

· 化学与分析 ·

基于近红外光谱的白芍药材快速分析

李家春^{1,2}, 萧伟^{1,2}, 孙兰^{1,2}, 夏翠英^{1,2}, 王振中^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的: 采用近红外(NIR)光谱技术建立一种快速测定白芍药材芍药苷的方法。方法: 运用 HPLC 测定样品中芍药苷的含量, 运用偏最小二乘(PLS)法建立含量如 NIR 光谱之间的多元校正模型, 对未知样品进行含量预测。结果: 校正集的内部交差验证均方差 RMSECV 为 0.019 7, 校正模型中真实值与预测值之间的相关系数(R^2)为 0.969 6, 外部验证均方差(RMSEP)为 0.046 1。结论: 近红外漫反射光谱法快速、简便、无损, 可用于白芍药材中芍药苷含量的快速检测, 对其他药材中指标性成分的测定也有一定的参考价值。

[关键词] 近红外光谱法; 白芍; 快速分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0057-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120113.1033.010 **[网络出版时间]** 2012-01-13 10:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120113.1033.010.html>

Rapid Analysis of Paeoniae Radix Alba by Near Infrared Spectroscopy

LI Jia-chun^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, SUN Lan^{1,2}, XIA Cui-ying^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmacological Prde, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid NIR method for determination of paeoniflorin in paeony root.

Method: HPLC was used as a reference method to determine the content of paeoniflorin. Multivariate calibration model based on PLS algorithm was developed to correlate the spectra and the corresponding values determined by the reference method. **Result:** the RMSECV of the model for paeoniflorin was 0.019 7, the correlation coefficients of the calibration models was 0.969 7, the RMSEP was 0.046 1. **Conclusion:** The NIR method was rapid, simple, and noninvasive and that is applied to determine the content of paeoniflorin in paeony root. It can offer reference to content determination of other Chinese herbs.

[Key words] near-infrared spectroscopy; Paeoniae Radix Alba; rapid analysis

近红外光谱分析技术是一种快速、无损的绿色分析技术, 具有分析速度快、样品处理简单、无需试剂消耗等特点^[1], 目前已经陆续用于药效成分的含量测定^[2]、中药提取过程分析^[3]、天然药物鉴别^[4-5]

和药材的快速模式识别^[6]等。

目前对白芍中芍药苷的含量测定主要是采用高效液相等常规方法。此类方法前处理耗时、样品无法回收、分析结果滞后, 影响制药速度。本文建立将近红外光谱技术与偏最小二乘法处理方法相结合测定白芍药材中芍药苷的含量方法。

1 材料

Luminar 5030-731 型便携式 AOTF 技术近红外光谱仪(BRIMROSE 公司), Un-scrambler 分析软件(CAMO 公司), Anglinter 1100 高效液相色谱仪, BP211D 型电子天平(德国 Sartorius), 5415D 高速离心机(德国 Eppendorf), Milli-Q Academic 纯水机(法

[收稿日期] 20110513(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09504004)

[第一作者] 李家春, 硕士, 从事药品质量标准研究, Tel: 0518-85521949, E-mail: ljcljy2010@163.com

[通讯作者] * 王振中, 研究员, 从事复方中药物质基础与作用机制研究, Tel: 0518-85521956, E-mail: wzzh-nj@163.net

国 Millipore)。

芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110736-200732),乙腈(色谱纯),超纯水,其余试剂均为分析纯。49 批白芍药材(经王振中研究员鉴定,江苏康缘药业股份有限公司提供)。

2 方法与结果

2.1 芍药苷化学值的测定(HPLC) 色谱条件: Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相(A)0.02% 三氟乙酸-(B)乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 95% A, 5~20 min, 95%~83% A, 20~30 min, 83%~81% A, 30~40 min, 81%~74% A, 40~60 min, 74%~12% A, 60~70 min, 12% A)柱温 30 ℃,测定波长 230 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,见图 1。

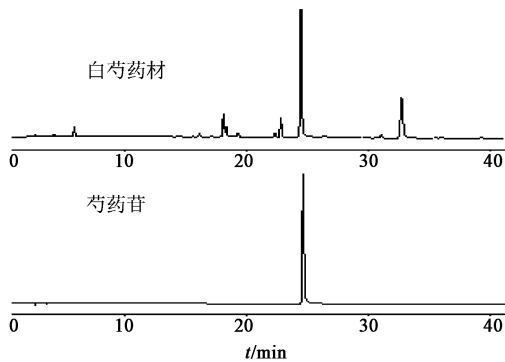


图 1 白芍药材及芍药苷 HPLC 图

2.2 近红外光谱采集 取不同批次的白芍样品,分别倒入样品槽中,药材粉碎过 45 目筛,装样量 > 1 cm,用专用的槽盖将样品表面抹平,在 1 100~2 300 nm 扫描,波长增量 2 nm,扫描平均次数 600 次。每个样品测 3 次,取平均光谱作为该样品的近红外光谱,得到 49 个样品的总光谱图,见图 2。

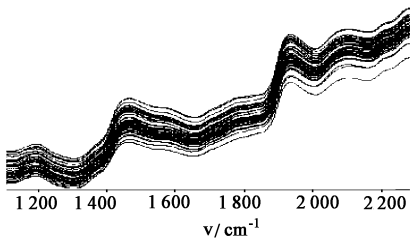


图 2 白芍样品的近红外漫反射光谱

从图中可以看出 49 份样品的近红外原始图谱基本一致,很难看出药材的光谱信息差别,因此也就很难从原始近红外光谱中找出特定的吸收谱带对其加以区分。其原因一方面是由于近红外光谱谱带自身严重重叠,另一方面是由于中药成分众多,组成复杂。因此,我们需要对原始图谱进行相应的前处理,

来使图谱信息更加直观、明确。

3 模型的建立与验证

3.1 模型的优化 谱区范围、预处理方法和主因子数的选择是决定所构建的近红外模型质量高低的关键因素,选择恰当的建模参数不仅有利于加快模型的运算速度,而且会提高模型的精度和预测能力。

3.2 光谱预处理的方法与选择 本研究以内部交叉决定系数(R^2)、内部交叉验证均方差(RMSEC)和验证均方根偏差(RMSEP)为综合指标,考察不同预处理方法对模型性能的影响。其中 R^2 越接近 1, RMSEC, RMSEP 越小越好,见表 1。本实验经过比较选取的最佳光谱预处理方法为一阶导数 9 点平滑。

表 1 不同光谱预处理方法对建模的影响

预处理方法	芍药苷		
	校正集	验证集	
	R^2	RMSECV	RMSEP
原始光谱	0.896 6	0.064 6	0.088 5
多元散射校正	0.922 6	0.025 7	0.074 5
标准归一化	0.892 7	0.053 8	0.093 2
一阶导数 9 点平滑	0.929 5	0.011 0	0.069 5

3.3 光谱范围的选择 近红外全波段光谱可能会有冗余信息,对光谱波段进行选择,可使其包含待测组份的信息量最大,受背景干扰最小,改善所建模型的性能,以达到最佳预测效果。图 2 所示,1 100~1 300 cm^{-1} 吸光度变化不明显,噪音干扰较大,可能影响模型的预测能力,而 1 300~2 300 cm^{-1} 信息量丰富。为进一步优选建模谱段,选择以下 4 个波段进行分析,以 R^2 , RMSECV, RMSEP 为综合考察指标,结果见表 2。

表 2 建模波段对模型的影响

ν/cm^{-1}	芍药苷		
	校正集	验证集	
	R^2	RMSECV	RMSEP
1 100~2 300	0.929 5	0.011 0	0.069 5
1 100~2 100	0.900 2	0.005 7	0.084 8
1 300~2 100	0.968 0	0.012 5	0.046 6
1 400~2 000	0.852 4	0.002 8	0.102 4
1 400~2 300	0.969 6	0.019 7	0.046 1

3.4 主成分数的选定 使用 PLS 方法建立校正模型,关键在于如何确定建立模型所使用的主成分数。在计算的多个主成分中,第一主成分最重要,随着主

成分数的增加,重要程度降低,一直到后来的许多主成分反映的是噪音信息。如果建立模型时使用的主成分数过少,就不能反映未知样品被测组分产生的量测数据(如光谱)变化,其模型预测准确度就会降低^[7]。本实验采用交互验证法,以校正样品集 RMSECV 为优化参数,选择最适主成分数,当 RMSECV 最小时,所选主成分数最佳。如图 3 所示,确定最佳主成分数为 11。

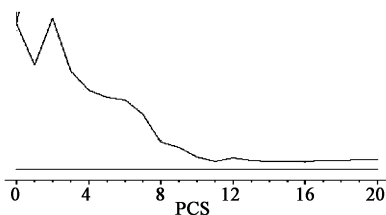


图 3 校正集 RMSECV 与主成分数之间的相关性

3.5 建立白芍药材定性分析模型 随机选取 43 批次不同批号的白芍样品,用于建立白芍药材定性分析模型,以外部 6 批次验证集样品,用来验证所建立模型的预测能力。将校正集样品光谱经过处理后的光谱数据导入 Unscrambler 分析软件,然后利用 PCA (主成分分析)对光谱数据进行计算,建立的白芍药材定性分析模型。校正集样品的 PC1, PC2 主成分空间分布图,见图 4。

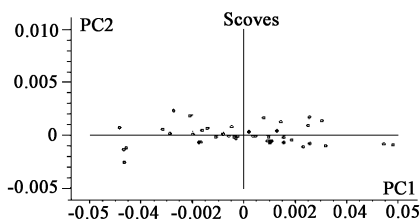


图 4 校正集白芍药材 PC1, PC2 主成分空间分布图

3.6 检测定性模型效果 对以 PCA 主成分分析法建立的白芍药材定性分析模型性能的预测,采用两种方法显示:①Excel 表格显示,②数据区域判别法,见图 5。图 5 中左侧表格中验证集样品编号后均有 * 号标记,说明它们属于模型内样品。模型区域图中方括内方块所指圆点代表验证集样品,其余圆点为模型区域。图中验证集样品均落在白芍药材定性分析区域内,说明被检测的样品与建模样品相同,被定性分析模型认可。两种显示方法均表明被检测的样品属于建模样品,即是白芍药材。

3.7 定量模型的建立 将经过预处理后的光谱数据与样品 HPLC 含量数据关联,采用偏最小二乘法 (PLS1),交叉-验证法 (cross-validation),用 Unscrambler 定量分析软件建立模型。光谱和化学

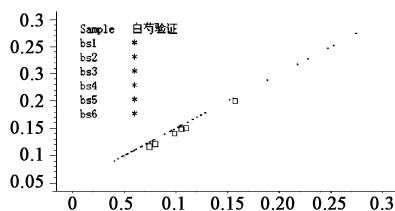


图 5 定性模型对验证集验证

值异常值(outlier)分别采用光谱影响值 leverage 和化学值误差 residual 这两个统计量来检验剔除。各成分模型经过异常值的剔除进行逐步优化,最后得到了较为理想的校正模型,结果见图 6。

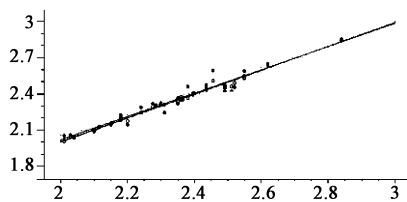


图 6 芍药苷预测值与测定值之间的相关性

3.8 模型的验证 将 HPLC 测定值作为化验值,用近红外预测值与化验值的相对误差来衡量模型的预测能力。如表 3 所示,6 批预测集样本的相对误差均未超过 10%。

表 3 预测集样本的近红外模型预测值

No.	预测值	化验值	绝对误差	相对误差 %
bs1	2.479	2.355	0.124	5.265
bs2	2.281	2.350	0.069	2.936
bs3	2.608	2.455	0.153	6.232
bs4	2.29	2.190	0.100	4.566
bs5	2.516	2.355	0.161	6.837
bs6	2.077	1.910	0.167	8.744

4 讨论

通过 NIR 法与 HPLC 法相结合,建立了快速测定白芍药材中芍药苷含量的分析方法。结果表明该方法快速、无损、无污染、不消耗试剂,为白芍药材质量的快速评价和在线检测提供了参考和依据,同时也为近红外技术应用于中药检测领域提供了一个新的途径。

白芍中主要活性成分除芍药苷以外,主要以没食子酸和苯甲酰芍药苷为主。本实验曾对二者进行过考察,由于近红外光谱分析技术其自身的局限性,目前还只能作常量分析,其检测极限一般为 0.1%,而二者含量均小于 0.1%,在建模过程中易被干扰,结果显示二者所建模型的精度与预测能力均较差,不宜进行近红外定量分析。

FTIR 定量测定扶芳藤中卫矛醇的方法研究

郑娟梅¹, 毛晓丽^{2,3}, 李自达², 黄荣韶⁴, 蔡鹏^{2,3}, 黄庶识^{2*}, 刘华钢^{5*}

(1. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021; 2. 广西科学院, 南宁 530007;
3. 广西中医学院, 南宁 530001; 4. 广西大学农学院, 南宁 530003; 5. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 建立快速测定扶芳藤中卫矛醇含量的方法。方法: 以高效液相色谱法测定结果为对照, 应用 FTIR 技术, 采用偏最小二乘法、主成分回归法和多元线性回归法 3 种回归分析方法对不同产地扶芳藤药材中的卫矛醇进行定量测定。结果: 三种方法的测定结果与高效液相测定的结果没有显著差异 ($P < 0.05$), 各定量方法的实测值与预测值均没有系统误差; 多元线性回归法测定 8 个产地扶芳藤原药材和甲醇提取物卫矛醇的结果和 HPLC 结果最为接近, 其平均标准误差分别为 0.16, 0.296。RSD 分别为 4.475%, 6.643%, 小于其他两种方法, 说明多元线性回归法的结果最为理想。结论: 所建立的定量校正模型具有较强的测定能力, 采用自编计算程序和现有统计软件, 还可将模型实现实时在线检测, 大大提高了测定速度而更加具有应用价值。

[关键词] 扶芳藤; 卫矛醇; 傅里叶红外光谱; 定量分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0060-06

Quantitative Determination of Dulcitol in Euonymus Fortune Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technology

ZHENG Juan-mei¹, MAO Xiao-li^{2,3}, LI Zi-da², HUANG Rong-shao⁴,
CAI Juan^{2,3}, HUANG Shu-shi^{2*}, LIU Hua-gang^{5*}

(1. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China;
2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;
3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

[收稿日期] 20111008(004)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(0992003A-20)

[第一作者] 郑娟梅, 硕士研究生, 从事药物新制剂、新剂型的研制与开发, Tel: 15878808110, E-mail: jancemm@gmail.com

[通讯作者] * 黄庶识, 副研究员, Tel: 0771-2503990, E-mail: hshushi@gxas.cn, hshushi@yahoo.com.cn; * 刘华钢, 教授, 博士生导师, Tel: 0771-5700208, E-mail: hgliu@126.com

[参考文献]

[1] 王宁, 傅春华, 周爱敏, 等. 近红外漫反射光谱法直接测定小儿消食片中总有机酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1597.
[2] 刘雪松, 程翼宇. 用于中药药品质量快速检测的近红外光谱模糊神经元分类方法[J]. 化学学报, 2005, 21(1): 36.
[3] 杨南林, 程翼宇, 瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报, 2003, 61(5): 742.
[4] Laasonen M, Harmia-Pulkkinen T, Simard C L. Fast identification of Echinacea purpurea dried roots using

near-infrared spectroscopy [J]. Anal Chem, 2002, 74(11): 2493.
[5] 汤彦丰, 张卓勇, 范国强, 等. 中草药大黄的近红外光谱和人工神经网络鉴别研究[J]. 光谱学与光谱析, 2004, 24(11): 1348.
[6] Woo Y A, Kim H J, Ze K R, et al. Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of Angelicae Gigantis Radix [J]. Pharmaceut Biomed, 2005, 36(5): 955.
[7] 李岩梅, 国馨月, 陈庆先, 等. 近红外漫反射光谱法非破坏分析颠茄粉末药品质量[J]. 生命科学, 2009, 8(2): 50.

[责任编辑 蔡仲德]