

基于近红外光谱结合化学计量学的壮骨关节 胶囊流浸膏中总黄酮醇苷的检测研究

李霞, 张大翰, 黄信果, 欧阳燕琴, 张发森, 张勇

华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳

收稿日期: 2024年4月25日; 录用日期: 2024年5月23日; 发布日期: 2024年5月30日

摘要

目的: 本研究旨在建立近红外光谱法快速检测壮骨关节胶囊流浸膏中总黄酮醇苷的方法。方法: 使用近红外光谱技术对壮骨关节胶囊流浸膏进行扫描, 并测定流浸膏中总黄酮醇苷的含量, 利用PLS算法建立光谱与含量的模型, 实现快速无损检测。结果选择 $8870.95\sim 7729.29\text{ cm}^{-1}$ 波段, 一阶导预处理方法所建立的模型考察的相关系数结果较好, 预测值与真实值之间无显著差异($P > 0.05$)。结论: 所建立的模型准确度高, 适用于壮骨关节胶囊流浸膏中总黄酮醇苷的快速检测。

关键词

壮骨关节胶囊, 总黄酮醇苷, 近红外光谱技术, 偏小二乘法, 过程质量控制

Determination of Total Flavonol Glycosides in ZhuangGuGuanJieWan Fluidextract Based on Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics

Xia Li, Dahan Zhang, Xinguo Huang, Yanqin Ouyang, Fasen Zhang, Yong Zhang

China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen Guangdong

Received: Apr. 25th, 2024; accepted: May 23rd, 2024; published: May 30th, 2024

Abstract

Objective: The aim of this study was to establish a method for rapid determination of total flavonol

文章引用: 李霞, 张大翰, 黄信果, 欧阳燕琴, 张发森, 张勇. 基于近红外光谱结合化学计量学的壮骨关节胶囊流浸膏中总黄酮醇苷的检测研究[J]. 药物资讯, 2024, 13(3): 282-288. DOI: 10.12677/pi.2024.133033

glycosides in ZhuangGuGuanJieWan fluidextract by near-infrared spectroscopy. Methods: Near-infrared spectroscopy was used to scan the fluidextract of Zhuanggu joint capsule, and the content of total flavonol glycosides in fluidextract was determined. PLS algorithm was used to establish the spectrum and content model to realize rapid nondestructive testing. **Results:** The 8870.95~7729.29 cm^{-1} band was selected, and the correlation coefficient of the model established by the first-order guide pretreatment method was better, and there was no significant difference between the predicted value and the true value ($P > 0.05$). **Conclusion:** The established model is accurate and suitable for the rapid detection of total flavonol glycosides in ZhuangGuGuanJieWan fluidextract.

Keywords

ZhuangGuGuanJieWan, Total Flavonol Glycosides, Near-Infrared Spectroscopy, Partial Least Squares Method, Process Quality Control

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

壮骨关节胶囊系由壮骨关节丸改制为胶囊剂而成,壮骨关节丸收载于中国药典 2020 年版一部是由淫羊藿、补骨脂、桑寄生、独活、骨碎补、鸡血藤、狗脊、续断、熟地黄等 12 味中药组成的复方制剂[1],具有补益肝肾、养血活血、舒筋活络、理气止痛等功效,用于肝肾不足、血淤气滞、经络痹阻所致的骨性关节炎、腰肌劳损,症见关节肿胀、疼痛、麻木、活动受限等疾病[2] [3] [4]。现代药理学研究证明:淫羊藿主要有效成分淫羊藿苷,能够显著促进人成骨细胞的增殖和分化,能够使 BMP2 mRNA 的表达升高[4];补骨脂主要有效成分补骨脂素和异补骨脂素能提高大鼠成骨细胞内碱性磷酸酶活性,促进成骨细胞的增殖与分化[5] [6] [7];桑寄生、鸡血藤、骨碎补均具有促进骨细胞生长,抗骨质疏松作用;其主要有效成分分别是槲皮素、芒柄花素、柚皮苷[8]。目前,对壮骨关节胶囊的研究大多为临床、药效方面[9] [10] [11] [12],鲜有涉及含量测定[13] [14]。

近红外光谱分析(Near-Infrared Spectroscopy, NIRS)技术作为检测技术中的一朵奇葩,其具有快速、无损、绿色等特点,目前已成功应用于食品、烟和化工等诸多行业产品的分析测定中,可以用于对自动化生产进行监控、调节、反馈生产。2002 年美国 FDA 已把该项技术作为一种标准的检测方法,2005 版《中国药典》已将“近红外分光光度法指导原则”列入附录。近红外光谱技术在制药工业中的应用日趋广泛,从药物的定性、定量分析,到生产过程各个阶段(包括合成、制剂、包装等过程)的监控都体现出近红外光谱的巨大潜力。目前还没有关于近红外应用于壮骨关节胶囊的研究报道。本研究主要采用近红外光谱技术结合化学计量学方法-偏最小二乘(PLS),对壮骨关节胶囊中流浸膏指标成分总黄酮醇苷进行检测分析,并建立定量分析模型,以期提供一种新的快速检测壮骨关节胶囊流浸膏质量的方法,能够快速、准确的监控壮骨关节胶囊流浸膏质量,为壮骨关节胶囊生产提供质量合格的壮骨关节胶囊流浸膏。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

仪器信息见表 1,试剂材料见表 2。

Table 1. Experimental instruments and their manufacturers and models**表 1.** 实验使用仪器及其厂家、型号

设备	型号
高效液相色谱仪	Thermo Vanquish
电子分析天平	METTLER TOLEDO ME204
	METTLER TOLEDO XPR36/A
	METTLER TOLEDO ML204T
超声波清洗仪	KuDos SK8210LHC
近红外光谱仪	Thermo Antaris II

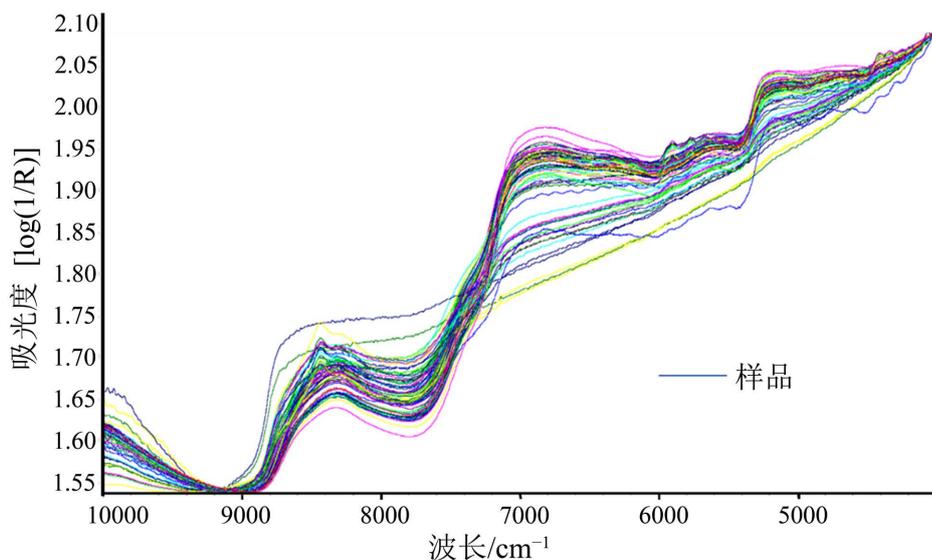
Table 2. Reagents used in the experiment and their manufacturers and batch numbers**表 2.** 实验使用试剂及其厂家、批号

试剂	厂家	批号
甲醇(HPLC)	Fisher chemical	F23NBL201
甲醇(AR)	广州化学试剂厂	20231102-28
乙腈(HPLC)	Fisher chemical	F23N5N203
乙醇(AR)	广东光华科技股份有限公司	20230525
淫羊藿苷	中国食品药品检定研究院	NIFDC110737
朝藿定 C	中国食品药品检定研究院	NIFDC111780

2.2. 近红外漫反射光谱采集

壮骨关节胶囊流浸膏光谱采集预处理：由华润三九股份有限公司技术部负责收集，共取样 65 个。

光谱采集条件：采集壮骨关节胶囊流浸膏样品的漫反射光谱，光谱扫描范围 4000~12000 nm，分辨率 16 cm^{-1} ，每个样本扫描 3 次，取平均光谱如图 1。实验采用内部参比进行光谱采集分析。

**Figure 1.** Raw near-infrared spectrum of ZhuangGuGuanJieWan fluid extract**图 1.** 壮骨关节胶囊流浸膏近红外原始光谱

2.3. 壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷的测定

对照品溶液的制备取朝藿定 C、淫羊藿苷对照品适量，精密称定，加稀乙醇制成每 1 ml 各含 20 μg 的混合溶液，即得。

供试品溶液的制备取本品适量，研细，混匀，取约 0.45 g，精密称定，精密加入稀乙醇 25 ml，称定重量，超声处理 45 分钟，放冷，再称定重量，用稀乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。色谱检测条件见表 3。

Table 3. Chromatographic detection conditions

表 3. 色谱检测条件

色谱柱材料	十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂
流动相	A 乙腈: B 水
波长	270 nm
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
流速	1.0 ml/min
进样体积	10 μl

理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 5000，梯度洗脱见表 4。

Table 4. Gradient elution table

表 4. 梯度洗脱表

时间(分钟)	乙腈(%)	水(%)
0~10	24	76
10~60	24→28	76→72
60~70	28→90	72→10

2.4. 数据处理与模型性能评价

使用赛默飞光谱仪利用漫反射原理，对样品进行扫描，采集光谱。将光谱数据导入 TQ Analyst 分析软件，为保证光谱的有效信息保留，需要将光谱中的噪声、光谱偏移及背景等造成的误差进行处理，一般采用平滑、基线矫正、MSC、导数等预处理方法，进行处理。将预处理后的光谱进行分析，为保证模型的准确性，需要将对应总黄酮醇苷的波段进行筛选，缩短建模时间。

使用偏最小二乘法对建立总黄酮醇苷模型，验证方式选用运用留一交叉验证法，计算预测残差平方选择模型最佳主成分数。对建模数据的训练集和验证集的误差均方根进行考察，越接近则模型预测结果约准确。并通过模型的相关系数判定模型效果，相关系数越接近 1，则模型稳定性越强。在建立模型后，还需对模型的稳定性、准确性及差值显著性进行考察。

3. 结果与讨论

3.1. 壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷含量测定结果

按照 2.3 项下的方法测定 65 个壮骨关节胶囊流浸膏中总黄酮醇苷的含量，总黄酮醇苷含量的范围 0.327~2.281 mg/g 之间。

3.2. 光谱预处理

为保证采集光谱含有建模所用的有效信息,对光谱进行预处理,常见预处理有导数、SNV、MSC等处理方法,通过对比不同预处理方法,壮骨关节胶囊流浸膏光谱采用一阶导数的预处理方法,可以将光谱中的背景噪声进行剔除,并将光谱之间的差异放大,为后续利用含量和光谱的线性关系建模起到重要作用。并通过对比建立模型的误差均方根和相关系数对光谱波段的筛选,比较,最终确定建模区间为 $8870.95\sim 7729.29\text{ cm}^{-1}$,此波段与总黄酮醇苷的对应性最好,结果如表5所示。

Table 5. Parameters of total flavonol glycosides content model

表 5. 总黄酮醇苷含量模型参数

建模方法	PLS-交叉验证-留一法			
指标	SEC	SEP	R^2_V	R^2_C
总黄酮醇苷	0.0746	0.133	0.9884	0.9774

通过比较发现,壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷含量模型通过进行光谱预处理处理后得到的模型有较低的RMSEC值,且相关系数R值更接近1,模型效果见图2。

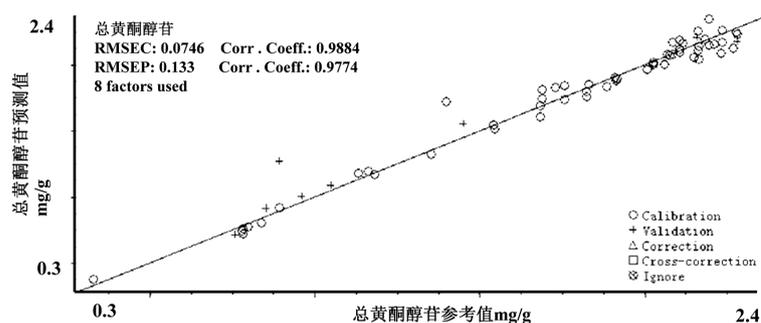


Figure 2. Schematic diagram of the total flavonoid glycoside model of ZhuangGuGuanJieWan fluid extract

图 2. 壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷模型示意图

4. 结论

4.1. 准确性

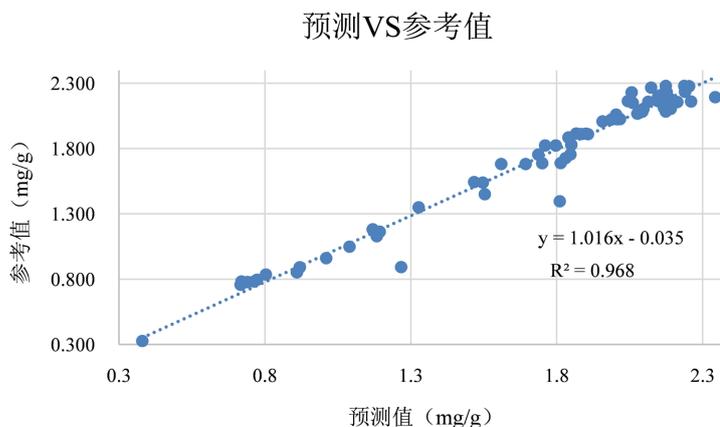


Figure 3. Prediction effect of ZhuangGuGuanJieWan fluid extract

图 3. 壮骨关节胶囊流浸膏预测效果图

从预测结果来看, 预测值与真实值接近, 符合中药分析的精度要求(如图 3)。用 NIR 定量校正模型验证壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷含量的预测效果优良。

4.2. 显著性

Table 6. Paired samples t-test table
表 6. 成对双样本均值的 t-检验表

	变量 1	变量 2
平均	1.728513	1.721351
方差	0.256497	0.273713
观测值	65	65
泊松相关系数	0.984114	
假设平均差	0	
df	64	
t Stat	0.619153	
P (T ≤ t) 单尾	0.269007	
t 单尾临界	1.669013	
P (T ≤ t) 双尾	0.538013	
t 双尾临界	1.99773	

使用 SPSS 分析软件对变量样本进行 t 检验, 结果如表 6 所示, $P > 0.05$, 真实值与预测值之间无显著性差异。

4.3. 差值的正态分布

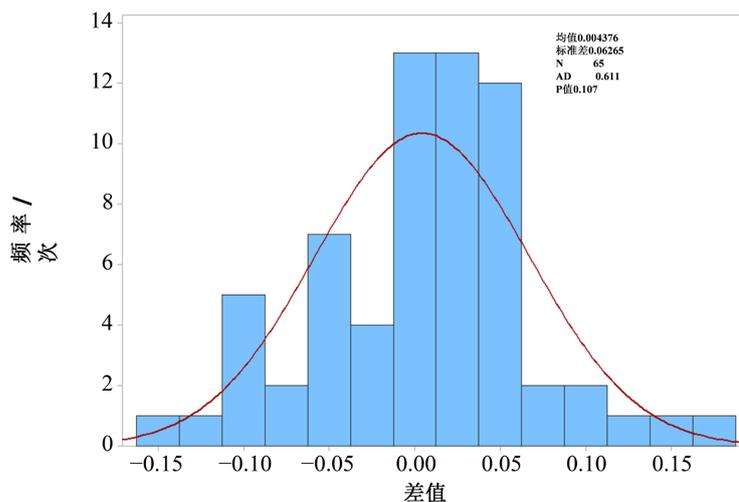


Figure 4. Normal Distribution Test Histogram

图 4. 正态分布检验直方图

为精确反应模型显著性, 计算模型数据残差, $P > 0.05$ (如图 4), 表明差值没有显著性。

从上述三个角度来验证壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷模型, 其结果均符合要求, 可以用于快速检测壮骨关节胶囊流浸膏总黄酮醇苷含量, 实现壮骨关节胶囊流浸膏质量的快速检测。

5. 结论

本研究建立了壮骨关节流浸膏总黄酮醇苷含量的近红外快速分析方法,应用 PLS 建立的壮骨关节流浸膏总黄酮醇苷含量的定量校正模型,模型考察的相关系数结果较好,且误差均方根接近,模型具有较高的稳定性和准确性,满足定量分析的要求。所建立的近红外模型能够在较短的时间内通过采集近红外光谱对壮骨关节流浸膏总黄酮醇苷含量进行测定,相对传统检测方法,该方法成本低、检测准确、快速。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 444.
- [2] 侯永新. 关节镜清理术结合透明质酸钠治疗膝骨关节炎的疗效[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(7): 945-946.
- [3] 沈曙晶, 张帮斌, 骆莉莉, 等. 局部与关节腔内注射治疗膝骨关节炎临床观察[J]. 实用疼痛学杂志, 2013; 9(4): 270-273.
- [4] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕叮, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 289-291.
- [5] 连其深. 蛇床子的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(2): 141-144.
- [6] 王建华, 王艳, 潘永梅. 补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5): 844-846.
- [7] 冯淑华, 李可意, 李灵芝. 6 种中药提取物对胎鼠体外骨生长的影响[J]. 北京联合大学学报, 2009, 23(1): 11-13.
- [8] 马克昌, 高子范, 张灵菊, 等. 骨碎补抗骨质疏松作用的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1993(2): 8-11.
- [9] 马锋, 马敬祖, 巩凡, 等. 壮骨关节流浸膏对 SD 大鼠骨性关节炎并骨质疏松症骨密度和雌激素受体表达的影响[J]. 中国临床研究, 2017, 30(3): 391-394.
- [10] 宋蕾, 袁晓美, 毕亚男, 等. 壮骨关节丸对去势所致雌性小鼠骨质疏松的治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2): 307-310.
- [11] 王来福, 侯芳丽. 壮骨关节流浸膏治疗膝关节炎 98 例疗效观察[J]. 北方药学, 2019, 16(1): 125-126.
- [12] 荆生龙, 徐彭, 赵宏艳, 等. 壮骨关节丸对肾虚型骨性关节炎大鼠脏器系数及总胆红素的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(10): 1087-1089, 1097.
- [13] 郭巧技, 王淑红. HPLC 法测定壮骨关节流浸膏中补骨脂素、异补骨脂素的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(10): 1471-1472.
- [14] 孙秀川. HPLC 测定壮骨关节丸中柚皮苷的含量[J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(4): 463-464.