

# 近红外漫反射光谱法测定不同厂家一清颗粒的含量\*

李艳英<sup>1</sup>, 白雁<sup>\*\*\*</sup>, 陈志红<sup>1</sup>, 樊克锋<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450008 2. 郑州牧业高等专科学校, 郑州 450011)

**摘要** 目的: 应用近红外漫反射光谱结合偏最小二乘法, 建立 25 个厂家 85 批一清颗粒中黄芩苷含量的近红外光谱定量分析模型。方法: 在 12000~4000  $\text{cm}^{-1}$  光谱范围内扫描样品, 以校正均方差 (RM SEC) 和相关系数 ( $R^2$ ) 为指标, 通过筛选, 确定了用于建模的最优近红外波段和光谱预处理方法。采用偏最小二乘法建立了近红外光谱与 HPLC 分析值之间的校正模型, 并以此预测了 10 个未知样本。结果: 近红外预测值与真实值的相关系数  $R^2$  为 0.9732, 校正均方差 (RM SEC) 为 0.0625, 含量预测回收率为 101.1%, RSD 为 3.0%, 预测均方差 (RM SEP) 为 1.5031。结论: 该模型可直接对样品进行快速准确的检测, 具有非破坏性、无污染、重现性好等优点, 可以应用于一清颗粒制剂的定量测定。

**关键词:** 近红外; 定量分析; 一清颗粒; 黄芩苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1126-04

## Quantitative analysis on Yiqing granule from different manufacturers by near infrared diffuse reflectance spectroscopy\*

LI Yan-ying<sup>1</sup>, BAI Yan<sup>\*\*\*</sup>, CHEN Zhi-hong<sup>1</sup>, FAN Ke-feng<sup>2</sup>

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou 450008 China

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering Zhengzhou 450011 China)

**Abstract Objective** The quantitative analysis model for determination of the content of baicalin in Yiqing granules of 85 samples from 25 manufacturers was established using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy (NRDS) combining with partial least squares (PLS). **Methods** The near infrared diffuse reflectance spectra of the samples were acquired in 12000-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Different wavenumber ranges and spectrum preprocessing methods were investigated according to the root mean square errors of correction (RM SEC) values and the correlation coefficient ( $R^2$ ). This model was developed to correlate the spectra and the values determined by HPLC. The model was successfully applied to predict 10 unknown samples. **Results** The  $R^2$  between true and prediction was 0.9732. The RM SEC was 0.0625 and the root mean square errors of prediction (RM SEP) was 1.5031. The average prediction recovery was 101.1%, RSD was 3.0%. **Conclusion** It can be used rapidly and correctly for determination of baicalin in Yiqing granules. It owns many remarkable advantages that can not be displayed by traditional analysis methods, such as nondestruction, no pollution, good reappearance. NRDS can control the quality of Yiqing granules.

**Key words** NIR; quantitative analysis; Yiqing granules; baicalin

近几年来, NIR 光谱分析技术已逐步被应用于药品的原料药、制剂、水分、药品包装材料及药物辅料的定性和定量分析<sup>[1]</sup>。近红外光谱分析方法具有分析速度快、分析操作简单、所需样品少、可以无损、原位直接测量等特点, 完全符合医药分析的要求。该方法用于中药中有效成分测定, 虽然模型建

立必须来源于经典的化学方法, 但一旦建立好预测模型, 分析将是无损的, 并且快捷。

本实验以 2005 年版《中国药典》收载的一清颗粒 (组方为黄芩、黄连、大黄, 经水提取浸膏制备的颗粒剂) 为对象, 对近红外光谱技术在中药制剂质量的快速检测中的应用进行研究与探索, 建立中药

\* 河南省杰出人才项目 (08420051017); 河南省重大公益科研项目 (081100912500)

\*\* 通讯作者 Tel: 13783686203; Email: white\_yan@hotmail.com

质量检测的一种新技术、新方法,力图实现中药生产的标准化和中药现代化。模型成功建立后,在短时间内完成图谱采集并计算出比较准确的含量,提供准确可靠质量控制数据,节约时间、人力、物力,并为药品 NIR 快检车提供中药制剂近红外分析模型。

### 1 仪器、试剂与样品

近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司 6700 型近红外光谱仪), InGaAs 检测器,该仪器配有 OMNIC 软件用于光谱采集, 50 mL 标准石英杯, TQ Analyst 6.2 软件处理光谱, 高速药材粉碎机(北京鑫环亚科技有限公司), Waters 2695 高效液相色谱仪, HS-6150 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA 2004A 型电子天平。

甲醇(色谱纯,天津四友),乙醇(分析纯,天津凯通),磷酸(分析纯,天津凯通),重蒸馏水,黄芩苷对照品(批号:110715-200212,中国药品生物制品检定所提供)。

本实验从市售药品中收集 25 个生产厂家的 85 批样品作为建模样品,厂家分别为北京亚东生物制药有限公司,黑龙江麦迪森制药有限公司,石家庄四药有限公司,江西杏林白马药业有限公司,贵州恒霸药业有限责任公司,贵州银杏鹰药业有限公司,西安圣威制药有限公司,山西吕梁中药厂,湖南九汇现代中药有限公司,山西奥迩药业有限公司,重庆陪都药业股份有限公司,太极集团重庆桐君阁药厂,通化永康药业股份有限公司,成都华神集团股份有限公司制药厂,陕西东泰制药有限公司,太原世乐药业有限公司,通化振霖药业有限责任公司等。

### 2 实验条件与方法

#### 2.1 一清颗粒样品近红外光谱的采集

取一清颗粒,粉碎,过 80 目药材标准筛,统一装入 50 mL 标准石英杯,垫实,采集光谱。测样方式:积分球漫反射,分辨率:  $8\text{ cm}^{-1}$ ;扫描次数:32 次;扫描范围:  $12000\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ ;温度:  $25\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ ;相对湿度:  $50\%\sim 60\%$ 。每个样品重复 3 次,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡烧杯 4~5 次,85 份样品的近红外光谱叠加见图 1。

#### 2.2 含量测定

将收集的市售 25 个生产厂家的 85 批一清颗粒按 2005 年版《中国药典》方法,采用 HPLC 测定样品中黄芩苷的含量,含量范围为  $0.1430\%\sim 1.4404\%$ ,符合一定的梯度分布及建模要求<sup>[2-3]</sup>。

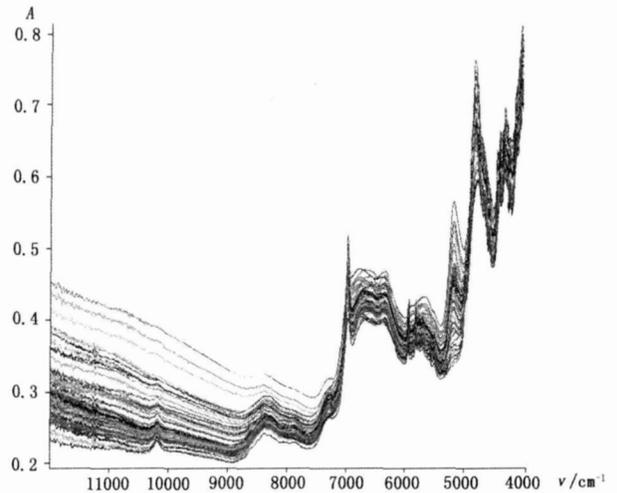


图 1 一清颗粒原始近红外光谱图

Fig 1 The original NIR spectrum of Yiqing granules

### 3 模型的建立

将黄芩苷的名称、HPLC 测定的含量结果输入 TQ 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 75 批样品用于建模(其中 64 批作为校正集样品,11 批作为内部交叉验证集样品),其余 10 批作为预测集样品。将校正集样品和内部交叉验证集样品与其指标测定结果相结合建立定量分析模型,对预测集样品进行扫描得到近红外光谱图,应用模型预测出含量,并与采用药典方法所测定的相对应的样品中指标成分含量进行比较,校正模型。以校正均方差(RMSEC)为指标选择建模参数和优化模型结构,以预测均方差(RMSEP)为指标,考察模型预测性和推广能力<sup>[4]</sup>。

#### 3.1 光谱预处理方法的选择

为了减小光谱噪声、颗粒散射、光谱漂移等非线性因素对定标结果的影响,同时又能最大限度地保留样品近红外光谱之间由于成分浓度的线性变化,通常对原始光谱进行预处理后再进行定标。

表 1 为采用不同的预处理方法后的  $R^2$  和 RMSEC 值,最佳预处理方法为: First Derivative + Msc,  $R^2$  为 0.9732, RMSEC 为 0.0625。

表 1 不同光谱预处理方法建模结果

Tab 1 Results of different pretreatment methods

方法(method)	$R^2$	RMSEC
First Derivative + Msc	0.9732	0.0625
First Derivative	0.9431	0.0999
Second Derivative	0.8952	0.1010
Second Derivative + Msc	0.9330	0.0812

图 2 为预处理后的光谱图,从图中可以看出经过预处理后的光谱峰变得尖锐,谱图特征更加明显。

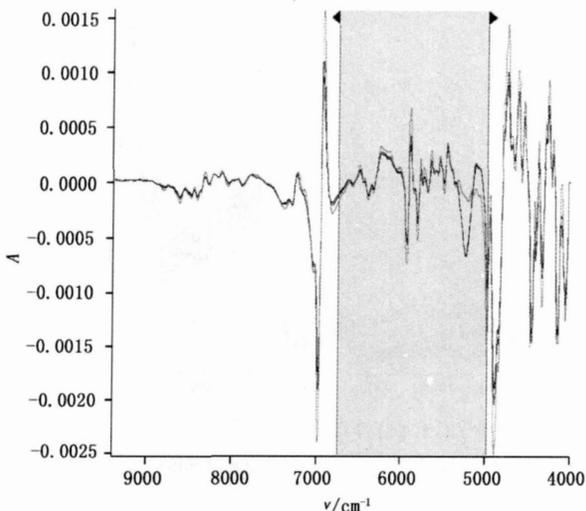


图 2 一阶导数预处理后的近红外光谱图

Fig 2 The NIR spectrum processing by FD

### 3.2 建模波段的选择

建模前对光谱波段进行筛选,以避免引入过多冗余信息,也可避免由于波段选择较窄丢掉一些必要的信息,改善模型性能,提高计算速度,首先采用软件自动优化功能进行谱段优选,软件提示参考区间为 7500.05~4987.02 cm<sup>-1</sup>,根据该提示区间进行手动调整,再根据 RMSEC 值对建模波段进行评价,确定最佳建模波段(表 2),最佳建模波段为 6749.63~4987.02 cm<sup>-1</sup>。

### 3.3 模型因子数的选择

在建模过程中,PLS 模型采用不同的主因子数,在校正集样本一定的情况下,因子数取得太少,会导致用来建模的信息不全,模型预测能力太低,反之,因子数取得太多,则会将一些噪声的信息掺入计算,会导致模型过于复杂,训练过程出现过拟合现象,降低模型的预测能力。

表 2 不同谱区范围的建模结果

Tab 2 Results of different spectral regions

光谱范围 (spectral regions) /cm <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	RMSEC
7500.05~4987.02	0.7621	0.2075
6749.63~4987.02	0.9732	0.0625
7502.21~4246.83	0.8697	0.0812
6102.18~5446.40	0.9429	0.0905
4601.65~4246.82		

本实验采用留一交互验证 (leave-one-out cross validation) 法得到 RMECV 值选择主因子数。从图 3 可以看出,对于黄芩苷,当 PLS 因子数为 15 时 RMSECV 最小,为最佳建模因子数<sup>[4]</sup>。

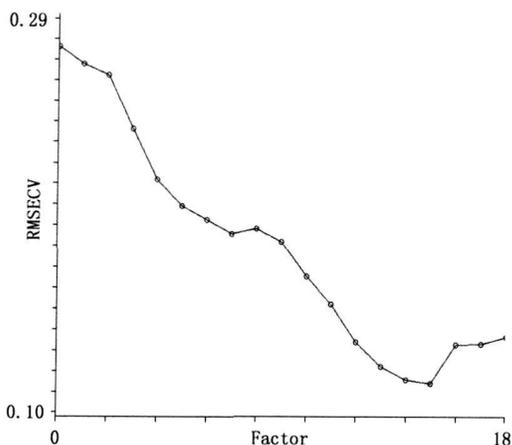


图 3 主因子数对 RMSECV 的影响

Fig 3 RMSECV for optimum number of factors

### 3.4 模型的建立及预测

**3.4.1 模型的建立** 在波长范围 6749.63~4987.02 cm<sup>-1</sup> 的区间,采用 First Derivative + MSC 处理后的光谱建立黄芩苷的 PLS 定量校正模型,其中,最佳主因子数为 15 结果如图 4 所示,其相关系数为 0.9732, RMSEC 为 0.0625 从图中可以看出真实值与 NIR 预测值绝对偏差非常小。

**3.4.2 精密性试验** 取 1 号样品按上述方法重复扫描 6 次将扫描的近红外光谱运用上述的定量模型进行预测,所得结果分别为 0.5728%, 0.5776%, 0.5534%, 0.5942%, 0.5976%, 0.5763%, 0.5836%, 从结果可以看出 6 次扫描的差别很小, RSD 值为 2.8%, 与常规方法相比精密性基本相当。这是由于近红外光谱仪的样品杯是在不停旋转的,光源偏在一侧,避免了样品不均匀带来的误差。

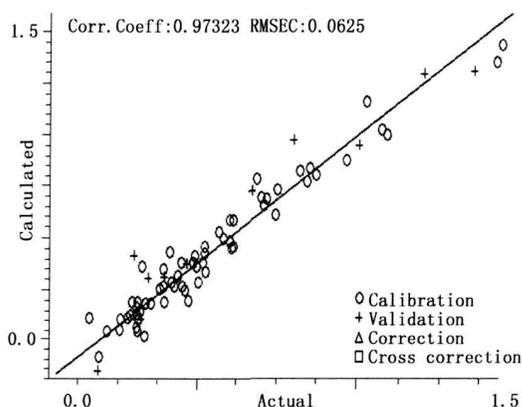


图 4 NIR 预测值与真实值的相关图

Fig 4 Corektion between NIR predict values

**3.4.3 加样回收率试验** 取预测集中已测含量的 2 号样品作为供试品,另从校正集中取一份已知含量的 1 号样品作为对照品。供试品与对照品等量混

合,充分混匀,平行准备 6份样品,分别用 HPLC 和近红外计算其含量。将 HPLC 的结果作为真实值,近红外模型预测值作为测量值,两者的比值作为加样回收率,所测加样回收率的范围为 96.20% ~ 103.6%, RSD 为 3.0%, 结果符合测定要求。

**3.4.4 模型的预测** 对于待测的 10批一清颗粒样品,只需将药品粉碎,按上述的条件扫描其近红外光谱图,把光谱输入到校正模型,经过校正模型的测定即得到该一清颗粒中黄芩苷的含量。从表 3 可以看出,验证集预测值与真实值之间的相对偏差均在 4% 以内,通过模型预测未知样品,所得预测均方差 (RM-SEP) 为 1.5031,可以看出模型的建立是成功的。

表 3 验证集的预测结果

Tab 3 Predicted results of the samples

编号 (No)	测量值 (measured value) %	预测值 (predicted value) %	绝对偏差 (absolute deviation) %	相对偏差 (relative deviation) %
5	0.8043	0.7796	0.0247	3.0710
20	0.6328	0.6173	0.0155	2.4494
21	0.8529	0.8801	-0.0272	3.1891
23	0.2879	0.2777	0.0102	3.5429
46	0.9156	0.9299	-0.0143	1.5618
71	0.6478	0.6621	-0.0143	2.2075
72	0.6300	0.6169	0.0131	2.0794
83	0.6298	0.6156	0.0142	2.2547
84	0.7456	0.7291	0.0165	2.2130
85	0.8237	0.8025	0.0212	2.5737

实验结果表明,不同厂家一清颗粒中黄芩苷含量的定量模型与传统检测方法的相关性 (Corr) 为 0.9732,校正均方差 (RMSEC) 为 0.0625, NIR 预测值能够准确地逼近 HPLC 的测定值,因此利用近红外光谱分析技术检测的一清颗粒中黄芩苷的含量是可行且可靠的<sup>[5]</sup>。

应用不同的光谱预处理方法和不同的光谱波段建立模型所得的结果是不同的,经优化后选择的光谱区域为 6749.63 ~ 4987.02  $\text{cm}^{-1}$ ,采用进行 First Derivative+MSC 法进行谱图预处理,模型建立效果最佳<sup>[6]</sup>。

该方法避免了常规检测方法的烦琐、检测时间长、环境污染、试剂消耗量大等问题,能够对一清颗粒进行快速准确的测定<sup>[7]</sup>。

#### 4 讨论

**4.1 近红外测定的准确性与传统方法测定的准确性和精密度密切相关**,因此传统方法的精密度数据对近红外建模尤其重要,应该通过认真反复测定取平均值提高参数的精密度。

**4.2 测定样品的光谱时要注意待分析样品要与建模样品的粒度和物理状态一致**,这样才能保证预测结果的准确性。

**4.3 一个优秀的模型由样品资源的代表性、样品资源技术合理应用、化学值的准确性等多种因素决定**,而从模型的建立到应用是一个不断完善的过程,对模型要进行不断地检验、修正与维护,本模型仅是初步的建立,在应用过程中还要经常添加有代表性的样品,对其进行不断的优化<sup>[8-9]</sup>。

#### 参考文献

- 1 QU Hai-bin(瞿海斌), LIU Quan(刘全), CHENG Yi-yu(程翼宇). Determination of the Coptis extract alkaloids using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy(近红外漫反射光谱法测定黄连浸膏粉中生物碱含量). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004 32(4): 477
- 2 BAI Yan(白雁), JIA Yong(贾永), WANG Dong(王东). Quantitative analysis of reducing sugar in Shu Di Huang sening wine by near-infrared diffuse reflectance spectrum(应用近红外漫反射光谱技术测定酒炖熟地黄中的还原糖含量). *J Chin Med Mater* (中药材), 2006 29(10): 1035
- 3 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 289
- 4 LU Jia-hui(逯家辉), WU Di(吴迪), ZHANG Tong(张彤), et al. Rapid determination of rifampicin capsules using near infrared diffuse reflectance spectroscopy(近红外漫反射光谱法快速测定利福平含量). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2006 26(4): 380
- 5 HU Gang-liang(胡钢亮), LÜ Xi-yang(吕秀阳), WU Jian-guo(吴建国), et al. Direct determination of total flavones in powder of Ginkgo bilba extract by near-infrared diffuse reflection spectroscopy(近红外漫反射光谱法直接测定银杏叶提取物粉末中总黄酮的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004 24(1): 18
- 6 SHI Gu-lian(史桂莲), YE Fu-li(叶福丽). The math model and evaluation of NRDRS method on analysis of Chinese traditional medicine(近红外漫反射光谱法在中药材分析中的数学模型及其评价). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007 18(1): 120
- 7 YANG Nan-lin(杨南林), CHENG Yi-yu(程翼宇), WU Yong-jiang(吴永江). A new method for fast and nondestructive analysis of saponins in Panax notoginseng herb by near infrared spectroscopy(中药材三七中皂苷类成分的近红外光谱快速无损分析新方法). *Acta Chim Sin* (化学学报), 2003, 61(3): 393
- 8 LU Jia-hui(逯家辉), LÜ Xi(吕昕), WANG Yue-xi(王跃溪). Nondestructive and quantitative analysis of isoniazid tablets by near infrared spectroscopy with PLS regression(近红外光谱-偏最小二乘法无损定量分析异烟肼片). *J Jilin Univ* (吉林大学学报), 2006, 44(3): 485
- 9 YANG Xin(杨欣), HE Lang-chong(贺浪冲), WANG Na(王娜). Determination of azithromycin dispersible tablets using near infrared diffuse reflectance spectrophotometry(近红外漫反射光谱法测定阿奇霉素分散片的含量). *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2007 32(9): 550

(本文于 2008年 6月 25日收到)