

# 近红外光谱法快速测定知母中芒果苷的含量

谢彩侠, 谢惠英, 白雁\*, 王丽娜, 刘蕊  
(河南中医学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:应用近红外光谱技术建立快速测定知母中芒果苷含量的方法。方法:以 HPLC 所测样品中芒果苷的含量为参考值,将近红外光谱与知母中芒果苷的含量进行关联,对光谱预处理方法和建模区间进行了考察,采用偏最小二乘法(PLS)建立定量分析模型。结果:通过比较最终确定以 SNV + SG + Second Derivative 对光谱进行预处理,结合软件的波长区间优化功能,确定  $4\ 139.58 \sim 5\ 068.56\ \text{cm}^{-1}$  为最佳波段。结果 100 份知母样品所建立的芒果苷的定量分析模型内部交叉验证决定系数( $R^2$ )校正均方根偏差(RMSEC)、预测均方根偏差(RMSEP)分别为 0.963 61, 0.061 6, 0.088 1。结论:该方法准确、快速、简便,建立的定量分析模型,能够对知母中芒果苷的含量进行快速测定。

**[关键词]** 近红外光谱技术; 知母; 芒果苷; 快速测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0059-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100059

## Rapid Determination of Mangiferin in Anemarrhenae Rhizoma by Near-infrared Spectroscopy Technique

XIE Cai-xia, XIE Hui-Ying, BAI Yan\*, WANG Li-na, LIU Rui (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** Determine the content of mangiferin in Anemarrhenae Rhizoma by near-infrared spectroscopy (NIRS). **Method:** Use the content of mangiferin in samples determined by HPLC as reference value. The quantitative model of mangiferin in Anemarrhenae Rhizoma was established by NIRS combining with partial least squares (PLS). **Result:** The correlation coefficients ( $R^2$ ) was 0.963 61, the root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.061 6, the root mean square error of predication (RMSEP) was 0.088 1. **Conclusion:** The method is accurate, fast, simple. It can be used as a rapid detection method for Anemarrhenae Rhizoma.

**[Key words]** near-infrared spectroscopy; Anemarrhenae Rhizome; mangiferin; rapid determination

知母具有清热泻火、生津润燥之功效。临床用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘<sup>[1]</sup>等。其主要功效成分为芒果苷和甾体皂苷<sup>[2-3]</sup>,研究表明芒果苷具有抗病原微生物、抗血小板聚集、降血糖、解热、抗炎、降低转氨酶等生理活性<sup>[4-5]</sup>。

芒果苷含量可作为知母药材的重要质量控制指标,常用的含量测定方法为高效液相色谱法,但此法存在样品处理繁琐、分析时间长、分析结果滞后等缺陷,不利于药材质量的快速检测。近红外(NIR)光谱技术是近年来迅速发展的一种新型光谱分析技

术,具有快速、高效、无污染、非破坏性以及实时在线分析等优点<sup>[6]</sup>,已经越来越多地被应用于中药研究<sup>[7-9]</sup>。NIR光谱法在中药材等天然药物含量测定方面取得了一定的研究成果,但尚未见应用于知母中芒果苷含量测定的报道。本研究将近红外光谱法与化学计量学相结合,采用偏最小二乘法建立定量分析模型,实现对知母药材中芒果苷含量的快速、简便、准确测定。

### 1 材料

Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪(配有积分球漫反射采样系统,OMNIC 光谱采集软件和

**[收稿日期]** 20140807(011)

**[基金项目]** 河南中医学院科技创新人才项目(2012XCXRC03);河南中医学院研究生创新基金项目(2013YCX015)

**[第一作者]** 谢彩侠,博士,副教授,从事现代仪器分析方法在中药质量控制中应用研究, Tel:13673651577, E-mail:942478100@qq.com

**[通讯作者]** \*白雁,教授,从事利用现代仪器分析方法对中药质量控制进行研究, Tel:0371-65962967, E-mail:white-yan@hotmail.com

TQ Analyst 8.0 分析软件), 1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent), FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司), CPA225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司), AL 204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Milli-Q Academic A 10 型超纯水机(美国 Millipore 公司), HY-8 型调速振荡器(国华电器有限公司)。

芒果苷对照品(批号 MUST-13110201, 成都曼思特生物科技有限公司), 乙腈(色谱纯, Tedia 公司), 纯水(河南中美纯水有限公司), 其他试剂均为国产分析纯。

本实验共收集样品 100 份, 购自安徽亳州, 由河南中医学院董诚明教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎。药材粉碎后过 60 目筛, 备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 芒果苷的含量测定

**2.1.1 色谱条件** Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 乙酸水(11:89), 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 258 nm, 进样量 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取芒果苷对照品 20 mg, 用稀乙醇溶解并定容至 200 mL, 制备成质量浓度为 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的对照品母液。精密吸取母液 5 mL, 用稀乙醇定容至 10 mL, 得对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取本品粉末约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(温度 25 °C, 功率 400 W, 频率 40 KHz) 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 精密吸取 2.1.2 项下对照品母液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用稀乙醇溶解并定容, 摇匀。按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以芒果苷浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程  $Y = 109.07X - 4.9048 (R^2 = 0.9998)$ , 线性范围 0.2 ~ 1 μg。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果峰面积的 RSD 0.3%, 表明仪器精密度良好。

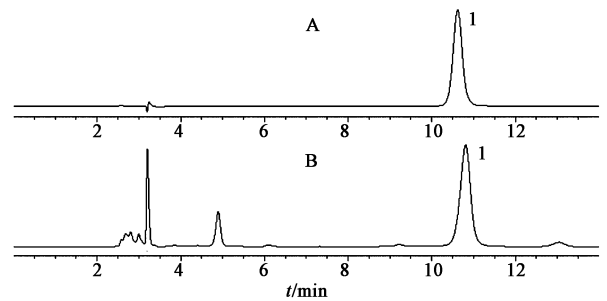
**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 结果峰面积的 RSD 1.6%, 表明供试品溶

液在 24 h 内稳定。

**2.1.7 重复性试验** 取同一批药材粉末 0.1 g, 共 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果平均含量为 14.7 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的知母粉末 6 份, 每份 0.05 g, 再分别加入一定量的对照品, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果芒果苷的平均加样回收率 100.2%, RSD 1.2%, 表明该方法准确可靠。

**2.1.9 样品测定** 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 见图 1。结果, 100 批样品中芒果苷的质量分数在 0.89% ~ 2.08%。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芒果苷

图 1 知母 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Anemarrhena Rhizoma*

**2.2 近红外光谱采集** 取约 5 g 样品粉末放入石英样品杯中, 均匀铺平, 采用积分球漫反射, 以空气为参比采集光谱图。采集参数如下: 分辨率 8 cm<sup>-1</sup>, 光谱采集范围 12 000 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数 64 次。温度 25 °C, 相对湿度 25% ~ 33%。每份样品重复扫描 3 次, 求平均光谱, 100 份样品的近红外光谱叠加图见图 2。

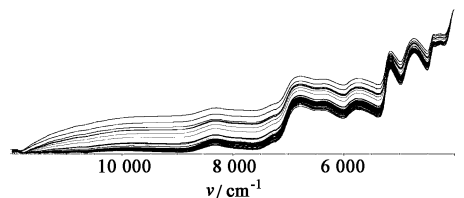


图 2 100 份知母样品的近红外光谱叠加

Fig. 2 NIRS spectra of 100 *Anemarrhena Rhizoma immaturus* samples

## 3 模型的建立与预测

将校正集近红外光谱与 HPLC 分析值相关联,

采用偏最小二乘法 (PLS) 和交叉验证法建立定量分析模型,并以内部交叉验证决定系数 ( $R^2$ )、校正均方根偏差 (RMSEC)、验证均方根偏差 (RMSEP) 作为模型性能的综合评价指标。其中,  $R^2$  越接近 1, 参考值与近红外预测值相关性越好, 均方差越小, 且 RMSEP 与 RMSEC 越接近, 所建模型适用性越强、预测效果越好。

**3.1 校正集和验证集的选择** 运用 TQ Analyst 8.0 定量分析软件中 PLS 法建立模型。根据知母样品中芒果苷的含量分布情况, 从 100 份知母药材样品中分别选择 73 个样品作为校正集, 27 个样品作为验证集。校正集和验证集样品中芒果苷含量分布范围分别为 0.89% ~ 2.08%, 1.40% ~ 1.88%, 平均值分别为 1.49%, 1.64%。

**3.2 光谱预处理方法的选择** 在用 PLS 法建立模型时, 根据模型的内部交叉验证决定系数 ( $R^2$ )、校正均方根偏差 (RMSEC)、预测均方根偏差 (RMSEP) 等性能参数来评价模型。预处理方法对  $R^2$ 、RMSEC、RMSEP 的影响见表 1。通过比较最终确定 SNV + SG + Second Derivative 对光谱进行预处理。

表 1 不同预处理方法对  $R^2$ , RMSEC, RMSEP 的影响

Table 1 Influence of different regression methods on  $R^2$ , RMSEC and RMSEP

光谱预处理方法	$R^2$	RMSEC	RMSEP
MSC + First Derivative	0.743 63	0.527	0.234
MSC + Second Derivative	0.950 89	0.244	0.096 1
SNV + First Derivative	0.853 47	0.234	0.147 0
SNV + Second Derivative	0.933 42	0.096 1	0.051 1
MSC + ND + First Derivative	0.875 52	0.143	0.171 3
MSC + ND + Second Derivative	0.905 72	0.162	0.079 6
MSC + SG + First Derivative	0.884 73	0.147	0.144 8
MSC + SG + Second Derivative	0.927 13	0.154	0.088 4
SNV + SG + First Derivative	0.869 39	0.145	0.169 2
SNV + SG + Second Derivative	0.963 61	0.061 6	0.088 1
SNV + ND + First Derivative	0.792 23	0.101 5	0.196 2
SNV + ND + Second Derivative	0.856 34	0.128 1	0.145 6

**3.3 波长区间的选择** 表 2 对比了不同波长区间对模型性能的影响, 结合软件的波长区间优化功能, 确定 4 139.58 ~ 5 068.56  $\text{cm}^{-1}$  为最佳波段。

**3.4 主成分数的选择** 主成分数对模型的稳定性有很大影响, 过多会使模型包含较多的测量噪声, 导致过拟合; 过少则建模信息不全, 预测精度不够。本

表 2 不同光谱范围对  $R^2$ , RMSEC, RMSEP 的影响

Table 2 Influence of different spectral region on  $R^2$ , RMSEC and RMSEP

建模波长区段/ $\text{cm}^{-1}$	$R^2$	RMSEC	RMSEP
4 139.58 ~ 5 068.56	0.963 61	0.062	0.088
4 408.38 ~ 7 477.92	0.882 01	0.372	0.229
6 905.04 ~ 9 835.74	0.915 13	0.318	0.326
4 952.38 ~ 10 000.00	0.857 01	0.406	0.248

试验采用内部交叉验证法来筛选主成分数, 当 RMSECV 最小时, 所选主成分数最佳; 且 RMSECV 越小, 模型的预测精度越高。由图 3 可见, RMSECV 最小值为 0.132 04, 对应的主成分数为 5。

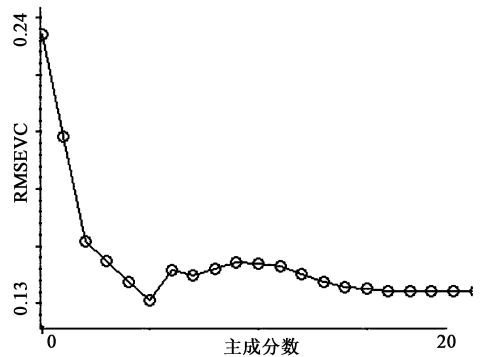


图 3 校正集 RMSECV 与主成分数之间的相关性

Fig. 3 RMSECV values changed with the changing of Factor

**3.5 定量模型的建立** 运用 TQ Analyst 8.0 分析软件建立定量模型, 100 份知母样品用于建模, 其中 73 份样品作为校正集样品, 27 份样品作为验证集样品, 光谱预处理方法为 SNV + SG + Second Derivative, 建模范围为 4 139.58 ~ 5 068.56  $\text{cm}^{-1}$ , 最佳主成分数为 5。此时,  $R^2 = 0.963 61$ , RMSEC = 0.061 6, RMSEP = 0.088 1, 可以看出预测值与参考值很接近, 两者相关性较高, 模型性能较好。见图 4, 5。

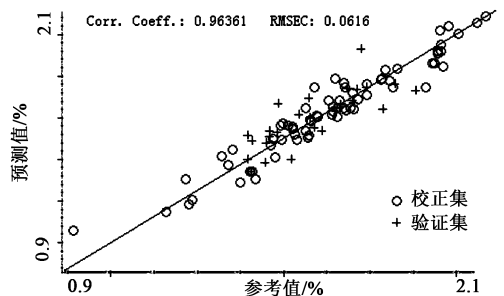


图 4 芒果苷含量 NIR 预测值与参考值之间的相关

Fig. 4 Correlation plot of NIR predicted values and reference values

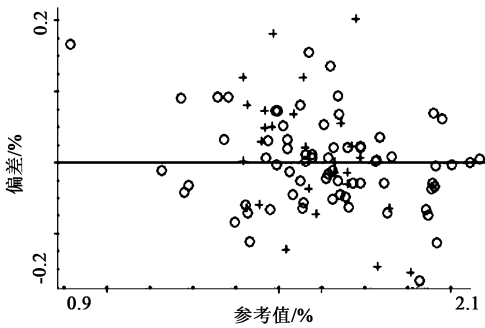


图5 芒果苷含量绝对误差与药典法测定值之间的相关  
Fig. 5 Deviation plot of NIR predicted values and reference values

**3.6 定量模型的验证** 采用校正集建立的芒果苷定量分析模型,对预测集中的样品进行定量分析,得到的预测统计结果见表3。以HPLC法测定值作为参考值,以模型的预测值与参考值的相对偏差来衡量模型的预测能力。由表3可知,预测结果最大相对偏差为12.08%,最小相对偏差为0,平均相对偏差为4.37%,表明模型的预测效果良好。

表3 NIR预测值与药典法测定值的比较  
Table 3 NIR predicted values and Hot-dip method reference values of validation set %

编号	参考值	预测值	偏差	相对偏差
8	1.71	1.73	0.02	1.70
12	1.52	1.40	-0.12	7.89
17	1.41	1.34	-0.07	4.96
18	1.45	1.39	-0.06	4.14
19	1.73	1.93	0.20	11.56
23	1.70	1.67	-0.03	1.76
26	1.74	1.75	0.01	0.57
29	1.68	1.74	0.06	3.57
31	1.61	1.54	-0.07	4.35
35	1.66	1.66	0	0
37	1.57	1.69	0.12	7.64
39	1.79	1.64	-0.15	8.38
42	1.82	1.76	-0.06	3.30
43	1.54	1.61	0.07	4.54
50	1.40	1.52	0.12	8.57
55	1.48	1.53	0.05	3.38
56	1.49	1.67	0.18	12.08
58	1.46	1.53	0.07	4.79
64	1.59	1.55	-0.04	2.52
66	1.46	1.51	0.05	3.42
67	1.40	1.40	0	0
70	1.41	1.49	0.08	5.67
71	1.45	1.48	0.03	2.07
82	1.88	1.73	-0.15	7.98
85	1.58	1.60	0.02	1.27
86	1.66	1.65	-0.01	0.60

#### 4 讨论

本实验通过近红外漫反射光谱技术与化学计量学技术相结合,将100份样品的原始光谱分别经标准归一化(SNV)和多元散射校正(MSC)预处理,并选取不同波段4 139.58 ~ 5 068.56, 4 408.38 ~ 7 477.92, 6 905.04 ~ 9 835.74, 4 952.38 ~ 10 000.00  $\text{cm}^{-1}$ 运用偏最小二乘法(PLS)建立定量校正模型并分析。结果模型的内部交叉验证决定系数( $R^2$ )为0.963 61,校正均方根偏差(RMSEC)为0.061 6,预测均方根偏差(RMSEP)为0.088 1,且在4 139.58 ~ 5 068.56  $\text{cm}^{-1}$ 谱段通过近红外建模方法对数据的拟合,可以较准确地预测其中芒果苷的含量。采用此NIR方法,知母粉末样品1次测量只需40 s(扫描64次),而HPLC测量1次至少要30 min,大大节省了分析时间。该方法分析快速、简便,结果准确可靠,可以为中药知母质量的快速评价和在线监控提供一定的参考依据。

#### [参考文献]

[1] 刘敏,赵白云,赵亮,等. 炮制前后知母中芒果苷和新芒果苷的含量变化[J]. 第二军医大学学报,2006,27(5):528-530.

[2] 廖洪利,吴秋业,叶光明,等. 芒果苷药理研究进展[J]. 天津药学,2005,17(2):50-52.

[3] 任晓光,李东伟,何彩梅,等. 芒果苷药理研究进展[J]. 中草药,2011,33(5):860-863.

[4] 倪梁红,秦民坚. 知母资源化学及药理研究进展[J]. 中国野生植物资源,2005,24(4):16.

[5] 徐冬英,谢崇源,韦袞政. 知母的研究进展[J]. 广西中医学院学报,1999,16(4):93.

[6] 马冬红,王锡昌,刘利平,等. 近红外光谱技术在食品产地溯源中的研究进展[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(4):877-881.

[7] 李家春,萧伟,孙兰,等. 基于近红外光谱的白芍药材快速分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):57-60.

[8] 李季静. 近红外光谱分析技术在药学领域的应用[J]. 首都医药,2010,17(4):15-16.

[9] 张延莹,张金巍,张培,等. 近红外光谱技术在丹酚酸B纯化在线质控中的应用研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):220-222.

[责任编辑 顾雪竹]