

NIRS 技术应用于赤芍配方颗粒多指标成分的快速测定

刘丽萍,陈向东,朱德全

(广东一方制药有限公司,广东 佛山,528244)

[摘要] 目的:采用近红外光谱(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)技术结合化学计量学方法建立赤芍配方颗粒水分、浸出物、芍药苷的定量模型,实现对赤芍配方颗粒多指标成分的快速检测。方法:以烘干法、热浸法和 HPLC 法作为参比分析方法,分别测定赤芍配方颗粒和提取物水分、浸出物、芍药苷含量,运用偏最小二乘(PLS)法分别建立 NIRS 与水分、浸出物、芍药苷含量之间的定量校正模型,并对预测集样品各指标成分的含量进行预测。结果:所建 NIRS 定量模型的相关系数(R^2)分别为 88.6、94.59 和 91.32;采用独立验证集对模型进行外部验证, RMSEP 分别为 0.283、2.26 和 3.96, RSEP 均 < 5%。所建 NIRS 快速检测方法的准确度、精密度和重复性,结果均良好。结论:NIRS 分析技术可应用于赤芍配方颗粒中水分、浸出物、芍药苷 3 个指标成分的快速检测,结果准确可靠。

[关键词] 近红外光谱;赤芍配方颗粒;多指标成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.068

Rapid determination of multi-target ingredients in Radix Paeoniae Rubra formulated granules by near-infrared spectroscopy

LIU Li-ping, CHEN Xiang-dong, ZHU De-quan

(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To establish a quantitative model of water content, extract, and paeoniflorin of Radix Paeoniae Rubra formulated granules using near-infrared spectroscopy (NIRS) combined with the chemometric method, and to realize the rapid determination of multi-target ingredients in Radix Paeoniae Rubra formulated granules. Methods: With the drying method, the hot dipping method, and high-performance liquid chromatography as the analytical methods for reference, the water content, extract content, and paeoniflorin content in Radix Paeoniae Rubra formulated granules and its extract were determined. The partial least square method was used to establish the quantitative calibration model between NIRS and water content/extract content/paeoniflorin content, and the content of each ingredient was measured for the samples in the prediction set. Results: The correlation coefficients of the established NIRS quantitative models (R^2) were 88.6, 94.59, and 91.32, respectively. An independent validation set was used for external validation of these models, and the results showed that RMSEP was 0.283, 2.26, and 3.96, respectively, and RSEP was lower than 5%. The NIRS-based rapid determination method established in this study had good accuracy, precision, reproducibility, and results. Conclusion: The NIRS-based analytical method can be used for rapid determination of water, extract, and paeoniflorin in Radix Paeoniae Rubra formulated granules and can yield accurate and reliable results.

Key words: near-infrared spectroscopy; Radix Paeoniae Rubra formulated granule; multi-target ingredient

赤芍来源于毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,味苦,性微寒,归肝经,具有清热凉血、散瘀止痛的功效^[1]。赤芍中含有芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、白芍药苷等单萜类成分,另外还含有苯甲醛、没食子鞣质、牡丹酚、没食子酸等化学成分,其中,芍药苷具有抗炎、镇痛、抗惊厥、抗溃疡和降压等作用,为赤芍的主要有效成分^[2]。

中药配方颗粒是用符合炮制规范的中药饮片为原料,经采用现代制药工业的先进工艺和方法,单独提取、制备而

成的纯中药颗粒^[3],其功能、主治、性味、归经与传统中药饮片一致,作为新的饮片形式代替中药饮片供临床辨证论治、随证加减、配方使用^[4]。《广东省中药配方颗粒标准(第一册)》收录的赤芍配方颗粒项下从水分、浸出物、芍药苷含量等指标对赤芍配方颗粒作了规定^[5]。但是水分与浸出物的测定,检验时间较长;芍药苷的测定采用高效液相色谱法,需进行繁杂的预处理,耗时耗试剂,并且信息反馈滞后,无法满足生产过程中即时分析多品种、多批量的需要。

近红外光谱(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)技术是一

种具有样品处理简单、快速分析、无需消耗试剂等特点的方法^[6],已被广泛应用于中药定性定量测定^[7-10]。目前,已有研究人员利用 NIRS 分析技术测定赤芍水提过程芍药苷含量^[11],但未见用于快速测定赤芍配方颗粒中多指标成分含量的文献报道。故本研究以赤芍配方颗粒和赤芍提取物为建模对象,利用近红外光谱技术结合化学计量学方法,在一定光谱范围内,建立赤芍配方颗粒 3 个指标成分的近红外定量模型,操作时无需对样品进行复杂的前处理,为检测赤芍配方颗粒提供一种简便有效的质量控制手段。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 傅立叶变换近红外光谱仪(德国 Bruker Tango, OPUS7.5 分析软件);Agilent 高效液相色谱(G1311C 四元泵,G1129B 自动进样器,G1314B 紫外检测器,Chemstation 色谱工作站)、JJ500 百分之一天平(常熟市双杰测试仪器厂)、ME204E 万分之一天平(梅特勒-托利多)、XP26 百万分之一天平(梅特勒-托利多)、KQ-500DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、HWS28 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 赤芍配方颗粒由广东一方制药有限公司生产,为 2012~2017 年间收集到的 99 批样品;赤芍提取物为生产赤芍配方颗粒的中间产品,为 2015~2016 年间收集到的 70 批样品;芍药苷(批号:110736-201438)由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 水分的测定 取研磨成细粉的赤芍配方颗粒或赤芍提取物约 2g,按《中国药典》2015 年版四部通则 0832 第二法烘干法进行测定。

2.2 浸出物的测定 取研磨成细粉的赤芍配方颗粒或赤芍提取物约 2g,按《中国药典》2015 年版四部通则“2201 醇溶性浸出物测定法”项下的热浸法进行测定。

2.3 芍药苷的测定 取研磨成细粉的赤芍配方颗粒或赤芍提取物约 0.1g,精密称定,精密加入稀乙醇 50mL,称定重量,超声处理(功率 300W,频率 40kHz)30min,放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5mL,置 25mL 量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。取芍药苷对照品约 2.354mg,精密称定,置 25mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得芍药苷对照品溶液(90.77μg/mL)。HPLC 色谱条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(200mm×4.6mm,5μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86);检测波长为 230nm;柱温为 30℃;流速为 1.0mL/min。在上述色谱条件下分别取对照品溶液与供试品溶液各 10μL,进样,测定。

2.4 指标成分测定结果 169 个样品中水分含量的变化范围为 2.3%~4.9%,浸出物含量的变化范围为 37.1%~76.3%,芍药苷含量的变化范围为 55.7~113.4mg/g。

2.5 近红外光谱的采集 取研磨成细粉的赤芍配方颗粒或赤芍提取物约 3g,装入具塞玻璃样品瓶中,采用积分球漫反射,采集近红外光谱。采集条件:以仪器内置背景为参比,扫描范围 11500~4000cm⁻¹,扫描次数 32 次,分辨率 8cm⁻¹,每批样品重复测定 3 次。所得赤芍配方颗粒和提取物近红外光谱图见图 1。

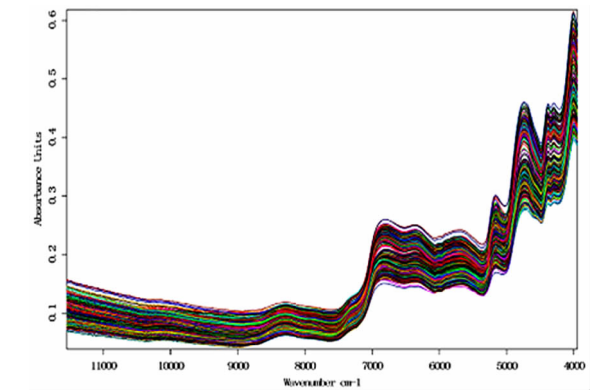


图 1 赤芍配方颗粒粉末与提取物原始 NIRS 图

2.6 模型性能评价指标 采用 OPUS 软件的偏最小二乘法(PLS)建立赤芍配方颗粒中水分、浸出物、芍药苷 3 个组分的定量模型,通过交叉验证的相关系数(R²)、交叉验证均方差(RMSECV)、相对分析误差(RPD)和主成分维数考察模型性能,选择合适的光谱范围及光谱预处理方法建立定量模型。以相关系数 R² 无限趋近于 1,RMSECV 越小,评价模型性能越好。同时将用于验证的赤芍配方颗粒样品的近红外光谱信息导入建立的定量校准模型中,预测各组分的含量,验证所建定量校准模型的预测性能。采用偏差、预测集均方差(RMSEP)和相对预测偏差(RSEP)来评价模型的预测性能。

2.7 NIRS 模型的建立

2.7.1 校正集和验证集的选择 本研究中采用赤芍配方颗粒,结合中间产品赤芍提取物样品来建立模型,将 78 批赤芍配方颗粒、70 批赤芍提取物样品选入校正集,用于建立模型,剩余 21 批赤芍配方颗粒样品划归验证集。校正集与验证集各组分含量范围见表 1,其中验证集样品的含量范围处于校正集样品含量范围之内。

表 1 校正集和验证集样品各组分含量分布

样品集	水分(%)	浸出物(%)	芍药苷(mg/g)
校正集	2.3~4.9	37.1~76.3	55.7~113.4
验证集	3.1~4.4	53.0~68.6	69.0~93.7

2.7.2 光谱预处理 选取 148 批校正集样本的全波长 11500~4000cm⁻¹ 光谱数据,比较 7 种不同预处理方法对模型性能的影响,包括消除常数偏移量、减去一条直线、矢量归一化(SNV)、多元散射校正(MSC)、一阶导数、一阶导数+矢量归一化(SNV)、一阶导数+多元散射校正(MSC),结果见表 2。结果显示,水分、浸出物、芍药苷定量模型分别选用一阶导数+MSC、MSC、一阶导数+SNV 的光谱预处理

方法,所得模型的 RMSECV 值最小且 R2 较大。3 种方法预处理后的光谱图见图 2。

表 2 不同光谱预处理方法对水分、浸出物、芍药苷 NIRS 模型性能的影响

预处理方法	水分		浸出物		芍药苷	
	RMSECV(%)	R ² (%)	RMSECV(%)	R ² (%)	RMSECV(%)	R ² (%)
消除常数偏移量	0.242	78.42	2.1	91.67	5.44	82.49
减去一条直线	0.238	79.23	2.03	92.19	5.31	83.27
SNV	0.223	81.77	1.82	93.76	4.6	87.47
MSC	0.221	82	1.81	93.83	4.58	87.54
一阶导数	0.214	2.43	2.05	92.09	4.76	86.58
一阶导数+SNV	0.21	83.77	1.98	92.57	4.14	89.86
一阶导数+MSC	0.209	83.93	1.98	92.58	4.17	89.68

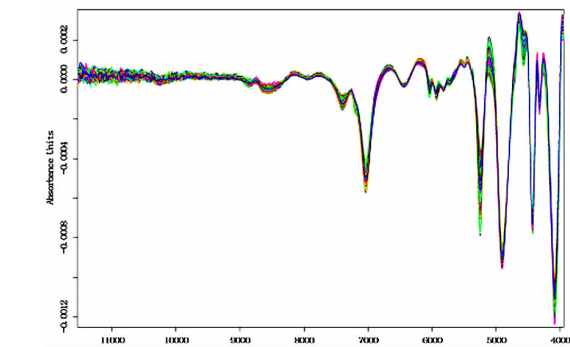


图 2-1 一阶 + MSC

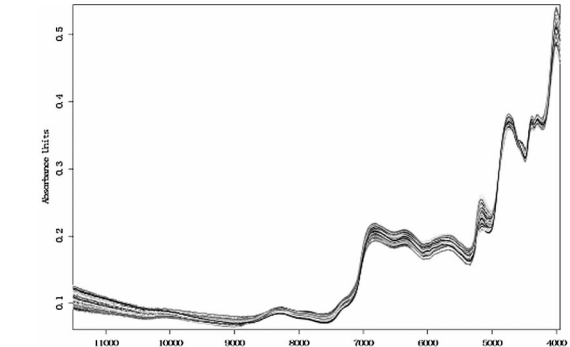


图 2-2 MSC

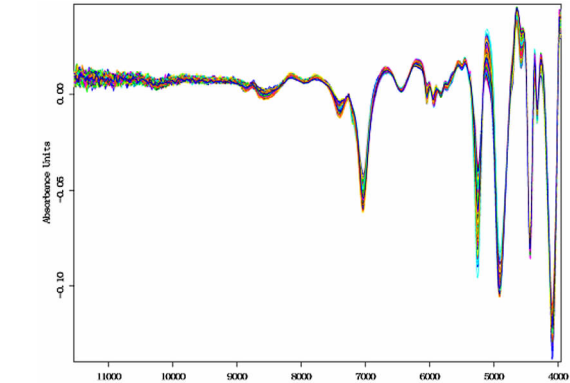


图 2-3 一阶 + SNV

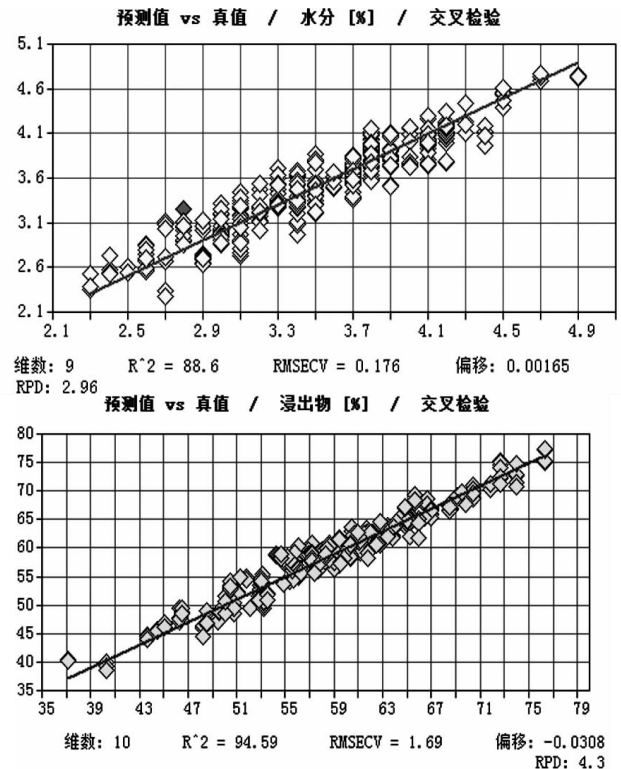
图 2 建模样品经预处理后 NIRS 光谱

2.7.3 波段的选择 样品近红外光谱大于 10000cm⁻¹的末端吸收较弱且容易形成噪音干扰,小于 4200cm⁻¹会因为边缘效应和噪音形成干扰,故选择谱段时避开此区域^[12]。根据赤芍配方颗粒粉末与提取物近红外光谱(见图 1),并参考 3 种方法预处理后的光谱图(见图 2)可以发现,样品在 9500 ~ 4200cm⁻¹谱段内有特征吸收峰,因此选择在 9500 ~ 4200cm⁻¹谱段内建模。结合 OPUS 软件自动优化的结果,通过比较不同建模谱段对模型性能的影响,最终水分、浸出物、芍药苷模型的建模谱段分别为 7500.1 ~ 6096.4cm⁻¹和 5451.7 ~ 4247.9cm⁻¹、9401.7 ~ 4598.8cm⁻¹、6100.5 ~ 4247.9cm⁻¹,结果见表 3。

表 3 谱段选择对水分、浸出物、芍药苷 NIRS 模型性能的影响

建模谱段(cm ⁻¹)	水分		浸出物		芍药苷	
	RMSECV(%)	R ² (%)	RMSECV(%)	R ² (%)	RMSECV(%)	R ² (%)
5451.7 ~ 4247.9	0.193	86.26	2.06	92.01	4.7	86.5
6100.5 ~ 4247.9	0.192	86.5	2.01	92.32	3.76	91.32
6100.5 ~ 4598.8	0.206	84.44	2.12	91.53	3.78	91.26
7500.1 ~ 4247.9	0.181	87.99	1.77	94.11	3.97	90.32
7500.1 ~ 4598.8	0.188	86.96	1.72	94.4	4	90.2
7500.1 ~ 6096.4 和 5451.7 ~ 4247.9	0.176	88.6	2.09	91.72	4.41	88.08
9401.7 ~ 4598.8	0.199	85.46	1.69	94.59	4.33	88.51

2.7.4 NIRS 定量模型的建立 应用近红外 OPUS 分析软件,选择相应的光谱预处理方法和建模谱段,选取 78 批赤芍配方颗粒、70 批赤芍提取物样品作为校正集。运用偏最小二乘法(PLS)法建立 NIRS 定量校正模型,其预测值与实测值相关图见图 3。



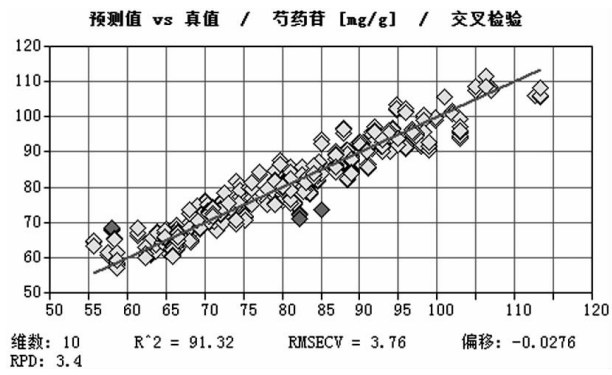


图3 NIRS 定量校正模型预测值与实测值相关图

表4 21 批样品 NIRS 预测值与标准方法实测值的比较

样品	水分				浸出物				芍药苷			
	预测值(%)	实测值(%)	偏差(%)	平均偏差(%)	预测值(%)	实测值(%)	偏差(%)	平均偏差(%)	预测值(mg/g)	实测值(mg/g)	偏差(mg/g)	平均偏差(mg/g)
1	3.8	4.1	0.3	0.2	62.5	58.6	3.9	1.8	82.6	88.4	5.8	3.5
2	3.7	3.6	0.1		66.5	68.2	1.7		79.0	75.7	3.3	
3	4.0	3.8	0.2		68.3	68.3	0.0		82.1	84.6	2.5	
4	4.0	3.8	0.2		68.2	68.3	0.1		83.3	84.6	1.3	
5	4.0	3.9	0.1		67.0	68.6	1.6		84.5	82.6	1.9	
6	3.2	3.4	0.2		59.5	58.4	1.1		92.2	90.4	1.8	
7	3.0	3.3	0.3		53.8	53.0	0.8		94.9	93.7	1.2	
8	3.1	3.3	0.2		53.0	55.4	2.4		91.9	90.1	1.8	
9	2.9	3.4	0.5		53.0	53.0	0.0		91.1	92.8	1.7	
10	3.9	4.4	0.5		60.3	55.9	4.4		73.1	78.8	5.7	
11	3.8	4.3	0.5		62.4	57.9	4.5		75.0	82.0	7.0	
12	3.6	3.8	0.2		60.7	58.3	2.4		75.0	72.8	2.2	
13	3.5	3.7	0.2		64.1	61.2	2.9		78.6	74.4	4.2	
14	3.6	4.0	0.4		60.9	61.8	0.9		75.1	71.0	4.1	
15	3.5	3.8	0.3		62.8	60.3	2.5		74.9	69.0	5.9	
16	3.6	3.8	0.2		57.2	56.3	0.9		75.5	79.5	4.0	
17	3.5	3.6	0.1		57.8	57.7	0.1		76.3	81.8	5.5	
18	3.5	3.8	0.3		62.3	61.9	0.4		83.2	88.0	4.8	
19	3.4	3.3	0.1		68.3	66.5	1.8		80.9	83.2	2.3	
20	3.2	3.1	0.1		67.4	64.4	3.0		78.2	79.0	0.8	
21	3.3	3.5	0.2		66.0	64.1	1.9		75.7	80.5	4.8	

表5 NIRS 定量校正模型预测结果参数汇总

组分	RMSEP	RSEP(%)
水分	0.283	1.38
浸出物	2.26	0.62
芍药苷	3.96	0.90

2.8.2 精密度 为了进一步验证模型精密度,取同一赤芍配方颗粒样品重复6次采集光谱,将所得近红外光谱代入建立的NIRS定量校正模型进行预测分析,所得水分、浸出物、芍药苷含量预测值的RSD值分别为1.28%、1.53%、2.26%,表明所建NIRS分析方法具有较高的精密度。

2.8.3 重复性 取同一批次的赤芍配方颗粒粉末6份(每份3g),在相同光谱采集条件下分别采集光谱1次,将所得

2.8 NIRS 模型的验证

2.8.1 准确性 为了检验所建NIRS定量模型的预测准确性,采用外部验证法进行,即将另外21批赤芍配方颗粒验证集样品的近红外图谱导入“2.7.4”所建NIRS定量模型中,预测其水分、浸出物、芍药苷的含量,并与传统方法测定的化学值进行比较,结果见表4、表5。结果表明NIRS预测值与实测值均较为接近,平均偏差分别为0.2%、1.8%、3.5%,RMSEP分别为0.283、2.26、4.48,RSEP分别为1.38%、0.62%、1.01%,均小于近红外快速检测对于偏差的限度要求。

近红外光谱代入建立的NIRS定量校正模型进行预测分析,所得水分、浸出物、芍药苷含量预测值的RSD值分别为1.60%、0.82%、1.27%,表明所建NIRS分析方法重复性良好。

3 讨 论

赤芍提取物是由赤芍饮片经过水煎煮、浓缩、喷雾干燥后混合制成的粉末,是赤芍配方颗粒的中间产品。赤芍配方颗粒由赤芍提取物直接干法制粒而成,不添加任何辅料。本研究采用赤芍配方颗粒和赤芍提取物作为校正集,简化将赤芍配方颗粒研成细粉的工作量,同时扩大了样品范围。应用NIRS分析技术建立了赤芍配方颗粒中水分、浸出物、芍药苷3个关键质控指标的同时快速检测方法,并考察了光

HPLC法测定金杏感冒止咳颗粒中绿原酸含量的研究

蔡勇科¹, 张火旺², 邱治汉¹

(1. 广东省河源市中医院, 广东 河源, 517000;

2. 广东省河源市药品检验所, 广东 河源, 517000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法(HPLC)测定绿原酸含量的方法, 为药品出厂质量控制提供可靠数据支持。方法: 采用 Inertsil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.4% 磷酸溶液 (10:90) 为流动相, 检测波长为 327nm, 流速为 1.0mL/min。结果: 绿原酸进样量在 0.1012μg ~ 0.3542μg 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 99.78%, RSD 为 0.08%。结论: 高效液相色谱法简便、灵敏、稳定、准确, 无其他成分干扰, 可作为金杏感冒止咳颗粒质量控制的有效方法。

[关键词] 金杏感冒止咳颗粒; 绿原酸; 高效液相色谱法; 实验研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.069

Content determination of chlorogenic acid in Jinxing Ganmao Zhike granules by high-performance liquid chromatography

CAI Yong-ke¹, ZHANG Huo-wang², QIU Zhi-han¹

(1. Heyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Heyuan 517000, Guangdong, China;

2. Heyuan Institute for Drug Control, Heyuan 517000, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of chlorogenic acid, and to provide reliable data for outgoing quality control of the medicinal product. Methods: HPLC was performed on an Inertsil C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm) with a mobile phase of acetonitrile - 0.4% phosphoric acid solution (10:90) at a detection wavelength of 327nm and a flow rate of 1.0mL/min. Results: There was a good linear relationship between chlorogenic acid and peak area within a range of

谱范围、光谱预处理方法对定量模型性能的影响。实验结果表明, 所建立的 NIRS 模型性能良好, 相对预测偏差 RSEP 总体控制在 5% 以内, 可用于对未知样品的快速定量分析; 并初步验证所建 NIRS 快速检测方法的准确度、精密度和重复性, 结果均良好。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(2015年版一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 158.
- [2] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [3] 涂瑶生, 毕晓黎, 罗文汇. 中药配方颗粒的质量控制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(1): 41-46.
- [4] 徐春波, 李振吉, 朱晓磊, 等. 中药配方颗粒国际组织标准的研究与制定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 12(6): 841-843.
- [5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药配方颗粒标准[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 101-103.

- [6] 泽郎尼玛. 近红外光谱分析技术的原理及在中药材中的应用[J]. 大家健康, 2015, 9(1): 278-279.
- [7] 胡小莉, 白雁, 雷敬卫, 等. NIRS 快速测定不同产地野菊花中总黄酮含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 547-553.
- [8] 吴文辉, 唐小龙, 冯健, 等. 盐补骨脂配方颗粒中指标成分及水分测定的 NIR 模型建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 41-44.
- [9] 付小环, 胡军华, 李家春, 等. 应用近红外光谱技术对茯苓药材进行定性定量检测研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 280-286.
- [10] 徐茂玲. 近红外光谱定量技术应用于中药领域的最新研究[J]. 天津药学, 2015, 27(6): 65-67.
- [11] 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.
- [12] 柳艳云, 胡昌勤. 近红外分析中谱波长选择方法进展与应用[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 968-971.

(收稿日期: 2017-11-07)