

基于AOTF-近红外光谱技术的六味地黄胶囊快速质量控制方法研究^Δ

边雨^{1*}, 姜文月¹, 王美慧¹, 任绪华¹, 曲佳乐¹, 李敏², 高陆^{1#} (1. 吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春 130012; 2. 修正药业集团股份有限公司, 吉林 通化 134001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1203-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.11

摘要 目的: 建立六味地黄胶囊快速无损的质量控制方法。方法: 利用声光可调滤光器(AOTF)-近红外(NIR)光谱技术。以某厂家近3年生产的80批六味地黄胶囊为样本, 采用高效液相色谱法测定其中马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸的含量, 并按2015年版《中国药典》(一部)通则方法测定其中水分含量。随后, 应用The Unscrambler定量分析软件, 以70批样品组成校正集样品, 采用偏最小二乘法和交叉-验证法分别建立六味地黄胶囊中上述6个指标的NIR定量模型; 并以剩余10批样品为验证集样品, 对模型进行外部验证。结果: 所建立的马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸、水分定量模型内、外部验证相关系数(R^2)均大于0.9, 校正标准偏差(RESEC)分别为0.372 8、0.025 4、0.263 3、0.288 5、0.186 7、0.037 7; 预测标准偏差(RESEP)分别为0.462 2、0.077 5、0.472 1、0.634 9、0.293 4、0.206 9。外部验证结果显示, 各指标预测值与真实值的平均偏差分别为6.04%、6.05%、5.87%、6.97%、5.62%、4.83%, 均小于10%。结论: 建立的方法可实现六味地黄胶囊质量的快速、无损分析。

关键词 声光可调滤光器-近红外光谱技术; 六味地黄胶囊; 质量控制; 马钱苷; 莫诺苷; 丹皮酚; 芍药苷; 熊果酸; 水分

Methodology Study on Rapid Quality Control of Liuwei Dihuang Capsule by AOTF-near Infrared Spectroscopy

BIAN Yu¹, JIANG Wenyue¹, WANG Meihui¹, REN Xuhua¹, QU Jiale¹, LI Min², GAO Lu¹ (1. Jilin Modern Chinese Medicine Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130012, China; 2. Xiuzheng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jilin Tonghua 134001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the rapidly non-destructive quality control of Liuwei dihuang capsule. METHODS: AOTF-NIR spectrometry was adopted. Taking 80 batches of Liuwei dihuang capsule produced by a manufacturer in recent three years as samples, HPLC chromatogram was adopted to determine the contents of loganin, morroniside, paeonol, paeoniflorin and ursolic acid; the content of water was determined according to general principles stated in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part I). Taking 70 batches of samples as correction set, the partial least square method and the cross-validation algorithm were used to establish the NIR quantitative model of 6 indexes in Liuwei dihuang capsules with the Unscrambler quantitative analysis software. Taking residual 10 batches of samples as validation set, external validation was conducted for the model. RESULTS: The correlation coefficients (R^2) of internal and external validation of loganin, morroniside, paeonol, paeoniflorin, the content of water quantitative model were all greater than 0.9; the correction of standand deviation (RMSEC) were 0.372 8, 0.025 4, 0.263 3, 0.288 5, 0.186 7 and 0.037 7; the prediction of standard deviation (RMSEP) were 0.462 2, 0.077 5, 0.472 1, 0.634 9, 0.293 4 and 0.206 9; the external verification showed that mean deviations of prelicted value to actual value were 6.04%, 6.05%, 5.87%, 6.97%, 5.62% and 4.83%, with the mean deviation less than 10%. CONCLUSIONS: The established method can achieve rapidly non-destructive analysis Liuwei dihuang capsule.

KEYWORDS AOTF-NIR spectrometry; Liuwei dihuang capsule; Quality control; Loganin; Morroniside; Paeonol; Paeoniflorin; Ursolic acid; Content of water

六味地黄胶囊是中药补益剂中滋补益肾的代表方剂, 处方由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、泽泻、山药、茯苓组

成, 为2015年版《中国药典》(一部)(后文简称“药典”)收录的成方制剂, 在药典标准中含量测定项下规定, 分别以薄层色谱扫描法测定其酒萸肉中熊果酸含量和高效液相色谱法测定其牡丹皮中丹皮酚的含量^[1]。现有检测方法分析过程复杂, 操作过程烦琐, 无法满足企业生产的工业要求; 并且, 六味地黄胶囊处方药材种类较多, 药典标准中仅测定了其中2种成分, 不能全面地反映产品

Δ 基金项目: 国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-JL-24)

* 助理工程师, 硕士。研究方向: 新药研发及中药二次开发。

E-mail: 1324635668@qq.com

通信作者: 主任药师, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药药理学。

E-mail: bxgl@163.com

质量。为更全面地表征该产品质量,含量检测指标的选择需尽量覆盖处方中主要药味。

近红外(NIR)光谱技术具有快速、简便、无污染以及可实现多个指标同步检测等优点,作为一种“绿色”分析技术,优势突出,能够有效地应用于大批样品的快速检测,特别是对于日常的质量监控,是一种十分经济且快速的技术手段^[2-6]。目前,该技术在六味地黄制剂的质量控制研究方面应用较多,如胡浩武等^[7]将声光可调滤光器(AOTF)-NIR光谱技术用于浓缩六味地黄丸提取浓缩过程理化指标快速分析;史会齐等^[8]采用NIR光谱技术快速测定六味地黄丸中水分含量;宋丽丽等^[9]采用NIR光谱技术测定六味地黄丸中丹皮酚含量以及陈斌等^[10]采用NIR光谱技术快速检测六味地黄丸中水分、丹酚皮、马钱苷含量。而本研究拟在六味地黄胶囊原质量标准基础上,新增马钱苷、莫诺苷和芍药苷等成分指标,采用AOTF-NIR光谱技术建立六味地黄胶囊中马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸含量及水分6个指标的NIR定量模型,旨在实现六味地黄胶囊整体质量的快速评价,为该产品质量的全面控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate3000型高效液相色谱仪(美国Thermo公司);Luminar-5030型ATOF-NIR光谱仪(美国Brimrose公司);101A-2型电热鼓风干燥箱(上海市仪器总厂);ME204E型电子天平、AB135-S型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SB-1200D型超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

近3年内(2016—2018年)生产的六味地黄胶囊成品80批次,均由修正药业集团股份有限公司提供(规格:每粒装0.3 g,36粒/盒);马钱苷对照品(批号:111640-201606,纯度:98.3%)、莫诺苷对照品(批号:111998-201602,纯度:96.3%)、丹皮酚对照品(批号:110708-201407,纯度:98.5%)、芍药苷对照品(批号:110736-201640,纯度:96.3%)、熊果酸对照品(批号:110742-201421,纯度:93.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。80批次样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 马钱苷、莫诺苷、芍药苷、丹皮酚的含量测定

查阅相关文献^[11-12],通过对供试品溶液制备方法 & 色谱条件优化等试验考察,最终确定最佳检测方法,实现同步测定六味地黄胶囊中马钱苷、莫诺苷、芍药苷、丹皮酚的含量。

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别取马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL中含马钱苷200 μg、莫诺苷60 μg、芍药苷20 μg、

丹皮酚500 μg的混合对照品溶液,即得。

表1 80批六味地黄胶囊的样品信息

Tab 1 Sample information of 80 batches of Liuwei dihuang capsules

编号	批号	编号	批号
1	160704	41	170607
2	160705	42	170608
3	160706	43	170609
4	160801	44	170610
5	160802	45	170801
6	160803	46	170810
7	160810	47	170815
8	161008	48	171009
9	161009	49	171011
10	161010	50	171013
11	161011	51	171015
12	161012	52	171017
13	161013	53	171101
14	161018	54	171102
15	161020	55	171103
16	161206	56	180101
17	161207	57	180102
18	161208	58	180103
19	161209	59	180105
20	161210	60	180109
21	161211	61	180111
22	161212	62	180112
23	161213	63	180301
24	161214	64	180302
25	161215	65	180303
26	161216	66	180601
27	170301	67	180701
28	170302	68	181001
29	170303	69	181004
30	170402	70	181007
31	170405	71	181010
32	170407	72	181013
33	170409	73	181016
34	170411	74	181101
35	170601	75	181102
36	170602	76	181103
37	170603	77	181104
38	170604	78	181105
39	170605	79	181106
40	170606	80	181107

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取本品内容物2 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇10 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)30 min,放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:ACE C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测器:紫外检测器;检测波长:240 nm;流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 5%→10% A; 15~25 min, 10%→20% A; 25~35 min, 20%→35% A; 35~55 min, 35%→75% A; 55~60 min, 75%→5% A; 60~70 min, 5% A);流速:1.0 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μL。取“2.1.1”和

“2.1.2”项下溶液,在此色谱条件下进样分析,记录色谱图。结果,各成分峰与相邻峰间的分离度均大于1.5,以马钱苷峰计理论板数为298 760、以莫诺苷峰计理论板数为42 741、以丹皮酚峰计理论板数为514 094、以芍药苷峰计理论板数为191 317。色谱图见图1。

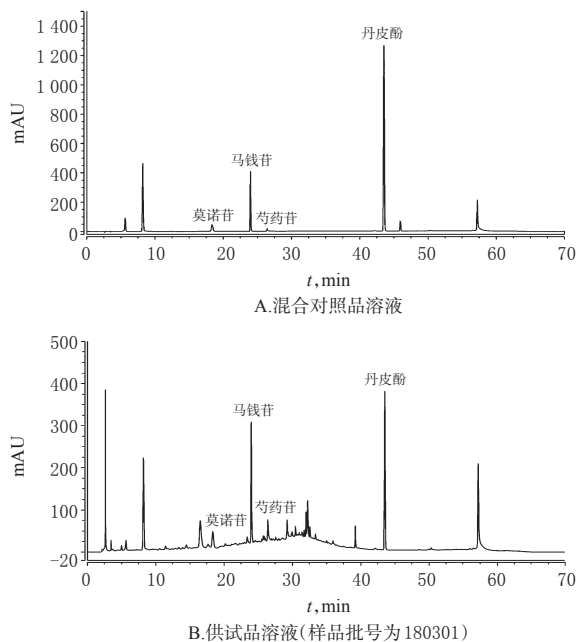


图1 马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷检测的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of loganin, morroniside, paeonol and paeoniflorin

2.1.4 方法学考察 按相关方法操作进行方法学考察。结果,线性关系及定量限考察结果显示,马钱苷、莫诺苷、丹皮酚和芍药苷进样量线性范围分别为0.442 6~3.319 5 ($r=0.999 9$)、0.118 2~0.886 5 ($r=0.999 3$)、2.607 2~19.554 ($r=0.999 2$)、0.051~0.382 5 μg ($r=0.999 7$),定量限分别为0.18、0.065、1.00、0.05 μg ;精密密度试验结果显示,马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷峰面积的RSD分别为0.95%、0.79%、0.40%、1.54% ($n=6$),表明仪器精密密度良好;稳定性考察试验结果显示,马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷峰面积的RSD分别为0.78%、1.29%、0.30%、1.09% ($n=7$),表明供试品溶液在室温[(25±5)℃]条件下24 h内稳定;重复性试验结果显示,马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷含量的RSD分别为0.80%、0.85%、1.13%、1.72% ($n=6$),表明方法重现性良好;加样回收率试验结果显示,马钱苷、莫诺苷、丹皮酚和芍药苷的平均回收率分别为104.31%、99.40%、96.50%、95.97% ($n=6$),RSD分别为0.91%、1.18%、1.26%、1.82% ($n=6$),表明该方法准确、可行。

2.1.5 含量测定 分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图并计算含量,测定结果见表2。

表2 80批六味地黄胶囊中6个指标的含量测定结果
Tab 2 Content determination results of 6 indexes in 80 batches of Liuwei dihuang capsule

编号	马钱苷,mg/粒	莫诺苷,mg/粒	丹皮酚,mg/粒	芍药苷,mg/粒	熊果酸,mg/粒	水分,%
1	1.383 3	0.360 8	5.399 0	1.279 8	0.795 8	3.98
2	1.689 3	0.598 7	4.543 2	1.308 6	0.885 8	4.47
3	1.671 3	0.446 4	4.940 4	0.928 2	0.687 7	3.72
4	0.089 9	0.493 4	4.964 1	1.216 5	0.931 6	4.04
5	1.208 7	0.684 5	4.082 7	0.772 2	0.632 0	3.98
6	1.303 2	0.840 8	4.861 0	1.340 4	0.850 2	3.83
7	1.765 8	0.388 6	4.702 0	1.148 7	0.653 9	3.55
8	0.938 7	0.711 8	5.143 5	0.088 9	1.275 4	3.08
9	1.239 3	0.686 4	4.944 7	1.064 7	0.762 8	3.58
10	1.344 6	0.863 9	5.323 3	0.684 2	0.626 4	3.08
11	0.093 7	0.567 8	4.421 1	0.839 6	1.042 6	3.26
12	1.240 2	0.746 8	4.197 9	0.783 7	0.981 5	3.04
13	1.371 6	0.550 0	4.918 7	0.782 4	0.914 8	3.95
14	1.443 6	0.783 9	4.912 0	0.692 1	1.265 4	3.26
15	0.246 3	0.778 1	4.460 6	0.786 1	1.260 0	3.03
16	1.223 1	0.546 4	4.930 6	0.941 0	1.010 4	3.29
17	1.263 6	0.716 0	4.705 2	0.068 8	0.622 0	3.15
18	1.242 0	0.858 1	5.441 7	1.070 0	0.627 6	2.98
19	0.119 9	0.862 2	5.349 9	0.809 0	0.984 6	3.33
20	1.262 7	0.542 4	5.044 8	0.919 7	0.819 8	3.04
21	1.258 2	0.836 5	4.598 5	0.802 7	0.657 6	2.56
22	1.231 2	0.579 2	5.013 5	1.289 4	0.615 0	3.77
23	1.226 7	0.441 0	5.447 1	1.328 2	0.877 8	3.28
24	0.976 5	0.323 8	4.640 8	1.520 7	1.288 8	3.63
25	1.088 1	0.325 7	4.603 6	1.068 0	1.061 4	3.54
26	1.053 9	0.285 6	5.339 9	1.294 4	0.702 0	3.43
27	1.280 7	0.325 7	4.471 8	1.326 4	0.790 2	3.70
28	1.287 0	0.366 7	4.631 8	0.674 2	0.922 2	3.82
29	1.446 3	0.477 8	4.837 1	1.478 3	0.755 8	3.13
30	1.537 2	0.540 1	5.391 6	1.106 0	0.682 4	3.46
31	0.743 4	0.296 7	5.558 8	1.252 5	0.742 2	5.69
32	0.724 5	0.473 5	5.530 0	0.865 4	0.810 0	5.57
33	0.707 4	0.357 5	5.262 7	0.744 3	1.176 0	5.60
34	0.757 8	0.288 8	5.326 9	0.724 6	0.991 8	6.71
35	0.734 4	0.317 9	4.721 5	1.166 9	1.017 0	6.22
36	0.741 6	0.292 5	4.622 9	1.056 8	0.615 0	7.45
37	0.772 2	0.335 7	4.834 5	1.323 8	0.843 0	6.87
38	0.672 3	0.271 1	5.283 9	0.616 6	1.046 4	6.51
39	0.675 9	0.475 5	4.618 9	0.709 3	0.667 0	6.57
40	0.843 3	0.259 3	5.082 9	1.241 9	0.806 4	5.90
41	0.801 0	0.368 4	4.546 4	0.985 3	0.754 2	6.34
42	0.849 6	0.198 9	5.209 4	1.003 6	0.909 6	6.08
43	0.693 0	0.298 3	4.926 3	0.637 6	0.805 8	5.93
44	0.535 5	0.189 2	5.018 1	1.017 8	0.891 0	6.57
45	0.606 6	0.275 5	5.188 1	0.080 7	1.392 6	6.92
46	0.495 9	0.281 0	5.089 2	1.115 9	0.936 6	5.96
47	0.883 8	0.293 3	4.636 8	0.943 8	1.026 6	5.48
48	0.957 6	0.309 9	5.579 3	0.977 7	0.862 2	5.25
49	0.873 0	0.280 9	4.719 0	1.184 1	0.739 2	5.04
50	0.773 1	0.345 2	4.543 1	1.388 9	0.682 8	5.91
51	1.079 1	0.356 8	4.888 6	1.389 0	0.737 4	3.72
52	1.042 2	0.300 3	5.320 4	0.836 3	0.789 6	3.64
53	0.873 9	0.316 2	4.632 2	0.845 7	1.326 6	3.77
54	0.983 7	0.310 1	5.238 4	1.102 7	0.837 6	4.05
55	0.860 4	0.304 2	5.323 1	1.107 3	0.685 2	3.60
56	1.018 8	0.323 8	4.763 5	1.272 9	1.327 2	3.80
57	0.952 2	0.306 1	4.882 4	1.296 4	0.982 8	3.31

续表2

Continued tab 2

编号	马钱苷,mg/粒	莫诺苷,mg/粒	丹皮酚,mg/粒	芍药苷,mg/粒	熊果酸,mg/粒	水分,%
58	1.068 3	0.282 8	4.963 7	1.485 7	0.825 0	3.68
59	0.954 0	0.314 0	5.381 1	1.304 4	0.751 2	3.41
60	1.133 1	0.290 4	4.735 6	0.568 3	1.062 6	3.49
61	0.083 8	0.553 6	5.132 9	0.058 9	1.102 2	1.18
62	1.460 7	0.421 4	4.863 3	1.126 8	0.887 4	1.97
63	1.386 9	0.407 6	4.963 1	1.092 7	0.659 4	2.03
64	1.458 0	0.316 2	4.973 6	0.771 9	0.738 8	3.07
65	0.078 8	0.635 9	4.646 6	0.756 4	0.732 6	3.67
66	1.414 8	0.608 5	4.650 4	0.908 4	1.023 0	3.82
67	1.371 6	0.863 8	4.738 9	0.880 6	1.171 2	4.30
68	1.425 6	0.746 9	4.681 8	1.416 5	0.957 0	3.43
69	1.851 3	0.706 1	5.056 8	1.115 0	0.815 4	4.04
70	1.512 0	0.807 5	5.172 2	1.107 3	1.172 4	3.68
71	1.584 9	0.710 3	5.423 9	0.871 3	1.121 4	3.35
72	1.675 8	0.727 4	5.337 2	0.872 8	1.249 8	3.41
73	1.735 2	0.366 7	5.190 3	1.421 9	1.288 8	3.67
74	1.183 2	0.472 1	5.197 1	1.380 3	0.638 4	4.58
75	1.063 7	0.619 1	4.857 8	1.138 7	0.920 4	5.25
76	0.963 7	0.646 6	4.937 9	0.128 3	0.713 4	3.27
77	0.954 4	0.599 5	4.842 4	1.217 7	1.222 2	4.21
78	1.236 0	0.789 0	4.888 6	1.227 4	1.009 2	2.88
79	0.843 9	0.564 2	5.495 8	1.127 2	1.160 4	4.38
80	1.438 2	0.864 9	4.978 5	1.106 3	0.859 8	3.64

2.2 熊果酸含量测定

查阅相关文献^[13-14],通过供试品溶液制备及色谱条件优化等试验考察,确定最佳检测方法,用以测定六味地黄胶囊中熊果酸含量。

2.2.1 对照品溶液的制备 取熊果酸对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1 mL中含熊果酸60 μg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:ACE C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测器:紫外检测器;检测波长:215 nm;流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(89:11, V/V),流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。取“2.2.1”和“2.2.2”项下溶液,在此色谱条件下进样测定,记录色谱图。结果,熊果酸色谱峰与相邻峰间的分离度为71.5,理论板数为14 323。色谱图见图2。

2.2.4 方法学考察 按照相关方法操作进行方法学考察。结果,线性关系及定量限考察结果显示,熊果酸进样量线性范围为0.119 6~1.196 μg($r=0.999 8$),定量限为0.10 μg;精密度试验结果显示,熊果酸峰面积的RSD=1.26%($n=6$),表明仪器精密度良好;稳定性试验结果显示,熊果酸峰面积的RSD=0.85%($n=7$),表明供试品溶液中熊果酸在室温[(25 ± 5) ℃]条件下24 h内稳定;重复性试验结果显示,熊果酸含量的RSD=1.24%($n=6$),表明方法重现性良好;加样回收率考察试验结果显示,熊果酸的平均回收率为99.77%,RSD=1.28%($n=6$),表明该方法准确、可行。

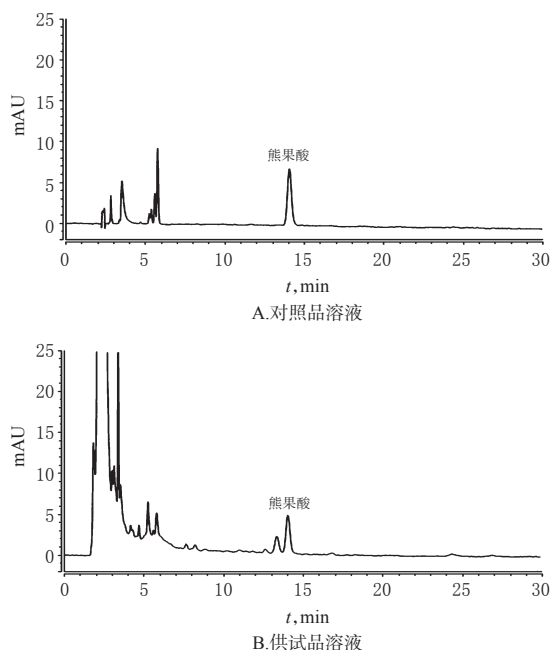


图2 熊果酸检测的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of ursolic acid

2.2.5 含量测定 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液与“2.2.2”项下供试品溶液各10 μL,注入色谱仪,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图并计算含量,结果详见表2。

2.3 水分含量测定

取供试品内容物适量,按2015年版《中国药典》(四部)通则0832水分测定法中第二法烘干法^[15]进行六味地黄胶囊水分含量测定,结果详见表2。

2.4 NIR原始光谱采集与预处理

取六味地黄胶囊内容物,置于样品采集槽中,扫描波长为1 100~2 300 nm,波长增量为2.0 nm,波长平均次数为300,每批次样品扫描3次,取平均值作为该样品的原始吸收光谱图,六味地黄胶囊的NIR原始吸收光谱图见图3。

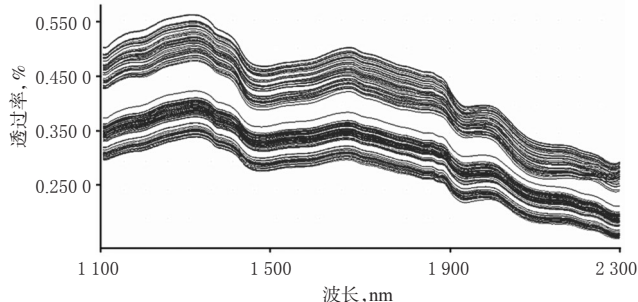


图3 六味地黄胶囊NIR原始吸收光谱图

Fig 3 Original NIR spectra of Liuwei dihuang capsule

在建立模型前,需要消除噪音和基线漂移等因素对光谱采集的影响。故先采用一阶导数9点平滑法(Savitzky-Golay)^[16-17]对NIR原始光谱进行预处理,以消除颜色差别等因素引起的光谱基线偏移和漂移,六味地黄胶

囊NIR预处理光谱图见4。

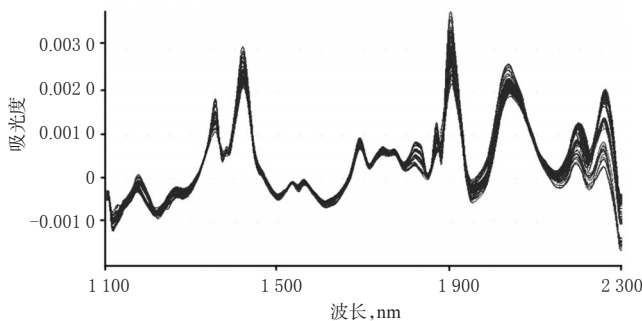


图4 六味地黄胶囊NIR预处理光谱图

Fig 4 NIR pretreatment spectrum of Liuwei dihuang capsule

2.5 NIR定量模型的建立

2.5.1 校正集与验证集样本的选取 按照马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸、水分指标含量高低,均匀选取70批样本组成校正集样品,用于建立NIR定量模型;其余10批样本为验证集样品,用于对模型进行外部验证。校正集与验证集样本含量分布范围见表3。

表3 校正集与验证集样品指标含量分布范围

Tab 3 Content distribution range of the indicators of sample in correction set and validation set

指标		校正集样品	验证集样品
马钱苷	样本数	70	10
	含量范围,mg/粒	0.078 8~1.851 3	0.860 4~1.133 1
莫诺苷	样本数	70	10
	含量范围,mg/粒	0.189 2~0.864 9	0.282 8~0.356 8
丹皮酚	样本数	70	10
	含量范围,mg/粒	4.082 7~5.579 3	4.632 2~5.381 1
芍药苷	样本数	70	10
	含量范围,mg/粒	0.058 9~1.520 7	0.568 3~1.458 7
熊果酸	样本数	70	10
	含量范围,mg/粒	0.615 0~1.392 6	0.685 2~1.327 2
水分	样本数	70	10
	含量范围,%	1.18~7.45	3.31~4.05

2.5.2 各指标定量模型的建立 利用Unscrambler定量分析软件,将六味地黄胶囊上述6个指标测定结果与预处理后的NIR光谱相结合,分别以偏最小二乘法(PLS)和交叉-验证法(Cross-validation)建立各指标的定量模型^[3]。采用光谱影响值Leverage和化学值误差Residual等统计量检验,剔除NIR光谱与各指标测定结果的异常值,并根据模型主要参数:内、外部验证相关系数(R^2)、校正标准偏差(RMSEC)、预测标准偏差(RMSEP)等进行筛选优化,确定各指标NIR检测定量模型。其中, R^2 越接近1,NIR模型预测值与实测值相关性越好;RMSEC与RMSEP越接近,且RMSEC小于RMSEP,表示所建模型适用性越强,预测效果越好。6个指标的NIR定量模型模型图见图5(图中横坐标为实测值,纵坐标为预测值),参数统计结果见表4。

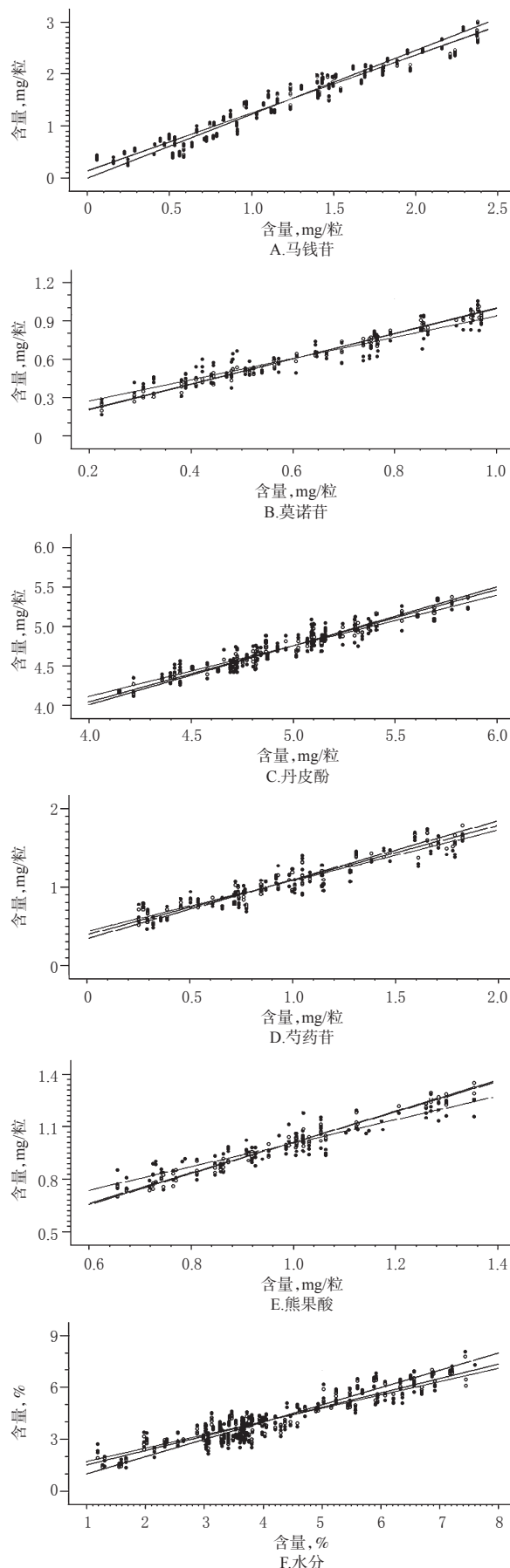


图5 6个指标的NIR定量模型

Fig 5 NIR quantitative model of 6 indexes

表4 6个指标的NIR定量模型参数

Tab 4 Parameters for NIR quantitative model of 6 indexes

指标	内部R ²	外部R ²	RMSEC	RMSEP
马钱苷	0.955 3	0.945 3	0.372 8	0.462 2
莫诺苷	0.993 0	0.933 8	0.025 4	0.077 5
丹皮酚	0.976 8	0.951 3	0.263 3	0.472 1
芍药苷	0.964 2	0.953 4	0.288 5	0.634 9
熊果酸	0.987 9	0.937 3	0.186 7	0.293 4
水分	0.912 4	0.951 3	0.037 7	0.206 9

上述结果表明,参与建模的六味地黄胶囊样品中6个指标含量与其NIR光谱的相关性较好,所建立的NIR检测模型预测性能良好。

2.6 NIR定量模型的验证

利用各指标的NIR定量模型,对未参与建模的10批次验证集样品进行分析。参考“2.5.2”NIR光谱采集与处理方法获取10批样品的光谱数据,将光谱数据导入The Unscrambler分析软件,调用已建立的NIR定量模型对外部样品进行分析,即得预测值。计算预测值与实测值的偏差[偏差(%)=(实测值-预测值)/实测值×100%],验证所建定量模型的准确性。各指标的验证结果见表5。

表5 验证结果

Tab 5 Results of validation

成分	编号	预测值	实测值	偏差, %	编号	预测值	实测值	偏差, %	平均偏差, %
马钱苷,mg/粒	51	0.998 6	1.079 1	7.46	56	1.029 7	1.018 8	1.07	6.04
	52	1.089 3	1.042 2	4.52	57	1.025 5	0.952 2	7.70	
	53	0.953 2	0.873 9	9.07	58	1.003 7	1.068 3	6.05	
	54	1.006 6	0.983 7	2.33	59	1.046 5	0.954 0	9.70	
	55	0.798 3	0.860 4	7.22	60	1.193 0	1.133 1	5.29	
莫诺苷,mg/粒	51	0.366 2	0.356 8	2.63	56	0.317 6	0.323 8	1.93	6.05
	52	0.314 6	0.300 3	4.75	57	0.336 1	0.306 1	9.80	
	53	0.314 3	0.316 2	0.61	58	0.312 0	0.282 8	10.33	
	54	0.337 7	0.310 1	8.90	59	0.340 0	0.314 0	8.28	
	55	0.321 1	0.304 2	5.57	60	0.312 8	0.290 4	7.70	
丹皮酚,mg/粒	51	4.461 1	4.888 6	8.74	56	4.582 2	4.763 5	3.81	5.87
	52	4.963 0	5.320 4	6.72	57	5.103 4	4.882 4	4.53	
	53	4.932 7	4.632 2	6.49	58	5.386 1	4.963 7	8.51	
	54	5.432 8	5.238 4	3.71	59	4.950 5	5.381 1	8.00	
	55	5.621 8	5.323 1	5.61	60	4.862 1	4.735 6	2.67	
芍药苷,mg/粒	51	1.432 5	1.389 0	3.13	56	1.152 4	1.272 9	9.47	6.97
	52	0.923 7	0.836 3	10.45	57	1.326 6	1.296 4	2.33	
	53	0.785 5	0.845 7	7.12	58	1.568 4	1.485 7	5.57	
	54	1.234 2	1.102 7	11.93	59	1.393 2	1.304 4	6.81	
	55	1.183 6	1.107 3	6.89	60	0.602 8	0.568 3	6.07	
熊果酸,mg/粒	51	0.702 5	0.737 4	4.73	56	1.451 0	1.327 2	9.33	5.62
	52	0.754 1	0.789 6	4.50	57	0.955 8	0.982 8	2.75	
	53	1.401 5	1.326 6	5.65	58	0.882 2	0.825 0	6.93	
	54	0.812 4	0.837 6	3.01	59	0.668 2	0.751 2	11.05	
	55	0.661 2	0.685 2	3.50	60	1.113 6	1.062 6	4.80	
水分, %	51	3.51	3.72	5.56	56	3.88	3.80	1.97	4.83
	52	3.73	3.64	2.58	57	3.16	3.31	4.62	
	53	3.49	3.77	7.53	58	3.52	3.68	4.29	
	54	4.23	4.05	4.49	59	3.49	3.41	2.29	
	55	3.46	3.6	4.00	60	3.59	3.49	2.89	

由以上结果可知,10批次验证集样品中马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷的预测值与HPLC实测值的平均偏差分别为6.04%、6.05%、5.87%、6.97%、5.62%,均小于10%;水分的预测值与实测值分别平均偏差为4.83%,小于5%。由此可见,各指标NIR检测模型预测值与常规检测方法测定值之间相关性良好,测定准确性较高,可以采用NIR光谱模型快速检测、分析六味地黄胶囊成品制剂中的马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸、水分的含量。

3 讨论

本研究前期提升了熊果酸含量检测的薄层色谱扫描法为高效液相色谱法,同时建立了马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷同步含量测定方法,其中马钱苷、莫诺苷属于酒萸肉,并且酒萸肉标准中以这两个指标为含量测定项;芍药苷、丹皮酚归属于牡丹皮,牡丹皮标准中以酚类成分丹皮酚为含量测定项,据文献报道牡丹皮中单萜类化合物具有滋肝阴补脾阴(保肝、增强免疫力)的功效^[18]。酒萸肉与牡丹皮在六味地黄胶囊处方中为主要药味,用量较大、有效成分含量高,故选定检测指标分别为马钱苷、莫诺苷、丹皮酚和芍药苷。以上建立的含量检测方法简便、准确、重复性好,可用于测定六味地黄胶囊中6个指标成分的含量,获取含量数据。接着,笔者采用AOTF-NIR光谱技术分别建立了六味地黄胶囊中马钱苷、莫诺苷、丹皮酚、芍药苷、熊果酸、水分指标的NIR光谱定量模型,实现了6个指标同步快速检测,整体表征产品质量,且建立的定量模型预测准确性较高、分析速度快,该方法的建立完善了六味地黄胶囊质量快速检测体系,为药品生产企业产品质量控制提供了可靠、便捷的检测方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015:707-708.
- [2] 汪方舟. 近红外光谱建模法在中药质检中的应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2018, 49(5):787-790.
- [3] 任绪华, 苏婷, 姜文月, 等. AOTF-NIR在精芪双参胶囊黄芪甲苷含量快速分析中的应用[J]. 中国医疗器械信息, 2018, 24(2):15-16, 20.
- [4] 吴钰. AOTF型红外光谱仪快速探测关键技术研究[D]. 上海:中国科学院研究生院(上海技术物理研究所), 2016.
- [5] 杨晓丽, 黄晓寒, 杨秋艳. 近3年国内近红外检测应用研究进展[J]. 云南化工, 2018, 45(6):1-3.
- [6] 李文龙, 瞿海斌. 近红外光谱应用于中药质量控制及生产过程监控的研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2017, 46(1):80-88.
- [7] 胡浩武, 耿焱, 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.

不同配比人参总皂苷、丹皮总苷、丹皮酚含药血清对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的改善作用研究[△]

张留记^{1,2*}, 王建霞², 李开言¹, 屠万倩¹(1.河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2.河南中医药大学药学院, 郑州 450008)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1209-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.12

摘要 目的:研究不同配比的人参总皂苷(TGG)、丹皮总苷(TGM)、丹皮酚含药血清对H₂O₂诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的改善作用,筛选最优配比并探讨其作用机制。方法:将大鼠随机分为空白组(蒸馏水)、TGG组(TGG, 2.025 g/kg)、TGM组(TGM, 4.05 g/kg)、丹皮酚组(丹皮酚, 1.08 g/kg),每组12只,每天灌胃相应药物2次,连续7 d,末次给药后1 h,腹主动脉取血,制备含药血清。以HUVEC细胞存活率为评价指标,人参总皂苷、丹皮总苷、丹皮酚含药血清不同配比为考察因素设计L₉(3⁴)正交试验,优选3种含药血清的最优配比;将HUVEC细胞分为空白组、模型组、TGG组、TGM组、丹皮酚组、最优配比组,除空白组细胞加入相应培养基外,其余各组均采用1.2 mmol/L H₂O₂诱导HUVEC损伤,然后TGG组(含药血清体积分数为0.000 5%)、TGM组(含药血清体积分数为0.000 5%)、丹皮酚组(含药血清体积分数为1%)、最优配比组再加入相应药物含药血清进行干预。采用微板法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)、内皮素1(ET-1)的水平。结果:含药血清最优配比为TGG 0.000 5%、TGM 0.000 5%、丹皮酚1%。与空白组比较,模型组细胞LDH、ET-1水平更高($P < 0.01$),NO水平更低($P < 0.05$);与模型组比较,TGG、TGM、最优配比组细胞NO水平更高($P < 0.01$),LDH、ET-1水平更低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与TGG组、TGM组、丹皮酚组比较,最优配比组细胞LDH水平更低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),NO水平更高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:TGG、TGM、丹皮酚联合应用对H₂O₂诱导的HUVEC损伤具有良好的改善作用,其作用机制与降低LDH、ET-1水平和升高NO水平有关。

关键词 人参总皂苷;丹皮总苷;丹皮酚;联合应用;含药血清;配比;人脐静脉内皮细胞

Study on Improvement Effects of Different Proportions of Total Ginsenoside of Ginseng, Total Glucosides of Moutan Cortex and Paeonol Containing Serum on HUVEC Injury Induced by H₂O₂

ZHANG Liuji^{1,2}, WANG Jianxia², LI Kaiyan¹, TU Wanqian¹(1.Henan Provincial Academy of TCM, Zhengzhou 450004, China; 2.College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effects of different proportions of total glucosides of ginseng (TGG), total

- [8] 史会齐,白雁,谢彩侠,等.近红外光谱法快速测定六味地黄丸中水分含量[J].实验室研究与探索,2011,30(5):38-41.
- [9] 宋丽丽,徐晓杰,范丙义,等.近红外光谱法测定六味地黄丸中丹皮酚[J].中草药,2005,36(8):58-61.
- [10] 陈斌,李军会,臧鹏,等.近红外光谱法快速检测六味地黄丸中的定量指标[J].时珍国医国药,2010,21(5):1064-1066.
- [11] 裴玲,茅向军.六味地黄胶囊的质量标准研究[J].中国民族民间医药,2016,25(16):29-32.
- [12] 徐灿辉,何维为,何云飞. HPLC法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚[J].药物评价研究,2014,37(3):257-259.
- [13] 刘毅,金传山,许甜甜.高效液相色谱法测定山茱萸中熊果酸与齐墩果酸的含量[J].安徽中医学院学报,2013,32(3):85-87.
- [14] 金德庄,张聪.不同产地山茱萸中熊果酸与齐墩果酸含量研究[J].中国药业,2010,19(14):34-35.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:104.
- [16] 丁银花,毕宇安,曹燕飞,等. AOTF近红外光谱技术快速测定茯苓中的水分[J].药学与临床研究,2014,22(3):209-211.
- [17] 任绪华,苏婷,姜文月,等.声光可调-近红外漫反射光谱法快速评价黄芪药材质量[J].中国药房,2018,29(2):168-171.
- [18] 黄丽苹,时桂芹,陈利平,等.芍药苷提取方法及药理作用研究进展[J].农产品加工,2018(1):71-75.

△ 基金项目:河南省科技创新人才计划项目(No.144200510019);河南省中医药科学研究专项课题(No.2016ZY1003)

* 研究员,博士。研究方向:中药质量评价及中药新药开发。电话:0371-66331598。E-mail:zlj666671@163.com

(收稿日期:2018-11-23 修回日期:2019-02-28)

(编辑:林 静)