

一种基于声光可调滤光器-近红外光谱技术建立的心通口服液的分析研究

王 宁¹, 李进启², 石俊英³, 蔡绍松⁴

(1. 山东医学高等专科学校, 山东 济南 250002; 2. 山东鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006; 3. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 4. 济南金宏利实业有限公司, 山东 济南 250100)

摘要:目的 应用声光可调滤光器(AOTF)-近红外(NIR)光谱技术和化学计量学方法建立一种用于心通口服液快速定性、定量分析的新方法。方法 采用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法(PLS1)分别建立心通口服液的定性定量分析模型,并以此进行快速分析。结果 建立的心通口服液定性分析模型(XT-C)可正确判断心通口服液;以葛根素为指标成分建立的心通口服液定量分析模型准确性好,葛根素的内部交叉验证均方差是 $RMSEP = 0.1371$, 决定系数 $R^2 = 0.9845$, 经对外部验证集样品进行外部验证,葛根素预测值与真值的相关系数是 $r^2 = 0.9964$, 预测值的平均回收率为101.9%,方法精密度 RSD 为1.98%,稳定性 RSD 为1.57%。结论 该方法是一种简便、快速、低耗的新型分析技术,可用于心通口服液的快速定性定量分析。

关键词: 心通口服液; 声光可调滤光器; 主成分分析; 偏最小二乘; 葛根素

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)01-0053-04

A new method for rapid analysis of Xintong Oral Liquid by AOTF-near infrared spectroscopy

WANG Ning¹, LI Jin-qi², SHI Jun-ying³, CAI Shao-song⁴

(1. Shandong Medical College, Jinan 250002 China; 2. Shandong Lunan Houpu Pharmaceutical Group Corporation, Linyi 276006, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 China; 4. Jinan Jinhongli Industrial Co., Ltd., Jinan 250100 China)

Abstract: **Objective** To set up a new method for fast determining and identifying Xintong Oral Liquid by acousto-optic tunable filter-near infrared (AOTF-NIR) spectroscopy. **Methods** Identifying method by NIR spectroscopy combined with principal component analysis (PCA), and determining model of qualitative and quantitative analyses based on PLS1 algorithm. **Results** The XT-C identifying model could be used to identify Xintong Oral Liquid, the determining model of qualitative and quantitative analyses with better accuracy, RMSEP of the models for puerarin was 0.1371, the determination coefficients was $R^2 = 0.9845$. The correlation coefficient of the true value and predication value from validation was $r^2 = 0.9964$. The average recovery of the predication set was 101.9%. RSD for precision was 1.98%, RSD for stability was 1.57%. **Conclusion** The method is a quick and simple assay technique with low cost, which is able to be used in the qualitative and quantitative analyses on Xintong Oral Liquid.

Key words: Xintong Oral Liquid; acousto-optic tunable filter (AOTF); near-infrared (NIR) spectroscopy; principal component analysis (PAC); PLS1 algorithm; puerarin

心通口服液是临床用于治疗冠心病、心绞痛的常用中成药,在《中国药典》2005年版中分别以葛根素、丹参素钠和黄芪甲苷为对照品采用薄层色谱法定性分析,以HPLC法选用葛根素为指标成分进行定量分析,被分析样品需要分别进行化学预处理,操作繁琐。近红外光谱分析技术是一种快速、无损和绿色的分析方法,已开始应用于中药快速分析^[1,2]和化学药生产过程的在线检测^[3,4],近两年来以声光可调滤光器(AOTF)为分光元件的第5代近红外

光谱仪引入国内,并成功用于烟草行业^[5]。本研究采用以声光可调滤光器为分光元件的第5代近红外光谱仪和化学计量学方法,建立了心通口服液定性分析和定量分析校正模型,只需采集一次口服液样品的光谱数据,即可完成心通口服液的定性、定量分析,操作简便快速,为心通口服液在药品流通领域中的快速质量评价和生产过程中的在线质量监控提供了有效的分析方法,同时也为探索其他中成药的快速检测提供了依据。

①收稿日期: 2008-04-11

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2007C144)

作者简介: 王 宁(1957-),女,教授,研究方向为天然药物化学与中药分析。Tel: (0531)86305103 E-mail: sdwxwn@163.com

1 仪器与试药

美国 Brimrose 公司生产的 Luminar 5030 型便携式 AOTF 近红外光谱仪, 仪器波长范围为 1 100 ~ 2 300 nm, 波长增量 2 nm, 扫描次数为 300, 采用 In-GaAs 检测器; 挪威 Camo 公司 The Unscrambler 分析软件; Waters1525 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站。

葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110766-200417); 甲醇、丙酮为色谱纯试剂; 水为超纯水。心通口服液, 共 52 批, 由山东鲁南厚普制药有限公司提供。清开灵口服液、小儿清热止咳口服液、安神补脑液、藿香正气口服液、小儿肺热咳喘口服液、健儿消食口服液、鼻窦炎口服液、脑心舒口服液购自济南药业集团有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 样品准备

2.1.1 校正集与验证集样品: 在定性分析中, 选择 52 个不同批号心通口服液, 40 个样品组成校正集, 12 个样品组成验证集。在定量分析中, 为消除建模样品的含量范围和分布对所建校正模型性能的影响, 除山东鲁南厚普制药有限公司提供的不同批号心通口服液样品以外, 还模拟车间生产条件在实验室制备部分样品以拉大分布范围, 共收集样品 51 批, 将 51 批样品分为校正集和验证集, 其中验证集 5 批均来自山东鲁南厚普制药有限公司。

2.1.2 口服液对照品: 分别由清开灵口服液、小儿

清热止咳口服液、安神补脑液、藿香正气口服液、小儿肺热咳喘口服液、健儿消食口服液、鼻窦炎口服液和脑心舒口服液 8 个品种组成。

2.2 近红外光谱采集及光谱预处理: 使用美国 Brimrose 公司 Luminar 5030 型近红外光谱仪, 通过安装的液体测量专用光纤探头采集样品的光谱数据。准备 180 mm × 18 mm 试管, 清洗干净晾干备用。将 Luminar 5030 近红外光谱仪通电开启, 用专用的网线连接仪器与笔记本电脑, 预热时间为 0.5 h。将液体测量专用探头安装到仪器的手持部分, 探头的光程为 10 mm, 测量方式为透反射测试。测量时, 将口服液样品, 倒入备用的试管中, 将光纤探头插入试管中的液体, 液体要将光纤探头的缺口部分完全覆盖, 轻微晃动探头, 将缺口部分可能存在的气泡消除, 待稳定后, 开始扫描光谱。扫描完成, 将探头取出, 用吸水纸擦拭干净残留液体后, 进行下一个样品的扫描。每一张光谱是 100 次扫描的平均结果, 波长范围 1 100 nm ~ 2 300 nm, 波长增量为 2 nm, 每个样品重复扫描 3 次, 得到原始光谱。

在建立模型前, 首先对扫描得到的原始吸收光谱进行光谱预处理, 以消除噪音和基线漂移的影响。实验采用的预处理方法为一阶导数 9 点平滑法 (savitzky-golay), 经一阶导数处理可以很好地消除样品由于颜色差别引起的光谱基线偏移和漂移。心通口服液和 8 种口服液对照品的原始光谱与一阶微分光谱见图 1。

2.3 建立心通口服液定性分析模型: 在 52 个心通

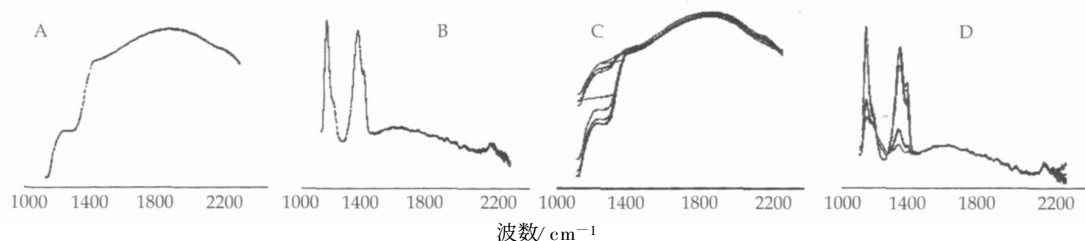


图 1 心通口服液近红外原始光谱(A)、一阶导数光谱(B)和其他 8 种口服液近红外原始光谱(C)、一阶导数光谱(D)图

Fig. 1 NIR Spectra of original (A) and first derivative (B) of Xintong Oral liquid and those of other eight kinds of oral liquids (C and D)

口服液样品中, 随机取出 40 个样品组成校正集 (名称为 XT-C), 用于建立心通口服液 XT-C 定性分析模型, 其余 12 个样品作为验证集 (名称为 XT-V), 用来验证所建立模型的预测能力。将校正集样品光谱经过一阶微分处理后的光谱数据导入 The Unscrambler 分析软件, 然后利用主成分分析对光谱数据进行计算, 建立心通口服液 XT-C 定性分析模型, 40 个校正集样品的 PC1、PC2 主成分空间分

布见图 2。

2.3.1 模型预测方法: 对以主成分分析法建立的心通口服液 XT-C 定性分析模型性能的预测, 可采用以下两种方法, 一是通过计算机 Excel 表格显示的方法, 二是模型区域判别法, 见图 3。如果在 Excel 表中样品编号后面是空白, 说明该样品被检测为不属于 XT-C 模型内样品, 如果样品编号后面有 * 号标记, 说明该样品被检测为属于 XT-C 模型内的样

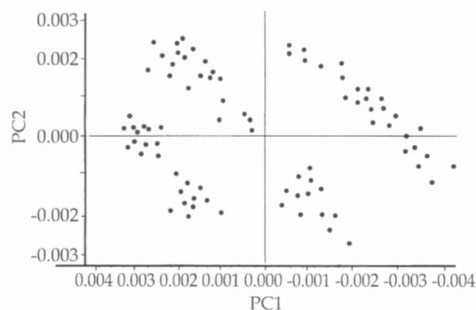


图 2 校正集心通口服液的 PC1、PC2 主成分空间分布图

Fig. 2 Plot of scores for PC1 and PC2 of Xintong Oral Liquid

品; 当 $\text{significance}=5\%$ 时校正集样品形成的 XT-C 模型分布区域图, 如果被检测的样品 X 落在 XT-C 定性分析区域内, 说明被检测的样品属于心通口服液, 反之, 说明被检测的样品与建模样品不相同。

2.3.2 定性分析模型预测已知心通口服液样品: 调用定性分析模型 XT-C, 对 12 个验证集样品进行预测, 结果见图 3。在模型区域图中, 12 个验证集样品 X 均落在 XT-C 模型区域内, 说明被检测的样品与建模样品相同, 被 XT-C 定性分析模型认可, 两种方法都说明被检测的样品属于建模样品, 即是心通口服液。

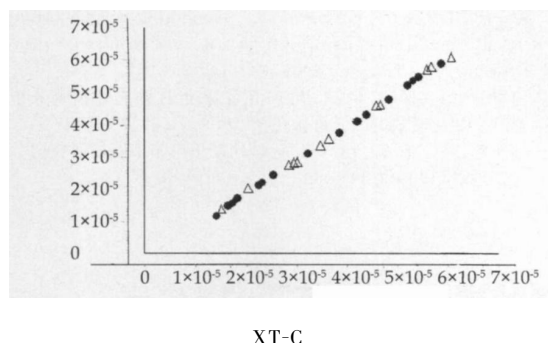


图 3 XT-C 模型预测验证集样品结果

Fig. 3 Predication of XT-C with Xintong Oral Liquid

2.3.3 定性分析模型预测口服液对照品: 调用 XT-C 定性分析模型, 分别对清开灵等 8 种口服液对照品进行预测, 结果见图 4。在模型区域图中, 口服液对照品 X 均没有落在 XT-C 模型区域内, 以上两种方法均说明被检测的样品与建模样品不相同, 被 XT-C 定性分析模型排除, 即不是心通口服液。

2.4 建立心通口服液定量分析模型

2.4.1 HPLC 分析: 将用于定量分析的 51 个样品按《中国药典》2005 年版心通口服液项下测定方法测定样品中葛根素的质量浓度, 每份样品重复测定 3 次, 以平均值作为结果, 测得供试样品中葛根素质

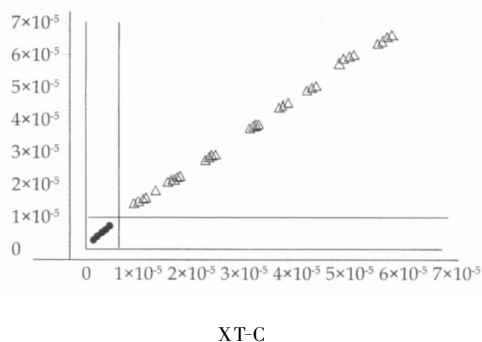


图 4 XT-C 模型预测其他口服液样品结果

Fig. 4 Predication of XT-C with other oral liquids
量浓度为 $2.2 \sim 4.6 \text{ mg/mL}$ 。

2.4.2 建立 PLS1 数学模型: 将经过预处理后的光谱数据与 HPLC 分析数据进行关联, 采用偏最小二乘法 (PLS1), 交叉-验证法 (cross-validation), 用 The Unscrambler 定量分析软件建立定量分析模型。NIR 和 HPLC 测定的异常值分别用光谱影响值 Leverage 和化学值误差 Residual 这两个统计量来检验剔除。经过异常值的剔除进行优化, 得到了较为理想的校正模型, 见图 5。葛根素模型的主成分维数为 5, 该模型的决定系数 $R^2=0.9845$, 内部交叉验证均方差 RMSEP=0.1371。

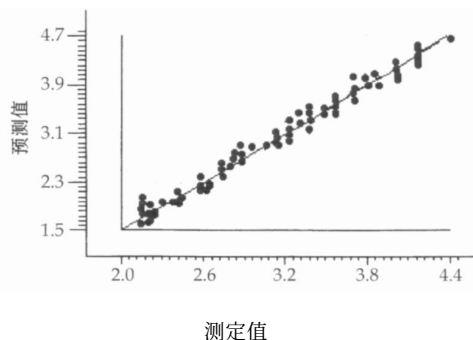


图 5 葛根素预测值与测定值之间的相关图

Fig. 5 Correlation of puerarin between NIR predicted and measured values

2.4.3 检测模型效果: 以 PLS1 建立的葛根素定量分析模型对 5 份外部验证集样品进行分析, 得到样品葛根素的 NIR 光谱预测值与 HPLC 分析值之间相关性良好, 葛根素 NIR 光谱预测值与 HPLC 测定值之间的相关系数 $r^2=0.9956$, 结果见表 1。

2.4.4 精密度试验: 取 1 个预测样品, 重复扫描 20 次, 将所得光谱带入建立的葛根素定量分析模型计算, 以考察方法的精密度, 结果葛根素质量浓度的 RSD 值为 1.98%。

2.4.5 稳定性试验: 取 1 个预测样品, 每 1 h 扫描 1 次, 于 5 h 内重复扫描 5 次, 结果葛根素的 RSD 值

表 1 葛根素校正模型对外部验证集样品的
分析结果($n=5$)

Table 1 Analysis of validation samples
by puerarin model ($n=5$)

编号	预测值/%	化学值/%	相对误差/%	绝对误差/%
001	3.26	3.2	1.87	-0.06
002	3.50	3.4	3.06	-0.10
003	3.86	3.9	1.10	0.04
004	4.14	4.3	3.65	0.16
005	4.18	4.4	4.91	0.22

为 1.193%，说明样品在 5 h 内相对稳定。

2.4.6 预测回收率试验：取 5 个预测样品，分别扫描，将所得光谱带入建立的葛根素定量分析模型中，计算葛根素预测值与 HPLC 测定的真值之间的比值(预测回收率)，结果葛根素的平均预测回收率为 101.9%，RSD 为 1.189%。

3 讨论

主成分分析是一种掌握事物主要矛盾的统计分析方法，它可以从多元事物中解析出主要影响因素，揭示事物的本质，简化复杂问题，进行判别分析^[6]。本实验中以主成分分析法选取 40 个不同批号心通口服液建立的 XT-C 定性分析模型，可对样品心通口服液进行准确的判定，同时，对清开灵等 8 种口服液对照品也能够准确地预测为不属于心通口服液，因此，该模型可用于心通口服液的快速定性分析。

应用近红外光谱技术进行定量分析，关键是在两者之间(采集的光谱数据与标准分析数据)建立一种定量的函数关系(校正模型)，依靠这种关系，就能

从未知样品的光谱中求出样品的成分和量。偏小二乘法(PLS1)是目前在近红外光谱分析中应用最多的多元校正方法，本实验采用 46 个样品以偏小二乘法建立的心通口服液定量分析校正模型，经外部验证集样品验证，葛根素预测值与真值的测定结果趋于一致，方法的精密度、稳定性和预测回收率良好，可满足药物分析的要求。

以 AOTF 作为分光元件的近红外光谱仪具有明显的优越性，它结构简单、重现性好、环境适应性强。本研究中使用美国 BRIMROSE 公司生产的 Luminar 5030 型便携式 AOTF 近红外光谱仪体积小，便于携带，使得测试分析既可在实验室内进行，也可实施现场即时分析。若继续以该类型的近红外光谱仪研究开发其他中药的快速分析方法，将在中药的质量控制方面有更广阔的应用前景。

参考文献：

- [1] 程存归, 李冰凤, 阮永明, 等. 傅立叶变换红外光谱法应用于中药砂仁真伪鉴别的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1355-1358.
- [2] 杨海雷, 刘雪松, 翟海斌, 等. 一种基于近红外的红参药材质量快速评价方法[J]. 中草药, 2005, 36(6): 912-915.
- [3] Sekulic S S, Wakeman J, Doherty P, et al. Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part II. Qualitative approaches to blend evaluation[J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17(8): 1285-1309.
- [4] Blanco M, Bano R G, Bertran E. Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy[J]. Talanta, 2002, 56(1): 203-212.
- [5] 何智慧, 练文柳, 吕名剑, 等. 声光可调近红外光谱技术分析烟草主要化学成分[J]. 分析化学, 2006, 34(5): 702-704.
- [6] 梁逸曾, 龚范, 俞汝勤, 等. 化学计量学用于中医药研究[J]. 化学进展, 1998, 2(11): 208.

固相萃取-高效液相色谱法测定银杏叶提取物中芦丁、槲皮素、山柰酚和异鼠李素

汤道权^{1,2,3}, 张尊建^{1,2}, 高媛媛³, 魏雅芹³, 韩琳³

(1. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009; 3. 徐州医学院 药物分析教研室, 江苏 徐州 221004)

摘要: 目的 建立固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定银杏叶提取物中芦丁、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的方法。方法 采用 Waters Sep-Park-C₁₈ 固相萃取小柱对银杏叶提取物样品进行处理, 流动相: 甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 线性梯度洗脱; 检测波长: 360 nm; 柱温: 40 ℃; 进样量: 20 μL; 体积流量: 1.0 mL/min。结果 芦丁、槲皮素、山柰酚、异鼠李素的定量限分别为 20、6.5、5 mg/mL, 芦丁、槲皮素、山柰酚、异鼠李素分别在 14~198、15~205、3~

①收稿日期: 2008-03-12

基金项目: 江苏省高校自然科学基金资助项目(07KJD360225)

作者简介: 汤道权(1971—), 男, 江苏徐州人, 讲师, 博士, 主要从事中药复方药效物质基础研究。

Tel: (0516)82885628 E-mail: tddq993@163.com

*通讯作者: 张尊建 Tel: (025)83271454 E-mail: zzj@cpu.edu.cn