

近红外光谱法快速测定不同连翘饮片中 连翘酯苷 A 的含量

郝敏, 白雁, 谢彩侠, 胡小莉, 张迪文, 谢惠英, 雷敬卫*
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 本文运用近红外光谱技术建立一种快速测定不同连翘饮片中连翘酯苷 A 含量的新方法, 为中药饮片的质量分析提供新思路。方法: 采用 2010 年版《中国药典》规定的 HPLC 色谱法测定连翘饮片中连翘酯苷 A 的含量, 利用近红外光谱技术结合偏最小二乘法 (PLS) 建立不同连翘饮片中连翘酯苷 A 的定量校正模型。结果: 连翘酯苷 A 定量校正模型的内部交叉验证决定系数 (R^2) 为 0.994 89, 验证集相关系数 (R^2) 为 0.997 0, 校正均方差 (RMSEC) 为 0.182。模型预测结果良好。结论: 由此表明近红外光谱法简便准确, 可用于不同连翘饮片连翘酯苷 A 含量的快速测定。

[关键词] 近红外光谱; 偏最小二乘; 不同连翘饮片; 连翘酯苷 A

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0078-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080078

Fast Determination of Forsythiaside A in Different Forsythiae Fructus by Near Infrared Spectroscopy

HAO Min, BAI Yan, XIE Cai-xia, HU Xiao-li, ZHANG Di-wen, XIE Hui-ying, LEI Jing-wei*
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a new method for fast determination of forsythiaside A content in different Forsythiae Fructus by using near infrared spectroscopy, and provide new ideas for quality analysis of this Chinese medicine. **Method:** Content of forsythoside A in Forsythiae Fructus was determined by using HPLC method prescribed in 2010 *Chinese Pharmacopoeia*, and simultaneously the near infrared spectroscopy was combined with partial least squares (PLS) to establish the quantitative calibration model of forsythoside A in different Forsythiae Fructus. **Result:** The correlation coefficients (R^2) of forsythoside A in the quantitative calibration model was 0.994 89; the validation coefficients (R^2) was 0.997 0; and root mean square error of calibration (RMSEC) was 0.182. The model had well prediction results. **Conclusion:** This near infrared spectroscopy method is convenient and accurate and suitable for rapid determination of the content of forsythoside A in different Forsythiae Fructus.

[Key words] near infrared spectroscopy; PLS; different Forsythiae Fructus; forsythoside A

连翘具有清热解毒, 消肿散结, 疏散风热之功效^[1], 秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去

杂质, 习称“老翘”^[2]。临床应用广泛, 是一味常用中药^[3]。连翘的化学成分复杂多样, 主要含有连翘苷、连翘酯苷 A、芦丁、右旋松脂酚等化学成分^[4]。

[收稿日期] 20150511(015)

[基金项目] 河南省中药开发工程技术研究中心项目(142102313109); 郑州市重点科技攻关计划项目(121PPTGG509); 河南中医学院科研苗圃工程项目(MP2014-88)

[第一作者] 郝敏, 在读硕士, 从事中药质量研究, Tel:13837131274, E-mail:1107567076@qq.com

[通讯作者] *雷敬卫, 副教授, 博士, 从事中药质量研究, Tel/Fax:0371-65575596, E-mail:ljwei@hactem.edu.cn

2010 年版《中国药典》中以连翘苷、连翘酯苷 A、醇浸出物等作为其质量控制标准。其中连翘苷,连翘酯苷 A 采用高效液相色谱法测定,醇浸出物采用冷浸法测定,以上方法均需要繁琐复杂的前处理过程,耗费大量有机试剂,并且损失样品,在制药过程中难以满足原药材的快速测定以及在线检测的要求。此外,连翘果实外部有一层蜡状物质,因此生品连翘难以晒干保存,容易发霉变质,疗效低下,但是从外观上并无差异,药农时常采用该法加工连翘,经过蒸或煮之后蜡样物质融化,利于晒干保存并起到杀酶保苷的作用,因此常用的产地加工方法有生晒、蒸晒、煮晒 3 种,不同的产地加工方法化学成分含量不尽相同,疗效也存在一定差异。

近红外光谱技术自 20 世纪 70 年代以来,由于其测试简单、分析速度快、无化学污染、投资及操作费用低等显著优点,广泛用于中药分类、活性成分测定等^[5-6]。本研究利用近红外光谱技术结合偏最小二乘法快速测定不同连翘饮片中连翘酯苷 A 的含量,并与实际结果进行分类对比。

1 材料

Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪(配有 Ingas 检测器、外接积分球、样品旋转器、OMNIC 光谱采集软件和 TQ Analyst 8.0 分析软件,美国 Thermo Nicolet),OPUS 分析软件(德国 Bruker),2695 型高效液相色谱仪(美国沃特斯科技公司),CPA225D 型 1/10 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),FW-100 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Milli-Q Academic A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),101A-2B 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)。

连翘样品为 2014 年 8 月底采集于河南洛阳野生连翘保护基地,经实验室炮制加工得到 122 份连翘饮片,其中生晒品 40 份(编号 1~40),蒸晒品 40 份(编号 41~80),煮晒品 42 份(编号 81~122),由河南中医药大学陈随清教授鉴定为药用连翘 *Forsythia suspensa* 的干燥果实。连翘酯苷 A 对照品(批号 MUST-14060118,纯度 $\geq 98\%$,成都曼思特生物科技有限公司)。乙腈和冰乙酸色谱纯,甲醇分析纯,蒸馏水自制。

2 方法与结果

2.1 连翘酯苷 A 的含量测定

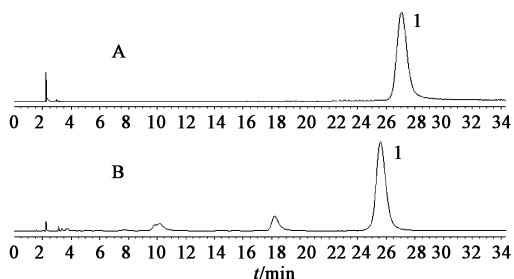
2.1.1 供试品溶液的制备 取本品粉末(过五号

筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 15 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取连翘酯苷 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得(临用配制)。

2.1.3 色谱条件的选择^[3] 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),流动相乙腈-0.4% 冰乙酸溶液(15:85),检测波长 330 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,以外标法计算含量。

2.1.4 连翘酯苷 A 含量测定结果 按照 2.1 项下的方法测定 122 份连翘饮片样品的连翘酯苷 A 的含量,122 份样品连翘酯苷 A 的含量范围为 3.81%~8.88%。HPLC 色谱图见图 1;122 份连翘饮片样品中连翘酯苷 A 测定结果见表 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 连翘酯苷 A

图 1 连翘酯苷 A 样品的 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of Forsythoside A sample

表 1 122 份不同连翘饮片样品的含量测定

Table 1 Determination of 122 Forsythiae Fructus samples results %

样品编号 (生晒品)	连翘 酯苷 A	样品编号 (蒸晒品)	连翘 酯苷 A	样品编号 (煮晒品)	连翘 酯苷 A
1	4.22	42	8.24	83	7.69
2	4.18	43	7.53	84	7.97
3	3.95	44	7.76	85	7.87
4	4.07	45	8.28	86	8.88
5	4.09	46	8.10	87	8.85
6	4.23	47	8.20	88	8.88
7	4.28	48	8.04	89	8.77
8	4.24	49	8.28	90	8.74
9	4.22	50	8.33	91	7.60
10	4.23	51	8.37	92	7.70
11	4.26	52	8.15	93	7.85

续表 1

样品编号 (生晒品)	连翘 酯苷 A	样品编号 (蒸晒品)	连翘 酯苷 A	样品编号 (煮晒品)	连翘 酯苷 A
12	4.27	53	7.94	94	7.45
13	4.23	54	8.19	95	7.64
14	4.05	55	8.45	96	8.09
15	4.15	56	8.21	97	7.96
16	4.24	57	7.57	98	7.51
17	4.25	58	8.24	99	7.74
18	4.24	59	8.08	100	7.98
19	4.14	60	8.01	101	8.16
20	4.21	61	8.38	102	8.43
21	4.24	62	8.15	103	8.27
22	4.21	63	8.12	104	8.18
23	3.88	64	8.13	105	8.05
24	4.00	65	8.26	106	6.91
25	4.05	66	8.12	107	7.07
26	4.17	67	7.66	108	7.08
27	4.15	68	7.25	109	7.09
28	4.20	69	7.39	110	6.97
29	4.18	70	7.55	111	7.20
30	4.25	71	7.61	112	7.49
31	4.19	72	7.75	113	6.16
32	4.22	73	7.33	114	6.66
33	3.81	74	7.52	115	7.24
34	4.06	75	7.56	116	7.30
35	4.09	76	7.40	117	7.50
36	4.09	77	7.40	118	7.20
37	3.96	78	7.52	119	7.62
38	4.17	79	7.36	120	7.29
39	4.23	80	7.75	121	7.61
40	4.08	81	8.02	122	7.81
41	8.18	82	7.98		

2.2 NIR 光谱采集 将实验室加工处理得到的 122 份样品粉碎,过 40 目筛,取粉末约 6 g 放入石英样品杯中,混合均匀,以空气为参比,按下述试验条件进行扫描,测样方式积分球漫反射,分辨率 8 cm^{-1} 光谱采集范围 $12\ 000\sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$,扫描次数 64 次,温度 $20\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $30\%\sim 36\%$ 。每个样品重复扫描 3 次,求平均光谱,122 份连翘饮片样品的原始近红外光谱叠加见图 2。由图 2 可以看出 122 份样品的近红外原始图谱基本一致,很难看出药材的光谱信息差别。因此,需要对原始图谱进行相应

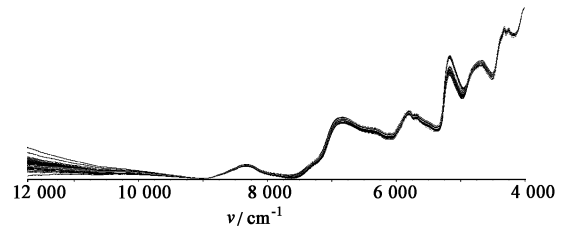


图 2 122 份不同连翘饮片样品的原始近红外光谱叠加
Fig.2 Original near infrared reflectance spectra of 122 samples

的前处理来使图谱信息更加直观,更加明确。
2.3 连翘酯苷 A 定量分析模型的优化 应用 TQ Analyst 8.0 软件中的偏最小二乘法(PLS)建立并优化定量分析模型,优化的内容包括光谱预处理方法、建模波段及主成分数的选择。以内部交叉验证系数 (R^2),内部交叉验证均方差(RMSECV),校正集均方差(RMSEC),验证集预测均方差(RMSEP)为综合指标,考察不同建模方法的合理性。 R^2 越接近 1, RMSECV, RMSEC 与 RMSEP 越小越好,所建模型适用性越强,预测效果越好。

从 122 份不同连翘饮片样品中,根据连翘酯苷 A 含量的分布范围,选择其中 91 个有代表性的样品为校正集,其余 31 个为验证集,其含量范围处于校正集样品含量范围之内。见表 2。

表 2 校正集和验证集含量分布范围

样品集	样品数	最大值	最小值	平均值
校正集	91	8.88	3.81	6.35
验证集	31	8.28	4.09	6.19

2.3.1 光谱预处理方法的选择 在近红外光谱的采集过程中,经常会由于样品状态、仪器的状态与测量条件的差异造成近红外光谱发生细微的变化,如杂散光、光的散射及仪器响应等的影响,均可导致近红外光谱的基线漂移和光谱的不重复,通过对光谱进行预处理可对其予以矫正。因此,为建立稳定、可靠的校正模型,应在数据分析前对光谱进行合理的处理,减弱甚至消除各种非目标因素对光谱信息的影响。本试验以 R^2 , RMSECV, RMSEC 与 RMSEP 为指标筛选光谱预处理方法。经比较,以 SNV + First Derivative + Norris 平滑方法处理效果最好,可以校正样品因散射而引起的光谱误差。见表 3。

2.3.2 建模波段的选择 各波段对应的 R^2 , RMSEC, SMSECV 和 RMSEP 的值可以看出,连翘饮片粉末连翘酯苷 A 含量所对应的最佳波段范围为 $4\ 008.11\sim 8\ 490.76\text{ cm}^{-1}$,见表 4。不同连翘饮片

表 3 不同光谱预处理方法对建模的影响

Table 3 Influence of different pretreatment methods on the performance of quantitative model

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSECV	RMSEP
Constant	0.994 87	0.182 0	0.260 05	0.136 0
MSC	0.994 20	0.194 0	0.255 27	0.125 0
MSC + First Derivative	0.996 24	0.156 0	0.499 81	0.152 0
MSC + Second Derivative	0.998 48	0.099 3	0.282 10	0.478 0
SNV + First Derivative + Norris	0.994 89	0.182 0	0.153 89	0.089 8
SNV + Second Derivative + Norris	0.989 56	0.260 0	0.259 65	0.214 0

表 4 建模波段对模型的影响

Table 4 Influence of different spectral ranges on the performance of quantitative model

光谱范围/ cm^{-1}	R^2	RMSEC	RMSECV	RMSEP
4 008.11 ~ 11 998.92	0.994 82	0.170	0.317 15	0.200 0
4 084.38 ~ 11 015.96	0.994 31	0.208	0.274 24	0.186 0
4 050.48 ~ 10 160.10	0.994 24	0.196	0.265 71	0.158 0
4 067.43 ~ 9 194.09	0.993 25	0.206	0.270 82	0.151 0
4 008.11 ~ 8 490.76	0.994 89	0.171	0.268 95	0.096 1

在上述处理方法下近红外光谱的一阶导数图谱,见图 4。

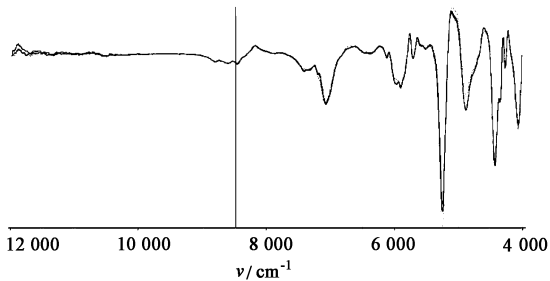


图 3 连翘样品在上述处理方法下近红外光谱的一阶导数图谱
Fig. 3 NIR spectroscopy first derivative spectra of Forsythiae Fructus sample at above process methods

2.3.3 主因子数的选择 采用 PLS 法建立定量模型,为充分提高光谱信号的有效信息利用率,同时避免出现过拟合现象,需要选择合适的主因子阶数。这是因为主成分数选择过少时,就不能反映未知样品被测组分产生的光谱变化,其模型预测准确度就会降低;选择主成分数过多时,就会将一些代表噪音的主成分加到模型中,出现计算结果“过拟合”现象,使模型的预测能力下降。通过近红外光谱仪自带软件对数据和光谱进行处理,得到了较为合适的主因子数 10,见图 4。此时 RMSECV 较小,模型建立较为成功。

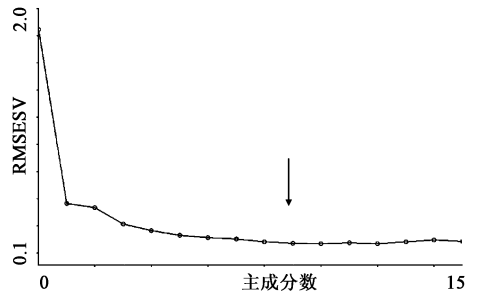


图 4 训练集 RMSECV 与主成分数之间的相关性
Fig. 4 Relevance between training set RMSECV and the principal components

2.4 定量模型的建立 运用 TQ Analyst 8.0 软件中的 PLS 法建立模型,122 份样品用于建模(其中 91 份作为校正集,31 份作为验证集),对光谱进行 SNV + First derivative + Norris 预处理,采用 4 008.11 ~ 8 490.76 cm^{-1} 波段,10 个主成分数进行建模,所建模型的 $R^2 = 0.994 89$, RMSEC = 0.182, RMSECV = 0.268 95,连翘酯苷 A 的 NIR 预测值与 HPLC 参考值的相关见图 5,偏差见图 6,从图中可以看出连翘酯苷 A 的 NIR 预测值与参考值接近,该模型可用于不同连翘饮片中连翘酯苷 A 的定量分析。

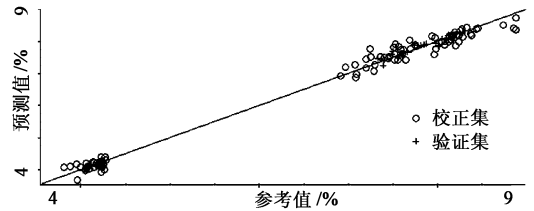


图 5 预测值与参考值之间的相关性
Fig. 5 Relevance between predicted values and reference values

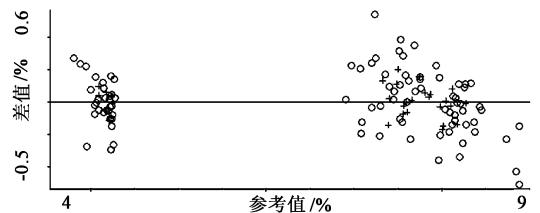


图 6 预测绝对误差与参考值相关性
Fig. 6 Relevance between prediction absolute error and reference values

2.5 定量模型的验证 将验证集样品的 NIR 预测值与 HPLC 参考值进行相关分析,31 份验证集样品的 NIR 预测值与 HPLC 参考值相接近,预测相关系数(R^2)为 0.997,预测均方差(RMSEP)为 0.089 8,因此可认为该模型能准确预测其覆盖范围内的连翘酯苷 A 的含量。见表 5。

表 5 NIR 预测值与 HPLC 参考值的比较

Table 5 Comparison between NIR predicted values and HPLC reference values %

No.	HPLC 参考值	NIR 预测值	No.	HPLC 参考值	NIR 预测值
1	4.18	4.24	17	7.39	7.25
2	4.23	4.27	18	7.61	7.55
3	4.23	4.14	19	7.33	7.46
4	4.25	4.24	20	7.56	7.48
5	4.21	4.10	21	7.40	7.42
6	4.17	4.11	22	8.02	7.87
7	4.18	4.13	23	7.87	7.91
8	4.09	4.13	24	7.60	7.60
9	4.09	4.19	25	7.85	7.88
10	8.18	8.04	26	7.74	7.89
11	8.10	8.08	27	7.98	7.95
12	8.28	8.27	28	8.05	8.05
13	7.57	7.54	29	7.49	7.60
14	8.01	7.84	30	7.50	7.70
15	8.12	8.20	31	7.81	7.87
16	7.66	7.67			

3 讨论

光谱的预处理、建模方法及模型谱段的选择对建模效果有很重要的作用。本试验采用 SNV + First Derivative + Norris 对光谱进行预处理, 根据 R^2 , RMSEC, RMSECV, RMSEP 为综合指标选用最佳建模波段为 $4\ 008.11 \sim 8\ 490.76\ \text{cm}^{-1}$, 最佳主成分数为 10。结果显示, 优化后的模型能将光谱隐藏的信息突出出来, 可以清晰地将不同连翘饮片样品完全分开。

近红外光谱可反映样品中含量 $>0.1\%$ 的组分

在结构与组成方面的信息, 比单纯的化学指标、色谱数据更全面、准确^[7], 可以更好地体现不同连翘饮片的整体信息, 对其进行较为准确的识别, 本方法为连翘饮片质量的优劣考察提供了一定的思路 and 依据。

近红外光谱技术是一种间接分析技术, 需要事先以标准方法测定一定范围的大批量样品的质量参数, 再以样品光谱和其质量参数进行关联, 建立数学模型, 然后利用数学模型预测样品的组成和性质。所以近红外光谱技术应用于中药的定量分析, 其前提是必须找到能够表征中药质量的化学物质作为分析的对象基础。对于大多数中药, 其物质化学基础研究还比较薄弱, 有待于进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] 雷敬卫, 谢彩侠, 白雁, 等. 河南产连翘的高效液相指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (1): 115-118.
- [2] 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: 159.
- [3] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [4] 张泉, 李发荣, 段飞, 等. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (6): 790-793.
- [5] 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.
- [6] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术 [M]. 北京: 中国石化出版社, 2007.
- [7] 白雁. 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.

[责任编辑 顾雪竹]