基于近红外光谱技术的摩罗丹水提液浓缩过程的多指标快速检测

吴春艳[1]，杜文俊[2]，张伟东[2]，陶玲艳[3](1.台州科技职业学院，浙江 台州 318020；2.金华市中心医院药学部，浙江 金华 321000；3.浙江大学药学院，杭州 310058)

摘要：目的 基于近红外光谱(near infrared spectroscopy，NIR)技术，以芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物为质量控制指标，对摩罗丹水提液的浓缩过程进行快速检测，实现摩罗丹浓缩过程在线质量控制。**方法** 采集摩罗丹水提液浓缩过程的在线近红外光谱，并收集样本；基于 HPLC、烘干法等理化仪器分析方法，测定摩罗丹水提液重要指标的含量；然后运用偏最小二乘法建立重要指标的近红外光谱校正模型；最后验证校正模型的性能，并运用校正模型预测摩罗丹水提液浓缩过程重要指标含量的变化。**结果** 所建立的芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物校正模型的相关系数(R)均>0.98，验证集的 R 均>0.99，且验证集相对偏差均<7%。**结论** 近红外光谱分析技术可实现摩罗丹水提液浓缩过程中芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物 4 个关键质控指标的快速检测，方法能够满足中药实际生产过程分析的准确性要求。

关键词：近红外光谱；偏最小二乘；质量控制；摩罗丹；浓缩过程

中图分类号：R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2022)01-0087-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.01.015

引用本文：吴春艳，杜文俊，张伟东，等. 基于近红外光谱技术的摩罗丹水提液浓缩过程的多指标快速检测[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(1): 87-92.

Multi-indicators Rapid Determination in Concentration Process of Moluodan Water Extration Liquid by Near-infrared Spectroscopy

WU Chunyan[1], DU Wenjun[2], ZHANG Weidong[2], TAO Lingyan[3](*1.Taizhou Vocational College of Sciences&Technology, Taizhou 318020, China; 2.Pharmacy Department, Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, China; 3.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE Based on near infrared spectroscopy(NIR) spectroscopy technology, taking alibiflorin, paeoniflorin, density and soluble solid content as quality control indicators, to carry out rapid detection of Moluodan aqueous extract in the concentration process, so as to realize the on-line quality control of Moluodan concentration process. **METHODS** Collect the on-line NIR spectrum of Moluodan aqueous extract in the concentration process, and collect samples. Based on HPLC, drying method and other physical and chemical instrument analysis methods, the content of important indexes of Moluodan aqueous extract were determined. Then the NIR spectrum correction model of important indexes was established by using partial least square method. Finally, the performance of the correction model was verified, and the correction model was used to predict the changes of important indexes in the concentration process of Moluodan aqueous extract. **RESULTS** The correlation coefficients(R) of the established calibration models for alibiflorin, paeoniflorin, density and solid content were > 0.98, the R of the validation set was >0.99, and the relative deviation of the validation set was<7%. **CONCLUSION** NIR spectral analysis technology can realize the rapid detection of alibiflorin, paeoniflorin, density and solid content in the concentration process of Moluodan aqueous extract, and the results are accurate and reliable.

KEYWORDS: near-infrared spectroscopy; partial least squares; quality control; Moluodan; concentration process

摩罗丹是治疗胃炎病症的经典方剂，由 18 味药材组成，主要包括百合、茯苓、乌药、麦冬、当归、白芍、茵陈等，主治功能为健脾和胃，益气养阴，化瘀通络，常用于脾胃气阴两虚、淤血阻络证[1]。摩罗丹水提液浓缩过程作为摩罗丹生产的一个重要环节，采用加热和减压浓缩方式实现有效物质的富集，其有效成分和溶剂含量的变化对后续精制过程有重要影响。浓缩效果易受溶液配比、温度和压强等因素的影响，导致浓缩过程产品质量波动范围大。目前摩罗丹水提液浓缩过程的质量检测常采用人工经验或者离线液相检测方法，时效性不佳。建立浓缩过程的在线检测方法，实时监测浓缩过程中有效成分和溶剂含量的变化可提高后续过程生产质量。

基金项目：浙江省教育厅一般科研项目(Y202043808)；金华市中心医院基础研究专项科研基金项目(JY2020-6-09)

作者简介：吴春艳，女，博士，中级工程师　E-mail: wcy13575460036@ 126.com

近红外光谱技术是目前较有前景和发展最快的过程分析技术之一[2]，具有绿色环保、分析速度快、不损坏样品等优点，已经陆续用于烟草[3]、食品[4]、农产品[5]等领域，近年来在中药制药领域的应用也逐渐广泛，包括中药材有效成分快速检测[6-8]、制药过程的在线检测[9-11]、中药材产地鉴别[12-13]等。本研究尝试将近红外光谱分析技术与偏最小二乘法结合，建立摩罗丹水提液浓缩过程芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物 4 个关键质控指标的定量校正模型，实现摩罗丹水提液浓缩过程中关键质控指标含量在线检测，为中药浓缩过程的质量控制提供技术参考。

1 材料

乙腈(色谱纯，北京百灵威科技有限公司)；水为超纯水；磷酸(分析纯)、无水乙醇(分析纯)均购自天津永大化学试剂有限公司。芍药苷对照品(批号：MUST-14081408)、芍药内酯苷对照品(批号：MUST14112008)均购自成都曼斯特生物科技有限公司。摩罗丹水提浓缩液(河北邯郸制药股份有限公司，批号：MLD1819，MLD2021，MLD2121，MLD4041，MLD6162，MLD6566，MLD7172)。

DHG-924A 烘箱(上海精宏实验设备有限公司)；ML-T 天平(METTLER TOLEDO)；DKB-5015 水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)；移液枪(德国 Eppendorf)；Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent)，含自动进样器、UV 检测器、在线脱气、四元泵和 Chemstation 色谱管理软件；Waters XBridge C18 分析柱(4.6 mm × 250 mm，5 μm)；ANTAIS Ⅱ近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet)及 TQ Analyst 数据处理软件。

2 方法与结果

2.1 浓缩过程样品和近红外光谱采集

摩罗丹水提液浓缩过程分为分膏前和分膏后 2 个阶段，分膏前采用常压浓缩，温度为 90~100 ℃，浓缩时间约为 5 h，每 30 min 取样 1 次。分膏后采用减压浓缩，压强为 0.05~0.06 MPa，浓缩温度为 80~90 ℃，浓缩时间为 1~2 h，每隔 20 min 取样 1 次，每个批次可获得 16 个样品，共取得 7 个不同批次样品合计 112 个。将浓缩液样品置于水浴锅中加热，恒温至相应的制备温度，以空气为背景，采集样品的近红外光谱，扫描范围为 10 000~4 000 cm^{-1}，扫描次数为 32 次，分辨率为 8 cm^{-1}，所得近红外光谱见图 1。

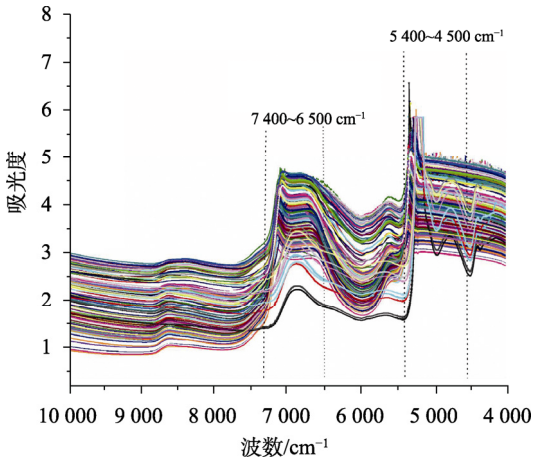

图 1 摩罗丹水提液浓缩过程近红外原始光谱

Fig. 1 Raw NIR spectra of Moluodan water extration liquid in concentration process

2.2 密度值和固含物测定

将浓缩液样品置于水浴锅中恒温至相应的制备温度，摇匀，精密吸取 1 mL，体积记做 v，精密称定，质量记为 m。即可计算出浓缩液的密度值，密度的计算公式见公式(1)，重复 3 次，取平均值。

$$\rho = \frac{m}{v} \tag{1}$$

精密量取提取液样品 3 mL 至已烘干至恒重的扁形瓶(重量记为 X_0)，精密称定，质量记为 X_1，水浴锅上挥干后，置于 105 ℃烘箱中 3 h，放置干燥器中冷却到室温，迅速称重记为 X_2。重复烘干直至 2 次质量差异<5 mg。固含物的计算公式见公式(2)。

$$固含物(mg\cdot g^{-1})=(X_2-X_0)/(X_1-X_0)\times 100 \tag{2}$$

2.3 芍药内酯苷和芍药苷含量测定

2.3.1 HPLC 色谱条件　流动相：0.1%磷酸水溶液-乙腈(15∶85)；检测波长为 237 nm；进样量 10 μL；柱温为 30 ℃；流速为 1 $mL\cdot min^{-1}$。HPLC 色谱图见图 2。

2.3.2 对照品溶液制备　精密称取芍药内酯苷和芍药苷对照品各 7 mg 和 20 mg 于 10 mL 量瓶中，用 50%甲醇溶解定容后作为储备液，用移液管精密吸取储备液 1 mL 至 25 mL 量瓶中，并用 50%甲醇稀释至刻度即得对照品中间液。

2.3.3 供试品溶液制备　取浓缩液样品 0.2 g 于 25 mL 量瓶中，用 50%的甲醇稀释至刻度，13 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，即得。

2.3.4 线性、精密度和重复性考察　精密吸取对照品中间液配成 6 个不同浓度的溶液，按“2.3.1”项下色谱条件依次进样，并记录峰面积。结果显示芍

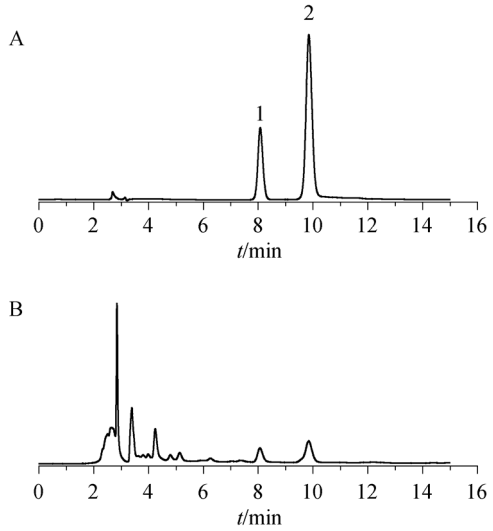

图 2 摩罗丹水提浓缩液色谱图

A–对照品；B–供试品；1–芍药内酯苷；2–芍药苷。

Fig. 2 HPLC chromatogram of Moluodan concentrated liquid

A–standard solution; B–sample solution; 1–paeoniflorin; 2–paeoniflorin.

药内酯苷和芍药苷含量分别在 3.328~ 33.28 μg·mL^{-1} 和 8.2~82 μg·mL^{-1} 线性关系良好，相关系数 R 均> 0.999。

取浓缩液样品(批号：MLD4041-3)按“2.3.3”项下制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次，进样量为 10 μL，测得芍药内酯苷和芍药苷峰面积的 RSD 值分别为 1.87%和 0.79%，结果显示该方法仪器精密度良好。

取浓缩液样品(批号：MLD4041-3)，按“2.3.3”项下平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件下进样，测得芍药内酯苷和芍药苷峰面积的 RSD 值分别为 1.66%和 0.55%，结果表明该方法的重复性符合要求。

2.3.5 稳定性和加样回收率考察考察 取浓缩液样品(批号：MLD4041-3)，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件下每隔 4 h 进样，测得 24 h 内芍药内酯苷和芍药苷峰面积的 RSD 值分别为 1.35%和 0.91%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

取已知芍药内酯苷和芍药苷含量的浓缩液样品(批号：MLD4041-3)，精密称取样品 0.2 g 各 9 份。按样品中已知含量的 80%，100%和120%分别加入芍药内酯苷和芍药苷对照品，每个标准平行 3 份。每份均按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测得芍药内酯苷的平均加样回收率为 98%，芍药苷的平均加样回收率为 97%，RSD 值分别为 1.23%和 1.05%，结果表明该方法准确性良好。

2.4 质控指标测定结果

7 个批次摩罗丹水提液浓缩过程中样品的 4 个关键质控指标的测定结果见表 1，其 RSD 值均较大，可见 4 个关键质控指标在浓缩过程中均有较大的变化。

表 1 质控指标的含量变化范围

Tab. 1 Content range of quality control indicators

指标	含量范围	RSD/%
芍药内酯苷含量/mg·g^{-1}	0.26~6.39	70.08
芍药苷含量/mg·g^{-1}	0.71~15.56	68.77
密度/g·mL^{-1}	0.987~1.404	8.51
固含物/%	6.34~83.32	64.22

2.5 数据处理与模型性能评价

运用 TQ Analyst 数据处理软件，经过异常点剔除，光谱预处理，波段选择，采用留一交叉验证法，以交互验证误差均方根(root mean square error of cross validation，RMSECV)为指标选择最适主成分数，建立摩罗丹水提液浓缩过程的偏最小二乘近红外定量校正模型。对于建立的定量模型，以校正集相关系数 R、校正集预测误差均方根(root mean square error of calibration，RMSEC)、验证集预测误差均方根(root mean squared error of prediction，RMSEP)、验证集相对偏差(relative standard errors of prediction，RSE)来考察模型性能。R 越接近 1 表示模型的预测值与参考方法分析值之间的相关性越好；RMSEC 和 RMSEP 的值越小越接近，则表明模型性能越好，预测精度越高。

2.6 近红外模型的建立

2.6.1 异常点剔除 随机选取 6 批摩罗丹浓缩液样品作为校正集，剩余的 1 批作为验证集。在建模过程中，近红外光谱易受测量环境的改变，光的散射等的影响，导致异常样品(outlier)的产生。本研究分别采用光谱的马氏距离(Mahalanobis ditance)，样品的杠杆值(leverage)和学生化残差(studentized residual)判断异常样品。

马氏距离通过计算每个样品光谱与平均光谱之间的距离，采用 Chauvenet 准则，在 95%置信限下计算样品的马氏距离。以芍药苷的模型为例，马氏距离计算结果见图 3，11 号，12 号，15 号样品的马氏距离值超出了阈值，故建模前将这 3 个样品剔除。

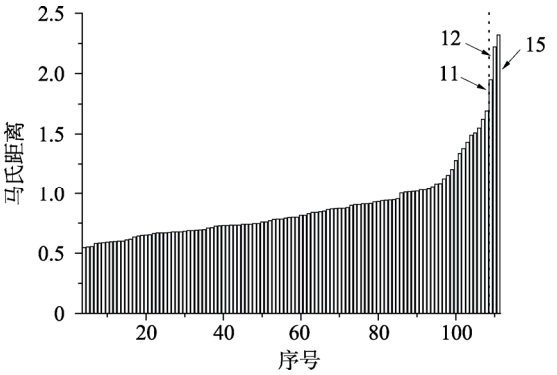

图 3 马氏距离排序图

Fig. 3 Rank of Mahalanobis ditance

样品杠杆值和学生化残差值可判断样品的化学值是否异常，样品杠杆值表示样品对模型影响的重要程度，学生化残差值与样品对应的浓度预测能力的优劣有关。杠杆值越小越有利于模型建立，而残差值较大则说明样品的化学值范围超出了建模样品的含量范围。以芍药苷模型为例，杠杆值和学生化残差计算结果见图 4，6 号和 20 号样品有较大的杠杆值，53 号和 81 号样品有较大的学生化残差值，因此建模前将这 4 个样品也剔除。

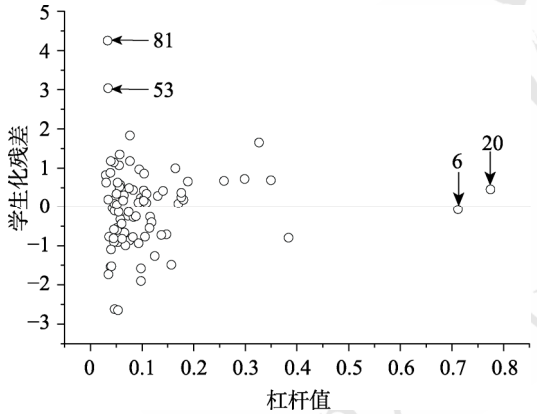

图 4 样品杠杆值与学生化残差

Fig. 4 Leverage *vs* studentized residual of samples

2.6.2 波段选择　摩罗丹浓缩液样品的近红外光谱见图 1。从图 1 可看出，由于摩罗丹浓缩液中主要溶剂为水，因此近红外原始光谱图在 5 400~4 500 cm^{-1} 和 7 400~6 500 cm^{-1} 区间形成两大水分吸收峰。密度和固含物这 2 个指标跟水分含量的变化有密切关系，故密度和固含物建模波段考虑包含水分吸收波段。而其他各种物质的倍频与合频吸收在这 2 个区间内相对较弱，故芍药内酯苷和芍药苷建模时尽量排除这 2 个波段。以芍药苷模型为例，不同波段对模型性能影响见表 2，当选择波段 6 005~5 434 cm^{-1} 和 9 997~8 674 cm^{-1} 时，模型的相关系数 *R* 较高且 RMSECV 值最小，RMSEC 和 RMESP 值较小且较为接近，说明模型性能较好。

表 2 不同波段对芍药苷模型性能的影响

Tab. 2 Performance of paeoniflorin model with different wavelength ranges

波段/cm^{-1}	*F*	*R*	RMSEC	RMSEP	RMSECV
5 985~5 376	7	0.961 3	0.331	0.385	0.503
6 587~5 322	9	0.977 2	0.351	0.374	0.495
6 005~5 434	6	0.971 3	0.322	0.376	0.514
9 997~8 674	5	0.966 9	0.324	0.388	0.523
6 005~5 434+9 997~8 674	7	0.991 6	0.300	0.324	0.400
7 058~5 773	3	0.910 2	0.517	0.320	0.872

2.6.3 预处理方法　近红外光谱容易受到温度、湿度、物质粒度及性状的影响，存在噪音和干扰。原始近红外光谱需要进行预处理、消除噪音干扰、提高信噪比。本研究比较了一阶导数(1st)、二阶导数(2nd)、Karl Norris(K-N)平滑、Savitzky-Golay(S-G)平滑等光谱预处理方法对模型的性能影响。以芍药苷模型为例，不同预处理方法的对芍药苷模型效果见表 3，结果显示选用 1st 和 K-N 平滑结合作为预处理方法，模型的相关系数 *R* 最高，且 RMSECV 值最小，建模效果最优。

表 3 不同光谱预处理方法对芍药苷模型性能影响

Tab. 3 Effects of different spectral preprocessing method on the performance of paeoniflorin model

预处理方法	*F*	*R*	RMSEC	RMSEP	RMSECV
1st	7	0.978 3	0.374	0.453	0.521
2nd	5	0.957 3	0.453	0.537	0.643
1st+S-G	8	0.979 3	0.367	0.397	0.510
1st+K-N	7	0.991 6	0.300	0.324	0.400
2nd+S-G	6	0.936 8	0.465	0.759	0.785
2nd+K-N	5	0.977 6	0.392	0.432	0.584

2.6.4 主成分数的确定　采用偏最小二乘回归法建立定量校正模型时，需要对主成分数进行合理选择。采用留一法交叉验证确定最佳主成分数，芍药苷定量分析模型的最佳主成分数的优选方法见图 5。当主成分数为 7 时，模型的 RMSECV 趋于稳定。因此芍药苷定量分析模型的最佳主成分数为 7。

2.6.5 定量模型的建立　根据上述模型优化结果，运用偏最小二乘回归法建立近红外光谱与芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物的多元校正模型。多元校正模型见图 6，芍药内酯苷、芍药苷和

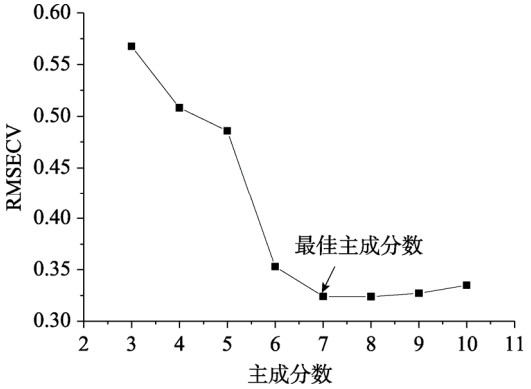

图 5 芍药苷模型不同主成分数的 RMSECV

Fig. 5 RMSECV of different principal component fractions of paeoniflorin model

固含物校正模型的相关系数 R 值均>0.99，密度校正模型的 R 值>0.98。芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物的校正模型的性能参数见表 4，其中 RMSEC、RMSEP 和 RMSECV 均较小且接近，表明所建立的校正模型性能稳定，且预测精度较好。

2.6.6 近红外校正模型的应用和验证 将所建立的近红外校正模型应用于预测验证集样品中芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物的含量，所得的含量数据统称为预测值。为验证预测值的准确性，采用标准方法检测验证集样品中芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物含量，统称为实测值。摩罗丹水提液浓缩过程关键质控指标的预测值和实测值的变化趋势基本一致，结果见图 7。4 个指标的近红外校正模型的验证参数见表 5，结果显示 4 个指标的预测值与实测值十分接近，相关系数 R 均>0.99，预测相对偏差 RSEP 均<7%，表明所建立的校正模型的准确性较高，能够满足中药实际生产过程分析的准确性要求。

表 4 摩罗丹浓缩过程各指标模型参数表

Tab. 4 Parameter table of each index model of Mordan concentration process

质控指标	F	R	RMSEC	RMSEP	RMSECV
芍药内酯苷	7	0.992 5	0.131	0.164	0.208
芍药苷	7	0.991 6	0.300	0.324	0.400
密度	4	0.980 4	0.017	0.027	0.019
固含物	10	0.996 7	1.520	1.350	1.910

表 5 4 个质控指标的校正模型性能评价参数

Tab. 5 Preditive performance of the calibration models for four indicators

质控指标	RMSEP	RSEP/%	R
芍药内酯苷	0.164	6.28	0.992 5
芍药苷	0.324	5.62	0.993 8
密度	0.027	2.50	0.993 4
固含物	1.350	3.18	0.996 9

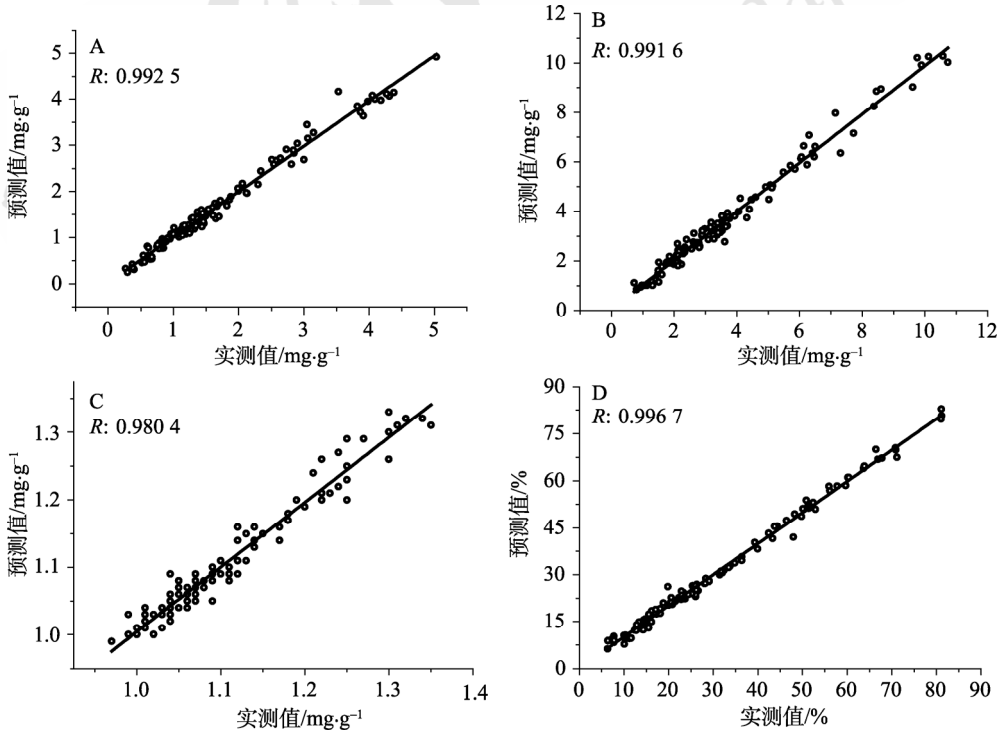

图 6 摩罗丹水提液浓缩过程近红外模型校正集预测值与实测值相关图

A–芍药内酯苷；B–芍药苷；C–密度；D–固含物。

Fig. 6 Correlation diagram between the reference values and predicted values in calibration of Moluodan water extration

A–alibiflorin; B–paeoniflorin; C–density; D–soluble solid content.

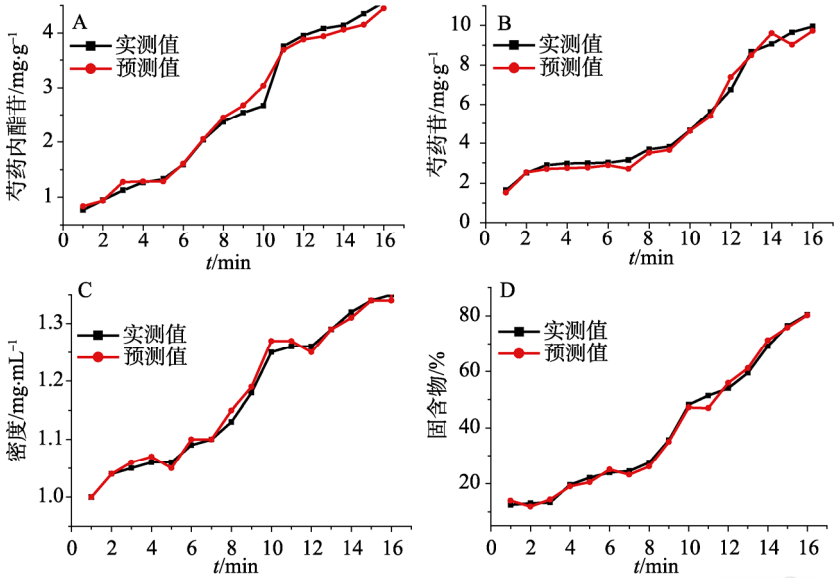

图 7 摩罗丹水提液浓缩过程近红外模型验证集预测值与实测值相对趋势图

A–芍药内酯苷；B–芍药苷；C–密度；D–固含物。

Fig. 7 Relative trend chart of Moluodan concentration process measured by reference assays and predicted by NIR on-line models

A–alibiflorin; B–paeoniflorin; C–density; D–soluble solid content.

3 讨论

本研究基于近红外光谱分析技术，运用偏最小二乘法，通过异常点剔除、光谱预处理、波段选择等优化步骤，建立了摩罗丹提取液浓缩过程中芍药内酯苷、芍药苷、密度和固含物的最佳定量分析校正模型。校正模型的性能参数 R 值均>0.98，并且 RESP 均<7%，说明预测结果准确可靠，可应用于摩罗丹水提液浓缩过程在线检测，实现中药制剂生产过程的在线检测和实时质量控制。在实际生产应用中，原药材质量、生产工艺波动等因素均有可能引起浓缩液中的各成分的含量波动，若含量波动超出所建立的近红外模型范围，则会影响模型的预测精度。本实验目前仅收集了 7 个批次的摩罗丹水提浓缩液样本，实际应用中还应继续积累大量的浓缩液样本，不断扩充模型，以提高模型的稳健性和适用性。

REFERENCES

[1] DING Z W. Advances in research on pharmacological effects and clinical application of MoLuodan[J]. China J Pharm Econ(中国药物经济学), 2018, 13(9): 127-129.

[2] LU W Z, CHU X L. Near infrared spectroscopy and process analytical technology[J]. Mod Sci Instruments(现代科学仪器), 2007(4): 13-17.

[3] ZHANG L, TANG X H, MA X, et al. Research on characteristic of tobaccos from different ecological environments base on near infrared spectroscopy[J]. Spectrosc Spectr Anal(光谱学与光谱分析), 2012, 32(3): 664-668.

[4] YANG R J, LIU R, YANG Y R, et al. Classification of adulterated milk by two-dimensional correlation near-infrared spectroscopy and multi-way principal component analysis[J]. Opt Precis Eng(光学精密工程), 2014, 22(9): 2352-2358.

[5] CHI Q, WANG Z W, YANG T T, et al. Recognition of early hidden bruises on kiwifruits based on near-infrared hyperspectral imaging technology[J]. Trans Chin Soc Agric Mach(农业机械学报), 2015, 46(3): 235-241, 234.

[6] XIE Y J, ZHANG J N, ZHU D N, et al. Establishment of near infrared quantitative analysis model for four components in cinnamomi cortex[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(2): 119-123.

[7] NI H F, SI L T, HUANG J P, et al. Rapid determination of active components in Ginkgo biloba leaves by near infrared spectroscopy combined with genetic algorithm joint extreme learning machine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(1): 110-117.

[8] buddleoside in chrysanthemi indici *Flos* of Henan Province by near infrared spectroscopy[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(8): 74-77.

[9] TAO Q, JIN Z J, LUO XI J, et al. Study on endpoint determination and process analysis of tablet coating based on near infrared spectroscopy[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(19): 4625-4632.

[10] KUANG Y H, TANG H J, WANG D Q, et al. A method for analyzing uniformity of borneol in manufactory process of compound Danshen tablets by near-infrared spectroscopy[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(6): 7-11.

[11] TAO L Y, LIN Z L, CHEN J S, et al. Mid-infrared and near-infrared spectroscopy for rapid detection of Gardeniae Fructus by a liquid-liquid extraction process[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017(145): 1-9.

[12] 唐艳, 王维皓, 刘江弟, 等. 基于近红外技术的西洋参质量评价及产地鉴别[J]. 中药材, 2018, 41(3): 540-545.

[13] SHI C X, YANG Y W, GUO Z X, et al. Identification of Astragalus from different habitats by NIR spectra[J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2006, 18(1): 19-21.

收稿日期：2020-12-10

(本文责编：曹粤锋)