

近红外光谱法快速测定六味地黄丸中马钱苷

董晓强^{1,5}, 魏惠珍², 饶毅^{2*}, 方少敏³, 邱伟华³, 刘安⁴

1. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000
2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006
3. 江西中医学院, 江西 南昌 330004
4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700
5. 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000

摘要: 目的 利用近红外光谱(NIRS)法快速测定不同厂家浓缩六味地黄丸中马钱苷。方法 利用HPLC法测定六味地黄丸中马钱苷, 运用偏最小二乘法建立NIRS与HPLC测定值之间的多元校正模型。结果 马钱苷定量校正模型的内部交叉验证均方差RMSECV为0.0493, 决定系数 R^2 为96.62, 对预测集进行预测, 预测值与真实值的相关系数 $r^2=97.17$, 预测均方差RMSEP为0.0389, 方法精密度RSD为1.99%, 稳定性RSD为1.13%。结论 NIRS法可准确测定马钱苷, 为中成药的快速、无损定量分析提供了依据。

关键词: 六味地黄丸; 马钱苷; 近红外光谱法; 偏最小二乘法; 多元校正模型

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)08-1543-04

Rapid determination of loganin in Liuwei Dihuang Pills by NIR spectroscopy

DONG Xiao-qiang^{1,5}, WEI Hui-zhen², RAO Yi², FANG Shao-min³, QIU Wei-hua³, LIU An⁴

1. Chengde Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China
2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China
3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
5. Hebei Provincial Engineering Technology Research Center for New Pharmaceutical Excipients in Traditional Chinese Medicine, Chengde, 067000, China

Key words: Liuwei Dihuang Pills; loganin; near-infrared spectroscopy (NIRS); partial least square (PLS); multivariate calibration models

六味地黄方是中医滋补肾阴的经典名方, 由熟地黄、山茱萸、山药、丹皮、茯苓、泽泻6味药组成, 具有调节肾功能、保肝、降血糖、免疫调节等多种生理作用^[1-4]。据市场调查, 浓缩六味地黄丸深受人们喜爱, 现行的质量标准采用HPLC法测定马钱苷的量^[5]。近年来, 近红外光谱(NIRS)技术发展迅速, 引人注目, 尤其是在中药材的鉴别^[6-9]、有效成分定量测定^[10-12]以及中药制剂的质量控制^[13]等方面得到了广泛应用, 具有分析速度快、操作方便、无污染、无破坏性等特点。本实验采用NIRS法对浓缩六味地黄丸中主要活性成分之一马钱苷进

行测定, 旨在探索六味地黄丸的快速、简便、无损定量分析方法。

1 仪器与材料

MPA傅里叶变换近红外光谱仪(德国BRUKER公司, 附带OPUS光谱采集和处理软件); Waters 2695高效液相色谱仪(美国Waters公司); KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

马钱苷对照品(批号111640-200503, 中国药品生物制品检定所)。甲醇、乙腈为色谱纯; 四氢呋喃、磷酸、中性氧化铝为分析纯; Millipore超纯水。

收稿日期: 2010-10-03

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09313-030); 江西省自然科学基金资助项目(0640168)

作者简介: 董晓强(1973—), 男, 河北承德人, 工程师, 主要从事中药研发与生产管理。Tel: (0314)2292042 E-mail: dxqcdjfk@163.com

*通讯作者 饶毅 Tel: (0791)7119609 E-mail: raoyi99@126.com

本实验室从市售药品中收集 13 个厂家的 35 批六味地黄丸(浓缩丸)样品, 厂家分别为河南省宛西制药股份有限公司(批号 090358、090621、090835、091055、091057)、北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(批号 7073590、9071832)、九芝堂股份有限公司(批号 20080245、200908005、200908006、200910019)、兰州佛慈制药股份有限公司(批号 2007319、2009379)、兰州太宝制药有限公司(批号 97080181、97080182)、上海童涵春堂制药有限公司(批号 070404、070405、070406)、江西汇仁药业有限公司(批号 0708012、0708013、0708014、0708015)、江西民济药业有限公司(批号 080101、080102、080103、080104)、修正药业集团通化通药制药股份有限公司(批号 070129、070303)、马鞍山神鹿科瑞药业有限公司(批号 20070916、20090506)、安徽华佗国药厂(批号 20080211、20080212)、南京同仁堂药业有限责任公司(批号 070705、070706)、湖北端药药业有限公司(批号 071201), 规格均为每 8 丸相当于原药材 3 g。

2 方法

2.1 六味地黄丸样品近红外光谱采集

取各厂家六味地黄丸样品 120 粒, 粉碎, 过 100 目筛, 统一装入石英样品瓶中, 垫实, 以金属箔为参比, 采集光谱。测样方式: 积分球漫反射; 扫描范围 $12\ 500\sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$; 分辨率 $8\ \text{cm}^{-1}$; 扫描次数为 64 次; 环境温度 $(20\pm 1)\ ^\circ\text{C}$, 相对湿度 42%。每份样品扫描 2 次, 第 2 次扫描时将粉末倒出, 再装入样品瓶采集第 2 张图谱, 求平均光谱用于建模, 样品的近红外光谱叠加见图 1。

2.2 马钱苷的 HPLC 法测定^[4]

2.2.1 色谱条件 Hypersil ODS₂ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 流动相为四氢呋喃-甲醇-乙腈-0.05%磷酸溶液 (1:4:8:87), 检测波长 236 nm, 体积流量 1 mL/min。理论塔板数以马钱苷计在 4 000 以上。

2.2.2 线性关系考察 精密称取马钱苷对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取该溶液适量, 置 10 mL 量瓶中, 稀释成含马钱苷 12.36 μg/mL 的溶液。精密吸取该对照品溶液 1、5、8、10、15、20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y=20\ 408 X-4\ 127.9$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 12.36~247.2 μg。

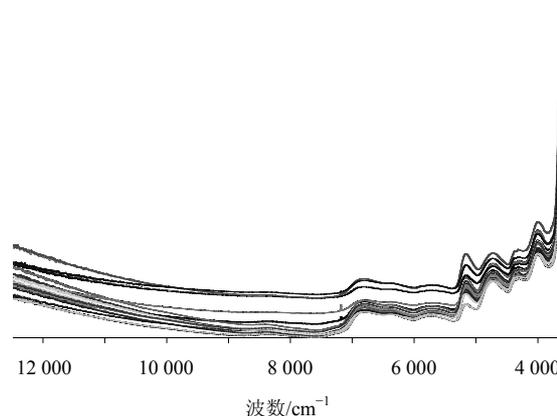


图 1 六味地黄丸的近红外光谱图

Fig. 1 Near infrared spectrum of Liuwei Dihuang Pills

2.2.3 样品测定 取六味地黄丸样品粉末约 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 加在中性氧化铝柱 (100~200 目, 4 g, 内径 1 cm) 上, 用 40%甲醇 50 mL 洗脱, 收集流出液及洗脱液, 蒸干, 残渣用 50%甲醇溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 进行测定, 得样品中马钱苷的质量分数为 0.238 3~1.404 1 mg/g, 符合一定的梯度分布及建模要求。

3 模型建立

将马钱苷的名称、HPLC 测定值输入 OPUS QUANT 定量分析软件包中, 进行数据处理, 采用偏最小二乘 (partial least square, PLS) 回归法建立定量校正模型, 选择其中 27 批样品用于建模, 其余 8 批作为预测集样品。注意所选的建模样品要能涵盖预测样品的质量分数 (0.238 3~1.404 1 mg/g), 即能代表组分的质量分数信息。

3.1 光谱预处理方法的选择

本实验比较了软件中不同的光谱预处理方法, 包括未处理、消除常数偏移量、多元散射校正、一阶导数等, 不同预处理方法对模型效果的影响见表 1。通过比较可知, 采用不同的光谱预处理方法得到的均方差 RMSECV 和相关系数 R^2 有显著差异, 原始光谱就可以很好地反映样品信息, 通过化学计量学可以达到较准确的定量效果。因此, 本实验采用原始光谱进行建模。

表 1 不同光谱预处理方法的建模结果

Table 1 Modeling results by different pretreatment methods

光谱预处理方法	R^2	RMSECV
无光谱预处理	96.62	0.049 3
多元散射校正	86.47	0.098 6
消除常数偏移量	90.27	0.083 6
一阶导数	85.27	0.103 0

3.2 光谱区间的选择

仪器中 OPUS 软件采用 PLS 回归法来进行拟合的, 尽管 PLS 回归方法可容许对全谱信息进行处理, 但建模前对光谱波长区间进行选择的话, 可以避免引入过多的冗余信息, 改善模型性能, 提高计算速度。通过观察图谱, 可知在 $12\ 500\sim 10\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 时, 光谱噪音明显, $3\ 800\sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 存在严重的末端吸收, $10\ 000\sim 3\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 信息量丰富, 所受干扰信息很少, 选定该区间为实验谱区, 通过进一步对光谱范围进行实验、筛选, 选定建模的最佳波段为: $7\ 502.1\sim 5\ 446.2$ 、 $4\ 601.5\sim 4\ 424.1\ \text{cm}^{-1}$, 该波段范围能较好地表现出马钱苷的特征性, 见表 2。

表 2 不同谱区范围的建模结果

Table 2 Modeling results by different spectral regions

光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSECV
$10\ 001.5\sim 3\ 796.5$	85.86	0.101 0
$10\ 001.5\sim 5\ 446.2$ 、 $4\ 601.5\sim 4\ 424.1$	93.85	0.066 5
$7\ 502.1\sim 5\ 446.2$ 、 $4\ 601.5\sim 4\ 424.1$	96.62	0.049 3

3.3 主因子数 (维数) 的选择

在相同波长范围和相同数据预处理方法条件下, 不同维数的选择会对相关系数 R^2 和内部交叉验证均方差 RMSECV 造成直接影响。本实验采用留一交叉验证法得到 RMSECV 值选择维数。从图 2 可以看出, 随着维数的增加, 校正模型性能在逐渐地提高, RMSECV 值不断减小。但是当维数大于 9 时, 会引起模型的过拟合, 模型的性能反而会降低。因此采用软件推荐的维数为 9。

3.4 模型的建立与预测

3.4.1 马钱苷定量模型的建立 用校正样品集进行内部交叉验证, 得到最终优化的模型结果为: 以原始图谱在波长 $7\ 502.1\sim 5\ 446.2\ \text{cm}^{-1}$ 和 $4\ 601.5\sim 4\ 424.1\ \text{cm}^{-1}$ 内, 选定维数为 9, 建立马钱苷的 PLS 定量校正模型, 结果见图 3, 其相关系数 R^2 为 96.62, RMSECV 值为 0.049 3, 线性拟合方程为 $Y=0.957 7$

$X+0.044 5$ 。结果表明六味地黄丸样品光谱与其中马钱苷的量之间存在良好地相关性。

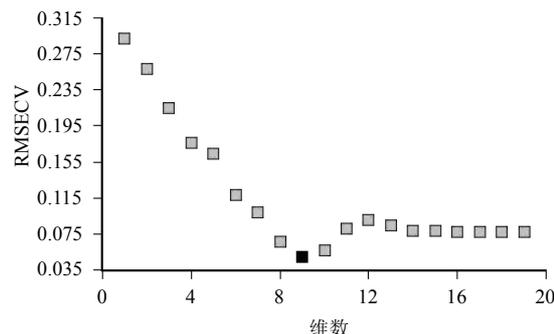


图 2 RMSECV 与维数的关系

Fig. 2 Relationship between RMSECV and dimensions

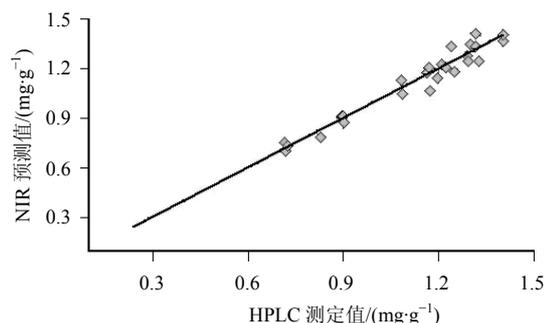


图 3 NIR 预测值与 HPLC 测定值之间的相关图

Fig. 3 Correlation between NIR predictive and HPLC values

3.4.2 精密度试验 取批号 090621 的预测样品, 重复扫描 8 次, 将所得光谱代入建立的马钱苷定量分析模型计算, 以考察方法的精密度, 马钱苷定量测定结果的 RSD 为 1.99%。

3.4.3 稳定性试验 取批号 090621 的预测样品, 每 1 h 扫描 1 次, 于 4 h 内重复扫描 4 次, 马钱苷测定结果的 RSD 为 1.13%。说明样品在 4 h 内相对稳定。

3.4.4 模型的预测 采用上述所建模型对预测集样品进行预测, 结果见表 3。其相关系数 $R^2=97.17$, 预测均方差 RMSEP 为 0.038 9。从分析结果来看, 所有样品的预测值与 HPLC 测定值都很接近, 绝对偏差非常小, 相对偏差除 3 号样品较大外, 其余都在 4% 以内, 平均相对偏差为 -1.33%。可见, 模型的建立较为成功。

4 讨论

由于该实验采集的是六味地黄丸样品的漫反射光信息, 因此在装样前样品粉末必须过筛, 以保证样品粉末的均一性, 同时, 必须保证装样的均匀度、

表 3 NIR 预测结果
Table 3 Results of prediction sets

样 品	HPLC 测定 值/(mg·g ⁻¹)	NIR 预测 值/(mg·g ⁻¹)	偏 差	相对偏差/%
070303	1.219 0	1.297 3	-0.078 3	-6.42
070705	1.213 5	1.218 1	-0.004 6	-0.38
20080245	1.323 7	1.367 1	-0.043 4	-3.28
20070916	0.822 7	0.795 6	0.027 2	3.30
0708012	1.296 0	1.301 5	-0.005 5	-0.42
7073590	1.243 0	1.290 0	-0.047 0	-3.78
090621	1.161 9	1.183 0	-0.021 1	-1.82
090835	1.165 1	1.140 0	0.025 1	2.15

松紧度一致。如果所测厂家的六味地黄丸样品中马钱苷超出建模时校正样品集的范围,只需在模型中加入该厂家的样品,在原有模型的基础上再次优化模型,进一步完善模型,而无需重新用 HPLC 测定所有建模样品的化学量值。

本研究表明,利用近红外光谱法快速测定市售六味地黄丸中有效成分马钱苷的量是可行的。中药成分复杂,分析过程繁杂、费时,近红外光谱能有效测定出中药中指标成分的量,同时还具有无化学试剂污染、费用低、操作简单等优点,不仅为制药企业分析成品、及时发现问题,杜绝不合格产品流入市场提供了有效方法,还为基层现场快速检测提供了一种强有力的手段,对于全国药品抽验、打击假冒伪劣药品等具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘德军. 六味地黄丸现代研究与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [2] 郭 鹏. 六味地黄丸治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. 中国民康医学, 2009, 21(10): 1165.
- [3] 聂孝平. 六味地黄丸的药理作用及临床应用探讨 [J]. 中国实用医药, 2007, 2(34): 125-126.
- [4] 赵 越, 叶宏军, 余 黎, 等. 六味地黄方及其配伍对血小板聚集的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2030-2034.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 余 驰, 姜 红, 刘爱萍. 近红外漫反射光谱法建立厚朴药材的定性模型 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 656-658.
- [7] 王钢力, 聂黎行, 张 继, 等. 应用近红外光谱技术鉴别红参药材 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 438-440.
- [8] 王钢力, 田金改, 聂黎行, 等. 近红外光谱鉴别高丽参的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 277-280.
- [9] 金哲雄, 徐胜艳, 孙素琴. 刺五加不同部位的红外光谱分析与鉴定 [J]. 现代药物与临床, 2008, 23(3): 96-99.
- [10] 白 雁, 王 星, 陈志红, 等. 近红外光谱法测定连翘药材中连翘苷含量 [J]. 中成药, 2009, 31(11): 1755-1759.
- [11] 张爱军, 戴 宁, 赵国磊. 丹参产业化提取中近红外在线检测技术的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 238-240.
- [12] 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.
- [13] 徐晓杰, 宋丽丽, 朱新科, 等. 近红外光谱法用于六味地黄丸粉末混合过程的质量控制研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(7): 644-646.