



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108732126 A

(43)申请公布日 2018.11.02

(21)申请号 201710278125.4

(22)申请日 2017.04.25

(71)申请人 天士力医药集团股份有限公司  
地址 300410 天津市北辰区淮河道与汀江西路交口天之骄园区法务中心知识产权部

(72)发明人 章顺楠 叶正良 周立红 熊皓舒  
李真 齐敏超 周磊斌

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所  
(普通合伙) 11130

代理人 王为

(51)Int. Cl.

G01N 21/359(2014.01)

G01N 21/3563(2014.01)

G01N 30/88(2006.01)

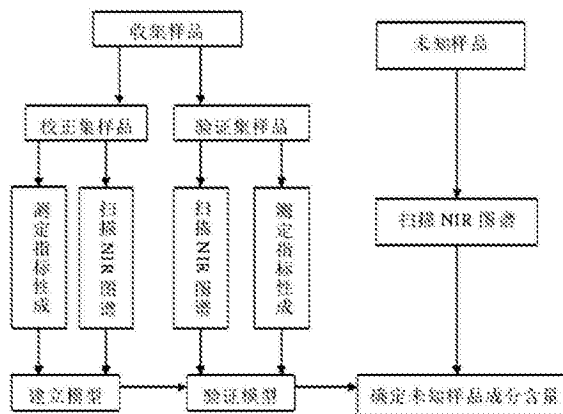
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54)发明名称

一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法

(57)摘要

本发明提供了一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法,探讨其在中成药原料质量保障系统中的应用可行性。以高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮II A、丹参酮I、隐丹参酮的含量为对照值;采用近红外漫反射法采集样品光谱,比较不同光谱预处理方法及建模波段的建模效果,优选最佳建模参数;采用偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)分别建立丹参中丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸和丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)的近红外定量分析模型,并对模型进行评价。本发明所建立的定量分析模型能够满足大批量丹参药材样品化学信息快速获取的需求。



1. 一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法,所述方法包括如下步骤:

步骤1:丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用;

步骤2:对步骤1的丹参药材进行近红外光谱测定;

步骤3:将得到的近红外光谱谱图代入已经建立好的丹参药材近红外光谱定量分析模型,计算丹参药材中丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量。

2. 丹参药材近红外光谱定量分析模型的建立方法,所述方法包括如下步骤:

步骤1:取多批次合格的丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用;

步骤2:采用高效液相色谱法测定步骤1丹参药材中的丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量作为对照值;

步骤3:采用近红外光谱法对步骤1的丹参药材进行采集;

步骤4:近红外光谱定量分析模型的建立

以丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量高低均匀选取样本组成校正集,建立校正模型;

剩余样本为验证集,对模型进行外部验证,保证校正集样本中指标成分的含量范围大于验证集;

以 $R^2$ 和RMSECV作为评价指标,对光谱预处理方法及建模波段进行优化;采用偏最小二乘法将校正集样本的近红外(NIR)光谱与其指标成分含量进行关联,分别建立丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮的定量校正模型;采用留一交叉验证法,确定各模型主因子数;运用外部验证法对模型做检验和评价,符合后即得到定量分析模型。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述步骤2中,丹参酮类成分为丹参酮II A、丹参酮I、隐丹参酮,它们的含量测定方法如下:

丹参药材中丹参酮II A、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定依据2015年版《中国药典》一部丹参药材标准项下方法进行;其中色谱条件

色谱柱:Diamonsil C18 (200mmx4.6mm, 5 $\mu$ m);检测波长:270nm;柱温:20 $^{\circ}$ C;流速:1ml/min;进样量:10 $\mu$ L;流动相:以乙睛为流动相A,0.02%磷酸水溶液为流动相B,梯度洗脱(0~6min,61%A;6~20min,61%A $\rightarrow$ 90%A;20~20.5min,90%A $\rightarrow$ 61%A;20.5~25min,61%A);

对照品溶液的制备

取丹参酮IIA对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成每1ml含20 $\mu$ g丹参酮IIA的溶液,即得;

供试品溶液的制备;

取本品粉末约0.3g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140W,频率42KHZ)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述步骤2中,丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定方法步骤如下:

1) 色谱条件

色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相:乙睛和0.01-0.1%磷酸水溶液,体积比为20-25:75-80;流速:0.5-2.0ml/min;检测波长:250-300nm;柱温:15-25 $^{\circ}$ C;洗脱时

间:25-35min;进样量:10 $\mu$ L;外标法;

2) 混合对照品溶液的制备

分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用;

分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B100.848 $\mu$ g、迷迭香酸10.660 $\mu$ g、紫草酸8.042 $\mu$ g的混合对照品溶液;

3) 供试品溶液的制备

取丹参药材粉末约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述步骤2中丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定方法步骤如下:

1) 色谱条件

色谱柱:Diamonsil Plus C18;流动相:乙睛和0.05%磷酸水溶液,体积比为22:78;流速:1.0ml/min;检测波长:288nm;柱温:20 $^{\circ}$ C;洗脱时间:30min;进样量:10 $\mu$ L;外标法;

2) 混合对照品溶液的制备

分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用;

分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B100.848 $\mu$ g、迷迭香酸10.660 $\mu$ g、紫草酸8.042 $\mu$ g的混合对照品溶液;

3) 供试品溶液的制备

取丹参药材粉末约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理45min,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述步骤3采用近红外光谱法对步骤1的丹参药材进行采集,方法如下:

采样方式:积分球固体采样;采集条件:分辨率8 $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,扫描范围12000~3800 $\text{cm}^{-1}$ ,数据格式为Lg(1/R),每个样品采集6张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯;样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在实验中都力求一致,以减小对实验结果的影响。

## 一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种中药成分的检测方法,特别涉及一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法。

### 背景技术

[0002] 丹参是应用历史悠久的常用中药,也是重要的天然资源。丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎。丹参的化学成分主要分为水溶性成分和脂溶性成分,其中:丹参的水溶性成分主要为酚酸类物质,丹酚酸B为2010年版中国药典含量测定项检测物质之一;丹参的脂溶性成分大多为共轭醌、酮类化合物,含量较高的为丹参酮IIA和隐丹参酮。丹参酮IIA为2010年版中国药典含量测定项检测物质之一。丹参酮类(隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA的总称)为2010年版中国药典第三增补本修订后的含量测定项检测物质之一。

[0003] 现代研究表明,丹参中的水溶性成分和脂溶性成分有广泛的药理作用。丹参酚酸类成分具有抗心肌缺血、抗动脉粥样硬化、抗血栓作用、抗消化性溃疡保护消化系统等作用,丹参多糖具有保肝作用,丹参多酚酸盐具有抗菌消炎作用,丹参酮IIA有抑制心肌纤维化作用,丹参酮IIA与顺铂连用具有抗肿瘤作用,此外还与中枢系统抑制作用、保护大脑、效预防呼吸困难综合征、促进肾功能恢复等作用,临床上主要用于治疗冠心病和心绞痛,效果较好。

[0004] 目前,随着野生资源的减少,丹参开始栽培。由于药材质量的优劣与其栽培技术、采收、炮制加工及贮藏等因素有密切关系,而目前丹参药材生产中栽培技术不规范、采收时间不合理,导致药用丹参有效成分含量差异很大,直接影响丹参药材的质量。中药的传统分析方法有显微鉴别、薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法等,这些方法往往具有前处理复杂、检验过程繁琐、成本高、费时费力,不能满足大批量的现场快速分析要求等缺点,而且都是离线监测,无法满足丹参药材规范化种植、合理采收、高效使用的需要。为解决该问题,有必要研发涵盖水分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物、指标成分等不同检测项目的快速检测方法作为企业内控标准,与法定标准一起构建准确、便捷、普适性强的中药材整体质量快速评价系统,以保障制剂终产品质量的可控性。

[0005] 近红外光谱法(Near Infrared Spectroscopy,NIRS)作为一种快速分析方法,具有很多优点:简便快速,可实现现场和在线分析;能在几分钟内,仅通过对被测样品完成一次近红外光谱的采集测量,即可完成多项性能指标的测定;测量结果稳定,重现性好。无损;环保;可对固体、液体和气体样品直接进行测定,无需复杂的前处理过程和化学反应过程。随着仪器与软件的发展,近红外光谱定量分析法已广泛应用于农业、生物医学、石油化工等领域。

[0006] 近红外光谱定量分析过程如下:

[0007] 选择足够多的且有代表性的样品组成校正集;通过现行标准方法测定校正样品的组成或性质,测定样品的近红外光谱;利用化学计量学算法,建立光谱信息与含量或性质之

间的数学关系,经统计验证,选择最佳数学模型;由一组已知含量或性质的样品构成验证集,通过对验证集样品近红外光谱的测定,由已建立的模型计算出相应组分的含量或性质,从而对所建模型进行验证评价。如果验证集的偏差在可接受范围内,则该模型可用于未知样品的测定。近红外光谱法分析操作流程如下(见图1)。

[0008] 现有技术虽然有应用近红外光谱技术测定丹参药材中丹酚酸B、丹参酮类成分(丹参酮ⅡA+丹参酮I+隐丹参酮)含量的方法,但是并未发现同时还测定丹参药材中迷迭香酸、紫草酸含量的方法,并且本发明同时监测丹参药材中丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮ⅡA+丹参酮I+隐丹参酮)含量,使得丹参药材质量控制标准比法定标准更高,进一步确保最终制剂产品的质量。

#### 发明内容:

[0009] 本发明提供了一种采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法,所述方法包括如下步骤:

[0010] 步骤1:丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用;

[0011] 步骤2:对步骤1的丹参药材进行近红外光谱测定;

[0012] 步骤3:将得到的近红外光谱谱图代入已经建立好的丹参药材近红外光谱定量分析模型,计算丹参药材中丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量。

[0013] 为得到上述测定丹参药材中多成分含量的方法,本发明为此提供一种丹参药材近红外光谱定量分析模型的建立方法,所述方法包括如下步骤:

[0014] 步骤1:取多批次合格的丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用;

[0015] 步骤2:采用高效液相色谱法测定步骤1丹参药材中的丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量作为对照值;

[0016] 步骤3:采用近红外光谱法对步骤1的丹参药材进行采集;

[0017] 步骤4:近红外光谱定量分析模型的建立

[0018] 以丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量高低均匀选取样本组成校正集,建立校正模型;

[0019] 剩余样本为验证集,对模型进行外部验证,保证校正集样本中指标成分的含量范围大于验证集;

[0020] 以 $R^2$ 和RMSECV作为评价指标,对光谱预处理方法及建模波段进行优化;采用偏最小二乘法将校正集样本的近红外(NIR)光谱与其指标成分含量进行关联,分别建立丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮ⅡA+丹参酮I+隐丹参酮的定量校正模型;采用留一交叉验证法,确定各模型主因子数;运用外部验证法对模型做检验和评价,符合后即得到定量分析模型。

[0021] 其中步骤2中,丹参酮类成分为丹参酮ⅡA、丹参酮I、隐丹参酮,它们的含量测定方法如下:

[0022] 丹参药材中丹参酮ⅡA、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定依据2015年版《中国药典》一部丹参药材标准项下方法进行;其中色谱条件

[0023] 色谱柱:Diamonsil C18(200mmx4.6mm,5 $\mu$ m);检测波长:270nm;柱温:20 $^{\circ}$ C;流速:1ml/min;进样量:10 $\mu$ L;流动相:以乙腈为流动相A,0.02%磷酸水溶液为流动相B,梯度洗脱

(0~6min,61%A;6~20min,61%A→90%A;20~20.5min,90%A→61%A;20.5~25min,61%A);

[0024] 对照品溶液的制备

[0025] 取丹参酮IIA对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成每1ml含20μg丹参酮IIA的溶液,即得;

[0026] 供试品溶液的制备;

[0027] 取本品粉末(过三号筛)约0.3g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140W,频率42KHZ)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得;

[0028] 其中步骤2中,丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定方法步骤如下:

[0029] 1) 色谱条件

[0030] 色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相:乙睛和0.01-0.1%磷酸水溶液,体积比为20-25:75-80;流速:0.5-2.0ml/min;检测波长:250-300nm;柱温:15-25℃;洗脱时间:25-35min;进样量:10μL;外标法;

[0031] 2) 混合对照品溶液的制备

[0032] 分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用;

[0033] 分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B100.848μg、迷迭香酸10.660μg、紫草酸8.042μg的混合对照品溶液;

[0034] 3) 供试品溶液的制备

[0035] 取丹参药材粉末约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0036] 优选的,步骤2中丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定方法步骤如下:

[0037] 1) 色谱条件

[0038] 色谱柱:Diamonsil Plus C18;流动相:乙睛和0.05%磷酸水溶液,体积比为22:78;流速:1.0ml/min;检测波长:288nm;柱温:20℃;洗脱时间:30min;进样量:10μL;外标法;

[0039] 2) 混合对照品溶液的制备

[0040] 分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用;

[0041] 分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B100.848μg、迷迭香酸10.660μg、紫草酸8.042μg的混合对照品溶液;

[0042] 3) 供试品溶液的制备

[0043] 取丹参药材粉末约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理45min,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0044] 其中步骤3所述采用近红外光谱法对步骤1的丹参药材进行采集,方法如下:

[0045] 采样方式:积分球固体采样;采集条件:分辨率 $8\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,扫描范围 $12000\sim 3800\text{cm}^{-1}$ ,数据格式为Lg(1/R),每个样品采集6张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯;样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在实验中都力求一致,以减小对实验结果的影响。

[0046] 需要说明的是:

[0047] 评价近红外数学模型的相关性常采用决定系数( $R^2$ )作为模型评价指标;评价近红外数学模型的预测偏差常采用校正均方差(RMSECV)作为模型评价指标,选择合适的建模参数以获得最优的校正模型, $R^2$ 越接近1、RMSECV越小,表明校正模型建立越合理。

[0048] 留一法交叉验证法:假设有N个样本,将每一个样本作为测试样本,其它N-1个样本作为训练样本。这样得到N个分类器,N个测试结果。用这N个结果的平均值来衡量模型的性能。

[0049] 外部验证法:将标准样品集分为校正集和验证集两组,将验证集样本作为测试样本,校正集样本作为训练样本,用测试结果来衡量模型的性能。

[0050] 本发明中采用高效液相色谱法测定的成分中,丹参酮类成分为丹参酮II A、丹参酮I和隐丹参酮,其具体检测见《中国药典》2015年版一部76-77页。

[0051] 样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在实验中都力求一致,以减小对实验结果的影响。

[0052] 本发明的方法是经过筛选获得的,筛选过程如下:

[0053] 1材料

[0054] 1.1仪器

[0055] Antaris II傅立叶变换近红外光谱仪(ThermoFisher Scientific(China),配置有漫反射积分球附件、样品旋转台及石英样品杯,InGaAs检测器,Result软件用于光谱采集,TQ Analyst 8.0软件处理光谱;WATERS 2695高效液相色谱仪;高速中药粉碎机(山东省青州市精诚医药装备制造有限公司);XS205电子分析天平。

[0056] 1.2试剂

[0057] 甲醇(天津市康科德科技有限公司,批号:20151228,色谱纯)、乙腈(Merck,批号:JA037130,色谱纯),其他试剂为分析纯,水为哇哈哈纯净水。丹参酮II A对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110766-200619,纯度 $>98.0\%$ )、迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111871-201102,纯度 $>99.8\%$ )、紫草酸对照品(天津士兰科技有限公司,批号:20130908,纯度 $>98.0\%$ )、丹酚酸B(天士力制药集团股份有限公司,批号:2013061,纯度 $>93.06\%$ )。

[0058] 1.3药材

[0059] 143批丹参药材由天士力制药集团股份有限公司提供,经梁宗锁(浙江理工大学,教授)鉴定均为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根和根茎,药材来源于陕西、山西、四川、甘肃、河南、河北等地。药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用。

[0060] 2方法与结果

[0061] 2.1方法

[0062] 2.1.1 NIR光谱采集

[0063] 采样方式:积分球固体采样。采集条件:分辨率 $8\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,扫描范围

12000~3800 $\text{cm}^{-1}$ ,数据格式为Lg(1/R),每个样品采集6张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯。样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等实验中力求一致,以减小对实验结果的影响。

[0064] 2.1.2含量测定

[0065] 2.1.2.1丹参酮IIA、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定

[0066] 丹参药材中丹参酮IIA、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定依据2015年版《中国药典》一部丹参药材标准项下方法进行。

[0067] 2.1.2.1.1色谱条件

[0068] 色谱柱:Diamonsil C18(200mmx4.6mm,5 $\mu\text{m}$ );检测波长:270nm;柱温:20 $^{\circ}\text{C}$ ;流速:1ml/min;进样量:10 $\mu\text{L}$ ;流动相:以乙睛为流动相A,0.02%磷酸水溶液为流动相B,梯度洗脱(0~6min,61%A;6~20min,61%A $\rightarrow$ 90%A;20~20.5min,90%A $\rightarrow$ 61%A;20.5~25min,61%A)。

[0069] 2.1.2.1.2对照品溶液的制备

[0070] 取丹参酮IIA对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成每1ml含20 $\mu\text{g}$ 丹参酮IIA的溶液,即得。

[0071] 2.1.2.1.3供试品溶液的制备;

[0072] 取本品粉末(过三号筛)约0.3g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140W,频率42KHZ)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0073] 2.1.2.1.4方法学考察

[0074] 采用HPLC法,丹参酮IIA的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;丹参酮I的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.2%;隐丹参酮的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.1%。

[0075] 2.1.2.2丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定

[0076] 2.1.2.2.1色谱条件

[0077] 色谱柱:Diamonsil Plus C18(4.6mm X 250mm,5 $\mu\text{m}$ );流动相:乙睛-0.05%磷酸水溶液(22:78),流速:1.0ml/min;检测波长:288nm;柱温:20 $^{\circ}\text{C}$ ;洗脱时间:30min;进样量:10 $\mu\text{L}$ ;外标法。

[0078] 2.1.2.2.2混合对照品溶液的制备

[0079] 分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用。分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B 100.848 $\mu\text{g}$ 、迷迭香酸10.660 $\mu\text{g}$ 、紫草酸8.042 $\mu\text{g}$ 的混合对照品溶液。

[0080] 2.1.2.2.3供试品溶液的制备

[0081] 取丹参药材粉末(过3号筛)约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140w,频率42KHZ)45min,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0082] 2.1.2.2.4方法学考察



[0083] 采用HPLC法,丹酚酸B的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.9%;迷迭香酸的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.9%;紫草酸的精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.7%。

### [0084] 2.1.3 NIR定量分析模型的建立与评价

[0085] 按丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)含量的高低均匀选取样本组成校正集,建立校正模型;剩余样本为验证集,对模型进行外部验证,保证校正集样本中指标成分的含量范围大于验证集。以 $R^2$ 和RMSECV作为评价指标,对光谱预处理方法及建模波段进行优化;采用偏最小二乘法将校正集样本的NIR光谱与其指标成分含量进行关联,分别建立丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮的定量校正模型;采用留一交叉验证法,确定各模型主因子数;运用外部验证法对模型做进一步的检验和评价。

## [0086] 2.2结果

### [0087] 2.2.1药材NIR光谱图及校正集和验证集样品的选择

[0088] 按丹参药材中指标成分(丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)含量的高低均匀选取了校正集和验证集样品,各指标成分(丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)的含量范围见表1。143批丹参样品的NIRS原始光谱叠加图如图2(a)所示。

[0089] 表1:校正集与验证集样品指标成分含量分布范围

	丹酚酸B		迷迭香酸		紫草酸		丹参酮II A+ 丹参酮I+ 隐丹参酮	
	样品数	含量/ (mg/g)	样品数	含量/ (mg/g)	样品数	含量/ (mg/g)	样品数	含量/ (mg/g)
校正集	127	1.03~78.24	120	0.33~5.21	127	0.24~4.22	127	0.84~10.57
验证集	16	5.31~58.64	23	0.76~3.78	16	1.17~4.16	16	2.03~7.82

### [0091] 2.2.2光谱预处理方法的选择

[0092] 红外光谱的采集容易受颜色、样品颗粒大小等影响,导致红外光谱的基线漂移和平移,因此,必须对原始光谱进行预处理,常用的预处理方法有多元散射校正法(Multiple scatter correction, MSC),标准归一化法(Standard normal variate, SNV),一阶导数法(First derivative),二阶导数法(Second derivative)等。

[0093] 实验比较了不同预处理方法(见表2)对模型 $R^2$ 和RMSECV的影响。由表2可知,丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)定量校正模型的最佳预处理方法均为一阶导数法。经一阶导数预处理后能够全面反映样品信息,达到较准确定量效果。经一阶导数预处理后的光谱图如图2(b)所示。

[0094] 表2:不同预处理方法对定量校正模型性能的影响

NIR 光谱预处理方法	丹酚酸 B		迷迭香酸		紫草酸		丹参酮 II A + 丹参酮 I + 隐丹参酮	
	R <sup>2</sup>	RMSECV/(mg·g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	RMSECV/(mg·g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	RMSECV/(mg·g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	RMSECV/(mg·g <sup>-1</sup> )
Constant (无)	0.8058	6.68	0.6838	0.64	0.7617	1.55	0.8198	1.07
MSC (多元散射校正)	0.8585	5.80	0.7378	0.58	0.6266	1.87	0.8129	1.08
SNV (标准归一化)	0.8479	6.00	0.7981	0.52	0.5526	1.97	0.8193	1.06
一阶导数 (1st D)	0.9190	4.46	0.8322	0.48	0.8215	1.34	0.9256	0.71
二阶导数 (2nd D)	0.5746	9.23	0.5194	0.74	0.4324	2.15	0.5274	1.59
SNV+1st D	0.9058	4.91	0.8291	0.49	0.7280	1.68	0.9167	0.74
MSC+2nd D	0.9101	4.78	0.8245	0.49	0.7259	1.68	0.9155	0.74

[0095] 2.2.3建模波段的选择

[0097] 尽管PLS法允许处理全谱信息,但是建模波段过宽,必然含有大量的冗余信息,因此波段的选择,有利于提高模型的预测准确性。建立NIRS定量分析模型时,选择的光谱区间应包含待测组分的最大信息量,并尽可能地减少NIR光谱中某些信息量小、失真大的谱区,以改善模型的性能。由表3可知,丹酚酸B的最佳波段范围为6773.98~3981.12cm<sup>-1</sup>、迷迭香酸的最佳波段范围为6670.85~3996.54cm<sup>-1</sup>、紫草酸的最佳波段范围为8544.66~3936.28cm<sup>-1</sup>、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)的最佳波段范围为8188.06~3875.31cm<sup>-1</sup>。

[0098] 表3:不同光谱范围对定量模型性能的影响

成分	光谱范围/cm <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	RMSECV/(mg·g <sup>-1</sup> )
丹酚酸 B	10018.38~3890.75	0.7730	7.22
	6773.98~3981.12	0.9190	4.46
迷迭香酸	9713.51~3996.54	0.7630	0.56
	6670.85~3996.54	0.8322	0.48
紫草酸	6631.36~3952.69	0.8057	1.40
	8544.66~3936.28	0.8215	1.34
丹参酮 II A+丹参酮I+隐丹参酮	6825.60~4000.85	0.9160	0.74
	8188.06~3875.31	0.9256	0.71

[0100] 2.2.4模型的建立与评价

[0101] 在建立NIR光谱模型时,主成分数对模型参数有很大的影响,主成分选择过少,会导致提取信息不全,模型预测性能下降,主成分选择过多,会导致模型过于复杂,出现过拟合现象。

[0102] 在光谱数据最佳预处理和最佳建模波段选择的基础上,应用TQ Analyst 8.0定量分析软件,采用偏最小二乘法将校正集样品的NIRS数据与其指标成分含量进行关联,分别建立了丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)的定量分析校正模型。图3分别为丹酚酸B[图3(a)]、迷迭香酸[图3(b)]、紫草酸[图3(c)]、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)[图3(d)]的定量校正集RMSECV/(g·g<sup>-1</sup>)与主因子数之间的相关图。由图3可知,定量校正模型主因子数分别为13、10、11、17时,各模型的RMSECV最小。表4综合了最优化模型的拟合效果、交叉验证及外部验证结果。

[0103] 采用校正集样品进行内部交互验证,结果表明丹参NIR光谱与丹酚酸B、迷迭香酸、

紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)含量/(g·g<sup>-1</sup>)之间存在较好的相关性(见图4),所建立的4个定量校正模型能够较为准确的预测各指标成分的含量。

[0104] 进一步采用验证集样品对模型的预测性能进行外部验证,结果表明验证集样品各指标成分含量/(g·g<sup>-1</sup>)的预测值与真实值/(g·g<sup>-1</sup>)之间也呈现良好的相关性(见图5)。验证集样品中各指标成分含量均能得到较为准确的预测。

[0105] 表4:各组定量校正模型验证结果

指标成分	主因子数	校正		内部交叉验证		外部验证	
		R <sup>2</sup>	RMSEC	R <sup>2</sup>	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSEP
丹酚酸B	13	0.9894	1.64	0.9190	4.46	0.8526	9.77
迷迭香酸	10	0.9575	0.25	0.8322	0.48	0.9573	0.28
紫草酸	11	0.9371	0.81	0.8215	1.34	0.8193	0.94
丹参酮类成分	17	0.9967	0.15	0.9256	0.71	0.9531	0.63

[0107] RMSEC, RMSECV, RMSEP:mg·g<sup>-1</sup>

[0108] 本发明提供的方法具有以下有益效果:

[0109] 1、由于近红外光谱作为分子振动的非谐振吸收,跃迁几率较低,一般近红外倍频和合频的谱带强度是其基频吸收的十到万分之一,所以近红外光谱技术的分析组分含量一般应大于0.1%。

[0110] 丹参药材中的丹参酮I、隐丹参酮等成分相对于药材量只有1/1000左右,用近红外光谱法检测可能会响应值可能会比较低,且近红外光谱图信息重叠且复杂,因此需研究合适的图谱特征信息提取方法处理谱图中蕴涵的信息。

[0111] 对于相当多的中药材,其已经明确或潜在可能的有效化学成分的量往往达不到近红外光谱分析的浓度下限,但近红外光谱技术在中药材大类组分,如总黄酮、总皂苷、总生物碱等的分析,以及提取物中有效组分的分析上是可行、且有优势的。

[0112] 在建模过程中,采用单一指标性成分丹参酮II A、丹参酮I、隐丹参酮含量建模,由于单一指标成分含量低于红外光谱的最低定量检测限,所建定量分析模型预测效果不佳。因此最终选择了它们的总含量(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)建立定量分析模型,进行含量预测,这也与2015版《中国药典》丹参项下丹参酮类成分含量HPLC测定采取丹参酮II A、丹参酮I、隐丹参酮总量进行药材质量评价是一致的。

[0113] 2、本发明建立的近红外漫反射光谱分析方法速度快,预测结果准确度高,无损、环保,定量模型的建立与评价可作为中药材指标性成分含量分析的一般规律,而且能满足工业生产中大批量采集样品化学信息的需求,适用于快速测定丹参药材高含量指标性成分,

## 附图说明

[0114] 图1:近红外光谱分析流程图;

[0115] 图2:43批丹参药材的NIRS原始光谱、一阶导数光谱叠加图,其中(a)为143批丹参药材的NIRS原始光谱叠加图,(b)为143批丹参药材的NIRS一阶导数光谱叠加图;

[0116] 图3:丹参指标性成分近红外定量模型主成分数,横坐标(Factor)为主因子数,纵坐标(RMSECV)为校正均方差,其中(a)为丹酚酸B,(b)为迷迭香酸,(c)为紫草酸,

[0117] (d)为丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮);

[0118] 图4:定量模型校正集样品内部交互验证,横坐标(Actual)为化学参考值,纵坐标(Calculated)为模型预测值。其中(a)为丹酚酸B,(b)为迷迭香酸,(c)为紫草酸,(d)为丹参酮类成分(丹参酮IIA+丹参酮I+隐丹参酮);

[0119] 图5:定量模型验证集样品外部验证,横纵坐标同图4。其中(a)为丹酚酸B,(b)为迷迭香酸,(c)为紫草酸,(d)为丹参酮类成分(丹参酮IIA+丹参酮I+隐丹参酮)。

## 具体实施方式

[0120] 本发明使用的材料如下,但是仅用来说明本发明的可操作性,而不应该构成对本发明的限制

[0121] 1仪器

[0122] Antaris II傅立叶变换近红外光谱仪(ThermoFisher Scientific(China),配置有漫反射积分球附件、样品旋转台及石英样品杯,InGaAs检测器,Result软件用于光谱采集,TQ Analyst 8.0软件处理光谱;WATERS 2695高效液相色谱仪;高速中药粉碎机(山东省青州市精诚医药装备制造有限公司);XS205电子分析天平。

[0123] 2试剂

[0124] 甲醇(天津市康科德科技有限公司,批号:20151228,色谱纯)、乙腈(Merck,批号:JA037130,色谱纯),其他试剂为分析纯,水为哇哈哈纯净水。

[0125] 丹参酮IIA对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110766-200619,纯度>98.0%)、迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111871-201102,纯度>99.8%)、紫草酸对照品(天津士兰科技有限公司,批号:20130908,纯度>98.0%)、丹酚酸B(天士力制药集团股份有限公司,批号:2013061,纯度>93.06%)。

[0126] 3药材

[0127] 143批丹参药材由天士力制药集团股份有限公司提供,经梁宗锁(浙江理工大学,教授)鉴定均为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根和根茎,药材来源于陕西、山西、四川、甘肃、河南、河北等地。药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用。

[0128] 实施例1:丹参药材近红外光谱定量分析模型的建立方法

[0129] 1、NIR(近红外)光谱采集

[0130] 丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀;

[0131] 采样方式:积分球固体采样;

[0132] 采集条件:分辨率 $8\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,扫描范围 $12000\sim 3800\text{cm}^{-1}$ ,数据格式为Lg(1/R),每个样品采集6张光谱,计算平均光谱以建立模型。

[0133] 每次扫描前振荡样品杯,样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在实验中都力求一致,以减小对实验结果的影响。

[0134] 2、含量测定

[0135] 2.1丹参酮IIA、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定

[0136] 丹参药材中丹参酮IIA、丹参酮I、隐丹参酮的含量测定依据2015年版《中国药典》一部第76-77页丹参药材标准项下方法进行。

[0137] 2.1.1色谱条件

[0138] 色谱柱:Diamonsil C18(200mmx4.6mm,5 $\mu\text{m}$ );检测波长:270nm;柱温:20 $^{\circ}\text{C}$ ;流速:

1ml/min;进样量:10 $\mu$ L;流动相:以乙腈为流动相A,0.02%磷酸水溶液为流动相B,梯度洗脱(0~6min,61%A;6~20min,61%A $\rightarrow$ 90%A;20~20.5min,90%A $\rightarrow$ 61%A;20.5~25min,61%A)。

[0139] 2.1.2对照品溶液的制备

[0140] 取丹参酮IIA对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成每1ml含20 $\mu$ g丹参酮IIA的溶液,即得。

[0141] 2.1.3供试品溶液的制备;

[0142] 取本品粉末(过三号筛)约0.3g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140W,频率42KHZ)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0143] 2.1.4测定分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得。

[0144] 2.2丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸的含量测定

[0145] 2.2.1色谱条件

[0146] 色谱柱:Diamondsil Plus C18(4.6mm X 250mm,5 $\mu$ m);流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液(22:78),流速:1.0ml/min;检测波长:288nm;柱温:20 $^{\circ}$ C;洗脱时间:30min;进样量:10 $\mu$ L;外标法。

[0147] 2.2.2混合对照品溶液的制备

[0148] 分别精密称取丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,加75%甲醇制成每1ml含丹酚酸B 0.504mg、迷迭香酸0.076mg、紫草酸0.201mg的对照品贮备液,备用。分别精密量取上述3种对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1ml含丹酚酸B 100.848 $\mu$ g、迷迭香酸10.660 $\mu$ g、紫草酸8.042 $\mu$ g的混合对照品溶液。

[0149] 2.2.3供试品溶液的制备

[0150] 取丹参药材粉末(过3号筛)约0.15g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇-水溶液50ml,密塞,称定重量,超声处理(功率140w,频率42KHZ)45min,放冷,再称定重量,用75%甲醇-水溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5ml,移至10ml容量瓶中,加75%甲醇-水溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0151] 2.2.4测定分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得。

[0152] 3、将按照2项下的检测方法检测得到的丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮IIA+丹参酮I+隐丹参酮)含量的高低均匀选取样本组成校正集,建立校正模型;剩余样本为验证集,对模型进行外部验证,保证校正集样本中指标成分的含量范围大于验证集。

[0153] 以 $R^2$ 和RMSECV作为评价指标,对光谱预处理方法及建模波段进行优化;采用偏最小二乘法将校正集样本的NIR光谱与其指标成分含量进行关联,分别建立丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮IIA+丹参酮I+隐丹参酮的定量校正模型(见表5);采用留一交叉验证法,确定各模型主因子数;运用外部验证法对模型做进一步的检验和评价。

[0154] 表5:各组定量校正模型验证结果

指标成分	主因子数	校正		内部交叉验证		外部验证	
		R <sup>2</sup>	RMSEC	R <sup>2</sup>	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSEP
[0155] 丹酚酸 B	13	0.9894	1.64	0.9190	4.46	0.8526	9.77
迷迭香酸	10	0.9575	0.25	0.8322	0.48	0.9573	0.28
紫草酸	11	0.9371	0.81	0.8215	1.34	0.8193	0.94
丹参酮类成分	17	0.9967	0.15	0.9256	0.71	0.9531	0.63

[0156] 实施例2:采用近红外光谱法测定丹参药材中多成分含量的方法

[0157] 步骤1:丹参药材粉碎后,过50目药材标准筛,混匀,密封备用;

[0158] 步骤2:对步骤1的丹参药材进行近红外光谱测定,具体方法为:

[0159] 采样方式:积分球固体采样;采集条件:分辨率 $8\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数64次,扫描范围 $12000\sim 3800\text{cm}^{-1}$ ,数据格式为Lg(1/R),每个样品采集6张光谱,计算平均光谱以建立模型,每次扫描前振荡样品杯;样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等实验中都力求一致,以减小对实验结果的影响;

[0160] 步骤3:将得到的近红外光谱谱图代入已经建立好的丹参药材近红外光谱定量分析模型,计算丹参药材中丹参酮类成分,丹酚酸B,迷迭香酸和紫草酸的含量。

[0161] 采用验证集样品作为测试批次,采集其近红外光谱图,代入已建立的定量模型,对丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹参酮类成分(丹参酮II A+丹参酮I+隐丹参酮)含量进行预测,并采用HPLC参考值对预测结果进行验证。

[0162] 以预测值与HPLC参考值的比值为预测回收率,结果如表6、表7、表8、表9所示。

[0163] 表6:丹酚酸B验证集样品的预测(mg/g)

No.	实测值	预测值	绝对偏差	平均回收率
1	58.64	53.82	-4.83	98.07%
2	42.82	42.82	-0.01	
3	48.80	51.23	2.44	
4	48.96	46.41	-2.55	
5	53.05	50.15	-2.90	
6	48.86	48.20	-0.66	
7	38.23	43.21	4.98	
8	15.31	15.01	-0.29	
9	43.79	44.02	0.23	
10	43.72	43.69	-0.03	
11	55.32	55.78	0.45	
12	19.15	12.61	-6.54	
13	10.41	10.13	-0.27	
14	12.93	13.30	0.36	
15	47.80	47.52	-0.28	
16	23.55	25.11	1.55	

[0165] 表7:迷迭香酸验证集样品的预测(mg/g)

No.	实测值	预测值	绝对偏差	平均回收率	
[0166]	1	3.21	3.38	0.17	104.50%
	2	3.03	3.12	0.09	
	3	2.31	2.64	0.33	

	4	2.53	2.85	0.32	104.50%
	5	4.60	4.23	-0.37	
	6	2.28	2.38	0.10	
	7	2.01	2.50	0.49	
	8	2.24	2.75	0.51	
[0167]	9	3.02	2.89	-0.12	
	10	2.76	2.58	-0.18	
	11	1.36	1.19	-0.16	
	12	1.76	1.75	-0.01	
	13	1.98	2.29	0.30	
	14	0.76	0.70	-0.06	

[0168] 表8:紫草酸验证集样品的预测 (mg/g)

No.	实测值	预测值	绝对偏差	平均回收率	
	1	5.76	5.51	-3.24	95.38%
	2	2.46	2.39	-0.57	
	3	2.72	2.76	-4.48	
	4	1.96	2.06	0.10	
	5	2.04	2.08	1.74	
	6	2.99	2.92	-0.47	
	7	3.36	3.20	-1.16	
[0169]	8	2.56	2.92	0.36	
	9	1.94	2.03	0.49	
	10	2.60	2.73	16.14	
	11	1.48	1.50	0.02	
	12	2.00	2.04	1.74	
	13	1.17	1.29	0.52	
	14	3.57	3.36	0.79	
	15	1.69	1.55	-0.14	
	16	3.48	0.32	-2.86	

[0170] 表9:丹参酮类成分验证集样品的预测 (mg/g)

No.	实测值	预测值	绝对偏差	平均回收率
1	2.84	2.81	-0.03	95.52%
2	6.40	6.14	-0.26	
3	3.79	3.60	-0.19	
4	3.71	4.08	0.38	
5	5.54	5.12	-0.42	
6	4.52	4.73	0.22	
7	7.14	5.03	-2.11	
8	2.74	2.55	-0.19	
9	2.62	2.37	-0.26	
10	3.47	3.51	0.05	
11	2.92	2.82	-0.10	
12	4.73	3.93	-0.80	
13	2.31	2.37	0.06	
14	2.03	2.56	0.53	
15	2.11	2.38	0.26	
16	7.82	7.21	-0.61	

[0173] 表6-9结果显示：验证集样品的平均预测回收率分别为98.07%、104.50%、95.38%、95.52%，说明本发明建立的模型能够较为准确的预测丹参各种表成分含量。

[0174] 从结果可以看出，近红外模型预测值与HPLC参考值吻合良好，模型能够准确预测丹参药材各指标性成分含量。



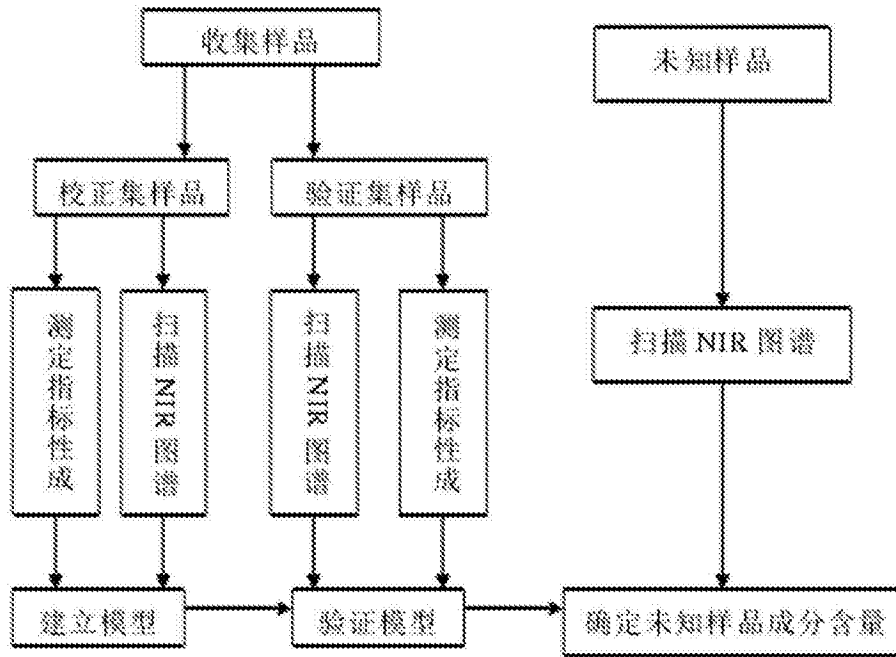
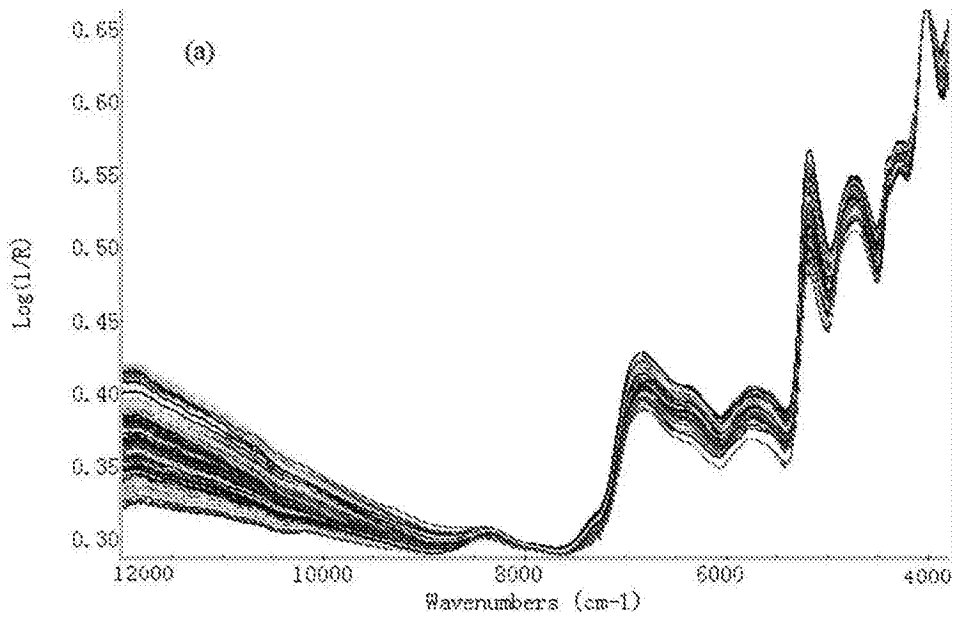


图1



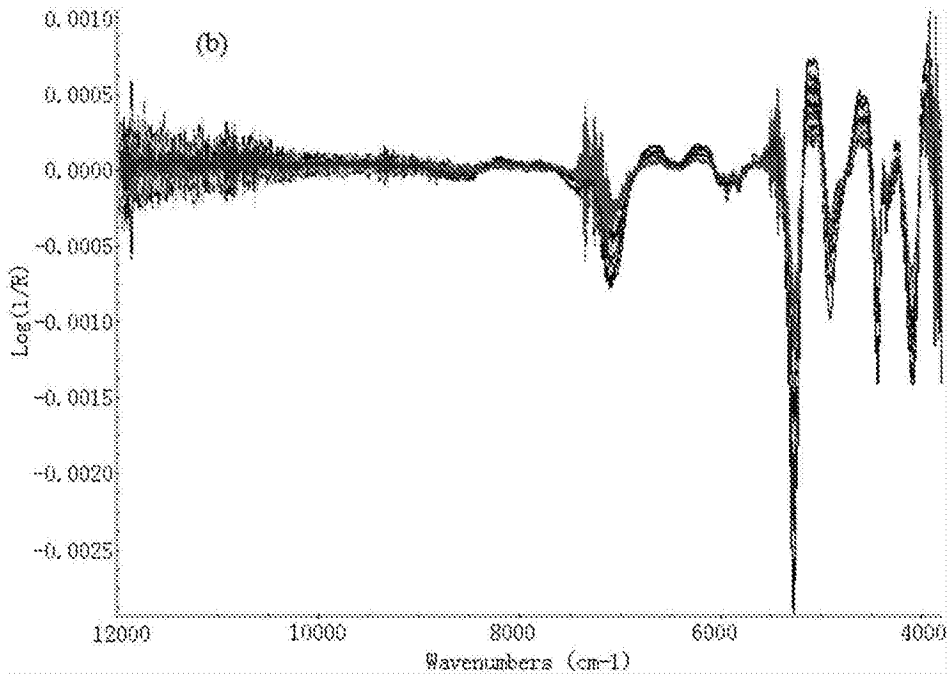


图2

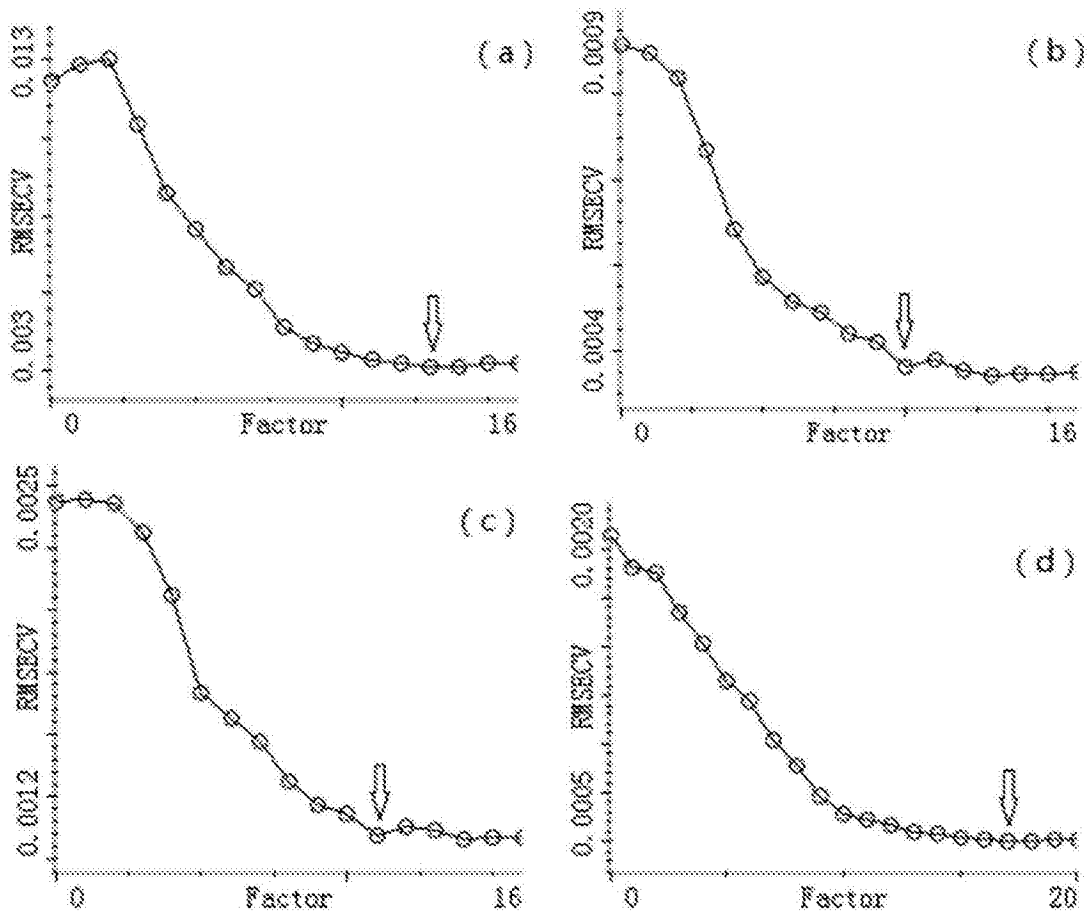


图3

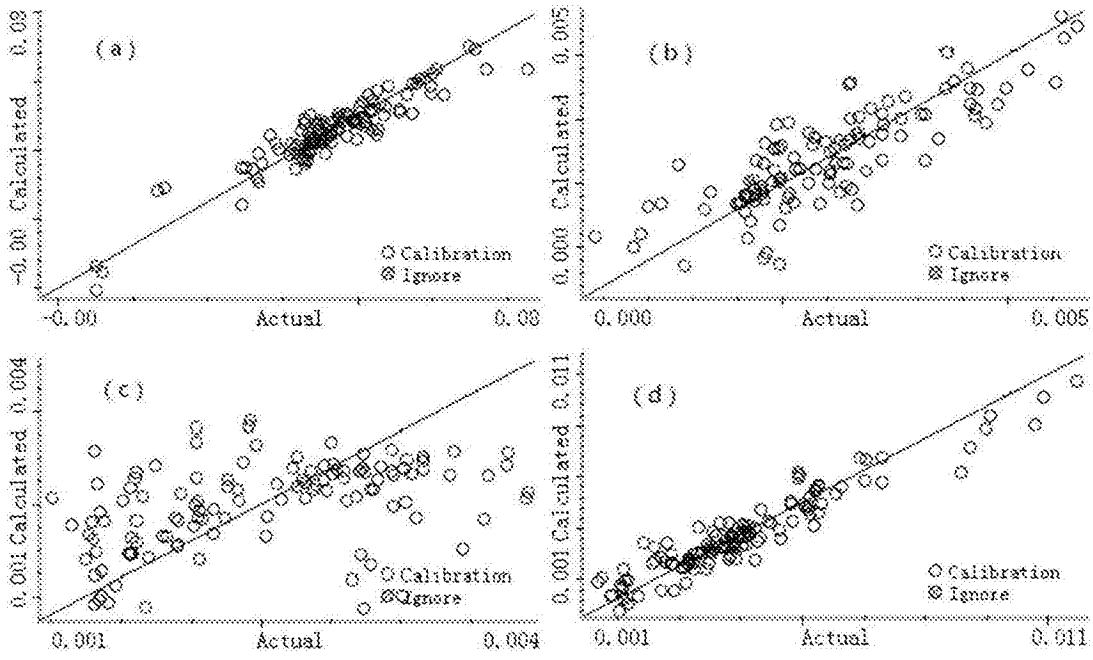


图4

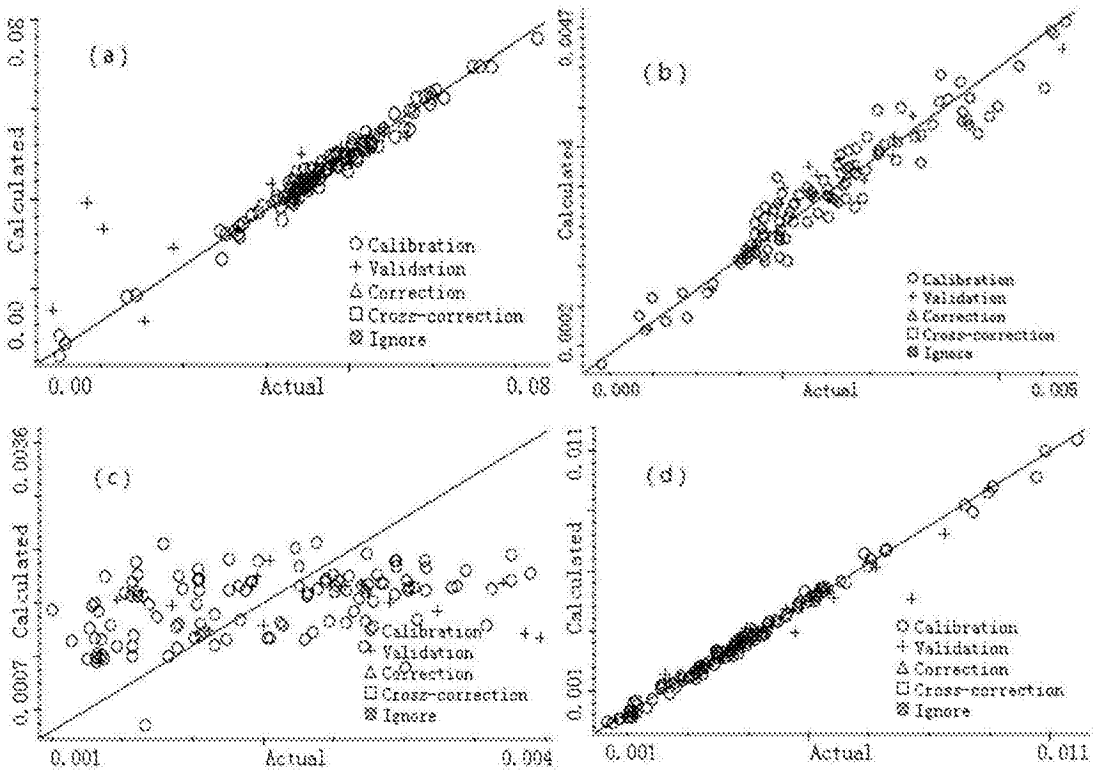


图5