光程对清开灵注射液中黄芩苷近红外定量模型的影响*

杜敏[1],吴志生[1],林兆洲[1],隋丞琳[1],史新元[1,2**],乔延江[1,2**]

(1. 北京中医药大学 中药学院,北京 100102;2. 国家中医药管理局(中药信息工程)重点研究室,北京 100102)

摘要 目的:探讨光程变化对清开灵注射液中黄芩苷近红外定量模型的影响。方法:以清开灵注射液为研究对象,分别采集 6 mm 和 8 mm 2 个不同光程下的近红外光谱,采用偏最小二乘回归法(PLSR)建立黄芩苷定量模型,比较不同光程及光谱预处理方式对黄芩苷定量模型性能的影响。结果:在 2 个光程下,采用原始光谱所建模型最优,且 6 mm 光程优于 8 mm 光程。PLS 模型对校正集的预测结果为 $R_C = 0.989$,RMSEC = 0.16;对验证集的预测结果为 $R_P = 0.993$,RMSEP = 0.12,RPD = 7.65。结论:光程变化对基于近红外光谱的黄芩苷定量模型存在影响,选择适合于待测组分的光程能够更有效地实现定量检测。

关键词: 近红外光谱;光程影响;定量模型;清开灵注射液;黄芩苷;光谱预处理方式;偏最小二乘回归法(PLSR)

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2012)10-1796-05

Effect of optical path length on the NIR quantitative determination of baicalin in Qingkailing injection*

DU Min[1], WU Zhi-sheng[1], LIN Zhao-zhou[1], SUI Cheng-lin[1], SHI Xin-yuan[1,2**], QIAO Yan-jiang[1,2**]

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Research Center of Traditional Chinese Medicine Information Engineering, Beijing 100102, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of optical path lengths on the NIR quantitative determination of baicalin. **Methods:** NIR transmission spectra of Qingkailing injection were collected at different optical path lengths (6 mm and 8 mm) using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectrometer in the wavelength range of 4000 cm^{-1} to 10000 cm^{-1}. Calibration models were developed using partial least-squares regression (PLSR) with high-performance liquid chromatography (HPLC) as a reference method. Seven spectral preprocessing methods were compared, and the number of PLS factors was optimized by leave-one-out cross-validation. **Result:** The PLS model of raw spectra at 6 mm optical path length presented the best prediction ability. For the calibration set, R_C = 0.989, RMSEC = 0.16; and for the validation set, R_P = 0.993, RMSEP = 0.12, RPD = 7.65. **Conclusion:** Our results demonstrated that the optical path length could affect the NIR analysis result of baicalin determination in Qingkailing injection, and an appropriate optical path length would guarantee the detection accuracy.

Key words: near infrared spectroscopy; optical path length influence; quantitative model; Qingkailing injection; baicalin; spectral preprocessing method; PLSR

近红外光谱作为一种快速、无损的分析方法,可对气体、液体和固体等各种样品进行快速精确的定性、定量分析[1]。分析液态样品时主要采用近红外透射光谱法,其应用已多见报道[2~5]。

近红外透射光谱法是通过检测待测样品的吸光度,而实现对待测成分含量的测定。根据朗伯-比尔定律可知,吸光度的大小主要取决于特定波长下样品的吸光系数和光程长度。对于清开灵注射液,其所含成分复杂,不同成分的吸光系数不同,因而其最佳检测光程也不同。黄芩苷作为清开灵注射液的

* 国家科技部十一五重大新药创制专项"清开灵注射液安全性关键技术研究"(2010ZX09502-002)和北京市中药基础与新药研究重点实验室资助

** 通讯作者 乔延江 Tel:(010)84738621;E-mail:yjqiao@263.net
史新元 Tel:(010)84738621;E-mail:shixinyuan01@163.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

指标成分,若能筛选出其最佳检测光程,则可确保所获取的光谱数据更有利于有效信息的提取,进一步保证定量检测的准确性。已有学者[6]研究了不同光程对黄酒中金属元素近红外透射光谱分析精度的影响,结果表明对于所测金属元素,最优光程为 5 mm。又有学者[7]开展了光程变化对基于近红外光谱的黄酒品质检测影响的研究,并确定了黄酒酒精度、糖度和 pH 的最佳检测光程。

本研究应用近红外光谱法分析清开灵注射液中指标成分黄芩苷的含量,主要考察不同光程对黄芩苷含量近红外分析结果的影响。通过光程选择指导光谱采集条件的优化,从而最终提升近红外定量模型的准确性。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 清开灵注射液(批号:011402A,011403A,011706A)购自北京中医药大学药厂,黄芩苷对照品(批号:110777-201005)购自中国食品药品检定研究院。甲醇和磷酸均为色谱级(Fisher 公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器 Antaris I 傅里叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司),配备 RESULT 3.0 光谱采集软件。Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱、DAD 二极管阵列检测器。

1.3 样本制备 取 3 批清开灵注射液,每个批次取 3 个样品,将每个样品用纯净水分别稀释至 1,2,3,4 mg·mL^{-1}4 个浓度水平,共得 36 个样本。

1.4 清开灵注射液的近红外光谱采集 将样本溶液分别注入直径为 6 mm 和 8 mm 的样品管进行光谱采集。光谱采集条件均为:透射模式,以仪器内置背景为参比,扫描范围 4000~10000 cm^{1},分辨率 8 cm^{-1},累计扫描次数 32 次,每个样品重复扫描 3 次,计算平均光谱用于分析。

1.5 清开灵注射液中黄芩苷含量的 HPLC 测定 近红外光谱采集之后,立即进行高效液相色谱分析。依照 2010 年版中国药典一部中清开灵注射液项下黄芩苷的含量测定方法和色谱条件,对样本中黄芩苷的含量进行测定,具体色谱条件如下:Waters ODS C_{18}色谱柱(5 μm,4.6 mm×150 mm);流动相为甲醇-水-磷酸(50:50:0.2);等度洗脱,流速 1.0 mL·min^{-1};检测波长 274 nm,柱温 30 ℃。

1.6 近红外光谱数据处理 数据处理采用 TQ Analyst 8.0 光谱分析软件。建模方法采用偏最小二乘回归进行全波段(4000~10000 cm^{-1})建模。同时对比 7 种不同预处理方法,包括原始光谱、一阶微分、一阶微分+SG(Savitzky-Golay)平滑、一阶微分+Norris 平滑、二阶微分、二阶微分+SG 平滑、二阶微分+Norris 平滑,筛选出最佳预处理方式。

1.7 模型的评价

将不同光程下采集的光谱分别按照"1.6"项下的方法进行建模,对比不同模型的预测能力。模型潜变量因子数的大小决定模型预测能力的好坏,本研究采用留一交叉验证选择模型的最佳潜变量因子数。当交叉验证均方差(Root Mean Square Error of Cross-Validation,RMSECV)随因子数增加而趋于平稳,一般选其最小值所对应的因子数为最优潜变量因子数[8]。

模型的内部稳健性和拟合效果以相关系数 R_C 和校正均方差(Root Mean Square Error of Calibration,RMSEC)为评价指标。R_C 越大,RMSEC 值越小,所对应的模型拟合效果越好[9]。

$$R_C=\sqrt{1-\frac{\sum_{i=1}^{N}(\hat{C}_i-C_i)^2}{\sum_{i=1}^{N}(C_i-\bar{C})^2}} \quad (1)$$

$$\mathrm{RMSEC}=\sqrt{1-\frac{\sum_{i=1}^{N}(\hat{C}_i-C_i)^2}{N}} \quad (2)$$

其中,C_i 为校正集中第 i 个样本的黄芩苷高效液相色谱测定浓度;$\hat{C}_i$为校正集中第 i 个样本的近红外光谱分析预测值;$\bar{C}$ 为校正集样本参考浓度的平均值;N 为校正集样本的个数。

为评价模型的预测性能,进一步对模型进行外部验证。所建模型对验证集样品的预测结果以 R_P 和预测均方差(Root Mean Square Error of Prediction,RMSEP)为评价指标。R_P 越大,RMSEP 值越小所对应的模型预测能力越好。

$$R_P=\sqrt{1-\frac{\sum_{i=1}^{n}(\hat{C}_{pi}-C_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(C_i-\bar{C})^2}} \quad (3)$$

$$\mathrm{RMSEC}=\sqrt{1-\frac{\sum_{i=1}^{n}(\hat{C}_{pi}-C_i)^2}{n}} \quad (4)$$

其中,C_i 为验证集中第 i 个样本的高效液相色谱测定浓度;$\hat{C}_{pi}$为验证集中第 i 个样本的近红外光谱分析预测值;$\bar{C}$ 验证集样本参考浓度的平均值;n 为验证集样本的个数。

此外,为消除由于样本集不同所造成的影响,使预测准确度标准化,本研究进一步采用 RPD(Residual Predictive Deviation)[10,11]评价模型的预测能力。RPD 值越大,所对应的校正模型的预测性能越好,当 RPD 大于 3 时,表明模型具有很好的预测性

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能[12,13]。

$$RPD = \frac{SD}{RMSEP} \quad (5)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(C_i - \overline{C})^2}{n-1}} \quad (6)$$

其中,C_i 为验证集中第 i 个样本的高效液相色谱测定浓度;$\overline{C}$ 为验证集样本浓度的平均值;n 为验证集样本的个数。

2 结果与讨论

2.1 清开灵注射液中黄芩苷的含量测定结果 本研究采用高效液相色谱法测定了 36 个样本中黄芩苷的含量,测定结果见表 1。

表 1 清开灵注射液中黄芩苷的含量测定结果(mg·mL^{-1})

Tab 1 Assay of baicalin in Qingkailing injection by HPLC

批号 (Lot No.)	样本数 (numbers)	浓度范围 (concentration range)	平均值 (average)	标准偏差 (SD)
011402A	12	0.91 ~ 3.78	2.31	1.08
011403A	12	0.88 ~ 3.63	2.23	1.04
011706A	12	0.90 ~ 3.77	2.31	1.08

2.2 样本集的划分 为消除样本集划分过程中主观因素的影响,本研究在 MATLAB 7.0 操作环境下,采用 Kennard - Stone 法进行样本集的划分,选取 24 个样本作为校正集,12 个样本作为验证集,校正集和验证集样本中黄芩苷浓度分布范围见表 2。

表 2 校正集和验证集样本中黄芩苷浓度分布范围(mg·mL^{-1})

Tab 2 Concentration range of baicalin in calibration and validation sets

光程 (optical path) /mm	样本集类型 (samples)	样本数 (numbers)	浓度范围 (concentration range)	平均值 (average)	标准偏差 (SD)
6	校正集(calibration set)	24	0.88 ~ 3.78	2.32	1.11
	验证集(validation set)	12	0.90 ~ 3.64	2.20	0.91
8	校正集(calibration set)	24	0.88 ~ 3.78	2.47	1.03
	验证集(validation set)	12	0.88 ~ 3.69	1.91	0.99

2.3 清开灵注射液的近红外光谱分析

不同光程下采集到的清开灵注射液的近红外吸收光谱见图 1。由原始光谱可以看出,在 7500 ~ 4000 cm^{-1}波段,清开灵注射液有较强的吸收,但是 6 mm 和 8 mm 光程下的吸收强度明显不同。

2 个光程下的光谱在 7200 ~ 7050 cm^{-1}、6560 ~ 6420 cm^{-1}和 5390 ~ 5280 cm^{-1}等处均具有明显的吸收峰,其中 7200 ~ 7050 cm^{-1}和 5390 ~ 5280 cm^{-1}处的吸收主要与 O - H 基团和 C - H 基团的一级倍频和组合频有关,6560 ~ 6420 cm^{-1}处主要与清开灵注射液中 N - H 基团的一级倍频有关。这些强吸收主要是由于清开灵注射液中含有苷类、有机酸和氨基酸等成分。

此外,在不同波段下,两类光谱的差异也各不相同。在 6500 ~ 5370 cm^{-1},8 mm 光程的吸收强度大于 6 mm 的;而在 7090 ~ 6500 cm^{-1}和 5370 ~ 4000 cm^{-1},8 mm 光程的吸收强度小于 6 mm 的。这也进一步说明了对于不同的成分,并不都是光程越长,吸光度就越大,其最佳检测光程是不同的。

2.4 光程对模型性能的影响

表 3 为不同光程采集的光谱数据经预处理后所建模型的性能。由表可知,对于 6 mm 光程,采用原始光谱所建模型的拟合能力最好,此时相关系数 R_C 最大(0.989),RMSEC 最小(0.16)。其余 6 种光谱

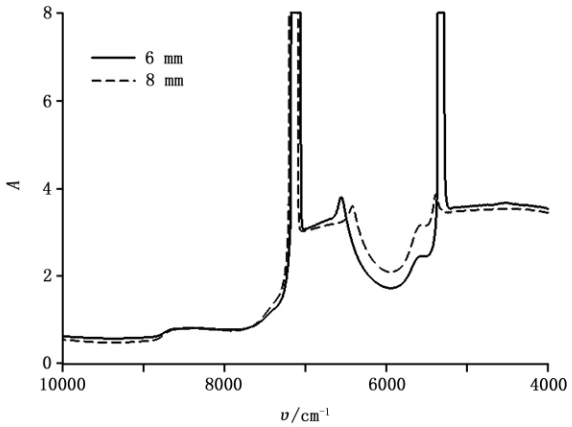

图 1 清开灵注射液的近红外吸收光谱图

Fig 1 Absorbance spectra of Qingkailing injection with different optical path lengths

预处理方式下所建模型拟合能力相近,其 R_C 为 0.918 ~ 0.926,RMSEC 为 0.41 ~ 0.43。

对于 8 mm 光程,其原始光谱、一阶微分 + SG 平滑、一阶微分 + Norris 平滑、二阶微分、二阶微分 + Norris 平滑光谱建模结果相近,R_C 为 0.975 ~ 0.984,RMSEC 为 0.18 ~ 0.21,说明所建模型具有很好的拟合能力和内部稳健性。一阶微分光谱建模结果较好,其 R_C 为 0.895,RMSEC 为 0.53。二阶微分 + SG 平滑光谱建模结果一般,R_C 仅为 0.844。

以上结果表明,除 8 mm 光程二阶微分 + SG 平

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

滑光谱建模结果一般外,其余模型的内部稳健性和拟合效果都比较好,其中 6 mm 光程下采用原始光谱所建模型的拟合能力最好。实验结果还表明,同一体系在不同光程下采集的数据,经相同光谱预处理后所建模型的效果不同。

对比不同模型对验证集的预测结果可以看出,在每一光程下,采用原始光谱所建的模型最好,其 R_P 和 RPD 值较高,且 RMSEP 处于较低水平,表明原始光谱包含的信息对于建模最有效。其中,当光程为 6 mm,采用偏最小二乘回归结合原始光谱建立的黄芩苷定量模型最好,R_P 为 0.993,RMSEP 最小为 0.12,RPD 最大为 7.93,大于 3,这说明模型具有很好的预测能力。该模型参考值和预测值之间的相关关系见图 2。而对于 8 mm 光程,R_P 为 0.926,RPD 为 2.73,该模型的定量效果稍逊于光程 6 mm 时所建模型。这表明 6 mm 光程更适于清开灵中黄芩苷含量的测定。

表 3 不同光程下的建模结果比较

Tab 3 Comparison of calibration models under different optical path lengths

光程 (optical path) /mm	预处理方法 (preprocessing methods)	校正结果 (calibration result)		交叉验证 (cross validation)	验证结果 (validation result)		
		R_C	RMSEC	RMSECV	R_P	RMSEP	RPD
6	raw	0.989	0.16	0.45	0.993	0.12	7.65
6	1 d	0.918	0.43	0.51	0.882	0.50	1.83
6	1 d + SG 平滑(smoothing)	0.920	0.43	0.53	0.884	0.49	1.86
6	1 d + Norris 平滑	0.928	0.41	0.52	0.894	0.47	1.93
6	2 d	0.926	0.41	0.47	0.909	0.44	2.05
6	2 d + SG 平滑(smoothing)	0.919	0.43	0.52	0.881	0.50	1.83
6	2 d + Norris 平滑(smoothing)	0.926	0.41	0.52	0.888	0.48	1.89
8	raw	0.978	0.21	0.62	0.926	0.36	2.73
8	1 d	0.895	0.53	0.77	0.917	0.49	2.03
8	1 d + SG 平滑(smoothing)	0.975	0.22	0.50	0.921	0.40	2.49
8	1 d + Norris 平滑(smoothing)	0.973	0.23	0.51	0.902	0.43	2.32
8	2 d	0.986	0.17	0.89	0.879	0.63	1.56
8	2 d + SG 平滑(smoothing)	0.844	0.54	0.78	0.921	0.50	1.98
8	2 d + Norris 平滑(smoothing)	0.984	0.18	0.48	0.874	0.50	1.97

注:raw:原始光谱(raw spectra);1 d:一阶微分(first order differential);2 d:二阶微分(sencond order differential);SG:Savitzky - Golay

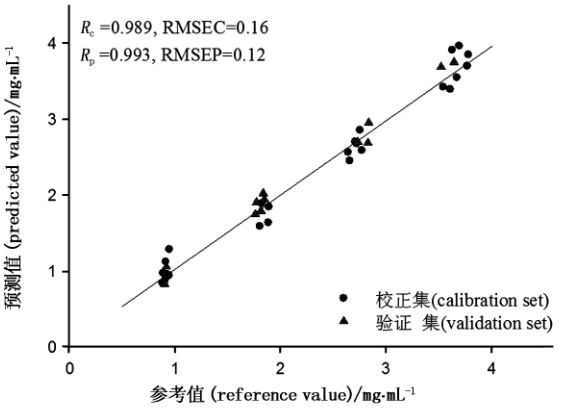

图 2 黄芩苷含量预测值与参考值相关图

Fig 2 Correlation between predicted and reference value of baicalin

3 结论

本研究探讨了近红外光谱的光程长度对清开灵注射液中黄芩苷含量检测的影响,并考察了不同预处理方法对建模的影响。结果表明,同一体系在不同光程下采集的数据,经相同光谱预处理后所建模型的效果不同。在每一光程下,均为原始光谱建模效果最好,且相比于 8 mm 光程,6 mm 光程更适于清开灵注射液中黄芩苷的含量测定。结果证明光程变化对基于近红外光谱的黄芩苷定量分析的确有一定的影响,选择适合于待测组分的光程能够更为有效地实现准确的定量检测。

本研究初步探讨了光程变化对于清开灵注射液这一中药复杂体系中指标成分定量检测的影响,但

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

采用的样本量较少,且考察的光程范围较窄,后续工作将增加样本数量和光程变化梯度进行进一步探索研究。

参考文献

1 LU Wan-zhen(陆婉珍),YUAN Hong-fu(袁洪福),XU Guang-tong(徐光通),*et al*. Modern Near Infrared Spectroscopy Analytical Technology(现代近红外光谱分析技术). Beijing(北京):China Petrochemical Press(中国石化出版社),2000

2 WANG Ning(王 宁),WU Wei-hong(武卫红),LI Zhong-wen(李中文),*et al*. Research based on near infrared spectroscopy on-site rapid quantitative analysis method for baicalin,chlorogenic acid and forsythin in Shuanghuanglian oral liquid(基于近红外光谱技术对双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸和连翘苷进行现场快速定量分析方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2010,30(9):1689

3 ZHU Xiang-rong(朱向荣),LI Na(李 娜),SHI Xin-yuan(史新元),*et al*. Analysis of geniposide and total nitrogen content in Qingkailing injection intermediate by near infrared spectroscopy and synergy interval partial least squares(近红外光谱与组合的间隔偏最小二乘法测定清开灵四混液中总氮和栀子苷的含量). *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报),2008,29(5):906

4 REN Jian-sheng(任建生),GUAN Xiao-lan(关晓岚),LU Ying(鲁 莹),*et al*. Quantity study in FT-207 micro emulsion by NIR(近红外光谱分析技术对替加氟微乳进行含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2010,30(2):94

5 LI Na(李娜). Study on the method of rapid quality evaluation of Qingkailing injection's manufacturing process(清开灵注射剂生产快速质量评价方法研究). Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学),2007

6 YU Hai-yan(于海燕),YING Yi-bin(应义斌),XIE Li-juan(谢丽娟),*et al*. Influence of optical path length on NIR analysis results for trace metal determination in Chinese rice wine(光程对黄酒金属元素近红外透射光谱分析精度的影响). *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析),2007,27(6):1118

7 LIN Tao(林 涛),YU Hai-yan(于海燕),XU Hui-rong(徐惠荣),*et al*. Effect of path length variation on the NIR spectra for quality evaluation of Chinese rice wine(光程变化对基于近红外光谱的黄酒品质检测的影响). *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析),2009,29(4):950

8 Chan CO,Chu CC,Mok DKW,*et al*. Analysis of berberine and total alkaloid content in cortex phellodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection. *Anal Chim Acta*,2007,592:121

9 Herrmann S,Mayer J,Michel K,*et al*. Predictive capacity of visible-near infrared spectroscopy for quality parameter assessment of compost. *Near Infrared Spectrosc*,2009,17(5):289

10 Joubert E,Manley M,Botha M. Use of NIRS for quantification of mangiferin and hesperidin contents of dried green honeybush (Cyclopia genistoides) plant material. *J Agric Food Chem*,2006,54(15):5279

11 WU Di,HE Yong,SHI Jia-hui,*et al*. Exploring near and mid-infrared spectroscopy to predict trace iron and zinc contents in powdered milk. *J Agric Food Chem*,2009,57:1697

12 Versari A,Parpinello GP,Mattioli AU,*et al*. Determination of grape quality at harvest using Fourier-Transform Mid-Infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Am J Enol Vitic*,2008,59(3):317

13 SHEN Fei,NIU Xiao-ying,YANG Dan-ting,*et al*. Determination of amino acids in Chinese rice wine by Fourier. *J Agric Food Chem*,2010,58(17):9809

(本文于 2011 年 12 月 8 日收到)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net