

· 光谱分析 ·

近红外光谱法快速测定白芍中芍药苷和水分的含量

贺敬霞^{1,2}, 杨滨¹, 柯华香^{1,3}, 尹蓉莉², 张继丹¹, 李化^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;
2. 成都中医药大学 药学院, 成都 611137; 3. 西华大学 食品与生物工程学院, 成都 610039)

[摘要] 目的: 采用近红外光谱技术建立白芍中芍药苷和水分的定量模型。方法: 收集不同产地白芍样品 108 批, 采用偏最小二乘法建立白芍中水分和芍药苷含量的近红外光谱校正模型, 以烘干法和超高效液相色谱法, 分别测定样品中水分和芍药苷含量, 作为参考值, 并用相关系数和预测均方差对模型预测性能进行评价。结果: 芍药苷和水分校正集的相关系数分别为 0.967 6, 0.873 1, 校正集均方根误差分别为 0.406, 0.264; 预测集均方根误差分别为 0.599, 0.252。结论: 该方法快速、简便、无污染、结果可靠, 实现了白芍样品中芍药苷和水分含量的快速、准确测定。

[关键词] 近红外光谱法; 白芍; 芍药苷; 水分; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220060

Establishment of Quantitative Models of Paeoniflorin and Water in Paeoniae Radix Alba Based on NIR Spectroscopy

HE Jing-xia^{1,2}, YANG Bin¹, KE Hua-xiang^{1,3}, YIN Rong-li², ZHANG Ji-dan¹, LI Hua^{1*}
(1. Institute of Chinese Materia Medica, State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of Tradition Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quantitative models of paeoniflorin and water in samples of Paeoniae Radix Alba using near infrared (NIR) spectroscopy. **Method:** 108 batches of Paeoniae Radix Alba samples were collected from different regions of China. Near infrared spectrum correction models for determination of paeoniflorin and water in samples were developed with the application of partial least squares regression. The reference analyses were performed with oven-drying method and ultra performance liquid chromatography method respectively for determination of water and paeoniflorin. Correlation coefficient and predicted root mean square error were also used for evaluating the estimated performance of the models. **Result:** For paeoniflorin and water, the correlation coefficients for calibration set were 0.967 6 and 0.873 1, respectively; root-mean-square errors for calibration set were 0.406 and 0.264, respectively; root-mean-square errors for prediction set of the two analytes reached 0.599 and 0.252, respectively. **Conclusion:** This method is rapid, simple, reliable and has no pollution, which can be used for rapid and accurate determination of paeoniflorin and water in Paeoniae Radix Alba.

[Key words] near infrared spectroscopy; Paeoniae Radix Alba; paeoniflorin; water; content determination

白芍具备养血调经, 敛阴止汗, 柔肝止痛, 平抑肝阳的功效^[1]。对于神经系统、脑血管系统、泌尿

系统等方面的疾病, 其治疗作用较为显著^[2]。在药材保存过程中, 如药材中含水量过高容易导致药材

[收稿日期] 20150815(001)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201407003)

[第一作者] 贺敬霞, 在读硕士, 从事中药质量评价和中药新剂型的研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: hejingxia123@163.com

[通讯作者] *李化, 副研究员, 从事中药化学与质量评价、元素的形态分析研究, Tel:010-64014411-2848, E-mail: lihua1976@icmm.ac.cn

霉变从而影响到药材的质量。白芍的主要成分芍药苷具有抗氧化、抗惊厥、改善微循环、降血糖、保护神经等多种药理活性^[3]。2010 年版《中国药典》规定白芍中水分含量不得超过 14.0%，芍药苷含量不得低于 1.6%。研究发现，进行白芍质量评价时，《中国药典》中芍药苷和水分含量测定方法均操作繁琐，且需要耗费大量时间，不适用于在药材流通市场上药材质量的快速评价。近红外光谱(Near Infrared, NIR)分析技术快速无损、绿色环保，其定性定量技术在药物分析领域已有较多的应用^[4-7]。迄今为止，尚未见到采用 NIR 法快速同步检测白芍样品中芍药苷和水分含量的文献报道。为此，本文以水分和芍药苷作为评价指标，采集 108 批不同产地的白芍样品，应用近红外光谱，结合偏最小二乘法(Partial Least Square, PLS)优化预处理方法和建模波段，实现白芍中芍药苷和水分含量的同步测定，为市场上大批量白芍质量的快速监测提供依据。

1 材料

Antaris II 型傅里叶变换近红外光谱仪，配有积分球漫反射采样系统，RESULT™ 光谱采集软件和 TQ 9.1 分析软件(美国 Thermo Fisher 公司)；ACQUITY H-Class UPLC™ 型超高效液相色谱仪(包括四元低压梯度泵，真空脱气机，自动进样器，柱温箱，二极管阵列检测器，Empower II 色谱工作站，美国 Waters)；KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)，Milli-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司)，电热恒温鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司)，BT125D 型电子天平(德国 Sartorius)，FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

芍药苷(纯度 ≥98%，批号 MUST-13113009)购自成都曼思特生物科技有限公司，乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司)，其余试剂均为分析纯，超纯水自制。108 批白芍样品购自 6 个省区的大型药材市场，经杨滨研究员鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根。药材粉碎过 40 目筛，编号，封口袋密封置防潮柜中常温保存，备用。

2 方法与结果

2.1 近红外光谱的采集 取样品约 5 g，混合均匀后放入石英样品杯中，摊平，以空气为参比，扣除背景，采集近红外光谱图。采样方式积分球漫反射，光谱扫描范围 4 000 ~ 12 000 cm^{-1} ，分辨率 8 cm^{-1} ，扫描次数 64 次，温度(20 ± 2) °C，相对湿度 30% ~ 40%。每批样品扫描 2 次，求平均 NIR 光谱值。108

批白芍样品近红外光谱叠加图见图 1。由图 1 可知，不同批次白芍样品间的近红外光谱图较为相似，近红外原始光谱数据与芍药苷含量、水分含量的相关性不显著，故需要选择合适的建模波段，对原始光谱进行预处理，才能建立准确可靠的含量预测模型。

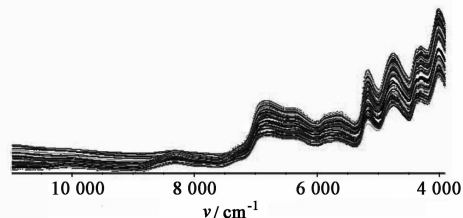
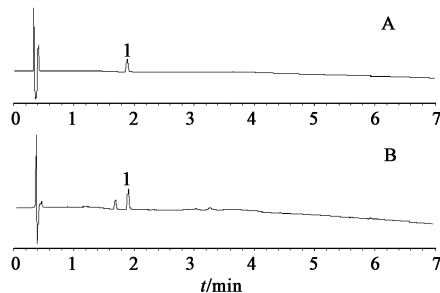


图 1 白芍样品的近红外原始光谱叠加
Fig.1 Original NIR spectra of samples of Paeoniae Radix Alba

2.2 超高效液相色谱法测定芍药苷含量 取芍药苷对照品适量，精密称定，加甲醇溶解，制得质量浓度为 20.37 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液。取白芍粉末约 0.05 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入稀乙醇 35 mL，超声处理(功率 250 W，频率 20 kHz)20 min，取出，放冷，加入稀乙醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液过 0.2 μm 微孔滤膜，供超高效液相色谱法(UPLC)分析用。色谱条件：Aquity BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)；流动相水(A)-乙腈(B)，梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 90% ~ 85% A; 0.5 ~ 2.5 min, 85% A; 2.5 ~ 3 min, 85% ~ 80% A; 3 ~ 6.5 min, 80% ~ 58% A; 6.5 ~ 7 min, 58% ~ 90% A)；柱温 40 °C，流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，检测波长 230 nm，进样体积 1 μL 。色谱图见图 2。以外标法计算芍药苷含量。每批样品平行测定 2 次，取平均值。结果显示，108 批样品的芍药苷含量范围 0.12% ~ 5.95%。



A. 对照品; B. 样品; 1. 芍药苷
图 2 白芍样品溶液的 UPLC
Fig.2 UPLC chromatograms of Paeoniae Radix Alba

2.3 烘干法测定水分含量 取样品粉末 2.0 g，精密称定，参考《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法(烘干法)，测定 108 批白芍样品的含水

量^[1]在 1.45% ~ 2.57%。

2.4 模型的建立与评价

2.4.1 样本集划分 以 2/3 白芍样品作为校正样品集,用于建立测定白芍样品中芍药苷和水分的定量校正模型,剩余 1/3 样品作为验证集,用于验证所建立校正模型的预测能力。校正集和验证集中芍药苷、水分的最大值、最小值和平均值见表 1。

表 1 样品中指标成分的含量分布

样品组		水分	芍药苷
校正集	最大值	2.57	5.95
	最小值	1.45	0.12
	平均值	2.07	2.57
验证集	最大值	2.50	4.75
	最小值	1.56	0.14
	平均值	2.12	2.34

2.4.2 模型的建立 为最大限度地减少误差,光谱数据经预处理后,采用 PLS 法分别建立水分和芍药苷定量校正模型。以校正集样品的内部交叉验证均方差 (Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV) 为指标优化建模参数,选择合适的主成分数 (Factors)。本研究利用 TQ Analyst 9.1 软件的杠杆值剔除异常光谱 2 批。

表 1 分别是未处理 (None), Savitsky Golay (SG) 平滑, Norris Derivative (ND) 平滑, 一阶导数 (First Derivative, FD), 二阶导数 (Second Derivative, SD), 多元散射校正 (Multiplicative Scatter Correction, MSC), 标准正态变量校正 (Standard Normal Variate, SNV) 等建立模型时的主成分数, *R* 和 RMSECV。采用 FD + SG(7,3) 时,水分和芍药苷校正模型的 *R* 最大,且 RMSECV 最小,见表 2。不同建模波段的比较结果见表 3。结果表明,水分在 7 000 ~ 5 000 cm⁻¹, 芍药苷在 6 000 ~ 4 500 cm⁻¹ 的光谱范围的校正性能最好。本实验以 RMSECV 为指标,进行主成分的筛选,选取 RMSECV 的最小值。芍药苷最佳主成分数为 7,水分最佳主成分数为 5。

2.4.3 模型的验证 以 PLS 法建立的校正模型对 34 批验证集样品进行分析,芍药苷、水分的 NIR 预测值与实测值的 *R* 为 0.934 9, 0.811 6, 见图 3, 4。结果表明,近红外漫反射光谱法快速准确地测定白芍样品中的芍药苷和水分含量。

3 讨论

本研究将 NIR 技术与 PLS 法相结合,以建立合

表 2 不同光谱预处理方法的建模

Table 2 Results of different spectra preprocessing methods

项目	预处理方法	主成分数	<i>R</i>	RMSECV
水分	None	2	0.791 1	0.332
	SD + ND(5,5)	5	0.820 0	0.311
	SD + SG(7,3)	6	0.784 8	0.339
	FD + ND(5,5)	5	0.818 6	0.312
	FD + SG(7,3)	5	0.822 1	0.310
	MSC	3	0.801 0	0.325
芍药苷	SNV	3	0.802 7	0.323
	None	9	0.780 6	1.04
	SD + ND(5,5)	6	0.839 3	0.902
	SD + SG(7,3)	5	0.842 9	0.899
	FD + ND(5,5)	7	0.825 0	0.937
	FD + SG(7,3)	6	0.844 5	0.881
	MSC	7	0.801 8	0.995
SNV	7	0.795 0	1.02	

表 3 不同光谱波段的建模

Table 3 Results of different regions

项目	波数范围/cm ⁻¹	主成分数	<i>R</i>	RMSECV
水分	5 436.38 ~ 4 927.65	4	0.797 2	0.327
	7 000.00 ~ 5 000.00	5	0.822 1	0.310
	7 256.99 ~ 5 117.21	7	0.817 5	0.314
	7 276.48 ~ 6 691.98,	5	0.797 0	0.328
	5 458.03 ~ 4 906.00			
	7 406.37 ~ 4 440.56	5	0.798 1	0.327
芍药苷	10 000.00 ~ 4 000.00	3	0.780 9	0.339
	5 655.85 ~ 4 175.17,	6	0.857 6	0.861
	7 480.27 ~ 6 822.92			
	6 000.00 ~ 4 500.00	7	0.883 4	0.759
	6 729.00 ~ 4 125.00	6	0.844 5	0.881
	7 218.65 ~ 4 142.53	7	0.797 1	1.01
	7 218.65 ~ 4 920.68	7	0.723 7	1.19
	10 000.00 ~ 4 000.00	8	0.781 8	1.07

理、可靠的定量模型为前提,对不同预处理方法、建模波段和主成分数进行优化,获得最佳建模参数,并进行模型的建立与验证,实现了大批量白芍中芍药苷和水分的快速检测。结果表明我国市售 108 批芍药样品的水分合格率为 100%,芍药苷含量合格率仅为 68%,其中芍药苷含量差异尤为显著,达 50 倍之多。结合液相色谱数据和文献报道,可初步推断白芍不合格品多为硫磺熏制品。产地、生长年限、采

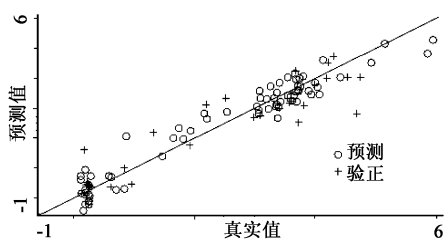


图 3 芍药苷预测值与实测值相关

Fig. 3 Correlation diagram of predicted value and measured value of paeoniflorin

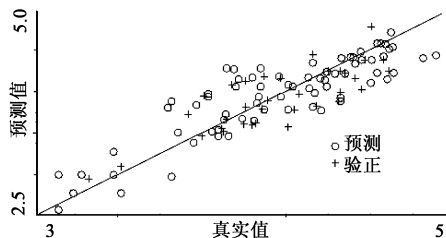


图 4 水分预测值与实测值相关

Fig. 4 Correlation diagram of predicted value and measured value of water

收期、加工方法等影响因素贯穿了药材种植、采收、加工、炮制等过程,从增加市售白芍药材质量控制的复杂性。本文采用近红外法建立的定量模型准确可

靠,且与传统的芍药苷、水分的含量测定方法相比较,耗时短、操作简便,研究结果可为白芍质量的现场快速评价提供帮助。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96.
- [2] 姜建萍. 白芍的现代药理研究及临床应用概况[J]. 中医药信息,2000,17(3):6-8.
- [3] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒,2012,9(2):100-103.
- [4] 张银,周孟然. 近红外光谱分析技术的数据处理方法[J]. 红外技术,2007,29(6):345-348.
- [5] 周文婷,王海霞,林萍,等. 近红外光谱法对巴戟天药材中水分含量的快速测定[J]. 湖北农业科学,2014,53(21):5253-5255,5259.
- [6] 于晓雪,乙引,周宁,等. 近红外光谱法快速测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定 C[J]. 光谱实验室,2012,29(3):1379-1383.
- [7] 周芸,张晓玲,吴永红,等. 近红外漫反射光谱法快速测定莲房原花青素及多酚含量[J]. 中国药理学杂志,2013,48(3):220-223.

[责任编辑 顾雪竹]

课题组介绍

近红外光谱(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)是介于可见光区和中红外之间的电磁辐射波,波数范围为 $4\ 000 \sim 12\ 800\ \text{cm}^{-1}$,其光谱区与有机分子中含氢基团(C-H, O-H, N-H)振动的合频与各级倍频的吸收区一致,通过扫描样品的近红外光谱,可以得到样品中有机分子各氢基团的特征信息。随着化学计量学方法的开发,现代近红外光谱分析技术近年来成为分析化学领域发展迅猛的高新分析技术,被广泛用于农业、食品、医药、林业、纺织、矿物和化妆品等领域。目前,NIRS技术在中药领域中越来越引起人们的关注,NIRS在线检测技术已应用于中成药制备的各工艺研究,如中药材提取过程的在线检测、中药提取物浓缩、纯化过程的在线检测,制剂成型过程的在线监测等;另外,在药材的道地性、生产年限、基源种类、真伪品、炮制品鉴别及药材/成药制剂多指标成分含量测定等方面也显示出良好的应用前景。NIRS技术具有检测快速,样品不需预处理,可同时检测多种成分及无污染等优点。

奥地利因斯布鲁克大学 Christian W. Huck 教授是近红外领域的国际知名专家。近年来,杨滨研究团队与 Huck 教授课题组进行了密切的合作,采用 NIRS 技术对中药材质量评价进行了研究,建立了厚朴等多种常见中药材质量的现场快速评价模型;实现了黄芩野生品种与栽培品种的鉴别,南北五味子的种源鉴别,人参产地及生长年限的鉴别;探讨了三七、五味子、厚朴、黄芩等药材中多指标成分、水分含量同步准确预测的可行性;评价了不同产地黄芩的抗氧化活性。研究结果发表在国际国内专业期刊上。