

黄芪提取过程总皂苷质量浓度的在线监测

李文龙, 瞿海斌*

浙江大学 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: **目的** 利用近红外光谱分析技术对黄芪提取过程进行在线监测, 实时反映药效成分的溶出信息。**方法** 利用远程光纤流通池在线采集黄芪提取过程中提取液的近红外光谱, 同时采集提取液样品, 利用 HPLC-MS 方法测得提取液中黄芪皂苷 II、异黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I 和黄芪甲苷 4 种成分的质量浓度作为对照值, 利用偏最小二乘法建立 4 种成分及黄芪总皂苷的定量分析模型, 将所建黄芪总皂苷定量分析模型用于黄芪提取过程的在线分析, 实时反映提取液中黄芪总皂苷的质量浓度信息。**结果** 黄芪提取液中 4 种皂苷的近红外定量分析模型相关系数分别达到 0.987 6、0.964 0、0.857 1、0.981 6, 黄芪总皂苷定量分析模型的相关系数为 0.993 2, 校正均方差 (RMSEC) 为 5.94, 内部交叉验证的相关系数为 0.976 6, 交叉验证均方差 (RMSECV) 为 11.1。将黄芪总皂苷定量分析模型用于 3 个批次提取过程的在线监测, 能够及时准确地反映提取液中黄芪总皂苷的质量浓度信息。**结论** 利用本实验所建立的方法, 可以实现以黄芪总皂苷为检测指标, 对黄芪提取过程的在线监测, 为黄芪提取过程的终点判断和工艺优化提供参考。

关键词: 近红外光谱; 黄芪; 在线监测; 过程分析技术; HPLC-MS

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1531-05

On-line monitoring of total saponins in extracting process of *Astragali Radix*

LI Wen-long, QU Hai-bin

Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: **Objective** To investigate the effective components dissolution using near-infrared (NIR) spectroscopy for the on-line monitoring of total saponins in the extracting process of *Astragali Radix*. **Methods** The extracts and their NIR spectra were collected using a long-distance fibre-optics flow cell in the extracting process of *Astragali Radix*, and the contents of four compounds, astragaloside II, isoastragaloside II, astragaloside I, and astragaloside IV, were determined as control values with HPLC-MS method. The quantitative analysis models of the above four compounds and total saponins in *Astragali Radix* were established using partial least square method. The established quantitative analysis model of total saponins in *Astragali Radix* was applied to the on-line monitoring in the extracting process of *Astragali Radix* to reveal the concentration of total saponins in the extracting process. **Results** The correlation coefficients of the four compounds reached 0.987 6, 0.964 0, 0.857 1, and 0.981 6, respectively, and 0.993 2 for the total saponins. The root mean square error of calibration (RMSEC) was 5.94, the correlation coefficient of inner cross-validation was 0.976 6, and root mean square error of cross validation (RMSECV) was 11.1. Using the calibration model of the total saponins for the on-line monitoring of *Astragali Radix* extracting process, the dissolving information of the total saponins was obtained synchronously and exactly. **Conclusion** This method is beneficial to the estimating of the end point and the optimizing of the process parameters.

Key words: near-infrared (NIR) spectroscopy; *Astragali Radix*; on-line monitoring; process analytical technology; HPLC-MS

中药生产过程由于缺乏在线检测技术, 无法及时判断生产过程是否正常进行, 造成最终产品质量的不稳定。过程分析技术 (process analytical technology, PAT) 是目前制药工业关注的焦点, 美国食品药品监督管理局将 PAT 定义为“一种用于设计、

分析和控制药品生产过程的方法, 通过及时测量原料、生产过程中的物料和工艺过程的关键质量和性能指标, 实现确保最终产品质量的目的”^[1]。近红外光谱分析技术具有分析时间短, 样品无需预处理且无损耗等优点, 是 PAT 的常用工具之一, 近年来

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 科学技术部“十一五”国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09313-036): 先进适用技术改造传统中药产业的技术平台

作者简介: 李文龙 (1980—), 男, 安徽太和人, 博士研究生, 主要从事中药制药过程分析技术研究。E-mail: wshliwenlong@126.com

*通讯作者 瞿海斌 Tel: (0571)88208428 E-mail: quhb@zju.edu.cn

网络出版时间: 2012-07-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120706.1714.006.html>

在中药品质鉴定和药效成分的定量测定上得到了较多应用^[2-4],但将近红外光谱用于中药工业生产过程在线检测的报道则较少。黄芪药材的主要药效成分为皂苷类化合物,常用的分析方法为 HPLC 法,由于黄芪皂苷类化合物没有共轭结构,仅在低波长端有紫外吸收,易受杂质和溶剂背景吸收的影响,因此常选用蒸发光散射检测器(ELSD)或质谱(MS)作为检测器^[5-6]。本实验对黄芪的提取过程进行研究,建立4种皂苷及其加和值(黄芪总皂苷)质量浓度与近红外光谱之间的相关模型,并将黄芪总皂苷定量分析模型用于黄芪提取过程的在线监测上,即时反映黄芪提取过程中总皂苷的溶出信息,为黄芪提取过程的终点判断和工艺优化提供参考。

1 仪器与材料

Antaris MX FT-NIR (Thermo 公司), 配备 40 m 远程光纤, 流通池 (Series 750, Precision Sensing Devices. Inc.), RESULT 3.0 光谱采集软件和 TQ Analyst 7.2 化学计量学软件。Agilent 1100 LC/MSD (Agilent 公司)。

黄芪药材(批号 071017)购于正大青春宝药业有限公司,经浙江大学药物信息学研究所徐金钟博士鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsio 的干燥根;乙酸、乙腈均为色谱纯;黄芪甲苷对照品(批号 110781-200711)购自中国药品生物制品检定所,黄芪皂苷 II、异黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I 购自上海同田生物技

术有限公司,质量分数>98%。

2 方法与结果

2.1 光谱采集方法

在 3 000 kg 规模的提取罐中,加入 400 kg 黄芪药材和 2 000 kg 纯化水,将料液预热至 95 ℃ 后保温提取 120 min。通过 Antaris MX FT-NIR 在线分析仪器对工厂黄芪提取过程进行监测,仪器参数设置为:分辨率 8 cm⁻¹,扫描次数 32 次,扫描光谱波数:5 000~10 000 cm⁻¹,每分钟采集 1 次光谱。

2.2 HPLC-MS 测定

采集近红外光谱的同时,每隔 10 min 取 1 次样品进行 HPLC-MS 分析。

样品预处理方法:精密吸取 0.5 mL 黄芪提取液,准确加入 0.5 mL 甲醇,旋涡混合 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 5 μL 供 HPLC-MS 分析。

色谱条件:色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.2% 乙酸水溶液(A)-0.2% 醋酸乙腈溶液(B),洗脱方法 1(测定黄芪皂苷 II、异黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I):0~15 min, 50% A, 等度洗脱;洗脱方法 2(测定黄芪甲苷):0~15 min, 65% A, 等度洗脱;体积流量 0.5 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 5 μL。

质谱条件:ESI 源电压 3.5 kV,负离子模式,干燥气(N₂)温度 350 ℃,体积流量 10 L/min,裂解电压 100 V。

该方法的各项方法学考察结果见表 1。

表 1 HPLC-MS 分析黄芪提取液中 4 种化学成分的方法学考察结果

Table 1 Methodological parameters of four saponins in extract solution of *Astragali Radix* with HPLC-MS

化学成分	回归方程	R ²	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)	回收率 (RSD) / %	精密度 RSD / %	重复性 RSD / %	24 h 室温稳定性 RSD / %
黄芪皂苷 II	$Y=2 \times 10^{-6} X-0.423$	0.997 3	1.00~8.00	96.2 (0.95)	3.01	1.03	3.92
异黄芪皂苷 II	$Y=2 \times 10^{-6} X-0.897$	0.994 1	1.00~8.00	80.3 (1.11)	2.28	0.94	4.56
黄芪皂苷 I	$Y=2 \times 10^{-6} X-0.252$	0.999 2	1.00~8.00	78.9 (1.12)	4.15	1.32	4.93
黄芪甲苷	$Y=2 \times 10^{-6} X-0.428$	0.997 5	1.00~10.00	104.0 (1.08)	2.25	1.25	4.89

X-峰面积; Y-质量浓度 (μg·mL⁻¹)

X-peak area; Y-concentration (μg·mL⁻¹)

2.3 光谱预处理方法和建模算法的优化

黄芪提取液中物质复杂,既有药材中的溶出物质,也有难溶的颗粒物质存在,存在着明显的散射效应。消除散射效应最常用的两种方法是多元散射校正(multiplicative scatter correction, MSC)和标准正则变化(standard normal variation, SNV),两种方法都可以有效消除颗粒分布不均匀及颗粒

大小产生的散射影响^[7]。本实验经过比较,确定选用 MSC 方法。近红外光谱测量的是样品振动光谱的 3 级和 4 级倍频吸收,样品背景颜色和其他因素常导致光谱出现明显的位移或漂移,常采用微分处理的方法进行基线校正。其中,一阶导数可以有效地消除光谱平移对测量的影响,二阶导数可消除光谱旋转对测量的影响^[8]。但微分处理在除

去低频基线的时候,还会放大高频的噪声,因此在微分处理前,通常都要进行平滑处理以滤去噪声。常用的平滑方法有平均窗口平滑方法、Savitsky-Golay 平滑方法和 Norris 导数滤波平滑方法等。本实验通过对比,选用 Norris 导数滤波平滑方法,采

用该方法时,应慎重选择段长和段间距,段长不宜大于 13,较为理想的段间距在 4~6 比较合适^[9],本实验选用段长和段间距均为 5。采用 MSC、二阶微分和 Norris 平滑对建模光谱进行预处理前后的光谱图见图 1。

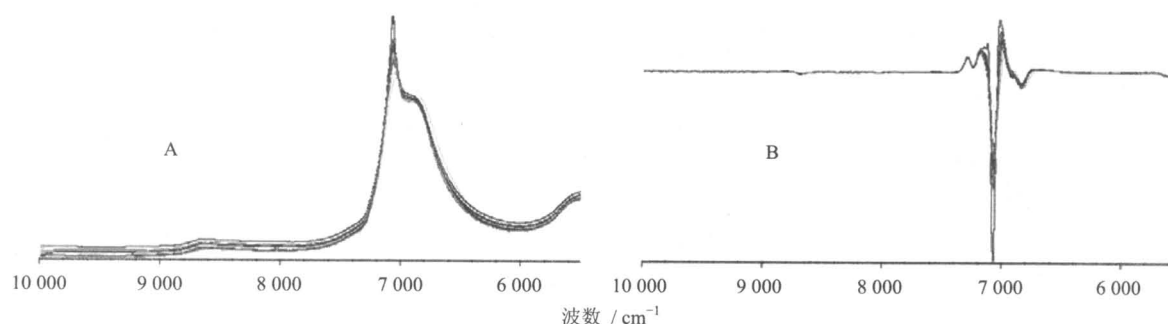


图 1 黄芪提取液近红外透射光谱图 (A) 和经 MSC、二阶微分和 Norris 平滑处理后的光谱图 (B)

Fig. 1 NIR transmission spectra of *Astragali Radix* extract solutions before (A) and after (B) treatment of MSC, second-order differential, and Norris

常用的近红外定量分析模型建立的算法有多元线性回归 (MLR)、主成分回归 (PCR) 和偏最小二乘回归 (PLS) 等。PLS 法是在 MLR 和 PCR 的基础上发展起来的,集二者的基本功能于一体,在一个算法下可以同时实现回归建模、数据简化以及两组变量之间的相关分析,具有模型简单、预测能力强等优点,可以很好地处理变量多、样本少的问题,因而成为近红外光谱定量建模中应用最为广泛的化学计量学算法。本实验比较了 MLR、PCR 和 PLS 3 种算法的建模质量,最终、选用 PLS 算法。

为了避免“过拟合”现象,需要应用交叉验证的方法,选择最佳主因子数。

2.4 4 种成分定量分析模型的建立

对采集到的原始光谱进行必要的平滑和求导等预处理,以达到过滤噪音、提高信噪比、消除基线漂移干扰的目的。本实验采用 MSC、Norris 导数平滑滤波、二阶导数方法对光谱进行预处理。然后分别选择不同波长区间,采用 PLS 法建立各成分的质量浓度与对应光谱的定量分析模型。所建模型的各项性能参数见表 2。

表 2 4 种黄芪皂苷定量分析模型的各项性能参数

Table 2 Parameters of quantitative calibration models for four saponins in *Astragali Radix*

化学成分	相关系数	校正均方差 (RMSEC)	交叉验证均方差 (RMSECV)	主成分数	选用光谱范围 / cm^{-1}
黄芪皂苷 II	0.987 6	7.60×10^{-6}	0.066	4	9 785.19~7 609.50, 6 420.63~5 830.16
异黄芪皂苷 II	0.964 0	2.73	1.260	3	9 785.19~7 609.50, 6 583.79~5 768.04
黄芪皂苷 I	0.857 1	1.50×10^{-6}	5.710	5	9 690.21~7 678.56, 6 361.71~5 791.95
黄芪甲苷	0.981 6	1.11	0.070	4	9 785.19~7 609.50, 6 583.79~6 039.96

2.5 黄芪总皂苷定量分析模型

中药产品成分复杂,其药效是基于各类化合物的协同作用,因此不能以某一成分的量对其进行衡量,文献报道黄芪药材中的主要药效成分为皂苷类化合物^[10],因此本实验选用黄芪总皂苷作为黄芪提取过程的监测指标,对其进行实时在线分析。文献报道黄芪总皂苷的定量方法为比色法,该方法操作

过程复杂,且准确度不高。本实验以量较高的 4 种皂苷类成分的质量浓度加和值作为总皂苷的质量浓度,建立黄芪总皂苷的定量分析模型。经过优选,选择建模光谱区间为 $9\,785.19 \sim 7\,609.50\text{ cm}^{-1}$ 和 $6\,420.63 \sim 5\,830.16\text{ cm}^{-1}$ 两段。采用 MSC、二阶微分和 Norris 平滑对建模光谱进行预处理,采用 PLS 法建立样品光谱与黄芪总皂苷 HPLC-MS 分析值之

间的相关模型,所建立的模型的相关系数达到了0.993 2, RMSEC 为 5.94, 图2为黄芪总皂苷质量浓度的模型预测值与分析值的相关图及残差分布

图。采用留一法对所建模型进行内部交叉验证,结果见图3,内部交叉验证预测值和分析值之间的相关系数为0.976 6, RMSECV 为 11.1。

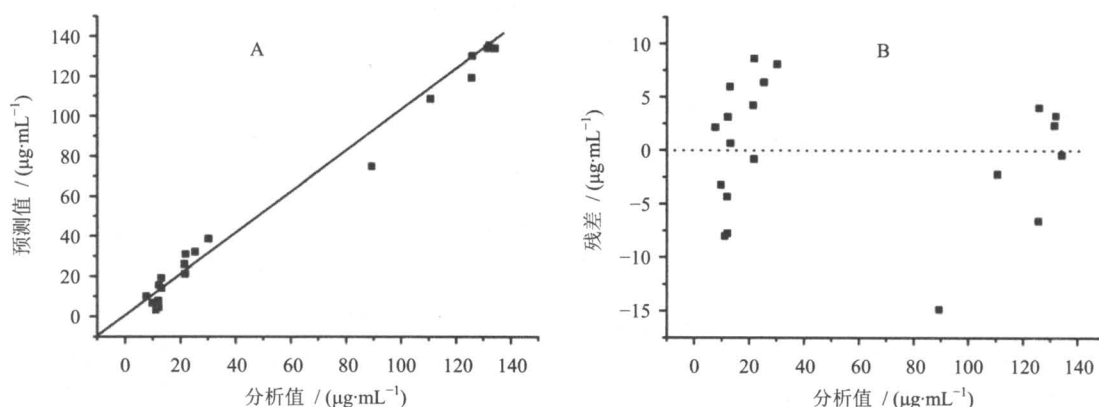


图2 黄芪总皂苷质量浓度的模型预测值与分析值的相关图 (A) 及残差分布图 (B)

Fig. 2 Correlation (A) and residual distribution (B) diagrams of content of total saponins in *Astragali Radix* between model predictive and actual values

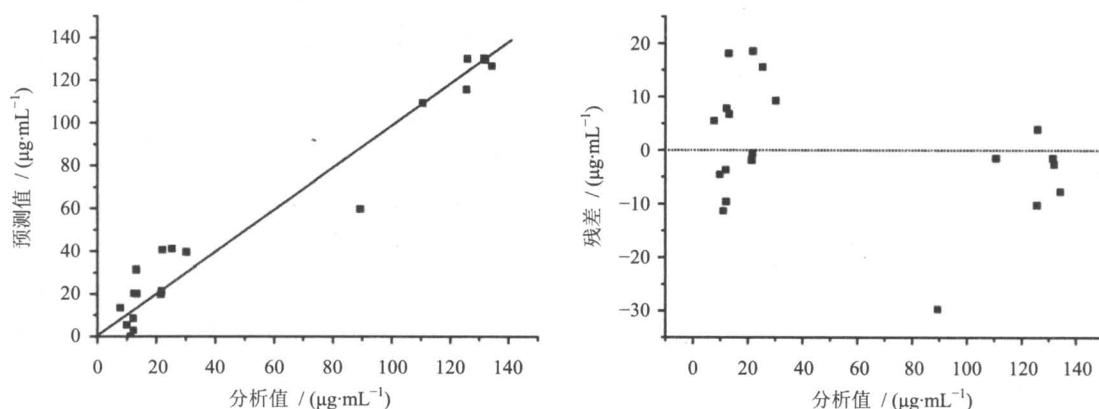


图3 黄芪总皂苷定量分析模型的内部交叉验证结果

Fig. 3 Inner cross-validation results of quantitative analysis model for total saponins in *Astragali Radix*

将所建立的黄芪总皂苷的定量分析模型应用于提取过程的在线监测,每分钟采集1次过程光谱,并根据模型进行定量,实时检测提取过程指标成分的质量浓度变化,直至提取过程结束。本实验共对3个批次的黄芪提取过程进行在线监测,黄芪总皂苷在提取过程中的质量浓度变化趋势见图4。

2.6 在线监测结果分析

目前黄芪提取的工艺是将料液预热至 95 ℃后保温 120 min。由图4中对3个批次黄芪提取过程中黄芪总皂苷质量浓度的在线监测结果可以看出,在提取过程刚开始的前30 min,测定结果起伏较大,原因可能是提取液中总皂苷的质量浓度较低,低于近红外光谱分析的检测限,无法进行准确定量。在30~80 min内,提取液中黄芪总皂苷质量浓度逐渐

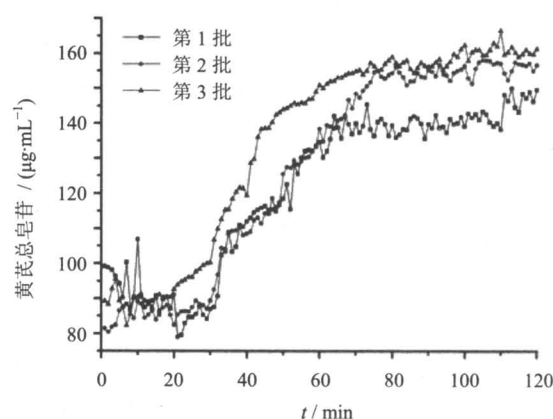


图4 3个批次黄芪提取过程中黄芪总皂苷的质量浓度变化趋势图

Fig. 4 Change tendency of total saponins in extracting processes of three batches of *Astragali Radix*

升高,且升高速率较快,说明黄芪总皂苷主要在这一时间段内溶出。在提取工艺不变的情况下,3个不同批次提取过程之间有所不同,可能是因为在原料间的差异。80~120 min,溶出曲线趋于平缓,基本无趋势性变化,说明总皂苷在固液两相之间已基本达到平衡,无法再溶出,因此,可在溶出曲线开始出现平台时及时停止提取过程,即将目前的提取时间由120 min缩短为80 min,这样既可防止杂质的继续溶出,便于进行后续的浓缩及醇沉操作,又可起到节约能源的目的。

3 讨论

本实验利用远程光纤近红外光谱分析技术对黄芪提取过程进行了在线监测,实现了黄芪总皂苷溶出信息的可视化,得到了3个批次黄芪提取过程的总皂苷溶出曲线,为黄芪提取过程的终点判断和过程优化提供了技术支持,并为其他药材的提取过程研究提供了借鉴。本研究需要进一步优化光谱预处理方法和建模算法,并在不同批次的提取过程中随机取样,对模型进行外部验证,以提高模型的预测能力和稳健性;同时增加监测批次,在数据积累的基础上,找出药效成分溶出信息的统计学规律,从而更好地发挥过程分析在中药材提取过程中的作用,目前相关的研究工作正在进一步开展中。

致谢:本实验室潘坚杨老师、邵青老师协助完成 HPLC-MS 测定工作。

参考文献

- [1] *Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance* [S]. 2004.
- [2] Woo Y A, Kim H J, Ze K R, *et al.* Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of *Angelica Gigantis Radix* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 36(5): 955-959.
- [3] 张金巍, 张延莹, 刘 岩, 等. 近红外光谱法在线质量监控白芍工业化提取 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2459-2461.
- [4] Luo X F, Yu X, Wu X M, *et al.* Rapid determination of *Paoniae Radix* using near infrared spectroscopy [J]. *Microchem J*, 2008, 90(1): 8-12.
- [5] Qi L W, Yu Q T, Li P, *et al.* Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1/2): 162-169.
- [6] Qi L W, Li P, Ren M T, *et al.* Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of *Radix Astragali* and its preparations [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2087-2097.
- [7] 褚小立, 袁洪福, 陆婉珍. 近红外分析中光谱预处理及波长选择方法进展与应用 [J]. *化学进展*, 2004, 16(4): 528-542.
- [8] 赵环环, 严衍禄. 噪声对近红外光谱分析的影响及相应的数学处理方法 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(5): 842-845.
- [9] 王家俊, 梁逸曾, 汪 帆. 偏最小二乘法结合傅里叶变换近红外光谱同时测定卷烟焦油、烟碱和一氧化碳的释放量 [J]. *分析化学*, 2005, 33(6): 793-797.
- [10] Wang H Y, Li J Z, Yu L, *et al.* Antifibrotic effect of the Chinese herbs, *Astragalus mongholicus* and *Angelica sinensis*, in a rat model of chronic paromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Life Sci*, 2004, 74(13): 1645-1658.