

近红外光谱法在白芍提取物纯化过程中快速质量控制研究

魏惠珍¹, 张五萍², 毛红梅³, 饶毅^{1*}, 方少敏², 邓杰华²

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006

3. 九江市第三人民医院, 江西 九江 332000

摘要: **目的** 建立一种基于近红外光纤透射光谱的白芍提取物纯化过程中的快速分析方法。**方法** 通过近红外透射光纤探头测定流经 D-101 大孔树脂的纯水洗脱液和 70%乙醇洗脱液的近红外光谱 (NIRS), 并采用模式识别方法对两个过程进行定性判别研究。同时针对醇洗过程, 以 HPLC 分析值作参比, 采用偏最小二乘法建立醇洗过程中芍药苷和芍药内酯苷的定量校正模型。**结果** 模式识别方法可以准确无误地对水洗除杂过程完全程度进行监测, 对醇洗过程中溶剂体系变化进行精确指示, 同时所建定量模型也成功地用于预测相同批次和不同批次白芍提取物大孔树脂纯化过程的洗脱曲线, 芍药苷和芍药内酯苷的预测均方差 (RMSEP) 分别为 0.124、0.172 和 0.120、0.133, NIRS 与 HPLC 测得值之间的相关系数 (r) 均在 0.992 以上。**结论** 本方法实时、高效、快速, 可对纯化过程进行定性定量全面监控, 可用于中药纯化过程的快速分析。

关键词: 近红外光谱; 白芍; 纯化过程; 模式识别; 偏最小二乘法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)09-1128-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.012

Rapid quality control in purifying process of *Paeoniae Alba Radix* extract using near infrared spectroscopy

WEI Hui-zhen¹, ZHANG Wu-ping², MAO Hong-mei³, RAO Yi¹, FANG Shao-min², DENG Jie-hua²

1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi University of Chinese Traditional Medicine, Nanchang 330006, China

3. The Third People's Hospital of Jiujiang, Jiujiang 332000, China

Abstract: **Objective** To establish a fast detection method during the purifying process of the extracts from *Paeoniae Alba Radix* based on near infrared optical fiber transmission spectroscopy. **Methods** The near infrared spectroscopy (NIRS) of the eluates by water and 70% ethanol which flowed through the macroporous resin D-101 was measured by NIR transmission optical fiber probe, and the method of pattern recognition was used to study the two processes. Aiming at the process of 70% ethanol elution, the contents of constituents were determined by HPLC as the reference values, and partial least square regression (PLSR) was applied to build the calibration models of paeoniflorin and albizflorin. **Results** The processes of water elution and 70% ethanol elution could be accurately monitored with pattern recognition, and the changes of the solvent system could be accurately indicated. The quantitative models were applied to successfully predict the elution curves of *Paeoniae Alba Radix* extracts from the same batch and different batches on macroporous resin. The root mean square errors of prediction (RMSEP) calculated by PLSR models for paeoniflorin and albizflorin were 0.124, 0.172, and 0.120, 0.133, respectively, and the correlation coefficient between the values calculated by NIRS and HPLC was all greater than 0.992. **Conclusion** The method is real time, efficient, and fast, and could be applied to the fast analysis for the purifying process of Chinese materia medica.

Key words: near infrared spectroscopy; *Paeoniae Alba Radix*; purifying process; pattern recognition; partial least square

收稿日期: 2012-09-25

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09313-030); 国家重点基础研究发展计划 (2010CB530602)

作者简介: 魏惠珍 (1965—), 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药质量控制新技术研究。

Tel: (0791)87119651 E-mail: weihuizhen_101@126.com

*通信作者 饶毅 Tel: (0791)87119609 E-mail: raoyi99@126.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.2014.016.html>

在中药制药过程中,提取、精制作为中药生产的特色环节,决定着中药中有效成分在成品中的比例,即决定着药品疗效。目前,我国对中药生产过程的质量控制仍十分被动,只对终端产品进行质量检测,很少考虑工艺过程中的变化,生产工艺很难得到精确控制,从而导致中药产品批次间质量差异较大,这也是阻碍中药现代化、国际化的因素之一。

近年来,近红外光谱(near infrared spectroscopy, NIRS)技术发展迅速,具有分析速度快、操作方便、无污染、无破坏性,特别适合于过程分析等特点^[1],已陆续用于中药提取^[2-5]、纯化^[6]和浓缩^[7]过程,在中药生产过程关键环节的质量控制中展示出巨大的应用潜力。本实验以大孔树脂纯化中药白芍过程为具体研究对象,根据纯化过程的特点,采用NIRS 光纤技术在实现大孔树脂洗脱过程中对芍药苷和芍药内酯苷定量检测的同时,对水洗除杂和醇洗脱过程也进行了快速定性分析,从而建立起一套全面的适合中药纯化过程的定性定量快速质量控制方法,为白芍提取物大孔树脂产业化纯化过程的在线检测提供了参考方法。

1 仪器与材料

岛津 LC—10ATvp 高效液相色谱仪 (SPD—M10Avp 检测器, CLASS—VP 软件)。MPA 傅里叶变换近红外光谱仪 (德国 Bruker 光学仪器公司),随机附有光程 2 mm、长度 2 m 的石英光导纤维透射式探头,TE—InGaAs 检测器。软件为 Bruker Opus 6.5 光谱采集和处理软件。

D-101 大孔吸附树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司);芍药内酯苷对照品 (批号 20091118,深圳市美荷生物科技有限公司),芍药苷对照品 (批号 1287-20100225,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心),质量分数均大于 98%;白芍饮片 (批号 20091110) 由宁波立华制药有限公司提供;乙腈为色谱纯 (上海振兴化工一厂),其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

大孔树脂先用 95%乙醇浸泡 24 h,使之充分溶胀,然后湿法装柱 (400 mm×20 mm),依次用 10 倍柱床体积的 0.1 mol/L 氢氧化钠水溶液和同量的 0.1 mol/L 盐酸水溶液漂洗,除去树脂含有的杂质,体积流量控制为 2.0 mL/min。最后用 20 倍柱床体积的纯净水以同一流量浸洗,充分除去残存的盐酸和氢氧化钠水溶液。

称取白芍饮片适量,加 12 倍量水加热回流 2 h 后滤过,取滤液,残渣再加 8 倍量水进行第 2 次加热回流,2 h 后滤过,合并 2 次滤液,减压浓缩,浓缩液上准备好的大孔树脂柱,静态吸附 6 h 后,先用纯水洗脱至澄清,再用 70%乙醇进行洗脱。分别收集水洗脱和 70%乙醇洗脱过程中的洗脱液。其中 70%乙醇洗脱液样品经光谱采集后进行 HPLC 分析,作为 NIRS 定量建模提供参考数据。本实验共进行 6 次纯化试验,共得 55 份水洗脱液和 76 份乙醇洗脱液样品用于近红外定性、定量分析。

2.2 光谱采集

测定方式:光纤透射式探头 (2 mm 光程);扫描范围 12 500~4 000 cm^{-1} ;分辨率 8 cm^{-1} ;扫描次数 64 次;环境温度 27.3~28.6 $^{\circ}\text{C}$,湿度 42%~59%。

取各样品依次倒入特定的样品瓶中,待溶液稳定后,将光纤探头浸入其中,按实验条件依次进行近红外扫描,每个样品测定 3 次,求平均光谱用于近红外建模,共得 55 张水洗脱液样品光谱图和 76 张醇洗脱液样品光谱图,见图 1。

2.3 HPLC 定量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,体积流量 1 mL/min,进样量 10 μL ,检测波长 230 nm;流动

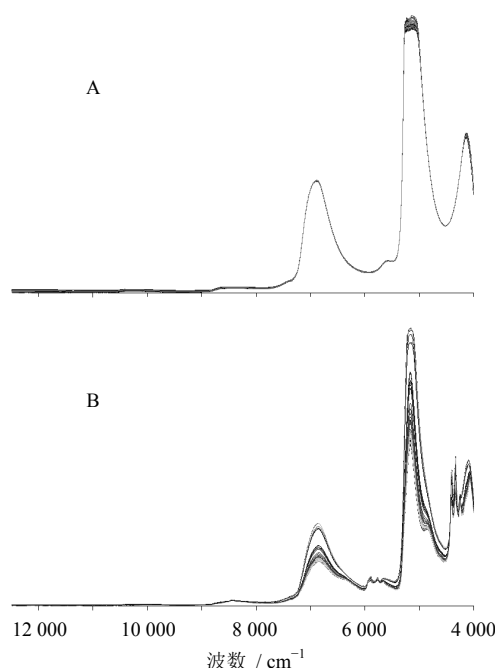


图1 水洗脱液 (A) 和 70%乙醇洗脱液样品 (B) 的原始 NIRS 图

Fig. 1 Original NIRS spectra for samples of water eluent (A) and 70% ethanol eluent (B)

相乙腈-0.1%磷酸水溶液(13:87)。

2.3.2 供试品溶液的制备 70%乙醇洗脱液, 稀释后微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.3 对照品溶液的配制 精密称取芍药苷对照品 17.98 mg, 芍药内酯苷对照品 3.23 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得芍药苷对照品储备液、芍药内酯苷对照品储备液; 分别精密吸取 1、2 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为芍药苷 71.9 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药内酯苷 25.8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3.4 方法学考察 对醇洗脱液进行了方法学考察, 结果芍药苷回归方程为 $Y=93\,298X-21\,529$, $r=0.999\,7$, 芍药内酯苷回归方程为 $Y=32\,431X-12\,294$, $r=0.999\,8$; 芍药苷、芍药内酯苷线性范围分别为 71.9~2 157.0、25.8~774.0 ng; 芍药苷、芍药内酯苷精密度试验 RSD 分别为 0.54%、0.58%; 芍药苷、芍药内酯苷重复性试验 RSD 分别为 0.69%、0.65%; 芍药苷、芍药内酯苷稳定性试验 RSD 分别为 0.76%、0.74%; 芍药苷、芍药内酯苷的平均回收率分别为 99.85%、99.50%, RSD 分别为 1.76%、1.62%。

2.3.5 样品测定 取所收集的 76 份醇洗脱液, 按供试品溶液的制备方法处理, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析, 样品中芍药苷和芍药内酯苷的浓度分布范围分别为 7.9~9 893.7、2.8~2 949.9 $\mu\text{g/mL}$ 。混合对照品和样品的 HPLC 谱图见图 2。

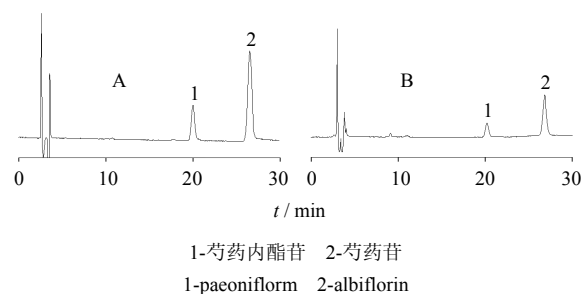


图2 混合对照品(A)和样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Paeoniae Alba Radix* sample (B)

2.4 基于模式识别^[1,8]的定性分析过程

利用大孔吸附树脂柱分离纯化中药提取物时, 通常用肉眼观察吸附、杂质洗脱和纯化物解吸洗脱等工艺过程中的颜色变化, 确定各过程的完成程度。但是利用这种方法难于实现分离纯化过程的高效质

量控制、高产率和低成本。因此, 本实验以近红外透射光纤技术为监控手段, 利用模式识别方法对 D-101 树脂分离纯化过程中的水洗和醇洗过程进行快速质量监控方法研究。

2.4.1 水洗除杂过程的主成分分析 采用 OPUS 软件, 对水洗除杂过程收集的洗脱液的 NIRS 采用因子化法, 对其进行主成分分析。通过多种预处理方法和波长范围选择试验后, 运用“一阶导数+矢量归一化法”预处理方法, 波数范围 11 007.7~7 968.5、6 109.4~5 442.2 cm^{-1} 所得出的主成分得分图可以最准确地反映出水洗除杂过程洗脱液的变化趋势(图 3)。由结果可见, 流经吸附柱的杂质水溶液与杂质洗净后的水溶液的 NIRS 存在明显的分界线, 并运用测试光谱进行测试, 能够在水洗除杂过程的洗脱液进行快速定性分析。表明 NIRS 能够监测柱子在提取物水溶液饱和吸附后用水作为洗脱液除去杂质的过程, 从而可使其在最小的用水量、最短的时间让杂质完全洗脱, 并且使粗提物尽可能纯化。

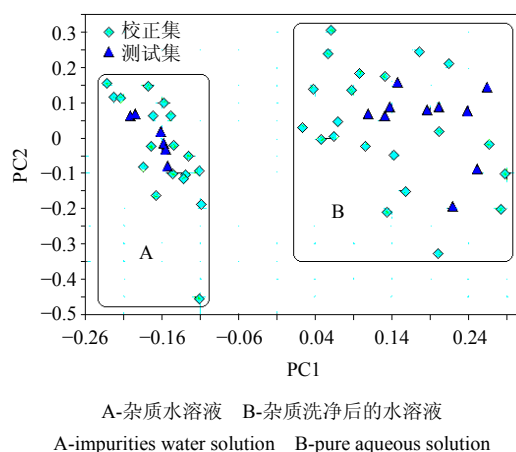


图3 水洗脱液样品的主成分得分图

Fig. 3 Principal component score plot for samples of water eluent

2.4.2 醇洗过程的主成分分析 采用 OPUS 软件, 对 70%乙醇洗脱过程收集的洗脱液的光谱图采用因子化法, 对其进行主成分分析。通过多种预处理方法和波长范围选择试验后, 运用“一阶导数+矢量归一化法”预处理, 波数范围 7 501.8~5 449.9 cm^{-1} , 结果见图 4。70%乙醇液的收集过程为浓缩液经上样吸附, 用纯水冲洗杂质后开始用 70%乙醇进行冲洗, 待流出液颜色最深时开始进行收集。流出液的溶剂体系是从水慢慢过渡到 70%乙醇, 由结果可见, NIRS 能正确地反映出这种变化趋势, 直至流

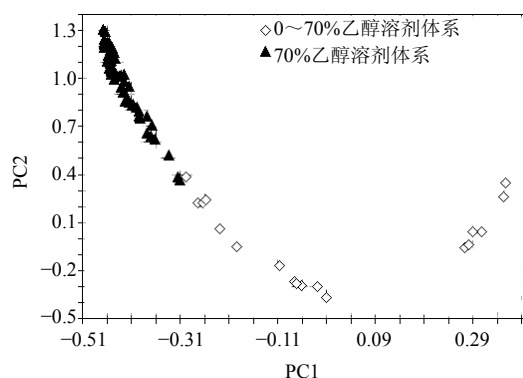


图 4 70%乙醇洗脱液样品的主成分得分图

Fig. 4 Principal component score plot for samples of 70% ethanol eluent

出液的溶剂体系完全为 70%乙醇时在小范围内聚为一类。并运用测试光谱进行测试，能够对 70%乙醇洗脱过程的洗脱液进行快速定性分析。可见，NIRS 可以准确对流体流经吸附柱的色谱行为作出指示，快速监测分离纯化过程中的动态变化过程。

2.5 基于偏最小二乘法的定量分析过程

将醇洗脱液样品的 NIRS、芍药苷和芍药内酯苷的名称和 HPLC 定量测定值输入 OPUS QUANT 定量分析软件包中，进行数据处理。以前 4 根树脂柱取得的 55 个样本作为校正集，第 5 根树脂柱所得 10 个样品（相同批次白芍）和第 6 根树脂柱所得 11 个样品（不同批次白芍）作为预测集。

2.5.1 芍药苷和芍药内酯苷定量模型的建立 在建立 NIRS 定量建模过程中常常需要对样品光谱图进行光谱范围选择，以避免引入过多的冗余信息和干扰信息，改善模型性能，提高计算速度。同时选择一定的预处理方法，以消除光谱测量过程中由外界因素带来的干扰和噪声。本实验比较研究了不同波段（表 1）和不同光谱预处理方法（表 2）对内部交叉验证均方根误差（root mean square error of cross validation, RMSECV）的影响，从而筛选出最优建模波段和光谱预处理方法，再采用偏最小二乘（partial least square, PLS）回归法将经过预处理后的光谱数据与 HPLC 分析数据进行关联，获得了预测效果较理想的定量校正模型，结果见表 3。

2.5.2 模型的预测 在优化了用于建模的波段和光谱预处理方法，用 PLS 法建立测定白芍大孔吸附树脂纯化洗脱物中芍药苷和芍药内酯苷浓度的 NIRS 校正模型后，将其用于对相同批次白芍提取物（第 5 根树脂柱收集 10 份）和不同批次白芍提取物（第 6 根树脂柱收集 11 份）分离纯化样品的预测，所得

表 1 不同 NIRS 波段对模型 RMSECV 的影响

Table 1 Influence of NIRS wave on model RMSECV

光谱范围 / cm^{-1}	芍药苷		芍药内酯苷	
	主因子数	RMSECV	主因子数	RMSECV
6 475.8~5 449.9	4	0.168	8	0.048 0
7 501.8~5 449.9	6	0.133	7	0.049 5
11 019.3~4 242.7	10	0.192	7	0.165 0
12 492.7~7 497.9	8	0.189	4	0.075 1
6 101.7~5 449.9				
6 101.7~5 449.9	6	0.233	9	0.071 0
4 601.3~4 242.7				

光谱预处理方法同表 2

Spectrum pretreatment method is the same as Table 2

表 2 不同光谱预处理方法对模型 RMSECV 的影响

Table 2 Influence of different pretreatment methods on model RMSECV

光谱预处理方法	芍药苷		芍药内酯苷	
	主因子数	RMSECV	主因子数	RMSECV
消除常数偏移量	6	0.133	8	0.048 2
矢量归一化	8	0.199	8	0.046 9
一阶导数	5	0.184	8	0.048 0
二阶导数	6	0.232	6	0.084 2
一阶导数+矢量归一化	6	0.184	8	0.077 2

所选光谱波段同表 3

Selection of spectral bands is the same as Table 3

的预测结果见表 3，NIRS 预测的第 5 根和第 6 根大孔树脂中纯化过程中芍药苷和芍药内酯苷的洗脱曲线见图 5。

R^2 越接近 1，说明校正模型的预测值与标准对照品方法分析值之间相关性越强。RMSECV 是选择建模参数和优化模型结构的指标，通常依据 RMSECV 值选择最佳的因子数、波段和预处理方法。RMSEP 值评价所建模型的预测性能和外推能力，RSECV 和 RSEP 反映所建模型和预测相对误差大小。 R^2 值越大，RMSECV、RMSEP、RSECV 和 RSEP 值越小，表示建立的芍药苷和芍药内酯苷定量模型的实际精度越高。

从表 3 可见对于 2 组白芍样品，芍药苷的 RSEP 要小于芍药内酯苷，而且芍药苷交叉检验结果和预测结果的相关系数 R^2 均大于芍药内酯苷，说明芍药苷模型的稳定性要好于芍药内酯苷模型，这同样能从图 5 的洗脱曲线中得到体现，NIRS 预测的芍药

表3 最优定量校正模型及其计算结果

Table 3 Optimal quantitative calibration models and their calculation results

名 称		芍药苷		芍药内酯苷	
		第5组	第6组	第5组	第6组
最优定量校正模型	光谱范围选择 / cm^{-1}	7 501.8~5 449.9		6 475.8~5 449.9	
	预处理方法	消除常数偏移量		一阶导数	
	检验方法	内部留一交叉检验		内部留一交叉检验	
交叉检验结果	主因子数	6		8	
	R^2	0.996 5		0.994 0	
	RMSECV / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.133		0.048	
	交叉验证相对标准偏差 (RSECV) / %	4.78		6.13	
预测结果	R^2	0.998 4	0.995 2	0.992 2	0.984 9
	预测误差均方根 (RMSEP) / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.124	0.172	0.120	0.133
	预测相对标准偏差 (RSEP) / %	3.91	5.66	10.73	16.66

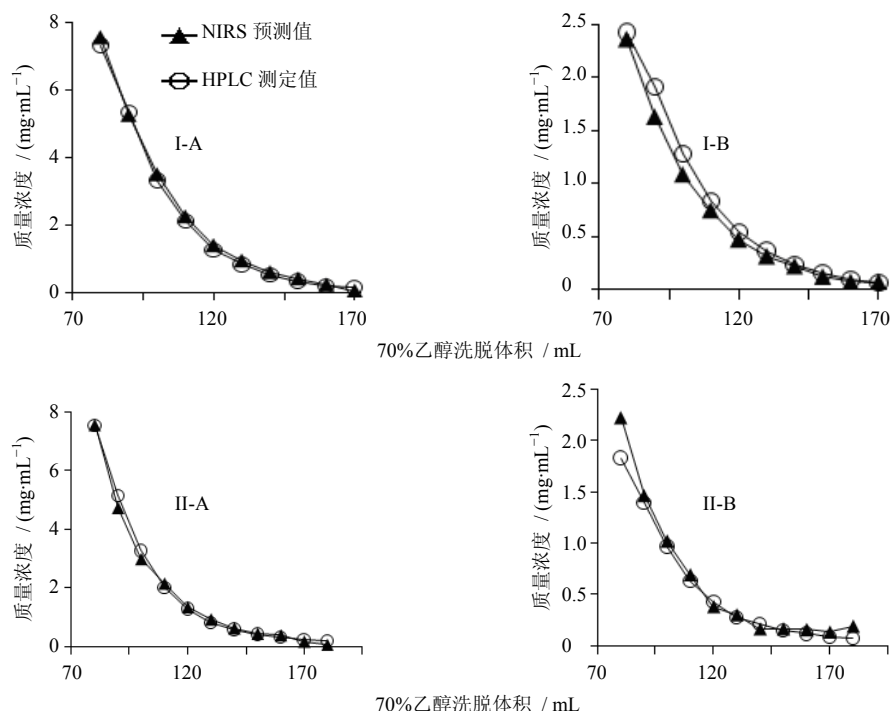


图5 NIRS 预测的第5组 (I) 和第6组 (II) 芍药苷 (A) 和芍药内酯苷 (B) 洗脱曲线

Fig. 5 Elution curves of paeoniflorm (A) and albiflorin (B) from groups 5 (I) and 6 (II) predicted with NIRS

苷洗脱曲线与实际洗脱曲线的吻合程度比芍药内酯苷要好。这是由于经大孔吸附树脂纯化后的白芍洗脱物里, 芍药苷的量较芍药内酯苷要高出3~4倍, NIRS 是属于常量分析方法, 对量较高的目标成分的预测精度会好于量较低的目标成分, 因此 NIRS 对芍药内酯苷的预测误差较芍药苷要大。芍药苷作为白芍中的主要成分之一, 在分离纯化过程中常被用来作为质控指标^[9-11], 因此, 使用 NIRS 方法对白芍纯化过程中的芍药苷浓度进行快速检测具有显著

的应用价值。尽管芍药内酯苷的质量浓度较低, 定量模型对其的预测效果不如芍药苷理想, 但依然对工业生产过程中的质量控制具有借鉴作用。

同时, 相对于与建模样品同批次的白芍而言, 不同批次白芍样品芍药苷和芍药内酯苷预测结果的相关系数均有所下降, 预测误差也有一定程度地提高, 但对不同批次白芍样品的预测结果同样也令人满意, 如果在此基础上继续加大建模样品数量, 增大建模用样品的代表性, 改进光谱特征信息提取方

法,进一步优化模型,提高预测能力,该方法可望作为产业化生产白芍总苷的纯化过程这一关键工序的实用方法。

3 讨论

本实验采用近红外光纤探头技术,对白芍提取物分离纯化过程进行快速分析研究,结果发现,利用 NIRS 技术不仅能对醇洗过程中有效成分芍药苷和芍药内酯苷进行即时定量检测,还能对水洗除杂过程完全程度、醇洗过程中溶剂变化体系进行准确监测。相对于中药制药过程中工艺参数的人为主观判断,NIRS 能给出科学、客观的判别结果,相比于 HPLC 分析方法,NIRS 能立即得出有效成分的含量,准确反映有效成分的变化趋势,更好地理解纯化工序过程,是一套全面的白芍提取物纯化过程定性定量分析方法。研究表明,NIR 作为一种快速、简便、无污染的分析方法,可用于中药大孔树脂纯化过程的快速分析,可进一步发展为实际中药生产纯化过程的在线检测方法。

参考文献

- [1] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术 (第二版) [M]. 北京: 中国石化出版社, 2006.
- [2] 严诗楷, 罗国安, 王义明, 等. 栀子药材提取工艺的近红外光谱实时控制方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 36(6): 1026-1030.
- [3] 吕琳昂, 师涛, 杨辉华, 等. NIR 在线检测监控安神补脑液水提过程的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 224-228.
- [4] 王静, 莫必琪, 李斌, 等. 近红外光谱法预测红参醇提过程中总皂苷的变化研究 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1323-1326.
- [5] 武卫红, 王宁, 蔡绍松, 等. 声光可调-近红外光谱技术用于丹参回流提取过程中丹参酮 II_A 含量的测定 [J]. 中药材, 2009, 32(1): 118-121.
- [6] 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): 742-747.
- [7] 蔡绍松, 武卫红, 王宁, 等. 黄芪水提液浓缩过程的 AOTF-近红外光谱法在线分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(7): 527-529.
- [8] 瞿海斌, 杨海雷, 程翼宇. 近红外漫反射光谱法快速无损鉴别阿胶真伪 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(1): 60-62.
- [9] 李衫, 王亚楠, 刘小宇, 等. 白芍总苷提取和纯化工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(05): 173-176.
- [10] 聂晓玉, 尚诚, 王雅亮, 等. 大孔吸附树脂分离白芍中芍药苷实验研究 [J]. 中成药, 2005, 27(3): 350-351.
- [11] 尹蓉莉, 江靖, 张淑儒, 等. 大孔吸附树脂纯化白芍总苷的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 610-612.