

## 近红外透射光谱法快速测定 赤芍提取液中芍药苷含量

许崇瑶<sup>1,2</sup>, 叶正良<sup>2\*</sup>, 李德坤<sup>2</sup>, 周大铮<sup>2</sup>, 刘君动<sup>1,2</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

**[摘要]** 目的: 采用近红外光谱仪透射光谱技术对赤芍提取过程中芍药苷的含量进行检测分析。方法: 将 54 份样品的原始光谱经多元散射校正(MSC)预处理, 选取 6 101.9 ~ 5 446.2, 4 601.5 ~ 4 424.1  $\text{cm}^{-1}$  波段, 并结合偏最小二乘法(PLS)对芍药苷建立定量校正模型并分析。结果:  $R^2 = 0.9989$ , 内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.0252, 最佳维数为 6。用建立的校正模型对 13 份提取液样品中的芍药苷进行了预测, 预测误差均方差(RMSEP)为 0.0861。结论: 该方法分析快速、简便, 结果准确可靠, 对中药提取工艺优化和生产工艺过程的质量控制具有很好的应用前景。

**[关键词]** 近红外透射光谱; 赤芍; 芍药苷; 提取过程监测; 多元散射校正

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0134-04

## Rapid Analysis of Paeoniflorin in *Paeonia lactiflora* Extracts by Near Infrared Transmittance Spectroscopy

XU Chong-yao<sup>1,2</sup>, YE Zheng-liang<sup>2\*</sup>, LI De-kun<sup>2</sup>, ZHOU Da-zheng<sup>2</sup>, LIU Jun-dong<sup>1,2</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co. Ltd, Tianjin 300410, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a novel method for fast analysis of one active component in water extracting process of *Paeonia lactiflora* with near infrared transmittance spectroscopy. **Method:** The calibration model of 54 extraction samples was developed by the spectral data pretreatment of the multiplicative scatter correction (MSC) with the spectral regions (6 101.9-5 446.2, 4 601.5-4 424.1  $\text{cm}^{-1}$ ) and analyzed the correlation between the spectra and the corresponding values by PLS method. **Result:** The  $R^2$  was 0.9989, the root mean square error of Cross-Validation (RMSECV) was 0.0252 and the best dimension was six. The paeoniflorin in the 13 samples was evaluated by using the model established, root mean square errors of prediction (RMSEP) was 0.0861. **Conclusion:** This method is not only rapid, simple, accurate and reliable, but also has great application prospects in the optimization of extraction technology and on-line monitoring of production process in TCM field.

**[Key words]** the near infrared transmittance spectroscopy; *Paeonia lactiflora*; paeoniflorin; extracting process monitoring; multiplicative scatter correction (MSC)

中药提取液有效成分含量低且含较多杂质, 样品预处理较为复杂, 难以直接准确地快速测定<sup>[1]</sup>,

同时在生产过程中, 绝大部分环节缺少在线监测手段, 无法控制有效成分含量, 导致中药产品质量难以保证, 极大地阻碍了中药现代化和国际化进程<sup>[2]</sup>。

赤芍的提取液以芍药苷为指标性成分。目前, 芍药苷的含量测定主要为高效液相色谱法(HPLC), 具有定量准确、重复性好的特点, 但是一般需要复杂的前处理, 分析时间长, 难以在生产过程中对芍药苷的含量进行有效的在线监测。

**[收稿日期]** 20120309(004)

**[第一作者]** 许崇瑶, 在读硕士, 从事新药研发和工艺优化研究, Tel: 022-26736121, E-mail: xcy. 20. life @ 163. com

**[通讯作者]** \*叶正良, 博士, 研究员, 从事制药工作, Tel: 022-86342066, E-mail: yezl@tasly. com

近红外 (near infrared, NIR) 光谱分析是近年迅速发展起来的一种快速检测方法,它无需对样品做复杂的预处理即可直接对多种成分含量同时进行测定,具有快速、方便、无污染、非破坏性等优点,已在众多工业领域的过程分析和质量控制中得到应用<sup>[3-5]</sup>。针对中药提取过程,通过近红外建模方法对提取液样品数据的拟合,不仅可以较为准确的实现有效成分含量的实时监测,达到控制质量的目的,同时能指导提取工艺优化,而且检测比常规理化分析方法更简便、更快速。以往有学者对赤芍的提取液进行近红外分析<sup>[1]</sup>,但批次单一,涵盖的信息不全面,无法有效的预测其他批次的药材,有局限性。

本研究利用近红外透射技术,以3个不同批次的赤芍药材作为提取样本,研究 NIR 光谱在中药提取过程分析中的应用:采用多元散射校正 (MSC) 预处理方法,并结合偏最小二乘法 (PLS) 建立一种芍药苷快速、简便的定量分析方法,具有重要的研究意义和应用前景。

## 1 仪器和试剂

BRUKER TENSOR37 型傅里叶变换近红外光谱仪 (德国布鲁克公司),配有定量分析软件为 OPUS 6.5 (德国布鲁克公司),Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent Technology, USA), 色谱柱 Waters symmetry® C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司),Mettler XS105 型电子天平 (上海梅特勒托利多仪器有限公司),芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所,批号 110736-201035,以 96.5% 计),提取用水为纯化水,液相用水为超纯水 (Millipore),色谱乙腈 (Merck, Germany),其他试剂为分析纯。

3 批赤芍药材饮片均产自内蒙古,批号分别为 20101103,20100607,20111210,经天士力之骄药业有限公司杨悦武研究员鉴定为芍药科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根。

## 2 方法

### 2.1 HPLC 测定芍药苷含量

**2.1.1 芍药苷对照品的制备** 芍药苷 2.66 mg (按 96.5% 计) 溶解于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,得储备液。分别吸取 1, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 mL 储备液至 2 mL 量瓶中,加甲醇定容。配成质量浓度分别为 0.256 69, 0.205 352, 0.102 676, 0.051 338, 0.025 669 g·L<sup>-1</sup> 的一系列对照品溶液。

**2.1.2 提取液样品的制备** 3 个赤芍药材批次,每个批次称取 400 g 药材,加 10 倍量纯化水于 5 L 圆

底烧瓶中,5 L 电热套煎煮,直到微沸 1 h;1 煎结束后,加 8 倍量纯化水,煎煮至微沸 1 h。每次煎煮隔 10 min 取 10 mL 提取液,1 煎和 2 煎混合液也作为取样点。3 个批次提取过程共获得 67 个样品。

**2.1.3 色谱条件** Waters symmetry® C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈 (A)-0.02% 磷酸 (B) 二元梯度洗脱, (0 min, 10% A, 15 ~ 20 min, 20% A; 平衡时间 10 min),检测波长 230 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 1 μL。

**2.1.4 样品的测定** 提取液样品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液和芍药苷对照品溶液按照 2.1.3 液相色谱条件进行测定。

**2.2 近红外光谱的采集** 样品溶液装入 1 mm 的石英比色皿中,采用 BRUKER 液体透射检测器扫描图谱,扫描波长范围为 4 000 ~ 12 000 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 32 次,分辨率 8 cm<sup>-1</sup>,每份样品扫描 3 张,取其平均光谱,见图 1。采集的光谱数据,运用 OPUS 6.5 数据分析软件进行处理和计算。

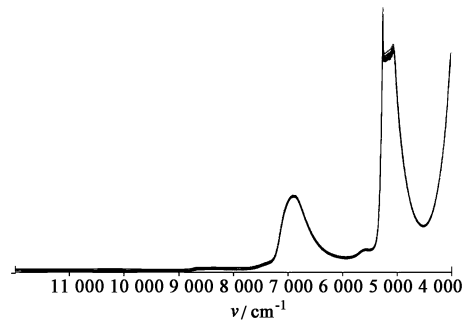


图 1 样品近红外透射光谱

## 3 结果与讨论

**3.1 芍药苷定量分析模型的建立的方法** 根据 HPLC 测定的芍药苷含量结果,从收集到的 67 份样品中,选取前 54 份有代表性的样品做为校正集,采用偏最小二乘法 (partial least square, PLS) 建立校正模型;将剩余的 13 份样品为验证集,检测校正模型的预测性能。校正集和验证集中芍药苷的含量分布情况见表 1。以决定系数 ( $R^2$ ),校正均方差 (root mean square error of calibration, RMSEC) 和预测均方差 (root mean squared error of prediction, RMSEP) 作为模型评价指标, $R^2$  越大、RMSEC 越小、表明校正模型建立越合理,选择合适的建模参数以获得最优的校正模型。RMSEP 越小,表明模型的预测性能越好。

**3.2 光谱波段选择** 由于样品间的浓度差异不大,近红外透射光谱图十分接近,芍药苷的含量与个别波长点的吸光度之间无直接相关性,因此,不可能从

表 1 校正集和验证集中芍药苷的含量分布  $g \cdot L^{-1}$

组成	样品数	最小值	最大值	平均值
校正集	45	0.417 3	3.371 4	1.583 8
验证集	13	0.343 7	3.207	1.514 1

某一个波长点来确定其含量。尽管偏最小二乘法 (PLS 法) 允许处理全谱信息, 但是建模波段过宽必然涵盖大量冗余信息, 由于分子结构存在差异, 使得各自对应的建模最优波段不同。因此, 必须在一定的区间内建立数学模型来确定近红外光谱和已知含量的关系, 即选择适当波段, 有利于提高模型的预测准确性<sup>[6]</sup>。在近红外透射光谱中, 水分子在 NIR 图谱中的  $7\ 000, 5\ 128\ cm^{-1}$  附近有一个很强的倍频和合频吸收带<sup>[7]</sup>, 对其他分子吸收峰有干扰, 所以建模时要除去这两个吸收谱段  $7\ 600 \sim 6\ 101.9\ cm^{-1}$  和  $5\ 446.2 \sim 4\ 601.5\ cm^{-1}$ ;  $4\ 424.1 \sim 4\ 000\ cm^{-1}$  吸收谱段噪音较大, 可能影响模型的预测能力;  $12\ 000 \sim 7\ 600\ cm^{-1}$  吸收谱段曲线光滑, 没有明显吸收峰, 并且噪音也较大, 而  $6\ 101.9 \sim 5\ 446.2\ cm^{-1}$  及  $4\ 601.5 \sim 4\ 424.1\ cm^{-1}$  谱段最丰富, 能反映样品的性质和组成间的关联。

**3.3 光谱预处理方法的选择** 在近红外透射光谱采集过程中, 光谱中会含有仪器噪音、基线漂移、光散射等干扰信号, 并且样品状态和测量条件的差异都会给实验结果带来影响。所以选择合适的光谱预处理技术能剔除干扰信号, 提取关键信息, 从而减少仪器噪音、基线不稳等因素带来的影响, 提高模型建立稳定性和预测的准确性<sup>[8-9]</sup>。

本实验采用 OPUS 6.5 数据分析软件, 选择在  $6\ 101.9 \sim 5\ 446.2\ cm^{-1}$  及  $4\ 601.5 \sim 4\ 424.1\ cm^{-1}$  谱段内进行数据分析, 参考仪器自动优化结果, 通过调整不断优化预处理方法。主要以模型的决定系数 ( $R^2$ ) 和内部验证均方差 (root mean square error of cross validation, RMSECV) 为指标进行检测,  $R^2$  越接近于 1, RMSECV 越小说明模型越好。最终发现多元散射校正预处理方法在其所有预处理方法中 RMSECV 最小, 校正模型的决定因子  $R^2$  (0.998 9) 接近于 1。液体样本采用近红外透射法采集光谱, 预处理方法的选择通常重点考虑如何消除仪器引起的偏差和测量时间有关的光谱漂移引起的误差, 这两个方面是模型失效的主要原因。对光谱进行多元散射 (multiplicative scatter correction, MSC) 预处理能基本消除颗粒度、测量条件<sup>[10]</sup> 等引起的散射影响, 准确地揭示了待测成分与浓度之间的线性相关

性; 极大地提高相关光谱的信噪比<sup>[11]</sup>; 并能有效减少回归模型的最佳因子数, 简化数学模型的同时使模型更稳定, 更便于传递<sup>[12]</sup>。

**3.4 模型维数的确定** 在校正集样本一定的情况下, 采用偏最小二乘法建立校正模型, 维数的选择对模型的预测能力有很大的影响: 维数太多, 包含过多的测量噪音, 出现过拟合现象; 维数过少, 光谱中一些有效信息未被包含而导致模型预测能力差。采用内部交叉验证法, RMSECV 值随维数的变化见图 2, 其最小的 RMSECV 值对应的即为最佳维数, 最佳维数为 6。

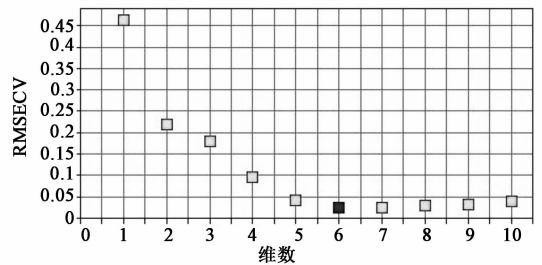


图 2 RMSECV 值随维数的变化

**3.5 模型的建立与评价** 样品近红外光谱经过多元散射校正预处理后, 在  $6\ 101.9 \sim 5\ 446.2\ cm^{-1}$  及  $4\ 601.5 \sim 4\ 424.1\ cm^{-1}$  波段内, 选择维数为 6, 运用偏最小二乘法 (PLS) 将 54 份校正集样品的 NIR 光谱与高效液相法测得的芍药苷含量进行回归关联, 建立芍药苷的最优近红外定量校正模型, 结果  $R^2 = 0.998\ 9$ , 内部交叉验证均方差 (RMSECV) 为 0.025 2。图 3 为芍药苷预测值和测定值的相关图。在建模过程中, 运用软件自动优化功能以及比较原始光谱图剔除了 9 个异常点 (7, 26 ~ 30, 42, 47, 49 号)。

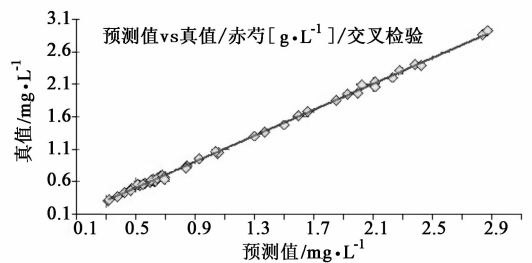


图 3 校正集预测值和真值相关性

**3.6 芍药苷定量分析模型的检验** 将其余 13 份验证集样品的近红外光谱输入校正模型, 预测芍药苷的含量, 并与高效液相法测定值进行比较, 预测情况见表 2, 验证校正模型的准确性。模型的外部验证均方差 (RMSEP) 为 0.086 1, 平均相对偏差为 6.55% (< 10%), 说明预测值和真实值相对吻合, 可看出模型有较好的预测能力。

**3.7 结果分析与讨论** 由表 2 可知,通过模型获得的近红外预测值与 HPLC 测定值基本一致,且预测值的变化趋势也与提取过程的含量相符。同时,从该表能明显的看出样品中芍药苷浓度的高低对近红外预测性能有一定影响,即高浓度样品预测值的偏差明显低于低浓度样品。可见,被测成分的浓度越高预测效果越好。

表 2 赤芍提取液中芍药苷含量的 HPLC 测定值和 NIR 预测值

No.	HPLC	NIR	偏差 /g·L <sup>-1</sup>	相对 偏差 /%	平均相 对偏差 /%
	测定值 (真实值) /g·L <sup>-1</sup>	预测值 /g·L <sup>-1</sup>			
1	2.381	2.351	0.030	1.263	
2	2.577	2.506	0.071	2.759	
3	2.701	2.619	0.082	3.019	
4	2.832	2.765	0.067	2.353	
5	2.205	2.031	0.175	7.918	
6	3.371	3.207	0.164	4.877	
7	0.417	0.344	0.074	17.645	6.55
8	0.545	0.480	0.066	12.076	
9	0.584	0.518	0.067	11.413	
10	0.659	0.597	0.062	9.445	
11	0.690	0.635	0.055	7.942	
12	0.785	0.770	0.015	1.963	
13	0.841	0.862	-0.021	2.476	
RMSEP			0.086 1		

本次研究发现,样品近红外分析的时效性对测量结果有很大影响,有连续的几个点(26~30号)在建模时被分析软件剔除,原因可能是样品经过 HPLC 含量测定之后没有及时进行近红外透射扫描,而液体样品受环境温度和湿度影响很大,溶液的颜色也会对实验结果产生影响,推测得出样品保存的环境因素(温湿度影响等)导致其偏离了预测结果。另一方面,在近红外透射光谱的采集过程中,环境的变化(温度、湿度等)会引起光谱基线的偏移,随机噪声和样品背景干扰都会对校正结果产生影响<sup>[1]</sup>。此外,本研究采用 3 个不同批次的赤芍药材作为研究对象,样品具有一定的代表性,整体预测结果较好,但仍有 3 个样品的预测值相对偏差都 > 10% (<17%)。分析其原因,有些样品的芍药苷浓度相对较低,浓度也不是均匀分布,导致部分结果存在较大的预测误差,但不影响模型的预测性能。

**4 结论**

采用此 NIR 方法,赤芍提取液样品 1 次测量只需 20 s(扫描 32 次),而 HPLC 测量 1 次至少要 30 min,大大节省了分析时间。该方法分析快速、简便,结果准确可靠。作为近红外技术应用于赤芍提取生

产和在线监控的前期研究,对中药提取工艺优化和生产工艺过程的质量控制具有很好的应用前景。

**[参考文献]**

[1] 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.

[2] Yang N L, Cheng Y Y, Qu H B. An approach to purifying process analysis of chinese herbal extracts using NIRS [J]. Acta Chemica Sinica, 2003, 61(5):742.

[3] Macho S, Larrechi M S. Near 2 infrared spectroscopy and multivariate calibration for the quantitative determination of certain properties in the petrochemical industry [J]. Trends Anal Chem, 2002, 21(12):799.

[4] Berntsson O, Danielsson L G, Lagerholm B, et al. Quantitative in 2 line monitoring of powder blending by near infrared reflection spectroscopy [J]. Powder Technology, 2002, 123:185.

[5] 徐云,王一鸣,吴静珠,等.用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺 [J]. 红外与毫米波学报, 2010, 29(1):53.

[6] 柳艳云,胡昌勤.近红外分析中光谱波长选择方法进展与应用[J].药物分析杂志,2010,30(5):968.

[7] 逢焕欢,冯艳春,胡昌勤,等.不同生产厂家注射用头孢哌酮钠含量测定的近红外定量模型的建立[J].光谱学与光谱分析,2006,26(12):2214.

[8] 尼珍,胡昌勤.近红外光谱分析中光谱预处理方法的作用及其发展[J].药物分析杂志,2008,28(5):824.

[9] 褚小立,袁洪福,陆婉珍.近红外分析中光谱预处理及波长选择方法进展与应用[J].化学进展,2004,16(4):528.

[10] 丁海泉,卢启鹏,朴仁官,等.土壤有机质近红外光谱分析组合波长的优选[J].光学精密工程,2007,15(12):194.7

[11] 芦永军,曲艳玲,冯志庆.多元散射校正技术用于近红外定标波长组合的优选研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(1):58.

[12] 赵强,张工力,陈星旦.多元散射校正对近红外光谱分析定标模型的影响[J].光学精密工程,2005,13(1):56.

[13] 王德杭,黄有带,景运条,等.正交试验法优选金芍胶囊的水提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):23.

[14] 周洪伟,许文博,王玉蓉,等.赤芍总苷提取与大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中医药学报, 2011, 39(1):48.

[15] 熊明华,方少敏,饶毅,等.白芍水提过程中芍药苷含量的 NIRS 快速测定研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):52.

[16] 李晓明,杨滨.近红外光谱技术的研究进展及其在中药领域的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(12):69.

[责任编辑 顾雪竹]