

近红外光谱法测定不同厂家六味地黄丸中丹皮酚

白雁, 史会齐, 龚海燕, 王星
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:应用近红外光谱法(NIRS)对六味地黄丸中丹皮酚的含量进行快速测定。方法:采集不同厂家不同批号六味地黄丸样品的近红外光谱图,以 HPLC 测定值为参考,结合偏最小二乘法(PLS)建立丹皮酚定量校正模型。结果:经内部交叉验证,所建模型的相关系数(R^2)为 0.952 1,内部交叉验证均方差(RMSECV)为 0.020 93;经外部验证集样品验证,该模型的预测均方差(RMSEP)为 0.099 74,平均回收率为 100.38%。结论:该预测模型准确可靠,可用于六味地黄丸中丹皮酚含量的检测,实现大批量样品的快速分析。

[关键词] 近红外光谱;六味地黄丸;丹皮酚;偏最小二乘法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0063-04

Content Determination of Paeonol in Liuwei Dihuang Pills from Different Manufacturers by Near-Infrared Spectroscopy

BAI Yan, SHI Hui-qi, GONG Hai-yan, WANG Xing

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To determine fast the content of paeonol in Liuwei Dihuang pills from different manufacturers by near-infrared spectroscopy (NIRS). **Method:** Near-infrared spectra of different batch of Liuwei Dihuang pills from different manufacturers were collected. Based on the reference values measured with HPLC, the quantitative calibration model of paeonol was built with near-Infrared spectrometry combined with partial least squares (PLS). **Result:** The internal cross validation proved that the correlation coefficient (R^2) was 0.952 1 and the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) was 0.020 93; By the verification of the external validation samples, the root-mean-square error of prediction (RMSEP) was 0.099 7 and the average recovery was 100.38%. **Conclusion:** The predicting model was accurate and credible. The proposed method could be used in predicting the content of paeonol in Liuwei Dihuang pills. The simple, fast and non-destructive NIRS combined with PLS can provide a new approach to determine rapidly the content of paeonol in large numbers of samples.

[Key words] near-infrared spectroscopy; Liuwei Dihuang pills; paeonol; partial least square

六味地黄丸(浓缩丸)由熟地黄、牡丹皮、山茱萸、山药、茯苓、泽泻 6 味药组成,具有滋阴补肾的功能,用于治疗肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、消渴等症。丹皮酚含量作为六味地黄丸质量控制的一个重要指标,《中国药典》2010 年版

采用高效液相色谱法对六味地黄丸中丹皮酚含量进行测定^[1]。但该法操作较为繁琐,难以满足大批量样品的快速分析。近红外光谱(near-infrared spectroscopy, NIRS)是可见光与中红外光谱之间的一段谱区,反映的主要是含氢基团(C-H, N-H, O-H等)的倍频与合频吸收^[2],因其快速、准确、无损、富含化学信息以及易于实现在线检测等特点,被广泛应用于石化、农业、食品等领域^[3-5]。近年来,近红外光谱已被逐步应用于中药领域,在定性分析和定量检测中都显示了巨大的潜力^[6-8]。

[收稿日期] 20100824(001)

[基金项目] 河南省重大公益科研项目(081100912500)

[第一作者] 白雁,教授,博士生导师,主要从事现代仪器分析技术在中药研究中的应用工作, Tel: 0371-65962967, E-mail: shihuiqi@163.com

本课题组在开发中药材光谱法在线检测系统研究的基础上,以六味地黄丸为分析对象,利用近红外光谱技术建立了丹皮酚的定量分析模型,对其进行了快速准确的含量测定。经与高效液相色谱法的交互验证,表明所建立的丹皮酚含量预测模型准确、可靠,可用于六味地黄丸中丹皮酚的含量测定,对于生产中大批量样品丹皮酚的含量检测具有潜在的应用前景,可为六味地黄丸的在线检测提供参考方法。

1 仪器和样品

近红外光谱仪器(美国 Thermo Nicolet 公司 6700 型近红外光谱仪,光源为卤钨灯,检测器为铟镓砷 InGasn,附 Antaris 漫反射积分球、样品旋转器和石英样品杯),OMMIC 样品采集软件,TQ8.0 光谱分析软件;高效液相色谱仪(Agilent1200 型,美国 Agilent 公司);天平(1/10 万,AE240 型,瑞士 METTLER 公司)。

甲醇为色谱纯,水为双蒸水。样品为 4 个不同厂家(北京同仁堂制药有限公司,河南宛西制药股份有限公司,吉林修正药业有限公司,九芝堂股份有限公司)生产的 100 批六味地黄丸(浓缩丸),丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110715-200212)。

2 方法

2.1 丹皮酚含量的 HPLC 测定^[11]

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ODS-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(69:31);流速 1 mL·min⁻¹;柱温 30℃;检测波长为 274 nm。以外标峰面积法定量。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品适量,加甲醇配制成 0.025 11 g·L⁻¹ 的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液用 0.4 μm 的微孔滤膜过滤,即得。

2.1.4 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入到液相色谱仪进行测定,每份样品平行测定 2 次。100 份六味地黄丸样品中丹皮酚的质量分数为 0.156 9% ~ 0.357 3%。

2.2 近红外光谱法分析

2.2.1 近红外光谱的采集 取 100 份六味地黄丸

样品,粉碎,过 80 目药材标准筛,每份样品取约 8 g 混和均匀后放入石英样品杯中,垫实,采集光谱。采用积分球漫反射测样,分辨率 8 cm⁻¹;扫描 32 次;扫描范围 12 000 ~ 4 000 cm⁻¹;温度 25 ~ 30℃;相对湿度 40% ~ 45%。

光谱采集图如下:以内置背景为参照,采集每一个样品的光谱数据,每批样品取 2 份,每份重复 3 次,每次扫描前振荡烧杯 4 ~ 5 次,计算平均光谱以建立模型。100 份样品的近红外光谱图叠加见图 1。

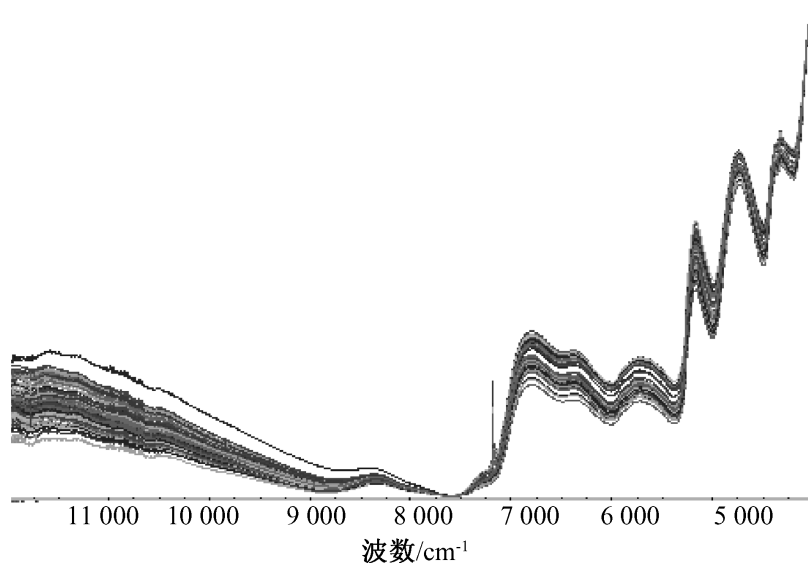


图 1 六味地黄丸样品的近红外光谱叠加

可以看出,100 份样品的近红外光谱原始图谱基本一致,各样品的特征信息很难从峰位、峰强及峰形等方面直观鉴别。一方面是由于近红外光谱谱带自身重叠严重,另一方面由于六味地黄丸成分众多,组成复杂,因此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,必须通过化学计量学方法对图谱进行适当处理。

2.2.2 丹皮酚定量分析模型的建立 将 100 份六味地黄丸样品随机分为 90 份校正集和 10 份验证集,所选的 90 份校正集样品涵盖了所测样品含量的范围,能代表组分的浓度信息,10 份验证集丹皮酚含量范围要在校正集含量范围之内^[9]。将用药典法测得的 100 份样品丹皮酚含量结果与其相对应的校正集及验证集的近红外光谱相关联,输入 TQ8.0 定量分析软件包中,进行数据处理,采用偏最小二乘法(partial least square, PLS)建立定量校正模型。

3 结果与讨论

3.1 光谱预处理 近红外光谱信息易受基线漂移、随机噪音、颗粒散射等干扰,对模型的建立产生较大的影响,所以光谱预处理是一个十分关键的步骤,预处理方法是否得当将直接影响预测结果准确度的高低。本试验以相关系数(R^2 ,其值越接近 1 说明模型

预测越准确) 和内部交叉验证均方差 (RMSECV, 其值越小说明模型的预测精度越高) 为考察指标, 采用不同的预处理方法进行比较, 结果见表 1。

表 1 丹皮酚模型不同预处理方法的选择

光谱预处理方法	R^2	RMSECV
SNV(标准归一化)	0.891 7	0.022 24
MSC(多元散射校正)	0.891 7	0.022 06
First Derivative(一阶导数)	0.807 4	0.025 95
First Derivative + MSC	0.952 1	0.020 93
First Derivative + SNV	0.871 5	0.024 39

表 1 显示, 采用多元散射校正 (MSC) 加一阶导数 (First Derivative) 处理效果最好。这是因为多元散射校正可以去除近红外漫反射光谱中样品的镜面反射及不均匀造成的噪声, 一阶导数可以消除样品颜色及基线漂移等因素的影响, 从而强化谱带特征^[10]。First Derivative + MSC 预处理在有效消除光谱基线漂移的同时, 还能克服谱带重叠, 强化谱带特征, 但微分处理在除去低频基线的同时, 还会放大高频的噪声, 因此在微分处理前, 通常都要进行平滑处理以滤去噪声^[11]。经多次试验后, 选用 Savitzky-Golay 平滑法 (21 点 5 阶数据平滑) 处理, 所建模型性能最好。

3.2 建模谱段的选择 尽管用偏最小二乘法可以处理全谱信息, 但由于所测指标性成分不同, 成分的结构也不同, 因此需要选择不同的波段, 以改善所建模型的性能, 获得最佳的预测效果。本试验以 R^2 , RMSECV 为考察指标, 对多个波段进行比较, 选择最佳谱段为 $7\ 143 \sim 4\ 011\ \text{cm}^{-1}$, 结果见表 2。

表 2 丹皮酚模型谱段的选择

光谱范围 / cm^{-1}	R^2	RMSECV
7 143 ~4 011	0.952 1	0.020 93
6 236 ~4 011	0.949 6	0.020 94
11 840 ~4 011	0.764 6	0.030 04
9 037 ~6 236	0.937 7	0.024 81

3.3 主成分数的选择 采用偏最小二乘法建立模型时, 主成分数的选择对模型的预测能力有很大的影响。主成分数太少, 会导致建模的信息不全, 模型预测能力差; 若主成分数太多, 使模型包含过多的测量噪音, 出现过拟合现象^[10]。为充分提高光谱信号的有效信息利用率, 并且同时避免出现“过拟合”现象, 本试验采用交互验证法考察不同主成分数对 RMSECV 值的影响, 结果见图 2。当 RMSECV 越小

时, 说明模型结构越好, 此时所选主因子数最佳。本试验采用的最佳主成分数为 13。

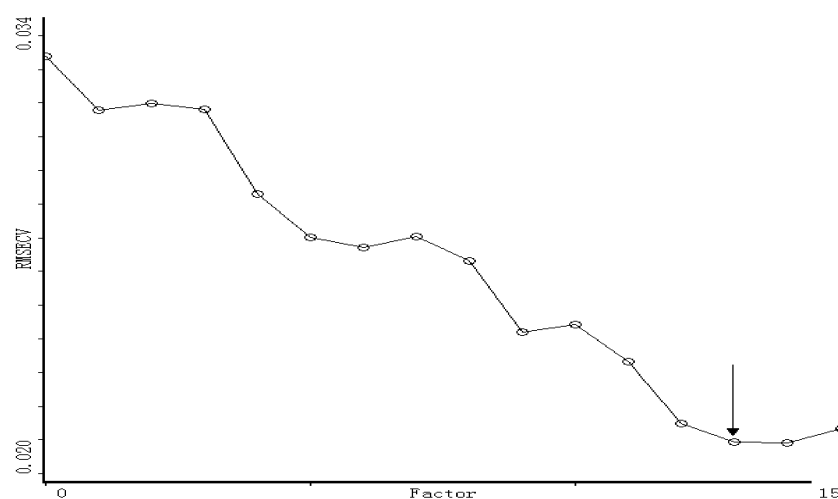


图 2 主成分数对 RMSECV 的影响

3.4 模型的建立 在 $7\ 143 \sim 4\ 011\ \text{cm}^{-1}$ 选择前 13 个主成分数, 采用偏最小二乘法将 90 份校正集样品的近红外光谱图与对应的 HPLC 测定值进行关联, 建立六味地黄丸中丹皮酚的定量分析模型。NIR 预测值与 HPLC 测定值的相关性见图 3, 可以看出, 校正集样品均匀分布在回归线的两侧, 所建模型较为成功。经内部交叉验证得 R^2 0.952 1, RMSECV 0.020 93。

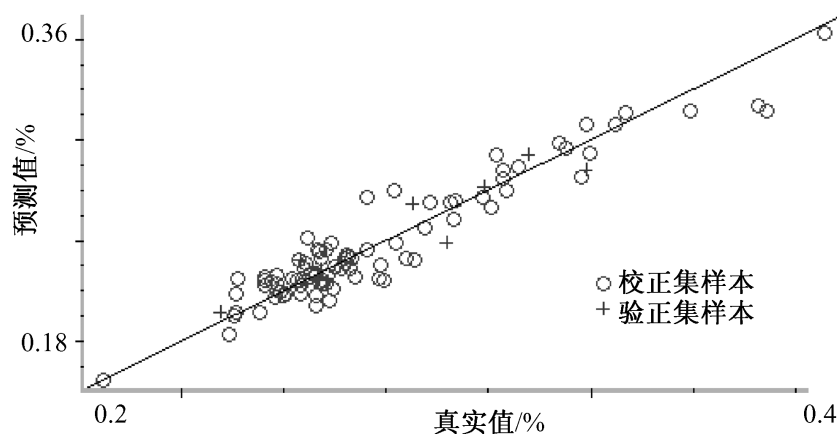


图 3 近红外模型预测值与 HPLC 测定值之间的相关图

3.5 模型的验证 根据上述所建的最佳校正模型对验证集的 10 份样品进行预测, 将预测值与其 HPLC 测定值进行比较, 来检验此定量模型的准确性。结果见表 3。以预测均方差 (RMSEP) 来考核模型对未知样品的预测效果, RMSEP 越小, 表明模型的预测能力越强。该模型 RMSEP 为 0.099 74。

以验证集样品的近红外预测值与 HPLC 测定值的比值作为预测回收率, 所得平均回收率为 100.38%, 可以看出所建模型具有良好的预测能力, 能够准确预测其覆盖范围的丹皮酚含量。

表 3 模型对验证集样品的预测 %

No.	真实值	预测值	绝对偏差	回收率	平均回收率
1	0.285 0	0.292 5	0.007 5	102.63	
2	0.298 8	0.284 8	-0.014 0	95.31	
3	0.274 1	0.276 9	0.002 8	101.02	
4	0.233 5	0.231 1	-0.002 4	98.97	
5	0.228 9	0.240 7	0.011 8	105.16	100.38
6	0.209 5	0.214 4	0.004 9	102.39	
7	0.234 0	0.235 4	0.001 4	100.60	
8	0.230 3	0.228 3	-0.002 0	99.13	
9	0.264 8	0.248 5	-0.016 3	93.84	
10	0.256 4	0.268 5	0.012 1	104.72	

4 结论

本试验利用近红外光谱法建立了六味地黄丸中丹皮酚的定量分析模型,可快速、准确地测定不同厂家六味地黄丸中丹皮酚的含量。此法不需要复杂的化学处理,只需运用化学计量学方法从近红外图谱中提取特定的信息,建立光谱特征与组分之间关系的数学模型,便可直接测定六味地黄丸中丹皮酚的含量。该法可实现六味地黄丸中丹皮酚的快速、无损、无污染的定量检测,为中药及其制剂质量的快速评价和在线检测提供一定的参考依据。

近红外分析技术作为一种“绿色”分析技术,优势突出,能够有效地应用于大批量样品的快速检测,特别是对于日常的质量监控是十分经济且快速的。随着近红外光谱仪硬件设备成本的不断降低和化学计量学方法的进一步完善,从复杂、重叠和变化的近红外光谱中提取有效信息的效率和光谱的信噪比得到不断提高,使得近红外光谱分析技术的应用前景更加广阔。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:598.
- [2] 刘玉明,柴逸峰.近红外光谱和聚类分析法无损快速鉴别蓝桉果实[J].中成药,2004,26(12):1050.
- [3] Siesler H W, Ozaki Y, Kawata S, et al. Near infrared spectroscopy: Principle instruments and application [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [4] Huck C W. Advances of near-infrared spectroscopy in phytochemistry[J]. Near Infrared Spectrosc, 2002, 10: 491.
- [5] Luypaert J, Massart D L, Vander Heyden Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis [J]. Talanta, 2007, 72: 865.
- [6] 丁念亚,黎薇,朱仲良,等.近红外漫反射光谱在中药分类及真伪鉴别中的应用[J].计算机与应用化学,2008,25(4):499.
- [7] Xie H P, Jiang J H, Chen Z Q. Chemometric classification of traditional Chinese medicines by their geographical origins using near-infrared reflectance spectra [J]. Analytical Sciences, 2006, 22: 1111.
- [8] Woo Y A, Kim H J, Ze K R. Near-infrared spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of Angelicae gigantis radix [J]. Phram Biomed, 2005, 36(5): 955.
- [9] 章顺楠,杨海雷,刘占强,等.近红外光谱法在线检测复方丹参滴丸料液中有效成分含量[J].药物分析杂志,2009,29(2):192.
- [10] 陆婉珍.现代近红外光谱分析技术[M].2版.北京:中国石化出版社,2007:44,194.
- [11] 白雁.现代近红外光谱分析技术在药品及食品品质评价系统中的应用[M].北京:高等教育出版社,2009:74.

[责任编辑 顾雪竹]