

近红外光谱法快速测定消渴丸浓缩液中葛根素含量

石猛*, 耿春贤, 叶彬, 苏碧茹, 吴长海
(广州中一药业有限公司, 广州 510530)

[摘要] 目的:采用近红外光谱法对消渴丸浓缩液中葛根素含量进行快速测定。方法:以 HPLC 分析值作为参照,采用近红外透射光谱技术和光纤探头采集消渴丸浓缩液近红外光谱,结合偏小二乘法建立葛根素含量的快速测定方法,并对未知样品进行了含量预测。结果:建立的葛根素校正模型 R^2 , RMSECV, RPD 值分别为 0.955 9, 0.241, 4.36。对预测集样品预测平均相对偏差为 1.8%。结论:该方法准确、快速、简便,可作为消渴丸提取浓缩过程质量检测 and 实时在线质量控制的方法。

[关键词] 近红外光谱法;消渴丸;葛根素;浓缩液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0048-04

Rapid Determination of Puerarin in Concentrating Process of Xiaoke Pills by Near-infrared Spectroscopy

SHI Meng*, GENG Chun-xian, YE Bin, SU Bi-ru, WU Chang-hai
(Guangzhou Zhongyi Pharmaceutical Company Ltd., Guangzhou 510530, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of puerarin in the concentrating process of Xiaoke pills rapidly by near-infrared spectroscopy. **Method:** Near-infrared transmission spectroscopy technology and fiber optic probe were used to collect NIR spectra of Xiaoke pills concentration liquid. With HPLC analysis results as reference, the fast determination method of puerarin was established with partial least squares (PLS). **Result:** The R^2 ,

[收稿日期] 2010-03-04

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003)

[通讯作者] *石猛,高级工程师, Tel:020-32016732, E-mail:shimeng1964@126.com

于 50%。酸橙枳实中独有的化学成分为 5 种,占挥发油总量的均值为 3.78%;甜橙枳实中独有的化学成分为 14 种,占挥发油总量的均值为 2.86%。此外,酸橙枳实中的 β -蒎烯和 β -顺式罗勒烯含量高于甜橙枳实 10 倍以上。 β -蒎烯具有抗炎、祛痰及抗真菌作用;而甜橙枳实中 4-松油醇和 γ -松油二酯均高于酸橙枳实 4 倍以上,4-松油醇具有显著的平喘作用和抑菌作用^[4]。

酸橙枳实与甜橙枳实所制备的枳术丸,临床用于治疗脾虚气滞型功能性消化不良,其疗效存在明显差异^[3]。本文研究结果表明,酸橙枳实和甜橙枳实挥发油主要化学成分相同,但又存在一定差异,是否对其药理作用有一定的影响还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:230.
- [2] 柯铭清.中草药有效成分理化与药理特性[M].长沙:湖南科学技术出版社,1982:214.
- [3] 廖凤霞,孙冠芸,杨致邦,等.枳实挥发油的化学成分分析及其抗菌活性的研究[J].中草药,2004,35(1):20.
- [4] 孙文基,绳金房.天然活性成分简明手册[M].北京:中国医药科技出版社,1998:448.
- [5] 张越颖.酸橙与甜橙枳实所制枳术丸治疗功能性消化不良脾虚气滞证的临床疗效比较[J].北京中医,2007,26(3):17.

[责任编辑 蔡仲德]

RMSECV and RPD of the calibration model for puerarin were 0.955 9, 0.241 and 4.36, respectively. The average relative deviation of the predication set was 1.8%. **Conclusion:** The method is accurate, fast and simple, which could be generalized to the on-line quality control of Xiaoke pills concentrating process.

[Key words] near-infrared spectroscopy; Xiaoke pill; puerarin; concentrating process

中药提取浓缩过程是中药生产的关键环节。中药提取液中通常含有大量的杂质,有时指标成分含量较低,难以准确地快速测定,造成中药提取浓缩生产中缺乏有效的过程质量控制手段,无法实时监控有效成分在生产过程中的变化,生产工艺难以得到良好地控制,从而导致中药产品批次间质量的差异。

近红外光谱技术(NIR)具有快速、高效、无污染、非破坏性以及实时在线分析等优点,已在农业、烟草、石化、医药等多领域得到广泛应用^[1]。样品的NIR谱的获取操作简便且成本低、无需复杂的样品前处理,特别符合中药生产在线检测的要求,近年已有NIR技术应用于复方或单味药材提取、渗漉过程在线分析的研究报道^[2-4]。

消渴丸为2010年版《中国药典》记载品种,由葛根、地黄、黄芪和格列本脲等8味药组成的中西药复方制剂,具有滋肾养阴、益气生津的功效^[5]。本研究针对消渴丸提取浓缩液具有黏度大、颜色深、透光性差等实际监测难题,采用NIR技术对浓缩液中有效成分葛根素含量进行快速测定,采用偏最小二乘法建立定量分析模型,实现对消渴丸浓缩液中葛根素含量的快速、简便、准确测定,为实现复方中药提取浓缩生产过程的在线质量控制提供实验依据。

1 材料

MPA型傅立叶变换近红外光谱仪(配半导体冷却的铟镓砷检测器、光纤探头、透反射附件和OPUS化学计量学软件,德国Bruker公司),1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),XT220A型电子天平(1/万,瑞士Precisa公司)。

葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号110752-200511),消渴丸浓缩液(共40个生产批次,干固物含量52%~54%,由广州中一药业有限公司提供),甲醇(色谱纯),超纯水。

2 方法

2.1 NIR谱采集 采用光纤探头采集浓缩液样品的透反射光谱。将液体透反射附件套在光纤探头上,固定光程2 mm,将探头放入浓缩液中至适当深度。设定光谱扫描范围12 000~4 000 cm^{-1} ,分辨率

8 cm^{-1} ,扫描次数64次。以空气为参比,在恒温20 $^{\circ}\text{C}$,湿度45%环境下采集浓缩液透反射光谱。40个消渴丸浓缩液样品的近红外光谱叠加图见图1。

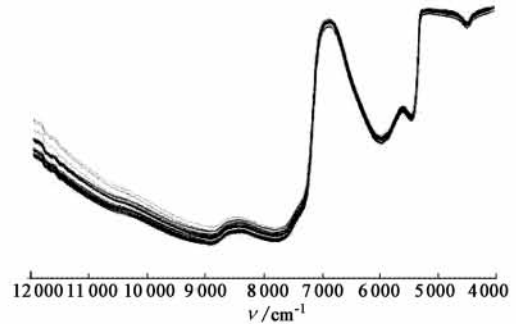


图1 40份消渴丸浓缩液近红外光谱

2.2 浓缩液中葛根素含量 HPLC 测定 Waters C₁₈分析柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(25:75),检测波长250 nm,进样体积10 μL ,流速1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,以保留时间定性,峰面积定量,外标法计算。葛根素含量在0.094 1~0.470 5 μg 与峰面积呈良好的线性关系,得回归方程 $Y = 3\ 283X + 31\ 522$ ($r = 0.999\ 7$),精密度、稳定性、重复性RSD分别为0.98%, 1.5%, 1.1%,表明本法精密度、稳定性、重复性均较好,平均回收率为101.0%, RSD 1.1%。每份样品平行测定2次,取平均值。

2.3 定量模型的建立 将40批样品随机分为校正集和预测集,其中校正集30批,预测集10批。校正集样品用于校正模型的建立,预测集不参与建模,用于模型的验证。校正集和预测集样品葛根素含量的分布分别为15.41~18.83 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和15.78~18.45 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

将校正集近红外光谱与HPLC分析值相关联,输入OPUS定量分析软件中。对光谱预处理方法进行比较,并优化建模的光谱区间,采用偏最小二乘法(PLS法)和交叉验证法(cross-validation)建立定量校正模型,并以决定系数(R^2)、交叉验证校正标准偏差(RMSECV)和交叉验证相对分析误差(RPD)等参数作为模型性能的评价指标。其中, R^2 越接近于1, RMSECV越小,表明模型结构越合理, RPD越大,表明模型的预测性能和适用能力越强^[3]。

3 结果与讨论

3.1 光谱预处理方法选择 本实验对导数、平滑、矢量归一化、标准正态变量变换 (SNV)、多元散射校正 (MSC) 等多种光谱预处理方法进行了比较, 见表 2, 并以 RMSECV, R^2 和 RPD 作为评价指标, 优选出最佳的光谱预处理方法。

表 2 不同光谱预处理方法对模型性能的影响

光谱预处理方法	RMSECV	R^2	RPD
无光谱预处理	0.308	0.9075	3.42
消除常数偏移量	0.310	0.9015	3.28
矢量归一化	0.270	0.9346	3.92
一阶导数 + norris 导数滤波平滑	0.247	0.9452	4.28
一阶导数 + 矢量归一化	0.261	0.9389	4.07
标准正态变量变换	0.272	0.9355	3.98
一阶导数 + 多元散射校正	0.251	0.9431	4.17

由表 1 可见一阶导数结合 norris 导数滤波平滑为最佳的光谱预处理方法。图 2 为样品的一阶导数光谱图。

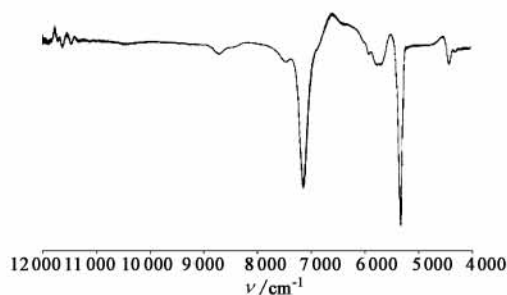


图 2 样品的一阶导数光谱

3.2 波长区间的选择 对于 NIR 结合 PLS 方法建

模中, 通过特定方法筛选特征波长或波长区间, 将不相关或非线性变量剔除, 有可能得到更好的定量校正模型。目前, 应用最广泛的波长选取方法为相关系数法和遗传算法^[6]。本试验采用相关系数法, 结合软件的波长区间优化功能, 对比了不同波长区间对模型性能的影响, 确定选择建模的最佳波长区间为 7 505.9 ~ 5 446.2 cm^{-1} 。

表 3 不同波长区间对模型性能的影响

建模波长区间/ cm^{-1}	RMSECV	R^2	RPD
11 987.9 ~ 4 242.8	0.274	0.9177	3.67
7 505.9 ~ 5 446.2, 4 605.4 ~ 4 242.8	0.245	0.9431	4.19
7 505.9 ~ 5 446.2	0.241	0.9559	4.36

3.3 模型主因子数的确定 采用 PLS 法建立模型时, 所选的主因子数对模型预测能力有非常大的影响。主因子数太少, 光谱中一些有用的信息尚未被包含而导致模型预测能力欠佳; 主因子数过多, 则出现过拟合现象而影响其结果^[7]。本试验采用交叉验证法考察不同主因子数对模型 RMSECV 值的影响, 如图 3, 本试验采用的最佳主因子数为 6。

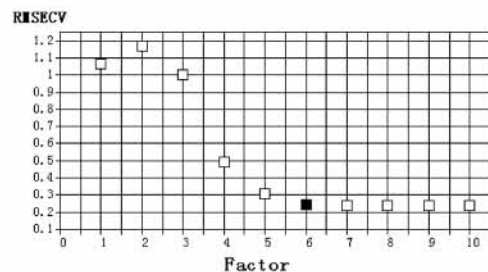


图 3 葛根素定量分析模型主因子数

表 4 交叉验证

样品批号	真实值 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	预测值 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	偏差 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	相对偏差 /%	样品批号	真实值 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	预测值 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	偏差 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	相对偏差 /%
NA3482	17.37	17.24	-0.13	0.75	NA3501	15.77	15.98	0.21	1.3
NA3484	16.65	16.65	0.00	0.00	NA3503	16.23	16.12	-0.11	0.68
NA3485	17.64	17.23	-0.41	2.3	NA3504	16.34	16.88	0.54	3.3
NA3487	15.41	16.11	0.70	4.5	NA3505	17.45	17.12	-0.33	1.9
NA3488	17.13	17.3	0.17	0.99	NA3508	18.41	18.87	0.46	2.5
NA3489	18.58	18.60	0.02	0.11	NA3509	16.89	17.09	0.20	1.2
NA3490	18.79	18.44	-0.35	1.9	NA3510	17.12	17.43	0.31	1.8
NA3492	18.76	18.85	0.09	0.48	NA3511	18.13	17.98	-0.15	0.83
NA3493	18.83	18.79	-0.04	0.21	NA3514	15.99	16.21	0.22	1.4
NA3494	18.46	18.51	0.05	0.27	NA3515	16.56	16.45	-0.11	0.66
NA3495	17.95	17.90	-0.05	0.28	NA3516	16.71	16.69	-0.02	0.12
NA3496	18.03	18.06	0.03	0.17	NA3517	16.63	16.87	0.24	1.4
NA3497	18.42	18.40	-0.02	0.11	NA3519	17.22	17.34	0.12	0.70
NA3499	17.62	17.49	-0.13	0.74	NA3520	17.87	18.43	0.56	3.1
NA3500	16.21	16.25	0.04	0.25	NA3521	17.19	17.01	-0.18	1.0

3.4 模型的建立和内部交叉验证 近红外光谱经过一阶导数结合 norris 导数滤波平滑处理后,在 $7\ 505.9 \sim 5\ 446.2\ \text{cm}^{-1}$ 处,选择 6 个主成分建立了葛根素定量校正模型。该模型 $R^2 = 0.955\ 9$, RMSECV 0.241 , RPD 4.36 , 并对该模型进行了内部交叉验证,其步长为 1 个样品,结果见表 4。由表 4 可知,30 批校正集样品交叉验证平均相对偏差为 1.2% ,表明模型性能较好。

3.5 采用预测集对校正模型进行验证 用校正集建立的葛根素定量分析模型,对预测集中的 10 批样品进行定量分析,得到的预测统计结果如表 5 所示。由表 5 可知,预测结果最大相对偏差为 3.54% ,最小相对偏差为 0.42% ,平均相对偏差为 1.8% ,模型的预测效果良好。

表 5 葛根素定量分析模型预测统计

样品批号	真实值 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	预测值 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	偏差 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	相对偏差/%	平均相对偏差/%
NA3483	17.06	17.34	0.28	1.6	1.8
NA3486	16.80	16.87	0.07	0.42	
NA3491	18.20	18.49	0.29	1.6	
NA3498	16.93	16.44	-0.49	2.9	
NA3502	17.25	17.86	0.61	3.5	
NA3506	15.78	16.01	0.23	1.6	
NA3507	16.23	16.44	0.21	1.3	
NA3512	16.78	16.35	-0.43	2.6	
NA3513	18.45	18.66	0.21	1.1	
NA3518	17.97	18.21	0.24	1.3	

4 结论

本试验将近红外光谱技术应用于复方中药浓缩

液的研究,结合化学计量学技术,建立了消渴丸浓缩液中有效成分葛根素含量快速分析方法,结果表明,该方法可精确、无损、有效地对浓缩液中的葛根素含量进行快速测定。

消渴丸浓缩液存在黏度大、颜色深、透光性差等实际监测难关,本试验模拟了中药生产现场状况,采用光纤技术结合液体透反射采样技术,将光纤探头直接放入浸膏中,样品无需进行任何预处理,即可采集到较为理想的近红外光谱,定量校正模型性能良好,为实现复方中药提取浓缩过程在线监测提供了试验依据。

[参考文献]

- [1] 高荣强,范世福.现代近红外光谱分析技术的原理及应用[J].分析仪器,2002(3):9.
- [2] 章顺楠,杨海雷,刘占强,等.近红外光谱法在线监测复方丹参滴丸料液中有有效成分含量[J].药物分析杂志,2009,29(2):192.
- [3] 瞿海斌,李斌,刘雪松,等.红参醇提液浓缩过程近红外光谱在线分析方法[J].中国药学杂志,2005,40(24):1897.
- [4] 张延莹,张金巍,刘岩.近红外技术在白芍醇提在线质量监控中的应用[J].中国医药工业杂志,2010,41(9):662.
- [5] 中国药典.一部[S].2010:1041.
- [6] 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.
- [7] 严衍祿.近红外光谱分析基础与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2005:174.

[责任编辑 全燕]