双黄连口服液中黄芩苷含量近红外测定方法的建立与验证*

□程 伟 史新元 乔延江**

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘 要:目的:建立与验证快速分析双黄连口服液中黄芩苷含量的近红外光谱法。方法:采用透射模式采集样品近红外光谱数据,以偏最小二乘法建立光谱数据与HPLC法分析结果的定量校正模型,根据R、RMSEC、RMSEP等参数评价模型的定量性能;以准确性轮廓方法,验证近红外模型的准确度和精密度。结果:偏最小二乘定量校正模型R为0.9902,RMSEC为0.4223,RMSEP为0.4162;在β-期望容许误差极限为95%、容许极限为12%、风险极限为5%的约束下,模型验证结果表明分析方法准确度、精密度、不确定度满足要求,最低定量限为5.32 mg·mL^{-1}。结论:双黄连口服液中黄芩苷近红外定量模型稳健可靠。此外,准确性轮廓作为一种新的验证方法,可运用于中药体系近红外分析模型验证。

关键词:近红外 黄芩苷 双黄连口服液 准确性轮廓 验证

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.04.022

近红外光谱技术(NIR)是20世纪80年代发展起来的一项快速无损检测的技术,可实现在线分析和生物体的在体非介入分析和监测,具有快速、方便、准确、非侵入式分析等优点[1],已广泛应用于石化、农业、食品、医药等领域。

中药产业是我国医药工业的重要组成部分,但由于其成分复杂,长期以来在生产过程中缺乏有效的质量控制手段。近年来,对NIR在中药领域的应用研究急剧增加。许多研究者将近红外光谱技术与化学计量学方法相结合,用于中药原料药、成品的定量分析乃至生产过程中的质量监测。结果均表明近红外能够用于中药生产过程中的质量控制[2~4]。然而,由于中药成分复杂,近红外谱带重叠严重,要真正将近红外光谱技术用于中药质量控制领域,需对模型的可靠性予以严格验证。

传统的近红外模型评价指标如R、RMSECV、RMSEP等,在一定程度上能够对模型的性能进行评估,但并不能充分验证和评价近红外分析模型[5]。本文引入准确性轮廓(Accuracy Profile)对NIR定量分析模型的性能进行了验证与评价。Accuracy Profile整合了几乎所有常用的统计量,包括准确性、真实性、精密度、定量限、风险性和线性等。基于β-期望

收稿日期:2011-11-29

修回日期:2012-07-17

* 科学技术部国家"重大新药创制"科技重大专项(2010ZX09502-002):清开灵注射液安全性关键技术研究,负责人:乔延江。

** 通讯作者:乔延江,本刊编委,教授,博士生导师,北京中医药大学副校长,主要研究方向:中药质量控制,中药信息学研究,中药新药研究与开发,Tel:010-84738621,E-mail:yjqiao@263.net。

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

宽容区间的准确性轮廓能够将分析方法的分析性能给出直观的图示[6]。

双黄连口服液具有抗菌、抗病毒、退热的作用，可用于呼吸道感染、肺炎，扁桃体炎等疾病。组方主要包括金银花、黄芩、连翘等，黄芩苷是其主要有效成分[7]。本文以组成复杂的双黄连口服液为载体，对近红外光谱用于黄芩苷定量分析的性能进行了研究，以期为 NIR 定量模型的验证提供一种新的方法。

一、方法与原理

分析测量的总误差是测量值(x_i)与未知真实值(μ_T)间的差。一种估测总误差的方法就是通过 Mee 介绍的方法计算 β 期望容许区间，然后与设定的可接受限 λ 比较。β 是测量值落入接受限的概率，β 期望容许区间是测量值以概率 β 落入的区间。因此，只要 β 期望容许区间在可接受限以内，就可以认为建立的分析方法是有效的[3]。β 期望容许区间的计算式如下：

$$\left[\hat{\mu}_j-Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2_j}}\,\hat{\sigma}IP,j;\ \hat{\mu}_j+Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2_j}}\,\hat{\sigma}IP,j;\right] \quad (1)$$

其中，P：系列数；n：每一系列的独立样本数；$\hat{\mu}_j$：j 浓度水平的估计均值；$\hat{\sigma}^2_{IP,j}=\hat{\sigma}^2_{W,j}+\hat{\sigma}^2_{B,j}$ 是 j 浓度水平的中间精密度的方差估计值，它等于组内方差$\hat{\sigma}^2_{W,j}$与组间方差$\hat{\sigma}^2_{B,j}$之和；

$$R_j=\frac{\hat{\sigma}^2_{B,j}}{\hat{\sigma}^2_{W,j}}$$

$$B_j=\sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}}$$

$$v=\frac{(R+1)^2}{R+(1/n)/(p-1)+1-(1/n)/(pn)}$$

$Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)$ 是自由度为 v 的 T 分布的 β 分位数。

由于准确性轮廓是以相对比例的方法所表示，式(1)也可写为相对误差的形式：

$$\left[\text{bias}(\%)_j-Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2_j}}\ \text{R.S.D.}_{IP,j};\ \text{bias}(\%)_j+Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB^2_j}}\ \text{R.S.D.}_{IP,j}\right] \quad (2)$$

$$\text{bias}(\%)_j=\frac{\hat{\mu}_j-\mu_{Tj}}{\mu_{Tj}}\times 100 \quad (3)$$

$$\text{R.S.D.}_{IP,j}=\frac{\hat{\sigma}_{IP,j}}{\mu_j}\times 100 \quad (4)$$

由此可以看出，这个区间的计算结合了验证集特定浓度水平估计的相对偏差和中间精密度，以及选定的风险水平。这些估计对于计算 β 期望容许区间很有必要，但是它们也不能与可接受限分开。β 期望容许区间同时考虑进了这些估计，对未来测量的总误差作出预测。此外，这段区间定义了一个概率区间，它预测了结果落在指定区间的概率，能作为一种对分析程序的预测工具。

二、实验部分

1. 仪器与试药

Antaris 傅里叶变换近红外光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)，Agilent1100 高效液相色谱仪（配有自动进样器，DAD 紫外检测器）。双黄连口服液来自哈药集团三精制药股份有限公司，批号：10010829，黄芩苷对照品来自中国食品药品检定研究院，批号：715-201016。

2. 样本的制备

将双黄连口服液稀释成含黄芩苷 10、8、6、4、2 $mg\cdot mL^{-1}$ 5 个不同的黄芩苷浓度水平，每个浓度水平随机配制 8 个样品(共 40 个)。校正集分别由 3 个操作员 3 天进行配制。外部验证集由 3 个操作员分别在 3 天中每个浓度水平配制 3 个样品(共 15 个)。

3. 方　法

采用透射模式采集光谱，以仪器内部的空气为背景，分辨率为 8 cm^{-1}，扫描范围 10000~4000 cm^{-1}，扫描次数 32 次，增益为 4，取平均光谱。

采用高效液相色谱法，色谱柱：Dikma Diamonsil C_{18}（250 mm×2.4 mm，5 μm），检测波长：274 nm，柱温：40℃，流动相：A：甲醇(60%)，B：2%醋酸溶液(40%)，流速：1 $mL\cdot min^{-1}$。

4. 数据处理软件

光谱处理软件 TQ7.1(美国 Thermo Fisher 公司)，准确性轮廓计算软件 Enoval3.0(Arlenda)。

三、结果与讨论

1. 近红外定量校正模型的建立

对所采集的光谱，经过光谱预处理、波段筛选，

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

采用偏最小二乘法建立黄芩苷的定量校正模型。光谱预处理方法为 Savitzky-Golay 平滑，建模波段为 6406~6252 cm^{-1}，7609~7031 cm^{-1}，所得结果见图 1。

由结果可知，模型的 RMSEC 为 0.4223，RMSEP 为 0.4162，预测集的 R 值达到 0.9902。以上述参数为评价指标，可认为该模型的预测性能良好。但由图 1 可以看出该模型在浓度高于 4 $mg \cdot mL^{-1}$ 时，预测值与真实值接近，然而在浓度低于 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 时，预测值与真实值之间存在较大的误差。模型的相关系数高，但是 RMSEC 和 RMSEP 也比较大，所建模型有可能“过拟合”。因此，需对模型的性能进行进一步的考察。

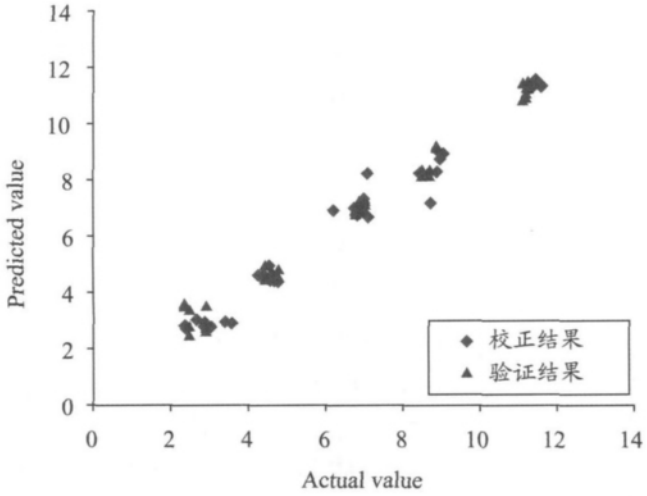

图 1 7 预测值与参考值间相关图

注：图中菱形为校正集，三角形为验证集。

2. 近红外分析方法的验证

(1) 真实性。

真实性表示真实值（本文为 HPLC 参考值）与实验平均值（本文为近红外预测值）之间的接近程度，由系统误差造成。各浓度水平验证集结果的真实性分别用绝对误差、相对误差以及回收率表示。如表 1 所示。

从表 1 可以看出，验证集在 4 $mg \cdot mL^{-1}$ 以上的绝对偏差、相对偏差、回收率以及 95%的置信区间均较合理，在 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 时变得较大，表明分析方法在这一浓度水平准确度较低。

(2) 精密度。

精密度表示一系列实验值（近红外预测值）之间的接近程度，由随机误差造成。如表 2 所示。

从表 2 可以看出，同真实性一样，分析结果的精密度值随着浓度水平的降低而变大，在 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 时

表 1 真实性考察结果

浓度水平 ($mg \cdot mL^{-1}$)	平均浓度 ($mg \cdot mL^{-1}$)	平均结果 ($mg \cdot mL^{-1}$)	绝对偏差(%)	相对偏差(%)	回收率 (%)	95% 回收率置信区间 (%)
2.0	2.569	3.090	0.5210	20.28	120.3	[102.0,138.5]
4.0	4.588	4.609	0.02104	0.4629	100.5	[96.72,104.2]
6.0	6.858	6.976	0.1174	1.712	101.7	[100.00,103.4]
8.0	8.651	8.540	−0.1112	−1.286	98.71	[95.69,101.7]
11.0	11.14	11.21	0.07041	0.6319	100.6	[98.87,102.4]

表 2 精密度与重复性考察结果

浓度水平 ($mg \cdot mL^{-1}$)	平均浓度 ($mg \cdot mL^{-1}$)	重复性 RSD (%)	中间精密度 RSD (%)
2.0	2.569	23.75	23.75
4.0	4.588	4.218	5.071
6.0	6.858	2.135	2.257
8.0	8.651	3.940	3.940
11.0	11.14	2.291	2.291

注：重复性、精密度以及重现性的相对标准偏差分别由相应的标准偏差除以平均浓度。

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

最大，其 RSD=23.75%，表明分析结果的误差较大。

(3) 准确性轮廓。

准确性表示实验值（近红外预测值）与参考值（HPLC 值）之间的接近程度，考虑了总误差（即系统误差与随机误差之和）。根据实验对象的需求（中药成分的不稳定性与重复性较差），可接受限设为 12%（可接受限的设定决定于分析对象，散装材料为 1%，剂型中活性成分的定量为 5%，生物环境分析为 15%[8]），验证结果的准确性轮廓如图 2 所示。

由于本文的研究对象为中药口服液中的有效成分，进行方法验证时，落在宽容区间外的结果的最大风险值（1—β）设为 5%。在设定的可接受限范围内分析方法被认为是有效的。

由图 2 还可得出所建分析方法的最低和最高定量限，确定了一种分析方法所适用的定量范围。如果 β 期望宽容区间与可接受限相交，定量范围位于两者之间的区间。如果 β 期望宽容区间永远不与可接受限相交，定量范围就是所研究有效成分的含量范围。本文所建近红外方法的最低定量限（LLOQ）为 5.324 $mg \cdot mL^{-1}$，最高定量限（ULOQ）为 11.140 $mg \cdot mL^{-1}$。

(4) 风险性轮廓。

基于准确性轮廓分析，还给出了了近红外分析方法的测量值处于可接受限外的风险。如图 3。

对于较大的 3 个浓度水平（6、8、10 $mg \cdot mL^{-1}$），预测结果处于±10%可接受限外的风险低于 5%（预设的最大风险性水平），而在较低的浓度水平（2、4 $mg \cdot mL^{-1}$），预测结果处于±10%可接受限外的风险急剧上升而高于 5%。

(5) 线性。

分析方法的线性是指分析样品在某一指定范围获得的结果与浓度（或其含量）成正比关系的能力。为了阐明方法的线性，基于绝对 β 期望宽容区间的方法如图 4 所示。

线性方程 Y=0.449+0.9530X，Y 为近红外预测值，X 为 HPLC 参考值，相关系数为 0.9836，剩余残差平方和（RSS）为 6.154 当短虚线在虚直线以内时，分析方法被认为是有效的。

四、结 论

对分析方法的验证广泛应用于化学、药学、生物制药以及农产品的分析过程。在医学领域，有 ICH Q2(R1)文件对此进行指导。然而，由既往的研究工作可以看出，尽管不同领域已有专属的文件对分析方法的验证进行了定义，依然有许多研究者关注分析方法验证的方法学[8]。分析方法的目的是使分析结果以可接受的准确性标准反应样本内容。需注意的是，对验证指标的计算并不表示对方法的验证[9]。

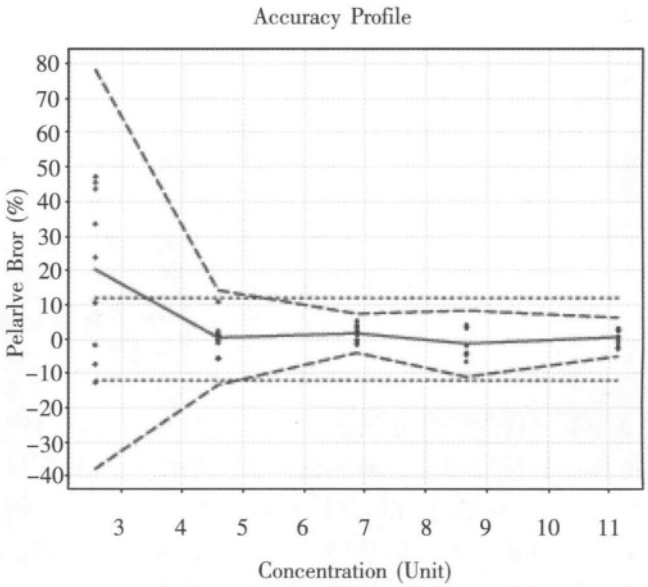

图 2 准确性轮廓

注：实线为相对偏差，虚折线为 95%的期望容许间隔，虚直线为 12%可接受限。

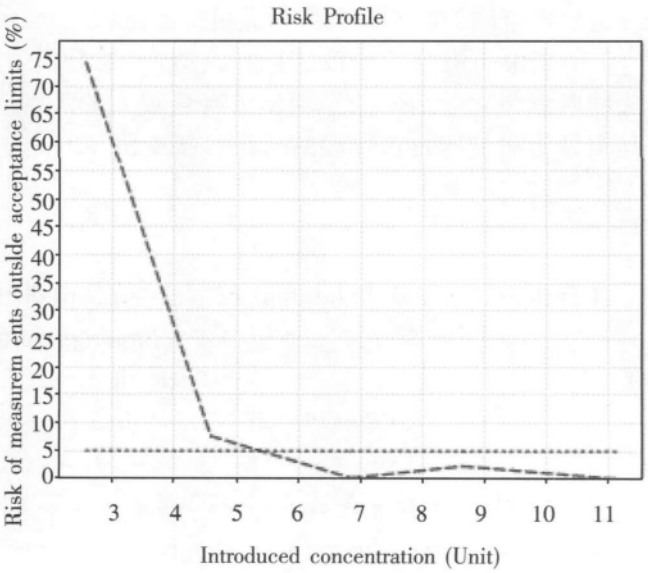

图 3 风险性轮廓

注：近红外光谱法分析的样品处于特定区间外的风险性轮廓虚线表示设置的 5%最大容许风险，虚折线表示预测结果处于 12%可接受限外的有效风险。

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

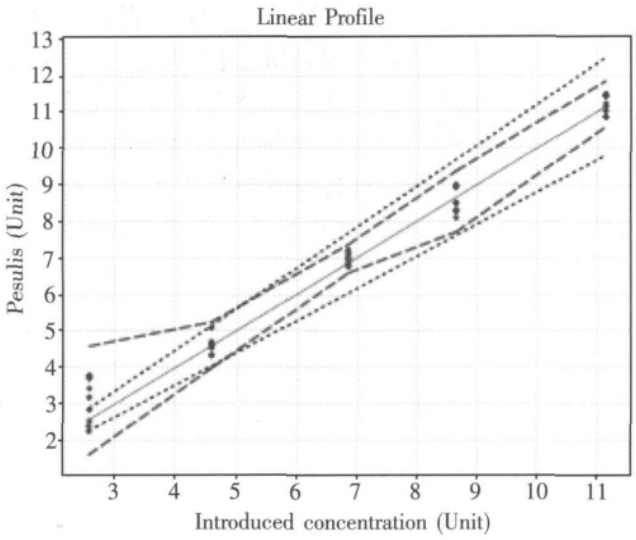

图 4 线性轮廓

注：实直线为方法的线性，短虚线与准确性轮廓中的 β 期望宽容区间相对应，以绝对值表示。虚线为可接受限。

本文以近红外光谱法定量分析双黄连口服液中黄芩苷含量的方法为研究载体，在采用传统的评价指标 R2、RMSECV、RMCEP、主成分数等评价分析模型性能的基础上，创新性的引入准确性轮廓来评估其有效性。结果表明，这种验证方法能够给出分析对象在不同浓度水平下的真实性、精密度等，并且分析验证结果可视化，使结果更加全面、直观。采用上述方法，证实了近红外光谱能够用于双黄连口服液中一定浓度范围的黄芩苷含量的无损快速分析。

由于中药成分的不稳定性和复杂性，对分析方法的考虑与化学药品的实验结果有着较大的区别。其中最为明显的是在预设的较大可接受限 12%（化学药品为 5%）下，近红外分析方法的定量范围较狭窄，仅为 5.324~11.14 mg·mL^{-1}。解决这一问题仍有待进一步的研究。

参考文献

1 陆婉珍，袁洪福，徐广通. 现代近红外光谱分析技术. 北京：中国石化出版社，2007.

2 王小梅，焦龙. 近红外漫反射光谱法定量分析川芎中的阿魏酸含量. 药物分析杂志，2011，31(6):1016~1019.

3 张延莹，张金巍，刘岩. 近红外技术在白芍醇提在线质量监控中的应用. 中国医药工业杂志，2010，41(9):662~665.

4 刘冰，陈晓辉. 近红外光谱法快速测定乳块消糖衣片的包衣厚度. 药物分析杂志，2009，29(9):1435~1439.

5 Mantanusa J, Ziémonsa E, Lebrun P, *et al*. Active content determination of non-coated pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development, validation and reliability evaluation. *Talanta*, 2010, 80(5):1750~1757.

6 Mantanusa J, Ziémonsa E, Lebrun P, *et al*. Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development and validation. *Anal Chim Acta*, 2009, 642 (1-2):186~192.

7 张玉玲，周亮，李翠英. HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷的含量. 湖南中医药导报，2003，7:78.

8 Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, *et al*. Anal Bioanal Chem, 380 (2004) :502~514.

9 Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, *et al*. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta*, 2007, 591 (2): 239~247.

10 Max Feinberg. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1158 (1-2):174~183.

Development and Validation of Near-infrared Method in the Accuracy Determination of Baicalin in *Shuanghuanglian* Oral Liquid

Cheng Wei, Shi Xinyuan, Qiao Yanjiang

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: This study was aimed to develop and validate a near-infrared (NIR) method to accurately determine baicalin in the *Shuanghuanglian* oral liquid. Transmission mode was used in the collection of NIR spectral samples. A robust PLS model was established based on the correlation between the NIR spectrum and HPLC reference. And quantitative property of the established model was evaluated through indexes of R, RMSEC, and RMSEP. The accuracy profile was introduced as a new method to validate the accuracy and trueness of the model. The results showed that conventional criteria such as the R, RMSEC, and RMSEP are 0.9902, 0.4223 and

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

0.4162, respectively. The limit of quality (LOQ) of the model is from 5.324 mg/mL to 11.14 mg/mL when the β-expectations tolerance limits, accept limit and risk profile was at 95%, 12% and 5%, respectively. The results were with high truness, intermediate precision and recovery. It was concluded that the NIR quantitative model of baicalin in *Shuanghuanglian* oral liquid is reliable. In addition, accuracy profile as a new validation method which can be used to evaluate NIR model in traditional Chinese medicine.

Keywords: Near-infrared (NIR), baicalin, *Shuanghuanglian* oral liquid, accuracy profile, validation

（责任编辑:李沙沙　张志华,责任译审:王　晶）

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