**河南中医学院２０１3 届硕士研究生学位论文**

**HPLC 指纹图谱与 NIR 光谱技术在杞菊地黄丸质量分析中的应用研究**

|  |  |
| --- | --- |
| **研 究 生 姓 名 ：** | 刘建营 |
| **导** **师：** | 白 雁 教 授 |
| **指 导 组 成 员 ：** | 雷敬卫 副教授 |
|  | 谢彩侠 副教授 |
| **学 科 、 专 业 ：** | 药物分析学 |
| **所 属 院 、 部 ：** | 药学院 |

**中国﹒郑州**

**２０１3 年 5 月 02 日**

**硕士学位论文原创性声明**

本人所呈交的硕士学位论文，是在导师白雁教授的指导下，独立进行科学研究工作所取得的成果。除文中已特别加以注明引用的内容外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

特此声明。

论文作者（签名）：

年 月 日

**硕士学位论文使用授权声明**

本人已完全了解河南中医学院有关保留、使用硕士学位论文的相关规定，同意学校保留或向国家有关部门、机构送交本学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权河南中医学院可以将本论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编本论文（注：保密论文在解密后适用本授权声明）。

特此声明。

论文作者（签名）： 导师（签名）：

年 月 日 年 月 日

目 录

[中文摘要](#_Toc686707325) 4

**[Abstract](#_Toc686707326)** 4

[前](#_Toc686707327)[言](#_Toc686707327) 5

**[1](#_Toc686707328)** [现代中药分析简介](#_Toc686707328) 5

**[2](#_Toc686707329)** [中药高效液相指纹图谱技术简介](#_Toc686707329) 5

[2.1 高效液相指纹图谱技术简介](#_Toc686707330) 5

[2.2 HPLC指纹图谱的研究方法和技术要求](#_Toc686707331)[[5]](#_Toc686707331) 5

[2.3 HPLC指纹图谱涉及的研究内容](#_Toc686707332)[[6]](#_Toc686707332) 5

**[3](#_Toc686707333)** [近红外光谱技术](#_Toc686707333) 6

[3.1 近红外简介](#_Toc686707334) 6

[3.2 原理](#_Toc686707335) 6

[3.3 应用基础](#_Toc686707336) 6

[3.4 近红外分析流程](#_Toc686707337) 6

[3.5 定量分析模型的建立](#_Toc686707338) 7

[3.6 定性分析模型的建立](#_Toc686707339) 8

[3.7 分析模型的评价和优化](#_Toc686707340) 8

[3.8 模型的推广应用](#_Toc686707341) 8

[4 杞菊地黄丸（浓缩丸）简介](#_Toc686707342)[[32]](#_Toc686707342) 8

**[5](#_Toc686707343)** [本课题研究内容、预期目标](#_Toc686707343) 9

[5.1 研究内容](#_Toc686707344) 9

[5.2 预期目标](#_Toc686707345) 9

**[6](#_Toc686707346)** [本项实验研究的意义](#_Toc686707346) 9

[第一部分 杞菊地黄丸的](#_Toc686707347)**[HPLC](#_Toc686707347)**[指纹图谱研究](#_Toc686707347) 9

**[1](#_Toc686707348)** [杞菊地黄丸指纹图谱方法学考察](#_Toc686707348) 9

[1.1 仪器、试剂与实验样品](#_Toc686707349) 9

[1.2 实验方法](#_Toc686707350) 12

**[2](#_Toc686707351)** [杞菊地黄丸样品](#_Toc686707351)**[HPLC](#_Toc686707351)**[指纹图谱建立](#_Toc686707351) 40

[2.1 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的建立](#_Toc686707352) 40

[2.2 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸指纹图谱的建立](#_Toc686707353) 49

[2.3 北京同仁堂产杞菊地黄丸指纹图谱的建立](#_Toc686707354) 57

[2.4 不同生产厂家产杞菊地黄丸指纹图谱的建立](#_Toc686707355) 66

**[3](#_Toc686707356)** [讨论与小结](#_Toc686707356) 67

[3.1 讨论](#_Toc686707357) 67

[3.2 小结](#_Toc686707358) 67

[第二部分 近红外光谱技术在河南宛西产杞菊地黄丸定量分 析中的应用](#_Toc686707359) 68

**[1](#_Toc686707360)** [材料与方法](#_Toc686707360) 68

[1.1 仪器、试剂与实验样品](#_Toc686707361) 68

[1.2 NIR图谱的采集](#_Toc686707362) 74

**[2](#_Toc686707363)** [杞菊地黄丸中指标性成分的含量测定](#_Toc686707363)**[[33]](#_Toc686707363)** 74

[2.1 杞菊地黄丸（浓缩丸）中水分的含量测定](#_Toc686707364) 74

[2.2 杞菊地黄丸中丹皮酚含量HPLC分析](#_Toc686707365) 80

[2.3 杞菊地黄丸中马钱苷的含量测定](#_Toc686707366) 89

**[3](#_Toc686707367)** [杞菊地黄丸中各指标性成分近红外模型的建立](#_Toc686707367) 98

[3.1 杞菊地黄丸水分模型的建立](#_Toc686707368) 98

[3.2 杞菊地黄丸丹皮酚模型的建立](#_Toc686707369) 101

[3.3 杞菊地黄丸马钱苷模型的建立](#_Toc686707370) 103

**[4](#_Toc686707371)** [讨论与小结](#_Toc686707371) 106

[4.1 讨论](#_Toc686707372) 106

[4.2 小结](#_Toc686707373) 106

[第三部分 近红外光谱技术在不同厂家杞菊地黄丸定量及定 性分析中的应用](#_Toc686707374) 106

**[1](#_Toc686707375)** [材料与方法](#_Toc686707375) 106

[1.1 仪器、试剂同第二部分1.1.](#_Toc686707376) 106

[1.2 NIR图谱的采集](#_Toc686707377) 115

**[2](#_Toc686707378)** [不同生产厂家杞菊地黄丸中指标性成分的含量测定](#_Toc686707378) 115

[2.1 水分的含量测定](#_Toc686707379) 115

[2.2 杞菊地黄丸中丹皮酚含量HPLC分析方法同本文第二部分2.2，结果如下表所示。](#_Toc686707380) 121

[2.3 杞菊地黄丸中马钱苷的含量测定](#_Toc686707381) 126

**[3](#_Toc686707382)** [不同生产厂家杞菊地黄丸中各指标性成分近红外模型的建立](#_Toc686707382) 131

[3.1 不同生产厂家杞菊地黄丸水分模型的建立](#_Toc686707383) 131

[3.2 杞菊地黄丸丹皮酚模型的建立](#_Toc686707384) 132

[3.3 杞菊地黄丸马钱苷模型的建立](#_Toc686707385) 132

**[4](#_Toc686707386)** [不同生产厂家近红外定性分析模型的建立](#_Toc686707386) 132

[4.1 不同厂家杞菊地黄丸近红外判别分析模型的建立](#_Toc686707387) 132

[4.2 不同厂家杞菊地黄丸近红外聚类分析模型的建立](#_Toc686707388) 135

**[5](#_Toc686707389)** [讨论与小结](#_Toc686707389) 139

[5.1 讨论](#_Toc686707390) 139

[5.2 小结](#_Toc686707391) 139

[总结与展望](#_Toc686707392) 139

[总结与展望](#_Toc686707393) 139

**[1](#_Toc686707394)** [总结](#_Toc686707394) 139

**[2](#_Toc686707395)** [展望](#_Toc686707395) 139

[参考文献](#_Toc686707396) 140

[附](#_Toc686707397)[录](#_Toc686707397) 141

[附录](#_Toc686707398)**[1](#_Toc686707398)** [文献综述](#_Toc686707398) 141

[参考文献](#_Toc686707399) 142

# 中文摘要

本论文将HPLC指纹图谱技术与NIR光谱技术联用，从整体性角度对杞菊地黄丸（浓缩丸）进行质量分析。主要内容为以下三个部分：

1、在HPLC指纹图谱研究中，通过对样品不同提取方法、不同提取溶剂、不同色谱条件等的考察，最终确定了杞菊地黄丸HPLC指纹图谱分析方法，并对不同生产厂家的样品进行分析。实验结果表明，该方法专属性强，可以作为杞菊地黄丸质量评价手段。

2、建立一种能快速测定河南宛西产杞菊地黄丸中水分、丹皮酚、马钱苷三种指标性成分含量的分析方法。采用2010版《中国药典》法分别测定96份杞菊地黄丸样本中水分、丹皮酚、马钱苷的含量，同时扫描其近红外光谱图，以偏最小二乘法建立近红外光谱与其含量之间的定量分析模型。结果表明，水分、丹皮酚、马钱苷模型的内部交叉验证决定系数分别（R2）分别为0.98809、0.98089和0.99764，校正均方差（RMSEC）分别为0.0587、0.057和0.0416，内部交叉验证均方差（RMSECV）分别为0.26405、0.19403和0.0934；经外部验证，预测相关系数（r）分别为0.9969、0.9976和0.97348，预测均方差(RMSEP)分别为0.0752、0.0617和0.08491。经统计学检验，未知样品的预测结果与真实值之间的差异无统计学意义，表明所建分析模型性能较好，可以用于对未知样品的分析。

3、研究NIR光谱技术在不同厂家杞菊地黄丸快速定量分析和定性鉴别分析中的应用。将收集到的三个不同生产厂家的杞菊地黄丸样品共100 批，采集样

品的近红外光谱数据；采用2010版《中国药典》规定的方法测定指标性成分含量；结合化学计量学方法建立水分、丹皮酚和马钱苷近红外定量分析模型。经统计学检验，模型对未知样品的预测结果与HPLC测定结果之间的差异无统计学意义。另外，实验对三个不同厂家的30批杞菊地黄丸样品建立了近红外定性分析模型，所建判别分析模型可以准确区分三厂家的样品，对校正集样品的分类鉴别准确率和验证集样品的预测鉴别准确率均为100%；所建聚类分析模型将

30批样品清晰地聚为三类，界限明显，归属确切，验证了判别分析模型的准确性。结果表明，NIR光谱技术可用于杞菊地黄丸指标性成分的快速定量分析和不同厂家定性鉴别分析。

本文将HPLC指纹图谱技术与NIR光谱技术应用于杞菊地黄丸，利用这两种技术各自的优点，从整体角度对其进行质量分析，为杞菊地黄丸整体质量的快速评价和真伪鉴别提供了一种新方法，同时也为杞菊地黄丸及其它中药制剂

生产过程中的在线检测和质量控制提供了参考和应用基础。

关键词：杞菊地黄丸； HPLC 指纹图谱技术； NIR 光谱技术；整体性；定量分析； 定性分析

**Quality evaluation and control of Qiju Dihuang Pills by HPLC Fingerprint** and NIR Spectroscopy

*Liu Jianying(Science of Pharmaceutical Analysis)*

Directed by *Professor Bai Yan*

**Abstract**

In this paper, the quality of Qijudihuang Pills was analyzed from holistic ideology by HPLC fingerprinting and NIR spectroscopy. Considering the content, this paper is mainly talking about the following thr ee parts:

1. By investigating samples of different extraction methods, solvents, chromatographic conditions and so on, the HPLC fingerprint analysis method was established, and the samples from three different manufacturers were analyzed by

This method. The experimental results showed that, this method wasspecific, could be used as a means of identification of Qiju Dihuang Pills.

2. In this part, a new method that can directly determine three components of Qiju Dihuang Pills(samples from Wanxi Henan) by Near-infrared spectroscopy

Combined with chemometrics methods was created. First, the method indexed by the 2010 edition of" Chinese Pharmacopoeia" were used to determine the contents of Moisture, Paeonol and Loganin from 96 samples of Qiju Dihuang Pills. Meanwhile ，

NIR diffuse reflectance spectra of 96 samples were collected. Then, Partial Least-Squares (PLS) method was used to create a quantitative model of calibration. Research findings showed that the correlation coefficients of the PLS calibration

Models of NIR spectroscopy for Moisture, Paeonol and Loganin were 0.98809 、

0.9089 and 0.99764, the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) was

0.0587、0.057 and 0.0416; the correlation between the reference value of the testing sample set and the near infrared predictive value were0.9969、0.9976 and 0.97348;

The root-mean-square error of prediction(RMSEP) was 0.0752、0.0617 and 0.08491. Statistical test was used to analysis the dates and the results showed that there was no significant difference between NIR prediction values and the values determinated by standard methods. It is indicated that the analysis model has good performa nce, can be used for the analysis of unknown samples.

3. In this part, we studied the application of NIR spectroscopy in the rapid

Quantitative analysis of Qiju Dihuang Pills and qualitative identification of different

Manufacturers. A total of 100 batches of samples, which were produced by three different manufacturers, were collected. Collecting NIR spectra by NIR Diffuse Reflectance Spectroscopy with the index components content determined by 2010

Edition of" Chinese pharmacopoeia" method as a reference of the partial least square

（PLS） calibration models of Moisture, Paeonol and Loganin were built. Statistical test was used to analysis the dates and the results showed that there was no significant difference between NIR prediction values and the values determinated by

Standard methods. Moreover, the NIR qualitative analysis model of 30 batches of

Qiju Dihuang pills from three different manufacturers was established. For the discriminant analysis model, the classification precision of calibration set and the forecasting precision of validation set were all 100%; for clustering analysis model,30 samples were clearly and correctly gather into three categories, and it verified the accuracy of the discriminant analysis model. The result showed that the near infrared spectroscopy technology could be used in the quick quantification analysis and manufacturers identify qualitative analysis of Qiju Dihuang pills .

In this study, a new method for Qiju Dihuang pills fast quality evaluation and

Identification was established from the overall perspective by taking advantages of the HPLC fingerprint technology and the NIR spectrum technology. At the same time, it provided reference and application foundation for on -line detection and quality control of Qiju Dihuang pills and other Chinese medicine production.

**Key words:** Qiju; Dihuang; Pills; HPLC; Fingerprint; NIR; Spectroscopy; Holistic; Ideology; Quantitative analysis; qualitative; Analysis

前 **言**

## **1** 现代中药分析简介

当今，传统医学的治疗理念正逐渐为世界所接受，传统医药也受到国际社会越来越多的关注，世界范围内对中医药的需求日益增长，这为中医药的发展提供了广阔的空间。英国著名学者马丁・雅克在其新作《当中国统治世界》中说，“中国已经有两个领域在全球享有巨大影响力：饮食和传统中医。中餐和中医都是悠久历史的产物，世界大部分地区是通过这两种文化遗产的精髓了解中国的。中医的全球影响力似乎有可能持续扩大。”中医药经过改革开放30多年的发展，已经在国际上形成了集医疗、保健、教育、科研、生产和贸易为一体的完整的产业链；中医药文化的价值观和理念反映了当前我国的社会和经济发展及外交等多方面的战略需求和价值取向；广大中医师以中医药为载体传播中医药文化，传播中华民族的认知方式、价值取向和审美情趣。因此，发展中医药现代化具有非常重要的理论和现实意义。

然而，传统中医药在国内的发展却相当的坎坷。从中药市场的混乱状况，到中医药的存废之争，都显示出了中医的尴尬处境。究其原因，笔者以为无非有两点：一是相对于西医药，中医药有其自身的复杂性；二是中医药缺乏适合自身的标准。

中药及其制剂均为多组分复杂体系，因此评价其质量应采用与之相适应的，能提供丰富鉴别信息的检测方法，但现行的显微鉴别、理化鉴别和含量测定等方法都不足以解决这一问题。中药的复杂性使其对检测手段提出了很高的要求。具有准确行、普适性、全面性和稳定性的检测器才能制定出适合中药自身情况的质量标准。现行的中药质量控制模式基本上是建立以测定中药某一有效成分为目标，分析方法既有定性又可定量的质量标准。这种模式的质量标准在中药材及中成药生产、研究和市场商品的监督管理、优化生产工艺、控制药品质量、评价商品真伪、整顿中药市场等方面，至今起着不可替代的重要作用。但是，这对于中医“整体”理论指导下的中药，不能全面衡量中药及制剂的质量、疗效和稳定性。要控制中药的功效，不应该局限于只针对某几种化学成分，还必须对方剂的物质群整体予以控制[1]。

## **2** 中药高效液相指纹图谱技术简介

### 2.1 高效液相指纹图谱技术简介

HPLC指纹图谱技术是以高效液相色谱法为基础而建立起来的一种综合的、整体的鉴定手段。“模糊性”和“整体性”为其显著特点[2]。高效液相色谱法（HPLC）

以其在药品的质量控制、中药的成分研究等方面所特有的分离效率高、灵敏度高、分析速度快、稳定性和重现性好、流动相选择性广、检测器种类多、色谱柱可反复使用等优势，非常适合构建中药指纹图谱。

近年来，高效液相指纹图谱技术在中药的而品质评价、资源开发及药效学成分寻找等方面得到了越来广泛的应用，已成为中药品种鉴定和质量评价的重要手段之一[3-4]。2010版《中国药典》编写大纲中明确指出，积极推进自主创新，根据中医学理论和重要成分复杂的特点，建立能反应中药整体特性的色谱指纹图谱方法，以保证质量的稳定、均一。

### 2.2 HPLC指纹图谱的研究方法和技术要求[5]

#### 2.1.1 样品的收集

样品的收集是研究指纹图谱最初也是最关键的步骤。由于不可能对一个药材的所有样本进行试验，所以收集的样品要有足够的代表性。考虑到生物样品的个体差异，只有在相当数量的样品中，才能清楚地显现出它的特性，所以要收集10批次以上的样品。

#### 2.2.2 供试品的制备

供试品制备过程中的每一步骤均应规范化操作，所有批次供试品制备过程中都必须保持一致，以保证样品分析具有良好的精密度、正确性、重现性以及样品间的可比性。

#### 2.2.3 参照物的制备

制定指纹图谱应设立参照物或参照峰，应根据供试品中所含成分的性质，选择适宜的对照品作为参照物。如果没有适宜的对照品，可选择适宜的内标物作为参照物。参照物的制备应根据检测方法的需要选择适宜的方法进行。

#### 2.2.4 色谱条件的优选

高效液相色谱法之所以适用范围很广，主要是因为可根据检测对象选择适宜的色谱条件。色谱条件主要包括色谱柱、流动相、检测器等的优化选择。要建立最佳色谱条件，使中药的内在特性都显现出来，位药材的指纹图谱评价及其品质鉴定提供足够的信息。

#### 2.2.5 样品测试及方法学考察

中药材样品按优化的提取分离方法制备供试品，在最佳的色谱分离分析条件下进样测试。对于所含成分类型相同或相似的中药材，可以制定一张指纹图谱；对于所含成分类型复杂的中药材，一张指纹图谱不能反映该中药材的固有特性，应根据成分类型，采用多种测定条件，制作多张指纹图谱。通过大量比较实验，获取足以代表中药材特征的指纹图谱，以满足指纹图谱的专属性、重现性、稳定性和普适性的要求。为了验证测试结果的可靠性，供试品稳定性、

仪器精密度、实验方法重现性必须经过严格的方法学考察。

#### 2.2.6 指纹图谱的建立

根据足够样品数（10批次以上）测试结果所给出的峰数、峰值（积分值）和峰位（保留时间）等参数，确定共有指纹峰（相对保留时间、峰面积比值），选取特征指纹峰群（色谱峰组合），制定指纹图谱。采用阿拉伯数字标示共有峰，用“S”标示参照物峰。实验中，应记录2h的色谱峰，以考察1h以后的色谱峰情况。

中药材指纹图谱必须具有充分的代表性和专属性，要对不同产地、不同等级规格或不同采收季节等的代表性的样品进行分析比较，从中归纳出中药材共有的、峰面积相对稳定的色谱峰作为特征指纹峰。所选择特征指纹峰群必须具备专属性。对于多来源的中药材，必须考察品种间的特异性。

#### 2.2.7 指纹图谱的分析与评价

根据指纹图谱所获取的信息，建立指纹图谱分析比较的重要参数（共有峰、重叠率、N强峰、特征指纹等）；计算特征指纹的相似率与差异率，进行指纹图谱的评价；应用计算机技术（主成分分析、聚类分析、人工神经网络或相似度分析等）解析、识别图谱信息以及图谱相似度评价，以建立可行、实用的HPLC指纹图谱量化评价标准。

### 2.3 HPLC指纹图谱涉及的研究内容[6]

#### 2.3.1 建立单味中药材的高效液相指纹图谱

单位药材是中药的组成基础，对单味中药材的高效液相指纹图谱的研究，不仅在基础理论上为药材质量的评价做了大量而有效的工作，而且也为指纹图谱理论在应用领域中的开展提供了简便易行的方法。

#### 2.3.2 应用于相似药材的鉴别及质量评

许多同科或同属的药材，由于相似的功效，在临床上有时混用，或在药材流通中渗伪。与此同时，某些资源匮乏、稀有的名贵药材，也存在急需寻找替代品的问题，而上述问题的解决都需要通过有力的质量控制和评价方法来解决，

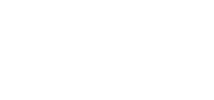
HPLC就是其中一种方法。

#### 2.3.3 药材中主要化学成分的指纹图谱研

对于部分应用时间长、疗效肯定、成分明确的药材，通过研究其主要化学成分的HPLC指纹图谱，从方法学的角度讲，能够使研究的方向更加明确，结果比较确定，能对药材质量做出更好的评价。

#### 2.3.4 中药制剂的HPLC指纹图谱研

中药制剂是中药产业发展的一个重要部分，质量控制是影响其全面发展和国际化的一个瓶颈。2002 年国家食品药品监督管理局要求对中药注射剂进行指

纹图谱研究，而其他剂型的指纹图谱也相继有人开展了研究。随着HPLC及HPLC-MS技术的逐步发展和完善，它们必将在中药及其制剂生产的质量监控等方面起到重要的作用，从而加快中药产业现代化的步伐 

## **3** 近红外光谱技术

### 3.1 近红外简介

近红外光谱（Near Infrared, NIR）区域按美国材料检测协会（American Society for Testing Materials, ASTM）定义是指波长在780～2526nm范围内的电磁波，是人们最早发现的非可见光区域[7]。由于近红外光谱区主要是由含氢基团的谱带重叠严重的倍频和合频吸收峰组成，吸收度较弱，光谱的信噪比低，并且在测定光谱过程中，不可避免地引入各种各样的噪声，同时其信息量丰富，数据量庞大，都使得NIR光谱的谱图解析、信息提取及依靠传统工作曲线方法进行定量分析变得异常的困难，这也是长期以来限制NIR技术的主要原因。

直到上世纪80年，随着光谱仪器技术的发展，更重要的是计算机硬件及在化学计量学发展基础上的软件技术的发展，近红外光谱才被人们重新重视并得到较多应用，被认为是NIRS技术的复兴[8]。除因多元分析等数据处理手段和计算机软件技术的发展可在相当程度上解决NIRS谱带宽、重叠大等问题以外，还因NIRS吸光度低所致的分析试样无须处理的优点，以及NIRS光透射度大、散射强、对试样无损伤，可同时进行多种组分的分析。它能在几分钟内，仅通过对被测样品完成一次近红外光谱的采集测量，即可完成其多项性能指标的测定（最多可达十余项指标）。光谱测量时不需要对分析样品进行前处理，分析过程中不消耗其它材料或破坏样品，不污染环境，真正实现“绿色”检验，节约检测成本[9]。因此，近红外光谱技术很适合用于整体质量控制的在线分析。

### 3.2 原理

近红外光谱是由于分子振动能级的跃迁（同时伴随转动能级跃迁）而产生的。近红外分析技术是依据被检测样品中某一化学成分对近红外光谱区的吸收特性而进行检测的一种方法，记录的是分子中单个化学键的基频振动的倍频和合频信息，该光谱是在700～2526 nm范围内分子的吸收辐射。在NIRS测量中显示的是综合波带与谐波带，是R-H分子团(R是O、C、N和S)产生的吸收频率谐波[10-12]，并常常受含氢基团X-H(C-H、N-H、O-H)的倍频和合频的重叠主导，精确近红外谱带的归属很困难，因为每个近红外谱带可能是若干个不同基频的倍频和合频谱带的组合，没有锐峰和基线分离的谱峰，大量是重叠谱峰和肩峰，从直观上根本难以对其进行分析。

### 3.3 应用基础

近红外光谱分析技术方法由三个要素组成。第一是准确、稳定地测定样品

的吸收或漫反射光谱图谱的硬件技术（即光谱仪），这一硬件技术的主要要求是必须保持长时间的稳定性，以取得样品真实的光谱数据。第二是化学计量学软件，用于光谱预处理，建立分析模型，研究模型的转移等。对这一技术的要求是能降低所得光谱的噪声，并从光谱中尽可能多的提取有用的信息，建立准确的模型，并能使模型在不同仪器中使用。第三是针对分析任务建立的校正模型，要求模型稳定、实用，并能在一定范围内推广应用[13]。

### 3.4 近红外分析流程

#### 3.4.1 收集具有代表性的样品

近红外光谱分析技术作为一种“绿色”分析技术，具有快速、高效、非破坏性等优点，样品在近红外光谱区中信息量丰富，可以实现多组分同时分析和在线分析[14]。但是，由于近红外光谱分析是从复杂的光谱背景中提取有用的光谱信息，所以，测定样品的光谱易受测量条件、样品状态以及样品水分等多种因素的影响，给分析结果带来一定的误差。因此，为了建立一个具有准确性、代表性、可靠性以及覆盖范围广的近红外校正模型，样品的选择是非常重要的一个环节。一般来说，近红外光谱分析对样品有如下要求：

（1）样品必须具有代表性，能够代表某一类分析对象的化学特征，尽量包含使用模型分析的未知样品中所有化学成分。

（2）样品中待分析组分的浓度变化范围应大于未知样品中该组分的浓度变化范围，且浓度范围在整个变化范围内是均匀分布的。

（3）待测样品的物理性质，如样品的温度、湿度、澄明度、色泽、松紧程度等应尽量保证一致，以减少其对光谱产生的差异。

（4）样品必须具有一定的数量已达到统计意义，以此确定光谱变量与样品性质之间的数学关系。

#### 3.4.2 样品光学数据的采集[15]

不同于中红外等分析测定技术，近红外对样品前处理要求不高，一般可直接对样品进行近红外光谱测量。近红外光谱的测试方法主要分为透射和反射两种类型。依据不同的测量对象，又可细分为透（反）射、漫反射、漫透（反）射等采集方式。

##### 3.4.2.1 透射和透反射法采集

对于均匀透明的液体，如汽油、白酒等样品，透射式最理想的测量方式。最常用的透射测量附件是石英材料制成的比色皿，用于装载比色皿的池架通常为标准件，依据不同的测量对象和使用的波段，可选用不同光程和结构的比色皿。

透反射与透射的测量原理相同，只是在比色皿后放置一组反射镜，使透过

比色皿的光又折回重新通过样品，其与透射相比光程增加一倍。

需要注意的是，不论是何种测量方式，由于液体样品的光谱对温度较为敏感，尤其在短波近红外区域，为得到稳定可靠的光谱，往往对比色皿进行恒温控制。恒温温度和精度依据测量对象而定，一般用户可以根据实际情况自行设定，通常恒定在常温，如25℃，恒温精度一般为0.1℃；较低的恒定温度，可以减少样品挥发成分的损失，以及抑制样品的降解等，但过低的温度会是空气中的水分凝结到比色皿上，影响光谱的测量准确性。

近几年来，为了生产自动化的需要，浸入透（反）射式光纤探头成了另一种常用的透射测样附件，其原理是，入射光纤传输的光经透镜耦合准直后变成平行光，照射到棱镜上，经棱镜改变光的传输方向后，进入待测样品，携带样品信息的光再透过透镜耦合进入出射光纤中。光纤探头进行样品测量时较为方便，只需将探头完全浸入液体即可，但使用时，应注意不要过度弯曲光纤，以防折断。最好使用光纤支架来固定光纤探头，这样可以在避免折断光纤的同时，还可满足在测量不同样品时，光纤的弯曲程度尽量保持一致。

##### 3.4.2.2 漫反射采集

对于固体颗粒、粉末、纸张和织物等样品，漫反射是最常见的近红外光谱测量方式。在漫反射过程中，分析光与样品表面或内部作用，光传播方向不断变化，最终携带样品信息有反射出样品表面，由检测器进行检测。

以漫反射原理进行光谱数据采集的测样附件中，有两种最常用。一是积分球。积分球采集特别适用于固体和小颗粒状样品。从固体或者粉末样品表面漫反射回来的光的方向是向四面八方的，积分球的作用就是收集这些反射光已被检测器检测。积分球的反射光收集率效率更高，得到的光谱信噪比高、重复性也较好。而且，检测器放置在积分球的出口，不易受到入射光束波动的影响。另一种是光纤漫反射探头。光纤漫反射探头可以用来测量各种类型的固体样品，如塑料、水果、药片和谷物等。为有效收集样品漫反射的光，漫反射探头多采用光纤束，其中一部分用来传输来自光源或单色器的光（光源光纤），使之照射到待测样品上，另一部分光纤则用来收集样品的漫反射光（检测光纤），并传输回光谱仪。但是要注意的是，由于采用光纤束，光能量衰减严重，传输距离不宜超过50m。

##### 3.4.2.3 漫透射和漫透反射采集

对于浆状、黏稠状和含有悬浮物颗粒的液体，如牛奶、涂料以及油漆等，多采用漫透射或者漫透反射方式进行测量。当一束平行光照射到上述液体时，与均匀透明的液体相比，除了吸收外，还将对光产生散射作用，因此对这些样品进行透射分析时称为漫透射。它的测试形式与透射相同，只是光与样品的作

用形式不同。利用上述透射附件如比色皿和透射式光纤探头可以对这类液体进行测量。

通过以上介绍可以看出，对同一类样品可以采用多种方式和附件进行近红外光谱分析。在选择具体测量附件时，要拥有这样的观点，即用最可重复的样品测量方式采集光谱。此外，还需考虑测量的方便性、光谱的信噪比和光谱包含的样品信息量等问题。在选择测量方式时，另一种观点也非常重要，即在相同的仪器条件下，透射光谱通常要比反射光谱包含更强的样品化学组成的信息。因此透射方式更有利于对组成或与组成密切相关的性质进行分析。

#### 3.4.3 样品组成或性质的测定

近红外光谱分析技术是二次分析技术[16]，其模型预测结果的准确性取决于标准方法测定结果的准确性，因此为建立高质量的校正模型，在测定样品的组成和性质时，应选用标准方法，使测定结果的误差降至最小。可以通过反复测定取平均值的方法提高参比数据的精密度。

#### 3.4.4 采用定量或定性校正方法建立数学模型

##### 3.4.4.1 校正集与验证集的选择

建立样品的近红外分析模型时，校正集与验证应能充分代表样品整体的信息，组成应包含以后未知样品所包含的所有化学组成，浓度变化范围大于使用模型进行分析的未知样品的浓度变化范围[17]，且组分浓度在整个变化范围内是均匀分布的。

##### 3.4.4.2 光谱预处理方法的选择

由于样品在NIR区域的吸收主要为分子振动的倍频和合频振动吸收，吸收强度低、谱带复杂、重叠严重，无法使用经典定性、定量方法，因此在分析之前必须对光谱数据进行预处理，一方面可以消除样品背景干扰、随机噪声、基线飘移、光散射以及器件引起光谱差异等因素对校正结果产生的影响，为校正模型的建立奠定良好基础；另一方面通过光谱预处理中的相关图或光谱方差分析等功能，筛选用于建立分析模型的合适波数范围，提高模型运算效率和预测精度[18]。现对本文中使用的预处理方法原理做简单介绍。

（1）平滑处理

光谱的平滑处理是消除噪声的常用方法，也被称为数字滤波器。其基本思路是在平滑点的前后各取若干点来进行“平均”或“拟合”，以求得平滑点的最佳估计值，消除随机噪声。常用的平滑方法主要有：移动窗口(Moving Window)平滑法、中位值平滑法、Savitsky-Golay平滑法和Norris平滑法等。

（2）导数光谱

将原始光谱数据微分（逐点相减）即可得到，主要可以消除基线漂移，提

供比原始光谱更具特征的光谱信息。微分处理是净化谱图信息最常用的处理方法，可根据需要进行一阶或二阶微分处理。其结果不依赖于所选择的的光谱范围，但依赖于窗口的大小（即选择的点数），同时增大了噪声，需要作平滑处理。

（3）归一化处理

*A*(*k* )

先计算平均强度y（只有被选定谱区范围参与计算）*am*  *k*

*N*

；然后从

光谱中减去这个值，这使得光谱集中在y＝0附近

*a*'(*k*)*a*(*k*)*am*

；将y值平

方和开根号后除以谱图

*A*' ' (*k*) 

*A*' (*k* )

 (*a*' (*k* ))2



；计算y值的平方和，结果谱图的

*k*

y值矢量和是1（在被选定的谱区范围）

*k*

（*A*''(*k*))2 1 .

矢量归一化能降低同一样品若干次测量之间的误差，用于消除光程的变化

或样品的稀释等变化对光谱产生的影响。它能保持光谱的特征，比较容易解释光谱，但结果依赖于所选的谱区范围。

（4）多元散射校正

多元散射校正可以去除近红外漫反射光谱中样品的镜面反射以及不均匀性造成的噪声，同时可以消除漫反射光谱的基线及光谱的不重复性。

（5）标准正则变换

与MSC 相似，SNV 校正也可用来校正样品间因散射而引起的光谱的误差

[19]。

除上述比较常见的光谱预处理方法外，又有一些新的光谱预处理方法得到了发展和应用，如小波变换[20-21]、平均样品残余光谱修正、正交信号校正和褶合变换等。其中小波变换是近年来新出现并不断获得应用推广的一种高效信号处理方法。该方法可把各种频率组成的混合信号按不同分辨尺度分解成一系列不同频率的块信号。根据这一特点，依先验知识可对特殊频率范围的噪声或背景进行滤波处理，如高频随机噪声的滤波，可设定一个阀值，对高频部分的信号进行重构，即可滤掉随机噪声，同样，也可以对白噪声或慢漂移进行扣除。如果需要，加以特殊“修饰”，甚至可对倍频等其它千扰进行平滑处理，小波变换滤波适应面广的特点是其它方法所不能比拟的[22]。

### 3.5 定量分析模型的建立

定量校正也称多元校正，即在样品浓度（或其它物化性质）与分析仪器响应值之间建立定量关系，是化学计量学的一个主要分支。由于近红外光谱的复杂性和分析对象的多元性，决定NIR分析技术必须使用多元信息处理技术。

近红外定量分析的常用方法有如下三种：主成分回归、多元线性回归、偏最小二乘法。

（1）主成分回归

主成分分析在化学计量学中的地位举足轻重，包括主成分分析(PCA)和主成

分回归(PCR)两步。

在进行主成分分析时，先求出样品集光谱矩阵的主成分矩阵，再建立样品成分含量矩阵与主成分矩阵的线形关系，用所建立的线形函数来预测未知样品

（其中的最佳主成分矩阵的维数采用内部交叉检验来得出）。

PCA中，光谱数据是由主成分光谱和得分组成的，可以使用全谱数据，保留了平均效应；但浓度C没有起作用，因此单独使用PCA不能分析待测组分含量，需要再进行主成分回归。在PCR中，完成浓度矩阵C对得分矩阵T的回归。

主成分回归充分利用了光谱数据的信息，增加了模型抗干扰的能力；解决了共线性问题；适合于复杂分析体系，无需知道干扰组分的存在就可以预测被测组分。但主成分回归在分解光谱矩阵时，没有考虑光谱矩阵与样品成分矩阵之间的内在联系，不能保证参与回归的主成分一定与被测组分或性质的相关。

（2）多元线性回归法

多元线性回归分析(MLR)是从对因变量有影响的许多变量中，选择一些变量作为自变量建立“最优”回归方程，对因变量进行预报和控制。“最优”回归方程主要是指在回归方程中包含所有对因变量影响显著的自变量而不包含对因变量影响不显著的自变量的回归方程。

近红外分析中，MLR的基本思想是经过反复搜索，选择出包含待测成分信息量最大的波长点以及能表征主要背景的波长点，用这些波长点的吸光度与样品组分含量的线形函数组成的线形方程来预测未知样品。

在做多元线性回归分析时，仅知一种组分的含量，也可进行定量分析，而且只有待测组分的含量进行参照方法的测定。但是，其参加回归的变量数不能超过校正集的样本数，所使用的变量数受到限制；无法消除回归中遇到的共线性问题；对仪器的信噪比要求很高，若使用的变量包含了噪声，会影响模型的预测能力。

（3）偏最小二乘法（PLS）[23]

在主成分回归中，只对光谱矩阵作了分解，消除了光谱矩阵中的无用信息；同样，浓度矩阵中也包含了无用信息，也应作相应处理。偏最小二乘法就是基于以上思想提出的多元回归方法。

在进行偏最小二乘法时，分别求出样品集光谱矩阵和样品组分矩阵的主成分矩阵，将这两个矩阵相关联，求其线形关系，用所建立的线形函数来预测未知样品（其中的最佳主成分矩阵的维数采用内部交叉检验来得出）。

第一步，矩阵分解，其模型为：

*X*=*TP*+*E Y*=*UQ*+*F*

第二步，将T和U作线性回归

*U*=*TB*

预测时，先求出未知样品X矩阵的T未知，再按下式计算浓度

*Y*未知＝*T*未知*BQ*

偏最小二乘法充分提取样品光谱的有效信息，消除了线性相关的问题，考虑了光谱矩阵与样品成分矩阵之间的内在联系，模型更稳健，适合于复杂分析体系；所需处理数据量庞大，计算速度较慢，计算过程较繁琐，需要多次迭代，同时模型建立过程复杂，较抽象，较难理解，是目前世界上近红外定量分析商品化软件中最流行的算法。本实验所使用的两个近红外软件在建立定量分析模型时均是以偏最小二乘法为基础。

### 3.6 定性分析模型的建立

光谱的定性分析都是依靠已知样品及未知样品的谱图比较来完成。由于

NIRS的谱带较宽且灵敏度较差，吸收峰重叠严重，从人眼考察NIRS图的相似性难以判别，因此定性分析一般须借助模式识别法方可完成。常用的模式识别定性分析方法包括有监督模式识别法和无监督模式识别法两大类[24]。

有监督模式识别法要运用一组已知其类别的样本，这些样本集在特征空间中构成的点集称为训练集（校正集）。有监督的模式识别就是利用训练集（因为已经知道各个模式的所属类别）通过所谓的训练（或学习）来获得识别准则（或判别函数），然后再用这些识别准则来判决未知模式所属的类别。为了检验从训练集中得到的识别准则的可靠程度，常常利用一些未包含在训练集中的已知类别的样本构成所谓预示集（验证集），利用从训练集中获得的识别准则对预示集中各模式进行识别，以检验其识别的可靠性，如PRIMA、SIMCA[25-26]、判别分析和人工神经网络[27]等都属于有监督学习系统。

无监督学习与有监督学习不同，它不依赖于训练集，而是在特征空间中直接寻找点群或其他可以识别的数据结构，如聚类分析、非线性映射和最小生成树等就属于无监督的学习系统。

本课题采用的近红外定性分析方法分别为判别分析和聚类分析。在此对这两种方法做以简单介绍。

（1）判别分析

判别分析法是利用已知类别样品的光谱信息建立判别分析模型，然后利用该模型来判断未知样品与已知类别中的哪类最相似。其思路是用几组已知类别的样本作为训练集，让计算机向这些已知样本“学习”，建立一个模式识别库，来对未知样品进行识别分类。对于库里的每类样品中的所有样品进行统计分析而计算出每类样品所对应的阈值，这个阈值就可以作为鉴定未知样品的标准。

鉴定未知样品时，其光谱可以和库中每一类物质的参考光谱进行比较。如果该光谱和库中参考光谱距离小于参考光谱对应的阈值，那么该样品可能和库中的这种物质属于同一种物质。但是对这个新样品最后鉴定结果必须将它同库中所有的物质比较后才能得出。如果未知样品的光谱在库中只在一类光谱阈值之内，那么就认为这个样品属于这一类别；如果未知样品的光谱在库中所有物质阈值之外，那么就认为这个样品不能用这个库来鉴定。

欧氏距离是两条光谱差异程度的一个尺度，也就是说欧氏距离越大，光谱的差异也就越大，而两条完全相同光谱的欧氏距离为零。1条样品光谱同库中1 条

光谱的距离（D）被定 （式中*Asi* 为样品光谱在波长点处吸光度值，*Ari*为库中光谱在波长点*i*处吸光度值）。欧氏距离的本质

为

是两条光谱在所选波长范围内Y轴差异的总和。所以对两条完全相同的光谱，它们的吸光度是完全相同的，差异的总和也就为零，而且随着吸光度值差异的增加，欧氏距离也会相应得增大。

（2）聚类分析

聚类分析是根据样本自身的属性，用数学方法按照某种相似性或差异性指标来确定样本之间的亲疏关系，并按这种亲疏关系程度对样本进行聚类[28]。

在分析时，首先计算所有谱图之间的距离，两张最相似（最小距离）的谱图被聚为一类。同时计算该类与其他谱图之间的距离，最小距离的两个目标（谱图/谱图、谱图/类）被聚会一类。再计算这个新类与其他谱图（谱图、类）之间的距离，最小距离的两个目标（谱图/谱图、谱图/类、类/类）会再被聚会一类，以此类推，直至所有样本聚类完成，达到分类的目的。

### 3.7 分析模型的评价和优化

在建立模型时，对校正集样品建立校正模型，同时作交叉验证，并用验证集样品对模型进行外部验证，最后根据交叉检验决定系数（R2）、校正均方差

（RMSEC）、交互验证均方差（RMSECV）、预测相关系数（r）、预测均方差

（RMSEP）等性能参数来确定最优校正模型。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型，相关系数越大、均方差越小，表明所建模型适用性越强、预测效果越好[29]。

在对模型进行验证时，可以用外部证实法检验数学模型，用于评价数学模型时间和空间的稳定性。为了检验数学模型在时间和空间的检验样品集，必须检验是否都能得到稳定的结果。如果用外边证实的方法确定的数学模型预测效果较好，则可以考虑在近红外光谱分析中应用该数学模型；如果测定的样品在时间和空间条件上有一些新的变化，原有的数学模型已不适合此条件，则需要建立新的有代表性的校正样品集（可以在原有的样品集中增加一些新的样品类

型，以使新的校正集能代表新类型的样品），然后再对数学模型进行修正与维护。

### 3.8 模型的推广应用

在多元校正方法的应用过程中，经常遇到这样的情况，在某一仪器上（称源机，Master）上建立的一个近红外分析模型，在另一台与源机相同型号的仪器

（称目标机，Slaver）上无法使用，或者结果产生较大偏差，解决这类问题的过程称为模型传递。由于建立满足实际应用要求的多元校正模型往往花费大量人力和物力，因此研究模型传递技术具有很高的应用价值，也一直是近年分析信息处理技术研究的热点课题之一[30]。

目前解决模型传递问题主要有三种途径：（1）建立稳定的校正模型，可以不用进行模型传递就可以适用在不同的仪器上，主要是通过变量的筛选、微分、小波变换、多元散射校正（MSC）、标准正交变量变换（SNV）、傅里叶变换（FT）、正交信号校正（OSC）等预处理方法，和使用稳定、不同仪器等测量条件扩充校正模型，以及采用稳健回归方法如RPLS等方法增强源机所建模型的选择能力，使其能用于目标机所测的信号；（2）修改现有的模型，以便能在现有的仪器上使用，主要是通过对预测结果进行校正，如斜率/偏差（S/B）算法；（3）校正光谱图，以便与另外仪器的光谱一致，常用的方法有直接校正（DS）算法、分段直接校正（PDS）算法和Shenk, s算法，另一类是无标样方法，使用这类算法不需要任何标准样品，主要以有限脉冲响应（FIR）算法为代表[31]。

## 4 杞菊地黄丸（浓缩丸）简介[32]

杞菊地黄丸处方来自《麻疹全书》，其组成为[枸杞子](http://baike.baidu.com/view/24692.htm)40g，菊花40g，[熟地黄](http://baike.baidu.com/view/283510.htm)160g，[ft茱萸](http://baike.baidu.com/view/40223.htm)（制）80g，[牡丹皮](http://baike.baidu.com/view/20409.htm)60g，[ft药](http://baike.baidu.com/view/21503.htm)80g，[茯苓](http://baike.baidu.com/view/15099.htm)60g，[泽泻](http://baike.baidu.com/view/61181.htm)60g。中医认为：肝开窍于目，肝血上注于目则能视。枸杞子补肾益精，养肝明目；菊花善清利头目，宣散肝经之热。熟地滋阴补肾，填精益髓；ft茱萸补养肝肾，并能涩精，取肝肾同源之意；ft药补益脾阴，亦能固肾，共为臣药；泽泻利湿而泄肾浊，并能减熟地黄之滋腻；茯苓淡渗脾湿，并助ft药之健运，与泽泻共泻肾浊，助真阴得复其位；丹皮清泄虚热，并制ft茱萸之温涩。

将以上八味药材，泽泻、茯苓粉碎成细粉，加水煎煮两次，第一次3小时，第二次2小时，滤过，合并滤液并浓缩成相对密度为1.30～1.35（60～80℃）的稠膏；熟地黄切片，加水煎煮三次，第一次3小时，第二次2小时，第三次一小时，滤过，合并滤液并浓缩成相对密度为1.30～1.35（60～80℃）的稠膏；取枸杞子以45%乙醇作溶剂，酒萸肉53.3g、牡丹皮33.5g及菊花以70%乙醇作溶剂，浸渍24小时后，分别进行渗滤，收集滤液，合并两种滤液，回收乙醇浓缩成相对密度为1.30～1.35（60～80℃）的稠膏；将ft药、剩余的牡丹皮和酒萸肉粉碎成细粉，与上述各清膏混匀，制成浓缩丸，干燥，打光，即得。

传统中医理论认为，杞菊地黄丸具有滋阴补肾的功效，用于肝肾阴亏，眩晕耳鸣，羞明畏光，迎风流泪等。现代医学研究则证明，杞菊地黄丸可增强免疫功能，抗衰老，改善肝脏脂肪代谢，促进肝细胞新生，预防脂肪肝发生，降低毛细血管通透性，抗炎，降低四氧嘧啶引起的高血糖，减少东莨菪碱对学习记忆功能的影响，还有抗[肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)、降血脂等作用。

2010版《中国药典》初次收载杞菊地黄丸（浓缩丸）。文中对杞菊地黄丸（浓缩丸）的处方组成、制作工艺、性状、鉴别、检查、含量测定等做了严格要求。

## **5** 本课题研究内容、预期目标

### 5.1 研究内容

#### 5.1.1 HPLC指纹图谱的建立

（1）建立杞菊地黄丸浓缩丸（河南宛西制药提供）HPLC指纹图谱。

（2）收集市场上不同厂家生产的杞菊地黄丸浓缩丸，建立不同厂家的HPLC

指纹图谱。

#### 5.1.2 近红外定性、定量模型的建立

（1）建立河南宛西产杞菊地黄丸（浓缩丸）中水分、丹皮酚、马钱苷的近红外定量模型。

（2）收集市场上不同厂家生产的杞菊地黄丸浓缩丸，建立不同生产厂家杞菊地黄丸（浓缩丸）中水分、丹皮酚、马钱苷的近红外定量模型。

（3）建立不同厂家近红外定性鉴别模型。

（4）在定性鉴别项上对比HPLC指纹图谱与近红外定性模型效果。

### 5.2 预期目标

为河南宛西制药建立杞菊地黄丸浓缩丸的HPLC指纹图谱及水分、丹皮酚、马钱苷的近红外定量模型，用于指导生产。建立不同生产厂家杞菊地黄丸浓缩丸的HPLC指纹图谱及近红外定性鉴别模型，用于市场上流通的药品的质量监控。

## **6** 本项实验研究的意义

随着现代科学技术的飞速发展和多种学科的相互交叉融合，尤其是现代生物学、化学、物理学、信息科学等学科向中药研究开发和生产领域的不断融合，给中药的质量控制方法的研究开发提供了新思路。

将近红外光谱技术这个新一代分析技术引入中药质量控制当中，为改变了当前常规分析方法费时费力、操作繁冗、毒害性大、污染环境的面貌，同时满足了中药材及其制剂的在线实时控制，多种性质和成分同时分析测定，提高了分析效率，可以实现数据资源共享的需求，为中药质量控制开拓了一个新的空间。

通过本研究，完善建立杞菊地黄丸浓缩丸整体质量控制的检测方法，建成并将其推广到其他中药制剂的质量评价与控制中，确保中药制剂质量的均一性和稳定性。

# 第一部分 杞菊地黄丸的**HPLC**指纹图谱研究

## **1** 杞菊地黄丸指纹图谱方法学考察

### 1.1 仪器、试剂与实验样品

仪器Agilent 1200型高效液相色谱仪 美国安捷伦科技公司配有四元泵

标准自动进样器

DAD检测器

Chemstation色谱工作站

HS-6150超声波清洗仪 昆ft市超声仪器有限公司 METTLER AE240型电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司WND-200A型中药粉碎机 浙江省兰溪市伟能达电器公司HH-S型水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂

CHROMAP1.5指纹图谱处理软件 珠海科曼有限公司

Milli-Q Academic A10超纯水机 美国Millipore公司

试剂丹皮酚对照品（110708-200506） 中国药品生物制品检定所马钱苷对照品（11640-201005） 中国药品生物制品检定所甲醇（色谱纯）美国Tedia

乙腈（色谱纯）美国Tedia

超纯水自制

冰乙酸天津科密欧化学试剂开发中心

实验样品实验所用杞菊地黄丸（浓缩丸）样品均购至市场。粉碎后过60目药典筛备用。30份杞菊地黄丸生产厂家与生产批号如下表所示。

表1-1 杞菊地黄丸指纹图谱编号

| 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 | 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| W1 | 河南宛西 | 20100366 | M16 | 湖北马鞍ft | 20111130 |
| W2 | 河南宛西 | 20100376 | M17 | 湖北马鞍ft | 20111152 |
| W3 | 河南宛西 | 201003103 | M18 | 湖北马鞍ft | 20120314 |
| W4 | 河南宛西 | 20100467 | M19 | 湖北马鞍ft | 20120404 |
| W5 | 河南宛西 | 20100490 | M20 | 湖北马鞍ft | 20120620 |
| W6 | 河南宛西 | 20100516 | T21 | 北京同仁堂 | 9065145 |
| W7 | 河南宛西 | 20100546 | T22 | 北京同仁堂 | 9072677 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| W8 | 河南宛西 | 201005105 | T23 | 北京同仁堂 | 9072839 |
| W9 | 河南宛西 | 20100614 | T24 | 北京同仁堂 | 1060172 |
| W10 | 河南宛西 | 20100632 | T25 | 北京同仁堂 | 1070260 |
| M11 | 湖北马鞍ft | 201001204 | T26 | 北京同仁堂 | 1070263 |
| M12 | 湖北马鞍ft | 20100841 | T27 | 北京同仁堂 | 1071472 |
| M13 | 湖北马鞍ft | 20101204 | T28 | 北京同仁堂 | 12051949 |
| M14 | 湖北马鞍ft | 20110231 | T29 | 北京同仁堂 | 12074784 |
| M15 | 湖北马鞍ft | 20110352 | T30 | 北京同仁堂 | 12077331 |

其他烧瓶（50mL）；移液管（5mL, 1mL）；容量瓶（10mL, 5mL）；量筒（50mL）；注射器；称量纸；0.45um微孔滤膜；0.45微孔滤头；滤纸；玻棒；冷凝管；橡胶管；沸石；漏斗；洗耳球；洗瓶；蒸发皿。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 供试品溶液的制备

取杞菊地黄丸粉末约2g，精密称定，置100mL的锥形瓶中，精密加入75%的乙醇40mL，称定重量，功率50HZ，超声处理60min，放冷，再称定重量，用75%乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，滤液用微孔滤膜过滤器（0.45µm）过滤，作为供试品溶液。

#### 1.2.2 对照品溶液的制备

取丹皮酚、马钱苷对照品适量，精密称定，置量瓶中，加75%的乙醇制成含丹皮酚225ug/mL、马钱苷204ug/mL的溶液，即得。

#### 1.2.3 色谱条件

色谱柱：Diamonsil C18色谱柱( 250 mm×4.6mm, 5μm)；乙腈-0.1%磷酸水梯度洗脱（见表下表）；记录时间为125min；柱温：30℃；检测波长：220nm。

表1-2 流动相梯度洗脱运行时间表

| Time(min) | Flow(mL/min) | B%(乙腈) | A%(0.1%冰乙酸水溶液) |
| --- | --- | --- | --- |
| 0 | 1.0 | 10 | 90 |
| 15 | 1.0 | 10 | 90 |
| 25 | 1.0 | 15 | 85 |
| 35 | 1.0 | 15 | 85 |
| 50 | 1.0 | 20 | 80 |
| 60 | 1.0 | 35 | 65 |
| 75 | 1.0 | 90 | 10 |

1.2.4 2h试验

##### 1.2.4.1 吸取色谱甲醇溶剂10µl ,注入高效液相色谱仪，进样2h，结果见图1-1。试验结果表明，空白试验除基线稍有漂移外，无杂质峰干扰。



图1-1 纯甲醇2小时试验

##### 1.2.4.2 精密吸取样品溶液10µl ,注入高效液相色谱仪，进样2h，结果见图1-2。



1.2.5对照试验

图1-2 杞菊地黄丸样品（河南宛西）2小时试验

取对照品及样品溶液10µL，注入高效液相色谱仪，按上述色谱条件测定，记录色谱图，见下图所示。



图1-3 杞菊地黄丸及对照品指纹图谱（河南宛西产样品）

#### 1.2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液10µL，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“1.2.3”项下色谱条件进样，连续进样5次，记录色谱图中共有峰保留时

间和峰面积，以共有峰的10号峰作为内标准峰，结果显示，共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的RSD值均小于3%，表明仪器精密度良好。结果见表1-3、1-4。

表1-3 仪器精密度试验相对保留时间计算结果

共有样品编号

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  | |
| 1 | 0.1601 | 0.1597 | 0.1600 | 0.1599 | 0.1603 | 0.1600 | 0.14 |
| 2 | 0.2039 | 0.2034 | 0.2037 | 0.2036 | 0.2042 | 0.2038 | 0.15 |
| 3 | 0.2419 | 0.2417 | 0.2423 | 0.2420 | 0.2421 | 0.2420 | 0.09 |
| 4 | 0.2564 | 0.2565 | 0.2566 | 0.2563 | 0.2561 | 0.2564 | 0.08 |
| 5 | 0.3488 | 0.3486 | 0.3488 | 0.3491 | 0.3490 | 0.3489 | 0.06 |
| 6 | 0.4441 | 0.4440 | 0.4438 | 0.4443 | 0.4445 | 0.4441 | 0.06 |
| 7 | 0.6087 | 0.6086 | 0.6091 | 0.6088 | 0.6091 | 0.6089 | 0.04 |
| 8 | 0.7675 | 0.7673 | 0.7681 | 0.7679 | 0.7682 | 0.7678 | 0.05 |
| 9 | 0.9189 | 0.9185 | 0.9191 | 0.9195 | 0.9193 | 0.9191 | 0.04 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |
| 11 | 1.0920 | 1.0915 | 1.0929 | 1.0931 | 1.0928 | 1.0925 | 0.06 |
| 12 | 1.1166 | 1.1161 | 1.1172 | 1.1171 | 1.1170 | 1.1168 | 0.04 |
| 13 | 1.1859 | 1.1855 | 1.1867 | 1.1865 | 1.1861 | 1.1861 | 0.04 |
| 14 | 1.2481 | 1.2471 | 1.2495 | 1.2491 | 1.2489 | 1.2485 | 0.08 |
| 15 | 1.2902 | 1.2889 | 1.2916 | 1.2911 | 1.2913 | 1.2906 | 0.08 |
| 16 | 1.3070 | 1.3061 | 1.3089 | 1.3079 | 1.3075 | 1.3075 | 0.08 |
| 17 | 1.4191 | 1.4184 | 1.4199 | 1.4199 | 1.4195 | 1.4194 | 0.04 |
| 18 | 1.5604 | 1.5595 | 1.5621 | 1.5619 | 1.5614 | 1.5611 | 0.07 |
| 19 | 1.6633 | 1.6619 | 1.6648 | 1.6644 | 1.6649 | 1.6639 | 0.07 |
| 20 | 1.7241 | 1.7237 | 1.7248 | 1.7246 | 1.7244 | 1.7243 | 0.03 |
| 21 | 1.7620 | 1.7615 | 1.7629 | 1.7627 | 1.7625 | 1.7623 | 0.03 |
| 22 | 1.8681 | 1.8675 | 1.8690 | 1.8688 | 1.8684 | 1.8684 | 0.03 |
| 23 | 1.8906 | 1.8889 | 1.8929 | 1.8918 | 1.8916 | 1.8912 | 0.08 |
| 24 | 1.8983 | 1.8971 | 1.8999 | 1.8991 | 1.8984 | 1.8986 | 0.05 |

均值RSD(%)

表1-4 仪器精密度试验相对保留峰面积计算结果

| 共有 |  |  | 样品编号 |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  | 均值 | RSD(%) |
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  |  |
| 1 | 3.5979 | 3.5935 | 3.5998 | 3.6002 | 3.5935 | 3.5970 | 0.09 |
| 2 | 2.1014 | 2.0998 | 2.1029 | 2.1025 | 2.1022 | 2.1018 | 0.06 |
| 3 | 0.5101 | 0.5095 | 0.5106 | 0.5104 | 0.5105 | 0.5102 | 0.09 |
| 4 | 1.2867 | 1.2855 | 1.2870 | 1.2873 | 1.2869 | 1.2867 | 0.05 |
| 5 | 0.1241 | 0.1237 | 0.1247 | 0.1245 | 0.1243 | 0.1243 | 0.31 |
| 6 | 1.1967 | 1.1954 | 1.1975 | 1.1973 | 1.1970 | 1.1968 | 0.07 |
| 7 | 1.1652 | 1.1645 | 1.1661 | 1.1659 | 1.1655 | 1.1654 | 0.05 |
| 8 | 0.0719 | 0.0718 | 0.0721 | 0.0722 | 0.0722 | 0.0720 | 0.25 |
| 9 | 0.6458 | 0.6453 | 0.6465 | 0.6462 | 0.6461 | 0.6460 | 0.07 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |
| 11 | 0.2838 | 0.2834 | 0.2845 | 0.2841 | 0.2843 | 0.2840 | 0.15 |
| 12 | 0.3780 | 0.3771 | 0.3791 | 0.3787 | 0.3783 | 0.3782 | 0.20 |
| 13 | 0.3028 | 0.3021 | 0.3037 | 0.3034 | 0.3029 | 0.3030 | 0.20 |
| 14 | 0.0998 | 0.0996 | 0.1004 | 0.1004 | 0.1001 | 0.1001 | 0.36 |
| 15 | 0.2982 | 0.2975 | 0.2994 | 0.2996 | 0.2991 | 0.2988 | 0.30 |
| 16 | 0.1629 | 0.1621 | 0.1638 | 0.1636 | 0.1632 | 0.1631 | 0.41 |
| 17 | 0.3312 | 0.3309 | 0.3321 | 0.3319 | 0.3315 | 0.3315 | 0.15 |
| 18 | 0.1083 | 0.1078 | 0.1089 | 0.1091 | 0.1089 | 0.1086 | 0.50 |
| 19 | 0.0837 | 0.0835 | 0.0842 | 0.0843 | 0.0843 | 0.0840 | 0.45 |
| 20 | 0.1381 | 0.1375 | 0.1390 | 0.1387 | 0.1384 | 0.1383 | 0.42 |
| 21 | 0.7393 | 0.7387 | 0.7401 | 0.7397 | 0.7395 | 0.7395 | 0.07 |
| 22 | 3.5995 | 3.5985 | 3.6019 | 3.6017 | 3.6011 | 3.6005 | 0.04 |
| 23 | 0.1300 | 0.1296 | 0.1303 | 0.1302 | 0.1301 | 0.1300 | 0.21 |
| 24 | 0.1645 | 0.1640 | 0.1652 | 0.1653 | 0.1649 | 0.1648 | 0.33 |

#### 1.2.7 重复性试验

分别精密称取同一批样品5份，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，

按“1.2.3”项下色谱条件测定，记录各共有峰保留时间和峰面积。以21号峰的保留时间和峰面积值作为参照，共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值

RSD 值均小于3%，符合指纹图谱要求，整个试验的重复性良好。见表1-5、

1-6.

表1-5 重复性试验相对保留时间计算结果

| 共有 |  |  | 样品编号 |  | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  | 均值 | RSD(%) |
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  |  |
| 1 | 0.0908 | 0.0905 | 0.0914 | 0.0909 | 0.0910 | 0.0909 | 0.36 |
| 2 | 0.1157 | 0.1155 | 0.1160 | 0.1163 | 0.1161 | 0.1159 | 0.28 |
| 3 | 0.1373 | 0.1369 | 0.1376 | 0.1374 | 0.1371 | 0.1373 | 0.20 |
| 4 | 0.1455 | 0.1451 | 0.1459 | 0.1455 | 0.1457 | 0.1455 | 0.20 |
| 5 | 0.1980 | 0.1976 | 0.1983 | 0.1985 | 0.1981 | 0.1981 | 0.17 |
| 6 | 0.2520 | 0.2515 | 0.2526 | 0.2526 | 0.2522 | 0.2522 | 0.18 |
| 7 | 0.3455 | 0.3450 | 0.3459 | 0.3457 | 0.3458 | 0.3456 | 0.10 |
| 8 | 0.4356 | 0.4349 | 0.4361 | 0.4365 | 0.4362 | 0.4359 | 0.14 |
| 9 | 0.5215 | 0.5209 | 0.5222 | 0.5220 | 0.5219 | 0.5217 | 0.10 |
| 10 | 0.5675 | 0.5668 | 0.5683 | 0.5682 | 0.5679 | 0.5677 | 0.11 |
| 11 | 0.6198 | 0.6189 | 0.6209 | 0.6210 | 0.6201 | 0.6201 | 0.14 |
| 12 | 0.6337 | 0.6332 | 0.6345 | 0.6346 | 0.6341 | 0.6340 | 0.09 |
| 13 | 0.6730 | 0.6725 | 0.6740 | 0.6739 | 0.6737 | 0.6734 | 0.10 |
| 14 | 0.7083 | 0.7078 | 0.7091 | 0.7089 | 0.7085 | 0.7085 | 0.07 |
| 15 | 0.7322 | 0.7315 | 0.7331 | 0.7332 | 0.7329 | 0.7326 | 0.10 |
| 16 | 0.7418 | 0.7410 | 0.7429 | 0.7425 | 0.7421 | 0.7421 | 0.10 |
| 17 | 0.8054 | 0.8046 | 0.8061 | 0.8062 | 0.8057 | 0.8056 | 0.08 |
| 18 | 0.8856 | 0.8849 | 0.8867 | 0.8865 | 0.8861 | 0.8860 | 0.08 |
| 19 | 0.9439 | 0.9435 | 0.9444 | 0.9441 | 0.9447 | 0.9441 | 0.05 |
| 20 | 0.9785 | 0.9776 | 0.9795 | 0.9793 | 0.9789 | 0.9788 | 0.08 |
| 21 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |
| 22 | 1.0602 | 1.0591 | 1.0611 | 1.0609 | 1.0606 | 1.0604 | 0.07 |
| 23 | 1.0730 | 1.0719 | 1.0731 | 1.0739 | 1.0735 | 1.0731 | 0.07 |
| 24 | 1.0773 | 1.0765 | 1.0781 | 1.0783 | 1.0779 | 1.0776 | 0.07 |

1-6 重复性试验相对保留峰面积计算结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 共有 |  |  | 样品编号 |  |  |  |
| 均值 | | | | | | RSD(%) |
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1 | 4.8666 | 4.8641 | 4.8685 | 4.8679 | 4.8672 | 4.8669 | 0.03 |  |
|  | 2 | 2.8423 | 2.8401 | 2.8439 | 2.8441 | 2.8428 | 2.8426 | 0.06 |  |
|  | 3 | 0.6899 | 0.6890 | 0.6913 | 0.6911 | 0.6911 | 0.6905 | 0.14 |  |
|  | 4 | 1.7404 | 1.7393 | 1.7415 | 1.7418 | 1.7409 | 1.7408 | 0.06 |  |
|  | 5 | 0.1678 | 0.1669 | 0.1688 | 0.1689 | 0.1685 | 0.1682 | 0.50 |  |
|  | 6 | 1.6187 | 1.6178 | 1.6199 | 1.6195 | 1.6189 | 1.6190 | 0.05 |  |
|  | 7 | 1.5761 | 1.5748 | 1.5782 | 1.5779 | 1.5767 | 1.5767 | 0.09 |  |
|  | 8 | 0.0973 | 0.0971 | 0.0974 | 0.0977 | 0.0975 | 0.0974 | 0.23 |  |
|  | 9 | 0.8735 | 0.8726 | 0.8743 | 0.8747 | 0.8741 | 0.8738 | 0.09 |  |
|  | 10 | 1.3526 | 1.3511 | 1.3537 | 1.3539 | 1.3529 | 1.3528 | 0.08 |  |
|  | 11 | 0.3838 | 0.3835 | 0.3841 | 0.3840 | 0.3842 | 0.3839 | 0.07 |  |
|  | 12 | 0.5113 | 0.5101 | 0.5129 | 0.5124 | 0.5115 | 0.5116 | 0.21 |  |
|  | 13 | 0.4096 | 0.4085 | 0.4105 | 0.4100 | 0.4103 | 0.4098 | 0.19 |  |
|  | 14 | 0.1349 | 0.1345 | 0.1356 | 0.1355 | 0.1351 | 0.1351 | 0.33 |  |
|  | 15 | 0.4033 | 0.4025 | 0.4037 | 0.4043 | 0.4039 | 0.4035 | 0.17 |  |
|  | 16 | 0.2203 | 0.2200 | 0.2210 | 0.2209 | 0.2206 | 0.2206 | 0.19 |  |
|  | 17 | 0.4480 | 0.4469 | 0.4491 | 0.4489 | 0.4482 | 0.4482 | 0.19 |  |
|  | 18 | 0.1465 | 0.1460 | 0.1466 | 0.1470 | 0.1469 | 0.1466 | 0.27 |  |
|  | 19 | 0.1132 | 0.1130 | 0.1135 | 0.1133 | 0.1136 | 0.1133 | 0.21 |  |
|  | 20 | 0.1868 | 0.1859 | 0.1871 | 0.1875 | 0.1872 | 0.1869 | 0.33 |  |
|  | 21 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |  |
|  | 22 | 4.8688 | 4.8653 | 4.8721 | 4.8715 | 4.8719 | 4.8699 | 0.06 |  |
|  | 23 | 0.1759 | 0.1755 | 0.1765 | 0.1763 | 0.1761 | 0.1761 | 0.22 |  |
|  | 24 | 0.2225 | 0.2221 | 0.2232 | 0.2231 | 0.2229 | 0.2228 | 0.20 |  |

#### 1.2.8 稳定性试验

取同一批供试品溶液，在相同的条件下分别于0h，4h，8h，12h，24h测定结果，以21号峰的保留时间和峰面积值作为参照，共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值RSD值均小于3%，符合指纹图谱要求，表明试液在24h内稳定，结果见下表1-7、1-8。

表1-7 稳定性试验相对保留时间计算结果

| 共有 |  |  | 样品编号 |  | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  | 均值 | RSD(%) |
| 峰号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  |  |
| 1 | 0.0912 | 0.0913 | 0.0909 | 0.0911 | 0.0906 | 0.0910 | 0.30 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2 | 0.1154 | 0.1151 | 0.1159 | 0.1160 | 0.1157 | 0.1156 | 0.32 |  |
|  | 3 | 0.1376 | 0.1381 | 0.1379 | 0.1374 | 0.1369 | 0.1376 | 0.34 |  |
|  | 4 | 0.1456 | 0.1465 | 0.1461 | 0.1459 | 0.1451 | 0.1458 | 0.36 |  |
|  | 5 | 0.1987 | 0.1989 | 0.1989 | 0.1984 | 0.1979 | 0.1986 | 0.21 |  |
|  | 6 | 0.2527 | 0.2531 | 0.2530 | 0.2529 | 0.2511 | 0.2526 | 0.33 |  |
|  | 7 | 0.3451 | 0.3467 | 0.3469 | 0.3465 | 0.3457 | 0.3462 | 0.22 |  |
|  | 8 | 0.4359 | 0.4354 | 0.4367 | 0.4369 | 0.4360 | 0.4362 | 0.14 |  |
|  | 9 | 0.5219 | 0.5231 | 0.5230 | 0.5229 | 0.5215 | 0.5225 | 0.14 |  |
|  | 10 | 0.5679 | 0.5689 | 0.5688 | 0.5683 | 0.5671 | 0.5682 | 0.13 |  |
|  | 11 | 0.6196 | 0.6191 | 0.6208 | 0.6204 | 0.6201 | 0.6200 | 0.11 |  |
|  | 12 | 0.6335 | 0.6348 | 0.6347 | 0.6345 | 0.6338 | 0.6343 | 0.09 |  |
|  | 13 | 0.6735 | 0.6745 | 0.6746 | 0.6741 | 0.6732 | 0.6740 | 0.09 |  |
|  | 14 | 0.7079 | 0.7071 | 0.7089 | 0.7091 | 0.7090 | 0.7084 | 0.12 |  |
|  | 15 | 0.7319 | 0.7311 | 0.7331 | 0.7329 | 0.7330 | 0.7324 | 0.12 |  |
|  | 16 | 0.7408 | 0.7401 | 0.7421 | 0.7419 | 0.7418 | 0.7413 | 0.12 |  |
|  | 17 | 0.8059 | 0.8067 | 0.8069 | 0.8061 | 0.8055 | 0.8062 | 0.07 |  |
|  | 18 | 0.8851 | 0.8844 | 0.8859 | 0.8861 | 0.8863 | 0.8856 | 0.09 |  |
|  | 19 | 0.9431 | 0.9419 | 0.9439 | 0.9441 | 0.9438 | 0.9434 | 0.10 |  |
|  | 20 | 0.9789 | 0.9799 | 0.9792 | 0.9789 | 0.9786 | 0.9791 | 0.05 |  |
|  | 21 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |  |
|  | 22 | 1.0599 | 1.0621 | 1.0619 | 1.0615 | 1.0605 | 1.0612 | 0.09 |  |
|  | 23 | 1.0723 | 1.0711 | 1.0731 | 1.0734 | 1.0729 | 1.0726 | 0.08 |  |
|  | 24 | 1.0768 | 1.0759 | 1.0773 | 1.0771 | 1.0769 | 1.0768 | 0.05 |  |

表1-8 稳定性试验相对保留峰面积计算结果

共有样品编号

峰号1 2 3 4 5

均值RSD(%)

| 1 | 4.8691 | 4.8689 | 4.8691 | 4.8710 | 4.8695 | 4.8695 | 0.02 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 2.8411 | 2.8404 | 2.8419 | 2.8421 | 2.8417 | 2.8414 | 0.02 |
| 3 | 0.6890 | 0.6921 | 0.6915 | 0.6918 | 0.6898 | 0.6908 | 0.20 |
| 4 | 1.7420 | 1.7423 | 1.7421 | 1.7430 | 1.7415 | 1.7422 | 0.03 |
| 5 | 0.1682 | 0.1685 | 0.1689 | 0.1691 | 0.1679 | 0.1685 | 0.29 |
| 6 | 1.6187 | 1.6198 | 1.6195 | 1.6191 | 1.6189 | 1.6192 | 0.03 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7 | 1.5780 | 1.5783 | 1.5790 | 1.5789 | 1.5779 | 1.5784 | 0.03 |
| 8 | 0.0969 | 0.0966 | 0.0971 | 0.0973 | 0.0970 | 0.0970 | 0.27 |
| 9 | 0.8748 | 0.8751 | 0.8756 | 0.8749 | 0.8739 | 0.8749 | 0.07 |
| 10 | 1.3539 | 1.3545 | 1.3541 | 1.3538 | 1.3531 | 1.3539 | 0.04 |
| 11 | 0.3831 | 0.3829 | 0.3839 | 0.3841 | 0.3842 | 0.3836 | 0.16 |
| 12 | 0.5120 | 0.5129 | 0.5125 | 0.5120 | 0.5119 | 0.5123 | 0.08 |
| 13 | 0.4098 | 0.4109 | 0.4111 | 0.4099 | 0.4095 | 0.4102 | 0.17 |
| 14 | 0.1345 | 0.1341 | 0.1349 | 0.1351 | 0.1353 | 0.1348 | 0.36 |
| 15 | 0.4031 | 0.4026 | 0.4035 | 0.4039 | 0.4041 | 0.4034 | 0.15 |
| 16 | 0.2201 | 0.2196 | 0.2212 | 0.2210 | 0.2209 | 0.2206 | 0.31 |
| 17 | 0.4485 | 0.4496 | 0.4497 | 0.4491 | 0.4489 | 0.4492 | 0.11 |
| 18 | 0.1459 | 0.1455 | 0.1468 | 0.1466 | 0.1469 | 0.1463 | 0.42 |
| 19 | 0.1129 | 0.1124 | 0.1135 | 0.1133 | 0.1137 | 0.1132 | 0.46 |
| 20 | 0.1880 | 0.1885 | 0.1889 | 0.1879 | 0.1878 | 0.1882 | 0.25 |
| 21 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00 |
| 22 | 4.8659 | 4.8702 | 4.8712 | 4.8699 | 4.8701 | 4.8695 | 0.04 |
| 23 | 0.1757 | 0.1754 | 0.1765 | 0.1766 | 0.1758 | 0.1760 | 0.30 |
| 24 | 0.2223 | 0.2218 | 0.2226 | 0.2229 | 0.2233 | 0.2226 | 0.26 |

## **2** 杞菊地黄丸样品**HPLC**指纹图谱建立

### 2.1 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

#### 2.1.1 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的测定

分别取河南宛西制药生产的10批不同批次的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品各2g，精密称定，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“1.2.3”项下色谱条件测定，记录各共有峰峰面积。不同批次样品以9号峰峰面积值作为参照，计算各共有峰相对峰面积积分值。结果见表1-9。

表1-9 河南宛西产不同生产批次杞菊地黄丸样品相对保留峰面积计算结果

| 共有峰  编号 |  |  |  |  | 样品编号 | |  |  |  |  | RSD  （%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| W1 | W2 | W3 | W4 | W5 | W6 | W7 | W8 | W9 | W10 |
| 1 | 5.2797 | 3.0454 | 2.742 | 3.9015 | 3.6674 | 4.9478 | 3.4421 | 3.2118 | 2.8742 | 3.3887 | 23.28 |
| 2 | 2.6647 | 0.4373 | 1.2727 | 1.3063 | 1.0371 | 2.6668 | 0.4957 | 0.8522 | 0.26 | 2.605 | 69.9 |
| 3 | 0.8337 | 0.1679 | 0.5071 | 0.5927 | 0.4889 | 0.8559 | 0.2557 | 0.4565 | 0.2121 | 0.8722 | 50.63 |
| 4 | 1.2933 | 0.7863 | 1.036 | 1.2831 | 0.9602 | 1.3002 | 0.7776 | 0.814 | 0.6926 | 1.4598 | 26.39 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 5 | 0.1284 | 0.1396 | 0.1381 | 0.1398 | 0.1408 | 0.2784 | 0.1311 | 0.1288 | 0.1322 | 0.9548 | 111.71 |  |
|  | 6 | 1.1737 | 1.0912 | 1.1852 | 1.5946 | 1.121 | 1.1032 | 0.9974 | 0.9057 | 0.9098 | 1.6435 | 21.74 |  |
|  | 7 | 0.9079 | 1.1761 | 0.9186 | 0.9953 | 0.9507 | 1.0305 | 1.098 | 0.9436 | 0.9052 | 1.0483 | 9.06 |  |
|  | 8 | 0.5512 | 0.6397 | 0.5614 | 0.5518 | 0.5246 | 0.5693 | 0.5425 | 0.4192 | 0.4659 | 0.5895 | 11.4 |  |
|  | 9 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0 |  |
|  | 10 | 0.3245 | 0.4417 | 0.3398 | 0.418 | 0.3421 | 0.3441 | 0.3699 | 0.3497 | 0.2977 | 0.4169 | 12.74 |  |
|  | 11 | 0.2802 | 0.3872 | 0.4056 | 0.3022 | 0.2461 | 0.3166 | 0.2334 | 0.3036 | 0.1898 | 0.4167 | 24.64 |  |
|  | 12 | 0.3566 | 0.3255 | 0.3313 | 0.1628 | 0.1155 | 0.1405 | 0.1009 | 0.316 | 0.097 | 0.4822 | 55.72 |  |
|  | 13 | 0.6764 | 0.7122 | 0.6647 | 0.6452 | 0.6848 | 0.6768 | 0.6926 | 0.6917 | 0.6217 | 0.6437 | 4.07 |  |
|  | 14 | 2.8749 | 3.4299 | 3.1478 | 3.1575 | 3.2099 | 2.7649 | 2.8624 | 3.0922 | 2.3214 | 2.8337 | 10.37 |  |
|  | 15 | 0.1014 | 0.1007 | 0.1292 | 0.1197 | 0.1300 | 0.1287 | 0.1161 | 0.1185 | 0.0887 | 0.0793 | 12.98 |  |
|  | 16 | 0.1203 | 0.1258 | 0.1574 | 0.1421 | 0.1645 | 0.1799 | 0.1679 | 0.1407 | 0.1263 | 0.0940 | 16.22 |  |

#### 2.1.2 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

将所得10批不同批次的杞菊地黄丸指纹图谱数据输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2004A版）”中，得到各样品的HPLC色谱叠加图，如图1-4所示。以相对峰面积为变量，按中位数法生成对照指纹图谱，如图1-5所示。



图1-4 10批河南宛西产杞菊地黄丸样品HPLC色谱叠加图

（从下至上依次为W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7、W8、W9、W10 号样品）



图1-5 河南宛西产杞菊地黄丸HPLC色谱指纹图谱共有模式

#### 2.1.3 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱指纹图谱相似度计算

相似度（Similarity）是评价中药指纹图谱的一个重要参数，据此分析中药质量的稳定性。本试验利用相关系数法对10批不同生产批号的杞菊地黄丸样品进行了相似度计算，结果见表1-10。

表1-10 河南宛西产杞菊地黄丸不同批次样品相似度计算表

|  | W1 | W2 | W3 | W4 | W5 | W6 | W7 | W8 | W9 | W10 | 对照 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| W1 | 1 | 0.968 | 0.981 | 0.965 | 0.963 | 0.975 | 0.986 | 0.972 | 0.995 | 0.985 | 0.992 |
| W2 | 0.968 | 1 | 0.978 | 0.982 | 0.987 | 0.968 | 0.99 | 0.98 | 0.991 | 0.965 | 0.994 |
| W3 | 0.981 | 0.978 | 1 | 0.973 | 0.978 | 0.97 | 0.978 | 0.973 | 0.985 | 0.974 | 0.984 |
| W4 | 0.965 | 0.982 | 0.973 | 1 | 0.994 | 0.966 | 0.961 | 0.961 | 0.973 | 0.995 | 0.965 |
| W5 | 0.963 | 0.987 | 0.978 | 0.994 | 1 | 0.976 | 0.973 | 0.967 | 0.982 | 0.989 | 0.983 |
| W6 | 0.975 | 0.968 | 0.97 | 0.966 | 0.976 | 1 | 0.969 | 0.979 | 0.978 | 0.965 | 0.975 |
| W7 | 0.986 | 0.99 | 0.978 | 0.961 | 0.973 | 0.969 | 1 | 0.991 | 0.997 | 0.973 | 0.998 |
| W8 | 0.972 | 0.98 | 0.973 | 0.961 | 0.967 | 0.979 | 0.991 | 1 | 0.993 | 0.969 | 0.992 |
| W9 | 0.995 | 0.991 | 0.985 | 0.973 | 0.982 | 0.978 | 0.997 | 0.993 | 1 | 0.988 | 0.999 |
| W10 | 0.985 | 0.965 | 0.974 | 0.995 | 0.989 | 0.965 | 0.973 | 0.969 | 0.988 | 1 | 0.979 |
| 对照 | 0.992 | 0.994 | 0.984 | 0.965 | 0.983 | 0.975 | 0.998 | 0.992 | 0.999 | 0.979 | 1 |

### 2.2 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

#### 2.2.1 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的测定

分别取湖北马鞍ft制药生产的10批不同批次的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品各

2g，精密称定，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“1.2.3”项下色谱条件测定，记录各共有峰峰面积。不同批次样品以10号峰峰面积值作为参照，计算各共有峰相对峰面积积分值。结果见表1-11。

表1-11 湖北马鞍ft产不同生产批次杞菊地黄丸样品相对保留峰面积计算结果

| 共有峰  编号 |  |  |  |  | 样品编号 | |  |  |  |  | RSD  （%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 | M18 | M19 | M20 |
| 1 | 4.5947 | 2.5190 | 3.6463 | 2.5412 | 3.7515 | 1.0806 | 4.7539 | 3.2543 | 4.9755 | 4.4332 | 42.06 |
| 2 | 1.2705 | 0.5169 | 1.2373 | 0.5405 | 1.1431 | 0.9849 | 1.0465 | 0.5169 | 1.2630 | 1.1997 | 39.4 |
| 3 | 1.7866 | 0.9921 | 1.8281 | 1.0357 | 1.8663 | 3.1203 | 1.6018 | 0.9760 | 1.8036 | 1.7745 | 30.29 |
| 4 | 0.6734 | 0.1710 | 0.8825 | 0.1793 | 0.6759 | 0.7574 | 0.7380 | 0.2060 | 0.9752 | 0.8236 | 52.92 |
| 5 | 0.2572 | 0.1265 | 0.2659 | 0.1328 | 0.2849 | 0.2208 | 0.2778 | 0.1473 | 0.2847 | 0.2867 | 35.65 |
| 6 | 1.0871 | 1.1683 | 1.1542 | 1.2028 | 1.3328 | 2.6745 | 1.1085 | 1.1911 | 1.2062 | 1.1728 | 19.42 |
| 7 | 0.1168 | 0.1502 | 0.1567 | 0.1648 | 0.1597 | 0.4964 | 0.1298 | 0.1583 | 0.1645 | 0.1672 | 37.41 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 8 | 1.0225 | 0.9809 | 1.1546 | 1.0159 | 1.0942 | 1.2227 | 1.0733 | 0.9831 | 0.9831 | 0.9731 | 15.06 |  |
|  | 9 | 0.4311 | 0.7429 | 0.8660 | 0.7234 | 0.4905 | 1.5549 | 0.4774 | 0.7990 | 0.8299 | 0.8154 | 27.57 |  |
|  | 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 15.16 |  |
|  | 11 | 0.2982 | 0.3102 | 0.2975 | 0.3296 | 0.3719 | 0.3470 | 0.2885 | 0.2904 | 0.2968 | 0.2881 | 11.84 |  |
|  | 12 | 0.1719 | 0.1936 | 0.1995 | 0.2060 | 0.2147 | 0.3877 | 0.1643 | 0.2120 | 0.2200 | 0.2118 | 13.02 |  |
|  | 13 | 0.6760 | 0.7017 | 0.7032 | 0.7035 | 0.8069 | 0.6950 | 0.8244 | 0.6636 | 0.6799 | 0.6692 | 18.93 |  |
|  | 14 | 2.2114 | 2.2550 | 2.2613 | 2.3665 | 2.0808 | 1.7399 | 1.7060 | 2.2235 | 2.2735 | 2.2166 | 17.81 |  |

#### 2.2.2 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

将所得10批不同批次的杞菊地黄丸指纹图谱数据输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2004A版）”中，得到各样品的HPLC色谱叠加图，如图1-6所示。以相对峰面积为变量，按中位数法生成对照指纹图谱，如图1-7所示。



图1-6 10批湖北马鞍ft产杞菊地黄丸样品HPLC色谱叠加图

（从下至上依次为M11、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M20 号

样品）



图1-7 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸HPLC色谱指纹图谱共有模式

#### 2.2.3 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸指纹图谱指纹图谱相似度计算

本试验利用相关系数法对10批不同生产批号的杞菊地黄丸样品进行了相似度计算，结果见表1-12。

表1-12 湖北马鞍ft产杞菊地黄丸不同批次样品相似度计算表

|  | M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 | M18 | M19 | M20 | 对照 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M11 | 1 | 0.989 | 0.993 | 0.891 | 0.895 | 0.892 | 0.894 | 0.836 | 0.841 | 0.839 | 0.979 |
| M12 | 0.989 | 1 | 0.991 | 0.894 | 0.895 | 0.894 | 0.894 | 0.842 | 0.84 | 0.839 | 0.971 |
| M13 | 0.993 | 0.991 | 1 | 0.891 | 0.896 | 0.896 | 0.893 | 0.838 | 0.835 | 0.841 | 0.981 |
| M14 | 0.891 | 0.894 | 0.891 | 1 | 0.989 | 0.991 | 0.992 | 0.861 | 0.861 | 0.862 | 0.965 |
| M15 | 0.895 | 0.895 | 0.896 | 0.989 | 1 | 0.992 | 0.989 | 0.859 | 0.862 | 0.861 | 0.972 |
| M16 | 0.892 | 0.894 | 0.896 | 0.991 | 0.992 | 1 | 0.991 | 0.863 | 0.861 | 0.859 | 0.975 |
| M17 | 0.894 | 0.894 | 0.893 | 0.992 | 0.989 | 0.991 | 1 | 0.861 | 0.859 | 0.86 | 0.961 |
| M18 | 0.836 | 0.842 | 0.838 | 0.861 | 0.859 | 0.863 | 0.861 | 1 | 0.989 | 0.992 | 0.971 |
| M19 | 0.841 | 0.84 | 0.835 | 0.861 | 0.862 | 0.861 | 0.859 | 0.989 | 1 | 0.991 | 0.97 |
| M20 | 0.839 | 0.839 | 0.841 | 0.862 | 0.861 | 0.859 | 0.86 | 0.992 | 0.991 | 1 | 0.978 |
| 对照 | 0.979 | 0.971 | 0.981 | 0.965 | 0.972 | 0.975 | 0.961 | 0.971 | 0.97 | 0.978 | 1 |

### 2.3 北京同仁堂产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

#### 2.3.1 河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱的测定

分别取北京同仁堂制药生产的10批不同批次的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品各

2g，精密称定，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“1.2.3”项下色谱条件测定，记录各共有峰峰面积。不同批次样品以9号峰峰面积值作为参照，计算各共有峰相对峰面积积分值。结果见表1-13。

表1-13 北京同仁堂产不同生产批次杞菊地黄丸样品相对保留峰面积计算结果

| 共有峰  编号 |  |  |  |  | 样品编号 | |  |  |  |  | RSD  （%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| T21 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 |
| 1 | 3.2272 | 5.5905 | 5.0234 | 5.1470 | 4.1961 | 4.6894 | 4.0598 | 4.3493 | 4.2496 | 4.4530 | 17.85 |
| 2 | 0.6924 | 1.1406 | 1.0044 | 0.9881 | 0.9173 | 0.9740 | 0.9399 | 1.0184 | 0.8377 | 0.8849 | 13.87 |
| 3 | 0.6499 | 0.8710 | 0.7625 | 0.7685 | 0.7341 | 0.7433 | 0.8084 | 0.8816 | 0.7372 | 0.8266 | 9.34 |
| 4 | 1.4918 | 2.2664 | 1.9272 | 1.2861 | 1.1822 | 1.2870 | 1.3094 | 1.5119 | 1.1323 | 1.1657 | 22.34 |
| 5 | 0.2086 | 0.2907 | 0.2432 | 0.2654 | 0.2568 | 0.2568 | 0.2639 | 0.2904 | 0.2127 | 0.2358 | 9.66 |
| 6 | 1.6027 | 2.2518 | 1.6830 | 1.9087 | 1.6672 | 1.6672 | 1.7765 | 2.0944 | 1.6368 | 1.8792 | 8.52 |
| 7 | 0.2267 | 0.2547 | 0.2227 | 0.2151 | 0.2174 | 0.2174 | 0.2412 | 0.2889 | 0.1969 | 0.2258 | 4.08 |
| 8 | 1.0447 | 1.3183 | 1.0200 | 1.1535 | 1.0470 | 1.1246 | 1.0208 | 1.1913 | 0.9421 | 0.9812 | 9.76 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9 | 0.0734 | 0.0844 | 0.0713 | 0.0724 | 0.0640 | 0.0729 | 0.0816 | 0.0880 | 0.0646 | 0.0684 | 3.87 |
| 10 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 11.36 |
| 11 | 1.2152 | 1.4802 | 1.1803 | 1.2178 | 1.0999 | 1.1807 | 1.3274 | 1.4990 | 1.0979 | 1.1104 | 3.66 |
| 12 | 0.2677 | 0.3321 | 0.2261 | 0.2334 | 0.1938 | 0.2130 | 0.3734 | 0.3860 | 0.1953 | 0.2020 | 16.62 |
| 13 | 0.1815 | 0.2479 | 0.2215 | 0.1954 | 0.1789 | 0.2002 | 0.2215 | 0.3000 | 0.2434 | 0.2549 | 13.34 |
| 14 | 0.2415 | 0.3533 | 0.2542 | 0.2620 | 0.3052 | 0.2636 | 0.2965 | 0.3212 | 0.2782 | 0.2879 | 11.26 |
| 15 | 0.1007 | 0.0962 | 0.0836 | 0.0867 | 0.0933 | 0.0866 | 0.1082 | 0.1124 | 0.0991 | 0.1196 | 12.83 |
| 16 | 0.4569 | 0.6228 | 0.5010 | 0.5165 | 0.4702 | 0.5074 | 0.5021 | 0.5021 | 0.4638 | 0.4634 | 7.88 |
| 17 | 1.7299 | 3.0937 | 2.5112 | 2.5993 | 2.3646 | 2.5556 | 2.2617 | 2.2617 | 2.3999 | 2.5121 | 15.59 |
| 18 | 0.0435 | 0.0540 | 0.1791 | 0.1873 | 0.1731 | 0.1785 | 0.2239 | 0.2239 | 0.1738 | 0.1935 | 38.63 |

#### 2.3.2 北京同仁堂产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

将所得10批不同批次的杞菊地黄丸指纹图谱数据输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2004A版）”中，得到各样品的HPLC色谱叠加图，如图1-8所示。以相对峰面积为变量，按中位数法生成对照指纹图谱，如图1-9所示。



图1-8 10批北京同仁堂产杞菊地黄丸样品HPLC色谱叠加图

（从下至上依次为T21、T22、T23、T24、T25、T26、T27、T28、T29、T30 号样品）



图1-9 北京同仁堂产杞菊地黄丸HPLC色谱指纹图谱共有模式

#### 2.3.3 北京同仁堂产杞菊地黄丸指纹图谱指纹图谱相似度计算

本试验利用相关系数法对10批不同生产批号的杞菊地黄丸样品进行了相似度计算，结果见表1-14。

表1-14 北京同仁堂产杞菊地黄丸不同批次样品相似度计算表

|  | T21 | T22 | T23 | T24 | T25 | T26 | T27 | T28 | T29 | T30 | 对照 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| T21 | 1 | 0.991 | 0.993 | 0.796 | 0.795 | 0.801 | 0.802 | 0.725 | 0.722 | 0.724 | 0.969 |
| T22 | 0.991 | 1 | 0.989 | 0.795 | 0.799 | 0.802 | 0.804 | 0.722 | 0.723 | 0.725 | 0.977 |
| T23 | 0.993 | 0.989 | 1 | 0.798 | 0.797 | 0.802 | 0.805 | 0.731 | 0.729 | 0.727 | 0.977 |
| T24 | 0.796 | 0.795 | 0.798 | 1 | 0.989 | 0.994 | 0.991 | 0.735 | 0.732 | 0.729 | 0.985 |
| T25 | 0.795 | 0.799 | 0.797 | 0.989 | 1 | 0.989 | 0.992 | 0.729 | 0.731 | 0.73 | 0.988 |
| T26 | 0.801 | 0.802 | 0.802 | 0.994 | 0.989 | 1 | 0.99 | 0.728 | 0.73 | 0.732 | 0.986 |
| T27 | 0.802 | 0.804 | 0.805 | 0.991 | 0.992 | 0.99 | 1 | 0.729 | 0.727 | 0.731 | 0.99 |
| T28 | 0.725 | 0.722 | 0.731 | 0.735 | 0.729 | 0.728 | 0.729 | 1 | 0.994 | 0.991 | 0.989 |
| T29 | 0.722 | 0.723 | 0.729 | 0.732 | 0.731 | 0.73 | 0.727 | 0.994 | 1 | 0.992 | 0.985 |
| T30 | 0.724 | 0.725 | 0.727 | 0.729 | 0.73 | 0.732 | 0.731 | 0.991 | 0.992 | 1 | 0.985 |
| 对照 | 0.969 | 0.977 | 0.977 | 0.985 | 0.988 | 0.986 | 0.99 | 0.989 | 0.985 | 0.985 | 1 |

### 2.4 不同生产厂家产杞菊地黄丸指纹图谱的建立

#### 2.4.1 不同生产厂家产杞菊地黄丸指纹图谱的测定

分别取上述不同生产厂家生产的30批不同批次的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品各2g，精密称定，按照“1.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“1.2.3”项下色谱条件测定。将此30批样品的指纹图谱数据输入到“中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2004A版）”中，得到各样品的HPLC色谱叠加图，如图1-10所示。以相对峰面积为变量，按中位数法生成对照指纹图谱，如图1-5所示。



图1-10 三个不同生产厂家产杞菊地黄丸样品HPLC色谱叠加图



图1-11 三个不同生产厂家产杞菊地黄丸HPLC色谱指纹图谱共有模式

## **3** 讨论与小结

### 3.1 讨论

#### 3.1.1 提取溶剂的考察

在选择提取溶剂时，本实验主要从以下三方面考虑：

（1）杞菊地黄丸中的指标性成分丹皮酚易溶于乙醇和甲醇中；马钱苷几乎不溶于乙酸乙酯、氯仿、丙酮等溶剂，在水中却极易溶解，因此在实验之初采用了乙醇水溶液和甲醇水溶液进行考察。试验中发现，乙醇溶液提取物所得图谱色谱峰比甲醇溶液多，可能是因为甲醇溶液极性更强，样品中的弱极性成分溶解过少所致。

（2）杞菊地黄丸（浓缩丸）在生产过程中，使用了水煎煮和乙醇溶液提取。根据“相似相容”原理，为了能尽量提取出更多的物质，应该使用乙醇的水溶液。

（3）考虑到实验的绿色环保，乙醇溶液更优于甲醇溶液。因此本实验采用乙醇溶液提取。

综上所述，通过对不同比例乙醇溶液的考察，确定使用75%乙醇作为实验的提取溶剂。

#### 3.1.2 提取方法的选择

本实验考察75%乙醇作为提取溶剂，用超声和水浴回流两种提取方法进行试验。结果显示超声提取所得色谱峰比回流所得色谱峰多、峰面积更大。因此采用超声提取法作为供试品溶液的提取方法。试验中也对超声时间（30min、45min、60min）、超声功率（40HZ、60HZ、80HZ）、溶剂用量（15mL、30mL、40mL）进行考察，发现超声功率对色谱峰影响不大，而超声时间为60min和溶剂用量为40mL

时，色谱峰最多，色谱图最具特征性，因此选择用40mL的75%乙醇超声提取60min

作为样品的提取方法。

#### 3.1.3 流动相的选择

为了取得尽可能多的组分峰和比较满意的分离，本试验选用多种流动相梯度洗脱系统进行洗脱。首先选用了乙腈-水系统、甲醇-水系统不同组成比例的梯度洗脱，结果发现，乙腈-水系统作为流动相时色谱峰分离效果比甲醇-水作为流动相峰的分离效果好，所得组分峰多，且基线较为平稳；图谱中个别峰的分离效果不佳，在水相中加入0.1%的冰乙酸调节后，色谱峰的分离度得到明显改善。最后确定流动相洗脱系统为乙腈-0.1%冰乙酸水溶液梯度洗脱75min。

#### 3.1.4 检测波长的选择

本实验采用二极管阵列紫外检测器作为检测器。首先在上述色谱条件下采用全波长扫描进行测定，并同时在200～400nm下采集其三维色谱图，通过对三维色谱图在所有波长下的出峰的情况、基线的平稳程度，以及各成分的分离情况等因素综合考虑，最终选定检测波长为236nm。

### 3.2 小结

（1）本实验尝试着为杞菊地黄丸建立一种符合其质量检测要求的指纹图谱方法。在实验中，通过对样品不同提取方法、不同提取溶剂、不同色谱条件等的考察，最终确定了杞菊地黄丸高效液相指纹图谱分析方法。实验结果表明，该方法专属性强，可以作为杞菊地黄丸质量评价手段。

（2）对于河南宛西制药有限公司产样品，建立了河南宛西产杞菊地黄丸指纹图谱。从10批样品的整体来看，各样品共有峰的相对保留时间严格一致，各个共有峰的相对峰面积变化也趋于一致，相似度都达到0.96以上，不同批次的杞菊地黄丸样品有较好的一致性，利用相似度评价不能有效区分出不同生产批次的杞菊地黄丸。产生这种结果的原因，一是因为河南宛西制药使用的原药材均来自道地产区，药材种植规范，药品生产工艺稳定，二是实验中使用的是同一年生产的药品，样品不具有足够的差异性。

（3）对于湖北马鞍ft产杞菊地黄丸，我们收集了三个不同生产年份（2010年、2011年、2012年）的样品。通过对比其不同生产年份样品的指纹图谱数据来看，在指纹图谱中某些色谱峰的含量变化较大，如1号共有峰，2012 年

样品面积平均值4359明显大于其他两个年份的平均值2267。可以认为2012

年样品在1号峰对应的物质含量大于其他年份生产的样品。同样对于北京同

仁堂生产的杞菊地黄丸，在收集到的3个不同生产年份（2009年、2010年、

2012年）的样品中，2009年产样品4号峰的峰面积明显高于其他生产年份；

而2012年产样品7号峰的峰面积要高于其他两个生产年份。之所以会产生这样的结果，我们推测可能是样品生产工艺的改变或者原药材的不同造成。

（4）对于不同生产厂家的杞菊地黄丸，本实验以河南宛西、湖北马鞍ft、北京同仁堂产杞菊地黄丸为例，建立了不同生产厂家的杞菊地黄丸指纹图谱。通过对比不同生产厂家样品指纹图谱的共有模式，可以明显看出不同厂家样品的差异：如，湖北马鞍ft产样品中，有一个明显的4号峰，其他生

产厂家样品中则没有；河南宛西产样品中有12 号、15 号、16 号三个特有

峰；北京同仁堂产样品有12号、18号两个特有峰，与湖北马鞍ft产样品共

有7号峰。除了这些差异，三家样品的相似度很高，三个不同厂家的样品总体相似，但又有些差异，这说明本实验所采用的方法合理，具有很强的准确性和可靠性，可用于杞菊地黄丸的定性鉴别。

# 第二部分 近红外光谱技术在河南宛西产杞菊地黄丸定量分 析中的应用

## **1** 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与实验样品

仪器Agilent 1200型高效液相色谱仪美国安捷伦科技公司配有四元泵

标准自动进样器

DAD检测器

Chemstation色谱工作站

Nicolet 6700傅立叶变换近红外光谱仪美国赛默飞世尔科技公司配有漫反射积分球附件

OMNIC光谱采集软件

TQ8.0分析软件

Bruker MPA傅里叶变换近红外仪德国布鲁克光谱仪器公司配有OPUS分析软件

HS-6150超声波清洗仪昆ft市超声仪器有限公司 METTLER AE240型电子天平瑞士梅特勒-托利多公司WND-200A型中药粉碎机浙江省兰溪市伟能达电器公司Milli-Q Academic A10超纯水机美国Millipore公司

试剂丹皮酚对照品（110708-200506） 中国药品生物制品检定所马钱苷对照品（11640-201005） 中国药品生物制品检定所甲醇（色谱纯）美国Tedia

乙腈（色谱纯）美国Tedia

磷酸天津科密欧化学试剂开发中心

实验样品96份杞菊地黄丸（浓缩丸）样品由河南宛西制药公司提供。粉碎后过

65目药典筛备用。96份杞菊地黄丸编号与生产批号如下表所示。

表2-1 96份杞菊地黄丸编号与生产批号

| 样品号 | 生产批号 | 样品号 | 生产批号 | 样品号 | 生产批号 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 20100353 | 33 | 20100387 | 65 | 20100508 |
| 2 | 20100354 | 34 | 20100388 | 66 | 20100516 |
| 3 | 20100355 | 35 | 20100389 | 67 | 20100517 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 4 | 20100356 | 36 | 20100390 | 68 | 20100521 |  |
|  | 5 | 20100357 | 37 | 20100391 | 69 | 20100522 |  |
|  | 6 | 20100357 | 38 | 20100392 | 70 | 20100526 |  |
|  | 7 | 20100358 | 39 | 20100393 | 71 | 20100533 |  |
|  | 8 | 20100359 | 40 | 20100394 | 72 | 20100537 |  |
|  | 9 | 20100360 | 41 | 20100395 | 73 | 20100539 |  |
|  | 10 | 20100361 | 42 | 20100396 | 74 | 20100546 |  |
|  | 11 | 20100362 | 43 | 20100397 | 75 | 20100549 |  |
|  | 12 | 20100363 | 44 | 20100398 | 76 | 20100550 |  |
|  | 13 | 20100364 | 45 | 20100399 | 77 | 20100551 |  |
|  | 14 | 20100365 | 46 | 201003101 | 78 | 20110054 |  |
|  | 15 | 20100366 | 47 | 201003102 | 79 | 20100560 |  |
|  | 16 | 20100367 | 48 | 201003103 | 80 | 20100561 |  |
|  | 17 | 20100368 | 49 | 201003109 | 81 | 20100579 |  |
|  | 18 | 20100373 | 50 | 201003100 | 82 | 20100582 |  |
|  | 19 | 20100374 | 51 | 201003111 | 83 | 20100609 |  |
|  | 20 | 20100375 | 52 | 20100466 | 84 | 2.01E+08 |  |
|  | 21 | 20100376 | 53 | 20100467 | 85 | 20100586 |  |
|  | 22 | 20100369 | 54 | 20100469 | 86 | 20100612 |  |
|  | 23 | 20100370 | 55 | 20100471 | 87 | 20100614 |  |
|  | 24 | 20100371 | 56 | 20100472 | 88 | 20100616 |  |
|  | 25 | 20100372 | 57 | 20100477 | 89 | 20100617 |  |
|  | 26 | 20100375 | 58 | 20100481 | 90 | 20100622 |  |
|  | 27 | 20100377 | 59 | 20100482 | 91 | 20100624 |  |
|  | 28 | 20100379 | 60 | 20100486 | 92 | 20100627 |  |
|  | 29 | 20100381 | 61 | 20100489 | 93 | 20100628 |  |
|  | 30 | 20100383 | 62 | 20100490 | 94 | 20100630 |  |
|  | 31 | 20100385 | 63 | 20100494 | 95 | 20100632 |  |
|  | 32 | 20100386 | 64 | 20100503 | 96 | 20100633 |  |

### 1.2 NIR图谱的采集

将96份杞菊地黄丸样品粉碎，过60目筛，取约10g粉末放入石英样品杯中，混合均匀，以空气为参比，按下述实验条件进行扫描：

测样方式：积分球漫反射，分辨率：8cm-1



光谱采集范围：12000～4000cm-1扫描次数：32次

温度：（20±1）℃相对湿度：35～37％

每个样品重复扫描3次，求平均光谱，96份杞菊地黄丸样品的近红外光谱叠加见图2-1。



图2-1 96份杞菊地黄丸近红外光谱图

## **2** 杞菊地黄丸中指标性成分的含量测定**[33]**

### 2.1 杞菊地黄丸（浓缩丸）中水分的含量测定

依据2010版《中国药典》一部附录IX H水分测定法中第二法“甲苯法”对杞菊地黄丸（浓缩丸）进行水分测定。

#### 2.1.2 样品制备

取各杞菊地黄丸（浓缩丸）样品，粉碎成可通过60目筛的粉末，备用。

#### 2.1.3 水分的测定

取各杞菊地黄丸（浓缩丸）粉末约15g，精密称定，装入水分测定仪的圆底烧瓶中（见图2-2），加甲苯200mL，加入几块干燥、洁净的沸石，将仪器各部分连接，自冷凝管顶端加入甲苯，至充B管的狭细部分。将A瓶置电热套中缓缓加热，待甲苯开始沸腾时，调节温度，使每秒钟馏出2滴。待水分完全馏出，即测定管刻度部分的水量不再增加时，将冷凝管内部先用甲苯冲洗，再用饱蘸甲苯的长刷或其他适宜的方法，将管壁上附着的水滴推下，继续蒸馏5min，放冷至室温，拆卸装置，如有水粘附在B管的管壁

上，可用蘸甲苯的铜丝推下，放置，使水分与甲苯完全分离。检读水量，并计算各杞菊地黄丸（浓缩丸）样品中的含水量（%），每个样品的测定结果为2次测定平均值。结果见表2-2。

表2-2 96份杞菊地黄丸水分含量

| 样品号 | 水分含量（%） | 样品号 | 水分含量（%） | 样品号 | 水分含量（%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 6.01 | 33 | 6.67 | 65 | 6.64 |
| 2 | 5.87 | 34 | 6.51 | 66 | 6.62 |
| 3 | 6.4 | 35 | 6.46 | 67 | 6.73 |
| 4 | 5.93 | 36 | 6.66 | 68 | 6.23 |
| 5 | 6.43 | 37 | 6.03 | 69 | 7.22 |
| 6 | 5.69 | 38 | 6.77 | 70 | 6.21 |
| 7 | 6.21 | 39 | 6.64 | 71 | 6.32 |
| 8 | 5.39 | 40 | 7.79 | 72 | 5.88 |
| 9 | 6.7 | 41 | 6.49 | 73 | 6.32 |
| 10 | 6.92 | 42 | 6.61 | 74 | 6.55 |
| 11 | 7.53 | 43 | 6.58 | 75 | 6.06 |
| 12 | 7.3 | 44 | 6.88 | 76 | 6.55 |
| 13 | 6.79 | 45 | 6.76 | 77 | 6.58 |
| 14 | 6.37 | 46 | 6.36 | 78 | 7.37 |
| 15 | 6.43 | 47 | 7.23 | 79 | 7.51 |
| 16 | 6.74 | 48 | 6.65 | 80 | 7.06 |
| 17 | 6.97 | 49 | 6.42 | 81 | 7.26 |
| 18 | 6.57 | 50 | 6.34 | 82 | 6.75 |
| 19 | 6.73 | 51 | 6.68 | 83 | 6.38 |
| 20 | 6.03 | 52 | 7.5 | 84 | 6.69 |
| 21 | 6.98 | 53 | 7.41 | 85 | 7.43 |
| 22 | 6.44 | 54 | 6.27 | 86 | 7.33 |
| 23 | 6.59 | 55 | 6.65 | 87 | 6.44 |
| 24 | 6.35 | 56 | 6.56 | 88 | 5.92 |
| 25 | 6.47 | 57 | 7.17 | 89 | 6.92 |
| 26 | 5.83 | 58 | 7.31 | 90 | 7.33 |
| 27 | 6.31 | 59 | 6.68 | 91 | 7.15 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 28 | 6.45 | 60 | 6.56 | 92 | 6.25 |  |
|  | 29 | 7.32 | 61 | 7.43 | 93 | 6.84 |  |
|  | 30 | 6.46 | 62 | 6.33 | 94 | 6.73 |  |
|  | 31 | 6.56 | 63 | 6.47 | 95 | 6.84 |  |
|  | 32 | 6.74 | 64 | 6.32 | 96 | 6.13 |  |

### 2.2 杞菊地黄丸中丹皮酚含量HPLC分析

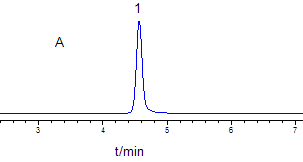
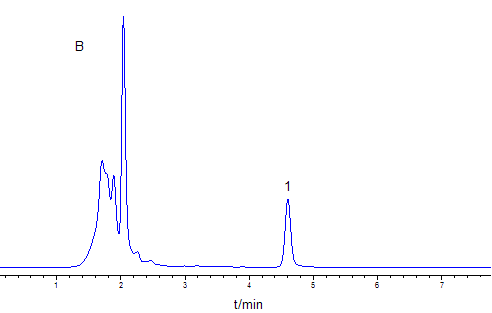
#### 2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取丹皮酚对照品1.91mg，加甲醇制成每1ml含丹皮酚191μg的溶液。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

取杞菊地黄丸粉末约0.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入70%甲醇50ml，密塞，称定重量，超声处理（功率220W，频率25KHz）45分钟，放冷，再称定重量，用70%甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

#### 2.2.3 色谱条件的选择



依利特Betasil C18色谱柱（200 mm×4.6mm, 5µm）；流动相为甲醇：水（70: 30）等度洗脱；流速1.0ml/min；柱温30℃；进样体积10μl；检测波长274 nm。以上述色谱条件，丹皮酚和其他组分色谱峰分离度良好，如图2-3所示。

2.2.4线形关系考察

A-对照品；B-样品；1-丹皮酚图2-3 杞菊地黄丸HPLC图谱

将2.2.1项下的对照品溶液稀释成186μg/ml、148.8μg/ml、111.6μg/ml、74.4

μg/ml和37.2μg/ml的溶液，按照2.4.3项下的色谱条件，精密吸取10μl，分别注入高效液相色谱仪，以峰面积积分值y为纵坐标，丹皮酚浓度x（μg/ml）为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程y = 43.631x - 90.737，相关系数R2=0.9991。结果表明，丹皮酚在1860～372μg范围内呈良好的线性关系，如图2-4所示。



2.2.5精密度试验

图2-4 丹皮酚标准曲线图

精密吸取丹皮酚186μg/ml对照品溶液10μL，重复进样6次，测定峰面积，其相对标准偏差RSD值为0.09 %，结果见表2-3。

表2-3 丹皮酚含量测定精密度试验（n=6）

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 丹皮酚峰面积 | 8024.85498 | 8022.25756 | 8007.4689 | 8011.4673 | 8020.4936 | 8009.8674 | 0.10 |

#### 2.2.6 重复性试验

分别称取21号样品6份，各1g，精密称定，按照2.2.2项下制备方法制备 6

份供试品溶液，分别精密吸取10 μL 进样，测定丹皮酚含量，其相对标准偏差

RSD值为0.68 %，由此可见采用本方法测定丹皮酚含量，重复性良好，结果见表2-4。

表2-4 丹皮酚含量测定重复性试验（n=6）

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 丹皮酚含量（%） | 2.02 | 1.99 | 2.02 | 2.01 | 2.01 | 2.03 | 0.68 |

#### 2.2.7 稳定性试验

取61号样品0.5g，精密称定，按照2.2.2项下制备方法制备供试品溶液，精密吸取10μL，分别在0h，2h，4h，8h，12h，24h进样，其峰面积相对标准偏差RSD值为0.45 %，结果表明丹皮酚在24小时内稳定性良好，结果见表2-5。

表2-5 丹皮酚含量测定稳定性试验（n=6）

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 丹皮酚峰面积 | 981.34387 | 985.92675 | 976.16493 | 973.27598 | 977.59751 | 979.71594 | 0.45 |

#### 2.2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品6份，各0.25g，精密称定，加入丹皮酚对照品适量， 按照2.4.2项下供试品制备方法制备供试品溶液，分别精密吸取10μL进样，测定丹皮酚含量，计算回收率，得平均回收率为99.75%, RSD值为1.01%，结果表明该方法准确可靠，见表2-6。

表2-6 丹皮酚含量测定加样回收试验（n=6）

| 样品量 | 样 品 含 | 量 | 丹 皮 酚 加 | 测 得 总 量 | 回收率 | 平均回收 | RSD |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| （g） | （mg） |  | 入量（mg） | （mg） | （%） | 率（%） | （%） |
| 0.2513 | 1.98 |  | 1.66 | 2.14 | 99.16 |  |  |
| 0.2489 | 1.93 |  | 1.66 | 2.14 | 100.15 |  |  |
| 0.2495  0.2493 | 1.93  1.94 |  | 1.35  1.35 | 1.82  1.81 | 99.87  98.87 | 99.75 | 1.01 |
| 0.2505 | 1.95 |  | 1.11 | 1.62 | 101.06 |  |  |
| 0.2511 | 1.96 |  | 1.11 | 1.61 | 99.78 |  |  |

#### 2.2.9 样品中丹皮酚含量测定

精密称取杞菊地黄丸粉末约1g，按照2.2.2项下制成供试品溶液，精密吸取供试品溶液10ul进样，以保留时间定性，峰面积定量，外标法计算。每份样品平行作三次求平均值，96份样品丹皮酚含量范围为1.89mg/g～3.14mg/g，如表2-7所示。

表2-7 96份杞菊地黄丸中丹皮酚含量

| 样品号 | 丹 皮 酚 含 量  （mg/g) | 样品号 | 丹皮酚含量(mg/g) | 样品号 | 丹皮酚含量(mg/g) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2.19 | 33 | 2.72 | 65 | 2.41 |
| 2 | 2.03 | 34 | 2.70 | 66 | 2.30 |
| 3 | 2.11 | 35 | 2.66 | 67 | 2.39 |
| 4 | 2.26 | 36 | 2.63 | 68 | 2.17 |
| 5 | 2.34 | 37 | 2.79 | 69 | 2.17 |
| 6 | 2.16 | 38 | 2.86 | 70 | 2.23 |
| 7 | 2.40 | 39 | 2.96 | 71 | 2.39 |
| 8 | 2.28 | 40 | 2.73 | 72 | 2.17 |
| 9 | 2.40 | 41 | 2.69 | 73 | 2.24 |
| 10 | 2.39 | 42 | 2.73 | 74 | 2.16 |
| 11 | 2.29 | 43 | 2.81 | 75 | 2.23 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 12 | 2.32 | 44 | 2.40 | 76 | 2.26 |  |
|  | 13 | 2.25 | 45 | 2.95 | 77 | 2.27 |  |
|  | 14 | 2.44 | 46 | 2.68 | 78 | 2.24 |  |
|  | 15 | 2.41 | 47 | 2.61 | 79 | 2.24 |  |
|  | 16 | 2.38 | 48 | 2.70 | 80 | 2.20 |  |
|  | 17 | 2.39 | 49 | 3.13 | 81 | 2.12 |  |
|  | 18 | 2.35 | 50 | 2.29 | 82 | 2.15 |  |
|  | 19 | 2.42 | 51 | 2.13 | 83 | 2.11 |  |
|  | 20 | 2.44 | 52 | 1.89 | 84 | 2.16 |  |
|  | 21 | 2.02 | 53 | 2.05 | 85 | 2.11 |  |
|  | 22 | 2.26 | 54 | 2.18 | 86 | 2.17 |  |
|  | 23 | 2.33 | 55 | 2.13 | 87 | 2.01 |  |
|  | 24 | 2.30 | 56 | 2.01 | 88 | 2.11 |  |
|  | 25 | 2.42 | 57 | 2.06 | 89 | 1.91 |  |
|  | 26 | 2.30 | 58 | 1.98 | 90 | 2.08 |  |
|  | 27 | 2.24 | 59 | 2.05 | 91 | 2.03 |  |
|  | 28 | 2.39 | 60 | 2.09 | 92 | 2.13 |  |
|  | 29 | 2.64 | 61 | 2.28 | 93 | 2.00 |  |
|  | 30 | 2.76 | 62 | 2.06 | 94 | 2.02 |  |
|  | 31 | 2.68 | 63 | 2.27 | 95 | 2.01 |  |
|  | 32 | 2.97 | 64 | 2.20 | 96 | 3.14 |  |

### 2.3 杞菊地黄丸中马钱苷的含量测定

#### 2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取马钱苷对照品2.56mg，加甲醇制成每1ml含丹皮酚256μg的溶液。

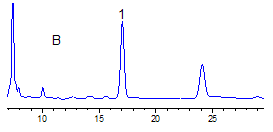
#### 2.3.2 杞菊地黄丸供试品溶液的制备

取本品适量，研碎，取约1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入50％甲醇25ml，密塞，称定重量，加热回流1小时，放冷，再称定重量，用50％甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液10ml，加在中性氧化铝柱（100～200目, 4g, 内径为1cm）上，用40％甲醇50ml洗脱，收集流出液与洗脱液，蒸干，残渣用50％甲醇溶解，转移至5ml量瓶中，加50％甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

#### 2.3.3 色谱条件

依利特Betasil C18色谱柱（200 mm×4.6mm, 5µm）；流动相为甲醇-乙腈-0.1％

磷酸溶液（5: 9: 86）等度洗脱；流速1.0ml/min；柱温30℃；进样体积10μL；检测波长236nm。以上述色谱条件，所得杞菊地黄丸（浓缩丸）HPLC图谱如图2-5所示。



2.3.4线形关系考察

A．对照品；B.样品；1.马钱苷

图2-5 杞菊地黄丸的HPLC 图

将2.3.1项下的对照品溶液稀释成256μg/mL、204.8g/mL、153.6μg/mL、

102.4μg/mL和51.2μg/mL的溶液，按照2.3.3项下的色谱条件，精密吸取10μL，分别注入高效液相色谱仪，以峰面积积分值y为纵坐标，马钱苷浓度x（μg/mL）为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程y =43.631x-90.737，相关系数R2=0.999。结果表明，马钱苷在2560～512μg范围内呈良好的线性关系，如图2-6所示。



2.3.5精密度试验

图2-6 马钱苷标准曲线图

精密吸取马钱苷256μg/mL对照品溶液10μL，重复进样6次，测定峰面积，其相对标准偏差RSD值为0.12%，结果见表2-8。

表2-8 马钱苷含量测定精密度试验（n=6）

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 马钱苷峰面积 | 4938.4589 | 4937.1235 | 4926.7561 | 4939.4288 | 4930.4583 | 4925.1573 | 0.12 |

#### 2.3.6 重复性试验

分别称取77号样品6份，各1g，精密称定，按照2.3.2项下制备方法制备6份供试品溶液，分别精密吸取10μL进样，测定马钱苷含量，其相对标准偏差RSD值为0.75 %，由此可见采用本方法测定马钱苷含量，重复性良好，结果见表2-9。

表2-9 马钱苷含量测定重复性试验（n=6）

| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 马钱苷含量（mg/g） | 1.41 | 1.39 | 1.38 | 1.39 | 1.40 | 1.41 | 0.75 |

#### 2.3.7 稳定性试验

取30号样品1g，精密称定，按照2.3.2项下制备方法制备供试品溶液，精密吸取10μL，分别在0h，2h，4h，8h，12h，24h进样，其峰面积相对标准偏差

RSD值为0.10 %，结果表明马钱苷在24小时内稳定性良好，结果见表2-10。表2-10马钱苷含量测定稳定性试验（n=6）

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD(%) |
| 马钱苷峰面积 | 1179.8154 | 1150.1576 | 1161.5684 | 1169.1566 | 1176.1563 | 1177.5935 | 0.10 |

#### 2.3.8 加样回收率试验

取已知含量的35号样品6份，各0.5g，精密称定，加入马钱苷对照品适量， 按照

#### 2.3.2 项下供试品制备方法制备供试品溶液,分别精密吸取10μL进样，测定马钱苷含量,计算回收率，得平均回收率为100.01%，RSD值为0.19%，结果表明该方法准确可靠，见表2-11。

表2-11 马钱苷含量测定加样回收试验（n=6）

| 样品量 | 样品含量 | 马钱苷加入 | 测 得 总 量 | 回收率 | 平 均 回 | RSD |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| （g） | （mg） | 量（mg） | （mg） | （%） | 收率（%） | （%） |
| 0.5149 | 1.49 | 1.38 | 2.15 | 100.23 |  |  |
| 0.4976 | 1.48 | 1.38 | 2.12 | 100.05 |  |  |
| 0.4953  0.4989 | 1.48  1.49 | 1.38  1.38 | 2.11  2.12 | 99.92  99.75 | 100.01 | 0.19 |
| 0.5051 | 1.47 | 1.38 | 2.13 | 100.17 |  |  |
| 0.5079 | 1.48 | 1.38 | 2.14 | 100.21 |  |  |

#### 2.3.9 马钱苷的含量测定

精密称取上述杞菊地黄丸粉末各约1g，按照2.3.2项下制成供试品溶液，精密吸取供试品溶液10uL进样，以保留时间定性，峰面积定量，外标法计算。每份样品平行作三次求平均值，96份样品马钱苷含量范围为1.18mg/g～1.85mg/g，如表2-12所示。

表2-12 96份杞菊地黄丸中马钱苷含量

| 样 品  号 | 马钱苷含  量(mg/g) | 样品号 | 马钱苷含  量(mg/g) | 样 品  号 | 马钱苷含  量(mg/g) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1.53 | 33 | 1.40 | 65 | 1.56 |
| 2 | 1.46 | 34 | 1.59 | 66 | 1.59 |
| 3 | 1.45 | 35 | 1.49 | 67 | 1.53 |
| 4 | 1.49 | 36 | 1.51 | 68 | 1.49 |
| 5 | 1.45 | 37 | 1.64 | 69 | 1.50 |
| 6 | 1.47 | 38 | 1.56 | 70 | 1.48 |
| 7 | 1.18 | 39 | 1.70 | 71 | 1.44 |
| 8 | 1.41 | 40 | 1.61 | 72 | 1.54 |
| 9 | 1.33 | 41 | 1.76 | 73 | 1.56 |
| 10 | 1.44 | 42 | 1.79 | 74 | 1.62 |
| 11 | 1.37 | 43 | 1.81 | 75 | 1.51 |
| 12 | 1.35 | 44 | 1.85 | 76 | 1.44 |
| 13 | 1.22 | 45 | 1.62 | 77 | 1.42 |
| 14 | 1.32 | 46 | 1.59 | 78 | 1.70 |
| 15 | 1.36 | 47 | 1.64 | 79 | 1.66 |
| 16 | 1.38 | 48 | 1.64 | 80 | 1.57 |
| 17 | 1.25 | 49 | 1.55 | 81 | 1.56 |
| 18 | 1.33 | 50 | 1.61 | 82 | 1.58 |
| 19 | 1.36 | 51 | 1.55 | 83 | 1.54 |
| 20 | 1.27 | 52 | 1.51 | 84 | 1.50 |
| 21 | 1.61 | 53 | 1.53 | 85 | 1.46 |
| 22 | 1.55 | 54 | 1.54 | 86 | 1.48 |
| 23 | 1.62 | 55 | 1.51 | 87 | 1.45 |
| 24 | 1.63 | 56 | 1.50 | 88 | 1.52 |
| 25 | 1.57 | 57 | 1.67 | 89 | 1.50 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| 26 | 1.64 | 58 | 1.56 | 90 | 1.49 |
| 27 | 1.72 | 59 | 1.41 | 91 | 1.57 |
| 28 | 1.65 | 60 | 1.56 | 92 | 1.43 |
| 29 | 1.71 | 61 | 1.63 | 93 | 1.50 |
| 30 | 1.63 | 62 | 1.44 | 94 | 1.47 |
| 31 | 1.65 | 63 | 1.52 | 95 | 1.42 |
| 32 | 1.53 | 64 | 1.42 | 96 | 1.51 |

## **3** 杞菊地黄丸中各指标性成分近红外模型的建立

### 3.1 杞菊地黄丸水分模型的建立

#### 3.1.1 校正集和验证集的选择

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸（浓缩丸）样品的水分含量分布情况，从96份杞菊地黄丸（浓缩丸）样品中选择77个样品作为校正集，19个样品作为验证集。为使校正集样品更具代表性，验证集样品的水分含量范围应在校正集含量之内，见表2-13。

表2-13 校正集与验证集中水分含量分布

| 样品集 | 样品数 | 最大值(%) | 最小值(%) | 平均值(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 校正集 | 77 | 7.51 | 5.83 | 6.59 |
| 验证集 | 19 | 7.17 | 5.88 | 6.76 |

#### 3.1.2 光谱预处理方法的选择

在用PLS 法建立模型时，根据模型的交叉检验决定系数（R2）、校正均方差

（RMSEC）、交互验证均方差（RMSECV）、预测相关系数（r）、预测均方差（RMSEP）等性能参数来评价模型。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型，相关系数越大、均方差越小，表明所建模型适用性越强、预测效果越好。预处理方法对RMSEC和R2的影响如表2-14所示。通过比较最终确定SNV+ SG+Second Derivative对光谱进行预处理。

表2-14 不同预处理方法对校正模型影响

| 光谱预处理方法 | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- |
| First Derivative + MSC | 0.86534 | 0.154 |
| Second Derivative + MSC | 0.91042 | 0.172 |
| First Derivative + SNV | 0.86542 | 0.563 |
| Second Derivative + SNV | 0.87615 | 0.457 |
| MSC +ND+ First Derivative | 0.67548 | 0.361 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | MSC +ND+ Second Derivative | 0.86475 | 0.154 |  |
|  | MSC + SG+ First Derivative | 0.75684 | 0.0657 |  |
|  | MSC + SG+ Second Derivative | 0.84674 | 0.1067 |  |
|  | SNV +SG+ First Derivative | 0.75968 | 0.248 |  |
|  | SNV +SG+ Second Derivative | 0.98809 | 0.0587 |  |
|  | SNV + ND+ First Derivative | 0.84672 | 0.1011 |  |
|  | SNV + ND+ Second Derivative | 0.89467 | 0.0842 |  |

#### 3.1.3 光谱范围及主因子数的选择

近红外在3700-7500 cm-1范围内主要由倍频和合频峰组成，信号强度高，信息丰富，而纯水中的O-H伸缩振动的一级基频区在1440nm（6944cm-1）附近，它的一个合频区在1940nm（5155cm-1）左右。因此，建模时手动优选最佳波段，辅以R2、RMSECV作为模型性能的评价指标。通过比较，确定4185.67～9022.44cm-1为最佳波段，如表2-15所示。

表2-15 不同建模区间对模型性能的影响

| 光谱处理方法 光谱范围（cm-1） | | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 4185.67～9022.44 | 0.98809 | 0.0587 |
| Second Derivative +SG + SNV | 4185.67～11871.95 | 0.91504 | 0.154 |
| 4185.67～7266.30 | 0.71980 | 0.265 |
|  | 4185.67～7762.78  7887.56～9073.64 | 0.92762 | 0.198 |

本实验采用PLS建立定量分析模型，主成分数对模型的预测能力有非常大的影响。主成分数太多，使模型包含过多的测量噪音，出现过拟合现象，主成分数过少，导致建模信息不全，模型预测能力差。因此，本实验采用内部交叉验证法筛选主成分数，RMSECV值最小时，所选主成分数最佳[40]。如图2-7所示，在此波长范围下，以8个主因子数建模，交互验证均方差RMSECV=0.26405，为最小。水分校正模型的交叉检验决定系数R2=0.98809，校正均方差RMSEC =0.0587, NIR预测值与真实值的相关图见图2-8。由此可见，水分的校正模型性能较好。



图2-7 主因子数对模型RMSECV的影响



图2-8 NIRS预测值与参考值的相关图

#### 3.1.4 NIR定量模型的外部验证

将19份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其水分含量。19份验证集样品的NIR 预测值与甲苯法测得值进行相关分析。水分的预测相关系数

r=0.9969，预测均方差RMSEP=0.0752。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸（浓缩丸）中的水分含量。

#### 3.1.5 未知样品NIR预测值和HPLC测定值的比较

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其水分真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其

水分含量。11份未知样品的NIR预测值与甲苯法测得值进行配对t检验。对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品水分NIR预测值与甲苯法测定值的t检验值为1.254，小于给定值2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中水分的定量分析。

### 3.2 杞菊地黄丸丹皮酚模型的建立

#### 3.2.1 定量模型的建立

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸中丹皮酚含量分布情况，从96样品中随机选取80个有代表性的样品组成校正集，16个样品为验证集，对模型进行内部交叉验证。要保证验证集的丹皮酚含量分布范围在校正集的丹皮酚含量范围之内，如表2所示。在建立模型过程中，对校正集样品建立校正模型，同时作交叉验证，并用验证集样品对模型进行外部验证，最后根据交叉检验决定系数（R2）、校正均方差（RMSEC）、交互验证均方差（RMSECV）、预测相关系数（r）、预测均方差（RMSEP）等性能参数来确定最优校正模型。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型，相关系数越大、均方差越小，表明所建模型适用性越强、预测效果越好。

表2-16 校正集与验证集中丹皮酚含量分布

| 样品集 | 样品数 | 最大值(mg/g) | 最小值(mg/g) | 平均值(mg/g) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 校正集 | 80 | 3.14 | 1.89 | 2.34 |
| 验证集 | 16 | 2.73 | 2.01 | 2.32 |

在建模过程中，首先考察不同的光谱预处理方法对RMSEC和R2的影响，如表2-17所示。通过比较最终确定SNV+ Second Derivative对光谱进行预处理。

表2-17 不同预处理方法对校正模型影响

| 光谱预处理方法 | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- |
| First Derivative + MSC | 0.76895 | 0.156 |
| Second Derivative + MSC | 0.84569 | 0.0914 |
| First Derivative + SNV | 0.89469 | 0.263 |
| Second Derivative + SNV | 0.98089 | 0.0527 |
| MSC +ND+ First Derivative | 0.65475 | 0.351 |
| MSC +ND+ Second Derivative | 0.78956 | 0.238 |
| MSC + SG+ First Derivative | 0.77956 | 0.152 |
| MSC + SG+ Second Derivative | 0.86731 | 0.0946 |
| SNV +SG+ First Derivative | 0.87157 | 0.110 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| SNV +SG+ Second Derivative | 0.88046 | 0.251 |  |
| SNV + ND+ First Derivative | 0.79438 | 0.265 |  |
| SNV + ND+ Second Derivative | 0.76342 | 0.342 |  |

同时优选最佳波段，以R2、RMSECV作为模型性能的评价指标。通过比较，确定7704.20～4013.86cm-1为最佳波段，如表2-18所示。

表2-18 不同建模区间对模型性能的影响

| 光谱处理方法 光谱范围（cm-1） | | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 7704.20～4013.86 | 0.98089 | 0.0527 |
| Second Derivative + SNV | 7713.18～6738.13 | 0.87298 | 0.132 |
| 7244.54～4004.28 | 0.95296 | 0.0822 |
|  | 7327.34～7071.36  5556.83～4022.78 | 0.97065 | 0.0652 |

最终如图2-9所示，以7主因子数建模时，各方面评价指标为最好。丹皮酚校正模型的交叉检验决定系数R2=0.98089，校正均方差RMSEC=0.0527. NIR预测值与真实值的相关图见图2-10。由此可见，丹皮酚的校正模型性能较好。



图2-9 主因子数对模型RMSECV的影响



图2-10 NIRS预测值与参考值的相关图

#### 3.2.2 NIR定量模型的外部验证

将16份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其丹皮酚含量。16份验证集样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行相关分析。丹皮酚的预测相关系数r=0.9976，预测均方差RMSEP=0.0617。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸中丹皮酚含量。

#### 3.2.3 未知样品NIR预测值和HPLC测定值的比较

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其丹皮酚真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其丹皮酚含量。11份未知样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行配对t检验。对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品NIR预测值与药典法测定值的t检验值为1.149，小于给定值2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中丹皮酚成分的定量分析。

### 3.3 杞菊地黄丸马钱苷模型的建立

#### 3.3.1 校正集与验证集的选择

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸中马钱苷含量分布情况，从96样品中随机选取78个有代表性的样品组成校正集，18个样品为验证集，对模型进行内部交叉验证。要保证验证集的马钱苷含量分布范围在校正集的马钱苷含量范围之内，如表2-16所示。

表2-16 校正集与验证集中马钱苷含量分布(mg/g)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品集 | 样品数 | 最大值 | 最小值 | 平均值 |
| 校正集 | 78 | 1.85 | 1.18 | 1.52 |
| 验证集 | 18 | 1.81 | 1.22 | 1.63 |

#### 3.3.2 光谱预处理方法的选择

在建立模型过程中，对校正集样品建立校正模型，同时作交叉验证，并用验证集样品对模型进行外部验证，最后根据交叉检验决定系数（R2）、校正均方差

（RMSEC）、交互验证均方差（RMSECV）、预测相关系数（r）、预测均方差（RMSEP）等性能参数来确定最优校正模型。对于同一样品集所构建的近红外定量校正模型，相关系数越大、均方差越小，表明所建模型适用性越强、预测效果越好。如表2-17所示，考察不同的光谱预处理方法对RMSEC和R2的影响，如表2所示。通过比较最终确定SNV+ First Derivative对光谱进行预处理。

表2-17 不同预处理方法对校正模型影响

| 光谱预处理方法 | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- |
| First Derivative + MSC | 0.67995 | 0.145 |
| Second Derivative + MSC | 0.97559 | 0.0841 |
| First Derivative + SNV | 0.99764 | 0.0416 |
| Second Derivative + SNV | 0.91170 | 0.0746 |
| MSC +ND+ First Derivative | 0.57342 | 0.413 |
| MSC +ND+ Second Derivative | 0.84137 | 0.115 |
| MSC + SG+ First Derivative | 0.67467 | 0.243 |
| MSC + SG+ Second Derivative | 0.85437 | 0.764 |
| SNV +SG+ First Derivative | 0.76976 | 0.119 |
| SNV +SG+ Second Derivative | 0.89675 | 0.453 |
| SNV + ND+ First Derivative | 0.76482 | 0.157 |
| SNV + ND+ Second Derivative | 0.73481 | 0.225 |

#### 3.3.3 光谱范围的选择

由图1可以看出，近红外光谱中各峰重叠严重，用常规的线性分析方法无法分析，但经过一阶导数处理后，其吸收峰变得尖锐，可以使含有有效信息的谱段更加明显，如图2-11所示。



图2-11 杞菊地黄丸（浓缩丸）NIR一阶导数图谱

根据一阶导数光谱图，发现样品在7361.88～4062.14cm-1处信息丰富。经过比较，确定7361.88～4062.14cm-1为最佳建模区间，如表2-18所示。

表2-18 不同建模区间对模型性能的影响

| 光谱处理方法 光谱范围（cm-1） | | R2 | RMSEC |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 7361.88～4062.14 | 0.99764 | 0.0416 |
|  | 7819.20～6514.46 | 0.88012 | 0.276 |
| First Derivative + SNV | 7176.23～4010.76 | 0.91296 | 0.0917 |
|  | 7976.58～7107.18  5689.44～4098.43 | 0.90737 | 0.113 |

#### 3.3.4 主因子数的选择

如图2-12所示，以7主因子数建模时，各方面评价指标为最好。马钱苷校正模型的交叉检验决定系数R2=0.99764，校正均方差RMSEC =0.0416. NIR预测值与真实值的相关图见图2-13。由此可见，马钱苷的校正模型性能较好。



图2-12 主成分数对模型交互验证均方差的影响



图 2-13 NIRS预测值与参考值的相关图

#### 3.3.5 NIR定量模型的外部验证

将10份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其马钱苷的含量。10份验证集样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行相关分析。马钱苷的预测相关系数r=0.97348，预测均方差RMSEP=0.08491。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸中马钱苷含量。

#### 3.3.6 未知样品NIR预测值和HPLC测定值的比较

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其马钱苷真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其马钱苷含量。11份未知样品的马钱苷NIR预测值与HPLC法测得值进行配对 t

检验。对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品NIR预测值与药典法测定值的t检验值为1.783，小于给定值

2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中马钱苷成分的定量分析。

## **4** 讨论与小结

### 4.1 讨论

（1）建模样品的选择对于近红外模型的建立是至关重要的，建模样品的组成决定了所建模型的适用性。选择的建模样品范围应尽量广泛，对待检指标有很好的代表性，必须保证建模样品能充分代表所分析对象的整体，其收集范围应包括将来收集样品的含量水平。

（2）由于近红外光谱技术是二级分析方法，其预测准确度与化学方法测定的参考值准确性密切相关。实验对《中国药典》规定采用的样品测定法进行了详细的方法学考察和系统适用性试验，并对每份样品多次重复测定取平均值，以获得准确性更高的样品指标性成分分析值。

（3）对近红外光谱区间及光谱预处理方法的选择，本实验采用多种方法处理，再从中选择最优的方法，以保证建立最优的模型。

（4）样品粒度的差异会影响入射光与样本相互作用的环境，影响漫反射的光谱特性。因此为了保持样品粒度一致，本试验中用到的样品粉碎后，过65 目筛。

为了获得样品平均光谱时，每份样品测定了3次，每次测定均将样品粉末取出，将粉末混匀后再放入样品杯中重新测定，以尽量减少上述因素引起的误差。

### 4.2 小结

（1）本研究建立了基于近红外光谱技术对杞菊地黄丸（浓缩丸）制剂中水分、丹皮酚和马钱苷含量快速测定的新方法。试验分别建立了水分、丹皮酚和马钱苷的近红外定量分析模型，模型的内部交叉验证决定系数分别（R2）分别为0.98809、

0.98089和0.99764，校正均方差（RMSEC）分别为0.0587、0.057和0.0416，内部交叉验证均方差（RMSECV）分别为0.26405、0.19403和0.0934；经外部验证，预测相关系数（r）分别为0.9969、0.9976和0.97348，预测均方差(RMSEP)分别为0.0752、0.0617和0.08491。经统计学检验，对验证集样品的预测结果与参考数据之间的差异无统计学意义，表明所建分析模型性能较好，可以用于对未知样品的分析。

（2）实验结果表明，该方法准确、简便、无污染，可实现大批量杞菊地黄丸

（浓缩丸）中水分、丹皮酚和马钱苷的快速分析。近红外定量分析模型建成之后，可简便、快速、无污染地测定水分、丹皮酚和马钱苷的含量，结果准确可靠。该

技术适用于杞菊地黄丸生产、流通等对检测结果要求时效性较强的各个环节，为其质量评价提供一种新的检测方法。

（3）本次实验中，因条件限制，我们收集到的实验样品均为同一年生产的样品，样品还不具有完全的代表性。下一步，我们将收集更多不同生产年份的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品，建立适用性更强的近红外模型。

# 第三部分 近红外光谱技术在不同厂家杞菊地黄丸定量及定 性分析中的应用

## **1** 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂同第二部分1.1.

实验样品100份杞菊地黄丸（浓缩丸）样品部分由河南宛西制药公司提供，部分购至市场。粉碎后过65目药典筛备用。100份杞菊地黄丸编号与生产批号如下表所示。

表3-1 100份杞菊地黄丸编号、生产厂家与生产批号

| 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 | 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 河南宛西 | 20100356 | 51 | 湖北马鞍ft | 20111130 |
| 2 | 河南宛西 | 20100357 | 52 | 湖北马鞍ft | 20111130 |
| 3 | 河南宛西 | 20100365 | 53 | 湖北马鞍ft | 20111130 |
| 4 | 河南宛西 | 20100366 | 54 | 湖北马鞍ft | 20111130 |
| 5 | 河南宛西 | 20100376 | 55 | 湖北马鞍ft | 20101204 |
| 6 | 河南宛西 | 20100369 | 56 | 湖北马鞍ft | 20101204 |
| 7 | 河南宛西 | 20100383 | 57 | 湖北马鞍ft | 20101204 |
| 8 | 河南宛西 | 20100385 | 58 | 湖北马鞍ft | 20101204 |
| 9 | 河南宛西 | 20100396 | 59 | 湖北马鞍ft | 20100841 |
| 10 | 河南宛西 | 20100397 | 60 | 湖北马鞍ft | 20100841 |
| 11 | 河南宛西 | 201003102 | 61 | 湖北马鞍ft | 20100841 |
| 12 | 河南宛西 | 201003103 | 62 | 湖北马鞍ft | 20100841 |
| 13 | 河南宛西 | 201003100 | 63 | 湖北马鞍ft | 20100841 |
| 14 | 河南宛西 | 201003111 | 64 | 湖北马鞍ft | 20110231 |
| 15 | 河南宛西 | 20100466 | 65 | 湖北马鞍ft | 20110231 |
| 16 | 河南宛西 | 20100467 | 66 | 湖北马鞍ft | 20110231 |
| 17 | 河南宛西 | 20100489 | 67 | 湖北马鞍ft | 20110231 |
| 18 | 河南宛西 | 20100490 | 68 | 湖北马鞍ft | 20110231 |
| 19 | 河南宛西 | 20100494 | 69 | 湖北马鞍ft | 20110352 |
| 20 | 河南宛西 | 20100503 | 70 | 北京同仁堂 | 1070260 |
| 21 | 河南宛西 | 20100546 | 71 | 北京同仁堂 | 1070260 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 22 | 河南宛西 | 20100550 | 72 | 北京同仁堂 | 1070260 |  |
|  | 23 | 河南宛西 | 20100551 | 73 | 北京同仁堂 | 12077331 |  |
|  | 24 | 河南宛西 | 20100561 | 74 | 北京同仁堂 | 12077331 |  |
|  | 25 | 河南宛西 | 20100579 | 75 | 北京同仁堂 | 12077331 |  |
|  | 26 | 河南宛西 | 20100582 | 76 | 北京同仁堂 | 9072839 |  |
|  | 27 | 河南宛西 | 20100612 | 77 | 北京同仁堂 | 9072839 |  |
|  | 28 | 河南宛西 | 20100614 | 78 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 29 | 河南宛西 | 20100616 | 79 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 30 | 河南宛西 | 20100617 | 80 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 31 | 河南宛西 | 20100632 | 81 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 32 | 河南宛西 | 20100628 | 82 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 33 | 湖北马鞍ft | 20111152 | 83 | 北京同仁堂 | 9072677 |  |
|  | 34 | 湖北马鞍ft | 20120404 | 84 | 北京同仁堂 | 9072677 |  |
|  | 35 | 湖北马鞍ft | 20120404 | 85 | 北京同仁堂 | 9072677 |  |
|  | 36 | 湖北马鞍ft | 20120404 | 86 | 北京同仁堂 | 9072677 |  |
|  | 37 | 湖北马鞍ft | 20120404 | 87 | 北京同仁堂 | 12074784 |  |
|  | 38 | 湖北马鞍ft | 20120620 | 88 | 北京同仁堂 | 12074784 |  |
|  | 39 | 湖北马鞍ft | 20120620 | 89 | 北京同仁堂 | 12074784 |  |
|  | 40 | 湖北马鞍ft | 20120620 | 90 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 41 | 湖北马鞍ft | 201001204 | 91 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 42 | 湖北马鞍ft | 201001204 | 92 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 43 | 湖北马鞍ft | 201001204 | 93 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 44 | 湖北马鞍ft | 201001204 | 94 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 45 | 湖北马鞍ft | 20120314 | 95 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 46 | 湖北马鞍ft | 20120314 | 96 | 北京同仁堂 | 1071472 |  |
|  | 47 | 湖北马鞍ft | 20120314 | 97 | 北京同仁堂 | 1071472 |  |
|  | 48 | 湖北马鞍ft | 20120314 | 98 | 北京同仁堂 | 12051949 |  |
|  | 49 | 湖北马鞍ft | 20120314 | 99 | 北京同仁堂 | 9065145 |  |
|  | 50 | 湖北马鞍ft | 20111130 | 100 | 北京同仁堂 | 9065145 |  |

### 1.2 NIR图谱的采集

将100份杞菊地黄丸样品粉碎，过60目筛，取约10g粉末放入石英样品杯中，混合均匀，以空气为参比，按下述实验条件进行扫描：

测样方式：积分球漫反射，分辨率：8cm-1

光谱采集范围：12000～4000cm-1扫描次数：32 次

温度：（20±1）℃相对湿度：35～37％

每个样品重复扫描3次，求平均光谱，100份不同生产厂家杞菊地黄丸样品的近红外光谱叠加见图2-1。



图3-1 100份不同生产厂家杞菊地黄丸近红外光谱图

## **2** 不同生产厂家杞菊地黄丸中指标性成分的含量测定

### 2.1 水分的含量测定

方法同第二部分2.1，结果如下表所示。

表3-2 96份杞菊地黄丸水分含量

| 样品编号 | 水分含量（%） | 样品编号 | 水分含量（%） | 样品编号 | 水分含量（%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 6.15 | 35 | 5.92 | 68 | 6.40 |
| 2 | 5.97 | 36 | 5.97 | 69 | 6.58 |
| 3 | 6.36 | 37 | 5.88 | 70 | 6.88 |
| 4 | 6.84 | 38 | 6.09 | 71 | 6.79 |
| 5 | 7.07 | 39 | 6.12 | 72 | 6.83 |
| 6 | 6.87 | 40 | 6.15 | 73 | 6.62 |
| 7 | 6.95 | 41 | 6.84 | 74 | 6.64 |
| 8 | 7.34 | 42 | 6.82 | 75 | 6.62 |
| 9 | 6.48 | 43 | 6.88 | 76 | 7.31 |
| 10 | 6.68 | 44 | 6.76 | 77 | 7.21 |
| 11 | 6.85 | 45 | 6.90 | 78 | 6.65 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
| 12 | 6.81 | 46 | 6.88 | 79 | 6.73 |  |
| 13 | 6.55 | 47 | 6.99 | 80 | 6.64 |  |
| 14 | 6.94 | 48 | 6.89 | 81 | 6.58 |  |
| 15 | 5.90 | 49 | 6.97 | 82 | 6.64 |  |
| 16 | 6.20 | 50 | 6.89 | 83 | 6.88 |  |
| 17 | 6.83 | 51 | 6.84 | 84 | 6.87 |  |
| 18 | 6.69 | 52 | 6.97 | 85 | 6.97 |  |
| 19 | 6.97 | 53 | 6.99 | 86 | 6.89 |  |
| 20 | 7.00 | 54 | 6.90 | 87 | 7.11 |  |
| 21 | 6.35 | 55 | 6.35 | 88 | 6.97 |  |
| 22 | 6.58 | 56 | 6.37 | 89 | 6.99 |  |
| 23 | 6.61 | 57 | 6.39 | 90 | 6.78 |  |
| 24 | 6.42 | 58 | 6.40 | 91 | 6.72 |  |
| 25 | 6.60 | 59 | 6.88 | 92 | 6.88 |  |
| 26 | 6.47 | 60 | 6.81 | 93 | 7.07 |  |
| 27 | 6.73 | 61 | 6.90 | 94 | 6.89 |  |
| 28 | 6.62 | 62 | 6.85 | 95 | 6.82 |  |
| 29 | 6.58 | 63 | 6.97 | 96 | 6.28 |  |
| 30 | 6.79 | 64 | 6.42 | 97 | 6.36 |  |
| 31 | 6.68 | 65 | 6.40 | 98 | 6.72 |  |
| 32 | 6.68 | 66 | 6.48 | 99 | 7.47 |  |
| 33 | 6.84 | 67 | 6.36 | 100 | 7.51 |  |
| 34 | 5.88 |  |  |  |  |  |

### 2.2 杞菊地黄丸中丹皮酚含量HPLC分析方法同本文第二部分2.2，结果如下表所示。

表3-3 100份不同生产厂家杞菊地黄丸中丹皮酚含量

| 样品编号 | 丹皮酚含量  （%） | 样品编号 | 丹皮酚含量  （%） | 样品编号 | 丹皮酚含量  （%） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2.26 | 35 | 1.38 | 68 | 1.73 |
| 2 | 2.34 | 36 | 1.39 | 69 | 2.45 |
| 3 | 2.44 | 37 | 1.39 | 70 | 2.01 |
| 4 | 2.41 | 38 | 1.68 | 71 | 1.97 |
| 5 | 2.02 | 39 | 1.72 | 72 | 1.96 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| 6 | 2.26 | 40 | 1.71 | 73 | 1.97 |
| 7 | 2.76 | 41 | 1.31 | 74 | 1.97 |
| 8 | 2.68 | 42 | 1.30 | 75 | 1.94 |
| 9 | 2.73 | 43 | 1.36 | 76 | 1.99 |
| 10 | 2.81 | 44 | 1.33 | 77 | 2.01 |
| 11 | 2.61 | 45 | 1.93 | 78 | 2.19 |
| 12 | 2.70 | 46 | 1.99 | 79 | 2.15 |
| 13 | 2.29 | 47 | 1.98 | 80 | 1.96 |
| 14 | 2.13 | 48 | 1.98 | 81 | 1.90 |
| 15 | 1.89 | 49 | 1.99 | 82 | 2.18 |
| 16 | 2.05 | 50 | 1.59 | 83 | 0.98 |
| 17 | 2.28 | 51 | 1.55 | 84 | 1.00 |
| 18 | 2.06 | 52 | 1.61 | 85 | 1.03 |
| 19 | 2.27 | 53 | 1.58 | 86 | 1.20 |
| 20 | 2.20 | 54 | 1.55 | 87 | 1.96 |
| 21 | 2.16 | 55 | 1.42 | 88 | 1.93 |
| 22 | 2.26 | 56 | 1.42 | 89 | 1.96 |
| 23 | 2.27 | 57 | 1.42 | 90 | 1.95 |
| 24 | 2.20 | 58 | 1.46 | 91 | 1.97 |
| 25 | 2.12 | 59 | 1.00 | 92 | 2.00 |
| 26 | 2.15 | 60 | 1.01 | 93 | 1.91 |
| 27 | 2.17 | 61 | 1.68 | 94 | 1.96 |
| 28 | 2.01 | 62 | 1.70 | 95 | 1.96 |
| 29 | 2.11 | 63 | 1.68 | 96 | 1.45 |
| 30 | 1.91 | 64 | 1.70 | 97 | 1.47 |
| 31 | 2.01 | 65 | 1.72 | 98 | 1.89 |
| 32 | 2.00 | 66 | 1.76 | 99 | 1.91 |
| 33 | 2.08 | 67 | 1.77 | 100 | 1.92 |
| 34 | 1.38 |  |  |  |  |

### 2.3 杞菊地黄丸中马钱苷的含量测定

方法同本文第二部分2.3。结果如下表所示。

表3-4 100份不同生产厂家杞菊地黄丸中马钱苷含量

| 样品编号 | 马钱苷含量 | 样品编号 | 马钱苷含量（%） | 样品编号 | 马钱苷含量 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
|  | （%） |  |  |  | （%） |
| 1 | 1.49 | 35 | 1.71 | 68 | 1.37 |
| 2 | 1.45 | 36 | 1.76 | 69 | 1.29 |
| 3 | 1.32 | 37 | 1.66 | 70 | 1.81 |
| 4 | 1.36 | 38 | 1.80 | 71 | 1.85 |
| 5 | 1.61 | 39 | 1.73 | 72 | 1.83 |
| 6 | 1.55 | 40 | 1.66 | 73 | 1.83 |
| 7 | 1.63 | 41 | 1.18 | 74 | 1.85 |
| 8 | 1.65 | 42 | 1.17 | 75 | 1.87 |
| 9 | 1.79 | 43 | 1.14 | 76 | 1.70 |
| 10 | 1.81 | 44 | 1.21 | 77 | 1.70 |
| 11 | 1.64 | 45 | 1.55 | 78 | 1.82 |
| 12 | 1.64 | 46 | 1.47 | 79 | 1.81 |
| 13 | 1.61 | 47 | 1.55 | 80 | 1.76 |
| 14 | 1.55 | 48 | 1.44 | 81 | 1.75 |
| 15 | 1.51 | 49 | 1.40 | 82 | 1.84 |
| 16 | 1.53 | 50 | 1.40 | 83 | 1.45 |
| 17 | 1.63 | 51 | 1.39 | 84 | 1.45 |
| 18 | 1.44 | 52 | 1.42 | 85 | 1.46 |
| 19 | 1.52 | 53 | 1.44 | 86 | 1.53 |
| 20 | 1.42 | 54 | 1.48 | 87 | 1.89 |
| 21 | 1.62 | 55 | 1.82 | 88 | 1.80 |
| 22 | 1.44 | 56 | 1.82 | 89 | 1.85 |
| 23 | 1.42 | 57 | 1.75 | 90 | 1.85 |
| 24 | 1.57 | 58 | 1.99 | 91 | 1.85 |
| 25 | 1.56 | 59 | 1.78 | 92 | 1.87 |
| 26 | 1.58 | 60 | 1.98 | 93 | 1.81 |
| 27 | 1.48 | 61 | 1.57 | 94 | 1.75 |
| 28 | 1.45 | 62 | 1.51 | 95 | 1.80 |
| 29 | 1.52 | 63 | 1.53 | 96 | 1.56 |
| 30 | 1.50 | 64 | 1.41 | 97 | 1.45 |
| 31 | 1.42 | 65 | 1.35 | 98 | 0.81 |
| 32 | 1.50 | 66 | 1.39 | 99 | 1.66 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| 33 | 1.62 | 67 | 1.39 | 100 | 1.70 |
| 34 | 1.68 |  |  |  |  |

## **3** 不同生产厂家杞菊地黄丸中各指标性成分近红外模型的建立

### 3.1 不同生产厂家杞菊地黄丸水分模型的建立

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸（浓缩丸）样品的水分含量分布情况，从100份杞菊地黄丸（浓缩丸）样品中选择80个样品作为校正集，20个样品作为验证集。通过比较，最终确定SNV+ SG+Second

Derivative对光谱进行预处理，以4174.15～8983.25cm-1为建模区间，以8个主因子数建模，交互验证均方差RMSECV=0.09354，为最小。水分校正模型的交叉检验决定系数R2=0.98714，校正均方差RMSEC =0.107, NIR预测值与真实值的相关图见图3-3。由此可见，水分的校正模型性能较好。



图3-2 主因子数对模型RMSECV的影响



图3-3 NIRS预测值与参考值的相关图

将20份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其水分含量。20份验证集样品的NIR预测值与甲苯法测得值进行相关分析。水分的预测相关系数r=0.9947，预测均方差RMSEP=0.105。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸（浓缩丸）中的水分含量。

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其水分真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其丹皮酚含量。11份未知样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行配对t检验。对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品NIR预测值与药典法测定值的t检验值为1.923，小于给定值2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中水分的定量分析。

### 3.2 杞菊地黄丸丹皮酚模型的建立

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸中丹皮酚含量分布情况，从100样品中随机选取79个有代表性的样品组成校正集，21个样品为验证集，对模型进行内部交叉验证。在建模过程中，首先考察不同的光谱预处理方法对RMSEC和R2的影响，通过比较最终确定SNV+ Second Derivative对光谱进行预处理。同时优选最佳波段，以R2、RMSECV作为模型性能的评价指标。通过比较，确定7789.84～4011.28cm-1为最佳波段，最终如图3所示，以7主因子数建模时，各方面评价指标为最好。丹皮酚校正模型的交叉检验决定系数

R2=0.98164，校正均方差RMSEC =0.172. NIR预测值与真实值的相关图见图3-5。由此可见，丹皮酚的校正模型性能较好。



图3-4 主因子数对模型RMSECV的影响



图3-5 NIRS预测值与参考值的相关图

将21份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其丹皮酚含量。11份验证集样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行相关分析。丹皮酚的预测相关系数r=0.9823，预测均方差RMSEP=0.0977。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸中丹皮酚含量。

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其丹皮酚真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其丹皮酚含量。11份未知样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行配对t检验。

对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品NIR预测值与药典法测定值的t检验值为1.742，小于给定值2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中丹皮酚成分的定量分析。

### 3.3 杞菊地黄丸马钱苷模型的建立

运用TQ8.0定量分析软件中PLS法建立模型。根据杞菊地黄丸中马钱苷含量分布情况，从100样品中随机选取81个有代表性的样品组成校正集，19个样品为验证集，对模型进行内部交叉验证。考察不同的光谱预处理方法对RMSEC和R2的影响，通过比较最终确定SNV+ First Derivative对光谱进行预处理，经过比较，确定7219.28～4128.22cm-1为最佳建模区间。以7主因子数建模时，各方面评价指标为最好。马钱苷校正模型的交叉检验决定系数R2=0.97123，校正均方差RMSEC

=0.101. NIR预测值与真实值的相关图见图3-7。由此可见，马钱苷的校正模型性能较好。



图3-6 主因子数对模型交互验证均方差的影响



图3-7 NIRS预测值与参考值的相关图

将10份验证集样品的NIR图谱输入定量分析模型，预测其马钱苷的含量。10份验证集样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行相关分析。马钱苷的预测相关系数r=0.98192，预测均方差RMSEP=0.091。结果表明，模型可以准确预测其覆盖范围内的杞菊地黄丸中马钱苷含量。

另取11份未知杞菊地黄丸，按2.1项采集其近红外光谱数据，2.2.3项测量其马钱苷真实值。将11份未知样品的NIR图谱输入已建成的定量分析模型中，预测其丹皮酚含量。11份未知样品的NIR预测值与HPLC法测得值进行配对t检验。对于给定显著性水平0.05，t(0.05/2, 10) =2.228，经配对t检验，11个未知杞菊地黄丸样品NIR预测值与药典法测定值的t检验值为1.823，小于给定值2.228，即两种方法的分析结果差异无统计学意义，表明该模型可用于杞菊地黄丸中马钱苷的定量分析。

## **4** 不同生产厂家近红外定性分析模型的建立

### 4.1 不同厂家杞菊地黄丸近红外判别分析模型的建立

#### 4.1.1 校正集合验证集的划分

将收集到的3个不同生产厂家的100份杞菊地黄丸（浓缩丸）建立近红外定性分析模型，分别为：河南宛西制药股份有限公司（简称宛西，32 批）；湖北马鞍

ft制药股份有限公司（简称马鞍ft，37批）；北京同仁堂制药股份有限公司（简称同仁堂，31批）。

将100份样品划分为校正集和验证集。为保证所建模型更具代表性和适用性，采用三重交叉验证方法考察模型的预测能力。实验将样品分为三组，依次取其中两组样品作为校正集进行建模，其余一组样品作为验证集，共循环3次，使每组

样品均经历一次交叉验证。杞菊地黄丸样品的分组情况见表3-5。

表3-5 杞菊地黄丸样品分组信息表

| 分组 | 宛西 | 马鞍ft | 同仁堂 | 总数 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组一 | 12 | 11 | 11 | 34 |
| 组二 | 11 | 12 | 11 | 33 |
| 组三 | 11 | 11 | 11 | 33 |

#### 4.1.2 光谱预处理方法的选择

本研究将校正集和验证集的错判个数作为筛选最优判别分析模型的参考指标。经过比较，多元信号修正换+原光谱+SG平滑（MSC+Spectrum+SG）为最佳光谱预处理方法，见表3-6。

表3-6 不同预处理方法对模型性能的影响

错判个数

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 校正集 | 验证集 |
| SNV+Spectrum | 3 | 4 |
| SNV+First derivative | 5 | 5 |
| SNV+Second derivative | 5 | 6 |
| SNV+First derivative+SG | 5 | 4 |
| SNV+Second derivative+SG | 5 | 7 |
| SNV+First derivative+ND | 4 | 3 |
| SNV+Second derivative+ND | 5 | 5 |
| MSC+Spectrum | 0 | 1 |
| MSC+Spectrum+SG | 0 | 0 |
| MSC+First derivative | 2 | 3 |
| MSC+Second derivative | 3 | 4 |
| MSC+First derivative+SG | 3 | 3 |
| MSC+Second derivative+SG | 2 | 3 |
| MSC+First derivative+ND | 3 | 3 |
| MSC+Second derivative+ND | 3 | 4 |

光谱预处理方法

#### 4.1.3 建模区间的选择

结合TQ8.0软件的自动优化功能，经过手动筛选比较，最终确定最佳建模波段为7924.74～4310.18 cm-1，见表3-7。

表3-7 不同建模区间对模型性能的影响

| 建模区间（cm-1） | 错判个数 |
| --- | --- |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  | 校正集 | 验证集 |
| 12000.00～4000.00 | 3 | 5 |
| 10274.49～4293.12 | 3 | 4 |
| 9329.24～4310.18 | 2 | 2 |
| 7924.74～4310.18 | 0 | 0 |

#### 4.1.4 建模主因子数的选择

近红外判别分析模型的建立，主因子数的选择对模型的性能有很大的影响。随着主因子数的增多，光谱信息对模型的贡献率也会随之增加，模型的判别分析准确率和性能也会逐渐提高；主因子数增加到一定数目时，光谱信息对模型的贡献率将会增加的很少，还将包括进来过多的测量噪音，降低模型的预测能力和适用性。通过比较，实验选用前9个主因子数进行建模，光谱信息对模型的累积贡献率达到了99.4%，所建模型可以把不同厂家的样品区分开，预测结果与实际归属一致，见图3-8。



图3-8 主因子数与光谱累计贡献率之间的相关图

#### 4.1.5 判别分析模型的建立

以鉴别准确率作为模型性能的评价参数，筛选最优近红外分析模型，最终确定对近红外光谱进行多元散射校正+一阶导数+SG平滑（MSC+FD+SG）预处理，在7924.74～4310.18cm-1波段范围内选择前9个主成分，结合判别分析法建立杞菊地黄丸的近红外判别分析模型，见图3-9。



图3-9 三个不同厂家杞菊地黄的近红外判别分析模型

#### 4.1.6 判别分析模型的评价

从图6可以看出，三个不同厂家的杞菊地黄丸被聚为三类，同类之间的样品距离比较接近，而不同类之间的样品被明显的区分开，界限明显。采用三重交叉验证法对模型进行评价，模型对校正集样品的分类鉴别准确率为100%,对验证集样品的预测鉴别准确率也为100%，见表3-7。由此可见，建立的模型性能较好，该方法能够准确、快速的判别不同厂家的杞菊地黄丸。

表3-7 判别分析模型的三重交叉验证结果

| 数据组合 | 样品数 | 准确率（%） |
| --- | --- | --- |
| 校正集（组 1、2） | 67 | 100 |
| 组合Ⅰ |  |  |
| 验证集（组 3） | 33 | 100 |
| 校正集（组 1、3） | 67 | 100 |
| 组合Ⅱ |  |  |
| 验证集（组 2） | 33 | 100 |
| 校正集（组 2、3） | 66 | 100 |
| 组合Ⅲ |  |  |
| 验证集（组 1） | 34 | 100 |

### 4.2 不同厂家杞菊地黄丸近红外聚类分析模型的建立

将下表3-8三个不同厂家的30批杞菊地黄丸样品分别标记为宛西1.0～宛西安10.0（河南宛西制药股份有限公司）、马鞍ft 11.0～马鞍ft 20.0（湖北马鞍ft神鹿科瑞药业有限公司）和同仁堂21.0～同仁堂30.0（北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂）

表3-8 三个不同生产厂家杞菊地黄丸编号与生产批号

| 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 | 样品编号 | 生产厂家 | 生产批号 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.0 | 河南宛西 | 20100366 | 16.0 | 湖北马鞍ft | 20111130 |  |
|  | 2.0 | 河南宛西 | 20100376 | 17.0 | 湖北马鞍ft | 20111152 |  |
|  | 3.0 | 河南宛西 | 201003103 | 18.0 | 湖北马鞍ft | 20120314 |  |
|  | 4.0 | 河南宛西 | 20100467 | 19.0 | 湖北马鞍ft | 20120404 |  |
|  | 5.0 | 河南宛西 | 20100490 | 20.0 | 湖北马鞍ft | 20120620 |  |
|  | 6.0 | 河南宛西 | 20100516 | 21.0 | 北京同仁堂 | 9065145 |  |
|  | 7.0 | 河南宛西 | 20100546 | 22.0 | 北京同仁堂 | 9072677 |  |
|  | 8.0 | 河南宛西 | 201005105 | 23.0 | 北京同仁堂 | 9072839 |  |
|  | 9.0 | 河南宛西 | 20100614 | 24.0 | 北京同仁堂 | 1060172 |  |
|  | 10.0 | 河南宛西 | 20100632 | 25.0 | 北京同仁堂 | 1070260 |  |
|  | 11.0 | 湖北马鞍ft | 201001204 | 26.0 | 北京同仁堂 | 1070263 |  |
|  | 12.0 | 湖北马鞍ft | 20100841 | 27.0 | 北京同仁堂 | 1071472 |  |
|  | 13.0 | 湖北马鞍ft | 20101204 | 28.0 | 北京同仁堂 | 12051949 |  |
|  | 14.0 | 湖北马鞍ft | 20110231 | 29.0 | 北京同仁堂 | 12074784 |  |
|  | 15.0 | 湖北马鞍ft | 20110352 | 30.0 | 北京同仁堂 | 12077331 |  |

实验将30批样品的光谱图输入到OPUS软件，采用聚类分析方法建立聚类分析模型。通过筛选建模条件，最终确定使用一阶导数+归一化法处理光谱，光谱范围为8806.12～4520.34 cm-1，建立近红外聚类分析模型，见图3-10。



图 3-10 三厂家杞菊地黄丸的近红外聚类分析模型

从图3-10可以看出，当类间距离大于2.2时，样品被聚为一类；当类间距离

小于2.2时，三个厂家的样品各自聚为一类；对于湖北马鞍ft神鹿科瑞药业有限公

司的样品在类间距小于1.9时被聚成三类，三个不同生产年份的样品各自被聚为一

类（当类间距大于0.2时，2010年产3的个样品聚在一起；当类间距大于0.4时，

2011年产的4个样品聚在一起；当类间距大于0.1时，2012年产的3个样品聚在

一起）。同样的，北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂在类间距大于0.75时被

聚成三类，三个不同生产年份的样品各自被聚为一类（当类间距大于0.1时，2009年产的样品聚在一起；当类间距大于0.6时，2010年产的样品聚在一起；当类间距大于0.2时，2012年产的样品聚在一起）。河南宛西制药股份有限司的样品被较为随机的聚在一起，原因可能是样品为同一生产年份生产的，虽然批次不同，但不能从此聚类图中找出相关规律。各分类清晰，归属准确，与实际情况相符。

结果表明，通过对样品近红外光谱信息的提取和利用，可以从整体上对不同厂家的杞菊地黄丸进行定性鉴别分析，打破了仅依靠产品物理形态或某些指标性成分进行定性鉴别的传统分析方法。

## **5** 讨论与小结

### 5.1 讨论

（1）本实验收集了三个不同生产厂家不同批次的样品以代表其生产厂家的杞菊地黄丸（浓缩丸）。在样品的处理、样品光谱数据采集、含量测定等方面，按随机顺序进行，以避免某一条件改变致使某个局部浓度区域的光谱发生变化，从而影响模型的建立。

（2）在校正集与验证集的选择时，要使每一个生产厂家每一批次的样品中既有校正集又有验证集，以使建立的模型准确可靠。

（3）在建立定量分析模型时，我们发现同一生产厂家与不同生产厂家杞菊地黄丸指标性成分的近红外模型所使用的光谱预处理方法、建模区间的选择等基本是相同的。如丹皮酚，在同一生产厂家（河南宛西）其近红外模型的光谱预处理方法为SNV+ Second Derivative，建模区间为7704.20～4013.86cm-1；在不同生产厂家其近红外模型的光谱预处理方法为SNV+ Second Derivative，建模区间为7704.20～4013.86cm-1。这说明虽然近红外光谱吸收重叠严重，但是仍有一定的规律可循。通过合适的化学计量学的使用，可以提取出某一成分的特征信息。

（4）在建立不同生产厂家的近红外定性分析模型时，我们分别使用了判别分析与聚类分析。实验结果表明，上述两种模型均可以鉴别出不同厂家的样品，结果准确可靠。

（5）我们将近红外聚类分析定性模型的结果与本文第一部分的高效液相指纹图谱结果相比较，发现高效液相指纹图谱技术可以通过相似度的比较，定性鉴别出三个不同生产厂家的杞菊地黄丸样品，同时能够提供样品中组分的峰面积等数

据，信息量丰富，但分析过程耗时较长，且使用了大量的有机试剂；而近红外聚类分析通过计算样本间的相似性或差异性指标来确定样本之间的亲疏关系，用相对距离衡量关系的远近，所得树形图形象、直观，便于分析，模型建成之后无需消耗有机试剂。

### 5.2 小结

（1）本试验分别建立了不同生产厂家水分、丹皮酚和马钱苷的近红外定量分析模型，模型的内部交叉验证决定系数分别（R2）分别为0.98714、0.98164和0.97123，校正均方差（RMSEC）分别为0.107、0.172和0.101，内部交叉验证均方差（RMSECV）分别为0.09354、0.10475和0.0934；经外部验证，预测相关系数（r）分别为0.9947、0.9823和0.98192，预测均方差(RMSEP)分别为0.105、

0.0977和0.091。经统计学检验，对验证集样品的预测结果与参考数据之间的差异无统计学意义，表明所建分析模型性能较好，可以用于对未知样品的分析。

（2）在定性分析上分别建立了近红外判别分析模型和聚类分析模型，结果表明两种方法均可以鉴别出三个不同生产厂家的样品。所建判别分析模型可以准确地区分三厂家的样品，对校正集样品的分类鉴别准确率和验证集样品的预测鉴别准确率均为100%；所建近红外聚类分析模型将30批样品清晰的聚为三类，区分明显，归属确切，同时也验证了判别分析模型的准确性。

（3）试验中使用的样品均为知名生产厂家生产，在市场上经常见到的杞菊地黄丸。实验结果表明，近红外光谱技术可以用于大批量杞菊地黄丸（浓缩丸）中水分、丹皮酚和马钱苷的定量分析，操作简便快速，结果准确可靠，可以实现生产过程中的实时监控和在线检测；近红外光谱技术还可以用于不同厂家杞菊地黄丸（浓缩丸）的定性鉴别，快速准确，为打击医药市场上的假冒伪劣产品提供有利手段。因条件限制，我们收集到的实验样品或年份跨度不够，或样品批次不足，样品还不具有完全的代表性。下一步，我们将收集更多不同生产年份的杞菊地黄丸（浓缩丸）样品，建立适用性更强的近红外模型。

总结与展望

总结与展望

## **1** 总结

针对中药现代化的发展需要，本文在总结前人研究工作的基础之上，以杞菊地黄丸（浓缩丸）为研究对象，初步研究了高效液相指纹图谱技术及近红外光谱技术在中药制剂定性、定量分析中的应用，取得了一定的成果，具体包括以下几个方面：

（1）在阅读了大量中外文文献的基础之上，介绍了中药质量控制的重要性及亟待解决的问题，引入高效液相指纹图谱技术及近红外光谱技术，并详细介绍该两种技术，为本课题的展开做了充分的文献研究。

（2）在高效液相指纹图谱研究中，本实验分别建立了三个不同生产厂家杞菊地黄丸的指纹图谱，并对不同厂家的样品进行了定性鉴别。结果显示，三个厂家的样品在具有很高相似性的同时，也有一定的差异性，表明实验所采用的方法合理，具有很强的准确性和可靠性，高效液相指纹图谱技术可用于杞菊地黄丸的定性鉴别。

（3）在近红外光谱技术定量分析研究中，本实验分别建立了同一生产厂家（河南宛西）与不同生产厂家杞菊地黄丸水分、丹皮酚、马钱苷近红外定量分析模型。所建模型的各项评价指标良好，经统计学检验，对未知样品的预测结果与真实值之间的差异无统计学意义，表明所建分析模型性能较好，可以用于对未知样品的分析，为杞菊地黄丸指标性成分的快速测定提供了一种新方法。

（4）在近红外光谱技术定性分析研究中，本研究分别建立了不同生产厂家杞菊地黄丸样品的近红外判别分析模型和近红外聚类分析模型。分析结果显示，近红外光谱技术可以将不同厂家的杞菊地黄丸样品准确地区分开来。

（5）实验中将近红外聚类分析定性模型的结果与高效液相指纹图谱结果相比较，发现这两种方法均可定性鉴别出不同生产厂家的杞菊地黄丸样品，但高效液相指纹图谱技术分析过程耗时较长，且使用了大量的有机试剂，而近红外聚类分析模型建成之后无需消耗有机试剂，所得树形图形象、直观，便于分析，耗时短。

（6）针对中药制剂化学组成的复杂性，本文将高效液相指纹图谱技术与近红外光谱技术应用于杞菊地黄丸，利用这两种技术各自的优点，从整体角度对其进行质量分析，为杞菊地黄丸整体质量的快速评价和真伪鉴别提供了一种新方法，同时也为杞菊地黄丸及其它中药制剂生产过程中的在线检测和质量控制提供了参考和应用基础。

## **2** 展望

由于本试验条件有限，本文的试验都是在实验室中完成，没有对中药的制药过程等进行具体分析，在实际应用中还不够深入和细致，以下方面还需要作进一步的研究：

（1）传统中药的质量控制模式是借鉴化学药品质量控制模式，即以利用光谱或色谱分析等手段鉴别和测定某一成分或几种有效成分、活性成分为目标的定性、定量分析方法。但是，这对于中医“整体”理论指导下的中药，不能全面衡量中药及制剂的质量、疗效和稳定性。要控制中药的功效，不应该局限于只针对某几种化学成分，还必须对方剂的物质群整体予以控制。在这方面，高效液相指纹图谱技术与近红外光谱技术有很多的应用空间与价值。

（2）本实验所使用的部分样品为市场中购得，样品数量和代表性不足，需要收集更多有代表性的样品补充到所建分析模型中，扩大模型的工作范围，增强模型适用性。

（3）本研究只考察了正规生产厂家的样品，并没有对市场中遇到的伪品劣品进行考察；所考察的生产厂家只有三个，覆盖面不够，这些都是我们进一步研究的内容。

（4）近红外光谱技术不仅仅局限于有效成分的测定，还广泛应用于制药过程中的混合、包衣等诸多环节。可以将本文研究的对象进行扩展，使近红外光谱技术更好地运用到制药过程中。

（5）近红外光谱技术用于药物分析得优势所在是能够快速、简便、无污染的检测样品，并且近红外光谱可以通过光纤传播信号，可以实时、在线监控生产，发现问题及时反馈给车间，避免因检测结果不及时而带来的巨大损失，这是与传统分析方法的重大差别之处。由于时间有限，没有完成与药厂结合应用所建模型在线检测这一步，此项任务非常必要，有待于继续完成。

致谢

致 **谢**

本论文是在导师白雁教授的严格要求和精心指导下完成的。从论文的选题、试验的展开、问题的解决到论文的撰写，都倾注了导师大量的心血。在她领导下所建立与积累起来的良好的研究环境和软硬件条件是本论文得以完成的源泉和基石。导师严谨的治学态度、求实的作风、为人正直、乐于助人的崇高品德令学生终身受益。导师不仅在学术上给了指导，而且在为人处事方面，也给予了很大的帮助。同时，在生活上导师给予的无微不至的关心和帮助。在此，表示我最衷心的谢意和感激！

本课题得到雷敬卫老师和谢彩侠老师的大力帮助和指导，使我的实验得以顺利完成，并受益匪浅，在此表示衷心的感谢！

在试验过程中得到了分析测试中心陈志红老师、龚海燕老师的指导和帮助，在这里对他们表示诚挚的谢意。

感谢师姐宋瑞丽、李珊，师兄余振喜、樊克峰、王星、张威，师妹段小彦、张袭、樊明月，师弟张强在试验过程中给予的热情帮助。

感谢我的家人多年来一如既往的鼓励和支持，以及生活上无微不至的照顾，我的学业才得以顺利的完成。

最后，再一次向所有给予我关心和帮助的老师、同学和家人致以我最真挚的谢意！

参考文献

[1] 韩智峰. 三种地黄丸中药指纹图谱质且评价研究[D]. 济南: ft东大学硕士学位论, 2008.

[2] 蔡宝昌, 刘训红. 常用中药材HPLC指纹图谱测定技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 2-3.

[3] 周玉新, 袁永生, 高霞, 等. 三七药材及其制剂指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2 001, 26（2）: 122-123.

[4] 曹敏, 陈玉英. 栀子药材西红花苷类HPLC指纹图谱的研究[J]. 中国新药杂志, 2003, 12（7）: 553-555.

[5] 蔡宝昌, 刘训红. 常用中药材HPLC指纹图谱测定技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 20-23.

[6] 朱大勇. 高效液相色谱法及液－质联仪法在中药鉴定中的应用[J], 上海医药, 200 7, 28(7): 312-313.

[7] 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通等. 现代近红外光谱分析技术[M], 北京: 中国石油化工出版社, 2000: 14-19．

[8] 刘建学. 实用近红外光谱技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 2-4.

[9] 吴瑾光. 近代傅立叶变换红外光谱技术及应用(M).上卷. 北京: 科学技术文献出版社, 1994: 251-252.

[10] 刘玉明, 柴逸峰. 近红外光谱和聚类分析法无损快速鉴别蓝桉果实[J]. 中成药, 2004, 26(12): 10 50-1052.

[11] 白英奎, 申铉国. 近红外光谱技术在药品检测中的应用研究[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2005.

[12] 樊景超, 周国民. 苹果货架期的近红外光谱定性分析[J]. 中国食物与营养, 2011, 1 7(1): 47-49.

[13] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M].二版. 北京: 中国石化出版社, 2007: 7-8

[14] 冯新沪, 史永刚. 近红外光谱及其在石油产品分析中的应用[M]. 北京: 中国石油化工出版社, 2002: 4-5．

[15] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M].二版. 北京: 中国石化出版社, 2007: 120-12 9.

[16] 白雁主编. 现代近红外光谱分析技术在药品及食品品质评价系统中的应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 80

[17] 冯军勤, 周誉昌, 吕华. 运用近红外发射光谱技术检测中药水分含量[J]. 大众科技, 2006, 2: 46-48.

[18] 张勇, 赵冰. 灰度关联分析结合支持向量机用于近红外光谱研究[J], 光谱学与光谱分析, 2013, 33(2): 363-366.

[19] Dhanoa M. S., Lister S. J., Sanderson R., et al. Journal of near infrared spectroscopy[J]. 1994, 2: 43-47.

[20] Johan T., Svante W.. PLS regression on wavelet compressed NIR spectra[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998, 42: 209-220.

[21] 李华北, 陈斌, 赵杰文等. 用小波变换技术提高食醋近红外光谱分析的精度[J]. 农业工程学报, 2000.16 (6): 114-117.

[22] 闵顺耕, 谢秀娟, 周学秋等. 近红外漫反射光谱的小波变换滤波[J]. 分析化学, 199 8, 26(1): 34-47.

[23] 陆婉珍主编, 现代近红外光谱分析技术, 北京: 中国石化出版社, 2007, 第二版: 38-46.

[24] 陆婉珍主编, 现代近红外光谱分析技术, 北京: 中国石化出版社, 2007, 第二版: 61-65.

[25] Candolfi A., De Maesschalck R., Jouan R. D., et al. The influence of data pre- processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra[J]. Jo urnal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 1999, 21(1): 115-132.

[26] Kramer K., Ebel S.. Application of NIR reflectance spectroscopy for the identi fication of pharmaceu

[27] Paulo H. F., Itziar R., Ronei J. P.. Application of neural networks to the clssi fication of soils from Sao Paulo state using near infrard spectroscopy[J]. An alyst, 2001, 126: 2194-2200.

[28] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M].二版. 北京∶中国石化出版社, 2007∶61-64.

[29] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 中国轻工业出版社, 2005, 75.

[30] 褚小立, 袁洪福, 陆婉珍. 光谱多元校正中的模型传递[J]. 光谱学与光谱分析, 200 1, 21(6): 881-885.

[31] Fearn T.. Standardisation and calibration transfer for near infraredinstruments areview[J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2001, 9(4): 229-244.

[32] 国家药典委员会． 中华人民共和国药典[S]．一部, 北京: 化学工业出版社, 2010: 748.

[33] 国家药典委员会． 中华人民共和国药典[S]．一部, 北京: 化学工业出版社, 2010: 748.

附 **录**

**附录1** 文献综述

**HPLC指纹图谱与NIR光谱技术在中药制剂中的研究应用**

**摘要：**简要介绍中药制剂质量分析发展现状，提出充分利用HPLC指纹图谱技术和NIR光谱技术在质量控制中的优势，从整体角度评价中药，建立适合中药自身特点的质控标准。

**关键词：**HPLC 指纹图谱技术； NIR 光谱技术；系统性

**1中药质量认识的系统视角**

中药标准是中医药领域最重要的标准之一,近年来中药标准研究不断取得新的重大进展，中药质控水平明显提高。但是，目前中药标准主要是面向药品检验，对中医药临床的指导与参考意义不大[1]。现行中药质量控制模式基本上是借鉴化学药品质量模式，沿着天然药物化学的发展，去建立以测定某单一成分为目标的分析方法和既定性又定量的质量标准。但是这种以单一化学成分分析的观点，与中医理论的“整体”观念是不相容的[2]。在对中药质量评价和质量控制研究时，应把握对中药的安全性和有效性一切相关的化学指征，并从整个药物形成过程认识和评价中药质量

[3]. 中药指纹图谱检测技术在确保中药质量的一致性方面有着独特的作用。运用中

药指纹图谱和指标成分定量相结合的方式，既可以完善表述中药的整体性特征，又有别于西药单一成分定量的质量控制模式，采取适当模糊的处理方式，完全可以建立成为中国自立的创新型质量控制模式，并可以为国际社会接受[4]。

**2 HPLC指纹图谱技术及其应用**

2.1 HPLC指纹图谱技术

HPLC指纹图谱测定技术是以高效液相色谱法为基础而建立起来的一种综合的、整体的鉴定手段。高效液相色谱法（HPLC）是近30年迅速发展起来的分离分析技术，其在药品的质量控制（如主要成分的定性定量分析、杂质的限量检查和测定、稳定性考察等）、中药的成分研究等方面都是重要的分析手段，在药典中鉴别项下越来越多的使用到此方法。它以其特有的分离效率高、灵敏度高、分析速度快、稳定性和重现性好、流动相选择性广、检测器种类多、色谱柱可反复使用等优点，非常适合构建中药指纹图谱。

2.3 HPLC指纹图谱的应用

曹敏等[5]采用高效液相色谱法建立栀子药材的指纹图谱，以AlltechC18

（250mm×46mm, 5μm）为色谱柱，采用水和甲醇溶液梯度洗脱，流速10mL/min，检测波长440nm.结果精密度和重复性试验中对峰面积大于20％的共有峰，其相对峰面积的RSD均小于5％，符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》中有关规定，本方法可作为控制栀子药材内在质量的标准。

周玉新等[6]以HPLC梯度洗脱法对三七原药材、三七总皂苷提取物及以三七总皂苷为原料制成的市售注射液进行了指纹图谱研究。该方法可操作性强、重现性好，可作为三七药材及含三七主成分注射剂指纹图谱研究的基础的色谱指纹图谱。杨光明等[7]对川芎药材进行指纹图谱研究，对来源于不同地区的川芎进行了比较。采用KromasilKRl005C18分析柱，0.5％H3PO4-H2O与0.5％H3PO4-CH3OH梯度洗脱，流速1mL/min，柱温25℃，DAD检测器，检测波长280nm，参比波长360nm. 确定了川芎药材指纹图谱的高效液相分析条件，建立了川芎的特征指纹图谱。沈嘉等[8]以HPLC指纹图谱区分不同工艺、不同原料制备的黄连解毒汤（黄连、黄芩、黄柏、栀子）制品及日本汉方黄连解毒汤制剂。采用C18V反相色谱柱，二元梯度洗脱，二极管阵列检测器，以芍药苷为内标作为相对标准。结果共有15～16个特征峰为共有峰，但新工艺制品和醇提物出现1个独特的特征峰，与其它制品不同。各不同工艺及原料制品的特征峰与内标峰的峰高比有显著性区别。试验结果稳定，重复性良好，作者认为HPLC指纹谱可作为本复方中药不同工艺及原料制品的鉴别标准。刘艳华等[9]采用高效液相色谱法建立丹参药材的指纹图谱，以AlltechC18

（4.6mm×250mm, 5μm）为色谱柱，1％冰醋酸水溶液和1％冰醋酸甲醇溶液采用梯度洗脱，流速1.0mL／min，检测波长281nm.结果显示精密度和重复性试验中各共有峰相对峰面积的RSD均小于5％，符合有关规定，该方法可作为控制丹参药材内在质量的标准。邹忠梅等[10]研究芍药总苷的高效液相色谱指纹图谱，为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。他们利用HPLC-DAD方法，梯度洗脱，测定了10批芍药总苷样品。色谱条件为：SupelcosilTMLCl8分析柱（5μm, 150mm×4.6mm），柱温25℃，流动相A为乙腈，流动相B为水（磷酸调pH为3.0），流动相A梯度洗脱（10％～45％乙腈），分析时间为50min，时间为0、5、25、27、38、40、50min，A（％）为10、15、18、30、35、40.结果表明芍药总苷的指纹图谱特征性及专属性强，可结合含量测定用于全面控制芍药总苷的质量，确保每批产品的均一性。刘艳娥等[11]采用高效液相色谱梯度洗脱法，选用ZorbaXSB-C18

（5μm, 4.6mm×250mm）色谱柱，流动相：（A）甲醇-0.05％磷酸溶液（10∶90），

（B）甲醇-0.05％磷酸溶液（60∶40）梯度洗脱，检测波长为238nm，采用线性梯度洗脱程序。流速：1mL/min，运行时间60min.结果确定了金银花药材有11个共

有峰，该方法可靠，为提高金银花药材质量控制标准提供参考。陈闽军等[12]用高效液相色谱法测定参麦注射液中人参皂苷Rg1和Rb1的含量，并用所检测到的指纹图谱考察参麦注射液不同批次产品内在质量的一致性。实验采用汉邦C18（5μm, 250mm×4.6mm）色谱柱，流动相A为50mmol/LKH2PO4溶液，B为乙腈-水（80∶

20），pH=3.5梯度洗脱，流速1mL/min，检测波长为202nm，柱温为40℃。结果人参皂苷Rg1和Rb1的加样回收率> 99％，RSD<1.2％，人参皂苷Rg1和Rb1分别在4.20～42.0μg和3.30～33.0μg范围内线性关系良好，色谱指纹图谱中分离出

30多个峰。实验表明将指标性成分人参皂苷Rg1和Rb1的含量测定与色谱指纹图谱比较分析相结合，可提高参麦注射液的内在质量控制水平。李菁等[13]采用HPLC测定七叶皂苷钠，并用蒸发光检测器（ELSD）检测，得到HPLC-ELSD指纹图谱。对不同注射用七叶皂苷钠样品的比较研究表明，HPLC-ELSD指纹图谱准确的显示了样品的质量，结果直观、可靠。马仁玲等[14]对苦参药材用不同提取方法进行化学成分分析，采用高效液相色谱／电喷雾离子化质谱联用技术对苦参药材不同的提取方法进行研究，结果表明氯仿-浓氨溶液提取法、火溶液提取法、水-甲醇溶液提取法获取生物碱和黄酮依次为9、8和12种。该试验首次采用LC／ESI／MS联用技术对苦参药材的提取方法进行了研究，为中药苦参指纹图谱的建立提供了依据。游松等[15]以芦丁为内标物，采用HPLC法分析银杏黄酮苷。结果表明银杏叶药材、中间体及注射剂的指纹图谱有较好的相关性，所有共有峰的参数符合国家药品监督管理局关于有关中药注射剂的技术要求，有助于银杏叶药材的标准化种植及其制剂的质量控制。颜玉贞等[16]用优化的高效液相色谱试验条件，梯度洗脱，紫外检测，测定并记录色谱图，进行辨认、分析，所获得的色谱指纹图谱具有良好的重现性，可以明确鉴别西青果和诃子。从指纹图谱追踪初步证明试验所用的所有西青果是大诃子的幼果。

HPLC指纹图谱技术具有准确度高、信息量丰富的优点；但其需要复杂的前处理过程，费时长，主要限于实验室操作，不能进行现场快速分析[17]。近年来，近红外光谱技术以其快速性、整体性的特点，在众多分析方法中脱颖而出，成为研究的热点。

**3近红外光谱技术及其应用**

3.1近红外光谱技术

近红外区域按ASTM定义是指波长在780～2526nm范围内的电磁波，是人们最早发现的非可见光区域。出现在近红外波长区的光谱由于倍频、和频的形成机理，表现为谱带较宽而且重叠明显，因此难以辨，加上其光谱吸收较弱， 因而在中红外（MIR）光谱技术实用化后一直被人们淡忘了几十年。直到上世纪70年代后

出现了一些简单的滤光片式近红外光谱仪，被应用于牧草和某些农产品的定量分析工作中。到了上世纪80年代后由于光谱仪器技术的发展，更重要的是计算机硬件及在化学计量学发展基础上的软件技术的发展，近红外光谱才被人们重新重视并得到较多应用，被认为是NIRS技术的复兴[18-21]。除因多元分析等数据处理手段和计算机软件技术的发展可在相当程度上解决NIRS谱带宽、重叠大等问题以外，还因NIRS吸光度低所致的分析试样无须处理的优点，以及NIR光透射度大、散射强、对试样无损伤，可同时进行多种组分的分析：它能在几分钟内，仅通过对被测样品完成一次近红外光谱的采集测量，即可完成其多项性能指标的测定（最多可达十余项指标）。光谱测量时不需要对分析样品进行前处理；分析过程中不消耗其它材料或破坏样品；分析重现性好、成本低[22-24]。因此，近红外光谱技术很适合用于整体质量控制的在线分析。

3.2近红外光谱技术的应用

3.2.1近红外的定性分析

由于近红外光谱技术的特点，其不能用于化合物基团的识别及结构的鉴定。在定性分析中，常用判别分析法、主成分分析、马氏距离法进行定性判别[25]。

费坚等[26]系统分析了近红外光谱(NIR)分析技术特点，介绍了实现近红外光谱定性分析常用的几种分析方法，分析了近红外光谱(NIR)技术在国内外水果-果汁加工方面的应用领域和特点，提出利用近红外光谱技术检测果品-果汁品质指标是可行的。吴静珠等[27]将基于统计学理论的支持向量机（SVM）和近红外光谱（NIR）技术相结合，用于蔬菜上有机磷农药残留的快速检测分析。实验以蔬菜上常用的毒死蜱农药为分析对象，配制了浓度为0.005-5mg/kg共86个模拟的蔬菜农残样品，分别采用含量梯度法和Kennard-Stone法挑选训练集样品，以0.05mg/kg为检测阈值，建立基于样品近红外光谱的支持向量机定性识别模型，通过对惩罚参数的调整取得了满意的鉴别效果，为实现对蔬菜上的农药残留分析进行快速检测提供了一条可能的途径。于海燕等[28]应用近红外光谱透射技术，结合化学计量学方法，开展了黄酒酒龄定性鉴别的研究，并对不同光谱预处理方法（未处理、平滑、二阶微分）对酒龄鉴别结果的影响进行了对比分析。采用傅里叶变换近红外光谱仪，以86瓶绍兴黄酒为标准样品，并结合不同光谱预处理方法及判别分析法，建立了黄酒酒龄定性鉴别模型。光谱平滑处理对酒龄鉴别结果影响不显著，而微分光谱分析结果最差，近红外原始光谱结合判别分析法的分析结果最优，其校正集正确分类的百分比达

98.1%,预测集达90.6%。研究表明，近红外光谱透射技术结合原始光谱及判别分析法可作为一种可靠、准确、快速的检测方法用于黄酒酒龄定性鉴别分析。樊景超等[29]以嘎啦苹果为试材，使用ASD公司的FieldSpec3光谱仪在常温条件下进行近红外

光谱采集，应用OPUS软件的快速比较法和电子称重数据对苹果样品的近红外光谱信息进行处理。结果表明，苹果样品在室内常温及通风条件下10d失重率即可达到5％；货架期苹果的近红外光谱在水分吸收峰1440nm和1936nm发生显著变化；快速比较法在使用二阶导数预处理方法可以准确、有效地进行定性鉴别。杨永健等[30]采用近红外光谱定性分析法对不同厂家的盐酸氨溴索片进行快速识别。用固体光纤采集了13个生产厂家的345批盐酸氨溴索片的近红外漫反射光谱，随

机选择各厂家的共20批次的40个样本作为待测样组成验证集，用于评价模型预

测效果，其余662个样本作为校正集，建立定性识别分析模型。结果显示，所建模型可用于盐酸氨溴索片的快速识别分析。徐东来等[31]使用近红外光谱仪的光纤附件测定光谱，以不含有异性有机物的野木瓜片的近红外光谱为参照光谱，选择特定谱段，建立待测样品光谱与参照光谱在该谱段的相似系数阈值，定性判断待测样品是否含有异性有机物。选定6022～5587 cm－1谱段为特征谱段，设定阈值为65%，用54个含异性有机物的样品进行验证，相关系数小于65%的有49个，占样品总量的90.74%。说明此方法具有较好的预测能力，可用于药品检测车现场的快速筛查。林新等[32]分别应用2种不同型号近红外分析仪测定4个不同种类茶叶的光谱曲线，对不同的光谱数据预处理方式和不确定因子系数进行比较，确立最优定性判别定标模型。结果表明，NIRSystems6500型分析仪对不同种类茶叶的准确识别率达100%,效果较好。这种利用近红外光谱的判别技术可对茶叶的种类进行快速识别。沈漪等[33]按阿莫西林胶囊配方组成配制含主药阿莫西林浓度范围从5.91-84.13%的32个实验室样品，并收集来源于9个厂家的41批工业样品，采集其近红外光谱。分别采用判别分析和偏最小二乘回归法建立定性和定量分析模型，将其用于对未知样品含量及生产厂家进行预测分析，并对定量分析方法的重现性和加样回收率进行考察。结果显示定性分析模型对18个预测样品的判错数为0。所以用近红外光谱分析技术对阿莫西林胶囊进行定性和定量分析结果准确可靠，方法简便快速，不需预处理，可推广用于此类样品工业现场的原位和在线检测。杨庭栋等[34]根据近红外光谱表征的内燃机油结构族组成信息，采用Kohonen神经网络数据处理数学模型，预测了内燃机油的粘度指数，结果表明Kohonen神经网络是一种有效的定性分析内燃机油粘度特性的工具，内燃机油的组成与粘度特性有良好的相关性。

3.2.2近红外的定量分析

在用近红外光谱技术进行定量分析时，需要建立近红外定量模型。模型的建立要经历数据的收集、光谱数据的前处理、波长范围的选择、化学计量学方法的选择、模型的建立、模型的评价及优化等几个步骤。其中光谱数据的前处理方法

包括平滑处理、散射效应校正、导数法、矢量归一化法等，可以减小光谱噪声、颗粒散射、光谱漂移等非线性因素对定标结果的影响，同时又能最大限度的保留样品近红外光谱之间由于成分浓度的线性变化[35-37]；化学计量学方法有主成分分析法（PrincipalComponent Analysis, PCR），偏最小二乘法（Partial Least Squares, PLS）和人工神经网络法（Artificial Neural Network, ANN）等[38-39]。

齐小明等[40]用偏最小二乘法(PLS)，根据输出变量将原始数据压缩为主成分，输人BP网并用所建模型预测30个小麦样品的蛋白质含量，以克服所建模型与训练样本集产生“过拟合”现象，收到良好的效果。张铮[41]应用近红外漫反射技术通过偏最小二乘法建立数学模型，对预测集进行预测，并对实际样品的含量进行测定。结果显示36个样品经内部交叉验证建立预测模型，马钱苷和熊果酸内部交叉验证的均方差MSECV分别为0．393和0．043。用8个验证样品进行外部验证，预测值与真实值的相关系数R2分别为98．4%和98．9%，RMSEP分别为0．239和0．0392，方法重现性RSD分别为0．8%＆0．6%(n=5)，方法稳定性RSD分别为0．4%＆0．7%(n=3)表明适用于涉及企业的药品进行快速检查或质量控制。刘辉军等[42]基于径向基函数(RBF)和反向传播(BP)神经网络分别建立了绿茶水分含量的近红外光谱分析模型，结果表明：RBF网络预测模型的相关系数r（p）为0.933, 预测标准误RMSEP为0.528%; BP网络预测模型的相关系数r(p) =0.914,预测标准误

RMSEP为0.598%, RBF网络模型优于BP网络模型。章顺楠等[43]为了研究复方丹参滴丸滴制料液中丹参素、原儿茶醛含量的快速分析方法，及化料过程的均一性在线监测技术，以高效液相色谱分析值为参照，采用近红外透反射光谱技术采集料液NIR光谱，偏最小二乘回归建立校正模型，并使用建立好的PLSR定量模型对料液的丹参素、原儿茶醛含量进行快速检测，对化料过程均一性进行在线监测，确定化料终点。结果显示模型性能良好，丹参素、原儿茶醛的相关系数分别为0.9929和0.9937, 验证集均方差分别为0.368和0.159。NIR光谱法可实时反映料液中采集点位置的成分含量变化，并正确反映化料过程中料液均一状态，说明近红外透反射光谱技术可有效采集滴丸料液NIR光谱，近红外光谱法可快速准确测定滴丸料液中成分含量，可用于滴丸剂料液均一性的判断。

多组分同时测定，是近红外技术得以大力推广的主要原因。在同一模式下，可以同时测定多种组分，这对于具有复杂成分的中药质量控制具有重要意义。同时，利用近红外光谱和多变量统计分类技术系统聚类分析、逐步聚类分析、主成分分析和逐步判别等可很好地对药材和成药进行定性判别和分类，这在中药的优劣、真伪鉴别时可以发挥积极的作用。

**4总结**

中药质量评价是一项系统工程，中药的复杂性、未知性决定了质量研究工作必将是逐渐揭示规律不断接近真实的漫长探索过程，在这一过程中，保持多维的视角和着眼于系统的评价体系的建立是非常必要的[44]。利用HPLC指纹图谱技术与NIR光谱技术各自的优点，从整体角度系统性地对中药制剂进行质量分析，为中药制剂的快速评价和真伪鉴别提供了一种新方法，同时也为其它制剂生产过程中的在线检测和质量控制提供了参考和应用基础。

参考文献

[1] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2011,41(4):505-508

[2]富同义, 顾琳娜. 浅谈现行中药质量标准的局限性与构建要素[J]. 现代中药研究与实践,2006,20(2):5-6.

[3]张铁军.中药质量认识与质量评价[J].中草药, 2011,42(1):1-8.

[4]富同义, 顾琳娜. 浅谈现行中药质量标准的局限性与构建要素[J]. 现代中药研究与实践,2006,20(2):5-6.

[5]曹敏, 陈玉英.栀子药材西红花苷类HPLC指纹图谱的研究[J].中国新药杂志, 2003, 12（7）:

553-555.

[6]周玉新，袁永生，高霞，等.三七药材及其制剂指纹图谱研究[J].中国中药杂志，2001, 26（2）：

122-123.

[7]杨光明，蔡宝昌，潘扬，等.川芎药材指纹图谱研究与产地比较（Ⅰ）[J].南京中医药大学学报（自然科学版）,2002,18（3）：172-174.

[8]沈嘉，曹现峰，刘九飞.几种黄连解毒汤的HPLC指纹图谱研究[J].中成药，2003, 25（6）：

433-437.

[9]刘艳华，赵陆华，黄剑，等.丹参HPLC指纹图谱的研究[J].中国药科大学学报，2002, 33(2):127-130.

[10]邹忠梅，徐丽珍，杨世林。芍药总苷高效液相色谱指纹图谱研究[J].药学学报，2003，38

（1）：46-49.

[11]刘艳娥，吴玫涵，吴玉田，等.金银花药材高效液相指纹图谱研究[J].解放军药学学报，200,19

（3）:161-164.

[12]陈闽军，吴永江，程翼宇.高效液相色谱用于参麦注射液人参皂苷的含量测定和批次一致性考察[J].中国药学杂志，2003，38（8）：623-626.

[13]李菁，叶文才. HPLC-ELSD法在注射用七叶皂苷钠质量控制中的应用[J].中草药，2000，

31(8)：582-583.

[14]马仁玲.周红华.于喜水.等.苦参药材提取方法的LC/MS研究[J].中成药，2003, 25（10）：

831-832.

[15] 游松.王亮.蒋雅红.等.银杏叶注射剂指纹图谱的研究[J].中草药，2002,3（3）：216-218.

[16]颜玉贞，卢平华，谢培ft，西青果与诃子的HPLC指纹图谱鉴别研究[J].中药新药与临床药理，2001,12(3)：173-178.

[17]熊艳梅，唐果，段佳，等.近红外、中红外和拉曼光谱法测定商品农药制剂中溴氰菊酯的含量

[J].光谱学与光谱分析，2010，30(11)：2936-2940.

[18] DreassiE and CeramelliG. Controlofpharm, Analyst,2007,121(2):219-224.

[19] PluggeWandVandervliesC. J. pharm. andBiomed. Anal.,1996,14(8-10),891-897.

[20] KrischJDandDrennenJK. PharmaceuticalResearch.,2006,13(2),234-237.

[21] GonzalezFandPousR. J. Pham. andBiomed. Anal.,1995,13(4-5):419-423.

[22] Blanco, M. and. Coello, J., Anal. Chim. Acta,2006,298(2):183-187.

[23] PluggeWandVendervliesC. J. Pharm. andBiomed. Anal.,2004,10(10-12),797-805.

[24] CortiP, DreassiEandCeramellicG. Analusis,2005,19(7):198-206.

[25]白英奎，申铉国.近红外光谱技术在药品检测中的应用研究[D].吉林：吉林大学博士学位论文.2005.

[26]费坚，岳田利，张飞等. 果品-果汁加工中的近红外光谱技术[J]. 西北农业学 报

2005,14(1):88-93

[27]吴静珠，李慧，刘翠玲等.基于近红外的蔬菜农残快速定性检测技术研究[J].食品工业科技，2010,31(10)：377-379.

[28]于海燕，应义斌，傅霞萍等. 近红外透射光谱应用于黄酒酒龄的定性分析[J].光谱学与光谱分析,2007, 27(5)：920-923.

[29]樊景超，周国民.苹果货架期的近红外光谱定性分析[J].中国食物与营养，2011, 17(1)：47-49.

[30]杨永健，毛丹卓，王小天等.盐酸氨溴索片近红外光谱法的快速识别检测[J].中国医药工业杂志，2010,41(4)：280-283.

[31]徐东来，莫迎. 近红外光谱相关系数法测定野木瓜片中异性有机物[J]. 药物分析杂志，2011,31(7)：1423-1424.

[32]林新，牛智有. 基于近红外光谱茶叶种类的快速识别[J]. 华中农业大学学报,2008,27(2):326-330.

[33]沈漪，潘颖，刘全，等.近红外漫反射光谱法对阿莫西林胶囊的定性及定量分析[J].药物分析杂志，2005,25(4)：385-389.

[34]杨庭栋，冯新沪.近红外光谱法定性分析内燃机油的粘度特性[J].合成润滑材料，2004，

31(1)：13-16.

[35]王钢力，聂黎行，张继，等. 应用应用近红外光谱技术鉴别红参药材[J].中草药，2008，39（3）：

438-440

[36] IngeS. Helland, Tormod Neas, Tomas Isaksson. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,1995,29-233.

[37] TIAN Gaoyou, YUAN Hongfu, LIU Huiying, et al. Spectroscopy and Spectral Analysis,2003,23(6):1111.

[38] Barnes R J, Dhanoa M S, Lister S J. Applied Spectroscopy, 1989, 43-772.

[39] Svante Wold, Henrik Antti, Fredrik Lindgren, et al. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998,44-175.

[40]齐小明，张录达，杜晓林，等. PLS-BP 法近红外光谱定量分析研究[J].光谱学与光谱分

析,2003,23(3):870-872.

[41]张铮.近红外漫反射光谱快速测定ft茱萸醇提物马钱苷和熊果酸含量方法[J].安徽医药，2011,15(8)：955-957.

[42]刘辉军，吕进，林敏，等.基于RBF网络和NIRS的绿茶水分含量分析模型[J].中国计量学院学报，2005,16(3)：188-190.

[43]章顺楠，杨海雷，刘占强，等.近红外光谱法在线监测复方丹参滴丸料液中有效成分含量[J].药物分析杂志，2009,29(2)：192-196.

[44]张铁军.中药质量认识与质量评价[J].中草药，2011, 42(1)：1-8.