

声光可调-近红外光谱法快速测定丹参药材中隐丹参酮的含量[△]

苏婷^{1*}, 姜文月¹, 邢成², 任绪华³, 李心冬¹, 崔宪利², 高陆^{1#} (1. 吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春 130000; 2. 吉林长白山药业集团股份有限公司, 吉林白山 134300; 3. 长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 O631.6; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1044-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.08

摘要 目的: 建立快速测定丹参药材中隐丹参酮含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法测定药材样品中隐丹参酮含量(作为参考值)。采用声光可调-近红外光谱法结合偏最小二乘法建立药材样品中隐丹参酮含量的定量模型: 根据药材样品中隐丹参酮含量测定结果, 采集35份药材样品, 以一阶导数法联合平滑滤波系数法预处理光谱, 药材样品中隐丹参酮含量测定最佳波段范围为1 250~2 150 nm。结果: 药材样品中隐丹参酮含量测定方法学经验证符合要求。隐丹参酮定量模型的校正均方根偏差为0.014 6, 预测均方根偏差为0.022 3, 相关系数为0.976 6。内部验证偏差为2.41%, 外部验证偏差为4.06%。结论: 该方法快速准确, 简便无污染, 可用于丹参药材中隐丹参酮含量的快速测定。

关键词 声光可调-近红外光谱法; 偏最小二乘法; 丹参; 隐丹参酮

Rapid Determination of Cryptotanshinone in *Salvia miltiorrhiza* by AOTF-NIDRS

SU Ting¹, JIANG Wenyue¹, XING Cheng², REN Xuhua³, LI Xindong¹, CUI Xianli², GAO Lu¹ (1. Jilin Modern Chinese Medicine Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130000, China; 2. Jilin Changbai Mountain Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jilin Baishan 134300, China; 3. College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish rapid method for content determination of cryptotanshinone in *Salvia miltiorrhiza*. **METHODS:** The content of cryptotanshinone in sample was determined by HPLC (as reference value). AOTF-NIDRS combined with PLS was used to establish quantitative correction model for the content of cryptotanshinone in *S. miltiorrhiza*. According to the results of content determination of cryptotanshinone in samples, 35 samples of medicinal material were collected. First-order derivative combined with smoothing filter coefficient method was used to pretreat spectrum, and optimal band range for content determination of cryptotanshinone in sample ranged 1 250-2 150 nm. **RESULTS:** Methodology validation of content determination of cryptotanshinone in sample was in line with the requirements. Correction mean square deviation of quantitative correction model of cryptotanshinone was 0.014 6, and predicted mean square deviation was 0.022 3, coefficient of association was 0.976 6. The internal verification deviation was 2.41% and the external verification deviation was 4.06%. **CONCLUSIONS:** This method is rapid, accurate, simple and pollution-free. It can be used for rapid content determination of cryptotanshinone in *S. miltiorrhiza*.

KEYWORDS AOTF-NIDRS; Partial least square method; *Salvia miltiorrhiza*; Cryptotanshinone

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎, 有活血祛瘀、养血安神、凉血清心的功效, 系应用历史悠久的常用中药^[1]。隐丹参酮是丹参的主要脂溶性提取物, 有研究证实其在心血管疾病、代谢紊乱性疾病及神经退行性疾病等方面有良好的应用前景^[2], 而丹参药材资源分布遍及全国, 其质量参差不齐。

[△] 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No.20150311003YY、20150301009YY)

* 硕士。研究方向: 中药新药研发及近红外光谱分析技术。
E-mail: suting_1989@126.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药新药研发及近红外光谱分析技术。
E-mail: bxgl@163.com

目前, 药品生产单位按2015年版《中国药典》(一部)标准对丹参药材进行质量控制, 但步骤复杂, 检测效率较低。因此, 建立一种快速有效的检测方法对丹参药材质量控制具有重要意义。

近红外光谱(Near infrared reflectance spectroscopy, NIR)检测技术是近年来发展迅速的一种绿色分析技术^[3], 第5代声光可调(Acousto-optic tunable, AOTF)-NIR仪具有体积小、便于携带、性能稳定、环境适应性强等特点^[4], 可用于在线生产和室外现场。本研究采用AOTF-NIR技术^[5-6], 建立快速测定丹参药材中隐丹参酮含量的新方法, 以期对丹参药材的快速定量分析提供

参考。

1 材料

1.1 仪器

AOTF 便携式 Luminar-5030 型 NIR 仪, 包括石英检测皿、样品旋转器、SNAP 光谱分析软件、CAMO 化学计量学软件(美国 Brimrose 公司); Thermo-U3000 型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括紫外检测器、Chromeleon7 色谱工作站(美国 Thermo Scientific 公司); ME204E 型万分之一电子分析天平、MS105DU 型十万分之一电子分析天平(美国 Mettler-Toledo 公司); SB-1200D 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

丹参酮 II_A 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110766-201520, 纯度: 98.9%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

1.3 药材

35 批丹参药材来源于山东、安徽、河南、河北等省区(见表 1), 由吉林省现代中药工程研究中心有限公司提供, 经长春中医药大学李焕荣教授鉴定为真品。

表 1 丹参药材来源

Tab 1 Source of *S. miltiorrhiza*

集合	批号	产地	
校正集	20140701	山东	
	20140703	安徽	
	20140705	河北	
	20140822	山东	
	20140901	山东	
	20141212	河南	
	20141215	山东	
	20150302	河北	
	20150403	安徽	
	20150408	河南	
	20150801	河南	
	20150805	山东	
	20150809	山东	
	20150901	山东	
	20150902	安徽	
	20150908	河北	
	20151001	河北	
	20151018	河南	
	20151218	山东	
	20160115	山东	
	20160123	山东	
	20160324	山东	
	20160401	河南	
	20160402	山东	
	20160403	山东	
	20160404	河北	
	20160405	安徽	
	20160418	河北	
	20160501	山东	
	20160613	山东	
	验证集	20150209	山东
		20150902	山东
		20151110	河南
		20160203	山东
20160307		河北	

2 方法与结果

2.1 隐丹参酮(参考值)测定

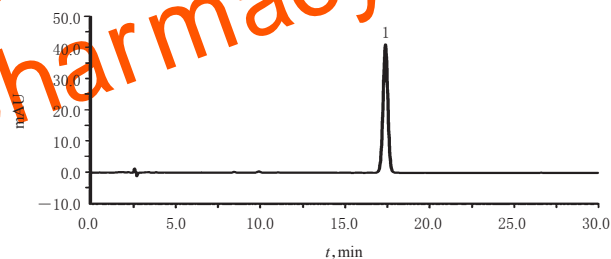
2.1.1 色谱条件 色谱柱: ACE C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.02% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱 (0~6 min, 39% B; 6~20 min, 39% B→10% B; 20~20.5 min, 10% B→39% B; 20.5~25 min, 39% B); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取丹参酮 II_A 对照品适量, 精密称定, 置于棕色量瓶中, 加甲醇制成丹参酮 II_A 质量浓度为 20 μg/mL 的对照品溶液。

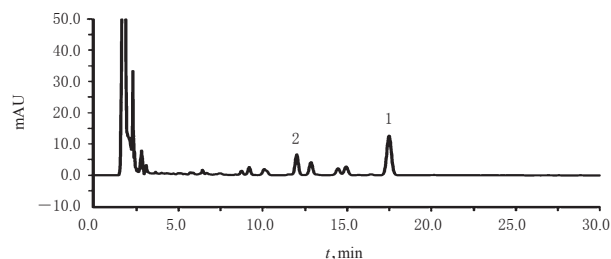
2.1.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末(过 3 号筛) 约 0.3 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声(功率: 140 W, 频率: 42 kHz) 处理 30 min, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 测定方法 以丹参酮 II_A 为参照, 以其相应的峰为标准峰, 计算隐丹参酮的相对保留时间, 其相对保留时间应在规定值的 ±5% 范围之内。隐丹参酮的相对保留时间为 0.75, 校正因子为 1.18。

2.1.5 专属性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液, 分别按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 色谱见图 1。结果表明, 供试品色谱图中, 在与丹参酮 II_A 吸收峰相对保留时间为 0.75 的相应位置上, 出现隐丹参酮吸收峰, 该峰分离度 > 1.5, 说明本色谱条件专属性良好。



A. 对照品



B. 供试品

注: 1. 丹参酮 II_A; 2. 隐丹参酮

Note: 1. tanshinone II_A; 2. cryptotanshinone

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.6 方法学考察 按相关标准进行方法学考察。结果, 中间精密度、稳定性、重复性试验中丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 均小于 1.65%, 表明方法精密度、溶液稳定性、方法重复性均较好。

2.1.7 耐用性试验 取药材样品(批号:20140701)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别考察不同色谱柱[Shimadzu Wondacraft ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent 5 TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ALC C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]、流速(±0.2 mL/min)、检测波长(±3 nm)、柱温(±5 ℃)、流动相比比例(±2%)条件下丹参酮Ⅱ_A的峰面积,各条件平行测试两次。结果,不同条件下丹参酮Ⅱ_A峰面积的RSD均小于0.73%,表明本色谱条件在一定波动范围内耐用性良好。

2.1.8 药材样品含量测定 取35批药材样品各适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按“2.1.4”项下测定方法计算隐丹参酮含量。结果,药材样品中隐丹参酮含量为0.02%~0.36%,详见表2(含量测定结果为去水百分含量)。

表2 药材样品含量测定结果(n=3, %)

Tab 2 Results of content determination in samples (n=3, %)

集合	批号	隐丹参酮
校正集	20140701	0.02
	20140703	0.03
	20140705	0.03
	20140822	0.17
	20140901	0.07
	20141212	0.02
	20141215	0.05
	20150302	0.08
	20150403	0.03
	20150408	0.03
	20150801	0.02
	20150805	0.17
	20150809	0.03
	20150901	0.13
	20150902	0.21
	20150908	0.14
	20151001	0.25
	20151018	0.18
	20151218	0.02
	20160115	0.04
	20160123	0.21
	20160324	0.17
	20160401	0.19
	20160402	0.05
	20160403	0.04
	20160404	0.32
	20160405	0.04
	20160418	0.24
	20160501	0.36
	20160613	0.17
验证集	20150209	0.04
	20150902	0.21
	20151110	0.13
	20160203	0.02
	20160307	0.07

2.2 NIR定量模型的建立与验证

2.2.1 NIR的采集 采样方式:样品杯固体采样。采集条件:扫描间隔为2.0 nm,扫描范围为1 100~2 300 nm,扫描300次^[7]。每批药材样品采集3张光谱,每次扫描前振荡样品杯,药材样品的装样厚度、装填的紧密性和颗粒均匀性等都在试验中都力求一致。35批药材样品近红外光谱原始叠加如图2。

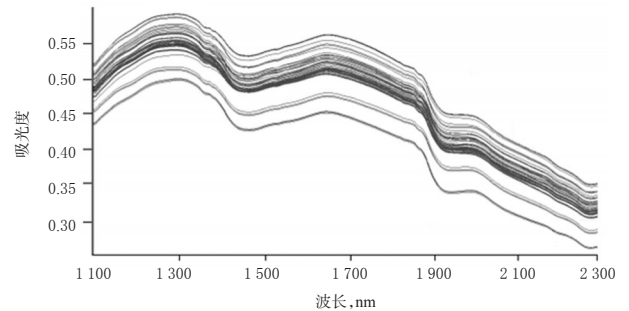


图2 35批药材样品近红外光谱原始叠加图

Fig 2 NIR original spectral superposition diagram of 35 batches of samples

2.2.2 校正集和验证集样品的选择 建模药材样品含量范围和分布情况直接影响校正模型的预测性能^[7],本研究收集近3年不同产地、批次的丹参药材共35批,根据表2药材样品中隐丹参酮含量分布情况,从35批药材样品中选取30批组成校正集用于建立NIR模型,其余药材样品(5批)组成验证集,用于验证模型。校正集样本隐丹参酮含量范围为0.02%~0.36%;验证集样本隐丹参酮含量范围为0.02%~0.21%。

2.2.3 光谱预处理方法的选择 在建立模型前,需要消除噪音和基线漂移等的影响,采用SNAP光谱分析软件中的光谱处理程序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, FD)、二阶导数法(Second derivative, SD)、平滑滤波系数法(Savitzky-Golay, SG)等。对各批药材样品原始光谱使用不同方法进行预处理,得各处理方法下的校正集内部交叉验证相关系数(R^2)、校正均方根偏差(RMSEC)、预测均方根偏差(RMSEP),详见表3。

表3 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Tab 3 Effects of different spectrum pretreatment methods on quantitative model performance

预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP
MSC+FD	0.930 0	0.097 6	0.101 0
MSC+SD	0.945 7	0.081 2	0.096 8
SNV+FD	0.958 1	0.057 3	0.068 7
SNV+SD	0.955 6	0.072 4	0.080 6
FD+SG	0.963 7	0.038 4	0.046 2

运用The Unscrambler分析软件对表2数据进行处理,以偏最小二乘法(PLS)建立NIR定量分析模型^[8]。选择 R^2 、RMSEC、RMSEP为评价指标,综合评价不同模型的准确性与适用性。其中, R^2 越接近1,NIR预测值与参

考值相关性越好;RMSEC、RMSEP 越小,所建定量分析模型适用性越强、预测效果越好。结果表明,采用FD+SG法预处理光谱可有效消除颜色差别等因素引起的光谱基线偏移和漂移。预处理后的近红外光谱见图3。

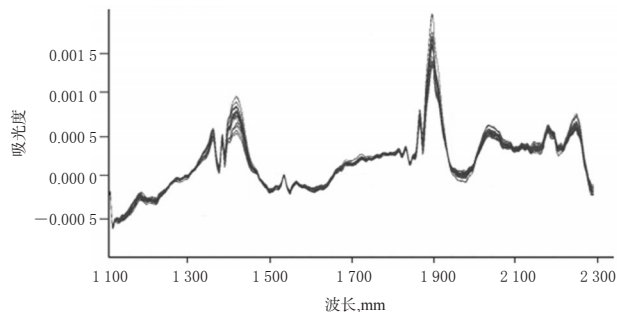


图3 预处理后的近红外光谱图

Fig 3 NIR spectrum after pretreatment

2.2.4 建模波段的选择 建模波段要求包含药材样品大量信息的同时避免冗余信息,降低噪声干扰。采用FD+SG法对不同的波段进行手动优化比较,通过The Unscrambler分析软件得到隐丹参酮含量预测最佳波段为1 250~2 150 nm,详见表4。

表4 不同波段对定量模型性能的影响

Tab 4 Effects of different spectral ranges on quantitative model performance

波段, nm	R ²	RMSEC	RMSEP
1 100~230 0	0.963 7	0.038 4	0.046 2
1 150~225 0	0.965 8	0.031 6	0.037 4
1 200~220 0	0.970 5	0.020 7	0.028 7
1 250~215 0	0.972 3	0.019 8	0.026 5
1 300~210 0	0.961 3	0.034 7	0.039 5

2.2.5 定量模型的建立 采用FD+SG法预处理光谱,在“2.2.4”项下波段,运用The Unscrambler分析软件对校正集30批药材样品的隐丹参酮含量进行建模。采用光谱影响值Leverage和化学值误差Residual等统计量检验剔除NIR光谱与测定结果的异常值^[8],进行优化。结果,预测值与参考值的相关性较高,表明该模型的性能较好,可以用于丹参药材中隐丹参酮成分的定量分析。校正集样品NIR模型见图4。

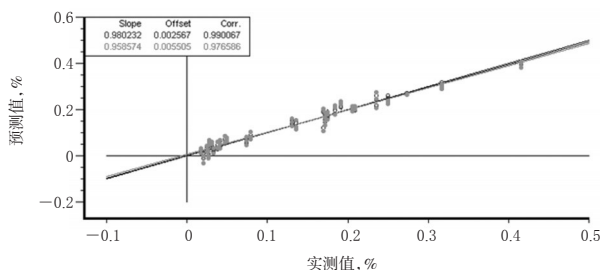


图4 校正集样品NIR模型

Fig 4 NIR model of correction set sample

2.2.6 定量模型的验证 利用校正模型对5批校正集样品进行验证,将其NIR输入定量模型,预测各指标含量,再与含量测定参考值进行比较,计算偏差,详见表5。

表5 定量模型验证结果

Tab 5 Results of quantitative model verification

指标	校正模型			验证偏差	
	R ²	RMSEC	RMSEP	内部, %	外部, %
隐丹参酮	0.976 6	0.014 6	0.022 3	2.41	4.06

3 讨论

研究结果表明,本研究建立的AOTF-NIR法能够快速、无损地测定丹参药材中隐丹参酮含量。此前,已有利用NIR技术快速测定丹参药材中丹酚酸B、丹参酮II_A含量等的报道^[9-10],而采用AOTF-NIR技术对丹参药材中隐丹参酮进行快速检测的研究尚未报道。本研究建立了丹参药材中隐丹参酮含量NIR快速检测模型,完善了丹参药材的快速检测体系,为全面控制丹参药材质量提供了可行方案。

本课题目的为制药生产企业监控实际品种提供技术支持,常规测定每批次药材样品约需4~7 h,本研究采用AOTF-NIR建立的模型,对药材样品仅进行粉碎处理,缩短了检测周期、减少了耗材的使用、降低了检测成本。若进一步增加药材样本数量,扩大其覆盖范围,可以建立更加稳定的模型^[11]。

综上,本研究建立的AOTF-NIR法所得预测结果较为准确,能够满足生产中丹参药材检查需求。虽然NIR法的准确度不及HPLC法,但因其快速、准确、无污染,能满足工业生产中大批量采集药材样品化学信息的需求,适用于快速测定药材中成分,亦可拓展多指标同时检测,可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方法体系,对保障最终制剂产品质量的稳定可控具有重要意义。

参考文献

- [1] 钱佳华,宋崎,马能溢. 丹参分散片中总丹参酮和丹参酮II_A的含量测定方法研究[A]//2008年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集[C]. 2008:8-11.
- [2] 赵杨,陆茵,郑仕中,等. 隐丹参酮的药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(11): 1839-1841.
- [3] 田华,黄开合,袁胜浩. 近红外光谱技术及其在中药质量分析中的应用[J]. 中国药房, 2011, 22(3): 281-282.
- [4] 杨丽,李菁,刘翠红,等. AOTF近红外光谱技术在淫羊藿浓缩过程在线检测中的应用[J]. 中国医药导报, 2014, 11(24): 111-114.
- [5] 钟英杰,李亮,庞云露,等. 近红外光谱技术在中药研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 1697-1703.
- [6] 周昭露,李杰,黄生权,等. 近红外光谱技术在中药质量控制应用中的化学计量学建模:综述和展望[J]. 化工进展, 2016, 35(6): 1627-1645.
- [7] 张爱军,戴宁,赵国磊. 丹参产业化提取中近红外在线检测技术的研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 238-240.
- [8] 吴莎,刘启安,李云,等. 最小二乘支持向量机和偏最小二乘法在栀子中间体纯化工艺近红外定量分析中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(7): 990-997.
- [9] 张强. NIRS和HPLC在丹参质量分析中的应用研究[D]. 郑州:河南中医学院, 2015.

UPLC-MS/MS法同时测定通关藤药材中3种皂苷的含量^Δ

王祁民^{1*}, 安静¹, 李颖², 马银玲¹, 董占军^{1#}(1.河北省人民医院药学部, 石家庄 050051; 2.河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R28 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1048-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.09

摘要 目的:建立同时测定通关藤药材中通关藤苷A、H、I含量的方法。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱法,色谱柱为Phenomenex Kinetex XB-C₁₈,流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.2 mL/min,柱温为40℃,进样量为5 μL,离子源为电喷雾离子源,多反应离子监测模式,正离子扫描,离子源喷射电压为5 500 V,雾化气压力为60 psi,加热气压力为60 psi,帘气压力为20 psi,去溶剂温度为600℃。结果:通关藤苷A、H、I检测质量浓度线性范围分别为0.1~10 ng/mL($r=0.9997$)、0.025~10 ng/mL($r=0.9995$)、0.025~10 ng/mL($r=0.9989$);定量限分别为0.1、0.025、0.025 ng/mL,检测限分别为0.05、0.012 5、0.012 5 ng/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于4.0%;加样回收率分别为97.67%~99.00%(RSD=0.47%, $n=6$)、95.00%~101.67%(RSD=2.59%, $n=6$)、96.67%~103.33%(RSD=2.83%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于通关藤药材中通关藤苷A、H、I含量的同时测定。

关键词 通关藤;通关藤苷A;通关藤苷H;通关藤苷I;超高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous Determination of 3 Kinds of Saponins in *Marsdenia tenacissima* by UPLC-MS/MS

WANG Qimin¹, AN Jing¹, LI Ying², MA Yinling¹, DONG Zhanjun¹(1. Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2. Graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I in *Marsdenia tenacissima*. METHODS: UPLC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on a Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was set at 40℃, and sample size was 5 μL. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was adopted with electrospray ion source as ion source, using positive ion scanning. Source jet voltage was 5 500 V, nebulizer pressure was 60 psi, heating pressure was 60 psi, curtain pressure was 20 psi and cone temp was set at 600℃. RESULTS: The linear ranges of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I were 0.1-10 ng/mL ($r=0.9997$), 0.025-10 ng/mL ($r=0.9995$), 0.025-10 ng/mL ($r=0.9989$), respectively; limited of quantation were 0.1, 0.025, 0.025 ng/mL, limited of detection were 0.05, 0.012 5, 0.012 5 ng/mL, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were <4.0%. The recoveries were 97.67%-99.00% (RSD=0.47%, $n=6$), 95.00%-101.67% (RSD=2.59%, $n=6$), 96.67%-103.33% (RSD=2.83%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I in *M. tenacissima*.

KEYWORDS *Marsdenia tenacissima*; Tenacissoside A; Tenacissoside H; Tenacissoside I; UPLC-MS/MS

通关藤 [*Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.] 又名乌骨藤、通光藤、通关散、奶浆藤等, 收载于2015年版《中国药典》(一部), 分布于我国云南、贵州等地, 入药部位为其干燥藤茎, 有止咳平喘、祛痰、通乳、清热解毒等功效^[1-3]。现有文献报道多集中于通关藤药材

中酚酸类物质^[4-7], 近期研究显示通关藤药材主要活性成分为甾体皂苷类化合物^[3]。2015年版《中国药典》(一部) 中通关藤药材的含量测定项是以通关藤苷H为指标成分, 采用高效液相色谱法(HPLC)进行检测的。随着对该药材研究的不断深入, 鉴定分离的通关藤苷种数不断

[10] 白雁, 李磊, 雷敬卫, 等. 近红外技术应用于药厂丹参药

Δ 基金项目:河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.冀中医药[2017]67号-2018073)

* 主管药师, 硕士。研究方向:医院药学。电话:0311-85988076。E-mail:littlebear_chao@sina.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药事管理。电话:0311-85988604。E-mail:13313213656@126.com

材质量检测[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(3):222-225.

[11] 闫研, 殷果, 刘凯双, 等. 近红外光谱法快速鉴别三九胃泰颗粒及其水分的定量分析[J]. 中国药房, 2016, 27(18):2551-2554.

(收稿日期:2017-07-04 修回日期:2017-08-17)

(编辑:张静)