

留时间:0.455~0.458(峰1)、0.485~0.488(峰2)、0.626~0.630(峰3)、0.670~0.674(峰4)、0.794~0.799(峰5)、0.834~0.841(峰6)、0.880~0.886(峰7)、0.907~0.913(峰8)、S(峰9)、1.106~1.113(峰10)、1.120~1.127(峰11)、1.156~1.163(峰12)、1.438~1.448(峰13)、1.463~1.472(峰14)、1.518~1.528(峰15)、1.599~1.609(峰16)。

共有峰相对面积:按《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定,单峰面积占总峰面积5%以下的不做规定。色谱图中仅有14号共有峰单峰面积占总峰面积超过5%,按规定14号峰相对S峰面积比不得超过(20%±0.69%)。非共有峰占总峰面积不到0.3%,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定。

3 讨论

根据指纹图谱相似度评价分析结果,方法的稳定性、精密度和重复性的相关系数均在0.999以上,10批样品相似度均在0.99以上,具有很好的相关性,可以作为痰热清氯化钠注射液质量控制标准。

黄芩苷为方中的主要有效成分,在使用紫外检测器扫描时,其最大吸收在280 nm处^[1],但熊胆粉中主要有效成分熊去氧胆酸没有吸收,未表现出相关性。使用蒸发光散射检测器可以克服此不足^[2,3],

显示更多的信息,根据信息最大化原则,选择ELSD进行分析测定。

由于痰热清氯化钠注射液有效成分质量浓度较低,直接进样时所显示的色谱峰信息量很少,不能达到指纹图谱的要求,且注射液中有辅料氯化钠,较多的氯化钠对ELSD污染严重^[2,3],需要进行前处理,以去除或基本除去无机盐,使成分质量浓度达到信息量的要求。经过考察,采用本实验供试品溶液的制备项下的方法进行样品处理,既基本除去了氯化钠,又使供试品得到富集。

根据痰热清氯化钠注射液生产工艺,成品中加有辅料L-盐酸半胱氨酸、枸橼酸,蒸发光散射检测器对两者也能产生信号响应,氯化钠虽然经处理基本除去,但还有残留,也产生信号响应。为考察指纹图谱中三者对色谱峰的干扰情况,对L-盐酸半胱氨酸、枸橼酸和氯化钠进行了考察,结果发现其色谱峰保留时间均在5~6 min,对色谱峰无干扰。

References

- [1] CH P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Zhao Y X, Li M L. The application of the ELSD in the analysis of composition of Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 913-916.
- [3] Deng H G, Cao Y Z. The current detector of quality of HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1994, 14(3): 61-63.

近红外光谱法预测红参醇提过程中总皂苷的变化研究

王 静¹, 莫必琪², 李 斌¹, 瞿海波^{1*}, 程翼宇¹

(1. 浙江大学 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027; 2. 正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023)

摘 要:目的 应用近红外(NIR)光谱技术快速分析红参乙醇回流提取过程。方法 采用比色法测定提取液样品的总皂苷质量浓度作为对照值,同时采集提取液样品的NIR光谱。运用正交信号校正算法消除光谱中的干扰信息,采用偏最小二乘回归法建立NIR光谱校正模型。结果 NIR光谱校正模型能够准确地预测红参提取过程总皂苷质量浓度。结论 NIR光谱技术可用于红参醇提过程快速分析。

关键词:红参;近红外光谱;正交信号校正

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1323-04

Determination of ginsenoside in ethanol extracting process of red ginseng using near-infrared spectroscopy

WANG Jing¹, MO Bi-qi², LI Bin¹, QU Hai-bin¹, CHENG Yi-yu¹

(1. Department of Chinese Medicine Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Chiatai Qinchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

Abstract: Objective Near-infrared (NIR) spectroscopy was used as a fast analytical technique in the

收稿日期:2006-12-05

基金项目:浙江省科技厅重大科技计划(021103549)

* 通讯作者 瞿海波 E-mail: quhb@zju.edu.cn

ethanol reflux-extraction process of red ginseng. **Methods** The NIR spectra of the extracting solution of red ginseng were obtained and the reference measurements of the active constituent in the extracting solution were performed by the colorimetric method. Firstly, the interference information in the spectra was detected by orthogonal signal correction (OSC) method. Then a calibration model between NIR spectra and reference measurements was established by partial least square regression. **Results** The results showed that the predictive accuracy of NIR calibration model used for the determination of ginsenoside in ethanol extracting process of red ginseng was good. **Conclusion** NIR Spectroscopy could be applied to the fast analysis for ethanol extracting processes of red ginseng.

Key words: red ginseng; near-infrared (NIR) spectroscopy; orthogonal signal correction (OSC)

红参是五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根除去根须后经蒸煮加工而成,具有补气、安神生津、强心固脱等功效。乙醇回流提取红参是最常用的提取工艺,其质控水平直接影响到红参药材的利用率、提取液中有效成分的质量分数和组成、后续加工的难易程度以及产品质量。目前,由于缺乏快速分析方法,无法实时测定红参提取液中有效成分的质量浓度,实际生产中完全凭经验操作,容易造成批次之间质量的波动。近红外(near-infrared, NIR)光谱分析技术是一种快速、无损的分析技术,具有样品处理简单、信息量丰富等优点,是近年来过程分析领域迅速发展的一种分析方法,可用于在线分析,已在制药领域得到广泛应用^[1,2],如混合过程、反应合成过程等。中药领域 NIR 光谱的定量分析已有报道^[3~5]。本实验拟建立红参乙醇回流提取过程 NIR 光谱分析方法。由于乙醇及水所含的羟基在 NIR 光谱区有较强的吸收,本实验采用正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC)法^[6]对 NIR 光谱进行预处理,以偏最小二乘(partial least square, PLS)回归方法建立 NIR 光谱的校正模型。结果表明,本方法可用于实时监控红参乙醇回流提取过程中总皂苷质量浓度的变化。

1 仪器与试剂

Antaris 傅里叶变换 NIR 光谱仪(Thermo Nicolet Corp., Madison, WI), 722 型可见光光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。红参饮片(杭州正大青春宝药业有限公司提供),人参皂苷 Re(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备:准确称取红参饮片 600 g,平行 2 份,分别在厂家所提供的工艺下用乙醇水溶液加热回流提取,一煎提取时间为 2 h,二煎提取时间为 1.5 h,三煎提取时间为 1.5 h,在提取过程中,每 10 min 从提取液循环管道上取 5 mL 提取液样品,共获得样品 132 个。

2.2 样品中总皂苷质量浓度的对照值,以人参皂苷 Re 为对照,采用香草醛-高氯酸比色法在 544 nm 处测定 132 个样本中总皂苷的质量浓度^[7],作为 NIR 光谱分析的对照值,共得到 99 个有效样本,其余样本因试验误差而舍去。将此 99 个有效样本随机抽取 66 个组成校正集,剩下的 33 个组成验证集,这些样本中总皂苷质量浓度分布情况见表 1。

表 1 校正集和验证集样品中总皂苷质量浓度的分布
Table 1 Concentration distribution of ginsenoside in calibration set and validation set by reference methods

样品	样品数	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	平均值/ (mg · mL ⁻¹)	标准偏差
校正集	66	4.555~0.330	1.258	0.997
验证集	33	4.547~0.335	1.338	1.174

2.3 样品的 NIR 光谱的采集:NIR 仪器设置为透射方式,采用光程为 2 mm 比色皿,以仪器内部的空气作为背景,分辨率为 4 cm⁻¹、增益为 1 倍、衰减为 B screen、扫描次数为 32 次、光谱波长范围为 4 000~10 000 cm⁻¹。

2.4 数据处理

2.4.1 波长区间选择:人参皂苷的母核是甾环,人参皂苷的 NIR 吸收区间符合芳香烃碳氢键的合频和倍频特征,所以人参皂苷的波长区间选择可以参考芳香烃碳氢键的谱带。从表 2 可见,芳香烃碳氢键的一、二级倍频均与乙醇和水的倍频区间相互重叠,但芳香烃碳氢键的一级倍频区与乙醇和水的倍频区间重叠比较少,所以选择芳香烃碳氢键的一级倍频区间的波长点(5 708~5 964 cm⁻¹)作为人参皂苷建模光谱区间。

2.4.2 OSC 参数:OSC 方法的基本思想是利用正交投影的方法除去光谱数据中与对照值不相关的信息。为避免 OSC 出现的过拟合现象,利用上述获得的 99 个有效样本数据,近红外光谱数据矩阵(X)和对照值向量(Y),用文献报道^[8]的方法优化 OSC 主成分数,结果见表 3。

表 2 不同氢键在 NIR 光谱区的吸收谱带

Table 2 NIR Spectral range of different hydrogen bonds

振动类型	芳香烃碳氢键/cm ⁻¹	乙醇氢氧键/cm ⁻¹	水氢氧键/cm ⁻¹
一级倍频	5 455~6 079	6 473~7 270	4 545~6 871
二级倍频	7 830~9 033	9 523~10 638	6 523~9 910

表 3 OSC 方法和不同预处理方法结合的优化结果

Table 3 Optimal results for OSC method combined with different pretreatment

方法	OSC 成分数	保留的方差/% *
OSC	6	20.95
一阶导数+OSC	9	9.55
二阶导数+OSC	2	11.34

* OSC 处理后, X 中保留的方差

* variance kept in X after OSC corrected

2.4.3 光谱预处理:分别用一阶导数、二阶导数和 OSC 方法对 NIR 光谱进行预处理,在对光谱求导同时用 Savitzky-Golay 算法十一平滑光谱。以校正集均方差(root mean square error in calibration, RMSEC)和验证集均方差(root mean square error in validation, RMSEV)为指标来考察校正模型的性能,用外部验证法确定模型的主成分数,数据全部用自编的 MATLAB(version 6.5.01, release R13)程序处理。不同预处理方法建模结果见表 4。方法 5 得到的模型性能最好,模型的主成分数明显少于方法 4,而两种方法的 RMSEV 基本一样,故选择一阶导数结合 OSC 作为光谱的预处理方法。

表 4 不同预处理方法的 PLS 校正模型的主成分数、RMSEC 和 RMSEV

Table 4 Principal component number, RMSEC, and RMSEV of PLS model with different pretreatment methods

方法编号	预处理方法	主成分数	RMSEC	RMSEV
1	无	9	0.104	0.164
2	一阶导数	6	0.146	0.164
3	二阶导数	4	0.199	0.255
4	OSC	3	0.108	0.163
5	一阶导数+OSC	1	0.146	0.163
6	二阶导数+OSC	4	0.157	0.163

对分别用表 4 中方法 2 和方法 5 预处理后的光谱进行主成分分析,取第一主成分 PC1(principal component 1)与第二主成分 PC2(principal component 2)作相关图,见图 1。PC1 和 PC2 解释的方差占 90%以上,代表了 NIR 光谱中的绝大部分信息,图 1-A 中第一和第二提取过程的样本分别在空间中聚集,这是因为 NIR 光谱受乙醇影响较大,两次提取过程中,提取液中乙醇损失量和乙醇体积分数变化情况不可能完全相同,从而导致这样的结果;

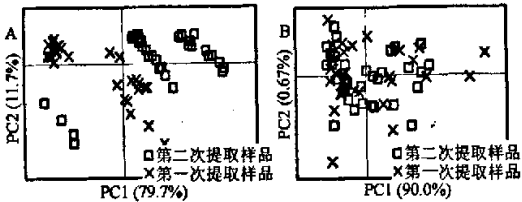


图 1 一阶导数光谱(A)和一阶导数+OSC(B)预处理的 NIR 光谱的得分图(括号中是每个主成分的方差解释率)

Fig. 1 NIR Score of principal component analysis for first derivative pretreated spectra (A) and first derivative + OSC pretreated spectra (B) (explained variance for each principal component is shown in brackets)

但从图 1-B 可看出,经 OSC 预处理后,两次提取过程的样本分布比较均匀,较好地消除了乙醇体积分数变化对光谱的影响。

2.4.4 校正模型建立:根据上述实验结果,选择的光谱波长区间为 5 708~5 964 cm⁻¹,光谱预处理顺序为:一阶导数,并用十一平滑光谱;OSC 方法消除乙醇体积分数变化对光谱的影响;PLS(1 个主成分)回归方法建立校正模型。校正集和验证集样品的 NIR 光谱预测值与对照分析值的相关图见图 2,校正集和验证集样品的相关系数分别是 0.989 和 0.991,可见预测值与对照分析值之间有很好的相关性,说明模型有较好的性能。

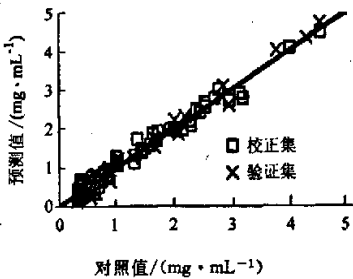


图 2 NIR 预测值和对照值之间的相关图

Fig. 2 Correlation between NIR predicted values and reference values

在提取开始过程中,会有一部分低质量浓度样品。以一阶导数+OSC 预处理光谱和没有经过预处理的 PLS 模型对低质量浓度样品的预测结果见图 3,预测结果的相关系数分别是 0.867 和 0.848, RMSEC 和 RMSEV 分别为 0.172 和 0.203,可以看出 OSC 在显著简化模型结构的情况下,模型的主成分数由 9 减少到 1,并且得到性能较好的模型。

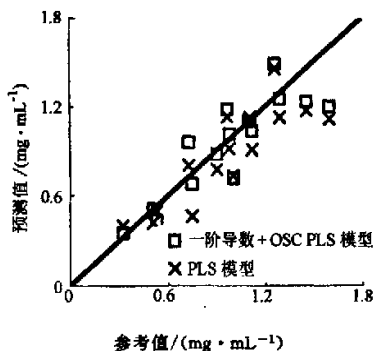


图3 一阶导数+OSC PLS模型和PLS模型对低质量浓度样品的预测结果

Fig. 3 Predicted results by first derivative + OSC-PLS and PLS models for low concentration samples

2.5 快速分析提取过程:准确称取红参饮片600 g,提取,每隔10 min取样并立刻扫描样品的NIR光谱,建立校正模型预测样品中总皂苷质量浓度,高(一煎过程)、低(二煎、三煎过程)总皂苷质量浓度的提取过程变化趋势结果见图4,以比色法分析的总皂苷质量浓度作为对照值,两个过程预测结果的相关系数分别是0.97和0.902, RMSEC和RMSEV是0.111和0.174。可见在两次提取过程中, NIR光谱校正模型反映红参提取过程指标成分变化趋势与分析值反映的趋势基本相同。

3 讨论

本实验建立了红参乙醇回流提取过程NIR光谱快速分析方法,采用一阶导数和OSC预处理NIR光谱,可剔除光谱中由于乙醇体积分数变化带来的干扰,得到了比较满意的结果。研究表明, NIR作为一种快速、简便、无污染的分析方法,可用于中药乙

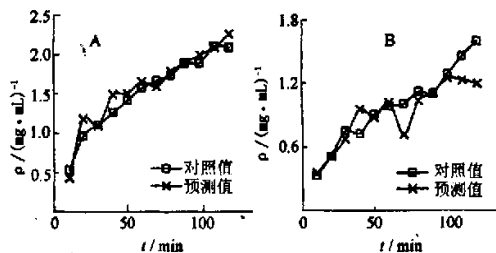


图4 NIR模型快速分析红参提取高质量浓度过程(A)和低质量浓度过程(B)曲线

Fig. 4 NIR Model fast analyzing of extracting red ginseng at high concentration process (A) and low concentration process (B)

醇回流提取过程的快速分析,可进一步发展为中药提取过程的在线检测方法。

References:

- [1] Blanco M, Gozalez B R, Bertran E. Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectrometry [J]. *Talanta*, 2002, 56(1): 203-212.
- [2] Blanco M, Serrano D. On-line monitoring and quantification of a process reaction by near-infrared spectroscopy. catalysed esterification of butan-1-ol by acetic acid [J]. *Analyst*, 2000, 125(11): 2059-2064.
- [3] Liu Q, Qu H B, Cheng Y Y. Near infrared spectroscopy method for fast determining active components of Chinese herb for percolation extracting process analysis [J]. *J Chem Ind Eng (化工学报)*, 2003, 54(11): 1586-1591.
- [4] Yang H L, Liu X S, Qu H B, et al. Fast quality assessment of red ginseng using near-infrared spectroscopy [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2005, 36(4): 912-915.
- [5] Liu Q, Qu H B, Cheng Y Y. Determination of the *Coptis* extract alkaloids using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2004, 32(4): 477-480.
- [6] Wold S, Henrik A, Fredrik L, et al. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra [J]. *Chemometr Intelligent Lab Syst*, 1998, 44(1): 175-185.
- [7] Cheng L Z, Sun J J, Cao J J, et al. Determination of total content of saponins from *Dendrobium candidum* granules by colorimetry [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 1999, 21(11): 606-607.
- [8] Fearn T. On orthogonal signal correction [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2000, 50(1): 47-52.

关于召开2007年“环渤海医药发展前沿论坛”及“代谢组学与中药研究”的调研汇报会的通知

由中国工程院医药卫生学部、天津市科委、天津市科协、天津市卫生局、天津市食品药品监督管理局和天津市滨海新区管委会共同主办,天津市药学会承办,北京市药学会、河北省药学会、辽宁省药学会、山东省药学会、大连市药学会和青岛市药学会协办,于2007年第四季度在天津滨海新区举办“环渤海医药发展前沿论坛”和“代谢组学与中药研究”的调研汇报会。届时将邀请有关院士、药学专家和企业代表共同围绕医药发展前沿、代谢组学与中药研究、产业发展和科技成果转化等议题进行学术交流,以推动环渤海地区医药事业的发展。

一、论坛主题:1. 医药发展的前沿问题 2. 代谢组学与中药研究

二、时间和地点:11月15日报到,2007年11月16至17日两天开会,11月18日离会。天津市滨海新区泰达国际酒店

三、征文内容:(一)区域经济与生物医药发展;(二)生物医药产业发展的战略;(三)环渤海地区国际合作的瓶颈、切入点和战略;(四)药品质量与安全合理用药;(五)医药新技术与中药现代化。

四、征文截止日期:2007年9月30日 论文将会集成册,由出版社正式出版。

联系地址:天津市药学会(300074天津市河西区佟楼佟卫里19号)

联系人:杨燕(022-23519124) 张铁军(022-23006848)