

近红外光谱测定桂附止痛凝胶膏单酯型乌头碱的含量

叶锦雄¹, 孙冬梅^{2*}, 毕晓黎², 罗文汇², 陈朋², 胥爱丽²

(1. 广州市东升医院, 广州 510140; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广州 510095)

[摘要] 目的:采用近红外光谱(NIR)测定桂附止痛凝胶膏(GZC)中单酯型乌头碱(AMA)的含量。方法:测定53批次桂附止痛凝胶膏的NIR图,运用TQ Analyst 8.0软件,运用原始光谱,在10 000~4 000 cm⁻¹,选择1个主因子数,采用偏小二乘法(PLS)建立桂附止痛凝胶膏中单酯型乌头碱含量NIR定量模型。结果:所建模型相关系数 $r=0.942 0$;校正均方根偏差(RMSEC)0.013 5;交叉验证均方根偏差(RMSECV)0.014 4;验证集平均预测回收率为101.44%。结论:本试验所建立的模型性能较好,对桂附止痛凝胶膏中单酯型乌头碱含量的预测准确,可以应用于桂附止痛凝胶膏中单酯型乌头碱的质量控制。

[关键词] 桂附止痛凝胶膏;单酯型乌头碱;近红外光谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0056-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160056

Determination of Aconitum Monoester Alkaloids in Guifu Zhitong Cataplasm by Near Infrared Spectroscopy

YE Jin-xiong¹, SUN Dong-mei^{2*}, BI Xiao-li², LUO Wen-hui², CHEN Peng², XU Ai-li²
(1. Guangzhou Dongsheng Hospital, Guangzhou 510140, China; 2. Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of Aconitum monoester alkaloids (AMA) in Guifu Zhitong cataplasm (GZC) by near infrared spectroscopy (NIR). **Method:** NIRs of 53 batches of GZC samples were determined by using TQ Analyst 8.0 software. Within the wavebands between 10 000-4 000 cm⁻¹, one main factor was selected from the primary spectrum. The quantitative calibration determination model was established with partial least squares (PLS). **Result:** The established quantitative calibration model showed a good correlation coefficient ($r=0.942 0$), low root mean square error of calibration (RMSEC) at 0.013 5, root mean square error of prediction (RMSECV) of 0.014 4, with the average predicted recovery rate of validation set of 101.44%. **Conclusion:** The quantitative calibration model can predict the content of alkaloids in GZC accurately and so can be used for the quality control of aconitum monoester alkaloids in GZC.

[Key words] Guifu Zhitong cataplasm; aconitum monoester alkaloids; near infrared spectroscopy

桂附止痛凝胶膏是广东省第二中医院新研制的医院制剂,主要治疗膝性关节炎,疗效显著。由桂枝、附片、制草乌、制川乌、续断等中药组成。在研制的过程中为了监测其质量,对单酯型乌头碱进行含量测定。目前常采用高效液相技术测定单酯型乌头碱的含量^[1-3],但该方法费时较长,操作繁琐。而近红外光谱(Near infrared spectroscopy, NIR)分析技术是快速,不破坏样品的分析方法,在医药行业已有较多的应用^[4-6]。

NIR测定制川乌中单酯型乌头碱已有文献报

道^[7],目前暂未有NIR测定制剂中单酯型乌头的报道。本文采用近红外光谱分析技术结合化学计量学方法对桂附止痛凝胶膏中的单酯型乌头碱进行快速、无损的含量测定。

1 材料

Fisher Nicolet 6700型傅里叶变换近红外光谱仪(Thermo),1200系列高效液相色谱仪(美国Agilent),Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。

苯甲酰新乌头原碱(批号B-009-110316),苯甲

[收稿日期] 20150105(016)

[第一作者] 叶锦雄,主管中药师,从事药品检验和临床药学工作, Tel:020-81911115, E-mail: yaehi@126.com

[通讯作者] *孙冬梅,硕士,教授,主任中药师,从事中药质量评价工作, Tel:020-83576735, E-mail: tcmgdp@tom.com

酰乌头原碱(批号 B-010-110316), 苯甲酰次乌头原碱(批号 B-016-110316) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 乙腈、四氢呋喃(默克公司, 色谱纯)、水为超纯水, 其他试剂均为分析纯(广州化学试剂厂)。53 批桂附止痛凝胶膏由广东省中医药工程技术研究院制备。

2 方法与结果

2.1 单酯型乌头碱含量测定 分别取 53 批桂附止痛凝胶膏各 1 贴, 经适当处理后, 按《中国药典》一部制川乌项下色谱条件进行操作^[8], 结果 53 批样品单酯型乌头碱的质量分数为 (0.328 ~ 0.515 mg·g⁻¹), 见表 1。

表 1 53 批样品单酯型乌头碱含量

Table 1 Aconitum monoester alkalids content in 53 samples

mg·g ⁻¹					
No.	单酯型 乌头碱	No.	单酯型 乌头碱	No.	单酯型 乌头碱
1	0.385	19	0.411	37	0.357
2	0.412	20	0.398	38	0.425
3	0.408	21	0.374	39	0.403
4	0.401	22	0.408	40	0.396
5	0.427	23	0.461	41	0.428
6	0.411	24	0.464	42	0.396
7	0.515	25	0.411	43	0.417
8	0.512	26	0.458	44	0.481
9	0.381	27	0.344	45	0.442
10	0.445	28	0.403	46	0.377
11	0.373	29	0.328	47	0.351
12	0.335	30	0.484	48	0.461
13	0.386	31	0.467	49	0.42
14	0.464	32	0.388	50	0.409
15	0.411	33	0.377	51	0.428
16	0.396	34	0.374	52	0.364
17	0.386	35	0.382	53	0.395
18	0.370	36	0.359		

2.2 近红外光谱采集 取桂附止痛凝胶膏 53 批, 每批取一贴剪成 3 块, 进行样品光谱采集, 仪器参数设置, 扫描范围 10 000 ~ 4 000 cm⁻¹, 每块扫描不同的位置共 3 次, 得到每批次的平均图谱, 叠加图见图 1。实验温度(22 ± 2) °C, 湿度 20% ± 5%。

2.3 NIR 模型建立

2.3.1 NIR 模型样品集的划分 桂附止痛凝胶膏共 53 个样品, 单酯型乌头碱经 HPLC 测定含量范围

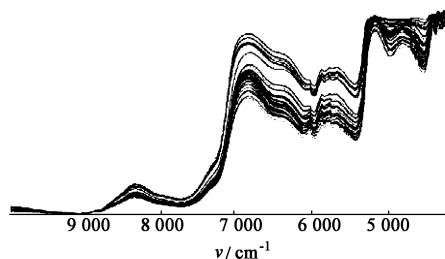


图 1 桂附止痛凝胶膏样品的近红外光谱

Fig. 1 NIRS of samples

(0.328 ~ 0.515 mg·g⁻¹), 由计算机挑选校正集 43 个和验证集 10 个, 样品编号 3, 8, 9, 18, 23, 36, 37, 40, 45, 49 为验证集。验证集单酯型乌头碱含量范围为 (0.357 ~ 0.512 mg·g⁻¹), 在校正集浓度范围内, 此校正集和验证集可用于单酯型生物碱含量 NIR 模型的建立, 样品集划分信息详见图 2。

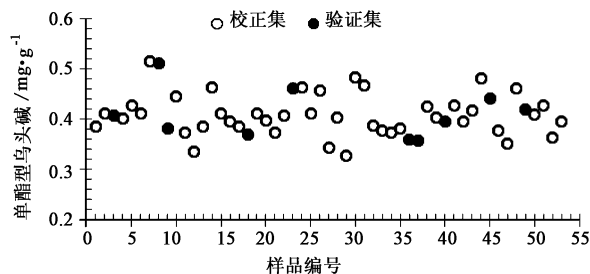


图 2 单酯型生物碱含量 NIR 验证集和校正验证集

Fig. 2 Calibration set and vilidation set of aconitum monoester alkalids in samples

2.3.2 建模方法的选择 本试验通过比较经典最小二乘法(Classical least squares, CLS), 逐步多元线性回归(Stepwise multiple linear regression, SMLR), 主成分回归(principal component regression, PCR), 偏最小二乘法(Partial least squares, PLS)等建模方法对 NIR 模型性能的影响, 以内部验证标准误差(Root mean square error of cross-validation, RMSECV), 根方校正标准差(Root mean square error of prediction, RMSEC)及相关系数为综合指标优化建模参数, 考察模型性能。其中 RMSECV 和 RMSEC 越小且两者越接近, 说明模型的稳健性和预测性能越好; 相关系数越接近 1, 表明样品实测值与模型预测值相关性越好。故选择 PLS 为单酯型乌头碱 NIR 模型的建模方法。详见表 2。

2.3.3 不同波长范围对单酯型乌头碱 NIR 建模的影响 本试验以 PLS 法为建模方法, 同以 RMSECV, RMSEC 及相关系数为综合指标对比多个建模谱段对模型性能的影响, 最终确定以 10 000 ~ 4 000 cm⁻¹ 为单酯型乌头碱 NIR 模型的建模区间, 详见表 3。

表 2 不同建模方法对单酯型乌头碱 NIR 模型的影响

Table 2 Influence on determination model of Aconitum monoester alkalids by NIRS

分析方法	RMSEC	Rc	RMSEP	Rp	RMSECV	Rcv	LVs
CLS	0.020 3	0.915 4	0.023 6	0.931 6	0.020 9	0.907 9	-
SMLR	0.015 1	0.927 9	0.017 4	0.934 5	0.015 9	0.919 2	-
PCR	0.014 7	0.931 6	0.018 4	0.924 9	0.020 1	0.869 6	8
PLS	0.015 2	0.926 3	0.017 5	0.935 5	0.016 1	0.917 4	1

表 3 不同波长范围对建模的影响

Table 3 Influence of different wavelengths on determination model

光谱范围/cm ⁻¹	RMSEC	Rc	RMSEP	Rp	RMSECV	Rcv	LVs
10 000 ~ 4 000	0.015 2	0.926 3	0.017 5	0.935 5	0.016 1	0.917 4	1
10 000 ~ 8 000	0.015 4	0.924 4	0.019 7	0.913 1	0.017 1	0.906 0	3
8 000 ~ 6 000	0.015 4	0.924 8	0.018 0	0.932 0	0.016 2	0.915 7	1
6 000 ~ 4 000	0.015 8	0.920 7	0.016 8	0.938 4	0.017 0	0.906 8	2
8 000 ~ 4 000	0.015 2	0.926 9	0.017 5	0.934 2	0.016 5	0.913 3	2

2.3.4 不同光谱预处理方法对 PLS 模型的影响 本试验在上述建模方法、光谱范围优选的基础上,比较

不同预处理方法对 NIR 模型性能的影响。结果显示使用原始光谱进行建模效果更好,详见表 4。

表 4 不同光谱预处理方法对单酯型乌头碱含量 PLS 模型的影响

Table 4 Influence of PLS models with different pretreatment methods on Aconitum monoester alkalid

Pretreatment	RMSEC	Rc	RMSEP	Rp	RMSECV	Rcv	LVs
Raw	0.015 2	0.926 3	0.017 5	0.935 5	0.016 1	0.917 4	1
MSC	0.019 3	0.879 2	0.021 2	0.896 8	0.021 3	0.849 5	2
SNV	0.019 3	0.879 2	0.021 2	0.896 7	0.021 4	0.849 1	2
Baseline	0.018 0	0.895 3	0.018 9	0.917 2	0.021 4	0.848 6	4
1st + SG	0.014 4	0.934 0	0.018 4	0.925 1	0.020 7	0.861 7	3
1st + Norris	0.019 7	0.873 5	0.017 9	0.926 0	0.021 6	0.845 2	2
1st + SG + MSC	0.019 5	0.876 4	0.019 6	0.910 8	0.020 9	0.855 5	1
1st + SG + SNV	0.019 5	0.875 8	0.019 6	0.910 9	0.021 0	0.854 9	1
1st + Norris + MSC	0.020 0	0.868 7	0.019 3	0.913 1	0.021 2	0.851 3	1
1st + Norris + SNV	0.020 1	0.868 2	0.019 3	0.913 0	0.021 3	0.850 7	1
2nd + SG	0.012 9	0.947 8	0.017 8	0.927 0	0.020 9	0.861 9	3
2nd + Norris	0.019 6	0.875 1	0.017 1	0.931 5	0.020 9	0.855 3	1
2nd + SG + MSC	0.014 0	0.937 8	0.019 7	0.910 4	0.021 2	0.856 2	3
2nd + SG + SNV	0.014 0	0.937 7	0.019 6	0.910 7	0.021 2	0.856 2	3
2nd + Norris + MSC	0.018 9	0.883 6	0.018 9	0.917 0	0.021 1	0.852 9	2
2nd + Norris + SNV	0.018 9	0.883 4	0.018 9	0.916 9	0.021 1	0.852 7	2

注:SG. 平滑;MSC. 多元散射校正;SNV. 标准归一化。

2.3.5 异常数据的剔除 为了消除各种原因对所测样品 NIR 可能出现的异常数据使预测精度降低^[9],本试验采用马氏距离法(Mahalanobis

distance)进行异常点的剔除,通过对比异常点剔除前后模型的参数,确定剔除 14 和 21 号样品。详见表 5。

表 5 异常点剔除前后模型参数比较

Table 5 Comparison of calibration model predictions after excluding outliers

异常点	验证均方差 (RMSEC)	相关系数	预测均方差 RMSEP	相关系数	交叉验证均方差 (RMSECV)	相关系数	LVs
剔除前	0.015 2	0.926 3	0.017 5	0.935 5	0.016 1	0.917 4	1
剔除后	0.013 5	0.942 0	0.017 5	0.935 4	0.014 4	0.933 4	1

2.3.6 定量模型的建立 运用 TQ Analyst 8.0 软件,以 PLS 法建模,43 份校正集样品进行建模,选用原始光谱,光谱采用 $10\ 000 \sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$,因子数为 1,通过马氏距离法剔除异常点 14 和 21 号样为建模参数,建立单酯型乌头碱 NIR 定量校正模型。所得模型参数见图 3。

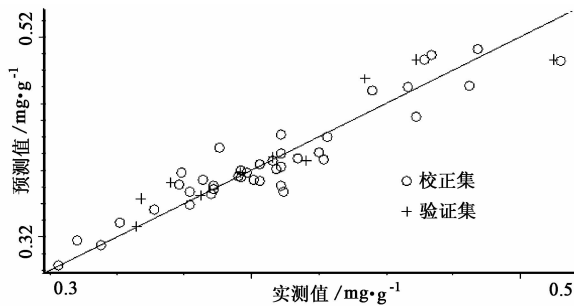


图 3 样品单酯型乌头碱含量 NIR 模型参数

Fig. 3 Relationship between reference and predictive values in calibration samples

2.3.7 模型的验证 将验证集样品代入 2.3.6 项下所建模型当中,测定单酯型乌头碱含量,并与 HPLC 测定值进行对比,以预测值和 HPLC 测定值的比值为预测回收率。模型验证得平均回收率为 101.44%,表明预测值与实测值接近,模型预测准确,详见表 6。

表 6 单酯型乌头碱模型验证

Table 6 Prediction values of Aconitum monoester alkalids

编号	实测值 /%	预测值 /%	绝对偏差	平均相对 偏差/%	平均预测 回收率/%
3	0.408	0.410	0.00	0.49	100.49
8	0.512	0.483	-0.03	5.66	94.34
9	0.381	0.381	0.00	0.00	100.00
18	0.370	0.391	0.02	5.68	105.68
23	0.461	0.483	0.02	4.77	104.77
36	0.359	0.378	0.02	5.29	105.29
37	0.357	0.358	0.00	0.28	100.28
40	0.396	0.398	0.00	0.51	100.51
45	0.442	0.469	0.03	6.11	106.11
49	0.420	0.407	-0.01	3.10	96.90

3 讨论

不同批次样品采用均匀设计法研制,基质和浸

膏投料比例有较大的变化范围,故单酯型乌头碱的含量有较大的波动范围。

本研究应用近红外光谱法结合化学计量学软件,建立了单酯型乌头碱含量的 NIR 定量校正模型,在实际检测中,只需几秒时间扫描样品的近红外光谱图,并将其代入模型即可测定其单酯型乌头碱含量,所得结果与 HPLC 测定结果相近,但可节省大量的检验时间。HPLC 测定本制剂单酯型乌头碱方法繁琐,需经多次处理除去基质的干扰才能进行,较耗时,需使用大量的有机溶剂。目前 NIR 技术还没得到充分应用,若能开发操作更加简便、智能的计量应用软件,势必更受欢迎,势必具有更广阔的前景。

[参考文献]

- [1] 任桂林,韩丽,王小平,等.小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(21):123-126.
- [2] 毛坤军,潘以琳,李富强,等.HPLC 同时测定乌七祛风散片中 4 种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22):74-77.
- [3] 刘敏,张海,蔡亚梅,等.附子总生物碱提取物中 3 个双酯型和 3 个单酯型乌头碱成分的含量测定[J].药学实践杂志,2013,31(3):181-184.
- [4] 李蕾蕾,王海霞,黄洁燕,等.近红外光谱法快速测定枇杷叶中熊果酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):103-106.
- [5] 权勤波.近红外光谱建立逍遥丸快速检测模型的研究[J].中国实用医药,2014,9(25):254-255.
- [6] 刘绍勇,薛东升,潘建超,等.基于近红外光谱技术的连翘药材质量控制方法研究[J].药物分析杂志,2014,34(4):681-685.
- [7] 涂瑶生,全智慧,孙冬梅,等.近红外光谱法快速测定制川乌提取浓缩过程中单酯型生物碱[J].中草药,2013,44(7):839-844.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:37-38.
- [9] 陈雪英,李页瑞,陈勇,等.近红外光谱分析技术在赤芍提取过程质量监控中的应用研究[J].中国中药杂志,2009,34(11):1355-1358.

[责任编辑 顾雪竹]