

复方板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红含量的近红外光谱检测模型研究

姜健¹, 苏明², 杨宝灵¹, 王冰¹, 姜国斌¹

(1. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600; 2. 大连大学医学院, 辽宁大连 116623)

摘要 [目的]提出一种用近红外光谱技术快速检测复方板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红含量的新方法。[方法]首先应用光谱仪获得6种复方板蓝根颗粒的光谱曲线,用主成分分析法进行聚类分析,再结合人工神经网络技术建立模型进行检测。在主成分分析的基础上,以每一个样品的前7个主成分作为神经网络的输入节点,成分类型作为神经网络的输出节点,建立一个7(输入节点)-7(隐含层节点)-2(输出节点)的3层BP人工神经网络模型。[结果]复方板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红2项指标人工神经网络模型预测值的平均相对误差分别为4.14%和4.72%,与高效液相色谱法测定值的符合程度很高,该模型具有很好的预测能力。[结论]新模型可用于复方板蓝根颗粒的质量检测和生产加工过程中的质量控制。

关键词 近红外光谱;复方板蓝根颗粒;靛蓝;靛玉红

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15676-03

Study on Testing Model for Indigotin and Indirubin Contents of Compound Indigowoad Root Granule Using NIRS

JIANG Jian et al (College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

Abstract [Objective] The aim was to put forward a new method for the detection of indigotin and indirubin contents in compound indigowoad root granule by using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). [Method] Firstly, through the principal component analysis method (PCA) to analyze spectroscopic curves of 6 kinds of compound indigowoad root granule which were obtained by spectrometer, then, combined with artificial neural network technology, the model was established to determine. The clustering of indigotin and indirubin content of indigowoad root granule was processed. Based on the PCA results, the first seven principal components were applied as ANN-BP input nodes, and the 2 predictive indexes were applied as output nodes, a testing model of artificial neural network (ANN-BP) with 7 (input nodes)-7 (hidden layer nodes)-2 (output nodes) was set up. [Result] The average relative error of NIRS model of indigotin and indirubin content were 4.14% and 4.72%. The predicted value nearly was equal to HPLC value. The NIRS model had good predictability to analyze compound indigowoad root granule quality. [Conclusion] This NIRS model can be used on detecting compound indigowoad root granule quality and quality controlling of compound indigowoad root granule production processing.

Key words Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS); Compound indigowoad root granule; Indigotin; Indirubin

中药板蓝根为十字花科菘蓝属植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根。板蓝根呈圆柱形,表面灰黄色或棕黄色,根头稍膨大,可见轮状排列的暗绿色叶柄残基、叶柄痕以及密集的疣状突起。板蓝根主要分布在我国江苏、浙江、河南、湖北等地,全国各地均有栽培^[1]。板蓝根临床用于治疗流行性感、高热头痛、瘟毒发斑、大头瘟疫、烂喉丹疹、疔腮、喉痹、疮肿、水痘麻疹、肝炎等,其主要药理作用有抗肿瘤、抑菌消炎、抗病毒、免疫调节等^[2]。板蓝根主要成分为靛蓝 (Indigotin)、靛玉红 (Indirubin)、多糖、 β -谷甾醇、 γ -谷甾醇、精氨酸、谷氨酸、次黄嘌呤及水杨酸等,目前认为具有治疗作用的活性成分主要为靛蓝、靛玉红和多糖^[3]。靛蓝为蓝色针状结晶,有升华性,易溶于吡啶,可溶于乙酸乙酯。靛蓝的药理作用主要表现为对肝脏的保护作用。靛玉红别名炮弹碱,为红色针状晶体,可升华,稍溶于乙醇和醋酸,不溶于水。靛玉红的药理作用主要为表现抗肿瘤和免疫调节。靛蓝和靛玉红的结构式如图1所示。目前,板蓝根固体和液体制剂中靛蓝和靛玉红含量主要通过高效液相色谱法^[4]、比色法^[5]和薄层扫描法^[6]进行检测分析。

近红外光谱法 (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) 具有快速、无损、原位与无消耗等特点,已广泛应用于石化^[7]、农业^[8]和食品^[9]等领域。近年来,NIRS技术已逐步应用于复杂天然药物(中药)分析^[10-12],但利用NIRS方法进

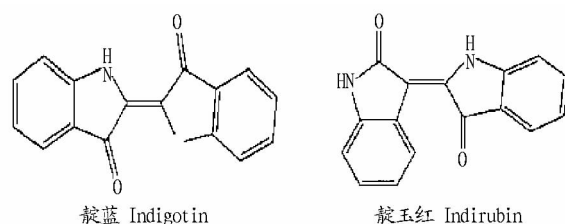


图1 靛蓝和靛玉红的结构式

Fig.1 The structure of indigotin and indirubin

行板蓝根及其制剂鉴定的研究还未见报道。该研究将应用主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 和基于误差反向传播算法 (Back Propagation, BP) 多层前馈神经网络建立复方板蓝根颗粒剂中靛蓝和靛玉红含量的近红外光谱检测模型。通过平滑和多元散射校正 (Multiplicative Scatter Correction, MSC) 的光谱预处理方法消除噪声,并优化光谱的波长范围^[13]。在主成分分析的基础上得到不同复方板蓝根颗粒靛蓝和靛玉红敏感的指纹图谱,将该区域的光谱反射值作为多层前馈神经网络的输入,建立不同复方板蓝根颗粒靛蓝和靛玉红神经网络检测模型,从而获得复方板蓝根颗粒剂品质鉴定和生产加工过程质量控制的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂 由哈尔滨滨鸿制药有限公司、吉林省通化振国药业有限公司等13家公司生产的复方板蓝根颗粒于2007年8月购自大连市医药公司,样品来源见表1。近红外光谱法 (NIRS) 建模:样品1~6作为建模集,每个样品各取30个样本,共计180个样本,样品7~13作为预测集。高效液相色谱法 (HPLC) 分析:经60℃烘干,粉碎后备用。标准品靛蓝和靛玉红均购于中国药品生物制品检定所,水为超纯

基金项目 国家自然科学基金项目 (30872004);大连市自然科学基金项目 (2005B10NC089)。

作者简介 姜健 (1970-),男,内蒙古通辽人,博士,副教授,从事药用植物学研究。

收稿日期 2009-07-20

水,其他试剂均为分析纯。

表 1 试验样品及来源

Table 1 The experimental samples and resources

样品 Sample	来源 Resource	批号 Batch number	包装 g/袋 Package
1	哈尔滨祥鸿制药有限公司	国药准字 Z20055248	15
2	吉林省通化振国药业有限公司	国药准字 Z20044324	15
3	河北东盛英华制药有限公司	国药准字 Z20064425	15
4	太极集团四川南充制药厂	国药准字 Z20055301	15
5	石家庄以岭药业股份有限公司	国药准字 Z20053167	15
6	广州诺金制药有限公司	国药准字 Z20044414	15
7	贵州光正制药有限责任公司	国药准字 Z52020514	15
8	上海玉安药业有限公司	国药准字 Z20043417	15
9	南宁市冠峰制药有限公司	国药准字 Z45022194	15
10	四川大千药业有限公司	国药准字 Z51022480	15
11	桂林聚顺药业有限公司	国药准字 Z45022170	15
12	沈阳恩世制药有限公司	国药准字 Z20043368	15
13	河北天合制药集团有限公司	国药准字 Z20055171	15

1.2 仪器设备 NIRS 分析:VECTOR 22/N 型傅立叶变换近红外光谱仪(德国),80 目标准试验筛,漫反射积分球附件,TQ Analyst V6.2 分析软件和 DPS 处理软件。HPLC 分析:LC-10AD 高效液相色谱仪(日本);UV-2201 紫外分光光度计(日本);MILLI-Q 超纯水装置(美国);HPCHEM 工作站(美国)。

1.3 近红外光谱测定

1.3.1 近红外光谱采集。将 180 个复方板蓝根颗粒样本分别机械粉碎,过 80 目筛,准确称取每个样品 2 g,置于测量杯中,按下述试验条件进行近红外光谱扫描。测样方式:积分球漫反射;扫描分辨率:8 cm⁻¹;扫描次数:30 次;扫描范围:3 800 ~ 10 000 cm⁻¹(波长 1 000 ~ 2 632 nm);温度:20 °C;空气湿度:70%。180 个样本扫描的近红外光谱见图 2。

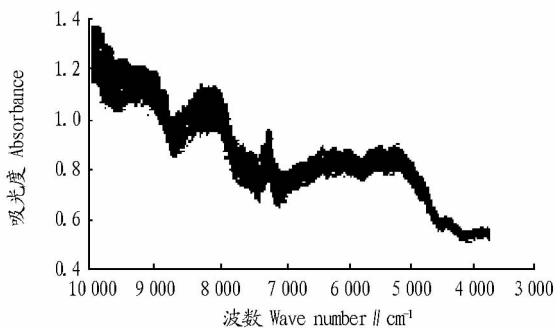


图 2 180 个复方板蓝根颗粒样本的近红外光谱曲线

Fig.2 NIRS curve of 180 compound indigowoad root granule swatches

1.3.2 人工神经网络模型的建立。建立一个 3 层的人工神经网络结构,各层传递函数都用 S 型(Sigmoid)函数。网络输入层节点数为 7,经多次试验确定隐含层节点数为 7,输出层节点数为 2(靛蓝和靛玉红含量值)。目标误差为 0.001,网络指定参数中学习效率为 0.2,设定训练迭代次数为 2000 次,运用 DPS 软件进行人工神经网络建模^[14]。

1.4 高效液相色谱分析

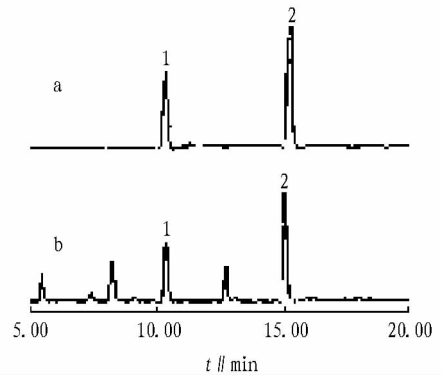
1.4.1 样品溶液与标准品溶液的制备。样品溶液制备:称取复方板蓝根胶囊颗粒约 1.0 g,置 50 ml 锥形瓶中,加乙醇

约 45 ml,超声处理 30 min,冷却,用氯仿萃取 2 次,每次 10 ml,合并萃取液置 25 ml 量瓶中,加氯仿至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

标准品溶液制备:精密称取靛蓝和靛玉红标准品各 5 mg,分别加氯仿溶解定容至 10 ml 容量瓶中,摇匀,使之成为浓度为 0.5 mg/ml 的标准品溶液。

1.4.2 色谱条件。色谱柱:Kromsil ODS 柱(200 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1% 醋酸铵-醋酸(70:30:1);流速:1.0 ml/min;检测波长:286 nm;柱温:25 °C。靛蓝、靛玉红标准品和复方板蓝根颗粒样品的色谱图见图 3。

1.4.3 回归方程、相关系数及检出限。分别配制浓度为 0.10、0.30、0.90、1.20 和 3.60 μg/L 的靛蓝和靛玉红标准品溶液,进样后计算出不同浓度的峰面积,以 3 次平均峰面积值为纵坐标,以进样量为横坐标绘制标准曲线,计算得到了回归方程,复方板蓝根颗粒中靛蓝的回归方程为:Y = 23.62 - 1 573.68X, r = 0.998 2;复方板蓝根颗粒中靛玉红的回归方程为:Y = 11.09 + 1 475.40X, r = 0.997 6。



注:a. 标准品;b. 复方板蓝根颗粒样品。1. 靛蓝;2. 靛玉红。

Note:a. Standard sample; b. Compound indigowoad root granule sample. 1. Indigotin; 2. Indirubin.

图 3 标准品和复方板蓝根颗粒样品的高效液相色谱

Fig.3 HPLC chromatogram of standard sample and compound indigowoad root granule sample

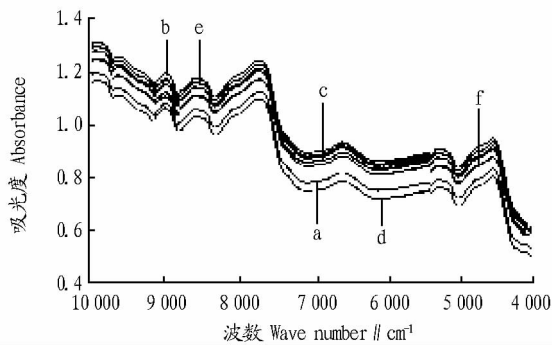
2 结果与分析

2.1 近红外光谱的预处理 为了去除来自高频随机噪声、基线漂移、样本不均匀、光散射等的影响,应用 TQ Analyst V6.2 分析软件对近红外漫反射光谱进行预处理,滤除各种因素产生的高频噪声,再进行多元散射校正处理,处理后的光谱图线见图 4。

2.2 近红外光谱数据的主成分分析 主成分分析的目的是将数据降维,以消除众多信息共存中相互重叠的信息部分^[15],方法是通过对实测的多个指标相关矩阵内部结构关系的研究,构造少数几个综合的主成分指标。它们都是原指标的线性组合,不仅保留原指标的主要信息,且互不相关,同时比原指标具有更好的性质。利用 DPS 处理软件进行主成分分析聚类,前 5 个主成分的累积可信度分别为 90.86%、92.57%、94.12%、97.38%、98.93%。经过计算,前 7 个主成分的累积贡献率已经达到 98.93%,说明这 7 个变量能够很好地表征原数据的信息,具有很好的聚类作用。

2.3 基于主成分建立的复方板蓝根颗粒鉴定模型 在主成分分析的基础上,取前 7 个主成分的吸收峰作为网络的输

入节点,靛蓝和靛玉红2项预测指标作为输出。通过多次试



注:a,b,c,d,e,f分别为样品1,2,3,4,5,6。

Note:a, b, c, d, e, f. stand for sample 1, 2, 3, 4, 5, 6, respectively.

图4 6个复方板蓝根颗粒样品的近红外光谱曲线

Fig.4 NIRS curve of 6 compound indigowoad root granule samples

表2 7个复方板蓝根颗粒样品中靛蓝和靛玉红的HPLC测定值和模型预测值比较

Table 2 Comparison of HPLC determined value and ANN model predicted value of indigotin and indirubin in 7 compound indigowoad root granule samples

样品 Sample	靛蓝 Indigotin			靛玉红 Indirubin		
	HPLC 测定值//mg/袋 HPLC determined value	NIRS 预测值//mg/袋 NIRS predicted value	相对误差 Relative error	HPLC 测定值//mg/袋 HPLC determined value	NIRS 预测值//mg/袋 NIRS predicted value	相对误差 Relative error
7	1.98	2.06	4.04	3.27	3.09	-5.50
8	1.37	1.28	-6.57	2.04	2.21	8.33
9	1.76	1.66	-5.68	3.01	2.92	-2.99
10	2.12	2.09	-1.42	3.45	3.66	6.09
11	1.54	1.59	3.25	2.62	2.69	2.67
12	1.03	0.96	-6.80	1.65	1.69	2.42
13	1.85	1.92	3.78	2.97	2.81	-5.39

近红外光谱光纤技术和近红外化学计量学的快速发展,近红外光谱分析技术已经逐步渗透到制药工业的多个领域,从药物中活性成分的测定到固体药物制剂的非破坏性表征,从药物生产各阶段如合成、混合、制剂、压片的在线检测到原料、产品的品质鉴定等。

研究结果表明,利用近红外光谱技术能够准确检测复方板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红的含量,对复方板蓝根颗粒质量快速检测是完全可行的。研究为大批量复方板蓝根颗粒的质量检测和复方板蓝根颗粒生产加工过程中的质量控制建立了简便、快速、准确的分析方法。NIRS法基于主成分分析和神经网络可以建立起多个成分预测的数学模型,利用已建立的数学模型能够准确、快速地确定未知样品中多个成分的含量,特别适合于中药大批量重复性样品的分析测定。

参考文献

- [1] 董娟娥,梁宗锁,尉芹,等.不同区域松蓝根、叶(板蓝根、大青叶)有效成分含量差异[J].应用生态学报,2006,17(9):1613-1618.
- [2] 闵志良,况瑛,冷文金.板蓝根颗粒质量标准的研究[J].药物分析杂志,2007,27(2):289-291.
- [3] 施霞,倪华,刘云海.板蓝根化学成分及其药理活性研究进展[J].中国

医院药学杂志,2006,26(11):1397-1399.

验表明当隐层含节点为7的时候,模型预测效果最好,这样就可以建立起一个7(输入节点)-7(隐含层节点)-2(输出节点)的3层神经网络模型。复方板蓝根颗粒靛蓝和靛玉红预测值的平均相对误差分别为4.14%和4.72%,预测结果良好。

对其他7份不同产地的复方板蓝根颗粒样品利用模型进行近红外光谱预测,并分别做高效液相色谱法测定,结果见表2。由表2可见,NIRS模型预测值与HPLC测定值之间很接近,相对误差较小,说明模型预测准确性很高,近红外光谱法可以快速、准确地进行复方板蓝根颗粒的品质鉴定。

3 结论与讨论

中药的现代化和国际化面临着许多障碍和难题,主要包括中药的药效药理研究、中药材质量标准化的研究、中药生产过程质量控制研究,以及中药制造工艺现代化等,要解决这些难题,必须利用和借鉴各学科成熟的技术和工艺。随着

- [4] 罗巍伟,贺英菊,王凌,等.HPLC测定板蓝根提取物中靛蓝和靛玉红的含量[J].华西药理学杂志,2004,19(6):455-456.
- [5] 刘依,韩鲁佳,阎巧娟,等.板蓝根中靛蓝和靛玉红的提取及其质量分数的测定[J].中国农业大学学报,2003,8(6):5-8.
- [6] 董娟娥,龚明贵,梁宗锁.板蓝根、大青叶中靛蓝和靛玉红的测定方法比较[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(2):215-217.
- [7] 褚小立,袁洪福,王艳斌,等.遗传算法用于偏最小二乘方法建模中的变量筛选[J].分析化学,2001,29(4):437-442.
- [8] 王卫东,谷运红,秦广雍,等.近红外漫反射光谱法测定整粒小麦单株蛋白质含量[J].光谱学与光谱分析,2007,27(4):697-700.
- [9] 王莉,何勇,刘飞,等.应用光谱技术和支持向量机分析方法快速检测啤酒精度和pH值[J].红外与毫米波学报,2008,27(1):51-54.
- [10] 刘名扬,赵景红,张晓明,等.神经网络-近红外光谱法定量分析Cofrel粉末药品[J].吉林大学学报:理学版,2007,45(2):301-304.
- [11] 虞科,胡楚楚,程翼宇.近红外光谱法测定复方丹参滴丸中的3种有效成分[J].中国药理学杂志,2006,41(3):622-625.
- [12] 高越,柴逸峰,吴玉田.近红外漫反射光谱法鉴别贝母药材的研究[J].中成药,2005,27(12):1440-1443.
- [13] 李晓丽,何勇,裴正军.一种基于可见近红外光谱快速鉴别茶叶品种的新方法[J].光谱学与光谱分析,2007,27(2):279-282.
- [14] 吴迪,冯雷,张传清,等.基于可见/近红外光谱技术的茄子叶片灰霉病早期检测研究[J].红外与毫米波学报,2007,26(4):269-273.
- [15] 何勇,李晓丽,邵咏妮.基于主成分分析和神经网络的近红外光谱苹果品种鉴别方法研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(5):850-853.