



红花提取物纯化过程的近红外光谱快速测定方法研究

陈雪英¹, 徐翔², 陈勇³, 刘雪松^{3*}

(1. 杭州市滨江医院, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009, 3. 浙江大学现代中药研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**应用近红外光谱法,实现中药提取物大孔树脂纯化过程中质量控制指标含量的快速检测和吸附终点的快速判断。**方法:**本研究以红花提取物大孔树脂吸附过程为例,将近红外光谱在线分析技术与偏最小二乘法(PLS)、移动块标准偏差法(MBSD)等方法相结合,以HPLC为参照,构建红花提取物大孔树脂吸附过程的羟基红花黄色素A(HSYA)定量校正模型和吸附终点的定性检测方法。**结果:**所建立的HSYA定量校正模型的相关系数 R 达到0.999,校正集RPD和验证集RPD分别为5.54,5.22($RPD > 5$),模型定量效果良好;同时利用吸附过程采集的近红外光谱,通过MBSD计算和HPLC所获得的吸附终点判断结果接近(仅有1 min偏差)。**结论:**该法操作简便、快速无损,能够应用于红花提取物大孔树脂纯化过程中HSYA浓度的快速检测和吸附终点的快速判断。

[关键词] 近红外透射光谱;红花;大孔吸附树脂纯化;定性定量

大孔树脂是20世纪60年代发展起来的新型吸附剂,具有价廉、吸附容量大、可反复使用等优点。在中药化学成分的提取分离、复方中药制剂的纯化和制备等方面,大孔树脂确有其独特的作用,具有传统分离纯化方法无法比拟的优势^[1-2]。

中药提取液中目标成分的有效吸附是大孔树脂纯化的关键步骤之一,在实际生产中,单柱吸附时,流出液含生药量以在泄漏点附近为宜;若多柱串联吸附,流出液含生药量以接近饱和点为宜。因此,研究适用于大孔树脂纯化过程的在线检测分析技术,实现泄漏点和吸附饱和点快速判断,将有助于解决大孔树脂纯化过程中有效成分泄漏等问题,对于推进该技术产业化应用和提高产品质量具有重大的现实意义。

近红外光谱分析技术是一种快速、无损的绿色分析技术,具有快速分析、样品处理简单、无需试剂消耗等特点^[3-4],目前已经陆续用于药效成分的含量测定^[5]、中药纯化过程分析^[6]、天然药物鉴别^[7]等。根据目前的研究进展,这种快速检测技术是最有希望在中药生产过程中实现工业化应用。

本研究选用“血必净”注射液中君药红花提取物大孔树脂纯化过程为对象,探讨采用近红外快速检测大孔树脂吸附过程中HSYA浓度变化曲线,实现泄漏点的快速预测,同时采用移动块标准偏差法(moving block of standard deviation, MBSD)^[8]计算吸附过程的光谱偏差,以此作为判断吸附饱和指标,实现吸附饱和点的快速判断。

1 材料

Antaris 傅立叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司),附件配置:液体透射检测器,2 mm 内径石英比色皿;Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括四元泵、在线脱气装置、自动进样器、UV 检测器、柱温箱和 Chemstation 工作站;玻璃色谱柱(2 cm × 40 cm);FA2004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司),蠕动泵(BT00-300M,保定兰格恒流泵有限公司)。

红花浓缩液(红日药业股份有限公司),羟基红花黄色素A对照品(成都曼斯特生物科技有限公司),色谱纯乙腈(Merck, Germany),超纯水(Millipore),工业乙醇(95%),HPD400 A 大孔树脂;磷酸(分析纯)。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 树脂预处理 采用 HPD400 A(中等极性)

[稿件编号] 20120528014

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30902017)

[通信作者] * 刘雪松, 副教授, Tel: 13958199997, (0571) 88208621, E-mail: liuxuesong@zju.edu.cn



大孔吸附树脂作纯化介质。使用前,大孔树脂先用95%乙醇浸泡24 h,使之充分溶胀。然后湿法装柱,依次用10倍柱床体积的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液和同量的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液通过柱身,漂洗除去树脂含有的杂质,流速控制为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。最后用20倍柱床体积的纯净水以同一流速浸洗,充分除去残存的盐酸和氢氧化钠。将处理的大孔树脂装柱备用。

2.1.2 吸附过程样品制备 将pH 2(使用盐酸调pH)的浓缩液离心后,以 $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$)进液速度上大孔树脂,10 min后开始取样,16 min前连续接样(为了准确判断泄漏点,需要密集取样),后面每隔2 min取样,每份样品3 mL。每次获得25个样品,重复4次吸附实验,共获得100个样品。

2.2 近红外光谱采集

采集2.1.2中吸附过程样品的透射光谱,光谱扫描范围 $4\ 000 \sim 10\ 000 \text{ cm}^{-1}$,扫描次数32次,分辨率 8 cm^{-1} ,液体样品池为2 mm光程的石英比色皿。实验采用空气为参比进行光谱采集,测量时环境温度 $23 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度40%。

2.3 HSYA浓度的HPLC分析^[9]

2.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈分析柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$);流动相甲醇-乙腈-0.7%磷酸溶液(26:2:72);流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长403 nm;柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量 $5 \text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取3.5 mg羟基红花黄色素A对照品,置5 mL量瓶中,加20%乙腈定容至刻度,梯度稀释后,分别进样分析。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4 数据处理

2.4.1 模型评价参数 对建立好的模型必须通过预测集(或称验证集)样本的预测来判断校正模型的质量,通常选用以下参数作为评价指标来评价所建模型的优劣。以下是相关参数的含义及公式。

交互验证得到的校正误差均方根(root mean square error of cross validation, RMSECV)计算公式为下式。参数由交互验证得到,作为选择主因子数的评价指标,最佳主因子数通常选择在上述参数值最小的地方。

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \hat{C}_i)^2}{n - p}} \quad (1)$$

校正误差均方根(root mean square error of cali-

bration, RMSEC)和预测误差均方根(root mean square error of prediction, RMSEP)2个参数的计算公式如下,其大小与样品化学值相关,这2个参数越小、越接近,则表明模型性能越佳,预测精度越高。

$$\text{RMSEC, RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \hat{C}_i)^2}{m}} \quad (2)$$

校正集和验证集相对偏差(RSEC, RSEP),计算公式如下,在中药研究中RSEC, RSEP通常控制在10%以内,越小越佳。

$$\text{RSEC, RSEP} = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \hat{C}_i)^2}{\sum C_i^2}} \times 100\% \quad (3)$$

相对分析误差(residual predictive deviation, RPD),其计算公式如下,其中SD为校正集标准偏差时,对应的RPD为校正集分析误差;同理为验证集分析误差。

$$\text{RPD} = \frac{\text{SD}}{\text{SECV}} \quad (4)$$

据研究表明,当RPD大于3时表明所建NIR模型较为理想,可以较好地用于实际检测;在2.5~3说明NIR模型用于定量分析是可行的,但预测精度有待于进一步提高;如果RPD小于或等于2.5,表明NIR模型难以用于定量分析^[10-11]。各式中, C_i 为传统分析方法测量值;为通过NIR测量及数学模型预测的结果; C_m 为 C_i 均值; n 为建立模型用的训练集样本数; p 为模型所采用的因子数; m 为用于检验模型的校正集或预测集样本数。

2.4.2 模型建立 定量模型:选择合适的波段,在适宜的光谱预处理的基础上,运用偏最小二乘法(PLS)建立NIR光谱的多元校正定量模型。以RMSECV为指标,运用留二法交互验证确定最佳PLS主因子数。

定性模型:将得到的吸附样品的近红外光谱进行适当的波段选择和预处理后,采用移动块标准偏差法(MBSD)计算光谱偏差S来评定红花提取物大孔树脂吸附饱和点,同时以HPLC作为参比方法进行验证。

3 结果与讨论

3.1 含量测定数据

将取得的样品用流动相稀释,离心后进行HPLC分析。100份吸附样品中HSYA的质量浓度分布范围为 $0.0193 \sim 12.403 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,均值为 $7.797 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,标准偏差为 $4.821 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。前3个实验HSYA的泄漏曲线见图1,从图中可以粗略地判断出

曲线中的2处拐点,即泄漏点和吸附饱和点。

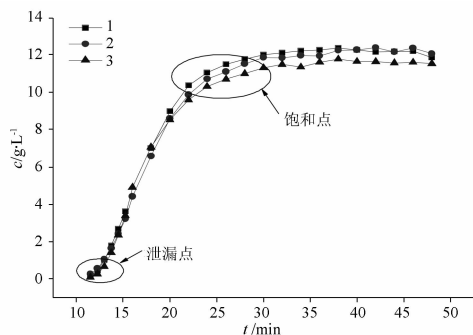


图1 前三批样品 HSYA 泄漏曲线
Fig. 1 HSYA leakage curves of three group samples before

3.2 光谱预处理

在对近红外光谱进行分析之前,一般需要对采集到的原始光谱进行必要的平滑和求导等数学预处理,过滤噪音、提高信噪比,消除基线漂移的干扰。TQ Analyst 软件提供了 Karl Norris 导数平滑滤波和 Savitzky-Golay 平滑滤波 2 种比较常用的滤波方法^[12-13]。本文通过交互验证法,以决定系数 R^2 , RMSEC, RMSEP 为指标来考察不同预处理方法对模型性能的影响,见表 1。通过比较分析,采用 Karl Norris 一阶导数平滑滤波法处理,建模效果比较理想,故选择该方法对光谱进行预处理。

表 1 不同预处理方法对模型性能的影响

Table 1 Effect of different pretreatment on performance of calibration model

预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP	FACTORS
A	0.997	0.327	0.638	8
B	0.988	0.698	0.898	3
B + S-G ¹⁾	0.987	0.710	0.886	3
B + Norris	0.998	0.274	0.463	8
C	0.983	0.822	1.24	4
C + S-G ¹⁾	0.987	0.725	0.878	10
C + Norris	0.999	0.137	0.538	10

注: ¹⁾ Savitzky-Golay 平滑滤波,采用 3 次多项式 7 点平滑;
A. 无预处理; B. 一阶导数; C. 二阶导数。

3.3 建模波段选择

建模波段过宽,必然包含大量冗余信息,同时增加计算量,延长建模时间,因此有必要进行波段的选择,以消除无关的干扰,提高建模速度。将原始近红外光谱进行 Karl Norris 一阶导数平滑滤波法处理,

见图 2。图中包括 10 个不同浓度的样品光谱图,根据图谱分析可见在波段 4 252 ~ 4 819 cm^{-1} , 6 252 ~ 7 371 cm^{-1} 处吸光度出现明显的梯度变化,与浓度变化密切相关,故选择上述 2 个波段建模,采用 7 个主因子数,建模得到的模型相关系数 R 为 0.999, RMSEC 和 RMSEP 分别降低到 0.229, 0.349。选取的 2 个波段较好的避开了水分子羟基的组合频峰,排除了溶剂吸收的干扰。

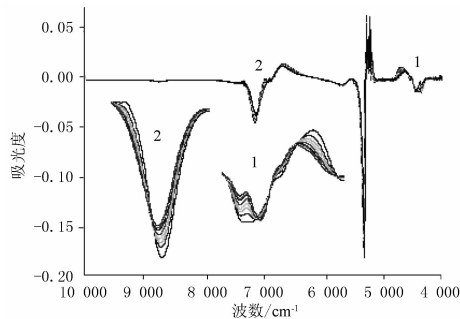


图 2 Karl Norris 一阶导数平滑滤波法处理后的样品光谱
Fig. 2 Spectra pretreated by Karl Norris and first derivative

3.4 吸附过程 HSYA 定量模型建立

将前 3 次吸附实验样品作为校正集,第 4 次实验样品作为验证集,采用 Karl Norris 一阶导数平滑处理,在 4 252 ~ 4 819, 6 252 ~ 7 371 cm^{-1} 波段,用 PLS 建立红花提取物大孔树脂吸附过程 HSYA 的近红外定量校正模型。校正模型中 HSYA 的 NIRS 预测值与 HPLC 测定值相关图见图 3,从图中可看出预测值与 HPLC 测定值之间相关性良好,测量结果趋于一致,计算得到 RSEC 和 RSEP 分别为 4.42%, 4.15%, 均控制在 5% 以内,结果较为理想。同时校正集 RPD 和验证集 RPD 分别为 5.54, 5.22, 均大于 5^[12],说明该模型定量效果良好,建立的 HSYA 定量模型可以用于实际检测。第 4 次吸附实验 HSYA 浓度 HPLC 测定和近红外预测曲线对照图见图 4,采用所建立的近红外模型可以较好的对未知样品进行预测,得到的预测曲线可以与 HPLC 测定结果较好地吻合。

3.5 大孔树脂吸附饱和点快速判断

3.5.1 光谱预处理及波段选择 根据 3.2 项中分析结果,采用一阶导数与 Norris 平滑对采集的原始近红外光谱进行预处理,消除光谱的基线漂移并减小噪声。根据 3.3 项中分析结果剔除噪声较大的波

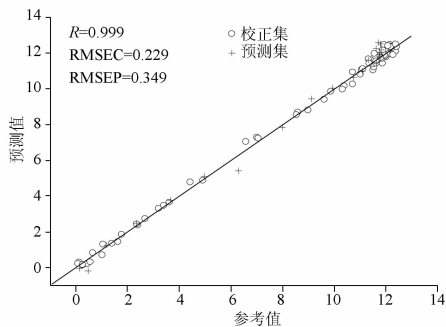


图3 校正集与验证集样品的预测值与 HPLC 测定值的相关图
Fig. 3 Correlation between NIR predicted and HPLC measured values for calibration set

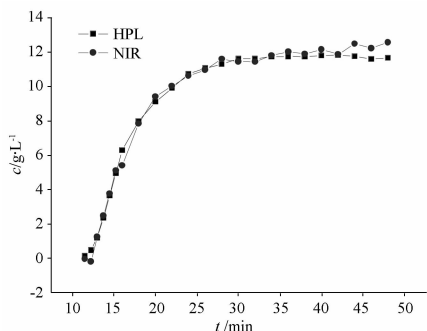


图4 吸附过程 HSYA 浓度近红外预测与 HPLC 测定趋势对照图
Fig. 4 Comparison of purifying process curves predicted by NIR and measured by HPLC

段,选择 $4\ 252 \sim 4\ 819\ \text{cm}^{-1}$, $6\ 252 \sim 7\ 371\ \text{cm}^{-1}$ 这两个波段进行计算。

3.5.2 MBSD 法定性判断 光谱偏差计算,吸附过程样品的光谱重叠严重,并不能从原始光谱图中直观地体现细微的差异,需采用化学计量学方法计算光谱差异。因此,本实验采用移动块标准偏差法(MBSD)计算光谱偏差来评定 HSYA 大孔树脂吸附饱和点。

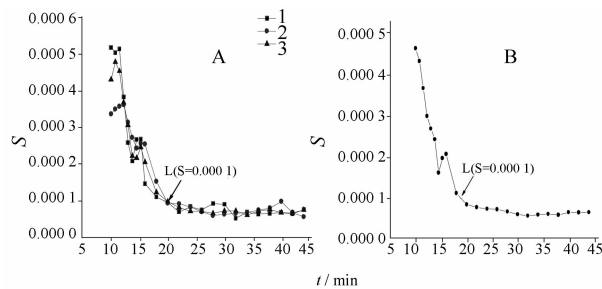
MBSD 法:选择 n 条连续采集的光谱组成一个块,计算块中 n 条光谱在波长点 i 处吸光度 A_{ij} 的标准偏差 S_i ,再计算 m 个波长点的平均标准偏差 S ,具体公式见(5)和(6)。

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{n-1}} \quad (5)$$

$$S = \frac{\sum_{i=1}^m S_i}{m} \quad (6)$$

其中 X_{ij} 是波长点 i 处第 j 条光谱的吸光度,是波长点 i 处块内 n 条光谱的平均吸光度, m 是选取的波长点总数。将块后移一个时间点,即剔除原 n 条光谱中时间点最早的光谱,补充一条新的光谱,重新计算标准偏差 S ,以此类推。

采用前 3 根树脂柱制备的吸附液样本扫描得到的 75 条光谱计算光谱偏差。MBSD 法中的 n 本实验选择 3,即取 3 条光谱作为一个块。以 S 为纵坐标,上样时间为横坐标作图,结果见图 5。



A. 前 3 根树脂柱吸附过程; B. 第 4 根树脂柱吸附过程(图 6 同)。
图 5 标准偏差 S 随上样时间的波动趋势图
Fig. 5 Scatter plots of standard deviation vs time

阈值 L 的选定,标准偏差 S 的大小反映了相邻光谱之间差异的大小。当 S 小于某个阈值 L 并趋向稳定时,表明体系已达稳态。由图 5 可知,上样时间达 20 min(上样量为 1.33 BV)后 S 小于 1×10^{-4} 并趋向稳定。因此,本实验设定阈值 L 为 1×10^{-4} 。为实现在线控制,能及时显示 S 稳定的趋势,又避免偶然因素造成的 S 小于阈值 L ,选用连续 5 个取样点的 S 小于阈值 L 时,判断为吸附终点,提示可以停止上样。

吸附过程饱和点预测,将第 4 根树脂柱制备的吸附液样本扫描得到的 25 条光谱计算光谱标准偏差。图 5 中的右图为 S 随上样时间变化的过程趋势图。根据前面设定的阈值 1×10^{-4} ,判断出当上样时间达 19 min(上样量达 1.27 BV)时,即为吸附饱和点。

3.5.3 HPLC 判断吸附饱和点 定义某个取样点 HSYA 含量相对浓度变化率(relative concentration changing rate, RCCR)为 $\text{RCCR}_i = \frac{C_{i+1} - C_i}{C_i} \times 100\%$,计算获得 HSYA 含量 RCCR 的吸附过程曲线,可根据该曲线设定吸附饱和点,即建议终止点(suggested endpoint, SEP)。当 HSYA 含量相对浓度变化率趋于



阈值时,即认为是吸附达饱和。前 3 次吸附过程的 RCCR 随时间变化曲线见图 6 中,由图获得 SEP,将该处对应的 RCCR(8.5%)确定为阈值。第 4 次吸附实验得到的 HSYA 含量相对浓度变化率随时间的曲线见图 6,通过阈值 0.085 判断,当上样时间达 20 min(上样量达到 1.33 BV)时,达到吸附饱和点。

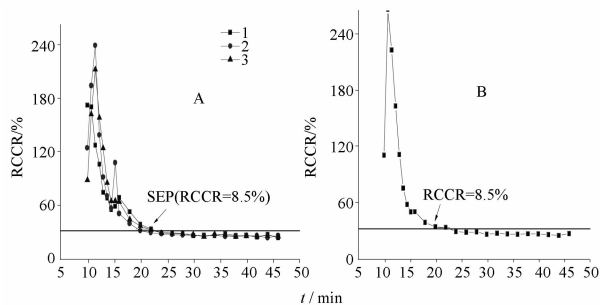


图 6 HSYA 含量相对浓度变化率的时间曲线
Fig. 6 Scatter plots of relative concentration changing rate vs time

3.5.4 MBSD 与 HPLC 判断方法比较 MBSD 判断出吸附饱和点为 19 min,即上样量达 1.27 BV 时,标准验证法 HPLC 计算结果为上样时间达 20 min(上样量达到 1.33 BV)时,2 种方法计算结果仅有 1 min 的偏差。

在大生产中,可在树脂柱底流出口处安装探头,无需取样,实时密集地采集流出液的光谱,有效地避开了光谱离线采集中取样量和取样时间的限制,缩小 MBSD 和 HPLC 的计算偏差,得出的吸附终点数据更加精确。

MBSD 定性分析方法直接利用过程采集的光谱进行计算,避免了 HPLC 分析过程的繁琐操作,快速便捷。因此,本研究采用 NIR 光谱进行 MBSD 计算的定性分析方法有望用于 HSYA 吸附饱和点快速判断。

4 结论

本研究建立了基于近红外光谱分析技术的红花提取物大孔树脂吸附过程 HSYA 含量的快速检测方法,解决了树脂纯化过程中目标成分含量的快速分析问题,实现了吸附过程泄漏点和饱和点的快速判断,为实现中药树脂纯化过程的在线检测提供了依

据。所建方法具有快速、无损和准确的优点,无需复杂的样品前处理,可直接对流出液样品进行检测。本研究同时采用光谱偏差作为判断吸附饱和点的评价指标,比较相邻光谱的差异,无需进行 HPLC 分析,无需建立标准光谱库,实现了大孔树脂吸附饱和点的快速判断。由于本研究所建立的方法具有分析快速的特点,有望用于大孔树脂纯化过程的回馈控制,以期实现吸附过程准确地上样控制,有效避免目标成分的流失,对中药生产过程具有重要指导意义。

[参考文献]

- [1] 侯杰荣,谷勇,柯发敏,等. 大孔吸附树脂技术在中药有效成分分离中的应用[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(5): 344.
- [2] 袁菊丽. 大孔吸附树脂在中药研究中应用近况[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(8):103.
- [3] 王宁,傅春华,周爱敏,等. 近红外漫反射光谱法直接测定小儿消食片中总有机酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1597.
- [4] 任卫波,韩建国,张蕴薇,等. 近红外光谱分析原理及其在牧草航天育种的应用前景[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(2): 303.
- [5] 武佳,杨阳,代涛,等. 近红外光谱法测定 5-羟基色氨酸的含量[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(2): 249.
- [6] 杨南林,程翼宇,瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报, 2003, 61(5): 742.
- [7] 周小芬,叶阳,陈芑,等. 近红外光谱技术在茶叶品质评价中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 413.
- [8] 龚益飞,刘雪松,章顺楠,等. 近红外光谱法在线判断滴丸料液混合终点[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(7): 509.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2005: 103.
- [10] Cozzolino D, Kwiatkowski M J, Parker M, et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy[J]. Anal Chim Acta, 2004, 513(1): 73.
- [11] Malley D F, Rönicke H, Findlay D L, et al. Feasibility of using near-infrared reflectance spectroscopy for the analysis of C, N, P, and diatoms in lake sediments[J]. J Paleolimnol, 1999, 21: 295.
- [12] Thermo Nicolet Corporation. TQ analyst user's guide[M]. Madison: Thermo Nicolet Corporation, 2003:153.
- [13] Chen H Z, Jin S Y. Near-infrared analysis of the chemical composition of rice straw[J]. Ind Crop Prod, 2007, 26(2): 207.
- [14] Hege N, Harald V, Gustav F, et al. Prediction of *in situ* degradation characteristics of neutral detergent fibre (aNDF) in temperate grasses and red clover using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS)[J]. Anim Feed Sci Tech, 2007, 139(1): 92.



Fast measurement method based on near infrared spectroscopy in purifying process of *Carthamus tinctorius* extracts

CHEN Xue-ying¹, XU Xiang², CHEN Yong³, LIU Xue-song^{3*}

(1. Hangzhou Binjiang Hospital, Hangzhou 310052, China;

2. Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;

3. Institute of Modern Chinese Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To really realize quality control of Chinese herb purifying process, near-infrared spectroscopy (NIRS) was used not only for fast monitoring quality-control index of the process, but also for fast judgment of absorption endpoint. **Method:** The purification process of *Carthamus tinctorius* extracts with nonionic macroreticular resin was selected as an example. HPLC was used as the reference method to determine the content of HSYA. Quantitative and qualitative detection modes of purification were developed by NIRS combined with partial least squares (PLS) and moving block of standard deviation (MBSD). **Result:** The correlation coefficient of the calibration model was 0.999, and the RPD for calibration and validation were above 5, of 5.54 and 5.22, respectively. Based on acquisition spectra, absorption endpoint calculated by MBSD was close to that by HPLC, Only 1 min deviation. **Conclusion:** The method mentioned above is proved to be convenient, rapid and nondestructive, and is applicable for fast monitoring the content of HSYA and fast judgment of absorption endpoint in purifying process of *C. tinctorius* extracts.

[Key words] near infrared transmitted spectroscopy; *Carthamus tinctorius*; purification with macroreticular resin; quality and quantity

doi:10.4268/cjmm20122013

[责任编辑 马超一]