



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866064 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610284900.2

(22)申请日 2016.05.03

(71)申请人 哈尔滨珍宝制药有限公司

地址 150060 黑龙江省哈尔滨市哈尔滨开发区哈平路集中区烟台一路8号

(72)发明人 方同华 程翼宇 瞿海斌 杨振中
许照芹 席桂才 张永年 王春生
孙海峰 孙淑娜 季庆亮 徐秀杰
周广红 贾文娟 王维龙

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G01N 21/359(2014.01)

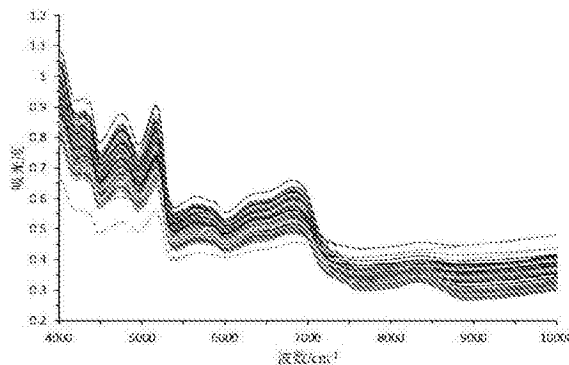
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法及应用

(57)摘要

本发明涉及采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法及应用。本发明通过收集三七不同批次的药材组成样本集,采集其近红外光谱,通过异常样本剔除,划分校正集和验证集,选择合适的光谱预处理方法和建模波段通过HPLC法测定三七药材中五种药效皂苷含量为参考值,应用化学计量学技术,构建三七药材近红外光谱与其五种药效皂苷含量之间的定量校正模型,可用于未知含量的三七药材及其相关制剂生产中五种药效皂苷含量的测定。本发明所涉及的五种药效皂苷是三七总皂苷类制剂的主要药效成分,且与其质控指标一致,故可为三七药材及其制剂质量控制提供快速、高效的技术方法,减轻检验工作量。



1. 采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 收集不同批次的三七药材或三七药材提取物或三七制剂, 得到校正集样本;

2) 采集所述校正集样本的近红外光谱数据, 采用一阶导滤波法进行预处理, 获取特征近红外光谱数据;

3) 用HPLC法测定所述校正集样本中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd的含量;

4) 采用偏最小二乘法建立步骤2)中所述校正集样本的特征近红外光谱数据与步骤3)中所述五种皂苷含量之间的定量校正模型;

5) 按照步骤2)相同的方法采集待测样品的近红外光谱数据, 导入所述定量校正模型, 得到待测样品的五种皂苷含量。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述五种皂苷成分的均以 $4,000-10,000\text{cm}^{-1}$ 全波段建模。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 光谱采集方式为: 积分球漫反射采样; 采集条件: 波数范围 $4,000-10,000\text{cm}^{-1}$, 扫描次数64次, 分辨率 4cm^{-1} , 参比光谱为空气。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 在对所采集的近红外光谱数据进行预处理前还包括剔除光谱异常样本的步骤; 优选地, 采用Chauvenet检验剔除光谱异常样本。

5. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 以交叉验证均方根误差RMSECV为指标确定最佳主成分数; 优选地, 三七皂苷R1, 人参皂苷Rg1, 人参皂苷Re, 人参皂苷Rb1、人参皂苷Rd的主成分数分别为7个、7个、7个、7个、8个。

6. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述步骤4)中, 还包括对所建立的定量校正模型的预测性能进行评价的步骤; 所述评价指标包括相关系数R、预测均方根误差RMSEP; 进一步地, 若R值接近于1, RMSEP值越小, 则所述定量校准模型适用于所述待测样品的检测; 反之, 则不适用。

7. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述批次中产地包括文山州、红河州、昆明市、玉溪市; 所述批次中部位包括三七剪口、主根、筋条、须根; 所述批次中主根规格包括至少10头。

8. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 在进行近红外光谱采集前对样品进行预处理: 将三七药材样品真空干燥, 粉碎后过 $280\mu\text{m}$ 筛, 得到三七药材粉末。

9. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述HPLC法色谱条件: Agilent Zorbax SB-C18色谱柱; 流动相: 流动相A为水, 流动相为B乙腈; 梯度洗脱: $0\sim 22\text{min}$, $17\%\sim 19\%B$; $22\sim 30\text{min}$, $19\%\sim 27\%B$; $30\sim 35\text{min}$, $27\%B$; $35\sim 47\text{min}$, $27\%\sim 46\%B$; $47\sim 70\text{min}$, $46\%\sim 90\%B$ 。

10. 权利要求1-9任一项所述的方法在三七药材及三七总皂苷类制剂的质量检测及控制领域中的应用。

采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法 及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种三七药材中五种皂苷含量快速测定方法,具体地说涉及一种采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种药效皂苷含量的方法,属于中医药研究技术领域。

背景技术

[0002] 三七为五加科植物植物Panax notoginseng(Burk)F.H.Chen的干燥根和根茎,具有散瘀止血,消肿定痛的功效,是一种重要的常见中药,在中国已有上百年的使用历史。其中,三七的皂苷类成分被认为是其中药药效物质,以三七总皂苷为原料的中药注射制剂,如血塞通和血栓通等,年销售额已近百亿,是中药注射剂界的“重磅炸弹”。

[0003] 三七单体皂苷成分大多为达玛烷型(dammarane)四环三萜皂苷,可分为两大类,分别是20(S)-原人参二醇型[20(S)-protopanaxadiol]和20(S)-原人参三醇型[20(S)-protopanaxatriol]。其中三七皂苷R1,人参皂苷Rg1,人参皂苷Re,人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd是三七中主要的皂苷类成分,被证明是三七及其制剂抗心肌缺血的主要药效物质,是三七总皂苷类制剂质量控制的指标成分。

[0004] 药材质量分析是中药制药过程分析和质量控制的源头。同为三七药材,不同产地、不同采收时间等都会导致药材质量的变化。现有的三七中皂苷类成分含量测定方法主要为高效液相分析方法,该方法费时费力,且需要对照品。因此,十分有必要建立三七药材中主要药效物质的含量测定方法,以满足三七及其制剂质量控制的需求。

[0005] 近红外光谱(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)能反映样本中有机分子含氢基团(如C-H、N-H、O-H等)的特征信息。近红外光谱技术可用于中药质量分析,样本无需或仅需简单处理,不消耗化学试剂,操作简单、快速,在中药质量控制领域具有巨大的应用潜力。将近红外光谱技术结合化学计量学技术,用于三七药材中主要药效物质的快速检测,对三七药材及三七总皂苷类制剂的质量控制具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种药效皂苷含量的方法及应用,为三七药材及三七总皂苷类制剂质量控制提供快速、高效的技术方法,减轻检验工作量。

[0007] 本发明的目的是通过如下技术方案实现:

[0008] 采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法,包括以下步骤:

[0009] 1)收集不同批次的三七药材或三七药材提取物或三七制剂,得到校正集样本;

[0010] 2)采集所述校正集样本的近红外光谱数据,采用一阶导滤波法进行预处理,获取特征近红外光谱数据;

[0011] 3)用HPLC法测定所述校正集样本中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd的含量;

[0012] 4)采用偏最小二乘法建立步骤2)中所述校正集样本的特征近红外光谱数据与步骤3)中所述五种皂苷含量之间的定量校正模型;

[0013] 5)按照步骤2)相同的方法采集待测样品的近红外光谱数据,导入所述定量校正模型,得到待测样品的五种皂苷含量。

[0014] 为便于描述,本发明中将三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd简称为五种皂苷。

[0015] 本发明中,样本收集是通过收集不同批次的三七药材或三七药材提取物或三七制剂样本,以增加样本集的代表性。本发明所称的“批次”是本领域常用的一个技术术语,具体到本发明,不同“批次”的药材之间的区别体现在:产地(即生长环境)、部位、主根规格、采收时间、贮存时间、到货入库时间、规格等。

[0016] 为了更好地建立定量校正模型,本发明所述产地包括文山州、红河州、昆明市、玉溪市等产地;所述部位包括三七剪口、主根、筋条、须根等部位;所述主根规格包括至少10头。

[0017] 本发明中,优选地,在进行近红外光谱采集前对样品进行预处理:将三七药材样品真空干燥,粉碎后过280 μm 筛,得到三七药材粉末。

[0018] 本发明中,优选地,光谱采集方式为:积分球漫反射采样;优选地采集条件:波数范围4,000-10,000 cm^{-1} ,扫描次数64次,分辨率4 cm^{-1} ,参比光谱为空气。

[0019] 本发明中,优选地,采用一阶导滤波对光谱进行预处理。

[0020] 本发明中,优选地,在对所采集的近红外光谱数据(包括校正集样本,验证集样本和待测样本)进行预处理前还包括剔除光谱异常样本;进一步优选地,采用Chauvenet检验剔除光谱异常样本。

[0021] 本发明中,优选地,采用偏最小二乘回归法(PLSR)建立所述定量校正模型。

[0022] 本发明中,优选地,所述五种皂苷成分的均以4,000-10,000 cm^{-1} 全波段建模。

[0023] 本发明在分别对光谱数据预处理和建模波段进行优选后,以交叉验证均方根误差RMSECV为指标确定最佳主成分数。优选地,三七皂苷R1,人参皂苷Rg1,人参皂苷Re,人参皂苷Rb1、人参皂苷Rd的主成分数分别为7个、7个、7个、7个、8个。

[0024] 优选地,本发明所述步骤4)中,还包括对所建立的所述定量校正模型的预测性能进行评价的步骤;所述评价指标包括相关系数R、预测均方根误差RMSEP;进一步地,若R值接近于1, RMSEP值越小,则所述定量校准模型适用于所述待测样品的检测;反之,则不适用。

[0025] 具体地,所述对所建立的所述定量校正模型的预测性能进行评价的步骤包括:取上述五种皂苷含量已知的验证集样本,按照步骤2)相同的方法采集待测样品的近红外光谱数据,导入所述定量校正模型,得到验证集样本的五种皂苷含量;与验证集样本的五种皂苷含量真测值的相比较,评价预测性能。

[0026] 所述验证集样本五种皂苷含量的检测可采用现有技术方法,也可采用上述HPLC法。

[0027] 优选地,本发明所述HPLC法色谱条件:Agilent Zorbax SB-C18色谱柱;流动相:流动相A为水,流动相为B乙腈;梯度洗脱:0~22min,17%~19%B;22~30min,19%~27%B;30~35min,27%B;35~47min,27%~46%B;47~70min,46%~90%B。

[0028] 具体地,本发明所述HPLC法色谱条件:Agilent Zorbax SB-C18色谱柱(4.6 \times

50mm, 1.8 μ m); 流动相: 流动相A为水, 流动相为B乙腈; 梯度洗脱: 0~22min, 17%~19%B; 22~30min, 19%~27%B; 30~35min, 27%B; 35~47min, 27%~46%B; 47~70min, 46%~90%B; 检测波长203nm; 进样体积3 μ L; 流速0.8mL \cdot min⁻¹; 柱温35 $^{\circ}$ C。

[0029] 进一步优选地, 所述HPLC法供试品溶液制备包括: 三七药材切碎, 粉碎, 过280 μ m筛; 精密称定三七粉末0.5g, 用70%甲醇水(v/v)40mL, 超声(工作频率53kHz)提取1小时; 过滤, 用70%甲醇充分洗涤残渣, 使完全转移; 60 $^{\circ}$ C旋转蒸发至干; 用70%甲醇转移至5.0mL容量瓶中, 相同溶剂定容; 过0.22 μ m尼龙滤膜, 即得。

[0030] 本发明还包括上述采用近红外光谱法快速测定三七药材中五种皂苷含量的方法在三七药材、三七制剂质量检测及控制领域中的应用。

[0031] 本发明所述三七制剂包括血塞通胶囊、血塞通注射剂、血栓通胶囊、血栓通注射剂等。

[0032] 本发明将近红外光谱分析技术引入到三七及其制剂的五种主要皂苷类药效物质的检测中, 实现了对这五种主要药效物质的快速测定, 与传统的检测方法相比, 大大缩短了测试时间, 节省了大量的人力物力。本发明有利于提高三七药材及其制剂质量控制水平, 可在三七药材检测及三七总皂苷类制剂的生产过程中推广使用。

[0033] 本发明通过选择三七样本的近红外光谱中的五种皂苷的光谱波段, 提取有效的特征光谱波段, 该特征光谱波段与按照现有常规方法测定的五种皂苷具有良好的相关性, 可有效的监控三七及其制剂五种皂苷含量。本发明通过采用Chauvenet检验剔除光谱异常样本, 采用一阶导滤波对光谱进行预处理, 以筛选信息, 减少噪音, 提高该方法检测的准确性和精确度。本发明所涉及的五种药效皂苷是三七总皂苷类制剂的主要药效成分, 且为三七总皂苷类制剂的质控指标故可为三七药材及其制剂质量控制提供快速、高效的技术方法, 减轻检验工作量。

附图说明

[0034] 图1为实验例1中三七药材粉末的近红外漫反射光谱图;

[0035] 图2实验例1中人参皂苷Rd定量模型的主成分数和RMSECV关系图;

[0036] 图3为实验例1中五种皂苷模型预测值与参考值相关图。

具体实施方式

[0037] 以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件, 或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

[0038] 如无特殊说明, 以下实验例及实施例所用仪器及试剂:

[0039] Antaris近红外光谱仪(Thermo公司, 美国), 配备积分球漫反射采样装置和RESULT 3.0光谱采集软件, 用于采集样本中的近红外光谱。

[0040] 安捷伦1100系列HPLC系统(Agilent公司, 美国), 配有四元溶剂泵、自动进样器、柱温箱、可变波长紫外光检测器。三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd五种皂苷标准品(上海融禾医药科技发展有限公司, 纯度 \geq 98%)。

[0041] 液相用水为超纯水(Millipore), 色谱乙腈(Merck, Germany), 其它试剂为分析纯。

[0042] 实验例1

[0043] 1样本采集:取173组三七不同部位(包括三七剪口、主根、筋条、须根等部位)、不同产地(包括文山州、红河州、昆明市、玉溪市等产地)、不同大小规格的三七样品,真空干燥,粉碎后过280 μm 筛。

[0044] 2方法

[0045] 2.1用HPLC法测定样本中五种药效皂苷含量

[0046] 2.1.1供试品溶液制备:精密称定三七粉末0.5g,用70%甲醇水(v/v)40mL,超声(工作频率53kHz)提取1小时。过滤,用70%甲醇充分洗涤残渣,使完全转移。60 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至干。用70%甲醇转移至5.0mL容量瓶中,相同溶剂定容。过0.22 μm 尼龙滤膜,即得。

[0047] 2.1.2色谱条件:Agilent Zorbax SB-C18色谱柱(4.6 \times 50mm,1.8 μm);流动相水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~22min,17%~19%B;22~30min,19%~27%B;30~35min,27%B;35~47min,27%~46%B;47~70min,46%~90%B);检测波长203nm;进样体积3 μL ;流速0.8mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温35 $^{\circ}\text{C}$ 。根据标准曲线计算三七样本中五种药效皂苷含量。

[0048] 2.2样本及近红外光谱采集

[0049] 光谱采集条件:波数范围4,000-10,000 cm^{-1} ,扫描次数64次,分辨率4 cm^{-1} ,参比光谱为空气。三七药材粉末的近红外漫反射光谱图如图1所示。

[0050] 3结果与讨论

[0051] 3.1近红外光谱数据预处理方法

[0052] 根据Chauvenet检验剔除光谱异常样本,然后随机划分校正集152例和验证集16例。采用全波段PLSR建模,用一阶导滤波对光谱进行预处理,各皂苷皆为全波段建模。三七皂苷R1,人参皂苷Rg1,人参皂苷Re,人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd的主成分数分别为7个、7个、7个、7个和8个。

[0053] 3.2定量校正模型的建立方法

[0054] 为了除去近红外光谱中的噪音和干扰。采用全波段PLSR建模,分别比较了未经光谱预处理、一阶导数、二阶导数、多元散射校正(MSC)和标准正则变换(SNV)这五种光谱预处理方法。结果如表1-表5所示,结果显示一阶导滤波对五种皂苷定量结果较好。其中RMSEC表示校正集均方根误差;RMSEP表示预测集均方根误差。

[0055] 表1 R1光谱预处理结果比较

[0056]

R1	R	RMSEC	RMSEP
未处理	0.8022	2.35	2.13
一阶导数	0.9463	1.27	2.50
二阶导数	0.7889	2.41	2.51
MSC	0.9250	1.13	2.06
SNV	0.7479	2.61	2.20

[0057] 表2 Rg1光谱预处理结果比较

[0058]

Rg1	R	RMSEC	RMSEP
未处理	0.9169	3.66	4.80
一阶导数	0.9718	2.16	3.73
二阶导数	0.9282	3.41	4.72
MSC	0.9284	3.40	4.19
SNV	0.9030	3.94	5.83

[0059] 表3 Re光谱预处理结果比较

[0060]

Rc	R	RMSEC	RMSEP
未处理	0.6355	1.26	1.42
一阶导数	0.9347	0.58	1.41
二阶导数	0.8590	0.83	1.29
MSC	0.6673	1.21	1.50
SNV	0.6006	1.30	1.44

[0061] 表4 Rb1光谱预处理结果比较

[0062]

Rb1	R	RMSEC	RMSEP
未处理	0.8686	3.54	2.57
一阶导数	0.9596	2.01	3.10
二阶导数	0.6914	5.16	5.24
MSC	0.8838	3.34	2.96
SNV	0.8687	3.54	2.72

[0063] 表5 Rd光谱预处理结果比较

[0064]

Rd	R	RMSEC	RMSEP
未处理	0.9219	1.15	1.02
一阶导数	0.9892	0.43	1.00
二阶导数	0.92500	1.13	2.06
MSC	0.9195	1.17	1.09
SNV	0.9181	1.18	1.14

[0065] 3.3光谱波段的选择

[0066] 虽然PLSR方法可以一定程度消除光谱的共线性,仍然有必要对建模波段进行优化。通过比较了不同波段的建模效果,结果见表6-表10。五种皂苷皆为全波段建模较优。

[0067] 表6 R1波段建模效果比较

[0068]

R1	R	RMSEC	RMSEP
全波段	0.9463	1.27	2.50
9989-7436	0.7206	2.72	2.91
7436-6888	0.8607	2.00	2.83
6888-5602	0.7486	2.60	2.15
5602-5172	0.9035	1.68	2.64
5172-4004	0.8486	2.08	2.50
7181-5193	0.8161	2.27	2.28

[0069] 表7 Rg1波段建模效果比较

[0070]

Rg1	R	RMSEC	RMSEP
全波段	0.9718	2.16	3.73
9989-7436	0.7507	6.05	7.53
7436-6888	0.9108	3.78	6.29
6888-5602	0.9648	2.41	3.94
5602-5172	0.9223	3.54	4.54
5172-4004	0.9407	3.11	3.44
7181-5193	0.9620	2.50	4.01

[0071] 表8 Re波段建模效果比较

[0072]

Re	R	RMSEC	RMSEP
全波段	0.9347	0.58	1.41
9989-7436	0.5632	1.34	1.38
7436-6888	0.7663	1.04	1.50
6888-5602	0.7906	1.00	1.26
5602-5172	0.8060	0.96	1.23
5172-4004	0.8202	0.93	1.11
7181-5193	0.8479	0.86	1.27

[0073] 表9 Rb1波段建模效果比较

[0074]

Rb1	R	RMSEC	RMSEP
全波段	0.9596	2.01	3.10
9989-7436	0.5848	5.80	6.61
7436-6888	0.8557	3.70	4.13
6888-5602	0.9226	2.76	2.73
5602-5172	0.8668	3.56	4.40
5172-4004	0.9420	2.40	3.05
7181-5193	0.9583	2.04	2.65

[0075] 表10 Rd波段建模效果比较

[0076]

Rd	R	RMSEC	RMSEP
全波段	0.9892	0.43	1.00
9989-7436	0.7644	1.91	2.35
7436-6888	0.9274	1.11	1.74
6888-5602	0.9592	0.84	1.03
5602-5172	0.7909	1.82	1.98
5172-4004	0.9511	0.92	0.91
7181-5193	0.9712	0.71	1.08

[0077] 3.4最佳主成分数的确定

[0078] 根据交叉验证均方根误差RMSECV判断PLSR的主成分数,图2为人参皂苷Rd定量模型的主成分数和交叉验证均方根残差(RMSECV)关系图,当主成分数为8时,RMSECV趋于稳定。同理,其他皂苷成分的主成分数分别为:R1,7个;Rg1,7个;Re,7个;Rb1,7个。

[0079] 3.5模型预测结果

[0080] 采用PLSR方法建立定量校正模型,以预测相关系数R和预测均方根误差RMSEP为指标评价模型预测性能。

[0081] 运用偏最小二乘回归法(PLSR)将152例校正集样品的NIR光谱与HPLC法测得的五种皂苷含量进行回归关联,建立五种皂苷的最优近红外定量校正模型。将其余16例验证集样品的近红外光谱输入定量校正模型,计算五种皂苷的含量,并与HPLC法测定值进行比较,以预测均方根误差RMSEP为指标评价模型预测性能,三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Re、Rb1和Rd的RMSEP分别为2.50,3.73,1.41,3.10和1.00。各个回归模型的预测值和参考值之间的相关图如图3所示。图3中,R1、Rg1、Re、Rb1、Rd分别表示三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1和人参皂苷Rd;Calibration为校正集,Validation为验证集。

[0082] 三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Re、Rb1和Rd在校正模型中的预测相关系数(R)分别为0.9463,0.9718,0.9347,0.9596和0.9892。

[0083] 3.6定量分析模型的应用

[0084] 在选定的光谱预处理和波段条件下,对三七药材中五种药效皂苷含量进行预测。本三七药材漫反射近红外定量模型,具有较高的预测精度,五种皂苷成分(三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Re、Rb1和Rd)的预测相关系数均大于0.93。而且检测指标与三七总皂苷类制剂的质控指标一致,增加了方法的实用性。该方法适合在三七总皂苷类制剂生产线旁快速准确的投料药材的含量信息,为制剂的生产提供参考。同时,该方法也可以用于三七药材采购阶段的质量检测。

[0085] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

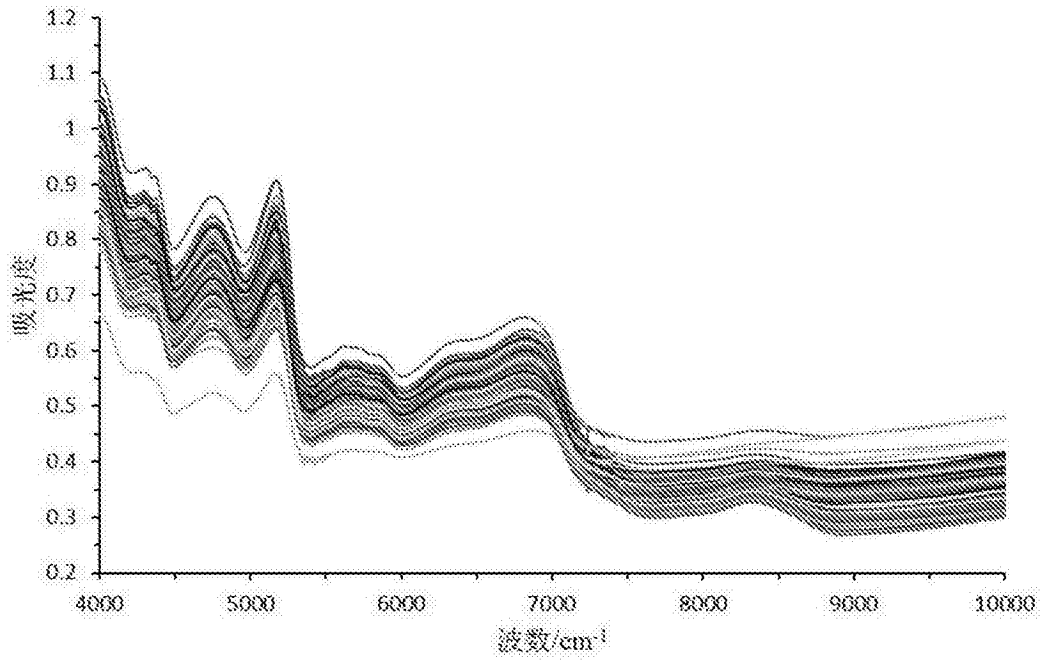


图1

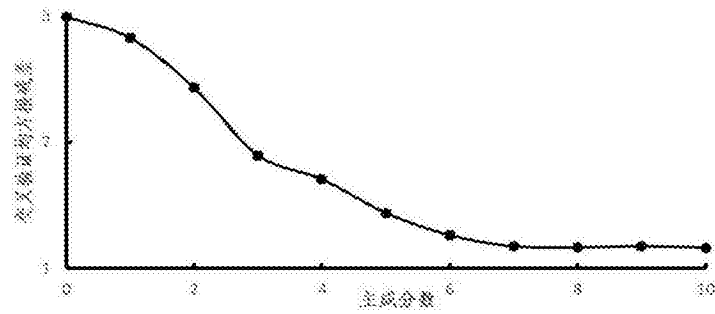


图2

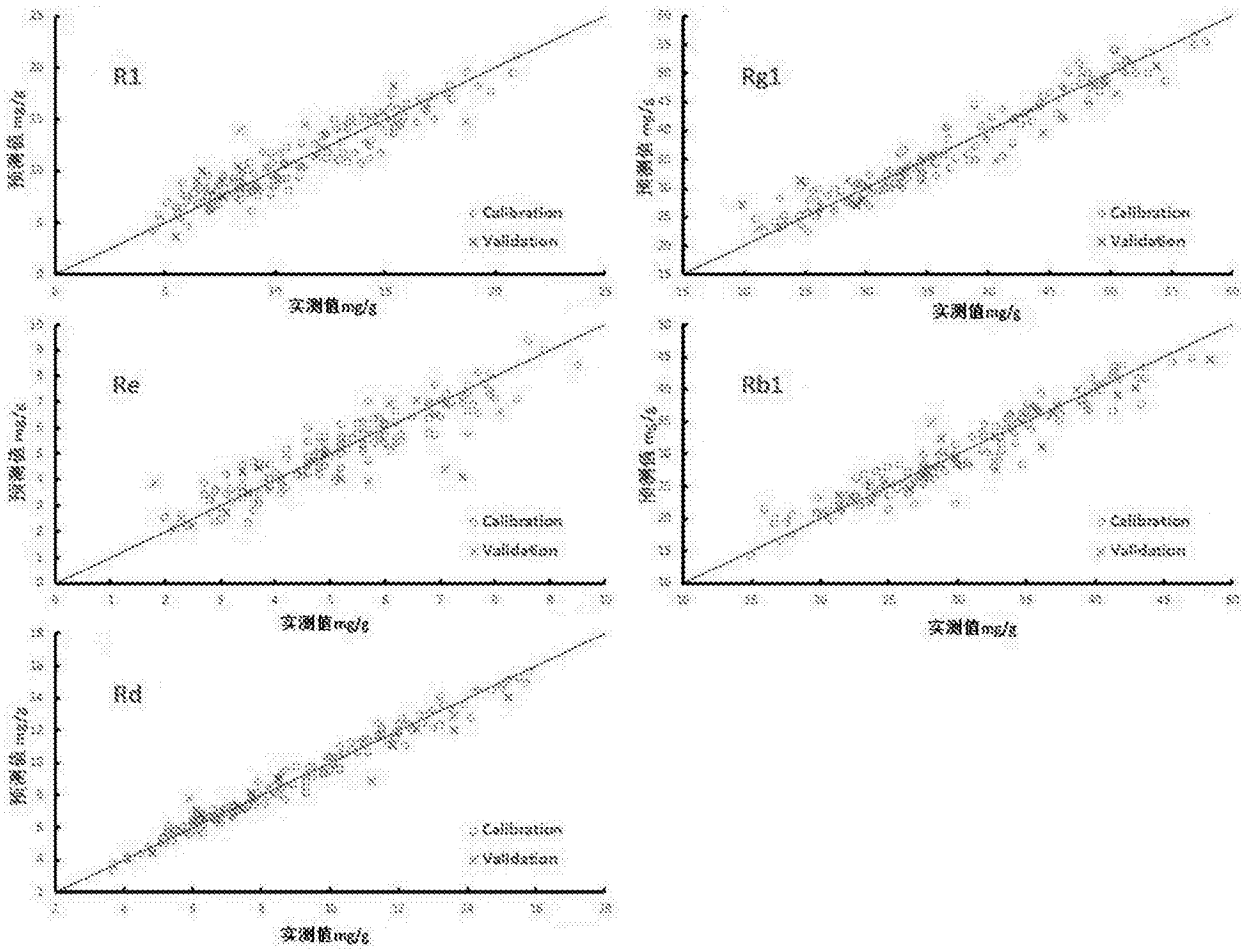


图3