳,且 MWRSD 小于 10%;进一步混合, C 段(27 ~ 37 min)中 MWRSD 出现较大幅度波动; D 段(37 ~ 43 min) MWRSD 呈相对平稳阶段且 MWRSD 小于 10%,提示到达混合终点到达。与 Hg 相似, As 228.816 nm 的混合可以划

分了4个阶段,见图5(b)。A段(0 ~ 27 min)和 C 段(32 ~ 38 min)过程中 MWRSD 变化剧烈; B 段(21 ~ 28 min)和 D 段(38 ~ 43 min)过程中 MWRSD 保持相对平稳,且 MWRSD 小于 10%。虽然 As 和 Hg 在 B 段均出现相对平稳显现,但混合并不完全,并非混合终点。综合考虑, As 和 Hg 的混合终点 D 段,建议混合终点为 38 min。



a. Hg 53.651 nm; b. As 228.816 nm。

图5 混合过程中 Hg 和 As 的 MWRSD 变化趋势

Fig. 5 The MWRSD variation tendency of Hg and As during blending

3.3.2 珍珠粉的混合终点判断 珍珠粉是安宫牛黄丸的组成成分之一,其主要成分是碳酸钙。珍珠粉的混合是否与朱砂、雄黄的混合过程一致,混合终点是否一致? 研究探讨安宫牛黄丸混合过程中,珍珠粉的混合过程变化特点和规律。混合过程中 Ca 在不同的特征谱线处的 MWRSD 变化趋势图见图 6。图 6 (a) 划分了 4 个阶段,在混合的前 20 min, Ca 393.379 nm 处的 MWRSD 变化剧烈;随着混合的进行, B 段(20 ~ 29 min) MWRSD 相对平稳, MWRSD 小于 10%;进一步混合, C 段(29 ~ 38 min)中 MWRSD 出现波动; D 段(38 ~ 43 min) MWRSD 呈相对平稳阶段且 MWRSD 小于 10%,提示到达混合终点。图 6 (b) 显示 2 个混合阶段, A 段在混合开始的前 13 min, Ca 585.746 nm 处的 MWRSD 变化剧烈,提示激烈混合的过程; B 段在混合 13 ~ 43 min 过程中 MWRSD 相对平稳,且均小于 10%,表明在此阶段混合较平稳。图 6 (c) 中 Ca 643.965 nm 处的 MWRSD 变化趋势图与图 6 (a) Ca 393.379 nm 处的 MWRSD 变化趋势图相似,混合分为 4 个阶段; A 段(0 ~ 21 min)和 C 段(27 ~ 38 min)过程中 MWRSD 变化剧烈; B 段(21 ~ 28 min)和 D 段(38 ~

43 min) 过程中 MWRSD 保持相对平稳,而且 MWRSD 小于 10%。与图 6 (a)、图 6 (c) 相似,图 6 (d) 中 Ca 854.172 nm 处的 MWRSD 变化同样呈现 4 个阶段,在混合开始的 13 min, MWRSD 变化剧烈,随着混合的进行, B 段(13 ~ 27 min)内 MWRSD 变化平稳,进一步混合,在混合的 27 ~ 38 min 时 MWRSD 出现微小波动,在 38 min 后(D 段) MWRSD 相对平稳且小于 10%。Ca 在 4 个特征谱线处处特征谱线的建议混合终点为 38 min。

3.3.3 3 个药味整体的混合终点判断 LIBS 技术结合 MWRSD 的朱砂、雄黄和珍珠粉在 B 段和 D 段的微区时序混合分析结果见图 7。对比发现在 B 段 Hg 与 Ca 共同时间段为 21 ~ 27 min;但是 As 即雄黄在 B 段混合相对均匀时间段为 27 ~ 31 min;表明在 B 段雄黄与朱砂和珍珠粉的混合并非同步。在 D 段(Ca 585.746 nm 为 D 段),其他元素共同时间段为 38 ~ 43 min,表明 3 个药味同时达到了混合均匀;故朱砂、雄黄和珍珠粉的共同混合终点为 38 min。

4 讨论

QbD 理念正推动着药品生产模式从传统的以检验为主到以科学地研究生产过程为主。ICH 发布

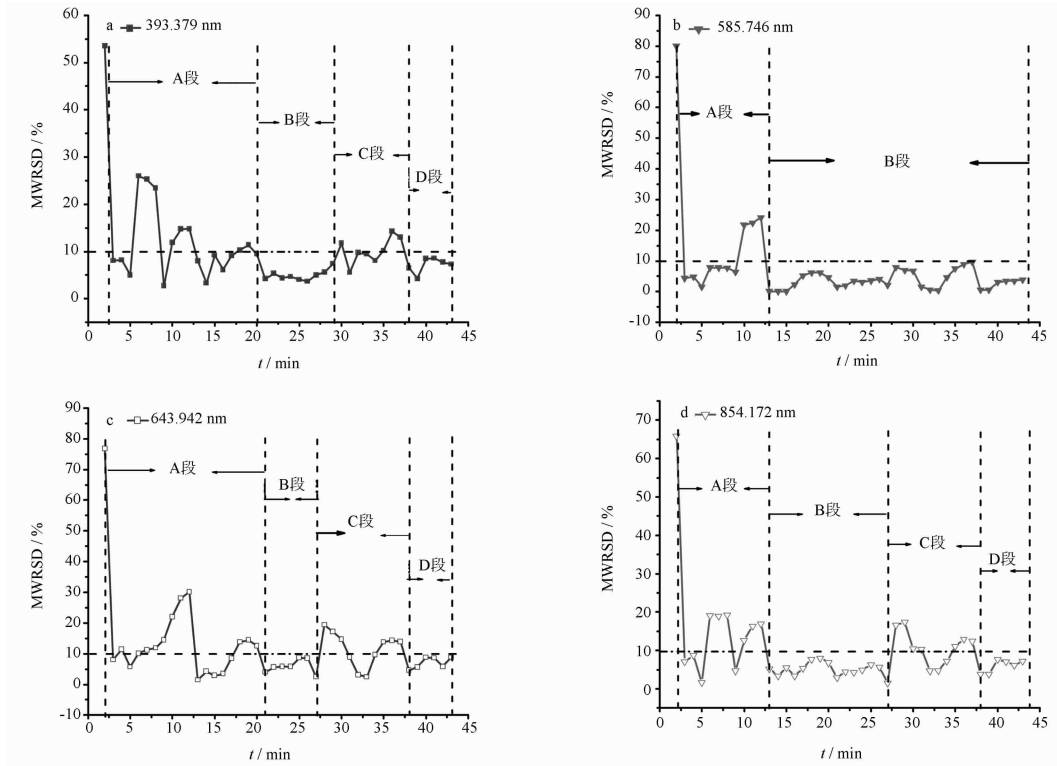


图 6 混合过程中 Ca 元素的 MWRSD 变化趋势

Fig. 6 The MWRSD variation tendency of Ca during blending

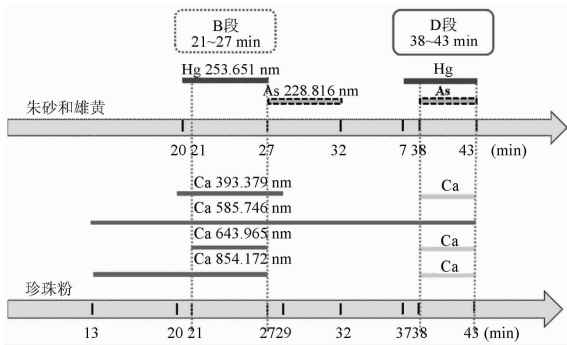


图 7 LIBS 实验中朱砂、雄黄和珍珠粉的微区时序分析

Fig. 7 The time series microanalysis of cinnabar, realgar and pearl powder

的 Q8 (pharmaceutical development, Q8) 药物研发中指出,质量是通过设计赋予的。获得合格的质量,必须加强对产品的理解和对生产的全过程控制。ICH Q8 的控制策略为“源于对现行产品和工艺的理解,制定一系列有计划的控制,用于确保工艺性能与产品质量的^[6]。所有产品的质量属性和工艺参数,均属于 ICH Q8 控制策略范畴。QbD 理念,要求生产过程中对工艺过程进行“实时质量保证”,保证每个

步骤工艺的输出均符合质量要求。关键工艺参数合格即可保证产品质量达到要求。

粉末混合过程是中药固体制剂生产的重要操作单元之一,也是时序过程。药物混合均匀度直接影响药品的疗效。药物混合均匀度直接影响药品的疗效。安宫牛黄丸是一种完全以药材原粉入药的中药丸剂,其处方的组分比较复杂,植物性药材、动物性药材和矿物性药材同时出现在处方中,导致药味的比重差异较大,尤其是含重金属矿物质如朱砂、雄黄等中药制剂的混合均匀与否不仅影响其疗效,而且严重影响其用药安全。对于中药的混合过程的评价多采用离线液相色谱法、气相色谱法等对其判断。这些方法虽然准确度高,但样品处理复杂,且多以研究有机化合物为主,未考虑矿物质中药的混合特征。

本文基于 QbD 控制策略,将 LIBS 过程技术应用于安宫牛黄丸的整体混合过程,结合 MWRSD 法研究雄黄、朱砂和珍珠粉 3 个药味的微区时序特征。构建的金属元素快速检测方法,实现整体混合终点的快速判断,确保混合均匀。结果表明:在混合的整

个时序过程中,初始阶段物料混合相对剧烈,混合效率高,到达最佳的混合状态后反方向变换,出现偏析或分料现象;随着进一步混合,颗粒以扩散混合为主。在整个混合过程中物料的混合和分离同时发生,当二者达到动态平衡的状态即混合终点。研究发现物料混合均匀的时间不是一个固定的时间点,而且是一个时间段,超过此时间段,粉末会出现过混合现象。雄黄、朱砂和珍珠粉的混合过程并非完全一致,但在混合的最后一个阶段,3个药味均达到了混合均匀;得到建议混合终点,且无过混合现象发生。所建立的方法无需建立标准光谱库,通过比较时间序列中相邻混合时间的光谱差异,实现了朱砂、雄黄和珍珠粉混合终点的快速判断。

过程分析技术(PAT)属于第三级控制策略,其目的在于增加过程理解、提高生产效率和产品质量,其优势在于实时分析、监测、控制。LIBS技术属于PAT技术,在微区时序分析研究方面彰显了其快速、实时、近似无损等优势,有望用于中药混合过程的反馈控制,有效避免过度混合和资源浪费。将PAT技术应用于中药材粉末的混合过程,研究混合过程时序变化的特点和规律,对过程理解具有重要的意义,同时为含矿物质中药制剂混合的在线监测提供了技术支持。

[参考文献]

- [1] 王欣美,张甦,王枚博,等. 安宫牛黄丸体外安全性评价方法的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(1): 238.
- [2] 薛忠,徐冰,张志强,等. 药物粉末混合过程在线监控技术研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(2): 91.
- [3] 杨婵,徐冰,张志强,等. 基于移动窗F检验法的中药配方颗粒混合均匀度近红外分析研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3557.
- [4] 马群. 安宫牛黄丸生产过程质量评价方法研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2007.
- [5] 刘倩. 中药粉末混合过程分析和中试放大效应研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [6] 徐冰,史新元,乔延江,等. 中药制剂生产工艺设计空间的建立[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 1001.
- [7] 刘倩. 中药粉末混合过程分析和中试放大效应研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.

- [8] Hahn D W, Omenetto N. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part I: review of basic diagnostics and plasma-particle interactions; still-challenging issues within the analytical plasma community[J]. *Appl Spectrosc*, 2010, 64(12): 335.
- [9] Hahn D W, Omenetto N. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: review of instrumental and methodological approaches to material analysis and applications to different fields [J]. *Appl Spectrosc*, 2012, 66(4): 347.
- [10] Singh V K, Rai A K. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review [J]. *Laser Med Sci*, 2011, 26(5): 673.
- [11] Cremers D A, Chinni R C. Laser-induced breakdown spectroscopy—capabilities and limitations[J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2009, 44(6): 457.
- [12] Blanco M, GozálezBañó R, Bertran E. Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy[J]. *Talanta*, 2002, 56: 203.
- [13] Scheibelhofer O, Balak N, Wahl P R, et al. Monitoring blending of pharmaceutical powders with multipoint NIR spectroscopy[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2013, 14(1): 234.
- [14] Kwak J H, Lenth C, Salb C, et al. Quantitative analysis of arsenic in mine tailing soils using double pulse-laser induced breakdown spectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part B*, 2009, 64: 1105.
- [15] Fang X, Ahmad S R. Detection of mercury in water by laser-induced breakdown spectroscopy with sample pre-concentration [J]. *Appl Phys B*, 2012, 106: 453.
- [16] Anzano J, Lasheras R J. Strategies for the identification of urinary calculus by laser induced breakdown spectroscopy [J]. *Talanta*, 2009, 79(2): 352.
- [17] Kumiawan K H, Tjia M O, Kagawa K. Review of laser-induced plasma, its mechanism, and application to quantitative analysis of hydrogen and deuterium [J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2014, 49(5): 323.
- [18] Bahreini M, Ashrafkhani B, Tavassoli S H. Elemental analysis of fingernail of alcoholic and doping subjects by laser-induced breakdown spectroscopy [J]. *Appl Phys B Lasers Opt*, 2014, 114(3): 439.
- [19] Liu Xiaona, Ma Qun, Liu Shanshan, et al. Monitoring As and Hg variation in An-Gong-Niu-Huang Wan (AGNH) intermediates in a pilot scale blending process using laser-induced breakdown spectroscopy[J]. *Spectrochim Acta Pt A Mol Bio*, 2015, 15: 1547.

[责任编辑 孔晶晶]