

近红外光谱技术用于六味地黄丸浓缩液质量的快速评价

常静*, 马明, 孙达

无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡

收稿日期: 2022年11月1日; 录用日期: 2022年11月11日; 发布日期: 2023年2月16日

摘要

目的: 采用近红外光谱技术对六味地黄丸浓缩液中马钱苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的含量建立一种快速无损检测方法。方法: 利用近红外光谱仪对六味地黄丸浓缩液样品进行扫描, 对其光谱进行预处理和波段选择, 并通过偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)建立马钱苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷含量快速无损检测方法。结果: 所建模型的决定系数 R 分别为0.9921、0.9941、0.9927, RMSEP分别为0.0534、0.0491、0.0241, 表明实验建立的近红外定量模型性能较好, 且模型预测的样品值与其实际理化值无显著差异($P > 0.05$)。结论: 本实验所建立的近红外定量模型能够较好地六味地黄丸浓缩液中马钱苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的含量进行检测, 表明近红外光谱技术适用于六味地黄丸浓缩液的快速无损检测。

关键词

六味地黄丸, 浓缩液, 马钱苷, 芍药苷, 苯甲酰芍药苷, 近红外光谱技术, 偏最小二乘法

Rapid Quality Evaluation of the Concentrated Liquid of Liuwei Dihuang Pills by Near-Infrared Spectroscopy

Jing Chang*, Ming Ma, Da Sun

Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi Jiangsu

Received: Nov. 1st, 2022; accepted: Nov. 11th, 2022; published: Feb. 16th, 2023

Abstract

Objective: A rapid and nondestructive testing method of the contents of loganin, paeoniflorin and

*通讯作者。

benzoyl paeoniflorin in the concentrated liquid of Liuwei Dihuang pills was established by the near-infrared spectroscopy. **Methods:** The sample of the concentrated liquid of Liuwei Dihuang pills was scanned by near-infrared spectrometer, its spectrum was preprocessed and band selection was carried out. Combined with Partial Least Squares (PLS) method, a rapid nondestructive testing method for the content of loganin, paeoniflorin and benzoyl paeoniflorin was established. **Results:** The determination coefficients R of the established model were 0.9921, 0.9941, 0.9927, and RMSEP were 0.0534, 0.0491, 0.0241, respectively, indicating that the NIR quantitative model established in the experiment had a good performance, and there was no significant difference between the sample values predicted by the model and the actual physical and chemical values ($P > 0.05$). **Conclusion:** The near-infrared quantitative model established in this experiment can be used to detect the contents of loganin, paeoniflorin and benzoyl paeoniflorin in the concentrated liquid of Liuwei Dihuang pills, indicating that the near-infrared spectroscopy technology is suitable for rapid and non-destructive testing of the concentrated liquid of Liuwei Dihuang pills.

Keywords

Liuwei Dihuang Pills, Concentrated Liquid, Loganin, Paeoniflorin, Benzoyl Paeoniflorin, Near-Infrared Spectroscopy, Partial Least Squares Method

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

六味地黄丸是众所熟知的一味中药名方，钱乙撰写的《小儿药证直诀》最早讲述这一药方，主要以熟地黄、山茱萸、牡丹皮等药材提取浓缩制得[1] [2]，它的作用主要表现在抗衰老、治疗骨质疏松、老年痴呆等方面[3] [4]。六味地黄丸在现代制剂工艺的基础上改剂制成，通过煎煮、提取、浓缩、干燥等过程形成制剂[5]，为了保证药品质量，工艺过程中的每一环节的质量检测都至关重要，这对最终成品质量有较大的影响。传统的定量检测主要以液相为主，不但预处理繁琐、耗时长，数据的检测也具有滞后性，难以对药品质量进行及时和大批量检测[6]。

近年来，在中药生产过程实现在线检测和质量控制的过程中，近红外光谱分析技术迅猛发展，其能够实现生产工段的实时监测，还具有无损、快速检测优点[7] [8]。本实验以六味地黄丸浓缩液为实验样品，通过对六味地黄丸浓缩液进行近红外光谱采集，利用偏最小二乘法算法对其光谱和理化值建立相应的定量模型，从而预测六味地黄丸浓缩液的有效成分含量，旨在探究实现六味地黄丸浓缩液质量的快速无损检测方法。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

样品：六味地黄丸浓缩液(实验室根据药典制作)。

仪器：高效液相色谱仪(Agilent 1260)；分析柱(ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm)；傅里叶变换近红外光谱仪(ANTARIS II, Thermo Scientific 公司)；万分之一天平(METTLER TOLEDO AL204)；超声波清洗器(KQ-250B 型, 昆山市超声仪器有限公司)；高速离心机(H1650-W, 长沙湘仪离心机仪器有限公司)；电子天平(梅特勒 XS105DU, 瑞士 Mettler Toledo 公司)。

试剂：甲醇，分析纯；水，超纯水；马钱苷对照品(纯度大于 99%)，上海融禾医药科技发展有限公

司；芍药苷对照品(纯度大于 98%)和苯甲酰芍药苷(纯度大于 99%)，成都曼斯特生物科技有限公司。

2.2. 近红外漫反射光谱采集

本次实验一共取样 9 批，九个批次共计样本数 264 个。光谱采集条件为：浓缩液温度为 75℃，分辨率选择 8 cm⁻¹，扫描次数选择 32 次，扫描范围为 4000 cm⁻¹~10,000 cm⁻¹。

2.3. 六味地黄丸浓缩液中理化指标含量测定

2.3.1. 色谱条件

本实验使用的色谱柱为 ZORBAX SB-C18 分析柱(4.6 × 250 mm, 5 μm)；检测波长是 0 min~30 min: 240 nm, 30 min~60 min: 274 nm；流速选择 1 mL·min⁻¹；进样量选择 10 μL；柱温为 30℃；流动相是乙腈(B) - 水(A)，梯度洗脱程序见表 1。

Table 1. Gradient elution procedures
表 1. 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	95	5
27	86	14
35	86	14
60	40	60
60.1	10	90

2.3.2. 对照品溶液制备

分别取马钱苷对照品、芍药苷对照品和苯甲酰芍药苷对照品约 4 mg，均放置于三个 10 mL 容量瓶中，再分别向三个容量瓶中加入 2、1 和 2 mL 上述对照品标准液，最后用 50% 甲醇定容，摇匀即可。

2.3.3. 供试品溶液制备

将每一批次的浓缩液样品按取样时间分为两组(组 1 为收膏浓缩前样品，组 2 为收膏浓缩后样本)，组 1 称取药液约 1 g 于 10 mL 量瓶中，组 2 称取药液约 1 g 于 25 mL 量瓶，并用 50% 甲醇稀释置刻度，之后将其放置于离心机上以 10,000 r·min⁻¹ 的转速离心 10 min，取得的离心液用 0.45 μm 滤膜过滤，即得。

2.4. 数据处理与模型性能评价

本实验对采集到的六味地黄丸浓缩液样本光谱的处理和建模分析均是采用 Thermo Fisher 公司的 TQ 软件。首先利用 TQ 软件对采集到的近红外光谱进行异常点的剔除，之后再对光谱进行一定的预处理，这些操作能够降低外界的不良信息对模型的干扰以及消除仪器背景或者漂移对信号的影响，从而降低其他因素对模型的影响，提升模型的精度，使模型具有良好的稳健性。

先根据留一交互验证法中的交互验证误差均方根(RMSECV)来选择最适的模型主因子数，然后通过偏最小二乘法建立六味地黄丸浓缩液的定量模型。其中，评价模型的参数主要包括相关系数 *R*、模型的校正集预测误差均方根(RMSEC)、验证集预测误差均方根(RMSEP)、验证集相对偏差(RSEP)等，通过观察相关系数 *R* 是否越接近 1、RMSEC 和 RMSEP 是否越小越接近等指标来判断所建立模型的性能。

3. 结果与讨论

3.1. 六味地黄丸浓缩液中有效成分含量测定结果

9 个批次六味地黄丸浓缩液样本的测定结果见表 2，结果显示，马钱苷含量为 0.126 mg·g⁻¹~1.147

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 42.6%; 芍药苷含量为 $0.106\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\sim 2.035\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 52.2%; 苯甲酰芍药苷含量为 $0.104\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\sim 1.064\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 48.2%。可见, 3 个关键质控指标在浓缩过程中均有较大的变化。

Table 2. Content variation range of three quality control indexes

表 2. 三个质控指标的含量变化范围

	马钱苷(mg/g)	芍药苷(mg/g)	苯甲酰芍药苷(mg/g)
含量范围	0.126~1.147	0.106~2.035	0.104~1.064
RSD%	42.6%	52.2%	48.2%

3.2. 六味地黄丸浓缩液的光谱采集

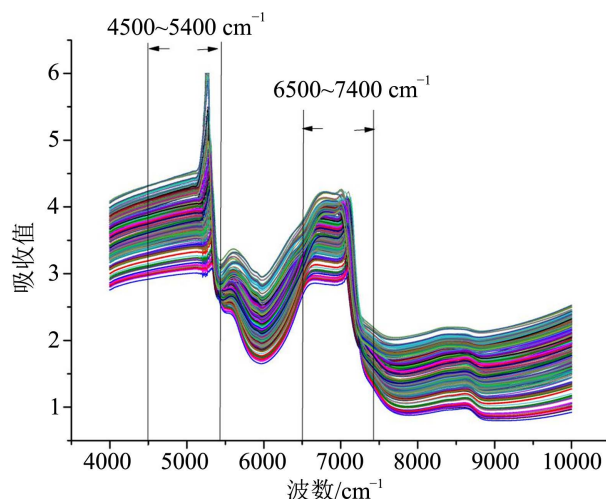


Figure 1. Near-infrared spectroscopy diagram of the concentrated liquid of Liuwei Dihuang pills
图 1. 六味地黄丸浓缩液近红外光谱图

9 批六味地黄丸浓缩液样本的近红外光谱图见图 1 所示, 从光谱图中可以看出, 六味地黄丸浓缩液中主要的溶剂为纯水, 因此近红外 $4500\text{ cm}^{-1}\sim 5400\text{ cm}^{-1}$ 和 $6500\text{ cm}^{-1}\sim 7400\text{ cm}^{-1}$ 区间形成两大水吸收峰。

3.3. 光谱预处理

近红外原始光谱图在 $4500\text{ cm}^{-1}\sim 5400\text{ cm}^{-1}$ 和 $6500\text{ cm}^{-1}\sim 7400\text{ cm}^{-1}$ 区间形成两大水吸收峰, 因此其它物质在这 2 个波段内的倍频与合频吸收较弱, 故马钱苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷建模时排除这两个波段。在对光谱进行波段选择和异常点剔除后, 还需要对六味地黄丸浓缩液的光谱进行一定的预处理操作, 常用的预处理方法包括消除常数偏移量、矢量归一化、多元散射校正、一阶和二阶导数等, 本实验采用 TQ 软件分别采用不同预处理方法对光谱进行相应处理, 对比不太预处理方法对六味地黄丸浓缩液的有效成分含量模型的影响。各个模型最终采用的波段和预处理方法见表 3。

Table 3. Pretreatment methods and band selection results of quantitative analysis models for different index components
表 3. 不同指标成分定量分析模型的预处理方式及波段选择结果

质控指标	建模波段/ cm^{-1}	预处理方法
马钱苷	5400~6120	一阶导数 + S-G 平滑
芍药苷	5450~6100	二阶导数 + Norris 平滑
苯甲酰芍药苷	5450~6100	二阶导数 + Norris 平滑

3.4. 定量模型的建立

模型建立前, 首先要对光谱进行筛选和优化, 主要包括剔除异常光谱、光谱预处理和波段选择等方法, 9 批浓缩液随机选择 1 批作为验证集, 其余 8 批作为校正集应用 TQ Analyst 数据分析软件进行分析。经过以上光谱预处理、异常点判断和建模波段的选择后, 先以留一交叉验证法中的交互验证误差均方根 (RMSECV) 为指标, 选择最适的模型主因子数, 建立六味地黄丸浓缩过程中偏最小二乘 (PLS) 近红外定量校正模型。最终, 将 264 个样本用于有效成分含量建模, 选取其中 229 个样本作为校正集样本, 剩余 35 个作为验证集样本。六味地黄丸浓缩液所得指标模型的建模参数见表 4。

Table 4. Parameter table of each index model of the concentration process of Liuwei Dihuang pills

表 4. 六味地黄丸浓缩过程各指标模型参数表

质控指标	R	RMSEC	RMSECV	RSEC	Factor
马钱苷	0.9921	0.0282	0.0313	0.0495	8
芍药苷	0.9941	0.0514	0.0562	0.0475	9
苯甲酰芍药苷	0.9927	0.0241	0.0265	0.0532	10

从表 4 中可以看出, 这三个有效成分指标 R 值均大于 0.99, RMSECV 值均小于 0.1。可见 3 个指标的近红外模型的建模效果良好。校正集样本实测值和近红外预测值相关性图见图 2 所示。

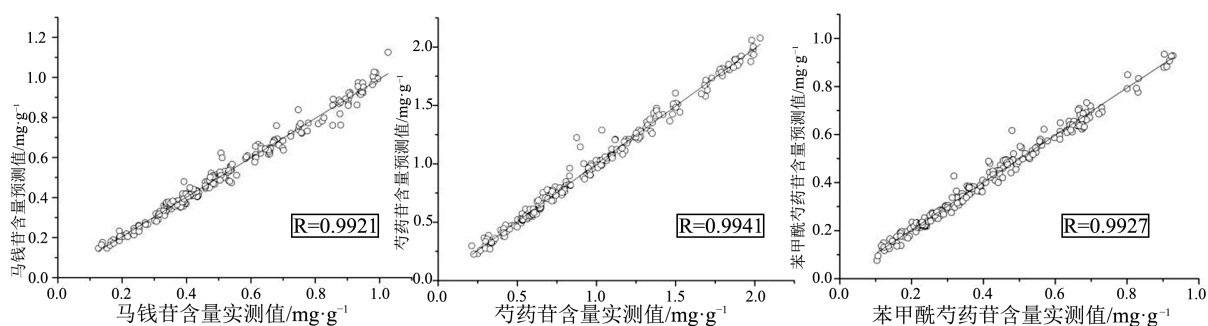


Figure 2. Near-infrared models of different indexes in the concentration process of Liuwei Dihuang pills

图 2. 六味地黄丸浓缩过程不同指标近红外模型

从图 2 中看出, 三个质控指标的近红外模型预测值和实测值之间的相关性较好, 可见六味地黄丸浓缩液马钱苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷含量的 NIR 建模效果更佳, 通过验证集对模型进行进一步验证。

3.5. 定量模型的验证

为了进一步验证模型的预测能力, 用上述建立的模型预测验证集中三个质控指标的含量, 各个质控指标近红外预测值和标准液相方法测定的相对趋势见图 3, 各个指标模型预测参数见表 5。

Table 5. Evaluation parameters of three index component models

表 5. 三个指标成分模型评价参数

质控指标	RMSEP	RSEP (%)
马钱苷	0.0534	8.75
芍药苷	0.0491	4.68
苯甲酰芍药苷	0.0241	5.32

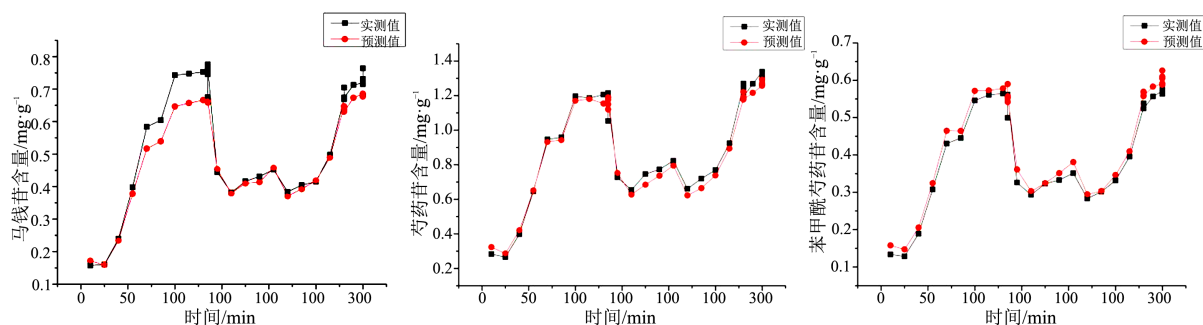


Figure 3. Relative trend diagrams between predicted values and measured values of near-infrared model validation set of the concentration process of Liuwei Dihuang pills

图 3. 六味地黄丸浓缩过程近红外模型验证集预测值与实测值相对趋势图

结果显示, 3 个质控指标实测值和近红外预测值十分接近, 变化趋势基本一致。马钱苷 NIR 定量模型、芍药苷 NIR 定量模型和苯甲酰芍药苷 NIR 定量模型的 RMSEP 均小于 0.1, 且 3 个质控指标的预测相对偏差 RSEP(%) 均在 10% 以内, 可见模型的预测能力好。

4. 结论

本研究建立了六味地黄丸浓缩液中马钱苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的近红外快速分析方法, 实验中测得的指标含量数据由苏州泽达兴邦医药科技有限公司实验室按照药典方法计算得出。本实验建立的浓缩液中的马钱苷含量定量模型、芍药苷含量定量模型和苯甲酰芍药苷含量定量模型的性能都较好, 预测效果佳, R 值均大于 0.99, RSEP 小于 10%, 可用于六味地黄丸浓缩液质量快速检测。近红外分析技术与传统药典方法相比, 大大提高了分析效率, 故可以作为一种快速定量分析技术用于六味地黄丸提取液中有效成分含量的测定。

参考文献

- [1] 朱彬, 田小仙. 中药药渣的综合利用[J]. 遵义师范学院学报, 2013, 15(5): 78-81.
- [2] 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.
- [3] 唐晓彦. 六味地黄丸的药理作用分析及研究进展[J]. 中国实用医药, 2009, 4(28): 233-234.
- [4] 张保国, 刘庆芳. 六味地黄丸(汤)药效研究新进展[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1052-1057.
- [5] 胡浩武, 耿昭, 王木兰, 等. AOTF-近红外光谱技术在浓缩六味地黄丸提取浓缩过程理化指标快速分析中的应用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 398-400.
- [6] 汪海峰, 鞠兴荣. 高效液相色谱法快速测定银杏叶提取物中的萜类内酯[J]. 色谱, 2000, 18(5): 394-397.
- [7] 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.
- [8] 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.