

近红外光谱法快速检测黄芪注射液中黄芪甲苷和总固体量

白新涛¹, 霍宝军², 张博², 陈进钱², 黄怀鹏¹

1. 河北国金药业有限责任公司, 河北 邢台 054001

2. 神威药业有限公司, 河北 石家庄 051430

摘要: **目的** 利用近红外透射技术和化学计量学方法对黄芪注射液质量进行快速检测分析。**方法** 用透射光谱采样系统测定样品的近红外透射光谱(NIRS); 定量模型的预处理方法为多元散射校正(MSC)和一阶微分处理, 波数范围为7 127~5 461、5 426~5 075、4 690~4 358 cm⁻¹, 回归方法为偏最小二乘法(PLS)。**结果** 定量模型中黄芪甲苷量和总固体量的最佳主因子数分别为5、10, 内部交叉验证均方差(RMSECV)分别为5.58×10⁻³、2.213, 决定系数(R²)分别为0.972、0.997, 系统精密度RSD分别为1.1%、0.9%, 方法精密度RSD分别为2.1%、1.6%; 外部验证预测均方差(RMSEP)分别为5.83×10⁻³、1.97。**结论** 建立NIRS预测模型对黄芪注射液进行快速测定是可行的, 该法分析快速、简便, 结果准确。

关键词: 近红外透射光谱(NIRS); 化学计量学; 黄芪注射液; 黄芪甲苷; 总固体量

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)11-2189-05

Rapid detection of astragaloside IV and total solids in *Astragali* Injection by NIRS

BAI Xin-tao¹, HUO Bao-jun², ZHANG Bo², CHEN Jin-qian², HUANG Huai-peng¹

1. Hebei Gogin Pharmaceutical Co., Ltd., Xingtai 054001, China

2. Shineway Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China

Key words: near-infrared transmission spectroscopy (NIRS); chemometrics; *Astragali* Injection; astragaloside IV; total solids

中药注射液特点优势主要体现在药效迅速, 作用可靠; 适用于不宜口服给药的药物与患者; 可实现定向或定位给药; 可以穴位注射发挥特有的疗效^[1]。但随着中药注射液的迅速发展, 引起的不良反应也不断增多, 社会各界尤其业内对中药注射液的安全性越加重视。黄芪注射液为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根经提取制成的灭菌水溶液^[2]。其质控标准有鉴别、检查及黄芪甲苷定量测定等多个检验项。为了更有效地控制其质量, 已有生产厂家标准中增加了很多中药注射液的安全检测项, 如总固体量检验项。黄芪甲苷(黄芪苷 IV, astragaloside IV)定量测定需要用高效液相色谱-蒸发光散射联用检测; 总固体量需要水浴蒸干, 再干燥至恒质量。标准方法检测的数据准确, 但存在操作繁复、耗时长、物耗大等缺点。

近红外透射光谱(near-infrared transmission spectroscopy, NIRS)区域为10 000~4 000 cm⁻¹, 其主要光谱信息为C-H、N-H、O-H等含氢基团的倍频及合频吸收, NIRS技术通过测定具有代表性的大量样品建立校正模型, 实现对未知样品的定性或定量分析^[3]。本实验采用近红外透射技术直接测定黄芪注射液中黄芪甲苷量和总固体量, 结合化学计量学中的偏最小二乘法(partial least squares, PLS)建立快速测定黄芪注射液中的黄芪甲苷和总固体量的NIRS方法。该方法具有分析速度快, 可同时分析多种成分, 无污染, 样品不需要特别预处理, 不使用有毒、有害试剂, 不对样品造成损伤, 可实时分析和远距离测定, 操作简单, 分析成本低等优点^[4]。

1 仪器与材料

美国 Thermo Fisher Scientific 公司的 Antaris II FI-NIR Analyzer 近红外光谱仪, 配有透射采样系统,

收稿日期: 2012-06-27

作者简介: 白新涛(1978—), 男, 河北石家庄人, 工程师, 主要从事中药制剂的质量标准研究工作和质量控制工作。

Tel: (0319)5911663 E-mail: baixintao@163.com

网络出版时间: 2012-10-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121019.1029.001.html>

Result 操作软件, TQ Analyst 8 建模分析软件; 赛多利斯 CP225D 电子天平; 科伟 HH—2 型电热恒温水浴锅; 天津泰斯特实验设备有限公司 101—1AB 型电热鼓风干燥箱; 岛津 LC—20AD 高效液相色谱仪

与 ALLtech ELSD2000ES 蒸发光散射检测器联用。

黄芪甲苷对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号 100781-200613; 黄芪注射液由石家庄平安医院提供, 88 批样品批号见表 1。

表 1 黄芪注射液样品批号

Table 1 Batch numbers of Astragali Injection

序号	样品批号										
1	11021642	16	11042341	31	11062241	46	11112931	61	11051041	76	11070742
2	11021742	17	11042541	32	11062642	47	11120431	62	11051341	77	11070841
3	11022541	18	11042742	33	11080842	48	11120732	63	11051441	78	11070842
4	11022842	19	11042942	34	11081141	49	11031041	64	11051841	79	11080641
5	11030142	20	11050141	35	11081241	50	11031042	65	11051942	80	11080642
6	11030442	21	11050241	36	11081641	51	11031342	66	11052442	81	11080841
7	11030642	22	11060141	37	11081642	52	11031442	67	11052542	82	11090231
8	11030742	23	11060241	38	11081741	53	11032341	68	11052841	83	11090232
9	11030941	24	11060841	39	11081742	54	11032441	69	11052941	84	11090531
10	11030942	25	11061141	40	11082141	55	11032541	70	11053042	85	11090631
11	11040542	26	11061241	41	11082142	56	11032641	71	11062841	86	11101141
12	11040941	27	11061341	42	11083131	57	11040141	72	11062941	87	11101241
13	11041141	28	11061741	43	11083132	58	11040142	73	11070441	88	11112131
14	11041641	29	11061842	44	11120733	59	11040541	74	11070442		
15	11042041	30	11061942	45	11112132	60	11050841	75	11070741		

2 方法与结果

2.1 总固体量的测定

精密量取本品 10 mL, 置已于 105 °C 干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105 °C 干燥 3 h, 移至干燥器中冷却 30 min, 迅速称定质量, 计算总固体量, 88 份样品中, 最大值为 95.4 mg/mL, 最小值为 61.5 mg/mL。

2.2 黄芪甲苷的测定^[2]

精密量取本品 25 mL 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL, 作为供试品溶液; 精密称取黄芪甲苷对照品 10.26 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释, 定容, 摇匀; 分别精密吸取对照品溶液 8、12、16 μ L, 供试品溶液 10 μ L, 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以甲醇-水 (75:25) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 蒸发光散射检测器检测, 将进样量 (μ g) 及对应的峰面积均取常用对数后, 在对照品同法做的回归曲线上读出样品质量浓度, 计算质量分数。

由于此法为国家标准方法, 故仅对此方法进行方法学确认, 分别精密吸取对照品溶液 2、4、8、12、

16、20 μ L, 对照品进样量为 2.052~20.52 μ g, 以对照品进样量 (μ g) 的常用对数为横坐标 (X), 峰面积的常用对数为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=1.5134X+9.6140$, $r=0.9983$; 将质量浓度为 0.21 mg/mL 的样品 (批号 11031041) 取 6 份, 各取 10 mL, 分别加入对照品 2 mg, 混匀, 依法测定, 计算得黄芪甲苷的平均回收率为 98.4%, RSD 为 1.4%; 将同一批样品检测 6 次的重复性 RSD 为 1.8%, 双人双机双柱的中间精密度 RSD 为 2.2%。

依法检测 88 批样品, 最大值为 0.24 mg/mL, 最小值为 0.17 mg/mL; 对照品、样品色谱图见图 1。

2.3 光谱扫描方法

光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 测量范围 10 000~4 000 cm^{-1} , 采用内置参比, 扫描信号累加 64 次, 数据格式为 $\log(1/R)$, 1 倍增益, 样品直接注入光程为 2 mm 的石英比色皿中进行测定。图 2-A 为 48 批样品的 NIRS 光谱图。

2.4 校正模型的建立

校正模型数据需要足够大的样本, 本实验选用序号为 1~48 的黄芪注射液样品合计 48 批样品作为

校正集样品。图谱预处理选择一阶导数处理，可以有效地消除样品由于颜色差别引起的基线飘移、强化谱带特征、克服谱带重叠^[5]。图 2-B 为 48 批校正集黄芪注射液样品的一阶导数图谱。

光谱范围在 10 000~4 000 cm^{-1} 反映黄芪注射

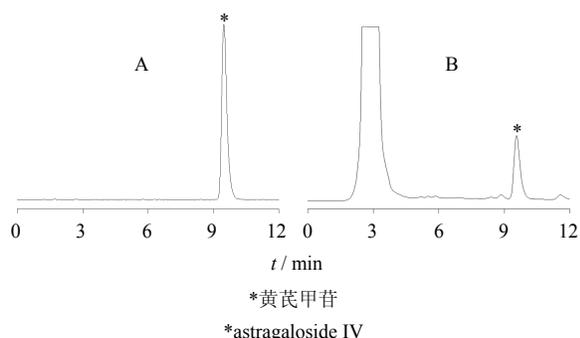


图 1 黄芪甲苷对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of astragaloside IV reference substance (A) and samples (B)

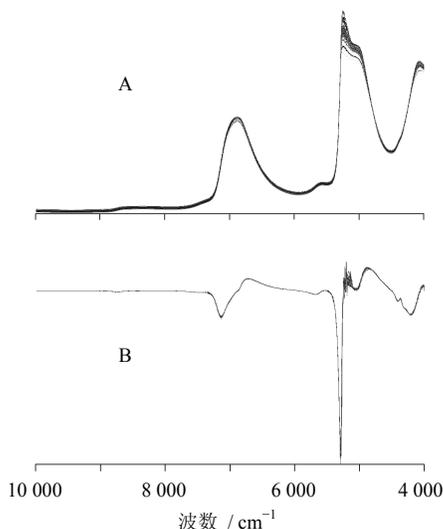


图 2 黄芪注射液的 NIRS (A) 和一阶导数 (B) 光谱图

Fig. 2 Spectra of NIRS (A) and first derivative (B) of *Astragali* Injection

液的整体性质，但以决定系数 (R^2) 判断其对黄芪甲苷定量回归不佳；选择软件自动计算的最佳相关区域 4 086~4 377、5 769~5 154、7 954~5 977 cm^{-1} 进行预测，结果也不理想；手动调整光谱范围为 4 690~4 358、5 426~5 075、7 127~5 461 cm^{-1} 时，总固体量和黄芪甲苷量的 R^2 最佳，故最佳光谱范围选择为 4 690~4 358、5 426~5 075、7 127~5 461 cm^{-1} ，结果见表 2。

校正方法采用多元散射校正 (MSC) 进行预处理，将 48 批校正集黄芪注射液样品的光谱数据与其黄芪甲苷量和总固体量的实测值进行 PLS 回归，均值中心化处理，采用交叉验证得到内部交叉验证均方差 (RMSECV) (表 2)，并建立校正模型。其中黄芪甲苷量主因子数为 5、总固体量主因子数为 10 (表 2)；最佳主因子数采用交互验证法所得的 RMSECV 确定 (表 2)，见图 3。

2.5 NIRS 法检测的系统精密度与方法精密度

从验证集样品中选择批号为 11031041 的黄芪注射液样品，测定 6 次 NIRS，用所建模型预测其黄芪甲苷量和总固体量值，测得系统精密度 RSD 分别为 1.1%、0.9%；随机取 6 支此批样品，分别测定其 NIRS，得方法精密度 RSD 分别为 2.1%、1.6%。

2.6 验证集样本预测

另取序号为 49~88 的 40 批黄芪注射液样品作为验证集样品，用建立的校正模型对验证集黄芪注射液样品进行预测，预测结果与传统方法测定结果汇总情况见表 3。用上述校正模型预测结果与黄芪甲苷量传统方法测定结果相对偏差的绝对值最大为 2.86%，最小为 0；与总固体量传统方法测定结果相对偏差的绝对值最大为 3.53%，最小为 0.07%。

预测结果与标准方法所得结果的对应关系见图 4，可见两种方法的分析结果具有良好的相关性；

表 2 选择不同光谱范围对参数的影响

Table 2 Effects of various spectral ranges on parameters

谱区范围 / cm^{-1}	项目	主因子数	预测残差平方和 (PRESS)	RMSECV	R^2	校正集均方差 (RMSEC)
10 000~4 000	黄芪甲苷量	3	1.61×10^{-3}	5.79×10^{-3}	0.924	4.79×10^{-3}
	总固体量	9	134.80	1.676	0.999	0.365
4 086~4 377、5 769~5 154、7 954~5 977	黄芪甲苷量	3	1.83×10^{-3}	6.18×10^{-3}	0.907	5.27×10^{-3}
	总固体量	8	254.15	2.301	0.993	0.962
4 690~4 358、5 426~5 075、7 127~5 461	黄芪甲苷量	5	1.50×10^{-3}	5.58×10^{-3}	0.972	3.28×10^{-3}
	总固体量	10	234.98	2.213	0.997	0.717

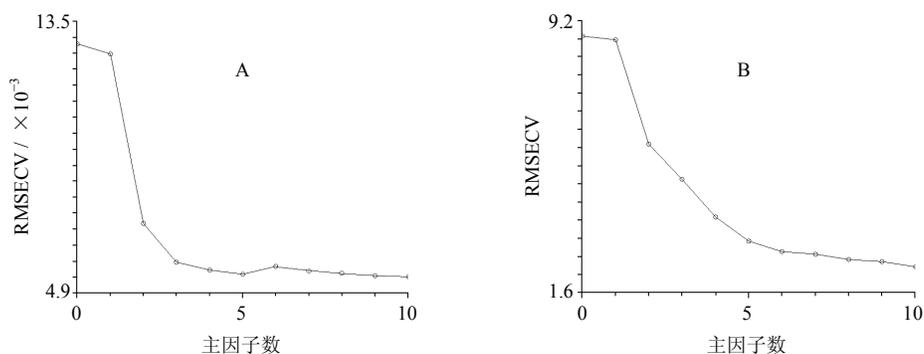


图 3 黄芪甲苷量 (A) 和总固体量 (B) 的 RMSECV 随主因子数的变化

Fig. 3 RMSECV value changes of astragaloside IV (A) and total solids (B) with number of main factors

表 3 校正模型中黄芪甲苷量和总固体量的实测值与 NIRS 预测值的比较

Table 3 Comparison between actual and predicted values of astragaloside IV and total solids content in calibration model

序号	黄芪甲苷			总固体量			序号	黄芪甲苷			总固体量		
	实测值 / (mg·mL ⁻¹)	预测值 / (mg·mL ⁻¹)	相对误差 / 差 / %	实测值 / (mg·mL ⁻¹)	预测值 / (mg·mL ⁻¹)	相对误差 / 差 / %		实测值 / (mg·mL ⁻¹)	预测值 / (mg·mL ⁻¹)	相对误差 / 差 / %	实测值 / (mg·mL ⁻¹)	预测值 / (mg·mL ⁻¹)	相对误差 / 差 / %
49	0.21	0.22	2.33	67.9	69.6	1.24	69	0.21	0.21	0.00	71.6	76.2	3.11
50	0.22	0.21	-2.33	76.8	77.3	0.32	70	0.20	0.21	2.44	82.7	81.4	-0.79
51	0.21	0.22	2.33	61.5	66.0	3.53	71	0.21	0.21	0.00	81.6	82.6	0.61
52	0.21	0.21	0.00	95.2	95.6	0.21	72	0.22	0.22	0.00	70.0	68.6	-1.01
53	0.23	0.22	-2.22	68.7	68.4	-0.22	73	0.22	0.23	2.22	70.3	70.8	0.35
54	0.23	0.22	-2.22	68.7	69.2	0.36	74	0.23	0.23	0.00	61.7	58.8	-2.41
55	0.22	0.22	0.00	81.4	84.3	1.75	75	0.17	0.18	2.86	92.6	95.5	1.54
56	0.23	0.23	0.00	62.9	62.0	-0.72	76	0.22	0.22	0.00	66.3	66.8	0.38
57	0.23	0.24	2.13	70.4	69.4	-0.72	77	0.23	0.22	-2.22	66.3	65.7	-0.45
58	0.23	0.24	2.13	70.4	69.8	-0.43	78	0.21	0.21	0.00	76.6	73.9	-1.79
59	0.23	0.23	0.00	69.6	68.9	-0.51	79	0.22	0.22	0.00	64.5	66.7	1.68
60	0.23	0.22	-2.22	69.6	67.2	-1.75	80	0.22	0.22	0.00	64.5	67.1	1.98
61	0.21	0.22	2.33	81.4	80.6	-0.49	81	0.20	0.20	0.00	82.0	83.1	0.67
62	0.21	0.22	2.33	81.4	81.8	0.25	82	0.22	0.22	0.00	72.5	71.1	-0.97
63	0.22	0.22	0.00	83.3	82.2	-0.66	83	0.22	0.22	0.00	72.5	72.6	0.07
64	0.22	0.22	0.00	79.0	78.3	-0.45	84	0.21	0.21	0.00	72.9	74.8	1.29
65	0.22	0.22	0.00	79.0	76.9	-1.35	85	0.21	0.21	0.00	73.0	72.8	-0.14
66	0.20	0.21	2.44	89.6	86.5	-1.76	86	0.21	0.22	2.33	73.0	72.9	-0.07
67	0.20	0.19	-2.56	93.5	94.0	0.27	87	0.21	0.20	-2.44	81.4	79.7	-1.06
68	0.19	0.19	0.00	93.5	91.4	-1.14	88	0.20	0.20	0.00	72.3	75.4	2.10

黄芪甲苷量的外部验证预测均方差 (RMSEP) 为 5.83×10^{-3} 、总固体量的 RMSEP 为 1.97。可见, 应用所选校正数学模型将 NIRS 用于快速测定黄芪注射液的质量, 预测结果准确, 可用于进一步分析。

3 讨论

本实验采用透射法测定样品的 NIRS, 定量模型的预处理方法为多元散射校正 (MSC) 和一阶微分

处理, 选择波数范围为 4 690~4 358、5 426~5 075、7 127~5 461 cm^{-1} , 回归方法为 PLS。定量模型中黄芪甲苷量和总固体量数据如下: 最佳主因子数分别为 5、10, RMSECV 分别为 5.58×10^{-3} 、2.213, R^2 分别为 0.972、0.997, RMSEP 分别为 5.83×10^{-3} 、1.97, 系统精密度的 RSD 分别为 1.1%、0.9%, 方法精密度的 RSD 为 2.1%、1.6%。方法方便快捷, 系统

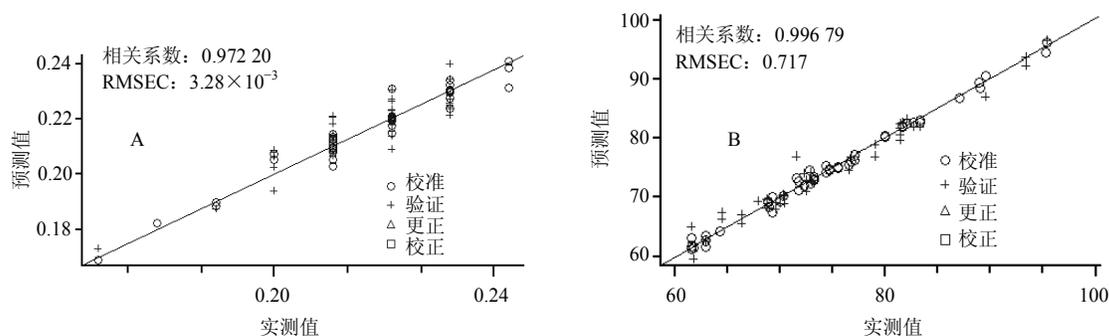


图 4 黄芪甲苷量 (A) 和总固体量 (B) 的实测值与 NIRS 预测值的相关图

Fig. 4 Correllogram of actual value and NIRS predicted value of astragaloside IV content (A) and total solids (B)

精密度和方法精密度良好, 显示出良好的实用价值。

NIRS 定量分析模型的建立对校正集样品中黄芪甲苷量和总固体量数值的分布范围有一定的要求, 本实验采用了广范围、长时间的收集样本, 扩大了校正集样品定量参数的分布范围, 取得了良好效果。上述研究表明, 根据 PLS 回归方法建立预测模型, 使用 NIRS 透射技术对黄芪注射液的黄芪甲苷量和总固体量进行测定是可行的, 而且结果令人满意, 同其他方法相比, 速度快捷、简便且不对样品进行破坏。

本实验仅对黄芪注射液中黄芪甲苷量和总固体量做了近红外光谱分析, 可以看出, 近红外光谱分析手段具有简便、快捷及不破坏性。笔者认为将近红外检测法运用于鉴别、杂质、定量等的检测, 可以提高检验效率; 而且由于其不对样品破坏即可得到样品的性质数据, 进而可以应用于药品生产的在

线检测, 以提高药品检验效率和生产质量, 对生产进行实时监测^[4], 以指导生产。

参考文献

- [1] 陈建波, 郁露, 孙素琴. 现代红外光谱技术用于参类中药注射剂的宏观质量分析 [A]. 中国光学会, 中国化学学会. 第十四届全国分子光谱学术会议论文集 [C]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [2] 国家药品监督管理局药品注册司. 国家药品监督管理局国家药品标准修订批件 (2001ZFBO171) [S]. 2002.
- [3] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术 [M]. 北京: 中国石化出版社, 2007.
- [4] 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.
- [5] 王宁, 蔡绍松, 魏红, 等. 声光可调近红外光谱技术快速分析复方丹参片中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的新方法 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 261-264.